(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)**
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11) **1-0038347**

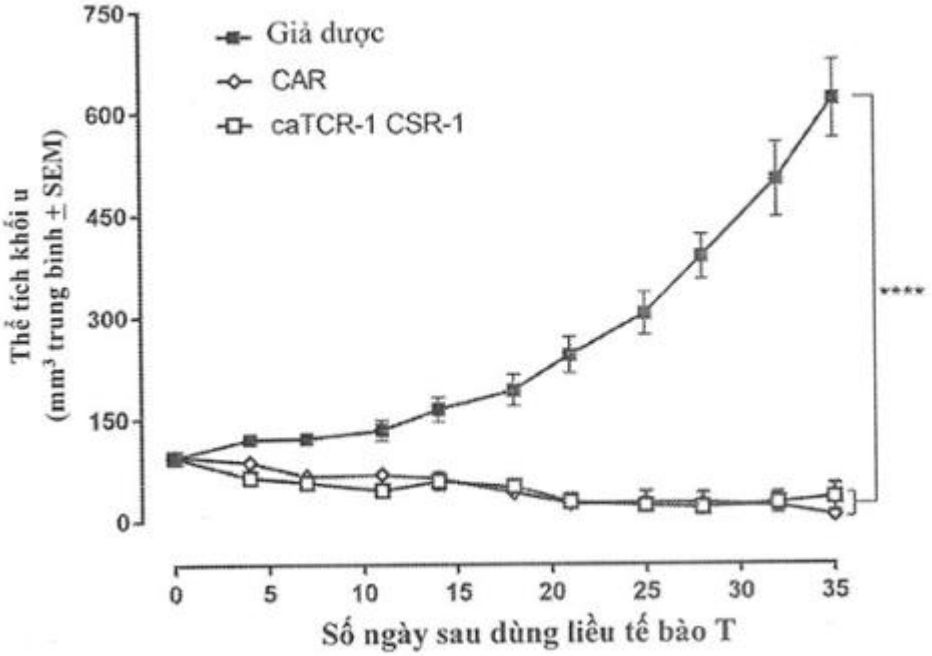
(51)[7] **A61K 35/17**; C07K 16/30; C07K 14/725; C07K 16/28; A61P 35/00; C07K 14/705

(13) **B**

(21) 1-2019-06572 (22) 24/04/2018
(86) PCT/US2018/029218 24/04/2018 (87) WO 2018/200583 01/11/2018
(30) 62/490,576 26/04/2017 US; 62/490,580 26/04/2017 US; 62/490,578 26/04/2017 US
(45) 25/01/2024 430 (43) 27/07/2020 388
(73) Eureka Therapeutics, Inc. (US)
5858 Horton Street, Suite 170, Emeryville, California 94608, United States of America
(72) LIU, Hong (US); ZHANG, Pengbo (CN); HORAN, Lucas (US); XU, Yiyang (US); STALEY, Binnaz K. (TR); LIU, Lianxing (CN); YUN, Hongruo (US).
(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) TẾ BÀO MIỄN DỊCH BAO GỒM CẤU TRÚC KHÁNG THỂ-THỤ THỂ TẾ BÀO T (TCR) KHẢM (CATCR) VÀ THỤ THỂ TRUYỀN TÍN HIỆU KHẢM (CSR), AXIT NUCLEIC MÃ HÓA CATCR VÀ CSR VÀ PHƯƠNG PHÁP TIÊU DIỆT TẾ BÀO ĐÍCH TRÌNH DIỆN KHÁNG NGUYÊN ĐÍCH SỬ DỤNG TẾ BÀO MIỄN DỊCH NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến các tế bào miễn dịch (như các tế bào T) bao gồm cấu trúc kháng thể-thụ thể tế bào T (TCR) khảm (caTCR) và cấu trúc thụ thể truyền tín hiệu khảm (CSR). caTCR này bao gồm môđun liên kết kháng nguyên mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích và môđun thụ thể tế bào T (TCRM) có khả năng huy động ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR, và CSR bao gồm miền liên kết phối tử mà liên kết đặc hiệu với phối tử đích và miền truyền tín hiệu đồng kích thích có khả năng tạo ra tín hiệu kích thích cho tế bào miễn dịch. Sáng chế cũng đề cập đến axit nucleic mã hóa caTCR và CSR, tế bào miễn dịch bao gồm axit nucleic này và phương pháp tiêu diệt tế bào đích trình diện kháng nguyên đích *in vitro*.


Giả dược
CAR
caTCR-1 CSR-1
Thể tích khối u
(mm³ trung bình ± SEM)
750
600
450
300
150
0
****
0
5
10
15
20
25
30
35
Số ngày sau dùng liều tế bào T

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các tế bào miễn dịch (như các tế bào T) bao gồm cấu trúc kháng thể-thụ thể tế bào T (TCR) khảm (caTCR) và cấu trúc thụ thể truyền tín hiệu khảm (CSR). caTCR này bao gồm môđun liên kết kháng nguyên mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích và môđun thụ thể tế bào T (TCRM) có khả năng huy động ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR, và CSR bao gồm miền liên kết phối tử mà liên kết đặc hiệu với phối tử đích và miền truyền tín hiệu đồng kích thích có khả năng tạo ra tín hiệu kích thích cho tế bào miễn dịch.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Khả năng miễn dịch qua trung gian tế bào T là quá trình thích nghi của các tế bào lympho T đặc hiệu kháng nguyên (Ag) đang phát triển để loại trừ sự nhiễm virut, vi khuẩn, ký sinh trùng hoặc các tế bào ác tính. Có thể cũng bao gồm sự nhận biết bất thường của tự kháng nguyên, dẫn đến các bệnh viêm tự miễn. Tính đặc hiệu Ag của các tế bào lympho T là dựa vào sự nhận biết thông qua thụ thể tế bào T (TCR) của các peptit kháng nguyên độc nhất được trình diện bởi các phân tử phức hợp tương hợp mô chính (MHC) trên các tế bào trình diện Ag (APC) (Broere, et al., Principles of Immunopharmacology, 2011). Mỗi tế bào lympho T biểu hiện một TCR duy nhất trên bề mặt tế bào là kết quả của sự chọn lọc phát triển dựa vào sự trưởng thành ở tuyến ức. TCR này xuất hiện ở hai dạng là αβ heterodime hoặc là γδ heterodime. Các tế bào T biểu hiện TCR dạng αβ hoặc dạng γδ trên bề mặt tế bào. Bốn chuỗi, α/β/γ/δ, tất cả có cấu trúc ngoại bào đặc trưng gồm miền đầu cùng N giống "vùng biến đổi globulin miễn dịch" đa hình cao và miền thứ hai giống "vùng không đổi globulin miễn dịch". Mỗi miền này có cầu liên kết disulfit nội chuỗi đặc trưng. Vùng không đổi này gần với màng tế bào, sau đó là peptit kết nối, vùng xuyên màng và đuôi bào tương ngắn. Liên kết cộng hóa trị giữa 2 chuỗi của TCR heterodime được tạo thành bởi gốc xystein được định vị bên trong trình tự peptit kết nối ngắn làm cầu nối miền không đổi ngoại bào và vùng

xuyên màng mà tạo thành liên kết disulfit với gốc xystein chuỗi TCR đã bắt cặp tại vị trí tương ứng (The T cell Receptor Factsbook, 2001).

Các TCR αβ và γδ được liên kết với các protein CD3 được liên kết màng không đa hình để tạo thành phức TCR-CD3 tám phân tử hoạt động, gồm TCR heterodime và ba phân tử truyền tín hiệu dime, CD3δ/ε, CD3γ/ε và CD3ζ/ζ hoặc ζ/η. Các gốc ion hóa được trong miền xuyên màng của mỗi tiểu đơn vị tạo thành mạng lưới phân cực của các tương tác mà giữ phức này với nhau. Đối với sự hoạt hóa tế bào T, các vùng biến đổi đầu cùng N của TCR nhận biết phức peptit/MHC được trình diện trên bề mặt của tế bào đích, trong khi các protein CD3 tham gia vào sự tải nạp tín hiệu (Call *et al.*, *Cell.* 111(7):967-79, 2002; The T cell Receptor Factsbook, 2001).

αβ TCR, còn được gọi là TCR thông thường, được biểu hiện trên hầu hết các tế bào lympho và gồm các chuỗi α và β đa hình được glycosyl hóa. Các αβ TCR khác nhau có thể phân biệt trong số các peptit khác nhau được nhúng trong các bề mặt của các phân tử MHC II (hầu hết được biểu hiện trên các bề mặt tế bào APC) và MHC I (được biểu hiện trên tất cả các tế bào có nhân), mà kích thước và hình dạng của chúng tương đối không thay đổi. γδ TCR, mặc dù tương tự về mặt cấu trúc với αβ TCR, nhận biết các kháng nguyên mang hydrat cacbon, nucleotit, hoặc phospho trong sự độc lập kiểu cách của sự trình diện MHC (The T cell Receptor Factsbook, 2001; Girardi *et al.*, *J. Invest. Dermatol.* 126(1):25-31, 2006; Hayes *et al.*, *Immunity*. 16(6):827-38, 2002).

Trong hai thập kỷ vừa qua, những tiến bộ chủ yếu trong miễn dịch học và sinh học khối u, kết hợp với sự xác định lượng lớn các kháng nguyên khối u, đã dẫn đến sự tiến bộ đáng kể trong lĩnh vực trị liệu miễn dịch dựa vào tế bào. Trị liệu tế bào T chiếm không gian lớn trong lĩnh vực trị liệu miễn dịch dựa vào tế bào, với mục đích điều trị bệnh ung thư bằng cách truyền các tế bào T tự thân và nhân rộng *ex vivo* cho bệnh nhân, và đã tạo ra một số đáp ứng kháng khối u đáng chú ý (Blattman *et al.*, *Science.* 305(5681):200-5, 2004). Ví dụ, sử dụng các tế bào lympho thâm nhiễm khối u (TIL) xuất hiện tự nhiên được mở rộng *ex vivo* qua trung gian tỷ lệ đáp ứng mục tiêu nằm trong khoảng từ 50-70% ở các bệnh nhân u melanin, bao gồm các khối u xâm lấn lớn tại nhiều vị trí bao gồm gan, phổi, mô mềm và não (Rosenberg *et al.*, *Nat. Rev. Cancer.* 8(4):299-308, 2008; Dudley ME *et al.*, *J. Clin. Oncol.* 23(10):2346-57, 2005).

Hạn chế chính đối với việc áp dụng diện rộng liệu pháp TIL là sự khó khăn trong việc tạo ra các tế bào T của người có tiềm năng kháng khối u. Sự tiếp cận thay thế là, các TCR ái lực cao ngoại sinh có thể được đưa vào trong các tế bào T tự thân bình thường của bệnh nhân thông qua thiết kế di truyền tế bào T. Sự chuyển các tế bào này vào trong bệnh nhân bị suy giảm lympho đã được thể hiện là làm trung gian thoái lui bệnh ung thư ở các bệnh ung thư như bệnh u melanin, ung thư biểu mô kết trực tràng, và sacôm hoạt dịch (Kunert R *et al.*, *Front. Immunol.* 4:363, 2013). Thử nghiệm lâm sàng pha I gần đây sử dụng các TCR kháng NY-ESO-1 chống lại sacôm hoạt dịch đã báo cáo rằng tỷ lệ đáp ứng tổng thể là 66% và đáp ứng hoàn toàn đạt được ở một bệnh nhân trong số các bệnh nhân tiếp nhận liệu pháp tế bào T (Robbins PF *et al.*, *Clin. Cancer Res*. 21(5):1019-27, 2015).

Một trong các ưu điểm của liệu pháp tế bào T được thiết kế TCR đó là nó có thể hướng đích toàn bộ rãy các protein đặc hiệu khối u nội bào tiềm năng, mà được xử lý và phân phối đến bề mặt tế bào thông qua sự trình diện MHC. Ngoài ra, TCR này có độ nhạy cao và có thể được hoạt hóa bởi chỉ ít phân tử peptit/MHC kháng nguyên, mà đến lượt nó có thể khơi mào sự đáp ứng tế bào T hủy tế bào, bao gồm sự tiết xytokin, sự tăng sinh tế bào T và sự hủy tế bào của các tế bào đích đã xác định. Do đó, so với các liệu pháp kháng thể hoặc phân tử nhỏ, các tế bào T được thiết kế TCR đặc biệt có giá trị cho khả năng giết chết tế bào đích của chúng với ít bản sao của các kháng nguyên nội bào đích (Kunert R *et al.*, *Front. Immunol.* 4:363, 2013).

Tuy nhiên, không giống các kháng thể trị liệu, mà hầu hết được phát hiện thông qua các công nghệ tế bào lai hoặc biểu hiện, sự xác định các TCR đặc hiệu đích đòi hỏi sự thiết lập các dòng vô tính TCR đặc hiệu peptit/MHC đích từ các tế bào T của bệnh nhân và sàng lọc cho sự kết hợp chuỗi α-β phải mà có ái lực liên kết kháng nguyên đích tối ưu. Rất thường xuyên là, sự biểu hiện thực khuẩn thể/nấm men được sử dụng sau khi tách dòng TCR từ các tế bào T của bệnh nhân để tăng cường thêm ái lực liên kết đích của TCR. Toàn bộ quy trình này đòi hỏi sự thành thạo ở nhiều lĩnh vực và tiêu tốn thời gian (Kobayashi E *et al.*, *Oncoimmunology*. 3(1):e27258, 2014). Những khó khăn trong quy trình phát hiện ra TCR này đã cản trở việc áp dụng rộng rãi liệu pháp tế bào T được thiết kế bởi TCR. Cũng bị cản trở bởi độc tính liên quan đến việc điều trị, đặc biệt là với các TCR chống lại các kháng nguyên được biểu hiện quá mức trên các tế bào khối u

nhưng cũng biểu hiện trên các tế bào khỏe mạnh, hoặc với các TCR nhận diện các phức peptit/MHC ngoài đích (Rosenberg SA *et al.*, *Science*. 348(6230):62-8, 2015).

Sự tiếp cận khác đã được phát triển trong những năm gần đây để gắn các tế bào T cho liệu pháp miễn dịch ung thư được hướng đích. Sự tiếp cận mới này còn được gọi là liệu pháp tế bào T thụ thể kháng nguyên khảm (CAR-T). Nó kết hợp tính đặc hiệu hướng đích nhạy của các kháng thể đơn dòng với tính gây độc tế bào có hiệu lực và độ lưu lại dài hạn được tạo ra bởi các tế bào T gây độc tế bào. CAR được tạo thành từ miền ngoại bào mà nhận diện kháng nguyên bề mặt tế bào, vùng xuyên màng, và miền truyền tín hiệu nội bào. Miền ngoại bào này gồm các vùng biến đổi liên kết kháng nguyên từ các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể đơn dòng mà được dung hợp vào mảnh biến đổi chuỗi đơn (scFv). Miền truyền tín hiệu nội bào này chứa môtip hoạt hóa dựa vào tyrosin thụ thể miễn dịch (ITAM), như cấu trúc từ CD3ζ hoặc FcRγ, và một hoặc nhiều miền truyền tín hiệu đồng kích thích, như miền từ CD28, 4-1BB hoặc OX40 (Barrett DM *et al.*, *Annu. Rev. Med.* 65:333-47, 2014; Davila ML *et al.*, *Oncoimmunology*. 1(9):1577-1583, 2012). Sự liên kết của các kháng nguyên đích bởi các CAR được ghép trên bề mặt tế bào T có thể khơi mào các chức năng yếu tố tác động tế bào T độc lập với sự tương tác phức TCR-peptit/MHC. Do đó, các tế bào T được trang bị các CAR có thể được điều khiển lại để tấn công số lượng lớn các tế bào, bao gồm các tế bào không phải loại MHC của các TCR trên các tế bào T nhưng biểu hiện các kháng nguyên bề mặt tế bào đích. Cách tiếp cận này vượt qua được các trở ngại về sự nhận diện TCR bị giới hạn ở MHC và tránh được sự trốn thoát của khối u thông qua việc làm suy yếu ở sự trình diện kháng nguyên hoặc sự biểu hiện phân tử MHC. Các thử nghiệm lâm sàng đã thể hiện hoạt tính kháng khối u đáng kể về mặt lâm sàng của liệu pháp CAR-T ở u nguyên bào thần kinh (Louis CU *et al.*, *Blood*. 118(23):6050-6056, 2011), B-ALL (Maude, SL, *et al.*, *New England Journal of Medicine* 371:16:1507-1517, 2014), CLL (Brentjens, RJ, *et al. Blood* 118:18:4817-4828, 2011), và u lympho tế bào B (Kochenderfer, JN, *et al. Blood* 116:20:4099-4102, 2010). Trong một nghiên cứu, tỷ lệ thuyên giảm hoàn toàn 90% ở 30 bệnh nhân có B-ALL được điều trị bằng liệu pháp CD19-CAR T đã được báo cáo (Maude, SL, *et al.*, *nêu trên*).

Tất cả các CAR được nghiên cứu cho đến nay đã hướng đến các kháng nguyên khối u có sự biểu hiện bề mặt tế bào cao. Để hướng đích các kháng nguyên khối u bề

mặt tế bào số lượng bản sao thấp và các kháng nguyên khối u nội bào, mà có 95% trong số toàn bộ các kháng nguyên đặc hiệu khối u đã biết, cần phát triển các liệu pháp tế bào được thiết kế có hiệu lực và có hiệu quả hơn (Cheever, *et al.*, *Clin. Cancer Res.* 15(17):5323-37, 2009).

Một số nỗ lực đã được thực hiện để thiết kế các phân tử thụ thể khảm có tính đặc hiệu kháng thể với các chức năng yếu tố tác động thụ thể tế bào T. *Xem*, ví dụ, Kuwana, Y, *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 149(3):960-968, 1987; Gross, G, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:10024-10028, 1989; Gross, G & Eshhar, Z, *FASEB J.* 6(15):3370-3378, 1992; và Patent Mỹ số 7,741,465. Đến ngày nay, chưa có thụ thể khảm nào được chọn để sử dụng lâm sàng, và vẫn cần các thiết kế mới cho các thụ thể khảm kháng thể-TCR với sự biểu hiện và chức năng cải thiện ở các tế bào T của người.

Phần bộc lộ của tất cả các công bố, các patent, đơn yêu cầu cấp patent và các đơn yêu cầu cấp patent đã được công bố được đề cập ở đây được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn nội dung của chúng. Đơn quốc tế số PCT/US2016/058305 được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn nội dung của nó.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất các tế bào miễn dịch (như các tế bào T) bao gồm cấu trúc kháng thể-thụ thể tế bào T (TCR) khảm (caTCR) và cấu trúc thụ thể truyền tín hiệu khảm (CSR). caTCR này bao gồm môđun liên kết kháng nguyên mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích và môđun thụ thể tế bào T (TCRM) có khả năng huy động ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR, và CSR bao gồm miền liên kết phối tử mà liên kết đặc hiệu với phối tử đích và miền truyền tín hiệu đồng kích thích có khả năng tạo ra tín hiệu kích thích cho tế bào miễn dịch.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất tế bào miễn dịch bao gồm: a) cấu trúc kháng thể-thụ thể tế bào T (TCR) khảm (caTCR) bao gồm: i) môđun liên kết kháng nguyên mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích; và ii) môđun thụ thể tế bào T (TCRM) bao gồm miền TCR (TCRD) thứ nhất bao gồm miền xuyên màng TCR (TCR-TM) thứ nhất và TCRD thứ hai bao gồm TCR-TM thứ hai, trong đó TCRM này thúc đẩy sự huy động của ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR; và b) thụ thể truyền tín hiệu khảm (CSR) bao gồm: i) môđun liên kết phối tử mà có khả năng liên kết

hoặc tương tác với phối tử đích; ii) môđun xuyên màng; và iii) môđun truyền tín hiệu tế bào miễn dịch đồng kích thích mà có khả năng tạo ra tín hiệu đồng kích thích cho tế bào miễn dịch, trong đó môđun liên kết phối tử và môđun truyền tín hiệu tế bào miễn dịch đồng kích thích này không có nguồn gốc từ cùng phân tử, và trong đó CSR này thiếu miền truyền tín hiệu tế bào miễn dịch sơ cấp về mặt chức năng.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất một hoặc nhiều axit nucleic mã hóa caTCR và CSR như được mô tả ở đây, trong đó caTCR và CSR này mỗi loại gồm một hoặc nhiều chuỗi polypeptit được mã hóa bởi một hoặc nhiều axit nucleic này.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất một hoặc nhiều axit nucleic mã hóa: a) cấu trúc kháng thể-thụ thể tế bào T (TCR) khảm (caTCR) bao gồm: i) môđun liên kết kháng nguyên mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích; và ii) môđun thụ thể tế bào T (TCRM) bao gồm miền TCR (TCRD) thứ nhất bao gồm miền xuyên màng TCR (TCR-TM) thứ nhất và TCRD thứ hai bao gồm TCR-TM thứ hai, trong đó TCRM này thúc đẩy sự huy động của ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR, và trong đó caTCR này gồm một hoặc nhiều chuỗi polypeptit; và b) thụ thể truyền tín hiệu khảm (CSR) bao gồm: i) môđun liên kết phối tử mà có khả năng liên kết hoặc tương tác với phối tử đích; ii) môđun xuyên màng; và iii) môđun truyền tín hiệu tế bào miễn dịch đồng kích thích mà có khả năng tạo ra tín hiệu đồng kích thích cho tế bào miễn dịch, trong đó môđun liên kết phối tử và môđun truyền tín hiệu tế bào miễn dịch đồng kích thích này không có nguồn gốc từ cùng phân tử, trong đó CSR này thiếu miền truyền tín hiệu tế bào miễn dịch sơ cấp về mặt chức năng, và trong đó CSR này gồm một hoặc nhiều chuỗi polypeptit.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất một hoặc nhiều vectơ bao gồm một hoặc nhiều axit nucleic như được mô tả ở đây.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm bao gồm một hoặc nhiều axit nucleic hoặc một hoặc nhiều vectơ như được mô tả ở đây.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất tế bào miễn dịch bao gồm một hoặc nhiều axit nucleic hoặc một hoặc nhiều vectơ như được mô tả ở đây.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất dược phẩm bao gồm tế bào miễn dịch như được mô tả ở đây, và chất mang dược dụng.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp tiêu diệt tế bào đích trình diện kháng nguyên đích, bao gồm bước cho tế bào đích này tiếp xúc với tế bào miễn dịch như được mô tả ở đây.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh liên kết với kháng nguyên đích ở đối tượng cần được điều trị, bao gồm bước sử dụng cho đối tượng này lượng hữu hiệu của dược phẩm như được mô tả ở đây.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra tín hiệu đồng kích thích cho tế bào miễn dịch bao gồm caTCR hoặc được tải nạp với axit nucleic mã hóa caTCR, bao gồm bước đưa vào trong tế bào này một hoặc nhiều axit nucleic hoặc một hoặc nhiều vectơ như được mô tả ở đây.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện sơ đồ biểu diễn một số phân tử caTCR có các môđun liên kết kháng nguyên khác nhau.

Fig.2 thể hiện phần trăm sự phân giải đặc trưng từ sự tiêu diệt dòng tế bào ung thư NALM6 ($CD19^+$), được trung gian bởi các tế bào T được tải nạp với mình caTCR-1-0 kháng CD19, mình CSR kháng CD19, hoặc caTCR (1-0 và 1-TM5) kháng CD19 + CSR kháng CD19.

Fig.3 thể hiện nồng độ của các xytokin (IL-2, GM-CSF, IFN-γ, và TNF-α) được phát hiện trong dịch nổi sau khi tiêu diệt *in vitro* dòng tế bào ung thư NALM6, được trung gian bởi các tế bào T được tải nạp với mình caTCR-1-0 kháng CD19, mình CSR kháng CD19, hoặc caTCR (1-0 và 1-TM5) kháng CD19 + CSR kháng CD19.

Fig.4 thể hiện hoạt tính mất hạt (như được xác định bởi sự biểu hiện CD107a) ở các tế bào T được tải nạp với mình caTCR-1-0 kháng CD19, mình CSR kháng CD19, hoặc caTCR (1-0 và 1-TM5) kháng CD19 + CSR kháng CD19 sau khi kích thích bằng dòng tế bào ung thư NALM6.

Fig.5 thể hiện sự tăng sinh (như được xác định bởi sự pha loãng thuốc nhuộm CFSE) của các tế bào T được tải nạp với mình caTCR-1-0 kháng CD19 hoặc caTCR (1-0 và 1-TM5) kháng CD19 + CSR kháng CD19 sau khi kích thích bằng các dòng tế bào ung thư BV173 hoặc NALM6.

Fig.6 thể hiện phần trăm sự phân giải đặc trưng từ sự tiêu diệt các dòng tế bào ung thư HepG2 ($AFP^+/GPC3^+$) và HepG2-GPC3.ko ($AFP^+/GPC3^-$), được trung gian bởi các tế bào T được tải nạp với mình caTCR-1-0 kháng AFP158/HLA-A*2:01, mình CSR kháng GPC3, hoặc caTCR (1-0 và 1-TM5) kháng AFP158/HLA-A*2:01 + CSR kháng GPC3 .

Fig.7 thể hiện nồng độ các xytokin (IL-2, GM-CSF, IFN-γ, và TNF-α) được phát hiện trong dịch nổi sau khi tiêu diệt *in vitro* các dòng tế bào ung thư HepG2 và HepG2-GPC3.ko, được trung gian bởi các tế bào T được tải nạp với mình caTCR-1-0 kháng AFP158/HLA-A*2:01, mình CSR kháng GPC3, hoặc caTCR (1-0 và 1-TM5) kháng AFP158/HLA-A*2:01 + CSR kháng GPC3.

Fig.8 thể hiện hoạt tính mất hạt (như được xác định bởi sự biểu hiện CD107a) ở các tế bào T được tải nạp với mình caTCR-1-0 kháng AFP158/HLA-A*2:01, mình CSR kháng GPC3, hoặc caTCR (1-0 và 1-TM5) kháng AFP158/HLA-A*2:01 + CSR kháng GPC3 sau khi kích thích bằng dòng tế bào ung thư HepG2.

Fig.9 thể hiện sự tăng sinh (như được xác định bởi sự pha loãng thuốc nhuộm CFSE) của các tế bào T được tải nạp với mình caTCR-1-0 kháng AFP158/HLA-A*2:01, mình CSR kháng GPC3, hoặc caTCR (1-0 và 1-TM5) kháng AFP158/HLA-A*2:01 + CSR kháng GPC3 sau khi kích thích bằng dòng tế bào ung thư HepG2.

Fig.10 thể hiện phần trăm sự dung giải đặc trưng từ sự tiêu diệt các dòng tế bào ung thư Raji, BV173, NALM6, và Jeko-1 (mỗi $CD19^+/CD20^+$), được trung gian bởi các tế bào T được tải nạp với caTCR (1-0 và 1-TM5) kháng CD19 + CSR kháng CD20.

Fig.11 thể hiện nồng độ của các xytokin (IL-2, GM-CSF, IFN-γ, và TNF-α) được phát hiện trong dịch nổi sau khi tiêu diệt *in vitro* dòng tế bào ung thư Raji, được trung gian bởi các tế bào T được tải nạp với mình caTCR-1-0 kháng CD19 hoặc caTCR (1-0 và 1-TM5) kháng CD19 + CSR kháng CD20.

Fig.12 thể hiện hoạt tính mất hạt (như được xác định bởi sự biểu hiện CD107a) ở các tế bào T được tải nạp với mình caTCR-1-0 kháng CD19, mình CSR kháng CD20, hoặc caTCR (1-0 và 1-TM5) kháng CD19 + CSR kháng CD20 sau khi kích thích bằng dòng tế bào ung thư Raji.

Các Fig.13A-Fig.13E thể hiện các cấu trúc sơ đồ của các phân tử caTCR đặc hiệu kép làm ví dụ.

Các Fig.14-Fig.15 thể hiện sự tăng sinh (như được xác định bởi sự pha loãng thuốc nhuộm CFSE) của các tế bào T biểu hiện caTCR-1-0 kháng CD19 và CSR kháng CD19 sau khi kích thích bằng dòng tế bào ung thư NALM6.

Fig.16 thể hiện sự sinh trưởng khối u ở mô hình chuột nhắt dưới da của NALM6 với sự điều trị giả dược hoặc với sự tiêm duy nhất trong khối u của các tế bào T biểu hiện caTCR-1 kháng CD19, hoặc caTCR-1 kháng CD19 kết hợp với CSR-1 kháng CD19.

Fig.17 thể hiện các mức xytokin huyết thanh ở chuột nhắt được điều trị bằng các tế bào T biểu hiện CAR kháng CD19 hoặc các tế bào T biểu hiện cả caTCR-1 kháng CD19 và CSR-1 kháng CD19. Kiểm định t student được sử dụng để phân tích ý nghĩa thống kê của các mức xytokin huyết thanh ở hai nhóm (***P*<0,01; ****P*<0,001; *****P*<0,0001).

Fig.18 thể hiện sự sinh trưởng khối u ở mô hình chuột nhắt dưới da của HepG2 với sự điều trị giả dược hoặc với sự tiêm duy nhất trong khối u của các tế bào T biểu hiện CAR kháng AFP, hoặc CAR kháng AFP kết hợp với CSR kháng GPC3.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất các tế bào miễn dịch (như các tế bào T) bao gồm cấu trúc kháng thể-thụ thể tế bào T (TCR) khảm (caTCR) và cấu trúc thụ thể truyền tín hiệu khảm (CSR). caTCR này bao gồm môđun liên kết kháng nguyên mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích và môđun thụ thể tế bào T (TCRM) có khả năng huy động ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR. CSR này bao gồm miền liên kết phối tử mà liên kết đặc hiệu với phối tử đích và miền truyền tín hiệu tế bào miễn dịch đồng kích thích có khả năng tạo ra tín hiệu kích thích cho tế bào miễn dịch, và không bao gồm trình tự truyền tín hiệu tế bào miễn dịch sơ cấp về mặt chức năng. Kháng nguyên đích và phối tử đích này có thể là các protein được biểu hiện trên bề mặt tế bào hoặc các phức hợp bao gồm peptit và protein MHC (được chỉ ra ở đây là "phức pMHC" hoặc "pMHC"), như peptit kháng nguyên liên kết với bệnh được trình diện bởi MHC trên bề mặt của tế bào bị bệnh. Các caTCR được điều hòa bởi cơ chế xuất hiện tự nhiên mà điều

khiển sự hoạt hóa thụ thể tế bào T, và truyền tín hiệu thông qua CSR có khả năng làm có hiệu lực sự đáp ứng miễn dịch được trung gian bởi caTCR này.

Các tác giả sáng chế đã phát triển một loạt các các tế bào T mới bao gồm các cấu trúc caTCR và CSR. Chúng thể hiện tính gây độc tế bào hiệu quả chống lại các tế bào khối u mang đích, với sự biểu hiện xytokin tăng trong sự đáp ứng với sự gắn tế bào đích so với các tế bào chỉ biểu hiện caTCR mà không có mặt CSR. CSR có trong các tế bào này còn tăng cường sự mất hạt, sự tăng sinh, và khả năng sống so với các tế bào chỉ biểu hiện caTCR.

Do đó, sáng chế đề xuất các tế bào miễn dịch bao gồm caTCR đặc hiệu cho kháng nguyên đích và CSR đặc hiệu cho phối tử đích, trong đó caTCR này bao gồm môđun liên kết kháng nguyên mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích và môđun thụ thể tế bào T (TCRM) có khả năng huy động ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR, và trong đó CSR này a) bao gồm miền liên kết phối tử mà liên kết đặc hiệu với phối tử đích và miền truyền tín hiệu tế bào miễn dịch đồng kích thích có khả năng tạo ra tín hiệu kích thích cho tế bào miễn dịch và b) không bao gồm trình tự truyền tín hiệu tế bào miễn dịch sơ cấp về mặt chức năng. caTCR này có thể lấy định dạng bất kỳ trong số các định dạng với những sự thay đổi ở môđun liên kết kháng nguyên và/hoặc TCRM. Ví dụ, caTCR này có thể có môđun liên kết kháng nguyên bao gồm gốc được chọn từ nhóm bao gồm Fab, Fab', $(Fab')_2$, Fv, và scFv, và TCRM bao gồm một hoặc nhiều trình tự thu được từ α/β hoặc γ/δ TCR, bao gồm các biến thể trong một hoặc nhiều trong số miền xuyên màng, peptit kết nối, và miền nội bào. *Xem* Fig.1. Theo một số phương án, môđun liên kết kháng nguyên này là đa đặc hiệu (như đặc hiệu kép). Tương tự, CSR này có thể có môđun liên kết phối tử bao gồm gốc được chọn từ nhóm bao gồm Fab, Fab', $(Fab')_2$, Fv, và scFv. Theo một số phương án, kháng nguyên đích và phối tử đích này là như nhau. Theo một số phương án, môđun liên kết kháng nguyên của caTCR và môđun liên kết phối tử của CSR là như nhau, hoặc bao gồm cùng các trình tự mang lại tính đặc hiệu kháng nguyên, như các CDR hoặc các miền biến đổi. Theo một số phương án, kháng nguyên đích và phối tử đích này là khác nhau.

Theo các khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất a) một hoặc nhiều axit nucleic mã hóa caTCR và CSR, b) các tế bào miễn dịch bao gồm một hoặc nhiều axit nucleic mã hóa caTCR và CSR, và c) các chế phẩm bao gồm các tế bào miễn dịch bao gồm i) caTCR

và CSR, hoặc ii) một hoặc nhiều axit nucleic mã hóa caTCR và CSR này. Các chế phẩm này có thể là dược phẩm.

Sáng chế cũng đề xuất các phương pháp tạo ra và sử dụng các tế bào miễn dịch bao gồm caTCR và CSR cho các mục đích điều trị, cũng như các kit và các sản phẩm của quy trình sản xuất hữu dụng cho các phương pháp này. Sáng chế còn đề xuất các phương pháp điều trị bệnh sử dụng các tế bào miễn dịch bao gồm caTCR và CSR.

Định nghĩa

Thuật ngữ "kháng thể" hoặc "gốc kháng thể" bao gồm các kháng thể có chiều dài đầy đủ và các mảnh liên kết kháng nguyên của nó. Kháng thể có chiều dài đầy đủ bao gồm hai chuỗi nặng và hai chuỗi nhẹ. Các vùng biến đổi của các chuỗi nhẹ và chuỗi nặng này chịu trách nhiệm cho sự liên kết kháng nguyên. Vùng biến đổi ở cả hai chuỗi thường chứa ba vòng biến đổi cao được gọi là các vùng quyết định bổ sung (CDR) (các CDR chuỗi nhẹ (LC) bao gồm LC-CDR1, LC-CDR2, và LC-CDR3, các CDR chuỗi nặng (HC) bao gồm HC-CDR1 , HC-CDR2, và HC-CDR3). Các ranh giới CDR cho các kháng thể và các mảnh liên kết kháng nguyên được bộc lộ ở đây có thể được xác định hoặc được nhận diện bởi các quy ước của Kabat, Chothia, hoặc Al-Lazikani (Al-Lazikani 1997; Chothia 1985; Chothia 1987; Chothia 1989; Kabat 1987; Kabat 1991). Ba CDR của các chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ được đặt giữa các vùng duỗi bên sườn đã biết là các vùng khung (FR), mà bảo tồn cao hơn các CDR và tạo thành khung để hỗ trợ các vòng siêu biến đổi. Các vùng không đổi của các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ không được bao gồm trong sự liên kết kháng nguyên, nhưng thể hiện các chức năng yếu tố tác động khác nhau. Các kháng thể được chỉ định vào các lớp dựa vào trình tự axit amin của vùng không đổi của chuỗi nặng của chúng. Năm lớp hoặc isotyp kháng thể chính là IgA, IgD, IgE, IgG, và IgM, mà được đặc trưng bởi sự có mặt của lần lượt các chuỗi nặng α, δ, ε, γ, và μ. Một vài trong số các lớp kháng thể chính này được chia thành các lớp phụ như lgG1 (chuỗi nặng γ1), lgG2 (chuỗi nặng γ2), lgG3 (chuỗi nặng γ3), lgG4 (chuỗi nặng γ4), lgA1 (chuỗi nặng α1), hoặc lgA2 (chuỗi nặng α2).

Thuật ngữ "mảnh liên kết kháng nguyên" như được sử dụng ở đây để chỉ mảnh kháng thể bao gồm, ví dụ, kháng thể dime, Fab, Fab', F(ab')2, mảnh Fv, mảnh Fv được ổn định bởi disulfua (dsFv), (dsFv)2, dsFv đặc hiệu kép (dsFv-dsFv'), kháng thể dime

được ổn định bởi disulfua (ds diabody), phân tử kháng thể đơn chuỗi (scFv), dime scFv (kháng thể dime hóa trị hai), kháng thể đa đặc hiệu được tạo thành từ một phần của kháng thể bao gồm một hoặc nhiều CDR, kháng thể đơn miền được lạc đà hóa (camelized), kháng thể nano, kháng thể miền, kháng thể miền hóa trị hai, hoặc mảnh kháng thể bất kỳ khác mà liên kết với kháng nguyên nhưng không bao gồm cấu trúc kháng thể hoàn chỉnh. Mảnh liên kết kháng nguyên có khả năng liên kết với cùng kháng nguyên mà kháng thể gốc hoặc mảnh kháng thể gốc (*ví dụ*, scFv gốc) liên kết với. Theo một số phương án, mảnh liên kết kháng nguyên có thể bao gồm một hoặc nhiều CDR từ kháng thể của người cụ thể được ghép với vùng khung từ một hoặc nhiều kháng thể của người khác nhau.

Như được sử dụng ở đây, gốc kháng thể thứ nhất "cạnh tranh" để liên kết với kháng nguyên đích với gốc kháng thể thứ hai khi gốc kháng thể thứ nhất này ức chế sự liên kết kháng nguyên đích của gốc kháng thể thứ hai bởi ít nhất khoảng 50% (như ít nhất khoảng giá trị bất kỳ trong số 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% hoặc 99%) trong sự có mặt của nồng độ đẳng mol của gốc kháng thể thứ nhất này, hoặc ngược lại. Quy trình thông lượng cao cho kháng thể "binning" dựa vào sự cạnh tranh chéo của chúng được mô tả trong Công bố đơn PCT số WO 03/48731.

Như sử dụng ở đây, thuật ngữ "liên kết đặc hiệu" hoặc "đặc hiệu với" là để chỉ các tương tác đo được và có tính lặp lại, như liên kết giữa đích và kháng thể hoặc gốc kháng thể, mà là yếu tố quyết định cho sự có mặt của đích khi có mặt nhóm phân tử khác loại, bao gồm các phân tử sinh học. Ví dụ, gốc kháng thể liên kết đặc hiệu với đích (có thể là epitop) là gốc kháng thể liên kết đích này với ái lực lớn hơn, mạnh hơn, dễ dàng hơn, và/hoặc với thời gian dài hơn so với các liên kết của nó với các đích khác. Theo một số phương án, gốc kháng thể mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên phản ứng với một hoặc nhiều nhân tố quyết định kháng nguyên của kháng nguyên (ví dụ kháng nguyên bề mặt tế bào hoặc phức peptit/protein MHC) với ái lực liên kết mà ít nhất là khoảng 10 lần ái lực liên kết của nó cho các đích khác.

Thuật ngữ "thụ thể tế bào T" hoặc "TCR" dùng để chỉ thụ thể heterodime được tạo thành từ các chuỗi αβ hoặc γδ mà bắt cặp trên bề mặt của tế bào T. Mỗi chuỗi α, β, γ, và δ được tạo thành từ hai miền giống Ig: miền biến đổi (V) mà có sự nhận diện kháng nguyên thông qua các vùng quyết định bổ sung (CDR), tiếp theo là miền không đổi (C)

mà neo bám vào màng tế bào bằng peptit kết nối và vùng xuyên màng (TM). Vùng TM này liên kết với các tiểu đơn vị bất biến của bộ máy truyền tín hiệu CD3. Mỗi miền trong số các miền V này có ba CDR. Các CDR này tương tác với phức giữa peptit kháng nguyên được liên kết với protein được mã hóa bởi phức hợp tương hợp mô chính (pMHC) (Davis và Bjorkman (1988) Nature, 334, 395-402; Davis et al. (1998) Annu Rev Immunol, 16, 523-544; Murphy (2012), xix, 868 p.).

Thuật ngữ "phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR" dùng để chỉ phân tử có môtip hoạt hóa dựa vào tyrosin thụ thể miễn dịch tế bào chất (ITAM) mà là bộ phận của phức TCR-CD3. Các phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR bao gồm CD3γε, CD3δε, và ζζ (cũng được biết đến là CD3ζ hoặc CD3ζζ).

"Sự hoạt hóa", như được sử dụng ở đây liên quan đến tế bào biểu hiện CD3, dùng để chỉ trạng thái của tế bào mà đã được kích thích đủ để cảm ứng sự tăng có thể phát hiện được ở các chức năng yếu tố tác động xuôi dòng của con đường truyền tín hiệu CD3, bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, sự tăng sinh tế bào và sản xuất xytokin.

Thuật ngữ "môđun" khi chỉ một phần của protein có nghĩa là bao gồm các phần liên quan về mặt cấu trúc và/hoặc chức năng của một hoặc nhiều polypeptit mà cấu thành protein này. Ví dụ, môđun xuyên màng của thụ thể dime có thể chỉ các phần của từng chuỗi polypeptit của thụ thể mà cách màng. Môđun có thể cũng chỉ các phần liên quan của chuỗi polypeptit đơn. Ví dụ, môđun xuyên màng của thụ thể monome có thể chỉ các phần của chuỗi polypeptit đơn của thụ thể mà cách màng. Môđun có thể cũng bao gồm chỉ một phần đơn của polypeptit.

Thuật ngữ "axit nucleic được phân lập" như được sử dụng ở đây được dự định để chỉ axit nucleic của bộ gen, cADN, hoặc nguồn gốc tổng hợp hoặc sự kết hợp nào đó của nó, mà theo nguồn gốc của nó "axit nucleic được phân lập" này (1) không liên kết với tất cả hoặc một phần của polynucleotit trong đó "axit nucleic được phân lập" này được tìm thấy trong tự nhiên, (2) được liên kết hoạt động với polynucleotit mà nó không được liên kết với trong tự nhiên, hoặc (3) không xuất hiện trong tự nhiên là một phần của trình tự lớn hơn.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "CDR" hoặc "vùng quyết định bổ sung" được dự định để chỉ các vị trí kết hợp kháng nguyên không kề nhau được tìm thấy trong vùng

biến đổi của cả polypeptit chuỗi nặng và chuỗi nhẹ. Các vùng cụ thể này đã được mô tả bởi Kabat *et al.*, J. Biol. Chem. 252:6609-6616 (1977); Kabat *et al.*, U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of proteins of immunological interest" (1991); Chothia *et al.*, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); Al-Lazikani B. *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 273: 927-948 (1997); MacCallum *et al.*, J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996); Abhinandan và Martin, *Mol. Immunol.*, 45: 3832-3839 (2008); Lefranc M.P. *et al.*, *Dev. Comp. Immunol.*, 27: 55-77 (2003); và Honegger và Plückthun, *J. Mol. Biol.*, 309:657-670 (2001), mà các định nghĩa này bao gồm sự xếp chồng hoặc các tập con của các gốc axit amin khi được so sánh với nhau. Tuy nhiên, áp dụng một trong hai định nghĩa để chỉ CDR của kháng thể hoặc các kháng thể được ghép hoặc các biến thể của chúng được dự định là nằm trong phạm vi của thuật ngữ như được định nghĩa và được sử dụng ở đây. Các gốc axit amin mà bao hàm các CDR như được xác định bởi từng tài liệu trong số các tài liệu được trích dẫn trên đây được nêu dưới đây trong bảng 1 để so sánh. Các thuật toán và các giao diện dự đoán CDR là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật, bao gồm, ví dụ, Abhinandan và Martin, *Mol. Immunol.*, 45: 3832-3839 (2008); Ehrenmann F. *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 38: D301-D307 (2010); và Adolf-Bryfogle J. *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 43: D432-D438 (2015). Nội dung của các tài liệu được trích dẫn trong đoạn này được kết hợp toàn bộ ở đây bằng cách viện dẫn để sử dụng trong sáng chế và có khả năng bao gồm ở một hoặc nhiều điểm yêu cầu bảo hộ ở đây.

Bảng 1: Định nghĩa CDR

	Kabat[1]	Chothia[2]	MacCallum[3]	IMGT[4]	AHo[5]
V_H CDR1	31-35	26-32	30-35	27-38	25-40
V_H CDR2	50-65	53-55	47-58	56-65	58-77
V_H CDR3	95-102	96-101	93-101	105-117	109-137
V_L CDR1	24-34	26-32	30-36	27-38	25-40
V_L CDR2	50-56	50-52	46-55	56-65	58-77
V_L CDR3	89-97	91-96	89-96	105-117	109-137

[1]Cách đánh số gốc theo danh pháp của Kabat *et al.*, *nêu trên*

[2]Cách đánh số gốc theo danh pháp của Chothia *et al.*, *nêu trên*

[3]Cách đánh số gốc theo danh pháp của MacCallum *et al.*, *nêu trên*

[4]Cách đánh số gốc theo danh pháp của Lefranc *et al.*, *nêu trên*

[5]Cách đánh số gốc theo danh pháp của Honegger và Plückthun, *nêu trên*

Thuật ngữ "các kháng thể khảm" dùng để chỉ các kháng thể trong đó một phần của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ là giống hoặc tương đồng với các trình tự tương ứng trong kháng thể thu được từ một loài cụ thể hoặc thuộc lớp hoặc phân lớp kháng thể cụ thể, trong khi đó phần còn lại của (các) chuỗi này là giống hoặc tương đồng với các trình tự tương ứng trong các kháng thể thu được từ một loài khác hoặc thuộc một lớp hoặc phân lớp kháng thể khác, cũng như các mảnh của các kháng thể này, miễn là chúng thể hiện hoạt tính sinh học của sáng chế (xem patent Mỹ số 4,816,567; và Morrison *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)).

Thuật ngữ "bán tổng hợp" dùng để chỉ kháng thể hoặc gốc kháng thể có nghĩa là kháng thể hoặc gốc kháng thể này có một hoặc nhiều trình tự xuất hiện tự nhiên và một hoặc nhiều trình tự xuất hiện không tự nhiên (*tức là*, tổng hợp).

Thuật ngữ "tổng hợp hoàn toàn" dùng để chỉ kháng thể hoặc gốc kháng thể có nghĩa là kháng thể hoặc gốc kháng thể này có sự bắt cặp khung V_H/V_L xuất hiện tự nhiên được cố định, nhưng các trình tự không xuất hiện tự nhiên (*tức là*, tổng hợp) của tất cả 6 CDR của cả chuỗi nặng và chuỗi nhẹ.

Các dạng "được nhân hóa" của các kháng thể không phải của người (*ví dụ*, loài gặm nhấm) là các kháng thể khảm mà chứa trình tự tối thiểu thu được từ kháng thể không phải của người. Đối với hầu hết các phần, các kháng thể được nhân hóa là các globulin miễn dịch của người (kháng thể nhận) trong đó các gốc từ vùng siêu biến đổi (HVR) của thể nhận được thay thế bằng các gốc từ vùng siêu biến đổi của loài không phải người (kháng thể cho) như chuột nhắt, chuột cống, thỏ hoặc linh trưởng không phải người có tính đặc hiệu, ái lực và năng lực kháng thể mong muốn. Trong một số trường hợp, các gốc vùng khung (FR) của globulin miễn dịch của người được thay thế bằng các gốc không phải của người tương ứng. Ngoài ra, các kháng thể được nhân hóa có thể bao gồm các gốc mà không được tìm thấy trong kháng thể nhận hoặc trong kháng thể cho. Các cải biến này được tạo ra để tinh chế thêm tính năng của kháng thể. Nhìn chung, kháng thể được nhân hóa sẽ chứa gần như tất cả của ít nhất một, và thường là hai, miền biến đổi, trong đó tất cả hoặc gần như tất cả các vòng siêu biến đổi này tương ứng với các vòng siêu biến đổi của globulin miễn dịch không phải của người, và tất cả hoặc gần như tất cả các FR là các FR của trình tự globulin miễn dịch của người. Kháng thể được nhân hóa tùy ý cũng bao gồm ít nhất một phần vùng không đổi (Fc) của globulin miễn

dịch, thường là vùng không đổi của globulin miễn dịch của người. Chi tiết hơn, xem Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-329 (1988); và Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992).

"Độ tương đồng" dùng để chỉ độ tương tự trình tự hoặc độ tương đồng trình tự giữa hai polypeptit hoặc giữa hai phân tử axit nucleic. Khi vị trí ở cả hai trình tự so sánh bị chiếm bởi cùng bazơ hoặc tiểu đơn vị monome axit amin, *ví dụ*, nếu vị trí ở mỗi phân tử trong số hai phân tử ADN bị chiếm bởi adenin, thì các phân tử này là "tương đồng" tại vị trí đó. "Phần trăm độ tương đồng" hoặc "phần trăm độ tương đồng trình tự" giữa hai trình tự là hàm số của số vị trí khớp hoặc tương đồng được chia sẻ bởi hai trình tự chia cho số vị trí nhân với 100, xem xét đến sự thế bảo toàn bất kỳ là một phần của độ tương đồng trình tự. Ví dụ, nếu 6 trong số 10 vị trí trong hai trình tự được khớp hoặc tương đồng thì hai trình tự này có độ tương đồng 60%. Ví dụ, các trình tự ADN ATTGCC và TATGGC có chung 50% độ tương đồng. Nói chung, sự so sánh được tạo ra khi hai trình tự được căn thẳng hàng để thu được độ tương đồng tối đa. Sự căn thẳng hàng cho mục đích xác định tỷ lệ phần trăm độ tương đồng trình tự axit amin có thể đạt được theo nhiều cách khác nhau nằm trong phạm vi kỹ năng trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, bằng cách sử dụng phần mềm máy tính sẵn có công khai như BLAST, BLAST-2, ALIGN, Megalign (ADNSTAR), hoặc phần mềm MUSCLE. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật có thể xác định các thông số thích hợp cho việc xếp thẳng hàng các trình tự, bao gồm các thuật toán bất kỳ cần thiết để đạt được mức xếp thẳng hàng tối đa trên khắp chiều dài đầy đủ của các trình tự được đem so sánh. Tuy nhiên, đối với các mục đích ở đây, các giá trị % độ tương đồng trình tự axit amin được tạo ra bằng cách sử dụng chương trình máy tính so sánh trình tự MUSCLE (Edgar, R.C., *Nucleic Acids Research* 32(5):1792-1797, 2004; Edgar, R.C., *BMC Bioinformatics* 5(1):113, 2004).

"Miền C_H1" của vùng IgG Fc của người (còn được gọi là "C1" của miền "H1") thường kéo dài từ khoảng axit amin 118 đến khoảng axit amin 215 (hệ thống đánh số Châu Âu).

Trừ khi có quy định khác, "trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin" bao gồm tất cả các trình tự nucleotit mà là các phiên bản suy biến của nhau và mã hóa cùng trình tự axit amin. Cụm từ trình tự nucleotit mà mã hóa protein hoặc ARN có thể cũng bao

gồm các intron cho sự mở rộng mà trình tự nucleotit mã hóa protein này có thể ở phiên bản nào đó chứa (các) intron.

Thuật ngữ "được liên kết hoạt động" dùng để chỉ mối liên kết chức năng giữa trình tự điều hòa và trình tự axit nucleic khác loại dẫn đến sự biểu hiện của trình tự axit nucleic khác loại này. Ví dụ, trình tự axit nucleic thứ nhất được liên kết hoạt động với trình tự axit nucleic thứ hai khi trình tự axit nucleic thứ nhất này được đặt trong mối quan hệ chức năng với trình tự axit nucleic thứ hai này. Ví dụ, trình tự khởi động được liên kết hoạt động với trình tự mã hóa nếu trình tự khởi động này tác động đến sự phiên mã hoặc sự biểu hiện của trình tự mã hóa này. Thông thường, các trình tự ADN được liên kết hoạt động là liền kề và, nơi mà cần thiết để nối hai vùng mã hóa protein, ở cùng khung đọc.

Thuật ngữ "trình tự khởi động cảm ứng được" dùng để chỉ trình tự khởi động mà hoạt tính của nó có thể được điều hòa bằng cách bổ sung hoặc loại bỏ một hoặc nhiều tín hiệu đặc hiệu. Ví dụ, trình tự khởi động cảm ứng được có thể hoạt hóa quá trình phiên mã của axit nucleic được liên kết hoạt động trong tập hợp các điều kiện đặc trưng, *ví dụ*, trong sự có mặt của chất cảm ứng hoặc các điều kiện mà hoạt hóa trình tự khởi động này và/hoặc làm giảm bớt sự ức chế của trình tự khởi động.

Như được sử dụng ở đây, "sự điều trị" hoặc "điều trị" là phương pháp để thu được các kết quả có lợi hoặc mong muốn, bao gồm các kết quả lâm sàng. Đối với các mục đích của sáng chế, các kết quả lâm sàng có lợi hoặc mong muốn bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, một hoặc nhiều dấu hiệu sau đây: làm giảm bớt một hoặc nhiều triệu chứng là kết quả từ bệnh, làm giảm mức độ của bệnh, làm ổn định bệnh (*ví dụ*, ngăn chặn hoặc trì hoãn sự xấu đi của bệnh), ngăn chặn hoặc trì hoãn sự lây lan (*ví dụ*, di căn) của bệnh, ngăn chặn hoặc trì hoãn sự tái phát của bệnh, trì hoãn hoặc làm chậm sự tiến triển của bệnh, cải thiện tình trạng bệnh, tạo ra sự phục hồi (một phần hoặc toàn bộ) bệnh, làm giảm liều của một hoặc nhiều thuốc khác cần để điều trị bệnh, làm trì hoãn sự tiến triển của bệnh, làm tăng hoặc cải thiện chất lượng cuộc sống, làm tăng cân, và/hoặc kéo dài sự sống. Cũng được bao hàm bởi thuật ngữ "sự điều trị" là sự giảm hậu quả bệnh lý của bệnh (như, ví dụ, thể tích khối u ở bệnh ung thư). Các phương pháp theo sáng chế bao hàm một hoặc nhiều khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh về điều trị.

Thuật ngữ "sự tái phát", "sự trở lại" hoặc "bị tái phát" dùng để chỉ sự quay trở lại của bệnh ung thư hoặc bệnh sau khi được đánh giá lâm sàng là đã không còn xuất hiện bệnh. Chẩn đoán sự di căn ra xa hoặc sự tái phát cục bộ có thể được coi là sự tái phát.

Thuật ngữ "khó chữa" hoặc "kháng" dùng để chỉ bệnh ung thư hoặc bệnh mà không đáp ứng với điều trị.

"Lượng hữu hiệu" của caTCR hoặc chế phẩm bao gồm caTCR như được bộc lộ ở đây là lượng đủ để tiến hành mục đích được đưa ra cụ thể. "Lượng hữu hiệu" có thể được xác định theo kinh nghiệm và bằng các phương pháp đã biết liên quan với mục đích được đưa ra.

Thuật ngữ "lượng có hiệu quả điều trị" dùng để chỉ lượng của caTCR hoặc chế phẩm bao gồm caTCR như được đề cập ở đây, có hiệu quả để "điều trị" bệnh hoặc rối loạn ở đối tượng. Trong trường hợp bệnh ung thư, lượng có hiệu quả điều trị của caTCR hoặc chế phẩm bao gồm caTCR như được bộc lộ ở đây có thể làm giảm số lượng tế bào ung thư; làm giảm kích thước hoặc khối lượng khối u; ức chế (*tức là*, làm chậm đến mức độ nào đó và tốt hơn là làm ngừng) sự xâm nhiễm tế bào ung thư vào các cơ quan ngoại vi; ức chế (*tức là*, làm chậm đến mức độ nào đó và tốt hơn là làm ngừng) sự di căn khối u; ức chế, đến mức độ nào đó, sự sinh trưởng khối u; và/hoặc làm giảm đến mức độ nào đó một hoặc nhiều triệu chứng bị gây ra bởi bệnh ung thư. Đối với phạm vi caTCR hoặc chế phẩm bao gồm caTCR như được đề cập ở đây có thể ngăn chặn sự sinh trưởng và/hoặc tiêu diệt các tế bào ung thư hiện có, có thể kìm hãm tế bào và/hoặc gây độc tế bào. Theo một số phương án, lượng có hiệu quả điều trị này là lượng ức chế sinh trưởng. Theo một số phương án, lượng có hiệu quả điều trị này là lượng mà cải thiện sự tiến triển tỷ lệ sống sót tự do của bệnh nhân. Trong trường hợp bệnh nhiễm khuẩn, như nhiễm virut, lượng có hiệu quả điều trị của caTCR hoặc chế phẩm bao gồm caTCR như được đề cập ở đây có thể làm giảm số lượng tế bào bị nhiễm bởi tác nhân gây bệnh; làm giảm sự tạo thành hoặc giải phóng các kháng nguyên bắt nguồn từ tác nhân gây bệnh; ức chế (*tức là*, làm chậm đến mức độ nào đó và tốt hơn là làm ngừng) sự lây lan của tác nhân gây bệnh đến các tế bào chưa bị nhiễm; và/hoặc làm giảm đến mức độ nào đó một hoặc nhiều triệu chứng liên quan đến sự nhiễm khuẩn này. Theo một số phương án, lượng có hiệu quả điều trị này là lượng mà tăng tỷ lệ sống sót của bệnh nhân.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "dược dụng" hoặc "tương thích về mặt dược lý" có nghĩa là nguyên liệu mà không có sự không mong muốn về mặt sinh học hoặc cách khác, *ví dụ*, vật liệu này có thể được kết hợp vào trong dược phẩm được sử dụng cho bệnh nhân mà không gây ra bất kỳ tác dụng sinh học không mong muốn nào một cách đáng kể hoặc tương tác theo cách có hại với thành phần bất kỳ trong số các thành phần khác của chế phẩm mà nó được chứa trong đó. Các chất mang hoặc tá dược dược dụng tốt hơn là đã đáp ứng các tiêu chuẩn được đề ra về thử nghiệm độc tính học và thử nghiệm sản xuất và/hoặc được bao gồm trên Hướng dẫn thành phần không hoạt động (Inactive Ingredient Guide) được biên soạn bởi Cục Thực phẩm và Dược phẩm Hoa kỳ.

Cần hiểu rằng các phương án của sáng chế được mô tả ở đây bao gồm "gồm" và/hoặc "về cơ bản gồm" các phương án.

Việc đề cập đến "khoảng" một giá trị hoặc thông số trong bản mô tả bao gồm (và mô tả) các dạng biến thiên mà hướng đến chính giá trị hoặc thông số đó. Ví dụ, phần mô tả đề cập đến "khoảng X" bao gồm phần mô tả về "X".

Như được sử dụng ở đây, việc đề cập đến "không" một giá trị hoặc tham số thường có nghĩa và mô tả "ngoại trừ" giá trị hoặc tham số đó. Ví dụ, phương pháp này không được sử dụng để điều trị bệnh ung thư loại X có nghĩa là phương pháp này được sử dụng để điều trị các loại bệnh ung thư ngoại trừ loại X.

Như được sử dụng trong bản mô tả và trong các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo, các dạng số ít "một" bao gồm các dạng đề cập số nhiều trừ khi ngữ cảnh quy định rõ ràng khác.

Tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR

Sáng chế đề xuất tế bào miễn dịch (như tế bào T) trình diện trên bề mặt của nó caTCR và CSR theo loại bất kỳ trong số các caTCR và các CSR được mô tả ở đây (tế bào miễn dịch này cũng được chỉ ra ở đây là "tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR"). Theo một số phương án, tế bào miễn dịch này bao gồm axit nucleic mã hóa caTCR và CSR, trong đó caTCR và CSR này được biểu hiện từ axit nucleic và được định vị đến bề mặt tế bào miễn dịch. Theo một số phương án, tế bào miễn dịch này là tế bào T. Theo một số phương án, tế bào miễn dịch này được chọn từ nhóm bao gồm tế bào T gây độc tế bào, tế bào T trợ giúp, tế bào T giết tự nhiên, và tế bào T ức chế. Theo một số phương

án, tế bào miễn dịch này không biểu hiện các tiểu đơn vị TCR mà các TCR-TM của caTCR thu được từ đó. Ví dụ, theo một số phương án, tế bào miễn dịch này là tế bào αβ T và các TCR-TM của caTCR được đưa vào bao gồm trình tự thu được từ các chuỗi TCR δ và γ, hoặc tế bào T này là tế bào γδ T và các TCR-TM của caTCR được đưa vào này bao gồm trình tự thu được từ các chuỗi TCR α và β. Theo một số phương án, tế bào miễn dịch này được cải biến để phong bế hoặc làm giảm sự biểu hiện của một hoặc cả hai tiểu đơn vị TCR nội sinh của tế bào miễn dịch này. Ví dụ, theo một số phương án, tế bào miễn dịch này là tế bào αβ T được cải biến để phong bế hoặc làm giảm sự biểu hiện của các chuỗi TCR α và/hoặc β hoặc tế bào miễn dịch này là tế bào γδ T được cải biến để phong bế hoặc làm giảm sự biểu hiện của các chuỗi TCR γ và/hoặc δ. Những cải biến của các tế bào để làm gián đoạn sự biểu hiện của gen bao gồm các kỹ thuật bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật, bao gồm ví dụ sự can thiệp ARN (*ví dụ*, siARN, shARN, miARN), sự chỉnh sửa gen (*ví dụ*, sự bất hoạt gen dựa vào CRISPR hoặc TALEN), và các kỹ thuật tương tự.

Ví dụ, theo một số phương án, sáng chế đề xuất tế bào miễn dịch (như tế bào T) bao gồm axit nucleic mã hóa caTCR theo loại bất kỳ trong số các caTCR được mô tả ở đây và CSR theo loại bất kỳ trong số các CSR được mô tả ở đây, trong đó caTCR và CSR được biểu hiện từ axit nucleic và được định vị đến bề mặt tế bào miễn dịch. Theo một số phương án, axit nucleic này bao gồm trình tự axit nucleic caTCR thứ nhất mã hóa chuỗi polypeptit caTCR thứ nhất của caTCR này, trình tự axit nucleic caTCR thứ hai mã hóa chuỗi polypeptit caTCR thứ hai của caTCR, và trình tự axit nucleic CSR mã hóa chuỗi polypeptit CSR của CSR này. Theo một số phương án, các trình tự axit nucleic caTCR thứ nhất và thứ hai này và trình tự axit nucleic CSR mỗi loại được chứa trong các vectơ khác nhau. Theo một số phương án, một số hoặc toàn bộ các trình tự axit nucleic này được chứa trong cùng vectơ. Các vectơ có thể được chọn, ví dụ, từ nhóm bao gồm các vectơ biểu hiện động vật có vú và các vectơ virut (như các vectơ thu được từ retrovirut, adenovirut, các virut liên kết với adeno, virut herpes, và lentivirut). Theo một số phương án, một hoặc nhiều vectơ này được hợp nhất vào trong bộ gen chủ của tế bào miễn dịch. Theo một số phương án, các trình tự axit nucleic caTCR thứ nhất và thứ hai này và trình tự axit nucleic CSR mỗi loại được điều khiển bởi các trình tự khởi động khác nhau. Theo một số phương án, một số hoặc tất cả các trình tự khởi động này

có cùng trình tự. Theo một số phương án, một số hoặc tất cả các trình tự khởi động này có các trình tự khác nhau. Theo một số phương án, một số hoặc tất cả các trình tự axit nucleic này được điều khiển bởi trình tự khởi động đơn. Theo một số phương án, một số hoặc tất cả các trình tự khởi động này là cảm ứng được. Theo một số phương án, tế bào miễn dịch này được chọn từ nhóm bao gồm tế bào T gây độc tế bào, tế bào T trợ giúp, tế bào T giết tự nhiên, và tế bào T ức chế.

Do đó, theo một số phương án, sáng chế đề xuất tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR (như tế bào T) biểu hiện trên bề mặt của nó caTCR theo loại bất kỳ trong số các caTCR được mô tả ở đây và CSR theo loại bất kỳ trong số các CSR được mô tả ở đây, trong đó tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR này bao gồm a) trình tự axit nucleic caTCR thứ nhất mã hóa chuỗi polypeptit caTCR thứ nhất của caTCR này; b) trình tự axit nucleic caTCR thứ hai mã hóa chuỗi polypeptit caTCR thứ hai của caTCR này; và c) trình tự axit nucleic CSR mã hóa chuỗi polypeptit CSR của CSR này, trong đó các chuỗi polypeptit caTCR thứ nhất và thứ hai này được biểu hiện từ các trình tự axit nucleic caTCR thứ nhất và thứ hai để tạo thành caTCR, trong đó chuỗi polypeptit CSR được biểu hiện từ axit nucleic CSR để tạo thành CSR, và trong đó caTCR và CSR này định vị đến bề mặt của tế bào miễn dịch. Theo một số phương án, trình tự axit nucleic caTCR thứ nhất được chứa trong vectơ thứ nhất (như vectơ lentivirut), trình tự axit nucleic caTCR thứ hai được chứa trong vectơ thứ hai (như vectơ lentivirut), và trình tự axit nucleic CSR này được kết hợp trong vectơ thứ ba (như vectơ lentivirut). Theo một số phương án, một số hoặc tất cả các trình tự axit nucleic caTCR thứ nhất và thứ hai và trình tự axit nucleic CSR này được chứa trong cùng vectơ (như vectơ lentivirut). Theo một số phương án, mỗi loại trong số các trình tự axit nucleic caTCR thứ nhất và thứ hai và trình tự axit nucleic CSR này, một cách riêng rẽ, được liên kết hoạt động với trình tự khởi động. Theo một số phương án, một số hoặc tất cả các trình tự axit nucleic này được điều khiển bởi trình tự khởi động đơn. Theo một số phương án, một số hoặc tất cả các trình tự khởi động này có cùng trình tự. Theo một số phương án, một số hoặc tất cả các trình tự khởi động này có các trình tự khác nhau. Theo một số phương án, một số hoặc tất cả các trình tự khởi động này là cảm ứng được. Theo một số phương án, một số hoặc tất cả các vectơ này đều là vectơ virut (như các vectơ lentivirut). Theo một số phương án, tế bào miễn dịch này không biểu hiện các tiểu đơn vị TCR mà các TCR-TM của

caTCR thu được từ đó. Ví dụ, theo một số phương án, tế bào miễn dịch này là tế bào αβ T và các TCR-TM của caTCR được đưa vào bao gồm trình tự thu được từ các chuỗi TCR δ và γ, hoặc tế bào miễn dịch này là tế bào γδ T và các TCR-TM của caTCR được đưa vào này bao gồm trình tự thu được từ các chuỗi TCR α và β. Theo một số phương án, tế bào miễn dịch này được cải biến để phong bế hoặc làm giảm sự biểu hiện của một hoặc cả hai tiểu đơn vị TCR nội sinh của nó. Ví dụ, theo một số phương án, tế bào miễn dịch này là tế bào αβ T được cải biến để phong bế hoặc làm giảm sự biểu hiện của các chuỗi TCR α và/hoặc β, hoặc tế bào miễn dịch này là tế bào γδ T được cải biến để phong bế hoặc làm giảm sự biểu hiện của các chuỗi TCR γ và/hoặc δ. Theo một số phương án, tế bào miễn dịch này được chọn từ nhóm bao gồm tế bào T gây độc tế bào, tế bào T trợ giúp, tế bào T giết tự nhiên, và tế bào T ức chế. Theo một số phương án, một số hoặc tất cả các vectơ này là vectơ virut (như các vectơ lentivirut) được hợp nhất vào trong bộ gen chủ của tế bào miễn dịch.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR (như tế bào T) biểu hiện trên bề mặt của nó caTCR theo loại bất kỳ trong số các caTCR được mô tả ở đây và CSR theo loại bất kỳ trong số các CSR được mô tả ở đây, trong đó tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR này bao gồm a) vectơ thứ nhất bao gồm trình tự khởi động thứ nhất được liên kết hoạt động với trình tự axit nucleic caTCR thứ nhất mã hóa chuỗi polypeptit caTCR thứ nhất của caTCR này; b) vectơ thứ hai bao gồm trình tự khởi động thứ hai được liên kết hoạt động với trình tự axit nucleic caTCR thứ hai mã hóa chuỗi polypeptit caTCR thứ hai của caTCR này; và c) vectơ thứ ba bao gồm trình tự khởi động thứ ba được liên kết hoạt động với trình tự axit nucleic CSR mã hóa chuỗi polypeptit CSR của CSR này, trong đó các chuỗi polypeptit caTCR thứ nhất và thứ hai này được biểu hiện từ các trình tự axit nucleic caTCR thứ nhất và thứ hai để tạo thành caTCR và chuỗi polypeptit CSR này được biểu hiện từ trình tự axit nucleic CSR để tạo thành CSR, và trong đó caTCR và CSR này định vị đến bề mặt của tế bào miễn dịch. Theo một số phương án, một số hoặc tất cả các trình tự khởi động này có cùng trình tự. Theo một số phương án, một số hoặc tất cả các trình tự khởi động này có các trình tự khác nhau. Theo một số phương án, một số hoặc tất cả các trình tự khởi động này là cảm ứng được. Theo một số phương án, tế bào miễn dịch này không biểu hiện các tiểu đơn vị TCR mà các TCR-TM của caTCR thu được từ đó. Ví dụ, theo một số phương án, tế

bào miễn dịch này là tế bào αβ T và các TCR-TM của caTCR được đưa vào bao gồm trình tự thu được từ các chuỗi TCR δ và γ, hoặc tế bào miễn dịch này là tế bào γδ T và các TCR-TM của caTCR được đưa vào này bao gồm trình tự thu được từ các chuỗi TCR α và β. Theo một số phương án, tế bào miễn dịch này được cải biến để phong bế hoặc làm giảm sự biểu hiện của một hoặc cả hai tiểu đơn vị TCR nội sinh của nó. Ví dụ, theo một số phương án, tế bào miễn dịch này là tế bào αβ T được cải biến để phong bế hoặc làm giảm sự biểu hiện của các chuỗi TCR α và/hoặc β, hoặc tế bào miễn dịch này là tế bào γδ T được cải biến để phong bế hoặc làm giảm sự biểu hiện của các chuỗi TCR γ và/hoặc δ. Theo một số phương án, tế bào miễn dịch này được chọn từ nhóm bao gồm tế bào T gây độc tế bào, tế bào T trợ giúp, tế bào T giết tự nhiên, và tế bào T ức chế. Theo một số phương án, các vectơ thứ nhất và thứ hai này là các vectơ virut (như các vectơ lentivirut) được hợp nhất vào trong bộ gen chủ của tế bào miễn dịch.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR (như tế bào T) biểu hiện trên bề mặt của nó caTCR theo loại bất kỳ trong số các caTCR được mô tả ở đây và CSR theo loại bất kỳ trong số các CSR được mô tả ở đây, trong đó tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR này bao gồm a) vectơ thứ nhất bao gồm i) trình tự khởi động thứ nhất được liên kết hoạt động với trình tự axit nucleic caTCR thứ nhất mã hóa chuỗi polypeptit caTCR thứ nhất của caTCR này và ii) trình tự khởi động thứ hai được liên kết hoạt động với trình tự axit nucleic caTCR thứ hai mã hóa chuỗi polypeptit caTCR thứ hai của caTCR này; và b) vectơ thứ hai bao gồm trình tự khởi động thứ ba được liên kết hoạt động với trình tự axit nucleic CSR mã hóa chuỗi polypeptit CSR của CSR này, trong đó các chuỗi polypeptit caTCR thứ nhất và thứ hai này được biểu hiện từ các trình tự axit nucleic caTCR thứ nhất và thứ hai này để tạo thành caTCR và chuỗi polypeptit CSR này được biểu hiện từ trình tự axit nucleic CSR để tạo thành CSR, và trong đó caTCR này định vị đến bề mặt của tế bào miễn dịch. Theo một số phương án, một số hoặc tất cả các trình tự khởi động này có cùng trình tự. Theo một số phương án, một số hoặc tất cả các trình tự khởi động này có các trình tự khác nhau. Theo một số phương án, một số hoặc tất cả các trình tự khởi động này là cảm ứng được. Theo một số phương án, tế bào miễn dịch này không biểu hiện các tiểu đơn vị TCR mà các TCR-TM của caTCR thu được từ đó. Ví dụ, theo một số phương án, tế bào miễn dịch này là tế bào αβ T và các TCR-TM của caTCR được đưa vào bao gồm trình tự thu được từ các

chuỗi TCR δ và γ, hoặc tế bào miễn dịch này là tế bào γδ T và các TCR-TM của caTCR được đưa vào này bao gồm trình tự thu được từ các chuỗi TCR α và β. Theo một số phương án, tế bào miễn dịch này được cải biến để phong bế hoặc làm giảm sự biểu hiện của một hoặc cả hai tiểu đơn vị TCR nội sinh của nó. Ví dụ, theo một số phương án, tế bào miễn dịch này là tế bào αβ T được cải biến để phong bế hoặc làm giảm sự biểu hiện của các chuỗi TCR α và/hoặc β, hoặc tế bào miễn dịch này là tế bào γδ T được cải biến để phong bế hoặc làm giảm sự biểu hiện của các chuỗi TCR γ và/hoặc δ. Theo một số phương án, tế bào miễn dịch này được chọn từ nhóm bao gồm tế bào T gây độc tế bào, tế bào T trợ giúp, tế bào T giết tự nhiên, và tế bào T ức chế. Theo một số phương án, các vectơ thứ nhất và thứ hai này là các vectơ virut (như các vectơ lentivirut) được hợp nhất vào trong bộ gen chủ của tế bào miễn dịch. Được đánh giá rằng các phương án mà trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit nucleic được trao đổi cũng được dự tính, như trình tự axit nucleic caTCR thứ nhất hoặc thứ hai được trao đổi với trình tự axit nucleic CSR.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR (như tế bào T) biểu hiện trên bề mặt của nó caTCR theo loại bất kỳ trong số các caTCR được mô tả ở đây và CSR theo loại bất kỳ trong số các CSR được mô tả ở đây, trong đó tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR này bao gồm a) vectơ thứ nhất bao gồm i) trình tự axit nucleic caTCR thứ nhất mã hóa chuỗi polypeptit caTCR thứ nhất của caTCR này và ii) trình tự axit nucleic caTCR thứ hai mã hóa chuỗi polypeptit caTCR thứ hai của caTCR này, trong đó các trình tự axit nucleic caTCR thứ nhất và thứ hai này được điều khiển bởi trình tự khởi động thứ nhất; và b) vectơ thứ hai bao gồm trình tự khởi động thứ hai được liên kết hoạt động với trình tự axit nucleic CSR mã hóa chuỗi polypeptit CSR của CSR này, trong đó các chuỗi polypeptit caTCR thứ nhất và thứ hai này được biểu hiện từ các trình tự axit nucleic caTCR thứ nhất và thứ hai để tạo thành caTCR và chuỗi polypeptit CSR này được biểu hiện từ trình tự axit nucleic CSR để tạo thành CSR, và trong đó caTCR và CSR này định vị đến bề mặt của tế bào miễn dịch. Theo một số phương án, trình tự khởi động thứ nhất này được liên kết hoạt động với đầu 5' của trình tự axit nucleic caTCR thứ nhất, và có cầu nối axit nucleic được chọn từ nhóm bao gồm vị trí đi vào ribosom nội bộ (IRES) và axit nucleic mã hóa peptit 2A tự phân tách (như P2A, T2A, E2A, hoặc F2A) liên kết đầu 3' của trình tự axit nucleic caTCR thứ nhất với

đầu 5' của trình tự axit nucleic caTCR thứ hai, trong đó trình tự axit nucleic caTCR thứ nhất và trình tự axit nucleic caTCR thứ hai này được phiên mã dưới dạng ARN đơn được điều khiển bởi trình tự khởi động này. Theo một số phương án, trình tự khởi động thứ nhất này được liên kết hoạt động với đầu 5' của trình tự axit nucleic caTCR thứ hai, và có cầu nối axit nucleic được chọn từ nhóm bao gồm vị trí đi vào ribosom nội bộ (IRES) và axit nucleic mã hóa peptit 2A tự phân tách (như P2A, T2A, E2A, hoặc F2A) liên kết đầu 3' của trình tự axit nucleic caTCR thứ hai với đầu 5' của trình tự axit nucleic caTCR thứ nhất, trong đó trình tự axit nucleic caTCR thứ nhất và trình tự axit nucleic caTCR thứ hai này được phiên mã dưới dạng ARN đơn được điều khiển bởi trình tự khởi động này. Theo một số phương án, các trình tự khởi động thứ nhất và/hoặc thứ hai này có cùng trình tự. Theo một số phương án, các trình tự khởi động thứ nhất và/hoặc thứ hai này có các trình tự khác nhau. Theo một số phương án, các trình tự khởi động thứ nhất và/hoặc thứ hai này là cảm ứng được. Theo một số phương án, tế bào miễn dịch này không biểu hiện các tiểu đơn vị TCR mà các TCR-TM của caTCR thu được từ đó. Ví dụ, theo một số phương án, tế bào miễn dịch này là tế bào αβ T và các TCR-TM của caTCR được đưa vào bao gồm trình tự thu được từ các chuỗi TCR δ và γ, hoặc tế bào miễn dịch này là tế bào γδ T và các TCR-TM của caTCR được đưa vào này bao gồm trình tự thu được từ các chuỗi TCR α và β. Theo một số phương án, tế bào miễn dịch này được cải biến để phong bế hoặc làm giảm sự biểu hiện của một hoặc cả hai tiểu đơn vị TCR nội sinh của nó. Ví dụ, theo một số phương án, tế bào miễn dịch này là tế bào αβ T được cải biến để phong bế hoặc làm giảm sự biểu hiện của các chuỗi TCR α và/hoặc β, hoặc tế bào miễn dịch này là tế bào γδ T được cải biến để phong bế hoặc làm giảm sự biểu hiện của các chuỗi TCR γ và/hoặc δ. Theo một số phương án, tế bào miễn dịch này được chọn từ nhóm bao gồm tế bào T gây độc tế bào, tế bào T trợ giúp, tế bào T giết tự nhiên, và tế bào T ức chế. Theo một số phương án, vectơ này là vectơ virut (như vectơ lentivirut) được hợp nhất vào trong bộ gen chủ của tế bào miễn dịch. Được đánh giá rằng các phương án mà trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit nucleic được trao đổi cũng được dự tính, như trình tự axit nucleic caTCR thứ nhất hoặc thứ hai được trao đổi với trình tự axit nucleic CSR.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR (như tế bào T) biểu hiện trên bề mặt của nó caTCR theo loại bất kỳ trong số các caTCR được

mô tả ở đây và CSR theo loại bất kỳ trong số các CSR được mô tả ở đây, trong đó tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR này bao gồm vectơ bao gồm a) trình tự axit nucleic caTCR thứ nhất mã hóa chuỗi polypeptit caTCR thứ nhất của caTCR này; b) trình tự axit nucleic caTCR thứ hai mã hóa chuỗi polypeptit caTCR thứ hai của caTCR này; và c) trình tự axit nucleic CSR mã hóa chuỗi polypeptit CSR của CSR này, trong đó các trình tự axit nucleic caTCR thứ nhất và thứ hai này và trình tự axit nucleic CSR được điều khiển bởi trình tự khởi động đơn; trong đó các chuỗi polypeptit caTCR thứ nhất và thứ hai này được biểu hiện từ các trình tự axit nucleic caTCR thứ nhất và thứ hai này để tạo thành caTCR và chuỗi polypeptit CSR này được biểu hiện từ trình tự axit nucleic CSR để tạo thành CSR, và trong đó caTCR và CSR này định vị đến bề mặt của tế bào miễn dịch. Theo một số phương án, trình tự khởi động này được liên kết hoạt động với một trong số các trình tự axit nucleic, mà được liên kết với các trình tự axit nucleic khác bởi các cầu liên kết axit nucleic được chọn, một cách riêng rẽ, từ nhóm bao gồm vị trí đi vào ribosom nội bộ (IRES) và axit nucleic mã hóa peptit 2A tự phân tách (như P2A, T2A, E2A, hoặc F2A), sao cho các trình tự axit nucleic caTCR thứ nhất và thứ hai này và trình tự axit nucleic CSR được phiên mã dưới dạng ARN đơn được điều khiển bởi trình tự khởi động này. Theo một số phương án, trình tự khởi động này là cảm ứng được. Theo một số phương án, tế bào miễn dịch này không biểu hiện các tiểu đơn vị TCR mà các TCR-TM của caTCR thu được từ đó. Ví dụ, theo một số phương án, tế bào miễn dịch này là tế bào αβ T và các TCR-TM của caTCR được đưa vào bao gồm trình tự thu được từ các chuỗi TCR δ và γ, hoặc tế bào miễn dịch này là tế bào γδ T và các TCR-TM của caTCR được đưa vào này bao gồm trình tự thu được từ các chuỗi TCR α và β. Theo một số phương án, tế bào miễn dịch này được cải biến để phong bế hoặc làm giảm sự biểu hiện của một hoặc cả hai tiểu đơn vị TCR nội sinh của nó. Ví dụ, theo một số phương án, tế bào miễn dịch này là tế bào αβ T được cải biến để phong bế hoặc làm giảm sự biểu hiện của các chuỗi TCR α và/hoặc β, hoặc tế bào miễn dịch này là tế bào γδ T được cải biến để phong bế hoặc làm giảm sự biểu hiện của các chuỗi TCR γ và/hoặc δ. Theo một số phương án, tế bào miễn dịch này được chọn từ nhóm bao gồm tế bào T gây độc tế bào, tế bào T trợ giúp, tế bào T giết tự nhiên, và tế bào T ức chế. Theo một số phương án, vectơ này là vectơ virut (như vectơ lentivirut) được hợp nhất vào trong bộ gen chủ của tế bào miễn dịch.

Cấu trúc kháng thể/thụ thể tế bào T khảm (caTCR)

Theo một khía cạnh, kháng thể/thụ thể tế bào T khảm (caTCR) đặc hiệu kháng nguyên đích được mô tả ở đây liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích (như kháng nguyên bề mặt tế bào hoặc phức hợp peptit/MHC) và có khả năng huy động ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR (như CD3δε, CD3γε, và/hoặc ζζ). Theo một số phương án, caTCR này bao gồm các miền TCR xuất hiện tự nhiên. Theo một số phương án, caTCR này bao gồm ít nhất một miền TCR không xuất hiện tự nhiên. caTCR này bao gồm môđun liên kết kháng nguyên mà tạo ra tính đặc hiệu kháng nguyên và môđun thụ thể tế bào T (TCRM) mà cho phép sự huy động và truyền tín hiệu CD3. Môđun liên kết kháng nguyên này không phải là gốc liên kết kháng nguyên thụ thể tế bào T xuất hiện tự nhiên. Theo một số phương án, môđun liên kết kháng nguyên này được liên kết với đầu cùng amino của chuỗi polypeptit trong TCRM. Theo một số phương án, môđun liên kết kháng nguyên này là gốc kháng thể. Theo một số phương án, gốc kháng thể này là Fab, Fab', (Fab')2, Fv, hoặc Fv đơn chuỗi (scFv). Theo một số phương án, môđun liên kết kháng nguyên này là đa đặc hiệu (như đặc hiệu kép). TCRM này bao gồm môđun xuyên màng thu được từ các miền xuyên màng của một hoặc nhiều TCR (TCR-TM), như αβ và/hoặc γδ TCR, và tùy ý còn bao gồm một hoặc cả hai peptit kết nối hoặc các mảnh của nó của TCR và/hoặc một hoặc nhiều miền nội bào TCR hoặc các mảnh của nó. Theo một số phương án, TCRM này bao gồm hai chuỗi polypeptit, mỗi chuỗi polypeptit bao gồm, từ đầu cùng amino đến đầu cùng carboxy, peptit kết nối, miền xuyên màng, và tùy ý miền nội bào TCR. Theo một số phương án, TCRM này bao gồm một hoặc nhiều miền TCR không xuất hiện tự nhiên. Ví dụ, theo một số phương án, TCRM này bao gồm một hoặc hai miền xuyên màng TCR không xuất hiện tự nhiên. Miền TCR không xuất hiện tự nhiên có thể là miền tương ứng của TCR xuất hiện tự nhiên được cải biến bởi sự thế một hoặc nhiều axit amin, và/hoặc bởi sự thay thế một phần của miền tương ứng bằng một phần của miền tương tự từ một TCR khác. caTCR này có thể bao gồm chuỗi polypeptit thứ nhất và chuỗi polypeptit thứ hai, trong đó các chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ hai này cùng tạo thành môđun liên kết kháng nguyên và TCRM. Theo một số phương án, các chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ hai này là các chuỗi polypeptit tách biệt, và caTCR này là multime, như dime. Theo một số phương án, các chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ hai này được liên kết cộng hóa trị, như bởi liên kết peptit,

hoặc bởi một liên kết hóa học khác, như liên kết disulfit. Theo một số phương án, chuỗi polypeptit thứ nhất và chuỗi polypeptit thứ hai này được liên kết bởi ít nhất một liên kết disulfit. Theo một số phương án, caTCR này còn bao gồm một hoặc nhiều trình tự truyền tín hiệu đồng kích thích tế bào T. Một hoặc nhiều trình tự truyền tín hiệu đồng kích thích này có thể là, một cách riêng rẽ, toàn bộ hoặc một phần của miền nội bào của phân tử đồng kích thích bao gồm, ví dụ, CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, ICOS, kháng nguyên liên kết với chức năng lympho bào 1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, phối tử liên kết đặc hiệu với CD83, và loại tương tự. Theo một số phương án, một hoặc nhiều trình tự truyền tín hiệu đồng kích thích này là nằm giữa TCR-TM thứ nhất và miền nội bào TCR thứ nhất và/hoặc nằm giữa TCR-TM thứ hai và miền nội bào TCR thứ hai. Theo một số phương án, một hoặc nhiều trình tự truyền tín hiệu đồng kích thích này là đầu cùng carboxy đến TCRD thứ nhất và/hoặc TCRD thứ hai. Theo một số phương án, caTCR này thiếu trình tự truyền tín hiệu đồng kích thích tế bào T. Theo một số phương án, caTCR này còn bao gồm môđun ổn định hóa bao gồm miền ổn định hóa thứ nhất và miền ổn định hóa thứ hai, trong đó miền ổn định hóa thứ nhất và thứ hai này có ái lực liên kết với nhau mà ổn định hóa caTCR. Theo một số phương án, môđun ổn định hóa này được định vị nằm giữa môđun liên kết kháng nguyên và TCRM. Theo một số phương án, caTCR này còn bao gồm môđun đệm nằm giữa hai môđun hoặc miền caTCR bất kỳ. Theo một số phương án, môđun đệm này bao gồm một hoặc nhiều cầu nối peptit kết nối hai môđun hoặc miền caTCR.

Các caTCR được mô tả ở đây có thể có một hoặc nhiều dấu hiệu được mô tả trong phần này. Được dự tính rằng dấu hiệu bất kỳ trong số các dấu hiệu cho mỗi thành phần của caTCR này (*ví dụ*, môđun liên kết kháng nguyên, TCRD, TCR-TM, môđun đệm, môđun ổn định hóa, các trình tự đồng kích thích tế bào T, và các cầu liên kết khác nhau v.v.) được mô tả ở đây có thể được kết hợp với nhau,với dấu hiệu bất kỳ trong số các dấu hiệu của CSR, và với dấu hiệu bất kỳ trong số các dấu hiệu của SSE như là từng và mỗi sự kết hợp được mô tả một cách riêng rẽ.

Theo một số phương án, môđun liên kết kháng nguyên này (như gốc kháng thể) liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích với a) ái lực là ít nhất khoảng 10 (bao gồm ví dụ ít nhất khoảng giá trị bất kỳ trong số 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500, 750, 1000 hoặc cao hơn) lần ái lực liên kết của nó với các phân tử khác; hoặc b) K_d

không lớn hơn khoảng 1/10 (như không lớn hơn khoảng giá trị bất kỳ trong số 1/10, 1/20, 1/30, 1/40, 1/50, 1/75, 1/100, 1/200, 1/300, 1/400, 1/500, 1/750, 1/1000 hoặc nhỏ hơn) lần K_d của nó cho sự liên kết với các phân tử khác. Ái lực liên kết có thể được xác định bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật, như ELISA, phân tích phân loại tế bào được hoạt hóa huỳnh quang (FACS), hoặc thử nghiệm kết tủa miễn dịch phóng xạ (RIA). K_d có thể được xác định bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật, như thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) sử dụng, ví dụ, thiết bị Biacore, hoặc thử nghiệm loại trừ động học (KinExA) sử dụng, ví dụ, thiết bị Sapidyne.

Các ví dụ về các miền ổn định hóa bao gồm vùng Fc; vùng bản lề; miền C_H3; miền C_H4; miền C_H1 hoặc C_L; miền khóa kéo leuxin (*ví dụ*, miền khóa kéo jun/fos leuxin, *xem*, *ví dụ*, Kostelney *et al*, *J. Immunol*, 148: 1547-1553, 1992; hoặc miền khóa kéo leuxin GCN4 nấm men); miền khóa kéo isoleuxin; miền tạo dime của thụ thể bề mặt tế bào tạo dime (ví dụ, thụ thể interleukin-8 (IL-8R); hoặc integrin heterodime như LFA-1 hoặc GPIIIb/IIIa); vùng tạo dime của phối tử tạo dime được tiết (ví dụ, yếu tố sinh trưởng dây thần kinh (NGF), neurotrophin-3 (NT-3), interleukin-8 (IL-8), yếu tố sinh trưởng nội mô mạch (VEGF), hoặc yếu tố thần kinh bắt nguồn từ não (BDNF); *xem*, *ví dụ*, Arakawa *et al*, *J. Biol. Chem.* 269:27833-27839, 1994, và Radziejewski *et al*, *Biochem.* 32: 1350, 1993); miền dime hóa xoắn đôi (*xem*, ví dụ, WO2014152878; Fletcher et al, *ACS Synth. Biol.* 1:240-250, 2012; và Thomas *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 135(13):5161-5166, 2013); và polypeptit bao gồm ít nhất một gốc xystein (ví dụ, từ khoảng một, hai, hoặc ba đến khoảng mười gốc xystein) sao cho (các) liên kết disulfit có thể tạo thành giữa polypeptit này và polypeptit thứ hai bao gồm ít nhất một gốc xystein.

Theo một số phương án, TCRM được mô tả ở đây bao gồm a) miền thụ thể tế bào T (TCRD) thứ nhất bao gồm miền xuyên màng TCR (TCR-TM) thứ nhất và b) TCRD thứ hai bao gồm TCR-TM thứ hai, trong đó TCRM này thúc đẩy sự huy động của ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR. Theo một số phương án, cả hai TCR-TM này đều xuất hiện tự nhiên. Theo một số phương án, ít nhất một trong số các TCR-TM này là không xuất hiện tự nhiên. Theo một số phương án, cả hai TCR-TM này đều không xuất hiện tự nhiên. Theo một số phương án, TCR-TM thứ nhất này là bắt nguồn từ một trong số các miền xuyên màng của thụ thể tế bào T (như αβ TCR hoặc γδ TCR) và TCR-

TM thứ hai này là bắt nguồn từ miền xuyên màng còn lại của thụ thể tế bào T. Theo một số phương án, TCRM này cho phép sự huy động được tăng cường của ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR so với TCRM bao gồm các miền xuyên màng của thụ thể tế bào T. Sự huy động của các phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR có thể được xác định bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật, như phân tích FACS cho sự biểu hiện bề mặt phức hợp TCR-CD3 hoặc sự đồng kết tủa miễn dịch của các tiểu đơn vị CD3 với caTCR này.

Ví dụ, theo một số phương án, TCR-TM thứ nhất của TCRM được mô tả ở đây bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm miền xuyên màng của chuỗi TCR α (*ví dụ*, Số đăng ký ngân hàng gen: CCI73895) hoặc biến thể của nó và TCR-TM thứ hai của TCRM này bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm miền xuyên màng của chuỗi TCR β (*ví dụ*, Số đăng ký ngân hàng gen: CCI73893) hoặc biến thể của nó. Theo một số phương án, TCR-TM thứ nhất này bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm miền xuyên màng của chuỗi TCR δ (*ví dụ*, Số đăng ký ngân hàng gen: AAQ57272) hoặc biến thể của nó và TCR-TM thứ hai này bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm miền xuyên màng của chuỗi TCR γ (*ví dụ*, Số đăng ký ngân hàng gen: AGE91788) hoặc biến thể của nó. Theo một số phương án, các TCR-TM thứ nhất và thứ hai của TCRM được mô tả ở đây bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm miền xuyên màng của miền không đổi chuỗi TCR α (*ví dụ*, SEQ ID NO: 1) hoặc biến thể của nó và miền xuyên màng của miền không đổi chuỗi TCR β (*ví dụ*, SEQ ID NO: 2) hoặc biến thể của nó, tương ứng. Theo một số phương án, các TCR-TM thứ nhất và thứ hai này bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm miền xuyên màng của miền không đổi chuỗi TCR δ (*ví dụ*, SEQ ID NO: 3) hoặc biến thể của nó và miền xuyên màng của miền không đổi chuỗi TCR γ (*ví dụ*, SEQ ID NO: 4) hoặc biến thể của nó, tương ứng. Theo một số phương án, các TCR-TM thứ nhất và thứ hai này bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm các trình tự axit amin của các SEQ ID NO: 5 và 6, hoặc các biến thể của nó, tương ứng. Theo một số phương án, các TCR-TM thứ nhất và thứ hai này bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm các trình tự axit amin của các SEQ ID NO: 7 và 8, hoặc các biến thể của nó, tương ứng. Các biến thể của các miền xuyên màng này bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, miền xuyên màng có một hoặc nhiều sự thế axit amin so với trình tự tham chiếu. Theo một số phương án, miền xuyên màng biến đổi bao gồm không nhiều hơn 5 sự thế axit amin so với trình tự tham chiếu. Theo một số phương án,

TCRD thứ nhất này còn bao gồm đầu cùng amino peptit kết nối thứ nhất với miền xuyên màng và/hoặc TCRD thứ hai này còn bao gồm đầu cùng amino peptit kết nối thứ hai với miền xuyên màng. Theo một số phương án, peptit kết nối thứ nhất này bao gồm toàn bộ hoặc một phần của peptit kết nối của tiểu đơn vị TCR mà từ đó TCR-TM thứ nhất này thu được, hoặc biến thể của nó, và/hoặc peptit kết nối thứ hai này bao gồm toàn bộ hoặc một phần của peptit kết nối của tiểu đơn vị TCR mà từ đó TCR-TM thứ hai này thu được, hoặc biến thể của nó. Theo một số phương án, các peptit kết nối thứ nhất và/hoặc thứ hai này bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm toàn bộ hoặc một phần của peptit kết nối của miền không đổi chuỗi TCR α (*ví dụ*, SEQ ID NO: 1) hoặc biến thể của nó và toàn bộ hoặc một phần của peptit kết nối của miền không đổi chuỗi TCR β (*ví dụ*, SEQ ID NO: 2) hoặc biến thể của nó, tương ứng. Theo một số phương án, các peptit kết nối thứ nhất và/hoặc thứ hai này bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm toàn bộ hoặc một phần của peptit kết nối của SEQ ID NO: 27 hoặc 28, hoặc biến thể của nó, và toàn bộ hoặc một phần của peptit kết nối của SEQ ID NO: 29 hoặc 30, hoặc biến thể của nó, tương ứng. Theo một số phương án, các peptit kết nối thứ nhất và/hoặc thứ hai này bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm toàn bộ hoặc một phần của peptit kết nối của miền không đổi chuỗi TCR δ (*ví dụ*, SEQ ID NO: 3) hoặc biến thể của nó và toàn bộ hoặc một phần của peptit kết nối của miền không đổi chuỗi TCR γ (*ví dụ*, SEQ ID NO: 4) hoặc biến thể của nó, tương ứng. Theo một số phương án, các peptit kết nối thứ nhất và/hoặc thứ hai này bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm toàn bộ hoặc một phần của peptit kết nối của SEQ ID NO: 31 hoặc 32, hoặc biến thể của nó, và toàn bộ hoặc một phần của peptit kết nối của SEQ ID NO: 33 hoặc 34, hoặc biến thể của nó, tương ứng. Theo một số phương án, TCRD thứ nhất này còn bao gồm đầu cùng carboxy miền nội bào TCR thứ nhất đến TCR-TM thứ nhất và/hoặc TCRD thứ hai còn bao gồm đầu cùng carboxy miền nội bào TCR thứ hai đến TCR-TM thứ hai. Theo một số phương án, miền nội bào TCR bao gồm toàn bộ hoặc một phần của miền nội bào của tiểu đơn vị TCR mà từ đó TCR-TM thứ nhất này thu được, hoặc biến thể của nó, và/hoặc miền nội bào TCR thứ hai này bao gồm toàn bộ hoặc một phần của miền nội bào của tiểu đơn vị TCR mà từ đó TCR-TM thứ hai này thu được, hoặc biến thể của nó. Theo một số phương án, các miền nội bào TCR thứ hai này bao gồm trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin của các SEQ ID NO: 35-36, hoặc biến thể của chúng. Theo một số phương án, TCRD thứ nhất này là mảnh của một chuỗi trong số TCR xuất hiện tự nhiên, hoặc biến thể của nó, và/hoặc

TCRD thứ hai này là một mảnh của chuỗi còn lại của TCR xuất hiện tự nhiên, hoặc biến thể của nó. Theo một số phương án, ít nhất một trong số các TCRD này là không xuất hiện tự nhiên. Theo một số phương án, các TCRD thứ nhất và thứ hai này được liên kết bằng liên kết disulfit. Theo một số phương án, các TCRD thứ nhất và thứ hai này được liên kết bằng liên kết disulfit giữa gốc trên peptit kết nối thứ nhất và gốc trên peptit kết nối thứ hai. Theo một số phương án, TCRM này có khả năng huy động ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR được chọn từ nhóm bao gồm CD3δε, CD3γε, và ζζ. Theo một số phương án, TCRM này có khả năng huy động mỗi loại trong số CD3δε, CD3γε, và ζζ để tạo thành phức hợp caTCR-CD3 (*tức là*, xúc tiến sự hình thành phức hợp caTCR-CD3).

