202122575

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本　(11)公開編號：TW 202122575 A

(43)公開日：中華民國 110 (2021) 年 06 月 16 日

(21)申請案號：109129629　(22)申請日：中華民國 109 (2020) 年 08 月 28 日

(51)Int. Cl.：　*C12N5/0783 (2010.01)*　*C12N15/13 (2006.01)*

C12N15/62 (2006.01)　*A61K35/17 (2015.01)*

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2019/08/28　世界智慧財產權組織　PCT/CN2019/103041

2019/12/16　世界智慧財產權組織　PCT/CN2019/125681

(71)申請人：大陸商南京傳奇生物科技有限公司 (中國大陸) NANJING LEGEND BIOTECH CO., LTD.　(CN)

中國大陸

(72)發明人：范　曉虎 FAN, XIAOHU (CA)；趙云程 ZHAO, YUNCHENG (CN)；王冰 WANG, BING (CN)；俞大偉 YU, DAWEI (CN)；黃鑫 HUANG, XIN (CN)；王平豔 WANG, PINGYAN (CN)；莊秋傳 ZHUANG, QIUCHUAN (CN)

(74)代理人：葉璟宗；卓俊傑

申請實體審查：無　申請專利範圍項數：52 項　圖式數：19　共 389 頁

(54)名稱

工程化的T細胞及其產生方法

(57)摘要

本申請案提供修飾的 T 細胞，其包含：功能性外源受體，所述功能性外源受體包含：(a) 細胞外配體結合結構域，(b) 跨膜結構域，以及 (c) 包含嵌合信號傳導結構域（CMSD）的細胞內信號傳導結構域（ISD），其中所述 CMSD 包含任選地通過一個或多個連接子連接的多個免疫受體酪胺酸啟動基序（ITAM）。還提供其載體、產生方法、醫藥組合物、套組和治療方法。

The present application provides a modified T cell comprising: a functional exogenous receptor comprising: (a) an extracellular ligand binding domain, (b) a transmembrane domain, and (c) an intracellular signaling domain (ISD) comprising a chimeric signaling domain (CMSD), wherein the CMSD comprises a plurality of Immune-receptor Tyrosine-based Activation Motifs (ITAMs) optionally connected by one or more linkers. Further provided are vectors, methods of producing, pharmaceutical compositions, kits, and methods of treatment thereof.

202122575

202122575

【發明摘要】

【中文發明名稱】工程化的T細胞及其產生方法

【英文發明名稱】ENGINEERED T CELLS AND METHODS OF PRODUCING THEREOF

【中文】本申請案提供修飾的T細胞，其包含：功能性外源受體，所述功能性外源受體包含：(a) 細胞外配體結合結構域，(b) 跨膜結構域，以及 (c) 包含嵌合信號傳導結構域（CMSD）的細胞內信號傳導結構域（ISD），其中所述CMSD包含任選地通過一個或多個連接子連接的多個免疫受體酪胺酸啟動基序（ITAM）。還提供其載體、產生方法、醫藥組合物、套組和治療方法。

【英文】The present application provides a modified T cell comprising: a functional exogenous receptor comprising: (a) an extracellular ligand binding domain, (b) a transmembrane domain, and (c) an intracellular signaling domain (ISD) comprising a chimeric signaling domain (CMSD), wherein the CMSD comprises a plurality of Immune-receptor Tyrosine-based Activation Motifs (ITAMs) optionally connected by one or more linkers. Further provided are vectors, methods of producing, pharmaceutical compositions, kits, and methods of treatment thereof.

【指定代表圖】無。

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】工程化的T細胞及其產生方法

【英文發明名稱】ENGINEERED T CELLS AND METHODS OF PRODUCING THEREOF

【技術領域】

【0001】 [相關申請案的交叉引用]

【0002】 本申請案要求 2019 年 8 月 28 日提交的國際專利申請案號 PCT/CN2019/103041 和 2019 年 12 月 16 日提交的 PCT/CN2019/125681 的優先權權益，所述申請案各自的內容通過引用以其整體併入本文。

【0003】 [ASCII 文字檔序列表的提交]

【0004】 將以下提交的 ASCII 文字檔的內容通過引用以其整體併入本文：序列表的電腦可讀形式（CRF）（檔案名稱：761422002042ITAMSEQLIST.TXT，記錄日期：2020 年 8 月 28 日，大小：221 KB）。

【0005】 本申請案涉及包含嵌合信號傳導結構域（CMSD）的功能性外源受體和含有這種功能性外源受體的 T 細胞。

【先前技術】

【0006】 CAR-T 細胞療法利用攜載特異性識別靶抗原（例如，腫瘤抗原）的工程化受體的遺傳修飾的 T 細胞將 T 細胞引導至腫瘤部

位。所述療法已經在治療血液癌症和多發性骨髓瘤（MM）中顯示有前景的結果。CAR 通常包含細胞外配體結合結構域、跨膜（TM）結構域和細胞內信號傳導結構域（ISD）。細胞外配體結合結構域可以包含靶向期望的靶抗原（例如，腫瘤抗原）的抗原結合片段（例如，單鏈可變片段，scFv）。在與靶抗原結合後，CAR 可以啟動 T 細胞，從而在不受對靶抗原具有特異性的主要組織相容性複合物（MHC）的可用性的限制的情況下，以抗原依賴性方式發動通過 ISD 介導的特異性抗靶標（例如，腫瘤）反應（例如，經由 CD3ζ ISD 的啟動信號，其類比 TCR 信號傳輸）。

【0007】 免疫受體酪胺酸啟動基序（ITAM）位於多種細胞表面受體或與其締合的亞基的胞質結構域中，並且在信號傳輸中具有重要的調節作用。例如，在 TCR 連接後，TCR 複合物的 ITAM 的磷酸化產生停泊位點以募集啟動信號傳導級聯必需的分子，從而導致 T 細胞啟動和分化。ITAM 功能並不限於 T 細胞，因為 B 細胞受體的組分（BCR、CD79a/Igα 和 CD79b/Igβ）、所選自然殺傷（NK）細胞受體（DAP-12）和特定 FcεR 都需要 ITAM 來傳送細胞內信號。迄今為止，大多數臨床研究使用 CD3ζ 作為 CAR 的主要 ISD，但是已經報導其作為信號傳導結構域的限制。表現分析鑒定包含完整 CD3ζ ISD 的第二代抗 CD19 CAR 對與炎症、細胞因數和趨化因數活性相關的基因集的顯著上調，並且還觀察到增強的效應子分化（Feucht, J 等人, 2019）。還發現 CD3ζ ISD 促進成熟 T 細胞凋亡（Combadiere, B 等人, 1996）。此外，在一些情況下，CAR-T 免疫

療法相關的細胞因數釋放症候群（CRS）可能限制其臨床實現。

【0008】 由於個體差異，自體 CAR-T 或 TCR-T 療法（使用患者自身的 T 細胞）在製造和標準化中呈現顯著挑戰，製造和治療的成本極其昂貴。另外，癌症患者通常免疫功能較低，其淋巴細胞數量降低，免疫活性較低，並且難以在體外擴增。通用同種異體 CAR-T 或 TCR-T 療法被視為理想的模型，其 T 細胞源自健康供體。然而，關鍵挑戰是如何有效地消除在治療期間由於組織不相容性所致的移植物抗宿主病（GvHD）。TCR 是細胞表面受體，其參與回應於抗原呈遞的 T 細胞啟動。人體中 95%的 T 細胞具有由阿爾法（α）鏈和貝塔（β）鏈組成的 TCR。TCRα 和 TCRβ 鏈組合形成異二聚體，並與 CD3 亞基締合以形成存在於細胞表面上的 TCR 複合物。在供體的 T 細胞經由 TCR 識別非自身 MHC 分子並且察覺宿主（移植物接受者）組織在抗原性上是外來的並攻擊所述組織時，發生 GvHD。為了從供體 T 細胞消除內源 TCR 從而預防 GvHD，人們已經使用基因編輯技術（如鋅指核酸酶（ZFN）、轉錄啟動因數樣效應物核酸酶（TALEN）和規律間隔成簇短回文重複序列（CRISPR）-CRISPR 相關（Cas）（CRISPR/Cas）進行內源 TCRα 或 TCRβ 基因敲除（KO），然後富集 TCR 陰性 T 細胞用於同種異體 CAR-T 或 TCR-T 產生。然而，TCR 缺失可導致受損的 CD3 下游信號轉導途徑，並影響 T 細胞擴增。

【0009】 本文提及的所有出版物、專利、專利申請案和公開的專利申請案的公開內容都通過引用以其整體特此併入本文。

【發明內容】

【0010】 本發明在一方面提供修飾的 T 細胞（例如，同種異體 T 細胞），其包含：功能性外源受體，所述功能性外源受體包含：(a) 細胞外配體結合結構域，(b) 跨膜結構域（例如，源自 CD8α），以及 (c) 包含嵌合信號傳導結構域（CMSD）的細胞內信號傳導結構域（ISD），其中 CMSD 包含一個或多個 ITAM（「CMSD ITAM」），其中所述多個 CMSD ITAM 任選地通過一個或多個連接子（「CMSD 連接子」）連接。在一些實施例中，CMSD 包含一種或多種選自以下的特徵：(a) 多個（例如，2、3、4 或更多個）CMSD ITAM 彼此直接連接；(b) CMSD 包含通過並非源自含有 ITAM 的親本分子的一個或多個連接子（例如，G/S 連接子）連接的兩個或更多個（例如，2、3、4 或更多個）CMSD ITAM；(c) CMSD 包含源自含有 ITAM 的親本分子的一個或多個 CMSD 連接子，所述含有 ITAM 的親本分子與衍生出一個或多個所述 CMSD ITAM 的含有 ITAM 的親本分子不同；(d) CMSD 包含兩個或更多個（例如，2、3、4 或更多個）相同的 CMSD ITAM；(e) 所述 CMSD ITAM 中的至少一個並非源自 CD3ζ；(f) 所述 CMSD ITAM 中的至少一個並非 CD3ζ 的 ITAM1 或 ITAM2；(g) 所述多個 CMSD ITAM 各自源自不同的含有 ITAM 的親本分子；和/或 (h) 所述 CMSD ITAM 中的至少一個源自選自以下的含有 ITAM 的親本分子：CD3ε、CD3δ、CD3γ、Igα（CD79a）、Igβ（CD79b）、FcεRIβ、FcεRIγ、DAP12、

CNAIP/NFAM1、STAM-1、STAM-2 和膜突蛋白。在一些實施例中，CMSD 基本上由一個 CMSD ITAM 組成（例如，由其組成）。在一些實施例中，CMSD 基本上由一個 CMSD ITAM 以及對於含有 ITAM 的親本分子是異源的 CMSD N 末端序列和/或 CMSD C 末端序列（例如，G/S 連接子）組成（例如，由其組成）。在一些實施例中，多個（例如，2、3、4 或更多個）CMSD ITAM 彼此直接連接。在一些實施例中，CMSD 包含通過並非源自含有 ITAM 的親本分子的一個或多個連接子（例如，G/S 連接子）連接的兩個或更多個（例如，2、3、4 或更多個）CMSD ITAM。在一些實施例中，CMSD 包含源自含有 ITAM 的親本分子的一個或多個 CMSD 連接子，所述含有 ITAM 的親本分子與衍生出一個或多個所述 CMSD ITAM 的含有 ITAM 的親本分子不同。在一些實施例中，CMSD 包含兩個或更多個（例如，2、3、4 或更多個）相同的 CMSD ITAM。在一些實施例中，所述 CMSD ITAM 中的至少一個並非源自 CD3ζ。在一些實施例中，所述 CMSD ITAM 中的至少一個並非 CD3ζ 的 ITAM1 或 ITAM2。在一些實施例中，所述多個 CMSD ITAM 各自源自不同的含有 ITAM 的親本分子。在一些實施例中，所述 CMSD ITAM 中的至少一個源自選自以下的含有 ITAM 的親本分子：CD3ε、CD3δ、CD3γ、Igα（CD79a）、Igβ（CD79b）、FcεRIβ、FcεRIγ、DAP12、CNAIP/NFAM1、STAM-1、STAM-2 和膜突蛋白。

【0011】 在根據任何一種上述修飾的 T 細胞的一些實施例中，所述多個 CMSD ITAM 中的至少一個源自選自以下的含有 ITAM 的親

本分子：CD3ε、CD3δ、CD3γ、CD3ζ、Igα（CD79a）、Igβ（CD79b）、FcεRIβ、FcεRIγ、DAP12、CNAIP/NFAM1、STAM-1、STAM-2 和膜突蛋白。在一些實施例中，CMSD 不包含 CD3ζ 的 ITAM1 和/或 ITAM2。在一些實施例中，CMSD 包含 CD3ζ 的 ITAM3。在一些實施例中，所述 CMSD ITAM 中的至少兩個源自相同的含有 ITAM 的親本分子。在一些實施例中，所述 CMSD ITAM 中的至少兩個彼此不同。在一些實施例中，所述 CMSD 連接子中的至少一個源自 CD3ζ。在一些實施例中，所述 CMSD 連接子中的至少一個對於含有 ITAM 的親本分子是異源的。在一些實施例中，異源 CMSD 連接子選自 SEQ ID NO: 17-39 和 116-120，如 SEQ ID NO: 17-31 中的任一個。在一些實施例中，異源 CMSD 連接子是 G/S 連接子。在一些實施例中，CMSD 包含兩個或更多個異源 CMSD 連接子。在一些實施例中，所述兩個或更多個異源 CMSD 連接子序列彼此相同。在一些實施例中，所述兩個或更多個異源 CMSD 連接子序列彼此不同。在一些實施例中，CMSD 連接子序列的長度是約 1 至約 15 個胺基酸。

【0012】 在根據任何上述修飾的 T 細胞的一些實施例中，CMSD 還包含在最 C 末端 ITAM 的 C 末端處的 CMSD C 末端序列。在一些實施例中，CMSD C 末端序列源自 CD3ζ。在一些實施例中，CMSD C 末端序列對於含有 ITAM 的親本分子是異源的。在一些實施例中，CMSD C 末端序列選自 SEQ ID NO: 17-39 和 116-120，如 SEQ ID NO: 17-31 中的任一個。在一些實施例中，CMSD C 末端

序列的長度是約 1 至約 15 個胺基酸。

【0013】 在根據任何上述修飾的 T 細胞的一些實施例中，CMSD 還包含在最 N 末端 ITAM 的 N 末端處的 CMSD N 末端序列。在一些實施例中，CMSD N 末端序列源自 CD3ζ。在一些實施例中，CMSD N 末端序列對於含有 ITAM 的親本分子是異源的。在一些實施例中，CMSD N 末端序列選自 SEQ ID NO: 17-39 和 116-120，如 SEQ ID NO: 17-31 中的任一個。在一些實施例中，CMSD N 末端序列的長度是約 1 至約 15 個胺基酸。

【0014】 在根據任何上述修飾的 T 細胞的一些實施例中，CMSD 從 N 末端至 C 末端包含：任選的 CMSD N 末端序列 - CD3ζ ITAM1 - 任選的第一 CMSD 連接子 - CD3ζ ITAM2 - 任選的第二 CMSD 連接子 - CD3ζ ITAM3 - 任選的 CMSD C 末端序列。在一些實施例中，CMSD 包含 SEQ ID NO: 41 或 54 的序列。

【0015】 在根據任何上述修飾的 T 細胞的一些實施例中，CMSD 從 N 末端至 C 末端包含：任選的 CMSD N 末端序列 - CD3ζ ITAM1 - 任選的第一 CMSD 連接子 - CD3ζ ITAM1 - 任選的第二 CMSD 連接子 - CD3ζ ITAM1 - 任選的 CMSD C 末端序列。在一些實施例中，CMSD 包含 SEQ ID NO: 42 或 55 的序列。

【0016】 在根據任何上述修飾的 T 細胞的一些實施例中，CMSD 從 N 末端至 C 末端包含：任選的 CMSD N 末端序列 - CD3ζ ITAM2 - 任選的第一 CMSD 連接子 - CD3ζ ITAM2 - 任選的第二 CMSD 連接子 - CD3ζ ITAM2 - 任選的 CMSD C 末端序列。在一些實施

例中，CMSD 包含 SEQ ID NO: 43 的序列。

【0017】 在根據任何上述修飾的 T 細胞的一些實施例中，CMSD 從 N 末端至 C 末端包含：任選的 CMSD N 末端序列 - CD3ζ ITAM3 - 任選的第一 CMSD 連接子 - CD3ζ ITAM3 - 任選的第二 CMSD 連接子 - CD3ζ ITAM3 - 任選的 CMSD C 末端序列。在一些實施例中，CMSD 包含 SEQ ID NO: 44 的序列。

【0018】 在根據任何上述修飾的 T 細胞的一些實施例中，CMSD 從 N 末端至 C 末端包含：任選的 CMSD N 末端序列 - CD3ε ITAM - 任選的第一 CMSD 連接子 - CD3ε ITAM - 任選的第二 CMSD 連接子 - CD3ε ITAM - 任選的 CMSD C 末端序列。在一些實施例中，CMSD 包含 SEQ ID NO: 46 或 56 的序列。

【0019】 在根據任何上述修飾的 T 細胞的一些實施例中，CMSD 從 N 末端至 C 末端包含：任選的 CMSD N 末端序列 - DAP12 ITAM - 任選的第一 CMSD 連接子 - DAP12 ITAM - 任選的第二 CMSD 連接子 - DAP12 ITAM - 任選的 CMSD C 末端序列。在一些實施例中，CMSD 包含 SEQ ID NO: 48 的序列。

【0020】 在根據任何上述修飾的 T 細胞的一些實施例中，CMSD 從 N 末端至 C 末端包含：任選的 CMSD N 末端序列 - Igα ITAM - 任選的第一 CMSD 連接子 - Igα ITAM - 任選的第二 CMSD 連接子 - Igα ITAM - 任選的 CMSD C 末端序列。在一些實施例中，CMSD 包含 SEQ ID NO: 49 的序列。

【0021】 在根據任何上述修飾的 T 細胞的一些實施例中，CMSD

從 N 末端至 C 末端包含：任選的 CMSD N 末端序列 - Igβ ITAM - 任選的第一 CMSD 連接子 - Igβ ITAM - 任選的第二 CMSD 連接子 - Igβ ITAM - 任選的 CMSD C 末端序列。在一些實施例中，CMSD 包含 SEQ ID NO: 50 的序列。

【0022】 在根據任何上述修飾的 T 細胞的一些實施例中，CMSD 從 N 末端至 C 末端包含：任選的 CMSD N 末端序列 - FcεRIγ ITAM - 任選的第一 CMSD 連接子 - FcεRIγ ITAM - 任選的第二 CMSD 連接子 - FcεRIγ ITAM - 任選的 CMSD C 末端序列。在一些實施例中，CMSD 包含 SEQ ID NO: 52 的序列。

【0023】 在根據任何上述修飾的 T 細胞的一些實施例中，CMSD 從 N 末端至 C 末端包含：任選的 CMSD N 末端序列 - CD3δ ITAM - 任選的第一 CMSD 連接子 - CD3ε ITAM - 任選的第二 CMSD 連接子 - CD3γ ITAM - 任選的第三 CMSD 連接子 - DAP12 ITAM - 任選的 CMSD C 末端序列。在一些實施例中，CMSD 包含 SEQ ID NO: 57 的序列。

【0024】 在根據任何上述修飾的 T 細胞的一些實施例中，CMSD 從 N 末端至 C 末端包含：任選的 CMSD N 末端序列 - CD3δ ITAM - 任選的第一 CMSD 連接子 - CD3δ ITAM - 任選的第二 CMSD 連接子 - CD3δ ITAM - 任選的 CMSD C 末端序列。在一些實施例中，CMSD 包含 SEQ ID NO: 45 的序列。

【0025】 在根據任何上述修飾的 T 細胞的一些實施例中，CMSD 從 N 末端至 C 末端包含：任選的 CMSD N 末端序列 - CD3γ ITAM

- 任選的第一 CMSD 連接子 - CD3γ ITAM - 任選的第二 CMSD 連接子 - CD3γ ITAM - 任選的 CMSD C 末端序列。在一些實施例中，CMSD 包含 SEQ ID NO: 47 的序列。

【0026】 在根據任何上述修飾的 T 細胞的一些實施例中，CMSD 從 N 末端至 C 末端包含：任選的 CMSD N 末端序列 - FcεRIβ ITAM - 任選的第一 CMSD 連接子 - FcεRIβ ITAM - 任選的第二 CMSD 連接子 - FcεRIβ ITAM - 任選的 CMSD C 末端序列。在一些實施例中，CMSD 包含 SEQ ID NO: 51 的序列。

【0027】 在根據任何上述修飾的 T 細胞的一些實施例中，CMSD 從 N 末端至 C 末端包含：任選的 CMSD N 末端序列 - CNAIP/NFAM1 ITAM - 任選的第一 CMSD 連接子 - CNAIP/NFAM1 ITAM - 任選的第二 CMSD 連接子 - CNAIP/NFAM1 ITAM - 任選的 CMSD C 末端序列。在一些實施例中，CMSD 包含 SEQ ID NO: 53 的序列。

【0028】 在根據任何上述修飾的 T 細胞的一些實施例中，CMSD 從 N 末端至 C 末端包含：任選的 CMSD N 末端序列 - CD3ε ITAM - 任選的第一 CMSD 連接子 - CD3δ ITAM - 任選的第二 CMSD 連接子 - DAP12 ITAM - 任選的第三 CMSD 連接子 - CD3γ ITAM - 任選的 CMSD C 末端序列。在一些實施例中，CMSD 包含 SEQ ID NO: 64 的序列。

【0029】 在根據任何上述修飾的 T 細胞的一些實施例中，CMSD 從 N 末端至 C 末端包含：任選的 CMSD N 末端序列 - CD3γ ITAM

- 任選的第一 CMSD 連接子 - DAP12 ITAM - 任選的第二 CMSD 連接子 - CD3δ ITAM - 任選的第三 CMSD 連接子 - CD3ε ITAM - 任選的 CMSD C 末端序列。在一些實施例中，CMSD 包含 SEQ ID NO: 65 的序列。

【0030】 在根據任何上述修飾的 T 細胞的一些實施例中，CMSD 從 N 末端至 C 末端包含：任選的 CMSD N 末端序列 - DAP12 ITAM - 任選的第一 CMSD 連接子 - CD3γ ITAM - 任選的第二 CMSD 連接子 - CD3ε ITAM - 任選的第三 CMSD 連接子 - CD3δ ITAM - 任選的 CMSD C 末端序列。在一些實施例中，CMSD 包含 SEQ ID NO: 66 的序列。

【0031】 在根據任何上述修飾的 T 細胞的一些實施例中，CMSD 從 N 末端至 C 末端包含：任選的 CMSD N 末端序列 - CD3δ ITAM - 任選的第一 CMSD 連接子 - CD3ε ITAM - 任選的 CMSD C 末端序列。在一些實施例中，CMSD 包含 SEQ ID NO: 69 的序列。

【0032】 在根據任何上述修飾的 T 細胞的一些實施例中，CMSD 從 N 末端至 C 末端包含：任選的 CMSD N 末端序列 - CD3γ ITAM - 任選的第一 CMSD 連接子 - DAP12 ITAM - 任選的 CMSD C 末端序列。在一些實施例中，CMSD 包含 SEQ ID NO: 70 的序列。

【0033】 在根據任何上述修飾的 T 細胞的一些實施例中，CMSD 從 N 末端至 C 末端包含：任選的 CMSD N 末端序列 - CD3δ ITAM - 任選的第一 CMSD 連接子 - CD3ε ITAM - 任選的第二 CMSD 連接子 - CD3ε ITAM - 任選的 CMSD C 末端序列。在一些實施例

中，CMSD 包含 SEQ ID NO: 71 的序列。

【0034】 在根據任何上述修飾的 T 細胞的一些實施例中，CMSD 從 N 末端至 C 末端包含：任選的 CMSD N 末端序列 - CD3δ ITAM - 任選的第一 CMSD 連接子 - CD3ε ITAM - 任選的第二 CMSD 連接子 - CD3γ ITAM - 任選的 CMSD C 末端序列。在一些實施例中，CMSD 包含 SEQ ID NO: 72 的序列。

【0035】 在根據任何上述修飾的 T 細胞的一些實施例中，CMSD 從 N 末端至 C 末端包含：任選的 CMSD N 末端序列 - DAP12 ITAM - 任選的第一 CMSD 連接子 - CD3ε ITAM - 任選的第二 CMSD 連接子 - CD3δ ITAM - 任選的 CMSD C 末端序列。在一些實施例中，CMSD 包含 SEQ ID NO: 73 的序列。

【0036】 在根據任何上述修飾的 T 細胞的一些實施例中，CMSD 從 N 末端至 C 末端包含：任選的 CMSD N 末端序列 - DAP12 ITAM - 任選的第一 CMSD 連接子 - CD3δ ITAM - 任選的第二 CMSD 連接子 - CD3ε ITAM - 任選的 CMSD C 末端序列。在一些實施例中，CMSD 包含 SEQ ID NO: 74 的序列。

【0037】 在根據任何上述修飾的 T 細胞的一些實施例中，CMSD 從 N 末端至 C 末端包含：任選的 CMSD N 末端序列 - CD3ε ITAM - 任選的 CMSD C 末端序列。在一些實施例中，CMSD 包含 SEQ ID NO: 67 的序列。

【0038】 在根據任何上述修飾的 T 細胞的一些實施例中，CMSD 從 N 末端至 C 末端包含：任選的 CMSD N 末端序列 - CD3δ ITAM

- 任選的 CMSD C 末端序列。在一些實施例中，CMSD 包含 SEQ ID NO: 68 的序列。

【0039】 在根據任何上述修飾的 T 細胞的一些實施例中，CMSD 從 N 末端至 C 末端包含：任選的 CMSD N 末端序列 - CD3δ ITAM - 任選的第一 CMSD 連接子 - CD3ε ITAM - 任選的第二 CMSD 連接子 - CD3γ ITAM - 任選的第三 CMSD 連接子 - DAP12 ITAM - 任選的 CMSD C 末端序列。在一些實施例中，CMSD 包含 SEQ ID NO: 58-63 中任一個的序列。

