



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113056283 A

(43) 申请公布日 2021.06.29

---

(21) 申请号 201980070384.5 (74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所  
11105  
代理人 余晓文

(22) 申请日 2019.10.01

(30) 优先权数据  
62/739,822 2018.10.01 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2021.04.23

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2019/054132 2019.10.01

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02020/072536 EN 2020.04.09

(71) 申请人 阿迪塞特生物股份有限公司  
地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 D.K. 萨特帕耶夫 M.A. 赫尔曼  
J.M. 罗梅罗 Y.F. 井 Z. 安  
A. 雅克博维茨

(51) Int. Cl.  
A61K 39/00 (2006.01)  
C07K 14/54 (2006.01)  
C07K 16/28 (2006.01)  
C07K 14/725 (2006.01)  
A61K 39/395 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)  
A61P 35/02 (2006.01)  
A61K 35/17 (2006.01)

---

权利要求书5页 说明书36页 附图19页

(54) 发明名称

关于治疗血液肿瘤的工程化和非工程化  $\gamma$   $\delta$ -T细胞的组合物和方法

(57) 摘要

本发明的方面包括用工程化或非工程化  $\gamma$   $\delta$ -T细胞治疗血液肿瘤的组合物和方法。在一些实施方案中,所述  $\gamma$   $\delta$ -T细胞包含嵌合抗原受体(CAR)构建体。所述CAR构建体可以包含抗CD20结合结构域或抗B细胞成熟抗原(BCMA)结合结构域、CD8铰链和跨膜结构域、共刺激结构域、CD3  $\zeta$  信号传导结构域、其组合或全部。所述CAR构建体可以包含编码分泌的共用  $\gamma$  链细胞因子的结构域,诸如sIL15结构域。

1. 一种编码嵌合抗原受体 (CAR) 的分离的核酸序列, 其中所述CAR包含
  - a. 与在血液肿瘤细胞表面上表达的肿瘤相关抗原 (TAA) 特异性结合的结合结构域;
  - b. CD8 $\alpha$  铰链结构域;
  - c. CD8 $\alpha$  跨膜结构域;
  - d. 共刺激信号传导区, 任选地其中所述共刺激信号传导区选自4-1BB (CD137) 共刺激信号传导区和CD27共刺激信号传导区; 以及
  - e. CD3 $\zeta$  信号传导结构域。
2. 如权利要求1所述的分离的核酸序列, 其中所述(a) - (e) 呈5'至3'的顺序。
3. 如权利要求1或2所述的分离的核酸序列, 其中所述结合结构域与CD20特异性结合。
4. 如权利要求3所述的分离的核酸序列, 其中:
  - a. 所述结合结构域与由抗CD20抗体所结合的CD20内的表位选择性结合或与抗CD20抗体竞争结合, 所述抗CD20抗体选自由3B9、3H7、2B7和9C11, 优选地3H7组成的组; 和/或
  - b. 所述结合结构域包含选自由3B9、3H7、2B7和9C11, 优选3H7组成的组的抗CD20抗体的互补决定区。
5. 如权利要求1至4中任一项所述的分离的核酸序列, 其中所述结合结构域编码:
  - a. 重链可变区 (HCVR) 序列和轻链可变区 (LCVR) 序列, 其中所述HCVR和所述LCVR序列分别为SEQ ID NO:99和107;
  - b. 分别为SEQ ID NO:101、103和105的重链互补决定区1、2和3序列, 以及分别为SEQ ID NO:109、111和113的轻链互补决定区1、2和3序列;
  - c. 重链互补决定区3 (HCDR3) 和轻链CDR3 (LCDR3), 其中所述HCDR3和所述LCDR3选自由SEQ ID NO:345和353; 201和209; 以及249和257组成的组;
  - d. 重链可变区 (HCVR) 序列和轻链可变区 (LCVR) 序列, 其中所述HCVR和所述LCVR序列选自由SEQ ID NO:339和347; 195和203; 以及243和251组成的组; 和/或
  - e. 重链互补决定区3 (HCDR3) 结构域和轻链CDR3 (LCDR3) 结构域, 其中所述HCDR3结构域包含式X1—X2—X3—X4—X5—X6—X7—X8—X9—X10—X11—X12—X13—X14—X15—X16—X17—X18—X19的氨基酸序列, 其中X1=A、V或T; X2=K; X3=D; X4=P、F或G; X5=S或H; X6=Y; X7=G; X8=S或H; X9=G或F; X10=S或Y; X11=Y、N或S; X12=Y、G或H; X13=G、L或S; X14=Y、M或D; X15=Y、D或V; X16=G、V或不存在; X17=M或不存在; X18=D或不存在; X19=V或不存在 (SEQ ID NO:369); 并且所述LCDR3结构域包含式X1—X2—X3—X4—X5—X6—X7—X8—X9的氨基酸序列, 其中X1=Q; X2=Q; X3=R或S; X4=N、Y或F; X5=N、D或Y; X6=W; X7=P; X8=L; X9=T (SEQ ID NO:370)。
6. 如权利要求1或2所述的分离的核酸序列, 其中所述结合结构域与CD19或BCMA特异性结合。
7. 如权利要求6所述的分离的核酸序列, 其中所述结合结构域与BCMA特异性结合。
8. 如权利要求7所述的分离的核酸序列, 其中:
  - a. 所述结合结构域与由抗BCMA结合区所结合的BCMA内的表位选择性结合, 或与抗BCMA结合区竞争结合, 所述抗BCMA结合区具有选自由SEQ ID NO:27和28; SEQ ID NO:29和30; 以及SEQ ID NO:31和32组成的组的序列; 和/或
  - b. 所述结合结构域包含抗BCMA结合区的互补决定区, 所述抗BCMA结合区具有选自由

SEQ ID NO:27和28;SEQ ID NO:29和30;以及SEQ ID NO:31和32组成的组的序列。

9. 如权利要求1至8中任一项所述的分离的核酸序列,其中所述CAR包含:

a. CD8 $\alpha$  铰链结构域,所述CD8 $\alpha$  铰链结构域包含SEQ ID NO:1 (PTPAPTIASQPLSLRPE ACRPAAGGAVHTRGLDFACDIY);或SEQ ID NO:2 (TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIY);

b. CD8 $\alpha$  跨膜结构域,所述CD8 $\alpha$  跨膜结构域包含SEQ ID NO:3 (IWAPLAGTCGVLLLLSLVITLYC);和/或

c. CD3 $\zeta$  信号传导结构域,所述CD3 $\zeta$  信号传导结构域包含:

(i) SEQ ID NO:4 (RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKQRRKNPQE GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR);或

(ii) SEQ ID NO:5 (RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQE GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR)。

10. 如权利要求9所述的分离的核酸序列,其中所述CAR包含:

a. 含有SEQ ID NO:6 (KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL)的4-1BB共刺激信号传导区;或

b. 含有SEQ ID NO:7 (QRRKYRSNKGESVPEPAEPCH YSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSP)的CD27共刺激信号传导区,或者

其中所述分离的核酸编码包含SEQ ID NO:6的4-1BB共刺激信号传导区以及包含SEQ ID NO:7的CD27共刺激信号传导区。

11. 如权利要求1至10中任一项所述的分离的核酸序列,其中所述核酸进一步编码:

a. 分泌的细胞因子;或

b. 分泌的共用 $\gamma$ 链白介素;或

c. 分泌的IL-15,优选地其中所述IL-15包含序列SEQ ID NO:34,更优选地其中所述IL-15包含可操作地连接到分泌信号序列SEQ ID NO:33的序列SEQ ID NO:34,或者其中所述IL-15包含可操作地连接到分泌信号序列SEQ ID NO:49的序列SEQ ID NO:34;或

d. 分泌的共用 $\gamma$ 链白介素,优选地IL-15,以及白介素或白介素分泌信号的氨基末端的多顺反子接头区,优选地其中所述多顺反子接头区包含SEQ ID NO:43-45、47或52-55中任一者的序列或其组合,或编码内部核糖体进入位点,例如SEQ ID NO:56或60。

12. 如权利要求1至5、9至10或11中任一项所述的分离的核酸序列,其中所述结合结构域与CD20特异性结合,并且所述核酸编码SEQ ID NO:8、9、10、11、12、46、48或57和58。

13. 如权利要求12所述的分离的核酸序列,其中所述核酸包含序列SEQ ID NO:13、14、15、16、17、50、51或59。

14. 如权利要求1至2、6至10或11中任一项所述的分离的核酸序列,其中所述结合结构域与BCMA特异性结合,并且所述核酸编码SEQ ID NO:35、36、37或38。

15. 如权利要求14所述的分离的核酸序列,其中所述核酸包含序列SEQ ID NO:39、40、41或42。

16. 一种多肽,其包含嵌合抗原受体,所述嵌合抗原受体包含由前述权利要求1至15中任一项所述的分离的核酸编码的氨基酸序列。

17. 一种 $\gamma\delta$  T细胞,其包含如权利要求16所述的多肽或包含编码如权利要求1至15中

任一项所述的CAR构建体的核酸,其中所述 $\gamma\delta$  T细胞在所述 $\gamma\delta$  T细胞的表面上功能性表达所述多肽或所述核酸编码的CAR的结合结构域。

18.如权利要求17所述的 $\gamma\delta$  T细胞,其中所述 $\gamma\delta$  T细胞针对血液肿瘤细胞表现出体外和/或体内细胞杀伤活性,所述血液肿瘤细胞表现出所述肿瘤相关抗原(TAA)的细胞表面表达。

19.如权利要求18所述的 $\gamma\delta$  T细胞,其中所述 $\gamma\delta$  T细胞的所述血液肿瘤细胞杀伤活性大于不包含CAR构建体的对照 $\gamma\delta$  T细胞中的体外和/或体内血液肿瘤细胞杀伤活性的先天性水平。

20.如权利要求19所述的 $\gamma\delta$  T细胞,其中所述 $\gamma\delta$  T细胞表现出针对HLA I<sup>+</sup>类血液肿瘤细胞的增加的血液肿瘤细胞杀伤活性。

21.如权利要求18至20中任一项所述的 $\gamma\delta$  T细胞,其中所述血液肿瘤细胞杀伤活性或增加的血液肿瘤细胞杀伤活性在与所述血液肿瘤细胞第一次接触后持续、持续约、至少或至少约6天至180天。

22.如权利要求18至21中任一项所述的 $\gamma\delta$  T细胞,其中所述 $\gamma\delta$  T细胞响应于与表现出所述肿瘤相关抗原(TAA)的细胞表面表达的血液肿瘤细胞的接触而增殖。

23.如权利要求18至22中任一项所述的 $\gamma\delta$  T细胞,其中与在所述 $\gamma\delta$  T细胞的表面上没有功能性表达所述核酸编码的CAR的对照 $\gamma\delta$  T细胞相比,所述 $\gamma\delta$  T细胞响应于与表现出所述肿瘤相关抗原(TAA)的细胞表面表达的血液肿瘤细胞接触而表现出增加的增殖。

24.如权利要求18至23中任一项所述的 $\gamma\delta$  T细胞,其中所述 $\gamma\delta$  T细胞在宿主生物体中增殖,所述宿主生物体包含表现出所述肿瘤相关抗原(TAA)的细胞表面表达的所述血液肿瘤细胞。

25.如权利要求22至24中任一项所述的 $\gamma\delta$  T细胞,其中所述 $\gamma\delta$  T细胞增殖或增加的 $\gamma\delta$  T细胞增殖在与所述血液肿瘤细胞第一次接触后持续、持续约、至少或至少约6天至180天。

26.如权利要求17至25中任一项所述的 $\gamma\delta$  T细胞,其中所述 $\gamma\delta$  T细胞在与所述血液肿瘤细胞接触后表达促炎细胞因子,所述促炎细胞因子包含肿瘤坏死因子 $\alpha$ 或干扰素 $\gamma$ 。

27.如权利要求17至26中任一项所述的 $\gamma\delta$  T细胞,其中与施用至同种异体宿主的 $\alpha\beta$ T细胞表现出的移植物抗宿主反应相比,当引入到同种异体宿主中时,所述 $\gamma\delta$  T细胞表现出减少、实质上减少、基本上没有或没有移植物抗宿主反应。

28.如权利要求17至27中任一项所述的 $\gamma\delta$  T细胞,其中所述 $\gamma\delta$  T细胞是 $\delta 1$ 、 $\delta 2$ 、 $\delta 3$ 或 $\delta 4$   $\gamma\delta$  T细胞,优选地 $\delta 2^-$   $\gamma\delta$  T细胞,更优选地 $\delta 1$   $\gamma\delta$  T细胞。

29.如权利要求17至28中任一项所述的多个 $\gamma\delta$  T细胞。

30.如权利要求29所述的多个 $\gamma\delta$  T细胞,其中所述多个包含至少约 $10^8$ 个 $\gamma\delta$  T细胞,优选地约 $10^8$ 个 $\gamma\delta$  T细胞至约 $10^{11}$ 个 $\gamma\delta$  T细胞。

31.如权利要求29或30所述的多个 $\gamma\delta$  T细胞,其中所述多个包含至少60%、80%或约60%或80%至约90%或95%的 $\delta 1$ 、 $\delta 2$ 、 $\delta 3$ 或 $\delta 4$   $\gamma\delta$  T细胞,优选地 $\delta 1$ 或 $\delta 2$   $\gamma\delta$  T细胞,更优选地 $\delta 2^-$   $\gamma\delta$  T细胞,最优选地 $\delta 1$   $\gamma\delta$  T细胞的组合物。

32.一种制备如权利要求17至28中任一项所述的 $\gamma\delta$  T细胞或如权利要求29至31中任一项所述的多个 $\gamma\delta$  T细胞的方法,其中所述方法包括用包含如权利要求1至15中任一项所

述的分离的核酸序列的构建体来转染  $\gamma\delta$  T细胞。

33. 如权利要求32所述的方法,其中所述方法包括逆转录病毒转导。

34. 如权利要求32或33所述的方法,其中所述方法包括离体扩增所述  $\gamma\delta$  T细胞,其中所述离体扩增在所述分离的核酸序列转染前和/或转染后进行。

35. 一种药物组合物,其包含药学上可接受的赋形剂以及如权利要求17至28中任一项所述的  $\gamma\delta$  T细胞或如权利要求29至31中任一项所述的多个  $\gamma\delta$  T细胞。

36. 一种杀伤血液肿瘤细胞的方法,所述方法包括使所述血液肿瘤细胞与肿瘤细胞杀伤有效量的如权利要求17至28中任一项所述的  $\gamma\delta$  T细胞;如权利要求29至31中任一项所述的多个  $\gamma\delta$  T细胞;或如权利要求35所述的药物组合物接触。

37. 如权利要求36所述的方法,其中所述方法包括将治疗有效量的所述  $\gamma\delta$  T细胞或所述药物组合物引入到包含所述血液肿瘤细胞的宿主生物体中。

38. 如权利要求37所述的方法,其中所述方法包括将治疗有效量的所述  $\gamma\delta$  T细胞或所述药物组合物引入到包含所述血液肿瘤细胞的宿主生物体中,并且同时或依序施用一种或多种升高共用  $\gamma$  链细胞因子的方法。

39. 如权利要求38所述的方法,其中所述施用一种或多种升高共用  $\gamma$  链细胞因子的方法包括与引入所述  $\gamma\delta$  T细胞同时或依序施用有效增加所述引入的  $\gamma\delta$  T细胞的增殖、细胞毒性活性、持久性或其组合的量的共用  $\gamma$  链细胞因子,优选地其中所述方法包括施用IL-2,更优选地其中所述方法包括施用IL-15。

40. 如权利要求39所述的方法,其中所述一种或多种升高共用  $\gamma$  链细胞因子的方法包括在引入所述  $\gamma\delta$  T细胞之前和/或之后施用有效增加所述引入的  $\gamma\delta$  T细胞的增殖、细胞毒性活性、持久性或其组合的量的共用  $\gamma$  链细胞因子。

41. 如权利要求38至40中任一项所述的方法,其中所述一种或多种升高共用  $\gamma$  链细胞因子的方法包括在引入所述  $\gamma\delta$  T细胞之前的淋巴细胞耗竭。

42. 如权利要求38至40中任一项所述的方法,其中所述一种或多种升高共用  $\gamma$  链细胞因子的方法包括从所述引入的  $\gamma\delta$  T细胞中分泌一种或多种共用  $\gamma$  链细胞因子。

43. 如权利要求37至42中任一项所述的方法,其中与对照生物体相比,所述方法减少所述宿主生物体中的体内肿瘤负荷,和/或增加所述宿主生物体的平均存活时间,其中所述对照生物体没有用所述  $\gamma\delta$  T细胞或所述药物组合物治疗。

44. 如权利要求36至43中任一项所述的方法,其中所述方法是治疗有需要的受试者中的癌症的方法。

45. 肿瘤细胞杀伤有效量的如权利要求17至28中任一项所述的  $\gamma\delta$  T细胞;如权利要求29至31中任一项所述的多个  $\gamma\delta$  T细胞;或如权利要求35所述的药物组合物在制造用于治疗有需要的受试者中的血液肿瘤细胞癌症的药物中的用途。

46. 一种治疗有需要的受试者中的癌症的方法,所述方法包括:

a. 施用治疗有效量的  $\gamma\delta$  T细胞,其中所述癌症包括表现出CD20细胞表面表达的血液肿瘤细胞;或

b. 施用治疗有效量的  $\gamma\delta$  T细胞,其中所述癌症包括表现出BCMA细胞表面表达的血液肿瘤细胞。

47. 如权利要求46所述的方法,其中所述方法包括与  $\gamma\delta$  T细胞的施用同时或依序地施

用一种或多种升高共用 $\gamma$ 链细胞因子的方法。

48. 如权利要求46或47所述的方法,其中所述方法包括进行所述 $\gamma\delta$  T细胞的多次施用,其中所述多次施用之间的时间间隔为至少约一周,优选地至少约2、3、4、5、6、7、8或12周,和/或每6或12个月不超过一次。

49. 一种用于如权利要求46至48中任一项所述的方法的药物组合物。

## 关于治疗血液肿瘤的工程化和非工程化 $\gamma\delta$ -T细胞的组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2018年10月1日提交的美国临时专利申请号62/739,822的优先权权益,所述临时专利申请的内容出于所有目的整体并入。

[0003] 序列表

[0004] 本申请含有序列表,所述序列表以ASCII格式通过电子方式提交并且在此以引用的方式整体并入。所述ASCII副本于2019年12月17日创建,名为ADC-0005-PCT\_SL.txt,大小为147,616字节。

### 背景技术

[0005] 从早期专注于基本淋巴因子活化和/或肿瘤浸润发展到改造这些免疫细胞以表达遗传工程化抗原受体(诸如嵌合抗原受体)的最新策略,过继细胞疗法已经经历了超过三十(30)年的不断迭代。尽管在此过程中已经有一些暗示和迹象表明了这些方法的治愈潜力,但仍有许多工作要做。特别是,CAR-T淋巴细胞能否成功根除肿瘤取决于CAR-T细胞的持久性和效应功能,但其中任何一种过量都会触发患者的移植物抗宿主效应。因此,本领域正在测试T细胞和NK细胞,特别是 $\alpha\beta$ T细胞中的多种共刺激策略,以平衡功效与安全性。值得注意的是,鉴于与 $\alpha\beta$ T细胞相比,目前对 $\gamma\delta$ T细胞的共刺激要求缺乏了解,因此将这些各种方法中的任何一种实际转化至同种异体 $\gamma\delta$ T细胞充其量是不确定的。参见例如Ribot等,“Searching for “signal 2”: costimulation requirements of  $\gamma\delta$ T cells”, Cell.Mol.Life Sci. (2011) 68:2345-2355。

[0006] 因此,仍然需要改进的策略以提高细胞的特异性或选择性,以便例如通过减少或避免移植物抗宿主(GVH)作用来提高细胞的安全性,以便例如通过避免抑制效应功能来提高细胞的效力,并在施用于受试者后改善细胞的活性和/或存活。提供满足此类需求的方法、细胞、组合物、试剂盒和系统。

### 发明内容

[0007] 本发明的方面包括一种编码嵌合抗原受体(CAR)的分离的核酸序列,其中所述CAR包含与在血液肿瘤细胞表面上表达的肿瘤相关抗原(TAA)特异性结合的结合结构域;例如CD8 $\alpha$ 铰链结构域;例如CD8 $\alpha$ 跨膜结构域;共刺激信号传导区,任选地其中所述共刺激信号传导区选自4-1BB(CD137)共刺激信号传导区和CD27共刺激信号传导区;以及CD3 $\zeta$ 信号传导结构域。

[0008] 本发明的方面还包括本文所述的非工程化的 $\gamma\delta$ T细胞以及包含编码本文所述的CAR构建体的核酸的 $\gamma\delta$ T细胞,其中所述 $\gamma\delta$ T细胞在 $\gamma\delta$ T细胞的表面上功能性表达核酸编码的CAR。本发明的方面还包括本文所述的多个工程化或非工程化 $\gamma\delta$ T细胞。本发明的方面还包括制备本文所述的 $\gamma\delta$ T细胞或多个 $\gamma\delta$ T细胞的方法,其中所述方法包括用本文所述的构建体转染 $\gamma\delta$ T细胞。本发明的方面还包括药物组合物,其包含药学上可接受的赋形剂以

及如本文所述的 $\gamma\delta$ T细胞或多个 $\gamma\delta$ T细胞。本发明的方面还包括使血液肿瘤细胞与肿瘤细胞杀伤有效量的如本文所述的 $\gamma\delta$ T细胞接触。

[0009] 在一方面,本发明提供了一种编码嵌合抗原受体(CAR)的分离的核酸序列,其中所述CAR包含(a)与在血液肿瘤细胞表面上表达的肿瘤相关抗原(TAA)特异性结合的结合结构域;(b)铰链结构域,诸如CD8 $\alpha$ 铰链结构域;(c)跨膜结构域,诸如CD8 $\alpha$ 跨膜结构域;(d)共刺激信号传导区或共刺激信号传导区的组合,任选地其中所述共刺激信号传导区选自4-1BB(CD137)共刺激信号传导区和CD27共刺激信号传导区;以及(e)信号传导结构域,诸如CD3 $\zeta$ 信号传导结构域。在一些实施方案中,前述元件(a)-(e)以5'至3'的顺序被编码在分离的核酸的有义链上。

[0010] 在一些实施方案中,所述结合结构域与CD20特异性结合。在一些实施方案中,所述结合结构域与由抗CD20抗体所结合的CD20内的表位选择性结合或与抗CD20抗体竞争结合,所述抗CD20抗体选自自由3B9、3H7、2B7和9C11,优选地3H7组成的组。在一些实施方案中,所述结合结构域包含选自自由3B9、3H7、2B7和9C11,优选地3H7组成的组的抗CD20抗体的互补决定区。

[0011] 在一些实施方案中,所述分离的核酸编码重链可变区(HCVR)序列和轻链可变区(LCVR)序列,例如:其中所述HCVR和所述LCVR序列分别为SEQ ID NO:99和107;分别为SEQ ID NO:101、103和105的重链互补决定区1、2和3序列,以及分别为SEQ ID NO:109、111和113的轻链互补决定区1、2和3序列;重链互补决定区3(HCDR3)和轻链CDR3(LCDR3),其中所述HCDR3和所述LCDR3选自自由SEQ ID NO:345和353;201和209;以及249和257组成的组;重链可变区(HCVR)序列和轻链可变区(LCVR)序列,其中所述HCVR和所述LCVR序列选自自由SEQ ID NO:339和347;195和203;以及243和251组成的组;和/或重链互补决定区3(HCDR3)结构域和轻链CDR3(LCDR3)结构域,其中所述HCDR3结构域包含式X1—X2—X3—X4—X5—X6—X7—X8—X9—X10—X11—X12—X13—X14—X15—X16—X17—X18—X19的氨基酸序列,其中X1=A、V或T;X2=K;X3=D;X4=P、F或G;X5=S或H;X6=Y;X7=G;X8=S或H;X9=G或F;X10=S或Y;X11=Y、N或S;X12=Y、G或H;X13=G、L或S;X14=Y、M或D;X15=Y、D或V;X16=G、V或不在于;X17=M或不在于;X18=D或不在于;X19=V或不在于(SEQ ID NO:369);并且所述LCDR3结构域包含式X1—X2—X3—X4—X5—X6—X7—X8—X9的氨基酸序列,其中X1=Q;X2=Q;X3=R或S;X4=N、Y或F;X5=N、D或Y;X6=W;X7=P;X8=L;X9=T(SEQ ID NO:370)。

[0012] 在一些实施方案中,所述分离的核酸编码与CD19或BCMA特异性结合的结合结构域。在一些实施方案中,所述结合结构域与BCMA特异性结合。在一些实施方案中,所述结合结构域与由抗BCMA结合区所结合的BCMA内的表位选择性结合,或与抗BCMA结合区竞争结合,所述抗BCMA结合区具有选自由SEQ ID NO:27和28;SEQ ID NO:29和30;以及SEQ ID NO:31和32组成的组的序列。在一些实施方案中,b.所述结合结构域包含抗BCMA结合区的互补决定区,所述抗BCMA结合区具有选自由SEQ ID NO:27和28;SEQ ID NO:29和30;以及SEQ ID NO:31和32组成的组的序列。

