



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110177803 A

(43)申请公布日 2019.08.27

(21)申请号 201780083288.5

(22)申请日 2017.11.22

(30)优先权数据

62/425,407 2016.11.22 US

62/425,535 2016.11.22 US

62/425,697 2016.11.23 US

62/425,884 2016.11.23 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.07.12

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/063137 2017.11.22

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/098365 EN 2018.05.31

(71)申请人 T细胞受体治疗公司

地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 帕特里克·博伊尔勒

罗伯特·霍夫梅斯特

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

代理人 贺淑东

(51)Int.Cl.

C07K 14/725(2006.01)

C07K 16/28(2006.01)

C12N 15/00(2006.01)

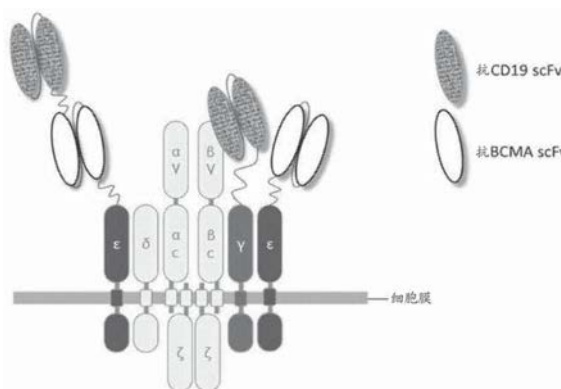
权利要求书38页 说明书150页 附图33页

(54)发明名称

用于使用融合蛋白进行TCR重新编程的组合物和方法

(57)摘要

本文提供对一种或多种肿瘤细胞相关抗原具有特异性的T细胞受体(TCR)融合蛋白(TFP)、被工程改造来表达一种或多种TFP的T细胞及其用于治疗包括癌症的疾病的使用方法。



1. 一种编码包含以下的T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP) 的经分离重组核酸分子:
  - (a) TCR亚单位,其包含
    - (i) TCR细胞外结构域的至少一部分,和
    - (ii) 包含来自选自CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 、TCR $\alpha$ 和TCR $\beta$ 组成的组的细胞内信号传导结构域的刺激性结构域的TCR细胞内结构域;以及
  - (b) 能够结合抗体或其片段的结合配体或其片段;其中所述TCR亚单位和所述结合配体操作性地连接,并且其中所述TFP在T细胞中表达时并入TCR中。
2. 如权利要求1所述的经分离核酸分子,其中所述结合配体能够结合所述抗体的Fc结构域。
3. 如权利要求1所述的经分离核酸分子,其中所述结合配体能够选择性结合IgG1抗体。
4. 如权利要求1所述的经分离核酸分子,其中所述结合配体能够特异性结合IgG1抗体。
5. 如权利要求1所述的经分离核酸分子,其中所述抗体或其片段结合细胞表面抗原。
6. 如权利要求1所述的经分离核酸分子,其中所述抗体或其片段结合肿瘤细胞的表面上的细胞表面抗原。
7. 如权利要求1所述的经分离核酸分子,其中所述结合配体包含单体、二聚体、三聚体、四聚体、五聚体、六聚体、七聚体、八聚体、九聚体或十聚体。
8. 如权利要求1所述的经分离核酸分子,其中所述结合配体不包含抗体或其片段。
9. 如权利要求1所述的经分离核酸分子,其中所述结合配体包含CD16多肽或其片段。
10. 如权利要求1所述的经分离核酸分子,其中所述结合配体包含CD16结合多肽。
11. 如权利要求1所述的经分离核酸分子,其中所述结合配体是人结合配体或人源化结合配体。
12. 如权利要求1所述的经分离核酸分子,其进一步包含编码能够由所述结合配体结合的抗体或其片段的核酸序列。
13. 如权利要求12所述的经分离核酸分子,其中所述抗体或其片段能够从细胞分泌。
14. 一种编码包含以下的T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP) 的经分离重组核酸分子:
  - (a) TCR亚单位,其包含
    - (i) TCR细胞外结构域的至少一部分,和
    - (ii) 包含来自选自CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 、TCR $\alpha$ 和TCR $\beta$ 组成的组的细胞内信号传导结构域的刺激性结构域的TCR细胞内结构域;以及
  - (b) 包含结合在细胞的表面上表达的受体或多肽的配体或其片段的抗原结构域;其中所述TCR亚单位和所述抗原结构域操作性地连接,并且其中所述TFP在T细胞中表达时并入TCR中。
15. 如权利要求14所述的经分离核酸分子,其中所述抗原结构域包含配体。
16. 如权利要求14或15所述的经分离核酸分子,其中所述配体结合细胞的所述受体。
17. 如权利要求14或15所述的经分离核酸分子,其中所述配体结合在细胞的表面上表达的所述多肽。
18. 如权利要求14-17中任一项所述的经分离核酸分子,其中在细胞的表面上表达的所述受体或多肽包括应激应答受体或多肽。

19. 如权利要求14-18中任一项所述的经分离核酸分子,其中在细胞的表面上表达的所述受体或多肽是I类MHC相关糖蛋白。

20. 如权利要求19所述的经分离核酸分子,其中所述I类MHC相关糖蛋白选自由以下组成的组:MICA、MICB、RAET1E、RAET1G、ULBP1、ULBP2、ULBP3、ULBP4及其组合。

21. 如权利要求14-20中任一项所述的经分离核酸分子,其中所述抗原结构域包含单体、二聚体、三聚体、四聚体、五聚体、六聚体、七聚体、八聚体、九聚体或十聚体。

22. 如权利要求21所述的经分离核酸分子,其中所述抗原结构域包含所述配体或其片段的单体或二聚体。

23. 如权利要求14-21中任一项所述的经分离核酸分子,其中所述配体或其片段是单体、二聚体、三聚体、四聚体、五聚体、六聚体、七聚体、八聚体、九聚体或十聚体。

24. 如权利要求23所述的经分离核酸分子,其中所述配体或其片段是单体或二聚体。

25. 如权利要求14-24中任一项所述的经分离核酸分子,其中所述抗原结构域不包含抗体或其片段。

26. 如权利要求14-25中任一项所述的经分离核酸分子,其中所述抗原结构域不包含可变区。

27. 如权利要求14-26中任一项所述的经分离核酸分子,其中所述抗原结构域不包含CDR。

28. 如权利要求14-27中任一项所述的经分离核酸分子,其中所述配体或其片段是天然杀伤组2D (NKG2D) 配体或其片段。

29. 如权利要求14-28中任一项所述的经分离核酸分子,其中所述TCR亚单位包含第一TCR亚单位和第二TCR亚单位,其中所述抗原结构域包含第一抗原结构域和第二抗原结构域,其中所述第一TCR亚单位操作性地连接于所述第一抗原结构域,并且其中所述第二TCR亚单位操作性地连接于所述第二抗原结构域。

30. 如权利要求14-29中任一项所述的经分离核酸分子,其中所述抗原结构域是人抗原结构域或人源化抗原结构域。

31. 一种编码包含以下的T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP) 的经分离重组核酸分子:

(a) TCR亚单位,其包含

(i) TCR细胞外结构域的至少一部分,和

(ii) 包含来自CD3 $\epsilon$ 的细胞内信号传导结构域的刺激性结构域的TCR细胞内结构域;以

及

(b) 包含CD16多肽或其片段的结合配体;

其中所述TCR亚单位和所述结合配体操作性地连接,并且

其中所述TFP在T细胞中表达时并入TCR中。

32. 一种编码包含以下的T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP) 的经分离重组核酸分子:

(a) TCR亚单位,其包含

(i) TCR细胞外结构域的至少一部分,和

(ii) 包含来自CD3 $\gamma$ 的细胞内信号传导结构域的刺激性结构域的TCR细胞内结构域;以

及

(b) 包含CD16多肽或其片段的结合配体;

其中所述TCR亚单位和所述结合配体操作性地连接,并且  
其中所述TFP在T细胞中表达时并入TCR中。

33. 一种编码包含以下的T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP) 的经分离重组核酸分子:

(a) TCR亚单位,其包含

(i) TCR细胞外结构域的至少一部分,和

(ii) 包含来自CD3 $\delta$ 的细胞内信号传导结构域的刺激性结构域的TCR细胞内结构域;以  
及

(b) 包含CD16多肽或其片段的结合配体;

其中所述TCR亚单位和所述结合配体操作性地连接,并且  
其中所述TFP在T细胞中表达时并入TCR中。

34. 一种编码包含以下的T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP) 的经分离重组核酸分子:

(a) TCR亚单位,其包含

(i) TCR细胞外结构域的至少一部分,和

(ii) 包含来自TCR $\alpha$ 的细胞内信号传导结构域的刺激性结构域的TCR细胞内结构域;以  
及

(b) 包含CD16多肽或其片段的结合配体;

其中所述TCR亚单位和所述结合配体操作性地连接,并且  
其中所述TFP在T细胞中表达时并入TCR中。

35. 一种编码包含以下的T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP) 的经分离重组核酸分子:

(a) TCR亚单位,其包含

(i) TCR细胞外结构域的至少一部分,和

(ii) 包含来自TCR $\beta$ 的细胞内信号传导结构域的刺激性结构域的TCR细胞内结构域;以  
及

(b) 包含CD16多肽或其片段的结合配体;

其中所述TCR亚单位和所述结合配体操作性地连接,并且  
其中所述TFP在T细胞中表达时并入TCR中。

36. 一种编码包含以下的T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP) 的经分离重组核酸分子:TCR  
亚单位和能够结合抗体或其片段的结合配体。

37. 一种编码包含以下的T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP) 的经分离重组核酸分子:TCR  
亚单位和包含CD16多肽或其片段的结合配体。

38. 一种编码包含以下的T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP) 的经分离重组核酸分子:

(a) TCR亚单位,其包含

(i) TCR细胞外结构域的至少一部分,和

(ii) 包含来自CD3 $\epsilon$ 的细胞内信号传导结构域的刺激性结构域的TCR细胞内结构域;以  
及

(b) 包含是抗受体酪氨酸激酶样孤儿受体1 (ROR1) 结合结构域的抗原结合结构域的人  
或人源化抗体结构域;

其中所述TCR亚单位和所述抗体结构域操作性地连接,并且  
其中所述TFP在T细胞中表达时并入TCR中。



39. 一种编码包含以下的T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP) 的经分离重组核酸分子:

(a) TCR亚单位, 其包含

(i) TCR细胞外结构域的至少一部分, 和

(ii) 包含来自CD3  $\gamma$  的细胞内信号传导结构域的刺激性结构域的TCR细胞内结构域; 以及

(b) 包含是抗受体酪氨酸激酶样孤儿受体1 (ROR1) 结合结构域的抗原结合结构域的人或人源化抗体结构域;

其中所述TCR亚单位和所述抗体结构域操作性地连接, 并且

其中所述TFP在T细胞中表达时并入TCR中。

40. 一种编码包含以下的T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP) 的经分离重组核酸分子:

(a) TCR亚单位, 其包含

(i) TCR细胞外结构域的至少一部分, 和

(ii) 包含来自CD3  $\delta$  的细胞内信号传导结构域的刺激性结构域的TCR细胞内结构域; 以及

(b) 包含是抗受体酪氨酸激酶样孤儿受体1 (ROR1) 结合结构域的抗原结合结构域的人或人源化抗体结构域;

其中所述TCR亚单位和所述抗体结构域操作性地连接, 并且

其中所述TFP在T细胞中表达时并入TCR中。

41. 一种编码包含以下的T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP) 的经分离重组核酸分子:

(a) TCR亚单位, 其包含

(i) TCR细胞外结构域的至少一部分, 和

(ii) 包含来自TCR $\alpha$ 的细胞内信号传导结构域的刺激性结构域的TCR细胞内结构域; 以及

(b) 包含是抗受体酪氨酸激酶样孤儿受体1 (ROR1) 结合结构域的抗原结合结构域的人或人源化抗体结构域;

其中所述TCR亚单位和所述抗体结构域操作性地连接, 并且

其中所述TFP在T细胞中表达时并入TCR中。

42. 一种编码包含以下的T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP) 的经分离重组核酸分子:

(a) TCR亚单位, 其包含

(i) TCR细胞外结构域的至少一部分, 和

(ii) 包含来自TCR $\beta$ 的细胞内信号传导结构域的刺激性结构域的TCR细胞内结构域; 以及

(b) 包含是抗受体酪氨酸激酶样孤儿受体1 (ROR1) 结合结构域的抗原结合结构域的人或人源化抗体结构域;

其中所述TCR亚单位和所述抗体结构域操作性地连接, 并且

其中所述TFP在T细胞中表达时并入TCR中。

43. 一种编码包含以下的T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP) 的经分离重组核酸分子: TCR亚单位和包含是抗ROR1结合结构域的抗原结合结构域的人或人源化抗体结构域。

44. 一种编码包含以下的T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP) 的经分离重组核酸分子:

- (a) TCR亚单位,其包含
- (i) TCR细胞外结构域的至少一部分,和
- (ii) 包含来自CD3 $\epsilon$ 的细胞内信号传导结构域的刺激性结构域的TCR细胞内结构域;以及
- (b) 包含是天然杀伤组2D (NKG2D) 配体或其片段的配体的抗原结构域;
- 其中所述TCR亚单位和所述抗原结构域操作性地连接,并且
- 其中所述TFP在T细胞中表达时并入TCR中。
45. 一种编码包含以下的T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP) 的经分离重组核酸分子:
- (a) TCR亚单位,其包含
- (i) TCR细胞外结构域的至少一部分,和
- (ii) 包含来自CD3 $\gamma$ 的细胞内信号传导结构域的刺激性结构域的TCR细胞内结构域;以及
- (b) 包含是天然杀伤组2D (NKG2D) 配体或其片段的配体的抗原结构域;
- 其中所述TCR亚单位和所述抗原结构域操作性地连接,并且
- 其中所述TFP在T细胞中表达时并入TCR中。
46. 一种编码包含以下的T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP) 的经分离重组核酸分子:
- (a) TCR亚单位,其包含
- (i) TCR细胞外结构域的至少一部分,和
- (ii) 包含来自CD3 $\delta$ 的细胞内信号传导结构域的刺激性结构域的TCR细胞内结构域;以及
- (b) 包含是天然杀伤组2D (NKG2D) 配体或其片段的配体的抗原结构域;
- 其中所述TCR亚单位和所述抗原结构域操作性地连接,并且
- 其中所述TFP在T细胞中表达时并入TCR中。
47. 一种编码包含以下的T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP) 的经分离重组核酸分子:
- (a) TCR亚单位,其包含
- (i) TCR细胞外结构域的至少一部分,和
- (ii) 包含来自TCR $\alpha$ 的细胞内信号传导结构域的刺激性结构域的TCR细胞内结构域;以及
- (b) 包含是天然杀伤组2D (NKG2D) 配体或其片段的配体的抗原结构域;
- 其中所述TCR亚单位和所述抗原结构域操作性地连接,并且
- 其中所述TFP在T细胞中表达时并入TCR中。
48. 一种编码包含以下的T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP) 的经分离重组核酸分子:
- (a) TCR亚单位,其包含
- (i) TCR细胞外结构域的至少一部分,和
- (ii) 包含来自TCR $\beta$ 的细胞内信号传导结构域的刺激性结构域的TCR细胞内结构域;以及
- (b) 包含是天然杀伤组2D (NKG2D) 配体或其片段的配体的抗原结构域;
- 其中所述TCR亚单位和所述抗原结构域操作性地连接,并且
- 其中所述TFP在T细胞中表达时并入TCR中。

49.一种编码包含以下的T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP) 的经分离重组核酸分子:TCR 亚单位和抗原结构域。

50.一种编码包含以下的T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP) 的经分离重组核酸分子:TCR 亚单位和包含是天然杀伤组2D (NKG2D) 配体或其片段的配体的抗原结构域。

51.如权利要求49或50所述的经分离核酸分子,其中所述TCR亚单位和所述抗原结构域操作性地连接。

52.如权利要求49-51中任一项所述的经分离核酸分子,其中所述TFP在T细胞中表达时并入TCR中。

53.如权利要求14-30和44-52中任一项所述的经分离核酸分子,其中所述抗原结构域是人抗原结构域或人源化抗原结构域。

54.如权利要求44-53中任一项所述的经分离核酸分子,其中所述天然杀伤组2D (NKG2D) 配体或其片段结合细胞的所述受体。

55.如权利要求44-54中任一项所述的经分离核酸分子,其中所述天然杀伤组2D (NKG2D) 配体或其片段结合在细胞的表面上表达的所述多肽。

56.如权利要求44-55中任一项所述的经分离核酸分子,其中所述天然杀伤组2D (NKG2D) 配体或其片段结合应激应答受体或多肽。

57.如权利要求44-56中任一项所述的经分离核酸分子,其中所述天然杀伤组2D (NKG2D) 配体或其片段结合I类MHC相关糖蛋白。

58.如权利要求57所述的经分离核酸分子,其中所述I类MHC相关糖蛋白选自由以下组成的组:MICA、MICB、RAET1E、RAET1G、ULBP1、ULBP2、ULBP3、ULBP4及其组合。

59.如权利要求44-58中任一项所述的经分离核酸分子,其中所述抗原结构域包含所述天然杀伤组2D (NKG2D) 配体或其片段的单体、二聚体、三聚体、四聚体、五聚体、六聚体、七聚体、八聚体、九聚体或十聚体。

60.如权利要求59所述的经分离核酸分子,其中所述抗原结构域包含所述天然杀伤组2D (NKG2D) 配体或其片段的单体或二聚体。

61.如权利要求44-60中任一项所述的经分离核酸分子,其中所述天然杀伤组2D (NKG2D) 配体或其片段是单体、二聚体、三聚体、四聚体、五聚体、六聚体、七聚体、八聚体、九聚体或十聚体。

62.如权利要求61所述的经分离核酸分子,其中所述天然杀伤组2D (NKG2D) 配体或其片段是单体或二聚体。

63.如权利要求44-62中任一项所述的经分离核酸分子,其中所述抗原结构域不包含抗体或其片段。

64.如权利要求44-63中任一项所述的经分离核酸分子,其中所述抗原结构域不包含可变区。

65.如权利要求44-64中任一项所述的经分离核酸分子,其中所述抗原结构域不包含CDR。

66.如权利要求44-65中任一项所述的经分离核酸分子,其中所述TCR亚单位包含第一TCR亚单位和第二TCR亚单位,其中所述抗原结构域包含第一抗原结构域和第二抗原结构域,其中所述第一TCR亚单位操作性地连接于所述第一抗原结构域,并且其中所述第二TCR

亚单位操作性地连接于所述第二抗原结构域。

67. 如权利要求14-30和44-66中任一项所述的经分离核酸分子, 其中所编码配体通过接头序列来连接于所述TCR细胞外结构域。

68. 一种经分离重组核酸分子, 其编码

(a) 第一T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP), 其包含:

(i) TCR亚单位, 其包含

(1) TCR细胞外结构域的至少一部分, 和

(2) 包含来自CD3 $\epsilon$ 的细胞内信号传导结构域的刺激性结构域的TCR细胞内结构域; 以及

(ii) 包含第一抗原结合结构域的第一人或人源化抗体结构域; 和

(b) 第二T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP), 其包含

(i) 包含TCR细胞外结构域的至少一部分的TCR亚单位, 以及

(ii) 包含第二抗原结合结构域的第二人或人源化抗体结构域;

其中所述第一TFP的所述TCR亚单位和所述第一抗体结构域操作性地连接, 并且所述第二TFP的所述TCR亚单位和所述第二抗体结构域操作性地连接, 并且

其中所述第一TFP和所述第二TFP在T细胞中表达时并入TCR中。

69. 一种经分离重组核酸分子, 其编码

(a) 第一T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP), 其包含:

(i) TCR亚单位, 其包含

(1) TCR细胞外结构域的至少一部分, 和

(2) 包含来自CD3 $\gamma$ 的细胞内信号传导结构域的刺激性结构域的TCR细胞内结构域; 以及

(ii) 包含第一抗原结合结构域的第一人或人源化抗体结构域; 和

(b) 第二T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP), 其包含

(i) 包含TCR细胞外结构域的至少一部分的TCR亚单位, 以及

(ii) 包含第二抗原结合结构域的第二人或人源化抗体结构域;

其中所述第一TFP的所述TCR亚单位和所述第一抗体结构域操作性地连接, 并且所述第二TFP的所述TCR亚单位和所述第二抗体结构域操作性地连接, 并且

其中所述第一TFP和所述第二TFP在T细胞中表达时并入TCR中。

70. 一种经分离重组核酸分子, 其编码

(a) 第一T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP), 其包含:

(i) TCR亚单位, 其包含

(1) TCR细胞外结构域的至少一部分, 和

(2) 包含来自CD3 $\delta$ 的细胞内信号传导结构域的刺激性结构域的TCR细胞内结构域; 以及

(ii) 包含第一抗原结合结构域的第一人或人源化抗体结构域; 和

(b) 第二T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP), 其包含

(i) 包含TCR细胞外结构域的至少一部分的TCR亚单位, 以及

(ii) 包含第二抗原结合结构域的第二人或人源化抗体结构域;

其中所述第一TFP的所述TCR亚单位和所述第一抗体结构域操作性地连接, 并且所述第二TFP的所述TCR亚单位和所述第二抗体结构域操作性地连接, 并且

其中所述第一TFP和所述第二TFP在T细胞中表达时并入TCR中。

71. 一种经分离重组核酸分子,其编码

(a) 第一T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP),其包含:

(i) TCR亚单位,其包含

(1) TCR细胞外结构域的至少一部分,和

(2) 包含来自TCR $\alpha$ 的细胞内信号传导结构域的刺激性结构域的TCR细胞内结构域;以及

(ii) 包含第一抗原结合结构域的第一人或人源化抗体结构域;和

(b) 第二T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP),其包含

(i) 包含TCR细胞外结构域的至少一部分的TCR亚单位,以及

(ii) 包含第二抗原结合结构域的第二人或人源化抗体结构域;

其中所述第一TFP的所述TCR亚单位和所述第一抗体结构域操作性地连接,并且所述第二TFP的所述TCR亚单位和所述第二抗体结构域操作性地连接,并且

其中所述第一TFP和所述第二TFP在T细胞中表达时并入TCR中。

72. 一种经分离重组核酸分子,其编码

(a) 第一T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP),其包含:

(i) TCR亚单位,其包含

(1) TCR细胞外结构域的至少一部分,和

(2) 包含来自TCR $\beta$ 的细胞内信号传导结构域的刺激性结构域的TCR细胞内结构域;以及

(ii) 包含第一抗原结合结构域的第一人或人源化抗体结构域;和

(b) 第二T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP),其包含

(i) 包含TCR细胞外结构域的至少一部分的TCR亚单位,以及

(ii) 包含第二抗原结合结构域的第二人或人源化抗体结构域;

其中所述第一TFP的所述TCR亚单位和所述第一抗体结构域操作性地连接,并且所述第二TFP的所述TCR亚单位和所述第二抗体结构域操作性地连接,并且

其中所述第一TFP和所述第二TFP在T细胞中表达时并入TCR中。

73. 如权利要求68-72所述的经分离重组核酸分子,其中所述第二TFP的所述TCR亚单位进一步包含TCR细胞内结构域,其包含来自选自由TCR $\alpha$ 、TCR $\beta$ 、CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\gamma$ 和CD3 $\delta$ 组成的组的细胞内信号传导结构域或其功能性片段的刺激性结构域。

74. 一种经分离重组核酸分子,其编码包含以下的第一T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP):

(a) TCR亚单位,其包含

(i) TCR细胞外结构域的至少一部分,和

(ii) 包含来自CD3 $\epsilon$ 的细胞内信号传导结构域的刺激性结构域的TCR细胞内结构域;以及

(b) 包含第一抗原结合结构域的第一人或人源化抗体结构域和包含第二抗原结合结构域的第二人或人源化抗体结构域;

其中所述TCR亚单位、所述第一抗体结构域和所述第二抗体结构域操作性地连接,并且其中所述第一TFP在T细胞中表达时并入TCR中。

75. 一种经分离重组核酸分子,其编码包含以下的第一T细胞受体 (TCR) 融合蛋白

(TFP) :

(a) TCR亚单位,其包含

(i) TCR细胞外结构域的至少一部分,和

(ii) 包含来自CD3  $\gamma$  的细胞内信号传导结构域的刺激性结构域的TCR细胞内结构域;以及

(b) 包含第一抗原结合结构域的第一人或人源化抗体结构域和包含第二抗原结合结构域的第二人或人源化抗体结构域;

其中所述TCR亚单位、所述第一抗体结构域和所述第二抗体结构域操作性地连接,并且其中所述第一TFP在T细胞中表达时并入TCR中。

76. 一种经分离重组核酸分子,其编码包含以下的第一T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP) :

(a) TCR亚单位,其包含

(i) TCR细胞外结构域的至少一部分,和

(ii) 包含来自CD3  $\delta$  的细胞内信号传导结构域的刺激性结构域的TCR细胞内结构域;以及

(b) 包含第一抗原结合结构域的第一人或人源化抗体结构域和包含第二抗原结合结构域的第二人或人源化抗体结构域;

其中所述TCR亚单位、所述第一抗体结构域和所述第二抗体结构域操作性地连接,并且其中所述第一TFP在T细胞中表达时并入TCR中。

77. 一种经分离重组核酸分子,其编码包含以下的第一T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP) :

(a) TCR亚单位,其包含

(i) TCR细胞外结构域的至少一部分,和

(ii) 包含来自TCR  $\alpha$  的细胞内信号传导结构域的刺激性结构域的TCR细胞内结构域;以及

(b) 包含第一抗原结合结构域的第一人或人源化抗体结构域和包含第二抗原结合结构域的第二人或人源化抗体结构域;

其中所述TCR亚单位、所述第一抗体结构域和所述第二抗体结构域操作性地连接,并且其中所述第一TFP在T细胞中表达时并入TCR中。

78. 一种经分离重组核酸分子,其编码包含以下的第一T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP) :

(a) TCR亚单位,其包含

(i) TCR细胞外结构域的至少一部分,和

(ii) 包含来自TCR  $\beta$  的细胞内信号传导结构域的刺激性结构域的TCR细胞内结构域;以及

(b) 包含第一抗原结合结构域的第一人或人源化抗体结构域和包含第二抗原结合结构域的第二人或人源化抗体结构域;

其中所述TCR亚单位、所述第一抗体结构域和所述第二抗体结构域操作性地连接,并且其中所述第一TFP在T细胞中表达时并入TCR中。

79. 如权利要求68-78中任一项所述的经分离重组核酸分子,其中所述第一抗原结合结构域或所述第二抗原结合结构域是抗CD19结合结构域。

80. 如权利要求68-79中任一项所述的经分离重组核酸分子,其中所述第一抗原结合结构域或所述第二抗原结合结构域是抗B细胞成熟抗原 (BCMA) 结合结构域。

81. 如权利要求68-80中任一项所述的经分离重组核酸分子,其中所述第一抗原结合结构域或所述第二抗原结合结构域是抗CD22结合结构域。

82. 一种经分离重组核酸分子,其编码:

(a) 第一T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP),其包含TCR亚单位、包含是抗CD19结合结构域的第一抗原结合结构域的第一人或人源化抗体结构域;和

(b) 第二T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP),其包含TCR亚单位、包含是抗BCMA结合结构域的第二抗原结合结构域的第二人或人源化抗体结构域。

83. 一种经分离重组核酸分子,其编码:

(a) 第一T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP),其包含TCR亚单位、包含是抗CD19结合结构域的第一抗原结合结构域的第一人或人源化抗体结构域;和

(b) 第二T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP),其包含TCR亚单位、包含是抗CD22结合结构域的第二抗原结合结构域的第二人或人源化抗体结构域。

84. 如权利要求82或83所述的经分离核酸分子,其中所述第一TFP的所述TCR亚单位和所述第一抗体结构域操作性地连接,并且所述第二TFP的所述TCR亚单位和所述第二抗体结构域操作性地连接。

85. 如权利要求82-84中任一项所述的经分离核酸分子,其中所述第一TFP、所述第二TFP或两者在T细胞中表达时并入TCR中。

86. 如权利要求68-85中任一项所述的经分离核酸分子,其中所编码第一抗原结合结构域通过第一接头序列来连接于所述第一TFP的所述TCR细胞外结构域,所编码第二抗原结合结构域通过第二接头序列来连接于所述第二TFP的所述TCR细胞外结构域,或所述第一抗原结合结构域通过所述第一接头序列来连接于所述第一TFP的所述TCR细胞外结构域,并且所编码第二抗原结合结构域通过所述第二接头序列来连接于所述第二TFP的所述TCR细胞外结构域。

87. 如权利要求86所述的经分离核酸分子,其中所述第一接头序列和所述第二接头序列包含  $(G_4S)_n$ ,其中 $n=1$ 至4。

88. 如权利要求68-87中任一项所述的经分离核酸分子,其中所述第一TFP的所述TCR亚单位、所述第二TFP的所述TCR亚单位或两者包含TCR细胞外结构域。

89. 如权利要求68-88中任一项所述的经分离核酸分子,其中所述第一TFP的所述TCR亚单位、所述第二TFP的所述TCR亚单位或两者包含TCR跨膜结构域。

90. 如权利要求68-89中任一项所述的经分离核酸分子,其中所述第一TFP的所述TCR亚单位、所述第二TFP的所述TCR亚单位或两者包含TCR细胞内结构域。

91. 如权利要求68-90中任一项所述的经分离核酸分子,其中所述第一TFP的所述TCR亚单位、所述第二TFP的所述TCR亚单位或两者包含 (i) TCR细胞外结构域, (ii) TCR跨膜结构域,和 (iii) TCR细胞内结构域,其中 (i)、(ii) 和 (iii) 中的至少两者来自同一TCR亚单位。

92. 如权利要求68-91中任一项所述的经分离核酸分子,其中所述第一TFP的所述TCR亚

单位、所述第二TFP的所述TCR亚单位或两者包含TCR细胞内结构域,其包含选自CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\gamma$ 或CD3 $\delta$ 的细胞内信号传导结构域的刺激结构域或具有至少一个对其进行的修饰的氨基酸序列。

93. 如权利要求68-92中任一项所述的经分离核酸分子,其中所述第一TFP的所述TCR亚单位、所述第二TFP的所述TCR亚单位或两者包含细胞内结构域,其包含选自4-1BB的功能性信号传导结构域和/或CD3 $\zeta$ 的功能性信号传导结构域的刺激结构域或具有至少一个对其进行的修饰的氨基酸序列。

94. 如权利要求68-93中任一项所述的经分离核酸分子,其中所述第一人或人源化抗体结构域、所述第二人或人源化抗体结构域或两者包含抗体片段。

95. 如权利要求68-94中任一项所述的经分离核酸分子,其中所述第一人或人源化抗体结构域、所述第二人或人源化抗体结构域或两者包含scFv或V<sub>H</sub>结构域。

96. 如权利要求68-95中任一项所述的经分离核酸分子,其编码(i)抗CD19轻链结合结构域氨基酸序列的分别与SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:29具有70-100%序列同一性的轻链(LC)CDR1、LC CDR2和LC CDR3,和/或(ii)抗CD19重链结合结构域氨基酸序列的分别与SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:33和SEQ ID NO:35具有70-100%序列同一性的重链(HC)CDR1、HC CDR2和HC CDR3。

97. 如权利要求68-96中任一项所述的经分离核酸分子,其编码轻链可变区,其中所述轻链可变区包含轻链可变区氨基酸序列SEQ ID NO:49的具有至少1个但不超过30个修饰的氨基酸序列,或与轻链可变区氨基酸序列SEQ ID NO:49具有95-99%同一性的序列。

98. 如权利要求68-97中任一项所述的经分离核酸分子,其编码重链可变区,其中所述重链可变区包含重链可变区氨基酸序列SEQ ID NO:51的具有至少1个但不超过30个修饰的氨基酸序列,或与重链可变区氨基酸序列SEQ ID NO:51具有95-99%同一性的序列。

99. 如权利要求68-80、82和84-98中任一项所述的经分离核酸分子,其编码(i)抗BCMA轻链结合结构域氨基酸序列的分别与SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39和SEQ ID NO:41具有70-100%序列同一性的轻链(LC)CDR1、LC CDR2和LC CDR3,和/或(ii)抗BC MA重链结合结构域氨基酸序列的分别与SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:45和SEQ ID NO:47具有70-100%序列同一性的重链(HC)CDR1、HC CDR2和HC CDR3。

100. 如权利要求68-80、82和84-99中任一项所述的经分离核酸分子,其编码轻链可变区,其中所述轻链可变区包含轻链可变区氨基酸序列SEQ ID NO:53的具有至少1个但不超过30个修饰的氨基酸序列,或与轻链可变区氨基酸序列SEQ ID NO:53具有95-99%同一性的序列。

101. 如权利要求68-80、82和84-100中任一项所述的经分离核酸分子,其编码重链可变区,其中所述重链可变区包含对重链可变区氨基酸序列SEQ ID NO:55进行至少1个但不超过30个修饰的氨基酸序列,或与重链可变区氨基酸序列SEQ ID NO:55具有95-99%同一性的序列。

102. 如权利要求68-80、82和84-101中任一项所述的经分离核酸分子,其中所述抗CD22抗原结合结构域包含如本文所述的可变区或一个或多个如本文所述的CDR。

103. 如权利要求68-102中任一项所述的经分离核酸分子,其中所编码第一TFP、所编码第二TFP或两者包括TCR亚单位的细胞外结构域,其包括选自由以下组成的组的蛋白质的细



胞外结构域或其部分、其功能性片段及其具有至少1个但不超过20个修饰的氨基酸序列：TCR $\alpha$ 链、TCR $\beta$ 链、CD3 $\epsilon$  TCR亚单位、CD3 $\gamma$  TCR亚单位、CD3 $\delta$  TCR亚单位。

104. 如权利要求68-103中任一项所述的经分离核酸分子，其中所编码第一TFP和所编码第二TFP包括跨膜结构域，其包括选自由以下组成的组的蛋白质的跨膜结构域、其功能性片段及其具有至少1个但不超过20个修饰的氨基酸序列：TCR $\alpha$ 链、TCR $\beta$ 链、CD3 $\epsilon$  TCR亚单位、CD3 $\gamma$  TCR亚单位、CD3 $\delta$  TCR亚单位。

105. 如权利要求68-104中任一项所述的经分离核酸分子，其中所编码第一TFP和所编码第二TFP包括跨膜结构域，其包括选自由以下组成的组的蛋白质的跨膜结构域、其功能性片段及其具有至少1个但不超过20个修饰的氨基酸序列：TCR $\alpha$ 链、TCR $\beta$ 链、TCR $\zeta$ 链、CD3 $\epsilon$  TCR亚单位、CD3 $\gamma$  TCR亚单位、CD3 $\delta$  TCR亚单位、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD28、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154。

106. 如权利要求36-37所述的经分离核酸分子，其中所述TCR亚单位和所述结合配体操作性地连接。

107. 如权利要求43所述的经分离核酸分子，其中所述TCR亚单位和所述抗体结构域操作性地连接。

108. 如权利要求36-37、43和106-107中任一项所述的经分离核酸分子，其中所述TFP在T细胞中表达时并入TCR中。

109. 如权利要求1-13、31-37、106和108中任一项所述的经分离核酸分子，其中所述结合配体通过接头序列来连接于所述TCR细胞外结构域。

110. 如权利要求38-43和107-108中任一项所述的经分离核酸分子，其中所编码抗原结合结构域通过接头序列来连接于所述TCR细胞外结构域。

111. 如权利要求109所述的经分离核酸分子，其中所述接头序列包含 $(G_4S)_n$ ，其中 $n=1$ 至4。

112. 如权利要求1-111中任一项所述的经分离核酸分子，其中所述TCR亚单位包含TCR细胞外结构域。

113. 如权利要求1-112中任一项所述的经分离核酸分子，其中所述TCR亚单位包含TCR跨膜结构域。

114. 如权利要求1-113中任一项所述的经分离核酸分子，其中所述TCR亚单位包含TCR细胞内结构域。

115. 如权利要求1-114中任一项所述的经分离核酸分子，其中所述TCR亚单位包含(i) TCR细胞外结构域，(ii) TCR跨膜结构域，和(iii) TCR细胞内结构域，并且其中(i)、(ii)和(iii)中的至少两者来自同一TCR亚单位。

116. 如权利要求1-115中任一项所述的经分离核酸分子，其中所述TCR亚单位包含TCR细胞内结构域，其包含选自CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 的细胞内信号传导结构域的刺激结构域或具有至少一个对其进行的修饰的氨基酸序列。

117. 如权利要求1-116中任一项所述的经分离核酸分子，其中所述TCR亚单位包含细胞内结构域，其包含选自4-1BB的功能性信号传导结构域和/或CD3 $\zeta$ 的功能性信号传导结构域的刺激结构域或具有至少一个对其进行的修饰的氨基酸序列。

118. 如权利要求1-13、31-37、106、108-109和111-117中任一项所述的经分离核酸分

子,其中所述结合配体包含CD16结合抗体或抗体片段。

119.如权利要求38-43、107-108和111-117中任一项所述的经分离核酸分子,其中所述人或人源化抗体结构域包含抗体片段。

120.如权利要求38-43、107-108、111-117和119中任一项所述的经分离核酸分子,其中所述人或人源化抗体结构域包含scFv或V<sub>H</sub>结构域。

121.如权利要求14-30、44-67和111-117中任一项所述的经分离核酸分子,其编码与本文提供的NKG2D配体具有70-100%序列同一性的NKG2D氨基酸序列。

122.如权利要求1-13、31-37以及106、108-109和111-118中任一项所述的经分离核酸分子,其编码与本文提供的CD16多肽具有约70至约100%序列同一性的CD16氨基酸序列。

123.如权利要求38-43、107-108、111-117和119-120中任一项所述的经分离核酸分子,其编码(i)抗ROR1轻链结合结构域氨基酸序列的分别与本文提供的抗ROR1轻链结合结构域的轻链(LC)CDR1、LC CDR2和LC CDR3具有70-100%序列同一性的轻链(LC)CDR1、LC CDR2和LC CDR3,和/或(ii)抗ROR1重链结合结构域氨基酸序列的分别与本文提供的抗ROR1重链结合结构域的重链(HC)CDR1、HC CDR2和HC CDR3具有70-100%序列同一性的重链(HC)CDR1、HC CDR2和HC CDR3。

124.如权利要求38-43、107-108、111-117、119-120和123中任一项所述的经分离核酸分子,其编码轻链可变区,其中所述轻链可变区包含本文提供的轻链可变区的轻链可变区氨基酸序列的具有至少1个但不超过30个修饰的氨基酸序列,或与本文提供的轻链可变区的轻链可变区氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。

125.如权利要求38-43、107-108、111-117、119-120和123-124中任一项所述的经分离核酸分子,其编码重链可变区,其中所述重链可变区包含本文提供的重链可变区的重链可变区氨基酸序列的具有至少1个但不超过30个修饰的氨基酸序列,或与本文提供的重链可变区的重链可变区氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。

126.如权利要求1-67和106-125中任一项所述的经分离核酸分子,其中所述TFP包括TCR亚单位的细胞外结构域,其包括选自以下组成的组的蛋白质的细胞外结构域或其部分、其功能性片段及其具有至少1个但不超过20个修饰的氨基酸序列:TCR $\alpha$ 链、TCR $\beta$ 链、CD3 $\epsilon$  TCR亚单位、CD3 $\gamma$  TCR亚单位、CD3 $\delta$  TCR亚单位。

127.如权利要求1-67和106-126中任一项所述的经分离核酸分子,其中所编码TFP包括跨膜结构域,其包括选自以下组成的组的蛋白质的跨膜结构域、其功能性片段及其具有至少1个但不超过20个修饰的氨基酸序列:TCR $\alpha$ 链、TCR $\beta$ 链、CD3 $\epsilon$  TCR亚单位、CD3 $\gamma$  TCR亚单位、CD3 $\delta$  TCR亚单位。

128.如权利要求1-67和106-127中任一项所述的经分离核酸分子,其中所编码TFP包括跨膜结构域,其包括选自以下组成的组的蛋白质的跨膜结构域、其功能性片段及其具有至少1个但不超过20个修饰的氨基酸序列:TCR $\alpha$ 链、TCR $\beta$ 链、TCR $\zeta$ 链、CD3 $\epsilon$  TCR亚单位、CD3 $\gamma$  TCR亚单位、CD3 $\delta$  TCR亚单位、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD28、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154。

129.如权利要求1-128中任一项所述的经分离核酸分子,其进一步包含编码共刺激性结构域的序列。

130.如权利要求129所述的经分离核酸分子,其中所述共刺激性结构域是从选自由以

下组成的组的蛋白质获得的功能性信号传导结构域及其具有至少1个但不超过20个对其进行修饰的氨基酸序列:OX40、CD2、CD27、CD28、CDS、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)、ICOS (CD278) 和4-1BB (CD137)。

131. 如权利要求1-67和106-130中任一项所述的经分离核酸分子,其中所述至少1个但不超过20个对其进行修饰包括对介导细胞信号传导的氨基酸的修饰或对应答于配体与所述TFP结合加以磷酸化的氨基酸的修饰。

132. 如权利要求68-105和129-130中任一项所述的经分离核酸分子,其进一步包含编码细胞内信号传导结构域的序列。

133. 如权利要求68-105、129-130和132中任一项所述的经分离核酸分子,其进一步包含前导序列。

134. 如权利要求68-105、129-130和133中任一项所述的经分离核酸分子,其进一步包含蛋白酶裂解位点。

135. 如权利要求68-105、129-130和134中任一项所述的经分离核酸分子,其中所述至少1个但不超过20个对其进行修饰包括对介导细胞信号传导的氨基酸的修饰或对应答于配体与所述第一TFP、所述第二TFP或两者结合加以磷酸化的氨基酸的修饰。

136. 如权利要求1-135中任一项所述的经分离核酸分子,其中所述经分离核酸分子是mRNA。

137. 如权利要求1-67、106-131和136中任一项所述的经分离核酸分子,其中所述TFP包括TCR亚单位的免疫受体酪氨酸基活化基序(ITAM),其包括选自由以下组成的组的蛋白质的ITAM或其部分、其功能性片段及其具有至少1个但不超过20个对其进行修饰的氨基酸序列:CD3 $\zeta$  TCR亚单位、CD3 $\epsilon$  TCR亚单位、CD3 $\gamma$  TCR亚单位、CD3 $\delta$  TCR亚单位、TCR $\zeta$ 链、Fc $\epsilon$ 受体1链、Fc $\epsilon$ 受体2链、Fc $\gamma$ 受体1链、Fc $\gamma$ 受体2a链、Fc $\gamma$ 受体2b1链、Fc $\gamma$ 受体2b2链、Fc $\gamma$ 受体3a链、Fc $\gamma$ 受体3b链、Fc $\beta$ 受体1链、TYROBP (DAP12)、CD5、CD16a、CD16b、CD22、CD23、CD32、CD64、CD79a、CD79b、CD89、CD278、CD66d。

138. 如权利要求68-105、129-130和136中任一项所述的经分离核酸分子,其中所述第一TFP、所述第二TFP或两者包括TCR亚单位的免疫受体酪氨酸基活化基序(ITAM),其包括选自由以下组成的组的蛋白质的ITAM或其部分、其功能性片段及其具有至少1个但不超过20个对其进行修饰的氨基酸序列:CD3 $\zeta$  TCR亚单位、CD3 $\epsilon$  TCR亚单位、CD3 $\gamma$  TCR亚单位、CD3 $\delta$  TCR亚单位、TCR $\zeta$ 链、Fc $\epsilon$ 受体1链、Fc $\epsilon$ 受体2链、Fc $\gamma$ 受体1链、Fc $\gamma$ 受体2a链、Fc $\gamma$ 受体2b1链、Fc $\gamma$ 受体2b2链、Fc $\gamma$ 受体3a链、Fc $\gamma$ 受体3b链、Fc $\beta$ 受体1链、TYROBP (DAP12)、CD5、CD16a、CD16b、CD22、CD23、CD32、CD64、CD79a、CD79b、CD89、CD278、CD66d。

139. 如权利要求137-138所述的经分离核酸分子,其中所述ITAM替代CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 或CD3 $\epsilon$ 的ITAM。

140. 如权利要求137-138所述的经分离核酸分子,其中所述ITAM选自由CD3 $\zeta$  TCR亚单位、CD3 $\epsilon$  TCR亚单位、CD3 $\gamma$  TCR亚单位和CD3 $\delta$  TCR亚单位组成的组,并且替代选自由CD3 $\zeta$  TCR亚单位、CD3 $\epsilon$  TCR亚单位、CD3 $\gamma$  TCR亚单位和CD3 $\delta$  TCR亚单位组成的组的不同ITAM。

141. 如权利要求1-140中任一项所述的经分离核酸分子,其中所述核酸包含核苷酸类似物。

142. 如权利要求141所述的经分离核酸分子,其中所述核苷酸类似物选自由以下组成

的组:2'-O-甲基、2'-O-甲氧基乙基(2'-O-MOE)、2'-O-氨基丙基、2'-脱氧、T-脱氧-2'-氟代、2'-O-氨基丙基(2'-O-AP)、2'-O-二甲基氨基乙基(2'-O-DMAOE)、2'-O-二甲基氨基丙基(2'-O-DMAP)、T-O-二甲基氨基乙基氧基乙基(2'-O-DMAEOE)、经2'-O-N-甲基乙酰胺基(2'-O-NMA)修饰、锁定核酸(LNA)、亚乙基核酸(ENA)、肽核酸(PNA)、1',5'-失水己糖醇核酸(HNA)、吗啉代、甲基膦酸酯核苷酸、硫代膦酸酯核苷酸和2'-氟代N3-P5'-亚磷酰胺。

143.如权利要求1-142中任一项所述的经分离核酸分子,其进一步包含前导序列。

144.一种经分离多肽分子,其由如权利要求1-143中任一项所述的核酸分子编码。

145.如权利要求144所述的经分离多肽分子,其中所述经分离多肽包含由第一核酸分子编码的第一多肽和由第二核酸分子编码的第二多肽。

146.一种经分离重组TFP分子,其包含人或人源化CD16多肽或其片段、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域。

147.一种经分离重组TFP分子,其包含人或人源化CD16多肽或其片段、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域,其中所述TFP分子能够功能性地与内源性TCR复合物和/或至少一种内源性TCR多肽相互作用。

148.一种经分离重组TFP分子,其包含人或人源化CD16多肽或其片段、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域,其中所述TFP分子能够功能性地整合至内源性TCR复合物中。

149.一种经分离重组TFP分子,其包含人或人源化抗受体酪氨酸激酶样孤儿受体1(ROR1)结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域。

150.一种经分离重组TFP分子,其包含人或人源化抗受体酪氨酸激酶样孤儿受体1(ROR1)结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域,其中所述TFP分子能够功能性地与内源性TCR复合物和/或至少一种内源性TCR多肽相互作用。

151.一种经分离重组TFP分子,其包含人或人源化抗受体酪氨酸激酶样孤儿受体1(ROR1)结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域,其中所述TFP分子能够功能性地整合至内源性TCR复合物中。

152.一种经分离重组TFP分子,其包含人NKG2D多肽或其片段、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域。

153.一种经分离重组TFP分子,其包含人NKG2D多肽或其片段、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域,其中所述TFP分子能够功能性地与内源性TCR复合物和/或至少一种内源性TCR多肽相互作用。

154.一种经分离重组TFP分子,其包含人NKG2D多肽或其片段、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域,其中所述TFP分子能够功能性地整合至内源性TCR复合物中。

155.一种经分离重组TFP分子,其包含

(a)第一TFP分子,其包含人或人源化抗CD19结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域,和

(b)第二TFP分子,其包含人或人源化抗BCMA结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域。

156.一种经分离重组TFP分子,其包含

(a) 第一TFP分子,其包含人或人源化抗CD19结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域,和

(b) 第二TFP分子,其包含人或人源化抗BCMA结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域,

其中所述第一TFP分子能够功能性地与内源性TCR复合物和/或至少一种内源性TCR多肽相互作用。

157. 一种经分离重组TFP分子,其包含

(a) 第一TFP分子,其包含人或人源化抗CD19结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域,和

(b) 第二TFP分子,其包含人或人源化抗BCMA结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域,

其中所述第一TFP分子能够功能性地整合至内源性TCR复合物中。

158. 如权利要求155-157中任一项所述的经分离重组TFP分子,其包含含有人或人源化抗CD19结合结构域、人源化抗BCMA结合结构域的抗体或抗体片段、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域。

159. 一种经分离重组TFP分子,其包含

(a) 第一TFP分子,其包含人或人源化抗CD19结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域,和

(b) 第二TFP分子,其包含人或人源化抗CD22结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域。

160. 一种经分离重组第一TFP分子,其包含人或人源化抗CD19结合结构域、人源化抗CD22结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域,其中所述第一TFP分子能够功能性地与内源性TCR复合物和/或至少一种内源性TCR多肽相互作用。

161. 一种经分离重组第一TFP分子,其包含人或人源化抗CD19结合结构域、人源化抗CD22结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域,其中所述第一TFP分子能够功能性地整合至内源性TCR复合物中。

162. 如权利要求149所述的经分离TFP分子,其包含含有人或人源化抗ROR1结合结构域的抗体或抗体片段、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域。

163. 如权利要求149-151和162中任一项所述的经分离TFP分子,其中所述抗ROR1结合结构域是scFv或VH结构域。

164. 如权利要求149-151和162-163中任一项所述的经分离TFP分子,其中所述抗ROR1结合结构域包含与本文提供的抗ROR1轻链的氨基酸序列具有95-100%同一性的重链、其功能性片段、或其具有至少1个但不超过30个修饰的氨基酸序列。

165. 如权利要求149-151和162-164中任一项所述的经分离TFP分子,其中所述抗ROR1结合结构域包含与本文提供的抗ROR1重链的氨基酸序列具有95-100%同一性的轻链、其功能性片段、或其具有至少1个但不超过30个修饰的氨基酸序列。

166. 如权利要求146-154和162-165中任一项所述的经分离TFP分子,其包含TCR细胞外结构域,其包括选自由以下组成的组的蛋白质的细胞外结构域或其部分、其功能性片段及其具有至少1个但不超过20个修饰的氨基酸序列:TCR $\alpha$ 链、TCR $\beta$ 链、CD3 $\epsilon$  TCR亚单位、CD3 $\gamma$

TCR亚单位、CD3 $\delta$  TCR亚单位。

167. 如权利要求146-154和162-166中任一项所述的经分离TFP分子,其中所述TCR细胞外结构域通过接头序列来可操作地连接。

168. 如权利要求167所述的经分离TFP分子,其中所述接头区域包含  $(G_4S)_n$ , 其中 $n=1$ 至4。

169. 如权利要求146-154和162-168中任一项所述的经分离TFP分子,其进一步包含编码共刺激性结构域的序列。

170. 如权利要求146-154和162-169中任一项所述的经分离TFP分子,其进一步包含编码细胞内信号传导结构域的序列。

171. 如权利要求146-154和162-170中任一项所述的经分离TFP分子,其进一步包含前导序列。

172. 一种核酸,其包含编码如权利要求146-154和162-171中任一项所述的TFP的序列。

173. 如权利要求159-161中任一项所述的经分离重组TFP分子,其包含含有人或人源化抗CD19结合结构域、人源化抗CD22结合结构域的抗体或抗体片段、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域。

174. 如权利要求155-161和173中任一项所述的经分离的重组TFP分子,其中所述抗CD19结合结构域、所述抗BCMA结合结构域、所述抗CD22结合结构域或其组合是scFv或V<sub>H</sub>结构域。

175. 如权利要求155-161和173-174中任一项所述的经分离重组TFP分子,其中所述抗CD19结合结构域包含与氨基酸序列SEQ ID NO:51具有95-100%同一性的重链、其功能性片段、或其具有至少1个但不超过30个修饰的氨基酸序列。

176. 如权利要求155-161和173-175中任一项所述的经分离重组TFP分子,其中所述抗CD19结合结构域包含与氨基酸序列SEQ ID NO:49具有95-100%同一性的轻链、其功能性片段、或其具有至少1个但不超过30个修饰的氨基酸序列。

177. 如权利要求155-158或174-176中任一项所述的经分离重组TFP分子,其中所述抗BCMA结合结构域包含与氨基酸序列SEQ ID NO:55具有95-100%同一性的重链、其功能性片段、或其具有至少1个但不超过30个修饰的氨基酸序列。

178. 如权利要求155-158或174-177中任一项所述的经分离重组TFP分子,其中所述抗BCMA结合结构域包含与氨基酸序列SEQ ID NO:53具有95-100%同一性的轻链、其功能性片段、或其具有至少1个但不超过30个修饰的氨基酸序列。

179. 如权利要求159-161和173-174中任一项所述的经分离重组TFP分子,其中所述抗CD22结合结构域包含如本文所述的可变区或一个或多个如本文所述的CDR。

180. 如权利要求155-161和173-179中任一项所述的经分离重组TFP分子,其包含TCR细胞外结构域,其包括选自由以下组成的组的蛋白质的细胞外结构域或其部分、其功能性片段及其具有至少1个但不超过20个修饰的氨基酸序列:TCR $\alpha$ 链、TCR $\beta$ 链、CD3 $\epsilon$  TCR亚单位、CD3 $\gamma$  TCR亚单位、CD3 $\delta$  TCR亚单位。

181. 如权利要求155-158、174-178或180中任一项所述的经分离重组TFP分子,其中所述抗CD19结合结构域通过第一接头序列来连接于所述第一TFP分子的所述TCR细胞外结构域,并且所述抗BCMA结合结构域通过第二接头序列来连接于所述第一TFP分子的所述TCR细

胞外结构域。

182. 如权利要求159-161和/或173-174中任一项所述的经分离重组TFP分子,其中所述抗CD19结合结构域通过第一接头序列来连接于所述第一TFP分子的所述TCR细胞外结构域,并且所述抗CD22结合结构域通过第二接头序列来连接于所述第一TFP分子的所述TCR细胞外结构域。

183. 如权利要求181或182所述的经分离重组TFP分子,其中所述第一接头序列和所述第二接头序列包含 $(G4S)_n$ ,其中 $n=1$ 至4。

184. 如权利要求155-161和173-183中任一项所述的经分离重组TFP分子,其进一步包含共刺激性结构域。

185. 如权利要求155-161和173-184中任一项所述的经分离重组TFP分子,其进一步包含细胞内信号传导结构域。

186. 如权利要求155-161和173-185中任一项所述的经分离重组TFP分子,其进一步包含前导序列。

187. 一种核酸,其包含编码如权利要求155-161和173-186中任一项所述的经分离重组TFP的序列。

188. 如权利要求187所述的核酸,其中所述核酸包含编码所述第一TFP分子的第一核酸和编码所述第二TFP分子的第二核酸。

189. 如权利要求172或187-188中任一项所述的核酸,其中所述核酸选自DNA和RNA组成的组。

190. 如权利要求172或189所述的核酸,其中所述核酸是mRNA。

191. 如权利要求172-190中任一项所述的核酸,其中所述核酸包含核苷酸类似物。

192. 如权利要求191所述的核酸,其中所述核苷酸类似物选自以下组成的组:2'-O-甲基、2'-O-甲氧基乙基(2'-O-MOE)、2'-O-氨基丙基、2'-脱氧、T-脱氧-2'-氟代、2'-O-氨基丙基(2'-O-AP)、2'-O-二甲基氨基乙基(2'-O-DMAOE)、2'-O-二甲基氨基丙基(2'-O-DMAPE)、T-O-二甲基氨基乙基氧基乙基(2'-O-DMAEOE)、经2'-O-N-甲基乙酰胺基(2'-O-NMA)修饰、锁定核酸(LNA)、亚乙基核酸(ENA)、肽核酸(PNA)、1',5'-失水己糖醇核酸(HNA)、吗啉代、甲基磷酸酯核苷酸、硫代磷酸酯核苷酸和2'-氟代N3-P5'-亚磷酰胺。

193. 如权利要求172-192中任一项所述的核酸,其进一步包含启动子。

194. 如权利要求172-193中任一项所述的核酸,其中所述核酸是在体外转录的核酸。

195. 如权利要求172-194中任一项所述的核酸,其中所述核酸进一步包含编码poly(A)尾部的序列。

196. 如权利要求172-195中任一项所述的核酸,其中所述核酸进一步包含3' UTR序列。

197. 如权利要求187-196中任一项所述的核酸,其中所述核酸进一步包含编码蛋白酶裂解位点的序列。

198. 一种载体,其包含编码权利要求146-154和162-171中任一项的TFP的核酸分子。

199. 一种载体,其包含编码如权利要求155-161和173-175中任一项所述的经分离重组TFP分子的核酸分子。

200. 如权利要求199所述的载体,其中所述载体包含a) 第一载体,其包含编码所述第一TFP的第一核酸分子;和b) 第二载体,其包含编码所述第二TFP的第二核酸分子。

201. 如权利要求198-200中任一项所述的载体,其中所述载体选自由以下组成的组: DNA、RNA、质粒、慢病毒载体、腺病毒载体、劳斯肉瘤病毒(RSV)载体或逆转录病毒载体。

202. 如权利要求198-201中任一项所述的载体,其进一步包含启动子。

203. 如权利要求198-202中任一项所述的载体,其中所述载体是在体外转录的载体。

204. 如权利要求198-203中任一项所述的载体,其中所述载体中的所述核酸分子进一步编码poly(A)尾部。

205. 如权利要求198-204中任一项所述的载体,其中所述载体中的所述核酸分子进一步编码3' UTR。

206. 如权利要求199-205中任一项所述的载体,其中所述载体中的所述核酸分子进一步编码蛋白酶裂解位点。

207. 一种细胞,其包含如权利要求1-67、106-131、136-137和139-143中任一项所述的经分离核酸分子、如权利要求144所述的多肽分子、如权利要求146-154和162-171中任一项所述的TFP分子、如权利要求172-196中任一项所述的核酸、如权利要求198-205中任一项所述的载体。

208. 一种细胞,其包含如权利要求68-105、129-130、132-136和138-143中任一项所述的经分离核酸分子、如权利要求144所述的多肽分子、如权利要求155-161和173-186中任一项所述的经分离重组TFP分子、如权利要求187-197中任一项所述的核酸、或如权利要求199-206中任一项所述的载体。

209. 如权利要求207所述的细胞,其中所述细胞是人T细胞。

210. 如权利要求209所述的细胞,其中所述T细胞是CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup> T细胞。

211. 如权利要求207-210中任一项所述的细胞,其进一步包含编码抑制性分子的核酸,所述抑制性分子包含含有抑制性分子的至少一部分的第一多肽与含有来自细胞内信号传导结构域的正性信号的第二多肽缔合。

212. 如权利要求211所述的细胞,其中所述抑制性分子包含含有PD1的至少一部分的第一多肽和含有共刺激性结构域和初级信号传导结构域的第二多肽。

213. 一种包含至少两种TFP分子的人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup> T细胞,所述TFP分子包含人或人源化CD16多肽或其片段、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域,其中所述TFP分子能够功能性地与在所述人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup> T细胞中、所述人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup> T细胞的表面处和/或表面上的内源性TCR复合物和/或至少一种内源性TCR多肽相互作用。

214. 一种蛋白质复合物,其包含:

(i) TFP分子,其包含人或人源化CD16多肽或其片段、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域;以及

(ii) 至少一种内源性TCR亚单位或内源性TCR复合物。

215. 一种包含至少两种TFP分子的人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup> T细胞,所述TFP分子包含人或人源化抗受体酪氨酸激酶样孤儿受体1(ROR1)结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域,其中所述TFP分子能够功能性地与在所述人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup> T细胞中、所述人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup> T细胞的表面处和/或表面上的内源性TCR复合物和/或至少一种内源性TCR多肽相互作用。

216. 一种蛋白质复合物,其包含:



(i) TFP分子,其包含人或人源化抗受体酪氨酸激酶样孤儿受体1 (ROR1) 结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域;以及

(ii) 至少一种内源性TCR亚单位或内源性TCR复合物。

217. 一种包含至少两种TFP分子的人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup> T细胞,所述TFP分子包含人NKG2D多肽或其片段、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域,其中所述TFP分子能够功能性地与在所述人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup> T细胞中、所述人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup> T细胞的表面处和/或表面上的内源性TCR复合物和/或至少一种内源性TCR多肽相互作用。

218. 一种蛋白质复合物,其包含:

(i) TFP分子,其包含人NKG2D多肽或其片段、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域;以及

(ii) 至少一种内源性TCR亚单位或内源性TCR复合物。

219. 一种包含经分离重组TFP分子的人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup> T细胞,所述经分离重组TFP分子包含a) 第一TFP分子,其包含人或人源化抗CD19结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域,和b) 第二TFP分子,其包含人或人源化抗BCMA结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域,其中所述TFP分子能够功能性地与在所述人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup> T细胞中、所述人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup> T细胞的表面处和/或表面上的内源性TCR复合物和/或至少一种内源性TCR多肽相互作用。

220. 一种包含经分离重组TFP分子的人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup> T细胞,所述经分离重组TFP分子包含a) 第一TFP分子,其包含人或人源化抗CD19结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域,和b) 第二TFP分子,其包含人或人源化抗CD22结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域,其中所述TFP分子能够功能性地与在所述人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup> T细胞中、所述人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup> T细胞的表面处和/或表面上的内源性TCR复合物和/或至少一种内源性TCR多肽相互作用。

221. 一种蛋白质复合物,其包含:

(i) 第一TFP分子,其包含人或人源化CD19结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域;

(ii) 第二TFP分子,其包含人或人源化抗BCMA结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域;以及

(iii) 至少一种内源性TCR亚单位或内源性TCR复合物。

222. 一种蛋白质复合物,其包含:

(i) 第一TFP分子,其包含人或人源化CD19结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域;

(ii) 第二TFP分子,其包含人或人源化抗CD22结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域;以及

(iii) 至少一种内源性TCR亚单位或内源性TCR复合物。

223. 如权利要求214、216或218中任一项所述的蛋白质复合物,其中所述TCR包含选自由以下组成的组的蛋白质的细胞外结构域或其部分:TCR $\alpha$ 链、TCR $\beta$ 链、CD3 $\epsilon$  TCR亚单位、CD3 $\gamma$  TCR亚单位和CD3 $\delta$  TCR亚单位。

224. 如权利要求218或223所述的蛋白质复合物,其中所述NKG2D配体或其片段通过接

头序列来连接于所述TCR细胞外结构域。

225. 如权利要求214或217所述的蛋白质复合物,其中所述CD16多肽或其片段通过接头序列来连接于所述TCR细胞外结构域。

226. 如权利要求216或223所述的蛋白质复合物,其中所述抗ROR1结合结构域通过接头序列来连接于所述TCR细胞外结构域。

227. 如权利要求217所述的蛋白质复合物,其中所述接头区域包含 $(G_4S)_n$ ,其中 $n=1$ 至4。

228. 一种蛋白质复合物,其包含

(a) 由如权利要求1-67、106-131、136-137和139-143中任一项所述的经分离核酸分子编码的TFP,以及

(b) 至少一种内源性TCR亚单位或内源性TCR复合物。

229. 一种人 $CD8^+$ 或 $CD4^+$  T细胞,其在每个如权利要求214以及216-218和223-228中任一项所述的蛋白质复合物中包含至少两种不同TFP蛋白。

230. 一种人 $CD8^+$ 或 $CD4^+$  T细胞,其包含至少两种由如权利要求1-67、106-131、136-137和139-143中任一项所述的经分离核酸分子编码的不同TFP分子。

231. 如权利要求221或222所述的蛋白质复合物,其中所述TFP包含选自以下组成的组的蛋白质的细胞外结构域或其部分:TCR  $\alpha$ 链、TCR $\beta$ 链、CD3 $\epsilon$  TCR亚单位、CD3 $\gamma$  TCR亚单位和CD3 $\delta$  TCR亚单位。

232. 如权利要求221或231所述的蛋白质复合物,其中所述人或人源化抗CD19结合结构域通过第一接头序列来连接于所述第一TFP分子的所述TCR细胞外结构域,并且所述人或人源化抗BCMA结合结构域通过第二接头序列来连接于所述第二TFP分子的所述TCR细胞外结构域。

233. 如权利要求231或232所述的蛋白质复合物,其中所述人或人源化抗CD19结合结构域通过第一接头序列来连接于所述第一TFP分子的所述TCR细胞外结构域,并且所述人或人源化抗CD20结合结构域通过第二接头序列来连接于所述第二TFP分子的所述TCR细胞外结构域。

234. 如权利要求232或233所述的蛋白质复合物,其中所述第一接头序列和所述第二接头序列包含 $(G_4S)_n$ ,其中 $n=1$ 至4。

235. 一种蛋白质复合物,其包含

(a) 由如权利要求68-105、129-130、132-136和138-143中任一项所述的经分离核酸分子编码的第一TFP和第二TFP,以及

(b) 至少一种内源性TCR亚单位或内源性TCR复合物。

236. 一种人 $CD8^+$ 或 $CD4^+$  T细胞,其在每个如权利要求221-222和231-235中任一项所述的蛋白质复合物中包含所述第一TFP分子和所述第二TFP分子。

237. 一种人 $CD8^+$ 或 $CD4^+$  T细胞,其包含由如权利要求68-105、129-130、132-136和138-143中任一项所述的经分离核酸分子编码的所述第一TFP分子和所述第二TFP分子。

238. 一种人 $CD8^+$ 或 $CD4^+$  T细胞群体,其中所述群体的所述T细胞单独地或总体地包含至少两种TFP分子,所述TFP分子包含人或人源化CD16多肽或其片段、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域,其中所述TFP分子能够功能性地与在所述人 $CD8^+$ 或 $CD4^+$  T细胞中、

所述人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup> T细胞的表面处和/或表面上的内源性TCR复合物和/或至少一种内源性TCR多肽相互作用。

239. 一种人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup> T细胞群体,其中所述群体的所述T细胞单独地或总体地包含至少两种TFP分子,所述TFP分子包含人或人源化抗受体酪氨酸激酶样孤儿受体1 (ROR1) 结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域,其中所述TFP分子能够功能性地与在所述人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup> T细胞中、所述人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup> T细胞的表面处和/或表面上的内源性TCR复合物和/或至少一种内源性TCR多肽相互作用。

240. 一种人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup> T细胞群体,其中所述群体的所述T细胞单独地或总体地包含至少两种TFP分子,所述TFP分子包含人NKG2D多肽或其片段、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域,其中所述TFP分子能够功能性地与在所述人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup> T细胞中、所述人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup> T细胞的表面处和/或表面上的内源性TCR复合物和/或至少一种内源性TCR多肽相互作用。

241. 一种人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup> T细胞群体,其中所述群体的所述T细胞单独地或总体地包含第一TFP分子和第二TFP分子,所述第一TFP分子包含人或人源化抗CD19结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域,并且所述第二TFP分子包含人或人源化抗BCMA结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域,其中所述第一TFP分子和所述第二TFP分子能够功能性地与在所述人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup> T细胞中、所述人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup> T细胞的表面处和/或表面上的内源性TCR复合物和/或至少一种内源性TCR多肽相互作用。

242. 一种人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup> T细胞群体,其中所述群体的所述T细胞单独地或总体地包含第一TFP分子和第二TFP分子,所述第一TFP分子包含人或人源化抗CD19结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域,并且所述第二TFP分子包含人或人源化抗CD22结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域,其中所述第一TFP分子和所述第二TFP分子能够功能性地与在所述人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup> T细胞中、所述人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup> T细胞的表面处和/或表面上的内源性TCR复合物和/或至少一种内源性TCR多肽相互作用。

243. 一种人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup> T细胞群体,其中所述群体的所述T细胞单独地或总体地包含由如权利要求68-105、129-130、132-136和138-143中任一项所述的经分离核酸分子编码的所述第一TFP分子和所述第二TFP分子。

244. 一种人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup> T细胞群体,其中所述群体的所述T细胞单独地或总体地包含至少两种由如权利要求1-67、106-131、136-137和139-143中任一项所述的经分离核酸分子编码的TFP分子。

245. 一种制备细胞的方法,其包括用如权利要求1-67、106-131、136-137和139-143中任一项所述的经分离核酸分子、如权利要求172和189-196中任一项所述的核酸、或如权利要求198和201-205中任一项所述的载体转导T细胞。

246. 一种产生经RNA工程改造的细胞的群体的方法,其包括将在体外转录的RNA或合成RNA引入细胞中,其中所述RNA包含编码如权利要求146-154和162-171中任一项所述的TFP分子的核酸。

247. 一种产生经RNA工程改造的细胞的群体的方法,其包括将在体外转录的RNA或合成RNA引入细胞中,其中所述RNA包含编码如权利要求155-161和173-186中任一项所述的经分离重组TFP分子的核酸。

248. 一种在哺乳动物中提供抗肿瘤免疫性的方法, 其包括向所述哺乳动物施用有效量的如权利要求1-67、106-131、136-137和139-143中任一项所述的经分离核酸分子、如权利要求144所述的多肽分子、表达如权利要求144所述的多肽分子的细胞、如权利要求146-154和162-171中任一项所述的TFP分子、如权利要求172和189-196中任一项所述的核酸、如权利要求198和201-205中任一项所述的载体、或如权利要求207、209-213、215以及229-230、238-240和244-246中任一项所述的细胞。

249. 一种在哺乳动物中提供抗肿瘤免疫性的方法, 其包括向所述哺乳动物施用有效量的如权利要求68-105、129-130、132-136和138-143中任一项所述的经分离核酸分子、如权利要求144所述的多肽分子、表达如权利要求144所述的多肽分子的细胞、如权利要求155-161和173-186中任一项所述的经分离重组TFP分子、如权利要求187-197中任一项所述的核酸、如权利要求199-206中任一项所述的载体、或如权利要求208-212、236-237、241-243和247中任一项所述的细胞。

250. 如权利要求248所述的方法, 其中所述细胞是自体T细胞。

251. 如权利要求248所述的方法, 其中所述细胞是同种异体T细胞。

252. 如权利要求248-251中任一项所述的方法, 其中所述哺乳动物是人。

253. 一种治疗患有与肿瘤相关抗原的表达相关的疾病的哺乳动物的方法, 其包括向所述哺乳动物施用有效量的如权利要求1-13、31-37、106、108-109、111-118、122、126-131、136-137和139-143中任一项所述的经分离核酸分子、如权利要求144所述的多肽分子、表达如权利要求144所述的多肽分子的细胞、如权利要求146-148和166-171中任一项所述的TFP分子、如权利要求172和189-196中任一项所述的核酸、如权利要求198和201-205中任一项所述的载体、或如权利要求207和209-214中任一项所述的细胞。

254. 一种治疗患有与ROR1的表达相关的疾病的哺乳动物的方法, 其包括向所述哺乳动物施用有效量的如权利要求38-43、107-108、110-117、119-120、123-125、126-131、136-137和139-143中任一项所述的经分离核酸分子、如权利要求144所述的多肽分子、表达如权利要求144所述的多肽分子的细胞、如权利要求149-151和162-171中任一项所述的TFP分子、如权利要求172和189-196中任一项所述的核酸、如权利要求198和201-205中任一项所述的载体、或如权利要求207、209-212和215中任一项所述的细胞。

255. 一种治疗患有与NKG2D受体的表达相关的疾病的哺乳动物的方法, 其包括向所述哺乳动物施用有效量的如权利要求14-30、44-67、111-117、121、126-131、136-137和139-143中任一项所述的经分离核酸分子、如权利要求144所述的多肽分子、表达如权利要求144所述的多肽分子的细胞、如权利要求152-154和166-171中任一项所述的TFP分子、如权利要求172和189-196中任一项所述的核酸、如权利要求198和201-205中任一项所述的载体、或如权利要求207、209-212、229-230、240和244-246中任一项所述的细胞。

256. 如权利要求255所述的方法, 其中与NKG2D受体抗体的表达相关的所述疾病选自以下组成的组: 发育不良、增生性疾病、癌症、恶性肿瘤、与NKG2D受体抗体的表达相关的非癌症相关适应症、炎症性疾病、类风湿性关节炎、结肠炎、乳糜泻、肠炎、多发性硬化症、斑形脱发、1型糖尿病、慢性阻塞性肺病、动脉粥样硬化以及与2型糖尿病相关的代谢综合征。

257. 如权利要求255所述的方法, 其中与NKG2D受体抗体的表达相关的所述疾病是感染性疾病。

258. 一种治疗患有与CD19、BCMA或CD22的表达相关的疾病的哺乳动物的方法,其包括向所述哺乳动物施用有效量的如权利要求68-105、129-130、132-136和138-143中任一项所述的经分离核酸分子、如权利要求144所述的多肽分子、表达如权利要求144所述的多肽分子的细胞、如权利要求155-161和173-186中任一项所述的第一TFP分子和第二TFP分子、如权利要求187-197中任一项所述的核酸、如权利要求199-206中任一项所述的载体、或如权利要求208-212、236-237、241-243和247中任一项所述的细胞。

259. 如权利要求258所述的方法,其中与CD19、BCMA或CD22表达相关的所述疾病选自由以下组成的组:增生性疾病、癌症、恶性肿瘤、骨髓发育不良、骨髓发育不良综合征、前白血病、与CD19的表达相关的非癌症相关适应症、与BCMA的表达相关的非癌症相关适应症以及与CD22的表达相关的非癌症相关适应症。

260. 如权利要求254所述的方法,其中与ROR1表达相关的所述疾病选自由以下组成的组:发育不良、增生性疾病、癌症、恶性肿瘤以及与ROR1的表达相关的非癌症相关适应症。

261. 如权利要求253所述的方法,其中所述疾病是选自由以下组成的组的癌症:间皮瘤、乳头状浆液性卵巢腺癌、透明细胞急性淋巴细胞性白血病(T-ALL)、急性淋巴母细胞性白血病(ALL);慢性骨髓源性白血病(CML)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、B细胞慢性淋巴细胞性白血病、B细胞前淋巴细胞性白血病、母细胞性浆细胞样树突细胞赘瘤、伯基特氏淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、毛细胞白血病、小细胞滤泡性淋巴瘤、大细胞滤泡性淋巴瘤、恶性淋巴组织增生性疾病、MALT淋巴瘤、套膜细胞淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、多发性骨髓瘤、骨髓发育不良、骨髓发育不良综合征、非霍奇金氏淋巴瘤、浆母细胞性淋巴瘤、浆细胞样树突细胞赘瘤、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、前白血病、卵巢癌、混合苗勒卵巢癌、子宫内膜样粘液卵巢癌、胰腺腺癌、导管胰腺腺癌、子宫浆液性癌瘤、肺腺癌、肝外胆管癌、胃腺癌、食道腺癌、结肠直肠腺癌、乳腺腺癌、肾癌、结肠癌、胃癌、自体免疫疾病及其组合。

262. 如权利要求254所述的方法,其中所述疾病是选自由以下组成的组的癌症:间皮瘤、乳头状浆液性卵巢腺癌、透明细胞急性淋巴细胞性白血病(T-ALL)、急性淋巴母细胞性白血病(ALL);慢性骨髓源性白血病(CML)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、B细胞慢性淋巴细胞性白血病、B细胞前淋巴细胞性白血病、母细胞性浆细胞样树突细胞赘瘤、伯基特氏淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、毛细胞白血病、小细胞滤泡性淋巴瘤、大细胞滤泡性淋巴瘤、恶性淋巴组织增生性疾病、MALT淋巴瘤、套膜细胞淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、多发性骨髓瘤、骨髓发育不良、骨髓发育不良综合征、非霍奇金氏淋巴瘤、浆母细胞性淋巴瘤、浆细胞样树突细胞赘瘤、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、前白血病、卵巢癌、混合苗勒卵巢癌、子宫内膜样粘液卵巢癌、胰腺腺癌、导管胰腺腺癌、子宫浆液性癌瘤、肺腺癌、肝外胆管癌、胃腺癌、食道腺癌、结肠直肠腺癌、乳腺腺癌、肾癌、结肠癌、胃癌、与ROR1表达相关的疾病及其组合。

263. 如权利要求255所述的方法,其中所述疾病是选自由以下组成的组的癌症:尤因氏肉瘤、神经胶质瘤、神经母细胞瘤、多发性骨髓瘤、黑素瘤、白血病(例如AML、CML和CLL)、卵巢癌、膀胱癌、乳腺癌、肺癌、肝细胞癌、结肠癌、肾癌和前列腺癌。

264. 如权利要求258所述的方法,其中所述疾病是选自由以下组成的组的血液癌症:B细胞急性淋巴细胞性白血病(B-ALL)、T细胞急性淋巴细胞性白血病(T-ALL)、急性淋巴母细胞性白血病(ALL);慢性骨髓源性白血病(CML)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、B细胞前淋巴

细胞性白血病、母细胞性浆细胞样树突细胞赘瘤、伯基特氏淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、毛细胞白血病、小细胞滤泡性淋巴瘤、大细胞滤泡性淋巴瘤、恶性淋巴组织增生性疾患、MALT淋巴瘤、套膜细胞淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、多发性骨髓瘤、骨髓发育不良、骨髓发育不良综合征、非霍奇金氏淋巴瘤、浆母细胞性淋巴瘤、浆细胞样树突细胞赘瘤、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、前白血病、与CD19、BCMA或CD22表达相关的疾病及其组合。

265. 如权利要求253所述的方法,其中表达TFP分子的所述细胞与使表达TFP分子的细胞的功效增加的药剂组合施用。

266. 如权利要求253所述的方法,其中表达TFP分子的所述细胞与特异性结合肿瘤细胞上的细胞表面相关抗原的抗体或其片段组合施用。

267. 如权利要求258所述的方法,其中表达第一TFP分子和第二TFP分子的所述细胞与使表达所述第一TFP分子和所述第二TFP分子的细胞的功效增加的药剂组合施用。

268. 如权利要求255-257、261、263和265中任一项所述的方法,其中相较于被施用有效量的表达具有所述抗原结构域的嵌合抗原受体(CAR)的T细胞的哺乳动物,在所述哺乳动物中释放较少细胞因子。

269. 如权利要求255-257、261、263、265和268中任一项所述的方法,其中相较于被施用有效量的表达具有包含所述配体NKG2D的所述抗原结构域的嵌合抗原受体(CAR)的T细胞的哺乳动物,在所述哺乳动物中释放较少细胞因子。

270. 如权利要求253、261、265和266中任一项所述的方法,其中相较于被施用有效量的表达能够结合所述细胞表面相关抗原的嵌合抗原受体(CAR)的T细胞的哺乳动物,在所述哺乳动物中释放较少细胞因子。

271. 如权利要求254和260-262中任一项所述的方法,其中相较于被施用有效量的表达抗ROR1嵌合抗原受体(CAR)的T细胞的哺乳动物,在所述哺乳动物中释放较少细胞因子。

272. 如权利要求258、259、264和267中任一项所述的方法,其中相较于被施用有效量的表达以下各物的T细胞的哺乳动物,在所述哺乳动物中释放较少细胞因子:

- (a) 抗CD19嵌合抗原受体(CAR);
- (b) 抗BCMA CAR;
- (c) 抗CD22 CAR;
- (d) 抗CD19 CAR和抗BCMA CAR;
- (e) 抗CD19 CAR和抗CD22 CAR;或
- (f) 其组合。

273. 如权利要求253-257、260-263、265-266、268-271中任一项所述的方法,其中表达TFP分子的所述细胞与改善一种或多种与施用表达TFP分子的细胞相关的副作用的药剂组合施用。

274. 如权利要求254、260-262和265中任一项所述的方法,其中表达TFP分子的所述细胞与第二治疗剂组合施用。

275. 如权利要求254、260-262、265和271中任一项所述的方法,其中表达TFP分子的所述细胞与治疗与ROR1相关的疾病的药剂组合施用。

276. 如权利要求255-257、261、263、265和273中任一项所述的方法,其中表达TFP分子的所述细胞与治疗与NKG2D受体抗体相关的疾病的药剂组合施用。

277. 如权利要求258、259、264、267和272中任一项所述的方法,其中表达所述第一TFP分子和第二TFP分子的所述细胞与改善一种或多种与施用表达所述第一TFP分子和所述第二TFP分子的细胞相关的副作用的药剂组合施用。

278. 如权利要求258、259、264、267、272和277中任一项所述的方法,其中表达所述第一TFP分子和第二TFP分子的所述细胞与治疗与CD19、BCMA或CD22相关的所述疾病的药剂组合施用。

279. 如权利要求1-67、106-131、136-137和139-143中任一项所述的经分离核酸分子、如权利要求144所述的经分离多肽分子、表达如权利要求144所述的多肽分子的细胞、如权利要求146-154和162-171中任一项所述的经分离TFP、如权利要求172和189-196中任一项所述的核酸、如权利要求198和201-205中任一项所述的载体、如权利要求214以及216-218和223-228中任一项所述的复合物、或如权利要求207、209-213、215以及229-230、238-240和244-246中任一项所述的细胞,其用作药剂。

280. 如权利要求68-105、129-130、132-136和138-143中任一项所述的经分离核酸分子、如权利要求144所述的经分离多肽分子、表达如权利要求144所述的多肽分子的细胞、如权利要求155-161和173-186中任一项所述的经分离重组TFP分子、如权利要求187-197中任一项所述的核酸、如权利要求199-206中任一项所述的载体、如权利要求221-222、231-237、241-243、247、249-252、258-259、264、267、272和277-278中任一项所述的复合物、或如权利要求208-212、236-237、241-243和247中任一项所述的细胞,其用作药剂。

281. 一种治疗患有与ROR1的表达相关的疾病的哺乳动物的方法,其包括向所述哺乳动物施用有效量的如权利要求38-43、107-108、110-117、119-120、123-125、126-131、136-137和139-143中任一项所述的经分离核酸分子、如权利要求144所述的多肽分子、表达如权利要求144所述的多肽分子的细胞、如权利要求149-151和162-171中任一项所述的TFP分子、如权利要求172和189-196中任一项所述的核酸、如权利要求198和201-205中任一项所述的载体、或如权利要求207、209-212和215中任一项所述的细胞,其中相较于被施用有效量的表达抗ROR1嵌合抗原受体(CAR)的T细胞的哺乳动物,在所述哺乳动物中释放较少细胞因子。

282. 一种治疗患有与NKG2D受体抗体的表达相关的疾病的哺乳动物的方法,其包括向所述哺乳动物施用有效量的如权利要求14-30、44-67、111-117、121、126-131、136-137和139-143中任一项所述的经分离核酸分子、如权利要求144所述的多肽分子、表达如权利要求144所述的多肽分子的细胞、如权利要求152-154和166-171中任一项所述的TFP分子、如权利要求172和189-196中任一项所述的核酸、如权利要求198和201-205中任一项所述的载体、或如权利要求207、209-212、229-230、240和244-246中任一项所述的细胞,其中相较于被施用有效量的表达具有包含所述配体NKG2D的所述抗原结构域的嵌合抗原受体(CAR)的T细胞的哺乳动物,在所述哺乳动物中释放较少细胞因子。

283. 一种治疗患有与CD19、BCMA或CD22的表达相关的疾病的哺乳动物的方法,其包括向所述哺乳动物施用有效量的如权利要求68-105、129-130、132-136和138-143中任一项所述的经分离核酸分子、如权利要求144所述的多肽分子、表达如权利要求144所述的多肽分子的细胞、如权利要求155-161和173-186中任一项所述的经分离重组TFP分子、如权利要求187-197中任一项所述的核酸、如权利要求199-206中任一项所述的载体、或如权利要求

208-212、236-237、241-243和247中任一项所述的细胞,其中相较于被施用有效量的表达以下各物的T细胞的哺乳动物,在所述哺乳动物中释放较少细胞因子:

- (a) 抗CD19嵌合抗原受体 (CAR);
- (b) 抗BCMA CAR;
- (c) 抗CD22 CAR;
- (d) 抗CD19 CAR和抗BCMA CAR;
- (e) 抗CD19 CAR和抗CD22CAR;或
- (f) 其组合。

284. 一种经分离重组核酸分子,其编码

- (a) 第一T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP),其包含:

- (i) TCR亚单位,其包含

- (1) TCR细胞外结构域的至少一部分,和

- (2) 包含来自CD3 $\epsilon$ 的细胞内信号传导结构域的刺激性结构域的TCR细胞内结构域;以及

- (ii) 包含第一抗原结合结构域的第一人或人源化抗体结构域;和

- (b) 第二T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP),其包含

- (i) 包含TCR细胞外结构域的至少一部分的TCR亚单位,以及

- (ii) 包含第二抗原结合结构域的第二人或人源化抗体结构域;

其中所述第一TFP的所述TCR亚单位和所述第一抗体结构域操作性地连接,并且所述第二TFP的所述TCR亚单位和所述第二抗体结构域操作性地连接,并且

其中所述第一TFP和所述第二TFP在T细胞中表达时并入TCR中。

285. 一种经分离重组核酸分子,其编码

- (a) 第一T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP),其包含:

- (i) TCR亚单位,其包含

- (1) TCR细胞外结构域的至少一部分,和

- (2) 包含来自CD3 $\gamma$ 的细胞内信号传导结构域的刺激性结构域的TCR细胞内结构域;以及

及

- (ii) 包含第一抗原结合结构域的第一人或人源化抗体结构域;和

- (b) 第二T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP),其包含

- (i) 包含TCR细胞外结构域的至少一部分的TCR亚单位,以及

- (ii) 包含第二抗原结合结构域的第二人或人源化抗体结构域;

其中所述第一TFP的所述TCR亚单位和所述第一抗体结构域操作性地连接,并且所述第二TFP的所述TCR亚单位和所述第二抗体结构域操作性地连接,并且

其中所述第一TFP和所述第二TFP在T细胞中表达时并入TCR中。

286. 一种经分离重组核酸分子,其编码

- (a) 第一T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP),其包含:

- (i) TCR亚单位,其包含

- (1) TCR细胞外结构域的至少一部分,和

- (2) 包含来自CD3 $\delta$ 的细胞内信号传导结构域的刺激性结构域的TCR细胞内结构域;以及

- (ii) 包含第一抗原结合结构域的第一人或人源化抗体结构域;和



(b) 第二T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP), 其包含

(i) 包含TCR细胞外结构域的至少一部分的TCR亚单位, 以及

(ii) 包含第二抗原结合结构域的第二人 or 人源化抗体结构域;

其中所述第一TFP的所述TCR亚单位和所述第一抗体结构域操作性地连接, 并且所述第二TFP的所述TCR亚单位和所述第二抗体结构域操作性地连接, 并且

其中所述第一TFP和所述第二TFP在T细胞中表达时并入TCR中。

287. 一种经分离重组核酸分子, 其编码

(a) 第一T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP), 其包含:

(i) TCR亚单位, 其包含

(1) TCR细胞外结构域的至少一部分, 和

(2) 包含来自TCR $\alpha$ 的细胞内信号传导结构域的刺激性结构域的TCR细胞内结构域; 以及

(ii) 包含第一抗原结合结构域的第一人 or 人源化抗体结构域; 和

(b) 第二T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP), 其包含

(i) 包含TCR细胞外结构域的至少一部分的TCR亚单位, 以及

(ii) 包含第二抗原结合结构域的第二人 or 人源化抗体结构域;

其中所述第一TFP的所述TCR亚单位和所述第一抗体结构域操作性地连接, 并且所述第二TFP的所述TCR亚单位和所述第二抗体结构域操作性地连接, 并且

其中所述第一TFP和所述第二TFP在T细胞中表达时并入TCR中。

288. 一种经分离重组核酸分子, 其编码

(a) 第一T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP), 其包含:

(i) TCR亚单位, 其包含

(1) TCR细胞外结构域的至少一部分, 和

(2) 包含来自TCR $\beta$ 的细胞内信号传导结构域的刺激性结构域的TCR细胞内结构域; 以及

(ii) 包含第一抗原结合结构域的第一人 or 人源化抗体结构域; 和

(b) 第二T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP), 其包含

(i) 包含TCR细胞外结构域的至少一部分的TCR亚单位, 以及

(ii) 包含第二抗原结合结构域的第二人 or 人源化抗体结构域;

其中所述第一TFP的所述TCR亚单位和所述第一抗体结构域操作性地连接, 并且所述第二TFP的所述TCR亚单位和所述第二抗体结构域操作性地连接, 并且

其中所述第一TFP和所述第二TFP在T细胞中表达时并入TCR中。

289. 如权利要求284-288所述的经分离重组核酸分子, 其中所述第二TFP的所述TCR亚单位进一步包含TCR细胞内结构域, 其包含来自选自由TCR $\alpha$ 、TCR $\beta$ 、CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\gamma$  和CD3 $\delta$ 组成的组的细胞内信号传导结构域或其功能性片段的刺激性结构域。

290. 如权利要求284-289中任一项所述的经分离重组核酸分子, 其中所述第一抗原结合结构域或所述第二抗原结合结构域是抗CD19结合结构域。

291. 如权利要求284-290中任一项所述的经分离重组核酸分子, 其中所述第一抗原结合结构域或所述第二抗原结合结构域是抗B细胞成熟抗原 (BCMA) 结合结构域。

292. 如权利要求284-290中任一项所述的经分离重组核酸分子, 其中所述第一抗原结合结构域或所述第二抗原结合结构域是抗CD22结合结构域。

293. 一种经分离重组核酸分子,其编码:

(a) 第一T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP),其包含TCR亚单位、包含是抗CD19结合结构域的第一抗原结合结构域的第一人或人源化抗体结构域;和

(b) 第二T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP),其包含TCR亚单位、包含是抗BCMA结合结构域的第二抗原结合结构域的第二人或人源化抗体结构域。

294. 一种经分离重组核酸分子,其编码:

(a) 第一T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP),其包含TCR亚单位、包含是抗CD19结合结构域的第一抗原结合结构域的第一人或人源化抗体结构域;和

(b) 第二T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP),其包含TCR亚单位、包含是抗CD22结合结构域的第二抗原结合结构域的第二人或人源化抗体结构域。

295. 如权利要求293或294所述的经分离核酸分子,其中所述第一TFP的所述TCR亚单位和所述第一抗体结构域操作性地连接,并且所述第二TFP的所述TCR亚单位和所述第二抗体结构域操作性地连接。

296. 如权利要求293-295中任一项所述的经分离核酸分子,其中所述第一TFP、所述第二TFP或两者在T细胞中表达时并入TCR中。

297. 如权利要求284-296中任一项所述的经分离核酸分子,其中所编码第一抗原结合结构域通过第一接头序列来连接于所述第一TFP的所述TCR细胞外结构域,所编码第二抗原结合结构域通过第二接头序列来连接于所述第二TFP的所述TCR细胞外结构域,或所述第一抗原结合结构域通过所述第一接头序列来连接于所述第一TFP的所述TCR细胞外结构域,并且所编码第二抗原结合结构域通过所述第二接头序列来连接于所述第二TFP的所述TCR细胞外结构域。

298. 如权利要求297所述的经分离核酸分子,其中所述第一接头序列和所述第二接头序列包含  $(G_4S)_n$ , 其中  $n=1$  至  $4$ 。

299. 如权利要求284-298中任一项所述的经分离核酸分子,其中所述第一TFP的所述TCR亚单位、所述第二TFP的所述TCR亚单位或两者包含TCR细胞外结构域。

300. 如权利要求284-299中任一项所述的经分离核酸分子,其中所述第一TFP的所述TCR亚单位、所述第二TFP的所述TCR亚单位或两者包含TCR跨膜结构域。

301. 如权利要求284-300中任一项所述的经分离核酸分子,其中所述第一TFP的所述TCR亚单位、所述第二TFP的所述TCR亚单位或两者包含TCR细胞内结构域。

302. 如权利要求284-301中任一项所述的经分离核酸分子,其中所述第一TFP的所述TCR亚单位、所述第二TFP的所述TCR亚单位或两者包含 (i) TCR细胞外结构域, (ii) TCR跨膜结构域,和 (iii) TCR细胞内结构域,其中 (i)、(ii) 和 (iii) 中的至少两者来自同一TCR亚单位。

303. 如权利要求284-302中任一项所述的经分离核酸分子,其中所述第一TFP的所述TCR亚单位、所述第二TFP的所述TCR亚单位或两者包含TCR细胞内结构域,其包含选自CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\gamma$  或CD3 $\delta$ 的细胞内信号传导结构域的刺激结构域或具有至少一个对其进行的修饰的氨基酸序列。

304. 如权利要求284-303中任一项所述的经分离核酸分子,其中所述第一TFP的所述TCR亚单位、所述第二TFP的所述TCR亚单位或两者包含细胞内结构域,其包含选自4-1BB的

功能性信号传导结构域和/或CD3 $\zeta$ 的功能性信号传导结构域的刺激结构域或具有至少一个对其进行修饰的氨基酸序列。

305. 如权利要求284-304中任一项所述的经分离核酸分子, 其中所述第一人或人源化抗体结构域、所述第二人或人源化抗体结构域或两者包含抗体片段。

306. 如权利要求284-305中任一项所述的经分离核酸分子, 其中所述第一人或人源化抗体结构域、所述第二人或人源化抗体结构域或两者包含scFv或V<sub>H</sub>结构域。

307. 如权利要求284-306中任一项所述的经分离核酸分子, 其编码(i) 抗CD19轻链结合结构域氨基酸序列的分别与SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:29具有70-100%序列同一性的轻链(LC) CDR1、LC CDR2和LC CDR3, 和/或(ii) 抗CD19重链结合结构域氨基酸序列的分别与SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:33和SEQ ID NO:35具有70-100%序列同一性的重链(HC) CDR1、HC CDR2和HC CDR3。

308. 如权利要求284-307中任一项所述的经分离核酸分子, 其编码轻链可变区, 其中所述轻链可变区包含轻链可变区氨基酸序列SEQ ID NO:49的具有至少1个但不超过30个修饰的氨基酸序列, 或与轻链可变区氨基酸序列SEQ ID NO:49具有95-99%同一性的序列。

309. 如权利要求284-308中任一项所述的经分离核酸分子, 其编码重链可变区, 其中所述重链可变区包含重链可变区氨基酸序列SEQ ID NO:51的具有至少1个但不超过30个修饰的氨基酸序列, 或与重链可变区氨基酸序列SEQ ID NO:51具有95-99%同一性的序列。

310. 如权利要求284-291、293、295-309中任一项所述的经分离核酸分子, 其编码(i) 抗BCMA轻链结合结构域氨基酸序列的分别与SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39和SEQ ID NO:41具有70-100%序列同一性的轻链(LC) CDR1、LC CDR2和LC CDR3, 和/或(ii) 抗BCMA重链结合结构域氨基酸序列的分别与SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:45和SEQ ID NO:47具有70-100%序列同一性的重链(HC) CDR1、HC CDR2和HC CDR3。

311. 如权利要求284-291、293、295-310中任一项所述的经分离核酸分子, 其编码轻链可变区, 其中所述轻链可变区包含轻链可变区氨基酸序列SEQ ID NO:53的具有至少1个但不超过30个修饰的氨基酸序列, 或与轻链可变区氨基酸序列SEQ ID NO:53具有95-99%同一性的序列。

312. 如权利要求284-291、293、295-311中任一项所述的经分离核酸分子, 其编码重链可变区, 其中所述重链可变区包含重链可变区氨基酸序列SEQ ID NO:55的具有至少1个但不超过30个修饰的氨基酸序列, 或与重链可变区氨基酸序列SEQ ID NO:55具有95-99%同一性的序列。

313. 如权利要求284-291、293、295-312中任一项所述的经分离核酸分子, 其中所述抗CD22抗原结合结构域包含如本文所述的可变区或一个或多个如本文所述的CDR。

314. 如权利要求284-313中任一项所述的经分离核酸分子, 其中所编码第一TFP、所编码第二TFP或两者包括TCR亚单位的细胞外结构域, 其包括选自由以下组成的组的蛋白质的细胞外结构域或其部分、其功能性片段及其具有至少1个但不超过20个修饰的氨基酸序列: TCR $\alpha$ 链、TCR $\beta$ 链、CD3 $\epsilon$  TCR亚单位、CD3 $\gamma$  TCR亚单位、CD3 $\delta$  TCR亚单位。

315. 如权利要求284-314中任一项所述的经分离核酸分子, 其中所编码第一TFP和所编码第二TFP包括跨膜结构域, 其包括选自由以下组成的组的蛋白质的跨膜结构域、其功能性片段及其具有至少1个但不超过20个修饰的氨基酸序列: TCR $\alpha$ 链、TCR $\beta$ 链、CD3 $\epsilon$  TCR亚单位、

CD3 $\gamma$  TCR亚单位、CD3 $\delta$  TCR亚单位。

316. 如权利要求284-315中任一项所述的经分离核酸分子,其中所编码第一TFP和所编码第二TFP包括跨膜结构域,其包括选自由以下组成的组的蛋白质的跨膜结构域、其功能性片段及其具有至少1个但不超过20个修饰的氨基酸序列:TCR $\alpha$ 链、TCR $\beta$ 链、TCR $\zeta$ 链、CD3 $\epsilon$  TCR亚单位、CD3 $\gamma$  TCR亚单位、CD3 $\delta$  TCR亚单位、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD28、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154。

317. 如权利要求284-316中任一项所述的经分离核酸分子,其进一步包含编码共刺激性结构域的序列。

318. 如权利要求317所述的经分离核酸分子,其中所述共刺激性结构域是从选自由以下组成的组的蛋白质获得的功能性信号传导结构域及其具有至少1个但不超过20个对其进行的修饰的氨基酸序列:OX40、CD2、CD27、CD28、CDS、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)、ICOS (CD278) 和4-1BB (CD137)。

319. 如权利要求284-318中任一项所述的经分离核酸分子,其进一步包含编码细胞内信号传导结构域的序列。

320. 如权利要求284-319中任一项所述的经分离核酸分子,其进一步包含前导序列。

321. 如权利要求284-320中任一项所述的经分离核酸分子,其进一步包含蛋白酶裂解位点。

322. 如权利要求284-321中任一项所述的经分离核酸分子,其中所述至少1个但不超过20个对其进行的修饰包括对介导细胞信号传导的氨基酸的修饰或对应答于配体与所述第一TFP、所述第二TFP或两者结合加以磷酸化的氨基酸的修饰。

323. 如权利要求284-322中任一项所述的经分离核酸分子,其中所述经分离核酸分子是mRNA。

324. 如权利要求284-323中任一项所述的经分离核酸分子,其中所述第一TFP、所述第二TFP或两者包括TCR亚单位的免疫受体酪氨酸基活化基序 (ITAM),其包括选自由以下组成的组的蛋白质的ITAM或其部分、其功能性片段及其具有至少1个但不超过20个对其进行的修饰的氨基酸序列:CD3 $\zeta$  TCR亚单位、CD3 $\epsilon$  TCR亚单位、CD3 $\gamma$  TCR亚单位、CD3 $\delta$  TCR亚单位、TCR $\zeta$ 链、Fc $\epsilon$ 受体1链、Fc $\epsilon$ 受体2链、Fc $\gamma$ 受体1链、Fc $\gamma$ 受体2a链、Fc $\gamma$ 受体2b1链、Fc $\gamma$ 受体2b2链、Fc $\gamma$ 受体3a链、Fc $\gamma$ 受体3b链、Fc $\beta$ 受体1链、TYROBP (DAP12)、CD5、CD16a、CD16b、CD22、CD23、CD32、CD64、CD79a、CD79b、CD89、CD278、CD66d。

325. 如权利要求324所述的经分离核酸分子,其中所述ITAM替代CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 或CD3 $\epsilon$ 的ITAM。

326. 如权利要求324所述的经分离核酸分子,其中所述ITAM选自由CD3 $\zeta$  TCR亚单位、CD3 $\epsilon$  TCR亚单位、CD3 $\gamma$  TCR亚单位和CD3 $\delta$  TCR亚单位组成的组,并且替代选自由CD3 $\zeta$ TCR亚单位、CD3 $\epsilon$  TCR亚单位、CD3 $\gamma$  TCR亚单位和CD3 $\delta$  TCR亚单位组成的组的不同ITAM。

327. 如权利要求284-326中任一项所述的经分离核酸分子,其中所述核酸包含核苷酸类似物。

328. 如权利要求327所述的经分离核酸分子,其中所述核苷酸类似物选自由以下组成的组:2'-O-甲基、2'-O-甲氧基乙基 (2'-O-MOE)、2'-O-氨基丙基、2'-脱氧、T-脱氧-2'-氟代、2'-O-氨基丙基 (2'-O-AP)、2'-O-二甲基氨基乙基 (2'-O-DMAOE)、2'-O-二甲基氨基丙基