Các cấu trúc caTCR được dự tính bao gồm, ví dụ, các caTCR mà liên kết đặc hiệu với các kháng nguyên bề mặt tế bào, các caTCR mà liên kết đặc hiệu với các phức hợp peptit/MHC trình diện trên bề mặt tế bào, và các caTCR mà liên kết đặc hiệu với cả các kháng nguyên bề mặt tế bào và các phức hợp peptit/MHC trình diện trên bề mặt tế bào.

Theo một số phương án, môđun liên kết kháng nguyên này là gốc kháng thể được chọn từ nhóm bao gồm Fab, Fab', (Fab')2, Fv, hoặc Fv đơn chuỗi (scFv). Theo một số phương án, gốc kháng thể này là đặc hiệu đơn. Theo một số phương án, gốc kháng thể này là đa đặc hiệu. Theo một số phương án, gốc kháng thể này là đặc hiệu kép. Theo một số phương án, gốc kháng thể này là scFv nối tiếp, kháng thể dime (Db), kháng thể dime đơn chuỗi (scDb), kháng thể hướng đích lại ái lực kép (DART), kháng thể miền biến đổi kép (DVD), kháng thể liên kết chéo về mặt hóa học, kháng thể heteromultime, hoặc kháng thể liên hợp khác loại. Theo một số phương án, gốc kháng thể này là scFv nối tiếp bao gồm hai scFv được liên kết bởi cầu liên kết peptit. Theo một số phương án, gốc kháng thể này là hai scFv mà không được liên kết trực tiếp. Theo một số phương án, gốc kháng thể này là hoàn toàn của người, bán tổng hợp với các vùng khung kháng thể của người, hoặc được nhân hóa.

Theo một số phương án, môđun liên kết kháng nguyên này bao gồm miền liên kết kháng nguyên thứ nhất bao gồm miền kháng thể V_H và miền liên kết kháng nguyên thứ hai bao gồm miền kháng thể V_L. Theo một số phương án, các CDR miền kháng thể V_H và miền kháng thể V_L này thu được từ cùng gốc kháng thể. Theo một số phương án, một số trong số các CDR miền kháng thể V_H và miền kháng thể V_L này thu được từ các gốc

kháng thể khác nhau. Theo một số phương án, miền kháng thể V_H và/hoặc miền kháng thể V_L này là của người, được nhân hóa, khảm, bán tổng hợp, hoặc tổng hợp hoàn toàn.

Theo một số phương án, môđun liên kết kháng nguyên này là gốc kháng thể mà là bán tổng hợp, bao gồm các trình tự người đầy đủ và một hoặc nhiều vùng tổng hợp. Theo một số phương án, môđun liên kết kháng nguyên này là gốc kháng thể bán tổng hợp, bao gồm V_L người đầy đủ và V_H bán tổng hợp bao gồm các vùng FR1, HC-CDR1, FR2, HC-CDR2, FR3, và FR4 người đầy đủ và HC-CDR3 tổng hợp. Theo một số phương án, V_H bán tổng hợp này bao gồm HC-CDR3 tổng hợp hoàn toàn có trình tự dài từ khoảng 5 đến khoảng 25 (như khoảng giá trị bất kỳ trong số 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, hoặc 25) axit amin. Theo một số phương án, V_H bán tổng hợp hoặc HC-CDR3 tổng hợp thu được từ thư viện bán tổng hợp (như thư viện người bán tổng hợp) bao gồm các vùng HC-CDR3 tổng hợp hoàn toàn có trình tự dài từ khoảng 5 đến khoảng 25 (như khoảng giá trị bất kỳ trong số 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, hoặc 25) axit amin, trong đó mỗi axit amin trong trình tự này, độc lập với nhau, được chọn ngẫu nhiên từ các axit amin người chuẩn, trừ xystein. Theo một số phương án, HC-CDR3 tổng hợp này là dài từ khoảng 10 đến khoảng 19 (như khoảng giá trị bất kỳ trong số 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 hoặc 19) axit amin. Theo một số phương án, môđun liên kết kháng nguyên này là gốc kháng thể bán tổng hợp, bao gồm V_L bán tổng hợp và V_H bán tổng hợp. Theo một số phương án, môđun liên kết kháng nguyên này là gốc kháng thể tổng hợp hoàn toàn, bao gồm các sự bắt cặp khung V_H/V_L người cố định, nhưng là các trình tự ngẫu nhiên và tổng hợp cho tất cả 6 CDR của cả chuỗi nặng và chuỗi nhẹ.

Môđun liên kết kháng nguyên theo một số phương án là gốc kháng thể bao gồm trình tự CDR đặc trưng thu được từ một hoặc nhiều gốc kháng thể (như kháng thể đơn dòng) hoặc các biến thể cụ thể của các trình tự bày bao gồm một hoặc nhiều sự thế axit amin. Theo một số phương án, các sự thế axit amin trong các trình tự biến đổi không làm giảm đáng kể khả năng của môđun liên kết kháng nguyên liên kết với kháng nguyên đích. Các thay đổi mà cải thiện đáng kể ái lực liên kết kháng nguyên đích hoặc ảnh hưởng đến tính chất khác nào đó, như tính đặc hiệu và/hoặc khả năng phản ứng chéo với các biến thể liên quan của kháng nguyên đích này, cũng được dự tính.

Theo một số phương án, môđun ổn định hóa này thu được từ gốc kháng thể. Ví dụ, theo một số phương án, môđun ổn định hóa này bao gồm miền ổn định hóa thứ nhất bao gồm miền kháng thể C_H1 hoặc biến thể của nó và miền ổn định hóa thứ hai bao gồm miền kháng thể C_L hoặc biến thể của nó. Theo một phương án khác, môđun ổn định hóa này bao gồm miền ổn định hóa thứ nhất bao gồm miền kháng thể C_H3 hoặc biến thể của nó và miền ổn định hóa thứ hai bao gồm miền kháng thể C_H3 hoặc biến thể của nó. Theo một số phương án, các miền không đổi chuỗi nặng kháng thể (*ví dụ*, C_H1 hoặc C_H3) được chứa trong môđun ổn định hóa thu được từ chuỗi nặng IgG (*ví dụ*, IgG1, IgG2, IgG3, hoặc IgG4), IgA (*ví dụ*, IgA1 hoặc IgA2), IgD, IgM, hoặc IgE, tùy ý của người. Theo một số phương án, miền không đổi chuỗi nặng kháng thể (*ví dụ*, C_H1 hoặc C_H3) được chứa trong môđun ổn định hóa là biến thể bao gồm một hoặc nhiều cải biến (*ví dụ*, sự thế, sự chèn, và/hoặc sự loại bỏ axit amin) so với trình tự mà từ đó nó thu được. Theo một số phương án, các miền không đổi chuỗi nhẹ kháng thể (C_L) được chứa trong môđun ổn định hóa thu được từ chuỗi nhẹ kappa hoặc lambda, tùy ý của người. Theo một số phương án, miền không đổi chuỗi nhẹ kháng thể (C_L) được chứa trong môđun ổn định hóa là biến thể bao gồm một hoặc nhiều sự cải biến (*ví dụ*, sự thế, sự chèn, và/hoặc sự loại bỏ axit amin) so với trình tự mà từ đó nó thu được. Theo một số phương án, các miền ổn định hóa thứ nhất và/hoặc thứ hai này bao gồm một hoặc nhiều sự cải biến mà không thay đổi đáng kể ái lực liên kết của chúng với nhau. Theo một số phương án, các miền ổn định hóa thứ nhất và/hoặc thứ hai này bao gồm một hoặc nhiều sự cải biến mà làm tăng ái lực liên kết của chúng với nhau và/hoặc đưa vào liên kết disulfit không xuất hiện tự nhiên. Theo một số phương án, môđun ổn định hóa này bao gồm sự cải biến nút vào lỗ (knob-into-hole) (*xem*, ví dụ, Carter P. *J Immunol Methods*. 248:7–15, 2001). Ví dụ, theo một số phương án, môđun ổn định hóa này bao gồm các vùng miền không đổi kháng thể (*ví dụ*, các miền C_H3) bao gồm sự cải biến nút vào lỗ. Theo một số phương án, môđun ổn định hóa này bao gồm các vùng miền không đổi kháng thể (*ví dụ*, các miền C_H3) được cải biến bằng cách hướng tĩnh điện để tăng cường sự liên kết của chúng (*xem*, ví dụ, WO2006106905 và Gunasekaran K, *et al. J Biol Chem*. 285:19637–46, 2010). Theo một số phương án, các miền ổn định hóa thứ nhất và thứ hai này được liên kết bởi liên kết disulfit.

Theo một số phương án, caTCR này bao gồm môđun liên kết kháng nguyên được mô tả ở đây liên kết với TCRM được mô tả ở đây, tùy ý bao gồm môđun ổn định hóa. Ví dụ, theo một số phương án, caTCR này bao gồm môđun liên kết kháng nguyên liên kết với đầu cùng N của một hoặc cả hai TCRD. Theo một số phương án, caTCR này bao gồm môđun ổn định hóa nằm giữa TCRM và môđun liên kết kháng nguyên. Theo một số phương án, caTCR này còn bao gồm môđun đệm nằm giữa hai môđun hoặc miền caTCR bất kỳ. Theo một số phương án, môđun đệm này bao gồm một hoặc nhiều cầu nối peptit có chiều dài nằm trong khoảng từ khoảng 5 đến khoảng 70 (như khoảng giá trị bất kỳ trong số 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, hoặc 70, bao gồm khoảng bất kỳ trong số các giá trị này) axit amin. Theo một số phương án, caTCR này còn bao gồm một hoặc nhiều miền nội bào đi kèm. Theo một số phương án, một hoặc nhiều miền nội bào đi kèm này là đầu cùng carboxy đến TCRD thứ nhất và/hoặc thứ hai. Theo một số phương án, một hoặc nhiều miền nội bào đi kèm này là nằm giữa TCR-TM thứ nhất và miền nội bào TCR thứ nhất và/hoặc giữa TCR-TM thứ hai và miền nội bào TCR thứ hai. Theo một số phương án, một hoặc nhiều miền nội bào đi kèm này bao gồm, một cách riêng rẽ, miền đồng kích thích TCR. Theo một số phương án, miền đồng kích thích TCR này bao gồm toàn bộ hoặc một phần của miền nội bào của phân tử đồng kích thích miễn dịch (như CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, ICOS, kháng nguyên liên kết với chức năng lympho bào 1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, phối tử liên kết đặc hiệu với CD83, và loại tương tự). Theo một số phương án, miền đồng kích thích TCR này bao gồm toàn bộ hoặc một phần của trình tự axit amin theo trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 51-56, hoặc biến thể của nó.

Theo một số phương án, môđun liên kết kháng nguyên này liên kết đặc hiệu kháng nguyên bề mặt tế bào. Theo một số phương án, kháng nguyên bề mặt tế bào này được chọn từ nhóm bao gồm protein, hydrat cacbon, và lipit. Theo một số phương án, kháng nguyên bề mặt tế bào này là kháng nguyên liên kết với bệnh được biểu hiện trong tế bào bị bệnh. Theo một số phương án, môđun liên kết kháng nguyên này liên kết đặc hiệu với phức hợp bao gồm peptit và protein MHC. Phức hợp peptit/MHC bao gồm, ví dụ, phức hợp trình diện bề mặt bao gồm peptit thu được từ kháng nguyên liên kết với bệnh được biểu hiện ở tế bào bị bệnh và protein MHC. Theo một số phương án, kháng nguyên liên kết với bệnh chiều dài đầy đủ này không được biểu hiện bình thường trên bề mặt

của tế bào bị bệnh (*ví dụ*, kháng nguyên liên kết với bệnh này là protein nội bào hoặc được tiết). Theo một số phương án, bệnh này là bệnh ung thư và kháng nguyên liên kết với bệnh này là kháng nguyên liên kết với khối u được biểu hiện ở tế bào ung thư. Theo một số phương án, kháng nguyên liên kết với khối u này là protein gây ung thư. Theo một số phương án, protein gây ung thư này là kết quả của đột biến ở gen tiền sinh ung thư, và protein gây ung thư này bao gồm neoepitop bao gồm đột biến này. Ví dụ, theo một số phương án, môđun liên kết kháng nguyên này liên kết đặc hiệu kháng nguyên liên kết với khối u bề mặt tế bào (*ví dụ*, protein gây ung thư bao gồm neoepitop). Theo một số phương án, môđun liên kết kháng nguyên này liên kết đặc hiệu với phức hợp bao gồm peptit thu được từ kháng nguyên liên kết với khối u (*ví dụ*, protein gây ung thư bao gồm neoepitop) không được biểu hiện bình thường trên bề mặt của tế bào ung thư (*ví dụ*, kháng nguyên liên kết với khối u nội bào hoặc được tiết) và protein MHC. Theo một số phương án, bệnh này là bệnh nhiễm virut và kháng nguyên liên kết với bệnh này là kháng nguyên liên kết với virut trong tế bào bị nhiễm. Ví dụ, theo một số phương án, môđun liên kết kháng nguyên này liên kết đặc hiệu với kháng nguyên liên kết với virut bề mặt tế bào. Theo một số phương án, môđun liên kết kháng nguyên này liên kết đặc hiệu với phức hợp bao gồm peptit thu được từ kháng nguyên liên kết với virut không được biểu hiện bình thường trên bề mặt của tế bào bị nhiễm virut (*ví dụ*, kháng nguyên liên kết với virut nội bào hoặc được tiết) và protein MHC. Theo một số phương án, cấu trúc caTCR này liên kết kháng nguyên đích với K_d nằm trong khoảng từ khoảng 0,1 pM đến khoảng 500 nM (như khoảng giá trị bất kỳ trong số 0,1 pM, 1,0 pM, 10 pM, 50 pM, 100 pM, 500 pM, 1 nM, 10 nM, 50 nM, 100 nM, hoặc 500 nM, bao gồm khoảng bất kỳ nằm giữa các giá trị này).

Theo một số phương án, caTCR này bao gồm môđun liên kết kháng nguyên mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên bề mặt tế bào, trong đó kháng nguyên bề mặt tế bào này là CD19, CD20, CD22, CD47, GPC-3, ROR1, ROR2, BCMA, GPRC5D, hoặc FCRL5, bao gồm các biến thể hoặc các đột biến của nó. Sự liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đầy đủ, ví dụ, kháng nguyên bề mặt tế bào, đôi khi còn được gọi là "liên kết không bị hạn chế bởi MHC".

Theo một số phương án, caTCR này bao gồm môđun liên kết kháng nguyên mà liên kết đặc hiệu với phức hợp bao gồm peptit và protein MHC, trong đó peptit này thu

được từ protein được chọn từ nhóm bao gồm WT-1, AFP, HPV16-E7, NY-ESO-1, PRAME, EBV-LMP2A, HIV-1, KRAS, Histon H3.3, và PSA, bao gồm các biến thể hoặc các đột biến của nó. Sự liên kết đặc hiệu với phức hợp bao gồm peptit và protein MHC đôi khi còn được gọi là "liên kết bị hạn chế bởi MHC".

Theo một số phương án, caTCR này bao gồm môđun liên kết kháng nguyên mà liên kết đặc hiệu với phức hợp bao gồm peptit thu được từ kháng nguyên liên kết với bệnh (như kháng nguyên liên kết với khối u hoặc kháng nguyên được mã hóa bởi virut) và protein MHC lớp I, trong đó protein MHC lớp I này là HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F, hoặc HLA-G. Theo một số phương án, protein MHC lớp I này là HLA-A, HLA-B, hoặc HLA-C. Theo một số phương án, protein MHC lớp I này là HLA-A. Theo một số phương án, protein MHC lớp I này là HLA-B. Theo một số phương án, protein MHC lớp I này là HLA-C. Theo một số phương án, protein MHC lớp I này là HLA-A01, HLA-A02, HLA-A03, HLA-A09, HLA-A10, HLA-A11, HLA-A19, HLA-A23, HLA-A24, HLA-A25, HLA-A26, HLA-A28, HLA-A29, HLA-A30, HLA-A31, HLA-A32, HLA-A33, HLA-A34, HLA-A36, HLA-A43, HLA-A66, HLA-A68, HLA-A69, HLA-A74, hoặc HLA-A80. Theo một số phương án, protein MHC lớp I này là HLA-A02. Theo một số phương án, protein MHC lớp I này là loại bất kỳ trong số HLA-A*02:01-555, như HLA-A*02:01, HLA-A*02:02, HLA-A*02:03, HLA-A*02:04, HLA-A*02:05, HLA-A*02:06, HLA-A*02:07, HLA-A*02:08, HLA-A*02:09, HLA-A*02:10, HLA-A*02:11, HLA-A*02:12, HLA-A*02:13, HLA-A*02:14, HLA-A*02:15, HLA-A*02:16, HLA-A*02:17, HLA-A*02:18, HLA-A*02:19, HLA-A*02:20, HLA-A*02:21, HLA-A*02:22, hoặc HLA-A*02:24. Theo một số phương án, protein MHC lớp I này là HLA-A*02:01.

Theo một số phương án, caTCR này bao gồm môđun liên kết kháng nguyên mà liên kết đặc hiệu với phức hợp bao gồm peptit thu được từ kháng nguyên liên kết với bệnh (như kháng nguyên liên kết với khối u hoặc kháng nguyên được mã hóa bởi virut) và protein MHC lớp II, trong đó protein MHC lớp II này là HLA-DP, HLA-DQ, hoặc HLA-DR. Theo một số phương án, protein MHC lớp II này là HLA-DP. Theo một số phương án, protein MHC lớp II này là HLA-DQ. Theo một số phương án, protein MHC lớp II này là HLA-DR.

Theo một số phương án, caTCR được mô tả ở đây bao gồm a) môđun liên kết kháng nguyên mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích, và b) TCRM bao gồm các TCR-TM thứ nhất và thứ hai thu được từ các miền xuyên màng của TCR (như αβTCR hoặc γδTCR), trong đó TCRM này có khả năng huy động ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR. Theo một số phương án, môđun liên kết kháng nguyên này được liên kết với các đầu cùng amino của một hoặc nhiều chuỗi polypeptit trong TCRM. Ví dụ, theo một số phương án, TCRM này bao gồm hai chuỗi polypeptit, và môđun liên kết kháng nguyên này được liên kết với các đầu cùng amino của một hoặc cả hai chuỗi polypeptit TCRM. Theo một số phương án, các TCR-TM thứ nhất và thứ hai này đều là xuất hiện tự nhiên. Theo một số phương án, ít nhất một trong số các TCR-TM này là không xuất hiện tự nhiên. Theo một số phương án, các TCR-TM thứ nhất và thứ hai này đều không xuất hiện tự nhiên. Theo một số phương án, TCRM này còn bao gồm ít nhất một peptit kết nối hoặc mảnh của nó của đầu cùng amino TCR đến TCR-TM. Theo một số phương án, TCRM này còn bao gồm ít nhất một miền nội bào TCR bao gồm trình tự từ miền nội bào của đầu cùng carboxy TCR đến TCR-TM. Theo một số phương án, TCRM này bao gồm các TCRD thu được từ các mảnh của các chuỗi TCR. Theo một số phương án, ít nhất một trong số các TCRD này là không xuất hiện tự nhiên. Theo một số phương án, caTCR này còn bao gồm ít nhất một miền nội bào kèm theo bao gồm đầu cùng carboxy trình tự truyền tín hiệu đồng kích thích tế bào T (như từ CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, hoặc CD40) đến TCR-TM. Theo một số phương án, caTCR này thiếu trình tự truyền tín hiệu đồng kích thích. Theo một số phương án, môđun liên kết kháng nguyên này là gốc kháng thể. Theo một số phương án, gốc kháng thể này bao gồm miền kháng thể V_H và miền kháng thể V_L. Theo một số phương án, gốc kháng thể này là của người, được nhân hóa, khảm, bán tổng hợp, hoặc tổng hợp hoàn toàn. Theo một số phương án, caTCR này còn bao gồm môđun ổn định hóa bao gồm miền ổn định hóa thứ nhất và miền ổn định hóa thứ hai, trong đó miền ổn định hóa thứ nhất và thứ hai này có ái lực liên kết với nhau mà ổn định hóa caTCR. Theo một số phương án, môđun ổn định hóa này bao gồm ít nhất một liên kết disulfit nối các miền ổn định hóa. Theo một số phương án, các miền ổn định hóa thứ nhất và thứ hai này bao gồm các miền kháng thể, như miền kháng thể C_H1 và C_L, hoặc các biến thể của nó. Theo một số phương án, TCRM này có khả năng huy động ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR được chọn từ nhóm bao gồm CD3δε, CD3γε, và ζζ. Theo một số phương án, TCRM

này cho phép sự huy động được tăng cường của ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR khi so sánh với TCRM bao gồm các miền xuyên màng thụ thể tế bào T. Theo một số phương án, TCRM này thúc đẩy sự tạo thành phức hợp caTCR-CD3. Theo một số phương án, có môđun đệm giữa hai môđun hoặc miền caTCR bất kỳ. Theo một số phương án, caTCR này là heteromultime, như heterodime. Ví dụ, theo một số phương án, caTCR này là heterodime bao gồm chuỗi polypeptit thứ nhất bao gồm TCRD thứ nhất và chuỗi polypeptit thứ hai bao gồm TCRD thứ hai, trong đó môđun liên kết kháng nguyên này được liên kết với các chuỗi polypeptit thứ nhất và/hoặc thứ hai này. Theo một số phương án, môđun liên kết kháng nguyên này là đa đặc hiệu (như đặc hiệu kép).

Theo một số phương án, caTCR được mô tả ở đây liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích, bao gồm a) TCRD thứ nhất bao gồm TCR-TM thứ nhất thu được từ một trong số các miền xuyên màng của TCR và TCRD thứ hai bao gồm TCR-TM thứ hai thu được từ miền xuyên màng còn lại của TCR, trong đó các TCRD thứ nhất và thứ hai này tạo thành TCRM mà có khả năng huy động ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR; và b) môđun liên kết kháng nguyên mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích, trong đó môđun liên kết kháng nguyên này được liên kết với các TCRD thứ nhất và/hoặc thứ hai này. Theo một số phương án, cả hai TCR-TM này đều xuất hiện tự nhiên. Theo một số phương án, ít nhất một trong số các TCR-TM này là không xuất hiện tự nhiên. Theo một số phương án, TCR này là αβ TCR và các TCR-TM thứ nhất và thứ hai thu được từ các miền xuyên màng tiểu đơn vị TCR α và β. Theo một số phương án, TCR này là γδ TCR và các TCR-TM thứ nhất và thứ hai này thu được từ các miền xuyên màng tiểu đơn vị TCR γ và δ. Theo một số phương án, TCRD thứ nhất này còn bao gồm peptit kết nối TCR thứ nhất hoặc mảnh của nó và/hoặc TCRD thứ hai này còn bao gồm peptit kết nối TCR thứ hai hoặc mảnh của nó. Theo một số phương án, peptit kết nối thứ nhất này bao gồm toàn bộ hoặc một phần của peptit kết nối của tiểu đơn vị TCR mà từ đó TCR-TM thứ nhất này thu được, hoặc biến thể của nó, và/hoặc peptit kết nối thứ hai này bao gồm toàn bộ hoặc một phần của peptit kết nối của tiểu đơn vị TCR mà từ đó TCR-TM thứ hai này thu được, hoặc biến thể của nó. Theo một số phương án, các peptit kết nối thứ nhất và thứ hai này được liên kết bằng liên kết disulfit. Theo một số phương án, TCRD thứ nhất còn này bao gồm miền nội bào TCR thứ nhất và/hoặc TCRD thứ hai này còn bao gồm miền nội bào TCR thứ hai. Theo một số phương án, miền nội bào TCR

thứ nhất này bao gồm trình tự từ miền nội bào của tiểu đơn vị TCR mà từ đó TCR-TM thứ nhất thu được và/hoặc miền nội bào TCR thứ hai này bao gồm trình tự từ miền nội bào của tiểu đơn vị TCR mà từ đó TCR-TM thứ hai thu được. Theo một số phương án, TCRD thứ nhất này là mảnh của tiểu đơn vị TCR mà từ đó TCR-TM thứ nhất này thu được và/hoặc TCRD thứ hai này là mảnh của tiểu đơn vị TCR mà từ đó TCR-TM thứ hai thu được. Theo một số phương án, caTCR này còn bao gồm ít nhất một miền nội bào kèm theo bao gồm trình tự tín hiệu đồng kích thích tế bào T (như từ CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, hoặc CD40). Theo một số phương án, caTCR này còn bao gồm môđun ổn định hóa bao gồm miền ổn định hóa thứ nhất và miền ổn định hóa thứ hai, trong đó miền ổn định hóa thứ nhất và thứ hai này có ái lực liên kết với nhau mà ổn định hóa caTCR. Theo một số phương án, các miền ổn định hóa thứ nhất và thứ hai này được liên kết bởi liên kết disulfit. Theo một số phương án, các miền ổn định hóa thứ nhất và thứ hai này bao gồm các miền kháng thể, như miền kháng thể C_H1 và C_L, hoặc các biến thể của nó. Theo một số phương án, TCRM này có khả năng huy động ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR được chọn từ nhóm bao gồm CD3δε, CD3γε, và ζζ. Theo một số phương án, TCRM này cho phép sự huy động được tăng cường của ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR khi so sánh với TCRM bao gồm các miền xuyên màng thụ thể tế bào T. Theo một số phương án, TCRM này thúc đẩy sự tạo thành phức hợp caTCR-CD3. Theo một số phương án, có môđun đệm giữa hai môđun hoặc miền caTCR bất kỳ. Theo một số phương án, môđun liên kết kháng nguyên này là gốc kháng thể. Theo một số phương án, gốc kháng thể này là Fab, Fab', (Fab')2, Fv, hoặc Fv đơn chuỗi (scFv). Theo một số phương án, môđun liên kết kháng nguyên này là đa đặc hiệu (như đặc hiệu kép).

Theo một số phương án, caTCR được mô tả ở đây liên kết đặc hiệu kháng nguyên đích, bao gồm a) TCRD thứ nhất bao gồm TCR-TM thứ nhất thu được từ một trong số các miền xuyên màng của αβ TCR xuất hiện tự nhiên và TCRD thứ hai bao gồm TCR-TM thứ hai thu được từ miền xuyên màng còn lại của αβ TCR xuất hiện tự nhiên, trong đó các TCRD thứ nhất và thứ hai này tạo thành TCRM mà có khả năng huy động ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR; và b) môđun liên kết kháng nguyên mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích, trong đó môđun liên kết kháng nguyên này được liên kết với các TCRD thứ nhất và/hoặc thứ hai này. Theo một số phương án, cả

hai TCR-TM này đều xuất hiện tự nhiên. Theo một số phương án, ít nhất một trong số các TCR-TM này là không xuất hiện tự nhiên. Theo một số phương án, TCRD thứ nhất này còn bao gồm peptit kết nối TCR thứ nhất hoặc mảnh của nó và/hoặc TCRD thứ hai này còn bao gồm peptit kết nối TCR thứ hai hoặc mảnh của nó. Theo một số phương án, peptit kết nối thứ nhất này bao gồm toàn bộ hoặc một phần của peptit kết nối của tiểu đơn vị TCR mà từ đó TCR-TM thứ nhất này thu được, hoặc biến thể của nó, và/hoặc peptit kết nối thứ hai này bao gồm toàn bộ hoặc một phần của peptit kết nối của tiểu đơn vị TCR mà từ đó TCR-TM thứ hai này thu được, hoặc biến thể của nó. Theo một số phương án, các peptit kết nối thứ nhất và thứ hai này được liên kết bằng liên kết disulfit. Theo một số phương án, TCRD thứ nhất còn này bao gồm miền nội bào TCR thứ nhất và/hoặc TCRD thứ hai này còn bao gồm miền nội bào TCR thứ hai. Theo một số phương án, miền nội bào TCR thứ nhất này bao gồm trình tự từ miền nội bào của tiểu đơn vị TCR mà từ đó TCR-TM thứ nhất thu được và/hoặc miền nội bào TCR thứ hai này bao gồm trình tự từ miền nội bào của tiểu đơn vị TCR mà từ đó TCR-TM thứ hai thu được. Theo một số phương án, TCRD thứ nhất này là mảnh của tiểu đơn vị TCR mà từ đó TCR-TM thứ nhất này thu được và/hoặc TCRD thứ hai này là mảnh của tiểu đơn vị TCR mà từ đó TCR-TM thứ hai thu được. Theo một số phương án, caTCR này còn bao gồm ít nhất một miền nội bào kèm theo bao gồm trình tự tín hiệu đồng kích thích tế bào T (như từ CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, hoặc CD40). Theo một số phương án, caTCR này còn bao gồm môđun ổn định hóa bao gồm miền ổn định hóa thứ nhất và miền ổn định hóa thứ hai, trong đó miền ổn định hóa thứ nhất và thứ hai này có ái lực liên kết với nhau mà ổn định hóa caTCR. Theo một số phương án, các miền ổn định hóa thứ nhất và thứ hai này được liên kết bởi liên kết disulfit. Theo một số phương án, các miền ổn định hóa thứ nhất và thứ hai này bao gồm các miền kháng thể, như miền kháng thể C_H1 và C_L, hoặc các biến thể của nó. Theo một số phương án, TCRM này có khả năng huy động ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR được chọn từ nhóm bao gồm CD3δε, CD3γε, và ζζ. Theo một số phương án, TCRM này cho phép sự huy động được tăng cường của ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR khi so sánh với TCRM bao gồm các miền xuyên màng thụ thể tế bào T αβ xuất hiện tự nhiên . Theo một số phương án, TCRM này thúc đẩy sự tạo thành phức hợp caTCR-CD3. Theo một số phương án, có môđun đệm giữa hai môđun hoặc miền caTCR bất kỳ. Theo một số phương án, môđun liên kết kháng nguyên này là gốc kháng thể. Theo một số phương

án, gốc kháng thể này là Fab, Fab', (Fab')2, Fv, hoặc Fv đơn chuỗi (scFv). Theo một số phương án, môđun liên kết kháng nguyên này là đa đặc hiệu (như đặc hiệu kép).

Theo một số phương án, caTCR được mô tả ở đây liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích, bao gồm a) TCRD thứ nhất bao gồm TCR-TM thứ nhất thu được từ một trong số các miền xuyên màng của γδ TCR xuất hiện tự nhiên và TCRD thứ hai bao gồm TCR-TM thứ hai thu được từ miền xuyên màng còn lại của γδ TCR xuất hiện tự nhiên, trong đó các TCRD thứ nhất và thứ hai này tạo thành TCRM mà có khả năng huy động ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR; và b) môđun liên kết kháng nguyên mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích, trong đó môđun liên kết kháng nguyên này được liên kết với các TCRD thứ nhất và/hoặc thứ hai này. Theo một số phương án, cả hai TCR-TM này đều xuất hiện tự nhiên. Theo một số phương án, ít nhất một trong số các TCR-TM này là không xuất hiện tự nhiên. Theo một số phương án, TCRD thứ nhất này còn bao gồm peptit kết nối TCR thứ nhất hoặc mảnh của nó và/hoặc TCRD thứ hai này còn bao gồm peptit kết nối TCR thứ hai hoặc mảnh của nó. Theo một số phương án, peptit kết nối thứ nhất này bao gồm toàn bộ hoặc một phần của peptit kết nối của tiểu đơn vị TCR mà từ đó TCR-TM thứ nhất này thu được, hoặc biến thể của nó, và/hoặc peptit kết nối thứ hai này bao gồm toàn bộ hoặc một phần của peptit kết nối của tiểu đơn vị TCR mà từ đó TCR-TM thứ hai này thu được, hoặc biến thể của nó. Theo một số phương án, các peptit kết nối thứ nhất và thứ hai này được liên kết bằng liên kết disulfit. Theo một số phương án, TCRD thứ nhất còn này bao gồm miền nội bào TCR thứ nhất và/hoặc TCRD thứ hai này còn bao gồm miền nội bào TCR thứ hai. Theo một số phương án, miền nội bào TCR thứ nhất này bao gồm trình tự từ miền nội bào của tiểu đơn vị TCR mà từ đó TCR-TM thứ nhất thu được và/hoặc miền nội bào TCR thứ hai này bao gồm trình tự từ miền nội bào của tiểu đơn vị TCR mà từ đó TCR-TM thứ hai thu được. Theo một số phương án, TCRD thứ nhất này là mảnh của tiểu đơn vị TCR mà từ đó TCR-TM thứ nhất này thu được và/hoặc TCRD thứ hai này là mảnh của tiểu đơn vị TCR mà từ đó TCR-TM thứ hai thu được. Theo một số phương án, caTCR này còn bao gồm ít nhất một miền nội bào kèm theo bao gồm trình tự tín hiệu đồng kích thích tế bào T (như từ CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, hoặc CD40). Theo một số phương án, caTCR này còn bao gồm môđun ổn định hóa bao gồm miền ổn định hóa thứ nhất và miền ổn định hóa thứ hai, trong đó miền ổn định hóa thứ nhất và thứ hai

này có ái lực liên kết với nhau mà ổn định hóa caTCR. Theo một số phương án, các miền ổn định hóa thứ nhất và thứ hai này được liên kết bởi liên kết disulfit. Theo một số phương án, các miền ổn định hóa thứ nhất và thứ hai này bao gồm các miền kháng thể, như miền kháng thể C_H1 và C_L, hoặc các biến thể của nó. Theo một số phương án, TCRM này có khả năng huy động ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR được chọn từ nhóm bao gồm CD3δε, CD3γε, và ζζ. Theo một số phương án, TCRM này cho phép sự huy động được tăng cường của ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR khi so sánh với TCRM bao gồm các miền xuyên màng thụ thể tế bào T γδ xuất hiện tự nhiên. Theo một số phương án, TCRM này thúc đẩy sự tạo thành phức hợp caTCR-CD3. Theo một số phương án, có môđun đệm giữa hai môđun hoặc miền caTCR bất kỳ. Theo một số phương án, môđun liên kết kháng nguyên này là gốc kháng thể. Theo một số phương án, gốc kháng thể này là Fab, Fab', (Fab')2, Fv, hoặc Fv đơn chuỗi (scFv). Theo một số phương án, môđun liên kết kháng nguyên này là đa đặc hiệu (như đặc hiệu kép).

Theo một số phương án, caTCR được mô tả ở đây liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích, bao gồm a) TCRD thứ nhất bao gồm TCR-TM thứ nhất thu được từ miền xuyên màng được chứa trong một trong số các trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 và SEQ ID NO: 2 và TCRD thứ hai bao gồm TCR-TM thứ hai thu được từ miền xuyên màng được chứa trong trình tự axit amin còn lại, trong đó các TCRD thứ nhất và thứ hai này tạo thành TCRM mà có khả năng huy động ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR; và b) môđun liên kết kháng nguyên mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích, trong đó môđun liên kết kháng nguyên này được liên kết đặc hiệu với các TCRD thứ nhất và/hoặc thứ hai này. Theo một số phương án, cả hai TCR-TM này đều xuất hiện tự nhiên. Theo một số phương án, ít nhất một trong số các TCR-TM này là không xuất hiện tự nhiên. Theo một số phương án, TCRD thứ nhất này còn bao gồm peptit kết nối TCR thứ nhất hoặc mảnh của nó và/hoặc TCRD thứ hai này còn bao gồm peptit kết nối TCR thứ hai hoặc mảnh của nó. Theo một số phương án, peptit kết nối thứ nhất và peptit kết nối thứ hai này mỗi loại bao gồm, một cách độc lập với nhau, trình tự axit amin của peptit kết nối được chứa trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin của các SEQ ID NO: 1-4, hoặc biến thể của nó. Theo một số phương án, peptit kết nối thứ nhất và peptit kết nối thứ hai này mỗi loại bao gồm, một cách độc lập với nhau, trình

tự axit amin của trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 27-34, hoặc biến thể của nó. Theo một số phương án, các peptit kết nối thứ nhất và thứ hai này được liên kết bằng liên kết disulfit. Theo một số phương án, TCRD thứ nhất còn này bao gồm miền nội bào TCR thứ nhất và/hoặc TCRD thứ hai này còn bao gồm miền nội bào TCR thứ hai. Theo một số phương án, miền nội bào TCR thứ nhất và miền nội bào TCR thứ hai này mỗi loại bao gồm, một cách độc lập với nhau, trình tự axit amin của miền nội bào được chứa trong trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1-4, hoặc biến thể của nó. Theo một số phương án, miền nội bào TCR thứ nhất và miền nội bào TCR thứ hai này mỗi loại bao gồm, một cách độc lập với nhau, trình tự axit amin của SEQ ID NO: 35 hoặc 36, hoặc biến thể của nó. Theo một số phương án, caTCR này còn bao gồm ít nhất một miền nội bào kèm theo bao gồm trình tự tín hiệu đồng kích thích tế bào T (như từ CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, hoặc CD40). Theo một số phương án, caTCR này còn bao gồm môđun ổn định hóa bao gồm miền ổn định hóa thứ nhất và miền ổn định hóa thứ hai, trong đó miền ổn định hóa thứ nhất và thứ hai này có ái lực liên kết với nhau mà ổn định hóa caTCR. Theo một số phương án, các miền ổn định hóa thứ nhất và thứ hai này được liên kết bởi liên kết disulfit. Theo một số phương án, các miền ổn định hóa thứ nhất và thứ hai này bao gồm các miền kháng thể, như miền kháng thể C_H1 và C_L, hoặc các biến thể của nó. Theo một số phương án, TCRM này có khả năng huy động ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR được chọn từ nhóm bao gồm CD3δε, CD3γε, và ζζ. Theo một số phương án, TCRM này cho phép sự huy động được tăng cường của ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR khi so sánh với TCRM bao gồm các miền xuyên màng thụ thể tế bào T có các trình tự của các miền xuyên màng được chứa trong các SEQ ID NO: 1 và 2. Theo một số phương án, TCRM này thúc đẩy sự tạo thành phức hợp caTCR-CD3. Theo một số phương án, có môđun đệm giữa hai môđun hoặc miền caTCR bất kỳ. Theo một số phương án, môđun liên kết kháng nguyên này là gốc kháng thể. Theo một số phương án, gốc kháng thể này là Fab, Fab', (Fab')2, Fv, hoặc Fv đơn chuỗi (scFv). Theo một số phương án, môđun liên kết kháng nguyên này là đa đặc hiệu (như đặc hiệu kép).

Theo một số phương án, caTCR được mô tả ở đây liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích, bao gồm a) TCRD thứ nhất bao gồm TCR-TM thứ nhất thu được từ miền xuyên màng được chứa trong một trong số các trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 và

SEQ ID NO: 2 và TCRD thứ hai bao gồm TCR-TM thứ hai thu được từ miền xuyên màng được chứa trong trình tự axit amin còn lại, trong đó ít nhất một trong số các TCR-TM này bao gồm một hoặc nhiều (như 2, 3, 4, 5, hoặc nhiều hơn) sự thế axit amin so với trình tự axit amin mà từ đó nó thu được, và các TCRD thứ nhất và thứ hai này tạo thành TCRM mà có khả năng huy động ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR; và b) môđun liên kết kháng nguyên mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích, trong đó môđun liên kết kháng nguyên này được liên kết với các TCRD thứ nhất và/hoặc thứ hai này. Theo một số phương án, mỗi loại trong số các TCR-TM này bao gồm, một cách độc lập với nhau, một hoặc nhiều (như 2, 3, 4, 5, hoặc nhiều hơn) sự thế axit amin so với trình tự axit amin mà từ đó nó thu được. Theo một số phương án, TCR-TM thứ nhất và/hoặc TCR-TM thứ hai này mỗi loại bao gồm, một cách độc lập với nhau, không nhiều hơn 5 sự thế axit amin so với các trình tự axit amin mà từ đó chúng thu được. Theo một số phương án, ít nhất một trong số các TCR-TM này bao gồm sự thế axit amin đơn so với trình tự axit amin mà từ đó nó thu được. Theo một số phương án, mỗi loại trong số các TCR-TM này bao gồm sự thế axit amin đơn so với trình tự axit amin mà từ đó nó thu được. Theo một số phương án, ít nhất một trong số các axit amin được thế này trong TCR-TM thứ nhất được định vị sao cho ở caTCR này nó có thể tương tác với ít nhất một trong số các axit amin được thế ở TCR-TM thứ hai. Theo một số phương án, TCRD thứ nhất này còn bao gồm peptit kết nối TCR thứ nhất hoặc mảnh của nó và/hoặc TCRD thứ hai này còn bao gồm peptit kết nối TCR thứ hai hoặc mảnh của nó. Theo một số phương án, peptit kết nối thứ nhất và peptit kết nối thứ hai này mỗi loại bao gồm, một cách độc lập với nhau, trình tự axit amin của peptit kết nối được chứa trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin của các SEQ ID NO: 1-4, hoặc biến thể của nó. Theo một số phương án, peptit kết nối thứ nhất và peptit kết nối thứ hai này mỗi loại bao gồm, một cách độc lập với nhau, trình tự axit amin của trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 27-34, hoặc biến thể của nó. Theo một số phương án, các peptit kết nối thứ nhất và thứ hai này được liên kết bằng liên kết disulfit. Theo một số phương án, TCRD thứ nhất còn này bao gồm miền nội bào TCR thứ nhất và/hoặc TCRD thứ hai này còn bao gồm miền nội bào TCR thứ hai. Theo một số phương án, miền nội bào TCR thứ nhất và miền nội bào TCR thứ hai này mỗi loại bao gồm, một cách độc lập với nhau, trình tự axit amin của miền nội bào được chứa trong trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1-4, hoặc biến thể của nó. Theo một số phương án, miền nội bào TCR thứ nhất và miền nội

bào TCR thứ hai này mỗi loại bao gồm, một cách độc lập với nhau, trình tự axit amin của SEQ ID NO: 35 hoặc 36, hoặc biến thể của nó. Theo một số phương án, caTCR này còn bao gồm ít nhất một miền nội bào kèm theo bao gồm trình tự tín hiệu đồng kích thích tế bào T (như từ CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, hoặc CD40). Theo một số phương án, caTCR này còn bao gồm môđun ổn định hóa bao gồm miền ổn định hóa thứ nhất và miền ổn định hóa thứ hai, trong đó miền ổn định hóa thứ nhất và thứ hai này có ái lực liên kết với nhau mà ổn định hóa caTCR. Theo một số phương án, các miền ổn định hóa thứ nhất và thứ hai này được liên kết bởi liên kết disulfit. Theo một số phương án, các miền ổn định hóa thứ nhất và thứ hai này bao gồm các miền kháng thể, như miền kháng thể C_H1 và C_L, hoặc các biến thể của nó. Theo một số phương án, TCRM này có khả năng huy động ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR được chọn từ nhóm bao gồm CD3δε, CD3γε, và ζζ. Theo một số phương án, TCRM này cho phép sự huy động được tăng cường của ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR khi so sánh với TCRM bao gồm các miền xuyên màng thụ thể tế bào T có các trình tự của các miền xuyên màng được chứa trong các SEQ ID NO: 1 và 2. Theo một số phương án, TCRM này thúc đẩy sự tạo thành phức hợp caTCR-CD3. Theo một số phương án, có môđun đệm giữa hai môđun hoặc miền caTCR bất kỳ. Theo một số phương án, môđun liên kết kháng nguyên này là gốc kháng thể. Theo một số phương án, gốc kháng thể này là Fab, Fab', (Fab')2, Fv, hoặc Fv đơn chuỗi (scFv). Theo một số phương án, môđun liên kết kháng nguyên này là đa đặc hiệu (như đặc hiệu kép).

Theo một số phương án, caTCR được mô tả ở đây liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích, bao gồm a) TCRD thứ nhất bao gồm TCR-TM thứ nhất thu được từ miền xuyên màng được chứa trong một trong số các trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 và SEQ ID NO: 2 và TCRD thứ hai bao gồm TCR-TM thứ hai thu được từ miền xuyên màng được chứa trong trình tự axit amin còn lại, trong đó ít nhất một trong số các TCR-TM này bao gồm trình tự khảm bao gồm một phần của các axit amin liên tiếp từ miền xuyên màng được chứa trong SEQ ID NO: 3 hoặc 4, và các TCRD thứ nhất và thứ hai tạo thành TCRM mà có khả năng huy động ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR; và b) môđun liên kết kháng nguyên mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích, trong đó môđun liên kết kháng nguyên này được liên kết với các TCRD thứ nhất và/hoặc thứ hai này. Theo một số phương án, mỗi loại trong số các TCR-TM này bao

gồm, một cách độc lập với nhau, trình tự khảm bao gồm một phần của các axit amin liên tiếp từ miền xuyên màng được chứa trong SEQ ID NO: 3 hoặc 4. Theo một số phương án, TCR-TM thứ nhất và/hoặc TCR-TM thứ hai này mỗi loại bao gồm, một cách độc lập với nhau, trình tự khảm bao gồm một phần của không lớn hơn khoảng 10 (như không lớn hơn khoảng 9, 8, 7, 6, 5, hoặc ít hơn) axit amin liên tiếp từ miền xuyên màng được chứa trong SEQ ID NO: 3 hoặc 4. Theo một số phương án, trình tự khảm trong TCR-TM thứ nhất hoặc thứ hai này là từ miền xuyên màng được chứa trong SEQ ID NO: 3 và trình tự khảm trong TCR-TM còn lại là từ miền xuyên màng được chứa trong SEQ ID NO: 4. Theo một số phương án, trình tự khảm trong TCR-TM thứ nhất này được định vị sao cho nó có thể tương tác với trình tự khảm trong TCR-TM thứ hai. Theo một số phương án, TCRD thứ nhất này còn bao gồm peptit kết nối TCR thứ nhất hoặc mảnh của nó và/hoặc TCRD thứ hai này còn bao gồm peptit kết nối TCR thứ hai hoặc mảnh của nó. Theo một số phương án, peptit kết nối thứ nhất và peptit kết nối thứ hai này mỗi loại bao gồm, một cách độc lập với nhau, trình tự axit amin của peptit kết nối được chứa trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin của các SEQ ID NO: 1-4, hoặc biến thể của nó. Theo một số phương án, peptit kết nối thứ nhất và peptit kết nối thứ hai này mỗi loại bao gồm, một cách độc lập với nhau, trình tự axit amin của trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 27-34, hoặc biến thể của nó. Theo một số phương án, các peptit kết nối thứ nhất và thứ hai này được liên kết bằng liên kết disulfit. Theo một số phương án, TCRD thứ nhất còn này bao gồm miền nội bào TCR thứ nhất và/hoặc TCRD thứ hai này còn bao gồm miền nội bào TCR thứ hai. Theo một số phương án, miền nội bào TCR thứ nhất và miền nội bào TCR thứ hai này mỗi loại bao gồm, một cách độc lập với nhau, trình tự axit amin của miền nội bào được chứa trong trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1-4, hoặc biến thể của nó. Theo một số phương án, miền nội bào TCR thứ nhất và miền nội bào TCR thứ hai này mỗi loại bao gồm, một cách độc lập với nhau, trình tự axit amin của SEQ ID NO: 35 hoặc 36, hoặc biến thể của nó. Theo một số phương án, caTCR này còn bao gồm ít nhất một miền nội bào kèm theo bao gồm trình tự tín hiệu đồng kích thích tế bào T (như từ CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, hoặc CD40). Theo một số phương án, caTCR này còn bao gồm môđun ổn định hóa bao gồm miền ổn định hóa thứ nhất và miền ổn định hóa thứ hai, trong đó miền ổn định hóa thứ nhất và thứ hai này có ái lực liên kết với nhau mà ổn định hóa caTCR. Theo một số phương án, các miền ổn định hóa thứ nhất và thứ hai này được liên kết bởi liên kết

disulfit. Theo một số phương án, các miền ổn định hóa thứ nhất và thứ hai này bao gồm các miền kháng thể, như miền kháng thể C_H1 và C_L, hoặc các biến thể của nó. Theo một số phương án, TCRM này có khả năng huy động ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR được chọn từ nhóm bao gồm CD3δε, CD3γε, và ζζ. Theo một số phương án, TCRM này cho phép sự huy động được tăng cường của ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR khi so sánh với TCRM bao gồm các miền xuyên màng thụ thể tế bào T có các trình tự của các miền xuyên màng được chứa trong các SEQ ID NO: 1 và 2. Theo một số phương án, TCRM này thúc đẩy sự tạo thành phức hợp caTCR-CD3. Theo một số phương án, có môđun đệm giữa hai môđun hoặc miền caTCR bất kỳ. Theo một số phương án, môđun liên kết kháng nguyên này là gốc kháng thể. Theo một số phương án, gốc kháng thể này là Fab, Fab', (Fab')2, Fv, hoặc Fv đơn chuỗi (scFv). Theo một số phương án, môđun liên kết kháng nguyên này là đa đặc hiệu (như đặc hiệu kép).

Theo một số phương án, caTCR được mô tả ở đây liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích, bao gồm a) TCRD thứ nhất bao gồm TCR-TM thứ nhất thu được từ miền xuyên màng được chứa trong một trong số các trình tự axit amin của SEQ ID NO: 3 và SEQ ID NO: 4 và TCRD thứ hai bao gồm TCR-TM thứ hai thu được từ miền xuyên màng được chứa trong trình tự axit amin còn lại, trong đó các TCRD thứ nhất và thứ hai này tạo thành TCRM mà có khả năng huy động ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR; và b) môđun liên kết kháng nguyên mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích, trong đó môđun liên kết kháng nguyên này được liên kết đặc hiệu với các TCRD thứ nhất và/hoặc thứ hai này. Theo một số phương án, cả hai TCR-TM này đều xuất hiện tự nhiên. Theo một số phương án, ít nhất một trong số các TCR-TM này là không xuất hiện tự nhiên. Theo một số phương án, TCRD thứ nhất này còn bao gồm peptit kết nối TCR thứ nhất hoặc mảnh của nó và/hoặc TCRD thứ hai này còn bao gồm peptit kết nối TCR thứ hai hoặc mảnh của nó. Theo một số phương án, peptit kết nối thứ nhất và peptit kết nối thứ hai này mỗi loại bao gồm, một cách độc lập với nhau, trình tự axit amin của peptit kết nối được chứa trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin của các SEQ ID NO: 1-4, hoặc biến thể của nó. Theo một số phương án, peptit kết nối thứ nhất và peptit kết nối thứ hai này mỗi loại bao gồm, một cách độc lập với nhau, trình tự axit amin của trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 27-34, hoặc biến thể của nó. Theo một số phương án, các peptit kết nối thứ nhất và thứ hai này được liên kết bằng

liên kết disulfit. Theo một số phương án, TCRD thứ nhất còn này bao gồm miền nội bào TCR thứ nhất và/hoặc TCRD thứ hai này còn bao gồm miền nội bào TCR thứ hai. Theo một số phương án, miền nội bào TCR thứ nhất và miền nội bào TCR thứ hai này mỗi loại bao gồm, một cách độc lập với nhau, trình tự axit amin của miền nội bào được chứa trong trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1-4, hoặc biến thể của nó. Theo một số phương án, miền nội bào TCR thứ nhất và miền nội bào TCR thứ hai này mỗi loại bao gồm, một cách độc lập với nhau, trình tự axit amin của SEQ ID NO: 35 hoặc 36, hoặc biến thể của nó. Theo một số phương án, caTCR này còn bao gồm ít nhất một miền nội bào kèm theo bao gồm trình tự tín hiệu đồng kích thích tế bào T (như từ CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, hoặc CD40). Theo một số phương án, caTCR này còn bao gồm môđun ổn định hóa bao gồm miền ổn định hóa thứ nhất và miền ổn định hóa thứ hai, trong đó miền ổn định hóa thứ nhất và thứ hai này có ái lực liên kết với nhau mà ổn định hóa caTCR. Theo một số phương án, các miền ổn định hóa thứ nhất và thứ hai này được liên kết bởi liên kết disulfit. Theo một số phương án, các miền ổn định hóa thứ nhất và thứ hai này bao gồm các miền kháng thể, như miền kháng thể C_H1 và C_L, hoặc các biến thể của nó. Theo một số phương án, TCRM này có khả năng huy động ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR được chọn từ nhóm bao gồm CD3δε, CD3γε, và ζζ. Theo một số phương án, TCRM này cho phép sự huy động được tăng cường của ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR khi so sánh với TCRM bao gồm các miền xuyên màng thụ thể tế bào T có các trình tự của các miền xuyên màng được chứa trong các SEQ ID NO: 3 và 4. Theo một số phương án, TCRM này thúc đẩy sự tạo thành phức hợp caTCR-CD3. Theo một số phương án, có môđun đệm giữa hai môđun hoặc miền caTCR bất kỳ. Theo một số phương án, môđun liên kết kháng nguyên này là gốc kháng thể. Theo một số phương án, gốc kháng thể này là Fab, Fab', (Fab')2, Fv, hoặc Fv đơn chuỗi (scFv). Theo một số phương án, môđun liên kết kháng nguyên này là đa đặc hiệu (như đặc hiệu kép).

Theo một số phương án, caTCR được mô tả ở đây liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích, bao gồm a) TCRD thứ nhất bao gồm TCR-TM thứ nhất thu được từ miền xuyên màng được chứa trong một trong số các trình tự axit amin của SEQ ID NO: 3 và SEQ ID NO: 4 và TCRD thứ hai bao gồm TCR-TM thứ hai thu được từ miền xuyên màng được chứa trong trình tự axit amin còn lại, trong đó ít nhất một trong số các TCR-

TM này bao gồm một hoặc nhiều (như 2, 3, 4, 5, hoặc nhiều hơn) sự thế axit amin so với trình tự axit amin mà từ đó nó thu được, và các TCRD thứ nhất và thứ hai này tạo thành TCRM mà có khả năng huy động ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR; và b) môđun liên kết kháng nguyên mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích, trong đó môđun liên kết kháng nguyên này được liên kết với các TCRD thứ nhất và/hoặc thứ hai này. Theo một số phương án, mỗi loại trong số các TCR-TM này bao gồm, một cách độc lập với nhau, một hoặc nhiều (như 2, 3, 4, 5, hoặc nhiều hơn) sự thế axit amin so với trình tự axit amin mà từ đó nó thu được. Theo một số phương án, TCR-TM thứ nhất và/hoặc TCR-TM thứ hai này mỗi loại bao gồm, một cách độc lập với nhau, không nhiều hơn 5 sự thế axit amin so với các trình tự axit amin mà từ đó chúng thu được. Theo một số phương án, ít nhất một trong số các TCR-TM này bao gồm sự thế axit amin đơn so với trình tự axit amin mà từ đó nó thu được. Theo một số phương án, mỗi loại trong số các TCR-TM này bao gồm sự thế axit amin đơn so với trình tự axit amin mà từ đó nó thu được. Theo một số phương án, ít nhất một trong số các axit amin được thế này trong TCR-TM thứ nhất được định vị sao cho ở caTCR này nó có thể tương tác với ít nhất một trong số các axit amin được thế ở TCR-TM thứ hai. Theo một số phương án, TCRD thứ nhất này còn bao gồm peptit kết nối TCR thứ nhất hoặc mảnh của nó và/hoặc TCRD thứ hai này còn bao gồm peptit kết nối TCR thứ hai hoặc mảnh của nó. Theo một số phương án, peptit kết nối thứ nhất và peptit kết nối thứ hai này mỗi loại bao gồm, một cách độc lập với nhau, trình tự axit amin của peptit kết nối được chứa trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin của các SEQ ID NO: 1-4, hoặc biến thể của nó. Theo một số phương án, peptit kết nối thứ nhất và peptit kết nối thứ hai này mỗi loại bao gồm, một cách độc lập với nhau, trình tự axit amin của trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 27-34, hoặc biến thể của nó. Theo một số phương án, các peptit kết nối thứ nhất và thứ hai này được liên kết bằng liên kết disulfit. Theo một số phương án, TCRD thứ nhất còn này bao gồm miền nội bào TCR thứ nhất và/hoặc TCRD thứ hai này còn bao gồm miền nội bào TCR thứ hai. Theo một số phương án, miền nội bào TCR thứ nhất và miền nội bào TCR thứ hai này mỗi loại bao gồm, một cách độc lập với nhau, trình tự axit amin của miền nội bào được chứa trong trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1-4, hoặc biến thể của nó. Theo một số phương án, miền nội bào TCR thứ nhất và miền nội bào TCR thứ hai này mỗi loại bao gồm, một cách độc lập với nhau, trình tự axit amin của SEQ ID NO: 35 hoặc 36, hoặc biến thể của nó. Theo một số phương án, caTCR này

còn bao gồm ít nhất một miền nội bào kèm theo bao gồm trình tự tín hiệu đồng kích thích tế bào T (như từ CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, hoặc CD40). Theo một số phương án, caTCR này còn bao gồm môđun ổn định hóa bao gồm miền ổn định hóa thứ nhất và miền ổn định hóa thứ hai, trong đó miền ổn định hóa thứ nhất và thứ hai này có ái lực liên kết với nhau mà ổn định hóa caTCR. Theo một số phương án, các miền ổn định hóa thứ nhất và thứ hai này được liên kết bởi liên kết disulfit. Theo một số phương án, các miền ổn định hóa thứ nhất và thứ hai này bao gồm các miền kháng thể, như miền kháng thể C_H1 và C_L, hoặc các biến thể của nó. Theo một số phương án, TCRM này có khả năng huy động ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR được chọn từ nhóm bao gồm CD3δε, CD3γε, và ζζ. Theo một số phương án, TCRM này cho phép sự huy động được tăng cường của ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR khi so sánh với TCRM bao gồm các miền xuyên màng thụ thể tế bào T có các trình tự của các miền xuyên màng được chứa trong các SEQ ID NO: 3 và 4. Theo một số phương án, TCRM này thúc đẩy sự tạo thành phức hợp caTCR-CD3. Theo một số phương án, có môđun đệm giữa hai môđun hoặc miền caTCR bất kỳ. Theo một số phương án, môđun liên kết kháng nguyên này là gốc kháng thể. Theo một số phương án, gốc kháng thể này là Fab, Fab', (Fab')2, Fv, hoặc Fv đơn chuỗi (scFv). Theo một số phương án, môđun liên kết kháng nguyên này là đa đặc hiệu (như đặc hiệu kép).

Theo một số phương án, caTCR được mô tả ở đây liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích, bao gồm a) TCRD thứ nhất bao gồm TCR-TM thứ nhất thu được từ miền xuyên màng được chứa trong một trong số các trình tự axit amin của SEQ ID NO: 3 và SEQ ID NO: 4 và TCRD thứ hai bao gồm TCR-TM thứ hai thu được từ miền xuyên màng được chứa trong trình tự axit amin còn lại, trong đó ít nhất một trong số các TCR-TM này bao gồm trình tự khảm bao gồm một phần của các axit amin liên tiếp từ miền xuyên màng được chứa trong SEQ ID NO: 1 hoặc 2, và các TCRD thứ nhất và thứ hai tạo thành TCRM mà có khả năng huy động ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR; và b) môđun liên kết kháng nguyên mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích, trong đó môđun liên kết kháng nguyên này được liên kết với các TCRD thứ nhất và/hoặc thứ hai này. Theo một số phương án, mỗi loại trong số các TCR-TM này bao gồm, một cách độc lập với nhau, trình tự khảm bao gồm một phần của các axit amin liên tiếp từ miền xuyên màng được chứa trong SEQ ID NO: 1 hoặc 2. Theo một số phương

án, TCR-TM thứ nhất và/hoặc TCR-TM thứ hai này mỗi loại bao gồm, một cách độc lập với nhau, trình tự khảm bao gồm một phần của không lớn hơn khoảng 10 (như không lớn hơn khoảng 9, 8, 7, 6, 5, hoặc ít hơn) axit amin liên tiếp từ miền xuyên màng được chứa trong SEQ ID NO: 1 hoặc 2. Theo một số phương án, trình tự khảm trong TCR-TM thứ nhất hoặc thứ hai này là từ miền xuyên màng được chứa trong SEQ ID NO: 1 và trình tự khảm trong TCR-TM còn lại là từ miền xuyên màng được chứa trong SEQ ID NO: 2. Theo một số phương án, trình tự khảm trong TCR-TM thứ nhất này được định vị sao cho nó có thể tương tác với trình tự khảm trong TCR-TM thứ hai. Theo một số phương án, TCRD thứ nhất này còn bao gồm peptit kết nối TCR thứ nhất hoặc mảnh của nó và/hoặc TCRD thứ hai này còn bao gồm peptit kết nối TCR thứ hai hoặc mảnh của nó. Theo một số phương án, peptit kết nối thứ nhất và peptit kết nối thứ hai này mỗi loại bao gồm, một cách độc lập với nhau, trình tự axit amin của peptit kết nối được chứa trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin của các SEQ ID NO: 1-4, hoặc biến thể của nó. Theo một số phương án, peptit kết nối thứ nhất và peptit kết nối thứ hai này mỗi loại bao gồm, một cách độc lập với nhau, trình tự axit amin của trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 27-34, hoặc biến thể của nó. Theo một số phương án, các peptit kết nối thứ nhất và thứ hai này được liên kết bằng liên kết disulfit. Theo một số phương án, TCRD thứ nhất còn này bao gồm miền nội bào TCR thứ nhất và/hoặc TCRD thứ hai này còn bao gồm miền nội bào TCR thứ hai. Theo một số phương án, miền nội bào TCR thứ nhất và miền nội bào TCR thứ hai này mỗi loại bao gồm, một cách độc lập với nhau, trình tự axit amin của miền nội bào được chứa trong trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1-4, hoặc biến thể của nó. Theo một số phương án, miền nội bào TCR thứ nhất và miền nội bào TCR thứ hai này mỗi loại bao gồm, một cách độc lập với nhau, trình tự axit amin của SEQ ID NO: 35 hoặc 36, hoặc biến thể của nó. Theo một số phương án, caTCR này còn bao gồm ít nhất một miền nội bào kèm theo bao gồm trình tự tín hiệu đồng kích thích tế bào T (như từ CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, hoặc CD40). Theo một số phương án, caTCR này còn bao gồm môđun ổn định hóa bao gồm miền ổn định hóa thứ nhất và miền ổn định hóa thứ hai, trong đó miền ổn định hóa thứ nhất và thứ hai này có ái lực liên kết với nhau mà ổn định hóa caTCR. Theo một số phương án, các miền ổn định hóa thứ nhất và thứ hai này được liên kết bởi liên kết disulfit. Theo một số phương án, các miền ổn định hóa thứ nhất và thứ hai này bao gồm các miền kháng thể, như miền kháng thể C_H1 và C_L, hoặc các biến thể của nó. Theo một

số phương án, TCRM này có khả năng huy động ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR được chọn từ nhóm bao gồm CD3δε, CD3γε, và ζζ. Theo một số phương án, TCRM này cho phép sự huy động được tăng cường của ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR khi so sánh với TCRM bao gồm các miền xuyên màng thụ thể tế bào T có các trình tự của các miền xuyên màng được chứa trong các SEQ ID NO: 3 và 4. Theo một số phương án, TCRM này thúc đẩy sự tạo thành phức hợp caTCR-CD3. Theo một số phương án, có môđun đệm giữa hai môđun hoặc miền caTCR bất kỳ. Theo một số phương án, môđun liên kết kháng nguyên này là gốc kháng thể. Theo một số phương án, gốc kháng thể này là Fab, Fab', (Fab')2, Fv, hoặc Fv đơn chuỗi (scFv). Theo một số phương án, môđun liên kết kháng nguyên này là đa đặc hiệu (như đặc hiệu kép).

Theo một số phương án, caTCR được mô tả ở đây liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích, bao gồm a) TCRD thứ nhất bao gồm TCR-TM thứ nhất thu được từ một trong số các trình tự axit amin của SEQ ID NO: 5 và SEQ ID NO: 6 và TCRD thứ hai bao gồm TCR-TM thứ hai thu được từ trình tự axit amin còn lại, trong đó các TCRD thứ nhất và thứ hai này tạo thành TCRM mà có khả năng huy động ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR; và b) môđun liên kết kháng nguyên mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích, trong đó môđun liên kết kháng nguyên này được liên kết đặc hiệu với các TCRD thứ nhất và/hoặc thứ hai này. Theo một số phương án, cả hai TCR-TM này đều xuất hiện tự nhiên. Theo một số phương án, ít nhất một trong số các TCR-TM này là không xuất hiện tự nhiên. Theo một số phương án, TCRD thứ nhất này còn bao gồm peptit kết nối TCR thứ nhất hoặc mảnh của nó và/hoặc TCRD thứ hai này còn bao gồm peptit kết nối TCR thứ hai hoặc mảnh của nó. Theo một số phương án, peptit kết nối thứ nhất và peptit kết nối thứ hai này mỗi loại bao gồm, một cách độc lập với nhau, trình tự axit amin của trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 27-34, hoặc biến thể của nó. Theo một số phương án, các peptit kết nối thứ nhất và thứ hai này được liên kết bằng liên kết disulfit. Theo một số phương án, TCRD thứ nhất còn này bao gồm miền nội bào TCR thứ nhất và/hoặc TCRD thứ hai này còn bao gồm miền nội bào TCR thứ hai. Theo một số phương án, miền nội bào TCR thứ nhất và miền nội bào TCR thứ hai này mỗi loại bao gồm, một cách độc lập với nhau, trình tự axit amin của SEQ ID NO: 35 hoặc 36, hoặc biến thể của nó. Theo một số phương án, caTCR này còn bao gồm ít nhất một miền nội bào kèm theo bao gồm trình tự tín hiệu đồng kích thích tế bào T

(như từ CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, hoặc CD40). Theo một số phương án, caTCR này còn bao gồm môđun ổn định hóa bao gồm miền ổn định hóa thứ nhất và miền ổn định hóa thứ hai, trong đó miền ổn định hóa thứ nhất và thứ hai này có ái lực liên kết với nhau mà ổn định hóa caTCR. Theo một số phương án, các miền ổn định hóa thứ nhất và thứ hai này được liên kết bởi liên kết disulfit. Theo một số phương án, các miền ổn định hóa thứ nhất và thứ hai này bao gồm các miền kháng thể, như miền kháng thể C_H1 và C_L, hoặc các biến thể của nó. Theo một số phương án, TCRM này có khả năng huy động ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR được chọn từ nhóm bao gồm CD3δε, CD3γε, và ζζ. Theo một số phương án, TCRM này cho phép sự huy động được tăng cường của ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR khi so sánh với TCRM bao gồm các miền xuyên màng thụ thể tế bào T có các trình tự của các SEQ ID NO: 5 và 6. Theo một số phương án, TCRM này thúc đẩy sự tạo thành phức hợp caTCR-CD3. Theo một số phương án, có môđun đệm giữa hai môđun hoặc miền caTCR bất kỳ. Theo một số phương án, môđun liên kết kháng nguyên này là gốc kháng thể. Theo một số phương án, gốc kháng thể này là Fab, Fab', (Fab')2, Fv, hoặc Fv đơn chuỗi (scFv). Theo một số phương án, môđun liên kết kháng nguyên này là đa đặc hiệu (như đặc hiệu kép).

Theo một số phương án, caTCR được mô tả ở đây liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích, bao gồm a) TCRD thứ nhất bao gồm TCR-TM thứ nhất thu được từ một trong số các trình tự axit amin của SEQ ID NO: 5 và SEQ ID NO: 6 và TCRD thứ hai bao gồm TCR-TM thứ hai thu được từ trình tự axit amin còn lại, trong đó ít nhất một trong số các TCR-TM này bao gồm một hoặc nhiều (như 2, 3, 4, 5, hoặc nhiều hơn) sự thế axit amin so với trình tự axit amin mà từ đó nó thu được, và các TCRD thứ nhất và thứ hai này tạo thành TCRM mà có khả năng huy động ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR; và b) môđun liên kết kháng nguyên mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích, trong đó môđun liên kết kháng nguyên này được liên kết với các TCRD thứ nhất và/hoặc thứ hai này. Theo một số phương án, mỗi loại trong số các TCR-TM này bao gồm, một cách độc lập với nhau, một hoặc nhiều (như 2, 3, 4, 5, hoặc nhiều hơn) sự thế axit amin so với trình tự axit amin mà từ đó nó thu được. Theo một số phương án, TCR-TM thứ nhất và/hoặc TCR-TM thứ hai này mỗi loại bao gồm, một cách độc lập với nhau, không nhiều hơn 5 sự thế axit amin so với các trình tự axit amin

mà từ đó chúng thu được. Theo một số phương án, ít nhất một trong số các TCR-TM này bao gồm sự thế axit amin đơn so với trình tự axit amin mà từ đó nó thu được. Theo một số phương án, mỗi loại trong số các TCR-TM này bao gồm sự thế axit amin đơn so với trình tự axit amin mà từ đó nó thu được. Theo một số phương án, ít nhất một trong số các axit amin được thế này trong TCR-TM thứ nhất được định vị sao cho ở caTCR này nó có thể tương tác với ít nhất một trong số các axit amin được thế ở TCR-TM thứ hai. Theo một số phương án, TCRD thứ nhất này còn bao gồm peptit kết nối TCR thứ nhất hoặc mảnh của nó và/hoặc TCRD thứ hai này còn bao gồm peptit kết nối TCR thứ hai hoặc mảnh của nó. Theo một số phương án, peptit kết nối thứ nhất và peptit kết nối thứ hai này mỗi loại bao gồm, một cách độc lập với nhau, trình tự axit amin của trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 27-34, hoặc biến thể của nó. Theo một số phương án, các peptit kết nối thứ nhất và thứ hai này được liên kết bằng liên kết disulfit. Theo một số phương án, TCRD thứ nhất còn này bao gồm miền nội bào TCR thứ nhất và/hoặc TCRD thứ hai này còn bao gồm miền nội bào TCR thứ hai. Theo một số phương án, miền nội bào TCR thứ nhất và miền nội bào TCR thứ hai này mỗi loại bao gồm, một cách độc lập với nhau, trình tự axit amin của SEQ ID NO: 35 hoặc 36, hoặc biến thể của nó. Theo một số phương án, caTCR này còn bao gồm ít nhất một miền nội bào kèm theo bao gồm trình tự tín hiệu đồng kích thích tế bào T (như từ CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, hoặc CD40). Theo một số phương án, caTCR này còn bao gồm môđun ổn định hóa bao gồm miền ổn định hóa thứ nhất và miền ổn định hóa thứ hai, trong đó miền ổn định hóa thứ nhất và thứ hai này có ái lực liên kết với nhau mà ổn định hóa caTCR. Theo một số phương án, các miền ổn định hóa thứ nhất và thứ hai này được liên kết bởi liên kết disulfit. Theo một số phương án, các miền ổn định hóa thứ nhất và thứ hai này bao gồm các miền kháng thể, như miền kháng thể C_H1 và C_L, hoặc các biến thể của nó. Theo một số phương án, TCRM này có khả năng huy động ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR được chọn từ nhóm bao gồm CD3δε, CD3γε, và ζζ. Theo một số phương án, TCRM này cho phép sự huy động được tăng cường của ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR khi so sánh với TCRM bao gồm các miền xuyên màng thụ thể tế bào T có các trình tự của các SEQ ID NO: 5 và 6. Theo một số phương án, TCRM này thúc đẩy sự tạo thành phức hợp caTCR-CD3. Theo một số phương án, có môđun đệm giữa hai môđun hoặc miền caTCR bất kỳ. Theo một số phương án, môđun liên kết kháng nguyên này là gốc kháng thể. Theo một số phương

án, gốc kháng thể này là Fab, Fab', (Fab')2, Fv, hoặc Fv đơn chuỗi (scFv). Theo một số phương án, môđun liên kết kháng nguyên này là đa đặc hiệu (như đặc hiệu kép).

Theo một số phương án, caTCR được mô tả ở đây liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích, bao gồm a) TCRD thứ nhất bao gồm TCR-TM thứ nhất thu được từ một trong số các trình tự axit amin của SEQ ID NO: 5 và SEQ ID NO: 6 và TCRD thứ hai bao gồm TCR-TM thứ hai thu được từ trình tự axit amin còn lại, trong đó ít nhất một trong số các TCR-TM này bao gồm trình tự khảm bao gồm một phần của các axit amin liên tiếp từ SEQ ID NO: 7 hoặc 8, và các TCRD thứ nhất và thứ hai tạo thành TCRM mà có khả năng huy động ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR; và b) môđun liên kết kháng nguyên mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích, trong đó môđun liên kết kháng nguyên này được liên kết với các TCRD thứ nhất và/hoặc thứ hai này. Theo một số phương án, mỗi loại trong số các TCR-TM này bao gồm, một cách độc lập với nhau, trình tự khảm bao gồm một phần của các axit amin liên tiếp từ SEQ ID NO: 7 hoặc 8. Theo một số phương án, TCR-TM thứ nhất và/hoặc TCR-TM thứ hai này mỗi loại bao gồm, một cách độc lập với nhau, trình tự khảm bao gồm một phần của không lớn hơn khoảng 10 (như không lớn hơn khoảng 9, 8, 7, 6, 5, hoặc ít hơn) axit amin liên tiếp từ SEQ ID NO: 7 hoặc 8. Theo một số phương án, trình tự khảm trong TCR-TM thứ nhất hoặc thứ hai này là từ SEQ ID NO: 7 và trình tự khảm trong TCR-TM còn lại là từ SEQ ID NO: 8. Theo một số phương án, trình tự khảm trong TCR-TM thứ nhất này được định vị sao cho nó có thể tương tác với trình tự khảm trong TCR-TM thứ hai. Theo một số phương án, TCRD thứ nhất này còn bao gồm peptit kết nối TCR thứ nhất hoặc mảnh của nó và/hoặc TCRD thứ hai này còn bao gồm peptit kết nối TCR thứ hai hoặc mảnh của nó. Theo một số phương án, peptit kết nối thứ nhất và peptit kết nối thứ hai này mỗi loại bao gồm, một cách độc lập với nhau, trình tự axit amin của trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 27-34, hoặc biến thể của nó. Theo một số phương án, các peptit kết nối thứ nhất và thứ hai này được liên kết bằng liên kết disulfit. Theo một số phương án, TCRD thứ nhất còn này bao gồm miền nội bào TCR thứ nhất và/hoặc TCRD thứ hai này còn bao gồm miền nội bào TCR thứ hai. Theo một số phương án, miền nội bào TCR thứ nhất và miền nội bào TCR thứ hai này mỗi loại bao gồm, một cách độc lập với nhau, trình tự axit amin của SEQ ID NO: 35 hoặc 36, hoặc biến thể của nó. Theo một số phương án, caTCR này còn bao gồm ít nhất một miền nội bào kèm theo

bao gồm trình tự tín hiệu đồng kích thích tế bào T (như từ CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, hoặc CD40). Theo một số phương án, caTCR này còn bao gồm môđun ổn định hóa bao gồm miền ổn định hóa thứ nhất và miền ổn định hóa thứ hai, trong đó miền ổn định hóa thứ nhất và thứ hai này có ái lực liên kết với nhau mà ổn định hóa caTCR. Theo một số phương án, các miền ổn định hóa thứ nhất và thứ hai này được liên kết bởi liên kết disulfit. Theo một số phương án, các miền ổn định hóa thứ nhất và thứ hai này bao gồm các miền kháng thể, như miền kháng thể C_H1 và C_L, hoặc các biến thể của nó. Theo một số phương án, TCRM này có khả năng huy động ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR được chọn từ nhóm bao gồm CD3δε, CD3γε, và ζζ. Theo một số phương án, TCRM này cho phép sự huy động được tăng cường của ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR khi so sánh với TCRM bao gồm các miền xuyên màng thụ thể tế bào T có các trình tự của các SEQ ID NO: 5 và 6. Theo một số phương án, TCRM này thúc đẩy sự tạo thành phức hợp caTCR-CD3. Theo một số phương án, có môđun đệm giữa hai môđun hoặc miền caTCR bất kỳ. Theo một số phương án, môđun liên kết kháng nguyên này là gốc kháng thể. Theo một số phương án, gốc kháng thể này là Fab, Fab', (Fab')2, Fv, hoặc Fv đơn chuỗi (scFv). Theo một số phương án, môđun liên kết kháng nguyên này là đa đặc hiệu (như đặc hiệu kép).

Theo một số phương án, caTCR được mô tả ở đây liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích, bao gồm a) TCRD thứ nhất bao gồm TCR-TM thứ nhất thu được từ một trong số các trình tự axit amin của SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 8 và TCRD thứ hai bao gồm TCR-TM thứ hai thu được từ trình tự axit amin còn lại, trong đó các TCRD thứ nhất và thứ hai này tạo thành TCRM mà có khả năng huy động ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR; và b) môđun liên kết kháng nguyên mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích, trong đó môđun liên kết kháng nguyên này được liên kết đặc hiệu với các TCRD thứ nhất và/hoặc thứ hai này. Theo một số phương án, cả hai TCR-TM này đều xuất hiện tự nhiên. Theo một số phương án, ít nhất một trong số các TCR-TM này là không xuất hiện tự nhiên. Theo một số phương án, TCRD thứ nhất này còn bao gồm peptit kết nối TCR thứ nhất hoặc mảnh của nó và/hoặc TCRD thứ hai này còn bao gồm peptit kết nối TCR thứ hai hoặc mảnh của nó. Theo một số phương án, peptit kết nối thứ nhất và peptit kết nối thứ hai này mỗi loại bao gồm, một cách độc lập với nhau, trình tự axit amin của trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 27-34, hoặc

biến thể của nó. Theo một số phương án, các peptit kết nối thứ nhất và thứ hai này được liên kết bằng liên kết disulfit. Theo một số phương án, TCRD thứ nhất còn này bao gồm miền nội bào TCR thứ nhất và/hoặc TCRD thứ hai này còn bao gồm miền nội bào TCR thứ hai. Theo một số phương án, miền nội bào TCR thứ nhất và miền nội bào TCR thứ hai này mỗi loại bao gồm, một cách độc lập với nhau, trình tự axit amin của SEQ ID NO: 35 hoặc 36, hoặc biến thể của nó. Theo một số phương án, caTCR này còn bao gồm ít nhất một miền nội bào kèm theo bao gồm trình tự tín hiệu đồng kích thích tế bào T (như từ CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, hoặc CD40). Theo một số phương án, caTCR này còn bao gồm môđun ổn định hóa bao gồm miền ổn định hóa thứ nhất và miền ổn định hóa thứ hai, trong đó miền ổn định hóa thứ nhất và thứ hai này có ái lực liên kết với nhau mà ổn định hóa caTCR. Theo một số phương án, các miền ổn định hóa thứ nhất và thứ hai này được liên kết bởi liên kết disulfit. Theo một số phương án, các miền ổn định hóa thứ nhất và thứ hai này bao gồm các miền kháng thể, như miền kháng thể C_H1 và C_L, hoặc các biến thể của nó. Theo một số phương án, TCRM này có khả năng huy động ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR được chọn từ nhóm bao gồm CD3δε, CD3γε, và ζζ. Theo một số phương án, TCRM này cho phép sự huy động được tăng cường của ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR khi so sánh với TCRM bao gồm các miền xuyên màng thụ thể tế bào T có các trình tự của các SEQ ID NO: 7 và 8. Theo một số phương án, TCRM này thúc đẩy sự tạo thành phức hợp caTCR-CD3. Theo một số phương án, có môđun đệm giữa hai môđun hoặc miền caTCR bất kỳ. Theo một số phương án, môđun liên kết kháng nguyên này là gốc kháng thể. Theo một số phương án, gốc kháng thể này là Fab, Fab', (Fab')2, Fv, hoặc Fv đơn chuỗi (scFv). Theo một số phương án, môđun liên kết kháng nguyên này là đa đặc hiệu (như đặc hiệu kép).

Theo một số phương án, caTCR được mô tả ở đây liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích, bao gồm a) TCRD thứ nhất bao gồm TCR-TM thứ nhất thu được từ một trong số các trình tự axit amin của SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 8 và TCRD thứ hai bao gồm TCR-TM thứ hai thu được từ trình tự axit amin còn lại, trong đó ít nhất một trong số các TCR-TM này bao gồm một hoặc nhiều (như 2, 3, 4, 5, hoặc nhiều hơn) sự thế axit amin so với trình tự axit amin mà từ đó nó thu được, và các TCRD thứ nhất và thứ hai này tạo thành TCRM mà có khả năng huy động ít nhất một phân tử truyền tín

hiệu liên kết với TCR; và b) môđun liên kết kháng nguyên mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích, trong đó môđun liên kết kháng nguyên này được liên kết với các TCRD thứ nhất và/hoặc thứ hai này. Theo một số phương án, mỗi loại trong số các TCR-TM này bao gồm, một cách độc lập với nhau, một hoặc nhiều (như 2, 3, 4, 5, hoặc nhiều hơn) sự thế axit amin so với trình tự axit amin mà từ đó nó thu được. Theo một số phương án, TCR-TM thứ nhất và/hoặc TCR-TM thứ hai này mỗi loại bao gồm, một cách độc lập với nhau, không nhiều hơn 5 sự thế axit amin so với các trình tự axit amin mà từ đó chúng thu được. Theo một số phương án, ít nhất một trong số các TCR-TM này bao gồm sự thế axit amin đơn so với trình tự axit amin mà từ đó nó thu được. Theo một số phương án, mỗi loại trong số các TCR-TM này bao gồm sự thế axit amin đơn so với trình tự axit amin mà từ đó nó thu được. Theo một số phương án, ít nhất một trong số các axit amin được thế này trong TCR-TM thứ nhất được định vị sao cho ở caTCR này nó có thể tương tác với ít nhất một trong số các axit amin được thế ở TCR-TM thứ hai. Theo một số phương án, TCRD thứ nhất này còn bao gồm peptit kết nối TCR thứ nhất hoặc mảnh của nó và/hoặc TCRD thứ hai này còn bao gồm peptit kết nối TCR thứ hai hoặc mảnh của nó. Theo một số phương án, peptit kết nối thứ nhất và peptit kết nối thứ hai này mỗi loại bao gồm, một cách độc lập với nhau, trình tự axit amin của trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 27-34, hoặc biến thể của nó. Theo một số phương án, các peptit kết nối thứ nhất và thứ hai này được liên kết bằng liên kết disulfit. Theo một số phương án, TCRD thứ nhất còn này bao gồm miền nội bào TCR thứ nhất và/hoặc TCRD thứ hai này còn bao gồm miền nội bào TCR thứ hai. Theo một số phương án, miền nội bào TCR thứ nhất và miền nội bào TCR thứ hai này mỗi loại bao gồm, một cách độc lập với nhau, trình tự axit amin của SEQ ID NO: 35 hoặc 36, hoặc biến thể của nó. Theo một số phương án, caTCR này còn bao gồm ít nhất một miền nội bào kèm theo bao gồm trình tự tín hiệu đồng kích thích tế bào T (như từ CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, hoặc CD40). Theo một số phương án, caTCR này còn bao gồm môđun ổn định hóa bao gồm miền ổn định hóa thứ nhất và miền ổn định hóa thứ hai, trong đó miền ổn định hóa thứ nhất và thứ hai này có ái lực liên kết với nhau mà ổn định hóa caTCR. Theo một số phương án, các miền ổn định hóa thứ nhất và thứ hai này được liên kết bởi liên kết disulfit. Theo một số phương án, các miền ổn định hóa thứ nhất và thứ hai này bao gồm các miền kháng thể, như miền kháng thể C_H1 và C_L, hoặc các biến thể của nó. Theo một số phương án, TCRM này có khả năng huy động ít nhất một phân tử

truyền tín hiệu liên kết với TCR được chọn từ nhóm bao gồm CD3δε, CD3γε, và ζζ. Theo một số phương án, TCRM này cho phép sự huy động được tăng cường của ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR khi so sánh với TCRM bao gồm các miền xuyên màng thụ thể tế bào T có các trình tự của các SEQ ID NO: 7 và 8. Theo một số phương án, TCRM này thúc đẩy sự tạo thành phức hợp caTCR-CD3. Theo một số phương án, có môđun đệm giữa hai môđun hoặc miền caTCR bất kỳ. Theo một số phương án, môđun liên kết kháng nguyên này là gốc kháng thể. Theo một số phương án, gốc kháng thể này là Fab, Fab', (Fab')2, Fv, hoặc Fv đơn chuỗi (scFv). Theo một số phương án, môđun liên kết kháng nguyên này là đa đặc hiệu (như đặc hiệu kép).

Theo một số phương án, caTCR được mô tả ở đây liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích, bao gồm a) TCRD thứ nhất bao gồm TCR-TM thứ nhất thu được từ một trong số các trình tự axit amin của SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 8 và TCRD thứ hai bao gồm TCR-TM thứ hai thu được từ trình tự axit amin còn lại, trong đó ít nhất một trong số các TCR-TM này bao gồm trình tự khảm bao gồm một phần của các axit amin liên tiếp từ SEQ ID NO: 5 hoặc 6, và các TCRD thứ nhất và thứ hai tạo thành TCRM mà có khả năng huy động ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR; và b) môđun liên kết kháng nguyên mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích, trong đó môđun liên kết kháng nguyên này được liên kết với các TCRD thứ nhất và/hoặc thứ hai này. Theo một số phương án, mỗi loại trong số các TCR-TM này bao gồm, một cách độc lập với nhau, trình tự khảm bao gồm một phần của các axit amin liên tiếp từ SEQ ID NO: 5 hoặc 6. Theo một số phương án, TCR-TM thứ nhất và/hoặc TCR-TM thứ hai này mỗi loại bao gồm, một cách độc lập với nhau, trình tự khảm bao gồm một phần của không lớn hơn khoảng 10 (như không lớn hơn khoảng 9, 8, 7, 6, 5, hoặc ít hơn) axit amin liên tiếp từ SEQ ID NO: 5 hoặc 6. Theo một số phương án, trình tự khảm trong TCR-TM thứ nhất hoặc thứ hai này là từ SEQ ID NO: 5 và trình tự khảm trong TCR-TM còn lại là từ SEQ ID NO: 6. Theo một số phương án, trình tự khảm trong TCR-TM thứ nhất này được định vị sao cho nó có thể tương tác với trình tự khảm trong TCR-TM thứ hai. Theo một số phương án, TCRD thứ nhất này còn bao gồm peptit kết nối TCR thứ nhất hoặc mảnh của nó và/hoặc TCRD thứ hai này còn bao gồm peptit kết nối TCR thứ hai hoặc mảnh của nó. Theo một số phương án, peptit kết nối thứ nhất và peptit kết nối thứ hai này mỗi loại bao gồm, một cách độc lập với nhau, trình tự axit amin của trình

tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 27-34, hoặc biến thể của nó. Theo một số phương án, các peptit kết nối thứ nhất và thứ hai này được liên kết bằng liên kết disulfit. Theo một số phương án, TCRD thứ nhất còn này bao gồm miền nội bào TCR thứ nhất và/hoặc TCRD thứ hai này còn bao gồm miền nội bào TCR thứ hai. Theo một số phương án, miền nội bào TCR thứ nhất và miền nội bào TCR thứ hai này mỗi loại bao gồm, một cách độc lập với nhau, trình tự axit amin của SEQ ID NO: 35 hoặc 36, hoặc biến thể của nó. Theo một số phương án, caTCR này còn bao gồm ít nhất một miền nội bào kèm theo bao gồm trình tự tín hiệu đồng kích thích tế bào T (như từ CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, hoặc CD40). Theo một số phương án, caTCR này còn bao gồm môđun ổn định hóa bao gồm miền ổn định hóa thứ nhất và miền ổn định hóa thứ hai, trong đó miền ổn định hóa thứ nhất và thứ hai này có ái lực liên kết với nhau mà ổn định hóa caTCR. Theo một số phương án, các miền ổn định hóa thứ nhất và thứ hai này được liên kết bởi liên kết disulfit. Theo một số phương án, các miền ổn định hóa thứ nhất và thứ hai này bao gồm các miền kháng thể, như miền kháng thể C_H1 và C_L, hoặc các biến thể của nó. Theo một số phương án, TCRM này có khả năng huy động ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR được chọn từ nhóm bao gồm CD3δε, CD3γε, và ζζ. Theo một số phương án, TCRM này cho phép sự huy động được tăng cường của ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR khi so sánh với TCRM bao gồm các miền xuyên màng thụ thể tế bào T có các trình tự của các SEQ ID NO: 7 và 8. Theo một số phương án, TCRM này thúc đẩy sự tạo thành phức hợp caTCR-CD3. Theo một số phương án, có môđun đệm giữa hai môđun hoặc miền caTCR bất kỳ. Theo một số phương án, môđun liên kết kháng nguyên này là gốc kháng thể. Theo một số phương án, gốc kháng thể này là Fab, Fab', (Fab')2, Fv, hoặc Fv đơn chuỗi (scFv). Theo một số phương án, môđun liên kết kháng nguyên này là đa đặc hiệu (như đặc hiệu kép).

Các khía cạnh khác nhau được thảo luận chi tiết hơn trong các phần khác nhau dưới đây.

Các biến thể TCR-TM

Theo một số phương án, các TCR-TM của caTCR thu được từ thụ thể tế bào T, trong đó ít nhất một trong số các TCR-TM này là không xuất hiện tự nhiên. Các TCR-TM không xuất hiện tự nhiên thu được từ thụ thể tế bào T bao gồm miền xuyên màng từ thụ thể tế bào T mà được cải biến bằng sự thế một hoặc nhiều axit amin. Theo một số

phương án, ít nhất một trong số các axit amin được thế này được thế bằng gốc kỵ nước hơn gốc không được thế tương ứng. Theo một số phương án, mỗi loại trong số các axit amin được thế này được thế bằng gốc kỵ nước hơn gốc không được thế tương ứng. Theo một số phương án, ít nhất một trong số các axit amin được thế này là gần (trong trình tự sơ cấp hoặc về mặt không gian) với axit amin ở TCRM được bao gồm trong liên kết với CD3. Ví dụ, theo một số phương án, ít nhất một trong số các axit amin được thế này được tách từ axit amin trong TCRM được bao gồm trong liên kết với CD3 bởi không nhiều hơn 3 (như 0, 1, 2, hoặc 3) axit amin. Theo một số phương án, ít nhất một trong số các axit amin được thế này được tách từ axit amin trong TCRM được bao gồm trong liên kết với CD3 bởi không lớn hơn khoảng 15 (như không lớn hơn khoảng giá trị bất kỳ trong số 14, 12, 10, 8, 6, 4, 2, hoặc 1) angstrom. Theo một số phương án, mỗi axit amin trong số các axit amin được thế này là gần với axit amin trong TCRM được bao gồm trong liên kết với CD3.

Ví dụ, theo một số phương án, TCR-TM không xuất hiện tự nhiên thu được từ thụ thể tế bào T bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm miền xuyên màng của tiểu đơn vị TCR α, β, γ, hoặc δ được cải biến bởi sự thế một hoặc nhiều gốc axit amin. Theo một số phương án, miền xuyên màng của tiểu đơn vị TCR này được cải biến bởi sự thế của không nhiều hơn 5 gốc axit amin. Theo một số phương án, miền xuyên màng của tiểu đơn vị TCR này được cải biến bởi sự thế của một gốc axit amin duy nhất. Theo một số phương án, ít nhất một trong số các axit amin được thế này được thế bằng gốc kỵ nước hơn gốc không được thế tương ứng. Theo một số phương án, mỗi loại trong số các axit amin được thế này được thế bằng gốc kỵ nước hơn gốc không được thế tương ứng. Theo một số phương án, ít nhất một trong số các axit amin được thế này là gần với axit amin trong TCRM được bao gồm trong liên kết với CD3. Theo một số phương án, mỗi axit amin trong số các axit amin được thế này là gần với axit amin trong TCRM được bao gồm trong liên kết với CD3.

Do đó, theo một số phương án, TCR-TM không xuất hiện tự nhiên thu được từ thụ thể tế bào T được mô tả ở đây bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm miền xuyên màng của tiểu đơn vị α TCR bao gồm trình tự axit amin của miền xuyên màng được chứa trong SEQ ID NO: 1 (*ví dụ*, SEQ ID NO: 5), được cải biến bởi sự thế của một hoặc nhiều gốc axit amin. Theo một số phương án, miền xuyên màng của tiểu đơn vị α TCR này được

cải biến bởi sự thế của không nhiều hơn 5 gốc axit amin ở miền xuyên màng được chứa trong SEQ ID NO: 1. Theo một số phương án, miền xuyên màng của tiểu đơn vị α TCR này được cải biến bởi sự thế của một gốc axit amin duy nhất trong miền xuyên màng được chứa trong SEQ ID NO: 1. Theo một số phương án, ít nhất một trong số các axit amin được thế này được thế bằng gốc kỵ nước hơn gốc không được thế tương ứng. Theo một số phương án, mỗi loại trong số các axit amin được thế này được thế bằng gốc kỵ nước hơn gốc không được thế tương ứng. Theo một số phương án, ít nhất một trong số các axit amin được thế này là gần với axit amin trong TCRM được bao gồm trong liên kết với CD3. Theo một số phương án, mỗi axit amin trong số các axit amin được thế này là gần với axit amin trong TCRM được bao gồm trong liên kết với CD3.