【0040】 在根據任何上述修飾的 T 細胞的一些實施例中，功能性外源受體是 ITAM 修飾的 T 細胞受體（TCR）、ITAM 修飾的嵌合抗原受體（CAR）、ITAM 修飾的嵌合 TCR（cTCR）、或 ITAM 修飾的 T 細胞抗原偶聯劑（TAC）樣嵌合受體。

【0041】 在根據任何上述修飾的 T 細胞的一些實施例中，功能性外源受體是 ITAM 修飾的 CAR。在一些實施例中，跨膜結構域源自 CD8α。在一些實施例中，ISD 還包含共刺激信號傳導結構域。在一些實施例中，共刺激信號傳導結構域源自 4-1BB 或 CD28。在一些實施例中，共刺激信號傳導結構域包含 SEQ ID NO: 124 的胺基酸序列。在一些實施例中，共刺激結構域位於 CMSD 的 N 末端。在一些實施例中，共刺激結構域位於 CMSD 的 C 末端。

【0042】 在根據任何上述修飾的 T 細胞的一些實施例中，功能性外源受體是 ITAM 修飾的 cTCR。在一些實施例中，ITAM 修飾的 cTCR 包含：(a) 細胞外配體結合結構域（如特異性識別一種或多

種靶抗原（例如，腫瘤抗原，如 BCMA、CD19、CD20）的一個或多個表位的抗原結合片段（例如，scFv、sdAb）、受體（例如，FcR）的細胞外結構域（或其部分）、配體（例如，APRIL、BAFF）的細胞外結構域（或其部分）），(b) 任選的受體結構域連接子，(c) 任選的第一 TCR 亞基（例如，CD3ε）的細胞外結構域或其部分，(d) 包含第二 TCR 亞基（例如，CD3ε）的跨膜結構域的跨膜結構域，以及 (e) 包含 CMSD（例如，包含選自 SEQ ID NO: 41-74 的序列的 CMSD）的 ISD，其中 CMSD 包含一個或多個 CMSD ITAM，其中所述多個 CMSD ITAM 任選地通過一個或多個 CMSD 連接子連接，並且其中所述第一 TCR 亞基和所述第二 TCR 亞基選自 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 和 CD3δ。在一些實施例中，所述第一 TCR 亞基和所述第二 TCR 亞基均為 CD3ε。在一些實施例中，其中所述一個或多個 CMSD ITAM 源自 CD3ε、CD3δ 和 CD3γ 中的一個或多個。

【0043】 在根據任何上述修飾的 T 細胞的一些實施例中，功能性外源受體是 ITAM 修飾的 TAC 樣嵌合受體。在一些實施例中，ITAM 修飾的 TAC 樣嵌合受體包含：(a) 細胞外配體結合結構域（如特異性識別一種或多種靶抗原（例如，腫瘤抗原，如 BCMA、CD19、CD20）的一個或多個表位的抗原結合片段（例如，scFv、sdAb）、受體（例如，FcR）的細胞外結構域（或其部分）、配體（例如，APRIL、BAFF）的細胞外結構域（或其部分）），(b) 任選的第一受體結構域連接子，(c) 特異性識別第一 TCR 亞基（例如，CD3ε）

的細胞外結構域的細胞外 TCR 結合結構域，(d) 任選的第二受體結構域連接子，(e) 任選的第二 TCR 亞基（例如，CD3ε）的細胞外結構域或其部分，(f) 包括第三 TCR 亞基（例如，CD3ε）的跨膜結構域的跨膜結構域，以及 (g) 包含 CMSD（例如，包含選自 SEQ ID NO: 41-74 的序列的 CMSD）的 ISD，其中所述 CMSD 包含一個或多個 CMSD ITAM，其中所述多個 CMSD ITAM 任選地通過一個或多個 CMSD 連接子連接，並且其中所述第一 TCR 亞基、所述第二 TCR 亞基和所述第三 TCR 亞基都選自 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 和 CD3δ。在一些實施例中，所述第二 TCR 亞基和所述第三 TCR 亞基均為 CD3ε。在一些實施例中，所述一個或多個 CMSD ITAM 源自 CD3ε、CD3δ 和 CD3γ 中的一個或多個。

【0044】 在根據任何上述修飾的 T 細胞的一些實施例中，細胞外配體結合結構域包含特異性識別一種或多種靶（例如，腫瘤）抗原的一個或多個表位的一個或多個抗原結合片段。在一些實施例中，細胞外配體結合結構域是 sdAb 或 scFv。在一些實施例中，靶（例如，腫瘤）抗原是 BCMA、CD19 或 CD20。

【0045】 在根據任何上述修飾的 T 細胞的一些實施例中，功能性外源受體還包含位於細胞外配體結合結構域的 C 末端與跨膜結構域的 N 末端之間的鉸鏈結構域。在一些實施例中，鉸鏈結構域源自 CD8α。在一些實施例中，功能性外源受體還包含位於功能性外源受體的 N 末端處的信號肽，如源自 CD8α 的信號肽。

【0046】 在根據任何上述修飾的 T 細胞的一些實施例中，包含含有 CMSD 的 ISD 的功能性外源受體的效應子功能比包含含有 CD3ζ 的細胞內信號傳導結構域的 ISD 的功能性外源受體少至多約 80%（如至多約 70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%或 5%中的任一個）。

【0047】 在根據任何上述修飾的 T 細胞的一些實施例中，相對於包含含有 CD3ζ 的細胞內信號傳導結構域的 ISD 的功能性外源受體，包含含有 CMSD 的 ISD 的功能性外源受體的效應子功能具有至少約 20%（如至少約 30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或 100%中的任一個）活性。

【0048】 在根據任何上述修飾的 T 細胞的一些實施例中，修飾的 T 細胞還表現外源 Nef 蛋白（例如，野生型、亞型、突變體或非天然存在的 Nef）。在一些實施例中，外源 Nef 蛋白下調修飾的 T 細胞的內源 TCR、CD3 和/或 MHC I（例如，下調其細胞表面表現和/或效應子功能），如將內源 TCR、CD3 和/或 MHC I 下調（例如，下調其細胞表面表現和/或效應子功能）至少約 40%（如至少約 50%、60%、70%、80%、90%或 95%中的任一個）。在一些實施例中，外源 Nef 蛋白將含有 CMSD 的功能性外源受體下調（例如，下調其細胞表面表現和/或效應子功能，如與細胞裂解活性相關的信號轉導）至多約 80%（如至多約 70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%或 5%中的任一個）。

【0049】 本發明在另一方面提供產生修飾的 T 細胞（例如，同種

異體或自體 T 細胞）的方法，所述方法包括向前體 T 細胞中引入編碼功能性外源受體（例如，ITAM 修飾的 CAR、ITAM 修飾的 TCR、ITAM 修飾的 cTCR、或 ITAM 修飾的 TAC 樣嵌合受體）的核酸，其中所述功能性外源受體包含：(a) 細胞外配體結合結構域（如特異性識別一種或多種靶抗原（例如，腫瘤抗原，如 BCMA、CD19、CD20）的一個或多個表位的抗原結合片段（例如，scFv、sdAb）、受體（例如，FcR）的細胞外結構域（或其部分）、配體（例如，APRIL、BAFF）的細胞外結構域（或其部分）），(b) 跨膜結構域（例如，源自 CD8α），以及 (c) 包含 CMSD（例如，包含選自 SEQ ID NO: 41-74 的序列的 CMSD）的 ISD，其中 CMSD 包含一個或多個 CMSD ITAM，其中所述多個 CMSD ITAM 任選地通過一個或多個 CMSD 連接子連接。在一些實施例中，核酸在載體如病毒載體（例如，慢病毒載體）上。在一些實施例中，所述方法還包括從所述修飾的 T 細胞分離和/或富集功能性外源受體陽性 T 細胞。在一些實施例中，所述方法還包括用至少一種醫藥上可接受的載劑配製修飾的 T 細胞。在一些實施例中，多個（例如，2、3、4 或更多個）CMSD ITAM 彼此直接連接。在一些實施例中，CMSD 包含通過並非源自含有 ITAM 的親本分子的一個或多個連接子（例如，G/S 連接子）連接的兩個或更多個（例如，2、3、4 或更多個）CMSD ITAM。在一些實施例中，CMSD 包含源自含有 ITAM 的親本分子的一個或多個 CMSD 連接子，所述含有 ITAM 的親本分子與衍生出一個或多個所述 CMSD ITAM 的含有 ITAM 的親

本分子不同。在一些實施例中，CMSD 包含兩個或更多個（例如，2、3、4 或更多個）相同的 CMSD ITAM。在一些實施例中，所述 CMSD ITAM 中的至少一個並非源自 CD3ζ。在一些實施例中，所述 CMSD ITAM 中的至少一個並非 CD3ζ 的 ITAM1 或 ITAM2。在一些實施例中，所述多個 CMSD ITAM 各自源自不同的含有 ITAM 的親本分子。在一些實施例中，所述 CMSD ITAM 中的至少一個源自選自以下的含有 ITAM 的親本分子：CD3ε、CD3δ、CD3γ、Igα（CD79a）、Igβ（CD79b）、FcεRIβ、FcεRIγ、DAP12、CNAIP/NFAM1、STAM-1、STAM-2 和膜突蛋白。在一些實施例中，CMSD 基本上由一個 CMSD ITAM 組成（例如，由其組成）。在一些實施例中，CMSD 基本上由一個 CMSD ITAM 以及對於含有 ITAM 的親本分子是異源的 CMSD N 末端序列和/或 CMSD C 末端序列（例如，G/S 連接子）組成（例如，由其組成）。在一些實施例中，所述多個 CMSD ITAM 中的至少一個源自選自以下的含有 ITAM 的親本分子：CD3ε、CD3δ、CD3γ、CD3ζ、Igα（CD79a）、Igβ（CD79b）、FcεRIβ、FcεRIγ、DAP12、CNAIP/NFAM1、STAM-1、STAM-2 和膜突蛋白。

【0050】 在另一方面，還提供通過上述任何方法獲得的修飾的 T 細胞（例如，同種異體或自體 T 細胞）。

【0051】 在另一方面，提供病毒載體（例如，慢病毒載體），其包含編碼功能性外源受體（例如，ITAM 修飾的 CAR、ITAM 修飾的 TCR、ITAM 修飾的 cTCR、或 ITAM 修飾的 TAC 樣嵌合受體）的

核酸，其中所述功能性外源受體包含：(a) 細胞外配體結合結構域（如特異性識別一種或多種靶抗原（例如，腫瘤抗原，如 BCMA、CD19、CD20）的一個或多個表位的抗原結合片段（例如，scFv、sdAb）、受體（例如，FcR）的細胞外結構域（或其部分）、配體（例如，APRIL、BAFF）的細胞外結構域（或其部分）），(b) 跨膜結構域（例如，源自 CD8α），以及 (c) 包含 CMSD（例如，包含選自 SEQ ID NO: 41-74 的序列的 CMSD）的 ISD，其中 CMSD 包含一個或多個 CMSD ITAM，其中所述多個 CMSD ITAM 任選地通過一個或多個 CMSD 連接子連接。在一些實施例中，所述 CMSD ITAM 中的至少一個源自選自以下的含有 ITAM 的親本分子：CD3ε、CD3δ、CD3γ、CD3ζ、Igα（CD79a）、Igβ（CD79b）、FcεRIβ、FcεRIγ、DAP12、CNAIP/NFAM1、STAM-1、STAM-2 和膜突蛋白。

【0052】 還提供包含本文所述的任何修飾的 T 細胞（例如，同種異體 T 細胞）的醫藥組合物、使用本文所述的任何修飾的 T 細胞或其醫藥組合物治療疾病（例如，癌症、感染性疾病、自身免疫障礙、或輻射病）的方法。在一些實施例中，用於治療的個體（例如，人）與衍生出修飾的 T 細胞的前體 T 細胞的供體是組織不相容的。

【0053】 本發明還提供可用于本文所述方法的套組和製品。

【圖式簡單說明】

【0054】

圖1展現CAR-T細胞中的CMSD ITAM具有CAR介導的特異性啟動活性。圖1A-圖1C分別顯示在與靶細胞株RPMI8226和非靶細胞株K562一起孵育的Jurkat-ISD修飾的BCMA CAR細胞中，CD69（圖1A）、CD25（圖1B）和HLA-DR（圖1C）的啟動分子表現。「Jurakt」指示用作對照的未轉導的Jurkat細胞。圖1D-圖1I展現SIV Nef和SIV Nef M116與包含各種修飾的細胞內信號傳導結構域（ISD）的BCMA CAR之間的相互作用。圖1D顯示作為對照的Jurkat-ISD修飾的CAR-空載體細胞中的高CAR陽性率。圖1E顯示Jurkat-M663-SIV Nef細胞、Jurkat-M665-SIV Nef細胞和Jurkat-M666-SIV Nef細胞中降低的BCMA CAR表現。圖1F顯示Jurkat-M663-SIV Nef M116細胞、Jurkat-M665-SIV Nef M116細胞和Jurkat-M666-SIV M116 Nef細胞中降低的BCMA CAR表現。圖1G顯示作為對照的Jurkat-ITAM修飾的BCMA CAR-空載體細胞中的高BCMA CAR陽性率。圖1H-圖1I分別顯示，在用SIV Nef和SIV Nef M116轉導的Jurkat-M678細胞、Jurkat-M680細胞、Jurkat-M684細胞和Jurkat-M799細胞中，BCMA CAR表現無顯著降低。圖1H-圖1I顯示在Jurkat-M663-SIV Nef細胞和Jurkat M663-SIV Nef M116細胞中BCMA CAR表現的顯著降低。

圖2A-圖2B顯示各種ITAM修飾的CAR-T細胞對靶細胞的特異性細胞毒性。圖2A顯示在40:1的E:T比率下，分別表現BCMA-BBz、BCMA-BB007、BCMA-BB008、BCMA-BB009和BCMA-BB010的修飾的T細胞對多發性骨髓瘤細胞株

RPMI8226.Luc的相對殺傷效率。表現BCMA-BB（僅具有4-1BB共刺激信號傳導結構域，無CD3ζ細胞內信號傳導結構域）的T細胞用作陰性對照。圖2B顯示在20:1的E:T比率下，分別表現LCAR-L186S和CD20-BB010的修飾的T細胞對淋巴瘤Raji.Luc細胞株的相對殺傷效率。「UnT」指示用作對照的未轉導的T細胞。

圖3展現CMSD連接子對CAR-T細胞活性的影響。圖3顯示在2.5:1的E:T比率下，修飾的T細胞對多發性骨髓瘤細胞株RPMI8226.Luc的相對殺傷效率，所述修飾的T細胞表現不同的ITAM修飾的BCMA CAR，如ISD分別由以下組成：傳統CD3ζ（BCMA-BBz）、彼此直接連接的CMSD ITAM（BCMA-BB024）、通過一個或多個CMSD連接子連接的CMSD ITAM（BCMA-BB010、BCMA-BB025、BCMA-BB026、BCMA-BB027、BCMA-BB028和BCMA-BB029）。「UnT」指示用作對照的未轉導的T細胞。

圖4展現CMSD ITAM的順序對CAR-T細胞活性的影響。圖4顯示在2.5:1的E:T比率下，修飾的T細胞對多發性骨髓瘤細胞株RPMI8226.Luc的相對殺傷效率，所述修飾的T細胞分別表現BCMA-BBz、BCMA-BB010、BCMA-BB030、BCMA-BB031和BCMA-BB032。「UnT」指示用作對照的未轉導的T細胞。

圖5展現CMSD ITAM的數量和來源對CAR-T細胞活性的影響。圖5顯示在2.5:1的E:T比率下，修飾的T細胞對多發性骨髓瘤細胞株RPMI8226.Luc的相對殺傷效率，所述修飾的T細胞單獨表現傳

統CD3ζ CAR（BCMA-BBz）和不同的ITAM修飾的BCMA CAR，如ISD分別包含：1個CMSD ITAM（BCMA-BB033和BCAM-BB034）、2個CMSD ITAM（BCMA-BB035和BCMA-BB036）、3個CMSD ITAM（BCMA-BB037和BCMA-BB038）、和4個CMSD ITAM（BCMA-BB010、BCMA-BB030、BCMA-BB031和BCMA-BB032）。「UnT」指示用作對照的未轉導的T細胞。

圖6顯示在靶腫瘤細胞再攻毒後ITAM修飾的BCMA CAR-T細胞的T細胞增殖。「UnT」指示未轉導的T細胞。

圖7A-圖7D顯示在靶腫瘤細胞再攻毒後，ITAM修飾的CAR-T細胞的表型。圖7A顯示T細胞耗竭標記在CAR-T細胞中的PD-1和LAG-3表現。圖7B-圖7C顯示TEMRA細胞(CD45RA+/CCR7-)、TEM細胞（CD45RA-/CCR7-）、TCM細胞（CD45RA-/CCR7+）和幼稚細胞（CD45RA+/CCR7+）在CAR+ T細胞、CAR+/CD8+ T細胞和CAR+/CD4+ T細胞中的細胞比率。

圖8描繪含有ITAM的親本分子（例如，CD3ζ、CD3ε）細胞內信號傳導結構域結構和示例性CMSD結構。

圖9A顯示在分別用攜載LCAR-UL186S（SIV Nef M116-IRES-CD8α SP-CD20 scFv（Leu16）-CD8α鉸鏈-CD8α TM-4-1BB-ITAM010）和LCAR-L186S（CD8α SP-CD20 scFv（Leu16）-CD8α鉸鏈-CD8α TM-4-1BB-CD3ζ）序列的慢病毒轉導原代T細胞後，通過FACS分析獲得的CD20 CAR陽性率。「CAR pos」

意指CAR陽性率。「UnT」指示未轉導的T細胞。圖9B顯示在殺傷測定的第3天，分別在20:1、10:1和5:1的不同的E:T比率下，LCAR-UL186S T細胞和LCAR-L186S T細胞對淋巴瘤Raji.Luc細胞株（CD20+）的細胞毒性。未轉導的T細胞（UnT）用作對照。

圖10A-圖10C展現在殺傷測定的第3天，在20:1、10:1和5:1的不同的E:T比率下殺傷淋巴瘤Raji.Luc細胞株時，LCAR-L186S T細胞（具有傳統CD3ζ細胞內信號傳導結構域的CD20 CAR）和LCAR-UL186S T細胞（ITAM修飾的CD20 CAR/SIV Nef M116共表現）釋放的促炎因數（圖10A）、趨化因數（圖10B）和細胞因數（圖10C）的水準。未轉導的T細胞（UnT）用作對照。

圖11A-圖11D顯示LCAR-L186S T細胞和TCRαβ MACS分選的LCAR-UL186S CAR+/TCRαβ- T細胞的體內功效。在第-4天向免疫缺陷型NCG小鼠植入人Raji.Luc腫瘤細胞（CD20+），隨後在第0天用HBSS、未轉導的T細胞（UnT）、LCAR-L186S T細胞、和TCRαβ MACS分選的LCAR-UL186S CAR+/TCRαβ- T細胞處理。每週通過生物發光成像（圖11A-圖11B）、體重（圖11C）和存活（圖11D）評估小鼠以監測腫瘤生長。

圖12A-圖12D顯示在類比腫瘤復發模型的腫瘤再攻毒後，LCAR-L186S T細胞和TCRαβ MACS分選的LCAR-UL186S CAR+/TCRαβ- T細胞的體內功效。CAR-T施用後41天，向未復發小鼠進一步注射3×10^4個Raji.Luc腫瘤細胞（表示為第0天）。定期通過生物發光成像（圖12A-圖12B）、體重（圖12C）和存活（圖12D）

評估小鼠以監測腫瘤生長。

圖13顯示LIC948A22 CAR-T細胞（86.5% CAR+）和TCRαβ MACS分選的LUC948A22 UCAR-T細胞（85.9% CAR+）的BCMA CAR陽性率。「UnT」表示未轉導的T淋巴細胞並用作對照。「LIC948A22 CAR-T」表示表現自體BCMA CAR並通過BCMA+ MACS富集的T淋巴細胞。「LUC948A22 UCAR-T」表示表現通用BCMA CAR並通過TCRαβ- MACS富集的T淋巴細胞。

圖14顯示在2.5:1和1.25:1的不同E:T細胞比率下，LIC948A22 CAR-T細胞和TCRαβ MACS分選的LUC948A22 UCAR-T細胞（CAR+/TCRαβ-）對RPMI8226.Luc細胞株的特異性腫瘤細胞毒性。「UnT」表示未轉導的T淋巴細胞並用作對照。「LIC948A22 CAR-T」表示表現自體BCMA CAR並通過BCMA+ MACS富集的T淋巴細胞。「LUC948A22 UCAR-T」表示表現通用BCMA CAR並通過TCRαβ- MACS富集的T淋巴細胞。

圖15A-圖15C展現在2.5:1和1.25:1的不同E:T比率下殺傷RPMI8226.Luc細胞株時，LIC948A22 CAR-T細胞和TCRαβ MACS分選的LUC948A22 UCAR-T細胞（CAR+/TCRαβ-）在體外釋放的促炎因數（圖15A）、趨化因數（圖15B）和細胞因數（圖15C）的水準。「UnT」表示未轉導的T淋巴細胞並用作對照。「LIC948A22 CAR-T」表示表現自體BCMA CAR並通過BCMA+ MACS富集的T淋巴細胞。「LUC948A22 UCAR-T」表示表現通用BCMA CAR並通過TCRαβ- MACS富集的T淋巴細胞。

圖16A顯示分別用SIV Nef M116+ITAM修飾的CD20 CAR和SIV Nef M116+CD3ζ CD20 CAR（M1185）一體化構建體轉導的Jurkat細胞的TCRαβ表現。圖16B顯示在20:1的E:T比率下，T細胞對淋巴瘤細胞株Raji.Luc的相對殺傷效率，所述T細胞分別用SIV Nef M116+ITAM修飾的CD20 CAR一體化構建體和SIV Nef M116+CD3ζ CD20 CAR（M1185）轉導。「TCRαβ pos」指示TCRαβ陽性率。「Jurkat」指示用作對照的未轉導的Jurkat細胞。「UnT」指示用作對照的未轉導的T細胞。

圖17A顯示分別用SIV Nef M116+ITAM修飾的BCMA CAR和SIV Nef M116+CD3ζ BCMA CAR（M1215）一體化構建體轉導的Jurkat細胞的TCRαβ表現。圖17B顯示在4:1的E:T比率下，T細胞對多發性骨髓瘤細胞株RPMI8226.Luc的相對殺傷效率，所述T細胞分別用SIV Nef M116+ITAM修飾的BCMA CAR和SIV Nef M116+CD3ζ BCMA CAR(M1215)一體化構建體轉導。「TCRαβ pos」指示TCRαβ陽性率。「Jurkat」指示用作對照的未轉導的Jurkat細胞。「UnT」指示用作對照的未轉導的T細胞。

圖18A顯示M598-T細胞和MACS分選的TCRαβ陰性M598-T細胞的TCRαβ表現。圖18B顯示M598-T細胞和MACS分選的TCRαβ陰性M598-T細胞的BCMA CAR表現。圖18C顯示分別在2.5:1、1.25:1和1:1.25的不同的E:T比率下，MACS分選的TCRαβ陰性M598-T細胞對多發性骨髓瘤細胞株RPMI8226.Luc的相對殺傷效率。「TCRαβ pos」指示TCRαβ陽性率。「CAR pos」指示CAR陽性率。「UnT」指

示未轉導的T細胞。「TCRαβ- M598-T」指示MACS分選的TCRαβ陰性M598-T細胞。

圖19A-圖19D顯示CAR-T細胞免疫療法中具有對TCRαβ和MHC表現的雙重調節的SIV Nef亞型。圖19A-圖19B顯示在分別表現LCAR-UL186S和M1392的修飾的T細胞中，CD20 CAR、TCRαβ和HLA-B7的表現率。圖19C顯示在與效應細胞以1:1的E:T比率一起孵育後48小時，基於LCAR-L186S T細胞、B2M KO LCAR-L186S T細胞和TCRαβ- M1392-T細胞的混合淋巴細胞反應的MHC I類交叉反應性。圖19D顯示在20:1、10:1和5:1的不同的E:T比率下，TCRαβ- M1392-T細胞對淋巴瘤細胞株Raji.Luc的相對殺傷效率。UnT指示用作對照的未轉導的T細胞。

【實施方式】

【0055】

【0056】 綜上所述，本發明……。

【0057】 本申請案提供修飾的T細胞，其包含含有嵌合信號傳導結構域（「CMSD」）的功能性外源受體。本文所述的CMSD包含以與任何天然存在的含有ITAM的親本分子（如CD3ζ）不同的構型佈置的一個或多個免疫受體酪胺酸啟動基序（「ITAM」）和任選的連接子。出人意料地發現，像含有天然存在的基於ITAM的信號傳導結構域的傳統功能性外源受體一樣，含有CMSD的受體能夠在受體與同源配體結合後啟動T細胞。與傳統功能性外源受體（如包含CD3ζ

細胞內信號傳導結構域（ISD）的嵌合抗原受體（CAR））相比，本文所述的包含CMSD的受體（例如，包含CMSD的CAR）在腫瘤異種移植小鼠模型和腫瘤復發小鼠模型二者中顯示優良的腫瘤細胞毒性，同時顯著降低對細胞因數、趨化因數和促炎因數的釋放的誘導。

【0058】 還出人意料地發現，當與能夠下調內源T細胞受體（TCR）的Nef蛋白在T細胞（本文中也稱為「TCR缺陷型T細胞」或「GvHD最小化的T細胞」）中共表現時，含有某些類型的CMSD（例如，不含CD3ζ的ITAM1和ITAM2的CMSD）的受體不顯示Nef蛋白的下調或顯示降低的所述下調。這種特性使含有CMSD的功能性外源受體特別適合與Nef蛋白結合使用，例如用於同種異體T細胞療法。