(2'-O-DMAP)、T-O-二甲基氨基乙基氧基乙基(2'-O-DMAEOE)、经2'-O-N-甲基乙酰胺基(2'-O-NMA)修饰、锁定核酸(LNA)、亚乙基核酸(ENA)、肽核酸(PNA)、1',5'-失水己糖醇核酸(HNA)、吗啉代、甲基膦酸酯核苷酸、硫代膦酸酯核苷酸和2'-氟代N3-P5'-亚磷酰胺。

329. 如权利要求284-328中任一项所述的经分离核酸分子,其进一步包含前导序列。

330. 一种经分离多肽分子,其由如权利要求284-329中任一项所述的核酸分子编码。

331. 如权利要求330所述的经分离多肽分子,其中所述经分离多肽包含由第一核酸分子编码的第一多肽和由第二核酸分子编码的第二多肽。

332. 一种经分离重组TFP分子,其包含

(a) 第一TFP分子,其包含人或人源化抗CD19结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域,和

(b) 第二TFP分子,其包含人或人源化抗BCMA结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域。

333. 一种经分离重组TFP分子,其包含

(a) 第一TFP分子,其包含人或人源化抗CD19结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域,和

(b) 第二TFP分子,其包含人或人源化抗BCMA结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域,其中所述第一TFP分子能够功能性地与内源性TCR复合物和/或至少一种内源性TCR多肽相互作用。

334. 一种经分离重组TFP分子,其包含

(a) 第一TFP分子,其包含人或人源化抗CD19结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域,和

(b) 第二TFP分子,其包含人或人源化抗BCMA结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域,其中所述第一TFP分子能够功能性地整合至内源性TCR复合物中。

335. 如权利要求332-334中任一项所述的经分离重组TFP分子,其包含含有人或人源化抗CD19结合结构域、人源化抗BCMA结合结构域的抗体或抗体片段、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域。

336. 一种经分离重组TFP分子,其包含

(a) 第一TFP分子,其包含人或人源化抗CD19结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域,和

(b) 第二TFP分子,其包含人或人源化抗CD22结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域。

337. 一种经分离重组第一TFP分子,其包含人或人源化抗CD19结合结构域、人源化抗CD22结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域,其中所述第一TFP分子能够功能性地与内源性TCR复合物和/或至少一种内源性TCR多肽相互作用。

338. 一种经分离重组第一TFP分子,其包含人或人源化抗CD19结合结构域、人源化抗CD22结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域,其中所述第一TFP分子能够功能性地整合至内源性TCR复合物中。

339. 如权利要求336-338中任一项所述的经分离重组TFP分子,其包含含有人或人源化抗CD19结合结构域、人源化抗CD22结合结构域的抗体或抗体片段、TCR细胞外结构域、跨膜

结构域和细胞内结构域。

340. 如权利要求336-339中任一项所述的经分离重组TFP分子,其中所述抗CD19结合结构域、所述抗BCMA结合结构域、所述抗CD22结合结构域或其组合是scFv或V<sub>H</sub>结构域。

341. 如权利要求336-340中任一项所述的经分离重组TFP分子,其中所述抗CD19结合结构域包含与氨基酸序列SEQ ID NO:51具有95-100%同一性的重链、其功能性片段、或其具有至少1个但不超过30个修饰的氨基酸序列。

342. 如权利要求336-341中任一项所述的经分离重组TFP分子,其中所述抗CD19结合结构域包含与氨基酸序列SEQ ID NO:49具有95-100%同一性的轻链、其功能性片段、或其具有至少1个但不超过30个修饰的氨基酸序列。

343. 如权利要求336-338或340-342中任一项所述的经分离重组TFP分子,其中所述抗BCMA结合结构域包含与氨基酸序列SEQ ID NO:55具有95-100%同一性的重链、其功能性片段、或其具有至少1个但不超过30个修饰的氨基酸序列。

344. 如权利要求336-338或340-343中任一项所述的经分离重组TFP分子,其中所述抗BCMA结合结构域包含与氨基酸序列SEQ ID NO:53具有95-100%同一性的轻链、其功能性片段、或其具有至少1个但不超过30个修饰的氨基酸序列。

345. 如权利要求336-342中任一项所述的经分离重组TFP分子,其中所述抗CD22结合结构域包含如本文所述的可变区或一个或多个如本文所述的CDR。

346. 如权利要求336-345中任一项所述的经分离重组TFP分子,其包含TCR细胞外结构域,其包括选自以下组成的组的蛋白质的细胞外结构域或其部分、其功能性片段及其具有至少1个但不超过20个修饰的氨基酸序列:TCR $\alpha$ 链、TCR $\beta$ 链、CD3 $\epsilon$  TCR亚单位、CD3 $\gamma$  TCR亚单位、CD3 $\delta$  TCR亚单位。

347. 如权利要求336-338、340-343或345中任一项所述的经分离重组TFP分子,其中所述抗CD19结合结构域通过第一接头序列来连接于所述第一TFP分子的所述TCR细胞外结构域,并且所述抗BCMA结合结构域通过第二接头序列来连接于所述第一TFP分子的所述TCR细胞外结构域。

348. 如权利要求336-338或344-345中任一项所述的经分离重组TFP分子,其中所述抗CD19结合结构域通过第一接头序列来连接于所述第一TFP分子的所述TCR细胞外结构域,并且所述抗CD22结合结构域通过第二接头序列来连接于所述第一TFP分子的所述TCR细胞外结构域。

349. 如权利要求347或348所述的经分离重组TFP分子,其中所述第一接头序列和所述第二接头序列包含(G<sub>4</sub>S)<sub>n</sub>,其中n=1至4。

350. 如权利要求336-349中任一项所述的经分离重组TFP分子,其进一步包含共刺激性结构域。

351. 如权利要求336-350中任一项所述的经分离重组TFP分子,其进一步包含细胞内信号传导结构域。

352. 如权利要求336-351中任一项所述的经分离重组TFP分子,其进一步包含前导序列。

353. 一种核酸,其包含编码如权利要求332-352中任一项所述的经分离重组TFP的序列。

354. 如权利要求353所述的核酸,其中所述核酸包含编码所述第一TFP分子的第一核酸和编码所述第二TFP分子的第二核酸。

355. 如权利要求353或354所述的核酸,其中所述核酸选自DNA和RNA组成的组。

356. 如权利要求353-355中任一项所述的核酸,其中所述核酸是mRNA。

357. 如权利要求353-356中任一项所述的核酸,其中所述核酸包含核苷酸类似物。

358. 如权利要求357所述的核酸,其中所述核苷酸类似物选自以下组成的组:2'-O-甲基、2'-O-甲氧基乙基(2'-O-MOE)、2'-O-氨基丙基、2'-脱氧、T-脱氧-2'-氟代、2'-O-氨基丙基(2'-O-AP)、2'-O-二甲基氨基乙基(2'-O-DMAOE)、2'-O-二甲基氨基丙基(2'-O-DMAP)、T-0-二甲基氨基乙基氧基乙基(2'-O-DMAEOE)、经2'-O-N-甲基乙酰胺基(2'-O-NMA)修饰、锁定核酸(LNA)、亚乙基核酸(ENA)、肽核酸(PNA)、1',5'-失水己糖醇核酸(HNA)、吗啉代、甲基磷酸酯核苷酸、硫代磷酸酯核苷酸和2'-氟代N3-P5'-亚磷酰胺。

359. 如权利要求353-358中任一项所述的核酸,其进一步包含启动子。

360. 如权利要求353-359中任一项所述的核酸,其中所述核酸是在体外转录的核酸。

361. 如权利要求353-360中任一项所述的核酸,其中所述核酸进一步包含编码poly(A)尾部的序列。

362. 如权利要求353-361中任一项所述的核酸,其中所述核酸进一步包含3' UTR序列。

363. 如权利要求353-361中任一项所述的核酸,其中所述核酸进一步包含编码蛋白酶裂解位点的序列。

364. 一种载体,其包含编码如权利要求332-352中任一项所述的经分离重组TFP分子的核酸分子。

365. 如权利要求364所述的载体,其中所述载体包含a) 第一载体,其包含编码所述第一TFP的第一核酸分子;和b) 第二载体,其包含编码所述第二TFP的第二核酸分子。

366. 如权利要求364或365所述的载体,其中所述载体选自以下组成的组:DNA、RNA、质粒、慢病毒载体、腺病毒载体、劳斯肉瘤病毒(RSV)载体或逆转录病毒载体。

367. 如权利要求364-366中任一项所述的载体,其进一步包含启动子。

368. 如权利要求364-367中任一项所述的载体,其中所述载体是在体外转录的载体。

369. 如权利要求364-368中任一项所述的载体,其中所述载体中的所述核酸分子进一步编码poly(A)尾部。

370. 如权利要求364-369中任一项所述的载体,其中所述载体中的所述核酸分子进一步编码3' UTR。

371. 如权利要求364-370中任一项所述的载体,其中所述载体中的所述核酸分子进一步编码蛋白酶裂解位点。

372. 一种细胞,其包含如权利要求284-329中任一项所述的经分离核酸分子、如权利要求330或331所述的多肽分子、如权利要求332-352中任一项所述的经分离重组TFP分子、如权利要求353-363中任一项所述的核酸、或如权利要求364-371中任一项所述的载体。

373. 如权利要求372所述的细胞,其中所述细胞是人T细胞。

374. 如权利要求373所述的细胞,其中所述T细胞是CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup> T细胞。

375. 如权利要求372-374中任一项所述的细胞,其进一步包含编码抑制性分子的核酸,所述抑制性分子包含含有抑制性分子的至少一部分的第一多肽与含有来自细胞内信号传

导结构域的正性信号的第二多肽缔合。

376. 如权利要求375所述的细胞, 其中所述抑制性分子包含含有PD1的至少一部分的第一多肽和含有共刺激性结构域和初级信号传导结构域的第二多肽。

377. 一种包含经分离重组TFP分子的人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup> T细胞, 所述经分离重组TFP分子包含

(a) 第一TFP分子, 其包含人 or 人源化抗CD19结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域, 和

(b) 第二TFP分子, 其包含人 or 人源化抗BCMA结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域,

其中所述TFP分子能够功能性地与在所述人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup> T细胞中、所述人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup> T细胞的表面处和/或表面上的内源性TCR复合物和/或至少一种内源性TCR多肽相互作用。

378. 一种包含经分离重组TFP分子的人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup> T细胞, 所述经分离重组TFP分子包含

(a) 第一TFP分子, 其包含人 or 人源化抗CD19结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域, 和

(b) 第二TFP分子, 其包含人 or 人源化抗CD22结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域, 其中所述TFP分子能够功能性地与在所述人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup> T细胞中、所述人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup> T细胞的表面处和/或表面上的内源性TCR复合物和/或至少一种内源性TCR多肽相互作用。

379. 一种蛋白质复合物, 其包含:

(i) 第一TFP分子, 其包含人 or 人源化CD19结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域;

(ii) 第二TFP分子, 其包含人 or 人源化抗BCMA结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域; 以及

(iii) 至少一种内源性TCR亚单位或内源性TCR复合物。

380. 一种蛋白质复合物, 其包含:

(i) 第一TFP分子, 其包含人 or 人源化CD19结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域;

(ii) 第二TFP分子, 其包含人 or 人源化抗CD22结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域; 以及

(iii) 至少一种内源性TCR亚单位或内源性TCR复合物。

381. 如权利要求379或380所述的蛋白质复合物, 其中所述TFP包含选自以下组成的组的蛋白质的细胞外结构域或其部分: TCR $\alpha$ 链、TCR $\beta$ 链、CD3 $\epsilon$  TCR亚单位、CD3 $\gamma$  TCR亚单位和CD3 $\delta$  TCR亚单位。

382. 如权利要求379或381所述的蛋白质复合物, 其中所述人 or 人源化抗CD19结合结构域通过第一接头序列来连接于所述第一TFP分子的所述TCR细胞外结构域, 并且所述人 or 人源化抗BCMA结合结构域通过第二接头序列来连接于所述第二TFP分子的所述TCR细胞外结构域。

383. 如权利要求380或381所述的蛋白质复合物, 其中所述人 or 人源化抗CD19结合结构



域通过第一接头序列来连接于所述第一TFP分子的所述TCR细胞外结构域,并且所述人或人源化抗CD20结合结构域通过第二接头序列来连接于所述第二TFP分子的所述TCR细胞外结构域。

384. 如权利要求382或383所述的蛋白质复合物,其中所述第一接头序列和所述第二接头序列包含  $(G_4S)_n$ , 其中  $n=1$  至  $4$ 。

385. 一种蛋白质复合物,其包含

(a) 由如权利要求284-329中任一项所述的经分离核酸分子编码的第一TFP和第二TFP, 以及

(b) 至少一种内源性TCR亚单位或内源性TCR复合物。

386. 一种人  $CD8^+$  或  $CD4^+$  T细胞,其在每个如权利要求379-385中任一项所述的蛋白质复合物中包含所述第一TFP分子和所述第二TFP分子。

387. 一种人  $CD8^+$  或  $CD4^+$  T细胞,其包含由如权利要求284-329中任一项所述的经分离核酸分子编码的所述第一TFP分子和所述第二TFP分子。

388. 一种人  $CD8^+$  或  $CD4^+$  T细胞群体,其中所述群体的所述T细胞单独地或总体地包含第一TFP分子和第二TFP分子,所述第一TFP分子包含人或人源化抗CD19结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域,并且所述第二TFP分子包含人或人源化抗BCMA结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域,其中所述第一TFP分子和所述第二TFP分子能够功能性地与在所述人  $CD8^+$  或  $CD4^+$  T细胞中、所述人  $CD8^+$  或  $CD4^+$  T细胞的表面处和/或表面上的内源性TCR复合物和/或至少一种内源性TCR多肽相互作用。

389. 一种人  $CD8^+$  或  $CD4^+$  T细胞群体,其中所述群体的所述T细胞单独地或总体地包含第一TFP分子和第二TFP分子,所述第一TFP分子包含人或人源化抗CD19结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域,并且所述第二TFP分子包含人或人源化抗CD22结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域,其中所述第一TFP分子和所述第二TFP分子能够功能性地与在所述人  $CD8^+$  或  $CD4^+$  T细胞中、所述人  $CD8^+$  或  $CD4^+$  T细胞的表面处和/或表面上的内源性TCR复合物和/或至少一种内源性TCR多肽相互作用。

390. 一种人  $CD8^+$  或  $CD4^+$  T细胞群体,其中所述群体的所述T细胞单独地或总体地包含由如权利要求284-329中任一项所述的经分离核酸分子编码的所述第一TFP分子和所述第二TFP分子。

391. 一种制备细胞的方法,其包括用如权利要求284-329中任一项所述的经分离核酸分子、如权利要求353-363中任一项所述的核酸、或如权利要求364-371中任一项所述的载体转导T细胞。

392. 一种产生经RNA工程改造的细胞的群体的方法,其包括将在体外转录的RNA或合成RNA引入细胞中,其中所述RNA包含编码如权利要求332-352中任一项所述的经分离重组TFP分子的核酸。

393. 一种在哺乳动物中提供抗肿瘤免疫性的方法,其包括向所述哺乳动物施用有效量的如权利要求284-329中任一项所述的经分离核酸分子、如权利要求330或331所述的多肽分子、如权利要求332-352中任一项所述的经分离重组TFP分子、如权利要求353-363中任一项所述的核酸、如权利要求364-371中任一项所述的载体、或如权利要求372-376和386-390中任一项所述的细胞或细胞群体。

394. 如权利要求393所述的方法,其中所述细胞是自体T细胞。

395. 如权利要求393所述的方法,其中所述细胞是同种异体T细胞。

396. 如权利要求393-395中任一项所述的方法,其中所述哺乳动物是人。

397. 一种治疗患有与CD19、BCMA或CD22的表达相关的疾病的哺乳动物的方法,其包括向所述哺乳动物施用有效量的如权利要求284-329中任一项所述的经分离核酸分子、如权利要求330或331所述的多肽分子、如权利要求332-352中任一项所述的经分离重组TFP分子、如权利要求353-363中任一项所述的核酸、如权利要求364-371中任一项所述的载体、或如权利要求372-376和386-390中任一项所述的细胞或细胞群体。

398. 如权利要求397所述的方法,其中与CD19、BCMA或CD22表达相关的所述疾病选自自由以下组成的组:增生性疾病、癌症、恶性肿瘤、骨髓发育不良、骨髓发育不良综合征、前白血病、与CD19的表达相关的非癌症相关适应症、与BCMA的表达相关的非癌症相关适应症以及与CD22的表达相关的非癌症相关适应症。

399. 如权利要求397所述的方法,其中所述疾病是选自自由以下组成的组的血液癌症:B细胞急性淋巴细胞性白血病(B-ALL)、T细胞急性淋巴细胞性白血病(T-ALL)、急性淋巴母细胞性白血病(ALL);慢性骨髓源性白血病(CML)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、B细胞前淋巴细胞性白血病、母细胞性浆细胞样树突细胞赘瘤、伯基特氏淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、毛细胞白血病、小细胞滤泡性淋巴瘤、大细胞滤泡性淋巴瘤、恶性淋巴组织增生性疾病、MALT淋巴瘤、套膜细胞淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、多发性骨髓瘤、骨髓发育不良、骨髓发育不良综合征、非霍奇金氏淋巴瘤、浆母细胞性淋巴瘤、浆细胞样树突细胞赘瘤、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、前白血病、与CD19、BCMA或CD22表达相关的疾病及其组合。

400. 如权利要求397所述的方法,其中表达第一TFP分子和第二TFP分子的所述细胞与使表达所述第一TFP分子和所述第二TFP分子的细胞的功效增加的药剂组合施用。

401. 如权利要求397-400中任一项所述的方法,其中相较于被施用有效量的表达以下各物的T细胞的哺乳动物,在所述哺乳动物中释放较少细胞因子:

- (a) 抗CD19嵌合抗原受体(CAR);
- (b) 抗BCMA CAR;
- (c) 抗CD22 CAR;
- (d) 抗CD19 CAR和抗BCMA CAR;
- (e) 抗CD19 CAR和抗CD22 CAR;或
- (f) 其组合。

402. 如权利要求397-401中任一项所述的方法,其中表达所述第一TFP分子和第二TFP分子的所述细胞与改善一种或多种与施用表达所述第一TFP分子和所述第二TFP分子的细胞相关的副作用的药剂组合施用。

403. 如权利要求397-402中任一项所述的方法,其中表达所述第一TFP分子和第二TFP分子的所述细胞与治疗与CD19、BCMA或CD22相关的所述疾病的药剂组合施用。

404. 如权利要求284-329中任一项所述的经分离核酸分子、如权利要求330或331所述的多肽分子、如权利要求332-352中任一项所述的经分离重组TFP分子、如权利要求353-363中任一项所述的核酸、如权利要求364-371中任一项所述的载体、如权利要求379-385中任一项所述的复合物、或如权利要求372-376和386-390中任一项所述的细胞或细胞群体,其

用作药剂。

405. 一种治疗患有与CD19、BCMA或CD22的表达相关的疾病的哺乳动物的方法,其包括向所述哺乳动物施用有效量的如权利要求284-329中任一项所述的经分离核酸分子、如权利要求330或331所述的多肽分子、表达如权利要求330或331所述的多肽分子的细胞、如权利要求379-385中任一项所述的经分离重组TFP分子、如权利要求353-363中任一项所述的核酸、如权利要求364-371中任一项所述的载体、或如权利要求372-376和386-390中任一项所述的细胞或细胞群体,其中相较于被施用有效量的表达以下各物的T细胞的哺乳动物,在所述哺乳动物中释放较少细胞因子:

- (a) 抗CD19嵌合抗原受体 (CAR) ;
- (b) 抗BCMA CAR;
- (c) 抗CD22 CAR;
- (d) 抗CD19 CAR和抗BCMA CAR;
- (e) 抗CD19 CAR和抗CD22 CAR;或
- (f) 其组合。

## 用于使用融合蛋白进行TCR重新编程的组合物和方法

[0001] 交叉引用

[0002] 本申请要求2016年11月22日提交的美国临时申请号62/425,407、2016年11月22日提交的美国临时申请号62/425,535、2016年11月23日提交的美国临时申请号62/425,697和2016年11月23日提交的美国临时申请号62/425,884的权益,所述美国临时申请各自以引用的方式整体并入本文。

[0003] 发明背景

[0004] 大多数患有血液恶性肿瘤或患有晚期实体肿瘤的患者不可用标准疗法治愈。此外,传统治疗选项经常具有严重副作用。已进行众多尝试来利用患者的免疫系统排斥癌细胞,这是一种总称为癌症免疫疗法的方法。然而,若干障碍使得相当难以实现临床有效性。尽管已鉴定数百个所谓肿瘤抗原,但这些肿瘤抗原经常源于自身,因此可引导癌症免疫疗法对抗健康组织,或具有不良免疫原性。此外,癌细胞使用多种机理来致使它们自身不可见或阻碍由癌症免疫疗法达成的免疫攻击的启动和传播。

[0005] 使用依赖于使经遗传工程改造的T细胞重定向于癌细胞上的适合细胞表面分子的经嵌合抗原受体(CAR)修饰的自体T细胞疗法获得的新近发展在利用免疫系统的效力来治疗癌症方面显示有希望的结果。举例来说,来自正在用B细胞成熟抗原(BCMA)特异性CAR T细胞进行的试验的临床结果已显示在一些多发性骨髓瘤患者中的部分缓解(一个所述试验可通过clinicaltrials.gov标识符NCT02215967而得见)。一种替代性方法是使用关于肿瘤相关肽抗原加以选择的T细胞受体(TCR) $\alpha$ 和 $\beta$ 链来遗传工程改造自体T细胞。这些TCR链将形成完整TCR复合物,并且提供具有用于达成第二确定特异性的TCR的T细胞。用表达NY-ESO-1特异性TCR $\alpha$ 和 $\beta$ 链的经工程改造自体T细胞在患有滑膜癌的患者中获得了令人鼓舞的结果。大多数患有晚期实体肿瘤的患者不可用标准疗法治愈。此外,传统治疗选项经常具有严重副作用。已进行众多尝试来利用患者的免疫系统排斥癌细胞,这是一种总称为癌症免疫疗法的方法。然而,若干障碍使得相当难以实现临床有效性。尽管已鉴定数百个所谓肿瘤抗原,但这些肿瘤抗原经常源于自身,因此可引导癌症免疫疗法对抗健康组织,或具有不良免疫原性。此外,癌细胞使用多种机理来致使它们自身不可见或阻碍由癌症免疫疗法达成的免疫攻击的启动和传播。

[0006] 在结合在自体肿瘤细胞和受病毒感染细胞的表面处显示的各种细胞应激诱导性配体后,NKG2D充当免疫监视中涉及的活化性和共刺激性受体。NKG2D在活化的杀伤(NK)细胞上提供刺激性先天性免疫应答与共刺激性先天性免疫应答两者,从而导致细胞毒性活性。NKG2D通过使T细胞活化扩大来在CD8<sup>+</sup>T细胞介导的适应性免疫应答中充当T细胞受体(TCR)的共刺激性受体。刺激穿孔素(perforin)介导的对配体表达性肿瘤细胞的消除。NKG2D信号传导涉及钙流入,从而导致TNF- $\alpha$ 的表达。NKG2D参与NK细胞介导的骨髓移植排斥,并且可在NK细胞的分化和存活方面起调控作用。NKG2D结合属于I类MHC相关糖蛋白的各个亚家族的配体,包括MICA、MICB、RAET1E、RAET1G、ULBP1、ULBP2、ULBP3 (ULBP2>ULBP1>ULBP3) 和ULBP4。

[0007] ROR1在恶性B细胞(B-CLL)和套膜细胞淋巴瘤(MCL)的细胞表面上表达。也已报道

ROR1在某些其他癌细胞系中表达,包括伯克特氏淋巴瘤(Burkett's lymphoma)、肾细胞癌、结肠癌和乳腺癌细胞系。

[0008] CD16是一种低亲和力Fc受体。它是一种见于天然杀伤细胞、嗜中性白细胞多形核白细胞、单核细胞和巨噬细胞的表面上的分化簇分子。它已被鉴定为Fc受体Fc $\gamma$ RIIIa(CD16a)和Fc $\gamma$ RIIIb(CD16b)。这些受体结合IgG抗体的Fc部分,此接着使NK细胞活化以达成抗体依赖性细胞介导的细胞毒性。

[0009] 除经遗传修饰的表达CAR或第二TCR的T细胞在体外/离体识别和破坏相应靶标细胞的能力之外,用经工程改造T细胞达成成功患者疗法也需要T细胞能够强力活化、扩增、随时间持续,并且在复发疾病的情况下,能够实现‘记忆’应答。CAR T细胞的高度和可管理临床功效当前限于间皮素(mesothelin)阳性B细胞恶性肿瘤和表达HLA-A2的NY-ESO-1肽表达性滑膜肉瘤患者。存在对使经遗传工程改造的T细胞改进以更广泛针对各种人恶性肿瘤起作用的明确需要。本文描述有可能克服现有方法的限制的包括CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\gamma$ 和CD3 $\delta$ 的TCR亚单位的新型融合蛋白以及具有对细胞表面抗原具有特异性的结合结构域的TCR $\alpha$ 和TCR $\beta$ 链的新型融合蛋白。本文描述相比于CAR,更高效杀灭靶标细胞,但释放类似或较低水平的促炎性细胞因子的新型融合蛋白。这些融合蛋白和它们的使用方法代表T细胞受体(TCR)融合蛋白(TFP)相对于CAR的优势,因为这些细胞因子的水平升高已与继承性CAR-T疗法的剂量限制性毒性相关联。

## 发明内容

[0010] 在一些方面,本文提供一种编码包含以下的T细胞受体(TCR)融合蛋白(TFP)的经分离重组核酸分子:TCR亚单位,其包含TCR细胞外结构域的至少一部分,和包含来自选自由CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 、TCR $\alpha$ 和TCR $\beta$ 组成的组的细胞内信号传导结构域的刺激结构域的TCR细胞内结构域;以及能够结合抗体或其片段的结合配体或其片段;其中所述TCR亚单位和所述结合配体操作性地连接,并且其中所述TFP在T细胞中表达时并入TCR中。

[0011] 在一些实施方案中,结合配体能够结合抗体的Fc结构域。在一些实施方案中,结合配体能够选择性结合IgG1抗体。在一些实施方案中,结合配体能够特异性结合IgG1抗体。在一些实施方案中,抗体或其片段结合细胞表面抗原。在一些实施方案中,抗体或其片段结合肿瘤细胞的表面上的细胞表面抗原。在一些实施方案中,结合配体包含单体、二聚体、三聚体、四聚体、五聚体、六聚体、七聚体、八聚体、九聚体或十聚体。在一些实施方案中,结合配体不包含抗体或其片段。在一些实施方案中,结合配体包含CD16多肽或其片段。在一些实施方案中,结合配体包含CD16结合多肽。在一些实施方案中,结合配体是人结合配体或人源化结合配体。在一些实施方案中,经分离核酸分子进一步包含编码能够由结合配体结合的抗体或其片段的核酸序列。在一些实施方案中,抗体或其片段能够从细胞分泌。

[0012] 在一些方面,本文提供一种编码包含以下的T细胞受体(TCR)融合蛋白(TFP)的经分离重组核酸分子:TCR亚单位,其包含TCR细胞外结构域的至少一部分,和包含来自选自由CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 、TCR $\alpha$ 和TCR $\beta$ 组成的组的细胞内信号传导结构域的刺激结构域的TCR细胞内结构域;以及包含结合在细胞的表面上表达的受体或多肽的配体或其片段的抗原结构域;其中所述TCR亚单位和所述抗原结构域操作性地连接,并且其中所述TFP在T细胞中表达时并入TCR中。

[0013] 在一些实施方案中,抗原结构域包含配体。在一些实施方案中,配体结合细胞的受体。在一些实施方案中,配体结合在细胞的表面上表达的多肽。在一些实施方案中,在细胞的表面上表达的受体或多肽包括应激应答受体或多肽。在一些实施方案中,在细胞的表面上表达的受体或多肽是I类MHC相关糖蛋白。在一些实施方案中,I类MHC相关糖蛋白选自自由以下组成的组:MICA、MICB、RAET1E、RAET1G、ULBP1、ULBP2、ULBP3、ULBP4及其组合。在一些实施方案中,抗原结构域包含单体、二聚体、三聚体、四聚体、五聚体、六聚体、七聚体、八聚体、九聚体或十聚体。在一些实施方案中,抗原结构域包含配体或其片段的单体或二聚体。在一些实施方案中,配体或其片段是单体、二聚体、三聚体、四聚体、五聚体、六聚体、七聚体、八聚体、九聚体或十聚体。在一些实施方案中,配体或其片段是单体或二聚体。在一些实施方案中,抗原结构域不包含抗体或其片段。在一些实施方案中,抗原结构域不包含可变区。在一些实施方案中,抗原结构域不包含CDR。在一些实施方案中,配体或其片段是天然杀伤组2D (NKG2D) 配体或其片段。在一些实施方案中,TCR亚单位包含第一TCR亚单位和第二TCR亚单位,其中抗原结构域包含第一抗原结构域和第二抗原结构域,其中所述第一TCR亚单位操作性地连接于所述第一抗原结构域,并且其中所述第二TCR亚单位操作性地连接于所述第二抗原结构域。在一些实施方案中,抗原结构域是人抗原结构域或人源化抗原结构域。

[0014] 在一些方面,本文提供一种编码包含以下的T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP) 的经分离重组核酸分子:TCR亚单位,其包含TCR细胞外结构域的至少一部分,和包含来自CD3 $\epsilon$ 的细胞内信号传导结构域的刺激结构域的TCR细胞内结构域;以及包含CD16多肽或其片段的结合配体;其中所述TCR亚单位和所述结合配体操作性地连接,并且其中所述TFP在T细胞中表达时并入TCR中。

[0015] 在一些方面,本文提供一种编码包含以下的T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP) 的经分离重组核酸分子:TCR亚单位,其包含TCR细胞外结构域的至少一部分,和包含来自CD3 $\gamma$ 的细胞内信号传导结构域的刺激结构域的TCR细胞内结构域;以及包含CD16多肽或其片段的结合配体;其中所述TCR亚单位和所述结合配体操作性地连接,并且其中所述TFP在T细胞中表达时并入TCR中。

[0016] 在一些方面,本文提供一种编码包含以下的T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP) 的经分离重组核酸分子:TCR亚单位,其包含TCR细胞外结构域的至少一部分,和包含来自CD3 $\delta$ 的细胞内信号传导结构域的刺激结构域的TCR细胞内结构域;以及包含CD16多肽或其片段的结合配体;其中所述TCR亚单位和所述结合配体操作性地连接,并且其中所述TFP在T细胞中表达时并入TCR中。

[0017] 在一些方面,本文提供一种编码包含以下的T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP) 的经分离重组核酸分子:TCR亚单位,其包含TCR细胞外结构域的至少一部分,和包含来自TCR $\alpha$ 的细胞内信号传导结构域的刺激结构域的TCR细胞内结构域;以及包含CD16多肽或其片段的结合配体;其中所述TCR亚单位和所述结合配体操作性地连接,并且其中所述TFP在T细胞中表达时并入TCR中。

[0018] 在一些方面,本文提供一种编码包含以下的T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP) 的经分离重组核酸分子:TCR亚单位,其包含TCR细胞外结构域的至少一部分,和包含来自TCR $\beta$ 的细胞内信号传导结构域的刺激结构域的TCR细胞内结构域;以及包含CD16多肽或其片段的结合配体;其中所述TCR亚单位和所述结合配体操作性地连接,并且其中所述TFP在T细胞

中表达时并入TCR中。

[0019] 在一些方面,本文提供一种编码包含以下的T细胞受体(TCR)融合蛋白(TFP)的经分离重组核酸分子:TCR亚单位和能够结合抗体或其片段的结合配体。

[0020] 在一些方面,本文提供一种编码包含以下的T细胞受体(TCR)融合蛋白(TFP)的经分离重组核酸分子:TCR亚单位和包含CD16多肽或其片段的结合配体。

[0021] 在一些方面,本文提供一种编码包含以下的T细胞受体(TCR)融合蛋白(TFP)的经分离重组核酸分子:TCR亚单位,其包含TCR细胞外结构域的至少一部分,和包含来自CD3 $\epsilon$ 的细胞内信号传导结构域的刺激性结构域的TCR细胞内结构域;以及包含是抗受体酪氨酸激酶样孤儿受体1(ROR1)结合结构域的抗原结合结构域的人或人源化抗体结构域;其中所述TCR亚单位和所述抗体结构域操作性地连接,并且其中所述TFP在T细胞中表达时并入TCR中。

[0022] 在一些方面,本文提供一种编码包含以下的T细胞受体(TCR)融合蛋白(TFP)的经分离重组核酸分子:TCR亚单位,其包含TCR细胞外结构域的至少一部分,和包含来自CD3 $\gamma$ 的细胞内信号传导结构域的刺激性结构域的TCR细胞内结构域;以及包含是抗受体酪氨酸激酶样孤儿受体1(ROR1)结合结构域的抗原结合结构域的人或人源化抗体结构域;其中所述TCR亚单位和所述抗体结构域操作性地连接,并且其中所述TFP在T细胞中表达时并入TCR中。

[0023] 在一些方面,本文提供一种编码包含以下的T细胞受体(TCR)融合蛋白(TFP)的经分离重组核酸分子:TCR亚单位,其包含TCR细胞外结构域的至少一部分,和包含来自CD3 $\delta$ 的细胞内信号传导结构域的刺激性结构域的TCR细胞内结构域;以及包含是抗受体酪氨酸激酶样孤儿受体1(ROR1)结合结构域的抗原结合结构域的人或人源化抗体结构域;其中所述TCR亚单位和所述抗体结构域操作性地连接,并且其中所述TFP在T细胞中表达时并入TCR中。

[0024] 在一些方面,本文提供一种编码包含以下的T细胞受体(TCR)融合蛋白(TFP)的经分离重组核酸分子:TCR亚单位,其包含TCR细胞外结构域的至少一部分,和包含来自TCR $\alpha$ 的细胞内信号传导结构域的刺激性结构域的TCR细胞内结构域;以及包含是抗受体酪氨酸激酶样孤儿受体1(ROR1)结合结构域的抗原结合结构域的人或人源化抗体结构域;其中所述TCR亚单位和所述抗体结构域操作性地连接,并且其中所述TFP在T细胞中表达时并入TCR中。

[0025] 在一些方面,本文提供一种编码包含以下的T细胞受体(TCR)融合蛋白(TFP)的经分离重组核酸分子:TCR亚单位,其包含TCR细胞外结构域的至少一部分,和包含来自TCR $\beta$ 的细胞内信号传导结构域的刺激性结构域的TCR细胞内结构域;以及包含是抗受体酪氨酸激酶样孤儿受体1(ROR1)结合结构域的抗原结合结构域的人或人源化抗体结构域;其中所述TCR亚单位和所述抗体结构域操作性地连接,并且其中所述TFP在T细胞中表达时并入TCR中。

[0026] 在一些方面,本文提供一种编码包含以下的T细胞受体(TCR)融合蛋白(TFP)的经分离重组核酸分子:TCR亚单位和包含是抗ROR1结合结构域的抗原结合结构域的人或人源化抗体结构域。

[0027] 在一些方面,本文提供一种编码包含以下的T细胞受体(TCR)融合蛋白(TFP)的经

分离重组核酸分子:TCR亚单位,其包含TCR细胞外结构域的至少一部分,和包含来自CD3 $\epsilon$ 的细胞内信号传导结构域的刺激性结构域的TCR细胞内结构域;以及包含是天然杀伤组2D (NKG2D) 配体或其片段的配体的抗原结构域;其中所述TCR亚单位和所述抗原结构域操作性地连接,并且其中所述TFP在T细胞中表达时并入TCR中。

[0028] 在一些方面,本文提供一种编码包含以下的T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP) 的经分离重组核酸分子:TCR亚单位,其包含TCR细胞外结构域的至少一部分,和包含来自CD3 $\gamma$ 的细胞内信号传导结构域的刺激性结构域的TCR细胞内结构域;以及包含是天然杀伤组2D (NKG2D) 配体或其片段的配体的抗原结构域;其中所述TCR亚单位和所述抗原结构域操作性地连接,并且其中所述TFP在T细胞中表达时并入TCR中。

[0029] 在一些方面,本文提供一种编码包含以下的T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP) 的经分离重组核酸分子:TCR亚单位,其包含TCR细胞外结构域的至少一部分,和包含来自CD3 $\delta$ 的细胞内信号传导结构域的刺激性结构域的TCR细胞内结构域;以及包含是天然杀伤组2D (NKG2D) 配体或其片段的配体的抗原结构域;其中所述TCR亚单位和所述抗原结构域操作性地连接,并且其中所述TFP在T细胞中表达时并入TCR中。

[0030] 在一些方面,本文提供一种编码包含以下的T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP) 的经分离重组核酸分子:TCR亚单位,其包含TCR细胞外结构域的至少一部分,和包含来自TCR $\alpha$ 的细胞内信号传导结构域的刺激性结构域的TCR细胞内结构域;以及包含是天然杀伤组2D (NKG2D) 配体或其片段的配体的抗原结构域;其中所述TCR亚单位和所述抗原结构域操作性地连接,并且其中所述TFP在T细胞中表达时并入TCR中。

[0031] 在一些方面,本文提供一种编码包含以下的T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP) 的经分离重组核酸分子:TCR亚单位,其包含TCR细胞外结构域的至少一部分,和包含来自TCR $\beta$ 的细胞内信号传导结构域的刺激性结构域的TCR细胞内结构域;以及包含是天然杀伤组2D (NKG2D) 配体或其片段的配体的抗原结构域;其中所述TCR亚单位和所述抗原结构域操作性地连接,并且其中所述TFP在T细胞中表达时并入TCR中。

[0032] 在一些方面,本文提供一种编码包含以下的T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP) 的经分离重组核酸分子:TCR亚单位和抗原结构域。

[0033] 在一些方面,本文提供一种编码包含以下的T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP) 的经分离重组核酸分子:TCR亚单位和包含是天然杀伤组2D (NKG2D) 配体或其片段的配体的抗原结构域。

[0034] 在一些实施方案中,TCR亚单位和抗原结构域操作性地连接。在一些实施方案中,TFP在T细胞中表达时并入TCR中。在一些实施方案中,抗原结构域是人抗原结构域或人源化抗原结构域。在一些实施方案中,天然杀伤组2D (NKG2D) 配体或其片段结合细胞的受体。在一些实施方案中,天然杀伤组2D (NKG2D) 配体或其片段结合在细胞的表面上表达的多肽。在一些实施方案中,天然杀伤组2D (NKG2D) 配体或其片段结合应激应答受体或多肽。在一些实施方案中,天然杀伤组2D (NKG2D) 配体或其片段结合I类MHC相关糖蛋白。在一些实施方案中,I类MHC相关糖蛋白选自自由以下组成的组:MICA、MICB、RAET1E、RAET1G、ULBP1、ULBP2、ULBP3、ULBP4及其组合。在一些实施方案中,抗原结构域包含天然杀伤组2D (NKG2D) 配体或其片段的单体、二聚体、三聚体、四聚体、五聚体、六聚体、七聚体、八聚体、九聚体或十聚体。在一些实施方案中,抗原结构域包含天然杀伤组2D (NKG2D) 配体或其片段的单体或二聚体。



在一些实施方案中,天然杀伤组2D (NKG2D) 配体或其片段是单体、二聚体、三聚体、四聚体、五聚体、六聚体、七聚体、八聚体、九聚体或十聚体。在一些实施方案中,天然杀伤组2D (NKG2D) 配体或其片段是单体或二聚体。在一些实施方案中,抗原结构域不包含抗体或其片段。在一些实施方案中,抗原结构域不包含可变区。在一些实施方案中,抗原结构域不包含CDR。在一些实施方案中,TCR亚单位包含第一TCR亚单位和第二TCR亚单位,其中抗原结构域包含第一抗原结构域和第二抗原结构域,其中所述第一TCR亚单位操作性地连接于所述第一抗原结构域,并且其中所述第二TCR亚单位操作性地连接于所述第二抗原结构域。在一些实施方案中,所编码配体通过接头序列来连接于TCR细胞外结构域。

[0035] 在一些方面,本文提供一种经分离重组核酸分子,其编码包含以下的第一T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP): TCR亚单位,其包含TCR细胞外结构域的至少一部分,和包含来自CD3 $\epsilon$ 的细胞内信号传导结构域的刺激结构域的TCR细胞内结构域;以及包含第一抗原结合结构域的第一人或人源化抗体结构域;和包含以下的第二T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP): 包含TCR细胞外结构域的至少一部分的TCR亚单位,以及包含第二抗原结合结构域的第二人或人源化抗体结构域;其中所述第一TFP的所述TCR亚单位和所述第一抗体结构域操作性地连接,并且所述第二TFP的所述TCR亚单位和所述第二抗体结构域操作性地连接,并且其中所述第一TFP和所述第二TFP在T细胞中表达时并入TCR中。

[0036] 在一些方面,本文提供一种经分离重组核酸分子,其编码包含以下的第一T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP): TCR亚单位,其包含TCR细胞外结构域的至少一部分,和包含来自CD3 $\gamma$ 的细胞内信号传导结构域的刺激结构域的TCR细胞内结构域;以及包含第一抗原结合结构域的第一人或人源化抗体结构域;和包含以下的第二T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP): 包含TCR细胞外结构域的至少一部分的TCR亚单位,以及包含第二抗原结合结构域的第二人或人源化抗体结构域;其中所述第一TFP的所述TCR亚单位和所述第一抗体结构域操作性地连接,并且所述第二TFP的所述TCR亚单位和所述第二抗体结构域操作性地连接,并且其中所述第一TFP和所述第二TFP在T细胞中表达时并入TCR中。

[0037] 在一些方面,本文提供一种经分离重组核酸分子,其编码包含以下的第一T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP): TCR亚单位,其包含TCR细胞外结构域的至少一部分,和包含来自CD3 $\delta$ 的细胞内信号传导结构域的刺激结构域的TCR细胞内结构域;以及包含第一抗原结合结构域的第一人或人源化抗体结构域;和包含以下的第二T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP): 包含TCR细胞外结构域的至少一部分的TCR亚单位,以及包含第二抗原结合结构域的第二人或人源化抗体结构域;其中所述第一TFP的所述TCR亚单位和所述第一抗体结构域操作性地连接,并且所述第二TFP的所述TCR亚单位和所述第二抗体结构域操作性地连接,并且其中所述第一TFP和所述第二TFP在T细胞中表达时并入TCR中。

[0038] 在一些方面,本文提供一种经分离重组核酸分子,其编码包含以下的第一T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP): TCR亚单位,其包含TCR细胞外结构域的至少一部分,和包含来自TCR $\alpha$ 的细胞内信号传导结构域的刺激结构域的TCR细胞内结构域;以及包含第一抗原结合结构域的第一人或人源化抗体结构域;和包含以下的第二T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP): 包含TCR细胞外结构域的至少一部分的TCR亚单位,以及包含第二抗原结合结构域的第二人或人源化抗体结构域;其中所述第一TFP的所述TCR亚单位和所述第一抗体结构域操作性地连接,并且所述第二TFP的所述TCR亚单位和所述第二抗体结构域操作性地连接,并

且其中所述第一TFP和所述第二TFP在T细胞中表达时并入TCR中。

[0039] 在一些方面,本文提供一种经分离重组核酸分子,其编码包含以下的第一T细胞受体(TCR)融合蛋白(TFP):TCR亚单位,其包含TCR细胞外结构域的至少一部分,和包含来自TCR $\beta$ 的细胞内信号传导结构域的刺激性结构域的TCR细胞内结构域;以及包含第一抗原结合结构域的第一人或人源化抗体结构域;和包含以下的第二T细胞受体(TCR)融合蛋白(TFP):包含TCR细胞外结构域的至少一部分的TCR亚单位,以及包含第二抗原结合结构域的第二人或人源化抗体结构域;其中所述第一TFP的所述TCR亚单位和所述第一抗体结构域操作性地连接,并且所述第二TFP的所述TCR亚单位和所述第二抗体结构域操作性地连接,并且其中所述第一TFP和所述第二TFP在T细胞中表达时并入TCR中。

[0040] 在一些实施方案中,第二TFP的TCR亚单位进一步包含TCR细胞内结构域,其包含来自选自自由TCR $\alpha$ 、TCR $\beta$ 、CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\gamma$ 和CD3 $\delta$ 组成的组的细胞内信号传导结构域或其功能性片段的刺激性结构域。

[0041] 在一些方面,本文提供一种经分离重组核酸分子,其编码包含以下的第一T细胞受体(TCR)融合蛋白(TFP):TCR亚单位,其包含TCR细胞外结构域的至少一部分,和包含来自CD3 $\epsilon$ 的细胞内信号传导结构域的刺激性结构域的TCR细胞内结构域;以及包含第一抗原结合结构域的第一人或人源化抗体结构域和包含第二抗原结合结构域的第二人或人源化抗体结构域;其中所述TCR亚单位、所述第一抗体结构域和所述第二抗体结构域操作性地连接,并且其中所述第一TFP在T细胞中表达时并入TCR中。

[0042] 在一些方面,本文提供一种经分离重组核酸分子,其编码包含以下的第一T细胞受体(TCR)融合蛋白(TFP):TCR亚单位,其包含TCR细胞外结构域的至少一部分,和包含来自CD3 $\gamma$ 的细胞内信号传导结构域的刺激性结构域的TCR细胞内结构域;以及包含第一抗原结合结构域的第一人或人源化抗体结构域和包含第二抗原结合结构域的第二人或人源化抗体结构域;其中所述TCR亚单位、所述第一抗体结构域和所述第二抗体结构域操作性地连接,并且其中所述第一TFP在T细胞中表达时并入TCR中。

[0043] 在一些方面,本文提供一种经分离重组核酸分子,其编码包含以下的第一T细胞受体(TCR)融合蛋白(TFP):TCR亚单位,其包含TCR细胞外结构域的至少一部分,和包含来自CD3 $\delta$ 的细胞内信号传导结构域的刺激性结构域的TCR细胞内结构域;以及包含第一抗原结合结构域的第一人或人源化抗体结构域和包含第二抗原结合结构域的第二人或人源化抗体结构域;其中所述TCR亚单位、所述第一抗体结构域和所述第二抗体结构域操作性地连接,并且其中所述第一TFP在T细胞中表达时并入TCR中。

[0044] 在一些方面,本文提供一种经分离重组核酸分子,其编码包含以下的第一T细胞受体(TCR)融合蛋白(TFP):TCR亚单位,其包含TCR细胞外结构域的至少一部分,和包含来自TCR $\alpha$ 的细胞内信号传导结构域的刺激性结构域的TCR细胞内结构域;以及包含第一抗原结合结构域的第一人或人源化抗体结构域和包含第二抗原结合结构域的第二人或人源化抗体结构域;其中所述TCR亚单位、所述第一抗体结构域和所述第二抗体结构域操作性地连接,并且其中所述第一TFP在T细胞中表达时并入TCR中。

[0045] 在一些方面,本文提供一种经分离重组核酸分子,其编码包含以下的第一T细胞受体(TCR)融合蛋白(TFP):TCR亚单位,其包含TCR细胞外结构域的至少一部分,和包含来自TCR $\beta$ 的细胞内信号传导结构域的刺激性结构域的TCR细胞内结构域;以及包含第一抗原结

合结构域的第一人或人源化抗体结构域和包含第二抗原结合结构域的第二人或人源化抗体结构域；其中所述TCR亚单位、所述第一抗体结构域和所述第二抗体结构域操作性地连接，并且其中所述第一TFP在T细胞中表达时并入TCR中。

[0046] 在一些实施方案中，第一抗原结合结构域或第二抗原结合结构域是抗CD19结合结构域。在一些实施方案中，第一抗原结合结构域或第二抗原结合结构域是抗B细胞成熟抗原(BCMA)结合结构域。在一些实施方案中，第一抗原结合结构域或第二抗原结合结构域是抗CD22结合结构域。

[0047] 在一些方面，本文提供一种经分离重组核酸分子，其编码：包含以下的第一T细胞受体(TCR)融合蛋白(TFP)：TCR亚单位、包含是抗CD19结合结构域的第一抗原结合结构域的第一人或人源化抗体结构域；和包含以下的第二T细胞受体(TCR)融合蛋白(TFP)：TCR亚单位、包含是抗BCMA结合结构域的第二抗原结合结构域的第二人或人源化抗体结构域。

[0048] 在一些方面，本文提供一种经分离重组核酸分子，其编码：包含以下的第一T细胞受体(TCR)融合蛋白(TFP)：TCR亚单位、包含是抗CD19结合结构域的第一抗原结合结构域的第一人或人源化抗体结构域；和包含以下的第二T细胞受体(TCR)融合蛋白(TFP)：TCR亚单位、包含是抗CD22结合结构域的第二抗原结合结构域的第二人或人源化抗体结构域。

[0049] 在一些实施方案中，第一TFP的TCR亚单位和第一抗体结构域操作性地连接，并且第二TFP的TCR亚单位和第二抗体结构域操作性地连接。在一些实施方案中，第一TFP、第二TFP或两者在T细胞中表达时并入TCR中。在一些实施方案中，所编码第一抗原结合结构域通过第一接头序列来连接于第一TFP的TCR细胞外结构域，所编码第二抗原结合结构域通过第二接头序列来连接于第二TFP的TCR细胞外结构域，或第一抗原结合结构域通过第一接头序列来连接于第一TFP的TCR细胞外结构域，并且所编码第二抗原结合结构域通过第二接头序列来连接于第二TFP的TCR细胞外结构域。在一些实施方案中，第一接头序列和第二接头序列包含(G4S)<sub>n</sub>，其中n=1至4。在一些实施方案中，第一TFP的TCR亚单位、第二TFP的TCR亚单位或两者包含TCR细胞外结构域。在一些实施方案中，第一TFP的TCR亚单位、第二TFP的TCR亚单位或两者包含TCR跨膜结构域。在一些实施方案中，第一TFP的TCR亚单位、第二TFP的TCR亚单位或两者包含TCR细胞内结构域。在一些实施方案中，第一TFP的TCR亚单位、第二TFP的TCR亚单位或两者包含(i) TCR细胞外结构域，(ii) TCR跨膜结构域，和(iii) TCR细胞内结构域，其中(i)、(ii)和(iii)中的至少两者来自同一TCR亚单位。在一些实施方案中，第一TFP的TCR亚单位、第二TFP的TCR亚单位或两者包含TCR细胞内结构域，其包含选自CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\gamma$ 或CD3 $\delta$ 的细胞内信号传导结构域的刺激结构域或具有至少一个对其进行的修饰的氨基酸序列。在一些实施方案中，第一TFP的TCR亚单位、第二TFP的TCR亚单位或两者包含细胞内结构域，其包含选自4-1BB的功能性信号传导结构域和/或CD3 $\zeta$ 的功能性信号传导结构域的刺激结构域或具有至少一个对其进行的修饰的氨基酸序列。在一些实施方案中，第一人或人源化抗体结构域、第二人或人源化抗体结构域或两者包含抗体片段。在一些实施方案中，第一人或人源化抗体结构域、第二人或人源化抗体结构域或两者包含scFv或VH结构域。

[0050] 在一些实施方案中，经分离核酸分子编码(i)抗CD19轻链结合结构域氨基酸序列的分别与SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:29具有70-100%序列同一性的轻链(LC)CDR1、LC CDR2和LC CDR3，和/或(ii)抗CD19重链结合结构域氨基酸序列的分别与SEQ

ID NO:31、SEQ ID NO:33和SEQ ID NO:35具有70-100%序列同一性的重链(HC)CDR1、HC CDR2和HC CDR3。在一些实施方案中,经分离核酸分子编码轻链可变区,其中所述轻链可变区包含轻链可变区氨基酸序列SEQ ID NO:49的具有至少1个但不超过30个修饰的氨基酸序列,或与轻链可变区氨基酸序列SEQ ID NO:49具有95-99%同一性的序列。在一些实施方案中,经分离核酸分子编码重链可变区,其中所述重链可变区包含重链可变区氨基酸序列SEQ ID NO:51的具有至少1个但不超过30个修饰的氨基酸序列,或与重链可变区氨基酸序列SEQ ID NO:51具有95-99%同一性的序列。在一些实施方案中,经分离核酸分子编码(i)抗BCMA轻链结合结构域氨基酸序列的分别与SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39和SEQ ID NO:41具有70-100%序列同一性的轻链(LC)CDR1、LC CDR2和LC CDR3,和/或(ii)抗BCMA重链结合结构域氨基酸序列的分别与SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:45和SEQ ID NO:47具有70-100%序列同一性的重链(HC)CDR1、HC CDR2和HC CDR3。在一些实施方案中,经分离核酸分子编码轻链可变区,其中所述轻链可变区包含轻链可变区氨基酸序列SEQ ID NO:53的具有至少1个但不超过30个修饰的氨基酸序列,或与轻链可变区氨基酸序列SEQ ID NO:53具有95-99%同一性的序列。在一些实施方案中,经分离核酸分子编码重链可变区,其中所述重链可变区包含重链可变区氨基酸序列SEQ ID NO:55的具有至少1个但不超过30个修饰的氨基酸序列,或与重链可变区氨基酸序列SEQ ID NO:55具有95-99%同一性的序列。在一些实施方案中,抗CD22抗原结合结构域包含如本文所述的可变区或一个或多个如本文所述的CDR。

[0051] 在一些实施方案中,所编码第一TFP、所编码第二TFP或两者包括TCR亚单位的细胞外结构域,其包括选自由以下组成的组的蛋白质的细胞外结构域或其部分、其功能性片段及其具有至少1个但不超过20个修饰的氨基酸序列:TCR $\alpha$ 链、TCR $\beta$ 链、CD3 $\epsilon$  TCR亚单位、CD3 $\gamma$  TCR亚单位、CD3 $\delta$  TCR亚单位。在一些实施方案中,所编码第一TFP和所编码第二TFP包括跨膜结构域,其包括选自由以下组成的组的蛋白质的跨膜结构域、其功能性片段及其具有至少1个但不超过20个修饰的氨基酸序列:TCR $\alpha$ 链、TCR $\beta$ 链、CD3 $\epsilon$  TCR亚单位、CD3 $\gamma$  TCR亚单位、CD3 $\delta$  TCR亚单位。在一些实施方案中,所编码第一TFP和所编码第二TFP包括跨膜结构域,其包括选自由以下组成的组的蛋白质的跨膜结构域、其功能性片段及其具有至少1个但不超过20个修饰的氨基酸序列:TCR $\alpha$ 链、TCR $\beta$ 链、TCR $\zeta$ 链、CD3 $\epsilon$  TCR亚单位、CD3 $\gamma$  TCR亚单位、CD3 $\delta$  TCR亚单位、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD28、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154。在一些实施方案中,TCR亚单位和结合配体操作性地连接。在一些实施方案中,TCR亚单位和抗体结构域操作性地连接。在一些实施方案中,TFP在T细胞中表达时并入TCR中。在一些实施方案中,结合配体通过接头序列来连接于TCR细胞外结构域。在一些实施方案中,所编码抗原结合结构域通过接头序列来连接于TCR细胞外结构域。在一些实施方案中,接头序列包含(G4S) $n$ ,其中 $n=1$ 至4。在一些实施方案中,TCR亚单位包含TCR细胞外结构域。在一些实施方案中,TCR亚单位包含TCR跨膜结构域。在一些实施方案中,TCR亚单位包含TCR细胞内结构域。在一些实施方案中,TCR亚单位包含(i) TCR细胞外结构域,(ii) TCR跨膜结构域,和(iii) TCR细胞内结构域,并且其中(i)、(ii)和(iii)中的至少两者来自同一TCR亚单位。在一些实施方案中,TCR亚单位包含TCR细胞内结构域,其包含选自CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 的细胞内信号传导结构域的刺激结构域或具有至少一个对其进行的修饰的氨基酸序列。在一些实施方案中,TCR亚单位包含细胞内结构域,其包含选自4-1BB的功能性信号传导结构域和/或CD3 $\zeta$ 的功能性信号传导结构域的刺激结构域或具有至少一个对

其进行的修饰的氨基酸序列。在一些实施方案中,结合配体包含CD16结合抗体或抗体片段。在一些实施方案中,人或人源化抗体结构域包含抗体片段。在一些实施方案中,人或人源化抗体结构域包含scFv或VH结构域。

[0052] 在一些实施方案中,经分离核酸分子编码与本文提供的NKG2D配体具有70-100%序列同一性的NKG2D氨基酸序列。

[0053] 在一些实施方案中,经分离核酸分子编码与本文提供的CD16多肽具有约70至约100%序列同一性的CD16氨基酸序列。在一些实施方案中,经分离核酸分子编码(i)抗ROR1轻链结合结构域氨基酸序列的分别与本文提供的抗ROR1轻链结合结构域的轻链(LC)CDR1、LC CDR2和LC CDR3具有70-100%序列同一性的轻链(LC)CDR1、LC CDR2和LC CDR3,和/或(ii)抗ROR1重链结合结构域氨基酸序列的分别与本文提供的抗ROR1重链结合结构域的重链(HC)CDR1、HC CDR2和HC CDR3具有70-100%序列同一性的重链(HC)CDR1、HC CDR2和HC CDR3。在一些实施方案中,经分离核酸分子编码轻链可变区,其中所述轻链可变区包含本文提供的轻链可变区的轻链可变区氨基酸序列的具有至少1个但不超过30个修饰的氨基酸序列,或与本文提供的轻链可变区的轻链可变区氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。在一些实施方案中,经分离核酸分子编码重链可变区,其中所述重链可变区包含本文提供的重链可变区的重链可变区氨基酸序列的具有至少1个但不超过30个修饰的氨基酸序列,或与本文提供的重链可变区的重链可变区氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。

[0054] 在一些实施方案中,TFP包括TCR亚单位的细胞外结构域,其包括选自以下组成的组的蛋白质的细胞外结构域或其部分、其功能性片段及其具有至少1个但不超过20个修饰的氨基酸序列:TCR $\alpha$ 链、TCR $\beta$ 链、CD3 $\epsilon$  TCR亚单位、CD3 $\gamma$  TCR亚单位、CD3 $\delta$  TCR亚单位。在一些实施方案中,所编码TFP包括跨膜结构域,其包括选自以下组成的组的蛋白质的跨膜结构域、其功能性片段及其具有至少1个但不超过20个修饰的氨基酸序列:TCR $\alpha$ 链、TCR $\beta$ 链、CD3 $\epsilon$  TCR亚单位、CD3 $\gamma$  TCR亚单位、CD3 $\delta$  TCR亚单位。在一些实施方案中,所编码TFP包括跨膜结构域,其包括选自以下组成的组的蛋白质的跨膜结构域、其功能性片段及其具有至少1个但不超过20个修饰的氨基酸序列:TCR $\alpha$ 链、TCR $\beta$ 链、TCR $\zeta$ 链、CD3 $\epsilon$  TCR亚单位、CD3 $\gamma$  TCR亚单位、CD3 $\delta$  TCR亚单位、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD28、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154。在一些实施方案中,经分离核酸分子进一步包含编码共刺激性结构域的序列。在一些实施方案中,共刺激性结构域是从选自以下组成的组的蛋白质获得的功能性信号传导结构域及其具有至少1个但不超过20个对其进行的修饰的氨基酸序列:OX40、CD2、CD27、CD28、CD5、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)、ICOS (CD278) 和4-1BB (CD137)。在一些实施方案中,至少1个但不超过20个对其进行的修饰包括对介导细胞信号传导的氨基酸的修饰或对应答于配体与TFP结合加以磷酸化的氨基酸的修饰。在一些实施方案中,经分离核酸分子进一步包含编码细胞内信号传导结构域的序列。在一些实施方案中,经分离核酸分子进一步包含前导序列。在一些实施方案中,经分离核酸分子进一步包含蛋白酶裂解位点。在一些实施方案中,至少1个但不超过20个对其进行的修饰包括对介导细胞信号传导的氨基酸的修饰或对应答于配体与第一TFP、第二TFP或两者结合加以磷酸化的氨基酸的修饰。

[0055] 在一些实施方案中,经分离核酸分子是mRNA。

[0056] 在一些实施方案中,TFP包括TCR亚单位的免疫受体酪氨酸基活化基序(ITAM),其

包括选自由以下组成的组的蛋白质的ITAM或其部分、其功能性片段及其具有至少1个但不超过20个对其进行的修饰的氨基酸序列:CD3 $\zeta$  TCR亚单位、CD3 $\epsilon$  TCR亚单位、CD3 $\gamma$  TCR亚单位、CD3 $\delta$  TCR亚单位、TCR $\zeta$ 链、Fc $\epsilon$ 受体1链、Fc $\epsilon$ 受体2链、Fc $\gamma$ 受体1链、Fc $\gamma$ 受体2a链、Fc $\gamma$ 受体2b1链、Fc $\gamma$ 受体2b2链、Fc $\gamma$ 受体3a链、Fc $\gamma$ 受体3b链、Fc $\beta$ 受体1链、TYROBP (DAP12)、CD5、CD16a、CD16b、CD22、CD23、CD32、CD64、CD79a、CD79b、CD89、CD278、CD66d。在一些实施方案中,第一TFP、第二TFP或两者包括TCR亚单位的免疫受体酪氨酸基活化基序(ITAM),其包括选自由以下组成的组的蛋白质的ITAM或其部分、其功能性片段及其具有至少1个但不超过20个对其进行的修饰的氨基酸序列:CD3 $\zeta$  TCR亚单位、CD3 $\epsilon$  TCR亚单位、CD3 $\gamma$  TCR亚单位、CD3 $\delta$  TCR亚单位、TCR $\zeta$ 链、Fc $\epsilon$ 受体1链、Fc $\epsilon$ 受体2链、Fc $\gamma$ 受体1链、Fc $\gamma$ 受体2a链、Fc $\gamma$ 受体2b1链、Fc $\gamma$ 受体2b2链、Fc $\gamma$ 受体3a链、Fc $\gamma$ 受体3b链、Fc $\beta$ 受体1链、TYROBP (DAP12)、CD5、CD16a、CD16b、CD22、CD23、CD32、CD64、CD79a、CD79b、CD89、CD278、CD66d。在一些实施方案中,ITAM替代CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 或CD3 $\epsilon$ 的ITAM。在一些实施方案中,ITAM选自由CD3 $\zeta$  TCR亚单位、CD3 $\epsilon$  TCR亚单位、CD3 $\gamma$  TCR亚单位和CD3 $\delta$  TCR亚单位组成的组,并且替代选自由CD3 $\zeta$  TCR亚单位、CD3 $\epsilon$  TCR亚单位、CD3 $\gamma$  TCR亚单位和CD3 $\delta$  TCR亚单位组成的组的不同ITAM。

[0057] 在一些实施方案中,经分离核酸分子进一步包含前导序列。

[0058] 在一些方面,本文提供一种由本文所述的核酸分子编码的经分离多肽分子。在一些实施方案中,经分离多肽包含由第一核酸分子编码的第一多肽和由第二核酸分子编码的第二多肽。

[0059] 在一些方面,本文提供一种经分离重组TFP分子,其包含人或人源化CD16多肽或其片段、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域。

[0060] 在一些方面,本文提供一种经分离重组TFP分子,其包含人或人源化CD16多肽或其片段、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域,其中所述TFP分子能够功能性地与内源性TCR复合物和/或至少一种内源性TCR多肽相互作用。

[0061] 在一些方面,本文提供一种经分离重组TFP分子,其包含人或人源化CD16多肽或其片段、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域,其中所述TFP分子能够功能性地整合至内源性TCR复合物中。

[0062] 在一些方面,本文提供一种经分离重组TFP分子,其包含人或人源化抗受体酪氨酸激酶样孤儿受体1 (ROR1) 结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域。

[0063] 在一些方面,本文提供一种经分离重组TFP分子,其包含人或人源化抗受体酪氨酸激酶样孤儿受体1 (ROR1) 结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域,其中所述TFP分子能够功能性地与内源性TCR复合物和/或至少一种内源性TCR多肽相互作用。

[0064] 在一些方面,本文提供一种经分离重组TFP分子,其包含人或人源化抗受体酪氨酸激酶样孤儿受体1 (ROR1) 结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域,其中所述TFP分子能够功能性地整合至内源性TCR复合物中。

[0065] 在一些方面,本文提供一种经分离重组TFP分子,其包含人NK G2D多肽或其片段、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域。

[0066] 在一些方面,本文提供一种经分离重组TFP分子,其包含人NK G2D多肽或其片段、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域,其中所述TFP分子能够功能性地

与内源性TCR复合物和/或至少一种内源性TCR多肽相互作用。

[0067] 在一些方面,本文提供一种经分离重组TFP分子,其包含人NK G2D多肽或其片段、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域,其中所述TFP分子能够功能性地整合至内源性TCR复合物中。

[0068] 在一些方面,本文提供一种经分离重组TFP分子,其包含第一TFP分子,所述第一TFP分子包含人或人源化抗CD19结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域,以及第二TFP分子,所述第二TFP分子包含人或人源化抗BCMA结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域。

[0069] 在一些方面,本文提供一种经分离重组TFP分子,其包含第一TFP分子,所述第一TFP分子包含人或人源化抗CD19结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域,以及第二TFP分子,所述第二TFP分子包含人或人源化抗BCMA结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域,其中所述第一TFP分子能够功能性地与内源性TCR复合物和/或至少一种内源性TCR多肽相互作用。

[0070] 在一些方面,本文提供一种经分离重组TFP分子,其包含第一TFP分子,所述第一TFP分子包含人或人源化抗CD19结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域,以及第二TFP分子,所述第二TFP分子包含人或人源化抗BCMA结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域,其中所述第一TFP分子能够功能性地整合至内源性TCR复合物中。在一些实施方案中,经分离重组TFP分子包含含有人或人源化抗CD19结合结构域、人源化抗BCMA结合结构域的抗体或抗体片段、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域。

[0071] 在一些方面,本文提供一种经分离重组TFP分子,其包含第一TFP分子,所述第一TFP分子包含人或人源化抗CD19结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域,以及第二TFP分子,所述第二TFP分子包含人或人源化抗CD22结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域。

[0072] 在一些方面,本文提供一种经分离重组第一TFP分子,其包含人或人源化抗CD19结合结构域、人源化抗CD22结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域,其中所述第一TFP分子能够功能性地与内源性TCR复合物和/或至少一种内源性TCR多肽相互作用。

[0073] 在一些方面,本文提供一种经分离重组第一TFP分子,其包含人或人源化抗CD19结合结构域、人源化抗CD22结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域,其中所述第一TFP分子能够功能性地整合至内源性TCR复合物中。

[0074] 在一些实施方案中,经分离TFP分子包含含有人或人源化抗ROR1结合结构域的抗体或抗体片段、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域。在一些实施方案中,抗ROR1结合结构域是scFv或VH结构域。在一些实施方案中,抗ROR1结合结构域包含与本文提供的抗ROR1轻链的氨基酸序列具有95-100%同一性的重链、其功能性片段、或其具有至少1个但不超过30个修饰的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗ROR1结合结构域包含与本文提供的抗ROR1重链的氨基酸序列具有95-100%同一性的轻链、其功能性片段、或其具有至少1个但不超过30个修饰的氨基酸序列。在一些实施方案中,经分离TFP分子包含TCR细胞外结构域,其包括选自由以下组成的组的蛋白质的细胞外结构域或其部分、其功能性片段及其具有至



少1个但不超过20个修饰的氨基酸序列:TCR $\alpha$ 链、TCR $\beta$ 链、CD3 $\epsilon$  TCR亚单位、CD3 $\gamma$  TCR亚单位、CD3 $\delta$  TCR亚单位。在一些实施方案中,TCR细胞外结构域通过接头序列来可操作地连接。在一些实施方案中,接头区域包含(G4S) $n$ ,其中 $n=1$ 至4。在一些实施方案中,经分离TFP分子进一步包含编码共刺激性结构域的序列。在一些实施方案中,经分离TFP分子进一步包含编码细胞内信号传导结构域的序列。在一些实施方案中,经分离TFP分子进一步包含前导序列。

[0075] 在一些方面,本文提供一种包含编码本文所述的TFP的序列的核酸。在一些实施方案中,经分离重组TFP分子包含含有人或人源化抗CD19结合结构域、人源化抗CD22结合结构域的抗体或抗体片段、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域。在一些实施方案中,经分离TFP分子进一步包含是scFv或VH结构域的抗CD19结合结构域、抗BCMA结合结构域、抗CD22结合结构域或其组合。

[0076] 在一些实施方案中,抗CD19结合结构域包含与氨基酸序列SEQ ID NO:51具有95-100%同一性的重链、其功能性片段、或其具有至少1个但不超过30个修饰的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD19结合结构域包含与氨基酸序列SEQ ID NO:49具有95-100%同一性的轻链、其功能性片段、或其具有至少1个但不超过30个修饰的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗BCMA结合结构域包含与氨基酸序列SEQ ID NO:55具有95-100%同一性的重链、其功能性片段、或其具有至少1个但不超过30个修饰的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗BCMA结合结构域包含与氨基酸序列SEQ ID NO:53具有95-100%同一性的轻链、其功能性片段、或其具有至少1个但不超过30个修饰的氨基酸序列。

[0077] 在一些实施方案中,抗CD22结合结构域包含如本文所述的可变区或一个或多个如本文所述的CDR。在一些实施方案中,经分离重组TFP分子包含TCR细胞外结构域,其包括选自以下组成的组的蛋白质的细胞外结构域或其部分、其功能性片段及其具有至少1个但不超过20个修饰的氨基酸序列:TCR $\alpha$ 链、TCR $\beta$ 链、CD3 $\epsilon$  TCR亚单位、CD3 $\gamma$  TCR亚单位、CD3 $\delta$  TCR亚单位。在一些实施方案中,抗CD19结合结构域通过第一接头序列来连接于第一TFP分子的TCR细胞外结构域,并且抗BCMA结合结构域通过第二接头序列来连接于第一TFP分子的TCR细胞外结构域。在一些实施方案中,抗CD19结合结构域通过第一接头序列来连接于第一TFP分子的TCR细胞外结构域,并且抗CD22结合结构域通过第二接头序列来连接于第一TFP分子的TCR细胞外结构域。在一些实施方案中,第一接头序列和第二接头序列包含(G4S) $n$ ,其中 $n=1$ 至4。在一些实施方案中,经分离重组TFP分子进一步包含共刺激性结构域。在一些实施方案中,经分离重组TFP分子进一步包含细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,经分离重组TFP分子进一步包含前导序列。

[0078] 在一些方面,本文提供一种包含编码本文所述的经分离重组TFP的序列的核酸。

[0079] 在一些实施方案中,核酸包含编码第一TFP分子的第一核酸和编码第二TFP分子的第二核酸。在一些实施方案中,核酸选自DNA和RNA组成的组。在一些实施方案中,核酸是mRNA。在一些实施方案中,核酸进一步包含启动子。在一些实施方案中,核酸是在体外转录的核酸。在一些实施方案中,核酸进一步包含编码poly(A)尾部的序列。在一些实施方案中,核酸进一步包含3' UTR序列。在一些实施方案中,核酸进一步包含编码蛋白酶裂解位点的序列。

[0080] 在一些方面,本文提供一种包含编码本文所述的TFP的核酸分子的载体。



[0081] 在一些方面,本文提供一种包含编码本文所述的经分离重组TFP分子的核酸分子的载体。

[0082] 在一些实施方案中,载体包含a) 第一载体,其包含编码第一TFP的第一核酸分子;和b) 第二载体,其包含编码第二TFP的第二核酸分子。

[0083] 在一些实施方案中,载体选自由以下组成的组:DNA、RNA、质粒、慢病毒载体、腺病毒载体、劳斯肉瘤病毒(RSV)载体或逆转录病毒载体。在一些实施方案中,载体进一步包含启动子。在一些实施方案中,载体是在体外转录的载体。在一些实施方案中,载体中的核酸分子进一步编码poly(A)尾部。在一些实施方案中,载体中的核酸分子进一步编码3' UTR。在一些实施方案中,载体中的核酸分子进一步编码蛋白酶裂解位点。

[0084] 在一些方面,本文提供一种细胞,其包含本文所述的经分离核酸分子、本文所述的多肽分子、本文所述的TFP分子、本文所述的核酸或本文所述的载体。

[0085] 在一些方面,本文提供一种细胞,其包含本文所述的经分离核酸分子、本文所述的多肽分子、本文所述的经分离重组TFP分子、本文所述的核酸或本文所述的载体。

[0086] 在一些实施方案中,细胞是人T细胞。在一些实施方案中,T细胞是CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>T细胞。在一些实施方案中,细胞进一步包含编码抑制性分子的核酸,所述抑制性分子包含含有抑制性分子的至少一部分的第一多肽与含有来自细胞内信号传导结构域的正性信号的第二多肽缔合。在一些实施方案中,抑制性分子包含含有PD1的至少一部分的第一多肽和含有共刺激性结构域和初级信号传导结构域的第二多肽。

[0087] 在一些方面,本文提供一种包含至少两种TFP分子的人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>T细胞,所述TFP分子包含人或人源化CD16多肽或其片段、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域,其中所述TFP分子能够功能性地与在所述人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>T细胞中、所述人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>T细胞的表面处和/或表面上的内源性TCR复合物和/或至少一种内源性TCR多肽相互作用。

[0088] 在一些方面,本文提供一种包含以下的蛋白质复合物:TFP分子,其包含人或人源化CD16多肽或其片段、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域;以及至少一种内源性TCR亚单位或内源性TCR复合物。

[0089] 在一些方面,本文提供一种包含至少两种TFP分子的人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>T细胞,所述TFP分子包含人或人源化抗受体酪氨酸激酶样孤儿受体1(ROR1)结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域,其中所述TFP分子能够功能性地与在所述人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>T细胞中、所述人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>T细胞的表面处和/或表面上的内源性TCR复合物和/或至少一种内源性TCR多肽相互作用。

[0090] 在一些方面,本文提供一种包含以下的蛋白质复合物:TFP分子,其包含人或人源化抗受体酪氨酸激酶样孤儿受体1(ROR1)结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域;以及至少一种内源性TCR亚单位或内源性TCR复合物。

[0091] 在一些方面,本文提供一种包含至少两种TFP分子的人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>T细胞,所述TFP分子包含人NKG2D多肽或其片段、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域,其中所述TFP分子能够功能性地与在所述人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>T细胞中、所述人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>T细胞的表面处和/或表面上的内源性TCR复合物和/或至少一种内源性TCR多肽相互作用。

[0092] 在一些方面,本文提供一种包含以下的蛋白质复合物:TFP分子,其包含人NKG2D多肽或其片段、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域;以及至少一种内源性TCR亚单

位或内源性TCR复合物。

[0093] 在一些方面,本文提供一种包含经分离重组TFP分子的人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>T细胞,所述经分离重组TFP分子包含a) 第一TFP分子,其包含人或人源化抗CD19结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域,和b) 第二TFP分子,其包含人或人源化抗BCMA结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域,其中所述TFP分子能够功能性地与在所述人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>T细胞中、所述人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>T细胞的表面处和/或表面上的内源性TCR复合物和/或至少一种内源性TCR多肽相互作用。

[0094] 在一些方面,本文提供一种包含经分离重组TFP分子的人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>T细胞,所述经分离重组TFP分子包含a) 第一TFP分子,其包含人或人源化抗CD19结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域,和b) 第二TFP分子,其包含人或人源化抗CD22结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域,其中所述TFP分子能够功能性地与在所述人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>T细胞中、所述人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>T细胞的表面处和/或表面上的内源性TCR复合物和/或至少一种内源性TCR多肽相互作用。

[0095] 在一些方面,本文提供一种包含以下的蛋白质复合物:第一TFP分子,其包含人或人源化CD19结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域;第二TFP分子,其包含人或人源化抗BCMA结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域;以及至少一种内源性TCR亚单位或内源性TCR复合物。

[0096] 在一些方面,本文提供一种包含以下的蛋白质复合物:第一TFP分子,其包含人或人源化CD19结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域;第二TFP分子,其包含人或人源化抗CD22结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域;以及至少一种内源性TCR亚单位或内源性TCR复合物。

[0097] 在一些实施方案中,TCR包含选自以下组成的组的蛋白质的细胞外结构域或其部分:TCR $\alpha$ 链、TCR $\beta$ 链、CD3 $\epsilon$  TCR亚单位、CD3 $\gamma$  TCR亚单位和CD3 $\delta$  TCR亚单位。在一些实施方案中,NKG2D配体或其片段通过接头序列来连接于TCR细胞外结构域。在一些实施方案中,CD16多肽或其片段通过接头序列来连接于TCR细胞外结构域。在一些实施方案中,抗ROR1结合结构域通过接头序列来连接于TCR细胞外结构域。在一些实施方案中,接头区域包含(G4S)<sub>n</sub>,其中n=1至4。

[0098] 在一些方面,本文提供一种蛋白质复合物,其包含由本文所述的经分离核酸分子编码的TFP以及至少一种内源性TCR亚单位或内源性TCR复合物。

[0099] 在一些方面,本文提供一种人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>T细胞,其在每个本文所述的蛋白质复合物中包含至少两种不同TFP蛋白。

[0100] 在一些方面,本文提供一种人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>T细胞,其包含至少两种由本文所述的经分离核酸分子编码的不同TFP分子。

[0101] 在一些实施方案中,TFP包含选自以下组成的组的蛋白质的细胞外结构域或其部分:TCR $\alpha$ 链、TCR $\beta$ 链、CD3 $\epsilon$  TCR亚单位、CD3 $\gamma$  TCR亚单位和CD3 $\delta$  TCR亚单位。在一些实施方案中,人或人源化抗CD19结合结构域通过第一接头序列来连接于第一TFP分子的TCR细胞外结构域,并且人或人源化抗BCMA结合结构域通过第二接头序列来连接于第二TFP分子的TCR细胞外结构域。在一些实施方案中,人或人源化抗CD19结合结构域通过第一接头序列来连接于第一TFP分子的TCR细胞外结构域,并且人或人源化抗CD20结合结构域通过第二接头

序列来连接于第二TFP分子的TCR细胞外结构域。在一些实施方案中,第一接头序列和第二接头序列包含 (G4S)<sub>n</sub>,其中n=1至4。

[0102] 在一些方面,本文提供一种蛋白质复合物,其包含由本文所述的经分离核酸分子编码的第一TFP和第二TFP以及至少一种内源性TCR亚单位或内源性TCR复合物。

[0103] 在一些方面,本文提供一种人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>T细胞,其在每个本文所述的蛋白质复合物中包含第一TFP分子和第二TFP分子。

[0104] 在一些方面,本文提供一种人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>T细胞,其包含由本文所述的经分离核酸分子编码的第一TFP分子和第二TFP分子。

[0105] 在一些方面,本文提供一种人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>T细胞群体,其中所述群体的所述T细胞单独地或总体地包含至少两种TFP分子,所述TFP分子包含人或人源化CD16多肽或其片段、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域,其中所述TFP分子能够功能性地与在所述人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>T细胞中、所述人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>T细胞的表面处和/或表面上的内源性TCR复合物和/或至少一种内源性TCR多肽相互作用。

[0106] 在一些方面,本文提供一种人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>T细胞群体,其中所述群体的所述T细胞单独地或总体地包含至少两种TFP分子,所述TFP分子包含人或人源化抗受体酪氨酸激酶样孤儿受体1 (ROR1) 结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域,其中所述TFP分子能够功能性地与在所述人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>T细胞中、所述人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>T细胞的表面处和/或表面上的内源性TCR复合物和/或至少一种内源性TCR多肽相互作用。

[0107] 在一些方面,本文提供一种人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>T细胞群体,其中所述群体的所述T细胞单独地或总体地包含至少两种TFP分子,所述TFP分子包含人NKG2D多肽或其片段、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域,其中所述TFP分子能够功能性地与在所述人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>T细胞中、所述人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>T细胞的表面处和/或表面上的内源性TCR复合物和/或至少一种内源性TCR多肽相互作用。

[0108] 在一些方面,本文提供一种人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>T细胞群体,其中所述群体的所述T细胞单独地或总体地包含第一TFP分子和第二TFP分子,所述第一TFP分子包含人或人源化抗CD19结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域,并且所述第二TFP分子包含人或人源化抗BCMA结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域,其中所述第一TFP分子和所述第二TFP分子能够功能性地与在所述人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>T细胞中、所述人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>T细胞的表面处和/或表面上的内源性TCR复合物和/或至少一种内源性TCR多肽相互作用。

[0109] 在一些方面,本文提供一种人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>T细胞群体,其中所述群体的所述T细胞单独地或总体地包含第一TFP分子和第二TFP分子,所述第一TFP分子包含人或人源化抗CD19结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域,并且所述第二TFP分子包含人或人源化抗CD22结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域,其中所述第一TFP分子和所述第二TFP分子能够功能性地与在所述人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>T细胞中、所述人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>T细胞的表面处和/或表面上的内源性TCR复合物和/或至少一种内源性TCR多肽相互作用。

[0110] 在一些方面,本文提供一种人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>T细胞群体,其中所述群体的所述T细胞单独地或总体地包含由本文所述的经分离核酸分子编码的第一TFP分子和第二TFP分子。

[0111] 在一些方面,本文提供一种人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>T细胞群体,其中所述群体的所述T细胞单独地或总体地包含至少两种由本文所述的经分离核酸分子编码的TFP分子。

[0112] 在一些方面,本文提供一种制备细胞的方法,其包括用本文所述的经分离核酸分子、本文所述的核酸或本文所述的载体转导T细胞。

[0113] 在一些方面,本文提供一种产生经RNA工程改造的细胞的群体的方法,其包括将在体外转录的RNA或合成RNA引入细胞中,其中所述RNA包含编码本文所述的TFP分子的核酸。

[0114] 在一些方面,本文提供一种产生经RNA工程改造的细胞的群体的方法,其包括将在体外转录的RNA或合成RNA引入细胞中,其中所述RNA包含编码本文所述的经分离重组TFP分子的核酸。

[0115] 在一些方面,本文提供一种在哺乳动物中提供抗肿瘤免疫性的方法,其包括向所述哺乳动物施用有效量的本文所述的经分离核酸分子、本文所述的多肽分子、表达本文所述的多肽分子的细胞、本文所述的TFP分子、本文所述的核酸、本文所述的载体或本文所述的细胞。

[0116] 在一些方面,本文提供一种在哺乳动物中提供抗肿瘤免疫性的方法,其包括向所述哺乳动物施用有效量的本文所述的经分离核酸分子、本文所述的多肽分子、表达本文所述的多肽分子的细胞、本文所述的TFP分子、本文所述的核酸、本文所述的载体或本文所述的细胞。

[0117] 在一些实施方案中,细胞是自体T细胞。在一些实施方案中,细胞是同种异体T细胞。在一些实施方案中,哺乳动物是人。

[0118] 在一些方面,本文提供一种治疗患有与肿瘤相关抗原的表达相关的疾病的哺乳动物的方法,其包括向所述哺乳动物施用有效量的本文所述的经分离核酸分子、本文所述的多肽分子、表达本文所述的多肽分子的细胞、本文所述的TFP分子、本文所述的核酸、本文所述的载体或本文所述的细胞。

[0119] 在一些方面,本文提供一种治疗患有与ROR1的表达相关的疾病的哺乳动物的方法,其包括向所述哺乳动物施用有效量的本文所述的经分离核酸分子、本文所述的多肽分子、表达本文所述的多肽分子的细胞、本文所述的TFP分子、本文所述的核酸、本文所述的载体或本文所述的细胞。

[0120] 在一些方面,本文提供一种治疗患有与NKG2D受体的表达相关的疾病的哺乳动物的方法,其包括向所述哺乳动物施用有效量的本文所述的经分离核酸分子、本文所述的多肽分子、表达本文所述的多肽分子的细胞、本文所述的TFP分子、本文所述的核酸、本文所述的载体或本文所述的细胞。

[0121] 在一些实施方案中,与NKG2D受体抗体的表达相关的疾病选自由以下组成的组:发育不良、增生性疾病、癌症、恶性肿瘤、与NKG2D受体抗体的表达相关的非癌症相关适应症、炎症性疾病、类风湿性关节炎、结肠炎、乳糜泻、肠炎、多发性硬化症、斑形脱发、1型糖尿病、慢性阻塞性肺病、动脉粥样硬化以及与2型糖尿病相关的代谢综合征。在一些实施方案中,与NKG2D受体抗体的表达相关的疾病是感染性疾病。

[0122] 在一些方面,本文提供一种治疗患有与CD19、BCMA或CD22的表达相关的疾病的哺乳动物的方法,其包括向所述哺乳动物施用有效量的本文所述的经分离核酸分子、本文所述的多肽分子、表达本文所述的多肽分子的细胞、本文所述的TFP分子、本文所述的核酸、本

文所述的载体或本文所述的细胞。

[0123] 在一些实施方案中,与CD19、BCMA或CD22表达相关的疾病选自由以下组成的组:增生性疾病、癌症、恶性肿瘤、骨髓发育不良、骨髓发育不良综合征、前白血病、与CD19的表达相关的非癌症相关适应症、与BCMA的表达相关的非癌症相关适应症以及与CD22的表达相关的非癌症相关适应症。在一些实施方案中,与ROR1表达相关的疾病选自由以下组成的组:发育不良、增生性疾病、癌症、恶性肿瘤以及与ROR1的表达相关的非癌症相关适应症。

[0124] 在一些实施方案中,疾病是选自由以下组成的组的癌症:间皮瘤、乳头状浆液性卵巢腺癌、透明细胞急性淋巴细胞性白血病(T-ALL)、急性淋巴母细胞性白血病(ALL);慢性骨髓源性白血病(CML)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、B细胞慢性淋巴细胞性白血病、B细胞前淋巴细胞性白血病、母细胞性浆细胞样树突细胞赘瘤、伯基特氏淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)、弥漫性大B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、毛细胞白血病、小细胞滤泡性淋巴瘤、大细胞滤泡性淋巴瘤、恶性淋巴组织增生性疾病、MALT淋巴瘤、套膜细胞淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、多发性骨髓瘤、骨髓发育不良、骨髓发育不良综合征、非霍奇金氏淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma)、浆母细胞性淋巴瘤、浆细胞样树突细胞赘瘤、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症(Waldenstrom macroglobulinemia)、前白血病、卵巢癌、混合苗勒卵巢癌(mixed Mullerian ovarian carcinoma)、子宫内膜样粘液卵巢癌、胰腺腺癌、导管胰腺腺癌、子宫浆液性癌瘤、肺腺癌、肝外胆管癌、胃腺癌、食道腺癌、结肠直肠腺癌、乳腺腺癌、肾癌、结肠癌、胃癌、自体免疫疾病及其组合。在一些实施方案中,疾病是选自由以下组成的组的癌症:间皮瘤、乳头状浆液性卵巢腺癌、透明细胞急性淋巴细胞性白血病(T-ALL)、急性淋巴母细胞性白血病(ALL);慢性骨髓源性白血病(CML)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、B细胞慢性淋巴细胞性白血病、B细胞前淋巴细胞性白血病、母细胞性浆细胞样树突细胞赘瘤、伯基特氏淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、毛细胞白血病、小细胞滤泡性淋巴瘤、大细胞滤泡性淋巴瘤、恶性淋巴组织增生性疾病、MALT淋巴瘤、套膜细胞淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、多发性骨髓瘤、骨髓发育不良、骨髓发育不良综合征、非霍奇金氏淋巴瘤、浆母细胞性淋巴瘤、浆细胞样树突细胞赘瘤、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、前白血病、卵巢癌、混合苗勒卵巢癌、子宫内膜样粘液卵巢癌、胰腺腺癌、导管胰腺腺癌、子宫浆液性癌瘤、肺腺癌、肝外胆管癌、胃腺癌、食道腺癌、结肠直肠腺癌、乳腺腺癌、肾癌、结肠癌、胃癌、与ROR1表达相关的疾病及其组合。在一些实施方案中,疾病是选自由以下组成的组的血液癌症:B细胞急性淋巴细胞性白血病(B-ALL)、T细胞急性淋巴细胞性白血病(T-ALL)、急性淋巴母细胞性白血病(ALL);慢性骨髓源性白血病(CML)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、B细胞前淋巴细胞性白血病、母细胞性浆细胞样树突细胞赘瘤、伯基特氏淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、毛细胞白血病、小细胞滤泡性淋巴瘤、大细胞滤泡性淋巴瘤、恶性淋巴组织增生性疾病、MALT淋巴瘤、套膜细胞淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、多发性骨髓瘤、骨髓发育不良、骨髓发育不良综合征、非霍奇金氏淋巴瘤、浆母细胞性淋巴瘤、浆细胞样树突细胞赘瘤、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、前白血病、与CD19、BCMA或CD22表达相关的疾病及其组合。

[0125] 在一些实施方案中,表达TFP分子的细胞与使表达TFP分子的细胞的功效增加的药

剂组合施用。在一些实施方案中,表达TFP分子的细胞与特异性结合肿瘤细胞上的细胞表面相关抗原的抗体或其片段组合施用。在一些实施方案中,表达第一TFP分子和第二TFP分子的细胞与使表达第一TFP分子和第二TFP分子的细胞的功效增加的药剂组合施用。在一些实施方案中,相较于被施用有效量的表达具有抗原结构域的嵌合抗原受体(CAR)的T细胞的哺乳动物,在哺乳动物中释放较少细胞因子。在一些实施方案中,相较于被施用有效量的表达具有包含配体NKG2D的抗原结构域的嵌合抗原受体(CAR)的T细胞的哺乳动物,在哺乳动物中释放较少细胞因子。在一些实施方案中,相较于被施用有效量的表达能够结合细胞表面相关抗原的嵌合抗原受体(CAR)的T细胞的哺乳动物,在哺乳动物中释放较少细胞因子。在一些实施方案中,相较于被施用有效量的表达抗ROR1嵌合抗原受体(CAR)的T细胞的哺乳动物,在哺乳动物中释放较少细胞因子。在一些实施方案中,相较于被施用有效量的表达:抗CD19嵌合抗原受体(CAR);抗BCMA CAR;抗CD22 CAR;抗CD19 CAR和抗BCMA CAR;抗CD19 CAR和抗CD22 CAR;或其组合的T细胞的哺乳动物,在哺乳动物中释放较少细胞因子。在一些实施方案中,表达TFP分子的细胞与改善一种或多种与施用表达TFP分子的细胞相关的副作用的药剂组合施用。在一些实施方案中,表达TFP分子的细胞与第二治疗剂组合施用。在一些实施方案中,表达TFP分子的细胞与治疗与ROR1相关的疾病的药剂组合施用。在一些实施方案中,表达TFP分子的细胞与治疗与NKG2D受体抗体相关的疾病的药剂组合施用。在一些实施方案中,表达第一TFP分子和第二TFP分子的细胞与改善一种或多种与施用表达第一TFP分子和第二TFP分子的细胞相关的副作用的药剂组合施用。在一些实施方案中,表达第一TFP分子和第二TFP分子的细胞与治疗与CD19、BCMA或CD22相关的疾病的药剂组合施用。

[0126] 在一些方面,本文提供一种用作药剂的本文所述的经分离核酸分子、本文所述的多肽分子、表达本文所述的多肽分子的细胞、本文所述的TFP分子、本文所述的核酸、本文所述的载体或本文所述的细胞。

[0127] 在一些方面,本文提供一种用作药剂的本文所述的经分离核酸分子。

[0128] 在一些方面,本文提供一种治疗患有与ROR1的表达相关的疾病的哺乳动物的方法,其包括向所述哺乳动物施用有效量的本文所述的经分离核酸分子、本文所述的多肽分子、表达本文所述的多肽分子的细胞、本文所述的TFP分子、本文所述的核酸、本文所述的载体或本文所述的细胞,其中相较于被施用有效量的表达抗ROR1嵌合抗原受体(CAR)的T细胞的哺乳动物,在所述哺乳动物中释放较少细胞因子。

[0129] 在一些方面,本文提供一种治疗患有与NKG2D受体抗体的表达相关的疾病的哺乳动物的方法,其包括向所述哺乳动物施用有效量的本文所述的经分离核酸分子、本文所述的多肽分子、表达本文所述的多肽分子的细胞、本文所述的TFP分子、本文所述的核酸、本文所述的载体或本文所述的细胞,其中相较于被施用有效量的表达具有包含配体NKG2D的抗原结构域的嵌合抗原受体(CAR)的T细胞的哺乳动物,在所述哺乳动物中释放较少细胞因子。

[0130] 在一些方面,本文提供一种治疗患有与CD19、BCMA或CD22的表达相关的疾病的哺乳动物的方法,其包括向所述哺乳动物施用有效量的本文所述的经分离核酸分子、本文所述的多肽分子、表达本文所述的多肽分子的细胞、本文所述的TFP分子、本文所述的核酸、本文所述的载体或本文所述的细胞,其中相较于被施用有效量的表达:抗CD19嵌合抗原受体(CAR);抗BCMA CAR;抗CD22 CAR;抗CD19 CAR和抗BCMA CAR;抗CD19 CAR和抗CD22 CAR;或

其组合的T细胞的哺乳动物,在所述哺乳动物中释放较少细胞因子。

[0131] 在一些方面,本文提供一种经分离重组核酸分子,其编码包含以下的第一T细胞受体(TCR)融合蛋白(TFP):TCR亚单位,其包含TCR细胞外结构域的至少一部分,和包含来自CD3 $\epsilon$ 的细胞内信号传导结构域的刺激结构域的TCR细胞内结构域;以及包含第一抗原结合结构域的第一人或人源化抗体结构域;和包含以下的第二T细胞受体(TCR)融合蛋白(TFP):包含TCR细胞外结构域的至少一部分的TCR亚单位,以及包含第二抗原结合结构域的第二人或人源化抗体结构域;其中所述第一TFP的所述TCR亚单位和所述第一抗体结构域操作性地连接,并且所述第二TFP的所述TCR亚单位和所述第二抗体结构域操作性地连接,并且其中所述第一TFP和所述第二TFP在T细胞中表达时并入TCR中。

[0132] 在一些方面,本文提供一种经分离重组核酸分子,其编码包含以下的第一T细胞受体(TCR)融合蛋白(TFP):TCR亚单位,其包含TCR细胞外结构域的至少一部分,和包含来自CD3 $\gamma$ 的细胞内信号传导结构域的刺激结构域的TCR细胞内结构域;以及包含第一抗原结合结构域的第一人或人源化抗体结构域;和包含以下的第二T细胞受体(TCR)融合蛋白(TFP):包含TCR细胞外结构域的至少一部分的TCR亚单位,以及包含第二抗原结合结构域的第二人或人源化抗体结构域;其中所述第一TFP的所述TCR亚单位和所述第一抗体结构域操作性地连接,并且所述第二TFP的所述TCR亚单位和所述第二抗体结构域操作性地连接,并且其中所述第一TFP和所述第二TFP在T细胞中表达时并入TCR中。

[0133] 在一些方面,本文提供一种经分离重组核酸分子,其编码包含以下的第一T细胞受体(TCR)融合蛋白(TFP):TCR亚单位,其包含TCR细胞外结构域的至少一部分,和包含来自CD3 $\delta$ 的细胞内信号传导结构域的刺激结构域的TCR细胞内结构域;以及包含第一抗原结合结构域的第一人或人源化抗体结构域;和包含以下的第二T细胞受体(TCR)融合蛋白(TFP):包含TCR细胞外结构域的至少一部分的TCR亚单位,以及包含第二抗原结合结构域的第二人或人源化抗体结构域;其中所述第一TFP的所述TCR亚单位和所述第一抗体结构域操作性地连接,并且所述第二TFP的所述TCR亚单位和所述第二抗体结构域操作性地连接,并且其中所述第一TFP和所述第二TFP在T细胞中表达时并入TCR中。

[0134] 在一些方面,本文提供一种经分离重组核酸分子,其编码包含以下的第一T细胞受体(TCR)融合蛋白(TFP):TCR亚单位,其包含TCR细胞外结构域的至少一部分,和包含来自TCR $\alpha$ 的细胞内信号传导结构域的刺激结构域的TCR细胞内结构域;以及包含第一抗原结合结构域的第一人或人源化抗体结构域;和包含以下的第二T细胞受体(TCR)融合蛋白(TFP):包含TCR细胞外结构域的至少一部分的TCR亚单位,以及包含第二抗原结合结构域的第二人或人源化抗体结构域;其中所述第一TFP的所述TCR亚单位和所述第一抗体结构域操作性地连接,并且所述第二TFP的所述TCR亚单位和所述第二抗体结构域操作性地连接,并且其中所述第一TFP和所述第二TFP在T细胞中表达时并入TCR中。

[0135] 在一些方面,本文提供一种经分离重组核酸分子,其编码包含以下的第一T细胞受体(TCR)融合蛋白(TFP):TCR亚单位,其包含TCR细胞外结构域的至少一部分,和包含来自TCR $\beta$ 的细胞内信号传导结构域的刺激结构域的TCR细胞内结构域;以及包含第一抗原结合结构域的第一人或人源化抗体结构域;和包含以下的第二T细胞受体(TCR)融合蛋白(TFP):包含TCR细胞外结构域的至少一部分的TCR亚单位,以及包含第二抗原结合结构域的第二人或人源化抗体结构域;其中所述第一TFP的所述TCR亚单位和所述第一抗体结构域操

作性地连接,并且所述第二TFP的所述TCR亚单位和所述第二抗体结构域操作性地连接,并且其中所述第一TFP和所述第二TFP在T细胞中表达时并入TCR中。

[0136] 在一些实施方案中,第二TFP的TCR亚单位进一步包含TCR细胞内结构域,其包含来自选自自由TCR $\alpha$ 、TCR $\beta$ 、CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\gamma$ 和CD3 $\delta$ 组成的组的细胞内信号传导结构域或其功能性片段的刺激性结构域。在一些实施方案中,第一抗原结合结构域或第二抗原结合结构域是抗CD19结合结构域。在一些实施方案中,第一抗原结合结构域或第二抗原结合结构域是抗B细胞成熟抗原(BCMA)结合结构域。在一些实施方案中,第一抗原结合结构域或第二抗原结合结构域是抗CD22结合结构域。

[0137] 在一些方面,本文提供一种经分离重组核酸分子,其编码:包含以下的第一T细胞受体(TCR)融合蛋白(TFP):TCR亚单位、包含是抗CD19结合结构域的第一抗原结合结构域的第一人或人源化抗体结构域;和包含以下的第二T细胞受体(TCR)融合蛋白(TFP):TCR亚单位、包含是抗BCMA结合结构域的第二抗原结合结构域的第二人或人源化抗体结构域。

[0138] 在一些方面,本文提供一种经分离重组核酸分子,其编码:包含以下的第一T细胞受体(TCR)融合蛋白(TFP):TCR亚单位、包含是抗CD19结合结构域的第一抗原结合结构域的第一人或人源化抗体结构域;和包含以下的第二T细胞受体(TCR)融合蛋白(TFP):TCR亚单位、包含是抗CD22结合结构域的第二抗原结合结构域的第二人或人源化抗体结构域。

[0139] 在一些实施方案中,第一TFP的TCR亚单位和第一抗体结构域操作性地连接,并且第二TFP的TCR亚单位和第二抗体结构域操作性地连接。在一些实施方案中,第一TFP、第二TFP或两者在T细胞中表达时并入TCR中。在一些实施方案中,所编码第一抗原结合结构域通过第一接头序列来连接于第一TFP的TCR细胞外结构域,所编码第二抗原结合结构域通过第二接头序列来连接于第二TFP的TCR细胞外结构域,或第一抗原结合结构域通过第一接头序列来连接于第一TFP的TCR细胞外结构域,并且所编码第二抗原结合结构域通过第二接头序列来连接于第二TFP的TCR细胞外结构域。在一些实施方案中,第一接头序列和第二接头序列包含(G4S) $n$ ,其中 $n=1$ 至4。在一些实施方案中,第一TFP的TCR亚单位、第二TFP的TCR亚单位或两者包含TCR细胞外结构域。在一些实施方案中,第一TFP的TCR亚单位、第二TFP的TCR亚单位或两者包含TCR跨膜结构域。在一些实施方案中,第一TFP的TCR亚单位、第二TFP的TCR亚单位或两者包含TCR细胞内结构域。在一些实施方案中,第一TFP的TCR亚单位、第二TFP的TCR亚单位或两者包含(i) TCR细胞外结构域,(ii) TCR跨膜结构域,和(iii) TCR细胞内结构域,其中(i)、(ii)和(iii)中的至少两者来自同一TCR亚单位。在一些实施方案中,第一TFP的TCR亚单位、第二TFP的TCR亚单位或两者包含TCR细胞内结构域,其包含选自CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\gamma$ 或CD3 $\delta$ 的细胞内信号传导结构域的刺激性结构域或具有至少一个对其进行的修饰的氨基酸序列。在一些实施方案中,第一TFP的TCR亚单位、第二TFP的TCR亚单位或两者包含细胞内结构域,其包含选自4-1BB的功能性信号传导结构域和/或CD3 $\zeta$ 的功能性信号传导结构域的刺激性结构域或具有至少一个对其进行的修饰的氨基酸序列。在一些实施方案中,第一人或人源化抗体结构域、第二人或人源化抗体结构域或两者包含抗体片段。在一些实施方案中,第一人或人源化抗体结构域、第二人或人源化抗体结构域或两者包含scFv或VH结构域。