Theo một số phương án, TCR-TM không xuất hiện tự nhiên thu được từ thụ thể tế bào T được mô tả ở đây bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm miền xuyên màng của tiểu đơn vị α TCR bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 5, được cải biến bởi sự thế của một hoặc nhiều gốc axit amin. Theo một số phương án, miền xuyên màng của tiểu đơn vị α TCR này được cải biến bởi sự thế của không nhiều hơn 5 gốc axit amin ở SEQ ID NO: 5. Theo một số phương án, miền xuyên màng của tiểu đơn vị α TCR này được cải biến bởi sự thế của một gốc axit amin duy nhất trong SEQ ID NO: 5. Theo một số phương án, ít nhất một trong số các axit amin được thế này được thế bằng gốc kỵ nước hơn gốc không được thế tương ứng. Theo một số phương án, mỗi loại trong số các axit amin được thế này được thế bằng gốc kỵ nước hơn gốc không được thế tương ứng. Theo một số phương án, ít nhất một trong số các axit amin được thế này là gần với axit amin trong TCRM được bao gồm trong liên kết với CD3. Theo một số phương án, mỗi axit amin trong số các axit amin được thế này là gần với axit amin trong TCRM được bao gồm trong liên kết với CD3.

Theo một số phương án, TCR-TM không xuất hiện tự nhiên thu được từ thụ thể tế bào T được mô tả ở đây bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm miền xuyên màng của tiểu đơn vị β TCR bao gồm trình tự axit amin của miền xuyên màng được chứa trong SEQ ID NO: 2 (*ví dụ*, SEQ ID NO: 6), được cải biến bởi sự thế của một hoặc nhiều gốc axit amin. Theo một số phương án, miền xuyên màng của tiểu đơn vị β TCR này được cải biến bởi sự thế của không nhiều hơn 5 gốc axit amin ở miền xuyên màng được chứa trong SEQ ID NO: 2. Theo một số phương án, miền xuyên màng của tiểu đơn vị β TCR

này được cải biến bởi sự thế của một gốc axit amin duy nhất trong miền xuyên màng được chứa trong SEQ ID NO: 2. Theo một số phương án, ít nhất một trong số các axit amin được thế này được thế bằng gốc kỵ nước hơn gốc không được thế tương ứng. Theo một số phương án, mỗi loại trong số các axit amin được thế này được thế bằng gốc kỵ nước hơn gốc không được thế tương ứng. Theo một số phương án, ít nhất một trong số các axit amin được thế này là gần với axit amin trong TCRM được bao gồm trong liên kết với CD3. Theo một số phương án, mỗi axit amin trong số các axit amin được thế này là gần với axit amin trong TCRM được bao gồm trong liên kết với CD3.

Theo một số phương án, TCR-TM không xuất hiện tự nhiên thu được từ thụ thể tế bào T được mô tả ở đây bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm miền xuyên màng của tiểu đơn vị β TCR bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 6, được cải biến bởi sự thế của một hoặc nhiều gốc axit amin. Theo một số phương án, miền xuyên màng của tiểu đơn vị β TCR này được cải biến bởi sự thế của không nhiều hơn 5 gốc axit amin ở SEQ ID NO: 6. Theo một số phương án, miền xuyên màng của tiểu đơn vị β TCR này được cải biến bởi sự thế của một gốc axit amin duy nhất trong SEQ ID NO: 6. Theo một số phương án, ít nhất một trong số các axit amin được thế này được thế bằng gốc kỵ nước hơn gốc không được thế tương ứng. Theo một số phương án, mỗi loại trong số các axit amin được thế này được thế bằng gốc kỵ nước hơn gốc không được thế tương ứng. Theo một số phương án, ít nhất một trong số các axit amin được thế này là gần với axit amin trong TCRM được bao gồm trong liên kết với CD3. Theo một số phương án, mỗi axit amin trong số các axit amin được thế này là gần với axit amin trong TCRM được bao gồm trong liên kết với CD3.

Theo một số phương án, TCR-TM không xuất hiện tự nhiên thu được từ thụ thể tế bào T được mô tả ở đây bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm miền xuyên màng của tiểu đơn vị δ TCR bao gồm trình tự axit amin của miền xuyên màng được chứa trong SEQ ID NO: 3 (*ví dụ*, SEQ ID NO: 7), được cải biến bởi sự thế của một hoặc nhiều gốc axit amin. Theo một số phương án, miền xuyên màng của tiểu đơn vị δ TCR này được cải biến bởi sự thế của không nhiều hơn 5 gốc axit amin ở miền xuyên màng được chứa trong SEQ ID NO: 3. Theo một số phương án, miền xuyên màng của tiểu đơn vị δ TCR này được cải biến bởi sự thế của một gốc axit amin duy nhất trong miền xuyên màng được chứa trong SEQ ID NO: 3. Theo một số phương án, ít nhất một trong số các axit

amin được thế này được thế bằng gốc kỵ nước hơn gốc không được thế tương ứng. Theo một số phương án, mỗi loại trong số các axit amin được thế này được thế bằng gốc kỵ nước hơn gốc không được thế tương ứng. Theo một số phương án, ít nhất một trong số các axit amin được thế này là gần với axit amin trong TCRM được bao gồm trong liên kết với CD3. Theo một số phương án, mỗi axit amin trong số các axit amin được thế này là gần với axit amin trong TCRM được bao gồm trong liên kết với CD3.

Theo một số phương án, TCR-TM không xuất hiện tự nhiên này bao gồm trình tự axit amin của miền xuyên màng được chứa trong SEQ ID NO: 3 (*ví dụ*, SEQ ID NO: 7), được cải biến bằng một hoặc nhiều sự thế (như các sự thế với các gốc kỵ nước nhiều hơn) ở các axit amin tương ứng với các axit amin sau đây trong SEQ ID NO: 7: L4, M6, V12, N15, F245, và L25. Theo một số phương án, TCR-TM không xuất hiện tự nhiên này bao gồm trình tự axit amin của miền xuyên màng được chứa trong SEQ ID NO: 3 được cải biến bởi các sự thế (như các sự thế với các gốc kỵ nước nhiều hơn) ở các axit amin tương ứng với V12 và N15 trong SEQ ID NO: 7. Theo một số phương án, TCR-TM không xuất hiện tự nhiên này bao gồm trình tự axit amin của miền xuyên màng được chứa trong SEQ ID NO: 3 được cải biến bởi một hoặc nhiều sự thế tương ứng với các sự thế sau đây trong SEQ ID NO: 7: L4C, M6V, V12F, N15S, F245S, và L25S. Theo một số phương án, TCR-TM không xuất hiện tự nhiên này bao gồm trình tự axit amin của miền xuyên màng được chứa trong SEQ ID NO: 3 được cải biến bởi các sự thế tương ứng với các sự thế V12F và N15S trong SEQ ID NO: 7. Theo một số phương án, TCR-TM không xuất hiện tự nhiên này bao gồm trình tự axit amin của trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 9-13.

Theo một số phương án, TCR-TM không xuất hiện tự nhiên thu được từ thụ thể tế bào T được mô tả ở đây bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm miền xuyên màng của tiểu đơn vị δ TCR bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 7, được cải biến bởi sự thế của một hoặc nhiều gốc axit amin. Theo một số phương án, miền xuyên màng của tiểu đơn vị δ TCR này được cải biến bởi sự thế của không nhiều hơn 5 gốc axit amin ở SEQ ID NO: 7. Theo một số phương án, miền xuyên màng của tiểu đơn vị δ TCR này được cải biến bởi sự thế của một gốc axit amin duy nhất trong SEQ ID NO: 7. Theo một số phương án, ít nhất một trong số các axit amin được thế này được thế bằng gốc kỵ nước hơn gốc không được thế tương ứng. Theo một số phương án, mỗi loại trong số các axit

amin được thế này được thế bằng gốc kỵ nước hơn gốc không được thế tương ứng. Theo một số phương án, ít nhất một trong số các axit amin được thế này là gần với axit amin trong TCRM được bao gồm trong liên kết với CD3. Theo một số phương án, mỗi axit amin trong số các axit amin được thế này là gần với axit amin trong TCRM được bao gồm trong liên kết với CD3.

Theo một số phương án, TCR-TM không xuất hiện tự nhiên này bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 7 được cải biến bằng một hoặc nhiều sự thế (như các sự thế với các gốc kỵ nước nhiều hơn) ở các axit amin tương ứng với các axit amin sau đây trong SEQ ID NO: 7: L4, M6, V12, N15, F245, và L25. Theo một số phương án, TCR-TM không xuất hiện tự nhiên này bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 7 được cải biến bởi các sự thế (như các sự thế với các gốc kỵ nước nhiều hơn) ở các axit amin tương ứng với V12 và N15 trong SEQ ID NO: 7. Theo một số phương án, TCR-TM không xuất hiện tự nhiên này bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 7 được cải biến bởi một hoặc nhiều sự thế tương ứng với các sự thế sau đây trong SEQ ID NO: 7: L4C, M6V, V12F, N15S, F245S, và L25S. Theo một số phương án, TCR-TM không xuất hiện tự nhiên này bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 7 được cải biến bởi các sự thế tương ứng với các sự thế V12F và N15S trong SEQ ID NO: 7. Theo một số phương án, TCR-TM không xuất hiện tự nhiên này bao gồm trình tự axit amin của trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 9-13.

Theo một số phương án, TCR-TM không xuất hiện tự nhiên thu được từ thụ thể tế bào T được mô tả ở đây bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm miền xuyên màng của tiểu đơn vị γ TCR bao gồm trình tự axit amin của miền xuyên màng được chứa trong SEQ ID NO: 4 (*ví dụ*, SEQ ID NO: 8), được cải biến bởi sự thế của một hoặc nhiều gốc axit amin. Theo một số phương án, miền xuyên màng của tiểu đơn vị γ TCR này được cải biến bởi sự thế của không nhiều hơn 5 gốc axit amin ở miền xuyên màng được chứa trong SEQ ID NO: 4. Theo một số phương án, miền xuyên màng của tiểu đơn vị γ TCR này được cải biến bởi sự thế của một gốc axit amin duy nhất trong miền xuyên màng được chứa trong SEQ ID NO: 4. Theo một số phương án, ít nhất một trong số các axit amin được thế này được thế bằng gốc kỵ nước hơn gốc không được thế tương ứng. Theo một số phương án, mỗi loại trong số các axit amin được thế này được thế bằng gốc kỵ nước hơn gốc không được thế tương ứng. Theo một số phương án, ít nhất một trong số

các axit amin được thế này là gần với axit amin trong TCRM được bao gồm trong liên kết với CD3. Theo một số phương án, mỗi axit amin trong số các axit amin được thế này là gần với axit amin trong TCRM được bao gồm trong liên kết với CD3.

Theo một số phương án, TCR-TM không xuất hiện tự nhiên này bao gồm trình tự axit amin của miền xuyên màng được chứa trong SEQ ID NO: 4 (*ví dụ*, SEQ ID NO: 8), được cải biến bằng một hoặc nhiều sự thế (như các sự thế với các gốc kỵ nước nhiều hơn) ở các axit amin tương ứng với các axit amin sau đây trong SEQ ID NO: 8: Y1, Y2, M3, L5, L8, V12, V13, F15, A16, I18, C19, C20, và C21. Theo một số phương án, TCR-TM không xuất hiện tự nhiên này bao gồm trình tự axit amin của miền xuyên màng được chứa trong SEQ ID NO: 4 được cải biến bởi các sự thế (như các sự thế với các gốc kỵ nước nhiều hơn) ở các axit amin tương ứng với Y2, M3, A16, và I18 trong SEQ ID NO: 8. Theo một số phương án, TCR-TM không xuất hiện tự nhiên này bao gồm trình tự axit amin của miền xuyên màng được chứa trong SEQ ID NO: 4 được cải biến bởi các sự thế (như các sự thế với các gốc kỵ nước nhiều hơn) ở các axit amin tương ứng với L8, V12, và F15 trong SEQ ID NO: 8. Theo một số phương án, TCR-TM không xuất hiện tự nhiên này bao gồm trình tự axit amin của miền xuyên màng được chứa trong SEQ ID NO: 4 được cải biến bởi một hoặc nhiều sự thế tương ứng với các sự thế sau đây trong SEQ ID NO: 8: Y1Q, Y2L, Y2I, M3V, M3I, L5C, L8F, V12F, V13Y, F15S, A16V, A16I, I18V, I18L, C19M, C20M, và C21G. Theo một số phương án, TCR-TM không xuất hiện tự nhiên này bao gồm trình tự axit amin của miền xuyên màng được chứa trong SEQ ID NO: 4 được cải biến bởi các sự thế tương ứng với các sự thế Y2L, M3V, A16V, và I18V trong SEQ ID NO: 8. Theo một số phương án, TCR-TM không xuất hiện tự nhiên này bao gồm trình tự axit amin của miền xuyên màng được chứa trong SEQ ID NO: 4 được cải biến bởi các sự thế tương ứng với các sự thế Y2I, M3I, A16I, và I18L trong SEQ ID NO: 8. Theo một số phương án, TCR-TM không xuất hiện tự nhiên này bao gồm trình tự axit amin của miền xuyên màng được chứa trong SEQ ID NO: 4 được cải biến bởi các sự thế tương ứng với các sự thế L8F, V12F, và F15S trong SEQ ID NO: 8. Theo một số phương án, TCR-TM không xuất hiện tự nhiên này bao gồm trình tự axit amin của trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 14-26.

Theo một số phương án, TCR-TM không xuất hiện tự nhiên thu được từ thụ thể tế bào T được mô tả ở đây bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm miền xuyên màng của tiểu

đơn vị γ TCR bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 8, được cải biến bởi sự thế của một hoặc nhiều gốc axit amin. Theo một số phương án, miền xuyên màng của tiểu đơn vị γ TCR này được cải biến bởi sự thế của không nhiều hơn 5 gốc axit amin ở SEQ ID NO: 8. Theo một số phương án, miền xuyên màng của tiểu đơn vị γ TCR được cải biến bằng cách thế gốc axit amin đơn ở SEQ ID NO: 8. Theo một số phương án, ít nhất một trong số các axit amin được thế này được thế bằng gốc kỵ nước hơn gốc không được thế tương ứng. Theo một số phương án, mỗi loại trong số các axit amin được thế này được thế bằng gốc kỵ nước hơn gốc không được thế tương ứng. Theo một số phương án, ít nhất một trong số các axit amin được thế này là gần với axit amin trong TCRM được bao gồm trong liên kết với CD3. Theo một số phương án, mỗi axit amin trong số các axit amin được thế này là gần với axit amin trong TCRM được bao gồm trong liên kết với CD3.

Theo một số phương án, TCR-TM không xuất hiện tự nhiên này bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 8 được cải biến bằng một hoặc nhiều sự thế (như các sự thế với các gốc kỵ nước nhiều hơn) ở các axit amin tương ứng với các axit amin sau đây trong SEQ ID NO: 8: Y1, Y2, M3, L5, L8, V12, V13, F15, A16, I18, C19, C20, và C21. Theo một số phương án, TCR-TM không xuất hiện tự nhiên này bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 8 được cải biến bởi các sự thế (như các sự thế với các gốc kỵ nước nhiều hơn) ở các axit amin tương ứng với Y2, M3, A16, và I18 trong SEQ ID NO: 8. Theo một số phương án, TCR-TM không xuất hiện tự nhiên này bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 8 được cải biến bởi các sự thế (như các sự thế với các gốc kỵ nước nhiều hơn) ở các axit amin tương ứng với L8, V12, và F15 trong SEQ ID NO: 8. Theo một số phương án, TCR-TM không xuất hiện tự nhiên này bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 8 được cải biến bởi một hoặc nhiều sự thế tương ứng với các sự thế sau đây trong SEQ ID NO: 8: Y1Q, Y2L, Y2I, M3V, M3I, L5C, L8F, V12F, V13Y, F15S, A16V, A16I, I18V, I18L, C19M, C20M, và C21G. Theo một số phương án, TCR-TM không xuất hiện tự nhiên này bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 8 được cải biến bởi các sự thế tương ứng với các sự thế Y2L, M3V, A16V, và I18V trong SEQ ID NO: 8. Theo một số phương án, TCR-TM không xuất hiện tự nhiên này bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 8 được cải biến bởi các sự thế tương ứng với các sự thế Y2I, M3I, A16I, và I18L trong SEQ ID NO: 8. Theo một số phương án, TCR-TM

không xuất hiện tự nhiên này bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 8 được cải biến bởi các sự thế tương ứng với các sự thế L8F, V12F, và F15S trong SEQ ID NO: 8. Theo một số phương án, TCR-TM không xuất hiện tự nhiên này bao gồm trình tự axit amin của trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 14-26.

Theo một số phương án, caTCR được mô tả ở đây liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích, bao gồm a) TCRD thứ nhất bao gồm TCR-TM thứ nhất bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin của các SEQ ID NO: 7 và 9-13, và TCRD thứ hai bao gồm TCR-TM thứ hai bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm trình tự axit amin của trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 8 hoặc 14-26, trong đó các TCRD thứ nhất và thứ hai tạo thành TCRM mà có khả năng huy động ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR; và b) môđun liên kết kháng nguyên mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích, trong đó môđun liên kết kháng nguyên này được liên kết với các TCRD thứ nhất và/hoặc thứ hai này. Theo một số phương án, ít nhất một trong số các TCR-TM này là không xuất hiện tự nhiên. Theo một số phương án, TCR-TM thứ nhất và TCR-TM thứ hai này được chọn theo loại bất kỳ trong số các caTCR được liệt kê trong bảng 2. Theo một số phương án, TCRD thứ nhất này còn bao gồm peptit kết nối TCR thứ nhất hoặc mảnh của nó và/hoặc TCRD thứ hai này còn bao gồm peptit kết nối TCR thứ hai hoặc mảnh của nó. Theo một số phương án, peptit kết nối thứ nhất này bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 31 hoặc 32, hoặc biến thể của nó, và/hoặc peptit kết nối thứ hai này bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 33 hoặc 34, hoặc biến thể của nó. Theo một số phương án, các peptit kết nối thứ nhất và thứ hai này được liên kết bằng liên kết disulfit. Theo một số phương án, TCRD thứ nhất còn này bao gồm miền nội bào TCR thứ nhất và/hoặc TCRD thứ hai này còn bao gồm miền nội bào TCR thứ hai. Theo một số phương án, miền nội bào TCR thứ hai này bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 36, hoặc biến thể của nó. Theo một số phương án, caTCR này còn bao gồm ít nhất một miền nội bào kèm theo bao gồm trình tự tín hiệu đồng kích thích tế bào T (như từ CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, hoặc CD40). Theo một số phương án, caTCR này còn bao gồm môđun ổn định hóa bao gồm miền ổn định hóa thứ nhất và miền ổn định hóa thứ hai, trong đó miền ổn định hóa thứ nhất và thứ hai này có ái lực liên kết với nhau mà ổn định hóa caTCR. Theo một số phương án, các miền ổn định hóa thứ nhất và thứ hai này được liên kết bởi liên kết disulfit. Theo một

số phương án, các miền ổn định hóa thứ nhất và thứ hai này bao gồm các miền kháng thể, như miền kháng thể C_H1 và C_L, hoặc các biến thể của nó. Theo một số phương án, TCRM này có khả năng huy động ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR được chọn từ nhóm bao gồm CD3δε, CD3γε, và ζζ. Theo một số phương án, TCRM này cho phép sự huy động được tăng cường của ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR khi so sánh với TCRM bao gồm các miền xuyên màng thụ thể tế bào T có các trình tự của các SEQ ID NO: 7 và 8. Theo một số phương án, TCRM này thúc đẩy sự tạo thành phức hợp caTCR-CD3. Theo một số phương án, có môđun đệm giữa hai môđun hoặc miền caTCR bất kỳ. Theo một số phương án, môđun liên kết kháng nguyên này là gốc kháng thể. Theo một số phương án, gốc kháng thể này là Fab, Fab', (Fab')2, Fv, hoặc Fv đơn chuỗi (scFv).

Bảng 2

ID của caTCR	TCR-TM thứ nhất (tiểu đơn vị δ)	TCR-TM thứ hai (tiểu đơn vị γ)
TM0	VLGLRMLFAKTVAVNFLLTAKLFFL (SEQ ID NO: 7)	YYMYLLLLLKSVVYFAIITCCLL (SEQ ID NO: 8)
TM1	VLGLRMLFAKTVAVNFLLTAKLFSL (SEQ ID NO: 9)	YYMYLLLLLKSVVYFAIITCCLL (SEQ ID NO: 8)
TM2	VLGLRMLFAKTVAVNFLLTAKLFFL (SEQ ID NO: 7)	YYMYLLLLLKSVYYFAIITCCLLRRTAF (SEQ ID NO: 14)
TM3	VLGLRMLFAKTVAVNFLLTAKLFFL (SEQ ID NO: 7)	YYMYLLLLLKSVVYFAIITCGLLRRTAF (SEQ ID NO: 15)
TM4	VLGLRMLFAKTVAVNFLLTAKLFFL (SEQ ID NO: 7)	YLVYLLLLLKSVVYFVIVTCCLLRRTAF (SEQ ID NO: 16)
TM5	VLGLRVLFAKTVAVNFLLTAKLFFL (SEQ ID NO: 10)	YLVYLLLLLKSVVYFVIVTCCLLRRTAF (SEQ ID NO: 16)
TM6	VLGLRMLFAKTVAVNFLLTAKLFFL (SEQ ID NO: 7)	YLMYLLLLLKSVVYFAIITCCLLRRTAF (SEQ ID NO: 17)
TM7	VLGLRMLFAKTVAVNFLLTAKLFFL (SEQ ID NO: 7)	YYVYLLLLLKSVVYFAIITCCLLRRTAF (SEQ ID NO: 18)
TM8	VLGLRMLFAKTVAVNFLLTAKLFFL (SEQ ID NO: 7)	YYMYLLLLLKSVVYFVIITCCLLRRTAF (SEQ ID NO: 19)
TM9	VLGLRMLFAKTVAVNFLLTAKLFFL (SEQ ID NO: 7)	YYMYLLLLLKSVVYFAIVTCCLLRRTAF (SEQ ID NO: 20)
TM10	VLGLRMLFAKTVAVNFLLTAKLFFL (SEQ ID NO: 7)	YYIYLLLLLKSVVYFAIITCCLLRRTAF (SEQ ID NO: 21)
TM11	VLGLRMLFAKTVAVNFLLTAKLFFL (SEQ ID NO: 7)	YIIYLLLLLKSVVYFIILTCCLLRRTAF (SEQ ID NO: 22)
TM12	VLGCRMLFAKTVAVNFLLTAKLFFL (SEQ ID NO: 11)	YYMYCLLLLKSVVYFAIITCCLLRRTAF (SEQ ID NO: 23)

TM13	VLGLRMLFAKTFAVSFLLTAKLFFL (SEQ ID NO: 12)	YYMYLLLFLKSFVYSAIITCCLLRRTAF (SEQ ID NO: 24)
TM14	VLGLRMLFAKTVAVNFLLTAKLFFL (SEQ ID NO: 7)	YYMYLLLLLKSVVYFAIITMCLLRRTAF (SEQ ID NO: 25)
TM15	VLGLRMLFAKTVAVNFLLTAKLFFS (SEQ ID NO: 13)	QYMYLLLLLKSVVYFAIITCCLLRRTAF (SEQ ID NO: 26)

Các môđun liên kết kháng nguyên

Theo một số phương án, theo loại bất kỳ trong số các caTCR được mô tả ở đây, môđun liên kết kháng nguyên này là gốc kháng thể. Theo một số phương án, gốc kháng thể này được chọn từ nhóm bao gồm Fab, Fab', (Fab')2, Fv, và Fv đơn chuỗi (scFv). Theo một số phương án, trong đó gốc kháng thể này là multime bao gồm chuỗi gốc kháng thể thứ nhất và chuỗi gốc kháng thể thứ hai, caTCR này bao gồm TCRD thứ nhất được liên kết với chuỗi gốc kháng thể thứ nhất hoặc thứ hai và TCRD thứ hai được liên kết với chuỗi gốc kháng thể còn lại. Theo một số phương án, gốc kháng thể này liên kết đặc hiệu với kháng nguyên bề mặt tế bào bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, CD19, CD20, CD22, CD47, GPC-3, ROR1, ROR2, BCMA, GPRC5D, và FCRL5, bao gồm các biến thể hoặc các đột biến của nó. Theo một số phương án, gốc kháng thể này liên kết đặc hiệu với phức hợp peptit/MHC, trong đó peptit này thu được từ protein bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, WT-1, AFP, HPV16-E7, NY-ESO-1, PRAME, EBV-LMP2A, HIV-1, KRAS, Histon H3.3, và PSA, bao gồm các biến thể hoặc các đột biến của nó.

Theo một số phương án, theo loại bất kỳ trong số các caTCR được mô tả ở đây, môđun liên kết kháng nguyên này là gốc kháng thể bao gồm các miền C_H1 và C_L. Theo một số phương án, miền C_H1 này thu được từ chuỗi nặng IgG (*ví dụ*, IgG1, IgG2, IgG3, hoặc IgG4), tùy ý của người. Theo một số phương án, miền C_H1 này là biến thể bao gồm một hoặc nhiều sự cải biến (*ví dụ*, sự thế, sự chèn, và/hoặc sự loại bỏ axit amin) so với trình tự mà từ đó nó thu được. Theo một số phương án, miền C_H1 này bao gồm trình tự axit amin của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 37-47, hoặc biến thể của nó. Theo một số phương án, miền C_H1 này bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 37, hoặc biến thể của nó. Theo một số phương án, miền C_L này thu được từ chuỗi nhẹ kappa hoặc lambda, tùy ý của người. Theo một số phương án, miền C_L này là biến thể bao gồm

một hoặc nhiều sự cải biến (*ví dụ*, sự thế, sự chèn, và/hoặc sự loại bỏ axit amin) so với trình tự mà từ đó nó thu được. Theo một số phương án, miền C_L này bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 48, hoặc biến thể của nó. Theo một số phương án, các miền C_H1 và/hoặc C_L này bao gồm một hoặc nhiều sự cải biến mà không thay đổi đáng kể ái lực liên kết của chúng với nhau. Theo một số phương án, các miền C_H1 và/hoặc C_L này bao gồm một hoặc nhiều sự cải biến mà làm tăng ái lực liên kết của chúng với nhau và/hoặc đưa vào liên kết disulfit không xuất hiện tự nhiên.

Theo một số phương án, theo loại bất kỳ trong số các caTCR được mô tả ở đây bao gồm gốc kháng thể mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích, gốc kháng thể này bao gồm các CDR hoặc các miền biến đổi (các miền V_H và/hoặc V_L) của gốc kháng thể đặc hiệu cho kháng nguyên đích. Theo một số phương án, gốc kháng thể này bao gồm các CDR hoặc các miền biến đổi (các miền V_H và/hoặc V_L) của gốc kháng thể đặc hiệu cho CD19 (xem, *ví dụ*, WO2017066136A2). Theo một số phương án, gốc kháng thể này bao gồm các CDR hoặc các miền biến đổi (các miền V_H và/hoặc V_L) của gốc kháng thể đặc hiệu cho CD19 (*ví dụ*, miền V_H bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 58 và/hoặc miền V_L bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 59, hoặc các CDR được chứa trong đó). Theo một số phương án, gốc kháng thể này bao gồm các CDR hoặc các miền biến đổi (các miền V_H và/hoặc V_L) của gốc kháng thể đặc hiệu cho CD20 (*ví dụ*, miền V_H bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 60 và/hoặc miền V_L bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 61, hoặc các CDR được chứa trong đó). Theo một số phương án, gốc kháng thể này bao gồm các CDR hoặc các miền biến đổi (các miền V_H và/hoặc V_L) của gốc kháng thể đặc hiệu cho CD22 (xem, *ví dụ*, USSN 62/650,955 được nộp ngày 30/03/2018, mà nội dung của nó được kết hợp toàn bộ ở đây bằng cách viện dẫn). Theo một số phương án, gốc kháng thể này bao gồm các CDR hoặc các miền biến đổi (các miền V_H và/hoặc V_L) của gốc kháng thể đặc hiệu cho CD22 (*ví dụ*, miền V_H bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 101 và/hoặc miền V_L bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 102, hoặc các CDR được chứa trong đó). Theo một số phương án, gốc kháng thể này bao gồm các CDR hoặc các miền biến đổi (các miền V_H và/hoặc V_L) của gốc kháng thể đặc hiệu cho GPC3 (xem, *ví dụ*, USSN 62/490,586 được nộp ngày 26/04/2017, mà nội

dung của nó được kết hợp toàn bộ ở đây bằng cách viện dẫn). Theo một số phương án, gốc kháng thể này bao gồm các CDR hoặc các miền biến đổi (các miền V_H và/hoặc V_L) của gốc kháng thể đặc hiệu cho GPC3 (*ví dụ*, miền V_H bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 64 và/hoặc miền V_L bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 65, hoặc các CDR được chứa trong đó). Theo một số phương án, gốc kháng thể này bao gồm các CDR hoặc các miền biến đổi (các miền V_H và/hoặc V_L) của gốc kháng thể đặc hiệu cho ROR1 (xem, *ví dụ*, WO2016/187220 và WO2016/187216). Theo một số phương án, gốc kháng thể này bao gồm các CDR hoặc các miền biến đổi (các miền V_H và/hoặc V_L) của gốc kháng thể đặc hiệu cho ROR2 (xem, *ví dụ*, WO2016/142768). Theo một số phương án, gốc kháng thể này bao gồm các CDR hoặc các miền biến đổi (các miền V_H và/hoặc V_L) của gốc kháng thể đặc hiệu cho BCMA (xem, *ví dụ*, WO2016/090327 và WO2016/090320). Theo một số phương án, gốc kháng thể này bao gồm các CDR hoặc các miền biến đổi (các miền V_H và/hoặc V_L) của gốc kháng thể đặc hiệu cho GPRC5D (xem, *ví dụ*, WO2016/090329 và WO2016/090312). Theo một số phương án, gốc kháng thể này bao gồm các CDR hoặc các miền biến đổi (các miền V_H và/hoặc V_L) của gốc kháng thể đặc hiệu cho FCRL5 (xem, *ví dụ*, WO2016/090337). Theo một số phương án, gốc kháng thể này bao gồm các CDR hoặc các miền biến đổi (các miền V_H và/hoặc V_L) của gốc kháng thể đặc hiệu cho WT-1 (*xem*, *ví dụ*, WO2012/135854, WO2015/070078, và WO2015/070061). Theo một số phương án, gốc kháng thể này bao gồm các CDR hoặc các miền biến đổi (các miền V_H và/hoặc V_L) của gốc kháng thể đặc hiệu cho AFP (*xem*, *ví dụ*, WO2016/161390). Theo một số phương án, gốc kháng thể này bao gồm các CDR hoặc các miền biến đổi (các miền V_H và/hoặc V_L) của gốc kháng thể đặc hiệu cho HPV16-E7 (xem, *ví dụ*, WO2016/182957). Theo một số phương án, gốc kháng thể này bao gồm các CDR hoặc các miền biến đổi (các miền V_H và/hoặc V_L) của gốc kháng thể đặc hiệu cho NY-ESO-1 (xem, *ví dụ*, WO2016/210365). Theo một số phương án, gốc kháng thể này bao gồm các CDR hoặc các miền biến đổi (các miền V_H và/hoặc V_L) của gốc kháng thể đặc hiệu cho PRAME (*xem*, *ví dụ*, WO2016/191246). Theo một số phương án, gốc kháng thể này bao gồm các CDR hoặc các miền biến đổi (các miền V_H và/hoặc V_L) của gốc kháng thể đặc hiệu cho EBV-LMP2A (xem, *ví dụ*, WO2016/201124). Theo một số phương án, gốc kháng thể này bao gồm các CDR hoặc các miền biến đổi (các miền V_H và/hoặc V_L) của gốc kháng thể đặc hiệu cho KRAS (*xem*, *ví dụ*, WO2016/154047). Theo một số phương

án, gốc kháng thể này bao gồm các CDR hoặc các miền biến đổi (các miền V_H và/hoặc V_L) của gốc kháng thể đặc hiệu cho PSA (*xem, ví dụ*, WO2017/015634). Theo một số phương án, gốc kháng thể này là Fab bao gồm một chuỗi Fab bao gồm miền V_H và miền C_H1, và một chuỗi Fab khác bao gồm miền V_L và miền C_L. Theo một số phương án, miền C_H1 này bao gồm trình tự axit amin của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 37-47 và/hoặc miền C_L này bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 48. Theo một số phương án, miền C_H1 này bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 37 và miền C_L này bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 48.

Các cấu trúc caTCR

Theo một số phương án, caTCR được mô tả ở đây liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích, bao gồm a) TCRD thứ nhất bao gồm TCR-TM thứ nhất thu được từ một trong số các miền xuyên màng của TCR và TCRD thứ hai bao gồm TCR-TM thứ hai thu được từ miền xuyên màng còn lại của TCR này, trong đó các TCRD thứ nhất và thứ hai này tạo thành TCRM mà có khả năng huy động ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR; và b) gốc kháng thể mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích, trong đó gốc kháng thể này được liên kết với các TCRD thứ nhất và/hoặc thứ hai này. Theo một số phương án, gốc kháng thể này được chọn từ nhóm bao gồm Fab, Fab', (Fab')2, Fv, và Fv đơn chuỗi (scFv). Theo một số phương án, gốc kháng thể này liên kết đặc hiệu với kháng nguyên bề mặt tế bào bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, CD19, CD20, CD22, CD47, GPC-3, ROR1, ROR2, BCMA, GPRC5D, và FCRL5, bao gồm các biến thể hoặc các đột biến của nó. Theo một số phương án, gốc kháng thể này liên kết đặc hiệu với phức hợp peptit/MHC, trong đó peptit này thu được từ protein bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, WT-1, AFP, HPV16-E7, NY-ESO-1, PRAME, EBV-LMP2A, HIV-1, KRAS, Histon H3.3, và PSA, bao gồm các biến thể hoặc các đột biến của nó. Theo một số phương án, caTCR này còn bao gồm môđun ổn định hóa bao gồm miền ổn định hóa thứ nhất và miền ổn định hóa thứ hai, trong đó miền ổn định hóa thứ nhất và thứ hai này có ái lực liên kết với nhau mà ổn định hóa caTCR. Theo một số phương án, môđun ổn định hóa này được định vị giữa TCRM và gốc kháng thể. Theo một số phương án, cả hai TCR-TM này đều xuất hiện tự nhiên. Theo một số phương án, ít nhất một trong số các TCR-TM này là không xuất hiện tự nhiên.

Theo một số phương án, caTCR được mô tả ở đây liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích, bao gồm a) TCRD thứ nhất bao gồm TCR-TM thứ nhất bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin của các SEQ ID NO: 7 và 9-13 và TCRD thứ hai bao gồm TCR-TM thứ hai bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm trình tự axit amin của trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 8 và 14-26, trong đó các TCRD thứ nhất và thứ hai này tạo thành TCRM mà có khả năng huy động ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR; và b) gốc kháng thể mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích, trong đó gốc kháng thể này được liên kết với các TCRD thứ nhất và/hoặc thứ hai này. Theo một số phương án, TCR-TM thứ nhất và TCR-TM thứ hai này được chọn theo loại bất kỳ trong số các caTCR được liệt kê trong bảng 2. Theo một số phương án, gốc kháng thể này được chọn từ nhóm bao gồm Fab, Fab', (Fab')2, Fv, và Fv đơn chuỗi (scFv). Theo một số phương án, gốc kháng thể này liên kết đặc hiệu với kháng nguyên bề mặt tế bào bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, CD19, CD20, CD22, CD47, GPC-3, ROR1, ROR2, BCMA, GPRC5D, và FCRL5, bao gồm các biến thể hoặc các đột biến của nó. Theo một số phương án, gốc kháng thể này liên kết đặc hiệu với phức hợp peptit/MHC, trong đó peptit này thu được từ protein bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, WT-1, AFP, HPV16-E7, NY-ESO-1, PRAME, EBV-LMP2A, HIV-1, KRAS, Histon H3.3, và PSA, bao gồm các biến thể hoặc các đột biến của nó. Theo một số phương án, TCRD thứ nhất này còn bao gồm peptit kết nối TCR thứ nhất hoặc mảnh của nó và/hoặc TCRD thứ hai này còn bao gồm peptit kết nối TCR thứ hai hoặc mảnh của nó. Theo một số phương án, peptit kết nối thứ nhất này bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 31 hoặc 32, hoặc biến thể của nó, và/hoặc peptit kết nối thứ hai này bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 33 hoặc 34, hoặc biến thể của nó. Theo một số phương án, các peptit kết nối thứ nhất và thứ hai này được liên kết bằng liên kết disulfit. Theo một số phương án, TCRD thứ nhất còn này bao gồm miền nội bào TCR thứ nhất và/hoặc TCRD thứ hai này còn bao gồm miền nội bào TCR thứ hai. Theo một số phương án, miền xuyên màng TCR thứ hai này bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 36, hoặc biến thể của nó. Theo một số phương án, caTCR này còn bao gồm ít nhất một miền nội bào kèm theo bao gồm trình tự tín hiệu đồng kích thích tế bào T (như từ CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, hoặc CD40). Theo một số phương án, caTCR này còn bao gồm môđun ổn định hóa bao gồm miền ổn định hóa thứ nhất và miền ổn định hóa thứ hai, trong đó miền ổn định hóa thứ nhất và thứ hai này có ái lực

liên kết với nhau mà ổn định hóa caTCR. Theo một số phương án, các miền ổn định hóa thứ nhất và thứ hai này được liên kết bởi liên kết disulfit. Theo một số phương án, TCRM này có khả năng huy động ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR được chọn từ nhóm bao gồm CD3δε, CD3γε, và ζζ. Theo một số phương án, TCRM này cho phép sự huy động được tăng cường của ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR khi so sánh với TCRM bao gồm các miền xuyên màng thụ thể tế bào T có các trình tự của các SEQ ID NO: 7 và 8. Theo một số phương án, TCRM này thúc đẩy sự tạo thành phức hợp caTCR-CD3. Theo một số phương án, có môđun đệm giữa hai môđun hoặc miền caTCR bất kỳ. Theo một số phương án, cả hai TCR-TM này đều xuất hiện tự nhiên. Theo một số phương án, ít nhất một trong số các TCR-TM này là không xuất hiện tự nhiên.

Theo một số phương án, caTCR được mô tả ở đây liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích, bao gồm a) TCRD thứ nhất bao gồm TCR-TM thứ nhất và TCRD thứ hai bao gồm TCR-TM thứ hai, trong đó các TCR-TM thứ nhất và thứ hai này bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm các trình tự axit amin của các SEQ ID NO: 7 và 8, 9 và 8, 7 và 14, 7 và 15, 7 và 16, 10 và 16, 7 và 17, 7 và 18, 7 và 19, 7 và 20, 7 và 21, 7 và 22, 11 và 23, 12 và 24, 7 và 25, hoặc 13 và 26, tương ứng, và trong đó các TCRD thứ nhất và thứ hai này tạo thành TCRM mà có khả năng huy động ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR; và b) gốc kháng thể mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích, trong đó gốc kháng thể này được liên kết với các TCRD thứ nhất và/hoặc thứ hai này. Ví dụ, theo một số phương án, caTCR được mô tả ở đây liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích, bao gồm a) TCRD thứ nhất bao gồm TCR-TM thứ nhất bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 7, và TCRD thứ hai bao gồm TCR-TM thứ hai bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 8, trong đó các TCRD thứ nhất và thứ hai này tạo thành TCRM mà có khả năng huy động ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR; và b) gốc kháng thể mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích, trong đó gốc kháng thể này được liên kết với các TCRD thứ nhất và/hoặc thứ hai này. Theo một số phương án, gốc kháng thể này được chọn từ nhóm bao gồm Fab, Fab', (Fab')2, Fv, và Fv đơn chuỗi (scFv). Theo một số phương án, gốc kháng thể này liên kết đặc hiệu với kháng nguyên bề mặt tế bào bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, CD19, CD20, CD22, CD47, GPC-3, ROR1, ROR2, BCMA, GPRC5D, và

FCRL5, bao gồm các biến thể hoặc các đột biến của nó. Theo một số phương án, gốc kháng thể này liên kết đặc hiệu với phức hợp peptit/MHC, trong đó peptit này thu được từ protein bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, WT-1, AFP, HPV16-E7, NY-ESO-1, PRAME, EBV-LMP2A, HIV-1, KRAS, Histon H3.3, và PSA, bao gồm các biến thể hoặc các đột biến của nó. Theo một số phương án, TCRD thứ nhất này còn bao gồm peptit kết nối TCR thứ nhất hoặc mảnh của nó và/hoặc TCRD thứ hai này còn bao gồm peptit kết nối TCR thứ hai hoặc mảnh của nó. Theo một số phương án, peptit kết nối thứ nhất này bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 31 hoặc 32, hoặc biến thể của nó, và/hoặc peptit kết nối thứ hai này bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 33 hoặc 34, hoặc biến thể của nó. Theo một số phương án, các peptit kết nối thứ nhất và thứ hai này được liên kết bằng liên kết disulfit. Theo một số phương án, TCRD thứ nhất còn này bao gồm miền nội bào TCR thứ nhất và/hoặc TCRD thứ hai này còn bao gồm miền nội bào TCR thứ hai. Theo một số phương án, miền nội bào TCR thứ hai này bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 36, hoặc biến thể của nó. Theo một số phương án, caTCR này còn bao gồm ít nhất một miền nội bào kèm theo bao gồm trình tự tín hiệu đồng kích thích tế bào T (như từ CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, hoặc CD40). Theo một số phương án, caTCR này còn bao gồm môđun ổn định hóa bao gồm miền ổn định hóa thứ nhất và miền ổn định hóa thứ hai, trong đó miền ổn định hóa thứ nhất và thứ hai này có ái lực liên kết với nhau mà ổn định hóa caTCR. Theo một số phương án, các miền ổn định hóa thứ nhất và thứ hai này được liên kết bởi liên kết disulfit. Theo một số phương án, TCRM này có khả năng huy động ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR được chọn từ nhóm bao gồm CD3δε, CD3γε, và ζζ. Theo một số phương án, TCRM này cho phép sự huy động được tăng cường của ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR khi so sánh với TCRM bao gồm các miền xuyên màng thụ thể tế bào T có các trình tự của các SEQ ID NO: 7 và 8. Theo một số phương án, TCRM này thúc đẩy sự tạo thành phức hợp caTCR-CD3. Theo một số phương án, có môđun đệm giữa hai môđun hoặc miền caTCR bất kỳ.

Theo một số phương án, caTCR được mô tả ở đây liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích, bao gồm a) chuỗi polypeptit thứ nhất bao gồm miền liên kết kháng nguyên thứ nhất bao gồm chuỗi Fab thứ nhất được liên kết với TCRD thứ nhất bao gồm TCR-TM thứ nhất thu được từ một trong số các miền xuyên màng của TCR; và b) chuỗi

polypeptit thứ hai bao gồm miền liên kết kháng nguyên thứ hai bao gồm chuỗi Fab thứ hai được liên kết với TCRD thứ hai bao gồm TCR-TM thứ hai thu được từ miền xuyên màng còn lại của TCR, trong đó các TCRD thứ nhất và thứ hai này tạo thành TCRM mà có khả năng huy động ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR, và trong đó các chuỗi Fab thứ nhất và thứ hai này tạo thành môđun liên kết kháng nguyên giống Fab mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích. Theo một số phương án, a) chuỗi Fab thứ nhất này bao gồm các miền kháng thể V_H và C_H1 và chuỗi Fab thứ hai này bao gồm các miền kháng thể V_L và C_L; hoặc b) chuỗi Fab thứ nhất này bao gồm các miền kháng thể V_L và C_L và chuỗi Fab thứ hai này bao gồm các miền kháng thể V_H và C_H1. Ví dụ, theo một số phương án, caTCR này bao gồm a) chuỗi polypeptit thứ nhất bao gồm chuỗi Fab thứ nhất bao gồm các miền kháng thể V_H và C_H1 được liên kết với TCRD thứ nhất và b) chuỗi Fab thứ hai bao gồm các miền kháng thể V_L và C_L được liên kết với TCRD thứ hai. Theo một số phương án, caTCR này bao gồm a) chuỗi Fab thứ nhất bao gồm các miền kháng thể V_L và C_L được liên kết với TCRD thứ nhất và b) chuỗi Fab thứ hai bao gồm các miền kháng thể V_H và C_H1 được liên kết với TCRD thứ hai. Theo một số phương án, có cầu nối peptit giữa một hoặc cả hai TCRD này và chuỗi Fab được liên kết của chúng. Theo một số phương án, có liên kết disulfit giữa gốc trong miền C_H1 và gốc trong miền C_L. Theo một số phương án, các miền C_H1 và/hoặc C_L này bao gồm một hoặc nhiều sự cải biến mà làm tăng ái lực liên kết của các chuỗi Fab với nhau. Theo một số phương án, các miền C_H1 và C_L này được trao đổi, sao cho một trong các chuỗi Fab bao gồm các miền kháng thể V_H và C_L và chuỗi Fab còn lại bao gồm các miền kháng thể V_L và C_H1. Theo một số phương án, môđun liên kết kháng nguyên giống Fab này liên kết đặc hiệu với kháng nguyên bề mặt tế bào bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, CD19, CD20, CD22, CD47, GPC-3, ROR1, ROR2, BCMA, GPRC5D, và FCRL5, bao gồm các biến thể hoặc các đột biến của nó. Theo một số phương án, môđun liên kết kháng nguyên giống Fab này liên kết đặc hiệu với phức hợp peptit/MHC, trong đó peptit này thu được từ protein bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, WT-1, AFP, HPV16-E7, NY-ESO-1, PRAME, EBV-LMP2A, HIV-1, KRAS, Histon H3.3, và PSA, bao gồm các biến thể hoặc các đột biến của nó. Theo một số phương án, caTCR này còn bao gồm môđun ổn định hóa bao gồm miền ổn định hóa thứ nhất và miền ổn định hóa thứ hai, trong đó miền ổn định hóa thứ nhất và thứ hai này có ái lực liên kết với nhau mà ổn định hóa caTCR. Theo một số phương án, miền ổn định hóa thứ nhất hoặc thứ hai này được

định vị giữa TCRD thứ nhất và chuỗi Fab liên kết của nó và miền ổn định hóa còn lại được định vị giữa TCRD thứ hai và chuỗi Fab liên kết của nó. Theo một số phương án, cả hai TCR-TM này đều xuất hiện tự nhiên. Theo một số phương án, ít nhất một trong số các TCR-TM này là không xuất hiện tự nhiên.

Theo một số phương án, caTCR được mô tả ở đây liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích, bao gồm a) chuỗi polypeptit thứ nhất bao gồm miền liên kết kháng nguyên thứ nhất bao gồm chuỗi Fab thứ nhất được liên kết với TCRD thứ nhất bao gồm TCR-TM thứ nhất bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin của các SEQ ID NO: 7 và 9-13; và b) chuỗi polypeptit thứ hai bao gồm miền liên kết kháng nguyên thứ hai bao gồm chuỗi Fab thứ hai được liên kết với TCRD thứ hai bao gồm TCR-TM thứ hai bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm trình tự axit amin của trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 8 và 14-26, trong đó các TCRD thứ nhất và thứ hai này tạo thành TCRM mà có khả năng huy động ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR, và trong đó các chuỗi Fab thứ nhất và thứ hai này tạo thành môđun liên kết kháng nguyên giống Fab mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích. Theo một số phương án, TCR-TM thứ nhất và TCR-TM thứ hai này được chọn theo loại bất kỳ trong số các caTCR được liệt kê trong bảng 2. Theo một số phương án, a) chuỗi Fab thứ nhất này bao gồm các miền kháng thể V_H và C_H1 và chuỗi Fab thứ hai này bao gồm các miền kháng thể V_L và C_L; hoặc b) chuỗi Fab thứ nhất này bao gồm các miền kháng thể V_L và C_L và chuỗi Fab thứ hai này bao gồm các miền kháng thể V_H và C_H1. Theo một số phương án, miền C_H1 này bao gồm trình tự axit amin của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 37-47 và/hoặc miền C_L này bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 48. Theo một số phương án, miền C_H1 này bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 37 và miền C_L này bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 48. Theo một số phương án, môđun liên kết kháng nguyên giống Fab này liên kết đặc hiệu với kháng nguyên bề mặt tế bào bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, CD19, CD20, CD22, CD47, GPC-3, ROR1, ROR2, BCMA, GPRC5D, và FCRL5, bao gồm các biến thể hoặc các đột biến của nó. Theo một số phương án, môđun liên kết kháng nguyên giống Fab này liên kết đặc hiệu với phức hợp peptit/MHC, trong đó peptit này thu được từ protein bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, WT-1, AFP, HPV16-E7, NY-ESO-1, PRAME, EBV-LMP2A, HIV-1, KRAS, Histon

H3.3, và PSA, bao gồm các biến thể hoặc các đột biến của nó. Theo một số phương án, TCRD thứ nhất này còn bao gồm peptit kết nối TCR thứ nhất hoặc mảnh của nó và/hoặc TCRD thứ hai này còn bao gồm peptit kết nối TCR thứ hai hoặc mảnh của nó. Theo một số phương án, peptit kết nối thứ nhất này bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 31 hoặc 32, hoặc biến thể của nó, và/hoặc peptit kết nối thứ hai này bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 33 hoặc 34, hoặc biến thể của nó. Theo một số phương án, các peptit kết nối thứ nhất và thứ hai này được liên kết bằng liên kết disulfit. Theo một số phương án, TCRD thứ nhất còn này bao gồm miền nội bào TCR thứ nhất và/hoặc TCRD thứ hai này còn bao gồm miền nội bào TCR thứ hai. Theo một số phương án, miền nội bào TCR thứ hai này bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 36, hoặc biến thể của nó. Theo một số phương án, caTCR này còn bao gồm ít nhất một miền nội bào kèm theo bao gồm trình tự tín hiệu đồng kích thích tế bào T (như từ CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, hoặc CD40). Theo một số phương án, caTCR này còn bao gồm môđun ổn định hóa bao gồm miền ổn định hóa thứ nhất và miền ổn định hóa thứ hai, trong đó miền ổn định hóa thứ nhất và thứ hai này có ái lực liên kết với nhau mà ổn định hóa caTCR. Theo một số phương án, các miền ổn định hóa thứ nhất và thứ hai này được liên kết bởi liên kết disulfit. Theo một số phương án, TCRM này có khả năng huy động ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR được chọn từ nhóm bao gồm CD3δε, CD3γε, và ζζ. Theo một số phương án, TCRM này cho phép sự huy động được tăng cường của ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR khi so sánh với TCRM bao gồm các miền xuyên màng thụ thể tế bào T có các trình tự của các SEQ ID NO: 7 và 8. Theo một số phương án, TCRM này thúc đẩy sự tạo thành phức hợp caTCR-CD3. Theo một số phương án, có môđun đệm giữa hai môđun hoặc miền caTCR bất kỳ. Theo một số phương án, cả hai TCR-TM này đều xuất hiện tự nhiên. Theo một số phương án, ít nhất một trong số các TCR-TM này là không xuất hiện tự nhiên.

Theo một số phương án, caTCR được mô tả ở đây liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích, bao gồm a) chuỗi polypeptit thứ nhất bao gồm miền liên kết kháng nguyên thứ nhất bao gồm chuỗi Fab thứ nhất được liên kết với TCRD thứ nhất bao gồm TCR-TM thứ nhất và chuỗi polypeptit thứ hai bao gồm miền liên kết kháng nguyên thứ hai bao gồm chuỗi Fab thứ hai được liên kết với TCRD thứ hai bao gồm TCR-TM thứ hai, trong đó các TCR-TM thứ nhất và thứ hai này bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm các

trình tự axit amin của các SEQ ID NO: 7 và 8, 9 và 8, 7 và 14, 7 và 15, 7 và 16, 10 và 16, 7 và 17, 7 và 18, 7 và 19, 7 và 20, 7 và 21, 7 và 22, 11 và 23, 12 và 24, 7 và 25, hoặc 13 và 26, tương ứng, trong đó các TCRD thứ nhất và thứ hai này tạo thành TCRM mà có khả năng huy động ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR, và trong đó các chuỗi Fab thứ nhất và thứ hai này tạo thành môđun liên kết kháng nguyên giống Fab mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích. Theo một số phương án, a) chuỗi Fab thứ nhất này bao gồm các miền kháng thể V_H và C_H1 và chuỗi Fab thứ hai này bao gồm các miền kháng thể V_L và C_L; hoặc b) chuỗi Fab thứ nhất này bao gồm các miền kháng thể V_L và C_L và chuỗi Fab thứ hai này bao gồm các miền kháng thể V_H và C_H1. Theo một số phương án, miền C_H1 này bao gồm trình tự axit amin của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 37-47 và/hoặc miền C_L này bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 48. Theo một số phương án, miền C_H1 này bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 37 và miền C_L này bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 48. Theo một số phương án, môđun liên kết kháng nguyên giống Fab này liên kết đặc hiệu với kháng nguyên bề mặt tế bào bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, CD19, CD20, CD22, CD47, GPC-3, ROR1, ROR2, BCMA, GPRC5D, và FCRL5, bao gồm các biến thể hoặc các đột biến của nó. Theo một số phương án, môđun liên kết kháng nguyên giống Fab này liên kết đặc hiệu với phức hợp peptit/MHC, trong đó peptit này thu được từ protein bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, WT-1, AFP, HPV16-E7, NY-ESO-1, PRAME, EBV-LMP2A, HIV-1, KRAS, Histon H3.3, và PSA, bao gồm các biến thể hoặc các đột biến của nó. Theo một số phương án, TCRD thứ nhất này còn bao gồm peptit kết nối TCR thứ nhất hoặc mảnh của nó và/hoặc TCRD thứ hai này còn bao gồm peptit kết nối TCR thứ hai hoặc mảnh của nó. Theo một số phương án, peptit kết nối thứ nhất này bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 31 hoặc 32, hoặc biến thể của nó, và/hoặc peptit kết nối thứ hai này bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 33 hoặc 34, hoặc biến thể của nó. Theo một số phương án, các peptit kết nối thứ nhất và thứ hai này được liên kết bằng liên kết disulfit. Theo một số phương án, TCRD thứ nhất còn này bao gồm miền nội bào TCR thứ nhất và/hoặc TCRD thứ hai này còn bao gồm miền nội bào TCR thứ hai. Theo một số phương án, miền nội bào TCR thứ hai này bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 36, hoặc biến thể của nó. Theo một số phương án, caTCR này còn bao gồm ít nhất một miền nội bào kèm theo bao gồm trình tự tín hiệu đồng kích thích tế bào T (như từ CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40,

CD30, hoặc CD40). Theo một số phương án, caTCR này còn bao gồm môđun ổn định hóa bao gồm miền ổn định hóa thứ nhất và miền ổn định hóa thứ hai, trong đó miền ổn định hóa thứ nhất và thứ hai này có ái lực liên kết với nhau mà ổn định hóa caTCR. Theo một số phương án, các miền ổn định hóa thứ nhất và thứ hai này được liên kết bởi liên kết disulfit. Theo một số phương án, TCRM này có khả năng huy động ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR được chọn từ nhóm bao gồm CD3δε, CD3γε, và ζζ. Theo một số phương án, TCRM này cho phép sự huy động được tăng cường của ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR khi so sánh với TCRM bao gồm các miền xuyên màng thụ thể tế bào T có các trình tự của các SEQ ID NO: 7 và 8. Theo một số phương án, TCRM này thúc đẩy sự tạo thành phức hợp caTCR-CD3. Theo một số phương án, có môđun đệm giữa hai môđun hoặc miền caTCR bất kỳ.

Theo một số phương án, caTCR được mô tả ở đây liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích, bao gồm a) TCRD thứ nhất bao gồm TCR-TM thứ nhất thu được từ một trong các miền xuyên màng của TCR và TCRD thứ hai bao gồm TCR-TM thứ hai thu được từ miền xuyên màng còn lại của TCR này, trong đó các TCRD thứ nhất và thứ hai này tạo thành TCRM mà có khả năng huy động ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR; và b) Fab' mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích, trong đó Fab' này bao gồm chuỗi Fab' thứ nhất bao gồm V_H, C_H1, và các miền kháng thể bản lề bộ phận và chuỗi Fab' thứ hai bao gồm các miền kháng thể V_L và C_L, và trong đó chuỗi Fab' thứ nhất này được liên kết với TCRD thứ nhất hoặc thứ hai và chuỗi Fab' thứ hai này được liên kết với TCRD còn lại. Theo một số phương án, có cầu nối peptit giữa một hoặc cả hai TCRD này và chuỗi Fab' được liên kết của chúng. Theo một số phương án, có liên kết disulfit giữa gốc trong miền C_H1 và gốc trong miền C_L. Theo một số phương án, các miền C_H1 và/hoặc C_L này bao gồm một hoặc nhiều sự cải biến mà làm tăng ái lực liên kết của các chuỗi Fab' với nhau. Theo một số phương án, các miền C_H1 và C_L này được trao đổi, sao cho chuỗi Fab' thứ nhất bao gồm các miền kháng thể V_H, C_L, và miền kháng thể bản lề bộ phận và chuỗi Fab' thứ hai này bao gồm các miền V_L và C_H1. Theo một số phương án, Fab' này liên kết đặc hiệu với kháng nguyên bề mặt tế bào bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, CD19, CD20, CD22, CD47, GPC-3, ROR1, ROR2, BCMA, GPRC5D, và FCRL5, bao gồm các biến thể hoặc các đột biến của nó. Theo một số phương án, Fab' này liên kết đặc hiệu với phức hợp peptit/MHC, trong đó peptit này thu

được từ protein bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, WT-1, AFP, HPV16-E7, NY-ESO-1, PRAME, EBV-LMP2A, HIV-1, KRAS, Histon H3.3, và PSA, bao gồm các biến thể hoặc các đột biến của nó. Theo một số phương án, caTCR này còn bao gồm môđun ổn định hóa bao gồm miền ổn định hóa thứ nhất và miền ổn định hóa thứ hai, trong đó miền ổn định hóa thứ nhất và thứ hai này có ái lực liên kết với nhau mà ổn định hóa caTCR. Theo một số phương án, miền ổn định hóa thứ nhất hoặc thứ hai này được định vị giữa TCRD thứ nhất và chuỗi Fab' liên kết của nó và miền ổn định hóa còn lại được định vị giữa TCRD thứ hai và chuỗi Fab' liên kết của nó. Theo một số phương án, cả hai TCR-TM này đều xuất hiện tự nhiên. Theo một số phương án, ít nhất một trong số các TCR-TM này là không xuất hiện tự nhiên.

Theo một số phương án, caTCR được mô tả ở đây liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích, bao gồm a) TCRD thứ nhất bao gồm TCR-TM thứ nhất thu được từ một trong số các miền xuyên màng của TCR và TCRD thứ hai bao gồm TCR-TM thứ hai thu được từ miền xuyên màng còn lại của TCR này, trong đó các TCRD thứ nhất và thứ hai này tạo thành TCRM mà có khả năng huy động ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR; và b) (Fab')2 mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích, trong đó (Fab')2 này bao gồm các chuỗi (Fab')2 thứ nhất và thứ hai bao gồm các miền kháng thể V_H, C_H1, và miền kháng thể bản lề bộ phận và các chuỗi (Fab')2 thứ ba và thứ tư bao gồm các miền kháng thể V_L và C_L, và trong đó chuỗi (Fab')2 thứ nhất này được liên kết với TCRD thứ nhất hoặc thứ hai và chuỗi (Fab')2 thứ hai này được liên kết với TCRD còn lại. Theo một số phương án, có cầu nối peptit giữa một hoặc cả hai TCRD này và chuỗi (Fab')2 được liên kết của chúng. Theo một số phương án, có liên kết disulfit giữa gốc trong miền C_H1 và gốc trong miền C_L. Theo một số phương án, các miền C_H1 và/hoặc C_L này bao gồm một hoặc nhiều sự cải biến mà làm tăng ái lực liên kết của các chuỗi (Fab')2 với nhau. Theo một số phương án, các miền C_H1 và C_L này được trao đổi, sao cho các chuỗi (Fab')2 thứ nhất và thứ hai bao gồm các miền kháng thể V_H, C_L, và miền kháng thể bản lề bộ phận và các chuỗi (Fab')2 thứ ba và thứ tư bao gồm các miền V_L và C_H1. Theo một số phương án, (Fab')2 này liên kết đặc hiệu với kháng nguyên bề mặt tế bào bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, CD19, CD20, CD22, CD47, GPC-3, ROR1, ROR2, BCMA, GPRC5D, và FCRL5, bao gồm các biến thể hoặc các đột biến của nó. Theo một số phương án, (Fab')2 này liên kết đặc hiệu với phức hợp peptit/MHC,

trong đó peptit này thu được từ protein bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, WT-1, AFP, HPV16-E7, NY-ESO-1, PRAME, EBV-LMP2A, HIV-1, KRAS, Histon H3.3, và PSA, bao gồm các biến thể hoặc các đột biến của nó. Theo một số phương án, caTCR này còn bao gồm môđun ổn định hóa bao gồm miền ổn định hóa thứ nhất và miền ổn định hóa thứ hai, trong đó miền ổn định hóa thứ nhất và thứ hai này có ái lực liên kết với nhau mà ổn định hóa caTCR. Theo một số phương án, miền ổn định hóa thứ nhất hoặc thứ hai này được định vị giữa TCRD thứ nhất và chuỗi (Fab')2 liên kết của nó và miền ổn định hóa còn lại được định vị giữa TCRD thứ hai và chuỗi (Fab')2 liên kết của nó. Theo một số phương án, cả hai TCR-TM này đều xuất hiện tự nhiên. Theo một số phương án, ít nhất một trong số các TCR-TM này là không xuất hiện tự nhiên.

Theo một số phương án, caTCR được mô tả ở đây liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích, bao gồm a) TCRD thứ nhất bao gồm TCR-TM thứ nhất thu được từ một trong số các miền xuyên màng của TCR và TCRD thứ hai bao gồm TCR-TM thứ hai thu được từ miền xuyên màng còn lại của TCR này, trong đó các TCRD thứ nhất và thứ hai này tạo thành TCRM mà có khả năng huy động ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR; và b) Fv mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích, trong đó Fv này bao gồm chuỗi Fv thứ nhất bao gồm miền kháng thể V_H và chuỗi Fv thứ hai bao gồm miền kháng thể V_L, và trong đó chuỗi Fv thứ nhất này được liên kết với TCRD thứ nhất hoặc thứ hai và chuỗi Fv thứ hai này được liên kết với TCRD còn lại. Theo một số phương án, có cầu nối peptit giữa một hoặc cả hai TCRD này và chuỗi Fv được liên kết của chúng. Theo một số phương án, Fv này liên kết đặc hiệu với kháng nguyên bề mặt tế bào bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, CD19, CD20, CD22, CD47, GPC-3, ROR1, ROR2, BCMA, GPRC5D, và FCRL5, bao gồm các biến thể hoặc các đột biến của nó. Theo một số phương án, Fv này liên kết đặc hiệu với phức hợp peptit/MHC, trong đó peptit này thu được từ protein bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, WT-1, AFP, HPV16-E7, NY-ESO-1, PRAME, EBV-LMP2A, HIV-1, KRAS, Histon H3.3, và PSA, bao gồm các biến thể hoặc các đột biến của nó. Theo một số phương án, caTCR này còn bao gồm môđun ổn định hóa bao gồm miền ổn định hóa thứ nhất và miền ổn định hóa thứ hai, trong đó miền ổn định hóa thứ nhất và thứ hai này có ái lực liên kết với nhau mà ổn định hóa caTCR. Theo một số phương án, miền ổn định hóa thứ nhất hoặc thứ hai này được định vị giữa TCRD thứ nhất và chuỗi Fv liên kết của nó và miền ổn định hóa còn lại

được định vị giữa TCRD thứ hai và chuỗi Fv liên kết của nó. Theo một số phương án, cả hai TCR-TM này đều xuất hiện tự nhiên. Theo một số phương án, ít nhất một trong số các TCR-TM này là không xuất hiện tự nhiên.

Theo một số phương án, caTCR được mô tả ở đây liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích, bao gồm a) TCRD thứ nhất bao gồm TCR-TM thứ nhất thu được từ một trong số các miền xuyên màng của TCR và TCRD thứ hai bao gồm TCR-TM thứ hai thu được từ miền xuyên màng còn lại của TCR này, trong đó các TCRD thứ nhất và thứ hai này tạo thành TCRM mà có khả năng huy động ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR; và b) scFv thứ nhất mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích, trong đó scFv thứ nhất này bao gồm các miền kháng thể V_H và V_L, và trong đó scFv thứ nhất này được liên kết với TCRD thứ nhất hoặc thứ hai. Theo một số phương án, caTCR này còn bao gồm môđun liên kết kháng nguyên thứ hai được liên kết với scFv thứ nhất hoặc với TCRD mà không được liên kết với scFv thứ nhất này. Theo một số phương án, môđun liên kết kháng nguyên thứ hai này liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích. Theo một số phương án, môđun liên kết kháng nguyên thứ hai này liên kết đặc hiệu với kháng nguyên không phải kháng nguyên đích. Theo một số phương án, môđun liên kết kháng nguyên thứ hai này là scFv thứ hai. Theo một số phương án, có cầu nối peptit giữa scFv thứ nhất và TCRD liên kết của nó và/hoặc giữa môđun liên kết kháng nguyên thứ hai và scFv hoặc TCRD liên kết của nó. Theo một số phương án, scFv liên kết đặc hiệu với kháng nguyên bề mặt tế bào bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, CD19, CD20, CD22, CD47, GPC-3, ROR1, ROR2, BCMA, GPRC5D, và FCRL5, bao gồm các biến thể hoặc các đột biến của nó. Theo một số phương án, scFv này liên kết đặc hiệu với phức hợp peptit/MHC, trong đó peptit này thu được từ protein bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, WT-1, AFP, HPV16-E7, NY-ESO-1, PRAME, EBV-LMP2A, HIV-1, KRAS, Histon H3.3, và PSA, bao gồm các biến thể hoặc các đột biến của nó. Theo một số phương án, caTCR này còn bao gồm môđun ổn định hóa bao gồm miền ổn định hóa thứ nhất và miền ổn định hóa thứ hai, trong đó miền ổn định hóa thứ nhất và thứ hai này có ái lực liên kết với nhau mà ổn định hóa caTCR. Theo một số phương án, miền ổn định hóa thứ nhất hoặc thứ hai này được định vị giữa scFv thứ nhất và TCRD liên kết của nó và miền ổn định hóa còn lại được liên kết với TCRD thứ hai. Theo một số phương án, cả hai

TCR-TM này đều xuất hiện tự nhiên. Theo một số phương án, ít nhất một trong số các TCR-TM này là không xuất hiện tự nhiên.

Theo một số phương án, caTCR được mô tả ở đây liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích, bao gồm a) TCRD thứ nhất bao gồm TCR-TM thứ nhất thu được từ một trong số các miền xuyên màng của TCR và TCRD thứ hai bao gồm TCR-TM thứ hai thu được từ miền xuyên màng còn lại của TCR này, trong đó các TCRD thứ nhất và thứ hai này tạo thành TCRM mà có khả năng huy động ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR; và b) scFv thứ nhất mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích và scFv thứ hai, trong đó các scFv thứ nhất và thứ hai này bao gồm các miền kháng thể V_H và V_L, và trong đó scFv thứ nhất này được liên kết với TCRD thứ nhất hoặc thứ hai và scFv thứ hai này được liên kết với TCRD còn lại. Theo một số phương án, TCRD thứ hai liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích. Theo một số phương án, scFv thứ hai này bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm trình tự axit amin của scFv thứ nhất. Theo một số phương án, scFv thứ hai này liên kết đặc hiệu với kháng nguyên khác với kháng nguyên đích. Theo một số phương án, các scFv thứ nhất và/hoặc thứ hai này liên kết đặc hiệu, một cách riêng rẽ, với kháng nguyên bề mặt tế bào bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, CD19, CD20, CD22, CD47, GPC-3, ROR1, ROR2, BCMA, GPRC5D, và FCRL5, bao gồm các biến thể hoặc các đột biến của nó. Theo một số phương án, các scFv thứ nhất hoặc thứ hai này liên kết đặc hiệu, một cách riêng rẽ, với phức hợp peptit/MHC, trong đó peptit này thu được từ protein bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, WT-1, AFP, HPV16-E7, NY-ESO-1, PRAME, EBV-LMP2A, HIV-1, KRAS, Histone H3.3, và PSA, bao gồm các biến thể hoặc các đột biến của nó. Theo một số phương án, caTCR này còn bao gồm môđun ổn định hóa bao gồm miền ổn định hóa thứ nhất và miền ổn định hóa thứ hai, trong đó miền ổn định hóa thứ nhất và thứ hai này có ái lực liên kết với nhau mà ổn định hóa caTCR. Theo một số phương án, miền ổn định hóa thứ nhất hoặc thứ hai này được định vị giữa scFv thứ nhất và TCRD liên kết của nó và miền ổn định hóa còn lại được định vị giữa scFv thứ hai và TCRD liên kết của nó. Theo một số phương án, cả hai TCR-TM này đều xuất hiện tự nhiên. Theo một số phương án, ít nhất một trong số các TCR-TM này là không xuất hiện tự nhiên.

Các caTCR đa đặc hiệu

Theo một số phương án, caTCR này là caTCR đa đặc hiệu mà liên kết đặc hiệu với hai hoặc nhiều (*ví dụ*, 2, 3, 4, hoặc nhiều hơn) kháng nguyên hoặc epitop đích khác nhau. Theo một số phương án, caTCR đa đặc hiệu này liên kết đặc hiệu với hai hoặc nhiều (*ví dụ*, 2, 3, 4, hoặc nhiều hơn) kháng nguyên đích khác nhau. Theo một số phương án, caTCR đa đặc hiệu này liên kết đặc hiệu với hai hoặc nhiều (*ví dụ*, 2, 3, 4, hoặc nhiều hơn) epitop khác nhau trên cùng kháng nguyên đích. Theo một số phương án, caTCR đa đặc hiệu bao gồm môđun liên kết kháng nguyên cho mỗi kháng nguyên hoặc epitop. Theo một số phương án, caTCR đa đặc hiệu này bao gồm nhiều hơn hai môđun liên kết kháng nguyên cho ít nhất một kháng nguyên hoặc epitop. Theo một số phương án, caTCR đa đặc hiệu này bao gồm môđun liên kết kháng nguyên đa đặc hiệu bao gồm hai hoặc nhiều (*ví dụ*, 2, 3, 4, hoặc nhiều hơn) miền liên kết kháng nguyên mỗi miền liên kết đặc hiệu với kháng nguyên hoặc epitop. Theo một số phương án, caTCR đa đặc hiệu này là đặc hiệu kép. Theo một số phương án, caTCR đa đặc hiệu này là ba đặc hiệu.

Các phân tử đa đặc hiệu là các phân tử mà có các tính đặc hiệu liên kết với ít nhất hai kháng nguyên hoặc epitop khác nhau *(ví dụ,* các kháng thể đặc hiệu kép có tính đặc hiệu liên kết với hai kháng nguyên hoặc epitop). Các caTCR đa đặc hiệu có nhiều hơn hai hóa trị và/hoặc tính đặc hiệu cũng được dự tính. Các kháng thể đặc hiệu kép đã được mô tả, *ví dụ*, xem, Brinkmann U. và Kontermann R.E. (2017) *MABS*, 9(2), 182-212. Các kháng thể ba đặc hiệu có thể được bào chế. *Xem*, Tutt *et al. J. Immunol.* 147: 60 (1991). Cũng được đánh giá rằng người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật có thể chọn các đặc điểm thích hợp của các phân tử đa đặc hiệu riêng rẽ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật để tạo thành caTCR đa đặc hiệu.

Theo một số phương án, caTCR này (cũng được đề cập ở đây là "caTCR đa đặc hiệu") bao gồm: a) môđun liên kết kháng nguyên đa đặc hiệu (*ví dụ*, đặc hiệu kép) bao gồm miền liên kết kháng nguyên thứ nhất mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích thứ nhất và miền liên kết kháng nguyên thứ hai mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích thứ hai; và b) TCRM bao gồm TCRD thứ nhất (TCRD1) bao gồm TCR-TM thứ nhất và TCRD thứ hai (TCRD2) bao gồm TCR-TM thứ hai; trong đó TCRM này thúc đẩy sự huy động của ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR. Theo một số phương án, TCRD thứ nhất này còn bao gồm peptit kết nối TCR thứ nhất hoặc mảnh

của nó và/hoặc TCRD thứ hai này còn bao gồm peptit kết nối TCR thứ hai hoặc mảnh của nó. Theo một số phương án, peptit kết nối thứ nhất này bao gồm toàn bộ hoặc một phần của peptit kết nối của tiểu đơn vị TCR mà từ đó TCR-TM thứ nhất này thu được, hoặc biến thể của nó, và/hoặc peptit kết nối thứ hai này bao gồm toàn bộ hoặc một phần của peptit kết nối của tiểu đơn vị TCR mà từ đó TCR-TM thứ hai này thu được, hoặc biến thể của nó. Theo một số phương án, các peptit kết nối thứ nhất và thứ hai này được liên kết bằng liên kết disulfit. Theo một số phương án, TCRD thứ nhất còn này bao gồm miền nội bào TCR thứ nhất và/hoặc TCRD thứ hai này còn bao gồm miền nội bào TCR thứ hai. Theo một số phương án, miền nội bào TCR thứ nhất này bao gồm trình tự từ miền nội bào của tiểu đơn vị TCR mà từ đó TCR-TM thứ nhất thu được và/hoặc miền nội bào TCR thứ hai này bao gồm trình tự từ miền nội bào của tiểu đơn vị TCR mà từ đó TCR-TM thứ hai thu được. Theo một số phương án, TCRD thứ nhất này là mảnh của tiểu đơn vị TCR mà từ đó TCR-TM thứ nhất này thu được và/hoặc TCRD thứ hai này là mảnh của tiểu đơn vị TCR mà từ đó TCR-TM thứ hai thu được. Theo một số phương án, caTCR này còn bao gồm ít nhất một miền nội bào kèm theo bao gồm trình tự tín hiệu đồng kích thích tế bào T (như từ CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, hoặc CD40). Theo một số phương án, caTCR này còn bao gồm môđun ổn định hóa bao gồm miền ổn định hóa thứ nhất và miền ổn định hóa thứ hai, trong đó miền ổn định hóa thứ nhất và thứ hai này có ái lực liên kết với nhau mà ổn định hóa caTCR. Theo một số phương án, các miền ổn định hóa thứ nhất và thứ hai này được liên kết bởi liên kết disulfit. Theo một số phương án, các miền ổn định hóa thứ nhất và thứ hai này bao gồm gốc kháng thể, như các miền kháng thể C_H1 và C_L, hoặc các biến thể của nó. Theo một số phương án, TCRM này có khả năng huy động ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR được chọn từ nhóm bao gồm CD3δε, CD3γε, và ζζ. Theo một số phương án, TCRM này cho phép sự huy động được tăng cường của ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR khi so sánh với TCRM bao gồm các miền xuyên màng thụ thể tế bào T αβ xuất hiện tự nhiên. Theo một số phương án, TCRM này thúc đẩy sự tạo thành phức hợp caTCR-CD3. Theo một số phương án, có môđun đệm giữa hai môđun hoặc miền caTCR bất kỳ. Theo một số phương án, cả TCR-TM thứ nhất và TCR-TM thứ hai này đều xuất hiện tự nhiên. Theo một số phương án, ít nhất một trong số các TCR-TM này là không xuất hiện tự nhiên. Theo một số phương án, TCR-TM thứ nhất này bao gồm lên đến 5 sự thế axit amin (*ví dụ*, sự thế axit amin đơn) so với miền xuyên

màng mà từ đó nó thu được và/hoặc TCR-TM thứ hai bao gồm lên đến 5 sự thế axit amin (*ví dụ*, sự thế axit amin đơn) so với miền xuyên màng mà từ đó nó thu được. Theo một số phương án, axit amin được thế ở TCR-TM thứ nhất là gần với axit amin được thế ở TCR-TM thứ hai. Theo một số phương án, một hoặc nhiều axit amin được thế là gần với axit amin ở TCR-TM thứ nhất hoặc thứ hai được bao gồm trong liên kết với CD3. Theo một số phương án, một hoặc nhiều (*ví dụ*, mỗi) axit amin được thế có tính kỵ nước nhiều hơn axit amin không được thế tương ứng của chúng. Theo một số phương án, TCR-TM thứ nhất này bao gồm trình tự axit amin của trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 7 và 9-13, và trong đó TCR-TM thứ hai này bao gồm trình tự axit amin của trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 8 và 14-26.

Các cấu trúc làm ví dụ của các caTCR đặc hiệu kép được thể hiện trong các hình vẽ từ Fig.13A đến Fig.13E, trong đó các kháng nguyên đích này là CD19 và CD22, nhưng người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật sẽ dễ dàng đánh giá rằng các caTCR đặc hiệu kép hướng đích các kháng nguyên hoặc epitop đích khác có thể được bào chế bằng cách sử dụng cùng định dạng cấu trúc này.

Ví dụ, các miền biến đổi kép (DVD) thu được từ các DVD IgG (xem, DiGiammarino *et al.*, mAbs 3(5): 487-494) có thể được sử dụng làm môđun liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép ở caTCR (Fig.13A). Các cầu nối khác nhau cho sự dung hợp của miền biến đổi bên ngoài và miền biến đổi bên trong đã được phát triển và được tối ưu hóa cho các DVD-Ig, mà có thể hữu dụng trong việc tạo cấu trúc các caTCR đặc hiệu kép có môđun DVD. Tuy nhiên, phương pháp xếp chồng miền biến đổi này ở các môđun DVD có thể ảnh hưởng đến khả năng gấp nếp và ái lực liên kết đích của miền biến đổi bên trong. Các cầu nối giữa hai miền biến đổi và bậc của hai miền biến đổi này có thể ảnh hưởng đến hiệu quả của caTCR này.

Theo một số phương án, caTCR này bao gồm: a) môđun liên kết kháng nguyên đa đặc hiệu (*ví dụ*, đặc hiệu kép) bao gồm Fv mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích thứ nhất và Fab mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích thứ hai; và b) TCRM bao gồm TCRD thứ nhất (TCRD1) bao gồm TCR-TM thứ nhất và TCRD thứ hai (TCRD2) bao gồm TCR-TM thứ hai; trong đó TCRM này thúc đẩy sự huy động của ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR.

Theo một số phương án, caTCR này bao gồm: (i) chuỗi polypeptit thứ nhất bao gồm từ đầu cùng N đến đầu cùng C: V_H 1-L1- V_H2-C_H1-TCRD1; và chuỗi polypeptit thứ hai bao gồm từ đầu cùng N đến đầu cùng C: V_L1-L2-V_L2-C_L-TCRD2; (ii) chuỗi polypeptit thứ nhất bao gồm từ đầu cùng N đến đầu cùng C: V_H1-L1-V_L2-C_L-TCRD1; và chuỗi polypeptit thứ hai bao gồm từ đầu cùng N đến đầu cùng C: V_L1-L2-V_H2-C_H1-TCRD2; (iii) chuỗi polypeptit thứ nhất bao gồm từ đầu cùng N đến đầu cùng C: V_L1-L1- V_H2-C_H1-TCRD1; và chuỗi polypeptit thứ hai bao gồm từ đầu cùng N đến đầu cùng C: V_H1-L2-V_L2-C_L-TCRD2; hoặc (iv) chuỗi polypeptit thứ nhất bao gồm từ đầu cùng N đến đầu cùng C: V_L1-L1-V_L2-C_L-TCRD1; và chuỗi polypeptit thứ hai bao gồm từ đầu cùng N đến đầu cùng C: V_H1-L2- V_H2-C_H1-TCRD2, trong đó V_H1 và V_L1 tạo thành miền liên kết kháng nguyên thứ nhất mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích thứ nhất, và V_H2 và V_L2 tạo thành miền liên kết kháng nguyên thứ hai mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích thứ hai, trong đó TCRD1 và TCRD2 tạo thành TCRM mà thúc đẩy sự hủy động của ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR, và trong đó L1 và L2 là các cầu nối peptit. Theo một số phương án, L1 và/hoặc L2 dài từ khoảng 5 đến khoảng 50 (*ví dụ*, khoảng 5-10, khoảng 10-15, hoặc khoảng 15-30) axit amin. Theo một số phương án, L1 và L2 có cùng chiều dài. Theo một số phương án, L1 và L2 có cùng trình tự axit amin. Theo một số phương án, L1 và L2 có chiều dài khác nhau. Theo một số phương án, L1 và L2 có các trình tự axit amin khác nhau. caTCR đặc hiệu kép làm ví dụ được thể hiện trong Fig.13A.

Các miền biến đổi kép giao nhau (CODV) thu được từ các CODV-IgG (*xem*, Steinmetz, *et al.*; mAbs (2016), 8(5): 867-878) có thể được sử dụng làm môđun liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép ở caTCR (Fig.13B). CODV cho phép các vị trí liên kết kháng nguyên tương đối không bị tắc cho mỗi Fv. Các cầu nối khác nhau cho sự dung hợp của các vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ đã được phát triển và được tối ưu hóa cho các CODV-Ig, mà có thể hữu dụng trong việc tạo cấu trúc các caTCR đặc hiệu kép có môđun CODV. Tuy nhiên, sự gấp nếp thích hợp của môđun CODV này có thể là vấn đề thử thách, và các cầu nối dài được sử dụng trong môđun CODV có thể là nguồn tiềm năng của tính gây miễn dịch và mẫn cảm với sự phân tách bằng protein phân giải.

Theo một số phương án, caTCR này bao gồm: a) môđun liên kết kháng nguyên đa đặc hiệu (ví dụ, đặc hiệu kép) bao gồm Fv thứ nhất mà liên kết đặc hiệu với kháng

nguyên đích thứ nhất và Fv thứ hai mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích thứ hai; và b) TCRM bao gồm TCRD thứ nhất (TCRD1) bao gồm TCR-TM thứ nhất và TCRD thứ hai (TCRD2) bao gồm TCR-TM thứ hai; trong đó TCRM này thúc đẩy sự huy động của ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR. Theo một số phương án, caTCR này còn bao gồm C_H1 và C_L.

Theo một số phương án, caTCR này bao gồm: (i) chuỗi polypeptit thứ nhất bao gồm từ đầu cùng N đến đầu cùng C: V_H1-L1- V_H2- C_H1-TCRD1, và chuỗi polypeptit thứ hai bao gồm từ đầu cùng N đến đầu cùng C: V_L2-L2-V_L1-C_L-TCRD2; hoặc (ii) chuỗi polypeptit thứ nhất bao gồm từ đầu cùng N đến đầu cùng C: V_L1-L1-V_L2-C_L-TCRD1, và chuỗi polypeptit thứ hai bao gồm từ đầu cùng N đến đầu cùng C: V_H2-L2- V_H1-C_H1-TCRD2, trong đó V_H1 và V_L1 tạo thành miền liên kết kháng nguyên thứ nhất mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích thứ nhất, và V_H2 và V_L2 tạo thành miền liên kết kháng nguyên thứ hai mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích thứ hai, trong đó TCRD1 và TCRD2 tạo thành TCRM mà thúc đẩy sự huy động của ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR, và trong đó L1 và L2 là các cầu nối peptit. Theo một số phương án, L1 và/hoặc L2 dài từ khoảng 5 đến khoảng 50 (*ví dụ*, khoảng 5-20, khoảng 15-30, hoặc khoảng 30-50) axit amin. Theo một số phương án, L1 và L2 có cùng chiều dài. Theo một số phương án, L1 và L2 có cùng trình tự axit amin. Theo một số phương án, L1 và L2 có chiều dài khác nhau. Theo một số phương án, L1 và L2 có các trình tự axit amin khác nhau. caTCR đặc hiệu kép làm ví dụ được thể hiện trong Fig.13B.

Các môđun liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép thu được từ các protein dung hợp scFv, như các loại được mô tả trong Chen *et al.*, mAbs 8(4): 761-774, có thể được sử dụng trong caTCR đặc hiệu kép (Fig.13C). Sự biểu hiện của các kháng thể đặc hiệu kép có định dạng dung hợp tương tự đã chứng minh sự gấp nếp thích hợp và độ ổn định của định dạng này. Các cầu nối khác nhau cho sự dung hợp của các scFv với các miền không đổi đã được phát triển và được tối ưu hóa cho các kháng thể đặc hiệu kép này, mà có thể hữu dụng trong việc tạo cấu trúc các caTCR đặc hiệu kép có miền dung hợp scFv tương tự. Tuy nhiên, sự cản trở không gian giữa các scFv này có thể làm hại sự liên kết của các scFv với các kháng nguyên đích của chúng.

Theo một số phương án, caTCR này bao gồm: a) môđun liên kết kháng nguyên đa đặc hiệu (ví dụ, đặc hiệu kép) bao gồm scFv thứ nhất mà liên kết đặc hiệu với kháng

nguyên đích thứ nhất và scFv thứ hai mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích thứ hai; và b) TCRM bao gồm TCRD thứ nhất (TCRD1) bao gồm TCR-TM thứ nhất và TCRD thứ hai (TCRD2) bao gồm TCR-TM thứ hai; trong đó TCRM này thúc đẩy sự huy động của ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR. Theo một số phương án, caTCR này còn bao gồm C_H1 và C_L.

Theo một số phương án, caTCR này bao gồm: (i) chuỗi polypeptit thứ nhất bao gồm từ đầu cùng N đến đầu cùng C: scFv1-L1-C_H1-TCRD1, và chuỗi polypeptit thứ hai bao gồm từ đầu cùng N đến đầu cùng C: scFv2-L2-C_L-TCRD2; hoặc (ii) chuỗi polypeptit thứ nhất bao gồm từ đầu cùng N đến đầu cùng C: scFv2-L1-C_H1-TCRD1, và chuỗi polypeptit thứ hai bao gồm từ đầu cùng N đến đầu cùng C: scFv1-L2-C_L-TCRD2; trong đó scFv1 liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích thứ nhất và scFv2 liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích thứ hai, trong đó TCRD1 và TCRD2 tạo thành TCRM mà thúc đẩy sự huy động của ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR, và trong đó L1 và L2 là các cầu nối peptit. Theo một số phương án, L1 và/hoặc L2 dài từ khoảng 5 đến khoảng 50 (*ví dụ*, khoảng 5-10, khoảng 10-15, hoặc khoảng 15-30) axit amin. Theo một số phương án, L1 và L2 có cùng chiều dài. Theo một số phương án, L1 và L2 có cùng trình tự axit amin. Theo một số phương án, L1 và L2 có chiều dài khác nhau. Theo một số phương án, L1 và L2 có các trình tự axit amin khác nhau. caTCR đặc hiệu kép làm ví dụ được thể hiện trong Fig.13C.

Các môđun liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép thu được từ kháng thể đặc hiệu kép IgG-scFv hoặc kháng thể đặc hiệu kép Fab-scFv-Fc có thể được sử dụng trong caTCR đặc hiệu kép. Trong một định dạng (Fig.13D), scFv được gắn với V_H hoặc V_L của Fab, mà cho phép tạo ra độ linh hoạt lớn hơn của scFv và do đó tạo ra khả năng truy cập lớn hơn của Fab vào kháng nguyên đích của nó. Tuy nhiên, môđun scFv-Fab này có thể có các vấn đề về độ ổn định. Trong định dạng thứ hai (Fig.13E), Fab được dung hợp với TCRD thứ nhất và scFv được dung hợp với TCRD thứ hai.

Theo một số phương án, caTCR này bao gồm: a) môđun liên kết kháng nguyên đa đặc hiệu (*ví dụ*, đặc hiệu kép) bao gồm scFv mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích thứ nhất và Fab mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích thứ hai; và b) TCRM bao gồm TCRD thứ nhất (TCRD1) bao gồm TCR-TM thứ nhất và TCRD thứ hai (TCRD2)

bao gồm TCR-TM thứ hai; trong đó TCRM này thúc đẩy sự huy động của ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR.

Theo một số phương án, caTCR này bao gồm: (i) chuỗi polypeptit thứ nhất bao gồm từ đầu cùng N đến đầu cùng C: scFv-L1-V_H-C_H1-TCRD1, và chuỗi polypeptit thứ hai bao gồm từ đầu cùng N đến đầu cùng C: V_L-C_L-TCRD2; hoặc (ii) chuỗi polypeptit thứ nhất bao gồm từ đầu cùng N đến đầu cùng C: V_H-C_H1-TCRD1, và chuỗi polypeptit thứ hai bao gồm từ đầu cùng N đến đầu cùng C: scFv-L2-V_L-C_L-TCRD2; trong đó scFv này liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích thứ nhất, và V_H và V_L này tạo thành miền liên kết kháng nguyên thứ hai mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích thứ hai, trong đó TCRD1 và TCRD2 tạo thành TCRM mà thúc đẩy sự huy động của ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR, và trong đó L1 và L2 là các cầu nối peptit. Theo một số phương án, L1 và/hoặc L2 dài từ khoảng 5 đến khoảng 50 (*ví dụ*, khoảng 5-10, khoảng 10-15, hoặc khoảng 15-30) axit amin. caTCR đặc hiệu kép làm ví dụ được thể hiện trong Fig.13D.

Theo một số phương án, caTCR này bao gồm: (i) chuỗi polypeptit thứ nhất bao gồm từ đầu cùng N đến đầu cùng C: V_L-C_L-L1-TCRD1, chuỗi polypeptit thứ hai bao gồm từ đầu cùng N đến đầu cùng C: V_H-C_H1, và chuỗi polypeptit thứ ba bao gồm từ đầu cùng N đến đầu cùng C: scFv-L2-TCRD2; (ii) chuỗi polypeptit thứ nhất bao gồm từ đầu cùng N đến đầu cùng C: V_H-C_H1-L1-TCRD1, chuỗi polypeptit thứ hai bao gồm từ đầu cùng N đến đầu cùng C: V_L-C_L, và chuỗi polypeptit thứ ba bao gồm từ đầu cùng N đến đầu cùng C: scFv-L2-TCRD2; (iii) chuỗi polypeptit thứ nhất bao gồm từ đầu cùng N đến đầu cùng C: scFv-L1-TCRD1, chuỗi polypeptit thứ hai bao gồm từ đầu cùng N đến đầu cùng C: V_H- C_H1, và chuỗi polypeptit thứ ba bao gồm từ đầu cùng N đến đầu cùng C: V_L-C_L-L2-TCRD2; hoặc (iv) chuỗi polypeptit thứ nhất bao gồm từ đầu cùng N đến đầu cùng C: scFv-L1-TCRD1, chuỗi polypeptit thứ hai bao gồm từ đầu cùng N đến đầu cùng C: V_L-C_L, và chuỗi polypeptit thứ ba bao gồm từ đầu cùng N đến đầu cùng C: V_H-C_H1-L2-TCRD2; trong đó scFv này liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích thứ nhất, và V_H và V_L này tạo thành miền liên kết kháng nguyên thứ hai mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích thứ hai, trong đó TCRD1 và TCRD2 tạo thành TCRM mà thúc đẩy sự huy động của ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR, và trong đó L1 và L2 là các cầu nối peptit. Theo một số phương án, L1 và/hoặc L2 dài từ khoảng 5 đến

khoảng 50 (*ví dụ*, khoảng 5-10, khoảng 10-15, hoặc khoảng 15-30) axit amin. caTCR đặc hiệu kép làm ví dụ được thể hiện trong Fig.13E. Chiều dài của cầu nối peptit giữa scFv và TCRD và chiều dài của cầu nối peptit giữa Fab và TCRD có thể được tối ưu hóa vì chúng có thể ảnh hưởng đến khả năng truy cập của scFv và Fab vào các kháng nguyên đích của chúng.

Môđun liên kết kháng nguyên đa đặc hiệu của caTCR đa đặc hiệu có thể liên kết đặc hiệu với sự kết hợp thích hợp bất kỳ của các kháng nguyên hoặc epitop đích. Theo một số phương án, môđun liên kết kháng nguyên đa đặc hiệu này liên kết đặc hiệu với ít nhất một kháng nguyên bề mặt tế bào. Theo một số phương án, ít nhất một kháng nguyên bề mặt tế bào này được chọn từ nhóm bao gồm CD19, CD20, CD22, CD47, GPC-3, ROR1, ROR2, BCMA, GPRC5D, và FCRL5, bao gồm các biến thể hoặc các đột biến của nó. Theo một số phương án, môđun liên kết kháng nguyên đa đặc hiệu này liên kết đặc hiệu với ít nhất một phức hợp peptit/MHC. Theo một số phương án, ít nhất một phức hợp peptit/MHC này bao gồm peptit thu được từ protein được chọn từ nhóm bao gồm WT-1, AFP, HPV16-E7, NY-ESO-1, PRAME, EBV-LMP2A, HIV-1, KRAS, Histon H3.3, và PSA, bao gồm các biến thể hoặc các đột biến của nó. Theo một số phương án, môđun liên kết kháng nguyên đa đặc hiệu này liên kết đặc hiệu với kháng nguyên bề mặt tế bào thứ nhất và kháng nguyên bề mặt tế bào thứ hai. Theo một số phương án, môđun liên kết kháng nguyên đa đặc hiệu này liên kết đặc hiệu với CD19 và CD22. Theo một số phương án, môđun liên kết kháng nguyên đa đặc hiệu này liên kết đặc hiệu với CD19 và CD20. Theo một số phương án, môđun liên kết kháng nguyên đa đặc hiệu này liên kết đặc hiệu với phức hợp peptit/MHC thứ nhất và phức hợp peptit/MHC thứ hai. Theo một số phương án, môđun liên kết kháng nguyên đa đặc hiệu này liên kết đặc hiệu với kháng nguyên bề mặt tế bào và phức hợp peptit/MHC.