【0059】 因此，本發明在一方面提供修飾的T細胞，其包含功能性外源受體，所述功能性外源受體包含：(a) 細胞外配體結合結構域；(b) 跨膜結構域；以及 (c) 包含含有一個或多個ITAM的CMSD（稱為「CMSD ITAM」）的細胞內信號傳導結構域（「ISD」），其中所述多個CMSD ITAM任選地通過一個或多個連接子（稱為「CMSD連接子」）連接。功能性外源受體（下文稱為「ITAM修飾的功能性外源受體」或「含有CMSD的功能性外源受體」）可以具有與嵌合抗原受體(「CAR」)、工程化T細胞受體(「工程化TCR」)、嵌合T細胞受體（「cTCR」）和T細胞抗原偶聯劑（「TAC」）樣嵌合受體相似的結構，只是ISD包含CMSD。這些功能性外源受體在本文中分別稱為「ITAM修飾的CAR」、「ITAM修飾的TCR」、「ITAM

修飾的cTCR」和「ITAM修飾的TAC樣嵌合受體」。包含本文所述的包含CMSD的功能性外源受體的修飾的T細胞稱為「ITAM修飾的TCR-T細胞」、「ITAM修飾的cTCR-T細胞」、「ITAM修飾的TAC樣T細胞」或「ITAM修飾的CAR-T細胞」。

【0060】 還提供要包括在修飾的T細胞中的功能性外源受體、編碼此類功能性外源受體的核酸，以及製備所述修飾的T細胞的方法。另外提供使用所述修飾的T細胞治療各種疾病如癌症的方法。

【0061】 **I. 定義**

【0062】 如本文所用，術語「功能性外源受體」是指在被引入T細胞後保留其生物活性的外源受體（例如，ITAM修飾的TCR、ITAM修飾的cTCR、ITAM修飾的TAC樣嵌合受體或ITAM修飾的CAR）。生物活性包括但不限於外源受體在以下方面的能力：特異性結合至分子，適當轉導下游信號，如誘導細胞增殖、細胞因數產生和/或調節性或細胞裂解效應子功能的執行。

【0063】 如本文所用，術語「特異性結合」、「特異性識別」或者「對……具有特異性」是指可測量且可重現的相互作用，如靶標與抗原結合蛋白（如抗原結合結構域、配體-受體、任何本文所述的包含CMSD的功能性外源受體）之間的結合，其決定在包括生物分子的異質性分子群體存在下靶標的存在。例如，特異性結合靶標（其可以是表位）的抗原結合蛋白是如下抗原結合蛋白：其結合此靶標比其結合其他靶標的親和力、親合力更大，更容易，和/或持續時間更長。在一些實施例中，抗原結合蛋白與無關靶標的

結合程度小於抗原結合蛋白與靶標的結合的約10%，如例如通過放射免疫測定（RIA）所測量。在一些實施例中，特異性結合靶標的抗原結合蛋白的解離常數（Kd）≦ 1 μM、≦ 100 nM、≦ 10 nM、≦ 1 nM或≦ 0.1 nM。在一些實施例中，抗原結合蛋白特異性結合蛋白質上的在來自不同物種的蛋白質之間保守的表位。在一些實施例中，特異性結合可以包括但不需要排他性結合。

【0064】 術語「特異性」是指抗原結合蛋白（例如，本文所述的包含CMSD的功能性外源受體、sdAb、scFv或配體-受體中的任一種）對抗原的特定表位的選擇性識別。例如，天然抗體是單特異性的。如本文所用，術語「多特異性」表示，抗原結合蛋白（例如，本文所述的包含CMSD的功能性外源受體、sdAb、scFv或配體-受體中的任一種）具有兩個或更多個抗原結合位點，其中至少兩個結合不同的抗原或表位。如本文所用，「雙特異性」表示，抗原結合蛋白（例如，本文所述的包含CMSD的功能性外源受體、sdAb、scFv或配體-受體中的任一種）具有兩種不同的抗原結合特異性。如本文所用，術語「單特異性」表示具有一個或多個結合位點的抗原結合蛋白（例如，本文所述的包含CMSD的功能性外源受體、sdAb、scFv或配體-受體中的任一種），所述結合位點各自結合抗原的相同表位。

【0065】 「結合親和力」通常是指分子（例如，抗體、配體-受體、任何本文所述的包含CMSD的功能性外源受體）的單一結合位點與其結合配偶體（例如，抗原、配體）之間的非共價相互作用的總

和的強度。除非另有指示，如本文所用，「結合親和力」是指內在結合親和力，其反映結合對（例如，抗體和抗原，或者任何本文所述的包含CMSD的功能性外源受體和抗原，如ITAM修飾的CAR和抗原）的成員之間的1:1相互作用。分子X對其配偶體Y的親和力通常可以通過解離常數（Kd）表示。親和力可以通過業內已知的常用方法（包括本文所述的那些）來測量。低親和力抗體通常緩慢地結合抗原並傾向于易於解離，而高親和力抗體通常更快地結合抗原並傾向於更長時間地保持結合。測量結合親和力的多種方法是業內已知的，其中任何方法都可用於本申請案的目的。用於測量結合親和力的具體說明性和示例性實施例描述於下文中。

【0066】 關於肽、多肽或抗體序列的「胺基酸序列同一性百分比（%）」和「同源性」定義為，在比對序列和引入空位（如果需要）以實現最大序列同一性百分比並且不將任何保守取代視為序列同一性的一部分之後，候選序列中與特定肽或多肽序列中的胺基酸殘基相同的胺基酸殘基的百分比。用於確定胺基酸序列同一性百分比的目的的比對可以以業內技術範圍內的多種方式實現，例如，使用公眾可用的電腦軟體，如BLAST、BLAST-2、ALIGN或MEGALIGN™（DNASTAR）軟體。熟習此項技術者可以確定用於測量比對的適當參數，包括在所比較序列的全長上實現最大比對所需的任何演算法。

【0067】 本文所述的「分離的」核酸分子（例如，編碼任何本文所述的包含CMSD的功能性外源受體）是被鑒定並與至少一種污染

核酸分子分離的核酸分子，在產生所述核酸分子的環境中，所述核酸分子通常與所述污染核酸分子締合。較佳地，分離的核酸與所有與產生環境相關的組分都不締合。編碼本文的多肽和抗體的分離的核酸分子的形式與其在自然界中發現的形式或設定不同。因此，分離的核酸分子與編碼在細胞中天然存在的本文多肽和抗體的核酸不同。

【0068】 當核酸被放置成與另一核酸序列有功能關係時，其為「可操作地連接」。例如，如果前序列或分泌前導序列的DNA表現為參與多肽分泌的前蛋白，則所述DNA與所述多肽的DNA可操作地連接；如果啟動子或增強子影響編碼序列的轉錄，則所述啟動子或增強子與所述序列可操作地連接；或者如果核糖體結合位點被定位以促進翻譯，則所述核糖體結合位點與編碼序列可操作地連接。通常，「可操作地連接」意指，被連接的DNA序列是連續的，並且在分泌前導序列的情況下，是連續的並且處於閱讀相。然而，增強子不必是連續的。通過在便利的限制性位點連接來完成連接。如果不存在此類位點，則根據常規實踐使用合成的寡核苷酸銜接子或連接子。

【0069】 除非另有規定，否則「編碼胺基酸序列的核苷酸序列」包括互為簡並形式並且編碼相同胺基酸序列的所有核苷酸序列。短語編碼蛋白質或RNA的核苷酸序列還可以包括內含子，至編碼蛋白質的核苷酸序列在一些形式中可以含有一個或多個內含子的程度。

【0070】 如本文所用，術語「載體」是指能傳播其所連接的另一核酸分子的核酸分子。所述術語包括作為自我複製核酸結構的載體以及摻入已引入其的宿主細胞的基因組中的載體。某些載體能夠引導與它們操作性連接的核酸的表現。此類載體在本文中稱為「表現載體」。

【0071】 如本文所用，術語「轉染」或「轉化」或「轉導」是指借之將外源核酸轉移至或引入宿主細胞(例如，T細胞)中的過程。「轉染的」或「轉化的」或「轉導的」細胞是已經用外源核酸轉染、轉化或轉導的細胞。所述細胞包括原代受試者細胞及其後代。

【0072】 如本文所用，「治療」(「treatment」或「treating」)是用於獲得有益或所需結果(包括臨床結果)的方法。出於本發明的目的，有益或所需臨床結果包括但不限於以下中的一種或多種：緩解由疾病引起的一種或多種症狀，降低疾病的程度，穩定疾病(例如，預防或延遲疾病的惡化)，預防或延遲疾病的擴散(例如，轉移)，預防或延遲疾病的復發，延遲或減緩疾病的進展，改善疾病狀態，提供疾病的緩解(部分或全部)，減少治療疾病所需的一種或多種其他藥物的劑量，延遲疾病的進展，提高生活品質，和/或延長存活。「治療」還涵蓋減少癌症的病理後果。本申請案的方法考慮了治療的這些方面中的任何一個或多個。

【0073】 如本文所用，「個體」或「受試者」是指哺乳動物，包括但不限於人、牛科動物、馬、貓科動物、犬科動物、齧齒動物或靈長類動物。在一些實施例中，個體是人。

【0074】 本文使用的術語「有效量」是指藥劑如本文所述的修飾的T細胞（例如，ITAM修飾的T細胞）或其醫藥組合物的如下量：足以治療指定的障礙、病症或疾病，如改善、緩和、減輕和/或延遲其一種或多種症狀（例如，癌症、感染性疾病、自身免疫障礙或輻射病）。關於癌症，有效量包含如下量：足以引起腫瘤縮小和/或降低腫瘤的生長速率（如抑制腫瘤生長），或者預防或延遲其他不期望的細胞增殖。在一些實施例中，有效量是足以延遲發展的量。在一些實施例中，有效量是足以預防或延遲復發的量。可以將有效量在一次或多次施用中施用。藥劑（例如，修飾的T細胞）或組合物的有效量可以：(i) 減少癌細胞的數量；(ii) 減小腫瘤大小；(iii) 抑制、遲滯、在一定程度上減緩且較佳地停止癌細胞浸潤至周圍器官中；(iv) 抑制（即，在一定程度上減緩且較佳地停止）腫瘤轉移；(v) 抑制腫瘤生長；(vi) 預防或延遲腫瘤的發作和/或復發；和/或 (vii) 一定程度上緩解與癌症相關的一種或多種症狀。在感染性疾病如病毒感染的情況下，本文所述的修飾的T細胞或其組合物的治療有效量可以減少病原體感染的細胞的數量；減少源自病原體的抗原的產生或釋放；抑制（即，在一定程度上減緩且較佳地停止）病原體向未感染細胞的擴散；和/或在一定程度上緩解與感染相關的一種或多種症狀。在一些實施例中，治療有效量是延長患者存活的量。

【0075】 如本文所用，術語「自體的」意在指代源自同一個體的任何材料，之後要將所述材料重新引入所述個體體內。

【0076】「同種異體的」是指源自相同物種的不同個體的移植物。「同種異體T細胞」是指來自供體的T細胞，其具有與接受者匹配的組織人白細胞抗原（HLA）類型。通常，基於HLA基因的三個或更多個基因座的變異性進行匹配，並且這些基因座處的完全匹配是較佳的。在一些情況下，同種異體移植物供體可以是有親緣關係的（通常密切HLA匹配的兄弟姊妹）、同基因的（患者的單合子「相同的」雙胞胎）或無親緣關係的（無親緣關係並且發現具有非常接近的HLA匹配程度的供體）。HLA基因分為兩個類別（I型和II型）。通常，I型基因（即，HLA-A、HLA-B或HLA-C）的錯配增加移植物排斥的風險。HLA II型基因（即，HLA-DR或HLA-DQB1）的錯配增加GvHD的風險。

【0077】如本文所用，「患者」包括受疾病（例如，癌症、病毒感染、GvHD）折磨的任何人。術語「受試者」、「個體」和「患者」在本文中可互換使用。術語「供體受試者」或「供體」在本文中是指如下受試者：獲得其細胞用於進一步體外工程化。供體受試者可以是要用通過本文所述方法產生的細胞群治療的患者（即，自體供體），或者可以是捐贈血液樣品（例如，淋巴細胞樣品）的個體，所述血液樣品在產生通過本文所述方法產生的細胞群後將用於治療不同的個體或患者（即，同種異體供體）。接受通過本發明方法製備的細胞的那些受試者可以稱為「接受者」或「接受者受試者」。

【0078】如本文所用，術語「刺激」是指通過連接細胞表面部分

誘導的初級反應。例如，在受體的情況下，這種刺激使得需要連接受體和隨後的信號轉導事件。關於T細胞的刺激，這種刺激是指連接T細胞表面部分，其在一實施例中隨後誘導信號轉導事件，如結合TCR/CD3複合物，或者結合任何本文所述的包含CMSD的功能性外源受體。此外，刺激事件可以啟動細胞並且上調或下調分子的表現或分泌，如下調TGF-β。因此，即使在不存在直接信號轉導事件的情況下，連接細胞表面部分也可以導致細胞支架結構的重組，或者在細胞表面部分的聯合中，所述部分各自可以用於增強、修改或改變隨後的細胞反應。

【0079】 如本文所用，術語「啟動」是指在充分細胞表面部分連接以誘導顯著的生化或形態變化後的細胞狀態。在T細胞的背景內，這種啟動是指已經被充分刺激以誘導細胞增殖的T細胞的狀態。啟動T細胞還可以誘導細胞因數產生以及調節性或細胞裂解效應子功能的執行。在其他細胞的背景下，此術語意指特定物理化學過程的上調或下調。術語「啟動的T細胞」指示目前正在經歷細胞分裂、細胞因數產生、調節性或細胞裂解效應子功能的執行的T細胞，和/或最近已經經歷「啟動」過程的T細胞。

【0080】 術語分子（例如，內源TCR（例如，TCRα和/或TCRβ）、CD4、CD28、MHC I、CD3ε、CD3δ、CD3γ、CD3ζ、本文所述的包含CMSD的功能性細胞外受體）在T細胞中的「下調」是指下調所述分子的細胞表面表現，和/或幹擾其信號轉導（例如，含有CMSD的功能性細胞外受體、TCR、CD3、CD4、CD28介導的信號

轉導）、T細胞啟動、T細胞刺激和/或T細胞增殖。還可以涵蓋經由例如以下方式對靶受體的下調：內化、剝離、加帽或者改變受體在細胞表面上的重排的其他形式。

【0081】 應理解，本文所述的本申請案的實施例包括「由實施例組成」和/或「基本上由實施例組成」。

【0082】 本文中對「約」某個值或參數的提及包括（並描述）涉及該值或參數本身的變化。例如，提及「約X」的描述包括「X」的描述。

【0083】 如本文所用，對「並非」某個值或參數的提及通常意指並描述「除了某個值或參數以外」。例如，所述方法不用於治療X型的癌症，意指所述方法用於治療除了X型以外的類型的癌症。

【0084】 本文使用的術語「約X-Y」具有與「約X至約Y」相同的含義。

【0085】 如本文和所附申請專利範圍中所用，單數形式「一個/一種」、「或」和「所述」包括複數指代物，除非上下文另有明確規定。

【0086】 **II. 包含含有CMSD的功能性外源受體的T細胞**

【0087】 本申請案提供修飾的T細胞（例如，同種異體或自體T細胞），其包含：本文所述的包含CMSD的功能性外源受體（例如，ITAM修飾的CAR、ITAM修飾的TCR、ITAM修飾的cTCR、或ITAM修飾的TAC樣嵌合受體）。在一些實施例中，本文所述的ITAM修飾的T細胞還表現外源Nef蛋白（例如，野生型Nef或突變體Nef）。共

表現外源Nef蛋白和含有CMSD的功能性外源受體的修飾的T細胞被稱為「含有Nef的ITAM修飾的T細胞」或「GvHD最小化的ITAM修飾的T細胞」，如「含有Nef的ITAM修飾的TCR-T細胞」、「含有Nef的ITAM修飾的cTCR-T細胞」、「含有Nef的ITAM修飾的TAC樣T細胞」或「含有Nef的ITAM修飾的CAR-T細胞」。

【0088】 在一些實施例中，提供修飾的T細胞（例如，同種異體或自體T細胞），其包含：功能性外源受體（例如，ITAM修飾的CAR、ITAM修飾的TCR、ITAM修飾的cTCR或ITAM修飾的TAC樣嵌合受體），所述功能性外源受體包含：(a) 細胞外配體結合結構域（如特異性識別一種或多種靶抗原（例如，腫瘤抗原，如BCMA、CD19、CD20）的一個或多個表位的抗原結合片段（例如，scFv、sdAb）、受體（例如，FcR）的細胞外結構域（或其部分）、配體（例如，APRIL、BAFF）的細胞外結構域（或其部分）），(b) 跨膜結構域（例如，源自CD8α），以及 (c) 包含CMSD（例如，包含選自SEQ ID NO: 41-74的序列的CMSD）的ISD，其中CMSD包含一個或多個CMSD ITAM，其中所述多個CMSD ITAM任選地通過一個或多個CMSD連接子連接。在一些實施例中，提供修飾的T細胞（例如，同種異體或自體T細胞），其包含編碼功能性外源受體（例如，ITAM修飾的CAR、ITAM修飾的TCR、ITAM修飾的cTCR、或ITAM修飾的TAC樣嵌合受體）的核酸，所述功能性外源受體包含：(a) 細胞外配體結合結構域（如特異性識別一種或多種靶抗原（例如，腫瘤抗原，如BCMA、CD19、CD20）的一個或多個表位的抗原結合

片段（例如，scFv、sdAb）、受體（例如，FcR）的細胞外結構域（或其部分）、配體（例如，APRIL、BAFF）的細胞外結構域（或其部分）），(b) 跨膜結構域（例如，源自CD8α），以及 (c) 包含CMSD（例如，包含選自SEQ ID NO: 41-74的序列的CMSD）的ISD，其中CMSD包含一個或多個CMSD ITAM，其中所述多個CMSD ITAM任選地通過一個或多個CMSD連接子連接。在一些實施例中，修飾的T細胞包含修飾的內源TCR或B2M基因座。

【0089】 在一些實施例中，功能性外源受體是ITAM修飾的CAR。因此，在一些實施例中，提供修飾的T細胞（例如，同種異體或自體T細胞），其包含：ITAM修飾的CAR，所述ITAM修飾的CAR包含：(a) 細胞外配體結合結構域（如特異性識別一種或多種靶抗原（例如，腫瘤抗原，如BCMA、CD19、CD20）的一個或多個表位的抗原結合片段（例如，scFv、sdAb）、受體（例如，FcR）的細胞外結構域（或其部分）、配體（例如，APRIL、BAFF）的細胞外結構域（或其部分）），(b) 跨膜結構域（例如，源自CD8α），以及 (c) 包含CMSD（例如，包含選自SEQ ID NO: 41-74的序列的CMSD）的ISD，其中CMSD包含一個或多個CMSD ITAM，其中所述多個CMSD ITAM任選地通過一個或多個CMSD連接子連接。在一些實施例中，ITAM修飾的CAR從N'至C'包含：(a) 細胞外配體結合結構域，所述細胞外配體結合結構域包含特異性識別一種或多種靶抗原（例如，腫瘤抗原，如BCMA、CD19、CD20）的一個或多個表位的抗原結合片段（例如，scFv、sdAb），(b) 任選的鉸

鏈結構域（例如，源自CD8α），(c) 跨膜結構域（例如，源自CD8α），以及 (d) ISD，所述ISD包含任選的共刺激信號傳導結構域（例如，源自4-1BB或CD28）和CMSD（例如，包含選自SEQ ID NO: 41-74的序列的CMSD），其中所述CMSD包含一個或多個CMSD ITAM，其中所述多個CMSD ITAM任選地通過一個或多個CMSD連接子連接。在一些實施例中，共刺激信號傳導結構域位於CMSD的N末端。在一些實施例中，共刺激信號傳導結構域位於CMSD的C末端。在一些實施例中，ITAM修飾的CAR還包含位於ITAM修飾的CAR的N末端處的信號肽（例如，源自CD8α）。在一些實施例中，ITAM修飾的CAR是ITAM修飾的BCMA CAR，其包含：(a) 細胞外配體結合結構域，所述細胞外配體結合結構域包含：i) 抗BCMA scFv；或ii) 與BCMA特異性結合的第一sdAb部分（例如，V_HH）、任選的連接子和與BCMA特異性結合的第二sdAb部分（例如，V_HH），(b) 任選的鉸鏈結構域（例如，源自CD8α），(c) 跨膜結構域（例如，源自CD8α），以及 (d) ISD，所述ISD包含共刺激信號傳導結構域（例如，源自4-1BB或CD28）和CMSD（例如，包含選自SEQ ID NO: 41-74的序列的CMSD），其中所述CMSD包含一個或多個CMSD ITAM，其中所述多個CMSD ITAM任選地通過一個或多個CMSD連接子連接，其中共刺激信號傳導結構域位於CMSD的N末端。在一些實施例中，ITAM修飾的BCMA CAR從N'至C'包含：(a) CD8α信號肽，(b) 細胞外配體結合結構域，所述細胞外配體結合結構域包含：i) 抗BCMA scFv，或ii) 與BCMA特異性結合的第

一sdAb部分（例如，V_HH）、任選的連接子和與BCMA特異性結合的第二sdAb部分（例如，V_HH），(c) CD8α鉸鏈結構域，(d) CD8α跨膜結構域，(e) 4-1BB共刺激信號傳導結構域，以及 (f) CMSD（例如，包含選自SEQ ID NO: 41-74的序列的CMSD），其中所述CMSD包含一個或多個CMSD ITAM，其中所述多個CMSD ITAM任選地通過一個或多個CMSD連接子連接。在一些實施例中，ITAM修飾的CAR是ITAM修飾的CD20 CAR，其包含：(a) 包含抗CD20 scFv的細胞外配體結合結構域，(b) 任選的鉸鏈結構域（例如，源自CD8α），(c) 跨膜結構域（例如，源自CD8α），以及 (d) ISD，所述ISD包含共刺激信號傳導結構域（例如，源自4-1BB或CD28）和CMSD（例如，包含選自SEQ ID NO: 41-74的序列的CMSD），其中所述CMSD包含一個或多個CMSD ITAM，其中所述多個CMSD ITAM任選地通過一個或多個CMSD連接子連接，其中共刺激信號傳導結構域位於CMSD的N末端。在一些實施例中，ITAM修飾的CD20 CAR從N'至C'包含：(a) CD8α信號肽，(b) 包含抗CD20 scFv的細胞外配體結合結構域，(c) CD8α鉸鏈結構域，(d) CD8α跨膜結構域，(e) 4-1BB共刺激信號傳導結構域，以及 (f) CMSD（例如，包含選自SEQ ID NO: 41-74的序列的CMSD），其中所述CMSD包含一個或多個CMSD ITAM，其中所述多個CMSD ITAM任選地通過一個或多個CMSD連接子連接。在一些實施例中，信號肽包含SEQ ID NO: 127的胺基酸序列。在一些實施例中，鉸鏈結構域包含SEQ ID NO: 125的胺基酸序列。在一些實施例中，跨膜結構域包含SEQ

ID NO: 126的胺基酸序列。在一些實施例中，共刺激信號傳導結構域包含SEQ ID NO: 124的胺基酸序列。在一些實施例中，一個或多個CMSD連接子和抗BCMA sdAb之間的連接子獨立地選自SEQ ID NO: 17-39和116-120。在一些實施例中，ITAM修飾的BCMA CAR包含SEQ ID NO: 76-96和106-113中任一個的胺基酸序列。在一些實施例中，抗CD20 scFv源自Leu16。在一些實施例中，ITAM修飾的CD20 CAR包含SEQ ID NO: 98-104中任一個的胺基酸序列。因此，在一些實施例中，提供修飾的T細胞（例如，同種異體或自體T細胞），其包含：包含SEQ ID NO: 76-96和106-113中任一個的胺基酸序列的ITAM修飾的BCMA CAR。在一些實施例中，提供修飾的T細胞（例如，同種異體或自體T細胞），其包含：包含SEQ ID NO: 98-104中任一個的胺基酸序列的ITAM修飾的CD20 CAR。

【0090】 在一些實施例中，提供修飾的T細胞（例如，同種異體或自體T細胞），其包含：ITAM修飾的TCR，所述ITAM修飾的TCR包含：(a) 細胞外配體結合結構域，所述細胞外配體結合結構域包含一起特異性識別一種或多種靶抗原（例如，腫瘤抗原，如BCMA、CD19、CD20）或靶抗原肽/MHC複合物（例如，BCMA/MHC複合物）的一個或多個表位的源自野生型TCR的Vα和Vβ，其中Vα、Vβ或二者相對於野生型TCR在一個或多個CDR中包含一個或多個突變，(b) 跨膜結構域，所述跨膜結構域包含TCRα的跨膜結構域和TCRβ的跨膜結構域，以及 (c) 包含CMSD（例如，包含選自SEQ ID NO: 41-74的序列的CMSD）的ISD，其中所述CMSD包含一個或多

個CMSD ITAM，其中所述多個CMSD ITAM任選地通過一個或多個CMSD連接子連接。在一些實施例中，ITAM修飾的TCR還包含位於ITAM修飾的TCR的N末端處的信號肽（例如，源自CD8α）。在一些實施例中，信號肽包含SEQ ID NO: 127的胺基酸序列。在一些實施例中，一個或多個CMSD連接子獨立地選自SEQ ID NO: 17-39和116-120。