[0140] 在一些实施方案中,经分离核酸分子编码(i)抗CD19轻链结合结构域氨基酸序列的分别与SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:29具有70-100%序列同一性的轻链



(LC) CDR1、LC CDR2和LC CDR3,和/或(ii)抗CD19重链结合结构域氨基酸序列的分别与SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:33和SEQ ID NO:35具有70-100%序列同一性的重链(HC) CDR1、HC CDR2和HC CDR3。在一些实施方案中,经分离核酸分子编码轻链可变区,其中所述轻链可变区包含轻链可变区氨基酸序列SEQ ID NO:49的具有至少1个但不超过30个修饰的氨基酸序列,或与轻链可变区氨基酸序列SEQ ID NO:49具有95-99%同一性的序列。在一些实施方案中,经分离核酸分子编码重链可变区,其中所述重链可变区包含重链可变区氨基酸序列SEQ ID NO:51的具有至少1个但不超过30个修饰的氨基酸序列,或与重链可变区氨基酸序列SEQ ID NO:51具有95-99%同一性的序列。在一些实施方案中,经分离核酸分子编码(i)抗BCMA轻链结合结构域氨基酸序列的分别与SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39和SEQ ID NO:41具有70-100%序列同一性的轻链(LC) CDR1、LC CDR2和LC CDR3,和/或(ii)抗BCMA重链结合结构域氨基酸序列的分别与SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:45和SEQ ID NO:47具有70-100%序列同一性的重链(HC) CDR1、HC CDR2和HC CDR3。在一些实施方案中,经分离核酸分子编码轻链可变区,其中所述轻链可变区包含轻链可变区氨基酸序列SEQ ID NO:53的具有至少1个但不超过30个修饰的氨基酸序列,或与轻链可变区氨基酸序列SEQ ID NO:53具有95-99%同一性的序列。在一些实施方案中,经分离核酸分子编码重链可变区,其中所述重链可变区包含重链可变区氨基酸序列SEQ ID NO:55的具有至少1个但不超过30个修饰的氨基酸序列,或与重链可变区氨基酸序列SEQ ID NO:55具有95-99%同一性的序列。在一些实施方案中,抗CD22抗原结合结构域包含如本文所述的可变区或一个或多个如本文所述的CDR。

[0141] 在一些实施方案中,所编码第一TFP、所编码第二TFP或两者包括TCR亚单位的细胞外结构域,其包括选自由以下组成的组的蛋白质的细胞外结构域或其部分、其功能性片段及其具有至少1个但不超过20个修饰的氨基酸序列:TCR $\alpha$ 链、TCR $\beta$ 链、CD3 $\epsilon$  TCR亚单位、CD3 $\gamma$  TCR亚单位、CD3 $\delta$  TCR亚单位。在一些实施方案中,所编码第一TFP和所编码第二TFP包括跨膜结构域,其包括选自由以下组成的组的蛋白质的跨膜结构域、其功能性片段及其具有至少1个但不超过20个修饰的氨基酸序列:TCR $\alpha$ 链、TCR $\beta$ 链、CD3 $\epsilon$  TCR亚单位、CD3 $\gamma$  TCR亚单位、CD3 $\delta$  TCR亚单位。在一些实施方案中,所编码第一TFP和所编码第二TFP包括跨膜结构域,其包括选自由以下组成的组的蛋白质的跨膜结构域、其功能性片段及其具有至少1个但不超过20个修饰的氨基酸序列:TCR $\alpha$ 链、TCR $\beta$ 链、TCR $\zeta$ 链、CD3 $\epsilon$  TCR亚单位、CD3 $\gamma$  TCR亚单位、CD3 $\delta$  TCR亚单位、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD28、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154。在一些实施方案中,经分离核酸分子进一步包含编码共刺激性结构域的序列。在一些实施方案中,共刺激性结构域是从选自由以下组成的组的蛋白质获得的功能性信号传导结构域及其具有至少1个但不超过20个对其进行的修饰的氨基酸序列:OX40、CD2、CD27、CD28、CDS、ICAM-1、LF A-1 (CD11a/CD18)、ICOS (CD278) 和4-1BB (CD137)。在一些实施方案中,经分离核酸分子进一步包含编码细胞内信号传导结构域的序列。在一些实施方案中,经分离核酸分子进一步包含前导序列。在一些实施方案中,经分离核酸分子进一步包含蛋白酶裂解位点。在一些实施方案中,至少1个但不超过20个对其进行的修饰包括对介导细胞信号传导的氨基酸的修饰或对应答于配体与第一TFP、第二TFP或两者结合加以磷酸化的氨基酸的修饰。在一些实施方案中,经分离核酸分子是mRNA。在一些实施方案中,第一TFP、第二TFP或两者包括TCR亚单位的免疫受体酪氨酸基活化基序(ITAM),其包括选自由以下组成的组的蛋白质的ITAM或其部分、其功能性片段及其具有至少1个但

不超过20个对其进行的修饰的氨基酸序列:CD3 $\zeta$  TCR亚单位、CD3 $\epsilon$  TCR亚单位、CD3 $\gamma$  TCR亚单位、CD3 $\delta$  TCR亚单位、TCR $\zeta$ 链、Fc $\epsilon$ 受体1链、Fc $\epsilon$ 受体2链、Fc $\gamma$ 受体1链、Fc $\gamma$ 受体2a链、Fc $\gamma$ 受体2b1链、Fc $\gamma$ 受体2b2链、Fc $\gamma$ 受体3a链、Fc $\gamma$ 受体3b链、Fc $\beta$ 受体1链、TYROBP (DAP12)、CD5、CD16a、CD16b、CD22、CD23、CD32、CD64、CD79a、CD79b、CD89、CD278、CD66d。在一些实施方案中,ITAM替代CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 或CD3 $\epsilon$ 的ITAM。在一些实施方案中,ITAM选自由CD3 $\zeta$  TCR亚单位、CD3 $\epsilon$  TCR亚单位、CD3 $\gamma$  TCR亚单位和CD3 $\delta$  TCR亚单位组成的组,并且替代选自由CD3 $\zeta$  TCR亚单位、CD3 $\epsilon$  TCR亚单位、CD3 $\gamma$  TCR亚单位和CD3 $\delta$  TCR亚单位组成的组的不同ITAM。在一些实施方案中,经分离核酸分子进一步包含前导序列。

[0142] 在一些方面,本文提供一种由本文所述的核酸分子编码的经分离多肽分子。在一些实施方案中,经分离多肽包含由第一核酸分子编码的第一多肽和由第二核酸分子编码的第二多肽。

[0143] 在一些方面,本文提供一种经分离重组TFP分子,其包含第一TFP分子,所述第一TFP分子包含人或人源化抗CD19结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域,以及第二TFP分子,所述第二TFP分子包含人或人源化抗BCMA结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域。

[0144] 在一些方面,本文提供一种经分离重组TFP分子,其包含第一TFP分子,所述第一TFP分子包含人或人源化抗CD19结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域,以及第二TFP分子,所述第二TFP分子包含人或人源化抗BCMA结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域,其中所述第一TFP分子能够功能性地与内源性TCR复合物和/或至少一种内源性TCR多肽相互作用。

[0145] 在一些方面,本文提供一种经分离重组TFP分子,其包含第一TFP分子,所述第一TFP分子包含人或人源化抗CD19结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域,以及第二TFP分子,所述第二TFP分子包含人或人源化抗BCMA结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域,其中所述第一TFP分子能够功能性地整合至内源性TCR复合物中。在一些实施方案中,经分离重组TFP分子包含含有人或人源化抗CD19结合结构域、人源化抗BCMA结合结构域的抗体或抗体片段、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域。

[0146] 在一些方面,本文提供一种经分离重组TFP分子,其包含第一TFP分子,所述第一TFP分子包含人或人源化抗CD19结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域,以及第二TFP分子,所述第二TFP分子包含人或人源化抗CD22结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域。

[0147] 在一些方面,本文提供一种经分离重组第一TFP分子,其包含人或人源化抗CD19结合结构域、人源化抗CD22结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域,其中所述第一TFP分子能够功能性地与内源性TCR复合物和/或至少一种内源性TCR多肽相互作用。

[0148] 在一些方面,本文提供一种经分离重组第一TFP分子,其包含人或人源化抗CD19结合结构域、人源化抗CD22结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域,其中所述第一TFP分子能够功能性地整合至内源性TCR复合物中。

[0149] 在一些实施方案中,经分离重组TFP分子包含含有人或人源化抗CD19结合结构域、

人源化抗CD22结合结构域的抗体或抗体片段、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域。

[0150] 在一些实施方案中,抗CD19结合结构域、抗BCMA结合结构域、抗CD22结合结构域或其组合是scFv或VH结构域。在一些实施方案中,抗CD19结合结构域包含与氨基酸序列SEQ ID NO:51具有95-100%同一性的重链、其功能性片段、或其具有至少1个但不超过30个修饰的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD19结合结构域包含与氨基酸序列SEQ ID NO:49具有95-100%同一性的轻链、其功能性片段、或其具有至少1个但不超过30个修饰的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗BCMA结合结构域包含与氨基酸序列SEQ ID NO:55具有95-100%同一性的重链、其功能性片段、或其具有至少1个但不超过30个修饰的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗BCMA结合结构域包含与氨基酸序列SEQ ID NO:53具有95-100%同一性的轻链、其功能性片段、或其具有至少1个但不超过30个修饰的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD22结合结构域包含如本文所述的可变区或一个或多个如本文所述的CDR。在一些实施方案中,经分离重组TFP分子包含TCR细胞外结构域,其包括选自以下组成的组的蛋白质的细胞外结构域或其部分、其功能性片段及其具有至少1个但不超过20个修饰的氨基酸序列:TCR $\alpha$ 链、TCR $\beta$ 链、CD3 $\epsilon$  TCR亚单位、CD3 $\gamma$  TCR亚单位、CD3 $\delta$  TCR亚单位。在一些实施方案中,抗CD19结合结构域通过第一接头序列来连接于第一TFP分子的TCR细胞外结构域,并且抗BCMA结合结构域通过第二接头序列来连接于第一TFP分子的TCR细胞外结构域。在一些实施方案中,抗CD19结合结构域通过第一接头序列来连接于第一TFP分子的TCR细胞外结构域,并且抗CD22结合结构域通过第二接头序列来连接于第一TFP分子的TCR细胞外结构域。在一些实施方案中,第一接头序列和第二接头序列包含(G4S) $_n$ ,其中 $n=1$ 至4。在一些实施方案中,经分离重组TFP分子进一步包含共刺激性结构域。在一些实施方案中,本文所述的经分离重组TFP分子进一步包含细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,本文所述的经分离重组TFP分子进一步包含前导序列。在一些方面,本文提供一种包含编码本文所述的经分离重组TFP的序列的核酸。在一些实施方案中,核酸包含编码第一TFP分子的第一核酸和编码第二TFP分子的第二核酸。在一些实施方案中,核酸选自由DNA和RNA组成的组。在一些实施方案中,核酸是mRNA。在一些实施方案中,本文所述的核酸进一步包含启动子。在一些实施方案中,核酸是在体外转录的核酸。在一些实施方案中,核酸进一步包含编码poly(A)尾部的序列。在一些实施方案中,核酸进一步包含3' UTR序列。在一些实施方案中,核酸进一步包含编码蛋白酶裂解位点的序列。

[0151] 在一些方面,本文提供一种包含编码本文所述的经分离重组TFP分子的核酸分子的载体。

[0152] 在一些实施方案中,载体包含a) 第一载体,其包含编码第一TFP的第一核酸分子;和b) 第二载体,其包含编码第二TFP的第二核酸分子。在一些实施方案中,载体选自由以下组成的组:DNA、RNA、质粒、慢病毒载体、腺病毒载体、劳斯肉瘤病毒(RSV)载体或逆转录病毒载体。在一些实施方案中,本文所述的载体进一步包含启动子。在一些实施方案中,载体是在体外转录的载体。在一些实施方案中,载体中的核酸分子进一步编码poly(A)尾部。在一些实施方案中,载体中的核酸分子进一步编码3' UTR。在一些实施方案中,载体中的核酸分子进一步编码蛋白酶裂解位点。

[0153] 在一些方面,本文提供一种细胞,其包含本文所述的经分离核酸分子、本文所述的

多肽分子、本文所述的经分离重组TFP分子、本文所述的核酸或本文所述的载体。

[0154] 在一些实施方案中,细胞是人T细胞。在一些实施方案中,T细胞是CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>T细胞。在一些实施方案中,本文所述的细胞进一步包含编码抑制性分子的核酸,所述抑制性分子包含含有抑制性分子的至少一部分的第一多肽与含有来自细胞内信号传导结构域的正性信号的第二多肽缔合。在一些实施方案中,抑制性分子包含含有PD1的至少一部分的第一多肽和含有共刺激性结构域和初级信号传导结构域的第二多肽。

[0155] 在一些方面,本文提供一种包含经分离重组TFP分子的人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>T细胞,所述经分离重组TFP分子包含第一TFP分子,其包含人或人源化抗CD19结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域,以及第二TFP分子,其包含人或人源化抗BCMA结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域,其中所述TFP分子能够功能性地与在所述人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>T细胞中、所述人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>T细胞的表面处和/或表面上的内源性TCR复合物和/或至少一种内源性TCR多肽相互作用。

[0156] 在一些方面,本文提供一种包含经分离重组TFP分子的人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>T细胞,所述经分离重组TFP分子包含第一TFP分子,其包含人或人源化抗CD19结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域,以及第二TFP分子,其包含人或人源化抗CD22结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域,其中所述TFP分子能够功能性地与在所述人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>T细胞中、所述人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>T细胞的表面处和/或表面上的内源性TCR复合物和/或至少一种内源性TCR多肽相互作用。

[0157] 在一些方面,本文提供一种包含以下的蛋白质复合物:第一TFP分子,其包含人或人源化CD19结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域;第二TFP分子,其包含人或人源化抗BCMA结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域;以及至少一种内源性TCR亚单位或内源性TCR复合物。

[0158] 在一些方面,本文提供一种包含以下的蛋白质复合物:第一TFP分子,其包含人或人源化CD19结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域;第二TFP分子,其包含人或人源化抗CD22结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域;以及至少一种内源性TCR亚单位或内源性TCR复合物。

[0159] 在一些实施方案中,TFP包含选自以下组成的组的蛋白质的细胞外结构域或其部分:TCR $\alpha$ 链、TCR $\beta$ 链、CD3 $\epsilon$  TCR亚单位、CD3 $\gamma$  TCR亚单位和CD3 $\delta$  TCR亚单位。在一些实施方案中,人或人源化抗CD19结合结构域通过第一接头序列来连接于第一TFP分子的TCR细胞外结构域,并且人或人源化抗BCMA结合结构域通过第二接头序列来连接于第二TFP分子的TCR细胞外结构域。在一些实施方案中,人或人源化抗CD19结合结构域通过第一接头序列来连接于第一TFP分子的TCR细胞外结构域,并且人或人源化抗CD20结合结构域通过第二接头序列来连接于第二TFP分子的TCR细胞外结构域。在一些实施方案中,第一接头序列和第二接头序列包含(G4S)<sub>n</sub>,其中n=1至4。

[0160] 在一些方面,本文提供一种蛋白质复合物,其包含由本文所述的经分离核酸分子编码的第一TFP和第二TFP以及至少一种内源性TCR亚单位或内源性TCR复合物。

[0161] 在一些方面,本文提供一种人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>T细胞,其在每个本文所述的蛋白质复合物中包含第一TFP分子和第二TFP分子。

[0162] 在一些方面,本文提供一种人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>T细胞,其包含由本文所述的经分离核酸

分子编码的第一TFP分子和第二TFP分子。

[0163] 在一些方面,本文提供一种人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>T细胞群体,其中所述群体的所述T细胞单独地或总体地包含第一TFP分子和第二TFP分子,所述第一TFP分子包含人 or 人源化抗CD19结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域,并且所述第二TFP分子包含人 or 人源化抗BCMA结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域,其中所述第一TFP分子和所述第二TFP分子能够功能性地与在所述人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>T细胞中、所述人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>T细胞的表面处和/或表面上的内源性TCR复合物和/或至少一种内源性TCR多肽相互作用。

[0164] 在一些方面,本文提供一种人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>T细胞群体,其中所述群体的所述T细胞单独地或总体地包含第一TFP分子和第二TFP分子,所述第一TFP分子包含人 or 人源化抗CD19结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域,并且所述第二TFP分子包含人 or 人源化抗CD22结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域,其中所述第一TFP分子和所述第二TFP分子能够功能性地与在所述人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>T细胞中、所述人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>T细胞的表面处和/或表面上的内源性TCR复合物和/或至少一种内源性TCR多肽相互作用。

[0165] 在一些方面,本文提供一种人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>T细胞群体,其中所述群体的所述T细胞单独地或总体地包含由本文所述的经分离核酸分子编码的第一TFP分子和第二TFP分子。

[0166] 在一些方面,本文提供一种制备细胞的方法,其包括用本文所述的经分离核酸分子、本文所述的核酸或本文所述的载体转导T细胞。

[0167] 在一些方面,本文提供一种产生经RNA工程改造的细胞的群体的方法,其包括将在体外转录的RNA或合成RNA引入细胞中,其中所述RNA包含编码本文所述的经分离重组TFP分子的核酸。

[0168] 在一些方面,本文提供一种在哺乳动物中提供抗肿瘤免疫性的方法,其包括向所述哺乳动物施用有效量的本文所述的经分离核酸分子、本文所述的多肽分子、表达本文所述的多肽分子的细胞、本文所述的TFP分子、本文所述的核酸、本文所述的载体或本文所述的细胞或细胞群体。

[0169] 在一些实施方案中,细胞是自体T细胞。在一些实施方案中,细胞是同种异体T细胞。在一些实施方案中,哺乳动物是人。

[0170] 在一些方面,本文提供一种治疗患有与CD19、BCMA或CD22的表达相关的疾病的哺乳动物的方法,其包括向所述哺乳动物施用有效量的本文所述的经分离核酸分子、本文所述的多肽分子、表达本文所述的多肽分子的细胞、本文所述的TFP分子、本文所述的核酸、本文所述的载体或本文所述的细胞或细胞群体。

[0171] 在一些实施方案中,与CD19、BCMA或CD22表达相关的疾病选自由以下组成的组:增生性疾病、癌症、恶性肿瘤、骨髓发育不良、骨髓发育不良综合征、前白血病、与CD19的表达相关的非癌症相关适应症、与BCMA的表达相关的非癌症相关适应症以及与CD22的表达相关的非癌症相关适应症。在一些实施方案中,疾病是选自由以下组成的组的血液癌症:B细胞急性淋巴细胞性白血病(B-ALL)、T细胞急性淋巴细胞性白血病(T-ALL)、急性淋巴母细胞性白血病(ALL);慢性骨髓源性白血病(CML)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、B细胞前淋巴细胞性白血病、母细胞性浆细胞样树突细胞赘瘤、伯基特氏淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤、滤泡

性淋巴瘤、毛细胞白血病、小细胞滤泡性淋巴瘤、大细胞滤泡性淋巴瘤、恶性淋巴组织增生性疾患、MALT淋巴瘤、套膜细胞淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、多发性骨髓瘤、骨髓发育不良、骨髓发育不良综合征、非霍奇金氏淋巴瘤、浆母细胞性淋巴瘤、浆细胞样树突细胞赘瘤、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、前白血病、与CD19、BCMA或CD22表达相关的疾病及其组合。在一些实施方案中,表达第一TFP分子和第二TFP分子的细胞与使表达第一TFP分子和第二TFP分子的细胞的功效增加的药剂组合施用。在一些实施方案中,相较于被施用有效量的表达:抗CD19嵌合抗原受体(CAR);抗BCMA CAR;抗CD22 CAR;抗CD19 CAR和抗BCMA CAR;抗CD19 CAR和抗CD22 CAR;或其组合的T细胞的哺乳动物,在哺乳动物中释放较少细胞因子。在一些实施方案中,表达第一TFP分子和第二TFP分子的细胞与改善一种或多种与施用表达第一TFP分子和第二TFP分子的细胞相关的副作用的药剂组合施用。在一些实施方案中,表达第一TFP分子和第二TFP分子的细胞与治疗与CD19、BCMA或CD22相关的疾病的药剂组合施用。

[0172] 在一些方面,本文提供一种用作药剂的本文所述的经分离核酸分子、本文所述的多肽分子、表达本文所述的多肽分子的细胞、本文所述的TFP分子、本文所述的核酸、本文所述的载体或本文所述的细胞或细胞群体。

[0173] 在一些方面,本文提供一种治疗患有与CD19、BCMA或CD22的表达相关的疾病的哺乳动物的方法,其包括向所述哺乳动物施用有效量的本文所述的经分离核酸分子、本文所述的多肽分子、表达本文所述的多肽分子的细胞、本文所述的TFP分子、本文所述的核酸、本文所述的载体或本文所述的细胞或细胞群体,其中相较于被施用有效量的表达:抗CD19嵌合抗原受体(CAR);抗BCMA CAR;抗CD22 CAR;抗CD19 CAR和抗BCMA CAR;抗CD19 CAR和抗CD22 CAR;或其组合的T细胞的哺乳动物,在所述哺乳动物中释放较少细胞因子。

[0174] 以引用的方式并入

[0175] 本说明书中提及的所有出版物、专利和专利申请都以引用的方式并入本文,所述引用的程度就好像已特定地和单独地指示将各个别出版物、专利或专利申请以引用的方式并入一样。

## 附图说明

[0176] 图1A是显示一些本文公开的双重靶向癌细胞的方法的图式。肿瘤细胞抗原靶标BCMA和CD19是示例性抗原。这个图将T细胞显示为圆圈。白色圆圈显示用具有连接于CD3 $\epsilon$ 亚单位的抗CD19 TFP的TFP转导的T细胞的实例。黑色圆圈显示用具有连接于CD3 $\epsilon$ ( $\epsilon$ )或CD3 $\gamma$ ( $\gamma$ )亚单位的抗BCMA TFP的TFP转导的T细胞的实例。使‘黑色’细胞和‘白色’细胞混合以产生包含抗BCMA TFP与抗CD19 TFP两者的T细胞群体。灰色细胞显示已通过以下方式制备的共转导T细胞群体的实例,用两种类型的慢病毒(即各自对不同抗肿瘤抗原具有特异性(即scFv))转导单一T细胞群体或用(a)具有在一种TCR亚单位上的第一抗肿瘤抗原scFv和在第二TCR亚单位上的第二抗肿瘤抗原scFv的慢病毒,或(b)具有第一抗肿瘤抗原scFv和第二抗肿瘤抗原scFv操作性地连接(例如由G4S接头)和附接于单一TCR亚单位的慢病毒转导单一T细胞群体。

[0177] 图1B是显示单一TCR被工程改造来具有双特异性两种示例性方式的图式。TCR亚单位 $\epsilon$ 、 $\delta$ 、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 和 $\eta$ 从左至右沿细胞膜加以显示。白色卵形代表抗BCMA scFv,并且纹理化卵形代表抗CD19 scFv。在一个实施方案中,scFv通过第一接头来彼此可操作地连接,并且通

过第二接头来可操作地连接于TCR,连接于例如 $\epsilon$ 亚单位(在图中在左侧上显示 $\epsilon$ 亚单位)。在另一实施方案中,scFv各自可操作地连接于TCR亚单位;在这个实例中显示抗CD19 scFv通过接头来可操作地连接于 $\gamma$ 亚单位,并且抗BCMA scFv通过接头来可操作地连接于 $\epsilon$ 亚单位(在图中在右侧上显示 $\gamma$ 和右侧 $\epsilon$ )。

[0178] 图2显示如通过FACS测量的TFP T细胞的表面表达。图2A显示NKG2D特异性TFP T细胞的表面表达,如实施例5中所述。相较于非转导(“NT”),单体NKG2D CD3 $\epsilon$  TFP T细胞与二聚NKG2D CD3 $\epsilon$  TFP T细胞两者均显示表达;二聚NKG2D TFP T细胞是最高度表达的。图2B是一系列显示对BCMA抗体和/或CD19抗体转导的T细胞的FACS分析的图像。细胞根据CD8的表面表达(y轴)以及Fab抗体(顶行)或BCMA-Fc(底行)(x轴)来分选。显示的是来自用空载体、CD19抗体-CD3 $\epsilon$ 、BCMA抗体-CD3 $\epsilon$ 、BCMA抗体-CD3 $\gamma$ 、CD19抗体-CD3 $\epsilon$ 与BCMA抗体-CD3 $\epsilon$ 两者、或CD19抗体-CD3 $\epsilon$ +BCMA抗体-CD3 $\gamma$ 转导的细胞的结果。

[0179] 图3A显示由抗CD20抗体利妥昔单抗(rituximab)结合的CD20<sup>+</sup>Raji细胞的示意图,所述利妥昔单抗转而由用CD16 TFP转导的T细胞结合,从而导致诱导细胞溶解(图3A)。当使用非糖基化利妥昔单抗时,CD16 TFP不能结合抗体,因此不诱导靶标细胞溶解(图3B)。

[0180] 图4A显示对在针对CD16(CD16抗体,x轴)和CD3(y轴)加以染色的细胞的情况下TFP的表面表达的确认。从左至右显示的是非转导或用:CD16-CD3 $\epsilon$  TFP、CD16-CD3 $\gamma$  TFP、CD16-CD3 $\delta$  TFP和CD16-CD3 $\beta$ 构建体转导的细胞(顶行);以及非转导、用CD16-CD28 $\zeta$ CAR、CD16-41BB $\zeta$  CAR和作为阳性对照的CD19抗体-CD3 $\epsilon$  TFP转导的细胞。CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>细胞的比例显示于各图版的右上角中。Zenon染色的示例性结果显示于图4B中。为证明方法的准确性,未染色或已用CD19抗体染色的Raji细胞(表达CD19与CD20两者)根据以上方法使用抗CD19 TFP进行处理。图4C显示利妥昔单抗与无糖基化利妥昔单抗两者均能够结合CD19<sup>+</sup>Raji细胞。

[0181] 图5显示单体和二聚NKG2D  $\epsilon$  TFP T细胞结构以及携带单体和二聚NKG2D  $\epsilon$  TFP构建体的慢病毒载体的图解。顶部图版显示具有NKG2D特异性亚单位的完整T细胞受体,所述亚单位具有单体或二聚NKG2D结合剂。底部图版显示构建体的布局的示意图。

[0182] 图6A是Zenon染色的迹线,其显示NKG2D-CD3 $\epsilon$  TFP T细胞在ULBP2肽刺激后增殖。图6B显示肿瘤细胞上的NKG2DL抗原表达:OVCAR3和OVCAR5细胞具有不同水平的在细胞表面上的NKG2DL表达,而AE17小鼠细胞系呈NKG2DL表达阴性。箭号指示TFP T细胞增殖(在72小时之后CFSE染料稀释)。

[0183] 图7A-图7C显示RTCA分析的迹线,所述RTCA分析是对在5:1(图7A)、1:1(图7B)或1:5(图7C)效应细胞:靶标细胞比率下,在卵巢癌细胞系OVCAR3和OVCAR5以及作为阴性对照的AE17间皮素<sup>+</sup>细胞系的情况下,单体和二聚体NKG2D  $\epsilon$  TFP T细胞针对NKG2D配体阳性细胞的活性所进行。这个图显示NKG2D  $\epsilon$  TFP T细胞在体外不有效杀灭非转导T细胞(NT),但特异性杀灭NKG2DL<sup>+</sup>卵巢癌细胞,最特别是在较高效应细胞:靶标细胞比率下。

[0184] 图8A-图8C是一系列显示如在荧光素酶测定中测量的肿瘤细胞溶解的图。T细胞用空表达载体或以下TFP转导:CD19抗体-CD3 $\epsilon$ 、BCMA抗体-CD3 $\epsilon$ 、BCMA抗体-CD3 $\gamma$ 、CD19抗体-CD3 $\epsilon$ /BCMA抗体-CD3 $\epsilon$ 、CD19抗体-CD3 $\epsilon$ /BCMA抗体-CD3 $\gamma$ 、CD19抗体-CD3 $\epsilon$ +BCMA抗体-CD3 $\epsilon$ 、或CD19抗体-CD3 $\epsilon$ +BCMA抗体-CD3 $\gamma$ 。使经转导T细胞与稳定表达CD19的HeLa细胞(图8A)、稳定表达BCMA的HeLa细胞(图8B)、或稳定表达CD19与BCMA两者的HeLa细胞(图8C)一起孵育。

“/”是指用采用两种病毒转导的T细胞群体进行的测定,一种病毒具有抗BCMA TFP,并且一种病毒具有抗CD19 TFP;“+”是指使用已加以组合的两种T细胞群体,一种T细胞群体用抗BCMA TFP转导,并且一种T细胞群体用抗CD19 TFP转导。使T细胞与靶标HeLa细胞混合,并且一起孵育24小时。将细胞旋转以获得集结块,并且再混悬于含有荧光素酶底物的培养基中。荧光素酶通过细胞溶解来释放;因此,较高荧光素酶活性对应于较大细胞死亡百分比。

[0185] 图9A-图9C是一系列显示如在于图8中所示的分析中集结的细胞的上清液中测量的细胞因子产生的图。进行Luminex®ELISA测定以检测和定量IFN  $\gamma$  (影线棒条)和IL-2 (实心棒条)的量。如上,使经转导T细胞与稳定表达CD19的HeLa细胞(图9A)、稳定表达BCMA的HeLa细胞(图9B)、或稳定表达CD19与BCMA两者的HeLa细胞(图9C)一起孵育。“/”是指用采用两种病毒转导的T细胞群体进行的测定,一种病毒具有抗BCMA TFP,并且一种病毒具有抗CD19TFP;“+”是指使用已加以组合的两种T细胞群体,一种T细胞群体用抗BCMA TFP转导,并且一种T细胞群体用抗CD19 TFP转导。总细胞因子产生显示在Y轴上。

[0186] 图10A-图10D是一系列显示如实施例9中所述的实时细胞毒性测定(RTCA)的结果的图像。在实时细胞分析器(RTCA)测定中测定指示细胞毒性的标准化细胞指数。表2概述用于实施例中的构建体。

[0187] 图11是两个显示CD16阳性T细胞在1 $\mu$ g/ml CD20抗体(利妥昔单抗)存在下而非在非糖基化CD20存在下高效达成CD20阳性肿瘤溶解的图。图11A显示在利妥昔单抗和各种经转导T细胞的组合的情况下的Raji细胞溶解;图11B显示与非糖基化利妥昔单抗的相同组合。

[0188] 图12是两个显示相较于由CAR转导的T细胞产生的较高水平的细胞因子,由与Raji细胞和利妥昔单抗组合的TFP转导的T细胞产生低水平的干扰素  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ,图12A)和白介素2(IL-2,图12B)的图。

[0189] 图13是采用Dynabeads™+IL-2条件进行的离体扩增实验设计以及通过流式细胞计量术测定NKG2D  $\epsilon$  TFP T细胞的转导效率的示意图(图13A)以及单体和二聚体NKG2D  $\epsilon$  TFP T细胞的相应转导效率(图13B)。同种型匹配用作阴性对照。

[0190] 图14显示多种实体肿瘤细胞系上的NKG2D配体表达以及由NKG2D  $\epsilon$  TFP T细胞达成的体外肿瘤细胞溶解。图14A显示使用(从左至右)ULBP1抗体、ULBP2/5/6抗体、ULBP3抗体、ULBP4抗体和MICA/B抗体在MST0-MSLN-Luc细胞、OVCAR3-Luc、SaOS2-Luc和SKOV3-Luc细胞上进行针对NKG2D配体的Zenon染色。在各图中,顶部迹线是NKG2D配体,中间迹线是同种型对照或单独二级抗体,并且底部迹线是未染色细胞。图14B显示对于24小时共培养,使用荧光素酶测定,由NKG2D单体和/或二聚体 $\epsilon$  TFP T细胞达成的体外肿瘤溶解。图14C显示A549、A431、U373和PC-3肿瘤细胞系上的ULBP2/5/6和MICA/B表达,以及对于24小时共培养,使用荧光素酶测定,由NKG2D二聚体 $\epsilon$  TFP T细胞达成的肿瘤溶解。图14D显示图14C中所示的结果的图。

[0191] 图15是一系列显示NKG2D  $\epsilon$  TFP T细胞在NSG小鼠中在间皮素表达性肿瘤异种移植物的情况下的体内功效的图。图15A显示在注射当天MST0-MSLN细胞上的NKG2D配体(ULBP2/5/6和MICA/B)表达(肿瘤QC)。图15B显示在注射当天NT和NKG2D二聚体 $\epsilon$  TFP T细胞上的NKG2D表达(T细胞QC)。图15C显示在两种剂量:5 $\times 10^6$ 个NKG2D  $\epsilon$  TFP细胞和1 $\times 10^6$ 个NKG2D  $\epsilon$  TFP细胞下,用两次剂量的非转导(“NT”、左侧图版)或NKG2D二聚体 $\epsilon$  TFP T细胞治



疗的小鼠的肿瘤体积。在第0和第20研究日注射T细胞。图中的各线代表一只小鼠。图15D显示用两次剂量的NT或NKG2D二聚体 $\epsilon$  TFP T细胞治疗的小鼠的存活率,NT相对于NKG2D二聚体 $\epsilon$  TFP T,  $P < 0.05$ 。

### 具体实施方式

[0192] 本文提供用于使用T细胞受体 (TCR) 融合蛋白或T细胞群体来治疗疾病诸如癌症的物质组合物和使用方法。如本文所用,“T细胞受体 (TCR) 融合蛋白”或“TFP”包括源于构成TCR的各种多肽的重组多肽,其通常能够i) 结合靶标细胞上的表面抗原,以及ii) 通常在共定位于T细胞中或T细胞的表面上时与完整TCR复合物的其他多肽组分相互作用。如本文所提供,相较于嵌合抗原受体,TFP提供实质性益处。术语“嵌合抗原受体”,或替代地,“CAR”是指包含呈scFv形式的细胞外抗原结合结构域、跨膜结构域和包含源于如下定义的刺激性子功能性的信号传导结构域的细胞质信号传导结构域(在本文中也称为“细胞内信号传导结构域”)的重组多肽。通常,CAR的主要细胞内信号传导结构域源于通常发现与TCR复合物相关联的CD3 $\zeta$ 链。CD3 $\zeta$ 信号传导结构域可与一个或多个源于至少一种共刺激性分子诸如4-1BB (即CD137)、CD27和/或CD28的功能性信号传导结构域融合。

[0193] 在一个方面,本文描述编码T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP) 的经分离核酸分子,所述融合蛋白包含TCR亚单位以及包含抗肿瘤抗原结合结构域诸如抗BCMA结合结构域、抗CD19结合结构域、抗CD20结合结构域、抗CD22结合结构域等的人或人源化抗体结构域。在一些实施方案中,TCR亚单位包含TCR细胞外结构域。在其他实施方案中,TCR亚单位包含TCR跨膜结构域。在其他实施方案中,TCR亚单位包含TCR细胞内结构域。在其他实施方案中,TCR亚单位包含(i) TCR细胞外结构域,(ii) TCR跨膜结构域,和(iii) TCR细胞内结构域,其中(i)、(ii)和(iii)中的至少两者来自同一TCR亚单位。在其他实施方案中,TCR亚单位包含TCR细胞内结构域,其包含选自CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\gamma$ 或CD3 $\delta$ 的细胞内信号传导结构域的刺激性的结构域或具有至少1个、2个或3个对其进行的修饰的氨基酸序列。在其他实施方案中,TCR亚单位包含细胞内结构域,其包含选自4-1BB的功能性信号传导结构域和/或CD3 $\zeta$ 的功能性信号传导结构域的刺激性的结构域或具有至少1个、2个或3个对其进行的修饰的氨基酸序列。

[0194] 在一些实施方案中,人或人源化抗体结构域包含抗体片段。在一些实施方案中,人或人源化抗体结构域包含scFv或V<sub>H</sub>结构域。

[0195] 在一些实施方案中,经分离核酸分子包含(i) 本文提供的任何抗肿瘤相关抗原轻链结合结构域氨基酸序列的轻链(LC) CDR1、LC CDR2和LC CDR3,和/或(ii) 本文提供的任何抗肿瘤相关抗原重链结合结构域氨基酸序列的重链(HC) CDR1、HC CDR2和HC CDR3。

[0196] 在一些实施方案中,轻链可变区包含本文提供的轻链可变区的氨基酸序列的具有至少1个、2个或3个修饰但不超过30、20或10个修饰的氨基酸序列,或与本文提供的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。在其他实施方案中,重链可变区包含本文提供的重链可变区的氨基酸序列的具有至少1个、2个或3个修饰但不超过30、20或10个修饰的氨基酸序列,或与本文提供的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。

[0197] 在一些实施方案中,TFP包括TCR亚单位的细胞外结构域,其包括选自由以下组成的组的蛋白质的细胞外结构域或其部分或其功能性片段或具有对其进行的至少1个、2个或3个修饰但不超过20、10或5个修饰的氨基酸序列:T细胞受体的 $\alpha$ 或 $\beta$ 链、CD3 $\delta$ 、CD3 $\epsilon$ 或CD3 $\gamma$ 。

在其他实施方案中,所编码TFP包括跨膜结构域,其包括选自以下组成的组的蛋白质的跨膜结构域或其功能性片段或具有对其进行的至少1个、2个或3个修饰但不超过20、10或5个修饰的氨基酸序列:TCR的 $\alpha$ 、 $\beta$ 链或TCR亚单位CD3 $\epsilon$ 、CD3  $\gamma$  和CD3 $\delta$ 。

[0198] 在一些实施方案中,所编码TFP包括跨膜结构域,其包括选自以下组成的组的蛋白质的跨膜结构域、其功能性片段及其具有对其进行的至少1个、2个或3个修饰但不超过20个修饰的氨基酸序列:TCR $\alpha$ 链、TCR $\beta$ 链、TCR $\zeta$ 链、CD3 $\epsilon$  TCR亚单位、CD3  $\gamma$  TCR亚单位、CD3 $\delta$  TCR亚单位、CD45、CD2、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD28、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137和CD154。

[0199] 在一些情况下,经分离核酸分子进一步包含编码共刺激性结构域的序列。在一些情况下,共刺激性结构域是从选自以下组成的组的蛋白质获得的功能性信号传导结构域及其具有至少1个但不超过20个对其进行的修饰的氨基酸序列:DAP10、DAP12、CD30、LIGHT、OX40、CD2、CD27、CD28、CDS、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)、ICOS (CD278) 和4-1BB (CD137)。在一些情况下,经分离核酸分子进一步包含前导序列。在一些情况下,经分离核酸分子是mRNA。

[0200] 在一些情况下,TFP包括TCR亚单位的免疫受体酪氨酸基活化基序(ITAM),其包括选自以下组成的组的蛋白质的ITAM或其部分、其功能性片段及其具有至少1个但不超过20个对其进行的修饰的氨基酸序列:CD3 $\zeta$  TCR亚单位、CD3 $\epsilon$  TCR亚单位、CD3  $\gamma$  TCR亚单位、CD3 $\delta$  TCR亚单位、TCR $\zeta$ 链、Fc $\epsilon$ 受体1链、Fc $\epsilon$ 受体2链、Fc  $\gamma$  受体1链、Fc  $\gamma$  受体2a链、Fc  $\gamma$  受体2b1链、Fc  $\gamma$  受体2b2链、Fc  $\gamma$  受体3a链、Fc  $\gamma$  受体3b链、Fc $\beta$ 受体1链、TYROBP (DAP12)、CD5、CD16a、CD16b、CD22、CD23、CD32、CD64、CD79a、CD79b、CD89、CD278、CD66d。在一些情况下,ITAM替代CD3  $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 或CD3 $\epsilon$ 的ITAM。在一些情况下,ITAM选自自由CD3 $\zeta$  TCR亚单位、CD3 $\epsilon$  TCR亚单位、CD3  $\gamma$  TCR亚单位和CD3 $\delta$  TCR亚单位组成的组,并且替代选自自由CD3 $\zeta$  TCR亚单位、CD3 $\epsilon$  TCR亚单位、CD3  $\gamma$  TCR亚单位和CD3 $\delta$  TCR亚单位组成的组的不同ITAM。

[0201] 在一些情况下,核酸包含核苷酸类似物。在一些情况下,核苷酸类似物选自自由以下组成的组:2'-O-甲基、2'-O-甲氧基乙基(2'-O-MOE)、2'-O-氨基丙基、2'-脱氧、T-脱氧-2'-氟代、2'-O-氨基丙基(2'-O-AP)、2'-O-二甲基氨基乙基(2'-O-DMAOE)、2'-O-二甲基氨基丙基(2'-O-DMAP)、T-O-二甲基氨基乙基氧基乙基(2'-O-DMAEOE)、经2'-O-N-甲基乙酰胺基(2'-O-NMA)修饰、锁定核酸(LNA)、亚乙基核酸(ENA)、肽核酸(PNA)、1',5'-失水己糖醇核酸(HNA)、吗啉代、甲基膦酸酯核苷酸、硫代膦酸酯核苷酸和2'-氟代N3-P5'-亚磷酰胺。

[0202] 在一些实施方案中,所编码抗肿瘤相关抗原结合结构域通过接头序列来连接于TCR细胞外结构域。在一些情况下,所编码接头序列包含(G<sub>4</sub>S)<sub>n</sub>,其中n=1至4。在一些情况下,所编码接头序列包括长接头(LL)序列。在一些情况下,所编码长接头序列包含(G<sub>4</sub>S)<sub>n</sub>,其中n=2至4。在一些情况下,所编码接头序列包括短接头(SL)序列。在一些情况下,所编码短接头序列包含(G<sub>4</sub>S)<sub>n</sub>,其中n=1至3。

[0203] 在一些实施方案中,经分离核酸分子进一步包含前导序列。

[0204] 本文也提供由任何先前所述核酸分子编码的经分离多肽分子。

[0205] 在另一方面,本文也提供经分离T细胞受体融合蛋白(TFP)分子,其包含人或人源化抗肿瘤相关抗原结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域。在一些实施方案中,经分离TFP分子包含含有人或人源化抗肿瘤相关抗原结合结构域的抗体或抗体

片段、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域。

[0206] 在一些实施方案中,抗肿瘤相关抗原结合结构域是scFv或V<sub>H</sub>结构域。在其他实施方案中,抗肿瘤相关抗原结合结构域包含具有本文提供的氨基酸序列的轻链和重链或其功能性片段,或本文提供的轻链可变区的氨基酸序列的具有至少1个、2个或3个修饰但不超过30、20或10个修饰的氨基酸序列,或与本文提供的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。在一些实施方案中,经分离TFP分子包含TCR细胞外结构域,其包括选自以下组成的组的蛋白质的细胞外结构域或其部分或具有对其进行至少1个、2个或3个修饰但不超过20、10或5个修饰的氨基酸序列:T细胞受体的 $\alpha$ 或 $\beta$ 链、CD3 $\delta$ 、CD3 $\epsilon$ 或CD3 $\gamma$ 。

[0207] 在一些实施方案中,抗肿瘤相关抗原结合结构域通过接头序列来连接于TCR细胞外结构域。在一些情况下,接头区域包含(G<sub>4</sub>S)<sub>n</sub>,其中n=1至4。在一些情况下,接头序列包括长接头(LL)序列。在一些情况下,长接头序列包含(G<sub>4</sub>S)<sub>n</sub>,其中n=2至4。在一些情况下,接头序列包括短接头(SL)序列。在一些情况下,短接头序列包含(G<sub>4</sub>S)<sub>n</sub>,其中n=1至3。

[0208] 在一些实施方案中,经分离TFP分子进一步包含编码共刺激性结构域的序列。在其他实施方案中,经分离TFP分子进一步包含编码细胞内信号传导结构域的序列。在其他实施方案中,经分离TFP分子进一步包含前导序列。

[0209] 本文也提供包含编码任何先前所述TFP分子的核酸分子的载体。在一些实施方案中,载体选自以下组成的组:DNA、RNA、质粒、慢病毒载体、腺病毒载体或逆转录病毒载体。在一些实施方案中,载体进一步包含启动子。在一些实施方案中,载体是在体外转录的载体。在一些实施方案中,载体中的核酸序列进一步包含poly(A)尾部。在一些实施方案中,载体中的核酸序列进一步包含3' UTR。

[0210] 本文也提供包含任何所述载体的细胞。在一些实施方案中,细胞是人T细胞。在一些实施方案中,细胞是CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>T细胞。在一个实施方案中,CD8<sup>+</sup>细胞是 $\gamma$ - $\delta$  T细胞。在另一实施方案中,CD8<sup>+</sup>细胞是NK-T细胞。在其他实施方案中,细胞进一步包含编码抑制性分子的核酸,所述抑制性分子包含含有抑制性分子的至少一部分的第一多肽与含有来自细胞内信号传导结构域的正性信号的第二多肽缔合。在一些情况下,抑制性分子包含含有PD1的至少一部分的第一多肽和含有共刺激性结构域和初级信号传导结构域的第二多肽。

[0211] 在另一方面,本文提供经分离TFP分子,其包含人或人源化抗肿瘤相关抗原(TAA)结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域,其中所述TFP分子能够功能性地与内源性TCR复合物和/或至少一种内源性TCR多肽相互作用。

[0212] 在另一方面,本文提供经分离TFP分子,其包含人或人源化抗TAA结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域,其中所述TFP分子能够功能性地整合至内源性TCR复合物中。

[0213] 在另一方面,本文提供包含一种或多种TFP分子的人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>T细胞,所述TFP分子包含人或人源化抗肿瘤相关抗原结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域,其中所述TFP分子能够功能性地与在所述人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>T细胞中、所述人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>T细胞的表面处和/或表面上的内源性TCR复合物和/或至少一种内源性TCR多肽相互作用。在另一方面,细胞包含至少两种非相同TFP分子。

[0214] 在另一方面,本文提供蛋白质复合物,其包含i) TFP分子,其包含人或人源化抗肿瘤相关抗原结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域;和ii) 至少一种内

源性TCR复合物。

[0215] 在一些实施方案中,TCR包含选自由以下组成的组的蛋白质的细胞外结构域或其部分:T细胞受体的 $\alpha$ 或 $\beta$ 链、CD3 $\delta$ 、CD3 $\epsilon$ 或CD3 $\gamma$ 。在一些实施方案中,抗肿瘤相关抗原结合结构域通过接头序列来连接于TCR细胞外结构域。在一些情况下,接头区域包含 $(G_4S)_n$ ,其中 $n=1$ 至4。在一些情况下,接头序列包括长接头(LL)序列。在一些情况下,长接头序列包含 $(G_4S)_n$ ,其中 $n=2$ 至4。在一些情况下,接头序列包括短接头(SL)序列。在一些情况下,短接头序列包含 $(G_4S)_n$ ,其中 $n=1$ 至3。

[0216] 本文也提供在每个任何所述蛋白质复合物中包含至少两种不同TFP蛋白的人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>T细胞。

[0217] 在另一方面,本文提供一种人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>T细胞群体,其中所述群体的所述T细胞单独地或总体地包含至少两种TFP分子,所述TFP分子包含人或人源化抗肿瘤相关抗原结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域,其中所述TFP分子能够功能性地与在所述人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>T细胞中、所述人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>T细胞的表面处和/或表面上的内源性TCR复合物和/或至少一种内源性TCR多肽相互作用。

[0218] 在另一方面,本文提供一种人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>T细胞群体,其中所述群体的所述T细胞单独地或总体地包含至少两种由本文提供的经分离核酸分子编码的TFP分子。

[0219] 在另一方面,本文提供制备细胞的方法,其包括用任何所述载体转导T细胞。

[0220] 在另一方面,本文提供产生经RNA工程改造的细胞的群体的方法,其包括将在体外转录的RNA或合成RNA引入细胞中,其中所述RNA包含编码所述TFP分子中的一者或多者的核酸。

[0221] 在另一方面,本文提供在哺乳动物中提供抗肿瘤免疫性的方法,其包括向所述哺乳动物施用有效量的表达任何所述TFP分子的细胞。在一些实施方案中,细胞是自体T细胞。在一些实施方案中,细胞是同种异体T细胞。在一些实施方案中,哺乳动物是人。

[0222] 在另一方面,本文提供治疗患有与肿瘤相关抗原的表达相关的疾病的哺乳动物的方法,其包括向所述哺乳动物施用有效量的包含任何所述TFP分子的细胞。在一些实施方案中,与肿瘤相关抗原表达相关的疾病选自增生性疾病诸如癌症或恶性肿瘤、或癌前期疾患诸如骨髓发育不良、骨髓发育不良综合征或前白血病,或是与肿瘤相关抗原的表达相关的非癌症相关适应症。

[0223] 在一些实施方案中,疾病是选自由以下组成的组的血液癌症:一种或多种急性白血病,包括但不限于B细胞急性淋巴细胞性白血病(“B-ALL”)、T细胞急性淋巴细胞性白血病(“T-ALL”)、急性淋巴母细胞性白血病(ALL);一种或多种慢性白血病,包括但不限于慢性骨髓源性白血病(CML)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL);额外血液癌症或血液疾患,包括但不限于B细胞前淋巴细胞性白血病、母细胞性浆细胞样树突细胞赘瘤、伯基特氏淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、毛细胞白血病、小细胞或大细胞滤泡性淋巴瘤、恶性淋巴瘤组织增生性疾患、MALT淋巴瘤、套膜细胞淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、多发性骨髓瘤、郁积性多发性骨髓瘤、孤立性浆细胞瘤、淋巴浆细胞性淋巴瘤、浆细胞白血病、骨髓发育不良和骨髓发育不良综合征、非霍奇金氏淋巴瘤、浆母细胞性淋巴瘤、浆细胞样树突细胞赘瘤、瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症和是一批由于骨髓性血细胞的低效产生(或发育不良)而合并在一起的不同血液疾患的“前白血病”、以及与肿瘤相关抗原表达相关的疾病,包括但不限于非典型

和/或非经典癌症、恶性肿瘤、癌前期疾患或表达肿瘤相关抗原的增生性疾病;及其组合。

[0224] 在一些实施方案中,表达任何所述TFP分子的细胞与改善一种或多种与施用表达TFP分子的细胞相关的副作用的药剂组合施用。在一些实施方案中,表达任何所述TFP分子的细胞与治疗与肿瘤相关抗原相关的疾病的药剂组合施用。

[0225] 本文也提供用作药剂的任何所述经分离核酸分子、任何所述经分离多肽分子、任何所述经分离TFP、任何所述蛋白质复合物、任何所述载体或任何所述细胞。

[0226] 定义

[0227] 除非另外定义,否则本文所用的所有技术和科学术语都具有与由本发明所属领域中的普通技术人员通常理解相同的含义。

[0228] 术语“一个(种)(a/an)”是指冠词的一个或超过一个(即至少一个)语法对象。举例来说,“一个(种)要素”意指一个(种)要素或超过一个(种)要素。

[0229] 如本文所用,视情况而定并且由或可由本领域技术人员所知,“约”可意指加上或减去小于1%或1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%或大于30%。术语“约”或“近似”可意指在如由本领域普通技术人员测定的特定值的可接受误差范围内,所述可接受误差范围将部分地取决于如何测量或测定所述值,即测量系统的限制。举例来说,“约”可意指根据本领域中的规范在1个或大于1个标准偏差内。或者,“约”可意指给定值的多达20%、多达10%、多达5%或多达1%的范围。或者,特别是关于生物系统或方法,术语“约”或“近似”可意指在某一值的某一数量级内,在5倍内,并且更优选在2倍内。当在本申请和权利要求中描述特定值时,除非另外陈述,否则应设想意指在特定值的可接受误差范围内的术语“约”。术语“约”可具有如由本领域普通技术人员通常理解的含义。术语“约”可指 $\pm 10\%$ 。术语“约”可指 $\pm 5\%$ 。

[0230] 如本文在说明书中所用,“受试者”或“个体”可包括但不限于哺乳动物诸如人或非人哺乳动物,例如驯化动物、农业动物或野生动物,以及鸟类和水生动物。“患者”是罹患疾病、病症或疾患或处于显现疾病、病症或疾患的风险下或另外需要本文提供的组合物和方法的受试者。

[0231] 如本文所用,“治疗”是指在治疗或改善疾病或疾患方面的任何成功迹象。治疗可包括例如减轻、延迟或缓和疾病或疾患的一种或多种症状的严重性,或它可包括降低由患者经受疾病、缺陷、病症或不利状况等的症状所处的频率。如本文所用,“治疗或预防”有时在本文中用于指代导致某一水平的对疾病或疾患的治疗或改善的方法,并且涵盖一定范围的涉及那个结局的结果,包括但不限于完全预防疾患。

[0232] 如本文所用,“预防”是指防止患者的疾病或疾患例如肿瘤形成。举例来说,如果处于显现肿瘤或其他形式的癌症的风险下的个体用本发明方法治疗并且后来未显现所述肿瘤或其他形式的癌症,那么疾病在那个个体中已至少历经一段时期得以预防。

[0233] 如本文所用,“治疗有效量”是组合物或其活性组分的足以对被施用所述组合物的个体提供有益作用或另外减少有害非有益事件的量。就“治疗有效剂量”来说,其在本文中意指产生一种或多种施用所述剂量所要达成的所需或合乎需要(例如有益)作用的剂量,所述施用历经给定时期发生一次或多次。精确剂量将取决于治疗目的,并且将可由本领域技术人员使用已知技术确定(参见例如Lieberman, Pharmaceutical Dosage Forms (第1-3卷,1992); Lloyd, The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding

(1999);以及Pickar,Dosage Calculations(1999))。

[0234] 如本文所用,“T细胞受体(TCR)融合蛋白”或“TFP”包括源于构成TCR的各种多肽的重组多肽,其通常能够i)结合靶标细胞上的表面抗原,以及ii)通常在共定位于T细胞中或T细胞的表面上与完整TCR复合物的其他多肽组分相互作用。

[0235] 如本文所用,术语“BCMA”是指B细胞成熟抗原或“BCMA”或“BCM”,也称为肿瘤坏死因子受体超家族成员17(TNFRSF17)和分化簇269蛋白(CD269)或TNFRSF13A,是一种在人中由TNFRSF17基因编码的蛋白质。BCMA是TNF受体超家族的细胞表面受体,其识别B细胞活化因子(BAFF)。所述受体优先在成熟B淋巴细胞中表达,并且对于B细胞发育和自体免疫应答可为重要的。已显示这个受体特异性结合肿瘤坏死因子(配体)超家族成员13b(TNFSF13B/TALL-1/BAFF),并且导致NF- $\kappa$ B和MAPK8/JNK活化。它是配体BAFF和APRIL的非糖基化整合膜受体。BCMA的配体也可结合额外受体:TACI(跨膜活化子和钙调节子以及亲环蛋白配体相互作用因子),其结合APRIL和BAFF;以及BAFF-R(BAFF受体或BR3),其显示对BAFF的限定但高度亲和力。总之,这些受体和它们的相应配体调控体液免疫性、B细胞发育和体内平衡的不同方面。

[0236] BCMA的表达通常局限于B细胞谱系,并且据报道在终末B细胞分化中增加。BCMA由人浆母细胞、来自扁桃体、脾和骨髓的浆细胞表达,但也由扁桃体记忆B细胞以及由具有TACI-BAFFR低表型的生发中心B细胞表达(Darce等,2007)。BCMA实际上不存在于原初和记忆B细胞上(Novak等,2004a和b)。BCMA抗原在细胞表面上表达,因此可为抗体所及,但也在高尔基体中表达。如由它的表达概况所表明,通常与B细胞存活和增殖相关联的BCMA信号传导在B细胞分化的晚期中以及在长寿骨髓浆细胞(O'Connor等,2004)和浆母细胞(Avery等,2003)的存活方面是重要的。此外,因为BCMA以高亲和力结合APRIL,所以提出BCMA-APRIL信号传导轴在B细胞分化的稍后时期起主要作用,也许是在生理上最相关的相互作用。

[0237] 人和鼠氨基酸和核酸序列可见于公共数据库诸如GenBank、UniProt和Swiss-Prot中。举例来说,人BCMA的氨基酸序列可以UniProt/Swiss-Prot登录号Q02223得见。人BCMA多肽典型序列是UniProt登录号Q02223-1:

MLQMAGQCSQNEYFDSLLHACIPCQLRCSSN  
TPPLTCQRYCNASVTNSVKGTNAILWTCLGLSLIISLAVFVLMFLLR  
KINSEPLKDEFKNTGSGLLGMANIDLEKSRTGDEIILPRGLEYTVEE  
CTCEDCIKSKPKVDSDFPLPAMEEGATILVTTKTNDYCKSLPAA  
LSATEIEKSISAR (SEQ ID NO:103)。

[0238] 人CD19多肽典型序列是UniProt登录号P15391(或P15391-2):

MPPPRLLFFLLFLTPMEVRPEEPLVVKVEEGDNAVLQCLKGTSDG  
PTQQLTWSRESPLKPFLKLSLGLPGLGIHMRPLAIWLFIFNVSQQM  
GGFYLCQPGPPSEKAWQPGWTVNVEGSGELFRWNVSDLGGLGC  
GLKNRSSEGPSSPSGKLMSPKLYVWAKDRPEIWEGEPPCLPPRDS  
LNQSLSQDLTMAPGSTLWLSCGVPPDSVSRGPLSWTHVHPKGPKS  
LLSLELKDDRPARDMWVMETGLLLPRATAQDAGKYYCHRGNLT  
MSFHLEITARPVLWHWLLRTGGWKVSAVTLAYLIFCLCSLVGILH  
LQRALVLRKRKRMTDPTRRFFKVTPPP GSGPQNQYGNVLSLPTP  
TSGLGRAQRWAAGLGGTAPSYGNPSSDVQADGALGSRSPPGVGP  
EEEEGEGYEEDSEEDSEFYENDSNLGQDQLSQDGSQYENPEDEP  
LGPEDEDSFSNAESYENENEDEELTQPVARTMDFLSPHGSAWDPSRE  
ATSLGSQSYEDMRGILYAAPQLRSIRGQPGPNHEEDADSYENMDN  
PDGPDPAWGGGGGRMGTWSTR (SEQ ID NO:104)。

[0239] 编码人CD19的核苷酸序列可以登录号NM001178098得见。CD19在包括例如ALL、CLL和非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)的大多数B谱系癌上表达。表达CD19的其他细胞在以下提供于对“与CD19的表达相关的疾病”的定义中。它也是正常B细胞祖细胞的早期标志物。参见例如Nicholson等Mol. Immun. 34 (16-17):1157-1165 (1997)。在一个实例中,TFP的抗原结合部分识别和结合如在恶性和正常B细胞上表达的CD19蛋白的细胞外结构域内的表位。

[0240] 如本文所用,术语“CD22”是指B细胞受体CD22,也称为B淋巴细胞细胞粘附分子(BL-CAM)、唾液酸结合Ig样凝集素2(Siglec-2)和T细胞表面抗原Leu-14。CD22介导B细胞与B细胞相互作用,并且可涉及于B细胞在淋巴组织中的定位。它结合唾液酸化糖蛋白,其中之一者是CD45,并且优先结合 $\alpha$ -2,6连接的唾液酸。唾液酸识别位点可通过与同一细胞表面上唾液酸的顺式相互作用来掩蔽。在配体诱导的酪氨酸磷酸化后,免疫应答似乎涉及于对B细胞抗原受体信号传导的调控中。CD22通过与Src家族酪氨酸激酶相互作用来在正性调控中起作用,并且也可通过募集细胞质磷酸酶(通过它们的SH2结构域)来充当抑制性受体,所述磷酸酶通过使信号传导分子脱磷酸来阻断信号转导。

[0241] CD22典型序列是 $\beta$ 亚型(五个亚型中的一者)并可以UniProt登录号P20273-1得见,并且对应于序列:MHLLGPWLLLLVLEYLAFSD



SSKWVFEHPETLYAWEGACVWIPCTYRALDGDLESFILFHNPEYN  
KNTSKFDGTRL YESTKD GKVPSEQKR VQFLGDKNKNCTLSIHPVH  
LNDSGQLGLRMESKTEKWMERIHLNVSERPFPPHIQLPPEIQESQE  
VTLTCLLNFS CYGYPIQLQWLLEGVPMRQAAVTSTSLTIKSVFTRS  
ELKFSPQWSHHGKIVTCQLQDADGKFLSNDTVQLNVKHTPKLEIK  
VTPSDAIVREGDSVTMTCEVSSSNPEYTTVSWLKDGTSLKKQNTF  
TLNLREVTKDQSGKYCCQVSNDVGPGRSEEVFLQVQY APEPSTV  
QILHSPA VEGSQVEFLCMSLANPLPTNYTWYHNGKEMQGRTEEK  
VHIPKILPWHAGTYSCVAENILGTGQRGPGAELDVQYPPKKVTTV  
IQNPMPIREGDTVTLS CNYNSSNPSVTRYEWKPHGA WEEPSLGVL  
KIQNVGWDNTTIACAACNSWCSWASPVALNVQYAPRDVRVRKI  
KPLSEIHSGNSVSLQCDFSSSHPK EVQFFWEKNGRLLGKESQLNFD  
SISPEDAGSYSCWVNNSIGQTASKAWTLEVLYAPRRLRVSMSPGD  
QVMEGKSATLTCESDANPPVSHYTWFDWNNQSLPYHSQKLRLEP  
VKVQHSGAYWCQGTNSVGKGRSPLSTLTVYYSPETIGRRVAVGL  
GSCLA LILAI CGLKLQRRWKRTQSQQGLQENSSGQSFFVRNKKV  
RRAPLSEGPLSLGCYNPMMEDGISYTTLRFPEMNIPRTGDAESSE  
MQRPPDCDDTVTYSALHKRQVGDYENVIPDFPEDEGIHYSELIQF  
GVGERPQAQENV DYVILKH。(SEQ ID NO:105)

[0242] 如本文所用,术语“ROR1”可指酪氨酸蛋白质激酶跨膜受体ROR1,也称为神经营养性酪氨酸激酶受体相关1蛋白(NTRKR1)或dJ537F10.1。它是一种在小鼠和人中由ROR1基因编码的蛋白质,并且连同ROR2一起是受体酪氨酸激酶样孤儿受体(ROR)家族的成员。ROR1是一种糖基化I型膜蛋白;它是缺乏催化活性的假激酶,并且可与非典型Wnt信号传导路径相互作用。ROR含有两个不同富含半胱氨酸的细胞外结构域和一个跨膜结构域。在细胞内部分内,ROR1具有酪氨酸激酶结构域、两个富含丝氨酸/苏氨酸的结构域和富含脯氨酸的结构域。这个基因在早期胚胎发育期间高度表达,但在正常(即非癌性)成人组织中在极低水平下表达。这个基因的表达增加与B细胞慢性淋巴细胞性白血病相关联。选择性剪接导致编码不同亚型的多个转录物变体。

[0243] 人和鼠氨基酸和核酸序列可见于公共数据库诸如GenBank、Uni Prot和Swiss-Prot中。举例来说,人ROR1多肽典型序列是UniProt登录号

**Q01973-1: MHRPRRRGTRPPLLALLAALLLAARGAAAQET**



ELSVSAELVPTSSWNISSELNKDSYLTLDPEMNNITTS LGQTAELHC  
KVSGNPPPTIRWFKNDAPVVQEPRRLSFRSTIYGSRLRIRNLDTTD  
TGYFQCVATNGKEVVSSTGVLFVKFGPPPTASPGYSDEYEEDGFC  
QPYRGIACARFIGNRTVYMESLHMQGEIENQITAAFTMIGTSSHLS  
DKCSQFAIPSLCHYAFPYCDETSSVPKPRDLRDECEILENVLCQTE  
YIFARSNPMILMRLKLPNCEDLPQPESPEAANCIRIGIPMADPINKN  
HKCYNSTGVDYRGTVSVTKSGRQCQPWNSQYPHTHTFTALRFPE  
LNGGHSYCRNPGNQKEAPWCFTLDENFKSDLCDIPACDSKDSKE  
KNKMEILYILVPSVAIPLAIALLLFFFCVCRNNQKSSSAPVQRQPKH  
VRGQNVEMSMLNAYKPKSKAKELPLSAVRFMEELGECAFGKIYK  
GHLYLPGMDHAQLVAIKTLKDYNPNPQQWTEFQQEASLMAELHHP  
NIVCLLGAVTQEQPVCMLFEYINQGDLHEFLIMRSPHSDVGCSSDE  
DGTVKSSLDHGDFLHIAIQIAAGMEYLSHFFVHKDLAARNILIGE  
QLHVKISDLGLSREIYSADYYRVQSKSLLPIRWMPPEAIMYGKFSS  
DSDIWSFGVVLWEIFSGLQPYYGFSNQEVIMVRKRQLLPCSEDC  
PPRMYSLMTECWNEIPSRRPRFKDIHVRLRSWEGLSSHTSSTTPSG  
GNATTQTTSLSASPVSNLSNPRYPNYMFPSQGITPQGQIAGFIGPIPI  
QNQRFIPINGYPIPPGYAAFPAAHYQPTGPPRVIQHCPPPKSRSPSSA  
SGSTSTGHVTSLPSSGSNQEANIPLLPHMSIPNHPGGMGITVFGNK  
SQKPYKIDSKQASLLGDANIHGHTESMISAEL (SEQ ID NO:20)。

[0244] 编码人ROR1转录物变体1的核苷酸序列可以登录号XM\_017001376得见。编码人ROR1转录物变体2的核苷酸序列可以登录号XM\_011541526得见。编码人ROR1转录物变体3的核苷酸序列可以登录号XM\_017001377得见。低水平的ROR1表达见于脂肪组织中,并且在较小程度上见于胰腺、肺和一子组中期B细胞中。

[0245] 如本文所用,术语“NKG2D”是指NKG2-D II型整合膜蛋白、NKG2-D、杀伤细胞凝集素样受体亚家族K成员1 (KLRK)、NK细胞受体D、NKG2-D活化NK受体和CD314。许多免疫受体由单独配体结合和信号转导亚单位组成。在天然杀伤(NK)细胞和T细胞中,DAP10被鉴定为与NKG2D的活化性受体复合物中的细胞表面衔接蛋白,所述NKG2D是应激诱导性和肿瘤相关主要组织相容性复合物分子MICA的受体。在DAP10细胞质结构域内,Src同源性2 (SH2) 结构域结合位点能够募集磷脂酰肌醇3激酶(PI 3激酶)的p85亚单位,从而提供NKG2D依赖性信号转导。因此,NKG2D-DAP10受体复合物使针对携带MICA的肿瘤的NK和T细胞应答活化。

[0246] NKG2D是具有C型凝集素样II型跨膜糖蛋白的同二聚体,通过跨膜结构域中与衔接头DAP10的跨膜结构域中带负电荷天冬氨酸缔合的带正电荷精氨酸来进行信号传导

(Charles L.Sentman,Cancer Immunity (2013年5月1日) 第13卷,第8页)。在人NK细胞和CD8<sup>+</sup>T细胞中,NKG2D增加与较高水平的 $\gamma$ 链细胞因子诸如IL-2、IL-7、IL-12和IL-15一起被观察到。已显示IL-21、IFN- $\gamma$ 和TGF- $\beta$ 使NKG2D表达降低。

[0247] NKG2D配体(NKG2DL)包括MHC区编码的MICA/B和第二家族的I类MHC相关蛋白ULBP,也称为视黄酸早期转录物(RAET)(Bahram等,1994,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91,6259-6263;Bauer等,1999,Science,7月30日;285(5428):727-9)。尽管MICA/B蛋白是MHC家族的一部分,但它们不递呈抗原,并且不与 $\beta$ 2微球蛋白缔合。迄今为止,六个基因ULBP1-6已被鉴定为属于ULBP家族(Cosman等,2001,Immunity 2月;14(2):123-33)。这些分子在它们的氨基酸序列方面是55-60%同源的,并且与MIC或MHC同等远缘相关。在功能上,ULBP不结合 $\beta$ 2微球蛋白或递呈抗原性肽,并且缺乏 $\alpha$ 3结构域(Eagle等,PLoS One 4:1-14,2009;Eagle等,Eur J Immunol 39:3207-30164:1-14,2009)。ULBP通过GPI锚定物来连接于细胞膜。

[0248] NKG2D配体在起源于结肠、肝、胃、乳腺、卵巢和肺的肿瘤细胞的表面上表达。它们也在包括AML、ALL、CML、CLL的非实体肿瘤上表达。在乳腺癌患者之中,NKG2DL表达增加与较高复发率相关联。

[0249] 人和鼠氨基酸和核酸序列可见于公共数据库诸如GenBank、UniProt和Swiss-Prot中。举例来说,人典型NKG2D序列(亚型1)对应于UniProt登录号P26718-1,并且具有序列

MGWIRGRRSRHSWEMSE  
FHNYNLDLKKSDFSTRWQKQRCPPVVKSKCRENASPFFFCFIAVA  
MGIRFIIMVAIWSAVFLNSLFNQEVQIPLTESYCGPCPKNWICYKNN  
CYQFFDESKNWYESQASCMSQNASLLKVYSKEDQDLLKLVKSYH  
WMGLVHIPTNGSWQWEDGSILSPNLLTIEMQKGDCALYASSFKG  
YIENCSTPNTYICMQRTV (SEQ ID NO:14)。

在一个实施方案中,用于TFP中的片段包含细胞外结构域序列

NSLFNQEVQIPLTESYCG  
PCPKNWICYKNNCYQFFDESKNWYESQASCMSQNASLLKVYSKE  
DQDLLKLVKSYHWMGLVHIPTNGSWQWEDGSILSPNLLTIEMQK  
GDCALYASSFKGYIENCSTPNTYICMQRTV (SEQ ID NO:110)。

[0250] 如本文所用,术语“CD16”可指以下两种不同亚型表达的50-80kDa糖蛋白:Fc $\gamma$ 受体IIIa(称为CD16、CD16a、CD16、CD16A、FcG3、FcGR3、FcGRIII、FcR-10、FcRIII、FcRIIIA、IGFR3、IMD20)和Fc $\gamma$ 受体IIIb(FCGR3B,UniProtKB Q9ULV2)。跨膜形式见于人NK细胞、巨噬细胞和肥大细胞上,而糖基磷脂酰肌醇(GPI)连接的形式存在于嗜中性白细胞上。人CD16抗原是聚集IgG的低亲和力受体。跨膜形式在信号转导、NK细胞活化和抗体依赖性细胞性细胞毒性中起作用。

[0251] 就“V158等位基因”或“V158变体”来说,其意指在残基158处具有缬氨酸的CD16多肽。在人群中,存在两个天然存在的CD16等位基因,即在残基158处具有苯丙氨酸(F)或缬氨酸(V)的等位基因。V158等位基因对IgG1抗体的Fc区具有更高亲和力,因此,在一个实施方案中,本文公开的TFP包含V158CD16多肽。相比于具有VF或FF基因型的患者,具有两个“V”

等位基因的患者对基于抗体的癌症疗法的响应更好。本文公开的方法提供一种用以在具有VF或FF基因型的患者中增强患者对IgG1治疗剂的响应的方式。参见例如Kudo等(2013) Cancer Res;74(1);1-11,其以引用的方式并入本文。

[0252] 人和鼠氨基酸和核酸序列可见于公共数据库诸如GenBank、UniProt和Swiss-Prot中。举例来说,人CD16亚型A是UniProt登录号P08637,并且具有序列:

MWQLLLPTALLLLVSAGMRTEDLPKAVV  
FLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASS  
YFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVF  
KEEDPIHLRCHSWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKA  
TLKDSGSYFCRGLFGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQV  
SFCLVMVLLFAVDTGLYFSVKTNIRSSTRDWKDHKFKWRKDPQD  
K (SEQ ID NO:23)。

[0253] 在一个实施方案中,CD16TFP组合物包含SEQ ID NO:23。在另一实施方案中,CD16TFP组合物包含SEQ ID NO:24,其是以SEQ ID NO:23阐述的序列的V158变化形式,并且具有序列MWQL

LLPTALLLLVSAGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQ  
GAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLS  
TLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHK  
VTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVS  
SETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQVSFCLVMVLLFAVDTGLYFSV  
KTNIRSSTRDWKDHKFKWRKDPQDK (SEQ ID NO:24)。

V158多态性的FCRG3A (CD16) 编码高亲和力免疫球蛋白Fc受体,并且与有利抗体疗法响应相关联(参见例如Kudo等,Cancer Res;74(1);93-103(2013),其以引用的方式并入本文)。

[0254] TFP组合物的包含抗体或其抗体片段的部分可以多种形式存在,其中抗原结合结构域表达为连续多肽链的一部分,包括例如单结构域抗体片段(sdAb)、源于鼠、人源化或人抗体的单链抗体(scFv) (Harlow等,1999,Using Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,N.Y.;Harlow等,1989,Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor,N.Y.;Houston等,1988,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883;Bird等,1988,Science 242:423-426)。在一个方面,TFP组合物的抗原结合结构域包含抗体片段。在另一方面,TFP包含包括scFv或sdAb的抗体片段。

[0255] 术语“抗原”或“Ag”可指能够由抗体特异性结合,或另外激起免疫应答的分子。这个免疫应答可涉及抗体产生、或特定免疫感受态细胞的活化、或两者。如本文所用,术语“癌症抗原”或“癌症相关抗原”可指在可用本文所述的组合疗法治疗的恶性或肿瘤细胞的表面上表达的任何癌细胞标志物,包括但不限于:5T4、8H9、 $\alpha v \beta 0$ 整合素、 $\alpha v \beta 6$ 整合素、 $\alpha$ 胎蛋白(AFP)、B7-H6、CA-125碳酸酐酶9(CA9)、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD38、CD44、CD44v6、

CD44v7/8、CD52、CD123、CD171、癌胚抗原(CEA)、EpCAM(上皮细胞粘附分子)、E-钙粘着蛋白(E-cadherin)、EMA(上皮膜抗原)、EGFRv111、上皮糖蛋白-2(EGP-2)、上皮糖蛋白-40(EGP-40)、ErbB1/EGFR、ErbB2/HER2/neu/EGFR2、ErbB3/HER3、ErbB4、上皮肿瘤抗原(ETA)、叶酸结合蛋白(FBP)、胎儿乙酰胆碱受体(AchR)、叶酸受体- $\alpha$ 、G250/CAIX、神经节苷脂2(GD2)、神经节苷脂3(GD3)、HLA-A1、HLA-A2、高分子量黑素瘤相关抗原(HMW-MAA)、IL-13受体 $\alpha$ 2(IL-13R $\alpha$ 2)、激酶插入结构域受体(KDR)、k-轻链、路易斯Y(Lewis Y, LeY)、L1细胞粘附分子、黑素瘤相关抗原(MAGE-A1)、间皮素、粘蛋白-1(MUC1)、粘蛋白-16(MUC16)、天然杀伤组2成员D(NKG2D)配体、神经细胞粘附分子(NCAM)、NY-ESO-1、癌胚抗原(h5T4)、前列腺干细胞抗原(PSCA)、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、受体酪氨酸激酶样孤儿受体1(ROR1)、由mAb IgE靶向的TAA、肿瘤相关糖蛋白-72(TAG-72)、酪氨酸酶和血管内皮生长因子(VEGF)受体。

[0256] 如本文所用的术语“抗体”是指源于免疫球蛋白分子的特异性结合抗原的蛋白质或多肽序列。抗体可为多克隆或单克隆来源的完整免疫球蛋白或其片段,并且可源于天然或重组来源。

[0257] 术语“抗体片段”或“抗体结合结构域”是指抗体的含有抗原结合结构域即完整抗体的抗原决定可变区的至少一个部分或其重组变体,所述抗原结合结构域足以赋予抗体片段对靶标诸如抗原和它的确定表位的识别和特异性结合。抗体片段的实例包括但不限于Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>和Fv片段、单链(sc)Fv(“scFv”)抗体片段、线性抗体、单结构域抗体(缩写为“sdAb”) (V<sub>L</sub>或V<sub>H</sub>)、骆驼科动物V<sub>H</sub>结构域以及由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0258] 术语“scFv”是指包含至少一个包含轻链的可变区的抗体片段和至少一个包含重链的可变区的抗体片段的融合蛋白,其中轻链可变区和重链可变区通过短柔性多肽接头来连续连接,并且能够表达为单一多肽链,并且其中scFv保留它所源于的完整抗体的特异性。

[0259] 关于抗体的“重链可变区”或“V<sub>H</sub>”(或在单结构域抗体例如纳米体的情况下,“V<sub>H</sub>”)是指重链的含有三个插入称为框架区的侧接链段之间的CDR的片段,这些框架区相比于CDR通常更加高度保守,并且形成用以支撑CDR的骨架。

[0260] 除非指定,否则如本文所用,scFv可具有例如关于多肽的N末端和C末端处于任一顺序的V<sub>L</sub>区和V<sub>H</sub>区,scFv可包含V<sub>L</sub>-接头-V<sub>H</sub>或可包含V<sub>H</sub>-接头-V<sub>L</sub>。

[0261] 本发明的TFP组合物的包含抗体或其抗体片段的部分可以多种形式存在,其中抗原结合结构域表达为连续多肽链的一部分,包括例如单结构域抗体片段(sdAb)或重链抗体HCAb。在一个方面,本发明的TFP组合物的抗原结合结构域包含抗体片段。在另一方面,TFP包含包括scFv或sdAb的抗体片段。

[0262] 术语“抗体重链”是指存在于呈它们的天然存在的构象的抗体分子中的两种类型的多肽链中的较大多肽链,并且其通常决定抗体所属的类别。

[0263] 术语“抗体轻链”是指存在于呈它们的天然存在的构象的抗体分子中的两种类型的多肽链中的较小多肽链。 $\kappa$ (“kappa”)和 $\lambda$ (“lambda”)轻链是指两种主要抗体轻链同种型。

[0264] 术语“重组抗体”是指使用重组DNA技术产生的抗体,诸如像由噬菌体或酵母表达系统表达的抗体。所述术语也应被解释为意指已通过合成编码抗体的DNA分子,并且所述DNA分子表达抗体蛋白质来产生或通过合成对抗体进行指定的氨基酸序列来产生的抗体,其中DNA或氨基酸序列已使用本领域中可用和熟知的重组DNA或氨基酸序列技术获得。术语“抗原”或“Ag”是指能够由抗体特异性结合,或另外激起免疫应答的分子。这个免疫应答可

涉及抗体产生、或特定免疫感受态细胞的活化、或两者。

[0265] 熟练技术人员将了解,包括实际上所有蛋白质或肽的任何大分子都可充当抗原。此外,抗原可源于重组或基因组DNA。熟练技术人员将了解,包含编码引发免疫应答的蛋白质的核苷酸序列或部分核苷酸序列的任何DNA都因此编码“抗原”(如这个术语在本文中所使用)。此外,本领域技术人员将了解,抗原无需只是由基因的全长核苷酸序列编码。显而易见的是本发明包括但不限于使用超过一个基因的部分核苷酸序列以及这些核苷酸序列以各种组合加以排列来编码引发所需免疫应答的多肽。此外,熟练技术人员将了解,抗原完全无需由“基因”编码。显而易见的是抗原可被合成产生,或可源于生物样品,或可为除多肽之外的大分子。这种生物样品可包括但不限于组织样品、肿瘤样品、细胞或具有其他生物组分的流体。

[0266] 术语“抗肿瘤作用”是指可通过各种方式来显现的生物作用,所述方式包括但不限于例如肿瘤体积降低、肿瘤细胞的数目降低、转移的数目降低、预期寿命增加、肿瘤细胞增殖降低、肿瘤细胞存活降低、或与癌性疾患相关的各种生理症状的改善。“抗肿瘤作用”也可通过本发明的肽、多核苷酸、细胞和抗体起初预防肿瘤发生的能力来显现。

[0267] 术语“自体”是指任何物质源于它稍后将被再引入其中的同一个体。

[0268] 术语“同种异体”是指任何物质源于与向其中引入所述物质的个体属于同一物种的不同动物或与所述个体不同的患者。当在一个或多个基因座处的基因不不同时,两个或更多个体被称为彼此同种异体。在一些方面,来自同一物种的个体的同种异体物质可在遗传上足够不相似以发生抗原性相互作用。

[0269] 术语“异种异体”是指移植物源于不同物种的动物。

[0270] 术语“癌症”可指特征在于异常细胞快速和不受控制生长的疾病。癌细胞可局部扩散,或通过血流和淋巴系统扩散至身体的其他部分。各种癌症的实例在本文中加以描述,并且包括但不限于前列腺癌、乳腺癌、黑素瘤、肉瘤、结肠直肠癌、胰腺癌、子宫癌、卵巢癌、胃癌(stomach cancer)、胃癌(gastric cancer)、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、膀胱癌、胆管癌、鳞状细胞肺癌、间皮瘤、肾上腺皮质癌、食道癌、头颈部癌、肝癌、鼻咽癌、神经上皮癌、腺样囊性癌、胸腺瘤、慢性淋巴细胞性白血病、神经胶质瘤、多形性胶质母细胞瘤、神经母细胞瘤、乳头状肾细胞癌、套膜细胞淋巴瘤、淋巴母细胞性白血病、急性骨髓性白血病等。

[0271] 术语“保守性序列修饰”是指不显著影响或改变含有氨基酸序列的抗体或抗体片段的结合特征的氨基酸修饰。所述保守性修饰包括氨基酸取代、添加和缺失。可通过本领域中已知的标准技术诸如定点诱变和PCR介导的诱变来将修饰引入本发明的抗体或抗体片段中。保守性氨基酸取代是其中氨基酸残基被具有类似侧链的氨基酸残基置换的氨基酸取代。本领域中已定义具有类似侧链的氨基酸残基的家族。这些家族包括具有碱性侧链的氨基酸(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、具有酸性侧链的氨基酸(例如天冬氨酸、谷氨酸)、具有不带电荷极性侧链的氨基酸(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸)、具有非极性侧链的氨基酸(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸)、具有 $\beta$ 分支侧链的氨基酸(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和具有芳族侧链的氨基酸(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。因此,本发明的TFP内的一个或多个氨基酸残基可来自同一侧链家族的其他氨基酸残基置换,并且可使用本文所述的功能性测定测试改变的TFP。

[0272] 术语“刺激”是指由以下方式诱导的初级应答：刺激性结构域或刺激性分子（例如TCR/CD3复合物）与它的同源配体结合，由此介导信号转导事件，诸如但不限于通过TCR/CD3复合物进行的信号转导。刺激可介导某些分子的表达改变和/或细胞骨架结构的重新组织等。

[0273] 术语“刺激性分子”或“刺激性结构域”是指由T细胞表达的提供初级细胞质信号传导序列的分子或其部分，所述序列以对于T细胞信号传导路径的至少某一方面具有刺激性的方式调控TCR复合物的初级活化。在一个方面，初级信号由例如TCR/CD3复合物与装载有肽的MHC分子的结合引发，并且此导致介导T细胞应答，包括但不限于增殖、活化、分化等。以刺激性方式起作用的初级细胞质信号传导序列（也被称为“初级信号传导结构域”）可含有称为免疫受体酪氨酸基活化基序或“ITAM”的信号传导基序。特别适用于本发明中的含ITAM初级细胞质信号传导序列的实例包括但不限于源于TCR $\zeta$ 、FcR $\gamma$ 、FcR $\beta$ 、CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 、CD3 $\epsilon$ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD278（也称为“ICOS”）和CD66d的那些。

[0274] 术语“抗原递呈细胞”或“APC”是指在它的表面上显示与主要组织相容性复合物（MHC）复合的外来抗原的免疫系统细胞，诸如辅助细胞（例如B细胞、树突细胞等）。T细胞可使用它们的T细胞受体（TCR）识别这些复合物。APC对抗原进行加工，并且将它们递呈于T细胞。

[0275] “细胞内信号传导结构域”，如所述术语在本文中所使用，是指分子的细胞内部分。细胞内信号传导结构域产生促进含有TFP的细胞例如TFP表达性T细胞的免疫效应物功能的信号。例如在TFP表达性T细胞的情况下，免疫效应物功能的实例包括细胞溶解活性和T辅助细胞活性，包括分泌细胞因子。在一实施方案中，细胞内信号传导结构域可包含初级细胞内信号传导结构域。示例性初级细胞内信号传导结构域包括源于导致初级刺激或抗原依赖性刺激的分子的那些。在一实施方案中，细胞内信号传导结构域可包含共刺激性细胞内结构域。示例性共刺激性细胞内信号传导结构域包括源于导致共刺激性信号或抗原非依赖性刺激的分子的那些。

[0276] 初级细胞内信号传导结构域可包含ITAM（“免疫受体酪氨酸基活化基序”）。含ITAM初级细胞质信号传导序列的实例包括但不限于源于CD3 $\zeta$ 、FcR $\gamma$ 、FcR $\beta$ 、CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 、CD3 $\epsilon$ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b以及CD66d DAP10和DAP12的那些。

[0277] 术语“共刺激性分子”是指T细胞上与共刺激性配体特异性结合，由此介导由T细胞达成的共刺激性应答诸如但不限于增殖的同源结合配偶体。共刺激性分子是除抗原受体或它们的配体以外的为高效免疫应答所需的细胞表面分子。共刺激性分子包括但不限于1类MHC分子、BTLA和To11配体受体以及OX40、CD2、CD27、CD28、CD30、CD40、ICAM-1、LFA-1（CD11a/CD18）和4-1BB（CD137）。共刺激性细胞内信号传导结构域可为共刺激性分子的细胞内部分。共刺激性分子可表示在以下蛋白质家族中：TNF受体蛋白、免疫球蛋白样蛋白质、细胞因子受体、整合素、信号传导淋巴细胞活化分子（SLAM蛋白）和活化性NK细胞受体。所述分子的实例包括CD27、CD28、4-1BB（CD137）、OX40、GITR、CD30、CD40、ICOS、BAFFR、HVEM、淋巴细胞功能相关抗原-1（LFA-1）、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、SLAMF7、NKp80、CD160、B7-H3和与CD83特异性结合的配体等。细胞内信号传导结构域可包含它所源于的分子的整个细胞内部分或整个天然细胞内信号传导结构域或其功能性片段。术语“4-1BB”是指TNFR超家族的具有以GenBank登录号AAA62478.2提供的氨基酸序列或来自非人物种例如小鼠、啮齿动物、猴、猿等的等效残基

的成员;并且“4-1BB共刺激性结构域”被确定为GenBank登录号AAA62478.2的氨基酸残基214-255或来自非人物种例如小鼠、啮齿动物、猴、猿等的等效残基。

[0278] 术语“编码”是指多核苷酸(诸如基因、cDNA或mRNA)中的特定核苷酸序列用以在生物过程中充当用于合成具有确定核苷酸序列(例如rRNA、tRNA和mRNA)或确定氨基酸序列以及由其所致的生物性质的其他聚合物和大分子的模板的固有性质。因此,如果对应于某一基因的mRNA的转录和翻译在细胞或其他生物系统中产生蛋白质,那么那个基因、cDNA或RNA编码所述蛋白质。编码链(其核苷酸序列与mRNA序列同一,并且通常提供在序列表中)与非编码链(用作用于基因或cDNA的转录的模板)两者均可称为编码那个基因或cDNA的蛋白质或其他产物。

[0279] 除非另外规定,否则“编码氨基酸序列的核苷酸序列”包括是彼此的简并形式并且编码相同氨基酸序列的所有核苷酸序列。短语编码蛋白质或RNA的核苷酸序列也可在编码所述蛋白质的核苷酸序列可在某一形式中含有一个或多个内含子的程度上包括内含子。

[0280] 术语“有效量”或“治疗有效量”在本文中可互换使用,并且是指如本文所述的化合物、制剂、物质或组合物的有效实现特定生物或治疗结果的量。

[0281] 术语“内源性”是指任何物质来自生物体、细胞、组织或系统或在其内部产生。

[0282] 术语“外源性”是指任何物质从生物体、细胞、组织或系统引入或在其外部产生。

[0283] 术语“表达”是指特定核苷酸序列的由启动子驱动的转录和/或翻译。

[0284] 术语“转移载体”是指包含经分离核酸,并且可用于将所述经分离核酸递送至细胞的内部中的物质组合物。众多载体在本领域中是已知的,包括但不限于线性多核苷酸、与离子性或两亲性化合物缔合的多核苷酸、质粒和病毒。因此,术语“转移载体”包括自主复制性质粒或病毒。所述术语也应解释为进一步包括有助于将核酸转移至细胞中的非质粒和非病毒化合物,诸如像聚赖氨酸化合物、脂质体等。病毒转移载体的实例包括但不限于腺病毒载体、腺相关病毒载体、逆转录病毒载体、慢病毒载体等。

[0285] 术语“表达载体”是指包含重组多核苷酸的载体,所述重组多核苷酸包含表达控制序列操作性地连接于待表达的核苷酸序列。表达载体包含足以用于表达的顺式作用性元件;用于表达的其他元件可由宿主细胞或在体外表达系统中供给。表达载体包括本领域中已知的所有那些,包括并有重组多核苷酸的粘粒、质粒(例如裸质粒或含于脂质体中的质粒)和病毒(例如慢病毒、逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒)。

[0286] 术语“慢病毒”是指逆转录病毒科的一个属。慢病毒在逆转录病毒之中在能够感染非分裂细胞方面是独特的;它们可将大量遗传信息递送至宿主细胞的DNA中,因此它们是基因递送载体的一种最高效方法。HIV、SIV和FIV是慢病毒的所有实例。

[0287] 术语“慢病毒载体”是指源于慢病毒基因组的至少一部分的载体,尤其包括自失活慢病毒载体,如Milone等,Mol. Ther. 17 (8):1453-1464 (2009) 中所提供。可在临床中使用的慢病毒载体的其他实例包括但不限于例如来自Oxford BioMedica的LENTIVECTOR™基因递送技术、来自Lentigen的LENTIMAX™载体系统等。非临床类型的慢病毒载体也是可用的,并且将为本领域技术人员所知。

[0288] 术语“同源性”或“同一性”是指两个聚合分子之间,例如两个核酸分子诸如两个DNA分子或两个RNA分子之间,或两个多肽分子之间的亚单位序列同一性。当两个分子中的某一亚单位位置均由相同单体亚单位占据时;例如如果两个DNA分子各自之中的某一位置



由腺嘌呤占据,那么它们在那个位置处是同源的或同一的。两个序列之间的同源性是匹配或同源性位置的数目的直接函数;例如如果两个序列中的半数位置(例如长度是10个亚单位的聚合物中的5个位置)是同源的,那么两个序列是50%同源的;如果90%的位置(例如10个中的9个)是匹配的或同源的,那么两个序列是90%同源的。

[0289] 非人(例如鼠)抗体的“人源化”形式是含有源于非人免疫球蛋白的最小序列的嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段(诸如Fv、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>或抗体的其他抗原结合子序列)。在很大程度上,人源化抗体及其抗体片段是人免疫球蛋白(接受者抗体或抗体片段),其中来自接受者的互补决定区(CDR)的残基被来自非人物种(供者抗体)诸如小鼠、大鼠或兔的CDR的具有所需特异性、亲和力和能力的残基置换。在一些情况下,人免疫球蛋白的Fv框架区(FR)残基被相应非人残基置换。此外,人源化抗体/抗体片段可包含既不见于接受者抗体中也不见于输入CDR或框架序列中的残基。这些修饰可进一步改进和优化抗体或抗体片段性能。一般来说,人源化抗体或其抗体片段将包含大致上全部至少一个,并且通常两个可变结构域,其中全部或大致上全部CDR区对应于非人免疫球蛋白的那些,并且全部或重大部分的FR区是人免疫球蛋白序列的那些。人源化抗体或抗体片段也可包含至少一部分免疫球蛋白恒定区(Fc),通常是人免疫球蛋白的至少一部分恒定区。对于其他细节,参见Jones等,Nature,321:522-525,1986;Reichmann等,Nature,332:323-329,1988;Presta, Curr.Op.Struct.Biol.,2:593-596,1992。

[0290] “人”或“完全人”是指免疫球蛋白诸如抗体或抗体片段,其中整个分子具有人来源或由与抗体或免疫球蛋白的人形式同一的氨基酸序列组成。

[0291] 术语“经分离”意指从天然状态改变或移除。举例来说,天然存在于活体动物中的核酸或肽不是“经分离的”,但部分地或完全地与它的天然状态的共存物质分离的相同核酸或肽是“经分离的”。经分离核酸或蛋白质可以大致上纯化形式存在,或可存在于非天然环境诸如像宿主细胞中。

[0292] 在本发明的情形下,使用代表通常存在的核酸碱基的以下缩写。“A”是指腺苷,“C”是指胞嘧啶,“G”是指鸟苷,“T”是指胸苷,并且“U”是指尿苷。

[0293] 术语“可操作地连接”或“转录控制”是指调控序列与异源性核酸序列之间的导致后者的表达的功能性连接。举例来说,当第一核酸序列与第二核酸序列以功能关系放置时,所述第一核酸序列与所述第二核酸序列可操作地连接。举例来说,如果启动子影响编码序列的转录或表达,那么所述启动子可操作地连接于所述编码序列。可操作地连接的DNA序列可彼此邻接,并且例如当有必要使两个蛋白质编码区接合时,处于同一阅读框中。

[0294] 术语“胃肠外”施用免疫原性组合物包括例如皮下(s.c.)、静脉内(i.v.)、肌肉内(i.m.)或胸骨内注射、肿瘤内或输注技术。

[0295] 术语“核酸”或“多核苷酸”是指呈单链或双链形式的脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)及其聚合物。除非明确限制,否则所述术语涵盖含有天然核苷酸的已知类似物的核酸,其与参照核酸具有类似结合性质,并且以与天然存在的核苷酸类似的方式进行代谢。除非另外指示,否则特定核酸序列也隐含地涵盖其保守修饰的变体(例如简并密码子取代)、等位基因、直系同源物、SNP和互补序列以及明确指示的序列。具体来说,简并密码子取代可通过产生其中一个或多个所选(或所有)密码子的第三位置被混合碱基和/或脱氧肌苷残基取代的序列来实现(Batzner等,Nucleic Acid Res.19:5081(1991);Ohtsuka等,



J.Biol.Chem.260:2605-2608(1985);以及Rossolini等,Mol.Cell.Probes 8:91-98(1994))。

[0296] 术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”可互换使用,并且是指包含由肽键共价连接的氨基酸残基的化合物。蛋白质或肽必须含有至少两个氨基酸,并且关于可构成蛋白质的序列或肽的序列的氨基酸的最大数目不设限制。多肽包括包含两个或更多个由肽键彼此接合的氨基酸的任何肽或蛋白质。如本文所用,所述术语是指也通常在本领域中被称为例如肽、寡肽和寡聚物的短链与通常在本领域中被称为其中存在许多类型的蛋白质的较长链两者。“多肽”包括例如生物活性片段、大致上同源性多肽、寡肽、同二聚体、异二聚体、多肽的变体、经修饰多肽、衍生物、类似物、融合蛋白以及其他多肽。多肽包括天然肽、重组肽或其组合。

[0297] 术语“启动子”是指由细胞的转录机构或引入的合成机构识别,为启动多核苷酸序列的特异性转录所需的DNA序列。

[0298] 术语“启动子/调控序列”是指为表达可操作地连接于启动子/调控序列的基因产物所需的核酸序列。在一些情况下,这个序列可为核心启动子序列,并且在其他情况下,这个序列也可包括增强子序列和为基因产物的表达所需的其他调控元件。启动子/调控序列可例如是以组织特异性方式表达基因产物的启动子/调控序列。

[0299] 术语“组成型”启动子是指当与编码或指定基因产物的多核苷酸可操作地连接时,导致所述基因产物在细胞的大多数或所有生理条件下在所述细胞中产生的核苷酸序列。

[0300] 术语“诱导型”启动子是指当与编码或指定基因产物的多核苷酸可操作地连接时,导致所述基因产物实质上仅当对应于启动子的诱导剂存在于细胞中时在所述细胞中产生的核苷酸序列。

[0301] 术语“组织特异性”启动子是指当与编码基因或由基因指定的多核苷酸可操作地连接时,导致基因产物实质上仅当细胞是具有对应于启动子的组织类型的细胞时才在所述细胞中产生的核苷酸序列。

[0302] 如在scFv的情形下使用的术语“接头”和“柔性多肽接头”是指由氨基酸诸如甘氨酸和/或丝氨酸残基组成的肽接头,其单独或组合用于将可变重链区和可变轻链区连接在一起。在一个实施方案中,柔性多肽接头是Gly/Ser接头,并且包含氨基酸序列(Gly-Gly-Gly-Ser)<sub>n</sub>,其中n是等于或大于1的正整数。举例来说,n=1,n=2,n=3,n=4,n=5,n=6,n=7,n=8,n=9以及n=10。在一个实施方案中,柔性多肽接头包括但不限于(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>4</sub>或(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>。在另一实施方案中,接头包括(Gly<sub>2</sub>Ser)、(GlySer)或(Gly<sub>3</sub>Ser)的多个重复。在本发明的范围内也包括W02012/138475(以引用的方式并入本文)中所述的接头。在一些情况下,接头序列包括长接头(LL)序列。在一些情况下,长接头序列包含(G<sub>4</sub>S)<sub>n</sub>,其中n=2至4。在一些情况下,接头序列包括短接头(SL)序列。在一些情况下,短接头序列包含(G<sub>4</sub>S)<sub>n</sub>,其中n=1至3。

[0303] 如本文所用,5'帽(也被称为RNA帽、RNA 7-甲基鸟苷帽或RNA m<sup>7</sup>G帽)是一种在转录开始之后不久已被添加至真核信使RNA的“前端”或5'末端中的经修饰鸟嘌呤核苷酸。5'帽由连接于第一转录核苷酸的末端基团组成。它的存在对由核糖体进行的识别以及保护免遭RNA酶至关重要。帽添加与转录联结,并且以共转录方式发生,以致各自影响另一者。在转录开始之后不久,所合成的mRNA的5'末端由与RNA聚合酶缔合的帽合成复合物结合。这个酶复合物催化为mRNA加帽所需的化学反应。合成以多步生物化学反应形式进行。加帽部分可

被修饰以调节mRNA的功能性诸如它的稳定性或翻译效率。

[0304] 如本文所用,“在体外转录的RNA”是指已在体外合成的RNA,优选是mRNA。通常,在体外转录的RNA由体外转录载体产生。体外转录载体包含用于产生在体外转录的RNA的模板。

[0305] 如本文所用,“poly (A)”是通过多腺苷酸化来连接于mRNA的一系列腺苷。在用于短暂表达的构建体的优选实施方案中,polyA在50与5000之间,优选大于64,更优选大于100,最优选大于300或400。Poly (A) 序列可以化学方式或以酶促方式修饰以调节mRNA功能性诸如定位、稳定性或翻译效率。

[0306] 如本文所用,“多腺苷酸化”是指多腺苷酰基部分或它的经修饰变体共价连接于信使RNA分子。在真核生物体中,大多数信使RNA (mRNA) 分子在3' 末端加以多腺苷酸化。3' poly (A) 尾部是通过酶多腺苷酸聚合酶的作用来添加至前mRNA中的腺嘌呤核苷酸长序列(经常数百个腺嘌呤核苷酸)。在高等真核生物中,poly (A) 尾部添加于含有特定序列即多腺苷酸化信号的转录物上。poly (A) 尾部和结合于它的蛋白质有助于保护mRNA免遭由核酸外切酶达成的降解。多腺苷酸化对于转录终止、mRNA从核输出、以及翻译也是重要的。多腺苷酸化紧接在DNA转录成RNA之后发生在核中,但另外也可稍后发生在细胞质中。在已终止转录之后,mRNA链通过与RNA聚合酶缔合的核酸内切酶复合物的作用来裂解。裂解位点的特征通常在于在裂解位点附近存在碱基序列AAUAAA。在已裂解mRNA之后,腺苷残基在裂解位点处被添加至游离3' 末端。