Các cấu trúc thụ thể đồng kích thích khảm (CSR)

Thụ thể đồng kích thích khảm (CSR) đặc hiệu phối tử được mô tả ở đây liên kết đặc hiệu với phối tử đích (như kháng nguyên bề mặt tế bào hoặc phức hợp peptit/MHC) và có khả năng kích thích tế bào miễn dịch trên bề mặt mà nó được biểu hiện chức năng dựa vào liên kết phối tử đích. CSR này bao gồm môđun liên kết phối tử mà tạo ra tính đặc hiệu liên kết phối tử, môđun xuyên màng, và môđun truyền tín hiệu tế bào miễn dịch đồng kích thích mà cho phép kích thích tế bào miễn dịch. CSR này thiếu trình tự truyền

tín hiệu tế bào miễn dịch sơ cấp về mặt chức năng. Theo một số phương án, CSR này thiếu trình tự truyền tín hiệu tế bào miễn dịch sơ cấp bất kỳ. Theo một số phương án, CSR này bao gồm chuỗi polypeptit đơn bao gồm môđun liên kết phối tử, môđun xuyên màng, và môđun truyền tín hiệu đồng kích thích. Theo một số phương án, CSR này bao gồm chuỗi polypeptit thứ nhất và chuỗi polypeptit thứ hai, trong đó các chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ hai này cùng nhau tạo thành môđun liên kết phối tử, môđun xuyên màng, và môđun truyền tín hiệu đồng kích thích. Theo một số phương án, các chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ hai này là các chuỗi polypeptit riêng rẽ, và CSR này là multime, như dime. Theo một số phương án, các chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ hai này được liên kết cộng hóa trị, như bởi liên kết peptit, hoặc bởi một liên kết hóa học khác, như liên kết disulfit. Theo một số phương án, chuỗi polypeptit thứ nhất và chuỗi polypeptit thứ hai này được liên kết bởi ít nhất một liên kết disulfit. Theo một số phương án, sự biểu hiện của CSR này trong tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR là cảm ứng được. Theo một số phương án, sự biểu hiện của CSR này trong tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR là cảm ứng được dựa vào sự truyền tín hiệu thông qua caTCR này.

Các ví dụ về các miền truyền tín hiệu tế bào miễn dịch đồng kích thích để sử dụng trong các CSR của sáng chế bao gồm các trình tự tế bào chất của các đồng thụ thể của thụ thể tế bào T (TCR), mà có thể hoạt động phối hợp với caTCR để bắt đầu quá trình tải nạp tín hiệu theo sự ràng buộc caTCR, cũng như dẫn xuất hoặc biến thể bất kỳ của các trình tự này và trình tự tổng hợp bất kỳ mà có cùng khả năng chức năng.

Trong một số trường hợp, các tín hiệu được sinh ra thông qua chỉ một mình TCR là không để cho hoạt hóa đầy đủ tế bào T và tín hiệu thứ cấp hoặc đồng kích thích cũng được yêu cầu. Do đó, theo một số phương án, sự hoạt hóa tế bào T được trung gian bởi hai lớp khác biệt của trình tự truyền tín hiệu nội bào: các lớp mà bắt đầu sự hoạt hóa sơ cấp phụ thuộc kháng nguyên thông qua TCR (được đề cập đến ở đây là "các trình tự truyền tín hiệu tế bào T sơ cấp") và các lớp mà hoạt động theo cách không phụ thuộc kháng nguyên để tạo ra tín hiệu thứ cấp hoặc đồng kích thích (được đề cập đến ở đây là "các trình tự truyền tín hiệu tế bào T đồng kích thích").

Các trình tự truyền tín hiệu tế bào miễn dịch sơ cấp mà hoạt động theo cách kích thích có thể chứa các môtip truyền tín hiệu mà đã biết là các môtip hoạt hóa dựa trên tyrosin thụ thể miễn dịch hoặc ITAM. Các ví dụ về các trình tự truyền tín hiệu tế bào

miễn dịch sơ cấp chứa ITAM bao gồm các trình tự thu được từ TCRζ, FcRγ, FcRβ, CD3γ, CD3δ, CD3ε, CD5, CD22, CD79a, CD79b, và CD66d. Trình tự truyền tín hiệu tế bào miễn dịch sơ cấp "chức năng" là các trình tự mà có khả năng tải nạp tín hiệu hoạt hóa tế bào miễn dịch khi được kết cặp hoạt động với thụ thể thích hợp. Các trình tự truyền tín hiệu tế bào miễn dịch sơ cấp "không chức năng", mà có thể bao gồm các mảnh hoặc các biến thể của các trình tự truyền tín hiệu tế bào miễn dịch sơ cấp, không thể tải nạp tín hiệu hoạt hóa tế bào miễn dịch. Các CSR được mô tả ở đây thiếu trình tự truyền tín hiệu tế bào miễn dịch sơ cấp về mặt chức năng, như trình tự truyền tín hiệu chức năng bao gồm ITAM. Theo một số phương án, các CSR này thiếu trình tự truyền tín hiệu tế bào miễn dịch sơ cấp bất kỳ.

Trình tự truyền tín hiệu tế bào miễn dịch đồng kích thích này có thể là một phần của miền nội bào của phân tử đồng kích thích bao gồm, ví dụ, CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD27, CD40, PD-1, ICOS, kháng nguyên liên kết với chức năng lympho bào 1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, phối tử mà liên kết đặc hiệu với CD83, và loại tương tự.

Theo một số phương án, phối tử đích này là kháng nguyên bề mặt tế bào. Theo một số phương án, phối tử đích này là phức hợp peptit/MHC. Theo một số phương án, phối tử đích này là giống với kháng nguyên đích của caTCR được biểu hiện trong cùng tế bào miễn dịch. Theo một số phương án, phối tử đích này là khác với kháng nguyên đích của caTCR được biểu hiện trong cùng tế bào miễn dịch. Theo một số phương án, phối tử đích này là phân tử được trình diện trên bề mặt của tế bào trình diện kháng nguyên đích. Ví dụ, theo một số phương án, kháng nguyên đích của caTCR này là kháng nguyên liên kết với bệnh ung thư được trình diện trên tế bào ung thư, và phối tử đích này là phân tử phổ biến được biểu hiện trên bề mặt của tế bào ung thư, như integrin. Theo một số phương án, phối tử đích này là phối tử liên kết với bệnh. Theo một số phương án, phối tử đích này là phối tử liên kết với bệnh ung thư. Theo một số phương án, phối tử liên kết với bệnh ung thư này là, ví dụ, CD19, CD20, CD22, CD47, IL4, GPC-3, ROR1, ROR2, BCMA, GPRC5D, hoặc FCRL5. Theo một số phương án, phối tử liên kết với bệnh ung thư này là phức hợp peptit/MHC bao gồm peptit thu được từ protein bao gồm WT-1, AFP, HPV16-E7, NY-ESO-1, PRAME, EBV-LMP2A, và PSA. Theo một số phương án, phối tử đích này là phối tử liên kết với virut. Theo một số

phương án, phối tử đích này là phân tử điểm kiểm tra miễn dịch. Theo một số phương án, phân tử điểm kiểm tra miễn dịch này bao gồm PD-L1, PD-L2, CD80, CD86, ICOSL, B7-H3, B7-H4, HVEM, 4-1BBL, OX40L, CD70, CD40, và GAL9. Theo một số phương án, phối tử đích này là phân tử chết theo chương trình. Theo một số phương án, phân tử chết theo chương trình này bao gồm FasL, FasR, TNFR1, và TNFR2.

Theo một số phương án, môđun liên kết phối tử này là gốc kháng thể. Theo một số phương án, gốc kháng thể này là Fab, Fab', (Fab')2, Fv, hoặc Fv đơn chuỗi (scFv). Theo một số phương án, gốc kháng thể này liên kết đặc hiệu với kháng nguyên bề mặt tế bào bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, CD19, CD20, CD22, CD47, GPC-3, ROR1, ROR2, BCMA, GPRC5D, và FCRL5. Theo một số phương án, gốc kháng thể này liên kết đặc hiệu phức hợp peptit/MHC, trong đó peptit này thu được từ protein bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, WT-1, AFP, HPV16-E7, NY-ESO-1, PRAME, EBV-LMP2A, và PSA. Theo một số phương án, gốc kháng thể này bao gồm các CDR hoặc các miền biến đổi (các miền V_H và/hoặc V_L) của gốc kháng thể đặc hiệu cho CD19 (xem, *ví dụ*, WO2017066136A2). Theo một số phương án, gốc kháng thể này bao gồm các CDR hoặc các miền biến đổi (các miền V_H và/hoặc V_L) của gốc kháng thể đặc hiệu cho CD19 (*ví dụ*., miền V_H bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 58 và/hoặc miền V_L bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 59, hoặc các CDR được chứa trong đó). Theo một số phương án, gốc kháng thể này bao gồm các CDR hoặc các miền biến đổi (các miền V_H và/hoặc V_L) của gốc kháng thể đặc hiệu cho CD20 (*ví dụ*., miền V_H bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 60 và/hoặc miền V_L bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 61, hoặc các CDR được chứa trong đó). Theo một số phương án, gốc kháng thể này bao gồm các CDR hoặc các miền biến đổi (các miền V_H và/hoặc V_L) của gốc kháng thể đặc hiệu cho CD22 (*xem*, *ví dụ*, USSN 62/650,955 được nộp ngày 30/03/2018). Theo một số phương án, gốc kháng thể này bao gồm các CDR hoặc các miền biến đổi (các miền V_H và/hoặc V_L) của gốc kháng thể đặc hiệu cho CD22 (*ví dụ*, miền V_H bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 101 và/hoặc miền V_L bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 102, hoặc các CDR được chứa trong đó). Theo một số phương án, gốc kháng thể này bao gồm các CDR hoặc các miền biến đổi (các miền V_H và/hoặc V_L) của

gốc kháng thể đặc hiệu cho GPC3 (xem, *ví dụ*, USSN 62/490,586 được nộp ngày 26/04/2017). Theo một số phương án, gốc kháng thể này bao gồm các CDR hoặc các miền biến đổi (các miền V_H và/hoặc V_L) của gốc kháng thể đặc hiệu cho GPC3 (*ví dụ*., miền V_H bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 64 và/hoặc miền V_L bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 65, hoặc các CDR được chứa trong đó). Theo một số phương án, gốc kháng thể này bao gồm các CDR hoặc các miền biến đổi (các miền V_H và/hoặc V_L) của gốc kháng thể đặc hiệu cho ROR1 (xem, *ví dụ*, WO2016/187220 và WO2016/187216). Theo một số phương án, gốc kháng thể này bao gồm các CDR hoặc các miền biến đổi (các miền V_H và/hoặc V_L) của gốc kháng thể đặc hiệu cho ROR2 (xem, *ví dụ*, WO2016/142768). Theo một số phương án, gốc kháng thể này bao gồm các CDR hoặc các miền biến đổi (các miền V_H và/hoặc V_L) của gốc kháng thể đặc hiệu cho BCMA (xem, *ví dụ*, WO2016/090327 và WO2016/090320). Theo một số phương án, gốc kháng thể này bao gồm các CDR hoặc các miền biến đổi (các miền V_H và/hoặc V_L) của gốc kháng thể đặc hiệu cho GPRC5D (xem, *ví dụ*, WO2016/090329 và WO2016/090312). Theo một số phương án, gốc kháng thể này bao gồm các CDR hoặc các miền biến đổi (các miền V_H và/hoặc V_L) của gốc kháng thể đặc hiệu cho FCRL5 (xem, *ví dụ*, WO2016/090337). Theo một số phương án, gốc kháng thể này bao gồm các CDR hoặc các miền biến đổi (các miền V_H và/hoặc V_L) của gốc kháng thể đặc hiệu cho WT-1 (*xem*, *ví dụ*, WO2012/135854, WO2015/070078, và WO2015/070061). Theo một số phương án, gốc kháng thể này bao gồm các CDR hoặc các miền biến đổi (các miền V_H và/hoặc V_L) của gốc kháng thể đặc hiệu cho AFP (*xem*, *ví dụ*, WO2016/161390). Theo một số phương án, gốc kháng thể này bao gồm các CDR hoặc các miền biến đổi (các miền V_H và/hoặc V_L) của gốc kháng thể đặc hiệu cho HPV16-E7 (xem, *ví dụ*, WO2016/182957). Theo một số phương án, gốc kháng thể này bao gồm các CDR hoặc các miền biến đổi (các miền V_H và/hoặc V_L) của gốc kháng thể đặc hiệu cho NY-ESO-1 (xem, *ví dụ*, WO2016/210365). Theo một số phương án, gốc kháng thể này bao gồm các CDR hoặc các miền biến đổi (các miền V_H và/hoặc V_L) của gốc kháng thể đặc hiệu cho PRAME (*xem*, *ví dụ*, WO2016/191246). Theo một số phương án, gốc kháng thể này bao gồm các CDR hoặc các miền biến đổi (các miền V_H và/hoặc V_L) của gốc kháng thể đặc hiệu cho EBV-LMP2A (xem, *ví dụ*, WO2016/201124). Theo một số phương án, gốc kháng thể này bao gồm các CDR hoặc các miền biến đổi (các miền V_H và/hoặc V_L) của gốc kháng

thể đặc hiệu cho KRAS (*xem, ví dụ*, WO2016/154047). Theo một số phương án, gốc kháng thể này bao gồm các CDR hoặc các miền biến đổi (các miền V_H và/hoặc V_L) của gốc kháng thể đặc hiệu cho PSA (*xem, ví dụ*, WO2017/015634).

Theo một số phương án, môđun liên kết phối tử này là (hoặc thu được từ) toàn bộ hoặc một phần của miền ngoại bào của thụ thể cho phối tử đích này. Theo một số phương án, thụ thể này bao gồm, ví dụ, FasR, TNFR1, TNFR2, PD-1, CD28, CTLA-4, ICOS, BTLA, KIR, LAG-3, 4-1BB, OX40, CD27, và TIM-3.

Theo một số phương án, môđun xuyên màng này bao gồm một hoặc nhiều miền xuyên màng thu được từ, ví dụ, CD28, CD3ε, CD3ζ, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, hoặc CD154.

Theo một số phương án, môđun truyền tín hiệu đồng kích thích này bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm toàn bộ hoặc một phần của miền nội bào của phân tử đồng kích thích tế bào miễn dịch bao gồm, ví dụ, CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, ICOS, kháng nguyên liên kết với chức năng lympho bào 1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, phối tử liên kết đặc hiệu với CD83, và loại tương tự. Theo một số phương án, phân tử truyền tín hiệu đồng kích thích này bao gồm mảnh của CD28 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 51. Theo một số phương án, phân tử truyền tín hiệu đồng kích thích này bao gồm mảnh của CD28 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 52. Theo một số phương án, phân tử truyền tín hiệu đồng kích thích này mảnh của 4-1BBbao gồm mảnh của 4-1BB bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 53. Theo một số phương án, phân tử truyền tín hiệu đồng kích thích này mảnh của 4-1BBbao gồm mảnh của 4-1BB bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 54. Theo một số phương án, phân tử truyền tín hiệu đồng kích thích này bao gồm mảnh của CD8 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 57. Theo một số phương án, phân tử truyền tín hiệu đồng kích thích này bao gồm mảnh của OX40 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 55. Theo một số phương án, phân tử truyền tín hiệu đồng kích thích này bao gồm mảnh của OX40 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 56. Theo một số phương án, phân tử truyền tín hiệu đồng kích thích này bao gồm mảnh của CD27 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 86 hoặc 87. Theo một số phương án, phân tử truyền tín hiệu đồng kích thích này bao gồm mảnh của CD30 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 88 hoặc 89.

Theo một số phương án, CSR này còn bao gồm môđun đệm giữa loại bất kỳ trong số môđun liên kết phối tử, môđun xuyên màng, và môđun truyền tín hiệu đồng kích thích. Theo một số phương án, môđun đệm này bao gồm một hoặc nhiều cầu nối peptit kết nối hai môđun CSR. Theo một số phương án, môđun đệm này bao gồm một hoặc nhiều cầu nối peptit có chiều dài nằm trong khoảng từ khoảng 5 đến khoảng 70 (như khoảng giá trị bất kỳ trong số 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, hoặc 70, bao gồm khoảng bất kỳ trong số các giá trị này) axit amin.

Theo một số phương án, môđun liên kết phối tử này (như gốc kháng thể) liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích với a) ái lực mà là ít nhất khoảng 10 (bao gồm ví dụ ít nhất khoảng giá trị bất kỳ trong số 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500, 750, 1000 hoặc nhiều hơn) lần ái lực liên kết của nó với các phân tử khác; hoặc b) K_d không lớn hơn khoảng 1/10 (như không lớn hơn khoảng giá trị bất kỳ trong số 1/10, 1/20, 1/30, 1/40, 1/50, 1/75, 1/100, 1/200, 1/300, 1/400, 1/500, 1/750, 1/1000 hoặc thấp hơn) lần K_d của nó để liên kết với các phân tử khác. Ái lực liên kết có thể được xác định bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật, như ELISA, phân tích phân loại tế bào được hoạt hóa huỳnh quang (FACS), hoặc thử nghiệm kết tủa miễn dịch phóng xạ (RIA). K_d có thể được xác định bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật, như thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) sử dụng, ví dụ, thiết bị Biacore, hoặc thử nghiệm loại trừ động học (KinExA) sử dụng, ví dụ, thiết bị Sapidyne.

Theo một số phương án, CSR được mô tả ở đây liên kết đặc hiệu với phối tử đích (như kháng nguyên bề mặt tế bào hoặc phức hợp peptit/MHC), bao gồm a) miền liên kết phối tử (LBD) đích; b) miền xuyên màng; và c) miền truyền tín hiệu đồng kích thích, trong đó CSR này có khả năng kích thích tế bào miễn dịch trên bề mặt mà nó được biểu hiện chức năng dựa vào sự liên kết phối tử đích. Theo một số phương án, phối tử đích này là kháng nguyên bề mặt tế bào. Theo một số phương án, phối tử đích này là phức hợp peptit/MHC. Theo một số phương án, phối tử đích này là giống với kháng nguyên đích của caTCR được biểu hiện trong cùng tế bào miễn dịch. Theo một số phương án, phối tử đích này là khác với kháng nguyên đích của caTCR được biểu hiện ở cùng tế bào miễn dịch. Theo một số phương án, phối tử đích này là phối tử liên kết với bệnh. Theo một số phương án, phối tử đích này là phối tử liên kết với bệnh ung thư. Theo một số phương án, phối tử liên kết với bệnh ung thư này là, ví dụ, CD19, CD20, CD22,

CD47, IL4, GPC-3, ROR1, ROR2, BCMA, GPRC5D, hoặc FCRL5. Theo một số phương án, phối tử liên kết với bệnh ung thư này là phức hợp peptit/MHC bao gồm peptit thu được từ protein bao gồm WT-1, AFP, HPV16-E7, NY-ESO-1, PRAME, EBV-LMP2A, và PSA. Theo một số phương án, phối tử đích này là phối tử liên kết với virut. Theo một số phương án, phối tử đích này là phân tử điểm kiểm tra miễn dịch. Theo một số phương án, phân tử điểm kiểm tra miễn dịch này bao gồm PD-L1, PD-L2, CD80, CD86, ICOSL, B7-H3, B7-H4, HVEM, 4-1BBL, OX40L, CD70, CD40, và GAL9. Theo một số phương án, phối tử đích này là phân tử chết theo chương trình. Theo một số phương án, phân tử chết theo chương trình này bao gồm FasL, FasR, TNFR1, và TNFR2. Theo một số phương án, miền liên kết phối tử này là gốc kháng thể. Theo một số phương án, gốc kháng thể này là Fab, Fab', (Fab')2, Fv, hoặc Fv đơn chuỗi (scFv). Theo một số phương án, miền liên kết phối tử này là (hoặc thu được từ) toàn bộ hoặc một phần của miền ngoại bào của thụ thể cho phối tử đích. Theo một số phương án, thụ thể này bao gồm, ví dụ, FasR, TNFR1, TNFR2, PD-1, CD28, CTLA-4, ICOS, BTLA, KIR, LAG-3, 4-1BB, OX40, CD27, và TIM-3. Theo một số phương án, miền xuyên màng này bao gồm miền xuyên màng thu được từ protein xuyên màng bao gồm, ví dụ, CD28, CD3ε, CD3ζ, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, hoặc CD154. Theo một số phương án, CSR này bao gồm mảnh protein xuyên màng (fTMP), trong đó fTMP này bao gồm miền xuyên màng CSR. Theo một số phương án, miền truyền tín hiệu đồng kích thích này bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm toàn bộ hoặc một phần của miền nội bào của phân tử đồng kích thích tế bào miễn dịch bao gồm, ví dụ, CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, ICOS, kháng nguyên liên kết với chức năng lympho bào 1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, phối tử liên kết đặc hiệu với CD83, và loại tương tự. Theo một số phương án, CSR này bao gồm mảnh của phân tử đồng kích thích tế bào miễn dịch (fCSM), trong đó fCSM này bao gồm miền xuyên màng CSR và miền truyền tín hiệu đồng kích thích CSR. Theo một số phương án, CSR này còn bao gồm miền đệm giữa miền bất kỳ trong số miền liên kết phối tử, miền xuyên màng, và miền truyền tín hiệu đồng kích thích. Theo một số phương án, miền đệm này bao gồm cầu nối peptit kết nối hai miền CSR.

Theo một số phương án, CSR được mô tả ở đây liên kết đặc hiệu với phối tử đích, bao gồm a) miền liên kết phối tử đích; b) miền xuyên màng; và c) miền truyền tín hiệu đồng kích thích, trong đó phối tử đích này là kháng nguyên bề mặt tế bào, và trong đó CSR này có khả năng kích thích tế bào miễn dịch trên bề mặt mà nó được biểu hiện chức năng dựa vào sự liên kết phối tử đích. Theo một số phương án, phối tử đích này là giống với kháng nguyên đích của caTCR được biểu hiện trong cùng tế bào miễn dịch. Theo một số phương án, phối tử đích này là khác với kháng nguyên đích của caTCR được biểu hiện ở cùng tế bào miễn dịch. Theo một số phương án, phối tử đích này là phối tử liên kết với bệnh. Theo một số phương án, phối tử đích này là phối tử liên kết với bệnh ung thư. Theo một số phương án, phối tử liên kết với bệnh ung thư này là, ví dụ, CD19, CD20, CD22, CD47, IL4, GPC-3, ROR1, ROR2, BCMA, GPRC5D, hoặc FCRL5. Theo một số phương án, phối tử đích này là phối tử liên kết với virut. Theo một số phương án, phối tử đích này là phân tử điểm kiểm tra miễn dịch. Theo một số phương án, phân tử điểm kiểm tra miễn dịch này bao gồm PD-L1, PD-L2, CD80, CD86, ICOSL, B7-H3, B7-H4, HVEM, 4-1BBL, OX40L, CD70, CD40, và GAL9. Theo một số phương án, phối tử đích này là phân tử chết theo chương trình. Theo một số phương án, phân tử chết theo chương trình này bao gồm FasL, FasR, TNFR1, và TNFR2. Theo một số phương án, miền liên kết phối tử này là gốc kháng thể. Theo một số phương án, gốc kháng thể này là Fab, Fab', (Fab')2, Fv, hoặc Fv đơn chuỗi (scFv). Theo một số phương án, miền liên kết phối tử này là (hoặc thu được từ) toàn bộ hoặc một phần của miền ngoại bào của thụ thể cho phối tử đích. Theo một số phương án, thụ thể này bao gồm, ví dụ, FasR, TNFR1, TNFR2, PD-1, CD28, CTLA-4, ICOS, BTLA, KIR, LAG-3, 4-1BB, OX40, CD27, và TIM-3. Theo một số phương án, miền xuyên màng này bao gồm miền xuyên màng thu được từ protein xuyên màng bao gồm, ví dụ, CD28, CD3ε, CD3ζ, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, hoặc CD154. Theo một số phương án, CSR này bao gồm mảnh protein xuyên màng (fTMP), trong đó fTMP này bao gồm miền xuyên màng CSR. Theo một số phương án, miền truyền tín hiệu đồng kích thích này bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm toàn bộ hoặc một phần của miền nội bào của phân tử đồng kích thích tế bào miễn dịch bao gồm, ví dụ, CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, ICOS, kháng nguyên liên kết với chức năng lympho bào 1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, phối tử liên kết đặc hiệu với CD83, và loại tương tự. Theo một số phương án, CSR này bao gồm

mảnh của phân tử đồng kích thích tế bào miễn dịch (fCSM), trong đó fCSM này bao gồm miền xuyên màng CSR và miền truyền tín hiệu đồng kích thích CSR. Theo một số phương án, CSR này còn bao gồm miền đệm giữa miền bất kỳ trong số miền liên kết phối tử, miền xuyên màng, và miền truyền tín hiệu đồng kích thích. Theo một số phương án, miền đệm này bao gồm cầu nối peptit kết nối hai miền CSR.

Theo một số phương án, CSR được mô tả ở đây liên kết đặc hiệu với phối tử đích, bao gồm a) miền liên kết phối tử đích; b) miền xuyên màng; và c) miền truyền tín hiệu đồng kích thích, trong đó phối tử đích này là phức hợp peptit/MHC, và trong đó CSR này có khả năng kích thích tế bào miễn dịch trên bề mặt mà nó được biểu hiện chức năng dựa vào sự liên kết phối tử đích. Theo một số phương án, phối tử đích này là giống với kháng nguyên đích của caTCR được biểu hiện trong cùng tế bào miễn dịch. Theo một số phương án, phối tử đích này là khác với kháng nguyên đích của caTCR được biểu hiện ở cùng tế bào miễn dịch. Theo một số phương án, phối tử đích này là phối tử liên kết với bệnh. Theo một số phương án, phối tử đích này là phối tử liên kết với bệnh ung thư. Theo một số phương án, phối tử liên kết với bệnh ung thư này là phức hợp peptit/MHC bao gồm peptit thu được từ protein bao gồm WT-1, AFP, HPV16-E7, NY-ESO-1, PRAME, EBV-LMP2A, và PSA. Theo một số phương án, phối tử đích này là phối tử liên kết với virut. Theo một số phương án, miền liên kết phối tử này là gốc kháng thể. Theo một số phương án, gốc kháng thể này là Fab, Fab', (Fab')2, Fv, hoặc Fv đơn chuỗi (scFv). Theo một số phương án, miền xuyên màng này bao gồm miền xuyên màng thu được từ protein xuyên màng bao gồm, ví dụ, CD28, CD3ε, CD3ζ, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, hoặc CD154. Theo một số phương án, CSR này bao gồm mảnh protein xuyên màng (fTMP), trong đó fTMP này bao gồm miền xuyên màng CSR. Theo một số phương án, miền truyền tín hiệu đồng kích thích này bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm toàn bộ hoặc một phần của miền nội bào của phân tử đồng kích thích tế bào miễn dịch bao gồm, ví dụ, CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, ICOS, kháng nguyên liên kết với chức năng lympho bào 1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, phối tử liên kết đặc hiệu với CD83, và loại tương tự. Theo một số phương án, CSR này bao gồm mảnh của phân tử đồng kích thích tế bào miễn dịch (fCSM), trong đó fCSM này bao gồm miền xuyên màng CSR và miền truyền tín hiệu đồng kích thích CSR. Theo một số

phương án, CSR này còn bao gồm miền đệm giữa miền bất kỳ trong số miền liên kết phối tử, miền xuyên màng, và miền truyền tín hiệu đồng kích thích. Theo một số phương án, miền đệm này bao gồm cầu nối peptit kết nối hai miền CSR.

Theo một số phương án, CSR được mô tả ở đây liên kết đặc hiệu với phối tử đích (như kháng nguyên bề mặt tế bào hoặc phức hợp peptit/MHC), bao gồm a) miền liên kết phối tử đích; b) miền xuyên màng; và c) miền truyền tín hiệu đồng kích thích, trong đó miền liên kết phối tử này là gốc kháng thể, và trong đó CSR này có khả năng kích thích tế bào miễn dịch trên bề mặt mà nó được biểu hiện chức năng dựa vào sự liên kết phối tử đích. Theo một số phương án, phối tử đích này là kháng nguyên bề mặt tế bào. Theo một số phương án, phối tử đích này là phức hợp peptit/MHC. Theo một số phương án, phối tử đích này là giống với kháng nguyên đích của caTCR được biểu hiện trong cùng tế bào miễn dịch. Theo một số phương án, phối tử đích này là khác với kháng nguyên đích của caTCR được biểu hiện ở cùng tế bào miễn dịch. Theo một số phương án, phối tử đích này là phối tử liên kết với bệnh. Theo một số phương án, phối tử đích này là phối tử liên kết với bệnh ung thư. Theo một số phương án, phối tử liên kết với bệnh ung thư này là, ví dụ, CD19, CD20, CD22, CD47, IL4, GPC-3, ROR1, ROR2, BCMA, GPRC5D, hoặc FCRL5. Theo một số phương án, phối tử liên kết với bệnh ung thư này là phức hợp peptit/MHC bao gồm peptit thu được từ protein bao gồm WT-1, AFP, HPV16-E7, NY-ESO-1, PRAME, EBV-LMP2A, và PSA. Theo một số phương án, phối tử đích này là phối tử liên kết với virut. Theo một số phương án, phối tử đích này là phân tử điểm kiểm tra miễn dịch. Theo một số phương án, phân tử điểm kiểm tra miễn dịch này bao gồm PD-L1, PD-L2, CD80, CD86, ICOSL, B7-H3, B7-H4, HVEM, 4-1BBL, OX40L, CD70, CD40, và GAL9. Theo một số phương án, phối tử đích này là phân tử chết theo chương trình. Theo một số phương án, phân tử chết theo chương trình này bao gồm FasL, FasR, TNFR1, và TNFR2. Theo một số phương án, gốc kháng thể này là Fab, Fab', (Fab')2, Fv, hoặc Fv đơn chuỗi (scFv). Theo một số phương án, miền xuyên màng này bao gồm miền xuyên màng thu được từ protein xuyên màng bao gồm, ví dụ, CD28, CD3ε, CD3ζ, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, hoặc CD154. Theo một số phương án, CSR này bao gồm mảnh protein xuyên màng (fTMP), trong đó fTMP này bao gồm miền xuyên màng CSR. Theo một số phương án, miền truyền tín hiệu đồng kích thích này bao gồm,

về cơ bản gồm, hoặc gồm toàn bộ hoặc một phần của miền nội bào của phân tử đồng kích thích tế bào miễn dịch bao gồm, ví dụ, CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, ICOS, kháng nguyên liên kết với chức năng lympho bào 1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, phối tử liên kết đặc hiệu với CD83, và loại tương tự. Theo một số phương án, CSR này bao gồm mảnh của phân tử đồng kích thích tế bào miễn dịch (fCSM), trong đó fCSM này bao gồm miền xuyên màng CSR và miền truyền tín hiệu đồng kích thích CSR. Theo một số phương án, CSR này còn bao gồm miền đệm giữa miền bất kỳ trong số miền liên kết phối tử, miền xuyên màng, và miền truyền tín hiệu đồng kích thích. Theo một số phương án, miền đệm này bao gồm cầu nối peptit kết nối hai miền CSR. Theo một số phương án, các miền CSR này được chọn theo loại bất kỳ trong số các CSR được liệt kê trong bảng 3.

Bảng 3

ID của CSR	Đệm theo LBD (SEQ ID NO)	fTMP (SEQ ID NO)	fCSM (SEQ ID NO)	Miền CSR đầy đủ (không có LBD; SEQ ID NO)
1	103	-	51	90
2	104	57	54	91
3	104	-	53	92
4	104	57	87	93
5	104	-	86	94
6	104	57	89	95
7	104	-	88	96
8	104	57	56	97
9	104	-	55	98

Theo một số phương án, CSR này bao gồm fCSM của CD28. Theo một số phương án, CSR này bao gồm: a) miền liên kết phối tử đích; b) miền xuyên màng CD8 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 57, và c) mảnh của CD28 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 52. Theo một số phương án, CSR này bao gồm: a) miền liên kết phối tử đích; và b) mảnh của CD28 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 51. Theo một số phương án, CSR này bao gồm: miền liên kết phối tử đích và miền CSR bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 90.

Theo một số phương án, CSR này bao gồm fCSM của 4-1BB. Theo một số phương án, CSR này bao gồm: a) miền liên kết phối tử đích; b) miền xuyên màng CD8 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 57, và c) mảnh của 4-1BB bao gồm trình tự axit

amin của SEQ ID NO: 54. Theo một số phương án, CSR này bao gồm: a) miền liên kết phối tử đích; và b) mảnh của 4-1BB bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 53. Theo một số phương án, CSR này bao gồm: miền liên kết phối tử đích và miền CSR bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 91 hoặc 92.

Theo một số phương án, CSR này bao gồm fCSM của CD27. Theo một số phương án, CSR này bao gồm: a) miền liên kết phối tử đích; b) miền xuyên màng CD8 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 57, và c) mảnh của CD27 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 87. Theo một số phương án, CSR này bao gồm: a) miền liên kết phối tử đích; và b) mảnh của CD27 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 86. Theo một số phương án, CSR này bao gồm: miền liên kết phối tử đích và miền CSR bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 93 hoặc 94.

Theo một số phương án, CSR này bao gồm fCSM của CD30. Theo một số phương án, CSR này bao gồm: a) miền liên kết phối tử đích; b) miền xuyên màng CD8 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 57, và c) mảnh của CD30 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 89. Theo một số phương án, CSR này bao gồm: a) miền liên kết phối tử đích; và b) mảnh của CD30 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 88. Theo một số phương án, CSR này bao gồm: miền liên kết phối tử đích và miền CSR bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 95 hoặc 96.

Theo một số phương án, CSR này bao gồm fCSM của OX40. Theo một số phương án, CSR này bao gồm: a) miền liên kết phối tử đích; b) miền xuyên màng CD8 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 57, và c) mảnh của OX40 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 56. Theo một số phương án, CSR này bao gồm: a) miền liên kết phối tử đích; và b) mảnh của OX40 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 55. Theo một số phương án, CSR này bao gồm: miền liên kết phối tử đích và miền CSR bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 97 hoặc 98.

Theo một số phương án, CSR được mô tả ở đây liên kết đặc hiệu với phối tử đích (như kháng nguyên bề mặt tế bào hoặc phức hợp peptit/MHC), bao gồm a) miền liên kết phối tử đích; b) miền xuyên màng; và c) miền truyền tín hiệu đồng kích thích, trong đó miền liên kết phối tử này là (hoặc thu được từ) toàn bộ hoặc một phần của miền ngoại bào của thụ thể cho phối tử đích, và trong đó CSR này có khả năng kích thích tế bào

miễn dịch trên bề mặt mà nó được biểu hiện chức năng dựa vào sự liên kết phối tử đích. Theo một số phương án, phối tử đích này là kháng nguyên bề mặt tế bào. Theo một số phương án, phối tử đích này là giống với kháng nguyên đích của caTCR được biểu hiện trong cùng tế bào miễn dịch. Theo một số phương án, phối tử đích này là khác với kháng nguyên đích của caTCR được biểu hiện ở cùng tế bào miễn dịch. Theo một số phương án, phối tử đích này là phối tử liên kết với bệnh. Theo một số phương án, phối tử đích này là phối tử liên kết với bệnh ung thư. Theo một số phương án, phối tử liên kết với bệnh ung thư này là, ví dụ, CD19, CD20, CD22, CD47, IL4, GPC-3, ROR1, ROR2, BCMA, GPRC5D, hoặc FCRL5. Theo một số phương án, phối tử đích này là phân tử điểm kiểm tra miễn dịch. Theo một số phương án, phân tử điểm kiểm tra miễn dịch này bao gồm PD-L1, PD-L2, CD80, CD86, ICOSL, B7-H3, B7-H4, HVEM, 4-1BBL, OX40L, CD70, CD40, và GAL9. Theo một số phương án, phối tử đích này là phân tử chết theo chương trình. Theo một số phương án, phân tử chết theo chương trình này bao gồm FasL, FasR, TNFR1, và TNFR2. Theo một số phương án, thụ thể phối tử đích này bao gồm, ví dụ, FasR, TNFR1, TNFR2, PD-1, CD28, CTLA-4, ICOS, BTLA, KIR, LAG-3, 4-1BB, OX40, CD27, và TIM-3. Theo một số phương án, miền xuyên màng này bao gồm miền xuyên màng thu được từ, ví dụ, CD28, CD3ε, CD3ζ, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, hoặc CD154. Theo một số phương án, miền truyền tín hiệu đồng kích thích này bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm toàn bộ hoặc một phần của miền nội bào của phân tử đồng kích thích tế bào miễn dịch bao gồm, ví dụ, CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, ICOS, kháng nguyên liên kết với chức năng lympho bào 1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, phối tử liên kết đặc hiệu với CD83, và loại tương tự. Theo một số phương án, CSR này còn bao gồm miền đệm giữa miền bất kỳ trong số miền liên kết phối tử, miền xuyên màng, và miền truyền tín hiệu đồng kích thích. Theo một số phương án, miền đệm này bao gồm cầu nối peptit kết nối hai miền CSR.

Theo một số phương án, CSR được mô tả ở đây liên kết đặc hiệu với CD19, bao gồm a) scFv bao gồm miền V_H có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 58 và miền V_L có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 59; và b) mảnh của CD28 bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 51 hoặc 52. Theo một số phương án, scFv này bao gồm, từ đầu cùng amino đến đầu cùng carboxy, miền V_L, cầu nối peptit bao

gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 76, và miền V_H. Theo một số phương án, scFv này bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 77. Theo một số phương án, mảnh của CD28 này bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 51. Theo một số phương án, CSR này bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 90. Theo một số phương án, CSR này bao gồm, từ đầu cùng amino đến đầu cùng carboxy, scFv, cầu nối peptit bao gồm SEQ ID NO: 103, và mảnh của CD28. Theo một số phương án, CSR này bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 80.

Theo một số phương án, CSR được mô tả ở đây liên kết đặc hiệu với CD20, bao gồm a) scFv bao gồm miền V_H có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 60 và miền V_L có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 61; và b) mảnh của CD28 bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 51 hoặc 52. Theo một số phương án, scFv này bao gồm, từ đầu cùng amino đến đầu cùng carboxy, miền V_L, cầu nối peptit bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 76, và miền V_H. Theo một số phương án, scFv này bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 78. Theo một số phương án, mảnh của CD28 này bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 51. Theo một số phương án, CSR này bao gồm, từ đầu cùng amino đến đầu cùng carboxy, scFv, cầu nối peptit bao gồm SEQ ID NO: 103, và mảnh của CD28. Theo một số phương án, CSR này bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 81.

Theo một số phương án, CSR được mô tả ở đây liên kết đặc hiệu với GPC3, bao gồm a) scFv bao gồm miền V_H có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 64 và miền V_L có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 65; và b) mảnh của CD28 bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 51 hoặc 52. Theo một số phương án, scFv này bao gồm, từ đầu cùng amino đến đầu cùng carboxy, miền V_L, cầu nối peptit bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 76, và miền V_H. Theo một số phương án, scFv này bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 79. Theo một số phương án, mảnh của CD28 này bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 51. Theo một số phương án, CSR này bao gồm, từ đầu cùng amino đến đầu cùng carboxy, scFv, cầu nối peptit bao gồm SEQ ID NO: 103, và mảnh của CD28. Theo một số phương án, CSR này bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 82.

Theo một số phương án, CSR được mô tả ở đây liên kết đặc hiệu với CD20, bao gồm a) scFv bao gồm miền V_H có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 60 và miền V_L có

trình tự axit amin của SEQ ID NO: 61; và b) mảnh của CD28 bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 51 hoặc 52. Theo một số phương án, scFv này bao gồm, từ đầu cùng amino đến đầu cùng carboxy, miền V_L, cầu nối peptit bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 76, và miền V_H. Theo một số phương án, scFv này bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 78. Theo một số phương án, mảnh của CD28 này bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 51. Theo một số phương án, CSR này bao gồm, từ đầu cùng amino đến đầu cùng carboxy, scFv, cầu nối peptit bao gồm SEQ ID NO: 103, và mảnh của CD28. Theo một số phương án, CSR này bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 81.

Theo một số phương án, CSR được mô tả ở đây liên kết đặc hiệu với CD19, bao gồm a) scFv bao gồm miền V_H có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 58 và miền V_L có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 59; và b) mảnh của 4-1BB bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 53 hoặc 54. Theo một số phương án, scFv này bao gồm, từ đầu cùng amino đến đầu cùng carboxy, miền V_L, cầu nối peptit bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 76, và miền V_H. Theo một số phương án, mảnh của 4-1BB này bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 53. Theo một số phương án, CSR này bao gồm, từ đầu cùng amino đến đầu cùng carboxy, scFv, cầu nối peptit bao gồm SEQ ID NO: 104, và mảnh của 4-1BB.

Theo một số phương án, CSR được mô tả ở đây liên kết đặc hiệu với CD19, bao gồm a) scFv bao gồm miền V_H có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 58 và miền V_L có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 59; b) mảnh của CD8 bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 57; và c) mảnh của 4-1BB bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 54. Theo một số phương án, scFv này bao gồm, từ đầu cùng amino đến đầu cùng carboxy, miền V_L, cầu nối peptit bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 76, và miền V_H. Theo một số phương án, CSR này bao gồm, từ đầu cùng amino đến đầu cùng carboxy, scFv, cầu nối peptit bao gồm SEQ ID NO: 104, mảnh của CD8, và mảnh của 4-1BB.

Theo một số phương án, CSR được mô tả ở đây liên kết đặc hiệu với CD19, bao gồm a) scFv bao gồm miền V_H có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 58 và miền V_L có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 59; b) mảnh của CD8 bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 57; và c) mảnh của OX40 bao gồm, về cơ bản

gồm, hoặc gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 57. Theo một số phương án, scFv này bao gồm, từ đầu cùng amino đến đầu cùng carboxy, miền V_L, cầu nối peptit bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 76, và miền V_H. Theo một số phương án, CSR này bao gồm, từ đầu cùng amino đến đầu cùng carboxy, scFv, cầu nối peptit bao gồm SEQ ID NO: 104, mảnh của CD8, và mảnh của OX40.

Theo một số phương án, CSR được mô tả ở đây liên kết đặc hiệu với CD19, bao gồm a) scFv bao gồm miền V_H có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 58 và miền V_L có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 59; và b) mảnh của OX40 bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 56 hoặc 57. Theo một số phương án, scFv này bao gồm, từ đầu cùng amino đến đầu cùng carboxy, miền V_L, cầu nối peptit bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 76, và miền V_H. Theo một số phương án, mảnh của OX40 này bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 56. Theo một số phương án, CSR này bao gồm, từ đầu cùng amino đến đầu cùng carboxy, scFv, cầu nối peptit bao gồm SEQ ID NO: 104, và mảnh của OX40.

Theo một số phương án, CSR được mô tả ở đây liên kết đặc hiệu với CD19, bao gồm a) scFv bao gồm miền V_H có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 58 và miền V_L có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 59; b) mảnh của CD8 bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 57; và c) mảnh của CD27 bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 87. Theo một số phương án, scFv này bao gồm, từ đầu cùng amino đến đầu cùng carboxy, miền V_L, cầu nối peptit bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 76, và miền V_H. Theo một số phương án, CSR này bao gồm, từ đầu cùng amino đến đầu cùng carboxy, scFv, cầu nối peptit bao gồm SEQ ID NO: 104, mảnh của CD8, và mảnh của CD27.

Theo một số phương án, CSR được mô tả ở đây liên kết đặc hiệu với CD19, bao gồm a) scFv bao gồm miền V_H có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 58 và miền V_L có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 59; và b) mảnh của CD27 bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 86 hoặc 87. Theo một số phương án, scFv này bao gồm, từ đầu cùng amino đến đầu cùng carboxy, miền V_L, cầu nối peptit bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 76, và miền V_H. Theo một số phương án, mảnh của CD27 này bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 86. Theo một số phương án,

CSR này bao gồm, từ đầu cùng amino đến đầu cùng carboxy, scFv, cầu nối peptit bao gồm SEQ ID NO: 104, và mảnh của CD27.

Theo một số phương án, CSR được mô tả ở đây liên kết đặc hiệu với CD19, bao gồm a) scFv bao gồm miền V_H có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 58 và miền V_L có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 59; b) mảnh của CD8 bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 57; và c) mảnh của CD30 bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 89. Theo một số phương án, scFv này bao gồm, từ đầu cùng amino đến đầu cùng carboxy, miền V_L, cầu nối peptit bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 76, và miền V_H. Theo một số phương án, CSR này bao gồm, từ đầu cùng amino đến đầu cùng carboxy, scFv, cầu nối peptit bao gồm SEQ ID NO: 104, mảnh của CD8, và mảnh của CD30.

Theo một số phương án, CSR được mô tả ở đây liên kết đặc hiệu với CD19, bao gồm a) scFv bao gồm miền V_H có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 58 và miền V_L có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 59; và b) mảnh của CD30 bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 88 hoặc 89. Theo một số phương án, scFv này bao gồm, từ đầu cùng amino đến đầu cùng carboxy, miền V_L, cầu nối peptit bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 76, và miền V_H. Theo một số phương án, mảnh của CD30 này bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 88. Theo một số phương án, CSR này bao gồm, từ đầu cùng amino đến đầu cùng carboxy, scFv, cầu nối peptit bao gồm SEQ ID NO: 104, và mảnh của CD30.

Theo một số phương án, sự biểu hiện của CSR này trong tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR là cảm ứng được. Theo một số phương án, tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR này bao gồm trình tự axit nucleic mã hóa CSR được liên kết hoạt động với trình tự khởi động cảm ứng được, bao gồm trình tự bất kỳ trong số các trình tự khởi động cảm ứng được được mô tả ở đây. Theo một số phương án, sự biểu hiện của CSR này trong tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR là cảm ứng được dựa vào sự truyền tín hiệu thông qua caTCR này. Theo một số phương án như vậy, tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR này bao gồm trình tự axit nucleic mã hóa CSR được liên kết hoạt động với trình tự khởi động hoặc yếu tố điều hòa đáp lại sự truyền tín hiệu thông qua caTCR. Theo một số phương án, trình tự axit nucleic này mã hóa CSR được liên kết hoạt động với trình tự khởi động thu được từ yếu tố nhân của tế bào T được hoạt hóa (nuclear-factor of the activated T-

cell - NFAT). Theo một số phương án, trình tự khởi động thu được từ NFAT này là trình tự khởi động tối thiểu thu được từ NFAT (xem ví dụ Durand, D. *et. al.*, *Molec. Cell. Biol.* 8, 1715-1724 (1988); Clipstone, NA, Crabtree, GR. *Nature. 1992* 357(6380): 695-7; Chmielewski, M., et al. *Cancer research* 71.17 (2011): 5697-5706; và Zhang, L., et al. *Molecular therapy* 19.4 (2011): 751-759). Theo một số phương án, trình tự khởi động thu được từ NFAT này bao gồm trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 85. Theo một số phương án, trình tự axit nucleic này mã hóa CSR được liên kết hoạt động với trình tự khởi động IL-2.

Các cấu trúc yếu tố tác động thứ cấp kích thích bài tiết (SSE)

Theo một số phương án, tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR (như tế bào T) này có khả năng tiết yếu tố tác động thứ cấp kích thích bài tiết (SSE). Tế bào miễn dịch này cũng được đề cập đến ở đây là "tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR và SSE". SSE này tăng cường đáp ứng miễn dịch được trung gian bởi tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR và SSE trong đó nó được biểu hiện về mặt chức năng và được tiết từ đó. Theo một số phương án, SSE này có khả năng tái định hướng các tế bào miễn dịch khác (như các tế bào T ngoài cuộc hoặc các tế bào NK ngoài cuộc) đến các tế bào bệnh đích (như các tế bào ung thư đích). Theo một số phương án, SSE này là kháng thể đa đặc hiệu (như kháng thể đặc hiệu kép) hướng đích tế bào miễn dịch (như tế bào T hoặc tế bào NK) và tế bào bệnh (như tế bào ung thư). Theo một số phương án, SSE này bảo vệ tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR và SSE khỏi môi trường ức chế miễn dịch, như môi trường khối u ức chế miễn dịch. Theo một số phương án, SSE này tạo ra sự hoạt hóa tự tiết của các thụ thể kích thích trên tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR và SSE. Theo một số phương án, SSE này là yếu tố sinh trưởng ngoại sinh hoặc xytokin kích thích. Theo một số phương án, sự biểu hiện của SSE ở tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR và SSE là cảm ứng được. Theo một số phương án, sự biểu hiện của SSE ở tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR và SSE là cảm ứng được dựa vào việc truyền tín hiệu thông qua caTCR.

Theo một số phương án, SSE này là kháng thể đa đặc hiệu (như kháng thể đặc hiệu kép) hướng đích tế bào T và tế bào bệnh. Theo một số phương án, SSE này bao gồm gốc kháng thể mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên bề mặt của tế bào T. Theo một số phương án, kháng nguyên bề mặt tế bào T này là CD3. Theo một số phương án, SSE này bao gồm gốc kháng thể mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên liên kết với bệnh

(như kháng nguyên liên kết với bệnh ung thư). Theo một số phương án, kháng nguyên liên kết với bệnh này là kháng nguyên bề mặt của tế bào bệnh (như tế bào ung thư). Theo một số phương án, kháng nguyên liên kết với bệnh này là glypican-3 (GPC3), CD47, muxin-16 (MUC16), CD19, CD20, CD22, EpCAM, EGFR, HER2, CEA, PSMA, AFP, PSA, BCMA, FCRL5, NY-ESO, HPV16, hoặc FoxP3, bao gồm các biến thể hoặc các đột biến của nó. Theo một số phương án, SSE này là kháng thể đa đặc hiệu được chọn từ nhóm bao gồm scFv nối tiếp, kháng thể dime (Db), kháng thể dime đơn chuỗi (scDb), kháng thể tái hướng đích ái lực kép (DART), và kháng thể miền biến đổi kép (DVD). Theo một số phương án, SSE này là kháng thể đặc hiệu kép. Theo một số phương án, SSE này là scFv nối tiếp bao gồm scFv thứ nhất hướng đích kháng nguyên bề mặt tế bào T và scFv thứ hai hướng đích kháng nguyên liên kết với bệnh.

Theo một số phương án, SSE này là scFv nối tiếp bao gồm scFv thứ nhất hướng đích CD3 và scFv thứ hai hướng đích kháng nguyên liên kết với bệnh. Theo một số phương án, kháng nguyên liên kết với bệnh này là GPC3, CD47, MUC16, CD19, CD20, CD22, EpCAM, EGFR, HER2, CEA, PSMA, AFP, PSA, BCMA, FCRL5, NY-ESO, HPV16, hoặc FoxP3, bao gồm các biến thể hoặc các đột biến của nó.

Theo một số phương án, SSE này là scFv nối tiếp bao gồm scFv thứ nhất hướng đích CD3 và scFv thứ hai hướng đích GPC3. Theo một số phương án, scFv thứ hai này bao gồm miền V_H bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 64 và miền V_L bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 65. Theo một số phương án, miền V_H này là đầu cùng amino đến miền V_L. Theo một số phương án, miền V_L này là đầu cùng amino đến miền V_H. Theo một số phương án, scFv thứ hai này bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 79. Theo một số phương án, scFv thứ nhất này là đầu cùng amino đến scFv thứ hai. Theo một số phương án, scFv thứ hai này là đầu cùng amino đến scFv thứ nhất. Theo một số phương án, SSE này bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 105.

Theo một số phương án, SSE này là scFv nối tiếp bao gồm scFv thứ nhất hướng đích CD3 và scFv thứ hai hướng đích CD47. Theo một số phương án, SSE này là scFv nối tiếp bao gồm scFv thứ nhất hướng đích CD3 và scFv thứ hai hướng đích MUC16.

Theo một số phương án, SSE này là kháng thể đa đặc hiệu (như kháng thể đặc hiệu kép) hướng đích tế bào NK và kháng nguyên liên kết với bệnh (như kháng nguyên liên kết với bệnh ung thư). Theo một số phương án, SSE này bao gồm gốc kháng thể mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên bề mặt của tế bào NK. Theo một số phương án, kháng nguyên bề mặt tế bào NK này là CD16a. Theo một số phương án, SSE này bao gồm gốc kháng thể mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên liên kết với bệnh (như kháng nguyên liên kết với bệnh ung thư). Theo một số phương án, kháng nguyên liên kết với bệnh này là kháng nguyên bề mặt của tế bào bệnh (như tế bào ung thư). Theo một số phương án, kháng nguyên liên kết với bệnh này là GPC3, CD47, MUC16, CD19, CD20, CD22, EpCAM, EGFR, HER2, CEA, PSMA, AFP, PSA, BCMA, FCRL5, NY-ESO, HPV16, hoặc FoxP3, bao gồm các biến thể hoặc các đột biến của nó. Theo một số phương án, SSE này là kháng thể đa đặc hiệu được chọn từ nhóm bao gồm scFv nối tiếp, kháng thể dime (Db), kháng thể dime đơn chuỗi (scDb), kháng thể tái hướng đích ái lực kép (DART), và kháng thể miền biến đổi kép (DVD). Theo một số phương án, SSE này là kháng thể đặc hiệu kép. Theo một số phương án, SSE này là scFv nối tiếp bao gồm scFv thứ nhất hướng đích kháng nguyên bề mặt tế bào NK và scFv thứ hai hướng đích kháng nguyên liên kết với bệnh.

Theo một số phương án, SSE này là scFv nối tiếp bao gồm scFv thứ nhất hướng đích CD16a và scFv thứ hai hướng đích kháng nguyên liên kết với bệnh. Theo một số phương án, kháng nguyên liên kết với bệnh này là GPC3, CD47, MUC16, CD19, CD20, CD22, EpCAM, EGFR, HER2, CEA, PSMA, AFP, PSA, BCMA, FCRL5, NY-ESO, HPV16, hoặc FoxP3, bao gồm các biến thể hoặc các đột biến của nó.

Theo một số phương án, SSE này là scFv nối tiếp bao gồm scFv thứ nhất hướng đích CD16a và scFv thứ hai hướng đích GPC3. Theo một số phương án, SSE này là scFv nối tiếp bao gồm scFv thứ nhất hướng đích CD16a và scFv thứ hai hướng đích CD47. Theo một số phương án, SSE này là scFv nối tiếp bao gồm scFv thứ nhất hướng đích CD16a và scFv thứ hai hướng đích MUC16.

Theo một số phương án, các SSE được mô tả ở đây bao gồm gốc kháng thể mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên liên kết với bệnh, trong đó gốc kháng thể này bao gồm các CDR hoặc các miền biến đổi (các miền V_H và/hoặc V_L) của gốc kháng thể đặc hiệu đối với kháng nguyên liên kết với bệnh. Theo một số phương án, gốc kháng thể

này bao gồm các CDR hoặc các miền biến đổi (các miền V_H và/hoặc V_L) của gốc kháng thể đặc hiệu cho CD19 (xem, *ví dụ*, WO2017066136A2). Theo một số phương án, gốc kháng thể này bao gồm các CDR hoặc các miền biến đổi (các miền V_H và/hoặc V_L) của gốc kháng thể đặc hiệu cho CD19 (*ví dụ*, miền V_H bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 58 và/hoặc miền V_L bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 59, hoặc các CDR được chứa trong đó). Theo một số phương án, gốc kháng thể này bao gồm các CDR hoặc các miền biến đổi (các miền V_H và/hoặc V_L) của gốc kháng thể đặc hiệu cho CD20 (*ví dụ*, miền V_H bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 60 và/hoặc miền V_L bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 61, hoặc các CDR được chứa trong đó). Theo một số phương án, gốc kháng thể này bao gồm các CDR hoặc các miền biến đổi (các miền V_H và/hoặc V_L) của gốc kháng thể đặc hiệu cho CD22 (xem, *ví dụ*, USSN 62/650,955 được nộp ngày 30/03/2018, mà nội dung của nó được kết hợp toàn bộ ở đây bằng cách viện dẫn). Theo một số phương án, gốc kháng thể này bao gồm các CDR hoặc các miền biến đổi (các miền V_H và/hoặc V_L) của gốc kháng thể đặc hiệu cho CD22 (*ví dụ*, miền V_H bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 101 và/hoặc miền V_L bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 102, hoặc các CDR được chứa trong đó). Theo một số phương án, gốc kháng thể này bao gồm các CDR hoặc các miền biến đổi (các miền V_H và/hoặc V_L) của gốc kháng thể đặc hiệu cho GPC3 (xem, *ví dụ*, USSN 62/490,586 được nộp ngày 26/04/2017, mà nội dung của nó được kết hợp toàn bộ ở đây bằng cách viện dẫn). Theo một số phương án, gốc kháng thể này bao gồm các CDR hoặc các miền biến đổi (các miền V_H và/hoặc V_L) của gốc kháng thể đặc hiệu cho GPC3 (*ví dụ*, miền V_H bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 64 và/hoặc miền V_L bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 65, hoặc các CDR được chứa trong đó). Theo một số phương án, gốc kháng thể này bao gồm các CDR hoặc các miền biến đổi (các miền V_H và/hoặc V_L) của gốc kháng thể đặc hiệu cho ROR1 (xem, *ví dụ*, WO2016/187220 và WO2016/187216). Theo một số phương án, gốc kháng thể này bao gồm các CDR hoặc các miền biến đổi (các miền V_H và/hoặc V_L) của gốc kháng thể đặc hiệu cho ROR2 (xem, *ví dụ*, WO2016/142768). Theo một số phương án, gốc kháng thể này bao gồm các CDR hoặc các miền biến đổi (các miền V_H và/hoặc V_L) của gốc kháng thể đặc hiệu cho BCMA (xem, *ví dụ*, WO2016/090327 và

WO2016/090320). Theo một số phương án, gốc kháng thể này bao gồm các CDR hoặc các miền biến đổi (các miền V_H và/hoặc V_L) của gốc kháng thể đặc hiệu cho GPRC5D (xem, *ví dụ*, WO2016/090329 và WO2016/090312). Theo một số phương án, gốc kháng thể này bao gồm các CDR hoặc các miền biến đổi (các miền V_H và/hoặc V_L) của gốc kháng thể đặc hiệu cho FCRL5 (xem, *ví dụ*, WO2016/090337). Theo một số phương án, gốc kháng thể này bao gồm các CDR hoặc các miền biến đổi (các miền V_H và/hoặc V_L) của gốc kháng thể đặc hiệu cho WT-1 (*xem*, *ví dụ*, WO2012/135854, WO2015/070078, và WO2015/070061). Theo một số phương án, gốc kháng thể này bao gồm các CDR hoặc các miền biến đổi (các miền V_H và/hoặc V_L) của gốc kháng thể đặc hiệu cho AFP (*xem*, *ví dụ*, WO2016/161390). Theo một số phương án, gốc kháng thể này bao gồm các CDR hoặc các miền biến đổi (các miền V_H và/hoặc V_L) của gốc kháng thể đặc hiệu cho HPV16-E7 (xem, *ví dụ*, WO2016/182957). Theo một số phương án, gốc kháng thể này bao gồm các CDR hoặc các miền biến đổi (các miền V_H và/hoặc V_L) của gốc kháng thể đặc hiệu cho NY-ESO-1 (xem, *ví dụ*, WO2016/210365). Theo một số phương án, gốc kháng thể này bao gồm các CDR hoặc các miền biến đổi (các miền V_H và/hoặc V_L) của gốc kháng thể đặc hiệu cho PRAME (*xem*, *ví dụ*, WO2016/191246). Theo một số phương án, gốc kháng thể này bao gồm các CDR hoặc các miền biến đổi (các miền V_H và/hoặc V_L) của gốc kháng thể đặc hiệu cho EBV-LMP2A (xem, *ví dụ*, WO2016/201124). Theo một số phương án, gốc kháng thể này bao gồm các CDR hoặc các miền biến đổi (các miền V_H và/hoặc V_L) của gốc kháng thể đặc hiệu cho KRAS (*xem*, *ví dụ*, WO2016/154047). Theo một số phương án, gốc kháng thể này bao gồm các CDR hoặc các miền biến đổi (các miền V_H và/hoặc V_L) của gốc kháng thể đặc hiệu cho PSA (*xem*, *ví dụ*, WO2017/015634). Theo một số phương án, gốc kháng thể này là scFv. Theo một số phương án, SSE này là scFv nối tiếp bao gồm a) scFv thứ nhất mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên bề mặt của tế bào T (như CD3) hoặc tế bào NK (như CD16a) và b) gốc kháng thể, trong đó gốc kháng thể này là scFv thứ hai. Theo một số phương án, SSE này bao gồm các scFv thứ nhất và thứ hai được kết nối bằng cầu nối peptit. Theo một số phương án, scFv thứ nhất này là đầu cùng amino đến scFv thứ hai. Theo một số phương án, scFv thứ hai này là đầu cùng amino đến scFv thứ nhất.

Theo một số phương án, SSE này là kháng thể đa đặc hiệu (như kháng thể đặc hiệu kép) hướng đích một hoặc nhiều chất ức chế miễn dịch hòa tan. SSE như vậy có thể

đóng vai trò là bẫy để tách các chất ức chế miễn dịch hòa tan khỏi các đích của nó, do đó làm giảm các tác động ức chế miễn dịch của chúng. Theo một số phương án, SSE này bao gồm một hoặc nhiều gốc kháng thể mà liên kết đặc hiệu với một hoặc nhiều chất ức chế miễn dịch hòa tan. Theo một số phương án, các chất ức chế miễn dịch này là các xytokin ức chế miễn dịch. Theo một số phương án, các xytokin ức chế miễn dịch này bao gồm các thành viên họ TGF-β (như TGF-β từ 1 đến 4), IL-4, và IL-10, bao gồm các biến thể hoặc các đột biến của nó. Theo một số phương án, SSE này là kháng thể đa đặc hiệu được chọn từ nhóm bao gồm scFv nối tiếp, kháng thể dime (Db), kháng thể dime đơn chuỗi (scDb), kháng thể tái hướng đích ái lực kép (DART), và kháng thể miền biến đổi kép (DVD). Theo một số phương án, SSE này là kháng thể đặc hiệu kép. Ví dụ, theo một số phương án, SSE này là scFv nối tiếp bao gồm scFv thứ nhất hướng đích xytokin ức chế miễn dịch thứ nhất (như TGFβ) và scFv thứ hai hướng đích xytokin ức chế miễn dịch thứ hai (như IL-4).

Theo một số phương án, SSE này là gốc kháng thể hướng đích phân tử điểm kiểm tra miễn dịch. Theo một số phương án, SSE này là chất đối kháng của phân tử điểm kiểm tra miễn dịch ức chế. Theo một số phương án, phân tử điểm kiểm tra miễn dịch ức chế này được chọn từ nhóm bao gồm PD-1, PD-L1, CTLA-4, HVEM, BTLA, KIR, LAG-3, TIM-3, và A2aR. Theo một số phương án, SSE này là chất chủ vận của phân tử điểm kiểm tra miễn dịch kích thích. Theo một số phương án, phân tử điểm kiểm tra miễn dịch kích thích này được chọn từ nhóm bao gồm CD28, ICOS, 4-1BB, OX40, CD27, và CD40. Theo một số phương án, gốc kháng thể này là kháng thể có chiều dài đầy đủ, Fab, Fab', (Fab')2, Fv, hoặc Fv đơn chuỗi (scFv). Theo một số phương án, gốc kháng thể này là scFv.

Theo một số phương án, SSE này là gốc kháng thể đối kháng hướng đích PD-1. Theo một số phương án, gốc kháng thể này bao gồm các CDR hoặc các miền biến đổi (các miền V_H và/hoặc V_L) của gốc kháng thể đối kháng đặc hiệu đối với PD-1 (xem, *ví dụ*, WO2016/210129). Theo một số phương án, gốc kháng thể đối kháng này là kháng thể có chiều dài đầy đủ, Fab, a Fab', (Fab')2, Fv, hoặc Fv đơn chuỗi (scFv). Theo một số phương án, gốc kháng thể đối kháng này là scFv.

Theo một số phương án, SSE này là gốc kháng thể đối kháng hướng đích CD47. Theo một số phương án, gốc kháng thể đối kháng này bao gồm các CDR hoặc các miền

biến đổi (các miền V_H và/hoặc V_L) của gốc kháng thể đối kháng đặc hiệu đối với CD47 (ví dụ, miền V_H bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 66 và/hoặc miền V_L bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 67, hoặc các CDR được chứa trong đó). Theo một số phương án, gốc kháng thể đối kháng này là kháng thể có chiều dài đầy đủ, Fab, a Fab', (Fab')2, Fv, hoặc Fv đơn chuỗi (scFv). Theo một số phương án, gốc kháng thể đối kháng này là scFv.

Theo một số phương án, SSE này bao gồm gốc kháng thể mà liên kết với kháng nguyên đích với a) ái lực là ít nhất khoảng 10 (bao gồm ví dụ ít nhất khoảng giá trị bất kỳ trong số 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500, 750, 1000 hoặc nhiều hơn) lần ái lực liên kết của nó với các phân tử khác; hoặc b) K_d không lớn hơn khoảng 1/10 (như không lớn hơn khoảng giá trị bất kỳ trong số 1/10, 1/20, 1/30, 1/40, 1/50, 1/75, 1/100, 1/200, 1/300, 1/400, 1/500, 1/750, 1/1000 hoặc ít hơn) lần K_d của nó để liên kết với các phân tử khác. Ái lực liên kết có thể được xác định bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật, như ELISA, phân tích phân loại tế bào được hoạt hóa huỳnh quang (FACS), hoặc thử nghiệm kết tủa miễn dịch phóng xạ (RIA). K_d có thể được xác định bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật, như thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) sử dụng, ví dụ, thiết bị Biacore, hoặc thử nghiệm loại trừ động học (KinExA) sử dụng, ví dụ, thiết bị Sapidyne.

Theo một số phương án, SSE này là phân tử hòa tan mà liên kết đặc hiệu với phối tử của thụ thể ức chế miễn dịch. Theo một số phương án, SSE này bao gồm miền liên kết phối tử thu được từ miền ngoại bào của thụ thể ức chế miễn dịch. Theo một số phương án, miền liên kết phối tử này là một phần của miền ngoại bào của thụ thể. Theo một số phương án, thụ thể ức chế miễn dịch này được chọn lựa từ nhóm gồm FasR, TNFR1, TNFR2, SIRPα, PD-1, CD28, CTLA-4, ICOS, BTLA, KIR, LAG-3, 4-1BB, OX40, CD27, CD40, và TIM-3.

Theo một số phương án, SSE này là phân tử hòa tan mà liên kết đặc hiệu với và đối kháng với thụ thể ức chế miễn dịch. Theo một số phương án, SSE này bao gồm miền liên kết thụ thể thu được từ miền ngoại bào của phối tử cho thụ thể ức chế miễn dịch. Theo một số phương án, miền liên kết thụ thể này là một phần của miền ngoại bào của phối tử này. Theo một số phương án, phối tử này được chọn từ nhóm bao gồm FasL,

PD-L1, PD-L2, CD47, CD80, CD86, ICOSL, HVEM, 4-1BBL, OX40L, CD70, CD40L, và GAL9.

Theo một số phương án, SSE này là xytokin kích thích ngoại sinh. Xytokin ngoại sinh được mô tả ở đây là xytokin được biểu hiện từ gen ngoại sinh. Theo một số phương án, xytokin kích thích ngoại sinh này là thành viên thuộc họ IL-12. Theo một số phương án, thành viên họ IL-12 này là IL-12, IL-23, IL-27, hoặc IL-35. Theo một số phương án, xytokin kích thích ngoại sinh này là IL-2, IL-15, IL-18, hoặc IL-21. Theo một số phương án, xytokin kích thích ngoại sinh này có khả năng tạo ra sự hoạt hóa tự tiết của các thụ thể đối với xytokin trên tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR và SSE.

Theo một số phương án, sự biểu hiện của SSE ở tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR và SSE là cảm ứng được. Theo một số phương án, tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR và SSE này bao gồm trình tự axit nucleic mã hóa SSE được liên kết hoạt động với trình tự khởi động cảm ứng được, bao gồm trình tự khởi động bất kỳ trong số các trình tự khởi động cảm ứng được được mô tả ở đây. Theo một số phương án, sự biểu hiện của SSE ở tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR và SSE là cảm ứng được dựa vào việc truyền tín hiệu thông qua caTCR. Theo một số phương án như vậy, tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR và SSE bao gồm trình tự axit nucleic mã hóa SSE được liên kết hoạt động với trình tự khởi động hoặc yếu tố điều hòa đáp lại sự truyền tín hiệu thông qua caTCR. Theo một số phương án, trình tự axit nucleic mã hóa SSE này được liên kết hoạt động với trình tự khởi động thu được từ yếu tố nhân của tế bào T được hoạt hóa (NFAT). Theo một số phương án, trình tự khởi động thu được từ NFAT này là trình tự khởi động tối thiểu thu được từ NFAT (xem ví dụ Durand, D. *et. al.*, *Molec. Cell. Biol.* 8, 1715-1724 (1988); Clipstone, NA, Crabtree, GR. *Nature. 1992* 357(6380): 695-7; Chmielewski, M., et al. *Cancer research* 71.17 (2011): 5697-5706; và Zhang, L., et al. *Molecular therapy* 19.4 (2011): 751-759). Theo một số phương án, trình tự khởi động thu được từ NFAT này bao gồm trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 85. Theo một số phương án, trình tự axit nucleic mã hóa SSE này được liên kết hoạt động với trình tự khởi động IL-2.

Axit nucleic

Các phân tử axit nucleic mã hóa các caTCR, CSR và/hoặc SSE được mô tả ở đây cũng được dự tính. Theo một số phương án, theo loại bất kỳ trong số các caTCR, CSR và SSE được mô tả ở đây, sáng chế đề xuất axit nucleic (hoặc tập hợp các axit nucleic) mã hóa caTCR, CSR và/hoặc SSE này.

Sáng chế cũng đề xuất các vectơ trong đó axit nucleic theo sáng chế được chèn vào.

Nói tóm lại, sự biểu hiện của caTCR và/hoặc CSR và/hoặc SSE được mô tả ở đây bởi axit nucleic mã hóa caTCR và/hoặc CSR và/hoặc SSE có thể đạt được bằng cách chèn axit nucleic này vào trong vectơ biểu hiện thích hợp, sao cho axit nucleic này được liên kết hoạt động với các yếu tố điều hòa đầu 5' và 3', bao gồm ví dụ trình tự khởi động (ví dụ, trình tự khởi động đặc hiệu tế bào lympho) và vùng không dịch mã (UTR) đầu 3'. Các vectơ này có thể thích hợp cho sự sao chép và hợp nhất trong các tế bào chủ động vật nhân chuẩn. Các vectơ biểu hiện và tách dòng tiêu biểu chứa các trình tự kết thúc phiên mã và dịch mã, các trình tự bắt đầu, và các trình tự khởi động hữu dụng để điều hòa sự biểu hiện của trình tự axit nucleic mong muốn.

Các axit nucleic của sáng chế có thể cũng được sử dụng cho liệu pháp miễn dịch axit nucleic và liệu pháp gen, bằng cách sử dụng các quy trình phân phối gen chuẩn. Các phương pháp phân phối gen là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Xem, ví dụ, Patent Mỹ số 5,399,346, 5,580,859, 5,589,466, được kết hợp toàn bộ ở đây bằng cách viện dẫn. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất vectơ liệu pháp gen.

Axit nucleic này có thể được tách dòng vào trong nhiều loại vectơ. Ví dụ, axit nucleic này có thể được tách dòng vào trong vectơ bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, plasmit, phagemit, dẫn xuất thực khuẩn thể, virut động vật, và cosmit. Các vectơ được đặc biệt quan tâm bao gồm các vectơ biểu hiện, các vectơ sao chép, các vectơ tạo mẫu dò, và các vectơ giải trình tự.

Ngoài ra, vectơ biểu hiện này có thể được cung cấp cho tế bào ở dạng vectơ virut. Công nghệ vectơ virut là đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật và được mô tả, ví dụ, trong Sambrook et al. (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York), và trong các tài liệu hướng dẫn virut học và sinh học phân tử

khác. Các virut mà hữu dụng làm vectơ bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, retrovirut, adenovirut, virut liên kết với adeno, virut herpes, và lentivirut. Thông thường, vectơ thích hợp chứa gốc sao chép chức năng trong ít nhất một sinh vật, trình tự khởi động, các vị trí endonucleaza giới hạn thông thường, và một hoặc nhiều chỉ thị chọn lọc (xem, ví dụ, WO 01/96584; WO 01/29058; và Patent Mỹ số 6,326,193).

Nhiều hệ thống dựa vào virut đã được phát triển để chuyển gen vào tế bào động vật có vú. Ví dụ, retrovirut tạo ra nền tảng thuận tiện cho hệ thống phân phối gen. Gen được chọn có thể được chèn vào trong vectơ và được đóng gói trong các hạt retrovirut bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Virut tái tổ hợp này sau đó có thể được phân lập và được phân phối đến các tế bào của đối tượng in vivo hoặc ex vivo. Nhiều hệ thống retrovirut là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Theo một số phương án, các vectơ adenovirut được sử dụng. Nhiều vectơ adenovirut là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Theo một số phương án, các vectơ lentivirut được sử dụng. Các vectơ thu được từ các retrovirut như lentivirut là các công cụ thích hợp để đạt được sự chuyển gen lâu dài vì chúng cho phép sự hợp nhất ổn định lâu dài của gen chuyển và sự nhân lên của nó trong các tế bào thế hệ con. Các vectơ lentivirut có các ưu điểm hơn so với các vectơ thu được từ các onco-retrovirut như các virut bệnh bạch cầu chuột trong đó chúng có thể tải nạp các tế bào không tăng sinh, như các tế bào gan. Chúng cũng có thể có các ưu điểm hơn về khả năng gây miễn dịch thấp.

Các yếu tố khởi động bổ sung, ví dụ, trình tự tăng cường, điều hòa tần suất của sự khởi đầu phiên mã. Thông thường, chúng được định vị ở vùng 30-110 bp ngược dòng của vị trí bắt đầu, mặc dù nhiều trình tự khởi động gần đây cũng được chỉ ra là chứa các yếu tố chức năng xuôi dòng của vị trí bắt đầu. Khoảng cách giữa các yếu tố khởi động thường là linh hoạt, sao cho chức năng khởi động được bảo toàn khi các yếu tố này bị đảo ngược hoặc dịch chuyển so với nhau. Trong trình tự khởi động thymidin kinaza (tk), khoảng cách giữa các yếu tố khởi động có thể được tăng đến một khoảng cách 50 bp trước khi hoạt tính bắt đầu suy giảm.

Một ví dụ về trình tự khởi động thích hợp là trình tự khởi động cytomegalovirut sớm tức thì (CMV). Trình tự khởi động này là trình tự khởi động cơ định mạnh có khả năng điều khiển các mức biểu hiện cao của trình tự polynucleotit bất kỳ được liên kết hoạt động với chúng. Một ví dụ khác về trình tự khởi động thích hợp là yếu tố sinh

trưởng kéo dài-1α (EF-1α). Tuy nhiên, các trình tự khởi động cơ định khác có thể cũng được sử dụng, bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở trình tự khởi động sớm virut khỉ 40 (SV40), trình tự khởi động lặp đầu cùng dài (LTR) virut khối u vú chuột nhắt (MMTV), trình tự khởi động lặp đầu cùng dài (LTR) virut suy giảm miễn dịch ở người (HIV), trình tự khởi động MoMuLV, trình tự khởi động virut gây bệnh bạch cầu ở chim, trình tự khởi động sớm tức thì virut Epstein-Barr, trình tự khởi động virut Rous bệnh sacôm, cũng như trình tự khởi động gen người như, nhưng không bị giới hạn ở, trình tự khởi động actin, trình tự khởi động myosin, trình tự khởi động hemoglobin, và trình tự khởi động creatin kinaza.

Ngoài ra, sáng chế không bị giới hạn ở việc sử dụng các trình tự cơ định. Các trình tự khởi động cảm ứng được cũng được dự kiến là một phần của sáng chế. Việc sử dụng trình tự khởi động cảm ứng được tạo cho phân tử chuyển khả năng bật sự biểu hiện của trình tự polynucleotit mà nó được liên kết hoạt động khi sự biểu hiện này được mong muốn, hoặc tắt sự biểu hiện khi sự biểu hiện này không được mong muốn. Các hệ thống trình tự khởi động cảm ứng được làm ví dụ để sử dụng trong các tế bào nhân chuẩn bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các yếu tố được điều hòa bằng hocmon (ví dụ, xem Mader, S. và White, J. H. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5603-5607), các yếu tố được điều hòa bằng phối tử tổng hợp (xem, ví dụ, Spencer, D. M. et al 1993) Science 262: 1019-1024) và các yếu tố được điều hòa bằng sự chiếu xạ ion hóa (ví dụ, xem Manome, Y. et al. (1993) Biochemistry 32: 10607-10613; Datta, R. et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 1014- 10153). Các hệ thống trình tự khởi động cảm ứng được làm ví dụ khác để sử dụng trong các hệ thống động vật có vú in vitro hoặc in vivo được nêu tổng quát trong Gingrich et al. (1998) Annual Rev. Neurosci 21:377-405.

Hệ thống trình tự khởi động cảm ứng được làm ví dụ để sử dụng trong sáng chế là hệ thống Tet. Các hệ thống này là dựa trên hệ thống Tet được mô tả bởi Gossen et al. (1993). Theo phương án làm ví dụ, polynucleotit quan tâm là được điều khiển bởi trình tự khởi động mà bao gồm một hoặc nhiều vị trí hoạt động Tet (TetO). Ở trạng thái không hoạt động, yếu tố kìm hãm Tet (TetR) sẽ liên kết với các vị trí TetO và kìm hãm sự phiên mã từ trình tự khởi động. Ở trạng thái hoạt động, ví dụ, trong sự có mặt của chất cảm ứng như tetraxyclin (Tc), anhydrotetraxyclin, doxyxyclin (Dox), hoặc chất hoạt động tương tự của nó, chất cảm ứng này gây ra sự giải phóng TetR từ TetO, do đó cho

phép sự phiên mã được diễn ra. Doxyxyclin là thành viên thuộc họ kháng sinh tetraxyclin có tên hóa học là 1-dimetylamino-2,4a,5,7,12-pentahydroxy-11-metyl-4,6-dioxo-1,4a,11,11a,12,12a-hexahydrotetracen-3-carboxamit.

Theo một phương án, TetR được tối ưu hóa codon cho sự biểu hiện ở tế bào động vật có vú, ví dụ, tế bào chuột hoặc người. Hầu hết các axit amin được mã hóa bởi nhiều hơn một codon do tính suy biến của mã di truyền, cho phép các thay đổi thực tế ở trình tự nucleotit của axit nucleic đã cho mà không có sự thay đổi bất kỳ trong trình tự axit amin được mã hóa bởi axit nucleic này. Tuy nhiên, nhiều sinh vật thể hiện sự khác biệt ở việc sử dụng codon, cũng được biết là "độ lệch codon" (tức là, thiên về việc sử dụng (các) codon cụ thể cho axit amin nhất định). Độ lệch codon thường tương quan với sự có mặt của các loại tARN chiếm ưu thế cho codon cụ thể, mà đến lượt nó làm tăng hiệu quả của sự dịch mã mARN. Do đó, trình tự mã hóa thu được từ sinh vật cụ thể (ví dụ, sinh vật chưa có nhân chuẩn) có thể được gắn vào cho sự biểu hiện được cải thiện ở các sinh vật khác (ví dụ, sinh vật nhân chuẩn) thông qua sự tối ưu hóa codon.

Các biến đổi đặc trưng khác của hệ thống Tet bao gồm các hệ thống "Tet-Off" và "Tet-On" sau đây. Ở hệ thống Tet-Off, quá trình phiên mã là không hoạt động khi có mặt Tc hoặc Dox. Ở hệ thống này, protein dịch hoạt hóa được điều khiển bởi tetraxyclin (tTA), mà được cấu thành từ TetR được dung hợp với miền dịch hoạt hóa mạnh của VP16 từ virut đơn hình Herpes, điều hòa sự biểu hiện của axit nucleic đích mà nằm dưới sự điều khiển phiên mã của yếu tố khởi động đáp lại tetraxyclin (TRE). TRE được cấu thành từ các đoạn trùng lặp trình tự TetO được dung hợp với trình tự khởi động (phổ biến là trình tự khởi động tối thiểu thu được từ trình tự khởi động sớm tức thì cytomegalovirut người (hCMV)). Khi không có mặt Tc hoặc Dox, tTA liên kết với TRE và hoạt hóa sự phiên mã của gen đích. Khi có mặt Tc hoặc Dox, tTA không thể liên kết với TRE, và sự biểu hiện từ gen đích vẫn ở trạng thái không hoạt động.

Ngược lại, ở hệ thống Tet-On, sự phiên mã hoạt động khi có mặt Tc hoặc Dox. Hệ thống Tet-On này là dựa trên yếu tố dịch hoạt hóa được điều khiển bởi tetraxyclin ngược, rtTA. Giống như tTA, rtTA là protein dung hợp được cấu thành từ yếu tố kìm hãm TetR và miền dịch hoạt hóa VP16. Tuy nhiên, sự thay đổi bốn axit amin ở gốc liên kết TetR ADN làm thay đổi các đặc tính liên kết của rtTA sao cho nó chỉ có thể nhận biết trình

tự tetO ở TRE của gen chuyển đích khi có mặt Dox. Do đó, ở hệ thống Tet-On, sự phiên mã của gen đích được điều hòa bởi TRE được kích thích bởi rtTA chỉ khi có mặt Dox.

Một hệ thống trình tự khởi động cảm ứng được khác là hệ thống kìm hãm lac từ E. coli. (Xem, Brown et al., Cell 49:603-612 (1987). Hệ thống kìm hãm lac hoạt động bằng cách điều hòa sự phiên mã của polynucleotit quan tâm được liên kết hoạt động với trình tự khởi động bao gồm trình tự điều hòa lac (lacO). Yếu tố kìm hãm lac (lacR) liên kết với LacO, do đó ngăn chặn quá trình phiên mã của polynucleotit quan tâm. Sự biểu hiện của polynucleotit quan tâm được cảm ứng bởi chất cảm ứng thích hợp, ví dụ, isopropyl-β-D-thiogalactopyranosit (IPTG).

Một hệ thống trình tự khởi động cảm ứng được khác làm ví dụ để sử dụng trong sáng chế là hệ thống yếu tố nhân của tế bào T được hoạt hóa (NFAT). Họ NFAT của các yếu tố phiên mã là các chất điều hòa quan trọng của quá trình hoạt hóa tế bào T. Các yếu tố đáp ứng NFAT được tìm thấy, ví dụ, trong trình tự khởi động IL-2 (xem ví dụ Durand, D. *et. al.*, *Molec. Cell. Biol.* 8, 1715-1724 (1988); Clipstone, NA, Crabtree, GR. *Nature. 1992* 357(6380): 695-7; Chmielewski, M., et al. *Cancer research* 71.17 (2011): 5697-5706; và Zhang, L., et al. *Molecular therapy* 19.4 (2011): 751-759). Theo một số phương án, trình tự khởi động cảm ứng được được mô tả ở đây bao gồm một hoặc nhiều (như 2, 3, 4, 5, 6, hoặc nhiều hơn) yếu tố đáp ứng NFAT. Theo một số phương án, trình tự khởi động cảm ứng được này bao gồm 6 yếu tố đáp ứng NFAT, ví dụ, bao gồm trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 83. Theo một số phương án, trình tự khởi động cảm ứng được được mô tả ở đây bao gồm một hoặc nhiều (như 2, 3, 4, 5, 6, hoặc nhiều hơn) yếu tố đáp ứng NFAT được liên kết với trình tự khởi động tối thiểu, như trình tự khởi động TA tối thiểu. Theo một số phương án, trình tự khởi động TA tối thiểu này bao gồm trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 84. Theo một số phương án, trình tự khởi động cảm ứng được này bao gồm trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 85.

Để đánh giá sự biểu hiện của polypeptit hoặc các phần của nó, vectơ biểu hiện được được đưa vào trong tế bào có thể cũng chứa gen chỉ thị chọn lọc hoặc gen báo cáo hoặc cả hai để tạo điều kiện cho việc xác định và chọn lọc các tế bào biểu hiện từ quần thể tế bào được tìm kiếm để được chuyển nhiễm hoặc nhiễm thông qua vectơ virut. Theo các khía cạnh khác, chỉ thị chọn lọc này có thể được mang trên các mẩu ADN riêng biệt và được sử dụng trong quy trình đồng chuyển nhiễm. Cả chỉ thị chọn lọc và gen báo cáo

đều có thể được tạo sườn với các trình tự điều hòa thích hợp để cho phép sự biểu hiện ở tế bào chủ. Các chỉ thị chọn lọc hữu dụng bao gồm, ví dụ, các gen kháng kháng sinh, như neo và loại tương tự.

Các gen báo cáo được sử dụng để nhận diện các tế bào đã chuyển nhiễm tiềm năng và để đánh giá chức năng của các trình tự điều hòa. Thông thường, gen báo cáo là gen mà không có mặt ở hoặc được biểu hiện bởi sinh vật hoặc mô nhận và mã hóa polypeptit mà sự biểu hiện của nó được phóng đại bởi tính chất phát hiện được dễ dàng nào đó, ví dụ, hoạt tính enzym. Sự biểu hiện của gen báo cáo được phân tích tại thời điểm thích hợp sau khi ADN này đã được đưa vào trong tế bào nhận. Các gen báo cáo thích hợp có thể bao gồm các gen mã hóa luciferaza, β-galactosidaza, cloramphenicol axetyl transferaza, alkalin phosphataza được tiết, hoặc gen protein huỳnh quang xanh (ví dụ, Ui-Tel et al., 2000 FEBS Letters 479: 79-82). Các hệ thống biểu hiện thích hợp cũng đã biết rõ và có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết hoặc thu được từ nguồn thương mại. Thông thường, cấu trúc có vùng gắn sườn đầu 5' tối thiểu thể hiện mức biểu hiện cao nhất của gen báo cáo được xác định là trình tự khởi động. Các vùng trình tự khởi động này có thể được liên kết với gen báo cáo và được sử dụng để đánh giá các chất có khả năng điều biến quá trình phiên mã do trình tự khởi động điều khiển.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất axit nucleic mã hóa caTCR và/hoặc CSR theo loại bất kỳ trong số các caTCR, CSR và SSE được mô tả ở đây. Theo một số phương án, axit nucleic này bao gồm một hoặc nhiều trình tự axit nucleic mã hóa tất cả các chuỗi polypeptit của caTCR này. Theo một số phương án, axit nucleic này bao gồm một hoặc nhiều trình tự axit nucleic mã hóa tất cả các chuỗi polypeptit của CSR này. Theo một số phương án, axit nucleic này bao gồm một hoặc nhiều trình tự axit nucleic mã hóa tất cả các chuỗi polypeptit của caTCR này và CSR. Theo một số phương án, mỗi loại trong số một hoặc nhiều trình tự axit nucleic này được chứa trong các vectơ riêng rẽ. Theo một số phương án, ít nhất một số trong số các trình tự axit nucleic này được chứa trong cùng một vectơ. Theo một số phương án, tất cả các trình tự axit nucleic được chứa trong cùng một vectơ. Các vectơ có thể được chọn, ví dụ, từ nhóm bao gồm các vectơ biểu hiện động vật có vú và các vectơ virut (như các vectơ thu được từ retrovirut, adenovirut, các virut liên kết với adeno, virut herpes, và lentivirut).

Ví dụ, theo một số phương án, caTCR này là dime bao gồm chuỗi polypeptit caTCR thứ nhất và chuỗi polypeptit caTCR thứ hai và CSR này là monome bao gồm chuỗi polypeptit CSR đơn, và axit nucleic này bao gồm trình tự axit nucleic thứ nhất mã hóa chuỗi polypeptit caTCR thứ nhất, axit nucleic thứ hai mã hóa chuỗi caTCR thứ hai, và trình tự axit nucleic thứ ba mã hóa chuỗi polypeptit CSR. Theo một số phương án, trình tự axit nucleic thứ nhất này được chứa trong vectơ thứ nhất, trình tự axit nucleic thứ hai này được chứa trong vectơ thứ hai, và trình tự axit nucleic thứ ba này được chứa trong vectơ thứ ba. Theo một số phương án, trình tự axit nucleic thứ nhất và thứ hai được chứa trong vectơ thứ nhất, và trình tự axit nucleic thứ ba được chứa trong vectơ thứ hai. Theo một số phương án, trình tự axit nucleic thứ nhất và thứ ba được chứa trong vectơ thứ nhất, và trình tự axit nucleic thứ hai được chứa trong vectơ thứ hai. Theo một số phương án, trình tự axit nucleic thứ hai và thứ ba được chứa trong vectơ thứ nhất, và trình tự axit nucleic thứ nhất được chứa trong vectơ thứ hai. Theo một số phương án, trình tự axit nucleic thứ nhất, thứ hai, và thứ ba được chứa trong cùng một vectơ. Theo một số phương án, trình tự axit nucleic thứ nhất này được điều khiển bởi trình tự khởi động thứ nhất, trình tự axit nucleic thứ hai được điều khiển bởi trình tự khởi động thứ hai, và trình tự axit nucleic thứ ba được điều khiển bởi trình tự khởi động thứ ba. Theo một số phương án, một số hoặc tất cả các trình tự khởi động thứ nhất, thứ hai, và thứ ba này có cùng trình tự. Theo một số phương án, một số hoặc tất cả các trình tự khởi động thứ nhất, thứ hai, và thứ ba này có các trình tự khác nhau. Theo một số phương án, một số hoặc tất cả các trình tự khởi động thứ nhất, thứ hai, và thứ ba này được biểu hiện dưới dạng bản phiên mã đơn được điều khiển bởi trình tự khởi động đơn ở vectơ đa cistron. Xem ví dụ Kim, JH, et al., PLoS One 6(4):e18556, 2011. Theo một số phương án, một hoặc nhiều trình tự khởi động này là cảm ứng được. Theo một số phương án, trình tự axit nucleic thứ ba mã hóa chuỗi polypeptit CSR được liên kết hoạt động với trình tự khởi động cảm ứng được. Theo một số phương án, trình tự khởi động cảm ứng được này bao gồm một hoặc nhiều yếu tố đáp ứng với sự hoạt hóa tế bào miễn dịch, như các yếu tố đáp ứng NFAT.

Theo một số phương án, một số hoặc tất cả các trình tự axit nucleic thứ nhất, thứ hai, và thứ ba này có các mức biểu hiện tương tự (như gần như hoặc khoảng cùng mức) ở tế bào chủ (như tế bào T). Theo một số phương án, một số trong số các trình tự axit

nucleic thứ nhất, thứ hai, và thứ ba này có các mức biểu hiện ở tế bào chủ (như tế bào T) khác nhau ít nhất khoảng hai lần (như ít nhất khoảng giá trị bất kỳ trong số 2, 3, 4, 5, hoặc nhiều hơn). Sự biểu hiện có thể được xác định tại mức mARN hoặc protein. Mức biểu hiện mARN có thể được xác định bằng cách đo lượng mARN được phiên mã từ axit nucleic bằng cách sử dụng nhiều phương pháp đã biết, bao gồm phương pháp thẩm tách Northern, RT-PCR định lượng, phương pháp phân tích vi dãy và loại tương tự. Mức biểu hiện protein có thể được đo bằng phương pháp đã biết bao gồm nhuộm miễn dịch hóa học tế bào, thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA), phân tích thẩm tách western, thử nghiệm phát quang, phổ khối, sắc ký lỏng hiệu năng cao, phổ khối nối tiếp sắc ký lỏng áp suất cao, và loại tương tự.

Cần hiểu rằng các dấu hiệu của các phương án được mô tả ở đây có thể được làm thích hợp và được kết hợp để bao hàm các phương án bao gồm số lượng bất kỳ của các trình tự axit nucleic, *ví dụ*, trong đó axit nucleic mã hóa caTCR và/hoặc CSR và/hoặc SSE bao gồm năm trình tự axit nucleic hoặc nhiều hơn (*ví dụ*, trong đó aTCR và SSE mỗi loại bao gồm 2 chuỗi polypeptit khác biệt hoặc nhiều hơn).

Do đó, theo một số phương án, sáng chế đề xuất axit nucleic mã hóa a) caTCR dime bao gồm chuỗi polypeptit caTCR thứ nhất và chuỗi polypeptit caTCR thứ hai theo loại bất kỳ trong số các caTCR được mô tả ở đây, axit nucleic này bao gồm i) trình tự axit nucleic caTCR thứ nhất mã hóa chuỗi polypeptit caTCR thứ nhất, và ii) trình tự axit nucleic caTCR thứ hai mã hóa chuỗi polypeptit caTCR thứ hai; và b) CSR monome bao gồm chuỗi polypeptit CSR đơn theo loại bất kỳ trong số các CSR được mô tả ở đây, axit nucleic này còn bao gồm trình tự axit nucleic CSR mã hóa chuỗi polypeptit CSR này. Theo một số phương án, trình tự axit nucleic caTCR thứ nhất được chứa trong vectơ thứ nhất (như vectơ lentivirut), trình tự axit nucleic caTCR thứ hai được chứa trong vectơ thứ hai (như vectơ lentivirut), và trình tự axit nucleic CSR này được chứa trong vectơ thứ ba (như vectơ lentivirut). Theo một số phương án, một số hoặc tất cả các trình tự axit nucleic caTCR thứ nhất và thứ hai và trình tự axit nucleic CSR này được chứa trong cùng vectơ (như vectơ lentivirut). Theo một số phương án, mỗi loại trong số các trình tự axit nucleic caTCR thứ nhất và thứ hai và trình tự axit nucleic CSR này, một cách riêng rẽ, được liên kết hoạt động với trình tự khởi động. Theo một số phương án, một số hoặc tất cả các trình tự khởi động này có cùng trình tự. Theo một số phương án, một

số hoặc tất cả các trình tự khởi động này có các trình tự khác nhau. Theo một số phương án, một số hoặc tất cả các trình tự khởi động này là cảm ứng được. Theo một số phương án, trình tự axit nucleic CSR này được liên kết hoạt động với trình tự khởi động cảm ứng được. Theo một số phương án, trình tự khởi động cảm ứng được này bao gồm một hoặc nhiều yếu tố đáp ứng với sự hoạt hóa tế bào miễn dịch. Theo một số phương án, trình tự axit nucleic CSR này được liên kết hoạt động với trình tự khởi động thu được từ NFAT. Theo một số phương án, một số hoặc tất cả các vectơ này đều là vectơ virut (như các vectơ lentivirut).

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất a) vectơ thứ nhất (như vectơ lentivirut) bao gồm axit nucleic mã hóa caTCR dime bao gồm chuỗi polypeptit caTCR thứ nhất và chuỗi polypeptit caTCR thứ hai theo loại bất kỳ trong số các caTCR được mô tả ở đây bao gồm i) trình tự khởi động thứ nhất được liên kết hoạt động với trình tự axit nucleic caTCR thứ nhất mã hóa chuỗi polypeptit caTCR thứ nhất; và ii) trình tự khởi động thứ hai được liên kết hoạt động với trình tự axit nucleic caTCR thứ hai mã hóa chuỗi polypeptit caTCR thứ hai; và b) vectơ thứ hai (như vectơ lentivirut) bao gồm axit nucleic mã hóa CSR monome bao gồm chuỗi polypeptit CSR theo loại bất kỳ trong số các CSR được mô tả ở đây bao gồm trình tự khởi động thứ ba được liên kết hoạt động với trình tự axit nucleic CSR mã hóa chuỗi polypeptit CSR này. Theo một số phương án, một số hoặc tất cả các trình tự khởi động này có cùng trình tự. Theo một số phương án, một số hoặc tất cả các trình tự khởi động này có các trình tự khác nhau. Theo một số phương án, một số hoặc tất cả các trình tự khởi động này là cảm ứng được. Theo một số phương án, các vectơ thứ nhất và/hoặc thứ hai này là vectơ virut (như các vectơ lentivirut).