【0091】 在一些實施例中，提供修飾的T細胞（例如，同種異體或自體T細胞），其包含：ITAM修飾的cTCR，所述ITAM修飾的cTCR包含：(a) 細胞外配體結合結構域（如特異性識別一種或多種靶抗原（例如，腫瘤抗原，如BCMA、CD19、CD20）的一個或多個表位的抗原結合片段（例如，scFv、sdAb）、受體（例如，FcR）的細胞外結構域（或其部分）、配體（例如，APRIL、BAFF）的細胞外結構域（或其部分）），(b) 任選的受體結構域連接子，(c) 任選的第一TCR亞基（例如，CD3ε）的細胞外結構域或其部分，(d) 包含第二TCR亞基（例如，CD3ε）的跨膜結構域的跨膜結構域，以及 (e) 包含CMSD（例如，包含選自SEQ ID NO: 41-74的序列的CMSD）的ISD，其中CMSD包含一個或多個CMSD ITAM，其中所述多個CMSD ITAM任選地通過一個或多個CMSD連接子連接，其中所述第一TCR亞基和所述第二TCR亞基獨立地選自TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ和CD3δ。在一些實施例中，細胞外配體結合結構域包含抗BCMA scFv或抗CD20 scFv。在一些實施例中，細胞外配體結合結構域包含與BCMA特異性結合的第一

sdAb部分（例如，V_HH）、任選的連接子和與BCMA特異性結合的第二sdAb部分（例如，V_HH）。在一些實施例中，第一TCR亞基和第二TCR亞基是相同的。在一些實施例中，第一TCR亞基和第二TCR亞基是不同的。在一些實施例中，受體結構域連接子和/或兩個抗BCMA sdAb之間的連接子選自SEQ ID NO: 17-39和116-120。

在一些實施例中，CMSD基本上由一個CD3ε/δ/γ ITAM組成（例如，由其組成）。在一些實施例中，所述第一TCR亞基和所述第二TCR亞基均為CD3ε。在一些實施例中，CMSD ITAM中的一個或多個源自CD3ε、CD3δ和CD3γ中的一個或多個。在一些實施例中，CMSD連接子源自CD3ε、CD3δ或CD3γ，或者選自SEQ ID NO: 17-39和116-120。在一些實施例中，CMSD包含至少兩個CD3ε ITAM、至少兩個CD3δ ITAM或至少兩個CD3γ ITAM。在一些實施例中，ITAM修飾的cTCR還包含位於細胞外配體結合結構域的C末端與跨膜結構域的N末端之間的鉸鏈結構域（例如，源自CD8α）（如果所述任選的第一TCR亞基的細胞外結構域或其部分不存在）。在一些實施例中，ITAM修飾的cTCR還包含位於ITAM修飾的cTCR的N末端處的信號肽（例如，源自CD8α）。在一些實施例中，信號肽包含SEQ ID NO: 127的胺基酸序列。在一些實施例中，鉸鏈結構域包含SEQ ID NO: 125的胺基酸序列。

【0092】 在一些實施例中，提供修飾的T細胞（例如，同種異體或自體T細胞），其包含：ITAM修飾的TAC樣嵌合受體，所述ITAM修飾的TAC樣嵌合受體包含：(a) 細胞外配體結合結構域（如特異

性識別一種或多種靶抗原（例如，腫瘤抗原，如BCMA、CD19、CD20）的一個或多個表位的抗原結合片段（例如，scFv、sdAb）、受體（例如，FcR）的細胞外結構域（或其部分）、配體（例如，APRIL、BAFF）的細胞外結構域（或其部分）），(b) 任選的第一受體結構域連接子，(c) 特異性識別第一TCR亞基（例如，CD3ε）的細胞外結構域的細胞外TCR結合結構域，(d) 任選的第二受體結構域連接子，(e) 任選的第二TCR亞基（例如，CD3ε）的細胞外結構域或其部分，(f) 包含第三TCR亞基（例如，CD3ε）的跨膜結構域的跨膜結構域，以及 (g) 包含CMSD（例如，包含選自SEQ ID NO: 41-74的序列的CMSD）的ISD，其中CMSD包含一個或多個CMSD ITAM，其中所述多個CMSD ITAM任選地通過一個或多個CMSD連接子連接，其中所述第一TCR亞基、所述第二TCR亞基和所述第三TCR亞基獨立地選自TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ和CD3δ。在一些實施例中，細胞外配體結合結構域包含抗BCMA scFv或抗CD20 scFv。在一些實施例中，細胞外配體結合結構域包含與BCMA特異性結合的第一sdAb部分（例如，V_HH）、任選的連接子和與BCMA特異性結合的第二sdAb部分（例如，V_HH）。

在一些實施例中，第一TCR亞基、第二TCR亞基和第三TCR亞基是相同的。在一些實施例中，第一TCR亞基、第二TCR亞基和第三TCR亞基都是不同的。在一些實施例中，第二TCR亞基和第三TCR亞基是相同的，但是與第一TCR亞基不同。在一些實施例中，ITAM修飾的TAC樣嵌合受體還包含位於細胞外配體結合結構域的C末

端與跨膜結構域的N末端之間的鉸鏈結構域（例如，源自CD8α）（如果細胞外TCR結合結構域位於細胞外配體結合結構域的N末端，並且任選的第二TCR亞基的細胞外結構域或其部分不存在）。在一些實施例中，ITAM修飾的TAC樣嵌合受體還包含位於細胞外TCR結合結構域的C末端與跨膜結構域的N末端之間的鉸鏈結構域（例如，源自CD8α）（如果細胞外TCR結合結構域位於細胞外配體結合結構域的C末端，並且任選的第二TCR亞基的細胞外結構域或其部分不存在）。在一些實施例中，ITAM修飾的TAC樣嵌合受體還包含位於ITAM修飾的TAC樣嵌合受體的N末端處的信號肽（例如，源自CD8α）。在一些實施例中，第一和/或第二受體結構域連接子、兩個抗BCMA sdAb之間的連接子和一個或多個CMSD連接子獨立地選自SEQ ID NO: 17-39和116-120。在一些實施例中，所述第二TCR亞基和所述第三TCR亞基均為CD3ε。在一些實施例中，一個或多個CMSD ITAM源自CD3ε、CD3δ和CD3γ中的一個或多個。在一些實施例中，CMSD連接子源自CD3ε、CD3δ或CD3γ，或者選自SEQ ID NO: 17-39和116-120。在一些實施例中，CMSD包含至少兩個CD3ε ITAM、至少兩個CD3δ ITAM或至少兩個CD3γ ITAM。在一些實施例中，信號肽包含SEQ ID NO: 127的胺基酸序列。在一些實施例中，鉸鏈結構域包含SEQ ID NO: 125的胺基酸序列。

【0093】 在一些實施例中，編碼本文所述的含有CMSD的功能性外源受體的核酸可操作地連接至啟動子。在一些實施例中，啟動子選自勞斯肉瘤病毒（RSV）啟動子、猿猴病毒40（SV40）啟動子、

巨細胞病毒立即早期基因啟動子（CMV IE）、延長因數1α啟動子（EF1-α）、磷酸甘油酸激酶-1（PGK）啟動子、泛素-C（UBQ-C）啟動子、巨細胞病毒增強子/雞β肌動蛋白（CAG）啟動子、多瘤增強子/單純皰疹胸苷激酶（MC1）啟動子、β肌動蛋白（β-ACT）啟動子、「骨髓增生性肉瘤病毒增強子、負控制區缺失的、d1587rev引物結合位點取代的（MND）」啟動子、NFAT啟動子、TETON®啟動子和NFκB啟動子。在一些實施例中，啟動子是EF1-α或PGK啟動子。在一些實施例中，載體是病毒載體。在一些實施例中，病毒載體選自腺病毒載體、腺相關病毒載體、逆轉錄病毒載體、慢病毒載體、附加型載體 表現載體、單純皰疹病毒載體及其衍生物。在一些實施例中，載體是慢病毒載體。在一些實施例中，載體是非病毒載體。在一些實施例中，載體是Piggybac載體或睡美人（Sleeping Beauty）載體。

【0094】 因此，在一些實施例中，提供修飾的T細胞（例如，同種異體或自體T細胞），其包含：第二載體（例如，病毒載體，如慢病毒載體），所述第二載體包含編碼功能性外源受體（例如，ITAM修飾的CAR、ITAM修飾的TCR、ITAM修飾的cTCR、或ITAM修飾的TAC樣嵌合受體）的核酸，所述功能性外源受體包含：(a) 細胞外配體結合結構域（如特異性識別一種或多種靶抗原（例如，腫瘤抗原，如BCMA、CD19、CD20）的一個或多個表位的抗原結合片段（例如，scFv、sdAb）、受體（例如，FcR）的細胞外結構域（或其部分）、配體（例如，APRIL、BAFF）的細胞外結構域（或

其部分）），(b) 跨膜結構域（例如，源自CD8α），以及 (c) 包含CMSD（例如，包含選自SEQ ID NO: 41-74的序列的CMSD）的ISD，其中CMSD包含一個或多個CMSD ITAM，其中所述多個CMSD ITAM任選地通過一個或多個CMSD連接子連接。在一些實施例中，提供修飾的T細胞（例如，同種異體或自體T細胞），其包含：載體（例如，病毒載體，如慢病毒載體），所述載體包含編碼ITAM修飾的CAR的核酸，所述ITAM修飾的CAR包含：(a) 細胞外配體結合結構域（如特異性識別一種或多種靶抗原（例如，腫瘤抗原，如BCMA、CD19、CD20）的一個或多個表位的抗原結合片段（例如，scFv、sdAb）、受體（例如，FcR）的細胞外結構域（或其部分）、配體（例如，APRIL、BAFF）的細胞外結構域（或其部分）），(b) 任選的鉸鏈結構域（例如，源自CD8α），(c) 跨膜結構域（例如，源自CD8α），以及 (d) ISD，所述ISD包含任選的共刺激信號傳導結構域（例如，源自4-1BB或CD28）和CMSD（例如，包含選自SEQ ID NO: 41-74的序列的CMSD），其中CMSD包含一個或多個CMSD ITAM，其中所述多個CMSD ITAM任選地通過一個或多個CMSD連接子連接。在一些實施例中，ITAM修飾的CAR是ITAM修飾的BCMA CAR，其包含：(a) 細胞外配體結合結構域，所述細胞外配體結合結構域包含：i) 抗BCMA scFv，或ii) 與BCMA特異性結合的第一sdAb部分（例如，V_HH）、任選的連接子和與BCMA特異性結合的第二sdAb部分（例如，V_HH），(b) 鉸鏈結構域（例如，源自CD8α），(c) 跨膜結構域（例如，源自CD8α），以及 (d) ISD，

所述ISD包含共刺激信號傳導結構域（例如，源自4-1BB或CD28）和CMSD（例如，包含選自SEQ ID NO: 41-74的序列的CMSD），其中所述CMSD包含一個或多個CMSD ITAM，其中所述多個CMSD ITAM任選地通過一個或多個CMSD連接子連接，其中共刺激信號傳導結構域位於CMSD的N末端。在一些實施例中，ITAM修飾的CAR是ITAM修飾的CD20 CAR，其包含：(a) 包含抗CD20 scFv的細胞外配體結合結構域，(b) 鉸鏈結構域（例如，源自CD8α），(c) 跨膜結構域（例如，源自CD8α），以及 (d) ISD，所述ISD包含共刺激信號傳導結構域（例如，源自4-1BB或CD28）和CMSD（例如，包含選自SEQ ID NO: 41-74的序列的CMSD），其中所述CMSD包含一個或多個CMSD ITAM，其中所述多個CMSD ITAM任選地通過一個或多個CMSD連接子連接，其中共刺激信號傳導結構域位於CMSD的N末端。在一些實施例中，鉸鏈結構域包含SEQ ID NO: 125的胺基酸序列。在一些實施例中，跨膜結構域包含SEQ ID NO: 126的胺基酸序列。在一些實施例中，共刺激信號傳導結構域包含SEQ ID NO: 124的胺基酸序列。在一些實施例中，ITAM修飾的BCMA CAR包含SEQ ID NO: 76-96和106-113中任一個的序列。在一些實施例中，ITAM修飾的CD20 CAR包含SEQ ID NO: 98-104中任一個的序列。在一些實施例中，提供修飾的T細胞（例如，同種異體或自體T細胞），其包含：載體（例如，病毒載體，如慢病毒載體），所述載體包含編碼ITAM修飾的BCMA CAR的核酸，其中所述ITAM修飾的BCMA CAR包含SEQ ID NO: 76-96和106-113中任一

個的序列。在一些實施例中，提供修飾的T細胞（例如，同種異體或自體T細胞），其包含：載體（例如，病毒載體，如慢病毒載體），所述載體包含編碼ITAM修飾的CD20 CAR的核酸，其中所述ITAM修飾的CD20 CAR包含SEQ ID NO: 98-104中任一個的胺基酸序列。在一些實施例中，載體是病毒載體（例如，慢病毒載體）。在一些實施例中，載體啟動子是EF1-α或PGK啟動子。

【0095】 在一些實施例中，ITAM修飾的功能性外源受體-T細胞（例如，ITAM修飾的CAR-T細胞、ITAM修飾的TCR-T細胞、ITAM修飾的cTCR-T細胞或ITAM修飾的TAC樣嵌合受體-T細胞）包含未修飾的內源TCR（例如，TCRα和/或TCRβ）基因座和/或B2M基因座。在一些實施例中，ITAM修飾的功能性外源受體-T細胞包含修飾的內源TCR（例如，TCRα和/或TCRβ）基因座和/或修飾的內源B2M基因座。在一些實施例中，通過選自CRISPR-Cas、TALEN、shRNA和ZFN的基因編輯系統修飾內源TCR基因座。在一些實施例中，內源TCR基因座是通過CRISPR-Cas系統修飾的。在一些實施例中，編碼基因編輯系統的一種或多種核酸和編碼包含CMSD的功能性外源受體（例如，ITAM修飾的CAR、ITAM修飾的TCR、ITAM修飾的cTCR、或ITAM修飾的TAC樣嵌合受體）的核酸在相同載體上（例如，在相同啟動子控制或單獨啟動子控制下）。在一些實施例中，編碼基因編輯系統的一種或多種核酸和編碼包含CMSD的功能性外源受體的核酸在不同載體上。

【0096】 另外提供通過引入本文所述的任何載體（例如，病毒載

體，如慢病毒載體）獲得的修飾的T細胞（例如，同種異體或自體T細胞）。另外提供通過本文所述的任何方法獲得的修飾的T細胞（例如，同種異體或自體T細胞）。

【0097】 **效應子功能**

【0098】 如本文所用的「效應子功能」是指分子（例如，TCR（例如，TCRα和/或TCRβ）、MHC I、CD3ε、CD3δ、CD3γ、CD3ζ、CD4、CD28或本文所述的包含CMSD的功能性細胞外受體）的生物活性。例如，TCR（例如，TCRα和/或TCRβ）、CD3ε、CD3δ、CD3γ、CD3ζ、CD4、CD28、本文所述的包含CMSD的功能性細胞外受體、含有ITAM的分子、含有CD3ζ ISD的分子（例如，傳統CAR）或含有CMSD的分子（或包含它的修飾的T細胞）的效應子功能可以是信號轉導，如與T細胞刺激、T細胞啟動、T細胞增殖、細胞因數產生、T細胞的調節活性或細胞裂解活性等相關的信號轉導。含有ITAM的分子、含有CMSD的分子或CMSD的效應子功能可以是前文所提及的信號轉導，和/或可以是用作其他信號傳導分子的停泊位點。MHC I的效應子功能可以是表位呈遞等。

【0099】 分子（例如，TCR（例如，TCRα和/或TCRβ）、MHC I、CD3ε、CD3δ、CD3γ、CD3ζ、CD4、CD28或本文所述的包含CMSD的功能性細胞外受體）的下調涵蓋分子的細胞表面表現的下調，和/或分子或包含這種分子的細胞（例如，修飾的T細胞）的效應子功能的下調。為了測試外源Nef蛋白（例如，wt或突變體Nef）的表現是否下調TCR（例如，TCRα和/或TCRβ）、MHC I、CD3ε、

CD3δ、CD3γ、CD3ζ、CD4、CD28、本文所述的包含CMSD的功能性細胞外受體等（例如，下調其細胞表面表現和/或效應子功能），或者為了測試外源Nef蛋白是否與前文所提及的分子相互作用（例如，結合），可以測試是否存在蛋白質的細胞表面表現的下調，或者信號傳導分子介導的信號轉導（例如，TCR/CD3複合物介導的信號轉導）是否受影響（例如，被消除或減弱）。TCR、含有CMSD的功能性細胞外受體或包含其的修飾的T細胞等的效應子功能可以通過業內已知用於研究傳統CAR、傳統CAR-T或細胞受體的效應子功能的各種方法（例如，通過測量細胞因數釋放或受體介導的細胞毒性）來測量。示例性測試方法還參見實例。

【0100】 例如，可以測量表現含有CMSD的功能性細胞外受體的T細胞中受體介導的對靶細胞（例如，腫瘤細胞）的細胞毒性，例如，通過使用具有螢光素酶標記的靶細胞（例如，Raji.Luc）進行體外測試或進行關於腫瘤大小的體內測試。在一些實施例中，可以測量細胞外受體介導的促炎因數、趨化因數和/或細胞因數的釋放。如果受體介導的細胞毒性和/或促炎因數、趨化因數和/或細胞因數的釋放低於包含CD3ζ ISD的相同功能性細胞外受體（例如，除了具有CD3ζ ISD以外其他全部相同的相同傳統CAR），表明含有CMSD的功能性細胞外受體具有與包含CD3ζ ISD的相同功能性細胞外受體相比更低的效應子功能；反之亦然。或者，如果受體介導的細胞毒性和/或促炎因數、趨化因數和/或細胞因數的釋放在修飾的T細胞中共表現的外源Nef蛋白的存在下有所降低，這反映外

源Nef蛋白與功能性細胞外受體之間的相互作用，或者外源Nef蛋白下調功能性外源受體（例如，下調其細胞表面表現和/或效應子功能）。

【0101】 為了測試外源Nef蛋白的表現是否下調信號傳導分子介導的信號轉導（例如，TCR/CD3複合物介導的信號轉導），可以用植物凝集素（PHA）誘導被編碼外源Nef蛋白的載體轉導/轉染的細胞（例如，T細胞）用於T細胞啟動。PHA結合至糖基化表面蛋白（包括TCR）上的糖，由此與其交聯。這觸發鈣依賴性信號傳導途徑，導致活化T細胞核因數（NFAT）啟動。然後可以使用FACS使用例如PE抗人CD69抗體測試這些細胞的CD69+率，以在外源Nef蛋白的影響下檢測PHA介導的T細胞啟動。

【0102】 在一些實施例中，還可以使用常規生物化學方法如免疫沉澱和免疫螢光來確定Nef蛋白與信號傳導分子（如本文所述的功能性外源受體或TCR的CMSD）的結合。示例性測試方法還參見實例。

【0103】 為了測試外源Nef蛋白的表現是否下調TCR（例如，TCRα和/或TCRβ）的細胞表面表現，可以使被編碼外源Nef蛋白的載體轉導/轉染的細胞（例如，T細胞）經歷使用抗TCRα和/或抗TCRβ抗體的FACS或MACS分選（還參見實例）。例如，可以將轉導/轉染的細胞與PE/Cy5抗人TCRαβ抗體（例如，Biolegend，#306710）一起孵育用於FACS以檢測TCRαβ陽性率，或者與生物素化的人TCRαβ抗體（Miltenyi，200-070-407）一起孵育用於生物素標記，

然後根據MACS套組方案經歷磁性分離和富集。

【0104】 為了測試外源Nef蛋白的表現是否下調本文所述的包含CMSD的功能性細胞外受體的細胞表面表現，可以使用功能性細胞外受體所識別的標記的抗原（例如，FITC標記的人BCMA蛋白（例如，ACROBIOSYSTEM，BCA-HF254-200UG））用於FACS以檢測ITAM修飾的BCMA CAR表現。示例性測試方法還參見實例。

【0105】 **III.含有CMSD的功能性外源受體**

【0106】 本文所述的T細胞包含含有CMSD的功能性外源受體。本申請案在一方面還提供此類含有CMSD的功能性外源受體和表現此類受體的細胞（例如，效應細胞，如T細胞）。

【0107】 在一些實施例中，功能性外源受體包含：(a) 細胞外配體結合結構域（如特異性識別一種或多種靶抗原（例如，腫瘤抗原，如BCMA、CD19、CD20）的一個或多個表位的抗原結合片段（例如，scFv、sdAb）、受體（例如，FcR）的細胞外結構域（或其部分）、配體（例如，APRIL、BAFF）的細胞外結構域（或其部分）），(b) 跨膜結構域（例如，源自CD8α），以及 (c) 包含CMSD的ISD，其中所述CMSD包含一個或多個ITAM（「CMSD ITAM」），其中所述多個CMSD ITAM任選地通過一個或多個連接子（「CMSD連接子」）連接。在一些實施例中，多個（例如，2、3、4或更多個）CMSD ITAM彼此直接連接。在一些實施例中，CMSD包含通過並非源自含有ITAM的親本分子的一個或多個CMSD連接子（例如，G/S連接子）連接的兩個或更多個（例如，2、3、4或更多個）CMSD

ITAM。在一些實施例中，CMSD包含源自含有ITAM的親本分子的一個或多個CMSD連接子，所述含有ITAM的親本分子與衍生出一個或多個所述CMSD ITAM的含有ITAM的親本分子不同。在一些實施例中，CMSD包含兩個或更多個（例如，2、3、4或更多個）相同的CMSD ITAM。在一些實施例中，所述CMSD ITAM中的至少一個並非源自CD3ζ。在一些實施例中，所述CMSD ITAM中的至少一個並非CD3ζ的ITAM1或ITAM2。在一些實施例中，所述CMSD ITAM中的至少兩個彼此不同。在一些實施例中，所述多個CMSD ITAM各自源自不同的含有ITAM的親本分子。在一些實施例中，所述CMSD ITAM中的至少一個源自選自以下的含有ITAM的親本分子：CD3ε、CD3δ、CD3γ、Igα（CD79a）、Igβ（CD79b）、FcεRIβ、FcεRIγ、DAP12、CNAIP/NFAM1、STAM-1、STAM-2和膜突蛋白。在一些實施例中，CMSD基本上由一個CMSD ITAM組成（例如，由其組成）。在一些實施例中，CMSD包含一個CMSD ITAM（例如，源自CD3ε、CD3δ或CD3γ）和對於含有ITAM的親本分子是異源的CMSD N末端序列和/或CMSD C末端序列（例如，G/S連接子）（例如，基本上由其組成或由其組成）。在一些實施例中，至少一個或多個CMSD ITAM源自選自以下的含有ITAM的親本分子：CD3ε、CD3δ、CD3γ、CD3ζ、Igα（CD79a）、Igβ（CD79b）、FcεRIβ、FcεRIγ、DAP12、CNAIP/NFAM1、STAM-1、STAM-2和膜突蛋白。在一些實施例中，多個CMSD ITAM源自CD3ε、CD3δ、CD3γ、CD3ζ、DAP12、Igα（CD79a）、Igβ（CD79b）和FcεRIγ中的一種或多種。

在一些實施例中，CMSD不包含CD3ζ ITAM1和/或CD3ζ ITAM2。在一些實施例中，CMSD ITAM中的至少一個是CD3ζ ITAM3。在一些實施例中，CMSD不包含任何來自CD3ζ的ITAM。在一些實施例中，所述CMSD ITAM中的至少兩個源自相同的含有ITAM的親本分子。在一些實施例中，CMSD包含SEQ ID NO: 41-74中任一個的胺基酸序列。在一些實施例中，ISD還包含共刺激信號傳導結構域（例如，源自CD28或4-1BB）。在一些實施例中，共刺激結構域位於CMSD的N末端。在一些實施例中，共刺激結構域位於CMSD的C末端。在一些實施例中，共刺激信號傳導結構域包含SEQ ID NO: 124的胺基酸序列。在一些實施例中，跨膜結構域包含SEQ ID NO: 126的序列。在一些實施例中，鉸鏈結構域包含SEQ ID NO: 125的序列。在一些實施例中，含有CMSD的功能性外源受體還包含位於功能性外源受體的N末端處的信號肽（例如，源自CD8α）。在一些實施例中，信號肽包含SEQ ID NO: 127的序列。

【0108】 在一些實施例中，本文所述的包含CMSD的功能性外源受體沒有通過Nef蛋白（例如，野生型Nef如野生型SIV Nef，或突變體Nef如突變體SIV Nef）下調（例如，下調細胞表面表現和/或效應子功能，如參與細胞裂解活性的信號轉導）。在一些實施例中，與Nef不存在時相比，本文所述的包含CMSD的功能性外源受體通過Nef蛋白（例如，野生型Nef如野生型SIV Nef，或突變體Nef如突變體SIV Nef）下調（例如，下調細胞表面表現和/或效應子功能，如參與細胞裂解活性的信號轉導）至多約80%（如至多約70%、

60%、50%、40%、30%、20%、10%或5%中的任一個）。在一些實施例中，包含CMSD的功能性外源受體通過Nef蛋白（例如，wt、亞型或突變體Nef）進行的下調（例如，下調細胞表面表現和/或效應子功能，如參與細胞裂解活性的信號轉導）與包含CD3ζ ISD的相同外源受體（例如，除了具有CD3ζ ISD以外全部相同的傳統CAR）的下調相同或相似。在一些實施例中，包含CMSD的功能性外源受體通過Nef蛋白（例如，野生型Nef如野生型SIV Nef，或突變體Nef如突變體SIV Nef）進行的下調（例如，下調細胞表面表現和/或效應子功能，如參與細胞裂解活性的信號轉導）比包含CD3ζ ISD的相同外源受體（例如，具有CD3ζ ISD的傳統CAR）的下調少至少約3%（例如，少至少約4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%中的任一個）。

【0109】 含有CMSD的功能性外源受體以及特定功能性外源受體（如ITAM修飾的CAR、ITAM修飾的TCR、ITAM修飾的cTCR和ITAM修飾的TAC樣嵌合受體）的各種組分更詳細地進一步描述於下文中。