[0307] 如本文所用,“短暂”是指非整合转基因持续数小时、数天或数周的时期进行表达,其中表达时期短于如果在宿主细胞中整合至基因组中或含于稳定质粒复制子内的基因表达时期。

[0308] 术语“信号转导路径”是指在信号从细胞的一个部分传递至细胞的另一部分中起作用的多种信号转导分子之间的生物化学关系。短语“细胞表面受体”包括能够接受信号以及跨越细胞的膜传递信号的分子和分子的复合物。

[0309] 术语“受试者”意图包括其中可引发免疫应答的活生物体(例如哺乳动物、人)。

[0310] 术语“大致上纯化”细胞是指基本上不含其他细胞类型的细胞。大致上纯化细胞也指已与它在它的天然存在状态下通常与其相伴的其他细胞类型分离的细胞。在一些情况下,大致上纯化细胞的群体是指同质细胞群体。在其他情况下,这个术语仅仅指代已与它们在它们的天然状态下天然地与其相伴的细胞分离的细胞。在一些方面,在体外培养细胞。在其他方面,不在体外培养细胞。

[0311] 如本文所用的术语“治疗性”意指治疗。治疗作用通过减轻、抑制、缓解或根除疾病状态来获得。

[0312] 如本文所用的术语“防治”意指预防或保护性治疗疾病或疾病状态。

[0313] 在本发明的情形下,“肿瘤抗原”或“过度增生性病征抗原”或“与过度增生性病征相关的抗原”是指特定过度增生性病征所常见的抗原。在某些方面,本发明的过度增生性病征抗原源于包括但不限于以下的癌症:原发性或转移性黑素瘤、胸腺瘤、淋巴瘤、肉瘤、肺癌、肝癌、NHL、白血病、子宫癌、子宫颈癌、膀胱癌、肾癌和腺癌诸如乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、胰腺癌等。

[0314] 术语“转染”或“转化”或“转导”是指外源性核酸被转移至或引入宿主细胞中所采

用的过程。“经传染”或“经转化”或“经转导”细胞是已用外源性核酸传染、转化或转导的细胞。细胞包括原代主题细胞和它的子代。

[0315] 术语“特异性结合”是指抗体、抗体片段或特定配体识别和结合存在于样品中的同源结合配偶体(例如BCMA、NKG2D、ROR1等),但必定地以及大致上不识别或结合所述样品中的其他分子。

[0316] 术语“结合配体”可通常指代多肽(例如蛋白质)、多核苷酸(例如DNA、RNA、或DNA和RNA的杂交物)、分子、化合物、其片段和/或其杂合物。在一些实施方案中,结合配体可包含多核苷酸,并且所述多核苷酸可为单链、双链或其组合。在一些实施方案中,结合配体可包含生物分子或非生物分子。在一些实施方案中,生物分子或非生物分子可为天然存在的分子或人工分子。结合配体的非限制性实例包括蛋白质、碳水化合物、脂质或核酸。在一些实施方案中,结合配体可与抗体或其片段(例如IgA同种型抗体、IgD同种型抗体、IgE同种型抗体、IgG同种型抗体、IgM同种型抗体、IgW同种型抗体、IgY同种型抗体)缔合、结合和/或偶联。在一些实施方案中,抗体或其片段可为抗体的Fc结构域(例如结合配体是Fc受体)。举例来说,在一些实施方案中,结合配体可特异性结合IgG1抗体。在一些实施方案中,结合配体可能与抗体或其片段缔合、结合和/或偶联。在一个实施方案中,结合配体可包含CD16多肽或其片段。在另一实施方案中,结合配体可包含CD16多核苷酸或其片段。在一些实施方案中,结合配体可包含CD16多肽,并且所述CD16多肽包含与天然CD16多肽序列的至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%序列同源性。在一些实施方案中,结合配体可包含CD16多肽,并且所述CD16多肽包含与天然CD16多肽序列的至多约99%、95%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%或10%序列同源性。在一些实施方案中,结合配体可包含CD16多核苷酸,并且所述CD16多核苷酸包含与天然CD16多核苷酸序列的至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%序列同源性。在一些实施方案中,结合配体可包含CD16多核苷酸,并且所述CD16多核苷酸包含与天然CD16多核苷酸序列的至多约99%、95%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%或10%序列同源性。在一些实施方案中,结合配体可包含多个亚单位。在一些实施方案中,结合配体可包含多个亚单位,并且所述亚单位可相同。在一些实施方案中,结合配体可包含多个不同亚单位。在一些实施方案中,结合配体可包含多个亚单位,并且所述亚单位中的至少两者可不同。在一些实施方案中,结合配体可包含二聚体、三聚体、四聚体、五聚体、六聚体、七聚体、九聚体或十聚体。在一些实施方案中,结合配体可包含大于约10个亚单位。在一些实施方案中,结合配体可包含聚合物。在一些实施方案中,结合配体可为非人(例如灵长类动物)结合配体、人结合配体或人源化结合配体。

[0317] 范围:在整篇本公开中,本发明的各个方面可以范围形式呈现。应了解,以范围形式进行的描述仅为方便和简洁起见,并且不应解释为刚性限制本发明的范围。因此,对范围的描述应被视为已明确公开所有可能的子范围以及在那个范围内的个别数值。举例来说,对诸如1至6的范围的描述应视为已明确公开子范围诸如1至3、1至4、1至5、2至4、2至6、3至6等,以及在那个范围内的个别数值例如1、2、2.7、3、4、5、5.3和6。作为另一实例,诸如95-99%同一性的范围包括某物具有95%、96%、97%、98%或99%同一性,并且包括子范围诸如96-99%、96-98%、96-97%、97-99%、97-98%以及98-99%同一性。无论范围的宽度如何,这都适用。

[0318] T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP)

[0319] 本发明涵盖编码TFP的重组DNA构建体,其中在一个方面,所述TFP包含特异性结合一种或多种肿瘤相关抗原(“TAA”)例如人TAA的抗体片段,其中所述抗体片段的序列与编码TCR亚单位或其部分的核酸序列邻接,并且与编码TCR亚单位或其部分的核酸序列处于同一阅读框中。本文提供的TFP能够与一个或多个内源性TCR亚单位(或替代地,一个或多个外源性TCR亚单位、或内源性TCR亚单位和外源性TCR亚单位的组合)缔合以形成功能性TCR复合物。在另一方面,TFP包含特异性结合IgG1或IgG4抗体的Tc区的CD16片段。

[0320] 在一个方面,本发明的TFP包含另外被称为抗原结合结构域的靶标特异性结合元件。对部分的选择取决于限定靶标细胞的表面的靶标抗原的类型和数目。举例来说,可选择抗原结合结构域以识别充当靶标细胞上与特定疾病状态相关的细胞表面标志物的靶标抗原。因此,可充当本发明的TFP中的抗原结合结构域的靶标抗原的细胞表面标志物的实例包括与病毒、细菌和寄生生物感染;自体免疫疾病;以及癌性疾病(例如恶性疾病)相关的那些。

[0321] 在一个方面,可通过将抗原结合结构域工程改造成特异性结合所需抗原的TFP的方式来使TFP介导的T细胞应答针对目标抗原。

[0322] 在一个方面,TFP的包含抗原结合结构域的部分包含靶向BCMA的抗原结合结构域。在另一方面,抗原结合结构域靶向人ROR1。在另一方面,抗原结合结构域靶向人NKG2D。在另一方面,TFP包含CD16多肽作为抗原结合结构域,并且靶标是抗TAA抗体,其转而靶向TAA。

[0323] TFP包含CD16部分例如人CD16部分,其中CD16蛋白或其片段的序列与编码TCR亚单位或其部分的核酸序列邻接,并且与编码TCR亚单位或其部分的核酸序列处于同一阅读框中。本文提供的TFP能够与一个或多个内源性TCR亚单位(或替代地,一个或多个外源性TCR亚单位、或内源性TCR亚单位和外源性TCR亚单位的组合)缔合以形成功能性TCR复合物。在一个方面,CD16 TFP包含另外被称为Fc  $\gamma$  受体的靶标特异性结合元件。可选择CD16 TFP与核准的抗癌单克隆(IgG)抗体一起起作用,由此使抗体的特异性与介导抗体触发的效应物功能的免疫细胞组合。Fc结构域充当由Fab区指定的特异性与CD16 TFP之间的纽带。举例来说,CD16 TFP可与护理标准抗CD20抗体利妥昔单抗组合。CD20主要见于免疫系统B细胞的表面上。利妥昔单抗破坏B细胞,因此用于治疗特征在于B细胞具有过度活性、功能异常或过量数目的疾病。这可包括许多淋巴瘤、白血病、移植排斥和自体免疫病症。因此,可充当与TFP组合的抗体的靶标抗原的细胞表面标志物的实例包括与病毒、细菌和寄生生物感染;自体免疫疾病;以及癌性疾病(例如恶性疾病)相关的那些。CD16部分可通过接头来连接于TFP。在另一实施方案中,接头序列包含各组甘氨酸和丝氨酸重复诸如(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>n</sub>,其中n是等于或大于1的正整数。在一个实施方案中,接头可为(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>4</sub>或(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>。在一些情况下,接头序列包括长接头(LL)序列。在一些情况下,长接头序列包含(G<sub>4</sub>S)<sub>n</sub>,其中n=2至4。在一些情况下,接头序列包括短接头(SL)序列。在一些情况下,短接头序列包含(G<sub>4</sub>S)<sub>n</sub>,其中n=1至3。

[0324] 抗原结合结构域可为结合抗原的任何结构域,包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、重组抗体、人抗体、人源化抗体及其功能性片段,包括但不限于单结构域抗体诸如重链可变结构域(V<sub>H</sub>)、轻链可变结构域(V<sub>L</sub>)和骆驼科动物源性纳米体的可变结构域(V<sub>HH</sub>),以及本领域中已知的用以充当抗原结合结构域的替代性骨架,诸如重组纤维连接蛋白结构

域、抗运载蛋白 (anticalin)、DARPIN等。同样,特异性识别和结合靶标抗原的天然或合成配体可用作TFP的抗原结合结构域。在一些情况下,有益的是抗原结合结构域源于TFP将最终在其中使用的同一物种。举例来说,对于在人中使用,可为有益的是TFP的抗原结合结构域包含用于抗体或抗体片段的抗原结合结构域的人或人源化残基。

[0325] 因此,在一个方面,抗原结合结构域包含人源化或人抗体或抗体片段、或鼠抗体或抗体片段。在一个实施方案中,人源化或人抗TAA结合结构域包含本文所述的人源化或人抗TAA结合结构域的轻链互补决定区1 (LC CDR1)、轻链互补决定区2 (LC CDR2) 和轻链互补决定区3 (LC CDR3) 中的一者或多者 (例如全部三者), 和/或本文所述的人源化或人抗TAA结合结构域的重链互补决定区1 (HC CDR1)、重链互补决定区2 (HC CDR2) 和重链互补决定区3 (HC CDR3) 中的一者或多者 (例如全部三者), 例如人源化或人抗TAA结合结构域包含一个或多个例如全部三个LC CDR和一个或多个例如全部三个HC CDR。在一个实施方案中,人源化或人抗TAA结合结构域包含本文所述的人源化或人抗TAA结合结构域的重链互补决定区1 (HC CDR1)、重链互补决定区2 (HC CDR2) 和重链互补决定区3 (HC CDR3) 中的一者或多者 (例如全部三者), 例如人源化或人抗肿瘤相关抗原结合结构域具有两个可变重链区,各自包含本文所述的HC CDR1、HC CDR2和HC CDR3。在一个实施方案中,人源化或人抗肿瘤相关抗原结合结构域包含本文所述的人源化或人轻链可变区和/或本文所述的人源化或人重链可变区。在一个实施方案中,人源化或人抗肿瘤相关抗原结合结构域包含本文所述的人源化重链可变区,例如至少两个本文所述的人源化或人重链可变区。在一个实施方案中,抗肿瘤相关抗原结合结构域是包含具有本文提供的氨基酸序列的轻链和重链的scFv。在一实施方案中,抗肿瘤相关抗原结合结构域 (例如scFv或V<sub>H</sub>H nb) 包含:轻链可变区,其包含本文提供的轻链可变区的氨基酸序列的具有至少1个、2个或3个修饰 (例如取代) 但不超过30、20或10个修饰 (例如取代) 的氨基酸序列,或与本文提供的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列;和/或重链可变区,其包含本文提供的重链可变区的氨基酸序列的具有至少1个、2个或3个修饰 (例如取代) 但不超过30、20或10个修饰 (例如取代) 的氨基酸序列,或与本文提供的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。在一个实施方案中,人源化或人抗肿瘤相关抗原结合结构域是scFv,并且包含本文所述的氨基酸序列的轻链可变区通过接头例如本文所述的接头来连接于包含本文所述的氨基酸序列的重链可变区。在一个实施方案中,人源化抗肿瘤相关抗原结合结构域包括 (Gly<sub>4</sub>-Ser)<sub>n</sub>接头,其中n是1、2、3、4、5或6,优选是3或4。scFv的轻链可变区和重链可变区可例如呈任何以下定向:轻链可变区-接头-重链可变区或重链可变区-接头-轻链可变区。在一些情况下,接头序列包括长接头 (LL) 序列。在一些情况下,长接头序列包含 (G<sub>4</sub>S)<sub>n</sub>,其中n=2至4。在一些情况下,接头序列包括短接头 (SL) 序列。在一些情况下,短接头序列包含 (G<sub>4</sub>S)<sub>n</sub>,其中n=1至3。

[0326] 在一些方面,非人抗体是人源化抗体,其中抗体的特定序列或区域被修饰以使与在人中天然产生的抗体或其片段的类似性增加。在一个方面,抗原结合结构域是人源化抗原结合结构域。

[0327] 人源化抗体可使用本领域中已知的多种技术产生,包括但不限于CDR移植 (参见例如欧洲专利号EP 239,400;国际公布号W0 91/09967;以及美国专利号5,225,539、5,530,101和5,585,089,其各自以引用的方式整体并入本文)、镶饰或表面重塑 (参见例如欧洲专利号EP 592,106和EP 519,596;Padlan,1991,Molecular Immunology,28 (4/5):489-498;

Studnicka等,1994,Protein Engineering,7 (6):805-814;以及Roguska等,1994,PNAS,91:969-973,其各自以引用的方式整体并入本文)、链改组(参见例如美国专利号5,565,332,其以引用的方式整体并入本文)、以及例如其各自以引用的方式整体并入本文的美国专利申请公布号US2005/0042664、美国专利申请公布号US2005/0048617、美国专利号6,407,213、美国专利号5,766,886、国际公布号W0 9317105、Tan等,J.Immunol.,169:1119-25 (2002)、Caldas等,Protein Eng.,13 (5):353-60 (2000)、Morea等,Methods,20 (3):267-79 (2000)、Baca等,J.Biol.Chem.,272 (16):10678-84 (1997)、Roguska等,Protein Eng.,9 (10):895-904 (1996)、Couto等,Cancer Res.,55 (23增刊):5973s-5977s (1995)、Couto等,Cancer Res.,55 (8):1717-22 (1995)、Sandhu J S, Gene,150 (2):409-10 (1994) 以及Pedersen等,J.Mol.Biol.,235 (3):959-73 (1994) 中公开的技术。经常,框架区中的框架残基将被来自CDR供者抗体的相应残基取代以改变例如改进抗原结合。这些框架取代通过本领域中熟知的方法来鉴定,例如通过对CDR和框架残基的相互作用建模以鉴定对抗原结合重要的框架残基,以及进行序列比较以鉴定在特定位置处的不寻常框架残基(参见例如Queen等,美国专利号5,585,089;以及Riechmann等,1988,Nature,332:323,其以引用的方式整体并入本文)。

[0328] 人源化抗体或抗体片段具有一个或多个保持在它之中的来自非人来源的氨基酸残基。这些非人氨基酸残基经常被称为“输入”残基,其通常取自“输入”可变结构域。如本文所提供,人源化抗体或抗体片段包含一个或多个来自非人免疫球蛋白分子的CDR以及框架区,其中构成框架的氨基酸残基完全或主要源于人种系。用于使抗体或抗体片段人源化的多种技术在本领域中是熟知的,并且可基本上遵循Winter和同事的方法(Jones等,Nature,321:522-525 (1986);Riechmann等,Nature,332:323-327 (1988);Verhoeyen等,Science,239:1534-1536 (1988)),通过用啮齿动物CDR或CDR序列取代人抗体的相应序列来进行,即CDR移植(EP 239,400;PCT公布号W0 91/09967;以及美国专利号4,816,567;6,331,415;5,225,539;5,530,101;5,585,089;6,548,640,其内容以引用的方式整体并入本文)。在所述人源化抗体和抗体片段中,实质上少于完整人可变结构域已被来自非人物种的相应序列取代。人源化抗体经常是人抗体,其中一些CDR残基以及有可能一些框架(FR)残基被来自啮齿动物抗体中类似位点的残基取代。抗体和抗体片段的人源化也可通过镶饰或表面重塑(EP 592,106;EP 519,596;Padlan,1991,Molecular Immunology,28 (4/5):489-498;Studnicka等,Protein Engineering,7 (6):805-814 (1994);以及Roguska等,PNAS,91:969-973 (1994))或链改组(美国专利号5,565,332)来实现,所述文献和专利的内容以引用的方式整体并入本文。

[0329] 对待用于制备人源化抗体的人轻链可变结构域与重链可变结构域两者的选择旨在降低抗原性。根据所谓“最适匹配”方法,相对于已知人可变结构域序列的整个文库来筛选啮齿动物抗体的可变结构域的序列。与啮齿动物的序列最接近的人序列接着被接受为人源化抗体的人框架(FR)(Sims等,J.Immunol.,151:2296 (1993);Chothia等,J.Mol.Biol.,196:901 (1987),其内容以引用的方式整体并入本文)。另一方法使用特定轻链或重链子组的源于所有人抗体的共有序列的特定框架。相同框架可用于若干不同人源化抗体(参见例如Nicholson等Mol.Immun.34 (16-17):1157-1165 (1997);Carter等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,89:4285 (1992);Presta等,J.Immunol.,151:2623 (1993),其内

容以引用的方式整体并入本文)。在一些实施方案中,重链可变区的框架区例如全部四个框架区源于V<sub>H</sub>4-4-59种系序列。在一个实施方案中,框架区可包含例如来自在相应鼠序列处的氨基酸的一个、两个、三个、四个或五个修饰例如取代。在一个实施方案中,轻链可变区的框架区例如全部四个框架区源于VK3-1.25种系序列。在一个实施方案中,框架区可包含例如来自在相应鼠序列处的氨基酸的一个、两个、三个、四个或五个修饰例如取代。

[0330] 在一些方面,本发明的TFP组合物的包含抗体片段的部分是保留对靶标抗原的高亲和力以及其他有利生物性质的人源化部分。根据本发明的一个方面,人源化抗体和抗体片段通过使用亲本序列和人源化序列的三维模型来分析亲本序列和各种概念性人源化产物的方法制备。三维免疫球蛋白模型通常是可用的,并且为本领域技术人员所熟知。说明和显示所选候选免疫球蛋白序列的可能三维构象结构的计算机程序是可用的。对这些显示物的检查容许分析残基在候选免疫球蛋白序列的功能发挥方面的可能作用,例如分析影响候选免疫球蛋白结合靶标抗原的能力的残基。以这个方式,可选择和组合来自接受者序列和输入序列的FR残基以便实现所需抗体或抗体片段特征诸如对靶标抗原的亲和力增加。一般来说,CDR残基直接以及最实质上涉及影响抗原结合。

[0331] 在一个方面,抗肿瘤相关抗原结合结构域是片段,例如单链可变片段(scFv)或骆驼科动物重链(V<sub>H</sub>H)。在一个方面,抗肿瘤相关抗原结合结构域是Fv、Fab、(Fab')<sub>2</sub>或双功能性(例如双特异性)杂合抗体(例如Lanzavecchia等,Eur.J.Immunol.17,105(1987))。在一个方面,本发明的抗体及其片段以野生型或增强的亲和力结合肿瘤相关抗原蛋白。

[0332] 本文也提供用于获得对靶标抗原(例如BCMA或在本文中其他地方对于融合部分结合结构域的靶标所述的任何靶标抗原)具有特异性的抗体抗原结合结构域的方法,所述方法包括通过在本文阐述的V<sub>H</sub>(或V<sub>H</sub>H)结构域的氨基酸序列中添加、缺失、取代或插入一个或多个氨基酸的方式来提供是所述V<sub>H</sub>结构域的氨基酸序列变体的V<sub>H</sub>结构域,任选使由此提供的所述V<sub>H</sub>结构域与一个或多个V<sub>L</sub>结构域组合,以及测试所述V<sub>H</sub>结构域或一个或多个V<sub>H</sub>/V<sub>L</sub>组合以鉴定对目标靶标抗原(例如BCMA、NKG2D、ROR1或CD16 TFP+抗TAA抗体的组合的TAA靶标)具有特异性以及任选具有一种或多种所需性质的特异性结合成员或抗体抗原结合结构域。

[0333] 在一些情况下,V<sub>H</sub>结构域和scFv可根据本领域中已知的方法制备(参见例如Bird等,(1988) Science 242:423-426以及Huston等,(1988) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883)。scFv分子可通过使用柔性多肽接头将V<sub>H</sub>区和V<sub>L</sub>区连接在一起来产生。scFv分子包含具有优化长度和/或氨基酸组成的接头(例如Ser-Gly接头)。接头长度可极大影响scFv的可变区如何折叠和相互作用。实际上,如果采用短多肽接头(例如在5-10个氨基酸之间),那么链内折叠得以阻止。链间折叠也为使两个可变区在一起以形成功能性表位结合位点所需。在一些情况下,接头序列包括长接头(LL)序列。在一些情况下,长接头序列包含(G<sub>4</sub>S)<sub>n</sub>,其中n=2至4。在一些情况下,接头序列包括短接头(SL)序列。在一些情况下,短接头序列包含(G<sub>4</sub>S)<sub>n</sub>,其中n=1至3。对于接头定向和大小的实例,参见例如Hollinger等1993 Proc Natl Acad.Sci.U.S.A.90:6444-6448、美国专利申请公布号2005/0100543、2005/0175606、2007/0014794以及PCT公布号W02006/020258和W02007/024715,其以引用的方式并入本文。

[0334] scFv可在它的V<sub>L</sub>区与V<sub>H</sub>区之间包含具有约10、11、12、13、14、15或大于15个残基的接头。接头序列可包含任何天然存在的氨基酸。在一些实施方案中,接头序列包含氨基酸甘

氨酸和丝氨酸。在另一实施方案中,接头序列包含各组甘氨酸和丝氨酸重复诸如 $(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$ ,其中 $n$ 是等于或大于1的正整数。在一个实施方案中,接头可为 $(\text{Gly}_4\text{Ser})_4$ 或 $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$ 。接头长度的变化可保留或增强活性,从而在活性研究中导致优越功效。在一些情况下,接头序列包括长接头(LL)序列。在一些情况下,长接头序列包含 $(\text{G}_4\text{S})_n$ ,其中 $n=2$ 至4。在一些情况下,接头序列包括短接头(SL)序列。在一些情况下,短接头序列包含 $(\text{G}_4\text{S})_n$ ,其中 $n=1$ 至3。

#### [0335] 稳定性和突变

[0336] 抗肿瘤相关抗原结合结构域例如scFv分子(例如可溶性scFv)的稳定性可参照于常规对照scFv分子或全长抗体的生物物理学性质(例如热稳定性)加以评估。在一个实施方案中,在所述测定中,人源化或人scFv具有比亲本scFv高约0.1、约0.25、约0.5、约0.75、约1、约1.25、约1.5、约1.75、约2、约2.5、约3、约3.5、约4、约4.5、约5、约5.5、约6、约6.5、约7、约7.5、约8、约8.5、约9、约9.5、约10摄氏度、约11摄氏度、约12摄氏度、约13摄氏度、约14摄氏度或约15摄氏度的热稳定性。

[0337] 抗肿瘤相关抗原结合结构域例如scFv的改进热稳定性随后对整个肿瘤相关抗原TFP构建体进行赋予,从而导致抗肿瘤相关抗原TFP构建体的治疗性质改进。相较于常规抗体,抗肿瘤相关抗原结合结构域例如scFv的热稳定性可改进至少约2°C或3°C。在一个实施方案中,相较于常规抗体,抗肿瘤相关抗原结合结构域例如scFv具有改进了1°C的热稳定性。在另一实施方案中,相较于常规抗体,抗肿瘤相关抗原结合结构域例如scFv具有改进了2°C的热稳定性。在另一实施方案中,相较于常规抗体,scFv具有改进了4°C、5°C、6°C、7°C、8°C、9°C、10°C、11°C、12°C、13°C、14°C或15°C的热稳定性。可例如在本文公开的scFv分子与scFv  $V_H$ 和 $V_L$ 所源于的抗体的scFv分子或Fab片段之间进行比较。热稳定性可使用本领域中已知的方法测量。举例来说,在一个实施方案中,可测量 $T_M$ 。用于测量 $T_M$ 的方法以及测定蛋白质稳定性的其他方法在以下加以描述。

[0338] scFv中的突变(通过可溶性scFv的人源化或诱变而产生)会改变scFv的稳定性以及改进scFv和抗肿瘤相关抗原TFP构建体的总体稳定性。使用诸如 $T_M$ 、温度变性和温度聚集的测量结果相对于鼠scFv来比较人源化scFv的稳定性。在一个实施方案中,抗肿瘤相关抗原结合结构域例如scFv包含至少一个由人源化过程产生的突变以致突变scFv对肿瘤相关抗原TFP构建体赋予改进的稳定性。在另一实施方案中,抗肿瘤相关抗原结合结构域例如scFv包含至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个由人源化过程产生的突变以致突变scFv对肿瘤相关抗原TFP构建体赋予改进的稳定性。

[0339] 在一个方面,TFP的抗原结合结构域包含与本文所述的抗原结合结构域氨基酸序列同源的氨基酸序列,并且抗原结合结构域保留本文所述的抗肿瘤相关抗原抗体片段的所需功能性质。在一个特定方面,本发明的TFP组合物包含抗体片段。在另一方面,那个抗体片段包含scFv。

[0340] 在各个方面,TFP的抗原结合结构域可通过修饰一个或两个可变区(例如 $V_H$ 和/或 $V_L$ )内,例如一个或多个CDR区内和/或一个或多个框架区内的一个或多个氨基酸来工程改造。在一个特定方面,本发明的TFP组合物包含抗体片段。在另一方面,那个抗体片段包含scFv。

[0341] 本领域普通技术人员将了解,本发明的抗体或抗体片段可进一步被修饰以使它们



在氨基酸序列方面变化(例如从野生型变化)但不在所需活性方面变化。举例来说,可对蛋白质进行导致在“非必需”氨基酸残基处的氨基酸取代的额外核苷酸取代。举例来说,分子中的非必需氨基酸残基可用来自同一侧链家族的另一氨基酸残基置换。在另一实施方案中,一串氨基酸可用在侧链家族成员的顺序和/或组成方面不同的在结构上类似的串段置换,例如可进行保守性取代,其中氨基酸残基用具有类似侧链的氨基酸残基置换。

[0342] 已在本领域中定义具有类似侧链的氨基酸残基的家族,包括碱性侧链(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷极性侧链(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、非极性侧链(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、 $\beta$ 分支侧链(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳族侧链(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。

[0343] 在两个或更多个核酸或多肽序列的情形下的同一性百分比是指两个或更多个序列是相同的。如使用以下序列比较算法中的一者或通过手动比对和目视检查所测量,如果当历经比较窗或指定区域进行比较和对准以达成最大对应性时,两个序列具有指定百分比的相同氨基酸残基或核苷酸(例如历经指定区域,或当未指定时历经整个序列,60%同一性,任选70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性),那么两个序列“大致上同一”。任选地,历经长度是至少约50个核苷酸(或10个氨基酸)的区域,或更优选历经长度是100至500或1000或更多个核苷酸(或20、50、200或更多个氨基酸)的区域,存在同一性。

[0344] 对于序列比较,通常一个序列充当测试序列与其进行比较的参照序列。当使用序列比较算法时,将测试序列和参照序列输入计算机中,必要时指定子序列坐标,并且指定序列算法程序参数。可使用缺省程序参数,或可指定替代性参数。序列比较算法接着基于程序参数计算测试序列相对于参照序列的序列同一性百分比。使序列对准以供比较的方法在本领域中是熟知的。可例如通过Smith和Waterman, (1970) *Adv. Appl. Math.* 2:482c的局部同源性算法,通过Needleman和Wunsch, (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443的同源性比对算法,通过Pearson和Lipman, (1988) *Proc. Nat' l. Acad. Sci. USA* 85:2444的类似性搜索方法,通过这些算法的计算机化执行程序(Wisconsin Genetics软件包(Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.)中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA),或通过手动比对和目视检查(参见例如Brent等, (2003) *Current Protocols in Molecular Biology*)来进行供比较的序列的最优比对。适于确定序列同一性百分比和序列类似性百分比的算法的两个实例是BLAST和BLAST 2.0算法,其分别描述于Altschul等, (1977) *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402;以及Altschul等, (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410中。用于进行BLAST分析的软件可通过国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)公开获得。

[0345] 在一个方面,本发明涵盖对起始抗体或片段(例如scFv)氨基酸序列的产生功能等效分子的修饰。举例来说,包含在TFP中的抗肿瘤相关抗原结合结构域例如scFv的V<sub>H</sub>或V<sub>L</sub>可被修饰以保留抗肿瘤相关抗原结合结构域例如scFv的起始V<sub>H</sub>或V<sub>L</sub>框架区的至少约70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性。

本发明涵盖对整个TFP构建体的修饰,例如在TFP构建体的各种结构域的一个或多个氨基酸序列中的修饰,以产生功能等效分子。TFP构建体可被修饰以保留起始TFP构建体的至少约70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性。

#### [0346] 细胞外结构域

[0347] 细胞外结构域可源于天然来源或重组来源。当来源是天然的时,结构域可源于任何蛋白质,但特别是膜结合或跨膜蛋白质。在一个方面,细胞外结构域能够与跨膜结构域缔合。特别适用于本发明中的细胞外结构域可包括至少以下各物的细胞外区域:例如T细胞受体的 $\alpha$ 、 $\beta$ 或 $\zeta$ 链、或CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\gamma$ 或CD3 $\delta$ ,或在替代性实施方案中,CD28、CD45、CD2、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154。

#### [0348] 跨膜结构域

[0349] 一般来说,TFP序列含有由单一基因组序列编码的细胞外结构域和跨膜结构域。在替代性实施方案中,TFP可被设计来包含对于TFP的细胞外结构域是异源性的跨膜结构域。跨膜结构域可包括一个或多个邻近于跨膜区域的额外氨基酸,例如一个或多个与跨膜区域所源于的蛋白质的细胞外区域相关的氨基酸(例如细胞外区域的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或多达15个氨基酸),和/或一个或多个与跨膜蛋白质所源于的蛋白质的细胞内区域相关的额外氨基酸(例如细胞内区域的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或多达15个氨基酸)。在一个方面,跨膜结构域是与TFP的所使用的一个其他结构域缔合的跨膜结构域。在一些情况下,跨膜结构域可通过氨基酸取代来选择或修饰以避免所述结构域与相同或不同表面膜蛋白的跨膜结构域的结合,例如以使与受体复合物的其他成员的相互作用最小。在一个方面,跨膜结构域能够与TFP T细胞表面上的另一TFP同二聚化。在一不同方面,可修饰或取代跨膜结构域的氨基酸序列以便使与存在于同一TFP中的天然结合配偶体的结合结构域的相互作用最小。

[0350] 跨膜结构域可源于天然来源或重组来源。当来源是天然的时,结构域可源于任何膜结合或跨膜蛋白质。在一个方面,每当TFP已结合于靶标时,跨膜结构域能够向细胞内结构域传导信号。特别适用于本发明中的跨膜结构域可包括至少以下各物的跨膜区域:例如T细胞受体的 $\alpha$ 、 $\beta$ 或 $\zeta$ 链、CD28、CD3 $\epsilon$ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154。

[0351] 在一些情况下,跨膜结构域可通过铰链例如来自人蛋白质的铰链来连接于TFP的细胞外区域,例如TFP的抗原结合结构域。举例来说,在一个实施方案中,铰链可为人免疫球蛋白(Ig)铰链例如IgG4铰链,或CD8a铰链。

#### [0352] 接头

[0353] 任选地,长度在2与20个氨基酸之间的短寡肽或多肽接头可形成TFP的跨膜结构域与细胞质区域之间的连接。甘氨酸-丝氨酸双联体提供特别适合的接头。举例来说,在一个方面,接头包含氨基酸序列GGGSGGGGS (SEQ ID NO:101)。在一些实施方案中,接头由核苷酸序列GGTGGCGGAGGTTCTGGAGGTGGAGGTTCC (SEQ ID NO:102) 编码。在一些实施方案中,接头包含氨基酸序列GGGSGGGSGGGGSLE (SEQ ID NO:1)。在其他实施方案中,接头包含氨基酸序列AAAGGGSGGGSGGGGSLE (SEQ ID NO:2)。在其他实施方案中,接头是具有序列AAIEVMYPPPYLGGGSGGGSGGGGSLE (SEQ ID NO:3) 的长接头。在一些实施方案中,接头由核

核苷酸序列GGTGGAGGCGGTTCTGGTGGAGGCGGTTCCGATGGCGGAGGTTCA (SEQ ID NO:66) 编码。在其他实施方案中,接头由核苷酸序列GGAGAGGGTAAATCTTCCGGATCTGGTTCCGAAAGCAAGGCTAGC (SEQ ID NO:73) 编码。

#### [0354] 细胞质结构域

[0355] 如果TFP含有CD3  $\gamma$ 、 $\delta$ 或 $\epsilon$ 多肽,那么TFP的细胞质结构域可包括细胞内信号传导结构域;TCR $\alpha$ 和TCR $\beta$ 亚单位通常缺乏信号传导结构域。细胞内信号传导结构域通常负责使其其中已引入TFP的免疫细胞的至少一种正常效应物功能活化。术语“效应物功能”是指细胞的专门化功能。T细胞的效应物功能例如可为细胞溶解活性或辅助活性,包括分泌细胞因子。因此,术语“细胞内信号传导结构域”是指蛋白质的转导效应物功能信号以及引导细胞执行专门化功能的部分。尽管通常可采用整个细胞内信号传导结构域,但在许多情况下不必使用整个链。就使用细胞内信号传导结构域的截短部分而言,所述截短部分可替代完整链使用,只要它转导效应物功能信号即可。因此,术语细胞内信号传导结构域意图包括细胞内信号传导结构域的足以转导效应物功能信号的任何截短部分。

[0356] 用于本发明的TFP中的细胞内信号传导结构域的实例包括在抗原受体啮合之后协力起引发信号转导的作用的T细胞受体 (TCR) 和共受体的细胞质序列,以及这些序列的具有相同功能性能的任何衍生物或变体和具有相同功能性能的任何重组序列。

[0357] 已知通过单独TCR产生的信号不足以使原初T细胞完全活化,并且需要二级和/或共刺激性信号。因此,原初T细胞活化可被称为由以下两个不同类别的细胞质信号传导序列介导:通过TCR来引发抗原依赖性初级活化的细胞质信号传导序列(初级细胞内信号传导结构域)和以抗原非依赖性方式起提供二级或共刺激性信号的作用的细胞质信号传导序列(二级细胞质结构域,例如共刺激性结构域)。

[0358] 初级信号传导结构域以刺激性方式或以抑制性方式调控TCR复合物的初级活化。以刺激性方式起作用的初级细胞内信号传导结构域可含有称为免疫受体酪氨酸基活化基序 (ITAM) 的信号传导基序。

[0359] 特别适用于本发明中的含ITAM初级细胞内信号传导结构域的实例包括CD3 $\zeta$ 、FcR  $\gamma$ 、FcR $\beta$ 、CD3  $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 、CD3 $\epsilon$ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b和CD66d的那些。在一个实施方案中,本发明的TFP包含细胞内信号传导结构域,例如CD3- $\epsilon$ 的初级信号传导结构域。在一个实施方案中,初级信号传导结构域包含经修饰ITAM结构域,例如相较于天然ITAM结构域具有改变的(例如增加的或降低的)活性的突变ITAM结构域。在一个实施方案中,初级信号传导结构域包含含经修饰ITAM初级细胞内信号传导结构域,例如含优化和/或截短ITAM初级细胞内信号传导结构域。在一实施方案中,初级信号传导结构域包含一个、两个、三个、四个或更多个ITAM基序。

[0360] TFP的细胞内信号传导结构域可包含单独CD3 $\zeta$ 信号传导结构域,或它可与在本发明的TFP的情形下适用的任何其他所需细胞内信号传导结构域组合。举例来说,TFP的细胞内信号传导结构域可包含CD3 $\epsilon$ 链部分和共刺激性信号传导结构域。共刺激性信号传导结构域是指TFP的包含共刺激性分子的细胞内结构域的部分。共刺激性分子是除抗原受体或它的配体以外的为淋巴细胞对抗原的高效应答所需的细胞表面分子。所述分子的实例包括CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX40、CD30、CD40、PD1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3和与CD83特异性结合的配体等。举例来说,已证明CD27共刺激

会在体外增强人TFP T细胞的扩增、效应物功能和存活,并且在体内加强人T细胞持久性和抗肿瘤活性(Song等Blood.2012;119(3):696-706)。

[0361] 本发明的TFP的细胞质部分内的细胞内信号传导序列可以随机或指定顺序彼此连接。任选地,例如长度在2与10个氨基酸之间(例如2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸)的短寡肽或多肽接头可形成细胞内信号传导序列之间的连接。

[0362] 在一个实施方案中,甘氨酸-丝氨酸双联体可用作适合接头。在一个实施方案中,单一氨基酸例如丙氨酸、甘氨酸可用作适合接头。

[0363] 在一个方面,本文所述的TFP表达性细胞可进一步包含第二TFP,例如包括例如针对相同靶标(例如CD22)或不同靶标(例如CD123)的不同抗原结合结构域的第二TFP。在一个实施方案中,当TFP表达性细胞包含两种或更多种不同TFP时,不同TFP的抗原结合结构域可为如此以致抗原结合结构域不彼此相互作用。举例来说,表达第一TFP和第二TFP的细胞可具有所述第一TFP的例如呈片段形式的抗原结合结构域例如scFv,其不与所述第二TFP的抗原结合结构域缔合,例如所述第二TFP的抗原结合结构域是V<sub>H</sub>。

[0364] 在另一方面,本文所述的TFP表达性细胞可进一步表达另一药剂,例如使TFP表达性细胞的活性增强的药剂。举例来说,在一个实施方案中,药剂可为抑制抑制性分子的药剂。在一些实施方案中,抑制性分子例如PD1可使TFP表达性细胞发动免疫效应物应答的能力降低。抑制性分子的实例包括PD1、PD-L1、CTLA4、TIM3、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4和TGFR $\beta$ 。在一个实施方案中,抑制抑制性分子的药剂包含第一多肽例如抑制性分子与对细胞提供正性信号的第二多肽例如本文所述的细胞内信号传导结构域缔合。在一个实施方案中,药剂包含第一多肽,例如抑制性分子诸如PD1、LAG3、CTLA4、CD160、BTLA、LAIR1、TIM3、2B4和TIGIT或任何这些抑制性分子的片段(例如任何这些抑制性分子的细胞外结构域的至少一部分)的第一多肽,以及第二多肽,其是本文所述的细胞内信号传导结构域(例如包含共刺激性结构域(例如4-1BB、CD27或CD28,例如如本文所述)和/或初级信号传导结构域(例如本文所述的CD3 $\zeta$ 信号传导结构域))。在一个实施方案中,药剂包含PD1或其片段(例如PD1的细胞外结构域的至少一部分)的第一多肽,以及本文所述的细胞内信号传导结构域(例如本文所述的CD28信号传导结构域和/或本文所述的CD3 $\zeta$ 信号传导结构域)的第二多肽。PD1是CD28受体家族的抑制性成员,所述家族也包括CD28、CTLA-4、ICOS和BTLA。PD-1在活化的B细胞、T细胞和骨髓细胞上表达(Agata等1996 Int.Immunol 8:765-75)。已显示PD1的两个配体PD-L1和PD-L2在结合PD1后会使得T细胞活化下调(Freeman等2000 J Exp Med 192:1027-34;Latchman等2001 Nat Immunol 2:261-8;Carter等2002 Eur J Immunol 32:634-43)。PD-L1在人癌症的情况下是丰富的(Dong等2003 J Mol Med 81:281-7;Blank等2005Cancer Immunol.Immunother 54:307-314;Konishi等2004 Clin Cancer Res 10:5094)。免疫抑制可通过抑制PD1与PD-L1的局部相互作用来逆转。

[0365] 在一个实施方案中,药剂包含抑制性分子的细胞外结构域(ECD),例如程序化死亡1蛋白(PD1)可融合于跨膜结构域以及任选融合于细胞内信号传导结构域诸如41BB和CD3 $\zeta$ (在本文中也称为PD1 TFP)。在一个实施方案中,PD1 TFP在与本文所述的抗肿瘤抗原TFP组合使用时使T细胞的持久性改进。在一个实施方案中,TFP是PD1 TFP,其包含PD 1的细胞外结构域。或者,提供TFP,其含有抗体或抗体片段,诸如特异性结合程序化死亡配体1蛋白(PD-L1)或程序化死亡配体2蛋白(PD-L2)的scFv。

[0366] 在另一方面,本发明提供一种TFP表达性T细胞群体,所述T细胞例如是TFP T细胞。在一些实施方案中,TFP表达性T细胞的群体包含表达不同TFP的细胞的混合物。举例来说,在一个实施方案中,TFP T细胞的群体可包括表达具有本文所述的抗肿瘤相关抗原结合结构域的TFP的第一细胞,以及表达具有不同抗肿瘤相关抗原结合结构域的TFP的第二细胞,所述不同抗肿瘤相关抗原结合结构域例如是不同于由所述第一细胞表达的TFP中的抗肿瘤相关抗原结合结构域的本文所述的抗肿瘤相关抗原结合结构域。作为另一实例,TFP表达性细胞的群体可包括表达包括例如如本文所述的抗肿瘤相关抗原结合结构域的TFP的第一细胞,以及表达包括针对除肿瘤相关抗原以外的靶标(例如另一肿瘤相关抗原)的抗原结合结构域的TFP的第二细胞。

[0367] 在另一方面,本发明提供一种细胞群体,其中所述群体中的至少一种细胞表达具有本文所述的抗肿瘤相关抗原结构域的TFP,并且第二细胞表达另一药剂,例如使TFP表达性细胞的活性增强的药剂。举例来说,在一个实施方案中,药剂可为抑制抑制性分子的药剂。在一些实施方案中,抑制性分子例如可使TFP表达性细胞发动免疫效应物应答的能力降低。抑制性分子的实例包括PD1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4和TGFR $\beta$ 。在一个实施方案中,抑制抑制性分子的药剂包含第一多肽例如抑制性分子与对细胞提供正性信号的第二多肽例如本文所述的细胞内信号传导结构域缔合。

[0368] 本文公开用于产生在体外转录的编码TFP的RNA的方法。本发明也包括一种可直接转染至细胞中的编码TFP的RNA构建体。一种用于产生供在转染中使用的mRNA的方法可涉及对采用特别设计的引物获得的模板的体外转录(IVT),继之以添加polyA,以产生含有3'和5'非翻译序列(“UTR”)、5'帽和/或内部核糖体进入位点(IRES)、待表达的核酸以及长度通常是50-2000个碱基的polyA尾部的构建体。如此产生的RNA可高效转染不同种类的细胞。在一个方面,模板包括用于获得TFP的序列。

[0369] 在一个方面,抗肿瘤相关抗原TFP由信使RNA(mRNA)编码。在一个方面,将编码抗肿瘤相关抗原TFP的mRNA引入T细胞中以产生TFP T细胞。在一个实施方案中,在体外转录的RNA TFP可以短暂转染的形式引入细胞中。RNA通过使用聚合酶链式反应(PCR)产生的模板进行体外转录来产生。使用适当引物和RNA聚合酶,来自任何来源的目标DNA都可通过PCR直接转变成模板以达成体外mRNA合成。DNA的来源可为例如基因组DNA、质粒DNA、噬菌体DNA、cDNA、合成DNA序列或任何其他适当来源的DNA。为体外转录所需的模板是本发明的TFP。在一个实施方案中,待用于PCR的DNA含有开放阅读框。DNA可来自生物体的基因组的天然存在的DNA序列。在一个实施方案中,核酸可包括5'和/或3'非翻译区(UTR)的一些或全部。核酸可包括外显子和内含子。在一个实施方案中,待用于PCR的DNA是人核酸序列。在另一实施方案中,待用于PCR的DNA是包括5'和3'UTR的人核酸序列。或者,DNA可为通常不在天然存在的生物体中表达的人工DNA序列。一示例性人工DNA序列是含有各基因的连接在一起以形成编码融合蛋白的开放阅读框的各部分的DNA序列。连接在一起的各DNA部分可来自单一生物体或来自超过一个生物体。

[0370] PCR用于产生模板以进行用于转染的mRNA的体外转录。用于进行PCR的方法在本领域中是熟知的。用于PCR中的引物被设计来具有与DNA的待用作PCR的模板的区域大致上互补的区域。如本文所用的“大致上互补”是指核苷酸序列中大部分或全部引物序列碱基是互

补的,或一个或多个碱基是非互补的或不匹配的。大致上互补序列能够在用于PCR的退火条件下与预定DNA靶标退火或杂交。引物可被设计来大致上互补于DNA模板的任何部分。举例来说,引物可被设计来扩增核酸的通常在细胞中转录的包括5'和3' UTR的部分(开放阅读框)。引物也可被设计来扩增核酸的编码特定目标结构域的部分。在一个实施方案中,引物被设计来扩增人cDNA的包括5'和3' UTR的全部或部分的编码区。适用于PCR的引物可通过本领域中熟知的合成方法来产生。“正向引物”是含有大致上互补于DNA模板上在待扩增的DNA序列的上游的核苷酸的核苷酸区域的引物。“上游”在本文中用于指代关于编码链在待扩增的DNA序列的5'位。“反向引物”是含有在待扩增的DNA序列的下游大致上互补于双链DNA模板的核苷酸区域的引物。“下游”在本文中用于指代关于编码链在待扩增的DNA序列的3'位。

[0371] 适用于PCR的任何DNA聚合酶都可用于本文公开的方法中。试剂和聚合酶可从许多来源商购获得。

[0372] 也可使用能够促进稳定性和/或翻译效率的化学结构。RNA优选具有5'和3' UTR。在一个实施方案中,5' UTR的长度在1与3,000个核苷酸之间。待添加至编码区中的5'和3' UTR序列的长度可通过不同方法来改变,包括但不限于设计退火于UTR的不同区域的PCR引物。使用这个方法,本领域普通技术人员可修改为在转录RNA转染之后实现最优翻译效率所需的5'和3' UTR长度。

[0373] 5'和3' UTR可为目标核酸的天然存在的内源性5'和3' UTR。或者,不是目标核酸内源性的UTR序列可通过将UTR序列并入正向引物和反向引物中或通过对模板的任何其他修饰来添加。不是目标核酸内源性的UTR序列的使用可适用于改进RNA的稳定性和/或翻译效率。举例来说,已知在3' UTR序列中富含AU的元素可使mRNA的稳定性降低。因此,可基于UTR的在本领域中是熟知的性质来选择或设计3' UTR以使转录RNA的稳定性增加。

[0374] 在一个实施方案中,5' UTR可含有内源性核酸的Kozak序列。或者,当不是目标核酸内源性的5' UTR通过如上所述的PCR来添加时,共有Kozak序列可通过添加5' UTR序列来重新设计。Kozak序列可使一些RNA转录物的翻译效率增加,但似乎不为所有RNA能够达成高效翻译所需。对于许多mRNA,对Kozak序列的需要在本领域中是已知的。在其他实施方案中,5' UTR可为其RNA基因组在细胞中是稳定的RNA病毒的5' UTR。在其他实施方案中,各种核苷酸类似物可在3'或5' UTR中用于阻碍核酸外切酶对mRNA的降解。

[0375] 为使得能够在不需要基因克隆的情况下从DNA模板合成RNA,转录的启动子应在待转录序列的上游连接于DNA模板。当将充当RNA聚合酶的启动子的序列添加至正向引物的5'末端时,RNA聚合酶启动子变得在待转录的开放阅读框的上游并入PCR产物中。在一个优选实施方案中,启动子是如在本文中其他地方所述的T7聚合酶启动子。其他适用启动子包括但不限于T3和SP6RNA聚合酶启动子。T7、T3和SP6启动子的共有核苷酸序列在本领域中是已知的。

[0376] 在一优选实施方案中,mRNA具有决定mRNA在细胞中的核糖体结合、翻译起始和稳定性的在5'末端上的帽与3' poly(A)尾部两者。在环状DNA模板例如质粒DNA上,RNA聚合酶产生不适于在真核细胞中表达的长多联产物。在3' UTR的末端加以线性化的质粒DNA的转录产生正常大小mRNA,其在真核转染中不是有效的,即使在转录之后它被多腺苷酸化。

[0377] 在线性DNA模板上,噬菌体T7 RNA聚合酶可使转录物的3'末端延伸超过模板的末个碱基(Schenborn和Mierendorf,Nuc Acids Res.,13:6223-36(1985);Nacheva和Berzal-

Herranz, Eur. J. Biochem., 270:1485-65 (2003))。

[0378] 将polyA/T链段整合至DNA模板中的常规方法是分子克隆。然而,整合至质粒DNA中的polyA/T序列可导致质粒不稳定性,此是为何从细菌细胞获得的质粒DNA模板经常受到缺失和其他畸变高度污染的原因。这使得克隆程序不仅繁重和耗时,而且经常不可靠。那是为何允许在不进行克隆下构建具有polyA/T 3'链段的DNA模板的方法高度合乎需要的原因。

[0379] 转录DNA模板的polyA/T节段可通过使用含有polyT尾部诸如100T尾部(大小可为50-5000T)的反向引物来在PCR期间,或通过包括但不限于DNA连接或体外重组的任何其他方法来在PCR之后产生。Poly(A)尾部也对RNA提供稳定性,并且降低它们的降解。通常,poly(A)尾部的长度与转录RNA的稳定性正性相关。在一个实施方案中,poly(A)尾部在100与5000个腺苷之间。

[0380] RNA的Poly(A)尾部可在体外转录之后使用Poly(A)聚合酶诸如大肠杆菌(E.coli) polyA聚合酶(E-PAP)加以进一步延伸。在一个实施方案中,使poly(A)尾部的长度从100个核苷酸增加至在300与400个核苷酸之间导致RNA的翻译效率增加至约两倍。另外,使不同化学基团连接于3'末端可使mRNA稳定性增加。所述连接可含有经修饰/人工核苷酸、适体和其他化合物。举例来说,ATP类似物可使用poly(A)聚合酶来并入poly(A)尾部中。ATP类似物可进一步增加RNA的稳定性。

[0381] 5'帽也对RNA分子提供稳定性。在一优选实施方案中,通过本文公开的方法产生的RNA包括5'帽。使用本领域中已知以及本文所述的技术提供5'帽(Cougot,等,Trends in Biochem.Sci.,29:436-444(2001);Stepinski,等,RNA,7:1468-95(2001);Elango,等,Biochim.Biophys.Res.Comm.,330:958-966(2005))。

[0382] 通过本文公开的方法产生的RNA也可含有内部核糖体进入位点(IRES)序列。IRES序列可为引发帽非依赖性核糖体结合于mRNA以及有助于翻译起始的任何病毒、染色体或人工设计序列。可包括适于细胞电穿孔的任何溶质,其可含有有助于细胞可渗透性和活力的因子,诸如糖、肽、脂质、蛋白质、抗氧化剂和表面活性剂。

[0383] RNA可使用许多不同方法中的任一者来引入靶标细胞中,所述方法例如可商购获得的方法,其包括但不限于电穿孔(Amaxa Nucleo fector-II(Amaxa Biosystems, Cologne,Germany))、ECM 830(BTX)(Harvard Instruments,Boston,Mass.)或Gene Pulser II(BioRad,Denver,Colo.)、Multiporator(Eppendorf,Hamburg Germany),使用脂质体转染进行的阳离子脂质体介导的转染、聚合物囊封、肽介导的转染或基因枪粒子递送系统诸如“基因枪”(参见例如Nishikawa,等Hum Gene Ther.,12(8):861-70(2001))。

[0384] 编码TFP的核酸构建体

[0385] 本发明也提供编码一种或多种本文所述的TFP构建体的核酸分子。在一个方面,核酸分子以信使RNA转录物形式提供。在一个方面,核酸分子以DNA构建体形式提供。编码处于它们的表达质粒中的结合剂、接头和TFP的示例性DNA序列公开于附录A中。

[0386] 编码所需分子的核酸序列可使用本领域中已知的重组方法获得,诸如像使用标准技术,通过筛选由表达基因的细胞获得的文库,通过从已知包括基因的载体获得所述基因,或通过直接从含有基因的细胞和组织分离。或者,目标基因可合成产生,而非克隆。

[0387] 本发明也提供其中插入本发明的DNA的载体。源于逆转录病毒诸如慢病毒的载体是适于实现长期基因转移的工具,因为它们允许转基因的长期稳定整合以及它在子细胞中

的繁殖。慢病毒载体具有超过源于致癌性逆转录病毒诸如鼠白血病病毒的载体的附加优势,因为它们可转导非增殖细胞诸如肝细胞。它们也具有低免疫原性的附加优势。

[0388] 在另一实施方案中,包含编码本发明的所需TFP的核酸的载体是腺病毒载体(A5/35)。

[0389] 在另一实施方案中,TFP构建体的一个或多个结构域(例如细胞外、跨膜和细胞内信号传导结构域)使用基因编辑技术来工程改造,所述技术诸如成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR®,参见例如美国专利号8,697,359)、转录活化因子样效应物核酸酶(TALEN,参见例如美国专利号9,393,257)、兆碱基大范围核酸酶(天然存在的具有包含12至40个碱基对的双链DNA序列的大型识别位点的脱氧核糖核酸内切酶)、或锌指核酸酶(ZFN,参见例如Urnov等,Nat.Rev.Genetics (2010) v11,636-646)方法。以这个方式,嵌合构建体可被工程改造来组合各亚单位的合乎需要特征,诸如构象或信号传导能力。也参见Sander和Joung,Nat.Biotech. (2014) v32,347-55;以及June等,2009 Nature Reviews Immunol.9.10:704-716,各自以引用的方式并入本文。在一些实施方案中,TFP亚单位的细胞外结构域、跨膜结构域或细胞质结构域中的一者或多者被工程改造来具有超过一个天然TCR亚单位结构域的方面(即是嵌合的)。

[0390] 本发明的表达构建体也可用于使用标准基因递送方案进行核酸免疫和基因疗法。用于基因递送的方法在本领域中是已知的(参见例如美国专利号5,399,346、5,580,859、5,589,466,其以引用的方式整体并入本文)。在另一实施方案中,本发明提供一种基因疗法载体。

[0391] 核酸可被克隆至许多类型的载体中。举例来说,核酸可被克隆至包括但不限于质粒、噬菌粒、噬菌体衍生物、动物病毒和粘粒的载体中。受到特别关注的载体包括表达载体、复制载体、探针产生载体和测序载体。

[0392] 此外,表达载体可以病毒载体形式对细胞提供。病毒载体技术在本领域中是熟知的,并且例如描述于Sambrook等,2012,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第1-4卷,Cold Spring Harbor Press,NY以及其他病毒学和分子生物学手册中。适用作载体的病毒包括但不限于逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒和慢病毒。一般来说,适合载体含有在至少一种生物体中具有功能性的复制起点、启动子序列、适宜限制核酸内切酶位点以及一种或多种可选择标记(例如WO 01/96584;WO 01/29058;以及美国专利号6,326,193)。

[0393] 已开发许多基于病毒的系统用于将基因转移至哺乳动物细胞中。举例来说,逆转录病毒提供适宜用于基因递送系统的平台。所选基因可使用本领域中已知的技术来插入载体中,并且包装在逆转录病毒粒子中。可接着分离重组病毒,并且在体内或离体递送至受试者的细胞中。许多逆转录病毒系统在本领域中是已知的。在一些实施方案中,使用腺病毒载体。许多腺病毒载体在本领域中是已知的。在一个实施方案中,使用慢病毒载体。

[0394] 额外启动子元件例如增强子会调控转录起始的频率。通常,这些元件位于起始位点的上游30-110bp的区域中,但已显示许多启动子也含有在起始位点的下游的功能性元件。启动子元件之间的间隙经常是灵活的,以致当元件相对于彼此倒置或移动时,启动子功能得以保持。在胸苷激酶(tk)启动子中,在活性开始下降之前,启动子元件之间的间隙可增加至相隔50bp。视启动子而定,似乎个别元件可合作地或独立地起使转录活化的作用。



[0395] 能够在哺乳动物T细胞中表达TFP转基因的启动子的一实例是EF1a启动子。天然EF1a启动子驱动延伸因子-1复合物的 $\alpha$ 亚单位的表达,所述 $\alpha$ 亚单位负责将氨基酰基tRNA酶促递送至核糖体中。EF1a启动子已广泛用于哺乳动物表达质粒中,并且已显示有效驱动从克隆至慢病毒载体中的转基因进行TFP表达(参见例如Milone等, *Mol. Ther.* 17 (8):1453-1464 (2009))。启动子的另一实例是立即早期巨细胞病毒(CMV)启动子序列。这个启动子序列是能够驱动与其操作性地连接的任何多核苷酸序列的高水平表达的强力组成型启动子序列。然而,也可使用其他组成型启动子序列,包括但不限于猿猴病毒40(SV40)早期启动子、小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)、人免疫缺陷病毒(HIV)长末端重复序列(LTR)启动子、MoMuLV启动子、禽白血病毒启动子、艾伯斯坦-巴尔病毒(Epstein-Barr virus)立即早期启动子、劳斯肉瘤病毒启动子以及人基因启动子诸如但不限于肌动蛋白启动子、肌球蛋白启动子、延伸因子-1a启动子、血红蛋白启动子和肌酸激酶启动子。此外,本发明不应限于使用组成型启动子。诱导型启动子也被涵盖为本发明的一部分。使用诱导型启动子会提供能够在需要它所操作性地连接的多核苷酸序列的表达时开启所述表达,或在不需要表达时关闭表达的分子开关。诱导型启动子的实例包括但不限于金属硫蛋白启动子、糖皮质激素启动子、孕酮启动子和四环素调控启动子。

[0396] 为评估TFP多肽或其部分的表达,待引入细胞中的表达载体也可含有可选择标记基因或报道体基因或两者以有助于从设法通过病毒载体来转染或感染的细胞群体鉴定和选择表达性细胞。在其他方面,可选择标记可携带在单独DNA片块上,并且用于共转染程序中。可选择标记与报道体基因两者均可用适当调控序列侧接以使得能够在宿主细胞中进行表达。适用可选择标记包括例如抗生素抗性基因诸如neo等。

[0397] 报道体基因用于鉴定潜在经转染细胞以及评估调控序列的功能性。一般来说,报道体基因是不存在于接受生物体或组织中或不由接受生物体或组织表达,并且编码其表达通过某一可易于检测性质例如酶活性来显现的多肽的基因。在DNA已引入接受细胞中之后,在某一适合时间测定报道体基因的表达。适合报道体基因可包括编码荧光素酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶、氯霉素乙酰基转移酶、分泌碱性磷酸酶的基因或绿色荧光蛋白基因(例如Ui-Tei等, 2000 *FEBS Letters* 479:79-82)。适合表达系统是熟知的,并且可使用已知技术制备或商购获得。一般来说,具有显示报道体基因的最高表达水平的最小5'侧接区域的构建体被鉴定为启动子。所述启动子区域可连接于报道体基因,并且用于评估各试剂的调节启动子驱动的转录的能力。

[0398] 向细胞中引入和表达基因的方法在本领域中是已知的。在表达载体的情形下,载体可易于通过本领域中的任何方法来引入宿主细胞例如哺乳动物、细菌、酵母或昆虫细胞中。举例来说,表达载体可通过物理、化学或生物手段来转移至宿主细胞中。

[0399] 用于将多核苷酸引入宿主细胞中的物理方法包括磷酸钙沉淀、脂质体转染、粒子轰击、显微注射、电穿孔等。用于产生包含载体和/或外源性核酸的细胞的方法在本领域中是熟知的(参见例如Sambrook等, 2012, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第1-4卷, Cold Spring Harbor Press, NY)。一种用于将多核苷酸引入宿主细胞中的方法是磷酸钙转染。

[0400] 用于将目标多核苷酸引入宿主细胞中的生物方法包括使用DNA和RNA载体。病毒载体,并且尤其是逆转录病毒载体,已变为用于将基因插入哺乳动物例如人细胞中的最广泛

使用方法。其他病毒载体可源于慢病毒、痘病毒、单纯疱疹病毒I、腺病毒和腺相关病毒等(参见例如美国专利号5,350,674和5,585,362)。

[0401] 用于将多核苷酸引入宿主细胞中的化学手段包括胶体分散系统,诸如大分子复合物、纳米胶囊、微球体、珠粒和基于脂质的系统,包括水包油乳液、胶束、混合胶束和脂质体。在体外以及在体内用作递送载体的一示例性胶体系统是脂质体(例如人工膜囊泡)。其他现有技术核酸靶向递送方法是可用的,诸如用靶向纳米粒子或其他适合亚微米大小递送系统递送多核苷酸。

[0402] 在其中利用非病毒递送系统的情况下,一示例性递送载体是脂质体。脂质制剂的使用被预期用于将核酸引入宿主细胞中(体外、离体或体内)。在另一方面,核酸可与脂质缔合。与脂质缔合的核酸可囊封在脂质体的水性内部中,散布在脂质体的脂质双层内,通过与脂质体与寡核苷酸两者缔合的连接分子来连接于脂质体,圈闭在脂质体中,与脂质体复合,分散在含有脂质的溶液中,与脂质混合,与脂质组合,以混悬液形式含于脂质中,用胶束容纳或与胶束复合,或以其他方式与脂质缔合。脂质、脂质/DNA或脂质/表达载体相关组合物不限于处于溶液中的任何特定结构。举例来说,它们可以双层结构、胶束、或“崩塌”结构形式存在。它们也可简单地散布在溶液中,有可能形成在大小或形状方面不均一的聚集物。脂质是可为天然存在或合成脂质的脂肪物质。举例来说,脂质包括天然存在于细胞质中的脂肪小滴以及含有长链脂族烃和它们的衍生物诸如脂肪酸、醇、胺、氨基醇和醛的化合物类别。

[0403] 适于使用的脂质可从商业来源获得。举例来说,二肉豆蔻基磷脂酰胆碱(“DMPC”)可从Sigma, St. Louis, Mo. 获得;磷酸二鲸蜡酯(“DCP”)可从K&K Laboratories (Plainview, N.Y.) 获得;胆固醇(“Choi”)可从Calbiochem-Behring获得;二肉豆蔻基磷脂酰甘油(“DMPG”)和其他脂质可从Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, Ala.) 获得。脂质于氯仿或氯仿/甲醇中的储备溶液可储存在约-20℃下。氯仿用作唯一溶剂,因为它比甲醇更易于蒸发。“脂质体”是通用术语,其涵盖通过产生封闭脂质双层或聚集物来形成的多种单层和多层脂质载体。脂质体可被表征为具有囊泡结构,所述囊泡结构具有磷脂双层膜和内部水性介质。多层脂质体具有由水性介质分隔的多个脂质层。它们在磷脂混悬于过量水溶液中时自发形成。脂质组分经受自身重排,随后形成闭合结构,并且将水和溶解溶质圈闭在脂质双层之间(Ghosh等, 1991 *Glycobiology* 5:505-10)。然而,也涵盖在溶液中具有与正常囊泡结构不同的结构的组合物。举例来说,脂质可采用胶束结构或仅以脂质分子的非均一聚集物形式存在。也涵盖转脂胺-核酸复合物。

[0404] 无论用于将外源性核酸引入宿主细胞中或另外使细胞暴露于本发明的抑制剂的方法如何,为确认在宿主细胞中存在重组DNA序列,可进行多种测定。所述测定包括例如为本领域技术人员所熟知的“分子生物学”测定,诸如Southern和Northern印迹、RT-PCR和PCR;“生物化学”测定,诸如检测特定肽的存在或不存在,例如通过免疫手段(ELISA和Western印迹)或通过本文所述的用以鉴定属于本发明的范围内的试剂的测定。

[0405] 本发明进一步提供一种包含编码TFP的核酸分子的载体。在一个方面,TFP载体可直接转导至细胞例如T细胞中。在一个方面,载体是克隆载体或表达载体,例如包括但不限于一种或多种质粒(例如表达质粒、克隆载体、小环、小型载体、双微染色体)、逆转录病毒和慢病毒载体构建体的载体。在一个方面,载体能够在哺乳动物T细胞中表达TFP构建体。在一

个方面,哺乳动物T细胞是人T细胞。

[0406] T细胞的来源

[0407] 在扩增和遗传修饰之前,从受试者获得T细胞来源。术语“受试者”意图包括其中可引发免疫应答的活生物体(例如哺乳动物)。受试者的实例包括人、狗、猫、小鼠、大鼠及其转基因物种。T细胞可从许多来源获得,包括外周血液单核细胞、骨髓、淋巴结组织、脐带血、胸腺组织、来自感染部位的组织、腹水、胸腔积液、脾组织和肿瘤。在本发明的某些方面,可使用许多本领域中可用的T细胞系。在本发明的某些方面,T细胞可从使用为熟练技术人员所知的许多技术诸如Ficoll®分离从受试者收集的某一单位的血液获得。在一个优选方面,来自个体的循环血液的细胞通过单独采集获得。单独采集产物通常含有淋巴细胞,包括T细胞、单核细胞、粒细胞、B细胞、其他有核白血细胞、红血细胞和血小板。在一个方面,通过单独采集收集的细胞可加以洗涤以移除血浆级分,以及将细胞放置在适当缓冲液或培养基中以进行后续处理步骤。在本发明的一个方面,细胞用磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤。在一替代性方面,洗涤溶液缺乏钙,并且可缺乏镁,或可缺乏许多(若非全部)二价阳离子。在不存在钙下的初始活化步骤可导致放大活化。如本领域普通技术人员将易于了解,洗涤步骤可通过为本领域中的人士所知的方法来完成,诸如通过根据制造商说明书使用半自动化“流穿”离心机(例如COBE®2991细胞处理器、Baxter CytoMate®或Haemonetics®Cell Saver®5)。在洗涤之后,可将细胞再混悬于多种生物可相容缓冲液诸如像无Ca无Mg PBS、PlasmaLyte®A或具有或不具有缓冲剂的其他盐水溶液中。或者,可移除单独采集样品的不合需要组分,并且将细胞直接再混悬于培养基中。

[0408] 在一个方面,通过使红血细胞溶解以及使单核细胞消减,例如通过Percoll®梯度离心或通过逆流离心淘析,从外周血液淋巴细胞分离T细胞。特定子群体的T细胞诸如CD3<sup>+</sup>、CD28<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、CD45RA<sup>+</sup>和CD45RO<sup>+</sup>T细胞可通过正性或负性选择技术来进一步分离。举例来说,在一个方面,T细胞通过与CD3抗体/CD28抗体(例如3x28)缀合珠粒一起孵育一段足以对所需T细胞进行正性选择的时期来分离,所述珠粒诸如Dynabeads®M-450CD3/CD28T。在一个方面,时期是约30分钟。在另一方面,时期在30分钟至36小时的范围内或更久时间以及介于之间的所有整数值。在另一方面,时期是至少1、2、3、4、5或6小时。在另一优选方面,时期是10至24小时。在一个方面,孵育时期是24小时。较长孵育时间可用于在其中相较于其他细胞类型存在少许T细胞的任何情况下分离T细胞,诸如在从肿瘤组织或从免疫损害个体分离肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)时。此外,使用较长孵育时间可使对CD8<sup>+</sup>T细胞的捕集的效率增加。因此,通过简单地缩短或延长允许T细胞结合CD3/CD28珠粒的时间,和/或通过增加或降低珠粒与T细胞的比率(如本文进一步所述),在培养起始时或在过程期间的其他时间点,可优先选择或不选择T细胞子群体。另外,通过增加或降低珠粒或其他表面上的抗CD3抗体和/或抗CD28抗体的比率,在培养起始时或在其他所需时间点,可优先选择或不选择T细胞子群体。熟练技术人员将认识到多轮选择也可在本发明的情形下使用。在某些方面,可合乎需要的是进行选择程序以及在活化和扩增过程中使用“未经选择”细胞。也可使“未经选择”细胞经受进一步各轮选择。

[0409] 通过负性选择来富集T细胞群体可用针对为负性选择细胞所特有的表面标志物的抗体的组合完成。一种方法是通过使用针对存在于负性选择细胞上的细胞表面标志物的单克隆抗体的混合物的负性磁性免疫粘附或流式细胞计量术进行细胞分选和/或选择。举例

来说,为通过负性选择来富集CD4<sup>+</sup>细胞,单克隆抗体混合物通常包括针对CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR和CD8的抗体。在某些方面,可合乎需要的是富集或正性选择通常表达CD4<sup>+</sup>、CD25<sup>+</sup>、CD62Lhi、GITR<sup>+</sup>和FoxP3<sup>+</sup>的调控性T细胞。或者,在某些方面,T调控性细胞通过C25抗体缀合珠粒或其他类似选择方法来消减。

[0410] 在一个实施方案中,可选择表达IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-17A、IL-2、IL-3、IL-4、GM-CSF、IL-10、IL-13、粒酶B和穿孔素或其他适当分子例如其他细胞因子中的一者或多者的T细胞群体。用于筛选细胞表达的方法可例如通过PCT公布号:W02013/126712中所述的方法来确定。

[0411] 对于通过正性或负性选择来分离所需细胞群体,可改变细胞和表面(例如粒子诸如珠粒)的浓度。在某些方面,可合乎需要的是显著降低珠粒和细胞混合在一起所处的体积(例如增加细胞的浓度),以确保细胞和珠粒的最大接触。举例来说,在一个方面,使用20亿个细胞/毫升的浓度。在一个方面,使用10亿个细胞/毫升的浓度。在另一方面,使用大于10000万个细胞/毫升。在另一方面,使用1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500或5000万个细胞/毫升的细胞浓度。在另一个方面,使用7500、8000、8500、9000、9500或10000万个细胞/毫升的细胞浓度。在其他方面,可使用12500或15000万个细胞/毫升的浓度。使用高浓度可导致细胞产率、细胞活化和细胞扩增增加。此外,使用高细胞浓度允许更高效捕集可微弱表达目标靶标抗原的细胞诸如CD28阴性T细胞,或来自其中有许多肿瘤细胞存在的样品(例如白血病性血液、肿瘤组织等)的细胞。所述细胞群体可具有治疗价值,并且将需要获得。举例来说,使用高浓度的细胞允许更高效选择通常具有较微弱CD28表达的CD8<sup>+</sup>T细胞。

[0412] 在一相关方面,可合乎需要的是使用较低浓度的细胞。通过显著稀释T细胞和表面(例如粒子诸如珠粒)的混合物,粒子与细胞之间的相互作用得以最小化。这会选择表达待结合于粒子的高量所需抗原的细胞。举例来说,CD4<sup>+</sup>T细胞表达较高水平的CD28,并且在稀释浓度的情况下比CD8<sup>+</sup>T细胞更高效被捕集。在一个方面,所用细胞浓度是 $5 \times 10^6$ /mL。在其他方面,所用浓度可为约 $1 \times 10^5$ /mL至 $1 \times 10^6$ /mL,以及介于之间的任何整数值。在其他方面,细胞可在2-10°C下或在室温下在旋转器上在不同速度下孵育不同时长。

[0413] 用于刺激的T细胞也可在洗涤步骤之后加以冷冻。在不希望受理论束缚下,冷冻和后续解冻步骤通过移除细胞群体中的粒细胞以及在一定程度上移除单核细胞而提供更均一产物。在移除血浆和血小板的洗涤步骤之后,可将细胞混悬于冷冻溶液中。尽管许多冷冻溶液和参数在本领域中是已知的,并且将在这个情形下适用,但一种方法涉及使用含有20%DMSO和8%人血清白蛋白的PBS,或含有10%右旋糖酐40和5%右旋糖、20%人血清白蛋白和7.5%DMSO、或31.25%血浆电解质-A、31.25%右旋糖5%、0.45%NaCl、10%右旋糖酐40和5%右旋糖、20%人血清白蛋白、以及7.5%DMSO的培养基或含有例如Hespan®和PlasmaLyte®A的其他适合细胞冷冻介质,接着将细胞在每分钟1°C的速率下冷冻至-80°C,并且储存在液氮储槽的蒸汽相中。可使用其他控制冷冻方法,以及在-20°C下或在液氮中进行的非控制立刻冷冻。在某些方面,低温保存细胞如本文所述加以解冻和洗涤,并且使其在室温下静息1小时,随后使用本发明方法进行活化。

[0414] 在本发明的情形下也涵盖在可能需要如本文所述的经扩增细胞所处的时间之前在某一时期从受试者收集血液样品或单独采集产物。因此,待扩增的细胞来源可在所需任

何时间点收集,并且分离和冷冻所需细胞诸如T细胞以稍后在针对将受益于T细胞疗法的许多疾病或疾患诸如本文所述的那些的T细胞疗法中使用。在一个方面,血液样品或单独采集物取自大体上健康受试者。在某些方面,血液样品或单独采集物取自处于显现疾病的风险下,但尚未显现疾病的大体上健康受试者,并且分离和冷冻目标细胞以供稍后使用。在某些方面,可扩增、冷冻T细胞,并且在稍后时间使用。在某些方面,在诊断如本文所述的特定疾病之后不久但在任何治疗之前从患者收集样品。在另一方面,在许多相关治疗模态之前从来自受试者的血液样品或单独采集物分离细胞,所述治疗模态包括但不限于用诸如以下的药剂治疗:那他珠单抗(natalizumab)、依法珠单抗(efalizumab)、抗病毒剂、化学疗法、放射、免疫抑制剂诸如环孢菌素(cyclosporin)、咪唑硫嘌呤(azathioprine)、甲氨蝶呤(methotrexate)、霉酚酸酯(mycophenolate)和他克莫司(tacrolimus)(FK506)、抗体或其他免疫净化剂诸如阿来珠单抗(alemtuzumab)、抗CD3抗体、环磷酰胺(cyclophosphamide)、氟达拉滨(fludarabine)、环孢菌素(cyclosporin)、雷帕霉素(rapamycin)、霉酚酸(mycophenolic acid)、类固醇、罗米地辛(romidepsin)(先前是FR901228)和照射。

[0415] 在本发明的另一方面,T细胞在使受试者保留有功能性T细胞的治疗之后直接从患者获得。就此而言,已观察到在某些癌症治疗特别是用损害免疫系统的药物治疗之后,在治疗之后不久在患者将通常从治疗恢复所处的时期期间,所得T细胞的就它们离体扩增的能力来说的品质可为最优的或改进的。同样,在使用本文所述的方法进行离体操作之后,这些细胞就达成增强的移入和体内扩增来说可处于优选状态。因此,在本发明的情形内涵盖在这个恢复期期间收集血细胞,包括T细胞、树突细胞或造血谱系的其他细胞。此外,在某些方面,动员(例如用GM-CSF动员)和调节方案可用于在受试者中创建有利于特定细胞类型的再群体化、再循环、再生和/或扩增所处的条件,尤其是在疗法之后确定时间窗口期间。说明性细胞类型包括T细胞、B细胞、树突细胞和免疫系统的其他细胞。

[0416] T细胞的活化和扩增

[0417] T细胞可通常使用如例如于美国专利号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;和7,572,631中所述的方法来活化和扩增。

[0418] 通常,本发明的T细胞可通过与具有与其连接的刺激CD3/TCR复合物相关信号的试剂和刺激T细胞的表面上的共刺激性分子的配体的表面接触来扩增。特定来说,T细胞群体可如本文所述加以刺激,诸如通过与固定在表面上的抗CD3抗体或其抗原结合片段或抗CD2抗体接触,或通过与和钙离子载体联合的蛋白质激酶C活化剂(例如苔藓抑素(bryostatin))接触。对于共刺激T细胞的表面上的辅助分子,使用结合所述辅助分子的配体。举例来说,可使T细胞群体与抗CD3抗体和抗CD28抗体在适于刺激T细胞的增殖的条件下接触。为刺激CD4<sup>+</sup>T细胞或CD8<sup>+</sup>T细胞的增殖,使用抗CD3抗体和抗CD28抗体。抗CD28抗体的实例包括9.3、B-T3、XR-CD28(Diaclone,Besancon,France),其可如本领域中通常已知的其他方法加以使用(Berg等,Transplant Proc.30(8):3975-3977,1998;Haanen等,J.Exp.Med.190(9):13191328,1999;Garland等,J.Immunol.Meth.227(1-2):53-63,1999)。

[0419] 已暴露了不同刺激时间的T细胞可展现不同特征。举例来说,典型血液或单独采集外周血液单核细胞产物具有大于细胞毒性或抑制T细胞群体(TC,CD8<sup>+</sup>)的辅助T细胞群体

(TH, CD4<sup>+</sup>)。通过刺激CD3和CD28受体来离体扩增T细胞会产生以下T细胞群体：其在约第8-9天之前主要由TH细胞组成，而在约第8-9天之后，所述T细胞群体包含日益更大TC细胞群体。因此，视治疗目的而定，用主要包含TH细胞的T细胞群体对受试者输注可为有利的。类似地，如果已分离抗原特异性TC细胞子组，那么可有益的是在更大程度上扩增这个子组。

[0420] 此外，除CD4和CD8标志物之外，其他表型标志物在细胞扩增过程期间也显著地但在很大程度上可重现地变化。因此，所述可重现性使得能够调适活化T细胞产物以达成特定目的。

[0421] 一旦构建抗肿瘤相关抗原TFP，各种测定即可用于评估分子的活性，诸如但不限于在抗原刺激之后使T细胞扩增的能力，在不存在再刺激下维持T细胞扩增的能力，以及在适当体外和动物模型中的抗癌活性。用以评估抗肿瘤相关抗原TFP的作用的测定在以下进一步详细描述。

[0422] 对原代T细胞中TFP表达的Western印迹分析可用于检测单体和二聚体的存在（参见例如Milone等，*Molecular Therapy* 17 (8) :1453-1464 (2009)）。极其简要来说，使表达TFP的T细胞（CD4<sup>+</sup>T细胞和CD8<sup>+</sup>T细胞的1:1混合物）在体外扩增超过10天，随后进行溶解和在还原性条件下进行SDS-PAGE。使用针对TCR链的抗体，通过Western印迹来检测TFP。相同T细胞子组用于在非还原性条件下进行SDS-PAGE分析以容许评估共价二聚体形成。

[0423] 在抗原刺激之后TFP<sup>+</sup>T细胞的体外扩增可通过流式细胞计量术来测量。举例来说，CD4<sup>+</sup>T细胞和CD8<sup>+</sup>T细胞的混合物用 $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28和APC刺激，随后用在待分析的启动子的控制下表达GFP的慢病毒载体转导。示例性启动子包括CMV IE基因、EF-1 $\alpha$ 、泛素C、或磷酸甘油激酶（PGK）启动子。在培养的第6天，通过流式细胞计量术来评估CD4<sup>+</sup>和/或CD8<sup>+</sup>T细胞子组中的GFP荧光（参见例如Milone等，*Molecular Therapy* 17 (8) :1453-1464 (2009)）。或者，CD4<sup>+</sup>T细胞和CD8<sup>+</sup>T细胞的混合物在第0天用 $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28涂布的磁性珠粒刺激，并且在第1天使用利用2A核糖体跳跃序列的表达TFP以及eGFP的双顺反子慢病毒载体来用TFP转导。

[0424] 也可测量在不存在再刺激下的持续TFP<sup>+</sup>T细胞扩增（参见例如Milone等，*Molecular Therapy* 17 (8) :1453-1464 (2009)）。简要来说，在第0天用 $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28涂布的磁性珠粒刺激，以及在第1天用指示的TFP转导之后，在培养的第8天使用Coulter Multisizer III粒子计数器测量平均T细胞体积（f1）。

[0425] 动物模型也可用于测量TFP-T活性。举例来说，在使用人BCMA特异性TFP<sup>+</sup>T细胞来治疗免疫缺陷小鼠的癌症的情况下的异种移植物模型（参见例如Milone等，*Molecular Therapy* 17 (8) :1453-1464 (2009)）。极其简要来说，在建立癌症之后，使小鼠关于治疗组加以随机化。不同数目的经工程改造T细胞在1:1比率下共注射至携带癌症的NOD/SCID/ $\gamma^{-/-}$ 小鼠中。评估在T细胞注射之后在各种时间来自小鼠的脾DNA中各载体的拷贝数。在每周间隔下评估动物的癌症。测量用 $\alpha$ 肿瘤相关抗原- $\zeta$ TFP<sup>+</sup>T细胞或模拟转导的T细胞注射的小鼠中的外周血液肿瘤相关抗原<sup>+</sup>癌细胞计数。使用对数秩检验比较各组的存活曲线。此外，也可分析在T细胞注射之后4周NOD/SCID/ $\gamma^{-/-}$ 小鼠中的绝对外周血液CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞计数。小鼠用癌细胞注射，并且3周后用通过编码连接于eGFP的TFP的双顺反子慢病毒载体加以工程改造来表达TFP的T细胞注射。通过在注射之前与模拟转导的细胞混合来使T细胞标准化成45-50%输入GFP<sup>+</sup>T细胞，并且通过流式细胞计量术加以确认。在1周间隔下评估动物的癌症。使用对数秩检验比较TFP<sup>+</sup>T细胞组的存活曲线。

[0426] 可评估剂量依赖性TFP治疗响应(参见例如Milone等,Molecular Therapy 17(8):1453-1464(2009))。举例来说,在第21天用TFP T细胞、相等数目的模拟转导T细胞或不用T细胞注射的小鼠中,在建立癌症之后35-70天获得外周血液。对来自各组的小鼠随机放血以测定外周血液+癌细胞计数,接着在第35和49天杀灭小鼠。其余动物在第57和70天加以评估。

[0427] 先前已例如在Milone等,Molecular Therapy 17(8):1453-1464(2009)处描述对细胞增殖和细胞因子产生的评估。简要来说,在微量滴定板中通过以下方式对TFP介导的增殖进行评估:使经洗涤T细胞与表达BCMA或CD32和CD137(KT32-BBL)的细胞混合以达成最终T细胞:表达BCMA的细胞比率2:1。表达BCMA的细胞在使用之前用 $\gamma$ 射线加以照射。抗CD3(克隆OKT3)单克隆抗体和抗CD28(克隆9.3)单克隆抗体与KT32-BBL细胞一起添加至培养物中以充当刺激T细胞增殖的阳性对照,因为这些信号支持长期CD8<sup>+</sup>T细胞离体扩增。如由制造商所述,使用CountBright™荧光珠粒(Invitrogen)和流式细胞计量术来对培养物中的T细胞计数。使用用eGFP-2A连接的TFP表达性慢病毒载体工程改造的T细胞,通过GFP表达来鉴定TFP+T细胞。对于不表达GFP的TFP+T细胞,TFP+T细胞用生物素化重组BCMA蛋白和二级亲和素-PE缀合物检测。T细胞上的CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>表达也同时用特定单克隆抗体(BD Biosciences)检测。根据制造商说明书,使用人TH1/TH2细胞因子细胞测量珠粒阵列试剂盒(BD Biosciences)对在再刺激之后24小时收集的上清液进行细胞因子测量。使用FACScalibur™流式细胞仪评估荧光,并且根据制造商说明书分析数据。

[0428] 细胞毒性可通过标准<sup>51</sup>Cr释放测定来评估(参见例如Milone等,Molecular Therapy 17(8):1453-1464(2009))。简要来说,靶标细胞在37℃下在频繁搅拌下用<sup>51</sup>Cr(以NaCrO<sub>4</sub>形式,New England Nuclear)装载2小时,于完全RPMI中洗涤两次,并且涂铺至微量滴定板中。使效应T细胞与靶标细胞在不同效应细胞:靶标细胞比率(E:T)下在孔中于完全RPMI中混合。也制备仅含有培养基(自发性释放,SR)或1%曲通-X 100清洁剂溶液(总体释放,TR)的额外孔。在37℃下孵育4小时之后,收集来自各孔的上清液。接着使用 $\gamma$ 粒子计数器(Packard Instrument Co.,Waltham,Mass.)测量释放<sup>51</sup>Cr。各条件都至少一式三份进行,并且使用下式计算溶解百分比:溶解%=(ER-SR)/(TR-SR),其中ER代表各实验条件的平均释放<sup>51</sup>Cr。

[0429] 成像技术可用于评估携带肿瘤的动物模型中TFP的特定迁移和增殖。所述测定已例如描述于Barrett等,Human Gene Therapy 22:1575-1586(2011)中。简要来说,NOD/SCID/ $\gamma$ c-/- (NSG)小鼠用癌细胞进行静脉内注射,随后在7天后用在用TFP构建体进行电穿孔之后4小时的T细胞注射。T细胞用慢病毒构建体稳定转染以表达萤火虫荧光素酶,并且对小鼠的生物发光进行成像。或者,单次注射TFP+T细胞在癌症异种移植模型中的治疗功效和特异性可如下加以测量:NSG小鼠用被转导来稳定表达萤火虫荧光素酶的癌细胞注射,随后在7天后单次尾部静脉注射用BCMA TFP电穿孔的T细胞。在注射后在各种时间点对动物成像。举例来说,可产生在第5天(在治疗之前2天)以及第8天(在TFP+PBL后24小时)代表性小鼠中萤火虫荧光素酶阳性癌症的光子密度热图。

[0430] 其他测定,包括本文实施例章节中所述的那些以及本领域中已知的那些,也可用于评估本文公开的抗TAA TFP构建体。

[0431] 治疗性应用



[0432] 肿瘤抗原相关疾病或病症

[0433] 尽管已在本文中提供实例和实施方案,但与例如ROR1相关疾病和/或抗ROR1抗体及其用途相关的额外技术和实施方案可见于2013年1月13日提交的美国专利号9,217,040;2011年11月30日提交的美国专利号9,758,586;2011年6月17日提交的国际公布号W0 2012076066;Mato,A.和Porter,D.(2015) Blood 126(4),478-485;Choi,M.,等(2015) Clinical Lymphoma,Myeloma&Leukemia 15(S1),S167-S169;Cui,B.,等(2015) Cancer Research 73(12),3649-3660;Yu,J.,等(2015) Journal of Clinical Investigation 10(1172),1-34;Borcherding,N.,等(2014) Protein Cell 5(7),496-502;Zhang,S.,等(2012) The American Journal of Pathology 181(6),1903-1910;Hudecek,M.,等(2010) Blood 116(22),4532-4541;以及Deniger,D.,等(2015) PLoS ONE 10(6),1-19中,所述专利和文献以引用的方式整体并入本文。

[0434] 在一个方面,本发明提供用于治疗与TAA例如ROR1或NKG2D配体(NKG2DL)表达相关的疾病的方法。在一个方面,本发明提供用于治疗疾病的方法,其中肿瘤的一部分呈NKG2DL阴性,并且肿瘤的一部分呈NKG2DL阳性。举例来说,TFP适用于治疗已经受对与NKG2DL的表达升高相关的疾病的治疗的受试者,其中已经受对NKG2DL的水平升高的治疗的所述受试者展现与NKG2DL的水平升高相关的疾病。

[0435] 在一个方面,本发明涉及一种载体,其包含TAA结合TFP可操作地连接于启动子以达成在哺乳动物T细胞中表达。在一个方面,本发明提供一种用于治疗NKG2DL表达性肿瘤的表达式例如NKG2D TFP的重组T细胞,其中表达NKG2D TFP的所述重组T细胞被称为NKG2D TFP-T。在一个方面,NKG2D TFP-T能够使肿瘤细胞与至少一种在它的表面上表达的NKG2DL接触以使TFP-T靶向所述肿瘤细胞,并且肿瘤的生长被抑制。

[0436] 双特异性TFP

[0437] 用针对肿瘤细胞上的一种靶标例如BCMA、CD19、CD20、CD22、CD123等的癌症治疗剂治疗的许多患者随时间变得具有抗性,因为逃避机制诸如替代性信号传导路径和反馈环路变得被活化。双特异性治疗剂试图通过使经常替代彼此作为逃避途径的靶标组合来对此进行解决。具有对超过一种肿瘤相关抗原具有特异性的TCR的治疗性T细胞群体是有希望的组合治疗剂。

[0438] 抗TAA TFP T细胞、双特异性抗TAA TFP T细胞、或CD-16TFP T细胞与抗TAA抗体组合的肿瘤相关抗原靶标

[0439] 示例性肿瘤相关抗原包括但不限于癌胚抗原(例如在胎儿组织中以及在癌性体细胞中表达的那些)、致癌病毒性抗原(例如由致肿瘤性转化病毒编码的那些)、过度表达/积累抗原(例如由正常组织与赘生性组织两者表达,其中在赘瘤形成的情况下表达水平高度升高的那些)、癌症睾丸抗原(例如仅由癌细胞和成人生殖组织诸如睾丸和胎盘表达的那些)、谱系限定抗原(例如主要由单一癌组织型表达的那些)、突变抗原(例如由于遗传突变或转录改变而由癌表达的那些)、翻译后改变抗原(例如那些肿瘤相关糖基化改变等)以及个体基因型抗原(例如来自高度多态性基因的那些,其中肿瘤细胞表达特定纯系型,例如如在由纯系异常所致的B细胞淋巴瘤/白血病、T细胞淋巴瘤/白血病的情况下)。示例性肿瘤相关抗原包括但不限于以下抗原: $\alpha$ -辅肌动蛋白-4(alpha-actinin-4)、ARTC1、BCR-ABL融合蛋白(b3a2)、B-Raf、CASP-5、CASP-8、 $\beta$ -连环蛋白(beta-catenin)、Cdc27、CDK4、CDK12、



CDKN2A、CLPP、COA-1、CSNK1A1、dek-can融合蛋白、EFTUD2、延伸因子2、ETV6-AML1融合蛋白、FLT3-ITD、FNDC3B、FN1、GAS7、GPNMB、HAUS3、HSDL1、LDLR-海藻糖基转移酶AS融合蛋白、HLA-A2d、HLA-A11d、hsp70-2、MART2、MATN、ME1、MUM-1f、MUM-2、MUM-3、neo-PAP、I类肌球蛋白(Myosin class I)、NFYC、OGT、OS-9、p53、pml-RAR $\alpha$ 融合蛋白、PPP1R3B、PRDX5、PTPRK、K-ras、N-ras、RBAF600、SIRT2、SNRPD1、SYT-SSX1或SYT-SSX2融合蛋白、TGF- $\beta$ RII、磷酸丙糖异构酶、BAGE-1、D393-CD20n、周期素-A1 (Cyclin-A1)、GAGE-1、GAGE-2、GAGE-8、GAGE-3、GAGE-4、GAGE-5、GAGE-6、GAGE-7、GnTVf、HERV-K-MEL、KK-LC-1、KM-HN-1、LAGE-1、LY6K、MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A6、MAGE-A9、MAGE-A10、MAGE-A12m、MAGE-C1、MAGE-C2、mucink、NA88-A、NY-ESO-1/LAGE-2、SAGE、Sp17、SSX-2、SSX-4、TAG-1、TAG-2、TRAG-3、TRP2-INT2g、XAGE-1b/GAGED2a、基因/蛋白质、CEA、gp100/Pmel17、乳腺球蛋白-A (mammaglobin-A)、Melan-A/MART-1、NY-BR-1、OA1、PAP、PSA、RAB38/NY-MEL-1、TRP-1/gp75、TRP-2、酪氨酸酶、亲脂素(adipophilin)、AIM-2、ALDH1A1、BCLX(L)、BING-4、CALCA、CD45、CD274、CPSF、周期素D1、DKK1、ENAH(hMena)、EpCAM、EphA3、EZH2、FGF5、磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3(glypican-3)、G250/MN/CAIX、HER-2/neu、HLA-DOB、丝氨酸蛋白酶(Hepsin)、IDO1、IGF2B3、IL13R $\alpha$ 2、羧基酯酶、 $\alpha$ 胎蛋白、激肽释放酶4(Kallikrein 4)、KIF20A、含谷氨酰胺合成酶结构域晶体蛋白(Lengsin)、M-CSF、MCSP、mdm-2、Meloe、肝素结合细胞因子(Midkine)、MMP-2、MMP-7、MUC1、MUC5AC、p53、PAX5、PBF、PRAME、PSMA、RAGE-1、RGS5、RhoC、RNF43、RU2AS、分离蛋白1(secernin 1)、SOX10、STEAP1、存活素(survivin)、端粒酶(Telomerase)、TPBG、VEGF和WT1。

[0440] 在一个方面,本发明提供用于治疗与至少一种肿瘤相关抗原表达相关的疾病的方法。在一个方面,本发明提供用于治疗疾病的方法,其中肿瘤的一部分呈肿瘤相关抗原阴性,并且肿瘤的一部分呈肿瘤相关抗原阳性。举例来说,本发明的抗体或TFP适用于治疗已经受对与所述肿瘤抗原的表达升高相关的疾病的治疗的受试者,其中已经受对肿瘤相关抗原的水平升高的治疗的所述受试者展现与肿瘤相关抗原的水平升高相关的疾病。

[0441] 在一个方面,本发明涉及一种载体,其包含抗肿瘤相关抗原抗体或TFP可操作地连接于启动子以达成在哺乳动物T细胞中表达。在一个方面,本发明提供一种用于治疗肿瘤相关抗原表达性肿瘤的肿瘤相关抗原TFP的重组T细胞,其中表达所述肿瘤相关抗原TFP的所述重组T细胞被称为肿瘤相关抗原TFP-T。在一个方面,本发明的肿瘤相关抗原TFP-T能够使肿瘤细胞与至少一种在它的表面上表达的本发明的肿瘤相关抗原TFP接触以使TFP-T靶向所述肿瘤细胞,并且肿瘤的生长被抑制。

[0442] 在一个方面,本发明涉及一种抑制肿瘤相关抗原表达性肿瘤细胞的生长的方法,其包括使所述肿瘤细胞与本发明的肿瘤相关抗原抗体或TFP T细胞接触以使所述TFP-T应答于抗原而活化,并且靶向癌细胞,其中肿瘤的生长被抑制。

[0443] 在一个方面,本发明涉及一种治疗受试者的癌症的方法。方法包括向受试者施用本发明的肿瘤相关抗原抗体、双特异性抗体或TFP T细胞以使受试者中的癌症得以治疗。可通过本发明的肿瘤相关抗原TFP T细胞治疗的癌症的一实例是与肿瘤相关抗原的表达相关的癌症。在一个方面,癌症是骨髓瘤。在一个方面,癌症是淋巴瘤。在一个方面,癌症是结肠癌。

[0444] 在一些实施方案中,肿瘤相关抗原抗体或TFP疗法可与一种或多种额外疗法组合使用。在一些情况下,所述额外疗法包括化学治疗剂例如环磷酰胺。在一些情况下,所述额

外疗法包括手术切除或放射治疗。

[0445] 在一个方面,本文公开一种细胞治疗的方法,其中T细胞被遗传修饰来表达TFP,并且将TFP表达性T细胞输注至有需要的接受者中。所输注细胞能够杀灭接受者中的肿瘤细胞。不同于抗体疗法,TFP表达性T细胞能够在体内复制,从而产生可导致持续肿瘤控制的长期持久性。在各个方面,在向患者施用T细胞之后,向患者施用的T细胞或它们的子代在患者中持续存在至少4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、12个月、13个月、14个月、15个月、16个月、17个月、18个月、19个月、20个月、21个月、22个月、23个月、2年、3年、4年或5年。

[0446] 在一些情况下,本文公开一种类型的细胞疗法,其中T细胞例如通过在体外转录的RNA来修饰以短暂表达TFP,并且将TFP表达性T细胞输注至有需要的接受者中。所输注细胞能够杀灭接受者中的肿瘤细胞。因此,在各个方面,在向患者施用T细胞之后,向患者施用的T细胞存在小于1个月,例如3周、2周或1周。

[0447] 在不希望受任何特定理论束缚下,由TFP表达性T细胞引发的抗肿瘤免疫性应答可为主动或被动免疫应答,或替代地,可归因于直接免疫应答相对于间接免疫应答。在一个方面,TFP转导的T细胞应答于表达肿瘤相关抗原的人癌细胞而展现特异性促炎性细胞因子分泌和强力细胞溶解活性,抵抗可溶性肿瘤相关抗原抑制,介导旁邻杀灭和/或介导建立的人肿瘤的消退。举例来说,肿瘤相关抗原表达性肿瘤的异质区域内的无抗原肿瘤细胞可易经受由先前已针对邻近抗原阳性癌细胞起反应的肿瘤相关抗原重定向T细胞达成的间接破坏。

[0448] 在一个方面,本发明的人经TFP修饰T细胞可为一种用于在哺乳动物中进行离体免疫和/或体内治疗的疫苗类型。在一个方面,哺乳动物是人。

[0449] 关于离体免疫,在向哺乳动物中施用细胞之前在体外发生以下中的至少一者:i)使细胞扩增,ii)将编码TFP的核酸引入细胞中或iii)对细胞进行低温保存。

[0450] 离体程序在本领域中是熟知的,并且在以下更充分讨论。简要来说,从哺乳动物(例如人)分离细胞,并且用表达本文公开的TFP的载体加以遗传修饰(即在体外转导或转染)。经TFP修饰细胞可向哺乳动物接受者施用以提供治疗益处。哺乳动物接受者可为人,并且经TFP修饰细胞关于接受者可为自体的。或者,细胞关于接受者可为同种异体的、同种同基因的或异种异体的。

[0451] 用于离体扩增造血干细胞和祖细胞的程序例如描述于以引用的方式并入本文的美国专利号5,199,942中,可应用于本发明的细胞。其他适合方法在本领域中是已知的;因此,本发明不限于任何特定离体细胞扩增方法。简要来说,T细胞的离体培养和扩增包括:(1)从哺乳动物从外周血液收集物或骨髓外植体收集CD34+造血干细胞和祖细胞;和(2)离体扩增所述细胞。除美国专利号5,199,942中所述的细胞生长因子之外,诸如f1t3-L、IL-1、IL-3和c-kit配体的其他因子也可用于培养和扩增细胞。

[0452] 除在离体免疫方面使用基于细胞的疫苗之外,本发明也提供用于体内免疫以在患者中引发针对抗原的免疫应答的组合物和方法。

[0453] 通常,如本文所述加以活化和扩增的细胞可用于治疗和预防在免疫损害个体中出现的疾病。特定来说,本发明的经TFP修饰T细胞用于治疗与肿瘤相关抗原的表达相关的疾病、病症和疾患。在某些方面,本发明的细胞用于治疗处于显现与肿瘤相关抗原的表达相关

的疾病、病症和疾患的风险下的患者。因此，本发明提供用于治疗或预防与肿瘤相关抗原的表达相关的疾病、病症和疾患的方法，其包括向有需要的受试者施用治疗有效量的本发明的经TFP修饰T细胞。

[0454] 在一个方面，本发明的抗体或TFP T细胞可用于治疗诸如癌症或恶性肿瘤或是癌前期疾患的增生性疾病。在一个方面，癌症是骨髓瘤。在一个方面，癌症是淋巴瘤。在一个方面，癌症是结肠癌。此外，与肿瘤相关抗原表达相关的疾病包括但不限于例如表达肿瘤相关抗原的非典型和/或非经典癌症、恶性肿瘤、癌前期疾患或增生性疾病。与肿瘤相关抗原的表达相关的非癌症相关适应症视抗原而变化，但不限于例如感染性疾病、自体免疫疾病(例如狼疮)、炎症性病症(过敏和哮喘)和移植。

[0455] 本发明的抗体或经TFP修饰T细胞可单独或以与稀释剂和/或与其他组分诸如IL-2、IL-7、IL-12、IL-15或其他细胞因子或细胞群体组合的药物组合物形式施用。