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất a) vectơ thứ nhất (như vectơ lentivirut) bao gồm axit nucleic mã hóa caTCR dime bao gồm chuỗi polypeptit caTCR thứ nhất và chuỗi polypeptit caTCR thứ hai theo loại bất kỳ trong số các caTCR được mô tả ở đây bao gồm i) trình tự axit nucleic caTCR thứ nhất mã hóa chuỗi polypeptit caTCR thứ nhất; và ii) trình tự axit nucleic caTCR thứ hai mã hóa chuỗi polypeptit caTCR thứ hai, trong đó các trình tự axit nucleic caTCR thứ nhất và thứ hai này được điều khiển bởi trình tự khởi động thứ nhất; và b) vectơ thứ hai (như vectơ lentivirut) bao gồm axit nucleic mã hóa CSR monome bao gồm chuỗi polypeptit CSR theo loại bất kỳ trong số các CSR được mô tả ở đây bao gồm trình tự khởi động thứ hai được liên kết hoạt động

với trình tự axit nucleic CSR mã hóa chuỗi polypeptit CSR này. Theo một số phương án, trình tự khởi động thứ nhất này được liên kết hoạt động với đầu 5' của trình tự axit nucleic caTCR thứ nhất, và có cầu nối axit nucleic được chọn từ nhóm bao gồm vị trí đi vào ribosom nội bộ (IRES) và axit nucleic mã hóa peptit 2A tự phân tách (như P2A, T2A, E2A, hoặc F2A) liên kết đầu 3' của trình tự axit nucleic caTCR thứ nhất với đầu 5' của trình tự axit nucleic caTCR thứ hai, trong đó trình tự axit nucleic caTCR thứ nhất và trình tự axit nucleic caTCR thứ hai này được phiên mã dưới dạng ARN đơn được điều khiển bởi trình tự khởi động thứ nhất. Theo một số phương án, trình tự khởi động thứ nhất này được liên kết hoạt động với đầu 5' của trình tự axit nucleic caTCR thứ hai, và có cầu nối axit nucleic được chọn từ nhóm bao gồm vị trí đi vào ribosom nội bộ (IRES) và axit nucleic mã hóa peptit 2A tự phân tách (như P2A, T2A, E2A, hoặc F2A) liên kết đầu 3' của trình tự axit nucleic caTCR thứ hai với đầu 5' của trình tự axit nucleic caTCR thứ nhất, trong đó trình tự axit nucleic caTCR thứ nhất và trình tự axit nucleic caTCR thứ hai này được phiên mã dưới dạng ARN đơn được điều khiển bởi trình tự khởi động thứ nhất. Theo một số phương án, các trình tự khởi động thứ nhất và/hoặc thứ hai này là cảm ứng được. Theo một số phương án, các vectơ thứ nhất và/hoặc thứ hai này là vectơ virut (như các vectơ lentivirut). Được đánh giá rằng các phương án mà trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit nucleic được trao đổi cũng được dự tính, như trình tự axit nucleic caTCR thứ nhất hoặc thứ hai được trao đổi với trình tự axit nucleic CSR.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất vectơ (như vectơ virut, ví dụ, vectơ lentivirut) bao gồm a) axit nucleic mã hóa caTCR dime bao gồm chuỗi polypeptit caTCR thứ nhất và chuỗi polypeptit caTCR thứ hai theo loại bất kỳ trong số các caTCR được mô tả ở đây bao gồm i) trình tự axit nucleic caTCR thứ nhất mã hóa chuỗi polypeptit caTCR thứ nhất; và ii) trình tự axit nucleic caTCR thứ hai mã hóa chuỗi polypeptit caTCR thứ hai; và b) axit nucleic mã hóa CSR monome bao gồm chuỗi polypeptit CSR theo loại bất kỳ trong số các CSR được mô tả ở đây bao gồm trình tự axit nucleic CSR mã hóa chuỗi polypeptit CSR, trong đó các trình tự axit nucleic caTCR thứ nhất và thứ hai này được điều khiển bởi trình tự khởi động thứ nhất, và trong đó trình tự axit nucleic CSR này được điều khiển bởi trình tự khởi động thứ hai. Theo một số phương án, trình tự khởi động thứ nhất được liên kết hoạt động với một trong số các trình tự axit nucleic caTCR, mà được liên kết với trình tự axit nucleic caTCR còn lại bằng cầu nối axit

nucleic được chọn từ nhóm bao gồm vị trí đi vào ribosom nội bộ (IRES) và axit nucleic mã hóa peptit 2A tự phân tách (như P2A, T2A, E2A, hoặc F2A), sao cho các trình tự axit nucleic caTCR thứ nhất và thứ hai này được phiên mã dưới dạng ARN đơn được điều khiển bởi trình tự khởi động thứ nhất. Theo một số phương án, các trình tự khởi động thứ nhất và/hoặc thứ hai này là cảm ứng được. Theo một số phương án, trình tự khởi động thứ hai này là trình tự khởi động cảm ứng được. Theo một số phương án, trình tự khởi động cảm ứng được này bao gồm một hoặc nhiều yếu tố đáp ứng với sự hoạt hóa tế bào miễn dịch. Theo một số phương án, trình tự khởi động thứ hai này là trình tự khởi động thu được từ NFAT. Theo một số phương án, trình tự khởi động thu được từ NFAT này bao gồm trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 85. Theo một số phương án, vectơ này là vectơ virut (như vectơ lentivirut).

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất vectơ (như vectơ lentivirut) bao gồm a) axit nucleic mã hóa caTCR dime bao gồm chuỗi polypeptit caTCR thứ nhất và chuỗi polypeptit caTCR thứ hai theo loại bất kỳ trong số các caTCR được mô tả ở đây bao gồm i) trình tự axit nucleic caTCR thứ nhất mã hóa chuỗi polypeptit caTCR thứ nhất; và ii) trình tự axit nucleic caTCR thứ hai mã hóa chuỗi polypeptit caTCR thứ hai; và b) axit nucleic mã hóa CSR monome bao gồm chuỗi polypeptit CSR theo loại bất kỳ trong số các CSR được mô tả ở đây bao gồm trình tự axit nucleic CSR mã hóa chuỗi polypeptit CSR, trong đó các trình tự axit nucleic caTCR thứ nhất và thứ hai này và trình tự axit nucleic CSR này được điều khiển bởi trình tự khởi động đơn. Theo một số phương án, trình tự khởi động này được liên kết hoạt động với một trong số các trình tự axit nucleic, mà được liên kết với các trình tự axit nucleic còn lại bởi các cầu liên kết axit nucleic được chọn, một cách riêng rẽ, từ nhóm bao gồm vị trí đi vào ribosom nội bộ (IRES) và axit nucleic mã hóa peptit 2A tự phân tách (như P2A, T2A, E2A, hoặc F2A), sao cho các trình tự axit nucleic caTCR thứ nhất và thứ hai này và trình tự axit nucleic CSR được phiên mã dưới dạng ARN đơn được điều khiển bởi trình tự khởi động này. Theo một số phương án, trình tự khởi động này là cảm ứng được. Theo một số phương án, vectơ này là vectơ virut (như vectơ lentivirut).

Các phương pháp đưa vào và biểu hiện gen bên trong tế bào là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Trong ngữ cảnh vectơ biểu hiện, vectơ này có thể được đưa sẵn vào trong tế bào chủ, ví dụ, tế bào động vật có vú, vi khuẩn, nấm men, hoặc côn trùng bằng phương

pháp bất kỳ trong lĩnh vực kỹ thuật. Ví dụ, vectơ biểu hiện này có thể được chuyển vào trong tế bào chủ bằng phương pháp vật lý, hóa học, hoặc sinh học.

Các phương pháp vật lý để đưa polynucleotit vào trong tế bào chủ bao gồm phương pháp kết tủa canxi phosphat, chuyển nhiễm qua trung gian liposom, bắn phá hạt, vi tiêm, xung điện, và phương pháp tương tự. Các phương pháp sản xuất tế bào bao gồm các vectơ và/hoặc các axit nucleic ngoại sinh là đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật. Xem, ví dụ, Sambrook et al. (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York). Theo một số phương án, quá trình đưa polynucleotit vào trong tế bào chủ được thực hiện bằng sự chuyển nhiễm canxi phosphat.

Các phương pháp sinh học để đưa polynucleotit quan tâm vào trong tế bào chủ bao gồm việc sử dụng các vectơ ADN và ARN. Các vectơ virut, và đặc biệt là các vectơ retrovirut, đã trở thành phương pháp được sử dụng rộng rãi nhất để chèn các gen vào trong động vật có vú, ví dụ, các tế bào người. Các vectơ virut khác có thể thu được từ lentivirut, poxvirut, virut đơn thể herpes 1, adenovirut và các virut liên kết với adeno, và loại tương tự. Xem, ví dụ, patent Mỹ số 5,350,674 và 5,585,362.

Các phương pháp hóa học để đưa polynucleotit vào trong tế bào chủ bao gồm hệ thống phân tán keo, như các phức hợp đại phân tử, các nang nano, các vi cầu, các hạt, và hệ thống nền lipit bao gồm các nhũ tương dầu trong nước, mixen, các mixen hỗn hợp, và liposom. Hệ thống keo làm ví dụ để sử dụng làm phương tiện phân phối in vitro và in vivo là liposom (ví dụ, túi màng nhân tạo).

Trong trường hợp hệ thống phân phối không phải virut được sử dụng, phương tiện phân phối làm ví dụ là liposom. Việc sử dụng các chế phẩm lipit được dự tính để đưa các axit nucleic vào trong tế bào chủ (in vitro, ex vivo hoặc in vivo). Theo một khía cạnh khác, axit nucleic này có thể được liên kết với lipit. Axit nucleic liên kết với lipit có thể được bao nang trong phần bên trong chứa nước của liposom, được rải bên trong lớp kép lipit của liposom, được gắn vào liposom qua phân tử liên kết mà được liên kết với cả liposom này và oligonucleotit, bị bẫy trong liposom, được tạo phức với liposom, được phân tán trong dung dịch chứa lipit, được trộn với lipit, được kết hợp với lipit, được chứa dưới dạng huyền phù trong lipit, được chứa hoặc được tạo phức với mixen, hoặc theo cách khác được liên kết với lipit. Các hợp chất liên kết với lipit, lipit/ADN hoặc

lipit/vectơ biểu hiện không bị giới hạn ở cấu trúc cụ thể bất kỳ trong dung dịch. Ví dụ, chúng có thể có mặt ở cấu trúc lớp kép, như mixen, hoặc có cấu trúc "bị co". Chúng có thể cũng đơn giản được rải bên trong dung dịch, có thể tạo thành các khối tụ mà có kích thước hoặc hình dạng không đồng nhất. Các lipit là các chất béo mà có thể là các lipit xuất hiện tự nhiên hoặc tổng hợp. Ví dụ, các lipit bao gồm các hạt chất béo mà xuất hiện tự nhiên trong tế bào chất cũng như lớp hợp chất mà chứa các hydrocacbon béo mạch dài và các dẫn xuất của chúng, như các axit béo, rượu, amin, rượu amino, và aldehyt.

Không kể đến phương pháp được sử dụng để đưa các axit nucleic ngoại sinh vào trong tế bào chủ hoặc theo cách khác tiếp xúc tế bào với chất ức chế theo sáng chế, để xác nhận sự có mặt của trình tự ADN tái tổ hợp bên trong tế bào chủ, nhiều thử nghiệm có thể được thực hiện. Các thử nghiệm này bao gồm, ví dụ, thử nghiệm "sinh học phân tử" đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật, như phương pháp thẩm tách Southern và Northern, RT-PCR và PCR; thử nghiệm "hóa sinh", như phát hiện sự có mặt hoặc vắng mặt của peptit cụ thể, ví dụ, bằng các phương pháp miễn dịch học (ELISA và thẩm tách Western) hoặc bằng các thử nghiệm được mô tả ở đây để nhận diện các chất nằm trong phạm vi của sáng chế.

Quá trình tạo các caTCR, CSR và SSE

Theo một số phương án, theo loại bất kỳ trong số các caTCR, CSR và SSE được mô tả ở đây bao gồm gốc kháng thể, gốc kháng thể này (*ví dụ*, Fab, Fab', (Fab')2, Fv, hoặc scFv) bao gồm trình tự thu được từ kháng thể đơn dòng. Theo một số phương án, gốc kháng thể này bao gồm các miền V_H và V_L, hoặc các biến thể của nó, từ kháng thể đơn dòng này. Theo một số phương án, gốc kháng thể này còn bao gồm các miền C_H1 và C_L, hoặc các biến thể của nó, từ kháng thể đơn dòng này. Các kháng thể đơn dòng có thể được bào chế, *ví dụ,* bằng cách sử dụng phương pháp tế bào lai, như các phương pháp được mô tả bởi Kohler và Milstein, *Nature,* 256:495 (1975) và Sergeeva *et al.*, *Blood*, 117(16):4262-4272.

Trong phương pháp tế bào lai, chuột đồng, chuột nhắt, hoặc động vật chủ thích hợp khác thường được gây miễn dịch bằng tác nhân sinh miễn dịch để khiến cho lympho bào tạo ra hoặc có khả năng tạo ra các kháng thể sẽ liên kết đặc hiệu với tác nhân gây miễn dịch. Theo cách khác, các lympho bào có thể được gây miễn dịch *in vitro*. Các tác

nhân sinh miễn dịch có thể bao gồm polypeptit hoặc protein dung hợp của protein quan tâm, hoặc phức hợp bao gồm ít nhất hai phân tử, như phức hợp bao gồm peptit và protein MHC. Thông thường, các lympho bào máu ngoại vi ("PBL") được sử dụng nếu tế bào có nguồn gốc từ người được mong muốn, hoặc các tế bào lách hoặc hạch bạch huyết được sử dụng nếu các nguồn động vật có vú không phải người được sử dụng. Sau đó, các lympho bào được dung hợp với dòng tế bào bất tử bằng cách sử dụng tác nhân dung hợp thích hợp, như polyetylen glycol, để tạo ra tế bào lai. *Xem, ví dụ,* Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice (New York: Academic Press, 1986), pp. 59-103. Dòng tế bào bất tử thường là tế bào động vật có vú được biến nạp, cụ thể là tế bào u tủy có nguồn gốc từ loài gặm nhấm, bò, và người. Thông thường, dòng tế bào u tủy chuột cống hoặc chuột nhắt được sử dụng. Tế bào lai có thể được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy thích hợp tốt hơn là chứa một hoặc nhiều chất ức chế sự sinh trưởng hoặc sống sót của tế bào bất tử, không dung hợp. Ví dụ, nếu các tế bào gốc thiếu enzym hypoxanthin guanin phosphoribosyl transferaza (HGPRT hoặc HPRT), môi trường nuôi cấy cho các tế bào lai này thường sẽ bao gồm hypoxanthin, aminopterin, và thymidin ("môi trường HAT"), mà ngăn chặn sự sinh trưởng của các tế bào thiết hụt HGPRT.

Theo một số phương án, các dòng tế bào bất tử dung hợp hiệu quả, hỗ trợ sự biểu hiện kháng thể ở mức độ ổn định cao bởi các tế bào sinh kháng thể được chọn, và nhạy cảm với môi trường như môi trường HAT. Theo một số phương án, dòng tế bào bất tử là dòng u tủy của chuột, dòng này có thể thu được, ví dụ, từ Trung tâm phân phối tế bào của Viện nghiên cứu Salk (Salk Institute Cell Distribution Center), San Diego, California và Bộ sưu tập chủng nuôi cấy chuẩn Hoa Kỳ (American Type Culture Collection), Manassas, Virginia. Các dòng tế bào u tủy người và các dòng tế bào dị u tủy chuột nhắt-người cũng đã được mô tả để sản xuất các kháng thể đơn dòng của người. Kozbor, *J. Immunol.,* 133:3001 (1984); Brodeur *et al.* Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications (Marcel Dekker, Inc.: New York, 1987) pp. 51-63.

Môi trường nuôi cấy trong đó các tế bào lai được nuôi cấy sau đó có thể được thử nghiệm cho sự có mặt của các kháng thể đơn dòng hướng đến kháng polypeptit. Tính đặc hiệu liên kết của các kháng thể đơn dòng được tạo ra bởi các tế bào lai có thể được xác định bằng phương pháp kết tủa miễn dịch hoặc bằng thử nghiệm liên kết *in vitro*, như thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA) hoặc thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết

enzym (ELISA). Các kỹ thuật và thử nghiệm này là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Ái lực liên kết của kháng thể đơn dòng có thể, ví dụ, được xác định bằng phương pháp phân tích Scatchard của Munson và Pollard, *Anal. Biochem.,* 107:220 (1980).

Sau khi các tế bào lai mong muốn được xác định, các dòng vô tính này có thể được tách dòng phụ bằng các quy trình pha loãng giới hạn và được sinh trưởng bằng phương pháp chuẩn. Goding, *nêu trên.* Các môi trường nuôi cấy thích hợp cho mục đích này bao gồm, ví dụ, môi trường Eagle được cải biến của Dulbecco và môi trường RPMI-1640. Theo cách khác, các tế bào lai này có thể được sinh trưởng *in vivo* như cổ trướng ở động vật có vú.

Các kháng thể đơn dòng được tiết ra bởi các dòng phụ có thể được tách hoặc tinh chế từ môi trường nuôi cấy hoặc dịch cổ trướng bằng quy trình tinh chế globulin miễn dịch thông thường như, ví dụ, protein A-Sepharoza, sắc ký hydroxylapatit, điện di gel, thẩm tách, hoặc sắc ký ái lực.

Theo một số phương án, theo loại bất kỳ trong số các caTCR, CSR và SSE được mô tả ở đây bao gồm gốc kháng thể, gốc kháng thể này bao gồm các trình tự từ dòng vô tính được chọn từ thư viện gốc kháng thể (như thư viện thực khuẩn thể trình diện các mảnh scFv hoặc Fab). Dòng vô tính này có thể được xác định bằng cách sàng lọc các thư viện tổ hợp để có được các mảnh kháng thể có hoạt tính hoặc các hoạt tính mong muốn. Ví dụ, nhiều phương pháp khác nhau đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này để tạo các thư viện biểu hiện thực khuẩn thể và sàng lọc các thư viện này để thu được các kháng thể có các đặc điểm liên kết mong muốn. Các phương pháp này được đánh giá tổng quát, ví dụ, trong Hoogenboom *et al.*, *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien *et al.*, ed., Human Press, Totowa, N.J., 2001) và được mô tả thêm, *ví dụ*, trong McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-554; Clackson *et al.*, *Nature* 352: 624-628 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Marks và Bradbury, *Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, N.J., 2003); Sidhu *et al.*, *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee *et al.*, *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); và Lee *et al.*, *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132(2004).

Trong các phương pháp biểu hiện thực khuẩn thể cụ thể, các danh mục gen V_H và V_L được tách dòng riêng bằng phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) và được tái tổ hợp ngẫu nhiên trong các thư viện thực khuẩn thể, mà sau đó có thể được sàng lọc để thu được các thực khuẩn thể liên kết kháng nguyên như được mô tả trong Winter *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Thực khuẩn thể thường biểu hiện các mảnh kháng thể, là các mảnh Fv chuỗi đơn (scFv) hoặc là các mảnh Fab. Các thư viện từ các nguồn được gây miễn dịch tạo ra các kháng thể ái lực cao với chất kháng nguyên mà không đòi hỏi tạo ra các tế bào lai. Theo cách khác, danh mục chưa qua thí nghiệm này có thể được tách dòng (*ví dụ*, từ người) để cung cấp nguồn kháng thể duy nhất cho khoảng rộng tự kháng nguyên và kháng nguyên không tự thân mà không cần gây miễn dịch như được mô tả bởi Griffiths *et al.*, *EMBO J,* 12: 725-734 (1993). Cuối cùng, các thư viện chưa qua thí nghiệm có thể cũng được tạo ra tổng hợp bằng cách tách dòng các đoạn gen V chưa được sắp xếp lại từ các tế bào gốc, và sử dụng các mồi PCR chứa trình tự ngẫu nhiên mã hóa các vùng CDR3 biến đổi cao và hoàn thành việc tái sắp xếp *in vitro*, được mô tả bởi Hoogenboom và Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992). Các công bố sáng chế mô tả các thư viện thực khuẩn thể kháng thể của người bao gồm, ví dụ: Patent Mỹ số 5,750,373, và các Công bố Patent Mỹ số 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936, và 2009/0002360.

Gốc kháng thể này có thể được tạo ra bằng cách sử dụng sự biểu hiện thực khuẩn thể để sàng lọc các thư viện cho các kháng thể đặc hiệu với kháng nguyên đích (như phức hợp peptit/MHC lớp I/II hoặc kháng nguyên bề mặt tế bào). Thư viện này có thể là thư viện biểu hiện thực khuẩn thể scFv người có sự đa dạng của ít nhất một x 10^9 (như ít nhất khoảng giá trị bất kỳ trong số 1 x 10^9, 2,5 x 10^9, 5 x 10^9, 7,5 x 10^9, 1 x 10^{10}, 2,5 x 10^{10}, 5 x 10^{10}, 7,5 x 10^{10}, hoặc 1 x 10^{11}) mảnh kháng thể của người đơn nhất. Theo một số phương án, thư viện này là thư viện người chưa qua thí nghiệm được cấu tạo từ ADN được tách chiết từ PMBC người và lách từ người cho khỏe mạnh, bao gồm tất cả các họ phụ chuỗi nặng và chuỗi nhẹ người. Theo một số phương án, thư viện này là thư viện người chưa qua thí nghiệm được cấu tạo từ ADN được tách chiết từ các PBMC được phân lập từ bệnh nhân bị các bệnh khác nhau, như bệnh nhân bị bệnh tự miễn, bệnh nhân bị bệnh ung thư, và bệnh nhân bị bệnh nhiễm trùng. Theo một số phương án,

thư viện này là thư viện người bán tổng hợp, trong đó CDR3 chuỗi nặng được ngẫu nhiên hóa hoàn toàn, có tất cả các axit amin (trừ xystein) như nhau có khả năng có mặt tại vị trí đã cho bất kỳ (xem, *ví dụ,* Hoet, R.M. *et al.*, *Nat. Biotechnol.* 23(3):344-348, 2005). Theo một số phương án, CDR3 chuỗi nặng của thư viện người bán tổng hợp này có chiều dài từ khoảng 5 đến khoảng 24 (như khoảng giá trị bất kỳ trong số 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, hoặc 24) axit amin. Theo một số phương án, thư viện này là thư viện biểu hiện thực khuẩn thể tổng hợp đầy đủ. Theo một số phương án, thư viện này là thư viện biểu hiện thực khuẩn thể không phải người.

Các dòng vô tính thực khuẩn thể mà liên kết với kháng nguyên đích có ái lực cao có thể được chọn bằng cách liên kết lặp của thực khuẩn thể với kháng nguyên đích, mà được liên kết với chất nền rắn (như, ví dụ, các hạt để sàng lọc dung dịch hoặc các tế bào động vật có vú để sàng lọc tế bào), sau đó loại bỏ các thực khuẩn thể không liên kết và tách rửa thực khuẩn thể liên kết đặc hiệu. Trong ví dụ về sàng lọc dung dịch, kháng nguyên đích có thể được biotinyl hóa để cố định vào chất nền rắn. Kháng nguyên đích được biotinyl hóa này được trộn với thư viện thực khuẩn thể và chất nền rắn, như Dynabeads M-280 được liên hợp với streptavidin, và sau đó các phức hợp kháng nguyên đích-thực khuẩn thể-hạt được phân lập. Các dòng vô tính thực khuẩn thể đã liên kết sau đó được tách rửa và được sử dụng để nhiễm tế bào chủ thích hợp, như *E. coli* XL1-xanh dương, để biểu hiện và tinh chế. Trong ví dụ về sàng lọc tế bào, các tế bào T2 (dòng tế bào nguyên bào lympho HLA-A*02:01$^+$ thiếu TAP) được tải với AFP peptit được trộn với thư viện thực khuẩn thể, sau đó các tế bào được thu gom và các dòng vô tính đã liên kết được tách rửa và được sử dụng để nhiễm tế bào chủ thích hợp để biểu hiện và tinh chế. Việc sàng lọc này có thể được thực hiện nhiều vòng (như khoảng giá trị bất kỳ trong số 2, 3, 4, 5, 6 hoặc nhiều hơn) với sàng lọc dung dịch, sàng lọc tế bào, hoặc kết hợp cả hai, để làm giàu cho các dòng vô tính thực khuẩn thể liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích. Các dòng vô tính được làm giàu có thể được thử nghiệm cho sự liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật, bao gồm ví dụ ELISA và FACS.

Các gốc kháng thể của người và được nhân hóa

Các gốc kháng thể caTCR, CSR và SSE này có thể là của người hoặc được nhân hóa. Dạng được nhân hóa của các gốc kháng thể không phải của người (*ví dụ*, chuột) là

globulin miễn dịch khảm, chuỗi globulin miễn dịch hoặc các mảnh của nó (như Fv, Fab, Fab', $F(ab')_2$, scFv, hoặc các trình tự ngắn liên kết kháng nguyên của kháng thể) mà thường chứa trình tự tối thiểu có nguồn gốc từ globulin miễn dịch không phải của người. Các gốc kháng thể được nhân hóa bao gồm globulin miễn dịch của người, chuỗi globulin miễn dịch, hoặc mảnh của chúng (kháng thể nhận) trong đó các gốc từ CDR của kháng thể nhận được thay thế bởi các gốc từ CDR của loài không phải là người (kháng thể cho) như chuột nhắt, chuột cống, hoặc thỏ có tính đặc hiệu, ái lực, và hiệu lực mong muốn. Trong một số trường hợp, các gốc của khung Fv của globulin miễn dịch của người được thay thế bằng các gốc không phải là người tương ứng. Các gốc kháng thể được nhân hóa cũng có thể bao gồm các gốc không tìm thấy trong gốc kháng thể nhận cũng như trong trình tự CDR hoặc khung ngoại lai. Nói chung, gốc kháng thể được nhân hóa có thể bao gồm gần như toàn bộ của ít nhất một, và thường là hai miền biến đổi, trong đó tất cả hoặc gần như tất cả các vùng CDR tương ứng với các vùng này ở globulin miễn dịch không phải của người và toàn bộ hoặc gần như toàn bộ các vùng FR là vùng FR của trình tự liên ứng của globulin miễn dịch của người. *Xem, ví dụ,* Jones *et al.*, *Nature,* 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al., Nature,* 332: 323-329 (1988); Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.,* 2:593-596 (1992).

Nhìn chung, các gốc kháng thể được nhân hóa có một hoặc nhiều gốc axit amin được đưa vào trong nó từ nguồn không phải là người. Các gốc axit amin không phải của người này thường được đề cập đến là các gốc "du nhập", mà thường được lấy từ miền biến đổi "du nhập". Theo một số phương án, sự nhân hóa có thể được thực hiện về cơ bản theo phương pháp của Winter và cộng sự (Jones *et al.*, *Nature,* 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature,* 332: 323-327 (1988); Verhoeyen *et al.*, *Science,* 239: 1534-1536 (1988)), bằng cách thế các CDR hoặc các trình tự CDR loài gặm nhấm cho các trình tự tương ứng của gốc kháng thể của người. Theo đó, các gốc kháng thể "được nhân hóa" là các gốc kháng thể (Patent Mỹ số 4,816,567), trong đó về cơ bản có ít nhất một trình tự miền biến đổi của người nguyên vẹn được thế bởi trình tự tương ứng từ loài không phải là người. Trong thực tế, các gốc kháng thể được nhân hóa thường là các gốc kháng thể của người, trong đó một số gốc CDR và có thể là một số gốc FR được thế bằng các gốc từ các vị trí tương tự trong kháng thể của động vật gặm nhấm.

Phương pháp thay thế cho sự nhân hóa là có thể tạo ra các gốc kháng thể của người. Ví dụ, hiện nay có thể tạo ra động vật chuyển gen *(ví dụ,* chuột nhắt) mà có khả năng, khi gây miễn dịch, sản xuất danh mục đầy đủ các kháng thể của người khi vắng mặt quá trình sản xuất globulin miễn dịch nội sinh. Ví dụ, đã được mô tả là sự loại bỏ đồng hợp tử của gen vùng nối chuỗi nặng (JH) kháng thể ở chuột nhắt khảm và đột biến dòng mầm tạo ra sự ức chế hoàn toàn quá trình sản xuất kháng thể nội sinh. Sự chuyển dãy gen globulin miễn dịch dòng mầm người vào chuột nhắt đột biến dòng mầm này sẽ tạo ra quá trình sản xuất kháng thể của người dựa vào thử thách kháng nguyên. Xem, *ví dụ,* Jakobovits *et al.*, *PNAS USA,* 90:2551 (1993); Jakobovits *et al., Nature,* 362:255-258 (1993); Bruggemann *et al.*, *Year in Immunol.,* 7:33 (1993); Patent Mỹ số 5,545,806, 5,569,825, 5,591,669; 5,545,807; và WO 97/17852. Theo cách khác, các kháng thể của người có thể được tạo ra bằng cách đưa các locus globulin miễn dịch của người vào động vật chuyển gen, *ví dụ,* chuột nhắt trong đó các gen globulin miễn dịch nội sinh này đã bị bất hoạt một phần hoặc hoàn toàn. Dựa vào thử thách này, quá trình sản xuất kháng thể được quan sát là gần giống như được nhìn thấy ở người về mọi mặt, bao gồm sự tái sắp xếp gen, sự lắp ráp, và danh mục kháng thể. Phương pháp này được mô tả, ví dụ, trong Patent Mỹ số 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; và 5,661,016, và Marks *et al., Bio/Technology,* 10: 779-783 (1992); Lonberg *et al., Nature,* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature,* 368: 812-813 (1994); Fishwild *et al.*, *Nature Biotechnology,* 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology,* 14: 826 (1996); Lonberg và Huszar, *Intern. Rev. Immunol.,* 13: 65-93 (1995).

Các kháng thể của người có thể cũng được tạo ra bằng các tế bào B được hoạt hóa *in vitro* (xem Patent Mỹ số 5,567,610 và 5,229,275) hoặc bằng cách sử dụng các kỹ thuật khác nhau đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật, bao gồm thư viện biểu hiện thực khuẩn thể. Hoogenboom và Winter, *J. Mol. Biol.,* 227:381 (1991); Marks *et al., J. Mol. Biol.,* 222:581 (1991). Các kỹ thuật của Cole *et al.* và Boerner *et al.* cũng sẵn có để bào chế các kháng thể đơn dòng của người. Cole *et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy,* Alan R. Liss, p. 77 (1985) và Boerner *et al., J. Immunol.,* 147(1): 86-95 (1991).

Các biến thể bổ sung

Theo một số phương án, các biến thể trình tự axit amin của các môđun liên kết kháng nguyên đã đưa ra ở đây được đề xuất. Ví dụ, có thể mong muốn cải thiện ái lực

liên kết và/hoặc các tính chất sinh học khác của môđun liên kết kháng nguyên. Các biến thể trình tự axit amin của môđun liên kết kháng nguyên có thể được tạo ra bằng cách đưa các biến đổi thích hợp vào trình tự nucleotit mã hóa môđun liên kết kháng nguyên này, hoặc bằng phương pháp tổng hợp peptit. Các cải biến này bao gồm, ví dụ, các đột biến mất đoạn từ, và/hoặc các đột biến chèn vào và/hoặc các đột biến thế của các gốc nằm trong các trình tự axit amin của môđun liên kết kháng nguyên. Tổ hợp bất kỳ của đột biến mất đoạn, đột biến chèn và đột biến thế có thể được tạo ra để đạt được cấu trúc cuối cùng, với điều kiện là cấu trúc cuối cùng này có các đặc điểm mong muốn, ví dụ, khả năng liên kết kháng nguyên.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất các biến thể môđun liên kết kháng nguyên có một hoặc nhiều đột biến thế axit amin. Các vị trí cần quan tâm để gây đột biến thế bao gồm các HVR và các FR của các gốc kháng thể. Các sự thế axit amin có thể được đưa vào trong môđun liên kết kháng nguyên quan tâm và các sản phẩm được sàng lọc cho hoạt tính mong muốn, *ví dụ*, sự liên kết kháng nguyên duy trì/cải thiện hoặc khả năng gây miễn dịch được giảm.

Các đột biến thế bảo toàn được thể hiện trong bảng 4 dưới đây.

Bảng 4: Các đột biến thế bảo tồn

Gốc ban đầu	Các đột biến thế làm ví dụ	Các đột biến thế được ưu tiên
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Xys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleuxin	Leu
Leu (L)	Norleuxin; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr

Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleuxin	Leu

Các axit amin có thể được chia nhóm thành các loại khác nhau theo các đặc điểm chuỗi bên chung:

a. tính kỵ nước: Norleuxin, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

b. tính ưa nước trung tính: Xys, Ser, Thr, Asn, Gln;

c. tính axit: Asp, Glu;

d. tính bazơ: His, Lys, Arg;

e. các gốc ảnh hưởng đến hướng chuỗi: Gly, Pro;

f. tính thơm: Trp, Tyr, Phe.

Các đột biến thế không bảo tồn sẽ dẫn đến việc đổi thành viên của một trong số các nhóm này sang một nhóm khác.

Một biến thể thế điển hình là gốc kháng thể thành thục về mặt ái lực, mà có thể được tạo ra một cách thuận tiện, *ví dụ*, bằng cách sử dụng các kỹ thuật trưởng thành ái lực dựa vào sự biểu hiện thực khuẩn thể. Nói ngắn gọn, một hoặc nhiều gốc CDR được gây đột biến và các gốc kháng thể biến thể được biểu hiện trên thực khuẩn thể và được sàng lọc để có hoạt tính sinh học cụ thể (*ví dụ*, ái lực liên kết). Các thay đổi (*ví dụ*, các đột biến thế) có thể được tạo ra ở các HVR, *ví dụ*, để cải thiện ái lực gốc kháng thể. Các thay đổi này có thể được tạo ra trong "các điểm nóng" HVR, *nghĩa là,* các gốc được mã hóa bởi các codon trải qua đột biến ở tần suất cao trong quá trình thành thục sinh dưỡng (*xem, ví dụ*, Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)), và/hoặc các gốc quyết định tính đặc hiệu (SDR), với V_H hoặc V_L biến thể tạo thành được thử nghiệm cho ái lực liên kết. Sự thành thục ái lực bằng cách cấu trúc và chọn lọc lại từ các thư viện thứ cấp đã được mô tả, *ví dụ*, trong Hoogenboom et al. trong *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001).)

Theo một số phương án về thành thục ái lực, tính đa dạng được đưa vào các gen biến đổi được chọn để làm thành thục bằng phương pháp bất kỳ trong số nhiều phương pháp khác nhau *(ví dụ,* PCR dễ bị lỗi, trộn rối chuỗi, hoặc quá trình gây đột biến định hướng oligonucleotit). Sau đó, thư viện thứ cấp được tạo ra. Sau đó, thư viện này được sàng lọc để nhận diện các biến thể gốc kháng thể bất kỳ có ái lực mong muốn. Một phương pháp khác để đưa vào tính đa dạng bao gồm các phương pháp định hướng bằng HVR, mà trong đó một số gốc HVR *(ví dụ,* 4-6 gốc một lần) được ngẫu nhiên hóa. Các gốc HVR liên kết với sự liên kết kháng nguyên có thể được xác định cụ thể, *ví dụ*, bằng cách sử dụng kỹ thuật gây đột biến quét alanin hoặc tạo mô hình. Cụ thể là, CDR-H3 và CDR-L3 thường được hướng đích.

Theo một số phương án, đột biến thế, đột biến chèn, hoặc đột biến mất đoạn có thể xảy ra trong một hoặc nhiều HVR miễn là các thay đổi này gần như không làm giảm khả năng liên kết của gốc kháng thể này với kháng nguyên. Ví dụ, các thay đổi bảo tồn (*ví dụ*, các đột biến thế bảo tồn như được đưa ra ở đây) mà gần như không làm giảm ái lực liên kết có thể được tạo ra trong các HVR. Các thay đổi này có thể nằm ngoài "các điểm nóng" HVR hoặc các SDR. Theo các phương án nhất định về các trình tự V_H và V_L biến đổi được đề xuất trên đây, mỗi HVR không bị thay đổi, hoặc chứa không nhiều hơn một, hai hoặc ba đột biến thế axit amin.

Phương pháp hữu ích để xác định các gốc hoặc các vùng của môđun liên kết kháng nguyên mà có thể được gắn đích để gây đột biến được gọi là "kỹ thuật gây đột biến quét alanin" như được mô tả bởi Cunningham và Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085. Theo phương pháp này, gốc hoặc nhóm gồm các gốc đích *(ví dụ*, các gốc tích điện như arg, asp, his, lys, và glu) được nhận diện và được thay thế bằng một axit amin trung tính hoặc axit amin tích điện âm *(ví dụ*, alanin hoặc polyalanin) để xác định xem liệu sự tương tác của môđun liên kết kháng nguyên với kháng nguyên có bị ảnh hưởng hay không. Các đột biến thế khác có thể được đưa vào ở các vị trí axit amin thể hiện tính nhạy cảm chức năng với các đột biến thế ban đầu. Theo cách khác, hoặc ngoài ra, cấu trúc tinh thể của phức hợp kháng nguyên-môđun liên kết kháng nguyên có thể được xác định để nhận diện các điểm tiếp xúc giữa môđun liên kết kháng nguyên và kháng nguyên. Các gốc tiếp xúc và các gốc lân cận này có thể được gắn đích hoặc bị loại bỏ dưới dạng ứng viên

cho đột biến thế. Các biến thể có thể được sàng lọc để xác định xem liệu chúng có chứa các đặc điểm mong muốn hay không.

Các đột biến chèn trình tự axit amin bao gồm các dạng dung hợp đầu cùng amino và/hoặc đầu cùng carboxyl có độ dài nằm trong khoảng từ một gốc đến các polypeptit chứa một trăm gốc trở lên, cũng như các đột biến chèn nội trình tự của một gốc axit amin duy nhất hoặc nhiều gốc axit amin. Các ví dụ về các đột biến chèn đầu cùng bao gồm mođun liên kết kháng nguyên có gốc methionyl đầu cùng N. Các biến thể chèn khác của môđun liên kết kháng nguyên này bao gồm dạng dung hợp với đầu cùng N hoặc C của môđun liên kết kháng nguyên với enzym (*ví dụ*, đối với ADEPT) hoặc polypeptit mà làm tăng thời gian bán thải trong huyết thanh của môđun liên kết kháng nguyên này.

Dẫn xuất

Theo một số phương án, caTCR theo loại bất kỳ trong số các caTCR được mô tả ở đây và/hoặc CSR theo loại bất kỳ trong số các CSR được mô tả ở đây và/hoặc SSE theo loại bất kỳ trong số các SSE được mô tả ở đây có thể còn được cải biến để chứa các gốc không phải protein bổ sung mà đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật và có sẵn. Các gốc thích hợp để tạo dẫn xuất caTCR và/hoặc CSR và/hoặc SSE bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các polyme tan được trong nước. Ví dụ không giới hạn về các polyme tan trong nước bao gồm, nhưng không giới hạn ở, polyetylen glycol (PEG), copolyme của etylen glycol/propylen glycol, carboxymetylxenluloza, dextran, rượu polyvinylic, polyvinyl pyrolidon, poly-1,3-dioxolan, poly-1,3,6-trioxan, copolyme etylen/anhydrit maleic, các axit polyamin (homopolyme hoặc copolyme ngẫu nhiên), và dextran hoặc poly(n-vinyl pyrolidon)polyetylen glycol, polypropylen glycol homopolyme, co-polyme polypropylen oxit/etylen oxit, các polyol được polyoxyetyl hóa (*ví dụ*, glyxerol), rượu polyvinylic, và các hỗn hợp của chúng. Polyetylen glycol propionaldehyt có thể có nhiều ưu điểm trong việc sản xuất do độ ổn định của nó trong nước. Polyme này có thể có khối lượng phân tử bất kỳ, và có thể phân nhánh hoặc không phân nhánh. Số lượng polyme được gắn vào caTCR và/hoặc CSR và/hoặc SSE có thể thay đổi, và nếu nhiều hơn một polyme được gắn vào, thì chúng có thể là cùng một phân tử hoặc các phân tử khác nhau. Nhìn chung, số lượng và/hoặc loại polyme được sử dụng để tạo dẫn xuất có thể được xác định dựa trên các cân nhắc bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các tính

chất hoặc chức năng cụ thể của caTCR và/hoặc CSR và/hoặc SSE cần được cải thiện, không phụ thuộc vào việc dẫn xuất caTCR và/hoặc CSR và/hoặc SSE này có được sử dụng trong liệu pháp trong các điều kiện xác định hay không, v.v.

Theo một số phương án, các thể liên hợp của caTCR và/hoặc CSR và/hoặc SSE và các gốc không phải protein mà có thể được gia nhiệt chọn lọc bằng cách tiếp xúc với bức xạ được đề xuất. Theo một số phương án, gốc không phải protein này là ống nano cacbon (Kam *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 11600-11605 (2005)). Bức xạ có thể có bước sóng bất kỳ, và bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bước sóng mà không gây hại cho các tế bào thông thường, nhưng gia nhiệt gốc không phải protein này đến một nhiệt độ mà tại đó các tế bào gần với caTCR và/hoặc CSR và/hoặc SSE-gốc không phải protein bị tiêu diệt.

Bào chế các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR

Sáng chế theo một khía cạnh đề xuất các tế bào miễn dịch (như lympho bào, ví dụ các tế bào T) biểu hiện caTCR và CSR theo phương án bất kỳ trong số các phương án được mô tả ở đây. Các phương pháp bào chế các tế bào miễn dịch làm ví dụ (như các tế bào T) biểu hiện caTCR và CSR (các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR, như các tế bào T caTCR cộng CSR) được đề xuất ở đây.

Theo một số phương án, tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR (như các tế bào T caTCR cộng CSR) có thể được tạo ra bằng cách đưa một hoặc nhiều axit nucleic (bao gồm ví dụ vectơ lentivirut) mã hóa caTCR (như loại bất kỳ trong số các caTCR được mô tả ở đây) mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích (như kháng nguyên liên kết với bệnh) và CSR (như loại bất kỳ trong số các CSR được mô tả ở đây) mà liên kết đặc hiệu với phối tử đích vào trong tế bào miễn dịch. Việc đưa một hoặc nhiều axit nucleic vào trong tế bào miễn dịch có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật, như các kỹ thuật được mô tả ở đây cho các axit nucleic. Theo một số phương án, các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR (như các tế bào T caTCR cộng CSR) của sáng chế là có khả năng lặp lại *in vivo*, tạo ra sự bền vững lâu dài mà có thể dẫn đến sự kiểm soát lâu dài bệnh liên quan đến sự biểu hiện của kháng nguyên đích (như bệnh ung thư hoặc nhiễm virut).

Theo một số phương án, sáng chế mô tả việc sử dụng tế bào T được cải biến về mặt di truyền biểu hiện caTCR mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích theo loại bất kỳ trong số các caTCR được mô tả ở đây và CSR mà liên kết đặc hiệu với phối tử đích theo loại bất kỳ trong số các CSR được mô tả ở đây để điều trị cho bệnh nhân bị hoặc có nguy cơ phát triển bệnh và/hoặc rối loạn liên quan đến sự biểu hiện của kháng nguyên đích (còn được chỉ ra ở đây là bệnh hoặc rối loạn "dương tính kháng nguyên đích" hoặc "dương tính TA"), bao gồm, ví dụ, bệnh ung thư hoặc nhiễm virut, bằng cách sử dụng phương pháp truyền lympho bào. Theo một số phương án, phương pháp truyền lympho bào tự thân được sử dụng trong điều trị. Các PBMC tự thân được thu gom từ bệnh nhân cần điều trị và các tế bào T được hoạt hóa và được nhân rộng bằng cách sử dụng các phương pháp được mô tả ở đây và đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật và sau đó được truyền trở lại vào bệnh nhân.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất tế bào T biểu hiện caTCR mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích theo loại bất kỳ trong số các caTCR được mô tả ở đây và CSR mà liên kết đặc hiệu với phối tử đích theo loại bất kỳ trong số các CSR được mô tả ở đây (còn được chỉ ra ở đây là "tế bào T caTCR cộng CSR"). Các tế bào T caTCR cộng CSR theo sáng chế có thể trải qua sự nhân rộng tế bào T *in vivo* tăng cường và có thể tạo thành các tế bào nhớ đặc hiệu kháng nguyên đích mà vẫn có mức cao số lượng đã nhân rộng theo thời gian ở máu và tủy xương. Theo một số phương án, các tế bào T caTCR cộng CSR theo sáng chế được truyền vào trong bệnh nhân có thể loại bỏ các tế bào trình diện kháng nguyên đích, như tế bào ung thư hoặc bị nhiễm virut trình diện kháng nguyên đích, *in vivo* ở bệnh nhân có bệnh liên quan đến kháng nguyên đích. Theo một số phương án, các tế bào T caTCR cộng CSR theo sáng chế được truyền vào trong bệnh nhân có thể loại bỏ các tế bào trình diện kháng nguyên đích, như tế bào ung thư hoặc bị nhiễm virut trình diện kháng nguyên đích, *in vivo* ở bệnh nhân có bệnh liên kết với kháng nguyên đích mà kháng với ít nhất một phương pháp điều trị thông thường.

Trước khi nhân rộng và cải biến di truyền các tế bào T, nguồn các tế bào T thu được từ đối tượng. Các tế bào T có thể thu được từ nhiều nguồn, bao gồm các tế bào đơn nhân máu ngoại vi, tủy xương, mô hạch bạch huyết, máu cuống rốn, mô tuyến ức, mô từ vị trí bị nhiễm trùng, cổ trướng, tràn dịch màng phổi, mô lách, và khối u. Theo một số phương án của sáng chế, nhiều dòng tế bào T có sẵn trong lĩnh vực kỹ thuật có

thể được sử dụng. Theo một số phương án của sáng chế, các tế bào T có thể thu được từ đơn vị máu được thu từ đối tượng bằng cách sử dụng nhiều kỹ thuật đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật, như kỹ thuật phân tách FICOLL™. Theo một số phương án, các tế bào từ máu tuần hoàn của đối tượng được thu bằng cách phân tách. Sản phẩm phân tách này thường chứa các tế bào lympho, bao gồm các tế bào T, các bạch cầu đơn nhân, bạch cầu hạt, tế bào B, tế bào máu trắng có nhân khác, tế bào hồng cầu, và tiểu cầu. Theo một số phương án, các tế bào được thu gom bằng cách phân tách có thể được rửa để loại bỏ phân đoạn huyết tương và đặt các tế bào trong đệm hoặc môi trường thích hợp cho bước xử lý tiếp theo. Theo một số phương án, các tế bào này được rửa bằng dung dịch muối đệm phosphat (PBS). Theo một số phương án, dung dịch rửa này thiếu canxi và có thể thiếu magie hoặc có thể thiếu nhiều nếu không phải là tất cả các cation hóa trị hai. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật sẽ dễ dàng đánh giá bước rửa có thể được thực hiện bằng các phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật, như bằng cách sử dụng phương pháp ly tâm "thông lượng cao" bán tự động (ví dụ, các bộ xử lý tế bào Cobe 2991, Baxter CytoMate, hoặc Haemonetics Cell Saver 5) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sau khi rửa, các tế bào này có thể được tái huyền phù trong nhiều đệm tương thích sinh học, như PBS không chứa Ca^{2+}, không chứa Mg^{2+}, PlasmaLyte A, hoặc các dung dịch muối khác có hoặc không có đệm. Theo cách khác, các thành phần không mong muốn của mẫu phân tách có thể được loại bỏ và các tế bào được tái huyền phù trực tiếp trong môi trường nuôi cấy.

Theo một số phương án, các tế bào T được phân lập từ các lympho bào máu ngoại vi bằng cách dung giải các tế bào hồng cầu và loại bỏ bạch cầu đơn bào, ví dụ, bằng cách ly tâm thông qua gradien PERCOLL™ hoặc bằng cách rửa gạn ly tâm luồng ngược. Quần thể phụ đặc trưng của các tế bào T, như các tế bào T $CD3^+$, $CD28^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD45RA^+$, và $CD45RO^+$, có thể còn được phân lập bằng các kỹ thuật chọn lọc dương hoặc âm. Ví dụ, theo một số phương án, các tế bào T được phân lập bằng cách ủ với các hạt liên hợp với hạt liên hợp kháng CD3/kháng CD28 (*tức là*, 3×28), như DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T, trong khoảng thời gian đủ để chọn lọc dương các tế bào T mong muốn. Theo một số phương án, khoảng thời gian này là khoảng 30 phút. Theo một số phương án, khoảng thời gian này nằm trong khoảng từ 30 phút đến

36 giờ hoặc lâu hơn (bao gồm tất cả các khoảng nằm giữa các giá trị này). Theo một số phương án, khoảng thời gian này ít nhất là một, 2, 3, 4, 5, hoặc 6 giờ. Theo một số phương án, khoảng thời gian này là từ 10 đến 24 giờ. Theo một số phương án, thời gian ủ là 24 giờ. Để phân lập các tế bào T từ bệnh nhân bị bệnh máu trắng, việc sử dụng các thời gian ủ lâu hơn, như 24 giờ, có thể làm tăng hiệu suất tế bào. Thời gian ủ dài hơn có thể được sử dụng để phân lập các tế bào T trong tình huống bất kỳ trong đó có ít tế bào T khi so sánh với các loại tế bào khác, như trong phân lập các lympho bào xâm nhập khối u (TIL) từ mô khối u hoặc từ các cá nhân bị tổn thương miễn dịch. Hơn nữa, việc sử dụng thời gian ủ lâu hơn có thể làm tăng hiệu quả bắt giữ của các tế bào $CD8^+$ T. Do đó, bằng cách làm ngắn hoặc kéo dài đơn giản thời gian các tế bào T được phép liên kết với các hạt CD3/CD28 và/hoặc bằng cách làm tăng hoặc giảm tỷ lệ của các hạt so với các tế bào T, các quần thể con của các tế bào T có thể được ưu tiên chọn lọc cho hoặc chống lại tại thời điểm bắt đầu nuôi cấy hoặc tại các thời điểm khác trong quá trình này. Do đó, bằng cách làm tăng hoặc giảm tỷ lệ của kháng thể kháng CD3 và/hoặc kháng CD28 trên các hạt hoặc các bề mặt khác, các quần thể con của các tế bào T có thể được ưu tiên chọn lọc cho hoặc chống lại tại thời điểm bắt đầu nuôi cấy hoặc tại thời điểm mong muốn khác. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật sẽ nhận biết là nhiều vòng chọn lọc có thể cũng được sử dụng trong ngữ cảnh của sáng chế. Theo một số phương án, có thể mong muốn thực hiện quy trình chọn lọc và sử dụng các tế bào "không được chọn lọc" trong quá trình hoạt hóa và nhân rộng. Các tế bào "không được chọn lọc" có thể cũng được cho tiến hành các vòng chọn lọc khác.

Việc làm giàu quần thể tế bào T bằng chọn lọc âm có thể được thực hiện với sự kết hợp các kháng thể được hướng đến các chỉ thị bề mặt là duy nhất cho các tế bào được chọn lọc âm tính. Một phương pháp là phân loại và/hoặc chọn lọc tế bào qua bám dính miễn dịch từ âm hoặc đo tế bào theo dòng mà sử dụng hỗn hợp các kháng thể đơn dòng được hướng đến các chỉ thị bề mặt tế bào có mặt trên các tế bào được chọn lọc âm tính này. Ví dụ, để làm giàu cho các tế bào CD4+ bằng sự chọn lọc âm, hỗn hợp kháng thể đơn dòng thường bao gồm các kháng thể đối với CD 14, CD20, CD11b, CD 16, HLA-DR, và CD8. Theo một số phương án, có thể mong muốn làm giàu cho hoặc chọn lọc dương cho các tế bào T điều hòa mà thường biểu hiện $CD4^+$, $CD25^+$, CD62Lhi, $GITR^+$, và $FoxP3^+$. Theo cách khác, theo một số phương án, các tế bào điều hòa T được

loại bỏ bằng các hạt liên hợp kháng CD25 hoặc các phương pháp chọn lọc tương tự khác.

Đối với sự phân lập quần thể tế bào mong muốn bằng phương pháp chọn lọc dương hoặc âm, nồng độ của tế bào và bề mặt (*ví dụ*, các hạt như hạt nhỏ) có thể được thay đổi. Theo một số phương án, có thể mong muốn làm giảm đáng kể thể tích trong đó các hạt và các tế bào được trộn với nhau (*tức là*, làm tăng nồng độ tế bào), để đảm bảo tế bào và hạt được tiếp xúc tối đa. Ví dụ, theo một số phương án, nồng độ là khoảng 2 tỷ tế bào/ml được sử dụng. Theo một số phương án, nồng độ là khoảng 1 tỷ tế bào/ml được sử dụng. Theo một số phương án, lớn hơn khoảng 100 triệu tế bào/ml được sử dụng. Theo một số phương án, nồng độ tế bào là khoảng giá trị bất kỳ trong số 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, hoặc 50 triệu tế bào/ml được sử dụng. Theo một số phương án, nồng độ tế bào là khoảng giá trị bất kỳ trong số 75, 80, 85, 90, 95, hoặc 100 triệu tế bào/ml được sử dụng. Theo một số phương án, nồng độ khoảng 125 hoặc khoảng 150 triệu tế bào/ml được sử dụng. Sử dụng nồng độ cao hơn có thể làm tăng hiệu suất tế bào, tăng sự hoạt hóa tế bào, và sự nhân rộng tế bào. Ngoài ra, sử dụng nồng độ tế bào cao hơn cho phép bắt giữ tế bào hiệu quả hơn mà có thể biểu hiện yếu các kháng nguyên đích quan tâm, như các tế bào T âm tính CD28, hoặc từ mẫu mà có nhiều tế bào khối u có mặt (*tức là*, máu của bệnh nhân mắc bệnh bạch cầu, mô khối u, v.v.). Các quần thể tế bào này có thể có giá trị điều trị và sẽ mong muốn thu được. Ví dụ, sử dụng nồng độ tế bào cao cho phép chọn lọc hiệu quả các tế bào $CD8^+$ T mà thường có sự biểu hiện CD28 yếu.

Theo một số phương án của sáng chế, các tế bào T thu được từ bệnh nhân trực tiếp sau điều trị. Liên quan đến vấn đề này, quan sát được là sau khi điều trị ung thư nhất định, cụ thể khi điều trị bằng thuốc mà làm tổn thương hệ miễn dịch, một thời gian ngắn sau khi điều trị trong khoảng thời gian mà bệnh nhân thường đang hồi phục từ điều trị, chất lượng của các tế bào T thu được có thể là tối ưu hoặc được cải thiện về khả năng nhân rộng *ex vivo*. Như vậy, sau khi thao tác *ex vivo* sử dụng các phương pháp được mô tả ở đây, các tế bào này có thể là ở trạng thái ưu tiên cho sự ghép tăng cường và nhân rộng *in vivo*. Do đó, được dự tính trong ngữ cảnh của sáng chế là thu gom các tế bào máu, bao gồm các tế bào T, tế bào đuôi gai, hoặc các tế bào khác của dòng tạo máu, trong giai đoạn phục hồi này. Ngoài ra, theo một số phương án, sự di động (ví dụ, sự di động bằng GM-CSF) và các phác đồ tạo điều kiện có thể được sử dụng để tạo ra các

điều kiện ở đối tượng trong đó sự phục hồi quần thể, sự tái tuần hoàn, sự tái sinh, và/hoặc sự mở rộng của các loại tế bào cụ thể thu được, đặc biệt trong khung thời gian đã định sau điều trị. Các loại tế bào minh họa bao gồm các tế bào T, tế bào B, các tế bào đuôi gai, và các tế bào khác của hệ miễn dịch.

Dù trước hoặc sau quá trình cải biến gen của các tế bào T để biểu hiện caTCR, CSR và tùy ý SSE mong muốn, các tế bào T này có thể được hoạt hóa và mở rộng thường bằng cách sử dụng các phương pháp được mô tả, ví dụ, trong Patent Mỹ số 6,352,694; 6,534,055; 6,905,680; 6,692,964; 5,858,358; 6,887,466; 6,905,681; 7,144,575; 7,067,318; 7,172,869; 7,232,566; 7,175,843; 5,883,223; 6,905,874; 6,797,514; 6,867,041; và Công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 20060121005.

Thông thường, các tế bào T theo sáng chế được nhân rộng bằng cách tiếp xúc với bề mặt mà nó gắn vào chất mà kích thích tín hiệu liên kết với phức hợp CD3/TCR và phối tử mà kích thích phân tử đồng kích thích trên bề mặt của các tế bào T. Cụ thể, các quần thể tế bào T có thể được kích thích, như bằng cách tiếp xúc với kháng thể kháng CD3, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, hoặc kháng thể kháng CD2 được cố định trên bề mặt, hoặc bằng sự tiếp xúc với chất hoạt hóa kinaza protein C (*ví dụ*, bryostatin) trong sự liên hợp với thể mang ion canxi. Đối với sự đồng kích thích của phân tử kèm theo trên bề mặt của các tế bào T, phối tử mà liên kết với phân tử kèm theo này được sử dụng. Ví dụ, quần thể tế bào T có thể được cho tiếp xúc với kháng thể kháng CD3 và kháng thể kháng CD28, trong các điều kiện thích hợp để kích thích sự tăng sinh của các tế bào T. Để kích thích sự tăng sinh của các tế bào $CD4^+$ T hoặc các tế bào $CD8^+$ T, kháng thể kháng CD3 và kháng thể kháng CD28. Ví dụ về kháng thể kháng CD28 bao gồm 9.3, B-T3, XR-CD28 (Diaclone, Besançon, France) có thể được sử dụng như các phương pháp khác thường đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật (Berg *et al.*, *Transplant Proc.* 30(8):3975-3977, 1998; Haanen *et al.*, *J. Exp. Med.* 190(9):13191328, 1999; Garland *et al.*, *J. Immunol. Meth.* 227(1-2):53-63, 1999).

Sự cải biến gen

Theo một số phương án, các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR (như các tế bào T caTCR cộng CSR) theo sáng chế được tạo ra bằng cách tải nạp các tế bào miễn dịch (như các tế bào T được bào chế bằng các phương pháp được mô tả ở đây) với một hoặc

nhiều vectơ virut mã hóa caTCR như được mô tả ở đây và CSR như được mô tả ở đây. Hệ thống phân phối vectơ virut bao gồm virut ADN và ARN, mà có các bộ gen thể bổ sung hoặc được hợp nhất sau khi phân phối đến tế bào miễn dịch. Đối với tổng quan về các quy trình liệu pháp gen, xem Anderson, Science 256:808-813 (1992); Nabel & Feigner, TIBTECH 11 :211 - 217 (1993); Mitani & Caskey, TIBTECH 11 :162-166 (1993); Dillon, TIBTECH 11 : 167-175 (1993); Miller, Nature 357:455-460 (1992); Van Brunt, Biotechnology 6(10): 1149-1 154 (1988); Vigne, Restorative Neurology and Neuroscience 8:35-36 (1995); Kremer & Perricaudet, British Medical Bulletin 51(l):31-44 (1995); và Yu et al., Gene Therapy 1 :13-26 (1994). Theo một số phương án, tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR này bao gồm một hoặc nhiều vectơ được hợp nhất vào trong bộ gen tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR. Theo một số phương án, một hoặc nhiều vectơ virut này là các vectơ lentivirut. Theo một số phương án, tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR này là tế bào T caTCR cộng CSR bao gồm các vectơ lentivirut được hợp nhất vào trong bộ gen của nó.

Theo một số phương án, tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR này là tế bào T được cải biến để phong bế hoặc làm giảm sự biểu hiện của một hoặc cả hai chuỗi TCR nội sinh của nó. Ví dụ, theo một số phương án, tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR này là tế bào αβ T được cải biến để phong bế hoặc làm giảm sự biểu hiện của các chuỗi TCR α và/hoặc β, hoặc tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR này là tế bào γδ T được cải biến để phong bế hoặc làm giảm sự biểu hiện của các chuỗi TCR γ và/hoặc δ. Các cải biến của các tế bào để phá vỡ sự biểu hiện của gen bao gồm các kỹ thuật bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật, bao gồm ví dụ sự can thiệp ARN (*ví dụ*, siARN, shARN, miARN), sự chỉnh sửa gen (*ví dụ*, sự bất hoạt gen dựa vào CRISPR- hoặc TALEN), và các kỹ thuật tương tự.

Theo một số phương án, các tế bào T caTCR cộng CSR có sự biểu hiện giảm của một hoặc cả hai chuỗi TCR nội sinh của tế bào T được tạo ra bằng cách sử dụng hệ thống CRISPR/Cas. Đối với tổng quan về hệ thống chỉnh sửa gen CRISPR/Cas, *xem* ví dụ Jian W & Marraffini LA, *Annu. Rev. Microbiol.* 69, 2015; Hsu PD *et al.*, *Cell*, 157(6):1262-1278, 2014; và O'Connell MR *et al.*, *Nature* 516: 263–266, 2014. Theo một số phương án, các tế bào T caTCR cộng CSR có sự biểu hiện giảm của một hoặc cả

hai chuỗi TCR nội sinh của tế bào T được tạo ra bằng cách sử dụng sự chỉnh sửa bộ gen dựa vào TALEN.

Sự làm giàu

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp làm giàu quần thể tế bào không đồng nhất cho tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR nhờ các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR bất kỳ được mô tả ở đây.

Các quần thể con đặc trưng của các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR (như các tế bào T caTCR cộng CSR) mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích và phối tử đích có thể được làm giàu bằng các kỹ thuật chọn lọc dương. Ví dụ, theo một số phương án, các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR (như các tế bào T caTCR cộng CSR) được làm giàu bằng cách ủ với các hạt liên hợp với kháng nguyên đích và/hoặc các hạt liên hợp với phối tử đích trong khoảng thời gian đủ để chọn lọc dương các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR mong muốn. Theo một số phương án, khoảng thời gian này là khoảng 30 phút. Theo một số phương án, khoảng thời gian này nằm trong khoảng từ 30 phút đến 36 giờ hoặc lâu hơn (bao gồm tất cả các khoảng nằm giữa các giá trị này). Theo một số phương án, khoảng thời gian này ít nhất là một, 2, 3, 4, 5, hoặc 6 giờ. Theo một số phương án, khoảng thời gian này là từ 10 đến 24 giờ. Theo một số phương án, thời gian ủ là 24 giờ. Để phân lập các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR có mặt ở mức thấp trong quần thể tế bào không đồng nhất, sử dụng thời gian ủ lâu hơn, như 24 giờ, có thể làm tăng hiệu suất tế bào. Thời gian ủ lâu hơn có thể được sử dụng để phân lập các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR trong tình huống bất kỳ mà có ít tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR khi so sánh với các loại tế bào khác. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật sẽ nhận biết là nhiều vòng chọn lọc có thể cũng được sử dụng trong ngữ cảnh của sáng chế.

Để phân lập quần thể tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR mong muốn bằng chọn lọc dương, nồng độ tế bào và bề mặt (*ví dụ*, hạt như hạt nhỏ) có thể được thay đổi. Theo một số phương án, có thể mong muốn làm giảm đáng kể thể tích trong đó các hạt và các tế bào được trộn với nhau (*tức là*, làm tăng nồng độ tế bào), để đảm bảo tế bào và hạt được tiếp xúc tối đa. Ví dụ, theo một số phương án, nồng độ khoảng 2 tỷ tế bào/ml được sử dụng. Theo một số phương án, nồng độ khoảng 1 tỷ tế bào/ml được sử dụng. Theo

một số phương án, lớn hơn khoảng 100 triệu tế bào/ml được sử dụng. Theo một số phương án, nồng độ tế bào là khoảng giá trị bất kỳ trong số 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, hoặc 50 triệu tế bào/ml được sử dụng. Theo một số phương án, nồng độ tế bào là khoảng giá trị bất kỳ trong số 75, 80, 85, 90, 95, hoặc 100 triệu tế bào/ml được sử dụng. Theo một số phương án, nồng độ khoảng 125 hoặc khoảng 150 triệu tế bào/ml được sử dụng. Sử dụng nồng độ cao có thể làm tăng hiệu suất tế bào, tăng sự hoạt hóa tế bào, và sự nhân rộng tế bào. Ngoài ra, sử dụng nồng độ tế bào cao cho phép bắt giữ hiệu quả hơn các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR mà có thể biểu hiện yếu caTCR và/hoặc CSR.

Theo một số phương án như vậy được mô tả ở đây, quá trình làm giàu dẫn đến sự cạn kiệt tối thiểu hoặc hầu như không cạn kiệt các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR. Ví dụ, theo một số phương án, sự làm giàu dẫn đến ít hơn khoảng 50% (như ít hơn khoảng giá trị bất kỳ trong số 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, hoặc 5%) của các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR trở nên bị cạn kiệt. Sự cạn kiệt tế bào miễn dịch có thể được xác định bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật, bao gồm phương pháp bất kỳ được mô tả ở đây.

Theo một số phương án như vậy được mô tả ở đây, quá trình làm giàu dẫn đến sự biệt hóa cuối cùng tối thiểu hoặc hầu như không biệt hóa của các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR. Ví dụ, theo một số phương án, sự làm giàu dẫn đến ít hơn khoảng 50% (như ít hơn khoảng giá trị bất kỳ trong số 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, hoặc 5%) của các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR trở nên bị biệt hóa cuối cùng. Sự biệt hóa tế bào miễn dịch có thể được xác định bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật, bao gồm phương pháp bất kỳ được mô tả ở đây.

Theo một số phương án như vậy được mô tả ở đây, quá trình làm giàu dẫn đến sự nội hóa tối thiểu hoặc hầu như không nội hóa các caTCR và/hoặc CSR trên các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR. Ví dụ, theo một số phương án, sự làm giàu dẫn đến ít hơn khoảng 50% (như ít hơn khoảng giá trị bất kỳ trong số 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, hoặc 5%) các caTCR và/hoặc CSR trên các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR trở nên bị nội hóa. Sự nội hóa các caTCR và/hoặc CSR trên các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR có thể được xác định bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật, bao gồm phương pháp bất kỳ được mô tả ở đây.

Theo một số phương án như vậy được mô tả ở đây, quá trình làm giàu dẫn đến sự tăng sinh tăng của các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR. Ví dụ, theo một số phương án, sự làm giàu dẫn đến tăng ít nhất khoảng 10% (như ít nhất khoảng giá trị bất kỳ trong số 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 1000% hoặc nhiều hơn) số lượng tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR sau khi làm giàu.

Do đó, theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp làm giàu quần thể tế bào không đồng nhất đối với các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR biểu hiện caTCR mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích và CSR mà liên kết đặc hiệu với phối tử đích bao gồm bước: a) cho quần thể tế bào không đồng nhất này tiếp xúc với phân tử thứ nhất bao gồm kháng nguyên đích hoặc một hoặc nhiều epitop được chứa trong đó và/hoặc phân tử thứ hai bao gồm phối tử đích hoặc một hoặc nhiều epitop được chứa trong đó để tạo thành các phức hợp bao gồm tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR được liên kết với phân tử thứ nhất này và/hoặc các phức hợp bao gồm tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR liên kết với phân tử thứ hai; và b) tách các phức hợp khỏi quần thể tế bào không đồng nhất này, từ đó tạo ra quần thể tế bào được làm giàu đối với các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR. Theo một số phương án, các phân tử thứ nhất và/hoặc thứ hai này được cố định, một cách riêng rẽ, vào chất nền rắn. Theo một số phương án, chất nền rắn này là chất dạng hạt (như hạt). Theo một số phương án, chất nền rắn này là bề mặt (như đáy của giếng). Theo một số phương án, các phân tử thứ nhất và/hoặc thứ hai này được đánh dấu, một cách riêng rẽ, bằng thẻ. Theo một số phương án, thẻ này là phân tử huỳnh quang, thẻ ái lực, hoặc thẻ từ tính. Theo một số phương án, phương pháp này còn bao gồm bước rửa giải các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR khỏi các phân tử thứ nhất và/hoặc thứ hai và thu hồi chất rửa giải này.

Sàng lọc thư viện

Theo một số phương án, để phân lập cấu trúc caTCR ứng viên đặc hiệu kháng nguyên đích, thư viện caTCR, ví dụ tế bào biểu hiện thư viện các axit nucleic mã hóa nhiều caTCR, có thể được tiếp xúc với phân tử bắt giữ bao gồm kháng nguyên đích hoặc một hoặc nhiều epitop được chứa trong đó, sau đó phân lập các thành viên ái lực của thư viện mà liên kết đặc hiệu với phân tử bắt giữ. Theo một số phương án, phân tử bắt giữ này được cố định trên chất nền rắn. Theo một số phương án, chất nền này có thể là các bề mặt của hạt, đĩa vi chuẩn độ, ống miễn dịch, hoặc vật liệu bất kỳ đã biết trong

lĩnh vực kỹ thuật hữu dụng cho mục đích này. Theo một số phương án, sự tương tác diễn ra trong dung dịch với phân tử bắt giữ được gắn thẻ (ví dụ phân tử bắt giữ được biotinyl hóa). Theo một số phương án, quy trình này bao gồm một hoặc nhiều bước rửa để loại bỏ các thành viên thư viện không đặc hiệu và không phản ứng (sàng lọc). Theo một số phương án, để tinh chế phức hợp trong dung dịch, chúng được thu gom bằng cách cố định hoặc ly tâm. Theo một số phương án, các thành viên ái lực được bắt giữ trên phân tử bắt giữ được biotinyl hóa hòa tan, sau đó được cố định phức hợp ái lực (thành viên ái lực và phân tử bắt giữ) trên hạt streptavidin. Theo một số phương án, chất nền rắn này là hạt. Theo một số phương án, hạt này bao gồm, ví dụ, hạt từ tính (ví dụ từ Bangs Laboratories, Polysciences inc., Dynal Biotech, Miltenyi Biotech hoặc Quantum Magnetic), hạt không từ tính (ví dụ Pierce and Upstate technology), hạt phân tán đơn (ví dụ Dynal Biotech and Microparticle Gmbh), và hạt đa phân tán (ví dụ Chemagen). Sử dụng hạt từ tính đã được mô tả kỹ trong tài liệu (Uhlen, M, et al (1994) trong Advances in Biomagnetic Separation, BioTechniques press, Westborough, MA). Theo một số phương án, các thành viên ái lực này được tinh chế bằng cách chọn lọc dương. Theo một số phương án, các thành viên ái lực này được tinh chế bằng chọn lọc âm để loại bỏ các thành viên thư viện không mong muốn. Theo một số phương án, các thành viên ái lực này được tinh chế bằng cả bước chọn lọc dương và âm.

Theo một số phương án, để phân lập cấu trúc CSR ứng viên đặc hiệu phối tử đích, thư viện CSR, ví dụ tế bào biểu hiện thư viện các axit nucleic mã hóa nhiều CSR, có thể được tiếp xúc với phân tử bắt giữ bao gồm phối tử đích hoặc một hoặc nhiều epitop được chứa trong đó, sau đó phân lập các thành viên ái lực của thư viện mà liên kết đặc hiệu với phân tử bắt giữ. Theo một số phương án, phân tử bắt giữ này được cố định trên chất nền rắn. Theo một số phương án, chất nền này có thể là các bề mặt của hạt, đĩa vi chuẩn độ, ống miễn dịch, hoặc vật liệu bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật hữu dụng cho mục đích này. Theo một số phương án, sự tương tác diễn ra trong dung dịch với phân tử bắt giữ được gắn thẻ (ví dụ phân tử bắt giữ được biotinyl hóa). Theo một số phương án, quy trình này bao gồm một hoặc nhiều bước rửa để loại bỏ các thành viên thư viện không đặc hiệu và không phản ứng (sàng lọc). Theo một số phương án, để tinh chế phức hợp trong dung dịch, chúng được thu gom bằng cách cố định hoặc ly tâm. Theo một số phương án, các thành viên ái lực được bắt giữ trên phân tử bắt giữ được

biotinyl hóa hòa tan, sau đó được cố định phức hợp ái lực (thành viên ái lực và phân tử bắt giữ) trên hạt streptavidin. Theo một số phương án, chất nền rắn này là hạt. Theo một số phương án, hạt này bao gồm, ví dụ, hạt từ tính (ví dụ từ Bangs Laboratories, Polysciences inc., Dynal Biotech, Miltenyi Biotech hoặc Quantum Magnetic), hạt không từ tính (ví dụ Pierce and Upstate technology), hạt phân tán đơn (ví dụ Dynal Biotech and Microparticle Gmbh), và hạt đa phân tán (ví dụ Chemagen). Theo một số phương án, các thành viên ái lực này được tinh chế bằng cách chọn lọc dương. Theo một số phương án, các thành viên ái lực này được tinh chế bằng chọn lọc âm để loại bỏ các thành viên thư viện không mong muốn. Theo một số phương án, các thành viên ái lực này được tinh chế bằng cả bước chọn lọc dương và âm.

Thông thường, các kỹ thuật được sử dụng để tạo ra các cấu trúc thư viện sẽ được dựa trên các kỹ thuật thiết kế di truyền đã biết. Liên quan đến vấn đề này, trình tự axit nucleic mã hóa các caTCR hoặc CSR để được biểu hiện ở thư viện được kết hợp vào các vectơ biểu hiện thích hợp cho loại hệ thống biểu hiện được sử dụng. Các vectơ biểu hiện thích hợp để sử dụng trong sự biểu hiện ở tế bào, như các tế bào CD3+, là đã biết và được mô tả trong lĩnh vực kỹ thuật. Ví dụ, theo một số phương án, vectơ biểu hiện này là vectơ virut, như vectơ lentivirut.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất thư viện axit nucleic bao gồm các trình tự mã hóa nhiều caTCR theo phương án bất kỳ trong số các phương án được mô tả ở đây. Theo một số phương án, thư viện axit nucleic này bao gồm các vectơ virut mã hóa nhiều caTCR. Theo một số phương án, các vectơ virut này là các vectơ lentivirut.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất thư viện axit nucleic bao gồm các trình tự mã hóa nhiều CSR theo phương án bất kỳ trong số các phương án được mô tả ở đây. Theo một số phương án, thư viện axit nucleic này bao gồm các vectơ virut mã hóa nhiều CSR. Theo một số phương án, các vectơ virut này là các vectơ lentivirut.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp sàng lọc thư viện axit nucleic theo phương án bất kỳ trong số các phương án được mô tả ở đây cho các trình tự mã hóa caTCR đặc hiệu cho kháng nguyên đích, bao gồm bước: a) đưa thư viện axit nucleic vào trong nhiều tế bào, sao cho các caTCR này được biểu hiện trên bề mặt của nhiều tế bào này; b) ủ nhiều tế bào này với phân tử bắt giữ bao gồm kháng nguyên đích

hoặc một hoặc nhiều epitop được chứa trong đó; c) thu gom tế bào liên kết với phân tử bắt giữ; và d) phân lập các trình tự mã hóa các caTCR từ tế bào được thu gom trong bước c), từ đó xác định được các caTCR đặc hiệu kháng nguyên đích này. Theo một số phương án, phương pháp này còn bao gồm một hoặc nhiều bước rửa. Theo một số phương án, một hoặc nhiều bước rửa được tiến hành giữa các bước b) và c). Theo một số phương án, nhiều tế bào này là nhiều tế bào CD3+. Theo một số phương án, phân tử bắt giữ này được cố định trên chất nền rắn. Theo một số phương án, chất nền rắn này là hạt. Theo một số phương án, bước thu gom tế bào liên kết với phân tử bắt giữ bao gồm bước rửa giải các tế bào từ phối tử bắt giữ đã liên kết với chất nền rắn và thu gom chất rửa giải. Theo một số phương án, phân tử bắt giữ này được đánh dấu bằng thẻ. Theo một số phương án, thẻ này là phân tử huỳnh quang, thẻ ái lực, hoặc thẻ từ tính. Theo một số phương án, bước thu gom tế bào liên kết với phân tử bắt giữ bao gồm bước phân lập các phức hợp bao gồm các tế bào và các phối tử được đánh dấu. Theo một số phương án, tế bào được phân ly từ phức hợp.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp sàng lọc thư viện axit nucleic theo phương án bất kỳ trong số các phương án được mô tả ở đây cho các trình tự mã hóa CSR đặc hiệu cho phối tử đích, bao gồm bước: a) đưa thư viện axit nucleic vào trong nhiều tế bào, sao cho các CSR này được biểu hiện trên bề mặt của nhiều tế bào này; b) ủ nhiều tế bào này với phân tử bắt giữ bao gồm phối tử đích hoặc một hoặc nhiều epitop được chứa trong đó; c) thu gom tế bào liên kết với phân tử bắt giữ; và d) phân lập các trình tự mã hóa các CSR từ tế bào được thu gom trong bước c), từ đó xác định được các CSR đặc hiệu phối tử đích này. Theo một số phương án, phương pháp này còn bao gồm một hoặc nhiều bước rửa. Theo một số phương án, một hoặc nhiều bước rửa được tiến hành giữa các bước b) và c). Theo một số phương án, nhiều tế bào này là nhiều tế bào CD3+. Theo một số phương án, phân tử bắt giữ này được cố định trên chất nền rắn. Theo một số phương án, chất nền rắn này là hạt. Theo một số phương án, bước thu gom tế bào liên kết với phân tử bắt giữ bao gồm bước rửa giải các tế bào từ phối tử bắt giữ đã liên kết với chất nền rắn và thu gom chất rửa giải. Theo một số phương án, phân tử bắt giữ này được đánh dấu bằng thẻ. Theo một số phương án, thẻ này là phân tử huỳnh quang, thẻ ái lực, hoặc thẻ từ tính. Theo một số phương án, bước thu gom tế bào liên kết với phân tử bắt giữ bao gồm bước phân lập các phức hợp bao

gồm các tế bào và các phối tử được đánh dấu. Theo một số phương án, tế bào được phân ly từ phức hợp.

Protein MHC

Các protein MHC lớp I là một trong hai lớp chính của các phân tử phức hợp tương hợp mô chính (MHC) (protein còn lại là MHC lớp II) và được tìm thấy trên hầu hết các tế bào có nhân của cơ thể. Chức năng của chúng là biểu hiện các mảnh protein từ bên trong tế bào thành các tế bào T; các tế bào khỏe mạnh sẽ được bỏ qua, trong khi các tế bào chứa các protein ngoại lai hoặc đột biến sẽ bị tấn công bởi hệ miễn dịch. Vì các protein MHC lớp I trình diện peptit thu được từ các protein nguyên sinh chất, nên con đường trình diện MHC lớp I thường được gọi là con đường nguyên sinh chất hoặc nội sinh. Các phân tử MHC lớp I liên kết với peptit được tạo thành chủ yếu từ sự suy biến các protein nguyên sinh chất bởi proteasom. Phức hợp MHC I:peptit này sau đó được chèn vào màng huyết tương của tế bào. Peptit này được liên kết với phần ngoại bào của phân tử MHC lớp I. Do đó, chức năng của MHC lớp I này là để biểu hiện các protein nội bào thành các tế bào T gây độc tế bào (CTL). Tuy nhiên, MHC lớp I có thể cũng trình diện các peptit được tạo ra từ các protein ngoại sinh, trong quy trình đã biết là trình diện chéo.

Các protein MHC lớp I gồm hai chuỗi polypeptit, α và β2-microglobulin (β2M). Hai chuỗi này được liên kết không cộng hóa trị nhờ tương tác giữa β2M và miền α3. Chỉ chuỗi α là đa hình và được mã hóa bởi gen HLA, trong khi tiểu đơn vị β2M không đa hình và được mã hóa bởi gen β-2 microglobulin. Miền α3 này là cách màng huyết tương và tương tác với đồng thụ thể CD8 của các tế bào T. Sự tương tác α3-CD8 giữ cho phân tử MHC I ở vị trí trong khi thụ thể tế bào T (TCR) trên bề mặt của tế bào T gây độc tế bào liên kết với phối tử heterodime α1-α2 của nó, và kiểm tra peptit đã ghép nối đối với tính kháng nguyên. Các miền α1 và α2 gấp nếp để tạo thành đường rãnh cho các peptit liên kết. Các protein MHC lớp I liên kết với các peptit mà có chiều dài 8-10 axit amin.

Các phân tử MHC lớp II là họ các phân tử thường được tìm thấy chỉ trên các tế bào trình diện kháng nguyên như các tế bào đuôi gai, các thực bào đơn nhân, một số tế bào nội mạc, các tế bào biểu mô tuyến ức, và các tế bào B. Các kháng nguyên được trình

diện bởi các peptit lớp II thu được từ các protein ngoại bào (không phải nguyên sinh chất như trong lớp I); do đó, con đường phụ thuộc MHC lớp II của sự trình diện kháng nguyên được gọi là con đường nhập bào hoặc ngoại sinh. Nạp phân tử MHC lớp II xảy ra bởi sự thực bào; protein ngoại bào bị nhập bào, bị phân hủy trong lysosom, và các mảnh peptit epitop tạo thành được nạp lên trên các phân tử MHC lớp II trước khi chúng di chuyển đến bề mặt tế bào.

Giống như các phân tử MHC lớp I, các phân tử lớp II cũng là các heterodime, nhưng trong trường hợp này gồm hai peptit giống nhau, chuỗi α và β. Chỉ số phụ α1, α2, v.v. để chỉ các miền riêng rẽ bên trong gen HLA; mỗi miền thường được mã hóa bởi exon khác nhau bên trong gen, và một số gen có các miền khác mà mã hóa các trình tự dẫn, trình tự xuyên màng, v.v. Vì đường rãnh liên kết kháng nguyên của các phân tử MHC lớp II mở tại cả hai đầu trong khi đường rãnh tương ứng trên các phân tử lớp I bị đóng tại mỗi đầu, nên các kháng nguyên được trình diện bởi các phân tử MHC lớp II dài hơn, thường nằm trong khoảng độ dài từ 15 đến 24 gốc axit amin.

Các gen kháng nguyên bạch cầu của người (HLA) là các phiên bản của người có gen MHC. Ba protein MHC lớp I chính ở người là HLA-A, HLA-B, và HLA-C, trong khi 3 protein phụ là HLA-E, HLA-F, và HLA-G. Ba protein MHC lớp II chính có liên quan trong sự trình diện kháng nguyên ở người là HLA-DP, HLDA-DQ, và HLA-DR, trong khi các protein MHC lớp II còn lại, HLA-DM và HLA-DO, có liên quan đến quá trình xử lý bên trong và nạp kháng nguyên. HLA-A được xếp hạng trong số các gen ở người với trình tự mã hóa tiến hóa nhanh nhất. Vì tháng 12/2013, đã có 2432 alen HLA-A đã biết mã hóa 1740 protein hoạt động và 117 protein không chức năng. Gen HLA-A này được định vị trên nhánh ngắn của nhiễm sắc thể 6 và mã hóa chuỗi α lớn hơn, cấu trúc của HLA-A. Sự thay đổi chuỗi HLA-A α là quan trọng cho chức năng của HLA. Sự thay đổi này thúc đẩy sự đa dạng di truyền ở trong quần thể. Vì mỗi HLA có ái lực khác nhau với các peptit của cấu trúc cụ thể, sự đa dạng lớn hơn của các HLA nghĩa là sự đa dạng kháng nguyên lớn hơn được 'trình diện' trên bề mặt tế bào, tăng cường khả năng tập hợp con của quần thể sẽ kháng yếu tố xâm nhập ngoại lai xác định bất kỳ. Điều này làm giảm khả năng một tác nhân gây bệnh duy nhất có khả năng loại trừ toàn bộ quần thể người. Mỗi đối tượng có thể biểu hiện lên đến hai loại HLA-A, mỗi loại từ mỗi trong số bố mẹ của họ. Một số đối tượng sẽ thừa hưởng cùng HLA-A từ cả bố và mẹ,

làm giảm sự đa dạng HLA riêng rẽ của họ; tuy nhiên, phần lớn các đối tượng sẽ nhận hai bản sao khác nhau của HLA-A. Mô hình tương tự này áp dụng cho tất cả các nhóm HLA. Nói cách khác, một người có thể chỉ biểu hiện một hoặc hai trong số 2432 alen HLA-A đã biết.

Tất cả các alen nhận ít nhất một sự phân nhóm bốn chữ số, *ví dụ*, HLA-A*02:12. A thể hiện là gen HLA mà alen này thuộc về. Có nhiều alen HLA-A, để sự phân loại bởi typ huyết thanh làm đơn giản hóa sự phân nhóm. Cặp số tiếp theo để chỉ sự gán này. Ví dụ, HLA-A*02:02, HLA-A*02:04, và HLA-A*02:324 là tất cả các thành viên thuộc typ huyết thanh A2 (được ký hiệu bằng tiền tố *02). Nhóm này là yếu tố chính chịu trách nhiệm cho khả năng tương hợp HLA. Tất cả các số sau này không thể được xác định bằng cách đánh giá typ huyết thanh và được chỉ định qua giải trình tự gen. Bộ số thứ hai chỉ ra là protein HLA nào được tạo ra. Chúng được gán theo thứ tự khám phá và đến tháng 12/2013 đã có 456 protein HLA-A02 khác nhau đã biết (các tên được gán là từ HLA-A*02:01 đến HLA-A*02:456). Tên HLA có khả năng ngắn nhất bao gồm cả hai chi tiết này. Mỗi sự mở rộng ra ngoài là biểu thị sự thay đổi nucleotit mà có thể hoặc không thể thay đổi protein.

Theo một số phương án, môđun liên kết kháng nguyên giống Fab này liên kết đặc hiệu với phức hợp bao gồm peptit thu được từ kháng nguyên liên kết với bệnh (như kháng nguyên liên kết với khối u hoặc kháng nguyên được mã hóa virut) và protein MHC lớp I, trong đó protein MHC lớp I này là HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F, hoặc HLA-G. Theo một số phương án, protein MHC lớp I này là HLA-A, HLA-B, hoặc HLA-C. Theo một số phương án, protein MHC lớp I này là HLA-A. Theo một số phương án, protein MHC lớp I này là HLA-B. Theo một số phương án, protein MHC lớp I này là HLA-C. Theo một số phương án, protein MHC lớp I này là HLA-A01, HLA-A02, HLA-A03, HLA-A09, HLA-A10, HLA-A11, HLA-A19, HLA-A23, HLA-A24, HLA-A25, HLA-A26, HLA-A28, HLA-A29, HLA-A30, HLA-A31, HLA-A32, HLA-A33, HLA-A34, HLA-A36, HLA-A43, HLA-A66, HLA-A68, HLA-A69, HLA-A74, hoặc HLA-A80. Theo một số phương án, protein MHC lớp I này là HLA-A02. Theo một số phương án, protein MHC lớp I này là loại bất kỳ trong số HLA-A*02:01-555, như HLA-A*02:01, HLA-A*02:02, HLA-A*02:03, HLA-A*02:04, HLA-A*02:05, HLA-A*02:06, HLA-A*02:07, HLA-A*02:08, HLA-A*02:09, HLA-A*02:10, HLA-

A*02:11, HLA-A*02:12, HLA-A*02:13, HLA-A*02:14, HLA-A*02:15, HLA-A*02:16, HLA-A*02:17, HLA-A*02:18, HLA-A*02:19, HLA-A*02:20, HLA-A*02:21, HLA-A*02:22, hoặc HLA-A*02:24. Theo một số phương án, protein MHC lớp I này là HLA-A*02:01. HLA-A*02:01 được biểu hiện trong 39-46% trong tổng số người Cáp-ca, và do đó là sự lựa chọn protein MHC lớp I thích hợp để sử dụng trong sáng chế.

Theo một số phương án, môđun liên kết kháng nguyên giống Fab này liên kết đặc hiệu với phức hợp bao gồm peptit thu được từ kháng nguyên liên kết với bệnh (như kháng nguyên liên kết với khối u hoặc kháng nguyên được mã hóa bởi virut) và protein MHC lớp II, trong đó protein MHC lớp II này là HLA-DP, HLA-DQ, hoặc HLA-DR. Theo một số phương án, protein MHC lớp II này là HLA-DP. Theo một số phương án, protein MHC lớp II này là HLA-DQ. Theo một số phương án, protein MHC lớp II này là HLA-DR.

Các peptit thích hợp để sử dụng trong việc tạo ra môđun liên kết kháng nguyên giống Fab có thể được xác định, ví dụ, dựa trên sự có mặt của môtip và vị trí phân tách liên kết HLA (như HLA-A*02:01) cho proteasom và các proteasom miễn dịch sử dụng các mô hình dự đoán bằng máy tính đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. Để dự đoán vị trí liên kết MHC, các mô hình như vậy bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, ProPred1 (được mô tả chi tiết hơn trong Singh và Raghava, *ProPred: prediction of HLA-DR binding sites. BIOINFORMATICS* 17(12):1236-1237, 2001), và SYFPEITHI (xem Schuler *et al. SYFPEITHI, Database for Searching and T-Cell Epitope Prediction. in Immunoinformatics Methods in Molecular Biology*, vol 409(1): 75-93, 2007).

Khi các peptit thích hợp đã được xác định, sự tổng hợp peptit có thể được thực hiện theo các quy trình đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. Vì kích thước tương đối nhỏ của chúng, các peptit theo sáng chế có thể được tổng hợp trực tiếp trong dung dịch hoặc trên chất nền rắn theo các kỹ thuật tổng hợp peptit thông thường. Các thiết bị tổng hợp tự động khác nhau có bán sẵn trên thị trường và có thể được sử dụng theo các quy trình đã biết. Tổng hợp peptit ở pha dung dịch đã trở thành quy trình được thiết lập tốt cho sản xuất quy mô lớn peptit tổng hợp và như là phương pháp thay thế thích hợp để bào chế các peptit theo sáng chế (xem ví dụ, Solid

Phase Peptide Synthesis by John Morrow Stewart and Martin *et al. Application of Almez-mediated Amidation Reactions to Solution Phase Peptide Synthesis*, Tetrahedron Letters Vol. 39, trang 1517-1520, 1998).

Dược phẩm

Sáng chế cũng đề xuất chế phẩm tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR (như các dược phẩm, cũng dùng để chỉ ở đây là các dạng bào chế) bao gồm tế bào miễn dịch (như tế bào T) trình diện trên bề mặt của nó caTCR theo loại bất kỳ trong số các caTCR được mô tả ở đây và CSR theo loại bất kỳ trong số các CSR được mô tả ở đây. Theo một số phương án, chế phẩm tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR này là dược phẩm.

Chế phẩm này có thể bao gồm quần thể tế bào đồng nhất bao gồm các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR của cùng loại tế bào và biểu hiện cùng caTCR và CSR, hoặc quần thể tế bào khác loại bao gồm nhiều quần thể tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR bao gồm các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR của các loại tế bào khác nhau, biểu hiện các caTCR khác nhau, và/hoặc biểu hiện các CSR khác nhau. Chế phẩm này có thể còn bao gồm các tế bào mà không phải là các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR.

Do đó, theo một số phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR bao gồm quần thể tế bào đồng nhất của các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR (như các tế bào T caTCR cộng CSR) của cùng loại tế bào và biểu hiện cùng caTCR và CSR. Theo một số phương án, tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR này là tế bào T. Theo một số phương án, tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR này được chọn từ nhóm bao gồm tế bào T gây độc tế bào, tế bào T trợ giúp, tế bào T giết tự nhiên, và tế bào T ức chế. Theo một số phương án, chế phẩm tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR này là dược phẩm.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR bao gồm quần thể tế bào khác loại bao gồm nhiều quần thể tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR bao gồm các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR của các loại tế bào khác nhau, biểu hiện các caTCR khác nhau, và/hoặc biểu hiện các CSR khác nhau. Theo một số phương án, các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR này là các tế bào T. Theo một số phương án, mỗi quần thể của các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR này là, một cách độc lập với nhau, thuộc loại tế bào được chọn từ nhóm bao gồm các tế bào T gây độc tế

bào, các tế bào T trợ giúp, các tế bào T giết tự nhiên, và các tế bào T ức chế. Theo một số phương án, tất cả các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR trong chế phẩm là thuộc cùng một loại tế bào (*ví dụ*, tất cả các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR này là các tế bào T gây độc tế bào). Theo một số phương án, ít nhất một quần thể các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR là thuộc loại tế bào khác với các loại còn lại (*ví dụ*, một quần thể các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR gồm các tế bào T gây độc tế bào và các quần thể còn lại của các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR gồm các tế bào T giết tự nhiên). Theo một số phương án, mỗi quần thể của các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR biểu hiện cùng caTCR. Theo một số phương án, ít nhất một quần thể các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR biểu hiện caTCR khác những quần thể còn lại. Theo một số phương án, mỗi quần thể của các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR biểu hiện caTCR khác với các quần thể còn lại. Theo một số phương án, mỗi quần thể của các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR biểu hiện caTCR mà liên kết đặc hiệu với cùng kháng nguyên đích. Theo một số phương án, ít nhất một quần thể của các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR biểu hiện caTCR mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích khác với các quần thể còn lại (*ví dụ*, một quần thể của các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR liên kết đặc hiệu với phức hợp pMHC và các quần thể còn lại của các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR liên kết đặc hiệu với thụ thể bề mặt tế bào). Theo một số phương án, khi ít nhất một quần thể của các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR biểu hiện caTCR mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích khác loại, mỗi quần thể của các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR biểu hiện caTCR mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích liên kết với cùng bệnh hoặc rối loạn (*ví dụ*, mỗi kháng nguyên đích liên kết với bệnh ung thư, như bệnh ung thư vú). Theo một số phương án, mỗi quần thể của các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR biểu hiện cùng CSR. Theo một số phương án, ít nhất một quần thể các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR biểu hiện CSR khác những quần thể còn lại. Theo một số phương án, mỗi quần thể của các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR biểu hiện CSR khác với các quần thể còn lại. Theo một số phương án, mỗi quần thể của các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR biểu hiện CSR mà liên kết đặc hiệu với cùng phối tử đích. Theo một số phương án, ít nhất một quần thể của các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR biểu hiện CSR mà liên kết đặc hiệu với phối tử đích khác với các quần thể còn lại (*ví dụ*, một quần thể của các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR liên kết đặc hiệu với phức hợp pMHC và các quần thể còn lại của các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR liên kết đặc hiệu với

thụ thể bề mặt tế bào). Theo một số phương án, khi ít nhất một quần thể của các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR biểu hiện CSR mà liên kết đặc hiệu với phối tử đích khác loại, mỗi quần thể của các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR biểu hiện CSR mà liên kết đặc hiệu với phối tử đích liên kết với cùng bệnh hoặc rối loạn (*ví dụ*, mỗi phối tử đích liên kết với bệnh ung thư, như bệnh ung thư vú). Theo một số phương án, chế phẩm tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR này là dược phẩm.