[0013] 在前述任一项或本文所述的一些实施方案中,所述CAR包含:CD8 $\alpha$ 铰链结构域,所述CD8 $\alpha$ 铰链结构域包含SEQ ID NO:1(PTPAPTIASQPLSLRPE ACRPAAGGAVHTRGLDFACDIY);或SEQ ID NO:2(TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIY)。在前述任一项或本文所述的一些实施方案中,所述CAR包含CD8 $\alpha$ 跨膜结构域,所述CD8 $\alpha$ 跨膜结构域包含SEQ

ID NO:3 (IWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC)。

[0014] 在前述任一项或本文所述的一些实施方案中,所述CAR包含CD3 $\zeta$ 信号传导结构域,所述CD3 $\zeta$ 信号传导结构域包含:SEQ ID NO:4 (RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKQRRKPNQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR)或SEQ ID NO:5 (RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEM GGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR)。

[0015] 在前述任一项或本文所述的一些实施方案中,所述CAR包含含有SEQ ID NO:6 (KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL)的4-1BB共刺激信号传导区;或含有SEQ ID NO:7 (QRRKYRSNKGESPEPAEPCH YSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSP)的CD27共刺激信号传导区。在前述任一项或本文所述的一些实施方案中,所述分离的核酸编码包含SEQ ID NO:6的4-1BB共刺激信号传导区以及包含SEQ ID NO:7的CD27共刺激信号传导区。

[0016] 在前述任一项或本文所述的一些实施方案中,所述分离的核酸进一步编码分泌的细胞因子;或分泌的共用 $\gamma$ 链白介素;或分泌的共用 $\gamma$ 链白介素诸如IL-15,优选地其中所述分泌的共用 $\gamma$ 链白介素诸如IL-15包含可操作地连接到分泌信号序列(例如SEQ ID NO:33或49的分泌信号)的白介素多肽序列。在一些实施方案中,所述分离的核酸编码分泌的IL-15,优选地其中所述IL-15包含序列SEQ ID NO:34,更优选地其中所述IL-15包含可操作地连接到分泌信号序列SEQ ID NO:33的序列34,或者其中所述IL-15包含可操作地连接到分泌信号序列SEQ ID NO:49的序列SEQ ID NO:34。在一些情况下,分泌的细胞因子、共用 $\gamma$ 链白介素和/或IL-15在结合区、铰链和跨膜结构域、信号传导结构域和/或共刺激内结构域的羧基末端被编码。在一些情况下,分泌细胞因子、共用 $\gamma$ 链白介素和/或IL-15在编码结合区、铰链和跨膜结构域、信号传导结构域和/或共刺激内结构域的区域有义链3'上被编码。

[0017] 在一些实施方案中,所述核酸编码多顺反子接头区,其被配置为促进CAR和作为单独的多肽的分泌的细胞因子、共用 $\gamma$ 链细胞因子或IL-15的翻译。在一些实施方案中,所述多顺反子接头区编码自切割和/或切割多肽序列。在一些情况下,所述自切割序列是P2A、F2A、T2A或E2A自切割序列。在一些情况下,所述切割序列是弗林蛋白酶切割序列。在一些情况下,所述切割序列(例如弗林蛋白酶切割序列)为自切割序列的氨基末端。在一些实施方案中,所述多顺反子接头区编码内部核糖体进入位点。在一些实施方案中,所述核酸编码白介素或细胞因子或白介素或细胞因子分泌信号的氨基末端的多顺反子接头区,优选地其中所述多顺反子接头区包含SEQ ID NO:43-45、47或52-55中任一者的序列或其组合,或编码内部核糖体进入位点,例如SEQ ID NO:56或60。

[0018] 在一些实施方案中,所述结合结构域与CD20特异性结合,并且所述核酸编码SEQ ID NO:8、9、10、11、12、46、48或57和58。在一些实施方案中,所述核酸包含序列SEQ ID NO:13、14、15、16、17、50、51或59。在一些实施方案中,所述结合结构域与BCMA特异性结合,并且所述核酸编码SEQ ID NO:35、36、37或38。在一些实施方案中,所述核酸包含序列SEQ ID NO:39、40、41或42。

[0019] 在一些方面,本发明提供了由前述分离的核酸中的任一者编码的或如本文所述的一种或多种多肽。在一些实施方案中,本发明提供了一种T细胞,诸如 $\gamma\delta$ T细胞,其包含前述多肽中的任一者或多种多肽。在一些实施方案中,T细胞在T细胞表面上表达如本文所述的

功能性结合结构域。在一些实施方案中，T细胞分泌细胞因子，诸如共用 $\gamma$ 链白介素，例如IL-15。

[0020] 在一些实施方案中，T细胞针对血液肿瘤细胞表现出体外和/或体内细胞杀伤活性，所述血液肿瘤细胞表现出肿瘤相关抗原(TAA)的细胞表面表达。在一些实施方案中，所述例如 $\gamma\delta$ T细胞的血液肿瘤细胞杀伤活性大于不包含CAR构建体的对照(例如 $\gamma\delta$ T细胞)的体外和/或体内血液肿瘤细胞杀伤活性的先天性水平。在一些实施方案中，例如， $\gamma\delta$ T细胞表现出针对HLA I<sup>+</sup>类血液肿瘤细胞的增加的血液肿瘤细胞杀伤活性。在一些实施方案中，血液肿瘤细胞杀伤活性或增加的血液肿瘤细胞杀伤活性在与血液肿瘤细胞第一次接触后持续、持续约、至少或至少约6天至180天。

[0021] 在一些实施方案中，例如， $\gamma\delta$ T细胞响应于与表现出肿瘤相关抗原(TAA)的细胞表面表达的血液肿瘤细胞的接触而增殖。在一些实施方案中，与在例如 $\gamma\delta$ T细胞的表面上没有功能性表达核酸编码的CAR的对照例如 $\gamma\delta$ T细胞相比，例如 $\gamma\delta$ T细胞响应于与表现出肿瘤相关抗原(TAA)的细胞表面表达的血液肿瘤细胞接触而表现出增加的增殖。在一些实施方案中，例如 $\gamma\delta$ T细胞在宿主生物体中增殖，所述宿主生物体包含表现出肿瘤相关抗原(TAA)的细胞表面表达的血液肿瘤细胞。

[0022] 在一些实施方案中，例如 $\gamma\delta$ T细胞增殖或增加的例如 $\gamma\delta$ T细胞增殖在与血液肿瘤细胞第一次接触后持续、持续约、至少或至少约6天至180天。在一些实施方案中，例如 $\gamma\delta$ T细胞在与血液肿瘤细胞接触后表达促炎细胞因子，诸如肿瘤坏死因子 $\alpha$ 和/或干扰素 $\gamma$ 。在一些实施方案中，例如 $\gamma\delta$ T细胞在与血液肿瘤细胞接触后表达促炎细胞因子，诸如肿瘤坏死因子 $\alpha$ 和/或干扰素 $\gamma$ ，其表达量大于在细胞表面上没有功能性表达核酸编码的CAR的对照T细胞。

[0023] 在一些实施方案中，与施用至同种异体宿主的 $\alpha\beta$ T细胞表现出的移植物抗宿主反应相比，当引入到同种异体宿主中时，例如 $\gamma\delta$ T细胞表现出减少、实质上减少、基本上没有或没有移植物抗宿主反应。在一些实施方案中，所述T细胞是 $\gamma$ T细胞。在一些实施方案中，所述T细胞是 $\delta$ T细胞。在一些实施方案中，所述T细胞是 $\gamma\delta$ T细胞。在一些实施方案中，所述T细胞是 $\delta 1$ 、 $\delta 2$ 、 $\delta 3$ 或 $\delta 4$ T细胞，优选地是 $\delta 2^-$  $\delta$ T细胞，更优选地是 $\delta 1$  $\delta$ T细胞。在一些实施方案中，所述T细胞是 $\delta 1$ 、 $\delta 2$ 、 $\delta 3$ 、或 $\delta 4$  $\gamma\delta$ T细胞，优选地是 $\delta 2^-$  $\gamma\delta$ T细胞，更优选地是 $\delta 1$  $\gamma\delta$ T细胞。

[0024] 在另一方面，本发明提供本文所述的多个前述例如 $\gamma\delta$ T细胞的任何一个，或多个例如 $\gamma\delta$ T细胞。在一些实施方案中，多个包含至少约 $10^8$ 个例如 $\gamma\delta$ T细胞，优选地约 $10^8$ 个例如 $\gamma\delta$ T细胞至约 $10^{11}$ 个例如 $\gamma\delta$ T细胞。在一些实施方案中，多个包含至少60%、80%或约60%或80%至约90%或95%的 $\delta 1$ 、 $\delta 2$ 、 $\delta 3$ 或 $\delta 4$  $\gamma\delta$ T细胞，优选地 $\delta 1$ 或 $\delta 2$  $\gamma\delta$ T细胞，更优选地 $\delta 2^-$  $\gamma\delta$ T细胞，最优选地 $\delta 1$  $\gamma\delta$ T细胞的组合物。

[0025] 在一些实施方案中，本发明提供了一种制备本文所述的例如 $\gamma\delta$ T细胞或本文所述的多个例如 $\gamma\delta$ T细胞的方法，其中所述方法包括用包含本文所述的分离的核酸序列的构建体来转染T细胞。在一些情况下，所述方法包括例如 $\gamma$ 逆转录病毒转导。在一些情况下，所述方法包括离体扩增T细胞，其中所述离体扩增在所述分离的核酸序列转染前和/或转染后进行。在一些情况下，所述方法包括离体扩增T细胞，其中所述离体扩增在所述分离的核酸序列转染前和转染后进行。在一些情况下，所述方法包括离体扩增T细胞，其中所述离体扩增在所述分离的核酸序列转染后进行。在一些实施方案中，所述方法包括在转染的约30天内

产生功能性表达本文所述的CAR的约 $10^8$ 个例如 $\gamma\delta$ T细胞至约 $10^{11}$ 个例如 $\gamma\delta$ T细胞。

[0026] 在另一方面,本发明提供了一种药物组合物,其包含药学上可接受的赋形剂和本文描述的例如 $\gamma\delta$ T细胞。

[0027] 在另一方面,本发明提供了一种杀伤血液肿瘤细胞的方法,所述方法包括使所述血液肿瘤细胞与肿瘤细胞杀伤有效量的例如 $\gamma\delta$ T细胞、多个此类细胞和/或包含本文所述的此类细胞的药物组合物接触。在一些实施方案中,所述方法包括将治疗有效量的例如 $\gamma\delta$ T细胞或所述药物组合物引入到包含所述血液肿瘤细胞的宿主生物体中。在一些实施方案中,所述方法包括将治疗有效量的例如 $\gamma\delta$ T细胞或所述药物组合物引入到包含所述血液肿瘤细胞的宿主生物体中,并且同时或依序施用一种或多种升高共用 $\gamma$ 链细胞因子的方法。

[0028] 在一些实施方案中,施用一种或多种升高共用 $\gamma$ 链细胞因子的方法包括与引入例如 $\gamma\delta$ T细胞同时或依序施用有效增加引入的例如 $\gamma\delta$ T细胞的增殖、细胞毒性活性、持久性或其组合的量的共用 $\gamma$ 链细胞因子,优选地其中所述方法包括施用IL-2,更优选地其中所述方法包括施用IL-15。在一些实施方案中,所述一种或多种升高共用 $\gamma$ 链细胞因子的方法包括在引入所述T细胞之前和/或之后施用有效增加引入的T细胞的增殖、细胞毒性活性、持久性或其组合的量的共用 $\gamma$ 链细胞因子。在一些实施方案中,所述一种或多种升高共用 $\gamma$ 链细胞因子的方法包括在引入所述T细胞之前的淋巴细胞耗竭(lymphodepletion)。

[0029] 在一些实施方案中,所述一种或多种升高共用 $\gamma$ 链细胞因子的方法包括从引入的T细胞中分泌一种或多种共用 $\gamma$ 链细胞因子。在一些实施方案中,与对照生物体相比,所述方法减少所述宿主生物体中的体内肿瘤负荷,和/或增加所述宿主生物体的平均存活时间,其中所述对照生物体没有用所述T细胞或所述药物组合物治疗。在一些实施方案中,所述方法是治疗有需要的受试者中的癌症的方法。在一些实施方案中,本发明提供本文所述的例如 $\gamma\delta$ T细胞、多个例如 $\gamma\delta$ T细胞或药物组合物,其用于治疗有需要的受试者中的血液肿瘤细胞。

[0030] 在一方面,本发明提供了通过施用治疗有效量的 $\gamma\delta$ T细胞来治疗癌症的方法,其中所述癌症包括表现出CD20细胞表面表达的血液肿瘤细胞;或施用治疗有效量的 $\gamma\delta$ T细胞,其中所述癌症包括表现出BCMA细胞表面表达的血液肿瘤细胞。在一些实施方案中,所述方法包括与 $\gamma\delta$ T细胞的施用同时或依序地施用一种或多种升高共用 $\gamma$ 链细胞因子的方法。在一些实施方案中,所述方法包括进行 $\gamma\delta$ T细胞的多次施用,其中所述多次施用之间的时间间隔为至少约一周,优选地至少约2、3、4、5、6、7、8或12周,和/或每6或12个月不超过一次。在一些实施方案中,本发明提供了一种用于前述任何一种治疗方法的药物组合物。

[0031] 以引用的方式并入

[0032] 本说明书中提及的所有出版物、专利和专利申请以引用的方式并入本文,其程度如同每个单独的出版物、专利或专利申请具体和单独地指出以引用方式并入。

## 附图说明

[0033] 图1是含有一个共刺激信号传导内结构域(左)或两个共刺激信号传导内结构域(右)的嵌合抗原受体(CAR)的实施方案的示意图。如本文所用,共刺激信号传导内结构域也称为共刺激(costimulation)内结构域或共刺激(costimulatory)内结构域。在示例性CAR中有用的示例性共刺激信号传导内结构域包括但不限于CD28;CD137(41BB);CD278(ICOS);

CD27;CD134 (OX40);TLR2及其组合。

[0034] 图2示出了与CD20内的表位特异性结合的结合结构域的序列。图2按出现顺序分别公开了SEQ ID NO 335-363、99、364、107和365-368。

[0035] 图3示出了通过未转导的V $\delta$ 1细胞和用各种CD20特异性CAR构建体转导的V $\delta$ 1细胞诱导表达CD20的正常B细胞的凋亡。

[0036] 图4示出了CD20特异性CAR  $\gamma$   $\delta$ T细胞对淋巴瘤细胞系的强效细胞毒性活性。

[0037] 图5示出了本文所述的工程化CAR  $\gamma$   $\delta$ T细胞对Raji细胞的细胞毒性。上图：在编码4-1BB共刺激内结构域和CD3 $\zeta$ 信号传导结构域的CAR构建体中测试了包含3B9、2B7、3H7和9C11的CDR的结合结构域。

[0038] 图6示出了本文描述的工程化CAR  $\gamma$   $\delta$ T细胞对Raji细胞的细胞毒性。上图：测试包含3H7的CDR的结合结构域。下图：显示了表达CAR的  $\gamma$   $\delta$ T细胞对Raji细胞的细胞毒性，所述CAR包含3H7结合结构域、CD3 $\zeta$ 信号传导结构域和各种共刺激内结构域，如所示。3H7-CD27z CAR具有3H7结合结构域、CD8 $\alpha$ 铰链和跨膜结构域、CD27共刺激内结构域和CD3 $\zeta$ 信号传导结构域。3H7-5.1具有3H7结合结构域、CD8 $\alpha$ 铰链和跨膜结构域、4-1BB共刺激内结构域和CD3 $\zeta$ 信号传导结构域。

[0039] 图7示出了使用所指示的  $\gamma$   $\delta$ T细胞的再攻击的细胞毒性测定的结果。箭头指示重新施用的时间。

[0040] 图8示出了本文描述的  $\gamma$   $\delta$ T细胞在皮下Raji细胞NOD scid  $\gamma$  (NSG) 小鼠模型中的体内功效。

[0041] 图9示出了体内肿瘤内CD20特异性  $\gamma$   $\delta$ CAR-T细胞的计数，表明  $\gamma$   $\delta$ CAR-T细胞的体内扩增和肿瘤清除。

[0042] 图10示出了CD20<sup>+</sup>淋巴瘤肿瘤和其他器官中CD20特异性  $\gamma$   $\delta$ CAR-T细胞的体内增殖。

[0043] 图11示出本文描述的  $\gamma$   $\delta$ T细胞在弥散性Raji细胞NOD scid  $\gamma$  (NSG) 小鼠模型中的体内功效。

[0044] 图12示出了在表达人IL-15的SRG-15小鼠模型中用CD20特异性  $\gamma$   $\delta$ CAR-T细胞有效治疗弥散性Raji肿瘤，而不诱导移植物抗宿主 (GVH) 反应。相反，CD20特异性 $\alpha$ BCAR-T细胞引发致命的GVH反应。

[0045] 图13示出了用于生产工程化的  $\gamma$   $\delta$ CAR-T细胞和非工程化的  $\gamma$   $\delta$ CAR-T细胞的制造过程。

[0046] 图14示出在皮下植入Raji细胞并随后在不同植入部位用Raji细胞再攻击(第62天)的NSG小鼠中表达sIL15的CD20 CAR V $\delta$ 1 T细胞的治疗功效和持久性。

[0047] 图15示出了具有指示的抗B细胞成熟抗原 (BCMA) scFv CAR构建体的V $\delta$ 1细胞的转导效率。BCMA也称为肿瘤坏死因子受体超家族成员17 (TNFRSF17)。

[0048] 图16示出了用各种抗-BCMA CAR构建体转导的V $\delta$ 1 T细胞对一组多发性骨髓瘤BCMA+细胞系的细胞毒性活性。SCABER-Luc细胞系是BCMA阴性的对照细胞系。

[0049] 图17示出了用各种抗-BCMA CAR构建体转导的V $\delta$ 1 T细胞对一组多发性骨髓瘤和伯基特(Burkitt)淋巴瘤BCMA+细胞系的细胞毒性活性。

[0050] 图18示出了抗BCMA CAR V $\delta$ 1 T细胞对皮下植入的NCI-H929细胞的体内治疗功效。

## 具体实施方式

### [0051] 定义:

[0052] 出于解释本说明书的目的,将应用以下定义,并且在任何适当的时候,以单数形式使用的术语也将包括复数形式且反之亦然。在所示出的任何定义与以引用方式并入本文的任何文件相矛盾时,应以下文示出的定义为准。除非另有定义,否则本文中使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同的含义。

[0053] 当涉及诸如量、持续时间等的可测量值时,如本文所用,“约”意指涵盖指定值的±20%或±10%,更优选地±5%,甚至更优选地±1%,并且还更优选地±0.1%的变化,因为此类变化适合于进行所公开的方法。

[0054] 如本文所用,术语“ $\gamma$   $\delta$ T细胞”是指在其表面上表达不同的T细胞受体(TCR)即 $\gamma$   $\delta$  TCR的T细胞的子集,所述T细胞受体由一条 $\gamma$ 链和一条 $\delta$ 链组成。术语“ $\gamma$   $\delta$ T细胞”具体包括 $\gamma$   $\delta$ T细胞的所有子集,包括但不限于V $\delta$ 1和V $\delta$ 2、V $\delta$ 3  $\gamma$   $\delta$ T细胞,以及初始、效应记忆、中央记忆和终末分化 $\gamma$   $\delta$ T细胞。作为另一个实例,术语“ $\gamma$   $\delta$ T细胞”包括V $\delta$ 4、V $\delta$ 5、V $\delta$ 7和V $\delta$ 8  $\gamma$   $\delta$ T细胞,以及V $\gamma$  2、V $\gamma$  3、V $\gamma$  5、V $\gamma$  8、V $\gamma$  9、V $\gamma$  10和V $\gamma$  11  $\gamma$   $\delta$ T细胞。在一些实施方案中, $\gamma$   $\delta$ T细胞是V $\delta$ 1<sup>-</sup>、V $\delta$ 2<sup>-</sup>或V $\delta$ 1<sup>-</sup>和V $\delta$ 2<sup>-</sup>。用于制备和使用工程化和非工程化 $\gamma$   $\delta$ T细胞和/或其亚型的组合物和方法包括但不限于US 2016/0175358;WO 2017/197347;US 9499788;US 2018/0169147;US 9907820;US 2018/0125889和US 2017/0196910中描述的那些,所述专利各自的内容出于所有目的以引用的方式并入,包括用于制备和使用工程化和非工程化 $\gamma$   $\delta$ T细胞和/或其亚型的所述组合物和方法。本申请进一步考虑表达一条 $\gamma$ 链或一条 $\delta$ 链的T细胞或其他工程化白细胞或淋巴细胞,任选地与第二多肽组合以形成功能性TCR。表达一条 $\gamma$ 链或一条 $\delta$ 链的此类工程化白细胞或淋巴细胞可用于本文描述的方法中或存在于本文描述的组合物中。

[0055] 如本文所用,术语“T淋巴细胞”或“T细胞”是指表达或已表达CD3 (CD3+) 和T细胞受体(TCR+) 的免疫细胞。T细胞在细胞介导的免疫中起着核心作用。“已表达”CD3和TCR的T细胞经过工程化以消除CD3和/或TCR细胞表面表达。

[0056] 如本文所用,术语“TCR”或“T细胞受体”是指形成 $\alpha$ - $\beta$ 或 $\gamma$ - $\delta$ 受体或其组合的二聚体异源细胞表面信号传导蛋白。 $\alpha\beta$ TCR识别由MHC分子呈递的抗原,而 $\gamma$   $\delta$ TCR可以独立于MHC呈递而识别抗原。

[0057] 术语“MHC”(主要组织相容性复合体)是指编码细胞表面抗原呈递蛋白的基因的子集。在人中,这些基因称为人白细胞抗原(HLA)基因。在本文中,缩写MHC或HLA可互换使用。

[0058] 如本文所用,“活化”是指已经被充分刺激以诱导可检测的细胞增殖的T细胞的状态。活化还可以与诱导的细胞因子产生和可检测的效应子功能相关联。术语“活化的T细胞”除其他情况之外是指正经历细胞分裂的T细胞。

[0059] 如本文所用,术语“抗体”是指与抗原特异性结合的免疫球蛋白分子。抗体可以是衍生自天然来源或重组来源的完整免疫球蛋白,并且可以是完整免疫球蛋白的免疫反应性部分。抗体通常是免疫球蛋白分子的四聚体。本发明中的抗体可以各种形式存在,包括例如多克隆抗体、单克隆抗体、Fv、Fab和F(ab)<sub>2</sub>以及单链抗体和人源化抗体(Harlow等,1999, In:Using Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY;Harlow等,1989, In: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)。

[0060] 术语“抗体片段”是指完整抗体的一部分,并且是指完整抗体的抗原决定可变区。抗体片段的实例包括但不限于Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>和Fv片段、线性抗体、scFv抗体以及由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0061] 如本文所用,“抗体重链”是指以其天然存在构象存在于抗体分子中的两种类型的多肽链中的较大者。

[0062] 如本文所用,“抗体轻链”是指以其天然存在构象存在于抗体分子中的两种类型的多肽链中的较小者。 $\kappa$ 轻链和 $\lambda$ 轻链是指两种主要的抗体轻链同种型。

[0063] 如本文所用,术语“合成抗体”意指使用重组DNA技术产生的抗体,例如像如本文所述由噬菌体表达的抗体。所述术语还应被解释为意指一种抗体,所述抗体通过合成编码所述抗体的DNA分子来生成,并且所述DNA分子表达抗体蛋白或指定所述抗体的氨基酸序列,其中所述DNA或氨基酸序列使用本领域中可得到的且众所周知的合成DNA或氨基酸序列技术来获得。

[0064] 如本文所用,术语“抗原”或“Ag”被定义为引起免疫反应的分子。这种免疫反应可能涉及抗体产生,或者特定免疫感受态细胞的活化,或者这两者。技术人员将理解,任何大分子(包含蛋白质或肽)都可以用作抗原。此外,抗原可以衍生自重组DNA或基因组DNA。技术人员将理解,包含编码引发免疫反应的蛋白质的核苷酸序列或部分核苷酸序列的任何DNA均因此编码本文所使用的术语“抗原”。此外,本领域技术人员将理解抗原不必仅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一个以上基因的部分核苷酸序列,并且这些核苷酸序列以各种组合排列以引发所需的免疫反应。此外,技术人员将理解,抗原根本不需要由“基因”编码。显而易见的是,抗原可以产生、合成或可以衍生自生物样品。此类生物样品可以包括但不限于组织样品、肿瘤样品、细胞或生物流体。

[0065] 术语“表位”包括能够与免疫球蛋白或T细胞受体特异性结合的任何蛋白决定簇、脂质或碳水化合物决定簇。表位决定簇通常由分子(诸如氨基酸、脂质或糖侧链)的活性表面基团组成并且通常具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。当平衡解离常数( $K_D$ )在 $10^{-6}$ - $10^{-12}$ M的范围内时,抗体被称为特异性结合抗原。

[0066] 抗体3B9、9C11、3H7、2B7和10F2代表特异性识别CD20的抗体的示例性实施方案。这些抗体、其片段以及它们的互补决定区还描述于U.S.2009/0035322中,其中它们分别被称为3B9-10、9C11-14、3H7-6、2B7-7和10F2-13。如本文所述,这些抗体、其片段以及它们的互补决定区可用于产生抗CD20嵌合抗原受体(CAR)构建体,并且可用于工程化和使用CAR-T细胞治疗表达CD20的血液肿瘤。