[0456] 本发明也提供用于抑制肿瘤相关抗原表达性细胞群体的增殖或降低肿瘤相关抗原表达性细胞群体的方法，所述方法包括使包含肿瘤相关抗原表达性细胞的细胞群体与本发明的结合所述肿瘤相关抗原表达性细胞的抗肿瘤相关抗原TFP T细胞接触。在一特定方面，本发明提供用于抑制表达肿瘤相关抗原的癌细胞的群体的增殖或降低所述群体的方法，所述方法包括使肿瘤相关抗原表达性癌细胞群体与本发明的结合肿瘤相关抗原表达性细胞的抗肿瘤相关抗原抗体或TFP T细胞接触。在一个方面，本发明提供用于抑制表达肿瘤相关抗原的癌细胞的群体的增殖或降低所述群体的方法，所述方法包括使肿瘤相关抗原表达性癌细胞群体与本发明的结合肿瘤相关抗原表达性细胞的抗肿瘤相关抗原抗体或TFP T细胞接触。在某些方面，相对于阴性对照，本发明的抗肿瘤相关抗原抗体或TFP T细胞使患有多发性骨髓瘤或与肿瘤相关抗原表达性细胞相关的另一癌症的受试者或多发性骨髓瘤或与肿瘤相关抗原表达性细胞相关的另一癌症动物模型中细胞和/或癌细胞的数量、数目、量或百分比降低至少25%、至少30%、至少40%、至少50%、至少65%、至少75%、至少85%、至少95%或至少99%。在一个方面，受试者是人。

[0457] 本发明也提供用于预防、治疗和/或管理与肿瘤相关抗原表达性细胞相关的疾病(例如表达肿瘤相关抗原的癌症)的方法，所述方法包括向有需要的受试者施用本发明的结合肿瘤相关抗原表达性细胞的抗肿瘤相关抗原抗体或TFP T细胞。在一个方面，受试者是人。与肿瘤相关抗原表达性细胞相关的病症的非限制性实例包括自体免疫病症(诸如狼疮)、炎症性病症(诸如过敏和哮喘)和癌症(诸如表达肿瘤相关抗原的血液癌症或非典型癌症)。

[0458] 本发明也提供用于预防、治疗和/或管理与肿瘤相关抗原表达性细胞相关的疾病的方法，所述方法包括向有需要的受试者施用本发明的结合肿瘤相关抗原表达性细胞的抗肿瘤相关抗原抗体或TFP T细胞。在一个方面，受试者是人。

[0459] 本发明提供用于预防与肿瘤相关抗原表达性细胞相关的癌症的复发的方法，所述方法包括向有需要的受试者施用本发明的结合肿瘤相关抗原表达性细胞的抗肿瘤相关抗原抗体和/或TFP T细胞。在一个方面，方法包括向有需要的受试者施用有效量的本文所述的结合肿瘤相关抗原表达性细胞的抗肿瘤相关抗原抗体或TFP T细胞与有效量的另一疗法组合。

[0460] 组合疗法

[0461] 本文所述的抗体或TFP表达性细胞可与其他已知药剂和疗法组合使用。如本文所用的“组合”施用意指在受试者受病症折磨的过程期间向受试者递送两种(或更多种)不同治疗,例如在受试者已被诊断有病症之后以及在病症已被治愈或消除或治疗已由于其他原因而停止之前递送两种或更多种治疗。在一些实施方案中,一种治疗的递送在开始第二治疗的递送时仍然在发生,以致在施用方面存在重叠。这有时在本文中称为“同时”或“并行递送”。在其他实施方案中,一种治疗的递送在开始另一治疗的递送之前结束。在任一情况的一些实施方案中,治疗由于组合施用而更加有效。举例来说,相比于将如果在不存在第一治疗下施用第二治疗所见,第二治疗更加有效,例如以较少第二治疗得见相等作用,或第二治疗在更大程度上减轻症状,或类似情况以第一治疗得见。在一些实施方案中,递送是如此以致症状减轻或与病症相关的其他参数的降低相比于将以在不存在另一治疗下递送一种治疗所观察是更大的。两种治疗的作用可为部分累加的,完全累加的,或大于累加的。递送可为如此以致递送的第一治疗的作用在递送第二治疗时仍然可检测。

[0462] 用于与CD16 TFP T细胞的组合疗法的抗癌抗体

[0463] 本文公开的CD16 TFP与抗癌抗体组合施用。针对在肿瘤细胞的表面上表达的肿瘤相关抗原的任何IgG1或IgG4抗癌抗体都适于在本文公开的组合和方法中使用。所述抗体包括但不限于针对以下的抗体:5T4、8H9、 $\alpha v \beta 0$ 整合素、 $\alpha v \beta 6$ 整合素、 $\alpha$ 胎蛋白(AFP)、B7-H6、CA-125碳酸酐酶9(CA9)、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD38、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD52、CD123、CD171、癌胚抗原(CEA)、EpCAM(上皮细胞粘附分子)、E-钙粘着蛋白、EMA(上皮膜抗原)、EGFRv111、上皮糖蛋白-2(EGP-2)、上皮糖蛋白-40(EGP-40)、ErbB1/EGFR、ErbB2/HER2/neu/EGFR2、ErbB3/HER3、ErbB4、上皮肿瘤抗原(ETA)、叶酸结合蛋白(FBP)、胎儿乙酰胆碱受体(AchR)、叶酸受体- $\alpha$ 、G250/CAIX、神经节苷脂2(GD2)、神经节苷脂3(GD3)、HLA-A1、HLA-A2、高分子量黑素瘤相关抗原(HMW-MAA)、IL-13受体 $\alpha 2$ (IL-13R $\alpha 2$ )、激酶插入结构域受体(KDR)、k-轻链、路易斯Y(Lewis Y, LeY)、L1细胞粘附分子、黑素瘤相关抗原(MAGE-A1)、间皮素、粘蛋白-1(MUC1)、粘蛋白-16(MUC16)、天然杀伤组2成员D(NKG2D)配体、神经细胞粘附分子(NCAM)、CTLA-4、PD-1、PD-L1、NY-ESO-1、癌胚抗原(h5T4)、前列腺干细胞抗原(PSCA)、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、受体酪氨酸激酶样孤儿受体1(ROR1)、由mAb IgE靶向的TAA、肿瘤相关糖蛋白-72(TAG-72)、酪氨酸酶和血管内皮生长因子(VEGF)受体。在一个实施方案中,肿瘤相关抗原是不在正常(即非癌性)组织的细胞的细胞表面上表达的抗原。在另一实施方案中,相比于抗原在肿瘤细胞上表达,肿瘤相关抗原以低得多的水平(例如每个细胞较少受体)在正常组织的细胞的细胞表面上表达。

[0464] 其他组合

[0465] 在一些实施方案中,“至少一种额外治疗剂”包括TFP表达性细胞。也提供表达多种结合相同或不同靶标抗原或同一靶标抗原上的相同或不同表位的TFP的T细胞。也提供T细胞群体,其中第一子组的T细胞表达第一TFP,并且第二子组的T细胞表达第二TFP。

[0466] 本文所述的TFP表达性细胞和至少一种额外治疗剂可于同一组合物中或于单独组合物中同时施用或依序施用。对于依序施用,本文所述的TFP表达性细胞可首先施用,并且额外药剂可其次施用,或施用顺序可加以逆转。

[0467] 在其他方面,本文所述的TFP表达性细胞可与以下治疗组合用于治疗方案中:手术、化学疗法、放射、免疫抑制剂诸如环孢菌素、咪唑硫嘌呤、甲氨蝶呤、霉酚酸酯、抗体或其

他免疫净化剂诸如阿来珠单抗、抗CD3抗体或其他抗体疗法、环磷酰胺、氟达拉滨、环孢菌素、他克莫司(富吉霉素(fujimycin))、雷帕霉素、霉酚酸、类固醇、罗米地辛(也称为FR901228)、细胞因子和照射。肽疫苗诸如描述于Izumoto等2008 J Neurosurg 108:963-971中。

[0468] 在一个实施方案中,可向受试者施用减少或改善与施用TFP表达性细胞相关的副作用的药剂。与施用TFP表达性细胞相关的副作用包括但不限于细胞因子释放综合征(CRS)和噬血细胞性淋巴组织细胞增生症(HLH),也被称为巨噬细胞活化综合征(MAS)。CRS的症状包括高热、恶心、短暂低血压、缺氧等。因此,本文所述的方法可包括向受试者施用本文所述的TFP表达性细胞,以及进一步施用用以管理由用TFP表达性细胞治疗所致的可溶性因子水平升高的药剂。在一个实施方案中,受试者中升高的可溶性因子是IFN- $\gamma$ 、TNF $\alpha$ 、IL-2、IL-6和IL-8中的一者或多者。因此,被施用来处理这个副作用的药剂可为中和这些可溶性因子中的一者或多者的药剂。所述药剂包括但不限于类固醇、TNF $\alpha$ 的抑制剂和IL-6的抑制剂。TNF $\alpha$ 抑制剂的一实例是依那西普(etanercept)(在名称**ENBREL®**下销售)。IL-6抑制剂的一实例是托珠单抗(tocilizumab)(在名称**ACTEMRA®**下销售)。

[0469] 在一个实施方案中,可向受试者施用增强TFP表达性细胞的活性的药剂。举例来说,在一个实施方案中,药剂可为抑制抑制性分子的药剂。在一些实施方案中,抑制性分子例如程序化死亡1蛋白(PD1)可使TFP表达性细胞发动免疫效应物应答的能力降低。抑制性分子的实例包括PD1、PD-L1、CTLA4、TIM3、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4和TIGR $\beta$ 。例如通过在DNA、RNA或蛋白质水平上进行抑制来抑制抑制性分子可使TFP表达性细胞性能最优化。在各实施方案中,抑制性核酸,例如抑制性核酸,例如dsRNA,例如siRNA或shRNA,可用于抑制TFP表达性细胞中抑制性分子的表达。在一实施方案中,抑制剂是shRNA。在一实施方案中,TFP表达性细胞内的抑制性分子被抑制。在这些实施方案中,抑制抑制性分子的表达的dsRNA分子连接于编码TFP的组分例如全部组分的核酸。在一个实施方案中,抑制性信号的抑制剂可为例如结合抑制性分子的抗体或抗体片段。举例来说,药剂可为结合PD1、PD-L1、PD-L2或CTLA4的抗体或抗体片段(例如易普利单抗(ipilimumab)(也被称为MDX-010和MDX-101,并且以**YERVOY®**销售);Bristol-Myers Squibb;曲美木单抗(tremelimumab)(可从Pfizer获得的IgG2单克隆抗体,先前称为替西木单抗(ticilimumab)、CP-675,206))。在一实施方案中,药剂是结合含T细胞免疫球蛋白结构域和粘蛋白结构域3蛋白(TIM3)的抗体或抗体片段。在一实施方案中,药剂是结合淋巴细胞活化基因3蛋白(LAG3)的抗体或抗体片段。

[0470] 在一些实施方案中,适于与本文公开的TFP T细胞组合使用的药剂是调节骨髓性抑制细胞的药剂例如CCR2抗体。其他治疗剂例如纳米粒子治疗剂在本领域中是已知的。

[0471] 在一些实施方案中,使TFP表达性细胞的活性增强的药剂可为例如包含第一结构域和第二结构域的融合蛋白,其中所述第一结构域是抑制性分子或其片段,并且所述第二结构域是与正性信号相关的多肽,例如包含如本文所述的细胞内信号传导结构域的多肽。在一些实施方案中,与正性信号相关的多肽可包括CD28、CD27、ICOS的共刺激性结构域,例如CD28、CD27和/或ICOS的细胞内信号传导结构域,和/或例如CD3 $\zeta$ 的初级信号传导结构域,例如如本文所述。在一个实施方案中,融合蛋白由表达TFP的同一细胞表达。在另一实施方案中,融合蛋白由例如不表达抗肿瘤相关抗原TFP的T细胞的细胞表达。

[0472] 药物组合物

[0473] 本发明的药物组合物可包含如本文所述的TFP表达性细胞例如多种TFP表达性细胞与一种或多种药学上或生理上可接受的载体、稀释剂或赋形剂组合。所述组合物可包含缓冲剂,诸如中性缓冲盐水、磷酸盐缓冲盐水等;碳水化合物,诸如葡萄糖、甘露糖、蔗糖或右旋糖酐、甘露糖醇;蛋白质;多肽或氨基酸,诸如甘氨酸;抗氧化剂;螯合剂,诸如EDTA或谷胱甘肽;佐剂(例如氢氧化铝);以及防腐剂。在一个方面,本发明组合物被配制以进行静脉内施用。

[0474] 本发明的药物组合物可以适合于待治疗(或预防)的疾病的方式施用。施用的数量和频率将由诸如患者的状况以及患者的疾病的类型和严重性的因素决定,但适当剂量可通过临床试验来确定。

[0475] 在一个实施方案中,药物组合物大致上不含例如不存在可检测水平的例如选自由以下组成的组的污染物:内毒素、支原体、有复制能力的慢病毒(RCL)、p24、VSV-G核酸、HIV gag、残余CD3抗体/CD28抗体涂布珠粒、小鼠抗体、汇合人血清、牛血清白蛋白、牛血清、培养基组分、载体包装细胞或质粒组分、细菌和真菌。在一个实施方案中,细菌是至少一种选自由以下组成的组的细菌:粪产碱菌(*Alcali genes faecalis*)、白色念珠菌(*Candida albicans*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenza*)、脑膜炎奈瑟氏菌(*Neisseria meningitides*)、绿脓假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、链球菌肺炎(*Streptococcus pneumonia*)和A组化脓性链球菌(*Streptococcus pyogenes* group A)。

[0476] 当指示“免疫有效量”、“抗肿瘤有效量”、“肿瘤抑制有效量”或“治疗量”时,本发明组合物的待施用的精确量可由医师在考虑在年龄、重量、肿瘤尺寸、感染或转移程度、以及患者(受试者)状况方面的个体差异的情况下确定。可通常陈述的是包含本文所述的T细胞的药物组合物可在以下剂量下施用:每kg体重 $10^4$ 至 $10^9$ 个细胞,在一些情况下每kg体重 $10^5$ 至 $10^6$ 个细胞,包括那些范围内的所有整数值。T细胞组合物也可在这些剂量下施用多次。细胞可通过使用免疫疗法中通常已知的输注技术来施用(参见例如Rosenberg等, *New Eng. J. of Med.* 319:1676,1988)。

[0477] 在某些方面,可需要向受试者施用活化的T细胞,接着随后再抽血(或进行单独采集),根据本发明使由此获得的T细胞活化,并且用这些活化和扩增的T细胞对患者进行再输注。这个过程可每隔几周进行多次。在某些方面,可使来自10cc至400cc的血液抽取物的T细胞活化。在某些方面,使来自20cc、30cc、40cc、50cc、60cc、70cc、80cc、90cc或100cc的血液抽取物的T细胞活化。

[0478] 主题组合物的施用可以任何适宜方式进行,包括通过气雾剂吸入、注射、摄取、输液、植入或移植。本文所述的组合物可以经动脉、皮下、真皮内、肿瘤内、结节内、髓内、肌肉内、通过静脉内(i.v.)注射、或腹膜内方式向患者施用。在一个方面,本发明的T细胞组合物通过真皮内或皮下注射来向患者施用。在一个方面,本发明的T细胞组合物通过静脉内注射来施用。T细胞的组合物可直接向肿瘤、淋巴结或感染部位中注射。

[0479] 在一特定示例性方面,受试者可经受白细胞单采术,其中离体收集、富集或消减白细胞以选择和/或分离目标细胞例如T细胞。这些T细胞分离物可通过本领域中已知的方法来扩增,并且处理以使一种或多种本发明的TFP构建体可被引入,由此产生本发明的TFP表

达性T细胞。有需要的受试者可随后经受用高剂量化学疗法继之以外周血液干细胞移植进行的标准治疗。在某些方面,在移植之后或与移植并行,受试者接受本发明的经扩增TFP T细胞的输注。在另一方面,在手术之前或之后施用经扩增细胞。

[0480] 以上治疗的待向患者施用的剂量将随所治疗的疾患的确切性质和治疗的接受者而变化。可根据本领域接受的规范对用于向人施用的剂量进行缩放。对于成人患者,阿来珠单抗(CAMPATH®)的剂量例如将通常在1至约100mg的范围内,通常每日施用持续1天与30天之间的时期。优选每日剂量是每天1至10mg,但在一些情况下可使用每天多达40mg的较大剂量(描述于美国专利号6,120,766中)。

[0481] 在一个实施方案中,例如使用体外转录将TFP引入T细胞中,并且受试者(例如人)接受初始施用本发明的TFP T细胞,以及一次或多次后续施用本发明的TFP T细胞,其中所述一次或多次后续施用在先前施用之后小于15天例如14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3或2天施用。在一个实施方案中,每周向受试者(例如人)施用本发明的TFP T细胞的超过一次施用,例如每周施用本发明的TFP T细胞的2、3或4次施用。在一个实施方案中,受试者(例如人受试者)接受每周超过一次TFP T细胞施用(例如每周2、3或4次施用)(在本文中也称为一个循环),继之以一周不施用TFP T细胞,接着向受试者施用TFP T细胞的一次或多次额外施用(例如每周超过一次TFP T细胞施用)。在另一实施方案中,受试者(例如人受试者)接受超过一个循环的TFP T细胞,并且各循环之间的时间小于10、9、8、7、6、5、4或3天。在一个实施方案中,每隔一天施用TFP T细胞,每周进行3次施用。在一个实施方案中,持续至少2、3、4、5、6、7、8周或更多周施用本发明的TFP T细胞。

[0482] 在一个方面,使用慢病毒病毒载体诸如慢病毒产生肿瘤相关抗原TFP T细胞。以那个方式产生的TFP T细胞将具有稳定TFP表达。

[0483] 在一个方面,在转导之后,TFP T细胞持续4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15天短暂表达TFP载体。TFP的短暂表达可通过递送RNA TFP载体来实现。在一个方面,TFP RNA通过电穿孔来转导至T细胞中。

[0484] 可在使用短暂表达性TFP T细胞(特别是用携带鼠scFv的TFP T细胞)治疗的患者中出现的潜在问题是在多次治疗之后的过敏性反应。

[0485] 在不受这个理论束缚下,据信这种过敏应答可能由患者产生体液抗TFP应答即具有抗IgE同种型的抗TFP抗体引起。据认为当有10至14天抗原暴露中断时,患者的抗体产生性细胞经受从IgG同种型(不导致过敏性反应)向IgE同种型的类别转换。

[0486] 如果患者处于在短暂TFP疗法(诸如通过RNA转导产生的那些)的过程期间产生抗TFP抗体应答的高风险下,那么TFP T细胞输注中断不应持续超过10至14天。

[0487] 实施例

[0488] 本发明通过参照以下实验实施例来进一步详述。除非另外规定,否则这些实施例仅出于说明的目的提供,并且不意图具有限制性。因此,本发明决不应解释为限于以下实施例,而是应解释为涵盖由于本文提供的教义而变得明显的任何和所有变化形式。在不进一步描述的情况下,据信本领域普通技术人员可使用先前描述和以下说明性实施例制备和利用本发明化合物以及实施要求保护的方法。以下工作实施例明确指出本发明的各个方面,并且不应解释为以任何方式限制本公开的其余部分。

[0489] 实施例1:TFP构建体

[0490] 抗TAA TFP构建体通过将—个或多个由编码短接头(SL):AAAGGGGSGGGGSGGGGSLE (SEQ ID NO:2)或长接头(LL):AAAIEVMYPPPYLG GGGSGGGGSGGGGSLE (SEQ ID NO:3)的DNA序列连接于CD3或TCR DNA片段的抗TAA scFv DNA片段或CD16片段在XbaI和EcoRI位点处克隆至例如p510载体((System Biosciences(SBI))中来工程改造。CAR构建体通过将编码抗TAA抗体(例如NKG2D或ROR1抗体)、部分CD28细胞外结构域、CD28跨膜结构域、CD28细胞内结构域和CD3 $\zeta$ 的合成DNA在XbaI和EcoRI位点处克隆至例如p510载体中来产生。本文公开的CD3 $\epsilon$  TFP构建体包含以SEQ ID NO:97阐述的序列,其关于完整序列(SEQ ID NO:4)具有N末端截短。

[0491] 抗ROR1 TFP、NKG2D TFP等如上所述加以产生。举例来说,产生的抗ROR1 TFP构建体是p510\_ROR1抗体\_LL\_TCR $\alpha$ (抗ROR1 scFv-长接头-人全长T细胞受体 $\alpha$ 链)、p510\_ROR1抗体\_LL\_TCR  $\alpha$ C(抗ROR1 scFv-长接头-人T细胞受体 $\alpha$ 恒定结构域链)、p510\_ROR1抗体\_LL\_TCR $\beta$ (抗ROR1 scFv-长接头-人全长T细胞受体 $\beta$ 链)、p510\_ROR1抗体\_LL\_TCR $\beta$ C(抗ROR1 scFv-长接头-人T细胞受体 $\beta$ 恒定结构域链)、p510\_ROR1抗体\_LL\_CD3 $\gamma$ (抗ROR1 scFv-长接头-人CD3 $\gamma$ 链)、p510\_ROR1抗体\_LL\_CD3 $\delta$ (抗ROR1 scFv-长接头-人CD3 $\delta$ 链)、p510\_ROR1抗体\_LL\_CD3 $\epsilon$ (抗ROR1 scFv-长接头-人CD3 $\epsilon$ 链)、p510\_ROR1抗体\_SL\_TCR $\beta$ (抗ROR1 scFv-短接头-人全长T细胞受体 $\beta$ 链)、p510\_ROR1抗体\_SL\_CD3 $\gamma$ (抗ROR1 scFv-短接头-人CD3 $\gamma$ 链)、p510\_ROR1抗体\_SL\_CD3 $\delta$ (抗ROR1 scFv-短接头-人CD3 $\delta$ 链)、p510\_ROR1抗体\_SL\_CD3 $\epsilon$ (抗ROR1 scFv-短接头-人CD3 $\epsilon$ 链)。

[0492] 抗ROR1 CAR构建体p510\_ROR1抗体\_28 $\zeta$ 通过将编码ROR1抗体、部分CD28细胞外结构域、CD28跨膜结构域、CD28细胞内结构域和CD3 $\zeta$ 的合成DNA在XbaI和EcoRI位点处克隆至p510载体中来产生。

[0493] 对双特异性TFP构建体进行工程改造,其中两个scFv均于同一TCR中表达。在一个实施方案中,第一抗肿瘤抗原scFv DNA片段由编码短接头(SL):AAAGGGGSGGGGSGGGGSLE或长接头(LL):AAAIEVMYPPPYLG GGGSGGGGSGGGGSLE的DNA序列连接于CD3或TCR DNA片段,在XbaI和EcoRI位点处进入p510载体((System Biosciences(SBI))中。在另一实施方案中,第二抗肿瘤抗原scFv DNA片段由SL或LL操作性地连接于第一抗肿瘤抗原片段。

[0494] 在另一实施方案中,在第一表达构建体中,第一抗肿瘤抗原scFv DNA片段由编码SL或LL的DNA序列连接于第一CD3或TCR片段,并且在第二表达构建体中,第二抗肿瘤抗原scFv DNA片段由编码SL或LL的DNA序列连接于第一CD3或TCR片段。举例来说,抗CD20或抗CD22抗原scFv DNA片段可操作地连接于CD3 $\epsilon$  DNA片段,并且抗CD19 scFv DNA片段可操作地连接于CD3 $\gamma$  scFv DNA片段,各自在它自身的病毒表达构建体中。可使用CD3亚单位的任何组合,诸如CD3 $\epsilon$ /CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\epsilon$ /CD3 $\beta$ 、CD3 $\epsilon$ /CD3 $\delta$ 、CD3 $\epsilon$ /CD3 $\alpha$ 等。

[0495] 在一个实施方案中,两种病毒表达构建体均用于转导相同T细胞群体以使一个T细胞群体将具有对超过一种肿瘤相关抗原具有特异性的TFP。在另一实施方案中,病毒表达构建体各自用于转导单独T细胞群体,并且接着在使用之前混合两个经转导T细胞群体。产生双特异性T细胞群体的示例性策略显示于图1A和图1B中。

[0496] 在一个实施方案中,抗肿瘤相关抗原CAR构建体作为比较物加以产生。p510\_肿瘤相关抗原抗体\_28 $\zeta$ CAR通过将编码肿瘤相关抗原抗体、部分CD28细胞外结构域、CD28跨膜结构域、CD28细胞内结构域和CD3 $\zeta$ 的合成DNA在XbaI和EcoRI位点处克隆至p510载体中来产



生。

[0497] 抗BCMA TFP构建体通过将由编码接头:GGGSGGGSGGGGSLE (SEQ ID NO:1)的DNA序列连接于CD3 DNA片段的抗BCMA scFv DNA片段在XbaI和EcoR1位点处克隆至p510载体(SBI)中来工程改造。产生的抗BCMA TFP构建体是p510\_BCMA抗体\_CD3 $\gamma$  (抗BCMA scFv (或V<sub>H</sub>H)-接头-人CD3 $\gamma$ 链)和p510\_BCMA抗体\_CD3 $\epsilon$  (抗BCMA scFv (或V<sub>H</sub>H)-接头-人CD3 $\epsilon$ 链)。

[0498] 合成全长BCMA,并且在BamHI和NheI位点处克隆至p514 (SBI)中以产生构建体p514\_BCMA,用于产生稳定靶标细胞系。

[0499] 抗CD19 TFP构建体通过将由编码短接头 (SL):AAAGGGSGGGSGGGGSLE (SEQ ID NO:2)或长接头 (LL):AAAIEVMYPPPYLGSGGGSGGGGSLE (SEQ ID NO:3)的DNA序列连接于CD3或TCR DNA片段的抗CD19 scFv DNA片段在XbaI和EcoR1位点处克隆至p510载体((System Biosciences (SBI))中来工程改造。

[0500] 产生的抗CD19 TFP构建体是p510\_CD19抗体\_LL\_TCR $\alpha$  (抗CD19 scFv-长接头-人全长T细胞受体 $\alpha$ 链)、p510\_CD19抗体\_LL\_TCR  $\alpha$ C (抗CD19 scFv-长接头-人T细胞受体 $\alpha$ 恒定结构域链)、p510\_CD19抗体\_LL\_TCR $\beta$  (抗CD19 scFv-长接头-人全长T细胞受体 $\beta$ 链)、p510\_CD19抗体\_LL\_TCR $\beta$ C (抗CD19 scFv-长接头-人T细胞受体 $\beta$ 恒定结构域链)、p510\_CD19抗体\_LL\_CD3 $\gamma$  (抗CD19scFv-长接头-人CD3 $\gamma$ 链)、p510\_CD19抗体\_LL\_CD3 $\delta$  (抗CD19 scFv-长接头-人CD3 $\delta$ 链)、p510\_CD19抗体\_LL\_CD3 $\epsilon$  (抗CD19 scFv-长接头-人CD3 $\epsilon$ 链)、p510\_CD19抗体\_SL\_TCR $\beta$  (抗CD19 scFv-短接头-人全长T细胞受体 $\beta$ 链)、p510\_CD19抗体\_SL\_CD3 $\gamma$  (抗CD19 scFv-短接头-人CD3 $\gamma$ 链)、p510\_CD19抗体\_SL\_CD3 $\gamma$  (抗CD19 scFv-短接头-人CD3 $\gamma$ 链)、p510\_CD19抗体\_SL\_CD3 $\epsilon$  (抗CD19 scFv-短接头-人CD3 $\epsilon$ 链)。

[0501] 抗CD19 CAR构建体p510\_CD19抗体\_28 $\zeta$ 通过将编码CD19抗体、部分CD28细胞外结构域、CD28跨膜结构域、CD28细胞内结构域和CD3 $\zeta$ 的合成DNA在XbaI和EcoR1位点处克隆至p510载体中来产生。

[0502] 编码抗BCMA构建体、抗CD19构建体、抗CAIX构建体和抗FAP构建体的示例性构建体序列公开于共同待决的以引用的方式并入本文的国际专利申请号PCT/US2016/033416中。

[0503] 抗CD22TFP构建体通过将由编码短接头 (SL):AAAGGGSGGGSGGGGSLE或长接头 (LL):AAAIEVMYPPPYLGSGGGSGGGGSLE的DNA序列连接于CD3或TCR DNA片段的抗CD19 scFv DNA片段在XbaI和EcoR1位点处克隆至p510载体((System Biosciences (SBI))中来工程改造。

[0504] 实施例2:抗体序列

[0505] 抗体序列的产生

[0506] 提供能够特异性结合人TAA多肽的抗体多肽及其片段或结构域。抗TAA抗体可使用不同技术产生(参见例如(Nicholson等,1997))。当鼠抗TAA抗体用作起始物质时,对鼠抗TAA抗体的人源化为临床环境所需,其中小鼠特异性残基可在接受T细胞受体(TCR)融合蛋白(TFP)治疗即用经TFP.TAA构建体转导的T细胞治疗的受试者中诱导人抗小鼠抗原(HAMA)应答。人源化通过将来自鼠抗TAA抗体的CDR区移植于适当人种系受体框架上来完成,任选包括对CDR和/或框架区的其他修饰。如本文所提供,抗体和抗体片段残基编号遵循Kabat (Kabat E.A.等,1991;Chothia等,1987)。

[0507] 人BCMA多肽典型序列是UniProt登录号Q02223。人ROR1多肽典型序列是UniProt登

录号Q01973-1。人NKG2D多肽典型序列是UniProt登录号P26718-1(亚型1)。提供能够特异性结合人IgG的Fc部分的多肽及其片段或结构域。

[0508] scFv的产生

[0509] 人或人源化抗TAA IgG用于产生用于TFP构建体的scFv序列。获得编码人或人源化V<sub>L</sub>和V<sub>H</sub>结构域的DNA序列,并且构建体的密码子任选针对在来自智人的细胞中表达加以优化。V<sub>L</sub>和V<sub>H</sub>结构域在scFv中出现所采用的顺序是变化的(即V<sub>L</sub>-V<sub>H</sub>或V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>定向),并且三个拷贝的“G4S”或“G4S”亚单位(G4S)<sub>3</sub>将可变结构域连接以产生scFv结构域。抗BCMA scFv质粒构建体可具有任选Flag、His或其他亲和标签,并且被电穿孔至HEK-293或其他适合人或哺乳动物细胞系中并加以纯化。验证测定包括通过FACS进行的结合分析、使用Proteon进行的动力学分析、以及对TAA表达性细胞的染色。

[0510] 示例性抗ROR1 V<sub>L</sub>和V<sub>H</sub>结构域、CDR和编码它们的核苷酸序列可为美国专利号:U.S.9,316,646、美国专利公布号2016/0208018和国际专利公布号W02016016344中所述的那些,所述专利各自以引用的方式整体并入本文。其他示例性抗ROR1 V<sub>L</sub>和V<sub>H</sub>结构域、CDR和编码它们的核苷酸序列分别可为以下单克隆抗体的那些:小鼠抗ROR1抗体2H6、小鼠抗ROR1抗体2A2,以及以下多克隆抗体的那些:抗ROR1山羊抗ROR1抗体目录号:AF2000(R&D Systems)、抗体号ABIN2869437、小鼠抗ROR1抗体号ABIN969385、抗ROR1抗体号ABIN1108893和兔多克隆抗ROR1抗体目录号ABIN359929(Antibodies Online)。

[0511] 示例性抗BMCA抗体和抗CD19抗体公开于共同待决的以引用的方式并入本文的国际专利公布号W0/2016/187349中。V<sub>L</sub>和V<sub>H</sub>结构域的示例性抗BMCA CDR和抗CD19CDR以及编码它们的核苷酸序列分别在以下显示:

[0512] CD16结合剂

[0513] 在一些实施方案中,本文公开的CD16TFP包含以SEQ ID NO:23阐述的氨基酸序列。在其他实施方案中,本文公开的CD16 TFP仅包含CD16的细胞外结构域,如以SEQ ID NO:106所阐述。

[0514] ROR1抗体

[0515] 在一些实施方案中,本文公开的抗体或其片段包括单结构域抗体(sdAb)诸如骆驼科动物单结构域抗体。在一个实施方案中,用于本文公开的TFP构建体中的抗ROR1 sdAb由SEQ ID No:80-96中的任一者编码。在其他实施方案中,抗ROR1抗体或其片段是scFv。一示例性抗ROR1结合剂由以定向VH\_接头\_VL编码scFv“2-7”的SEQ ID NO:65编码。另一示例性结合剂由以定向VH\_接头\_VL编码scFv“2-9”的NO:69编码。另一示例性结合剂由以定向VL\_接头\_VH编码scFv“3-6”的NO:79编码。

[0516] NKG2D配体(NKG2DL)的NKG2D结合剂

[0517] 在一些实施方案中,NKG2DL结合剂是单体,例如由以SEQ ID NO:107阐述的序列编码的单体。在其他实施方案中,NKG2DL结合剂是二聚体,例如由以SEQ ID NO:108阐述的序列编码的二聚体。

[0518] CD19抗体

[0519] 抗CD19轻链CDR1

[0520] 编码序列:AGGGCAAGTCAGGACATTAGTAAA (SEQ ID NO:25)

[0521] 氨基酸序列:RASQDISK (SEQ ID NO:26)

- [0522] 抗CD19轻链CDR2
- [0523] 编码序列:ATCTACCATACATCAAGATTA (SEQ ID NO:27)
- [0524] 氨基酸序列:IYHTSRL (SEQ ID NO:28)
- [0525] 抗CD19轻链CDR3
- [0526] 编码序列:CAACAGGGTAATACGCTTCCGTACACG (SEQ ID NO:29)
- [0527] 氨基酸序列:QQGNTLPYT (SEQ ID NO:30)
- [0528] 抗CD19重链CDR1
- [0529] 编码序列:GGGGTCTCATTACCCGACTATGGTGTAAGC (SEQ ID NO:31)
- [0530] 氨基酸序列:GVSLPDYGVS (SEQ ID NO:32)
- [0531] 抗CD19重链CDR2
- [0532] 编码序列:GTAATATGGGGTAGTGAAACCACATACTATAAT  
TCAGCTCTC (SEQ ID NO:33)
- [0533] 氨基酸序列:VIWGSETTYNSAL (SEQ ID NO:34)
- [0534] 抗CD19重链CDR3
- [0535] 编码序列:CATTATTACTACGGTGGTAGCTATGCTATGGAC  
TAC (SEQ ID NO:35)
- [0536] 氨基酸序列:HYYYGGSYAMDY (SEQ ID NO:36)
- [0537] 抗CD19轻链可变区
- [0538] 编码序列:GACATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTG  
TCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGCAGGGCAA  
GTCAGGACATTAGTAAATATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACC  
AGATGGAACTGTAAACTCCTGATCTACCATACATCAAGATTA  
CACTCAGGAGTCCCATCAAGGTTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGAA  
CAGATTATTCTCTCACCATTAGCAACCTGGAGCAAGAAGATAT  
TGCCACTTACTTTTGCCAACAGGGTAATACGCTTCCGTACACGT  
TCGGAGGGGGGACTAAGTTGGAAATAACA (SEQ ID NO:37)
- [0539] 氨基酸序列:DIQMTQTTSSLSASLGDRVITISCRASQDISKYLN  
WYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQ  
EDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEIT (SEQ ID NO:38)
- [0540] 抗CD19重链可变区
- [0541] 编码序列:GAGGTGAAACTGCAGGAGTCAGGACCTGGCCT

GGTGGCGCCCTCACAGAGCCTGTCCGTCACATGCACTGTCTCA  
GGGGTCTCATTACCCGACTATGGTGTAAGCTGGATTCGCCAGC  
CTCCACGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTAATATGGGGTA  
GTGAAACCACATACTATAATTACAGCTCTCAAATCCAGACTGAC  
CATCATCAAGGACAACCTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAAATG  
AACAGTCTGCAAACCTGATGACACAGCCATTTACTACTGTGCCA  
AACATTATTACTACGGTGGTAGCTATGCTATGGACTACTGGGG  
TCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:39)

[0542] 氨基酸序列: EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYG  
VSWIRQPPRKGLEWLGVWSETTYYN SALKSRLTIKD NSKSQVF  
LKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS (S  
EQ ID NO:40)

[0543] BCMA抗体

[0544] 抗BCMA轻链CDR1

[0545] 编码序列: AAAAGCAGCCAGAGCCTGGTGCATAGCAACGG  
CAACACCTATCTGCAT (SEQ ID NO:41)

[0546] 氨基酸序列: KSSQSLVHSNGNTYLH (SEQ ID NO:42)

[0547] 抗BCMA轻链CDR2

[0548] 编码序列: AAAGTGAGCAACCGCTTTAGC (SEQ ID NO:43)

[0549] 氨基酸序列: KVS NRFS (SEQ ID NO:44)

[0550] 抗BCMA轻链CDR3

[0551] 编码序列: GCGGAAACCAGCCATGTGCCGTGGACC (SEQ ID NO:45)

[0552] 氨基酸序列: AETSHVPWT (SEQ ID NO:46)

[0553] 抗BCMA重链CDR1

[0554] 编码序列: AAAGCGAGCGGCTATAGCTTTCCGGATTATTAT  
ATTAAC (SEQ ID NO:47)

[0555] 氨基酸序列: KASGYSPDYIN (SEQ ID NO:48)

[0556] 抗BCMA重链CDR2

[0557] 编码序列: TGGATTTATTTTGCGAGCGGCAACAGCGAATAT  
AACCAGAAATTTACCGGC (SEQ ID NO:49)

[0558] 氨基酸序列: WIYFASGNSEYNQKFTG (SEQ ID NO:50)

[0559] 抗BCMA重链CDR3

[0560] 编码序列: CTGTATGATTATGATTGGTATTTTGATGTG (SEQ ID NO:51)

[0561] 氨基酸序列: LYD YDWYFDV (SEQ ID NO:52)

[0562] 抗BCMA重链可变区

[0563] 编码序列: CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCGGAAGT  
GAAAAAACCGGGCGCGAGCGTGAAAGTGAGCTGCAAAGCGAG  
CGGCTATAGCTTTCCGGATTATTATATTA ACTGGGTGCGCCAG  
GCGCCGGGCCAGGGCCTGGAATGGATGGGCTGGATTTATTTTG  
CGAGCGGCAACAGCGAATATAACCAGAAATTTACCGGCCGCG  
TGACCATGACCCGCGATACCAGCAGCAGCACCGCGTATATGGA  
ACTGAGCAGCCTGCGCAGCGAAGATACCGCGGTGTATTTTGC  
GCGAGCCTGTATGATTATGATTGGTATTTTGATGTGTGGGGCC  
AGGGCACCATGGTGACCGTGAGCAGC (SEQ ID NO:53)

[0564] 氨基酸序列: QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSPDY  
YINWVRQAPGQGLEWMGWIFYFASGNSEYNQKFTGRVTMTRDTS  
SSTAYMELSSLRSEDTAVYFCASLYDYDWYFDVWGQGTMTVTS  
S (SEQ ID NO:54)

[0565] 抗BCMA轻链可变区

[0566] 编码序列: GATATTGTGATGACCCAGACCCCGCTGAGCCTG  
AGCGTGACCCCGGGCGAACCGGCGAGCATTAGCTGCAAAGC  
AGCCAGAGCCTGGTGCATAGCAACGGCAACACCTATCTGCATT  
GGTATCTGCAGAAACCGGGCCAGAGCCCGCAGCTGCTGATTTA  
TAAAGTGAGCAACCGCTTTAGCGGCGTGCCGGATCGCTTTAGC  
GGCAGCGGCAGCGGCGCGGATTTTACCCTGAAAATTAGCCGCG  
TGGAAGCGGAAGATGTGGGCGTGTATTATTGCGCGGAAACCA  
GCCATGTGCCGTGGACCTTTGGCCAGGGCACCAA ACTGGAAAT  
TAAAAGC (SEQ ID NO:55)

[0567] 氨基酸序列: DIVMTQTPLSLSVTPGEPASISCKSSQSLVHSNG  
NTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVS NRFS GVPDRFSGSGSGADFTLK  
ISRVEAEDVGVYYCAETSHVPWTFGQGTKLEIKS (SEQ ID NO:56  
)

[0568] CD22抗体示例性序列

[0569] 抗CD22轻链CDR1

[0570] 氨基酸序列: QDIHGY (SEQ ID NO:57)

[0571] 抗CD22轻链CDR2

[0572] 氨基酸序列: YTS (SEQ ID NO:58)

[0573] 抗CD22轻链CDR3

- [0574] 氨基酸序列:QQGNTLPWT (SEQ ID NO:59)
- [0575] 抗CD22重链CDR1
- [0576] 氨基酸序列:GFAFSIYD (SEQ ID NO:60)
- [0577] 抗CD22重链CDR2
- [0578] 氨基酸序列:ISSGGGTT (SEQ ID NO:61)
- [0579] 抗CD22重链CDR3
- [0580] 氨基酸序列:ARHSGYGTHWGVLFAY (SEQ ID NO:62)
- [0581] 抗CD22轻链可变区
- [0582] 氨基酸序列:EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFAFSIYD  
MSWVRQTPEKRLEWVAYISSGGGTTYYPDTVKGRFTISRDNANKN  
TLYLQMSSSLKSEDTAMYYCARHSGYGTHWGVLFAYWQGTLLTV  
SA (SEQ ID NO:63)
- [0583] 抗CD22重链可变区
- [0584] 氨基酸序列:GGSLAALTAHQACHLPLETFTRHRQPRGWEQL  
EQCGYPVQRLVALYLAARLSWNQVDQVIRNALASPGSGGDLGEA  
IREQPEQARLALTAAAESERFVRQGTGNDEAGAANGPADSGDA  
LLERNYPTGAEFLGDGGDVSFSTRGTQNWTVRLLQAHRLQLEER  
GYVFGVGYHGTFLAAQSIVFGGVRARSQDLDAIWRGFYIAGDPAL  
AYGYAQDQEPDAAGRIRNGALLRVYVPRSSLPGFYRTSLTLAAPE  
AAGEVERLIGHPLPLRLDAITGPEEEGGRLETILGWPLAERTVVIPS  
AIPTDPRNVGGDLDPSSIPDKEQAISALPDYASQPGKPPREDLK (S  
EQ ID NO:64)
- [0585] TCR亚单位的来源
- [0586] 人T细胞受体 (TCR) 复合物的亚单位全都含有细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域。人TCR复合物含有CD3- $\epsilon$ 多肽、CD3- $\gamma$ 多肽、CD3- $\delta$ 多肽、CD3- $\zeta$ 多肽、TCR $\alpha$ 链多肽和TCR $\beta$ 链多肽。人CD3- $\epsilon$ 多肽典型序列是UniProt登录号P07766。人CD3- $\gamma$ 多肽典型序列是UniProt登录号P09693。人CD3- $\delta$ 多肽典型序列是UniProt登录号P043234。人CD3- $\zeta$ 多肽典型序列是UniProt登录号P20963。人TCR $\alpha$ 链典型序列是UniProt登录号Q6ISU1。人TCR $\beta$ 链C区典型序列是UniProt登录号P01850,人TCR $\beta$ 链V区序列是P04435。
- [0587] 人CD3- $\epsilon$ 多肽典型序列是:MQSGTHWRVLGLCLLSVGWVGQ  
DGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGG  
DEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLY  
LRARVCENCMEMDVMSVATIVIVDICITGGLLLLVEYYWSKNRKA  
KAKPVTRGAGAGGRQRGQNKERPPPVPNPDIYPIRKGRDLYSG



LNQRRI (SEQ ID NO:4)。

在一个实施方案中,用于TFP中的人CD3- $\epsilon$ 片段是

DGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQH  
NDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPE  
DANFYLYLRARVCENCMEMDMVMSVATIVIVDICITGGLLLL VYY  
WSKNRKAKAKPVTRGAGAGGRQRGQNKERPPPVPNPDYEPKRG  
QRDLYSGLNQRRI (SEQ ID NO:97)。

[0588] 人CD3- $\gamma$ 多肽典型序列是:

MEQGKGLAVLILAILLQGTLAQSI  
KGNHLVKVYDYQEDGSVLLTCDAEAKNITWFKDGKMIGFLTED  
KKKWNLGSNAKDPRGMYQCKGSQNKSKPLQVYYRMCQNCIELN  
AATISGFLFAEIVSIFVLAVGVYFIAGQDGVQRQSRASDKQTLLPND  
QLYQPLKDREDDQYSHLQGNQLRRN (SEQ ID NO:5)。

在一个实施方案中,用于TFP中的人CD3- $\gamma$ 片段是二

QSIKGNHLVKVYDYQ  
EDGSVLLTCDAEAKNITWFKDGKMIGFLTEDKKKWNLGSNAKDP  
RGMVYQCKGSQNKSKPLQVYYRMCQNCIELNAATISGFLFAEIVSI  
FVLAVGVYFIAGQDGVQRQSRASDKQTLLPNDQLYQPLKDREDDQ  
YSHLQGNQLRRN (SEQ ID NO:107)。

[0589] 人CD3- $\delta$ 多肽典型序列是:MEHSTFLSGLVLATLLSQVSPFKIP

IEELED RVFVNCNTSITWVEGTVGTLLSDITRLDLGKRILDPRGIYR  
CNGTDIYKDKESTVQVHYRMCQSCVELDPATVAGIIVTDVIATLL  
LALGVFCFAGHETGRLSGAADTQALLRNDQVYQPLRDRDDAQYS  
HLGGNWARNK (SEQ ID NO:6)。

在一个实施方案中,用于TFP中的人CD3- $\delta$ 片段是:

FKIPIEELED RVFVNCNTSITWVEGTVGTLLSD  
ITRLDLGKRILDPRGIYRCNGTDIYKDKESTVQVHYRMCQSCVEL  
DPATVAGIIVTDVIATLL LALGVFCFAGHETGRLSGAADTQALLR  
NDQVYQPLRDRDDAQYSHLGGNWARNK (SEQ ID NO:108)。

[0590] 人CD3- $\zeta$ 多肽典型序列是:

MKWKALFTAAILQAQLPITEAQSF

GLLDPKLCYLLDGILFIYGVILTALFLRVKFSRSADAPAYQQGQNQ  
LYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPQRRKNPQEGLYNE  
LQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDAL  
HMQALPPR (SEQ ID NO:7)。

在一个实施方案中,用于TFP中的人CD3- $\zeta$ 片段是:

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY  
DVLDKRRGRDPGEMGGKPQRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI  
GMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ  
ID NO:109)。

[0591] 人TCR $\alpha$ 链典型序列是:

MAGTWLLLLLALGCPALPTGVGGTP  
FPSLAPPIMLLVDGKQQMVVCLVLDVAPPGLDSPIWFSAGNGSA  
LDAFTYGPSPATDGTWTNLAHLSLPSEELASWEPLVCHTGPGEAEG  
HSRSTQPMHLSGEASTARTCPQEPLRGTPGGALWLGVLRLLLFKL  
LLFDLLLTCSCLCDPAGPLPSPATTTRLRALGSHRLHPATETGGRE  
ATSSPRPQPRDRRWGDTPPGRKPGSPVWGEGSYLSSYPTCPAQA  
WCSRSALRAPSSSLGAFFAGDLPPPLQAGAA (SEQ ID NO:8)。

[0592] 人TCR $\alpha$ 链C区典型序列是:

PNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKS  
VCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAW  
SNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPPESSCDVKLVEKSFETDTNLNF  
QNLSVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS (SEQ ID NO:9)。

[0593] 人TCR $\alpha$ 链V区CTL-L17典型序列是:

MAMLLGASVLILWLQ  
PDWVNSQQKNDDQQVKQNSPSLSVQEGRISILNCDYTNSMFDYF  
LWYKKYPAEGPTFLISSIKDKNEDGRFTVFLNKS AKHLSLHIVPS  
QPGDSAVYFCAAKGAGTASKLTFGTGTRLQVTL (SEQ ID NO:10  
)。

[0594] 人TCR $\beta$ 链C区典型序列是:

EDLNKVFPEVAVFEPSEAEISH



TQKATLVCLATGFFPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQP  
ALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQ  
DRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYEILLGKA  
TLYAVLVSAVLMLMAMVKRKDF (SEQ ID NO:11)。

[0595] 人TCR $\beta$ 链V区CTL-L17典型序列是：

MGTSLLCWMALCLLG  
ADHADTGVSQNPRHNITKRGQNVTFRCDPISEHNRLYWYRQTLG  
QGPEFLTYFQNEAQLEKSRLLSDRFSAERP KGSFSTLEIQRTEQGD  
SAMYLCASSLAGLNQPQHFGDGTRLSIL (SEQ ID NO:12)。

[0596] 人TCR $\beta$ 链V区YT35典型序列是：

MDSWTFCCVSLCILVAKH  
TDAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPISGHNSLFWYRQTMMRGL  
ELLIYFNNNVPIDDSGMPEDRFS AKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAV  
YFCASSFSTCSANYGYTFGSGTRLTVV (SEQ ID NO:13)。

[0597] 从TCR结构域和scFv产生TFP

[0598] 一示例性双特异性TFP是具有对BCMA和CD19具有结合特异性的scFv的TFP。另一示例性双特异性TFP是具有对BCMA和CD20具有结合特异性的scFv的TFP。另一示例性双特异性TFP是具有对BCMA和CD22具有结合特异性的scFv的TFP。另一示例性双特异性TFP是具有对CD19和CD22具有结合特异性的scFv的TFP。

[0599] 抗TAA scFv (例如NKG2D、ROR1等) 使用接头序列诸如G<sub>4</sub>S、(G<sub>4</sub>S)<sub>2</sub>、(G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>或(G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub>来重组连接于CD3- $\epsilon$ 或其他TCR亚单位 (参见1C)。使用各种接头和scFv构型。TCR $\alpha$ 和TCR $\beta$ 链以全长多肽形式或以仅它们的恒定结构域形式用于产生TFP。TCR $\alpha$ 和TCR $\beta$ 链的任何可变序列都适于制备TFP。

[0600] CD19 scFv使用如上所述的接头序列来重组连接于第二CD3- $\epsilon$ 或其他TCR亚单位。

[0601] CD16肽使用接头序列诸如G<sub>4</sub>S、(G<sub>4</sub>S)<sub>2</sub>、(G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>或(G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub>来重组连接于CD3- $\epsilon$ 或其他TCR亚单位 (参见1C)。利用各种接头和scFv构型。TCR $\alpha$ 和TCR $\beta$ 链以全长多肽或仅它们的恒定结构域形式用于产生TFP。允许TCR $\alpha$ 和TCR $\beta$ 链的任何可变序列用于制备TFP。

[0602] TFP表达载体

[0603] 提供表达载体,其包括:启动子(巨细胞病毒(CMV)增强子-启动子)、用以使得能够达成分泌的信号序列、多腺苷酸化信号和转录终止子(牛生长激素(BGH)基因)、允许游离型复制以及在原核生物中复制的元件(例如SV40起点和ColE1或本领域中已知的其他元件)和允许进行选择的元件(氨苄青霉素抗性基因和泽奥辛(zeocin)标记)。

[0604] 优选地,将一种或多种编码TFP的核酸构建体克隆至一种或多种慢病毒表达载体中,并且基于经转导T细胞应答于TAA+靶标细胞的效应物T细胞应答的数量和质量来验证表达。效应物T细胞应答包括但不限于细胞扩增、增殖、倍增、细胞因子产生和靶标细胞溶解或细胞溶解活性(即脱粒)。

[0605] 单特异性或双特异性TFP慢病毒转移载体用于产生包装至VSVg假型慢病毒粒子中

的基因组物质。与Lipofectamine®试剂组合来使慢病毒转移载体DNA与三种包装组分VSVg、gag/pol和rev混合以将它们一起转染至293细胞中。在24和48小时之后,收集培养基,过滤,并且通过超速离心来浓缩。将所得病毒制备物储存在-80℃下。转导单元的数目通过采用SupT1细胞 (T细胞淋巴母细胞性淋巴瘤,ATCC®CRL-1942™) 进行滴定来测定。重定向双特异性TFP T细胞通过以下方式产生:用CD3抗体xCD28抗体珠粒使新鲜原初T细胞活化24小时,接着添加适当数目的转导单元以获得所需百分比的经转导T细胞。使这些经修饰T细胞扩增直至它们变得静息以及大小下降,此时对它们进行低温保存以进行稍后分析。使用CoulterCounter®Multisizer™3(Beckman Coulter) 测量细胞数目和大小。在低温保存之前,通过流式细胞计量分析来测定经转导细胞(在细胞表面上表达TFP.BCMA)的百分比以及它们的那个表达的相对荧光强度。根据直方图,TFP的相对表达水平通过将转导百分比与它们的相对荧光强度进行比较来考查。

[0606] 在一些实施方案中,通过用多种病毒载体进行T细胞转导来引入多种TFP。

[0607] CD16病毒制备物

[0608] 关于病毒制备物的高效价预示在T细胞表面上的CD16 TFP表达较高。表1显示从HEK-293细胞分离的各种构建体的病毒效价。

[0609] 表1.HEK-293效价值

[0610]

构建体	效价 *
19CD3ε	7.29E+07
CD16 CD3ε	2.74E+07
CD16 CD3 γ	8.37E+07
CD16 CD3δ	4.00E+07
CD16 CD28-CD3ζ	5.23E+07
CD16 41BB CD3ζ	5.21E+07
CD16 TCRβ	1.05E+08

[0611] \*感染单位/ml (IFU/ml)

[0612] 评估人源化TFP重定向T细胞的细胞溶解活性、增殖能力和细胞因子分泌

[0613] TFP.TAA T细胞产生细胞表面表达的TFP以及杀灭靶标肿瘤细胞、增殖和分泌细胞因子的功能能力使用本领域中已知的测定来测定。

[0614] 人PBMC (例如来自正常单独采集供者的血液,所述供者的原初T细胞通过对T细胞、CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>淋巴细胞的负性选择来获得) 用人白介素-2 (IL-2) 处理,接着在37℃、5%CO<sub>2</sub>下用CD3抗体xCD28抗体珠粒例如在10%RPMI中活化,随后用编码TFP的慢病毒载体转导。流式细胞计量术测定用于诸如通过抗FLAG抗体或抗鼠可变结构域抗体来确认细胞表面存在TFP。使用ELISA或其他测定测量细胞因子 (例如IFN- γ) 产生。

[0615] 实施例3:人TFP T细胞在人ALL小鼠模型中的功效

[0616] 可使原代人ALL细胞在免疫损害小鼠 (例如NSG或NOD) 中生长,而不必在体外培养它们。同样,培养的人ALL细胞系可在所述小鼠中诱发白血病。携带ALL的小鼠可用于测试人TFP.TAA T细胞例如在模型HALLX5447中的功效。在这个模型的情况下的读出数据是小鼠在静脉内 (i.v.) 输注ALL细胞之后在不存在以及存在静脉内施用的人TFP.TAA T细胞下的存

活。

[0617] 实施例4:人TFP T细胞在体内实体肿瘤异种移植小鼠模型中的治疗

[0618] 也可测试人TFP.TAA T细胞在携带源于人TAA表达性人细胞系的皮下实体肿瘤的免疫损害小鼠模型中的功效。响应于人TFP.TAAT细胞治疗的肿瘤收缩可通过用测径规测量肿瘤尺寸,或通过追踪由GFP表达性肿瘤细胞发出的GFP荧光信号的强度来评估。

[0619] 可使原代人实体肿瘤细胞在免疫损害小鼠中生长,而不必在体外培养它们。示例性实体癌细胞包括诸如提供于癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas,TCGA)和/或Broad癌细胞系百科全书(Broad Cancer Cell Line Encyclopedia,CCLE,参见Barretina等,Nature 483:603(2012))中的实体肿瘤细胞系。示例性实体癌细胞包括从间皮瘤、肾细胞癌、胃癌、乳腺癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、结肠癌、子宫颈癌、脑癌、肝癌、胰腺癌、肾癌、子宫内膜癌或胃癌分离的原代肿瘤细胞。在一些实施方案中,待治疗的癌症选自以下组成的组:间皮瘤、乳头状浆液性卵巢腺癌、透明细胞卵巢癌、混合苗勒卵巢癌、子宫内膜样粘液卵巢癌、胰腺腺癌、导管胰腺腺癌、子宫浆液性癌瘤、肺腺癌、肝外胆管癌、胃腺癌、食道腺癌、结肠直肠腺癌和乳腺腺癌。这些小鼠可用于测试TFP.肿瘤相关抗原T细胞在人肿瘤异种移植小鼠模型中的功效(参见例如Morton等,Nat.Procol.2:247(2007))。在皮下植入或注射 $1 \times 10^6$ – $1 \times 10^7$ 个原代细胞(于EC基质物质中的经胶原酶处理大块肿瘤混悬液)或肿瘤片段(于EC基质物质中的原代肿瘤片段)之后,使肿瘤生长至200–500mm<sup>3</sup>,随后启动治疗。

[0620] 实施例5:制备用TFP转导的T细胞

[0621] 慢病毒产生

[0622] 如下制备编码适当构建体的慢病毒。将 $5 \times 10^6$ 个HEK-293FT细胞接种至100mm培养皿中,并且使其过夜达到70–90%汇合。于0.5mL无血清的DMEM或Opti-MEM®I培养基中稀释2.5μg指示的DNA质粒和20μL慢病毒包装混合物(ALSTEM,目录号VP100),并且温和混合。在单独管中,于0.5mL无血清的DMEM或Opti-MEM I培养基中稀释30μL NanoFect®转染试剂(ALSTEM,目录号NF 100),并且温和混合。接着将NanoFect/DMEM和DNA/DMEM溶液混合在一起,并且涡旋10–15秒,随后在室温下孵育DMEM-质粒-NanoFect混合物15分钟。将来自先前步骤的完全转染复合物逐滴添加至具有细胞的板中,并且摇动以使转染复合物均匀分散在板中。接着在含湿气5%CO<sub>2</sub>孵育器中在37℃下将板孵育过夜。次日,将上清液用10mL新鲜培养基替换,并且补充以20μL ViralBoost™(500x,ALSTEM,目录号VB100)。接着在37℃下将板再孵育24小时。接着将含有慢病毒的上清液收集至50mL无菌封盖锥形离心管中,并且放置在冰上。在4℃下在3000rpm下离心15分钟之后,澄清上清液用低蛋白质结合性0.45μm无菌过滤器过滤,并且随后通过在4℃下在25,000rpm下超速离心(Beckmann,L8-70M)1.5小时来分离病毒。移除集结块并再混悬于DMEM培养基中,并且慢病毒浓度/效价通过使用Lenti-X™ qRT-PCR滴定试剂盒(Clontech®;目录号631235)进行定量RT-PCR来确定。任何残余质粒DNA都通过用DNA酶I处理来移除。病毒储备制备物立刻用于感染,或等分并储存在–80℃下以供未来使用。

[0623] 慢病毒效价通过用不同量的病毒制备物转导Jurkat细胞来确定。接着在转导之后24小时从经转导Jurkat细胞分离DNA。病毒效价通过定量实时PCR,用机构内部设计的对土拔鼠肝炎病毒(WHP)转录后调控元件(WPRE)以及对白蛋白(内部定量对照)具有特异性的引物/探针来测定。

**[0624] T细胞分离**

**[0625]** 从全血或白细胞层制备外周血液单核细胞 (PBMC)。将全血收集在10mL肝素真空采血管中,并且立刻处理或在4℃下储存过夜。使约10mL抗凝全血与无菌磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 缓冲液在50mL锥形离心管中混合以获得20mL的总体积 (PBS, pH 7.4, 无Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>)。接着将20mL这个血液/PBS混合物温和叠加于15mL **Ficoll-Paque®PLUS** (GE Healthcare, 17-1440-03) 的表面上,随后在室温下在400g下在不施加制动下离心30-40分钟。

**[0626]** 白细胞层购自Research Blood Components (Boston, MA)。LeucoSep™管 (Greiner bio-one) 通过添加15mL **Ficoll-Paque®** (GE Health Care), 并且在1000g下离心1分钟来制备。将白细胞层于PBS (pH 7.4, 无Ca<sup>2+</sup>或Mg<sup>2+</sup>) 中进行1:3稀释。将稀释白细胞层转移至LeucoSep管中,并且在1000g下在不施加制动下离心15分钟。小心地移除在稀释血浆/Ficoll界面处得见的含有PBMC的细胞层以使**Ficoll®**污染最小化。残余Ficoll、血小板和血浆蛋白质接着通过在室温下在200g下离心10分钟,用40mL PBS洗涤PBMC三次来移除。接着用血球计对细胞计数。接着将CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞于冷冻介质 (90%FBS+10%DMSO) 中在每个小瓶30-50x 10<sup>6</sup>个细胞的浓度下加以冷冻。

**[0627] T细胞活化**

**[0628]** 从全血或白细胞层制备的PBMC用抗人CD28和CD3抗体缀合的磁性珠粒刺激24小时,随后进行病毒转导。新鲜分离的PBMC于无huIL-2的CAR-T培养基 (AIM V-AlbuMAX (BSA, Life Technologies), 具有5%AB血清和1.25μg/mL两性霉素B (Gemini Bioproducts)、100U/mL青霉素和100μg/mL链霉素) 中洗涤一次,随后在1x10<sup>6</sup>个细胞/毫升的最终浓度下再混悬于具有300IU/mL人IL-2、IL-7或IL-15 (来自1000x储备物; Invitrogen) 的CAR-T培养基中。

**[0629]** 或者,使冷冻CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>T细胞在预升温DMEM+10%FBS中解冻,短暂离心,接着在1 x 10<sup>6</sup>个细胞/毫升的最终浓度下再混悬于补充以300IU/mL huIL2 (ThermoFisher®) 的完全T细胞扩增培养基中。在用于使T细胞活化之前,抗人CD28和抗人CD3抗体缀合的磁性珠粒 (**Dynabeads®**, Thermo Fisher) 用无菌1 x PBS (pH7.4) 洗涤三次,使用磁性架来从溶液分离珠粒。接着通过将25μL (1x10<sup>6</sup>个珠粒) 珠粒转移至1mL T细胞混悬液中来使T细胞与珠粒在1:1比率下混合。接着将珠粒/细胞混合物分配至非TC处理12孔板的单孔中,并且在37℃下在5%CO<sub>2</sub>下孵育24小时。

**[0630]** 在活化之前,抗人CD28和CD3抗体缀合的磁性珠粒 (可从例如Invitrogen, Life Technologies获得) 用1mL无菌1x PBS (pH 7.4) 洗涤三次,使用磁性架来从溶液分离珠粒,随后再混悬于具有300IU/mL人IL-2的CAR-T培养基中,以达到4x10<sup>7</sup>个珠粒/毫升的最终浓度。接着通过将25μL (1x10<sup>6</sup>个珠粒) 珠粒转移至1mL PBMC中来使PBMC和珠粒在1:1珠粒与细胞比率下混合。接着将所需数目的等分试样分配至12孔低附着或非处理细胞培养板的单孔中,并且在37℃下在5%CO<sub>2</sub>下孵育24小时,随后进行病毒转导。

**[0631] T细胞转导和扩增**

**[0632]** 在PBMC的活化之后,在37℃、5%CO<sub>2</sub>下孵育细胞24小时。使慢病毒在冰上解冻,接着在指示的MOI下在10μg/ml聚凝胺 (Sigma) 存在下添加至活化的T细胞中。在室温下在200g下用慢病毒对细胞进行旋转接种100分钟。将经转导T细胞再孵育24小时,随后再进行慢病毒转导。在第2轮慢病毒转导之后,在补充以300IU/mL hIL-2的T细胞扩增培养基中扩



增T细胞,并且每隔一天在 $5 \times 10^5$ 个细胞/毫升下加以亚培养。

[0633] 在一些情况下,活化的PBMC用在体外转录的 (IVT) mRNA电穿孔。人PBMC在300IU/ml 重组人IL-2 (R&D System) 存在下用**Dynabeads®** (Thermo**Fisher®**) 在1:1比率下刺激3天。在电穿孔之前移除珠粒。将细胞洗涤,并且在 $2.5 \times 10^7$ 个细胞/毫升的浓度下在5% hAB血清 (Gemini Bio-Products) 和1% 抗生素下再混悬于**OPTI-MEM®**培养基 (Thermo Fisher) 或AimV培养基 (Invitrogen) 中。将200 $\mu$ L细胞混悬液 ( $5 \times 10^6$ 个细胞) 转移至2mm间隙 Electroporation Cuvettes Plus™ (Harvard Apparatus BTX) 中,并且在冰上预先冷却。将10 $\mu$ g IVT TFP mRNA添加至细胞混悬液中。接着使用ECM830Electro Square Wave Porator (Harvard Apparatus BTX) 在200V下用mRNA/细胞混合物进行电穿孔20毫秒。在电穿孔之后立刻,将细胞转移至新鲜细胞培养基 (AIM V**AlbuMAX®** (BSA) 无血清培养基+5% 人AB血清+300IU/ml IL-2) 中,并且在37℃下孵育。

[0634] 通过细胞染色来验证TFP表达

[0635] 在慢病毒转导或mRNA电穿孔之后,通过流式细胞计量术确认TFP例如ROR1、NKG2D、CD16或双特异性TFP的表达。使用CD3抗体APC (克隆UCHT1)、CD4抗体-太平洋蓝 (克隆RPAT4)、CD8抗体-APCCY7 (克隆) 和例如人NKG2D/CD314-APC (R&D systems,批号LC0061321) 以及它们的相应同种型对照 (BD biosciences) 对T细胞染色。

[0636] NKG2D TFP T细胞群体

[0637] 将T细胞于3mL染色缓冲液 (PBS, 4% BSA) 中洗涤三次,并且在每孔 $1 \times 10^6$ 个细胞下再混悬于PBS中。为排除死细胞,使细胞与**LIVE/DEAD®**可固定水性死细胞染剂 (Invitrogen) 一起在冰上孵育30分钟。细胞用PBS洗涤两次,并且再混悬于50 $\mu$ L染色缓冲液中。为阻断Fc受体,将1 $\mu$ L 1:100稀释的正常山羊IgG (BD Bioscience) 添加至各管中,并且在冰中孵育10分钟。将1.0mL FACS缓冲液添加至各管中,充分混合,并且细胞通过在300g下离心5分钟来集结。scFv TFP的表面表达通过**Zenon®R**-藻红素标记的人NKG2D IgG1Fc或人IgG1同种型对照来检测。将1 $\mu$ g抗体添加至相应样品中,并且在冰上孵育30分钟。接着洗涤细胞两次,并且使用来自BD bioscience的CD3抗体APC (克隆UCHT1)、CD4抗体-太平洋蓝 (克隆RPA-T4)、CD8抗体APCCy7 (克隆SK1) 进行表面标志物染色。使用BD-LSRII**Fortessa®** X20 (BD Biosciences) 进行流式细胞计量术,并且使用FACS diva软件获得数据并用**FlowJo®** (Treestar, Inc. Ashland, OR) 进行分析。

[0638] 示例性结果显示于图2A中,所述图2A显示对针对CD8 (CD8抗体APCCy7, y轴) 和NKG2D (“NKG2D”) (**Zenon®R**-藻红素标记的hNKG2D IgG, x轴) 加以染色的活化的PBMC细胞的表面表达分析。从左至右显示的是非转导或用NKG2D-CD3 $\epsilon$ 、NKG2D-CD28 $\zeta$ 和NKG2D-41BB $\zeta$ 构建体转导的细胞。CD8<sup>+</sup>NKG2D<sup>+</sup>细胞的比例显示于各图版的右上角中。

[0639] 双特异性TFP T细胞群体

[0640] 携带抗CD19或抗BCMA scFv的TFP的表面表达用生物素化山羊抗小鼠F(ab')<sub>2</sub> (Thermo Fisher) 在每个样品4.5 $\mu$ g下在4℃下检测30分钟。在用染色缓冲液洗涤3次之后,细胞用PE缀合的链霉亲和素 (BD Biosciences, 在1:1000稀释度下) 染色。携带抗肿瘤相关抗原 (Ag) scFv的TFP的表面表达也通过用Ag Fc融合蛋白染色来检测。Ag Fc融合蛋白例如BCMA-Fc融合蛋白是机构内部表达的,并且根据制造商方案用**Zenon®-PE** (Thermo Fisher) 标记。T细胞用**LIVE/DEAD®**可固定水性死细胞染剂染色,用人BD Fc Block™阻

断,接着用每个样品1 $\mu$ g经标记BCMA\_Fc融合物样品染色。

[0641] T细胞标志物(CD3、CD4、CD8)用APC小鼠抗人CD3抗体(克隆UCHT1, BD Biosciences, 在1:100稀释度下)、PerCP/Cy5.5小鼠抗人CD8抗体(克隆SK1, BD Biosciences, 在1:100稀释度下)和Pacific Blue™小鼠抗人CD4抗体(克隆RPA-T4, BD Biosciences, 在1:1000稀释度下)在4℃下染色30分钟。在用染色缓冲液洗涤2次之后,细胞接着在LSRFortessa™ X20 (BD Biosciences) 上进行操作。使用FACSDiva®获得数据,并且用FlowJo® (Treestar, Inc. Ashland, OR) 进行分析。

[0642] 结果显示于图2B中,所述图2B确认TCR的表达。细胞根据CD8的表面表达(y轴)以及Fab抗体(顶行)或BCMA-Fc(底行)(x轴)来分选。显示的是来自用空载体、CD19抗体-CD3 $\epsilon$ 、BCMA抗体-CD3 $\epsilon$ 、BCMA抗体-CD3 $\gamma$ 、CD19抗体-CD3 $\epsilon$ 与BCMA抗体-CD3 $\epsilon$ 两者、或CD19抗体-CD3 $\epsilon$ +BCMA抗体-CD3 $\gamma$ 转导的细胞的结果。

[0643] CD16 TFP T细胞群体

[0644] CD16(Fc $\gamma$ RIIIa)主要存在于NK细胞、嗜中性白细胞、单核细胞、巨噬细胞和白细胞上。然而,不同于T细胞,NK细胞仅占循环淋巴细胞的一小部分(5-15%)。此外,NK细胞对大多数常规基因转染/转导技术具有抗性,但短期短暂转导已用痘苗病毒实现。然而,外源性T细胞更易于被转导,并且可通过本文公开的方法扩增,从而使得它们更加适于使患者对组合疗法中的抗癌治疗剂的免疫应答加强。

[0645] 在慢病毒转导或mRNA电穿孔之后,CD16 TFP的表达通过使用抗CD16-PE抗体和IgG1k-PE抗体(目录号分别是555407和555749,两者均来自BD Pharmingen)进行流式细胞计量术来确认。将T细胞于3mL染色缓冲液(PBS, 4%BSA)中洗涤三次,并且在每孔 $1 \times 10^6$ 个细胞下再混悬于PBS中。为排除死细胞,使细胞与LIVE/DEAD®可固定水性死细胞染剂(Invitrogen)一起在冰上孵育30分钟。细胞用PBS洗涤两次,并且再混悬于50 $\mu$ L染色缓冲液中。为阻断Fc受体,将1 $\mu$ L 1:100稀释的正常山羊IgG(BD Bioscience)添加至各管中,并且在冰中孵育10分钟。将1.0mL FACS缓冲液添加至各管中,充分混合,并且细胞通过在300g下离心5分钟来集结。

[0646] 图3显示由抗CD20抗体利妥昔单抗结合的CD20+Raji细胞的示意图,所述利妥昔单抗转而由用CD16 TFP转导的T细胞结合,从而导致诱导细胞溶解(图3A)。当使用非糖基化利妥昔单抗时,CD16TFP不能结合抗体,因此不诱导靶标细胞溶解(图3B)。

[0647] 通过CD16 TFP检测的癌症抗原的表面表达用Zenon®R-藻红素标记的人抗CD20IgG1 Fc(例如利妥昔单抗)或无糖基化形式的抗CD20抗体来检测。无糖基化形式的CD20具有结合肿瘤细胞表面上的CD20抗原的功能性scFv,但由于在它的Fc部分上N被G取代的N-糖基化突变而将不啮合CD16TFP或CAR。使1 $\mu$ g各CD20抗体或无糖基化CD20抗体或单独Zenon R-藻红素与Raji细胞一起在冰上孵育30分钟。细胞接着用PBS洗涤两次,使用LSRFortessa®X20 (BD Biosciences) 进行流式细胞计量术,并且使用FACS diva软件获得数据并用FlowJo® (Treestar, Inc. Ashland, OR) 进行分析。

[0648] FACS确认的示例性结果显示于图4A中,所述图4A显示针对CD16(CD16抗体,x轴)和CD3(y轴)加以染色的细胞。从左至右显示的是非转导或用:CD16-CD3 $\epsilon$  TFP、CD16-CD3 $\gamma$  TFP、CD16-CD3 $\delta$  TFP和CD16-CD3 $\beta$ 构建体转导的细胞(顶行);以及非转导、用CD16-CD28 $\zeta$  CAR、CD16-41BB $\zeta$  CAR和作为阳性对照的CD19抗体-CD3 $\epsilon$  TFP转导的细胞。CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>细胞的比

例显示于各图版的右上角中。

[0649] Zenon染色的示例性结果显示于图4B中。为证明方法的准确性,未染色或已用CD19抗体染色的Raji细胞(表达CD19与CD20两者)根据以上方法使用抗CD19TFP进行处理。图4C显示利妥昔单抗与无糖基化利妥昔单抗两者均能够结合CD19+Raji细胞。

[0650] 实施例6:通过流式细胞计量术进行的细胞毒性测定

[0651] 用荧光染料二乙酸羧基荧光素丁二酰亚胺酯(CFSE)标记抗肿瘤抗原靶标阳性或阴性靶标细胞。使这些靶标细胞与未转导、用对照CAR-T构建体转导、或用TFP转导的效应T细胞混合。在指示的孵育时期之后,通过流式细胞计量术来测定各效应细胞/靶标细胞培养的死体经CFSE标记靶标细胞对活体经CFSE标记靶标细胞以及阴性对照靶标细胞的百分比。相对于含有单独靶标细胞的孔计算各T细胞+靶标细胞培养中的靶标细胞的存活百分比。

[0652] 效应T细胞或抗癌剂和效应T细胞的组合(例如抗癌抗体和CD16 TFP)的细胞毒性活性通过在共同孵育效应细胞和靶标细胞之后,使用流式细胞计量术比较在无或有效应T细胞的情况下靶标细胞中存活靶标细胞的数目来测量。在用抗肿瘤抗原TFP或CAR-T细胞进行的实验中,靶标细胞是肿瘤抗原阳性细胞,而用作阴性对照的细胞是肿瘤抗原阴性细胞。

[0653] 将靶标细胞洗涤一次,并且在 $1 \times 10^6$ 个细胞/毫升下再混悬于PBS中。将荧光染料二乙酸羧基荧光素丁二酰亚胺酯(CFSE)(ThermoFisher®)在 $0.03 \mu\text{M}$ 的浓度下添加至细胞混悬液中,并且在室温下孵育细胞20分钟。通过在反应体积的5倍体积下向细胞混悬液中添加完全细胞培养基(RPMI-1640+10%HI-FBS)来终止标记反应,并且在室温下再孵育细胞2分钟。通过离心来集结细胞,并且在 $2 \times 10^5$ 个细胞/毫升下再混悬于外加5%AB血清(Gemini Bioproducts)的细胞毒性培养基(无酚红RPMI1640(Invitrogen))中。将50微升经CFSE标记靶标细胞混悬液(等效于10,000个细胞)添加至96孔U形底板(Corning)的各孔中。

[0654] 将用抗肿瘤抗原TFP构建体转导的效应T细胞以及作为阴性对照的非转导T细胞洗涤,并且在 $2 \times 10^6$ 个细胞/毫升或 $1 \times 10^6$ 个细胞/毫升下混悬于细胞毒性培养基中。将50 $\mu\text{L}$ 效应T细胞混悬液(等效于100,000或50,000个细胞)添加至经涂铺靶标细胞中来以100 $\mu\text{L}$ 的总体积分别达到效应物与靶标比率10:1或5:1。接着混合培养物,短暂离心,并且在 $37^\circ\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$ 下孵育4小时。在这个孵育之后立刻,如由制造商所推荐将7AAD(7-氨基放线菌素D)(BioLegend)添加至所培养细胞中,并且用BD Fortessa X-20(BD Biosciences)进行流式细胞计量术。使用FlowJo®软件(TreeStar, Inc.)对流式细胞计量数据进行分析。

[0655] RPMI-8226靶标细胞的存活百分比通过以下方式来计算:用具有效应T细胞和靶标细胞的样品中活的RPMI-8226靶标细胞(CFSE+7-AAD-)的数目除以具有单独靶标细胞的样品中活的RPMI-8226(CFSE+7-AAD-)细胞的数目。将效应细胞的细胞毒性计算为RPMI-8226的杀灭百分比=100%-RPMI-8226细胞的存活百分比。

[0656] 当相较于非转导或用非肿瘤相关抗原特异性CAR对照转导的T细胞时,用抗肿瘤抗原-28 $\zeta$  CAR构建体转导的T细胞可显示针对肿瘤抗原表达性细胞的细胞毒性。然而,相比于抗肿瘤相关抗原CAR对照,用肿瘤相关抗原抗体-CD3 $\epsilon$ 转导的T细胞可诱导更高效的针对靶标的细胞毒性。在5与10:1之间的效应物:靶标比率下,抗肿瘤相关抗原-CD3 $\gamma$  TFP也可介导大于用抗肿瘤相关抗原CAR所观察的细胞毒性的强力细胞毒性。一定细胞毒性可用抗肿瘤相关抗原-TCR $\alpha$  TFP和抗肿瘤相关抗原-TCR $\beta$  TFP观察到。类似结果可用采用替代性较链区构建的抗肿瘤相关抗原TFP获得。再次,相比于在抗肿瘤相关抗原CAR转导的T细胞的情

况下,针对肿瘤相关抗原表达性靶标细胞的细胞毒性在抗肿瘤相关抗原-CD3 $\epsilon$  TFP或抗肿瘤相关抗原-CD3 $\gamma$  TFP转导的T细胞的情况下可更大。

[0657] 实施例7:通过实时细胞毒性测定获得的细胞毒性:NKG2D TFP T细胞

[0658] NKG2D TFP也可在实时细胞毒性测定 (RTCA) 形式中显示比NKG2D CAR优越的细胞毒性。RTCA测定实时测量专门化96孔板的各孔中粘附靶标细胞单层的电阻抗,并且将最终读出数据呈现为称为细胞指数的值。细胞指数的变化指示由于由共同孵育的T细胞效应物对靶标细胞的杀灭而使靶标细胞单层破坏。因此,可将效应T细胞的细胞毒性评估为具有靶标细胞与效应T细胞两者的孔的细胞指数相较于具有单独靶标细胞的孔的细胞指数的变化。

[0659] 在DMEM、10%FBS、1%抗生素抗霉菌素 (Life Technologies) 中培养粘附靶标细胞。为准备RTCA,将50 $\mu$ L例如DMEM培养基添加至E板 (ACEA Biosciences, Inc, 目录号:JL-10-156010-1A) 的适当孔中。接着将板放置至RTCA MP仪器 (ACEA Biosciences, Inc.) 中,并且如制造商手册中所述将适当板布局 and 测定时程输入RTCA 2.0软件中。每15分钟进行基线测量,持续100次测量。接着将处于100 $\mu$ L体积中的 $1 \times 10^4$ 个靶标细胞添加至各测定孔中,并且使细胞沉降15分钟。使板返回至读取器中,并且再继续读取。

[0660] 次日,将效应T细胞洗涤,并且再混悬于细胞毒性培养基 (无酚红RPMI1640 (Invitrogen) 外加5%AB血清 (Gemini Bioproducts;100-318)) 中。接着将板从仪器移除,并且将混悬于细胞毒性培养基 (无酚红RPMI1640+5%AB血清) 中的效应T细胞在100,000个细胞或50,000个细胞下添加至各孔中以分别达到效应物与靶标比率10:1或5:1。接着将板放回至仪器中。每2分钟进行测量,持续100次测量,接着每15分钟进行测量,持续1,000次测量。

[0661] 在RTCA测定中,对NKG2D转导的细胞的杀灭可通过用NKG2D-28 $\zeta$ CAR转导的T细胞来观察,如由相对于单独细胞或与用对照CAR构建体转导的T细胞共同孵育的细胞,在添加效应细胞之后细胞指数的时间依赖性降低所证明。然而,相比于用NKG2D CAR观察到的靶标细胞杀灭,由NKG2D-CD3 $\epsilon$  TFP表达性T细胞达成的靶标细胞杀灭可更深以及更快速。举例来说,在添加用NKG2D-CD3 $\epsilon$  TFP转导的T细胞的4小时内,对NKG2DL表达性靶标细胞的杀灭可为基本上完全的。用采用包含其他CD3和TCR构建体的许多TFP构建体转导的T细胞可观察到少许杀灭或无杀灭。类似结果可用采用替代性铰链区构建的NKG2D TFP获得。相比于在NKG2D CAR转导的T细胞的情况下,针对NKG2D转导的靶标细胞的细胞毒性在NKG2D-CD3 $\epsilon$  TFP或NKG2D-CD3 $\gamma$  TFP转导的T细胞的情况下可更大。

[0662] TFP转导的T细胞的细胞毒性活性关于用于转导的病毒的量 (MOI) 可为剂量依赖性的。对NKG2DL阳性细胞的杀灭增加可随着NKG2D-CD3 $\epsilon$  TFP慢病毒的MOI递增而观察到,从而进一步强化TFP转导与细胞毒性活性之间的关系。

[0663] NKG2D TFP构建体通过将由编码接头:GGGSGGGSGGGGSLE (SEQ ID NO:1) 的DNA序列连接于CD3 $\epsilon$ DNA片段的NKG2D scFv DNA片段在XbaI和EcoRI位点处克隆至p510载体 (来自SBI) 中来工程改造。产生的NKG2D TFP构建体是例如p510\_NKG2D抗体\_SS1\_CD3 $\epsilon$  (NKG2D SS1 scFv-接头-人CD3 $\epsilon$ 链)。

[0664] 全长NKG2D从pCMV6\_XL4\_NKG2D (Origene) 加以PCR扩增,并且将单体或包含接头的二聚体通过Gibson重组反应来克隆至XbaI和EcoRI限制消化的p527a (pCDH-EF1-MCS-T2A-



Puro) (SBI) 中。

[0665] 用于RTCA的靶标细胞是例如NKG2D<sup>+</sup>HeLa细胞(子宫颈腺癌, **ATCC®CCL-2™**), 并且NKG2D阴性PC-3细胞(前列腺腺癌, **ATCC®CRL-1435™**) 用作阴性对照。在具有10%FBS和1%抗生素抗霉菌素(Life Technologies)的DMEM中培养粘附靶标细胞。

[0666] 接着测定指示细胞毒性的标准化细胞指数。活化的PBMC未经处理、未经转导、或用空载体、NKG2D TFP、具有CD28 $\zeta$ 或41BB $\zeta$ 信号传导结构域的NKG2D CAR转导。

[0667] 相较于阴性对照, 靶标NKG2D阳性HeLa细胞由抗NKG2D TFP转导的T细胞高效杀灭。相比之下, NKG2D阴性PC-3细胞不由任何构建体高效杀灭。

[0668] 表达抗NKG2D CAR和TFP构建体的T细胞的活化使用NKG2D<sup>+</sup>和NKG2D-K562细胞进行。如上所述, 活化的PBMC用50MOILV连续两天转导, 并且加以扩增。在转导后第8天, 在外加5%AB血清(Gemini Bioproducts; 100-318)的细胞毒性培养基(无酚红RPMI1640 (Invitrogen)) 中在1:1E:T比率(各细胞类型 $0.2 \times 10^6$ ) 下建立PBMC与靶标细胞(过度表达NKG2D的K562细胞)的共培养。过度表达BCMA的K562细胞用作阴性对照。在开始共培养之后24小时, 收集细胞, 用PBS洗涤三次, 并且用Live/Dead Aqua在冰上染色30分钟。为阻断Fc受体, 添加人Fc阻断物(BD), 并且在室温下孵育10分钟。细胞随后用来自BD Biosciences的CD3抗体APC(克隆UCHT1)、CD8抗体APCcy7(克隆SK1)、CD69抗体-Alexa**Fluor®**700(克隆FN50)以及CD25抗体-PE(克隆BC96, eBioscience)染色。将细胞洗涤两次, 并且通过BD LSRII-Fortessa来分析。如上使用**FlowJo®**分析软件(Tree star, Inc.)分析数据。

[0669] T细胞未经转导、用空载体转导、用抗NKG2D-CD3 $\epsilon$  TFP、抗NKG2D-28 $\zeta$  CAR或抗NKG2D-41BB $\zeta$  CAR转导。如将显示, 表达抗NKG2D CAR和TFP构建体的T细胞通过与NKG2D<sup>+</sup>细胞而非NKG2D<sup>-</sup>细胞一起培养而活化。数据将证明NKG2D表达性细胞能够特异性活化T细胞。

[0670] T细胞的活化可通过分析粒酶B产生来类似地评估。如上所述培养和扩增T细胞, 并且根据制造商试剂盒说明书(Gemini Bioproducts; 100-318)对粒酶B进行细胞内染色。收集细胞, 用PBS洗涤三次, 并且用人Fc阻断物阻断10分钟。用CD3抗体APC(克隆UCHT1)和CD8抗体APCcy7(克隆SK1)在4℃下对细胞进行表面抗原染色30分钟。接着在4℃下用固定/可渗透化溶液(BD Cytofix/Cytoperm固定/可渗透化试剂盒, 目录号554714)固定细胞20分钟, 随后用BD渗透/洗涤缓冲液洗涤。细胞随后用粒酶B抗体Alexafluor700(克隆GB11)染色, 用BD渗透/洗涤缓冲液洗涤两次, 并且再混悬于FACS缓冲液中。在BD LSRII-Fortessa上获得数据, 并且使用**FlowJo®**(Tree star Inc.)进行分析。

[0671] T细胞未经转导、用空载体转导、用抗NKG2D-CD3 $\epsilon$  TFP、抗NKG2D-28 $\zeta$  CAR或抗NKG2D-41BB $\zeta$  CAR转导。表达抗NKG2D CAR和TFP构建体的T细胞通过与NKG2D<sup>+</sup>细胞而非NKG2D<sup>-</sup>细胞一起培养而活化。测定在各构建体的情况下, NKG2D配体<sup>-</sup>细胞和NKG2D配体<sup>+</sup>细胞中粒酶B阳性细胞的百分比。

[0672] 实施例8: 通过实时细胞毒性测定获得的细胞毒性: CD16 TFPT细胞

[0673] 如上对于NKG2D所述进行靶标细胞和经转导T细胞的制备。

[0674] 在RTCA测定中, 对Ag转导的细胞的杀灭可通过用CD16-28 $\zeta$ CAR转导的T细胞来观察, 如由相对于单独细胞或与用对照CAR构建体转导的T细胞共同孵育的细胞, 在添加效应细胞之后细胞指数的时间依赖性降低所证明。然而, 相比于用CD16CAR观察到的靶标细胞杀灭, 由CD16-CD3 $\epsilon$  TFP表达性T细胞达成的靶标细胞杀灭可更深以及更快速。举例来说, 在添

加用CD16-CD3 $\epsilon$  TFP转导的T细胞和抗TAA抗体的4小时内,对Ag表达性靶标细胞的杀灭可为基本上完全的。用采用包含其他CD3和TCR构建体的许多TFP构建体转导的T细胞可观察到少许杀灭或无杀灭。类似结果可用采用替代性铰链区构建的CD16 TFP获得。相比于在CD16 CAR转导的T细胞的情况下,针对Ag转导的靶标细胞的细胞毒性在CD16-CD3 $\epsilon$  TFP或CD16-CD3 $\gamma$  TFP转导的T细胞的情况下可更大。

[0675] CD16TFP转导的T细胞与抗TAA抗体组合的细胞毒性活性关于用于转导的病毒的量(MOI)可为剂量依赖性的。对Ag阳性细胞的杀灭增加可随着CD16-CD3 $\epsilon$  TFP慢病毒的MOI递增以及抗Ag抗体的剂量增加而观察到,从而进一步强化TFP转导与细胞毒性活性之间的关系。

[0676] CD16TFP构建体通过将由编码接头:GGGSGGGSGGGGSLE (SEQ ID NO:1)的DNA序列连接于CD3 $\epsilon$  DNA片段的CD16DNA片段在XbaI和EcoRI位点处克隆至p510载体(来自SBI)中来工程改造。

[0677] 用于RTCA的靶标细胞是例如Ag阳性HeLa细胞(子宫颈癌,ATCC®CCL-2™),并且Ag阴性细胞例如PC-3细胞(前列腺腺癌,ATCC®CRL-1435™)用作阴性对照。在具有10%FBS和1%抗生素抗霉菌素(Life Technologies)的DMEM中培养粘附靶标细胞。

[0678] 接着测定指示细胞毒性的标准化细胞指数。活化的PBMC未经处理、未经转导、或用空载体、CD16TFP、具有CD28 $\zeta$ 或41BB $\zeta$ 信号传导结构域的CD16 CAR转导。

[0679] 相较于阴性对照,靶标Ag阳性HeLa细胞由抗Ag抗体与CD16TFP转导的T细胞组合高效杀灭。相比之下,Ag阴性PC-3细胞不由任何构建体高效杀灭。

[0680] 表达抗CD16 CAR和TFP构建体的T细胞的活化使用CD16<sup>+</sup>和CD16-K562细胞进行。如上所述,活化的PBMC用50MOI LV连续两天转导,并且加以扩增。在转导后第8天,在外加5% AB血清(Gemini Bioproducts;100-318)的细胞毒性培养基(无酚红RPMI1640 (Invitrogen))中在1:1 E:T比率(各细胞类型 $0.2 \times 10^6$ )下建立PBMC与靶标细胞(过度表达CD16的K562细胞)的共培养。过度表达BCMA的K562细胞用作阴性对照。在开始共培养之后24小时,收集细胞,用PBS洗涤三次,并且用Live/Dead Aqua在冰上染色30分钟。为阻断Fc受体,添加人Fc阻断物(BD),并且在室温下孵育10分钟。细胞随后用来自BD Biosciences的CD3抗体APC(克隆UCHT1)、CD8抗体APCcy7(克隆SK1)、CD69抗体-AlexaFluor®700(克隆FN50)以及CD25抗体-PE(克隆BC96,eBioscience)染色。将细胞洗涤两次,并且通过BD LSRII-Fortessa来分析。如上使用FlowJo®分析软件(Tree star, Inc.)分析数据。

[0681] T细胞未经转导、用空载体转导、用CD16-CD3 $\epsilon$  TFP、CD16-28 $\zeta$ CAR或CD16-41BB $\zeta$ CAR转导。如将显示,表达CD16CAR和TFP构建体的T细胞通过与Ag+细胞和有效量的抗Ag抗体而非Ag-细胞一起培养而活化。数据证明Ag表达性细胞能够在抗Ag抗体存在下特异性活化T细胞。

[0682] T细胞的活化可通过分析粒酶B产生来类似地评估。如上所述培养和扩增T细胞,并且根据制造商试剂盒说明书(Gemini Bioproducts;100-318)对粒酶B进行细胞内染色。收集细胞,用PBS洗涤三次,并且用人Fc阻断物阻断10分钟。用CD3抗体APC(克隆UCHT1)和CD8抗体APCcy7(克隆SK1)在4℃下对细胞进行表面抗原染色30分钟。接着在4℃下用固定/可渗透化溶液(BD Cytofix/Cytoperm固定/可渗透化试剂盒,目录号554714)固定细胞20分钟,随后用BD渗透/洗涤缓冲液洗涤。细胞随后用粒酶B抗体Alexafluor700(克隆GB11)染色,用

BD渗透/洗涤缓冲液洗涤两次,并且再混悬于FACS缓冲液中。在BD LSRII-Fortessa上获得数据,并且使用**FlowJo®**(Treestar Inc.)进行分析。

[0683] T细胞未经转导、用空载体转导、用CD16-CD3 $\epsilon$  TFP、CD16-28 $\zeta$ CAR或CD16-41BB $\zeta$ CAR转导。表达CD16CAR和TFP构建体的T细胞通过与Ag<sup>+</sup>细胞而非Ag<sup>-</sup>细胞一起培养而活化。测定在各构建体的情况下,Ag<sup>-</sup>细胞和Ag<sup>+</sup>细胞中粒酶B阳性细胞的百分比。

[0684] 实施例9:NKG2D TFP T细胞在体外以抗原特异性方式增殖并且使NKG2D配体表达性肿瘤细胞溶解。

[0685] 为进一步评估NKG2D TFP T细胞在体外的功效,测试三组TFP T细胞:单体NKG2D-CD3 $\epsilon$ 、二聚NKG2D-CD3 $\epsilon$ 和未转导。单体和二聚NKG2D TFP的示意图显示于图5中。

[0686] 材料和方法

[0687] 慢病毒产生

[0688] 慢病毒通过短暂转染293TN产生细胞系(System Biosciences, Inc., LV900A-1)来制备。TFP和CAR构建体使用NKG2D受体序列的单体或二聚体融合于CD3 $\epsilon$ 链来产生(参见附录A)。

[0689] T细胞分离和慢病毒转导

[0690] CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞从**Leukopack®**样品(HemaCare, 供者ID:W313716040891)纯化。使白细胞单采术样品经受根据制造商说明书,使用自动化**cliniMACS®**Prodigy自动化系统(Miltenyi),利用CD4和CD8MACS珠粒进行的CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞富集。

[0691] 使用Dynabeads在1:1比率下使T细胞活化,并且在300IU/ml IL-2(Peprotech)存在下在5%人AB血清(Gemini Bio Products, 目录号100-318)和1%青霉素-链霉素(Gibco, 目录号15240-062)下维持在AimV培养基(Invitrogen)中。Dynabead活化的T细胞在聚凝胺(5 $\mu$ g/ml)存在下分别用慢病毒在10MOI(病毒使用Jurkat细胞加以滴定)下转导,并且在转导后24小时在100xg下持续100分钟旋转接种一次。

[0692] 转导效率测定

[0693] 通过流式细胞计量术来测定转导效率。使用CD3抗体APC(克隆UCHT1)、CD4抗体-太平洋蓝(克隆RPAT4)、CD8抗体-APCCY7(克隆)、人NKG2D/CD314-APC(R&D systems, 批号LC0061321)以及它们的相应同种型对照(BD biosciences)对T细胞染色。使用BD-LSRII **Fortessa®**X20分析细胞。

[0694] 细胞系以及肿瘤细胞表面上的抗原表达:

[0695] 卵巢癌细胞系OVCAR3和OVCAR5购自ATCC。AE17间皮瘤细胞系购自Sigma。根据制造商说明书来使所有细胞系生长。肿瘤细胞表面上的抗原表达使用MIC A/B抗体-R-藻红素(PE)(BD Pharmingen<sup>TM</sup>, 批号6049687)、ULBP-2/5/6抗体-PE(R&D systems, 批号LWE0716091)、IgG1 k同种型对照-PE(BD Pharmingen, 批号6070641)来测定。使用标准方案进行细胞表面染色,并且使用BD-LSRII **Fortessa®**X20来分析。

[0696] 测定抗原特异性T细胞增殖:

[0697] 如下进行增殖测定:将100 $\mu$ g/孔的ULBP2-Fc(R&D systems, 批号GMI0316041)或IgG对照于100 $\mu$ l 1X PBS中在4 $^{\circ}$ C下在96孔高结合板上涂布过夜。将板用1X PBS洗涤,并且用1%BSA在4 $^{\circ}$ C下阻断20分钟并用1X PBS再次洗涤。每孔涂铺5000个CFSC标记的T细胞,并且在37 $^{\circ}$ C下孵育3天。在第4天根据确定方案对细胞进行Live/Dead染色,并且使用BD-LSRII

Fortessa®X20来分析。

[0698] 测定抗原特异性肿瘤溶解：

[0699] 使卵巢癌细胞系OVCAR3或OVCAR5或间皮瘤细胞系AE17与NKG2D CD3 $\epsilon$  TFP T细胞或未转导T细胞在96孔RTCA板上在1:5、1:1和5:1 E:T比率下共培养。将活体粘附肿瘤细胞的存在记录为由在RTCA板的底部的电极捕集的电脉冲。非粘附性死细胞不被电极记录，因此在标准确定方案之后细胞计数下降。

[0700] 结果

[0701] 使T细胞中的CD4 $^{+}$ 和CD8 $^{+}$ T细胞富集，并且用指示的慢病毒载体转导(图6)。如上所提及，使用CD3和CD28Dynabeads刺激T细胞，并且在IL-2存在下加以培养。图7A-图7C显示使用(从左至右)ULBP1抗体、ULBP2/5/6抗体、ULBP3抗体、ULBP4抗体和MICA/B抗体在MST0-MSLN-Luc细胞、OVCAR3-Luc、SaOS2-Luc和SKOV3-Luc细胞上针对NKG2D配体的Zenon染色。在各图中，顶部迹线是NKG2D配体抗体，中间迹线是同种型对照或单独二级抗体，并且底部迹线是未染色细胞。

[0702] 单NKG2D CD3g TFP和二NKG2D CD3 $\epsilon$  TFP形式通过抗NKG2D表面染色来评估。我们的数据揭示当相较于单NKG2D CD3 $\epsilon$  TFP变体时，二NKG2D CD3 $\epsilon$ TFP变体最高效在表面上表达，而对于所有T细胞组，同种型对照都是阴性(参见图2A)。

[0703] 为测定NKG2D CD3 $\epsilon$  TFP T细胞的抗原特异性，使CFSC标记的T细胞与涂布于板上的ULBP-2共培养3天培养时期。不同于未转导T细胞，二聚体NKG2D CD3 $\epsilon$  TFP T细胞在浓度低至60ng/ml的抗原存在下增殖(由图6A中的红色箭号指示)。单NKG2D CD3 $\epsilon$  TFP T细胞在抗原浓度多达250ng/ml下增殖(由图6A上的箭号指示)。二NKG2D CD3 $\epsilon$  TFP的增殖能力增加可归因于相较于单NKG2D CD3 $\epsilon$  TFP，二NKG2D CD3 $\epsilon$ 在T细胞表面上的表达增加。在结合于板的同种型对照存在下，转导或未转导条件都不增殖。

[0704] 为评估NKG2D CD3 $\epsilon$  TFP T细胞的抗原特异性肿瘤溶解能力，使效应细胞和肿瘤细胞在1:5、1:1和5:1 E:T比率下共培养。在它的表面上表达NKG2DL的卵巢癌细胞通过对NKG2DL表达的流式细胞计量术分析来评估。相较于同种型对照或未染色样品，OVCAR3与OVCAR5均是MICA/B和ULBP 2/5/6阳性。AE17小鼠肿瘤细胞系呈NKG2DL抗原表达阴性，并且当通过流式细胞计量术来评估时，与PE通道中的同种型对照或未染色样品具有类似概况(图6B)。

[0705] 通过RTCA测定来评估的抗原特异性肿瘤溶解能力显示在1:5比率下二聚NKG2D CD3 $\epsilon$  TFP T细胞和单NKG2D CD3 $\epsilon$  TFP T细胞在类似程度上使抗原阳性肿瘤细胞溶解，而在1:1和5:1比率下，由于相较于二NKG2D CD3 $\epsilon$  T细胞具有较低TFP表达，所以单NKG2D CD3 $\epsilon$  TFP显示延迟肿瘤溶解(图7A-图7C)。用抗原阴性AE17小鼠肿瘤细胞系或用未转导T细胞条件未观察到肿瘤溶解。

[0706] 这些结果显示单NKG2D CD3 $\epsilon$  TFP T细胞和二NKG2D CD3 $\epsilon$  TFP T细胞相较于未转导T细胞的抗原特异性增殖和肿瘤溶解。

[0707] 实施例10:基于荧光素酶的细胞毒性测定-双特异性TFP T细胞

[0708] 基于荧光素酶的细胞毒性测定(“Luc-Cyto”测定)通过间接测量在共培养之后残余活体靶标细胞中的荧光素酶活性来评估TFP T细胞的细胞毒性。用于Luc-Cyto测定中的靶标细胞是被稳定转导来表达萤火虫荧光素酶的HeLa-BCMA $\epsilon$ t和HeLa-CD19 $\epsilon$ t细胞。编码萤

萤火虫荧光素酶的DNA由GeneArt® (ThermoFisher®) 合成, 并且插入单启动子慢病毒载体pCDH527A-1 (System Bioscience) 的多克隆位点中。携带萤火虫荧光素酶的慢病毒与与章节1.1中提及的程序相同的程序加以包装。HeLa-BCMA<sup>t</sup>和HeLa-CD19<sup>t</sup>细胞接着用携带萤火虫荧光素酶构建体的慢病毒转导24小时, 接着用嘌呤霉素 (5μg/mL) 进行选择。HeLa-BCMA<sup>t</sup>-荧光素酶细胞或HeLa-CD19<sup>t</sup>-荧光素酶细胞的产生通过用Bright-Glo™荧光素酶测定系统 (Promega) 测量细胞中的荧光素酶活性来确认。