Do đó, theo một số phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR bao gồm nhiều quần thể tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR theo phương án bất kỳ trong số các phương án được mô tả ở đây, trong đó tất cả các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR trong chế phẩm là thuộc cùng loại tế bào (*ví dụ*, tất cả các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR là các tế bào T gây độc tế bào), và trong đó mỗi quần thể của các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR biểu hiện caTCR khác với các quần thể còn lại. Theo một số phương án, các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR này là các tế bào T. Theo một số phương án, các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR được chọn từ nhóm bao gồm tế bào T gây độc tế bào, tế bào T trợ giúp, tế bào T giết tự nhiên, và tế bào T ức chế. Theo một số phương án, mỗi quần thể của các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR biểu hiện caTCR mà liên kết đặc hiệu với cùng kháng nguyên đích. Theo một số phương án, ít nhất một quần thể của các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR biểu hiện caTCR mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích khác với các quần thể còn lại (*ví dụ*, một quần thể của các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR liên kết đặc hiệu với phức hợp pMHC và các quần thể còn lại của các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR liên kết đặc hiệu với thụ thể bề mặt tế bào). Theo một số phương án, khi ít nhất một quần thể của các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR biểu hiện caTCR mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích khác loại, mỗi quần thể của các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR biểu hiện caTCR mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích liên kết với cùng bệnh hoặc rối loạn (*ví dụ*, mỗi kháng nguyên đích liên kết với bệnh ung thư, như bệnh ung thư vú). Theo một số phương án, chế phẩm tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR này là dược phẩm.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR bao gồm nhiều quần thể tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR theo phương án bất kỳ trong số các phương án được mô tả ở đây, trong đó tất cả các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR trong chế phẩm là thuộc cùng loại tế bào (*ví dụ*, tất cả các tế bào miễn dịch

caTCR cộng CSR là các tế bào T gây độc tế bào), và trong đó mỗi quần thể của các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR biểu hiện CSR khác với các quần thể còn lại. Theo một số phương án, các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR này là các tế bào T. Theo một số phương án, các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR được chọn từ nhóm bao gồm tế bào T gây độc tế bào, tế bào T trợ giúp, tế bào T giết tự nhiên, và tế bào T ức chế. Theo một số phương án, mỗi quần thể của các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR biểu hiện CSR mà liên kết đặc hiệu với cùng phối tử đích. Theo một số phương án, ít nhất một quần thể của các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR biểu hiện CSR mà liên kết đặc hiệu với phối tử đích khác với các quần thể còn lại (*ví dụ*, một quần thể của các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR liên kết đặc hiệu với phức hợp pMHC và các quần thể còn lại của các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR liên kết đặc hiệu với thụ thể bề mặt tế bào). Theo một số phương án, khi ít nhất một quần thể của các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR biểu hiện CSR mà liên kết đặc hiệu với phối tử đích khác loại, mỗi quần thể của các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR biểu hiện CSR mà liên kết đặc hiệu với phối tử đích liên kết với cùng bệnh hoặc rối loạn (*ví dụ*, mỗi phối tử đích liên kết với bệnh ung thư, như bệnh ung thư vú). Theo một số phương án, chế phẩm tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR này là dược phẩm.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm bao gồm nhiều quần thể tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR theo phương án bất kỳ trong số các phương án được mô tả ở đây, trong đó ít nhất một quần thể các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR là thuộc loại tế bào khác với các quần thể còn lại. Theo một số phương án, tất cả các quần thể các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR đều thuộc các loại tế bào khác nhau. Theo một số phương án, các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR này là các tế bào T. Theo một số phương án, mỗi quần thể của các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR này là, một cách độc lập với nhau, thuộc loại tế bào được chọn từ nhóm bao gồm các tế bào T gây độc tế bào, các tế bào T trợ giúp, các tế bào T giết tự nhiên, và các tế bào T ức chế. Theo một số phương án, mỗi quần thể của các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR biểu hiện cùng caTCR. Theo một số phương án, ít nhất một quần thể các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR biểu hiện caTCR khác những quần thể còn lại. Theo một số phương án, mỗi quần thể của các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR biểu hiện caTCR khác với các quần thể còn lại. Theo một số phương án, mỗi quần thể của các tế bào miễn dịch caTCR cộng

CSR biểu hiện caTCR mà liên kết đặc hiệu với cùng kháng nguyên đích. Theo một số phương án, ít nhất một quần thể của các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR biểu hiện caTCR mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích khác với các quần thể còn lại (*ví dụ*, một quần thể của các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR liên kết đặc hiệu với phức hợp pMHC và các quần thể còn lại của các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR liên kết đặc hiệu với thụ thể bề mặt tế bào). Theo một số phương án, khi ít nhất một quần thể của các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR biểu hiện caTCR mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích khác loại, mỗi quần thể của các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR biểu hiện caTCR mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích liên kết với cùng bệnh hoặc rối loạn (*ví dụ*, mỗi kháng nguyên đích liên kết với bệnh ung thư, như bệnh ung thư vú). Theo một số phương án, mỗi quần thể của các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR biểu hiện cùng CSR. Theo một số phương án, ít nhất một quần thể các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR biểu hiện CSR khác những quần thể còn lại. Theo một số phương án, mỗi quần thể của các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR biểu hiện CSR khác với các quần thể còn lại. Theo một số phương án, mỗi quần thể của các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR biểu hiện CSR mà liên kết đặc hiệu với cùng phối tử đích. Theo một số phương án, ít nhất một quần thể của các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR biểu hiện CSR mà liên kết đặc hiệu với phối tử đích khác với các quần thể còn lại (*ví dụ*, một quần thể của các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR liên kết đặc hiệu với phức hợp pMHC và các quần thể còn lại của các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR liên kết đặc hiệu với thụ thể bề mặt tế bào). Theo một số phương án, khi ít nhất một quần thể của các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR biểu hiện CSR mà liên kết đặc hiệu với phối tử đích khác loại, mỗi quần thể của các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR biểu hiện CSR mà liên kết đặc hiệu với phối tử đích liên kết với cùng bệnh hoặc rối loạn (*ví dụ*, mỗi phối tử đích liên kết với bệnh ung thư, như bệnh ung thư vú). Theo một số phương án, chế phẩm tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR này là dược phẩm.

Tại các thời điểm khác nhau trong quá trình bào chế chế phẩm, có thể cần thiết hoặc có lợi để bảo quản lạnh tế bào. Thuật ngữ "được đông lạnh/làm đông lạnh" và "được bảo quản lạnh/bảo quản lạnh" có thể được sử dụng thay thế lẫn nhau. Làm đông lạnh bao gồm làm đông khô.

Như được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật, làm đông lạnh tế bào có thể phá hủy tế bào (xem Mazur, P., 1977, Cryobiology 14:251 -272) nhưng có nhiều quy trình sẵn có ngăn chặn sự phá hủy này. Ví dụ, có thể tránh được sự phá hủy này bằng cách (a) sử dụng chất bảo quản lạnh, (b) kiểm soát tốc độ làm đông lạnh, và/hoặc (c) bảo quản ở nhiệt độ đủ thấp để giảm thiểu các phản ứng phân hủy. Các chất bảo quản lạnh làm ví dụ bao gồm dimetyl sulfoxit (DMSO) (Lovelock và Bishop, 1959, Nature 183:1394- 1395; Ashwood-Smith, 1961 , Nature 190:1204-1205), glyxerol, polyvinylpyrolidin (Rinfret, 1960, Ann. N.Y. Acad. Sci. 85:576), polyetylen glycol (Sloviter và Ravdin, 1962, Nature 196:548), albumin, dextran, sucroza, etylen glycol, i-erythritol, D-ribitol, D-manitol (Rowe et al., 1962, Fed. Proc. 21 :157), D-sorbitol, i-inositol, D-lactoza, cholin clorua (Bender et al., 1960, J. Appl. Physiol. 15:520), axit amin (Phan The Tran và Bender, 1960, Exp. Cell Res. 20:651), metanol, axetamit, glyxerol monoaxetat (Lovelock, 1954, Biochem. J. 56:265), và các muối vô cơ (Phan The Tran và Bender, 1960, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 104:388; Phan The Tran và Bender, 1961, trong Radiobiology, Proceedings of the Third Australian Conference on Radiobiology, llbery ed., Butterworth, London, p. 59). Theo các phương án cụ thể, DMSO có thể được sử dụng. Sự bổ sung huyết tương (*ví dụ*, đến nồng độ 20-25%) có thể làm gia tăng hiệu quả bảo vệ của DMSO. Sau khi bổ sung DMSO, các tế bào có thể được giữ ở nhiệt độ 0°C tới khi làm đông lạnh, vì nồng độ DMSO là 1% có thể có độc ở nhiệt độ trên 4°C.

Trong quá trình bảo quản lạnh các tế bào, tốc độ làm lạnh được kiểm soát chậm có thể quan trọng và các chất bảo quản lạnh khác nhau (Rapatz et al., 1968, Cryobiology 5(1): 18-25) và các loại tế bào khác nhau có tốc độ làm lạnh tối ưu khác nhau (xem *ví dụ*, Rowe và Rinfret, 1962, Blood 20:636; Rowe, 1966, Cryobiology 3(1):12-18; Lewis, et al., 1967, Transfusion 7(1):17-32; và Mazur, 1970, Science 168:939- 949 đối với các tác động của tốc độ làm lạnh đối với sự sống của tế bào gốc và đối với hiệu quả cấy ghép của chúng). Nhiệt độ của pha dung hợp mà tại đó nước chuyển thành đá sẽ là tối thiểu. Quy trình làm lạnh có thể được thực hiện bằng cách sử dụng, *ví dụ*, thiết bị đông lạnh được lập trình hoặc quy trình bể metanol. Thiết bị làm lạnh được lập trình cho phép xác định tốc độ làm lạnh tối ưu và tạo điều kiện thuận lợi cho việc làm lạnh lặp lại đạt chuẩn.

Theo các phương án cụ thể, các tế bào được xử lý DMSO có thể được làm lạnh trước trên đá và được chuyển đến khay chứa metanol lạnh mà được đặt, lần lượt, ở máy lạnh cơ học (*ví dụ*, Harris hoặc Revco) ở nhiệt độ -80°C. Các kỹ thuật đo cặp nhiệt của bể metanol và các mẫu chỉ ra tốc độ làm lạnh là từ 1°C đến 3°C/phút có thể được ưu tiên. Sau ít nhất hai giờ, các mẫu có thể đạt đến nhiệt độ - 80°C và có thể được đặt trực tiếp vào trong nitơ lỏng (-196°C).

Sau khi làm lạnh hoàn toàn, các tế bào có thể được chuyển nhanh chóng đến bình bảo quản lạnh dài hạn. Theo phương án được ưu tiên, các mẫu có thể được bảo quản lạnh trong nitơ lỏng (-196°C) hoặc hơi (-1°C). Quá trình bảo quản này được tạo thuận lợi bằng tính khả dụng của các máy lạnh nitơ lỏng hiệu quả cao.

Sự xem xét thêm và các quy trình khác để thao tác, bảo quản lạnh, và bảo quản dài hạn tế bào, có thể được tìm thấy trong các tài liệu tham khảo làm ví dụ sau đây: Patent Mỹ số 4,199,022; 3,753,357; và 4,559,298; Gorin, 1986, Clinics In Haematology 15(1):19-48; Bone-Marrow Conservation, Culture and Transplantation, Proceedings of a Panel, Moscow, July 22-26, 1968, International Atomic Energy Agency, Vienna, pp. 107- 186; Livesey và Linner, 1987, Nature 327:255; Linner et al., 1986, J. Histochem. Cytochem. 34(9):1 123-1 135; Simione, 1992, J. Parenter. Sci. Technol. 46(6):226-32).

Sau quy trình bảo quản lạnh, các tế bào đã đông lạnh có thể được làm tan để sử dụng theo các phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. Các tế bào đông lạnh tốt hơn là được làm tan nhanh và được làm lạnh ngay lập tức sau khi làm tan. Theo các phương án cụ thể, lọ chứa các tế bào đông lạnh có thể được nhúng lên đến cổ của nó trong bể nước ấm; quay nhẹ sẽ đảm bảo trộn huyền phù tế bào khi nó tan và tăng truyền nhiệt từ nước ấm đến khối đá bên trong. Ngay khi đá đã tan hoàn toàn, lọ này có thể được đặt ngay trên đá.

Theo các phương án cụ thể, các phương pháp có thể được sử dụng để ngăn vón cục tế bào trong quá trình làm tan. Các phương pháp làm ví dụ bao gồm: bổ sung trước và/hoặc sau khi làm đông DNaza (Spitzer et al., 1980, Cancer 45:3075-3085), dextran và xitrat khối lượng phân tử thấp, tinh bột hydroxyetyl (Stiff et al., 1983, Cryobiology 20:17-24), v.v. [0162] Như được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực

kỹ thuật, nếu chất bảo quản lạnh mà độc với người được sử dụng, thì nên được loại bỏ trước khi sử dụng điều trị. DMSO không có tính độc nghiêm trọng.

Các chất mang và các chế độ sử dụng tế bào làm ví dụ được mô tả tại trang 14-15 của Công bố patent Mỹ số 2010/0183564. Các chất mang dược dụng bổ sung được mô tả trong Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21 st Edition, David B. Troy, ed., Lippicott Williams & Wilkins (2005).

Theo các phương án cụ thể, các tế bào có thể được thu hoạch từ môi trường nuôi cấy, và được rửa và được cô vào chất mang ở lượng có hiệu quả điều trị. Các chất mang làm ví dụ bao gồm nước muối, nước muối đệm, nước muối sinh lý, nước, dung dịch Hanks, dung dịch Ringer, Nonnosol-R (Abbott Labs), Plasma-Lyte A(R) (Baxter Laboratories, Inc., Morton Grove, IL), glyxerol, etanol, và tổ hợp của chúng.

Theo các phương án cụ thể, các chất mang có thể được bổ sung bằng albumin huyết thanh người (HSA) hoặc các thành phần huyết thanh người khác hoặc huyết thanh thai bò. Theo các phương án cụ thể, chất mang để truyền bao gồm nước muối đệm với 5% HAS hoặc dextroza. Chất đẳng trương bổ sung bao gồm các rượu đường polyhydric bao gồm rượu đường ba lần hoặc cao hơn, như glyxerin, erythritol, arabitol, xylitol, sorbitol, hoặc manitol.

Các chất mang có thể bao gồm chất đệm, như đệm xitrat, đệm suxinat, đệm tartrat, đệm fumarat, đệm gluconat, đệm oxalat, đệm lactat, đệm axetat, đệm phosphat, đệm histidin, và/hoặc muối trimetylamin.

Các chất làm ổn định dùng để chỉ nhóm rộng các tá dược có thể thay đổi về chức năng từ chất độn đến chất phụ gia mà giúp ngăn ngừa sự kết dính vào thành của vật chứa. Các chất làm ổn định điển hình có thể bao gồm các rượu đường polyhydric; các axit amin như arginin, lysin, glyxin, glutamin, asparagin, histidin, alanin, ornithin, L-leuxin, 2-phenylalanin, axit glutamic, và threonin; đường hữu cơ hoặc rượu đường, như lactoza, trehaloza, stachyoza, manitol, sorbitol, xylitol, ribitol, myoinisitol, galaxtitol, glyxerol, và các xyclitol như inositol; PEG; các polyme axit amin; chất khử chứa lưu huỳnh, như ure, glutathion, axit thioctic, natri thioglycolat, thioglyxerol, alpha-monothioglyxerol, và natri thiosulfat; các polypeptit khối lượng phân tử thấp (*tức là*, <10 gốc); protein như HSA, albumin huyết thanh bò, gelatin hoặc các globulin miễn

dịch; các polyme ưa nước, như polyvinylpyrolidon monosacarit, như xyloza, manoza, fructoza và glucoza; disacarit như lactoza, maltoza và sucroza; trisacarit như rafinoza, và polysacarit như dextran.

Khi cần thiết hoặc có lợi, các chế phẩm có thể bao gồm gây mê tại chỗ như lidocain để giảm đau tại vị trí tiêm.

Các chất bảo quản làm ví dụ bao gồm phenol, rượu benzylic, meta-cresol, metyl paraben, propyl paraben, octadexyldimetylbenzyl amoni clorua, benzalkoni halogenua, hexametoni clorua, alkyl paraben như metyl hoặc propyl paraben, catechol, resorxinol, xyclohexanol, và 3-pentanol.

Lượng có hiệu quả điều trị của các tế bào trong chế phẩm có thể lớn hơn 10^2 tế bào, lớn hơn 10^3 tế bào, lớn hơn 10^4 tế bào, lớn hơn 10^5 tế bào, lớn hơn 10^6 tế bào, lớn hơn 10^7 tế bào, lớn hơn 10^8 tế bào, lớn hơn 10^9 tế bào, lớn hơn 10^{10} tế bào, hoặc lớn hơn 10^{11} tế bào.

Trong các chế phẩm và dạng bào chế được bộc lộ ở đây, các tế bào thường ở thể tích một lít hoặc nhỏ hơn, 500 ml hoặc nhỏ hơn, 250 ml hoặc nhỏ hơn hoặc 100 ml hoặc nhỏ hơn. Do đó mật độ tế bào được sử dụng thường lớn hơn 10^4 tế bào/ml, 10^7 tế bào/ml hoặc 10^8 tế bào/ml.

Sáng chế cũng đề xuất chế phẩm axit nucleic (như các dược phẩm, cũng được chỉ ra là các dạng bào chế) bao gồm axit nucleic bất kỳ trong số các axit nucleic mã hóa caTCR và/hoặc CSR và/hoặc SSE được mô tả ở đây. Theo một số phương án, chế phẩm axit nucleic này là dược phẩm. Theo một số phương án, chế phẩm axit nucleic này còn bao gồm chất bất kỳ trong số chất tạo đẳng trương, tá dược, chất pha loãng, chất gây lắng, chất ổn định, chất đệm, và/hoặc chất bảo quản; và/hoặc chất dẫn có nước, như nước tinh khiết, dung dịch đường có nước, dung dịch đệm, nước muối sinh lý, dung dịch polyme có nước, hoặc nước không chứa ARNaza. Lượng các chất bổ trợ và chất dẫn chứa nước cần bổ sung này có thể được chọn thích hợp theo dạng sử dụng chế phẩm axit nucleic.

Các chế phẩm và dạng bào chế được bộc lộ ở đây có thể được bào chế để sử dụng bằng cách, ví dụ, tiêm, truyền, truyền dịch, hoặc thụt rửa. Các chế phẩm và dạng bào chế này có thể còn được bào chế để sử dụng cho tủy xương, trong tĩnh mạch, trong da,

trong động mạch, trong hạch, trong mạch bạch huyết, trong phúc mạc, trong thương tổn, trong tuyến tiền liệt, trong âm đạo, trong trực tràng, tại chỗ, nội tủy mạc, trong khối u, trong cơ, trong phế nang, và/hoặc tiêm dưới da.

Các chế phẩm được sử dụng *in vivo* phải là vô khuẩn. Điều này được thực hiện dễ dàng bằng cách, *ví dụ*, lọc qua màng lọc vô khuẩn.

Phương pháp điều trị sử dụng các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR

Các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR theo sáng chế có thể đước sử dụng cho các đối tượng (*ví dụ*, động vật có vú như người) để điều trị bệnh và/hoặc rối loạn liên kết với sự biểu hiện kháng nguyên đích (TA) (cũng được chỉ ra ở đây là bệnh hoặc rối loạn "dương tính kháng nguyên đích" hoặc "dương tính TA"), bao gồm, ví dụ, bệnh ung thư và bệnh nhiễm trùng (như nhiễm virut). Sáng chế do đó theo một số phương án đề xuất phương pháp điều trị bệnh dương tính với kháng nguyên đích (như bệnh ung thư hoặc bệnh nhiễm virut) ở đối tượng bao gồm bước sử dụng cho đối tượng này lượng hữu hiệu của chế phẩm (như dược phẩm) bao gồm các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR theo phương án bất kỳ trong số các phương án được mô tả ở đây. Theo một số phương án, bệnh ung thư này được chọn, ví dụ, từ nhóm bao gồm bệnh ung thư biểu mô tuyến thượng thận, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư cổ tử cung, bệnh ung thư biểu mô đường mật, bệnh ung thư trực kết tràng, bệnh ung thư thực quản, u nguyên bào đệm, u thần kinh đệm, bệnh ung thư biểu mô tế bào gan, bệnh ung thư vùng đầu cổ, bệnh ung thư thận, bệnh bạch cầu, bệnh ung thư phổi, u lympho, bệnh u melanin, u trung biểu mô, đa u tủy, bệnh ung thư tụy, u tủy thượng thận, u tương bào, u nguyên bào thần kinh, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh sacôm, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư tử cung và bệnh ung thư tuyến giáp. Theo một số phương án, bệnh nhiễm virut bị gây ra bởi virut được chọn, ví dụ, từ nhóm bao gồm Cytomegalovirut (CMV), virut Epstein-Barr (EBV), virut viêm gan B (HBV), virut herpes liên kết với bệnh sacôm Kaposi (KSHV), virut gây bệnh u nhú ở người (HPV), virut gây bệnh u mềm lây (MCV), virut bệnh bạch cầu tế bào T của người 1 (HTLV-1), HIV (virut gây suy giảm miễn dịch người), và virut viêm gan C (HCV).

Ví dụ, theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh liên kết với kháng nguyên đích (như bệnh ung thư hoặc nhiễm virut) ở đối tượng cần được điều

trị bao gồm bước sử dụng cho đối tượng này lượng hữu hiệu của chế phẩm bao gồm các tế bào miễn dịch (như các tế bào T hoặc tế bào giết tự nhiên) trình diện trên bề mặt của chúng a) caTCR bao gồm i) TCRD thứ nhất bao gồm TCR-TM thứ nhất thu được từ một trong số các miền xuyên màng của TCR và TCRD thứ hai bao gồm TCR-TM thứ hai thu được từ miền xuyên màng còn lại của TCR này, trong đó các TCRD thứ nhất và thứ hai này tạo thành TCRM mà có khả năng huy động ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR, và ii) môđun liên kết kháng nguyên mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích, trong đó môđun liên kết kháng nguyên này được liên kết với các TCRD thứ nhất và/hoặc thứ hai; và b) thụ thể truyền tín hiệu khảm (CSR) bao gồm i) miền liên kết phối tử mà liên kết đặc hiệu với phối tử đích, ii) miền xuyên màng, và iii) miền truyền tín hiệu nội bào mà có khả năng tạo ra tín hiệu đồng kích thích cho tế bào miễn dịch. Theo một số phương án, cả hai TCR-TM này đều xuất hiện tự nhiên. Theo một số phương án, ít nhất một trong số các TCR-TM này là không xuất hiện tự nhiên. Theo một số phương án, TCR này là αβ TCR và các TCR-TM thứ nhất và thứ hai thu được từ các miền xuyên màng tiểu đơn vị TCR α và β. Theo một số phương án, TCR này là γδ TCR và các TCR-TM thứ nhất và thứ hai này thu được từ các miền xuyên màng tiểu đơn vị TCR γ và δ. Theo một số phương án, TCRD thứ nhất này còn bao gồm peptit kết nối TCR thứ nhất hoặc mảnh của nó và/hoặc TCRD thứ hai này còn bao gồm peptit kết nối TCR thứ hai hoặc mảnh của nó. Theo một số phương án, peptit kết nối thứ nhất này bao gồm toàn bộ hoặc một phần của peptit kết nối của tiểu đơn vị TCR mà từ đó TCR-TM thứ nhất này thu được, hoặc biến thể của nó, và/hoặc peptit kết nối thứ hai này bao gồm toàn bộ hoặc một phần của peptit kết nối của tiểu đơn vị TCR mà từ đó TCR-TM thứ hai này thu được, hoặc biến thể của nó. Theo một số phương án, các peptit kết nối thứ nhất và thứ hai này được liên kết bằng liên kết disulfit. Theo một số phương án, TCRD thứ nhất còn này bao gồm miền nội bào TCR thứ nhất và/hoặc TCRD thứ hai này còn bao gồm miền nội bào TCR thứ hai. Theo một số phương án, miền nội bào TCR thứ nhất này bao gồm trình tự từ miền nội bào của tiểu đơn vị TCR mà từ đó TCR-TM thứ nhất thu được và/hoặc miền nội bào TCR thứ hai này bao gồm trình tự từ miền nội bào của tiểu đơn vị TCR mà từ đó TCR-TM thứ hai thu được. Theo một số phương án, TCRD thứ nhất này là mảnh của tiểu đơn vị TCR mà từ đó TCR-TM thứ nhất này thu được và/hoặc TCRD thứ hai này là mảnh của tiểu đơn vị TCR mà từ đó TCR-TM thứ hai thu đươc. Theo một số phương án, caTCR này còn bao gồm ít nhất một miền nội

bào kèm theo bao gồm trình tự tín hiệu đồng kích thích tế bào T (như từ CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, hoặc CD40). Theo một số phương án, caTCR này còn bao gồm môđun ổn định hóa bao gồm miền ổn định hóa thứ nhất và miền ổn định hóa thứ hai, trong đó miền ổn định hóa thứ nhất và thứ hai này có ái lực liên kết với nhau mà ổn định hóa caTCR. Theo một số phương án, các miền ổn định hóa thứ nhất và thứ hai này được liên kết bởi liên kết disulfit. Theo một số phương án, các miền ổn định hóa thứ nhất và thứ hai này bao gồm các miền kháng thể, như miền kháng thể C_H1 và C_L, hoặc các biến thể của nó. Theo một số phương án, TCRM này có khả năng huy động ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR được chọn từ nhóm bao gồm CD3δε, CD3γε, và ζζ. Theo một số phương án, TCRM này cho phép sự huy động được tăng cường của ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR khi so sánh với TCRM bao gồm các miền xuyên màng thụ thể tế bào T. Theo một số phương án, TCRM này thúc đẩy sự tạo thành phức hợp caTCR-CD3. Theo một số phương án, có môđun đệm giữa hai môđun hoặc miền caTCR bất kỳ. Theo một số phương án, môđun liên kết kháng nguyên này là gốc kháng thể. Theo một số phương án, gốc kháng thể này là Fab, Fab', (Fab')2, Fv, hoặc Fv đơn chuỗi (scFv). Theo một số phương án, môđun liên kết kháng nguyên này là đa đặc hiệu (*ví dụ*, đặc hiệu kép). Theo một số phương án, kháng nguyên đích này là kháng nguyên bề mặt tế bào. Theo một số phương án, kháng nguyên bề mặt tế bào này được chọn từ nhóm bao gồm protein, hydrat cacbon, và lipit. Theo một số phương án, kháng nguyên bề mặt tế bào này là kháng nguyên liên kết với bệnh, như kháng nguyên liên kết với khối u hoặc kháng nguyên được mã hóa bởi virut. Theo một số phương án, kháng nguyên bề mặt tế bào này là CD19, ROR1, ROR2, BCMA, GPRC5D, hoặc FCRL5. Theo một số phương án, kháng nguyên đích này là phức hợp peptit/MHC trình diện bề mặt. Theo một số phương án, phức hợp peptit/MHC này bao gồm peptit thu được từ kháng nguyên liên kết với bệnh (như kháng nguyên liên kết với khối u hoặc kháng nguyên được mã hóa bởi virut) và protein MHC. Theo một số phương án, phức hợp peptit/MHC bao gồm peptit và protein MHC, trong đó peptit này thu được từ protein được chọn từ nhóm bao gồm WT-1, AFP, HPV16-E7, NY-ESO-1, PRAME, EBV-LMP2A, và PSA. Theo một số phương án, protein MHC này là protein MHC lớp I. Theo một số phương án, protein MHC lớp I này là HLA-A. Theo một số phương án, HLA-A này là HLA-A02. Theo một số phương án, HLA-A02 này là HLA-A*02:01. Theo một số phương án, phối tử đích của CSR này là kháng nguyên bề mặt tế bào. Theo

một số phương án, phối tử đích này là phức hợp peptit/MHC. Theo một số phương án, phối tử đích của CSR này và kháng nguyên đích của caTCR này như nhau. Theo một số phương án, phối tử đích và kháng nguyên đích là khác nhau. Theo một số phương án, phối tử đích này là phối tử liên kết với bệnh. Theo một số phương án, phối tử đích này là phối tử liên kết với bệnh ung thư. Theo một số phương án, phối tử liên kết với bệnh ung thư này là, ví dụ, CD19, CD20, CD22, CD47, IL4, GPC-3, ROR1, ROR2, BCMA, GPRC5D, hoặc FCRL5. Theo một số phương án, phối tử liên kết với bệnh ung thư này là phức hợp peptit/MHC bao gồm peptit thu được từ protein bao gồm WT-1, AFP, HPV16-E7, NY-ESO-1, PRAME, EBV-LMP2A, và PSA. Theo một số phương án, phối tử đích này là phối tử liên kết với virut. Theo một số phương án, phối tử đích này là phân tử điểm kiểm tra miễn dịch. Theo một số phương án, phân tử điểm kiểm tra miễn dịch này bao gồm PD-L1, PD-L2, CD80, CD86, ICOSL, B7-H3, B7-H4, HVEM, 4-1BBL, OX40L, CD70, CD40, và GAL9. Theo một số phương án, phối tử đích này là phân tử chết theo chương trình. Theo một số phương án, phân tử chết theo chương trình này bao gồm FasL, FasR, TNFR1, và TNFR2. Theo một số phương án, miền liên kết phối tử này là gốc kháng thể. Theo một số phương án, miền liên kết phối tử gốc kháng thể là Fab, Fab', (Fab')2, Fv, hoặc Fv đơn chuỗi (scFv). Theo một số phương án, miền liên kết phối tử này là (hoặc thu được từ) toàn bộ hoặc một phần của miền ngoại bào của thụ thể cho phối tử đích. Theo một số phương án, thụ thể này bao gồm, ví dụ, FasR, TNFR1, TNFR2, PD-1, CD28, CTLA-4, ICOS, BTLA, KIR, LAG-3, 4-1BB, OX40, CD27, và TIM-3. Theo một số phương án, miền xuyên màng của CSR này bao gồm miền xuyên màng thu được từ, ví dụ, CD28, CD3ε, CD3ζ, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, hoặc CD154. Theo một số phương án, miền truyền tín hiệu đồng kích thích của CSR này bao gồm, về cơ bản gồm, hoặc gồm toàn bộ hoặc một phần của miền nội bào của phân tử đồng kích thích tế bào miễn dịch bao gồm, ví dụ, CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, ICOS, kháng nguyên liên kết với chức năng lympho bào 1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, phối tử liên kết đặc hiệu với CD83, và loại tương tự. Theo một số phương án, CSR này còn bao gồm miền đệm giữa miền bất kỳ trong số miền liên kết phối tử, miền xuyên màng, và miền truyền tín hiệu đồng kích thích. Theo một số phương án, miền đệm này bao gồm cầu nối peptit kết nối hai miền CSR. Theo một số phương án, tế bào miễn dịch này là tế bào γδ T. Theo một số phương án, tế bào miễn

dịch này tế bào αβ T được cải biến để phong bế hoặc làm giảm sự biểu hiện của các chuỗi TCR α và/hoặc β. Theo một số phương án, tế bào miễn dịch này được chọn từ nhóm bao gồm tế bào T gây độc tế bào, tế bào T trợ giúp, tế bào T giết tự nhiên, và tế bào T ức chế.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh liên kết với kháng nguyên đích (như bệnh ung thư hoặc nhiễm virut) ở đối tượng cần được điều trị bao gồm bước sử dụng cho đối tượng này lượng hữu hiệu của chế phẩm bao gồm các tế bào miễn dịch (như các tế bào T hoặc tế bào giết tự nhiên) trình diện trên bề mặt của chúng a) caTCR mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích bao gồm i) TCRD thứ nhất bao gồm TCR-TM thứ nhất thu được từ một trong số các miền xuyên màng của αβ TCR xuất hiện tự nhiên và TCRD thứ hai bao gồm TCR-TM thứ hai thu được từ miền xuyên màng còn lại của αβ TCR xuất hiện tự nhiên này, trong đó các TCRD thứ nhất và thứ hai này tạo thành TCRM mà có khả năng huy động ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR, và ii) môđun liên kết kháng nguyên mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích, trong đó môđun liên kết kháng nguyên này được liên kết với các TCRD thứ nhất và/hoặc thứ hai; và b) thụ thể truyền tín hiệu khảm (CSR) bao gồm i) miền liên kết phối tử mà liên kết đặc hiệu với phối tử đích, ii) miền xuyên màng, và iii) miền truyền tín hiệu nội bào mà có khả năng tạo ra tín hiệu đồng kích thích cho tế bào miễn dịch.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh liên kết với kháng nguyên đích (như bệnh ung thư hoặc nhiễm virut) ở đối tượng cần được điều trị bao gồm bước sử dụng cho đối tượng này lượng hữu hiệu của chế phẩm bao gồm các tế bào miễn dịch (như các tế bào T hoặc tế bào giết tự nhiên) trình diện trên bề mặt của chúng a) caTCR mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích bao gồm i) TCRD thứ nhất bao gồm TCR-TM thứ nhất thu được từ một trong số các miền xuyên màng của γδ TCR xuất hiện tự nhiên và TCRD thứ hai bao gồm TCR-TM thứ hai thu được từ miền xuyên màng còn lại của γδ TCR xuất hiện tự nhiên này, trong đó các TCRD thứ nhất và thứ hai này tạo thành TCRM mà có khả năng huy động ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR, và ii) môđun liên kết kháng nguyên mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích, trong đó môđun liên kết kháng nguyên này được liên kết với các TCRD thứ nhất và/hoặc thứ hai; và b) thụ thể truyền tín hiệu khảm (CSR) bao gồm i) miền liên

kết phối tử mà liên kết đặc hiệu với phối tử đích, ii) miền xuyên màng, và iii) miền truyền tín hiệu nội bào mà có khả năng tạo ra tín hiệu đồng kích thích cho tế bào miễn dịch.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh liên kết với kháng nguyên đích (như bệnh ung thư hoặc nhiễm virut) ở đối tượng cần được điều trị bao gồm bước sử dụng cho đối tượng này lượng hữu hiệu của chế phẩm bao gồm các tế bào miễn dịch (như các tế bào T hoặc tế bào giết tự nhiên) trình diện trên bề mặt của chúng a) caTCR mà liên kết đặc hiệu kháng nguyên đích bao gồm i) TCRD thứ nhất bao gồm TCR-TM thứ nhất thu được từ trình tự axit amin của SEQ ID NO: 5 và TCRD thứ hai bao gồm TCR-TM thứ hai thu được từ trình tự axit amin của SEQ ID NO: 6, trong đó các TCRD thứ nhất và thứ hai này tạo thành TCRM mà có khả năng huy động ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR; và b) môđun liên kết kháng nguyên mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích, trong đó môđun liên kết kháng nguyên được liên kết với các TCRD thứ nhất và/hoặc thứ hai; và b) thụ thể truyền tín hiệu khảm (CSR) bao gồm i) miền liên kết phối tử mà liên kết đặc hiệu với phối tử đích, ii) miền xuyên màng, và iii) miền truyền tín hiệu nội bào mà có khả năng tạo ra tín hiệu đồng kích thích cho tế bào miễn dịch. Theo một số phương án, ít nhất một trong số các TCR-TM bao gồm một hoặc nhiều (như 2, 3, 4, 5, hoặc nhiều hơn) sự thế axit amin so với trình tự axit amin mà từ đó nó thu được. Theo một số phương án, mỗi loại trong số các TCR-TM này bao gồm, một cách độc lập với nhau, một hoặc nhiều (như 2, 3, 4, 5, hoặc nhiều hơn) sự thế axit amin so với trình tự axit amin mà từ đó nó thu được. Theo một số phương án, TCR-TM thứ nhất và/hoặc TCR-TM thứ hai này mỗi loại bao gồm, một cách độc lập với nhau, không nhiều hơn 5 sự thế axit amin so với các trình tự axit amin mà từ đó chúng thu được. Theo một số phương án, ít nhất một trong số các TCR-TM này bao gồm sự thế axit amin đơn so với trình tự axit amin mà từ đó nó thu được. Theo một số phương án, mỗi loại trong số các TCR-TM này bao gồm sự thế axit amin đơn so với trình tự axit amin mà từ đó nó thu được. Theo một số phương án, ít nhất một trong số các axit amin được thế này trong TCR-TM thứ nhất được định vị sao cho ở caTCR này nó có thể tương tác với ít nhất một trong số các axit amin được thế ở TCR-TM thứ hai.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh liên kết với kháng nguyên đích (như bệnh ung thư hoặc nhiễm virut) ở đối tượng cần được điều trị bao gồm bước sử dụng cho đối tượng này lượng hữu hiệucủa chế phẩm bao gồm các tế bào miễn dịch (như các tế bào T hoặc tế bào giết tự nhiên) trình diện trên bề mặt của chúng a) caTCR mà liên kết đặc hiệu kháng nguyên đích bao gồm i) TCRD thứ nhất bao gồm TCR-TM thứ nhất thu được từ trình tự axit amin của SEQ ID NO: 7 và TCRD thứ hai bao gồm TCR-TM thứ hai thu được từ trình tự axit amin của SEQ ID NO: 8, trong đó các TCRD thứ nhất và thứ hai này tạo thành TCRM mà có khả năng huy động ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR; và b) môđun liên kết kháng nguyên mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích, trong đó môđun liên kết kháng nguyên được liên kết với các TCRD thứ nhất và/hoặc thứ hai; và b) thụ thể truyền tín hiệu khảm (CSR) bao gồm i) miền liên kết phối tử mà liên kết đặc hiệu với phối tử đích, ii) miền xuyên màng, và iii) miền truyền tín hiệu nội bào mà có khả năng tạo ra tín hiệu đồng kích thích cho tế bào miễn dịch. Theo một số phương án, ít nhất một trong số các TCR-TM bao gồm một hoặc nhiều (như 2, 3, 4, 5, hoặc nhiều hơn) sự thế axit amin so với trình tự axit amin mà từ đó nó thu được. Theo một số phương án, mỗi loại trong số các TCR-TM này bao gồm, một cách độc lập với nhau, một hoặc nhiều (như 2, 3, 4, 5, hoặc nhiều hơn) sự thế axit amin so với trình tự axit amin mà từ đó nó thu được. Theo một số phương án, TCR-TM thứ nhất và/hoặc TCR-TM thứ hai này mỗi loại bao gồm, một cách độc lập với nhau, không nhiều hơn 5 sự thế axit amin so với các trình tự axit amin mà từ đó chúng thu được. Theo một số phương án, ít nhất một trong số các TCR-TM này bao gồm sự thế axit amin đơn so với trình tự axit amin mà từ đó nó thu được. Theo một số phương án, mỗi loại trong số các TCR-TM này bao gồm sự thế axit amin đơn so với trình tự axit amin mà từ đó nó thu được. Theo một số phương án, ít nhất một trong số các axit amin được thế này trong TCR-TM thứ nhất được định vị sao cho ở caTCR này nó có thể tương tác với ít nhất một trong số các axit amin được thế ở TCR-TM thứ hai. Theo một số phương án, TCR-TM thứ nhất và TCR-TM thứ hai này được chọn theo loại bất kỳ trong số các caTCR được liệt kê trong bảng 2. Theo một số phương án, các miền CSR này được chọn theo loại bất kỳ trong số các CSR được liệt kê trong bảng 3.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh liên kết với kháng nguyên đích (như bệnh ung thư hoặc nhiễm virut) ở đối tượng cần được điều trị

bao gồm bước sử dụng cho đối tượng này lượng hữu hiệucủa chế phẩm bao gồm các tế bào miễn dịch (như các tế bào T hoặc tế bào giết tự nhiên) trình diện trên bề mặt của chúng a) caTCR mà liên kết đặc hiệu kháng nguyên đích bao gồm i) TCRD thứ nhất bao gồm TCR-TM thứ nhất có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 10 và TCRD thứ hai bao gồm TCR-TM thứ hai có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 16, trong đó các TCRD thứ nhất và thứ hai này tạo thành TCRM mà có khả năng huy động ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR; và b) môđun liên kết kháng nguyên mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích, trong đó môđun liên kết kháng nguyên được liên kết với các TCRD thứ nhất và/hoặc thứ hai; và b) thụ thể truyền tín hiệu khảm (CSR) bao gồm i) miền liên kết phối tử mà liên kết đặc hiệu với phối tử đích, ii) miền xuyên màng, và iii) mảnh của phân tử đồng kích thích tế bào miễn dịch (fCSM) bao gồm miền truyền tín hiệu nội bào mà có khả năng tạo ra tín hiệu đồng kích thích cho tế bào miễn dịch, trong đó mảnh phân tử đồng kích thích này bao gồm trình tự axit amin của trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 51-56 và 86-89. Theo một số phương án, miền xuyên màng CSR này thu được từ CD8. Theo một số phương án, CSR này bao gồm mảnh của protein xuyên màng (fTMP), trong đó mảnh protein xuyên màng này bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 57. Theo một số phương án, CSR này bao gồm peptit đệm theo miền liên kết phối tử. Theo một số phương án, peptit đệm này bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 103 hoặc 104. Theo một số phương án, các miền CSR này được chọn theo loại bất kỳ trong số các CSR được liệt kê trong bảng 3. Theo một số phương án, kháng nguyên đích này là CD19. Theo một số phương án, phối tử đích này là CD19. Theo một số phương án, môđun liên kết kháng nguyên caTCR này là gốc liên kết kháng nguyên giống Fab bao gồm miền V_H bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 58 và miền V_L bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 59. Theo một số phương án, kháng nguyên đích này là CD19 và phối tử đích này là CD19. Theo một số phương án, miền liên kết phối tử CSR là scFv bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 77. Theo một số phương án, kháng nguyên đích này là CD19 và phối tử đích này là CD20. Theo một số phương án, miền liên kết phối tử CSR là scFv bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 78. Theo một số phương án, kháng nguyên đích này là phức hợp peptit AFP/MHC (*ví dụ*, phức hợp AFP158/HLA-A02) và phối tử đích là GPC3. Theo một số phương án, môđun liên kết kháng nguyên caTCR này là gốc liên kết kháng nguyên giống Fab bao gồm miền V_H bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 62 và miền V_L bao gồm trình

tự axit amin SEQ ID NO: 63. Theo một số phương án, miền liên kết phối tử CSR là scFv bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 79.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh liên kết với CD19 (như bệnh ung thư) ở đối tượng cần được điều trị bao gồm bước sử dụng cho đối tượng này lượng hữu hiệucủa chế phẩm bao gồm các tế bào miễn dịch (như các tế bào T hoặc tế bào giết tự nhiên) trình diện trên bề mặt của chúng a) caTCR mà liên kết đặc hiệu CD19 bao gồm i) TCRD thứ nhất bao gồm TCR-TM thứ nhất có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 10 và TCRD thứ hai bao gồm TCR-TM thứ hai có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 16, trong đó các TCRD thứ nhất và thứ hai này tạo thành TCRM mà có khả năng huy động ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR; và b) môđun liên kết kháng nguyên giống Fab bao gồm chuỗi Fab thứ nhất bao gồm miền V_H bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 58 và chuỗi Fab thứ hai bao gồm miền V_L bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 59, trong đó chuỗi Fab thứ nhất được liên kết với một trong số TCRD thứ nhất và thứ hai, và chuỗi Fab thứ hai được liên kết với TCRD còn lại; và b) thụ thể truyền tín hiệu khảm (CSR) bao gồm i) scFv mà liên kết đặc hiệu CD19 bao gồm miền V_H bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 58 và miền V_L bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 59, ii) miền xuyên màng, và iii) mảnh của phân tử đồng kích thích tế bào miễn dịch (fCSM) bao gồm miền truyền tín hiệu nội bào mà có khả năng tạo ra tín hiệu đồng kích thích cho tế bào miễn dịch, trong đó mảnh phân tử đồng kích thích này bao gồm trình tự axit amin của trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 51-56 và 86-89. Theo một số phương án, miền xuyên màng CSR này thu được từ CD8. Theo một số phương án, CSR này bao gồm mảnh của protein xuyên màng (fTMP), trong đó mảnh protein xuyên màng này bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 57. Theo một số phương án, CSR này bao gồm peptit đệm theo miền liên kết phối tử. Theo một số phương án, peptit đệm này bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 103 hoặc 104. Theo một số phương án, các miền CSR này được chọn theo loại bất kỳ trong số các CSR được liệt kê trong bảng 3. Theo một số phương án, miền liên kết phối tử CSR là scFv bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 77. Theo một số phương án, bệnh liên kết với CD19 này là bệnh bạch cầu, *ví dụ*, bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp (ALL).

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh liên kết với CD19/CD20 (như bệnh ung thư) ở đối tượng cần được điều trị bao gồm bước sử dụng cho đối tượng này lượng hữu hiệu của chế phẩm bao gồm các tế bào miễn dịch (như các tế bào T hoặc tế bào giết tự nhiên) trình diện trên bề mặt của chúng a) caTCR mà liên kết đặc hiệu CD19 bao gồm i) TCRD thứ nhất bao gồm TCR-TM thứ nhất có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 10 và TCRD thứ hai bao gồm TCR-TM thứ hai có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 16, trong đó các TCRD thứ nhất và thứ hai này tạo thành TCRM mà có khả năng huy động ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR; và b) môđun liên kết kháng nguyên giống Fab bao gồm chuỗi Fab thứ nhất bao gồm miền V_H bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 58 và chuỗi Fab thứ hai bao gồm miền V_L bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 59, trong đó chuỗi Fab thứ nhất được liên kết với một trong số TCRD thứ nhất và thứ hai, và chuỗi Fab thứ hai được liên kết với TCRD còn lại; và b) thụ thể truyền tín hiệu khảm (CSR) bao gồm i) scFv mà liên kết đặc hiệu CD20 bao gồm miền V_H bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 60 và miền V_L bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 61, ii) miền xuyên màng, và iii) mảnh của phân tử đồng kích thích tế bào miễn dịch (fCSM) bao gồm miền truyền tín hiệu nội bào mà có khả năng tạo ra tín hiệu đồng kích thích cho tế bào miễn dịch, trong đó mảnh phân tử đồng kích thích này bao gồm trình tự axit amin của trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 51-56 và 86-89. Theo một số phương án, miền xuyên màng CSR này thu được từ CD8. Theo một số phương án, CSR này bao gồm mảnh của protein xuyên màng (fTMP), trong đó mảnh protein xuyên màng này bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 57. Theo một số phương án, CSR này bao gồm peptit đệm theo miền liên kết phối tử. Theo một số phương án, peptit đệm này bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 103 hoặc 104. Theo một số phương án, các miền CSR này được chọn theo loại bất kỳ trong số các CSR được liệt kê trong bảng 3. Theo một số phương án, miền liên kết phối tử CSR là scFv bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 81.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh liên kết với AFP/GPC3 (như bệnh ung thư, *ví dụ*, bệnh ung thư gan) ở đối tượng cần được điều trị bao gồm bước sử dụng cho đối tượng này lượng hữu hiệu của chế phẩm bao gồm các tế bào miễn dịch (như các tế bào T hoặc tế bào giết tự nhiên) trình diện trên bề mặt của chúng a) caTCR mà liên kết đặc hiệu với phức hợp peptit AFP/MHC (*ví dụ*, phức hợp

AFP158/HLA-A02) bao gồm i) TCRD thứ nhất bao gồm TCR-TM thứ nhất có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 10 và TCRD thứ hai bao gồm TCR-TM thứ hai có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 16, trong đó các TCRD thứ nhất và thứ hai này tạo thành TCRM mà có khả năng huy động ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR; và b) môđun liên kết kháng nguyên giống Fab bao gồm chuỗi Fab thứ nhất bao gồm miền V_H bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 62 và chuỗi Fab thứ hai bao gồm miền V_L bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 63, trong đó chuỗi Fab thứ nhất được liên kết với một trong số TCRD thứ nhất và thứ hai, và chuỗi Fab thứ hai được liên kết với TCRD còn lại; và b) thụ thể truyền tín hiệu khảm (CSR) bao gồm i) scFv mà liên kết đặc hiệu GPC3 bao gồm miền V_H bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 64 và miền V_L bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 65, ii) miền xuyên màng, và iii) mảnh của phân tử đồng kích thích tế bào miễn dịch (fCSM) bao gồm miền truyền tín hiệu nội bào mà có khả năng tạo ra tín hiệu đồng kích thích cho tế bào miễn dịch, trong đó mảnh phân tử đồng kích thích này bao gồm trình tự axit amin của trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 51-56 và 86-89. Theo một số phương án, miền xuyên màng CSR này thu được từ CD8. Theo một số phương án, CSR này bao gồm mảnh của protein xuyên màng (fTMP), trong đó mảnh protein xuyên màng này bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 57. Theo một số phương án, CSR này bao gồm peptit đệm theo miền liên kết phối tử. Theo một số phương án, peptit đệm này bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 103 hoặc 104. Theo một số phương án, các miền CSR này được chọn theo loại bất kỳ trong số các CSR được liệt kê trong bảng 3. Theo một số phương án, miền liên kết phối tử CSR là scFv bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 82.

Cũng được dự tính là phương pháp điều trị bệnh liên kết với kháng nguyên đích ở đối tượng cần được điều trị bao gồm bước sử dụng cho đối tượng này chế phẩm bao gồm nhiều tế bào miễn dịch biểu hiện các caTCR khác nhau và/hoặc các CSR khác nhau. Do đó, theo một số phương án, theo phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp điều trị bệnh liên kết với kháng nguyên đích ở đối tượng được mô tả ở đây, chế phẩm này là chế phẩm tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR khác loại như được mô tả ở đây.

Theo một số phương án, đối tượng này là động vật có vú (*ví dụ*, người, linh trưởng không phải người, chuột cống, chuột nhắt, bò, ngựa, lợn, cừu, dê, chó, mèo, v.v.). Theo một số phương án, đối tượng này là người. Theo một số phương án, đối tượng này là

bệnh nhân lâm sàng, tình nguyện viên thử nghiệm lâm sàng, động vật thí nghiệm, v.v. Theo một số phương án, đối tượng này ở độ tuổi nhỏ hơn khoảng 60 tuổi (bao gồm ví dụ ở độ tuổi nhỏ hơn khoảng giá trị bất kỳ trong số 50, 40, 30, 25, 20, 15, hoặc 10 tuổi). Theo một số phương án, đối tượng này ở độ tuổi lớn hơn khoảng 60 tuổi (bao gồm ví dụ ở độ tuổi lớn hơn khoảng giá trị bất kỳ trong số 70, 80, 90, hoặc 100 tuổi). Theo một số phương án, đối tượng này được chẩn đoán có thiên hướng về mặt môi trường hoặc di truyền bị một hoặc nhiều bệnh hoặc rối loạn được mô tả ở đây (như bệnh ung thư hoặc nhiễm virut). Theo một số phương án, đối tượng này có một hoặc nhiều yếu tố nguy cơ liên kết với một hoặc nhiều bệnh hoặc rối loạn được mô tả ở đây.

Theo một số phương án, chế phẩm tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR theo sáng chế được sử dụng kết hợp với chất thứ hai, thứ ba, hoặc thứ tư (bao gồm, *ví dụ,* chất chống ung thư, chất ức chế sinh trưởng, chất gây độc tế bào, hoặc chất hóa trị liệu) để điều trị bệnh hoặc rối loạn liên quan đến sự biểu hiện kháng nguyên đích. Theo một số phương án, chế phẩm tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR này được sử dụng kết hợp với xytokin (như IL-2). Theo một số phương án, chế phẩm tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR này được sử dụng kết hợp với chất mà làm tăng sự biểu hiện của protein MHC và/hoặc tăng cường sự trình diện bề mặt của các peptit bởi các protein MHC. Theo một số phương án, chất này bao gồm, ví dụ, chất chủ vận thụ thể IFN, chất ức chế Hsp90, chất tăng cường sự biểu hiện p53, và chất hóa trị liệu. Theo một số phương án, chất này là chất chủ vận thụ thể IFN bao gồm, ví dụ, IFNγ, IFNβ, và IFNα. Theo một số phương án, chất này là chất ức chế Hsp90 bao gồm, ví dụ, tanespimyxin (17-AAG), alvespimyxin (17-DMAG), retaspimyxin (IPI-504), IPI-493, CNF2024/BIIB021, MPC-3100, Debio 0932 (CUDC-305), PU-H71, Ganetespib (STA-9090), NVP-AUY922 (VER-52269), HSP990, KW-2478, AT13387, SNX-5422, DS-2248, và XL888. Theo một số phương án, chất này là chất tăng cường sự biểu hiện p53 bao gồm, ví dụ, 5-florouraxil và nutlin-3. Theo một số phương án, chất này là chất hóa trị liệu bao gồm, ví dụ, topotecan, etoposit, cisplatin, paclitaxel, và vinblastin.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh dương tính kháng nguyên đích ở đối tượng cần được điều trị bao gồm bước sử dụng cho đối tượng này chế phẩm tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR theo phương án bất kỳ trong số các phương án được mô tả ở đây kết hợp với xytokin (như IL-2). Theo một số phương án,

chế phẩm tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR này và xytokin được sử dụng đồng thời. Theo một số phương án, chế phẩm tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR này và xytokin được sử dụng liên tiếp.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh dương tính kháng nguyên đích ở đối tượng cần được điều trị, trong đó các tế bào biểu hiện kháng nguyên đích không trình diện bình thường, hoặc trình diện ở mức thấp, phức hợp bao gồm kháng nguyên đích và protein MHC lớp I trên bề mặt của chúng, phương pháp này bao gồm bước sử dụng cho đối tượng này chế phẩm tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR theo phương án bất kỳ trong số các phương án được mô tả ở đây kết hợp với chất mà làm tăng sự biểu hiện của protein MHC lớp I và/hoặc tăng cường sự trình diện bề mặt của kháng nguyên đích bởi protein MHC lớp I. Theo một số phương án, chất này bao gồm, ví dụ, chất chủ vận thụ thể IFN, chất ức chế Hsp90, chất tăng cường sự biểu hiện p53, và chất hóa trị liệu. Theo một số phương án, chất này là chất chủ vận thụ thể IFN bao gồm, ví dụ, IFNγ, IFNβ, và IFNα. Theo một số phương án, chất này là chất ức chế Hsp90 bao gồm, ví dụ, tanespimyxin (17-AAG), alvespimyxin (17-DMAG), retaspimyxin (IPI-504), IPI-493, CNF2024/BIIB021, MPC-3100, Debio 0932 (CUDC-305), PU-H71, Ganetespib (STA-9090), NVP-AUY922 (VER-52269), HSP990, KW-2478, AT13387, SNX-5422, DS-2248, và XL888. Theo một số phương án, chất này là chất tăng cường sự biểu hiện p53 bao gồm, ví dụ, 5-florouraxil và nutlin-3. Theo một số phương án, chất này là chất hóa trị liệu bao gồm, ví dụ, topotecan, etoposit, cisplatin, paclitaxel, và vinblastin. Theo một số phương án, chế phẩm tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR này và chất này được sử dụng đồng thời. Theo một số phương án, chế phẩm tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR này và chất này được sử dụng liên tiếp.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh liên kết với kháng nguyên đích (như bệnh ung thư hoặc nhiễm virut) ở đối tượng cần được điều trị bao gồm bước sử dụng cho đối tượng này lượng hữu hiệu của chế phẩm bao gồm axit nucleic mã hóa caTCR và CSR theo phương án bất kỳ trong số các phương án được mô tả ở đây. Các phương pháp phân phối gen là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Xem, *ví dụ*, Patent Mỹ số 5,399,346, 5,580,859, 5,589,466, được kết hợp toàn bộ ở đây bằng cách viện dẫn.

Việc điều trị bệnh ung thư có thể được đánh giá, ví dụ, bởi sự thoái lui khối u, sự co lại khối lượng hoặc kích thước khối u, thời gian tiến triển, thời gian sống sót, sự sống sót không tiến triển, tỷ lệ đáp ứng tổng thể, thời gian đáp ứng, chất lượng cuộc sống, sự biểu hiện và/hoặc hoạt tính protein. Các phương pháp để xác định hiệu quả của điều trị có thể được sử dụng, bao gồm ví dụ, phương pháp đo sự đáp ứng thông qua chụp X quang.

Theo một số phương án, hiệu quả điều trị được đo dưới dạng ức chế sinh trưởng khối u phần trăm (% TGI), được tính bằng cách sử dụng phương trình 100-(T/C x 100), trong đó T là thể tích khối u tương đối trung bình của khối u được điều trị, và C là thể tích khối u tương đối trung bình của khối u không được xử lý. Theo một số phương án, %TGI này là khoảng 10%, khoảng 20%, khoảng 30%, khoảng 40%, khoảng 50%, khoảng 60%, khoảng 70%, khoảng 80%, khoảng 90%, khoảng 91%, khoảng 92%, khoảng 93%, khoảng 94% , khoảng 95%, hoặc lớn hơn 95%.

Điều trị nhiễm virut có thể được đánh giá, ví dụ, bởi sự nạp virut, thời gian sống sót, chất lượng cuộc sống, sự biểu hiện và/hoặc hoạt tính protein.

Các loại bệnh

Các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR theo một số phương án có thể hữu dụng để điều trị bệnh ung thư liên kết với kháng nguyên đích. Các bệnh ung thư này có thể được điều trị bằng cách sử dụng phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp được mô tả ở đây bao gồm các khối u mà không được mạch hóa, hoặc về cơ bản chưa được mạch hóa, cũng như các khối u đã mạch hóa. Các khối u này có thể bao gồm các khối u không phải khối u rắn (như các khối u huyết học, ví dụ, bệnh bạch cầu và u lympho) hoặc có thể bao gồm các khối u rắn. Các loại bệnh ung thư cần được điều trị bằng các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR theo sáng chế bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, bệnh ung thư biểu mô, u nguyên bào, và bệnh sacôm, và bệnh bạch cầu hoặc bệnh di căn lympho cụ thể, các khối u lành tính và di căn, và các bệnh ác tính *ví dụ*, bệnh sacôm, bệnh ung thư biểu mô, và bệnh u melanin. Các khối u/bệnh ung thư người lớn và các khối u/bệnh ung thư ở trẻ em cũng được bao gồm.

Các bệnh ung thư huyết là bệnh ung thư của máu hoặc tủy xương. Các ví dụ về bệnh ung thư huyết (hoặc tạo huyết) bao gồm bệnh bạch cầu, bao gồm bệnh bạch cầu

cấp tính (như bệnh bạch cầu lympho bào cấp tính, bệnh bạch cầu tủy bào cấp tính, bệnh bạch cầu sinh tủy cấp tính và bệnh bạch cầu nguyên bào tủy, tiền bào tủy, đơn bào tủy, đơn bào và bệnh bạch cầu phôi), bệnh bạch cầu mạn tính (như bệnh bạch cầu tủy bào mạn tính (bạch cầu hạt), bệnh bạch cầu sinh tủy mạn tính, và bệnh bạch cầu lympho bào mạn tính), bệnh đa hồng cầu, u lympho, bệnh Hodgkin, u lympho không phải Hodgkin (các dạng không đau và cấp độ cao), đa u tủy, u tương bào, bệnh tăng globulin đại phân tử Waldenstrom, bệnh chuỗi nặng, hội chứng loạn sản tủy, bệnh bạch cầu tế bào lông và loạn sản tủy.

Các khối u rắn là các khối bất thường của mô mà luôn không chứa u lang hoặc các vùng chất lỏng. Các khối u rắn có thể là lành tính hoặc ác tính. Các loại khối u rắn khác nhau được đặt tên cho loại tế bào mà tạo thành chúng (như bệnh sacôm, bệnh ung thư biểu mô, và u lympho). Các ví dụ về khối u rắn, như bệnh sacôm và bệnh ung thư biểu mô, bao gồm bệnh ung thư biểu mô tuyến thượng thận, bệnh ung thư đường mật, sacôm xơ, sacôm niêm, sacôm mỡ, sacôm sụn, sacôm xương, và các bệnh sacôm khác, u màng hoạt dịch, u trung biểu mô, khối u Ewing, sacôm cơ trơn, sacôm cơ vân, bệnh ung thư biểu mô ruột, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ác tính lympho, bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư biểu mô tế bào gan, bệnh ung thư biểu mô tế bào vảy, bệnh ung thư biểu mô tế bào đáy, bệnh ung thư biểu mô tuyến, bệnh ung thư biểu mô tuyến nước bọt, bệnh ung thư tuyến giáp (*ví dụ*, bệnh ung thư biểu mô tuyến giáp tủy và bệnh ung thư biểu mô tuyến giáp nhú), u tủy tuyến thượng thận, bệnh ung thư biểu mô tuyến bã nhờn, bệnh ung thư biểu mô nhú, bệnh ung thư biểu mô tuyến nhú, bệnh ung thư biểu mô tủy, bệnh ung thư biểu mô phế quản, bệnh ung thư biểu mô tế bào thận, ung thư gan, bệnh ung thư biểu mô túi mật, bệnh ung thư biểu mô tử cung, khối u Wilms, bệnh ung thư cổ tử cung (*ví dụ*, bệnh ung thư biểu mô cổ tử cung và bệnh loạn sản cổ tử cung tiền xâm lấn), bệnh ung thư trực kết tràng, bệnh ung thư của hậu môn, ống hậu môn, hoặc trực tràng-hậu môn, bệnh ung thư âm đạo, bệnh ung thư âm hộ (*ví dụ*, bệnh ung thư biểu mô tế bào vảy, bệnh ung thư biểu mô trong biểu mô, bệnh ung thư biểu mô tuyến, và sacôm xơ), bệnh ung thư dương vật, bệnh ung thư miệng hầu, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư đầu (*ví dụ*, bệnh ung thư biểu mô tế bào vảy), bệnh ung thư cổ (*ví dụ*, bệnh ung thư biểu mô tế bào vảy), bệnh ung thư tinh hoàn (*ví dụ*, u tinh, u quái, bệnh ung thư biểu mô

phôi, bệnh ung thư biểu mô quái, bệnh ung thư biểu mô tử cung, bệnh sacôm, khối u tế bào Leydig, u xơ, u xơ tuyến vú, các khối u dạ tuyến, và u mỡ), bệnh ung thư biểu mô bàng quang, bệnh ung thư thận, bệnh u melanin, bệnh ung thư tử cung (*ví dụ*, bệnh ung thư biểu mô nội mạc tử cung), bệnh ung thư đường tiết niệu (*ví dụ*, bệnh ung thư biểu mô tế bào vảy, bệnh ung thư biểu mô tế bào chuyển tiếp, bệnh ung thư biểu mô tuyến, bệnh ung thư niệu quản, và bệnh ung thư bàng quang nước tiểu), và khối u CNS (như u thần kinh đệm (như u thần kinh đệm thân não và u thần kinh đệm hỗn hợp), u nguyên bào đệm (cũng được biết là u nguyên bào đệm đa dạng) u hình sao, u lympho CNS, u tế bào mầm, u nguyên bào tủy, u sọ hầu Schwannoma, u màng não thất, u nguyên bào mạch máu, u dây thần kinh thính giác, u thần kinh đệm ít nhánh, u màng não, u nguyên bào thần kinh, u nguyên bào võng mạc và các di căn não).

Việc điều trị bệnh ung thư có thể được đánh giá, ví dụ, bởi sự thoái lui khối u, sự co lại khối lượng hoặc kích thước khối u, thời gian tiến triển, thời gian sống sót, sự sống sót không tiến triển, tỷ lệ đáp ứng tổng thể, thời gian đáp ứng, chất lượng cuộc sống, sự biểu hiện và/hoặc hoạt tính protein. Các phương pháp để xác định hiệu quả của điều trị có thể được sử dụng, bao gồm ví dụ, phương pháp đo sự đáp ứng thông qua chụp X quang.

Các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR theo các phương án khác có thể hữu dụng để điều trị các bệnh nhiễm trùng bằng cách hướng đích các kháng nguyên liên kết với tác nhân gây bệnh (như kháng nguyên được mã hóa bởi virut). Sự nhiễm trùng cần được ngăn chặn hoặc điều trị, ví dụ, có thể bị gây ra bởi virut, vi khuẩn, động vật nguyên sinh, hoặc vật ký sinh. Kháng nguyên đích này có thể là protein gây bệnh, polypeptit hoặc peptit mà chịu trách nhiệm cho bệnh bị gây ra bởi tác nhân gây bệnh, hoặc có khả năng cảm ứng sự đáp ứng miễn dịch ở vật chủ bị nhiễm tác nhân gây bệnh. Các kháng nguyên gây bệnh mà có thể được hướng đích bởi các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, kháng nguyên thu được từ Acinetobacter baumannii, chi Anaplasma, Anaplasma phagocytophilum, Ancylostoma braziliense, Ancylostoma duodenale, Arcanobacterium haemolyticum, Ascaris lumbricoides, chi Aspergillus, Astroviridae, chi Babesia, Bacillus anthracis, Bacillus cereus, Bartonella henselae, virut BK, Blastocystis hominis, Blastomyces dermatitidis, Bordetella pertussis, Borrelia burgdorferi, chi Borrelia, Borrelia spp, chi Brucella, Brugia malayi, họ Bunyaviridae,

Burkholderia cepacia và loài Burkholderia khác, Burkholderia mallei, Burkholderia pseudomallei, họ Caliciviridae, chi Campylobacter, Candida albicans, Candida spp, Chlamydia trachomatis, Chlamydophila pneumoniae, Chlamydophila psittaci, thể đạm độc (prion) CJD, Clonorchis sinensis, Clostridium botulinum, Clostridium difficile, Clostridium perfringens, Clostridium perfringens, Clostridium spp, Clostridium tetani, Coccidioides spp, virut corona, Corynebacterium diphtheriae, Coxiella burnetii, virut sốt xuất huyết Crimean-Congo, Cryptococcus neoformans, chi Cryptosporidium, Cytomegalovirut (CMV), virut Dengue (DEN-1, DEN-2, DEN-3 và DEN-4), Dientamoeba fragilis, Ebolavirut (EBOV), chi Echinococcus, Ehrlichia chaffeensis, Ehrlichia ewingii, chi Ehrlichia, Entamoeba histolytica, chi Enterococcus, chi Enterovirut, các Enterovirut, chủ yếu là virut Coxsackie A và Enterovirut 71 (EV71), Epidermophyton spp, virut Epstein-Barr (EBV), Escherichia coli O157:H7, O111 và O104:H4, Fasciola hepatica và Fasciola gigantica, thể đạm độc (prion) FFI, siêu họ Filarioidea, Flavivirut, Francisella tularensis, chi Fusobacterium, Geotrichum candidum, Giardia intestinalis, Gnathostoma spp, thể đạm độc GSS, virut Guanarito, Haemophilus ducreyi, Haemophilus influenzae, Helicobacter pylori, Henipavirut (virut Hendra, virut Nipah), virut viêm gan A, virut viêm gan B (HBV), virut viêm gan C (HCV), virut viêm gan D, virut viêm gan E, virut thể đơn hình Herpes 1 và 2 (HSV-1 và HSV-2), Histoplasma capsulatum, HIV (virut gây suy giảm miễn dịch người), Hortaea werneckii, bocavirut người (HBoV), virut herpes người 6 (HHV-6) và virut herpes người 7 (HHV-7), metapneumovirut ở người (hMPV), virut gây bệnh u nhú ở người (HPV), virut gây bệnh khó thở ở người (HPIV), virut bệnh bạch cầu tế bào T của người 1 (HTLV-1), virut viêm não Nhật Bản, virut JC, virut Junin, virut herpes liên kết với bệnh sacôm Kaposi (KSHV), Kingella kingae, Klebsiella granulomatis, protein thể độc Kuru, virut Lassa, Legionella pneumophila, chi Leishmania, chi Leptospira, Listeria monocytogenes, virut gây bệnh viêm màng phổi lympho (LCMV), virut Machupo, Malassezia spp, virut Marburg, virut Measles, Metagonimus yokagawai, ngành Microsporidia, virut gây bệnh u mềm lây (MCV), virut Mumps, Mycobacterium leprae và Mycobacterium lepromatosis, Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium ulcerans, Mycoplasma pneumoniae, Naegleria fowleri, Necator americanus, Neisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Nocardia asteroides, Nocardia spp, Onchocerca volvulus, Orientia tsutsugamushi, họ Orthomyxoviridae (bệnh cúm), Paracoccidioides

brasiliensis, Paragonimus spp, Paragonimus westermani, Parvovirut B19, chi Pasteurella, chi Plasmodium, Pneumocystis jirovecii, Poliovirut, virut dại, virut hợp bào hô hấp (RSV), Rhinovirut, rhinovirut, Rickettsia akari, chi Rickettsia, Rickettsia prowazekii, Rickettsia rickettsii, Rickettsia typhi, virut sốt Rift Valley, Rotavirut, virut Rubella, virut Sabia, chi Salmonella, Sarcoptes scabiei, virut corona SARS , chi Schistosoma, chi Shigella, virut Sin Nombre, Hantavirut, Sporothrix schenckii, chi Staphylococcus, chi Staphylococcus, Streptococcus agalactiae, Streptococcus pneumoniae, Streptococcus pyogenes, Strongyloides stercoralis, chi Taenia, Taenia solium, virut viêm não xương Tick (TBEV), Toxocara canis hoặc Toxocara cati, Toxoplasma gondii, Treponema pallidum, Trichinella spiralis, Trichomonas vaginalis, Trichophyton spp, Trichuris trichiura, Trypanosoma brucei, Trypanosoma cruzi, Ureaplasma urealyticum, virut zoster Varicella (VZV), virut zoster Varicella (VZV), Variola chính hoặc Variola phụ, thể đạm độc (prion) vCJD, virut gây viêm não ngựa Venezuelan, Vibrio cholerae, virut West Nile, virut viêm não ngựa miền Tây, Wuchereria bancrofti, virut gây sốt Vàng, Yersinia enterocolitica, Yersinia pestis, và Yersinia pseudotuberculosis.

Theo một số phương án, các tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR này được sử dụng để điều trị bệnh nhiễm trùng sinh ung thư, như nhiễm virut gây ung thư. Virut gây ung thư bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, CMV, EBV, HBV, KSHV, HPV, MCV, HTLV-1, HIV-1, và HCV. Kháng nguyên đích của caTCR này có thể là protein gây ung thư virut bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, Tax, E7, E6/E7, E6, HBx, EBNA proteins (*ví dụ*, EBNA3 A, EBNA3 C, và EBNA 2), v-xyclin, LANA1, LANA2, LMP-1, k-bZIP, RTA, KSHV K8, và các mảnh của nó. *Xem* Ahuja, Richa, *et al*., *Curr. Sci*., 2014.

Sản phẩm của quá trình sản xuất và kit

Theo một số phương án theo sáng chế, sáng chế đề xuất sản phẩm của quá trình sản xuất chứa các nguyên liệu hữu dụng để điều trị bệnh dương tính với kháng nguyên đích như bệnh ung thư (ví dụ bệnh ung thư biểu mô tuyến thượng thận, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư cổ tử cung, bệnh ung thư đường mật, bệnh ung thư trực kết tràng, bệnh ung thư thực quản, u nguyên bào đệm, u thần kinh đệm, bệnh ung thư biểu mô tế bào gan, bệnh ung thư vùng đầu cổ, bệnh ung thư thận, bệnh bạch cầu, bệnh ung thư phổi, u lympho, bệnh u melanin, u trung biểu mô, đa u tủy, bệnh

ung thư tụy, u tủy thượng thận, u tương bào, u nguyên bào thần kinh, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh sacôm, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư tử cung hoặc bệnh ung thư tuyến giáp) hoặc nhiễm virut (ví dụ nhiễm CMV, EBV, HBV, KSHV, HPV, MCV, HTLV-1, HIV-1, hoặc HCV). Sản phẩm của quá trình sản xuất có thể bao gồm vật chứa và nhãn hoặc hướng dẫn sử dụng nằm trên hoặc đi kèm theo vật chứa. Các vật chứa thích hợp bao gồm, ví dụ, chai, lọ, xylanh, v.v. Các vật chứa này có thể được tạo ra từ nhiều loại nguyên liệu như thủy tinh và chất dẻo. Thông thường, vật chứa này chứa chế phẩm hữu hiệu để điều trị bệnh hoặc rối loạn được mô tả ở đây, và có thể có cửa vào vô trùng (ví dụ, vật chứa này có thể là túi dung dịch dùng trong tĩnh mạch hoặc lọ thủy tinh có nút có thể chọc thủng được bằng kim tiêm dưới da). Ít nhất một hoạt chất trong chế phẩm là tế bào miễn dịch trình diện trên bề mặt của nó caTCR và CSR theo sáng chế. Nhãn hoặc tờ hướng dẫn sử dụng thể hiện rằng chế phẩm được sử dụng để điều trị tình trạng cụ thể. Nhãn hoặc tờ hướng dẫn sử dụng sẽ bao gồm thêm hướng dẫn sử dụng chế phẩm tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR cho bệnh nhân. Sản phẩm của quá trình sản xuất và kit bao gồm các liệu pháp kết hợp được mô tả ở đây cũng được dự tính.

Tờ hướng dẫn sử dụng dùng để chỉ hướng dẫn thông thường có trong các bao gói thương mại của sản phẩm điều trị mà chứa thông tin về các chỉ định, cách sử dụng, liều dùng, đường sử dụng, chống chỉ định và/hoặc các khuyến cáo liên quan đến việc sử dụng các sản phẩm điều trị này. Theo một số phương án, tờ hướng dẫn sử dụng chỉ ra là chế phẩm được sử dụng để điều trị bệnh ung thư dương tính kháng nguyên đích (như bệnh ung thư biểu mô tuyến thượng thận, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư cổ tử cung, bệnh ung thư đường mật, bệnh ung thư trực kết tràng, bệnh ung thư thực quản, u nguyên bào đệm, u thần kinh đệm, bệnh ung thư biểu mô tế bào gan, bệnh ung thư vùng đầu cổ, bệnh ung thư thận, bệnh bạch cầu, bệnh ung thư phổi, u lympho, bệnh u melanin, u trung biểu mô, đa u tủy, bệnh ung thư tụy, u tủy thượng thận, u tương bào, u nguyên bào thần kinh, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh sacôm, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư tử cung hoặc bệnh ung thư tuyến giáp). Theo các phương án khác, tờ hướng dẫn sử dụng này chỉ ra là chế phẩm được sử dụng để điều trị bệnh nhiễm virut dương tính kháng nguyên đích (ví dụ nhiễm CMV, EBV, HBV, KSHV, HPV, MCV, HTLV-1, HIV-1, hoặc HCV).

Ngoài ra, sản phẩm của quá trình sản xuất có thể còn bao gồm vật chứa thứ hai chứa dung dịch đệm dược dụng, như nước kìm hãm vi khuẩn dùng để tiêm (BWFI), nước muối được đệm phosphat, dung dịch Ringer và dung dịch dextroza. Nó có thể bao gồm thêm các nguyên liệu khác mong muốn theo quan điểm thương mại và người sử dụng, bao gồm các dung dịch đệm, chất pha loãng, bộ lọc, kim tiêm và xylanh khác.

Sáng chế cũng đề xuất kit mà hữu dụng cho mục đích khác nhau, *ví dụ*, để điều trị bệnh hoặc rối loạn dương tính kháng nguyên đích được mô tả ở đây, tùy ý kết hợp với sản phẩm của quá trình sản xuất. Kit theo sáng chế bao gồm một hoặc nhiều vật chứa chứa chế phẩm tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR (hoặc dạng liều đơn vị và/hoặc sản phẩm của quá trình sản xuất), và theo một số phương án, còn chứa một chất khác (như các chất được mô tả ở đây) và/hoặc hướng dẫn sử dụng theo phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp được mô tả ở đây. Kit có thể còn bao gồm phần mô tả sự lựa chọn các đối tượng thích hợp để điều trị. Hướng dẫn được cung cấp trong kit theo sáng chế thường là hướng dẫn bằng văn bản trên tờ nhãn hoặc tờ hướng dẫn sử dụng (*ví dụ*, tờ giấy được bao gồm trong kit), nhưng các hướng dẫn đọc được bằng máy (*ví dụ*, hướng dẫn được lưu trong đĩa từ hoặc đĩa quang) cũng được chấp nhận.

Ví dụ, theo một số phương án, kit này bao gồm chế phẩm bao gồm tế bào miễn dịch trình diện trên bề mặt của nó caTCR và CSR. Theo một số phương án, kit này bao gồm a) chế phẩm bao gồm tế bào miễn dịch trình diện trên bề mặt của nó caTCR và CSR, và b) lượng hữu hiệu của ít nhất một chất khác, trong đó chất khác này làm tăng sự biểu hiện của protein MHC và/hoặc tăng cường sự trình diện bề mặt của peptit bởi protein MHC (*ví dụ*, chất ức chế IFNγ, IFNβ, IFNα, hoặc Hsp90). Theo một số phương án, kit này bao gồm a) chế phẩm bao gồm tế bào miễn dịch trình diện trên bề mặt của nó caTCR và CSR, và b) hướng dẫn sử dụng chế phẩm tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR cho đối tượng để điều trị bệnh dương tính với kháng nguyên đích (như bệnh ung thư hoặc nhiễm virut). Theo một số phương án, kit này bao gồm a) chế phẩm bao gồm tế bào miễn dịch trình diện trên bề mặt của nó caTCR và CSR, b) lượng hữu hiệu của ít nhất một chất khác, trong đó chất khác này làm tăng sự biểu hiện của protein MHC và/hoặc tăng cường sự trình diện bề mặt của peptit bởi protein MHC (*ví dụ*, chất ức chế IFNγ, IFNβ, IFNα, hoặc Hsp90), và c) hướng dẫn sử dụng chế phẩm tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR và (các) chất khác cho đối tượng để điều trị bệnh dương tính với

kháng nguyên đích (như bệnh ung thư hoặc nhiễm virut). Chế phẩm tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR và (các) chất khác có thể có mặt trong các vật chứa riêng rẽ hoặc ở vật chứa đơn. Ví dụ, kit này có thể bao gồm một chế phẩm phân biệt hoặc hai hoặc nhiều chế phẩm trong đó một chế phẩm bao gồm tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR và một chế phẩm khác bao gồm chất còn lại.

Theo một số phương án, kit này bao gồm a) một hoặc nhiều chế phẩm bao gồm caTCR và CSR, và b) các hướng dẫn để kết hợp caTCR và CSR với các tế bào miễn dịch (như các tế bào miễn dịch, *ví dụ*, các tế bào T hoặc tế bào giết tự nhiên, thu được từ đối tượng) để tạo thành chế phẩm bao gồm các tế bào miễn dịch trình diện trên bề mặt của chúng caTCR và CSR, và sử dụng chế phẩm tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR cho đối tượng để điều trị bệnh dương tính với kháng nguyên đích (như bệnh ung thư hoặc nhiễm virut). Theo một số phương án, kit này bao gồm a) một hoặc nhiều chế phẩm bao gồm caTCR và CSR, và b) tế bào miễn dịch (như tế bào gây độc tế bào). Theo một số phương án, kit này bao gồm a) một hoặc nhiều chế phẩm bao gồm caTCR và CSR, b) tế bào miễn dịch (như tế bào gây độc tế bào), và c) hướng dẫn để kết hợp caTCR và CSR với tế bào miễn dịch để tạo thành chế phẩm bao gồm tế bào miễn dịch trình diện trên bề mặt của nó caTCR và CSR, và sử dụng chế phẩm tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR cho đối tượng để điều trị bệnh dương tính kháng nguyên đích (như bệnh ung thư hoặc nhiễm virut).

Theo một số phương án, kit này bao gồm axit nucleic (hoặc bộ các axit nucleic) mã hóa caTCR và CSR. Theo một số phương án, kit này bao gồm a) axit nucleic (hoặc bộ các axit nucleic) mã hóa caTCR và CSR, và b) tế bào chủ (như tế bào miễn dịch) để biểu hiện axit nucleic (hoặc bộ các axit nucleic). Theo một số phương án, kit này bao gồm a) axit nucleic (hoặc bộ các axit nucleic) mã hóa caTCR và CSR, và b) hướng dẫn để i) biểu hiện caTCR và CSR ở tế bào chủ (như tế bào miễn dịch, *ví dụ*, tế bào T), ii) điều chế chế phẩm bao gồm tế bào chủ biểu hiện caTCR và CSR, và iii) sử dụng chế phẩm bao gồm tế bào chủ biểu hiện caTCR và CSR cho đối tượng để điều trị bệnh dương tính với kháng nguyên đích (như bệnh ung thư hoặc nhiễm virut). Theo một số phương án, tế bào chủ này thu được từ đối tượng. Theo một số phương án, kit này bao gồm a) axit nucleic (hoặc bộ các axit nucleic) mã hóa caTCR và CSR, b) tế bào chủ (như tế bào miễn dịch) để biểu hiện axit nucleic (hoặc bộ các axit nucleic), và c) hướng dẫn để i)

biểu hiện caTCR và CSR này ở tế bào chủ, ii) điều chế chế phẩm bao gồm tế bào chủ biểu hiện caTCR và CSR, và iii) sử dụng chế phẩm bao gồm tế bào chủ biểu hiện caTCR và CSR cho đối tượng điều trị bệnh dương tính với kháng nguyên đích (như bệnh ung thư hoặc nhiễm virut).

Kit này theo sáng chế là ở dạng bao gói thích hợp. Việc bao gói thích hợp bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, lọ, chai, bình, bao gói dẻo (*ví dụ*, túi Mylar hoặc nhựa hàn kín), và loại tương tự. Kit có thể tùy ý cung cấp các thành phần bổ sung như chất đệm và thông tin giải thích. Do đó, sáng chế cũng đề xuất sản phẩm của quy trình sản xuất, mà bao gồm các lọ (như lọ đậy kín), chai, bình, bao gói dẻo, và loại tương tự.

Hướng dẫn liên quan đến việc sử dụng chế phẩm tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR thường bao gồm thông tin như liều dùng, lịch dùng liều, và đường sử dụng cho điều trị được dự tính. Các vật chứa này có thể là các liều đơn vị, các gói gộp *(ví dụ*, gói nhiều liều), hoặc các liều chia nhỏ. Ví dụ, các kit có thể được cung cấp mà chứa các liều đủ của chế phẩm tế bào miễn dịch caTCR cộng CSR như được đề cập ở đây để tạo ra hiệu quả điều trị cho đối tượng trong khoảng thời gian kéo dài, như khoảng thời gian bất kỳ trong số một tuần, 8 ngày, 9 ngày, 10 ngày, 11 ngày, 12 ngày, 13 ngày, 2 tuần, 3 tuần, 4 tuần, 6 tuần, 8 tuần, 3 tháng, 4 tháng, 5 tháng, 7 tháng, 8 tháng, 9 tháng, hoặc nhiều hơn. Kit có thể cũng bao gồm nhiều liều đơn vị của caTCR và CSR, và dược phẩm và hướng dẫn sử dụng và được đóng gói ở lượng đủ để bảo quản và sử dụng trong ngành dược, ví dụ, dược học bệnh viện và dược học kết hợp.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật sẽ nhận biết là có thể có nhiều phương án nằm trong phạm vi và nguyên lý của sáng chế. Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn với sự tham chiếu đến các ví dụ không giới hạn sau đây. Các ví dụ dưới đây tiếp tục minh họa sáng chế nhưng tất nhiên không được hiểu là giới hạn phạm vi của sáng chế theo bất kỳ cách nào.

Các phương án làm ví dụ

Phương án 1. Theo một phương án, sáng chế đề xuất tế bào miễn dịch bao gồm:

a) cấu trúc kháng thể-thụ thể tế bào T (TCR) khảm (caTCR) bao gồm:

i) môđun liên kết kháng nguyên mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích; và

ii) môđun thụ thể tế bào T (TCRM) bao gồm miền TCR (TCRD) thứ nhất bao gồm miền xuyên màng TCR (TCR-TM) thứ nhất và TCRD thứ hai bao gồm TCR-TM thứ hai,

trong đó TCRM này thúc đẩy sự huy động của ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR; và

b) thụ thể truyền tín hiệu khảm (CSR) bao gồm:

i) môđun liên kết phối tử mà có khả năng liên kết hoặc tương tác với phối tử đích;

ii) môđun xuyên màng; và

iii) môđun truyền tín hiệu tế bào miễn dịch đồng kích thích mà có khả năng tạo ra tín hiệu đồng kích thích cho tế bào miễn dịch,

trong đó môđun liên kết phối tử và môđun truyền tín hiệu tế bào miễn dịch đồng kích thích này không có nguồn gốc từ cùng phân tử, và trong đó CSR này thiếu miền truyền tín hiệu tế bào miễn dịch sơ cấp về mặt chức năng.

Phương án 2. Tế bào miễn dịch theo phương án 1, trong đó CSR này thiếu các trình tự truyền tín hiệu tế bào miễn dịch sơ cấp bất kỳ.

Phương án 3. Tế bào miễn dịch theo phương án 1 hoặc phương án 2, trong đó kháng nguyên đích này là kháng nguyên bề mặt tế bào.

Phương án 4. Tế bào miễn dịch theo phương án 3, trong đó kháng nguyên bề mặt tế bào này được chọn từ nhóm bao gồm protein, hydrat cacbon, và lipit.

Phương án 5. Tế bào miễn dịch theo phương án 4, trong đó kháng nguyên bề mặt tế bào này được chọn từ nhóm bao gồm CD19, ROR1, ROR2, BCMA, GPRC5D, và FCRL5.

Phương án 6. Tế bào miễn dịch theo phương án 1 hoặc phương án 2, trong đó kháng nguyên đích này là phức hợp bao gồm peptit và protein phức hợp tương hợp mô chính (MHC).

Phương án 7. Tế bào miễn dịch theo phương án 6, trong đó peptit này thu được từ protein được chọn từ nhóm bao gồm WT-1, AFP, HPV16-E7, NY-ESO-1, PRAME, EBV-LMP2A, và PSA.

Phương án 8. Tế bào miễn dịch theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 7, trong đó TCR-TM thứ nhất thu được từ một trong số các miền xuyên màng của thụ thể tế bào T thứ nhất và TCR-TM thứ hai này thu được từ miền xuyên màng còn lại của thụ thể tế bào T thứ nhất.

Phương án 9. Tế bào miễn dịch theo phương án 8, trong đó ít nhất một trong số các TCR-TM là không xuất hiện tự nhiên.

Phương án 10. Tế bào miễn dịch theo phương án 9, trong đó TCRM này cho phép sự huy động được tăng cường của ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR khi so sánh với TCRM bao gồm các miền xuyên màng thụ thể tế bào T thứ nhất.

Phương án 11. Tế bào miễn dịch theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 8 đến 10, trong đó TCR-TM thứ nhất này bao gồm lên đến 5 sự thế axit amin so với miền xuyên màng mà từ đó nó thu được và/hoặc TCR-TM thứ hai bao gồm lên đến 5 sự thế axit amin so với miền xuyên màng mà từ đó nó thu được.

Phương án 12. Tế bào miễn dịch theo phương án 11, trong đó TCR-TM thứ nhất này bao gồm sự thế axit amin đơn và/hoặc TCR-TM thứ hai này bao gồm sự thế axit amin đơn.

Phương án 13. Tế bào miễn dịch theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 8 đến 12, trong đó thụ thể tế bào T thứ nhất này là thụ thể tế bào γ/δ T.

Phương án 14. Tế bào miễn dịch theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 8 đến 12, trong đó thụ thể tế bào T thứ nhất này là thụ thể tế bào T α/β.

Phương án 15. Tế bào miễn dịch theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 14, trong đó môđun liên kết kháng nguyên này là gốc kháng thể được chọn từ nhóm bao gồm Fab, Fab', (Fab')2, Fv, và Fv đơn chuỗi (scFv).

Phương án 16. Tế bào miễn dịch theo phương án 15, trong đó môđun liên kết kháng nguyên bao gồm miền V_H và miền V_L, và trong đó miền V_H này được liên kết với đầu cùng amino của một trong số các TCRD và miền V_L này được liên kết với đầu cùng amino của TCRD còn lại.

Phương án 17. Tế bào miễn dịch theo phương án 16, trong đó miền V_H này được liên kết với một trong số các TCRD qua miền C_H1 và miền V_L này được liên kết với TCRD còn lại qua miền C_L.

Phương án 18. Tế bào miễn dịch theo phương án 15, trong đó caTCR này còn bao gồm ít nhất một môđun liên kết kháng nguyên bổ sung.

Phương án 19. Tế bào miễn dịch theo phương án 18, trong đó ít nhất một môđun liên kết kháng nguyên bổ sung này là gốc kháng thể.

Phương án 20. Tế bào miễn dịch theo phương án 18 hoặc 19, trong đó caTCR này là đa đặc hiệu.

Phương án 21. Tế bào miễn dịch theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 15 đến 20, trong đó môđun liên kết kháng nguyên này bao gồm scFv được dung hợp với đầu cùng amino của một trong số các TCRD này.

Phương án 22. Tế bào miễn dịch theo phương án 21, trong đó caTCR này bao gồm scFv thứ nhất được dung hợp với đầu cùng amino của TCRD thứ nhất và scFv thứ hai được dung hợp với đầu cùng amino của TCRD thứ hai.

Phương án 23. Tế bào miễn dịch theo phương án 22, trong đó scFv thứ nhất này liên kết với đích khác với scFv thứ hai.

Phương án 24. Tế bào miễn dịch theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 23, trong đó caTCR này là heterodime bao gồm chuỗi polypeptit thứ nhất bao gồm TCRD thứ nhất và chuỗi polypeptit thứ hai bao gồm TCRD thứ hai, và trong đó môđun liên kết kháng nguyên này được liên kết với đầu cùng amino của một hoặc cả hai TCRD thứ nhất và thứ hai.

Phương án 25. Tế bào miễn dịch theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 24, trong đó caTCR này còn bao gồm môđun ổn định hóa bao gồm miền ổn định hóa thứ nhất và miền ổn định hóa thứ hai, trong đó miền ổn định hóa thứ nhất và thứ hai này có ái lực liên kết với nhau mà ổn định hóa caTCR.

Phương án 26. Tế bào miễn dịch theo phương án 25, trong đó môđun ổn định hóa này được chọn từ nhóm bao gồm môđun C_H1-C_L, môđun C_H2-C_H2, môđun C_H3- C_H3, và môđun C_H4-C_H4.

Phương án 27. Tế bào miễn dịch theo phương án 25 hoặc phương án 26, trong đó có liên kết cộng hóa trị giữa miền ổn định hóa thứ nhất và thứ hai.

Phương án 28. Tế bào miễn dịch theo phương án 27, trong đó liên kết cộng hóa trị này là liên kết disulfit.

Phương án 29. Tế bào miễn dịch theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 25 đến 28, trong đó môđun ổn định hóa này được định vị giữa môđun liên kết kháng nguyên và TCRM.

Phương án 30. Tế bào miễn dịch theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 25 đến 29, trong đó caTCR này là heterodime bao gồm:

a) chuỗi polypeptit thứ nhất bao gồm miền ổn định hóa thứ nhất được dung hợp với đầu cùng amino của TCRD thứ nhất và chuỗi polypeptit thứ hai bao gồm miền ổn định hóa thứ hai được dung hợp với đầu cùng amino của TCRD thứ hai, và trong đó môđun liên kết kháng nguyên này được dung hợp với đầu cùng amino của một hoặc cả hai miền ổn định hóa thứ nhất và thứ hai.

Phương án 31. Tế bào miễn dịch theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 30, trong đó caTCR này liên kết với kháng nguyên đích có hằng số cân bằng phân ly (Kd) nằm trong khoảng từ khoảng 0,1 pM đến khoảng 500 nM.

Phương án 32. Tế bào miễn dịch theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 31, trong đó phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR này được chọn từ nhóm bao gồm CD3δε, CD3γε, và ζζ.

Phương án 33. Tế bào miễn dịch theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 32, trong đó kháng nguyên đích và phối tử đích này là như nhau.

Phương án 34. Tế bào miễn dịch theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 32, trong đó kháng nguyên đích và phối tử đích này là khác nhau.

Phương án 35. Tế bào miễn dịch theo phương án 34, trong đó phối tử đích này là phối tử được biểu hiện trên bề mặt của tế bào trình diện kháng nguyên đích.

Phương án 36. Tế bào miễn dịch theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 35, trong đó phối tử đích này là phối tử liên kết với bệnh.

Phương án 37. Tế bào miễn dịch theo phương án 36, trong đó phối tử đích này là phối tử liên kết với bệnh ung thư.

Phương án 38. Tế bào miễn dịch theo phương án 37, trong đó phối tử liên kết với bệnh ung thư này được chọn từ nhóm bao gồm CD19, CD20, CD22, CD47, IL4, GPC-3, ROR1, ROR2, BCMA, GPRC5D, và FCRL5.

Phương án 39. Tế bào miễn dịch theo phương án 37, trong đó phối tử liên kết với bệnh ung thư này là phức hợp peptit/MHC bao gồm peptit thu được từ protein được chọn từ nhóm bao gồm WT-1, AFP, HPV16-E7, NY-ESO-1, PRAME, EBV-LMP2A, và PSA.

Phương án 40. Tế bào miễn dịch theo phương án 36, trong đó phối tử đích này là phối tử liên kết với virut.

Phương án 41. Tế bào miễn dịch theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 35, trong đó phối tử đích này là phân tử điều hòa miễn dịch.

Phương án 42. Tế bào miễn dịch theo phương án 41, trong đó phân tử miễn dịch này là thụ thể ức chế miễn dịch, và CSR này là chất đối kháng của thụ thể ức chế miễn dịch.

Phương án 43. Tế bào miễn dịch theo phương án 41, trong đó phân tử điều hòa miễn dịch này là thụ thể kích thích miễn dịch, và CSR này là chất chủ vận của thụ thể kích thích miễn dịch.

Phương án 44. Tế bào miễn dịch theo phương án 41, trong đó phối tử đích này là phân tử điểm kiểm tra miễn dịch.

Phương án 45. Tế bào miễn dịch theo phương án 44, trong đó phân tử điểm kiểm tra miễn dịch này được chọn từ nhóm bao gồm PD-L1, PD-L2, CD80, CD86, ICOSL, B7-H3, B7-H4, HVEM, 4-1BBL, OX40L, CD70, CD40, và GAL9.

Phương án 46. Tế bào miễn dịch theo phương án 41, trong đó phối tử đích này là xytokin ức chế.

Phương án 47. Tế bào miễn dịch theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 35, trong đó phối tử đích này là phân tử chết theo chương trình.

Phương án 48. Tế bào miễn dịch theo phương án 47, trong đó phân tử chết theo chương trình này được chọn từ nhóm bao gồm FasL, FasR, TNFR1, và TNFR2.

Phương án 49. Tế bào miễn dịch theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 48, trong đó môđun liên kết phối tử này là gốc kháng thể.

Phương án 50. Tế bào miễn dịch theo phương án 49, trong đó gốc kháng thể của CSR này được chọn từ nhóm bao gồm Fab, Fab', (Fab')2, Fv, và Fv đơn chuỗi (scFv).

Phương án 51. Tế bào miễn dịch theo phương án 50, trong đó gốc kháng thể của CSR này là scFv.

Phương án 52. Tế bào miễn dịch theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 48, trong đó môđun liên kết phối tử này thu được từ miền ngoại bào của thụ thể.

Phương án 53. Tế bào miễn dịch theo phương án 52, trong đó thụ thể này được chọn từ nhóm bao gồm FasR, TNFR1, TNFR2, PD-1, CD28, CTLA-4, ICOS, BTLA, KIR, LAG-3, 4-1BB, OX40, CD27, TIM-3, IL-10R, IL-6R, và IL-4R.

Phương án 54. Tế bào miễn dịch theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 53, trong đó môđun xuyên màng của CSR này bao gồm miền xuyên màng thu được từ CD28, CD3ε, CD3ζ, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, hoặc CD154.

Phương án 55. Tế bào miễn dịch theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 54, trong đó môđun truyền tín hiệu tế bào miễn dịch đồng kích thích này thu được từ miền nội bào của thụ thể đồng kích thích của TCR.

Phương án 56. Tế bào miễn dịch theo phương án 55, trong đó thụ thể đồng kích thích này được chọn từ nhóm bao gồm CD28, 4-1BB, OX40, ICOS, CD27, và CD40.