CMSD

【0110】 本文所述的嵌合信號傳導結構域（「CMSD」）包含以與任何天然存在的含有ITAM的親本分子不同的構型佈置的一個或多個ITAM（本文中也稱為「CMSD ITAM」）和任選的連接子（本文中也稱為「CMSD連接子」）。例如，在一些實施例中，CMSD包含

彼此直接連接的兩個或更多個ITAM。在一些實施例中，CMSD包含通過一個或多個「異源連接子」連接的ITAM，所述異源連接子即如下連接子序列：其並非源自含有ITAM的親本分子（例如，G/S連接子），或者源自與衍生出一個或多個CMSD ITAM的含有ITAM的親本分子不同的含有ITAM的親本分子。在一些實施例中，CMSD包含兩個或更多個（如2、3、4或更多個）相同ITAM。在一些實施例中，所述CMSD ITAM中的至少兩個彼此不同。在一些實施例中，所述CMSD ITAM中的至少一個並非源自CD3ζ。在一些實施例中，所述CMSD ITAM中的至少一個並非CD3ζ的ITAM1或ITAM2。在一些實施例中，CMSD不包含CD3ζ ITAM1和/或CD3ζ ITAM2。在一些實施例中，CMSD ITAM中的至少一個是CD3ζ ITAM3。在一些實施例中，CMSD不包含任何來自CD3ζ的ITAM。在一些實施例中，所述CMSD ITAM中的至少兩個源自相同的含有ITAM的親本分子。在一些實施例中，CMSD包含兩個或更多個（如2、3、4或更多個）ITAM，其中至少兩個CMSD ITAM各自源自不同的含有ITAM的親本分子。在一些實施例中，CMSD ITAM中的至少一個源自選自以下的含有ITAM的親本分子：CD3ε、CD3δ、CD3γ、Igα（CD79a）、Igβ（CD79b）、FcεRIβ、FcεRIγ、DAP12、CNAIP/NFAM1、STAM-1、STAM-2和膜突蛋白。在一些實施例中，CMSD基本上由一個CMSD ITAM組成（例如，由其組成）。在一些實施例中，CMSD基本上由一個CMSD ITAM（例如，源自CD3ε、CD3δ或CD3γ）以及對於含有ITAM的親本分子是「異源」的CMSD N末端序列和/或

CMSD C末端序列（例如，G/S連接子）組成（例如，由其組成），即，CMSD N末端序列和/或CMSD C末端序列並非源自含有ITAM的親本分子（例如，含有G/S的序列），或者源自與衍生出CMSD ITAM（例如，一個或多個CMSD ITAM）的含有ITAM的親本分子不同的含有ITAM的親本分子。在一些實施例中，CMSD包含CD3ζ的ITAM1、ITAM2和ITAM3，但是a) 兩個或三個ITAM並非通過連接子連接；b) 三個ITAM並非以與CD3ζ中的順序相比正確的順序來佈置；c) 至少一個ITAM位於與CD3ζ中的相應ITAM相比不同的位置；d) 至少兩個ITAM通過異源連接子連接；和/或e) CMSD還包含另外的CMSD ITAM。

【0111】 因此，例如，在一些實施例中，CMSD包含一個或多個CMSD ITAM，其中所述多個CMSD ITAM任選地通過一個或多個連接子（「CMSD連接子」）連接，其中：

(a) 所述多個（例如，2、3、4或更多個）CMSD ITAM彼此直接連接；

(b) 所述CMSD包含通過並非源自含有ITAM的親本分子的一個或多個連接子（例如，G/S連接子）連接的兩個或更多個（例如，2、3、4或更多個）CMSD ITAM；

(c) 所述CMSD包含源自含有ITAM的親本分子的一個或多個CMSD連接子，所述含有ITAM的親本分子與衍生出一個或多個所述CMSD ITAM的含有ITAM的親本分子不同；

(d) 所述CMSD包含兩個或更多個（例如，2、3、4或更多個）相

同的CMSD ITAM；

(e) 所述CMSD ITAM中的至少一個並非源自CD3ζ；

(f) 所述CMSD ITAM中的至少一個並非CD3ζ的ITAM1或ITAM2；

(g) 所述多個CMSD ITAM各自源自不同的含有ITAM的親本分子；

(h) 所述CMSD ITAM中的至少一個源自選自以下的含有ITAM的親本分子：CD3ε、CD3δ、CD3γ、Igα（CD79a）、Igβ（CD79b）、FcεRIβ、FcεRIγ、DAP12、CNAIP/NFAM1、STAM-1、STAM-2和膜突蛋白；(i) 所述CMSD由一個CMSD ITAM組成；和/或

(j) 所述CMSD基本上由一個CMSD ITAM以及對於含有ITAM的親本分子是異源的CMSD N末端序列和/或CMSD C末端序列（例如，G/S連接子）組成（例如，由其組成）。

【0112】 在一些實施例中，CMSD具有上述特徵中的兩種或更多種。例如，在一些實施例中，(a) 多個（例如，2、3、4或更多個）CMSD ITAM彼此直接連接，並且 (d) CMSD包含兩個或更多個（例如，2、3、4或更多個）相同的CMSD ITAM。在一些實施例中，(b) CMSD包含通過並非源自含有ITAM的親本分子的一個或多個連接子（例如，G/S連接子）連接的兩個或更多個（例如，2、3、4或更多個）CMSD ITAM，並且 (d) CMSD包含兩個或更多個（例如，2、3、4或更多個）相同的CMSD ITAM。在一些實施例中，(c) CMSD包含源自含有ITAM的親本分子的一個或多個CMSD連接子，所述含有ITAM的親本分子與衍生出一個或多個所述CMSD ITAM的含有ITAM的親本分子不同，並且 (d) CMSD包含兩個或更多個（例

如，2、3、4或更多個）相同的CMSD ITAM。在一些實施例中，(f) 所述CMSD ITAM中的至少一個並非CD3ζ的ITAM1或ITAM2，並且 (h) 所述CMSD ITAM中的至少一個源自選自以下的含有ITAM的親本分子：CD3ε、CD3δ、CD3γ、Igα（CD79a）、Igβ（CD79b）、FcεRIβ、FcεRIγ、DAP12、CNAIP/NFAM1、STAM-1、STAM-2和膜突蛋白。在一些實施例中，(b) CMSD包含通過並非源自含有ITAM的親本分子的一個或多個連接子（例如，G/S連接子）連接的兩個或更多個（例如，2、3、4或更多個）CMSD ITAM，並且 (f) 所述CMSD ITAM中的至少一個並非CD3ζ的ITAM1或ITAM2。在一些實施例中，(b) CMSD包含通過並非源自含有ITAM的親本分子的一個或多個連接子（例如，G/S連接子）連接的兩個或更多個（例如，2、3、4或更多個）CMSD ITAM，並且 (h) 所述CMSD ITAM中的至少一個源自選自以下的含有ITAM的親本分子：CD3ε、CD3δ、CD3γ、Igα（CD79a）、Igβ（CD79b）、FcεRIβ、FcεRIγ、DAP12、CNAIP/NFAM1、STAM-1、STAM-2和膜突蛋白。在一些實施例中，(b) CMSD包含通過並非源自含有ITAM的親本分子的一個或多個連接子（例如，G/S連接子）連接的兩個或更多個（例如，2、3、4或更多個）CMSD ITAM，(d) CMSD包含兩個或更多個（例如，2、3、4或更多個）相同的CMSD ITAM，並且 (h) 所述CMSD ITAM中的至少一個源自選自以下的含有ITAM的親本分子：CD3ε、CD3δ、CD3γ、Igα（CD79a）、Igβ（CD79b）、FcεRIβ、FcεRIγ、DAP12、CNAIP/NFAM1、STAM-1、STAM-2和膜突蛋白。在一些

實施例中，(c) CMSD包含源自含有ITAM的親本分子的一個或多個CMSD連接子，所述含有ITAM的親本分子與衍生出一個或多個所述CMSD ITAM的含有ITAM的親本分子不同，並且 (e) 至少一個所述CMSD ITAM並非源自CD3ζ。

【0113】 在一些實施例中，本文所述的功能性外源受體（例如，ITAM修飾的TCR、ITAM修飾的CAR、ITAM修飾的cTCR或ITAM修飾的TAC樣嵌合受體）的ISD基本上由CMSD組成（如由其組成）。在一些實施例中，本文所述的功能性外源受體（例如，ITAM修飾的CAR）的ISD還包含共刺激信號傳導結構域（例如，4-1BB或CD28共刺激信號傳導結構域），所述共刺激信號傳導結構域可以定位於CMSD的N末端或C末端，並且經由CMSD內的任選的連接肽與CMSD連接（例如，經由任選的CMSD N末端序列或任選的CMSD C末端序列連接）。

【0114】 本文所述的CMSD在ISD中起初級信號傳導結構域的作用，所述CMSD以刺激性方式作用以誘導免疫效應子功能。例如，T細胞的效應子功能可以是細胞裂解活性或輔助細胞活性，包括細胞因數的分泌。如本文所用的「ITAM」是指可以在多種免疫細胞（例如，T細胞）中表現的信號傳導分子的尾部中發現的保守蛋白質基序。ITAM位於多種細胞表面受體（例如，TCR複合物）或與其締合的亞基的胞質結構域中，並且在信號傳輸中具有重要的調節作用。傳統CAR通常包含CD3ζ的初級ISD，其含有3個ITAM，即CD3ζ ITAM1、CD3ζ ITAM2和CD3ζ ITAM3。然而，已經報導了使

用CD3ζ作為CAR的ISD的限制。在一些實施例中，本文所述的ITAM是天然存在的，即可以在天然存在的含有ITAM的親本分子中發現。在一些實施例中，對ITAM進行進一步修飾，例如，通過相對于天然存在的ITAM進行一個、兩個或更多個胺基酸取代、缺失、添加或再定位來進行。在一些實施例中，修飾的ITAM（下文也稱為「非天然存在的ITAM」）具有與親本ITAM相比相同或相似的ITAM功能（例如，信號轉導，或者作為停泊位點）。

【0115】 ITAM通常包含由6-8個胺基酸殘基隔開的胺基酸序列YxxL/I的兩個重複序列，其中每個x獨立地是任何胺基酸殘基，得到保守基序YxxL/I-x_{6-8}-YxxL/I（SEQ ID NO: 114）。在一些實施例中，ITAM相對於第一ITAM酪胺酸（Y）在+2位置含有帶負電荷的胺基酸（D/E），得到D/E-x_{0-2}-YxxL/I-x_{6-8}-YxxL/I（SEQ ID NO: 115）的共有序列。示例性含有ITAM的信號傳導分子包括CD3ε、CD3δ、CD3γ、CD3ζ、Igα（CD79a）、Igβ（CD79b）、FcεRIβ、FcεRIγ、DAP12、CNAIP/NFAM1、STAM-1、STAM-2和膜突蛋白，本文中也稱為「含有ITAM的親本分子」。已知存在於含有ITAM的親本分子中的ITAM在配體接合後參與細胞內的信號轉導，這至少部分是在啟動信號傳導分子後通過ITAM中酪胺酸殘基的磷酸化介導的。ITAM還可以起參與信號傳導途徑的其他蛋白質的停泊位點的作用。

【0116】 在一些實施例中，含有ITAM的親本分子是CD3ζ。在一些實施例中，CD3ζ ISD具有SEQ ID NO: 7的序列，其包含CD3ζ

ITAM1（SEQ ID NO: 4）、CD3ζ ITAM2（SEQ ID NO: 5）、CD3ζ ITAM3（SEQ ID NO: 6）以及在CD3ζ ITAM1的N末端、在CD3ζ ITAM3的C末端並且連接所述三個ITAM的非ITAM序列。在一些實施例中，含有ITAM的親本分子包含具有選自SEQ ID NO: 1-6和8-16的序列的ITAM。

【0117】 在一些實施例中，CMSD包含多個（例如，2、3、4或更多個）ITAM，其中至少兩個彼此直接連接。在一些實施例中，CMSD包含多個ITAM，其中至少兩個ITAM通過異源連接子連接。在一些實施例中，CMSD還包含在最N末端CMSD ITAM的N末端處的N末端序列（本文中也稱為「CMSD N末端序列」）。在一些實施例中，CMSD還包含在最C末端CMSD ITAM的C末端處的C末端序列（本文中也稱為「CMSD C末端序列」）。在一些實施例中，一個或多個CMSD連接子、CMSD N末端序列和/或C末端CMSD序列選自SEQ ID NO: 17-39和116-120，如SEQ ID NO: 17-31中的任一個。在一些實施例中，一個或多個CMSD連接子、CMSD N末端序列和/或CMSD C末端序列的長度是約1至約15（如約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15中的任一個，或其間的任何範圍）個胺基酸。在一些實施例中，異源連接子是G/S連接子。在一些實施例中，一個或多個異源連接子選自SEQ ID NO: 17-19、23、25-29。在一些實施例中，CMSD C末端序列選自SEQ ID NO: 18、20、25和27-29。在一些實施例中，CMSD N末端序列選自SEQ ID NO: 17、21、22、24、30和31。在一些實施例中，異源連接子源自與

衍生出一個或多個CMSD ITAM的含有ITAM的親本分子不同的含有ITAM的親本分子。在一些實施例中，CMSD不包含任何CMSD連接子、CMSD N末端序列和/或C末端CMSD序列。

【0118】 在一些實施例中，含有一個ITAM的CMSD從N'至C'包含：任選的CMSD N末端序列 - CMSD ITAM - 任選的CMSD C末端序列。在一些實施例中，本文所述的CMSD從N'至C'包含：任選的CMSD N末端序列 - CD3ε ITAM - 任選的CMSD C末端序列。在一些實施例中，本文所述的CMSD從N'至C'包含：任選的CMSD N末端序列 - CD3δ ITAM - 任選的CMSD C末端序列。在一些實施例中，CMSD包含SEQ ID NO: 67的序列（下文也稱為「ITAM033」或「ITAM033構建體」）。在一些實施例中，CMSD包含SEQ ID NO: 68的序列（下文也稱為「ITAM034」或「ITAM034構建體」）。

【0119】 在一些實施例中，含有兩個ITAM的CMSD從N'至C'包含：任選的CMSD N末端序列 - 第一CMSD ITAM - 任選的CMSD連接子 - 第二CMSD ITAM - 任選的CMSD C末端序列。在一些實施例中，本文所述的CMSD從N'至C'包含：任選的CMSD N末端序列 - CD3δ ITAM - 任選的CMSD連接子 - CD3ε ITAM - 任選的CMSD C末端序列。在一些實施例中，本文所述的CMSD從N'至C'包含：任選的CMSD N末端序列 - CD3γ ITAM - 任選的CMSD連接子 - DAP12 ITAM - 任選的CMSD C末端序列。在一些實施例中，CMSD連接子與CD3ζ第一連接子或CD3ζ第二連接子相同。在一些實施例中，CMSD包含SEQ ID NO: 69的序列（下文也稱為

「ITAM035」或「ITAM035構建體」)。在一些實施例中，CMSD包含SEQ ID NO: 70的序列（下文也稱為「ITAM036」或「ITAM036構建體」)。

【0120】 在一些實施例中，含有三個ITAM的CMSD從N'至C'包含：任選的CMSD N末端序列 - 第一CMSD ITAM - 任選的第一CMSD連接子 - 第二CMSD ITAM - 任選的第二CMSD連接子 - 第三CMSD ITAM - 任選的CMSD C末端序列。示例性結構參見圖8。在一些實施例中，本文所述的CMSD從N'至C'包含：任選的CMSD N末端序列 - CD3ζ ITAM1 - 任選的第一CMSD連接子 - CD3ζ ITAM2 - 任選的第二CMSD連接子 - CD3ζ ITAM3 - 任選的CMSD C末端序列，其中第一CMSD連接子和第二CMSD連接子中的至少一個不存在或對於CD3ζ是異源的。在一些實施例中，第一CMSD連接子可以與CD3ζ第二連接子相同，並且第二CMSD連接子可以與CD3ζ第一連接子相同。在一些實施例中，第一CMSD連接子和第二CMSD連接子可以都與CD3ζ第一連接子相同。在一些實施例中，第一CMSD連接子和第二CMSD連接子可以都與CD3ζ第二連接子相同。在一些實施例中，本文所述的CMSD包含SEQ ID NO: 41的序列（下文也稱為「M663 CMSD」)。在一些實施例中，本文所述的CMSD包含SEQ ID NO: 54的序列（下文也稱為「ITAM007」或「ITAM007構建體」)。

【0121】 在一些實施例中，本文所述的CMSD從N'至C'包含：任選的CMSD N末端序列 - CD3ζ ITAM1 - 任選的第一CMSD連接子 -

CD3ζ ITAM1 - 任選的第二CMSD連接子 - CD3ζ ITAM1 - 任選的CMSD C末端序列，其中任選的第一CMSD連接子和/或第二CMSD連接子可以不存在，或者具有適合於CMSD的效應子功能信號轉導的任何連接子序列（例如，第一CMSD連接子可以與CD3ζ第一連接子相同，第二CMSD連接子可以與CD3ζ第二連接子相同，參見圖8）。在一些實施例中，本文所述的CMSD包含SEQ ID NO: 42的序列（下文也稱為「M665 CMSD」）。在一些實施例中，本文所述的CMSD包含SEQ ID NO: 55的序列（下文也稱為「ITAM008」或「ITAM008構建體」）。

【0122】 在一些實施例中，本文所述的CMSD從N'至C'包含：任選的CMSD N末端序列 - CD3ζ ITAM2 - 任選的第一CMSD連接子 - CD3ζ ITAM2 - 任選的第二CMSD連接子 - CD3ζ ITAM2 - 任選的CMSD C末端序列，其中任選的第一CMSD連接子和/或第二CMSD連接子可以不存在，或者具有適合於CMSD的效應子功能信號轉導的任何連接子序列（例如，第一CMSD連接子可以與CD3ζ第一連接子相同，第二CMSD連接子可以與CD3ζ第二連接子相同）。在一些實施例中，本文所述的CMSD包含SEQ ID NO: 43的序列（下文也稱為「M666 CMSD」）。

【0123】 在一些實施例中，本文所述的CMSD從N'至C'包含：任選的CMSD N末端序列 - CD3ζ ITAM3 - 任選的第一CMSD連接子 - CD3ζ ITAM3 - 任選的第二CMSD連接子 - CD3ζ ITAM3 - 任選的CMSD C末端序列，其中任選的第一CMSD連接子和/或第二CMSD

連接子可以不存在，或者具有適合於CMSD的效應子功能信號轉導的任何連接子序列（例如，第一CMSD連接子可以與CD3ζ第一連接子相同，第二CMSD連接子可以與CD3ζ第二連接子相同）。在一些實施例中，本文所述的CMSD包含SEQ ID NO: 44的序列（下文也稱為「M667 CMSD」）。

【0124】 在一些實施例中，本文所述的CMSD從N'至C'包含：任選的CMSD N末端序列 - CD3ζ ITAM1 - 任選的第一CMSD連接子 - CD3ζ ITAM2 - 任選的第二CMSD連接子 - CD3ζ ITAM2 - 任選的CMSD C末端序列。在一些實施例中，本文所述的CMSD從N'至C'包含：任選的CMSD N末端序列 - CD3ζ ITAM1 - 任選的第一CMSD連接子 - CD3ζ ITAM3 - 任選的第二CMSD連接子 - CD3ζ ITAM3 - 任選的CMSD C末端序列。在一些實施例中，本文所述的CMSD從N'至C'包含：任選的CMSD N末端序列 - CD3ζ ITAM1 - 任選的第一CMSD連接子 - CD3ζ ITAM3 - 任選的第二CMSD連接子 - CD3ζ ITAM2 - 任選的CMSD C末端序列。在一些實施例中，本文所述的CMSD從N'至C'包含：任選的CMSD N末端序列 - CD3ζ ITAM2 - 任選的第一CMSD連接子 - CD3ζ ITAM1 - 任選的第二CMSD連接子 - CD3ζ ITAM1 - 任選的CMSD C末端序列。在一些實施例中，本文所述的CMSD從N'至C'包含：任選的CMSD N末端序列 - CD3ζ ITAM2 - 任選的第一CMSD連接子 - CD3ζ ITAM1 - 任選的第二CMSD連接子 - CD3ζ ITAM2 - 任選的CMSD C末端序列。在一些實施例中，本文所述的CMSD從N'至C'包含：任選的

CMSD N末端序列 - CD3ζ ITAM2 - 任選的第一CMSD連接子 - CD3ζ ITAM1 - 任選的第二CMSD連接子 - CD3ζ ITAM3 - 任選的CMSD C末端序列。在一些實施例中，本文所述的CMSD從N'至C'包含：任選的CMSD N末端序列 - CD3ζ ITAM2 - 任選的第一CMSD連接子 - CD3ζ ITAM3 - 任選的第二CMSD連接子 - CD3ζ ITAM3 - 任選的CMSD C末端序列。在一些實施例中，本文所述的CMSD從N'至C'包含：任選的CMSD N末端序列 - CD3ζ ITAM3 - 任選的第一CMSD連接子 - CD3ζ ITAM1 - 任選的第二CMSD連接子 - CD3ζ ITAM1 - 任選的CMSD C末端序列。在一些實施例中，本文所述的CMSD從N'至C'包含：任選的CMSD N末端序列 - CD3ζ ITAM3 - 任選的第一CMSD連接子 - CD3ζ ITAM2 - 任選的第二CMSD連接子 - CD3ζ ITAM3 - 任選的CMSD C末端序列。在一些實施例中，本文所述的CMSD從N'至C'包含：任選的CMSD N末端序列 - CD3ζ ITAM3 - 任選的第一CMSD連接子 - CD3ζ ITAM2 - 任選的第二CMSD連接子 - CD3ζ ITAM2 - 任選的CMSD C末端序列。在一些實施例中，本文所述的CMSD從N'至C'包含：任選的CMSD N末端序列 - CD3ζ ITAM3 - 任選的第一CMSD連接子 - CD3ζ ITAM2 - 任選的第二CMSD連接子 - CD3ζ ITAM3 - 任選的CMSD C末端序列。在一些實施例中，CMSD不包

含CD3ζ的任何ITAM（例如，ITAM1、ITAM2或ITAM3）。在一些實施例中，含有3個ITAM的CMSD包含源自含有非CD3ζ ITAM的親本分子（例如，CD3ε、CD3δ、CD3γ、Igα（CD79a）、Igβ（CD79b）、FcεRIβ、FcεRIγ、DAP12、CNAIP/NFAM1、STAM-1、STAM-2或膜突蛋白）的一個或多個（例如，1、2或3個）ITAM，並且連接它們的一個或多個任選的連接子可以不存在，或者具有適合於CMSD的效應子功能信號轉導的任何連接子序列（例如，第一CMSD連接子可以與CD3ζ第一連接子相同，第二CMSD連接子可以與CD3ζ第二連接子或G/S連接子相同）。

【0125】 因此在一些實施例中，本文所述的CMSD從N'至C'包含：任選的CMSD N末端序列 - CD3ε ITAM - 任選的第一CMSD連接子 - CD3ε ITAM - 任選的第二CMSD連接子 - CD3ε ITAM - 任選的CMSD C末端序列。在一些實施例中，一個或多個CMSD連接子與CD3ζ第一連接子或CD3ζ第二連接子相同。在一些實施例中，本文所述的CMSD包含SEQ ID NO: 46的序列（下文也稱為「M679 CMSD」）。在一些實施例中，本文所述的CMSD包含SEQ ID NO: 56的序列（下文也稱為「ITAM009」或「ITAM009構建體」）。

【0126】 在一些實施例中，本文所述的CMSD從N'至C'包含：任選的CMSD N末端序列 - DAP12 ITAM - 任選的第一CMSD連接子 - DAP12 ITAM - 任選的第二CMSD連接子 - DAP12 ITAM - 任選的CMSD C末端序列。在一些實施例中，一個或多個CMSD連接子與CD3ζ第一連接子或CD3ζ第二連接子相同。在一些實施例中，本

文所述的CMSD包含SEQ ID NO: 48的序列（下文也稱為「M681 CMSD」）。

【0127】 在一些實施例中，本文所述的CMSD從N'至C'包含：任選的CMSD N末端序列 - Igα ITAM - 任選的第一CMSD連接子 - Igα ITAM - 任選的第二CMSD連接子 - Igα ITAM - 任選的CMSD C末端序列。在一些實施例中，一個或多個CMSD連接子與CD3ζ第一連接子或CD3ζ第二連接子相同。在一些實施例中，本文所述的CMSD包含SEQ ID NO: 49的序列（下文也稱為「M682 CMSD」）。

【0128】 在一些實施例中，本文所述的CMSD從N'至C'包含：任選的CMSD N末端序列 - Igβ ITAM - 任選的第一CMSD連接子 - Igβ ITAM - 任選的第二CMSD連接子 - Igβ ITAM - 任選的CMSD C末端序列。在一些實施例中，一個或多個CMSD連接子與CD3ζ第一連接子或CD3ζ第二連接子相同。在一些實施例中，本文所述的CMSD包含SEQ ID NO: 50的序列（下文也稱為「M683 CMSD」）。

【0129】 在一些實施例中，本文所述的CMSD從N'至C'包含：任選的CMSD N末端序列 - FcεRIγ ITAM - 任選的第一CMSD連接子 - FcεRIγ ITAM - 任選的第二CMSD連接子 - FcεRIγ ITAM - 任選的CMSD C末端序列。在一些實施例中，一個或多個CMSD連接子與CD3ζ第一連接子或CD3ζ第二連接子相同。在一些實施例中，本文所述的CMSD包含SEQ ID NO: 52的序列（下文也稱為「M685 CMSD」）。

【0130】 在一些實施例中，本文所述的CMSD從N'至C'包含：任選

的CMSD N末端序列 - CD3δ ITAM - 任選的第一CMSD連接子 - CD3δ ITAM - 任選的第二CMSD連接子 - CD3δ ITAM - 任選的CMSD C末端序列。在一些實施例中，一個或多個CMSD連接子與CD3ζ第一連接子或CD3ζ第二連接子相同。在一些實施例中，本文所述的CMSD包含SEQ ID NO: 45的序列（下文也稱為「M678 CMSD」）。