[0067] 结合结构域21587N、16747P、16711P和16716P代表特异性识别BCMA的结合结构域的示例性实施方案。这些抗体、其片段以及它们的互补决定区还描述于2019年7月18日提交的U.S.16/516,028中,其内容以引用的方式整体并入,并且出于所有目的,特别是对于其中描述的结合结构域、抗体、抗体片段、互补决定区、包含所述互补决定区的多肽、编码所述互补决定区的核酸以及表位特异性和用于确定表位特异性的测定。在一些情况下,分别将21587N、16747P、16711P和16716P称为H2aM21587N、H1H16747P、H1H16711P和H1H16716P。如本文所述,这些抗体、其片段以及它们的互补决定区可用于产生抗BCMA嵌合抗原受体(CAR)

构建体,并且可用于工程化和使用CAR-T细胞治疗表达BCMA的血液肿瘤。

[0068] 如本文所用,术语“嵌合抗原受体(CAR)”可以指例如人工T细胞受体、T小体(T-body)、单链免疫受体、嵌合T细胞受体或嵌合免疫受体,并且涵盖将人工特异性移植到特定的免疫效应细胞上的工程化受体。可使用CAR赋予T细胞单克隆抗体特异性,从而允许产生大量特异性T细胞,例如用于过继细胞疗法。在具体的实施方案中,例如,CAR指导细胞对肿瘤相关抗原的特异性。在一些实施方案中,CAR包含细胞内活化结构域(允许T细胞在靶向部分与靶细胞(诸如靶肿瘤细胞)接合后活化)、跨膜结构域以及长度可以变化并且包含与疾病或病症相关的例如肿瘤抗原结合区的细胞外结构域。在特定方面,CAR包含衍生自单克隆抗体的单链可变片段(scFv)的融合体,其融合至CD3- $\zeta$ 、跨膜结构域和内结构域。其他CAR设计的特异性可以衍生自受体(例如肽)的配体或模式识别受体(诸如树突状细胞相关C型凝集素(Dectin))。在某些情况下,可以修改抗原识别结构域的间隔以减少活化诱导的细胞死亡。在某些情况下,CAR包含用于额外共刺激信号传导的结构域,诸如CD3 $\zeta$ 、FcR、CD27、CD28、CD137、DAP 10/12和/或OX40、ICOS、TLR(例如TLR2)等。在一些情况下,分子可以与CAR共表达,包括共刺激分子、用于成像(例如,用于正电子发射断层扫描)的报告基因、在添加前药后有条件消融T细胞的基因产物、归巢受体、趋化因子、趋化因子受体、细胞因子和细胞因子受体。此外,本领域技术人员将理解共刺激结构域不需要仅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一个以上基因的部分核苷酸序列,并且这些核苷酸序列以各种组合排列以引发所需的免疫反应。

[0069] 如本文所用,术语“抗肿瘤作用”是指可以通过肿瘤体积减小、肿瘤细胞数量降低、转移瘤的数量降低、预期寿命增加或与癌性病状相关联的各种生理症状改善表现出来的生物作用。“抗肿瘤作用”还可通过本发明的肽、多核苷酸、细胞和抗体最初预防肿瘤发生的能力表现出来。

[0070] 根据本发明,术语“自身抗原”意指被免疫系统错误地识别为外来的任何自身抗原。自身抗原包括但不限于细胞蛋白、磷蛋白、细胞表面蛋白、细胞脂质、核酸、糖蛋白(包括细胞表面受体)。

[0071] 如本文所用,术语“自体的”是指衍生自个体的任何材料,其随后将被重新引入同一个体中。

[0072] 如本文所用,术语“同种异体的”是指衍生自动物的材料,其随后被引入相同物种的不同动物中。

[0073] 术语“治疗有效量”是指由研究员、兽医、医学博士或其他临床医师来探寻的将引发组织、系统或受试者的生物或医学反应的组合物的量。术语“治疗有效量”包括当施用时足以防止正治疗的病症或疾病(例如血液癌症)的一种或多种体征或症状的发展或在某种程度上减轻所述体征或症状的组合物量。治疗有效量将根据组合物、疾病及其严重性以及待治疗受试者的年龄、体重等而变化。

[0074] 如本文所使用的术语“治疗”疾病意指降低受试者所经受的疾病或病症的至少一种体征或症状的频率或严重性。

[0075] “与一种或多种另外的治疗剂组合”施用包括同时(并行)施用和以任何顺序依序施用。

[0076] 如本文所用,术语“药学上可接受的”是指材料(包括但不限于盐、载剂或稀释剂)

不消除化合物的生物活性或特性,并且是相对无毒的,即材料可施用至个体而不引起非期望的生物作用或不以有害方式与组合中含有的任何组分相互作用。

[0077] “编码”是指多核苷酸(诸如基因、cDNA或mRNA)中的核苷酸的特定序列充当在生物过程中合成具有限定的核苷酸序列(即rRNA、tRNA和mRNA)或限定的氨基酸序列的其他聚合物和大分子的模板的固有特性和由此产生的生物特性。因此,如果对应于基因的mRNA的转录和翻译在细胞或其他生物系统中产生蛋白质,则所述基因编码所述蛋白质。核苷酸序列与mRNA序列相同并且通常提供在序列表中的编码链以及用作基因或cDNA的转录模板的非编码链两者均可称为编码所述基因或cDNA的蛋白质或其他产物。

[0078] “分离的”意指从天然状态改变或去除。例如,在活体动物中天然存在的核酸或肽不是“分离的”,但部分地或完全地与其天然状态的共存材料分离的相同核酸或肽是“分离的”。分离的核酸或蛋白质可以实质上纯的形式存在,或者可存在于非天然环境(例如像宿主细胞)中。

[0079] 除非另外说明,否则“编码氨基酸序列的核苷酸序列”包括彼此是简并型式并且编码相同氨基酸序列的所有核苷酸序列。编码蛋白质和RNA的核苷酸序列可包含内含子。

[0080] 术语“患者”、“受试者”、“个体”等在本文中可互换使用,并且是指可顺从本文所述方法的任何动物。在某些非限制性实施方案中,患者、受试者或个体是人。

[0081] 如本文所用,关于抗体,术语“特异性结合”意指识别特异性抗原但实质上不识别或结合样品中的其他分子的抗体。例如,与来自一个物种的抗体特异性结合的抗体还可与来自一个或多个物种的所述抗原结合。但是,此类跨物种反应性本身并不改变抗体分类为特异性的。在另一个实例中,与抗原特异性结合的抗体还可与所述抗原的不同等位形式结合。然而,此类交叉反应性本身并不改变抗体分类为特异性的。在一些情况下,术语“特异性结合(specific binding/specifically binding)”可关于抗体、蛋白质或肽与第二化学物种的相互作用来使用,以意指所述相互作用依赖于化学物种上特定结构(例如抗原决定簇或表位)的存在;例如,抗体识别并与特定的蛋白质结构结合,而不是与蛋白质一般地结合。如果抗体对表位“A”是特异性的,则在含标记的“A”和抗体的反应中,含表位A(或游离的未标记A)的分子的存在将降低结合到所述抗体的标记的A的量。

[0082] 在一些实施方案中,特异性结合可通过至少约 $1 \times 10^{-8}$ M或更小的平衡解离常数来表征(例如较小 $K_D$ 表示较紧密结合)。用于确定两个分子是否特异性结合的方法是本领域众所周知的,并且包括例如平衡透析、表面等离子体共振等。此外,与第一抗原和一个或多个另外的抗原结合的多特异性抗体或与抗原的两个不同区域结合的双特异性抗体仍然被认为是如本文所用的“特异性地结合”的抗体。

[0083] 血液癌症是起源于血液或骨髓的癌症。血液(或血源性)癌症的实例包括白血病,包括急性白血病(诸如急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞白血病、急性骨髓性白血病和成髓细胞白血病、早幼粒细胞白血病、骨髓单核细胞性白血病、单核细胞白血病和红白血病)、慢性白血病(诸如慢性髓细胞(粒细胞性)白血病、慢性骨髓性白血病、和慢性淋巴细胞白血病)、真性红细胞增多症、淋巴瘤、霍奇金(Hodgkin)氏病、非霍奇金氏淋巴瘤(无痛性和高等级形式)、多发性骨髓瘤、沃尔丹斯特伦(Waldenstrom)氏巨球蛋白血症、重链病、骨髓增生异常综合征、毛细胞白血病以及骨髓增生异常。在优选的实施方案中,血液癌症表达或过表达CD20。在优选的实施方案中,血液癌症表达或过度表达B细胞成熟抗原(BCMA)(也称为肿

瘤坏死因子受体超家族成员17 (TNFRSF17))。

[0084] “表达盒”是指包含表达控制序列的核酸,所述表达控制序列可操作地连接到编码待表达的转录物或多肽的核酸。表达盒包含足够的顺式作用表达元件;其他表达元件可由宿主细胞或在体外表达系统中提供。表达盒可以是载体诸如粘粒、质粒(例如裸露或包含在脂质体中)或病毒(例如慢病毒、逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒)的组分。表达盒可以在宿主细胞(诸如 $\gamma\delta$ T细胞)中。

[0085] 范围:贯穿本公开,本发明的各个方面可以范围形式呈现。应理解,呈范围形式的描述仅仅是为了方便和简洁,并且不应解释为对本发明范围的不可改变的限制。因此,范围的描述应被认为已经确切地公开所有可能的子范围以及所述范围内的单独数值。例如,诸如1至6的范围描述应当被认为具有特定公开的子范围,诸如1至3、1至4、1至5、2至4、2至6、3至6等,以及所述范围内的单独数字,例如1、2、2.7、3、4、5、5.3和6。无论范围的广度如何,这都适用。

[0086] 嵌合抗原受体构建体:

[0087] 本发明的方面包括编码CAR的核酸,以及包含此类核酸的构建体和载体。在一些情况下,所述核酸是例如表达盒的异源组分。在一些实施方案中,所述核酸是例如逆转录病毒载体的异源组分。在一些实施方案中,所述核酸是例如 $\alpha\beta$ 或 $\gamma\delta$ T细胞,并且优选地 $\gamma\delta$ T细胞的异源组分。在一些实施方案中,所述核酸是例如 $\gamma^+$ T细胞和/或 $\delta^+$ T细胞的异源组分。在一些实施方案中,所述核酸是例如 $\alpha^-$ T细胞和/或 $\beta^-$ T细胞的异源组分。

[0088] 本文描述了编码CAR结合结构域的核酸,所述CAR结合结构域与血液肿瘤细胞表面上表达的肿瘤相关抗原(TAA)特异性结合。示例性TAA包括CD19、CD20和BCMA。在一些实施方案中,所述结合结构域是CD19结合结构域,诸如美国专利号9,540,445中描述的CD19结合结构域,所述专利的内容以引用的方式整体并入,并且出于所有目的,特别是对于其中描述的结合结构域、抗体、抗体片段、互补决定区、包含所述互补决定区的多肽、编码所述互补决定区的核酸以及表位特异性和用于确定表位特异性的测定。在一些实施方案中,所述结合结构域是CD20结合结构域,诸如美国专利申请号2009/0035322中描述的CD20结合结构域,所述专利申请的内容以引用的方式整体并入,并且出于所有目的,特别是对于其中描述的结合结构域、抗体、抗体片段、互补决定区、包含所述互补决定区的多肽、编码所述互补决定区的核酸以及表位特异性和用于确定表位特异性的测定。在一些实施方案中,所述结合结构域是BCMA结合结构域,诸如WO 2018/133877中描述的BCMA结合结构域或2019年7月18日提交的U.S. 16/516,028中描述的BCMA结合结构域,所述专利各自的内容以引用的方式整体并入,并且出于所有目的,特别是对于其中描述的结合结构域、抗体、抗体片段、互补决定区、包含所述互补决定区的多肽、编码所述互补决定区的核酸以及表位特异性和用于确定表位特异性的测定。通常,编码所述结合结构域的区域是接头区(例如编码CD8 $\alpha$ 铰链结构域的区域)的5'。

[0089] 在一些实施方案中,所述结合结构域结合如在细胞表面上的全长功能多肽中表达的抗原。在一些实施方案中,所述结合结构域结合如MHC:抗原复合物中所呈递的抗原。在一些实施方案中,所述结合结构域以HLA限制的方式结合所述抗原。对MHC:抗原复合物表现出特异性的结合结构域描述于例如WO/2016/199140和WO/2016/199141中,所述专利各自的内容以引用的方式整体并入,并且出于所有目的,特别是对于其中描述的结合结构域、抗体、

抗体片段、互补决定区、包含所述互补决定区的多肽、编码所述互补决定区的核酸以及表位特异性和用于确定表位特异性的测定。

[0090] 示例性CD20结合结构域包括但不限于与由以下所结合的CD20内的表位选择性结合或与以下竞争结合的结合结构域:3B9、3H7、2B7、9C11或10F2;或3B9、3H7、2B7或9C11;或3H7。另外地或可替代地,CD20结合结构域可包含选自由3B9、3H7、2B7、9C11和10F2组成的组;选自由3B9、3H7、2B7和9C11组成的组的抗CD20抗体的互补决定区;或包含选自由3H7组成的组的抗CD20抗体的互补决定区。本公开还考虑了与本文提供的序列竞争结合的CD20、CD19和BCMA结合结构域。

[0091] 通过使用已知方法,可以确定CD20结合结构域是否与参考抗体或结合结构域结合相同的表位,或与参考抗体或结合结构域竞争结合。例如,为了确定测试抗体是否与参考结合结构域结合相同的表位,可以使所述参考结合结构域与CD20在饱和条件下结合。接着,可以评估测试结合结构域与CD20分子结合的能力。如果在与参考结合结构域饱和结合后,测试结合结构域能够与CD20结合,则可得出结论:测试结合结构域与参考结合结构域结合不同的表位。另一方面,如果在与参考结合结构域饱和结合后,测试结合结构域不能与CD20结合,则测试结合结构域可结合与由参考结合结构域所结合的表位相同的表位。

[0092] 为了确定结合结构域是否与参考结合结构域竞争结合,上述结合方法在两个定向中进行:在第一定向中,允许参考结合结构域在饱和条件下与CD20结合,随后评估测试结合结构域与CD20分子的结合。在第二定向中,允许测试结合结构域在饱和条件下与CD20分子结合,随后评估参考结合结构域与CD20分子的结合。如果在两个定向中,仅第一(饱和)结合结构域能够与CD20分子结合,则得出的结论是测试结合结构域和参考结合结构域竞争与CD20结合。如本领域普通技术人员将理解的,与参考结合结构域竞争结合的结合结构域可能不一定与参考结合结构域结合相同的表位,但可通过结合重叠或相邻的表位来空间上阻断参考结合结构域的结合。上述确定竞争和与抗CD20结合结构域表位结合的方法同样可以应用于抗CD19结合结构域和抗BCMA结合结构域。

[0093] 如果两种结合结构域各自竞争性抑制(阻断)另一种结合结构域与抗原的结合,则这两种结合结构域与相同或重叠表位结合。也就是说,1倍、5倍、10倍、20倍或100倍过量的一种结合结构域抑制另一种结合结构域的结合达至少50%,例如75%、90%或甚至99%,如竞争结合测定中所测量(参见例如Junghans等,Cancer Res.1990 50:1495-1502)。可替代地,如果抗原中的减少或消除一种结合结构域的结合的基本上所有氨基酸突变减少或消除另一种结合结构域的结合,则两种结合结构域具有相同表位。如果减少或消除一种结合结构域的结合的一些氨基酸突变减少或消除另一种结合结构域的结合,则两种结合结构域具有重叠表位。

[0094] 然后可进行额外的常规实验(例如肽突变和结合测定),以确认所观察到的缺乏测试结合结构域的结合是否事实上由于与参考结合结构域结合相同表位所致,或是否因空间阻断(或另一现象)造成缺乏观察到的结合。这类实验可使用ELISA、RIA、表面等离子体共振、流式细胞术或本领域中可用的任何其他定量或定性结合测定来进行。

[0095] 本公开提供了与CDR或框架区中本文提供的序列具有“实质同一性”或“实质相似性”的抗体和CAR。当提及核酸或其片段时,术语“实质同一性”或“实质上相同”表示当与另一种核酸(或另一种核酸的互补链)最佳比对时,核苷酸序列同一性为%,例如至少80%、至

少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99.5%或100%的核苷酸碱基,如下文讨论的任何众所周知的序列同一性算法诸如FASTA、BLAST或GAP所测量。在某些情况下,与参考核酸分子具有实质同一性的核酸分子可编码与由参考核酸分子所编码的多肽具有相同或实质上类似氨基酸序列的多肽。

[0096] 应用于多肽时,术语“实质相似性”或“实质上类似”意指两个肽序列在诸如通过使用默认空位权重的程序GAP或BESTFIT进行最佳比对时,共享至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99.5%或100%的序列同一性。在一些方面,不相同的残基位置相差了保守氨基酸取代。“保守氨基酸取代”是一种氨基酸残基被具有带类似化学特性(例如电荷或疏水性)的侧链(R基)的另一氨基酸残基取代的取代。一般来说,保守氨基酸取代实质上将不会改变蛋白的功能特性。在两个或更多个氨基酸序列彼此相差保守取代的情况中,可向上调整类似性的百分比或程度以校正取代的保守性质。进行这种调整的手段是本领域技术人员众所周知的。参见例如Pearson(1994) *Methods Mol. Biol.* 24:307-331,所述参考以引用的方式并入本文。具有类似化学特性的侧链的氨基酸组的实例包括1) 脂族侧链:甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸;2) 脂族-羟基侧链:丝氨酸和苏氨酸;3) 含酰胺的侧链:天冬酰胺和谷氨酰胺;4) 芳族侧链:苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸;5) 碱性侧链:赖氨酸、精氨酸和组氨酸;6) 酸性侧链:天冬氨酸和谷氨酸;以及7) 含硫侧链:半胱氨酸和甲硫氨酸。优选的保守氨基酸取代组是:缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸、苯丙氨酸-酪氨酸、赖氨酸-精氨酸、丙氨酸-缬氨酸、谷氨酸-天冬氨酸以及天冬酰胺-谷氨酰胺。可替代地,保守置换是在Gonnet等(1992) *Science* 256:1443-45(以引用的方式并入本文)中公开的PAM250对数似然矩阵中具有正值的任何变化。“中度保守”置换是在PAM250对数似然矩阵中具有非负值的任何变化。

[0097] 多肽的序列同一性和/或类似性通常使用序列分析软件来测量。蛋白分析软件使用分配至各种取代、缺失和其他修饰(包括保守氨基酸取代)的类似性度量来匹配类似的序列。例如,GCG软件含有诸如GAP和BESTFIT的程序,所述程序可使用默认参数来确定密切相关多肽(诸如来自不同生物体物种的同源多肽)之间,或野生型蛋白与其突变蛋白之间的序列同源性或序列同一性。参见例如GCG 6.1版。多肽序列还可使用利用默认或推荐参数的FASTA(GCG 6.1版内的程序)进行比较。FASTA(例如FASTA2和FASTA3)提供查询序列和检索序列之间的最佳重叠区的比对和序列同一性百分比(Pearson(2000)同上)。序列还可使用Smith-Waterman同源性检索算法使用具有空位开放罚分(gap open penalty)为12,且空位扩展罚分(gap extension penalty)为2,BLOSUM矩阵为62的仿射空位检索来进行比较。当将本文公开的序列与含有大量来自不同生物体的序列的数据库进行比较时,另一优选的算法是使用默认参数的计算机程序BLAST,特别是BLASTP或TBLASTN。参见例如Altschul等.(1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410和(1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402,所述参考各自以引用的方式并入本文。

[0098] 本文提供的是抗CD20、抗BCMA或抗CD19 CAR,其包含具有一个或多个取代(例如保守取代)的本文公开的HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列中任一者的变体。例如,本公开包含具有HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列的抗CD20 CAR,相对于本文公开的HCVR、LCVR和/或CDR

(例如HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2或LCDR3)氨基酸序列中的任一者,所述抗CD20 CAR具有例如20个或更少、19个或更少、18个或更少、17个或更少、16个或更少、15个或更少、14个或更少、13个或更少、12个或更少、11个或更少、10个或更少、9个或更少、8个或更少、7个或更少、6个或更少、5个或更少、4个或更少、3个或更少、2个或更少或1个氨基酸取代。例如,相对于本文公开的HCVR、LCVR和/或CDR(例如HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2或LCDR3)氨基酸序列中的任一者,抗CD20 CAR可包含20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸取代(例如保守氨基酸取代)。

[0099] 类似地,本公开包含具有HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列的抗BCMA CAR,相对于本文公开的HCVR、LCVR和/或CDR(例如HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2或LCDR3)氨基酸序列中的任一者,所述抗BCMA CAR具有例如20个或更少、19个或更少、18个或更少、17个或更少、16个或更少、15个或更少、14个或更少、13个或更少、12个或更少、11个或更少、10个或更少、9个或更少、8个或更少、7个或更少、6个或更少、5个或更少、4个或更少、3个或更少、2个或更少或1个氨基酸取代。例如,相对于本文公开的HCVR、LCVR和/或CDR(例如HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2或LCDR3)氨基酸序列中的任一者,抗BCMA CAR可包含20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸取代(例如保守氨基酸取代)。

[0100] 在一些实施方案中,所述分离的核酸编码具有重链互补决定区3(HCDR3)和轻链CDR3(LCDR3)的抗CD20结合结构域,其中所述HCDR3和所述LCDR3选自由以下组成的组:SEQ ID NO:345(AKDPSYSGSGSYHSYYGMDV)和353(QQRFNWPLT);201(VKDFHYGSGSNYGM DV)和209(QQSNWPLT);以及249(TKDGSYGHFYSGLDV)和257(QQRYWPLT)。

[0101] 在一些实施方案中,所述分离的核酸编码具有重链可变区(HCV R)序列和轻链可变区(LCVR)序列的抗CD20结合结构域,其中所述HCVR和所述LCVR序列选自由以下组成的组:SEQ ID NO:339(EEQLVESGGDLVQPGRSLRLSCAASGFTFHDYTMH WVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSLGYADSVKGRFTISRDN AKKSLYLQMN SLRAEDTALYYCAKDP SYSGSGSYHSYYGMDVWVGQGT TTVTVSS)和347(EIVLTQSPATLSLSPGE RATLSCWASQSISR YLVWYQQKCGQAPRLLIYEASKRATGIPVRFSGSGSGTDFTLT ISSLESEDFAVYYCQQRFNWPLTFGGG TKVEIK);195(EVQLAESGGDLVQSGRSLRLSCAAS GITFHDYAMHWVRQPPGKGLEWVSGISWNSDYIGYADSVKGRFTISRDN AKKSLYLQMN SLRPDDTALYYCVKDFHYGSGSNYGM DVWGQGT TTVTVSP)和203(EIVMTQSPATL SMS PGERATLSCRASQSVSRNLAWYQQKVGQAPRLLISGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTINSLQSEDFAVYYCQQSNDWPLTFGQGRLEIK);以及243(EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFYDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSDTIGYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMN SLRAEDTALYYCTKDG SYGHFYSGLDVWVGQGT TTVTVSS)和251(EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYV ASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPDDFAVYYCQQRYWPLTFGGG TKVEIK)。

[0102] 在一些实施方案中,所述分离的核酸编码具有重链互补决定区3(HCDR3)结构域和轻链CDR3(LCDR3)结构域的抗CD20结合结构域,其中所述HCDR3结构域包含式X1—X2—X3—X4—X5—X6—X7—X8—X9—X10—X11—X12—X13—X14—X15—X16—X17—X18—X19的氨基酸序列,其中X1=A、V或T;X2=K;X3=D;X4=P、F或G;X5=S或H;X6=Y;X7=G;X8=S或H;X9=G或F;X10=S或Y;X11=Y、N或S;X12=Y、G或H;X13=G、L或S;X14=Y、M或D;X15=Y、D或V;X16=G、V或不存在;X17=M或不存在;X18=D或不存在;X19=V或不存在(SEQ ID NO:369);并且所述LCDR3结构域包含式X1—X2—X3—X4—X5—X6—X7—X8—X9的氨基酸序列,其中X1=Q;X2=Q;X3=R或S;X4=N、Y或F;X5=N、D或Y;X6=W;X7=P;X8=L;X9=T(SEQ ID

NO:370)。

[0103] 在一些实施方案中,所述分离的核酸编码具有重链可变区 (HCVR) 序列和轻链可变区 (LCVR) 序列的抗CD20结合结构域,其中所述HCVR和所述LCVR序列为SEQ ID NO:99 (EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFYDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGYIGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDNSYKGFYFYYGLDVWGQGTITVTVSS) 和107 (EIVMTQSPATLSVSPGERTTLSCRASQSVSSNLAWYLQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFILTISSLQSEDFAVYYCQQYNNWPITFGQGTRLEIK)。

[0104] 在一些实施方案中,所述分离的核酸编码抗CD20结合结构域,所述抗CD20结合结构域与具有重链互补性决定区 (HCDR) 和轻链互补性决定区 (LCDR) 的抗CD20结合结构域结合相同的表位、与其竞争或作为其,其中所述HCDR和所述LCDR序列分别是HCDR序列SEQ ID NO:99和LCDR序列SEQ ID NO:107。