[0709] 结果显示于图8中。T细胞用空表达载体或以下TFP转导: CD19抗体-CD3 $\epsilon$ 、BCMA抗体-CD3 $\epsilon$ 、BCMA抗体-CD3 $\gamma$ 、CD19抗体-CD3 $\epsilon$ /BCMA抗体-CD3 $\epsilon$ 、CD19抗体-CD3 $\epsilon$ /BCMA抗体-CD3 $\gamma$ 、CD19抗体-CD3 $\epsilon$ +BCMA抗体-CD3 $\epsilon$ 、或CD19抗体-CD3 $\epsilon$ +BCMA抗体-CD3 $\gamma$ 。使经转导T细胞与稳定表达CD19的HeLa细胞 (图8A)、稳定表达BCMA的HeLa细胞 (图8B)、或稳定表达CD19与BCMA两者的HeLa细胞 (图8C) 一起孵育。“/”是指用采用两种病毒转导的T细胞群体进行的测定, 一种病毒具有抗BCMA TFP, 并且一种病毒具有抗CD19TFP; “+”是指使用已加以组合的两种T细胞群体, 一种T细胞群体用抗BCMA TFP转导, 并且一种T细胞群体用抗CD19 TFP转导。将靶标细胞 (在这个测定中是HeLa-BCMA<sup>t</sup>-荧光素酶或HeLa-CD19<sup>t</sup>-荧光素酶) 在每孔5000个细胞下涂铺于96孔板中。将TFP T细胞在所需效应物与靶标比率下添加至靶标细胞中。接着在37℃下在5%CO<sub>2</sub>下培养细胞混合物24小时, 随后通过Bright-Glo®荧光素酶测定系统来测量活体靶标细胞中的荧光素酶活性。将细胞旋转以获得集结块, 并且再混悬于含有荧光素酶底物的培养基中。荧光素酶通过细胞溶解来释放, 因此, 较高荧光素酶活性对应于较大细胞死亡百分比。如图中所示, 相比于任何单独单一构建体, 双特异性TFP T细胞群体杀灭更高百分比的细胞。

[0710] 实施例11: 由Luminex®测定的IL-2和IFN- $\gamma$  分泌: 双特异性TFP T细胞

[0711] 为检测由与靶标细胞接触的效应细胞达成的细胞因子释放水平, 使用人细胞因子磁性缓冲试剂试剂盒 (Invitrogen, LHB0001M) 以及人IL-2磁性珠粒试剂盒 (Invitrogen, LHC0021M) 和人IFN- $\gamma$  磁性珠粒试剂盒 (Invitrogen, LHC4031M) 进行2路测定。测量在图8中所示的分析中集结的细胞的上清液中的细胞因子产生。

[0712] 结果显示于图9中, 并且显示IFN $\gamma$  (影线棒条) 和IL-2 (实心棒条) 的量。如上, 使经转导T细胞与稳定表达CD19的HeLa细胞 (图9A)、稳定表达BCMA的HeLa细胞 (图9B)、或稳定表达CD19与BCMA两者的HeLa细胞 (图9C) 一起孵育。“/”是指用采用两种病毒转导的T细胞群体进行的测定, 一种病毒具有抗BCMA TFP, 并且一种病毒具有抗CD19TFP; “+”是指使用已加以组合的两种T细胞群体, 一种T细胞群体用抗BCMA TFP转导, 并且一种T细胞群体用抗CD19 TFP转导。总细胞因子产生显示在Y轴上。如图中所示, 来自用双特异性TFP处理的细胞的细胞因子产生不高于单特异性TFP的细胞因子产生。在大多数情况下, 细胞因子的产生较低, 从而指示对于接受用本文所述的经工程改造T细胞进行治疗的患者, 在毒性方面可不存在增加。

[0713] 实施例12: 由ELISA测定的IL-2和IFN- $\gamma$  分泌: NKG2D TF P T细胞

[0714] 与识别携带同源抗原的细胞相关的效应T细胞活化和增殖的另一量度是效应物细胞因子诸如白介素-2 (IL-2) 和干扰素- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 的产生。

[0715] 如产品插页中所述进行针对人IL-2 (目录号EH2IL2, ThermoScientific®) 和IFN-

$\gamma$  (目录号KHC4012, Invitrogen) 的ELISA测定。在一个实例中, 将50 $\mu$ L复原标准物或样品一式两份添加至96孔板的各孔中, 随后添加50 $\mu$ L生物素化抗体试剂。通过对板温和轻叩数次来混合样品。接着将50 $\mu$ L标准稀释剂添加至不含有标准物或样品的所有孔中, 并且将板用粘性板盖小心密封, 随后在室温(20–25 $^{\circ}$ C)下孵育3小时。接着移除板盖, 清空板内含物, 并且各孔用洗涤缓冲液填充。重复这个洗涤程序总计3次, 并且将板于纸巾或其他吸收性材料上吸干。将100 $\mu$ L所制备链霉亲和素-HRP溶液添加至各孔中, 并且附着新板盖, 随后在室温下孵育30分钟。再次移除板盖, 丢弃板内含物, 并且将100 $\mu$ L TMB底物溶液添加至各孔中。使反应在室温下在黑暗中显色30分钟, 此后将100 $\mu$ L终止溶液添加至各孔中。对板进行评估。在使反应终止的30分钟内, 在设置在450nm和550nm下的ELISA板读取器上测量吸光度。从450nm值中减去550nm值, 并且相对于从IL-2标准曲线获得的值计算未知样品中的IL-2量。

[0716] 或者, 使用人细胞因子磁性缓冲试剂试剂盒 (Invitrogen, LHB0001M) 以及人IL-2磁性珠粒试剂盒 (Invitrogen, LHC0021M) 和人IFN- $\gamma$  磁性珠粒试剂盒 (Invitrogen, LHC4031M) 进行2路测定。简要来说, 将25 $\mu$ L人IL-2和IFN- $\gamma$  抗体珠粒添加至96孔板的各孔中, 并且使用以下指导方针加以洗涤: 200 $\mu$ L 1x洗涤溶液洗涤2次, 将板置于与磁性96孔板分离器 (Invitrogen, A14179) 接触, 让珠粒沉降1分钟以及将液体倾析。接着, 将50 $\mu$ L孵育缓冲液与100 $\mu$ L复原标准物一起一式两份或与50 $\mu$ L样品 (来自细胞毒性测定的上清液) 和50 $\mu$ L测定稀释剂一起一式三份添加至板的各孔中, 以获得150 $\mu$ L的总体积。采用具有3mm轨道半径的轨道式振荡器, 使样品在室温下在黑暗中以600rpm下混合2小时。遵循相同洗涤指导方针将板洗涤, 并且将100 $\mu$ L人IL-2和IFN- $\gamma$  生物素化检测抗体添加至各孔中。采用具有3mm轨道半径的轨道式振荡器, 使样品在室温下在黑暗中以600rpm下混合1小时。遵循相同洗涤指导方针将板洗涤, 并且将100 $\mu$ L链霉亲和素-R-藻红素添加至各孔中。采用具有3mm轨道半径的轨道式振荡器, 使样品在室温下在黑暗中以600rpm下混合30分钟。使用相同洗涤指导方针将板洗涤3次, 并且在将液体倾析之后, 将样品再混悬于150 $\mu$ L 1x洗涤溶液中。采用具有3mm轨道半径的轨道式振荡器, 使样品在600rpm下混合3分钟, 并且在4 $^{\circ}$ C下储存过夜。之后, 遵循相同洗涤指导方针将板洗涤, 并且将样品再混悬于150 $\mu$ L 1x洗涤溶液中。

[0717] 使用MAGPIX系统 (Luminex) 和xPONENT软件对板进行读取。使用MILLIPLEX Analyst软件进行数据分析, 所述软件提供标准曲线和细胞因子浓度。

[0718] 相对于非转导或对照CAR转导的T细胞, 用NKG2D TFP转导的T细胞在与内源性表达NKG2D的细胞或NKG2D转导的细胞共培养时可产生更高水平的IL-2与IFN- $\gamma$  两者。相比之下, 与NKG2D阴性细胞或非转导细胞共培养可导致少许细胞因子或无细胞因子从TFP转导的T细胞释放。与先前细胞毒性数据一致, 用替代性铰链区构建的NKG2D TFP在与携带NKG2D的靶标细胞共培养后可产生类似结果。

[0719] 与先前细胞毒性数据一致, NKG2D-CD3 $\epsilon$ 和NKG2D-CD3 $\gamma$  可产生TFP构建体的最高IL-2和IFN- $\gamma$  水平。然而, 由用NKG2D-CD3 $\epsilon$ 和NKG2D-CD3 $\gamma$  TFP转导的T细胞达成的细胞因子产生可与表达NKG2D-28 $\zeta$  CAR的T细胞的细胞因子产生类似, 尽管TFP显示高得多的靶标细胞杀灭水平。TFP可比CAR更高效杀灭靶标细胞, 但释放类似或更低水平的促炎性细胞因子的可能性代表TFP相对于CAR的潜在优势, 因为这些细胞因子的水平升高已与继承性CAR-T疗法的剂量限制性毒性相关联。

[0720] 活化的PBMC用50MOI慢病毒连续两天转导, 并且加以扩增。在转导后第8天, 在外加

5% AB血清 (Gemini Bioproducts; 100-318) 的细胞毒性培养基 (无酚红 RPMI 1640 (Invitrogen)) 中在 1:1 E:T 比率 (各细胞类型  $0.2 \times 10^6$ ) 下建立 PBMC 与靶标细胞 (过度表达 NKG2D 的 K562 细胞) 的共培养。过度表达 BCMA 的 K562 细胞用作阴性对照。在 24 小时之后, 如上所述通过 ELISA 来分析细胞的 IFN- $\gamma$  和 IL-2 表达。通过与 NKG2D<sup>+</sup> 细胞而非 NKG2D<sup>-</sup> 细胞共培养, 表达 NKG2D CAR 和 TFP 构建体的 T 细胞被活化, 如由 IFN- $\gamma$  产生与 IL-2 产生两者所证实, 从而进一步证明 NKG2D 表达性细胞能够特异性活化 T 细胞。

[0721] 实施例 13: 通过实时细胞毒性测定获得的细胞毒性: 双特异性 TFP T 细胞

[0722] RTCA 实时测量专门化 96 孔板的各孔中粘附靶标细胞单层的电阻抗, 并且将最终读出数据呈现为称为细胞指数的值。细胞指数的变化指示由于由共同孵育的 T 细胞效应物对靶标细胞的杀灭而使靶标细胞单层破坏。因此, 可将效应 T 细胞的细胞毒性评估为具有靶标细胞与效应 T 细胞两者的孔的细胞指数相较于具有单独靶标细胞的孔的细胞指数的变化。

[0723] 用于这个实施例中的靶标细胞是表达截短 BCMA 的 HeLa 细胞 (HeLa-BCMA<sub>t</sub>, 细胞内结构域被缺失) 或表达截短 CD19 的 HeLa 细胞 (HeLa-CD19<sub>t</sub>, 细胞内结构域被缺失)。编码人 BCMA<sub>t</sub> 或 CD19<sub>t</sub> 的 DNA 由 GeneArt® (Thermo Fisher) 合成, 并且插入携带新霉素作为选择标记的双启动子慢病毒载体 pCDH514B (System Bioscience) 的多克隆位点中, 所述选择标记在 EF1a 启动子的控制下。携带 BCMA<sub>t</sub> 或 CD19<sub>t</sub> 编码载体的慢病毒接着用与以上所述的程序相同的程序加以包装。HeLa 细胞接着用携带 BCMA<sub>t</sub> 或 CD19<sub>t</sub> 构建体的慢病毒转导 24 小时, 接着用 G418 (1mg/mL) 进行选择。由所选 HeLa-BCMA<sub>t</sub> 或 HeLa-CD19<sub>t</sub> 细胞达成的 BCMA<sub>t</sub> 或 CD19<sub>t</sub> 表达通过分别用抗人 BCMA 抗体 (BioLegend, 克隆号 19A2; Miltenyi, 克隆号 REA315) 或抗人 CD19 抗体 (BD Bioscience) 进行 FACS 分析来确认。

[0724] 对于 RTCA, 将靶标细胞 (HeLa-BCMA<sub>t</sub> 或 HeLa-CD19<sub>t</sub>) 在每孔 10,000 个细胞下涂铺在 96 孔聚对苯二甲酸乙二酯 (PET) E-Plate® (ACEA Biosciences, Inc.) 中。为测试双特异性 TFP T 细胞, 使 HeLa-BCMA<sub>t</sub> 和 HeLa-CD19<sub>t</sub> 细胞在 1:1 比率下混合以达到每孔 10,000 个细胞的最终数目。接着将板放置至 xCELLigence® RTCA MP 仪器 (ACEA Biosciences, Inc.) 中, 并且每 15 分钟进行基线测量, 持续 100 次测量。接着将板从仪器移除, 并且将混悬于细胞毒性培养基 (无酚红 RPMI 1640 + 5% AB 血清) 中的效应 T 细胞在 60,000 个细胞下添加至各孔中以达到效应物与靶标比率 6:1。接着将板放回至仪器中。每 2 分钟进行测量, 持续 100 次测量, 接着每 15 分钟进行测量, 持续 1000 次测量。

[0725] 结果显示于图 10 中。图 10 的图例呈现于下表中。

[0726] 表 2. 用于 RTCA 测定中的构建体。



图	迹线编号	靶标细胞	构建体
5A	1	HeLa-CD19	仅靶标
	2		$\alpha$ -BCMA-CD3 $\epsilon$
	3		$\alpha$ -BCMA-CD3 $\gamma$
	4		非转导
	5		空载体
	6		$\alpha$ -CD19-CD3 $\epsilon$ / $\alpha$ -BCMA-CD3 $\gamma$
	7		$\alpha$ -CD19-CD3 $\epsilon$ / $\alpha$ -BCMA-CD3 $\epsilon$
	8		$\alpha$ -CD19-CD3 $\epsilon$ + $\alpha$ -BCMA-CD3 $\gamma$
	9		$\alpha$ -CD19-CD3 $\epsilon$ + $\alpha$ -BCMA-CD3 $\epsilon$
	10		$\alpha$ -CD19-CD3 $\epsilon$
5B	1	HeLa-BCMA	仅靶标
	2		非转导
	3		空载体
	4		$\alpha$ -CD19-CD3 $\epsilon$
	5		$\alpha$ -CD19-CD3 $\epsilon$ + $\alpha$ -BCMA-CD3 $\epsilon$
	6		$\alpha$ -CD19-CD3 $\epsilon$ + $\alpha$ -BCMA-CD3 $\gamma$
	7		$\alpha$ -CD19-CD3 $\epsilon$ / $\alpha$ -BCMA-CD3 $\gamma$
	8		$\alpha$ -CD19-CD3 $\epsilon$ / $\alpha$ -BCMA-CD3 $\epsilon$
	9		$\alpha$ -BCMA-CD3 $\epsilon$
	10		$\alpha$ -BCMA-CD3 $\gamma$
5C	1	HeLa-CD19+HeLa-BCMA ( $\epsilon$ $\epsilon$ )	仅靶标
	2		非转导
	3		空载体
	4		$\alpha$ -CD19-CD3 $\epsilon$
	5		$\alpha$ -BCMA-CD3 $\epsilon$
	6		$\alpha$ -CD19-CD3 $\epsilon$ / $\alpha$ -BCMA-CD3 $\epsilon$
	7		$\alpha$ -CD19-CD3 $\epsilon$ + $\alpha$ -BCMA-CD3 $\epsilon$
5D	1	HeLa-CD19+HeLa-BCMA ( $\epsilon$ $\gamma$ )	仅靶标
	2		非转导
	3		空载体
	4		$\alpha$ -CD19-CD3 $\epsilon$
	5		$\alpha$ -BCMA-CD3 $\gamma$
	6		$\alpha$ -CD19-CD3 $\epsilon$ / $\alpha$ -BCMA-CD3 $\gamma$
	7		$\alpha$ -CD19-CD3 $\epsilon$ + $\alpha$ -BCMA-CD3 $\gamma$

[0728] 在表中在右手列中，“/”是指用采用两种病毒转导的T细胞群体进行的测定，一种病毒具有抗BCMA TFP，并且一种病毒具有抗CD19 TFP；“+”是指使用已加以组合的两种T细胞群体，一种T细胞群体用抗BCMA TFP转导，并且一种T细胞群体用抗CD19 TFP转导。

[0729] 图10A显示CD19表达性HeLa细胞，并且显示相比于在单独抗BCMA TFP T细胞的情况下的细胞，构成抗BCMA和抗CD19 TFP T细胞的双重构建体更好和更快杀灭细胞。单特异



性抗CD19 TFP对照与双特异性TFP T细胞具有类似活性。

[0730] 图10B显示BCMA表达性HeLa细胞,并且显示相比于在单独抗CD19 TFP T细胞的情况下的细胞,构成抗BCMA和抗CD19 TFP T细胞的双重构建体更好和更快杀灭细胞。单特异性抗BCMA TFP对照与双特异性TFP T细胞具有类似活性。

[0731] 图10C显示BCMA和CD19表达性HeLa细胞,并且相较于单特异性TFP来衡量“εε”双特异性构建体的能力。如所示,相比于任一单独单特异性TFP T细胞群体,双特异性TFP T细胞,无论是用两种病毒转导还是两种混合T细胞群体,都具有显著更大活性。

[0732] 图10D显示BCMA和CD19表达性HeLa细胞,并且相较于单特异性TFP来衡量“εγ”双特异性构建体的能力。如所示,相比于任一单独单特异性TFP T细胞群体,双特异性TFP T细胞,无论是用两种病毒转导还是两种混合T细胞群体,都具有显著更大活性。

[0733] 实施例14:通过流式细胞计量术获得的CD107a暴露

[0734] 关于T细胞活化的另一测定是CD107a的表面表达,所述CD107a是一种位于静息细胞中细胞质细胞溶解颗粒的膜中的溶酶体相关膜蛋白(LAMP-1)。作为细胞溶解活性的先决条件的效应T细胞脱粒导致在活化诱导的颗粒胞外分泌之后CD107a向细胞表面移动。因此,除细胞因子产生之外,CD107a暴露提供T细胞活化的与细胞毒性密切相关的另一量度。

[0735] 将靶标细胞和效应细胞分别洗涤,并且再混悬于细胞毒性培养基(RPMI+5%人AB血清+1%抗生素抗霉菌素)中。通过使 $2 \times 10^5$ 个效应细胞与 $2 \times 10^5$ 个靶标细胞以100μL最终体积在0.5μL/孔的PE/Cy7标记的抗人CD107a(LAMP-1)抗体(克隆H4A3,BD Biosciences)存在下在U形底96孔板(Corning)中组合来进行测定。接着在37℃、5%CO<sub>2</sub>下孵育培养物1小时。在这个孵育之后立刻,将10μL 1:10稀释的分泌抑制剂莫能菌素(monensin)(1000x溶液,BD GolgiStop™)在不搅扰细胞的情况下小心添加至各孔中。接着在37℃、5%CO<sub>2</sub>下将板再孵育2.5小时。在这个孵育之后,将细胞用APC抗人CD3抗体(克隆UCHT1,BD Biosciences)、PerCP/Cy5.5抗人CD8抗体(克隆SK1,BD Biosciences)和太平洋蓝抗人CD4抗体(克隆RPA-T4,BD Biosciences)染色,接着在37℃、5%CO<sub>2</sub>下孵育30分钟。细胞接着用FACS缓冲液洗涤2次,并且再混悬于100μL FACS缓冲液和100ul IC固定缓冲液中,随后进行分析。

[0736] T细胞的表面上的CD107a暴露通过流式细胞计量术来检测。用LSRFortessa™ X20(BD Biosciences)进行流式细胞计量术,并且使用FlowJo软件(Treestar, Inc. Ashland, OR)对流式细胞计量数据进行分析。测定在各效应细胞/靶标细胞培养的情况下,CD3门内的呈CD107<sup>+</sup>的CD8<sup>+</sup>效应细胞的百分比。

[0737] 与先前细胞毒性和细胞因子数据一致,相对于效应物与肿瘤相关抗原阴性靶标细胞一起孵育,肿瘤相关抗原表达性靶标细胞与用抗肿瘤相关抗原-28ζCAR转导的效应T细胞共培养可诱导表面CD107a表达增加。相比较来说,在相同条件下,抗肿瘤相关抗原-CD3ε LL或抗肿瘤相关抗原-CD3γ LL TFP表达性效应物可展现5至7倍CD107a表达诱导。用替代性铰链区构建的抗肿瘤相关抗原TFP在与携带肿瘤相关抗原的靶标细胞共培养后可产生类似结果。

[0738] 实施例15:体内小鼠功效研究

[0739] 为评估用抗肿瘤相关抗原TFP转导的效应T细胞在体内实现抗肿瘤应答的能力,将用抗肿瘤相关抗原-28ζ CAR、抗肿瘤相关抗原-CD3ε LL TFP或抗肿瘤相关抗原-CD3γ LL TFP转导的效应T细胞继承性地转移至先前已用肿瘤相关抗原<sup>+</sup>人癌细胞系接种的NOD/SCI

D/IL-2R  $\gamma$   $-/-$  (NSG-JAX) 小鼠中。

[0740] 在开始研究之前至少6周龄的雌性NOD/SCID/IL-2R  $\gamma$   $-/-$  (NSG-JAX) 小鼠从The Jackson Laboratory (库存品编号005557) 获得,并且在实验使用之前驯化3天。用于接种的人肿瘤相关抗原表达性细胞系以对数期培养加以维持,随后收集以及用台盼蓝 (trypan blue) 计数以测定活细胞计数。在肿瘤激发的当天,将细胞在300g下离心5分钟,并且在 $0.5-1 \times 10^6$ 个细胞/100 $\mu$ L下再混悬于预升温无菌PBS中。制备用于继承性转移的非转导或用抗肿瘤相关抗原-28 $\zeta$  CAR、抗肿瘤相关抗原-CD3 $\epsilon$  LL TFP或抗CD3  $\gamma$  LL TFP构建体转导的T细胞。在研究的第0天,每个实验组10个动物用 $0.5-1 \times 10^6$ 个肿瘤相关抗原表达性细胞在静脉内激发。3天后,将 $5 \times 10^6$ 个效应T细胞的群体于100 $\mu$ L无菌PBS中在静脉内转移至各动物中。每日记录对动物的详细临床观察直至安乐死。每周对所有动物进行体重测量直至死亡或安乐死。在继承性转移测试物品和对照物品之后35天使所有动物安乐死。在研究期间看起来濒死的任何动物都根据研究指导者的判断在与兽医商议的情况下加以安乐死。

[0741] 相对于非转导T细胞,继承性转移用抗肿瘤相关抗原-28 $\zeta$  CAR、抗肿瘤相关抗原-CD3 $\epsilon$  LL TFP或抗肿瘤相关抗原-CD3  $\gamma$  LL TFP转导的T细胞可延长携带间皮素表达性细胞系肿瘤的小鼠的存活,并且可指示抗肿瘤相关抗原CAR转导的T细胞与抗肿瘤相关抗原TFP转导的T细胞两者均能够在这些小鼠模型中介导靶标细胞杀灭,伴有相应存活增加。总之,这些数据可指示TFP代表一种用于工程改造嵌合受体的替代性平台,其在体外与在体内均显示比第一代CAR优越的抗原特异性杀灭。

[0742] 实施例16:CD16 TFP在肿瘤细胞抗原和抗肿瘤抗原抗体存在下诱导肿瘤细胞溶解和细胞因子产生

[0743] 使荧光素酶标记的Raji细胞(已用萤火虫荧光素酶稳定转导的Raji-FFLuc肿瘤细胞)与CD16 TFP T细胞在1:10比率下组合,例如5000个肿瘤细胞+50,000个TFP T细胞。在1 $\mu$ g/ml下添加利妥昔单抗或非糖基化利妥昔单抗,并且在37 $^{\circ}$ C下孵育细胞和抗体的组合24小时。将细胞旋转,并且收集上清液和集结块。将集结块再混悬,并且与虫荧光素底物一起孵育并在SpectraMax<sup>®</sup>板读取器上读取。荧光素酶信号与溶解等同,因为荧光素酶可仅从经溶解细胞获得。

[0744] 图11显示相较于无抗体对照,用采用各种构建体转导的T细胞进行的这个测定的结果。使Raji细胞与利妥昔单抗和以下T细胞一起孵育:单独培养基(无抗体,白色棒条)、作为阴性对照的不具有T细胞的Raji细胞、作为阴性对照的非转导T细胞、CD16-CD3 $\epsilon$  TFP、CD16-CD3  $\gamma$  TFP、CD16-CD3 $\delta$  TFP、CD16-CD3 $\beta$  TFP、CD16-CD28 $\zeta$  CAR、CD16-41BB $\zeta$  CAR以及作为阳性对照的具有已知活性的抗CD19-CD3 $\epsilon$  TFP。如可在图11A中所见,TFP和CAR全都能够不同程度上诱导靶标细胞群体溶解。阴性对照具有最小溶解,如果有的话。CD16-CD3 $\epsilon$  TFP和CD16-CD3  $\gamma$  是最强力的CD16 TFP。在“无抗体”对照组(白色棒条)中,阳性对照抗CD19 TFP诱导溶解,因为这个TFP直接结合靶标细胞。

[0745] 图11B显示相同但用非糖基化利妥昔单抗抗体进行的测定。如所预期,因为CD16将不结合非糖基化形式,所以除在独立于利妥昔单抗来起作用的抗CD19 TFP阳性对照的情况下以外,在任何T细胞构建体的情况下都检测到极其少许细胞溶解。

[0746] 根据以上方法收集的上清液在Luminex<sup>®</sup>ELISA测定中用于检测和定量IFN  $\gamma$  和IL-2的量。如图12A (IFN  $\gamma$ ) 和图12B (IL-2) 中所示,TFP T细胞相比于它们的CAR T细胞对应

物诱导低得多的细胞因子浓度,从而使得它们作为治疗剂具有吸引力,因为过量细胞因子产生会在患者中诱导不合需要的副作用。

[0747] 实施例17:NKG2D<sup>+</sup>TFP T细胞针对多种恶性肿瘤的体外和体内功效

[0748] 制备来自正常供者的NKG2D<sup>ε</sup> TFP T细胞以测试NKG2D<sup>ε</sup> TFP T细胞针对表达NKG2D配体的多种实体肿瘤细胞系的体外和体内抗肿瘤功效。纯化正常供者CD4和CD8T细胞通过prodigy来收集,并且NKG2D<sup>ε</sup> TFP T细胞在DynaBeads+IL-2或TransAct+IL-7/15条件存在下进行离体扩增和转导10天。体外和体内抗肿瘤活性使用多种NKG2D配体表达性肿瘤细胞系来分析。慢病毒载体和慢病毒如以上实施例中所述加以制备。

[0749] NKG2D单体或二聚体CD3<sup>ε</sup> TFP T细胞制备

[0750] 在第0天将来自ND13 (HemaCare, 供者ID:W313716040891) 或ND15 (HemaCare, 供者ID:W313717041459) 的冷冻CD4<sup>+</sup>或CD8<sup>+</sup>T细胞再混悬于补充以5%人AB血清 (Gemini Products, 100-318)、300IU/mL rhIL-2 (Peprotech, 200-02) 和1%抗生素 (Invitrogen, 批号1734036) 的T细胞扩增培养基 (AIM-V®+AlbuMAX® (BSA) (1×) (Gibco, 31035-025) 中,或具有3%人AB血清 (Gemini Products, 100-318)、12.5ng/mL IL-7 (Miltenyi, 目录号130-095-363) 和12.5ng/mL IL-15 (Miltenyi, 目录号130-095-765) 以及1%抗生素 (Invitrogen) 的Tex MACS™培养基 (Miltenyi, 批号5151126094) 中。对于在Dynabeads+IL-2条件下活化的T细胞, Dynabeads人T细胞活化剂CD3/CD28 (Gibco, 00415447, 批号1785079) 用无菌1×PBS洗涤三次。接着通过将50μL (1×10<sup>6</sup>个珠粒) 珠粒混悬液转移至1mL T细胞混悬液 (1×10<sup>6</sup>个细胞/毫升) 中来将珠粒在1:1比率下添加至T细胞中。接着将1mL珠粒/细胞混合物分配至48孔板的单孔中, 并且在37℃下在5%CO<sub>2</sub>下孵育。对于在TransAct+IL-7/15条件下活化的T细胞, 通过将40μL (1×10<sup>6</sup>个珠粒) 珠粒混悬液转移至1mL T细胞混悬液 (1×10<sup>6</sup>个细胞/毫升) 中来将珠粒在1:1比率下直接添加至T细胞中。在第1天在指示的MOI下进行慢病毒转导, 未添加慢病毒的T细胞充当未转导组 (NT)。将板在不搅扰孔中的细胞的情况下放回至37℃孵育器中。在补充以300IU/mL rhIL-2的T细胞扩增培养基或补充以12.5ng/mL IL-7和12.5ng/mL IL-15的TexMACS™中维持经转导T细胞。每48小时对经转导T细胞进行亚培养以达到5×10<sup>5</sup>个细胞/毫升的浓度。在活化后第10天, 对SD1 (抗间皮素) CD3a TFP T细胞和未转导T细胞进行计数, 分析表型, 并且冷冻在液氮中以用于进一步分析。

[0751] 肿瘤细胞

[0752] MSLN<sup>+</sup>细胞系MST0-211H (ATCC®CRL-2081™) 从ATCC获得。高MSLN表达性细胞系MST0-211H-FL MSLN通过用编码全长MSLN的慢病毒载体稳定转导MST0-211H (ATCC, CRL-2081™) 来产生。OVCAR3 (ATCC HTB-161™)、SaOS2 (ATCC HTB-85™)、SKOV3 (ATCC HTB-77™)、A549 (ATCC-CCL 185™)、A431 (ATCC CRL-1555™)、U373 (ATCC HTB-17™)、PC-3 (ATCC CRL-1435™)。荧光素酶表达性细胞系通过用编码萤火虫荧光素酶的慢病毒载体转导细胞来产生。在转导之后, 稳定表达物通过添加嘌呤霉素 (5μg/mL) 或G418 (5mg/mL) 来选择。所有细胞系以及它们的衍生物都在由ATCC推荐的培养基中维持。

[0753] 基于FACS的转导效率和T细胞活化测定

[0754] 对于更多细节, 参照SOP 005T细胞表型染色图版概略。简要说, 将T细胞去除珠粒 (如果在Dynabeads+IL-2条件下扩增), 并且用PBS洗涤2次, 随后用可固定live/dead aqua (在用PBS进行1:1000稀释下) 染色。在用PBS洗涤2次之后, 将细胞集结块再混悬于100μ

L抗体染色混合物中,用以下抗体在100μL/样品的FACS缓冲液中制备抗体染色混合物:人Fc阻断物(1μL/样品)、CD4-太平洋蓝(Biolegend,目录号300521,批号B231611,1μL/样品)、CD8-PerC Pcy5.5(Biolegend,目录号344710,批号B226362,1μL/样品)、NKG2D-APC(R&D,目录号:FAB139A,批号LC00613121,1μL/样品)、ULBP1-APC(R&D,目录号:FAB139A,批号LC00613121,1μL/样品)。ULBP2/5/6-PE(R&D,FAB1298P,批号LWE0716091,1μL/样品)、ULBP4-APC(R&D,目录号:FAB6285A,批号ADX00117041,1μL/样品)、MICA/B-AF488(ebioscience,目录号:53-5788-42,批号:E10683-1633,1μL/样品)。用匹配同种型对照抗体(1μL/样品)制备同种型对照混合物。在4℃下在黑暗中孵育至少30分钟。在室温下在600×g下离心2分钟,丢弃上清液,并且将细胞集结块再混悬于200μL FACS缓冲液中。重复洗涤2次,并且在BD LSR Fortessa X-20细胞分析器上操作样品。

[0755] 肿瘤细胞溶解-荧光素酶报道体(Luc)测定

[0756] 作为质量控制,在Luc测定当天,确认靶标细胞上的NKG2D配体表达,并且NKG2D单体或二聚体εTFP T细胞的表达通过流式细胞计量术来确认。在R10培养基中制备单一靶标细胞混悬液。将处于100μL的 $1 \times 10^4$ 个细胞添加至96孔圆底板中。将TFP T细胞解冻,去除珠粒(如果在Dynabeads+IL-2条件下离体扩增),洗涤,接着再混悬于无细胞因子的T细胞培养基中。添加所需数目的T细胞(以100μL)以分别达到在5:1、1:1和1:5下的效应物与靶标比率。对于各类型的T细胞,准备了在测试比率下的三个重复实验。接着在37℃下在5%CO<sub>2</sub>下培养细胞24小时。在24小时共培养之后,将板在300×g下离心2分钟以使细胞集结。小心移除100μL来自各孔的培养上清液以进行Luminex®测定。将100μL来自Bright-Glo™荧光素酶测定系统(Promega,E2650,批号0000223852)的测定缓冲液添加至各孔中。通过温和上下吸移来混合各孔中的内含物。使细胞-试剂混合物在室温下在黑暗中留置3分钟以达成细胞的完全溶解。将200μL来自各孔的细胞溶解产物转移至Greiner-One白壁96孔板中。通过SpectraMax®M5板读取器(Molecular Devices)来以相对发光单位(RLU)测量发光。

[0757] 肿瘤溶解百分比(%)由以下列出的公式计算:

$$[0758] \quad \text{肿瘤溶解}\% = 100 * \left[ 1 - \frac{\text{发光(肿瘤+T细胞)}}{\text{发光(肿瘤)}} \right]$$

[0759] 用MSTO-FL MSLN获得的皮下异种移植物小鼠模型和体内评估

[0760] 在Abpro(Woburn,MA)实现小鼠模型。雌性6周龄NSG小鼠(The Jackson Laboratory,库存品编号005557)在与用于以下ND研究的条件相同的条件下驯化最少3天。将MSTO-211H-FLMSLN-Luc细胞在 $1 \times 10^6$ 个细胞/100μL的浓度下混悬于无菌PBS中。接着使PBS细胞混悬液与冰冷Matrigel®以1:1混合以获得用于各小鼠的最终注射体积200μL。使所得PBS/Matrigel细胞混悬液保持在冰上直至在小鼠的背部后侧腹中进行皮下施用。将肿瘤生长以测径规测量来监测为肿瘤体积。将肿瘤的体积计算为:

[0761] 肿瘤体积 =  $1/2 \times (\text{长度} \times \text{宽度}^2)$

[0762] 在肿瘤细胞注射之后13天,根据肿瘤体积(200~300mm<sup>3</sup>)将动物随机化,并且分成3组以接受在dynabeads+IL-2条件下离体扩增的来自ND13的NKG2D二聚体εTFP T细胞的注射。T细胞注射日被视为研究的第0天。在无菌PBS中在 $1 \times 10^6$ 或 $5 \times 10^6$ 个细胞/100μL的浓度下分别在第0天和第20天两次制备T细胞。接着将细胞混悬液通过尾部静脉来在静脉内注射

至小鼠中。

[0763] 在以TransAct+IL-7/15条件进行NKG2D二聚体CD3 $\epsilon$  TFP T细胞离体扩增期间以及在抗原啮合期间的CD4和CD8比率、NKG2D配体表达

[0764] 对于使用TransAct+IL-7/15条件产生的NKG2D二聚体CD3 $\epsilon$  TFP T细胞,在扩增后第3、6、8、10天对细胞计数,并且进行CD3、CD4、CD8和NKG2D配体(NKG2DL)染色。对于在抗原啮合后的NKG2D配体表达,使EGFRvIII TFP T细胞和K562亲本或K562-EGFRvIII细胞在1:1比率下共培养24小时。NKG2D配体表达接着通过流式细胞计量术来测量,并且通过关于CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞进行门控来分析。

[0765] 在Dynabeads+IL-2条件下NKG2D单体和二聚体 $\epsilon$ TFP<sup>TM</sup> T细胞的离体扩增

[0766] NKG2D配体特异性TFP T细胞用编码处于相反顺序的NKG2D细胞外结构域(ECD)以及TFP的CD3 $\epsilon$ 形式的慢病毒制备,因为NKG2D在细胞表面上二聚化,所以产生单体融合物和二聚体融合物,NKG2D单体和二聚体CD3 $\epsilon$  TFP结构和质粒设计在以上显示于图5中。用于采用Dynabeads+IL-2条件进行离体扩增的实验计划显示于图13A中。ND13(W313716040891,来自HemaCare<sup>TM</sup>, Van Nuys, CA)用于产生NKG2D单体CD3 $\epsilon$  TFP T细胞与NKG2D二聚体CD3 $\epsilon$  TFP T细胞两者。在扩增的第10天通过关于NKG2D在CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>群体上的存在性进行表面染色来测定NKG2D单体和二聚体 $\epsilon$  TFP的转导效率(图13B)。NKG2D单体的转导效率是约18%,并且二聚体的转导效率是约78%。相较于NKG2D单体CD3 $\epsilon$  TFP, NKG2D二聚体CD3 $\epsilon$  TFP显示更高转导效率。

[0767] NKG2D单体或二聚体CD3 $\epsilon$  TFP细胞的体外功效使用荧光素酶报道体肿瘤细胞溶解测定来测试。确认MST0-211H-FLMSLN-Luc(间皮瘤/卵巢/胰腺/肺癌)、OVCAR3-Luc和SKOV3-Luc(卵巢癌)、SaOS2(骨肉瘤)细胞系上的配体表达(ULBP-1、ULBP2/5/6、ULBP-3、ULBP-4、MICA/B)(图14A),在测定当天确认A549-Luc(1肺癌)、A431(皮肤癌)、U373(胶质母细胞瘤)和PC-3(前列腺癌)细胞系上的ULBP2/5/6和MICA/B(图14C),NKG2D单体CD3 $\epsilon$  TFP T细胞与NKG2D二聚体CD3 $\epsilon$  TFP T细胞两者均显示不同水平的肿瘤杀灭。当在5:1效应物与靶标比率下与所有细胞系共培养时都观察到NKG2D二聚体CD3 $\epsilon$  TFP T细胞达成的强力肿瘤细胞溶解,NKG2D二聚体CD3 $\epsilon$  TFP T细胞当在1:1效应物与靶标比率下与所有细胞系共培养时或NKG2D单体CD3 $\epsilon$  TFP T细胞当在5:1效应物与靶标比率下与所有细胞系共培养时都显示在24小时之后30-50%的杀灭。对于两种NT T细胞,在与那些细胞系共培养时均未观察到肿瘤溶解(图14B和图14C)。

[0768] NKG2D二聚体 $\epsilon$  TFP T细胞在异种移植配体表达性肿瘤小鼠模型中的体内功效

[0769] MST0-211H-FLMSLN-Luc用于皮下建立异种移植NKG2D配体表达性肿瘤小鼠模型,一周两次测量肿瘤体积。分别在注射当天进行肿瘤上靶标表达和T细胞上TFP表达的QC(图15A和图15B)。在肿瘤注射后第13天,平均肿瘤体积达到200-300mm<sup>3</sup>。在第10天,使Dynabeads+IL-2扩增的来自ND13(W313716040891,来自Hema Care<sup>TM</sup>, Van Nuys, CA)的NKG2D二聚体 $\epsilon$  TFP T细胞解冻,并且确认转导效率。在第0天和第20天两次将每只小鼠1x 10<sup>6</sup>或5x 10<sup>6</sup>个NKG2D二聚体 $\epsilon$  TFP T细胞或匹配未转导T细胞进行静脉内注射,并且此后监测肿瘤体积。历经42天观察,用NKG2D二聚体 $\epsilon$  TFP T细胞在5x10<sup>6</sup>个细胞的剂量下进行治疗显示部分保护作用。10只小鼠中的4只清除了肿瘤,并且保持无肿瘤直至第42天;10只小鼠中的1只保持约100mm<sup>3</sup>的肿瘤体积。在用NT细胞治疗的小鼠与用5x 10<sup>6</sup>个NKG2D二聚体 $\epsilon$  TFP T

细胞治疗的小鼠之间显示显著存活差异。用NKG2D二聚体 $\epsilon$  TFP在 $1 \times 10^6$ 的剂量下进行的治  
疗不可控制肿瘤生长。(图15C和图15D)。

[0770] 尽管本文已显示和描述本发明的优选实施方案,但将对本领域技术人员明显的是  
所述实施方案仅通过举例方式来提供。在不脱离本发明下,众多改变、变化和替代现将为本  
领域技术人员所想到。应了解本文所述的本发明的实施方案的各种替代方案可用于实施本  
发明。意图以下权利要求限定本发明的范围,并且在这些权利要求的范围内的方法和结构  
以及它们的等效物由所述权利要求涵盖。

[0771] 附录A:序列概述

[0772]

SEQ ID N O.	名称	序列
1	短接头 1	GGGGS GGGGS GGGGSLE
2	短接头 2	AAAGGGGS GGGGS GGGGSLE
3	长接头	AAAIEVMYPPPYLGGGGS GGGGS GGGGSLE
4	人 CD3- $\epsilon$	MQSGTHWRVLGLCLLSVGWVGQDGNEEMGGITQTPYKVS ISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDH LSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENC MEMDVMSVATIVIVDICITGGLLLL VYYWSKNRKAKAKPV TRGAGAGGRQRGQNKERPPPVPNPDYEPKRGQRDLYSGL NQRRI
5	人 CD3- $\gamma$	MEQGKGLAVLILAILLQGTLAQSIKGNHLVKVYDYQEDGS VLLTCDAEAKNITWFKDGKMIGFLTEDKKKWNLSNAKD PRGMYQCKGSQNKSKPLQVYYRMCQNCIELNAATISGFLF AEIVSIFVLAVGVYFIAGQDGVQRASDKQTLLPNDQLYQ PLKDREDDQYSHLQGNQLRRN
6	人 CD3- $\delta$	MEHSTFLSGLVLATLLSQVSPFKIPIEELED RVFVNCNTSIT WVEGT VGTLLSDITRLDLGKRILDP RGIYRCNGTDIYKDKE STVQVHYRMCQSCVELDPATVAGIIVTDVIATLLALGVFC FAGHETGRLSGAADTQALLRNDQVYQPLRDRDDAQYSHL GGNWARNKS
7	人 CD3- $\zeta$	MKWKALFTAAILQAQLPITEAQSFGLLDPKLCYLLDGILFIY GVILTALFLRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREE YDVLDKRRGRDP EMGGKPQRRKNPQEGLYNELQKDKMA EAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ ALPPR
8	人 TCR $\alpha$ 链	MAGTWLLLLLALGCPALPTGVGGTPFP SLAPPIMLLVDGK QQMVVVCLVLDVAPPGLDSPIWF SAGNGSALDAFTYGPSP ATDGTWTNLAHLSLPSEELASWEPLVCHTGPGAEGHSRST QPMHLSGEASTARTCPQEPLRGTPGGALWLGVLRLLLFKL LLFDLLLTC SCLCDPAGPLPSPATTTRLRALGSHRLHPATET GGREATSSPRPQPRDRRWGDTPPGRKPGSPVWGE GSYLSS YPTCPAQAWCSRSALRAPSSSLGAFFAGDLPPPLQAGA
9	人 TCR $\alpha$ 链 C 区	PNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDS DVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNN SIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNL SVIGFRIL LLKVAGFNLLMTLRLWSS
10	人 TCR $\alpha$ 链 V 区 CTL-L17	MAMLLGASVLILWLQPDWVNSQQKNDDQQVKQNSPSLSV QEGRISILNCDYTNSMFDYFLWYKKYPAEGPTFLISSIKD KNEDGRFTVFLNKS AKHLSLHIVPSQPGDSAVYFCAAKGA GTASKLTFGTGTRLQVTL



[0773]

11	人 TCR $\beta$ 链 C 区	EDLNKVFPPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHV ELSWVWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLR VSATFWQNPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQI VSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYA VLVSALVLMAMVKRKDF
12	人 TCR $\beta$ 链 V 区 C TL-L17	MGTSLLCWMALCCLLGADHADTGVSQNPRHNITKRGQNVT FRCDPISEHNRLYWYRQTLGQGPEFLTYFQNEAQLEKSRL SDRFS AERP KGSFSTLEIQRTEQGDSAMYL CASSLAGLNQP QHFGDGTRLSIL
13	人 TCR $\beta$ 链 V 区 Y T35	MDSWTFCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMGQEVTL RCKPISGHNSLFWYRQTM MRGLELLIYFNNNPIDDSGMPE DRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCASSFSTCSANYG YTFGSGTRLTVV
14	NKG2D II 型整合 膜蛋白 U niProt 登 录号 P26 718-1	MGWIRGRRSRHSWEMSEFHNYNLDLKKSDFSTRWQKQRC PVVKS KCRENASPFFFCFIAVAMGIRFIIMVAIWSAVFLNS LFNQEVQIPLTESYCGPCPKNWICYKNNCYQFFDESKN WY ESQASCMSQNASLLKVYSKEDQDLLKLVKSYHWMGLVHI PTNGSWQWEDGSILSPNLLTIEMQKGDALYASSFKGYIE NCSTPNTYICMQRTV
15	p502_NK G2D_CD 3 $\epsilon$ 细胞外 结构域二 聚体(EC D)	NSLFNQEVQIPLTESYCGPCPKNWICYKNNCYQFFDESKN WY ESQASCMSQNASLLKVYSKEDQDLLKLVKSYHWMGL VHIPTNGSWQWEDGSILSPNLLTIEMQKGDALYASSFKG YIENCSTPNTYICMQRTVGGGGSGGGGSGGGGSLNSLFN QEVQIPLTESYCGPCPKNWICYKNNCYQFFDESKN WY ESQASCMSQNASLLKVYSKEDQDLLKLVKSYHWMGLVHIPTN GSWQWEDGSILSPNLLTIEMQKGDALYASSFKGYIENC STPNTYICMQRTVAAAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGLEDGNEEMG GITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDED DKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMEMDMVMS
16	p502_NK G2D_CD 3 $\epsilon$ ORF, 二聚体 (氨基酸 序列)	NSLFNQEVQIPLTESYCGPCPKNWICYKNNCYQFFDESKN WY ESQASCMSQNASLLKVYSKEDQDLLKLVKSYHWMGL VHIPTNGSWQWEDGSILSPNLLTIEMQKGDALYASSFKG YIENCSTPNTYICMQRTVGGGGSGGGGSGGGGSLNSLFN QEVQIPLTESYCGPCPKNWICYKNNCYQFFDESKN WY ESQASCMSQNASLLKVYSKEDQDLLKLVKSYHWMGLVHIPTN GSWQWEDGSILSPNLLTIEMQKGDALYASSFKGYIENC STPNTYICMQRTVAAAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGLEDGNEEMG GITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDED DKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMEMDMVMSVATIVIVDITGGLLLL VYYWS KNRKAKAKPVTRGAGAGGRQRGQNKERPPVPNPDPYEP IRKGQRDLYSGLNQRRRI*
17	p502 NK G2D 单体 DNA 序	ACGCGTGTAGTCTTATGCAATACTCTGTAGTCTTGCAAC ATGGTAACGATGAGTTAGCAACATGCCTTACAAGGAGA GAAAAAGCACC GTGCATGCCGATTGGTGGAAGTAAGGT GGTACGATCGTGCCTTATTAGGAAGGCAACAGACGGGTC TGACATGGATTGGACGAACCACTGAATTGCCGCATTGCA

[0774]

列	GAGATATTGTATTTAAGTGCCTAGCTCGATACATAAACG GGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCT CTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAA GCTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCCGTCTGT GTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTA GTCAGTGTGGAATACTCTAGCAGTGGCGCCCGAACAG GGACTTGAAAGCGAAAGGGAAACCAGAGGAGCTCTCTC GACGCAGGACTCGGCTTGCTGAAGCGCGCACGGCAAGA GGCGAGGGGGCGGCGACTGGTGAGTACGCCAAAAATTTT GACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGAGAGATGGGTGCGAGA GCGTCAGTATTAAGCGGGGGAGAATTAGATCGCGATGG GAAAAAATTCGGTTAAGGCCAGGGGGAAAGAAAAAATA TAAATTAACATATAGTATGGGCAAGCAGGGAGCTAG AACGATTCGCAGTTAATCCTGGCCTGTTAGAAACATCAG AAGGCTGTAGACAAATACTGGGACAGCTACAACCATCC CTTCAGACAGGATCAGAAGAACTTAGATCATTATATAAT ACAGTAGCAACCCTCTATTGTGTGCATCAAAGGATAGAG ATAAAAGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAGATAGAGGA AGAGCAAAACAAAAGTAAGACCACCGCACAGCAAGCGG CCACTGATCTTCAGACCTGGAGGAGGAGATATGAGGGA CAATTGGAGAAGTGAATTATATAAATATAAAGTAGTAAA AATTGAACCATTAGGAGTAGCACCCACCAAGGCAAAGA GAAGAGTGGTGCAGAGAGAAAAAAGAGCAGTGGGAATA GGAGCTTTGTTCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGC ACTATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGGC CAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAGCAGCAGAACAA TTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCA ACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAA TCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCC TGGGGATTTGGGGTTGCTCTGGAAAACCTATTTGCACCA CTGCTGTGCCTTGGAATGCTAGTTGGAGTAATAAATCTC TGGAACAGATTTGGAATCACACGACCTGGATGGAGTGG GACAGAGAAATTAACAATTACACAAGCTTAATACACTCC TTAATTGAAGAATCGCAAAACCAGCAAGAAAAAGAAATGA ACAAGAATTATTGGAATTAGATAAATGGGCAAGTTTGTG GAATTGGTTTAACATAACAAATTGGCTGTGGTATATAAA ATTATTCATAATGATAGTAGGAGGCTTGGTAGGTTTAAG AATAGTTTTTGCTGTACTTTCTATAGTGAATAGAGTTAGG CAGGGATATTCACCATTCGTTTCAGACCCACCTCCCA ACCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCCGAAGGAATAGAAGA AGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAGACAGATCCATTCGAT TAGTGAACGGATCTCGACGGTATCGGTTAACTTTTAAAA GAAAAGGGGGGATTGGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGA ATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAACTAAAGA ATTACAAAAACAAATTACAAAATTCAAAATTTTATCGAT ACTAGTGGATCTGCGATCGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGG CAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGG GGAGGGGTCGGCAATTGAACGGGTGCCTAGAGAAGGTG GCGCGGGGTAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCT CCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAG
---	---



[0775]

TGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTTCGCAACGGGTTT  
GCCGCCAGAACACAGCTGAAGCTTCGAGGGGCTCGCAT  
CTCTCCTTCACGCGCCCGCCGCCCTACCTGAGGCCGCCA  
TCCACGCCGGTTGAGTCGCGTTCTGCCGCTCCCGCCTGT  
GGTGCCTCCTGAACTGCGTCCGCCGTCTAGGTAAGTTTA  
AAGCTCAGGTCGAGACCGGGCCTTTGTCCGGCGCTCCCT  
TGGAGCCTACCTAGACTCAGCCGGCTCTCCACGCTTTGC  
CTGACCCTGCTTGCTCAACTCTACGTCTTTGTTTCGTTTT  
CTGTTCTGCGCCGTTACAGATCCAAGCTGTGACCGGCGC  
CTACTCTAGAGCCGCCACCATGCTTCTCCTGGTGACAAG  
CCTTCTGCTCTGTGAGTTACCACACCCAGCATTCCTCCTG  
ATCCCAAACCTCCCTCTTCAACCAGGAGGTGCAGATCCCC  
CTCACAGAGAGCTACTGCGGGCCCTGTCCAAAGAATTGG  
ATATGTTACAAGAACAATTGCTACCAGTTCTTCGATGAG  
TCAAAAAATTGGTATGAGAGCCAAGCTTCCTGCATGTCT  
CAGAATGCCAGCCTTCTGAAGGTGTACTCAAAGAAGA  
CCAGGACTTGCTGAAACTGGTCAAGTCTTACCACTGGAT  
GGGGCTCGTGACATTCCAACGAACGGTAGCTGGCAGTG  
GGAAGATGGCTCCATATTGTCTCCTAACCTTCTCACCAT  
AATAGAGATGCAGAAGGGTGATTGCGCTCTGTACGCTAG  
TAGCTTCAAGGGCTATATTGAGAATTGTAGTACACCCAA  
CACATACATTTGTATGCAGAGAACCGTGGGAGGTGGTGG  
CAGCGGTGGCGGTGGAAGTGGTGGCGGCGGTTCTCTCGA  
GGATGGTAATGAAGAAATGGGTGGTATTACACAGACAC  
CATATAAAGTCTCCATCTCTGGAACCACAGTAATATTGA  
CATGCCCTCAGTATCCTGGATCTGAAATACTATGGCAAC  
ACAATGATAAAAAACATAGGCGGTGATGAGGATGATAAA  
AACATAGGCAGTGATGAGGATCACCTGTCACTGAAGGA  
ATTTTCAGAATTGGAGCAAAGTGGTTATTATGTCTGCTA  
CCCCAGAGGAAGCAAACCAGAAGATGCGAACTTTTATCT  
CTACCTGAGGGCAAGAGTGTGTGAGAACTGCATGGAGA  
TGGATGTGATGTCGGTGGCCACAATTGTCATAGTGGACA  
TCTGCATCACTGGGGGCTTGCTGCTGCTGGTTTACTACTG  
GAGCAAGAATAGAAAGGCCAAGGCCAAGCCTGTGACAC  
GAGGAGCGGGTGCTGGCGGCAGGCAAAGGGGACAAAAC  
AAGGAGAGGCCACCACCTGTTCCCAACCCAGACTATGA  
GCCCATCCGGAAGGCCAGCGGGACCTGTATTCTGGCCT  
GAATCAGAGACGCATCTGATAAGAATTCGAATTTAAATC  
GGATCCGCGGCCGCGTCGACAATCAACCTCTGGATTACA  
AAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACCTATGTTGC  
TCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTG  
TATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTTCAATTTCTCCTC  
CTTGATATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTG  
TGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTG  
TTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACC  
ACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCC  
CTATTGCCACGGCGGAACCTCATCGCCGCTGCCTTGCCC  
GCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATT  
CCGTGGTGTTGTCGGGGAAATCATCGTCCTTTCTTGGCT  
GCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTC

[0776]

CTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTT  
CCTTCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGC  
GTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTG  
GGCCGCCTCCCCGCCTGGTACCTTTAAGACCAATGACTT  
ACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAGAAA  
AGGGGGGACTGGAAGGGCTAATTCACCTCCCAACGAAGA  
TAAGATCTGCTTTTTGCTTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAG  
ACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGA  
ACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGC  
TTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAA  
CTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAATA  
CTCTAGCAGTAGTAGTTCATGTATCTTATTATTCAGTAT  
TTATAACTTGCAAAGAAATGAATATCAGAGAGTGAGAG  
GAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAG  
CAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTC  
ACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAACTCATCAATGTA  
TCTTATCATGTCTGGCTCTAGCTATCCCGCCCCCTAACTCC  
GCCCATCCCGCCCCCTAACTCCGCCCAGTTCGCCCATCTCT  
CCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGG  
CCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGT  
GAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGACTTTTGCAGAGACG  
GCCAAATTCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTG  
AAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGC  
CGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAG  
TGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCG  
CTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCTGTGCCAGCTGCATTAAT  
GAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATT  
GGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCT  
CGGTCGTTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAA  
AGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAAC  
GCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGC  
CAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCA  
TAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACG  
CTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAA  
GATACCAGGCGTTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCT  
CTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGC  
CTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGCGGCTTTCTCATAGCTCA  
CGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCC  
AAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGAC  
CGCTGCGCCTTATCCGGTAACATCGTCTTGAGTCCAAC  
CCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACT  
GGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGC  
TACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACAC  
TAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCC  
AGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGG  
CAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGTG  
CAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAG  
AAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTG  
GAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATT  
ATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAATAA

[0777]

		ATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAAC TTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACC TATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCC TGAATCCCCGTCGTGTAGATAAAGTACGATACGGGAGGGC TTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGAC CCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAG CCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAAC TTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAA GCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAAC GTTGTGTCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCG TCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCTCAACGAT CAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAG CGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTGCAAGTA AGTTGGCCGAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCAC TGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTT TTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGA ATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTC AATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAA AAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAAC TCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGT AACCCACTCGTGACCCCACTGATCTTCAGCATCTTTTAC TTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCA AAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAAT GTTGAATACTCATACTCTTCTTTTCAATATTATTGAAG CATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTT GAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGC ACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACC ATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTATC ACGAGGCCCTTTCTGTCTCGCGCGTTTCGGTGATGACGGT GAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCAC AGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCC GTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGCGGGGTGTCGGGGCT GGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAG TGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAA GGAGAAAATACCGCATCAGGCGCCATTCGCCATTCAGGC TGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTT CGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCA AGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTCCCAGTCA CGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGCCAAGCTG
18	p502_NK G2D二聚 体_CD3ε (DNA 序列)	ACGCGTGTAGTCTTATGCAATACTCTGTAGTCTTGCAAC ATGGTAACGATGAGTTAGCAACATGCCTTACAAGGAGA GAAAAAGCACCGTGATGCCGATTGGTGGAAGTAAGGT GGTACGATCGTGCTTATTAGGAAGGCAACAGACGGGTC TGACATGGATTGGACGAACCACTGAATTGCCGCATTGCA GAGATATTGTATTTAAGTGCCTAGCTCGATACATAAACG GGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCT CTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAA GCTTGCCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCCGTCTGT GTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTA GTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCAGTGGCGCCCCGAACAG

[0778]

GGACTTGAAAGCGAAAGGGAAACCAGAGGAGCTCTCTC  
GACGCAGGACTCGGCTTGCTGAAGCGCGCACGGCAAGA  
GGCGAGGGGCGGCGACTGGTGAGTACGCCAAAAATTTT  
GACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGAGAGATGGGTGCGAGA  
GCGTCAGTATTAAGCGGGGGAGAATTAGATCGCGATGG  
GAAAAAATTCGGTTAAGGCCAGGGGGAAAGAAAAAATA  
TAAATTAACATATAGTATGGGCAAGCAGGGAGCTAG  
AACGATTCGCAGTTAATCCTGGCCTGTTAGAAACATCAG  
AAGGCTGTAGACAAATACTGGGACAGCTACAACCATCC  
CTTCAGACAGGATCAGAAGAAGCTTAGATCATTATATAAT  
ACAGTAGCAACCCTCTATTGTGTGCATCAAAGGATAGAG  
ATAAAAGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAGATAGAGGA  
AGAGCAAAACAAAAGTAAGACCACCGCACAGCAAGCGG  
CCACTGATCTTCAGACCTGGAGGAGGAGATATGAGGGA  
CAATTGGAGAAGTGAATTATATAAATATAAAGTAGTAAA  
AATTGAACCATTAGGAGTAGCACCCACCAAGGCAAAGA  
GAAGAGTGGTGCAGAGAGAAAAAGAGCAGTGGGAATA  
GGAGCTTTGTTCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGC  
ACTATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGGC  
CAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAGCAGCAGAACAA  
TTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCA  
ACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAA  
TCCTGGCTGTGGAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCC  
TGGGGATTTGGGGTTGCTCTGGAAAACCTATTTGCACCA  
CTGCTGTGCCTTGGAATGCTAGTTGGAGTAATAAATCTC  
TGGAACAGATTTGGAATCACACGACCTGGATGGAGTGG  
GACAGAGAAATTAACAATTACACAAGCTTAATACACTCC  
TTAATTGAAGAATCGCAAAACCAGCAAGAAAAAGAAATGA  
ACAAGAATTATTGGAATTAGATAAATGGGCAAGTTTGTG  
GAATTGGTTTAACATAACAAATTGGCTGTGGTATATAAA  
ATTATTCATAATGATAGTAGGAGGCTTGGTAGGTTTAAG  
AATAGTTTTTGCTGTACTTTCTATAGTGAATAGAGTTAGG  
CAGGGATATTCACCATTCGTTTCAGACCCACCTCCCA  
ACCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAGAAGA  
AGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAGACAGATCCATTCGAT  
TAGTGAACGGATCTCGACGGTATCGGTTAACTTTTAAAA  
GAAAAGGGGGGATTGGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGA  
ATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAACTAAAGA  
ATTACAAAAACAAATTACAAAATTCAAAATTTTATCGAT  
ACTAGTGGATCTGCGATCGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGG  
CAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGG  
GGAGGGGTCGGCAATTGAACGGGTGCCTAGAGAAGGTG  
GCGCGGGGTAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCT  
CCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAG  
TGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTTCGCAACGGGTTT  
GCCGCCAGAACACAGCTGAAGCTTCGAGGGGCTCGCAT  
CTCTCCTTCACGCGCCCGCCGCCCTACCTGAGGCCGCCA  
TCCACGCCGGTTGAGTCGCGTTCTGCCGCCTCCCGCCTGT  
GGTGCTCCTGAACTGCGTCCGCCGTCTAGGTAAGTTTA  
AAGCTCAGGTCGAGACCGGGCCTTTGTCCGGCGCTCCCT



[0779]

TGGAGCCTACCTAGACTCAGCCGGCTCTCCACGCTTTGC  
CTGACCCTGCTTGCTCAACTCTACGTCTTTGTTTCGTTTT  
CTGTTCTGCGCCGTTACAGATCCAAGCTGTGACCGGCGC  
CTACTCTAGAGCCGCCACCATGCTTCTCCTGGTGACAAG  
CCTTCTGCTCTGTGAGTTACCACACCCAGCATTCCTCTG  
ATCCCAAACCTCCCTCTTCAACCAGGAGGTGCAGATCCCC  
CTCACAGAGAGCTACTGCGGGCCCTGTCCAAAGAATTGG  
ATATGTTACAAGAACAATTGCTACCAGTTCTTCGATGAG  
TCAAAAAATTGGTATGAGAGCCAAGCTTCTGCATGTCT  
CAGAATGCCAGCCTTCTGAAGGTGTAATAAAAAGAAGA  
CCAGGACTTGCTGAAACTGGTCAAGTCTTACCACTGGAT  
GGGGCTCGTGACATTCCAACGAACGGTAGCTGGCAGTG  
GGAAGATGGCTCCATATTGTCTCCTAACCTTCTCACCAT  
AATAGAGATGCAGAAGGGTGATTGCGCTCTGTACGCTAG  
TAGCTTCAAGGGCTATATTGAGAATTGTAGTACACCCAA  
CACATACATTTGTATGCAGAGAACCGTGGGAGGTGGTGG  
CAGCGGTGGCGGTGGAAGTGGTGGCGGTGGCAGTCTCG  
AGAACTCATTATTCAACCAAGAAGTTCAAATTCCTTGA  
CCGAAAGTTACTGTGGCCCATGTCCTAAAAACTGGATAT  
GTTACAAAAATAACTGCTACCAATTTTTTGTATGAGAGTA  
AAAACCTGGTATGAGAGCCAGGCTTCTTGTATGTCTCAAA  
ATGCCAGCCTTCTGAAAGTATACAGCAAAGAGGACCAG  
GATTTACTTAAACTGGTGAAGTCATATCATTGGATGGGA  
CTAGTACACATTCCAACAAATGGATCTTGGCAGTGGGAA  
GATGGCTCCATTCTCTCACCCAACCTACTAACAATAATT  
GAAATGCAGAAGGGAGACTGTGCACTCTATGCCTCTAGC  
TTTAAAGGCTATATAGAAAACCTGTTCAACTCCAAATACA  
TACATCTGCATGCAAAGGACTGTGGCGGCCGCAGGTGGC  
GGCGGTTCTGGTGGCGGCGGTTCTGGTGGCGGCGGTTCT  
CTCGAGGATGGTAATGAAGAAATGGGTGGTATTACACA  
GACACCATATAAAGTCTCCATCTCTGGAACCACAGTAAT  
ATTGACATGCCCTCAGTATCCTGGATCTGAAATACTATG  
GCAACACAATGATAAAAACATAGGCGGTGATGAGGATG  
ATAAAAACATAGGCAGTGATGAGGATCACCTGTCAGTG  
AAGGAATTTTCAGAATTGGAGCAAAGTGGTTATTATGTC  
TGCTACCCCAGAGGAAGCAAACCAGAAGATGCGAACTT  
TTATCTCTACCTGAGGGCAAGAGTGTGTGAGAACTGCAT  
GGAGATGGATGTGATGTCGGTGGCCACAATTGTCATAGT  
GGACATCTGCATCACTGGGGGCTTGCTGCTGCTGGTTTA  
CTACTGGAGCAAGAATAGAAAGGCCAAGGCCAAGCCTG  
TGACACGAGGAGCGGGTGCTGGCGGCAGGCAAAGGGGA  
CAAAACAAGGAGAGGCCACCACCTGTTCCCAACCCAGA  
CTATGAGCCCATCCGGAAGGCCAGCGGGACCTGTATTC  
TGGCCTGAATCAGAGACGCATCTGATAAGAATTCGAATT  
TAAATCGGATCCGCGGCCGCGTCGACAATCAACCTCTGG  
ATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACT  
ATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAAT  
GCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTTCAAT  
TTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATG  
AGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGT

[0780]

GCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCA  
TTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTT  
CCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCTG  
CCTTGCCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCAC  
TGACAATTCCGTGGTGTGTCGGGGAAATCATCGTCCTTT  
CCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCG  
GGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGC  
GGACCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCC  
TCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATC  
TCCCTTTGGGCCGCTCCCCGCTGGTACCTTTAAGACCA  
ATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTTA  
AAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAATCACTCCCA  
ACGAAGATAAGATCTGCTTTTTTGCTTGTACTGGGTCTCTC  
TGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAA  
CTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCT  
TGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACT  
CTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGT  
GGAAAATCTCTAGCAGTAGTAGTTCATGTCATCTTATTAT  
TCAGTATTTATAACTTGCAAAGAAATGAATATCAGAGAG  
TGAGAGGAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAA  
ATAAAGCAATAGCATCACAAATTCACAAATAAAGCATT  
TTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATC  
AATGTATCTTATCATGTCTGGCTCTAGCTATCCCGCCCCT  
AACTCCGCCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGC  
CCATTCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTAT  
GCAGAGGCCGAGGCCGCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAG  
AAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGACTTTTGC  
AGAGACGGCCCAAATTCGTAATCATGGTCATAGCTGTTT  
CCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCACACAAC  
ATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGC  
CTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTC  
ACTGCCCCGCTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCT  
GCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTT  
TGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTC  
GCTGCGCTCGGTCGTTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGC  
TCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGG  
GGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGC  
AAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCG  
TTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAA  
AATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGG  
ACTATAAAGATAACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCT  
CGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATAC  
CTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTC  
ATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCG  
TTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTC  
AGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTG  
AGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAG  
CAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTA  
GGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTAC  
GGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTG

[0781]

		CTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCT TGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTT TTTGTGTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGG ATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGAC GCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTC ATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTA AATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATAT GAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGT GAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCA TAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATAC GGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATAC CGCGAGACCCACGCTCACC GGCTCCAGATTTATCAGCAA TAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGT CCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTT GCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTT TGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGT CACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTC CCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTG CAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGT CAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTAT GGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGT AAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTC ATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTG CCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCA GAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTTCGG GGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCA GTTTCGATGTAACCCACTCGTGCAACCCAACTGATCTTCAG CATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAA CAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGC GACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAA TATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCG GATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAG GGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACG TCTAAGAAACCATTAATTATCATGACATTAACCTATAAAA ATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTCGCGCGTTTCG GTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGG AGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGC AGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGCGCG GTGTCGGGGCTGGCTTAACCTATGCGGCATCAGAGCAGAT TGTAAGTGCAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCA CAGATGCGTAAGGAGAAAATAACCGCATCAGGCGCCATT CGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGG TGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGG GATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAAACGCCAGGGT TTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGCCA AGCTG
20	人 ROR 1, 亚型 1	MHRPRRRGTRPPLLALLAALLAARGAAAQETELSVSAEL VPTSSWNISSELNKDSYLTLDPMNITTSLGQTAEHCKV SGNPPPTIRWFKNDAPVVQEPRLSFRSTIYGSRLRIRNLD TDTGYFQCVATNGKEVVSSTGVLFVKFGPPPTASPGYSDEY



[0782]

	(典型) UniProt 登录号 Q 01973-1	EEDGFCQPYRGIACARFIGNRTVYMESLHMQGEIENQITAA FTMIGTSSHLSDKCSQFAIPSLCHYAFPYCDETSSVPKPRDL CRDECEILENVLCQTEYIFARSNPMILMRLKLPNCEDLPQPE SPEAANCIRIGIPMADPINKNHKCYNSTGVDIRGTVSVTKS GRQCQPWNSQYPHTHTFTALRFPELNGGHSYCRNPGNQKE APWCFTLDENFKSDLCDIPACDSKDSKEKNKMEILYILVPS VAIPLAIALLLFFICVCRNNQSSSAPVQRQPKHVRGQNVE MSMLNAYKPKSKAKELPLSAVRFMEELGECFAFGKIYKGHL YLPMDHAQLVAIKTLKDYNNPQQWTEFQQEASLMAELH HPNIVCLLGAVTQEQPVCMLFEYINQGDLEFLIMRSPHSD VGCSSDEDGTVKSSLDHGDFLHIAIQIAAGMEYLSSHFFVH KDLAARNILIGEQLHVKISDLGLSREIYSADYYRVQSKSLLP IRWMPPEAIMYGKFSSDSIWSFGVVLWEIFSGLQPYYG SNQEVIMVRKRQLLPCSEDCPPRMYSLMTECWNEIPSRP RFKDIHVRLRSWEGLSSHTSSTTPSGGNATTQTTSLSASPVS NLSNPRYPNYMFPSQGITPQQIAGFIGPPIPQNQRFIGY PIPPGYAAFPAAHYQPTGPPRVIQHCPPPKSRSPSSASGSTST GHVTSPLSSGSNQEANIPLLPHMSIPNHPGGMGITVFGNKSQ KPYKIDSKQASLLGDANIHGHTESMISAE
21	人 ROR1 亚型 2	MHRPRRRGTRPPLLALLAALLAARGAAAQETELSVSAEL VPTSSWNISSELNKDSYLTLEPMNNITSLGQTAELHCKV SGNPPPTIRWFKNDAPVVQEPRRLSFRSTIYGSRLRIRNLD TDTGYFQCVATNGKEVVSSTGVLFVKFGPPPTASPGYSDEY EEDGFCQPYRGIACARFIGNRTVYMESLHMQGEIENQITAA FTMIGTSSHLSDKCSQFAIPSLCHYAFPYCDETSSVPKPRDL CRDECEILENVLCQTEYIFARSNPMILMRLKLPNCEDLPQPE SPEAANCIRIGIPMADPINKNHKCYNSTGVDIRGTVSVTKS GRQCQPWNSQYPHTHTFTALRFPELNGGHSYCRNPGNQKE APWCFTLDENFKSDLCDIPACGK
22	人 ROR1 亚型 3	MNNITSLGQTAELHCKVSGNPPPTIRWFKNDAPVVQEPR LSF RSTIYGSRLRIRNLDTTDTGYFQCVATNGKEVVSSTGVLFV KFGPPPTASPGYSDEYEEDGFCQPYRGIACARFIGNRTVYM ESLHMQGEIENQITAAFTMIGTSSHLSDKCSQFAIPSLCHYA FPYCDETSSVPKPRDLCRDECEILENVLCQTEYIFARSNPMI LMRLKLPNCEDLPQPE SPEAANCIRIGIPMADPINKNHKCY NSTGVDIRGTVSVTKS GRQCQPWNSQYPHTHTFTALRFPE LNGGHSYCRNPGNQKEAPWCFTLDENFKSDLCDIPACDSK DSKEKNKMEILYILVPSVAIPLAIALLLFFICVCRNNQSSSA PVQRQPKHVRGQNVEMSMMLNAYKPKSKAKELPLSAVRFM EELGECFAFGKIYKGHL YLPMDHAQLVAIKTLKDYNNPQQ WTEFQQEASLMAELHHPNIVCLLGAVTQEQPVCMLFEYIN QGDLEFLIMRSPHSDVGCSSDEDGTVKSSLDHGDFLHIAI QIAAGMEYLSSHFFVHKDLAARNILIGEQLHVKISDLGLSRE IYSADYYRVQSKSLLPIRWMPPEAIMYGKFSSDSIWSFGV VLWEIFSGLQPYYGFSNQEVIMVRKRQLLPCSEDCPPRM YSLMTECWNEIPSRP RFKDIHVRLRSWEGLSSHTSSTTPSG GNATTQTTSLSASPVS NLSNPRYPNYMFPSQGITPQQIAGF IGPPIPQNQRFIGYPIPPGYAAFPAAHYQPTGPPRVIQHCP PPKSRSPSSASGSTSTGHVTSPLSSGSNQEANIPLLPHMSIPN

[0783]

		HPGGMGITVFGNKSQKPYKIDSKQASLLGDANIHGHTESMI SAEL
23	CD16 亚 型 A, Un iProt 登录 号 P0863 7	MWQLLLPTALLLLVSAGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLE KDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAAT VDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKE EDPIHLRCHSWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIP KATLKDSGSYFCRGLFGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFF PPGYQVSFCLVMVLLFAVDTGLYFSVKTNIRSSTRDWKDH KFKWRKDPQDK
24	SEQ ID NO:23 的 CD16 V 158 变体	MWQLLLPTALLLLVSAGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLE KDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAAT VDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKE EDPIHLRCHSWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIP KATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSF FPPGYQVSFCLVMVLLFAVDTGLYFSVKTNIRSSTRDWKD HKFKWRKDPQDK
25	抗 CD19 轻链 CD R1 (DN A)	AGGGCAAGTCAGGACATTAGTAAA
26	抗 CD19 轻链 CD R1 (蛋白 质)	RASQDISK
27	抗 CD19 轻链 CD R2 (DN A)	ATCTACCATACATCAAGATTA
28	抗 CD19 轻链 CD R2 (蛋白 质)	IYHTSRL
29	抗 CD19 轻链 CD R3 (DN A)	CAACAGGGTAATACGCTTCCGTACACG
30	抗 CD19 轻链 CD R3 (蛋白 质)	QQGNTLPYT

[0784]

31	抗 CD19 重链 CD R1 (DN A)	GGGGTCTCATTACCCGACTATGGTGTAAGC
32	抗 CD19 重链 CD R1 (蛋白 质)	GVSLPDYGVVS
33	抗 CD19 重链 CD R2 (DN A)	GTAATATGGGGTAGTGAAACCACATACTATAATTCAGCT CTC
34	抗 CD19 重链 CD R2 (蛋白 质)	VIWGSETTYNSAL
35	抗 CD19 重链 CD R3 (DN A)	CATTATTACTACGGTGGTAGCTATGCTATGGACTAC
36	抗 CD19 重链 CD R3 (蛋白 质)	HYYYGGSYAMDY
37	抗 CD19 轻链可变 区(DNA)	GACATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCC TCTCTGGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGCAGGGCAAGT CAGGACATTAGTAAATATTTAAATTGGTATCAGCAGAAA CCAGATGGAAGTGTAAACTCCTGATCTACCATAACATCA AGATTACACTCAGGAGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGT GGGTCTGGAACAGATTATTCTCTCACCATTAGCAACCTG GAGCAAGAAGATATTGCCACTTACTTTTGCCAACAGGGT AATACGCTTCCGTACACGTTCCGAGGGGGGACTAAGTTG GAAATAACA
38	抗 CD19 轻链可变 区(蛋白 质)	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPD GTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDI ATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEIT
39	抗 CD19	GAGGTGAAACTGCAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGC GCCCTCACAGAGCCTGTCCGTCACATGCACTGTCTCAGG

[0785]

	重链可变区(DNA)	GGTCTCATTACCCGACTATGGTGTAAGCTGGATTCGCCA GCCTCCACGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTAATAT GGGGTAGTGAAACCACATACTATAATTCAGCTCTCAAAT CCAGACTGACCATCATCAAGGACAACTCCAAGAGCCAA GTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCAAACCTGATGACACA GCCATTTACTACTGTGCCAAACATTATTACTACGGTGGT AGCTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTC ACCGTCTCCTCA
40	抗 CD19 重链可变区(蛋白质)	EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPP RKGLEWLGVWIGSETTYNSALKSRLTIHKDNSKSQVFLKM NSLQTDDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS
41	抗BCMA 轻链 CD R1 (DNA)	AAAAGCAGCCAGAGCCTGGTGCATAGCAACGGCAACAC CTATCTGCAT
42	抗BCMA 轻链 CD R1 (蛋白质)	KSSQSLVHSNGNTYLH
43	抗BCMA 轻链 CD R2 (DNA)	AAAGTGAGCAACCGCTTTAGC
44	抗BCMA 轻链 CD R2 (蛋白质)	KVSNRFS
45	抗BCMA 轻链 CD R3 (DNA)	GCGGAAACCAGCCATGTGCCGTGGACC
46	抗BCMA 轻链 CD R3 (蛋白质)	AETSHVPWT
47	抗BCMA 重链 CD	AAAGCGAGCGGCTATAGCTTCCGGATTATTATATTAAC

[0786]

	R1 (DN A)	
48	抗BCMA 重链 CD R1 (蛋白质)	KASGYSFPDYYIN
49	抗BCMA 重链 CD R2 (DN A)	TGGATTTATTTTGCAGCGGCAACAGCGAATATAACCAG AAATTTACCGGC
50	抗BCMA 重链 CD R2 (蛋白质)	WIYFASGNSEYNQKFTG
51	抗BCMA 重链 CD R3 (DN A)	CTGTATGATTATGATTGGTATTTTGATGTG
52	抗BCMA 重链 CD R3 (蛋白质)	LYDYDWYFDV
53	抗BCMA 重链可变 区(DNA)	CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAA ACCGGGCGCGAGCGTGAAAGTGAGCTGCAAAGCGAGCG GCTATAGCTTTCCGGATTATTATATTAAGTGGGTGCGCCA GGCGCCGGGCCAGGGCCTGGAATGGATGGGCTGGATTT ATTTTGCAGAGCGGCAACAGCGAATATAACCAGAAATTTA CCGGCCGCGTGACCATGACCCGCGATACCAGCAGCAGC ACCGCGTATATGGAAGTGAAGCAGCCTGCGCAGCGAAGA TACCGCGGTGTATTTTTCGCGGAGCCTGTATGATTATGAT TGGTATTTTGATGTGTGGGGCCAGGGCACCATGGTGACC GTGAGCAGC
54	抗BCMA 重链可变 区(蛋白质)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFPDYYINWVRQ APGQGLEWMGWYFASGNSEYNQKFTGRVTMTRDTSSST AYMELSSLRSEDTAVYFCASLYDYDWYFDVWGQGTMTV VSS
55	抗BCMA 轻链可变	GATATTGTGATGACCCAGACCCCGCTGAGCCTGAGCGTG ACCCCGGGCGAACCAGCGAGCATTAGCTGCAAAGCAG CCAGAGCCTGGTGCATAGCAACGGCAACACCTATCTGCA TTGGTATCTGCAGAAACCGGGCCAGAGCCCGCAGCTGCT

[0787]

	区(DNA)	GATTTATAAAGTGAGCAACCGCTTTAGCGGCGTGCCGGA TCGCTTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCGCGGATTTTACCCT GAAAATTAGCCGCGTGGAAGCGGAAGATGTGGGCGTGT ATTATTGCGCGGAAACCAGCCATGTGCCGTGGACCTTTG GCCAGGGCACCAAACTGGAAATTAAGC
56	抗BCMA 轻链可变 区(蛋白 质)	DIVMTQTPLSLSVTPGEPASISCKSSQSLVHSNGNTYLHWY LQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPRFSGSGSGADFTLKISRV EAEDVGVYYCAETSHVPWTFGQGKLEIKS
57	抗 CD22 轻链 CD R1	QDIHGY
58	抗 CD22 轻链 CD R2	YTS
59	抗 CD22 轻链 CD R3	QQGNTLPWT
60	抗 CD22 重链 CD R1	GFAFSIYD
61	抗 CD22 重链 CD R2	ISSGGGTT
62	抗 CD22 重链 CD R3	ARHSGYGTHWGVLFAY
63	抗 CD22 轻链可变 区	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQTIWSYLNWYQQRPG KAPNLLIYAASSLQSGVPSRFSGRGSGTDFTLTISLQAEDF ATYYCQQSYIPQTFGQGTKLEIKEVQLVESGGGLVKPGGS LKLSCAASGFAFSIYDMSWVRQTPEKRLEWVAYISSGGGT TYYPDTVKGRTISRDNKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCA RHSGYGTHWGVLFAYWQGLVTVSA
64	抗 CD22 重链可变 区	QVQLQQSGPGLVKPSQTLTLTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQ SPSRGLEWLGRYYRSKQWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQ FSLQLNSVTPEDTAVYYCAREVTGDLEDAFDIWGQGMVT VSSGGSALTAHQACHLPLETFTRHRQPRGWEQLEQCGY PVQRLVALYLAARLSWNQVDQVIRNALASPGSGGDLGEAI REQPEQARLALTAAAESERFVRQGTGNDEAGAANGPADS GDALLERNYPTGAEFLGDDGVSFSTRGTQNWTVRLLQA HRQLEERGYVFGYHGTFLAAQSIVFGGVRARSQDLDAI WRGFYIAGDPALAYGYAQDQEPDAAGRIRNGALLRVYVP

[0788]

		RSSLPGFYRTSLTLAAPEAAGEVERLIGHPLPLRLDAITGPE EEGGRLEILGWPLAERTVVIPSAIPTDPRNVGGDLDPSSIPD KEQAISALPDYASQPGKPPREDLK
65	抗 ROR1 scFv 2- 7 VH_接 头 4_抗 R OR1 2-7 VL (D NA)	GAAGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGCGGTGGTCTGGTTCA GCCGGGTGGCAGCCTGCGTCTGAGCTGTGCGGCGAGCG GCTTTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTGCGTC AGGCACCGGGTAAAGGCCTGGAATGGGTGAGCGCGATT AGCGGCAGCGGCGGCAGCACCTATTATGCGGATAGCGT GAAAGGCCGTTTTACCATTAGCCGTGATAACAGCAAAAA CACCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGA TACCGCGGTGTATTATTGCGCGAAAGATAAGGGTTGGTT TAACTGGCAATTCGATTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGT TACCGTTAGCAGCGGTGGAGGCGGTTCTGGTGGAGGCG GTTTCGGATGGCGGAGGTTTCAGAAATTGTGCTGACCCAGA GCCCCGGGCACGCTGTCTCTGAGCCCCGGGTGAACGTGCGA CCCTGAGCTGTCGTGCGAGCCAAAGCGTGAGCAGCAGCT ATCTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCGGGCCAGGCACCGC GTCTGCTGATTTATGGCGCGAGCAGCCgTGCGACCGGCA TTCCGGATCGTTTTAGCGGCAGCGGTAGCGGCACCGATT TTACCCTGACCATTAGCCGTCTGGAACCGGAAGATTTTG CGGTGTATTATTGCCAGCAGTATGGCAGCAGCCCGTGGA CCTTTGGCCAGGGCACCAAAGTGGAATTTAA
66	接头 4 (DNA)	GGTGGAGGCGGTTCTGGTGGAGGCGGTTTCGGATGGCGG AGGTTCA
67	抗 ROR1 scFv 2- 7 VH (D NA)	GAAGTGCAACTTCTCGAGAGCGGTGGGGGACTCGTCCA GCCGGGAGGTTCCCTGCGACTCAGCTGTGCAGCCTCAGG CTTTACCTTTTCCAGTTACGCAATGAGTTGGGTCCGGCA GGCGCCTGGTAAAGGACTCGAGTGGGTGAGTGCAATCA GCGGAAGTGGCGGGTCTACATACTATGCGGACTCTGTTA AAGGCAGGTTCACTATTTCAAGGGACAATTCCAAGAACA CGCTCTACCTGCAGATGAATAGCCTTAGAGCTGAAGACA CGGCCGTGTACTATTGTGCCAAAGACAAGGGATGGTTCA ACTGGCAGTTCGACTACTGGGGGCAGGGAACCTCTCGTCA CCGTGAGCTCC
68	抗 ROR1 scFv 2- 7 VL (D NA)	GAAATTGTTCTCACACAGTCACCCGGAACCTTTTCATTG TCCCCCGGCGAGCGCGCCACCCTCAGCTGTGCGGGCCAGT CAGAGCGTGTCTAGCTCTTACCTGGCCTGGTACCAGCAG AAACCTGGGCAAGCTCCCAGACTCCTGATATATGGGGCC AGCAGCCGGGCCACTGGCATTCCGGACAGGTTTAGTGGA TCAGGCTCTGGCACTGATTTTACACTGACGATTTCAAGG TTGGAACCCGAAGACTTCGCAGTGTACTATTGTGTCAGCAG TATGGGTCTAGCCCGTGGAAGTTTCGGGCAAGGCACCAAG GTGGAATCAAG
69	抗 ROR1 2-9 VH 接头 4_ 抗 ROR1 2-9 VL	GAAGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGCGGTGGTCTGGTTCA GCCGGGTGGCAGCCTGCGTCTGAGCTGTGCGGCGAGCG GCTTTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTGCGTC AGGCACCGGGTAAAGGCCTGGAATGGGTGAGCGCGATT AGCGGCAGCGGCGGCAGCACCTATTATGCGGATAGCGT GAAAGGCCGTTTTACCATTAGCCGTGATAACAGCAAAAA



[0789]

		CACCCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGA TACCGCGGTGTATTATTGCGCGAAAAACAATATCACTT CGATTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTTACCGTTAGCAG CGGTGGAGGCGGTTCTGGTGGAGGCGGTTCCGGGTGGCG GAGGTTCAAGAAATTGTGCTGACCCAGAGCCCGGGCACG CTGTCTCTGAGCCCGGGTGAACGTGCGACCCCTGAGCTGT CGTGCGAGCCAGAGCGTGAGCAGCAGCTATCTGGCCTG GTATCAGCAGAAACCGGGCCAGGCACCGCGTCTGCTGAT TTATGGCGCGAGCAGCCGTGCGACCGGCATTCCGGATCG TTTTAGCGGCAGCGGTAGCGGCACCGATTTTACCCTGAC CATTAGCCGTCTGGAACCGGAAGATTTTGCGGTGTATTA TTGCCAGCAGTATGGCAGCAGCCCGTGACCTTTGGCCA GGGCACCAAAGTGGAATTTAA
70	抗 ROR1 scFv 2- 9 VH (D NA)	GAAGTGCAACTTCTCGAGAGCGGTGGGGGACTCGTCCA GCCGGGAGGTTCCCTGCGACTCAGCTGTGCAGCCTCAGG CTTTACCTTTTCCAGTTACGCAATGAGTTGGGTCCGGCA GGCGCCTGGTAAAGGACTCGAGTGGGTGAGTGCAATCA GCGGAAGTGGCGGGTCTACATACTATGCGGACTCTGTTA AAGGCAGGTTCACTATTTCAAGGGACAATTCCAAGAACA CGCTCTACCTGCAGATGAATAGCCTTAGAGCTGAAGACA CGGCCGTGTACTATTGTGCCAAAAAGCAGTACCATTTTCG ACTACTGGGGGCAGGGAACCTCTCGTCACCGTGAGCTCC
71	抗 ROR1 scFv 2- 9 VL (D NA)	GAAATTGTTCTCACACAGTCACCCGGAACCCTTTCATTG TCCCCCGGCGAGCGCGCCACCCTCAGCTGTGCGGGCCAGT CAGAGCGTGTCTAGCTCTTACCTGGCCTGGTACCAGCAG AAACCTGGGCAAGCTCCCAGACTCCTGATATATGGGGCC AGCAGCCGGGCCACTGGCATTCCGGACAGGTTTAGTGGA TCAGGCTCTGGCACTGATTTTACACTGACGATTTCAAGG TTGGAACCCGAAGACTTCGCAGTGTACTATTGTCAGCAG TATGGGTCTAGCCCGTGACTTTCGGGCAAGGCACCAAG GTGGAATCAAG
72	抗 ROR1 scFv 3- 6 (DNA)	CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTC CTGGACAGTCGATCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCA GTGACGTTGGTGGTTATAACTATGTCTCCTGGTACCAAC AGCACCCAGGCAAAGCCCCCAAAGTCATGATTTATGATG TCAGTAATCGGCCCTCAGGGGTTTCTGATCGCTTCTCTGG CTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGACCATCTCTGG GCTCCAGGTTGAGGACGAGGCTGATTATTACTGCAGCTC ATATTCAACCAGCATCACCCAGTTTTTCGGCGGGGGGAC CAAGCTCACCGTCCTAGGAGAGGGTAAATCTTCCGGATC TGGTTCCGAAAGCAAGGCTAGCCAGGTCCAGCTGGTGCA GTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGGGAGTCTCTGA AGATCTCCTGTGAGGCTTCTGGATACAGCTTTACCAGCT ACTGGATCGGCTGGGTGCGCCAGATGCCCGGGAAAGGC CTGGAGTGGATGGGGATCATCTATCCTGGTGACTCTGAT ACCAGATACAGCCCGTCCTTCCAAGGCCAGGTCACCATC TCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCTGCAGTGG AGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTACTGT GCGAGACTGGAACCTCGGTTACTACTACTACGGTATGGAC GTCTGGGGCCAAGGAACCACGGTCACCGTCTCCTCA

[0790]

73	接头 5 (DNA)	GGAGAGGGTAAATCTTCCGGATCTGGTTCCGAAAGCAA GGCTAGC
74	抗 ROR1 scFv 3- 6 VL (D NA)	CAGTCAGCTCTGACCCAACCTGCCTCCGTCTCTGGGAGT CCAGGCCAGAGTATCACAATTTCTTGTACAGGCACCTCA TCTGATGTCGGCGGTTACAATTACGTTAGTTGGTATCAG CAACATCCAGGTAAGGCTCCAAAGGTGATGATCTATGAC GTCTCAAATAGACCCTCTGGCGTCAGCGACAGGTTTAGT GGTAGCAAATCCGGGAACACAGCTTCACTTACAATTAGC GGCCTCCAAGTAGAAGACGAAGCTGACTATTACTGCTCT AGTTATTCAACGTCAATTACCCCTGTGTTTGGTGGCGGTA CAAACTCACAGTGCTT
75	抗 ROR1 scFv 3- 6 VH (D NA)	CAAGTGCAACTTGTGCAATCAGGAGCTGAAGTCAAAAA GCCGGGAGAATCCCTGAAAATAAGCTGCGAAGCAAGTG GTTACTCTTTTACTTCTTACTGGATTGGATGGGTTCCGCA GATGCCCGGAAAGGGACTCGAGTGGATGGGAATTATTTA CCCTGGAGACAGCGACACAAGATACAGCCCTTCATTCCA GGGGCAGGTGACCATTTCTGCTGACAAATCAATCAGTAC AGCCTATCTGCAATGGAGTTCCCTCAAAGCCAGTGACAC TGCTATGTATTACTGCGCGCGACTGGAAGTGGGATACTA CTACTACGGAATGGACGTATGGGGACAGGGAACCACCG TACTGTAGTAGC
76	pLRPO- ROR1 2- 7 抗体 C D3ε_T2A -eGFP	CCAATTAACCAATTCTGAttagaaaaactcatcgagcatcaaatgaaactgca atttattcacatcaggattatcaataccatattttgaaaaagccgtttctgtaatgaaggagaaaa ctcaccgagcgagttccataggtggcaagatcctggatcgggtctgcatccgactcgtcca acatcaatacaacctattaatttcccctcgtcaaaaaataaggttatcaagtgagaatcaccatga gtgacgactgaatccggtgagaatggcaaaagttagcatttcttccagactgttcaacagg ccagccattacgctcgtcatcaaaatcactcgcacatcaacaaaccgttattcattcgtgattgcg cctgagcaagacgaaatacgcgacgctgttaaaggacaattacaacaggaatcgaatgc aaccggcgaggaacactgccagcgcatcaacaatatttcacctgaatcaggatatttctta atacctggaatgctgttttccggggatcgagtggtgagtaacctgcatcatcaggagtacg gataaaatgcttgatggcggaagaggcataaattccgtcagccagtttagtctgaccatctcat ctgtaacatcattggcaacgctacctttgccatgttcagaaacaactctggcgcatcgggcttc ccatacaagcgatagattgtcgcacctgattgcccagacattatcgcgagcccattatacccata taaatacagcatccatgttggaatttaatacgcggcctcgacgttcccggtgaatatggctcatAA CACCCCTTGTATTACTGTTTATGTAAGCAGACAGTTTTAT TGTTTCATGATGATATATTTTATCTTGTGCAATGTAACAT CAGAGATTTTGAGACACAACGTGGCTTTCCCCCCCCCCCC CCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTATCACGAGGC CAGCTTGGGAAACCATAAAGACCGAGATAGAGTTGAGTG TTGTTCCAGTTTGGAAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACG TGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAG GGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCCAAATCAAGT TTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAAC CCTAAAGGGAGCCCCCGATTAGAGCTTGACGGGGAAA GCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCG AAAGGAGCGGGCGCTAAGGCGCTGGCAAGTGTAAGCGGT CACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGC GCCGCTACAGGGCGCGTACTATGGTTGCTTTGACGTATG CGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATA

[0791]

CCGCATCAGGCGccattcgccattcaggctgcgcaactgttgggaagggcgatcg  
gtggggctcttcgctattacgccaGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTG  
CAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGT  
CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAATTGATCGAG  
ATCGTGATCCGGATCAAGATCCAGATCGAATTGGAGGCT  
ACAGTCAGTGGAGAGGACTTTCACTGACTGACTGACTGC  
GTCTCAACCTcctaggggacattgattattgactagttattaatagtaactaacggg  
gtcattagttcatagcccatatatggagttccgcttacataacttacggtaaatggccgctg  
gctgaccgcccacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgtcccatagtaacgc  
caatagggactttccattgacgtcaatgggtggagtattacggtaaacgccacttggcagta  
catcaagtgtatcatatgccaaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaatggccgct  
ggcattatgccagtlacatgacctatgggactttcctacttggcagtlacatctacgtattagtc  
cgctattaccatgggtgatcggttttggcagtlacatcaatggcgctggatagcggtttgactcac  
ggggatttccaaagtctccacccattgacgtcaatgggagtttggcaccaaaatcaacg  
ggactttccaaaatgtcgttaacaactccgccccattgacgcaaatggcggttaggcgtgtacg  
gtgggaggtctatataagcagagctcgtttagtgaaccgggtctctctggttagaccagatctg  
agcctgggagctctctggctaactaggggaacccactgcttaagcctcaataaagcttgccctga  
gtgctcaaagtagtgtgtgcccgtctgtgtgtgactctggtaactagatccctcagaccctt  
tagtcagtgtggaaaatctctagcagtggcgcccgaacagggacttgaagcgaaagtaag  
ccagaggagatctctcgacgcaggactcggcttgcgaagcgcgcacggcaagaggcgag  
ggcgggcgactggtgagtacgcaaaaattttagctagcggaggctagaaggagagagttag  
ggtgagagagcgtcgtttaaagcgggggagaattagataaatgggaaaaaattcggttaag  
gccagggggaaagaaacaataataaactaaaacatatagttagggaagcagggagctagaa  
cgattcgcagttatcctggccttttagagacatcagaaggctgtagacaaatactgggacagc  
tacaaccatcccttcagacaggatcagaagaacttagatcattatataatacaatagcagtcctc  
tattgtgtgcatcaaaggatagatgtaaaagacaccaaggaagccttagataagatagaggaa  
gagcaaaacaaaagtaagaaaaaggcacagcaagcgtatctcagacctggaggaggcagg  
aggcgatatgagggaacaattggagaagtgaattatataaataaagtagtaaaaattgaacca  
ttaggagtagcaccaccaaggcaagagaagagtgtgtagagagaaaaagagcagtg  
ggaataggagctttgtccttgggttcttgggagcagcaggaagcactatggcgcgacgtca  
atgacgctgacggtacaggccagacaattattgtctgatatagtgcagcagcagaacaatttgc  
tgagggttattgaggcgcaacagcatctgttgaactcacagctctggggcatcaaacagctcc  
aggcaagaatcctggctgtggaagatacctaaaggatcaacagctcctggggatttggggtt  
gctctggaaaactcatttgcaccactgctgtgccttggaaatgctagtggagtaataaatctctgg  
aacagatttgaataacatgacctggatggagtgggacagagaaatlaacaattacacaagct  
taatacactccttaattgaagaatcgaaaaccagcaagaaaagaatgaacaagaattattgga  
attagataaatgggcaagtgttgggaattggttaacataacaaattggctgtggtatataaaatta  
ttcataatgatagtaggaggttggtaggttaagaatagttttgctgtactttctatagtgaatag  
agttaggcaggatattcaccattatcgtttcagacccacctcccaatcccgaggggaccacg  
cgtacaaatggcagtaattcatccacaattttaaagaaaaggggggattggggggtacagtg  
aggggaaagaatagtagacataatagcaacagacatacaactaaagaattacaaaaacaaa  
ttacaaaaattcaaaatttccgggtttattacagggacagcagaatccacttggaaagctgag  
catccggctccggtgcccgtcagtgggcagagcgcacatcggccacagtccccgagaagtt  
ggggggaggggtcggcaattgaaccggtgcctagagaaggtggcgcggggtaaactggg  
aaagtgatgtcgtgtactggctccgcttttcccgagggtgggggagaaccgtatataagtgc  
agtagtcgctgaacgttcttttcgaacgggttggccgagaaacacaggttaagtccgtg  
tgtggtcccgcgggctggcctctttacgggttatggcccttgcgtgccttgaattacttcacg  
cccctggctgcagtlacgtgattcttgatcccagcttcgggttggagttgggtgggagagttc  
gaggccttgcgttaaggagcccccttcgcctcgtgcttgagttgaggcctggcctggcgctg  
gggcccgcgctgcaatctggtggcaccttcgcgctgtctcgtcttgcataagtcctta

[0792]

gccatttaaaatttt gatgacctgctgcgacgcttttttctggcaagatagtctt gtaa atcgcg  
gccaagatctgcacactggatcttgcgtttttggggccgcggcgccgacggggcccgctgcg  
tcccagcgcacatgttcggcgaggcggggcctgcgagcgcggccaccgagaatcgacg  
ggggtagctc caagctggccggcctgctctggtgcctggcctcgcgccgccgtgtatcgccc  
cgccctggcggaaggctggcccggctggcaccagttgcgtgagcggaaagatggccgc  
ttccggccctgctgcagggagctcaaatggaggacgcggcgctcgggagagcggggcg  
ggtgagtcacccacacaaaggaaaaggcctttccgtcctcagccgtcgttcatgtgactcc  
acggagtaccggcgccgtccaggcacctcgattagttctcgagcttttggagtacgtcgtctt  
taggttggggggagggttttatgcgatggagtctccacactgagtgggtggagactgaag  
ttaggccagcttggcacttgatgtaattctccttggaaatttgcctttttgagtttggatcttggttca  
tttcaagcctcagacagtgggtcaaagtttttcttccatttcaggtgtcgtgaaaactacccctc  
tagagccgccaccATGCTCCTCCTCGTGA CTAGCCTTCTCCTGT  
GCGAGCTCCCACACCCTGCATTCTCCTGATCCCAGAAG  
TGCAACTTCTCGAGAGCGGTGGGGGACTCGTCCAGCCGG  
GAGGTTCCCTGCGACTCAGCTGTGCAGCCTCAGGCTTTA  
CCTTTTCCAGTTACGCAATGAGTTGGGTCCGGCAGGCGC  
CTGGTAAAGGACTCGAGTGGGTGAGTGCAATCAGCGGA  
AGTGGCGGGTCTACATACTATGCGGACTCTGTAAAGGC  
AGGTTCACTATTTCAAGGGACAATTCCAAGAACACGCTC  
TACCTGCAGATGAATAGCCTTAGAGCTGAAGACACGGCC  
GTGTACTATTGTGCCAAAGACAAGGGATGGTTCAACTGG  
CAGTTCGACTACTGGGGGCAGGGA ACTCTCGTCACCGTG  
AGCTCCGGCGGAGGTGGAAGCGGGGGAGGGGGCTCCGG  
TGGTGGGGGATCAGAAATTGTTCTCACACAGTCACCCGG  
AACCCTTTTCA TTGTCCCCCGGCGAGCGCGCCACCCTCAG  
CTGTCCGGCCAGTCAGAGCGTGTCTAGCTCTTACCTGGC  
CTGGTACCAGCAGAAACCTGGGCAAGCTCCCAGACTCCT  
GATATATGGGGCCAGCAGCCGGGCCACTGGCATTCCGG  
ACAGGTTTAGTGGATCAGGCTCTGGCACTGATTTTACAC  
TGACGATTTCAAGGTTGGAACCCGAAGACTTCGCAGTGT  
ACTATTGTCAGCAGTATGGGTCTAGCCCGTGGACTTTTCG  
GGCAAGGCACCAAGGTGGAAATCAAGGCAGCTGCTGGA  
GGTGGGGGAAGTGGCGGTGGTGGCTCAGGCGGCGGGGG  
GAGCCTCGAGGACGGTAATGAAGAGATGGGGGGCATTA  
CACAAACCCCGTACAAGGTCTCTATCAGTGGGACGACTG  
TGATTCTGACATGCCACAGTATCCAGGTTTCAGAAATCC  
TGTGGCAGCATAATGACAAGAACATCGGTGGGGATGAG  
GATGATAAGAATATCGGAAGCGACGAAGACCACCTGTC  
TCTCAAAGAGTTTAGCGAGCTGGAGCAGAGTGGGTATTA  
TGTCTGCTATCCTAGAGGTAGCAAGCCAGAGGACGCAA  
ACTTTTACCTTTACCTCAGAGCCAGGGTCTGCGAGA ACT  
GCATGGAAATGGACGTGATGAGTGTTGCAACTATAGTGA  
TAGTTGACATTTGCATCACCGGGGGTCTGCTCCTGCTGG  
TTTACTATTGGAGCAAGAACCGCAAGGCTAAAGCCAAG  
CCAGTAACACGGGGCGCAGGCGCGGGAGGCAGGCAGCG  
AGGGCAGAATAAGGAGCGCCCCCACC CGTCCCGAATC  
CGGATTACGAACCCATTTCGAAAGGCCAGAGGGACTTG  
TACTCAGGGCTCAACCAAAGACGGATCGAGGGGCGAGG  
ATCCTTGCTGACATGTGGTGACGTGGAGGAGAATCCTGG  
TCCTTCTCGCgccgccaccATGGTGTCTAAAGGCGAAGAGCT