【0131】 在一些實施例中，本文所述的CMSD從N'至C'包含：任選的CMSD N末端序列 - CD3γ ITAM - 任選的第一CMSD連接子 - CD3γ ITAM - 任選的第二CMSD連接子 - CD3γ ITAM - 任選的CMSD C末端序列。在一些實施例中，一個或多個CMSD連接子與CD3ζ第一連接子或CD3ζ第二連接子相同。在一些實施例中，本文所述的CMSD包含SEQ ID NO: 47的序列（下文也稱為「M680 CMSD」）。

【0132】 在一些實施例中，本文所述的CMSD從N'至C'包含：任選的CMSD N末端序列 - FcεRIβ ITAM - 任選的第一CMSD連接子 - FcεRIβ ITAM - 任選的第二CMSD連接子 - FcεRIβ ITAM - 任選的CMSD C末端序列。在一些實施例中，一個或多個CMSD連接子與CD3ζ第一連接子或CD3ζ第二連接子相同。在一些實施例中，本文所述的CMSD包含SEQ ID NO: 51的序列（下文也稱為「M684 CMSD」）。

【0133】 在一些實施例中，本文所述的CMSD從N'至C'包含：任選的CMSD N末端序列 - CNAIP/NFAM1 ITAM - 任選的第一CMSD

連接子 - CNAIP/NFAM1 ITAM - 任選的第二CMSD連接子 - CNAIP/NFAM1 ITAM - 任選的CMSD C末端序列。在一些實施例中，一個或多個CMSD連接子與CD3ζ第一連接子或CD3ζ第二連接子相同。在一些實施例中，本文所述的CMSD包含SEQ ID NO: 53的序列（下文也稱為「M799 CMSD」）。

【0134】 在一些實施例中，本文所述的CMSD從N'至C'包含：任選的CMSD N末端序列 - CD3δ ITAM - 任選的第一CMSD連接子 - CD3ε ITAM - 任選的第二CMSD連接子 - CD3ε ITAM - 任選的CMSD C末端序列。在一些實施例中，一個或多個CMSD連接子與CD3ζ第一連接子或CD3ζ第二連接子相同。在一些實施例中，本文所述的CMSD包含SEQ ID NO: 71的序列（下文也稱為「ITAM037」或「ITAM037構建體」）。

【0135】 在一些實施例中，本文所述的CMSD從N'至C'包含：任選的CMSD N末端序列 - CD3δ ITAM - 任選的第一CMSD連接子 - CD3ε ITAM - 任選的第二CMSD連接子 - CD3γ ITAM - 任選的CMSD C末端序列。在一些實施例中，一個或多個CMSD連接子與CD3ζ第一連接子或CD3ζ第二連接子相同。在一些實施例中，本文所述的CMSD包含SEQ ID NO: 72的序列（下文也稱為「ITAM038」或「ITAM038構建體」）。

【0136】 在一些實施例中，本文所述的CMSD從N'至C'包含：任選的CMSD N末端序列 - DAP12 ITAM - 任選的第一CMSD連接子 - CD3ε ITAM - 任選的第二CMSD連接子 - CD3δ ITAM - 任選的

CMSD C末端序列。在一些實施例中，一個或多個CMSD連接子與CD3ζ第一連接子或CD3ζ第二連接子相同。在一些實施例中，本文所述的CMSD包含SEQ ID NO: 73的序列（下文也稱為「ITAM045」或「ITAM045構建體」）。

【0137】 在一些實施例中，本文所述的CMSD從N'至C'包含：任選的CMSD N末端序列 - DAP12 ITAM - 任選的第一CMSD連接子 - CD3δ ITAM - 任選的第二CMSD連接子 - CD3ε ITAM - 任選的CMSD C末端序列。在一些實施例中，一個或多個CMSD連接子與CD3ζ第一連接子或CD3ζ第二連接子相同。在一些實施例中，本文所述的CMSD包含SEQ ID NO: 74的序列（下文也稱為「ITAM046」或「ITAM046構建體」）。

【0138】 在一些實施例中，本文所述的CMSD從N'至C'包含：胞質CD3ζ N末端序列 - 第一CMSD ITAM - CD3ζ第一連接子 - 第二CMSD ITAM - CD3ζ第二連接子 - 第三CMSD ITAM - CD3ζ C末端序列，其中CMSD內的所有非ITAM序列（胞質CD3ζ N末端序列、CD3ζ第一連接子、CD3ζ第二連接子和CD3ζ C末端序列）都與親本CD3ζ ISD中的相同並且位置與它們在親本CD3ζ ISD中天然所在的位置相同，這種CMSD也被稱為「包含非ITAM CD3ζ ISD框架的CMSD」（參見圖8）。對於包含非ITAM CD3ζ ISD框架的CMSD，第一/第二/第三CMSD ITAM可以獨立地選自CD3δ ITAM、CD3γ ITAM、CD3ζ ITAM1、CD3ζ ITAM2、CD3ζ ITAM3、DAP12 ITAM、CNAIP/NFAM1 ITAM、Igα ITAM、Igβ ITAM和FcεRIγ ITAM（SEQ

ID NO: 1、3-6、8-11和13；長度都是29個胺基酸），但是第一CMSD ITAM是CD3ζ ITAM1，第二CMSD ITAM是CD3ζ ITAM2，並且第三CMSD ITAM是CD3ζ ITAM3的組合除外。例如，在一些實施例中，本文所述的CMSD從N'至C'包含：胞質CD3ζ N末端序列 - DAP12 ITAM - CD3ζ第一連接子 - DAP12 ITAM - CD3ζ第二連接子 - DAP12 ITAM - CD3ζ C末端序列（例如，由其組成）。在一些實施例中，本文所述的CMSD從N'至C'包含：胞質CD3ζ N末端序列 - CD3γ ITAM - CD3ζ第一連接子 - CD3γ ITAM - CD3ζ第二連接子 - CD3γ ITAM - CD3ζ C末端序列（例如，由其組成）。

【0139】 在一些實施例中，含有四個ITAM的CMSD從N'至C'包含：任選的CMSD N末端序列 - 第一CMSD ITAM - 任選的第一CMSD連接子 - 第二CMSD ITAM - 任選的第二CMSD連接子 - 第三CMSD ITAM - 任選的第三CMSD連接子 - 第四CMSD ITAM - 任選的CMSD C末端序列。對於含有5個ITAM的CMSD、含有6個ITAM的CMSD等，以此類推。對於包含四個或更多個（例如，4、5或更多個）ITAM的CMSD，既然含有ITAM的親本分子通常包含1個ITAM（例如，含有非CD3ζ ITAM的分子，如CD3ε、CD3δ、CD3γ、Igα（CD79a）、Igβ（CD79b）、FcεRIβ、FcεRIγ、DAP12、CNAIP/NFAM1、STAM-1、STAM-2或膜突蛋白）或3個ITAM（例如，CD3ζ），CMSD內的至少一個ITAM將與含有一個ITAM的親本分子不同，源自與含有ITAM的親本分子不同的分子，或者其位置與所述ITAM在含有ITAM的親本分子中天然所在的位置不同，因此

包含四個或更多個（例如，4、5或更多個）ITAM的CMSD可以包含源自本文所述的任何含有ITAM的親本分子（例如，CD3ζ）的ITAM，任選的連接子可以不存在，源自含有ITAM的親本分子的胞質非ITAM序列，或者具有來自含有ITAM的親本分子的異源序列（例如，可以是G/S連接子）。在一些實施例中，本文所述的CMSD從N'至C'包含：任選的CMSD N末端序列 - CD3δ ITAM（SEQ ID NO: 1）- 任選的第一CMSD連接子 - CD3ε ITAM（SEQ ID NO: 2）- 任選的第二CMSD連接子 - CD3γ ITAM（SEQ ID NO: 3）- 任選的第三CMSD連接子 - DAP12 ITAM（SEQ ID NO: 8）- 任選的CMSD C末端序列。在一些實施例中，一個或多個任選的CMSD連接子、CMSD N末端序列和CMSD C末端序列源自含有ITAM的親本分子的胞質非ITAM序列。在一些實施例中，任選的第一、第二和第三CMSD連接子、任選的CMSD N末端序列和任選的CMSD C末端序列是異源的，並且獨立地選自SEQ ID NO: 17-39和116-120，如SEQ ID NO: 17-31中的任一個。在一些實施例中，CMSD包含SEQ ID NO: 57的序列（下文也稱為「ITAM010」或「ITAM010構建體」）。在一些實施例中，CMSD包含SEQ ID NO: 59的序列（下文也稱為「ITAM025」或「ITAM025構建體」）。在一些實施例中，CMSD包含SEQ ID NO: 60的序列（下文也稱為「ITAM026」或「ITAM026構建體」）。在一些實施例中，CMSD包含SEQ ID NO: 61的序列（下文也稱為「ITAM027」或「ITAM027構建體」）。在一些實施例中，CMSD包含SEQ ID NO: 62的序列（下文也稱為

「ITAM028」或「ITAM028構建體」)。在一些實施例中，CMSD包含SEQ ID NO: 63的序列（下文也稱為 「ITAM029」或「ITAM029構建體」)。在一些實施例中，本文所述的CMSD從N'至C'由以下組成：CD3δ ITAM - CD3ε ITAM - CD3γ ITAM - DAP12 ITAM。在一些實施例中，CMSD包含SEQ ID NO: 58的序列（下文也稱為「ITAM024」或「ITAM024構建體」)。

【0140】 在一些實施例中，本文所述的CMSD從N'至C'包含：任選的CMSD N末端序列 - CD3ε ITAM - 任選的第一CMSD連接子 - CD3δ ITAM - 任選的第二CMSD連接子 - DAP12 ITAM - 任選的第三CMSD連接子 - CD3γ ITAM - 任選的CMSD C末端序列。在一些實施例中，一個或多個任選的CMSD連接子、CMSD N末端序列和CMSD C末端序列源自含有ITAM的親本分子的胞質非ITAM序列。在一些實施例中，CMSD包含SEQ ID NO: 64的序列（下文也稱為「ITAM030」或「ITAM030構建體」)。

【0141】 在一些實施例中，本文所述的CMSD從N'至C'包含：任選的CMSD N末端序列 - CD3γ ITAM - 任選的第一CMSD連接子 - DAP12 ITAM - 任選的第二CMSD連接子 - CD3δ ITAM - 任選的第三CMSD連接子 - CD3ε ITAM - 任選的CMSD C末端序列。在一些實施例中，一個或多個任選的CMSD連接子、CMSD N末端序列和CMSD C末端序列源自含有ITAM的親本分子的胞質非ITAM序列。在一些實施例中，CMSD包含SEQ ID NO: 65的序列（下文也稱為「ITAM031」或「ITAM031構建體」)。

【0142】 在一些實施例中，本文所述的CMSD從N'至C'包含：任選的CMSD N末端序列 - DAP12 ITAM - 任選的第一CMSD連接子 - CD3γ ITAM - 任選的第二CMSD連接子 - CD3ε ITAM - 任選的第三CMSD連接子 - CD3δ ITAM - 任選的CMSD C末端序列。在一些實施例中，一個或多個任選的CMSD連接子、CMSD N末端序列和CMSD C末端序列源自含有ITAM的親本分子的胞質非ITAM序列。在一些實施例中，CMSD包含SEQ ID NO: 66的序列（下文也稱為「ITAM032」或「ITAM032構建體」）。

【0143】 在一些實施例中，如與CD3ζ ISD相比，本文所述的CMSD不具有或具有降低的與本文所述的Nef蛋白（例如，wt、亞型、突變體或非天然存在的Nef）的結合（如降低至少約3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%中任一個的結合）。在一些實施例中，如與CD3ζ ISD相比，本文所述的CMSD具有相同或相似的與本文所述的Nef蛋白的結合。在一些實施例中，如與CD3ζ ISD相比，CMSD的功能（例如，信號轉導和/或作為停泊位點）通過本文所述的Nef蛋白進行的下調相同或相似。在一些實施例中，如與CD3ζ ISD相比，CMSD的功能（例如，信號轉導和/或作為停泊位點）通過本文所述的Nef蛋白進行的下調少至少約3%（例如，少至少約4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%中的任一個）。在一些實施例中，如與CD3ζ ISD相比，CMSD的功能（例如，信號轉導和/或作為停泊位點）通過本文所

述的Nef蛋白進行的下調多至多約80%（例如，至多約70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%或5%中的任一個）。在一些實施例中，CMSD不結合Nef（例如，野生型Nef如野生型SIV Nef，或突變體Nef如突變體SIV Nef）。在一些實施例中，CMSD不包含CD3ζ ITAM1和CD3ζ ITAM2。在一些實施例中，多個（例如，2、3、4、5或更多個）CMSD ITAM選自CD3ζ ITAM3、DAP12、CD3ε、Igα（CD79a）、Igβ（CD79b）或FcεRIγ。在一些實施例中，CMSD內的ITAM都是CD3ζ ITAM3。在一些實施例中，CMSD內的ITAM都是CD3ε ITAM。在一些實施例中，CMSD包含3個ITAM，即DAP12 ITAM、CD3ε ITAM和CD3ζ ITAM3。在一些實施例中，Nef（例如，野生型Nef如野生型SIV Nef，或突變體Nef如突變體SIV Nef）與CMSD之間的結合比Nef與含有ITAM的親本分子（例如，CD3ζ、CD3ε）之間的所述結合少至少約3%（例如，少至少約4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%中的任一個）。在一些實施例中，與CD3ζ ISD的活性相比，CMSD具有相同或相似的活性（例如，信號轉導和/或作為停泊位點）。在一些實施例中，與CD3ζ ISD的活性相比，CMSD具有低至多約80%（例如，至多約70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%或5%中的任一個）的活性（例如，信號轉導和/或作為停泊位點）。在一些實施例中，與CD3ζ ISD的活性相比，CMSD具有強至少約3%（例如，至少約4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%

或95%中的任一個）的活性（例如，信號轉導和/或作為停泊位點）。在一些實施例中，相對於包含含有CD3ζ的細胞內信號傳導結構域的ISD的功能性外源受體，包含含有CMSD的ISD的功能性外源受體的效應子功能具有至少約20%（如至少約30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%中的任一個）活性。

【0144】 還提供編碼本文所述的任何CMSD的分離的核酸。

【0145】 ***CMSD連接子、CMSD C末端序列、CMSD N末端序列***

【0146】 如上文所討論，本文所述的CMSD可以包含一個或多個任選的CMSD連接子、任選的CMSD C末端序列和/或任選的CMSD N末端序列。在一些實施例中，一個或多個CMSD連接子、CMSD C末端序列和/或CMSD N末端序列中的至少一個源自含有ITAM的親本分子，例如是含有ITAM的親本分子中的連接子序列。在一些實施例中，一個或多個CMSD連接子、CMSD C末端序列和/或CMSD N末端序列是異源的，即，它們並非源自含有ITAM的親本分子（例如，G/S連接子）或源自與衍生出一個或多個CMSD ITAM的含有ITAM的親本分子不同的含有ITAM的親本分子。在一些實施例中，一個或多個CMSD連接子、CMSD C末端序列和/或CMSD N末端序列中的至少一個對於含有ITAM的親本分子是異源的，例如可以包含與含有ITAM的親本分子的任一部分不同的序列（例如，G/S連接子）。在一些實施例中，CMSD包含兩個或更多個異源CMSD連接子。在一些實施例中，兩個或更多個異源CMSD連接子彼此相同。在一些實施例中，兩個或更多個（例如，2、3、4或更

多個）異源CMSD連接子中的至少兩個彼此相同。在一些實施例中，兩個或更多個異源CMSD連接子都彼此不同。在一些實施例中，CMSD連接子、CMSD C末端序列和/或CMSD N末端序列中的至少一個源自CD3ζ。在一些實施例中，一個或多個CMSD連接子、CMSD C末端序列和/或CMSD N末端序列彼此相同。在一些實施例中，一個或多個CMSD連接子、CMSD C末端序列和CMSD N末端序列中的至少一個彼此不同。

【0147】 根據CMSD的結構和/或功能特徵，CMSD內的一個或多個連接子、C末端序列和N末端序列可以具有相同或不同的長度和/或序列。可以對CMSD連接子、CMSD C末端序列和CMSD N末端序列獨立地進行選擇和優化。在一些實施例中，可以選擇較長CMSD連接子（例如，長度是至少約5、10、15、20、25或更多個胺基酸中的任一個的連接子）以確保兩個相鄰的ITAM不會在空間上相互幹擾。在一些實施例中，選擇較長CMSD N末端序列（例如，長度為至少約5、10、15、20、25或更多個胺基酸中的任一個的CMSD N末端序列）以為信號轉導分子提供足夠空間來結合最N末端ITAM。在一些實施例中，一個或多個CMSD連接子、C末端CMSD序列和/或N末端CMSD序列的長度不超過約30、25、20、15、10、5或1個胺基酸中的任一個。也可以將CMSD連接子長度設計為與連接含有ITAM的親本分子的ISD內的ITAM的內源連接子的長度相同。也可以將CMSD N末端序列長度設計為與含有ITAM的親本分子的在最N末端ITAM與膜之間的胞質N末端序列的長度相同。也可

以將CMSD C末端序列長度設計為與含有ITAM的親本分子的在最後一個ITAM的C末端處的胞質C末端序列的長度相同。

【0148】 在一些實施例中，CMSD連接子是柔性連接子（例如，包含柔性胺基酸殘基，如Gly和Ser，例如，Gly-Ser雙聯體）。示例性柔性連接子包括甘胺酸聚合物$(G)_n$（SEQ ID NO: 116）、甘胺酸-絲胺酸聚合物（包括例如$(GS)_n$（SEQ ID NO: 117）、$(GGGS)_n$（SEQ ID NO: 118）和$(GGGGS)_n$（SEQ ID NO: 119），其中n是至少一的整數；$(G_xS)_n$（SEQ ID NO: 120，其中n和x是獨立地選自3-12的整數））、甘胺酸-丙胺酸聚合物、丙胺酸-絲胺酸聚合物以及業內已知的其他柔性連接子。在一些實施例中，CMSD連接子是G/S連接子。在一些實施例中，柔性連接子包含以下胺基酸序列：GENLYFQSGG（SEQ ID NO: 17）、GGSG（SEQ ID NO: 18）、GS（SEQ ID NO: 19）、GSGSGS（SEQ ID NO: 20）、PPPYQPLGGGGS（SEQ ID NO: 21）、GGGGSGGGGS（SEQ ID NO: 22）、G（SEQ ID NO: 23）、GGGGS（SEQ ID NO: 29）、GSTSGSGKPGSGEGSTKG（SEQ ID NO: 32）、$(GGGS)_3$（SEQ ID NO: 33）、$(GGGS)_4$（SEQ ID NO: 34）、GGGGSGGGGSGGGGGGSGSGGGGS（SEQ ID NO: 35）、GGGGSGGGGSGGGGGGSGSGGGGSGGGGSGGGGS（SEQ ID NO: 36）、$(GGGGS)_3$（SEQ ID NO: 37）、$(GGGGS)_4$（SEQ ID NO: 38）、GGGGGSGGRASGGGGS（SEQ ID NO: 39）或GSGSGSGSGS（SEQ ID NO: 30）。在一些實施例中，CMSD連接子選自SEQ ID NO: 17-19、23、25-29。在一些實施例中，一個或多個CMSD連接子、

CMSD N末端序列和/或CMSD C末端序列是柔性的（例如，包含柔性胺基酸殘基，如Gly和Ser，例如，Gly-Ser雙聯體）。在一些實施例中，CMSD N末端序列和/或CMSD C末端序列獨立地選自SEQ ID NO: 17-39和116-120，如SEQ ID NO: 17-31中的任一個。在一些實施例中，CMSD C末端序列選自SEQ ID NO: 18、20、25和27-29。在一些實施例中，CMSD N末端序列選自SEQ ID NO: 17、21、22、24、30和31。

【0149】 一個或多個任選的CMSD連接子、CMSD N末端序列和/或CMSD C末端序列可以具有任何合適的長度。在一些實施例中，CMSD連接子、CMSD N末端序列和/或CMSD C末端序列的長度獨立地不超過約30、25、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1個胺基酸中的任一個。在一些實施例中，一個或多個CMSD連接子、CMSD N末端序列和/或CMSD C末端序列的長度獨立地為以下中的任一個：約1個胺基酸至約10個胺基酸、約4個胺基酸至約6個胺基酸、約1個胺基酸至約20個胺基酸、約1個胺基酸至約30個胺基酸、約5個胺基酸至約15個胺基酸、約10個胺基酸至約15個胺基酸、約10個胺基酸至約25個胺基酸、約5個胺基酸至約30個胺基酸、約10個胺基酸至約30個胺基酸長、或約1個胺基酸至約15個胺基酸。在一些實施例中，一個或多個CMSD連接子、CMSD N末端序列和/或CMSD C末端序列的長度為約1個胺基酸至約15個胺基酸。

【0150】 細胞外配體結合結構域

【0151】 本文所述的功能性外源受體的細胞外配體結合結構域包含一個或多個（如1、2、3、4、5、6或更多個中的任一個）結合部分，例如，特異性識別一種或多種靶抗原（例如，腫瘤抗原，如BCMA、CD19、CD20）的一個或多個表位的抗原結合片段（例如，scFv、sdAb）、受體（例如，FcR）的細胞外結構域（或其部分）、配體（例如，APRIL、BAFF）的細胞外結構域（或其部分）。在一些實施例中，一個或多個結合部分是抗體或其抗原結合片段（例如，scFv、sdAb）。在一些實施例中，一個或多個結合部分源自四鏈抗體。在一些實施例中，一個或多個結合部分源自駱駝科動物抗體。在一些實施例中，一個或多個結合部分源自人抗體。在一些實施例中，一個或多個結合部分選自駱駝Ig、Ig NAR、Fab片段、Fab'片段、F(ab)'2片段、F(ab)'3片段、Fv、單鏈Fv抗體（scFv）、bis-scFv、$(scFv)_2$、微抗體、雙抗體、三抗體、四抗體、二硫鍵穩定的Fv蛋白（dsFv）和單結構域抗體（例如，sdAb、納米抗體、VHH）。在一些實施例中，一個或多個結合部分是sdAb（例如，抗BCMA sdAb）。在一些實施例中，一個或多個結合部分是scFv（例如，抗CD19 scFv、抗CD20 scFv、抗BCMA scFv）。在一些實施例中，一個或多個結合部分是非抗體結合蛋白，如與抗原結合的多肽配體/受體或工程化蛋白質。在一些實施例中，一個或多個非抗體結合部分包含源自配體的至少一個結構域或細胞表面受體的細胞外結構域。在一些實施例中，配體或受體選自NKG2A、NKG2C、NKG2F、NKG2D、BCMA、APRIL、BAFF、IL-3、IL-13、LLT1、

AICL、DNAM-1和NKp80。在一些實施例中，配體是APRIL或BAFF，其可以與BCMA受體結合。在一些實施例中，受體是Fc受體（FcR）並且配體是含有Fc的分子（例如，全長單株抗體）。在一些實施例中，一個或多個結合部分源自FcR的細胞外結構域（或其部分）。在一些實施例中，FcR是Fcγ受體（FcγR）。在一些實施例中，FcγR選自FcγRIA（CD64A）、FcγRIB（CD64B）、FcγRIC（CD64C）、FcγRIIA（CD32A）、FcγRIIB（CD32B）、FcγRIIIA（CD16a）和FcγRIIIB（CD16b）。兩個或更多個結合部分（例如，sdAb）可以經由肽鍵彼此直接融合，或經由肽連接子融合（參見下文的受體結構域連接子小節）。在一些實施例中，肽連接子包含SEQ ID NO: 29的胺基酸序列。

【0152】 ***單結構域抗體（sdAb）***

【0153】 在一些實施例中，細胞外配體結合結構域包含一個或多個sdAb（例如，抗BCMA sdAb）。sdAb可以具有相同或不同的來源，以及相同或不同的大小。示例性sdAb包括但不限於來自僅重鏈抗體的重鏈可變結構域（例如，V_HH或V_{NAR}）、天然缺乏輕鏈的結合分子、源自常規4鏈抗體的單結構域（如V_H或V_L）、人源化僅重鏈抗體、由表現人重鏈區段的基因轉殖小鼠或大鼠產生的人sdAb、以及除了源自抗體的那些以外的工程化結構域和單結構域支架。可以使用業內已知的或由申請人開發的任何sdAb來構建本文所述的包含CMSD的功能性外源受體，所述sdAb包括PCT/CN2017/096938和PCT/CN2016/094408（所述文獻各自的內容

通過引用以其整體併入本文）中所述的sdAb。CAR（例如，ITAM修飾的CAR）的示例性結構顯示於PCT/CN2017/096938的圖15A-圖15D中。sdAb可以源自任何物種，包括但不限於小鼠、大鼠、人、駱駝、美洲駝、七鰓鰻、魚、鯊魚、山羊、兔和牛。本文考慮的sdAb還包括來自駱駝科（*Camelidae*）和鯊魚以外的物種的天然存在的sdAb分子。

【0154】 在一些實施例中，sdAb源自天然存在的單結構域抗原結合分子，其被稱為缺乏輕鏈的重鏈抗體（在本文中也稱為「僅重鏈抗體」）。此類單結構域分子披露于例如以下文獻中：WO 94/04678 和 Hamers-Casterman, C. 等人 (1993) *Nature* 363:446-448。為了清晰起見，源自天然缺乏輕鏈的重鏈分子的可變結構域在本文中稱為V_HH，以將其與四鏈免疫球蛋白的常規V_H相區分。這種V_HH分子可以源自駱駝科物種（例如，駱駝、美洲駝、駱馬、單峰駱駝、羊駝和原駝）中產生的抗體。除了駱駝科以外的其他物種可以產生天然缺乏輕鏈的重鏈分子，並且此類V_HH在本申請案的範圍內。