[0105] 在一些实施方案中,所述分离的核酸编码抗CD20结合结构域,所述抗CD20结合结构域与具有为或包含SEQ ID NO:101 (GFTFYDYA) 的HCDR1、为或包含SEQ ID NO:103 (ISWNSGYI) 的HCDR2和/或为或包含SEQ ID NO:105 (AKDNSYKGFYFYYGLDV) 的HCDR3的抗CD20结合结构域结合相同的表位、与其竞争或作为其。在一些实施方案中,所述分离的核酸编码抗CD20结合结构域,所述抗CD20结合结构域与具有为或包含SEQ ID NO:109 (QSVSSN) 的LCDR1、为或包含SEQ ID NO:111 (GAS) 的LCDR2和/或为或包含SEQ ID NO:113 (QQYNNWPIT) 的LCDR3的抗CD20结合结构域结合相同的表位、与其竞争或作为其。在一些实施方案中,所述分离的核酸编码抗CD20结合结构域,所述抗CD20结合结构域与具有为或包含SEQ ID NO:101的HCDR1、为或包含SEQ ID NO:103的HCDR2、为或包含SEQ ID NO:105的HCDR3、为或包含SEQ ID NO:109的LCDR1、为或包含SEQ ID NO:111的LCDR2和/或为或包含SEQ ID NO:113的LCDR3的抗CD20结合结构域结合相同的表位、与其竞争或作为其。在一些实施方案中,所述分离的核酸编码抗CD20结合结构域,所述抗CD20结合结构域具有包含SEQ ID NO:101的HCDR1、包含SEQ ID NO:103的HCDR2、包含SEQ ID NO:105的HCDR3、包含SEQ ID NO:109的LCDR1、包含SEQ ID NO:111的LCDR2以及包含SEQ ID NO:113的LCDR3。

[0106] 示例性BCMA结合结构域包括但不限于与由WO 2018/133877中描述的BCMA结合结构域或2019年7月18日提交的U.S.16/516,028中描述的BCMA结合结构域所结合的BCMA内的表位选择性结合或与所述BCMA结合结构域竞争结合的结合结构域。另外地或可替代地,BCMA结合结构域可包含抗BCMA抗体的互补决定区,所述抗BCMA抗体选自由WO 2018/133877中描述的抗BCMA抗体或嵌合抗原受体以及2019年7月18日提交的U.S.16/516,028中描述的抗BCMA抗体或嵌合抗原受体组成的组。

[0107] 示例性BMCA结合结构域包括但不限于与由以下所结合BCMA内的表位选择性结合或与以下竞争结合的结合结构域:抗BCMA-CAR 16716P、抗BCMA-CAR 16747P和/或抗BCMA-CAR 21587N。另外地或可替代地,BCMA结合结构域可包含抗BCMA CAR的互补决定区,所述抗BCMA CAR选自由抗BCMA-CAR 16716P、抗BCMA-CAR 16747P和抗BCMA-CAR 21587N组成的组。

[0108] 在一些实施方案中,所述分离的核酸编码具有重链互补决定区3 (HCDR3) 和轻链CDR3 (LCDR3) 的抗BCMA结合结构域,其中所述HCDR3和所述LCDR3选自由以下组成的组:SEQ ID NO:21 (RAGDNWNWFDP) 和SEQ ID NO:22 (QQAQKVPFT);SEQ ID NO:23 (EGGNYGMDV) 和SEQ

ID NO:24 (QQANSFPPT); 以及 SEQ ID NO:25 (FAEYCGGNICYYYYGMDV) 和 SEQ ID NO:26 (QQCGGSPWT)。

[0109] 在一些实施方案中,所述分离的核酸编码具有重链可变区 (HCVR) 序列和轻链可变区 (LCVR) 序列的抗BCMA结合结构域,其中所述HCVR和所述LCVR序列选自以下组成的组: 16716P结合结构域HCVR SEQ ID NO:27 (MSVPTQVLGLLLLWLTARCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFSSYVMSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK RAGDNWNWFDWPWGQTLVTV) 和16716P结合结构域LCVR SEQ ID NO:28 (DIQMTQSPSSVSASLGDRV TITCRASQGISSWLAWYQRKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGADFTLTISLQPEDFATYYCQQAKSVP FTFGPGTKVDIK); 16747P结合结构域HCVR SEQ ID NO:29 (MSVPTQVLGLLLLWLTARCEVQLVESGGGLV KPGGSLRLSCAASGFTFSDYYISWIRQAPGKGLEWVSYISSGSSIKYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQM NSLRAEDTAVYYCAREGGNYGMDVWGQTTVTV) 和16747P结合结构域LCVR SEQ ID NO:30 (DIQMTQ SPSSVSASVGDRTITCRASQGINNW LVWYQQKPGKAPKLLIYAATSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPE DFATYYCQQANSFPPTFGQGTKLEIK); 以及21587N结合结构域HCVR SEQ ID NO:31 (MSVPTQVLGL LLLWLTARCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYYISWIRQAPGKGLEWVSYISSGSSIKYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQM NSLRAEDTAVYYCAREGGNYGMDVWGQTTVTV) 和21587N结合结构域 LCVR SEQ ID NO:32 (EIVLTQSPGTLSPGERATFSCRASQSVGSSFLAWYQQKPGQAPRRMLYGASNRATG IPDRFSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQCGGSPWTFGQGTKVEIK)。

[0110] 本文提供的是抗BCMA CAR,其包含具有一个或多个取代(例如保守取代)的本文公开的HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列中任一者的变体。例如,本公开包含具有HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列的抗BCMA CAR,相对于本文公开的HCVR、LCVR和/或CDR(例如HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2或LCDR3)氨基酸序列中的任一者,所述抗BCMA CAR具有例如20个或更少、19个或更少、18个或更少、17个或更少、16个或更少、15个或更少、14个或更少、13个或更少、12个或更少、11个或更少、10个或更少、9个或更少、8个或更少、7个或更少、6个或更少、5个或更少、4个或更少、3个或更少、2个或更少或1个氨基酸取代。例如,相对于本文公开的HCVR、LCVR和/或CDR(例如HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2或LCDR3)氨基酸序列中的任一者,抗BCMA CAR可包含20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸取代(例如保守氨基酸取代)。

[0111] 本文描述的示例性结合结构域通常从氨基末端至羧基末端依次包含重链区,随后是轻链区 (VH-VL)。在显式或隐式描述结合结构域中的VH和VL区的某些顺序的情况下,本公开还应理解为描述VH和VL区的顺序被颠倒(例如在包含scFv结合结构域的scFv或CAR中)的替代实施方案。因此,例如在包含scFv结合结构域的scFv或CAR中,VH-VL顺序的描述还描述了替代的VL-VH顺序。此外,例如在包含scFv结合结构域的scFv或CAR中,VL-VH顺序的描述还描述了替代的VH-VL顺序。

[0112] 通常,本文描述的CAR编码核酸包含细胞外接头部分,所述接头部分编码将结合结构域连接到跨膜结构域的肽接头。示例性接头部分包括但不限于编码CD8 $\alpha$ 铰链结构域的接头部分,例如SEQ ID NO:1 (PTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIY) 或SEQ ID NO:2 (TTTPAPRP PTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIY)。通常,编码肽接头(例如CD8 $\alpha$ 铰链结构域)的区域是编码结合结构域的区域3'和编码跨膜结构域的区域5'。

[0113] 本文描述的CAR编码核酸包含跨膜结构域。跨膜结构域可以将细胞外抗原结合结

构域例如和铰链连接到一种或多种细胞内信号传导组分。例如,跨膜结构域可以将抗原结合结构域例如和铰链连接到CD3 $\zeta$ 信号传导结构域,并任选地具有一个或两个共刺激内结构域。示例性跨膜结构域包括但不限于CD8 $\alpha$ 跨膜结构域,例如SEQ ID NO:3 (IWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC)。通常,编码跨膜结构域(例如CD8 $\alpha$ 跨膜结构域)的区域是编码肽接头(例如CD8 $\alpha$ 铰链结构域)的区域的3'和编码一个或多个胞质结构域的区域5'。

[0114] 在一些实施方案中,所述分离的核酸编码包含一个或多个胞质结构域的胞质区。编码胞质区的区域通常是编码跨膜结构域的区域3'。胞质结构域通常是信号传导结构域,其为 $\gamma$   $\delta$ T细胞增殖、细胞毒性活性和/或促炎细胞因子表达(例如TNF- $\alpha$ 或IFN  $\gamma$ )提供活化信号。示例性胞质结构域是CD3 $\zeta$ 信号传导结构域。在一些实施方案中,CD3 $\zeta$ 信号传导结构域为或包含SEQ ID NO:4 (RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGR REEYDVLDRRRGRDPPEMGGKPRRK NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR)。在一些实施方案中,CD3 $\zeta$ 信号传导结构域为或包含SEQ ID NO:5 (RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR)。在一些实施方案中,胞质区包含多个(例如2、3、4、5或6个)信号传导结构域,诸如多个(例如2、3、4、5或6个)CD3 $\zeta$ 信号传导结构域,例如每个独立地选自SEQ ID NO:4和5。在一些实施方案中,胞质区包含多个(例如2、3、4、5或6个)非CD3 $\zeta$ 信号传导结构域和CD3 $\zeta$ 信号传导结构域。在一些实施方案中,胞质区包含非CD3 $\zeta$ 信号传导结构域和多个(例如2、3、4、5或6个)CD3 $\zeta$ 信号传导结构域。

[0115] 胞质区可包含一个或多个共刺激内结构域。编码一个或多个共刺激内结构域的区域可以是编码信号传导结构域的区域5'或3'。在一些实施方案中,编码一个或多个共刺激内结构域的区域是编码信号传导结构域的区域5'。在一些实施方案中,编码一个或多个共刺激内结构域的区域是信号传导结构域5',并且编码一个或多个共刺激内结构域的额外的区域是信号传导结构域3'。示例性共刺激内结构域包括但不限于CD28;CD137(4-1BB);CD278(ICOS);CD27;CD134(OX40);Dap10;Dap12;DNAm-1;2B4;SLAM结构域;和TLR2共刺激内结构域及其组合。

[0116] 在一些实施方案中,构建体编码至少一个4-1BB共刺激内结构域,并且任选地编码选自4-1BB、2B4、ICOS、CD28和CD27共刺激内结构域的第二共刺激内结构域。在一些实施方案中,构建体编码至少两个4-1BB共刺激内结构域,或两个4-1BB共刺激内结构域与选自4-1BB、ICOS、CD28和CD27的一个、两个、三个或四个或更多个共刺激内结构域组合。在一些实施方案中,4-1BB共刺激内结构域包含SEQ ID NO:6 (KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRF PEEEEGGCEL)。

[0117] 在一些实施方案中,构建体编码一个CD27共刺激内结构域,并且任选地编码选自4-1BB、ICOS、CD28和CD27共刺激内结构域的第二共刺激内结构域。在一些实施方案中,构建体编码CD27共刺激内结构域和4-1BB共刺激内结构域。在一些实施方案中,构建体编码两个CD27共刺激内结构域。在一些实施方案中,CD27共刺激内结构域包含SEQ ID NO:7 (QRRKYR SNKGESPVEPAEPCHYSCPREEEGSTIPIQED YRKPEPACSP)。

[0118] 在一些实施方案中,构建体编码分泌信号,例如SEQ ID NO:33 (MALPVTALLLPLALLLHAARP),所述分泌信号可操作地连接以促进C末端多肽诸如支持T细胞(例如CAR-T细胞)的活化、细胞毒性和/或持久性的细胞因子的分泌。在一些实施方案中,构

建体编码分泌信号例如SEQ ID NO:33,所述分泌信号可操作地连接以促进共用 $\gamma$ 链细胞因子诸如IL-15或其活性片段,例如SEQ ID NO:34(NWVNVISDLKKIED LIQSMHIDATLYTESDVHPS CKVTAMKCFLELQVISLES GDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMF INTS)的分泌。示例性共用 $\gamma$ 链细胞因子包括IL-2和IL-15。在一些实施方案中,共用 $\gamma$ 链细胞因子选自IL-2、IL-7和IL-15。在一些实施方案中,共用 $\gamma$ 链细胞因子是IL-15。IL-15序列(包含编码sIL15的密码子优化的核酸序列)在本文和WO 2007/037780中公开。

[0119] 在一些实施方案中,构建体编码一个或多个多顺反子接头区,例如在信号传导结构域和/或共刺激内结构域与可操作地连接以促进细胞因子分泌的分泌信号之间。多顺反子接头区是多肽序列或RNA序列的区域,其促进由单个转录产物产生多个离散多肽。在一些实施方案中,多顺反子接头区编码切割序列。合适的切割序列包括自切割序列,诸如P2A、F2A、E2A或T2A切割序列和/或被内源蛋白酶诸如弗林蛋白酶切割的序列。

[0120] 在一些实施方案中,切割序列是P2A切割序列。在一些实施方案中,切割序列是弗林蛋白酶切割序列。在一些实施方案中,切割序列是P2A和弗林蛋白酶切割序列。在一些实施方案中,切割序列是P2A切割序列SEQ ID NO:43(SGSGATNFSLLKQAGDVEENPGP)。在一些实施方案中,切割序列是弗林蛋白酶切割序列SEQ ID NO:44(RAKR)。在一些实施方案中,切割序列是P2A+弗林蛋白酶切割序列SEQ ID NO:45(RAKRSGSGATNFSLLKQAG DVEENPGP)。

[0121] 在一些实施方案中,切割序列为或包含P2A切割序列SEQ ID NO:52(ATNFSLLKQAGDVEENPGP)。在一些实施方案中,切割序列为或包含F2A切割序列SEQ ID NO:53(VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP)。在一些实施方案中,切割序列为或包含E2A切割序列SEQ ID NO:54(QCTNYALLKLAGDVESNPGP)。在一些实施方案中,切割序列为或包含T2A切割序列SEQ ID NO:55(EGRSLTTCGDVEENPGP)。在某些方面,多个自切割序列可以在信号传导和/或共刺激结构域的羧基末端以及编码的分泌的细胞因子(例如共用 $\gamma$ 链细胞因子,诸如IL-15)的氨基末端被编码,优选地其中所述多个自切割序列独立地选自P2A切割序列、T2A切割序列、E2A切割序列和F2A切割序列组成的组。在某些方面,在本文描述的构建体中编码一个或多个自切割序列和被内源蛋白酶切割的一个或多个序列。在某些实施方案中,内源蛋白酶识别位点在自切割序列的氨基末端被编码。

[0122] 在一些实施方案中,多顺反子接头区编码内部核糖体进入位点。示例性内部核糖体进入位点由SEQ ID NO:56(CTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGAATAAGGCCGGTGTGCGTTTGTCT ATATGTTATTTCCACCATATTGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAG CATTCTAGGGTCTTTCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCCTCTG GAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTCTGTAGCGACCCTTTCAGGCAGCGGAACCCCCACCTGGCGACAGGTGCC TCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCAGTGCCACGTTGTGAGTTGGAT AGTTGTGAAAGAGTCAAATGGCTCTCTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGATGCCAGAAGGTACCCCAT TGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTGCACATGCTTTACATGTGTTAGTCGAGGTTAAAAAACGTCTAGGCC CCCC GAACCACGGGGACGTGGTTTTCTTTGAAAAACACGATGATA) 编码。

[0123] 另一种示例性内部核糖体进入位点由SEQ ID NO:60(AGCAGGTTTCCCCAACTGACACA AAACGTGCAACTTGAAACTCCGCTGGTCTTTCCAGGTCTAGAGGGTAACACTTTGTACTGCGTTTGGCTCCACG CTCGATCCACTGGCGAGTGTTAGTAACAGCACTGTTGCTTCGTAGCGGAGCATGACGGCCGTGGGAACCTCCTT GGTAACAAGGACCCACGGGGCCAAAAGCCACGCCACACGGGCCCGTCATGTGTGCAACCCAGCACGGCGACTTT

ACTGCGAAACCCACTTTAAAGTGACATTGAAACTGGTACCCACACACTGGTGACAGGCTAAGGATGCCCTTCAGGT  
ACCCCGAGGTAACACGCGACTCGGGATCTGAGAAGGGGACTGGGGCTTCTATAAAAAGCGCTCGGTTTAAAAAGC  
TTCTATGCCTGAATAGGTGACCGGAGGTCGGCACCTTTCCTTTGCAATTACTGACCAC) 编码。

[0124] 其他合适的内部核糖体进入位点包括但不限于Nucleic Acids Res.2010年1月;  
38(数据库期):D131-6.doi:10.1093/nar/gkp981.Epub 2009年11月16日中描述的那些、  
iresite.org处描述的那些、WO 2018/215787中描述的那些、GenBank登录号KP019382.1中  
描述的序列以及GenBank登录号LT727339.1中公开的IRES元件。

[0125] 在US 2018/0360992和U.S.8,865,467中公开了额外的多顺反子接头区,包括切割  
自切割和IRES元件。

[0126] 在一些实施方案中,所述分离的核酸编码SEQ ID NO:8(MSVPTQVLGLLLLWLT DARCE  
IVMTQSPATLSVSPGERTTLSCRASQSVSSNLAWYLQKPGQAPRLLIYGA STRATGIPARFSGSGSGTEFILTIS  
LQSEDFAVYYCQQYNNWPI TFGQGRLEIKGGGSGGGGSGGGGEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFYDY  
AMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGYIGYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKD NSYKGFY  
LDVWGQGT TTVTSSTTPAPRPPTPAPT IASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLS  
LVITLYCQR RKYRSNKGESPVPAEPCHYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSPRVKFSRSADAPAYQQGQNQLY  
NELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPQRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTA  
TKD TYDALHMQUALPPR) 3H7-CD8-CD27z多肽,其依次包含以下结构域:3H7结合结构域、CD8 $\alpha$ 铰  
链和跨膜结构域、CD27共刺激内结构域和CD3 $\zeta$ 信号传导结构域。

[0127] 在一些实施方案中,所述分离的核酸编码SEQ ID NO:9(MSVPTQVLGLLLLWLT DARCE  
IVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGTSTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTIS  
LQSEDFAVYYCQQYNNWPLTFGGG TKVEIKGGGSGGGGSGGGGEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCVASGFTFNDY  
AMHWVRQAPGKGLEWVSVISWNSDSIGYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQM HSLRAEDTALYYCAKD NHYSGSY  
YYQYGM DVWGQGT TTVTSSTTPAPRPPTPAPT IASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCG  
VLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYN  
ELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPQRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTAT  
KD TYDALHMQUALPPR) 3B9-CD8-BBz多肽,其依次包含以下结构域:3B9结合结构域、CD8 $\alpha$ 铰链和  
跨膜结构域、4-1BB共刺激内结构域和CD3 $\zeta$ 信号传导结构域。

[0128] 在一些实施方案中,所述分离的核酸编码SEQ ID NO:10(MSVPTQVLGLLLLWLT DARC  
EIVMTQSPATLSVSPGERTTLSCRASQSVSSNLAWYLQKPGQAPRLLIYGA STRATGIPARFSGSGSGTEFILTIS  
SLQSEDFAVYYCQQYNNWPI TFGQGRLEIKGGGSGGGGSGGGGEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFYD  
YAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGYIGYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMN SLRAEDTALYYCAKD NSYKGFY  
GLDVWGQGT TTVTSSTTPAPRPPTPAPT IASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLS  
SLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNL  
GRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPQRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKD TY  
DALHMQUALPPR) 3H7-CD8-BBz多肽,其依次包含以下结构域:3H7结合结构域、CD8 $\alpha$ 铰链和跨膜  
结构域、4-1BB共刺激内结构域和CD3 $\zeta$ 信号传导结构域。

[0129] 在一些实施方案中,所述分离的核酸编码SEQ ID NO:11(MSVPTQVLGLLLLWLT DARC  
EIVLTQSPATLSLSPGERAALSCRASQSVSNLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTIS  
SLEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGGG TKVEIRGGGSGGGGSGGGGEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFRD

YTMHWVRQGPKGLEWVSGISWNSDYIGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNLSRVEDTALYYCAKLSGTYRDYF  
YGVVDVWGQTTVTVSSTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLL  
LSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELN  
LGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPQRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKHDGLYQGLSTATKDT  
YDALHMQUALPPR) 2B7-CD8-BBz多肽,其依次包含以下结构域:2B7结合结构域、CD8 $\alpha$ 铰链和跨  
膜结构域、4-1BB共刺激内结构域和CD3 $\zeta$ 信号传导结构域。

[0130] 在一些实施方案中,所述分离的核酸编码SEQ ID NO:12 (MSVPTQVLGLLLLWLT DARC  
EIVVTQSPATLSLSPGERATLSCRTSQTTTSYLAWYRQKPGQAPRLLIYDASNRAAGIPARFSGSGSGTDFTLTIN  
SLEPEDFAVYYCQLRTNWI TFGQTRLEIKGGGSGGGGSGGGGQVQLVESGGDSVKPGGSLRLSCAASGFTFSDS  
YMTWIRQAPGKLEWVSF ISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNVKKSLYLQMNRLRAEDTAVYYCAREEPGNVYYYG  
MDVWGQTTVTVSSTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLS  
LVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLG  
RREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPQRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKHDGLYQGLSTATKDTYD  
ALHMQUALPPR) 9C11-CD8-BBz多肽,其依次包含以下结构域:9C11结合结构域、CD8 $\alpha$ 铰链和跨  
膜结构域、4-1BB共刺激内结构域和CD3 $\zeta$ 信号传导结构域。

[0131] 在一些实施方案中,所述分离的核酸编码SEQ ID NO:20 (MSVPTQVLGLLLLWLT DARC  
EIVMTQSPATLSVSPGERTLS CRASQSVSSNLAWYLQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFILTIS  
SLQSEDFAVYYCQQYNWPITFGQTRLEIKGGGSGGGGSGGGGEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFYD  
YAMHWVRQAPGKLEWVSGISWNSGYIGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNLSRAEDTALYYCAKDNSYKGFYY  
GLDVWGQTTVTVSSTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLL  
SLVITLYCRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPQRRKNPQEGLYNELQKDKM  
AEAYSEIGMKGERRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR) 3H7-CD3z多肽,其依次包含以下结构  
域:3H7结合结构域、CD8 $\alpha$ 铰链和跨膜结构域以及CD3 $\zeta$ 信号传导结构域。

[0132] 在一些实施方案中,编码3H7-CD8-27z多肽的分离的核酸包含序列SEQ ID NO:13  
(ATGTCCGTGCCTACCCAGGTGCTGGGCCTGCTGCTGCTGCTGACCGACGCCAGATGCGAAATAGTGATGACG  
CAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGCTCCAGGGGAAAGAACCACCCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCA  
GCAACTTAGCCTGGTACCTTCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCACCAGGGCCAC  
TGGTATCCCAGCCAGGTT CAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCATTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAA  
GATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGTATAATAACTGGCCGATCACCTTCGGCCAAGGGACACGGCTGGAGATTA  
AAGGTGGAGGTGGATCTGGAGGAGGAGGATCCGGTGGAGGAGGTGAAGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTT  
GGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTTATGATTATGCCATGCACTGG  
GTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTTGGAATAGTGGTTACATAGGCTATGCGG  
ACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGA ACTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAG  
AGCTGAGGACACGGCCTTG TATTACTGTGCAAAAGATAACAGCTATGGAAAAGTTCTACTACGGTTTGGACGTCTGG  
GGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCACCATCG  
CGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCAGAGGCGTGCCGCCAGCGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGA  
CTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGCCGGGACTTGTGGGGTCTTCTCCTGTACTGGTTATCACC  
CTTTACTGCCAACGACGCAAGTACCGTCCAATAAAGGAGAGTACCAGTAGAACCCGCGCAACCTTGTCACTATT  
CATGTCCACGCGAAGAGGAGGGTTCAACGATCCCTATT CAGGAAGATTACAGAAAGCCGGAACCTGCTTGTAGCCC

CAGAGTGAAGTTCAGCCGCAGCGCCGACGCCCTGCCTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTGTATAACGAGCTGAAC  
CTGGGCAGGCGGGAGGAATACGACGTGCTGGACAAGCGCAGAGGCCGGGACCCTGAGATGGGCGGCAAGCCCCAGA  
GGCGGAAGAACCCCCAGGAAGGCCTGTATAACGAACTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATCGG  
CATGAAGGGCGAGCGGCGACGCGGCAAGGGCCACGACGGCCTGTACCAGGGCCTGTCCACCGCCACCAAGGACACC  
TACGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCTCCCCGTTAG)。

[0133] 在一些实施方案中,编码3H7-CD8-BBz多肽的分离的核酸包含序列SEQ ID NO:14  
(ATGTCCGTGCCTACCCAGGTGCTGGGCCTGCTGCTGTGGCTGACCGACGCCAGATGCGAAATAGTGATGACG  
CAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAAGAACCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCA  
GCAACTTAGCCTGGTACCTTCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCACCAGGGCCAC  
TGGTATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCATTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAA  
GATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGTATAATAACTGGCCGATCACCTTCGGCCAAGGGACACGGCTGGAGATTA  
AAGGTGGAGGTGGATCTGGAGGAGGAGGATCCGGTGGAGGAGGTGAAGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTT  
GGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTTATGATTATGCCATGCACTGG  
GTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTTGGAATAGTGGTTACATAGGCTATGCGG  
ACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACCCAAGAACTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAG  
AGCTGAGGACACGGCCTTGATTACTGTGCAAAAGATAACAGCTATGGAAAGTTCTACTACGGTTTGGACGTCTGG  
GGCCAAGGGACCACGGTACCGTCTCCTCAACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCACCATCG  
CGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGA  
CTTCGCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGCCGGGACTTGTGGGGTCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACC  
CTTTACTGCAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTATGAGACCAGTACAACTACTC  
AAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAG  
GAGCGCAGACGCCCCCGGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAG  
TACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGCAGAGAAGGAAGAACCCTCAGG  
AAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCG  
GAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATG  
CAGGCCCTGCCCCCTCGCTAA)。