[0793]

GTTCACCGGTGTGGTGCCGATTCTTGTAGAGCTGGATGG  
 AGATGTTAATGGTCACAAGTTTTTCAGTGTCTGGGGAGGG  
 CGAAGGCGACGCGACCTATGGTAACTCACGCTTAAGTT  
 TATCTGCACCACAGGGAAGCTCCCTGTTCCATGGCCAAC  
 CCTTGTGACAACACTTACTTACGGCGTGCAGTGTTCAG  
 CAGGTATCCTGACCATATGAAGCAGCACGATTTCTTCAA  
 GTCTGCAATGCCCAGGGGTACGTACAAGAGCGGACAA  
 TTTTCTTCAAGGACGACGGAAATTACAAAACCTAGGGCAG  
 AGGTTAAGTTCGAAGGGGATACACTTGTTAATAGGATCG  
 AACTGAAAGGCATTGATTTCAAGGAGGATGGAAACATA  
 CTCGGGCACAACTGGAATATAACTACAATTACATAAT  
 GTGTATATCATGGCTGATAAGCAGAAAAACGGTATCAAA  
 GTGAACTTTAAGATCCGGCATAACATTGAAGACGGTAGC  
 GTGCAGCTCGCTGACCACTACCAGCAGAACACTCCAATC  
 GGGGACGGGCCGGTCCTCCTGCCCCGACAACCACTACCTC  
 AGCACCCAGAGCGCACTTAGCAAAGACCCAAACGAGAA  
 GAGAGACCATATGGTGCTGCTGGAGTTCGTTACCGCAGC  
 CGGAATCACCTTGGGCATGGACGAGCTCTATAAATGAga  
 ttcgaacggatatcgagcatcttaccgccatttatacccatattgttctgttttctgtattgggtat  
 acatttaaatgttaataaaacaaaatggtggggcaatcattttagggatgtgaattacta  
 gttcaggtgtattgccacaagacaaacatgttaagaaacttcccgattttagctctgttctgtt  
 aatcaacctctggattacaaaattgtgaaagattgactgatattcttaactatgttgccttttacg  
 ctgtgtggatatgtctgtttatagcctctgtatctagctattgttcccgtagcggttctgtttctct  
 cctgtataaaactctggttctgtctcttttagaggagttgtggccgttgcctgcaacgtggcgt  
 ggtgtgtctgtgttctgtgacgcaacccccactggctggggcattgccaccacctgtcaactc  
 ctltctgggacttctgcttccccctcccgatcgccacggcagaactcatcgccgcctgccttgc  
 ccgctgtctggacaggggctaggttctgggcactgataattccgtgggtgtgtcagtagctgta  
 cctttaagaccaatgacttacaaggcagctgtatcttagccactttttaaagaaaaggggg  
 gactggaagggttaattcactcccaagaagacaagatctgttttgcctgtactgggtctctc  
 tgggttagaccagatctgagcctgggagctctctggctaactagggaacccactgttaagcctc  
 aataaagcttgccttgagtgttcaatgatcataatcaagccatcacatctgtagaggttactt  
 gctttaaanaacccacacctccccctgaacctgaaacataaaatgaatgcaattgttgttga  
 actgtttattgcagcttataatggttacaaaataagcaatagcatcacaatttcacaaaataagc  
 attttttactgcattctagtgtgtgttgtccaaactcatcaatgtatcttatcatgtctggatctgc  
 gtegacACGAAGAGACGACTGACTGACTGACTGGAAAGAG  
 GAAGGGCTGGAAGAGGAAGGAGCTTGATCCAGATCCCG  
 ATCTCGATCCAGATCCGGATCGCAGCTTGCGGTAATCAT  
 GGTTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCAC  
 AATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTA  
 AAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAA  
 TTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCAGTCGGGAAACC  
 TGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGG  
 GGAGAGGCGGTTTGGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCT  
 CGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCTGTTCCGGCTGCGGC  
 GAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTAT  
 CCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGA  
 GCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGC  
 CGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGAC  
 GAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCG  
 AAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCC

[0794]

		<p>TGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCG  CTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCG  TGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTC  GGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGA  ACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAA  CTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATC  GCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAG  CGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGT  GGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAAGAGTATTTGGTA  TCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAG  TTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTA  GCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCA  GAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTA  CGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTAA  GGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACC  TAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTAAATCAATCT  AAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAAT  GCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTAT  TTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGAT  AACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGC  TGCAATGATACCGCAGCTTGGGAAACCATAAGAGCTGA  AGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGAT  CCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTG  TTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCT  CAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCT  CAGTGGAACGAAAACCTCACGTAAAGGGATTTTGGTCATG  AGCTTGCGCCGTCCCGTCAAGTCAGCGTAATGCTCTGCC  AGTGTTACAA</p>
77	eGFP	<p>ATGGTGTCTAAAGGCGAAGAGCTGTTACCGGTGTGGTG  CCGATTCTTGTAAGAGCTGGATGGAGATGTTAATGGTCAC  AAGTTTTCAAGTGTCTGGGGAGGGCGAAGGCGACGCGAC  CTATGGTAAACTCACGCTTAAGTTTATCTGCACCACAGG  GAAGCTCCCTGTTCCATGGCCAACCCTTGTGACAACACT  TACTTACGGCGTGCAGTGTTTCAGCAGGTATCCTGACCA  TATGAAGCAGCACGATTTCTTCAAGTCTGCAATGCCCGA  GGGGTACGTACAAGAGCGGACAATTTTCTTCAAGGACG  ACGGAAATTACAAAACCTAGGGCAGAGGTTAAGTTCGAA  GGGGATACACTTGTTAATAGGATCGAACTGAAAGGCATT  GATTTCAAGGAGGATGGAAACATACTCGGGCACAACT  GGAATATAACTACAATTCACATAATGTGTATATCATGGC  TGATAAGCAGAAAAACGGTATCAAAGTGAACCTTTAAGA  TCCGGCATAACATTGAAGACGGTAGCGTGCAGCTCGCTG  ACCACTACCAGCAGAACACTCCAATCGGGGACGGGCCG  GTCCTCCTGCCCCGACAACCACTACCTCAGCACCCAGAGC  GCACTTAGCAAAGACCCAAACGAGAAGAGAGACCATAT  GGTGCTGCTGGAGTTCGTTACCGCAGCCGGAATCACCTT  GGGCATGGACGAGCTCTATAAATGA</p>
78	pLRPO-R ORI 2-9	<p>CCAATTAACCAATTCTGAttagaaaaactcatcgagcatcaaatgaaactgca  atttattcacatcaggattatcaataccatattttgaaaaagccgtttctgtaatgaaggagaaaa  ctcaccgaggcagttccataggtatggcaagatcctggatcggctcgcgattccgactcgtcca</p>

[0795]

抗体 CD3 ε T2A <sub>-</sub> e GFP	acatcaatacaacctattaatttccccctcgtcaaaaaataagggtatcaagtgagaatcaccatga gtgacgactgaatccgggtgagaatggcaaaagttaatgcatttcttccagacttggtcaacagg ccagccattacgctcgtcatcaaaatcactcgcacatcaacaaaccgttattcattcgtgattgcg cctgagcaagacgaaatacgcgatcgtgttaaaaggacaattacaacaggaatcgaatgc aaccggcgaggaacactgccagcgcacatcaacaatatttccactgaatcaggatattctcta atacctggaatgctgttttccggggatcgcagtggtgagtaacctgcatcatcaggagtacg gataaaatgcttgatggcggagaggcataaattccgtcagccagttagtctgaccatctcat ctgtaacatcattggcaacgctaccttggcatgttccagaaacaactctggcgcacatgggcttc ccatacaagcgatagattgtcgcacctgattgcccagacattatcgcgagcccatattataccata taaatcagcatccatgttggaatttaacgcggcctcgacgttcccgttgaatatggctcatAA CACCCCTTGTATTACTGTTTATGTAAGCAGACAGTTTTAT TGTTTCATGATGATATATTTTTATCTTGTGCAATGTAACAT CAGAGATTTTGAGACACAACGTGGCTTTCCCCCCCCCCCC CCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTATCACGAGGC CAGCTTGGGAAACCATAAGACCGAGATAGAGTTGAGTG TTGTTCCAGTTTGGAAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACG TGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAG GGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCCAAATCAAGT TTTTGGGGTTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAAC CCTAAAGGGAGCCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAA GCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCG AAAGGAGCGGGCGCTAAGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGT CACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGC GCCGCTACAGGGCGCGTACTATGGTTGCTTTGACGTATG CGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATA CCGCATCAGGCGccattcgccattcaggctcgcgaactgttgggaagggcgatcg gtgcgggcctcttcgtattacgccaGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTG CAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGT CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAATTGATCGAG ATCGTGATCCGGATCAAGATCCAGATCGAATTGGAGGCT ACAGTCAGTGGAGAGGACTTTCACTGACTGACTGACTGC GTCTCAACCTcctaggggacattgattattgactagttattaatagtaataacacggg gtcattagttcatagcccatataggagttccgcttacataacttacggtaaatggccgcctg gctgaccgccaacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgtcccatagtaacgc caatagggactttccattgacgtcaatgggtggagtattacggtaaacgtccacttggcagta catcaagtgtatcatatgccaagtacgccccattgacgtcaatgacggtaaatggccgcct ggcatattgcccagtlacatgacctatgggactttcctacttggcagtlacatctacgtattagtc cgtattaccatgggtgatgcggtttggcagtlacatcaatgggcgtggatagcggtttgactcac ggggatttccaagtcctcacccattgacgtcaatgggagttgtttggcaccaaaatcaacg ggactttccaaaatgtcgtlaacaactccgccccattgacgcaaatggcggttaggcgtgtacg gtgggaggctctatataagcagagctcgtttagtgaaccgggtctctctggttagaccagatctg agcctgggagctctctggttaactaggaaccactgcttaagcctcaataaagcttgccctga gtgctcaaagtagtgtgtgcccgtctgtgtgtgactctggttaactagatccctcagaccctt tagtcagtgtgaaaatctctagcagtggcgcccgaacagggacttgaaagcgaaagtaag ccagaggagatctctgacgcaggactcggcttgcgtgaagcgcgcacggcaagaggcgag gggcggcgactggtgagtacgcaaaaatttgactagcggaggctagaaggagagagtag ggtgcgagagcgtcgttattaagcgggggagaattagataaatgggaaaaaattcggttaag gccaggggggaaagaacaataataactaaaacatatagttaggcgcaagcaggagctagaa cgattcgcagttaatcctggccttttagagacatcagaaggctgtagacaaatactgggacagc tacaacatccctcagacaggatcagaagaacttagatcattatataatacaatagcagtcctc
---------------------------------------	---



[0796]

tattgtgtgcatcaaaggatagatgtaaaagacaccaaggaagccttagataagatagaggaa  
 gagcaaaacaaaagtaagaaaaaggcacagcaagcgcattcagacctggaggaggcagg  
 aggcgatatgagggacaattggagaagtgaattataataataaagtagtaaaaattgaacca  
 ttaggagtagcaccaccaaggcaagagaagagtgggtgcagagagaaaaagagcagtgc  
 ggaataggagccttctccttgggttcttgggagcagcaggaagcactatgggcgcagcgtca  
 atgacgctgacggtacaggccagacaattattgtctgatatagtgcagcagcagaacaatttgc  
 tgagggctattgaggcgcaacagcatctgttgcactcacagctctggggcatcaaacagctcc  
 aggcaagaatcctggctgtggaagatacctaaaggatcaacagctcctggggatttgggggt  
 gctctggaaaactcattgcaccactgctgtgccttggaaatgctagtggagtaataaatctctgg  
 aacagatttggaaataacatgacctggatggagtgggacagagaaattaacaattacacaagct  
 taatacactccttaattgaagaatcgcaaaaccagcaagaaaagaatgaacaagaattattgga  
 attagataaatgggcaagtttgggaattgggttaacataacaaattggctgtggtatataaaatta  
 ttcataatgatagtaggaggttggtaggttaagaatagtttttgcctgactttctatagtgaatg  
 agttaggcaggatattcaccattatcgtttcagaccacctcccaatcccagggggaccacg  
 cgtacaaatggcagtatccacacaattttaaagaaaaggggggatttgggggtacagtgc  
 aggggaaagaatagtagacataatagcaacagacatacaactaaagaattacaaaaacaaa  
 ttacaaaaattcaaaatttctgggtttattacagggacagcagaatccactttggaagctgag  
 catccggctccgggtgccgtcagtgggcagagcgacatcgccacagtcgccgagaagtt  
 ggggggaggggtcggaattgaaccgggtgcctagagaaggtggcgcggggttaaactggg  
 aaagtgatgtcgtgactggctccgcttttcccgagggtgggggagaaccgtatataagtgc  
 agtagtcgctgaacgttcttttgcacgggttgcgcgcagaaacacaggtaagtgcctgtg  
 tgtgttccgcgggctggccttttacgggttatggccttgcgtgccttgaattactccacg  
 cccctggctgcagtacgtgattcttgatcccgagcttgcgggttgaagtgggtgggagagttc  
 gaggccttgcgttaaggagccccttcgcctcgtgcttgagttgaggcctggcctgggcgtg  
 gggccgcgcgtgcgaatctgggtggcaccttcgcgcctgtctcgtcttgcataagctccta  
 gccatttaaaattttgatgacctgtgcgacgttttttctggcaagatagcttgaatgcgg  
 gccaaagtctgcacactggtatttgcgttttggggccgcggcgccgacggggcccgctgcg  
 tccagcgacatgttcggcgaggcggggctgcgagcgcgccaccgagaatcgagcg  
 ggggtagctcaagctggccggcctgctctggtgcctggcctcgcgcgcgctgtatcgccc  
 cgccctgggcggcaaggctggcccggtcggcaccagttgcgtgagcggaaagatggccgc  
 tcccgccctgctgcagggagctcaaaatggaggacgcggcgctcgggagagcgggcg  
 ggtgagtcacccacacaaaaggaaaaggcccttccgtcctcagccgtcgttcatgtgactcc  
 acggagtlaccggcgccgtccaggcacctcgattagttctcgagcttttggagtlacgtcgtt  
 taggttgggggggaggggtttatgcgatggagtccccacactgagtgggtggagactgaag  
 ttaggccagcttggcacttgatgaattctccttggaaattgccctttttgagtttggatcttggttca  
 ttctcaagcctcagacagtggttcaagtttttcttccatttcaggtgtcgtgaaaactaccctc  
 tagagccgccaccATGCTCCTCCTCGTGACTAGCCTTCTCCTGT  
 GCGAGCTCCCACACCCTGCATTCTCCTGATCCCAGAAG  
 TGCAACTTCTCGAGAGCGGTGGGGGACTCGTCCAGCCGG  
 GAGGTTCCCTGCGACTCAGCTGTGCAGCCTCAGGCTTTA  
 CCTTTTCCAGTTACGCAATGAGTTGGGTCCGGCAGGCGC  
 CTGGTAAAGGACTCGAGTGGGTGAGTGCAATCAGCGGA  
 AGTGGCGGGTCTACATACTATGCGGACTCTGTAAAGGC  
 AGGTTCACTATTTCAAGGGACAATTCCAAGAACACGCTC  
 TACCTGCAGATGAATAGCCTTAGAGCTGAAGACACGGCC  
 GTGTACTATTGTGCCAAAAGCAGTACCATTTCGACTAC  
 TGGGGGCAGGGAACCTCTCGTCACCGTGAGCTCCGGCGG  
 AGGTGGAAGCGGGGGAGGGGGCTCCGGTGGTGGGGGAT  
 CAGAAATTGTTCTCACACAGTCACCCGGAACCCCTTTCAT  
 TGTCCCCCGGCGAGCGCGCCACCCTCAGCTGTCCGGCCA

[0797]

GTCAGAGCGTGTCTAGCTCTTACCTGGCCTGGTACCAGC  
AGAAACCTGGGCAAGCTCCCAGACTCCTGATATATGGGG  
CCAGCAGCCGGGCCACTGGCATTCCGGACAGGTTTAGTG  
GATCAGGCTCTGGCACTGATTTTACACTGACGATTTCAA  
GGTTGGAACCCGAAGACTTCGCAGTGTACTATTGTCAGC  
AGTATGGGTCTAGCCCGTGGACTTTCGGGCAAGGCACCA  
AGGTGGAAATCAAGGCAGCTGCTGGAGGTGGGGGAAGT  
GGCGGTGGTGGCTCAGGCGGCGGGGGGAGCCTCGAGGA  
CGGTAATGAAGAGATGGGGGGCATTACACAAACCCCGT  
ACAAGGTCTCTATCAGTGGGACGACTGTGATTCTGACAT  
GCCCACAGTATCCAGGTTTCAAGAAATCCTGTGGCAGCATA  
ATGACAAGAACATCGGTGGGGATGAGGATGATAAGAAT  
ATCGGAAGCGACGAAGACCACCTGTCTCTCAAAGAGTTT  
AGCGAGCTGGAGCAGAGTGGGTATTATGTCTGCTATCCT  
AGAGGTAGCAAGCCAGAGGACGCAAACCTTTACCTTTAC  
CTCAGAGCCAGGGTCTGCGAGAACTGCATGGAAATGGA  
CGTGATGAGTGTTGCAACTATAGTGATAGTTGACATTTG  
CATCACCGGGGGTCTGCTCCTGCTGGTTTACTATTGGAG  
CAAGAACCGCAAGGCTAAAGCCAAGCCAGTAACACGGG  
GCGCAGGCGCGGGAGGCAGGCAGCGAGGGCAGAATAA  
GGAGCGCCCCCACCCTGTCCTCGAATCCGGATTACGAACC  
CATTCGGAAAGGCCAGAGGGACTTGTACTCAGGGCTCA  
ACCAAAGACGGATCGAGGGGCGAGGATCCTTGCTGACA  
TGTGGTGACGTGGAGGAGAATCCTGGTCCTTCTCGCgcccgc  
caccATGGTGTCTAAAGGCGAAGAGCTGTTACCGGTGTG  
GTGCCGATTCTTGAGAGCTGGATGGAGATGTTAATGGT  
CACAAAGTTTTCAGTGTCTGGGGAGGGCGAAGGCGACGC  
GACCTATGGTAAACTCACGCTTAAGTTTATCTGCACCAC  
AGGGAAGCTCCCTGTTCCATGGCCAACCCTTGTGACAAC  
ACTTACTTACGGCGTGCAGTGTTTCAGCAGGTATCCTGA  
CCATATGAAGCAGCACGATTTCTTCAAGTCTGCAATGCC  
CGAGGGGTACGTACAAGAGCGGACAATTTTCTTCAAGG  
ACGACGGAAATTACAAAACCTAGGGCAGAGGTTAAGTTC  
GAAGGGGATACACTTGTTAATAGGATCGAACTGAAAGG  
CATTGATTTCAAGGAGGATGGAAACATACTCGGGCACA  
AACTGGAATATAACTACAATTCACATAATGTGTATATCA  
TGGCTGATAAGCAGAAAAACGGTATCAAAGTGAACTTTA  
AGATCCGGCATAACATTGAAGACGGTAGCGTGCAGCTC  
GCTGACCACTACCAGCAGAACACTCCAATCGGGGACGG  
GCCGGTCCTCCTGCCCCACAACCACTACCTCAGCACCCA  
GAGCGCACTTAGCAAAGACCCAAACGAGAAGAGAGACC  
ATATGGTGCTGCTGGAGTTCGTTACCGCAGCCGGAATCA  
CCTTGGGCATGGACGAGCTCTATAAATGAGaattcgaacgatat  
cgagcatcttaccgccattatacccatatttgttctgttttcttgatttgggtatacatttaaagtta  
ataaaacaaaatggtggggcaatcatttacatttttagggatatgtaattactagttcaggtgtatt  
gccacaagacaaacatgttaagaaactttccgttatttacgctctgttctgttaatacaacctctg  
gattacaaaatttgtgaagattgactgatattcttaactatgttctctttacgctgtgtggatat  
gctgctttatagcctctgtatctagctattgcttcccgtaacgcttctgttctctctgtataaat  
cctggttgcctgtctcttttagaggagttgtggcccggtgtccgtcaacgtggcgtggtgtgctctg  
tgtttgcctgacgaacccccactggctggggcattgccaccacctgtcaactcctttctgggact

[0798]

ttcgtttccccctcccgatcgccacggcagaactcatcgccgctgccttggcctgctgga  
caggggctaggttgctgggcactgataattccgtggtgtgtcagtagtggtaaccttaagacca  
atgacttacaaggcagctgtagatcttagccactttttaaaagaaaaggggggactggagggg  
ctaattcactcccaaagaagacaagatctgctttttgctgtactgggtctctctggttagaccag  
atctgagcctgggagctctctggctaactaggaacccactgcttaagcctcaataaagcttgc  
cttgagtgttcaatgatcataatcaagccatatcacatctgtagaggttactgctttaaaaaac  
ctccacacctccccctgaacctgaacataaaatgaatgcaattgttgttgaactgtttattgc  
agcttataatggttacaaataaagcaatagcatcacaaattcacaaataaagcatttttactg  
cattctagttgtggtttgtccaaactcatcaatgtatcttatcatgtctggaatcgctcgacACG  
AAGAGACGACTGACTGACTGACTGGAAAGAGGAAGGGC  
TGGAAGAGGAAGGAGCTTGATCCAGATCCCGATCTCGAT  
CCAGATCCGGATCGCAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAG  
CTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCAC  
ACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGG  
GGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTG  
CGCTCACTGCCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCTGTC  
CAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGG  
CGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACT  
GACTCGCTGCGCTCGGTCTCGGTGCGGCGAGCGGTA  
TCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAA  
TCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGG  
CCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGC  
TGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATC  
ACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCG  
ACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGC  
TCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCG  
GATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGCGC  
TTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTA  
GGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCC  
CGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACATCG  
TCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACT  
GGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGT  
ATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTA  
ACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCG  
CTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTA  
GCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTG  
GTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAA  
AAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGT  
CTGACGCTCAGTGGAACGAAACTCACGTTAAGGGATTT  
TGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCC  
TTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTTAAATCAATCTAAAGTA  
TATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAA  
TCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTT  
ATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTAC  
GATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAAT  
GATACCGCAGCTTGGGAAACCATAAGAGCTGAAGCCAG  
TTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCA  
AACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCA  
AGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAA  
GATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGA

[0799]

		ACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGCTTGC GCCGTCCCGTCAAGTCAGCGTAATGCTCTGCCAGTGT CAA
79	pLRPO_ ROR1 3- 6 抗体 C D3e T2A eGFP	CCAATTAACCAATTCTGAttagaaaaactcatcgagcatcaaatgaaactgca atftattcacatcaggattatcaataccatattttgaaaaagccgtttctgtaatgaaggagaaaa ctcaccgagggcagttccataggtggcaagatcctggtatcggtctgcgattccgactcgcca acatcaatacaacctattaatttccctcgtcaaaaataagggtatcaagtgagaatcaccatga gtgacgactgaatccggtgagaatggcaaaagttaagcatttcttcagactgttcaacagg ccagccattacgctcgtcatcaaaatcactcgcacatcaaccaaaccgttatcattcgtgattgag cctgagcaagacgaaatacgcgacgctgttaaaaggacaattacaacaggaatcgaatgc aaccggcgaggaacactgccagcgcacatcaacaatatttcacctgaatcaggatattcttcta atacctggaatgctgttttccggggatcgcagtggtgagtaacctgcatcaccaggagtagc gataaaatgcttgatggtcgaagaggcataaattccgtcagccagtttagctgaccatcctat ctgtaacatcattggcaacgctacctttgccatgtttcagaacaactctggcgcacatcggttc ccatacaagcgaatagattgtcgcacctgattgcccagacattatcgagcccatattataccata taaatacagcatccatgttggaatttaacgcggcctcgacgtttcccggtgaatatggtcatAA CACCCCTTGTATTACTGTTTATGTAAGCAGACAGTTTTAT TGTTTCATGATGATATATTTTTATCTTGTGCAATGTAACAT CAGAGATTTTGAGACACAACGTGGCTTTCCCCCCCCCCCC CCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTATCACGAGGC CAGCTTGGGAAACCATAAGACCGAGATAGAGTTGAGTG TTGTTCCAGTTTGGAAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACG TGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAG GGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCCAAATCAAGT TTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAAC CCTAAAGGGAGCCCCCGATTAGAGCTTGACGGGGAAA GCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCG AAAGGAGCGGGCGCTAAGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGT CACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGC GCCGCTACAGGGCGCGTACTATGGTTGCTTTGACGTATG CGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATA CCGCATCAGGCGccattcgcattcaggctgcgcaactgttgggaagggcgatcg gtgcgggcctcttcgctattacgccaGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTG CAAGGCGATTAAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGT CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAATTGATCGAG ATCGTGATCCGGATCAAGATCCAGATCGAATTGGAGGCT ACAGTCAGTGGAGAGGACTTTCACTGACTGACTGACTGC GTCTCAACCTTcctaggggacattgattattgactagttattaatagtaataattacggg gtcattagttcatagcccatataggagttccggttacataacttacggtaaatggccgcctg gctgaccgcccacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgtcccatagtaacgc caatagggactttcattgacgtcaatgggtggagtattacggtaaatgccacttggcagta catcaagtgtatcatatgccaagtacgccccattgacgtcaatgacggtaaatggccgcct ggcattatgccagtlacatgacctatgggactttcctacttggcagtlacatctacgtattagtc cgctattaccatggtgatgcggtttggcagtlacatcaatgggcgtggatagcggttgactcac ggggatttccaagtctccacccattgacgtcaatgggagttgttttggcaccaaaatcaacg ggactttccaaaatgtcgtacaactccgccccattgacgcaaatggcggttaggcgtgtacg gtgggaggtctatataagcagagctcgttagtgaaccgggtctctcgttagaccagatctg agcctgggagctctctggctaactaggggaaccactgcttaagcctcaataaagcttgccctga gtgctaaaagtagtgtgtcccgtctgtgtgtgactctgttaactagagatccctcagaccctt tagtcagtggtgaaaatctctagcagtgccgcccgaacagggacttgaaagcgaaagtaag



[0800]

ccagaggagatctctcgacgcaggactcggcttgctgaagcgcgcacggcaagaggcgag  
 gggcggcgactggtagtacgcaaaaattttgactagcggaggctagaaggagagagtag  
 ggtgagagagcgtcggtagtaagcgggggagaattagataaatgggaaaaaattcggtaag  
 gccaggggggaaagaaacaatataaaactaaaacatatagtagggcaagcagggagctagaa  
 cgattcgagtaaatcctggccttttagagacatcagaaggctgtagacaaatactgggacagc  
 tacaaccatccctcagacaggatcagaagaacttagatcattatataatacaatagcagtcctc  
 tattgtgtgcatcaaaggatagatgtaaaagacaccaaggagccttagataagatagaggaa  
 gagcaaaacaaaagtaagaaaaaggcacagcaagcgatctcagacctggaggaggcagg  
 aggcgatatgagggacaattggagaagtgaattataataataaagtagtaaaaattgaacca  
 ttaggagtagcaccaccaaggcaagagaagagtggtgagagagaaaaagagcagtg  
 ggaataggagccttggtccttggttcttgaggagcagcagggaagcactatgggcgcagcgtca  
 atgacgctgacggtagcagccagacaattattgtctgatatagtgacgagcagacaatttgc  
 tgagggctattgaggcgaacagcatctgttgcaactcacagctcggggcatcaaacagctcc  
 agcaagaatcctggctgtggaagatacctaaggatcaacagctcctggggatttgggggt  
 gctctggaaaactcattgcaccactgctgtgcttggaatgctagttggagtaataatctctgg  
 aacagatttgaataacatgacctggatggagtgaggacagagaaattaacaattacacaagct  
 taatacacctccttaattgaagaatcgcaaaaccagcaagaaaaaatgaacaagaattattgga  
 attagataaatgggcaagtgttggaattggttaacataacaaattggcgtggtatataaaatta  
 ttcataatgatatagtaggagccttggtagggttaagaatagttttgctgtactttctatagtgaatag  
 agttaggcagggatattcaccattatcgtttcagaccacctcccaatcccagggggaccacg  
 cgtacaaatggcagtagtcatccacaattttaaagaaaaggggggattggggggtacagtg  
 aggggaaagaatagtagacataatgcaacagacatacaaaactaaagaattacaaaaacaaa  
 ttacaaaaattcaaaatttctgggttattacagggacagcagaatccacttggaaagctgag  
 catccggctccggtgcccgtcagtgggcagagcgcacatcgccacagtcgccgagaagt  
 ggggggaggggtcggaattgaaccggtgcctagagaagtgggcggggttaaactggg  
 aaagtgatgtcgtgactggctccgcttttcccgagggtgggggagaaccgtatataagtgc  
 agtagtcgccgtgaacgttcttttcgaacgggttgcgccagaaacacaggtgaagtgcctg  
 tgtgttcccgcgggctggcctctttacgggttatggccttgctgctgaattacttcacg  
 cccctggctgcagtagctgattcttgatcccgagcttcgggttgaagtgggtgggagagttc  
 gaggccttgcgcttaaggagcccttcgctcgtgcttgagttgaggcctggcctgggcgctg  
 gggccgcccgtgcaaatctggtggcaccttcgcccgtgctcgtgcttgcataagctctta  
 gccatttaaaattttgatgacctgctgcgacgctttttctggcaagatagcttgaatgcgg  
 gccaaagatctgcacactggtagtctgggttttggggccgcccggcgacggggcccgctgcg  
 tcccagcgcacatgttcggcgaggcggggcctgcgagcgcggccaccgagaatcgagc  
 ggggtagctcaagctggccggcctgctctggtgcctggcctgcgcccgcctgtagtgcgc  
 cgccctgggcggcaaggctggcccgtcggcaccagttgcgtgagcggaaagatggccgc  
 tcccggccctgctgcaggagctcaaaatggaggacgcggcgctgggagagcggggcg  
 ggtgagtcaccacacaaaaggaaaaggcccttccgtcctcagccgtcgttcatgtgactcc  
 acggagtaccggcgccgtccaggcacctcgattagttctcagactttggagtacgtcgtctt  
 taggttggggggagggggtttatgcgatggagttcccccacactgagtggggtggagactgaag  
 ttaggccagcttgacattgatgaattctccttggaattggccttttgagttggacttggttca  
 ttctcaagctcagacagtggttcaagtttttcttccattcaggtgtcgtgaaaactaccctc  
 tagagccgccaccATGCTTCTCCTTGTTACATCACTGTTGCTTTG  
 TGAAGTCCCCACCCCGCGTTTCTTTTGATCCCTCAGTCA  
 GCTCTGACCCAACCTGCCTCCGTCTCTGGGAGTCCAGGC  
 CAGAGTATCACAATTTCTTGACAGGCACCTCATCTGAT  
 GTCGGCGGTTACAATTACGTTAGTTGGTATCAGCAACAT  
 CCAGGTAAGGCTCCAAAGGTGATGATCTATGACGTCTCA  
 AATAGACCTCTGGCGTCAGCGACAGGTTTAGTGGTAGC  
 AAATCCGGGAACACAGCTTCACTTACAATTAGCGGCCCTC

[0801]

CAAGTAGAAGACGAAGCTGACTATTACTGCTCTAGTTAT  
TCAACGTCAATTACCCCTGTGTTTGGTGGCGGTACAAAA  
CTCACAGTGCTTGGCGGAGGCGGGTCTGGAGGTGGAGG  
TTCTGGAGGCGGAGGTTCCCAAGTGCAACTTGTGCAATC  
AGGAGCTGAAGTCAAAAAGCCGGGAGAATCCCTGAAAA  
TAAGCTGCGAAGCAAGTGGTTACTCTTTTACTTCTTACTG  
GATTGGATGGGTTCGGCAGATGCCCGGAAAGGGACTCG  
AGTGGATGGGAATTATTTACCCTGGAGACAGCGACACA  
AGATACAGCCCTTCATTCCAGGGGCAGGTGACCATTCT  
GCTGACAAATCAATCAGTACAGCCTATCTGCAATGGAGT  
TCCCTCAAAGCCAGTGACACTGCTATGTATTACTGCGCG  
CGACTGGAAGTGGGATACTACTACTACGGAATGGACGTA  
TGGGGACAGGGAACCAACCGTTACTGTTAGTAGCGCCGCC  
GCTGGAGGGGGAGGATCCGGAGGAGGGGGGAGCGGAG  
GAGGAGGATCATTGGAGGATGGAAATGAAGAGATGGGC  
GGCATCACTCAGACACCGTACAAAGTGAGTATTTCTGGA  
ACCACCGTCATTTTGACTTGTCTCAGTACCCAGGAAGC  
GAGATTCTGTGGCAGCATAACGACAAGAACATCGGGGG  
CGACGAGGACGATAAAAAATATAGGGTCTGACGAGGACC  
ACCTTAGCCTTAAGGAGTTTAGCGAGCTGGAACAGTCCG  
GATACTATGTATGCTATCCACGCGGCAGCAAACCCGAGG  
ATGCTAACTTTTACTTGTACTTGAGGGCGCGCGTTTGTGA  
GAACTGCATGGAGATGGATGTTATGTCCGTAGCTACCAT  
TGTTATCGTCGACATTTGTATTACCGGTGGATTGCTGCTG  
TTGGTCTACTATTGGTCCAAAAATCGGAAAGCCAAGGCC  
AAACCCGTAACGAGAGGTGCCGGCGCTGGAGGAAGACA  
GAGGGGCCAGAATAAAGAGAGGCCGCCAGTTCCCA  
ATCCTGATTATGAACCCATTTCGAAAAGGGCAGAGGGAC  
CTCTATTCCGGGCTCAACCAGAGGAGGATCGAAGGAAG  
GGGATCCTTGCTTACCTGTGGCGACGTAGAAGAGAATCC  
AGGCCCTCAAGGgcccgcaccATGGTGTCAAAGGGCGAAG  
AGTTGTTTACTGGAGTCGTACCCATCCTGGTGGAAATTGG  
ACGGGGACGTGAACGGCCACAAGTTCTCTGTGTCTGGAG  
AAGGCGAGGGCGACGCTACTTATGGAAAAGTGAAGTCTG  
AAATTTATTTGCACTACAGGAAAAGTGCCTGTCCCATGG  
CCCACGCTGGTTACAACCCTCACATATGGTGTTCAATGT  
TTCTCTCGCTACCCCGACCATGAAGCAGCATGACTTT  
TTCAAGTCCGCGATGCCCGAAGGGTACGTTCAAGAACGC  
ACTATATTTTTCAAGGATGATGGCAACTACAAGACAAGA  
GCTGAGGTGAAATTCGAAGGTGATACACTTGTAACAGA  
ATCGAACTCAAGGGAATCGACTTCAAGGAAGACGGAAA  
TATCCTCGGGCACAAGTGAATATAACTACAATAGCCA  
CAACGTATATATCATGGCCGACAAACAGAAGAATGGGA  
TCAAGGTAAATTTTAAGATAAGACACAATATAGAAGAC  
GGATCTGTGCAATTGGCCGACCATTATCAGCAGAATACC  
CCCATTTGGAGATGGCCCAGTGCTCCTTCAGACAATCAC  
TACCTTTCAACACAGTCCGCGTTGTCTAAAGACCCCAAT  
GAGAAGAGGGACCACATGGTGTTGCTCGAATTTGTTACT  
GCCGCTGGGATCACTCTGGGCATGGATGAGTTGTATAAA  
TGAgaattcgaacggatacgcagcatctaccgccattatacccatattgttctgtttcttga

[0802]

tttgggtatacatttaaatgttaataaaaacaaaatgggtggggcaatcatttacatttttagggatatg  
taattactagttcaggtgtattgccacaagacaaaacatgttaagaaactttcccgtatttacgctc  
tgttccgttaataaacctctggattacaaaatttgtgaaagattgactgatattcttaactatgttgc  
tcctttacgctgtgtggatatgctgctttatagcctctgtatctagctattgcttcccgtacggcttt  
cgttttctcctcctgtataaatcctgggtgtgtctcttttagaggagttgtggccgtgtccgtca  
acgtggcgtggtgtgtctgtgttctgtacgcaacccccactggctggggcattgccaccac  
ctgtcaactccttctgggactttcgtttccccctcccgatcggcacggcagaactcatcgccg  
cctgccttggccgctgtggacaggggctaggttctgggactgataattccgtggtgtgtc  
agtactggtaccittaaagaccaatgacttacaaggcagctgtagatcttagccactttttaaaga  
aaaggggggactggaagggctaattcactcccaaagaagacaagatcgtcttttgcctgtact  
gggtctctctggtagaccagatctgagcctgggagctctctggctaactagggaacccactg  
cttaagcctcaataaagcttgccttgagtgttcaatgatcataatcaagccatatcacatctgta  
gaggttacttgccttaaaaaacccacacccctcccctgaacctgaaacataaaatgaatgcaa  
ttgtgtgttaactgtttattgcagcttataatggttacaataaagcaatagcatcacaatttca  
caaataaagcatttttctactgcattctagttgtggttgtccaaactcatcaatgtatcttatcatgt  
ctggatctgcgtcgacACGAAGAGACGACTGACTGACTGACTGGA  
AAGAGGAAGGGCTGGAAGAGGAAGGAGCTTGATCCAGA  
TCCCGATCTCGATCCAGATCCGGATCGCAGCTTGCGTA  
ATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCG  
CTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAA  
GTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCAC  
ATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCGCTTTCCAGTCGGG  
AAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACG  
CGCGGGGAGAGGCGGTTTTCGTATTGGGCGCTCTTCCGC  
TTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCCGGCTG  
CGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACG  
GTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAGAACA  
TGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAA  
AAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTTCATAGGCTCCGCCCC  
CCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAG  
GTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGT  
TTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGAC  
CCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCG  
GGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTAT  
CTCAGTTCGGTGTAGGTCTGCTCCAAGCTGGGCTGT  
GTGCACGAACCCCCCGTTTACGCCCCGACCGCTGCGCCTTA  
TCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGTAAGACAC  
GACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATT  
AGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTG  
AAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGT  
ATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGG  
AAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCA  
CCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGA  
TTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTG  
ATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAAC  
TCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGG  
ATCTTACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTAA  
AATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACA  
GTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGA  
TCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGT



[0803]

		CGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGG CCCCAGTGCTGCAATGATACCGCAGCTTGGGAAACCATA AGAGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTA GCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTG GTTTTTTTGTGTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAA AAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGT CTGACGCTCAGTGGAACGAAACTCACGTTAAGGGATTT TGGTCATGAGCTTGCGCCGTCCCGTCAAGTCAGCGTAAT GCTCTGCCAGTGTTACAA
80	ROR1 sd Ab1 (DN A)	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGCCTTGGTGCA GGCTGGGGGATCTCTGAGACTCTCCTGTGAAGCCTCTGG AAGCAGCTTCAGCCTCTATACCATGGCCTGGTACCGCCA GACTCCAGGAAAGCAGCGGGAGTTGGTCGCAACGATTA CTAGTGGTTACCACACAAACTATGCCGACTCCGCGAAGG ACCGATTACCATTTCTAGAGACAACGCCAAGAACACGG CCTATCTGCAATTGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACAG CCGTCTATTACTGTGCAGCGAAGAGGGTTTGGAGCGCAG AGTATAACTACTGGGGCCAGGGGACCCTGGTCACCGTCT CCTCA
81	ROR1 sd Ab4 (DN A)	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGATTGGTGCA GGCTGGGGGCTCTCTGAAACTCTCCTGTGCAACCTCTGG AGGCACCTTCAGTAGCTATCGTGTAGGCTGGTTCCGCCA GGCTCCAGGGAAGCCGCGTGAGACTGTAGCCACTATTAG TAGGAATGGTGGAGGCACACACTATGCGGACTCCGTGA AGGGTCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAC ATGGCGTATCTACAAATGAACGGCCTGAAACCTGAGGA CACGGCCATTTATTACTGTGCAGCAGATTCCCTCTTCTGG CCTGGCCCAGGCCATTATGACAACTTGGGCCAGGGGACC CAGGTCACCGTCTCCTCA
82	ROR1 sd Ab5 (DN A)	GATGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGATTGGTGCA GGCTGGGGGCTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGG ACGCTCCTTCAATAGCTATACCTTGGGCTGGTTCCGCCA GGCTCCAGGAAAGGAGCGTGAGTTTGTAGCTTATGCCAT TACTATCCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCGT CAGAGACAACGCCAGGAACACGGTGTATCTGCAAATGA ATAGCCTCAAATCTGAGGATACGGCCATTTATTACTGTG CAGCAGCGGACATACGTACTAGGCGCTCTAGTACCTGGT ACAGGGAGACGATGGAGTATGACTACTGGGGCCAGGGG ACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
83	ROR1 sd Ab10 (D NA)	GATGTTTCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGATTGGTGCA GCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGA AGCATCTTCGCAGTCGATGCCATGGGCTGGTACCGCCAG GCTCCAGGGAAGCAGCGCGAGTTGGTCGCACGTATTAGT CGTACTAATTTGGGAGCAAGCTATTTAGACTCCGTGAAG GGCCGATTACCATCTCCAGAGACACCGGCAAGAACAC GGTGTATCTGCAAATGGTCAGCCTGGAACCTGAGGACAC AGCCGTTTATTACTGTGCAGCAGCGACAAGACCGACCCT CGCGCTCGTGGACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCA CCGTCTCCTCA
84	ROR1 sd	GATGTCCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCA

[0804]

	Ab11 (D NA)	CCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGA TTCACCTTCGGATTATTATGTCATAGGCTGGTTCCGCCAGG CCCCAGGGAAGGAGCGCGAGGGGGTATCATGTATTAGT AGTAGGTATGCGAACACAACTATGCAGACTCCGTGAA GGGCCGATTACCCAGTCCAGAGGTGCTGCTAAGAACAC GGTGTATCTGCAAATGAACGCCCTGAAACCTGAGGACAC GGCCGTTTATTACTGCGCGGCAGATACGAGGCGGTATAC ATGCCCCGATATAGCGACTATGGAGAGGAACTTTGATTC CTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA
85	ROR1 sd Ab12 (D NA)	GATGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGATTGGTGCA GGCTGGGGACTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGG ACGCACCTTCAGTAGCTATGCCATGGCCTGGTTCCGCCA GGCTCCAGGGAAGGAGCGTGAGTTAGTAGCAGCTTTGA GCAGTAGTGGTGCTAGCACATCGTATCCAGACTCCGTGA AGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAC ACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGA CACGGCCGTTTATTACTGTGCAGCGAGACTTTATACCTA CGGGTTGACAGAAAGAGCGTATGACTACTGGGGCCAGG GGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA
86	ROR1 sd Ab13 (D NA)	GATGTCCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGATTGGTGCA GCTGGGGACTCTCTGAGGCTCTCCTGTGCAGCCTCTGGA CGCACCTTCAGAGACTATGCCATGGCCTGGTTCCGCCAG GCTCCAGGGAAGGAGCGTGGGATTGTAGCAGCTTTGAG CAAGAGTGGTGGTAGTACATCGTATCTAGACTCCGTGAA GGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACA CGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGAC ACGGCCGTTTATTACTGTGCAGCGAGATTGTATACCTAC GGGTTGACAGAAAGGGCGTATGACTACTGGGGCCAGGG GACCCAGGTCACCGTCTCCTCA
87	ROR1 sd Ab14 (D NA)	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGATTGGTGCA GGCTGGGGGCTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTAC GGACACCTTCACTGGCTATACCATGGGCTGGTTCCGCCA GACTCCAGGGAAGGAGCGACAATTTGTAGCGTCCATGA GCTGGAATGGTGGTTTCATAAAGTATGCAGACTCTGTGA AGGGCCGATTACCATCTCCAGGGACAACGCCGAGAAC ATGGTGTATCTTGAAATGAACAACCTGAAATCTGAGGAC ACGGCCGTTTATTCCTGTGCAGCAGACAACATCTATTGG ACTGCGTCCGAGCGCCCCGGAGACTATAACTACTGGGGC CAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA
88	ROR1 sd Ab19 (D NA)	GAGGTCCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCA GCCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGCACTGCCTCTGG AACCATGTCCACCATCAACGCCATGGCCTGGTACCGCCA GGCTCCAGAGAAGCAGCGCGAGTTGGTCGCTCGCATTTG GAATGATGGAGAGACTAACTATGCAGACTCCGTGAGGG GCCGATTGCGCGTCTCTAGAGACAACGCAAAGAACACG GTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACAC GGCCGTCTATTACTGTAATGCGTATATACCTACTACTCA GCGTATGAATAAAATAGCTAGTTATTGGGGCCAGGGGAC CCTGGTCACCGTCTCCTCA
89	ROR1 sd	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGATTGGTGCA

[0805]

	Ab20 (D NA)	GGCTGGGGACTCTCTGAGGGTCTCCTGTGCAGCCTCTGG ACGCACCTTCAGTAGCTATGCCATGGCCTGGTTCCGCCA GGCTCCAGGGAAGGAGCGTGAGTTTGTAGCAGCTTTGAG CAGTAGTGGTGTAGCACATCGTATTCAGACTCCGTGAA GGGCCGATTACCATCTCCAGAGACACGGCCAAGAACA CGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCCGAGGAC ACGGCCGTTTATTACTGTGCAGCGAGACTATATACCTAC GGGTTGACAGAAAGGGCGTATGACTACTGGGGCCAGGG GACCCAGGTCACCGTCTCCTCA
90	ROR1 sd Ab22 (D NA)	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCA GCCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGG AAGCTTCCTCGACATCAATGCCATGGGCTGGTACCGCCA GGCTCCAGGAAAGCAGCGCGAGTTGGTCGCAATGATGC CTAGTGGTGGCCGCACAACTATCATGACTCCGTTGAGG GCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACA GTGTATCTGCAAATGGACAGCCTGAAACCTGAGGACAC GGCCGTCTATTACTGTGTTGCAGATGCGACCCGGTACTC CGGTTTCCGTACTAACTTCTGGGGCCGGGGAACCCAGGT CACCGTCTCCTCA
91	ROR1 sd Ab26 (D NA)	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCACGGTGCA GGCTGGGGGGTCTCTGCGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGG CGGTATCTTCAGCATCTATGTCATGGGCTGGCATCGCCA GGCTCCAGGGAAGCAGCGCGAATTGGTCGCAGCTATTAC TCCTGGTTTTAACACAACTATGCAGACCCCGTGAAGGG CCGATTCACCATCTCAAGAGACAACGCCAAGAGCACGG TGTACCTGGAAATGAACAGCCTCGAACCTGAGGATACG GCCGTTTATTACTGTTTACGCTAAACGAATCTATGAGTAC GAGTACTATTATTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTC TCCTCA
92	ROR1 sd Ab27 (D NA)	GATGTTCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGATTGGTGCA GCTGGGGACTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGA CGCACCTTCAGTGAATATGCCATGGCCTGGTTCCGCCAG GCTCCAGGGAAGGAGCGTGAGTTTGTAGCAGCTATGAG CAAGAGTGGTGCTAGCACATCGTATAGTGACTCCGTAAA GGGCCGATTACCATCTCCAGAGCCAACGCCAAGAACA CGGTGTATCTCGAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGAC ACGGCCGGTTACTACTGTGCAGCGAGACTATACACCTAC GGGTTGACAGAAAGGGCGTATGACTACTGGGGCCAGGG GACCCAGGTCACCGTCTCCTCA
93	ROR1 sd Ab29 (D NA)	GATGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGATTGGTGCA GGCTGGGGACTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGG ACGCACCTTCAGTGACTATGCCATGGCCTGGTTCCGCCA GGGTCCAGGGAAGGAGCGTGAGCTTGTAGCAGCTTTGA GCAAGAGTGGTGCTAGCACATCGTATGCAGACTCCGTGA AGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAC ACGGTGTATCTGCATATGAACAGCCTGAAACCTGAGGAC ACGGCCATTTATTACTGTGCAGCGAGACTTTATACCTAC GGGTTGACAGAAAGGGCGTATGACTACTGGGGCCAGGG GACCCAGGTCACCGTCTCCTCA
94	ROR1 sd	GATGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGATTGGTGCA

[0806]

	Ab30 (D NA)	GGCTGGGGGCTCTCTGAGCCTCTCCTGTGCATCCTCTGG ACGCACCTCCAGTATCTATGGCATGGGCTGGTTCCGCCA GGCTCCAGGGAAGGAGCGTGAGTTTGTAGCGGCTATTAG GTGGAGTGATAGTAACACAACTATGCAGACTCCGTGA AGGGCCGATTACCATCTCCGGAGACAACGCCAAGAAC GCGGTGCATCTGCAAATGCACAGCCTGAAACCTGAGGA CACGGCCGTTTATTACTGTGCAGCCAAAGGGACCCCTTA TTATTATACCGACTTCCGGACGTATCCGTACTGGGGCCA GGGGACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
95	ROR1 sd Ab31 (D NA)	GATGTCCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAG CCTGGGGGGTCTCTGAGACTCACCTGTGCAGCCTCTGGA TTCATTTCGGATTATTATGTCATAGGCTGGTTCCGCCAGG CCCCAGGGAAGGAGCGCGAGGGGGTATCATGTATTAGT AGTAGGTATGCGAACACAACTATGCAGACTCCGTGAA GGGCCGATTACCCAGTCCAGAGGTGCTGCTAAGAACAC GGTGTATCTGCAAATGAACGCCCTGAAACCTGGGGACAC GGCCGTTTATTACTGCGCGGCAGATACGAGGCGGTATAC ATGCCCCGATATAGCGACTATGCACAGGAACTTTGATTCT CTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA
96	ROR1 sd Ab32 (D NA)	GATGTCCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAG CCTGGGGGGTCTCTGAGACTCACCTGTGCAGCCTCTGGA TTCATTTCGGATTATTATGTCATAGGCTGGTTCCGCCAGG CCCCAGGGAAGGAGCGCGAGGGGGTATCATGTATTAGT AGTAGGTATGCGAACACAACTATGCAGACTCCGTGAA GGGCCGATTACCCAGTCCAGAGGTGCTGCTAAGAACAC GGTGTATCTGCAAATGAACGCCCTGAAACCTGGGGACAC GGCCGTTTATTACTGCGCGGCAGATACGAGGCGGTATAC ATGCCCCGATATAGCGACTATGCACAGGAACTTTGATTCT CTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA
97	用于 TFP 中的人 C D3-ε 片 段	DGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHND KNIGGDEDDKNIGSDEDLHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSK PEDANFYLYLRARVCENCMEMDVMSVATIVIVDICITGGLL LLVYYWSKNRKAKAKPVTRGAGAGGRQGRQNKERPPVP NPDYEPIRKGQRDLYSGLNQRR
98	p502_NK G2D_CD 3ε ORF, 单体(氨 基酸序 列)	NSLFNQEVQIPLTESYCGPCPKNWICYKNNCYQFFDESKN WYESQASCMSQNASLLKVYSKEDQDLLKLVKSYHWMGL VHIPTNGSWQWEDGSILSPNLLTIEMQKGDALYASSFKG YIENCSTPNTYICMQRTV GGGSGGGSGGGGSLEDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVI LTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDLHLSLKEF SELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMEMD VMS
99	p502_CD 16_ECD_ CD3ε (D NA)	acgcgtGTAGTCTTATGCAATACTCTGTAGTCTTGCAACATG GTAACGATGAGTTAGCAACATGCCTTACAAGGAGAGAA AAAGCACCGTGATGCCGATTGGTGGAAAGTAAGGTGGT ACGATCGTGCTTATTAGGAAGGCAACAGACGGGTCTGA CATGGATTGGACGAACCACTGAATTGCCGCATTGCAGAG ATATTGTATTTAAGTGCCTAGCTCGATACATAAACGGGT CTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTG



[0807]

GCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCT  
TGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCCGTCTGTTGTG  
TGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTC  
AGTGTGGAATAATCTCTAGCAGTGGCGCCCGAACAGGGA  
CTTGAAAGCGAAAGGGAAACCAGAGGAGCTCTCTCGAC  
GCAGGACTCGGCTTGCTGAAGCGCGCACGGCAAGAGGC  
GAGGGGCGGCGACTGGTGAGTACGCCAAAAATTTTGAC  
TAGCGGAGGCTAGAAGGAGAGAGatgggtgcgagagcgtcagtattaa  
gcgggggagaattAGATCGCGATGGGAAAAAATTCGGTTAAGG  
CCAGGGGGAAAGAAAAAATATAAATTAAAACATATAGT  
ATGGGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTTCGCAGTTAATC  
CTGGCCTGTTAGAAACATCAGAAGGCTGTAGACAAATAC  
TGGGACAGCTACAACCATCCCTTCAGACAGGATCAGAA  
GAACTTAGATCATTATATAATACAGTAGCAACCCTCTAT  
TGTGTGCATCAAAGGATAGAGATAAAAGACACCAAGGA  
AGCTTTAGACAAGATAGAGGAAGAGCAAAACAAAAGTA  
AGACCACCGCACAGCAAGCGGCCACTGATCTTCAGACCT  
GGAGGAGGAGATATGAGGGACAATTGGAGAAGTGAATT  
ATATAAATATAAAGTAGTAAAAAATTGAACCATTAGGAGT  
AGCACCCACCAAGGCAAAGAGAAGAGTGGTGCAGAGAG  
AAAAAAGAGCAGTGGGAATAGGAGCTTTGTTCCCTTGGGT  
TCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCGTCA  
ATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGT  
ATAGTGCAGCAGCAGAACAAATTTGCTGAGGGCTATTGAG  
GCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATC  
AAGCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATA  
CCTAAAGGATCAACAGCTCCTGGGGATTTGGGGTTGCTC  
TGGAAAACCTCATTTGCACCACTGCTGTGCCTTGGAAATGC  
TAGTTGGAGTAATAAATCTCTGGAACAGATTTGGAATCA  
CACGACCTGGATGGAGTGGGACAGAGAAATTAACAATT  
ACACAAGCTTAATACACTCCTTAATTGAAGAATCGCAAA  
ACCAGCAAGAAAAGAATGAACAAGAATTATTGGAATTA  
GATAAATGGGCAAGTTTGTGGAATTGGTTTAACATAACA  
AATTGGCTGTGGTATATAAAATTATTCATAATGATAGTA  
GGAGGCTTGGTAGGTTTAAGAATAGTTTTTGCTGTACTTT  
CTATAGTGAATAGAGTTAGGCAGGGATATTCACCATTAT  
CGTTTCAGACCCACCTCCCAACCCCGAGGGGACCCGACA  
GGCCCGAAGGAATAGAAGAAGAAGGTGGAGAGAGAGA  
CAGAGACAGATCCATTCGATTAGTGAACGGATCTCGACG  
GTATCGGTAACTTTTAAAAGAAAAGGGGGGATTGGGG  
GGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCA  
ACAGACATACAACTAAAGAATTACAAAAACAAATTAC  
AAAATTCAAAATTTTATCGATACTAGTGGATCTGCGATC  
GCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCCA  
CAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCGGCAATTGA  
ACGGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGA  
AAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTCCCGAGGG  
TGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGA  
ACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGC  
TGAAGCTTCGAGGGGCTCGCATCTCTCCTTCACGCGCCC

[0808]

GCCGCCCTACCTGAGGCCGCCATCCACGCCGGTTGAGTC  
GCGTTCTGCCGCCTCCCGCCTGTGGTGCCTCCTGAACTGC  
GTCCGCCGTCTAGGTAAGTTTAAAGCTCAGGTCGAGACC  
GGGCCTTTGTCCGGCGCTCCCTTGAGCCTACCTAGACT  
CAGCCGGCTCTCCACGCTTTGCCTGACCCTGCTTGCTCAA  
CTCTACGTCTTTGTTTTGTTTTCTGTTCTGCGCCGTTACAG  
ATCCAAGCTGTGACCGGCGCCTACTCTAGAgcggccaccATG  
GCCCTGCCTGTGACAGCTCTGCTGCTGCCTCTGGCCCTGC  
TGCTCCATGCCGCCAGACCCCCCAAGGCTGTAGTATTCC  
TCGAACCGCAGTGGTATCGGGTACTCGAAAAAGACAGT  
GTAACGCTGAAGTGCCAGGGGGCCTATAGTCCCGAGGA  
TAACTCAACCCAATGGTTCCACAATGAAAGCCTCATCTC  
TTCACAAGCAAGTTCTTATTTTCATAGATGCCGCCACTGT  
AGATGACTCCGGAGAATATCGGTGTCAAACGAATTTGTC  
TACTCTGAGCGACCCGGTTCAGCTTGAGGTACACATAGG  
GTGGTTGCTTCTCCAAGCCCCCGGTGGGTATTTAAGGA  
GGAAGATCCAATCCACTTGCGGTGTCACAGCTGGAAGA  
ACACAGCCCTTCACAAGGTAACATACTTGCAAAACGGCA  
AGGGTAGGAAATACTTCCATCACACAGCGATTTCTACA  
TACCAAAGCAACCCTCAAGGACTCCGGGAGTTATTTCT  
GCCGCGGGCTCTTCGGTTCTAAGAATGTAAGCAGTGAAA  
CGGTCAATATAACCATTACACAGGGTCTCGCGGTTTCTA  
CCATCTCAAGTTTCTTCCCTCCCGGTTATCAAgcggccgcGG  
GCGGTGGTGGTTCTGGGGGCGGGGGGTCTGGAGGAGGG  
GGAAGTtctcgagGATGGAAATGAAGAAATGGGAGGGATAA  
CCCAAATCCATACAAGGTCTCTATCAGCGGTACGACCG  
TAATTTTGACCTGTCCCCAGTATCCTGGTTCCGAAATACT  
TTGGCAACACAATGATAAGAATATCGGTGGAGACGAGG  
ATGATAAGAACATTGGGTCTGATGAAGACCACCTCTCTC  
TCAAGGAATTTAGCGAGCTTGAACAGTCAGGTTACTACG  
TGTGTTACCCACGGGGCAGCAAGCCCGAGGATGCCAACT  
TTTACCTGTACCTGCGGGCAAGGGTCTGTGAAAACCTGTA  
TGGAGATGGATGTGATGAGCGTAGCTACGATTGTAATAG  
TGGACATCTGCATCACCGGGGGTTTGTGTTGCTTGTTA  
CTACTGGAGTAAAAACAGAAAAGCGAAAGCTAAGCCTG  
TTACCCGGGGAGCCGGGGCTGGCGGAAGGCAGAGGGGT  
CAAAATAAAGAGCGCCCCCGCCTGTTCCGAATCCAGAC  
TACGAACCCATCCGGAAGGGCAACGGGATCTCTACTCC  
GGCTTGAATCAGCGAAGAATTTAGTAAGAATTCGAATTT  
AAATCGGATCCGCGGCCGCGTCGACAATCAACCTCTGGA  
TTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTAT  
GTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGC  
CTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTC  
TCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGG  
AGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCA  
CTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTG  
CCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCC  
CCTCCCTATTGCCACGGCGGAACATCGCCGCTGCCT  
TGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGA  
CAATTCCGTGGTGTGTCGGGGAAATCATCGTCCTTTCTCCT

[0809]

TGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGG  
 ACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGG  
 ACCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCT  
 TCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCC  
 CTTTGGGCGCCTCCCCGCCTGGTACCTTTAAGACCAAT  
 GACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTAAA  
 AGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAATTCACCTCCCAAC  
 GAAGATAAGATCTGCTTTTTGCTTGTACTGGGTCTCTCTG  
 GTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACT  
 AGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTG  
 AGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCT  
 GGTAAGTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGG  
 AAAATCTCTAGCAGTAGTAGTTCATGTCATCTTATTATTC  
 AGTATTTATAACTTGCAAAGAAATGAATATCAGAGAGTG  
 AGAGGAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAAT  
 AAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTT  
 TTTCAGTGCATTCTAGTTGTGGTTGTCCAAACTCATCAA  
 TGTATCTTATCATGTCTGGCTCTAGCTATCCCGCCCCTAA  
 CTCCGCCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGCCC  
 ATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTATGC  
 AGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAA  
 GTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGACTTTTGCagag  
 acggcccaaatcgtatcatggtcatagctgttccgtgtgaaattgtatccgctcacaattcc  
 acacaacatacagaccgaagcataaagtgtaaagcctggggcgctaatgagtgaactaac  
 tcacattaattcggtgagctcactgccgcttccagtcgggaacctgtcgtgccagctgcat  
 taatgaatcgccaacgcgcggggagagcggttgcgtattgggcgctcttccgcttccg  
 ctactgactcgtcgcgtcggctgttcggctgcggcgagcggtatcagctcactcaaaggc  
 ggtaatacgggtatccacagaatcaggggataacgcaggaagaacatgtgagcaaaaggc  
 cagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgcgttgcgtggcggttttccataggctccgccc  
 ccctgacgagcatcacaaaaatcagcgtcaagtcagaggtggcgaaacccgacaggacta  
 taaagataccaggcggttccccctggaagctccctcgtgcgtctcctgttccgacctgccgc  
 ttaccggatacctgtccgcttctcccttcgggaagcgtggcgcttctcatagctcacgctgta  
 ggtatctcagttcgggttaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaacccccgttca  
 gcccgaccgctgcgcttatccggtactatcgtcttgagtcgaacccggtaagacacgactta  
 tcgccactggcagcagccactggttaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcggtgctac  
 agagttctgaagtggtggcctaactacggctacactagaaggacagtatttggtatctgcgctc  
 tgcgtgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaaacaaaccacg  
 ctggtagcgggtggtttttgttgaagcagcagattacgcgcagaaaaaaggatctcaaga  
 agatccttgatctttctacggggtcgtacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggtttt  
 ggatcatgagattatcaaaaaggatctcacctagatccttttaaaataaaaatgaagtttaaatca  
 atctaaagtatatatgagtaacttggctcgtacagttaccaatgcttaatcagtgaggcacctatc  
 tcagcgatctgtctatctgttcatcatagttgcctgactccccgtcgtgtagataactacgatac  
 gggaggggttaccatctggccccagtgctgcaatgataccgcgagaccacgctcaccggct  
 ccagatttatcagcaataaaccagccagccggaaggccgagcgcagaagtggctcctgcaa  
 ctctatccgctccatccagctctattaattgttgcgggaagctagagtaagtgttcgcagtta  
 atagtttgcgaacgttgttgcattgctacaggcatcgtggtgtcacgctcgtcgttggatgg  
 ctctcattcagctccggttcccaacgatcaaggcgagttacatgatccccatgttgcacaaaaa  
 gcggttagctccttcggctcctccgatcgtgtgcagaagtaagtggccgcagtggtatcactcat  
 ggttatggcagcactgcataattctcttactgtcatgccatccgtaagatgctttctgtgactggt  
 gagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgtatgcggcgaccgagttgctcttcccggcgt



[0810]

		caatacgggataataaccgcgccacatagcagaactttaaaagtgtcatcattggaaaacgtc ttcggggcgaaaactctcaaggatcttaccgctgttgagatccagttcgtatgaacccactcgt gcacccaactgatcttcagcatcttttactttaccagcgtttctgggtgagcaaaaacaggaag gcaaaatgccgcaaaaagggaataagggcgacacggaaatgttgaatactcatactcttcct tttcaatattattgaagcatttatcagggttattgtctcatgagcggatacatattgaatgtatttag aaaaataaacaatataggggtccgcgcacatttcccgaagggtccacctgacgtctaagaa accattattatcatgacattaacctataaaaaataggcgtatcacgagggcccttcgtctcgcgcgt ttcgggtgatgacggtgaaaacctctgacacatgcagctcccggagacggtcacagcttgtctg taagcggatgccgggagcagacaagcccgtagggcgcgtagcgggtgttgccgggtgt cggggctggcttaactatgcggcatcagagcagattgtactgagagtgcacatatgcgggtgt gaaataccgcacagatgcgttaaggagaaaaataccgcatcaggcgccattcgccattcagggt gcgcaactgttgggaaggcgatcgggtgcgggcctcttcgtattacgccagctggcgaag ggggatgtgctgcaaggcgattaagttgggtaacgccagggttttccagtcacgacgttcta aaacgacggccagtgccaagctg
100	p502_CD 22 抗体_ CD3ε	acgctGTAGTCTTATGCAATACTCTGTAGTCTTGCAACATG GTAACGATGAGTTAGCAACATGCCTTACAAGGAGAGAA AAAGCACCGTGATGCCGATTGGTGGAAAGTAAGGTGGT ACGATCGTGCCCTTATTAGGAAGGCAACAGACGGGTCTGA CATGGATTGGACGAACCACTGAATTGCCGCATTGCAGAG ATATTGTATTTAAGTGCCTAGCTCGATACATAAACGGGT CTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTG GCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCT TGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTG TGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTC AGTGTGGAAAATCTCTAGCAGTGGCGCCCGAACAGGGA CTTGAAAGCGAAAGGGAAACCAGAGGAGCTCTCTCGAC GCAGGACTCGGCTTGCTGAAGCGCGCACGGCAAGAGGC GAGGGGCGGCGACTGGTGAGTACGCCAAAAATTTTAC TAGCGGAGGCTAGAAGGAGAGAGatgggtgcgagagcgtcagtattaa gcgggggagaattAGATCGCGATGGGAAAAAATTCGGTTAAGG CCAGGGGGAAAGAAAAAATATAAATTAAACATATAGT ATGGGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTTCGAGTTAATC CTGGCCTGTTAGAAACATCAGAAGGCTGTAGACAAATAC TGGGACAGCTACAACCATCCCTTCAGACAGGATCAGAA GAACTTAGATCATTATATAATACAGTAGCAACCCCTCTAT TGTGTGCATCAAAGGATAGAGATAAAAGACACCAAGGA AGCTTTAGACAAGATAGAGGAAGAGCAAAACAAAAGTA AGACCACCGCACAGCAAGCGGCCACTGATCTTCAGACCT GGAGGAGGAGATATGAGGGACAATTGGAGAAGTGAATT ATATAAATATAAAGTAGTAAAAAATTGAACCATTAGGAGT AGCACCCACCAAGGCAAAGAGAAGAGTGGTGCAGAGAG AAAAAAGAGCAGTGGGAATAGGAGCTTTGTTCCCTTGGGT TCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCGTCA ATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGT ATAGTGCAGCAGCAGAACAAATTTGCTGAGGGCTATTGAG GCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATC AAGCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATA CCTAAAGGATCAACAGCTCCTGGGGATTTGGGGTTGCTC TGGAAAACCTCATTTGCACCACTGCTGTGCCTTGGAAATGC TAGTTGGAGTAATAAATCTCTGGAACAGATTTGGAATCA

[0811]

CACGACCTGGATGGAGTGGGACAGAGAAATTAACAATT  
ACACAAGCTTAATACACTCCTTAATTGAAGAATCGCAAA  
ACCAGCAAGAAAAGAATGAACAAGAATTATTGGAATTA  
GATAAATGGGCAAGTTTGTGGAATTGGTTTAACATAACA  
AATTGGCTGTGGTATATAAAATTATTCATAATGATAGTA  
GGAGGCTTGGTAGGTTTAAGAATAGTTTTTGCTGTACTTT  
CTATAGTGAATAGAGTTAGGCAGGGATATTCACCATTAT  
CGTTTCAGACCCACCTCCCAACCCCGAGGGGACCCGACA  
GGCCCGAAGGAATAGAAGAAGAAGGTGGAGAGAGAGA  
CAGAGACAGATCCATTCGATTAGTGAACGGATCTCGACG  
GTATCGGTAACTTTTAAAAGAAAAGGGGGGATTGGGG  
GGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCA  
ACAGACATACAACTAAAGAATTACAAAAACAAATTAC  
AAAATTCAAAATTTTATCGATACTAGTGGATCTGCGATC  
GCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCCA  
CAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCTGGCAATTGA  
ACGGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGA  
AAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGG  
TGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGA  
ACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGC  
TGAAGCTTCGAGGGGCTCGCATCTCTCCTTCACGCGCCC  
GCCGCCCTACCTGAGGCCGCCATCCACGCCGGTTGAGTC  
GCGTTCTGCCGCCTCCCGCCTGTGGTGCCTCCTGAACTGC  
GTCCGCCGTCTAGGTAAGTTTAAAGCTCAGGTCGAGACC  
GGGCCTTTGTCCGGCGCTCCCTTGAGCCTACCTAGACT  
CAGCCGGCTCTCCACGCTTTGCCTGACCCTGCTTGCTCAA  
CTCTACGTCTTTGTTTTGTTTTCTGTTCTGCGCCGTTACAG  
ATCCAAGCTGTGACCGGCGCCTACTCTAGAGcgcgccaccatgctt  
ctcctggtgacaagcctctgctctgtgagttaccacaccagcattcctctgatcccaCAG  
GTCCAACCTTCAACAATCAGGACCAGGGCTCGTGAAGCCG  
TCCCAAACGCTTAGTCTCACATGCGCCATTAGTGGGGAC  
TCCGTGAGTTCAAATTCCGCCGCCTGGAATTGGATTAGG  
CAAAGTCCATCTAGGGGTCTTGAGTGGCTCGGCCGCACT  
TACTACAGATCCAAGTGGTATAACGACTACGCAGTATCC  
GTAAATCAAGAATAACAATTAATCCAGATACTTCTAAG  
AACCAATTTAGTCTTCAACTGAACAGCGTGACCCCGGAG  
GATACAGCGGTGTATTATTGTGCGCGAGAAGTTACCGGG  
GATCTGGAGGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGAACA  
ATGGTAACCGTTAGTTCAGGCGGTGGTGGTTCTGGGGGC  
GGGGGGTCTGGAGGAGGGGGAAGTGATATACAAATGAC  
ACAGAGCCCTAGTTCCCTTAGTGCCTCAGTTGGGGATAG  
GGTAACAATCACTTGCCGAGCATCACAGACGATATGGTC  
CTATCTCAACTGGTATCAACAACGCCCTGGCAAGGCACC  
CAACCTGCTGATCTACGCCGCTAGTAGTTTGCAAAGTGG  
GGTACCTAGTAGATTCTCCGGCAGAGGTTCTGGCACTGA  
CTTTACCTTGACAATCAGCAGCCTCCAAGCAGAAGACTT  
CGCGACATACTACTGTCAGCAAAGTTACTCTATACCTCA  
GACGTTCCGTCAGGGGACCAAGCTCGAGATCAAGgcggccg  
cgGGCGGTGGAGGCAGTGGTGGTGGCGGCTCTGGCGGTG  
GTGGTAGCCTCGAGGACGGGAACGAAGAGATGGGAGGC

[0812]

ATAACTCAAACGCCGTATAAAGTTAGTATAAGTGGAACA  
ACGGTTATATTGACGTGCCCAATATCCAGGATCAGAG  
ATCCTTTGGCAGCATAACGATAAAAACATCGGCGGCGAC  
GAAGACGACAAAAACATTGGCAGCGACGAAGACCACCT  
CAGCCTTAAAGAGTTCTCTGAGTTGGAACAAAGCGGGTA  
CTACGTCTGCTATCCACGGGGGTCTAAACCCGAGGATGC  
AAATTTCTACCTGTATCTCAGAGCTAGGGTATGCGAAAA  
CTGTATGGAAATGGACGTGATGAGCGTGGCGACTATCGT  
CATAGTAGATATTTGTATTACCGGGGGGCTTCTCCTTCTG  
GTTTATTATTGGTCTAAGAATCGGAAAGCGAAAGCGAAA  
CCCGTAACACGAGGGGCTGGTGCTGGGGGCAGGCAAAG  
GGGTCAAATAAGGAAAGGCCCTCCAGTCCCTAATCC  
TGATTACGAGCCGATAAGGAAAGGTCAGCGGGACTTGT  
ACAGCGGTTTGAACCAGCGGAGGATCTGATAAGAATTC  
GAATTTAAATCGGATCCGCGGGCCGCGTCGACAATCAACC  
TCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTT  
AACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTT  
TAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTT  
CATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTT  
ATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGG  
TGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGG  
GCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTCCGGGACTTTCGC  
TTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACATCGCCGCC  
TGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGC  
ACTGACAATTCGTTGGTGTGTCGGGGAAATCATCGTCC  
TTTCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGC  
GCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCC  
AGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCG  
GCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGG  
ATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCCTGGTACCTTTAAGA  
CCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTT  
TTAAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAATTCACTC  
CCAACGAAGATAAGATCTGCTTTTTGCTTGTACTGGGTCT  
CTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGC  
TAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTG  
CCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTG  
ACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAG  
TGTGGAAAATCTCTAGCAGTAGTAGTTCATGTCATCTTAT  
TATTCAGTATTTATAACTTGCAAAGAAATGAATATCAGA  
GAGTGAGAGGAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTA  
CAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTCACAAATAAAG  
CATTTTTTTCCTGCACTTCTAGTTGTGGTTTGTCCAACT  
CATCAATGTATCTTATCATGTCTGGCTCTAGCTATCCCGC  
CCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCAGTTC  
CGCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATT  
TATGCAGAGGCCGAGGCCGCTCGGCCTCTGAGCTATTC  
CAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGACTTT  
TGCagagacggcccaaatcgaatcatggtcatagctgttctgtgtgaaattgtatccgc  
tcacaattccacacaacatacgagccggaagcataaagtgtaaagcctggggtgcctaataga  
gtgagctaactcacattaattgcgttgcgctcactgcccgtttccagtcgggaacctgtcgtg

[0813]

		ccagctgcattaatgaatcgccaacgcgcggggagaggcggtttgcgtattggcgctcttc cgcttcctcgctcactgactcgctcgctcggtcggttcggctcgggcgagcggtatcagctca ctaaaaggcggttaatacgggtatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgag caaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgcgttgctggcggttttccatagg ctccgccccctgacgagcatcacaataacgacgctcaagtcagaggtggcgaaaccga caggactataaagataccaggcggttccccctggaagctccctcgtgcgctctcgttccgac cctgccgcttaccggatacctgtccgcttctcccttcgggaagcgtggcgcttctcatagct cacgctgtaggtatctcagttcgggtgtaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcagcaacc ccccgttcagcccagccgctgcgccttatccggtaactatcgttctgagccaaccggtaaga cacgactatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtagg cgggtgctacagagttctgaagtgggtggcctaactacggctacactagaaggacaglatttgg atctgcgctctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaac aaaccaccgctgtagcggtggtttttgttgcagcagcagattacgcgcagaaaaaag gatctcaagaagatcctttgatctttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaactcacgt taagggaatttggatcatgagattatcaaaaaggatcttcacatgaccttttaataaaaaatgaa gttttaataatctaaagtatatatgagtaaaacttgggtcgtacagttaccaatgcttaacagtg ggcacctatctcagcgatctgtctatcttctggtcatccatagttgctgactccccgctgtagata actacgatacgggagggcttaccatctggccccagtgctgcaatgataccgcgagaccacg ctcaccggctccagatttatcagcaataaaccagccagccggaaggggccgagcgagcaagt ggctcgtcaactttatccgctccatccagctctatfaattgttgcggggaagctagagtaagtagt tcgccagttaatagtttgcgcaacgttggcattgctacaggcatcgtgggtgcagctcgtc gtttggatggcttcacgctccggttccaacgatcaaggcgagttacatgatccccatgtt gtgcaaaaaagcggttagctccttcggctcctccgatcgtgtcagaagtaagttggccgagtg ttatcactcatggttatggcagcactgcataattcttactgtcatgccatccgtaagatgctttt tgtgactggtgagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgtagcggcgaccgagttgctctt gccccggcgtcaatacgggataataccgcgccacatagcagaactttaaagtgtcatcattg gaaaacgttcttcggggcgaaaactctcaaggatcttaccgctgttgagatccagttcgtatga accactcgtgcacccaactgatcttcagcatctttactttaccagcggttctgggtgagcaaa aacaggaaggcaaaatgccgcaaaaaagggaataaggcgacacggaaatgtgaatactc atactcttcttttcaatattattgaagcatttatcagggttattgtctcatgagcggtacatattg aatgtatttagaaaaataaacaatatgggggtccgcgcacatttccccgaaaagtgccacctga cgtctaagaacattattatcatgacattaacctataaaaataggcgtatcacgagggcccttcg tctcgcgcgtttcgggtgatgacgggtgaaaacctctgacacatgcagctcccgagacgggtcac agcttgtctgtaagcggatgccgggagcagacaagcccgtcagggcgcgctcagcgggtgtt ggcgggtgtcgggggtgggttaactatcgggcatcagagcagattgtactgagagtgcacca tatcggtgtgaaataccgcacagatgcgtaaggagaaaataccgcatcaggcgccattcgc cattcaggctgcgcaactgttgggaaggcgatcgggtcgggcctcttcgctattacgccagc tggcgaaaagggggatgtgctgcaaggcgattaagttgggtaacgccaggggtttccagtc cgacgttgtaaaacgacggccagtccaagctg
101	接头 6 (氨基酸)	GGGSGGGGS
102	接头 6 (DNA)	GGTGGCGGAGGTTCTGGAGGTGGAGGTTCC
103	hBCMA 多肽典型 序列 Uni Prot 登录	MLQMAGQCSQNEYFDSLLHACIPCQLRCSSNTPPLTCQRY CNASVTNSVKGTNAILWTCLGLSLIISLAVFVLMFLLRKINS EPLKDEFKNTGSGLLGMANIDLEKSRTGDEIILPRGLEYTVE ECTCEDCIKSKPKVSDSHCFPLPAMEEGATILVTTKTNDYC KSLPAALSATEIEKSISAR



[0814]

	号 Q0222 3-1	
104	hCD19 多 肽典型序 列 UniPr ot 登录号 P15391	MPPPRLLFFLLFLTPMEVRPEEPLVVKVEEGDNAVLQCLKG TSDGPTQQLTWSRESPLKPFLKLSLGLPGLGIHMRPLAIWLF IFNVSQQMGGFYLCQPGPPSEKAWQPGWTVNVEGSGELFR WNVSDLGGLGCGLKNRSSEGPSSPSGKLMSPKLYVWAKD RPEIWEGEPPCLPPRDSLNLQSLSQDLTMAPGSTLWLSCGVP PDSVSRGPLSWTHVHPKGPKSLLSLELKDDRPARDMWVM ETGLLLPRATAQDAGKYYCHRGNTMSFHLEITARPVLWH WLLRTGGWKVSAVTLAYLIFCLCSLVGILHLQRALVLRK RKRMTDPTRRFFKVTPPPGSGPQNQYGNVLSLPTPTSGLGR AQRWAAGLGGTAPSYGNPSSDVQADGALGSRSPPGVGPEE EEGEGYEEP DSEEDSEFYENDSNLGQDQLSQDGSYENPED EPLGPEDEDSFSNAESYENEDDELTQPVARTMDFLSPHGS WDPSREATSLGSQSYEDMRGILYAAPQLRSIRGQPGPNHEE DADSYENMDNPDGPDPAWGGGGGRMGWSTR
105	hCD22β 亚型多肽 典型序列 UniProt 登录号 P 20273-1	MHLLGPWLLLLVLEYLAFSDSSKWWFEHPETLYAWEGAC VWIPCTYRALDGDLESFILFHNPEYNKNTSKFDGTRLYEST KDGKVPSEQKRVQFLGDKNKNCTLSIHPVHLNDSGQLGLR MESKTEKWMERIHLNVSERPFPPHIQLPPEIQESQEVTLTCL LNFSCYGYPIQLQWLLEGVPMRQAAVTSTSLTIKSVFTRSE LKFSPPQWSHHGKIVTCQLQDADGKFLSNDTVQLNVKHTPK LEIKVTPSDAIVREGDSVTMTCEVSSSNPEYTTVSWLKDGT SLKKQNTFTLNLREVTKDQSGKYCCQVSNDVGPGRSEEVF LQVQYAPEPSTVQILHSPAVEGSQVEFLCMSLANPLPTNYT WYHNGKEMQGRTEEKVHIPKILPWHAGTYSVAENILGTG QRGPGAELDVQYPPKVVTTVIQNPMPPIREGDTVTLSNYS SNPSVTRYEWKPHGAWEEPSLGVLKIQNVGWDNTTIACAA CNSWCSWASPVALNVQYAPRDVRVRKIKPLSEIHSNVS LQCDFSSSHPKVQFFWEKNGRLLGKESQLNFDISPEDAG SYSCWVNNSIGQTASKAWTLEVLYAPRRLRVSMSPGDQV MEGKSATLTCESDANPPVSHYTWFDWNNQSLPYHSQKL LEPVKVQHSGAYWCQGTNSVGKGRSPLSTLTVYYSPETIG RRVAVGLGSCAILILAICGLKLQRRWKRTQSQQGLQENSS GQSFFVRNKKVRRAPLSEGPLSLGCYNPMMEDGISYTTLR PEMNIPRTGDAESSEMQRPPDCDDTVTYSALHKRQVGDY ENVIPDFPEDEGIHYSELIQFGVGERPQAQENVDYVILKH
106	CD16 E CD (DN A)	CCCAAGGCTGTAGTATTCCTCGAACCAGCAGTGGTATCGG GTACTCGAAAAAGACAGTGTAAACGCTGAAGTGCCAGGG GGCCTATAGTCCCGAGGATAACTCAACCAATGGTTCCA CAATGAAAGCCTCATCTCTTCACAAGCAAGTTCTTATTC ATAGATGCCGCCACTGTAGATGACTCCGGAGAATATCGG TGTCAAACGAATTTGTCTACTCTGAGCGACCCGGTTTCAG CTTGAGGTACACATAGGGTGGTTGCTTCTCCAAGCCCC CGGTGGGTATTTAAGGAGGAAGATCCAATCCACTTGCGG TGTCACAGCTGGAAGAACACAGCCCTTCACAAGGTAAC ATACTTGCAAAACGGCAAGGGTAGGAAATACTTCCATCA CAACAGCGATTTCTACATACCAAAAGCAACCCTCAAGGA CTCCGGGAGTTATTTCTGCCGCGGGCTCTTCGGTTCTAAG

[0815]

		AATGTAAGCAGTGAAACGGTCAATATAACCATTACACA GGGTCTCGCGGTTTCTACCATCTCAAGTTTCTTCCCTCCC GGTTATCAA
107	用于 TFP 中的人 C D3- $\gamma$ 片 段	FKIPIEELEDVRFVNCNTSITWVEGTVGTLLSDITRLDLGKRI LDPRGIYRCNGTDIYKDKESTVQVHYRMCQSCVELDPATV AGIIVTDVIATLLLALGVFCFAGHETGRLSGAADTQALLRN DQVYQPLRDRDDAQYSHLGGNWARNK
108	用于 TFP 中的人 C D3- $\delta$ 片 段	FKIPIEELEDVRFVNCNTSITWVEGTVGTLLSDITRLDLGKRI LDPRGIYRCNGTDIYKDKESTVQVHYRMCQSCVELDPATV AGIIVTDVIATLLLALGVFCFAGHETGRLSGAADTQALLRN DQVYQPLRDRDDAQYSHLGGNWARNK
109	用于 TFP 中的人 C D3- $\zeta$ 片 段	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRR GRDPEMGGKPQRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK GERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
110	用于 TFP 中的人 N KG2D II 型整合膜 蛋白片段 (EDC)	NSLFNQEVQIPLTESYCGPCPKNWICYKNNCYQFFDESKN WYESQASCMSQNASLLKVYSKEDQDLLKLVKSYHWMGL VHIPTNGSWQWEDGSILSPNLLTIEMQKGDALYASSFKG YIENCSTPNTYICMQRTV