【0155】 來自駱駝科動物的V_HH分子比IgG分子小約10倍。它們是單一多肽並且可以非常穩定，抵抗極端的pH和溫度條件。此外，它們可以抵抗蛋白酶的作用，而常規的4鏈抗體無法抵抗蛋白酶的作用。此外，V_HH的體外表現產生高產率、正確折疊的功能性V_HH。另外，駱駝科動物中產生的抗體可以識別的表位不同於通過使用抗體文庫或通過對除了駱駝科動物以外的哺乳動物進行免疫在體

外產生的抗體所識別的那些表位（參見例如，WO 9749805）。因此，包含一個或多個V_HH結構域的本文所述的包含CMSD的多特異性和/或多價功能性外源受體（例如，ITAM修飾的TCR、ITAM修飾的CAR、ITAM修飾的cTCR或ITAM修飾的TAC樣嵌合受體）可以比包含源自常規4鏈抗體的抗原結合片段的多特異性和/或多價功能性外源受體更高效地與靶標相互作用。由於已知V_HH結合至「罕見」表位如空穴或溝中，包含此類V_HH的功能性外源受體的親和力可以比常規多特異性不含V_HH的嵌合受體（例如，不含V_HH的CAR）更適合於治療性治療。

【0156】 在一些實施例中，sdAb源自在軟骨魚中發現的免疫球蛋白的可變區。例如，sdAb可以源自在鯊魚血清中發現的稱為新型抗原受體（NAR）的免疫球蛋白同種型。產生源自NAR（「IgNAR」）的可變區的單結構域分子的方法描述於以下文獻中：WO 03/014161和Streltsov (2005) *Protein Sci.* 14:2901-2909。

【0157】 在一些實施例中，sdAb是重組的、CDR移植的、人源化的、駝源化的、去免疫的和/或體外產生的（例如，通過噬菌體展示而選擇的）。在一些實施例中，框架區的胺基酸序列可以通過框架區中特定胺基酸殘基的「駝源化」來改變。駝源化是指將來自常規4鏈抗體的（天然存在的）V_HH結構域的胺基酸序列中的一個或多個胺基酸殘基用重鏈抗體V_HH結構域中一個或多個相應位置存在的一個或多個胺基酸殘基替代或取代。這可以以本身已知的方式來進行，所述方式對於技術人員是清楚的。此類「駝源化」取

代較佳地在形成和/或存在於以下的胺基酸位置處插入：V_H-V_L介面，和/或所謂的駱駝科標誌殘基（參見例如，WO 94/04678，Davies和Riechmann FEBS Letters 339: 285-290, 1994；Davies和Riechmann Protein Engineering 9 (6): 531-537, 1996；Riechmann J. Mol. Biol. 259: 957-969, 1996；以及Riechmann和Muyldermans J. Immunol. Meth. 231: 25-38, 1999）。

【0158】 在一些實施例中，sdAb是由表現人重鏈區段的基因轉殖小鼠或大鼠產生的人sdAb。參見例如，US20090307787A1、美國專利號8,754,287、US20150289489A1、US20100122358A1和WO 2004049794。在一些實施例中，sdAb是親和力成熟的。

【0159】 在一些實施例中，針對特定抗原或靶標的天然存在的V_HH結構域可以從駱駝科動物V_HH序列的（幼稚或免疫）文庫獲得。此類方法可以涉及或可以不涉及使用本身已知的一種或多種篩選技術，使用所述抗原或靶標或其至少一部分、片段、抗原決定簇或表位來篩選這種文庫。此類文庫和技術例如描述於WO 99/37681、WO 01/90190、WO 03/025020和WO 03/035694中。可替代地，可以使用源自（幼稚或免疫）V_HH文庫的改進的合成或半合成文庫，如通過多種技術如隨機誘變和/或CDR改組從（幼稚或免疫）V_HH文庫獲得的V_HH文庫，如例如WO 00/43507中所述。

【0160】 在一些實施例中，sdAb是從常規四鏈抗體產生的。參見例如，EP 0 368 684；Ward等人（Nature 1989年10月12日; 341 (6242): 544-6）；Holt等人（Trends Biotechnol., 2003, 21(11):484-490）；WO

06/030220；和WO 06/003388。

【0161】 在一些實施例中，sdAb與BCMA特異性結合。在一些實施例中，抗BCMA sdAb（例如，V_HH）包含含有SEQ ID NO: 130的胺基酸序列的CDR1、含有SEQ ID NO: 131的胺基酸序列的CDR2、和含有SEQ ID NO: 132的胺基酸序列的CDR3。在一些實施例中，sdAb（例如，V_HH）包含含有SEQ ID NO: 128的胺基酸序列的抗BCMA sdAb的CDR1、CDR2和CDR3。在一些實施例中，抗BCMA sdAb與包含含有SEQ ID NO: 130的胺基酸序列的CDR1、含有SEQ ID NO: 131的胺基酸序列的CDR2和含有SEQ ID NO: 132的胺基酸序列的CDR3的抗BCMA sdAb（例如，V_HH）一樣結合相同的表位。

【0162】 在一些實施例中，抗BCMA sdAb（例如，V_HH）包含含有SEQ ID NO: 133的胺基酸序列的CDR1、含有SEQ ID NO: 134的胺基酸序列的CDR2、和含有SEQ ID NO: 135的胺基酸序列的CDR3。在一些實施例中，抗BCMA sdAb包含含有SEQ ID NO: 129的胺基酸序列的抗BCMA sdAb的CDR1、CDR2和CDR3。在一些實施例中，抗BCMA sdAb與包含含有SEQ ID NO: 133的胺基酸序列的CDR1、含有SEQ ID NO: 134的胺基酸序列的CDR2和含有SEQ ID NO: 135的胺基酸序列的CDR3的抗BCMA sdAb部分（例如，V_HH）一樣結合相同的表位。

【0163】 在一些實施例中，含有CMSD的功能性外源受體在一些實施例中包含細胞外配體結合結構域，所述細胞外配體結合結構域

包含與BCMA特異性結合的第一sdAb部分和與BCMA特異性結合的第二sdAb部分（下文稱為「抗BCMA sdAb」，如「抗BCMA V_HH」）。第一sdAb部分和第二sdAb部分可以結合至BCMA的不同表位。兩個sdAb可以串聯佈置，任選地通過連接子序列連接。本文中可以使用如「CMSD連接子」和「受體結構域連接子」章節中所述的任何連接子序列。在一些實施例中，含有CMSD的功能性外源受體包含細胞外配體結合結構域，所述細胞外配體結合結構域包含3個或更多個sdAb（例如，特異性識別BCMA）。

【0164】 ***靶抗原和靶分子***

【0165】 本文所述的包含CMSD的功能性外源受體（例如，ITAM修飾的TCR、ITAM修飾的CAR、ITAM修飾的cTCR或ITAM修飾的TAC樣嵌合受體）的細胞外配體結合結構域可以特異性識別靶細胞（例如，腫瘤細胞）或靶分子（例如，含有Fc的分子，如單株抗體）上的任何抗原（或任何抗原的任何表位）。在一些實施例中，靶抗原是細胞表面分子（例如，受體/配體的細胞外結構域）。在一些實施例中，靶抗原作為細胞表面標記作用於特殊疾病狀態相關的靶細胞。在一些實施例中，靶抗原是腫瘤抗原。在一些實施例中，細胞外配體結合結構域特異性識別單一靶（例如，腫瘤）抗原。在一些實施例中，細胞外配體結合結構域特異性識別單一靶（例如，腫瘤）抗原的一個或多個表位。在一些實施例中，細胞外配體結合結構域特異性識別兩個或更多個靶（例如，腫瘤）抗原。在一些實施例中，腫瘤抗原與B細胞惡性腫瘤（如B細胞淋巴

瘤或多發性骨髓瘤（MM））相關。腫瘤表現可以充當免疫反應（特別是T細胞介導的免疫反應）的靶抗原的多種蛋白質。由細胞外配體結合結構域特異性識別的靶抗原（例如，腫瘤抗原、受體/配體的細胞外結構域）可以是單一患病細胞上的抗原或在不同細胞上表現的各自促進疾病的抗原。由細胞外配體結合結構域特異性識別的抗原可以直接或間接參與疾病。

【0166】 腫瘤抗原是由腫瘤細胞產生的可以引發免疫反應、特別是T細胞介導的免疫反應的蛋白質。本發明的靶向抗原的選擇將取決於要治療的癌症的具體類型。示例性腫瘤抗原包括例如神經膠質瘤相關抗原、BCMA（B細胞成熟抗原）、癌胚抗原（CEA）、β-人絨毛膜促性腺激素、甲胎蛋白（AFP）、凝集素反應性AFP、甲狀腺球蛋白、RAGE-1、MN-CAIX、人端粒酶逆轉錄酶、RU1、RU2（AS）、腸道羧基酯酶、mut hsp70-2、M-CSF、前列腺酶（prostase）、前列腺特異性抗原（PSA）、PAP、NY-ESO-1、LAGE-1a、p53、prostein、PSMA、HER2/neu、生存素和端粒酶、前列腺癌腫瘤抗原-1（PCTA-1）、MAGE、ELF2M、嗜中性粒細胞彈性蛋白酶、肝配蛋白B2、CD22、胰島素生長因數（IGF）-I、IGF-II、IGF-I受體和間皮素。在一些實施例中，腫瘤抗原包含與惡性腫瘤相關的一個或多個抗原性癌症表位。惡性腫瘤表現可以充當免疫攻擊的靶抗原的多種蛋白質。這些分子包括但不限於組織特異性抗原，如黑色素瘤中的MART-1、酪胺酸酶和gp100，以及前列腺癌中的前列腺酸性磷酸酶（PAP）和前列腺特異性抗原（PSA）。其他靶分

子屬於轉化相關分子的組，如致癌基因HER2/Neu/ErbB-2。又另一組靶抗原是癌胚胎抗原，如癌胚抗原（CEA）。在B細胞淋巴瘤中，腫瘤特異性獨特型免疫球蛋白構成為單獨腫瘤獨有的真正腫瘤特異性免疫球蛋白抗原。B細胞分化抗原如CD19、CD20和CD37是B細胞淋巴瘤中靶抗原的其他候選物。

【0167】 在一些實施例中，腫瘤抗原是腫瘤特異性抗原（TSA）或腫瘤相關抗原（TAA）。TSA是腫瘤細胞獨有的，並且在體內其他細胞上不存在。TAA不是腫瘤細胞獨有的，而是在不能誘導對抗原的免疫耐受狀態的條件下也在正常細胞上表現。腫瘤上抗原的表現可以在使得免疫系統能夠響應抗原的條件下發生。TAA可能是在胎兒發育期間，在免疫系統不成熟並且無法反應時，在正常細胞上表現的抗原，或者它們可能是通常在正常細胞上以極低水準存在，但是在腫瘤細胞上以更高的水準表現的抗原。TSA或TAA抗原的非限制性例子包括以下：分化抗原，如MART-1/黑色素A（MART-I）、gp 100（Pmel 17）、酪胺酸酶、TRP-1、TRP-2和腫瘤特異性多譜系抗原，如MAGE-1、MAGE-3、BAGE、GAGE-1、GAGE-2、p15；過表現的胚胎抗原，如CEA；過表現的癌基因和突變的腫瘤抑制基因，如p53、Ras、HER2/neu；由染色體易位產生的獨特腫瘤抗原，如BCR-ABL、E2A-PRL、H4-RET、IGH-IGK、MYL-RAR；以及病毒抗原，如愛潑斯坦-巴爾病毒（Epstein barr virus）抗原EBVA和人乳頭瘤病毒（HPV）抗原E6和E7。其他基於蛋白質的大抗原包括TSP-180、MAGE-4、MAGE-5、MAGE-6、

RAGE、NY-ESO、p185erbB2、p180erbB-3、c-met、nm-23HI、PSA、TAG-72、CA 19-9、CA 72-4、CAM 17.1、NuMa、K-ras、β-連環蛋白、CDK4、Mum-1、p 15、p 16、43-9F、5T4、791Tgp72、甲胎蛋白、β-HCG、BCA225、BTAA、CA 125、CA 15-3\CA 27.29\BCAA、CA 195、CA 242、CA-50、CAM43、CD68\P1、CO-029、FGF-5、G250、Ga733\EpCAM、HTgp-175、M344、MA-50、MG7-Ag、MOV18、NB/70K、NY-CO-1、RCAS 1、SDCCAG16、TA-90\Mac-2結合蛋白/親環蛋白C相關蛋白、TAAL6、TAG72、TLP和TPS。

【0168】 在一些實施例中，腫瘤抗原選自間皮素、TSHR、CD19、CD123、CD22、CD30、CD171、CS-1、CLL-1、CD33、EGFRvIII、GD2、GD3、BCMA、Tn Ag、前列腺特異性膜抗原（PSMA）、ROR1、FLT3、FAP、TAG72、CD38、CD44v6、CEA、EPCAM、B7H3、KIT、IL-13Ra2、白介素-11受體a（IL-11Ra）、PSCA、PRSS21、VEGFR2、LewisY、CD24、源自血小板的生長因數受體-β（PDGFR-β）、SSEA-4、CD20、葉酸受體α、ERBB2（Her2/neu）、MUC1、表皮生長因數受體（EGFR）、NCAM、前列腺酶、PAP、ELF2M、肝配蛋白B2、IGF-I受體、CAIX、LMP2、gp100、bcr-abl、酪胺酸酶、EphA2、岩藻糖基GM1、sLe、GM3、TGS5、HMWMAA、o-乙醯基-GD2、葉酸受體β、TEM1/CD248、TEM7R、CLDN6、CLDN18.2、GPRC5D、CXORF61、CD97、CD179a、ALK、多唾液酸、PLAC1、GloboH、NY-BR-1、UPK2、HAVCR1、ADRB3、PANX3、GPR20、LY6K、OR51E2、TARP、WT1、NY-ESO-1、

LAGE-1a、MAGE-A1、豆荚蛋白、HPV E6,E7、MAGE A1、ETV6-AML、精子蛋白17、XAGE1、Tie 2、MAD-CT-1、MAD-CT-2、Fos相關抗原1、p53、p53突變體、prostein、生存素和端粒酶、PCTA-1/半乳糖凝集素8、黑色素A/MART1、Ras突變體、hTERT、肉瘤易位中斷點、ML-IAP、ERG（TMPRSS2 ETS融合基因）、NA17、PAX3、雄激素受體、細胞週期蛋白B1、MYCN、RhoC、TRP-2、CYP1B1、BORIS、SART3、PAX5、OY-TES1、LCK、AKAP-4、SSX2、RAGE-1、人端粒酶逆轉錄酶、RU1、RU2、腸道羧基酯酶、mut hsp70-2、CD79a、CD79b、CD72、LAIR1、FCAR、LILRA2、CD300LF、CLEC12A、BST2、EMR2、LY75、GPC3、FCRL5和IGLL1。在一些實施例中，腫瘤抗原選自CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD38、BCMA、CS1、CD138、CD123/IL3Rα、c-Met、gp100、MUC1、IGF-I受體、EpCAM、EGFR/EGFRvIII、HER2、IGF1R、間皮素、PSMA、WT1、ROR1、CEA、GD-2、NY-ESO-1、MAGE A3、GPC3、糖脂F77、PD-L1、PD-L2及其任何組合。在一些實施例中，腫瘤抗原在B細胞上表現。在一些實施例中，腫瘤抗原是BCMA、CD19或CD20。

【0169】 在一些實施例中，靶抗原是病原體抗原，如真菌、病毒或細菌抗原。在一些實施例中，真菌抗原來自曲黴菌屬（Aspergillus）或念珠菌屬（Candida）。在一些實施例中，病毒抗原來自單純皰疹病毒（HSV）、呼吸道合胞病毒（RSV）、偏肺病毒（hMPV）、鼻病毒、副流感（PIV）、愛潑斯坦-巴爾病毒（EBV）、

巨細胞病毒（CMV）、JC病毒（約翰·坎甯安病毒（John Cunningham virus））、BK病毒、HIV、寨卡病毒（Zika virus）、人冠狀病毒、諾如病毒（norovirus）、腦炎病毒或埃博拉病毒（Ebola）。

【0170】 在一些實施例中，靶抗原是細胞表面分子。在一些實施例中，細胞表面抗原是配體或受體。在一些實施例中，細胞外配體結合結構域包含一個或多個結合部分，所述結合部分包含源自配體的至少一個結構域或受體的細胞外結構域。在一些實施例中，配體或受體源自選自以下的分子：NKG2A、NKG2C、NKG2F、NKG2D、BCMA、APRIL、BAFF、IL-3、IL-13、LLT1、AICL、DNAM-1和NKp80。在一些實施例中，配體源自APRIL和/或BAFF，其可以與BCMA結合。在一些實施例中，受體是FcR，並且配體是含有Fc的分子。在一些實施例中，FcR是Fcγ受體（FcγR）。在一些實施例中，FcγR選自FcγRIA（CD64A）、FcγRIB（CD64B）、FcγRIC（CD64C）、FcγRIIA（CD32A）、FcγRIIB（CD32B）、FcγRIIIA（CD16a）和FcγRIIIB（CD16b）。

【0171】 **鉸鏈**

【0172】 在一些實施例中，本文所述的包含CMSD的功能性外源受體（例如，ITAM修飾的TCR、ITAM修飾的CAR、ITAM修飾的cTCR或ITAM修飾的TAC樣嵌合受體）包含位於細胞外配體結合結構域的C末端與跨膜結構域的N末端之間的鉸鏈結構域。鉸鏈結構域是通常在蛋白質的兩個結構域之間發現的胺基酸區段，並且可以允許蛋白質的柔性以及一個或兩個所述結構域相對於彼此的移動。

可以使用提供這種柔性以及細胞外配體結合結構域相對於跨膜結構域的移動的任何胺基酸序列。

【0173】 鉸鏈結構域可以含有約10-100個胺基酸，例如，約15-75個胺基酸、20-50個胺基酸或30-60個胺基酸中的任一個。在一些實施例中，鉸鏈結構域的長度是至少約10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90或95個胺基酸中的任一個。

【0174】 在一些實施例中，鉸鏈結構域是天然存在的蛋白質的鉸鏈結構域。業內已知包含鉸鏈結構域的任何蛋白質的鉸鏈結構域適合用於本文所述的包含CMSD的功能性外源受體中。在一些實施例中，鉸鏈結構域是天然存在的蛋白質的鉸鏈結構域的至少一部分，並且為包含CMSD的功能性外源受體賦予柔性。在一些實施例中，鉸鏈結構域源自CD8α。在一些實施例中，鉸鏈結構域是CD8α的鉸鏈結構域的一部分，例如，CD8α的鉸鏈結構域中包含至少約15個（例如，至少約20、25、30、35、40或45個中的任一個）連續胺基酸的片段。在一些實施例中，鉸鏈結構域包含SEQ ID NO: 125的序列。

【0175】 抗體如IgG、IgA、IgM、IgE或IgD抗體的鉸鏈結構域也適合用於本文所述的包含CMSD的功能性外源受體（例如，ITAM修飾的TCR、ITAM修飾的CAR、ITAM修飾的cTCR或ITAM修飾的TAC樣嵌合受體）。在一些實施例中，功能性外源受體的鉸鏈結構域是

連接抗體的恒定結構域CH1與CH2的鉸鏈結構域。在一些實施例中，鉸鏈結構域源自抗體，並且包含抗體的鉸鏈結構域以及抗體的一個或多個恒定區。在一些實施例中，功能性外源受體的鉸鏈結構域包含抗體的鉸鏈結構域以及抗體的CH3恒定區。在一些實施例中，功能性外源受體的鉸鏈結構域包含抗體的鉸鏈結構域以及抗體的CH2和CH3恒定區。在一些實施例中，抗體是IgG、IgA、IgM、IgE或IgD抗體。在一些實施例中，抗體是IgG抗體。在一些實施例中，抗體是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4抗體。在一些實施例中，功能性外源受體的鉸鏈區包含IgG1抗體的鉸鏈區以及CH2和CH3恒定區。在一些實施例中，功能性外源受體的鉸鏈區包含IgG1抗體的鉸鏈區和CH3恒定區。

【0176】 也可以使用非天然存在的肽作為本文所述的包含CMSD的功能性外源受體的鉸鏈結構域。在一些實施例中，位於細胞外配體結合結構域的C末端與跨膜結構域的N末端之間的鉸鏈結構域是柔性連接子（例如，G/S連接子），如$(G_xS)_n$連接子，其中x和n獨立地可以是3與12之間的整數（例如，3、4、5、6、7、8、9、10、11、12）（SEQ ID NO: 120）。在一些實施例中，鉸鏈結構域可以是上文「CMSD連接子」和「受體結構域連接子」小節中所述的柔性連接子，如選自SEQ ID NO: 17-39和116-120。在一些實施例中，鉸鏈的長度是至少約10個胺基酸，例如，GENLYFQSGG（SEQ ID NO: 17）、PPPYQPLGGGGS（SEQ ID NO: 21）、GGGGSGGGGS（SEQ ID NO: 22）、GSTSGSGKPGSGEGSTKG（SEQ ID NO: 32）、

$(GGGS)_3$（SEQ ID NO: 33）、$(GGGS)_4$（SEQ ID NO: 34）、GGGGSGGGGSGGGGGGSGSGGGGS（SEQ ID NO: 35）、GGGGSGGGGSGGGGGGSGSGGGGSGGGGSGGGGS（SEQ ID NO: 36）、$(GGGGS)_3$（SEQ ID NO: 37）、$(GGGGS)_4$（SEQ ID NO: 38）、GGGGGSGGRASGGGGS（SEQ ID NO: 39）或GSGSGSGSGS（SEQ ID NO: 30）。

【0177】 **跨膜結構域**

【0178】 本文所述的包含CMSD的功能性外源受體（例如，ITAM修飾的TCR、ITAM修飾的CAR、ITAM修飾的cTCR或ITAM修飾的TAC樣嵌合受體）包含可以與細胞外配體結合結構域直接或間接融合的跨膜結構域。跨膜結構域可以源自天然來源或合成來源。例如，跨膜結構域可以是合成的非天然存在的蛋白質區段，例如，在細胞膜中熱力學穩定的疏水蛋白質區段。如本文所用，「跨膜結構域」是指在細胞膜、較佳真核細胞膜中熱力學穩定的任何蛋白質結構。

【0179】 基於跨膜結構域的三維結構對跨膜結構域進行分類。例如，跨膜結構域可以形成α螺旋、多於一個α螺旋的複合物、β桶或能夠跨越細胞的磷脂雙層的任何其他穩定結構。另外，也可以或者可替代地基於跨膜結構域拓撲學對跨膜結構域進行分類，所述跨膜結構域拓撲學包括跨膜結構域橫穿膜的跨越次數和蛋白質的定向。例如，單次跨膜蛋白質穿過細胞膜一次，並且多次跨膜蛋白質穿過細胞膜至少兩次（例如，2、3、4、5、6、7次或更多次）。

可以根據膜蛋白的末端和一個或多個跨膜區段相對於細胞內部和外部的拓撲學將膜蛋白定義為I型、II型或III型。I型膜蛋白具有單一跨膜區，並且定向使得蛋白質的N末端存在於細胞脂雙層的細胞外側上並且蛋白質的C末端存在於胞質側上。II型膜蛋白也具有單一跨膜區，但是定向使得蛋白質的C末端存在於細胞脂雙層的細胞外側上並且蛋白質的N末端存在於胞質側上。III型膜蛋白具有多個跨膜區段，並且可以基於跨膜區段的數量以及N末端和C末端的位置進一步細分類。

【0180】 在一些實施例中，本文所述的功能性外源受體的跨膜結構域源自I型單次跨膜蛋白質。在一些實施例中，來自多次跨膜蛋白質的跨膜結構域也可以適合用於本文所述的功能性外源受體中。多次跨膜蛋白質可以包含複合（至少2、3、4、5、6、7個或更多個）α螺旋或β片層結構。較佳地，多次跨膜蛋白質的N末端和C末端存在於脂雙層的相對側上，例如，蛋白質的N末端存在於脂雙層的胞質側上，並且蛋白質的C末端存在於細胞外側上。

【0181】 在一些實施例中，本文所述的包含CMSD的功能性外源受體包含跨膜結構域，所述跨膜結構域選自以下的任何跨膜結構域（或其部分）：TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ζ、CD3γ、CD3δ、CD3ε、CD2、CD45、CD4、CD5、CD8（例如，CD8α）、CD9、CD16、LFA-1（CDIIa、CD18）、CD19、CD22、CD27、CD28、CD29、CD33、CD37、CD40、CD45、CD64、CD80、CD84、CD86、CD96（Tactile）、CD100（SEMA4D）、CD103、CD134、CD137（4-1BB）、SLAM

（SLAMF1、CD150、IPO-3）、CD152、CD154、CD160（BY55）、SELPLG（CD162）、DNAM1（CD226）、Ly9（CD229）、SLAMF4（CD244、2B4）、ICOS（CD278）、KIRDS2、OX40、PD-1、GITR、BAFFR、HVEM（LIGHTR）、SLAMF7、NKp80（KLRF1）、IL-2Rβ、IL-2Rγ、IL-7Ra、ITGA1、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、ITGAE、ITGAL、CDIIa、ITGAM、CD11b、CD11c、CD11d、ITGAX、ITGB1、ITGB2、ITGB7、TNFR2、CEACAM1、CRT AM、PSGL1、SLAMF6（NTB-A、Ly108）、BLAME（SLAMF8）、LTBR、PAG/Cbp、NKp44、NKp30、NKp46、NKG2D和/或NKG2C。在一些實施例中，跨膜結構域源自選自以下的分子：TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ζ、CD3ε、CD3γ、CD3δ、CD4、CD5、CD8α、CD9、CD16、CD22、CD27、CD28、CD33、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137（4-1BB）、CD152、CD154和PD-1。在一些實施例中，跨膜結構域源自CD28。在一些實施例中，跨膜結構域源自CD8α。在一些實施例中，跨膜結構域包含SEQ ID NO: 126的序列。在一些實施例中，鉸鏈和跨膜結構域源自相同分子，例如，CD8α。