[0134] 在一些实施方案中,编码3B9-CD8-BBz多肽的分离的核酸包含序列SEQ ID NO:15  
(ATGAGCGTTCCAACCCAAGTTCCTGGGACTGCTTCTGCTCTGGTTGACTGACGCTAGGTGCGAAATAGTAATGACC  
CAATCCCCAGCCACTCTCTCCGTTAGCCCAGGTGAAAGAGCCACTCTTAGTTGCAGGGCTAGTCAATCCGTATCTA  
GCAACCTGGCCTGGTACCAGCAAAAGCCCGACAAGCGCCGCGGTTGTTGATCTATGGGACGAGCACACGAGCTAC  
GGGTATTCCGGCCAGGTTCTCAGGGTCTGGCTCCGGAACCGAATTTACATTGACGATCAGTAGTCTGCAATCAGAG  
GATTTCCGCCGTTTACTATTGCCAACAGTACAATAATTGGCCGCTCACATTCGGGGGAGGAACCAAGGTCGAGATTA  
AGGGAGGTGGGGTAGTGGGGCGGGGGTTCAGGAGGTGGAGGAGAGGTACAGTTGGTAGAAAGCGGCGGGGGT  
GGTTCAACCTGGACGGAGTCTGAGATTGTCTTGCCTGGCTTCCGGCTTACTTTCAATGATTACGCCATGCACTGG  
GTACGCCAGGCGCCTGGAAAGGGTCTGGAGTGGGTTTCCGTGATATCCTGGAATAGTGATAGTATAGGCTATGCCG  
ATAGTGTAAGGAAGGTTTACAATCTCTAGGGATAACGCTAAGAACAGCCTGTACCTTCAAATGCATAGTCTCCG  
GGCTGAGGACACAGCCTTGACTATTGTGCTAAGGACAATCATTATGGAAGCGGGTCATATTACTATCAATAT  
GGGATGGATGTGTGGGGTCAGGGAACGACCGTTACGGTATCCTCAACCACCACCCTGCACCAAGGCCCCCGACTC  
CCGCGCCACCATCGCGTCACAGCCTTTAGCCTGCGACCGGAAGCATGCAGACCAGCTGCCGGGGGGGCGGTGCA

TACGAGAGGTTTGGACTTCGCCTGCGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTG  
TCACTGGTTATCACCCCTTACTGCAAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGAC  
CAGTACAAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAG  
AGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTA  
GGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGAAAGCCGCAGAGAA  
GGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGAT  
GAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTAC  
GACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAA)。

[0135] 在一些实施方案中,编码2B7-CD8-BBz多肽的分离的核酸包含序列SEQ ID NO:16  
(ATGTCCGTACCTACCCAGGTGCTGGGCCTGCTGCTGTGGCTGACCGACGCCAGATGCGAAATTGTGTTGACA  
CAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCGCCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCA  
ACTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCAC  
TGCCATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAA  
GATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGCGTAGCAACTGGCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCA  
GAGGTGGAGGTGGATCTGGAGGAGGAGGATCCGGTGGAGGAGGTGAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTT  
GGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGCGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTCGAGATTATACCATGCACTGG  
GTCCGGCAAGGTCCAGGGAAGGGCCTGGAATGGGTCTCAGGTATTAGTTGGAATAGTATTACATAGGCTATGCGG  
ACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAG  
AGTTGAGGACACGGCCTTGATTACTGTCAAAGCTCAGTGGGACCTACAGGGACTACTTCTACGGAGTGGACGTC  
TGGGGCAAGGGACCACGGTCAACCTCAACCACCACCCTGCACCAAGGCCCCCGACTCCCGCGCCACCA  
TCGCGTCACAGCCTCTTAGCCTGCGACCGGAAGCATGCAGACCAGCTGCCGGGGGGCCGTGCATACGAGAGGTTT  
GGACTTCGCCTGCGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATC  
ACCCTTTACTGCAAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAAACTA  
CTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAG  
CAGGAGCGCAGACGCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAG  
GAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGAAAGCCGCAGAGAAGGAAGAACCCTC  
AGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCG  
CCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTAC  
ATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAA)。

[0136] 在一些实施方案中,编码9C11-CD8-BBz多肽的分离的核酸包含序列SEQ ID NO:17  
(ATGTCCGTGCCTACCCAGGTGCTGGGCCTGCTGCTGTGGCTGACCGACGCCAGATGCGAAATTGTGGTGACA  
CAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGACCAGTCAGACTACTACCA  
GCTACTTAGCCTGGTACCGACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCGC  
TGCCATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGACAGACTTCACTCTCACCATCAACAGCCTGGAGCCTGAA  
GATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCTGCGTACCAACTGGATCACCTTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAG  
GTGGAGGTGGATCTGGAGGAGGAGGATCCGGTGGAGGAGGTGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGACTCGGT  
CAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTCAGTGACTCCTACATGACTTGGATC  
CGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTTCATTATTAGTAGTAGTGAAGTACCATATATTATGCAGACT  
CTGTGAAGGGCCGATTACCATTTCCAGGGACAACGTCAAGAAGTCATTGTATCTGCAGATGAACAGACTGAGAGC

CGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAAGAACCAGGAACTACGTCTATTACGGTATGGACGTCTGGGGC  
CAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAACCACCACCCCTGCACCAAGGCCCGACTCCCGCGCCACCATCGCGT  
CACAGCCTCTTAGCCTGCGACCGGAAGCATGCAGACCAGCTGCCGGGGGGCCGTGCATACGAGAGGTTTGACTT  
CGCCTGCGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCTT  
TACTGCAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAG  
AGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAG  
CGCAGACGCCCCCGGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTAC  
GATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGAAAGCCGCAGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAG  
GCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGCGAGCGCCGGAG  
GGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAG  
GCCCTGCCCCCTCGCTAA)。

[0137] 在一些实施方案中,所述分离的核酸包含编码CD8 $\alpha$ 铰链区的密码子优化的序列。示例性密码子优化的CD8 $\alpha$ 铰链区核酸序列包括但不限于SEQ ID NO:18 (ACCACCACCCTGCA  
CCAAGGCCCGACTCCCGCGCCACCATCGCGTCA CAGCCTCTTAGCCTGCGACCGGAAGCATGCAGACCAGCT  
GCCGGGGGGCCGTGCATACGAGAGGTTTGACTTTCGCTGCGAT)。在一些实施方案中,CD8 $\alpha$ 铰链区由  
以下序列SEQ ID NO:19 (ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTGCAGC  
CCCTGTCCCTGCGCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTTCGCTG  
TGAT) 编码。

[0138] 在一些实施方案中,所述分离的核酸编码3B9结合结构域,并包含编码CD8 $\alpha$ 铰链结  
构域的以下序列SEQ ID NO:18。在一些实施方案中,所述分离的核酸编码2B7结合结构域,  
并包含编码CD8 $\alpha$ 铰链结构域的以下序列SEQ ID NO:18。在一些实施方案中,所述分离的核  
酸编码9C11结合结构域,并包含编码CD8 $\alpha$ 铰链结构域的以下序列SEQ ID NO:18。在一些实  
施方案中,所述分离的核酸编码3H7结合结构域,并包含编码CD8 $\alpha$ 铰链结构域的以下序列  
SEQ ID NO:19。

[0139] 在一些实施方案中,所述分离的核酸编码SEQ ID NO:35 (MSVPTQVLGLLLLWLT  
DARC EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS  
CAASGFTFSSYVMSWVRQAPGKGLEWVSAI  
IGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN  
SK NTLYLQMN  
SLRAEDTAVYYCAK  
RAGDNWNWFD  
PWGQGTLVTVSS  
GGGGSGGGGSGGGG  
DIQMTQSPSSVSAS  
LGDR VTITCRASQ  
GISSWLAWYQRK  
PGKAPKLLIYAAS  
SLQSGVPSRFS  
GSGSGADFTLT  
ISSLQPEDFATY  
YCQQAKSV PFT  
FGPGTKVDIKT  
TTPAPRPPTPAP  
TIASQPLSLRPE  
ACRPAAGGAVH  
TRGLDFACDIYI  
WAPLAGTCGVLL  
LSL VITLYCKR  
GRKLLYIFKQPF  
MRPVQTTQEED  
GCSCRFPEEEEG  
GCELRVKFSRS  
ADAPAYQQGNQ  
LYNELNLGR  
REEYDVL  
DKRRGRDPEM  
GGKQRRKNPQ  
EGLYNELQKDK  
MAEAYSEIGM  
KGERRRGK  
GHDGLYQGL  
STATKDTYDA  
LHMQUALPPR) 抗BCMA-CAR多肽,其依次包含以下结构域:16716P结合结构域、CD8 $\alpha$ 铰链和跨膜  
结构域、4-1BB共刺激内结构域和CD3 $\zeta$ 信号传导结构域。

[0140] 在一些实施方案中,所述分离的核酸编码SEQ ID NO:36 (MSVPTQVLGLLLLWLT  
DARC QVQLVESGGGLV  
KPGGSLRLS  
CAASGFTFSDY  
YISWIRQAPGK  
GLEWVSYISS  
SGSSIKYADSV  
KGRFTISRDN  
AK NSLYLQMN  
SLRAEDTAVYY  
CAREGGNYGM  
DVWQGTTVT  
VSSGGGGSGGG  
GSGGGDIQMT  
QSPSSVSASV  
GDRVT ITCRASQ  
GINNWLWVYQ  
QKPGKAPKLL  
IYAATSLQSG  
VPSRFSGSGS  
GTDFTLTIS  
SLQPEDFATY  
YCQQANSFPP  
TFGQGTKLEI  
KTTTPAPRPPT  
PAPTIASQPL  
SLRPEACRPA  
AGGAVHTRGL  
DFACDIYIWA  
PLAGTCGVLL  
LSLVI TLYCKR  
GRKLLYIFKQ  
PFMRPVQTT  
QEEDGCSCRF  
PEEEEGGCEL  
RVKFSRSAD  
APAYQQGNQ  
LYNELNLGR  
RE

EYDVLDKRRGRDPEMGGKPKRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR) 抗BCMA-CAR多肽,其依次包含以下结构域:16747P结合结构域、CD8 $\alpha$ 铰链和跨膜结构域、4-1BB共刺激内结构域和CD3 $\zeta$ 信号传导结构域。

[0141] 在一些实施方案中,所述分离的核酸编码SEQ ID NO:37 (MSVPTQVLGLLLLWLT DARC QVQLQESGPGLVK PSETLSLCTVSGGSINYYWYWNWIRQPPGKGLEWIGYISYSGNTNYP SLKSRVTISVATSRN QFSLTLSSVTAADTAVYYCARFAEYCGGNICYYYGMDVWVGQTTVTVSSGGGSGGGGSGGGGEIVLTQSPGTLSPGERATFSCRASQSVGSSFLAWYQQKPGQAPRR LMYGASNRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQCGGSPWTFGQGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGNQLYNELNLGRREYDVLDKRRGRDPEMGGKPKRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR) 抗BCMA-CAR多肽,其依次包含以下结构域:21587N结合结构域、CD8 $\alpha$ 铰链和跨膜结构域、4-1BB共刺激内结构域和CD3 $\zeta$ 信号传导结构域。

[0142] 在一些实施方案中,所述分离的核酸编码SEQ ID NO:38 (MSVPTQVLGLLLLWLT DARC QVQLVESGGGLVKPGGSLRLS CAASGFTFSDYYISWIRQAPGKLEWVSYISSSGSSIKYADSVKGRFTISRDNALNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGGNYGMDVWVGQTTVTVSSGGGSGGGGSGGGGDIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGINNWLVWYQQKPGKAPKLLIYAATSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQANSFPPTFGQGTKLEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVI TLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGNQLYNELNLGRREYDVLDKRRGRDPEMGGKPKRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRRAKRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMALPVTALLPLALLLHAARNWVNI SDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIK EFLQSFVHIVQMFINTS\*) 抗BCMA-CAR多肽,其依次包含以下结构域:16747P结合结构域、CD8 $\alpha$ 铰链和跨膜结构域、4-1BB共刺激内结构域、CD3 $\zeta$ 信号传导结构域、弗林蛋白酶+P2A切割结构域、分泌信号和sIL15结构域。

[0143] 在一些实施方案中,编码抗BCMA CAR 16716P多肽的分离的核酸包含序列SEQ ID NO:39 (ATGAGCGTGCTACCCAGGTGCTGGGACTGCTGCTGCTGTGGCTGACAGACGCAAGGTGCGAGGTGCAGC TGGTGGAGTCCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGAGGATCCCTGAGGCTGTCTTGCGCCGCCAGCGGCTTACCTT TAGCTCCTACGTGATGTCTGGGTGCGCCAGGCACCTGGCAAGGGACTGGAGTGGGTGTCTGCCATCATCGGCTCT GCGCGCAGCACATACTATGCCGACAGCGTGAAGGGCCGTTACCATCTCCAGAGATAACTCTAAGAATACACTGT ATCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCAGAGGACACCGCCGTGTACTATTGCGCCAAGAGAGCCGGCGACA ACTGGAA TTGGTTTGTATCCATGGGGCCAGGGCACCTGGTGACAGTGTCTAGCGGAGGAGGAGGATCTGGAGGAGGAGGAAGC GGCGGAGGAGGCGACATCCAGATGACACAGTCCCCATCCTCTGTGAGCGCCTCCCTGGGCGATAGGGTGACCATCA CATGTGCGCCTCTCAGGGCATCAGCTCCTGGCTGGCATGGTACCAGAGGAAGCCAGGCAAGGCCCTAAGCTGCT GATCTATGCAGCATCTAGCCTGCAGAGCGGAGTGCCTTCCCGTTCTCTGGAAGCGGATCCGGAGCAGACTTTACC CTGACAATCTCCTCTCTGCAGCCAGAGGATTCGCCACCTACTATTGTCAGCAGGCCAAGTCCGTGCCATTACCT TTGGCCCCGGCACAAAGGTGGATATCAAGACCACCACCCTGCACCAAGGCCCCCGACTCCCGCGCCACCATCGC GTCACAGCCTCTTAGCCTGCGACCGAAGCATGCAGACCAGCTGCCGGGGGGCCGTGCATACGAGAGGTTTGAC TTCGCTGCGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCC TTTACTGCAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCA

AGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGG  
AGCGCAGACGCCCCCGCTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGT  
ACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGAAAAGCCGCAGAGAAGGAAGAACCCTCAGGA  
AGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGG  
AGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGC  
AGGCCCTGCCCCCTCGCTAA)。

[0144] 在一些实施方案中,编码抗BCMA CAR 16747P多肽的分离的核酸包含序列SEQ ID  
NO:40 (ATGAGCGTGCCTACCCAGGTGCTGGGACTGCTGCTGCTGTGGCTGACAGACGCAAGGTGCCAGGTGCAGC  
TGTTGGAGAGCGGAGGAGGACTGGTGAAGCCAGGAGGAAGCCTGAGGCTGTCTGCGCCGCTCTGGCTTCACCTT  
TAGCGACTACTATATCTCCTGGATCAGGCAGGCACCTGGCAAGGGACTGGAGTGGGTGCCTACATCAGCTCCTCT  
GGCAGCTCCATCAAGTATGCCGACTCTGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCAGAGATAACGCCAAGAATTCTCTGT  
ACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACAGCCGTGTACTATTGCGCCAGAGAGGGCGGCAATTATGGCAT  
GGACGTGTGGGGCCAGGGCACCACAGTGACCGTGTCTAGCGGGCGGGCGGCTCTGGAGGAGGAGGAAGCGGCGGA  
GGAGGCGACATCCAGATGACACAGAGCCATCCAGCGTGAGCGCCAGCGTGGGCGATAGGGTGACCATCACATGTC  
GCGCCTCCCAGGGCATCAACAATTGGCTGGTGTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTA  
TGCAGCCACCTCCCTGCAGTCTGGAGTGCCTAGCCGTTCTCCGGATCTGGAAGCGGAACCGACTTTACCCTGACA  
ATCAGCTCCCTGCAGCCAGAGGATTTTGCCACATACTATTGTGACAGGCCAACTCCTTCCCCCTACCTTTGGCC  
AGGGCACAAAGCTGGAGATCAAGACCACCACCCTGCACCAAGGCCCCCGACTCCCGCGCCACCATCGCGTCACA  
GCCTCTTAGCCTGCGACCGGAAGCATGCAGACCAGCTGCCGGTGGGGCGGTGCATACGAGAGGTTTGGACTTCGCC  
TGCGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCTTTACT  
GCAAACGGGGCAGAAAAGAACTCCTGTATATATTTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGA  
AGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCA  
GACGCCCCCGCTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATG  
TTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGAAAAGCCGCAGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCT  
GTACAATGAACTGCAGAAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGC  
AAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCC  
TGCCCCCTCGCTAA)。

[0145] 在一些实施方案中,编码抗BCMA CAR 21587N多肽的分离的核酸包含序列SEQ ID  
NO:41 (ATGAGCGTGCCTACCCAGGTGCTGGGACTGCTGCTGCTGTGGCTGACAGACGCAAGGTGCCAGGTGCAGC  
TGCAGGAGTCTGGCCCTGGCCTGGTGAAGCCATCCGAGACCCTGTCTCTGACCTGCACAGTGAGCGGCGGCTCCAT  
CAATTACTATTACTGGAAGTGGATCAGGCAGCCACCTGGCAAGGGACTGGAGTGGATCGGCTACATCAGCTATTCC  
GGCAACACCAATTACAACCCTTCTCTGAAGAGCAGGGTGACCATCAGCGTGGCCACATCCCGAATCAGTTCAGCC  
TGACACTGAGCTCCGTGACCGCAGCAGACACAGCCGTGTATTACTGCGCAAGGTTTGCAGAGTACTGCGGAGGCAA  
CATCTGTTATTACTATGGCATGGACGTGTGGGGCCAGGGCACCACAGTGACCGTGTCTAGCGGGCGGGCGGCTCT  
GGAGGAGGAGGAAGCGGAGGAGGAGAGATCGTGCTGACCCAGTCCCAGGCACACTGTCTCTGAGCCCTGGAG  
AGAGGGCCACATTCTCTTGTGCGCCTCCCAGTCTGTGGGCTCCTCTTTTCTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCAGG  
ACAGGCACCACGGAGACTGATGTATGGAGCATCCAATAGGGCAACCGGAATCCCAGACAGATTCAGCGGCTCCGGC  
TCTGGCACAGACTTACCCTGACAATCAGCAGACTGGAGCCAGAGGACTTCGCCGTGTACTATTGCCAGCAGTGTG  
GAGGATCCCCATGGACCTTTGGCCAGGGAACAAAGGTGGAGATCAAGACCACCACCCTGCACCAAGGCCCCCGAC



YAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGYIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDNSYKFFYY  
GLDVWGQGTTVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLL  
SLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNL  
GRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKQRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTY  
DALHMQUALPPRGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMALPVTALLLPLALLLHAARPNNVVISDLKKIEDLIQSMHID  
ATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLES GDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKE  
FLQSFVHIVQMFINTS\*) 抗CD20-CAR多肽,其依次包含以下结构域:3H7结合结构域、CD8 $\alpha$ 铰链  
和跨膜结构域、4-1BB共刺激内结构域、CD3 $\zeta$ 信号传导结构域、P2A切割结构域  
(GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP, SEQ ID NO:47)、分泌信号和sIL15结构域。

[0148] 在一些实施方案中,所述分离的核酸编码SEQ ID NO:48(MSVPTQVLGLLLLWLT DARC  
EIVMTQSPATLSVSPGERTLSCRASQSVSSNLAWYLQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFILTIS  
SLQSEDFAVYYCQQYNWPITFGQGTREIKGGGSGGGGSGGGGEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFYD  
YAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGYIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDNSYKFFYY  
GLDVWGQGTTVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLL  
SLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNL  
GRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKQRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTY  
DALHMQUALPPRGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMRISKPHLRSISIQCYLCLLLNSHFLTEAGIHFVILGCFSAGL  
PKTEANWVVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLES GDASIHDTVENLIILAN  
NSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS\*) 抗CD20-CAR多肽,其依次包含以下结  
构域:3H7结合结构域、CD8 $\alpha$ 铰链和跨膜结构域、4-1BB共刺激内结构域、CD3 $\zeta$ 信号传导结构  
域、SEQ ID NO:47的P2A切割结构域、SEQ ID NO:49(MRISKPHLRSISIQCYLCLLLNSHFLTEAG  
IHFVILGCFSAGLPKTEA)的分泌信号以及sIL15结构域。

[0149] 在一些实施方案中,编码抗CD20 CAR+sIL15多肽的分离的核酸包含序列SEQ ID  
NO:50(ATGTCCGTGCTACCCAGGTGCTGGGCTGCTGCTGCTGGCTGACCGACCCAGATGCGAAATAGTGA  
TGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGAAAGAACCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGT  
TAGCAGCAACTTAGCCTGGTACCTTCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCACCAGG  
GCCACTGGTATCCAGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCATTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGT  
CTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTGTCAGCAGTATAATAACTGGCCGATCACCTTCGGCCAAGGGACACGGCTGGA  
GATTAAGGTGGAGGTGGATCTGGAGGAGGAGGATCCGGTGGAGGAGGTGAAGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGA  
GGCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTTATGATTATGCCATGC  
ACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTTGGAATAGTGGTTACATAGGCTA  
TGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAGTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGT  
CTGAGAGCTGAGGACACGGCCTGTATTACTGTGCAAAAGATAACAGCTATGGAAAGTTCTACTACGGTTTGGACG  
TCTGGGGCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAACCACGACGCCAGCGCCGACCACCAACACCGGCGCCAC  
CATCGCGTCGAGCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGG  
CTGGACTTCGCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCTTCTCCTGTCACTGGTTA  
TCACCCTTTACTGCAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCTTTATGAGACCAGTACAAAC  
TACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTC  
AGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAG

AGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGAAAGCCGCAGAGAAGGAAGAACCC  
TCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAG  
CGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTC  
ACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCGGTAGCGGGGCTACGAACTTCTCCCTTCTTAAACAAGCGGGAGACGTGGAAGA  
AAATCCCGGACCTATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCCAGGCCG  
AACTGGGTGAATGTAATAAGTGATTTGAAAAAATTGAAGATCTTATTCAATCTATGCATATTGATGCTACTTTAT  
ATACGAAAGTGATGTTACCCCAGTTGCAAAGTAACAGCAATGAAGTGCTTTCTCTTGGAGTTACAAGTTATTTTC  
ACTTGAGTCCGGAGATGCAAGTATTCATGATACAGTAGAAAATCTGATCATCCTAGCAAACAACAGTTTGTCTTCT  
AATGGGAATGTAACAGAATCTGGATGCAAAGAATGTGAGGAACTGGAGGAAAAAATATTAAGAATTTTTGCAGA  
GTTTTGTACATATTGTCCAAATGTTTCATCAACACTTCTTGA)。

[0150] 在一些实施方案中,编码抗CD20 CAR+sIL15多肽的分离的核酸包含序列SEQ ID NO:51 (ATGTCCGTGCCTACCCAGGTGCTGGCCCTGCTGCTGCTGTGGCTGACCGACGCCAGATGCGAAATAGTGA  
TGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAAGAACCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGT  
TAGCAGCAACTTAGCCTGGTACCTTCAGAACTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCACCAGG  
GCCACTGGTATCCAGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCATTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGT  
CTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGTATAATAACTGGCCGATCACCTTCGGCCAAGGGACACGGCTGGA  
GATTAAGGTGGAGGTGGATCTGGAGGAGGAGATCCGGTGGAGGAGGTGAAGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGA  
GGCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTTATGATTATGCCATGC  
ACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTTGGAATAGTGGTTACATAGGCTA  
TGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGT  
CTGAGAGCTGAGGACACGGCCTGTATTACTGTGCAAAAGATAACAGCTATGAAAAGTTCTACTACGTTTGGACG  
TCTGGGGCAAGGGACCACGGTACCGTCTCCTCAACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCAC  
CATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGGCGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGG  
CTGGACTTCGCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTA  
TCACCCTTTACTGCAAAAGGGGAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAAACAACCTTTATGAGACCAGTACAAAC  
TACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTC  
AGCAGGAGCGCAGACGCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAG  
AGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGAAAGCCGCAGAGAAGGAAGAACCC  
TCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAG  
CGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTC  
ACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCGGTAGCGGGGCTACGAACTTCTCCCTTCTTAAACAAGCGGGAGACGTGGAAGA  
AAATCCCGGACCTATGAGAATTTGAAACCACATTTGAGAAGTATTTCCATCCAGTGCTACTTGTGTTTACTTCTA  
AACAGTCATTTTCTAACTGAAGCTGGCATTTCATGTCTTCATTTTGGGCTGTTTCAGTGCAGGGCTTCCTAAAACAG  
AAGCCAACTGGGTGAATGTAATAAGTGATTTGAAAAAATTGAAGATCTTATTCAATCTATGCATATTGATGCTAC  
TTTATATACGAAAGTGATGTTACCCCAGTTGCAAAGTAACAGCAATGAAGTGCTTTCTCTTGGAGTTACAAGTT  
ATTTCACTTGAGTCCGGAGATGCAAGTATTCATGATACAGTAGAAAATCTGATCATCCTAGCAAACAACAGTTTGT  
CTTCTAATGGGAATGTAACAGAATCTGGATGCAAAGAATGTGAGGAACTGGAGGAAAAAATATTAAGAATTTTT  
GCAGAGTTTTGTACATATTGTCCAAATGTTTCATCAACACTTCTTGA)。