Phương án 57. Tế bào miễn dịch theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 56, trong đó sự biểu hiện của CSR này là cảm ứng được.

Phương án 58. Tế bào miễn dịch theo phương án 57, trong đó sự biểu hiện của CSR này cảm ứng được dựa vào sự hoạt hóa của tế bào miễn dịch.

Phương án 59. Tế bào miễn dịch theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 32, trong đó môđun liên kết kháng nguyên của caTCR này bao gồm gốc kháng thể mà liên kết với CD19, trong đó môđun liên kết phối tử của CSR này bao gồm scFv mà liên kết với CD19, và trong đó cả môđun xuyên màng và môđun truyền tín hiệu tế bào miễn dịch đồng kích thích này đều thu được từ CD28.

Phương án 60. Tế bào miễn dịch theo phương án 59, trong đó gốc kháng thể mà liên kết với CD19 bao gồm miền V_H bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 58 và miền V_L bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 59, trong đó scFv mà liên kết với CD19 bao gồm miền V_L bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 58 và miền V_L bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 59, và trong đó CSR này bao gồm mảnh của CD28 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 51.

Phương án 61. Tế bào miễn dịch theo phương án 60, trong đó caTCR này bao gồm hai chuỗi polypeptit bao gồm các trình tự axit amin của các SEQ ID NO: 72 và 73 hoặc các SEQ ID NO: 74 và 75, và/hoặc trong đó CSR này bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 80.

Phương án 62. Tế bào miễn dịch theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 32, trong đó môđun liên kết kháng nguyên của caTCR này bao gồm gốc kháng thể mà liên kết với AFP, trong đó môđun liên kết phối tử của CSR này bao gồm scFv mà liên kết với GPC3, và trong đó cả môđun xuyên màng và môđun truyền tín hiệu tế bào miễn dịch đồng kích thích đều thu được từ CD28.

Phương án 63. Tế bào miễn dịch theo phương án 62, trong đó gốc kháng thể mà liên kết với AFP bao gồm miền V_H bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 62 và miền V_L bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 63, trong đó scFv mà liên kết với GPC3 bao gồm miền V_L bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 64 và miền V_L bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 65, và trong đó CSR này bao gồm mảnh của CD28 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 51.

Phương án 64. Tế bào miễn dịch theo phương án 63, trong đó caTCR này bao gồm hai chuỗi polypeptit bao gồm các trình tự axit amin của các SEQ ID NO: 68 và 69 hoặc các SEQ ID NO: 70 và 71, và/hoặc trong đó CSR này bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 82.

Phương án 65. Tế bào miễn dịch theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 32, trong đó môđun liên kết kháng nguyên của caTCR này bao gồm gốc kháng thể mà liên kết với CD19, trong đó môđun liên kết phối tử của CSR này bao gồm scFv mà liên kết với CD20, và trong đó cả môđun xuyên màng và môđun truyền tín hiệu tế bào miễn dịch đồng kích thích này đều thu được từ CD28.

Phương án 66. Tế bào miễn dịch theo phương án 65, trong đó gốc kháng thể mà liên kết với CD19 bao gồm miền V_H bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 58 và miền V_L bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 59, trong đó scFv mà liên kết với CD20 bao gồm miền V_H bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 60 và miền V_L bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 61, và trong đó CSR này bao gồm mảnh của CD28 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 51.

Phương án 67. Tế bào miễn dịch theo phương án 66, trong đó caTCR này bao gồm hai chuỗi polypeptit bao gồm các trình tự axit amin của các SEQ ID NO: 72 và 73 hoặc các SEQ ID NO: 74 và 75, và/hoặc trong đó CSR này bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 81.

Phương án 68. Theo một phương án, sáng chế đề xuất một hoặc nhiều axit nucleic mã hóa caTCR và CSR theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 67, trong đó mỗi caTCR và CSR này gồm một hoặc nhiều chuỗi polypeptit được mã hóa bởi một hoặc nhiều axit nucleic.

Phương án 69. Theo một phương án, sáng chế đề xuất một hoặc nhiều axit nucleic mã hóa:

a) cấu trúc kháng thể-thụ thể tế bào T (TCR) khảm (caTCR) bao gồm:

i) môđun liên kết kháng nguyên mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích; và

ii) môđun thụ thể tế bào T (TCRM) bao gồm miền TCR (TCRD) thứ nhất bao gồm miền xuyên màng TCR (TCR-TM) thứ nhất và TCRD thứ hai bao gồm TCR-TM thứ hai, trong đó TCRM này thúc đẩy sự huy động của ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR, và trong đó caTCR này gồm một hoặc nhiều chuỗi polypeptit; và

b) thụ thể truyền tín hiệu khảm (CSR) bao gồm:

i) môđun liên kết phối tử mà có khả năng liên kết hoặc tương tác với phối tử đích;

ii) môđun xuyên màng; và

iii) môđun truyền tín hiệu tế bào miễn dịch đồng kích thích mà có khả năng tạo ra tín hiệu đồng kích thích cho tế bào miễn dịch, trong đó môđun liên kết phối tử và môđun truyền tín hiệu tế bào miễn dịch đồng kích thích này không thu được từ cùng phân tử,

trong đó CSR này thiếu miền truyền tín hiệu tế bào miễn dịch sơ cấp chức năng, và trong đó CSR này gồm một hoặc nhiều chuỗi polypeptit.

Phương án 70. Một hoặc nhiều axit nucleic theo phương án 68 hoặc phương án 69, trong đó caTCR và CSR này được mã hóa trên cùng phân tử axit nucleic.

Phương án 71. Một hoặc nhiều axit nucleic theo phương án 68 hoặc phương án 69, trong đó caTCR và CSR này được mã hóa trên các phân tử axit nucleic khác nhau.

Phương án 72. Một hoặc nhiều axit nucleic theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 68 đến 71, bao gồm trình tự nucleotit mã hóa CSR được liên kết hoạt động với trình tự khởi động cảm ứng được.

Phương án 73. Một hoặc nhiều axit nucleic theo phương án 72, trong đó trình tự khởi động cảm ứng được này cảm ứng được dựa vào sự hoạt hóa của tế bào miễn dịch.

Phương án 74. Một hoặc nhiều axit nucleic theo phương án 72, trong đó trình tự khởi động cảm ứng được này là trình tự khởi động thu được từ yếu tố nhân của tế bào T được hoạt hóa (NFAT).

Phương án 75. Theo một phương án, sáng chế đề xuất một hoặc nhiều vectơ bao gồm một hoặc nhiều axit nucleic theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 68 đến 74.

Phương án 76. Một hoặc nhiều vectơ theo phương án 75, trong đó ít nhất một trong số các vectơ này bao gồm trình tự axit nucleic mã hóa caTCR và ít nhất một vectơ còn lại bao gồm trình tự axit nucleic mã hóa CSR.

Phương án 77. Một hoặc nhiều vectơ theo phương án 75, bao gồm vectơ đơn bao gồm một hoặc nhiều axit nucleic.

Phương án 78. Theo một phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm bao gồm một hoặc nhiều axit nucleic theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 68 đến 74 hoặc một hoặc nhiều vectơ theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 75 đến 77.

Phương án 79. Theo một phương án, sáng chế đề xuất tế bào miễn dịch bao gồm một hoặc nhiều axit nucleic theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 68 đến 74 hoặc một hoặc nhiều vectơ theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 75 đến 77.

Phương án 80. Tế bào miễn dịch theo phương án 79, trong đó tế bào miễn dịch này còn bao gồm caTCR được biểu hiện từ một hoặc nhiều axit nucleic theo phương án bất kỳ

trong số các phương án từ 68 đến 74 hoặc một hoặc nhiều vectơ theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 75 đến 77.

Phương án 81. Tế bào miễn dịch theo phương án 79 hoặc phương án 80, trong đó tế bào miễn dịch này còn bao gồm CSR được biểu hiện từ một hoặc nhiều axit nucleic theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 68 đến 74 hoặc một hoặc nhiều vectơ theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 75 đến 77.

Phương án 82. Tế bào miễn dịch theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 67 và từ 79 đến 81, trong đó tế bào miễn dịch này được chọn từ nhóm bao gồm tế bào T gây độc tế bào, tế bào T trợ giúp, tế bào T giết tự nhiên, và tế bào T ức chế.

Phương án 83. Tế bào miễn dịch theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 67 và từ 79 đến 82, trong đó

a) caTCR này là heterodime bao gồm chuỗi polypeptit thứ nhất bao gồm TCRD thứ nhất và chuỗi polypeptit thứ hai bao gồm TCRD thứ hai, và trong đó môđun liên kết kháng nguyên bao gồm một hoặc hai chuỗi polypeptit được liên kết với đầu cùng amino của một hoặc cả hai TCRD, và

b) CSR này bao gồm chuỗi polypeptit đơn, tế bào miễn dịch này bao gồm:

i) trình tự axit nucleic thứ nhất mã hóa chuỗi polypeptit thứ nhất của caTCR này;

ii) trình tự axit nucleic thứ hai mã hóa chuỗi polypeptit thứ hai của caTCR này; và

iii) trình tự axit nucleic thứ ba mã hóa CSR.

Phương án 84. Tế bào miễn dịch theo phương án 83, bao gồm:

a) vectơ thứ nhất bao gồm trình tự axit nucleic thứ nhất được điều khiển bởi trình tự khởi động thứ nhất;

b) vectơ thứ hai bao gồm trình tự axit nucleic thứ hai được điều khiển bởi trình tự khởi động thứ hai; và

c) vectơ thứ ba bao gồm trình tự axit nucleic thứ ba được điều khiển bởi trình tự khởi động thứ ba.

Phương án 85. Tế bào miễn dịch theo phương án 83, bao gồm:

a) vectơ thứ nhất bao gồm:

i) trình tự axit nucleic thứ nhất được điều khiển bởi trình tự khởi động thứ nhất; và

ii) trình tự axit nucleic thứ hai được điều khiển bởi trình tự khởi động thứ hai; và

b) vectơ thứ hai bao gồm trình tự axit nucleic thứ ba được điều khiển bởi trình tự khởi động thứ ba.

Phương án 86. Tế bào miễn dịch theo phương án 83, bao gồm vectơ bao gồm:

a) trình tự axit nucleic thứ nhất được điều khiển bởi trình tự khởi động thứ nhất;

b) trình tự axit nucleic thứ hai được điều khiển bởi trình tự khởi động thứ hai; và

c) trình tự axit nucleic thứ ba được điều khiển bởi trình tự khởi động thứ ba.

Phương án 87. Tế bào miễn dịch theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 84 đến 86, trong đó trình tự khởi động thứ nhất và/hoặc trình tự khởi động thứ hai này là các trình tự khởi động hoạt động cơ định.

Phương án 88. Tế bào miễn dịch theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 84 đến 87, trong đó trình tự khởi động thứ ba này là trình tự khởi động cảm ứng được.

Phương án 89. Tế bào miễn dịch theo phương án 83, bao gồm:

a) vectơ thứ nhất bao gồm trình tự axit nucleic thứ nhất và trình tự axit nucleic thứ hai được điều khiển bởi trình tự khởi động thứ nhất đơn; và

b) vectơ thứ hai bao gồm trình tự axit nucleic thứ ba được điều khiển bởi trình tự khởi động thứ hai.

Phương án 90. Tế bào miễn dịch theo phương án 83, bao gồm vectơ bao gồm:

a) trình tự axit nucleic thứ nhất và trình tự axit nucleic thứ hai được điều khiển bởi trình tự khởi động thứ nhất đơn; và

b) trình tự axit nucleic thứ ba được điều khiển bởi trình tự khởi động thứ hai.

Phương án 91. Tế bào miễn dịch theo phương án 89 hoặc phương án 90, trong đó trình tự khởi động thứ nhất này là trình tự khởi động hoạt động cơ định.

Phương án 92. Tế bào miễn dịch theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 89 đến 91, trong đó trình tự khởi động thứ hai này là trình tự khởi động cảm ứng được.

Phương án 93. Tế bào miễn dịch theo phương án 88 hoặc phương án 92, trong đó trình tự khởi động cảm ứng được này là cảm ứng được dựa vào sự hoạt hóa của tế bào miễn dịch.

Phương án 94. Tế bào miễn dịch theo phương án 88 hoặc phương án 92, trong đó trình tự khởi động cảm ứng được này là trình tự khởi động thu được từ NFAT.

Phương án 95. Tế bào miễn dịch theo phương án 83, bao gồm vectơ bao gồm trình tự axit nucleic thứ nhất, trình tự axit nucleic thứ hai, và trình tự axit nucleic thứ ba tất cả được điều khiển bởi trình tự khởi động đơn.

Phương án 96. Tế bào miễn dịch theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 84 đến 95, trong đó các vectơ này được hợp nhất vào bộ gen tế bào miễn dịch.

Phương án 97. Theo một phương án, sáng chế đề xuất dược phẩm bao gồm tế bào miễn dịch theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 67 và từ 79 đến 96, và chất mang dược dụng.

Phương án 98. Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp tiêu diệt tế bào đích trình diện kháng nguyên đích (hoặc điều trị bệnh liên kết với kháng nguyên đích), bao gồm bước cho tế bào đích này tiếp xúc với tế bào miễn dịch theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 67 và từ 79 đến 96.

Phương án 99. Phương pháp theo phương án 98, trong đó bước tiếp xúc này được thực hiện *in vivo*.

Phương án 100. Phương pháp theo phương án 98, trong đó bước tiếp xúc này được thực hiện *in vitro*.

Phương án 101. Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh liên kết với kháng nguyên đích ở đối tượng cần được điều trị, bao gồm bước sử dụng cho đối tượng này lượng hữu hiệu của dược phẩm theo phương án 97.

Phương án 102. Phương pháp theo phương án 101, trong đó bệnh liên kết với kháng nguyên đích này là bệnh ung thư.

Phương án 103. Phương pháp theo phương án 102, trong đó bệnh ung thư này được chọn từ nhóm bao gồm bệnh ung thư biểu mô tuyến thượng thận, bệnh ung thư bàng quang, ung thư vú, bệnh ung thư cổ tử cung, bệnh ung thư đường mật, bệnh ung thư trực kết

tràng, bệnh ung thư thực quản, u nguyên bào đệm, u thần kinh đệm, bệnh ung thư biểu mô tế bào gan, bệnh ung thư vùng đầu cổ, bệnh ung thư thận, bệnh bạch cầu, bệnh ung thư phổi, u lympho, bệnh u melanin, u trung biểu mô, đa u tủy, bệnh ung thư tụy, u tủy thượng thận, u tương bào, u nguyên bào thần kinh, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh sacôm, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư tử cung và bệnh ung thư tuyến giáp.

Phương án 104. Phương pháp theo phương án 101, trong đó bệnh liên kết với kháng nguyên đích này là bệnh nhiễm virut.

Phương án 105. Phương pháp theo phương án 104, trong đó bệnh nhiễm virut này bị gây ra bởi virut được chọn từ nhóm bao gồm Cytomegalovirut (CMV), virut Epstein-Barr (EBV), virut viêm gan B (HBV), virut herpes liên kết với bệnh sacôm Kaposi (KSHV), virut gây bệnh u nhú ở người (HPV), virut gây bệnh u mềm lây (MCV), virut bệnh bạch cầu tế bào T của người 1 (HTLV-1), HIV (virut gây suy giảm miễn dịch người), và virut viêm gan C (HCV).

Phương án 106. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 101 đến 105, trong đó tế bào miễn dịch này là tự thân đối với đối tượng.

Phương án 107. Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra tín hiệu đồng kích thích cho tế bào miễn dịch bao gồm caTCR hoặc được tải nạp với axit nucleic mã hóa caTCR, bao gồm bước đưa vào trong tế bào này một hoặc nhiều axit nucleic theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 68 đến 74 hoặc một hoặc nhiều vectơ theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 75 đến 77.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Vật liệu và phương pháp

Mẫu tế bào, Dòng tế bào, và Kháng thể

Các dòng tế bào HepG2 (ATCC HB-8065; HLA-A2+, AFP^+), SK-HEP-1 (ATCC HTB-52; HLA-A2+, AFP^-), Raji (ATCC CCL-86; $CD19^+$), CA46 (ATCC CRL-1648; $CD19^+$), Jurkat (ATCC CRL-2899, $CD19^-$), J.RT3-T3,5 (ATCC TIB-153), Jeko-1 (ATCC CRL-3006; $CD19^+$), THP-1 (ATCC TIB-202, $CD19^-$), Daudi (ATCC CCL-213; $CD19^+$), HeLa (ATCC CCL-2), MDA-MB-231 (ATCC HTB-26) và MCF-7 (ATCC

HTB-22) thu được từ Bộ sưu tập chủng nuôi cấy chuẩn Hoa Kỳ. Jurkat là dòng tế bào lympho bào T của người thu được từ bệnh bạch cầu tế bào T. J.RT3-T3.5 là dòng đột biến thu được từ tế bào Jurkat mà thiếu chuỗi β thụ thể tế bào T. Raji là dòng tế bào u lympho Burkitt mà biểu hiện CD19. Dòng bất hoạt Raji-CD19 (Raji-CD19KO) được tạo ra bởi công nghệ CRISPR. Ba trình tự hướng dẫn khác nhau được thiết kế để hướng đích CD19 ở tế bào Raji. Vectơ CRISPR-Cas9 được mua từ Origene và mỗi trình tự hướng dẫn được tách dòng riêng rẽ vào vectơ pCas-Guide. Ba ngày sau khi xung điện, hiệu quả bất hoạt bởi mỗi trình tự hướng dẫn được đánh giá bằng cách đo tế bào theo dòng chảy và nguồn bất hoạt CD19 tốt nhất được chọn để chọn lọc dòng bằng cách pha loãng giới hạn. Dòng được chọn được xác nhận là bất hoạt CD19 hoàn toàn bằng giải trình tự. Tất cả các dòng tế bào được cấy ở RPMI 1640 hoặc DMEM được bổ sung bằng 10% FBS và 2 mM glutamin ở nhiệt độ 37°C/5% CO_2.

Đặt mua Ab đơn dòng chống lại HLA-A02 người (dòng BB7.2) được liên hợp với FITC hoặc APC, và IgG 2b chuột nhắt đối chứng isotyp của nó được liên hợp với FITC hoặc APC, kháng thể kháng CD3 người hoặc chuột nhắt, tiểu đơn vị khác nhau thụ thể tế bào T của người, thẻ 3xFlag, thẻ HA, F(ab)2 dê kháng IgG người liên hợp với PE hoặc FITC, và F(ab')2 dê kháng Ig chuột nhắt được liên hợp với chất phát huỳnh quang (Invitrogen). Kháng thể kháng idiotyp chống lại kháng thể đặc hiệu AFP158/HLA-A*02:01 được phát triển và được sản xuất nội bộ tại Eureka Therapeutics. Số liệu đo tế bào theo dòng được thu thập bằng cách sử dụng BD FACSCanto II và được phân tích bằng cách sử dụng gói phần mềm FlowJo.

Tất cả các peptit được đặt mua và được tổng hợp bởi Elim Biopharma. Các peptit có độ tinh khiết >90%. Các peptit này được hòa tan trong DMSO hoặc được pha loãng trong nước muối tại 10 mg/mL và được làm đông tại nhiệt độ -80°C. AFP158/HLA-A*02:01 chuỗi đơn được biotinyl hóa và các monome phức hợp peptit/HLA-A*02:01 đối chứng được tạo ra bằng cách tái gấp nếp các peptit với HLA-A*02:01 tái tổ hợp và beta-2 microglobulin (β2M). Các monome này được biotinyl hóa qua BSP peptit được liên kết với đầu cùng C của miền ngoại bào HLA-A*02:01 (ECD) bởi enzym BirA. Streptavidin được đánh dấu huỳnh quang được trộn với monome phức hợp peptit/HLA-A*02:01 được biotinyl hóa để tạo thành tetrame peptit/HLA-A*02:01 được đánh dấu huỳnh quang.

Lentivirut chứa CAR hoặc caTCR đặc hiệu CD19 người hoặc đặc hiệu AFP158/HLA-A*02:01 được sản xuất, ví dụ, bằng cách chuyển nhiễm tế bào 293T với vectơ mã hóa các cấu trúc khảm. Các tế bào T của người sơ cấp được sử dụng để tải nạp sau khi kích thích một ngày bằng hạt CD3/CD28 (Dynabeads®, Invitrogen) trong sự có mặt của interleukin-2 (IL-2) tại 100 U/ml. Các lentivirut cô đặc được sử dụng cho các tế bào T ở các đĩa 6 giếng được phủ Retronectin (Takara) trong 96 giờ. Hiệu quả tải nạp của các cấu trúc khảm kháng AFP và kháng CD19 được đánh giá bằng cách đo tế bào theo dòng, sử dụng tetrame AFP158/HLA-A*02:01 được biotinyl hóa ("tetrame AFP158") với streptavidin được liên hợp với PE hoặc kháng thể kháng myc tương ứng. Các phân tích đo tế bào theo dòng lặp lại được thực hiện vào ngày 5 và mỗi 3-4 ngày sau đó.

Các dòng tế bào được tải nạp với một hoặc hai vectơ mà mã hóa hai tiểu đơn vị cấu trúc caTCR. Năm ngày sau tải nạp, các chất dung giải tế bào được tạo ra cho phương pháp thẩm tách western sử dụng kháng thể kháng HA (kháng thể kháng thẻ HA - ChIP Grade, Abcam) hoặc kháng thể kháng cờ (kháng thể kháng cờ được tạo ra ở thỏ, Sigma).

Tính gây độc tế bào khối u được phân tích bằng cách thử nghiệm tính gây độc tế bào không phóng xạ Cytox 96 (Promega). Các tế bào $CD3^+$ T được tạo ra từ máu toàn phần được làm giàu PBMC bằng cách sử dụng Kit phân lập tế bào T của người EasySep (StemCell Technologies) mà loại bỏ âm tính các tế bào biểu hiện CD14, CD16, CD19, CD20, CD36, CD56, CD66b, CD123, glycophorin A. Các tế bào T của người được hoạt hóa và được nhân rộng bằng, ví dụ, CD3/CD28 Dynabeads (Invitrogen) theo quy trình của nhà sản xuất. Các tế bào T đã hoạt hóa (ATC) được cấy và được giữ trong môi trường RPMI1640 có 10% FBS cộng 100 U/ml IL-2, và được sử dụng tại ngày 7-14. Các tế bào T đã hoạt hóa (các tế bào miễn dịch) và các tế bào đích được đồng nuôi cấy tại các tỷ lệ yếu tố tác động so với đích khác nhau (*ví dụ,* 2,5:1 hoặc 5:1) trong 16 giờ và được phân tích tính gây độc tế bào.

Ví dụ 1. Thiết kế kháng thể/thụ thể tế bào T (caTCR) khảm

Nhiều thiết kế kháng thể-thụ thể tế bào T (caTCR) khảm được thực hiện, và sáu ví dụ khác nhau được thể hiện trong Fig.1 (caTCR-1, caTCR-2, caTCR-3, caTCR-4, caTCR-5, và caTCR-6). Trong các thiết kế này, các gốc kháng thể khác nhau (Fab, Fab',

(Fab')2, Fv, hoặc scFv) được dung hợp với các đầu cùng amino của các chuỗi α/β hoặc các chuỗi γ/δ thụ thể tế bào T thiếu miền biến đổi và miền không đổi và bao gồm toàn bộ hoặc một phần của peptit kết nối của chúng (vùng sau miền không đổi), miền xuyên màng của chúng hoặc biến thể của chúng, và miền nội bào bất kỳ để tạo thành các heterodime caTCR mà có thể được biểu hiện trên bề mặt của các tế bào T. Ở TCR tự nhiên, miền Vα/Vβ hoặc Vδ/Vγ tạo thành miền liên kết kháng nguyên của TCR. Các thiết kế này thay thế các vùng Vα-Cα/Vβ-Cβ hoặc Vδ-Cδ/Vγ-Cγ có các gốc kháng thể khác nhau, và đưa vào ít nhất một miền xuyên màng TCR biến đổi, do đó mang lại tính đặc hiệu liên kết của kháng thể cho cấu trúc này, và dẫn đến khả năng được tăng cường của cấu trúc để thu nạp các phân tử kèm theo ở phức hợp TCR, như CD3δε, CD3γε và CD3ζζ, khi so sánh với các TCR hoặc các cấu trúc liên quan với chỉ các miền xuyên màng TCR xuất hiện tự nhiên. Các cấu trúc caTCR này được đặt tên như sau: caTCR-[thiết kế#]-[vị trí biến thể][#]. Thiết kế# 1 tương ứng với caTCR với gốc kháng thể Fab, thiết kế# 2 tương ứng với caTCR với gốc kháng thể Fab', thiết kế# 3 tương ứng với caTCR có gốc kháng thể (Fab')2, thiết kế# 4 tương ứng với caTCR có gốc kháng thể Fv, thiết kế# 5 tương ứng với caTCR với gốc kháng thể scFv đơn, và thiết kế# 6 tương ứng với caTCR có hai gốc kháng thể scFv (*xem* Fig.1). Không có vị trí biến thể và # 0 (*ví dụ*, caTCR-1-0) tương ứng với cấu trúc có các miền TCR xuất hiện tự nhiên, và # ≥ 1 tương ứng với caTCR có các biến thể đặc hiệu ở vị trí biến đổi (*ví dụ*, caTCR-1-TM1 tương ứng với một biến thể miền xuyên màng, caTCR-1-EC1 tương ứng với một biến thể miền ngoại bào; *xem* bảng 2).

Ở thiết kế caTCR-1 (IgV_H-IgC_H1-TCRδ/IgV_L-IgC_L-TCRγ), miền biến đổi và miền không đổi thứ nhất (IgV_H-IgC_H1) của chuỗi nặng kháng thể thay thế phần đầu cùng amino của chuỗi TCRδ lên đến vị trí bao quanh hoặc bên trong peptit kết nối ở miền ngoại bào của chuỗi TCRδ sau vùng Vδ-Cδ, tùy ý trong đó miền xuyên màng của chuỗi TCRδ được cải biến, như bằng cách thế một hoặc nhiều axit amin. Miền biến đổi và miền không đổi (IgV_L-IgC_L) của chuỗi nhẹ kháng thể tương ứng thay thế phần đầu cùng amino của chuỗi TCRγ lên đến vị trí bao quanh hoặc bên trong peptit kết nối ở miền ngoại bào của chuỗi TCRγ sau vùng Vγ-Cγ, tùy ý trong đó miền xuyên màng của chuỗi TCRγ được cải biến, như bằng cách thế một hoặc nhiều axit amin.

Theo một phương án về caTCR-1, một chuỗi bao gồm miền IgV_H của kháng thể kháng AFP158/HLA-A*02:01 (SEQ ID NO: 62) được dung hợp với miền IgC_H1 (trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 37-47) được dung hợp với phần đầu cùng carboxy của chuỗi TCRδ bao gồm miền xuyên màng và tất cả hoặc một phần của peptit kết nối của chuỗi TCRδ, và chuỗi còn lại bao gồm miền IgV_L của kháng thể kháng AFP158/HLA-A*02:01 (SEQ ID NO: 63) được dung hợp với miền IgC_L (SEQ ID NO: 48) được dung hợp với phần đầu cùng carboxy của chuỗi TCRγ bao gồm miền xuyên màng và tất cả hoặc một phần của peptit kết nối của chuỗi TCRγ. Theo một số phương án, cả hai miền xuyên màng TCR là xuất hiện tự nhiên. Theo một số phương án, ít nhất một trong số các miền xuyên màng TCR là biến thể không xuất hiện tự nhiên bao gồm một hoặc nhiều sự thế axit amin. Theo một số phương án, phần đầu cùng carboxy của chuỗi TCRδ bao gồm peptit kết nối có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 31 hoặc 32. Theo một số phương án, phần đầu cùng carboxy của chuỗi TCRδ bao gồm miền xuyên màng có trình tự axit amin của trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 7, và 9-13). Theo một số phương án, phần đầu cùng carboxy của chuỗi TCRγ bao gồm peptit kết nối có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 33 hoặc 34. Theo một số phương án, phần đầu cùng carboxy của chuỗi TCRγ bao gồm miền xuyên màng có trình tự axit amin của trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 8, và 14-26).

Ở thiết kế caTCR-2 (IgV_H-IgC_H1-bản lề-TCRδ/IgV_L-IgC_L-cầu nối-TCRγ), miền biến đổi, miền không đổi thứ nhất, và bản lề (IgV_H-IgC_H1-bản lề) của chuỗi nặng kháng thể được thay thế phần đầu cùng amino của chuỗi TCRδ lên đến vị trí bao quanh hoặc bên trong peptit kết nối ở miền ngoại bào của chuỗi TCRδ sau vùng Vδ-Cδ, tùy ý trong đó miền xuyên màng của chuỗi TCRδ được mô tả, như bằng cách thế một hoặc nhiều axit amin. Miền biến đổi và miền không đổi của chuỗi nhẹ kháng thể tương ứng được dung hợp với cầu nối (IgV_L-IgC_L-cầu nối) thay thế phần đầu cùng amino của chuỗi TCRγ lên đến vị trí bao quanh hoặc bên trong peptit kết nối ở miền ngoại bào của chuỗi TCRγ sau vùng Vγ-Cγ, tùy ý trong đó miền xuyên màng của chuỗi TCRγ được cải biến, như bằng cách thế một hoặc nhiều axit amin.

Ở thiết kế caTCR-3 (IgV_H-IgC_H1-bản lề-TCRδ/IgV_H-IgC_H1-bản lề-TCRγ + IgV_L-IgC_L), miền biến đổi, miền không đổi thứ nhất, và bản lề (IgV_H-IgC_H1-bản lề) của chuỗi nặng kháng thể thay thế phần đầu cùng amino của chuỗi TCRδ lên đến vị trí bao quanh

hoặc bên trong peptit kết nối ở miền ngoại bào của chuỗi TCRδ sau vùng Vδ-Cδ, tùy ý trong đó miền xuyên màng của chuỗi TCRδ được cải biến, như bằng cách thế một hoặc nhiều axit amin. Miền biến đổi, miền không đổi thứ nhất, và bản lề (IgV_H-IgC_H1-bản lề) của chuỗi nặng kháng thể thay thế phần đầu cùng amino của chuỗi TCRγ lên đến vị trí bao quanh hoặc bên trong peptit kết nối ở miền ngoại bào của chuỗi TCRγ sau vùng Vγ-Cγ, tùy ý trong đó miền xuyên màng của chuỗi TCRγ được cải biến, như bằng cách thế một hoặc nhiều axit amin. Miền biến đổi và miền không đổi của chuỗi nhẹ kháng thể tương ứng (IgV_L-IgC_L) được liên kết với miền IgV_H-IgC_H1.

Ở thiết kế caTCR-4 (IgV_H-TCRδ/IgV_L-TCRγ), miền biến đổi (IgV_H) của chuỗi nặng kháng thể thay thế phần đầu cùng amino của chuỗi TCRδ lên đến vị trí bao quanh hoặc bên trong peptit kết nối ở miền ngoại bào của chuỗi TCRδ sau vùng Vδ-Cδ, tùy ý trong đó miền xuyên màng của chuỗi TCRδ được cải biến, như bằng cách thế một hoặc nhiều axit amin. Miền biến đổi (IgV_L) của chuỗi nhẹ kháng thể tương ứng thay thế phần đầu cùng amino của chuỗi TCRγ lên đến vị trí bao quanh hoặc bên trong peptit kết nối ở miền ngoại bào của chuỗi TCRγ sau vùng Vγ-Cγ, tùy ý trong đó miền xuyên màng của chuỗi TCRγ được cải biến, như bằng cách thế một hoặc nhiều axit amin.

Ở thiết kế caTCR-5 (IgV_H-IgV_L-TCRδ/TCRγ), miền biến đổi của chuỗi nặng kháng thể được dung hợp với miền biến đổi của chuỗi nhẹ kháng thể tương ứng (IgV_H-IgV_L hoặc IgV_L- IgV_H) thay thế phần đầu cùng amino của chuỗi TCRδ lên đến vị trí bao quanh hoặc bên trong peptit kết nối ở miền ngoại bào của chuỗi TCRδ sau vùng Vδ-Cδ, tùy ý trong đó miền xuyên màng của chuỗi TCRδ được cải biến, như bằng cách thế một hoặc nhiều axit amin. Phần đầu cùng amino của chuỗi TCRγ lên đến vị trí bao quanh hoặc bên trong peptit kết nối ở miền ngoại bào của chuỗi TCRγ sau vùng Vγ-Cγ bị loại bỏ, tùy ý trong đó miền xuyên màng của chuỗi TCRγ được cải biến, như bằng cách thế một hoặc nhiều axit amin.

Ở thiết kế caTCR-6 (IgV_H-IgV_L-TCRδ/IgV_H-IgV_L-TCRγ), miền biến đổi của chuỗi nặng kháng thể được dung hợp với miền biến đổi của chuỗi nhẹ kháng thể tương ứng (IgV_H- IgV_L hoặc IgV_L- IgV_H) thay thế phần đầu cùng amino của chuỗi TCRδ lên đến vị trí bao quanh hoặc bên trong peptit kết nối ở miền ngoại bào của chuỗi TCRδ sau vùng Vδ-Cδ, tùy ý trong đó miền xuyên màng của chuỗi TCRδ được cải biến, như bằng cách thế một hoặc nhiều axit amin. Miền biến đổi của chuỗi nặng kháng thể được dung

hợp với miền biến đổi của chuỗi nhẹ kháng thể tương ứng (IgV_H- IgV_L hoặc IgV_L- IgV_H) thay thế phần đầu cùng amino của chuỗi TCRγ lên đến vị trí bao quanh hoặc bên trong peptit kết nối ở miền ngoại bào của chuỗi TCRγ sau vùng Vγ-Cγ, tùy ý trong đó miền xuyên màng của chuỗi TCRγ được cải biến, như bằng cách thế một hoặc nhiều axit amin.

Ví dụ 2: Tạo cấu trúc và mô tả đặc điểm của các tế bào T được tải nạp với caTCR-1 kháng CD19 và thụ thể kích thích khảm kháng CD19

Mảnh axit nucleic mã hóa gốc liên kết kháng CD19 (các SEQ ID NO: 58 và 59) được sử dụng để tạo ra cả thụ thể đồng kích thích khảm (CSR; còn được gọi ở đây là "CSR1") bao gồm các trình tự xuyên màng và truyền tín hiệu nội bào CD28 (SEQ ID NO: 51) và các cấu trúc caTCR-1 (caTCR-1-0 hoặc caTCR-1-TM5). Các tế bào T chính được tải nạp với một mình CSR, một mình caTCR-1-0, caTCR-1-0 kết hợp với CSR, hoặc caTCR-1-TM5 kết hợp với CSR. Hiệu quả tải nạp được xác định bằng cách nhuộm bề mặt tế bào và tất cả các tế bào T caTCR-1 được khớp tại khoảng 40% độ dương tính thụ thể bằng cách trộn với các tế bào T giả.

Sự tiêu diệt *in vitro*

Các tế bào NALM6 âm tính CD80/86 (tế bào bệnh bạch cầu biểu hiện CD19) được sử dụng dưới dạng các tế bào đích cho sự kích thích tế bào T tại tỷ lệ của yếu tố tác động so với đích là 2,5:1. Sự phân giải tế bào T đặc hiệu được đo sau 16 giờ ủ bằng cách sử dụng thử nghiệm tính gây độc tế bào không phóng xạ Cytox 96 (Promega).

Sự biểu hiện của CSR kháng CD19 với caTCR-1-0 kháng CD19 hoặc caTCR-1-TM5 kháng CD19 đã tạo ra các tế bào T gây độc tế bào chức năng đầy đủ có khả năng phân giải tế bào khối u NALM6 *in vitro* (Fig.2). Vì các tế bào T biểu hiện chỉ caTCR-1-0 và các tế bào T biểu hiện cả caTCR-1 (caTCR-1-0 hoặc caTCR-1–TM5) và CSR đều có khả năng phân giải gần như 100% tế bào đích NALM6, sự sai khác không đáng kể về số lượng các tế bào đích bị tiêu diệt được quan sát thấy giữa hai loại tế bào T.

Sự tiết xytokin

Nồng độ của các xytokin được giải phóng vào dịch nổi của các phản ứng tiêu diệt *in vitro* được đo bằng Bioplex200 (Luminex) sử dụng kit Bio-plex Pro Human Cytokine 8-plex (BioRad). Các tế bào T biểu hiện CSR kết hợp với caTCR (các tế bào T dương

tính với CSR và dương tính với caTCR) đã giải phóng nhiều xytokin gây độc tế bào hơn các tế bào T biểu hiện mình ca-TCR-1-0 (Fig.3).

Sự biểu hiện xytokin nội bào

Các tế bào T được kích thích bằng các tế bào đích ở tỷ lệ E:T là 1:2 trong sự có mặt của chất ức chế tiết brefeldin A (BFA) trong 4 giờ. Các tế bào T được thấm và các kháng thể đặc hiệu xytokin được sử dụng để phát hiện các xytokin được biểu hiện đáp ứng với sự kích thích khối u. Tỷ lệ phần trăm của các tế bào dương tính xytokin được xác định bằng cách sử dụng phép đo tế bào theo dòng. Các tế bào T dương tính CSR và dương tính caTCR biểu hiện nhiều xytokin nội bào hơn các tế bào T biểu hiện mình ca-TCR-1-0 (bảng 5).

Bảng 5

Sự biểu hiện TNFα nội bào ở các tế bào CD8+ T			
% dương tính	Raji	NALM6	Một mình tế bào T
CSR	0,58	0,44	0,04
caTCR-1-0	24,3	20,1	0,04
caTCR-1-0+CSR	28,7	28,2	0,07
caTCR-1-TM5+CSR	29	31,5	0,04
Sự biểu hiện IL-2 nội bào ở các tế bào CD8+ T			
% dương tính	Raji	NALM6	Một mình tế bào T
CSR	0,97	0,71	0,49
caTCR-1-0	8,5	4,36	0,61
caTCR-1-0+CSR	12,5	8,2	0,53
caTCR-1-TM5+CSR	10,6	8,2	0,65
Sự biểu hiện IFN-γ nội bào ở các tế bào CD8+ T			
% dương tính	Raji	NALM6	Một mình tế bào T
CSR	1,43	2,28	0,17
caTCR-1-0	18,2	15,5	0,78
caTCR-1-0+CSR	21,8	18,8	1,72
caTCR-1-TM5+CSR	18,5	16,4	0,51

Các kết quả này cùng nhau chỉ ra là sự bổ sung CSR này làm tăng độ nhạy và khả năng đáp ứng của các tế bào T caTCR này. Lượng tăng lên của xytokin được biểu hiện và được giải phóng từ các tế bào T dương tính kép với CSR-caTCR chỉ ra là sự đồng kích thích của cả caTCR-1 và CSR làm tăng tiềm năng gây độc tế bào của các tế bào T.

Hiện tượng mất hạt

Cơ chế chính mà các tế bào T phân giải các tế bào khối u là bằng cách tạo ra các hạt tiết của các phân tử gây độc tế bào mà được giải phóng vào các tế bào đích. CD107a có thể được sử dụng là chỉ thị của hoạt tính mất hạt và sự biểu hiện tăng của CD107a liên quan đến sự tăng chức năng tế bào T gây độc tế bào.

Các tế bào T được trộn với kháng thể kháng CD107a được liên hợp với chất phát quang và được kích thích bằng các tế bào đích ở tỷ lệ E:T là 1:2 trong sự có mặt của chất ức chế nhập bào monensin trong 4 giờ. Lượng CD107a được phát hiện trên bề mặt tế bào T là số đo trực tiếp của mức độ mất hạt gây độc tế bào được cảm ứng bởi sự nhận diện kháng nguyên. Sự gắn kết của CSR này trên các tế bào T caTCR làm tăng sự mất hạt tế bào T, còn chứng tỏ là CSR làm cho các tế bào T trị liệu hướng đến các tế bào khối u dự tính hiệu quả hơn (Fig.4).

Sự tăng sinh

Sự tăng sinh và độ bền của các tế bào T được cải biến di truyền là yếu tố quyết định cho sự thành công của các liệu pháp truyền tế bào T thích ứng khi điều trị bệnh ung thư. Để thử nghiệm hiệu quả của CSR này đối với sự tăng sinh và độ bền của tế bào T, các tác giả sáng chế đã đánh dấu các tế bào T bằng thuốc nhuộm nội bào CFSE và quan sát sự pha loãng thuốc nhuộm khi các tế bào T phân chia khi được kích thích bằng các tế bào khối u. Các tác giả sáng chế cũng có khả năng đo độ bền của các tế bào T bằng cách đếm số lượng các tế bào dương tính CFSE còn lại tại ngày được chỉ định.

Các tế bào T tương ứng không được cung cấp huyết thanh qua đêm và được đánh dấu bằng CFSE sử dụng CellTrace CFSE (Thermo Fisher C34554). 100.000 tế bào T được ủ ở tỷ lệ E:T là 2:1 và phép đo tế bào theo dòng được sử dụng để quan sát sự pha loãng theo dãy của thuốc nhuộm CFSE khi các tế bào T phân chia tại ngày được chỉ định. Tổng số tế bào T được đếm bằng FACs.

Sự pha loãng CFSE tăng với sự kích thích CSR, chỉ ra là các tế bào T này có tiềm năng tăng sinh cao hơn (Fig.5). Quan trọng là cũng có sự tăng ở số lượng tế bào có nghĩa là các tế bào này không chỉ tăng sinh tốt hơn mà độ bền của chúng cũng được duy trì (bảng 6).

Bảng 6

Số các tế bào T vẫn còn sau khi gắn kết						
	BV173			NALM6		
	-0	-0 +CSR	-TM5 +CSR	-0	-0 +CSR	-TM5 +CSR
Ngày 3	10354	28847	38830	6591	17260	32331
Ngày 5	2945	16049	26551	1240	2988	8620
Ngày 7	253	2135	5985	329	158	684

Các kết quả này chỉ ra là các tác giả sáng chế có khả năng kích thích đồng thời cả CSR và caTCR với các tế bào khối u biểu hiện cả phối tử đích và kháng nguyên đích, và sự đồng kích thích CSR và caTCR tăng tính gây độc tế bào, tiềm năng tăng sinh, và độ bền của các tế bào T caTCR. Đây là tất cả các đặc tính mà sẽ làm tăng hiệu quả điều trị của các liệu pháp dựa trên caTCR bằng cách sử dụng sự truyền thích ứng.

Ví dụ 3. Tạo cấu trúc và mô tả đặc điểm của các tế bào T được tải nạp với caTCR-1 kháng AFP và CSR kháng GPC3

Mảnh axit nucleic mã hóa gốc liên kết kháng AFP (các SEQ ID NO: 62 và 63) được sử dụng để tạo ra các cấu trúc caTCR-1 (caTCR-1-0 hoặc caTCR-1-TM5). Mảnh axit nucleic mã hóa gốc liên kết kháng GPC3 (các SEQ ID NO: 64 và 65) được sử dụng để tạo ra CSR (*tức là*, CSR1) bao gồm các trình tự xuyên màng và truyền tín hiệu nội bào CD28 (SEQ ID NO: 51).

Sự tiêu diệt *in vitro*

Các tế bào HEPG2 (các tế bào ung thư gan người biểu hiện AFP và GPC3) và các tế bào HEPG2-GPC3.KO (các tế bào HEPG2 có sự bất hoạt được hướng đích của gen GPC3) được sử dụng là tế bào đích cho sự kích thích tế bào T ở tỷ lệ yếu tố tác động so

với đích là 2,5:1. Sự phân giải tế bào T đặc hiệu được đo sau 16 giờ ủ bằng cách sử dụng thử nghiệm tính gây độc tế bào không phóng xạ Cytox 96 (Promega).

Sự biểu hiện CSR kháng GPC3 với caTCR-1-0 kháng AFP hoặc caTCR-1-TM5 kháng AFP tạo ra các tế bào T gây độc tế bào chức năng đầy đủ có khả năng phân giải các tế bào HEPG2 *in vitro* (Fig.6). Các tế bào T chỉ biểu hiện caTCR-1-0 có khả năng tiêu diệt ít đặc hiệu hơn (khoảng 15%) so với các tế bào T biểu hiện cả caTCR-1 (caTCR-1-0 hoặc caTCR-1–TM5) và CSR (nằm trong khoảng từ khoảng 55% đến khoảng 65%). Ngược lại, khả năng tiêu diệt đặc hiệu bị giảm đến khoảng 10% đối với các tế bào T biểu hiện cả caTCR và CSR khi sử dụng các tế bào đích HEPG2-GPC3.KO (Fig.6), chỉ ra rằng sự gắn kết của CSR này với phối tử đích của nó chịu trách nhiệm cho tính gây độc tăng.

Sự tiết xytokin

Nồng độ của các xytokin được giải phóng vào dịch nổi của các thí nghiệm tiêu diệt *in vitro* được đo bằng Bioplex200 (Luminex) sử dụng kit Bio-plex Pro Human Cytokine 8-plex (BioRad). Các tế bào T dương tính CSR và dương tính caTCR giải phóng nhiều xytokin gây độc tế bào hơn các tế bào T biểu hiện chỉ một mình ca-TCR-1-0 đối với các tế bào đích HEPG2 biểu hiện cả kháng nguyên đích caTCR và phối tử đích CSR (Fig.7). Ngược lại, có ít hoặc không có sự khác biệt giữa các tế bào T biểu hiện mình ca-TCR-1-0 hoặc cả caTCR và CSR đối với các tế bào đích HEPG2-GPC3.KO thiếu phối tử đích CSR (Fig.7).

Sự biểu hiện xytokin nội bào

Các tế bào T được kích thích bằng các tế bào đích (HEPG2) ở tỷ lệ E:T là 1:2 trong sự có mặt của chất ức chế tiết brefeldin A (BFA) trong 4 giờ. Các tế bào T được thấm và các kháng thể đặc hiệu xytokin được sử dụng để phát hiện các xytokin được biểu hiện đáp ứng với sự kích thích khối u. Phần trăm tế bào dương tính xytokin được xác định bằng cách sử dụng phép đo tế bào theo dòng. Các tế bào T dương tính CSR và dương tính caTCR biểu hiện nhiều xytokin nội bào hơn các tế bào T biểu hiện mình ca-TCR-1-0 (bảng 7).

Bảng 7

Sự biểu hiện TNFα nội bào ở các tế bào CD8+ T		
% dương tính	HEPG2	Một mình tế bào T
CSR	0,3	0,2
caTCR-1-0	14,7	0,1
caTCR-1-0+CSR	17,0	0,1
caTCR-1-TM5+CSR	15,7	0,1

Sự biểu hiện IL-2 nội bào ở các tế bào CD4+ T		
% dương tính	HEPG2	Một mình tế bào T
CSR	0,1	0,04
caTCR-1-0	8,2	0,11
caTCR-1-0+CSR	9,8	0,05
caTCR-1-TM5+CSR	11,2	0,03

Sự biểu hiện IFNγ nội bào ở các tế bào CD8+ T		
% dương tính	HEPG2	Một mình tế bào T
CSR	0,2	0,08
caTCR-1-0	3,1	0,2
caTCR-1-0+CSR	4,5	0,1
caTCR-1-TM5+CSR	5,1	0,06

Các kết quả này cùng nhau chỉ ra là sự bổ sung CSR này làm tăng độ nhạy và khả năng đáp ứng của các tế bào T caTCR cộng CSR có kháng nguyên đích caTCR và phối tử đích CSR khác nhau. Lượng tăng lên của xytokin được biểu hiện và được giải phóng từ các tế bào T dương tính kép với CSR-caTCR này tạo ra bằng chứng bổ sung là sự đồng kích thích của cả caTCR-1 và CSR làm tăng tiềm năng gây độc tế bào của các tế bào T.

Hiện tượng mất hạt

Các tế bào T được trộn với kháng thể kháng CD107a được liên hợp với chất phát quang và được kích thích bằng các tế bào đích HEPG2 ở tỷ lệ E:T là 1:2 trong sự có mặt của chất ức chế nhập bào monensin trong 4 giờ. Sự gắn kết của CSR này trên các tế bào T caTCR làm tăng sự mất hạt tế bào T, còn chứng tỏ là CSR làm cho các tế bào T trị liệu hướng đến các tế bào khối u dự tính hiệu quả hơn (Fig.8).

Sự tăng sinh

Các tế bào T được đánh dấu với thuốc nhuộm nội bào CFSE, và chất pha loãng thuốc nhuộm và số lượng tế bào dương tính CFSE duy trì tại ngày được chỉ định được đo.

Các tế bào T tương ứng không được cung cấp huyết thanh qua đêm và được đánh dấu bằng CFSE sử dụng CellTrace CFSE (Thermo Fisher C34554). 100.000 tế bào T được ủ ở tỷ lệ E:T là 2:1 và phép đo tế bào theo dòng được sử dụng để quan sát sự pha loãng theo dãy của thuốc nhuộm CFSE khi các tế bào T phân chia tại ngày được chỉ định. Tổng số lượng tế bào T được đếm bằng FACs.

Sự pha loãng CFSE tăng với sự kích thích CSR, chỉ ra là các tế bào T có tiềm năng tăng sinh cao hơn (Fig.9). Quan trọng là cũng có sự tăng ở số lượng tế bào có nghĩa là các tế bào này không chỉ tăng sinh tốt hơn mà độ bền của chúng cũng được duy trì (bảng 8).

Bảng 8

Số các tế bào T vẫn còn sau khi gắn kết với HEPG2			
	Ngày 3	Ngày 5	Ngày 7
CSR	7.147	4.519	3.055
caTCR1-0	5.674	4.362	3.372
caTCR1-0 +CSR	31.422	18.689	8.833
caTCR-1-TM5 +CSR	28.874	21.978	9.471

Các kết quả này chỉ ra là các tác giả sáng chế có khả năng kích thích đồng thời cả CSR và caTCR với các tế bào khối u dương tính phối tử, và sự đồng kích thích của CSR và caTCR tăng tính gây độc tế bào, tiềm năng tăng sinh, và độ bền của các tế bào T

caTCR. Đây là tất cả các đặc tính mà sẽ làm tăng hiệu quả điều trị của các liệu pháp dựa trên caTCR bằng cách sử dụng sự truyền thích ứng.

Ví dụ 4. Tạo cấu trúc và mô tả đặc điểm của các tế bào T được tải nạp với caTCR-1 kháng CD19 và CSR kháng CD20

Mảnh axit nucleic mã hóa gốc liên kết kháng CD20 (các SEQ ID NO: 60 và 61) được sử dụng để tạo ra CSR kháng CD20 (*tức là*, "CSR1") mà bao gồm các trình tự xuyên màng và truyền tín hiệu nội bào CD28 (SEQ ID NO: 51), mà được biểu hiện trên cùng vectơ mà biểu hiện caTCR-1-0 hoặc caTCR-1-TM5 kháng CD19 được tạo ra bằng cách sử dụng gốc liên kết kháng CD19 (các SEQ ID NO: 58 và 59).

Sự tiêu diệt *in vitro*

Các tế bào Raji, BV173, NALM6, và Jeko-1 (các dòng tế bào mà biểu hiện CD19 và CD20) được sử dụng làm các tế bào đích cho sự tiêu diệt của tế bào T ở tỷ lệ yếu tố tác động so với đích là 2,5:1. Sự phân giải tế bào T đặc hiệu được đo sau 16 giờ ủ bằng cách sử dụng thử nghiệm tính gây độc tế bào không phóng xạ Cytox 96 (Promega).

Sự biểu hiện của CSR kháng CD20 với caTCR-1-0 kháng CD19 hoặc caTCR-1-TM5 kháng CD19 tạo ra các tế bào T gây độc tế bào đầy đủ chức năng có khả năng phân giải nhiều tế bào khối u dương tính với CD19, dương tính với CD20 *in vitro* (Fig.10).

Sự tiết xytokin

Nồng độ của các xytokin được giải phóng vào dịch nổi của các thí nghiệm tiêu diệt *in vitro* Raji được đo bằng Bioplex200 (Luminex) sử dụng kit Bio-plex Pro Human Cytokine 8-plex (BioRad). Các tế bào T dương tính CSR và dương tính caTCR giải phóng GM-CSF, IFNγ, và TNFα nhiều hơn các tế bào T biểu hiện một mình ca-TCR-1-0 (Fig.11).

Hiện tượng mất hạt

Các tế bào T được trộn với kháng thể kháng CD107a được liên hợp với chất phát quang và được kích thích bằng các tế bào đích Raji ở tỷ lệ E:T là 1:2 trong sự có mặt của chất ức chế nhập bào monensin trong 4 giờ. Sự gắn kết của CSR này trên các tế bào T caTCR làm tăng sự mất hạt tế bào T, còn chứng tỏ là CSR làm cho các tế bào T trị liệu hướng đến các tế bào khối u dự tính hiệu quả hơn (Fig.12).

Các ví dụ 2-4 chỉ ra rằng CSR là phân tử điều biến mà có thể được sử dụng kết hợp với nhiều gốc hướng đích kháng nguyên khác nhau để làm tăng hiệu quả điều trị của các tế bào T biểu hiện caTCR cho phổ rộng các tế bào bị bệnh.

Ví dụ 5: Tạo cấu trúc và mô tả đặc điểm của các tế bào T được tải nạp với caTCR-1 kháng CD19 và các biến thể thụ thể kích thích khảm kháng CD19

Các mảnh axit nucleic mã hóa gốc liên kết kháng CD19 (các SEQ ID NO: 58 và 59) được sử dụng để tạo ra cả thụ thể đồng kích thích khảm (CSR) và cấu trúc caTCR-1-0 (được đề cập trong ví dụ này là "caTCR-1"). Các CSR khác nhau được tạo ra bằng cách dung hợp gốc liên kết kháng CD19 với trình tự CSR. CSR1 bao gồm các trình tự xuyên màng và truyền tín hiệu nội bào CD28 (SEQ ID NO: 90). CSR2 bao gồm trình tự xuyên màng CD8 và trình tự truyền tín hiệu nội bào 4-1BB (SEQ ID NO: 91). CSR3 bao gồm các trình tự xuyên màng và truyền tín hiệu nội bào 4-1BB (SEQ ID NO: 92). CSR4 bao gồm trình tự xuyên màng CD8 và trình tự truyền tín hiệu nội bào CD27 (SEQ ID NO: 93). CSR5 bao gồm các trình tự xuyên màng và truyền tín hiệu nội bào CD27 (SEQ ID NO: 94). CSR6 bao gồm trình tự xuyên màng CD8 và trình tự truyền tín hiệu nội bào CD30 (SEQ ID NO: 95). CSR7 bao gồm các trình tự xuyên màng và truyền tín hiệu nội bào CD30 (SEQ ID NO: 96). CSR8 bao gồm trình tự xuyên màng CD8 và trình tự truyền tín hiệu nội bào OX40 (SEQ ID NO: 97). CSR9 bao gồm các trình tự xuyên màng và truyền tín hiệu nội bào OX40 (SEQ ID NO: 98).

Các tế bào T sơ cấp được tải nạp với một mình CSR kháng CD19, hoặc với caTCR-1 kháng CD19 kết hợp với CSR kháng CD19. Hiệu quả tải nạp được xác định bằng cách nhuộm bề mặt tế bào và tất cả các tế bào T được tải nạp caTCR được khớp tại khoảng 40% độ dương tính thụ thể bằng cách trộn với các tế bào T giả.

Các tế bào T biểu hiện mình CSR kháng CD19

Sự tiêu diệt *in vitro*

Các tế bào Raji hoặc NALM6 được sử dụng làm tế bào đích cho sự đồng kích thích tế bào T ở tỷ lệ yếu tố tác động so với đích là 2,5:1. Sự phân giải tế bào T đặc hiệu được đo sau 16 giờ ủ bằng cách sử dụng thử nghiệm tính gây độc tế bào không phóng xạ Cytox 96 (Promega). Các tế bào T biểu hiện một mình CSR-6, CSR-7, CSR-8 hoặc

CSR-9 kháng CD19 không tạo ra số lượng tăng các tế bào đích bị tiêu diệt so với các tế bào T giả không được tải nạp (số liệu không được thể hiện).

Sự tiết xytokin

Nồng độ của các xytokin được giải phóng vào dịch nổi của các phản ứng tiêu diệt *in vitro* được đo bằng Bioplex200 (Luminex) sử dụng kit Bio-plex Pro Human Cytokine 8-plex (BioRad). Các tế bào T biểu hiện một mình CSR-6, CSR-7, CSR-8 hoặc CSR-9 kháng CD19 không giải phóng lượng đáng kể IFNγ khi được ủ với Raji hoặc NALM6 (số liệu không được thể hiện).

Các tế bào T biểu hiện caTCR-1 kháng CD19 và CSR kháng CD19

Ở hai mẻ thí nghiệm khác nhau, các tế bào T tương ứng biểu hiện cả caTCR-1 kháng CD19 và CSR kháng CD19 không được cung cấp huyết thanh qua đêm và được đánh dấu bằng CFSE sử dụng CellTrace CFSE (Thermo Fisher C34554). Các tế bào T được ủ với NALM6 ở tỷ lệ E:T là 2:1 và phép đo tế bào theo dòng được sử dụng để quan sát sự pha loãng theo dãy của thuốc nhuộm CFSE khi các tế bào T phân chia tại ngày chỉ định. Tổng số lượng tế bào T được đếm bằng FACs. Các thí nghiệm này được lặp lại bằng cách sử dụng các tế bào T sơ cấp thu được từ người cho thứ hai. Các kết quả tương tự được quan sát thấy (số liệu không được thể hiện).

Sự pha loãng CFSE được quan sát ở tất cả các tế bào T biểu hiện cả caTCR-1 kháng CD19 và CSR kháng CD19, chỉ ra khả năng tăng sinh cao của các tế bào T này (Fig.14-Fig.15). Ngoài ra, các tế bào T biểu hiện cả caTCR-1 kháng CD19 và CSR kháng CD19 thể hiện độ bền đáng kể trong khoảng thời gian 10 ngày (bảng 9). Ở thí nghiệm đối chứng, các tế bào T biểu hiện loại bất kỳ trong số mình CSR-1 kháng CD19 đến CSR-5 kháng CD19 không thể hiện tiềm năng tăng sinh tăng hoặc độ bền tăng theo thời gian (số liệu không được thể hiện).

Bảng 9

Số các tế bào T vẫn còn sau khi gắn kết với NALM6					
	caTCR-1 + CSR-1	caTCR-1 + CSR-2	caTCR-1 + CSR-3	caTCR-1 + CSR-4	caTCR-1 + CSR-5
Ngày 3	144622	171874	128353	158852	173153
Ngày 5	307957	196842	126643	237138	275630
Ngày 7	187440	184933	75822	163892	168092

Ngày 10	88562	114640	36480	111527	118921
Số các tế bào T vẫn còn sau khi gắn kết với NALM6					
	caTCR-1 + CSR-1	caTCR-1 + CSR-6	caTCR-1 + CSR-7	caTCR-1 + CSR-8	caTCR-1 + CSR-9
Ngày 3	206073	234073	202600	264248	240125
Ngày 5	89685	243962	226587	264685	225515
Ngày 7	111523	186479	187614	175982	150052
Ngày 10	141112	285946	278322	274536	228298

Ví dụ 6: Nghiên cứu hiệu quả *in vivo* của các tế bào T được tải nạp với caTCR-1 kháng CD19 và CSR kháng CD19

Hoạt tính kháng khối u *in vivo* của các tế bào T biểu hiện cả caTCR-1 kháng CD19 và CSR-1 kháng CD19 được kiểm tra ở mô hình bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp tính (ALL) tiền tế bào B CD19+ NALM-6. Các tế bào NALM-6 biểu hiện luciferaza được cấy trong tĩnh mạch (i.v.) vào chuột nhắt bị tổn thương miễn dịch NOD SCID gamma (NSG) và gánh nặng khối u được đánh giá bằng cách đo sự sinh phát quang thu được từ khối u. Sáu ngày sau khi cấy khối u, chuột nhắt được chọn ngẫu nhiên dựa vào tổng luồng sinh phát quang vào các nhóm điều trị: (1) tiêm i.v. 5×10^6 tế bào T khớp với người cho không được tải nạp (Giả dược), (2) tiêm i.v. 2×10^6 tế bào T biểu hiện chỉ caTCR-1 kháng CD19 ("tế bào T caTCR-1") và (3) tiêm i.v. 2×10^6 tế bào T biểu hiện cả caTCR-1 kháng CD19 và CSR-1 kháng CD19 ("các tế bào T caTCR-1 CSR-1"; n=6 con chuột/nhóm). Các hiệu quả sức khỏe thu được từ việc truyền tế bào T ở chuột nhắt được đánh giá bằng cách theo dõi vẻ ngoài chung của chúng, khối lượng cơ thể, và các biểu hiện lâm sàng khác của phản ứng bất lợi (bao gồm sự hạ nhiệt, hô hấp không tự nhiên, và sự liệt/yếu chi trước-chi sau).

Như được thể hiện trong FIG.16, trong khi cả sự điều trị tế bào T caTCR-1 và tế bào T caTCR-1 CSR-1 đều dẫn đến sự ức chế sinh trưởng khối u, các tế bào T caTCR-1 CSR-1 thể hiện hoạt tính kháng khối u tăng so với các tế bào T caTCR-1. Tất cả chuột nhắt được điều trị bằng tế bào T caTCR-1 và được điều trị bằng tế bào T caTCR-1 CSR-1 đã chứng tỏ dáng đi, tư thế, và hoạt tính/đáp ứng bình thường trong thời gian nghiên cứu. Ngoài ra, chuột nhắt được điều trị bằng tế bào T caTCR-1 và được điều trị bằng các tế bào T caTCR-1 CSR-1 không bị giảm khối lượng cơ thể trong nghiên cứu. Tổng

quan, không quan sát thấy các tham số bất thường ở chuột nhắt được điều trị chứng tỏ độ an toàn của liệu pháp tế bào T caTCR-1 CSR-1.

Để xác định mức giải phóng xytokin *in vivo*, các xytokin quan trọng, bao gồm các xytokin liên quan đến hội chứng giải phóng xytokin lâm sàng, được phân tích 24 giờ sau khi chuột nhắt mang khối u NALM-6 được sử dụng các tế bào CAR-T kháng CD19 hoặc các tế bào T caTCR-1 CSR-1 kháng CD19. Các mức xytokin được định lượng bằng công nghệ Luminex Magpix bằng cách sử dụng các kit BioRad Bio-Plex. Như được thể hiện trong Fig.17, chuột nhắt được điều trị bằng tế bào T caTCR-1 CSR-1 có mức giải phóng xytokin thấp hơn đáng kể so với chuột nhắt được điều trị CAR-T.

Ví dụ 7: Nghiên cứu hiệu quả *in vivo* của các tế bào T được tải nạp với caTCR-1 kháng AFP và CSR kháng GPC3

Hoạt tính kháng khối u *in vivo* của các tế bào T biểu hiện cả caTCR-1 kháng AFP và CSR kháng GPC3-1 (xem, ví dụ 3 về thông tin tạo cấu trúc) được thử nghiệm ở mô hình ghép ngoại lai ung thư gan $AFP^+/HLA\text{-}A2^+$ Hep G2 người được thiết lập. Các tế bào Hep G2 được cấy dưới da (s.c.) qua sườn bên phải của chuột nhắt SCID-Beige. Khi các khối u đạt đến kích thước ~100mm^3, chuột nhắt được tiêm trong khối u (i.t.) bằng (1) 5×10^6 tế bào T khớp người cho không được tải nạp (Giả dược), (2) 2×10^6 tế bào T biểu hiện CAR kháng AFP bao gồm cùng gốc liên kết kháng AFP (các SEQ ID NO: 62 và 63), hoặc (3) 2×10^6 tế bào T biểu hiện cả caTCR-1 kháng AFP và CSR kháng GPC3-1 (n=6 chuột nhắt/nhóm). Các hiệu quả sức khỏe thu được từ việc truyền tế bào T ở chuột nhắt được đánh giá bằng cách theo dõi vẻ ngoài chung của chúng, khối lượng cơ thể, và các dấu hiệu lâm sàng khác của phản ứng bất lợi (bao gồm sự hạ nhiệt, hô hấp không tự nhiên, và sự liệt/yếu chi trước-chi sau).

Như được thể hiện trong Fig.18, cả hai sự điều trị bằng tế bào CAR-T kháng AFP và tế bào T caTCR-1 kháng AFP/CSR kháng GPC3-1 đều tạo ra tác dụng ức chế sinh trưởng khối u rõ ràng và có ý nghĩa (****P<0,0001; kiểm định đa so sánh Dunnett). Tất cả chuột nhắt được điều trị bằng tế bào CAR-T kháng AFP và được điều trị bằng tế bào T caTCR-1 kháng AFP/CSR-1 kháng GPC3 đều chứng tỏ dáng đi, tư thế, và hoạt tính/đáp ứng bình thường trong thời gian nghiên cứu. Ngoài ra, chuột nhắt được điều trị bằng tế bào T CAR-T kháng AFP và được điều trị bằng tế bào T caTCR-1 kháng

AFP/CSR-1 kháng GPC3 không bị giảm khối lượng cơ thể trong nghiên cứu. Tổng quan, không quan sát thấy các tham số bất thường ở chuột nhắt được điều trị chứng tỏ độ an toàn của liệu pháp tế bào T caTCR-1 kháng AFP/CSR-1 kháng GPC3.

Danh mục trình tự

SEQ ID NO.	Mô tả	Trình tự
1	Miền không đổi TCRα	PNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSK DSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACAN AFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLS VIGFRILLLKVAGFNLLMTLRLWSS
2	Miền không đổi TCRβ	EDLNKVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPD HVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCL SSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDR AKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYEIL LGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDF
3	Miền không đổi TCRδ	SQPHTKPSVFVMKNGTNVACLVKEFYPKDIRINLVSSK KITEFDPAIVISPSGKYNAVKLGKYEDSNSVTCSVQHDN KTVHSTDFEVKTDSTDHVKPKETENTKQPSKSCHKPKA IVHTEKVNMMSLTVLGLRMLFAKTVAVNFLLTAKLFFL
4	Miền không đổi TCRγ	DKQLDADVSPKPTIFLPSIAETKLQKAGTYLCLLEKFFPD VIKIHWQEKKSNTILGSQEGNTMKTNDTYMKFSWLTVP EKSLDKEHRCIVRHENNKNGVDQEIIFPPIKTDVITMDPK DNCSKDANDTLLLQLTNTSAYYMYLLLLLKSVVYFAII TCCLLRRTAFCCNGEKS
5	Miền xuyên màng TCRα	ILLLKVAGFNLLMTLRLWSS
6	Miền xuyên màng TCRβ	TILYEILLGKATLYAVLVSALVL
7	Miền xuyên màng TCRδ	VLGLRMLFAKTVAVNFLLTAKLFFL
8	Miền xuyên màng TCRγ (giống như uniprot)	YYMYLLLLLKSVVYFAIITCCLL
9	Miền xuyên màng TCRδ F24S	VLGLRMLFAKTVAVNFLLTAKLFSL
10	Miền xuyên màng TCRδ M6V	VLGLRVLFAKTVAVNFLLTAKLFFL
11	Miền xuyên màng TCRδ L4C	VLGCRMLFAKTVAVNFLLTAKLFFL

12	Miền xuyên màng TCRδ V12F, N15S	VLGLRMLFAKTFAVSFLLTAKLFFL
13	Miền xuyên màng TCRδ L25S	VLGLRMLFAKTVAVNFLLTAKLFFS
14	Miền xuyên màng TCRγ V13Y	YYMYLLLLLKSVYYFAIITCCLLRRTAF
15	Miền xuyên màng TCRγ C21G	YYMYLLLLLKSVVYFAIITCGLLRRTAF
16	Miền xuyên màng TCRγ Y2L, M3V, A16V, I18V	YLVYLLLLLKSVVYFVIVTCCLLRRTAF
17	Miền xuyên màng TCRγ Y2L	YLMYLLLLLKSVVYFAIITCCLLRRTAF
18	Miền xuyên màng TCRγ M3V	YYVYLLLLLKSVVYFAIITCCLLRRTAF
19	Miền xuyên màng TCRγ A16V	YYMYLLLLLKSVVYFVIITCCLLRRTAF
20	Miền xuyên màng TCRγ I18V	YYMYLLLLLKSVVYFAIVTCCLLRRTAF
21	Miền xuyên màng TCRγ M3I	YYIYLLLLLKSVVYFAIITCCLLRRTAF
22	Miền xuyên màng TCRγ Y2I, M3I, A16I, I18L	YIIYLLLLLKSVVYFIILTCCLLRRTAF
23	Miền xuyên màng TCRγ L5C	YYMYCLLLLKSVVYFAIITCCLLRRTAF
24	Miền xuyên màng TCRγ L8F, V12F, F15S	YYMYLLLFLKSFVYSAIITCCLLRRTAF
25	Miền xuyên màng TCRγ C19M	YYMYLLLLLKSVVYFAIITMCLLRRTAF

26	Miền xuyên màng TCRγ Y1Q	**Q**YMYLLLLLKSVVYFAIITCCLLRRTAF
27	Peptit kết nối TCRα	ESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLSVIGFR
28	Peptit kết nối TCRα MD	IPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLSVIGFR
29	Peptit kết nối TCRβ	ADCGFTSVSYQQGVLSA
30	Peptit kết nối TCRβ MD	GRADCGFTSVSYQQGVLSA
31	Peptit kết nối TCRδ	DHVKPKETENTKQPSKSCHKPKAIVHTEKVNMMSLTVL GLR
32	Peptit kết nối TCRδ MD	EVKTDSTDHVKPKETENTKQPSKSCHKPKAIVHTEKVN MMSLTVLGLR
33	Peptit kết nối TCRγ	MDPKDNCSKDANDTLLLQLTNTSA
34	Peptit kết nối TCRγ MD	PIKTDVITMDPKDNCSKDANDTLLLQLTNTSA
35	Miền nội bào TCRβ	MAMVKRKDF
36	Miền nội bào TCRγ	RRTAFCCNGEKS
37	IgG1 C_H1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC
38	IgG2-0C C_H1	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGT QTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK
39	IgG2-1C C_H1	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGT QTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKC
40	IgG2-2C C_H1	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGT QTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCC
41	IgG3 C_H1	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYTCNVNHKPSNTKVDKRVELKTP
42	IgG4 C_H1	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT KTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYG
43	IgA1 C_H1	ASPTSPKVFPLSLCSTQPDGNVVIACLVQGFFPQEPLSVT WSESGQGVTARNFPPSQDASGDLYTTSSQLTLPATQCL AGKSVTCHVKHYTNPSQDVTVPCPVPSTPPTPSPSTPPTP SPS

44	IgA2 C_H1	ASPTSPKVFPLSLDSTPQDGNVVVACLVQGFFPQEPLSV TWSESGQNVTARNFPPSQDASGDLYTTSSQLTLPATQCP DGKSVTCHVKHYTNPSQDVTVPCPVPPPPP
45	IgD C_H1	APTKAPDVFPIISGCRHPKDNSPVVLACLITGYHPTSVTV TWYMGTQSQPQRTFPEIQRRDSYYMTSSQLSTPLQQWR QGEYKCVVQHTASKSKKEIFRWPESPKAQASSVPTAQP QAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEEKKKEKEKEEQEER ETKTP
46	IgE C_H1	ASTQSPSVFPLTRCCKNIPSNATSVTLGCLATGYFPEPV MVTWDTGSLNGTTMTLPATTLTLSGHYATISLLTVSGA WAKQMFTCRVAHTPSSTDWVDNKTFS
47	IgM C_H1	GSASAPTLFPLVSCENSPSDTSSVAVGCLAQDFLPDSITL SWKYKNNSDISSTRGFPSVLRGGKYAATSQVLLPSKDV MQGTDEHVVCKVQHPNGNKEKNVPLP
48	Miền IgC_L	GQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVT VAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTP EQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
49	Mảnh của CD28	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPF WVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDY MNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS
50	Mảnh của CD3-zeta	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDK RRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI GMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALP PR
51	Mảnh đồng kích thích CD28 1	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPF WVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDY MNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS
52	Mảnh đồng kích thích CD28 2	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAA YRS
53	Mảnh đồng kích thích 4-1BB 1	PADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQIISFFLALTSTALLFL LFFLTLRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCEL
54	Mảnh đồng kích thích 4-1BB 2	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGG CEL
55	Mảnh đồng kích thích OX40 1	DPPATQPQETQGPPARPITVQPTEAWPRTSQGPSTRPVE VPGGRAVAAILGLGLVLGLLGPLAILLALYLLRRDQRLP PDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI
56	Mảnh đồng kích thích OX40 2	ALYLLRRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTL AKI
57	Mảnh CD8 TM	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGL DFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC
58	Miền IgV_H của kháng thể kháng CD19	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVR QMPGKGLEWMGIIYPGDSDTRYSPSFQGQVTISADKSIS

		TAYLQWSSLKASDTAMYYCARQVWGWQGGMYPRSN WWYNLDSWGQGTLVTVSS
59	Miền IgV_L của kháng thể kháng CD19	LPVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNIGSKSVHWYQQK PGQAPVLVVYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVE AGDEADYYCQVWDSSSDYVVFGGGTKLTVLG
60	Miền IgV_H của kháng thể kháng CD20	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHW VKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTAD KSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNV WGAGTTVTVSS
61	Miền IgV_L của kháng thể kháng CD20	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQQKP GSSPKPWIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEA EDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKR
62	Miền IgV_H của kháng thể kháng AFP	EVQLVQSGAEVKKPGESLTISCKASGYSFPNYWITWVR QMSGGGLEWMGRIDPGDSYTTYNPSFQGHVTISIDKST NTAYLHWNSLKASDTAMYYCARYYVSLVDIWGQGTL VTVSS
63	Miền IgV_L của kháng thể kháng AFP	QSVLTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQ QHPGKAPKLMIYDVNNRPSEVSNRFSGSKSGNTASLTIS GLQAEDEADYYCSSYTTGSRAVFGGGTKLTVL
64	Miền IgV_H của kháng thể kháng GPC3	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVR QAPGKGLEWVSVIYSGGSSTYYADSVKGRFTISRDNSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTSYLNHGDYWGQGT LVTVSS
65	Miền IgV_L của kháng thể kháng GPC3	QSVLTQPPSVSAAPGQRVTISCSGTRSNIGSDYVSWYQH LPGTAPKLLVYGDNLRPSGIPDRFSASKSGTSATLGITGL QTGDEADYYCGTWDYTLNGVVFGGGTKLTVLG
66	Miền IgV_H của kháng thể kháng CD47	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYTFTNYYVFWVR QARGQRLEWIGDINPVNGDTNFNEKFKNRVTISADKSIS TAYLQWSSLKASDTAMYYCARGGYTMDYWGQGTLVT VSS
67	Miền IgV_L của kháng thể kháng CD47	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVHSNGNTYLH WYQQKPGKAPKLLIYKVSYRFSGVPDRFSGSGSGTDFT LKISRVEAEDVGVYYCSQNTHVPRTFGQGTKVEIKR
68	caTCR-1-0 kháng AFP158/HLA-A*02:01 delta	EVQLVQSGAEVKKPGESLTISCKASGYSFPNYWITWVR QMSGGGLEWMGRIDPGDSYTTYNPSFQGHVTISIDKST NTAYLHWNSLKASDTAMYYCARYYVSLVDIWGQGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCEVKTDSTD HVKPKETENTKQPSKSCHKPKAIVHTEKVNMMSLTVLG LRMLFAKTVAVNFLLTAKLFFL
69	caTCR-1-0 kháng AFP158/HLA-A*02:01 gamma	QSVLTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQ QHPGKAPKLMIYDVNNRPSEVSNRFSGSKSGNTASLTIS GLQAEDEADYYCSSYTTGSRAVFGGGTKLTVLGQPKA NPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKA DGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSH RSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECSPIKTDVITMDPKDNC

		SKDANDTLLLQLTNTSAYYMYLLLLLKSVVYFAIITCCL LRRTAFCCNGEKS
70	caTCR-1-TM5 kháng AFP158/HLA-A*02:01 delta	EVQLVQSGAEVKKPGESLTISCKASGYSFPNYWITWVR QMSGGGLEWMGRIDPGDSYTTYNPSFQGHVTISIDKST NTAYLHWNSLKASDTAMYYCARYYVSLVDIWGQGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCEVKTDSTD HVKPKETENTKQPSKSCHKPKAIVHTEKVNMMSLTVLG LRVLFAKTVAVNFLLTAKLFFL
71	caTCR-1-TM5 kháng AFP158/HLA-A*02:01 gamma	QSVLTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQ QHPGKAPKLMIYDVNNRPSEVSNRFSGSKSGNTASLTIS GLQAEDEADYYCSSYTTGSRAVFGGGTKLTVLGQPKA NPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKA DGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSH RSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECSPIKTDVITMDPKDNC SKDANDTLLLQLTNTSAYLVYLLLLLKSVVYFVIVTCCL LRRTAFCCNGEKS
72	caTCR-1-0 kháng CD19 delta	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVR QMPGKGLEWMGIIYPGDSDTRYSPSFQGQVTISADKSIS TAYLQWSSLKASDTAMYYCARQVWGWQGGMYPRSN WWYNMDSWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCEVKTDSTDHVKPKETENTKQPSKSCHKPKAI VHTEKVNMMSLTVLGLRMLFAKTVAVNFLLTAKLFFL
73	caTCR-1-0 kháng CD19 gamma	LPVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNIGSKSVHWYQQK PGQAPVLVVYDDSNRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVE AGDEADYYCQVWDSSSEYVVFGGGTKLTVLGQPKANP TVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKAD GSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHR SYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECSPIKTDVITMDPKDNCS KDANDTLLLQLTNTSAYYMYLLLLLKSVVYFAIITCCLL RRTAFCCNGEKS
74	caTCR-1-TM5 kháng CD19 delta	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVR QMPGKGLEWMGIIYPGDSDTRYSPSFQGQVTISADKSIS TAYLQWSSLKASDTAMYYCARQVWGWQGGMYPRSN WWYNMDSWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCEVKTDSTDHVKPKETENTKQPSKSCHKPKAI VHTEKVNMMSLTVLGLRVLFAKTVAVNFLLTAKLFFL
75	caTCR-1-TM5 kháng CD19 gamma	LPVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNIGSKSVHWYQQK PGQAPVLVVYDDSNRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVE AGDEADYYCQVWDSSSEYVVFGGGTKLTVLGQPKANP TVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKAD GSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHR

		SYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECSPIKTDVITMDPKDNCS KDANDTLLLQLTNTSAYLVYLLLLLKSVVYFVIVTCCL LRRTAFCCNGEKS
76	Cầu nối scFv	SRGGGGSGGGGSGGGGSLEMA
77	scFv kháng CD19	LPVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNIGSKSVHWYQQK PGQAPVLVVYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVE AGDEADYYCQVWDSSSDYVVFGGGTKLTVLGSRGGG GSGGGGSGGGGSLEMAEVQLVQSGAEVKKPGESLKISC KGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSDTR YSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCA RQVWGWQGGMYPRSNWWYNLDSWGQGTLVTVSS
78	scFv kháng CD20	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQQKP GSSPKPWIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEA EDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKRSRGGGGSGGG GSGGGGSLEQVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYT FTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFK GKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYG GDWYFNVWGAGTTVTVSS
79	scFv kháng GPC3 #37	QSVLTQPPSVSAAPGQRVTISCSGTRSNIGSDYVSWYQH LPGTAPKLLVYGDNLRPSGIPDRFSASKSGTSATLGITGL QTGDEADYYCGTWDYTLNGVVFGGGTKLTVLGSRGG GGSGGGGSGGGGSLEMAQVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSVIYSGGSST YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CARTSYLNHGDYWGQGTLVTVSS
80	CSR kháng CD19	LPVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNIGSKSVHWYQQK PGQAPVLVVYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVE AGDEADYYCQVWDSSSDYVVFGGGTKLTVLGSRGGG GSGGGGSGGGGSLEMAEVQLVQSGAEVKKPGESLKISC KGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSDTR YSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCA RQVWGWQGGMYPRSNWWYNLDSWGQGTLVTVSSAA AIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKP FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSD YMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS
81	CSR kháng CD20	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQQKP GSSPKPWIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEA EDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKRSRGGGGSGGG GSGGGGSLEQVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYT FTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFK GKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYG GDWYFNVWGAGTTVTVSSAAAIEVMYPPPYLDNEKSN GTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSL LVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHY QPYAPPRDFAAYRS
82	CSR kháng GPC3	QSVLTQPPSVSAAPGQRVTISCSGTRSNIGSDYVSWYQH LPGTAPKLLVYGDNLRPSGIPDRFSASKSGTSATLGITGL

		QTGDEADYYCGTWDYTLNGVVFGGGTKLTVLGSRGG GGSGGGGSGGGGSLEMAQVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSVIYSGGSST YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CARTSYLNHGDYWGQGTLVTVSSAAAIEVMYPPPYLD NEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVL ACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPT RKHYQPYAPPRDFAAYRS
83	Yếu tố đáp ứng 6NFAT	GGAGGAAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGA AAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAAACT GTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAAACTGTTTCAT ACAGAAGGCGTGGAGGAAAAACTGTTTCATACAGAA GGCGTGGAGGAAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGT
84	Trình tự khởi động TA	GCCGCCCCGACTGCATCTGCGTGTTCCAATTCGCCAA TGACAAGACGCTGGGCGGGGTTTGTGTCATCATAGA ACTAAAGACATGCAAATATATTTCTTCCGGGGACACC GCCAGCAAACGCGAGCAACGGGCCACGGGGATGAAG CAG
85	Trình tự khởi động thu được từ NFAT	GGAGGAAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGA AAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAAACT GTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAAACTGTTTCAT ACAGAAGGCGTGGAGGAAAAACTGTTTCATACAGAA GGCGTGGAGGAAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTC TCGAGGCCGCCCCGACTGCATCTGCGTGTTCCAATTC GCCAATGACAAGACGCTGGGCGGGGTTTGTGTCATC ATAGAACTAAAGACATGCAAATATATTTCTTCCGGGG ACACCGCCAGCAAACGCGAGCAACGGGCCACGGGGA TGAAGCAG
86	Mảnh đồng kích thích CD27 1	PTHLPYVSEMLEARTAGHMQTLADFRQLPARTLSTHWP PQRSLCSSDFIRILVIFSGMFLVFTLAGALFLHQRRKYRS NKGESPVEPAEPCRYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACS P
87	Mảnh đồng kích thích CD27 2	QRRKYRSNKGESPVEPAEPCRYSCPREEEGSTIPIQEDYR KPEPACSP
88	Mảnh đồng kích thích CD30 1	APPLGTQPDCNPTPENGEAPASTSPTQSLLVDSQASKTL PIPTSAPVALSSTGKPVLDAGPVLFWVILVLVVVVGSSA FLLCHRRACRKRIRQKLHLCYPVQTSQPKLELVDSRPRR SSTQLRSGASVTEPVAEERGLMSQPLMETCHSVGAAYL ESLPLQDASPAGGPSSPRDLPEPRVSTEHTNNKIEKIYIM KADTVIVGTVKAELPEGRGLAGPAEPELEEELEADHTP HYPEQETEPPLGSCSDVMLSVEEEGKEDPLPTAASGK
89	Mảnh đồng kích thích CD30 2	HRRACRKRIRQKLHLCYPVQTSQPKLELVDSRPRRSSTQ LRSGASVTEPVAEERGLMSQPLMETCHSVGAAYLESLP LQDASPAGGPSSPRDLPEPRVSTEHTNNKIEKIYIMKAD TVIVGTVKAELPEGRGLAGPAEPELEEELEADHTPHYPE QETEPPLGSCSDVMLSVEEEGKEDPLPTAASGK

90	CSR1	AAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPS KPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLH SDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS
91	CSR2	AAATGTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGA VHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGR KKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL
92	CSR3	AAATGPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQIISFFLALTS TALLFLLFFLTLRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTT QEEDGCSCRFPEEEEGGCEL
93	CSR4	AAATGTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGA VHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCQRRK YRSNKGESPVEPAEPCRYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEP ACSP
94	CSR5	AAATGPTHLPYVSEMLEARTAGHMQTLADFRQLPART LSTHWPPQRSLCSSDFIRILVIFSGMFLVFTLAGALFLHQ RRKYRSNKGESPVEPAEPCRYSCPREEEGSTIPIQEDYRK PEPACSP
95	CSR6	AAATGTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGA VHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCHRRA CRKRIRQKLHLCYPVQTSQPKLELVDSRPRRSSTQLRSG ASVTEPVAEERGLMSQPLMETCHSVGAAYLESLPLQDA SPAGGPSSPRDLPEPRVSTEHTNNKIEKIYIMKADTVIVG TVKAELPEGRGLAGPAEPELEEELEADHTPHYPEQETEP PLGSCSDVMLSVEEEGKEDPLPTAASGK
96	CSR7	AAATGAPPLGTQPDCNPTPENGEAPASTSPTQSLLVDSQ ASKTLPIPTSAPVALSSTGKPVLDAGPVLFWVILVLVVV VGSSAFLLCHRRACRKRIRQKLHLCYPVQTSQPKLELV DSRPRRSSTQLRSGASVTEPVAEERGLMSQPLMETCHS VGAAYLESLPLQDASPAGGPSSPRDLPEPRVSTEHTNNK IEKIYIMKADTVIVGTVKAELPEGRGLAGPAEPELEEELE ADHTPHYPEQETEPPLGSCSDVMLSVEEEGKEDPLPTAA SGK
97	CSR8	AAATGTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGA VHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCALYL LRRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI
98	CSR9	AAATGDRDPPATQPQETQGPPARPITVQPTEAWPRTSQ GPSTRPVEVPGGRAVAAILGLGLVLGLLGPLAILLALYL LRRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI
99	Miền IgV_H của kháng thể kháng CD19	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVR QMPGKGLEWMGIIYPGDSDTRYSPSFQGQVTIADKSIST AYLQWSSLKASDTAMYYCARQVWGWQGGMYPRSNW WYNLDSWGQGTLVTVSS
100	Miền IgV_L của kháng thể kháng CD19	LPVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNIGSKSVHWYQQK PGQAPVLVVYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVE AGDEADYYCQVWDSSSDYVVFGGGTKLTVL

101	Miền IgV_H của kháng thể kháng CD22	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWV RQAPGKGLEWVSSISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDTSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYGSAAWMDSWGQGT LVTVSS
102	Miền IgV_L của kháng thể kháng CD22	DIQLTQSPSSLSTSVGDRVTITCQASHDIRNYLNWYQQK PGKAPNLLIYAASNLQTGVPSRFSGRGSGTDFTLTISSLQ PEDIATYYCQQYDGLPLTFGQGTRLEIKR
103	Cầu nối peptit	AAA
104	Cầu nối peptit	AAATG
105	GPC3-37/CD3 BsAb	QSVLTQPPSVSAAPGQRVTISCSGTRSNIGSDYVSWYQH LPGTAPKLLVYGDNLRPSGIPDRFSASKSGTSATLGITGL QTGDEADYYCGTWDYTLNGVVFGGGTKLTVLGSRGG GGSGGGGSGGGGSLEMAQVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSVIYSGGSST YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CARTSYLNHGDYWGQGTLVTVSSTSGGGGSDVQLVQS GAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGQ GLEWIGYINPSRGYTNYADSVKGRFTITTDKSTSTAYME LSSLRSEDTATYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTVTVSS GEGTSTGSGGSGGSGGADDIVLTQSPATLSLSPGERATL SCRASQSVSYMNWYQQKPGKAPKRWIYDTSKVASGVP ARFSGSGSGTDYSLTINSLEAEDAATYYCQQWSSNPLTF GGGTKVEIK

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Tế bào miễn dịch bao gồm:

a) cấu trúc kháng thể-thụ thể tế bào T (TCR) khảm (caTCR) bao gồm:

i) môđun liên kết kháng nguyên mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích; và

ii) môđun thụ thể tế bào T (TCRM) bao gồm miền TCR (TCRD) thứ nhất bao gồm miền xuyên màng TCR (TCR-TM) thứ nhất và TCRD thứ hai bao gồm TCR-TM thứ hai,

trong đó TCRM này thúc đẩy sự huy động của ít nhất một phân tử truyền tín hiệu liên kết với TCR,

trong đó caTCR này còn bao gồm môđun ổn định hóa bao gồm miền ổn định hóa thứ nhất và miền ổn định hóa thứ hai, và trong đó môđun ổn định hóa này được chọn từ nhóm bao gồm môđun C_H1-C_L, môđun C_H2-C_H2, môđun C_H3-C_H3, và môđun C_H4-C_H4; và

b) thụ thể truyền tín hiệu khảm (CSR) bao gồm:

i) môđun liên kết phối tử mà có khả năng liên kết hoặc tương tác với phối tử đích;

ii) môđun xuyên màng; và

iii) môđun truyền tín hiệu tế bào miễn dịch đồng kích thích mà có khả năng tạo ra tín hiệu đồng kích thích cho tế bào miễn dịch,

trong đó môđun liên kết phối tử và môđun truyền tín hiệu tế bào miễn dịch đồng kích thích này không có nguồn gốc từ cùng phân tử, và trong đó CSR này thiếu miền truyền tín hiệu tế bào miễn dịch sơ cấp về mặt chức năng.

2. Tế bào miễn dịch theo điểm 1, trong đó CSR thiếu các trình tự truyền tín hiệu tế bào miễn dịch sơ cấp bất kỳ.

3. Tế bào miễn dịch theo điểm 1, trong đó kháng nguyên đích là kháng nguyên bề mặt tế bào.

4. Tế bào miễn dịch theo điểm 1, trong đó kháng nguyên đích là phức hợp bao gồm peptit và protein phức hợp tương hợp mô chính (MHC).

5. Tế bào miễn dịch theo điểm 1, trong đó TCR-TM thứ nhất thu được từ một trong số các miền xuyên màng của thụ thể tế bào T thứ nhất và TCR-TM thứ hai thu được từ miền xuyên màng còn lại của thụ thể tế bào T thứ nhất này.

6. Tế bào miễn dịch theo điểm 5, trong đó ít nhất một trong số các TCR-TM không xuất hiện tự nhiên.

7. Tế bào miễn dịch theo điểm 5, trong đó thụ thể tế bào T thứ nhất là thụ thể tế bào T γ/δ.

8. Tế bào miễn dịch theo điểm 1, trong đó môđun liên kết kháng nguyên là đa đặc hiệu.

9. Tế bào miễn dịch theo điểm 1, trong đó kháng nguyên đích và phối tử đích là giống nhau.

10. Tế bào miễn dịch theo điểm 1, trong đó kháng nguyên đích và phối tử đích là khác nhau.

11. Tế bào miễn dịch theo điểm 10, trong đó phối tử đích là phối tử được biểu hiện trên bề mặt của tế bào trình diện kháng nguyên đích.

12. Tế bào miễn dịch theo điểm 1, trong đó phối tử đích là phối tử liên kết với bệnh.

13. Tế bào miễn dịch theo điểm 12, trong đó phối tử đích là phối tử liên kết với bệnh ung thư.

14. Tế bào miễn dịch theo điểm 1, trong đó môđun liên kết phối tử là gốc kháng thể.

15. Tế bào miễn dịch theo điểm 1, trong đó môđun xuyên màng của CSR bao gồm các miền xuyên màng thu được từ CD28, CD3ε, CD3ζ, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD30, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, hoặc CD154.

16. Tế bào miễn dịch theo điểm 1, trong đó môđun truyền tín hiệu tế bào miễn dịch đồng kích thích thu được từ miền nội bào của thụ thể đồng kích thích của TCR.

17. Tế bào miễn dịch theo điểm 16, trong đó thụ thể đồng kích thích là CD28.

18. Tế bào miễn dịch theo điểm 16, trong đó thụ thể đồng kích thích là 4-1BB.

19. Tế bào miễn dịch theo điểm 16, trong đó thụ thể đồng kích thích là OX40.

20. Tế bào miễn dịch theo điểm 16, trong đó thụ thể đồng kích thích là ICOS.

21. Tế bào miễn dịch theo điểm 16, trong đó thụ thể đồng kích thích là CD27.

22. Tế bào miễn dịch theo điểm 16, trong đó thụ thể đồng kích thích là CD30.

23. Tế bào miễn dịch theo điểm 16, trong đó thụ thể đồng kích thích là CD40.

24. Tế bào miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 23, trong đó tế bào miễn dịch là tế bào T.

25. Axit nucleic mã hóa caTCR và CSR theo điểm 1, trong đó mỗi caTCR và CSR bao gồm một hoặc nhiều chuỗi polypeptit được mã hóa bởi axit nucleic này.

26. Tế bào miễn dịch bao gồm axit nucleic theo điểm 25.

27. Phương pháp tiêu diệt tế bào đích trình diện kháng nguyên đích *in vitro*, bao gồm bước cho tế bào đích này tiếp xúc với tế bào miễn dịch theo điểm 1 .