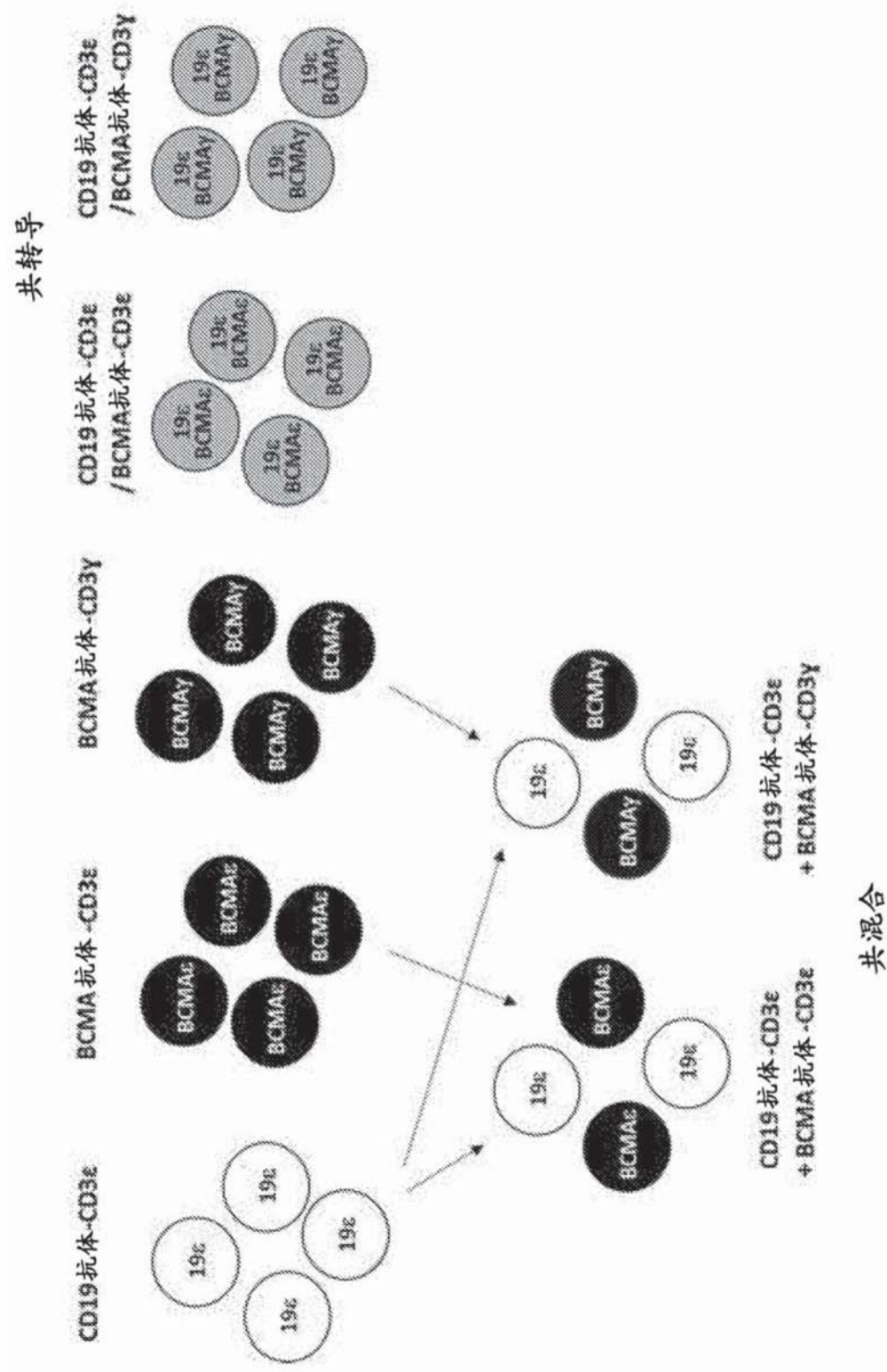


图1A



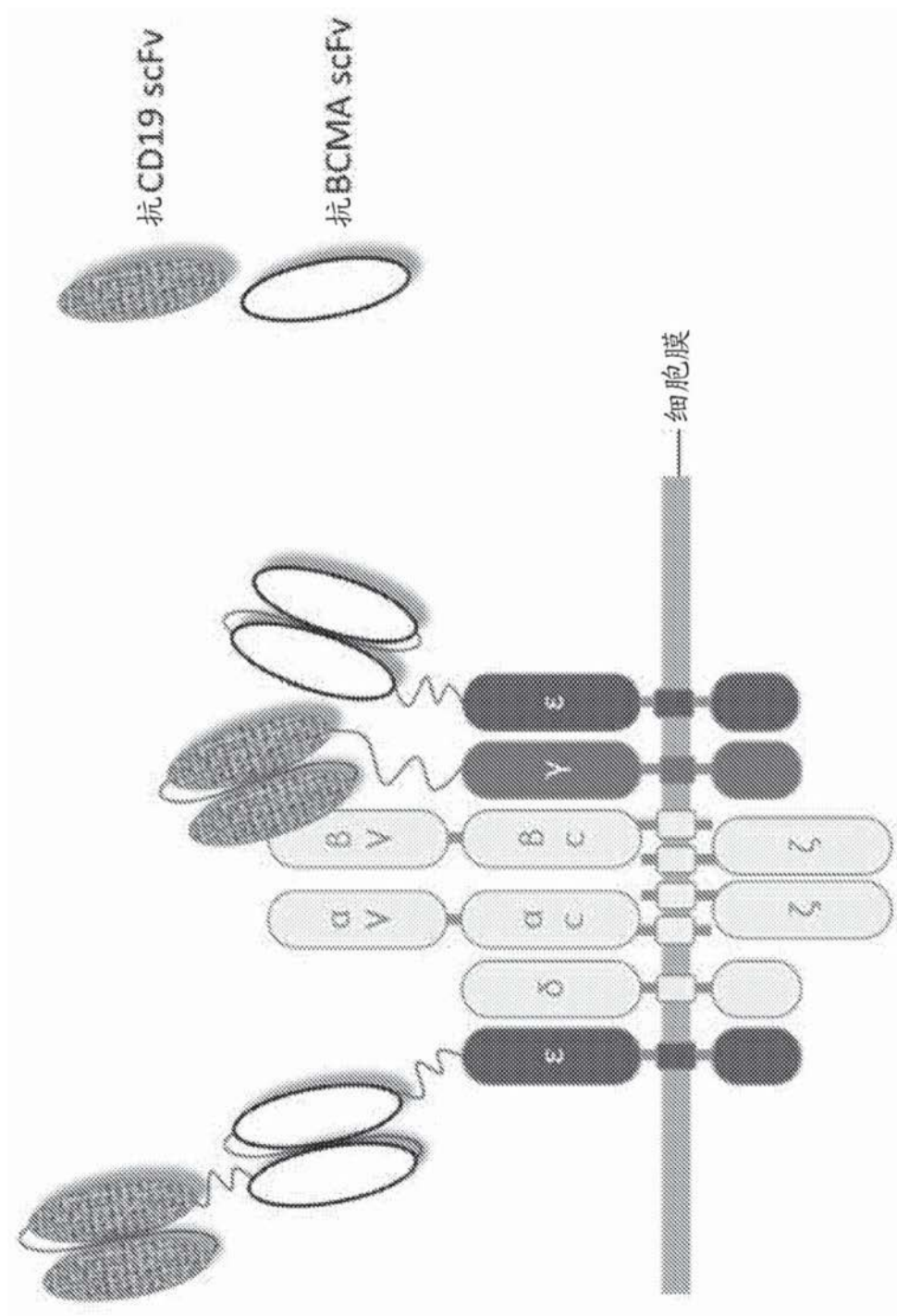


图1B

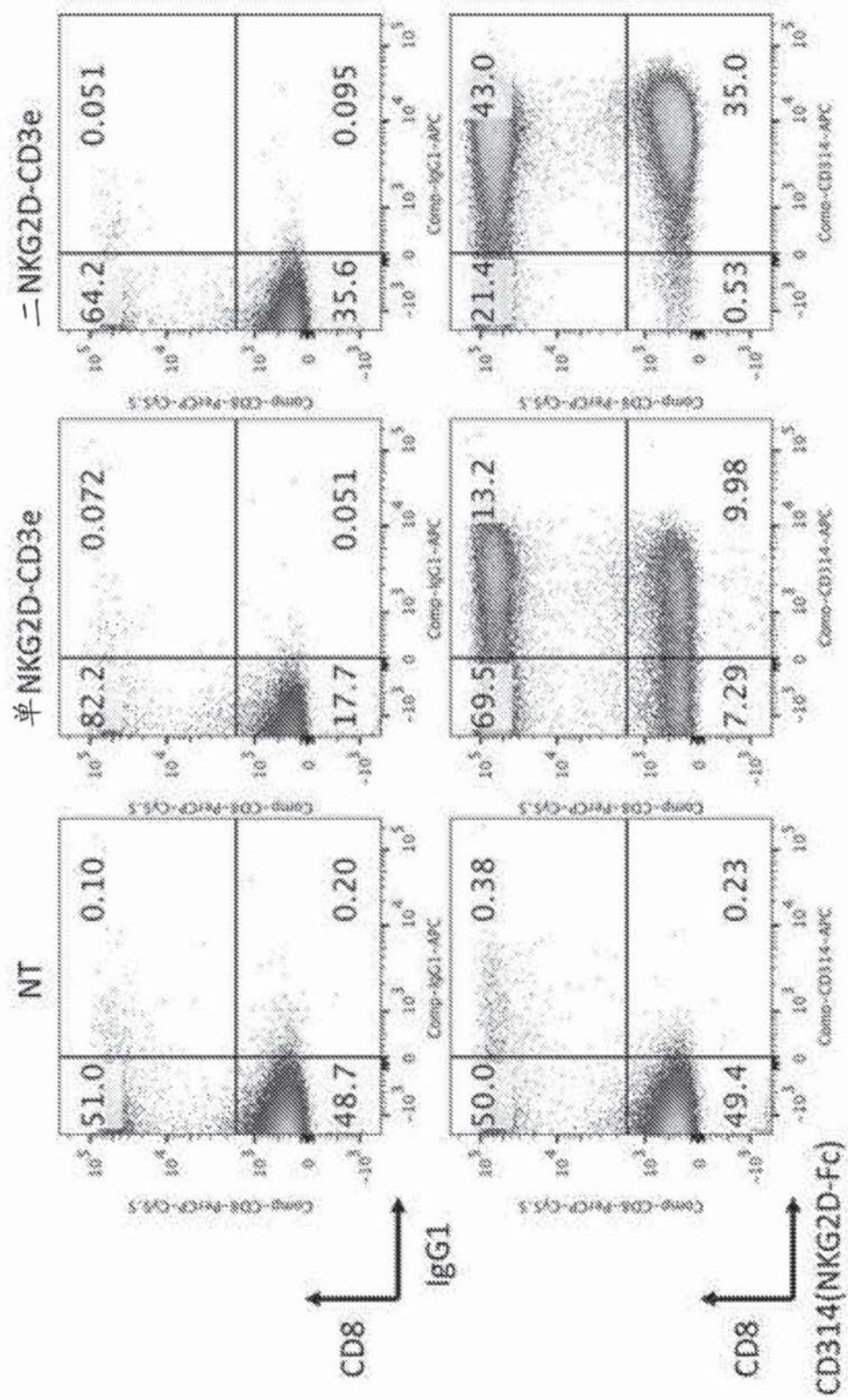


图2A

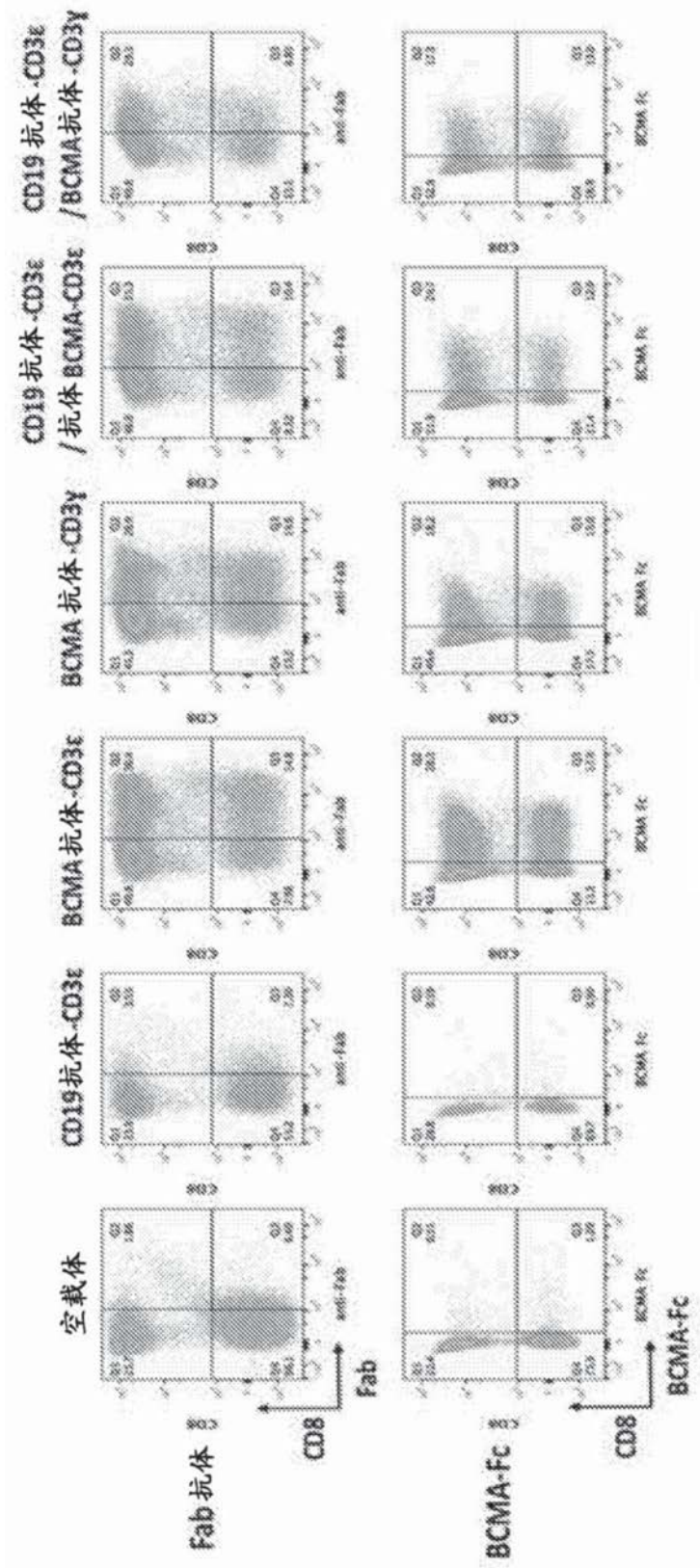


图2B



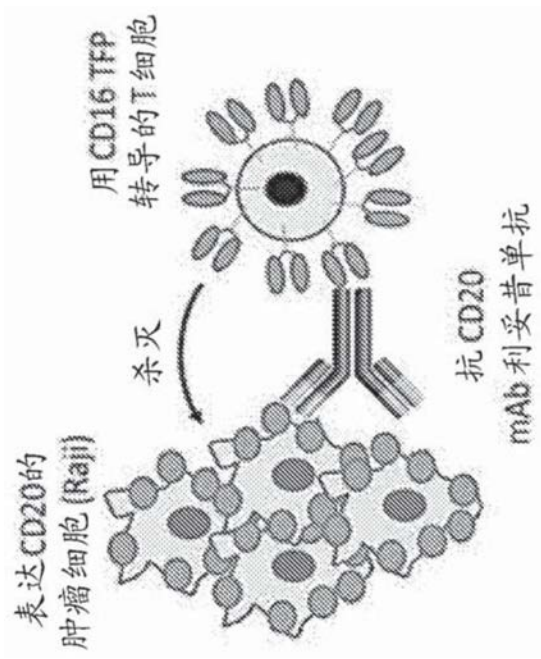


图3A

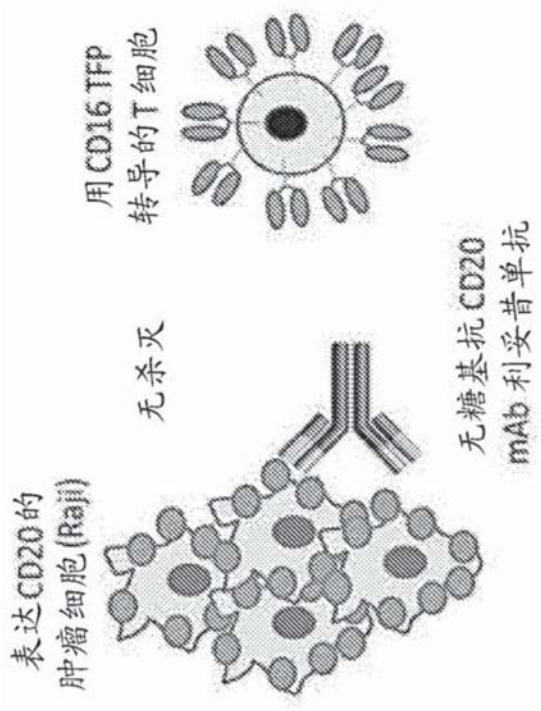


图3B

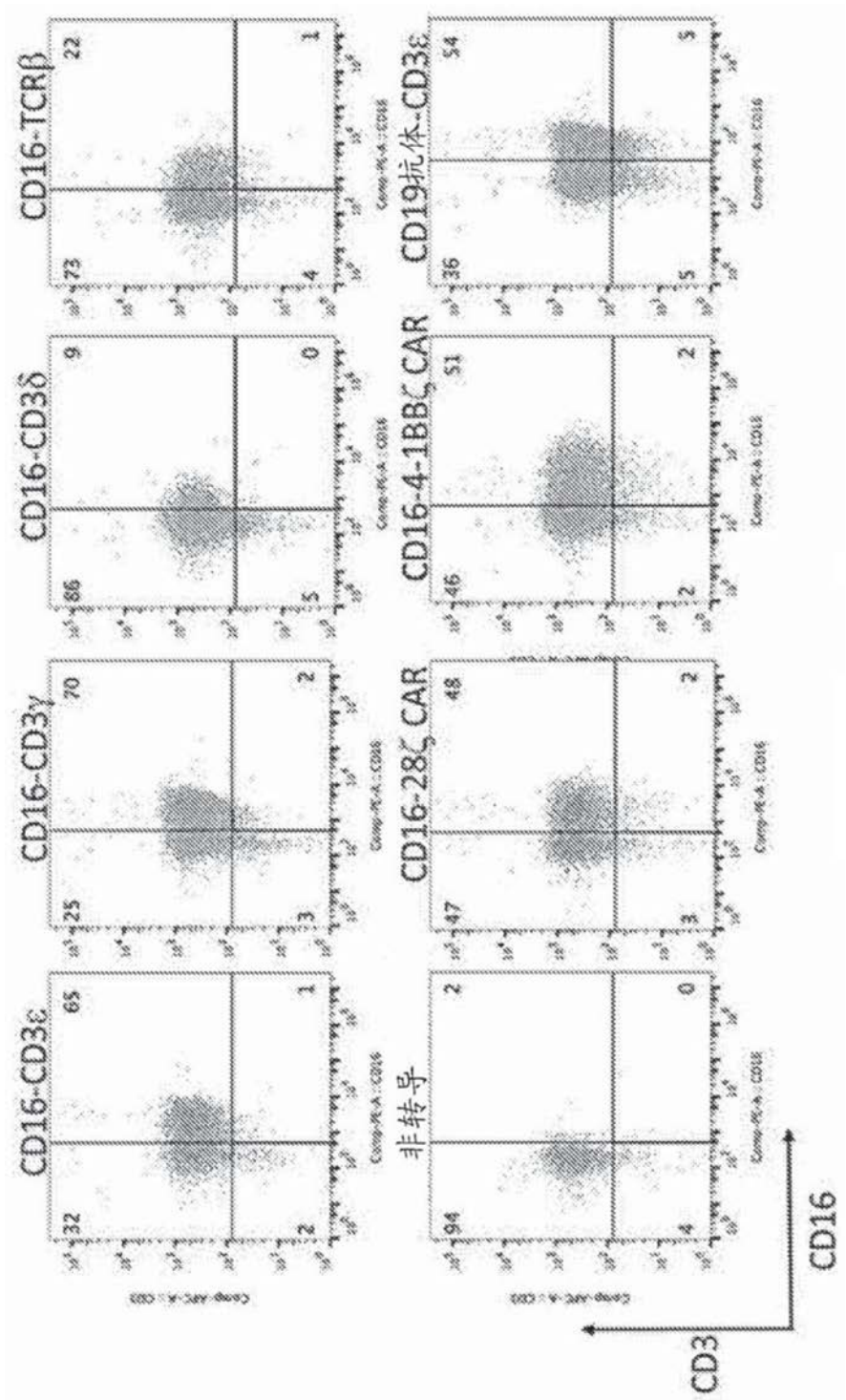


图4A

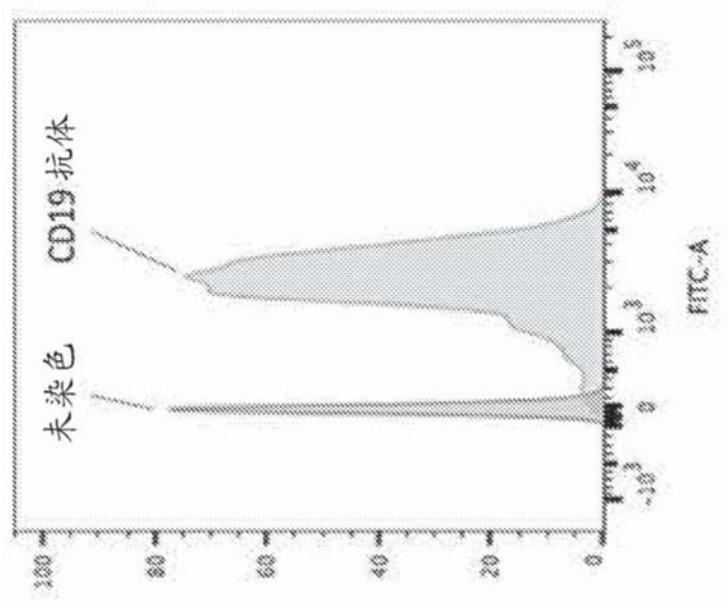


图4B

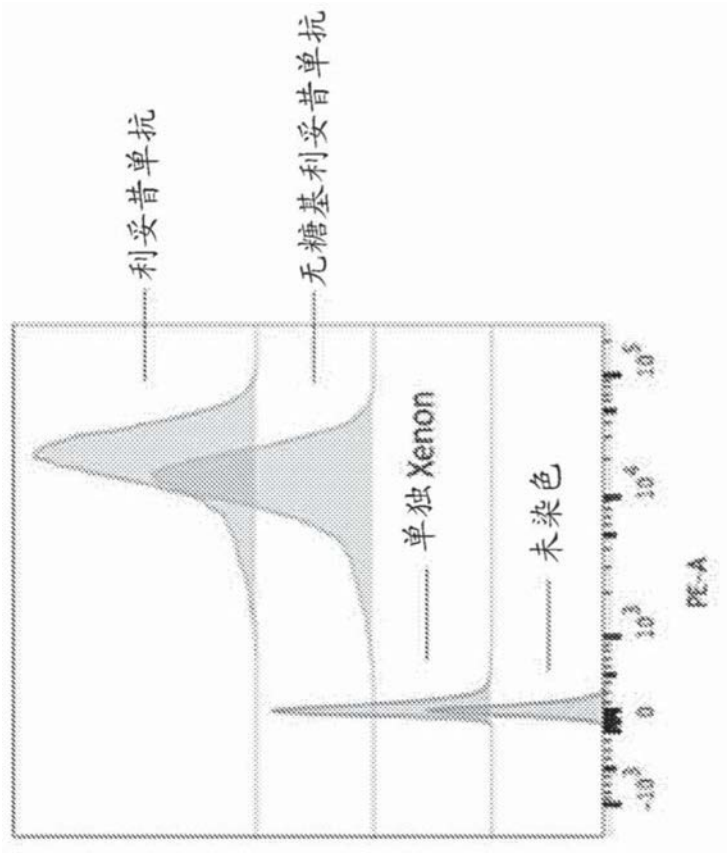


图4C



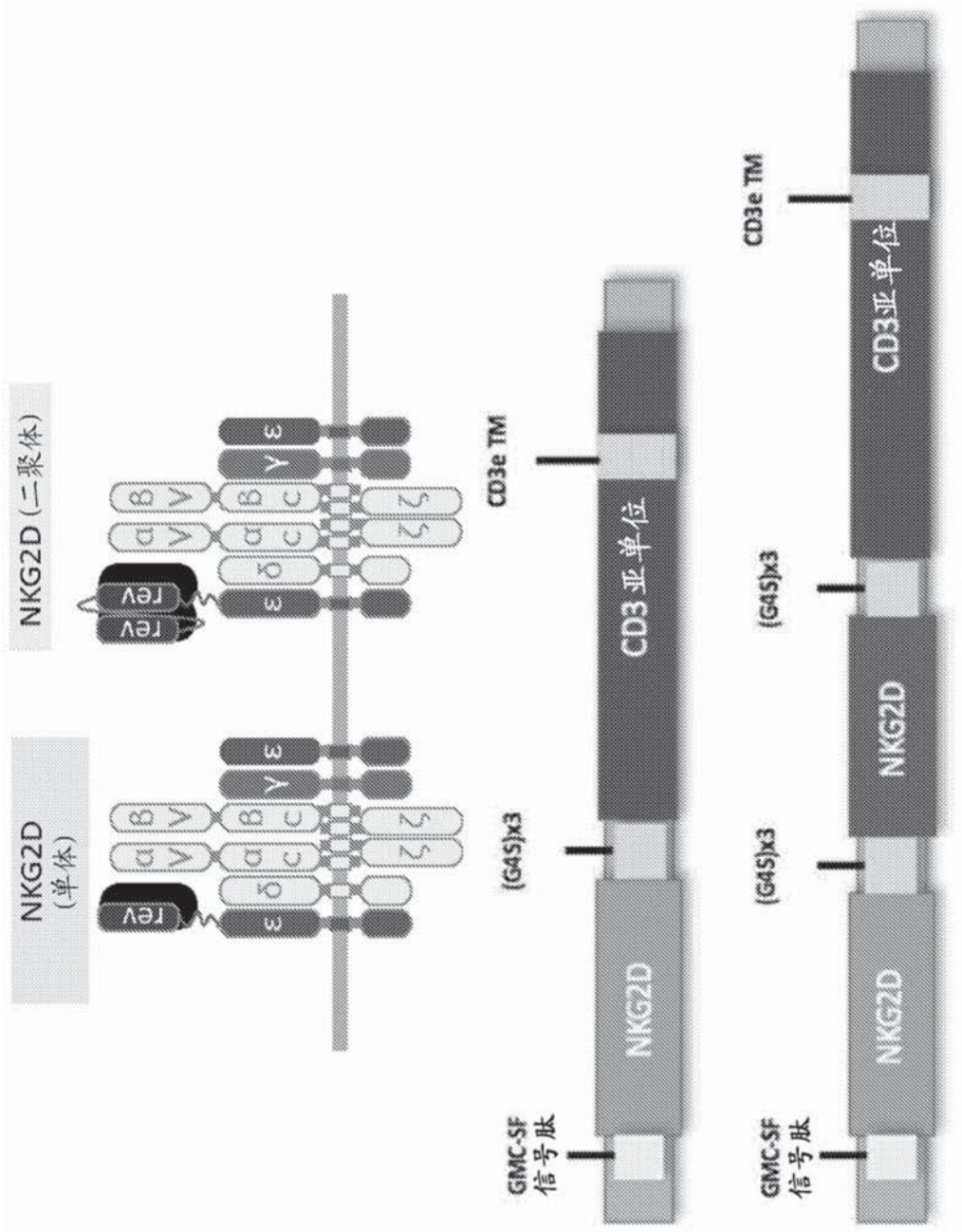


图5

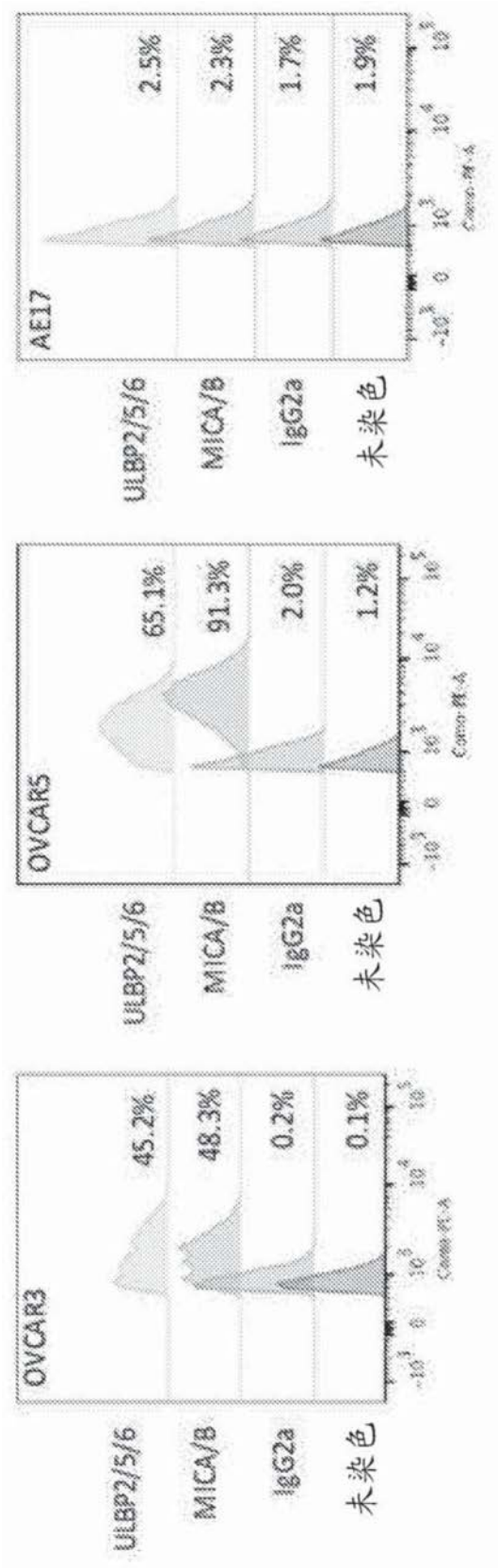


图6A

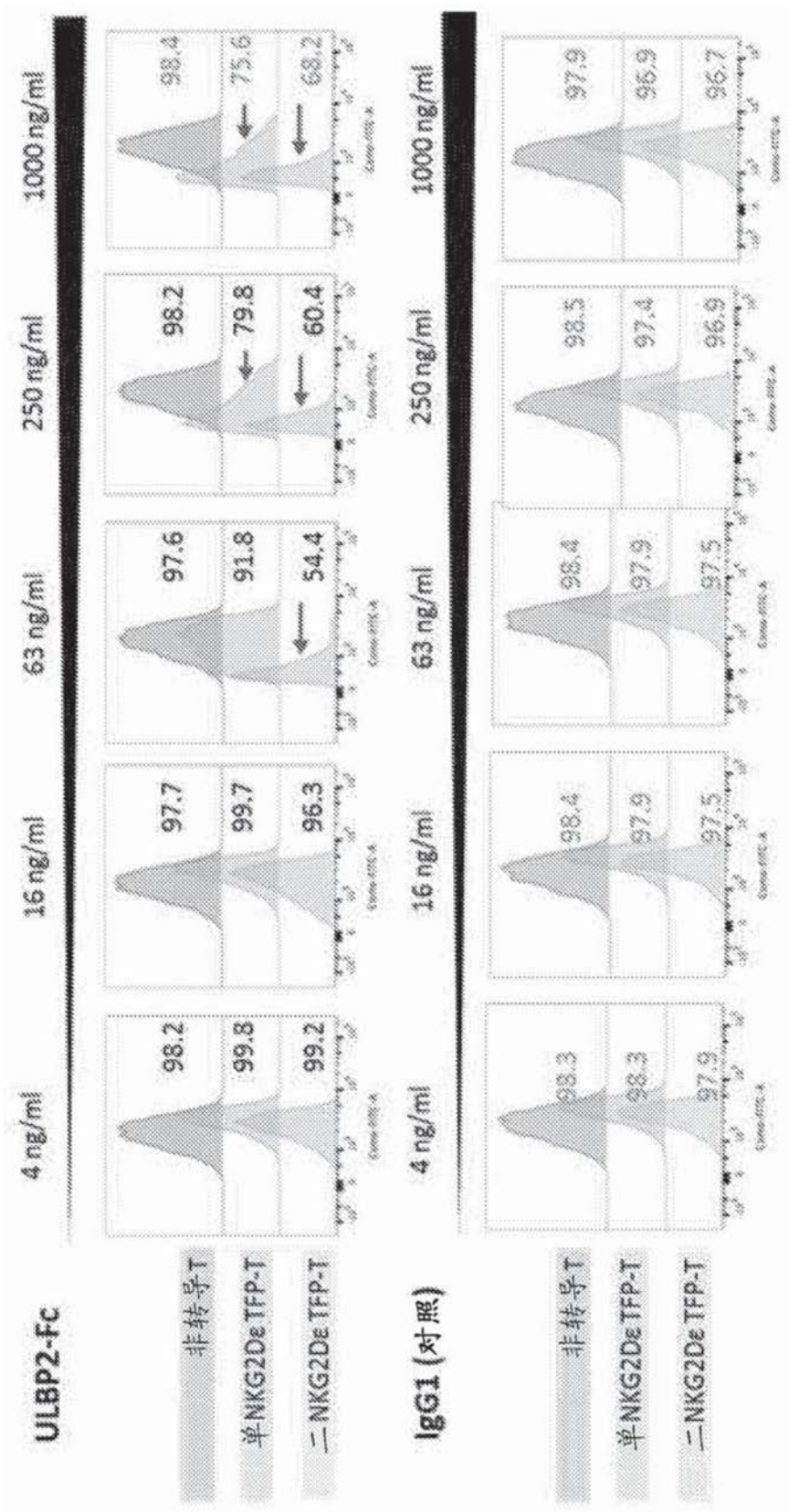


图6B

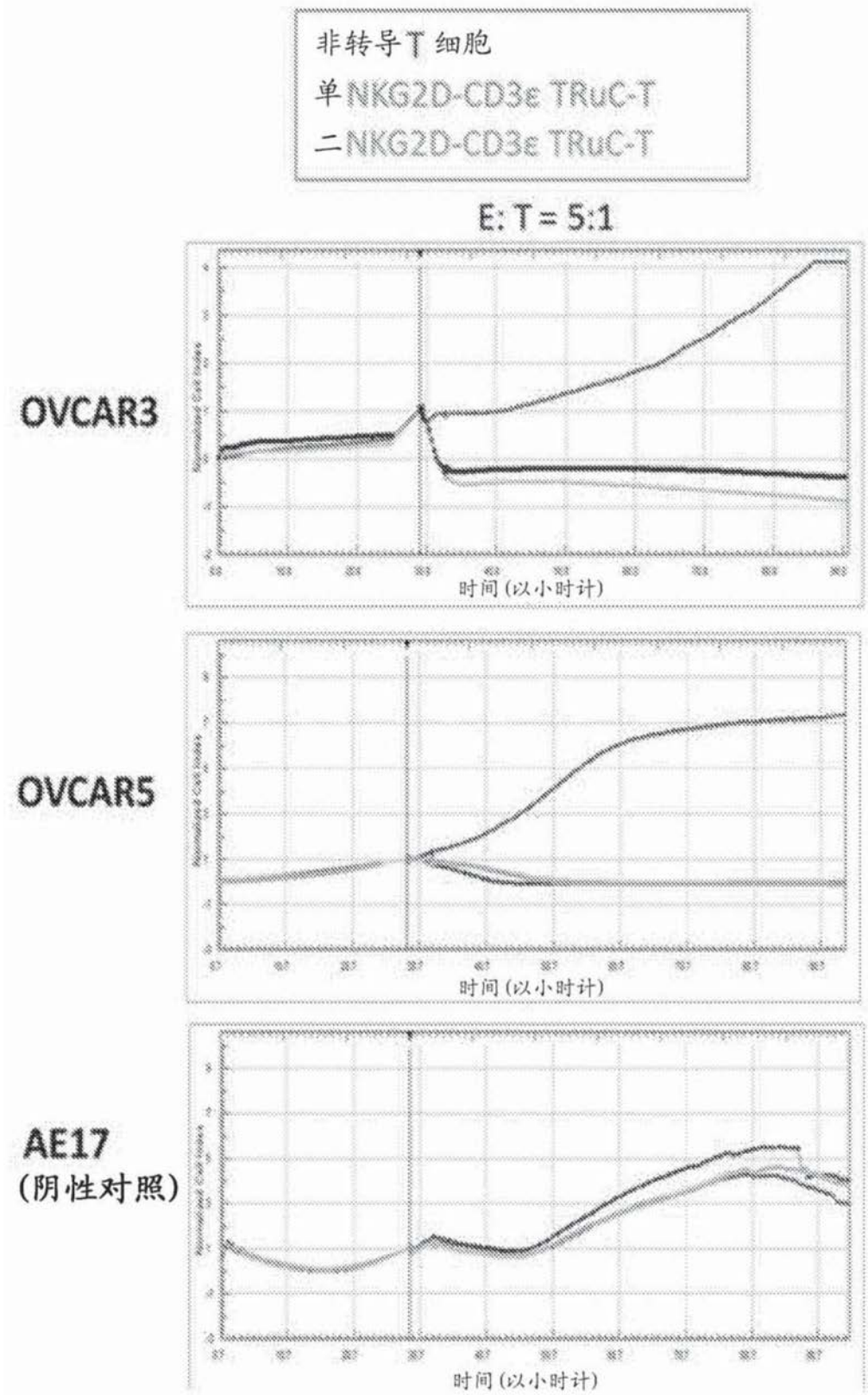


图7A



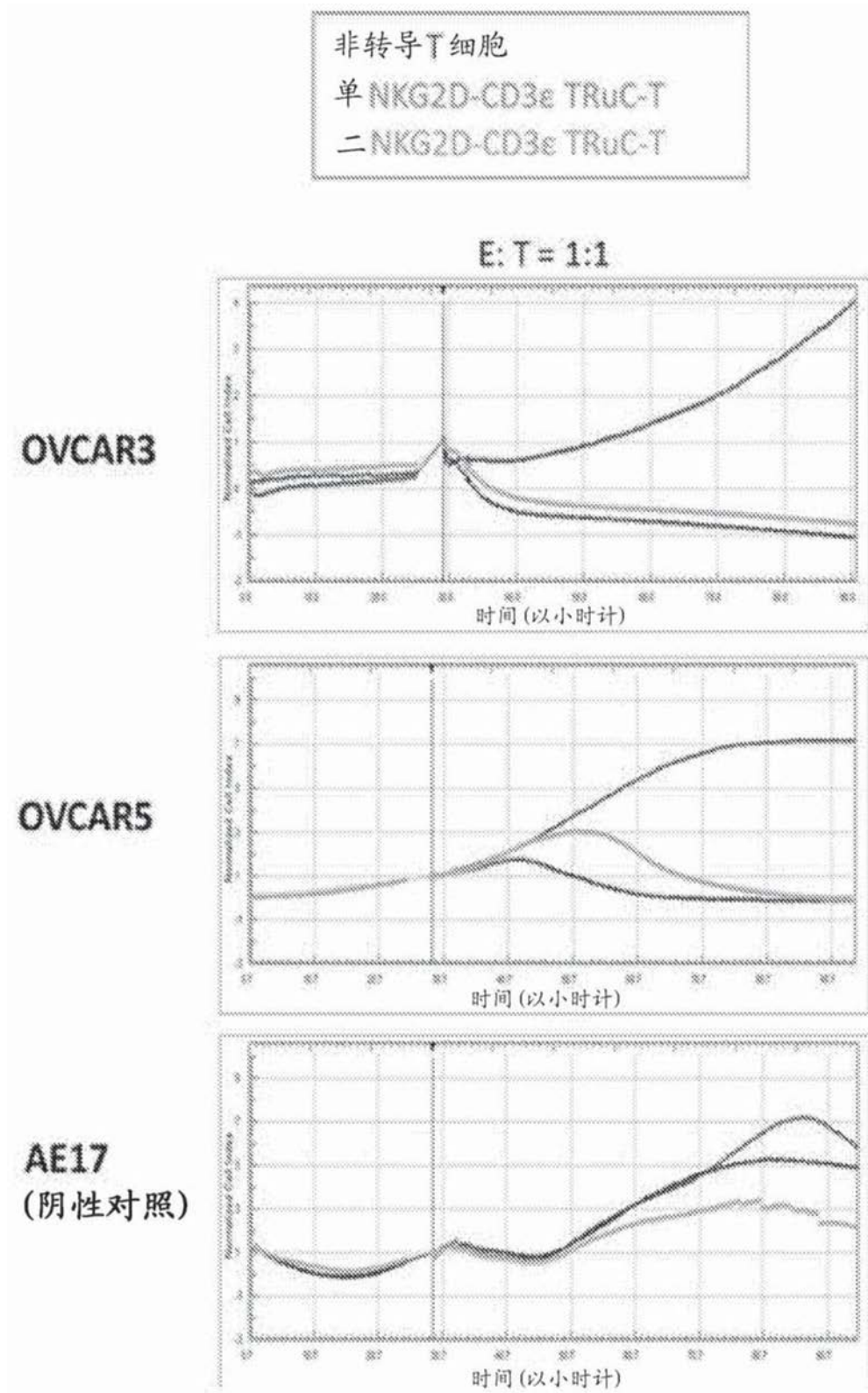


图7B

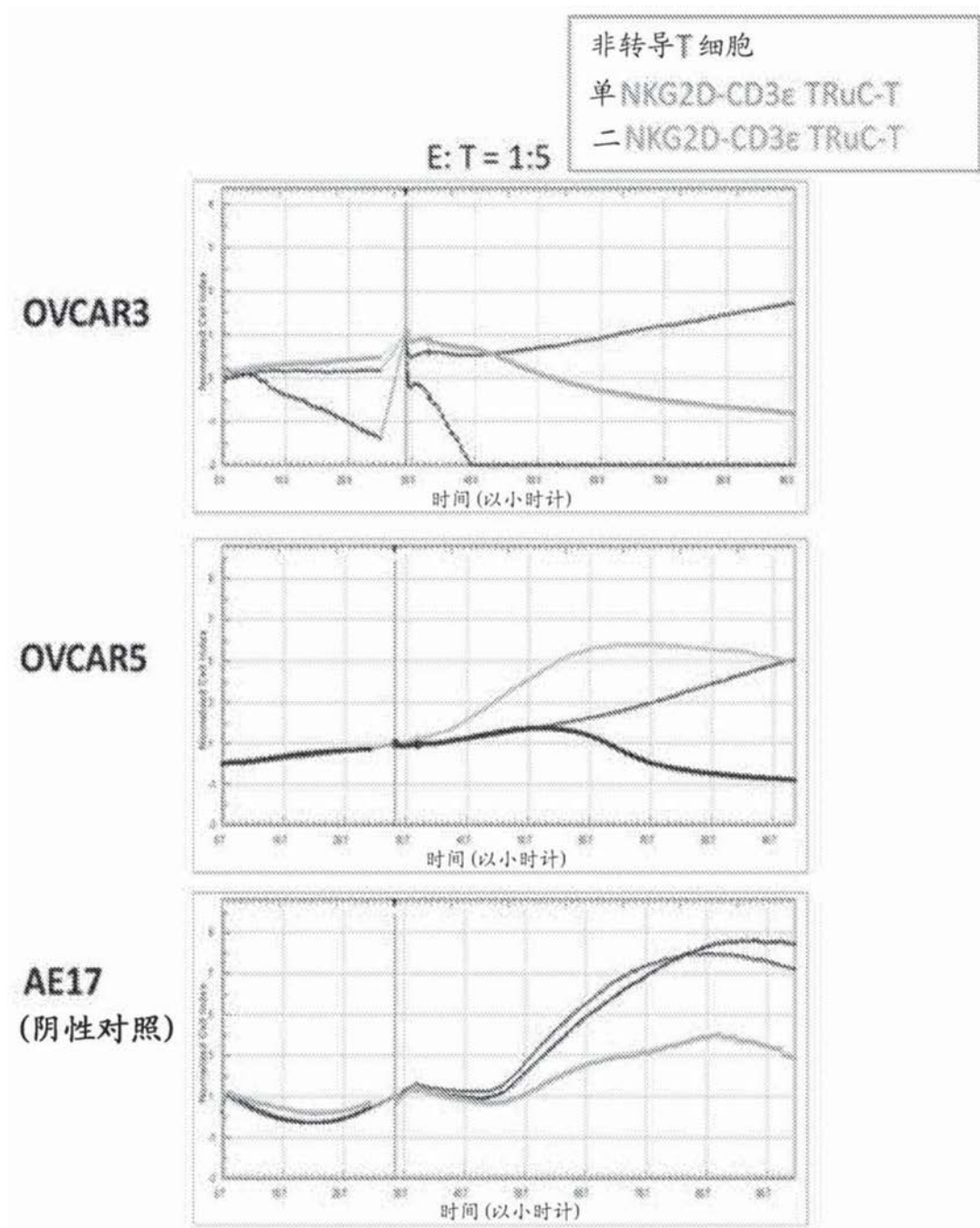


图7C



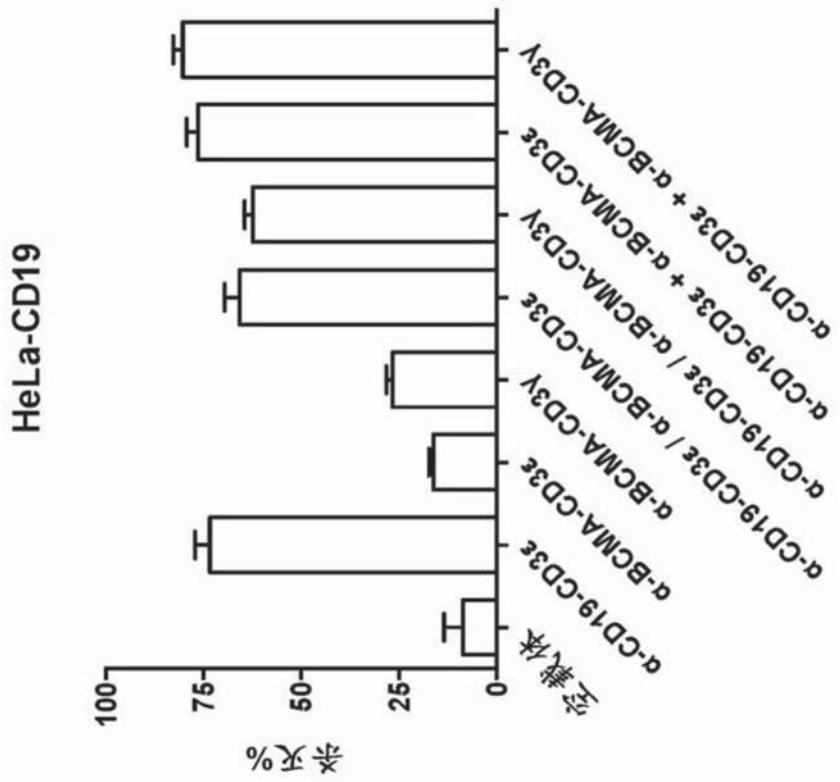


图8A

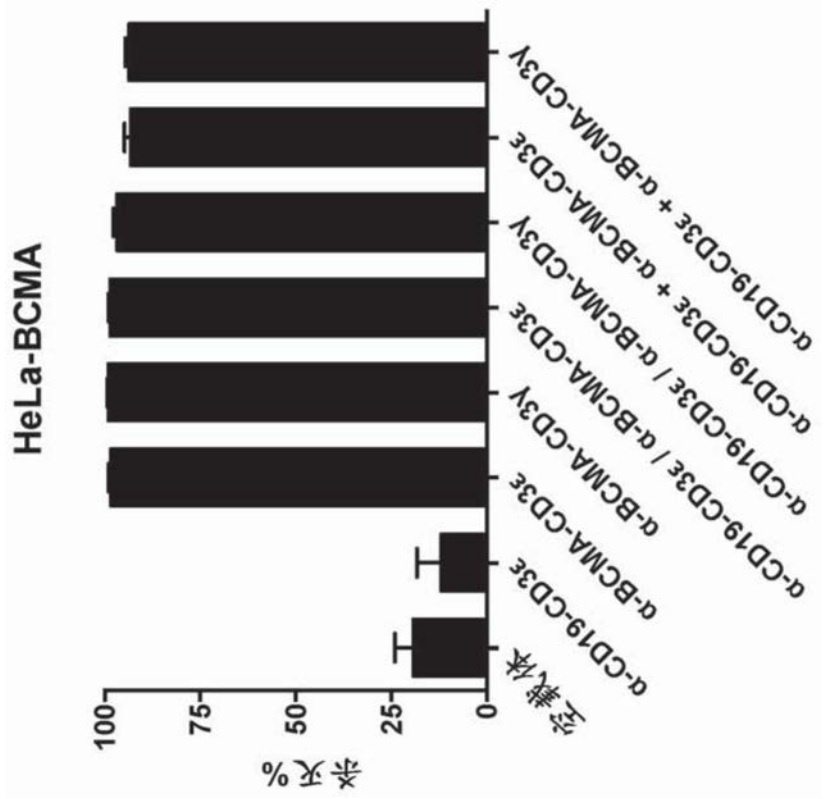


图8B

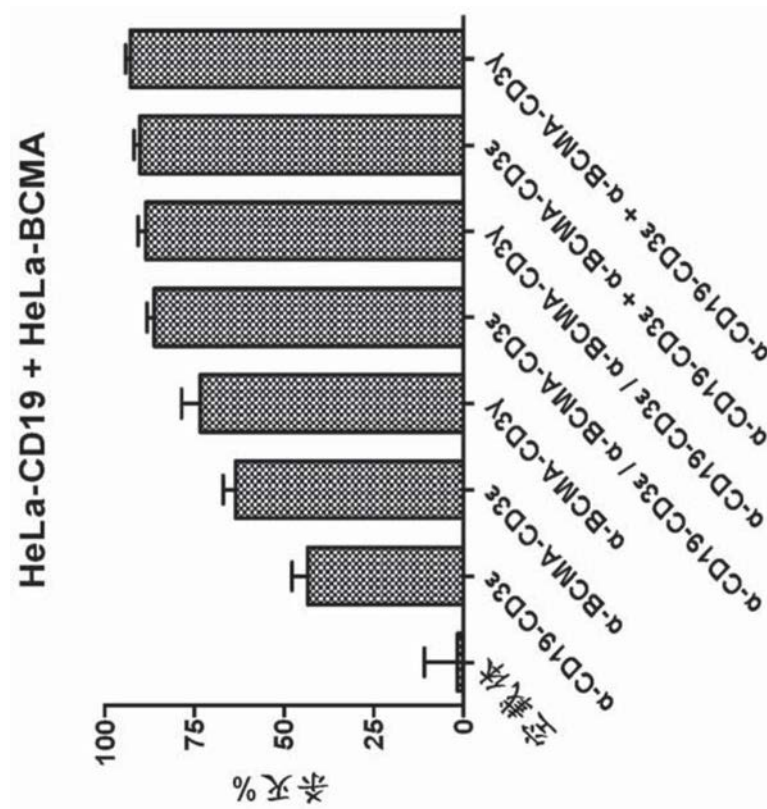


图8C

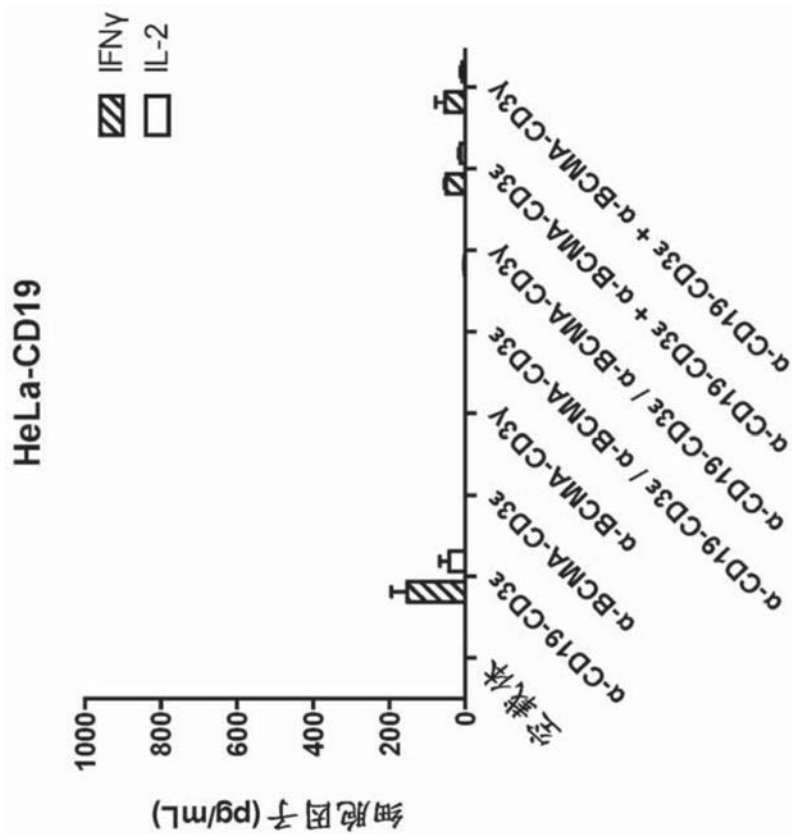


图9A

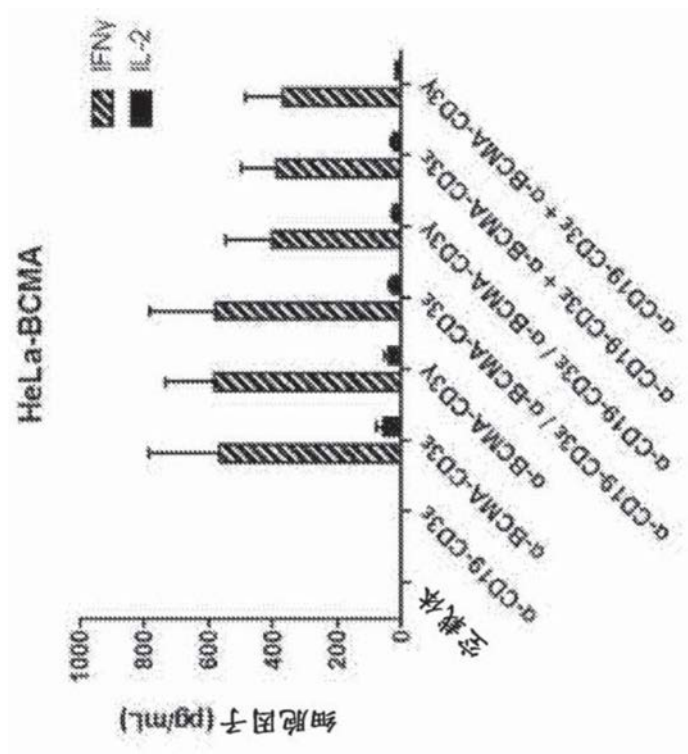


图9B

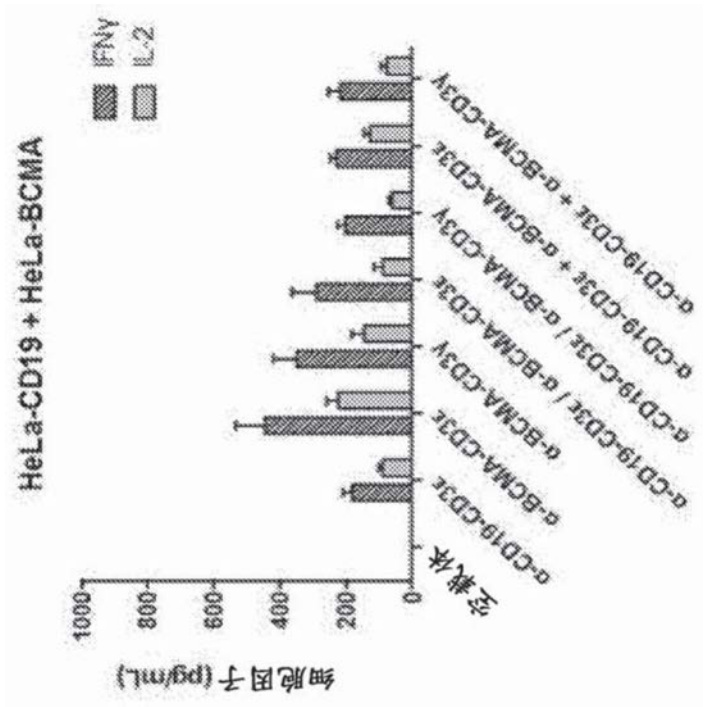


图9C

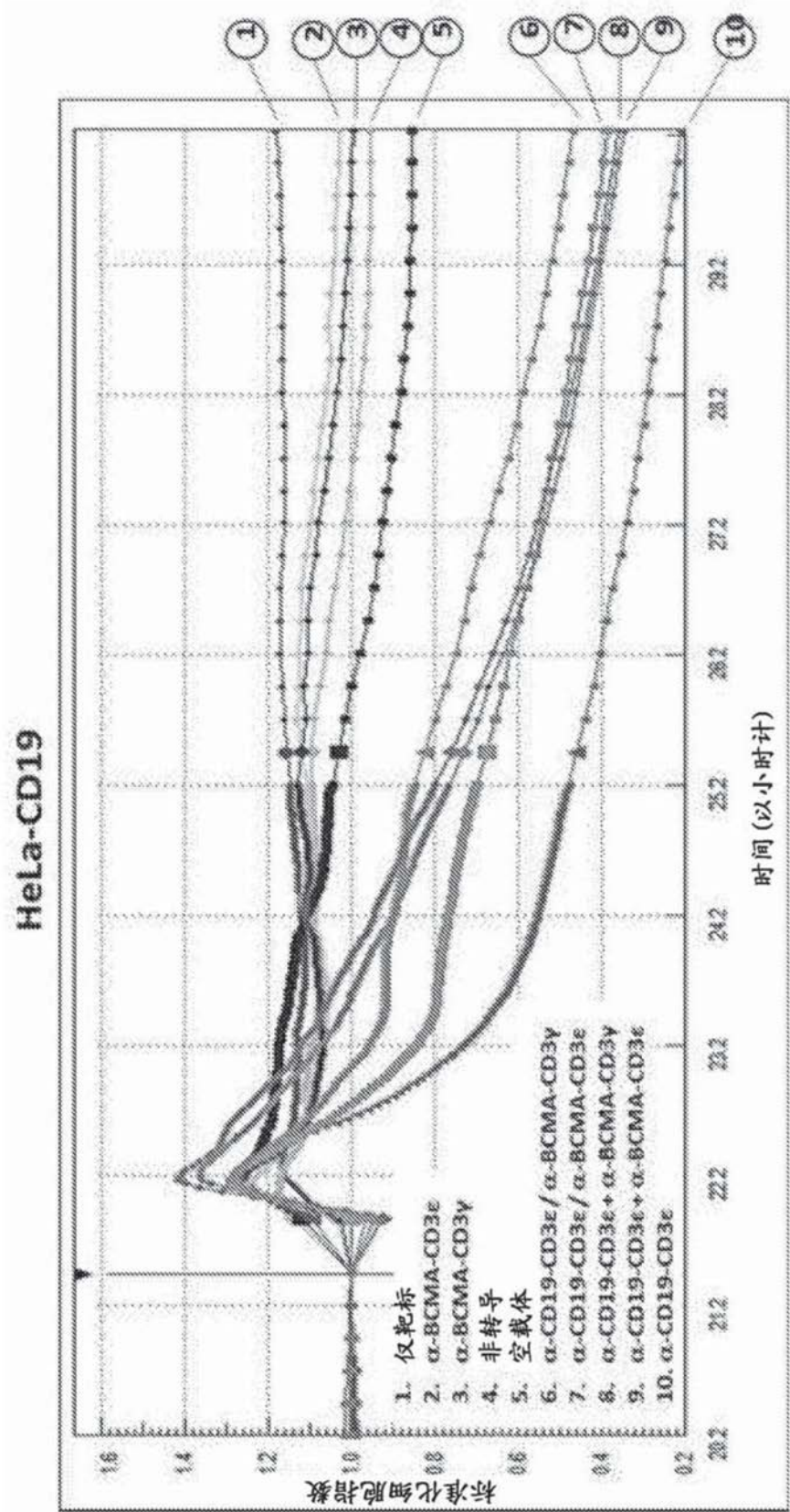


图10A



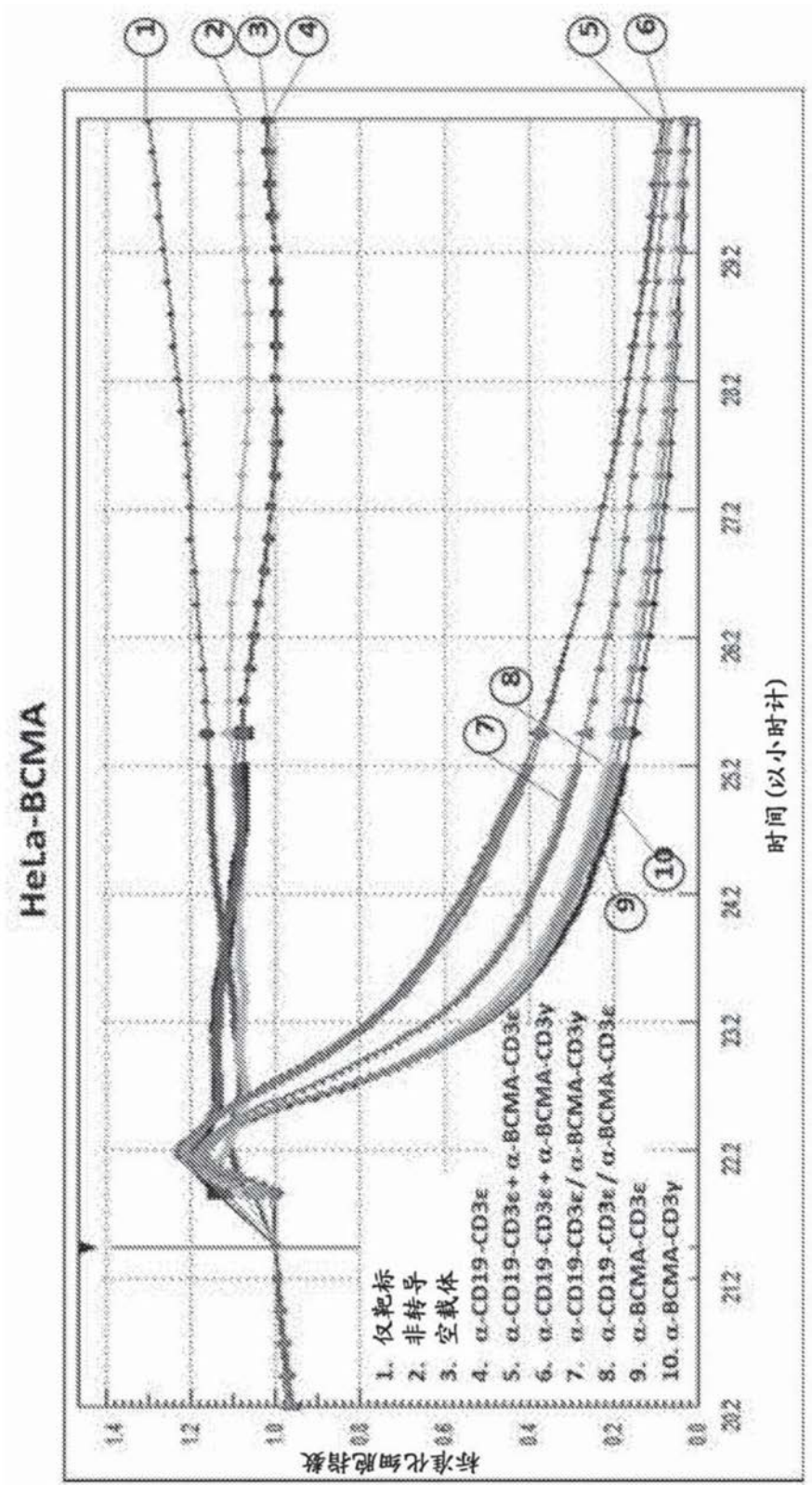


图10B



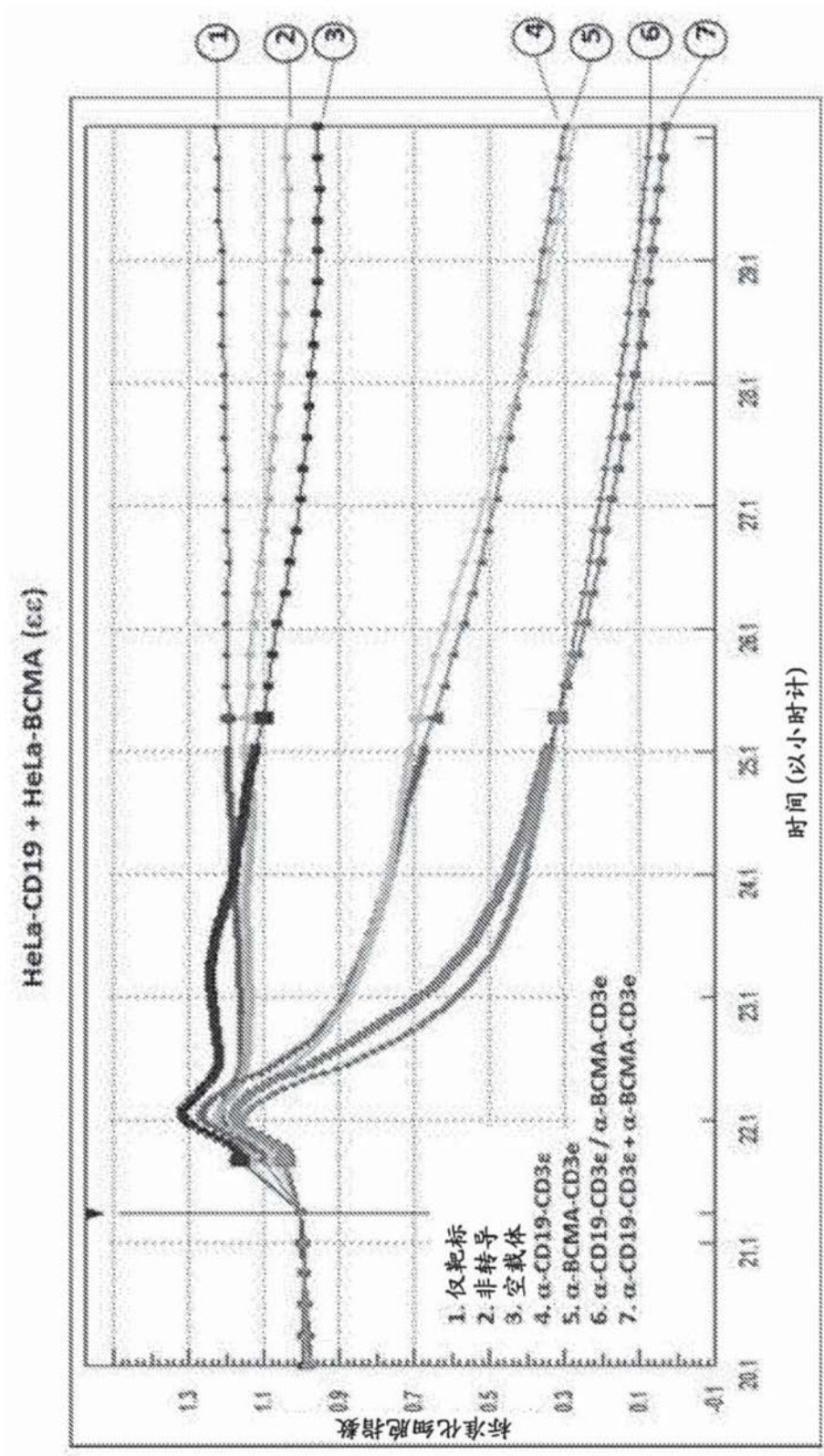


图10C

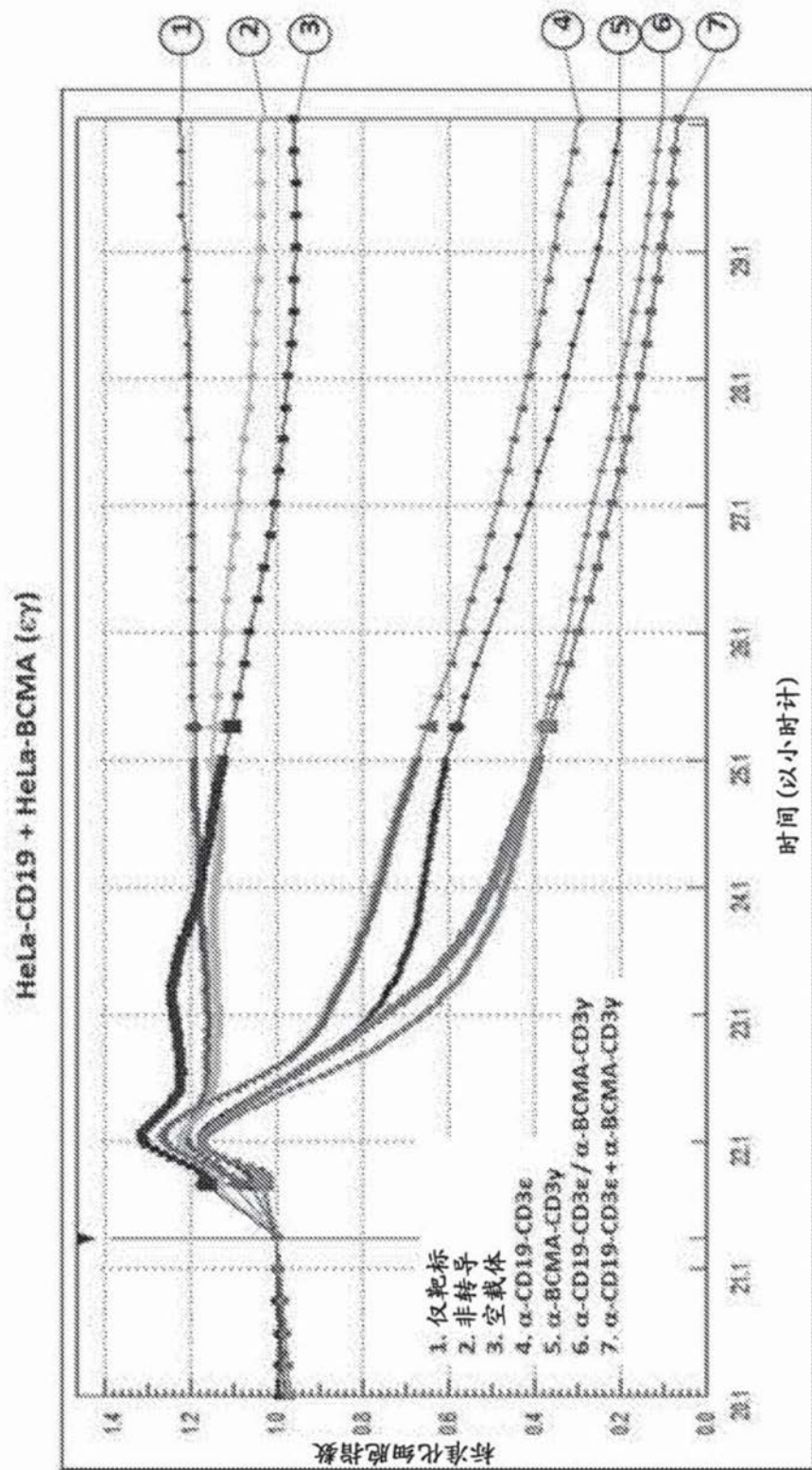


图10D

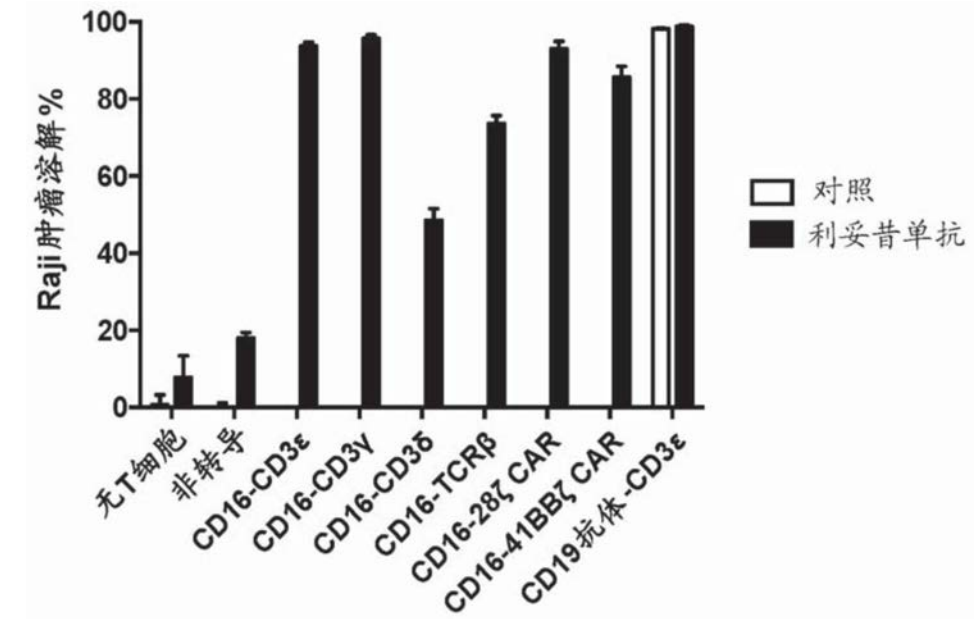


图11A

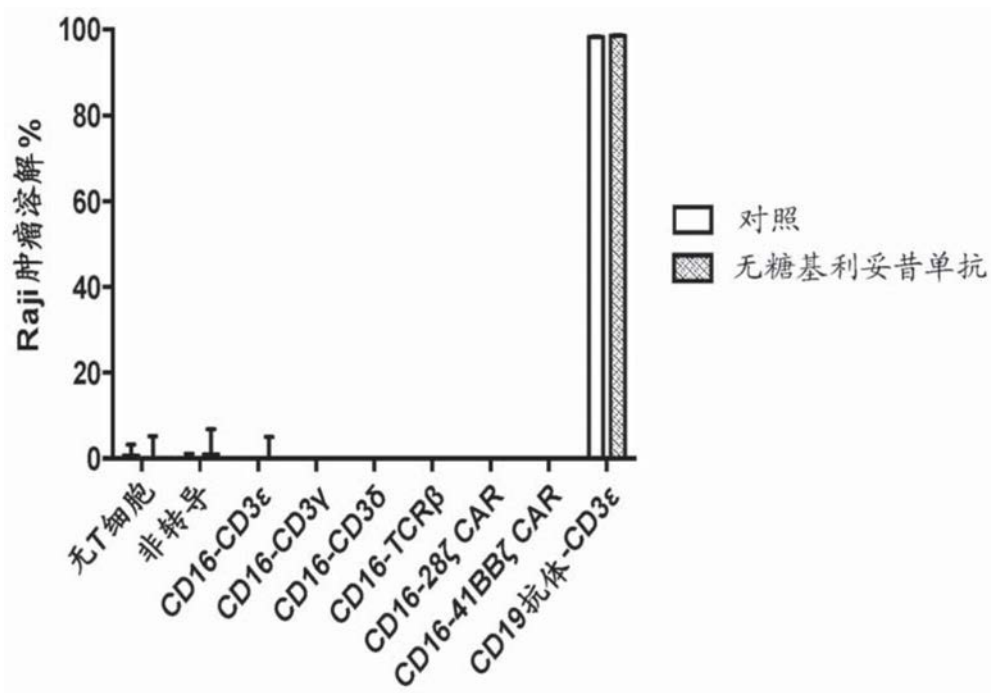


图11B

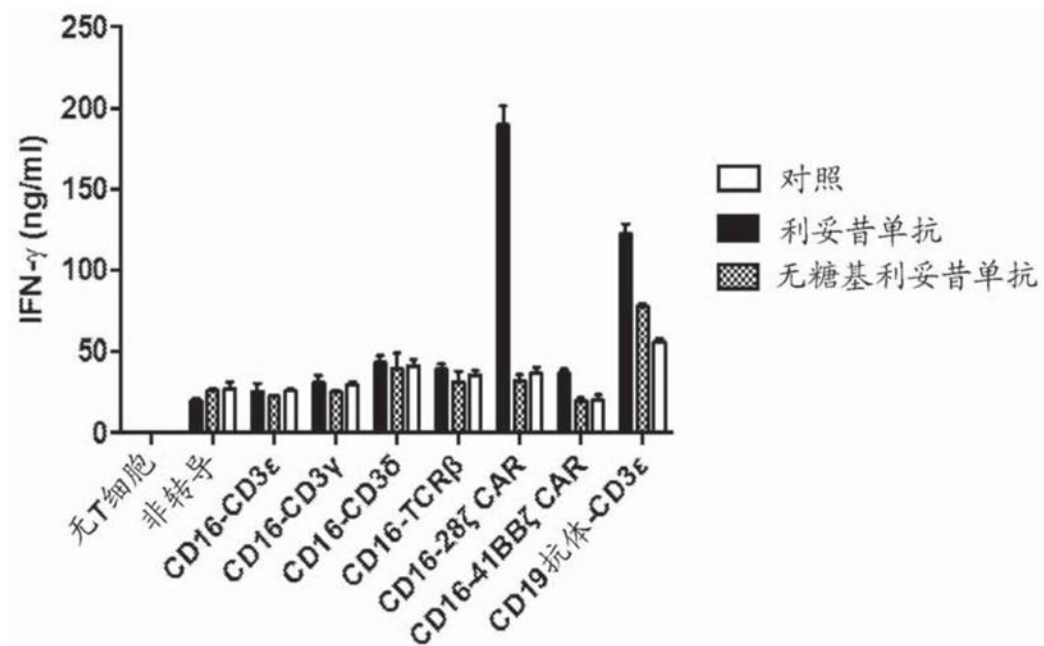


图12A

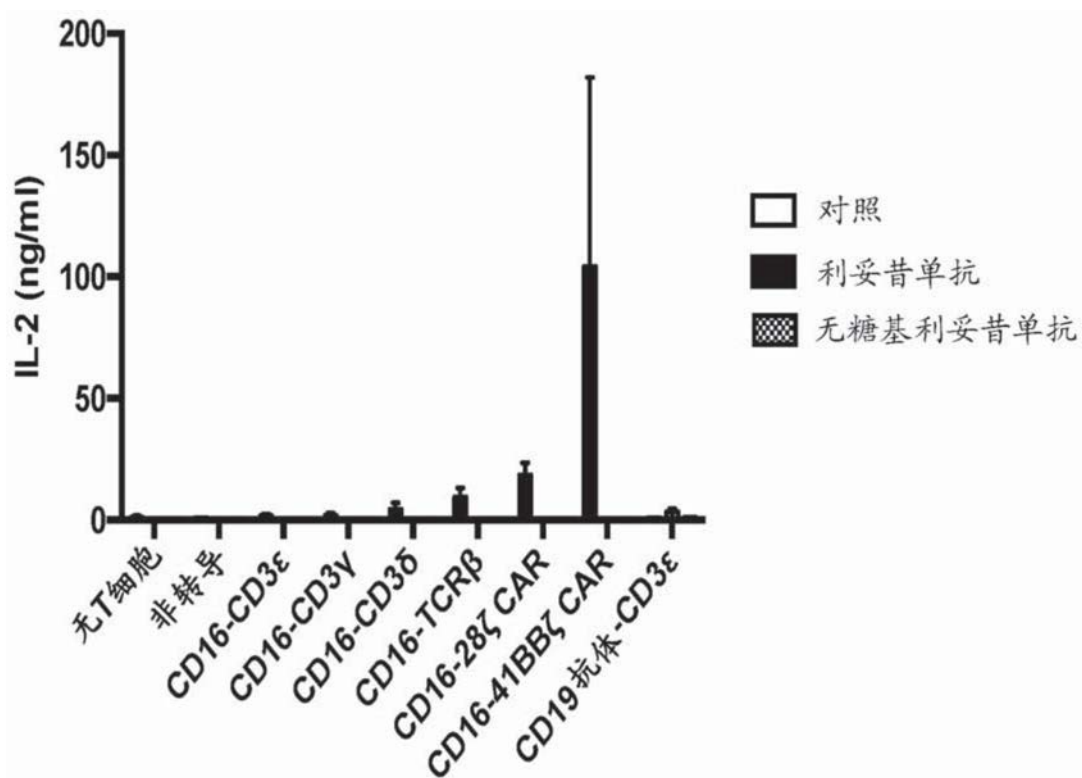


图12B

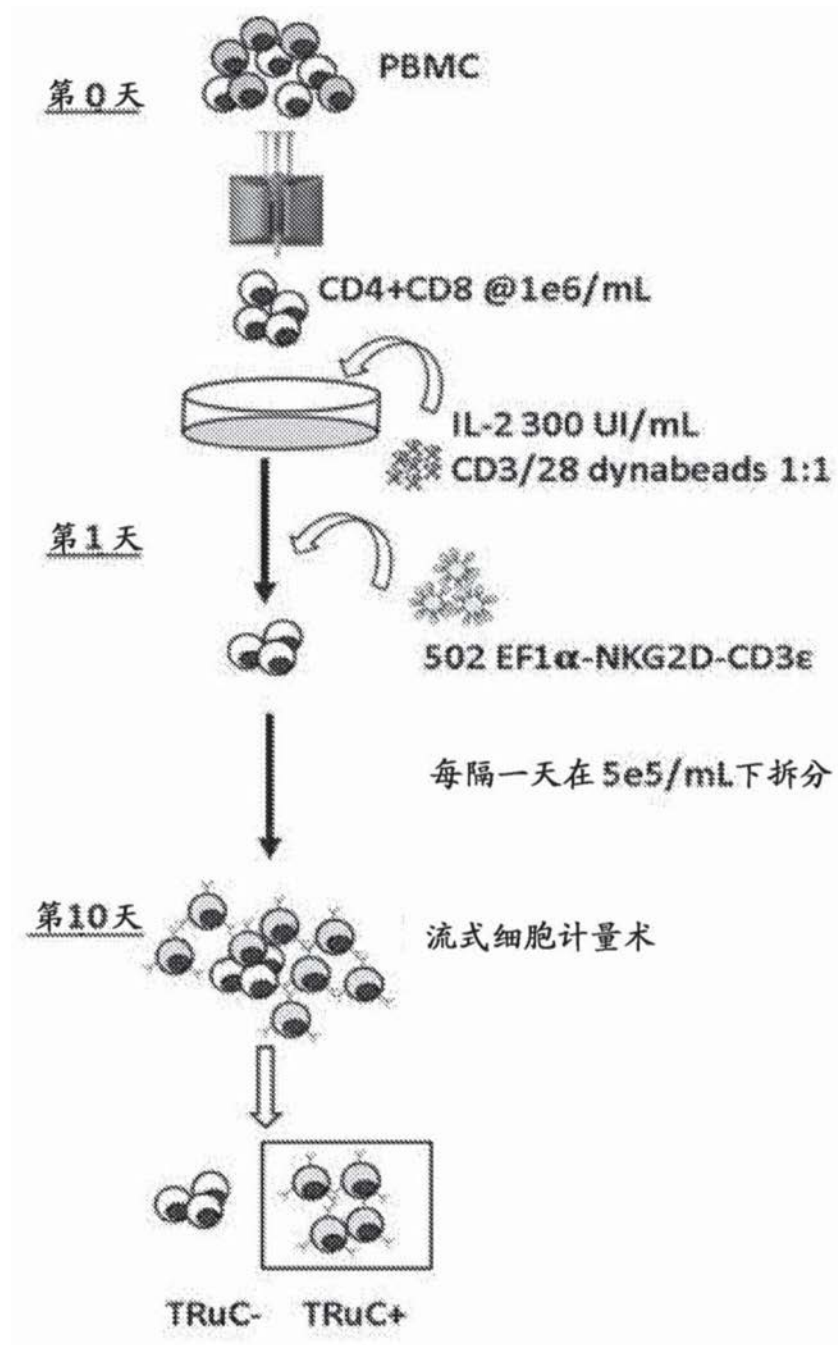


图13A



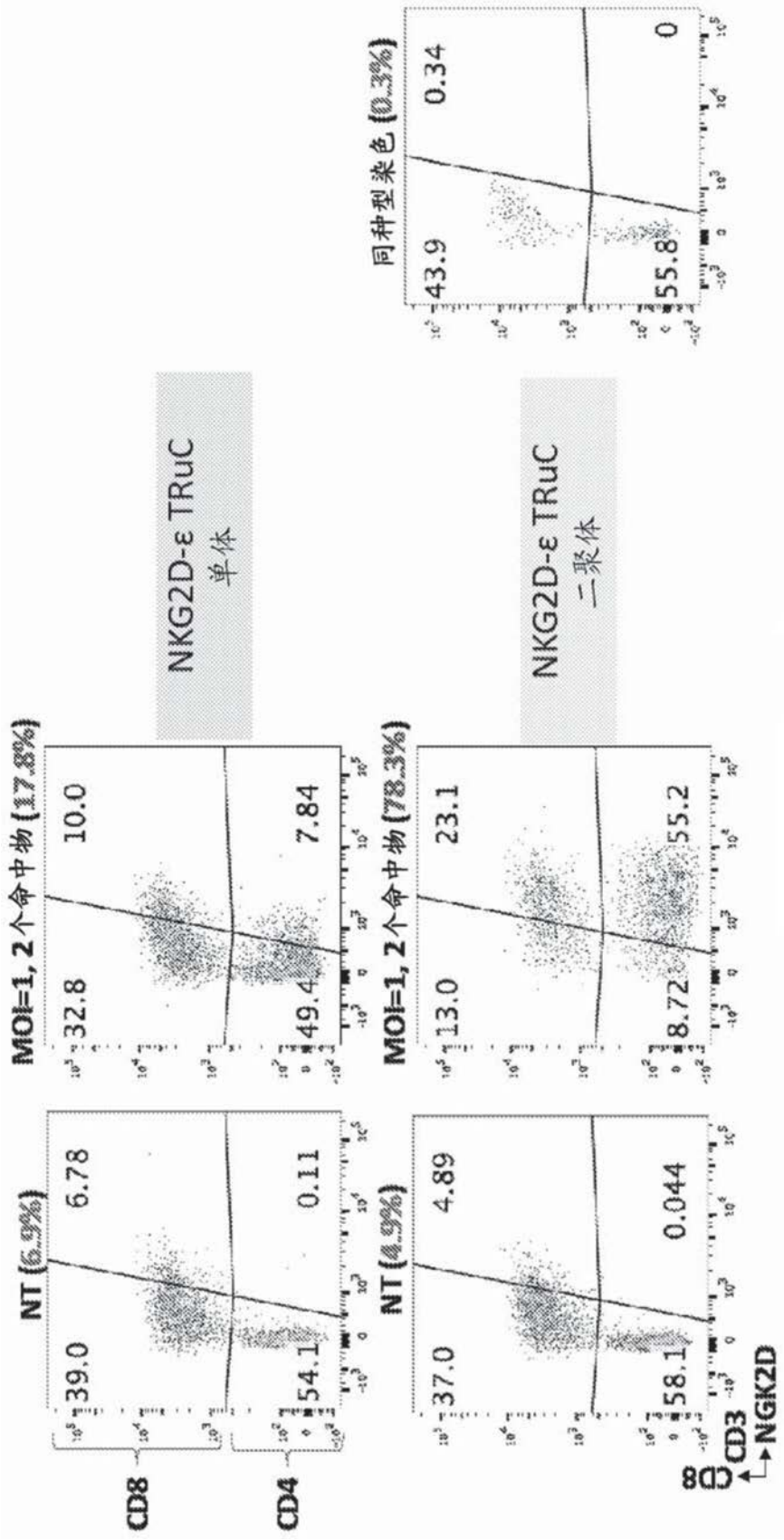


图13B



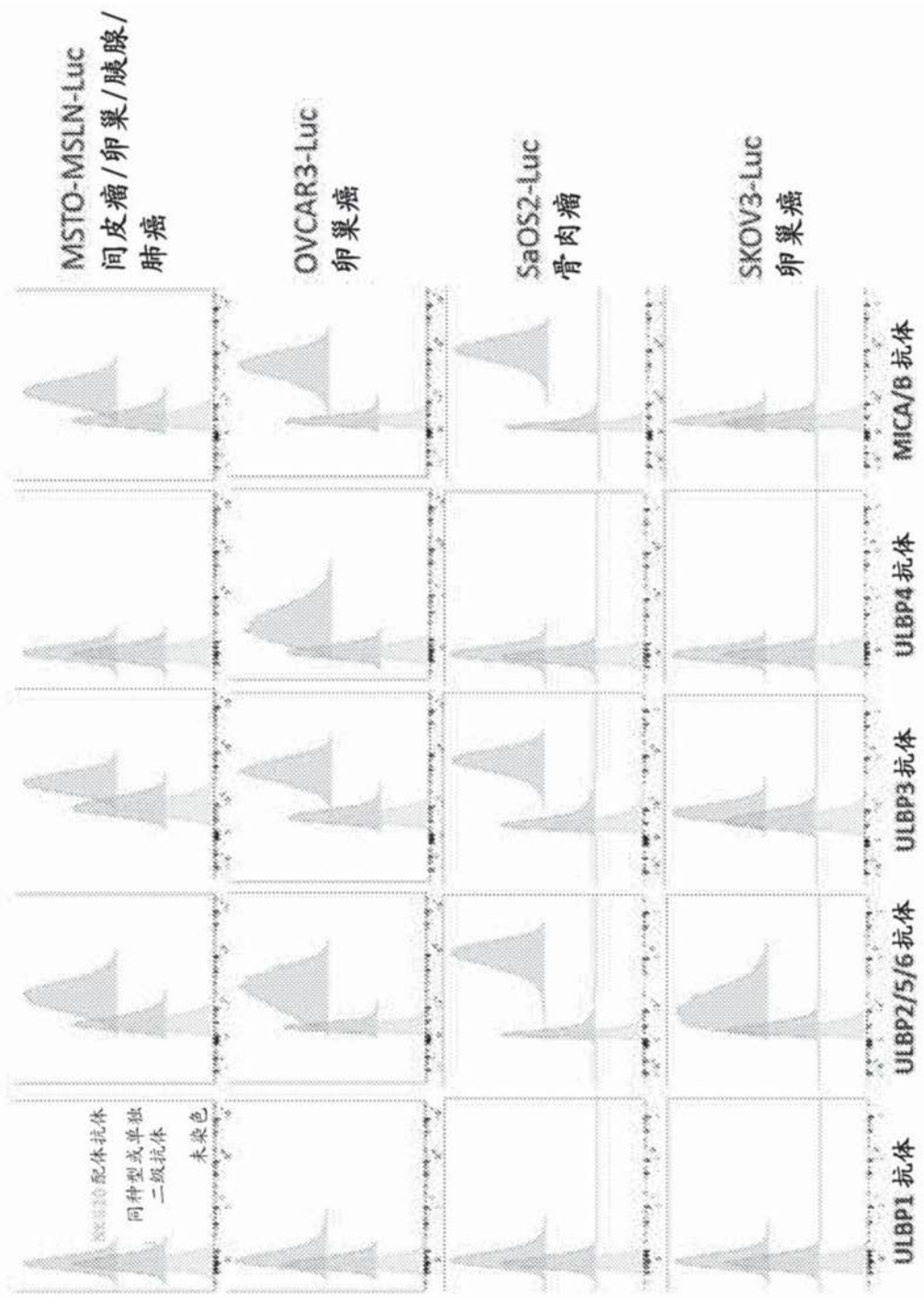


图14A

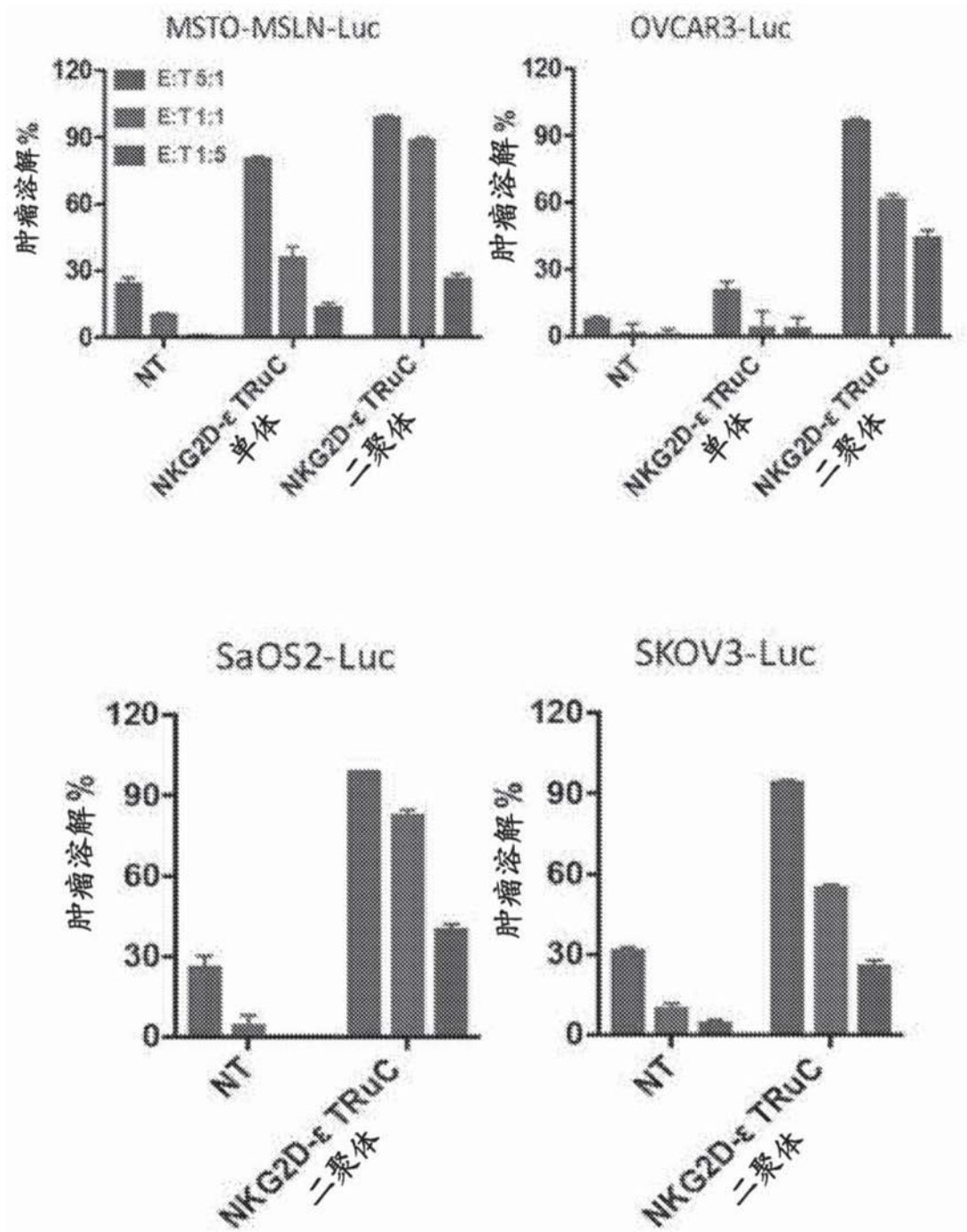


图14B

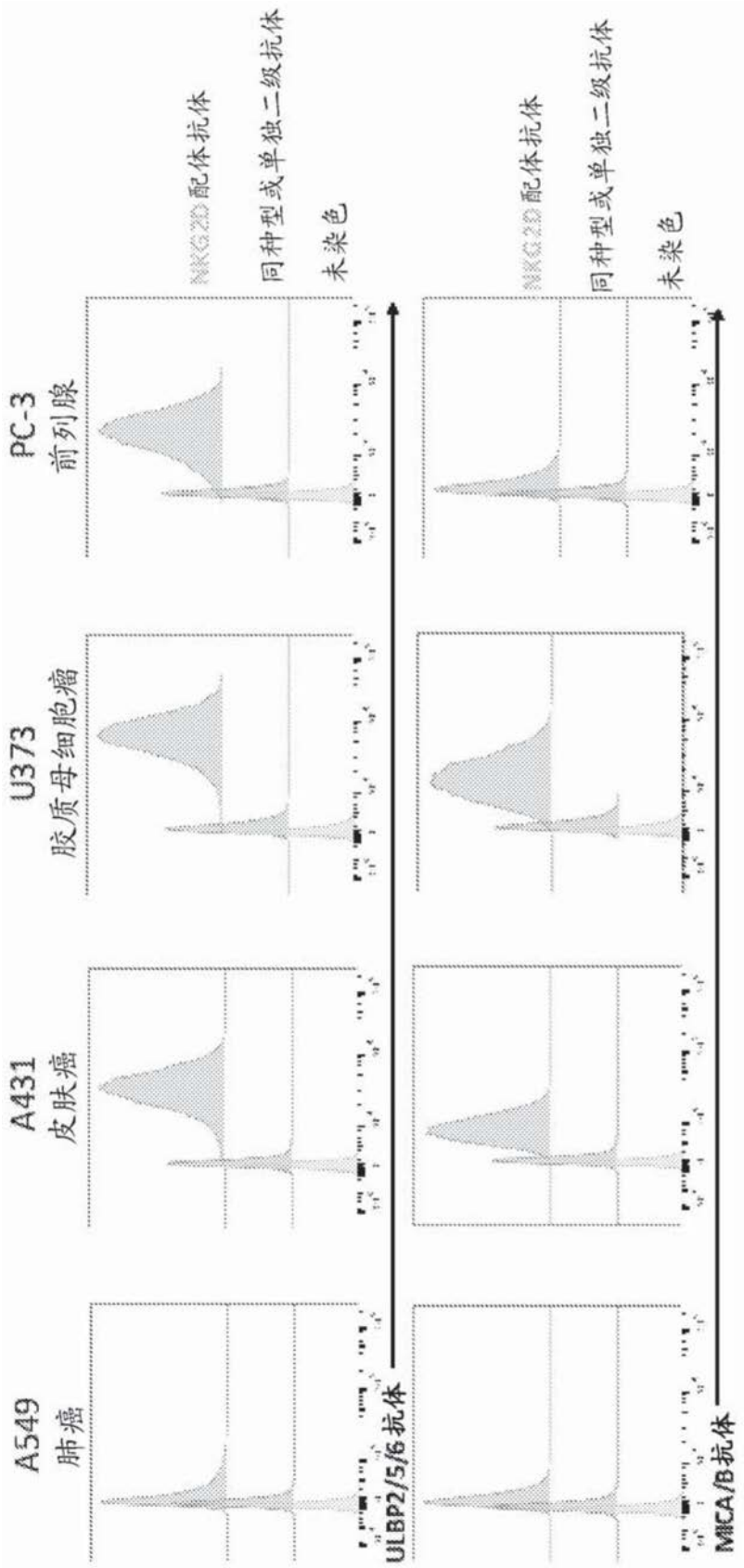


图14C

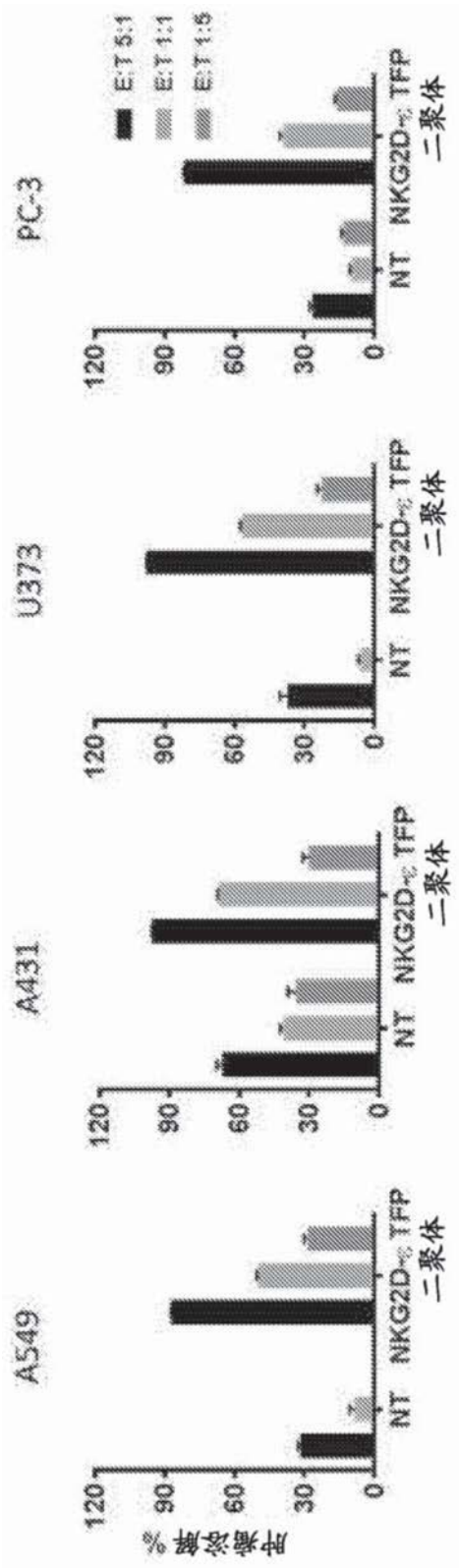


图14D

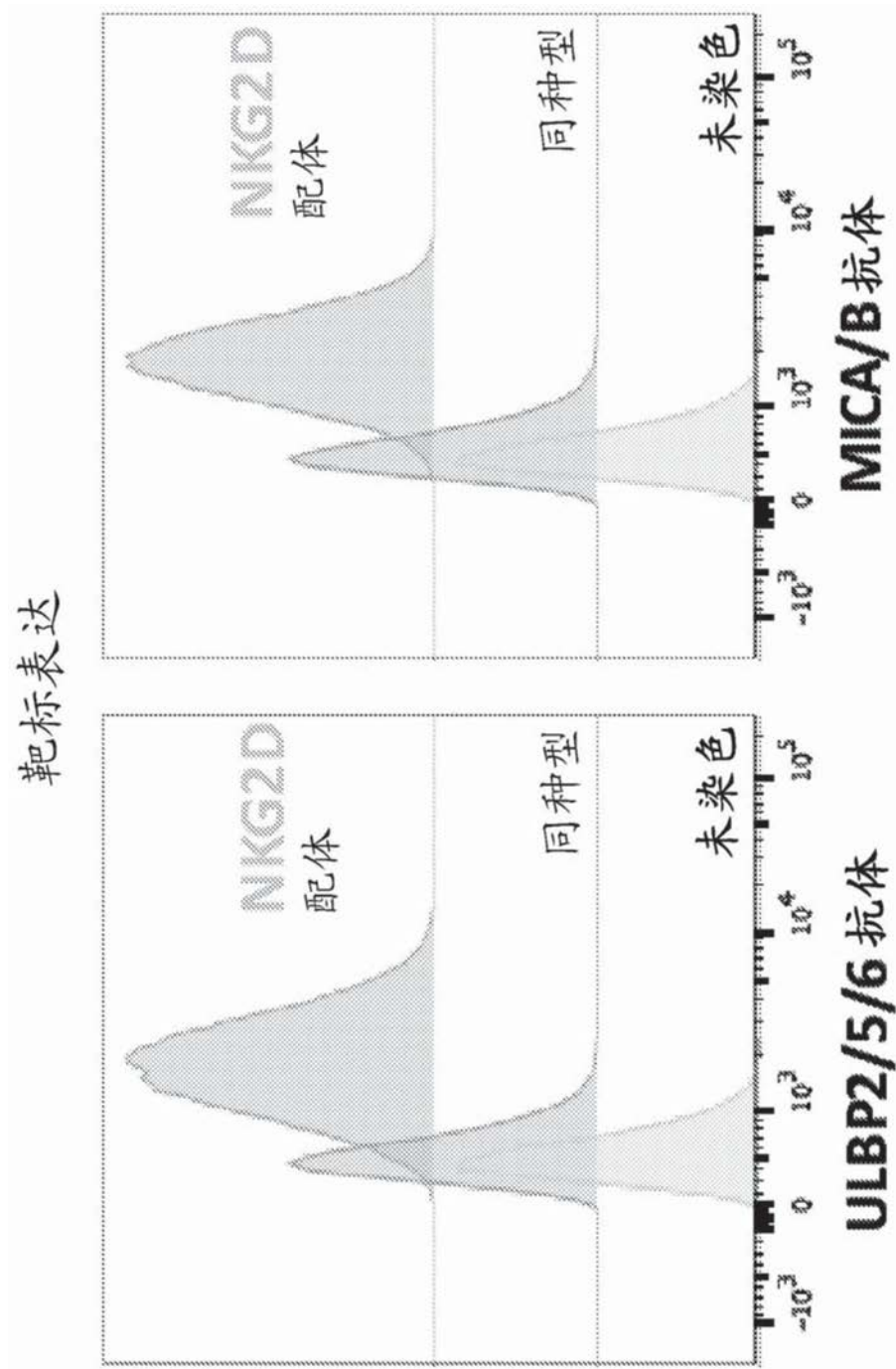


图15A



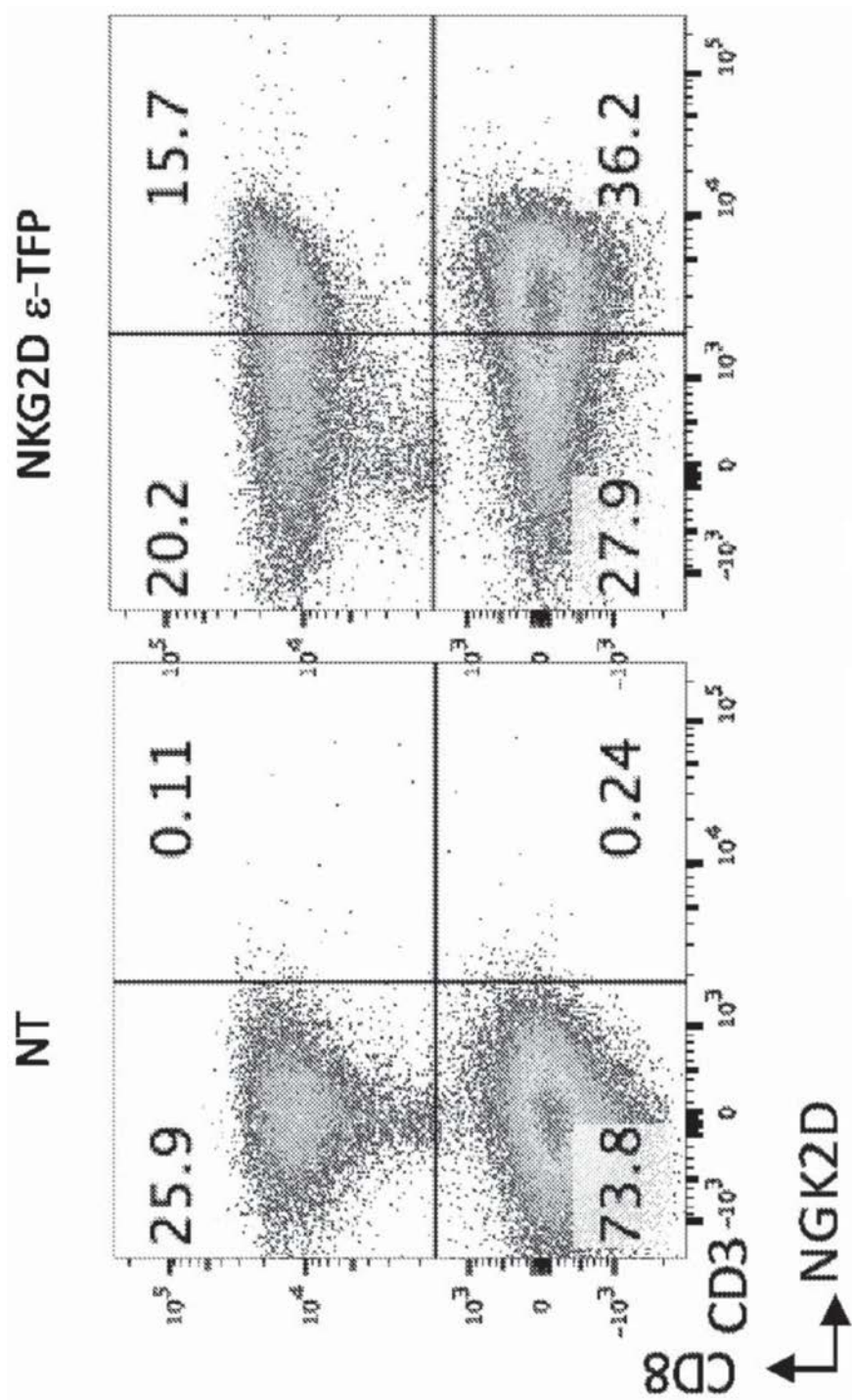


图15B



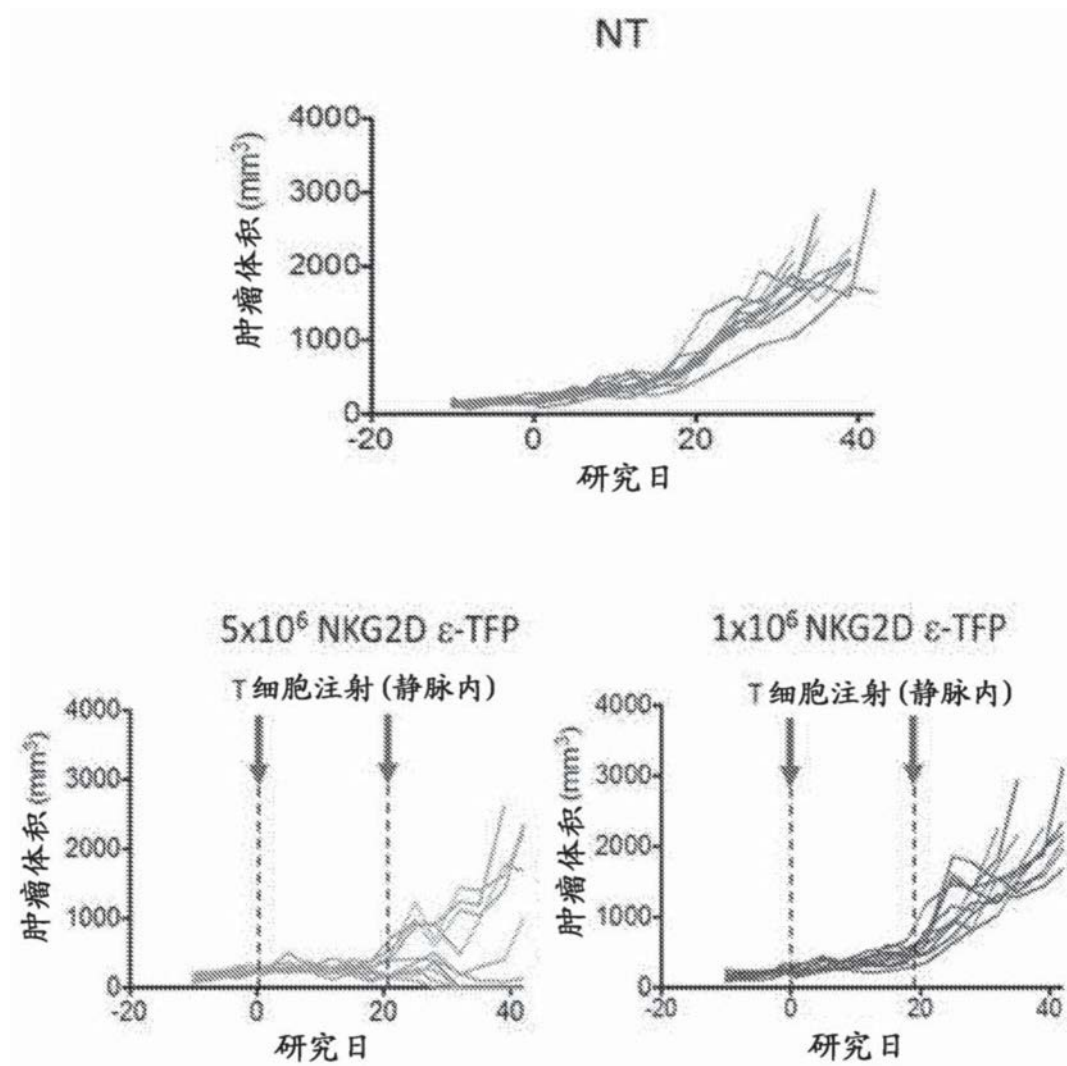


图15C

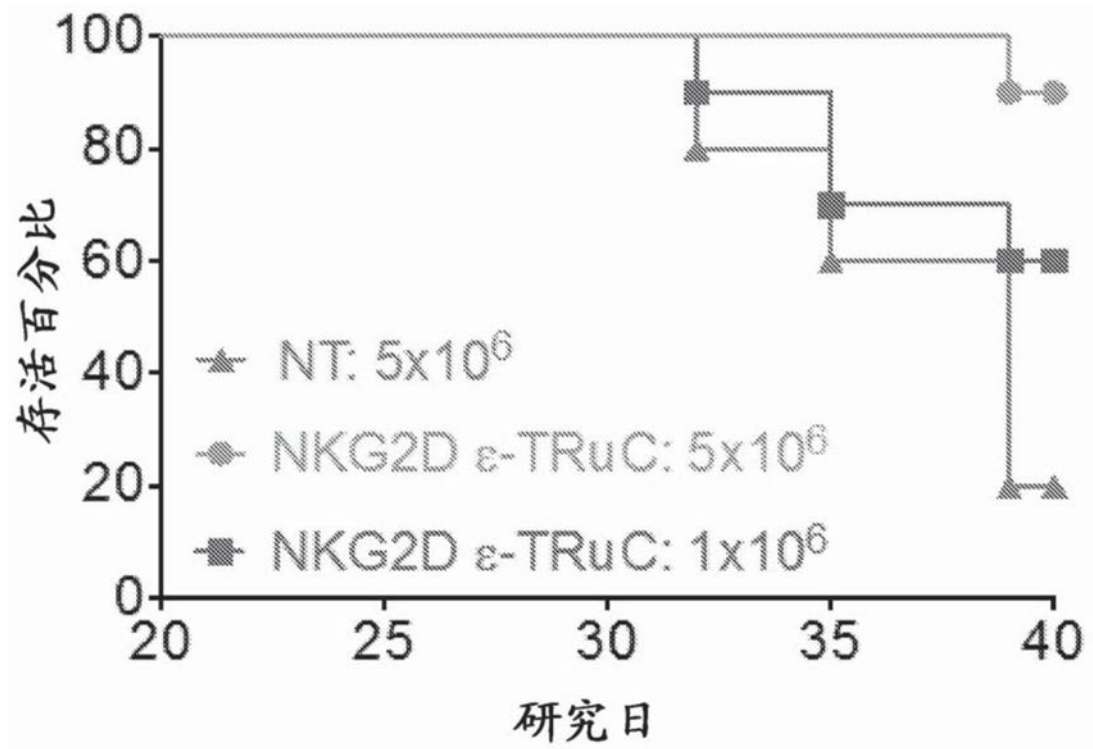


图15D