[0151] 在一些实施方案中,所述分离的核酸编码SEQ ID NO:57 (MSVPTQVLGLLLLWLT DARC

EIVMTQSPATLSVSPGERTTLCRASQSVSSNLAWYLQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFILTIS  
SLQSEDFAVYYCQYNNWPIITFGQGTRLEIKGGGSGGGGSGGGGEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFYD  
YAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGYIGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNLSRAEDTALYYCAKDNSYKGFYY  
GLDVWVGQTTVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLL  
SLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNLNELNL  
GRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPKRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTY  
DALHMQALPPR\*) 抗CD20-CAR多肽,其依次包含以下结构域:3H7结合结构域、CD8 $\alpha$ 铰链和跨膜  
结构域、4-1BB共刺激内结构域和CD3 $\zeta$ 信号传导结构域;并且经由编码SEQ ID NO:57的区域  
的内部核糖体进入位点(例如由SEQ ID NO:56编码)3',所述分离的核酸进一步编码SEQ ID  
NO:58 (MALPVTALLLPLALLLHAARNVWNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHP SCKVTAMKCFLELQ  
VISLESGDASIHDVTENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS\*)、SEQ ID  
NO:33的分泌信号和sIL15结构域。

[0152] 在一些实施方案中,编码抗CD20 CAR+sIL15多肽的分离的核酸包含序列SEQ ID  
NO:59 (ATGTCCGTGCCTACCCAGGTGCTGGGCTGCTGCTGCTGTGGCTGACCGACGCCAGATGCGAAATAGTGA  
TGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGAAAGAACCACCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGT  
TAGCAGCAACTTAGCCTGGTACCTTCAGAACTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCACCAGG  
GCCACTGGTATCCAGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCATTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGT  
CTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGTATAATAACTGGCCGATCACCTTCGGCCAAGGGACACGGCTGGA  
GATTAAGGTGGAGGTGGATCTGGAGGAGGAGATCCGGTGGAGGAGGTGAAGTGAAGTGGTGGAGTCTGGGGGA  
GGCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTTATGATTATGCCATGC  
ACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTTGGAATAGTGGTTACATAGGCTA  
TGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGT  
CTGAGAGCTGAGGACACGGCCTGTATTACTGTGAAAAGATAACAGCTATGAAAAGTTCTACTACGGTTTGGACG  
TCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCAC  
CATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGG  
CTGGACTTCGCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCTTCTCCTGTCACTGGTTA  
TCACCCTTACTGCAAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAAACAACCTTTATGAGACCAGTACAAAC  
TACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTC  
AGCAGGAGCGCAGACGCCCCGCTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAG  
AGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAGAAGGAAGAACC  
TCAGGAAGGCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAG  
CGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTC  
ACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAGAGTACTGCGGCCGCTACGTAAATTCGCCCCCTCTCCCTCCCCCCCCCTA  
ACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGAATAAGGCCGGTGTGCGTTTGTCTATATGTTATTTCCACCATATTGCCGTC  
TTTTGGCAATGTGAGGGCCCGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCCTAGGGGTCTTCCCCTCTCGCC  
AAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAGCTTCTGAAGACAAACAACGTCTG  
TAGCGACCCTTTGCAGGCAGCGGAACCCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTATAAGA  
TACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCAGTGCCACGTTGTGAGTTGGATAGTTGTGGAAGAGTCAAATGGCTCTCC  
TCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGATGCCAGAAGGTACCCATTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGT

GCACATGCTTTACATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAAACGTCTAGGCCCCCGAACCCACGGGGACGTGGTTTTCTT  
TTGAAAAACACGATGATATTAATTAAGCCACCGCCATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTT  
GCTGCTCCACGCCGCCAGGCCGAAGTGGGTGAATGTAATAAGTGATTTGAAAAAATTGAAGATCTTATTCAATCT  
ATGCATATTGATGCTACTTTATATACGGAAAGTGATGTTTACCCCGATTGCAAAGTAACAGCAATGAAGTGCTTTC  
TCTTGGAGTTACAAGTTATTTCACTTGAGTCCGGAGATGCAAGTATTCATGATACAGTAGAAAATCTGATCATCCT  
AGCAAACAACAGTTTGTCTTCTAATGGGAATGTAACAGAATCTGGATGCAAAGAATGTGAGGAACTGGAGGAAAA  
AATATTAAGAATTTTTGCAGAGTTTTGTACATATTGTCCAAATGTTTCATCAACACTTCTGA)。

[0153] 在一些实施方案中,所述分离的核酸是线性核酸。在一些实施方案中,所述分离的核酸是环状核酸。在一些实施方案中,所述分离的核酸是载体,诸如质粒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体、病毒载体、逆转录病毒载体或慢病毒载体。在一些实施方案中,所述分离的核酸或例如其包含结合结构域跨膜结构域以及一个或多个信号传导和/或共刺激内结构域连续部分,被整合到宿主细胞(诸如宿主 $\gamma$   $\delta$ T细胞)的基因组中。在示例性实施方案中,所述分离的核酸是逆转录病毒载体。

[0154]  $\gamma$   $\delta$ T细胞:

[0155] 本发明的方面包括 $\gamma$   $\delta$ T细胞,其功能性表达本文所述的分离的核酸并由此在所述 $\gamma$   $\delta$ T细胞表面上表达CAR。

[0156] 本发明的方面可以另外地或可替代地包括针对血液肿瘤细胞具有体外或体内细胞毒活性的 $\gamma$   $\delta$ T细胞,所述血液肿瘤细胞表现出肿瘤相关抗原(TAA)的细胞表面表达。在一些情况下,细胞毒性活性是先天性活性。在一些情况下,细胞毒性至少部分地、显著地(>约25%)或完全地由于存在具有特异性结合血液肿瘤细胞表面上表达的TAA的结合结构域的CAR构建体。在一些情况下,所述 $\gamma$   $\delta$ T细胞表现出所述 $\gamma$   $\delta$ T细胞的血液肿瘤细胞杀伤活性大于对照 $\gamma$   $\delta$ T细胞中的体外和/或体内血液肿瘤细胞杀伤活性的先天性水平。在一些情况下,所述对照 $\gamma$   $\delta$ T细胞不包含CAR构建体。在一些情况下,所述对照 $\gamma$   $\delta$ T细胞包含缺乏本文描述的结合结构域、本文描述的铰链区、本文描述的跨膜结构域、本文描述的信号传导结构域和/或本文描述的共刺激内结构域的CAR构建体。

[0157] 在一些情况下,细胞毒性至少部分地、显著地(>约25%)或完全地由于存在具有特异性结合CD20或CD20内的表位的结合结构域的CAR构建体。在一些情况下,所述 $\gamma$   $\delta$ T细胞功能性表达由本文描述的分离的核酸编码的CD20特异性CAR。

[0158] 在一些实施方案中,本文描述的 $\gamma$   $\delta$ T细胞可表现出HLA限制的(例如HLA I类限制的)细胞毒性。在其他实施方案中,大多数(>50%)、实质上所有(>90%)或所有细胞毒性活性不是HLA限制的(例如HLA I类限制的)。HLA限制的细胞毒性活性可以通过比较针对HLA(例如HLA I类)(null)肿瘤细胞系的体外细胞毒性对针对HLA+(例如HLA I<sup>+</sup>类)肿瘤细胞系的体外细胞毒性来评估。在一些实施方案中,HLA限制的细胞毒性活性至少部分地、显著地(>25%)或完全地通过使用T细胞受体样结合结构域来提供。T细胞受体样结合结构域是特异性识别与MHC分子复合呈递在细胞表面上时的抗原的结合结构域。T细胞受体样结合结构域进一步描述于例如WO 2016/199141中。

[0159] 本文描述的 $\gamma$   $\delta$ T细胞可表现出稳健的和/或持续的血液肿瘤细胞杀伤活性。在一些情况下,从第一次接触血液肿瘤细胞起,血液肿瘤细胞杀伤活性可以持续至少约6天至120天,或至少约6天至180天。在一些情况下,从第一次接触血液肿瘤细胞起,或从施用本文

描述的  $\gamma\delta$ T 细胞起, 本文描述的  $\gamma\delta$ T 细胞或其后代的血液肿瘤细胞杀伤活性可以持续至少约 6 天至 120 天, 或至少约 6 天至 180 天。这种持续的血液肿瘤细胞杀伤活性可以在体外、体内或在体外和体内同时表现。

[0160] 本发明的方面可以另外地或可替代地包括响应于与表现出肿瘤相关抗原 (TAA) 的细胞表面表达或过表达的细胞接触而增殖的  $\gamma\delta$ T 细胞。表现出肿瘤相关抗原 (TAA) 的细胞表面表达的细胞可以是正常的血液细胞, 诸如正常的 B 细胞。表现出肿瘤相关抗原 (TAA) 的细胞表面表达或过表达的细胞可以是血液肿瘤细胞。在一些情况下, 增殖是先天性活动。在一些情况下, 增殖至少部分地、显著地 (> 约 20% 或 > 约 25%) 或完全地由于存在具有特异性结合血液细胞或血液肿瘤细胞表面上表达的 TAA 的结合结构域的 CAR 构建体。在一些情况下, 与对照  $\gamma\delta$ T 细胞相比, 所述  $\gamma\delta$ T 细胞表现出更高水平的体外和/或体内增殖。在一些情况下, 所述对照  $\gamma\delta$ T 细胞不包含 CAR 构建体。在一些情况下, 所述对照  $\gamma\delta$ T 细胞包含缺乏本文描述的结合结构域、本文描述的铰链区、本文描述的跨膜结构域、本文描述的信号传导结构域和/或本文描述的共刺激内结构域的 CAR 构建体。

[0161] 在一些情况下, 增殖至少部分地、显著地 (> 约 20% 或 > 约 25%) 或完全地由于存在具有特异性结合 CD20 或 CD20 内的表位的结合结构域的 CAR 构建体。在一些情况下, 响应于与表现出 CD20 的细胞表面表达的血液细胞或血液肿瘤细胞接触而表现出增殖的  $\gamma\delta$ T 细胞, 功能性表达由本文描述的分离的核酸编码的 CD20 特异性 CAR。

[0162] 本文描述的  $\gamma\delta$ T 细胞可在包含血液细胞或血液肿瘤细胞的宿主生物体中表现出稳健的和/或持续的增殖, 所述血液细胞或血液肿瘤细胞表现出肿瘤相关抗原 (TAA) 的细胞表面表达或过表达。在一些情况下, 从第一次接触血液肿瘤细胞起, 或从向所述宿主生物体施用所述  $\gamma\delta$ T 细胞之日起, 增殖可以持续至少约 6 天至 120 天, 或至少约 6 天至 180 天。在一些情况下, 从第一次接触血液细胞或血液肿瘤细胞起或从第一次向宿主生物体施用  $\gamma\delta$ T 细胞之日起, 包含表现出肿瘤相关抗原 (TAA) 的细胞表面表达或过表达的血液细胞或血液肿瘤细胞的所述宿主生物体中的本文描述的  $\gamma\delta$ T 细胞或其后代的增殖可持续至少约 6 天至 120 天, 或至少约 6 天至 180 天。在一些情况下, 宿主生物体中的增殖至少部分地、显著地 (> 约 20% 或 > 约 25%) 或完全地由于存在具有特异性结合 CD20 或 CD20 内的表位的结合结构域的 CAR 构建体。在一些情况下, 宿主生物体中表现出增殖的  $\gamma\delta$ T 细胞功能性表达由本文描述的分离的核酸编码的 CD20 特异性 CAR, 所述宿主生物体包含表现出 CD20 的细胞表面表达的血液细胞或血液肿瘤细胞。

[0163] 在一些实施方案中, 本文描述的  $\gamma\delta$ T 细胞在与血液细胞或血液肿瘤细胞接触后表达或持续表达促炎细胞因子, 诸如肿瘤坏死因子  $\alpha$  或干扰素  $\gamma$ 。在一些实施方案中, 本文描述的  $\gamma\delta$ T 细胞或其后代在与血液细胞或血液肿瘤细胞接触后, 例如在包含血液细胞或血液肿瘤细胞的宿主生物体中表达或持续表达促炎细胞因子, 诸如肿瘤坏死因子  $\alpha$  或干扰素  $\gamma$ 。

[0164] 在一些实施方案中, 当引入到同种异体宿主中时, 所述  $\gamma\delta$ T 细胞或含有所述  $\gamma\delta$ T 细胞的药物组合物基本上不表现或不表现移植物抗宿主反应。在一些实施方案中, 当引入到同种异体宿主中时, 所述  $\gamma\delta$ T 细胞或含有所述  $\gamma\delta$ T 细胞的药物组合物表现出临床上可接受的移植物抗宿主反应水平。在一些实施方案中, 临床上可接受的水平是不需要停止  $\gamma\delta$ T 细胞治疗以实现治疗上有效治疗的移植物抗宿主反应的量。在一些实施方案中, 根据适用的 IBMTR 分级量表, 临床上可接受水平的移植物抗宿主反应 (GvHD) 是不如 C 级严重的急性反

应。急性移植物抗宿主反应的严重性通过评估皮肤、肝脏和胃肠道的累及程度来确定。各个器官累及的阶段相组合以产生总体分数,这具有预后意义。I (A) 级GvHD表征为轻度疾病,II (B) 级GvHD表征为中度,III (C) 级表征为重度,并且IV (D) 级危及生命。IBMTR分级系统定义了急性GvHD的严重性,如下 (Rowlings等,Br J Haematol 1997;97:855):

[0165] • A级-仅第1阶段皮肤累及(斑丘疹在<25%的身体上),无肝脏或胃肠道累及

[0166] • B级-第2阶段皮肤累及;第1至2阶段肠道或肝脏累及

[0167] • C级-任何器官系统累及的第3阶段(全身性红皮病;胆红素6.1至15.0mg/dL;腹泻1500至2000mL/天)

[0168] • D级-任何器官系统累及的第4阶段(全身性红皮病伴大疱形成;胆红素>15mg/dL;腹泻>2000mL/天或疼痛或肠梗阻)。

[0169] 还参见Schoemans等,Bone Marrow Transplantation第53卷,第1401-1415页(2018),例如在表1和表2处,所述参考公开了用于评估和分级急性GvHD的标准。

[0170] 在一些实施方案中,与施用至同种异体宿主的对照 $\alpha\beta$ T细胞或包含所述对照 $\alpha\beta$ T细胞的对照药物组合物表现出的移植物抗宿主反应相比,当引入到同种异体宿主中时,所述 $\gamma\delta$ T细胞或含有所述 $\gamma\delta$ T细胞的药物组合物表现出减少的或显著减少的移植物抗宿主反应。在一些情况下,对照 $\alpha\beta$ T细胞是同种异体非工程化对照 $\alpha\beta$ T细胞。在一些情况下,对照 $\alpha\beta$ T细胞不包含CAR或不包含与参考 $\gamma\delta$ T细胞相同的CAR。

[0171] 本文描述的 $\gamma\delta$ T细胞可以是 $\delta 1$ 、 $\delta 2$ 、 $\delta 3$ 或 $\delta 4$  $\gamma\delta$ T细胞或其组合。在一些情况下, $\gamma\delta$ T细胞主要是(>50%)、实质上(>90%)、基本上全部或完全是 $\delta 2$  $\gamma\delta$ T细胞。在一些情况下, $\gamma\delta$ T细胞主要是(>50%)、实质上(>90%)、基本上全部或完全是 $\delta 1$  $\gamma\delta$ T细胞。

[0172]  $\gamma\delta$ T细胞可获自同种异体或自体供体。 $\gamma\delta$ T细胞可以部分或完全纯化,或者不纯化,并且离体扩增。用于离体扩增的方法和组合物包括但不限于WO 2017/197347中描述的那些。可以在将CAR构建体引入到 $\gamma\delta$ T细胞中之前或之后或之前和之后进行扩增。

[0173] 本文描述的 $\gamma\delta$ T细胞可以被储存,例如冷冻保存,以用于过继细胞转移。

[0174] 抑制或杀伤肿瘤细胞的方法

[0175] 具有针对血液肿瘤细胞的细胞毒性活性的一种或多种非工程化 $\gamma\delta$ T细胞群、工程化 $\gamma\delta$ T细胞群和/或其混合物可以任何顺序或同时施用至受试者。如果同时施用,则本发明的多种非工程化 $\gamma\delta$ T细胞群、工程化 $\gamma\delta$ T细胞群和/或其混合物可以单一、统一形式(诸如静脉内注射)提供,或以多种形式(例如作为多种静脉内输注、皮下注射或丸剂)提供。本发明的非工程化 $\gamma\delta$ T细胞群、工程化 $\gamma\delta$ T细胞群和/或其混合物可以一起或分开包装于单个包装中或多个包装中。本发明的一种或全部非工程化 $\gamma\delta$ T细胞群、工程化 $\gamma\delta$ T细胞群和/或其混合物可以多次剂量给予。如果不同时施用,则多次剂量之间的时间安排可变化至多大约一周、一个月、两个月、三个月、四个月、五个月、六个月或约一年。在一些情况下,在施用至受试者之后,本发明的非工程化富集的 $\gamma\delta$ T细胞群、工程化富集的 $\gamma\delta$ T细胞群和/或其混合物可以在受试者身体内进行体内增殖。可以冷冻一种或多种非工程化 $\gamma\delta$ T细胞群、一种或多种工程化 $\gamma\delta$ T细胞群和/或其混合物,以提供用于使用相同的细胞制剂进行的多次治疗的细胞。本公开的一种或多种非工程化 $\gamma\delta$ T细胞群、一种或多种工程化 $\gamma\delta$ T细胞群和/或其混合物,以及包含它们的药物组合物可以包装为试剂盒。试剂盒可包括非工程化 $\gamma\delta$ T细胞群、工程化 $\gamma\delta$ T细胞群和/或其混合物,以及包含它们的组合物的使用说明书(例如书面

说明书)。

[0176] 在一些情况下,治疗血液癌症的方法包括向受试者施用治疗有效量的非工程化 $\gamma$  $\delta$ T细胞群、工程化 $\gamma$  $\delta$ T细胞群和/或其混合物,其中所述施用治疗血液癌症。在一些实施方案中,施用治疗有效量的非工程化 $\gamma$  $\delta$ T细胞群、工程化 $\gamma$  $\delta$ T细胞群和/或其混合物,持续至少约10秒、30秒、1分钟、10分钟、30分钟、1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、 $\delta$ 小时、12小时、24小时、2天、3天、4天、5天、 $\delta$ 天、1周、2周、3周、1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月或1年。在一些实施方案中,施用治疗有效量的非工程化 $\gamma$  $\delta$ T细胞群、工程化 $\gamma$  $\delta$ T细胞群和/或其混合物,持续至少一周。在一些实施方案中,施用治疗有效量的非工程化 $\gamma$  $\delta$ T细胞群、工程化 $\gamma$  $\delta$ T细胞群和/或其混合物,持续至少两周。

[0177] 本文描述的非工程化 $\gamma$  $\delta$ T细胞群、工程化 $\gamma$  $\delta$ T细胞群和/或其混合物可以在疾病或病状发生之前、期间或之后施用,并且施用含有所述 $\gamma$  $\delta$ T细胞群的药物组合物的时间安排可以变化。例如,所述 $\gamma$  $\delta$ T细胞群可以用作预防剂,并且可以连续地施用至具有病状或疾病倾向的受试者,以便减少疾病或病状发生的可能性。初始施用可以经由任何实用途径进行,诸如使用本文描述的任何制剂通过本文描述的任何途径进行。在一些实例中,本公开的 $\gamma$  $\delta$ T细胞群的施用是静脉内施用。一次或多次剂量的所述 $\gamma$  $\delta$ T细胞群可以在血液癌症发作之后可行地尽快施用,并且持续治疗免疫疾病所需的时间长度,例如像约24小时至约48小时、约48小时至约1周、约1周至约2周、约2周至约1个月、约1个月至约3个月。在一些实施方案中,可以在所述癌症发作后数年以及在其他治疗之前或之后施用一次或多次剂量的所述 $\gamma$  $\delta$ T细胞群。

[0178] 在一些实施方案中,与一种或多种升高共用 $\gamma$ 链细胞因子的方法同时或依序地施用所述 $\gamma$  $\delta$ T细胞群。如本文所用,“一种或多种升高共用 $\gamma$ 链细胞因子的方法”是指改变受试者的生理状态,使得受试者中至少一种共用 $\gamma$ 链细胞因子水平升高的方法或方法的组合。在一些实施方案中,所述方法升高选自IL-2、IL-7和IL-15组成的一种或多种共用 $\gamma$ 链细胞因子的水平,优选地其中所述方法升高受试者中IL-15的水平。在一些实施方案中,所述方法包括淋巴细胞耗竭。在一些实施方案中,所述方法包括向所述受试者施用一种或多种共用 $\gamma$ 链细胞因子。在一些情况下,施用IL-2、IL-7和/或IL-15,优选地IL-15。在一些实施方案中,所述方法包括从施用的例如 $\gamma$  $\delta$ T细胞中分泌共用 $\gamma$ 链细胞因子。在一些情况下,分泌IL-2、IL-7和/或IL-15,优选地IL-15。

[0179] 在一些实施方案中,施用一种或多种升高共用 $\gamma$ 链细胞因子的方法包括在引入所述 $\gamma$  $\delta$ T细胞之前的淋巴细胞耗竭。在一些实施方案中,施用一种或多种升高共用 $\gamma$ 链细胞因子的方法包括与引入所述 $\gamma$  $\delta$ T细胞同时或依序施用有效增加引入的 $\gamma$  $\delta$ T细胞的增殖、细胞毒性活性、持久性或其组合的量的共用 $\gamma$ 链细胞因子,优选地其中所述方法包括施用IL-2或其一种或多种模拟物,更优选地其中所述方法包括施用IL-15或其一种或多种模拟物。施用的共用 $\gamma$ 链细胞因子的量可以是在引入 $\gamma$  $\delta$ T细胞之前和/或之后有效增加引入的 $\gamma$  $\delta$ T细胞的增殖、细胞毒性活性、持久性或其组合的量。IL-15的示例性量包括但不限于每24小时0.01-10 $\mu$ g/kg/剂量之间的IL-15。IL-2的示例性量包括但不限于每8-48小时约 $3 \times 10^6$ 至约 $22 \times 10^6$ 个单位。例如,RCC中IL2的给药方案为600,000个国际单位/kg (0.037mg/kg) IV q8hr在15分钟内输注,持续最多14个剂量。

[0180] 在一些实施方案中,施用一种或多种升高共用 $\gamma$ 链细胞因子的方法包括在施用 $\gamma$

$\delta$ T细胞之前以及引入 $\gamma$  $\delta$ T细胞同时或依序施用有效增加引入的 $\gamma$  $\delta$ T细胞的增殖、细胞毒活性、持久性或其组合的量的共用 $\gamma$ 链细胞因子的淋巴细胞耗竭。

[0181] 实施例

[0182] 实施例1

[0183] 在24孔板(Costar)中,在IL-2(100U/mL)存在的情况下,将 $1 \times 10^6$ /mL的人PBMC在修饰的细胞培养基中在预涂布的抗V $\delta$ 1抗体D1-08或D1-35(参见WO 2017/197347)上活化5天。在第5天,在纤维连接蛋白(retronectin)存在的情况下,用编码嵌合抗原受体(2B7-5.1,SEQ ID NO:11;3B9-5.1,SEQ ID NO:9;3H7-5.1,SEQ ID NO:10;9C11-5.1,SEQ ID NO:12)的 $\gamma$ -逆转录病毒构建体转导细胞培养物。在第6天,将细胞返回到修饰的细胞培养基中,并根据需要用进料和IL-2置换进一步扩增。在第17、18或19天,收获细胞,并使用AutoMACS®试剂盒(Miltenyi Biotec)耗竭剩余的 $\alpha$ BT细胞。通过FACS评估 $\gamma$  $\delta$ 细胞群的纯度和转导效率。平行地,未转导的细胞培养物以相同的方式扩增,而无需添加逆转录病毒上清液。如图3所示,来自多个供体的未转导的扩增的V $\delta$ 1细胞对来自同种异体供体的正常B细胞没有细胞毒性。将CD20 CAR引入V $\delta$ 1细胞赋予了这些细胞针对正常B细胞的稳健的细胞毒性。通过流式细胞术在4小时测定中将细胞毒性测量为%膜联蛋白V+细胞。