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Eureka Therapeutics, Inc.
Liu, Hong
Zhang, Pengbo
Horan, Lucas
Xu, Yiyang
Staley, Binnaz K.
Liu, Lianxing
Yun, Hongruo

<120> Tế bào miễn dịch bao gồm cấu trúc kháng thể-thụ thể tế bào T (TCR) khảm (caTCR) và thụ thể truyền tín hiệu khảm (CSR), axit nucleic mã hóa caTCR và CSR và phương pháp tiêu diệt tế bào đích trình diện kháng nguyên đích sử dụng tế bào miễn dịch này

<130> 75004-20010.40

<140> Vẫn chưa được chuyển nhượng
<141> Đồng thời kèm theo với

<150> US 62/490,580
<151> 2017-04-26

<150> US 62/490,578
<151> 2017-04-26

<150> US 62/490,576
<151> 2017-04-26

<160> 105

<170> FastSEQ cho Windows Phiên bản 4.0

<210> 1
<211> 142
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 1

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

```
Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn
            100                 105                 110
Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val
        115                 120                 125
Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
    130                 135                 140


<210> 2
<211> 177
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 2
Glu Asp Leu Asn Lys Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro
 1               5                  10                  15
Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu
            20                  25                  30
Ala Thr Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn
        35                  40                  45
Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys
    50                  55                  60
Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu
65                  70                  75                  80
Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys
                85                  90                  95
Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp
            100                 105                 110
Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg
        115                 120                 125
Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Val Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser
    130                 135                 140
Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala
145                 150                 155                 160
Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asp
                165                 170                 175
Phe


<210> 3
<211> 153
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

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

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

<210> 4
<211> 173
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

```
<400> 4
Asp Lys Gln Leu Asp Ala Asp Val Ser Pro Lys Pro Thr Ile Phe Leu
 1               5                  10                  15
Pro Ser Ile Ala Glu Thr Lys Leu Gln Lys Ala Gly Thr Tyr Leu Cys
            20                  25                  30
Leu Leu Glu Lys Phe Phe Pro Asp Val Ile Lys Ile His Trp Gln Glu
        35                  40                  45
Lys Lys Ser Asn Thr Ile Leu Gly Ser Gln Glu Gly Asn Thr Met Lys
    50                  55                  60
Thr Asn Asp Thr Tyr Met Lys Phe Ser Trp Leu Thr Val Pro Glu Lys
65                  70                  75                  80
Ser Leu Asp Lys Glu His Arg Cys Ile Val Arg His Glu Asn Asn Lys
                85                  90                  95
Asn Gly Val Asp Gln Glu Ile Ile Phe Pro Pro Ile Lys Thr Asp Val
            100                 105                 110
Ile Thr Met Asp Pro Lys Asp Asn Cys Ser Lys Asp Ala Asn Asp Thr
        115                 120                 125
Leu Leu Leu Gln Leu Thr Asn Thr Ser Ala Tyr Tyr Met Tyr Leu Leu
    130                 135                 140
Leu Leu Leu Lys Ser Val Val Tyr Phe Ala Ile Ile Thr Cys Cys Leu
145                 150                 155                 160
Leu Arg Arg Thr Ala Phe Cys Cys Asn Gly Glu Lys Ser
                165                 170
```

<210> 5

<211> 20
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

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

<210> 6
<211> 23
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 6
Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val
 1   5   10   15
Leu Val Ser Ala Leu Val Leu
            20

<210> 7
<211> 25
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 7
Val Leu Gly Leu Arg Met Leu Phe Ala Lys Thr Val Ala Val Asn Phe
 1   5   10   15
Leu Leu Thr Ala Lys Leu Phe Phe Leu
            20   25

<210> 8
<211> 23
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 8
Tyr Tyr Met Tyr Leu Leu Leu Leu Leu Lys Ser Val Val Tyr Phe Ala

1 5 10 15
Ile Ile Thr Cys Cys Leu Leu
20

<210> 9
<211> 25
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

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

<210> 10
<211> 25
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

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

<210> 11
<211> 25
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

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

<210> 12
<211> 25
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

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

<210> 13
<211> 25
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

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

<210> 14
<211> 28
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 14
Tyr Tyr Met Tyr Leu Leu Leu Leu Leu Lys Ser Val Tyr Tyr Phe Ala
 1   5   10   15
Ile Ile Thr Cys Cys Leu Leu Arg Arg Thr Ala Phe
            20   25

<210> 15
<211> 28
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

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

<210> 16
<211> 28
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

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

<210> 17
<211> 28
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

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

<210> 18
<211> 28
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

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

<210> 19
<211> 28
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

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

<210> 20
<211> 28
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

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

<210> 21
<211> 28
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

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

<210> 22
<211> 28
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

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

<210> 23

<211> 28
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

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

<210> 24
<211> 28
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 24
Tyr Tyr Met Tyr Leu Leu Leu Phe Leu Lys Ser Phe Val Tyr Ser Ala
 1   5   10   15
Ile Ile Thr Cys Cys Leu Leu Arg Arg Thr Ala Phe
            20   25

<210> 25
<211> 28
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

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

<210> 26
<211> 28
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 26
Gln Tyr Met Tyr Leu Leu Leu Leu Leu Lys Ser Val Val Tyr Phe Ala

1 5 10 15
Ile Ile Thr Cys Cys Leu Leu Arg Arg Thr Ala Phe
20 25

<210> 27
<211> 30
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 27
Glu Ser Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp
1 5 10 15
Thr Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg
20 25 30

<210> 28
<211> 40
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

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

<210> 29
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

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

<210> 30
<211> 19

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 30
Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Val Ser Tyr Gln Gln Gly Val
 1   5   10   15
Leu Ser Ala

<210> 31
<211> 41
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 31
Asp His Val Lys Pro Lys Glu Thr Glu Asn Thr Lys Gln Pro Ser Lys
 1   5   10   15
Ser Cys His Lys Pro Lys Ala Ile Val His Thr Glu Lys Val Asn Met
            20   25   30
Met Ser Leu Thr Val Leu Gly Leu Arg
        35   40

<210> 32
<211> 48
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 32
Glu Val Lys Thr Asp Ser Thr Asp His Val Lys Pro Lys Glu Thr Glu
 1   5   10   15
Asn Thr Lys Gln Pro Ser Lys Ser Cys His Lys Pro Lys Ala Ile Val
            20   25   30
His Thr Glu Lys Val Asn Met Met Ser Leu Thr Val Leu Gly Leu Arg
        35   40   45

<210> 33
<211> 24
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 33
Met Asp Pro Lys Asp Asn Cys Ser Lys Asp Ala Asn Asp Thr Leu Leu
 1   5   10   15
Leu Gln Leu Thr Asn Thr Ser Ala
            20

<210> 34
<211> 32
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 34
Pro Ile Lys Thr Asp Val Ile Thr Met Asp Pro Lys Asp Asn Cys Ser
 1   5   10   15
Lys Asp Ala Asn Asp Thr Leu Leu Leu Gln Leu Thr Asn Thr Ser Ala
            20   25   30

<210> 35
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 35
Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asp Phe
 1   5

<210> 36
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 36
Arg Arg Thr Ala Phe Cys Cys Asn Gly Glu Lys Ser
 1   5   10

<210> 37
<211> 101
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 37
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1   5   10   15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
            20   25   30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
        35   40   45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Ser Leu Ser
    50   55   60
Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
65   70   75   80
Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val
                85   90   95
Glu Pro Lys Ser Cys
            100

<210> 38
<211> 99
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 38
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1   5   10   15
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
            20   25   30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
        35   40   45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Ser Leu Ser
    50   55   60
Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr
65   70   75   80
Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val
                85   90   95
Glu Arg Lys

<210> 39
<211> 100
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 39

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

<210> 40
<211> 101
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 40

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

<210> 41
<211> 101
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 41

```
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1               5                  10                  15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
            20                  25                  30
```

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Ser Leu Ser
50 55 60
Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Thr
65 70 75 80
Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val
85 90 95
Glu Leu Lys Thr Pro
100

<210> 42
<211> 101
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 42
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Ser Leu Ser
50 55 60
Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr
65 70 75 80
Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val
85 90 95
Glu Ser Lys Tyr Gly
100

<210> 43
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

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

Ser Ser Gln Leu Thr Leu Pro Ala Thr Gln Cys Leu Ala Gly Lys Ser
65 70 75 80
Val Thr Cys His Val Lys His Tyr Thr Asn Pro Ser Gln Asp Val Thr
85 90 95
Val Pro Cys Pro Val Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr
100 105 110
Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser
115

<210> 44
<211> 106
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 44
Asp Thr Ser Pro Lys Val Phe Pro Leu Ser Leu Asp Ser Thr Pro Gln
1 5 10 15
Asp Gly Asn Val Val Val Ala Cys Leu Val Gln Gly Phe Phe Pro Gln
20 25 30
Glu Pro Leu Ser Val Thr Trp Ser Glu Ser Gly Gln Asn Val Thr Ala
35 40 45
Arg Asn Phe Pro Pro Ser Gln Asp Ala Ser Gly Asp Leu Tyr Thr Thr
50 55 60
Ser Ser Gln Leu Thr Leu Pro Ala Thr Gln Cys Pro Asp Gly Lys Ser
65 70 75 80
Val Thr Cys His Val Lys His Tyr Thr Asn Pro Ser Gln Asp Val Thr
85 90 95
Val Pro Cys Pro Val Pro Pro Pro Pro Pro
100 105

<210> 45
<211> 159
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

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

```
Glu Tyr Lys Cys Val Val Gln His Thr Ala Ser Lys Ser Lys Lys Glu
                85                  90                  95
Ile Phe Arg Trp Pro Glu Ser Pro Lys Ala Gln Ala Ser Ser Val Pro
            100                 105                 110
Thr Ala Gln Pro Gln Ala Glu Gly Ser Leu Ala Lys Ala Thr Thr Ala
        115                 120                 125
Pro Ala Thr Thr Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Lys
    130                 135                 140
Glu Lys Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro
145                 150                 155
```

<210> 46
<211> 103
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

```
<400> 46
Ala Ser Thr Gln Ser Pro Ser Val Phe Pro Leu Thr Arg Cys Cys Lys
 1               5                  10                  15
Asn Ile Pro Ser Asn Ala Thr Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Ala Thr
            20                  25                  30
Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Met Val Thr Trp Asp Thr Gly Ser Leu
        35                  40                  45
Asn Gly Thr Thr Met Thr Leu Pro Ala Thr Thr Leu Thr Leu Ser Gly
    50                  55                  60
His Tyr Ala Thr Ile Ser Leu Leu Thr Val Ser Gly Ala Trp Ala Lys
65                  70                  75                  80
Gln Met Phe Thr Cys Arg Val Ala His Thr Pro Ser Ser Thr Asp Trp
                85                  90                  95
Val Asp Asn Lys Thr Phe Ser
            100
```

<210> 47
<211> 104
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

```
<400> 47
Gly Ser Ala Ser Ala Pro Thr Leu Phe Pro Leu Val Ser Cys Glu Asn
 1               5                  10                  15
Ser Pro Ser Asp Thr Ser Ser Val Ala Val Gly Cys Leu Ala Gln Asp
            20                  25                  30
Phe Leu Pro Asp Ser Ile Thr Leu Ser Trp Lys Tyr Lys Asn Asn Ser
        35                  40                  45
Asp Ile Ser Ser Thr Arg Gly Phe Pro Ser Val Leu Arg Gly Gly Lys
    50                  55                  60
```

Tyr Ala Ala Thr Ser Gln Val Leu Leu Pro Ser Lys Asp Val Met Gln
65 70 75 80
Gly Thr Asp Glu His Val Val Cys Lys Val Gln His Pro Asn Gly Asn
85 90 95
Lys Glu Lys Asn Val Pro Leu Pro
100

<210> 48
<211> 106
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 48
Gly Gln Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
1 5 10 15
Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
20 25 30
Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro
35 40 45
Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
50 55 60
Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
65 70 75 80
Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
85 90 95
Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
100 105

<210> 49
<211> 105
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 49
Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn
1 5 10 15
Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu
20 25 30
Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly
35 40 45
Val Leu Ala Cys Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val
50 55 60
Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
65 70 75 80
Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro
85 90 95

Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
100 105

<210> 50
<211> 108
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

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

<210> 51
<211> 105
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 51
Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn
1 5 10 15
Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu
20 25 30
Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly
35 40 45
Val Leu Ala Cys Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val
50 55 60
Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
65 70 75 80
Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro
85 90 95
Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
100 105

<210> 52
<211> 41
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 52
Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
 1   5   10   15
Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro
            20   25   30
Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
        35   40

<210> 53
<211> 94
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 53
Pro Ala Asp Leu Ser Pro Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro
 1   5   10   15
Ala Arg Glu Pro Gly His Ser Pro Gln Ile Ile Ser Phe Phe Leu Ala
            20   25   30
Leu Thr Ser Thr Ala Leu Leu Phe Leu Leu Phe Phe Leu Thr Leu Arg
        35   40   45
Phe Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys
    50   55   60
Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys
65   70   75   80
Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
                85   90

<210> 54
<211> 42
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 54
Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
 1   5   10   15
Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
            20   25   30
Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu

35 40

<210> 55
<211> 106
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

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

<210> 56
<211> 42
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 56
Ala Leu Tyr Leu Leu Arg Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His
1 5 10 15
Lys Pro Pro Gly Gly Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln
20 25 30
Ala Asp Ala His Ser Thr Leu Ala Lys Ile
35 40

<210> 57
<211> 69
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 57

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

<210> 58
<211> 130
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 58

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

<210> 59
<211> 109
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 59

```
Leu Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys
 1               5                  10                  15
Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val
            20                  25                  30
```

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

<210> 60
<211> 121
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

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

<210> 61
<211> 105
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

```
<400> 61
Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Asp Gly Glu Lys
 1               5                  10                  15
Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile His Trp
            20                  25                  30
Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr
        35                  40                  45
```

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


<210> 62
<211> 117
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 62
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1               5                  10                  15
Ser Leu Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Pro Asn Tyr
            20                  25                  30
Trp Ile Thr Trp Val Arg Gln Met Ser Gly Gly Gly Leu Glu Trp Met
        35                  40                  45
Gly Arg Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Phe
    50                  55                  60
Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ile Asp Lys Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80
Leu His Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95
Ala Arg Tyr Tyr Val Ser Leu Val Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu
            100                 105                 110
Val Thr Val Ser Ser
        115


<210> 63
<211> 110
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 63
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 1               5                  10                  15
Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr
            20                  25                  30
Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
        35                  40                  45
Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Glu Val Ser Asn Arg Phe
    50                  55                  60
```

```
Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65                  70                  75                  80
Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Thr Gly
                85                  90                  95
Ser Arg Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
            100                 105                 110


<210> 64
<211> 118
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 64
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1               5                  10                  15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
            20                  25                  30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45
Ser Val Ile Tyr Ser Gly Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95
Ala Arg Thr Ser Tyr Leu Asn His Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
            100                 105                 110
Leu Val Thr Val Ser Ser
        115


<210> 65
<211> 111
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

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

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Tyr Thr Leu
85 90 95
Asn Gly Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 66
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 66
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30
Tyr Val Phe Trp Val Arg Gln Arg Gln Arg Leu Glu Trp Ile Gly Asp
35 40 45
Ile Asn Pro Val Asn Gly Asp Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe Lys Asn
50 55 60
Arg Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Leu Gln
65 70 75 80
Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Arg Gly
85 90 95
Tyr Thr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 67
<211> 113
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 67
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
35 40 45
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Tyr Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn
85 90 95
Thr His Val Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 68
<211> 286
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 68
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15
Ser Leu Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Pro Asn Tyr
20 25 30
Trp Ile Thr Trp Val Arg Gln Met Ser Gly Gly Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Arg Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Phe
50 55 60
Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ile Asp Lys Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu His Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Tyr Tyr Val Ser Leu Val Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115 120 125
Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175
Ser Gly Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
180 185 190
Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
195 200 205
Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Glu Val Lys Thr Asp Ser
210 215 220
Thr Asp His Val Lys Pro Lys Glu Thr Glu Asn Thr Lys Gln Pro Ser
225 230 235 240
Lys Ser Cys His Lys Pro Lys Ala Ile Val His Thr Glu Lys Val Asn
245 250 255
Met Met Ser Leu Thr Val Leu Gly Leu Arg Met Leu Phe Ala Lys Thr
260 265 270
Val Ala Val Asn Phe Leu Leu Thr Ala Lys Leu Phe Phe Leu
275 280 285

<210> 69
<211> 283
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 69
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15
Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr
20 25 30
Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45
Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Glu Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60
Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80
Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Thr Gly
85 90 95
Ser Arg Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
100 105 110
Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
115 120 125
Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
130 135 140
Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val Lys
145 150 155 160
Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
165 170 175
Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
180 185 190
Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
195 200 205
Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser Pro Ile Lys Thr Asp Val Ile Thr
210 215 220
Met Asp Pro Lys Asp Asn Cys Ser Lys Asp Ala Asn Asp Thr Leu Leu
225 230 235 240
Leu Gln Leu Thr Asn Thr Ser Ala Tyr Tyr Met Tyr Leu Leu Leu Leu
245 250 255
Leu Lys Ser Val Val Tyr Phe Ala Ile Ile Thr Cys Cys Leu Leu Arg
260 265 270
Arg Thr Ala Phe Cys Cys Asn Gly Glu Lys Ser
275 280

<210> 70
<211> 286
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 70
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu

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

<210> 71
<211> 283
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 71

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

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

<210> 72
<211> 299
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 72

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

```
        115                 120                 125
Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
    130                 135                 140
Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
145                 150                 155                 160
Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
                165                 170                 175
Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Ser
            180                 185                 190
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
        195                 200                 205
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
    210                 215                 220
Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Glu Val Lys Thr Asp Ser Thr Asp His
225                 230                 235                 240
Val Lys Pro Lys Glu Thr Glu Asn Thr Lys Gln Pro Ser Lys Ser Cys
                245                 250                 255
His Lys Pro Lys Ala Ile Val His Thr Glu Lys Val Asn Met Met Ser
            260                 265                 270
Leu Thr Val Leu Gly Leu Arg Met Leu Phe Ala Lys Thr Val Ala Val
        275                 280                 285
Asn Phe Leu Leu Thr Ala Lys Leu Phe Phe Leu
    290                 295
```

<210> 73
<211> 281
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 73

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

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

<210> 74
<211> 299
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 74

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

```
    210                 215                 220
Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Glu Val Lys Thr Asp Ser Thr Asp His
225                 230                 235                 240
Val Lys Pro Lys Glu Thr Glu Asn Thr Lys Gln Pro Ser Lys Ser Cys
                245                 250                 255
His Lys Pro Lys Ala Ile Val His Thr Glu Lys Val Asn Met Met Ser
            260                 265                 270
Leu Thr Val Leu Gly Leu Arg Val Leu Phe Ala Lys Thr Val Ala Val
        275                 280                 285
Asn Phe Leu Leu Thr Ala Lys Leu Phe Phe Leu
    290                 295
```

<210> 75
<211> 281
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 75

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

Ser Val Val Tyr Phe Val Ile Val Thr Cys Cys Leu Leu Arg Arg Thr
260 265 270
Ala Phe Cys Cys Asn Gly Glu Lys Ser
275 280

<210> 76
<211> 21
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 76
Ser Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Glu Met Ala
20

<210> 77
<211> 260
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 77
Leu Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys
1 5 10 15
Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val
20 25 30
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr
35 40 45
Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly
65 70 75 80
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp Tyr
85 90 95
Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Ser Arg Gly
100 105 110
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Leu Glu
115 120 125
Met Ala Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
130 135 140
Gly Glu Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr
145 150 155 160
Ser Tyr Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu
165 170 175
Trp Met Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro
180 185 190

```
Ser Phe Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr
        195                 200                 205
Ala Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr
    210                 215                 220
Tyr Cys Ala Arg Gln Val Trp Gly Trp Gln Gly Gly Met Tyr Pro Arg
225                 230                 235                 240
Ser Asn Trp Trp Tyr Asn Leu Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
                245                 250                 255
Thr Val Ser Ser
            260
```

<210> 78
<211> 245
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 78

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

<210> 79
<211> 250
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 79
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Thr Arg Ser Asn Ile Gly Ser Asp
20 25 30
Tyr Val Ser Trp Tyr Gln His Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45
Val Tyr Gly Asp Asn Leu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80
Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Tyr Thr Leu
85 90 95
Asn Gly Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Ser
100 105 110
Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
115 120 125
Leu Glu Met Ala Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
130 135 140
Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
145 150 155 160
Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
165 170 175
Leu Glu Trp Val Ser Val Ile Tyr Ser Gly Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr
180 185 190
Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
195 200 205
Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
210 215 220
Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Thr Ser Tyr Leu Asn His Gly Asp Tyr Trp
225 230 235 240
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
245 250

<210> 80
<211> 368
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 80
Leu Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys

```
 1               5                  10                  15
Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val
            20                  25                  30
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr
        35                  40                  45
Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
    50                  55                  60
Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly
65                  70                  75                  80
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp Tyr
                85                  90                  95
Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Ser Arg Gly
            100                 105                 110
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Leu Glu
        115                 120                 125
Met Ala Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
    130                 135                 140
Gly Glu Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr
145                 150                 155                 160
Ser Tyr Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu
                165                 170                 175
Trp Met Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro
            180                 185                 190
Ser Phe Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr
        195                 200                 205
Ala Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr
    210                 215                 220
Tyr Cys Ala Arg Gln Val Trp Gly Trp Gln Gly Gly Met Tyr Pro Arg
225                 230                 235                 240
Ser Asn Trp Trp Tyr Asn Leu Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
                245                 250                 255
Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
            260                 265                 270
Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys
        275                 280                 285
His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp
    290                 295                 300
Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Leu Leu Val Thr Val
305                 310                 315                 320
Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His
                325                 330                 335
Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys
            340                 345                 350
His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
        355                 360                 365
```

<210> 81
<211> 353
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 81
Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Asp Gly Glu Lys
1 5 10 15
Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile His Trp
20 25 30
Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr
35 40 45
Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
50 55 60
Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala
65 70 75 80
Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly
85 90 95
Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ser Arg Gly Gly Gly Gly Ser
100 105 110
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Leu Glu Gln Val Gln Leu
115 120 125
Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met
130 135 140
Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His Trp
145 150 155 160
Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr
165 170 175
Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala
180 185 190
Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser
195 200 205
Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Thr
210 215 220
Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr
225 230 235 240
Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro
245 250 255
Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly
260 265 270
Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe
275 280 285
Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Leu Leu Val Thr
290 295 300
Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu
305 310 315 320
His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg
325 330 335
Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg
340 345 350
Ser

<210> 82
<211> 358
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 82
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Thr Arg Ser Asn Ile Gly Ser Asp
20 25 30
Tyr Val Ser Trp Tyr Gln His Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45
Val Tyr Gly Asp Asn Leu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80
Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Tyr Thr Leu
85 90 95
Asn Gly Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Ser
100 105 110
Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
115 120 125
Leu Glu Met Ala Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
130 135 140
Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
145 150 155 160
Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
165 170 175
Leu Glu Trp Val Ser Val Ile Tyr Ser Gly Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr
180 185 190
Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
195 200 205
Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
210 215 220
Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Thr Ser Tyr Leu Asn His Gly Asp Tyr Trp
225 230 235 240
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Ile Glu Val
245 250 255
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile
260 265 270
Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly
275 280 285
Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala
290 295 300
Cys Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys
305 310 315 320
Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg
325 330 335
Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp
340 345 350
Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
355

<210> 83

<211> 180
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 83
ggaggaaaaa ctgtttcata cagaaggcgt ggaggaaaaa ctgtttcata cagaaggcgt 60
ggaggaaaaa ctgtttcata cagaaggcgt ggaggaaaaa ctgtttcata cagaaggcgt 120
ggaggaaaaa ctgtttcata cagaaggcgt ggaggaaaaa ctgtttcata cagaaggcgt 180

<210> 84
<211> 149
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 84
gccgccccga ctgcatctgc gtgttccaat tcgccaatga caagacgctg ggcggggttt 60
gtgtcatcat agaactaaag acatgcaaat atatttcttc cggggacacc gccagcaaac 120
gcgagcaacg ggccacgggg atgaagcag 149

<210> 85
<211> 335
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 85
ggaggaaaaa ctgtttcata cagaaggcgt ggaggaaaaa ctgtttcata cagaaggcgt 60
ggaggaaaaa ctgtttcata cagaaggcgt ggaggaaaaa ctgtttcata cagaaggcgt 120
ggaggaaaaa ctgtttcata cagaaggcgt ggaggaaaaa ctgtttcata cagaaggcgt 180
ctcgaggccg ccccgactgc atctgcgtgt tccaattcgc caatgacaag acgctgggcg 240
gggtttgtgt catcatagaa ctaaagacat gcaaatatat ttcttccggg gacaccgcca 300
gcaaacgcga gcaacgggcc acggggatga agcag 335

<210> 86
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 86
Pro Thr His Leu Pro Tyr Val Ser Glu Met Leu Glu Ala Arg Thr Ala
 1   5   10   15
Gly His Met Gln Thr Leu Ala Asp Phe Arg Gln Leu Pro Ala Arg Thr

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

<210> 87
<211> 48
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 87
```
Gln Arg Arg Lys Tyr Arg Ser Asn Lys Gly Glu Ser Pro Val Glu Pro
 1               5                  10                  15
Ala Glu Pro Cys Arg Tyr Ser Cys Pro Arg Glu Glu Glu Gly Ser Thr
            20                  25                  30
Ile Pro Ile Gln Glu Asp Tyr Arg Lys Pro Glu Pro Ala Cys Ser Pro
        35                  40                  45
```

<210> 88
<211> 264
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 88
```
Ala Pro Pro Leu Gly Thr Gln Pro Asp Cys Asn Pro Thr Pro Glu Asn
 1               5                  10                  15
Gly Glu Ala Pro Ala Ser Thr Ser Pro Thr Gln Ser Leu Leu Val Asp
            20                  25                  30
Ser Gln Ala Ser Lys Thr Leu Pro Ile Pro Thr Ser Ala Pro Val Ser
        35                  40                  45
Ser Thr Gly Lys Pro Val Leu Asp Ala Gly Pro Val Leu Phe Trp Val
    50                  55                  60
Ile Leu Val Leu Val Val Val Val Gly Ser Ser Ala Phe Leu Leu Cys
65                  70                  75                  80
His Arg Arg Ala Cys Arg Lys Arg Ile Arg Gln Lys Leu His Leu Cys
                85                  90                  95
Tyr Pro Val Gln Thr Ser Gln Pro Lys Leu Glu Leu Val Asp Ser Arg
```

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

<210> 89
<211> 184
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 89

```
His Arg Arg Ala Cys Arg Lys Arg Ile Arg Gln Lys Leu His Leu Cys
 1               5                  10                  15
Tyr Pro Val Gln Thr Ser Gln Pro Lys Leu Glu Leu Val Asp Ser Arg
            20                  25                  30
Pro Arg Arg Ser Ser Thr Gln Leu Arg Ser Gly Ala Ser Val Thr Glu
        35                  40                  45
Pro Val Ala Glu Glu Arg Gly Leu Met Ser Gln Pro Leu Met Cys His
    50                  55                  60
Ser Val Gly Ala Ala Tyr Leu Glu Ser Leu Pro Leu Gln Asp Asp Ala
65                  70                  75                  80
Gly Gly Pro Ser Ser Pro Arg Asp Leu Pro Glu Pro Arg Val Ser Thr
                85                  90                  95
Glu His Thr Asn Asn Lys Ile Glu Lys Ile Tyr Ile Met Lys Ala Asp
            100                 105                 110
Thr Val Ile Val Gly Thr Val Lys Ala Glu Leu Pro Glu Gly Arg Gly
        115                 120                 125
Leu Ala Gly Pro Ala Glu Pro Glu Leu Glu Glu Glu Leu Glu Ala Asp
    130                 135                 140
His Thr Pro His Tyr Pro Glu Gln Glu Thr Glu Pro Pro Leu Gly Ser
145                 150                 155                 160
Cys Ser Asp Val Met Leu Ser Val Glu Glu Glu Gly Lys Glu Asp Pro
                165                 170                 175
```

Leu Pro Thr Ala Ala Ser Gly Lys
180

<210> 90
<211> 108
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

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

<210> 91
<211> 116
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 91
Ala Ala Ala Thr Gly Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro
1 5 10 15
Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys
20 25 30
Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala
35 40 45
Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu
50 55 60
Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys
65 70 75 80
Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr
85 90 95
Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly
100 105 110
Gly Cys Glu Leu
115

<210> 92
<211> 99
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 92
Ala Ala Ala Thr Gly Pro Ala Asp Leu Ser Pro Gly Ala Ser Ser Val
1 5 10 15
Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His Ser Pro Gln Ile Ile
20 25 30
Ser Phe Phe Leu Ala Leu Thr Ser Thr Ala Leu Leu Phe Leu Leu Phe
35 40 45
Phe Leu Thr Leu Arg Phe Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu
50 55 60
Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln
65 70 75 80
Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly
85 90 95
Cys Glu Leu

<210> 93
<211> 122
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 93
Ala Ala Ala Thr Gly Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro
1 5 10 15
Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys
20 25 30
Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala
35 40 45
Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu
50 55 60
Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Gln Arg Arg Lys Tyr Arg
65 70 75 80
Ser Asn Lys Gly Glu Ser Pro Val Glu Pro Ala Glu Pro Cys Arg Tyr
85 90 95
Ser Cys Pro Arg Glu Glu Glu Gly Ser Thr Ile Pro Ile Gln Glu Asp
100 105 110
Tyr Arg Lys Pro Glu Pro Ala Cys Ser Pro
115 120

<210> 94
<211> 124
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 94
Ala Ala Ala Thr Gly Pro Thr His Leu Pro Tyr Val Ser Glu Met Leu
1 5 10 15
Glu Ala Arg Thr Ala Gly His Met Gln Thr Leu Ala Asp Phe Arg Gln
20 25 30
Leu Pro Ala Arg Thr Leu Ser Thr His Trp Pro Pro Gln Arg Ser Leu
35 40 45
Cys Ser Ser Asp Phe Ile Arg Ile Leu Val Ile Phe Ser Gly Met Phe
50 55 60
Leu Val Phe Thr Leu Ala Gly Ala Leu Phe Leu His Gln Arg Arg Lys
65 70 75 80
Tyr Arg Ser Asn Lys Gly Glu Ser Pro Val Glu Pro Ala Glu Pro Cys
85 90 95
Arg Tyr Ser Cys Pro Arg Glu Glu Glu Gly Ser Thr Ile Pro Ile Gln
100 105 110
Glu Asp Tyr Arg Lys Pro Glu Pro Ala Cys Ser Pro
115 120

<210> 95
<211> 258
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

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

```
Leu Glu Ser Leu Pro Leu Gln Asp Asp Ala Gly Gly Pro Ser Ser Pro
145                 150                 155                 160
Arg Asp Leu Pro Glu Pro Arg Val Ser Thr Glu His Thr Asn Asn Lys
                165                 170                 175
Ile Glu Lys Ile Tyr Ile Met Lys Ala Asp Thr Val Ile Val Gly Thr
            180                 185                 190
Val Lys Ala Glu Leu Pro Glu Gly Arg Gly Leu Ala Gly Pro Ala Glu
        195                 200                 205
Pro Glu Leu Glu Glu Glu Leu Glu Ala Asp His Thr Pro His Tyr Pro
    210                 215                 220
Glu Gln Glu Thr Glu Pro Pro Leu Gly Ser Cys Ser Asp Val Met Leu
225                 230                 235                 240
Ser Val Glu Glu Glu Gly Lys Glu Asp Pro Leu Pro Thr Ala Ala Ser
                245                 250                 255
Gly Lys
```

<210> 96
<211> 269
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 96

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

```
    210                 215                 220
Glu Leu Glu Ala Asp His Thr Pro His Tyr Pro Glu Gln Glu Thr Glu
225                 230                 235                 240
Pro Pro Leu Gly Ser Cys Ser Asp Val Met Leu Ser Val Glu Glu Glu
                245                 250                 255
Gly Lys Glu Asp Pro Leu Pro Thr Ala Ala Ser Gly Lys
            260                 265
```

<210> 97
<211> 116
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 97

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

<210> 98
<211> 113
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 98

```
Ala Ala Ala Thr Gly Asp Arg Asp Pro Pro Ala Thr Gln Pro Gln Glu
 1               5                  10                  15
Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Ile Thr Val Gln Pro Thr Glu Ala
            20                  25                  30
Trp Pro Arg Thr Ser Gln Gly Pro Ser Trp Val Glu Val Pro Gly Gly
        35                  40                  45
Arg Ala Val Ala Ala Ile Leu Gly Leu Gly Leu Val Leu Gly Leu Leu
    50                  55                  60
Gly Pro Leu Ala Ile Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu Arg Arg Asp Gln
```

65 70 75 80
Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly Gly Ser Phe Arg
85 90 95
Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser Thr Leu Ala Lys
100 105 110
Ile

<210> 99
<211> 129
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 99
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15
Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60
Gln Gly Gln Val Thr Ile Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Leu
65 70 75 80
Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Gln Val Trp Gly Trp Gln Gly Gly Met Tyr Pro Arg Ser Asn Trp
100 105 110
Trp Tyr Asn Leu Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120 125
Ser

<210> 100
<211> 108
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 100
Leu Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys
1 5 10 15
Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val
20 25 30
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr
35 40 45
Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

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

<210> 101
<211> 118
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 101

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

<210> 102
<211> 106
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 102

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

65 70 75 80
Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Gly Leu Pro Leu Thr Phe
85 90 95
Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 103
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 103
Ala Ala Ala
1

<210> 104
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 104
Ala Ala Ala Thr Gly
1 5

<210> 105
<211> 500
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

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

```
Asn Gly Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Ser
            100                 105                 110
Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
        115                 120                 125
Leu Glu Met Ala Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
    130                 135                 140
Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
145                 150                 155                 160
Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
                165                 170                 175
Leu Glu Trp Val Ser Val Ile Tyr Ser Gly Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr
            180                 185                 190
Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
        195                 200                 205
Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
    210                 215                 220
Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Thr Ser Tyr Leu Asn His Gly Asp Tyr Trp
225                 230                 235                 240
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Thr Ser Gly Gly Gly Gly
                245                 250                 255
Ser Asp Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
            260                 265                 270
Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg
        275                 280                 285
Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
    290                 295                 300
Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser
305                 310                 315                 320
Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Thr Thr Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala
                325                 330                 335
Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
            340                 345                 350
Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
        355                 360                 365
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Gly Thr Ser Thr Gly Ser
    370                 375                 380
Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala Asp Asp Ile Val Leu Thr Gln
385                 390                 395                 400
Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser
                405                 410                 415
Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys
            420                 425                 430
Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala
        435                 440                 445
Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr
    450                 455                 460
Ser Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr
465                 470                 475                 480
Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
                485                 490                 495
Val Glu Ile Lys
            500
```

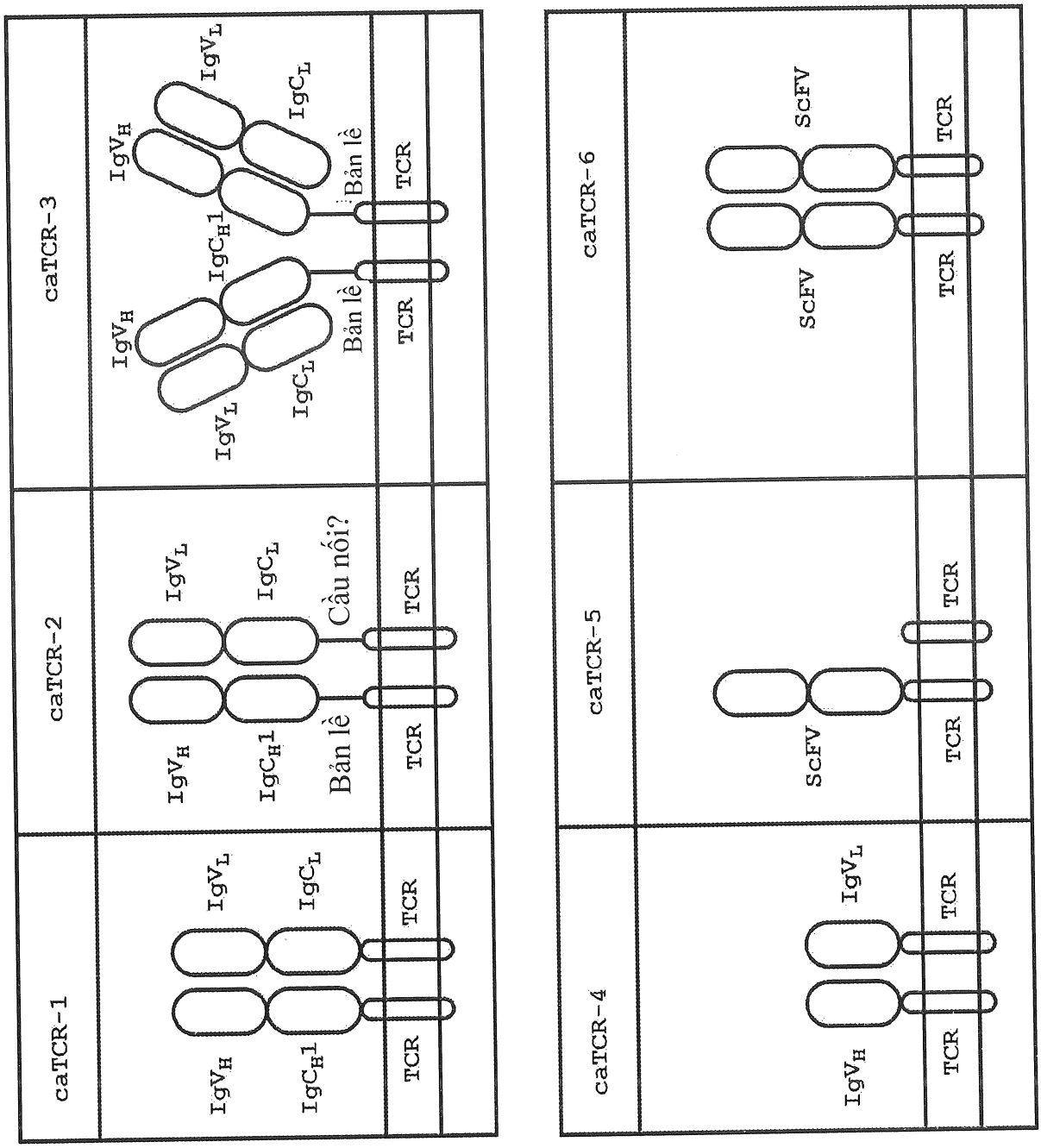

caTCR-1
caTCR-2
caTCR-3
caTCR-4
caTCR-5
caTCR-6
IgV_H
IgV_L
IgC_H1
IgC_L
Bản lề
Cầu nối?
TCR
ScFV

FIG. 1

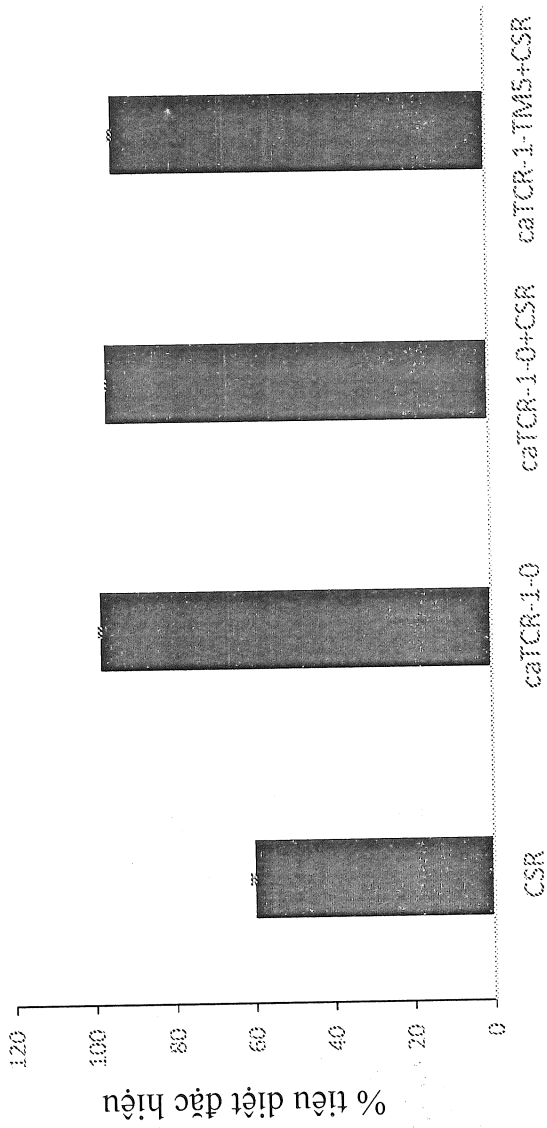

Tiêu diệt *in vitro* NALM6
% tiêu diệt đặc hiệu
120
100
80
60
40
20
0
CSR
caTCR-1-0
caTCR-1-0+CSR
caTCR-1-TM5+CSR

FIG. 2

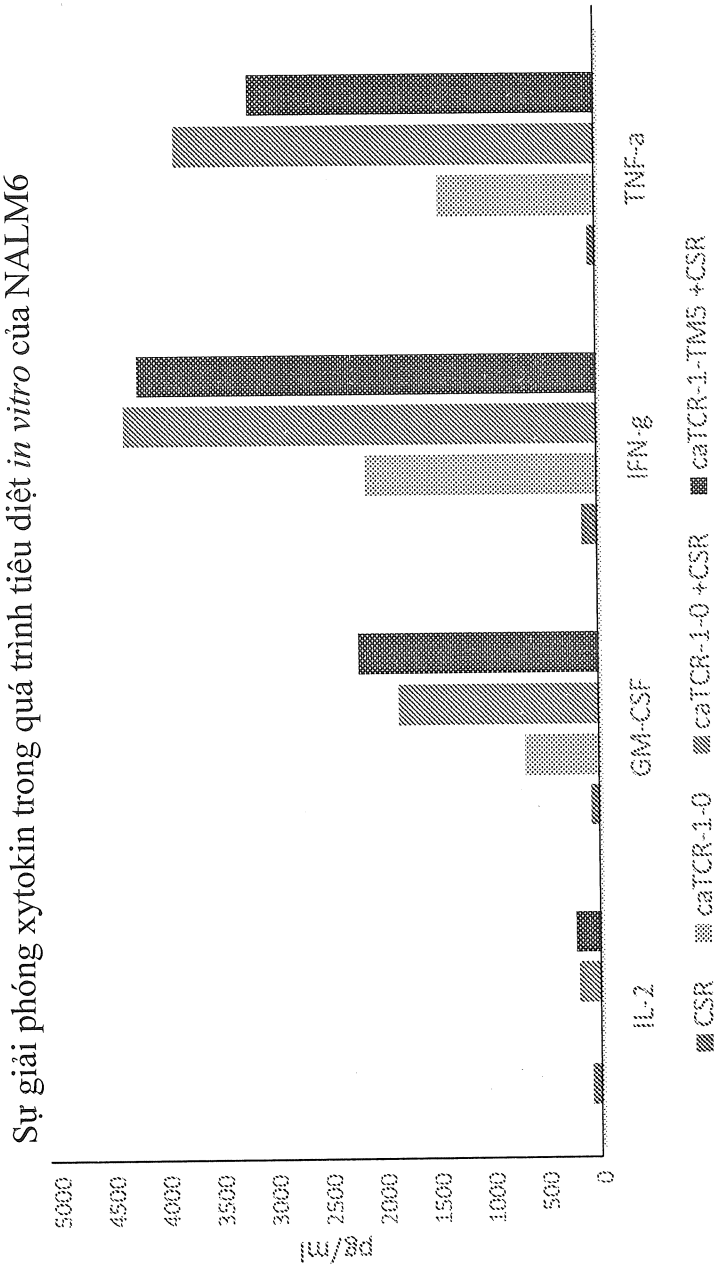

Sự giải phóng xytokin trong quá trình tiêu diệt *in vitro* của NALM6
pg/ml
5000
4500
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
IL-2
GM-CSF
IFN-g
TNF-a
CSR
caTCR-1-0
caTCR-1-0 +CSR
caTCR-1-TM5 +CSR

FIG. 3

FIG. 4

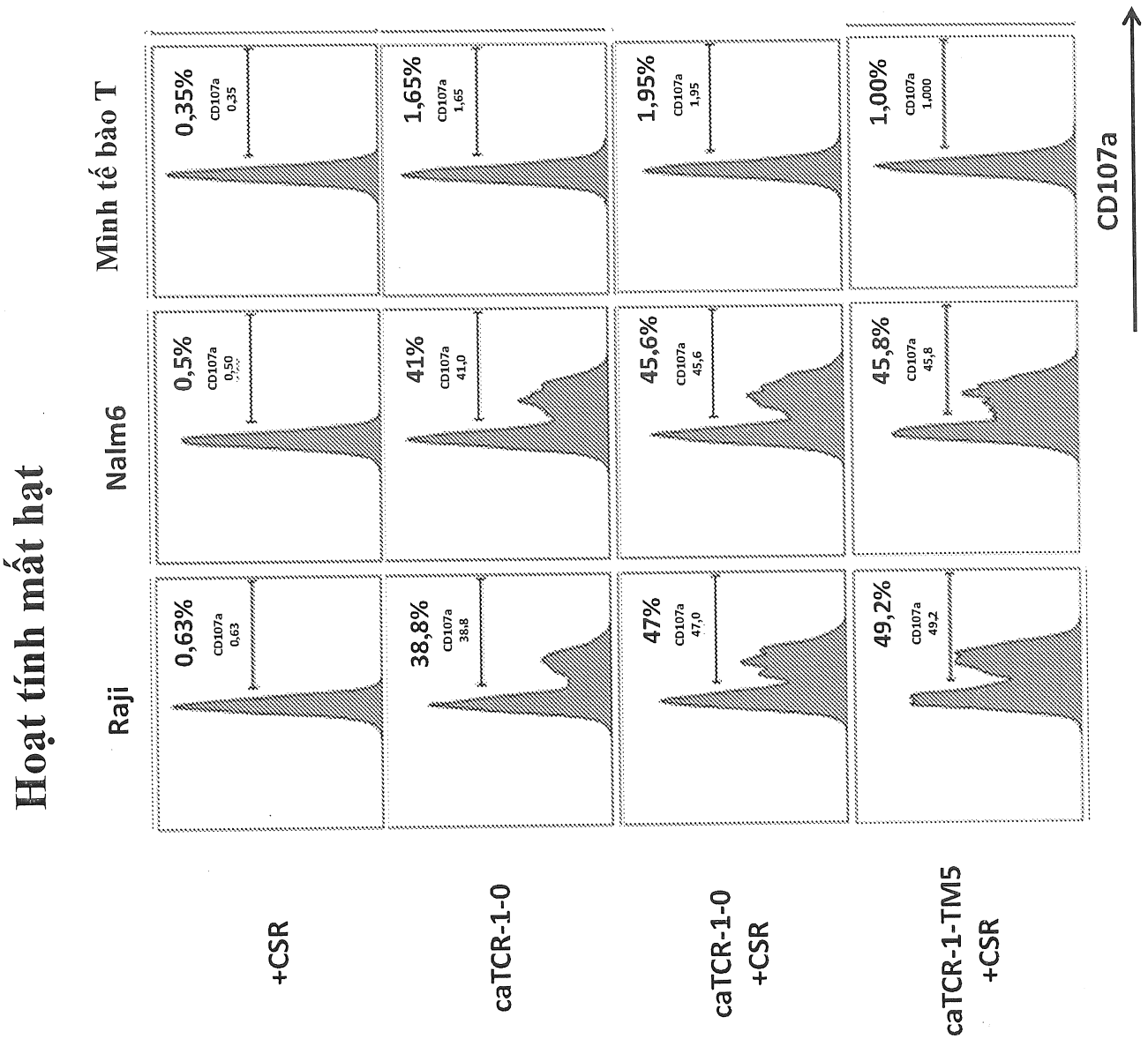

Hoạt tính mất hạt
Raji
Nalm6
Mình tế bào T
0,63%
CD107a
0,63
0,5%
CD107a
0,50
0,35%
CD107a
0,35
38,8%
CD107a
38,8
41%
CD107a
41,0
1,65%
CD107a
1,65
47%
CD107a
47,0
45,6%
CD107a
45,6
1,95%
CD107a
1,95
49,2%
CD107a
49,2
45,8%
CD107a
45,8
1,00%
CD107a
1,000
+CSR
caTCR-1-0
caTCR-1-0
+CSR
caTCR-1-TM5
+CSR
CD107a

FIG. 5

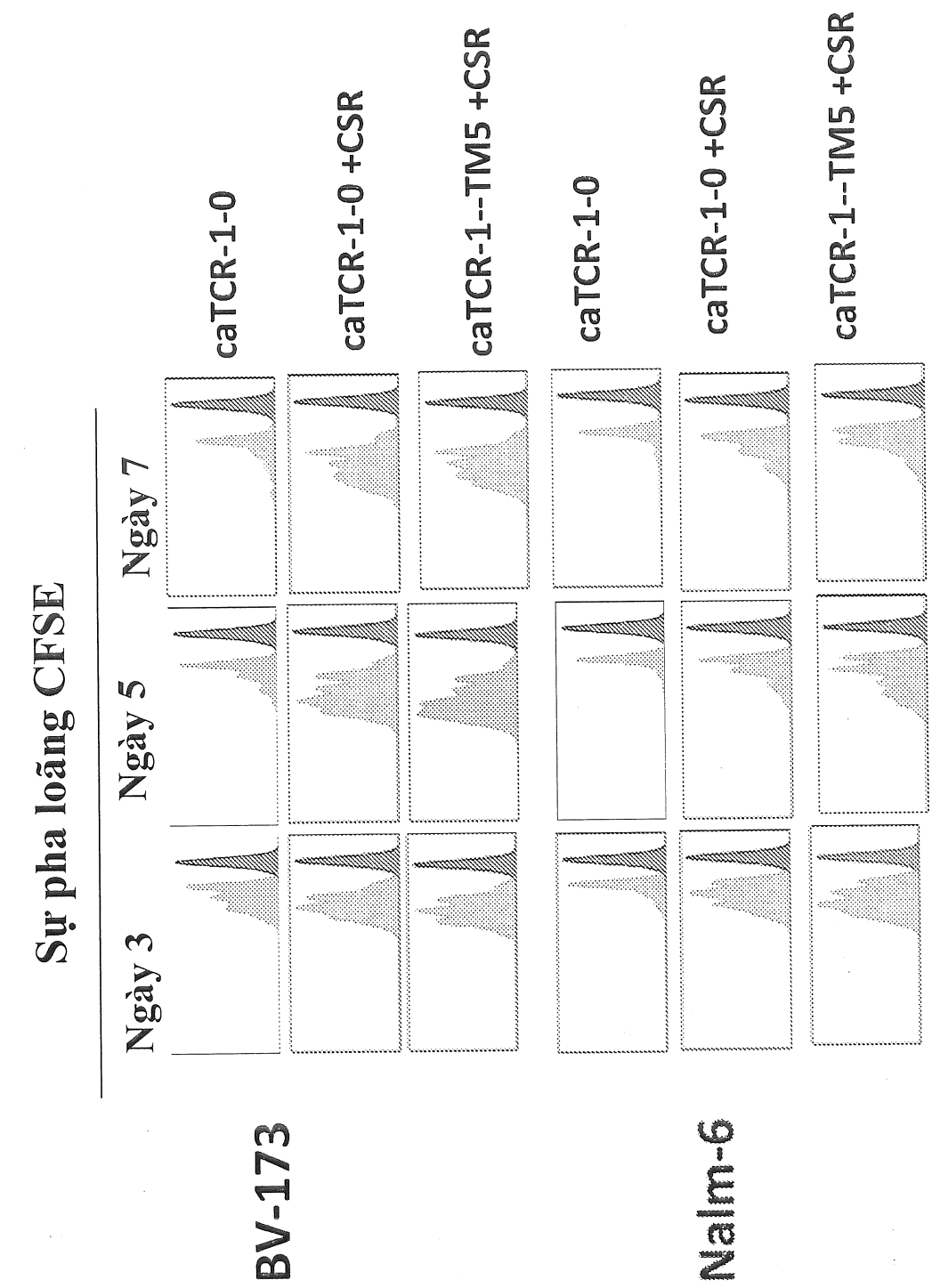

Sự pha loãng CFSE
Ngày 3
Ngày 5
Ngày 7
BV-173
Nalm-6
caTCR-1-0
caTCR-1-0 +CSR
caTCR-1--TM5 +CSR
caTCR-1-0
caTCR-1-0 +CSR
caTCR-1--TM5 +CSR

FIG. 6

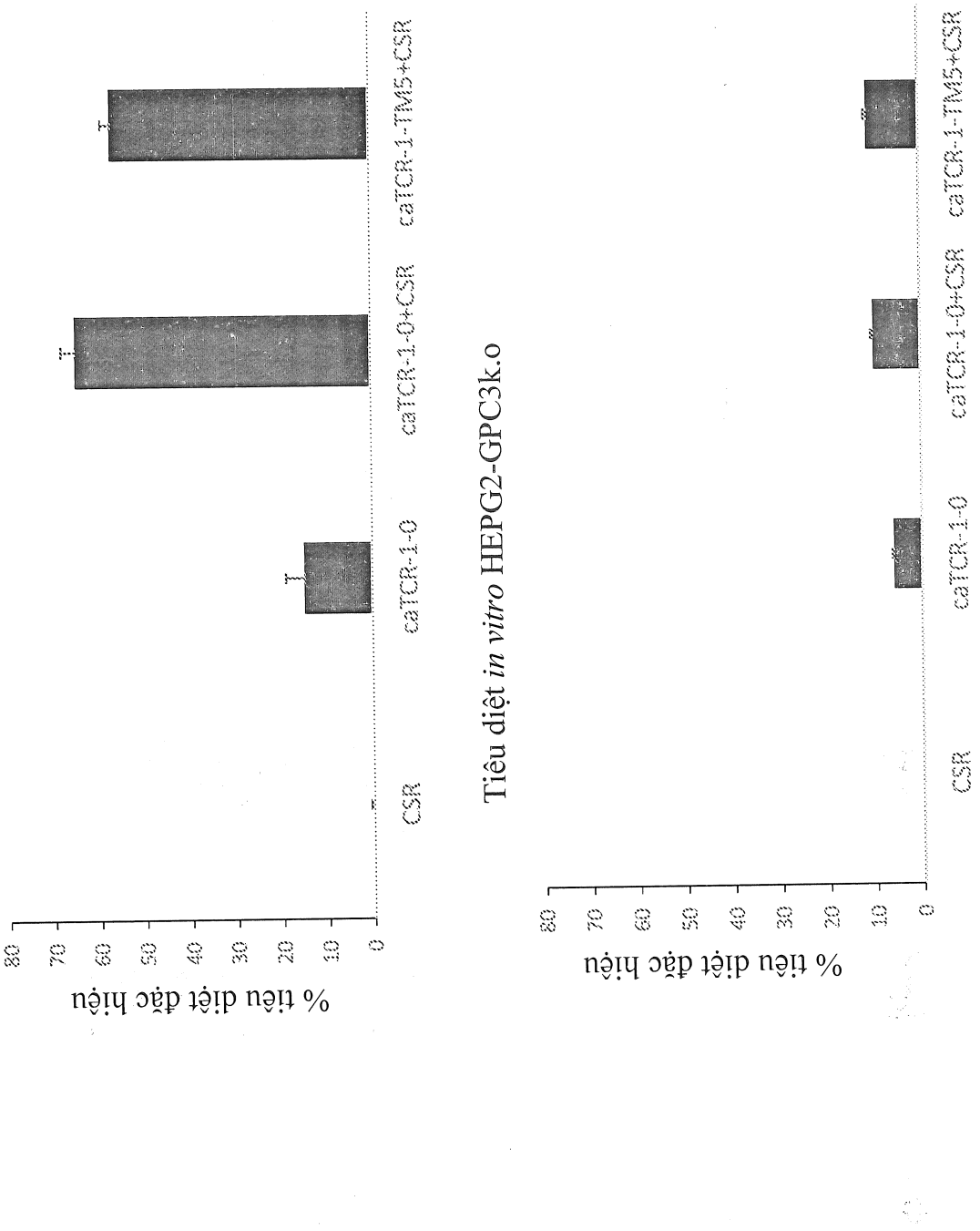

Tiêu diệt *in vitro* HEPG2
% tiêu diệt đặc hiệu
0
10
20
30
40
50
60
70
80
CSR
caTCR-1-0
caTCR-1-0+CSR
caTCR-1-TM5+CSR
Tiêu diệt *in vitro* HEPG2-GPC3k.o
% tiêu diệt đặc hiệu
0
10
20
30
40
50
60
70
80
CSR
caTCR-1-0
caTCR-1-0+CSR
caTCR-1-TM5+CSR

FIG. 7

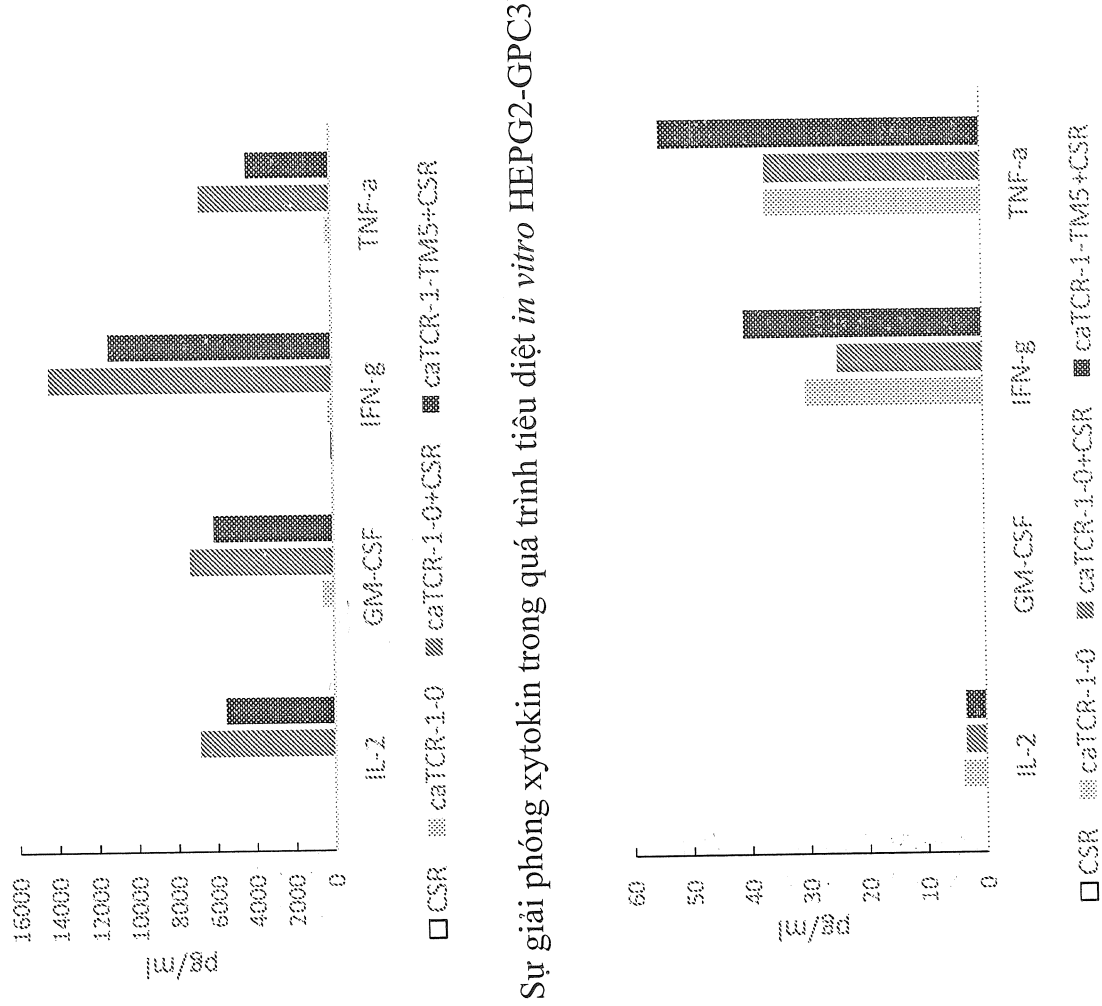

Sự giải phóng xytokin trong quá trình tiêu diệt *in vitro* HEPG2
pg/ml
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
IL-2
GM-CSF
IFN-g
TNF-a
CSR
caTCR-1-0
caTCR-1-0+CSR
caTCR-1-TM5+CSR
Sự giải phóng xytokin trong quá trình tiêu diệt *in vitro* HEPG2-GPC3k.o
pg/ml
60
50
40
30
20
10
0
IL-2
GM-CSF
IFN-g
TNF-a
CSR
caTCR-1-0
caTCR-1-0+CSR
caTCR-1-TM5+CSR

FIG. 8

Hiện tượng mất hạt CD107a

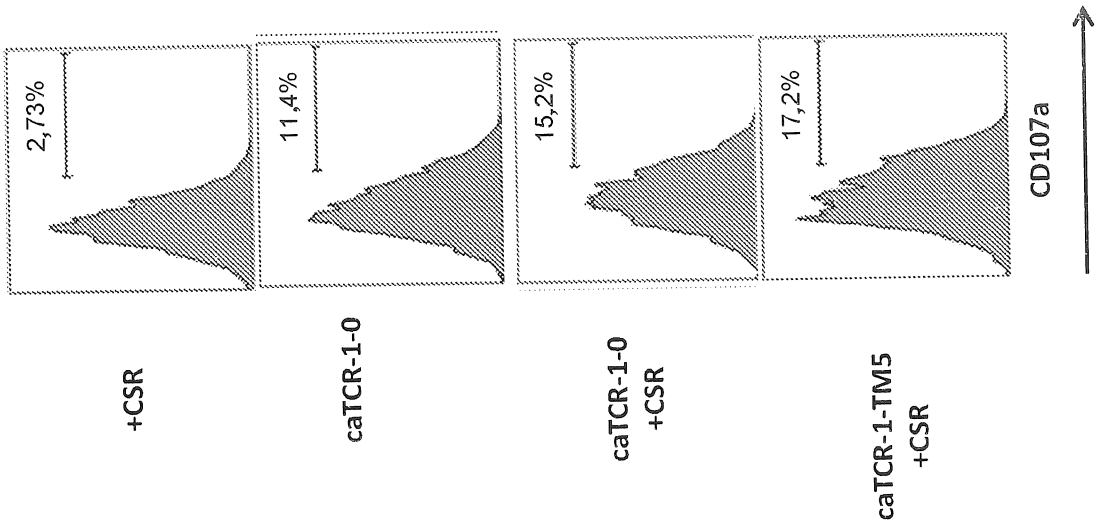


FIG. 9

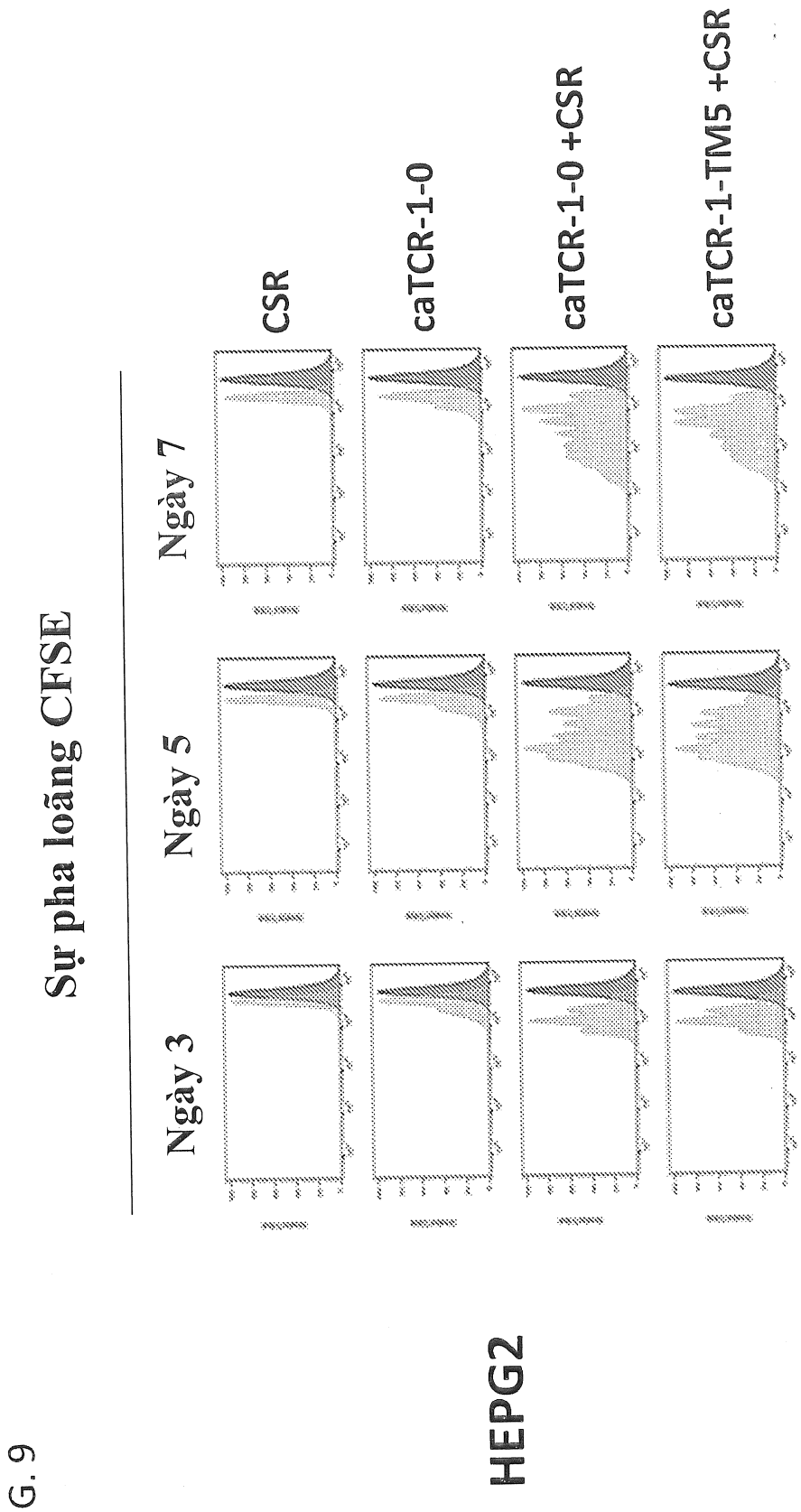

Sự pha loãng CFSE
Ngày 3
Ngày 5
Ngày 7
CSR
caTCR-1-0
caTCR-1-0 +CSR
caTCR-1-TM5 +CSR
HEPG2

FIG. 10

caTCR1 kháng CD19
CSR kháng CD20

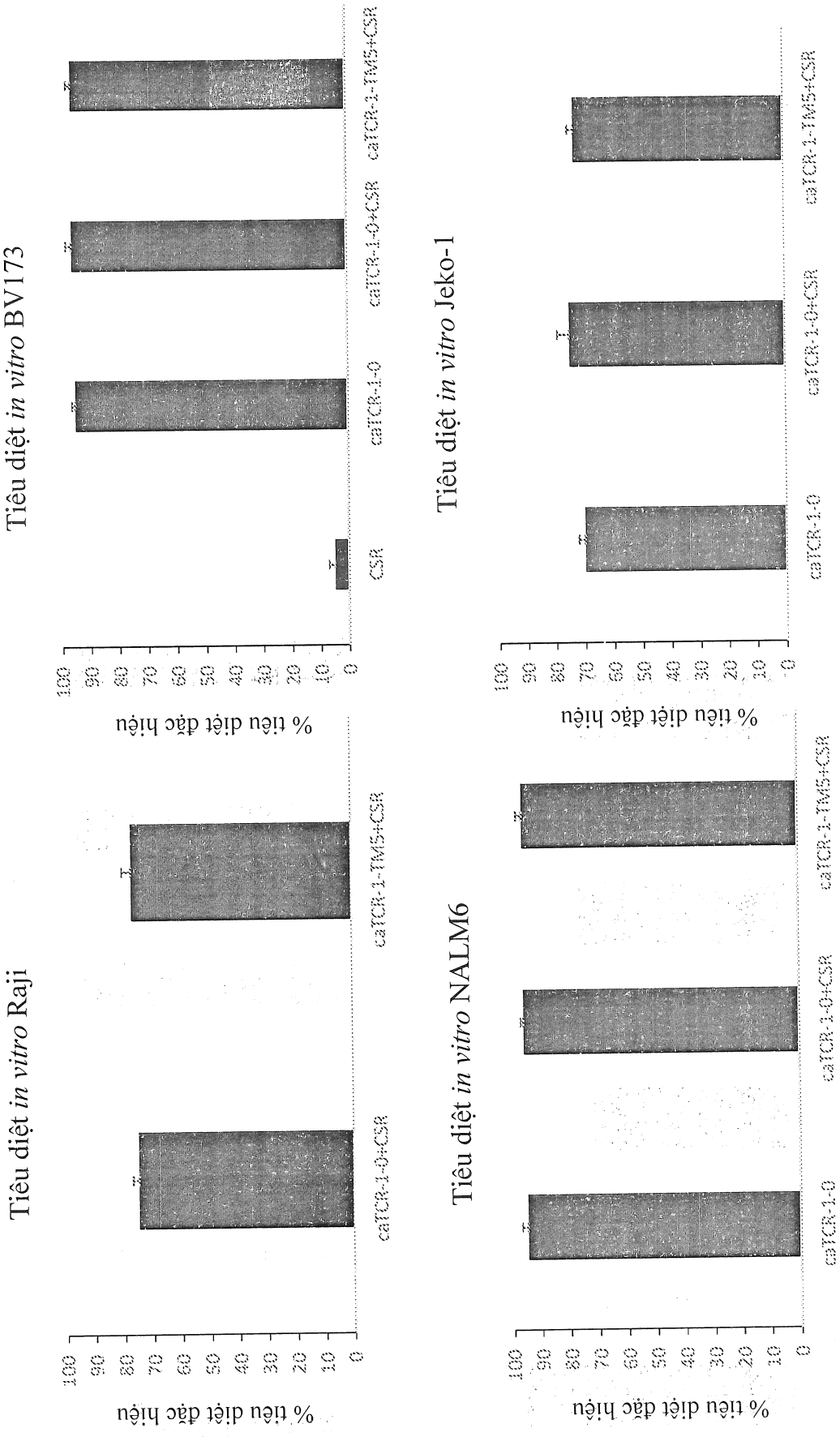


FIG. 11

Sự giải phóng xytokin trong quá trình tiêu diệt *in vitro* Raji

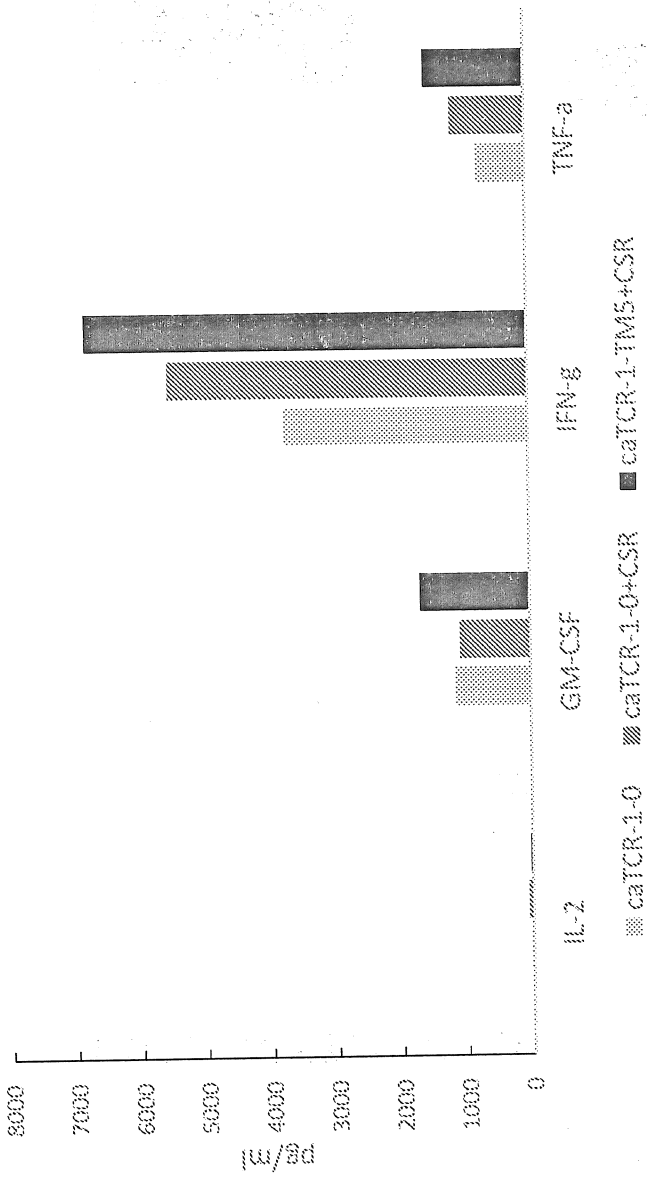


FIG. 12

Hiện tượng mất hạt CD107a

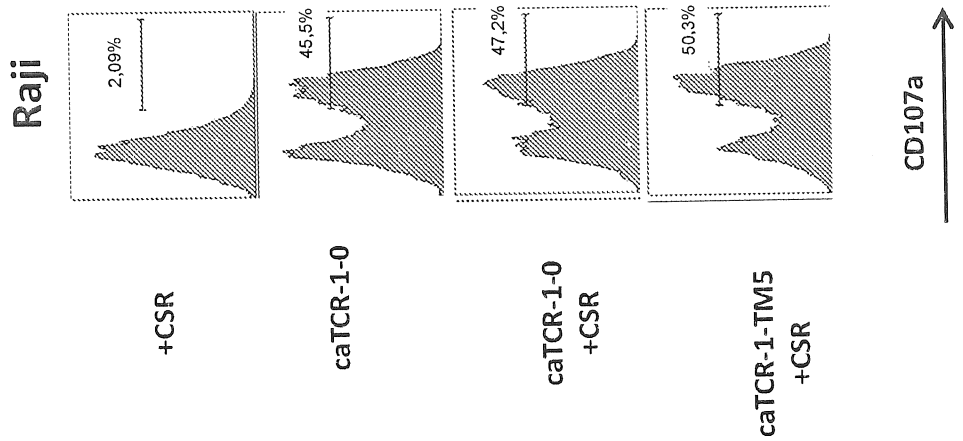


FIG. 13B

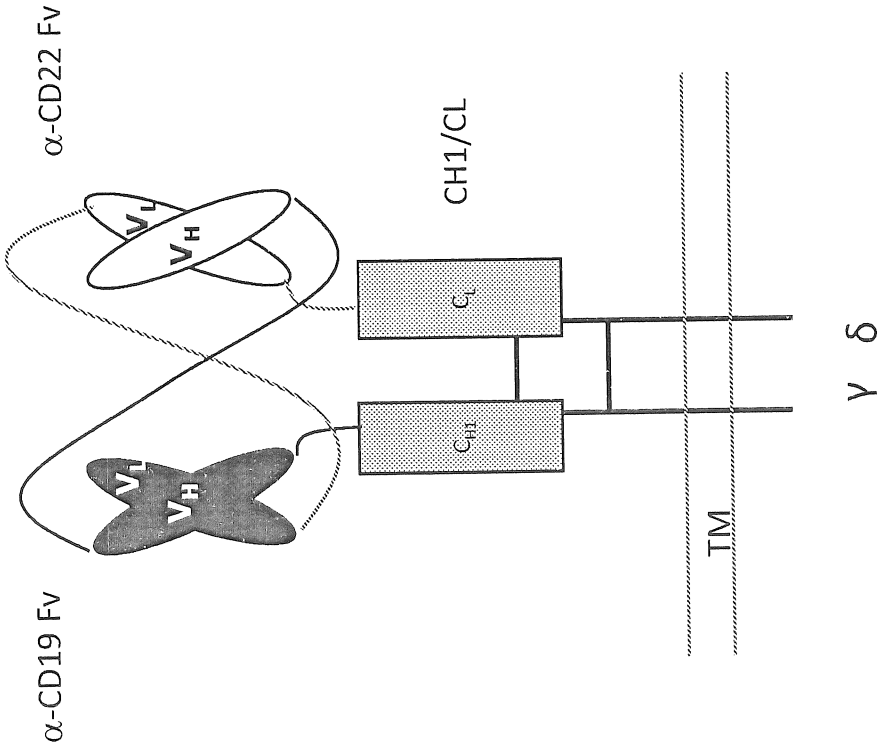


FIG. 13A

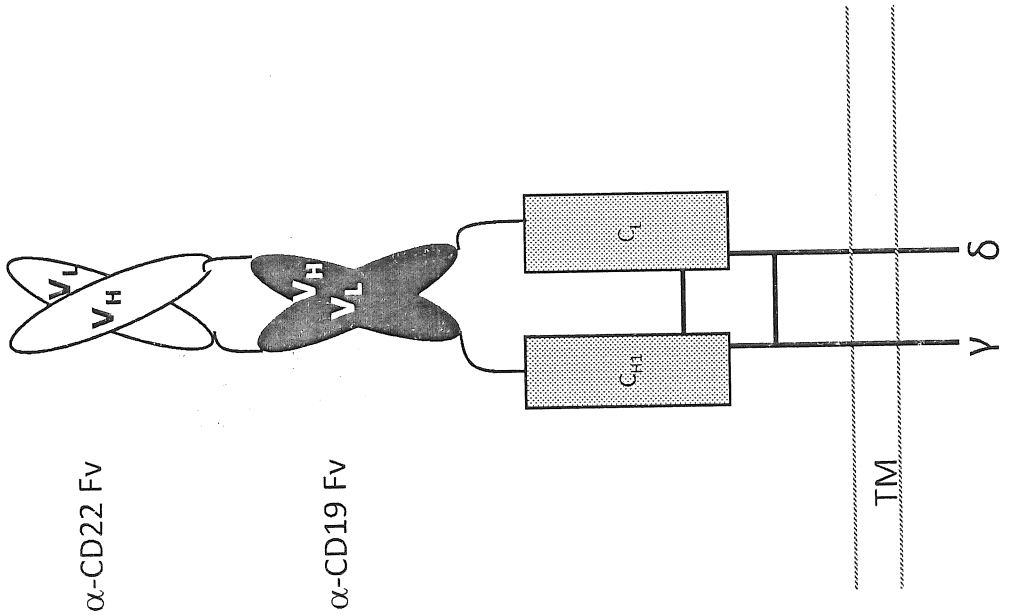


FIG. 13C

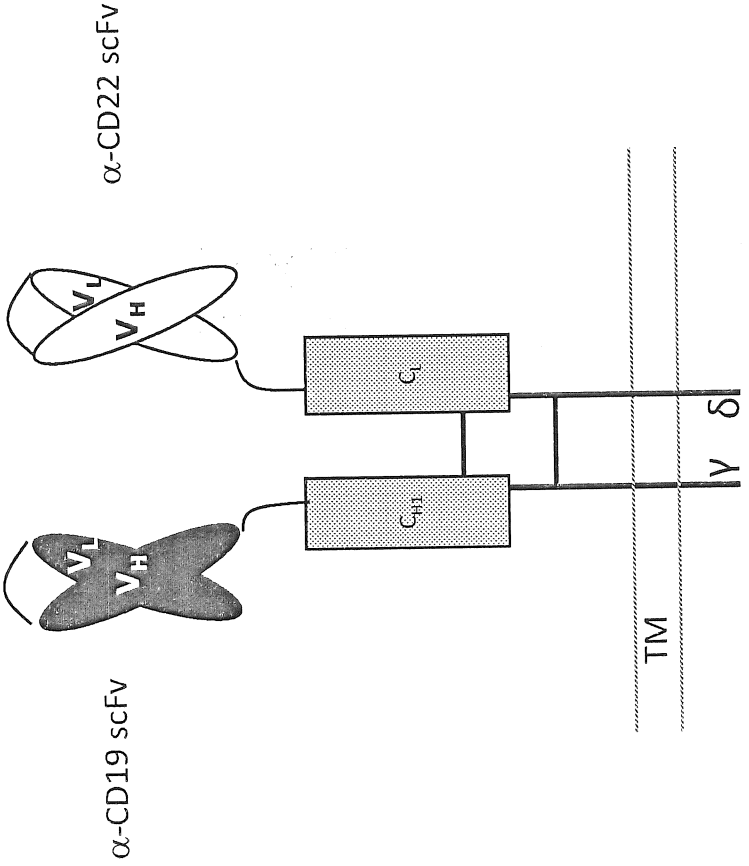


FIG. 13D

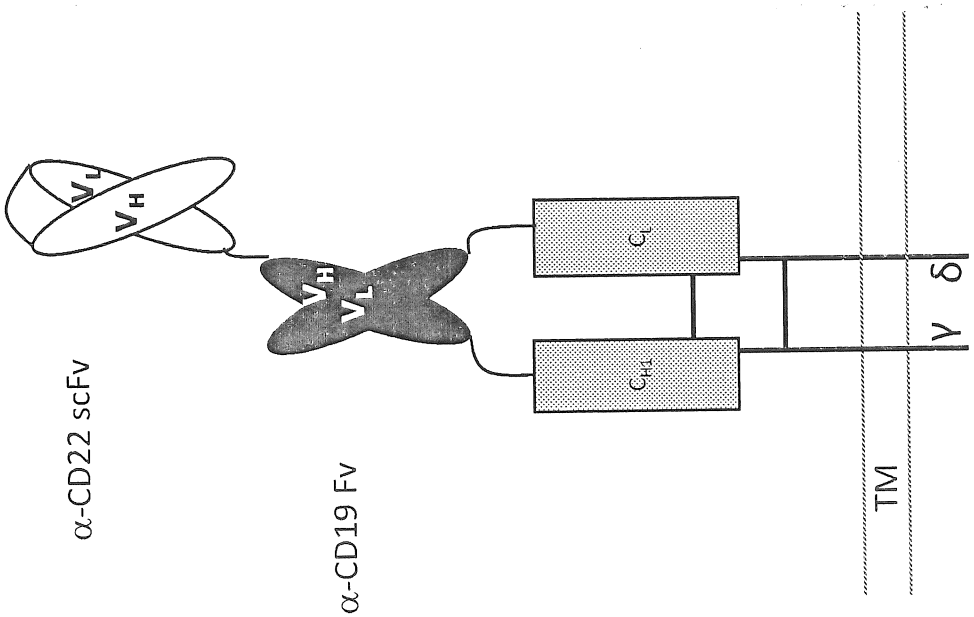


FIG. 13E

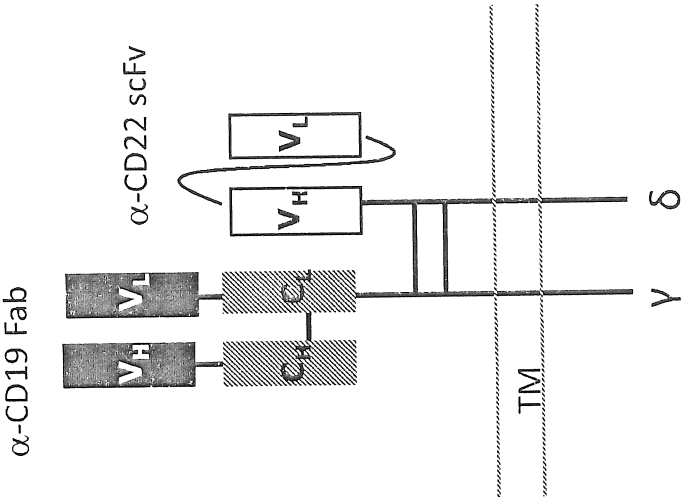


FIG. 14

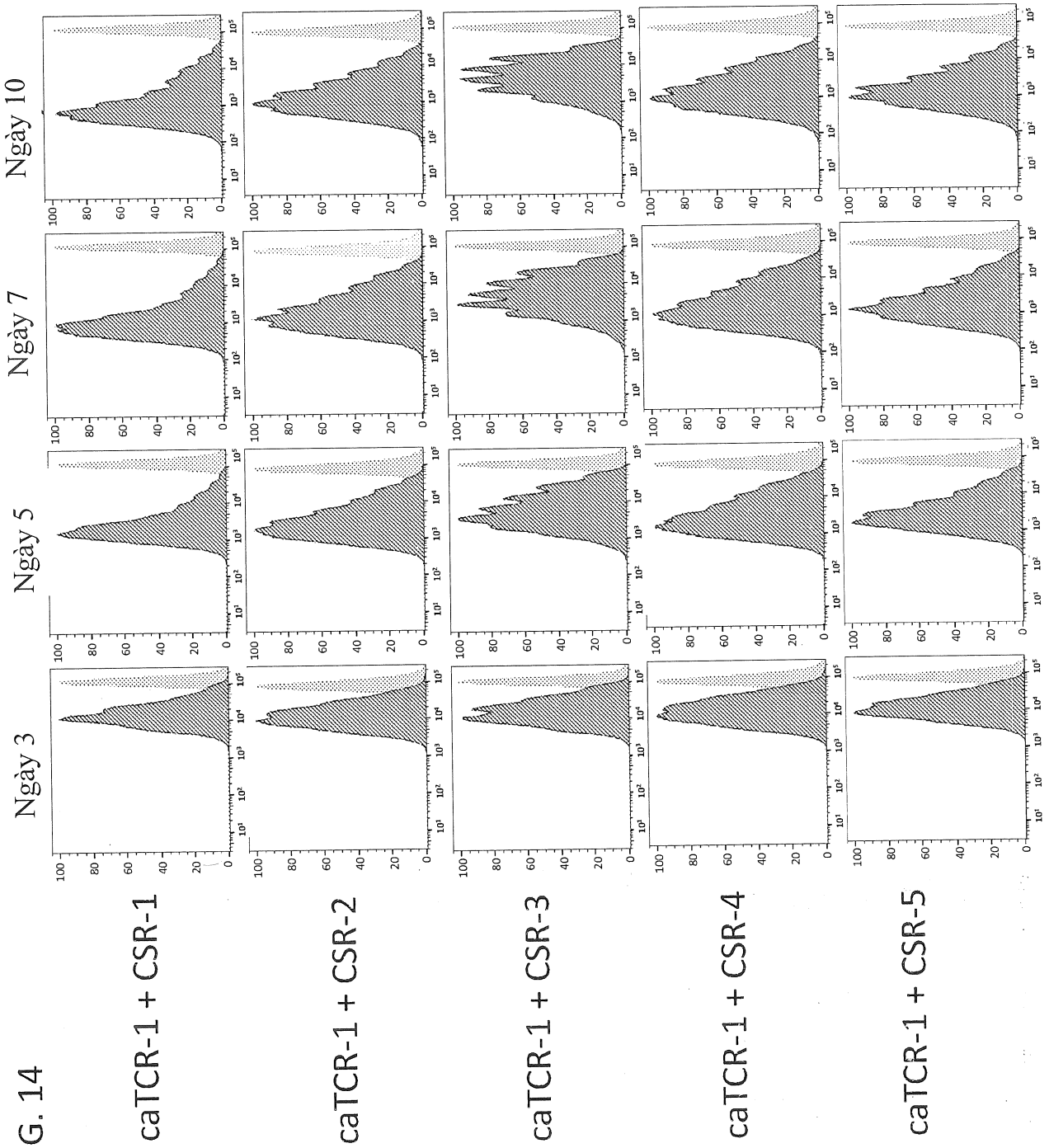

Ngày 3
Ngày 5
Ngày 7
Ngày 10
caTCR-1 + CSR-1
caTCR-1 + CSR-2
caTCR-1 + CSR-3
caTCR-1 + CSR-4
caTCR-1 + CSR-5

FIG. 15

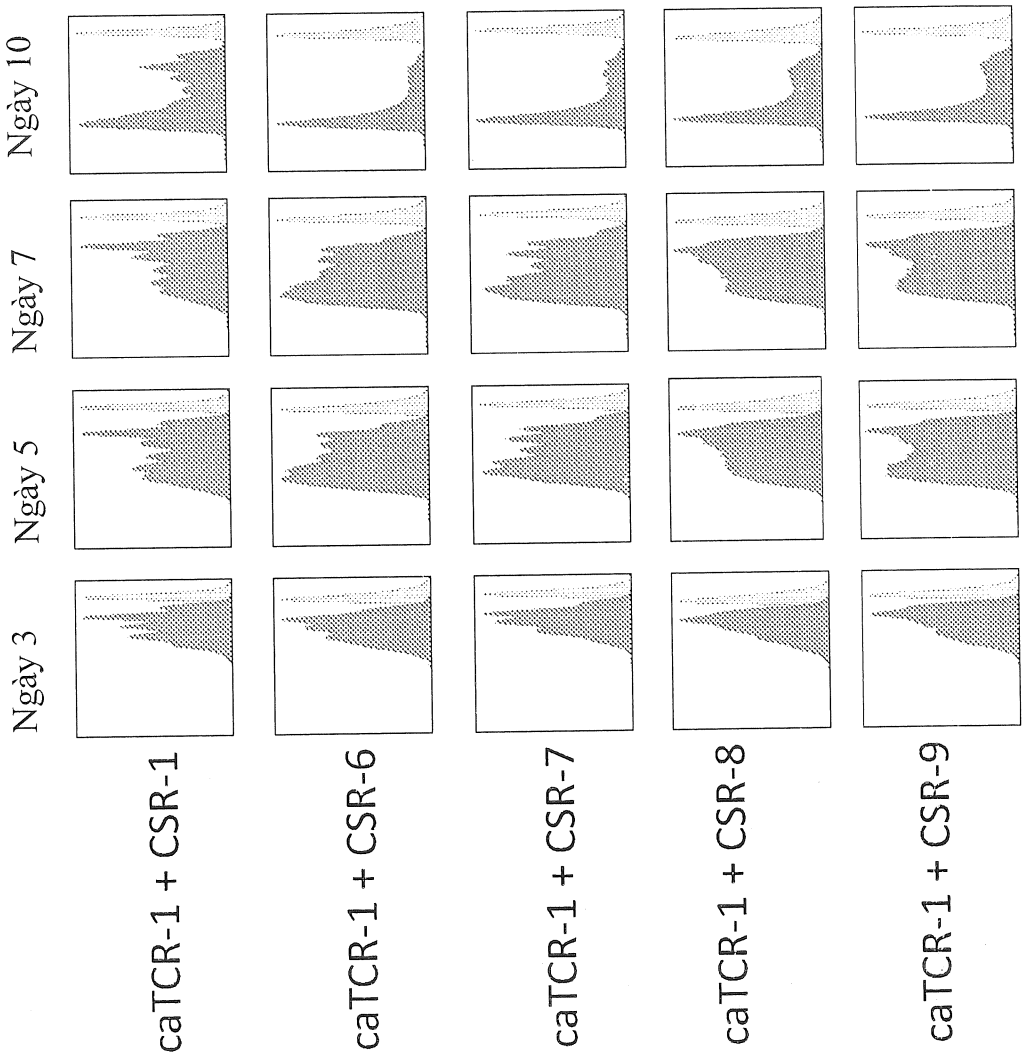
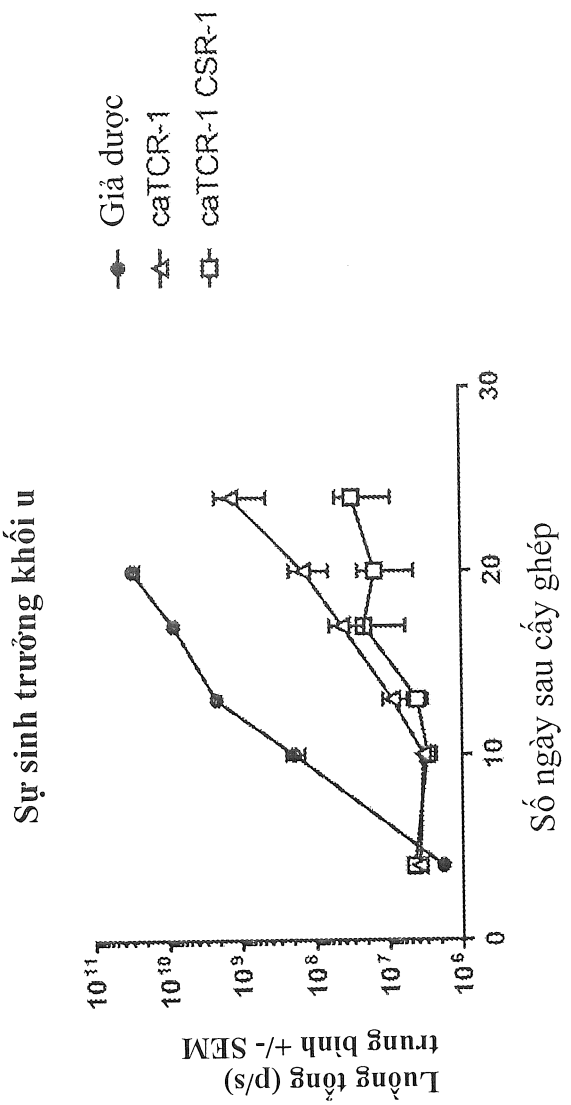

Sự pha loãng CFSE
Ngày 3
Ngày 5
Ngày 7
Ngày 10
caTCR-1 + CSR-1
caTCR-1 + CSR-6
caTCR-1 + CSR-7
caTCR-1 + CSR-8
caTCR-1 + CSR-9

FIG. 16


Giả dược
caTCR-1
caTCR-1 CSR-1
Sự sinh trưởng khối u
Lượng tổng (p/s)
trung bình +/- SEM
Số ngày sau cấy ghép
0
10
20
30
10^{5}
10^{6}
10^{7}
10^{8}
10^{9}
10^{10}
10^{11}

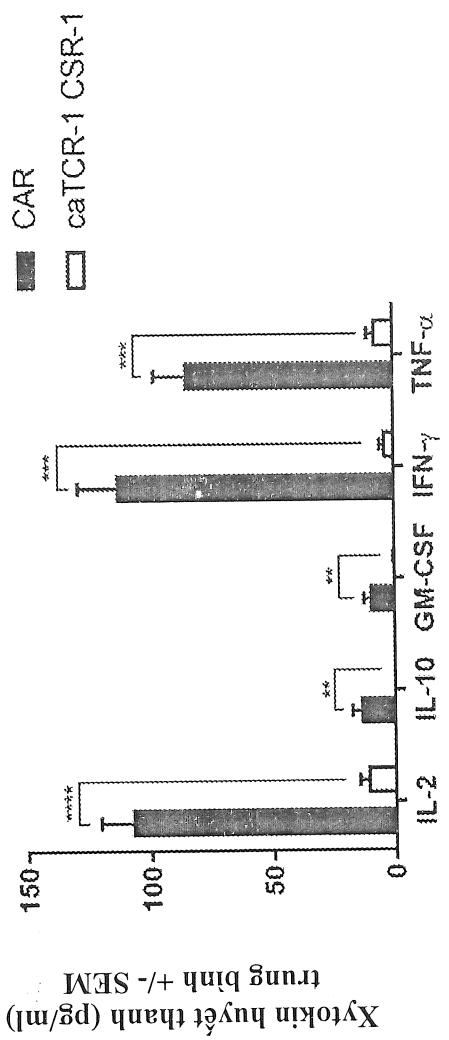
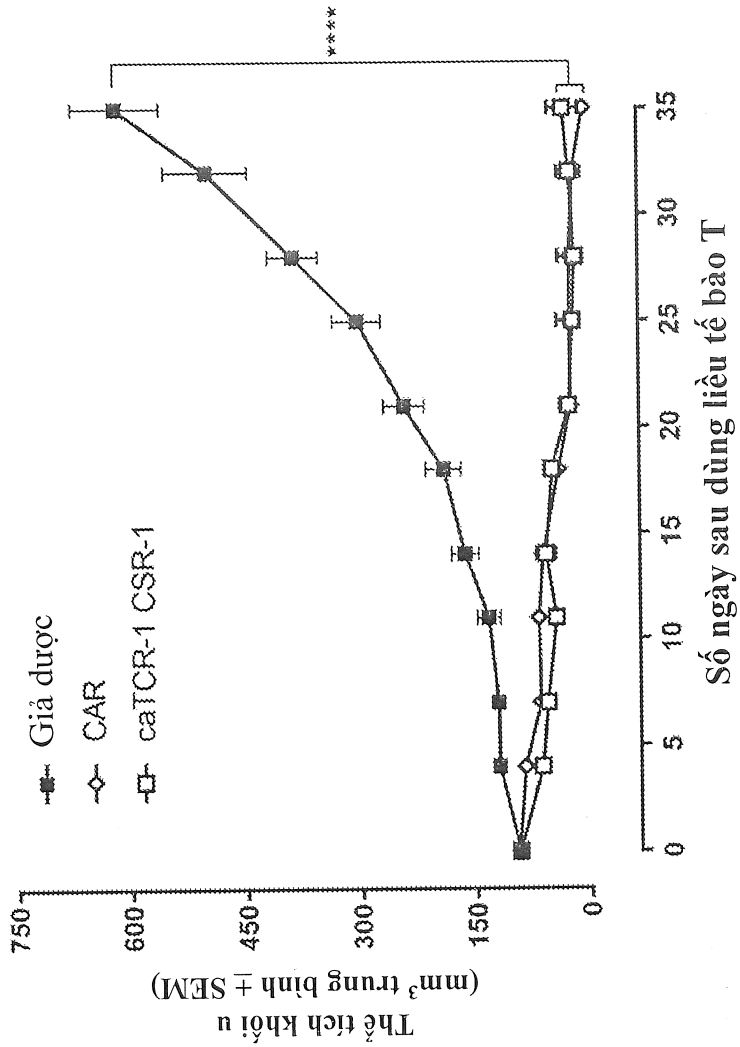

CAR
caTCR-1 CSR-1
150
100
50
0
****
**
**
***
***
IL-2
IL-10
GM-CSF
IFN-γ
TNF-α
Xytokin huyết thanh (pg/ml)
trung bình +/- SEM

FIG. 17

FIG. 18


Giả dược
CAR
caTCR-1 CSR-1
****
Thể tích khối u
(mm³ trung bình ± SEM)
750
600
450
300
150
0
0
5
10
15
20
25
30
35
Số ngày sau dùng liều tế bào T