[0184] 实施例2

[0185] 以与上述相同的方式激活、转导和扩增V $\delta$ 1细胞。将3H7 CAR构建体SEQ ID NO:10用于证明针对两种CD20+细胞系Daudi和Raji的细胞毒性。如图4所示,引入CAR增强了未工程化的V $\delta$ 1细胞的先天性细胞毒性。

[0186] 实施例3

[0187] 以与上述相同的方式激活、转导和扩增V $\delta$ 1细胞。在扩增期间,将四种不同的构建体(SEQ ID NO:9、10、11、12)引入到V $\delta$ 1细胞中,并针对Raji-Luc细胞进行测试。在以不同的E/T比率共孵育18小时后,在添加发光底物D-荧光素(Perkin Elmer)后,通过总发光测量来确定细胞毒性。如图5所示,包含本文描述的4-1BB共刺激内结构域的抗CD20 CAR细胞表现出针对Raji细胞的稳健的细胞杀伤活性。

[0188] 实施例4

[0189] 用若干个不同的结构域和CD20结合结构域(3H7-CD3z,SEQ ID NO:20;3H7-5.1,SEQ ID NO:10;和3H7-CD27z,SEQ ID NO:8)制备CAR构建体。如上所述引入CAR构建体,并如先前实施例所述针对Raji-Luc细胞测试细胞毒性(在不同的E/T比率下18小时的细胞毒性)。图6示出了使用不同信号传导和/或共刺激内结构域的针对Raji细胞的稳健的细胞杀伤活性。

[0190] 实施例5

[0191] 将各种CAR构建体引入到扩增的V $\delta$ 1细胞中,并使用IncuCyte®仪器在具有靶细胞再攻击(串行杀伤)的长期细胞毒性测定中进行测试。简而言之,用NucRed试剂标记Raji细胞,并随时间记录细胞的总荧光。在不添加任何细胞因子的情况下,将细胞在生长培养基中以3的E/T比率共孵育72小时。在72小时结束时,用另一剂量的Raji细胞再攻击培养物,并监测杀伤。用培养物重复此过程,其中到144小时,将Raji细胞清除。图7。3H7-ICOSz是其中4-1BB共刺激内结构域被ICOS内结构域(WLTKKKYSSSVHDPNGEYMFMRVNTAKKSRLTDVTL(SEQ ID NO:354))置换的构建体。

**[0192] 实施例6**

[0193] 将Raji细胞皮下植入到NSG小鼠 (Jackson Labs) 中。当肿瘤达到约 $100\text{mm}^3$ 大小时, 用 $5 \times 10^6$ 个V $\delta$ 1 CD20 CAR+细胞治疗动物, 以比较体内各种共刺激内结构域 (“co-stim” 或 “costim”) 的功效。在整个研究过程中, 每周3次用IL-2 (60,000U/剂量) 对动物进行同步给药。如图8所示, 测试的构建体在治疗NSG小鼠中的血液肿瘤方面表现出稳健的体内功效。在不希望受到理论束缚的情况下, 据推测, 与非优化的CAR构建体相比, 3H7-5.1、3H7-CD3z和3H7-CD27z的优化的CAR构建体在体内肿瘤控制、增殖、活化、持久性和/或细胞毒性方面表现优异。

**[0194] 实施例7**

[0195] 将Raji细胞皮下植入到NSG小鼠 (Jackson Labs) 中。当肿瘤达到约 $100\text{mm}^3$ 时, 使用用CellTrace紫罗兰预标记的 $5 \times 10^6$ 个V $\delta$ 1 CD20CAR+细胞治疗动物。在第2天和第6天, 将肿瘤和各种其他器官提取、消化并且分析所得细胞悬液的 (A)  $\gamma$   $\delta$ T细胞和Raji细胞的存在 (图9) 以及 (B)  $\gamma$   $\delta$ 细胞的增殖, 如CellTrace紫罗兰染料稀释所证明 (图10)。动物同步接受IL-2 (60,000U/剂量), 每周3次, 直到第6天。如图9所示, 从第2天至第6天, 引入的 $\gamma$   $\delta$ T细胞在肿瘤内环境中稳健地增加, 并且促进肿瘤细胞比 $\gamma$   $\delta$ T细胞的比率的显著降低。如图10所示,  $\gamma$   $\delta$ T细胞在肿瘤内空间稳健且优先增殖。

**[0196] 实施例8**

[0197] 用Raji-Luc细胞 (0.5mln/动物) 接种NSG小鼠。在第4天, 使用用相同构建体转导的 $8.7 \times 10^6$ 个V $\delta$ 1 CAR+细胞 (SEQ ID NO:10) 或 $6.8 \times 10^5$ 个 $\alpha$  $\beta$ T细胞治疗动物。在140天的时间段内监测动物的存活。在第0天、第1天和第2天, 所有动物接受3剂IL-2 (60,000/动物)。图11。如图11所示, 本文描述的 $\gamma$   $\delta$ T细胞的施用增加了患有血液癌症的受试者的存活。

**[0198] 实施例9**

[0199] 用Raji-Luc细胞 ( $0.5 \times 10^6$ /动物) 接种表达人IL-15的SRG-15小鼠 (Herndler-Brandstetter等, PNAS, 2017)。在第4天, 使用用相同构建体转导的 $20.2 \times 10^6$ 个V $\delta$ 1 CAR+细胞 (SEQ ID NO:10) 或 $1.9 \times 10^6$ 个 $\alpha$  $\beta$ T细胞治疗动物。在70天的时间段内监测动物的存活。图12。如图12所示, 引入的 $\gamma$   $\delta$ T细胞未引发GvHD反应。相反, 引入的 $\alpha$  $\beta$ T细胞引发GvHD反应。

**[0200] 实施例10**

[0201] 用Raji细胞 ( $1 \times 10^6$ /动物) 在右后侧皮下接种NSG小鼠。当肿瘤体积达到约 $100\text{mm}^3$ 时, 将小鼠随机化, 并用编码CD20 CAR或CD20 CAR和可溶性IL-15的 $5 \times 10^6$ 个V $\delta$ 1 CAR T细胞治疗。在整个研究过程中, 用IL-2 (60,000U/剂量, Peprotech, 3x周) 对动物进行同步给药。在第62天, 将来自没有可测量肿瘤的CD20+sIL15 CAR T组的四只动物用 $1 \times 10^6$ 个Raji细胞在相对 (左) 侧皮下再攻击。还包括对照组动物以证明肿瘤生长动力学。结果示出在图14中。如图14所示, 施用具有编码异源可溶性IL-15的核酸构建体的 $\gamma$   $\delta$ CAR-T细胞产生持续超过60天 (例如60至110天) 的持续抗肿瘤作用。

**[0202] 实施例11**

[0203] 在IL-2 (100U/mL) 存在的情况下, 将生长培养基中的 $1 \times 10^6$ /mL人PBMC在用抗V $\delta$ 1抗体D1-08或D1-35预涂布的24孔板 (Costar) 中活化5天。在第5天, 在纤维连接蛋白存在的情况下, 用编码BCMA嵌合抗原受体 (SEQ ID NO:35-38) 的 $\gamma$ -逆转录病毒构建体转导细胞培养物。在第6天, 将细胞返回到生长培养基中, 并根据需要用进料和IL-2置换进一步扩增。在

第17、18或19天,收获细胞,并使用AutoMACS®试剂盒(Miltenyi Biotec)耗竭剩余的 $\alpha\beta$ T细胞。通过FACS评估 $\gamma\delta$ 细胞群的纯度和转导效率(图15)。简而言之,通过将细胞与 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 的可溶性重组生物素化BCMA(Acro Biosystems)一起孵育,对CAR-T细胞进行染色。使用链霉亲和素-BV421以制造商建议的1:500稀释度进行结合的检测。平行地,未转导的细胞培养物以相同的方式扩增,而无需添加逆转录病毒上清液。将扩增的细胞在对BCMA阳性细胞系的体外细胞毒性测定中进行测试。如图16和图17所示,未转导的扩增的V $\delta$ 1细胞引发针对已知以不同程度表达BCMA的多发性骨髓瘤和伯基特淋巴瘤细胞系的一定程度的细胞毒性。通过引入BCMA CAR构建体来增强这种细胞毒性。通过在以指示的E/T比率共孵育18小时后添加发光底物D-荧光素(Perkin Elmer),在96孔板中通过总发光测量来确定细胞毒性。将BCMA阴性SCABER细胞系用作对照。

[0204] 实施例12

[0205] 将NCI-H929多发性骨髓瘤细胞( $1 \times 10^6$ /动物)皮下植入到NSG小鼠(Jackson Labs)中。当肿瘤达到约 $200\text{mm}^3$ 大小时,用 $5 \times 10^6$ 个V $\delta$ 1 BCMA CAR+细胞治疗动物,以比较16716P和16747P scFv衍生的CAR构建体在体内的功效。在整个研究过程中,每周3次用IL-2(13,000IU/剂量,Proleukin®)对动物进行同步给药。结果示出在图18中。如图19所示,抗BCMA CAR+细胞表现出稳健的体内肿瘤负荷控制。

[0206] \*\*\*

[0207] 前述内容仅说明本发明的原理。应理解,本领域技术人员将能够设计各种布置,这些布置尽管未在本文中明确描述或示出,但是它们体现本发明的原理并且包括在其精神和范围内。此外,本文所叙述的所有实施例和条件语言主要意图帮助读者理解本发明的原理和由发明人提供的促进技术的构想,并且应解释为不对此类具体叙述的实施例和条件构成限制。此外,本文中叙述本发明的原理和方面以及其具体实施例的所有陈述都意图涵盖其结构等效物和功能等效物两者。另外,意图是此类等效物包括目前已知的等效物和未来开发的等效物,即不管结构如何,开发的执行相同功能的任何元件。因此,本发明的范围不意图限于本文所示和描述的示例性方面。相反,本发明的范围和精神由所附权利要求体现。

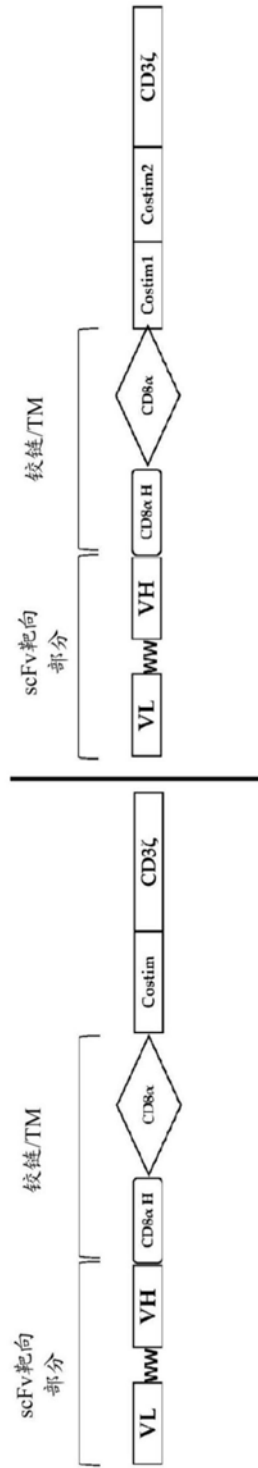


图1

从REGN收到的CD20结合物的VL和VH结构域序列

**3B9**  
**VH CDS**  
 GAAGTACAGCTGGTGGAGGCTGGTACAGCCCTGAGACTCCTGTTAGCCCTGGATTACCTTTAATGATTATGCCATGCTGGGTCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGC  
 CTGGAATGGGCTCAGATTATTAGTTGGAATAGTGATAGCATAGGCTATGCGACTCTGTGAAGGGCCGATTCCACATCTCCAGACAAACGCCAAAGAACTCCCTGTATCTGCAAAATGCACAGTCTGAGAGCTGA  
 GGACACGGCCCTGTATTACTGTGCAAAAGATAATCACATATGTTCCGGGAGTTATTACTACTACCAATACGGTATGACGCTGCGGGCCAAAGGGACCAAGGTCACCCGCTCCCTCAG  
**VH PEP**  
 EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCVASGFTFNDYAMHWVRQAPGKLEWVSIVSNDSIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMHSLRAEDTALYYCAKDNHYGSGSYYYQYGMVWVGQTTVTVSS  
**VK CDS**  
 GAAATAGTGATGACGAGTCTCCAGCCACCCTGTGTGTCTCCAGGGAAAGAGCCACCCTCTCTGCGAGGGCCAGTCAGAGGTGTTAGCAGCAACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCC  
 CGACTCCTCATCTATGTATACATCCACCAGGGCCACTGGTATCCAGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGACAGAGTTCACCTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTCAGTTTATTACTGTCAA  
 CAATATAAATAACTGGCCGCTCACTTCGCGGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAAAC  
**VK PEP**  
 EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLIYGTSTRATGIPARFSGSGSTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQYNWPLTFGGGTVKVEIK

**9C11**  
**VH CDS**  
 CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGACTCGGTCAAGCCCTGGAGGTCCTCTGTCAGGCTCTGGATTCACTTCAGTGACTCCTCTACATGACTTGGATCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGG  
 GCTGGAGTGGGTTTCATTTCATTAGTAGTAGTGAAGTACCATATATTATGACACTCTGTGAAGGGCCGATTCAACATTTCCAGGGACAACGTCAGAAAGTCAITGTATCTGCAGATGAACAGACTGAGAGCCCG  
 AGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAGAAGAAACAGGAAACTACGTTATAGGGTATGGACGCTCTGGGGCCAAAGGGACCAAGGTCACCCGCTCCCTCAG  
**VH PEP**  
 QVQLVESGGDSVKPQGSRLSCAAASGFTFDSYMTWIRQAPGKLEWVNFSSSGSTIYVADSVKGRFTISRDNVKSILYLMNRLRAEDTAVVYCAAREEPGNVYVGMVWVGQTTVTVSS  
**VK CDS**  
 GAAATTTGGTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTTTGTCTCCAGGGAAAGAGCCACCCTCTCTGCGAGGCAAGAGCTACTACCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAAACTGGCCAGGCTCCCA  
 GGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCGCTGGCATCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGCTGCGGACAGACTTCACTCTCACCATCAACAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGAGTTTATTACTGTCA  
 CTGCGTACCAACTGGATCACCTTCGGCCAAAGGGACACGACTGGAGATTAAAC  
**VK PEP**  
 EIVVTSQSPATLSLSPGERATLSCRSTQITTSYLAWVRQKPGQAPRLIYDASNRAAGIPARFSGSGSTDFLTINSLEPEDFAVYYCQLFTNWITFGGQTRLEIK

图2

从REGN收到的CD20结合物的VL和VH结构域序列

**3H7**  
**VH CDS**  
 GAAGTCAACTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTACAGCTGGCAGGTCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTTATGATATGCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAAGG  
 GCCTGGAGTGGGCTCAGGTATTAGTTGGAATAGTGTACATAGGCTIATGCGGACTCTGTGAAGGCGGATTCACCACTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCCCTGTATCTGCAAAATGAACAGTCTGAGA  
 GCTGAGGACACGGCCCTTGATTACTGTGCAAAAGATAACAGCTATGAAAGTTCTACTACGGTTTGGACGCTGGGGCCAAGGGACACCGGTACCCGTCCTCTCAG

**VH PEP**  
 EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFYDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGYIGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRATEDALVYCAKDNSYGFYVGLDWWGQGTITVTVSS

**VK CDS**  
 GAAATAGTATGAGGAGTCTCCAGCCACCTGTCTGTCTCCAGGGAAAGAACCCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAGCAGCAACTTAGCCTGGTACCTTCAGAAACCTGGCCAGGCTC  
 CCAGGCTCTCATATATGTGTCATCCAGGCCACTGTGTATCCAGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGCTGGGACAGAGTTCAITCTCACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACT  
 GTCAGCAGTATAATAAATGCGCCGATCACCTTCGCAAGGGACACGGCTGGAGATTAAC

**VK PEP**  
 EIVMTQSPATLSVSPGERITLSCRASQSVSSNLAWLQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGTEFLITISLQSEDFAVVYCOQYNNWPIITFGQGTRELEIK

**2B7**  
**VH CDS**  
 GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTCGAGATTIATACCATGCACTGGGTCCGGCAAGTCCAGGGAAG  
 GGCTGGAATGGTCTCAGGTATTAGTTGGAATAGTATTACATAGGCTATGCGGACTCTGTGAAGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCCCTGTATCTGCAAAATGAACAGTCTGAG  
 AGTTGAGGACACGGCCCTTGATTACTGTGCAAAAGCTCAGTGGACCTACAGGGACTACTTCTACGGAGTGGACGCTGGGGCCAAGGGACACCGGTACCCGTCCTCTCAG

**VH PEP**  
 EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFRDYMHWVRQPGKGLEWVSGISWNSDYIGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRVEDTALVYCAKLSGTYRDFYGVVDVWVGQGTITVTVSS

**VK CDS**  
 GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCTGTCTTTGTTCTCCAGGGAAAGAGCCGCCCTCTCCTGCAGGCCAGTCAAGTGTIAGCAACTTAGCCTGTGTACCACCAAGAAACCTGGCCAGGCTCC  
 CAGGCTCTCAITATGATGCAATCCAGGGCCACTGGCAITCCAGCCAGCGTTCAGTGGCAGTGGGCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAAGATTTTGCAGTTTATTACTG  
 TCAGCAGCGTAGCAACTGGCCGCTCACTTTCGGGGAGGGACCAAGGTGAGATCAGAC

**VK PEP**  
 EIVLTQSPATLSLSPGERAAALSCRASQSVSNLAWYQOKPGQAPRLLIYDASNRTGIPARFSGSGSDFTLTISLLEPEDFVYVYCOQRNSNWPIITFGGGTKVEIR

图2 (续)

用各种CD20 CAR构建体转导的V $\delta$ 1细胞诱导正常B细胞中的凋亡

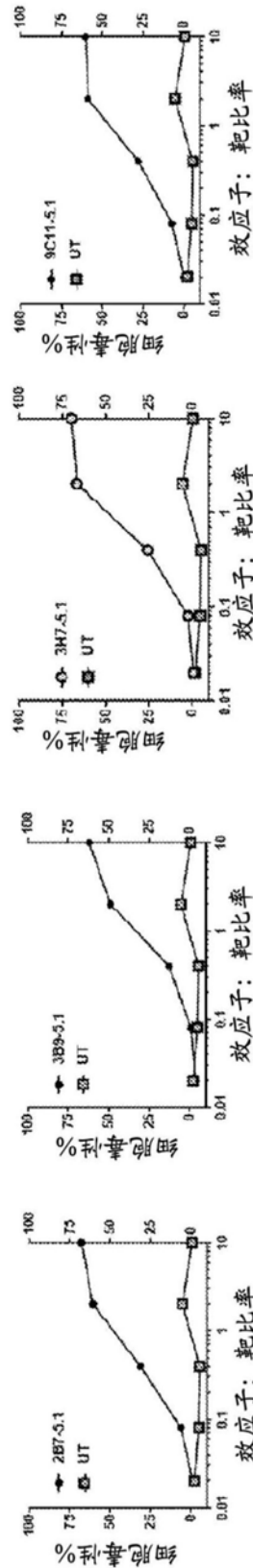


图3

CD20 CAR  $\gamma\delta$  T 细胞强杀伤淋巴瘤细胞系

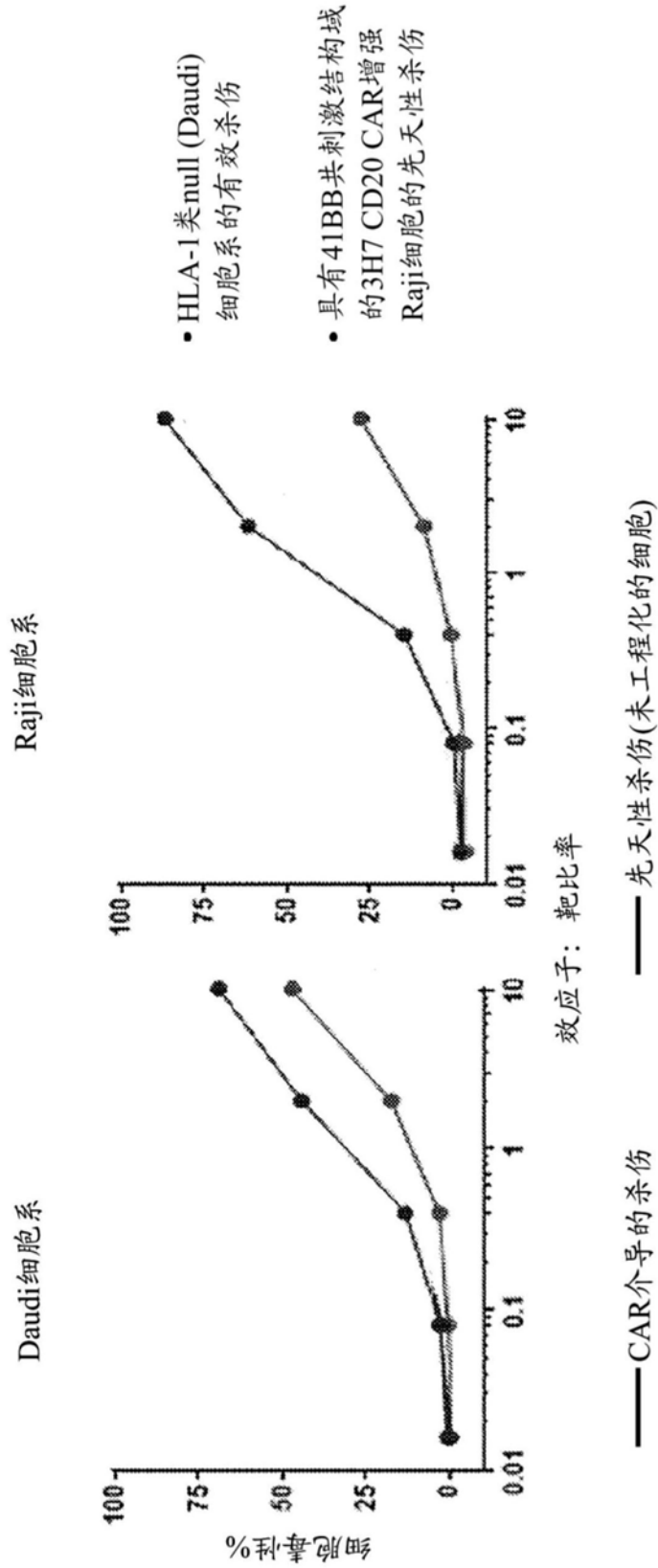


图4

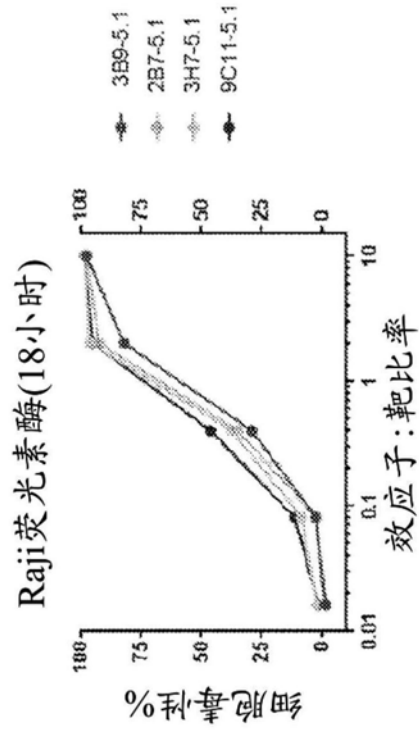


图5

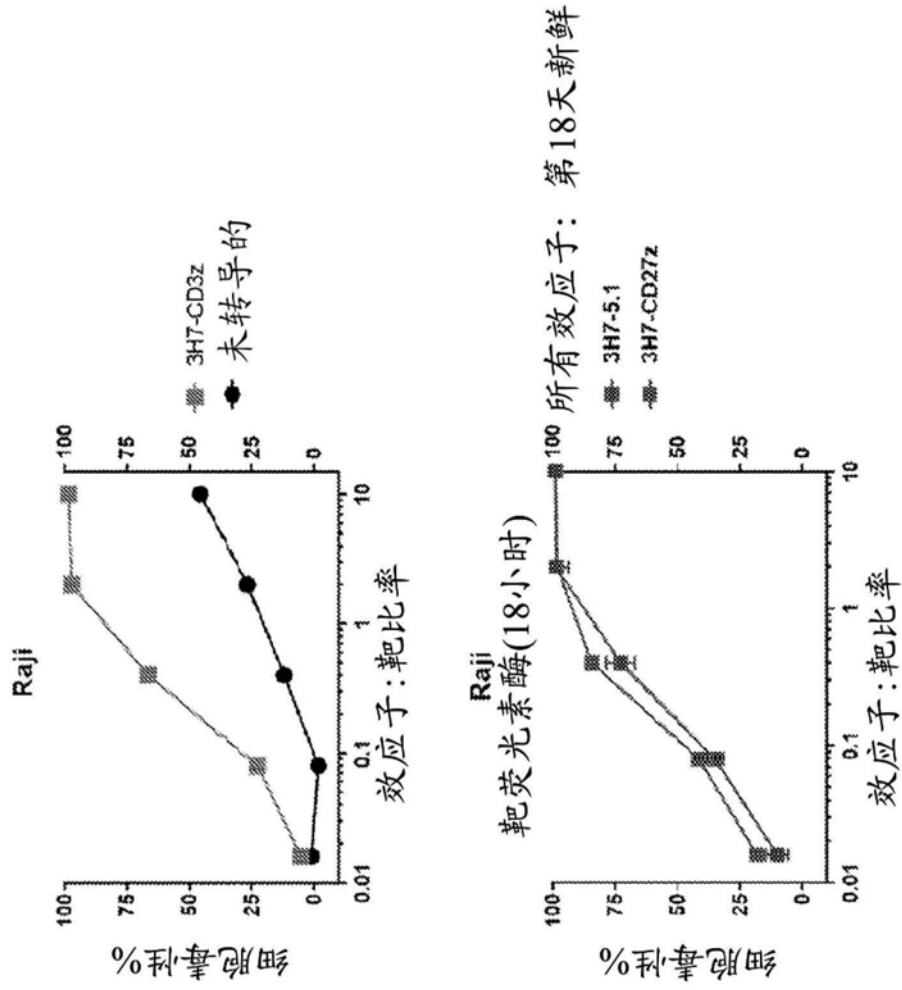


图6

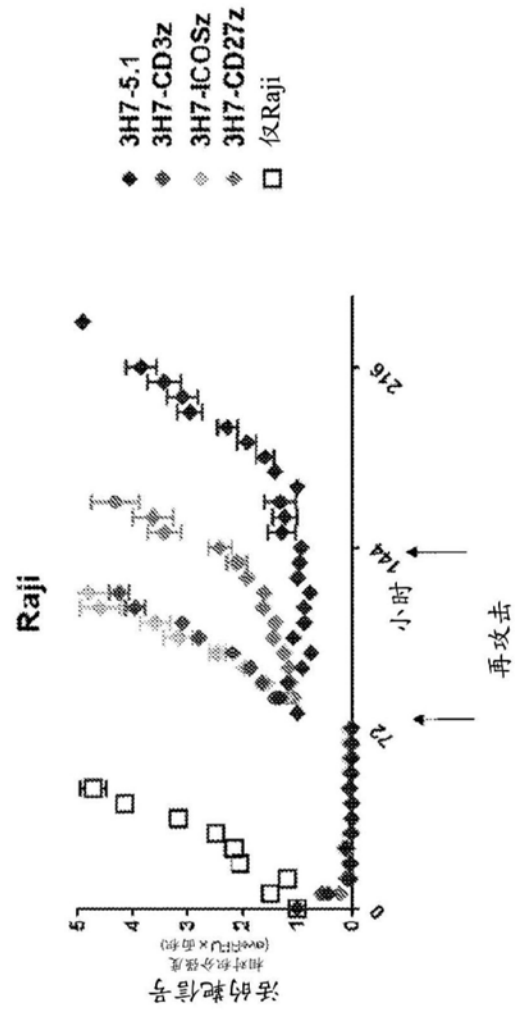


图7

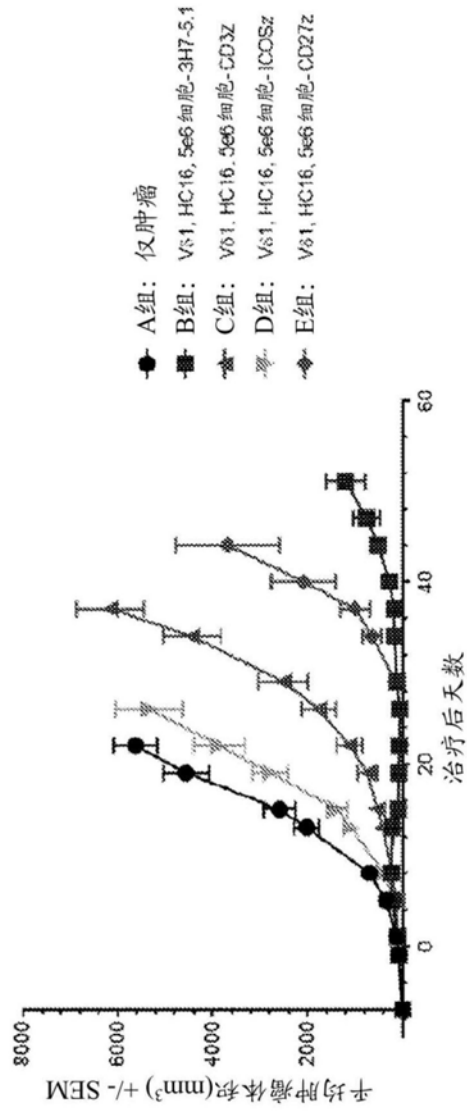


图8

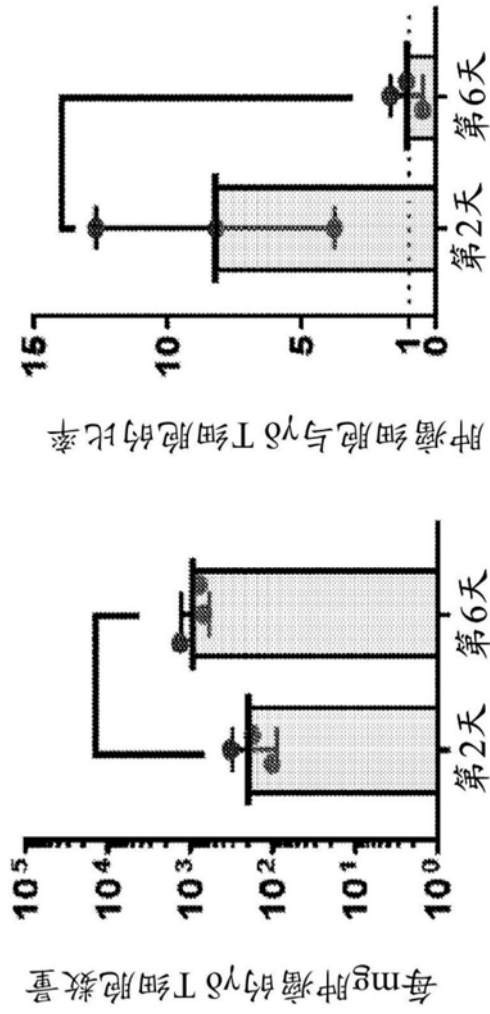


图9

$\gamma\delta$  T细胞响应于肿瘤而增殖

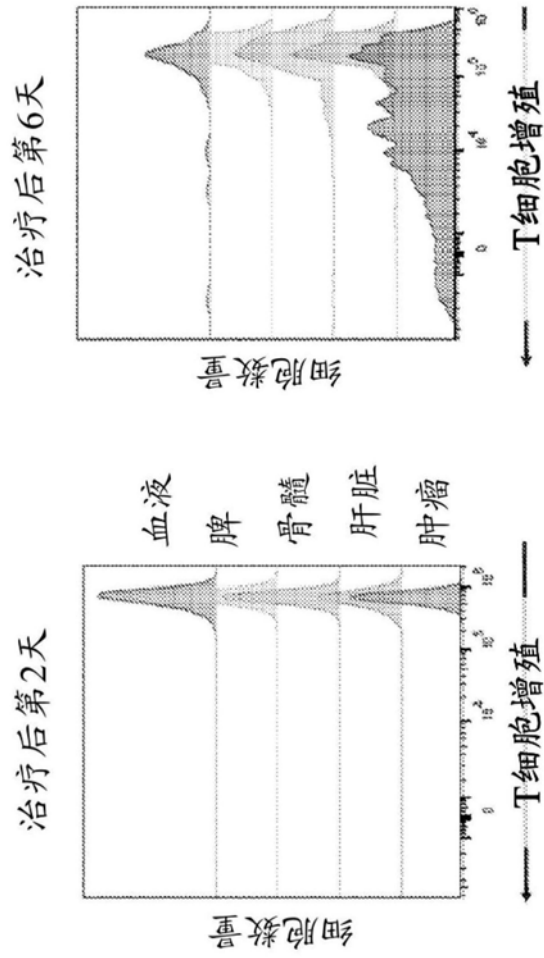


图10

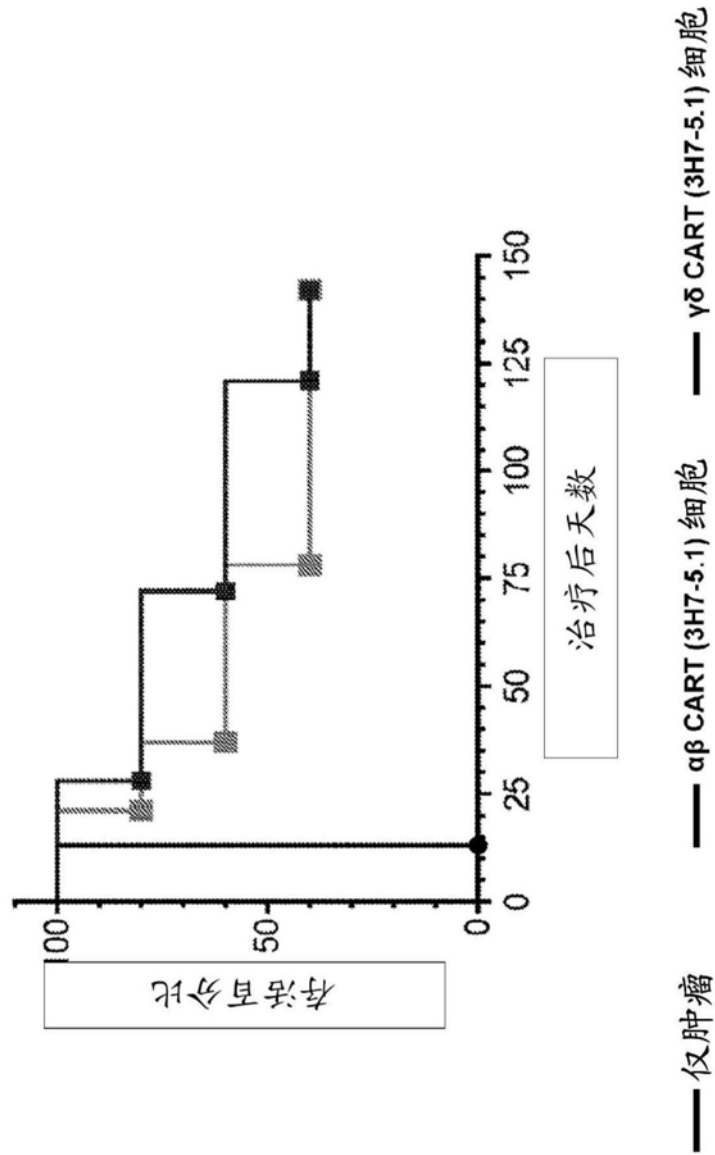


图11

- 由GvHD导致 $\alpha\beta$  CAR T细胞组死亡
- 用 $\gamma\delta$ 细胞治疗的小鼠中未观察到GvHD
- 3H7-5.1 CAR 构建设体

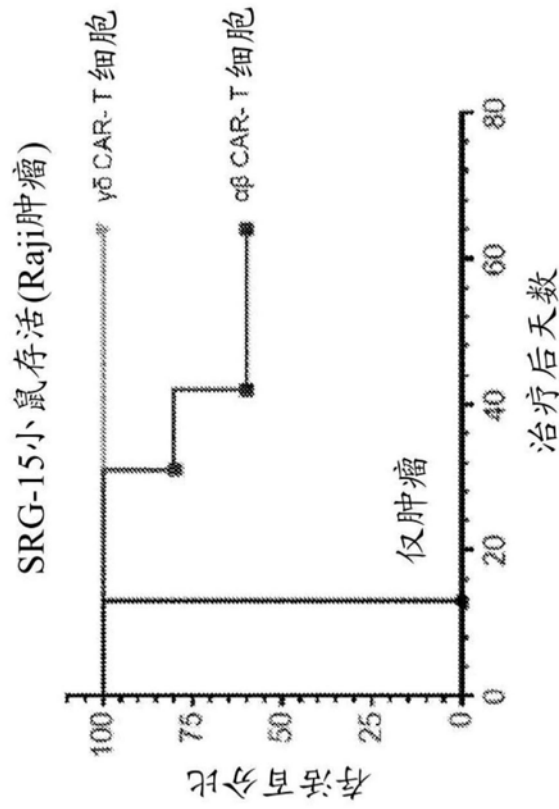


图12

γδ T细胞和CAR γδ T细胞制造工艺流程

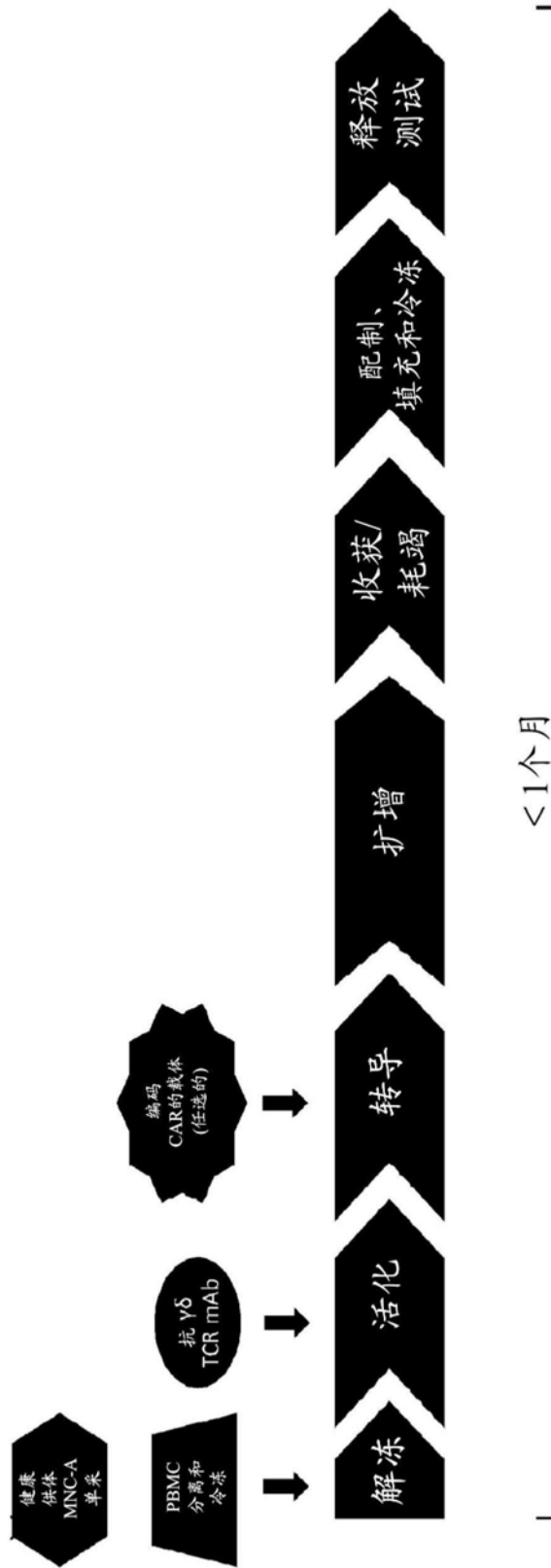


图13

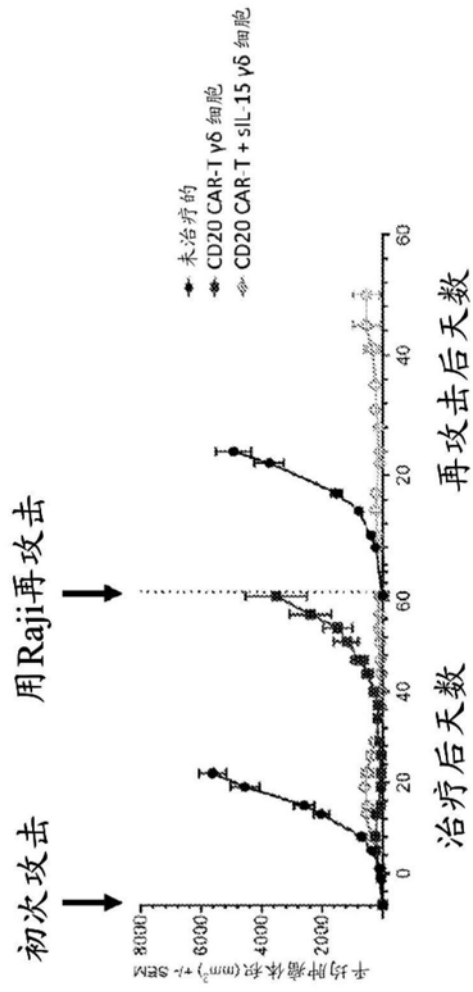


图14

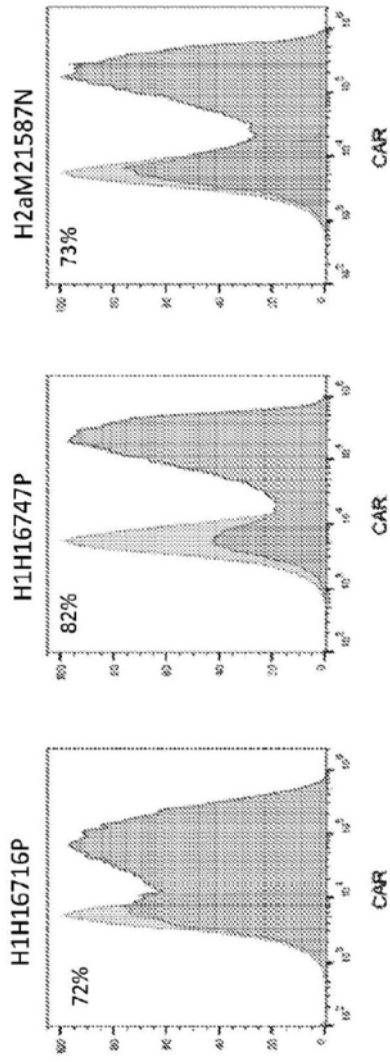


图15

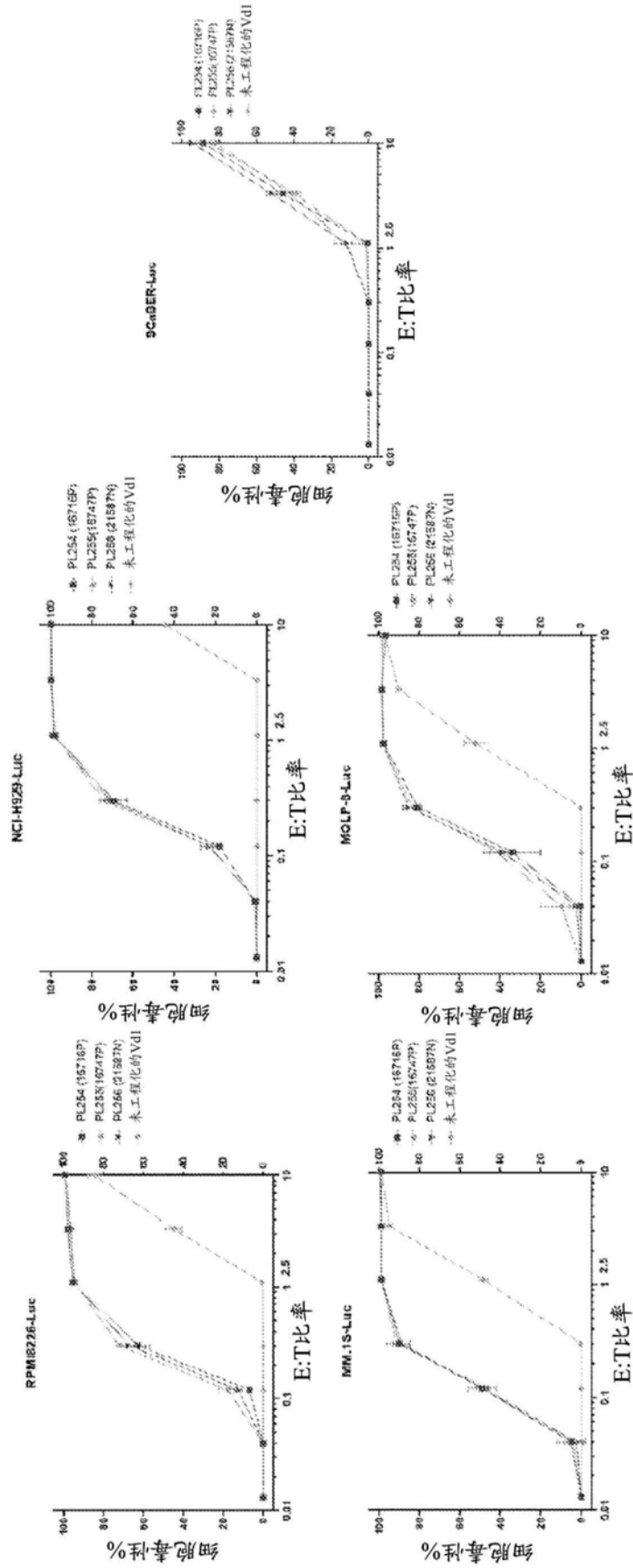


图16

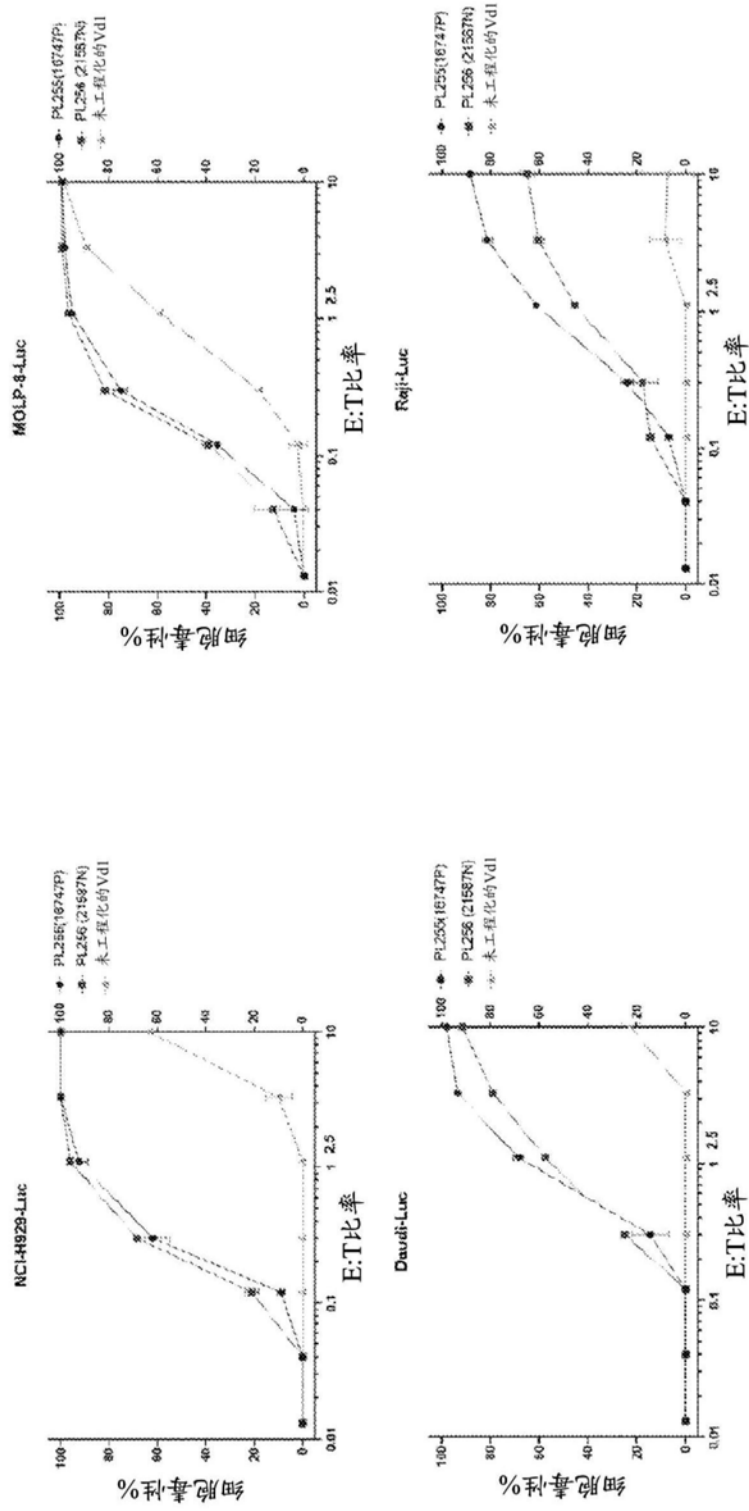


图17

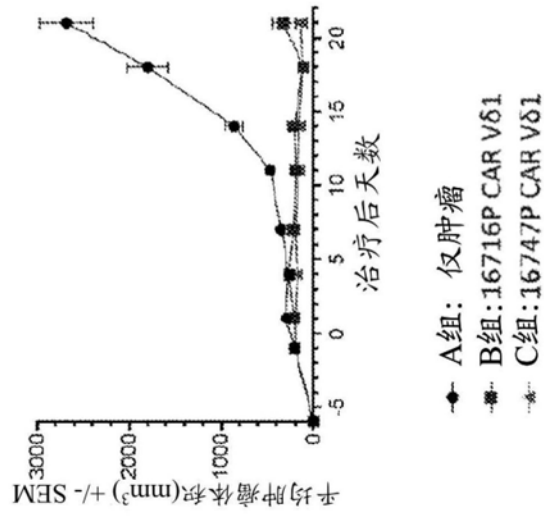


图18