【0182】 用於本文所述的包含CMSD的功能性外源受體中的跨膜結構域還可以包含合成的非天然存在的蛋白質區段的至少一部分。在一些實施例中，跨膜結構域是合成的非天然存在的α螺旋或β片層。在一些實施例中，蛋白質區段具有至少約大約18個胺基酸，例如，至少約18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、

28、29、30或更多個胺基酸中的任一個。合成跨膜結構域的例子是業內已知的，例如在以下文獻中：美國專利號7,052,906 B1和PCT公開號WO 2000/032776 A2，所述文獻的相關公開內容通過引用以其整體併入本文。

【0183】 本文所述的包含CMSD的功能性外源受體的跨膜結構域可以包含跨膜區和位於跨膜結構域的C末端側的胞質區。跨膜結構域的胞質區可以包含三個或更多個胺基酸，並且在一些實施例中，有助於使跨膜結構域在脂雙層中定向。在一些實施例中，一個或多個半胱胺酸殘基存在於跨膜結構域的跨膜區中。在一些實施例中，一個或多個半胱胺酸殘基存在於跨膜結構域的胞質區中。在一些實施例中，跨膜結構域的胞質區包含帶正電荷的胺基酸。在一些實施例中，跨膜結構域的胞質區包含胺基酸精胺酸、絲胺酸和離胺酸。

【0184】 在一些實施例中，本文所述的包含CMSD的功能性外源受體的跨膜區包含疏水胺基酸殘基。在一些實施例中，本文所述的包含CMSD的功能性外源受體的跨膜結構域包含人工疏水序列。例如，苯丙胺酸、色胺酸和擷胺酸的三聯體可以存在於跨膜結構域的C末端。在一些實施例中，跨膜區主要包含疏水胺基酸殘基，如丙胺酸、白胺酸、異白胺酸、甲硫胺酸、苯丙胺酸、色胺酸或擷胺酸。在一些實施例中，跨膜區是疏水的。在一些實施例中，跨膜區包含聚白胺酸-丙胺酸序列。可以通過業內已知的任何方法來評估蛋白質或蛋白質區段的親水性或者疏水或親水特徵，所述方

法例如Kyte-Doolittle親水性分析。

【0185】 **功能性外源受體結構域連接子（「受體結構域連接子」）**

【0186】 在一些實施例中，本文所述的包含CMSD的功能性外源受體（例如，ITAM修飾的TCR、ITAM修飾的CAR、ITAM修飾的cTCR或ITAM修飾的TAC樣嵌合受體）的各個結構域（如細胞外配體結合結構域內的兩個或更多個結合部分（例如，抗原結合片段，如scFv或sdAb、配體/受體結構域）、細胞外配體結合結構域與任選的鉸鏈結構域、細胞外配體結合結構域與跨膜結構域、跨膜結構域與ISD）可以經由肽連接子彼此融合，所述肽連接子在下文中也稱為「受體結構域連接子」，以與CMSD內的上述任選的CMSD連接子相區分。在一些實施例中，本文所述的包含CMSD的功能性外源受體的各個結構域（例如，細胞外配體結合結構域內的兩個或更多個結合部分（例如，抗原結合片段，如scFv或sdAb、配體/受體結構域））在沒有任何肽連接子的情況下直接彼此融合。例如，在細胞外配體結合結構域內的兩個或更多個結合部分（例如，抗原結合片段，如scFv或sdAb、配體/受體結構域）之間、在細胞外配體結合結構域與任選的鉸鏈結構域之間、在細胞外配體結合結構域與跨膜結構域之間、在跨膜結構域與ISD之間，連接本文所述的包含CMSD的功能性外源受體的各個結構域的受體結構域肽連接子可以相同或不同。

【0187】 根據功能性外源受體的各個結構域的結構和/或功能特徵，本文所述的包含CMSD的功能性外源受體（例如，ITAM修飾

的TCR、ITAM修飾的CAR、ITAM修飾的cTCR或ITAM修飾的TAC樣嵌合受體）中的每個受體結構域肽連接子可以具有相同或不同的長度和/或序列。可以對每個受體結構域肽連接子獨立地進行選擇和優化。用於本文所述的包含CMSD的功能性外源受體中的一個或多個受體結構域肽連接子（例如，連接細胞外配體結合結構域內的兩個或更多個結合部分（例如，抗原結合片段，如scFv或sdAb、配體/受體結構域）的肽連接子）的長度、柔性程度和/或其他特性可能對特性具有一定影響，所述特性包括但不限於對一個或多個特定抗原或表位的親和力、特異性或親合力。例如，可以選擇較長的肽連接子以確保兩個相鄰的結構域（或結合部分）不會在空間上相互幹擾。例如，在包含針對多聚抗原的sdAb的多價和/或多特異性的本文所述的包含CMSD的功能性外源受體（例如，ITAM修飾的TCR、ITAM修飾的CAR、ITAM修飾的cTCR或ITAM修飾的TAC樣嵌合受體）中，受體結構域肽連接子的長度和柔性較佳地使得其允許細胞外配體結合結構域內的每個sdAb與多聚體的每個亞基上的抗原決定簇結合。在一些實施例中，可以在跨膜結構域與ISD之間佈置短肽連接子。在一些實施例中，肽連接子包含柔性殘基（如甘胺酸和絲胺酸），使得相鄰的結構域（或結合部分）可相對于彼此自由移動。例如，甘胺酸-絲胺酸雙聯體可以是合適的肽連接子。

【0188】 受體結構域肽連接子可以具有任何合適的長度。在一些實施例中，肽連接子的長度是至少約1、2、3、4、5、6、7、8、9、

10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100或更多個胺基酸中的任一個。在一些實施例中，受體結構域肽連接子的長度不超過約100、90、80、70、60、50、40、35、30、25、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5或更少胺基酸中的任一個。在一些實施例中，受體結構域肽連接子的長度是約1個胺基酸至約10個胺基酸、約1個胺基酸至約20個胺基酸、約1個胺基酸至約30個胺基酸、約5個胺基酸至約15個胺基酸、約10個胺基酸至約25個胺基酸、約5個胺基酸至約30個胺基酸、約10個胺基酸至約30個胺基酸長、約30個胺基酸至約50個胺基酸、約50個胺基酸至約100個胺基酸、或約1個胺基酸至約100個胺基酸中的任一個。

【0189】 受體結構域肽連接子可以具有天然存在的序列，或非天然存在的序列。例如，可以使用源自僅重鏈抗體的鉸鏈區的序列作為受體結構域肽連接子。參見例如，WO 1996/34103。在一些實施例中，受體結構域肽連接子是柔性連接子。示例性柔性連接子包括甘胺酸聚合物$(G)_n$（SEQ ID NO: 116）、甘胺酸-絲胺酸聚合物（包括例如$(GS)_n$（SEQ ID NO: 117）、$(GGGS)_n$（SEQ ID NO: 118）和$(GGGGS)_n$（SEQ ID NO: 119），其中n是至少一的整數）、甘胺酸-丙胺酸聚合物、丙胺酸-絲胺酸聚合物以及業內已知的其他柔性連接子。在一些實施例中，受體結構域肽連接子是$(G_xS)_n$ 連接子，其中x和n獨立地可以是3與12之間的整數（例如，3、4、5、6、7、8、9、10、11、12）（SEQ ID NO: 120）。在一些實施例中，受體

結構域肽連接子包含SEQ ID NO: 17-39和116-120中任一個的胺基酸序列。在一些實施例中，受體結構域肽連接子包含SEQ ID NO: 29的胺基酸序列。

【0190】 **信號肽**

【0191】 本文所述的包含CMSD的功能性外源受體（例如，ITAM修飾的TCR、ITAM修飾的CAR、ITAM修飾的cTCR或ITAM修飾的TAC樣嵌合受體）可以包含在功能性外源受體多肽的N末端處的信號肽（也稱為信號序列）。通常，信號肽是將多肽靶向細胞中期望的位點的肽序列。在一些實施例中，信號肽將功能性外源受體靶向細胞的分泌途徑，並且將允許將功能性外源受體整合並錨定至脂雙層中。適合用於本文所述的包含CMSD的功能性外源受體中的信號肽（包括天然存在的蛋白質的信號序列或合成的非天然存在的信號序列）對於熟習此項技術者將是明顯的。在一些實施例中，信號肽源自選自以下的分子：CD8α、GM-CSF受體α和IgG1重鏈。在一些實施例中，信號肽源自CD8α。在一些實施例中，信號肽包含SEQ ID NO: 127的序列。

【0192】 **ITAM修飾的嵌合抗原受體（CAR）**

【0193】 在一些實施例中，本文所述的包含CMSD的功能性外源受體是ITAM修飾的CAR，即，包含本文所述的含有CMSD的ISD的CAR。在一些實施例中，ITAM修飾的CAR包含含有本文所述的任何CMSD的ISD。在一些實施例中，提供ITAM修飾的CAR，其包含：

(a) 細胞外配體結合結構域（如特異性識別一種或多種靶抗原（例

如，腫瘤抗原，如BCMA、CD19、CD20）的一個或多個表位的抗原結合片段（例如，scFv、sdAb）、受體（例如，FcR）的細胞外結構域（或其部分）、配體（例如，APRIL、BAFF）的細胞外結構域（或其部分）），(b) 跨膜結構域（例如，源自CD8α），以及 (c) 包含CMSD（例如，包含選自SEQ ID NO: 41-74的序列的CMSD）的ISD，其中所述CMSD包含一個或多個CMSD ITAM，其中所述多個CMSD ITAM任選地通過一個或多個CMSD連接子連接。在一些實施例中，多個（例如，2、3、4或更多個）CMSD ITAM彼此直接連接。在一些實施例中，CMSD包含通過並非源自含有ITAM的親本分子的一個或多個連接子（例如，G/S連接子）連接的兩個或更多個（例如，2、3、4或更多個）CMSD ITAM。在一些實施例中，CMSD包含源自含有ITAM的親本分子的一個或多個CMSD連接子，所述含有ITAM的親本分子與衍生出一個或多個所述CMSD ITAM的含有ITAM的親本分子不同。在一些實施例中，CMSD包含兩個或更多個（例如，2、3、4或更多個）相同的CMSD ITAM。在一些實施例中，所述CMSD ITAM中的至少一個並非源自CD3ζ。在一些實施例中，所述CMSD ITAM中的至少一個並非CD3ζ的ITAM1或ITAM2。在一些實施例中，所述多個CMSD ITAM各自源自不同的含有ITAM的親本分子。在一些實施例中，所述CMSD ITAM中的至少一個源自選自以下的含有ITAM的親本分子：CD3ε、CD3δ、CD3γ、Igα（CD79a）、Igβ（CD79b）、FcεRIβ、FcεRIγ、DAP12、CNAIP/NFAM1、STAM-1、STAM-2和膜突蛋白。在一些

實施例中，所述多個CMSD ITAM中的至少一個源自選自以下的含有ITAM的親本分子：CD3ε、CD3δ、CD3γ、CD3ζ、Igα（CD79a）、Igβ（CD79b）、FcεRIβ、FcεRIγ、DAP12、CNAIP/NFAM1、STAM-1、STAM-2和膜突蛋白。在一些實施例中，多個CMSD ITAM源自CD3ε、CD3δ、CD3γ、CD3ζ、DAP12、Igα（CD79a）、Igβ（CD79b）和FcεRIγ中的一種或多種。在一些實施例中，CMSD不包含CD3ζ ITAM1和/或CD3ζ ITAM2。在一些實施例中，CMSD包含CD3ζ ITAM3。在一些實施例中，CMSD不包含任何CD3ζ ITAM。在一些實施例中，跨膜結構域源自選自以下的分子：TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ζ、CD3ε、CD3γ、CD3δ、CD4、CD5、CD8α、CD9、CD16、CD22、CD27、CD28、CD33、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137（4-1BB）、CD152、CD154和PD-1。在一些實施例中，跨膜結構域源自CD8α。在一些實施例中，跨膜結構域包含SEQ ID NO: 126的序列。在一些實施例中，ISD還包含共刺激信號傳導結構域。在一些實施例中，共刺激信號傳導結構域源自選自以下的共刺激分子：CARD11、CD2（LFA-2）、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD54（ICAM-1）、CD134（OX40）、CD137（4-1BB）、CD162（SELPLG）、CD258（LIGHT）、CD270（HVEM、LIGHTR）、CD276（B7-H3）、CD278（ICOS）、CD279（PD-1）、CD319（SLAMF7）、LFA-1（淋巴細胞功能相關抗原-1）、NKG2C、CDS、GITR、BAFFR、NKp80（KLRF1）、CD160、CD19、CD4、IPO-3、BLAME（SLAMF8）、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、

NKp44、NKp30、NKp46、NKG2D、CD83、CD150（SLAMF1）、CD152（CTLA-4）、CD223（LAG3）、CD273（PD-L2）、CD274（PD-L1）、DAP10、TRIM、ZAP70、與CD83特異性結合的配體及其任何組合。在一些實施例中，共刺激信號傳導結構域源自CD137（4-1BB）或CD28。在一些實施例中，共刺激信號傳導結構域包含SEQ ID NO: 124的序列。在一些實施例中，共刺激結構域位於CMSD的N末端。在一些實施例中，共刺激結構域位於CMSD的C末端。在一些實施例中，細胞外配體結合結構域包含特異性識別一種或多種靶抗原（例如，腫瘤抗原，如CD19、CD20或BCMA）的一個或多個表位的抗原結合片段（例如，一個或多個scFv、sdAb）。在細胞外配體結合結構域內包含一個或多個抗原結合片段的ITAM修飾的CAR在下文中稱為「ITAM修飾的基於抗體的CAR」。在一些實施例中，抗原結合片段選自駱駝Ig、Ig NAR、Fab片段、單鏈Fv抗體和單結構域抗體（sdAb、納米抗體）。在一些實施例中，抗原結合片段是sdAb或scFv。在一些實施例中，腫瘤抗原選自間皮素、TSHR、CD19、CD123、CD22、CD30、CD171、CS-1、CLL-1、CD33、EGFRvIII、GD2、GD3、BCMA、Tn Ag、前列腺特異性膜抗原（PSMA）、ROR1、FLT3、FAP、TAG72、CD38、CD44v6、CEA、EPCAM、B7H3、KIT、IL-13Ra2、白介素-11受體a（IL-11Ra）、PSCA、PRSS21、VEGFR2、LewisY、CD24、源自血小板的生長因數受體-β（PDGFR-β）、SSEA-4、CD20、葉酸受體α、ERBB2（Her2/neu）、MUC1、表皮生長因數受體（EGFR）、

NCAM、前列腺酶、PAP、ELF2M、肝配蛋白B2、IGF-I受體、CAIX、LMP2、gp100、bcr-abl、酪胺酸酶、EphA2、岩藻糖基GM1、sLe、GM3、TGS5、HMWMAA、o-乙醯基-GD2、葉酸受體β、TEM1/CD248、TEM7R、CLDN6、CLDN18.2、GPRC5D、CXORF61、CD97、CD179a、ALK、多唾液酸、PLAC1、GloboH、NY-BR-1、UPK2、HAVCR1、ADRB3、PANX3、GPR20、LY6K、OR51E2、TARP、WT1、NY-ESO-1、LAGE-1a、MAGE-A1、豆莢蛋白、HPV E6,E7、MAGE A1、ETV6-AML、精子蛋白17、XAGE1、Tie 2、MAD-CT-1、MAD-CT-2、Fos相關抗原1、p53、p53突變體、prostein、生存素和端粒酶、PCTA-1/半乳糖凝集素8、黑色素A/MART1、Ras突變體、hTERT、肉瘤易位中斷點、ML-IAP、ERG(TMPRSS2 ETS融合基因)、NA17、PAX3、雄激素受體、細胞週期蛋白B1、MYCN、RhoC、TRP-2、CYP1B1、BORIS、SART3、PAX5、OY-TES1、LCK、AKAP-4、SSX2、RAGE-1、人端粒酶逆轉錄酶、RU1、RU2、腸道羧基酯酶、mut hsp70-2、CD79a、CD79b、CD72、LAIR1、FCAR、LILRA2、CD300LF、CLEC12A、BST2、EMR2、LY75、GPC3、FCRL5和IGLL1。在一些實施例中，腫瘤抗原是CD19、CD20或BCMA。在一些實施例中，細胞外配體結合結構域包含一個或多個非抗體結合部分，如與抗原結合的多肽配體或工程化蛋白質（例如，基本上由其組成）。在一些實施例中，一個或多個非抗體結合部分包含源自細胞表面配體或細胞表面受體的細胞外結構域的至少一個結構域。在一些實施例中，細胞外配體結合結構域包含特

異性識別一種或多種配體的受體的細胞外結構域或其部分（例如，一種或多種受體的一個或多個細胞外結構域，或其部分）。在一些實施例中，配體和/或受體選自NKG2A、NKG2C、NKG2F、NKG2D、BCMA、APRIL、BAFF、IL-3、IL-13、LLT1、AICL、DNAM-1和NKp80。在一些實施例中，受體是BCMA。在細胞外配體結合結構域中包含一種或多種受體的一個或多個細胞外結構域（或其部分）的ITAM修飾的CAR在下文中稱為「ITAM修飾的基於配體/受體的CAR」。在一些實施例中，受體是Fc受體（FcR），並且配體是含有Fc的分子。在細胞外配體結合結構域內包含一個或多個FcR的ITAM修飾的CAR在下文中稱為「ITAM修飾的抗體偶聯的T細胞受體（ACTR）」。表現ITAM修飾的ACTR的修飾的T細胞可以與含有Fc的分子結合，所述含有Fc的分子如特異性識別靶（例如，腫瘤）抗原的單株抗體（例如，抗BCMA、抗CD19或抗CD20全長抗體），其用作將修飾的T細胞引導至腫瘤細胞的橋。在一些實施例中，受體是Fcγ受體（FcγR）。在一些實施例中，FcγR選自FcγRIA（CD64A）、FcγRIB（CD64B）、FcγRIC（CD64C）、FcγRIIA（CD32A）、FcγRIIB（CD32B）、FcγRIIIA（CD16a）和FcγRIIIB（CD16b）。在一些實施例中，含有Fc的分子是全長抗體。在一些實施例中，細胞外配體結合結構域是單價的（或單特異性的），即，ITAM修飾的CAR是單價的（或單特異性的）。在一些實施例中，細胞外配體結合結構域是多價的（例如，二價的）和單特異性的，即，ITAM修飾的CAR是多價的（例如，二價的）和單特異性的。

在一些實施例中，細胞外配體結合結構域是多價的（例如，二價的）和多特異性的（例如，雙特異性的），即，ITAM修飾的CAR是多價的（例如，二價的）和多特異性的（例如，雙特異性的）。在一些實施例中，ITAM修飾的CAR還包含位於細胞外配體結合結構域（例如，scFv、sdAb）的C末端與跨膜結構域的N末端之間的鉸鏈結構域。在一些實施例中，鉸鏈結構域源自CD8α。在一些實施例中，鉸鏈結構域包含SEQ ID NO: 125的序列。在一些實施例中，ITAM修飾的CAR還包含位於ITAM修飾的CAR的N末端（即，細胞外配體結合結構域的N末端）處的信號肽（SP）。在一些實施例中，信號肽源自CD8α。在一些實施例中，信號肽包含SEQ ID NO: 127的序列。在一些實施例中，在將ITAM修飾的CAR輸出至細胞表面後，去除信號肽。在一些實施例中，ITAM修飾的CAR包含SEQ ID NO: 76-96、98-104和106-113中任一個的胺基酸序列。在一些實施例中，ITAM修飾的CAR沒有通過Nef蛋白（例如，野生型Nef如野生型SIV Nef、Nef亞型、或突變體Nef如突變體SIV Nef）下調（例如，下調細胞表面表現和/或效應子功能，如與細胞裂解活性相關的信號轉導）。在一些實施例中，與Nef不存在時相比，ITAM修飾的CAR通過Nef蛋白下調（例如，下調細胞表面表現和/或效應子功能，如參與細胞裂解活性的信號轉導）至多約80%（如至多約70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%或5%中的任一個）。在一些實施例中，ITAM修飾的CAR通過Nef蛋白進行的下調（例如，下調細胞表面表現和/或效應子功能，如參與細胞裂解活性的信號轉導）

與包含CD3ζ ISD的相同CAR（例如，除了具有CD3ζ ISD以外全部相同的傳統CAR）的下調相同或相似。在一些實施例中，ITAM修飾的CAR通過Nef蛋白進行的下調（例如，下調細胞表面表現和/或效應子功能，如參與細胞裂解活性的信號轉導）比包含CD3ζ ISD的傳統CAR的下調少至少約3%（例如，少至少約4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%中的任一個）。在一些實施例中，ITAM修飾的CAR通過Nef蛋白進行的下調（例如，下調細胞表面表現和/或效應子功能，如參與細胞裂解活性的信號轉導）比包含CD3ζ ISD的相同CAR（例如，具有CD3ζ ISD的傳統CAR）的下調多至多約80%（例如，至多約70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%或5%中的任一個）。在一些實施例中，與包含CD3ζ ISD的相同CAR（例如，具有CD3ζ ISD的傳統CAR）的效應子功能相比，ITAM修飾的CAR具有相同或相似的效應子功能（例如，參與細胞裂解活性的信號轉導）。在一些實施例中，與包含CD3ζ ISD的相同CAR（例如，具有CD3ζ ISD的傳統CAR）的效應子功能相比，ITAM修飾的CAR具有強至少約3%（例如，至少約4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%中的任一個）的效應子功能（例如，參與細胞裂解活性的信號轉導）。在一些實施例中，與包含CD3ζ ISD的相同CAR（例如，具有CD3ζ ISD的傳統CAR）的效應子功能相比，ITAM修飾的CAR具有低至多約80%（例如，至多約70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%或5%中的任

一個）的效應子功能（例如，參與細胞裂解活性的信號轉導）。在一些實施例中，與包含CD3ζ ISD的相同CAR（例如，具有CD3ζ ISD的傳統CAR）的活性相比，ITAM修飾的CAR具有至少約20%（如至少約30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%中的任一個）的活性。

【0194】 在一些實施例中，提供ITAM修飾的CAR，其從N'至C'包含：(a) 細胞外配體結合結構域，所述細胞外配體結合結構域包含特異性識別一種或多種靶抗原（例如，腫瘤抗原，如CD19、CD20或BCMA）的一個或多個表位的抗原結合片段（例如，scFv、sdAb），(b) 跨膜結構域（例如，源自CD8α），以及 (c) 包含CMSD（例如，包含選自SEQ ID NO: 41-74的序列的CMSD）的ISD，其中所述CMSD包含一個或多個CMSD ITAM，其中所述多個CMSD ITAM任選地通過一個或多個CMSD連接子連接。在一些實施例中，提供ITAM修飾的CAR，其從N'至C'包含：(a) 細胞外配體結合結構域，所述細胞外配體結合結構域包含特異性識別一種或多種靶抗原（例如，腫瘤抗原，如CD19、CD20或BCMA）的一個或多個表位的抗原結合片段（例如，scFv、sdAb），(b) 鉸鏈結構域（例如，源自CD8α），(c) 跨膜結構域（例如，源自CD8α），以及 (d) 包含CMSD（例如，包含選自SEQ ID NO: 41-74的序列的CMSD）的ISD，其中所述CMSD包含一個或多個CMSD ITAM，其中所述多個CMSD ITAM任選地通過一個或多個CMSD連接子連接。在一些實施例中，提供ITAM修飾的CAR，其從N'至C'包含：(a) 細胞外配

體結合結構域，所述細胞外配體結合結構域包含特異性識別一種或多種靶抗原（例如，腫瘤抗原，如CD19、CD20或BCMA）的一個或多個表位的抗原結合片段（例如，scFv、sdAb），(b) 任選的鉸鏈結構域（例如，源自CD8α），(c) 跨膜結構域（例如，源自CD8α），以及 (d) ISD，所述ISD包含共刺激信號傳導結構域（例如，源自4-1BB或CD28）和CMSD（例如，包含選自SEQ ID NO: 41-74的序列的CMSD），其中所述CMSD包含一個或多個CMSD ITAM，其中所述多個CMSD ITAM任選地通過一個或多個CMSD連接子連接，並且其中共刺激信號傳導結構域位於CMSD的N末端。在一些實施例中，提供ITAM修飾的CAR，其從N'至C'包含：(a) 細胞外配體結合結構域，所述細胞外配體結合結構域包含特異性識別一種或多種靶抗原（例如，腫瘤抗原，如CD19、CD20或BCMA）的一個或多個表位的抗原結合片段（例如，scFv、sdAb），(b) 任選的鉸鏈結構域（例如，源自CD8α），(c) 跨膜結構域（例如，源自CD8α），以及 (d) ISD，所述ISD包含共刺激信號傳導結構域（例如，源自4-1BB或CD28）和CMSD（例如，包含選自SEQ ID NO: 41-74的序列的CMSD），其中所述CMSD包含一個或多個CMSD ITAM，其中所述多個CMSD ITAM任選地通過一個或多個CMSD連接子連接，並且其中共刺激信號傳導結構域位於CMSD的C末端。在一些實施例中，提供ITAM修飾的CAR，其從N'至C'包含：(a) 細胞外配體結合結構域，所述細胞外配體結合結構域包含特異性識別一種或多種靶抗原（例如，腫瘤抗原，如CD19、CD20或BCMA）

的一個或多個表位的一個或多個scFv或sdAb，(b) 任選的鉸鏈結構域（例如，源自CD8α），(c) 跨膜結構域（例如，源自CD8α），以及 (c) ISD，所述ISD包含共刺激信號傳導結構域（例如，源自4-1BB或CD28）和CMSD（例如，包含選自SEQ ID NO: 41-74的序列的CMSD），其中所述CMSD包含一個或多個CMSD ITAM，其中所述多個CMSD ITAM任選地通過一個或多個CMSD連接子連接，並且其中共刺激信號傳導結構域位於CMSD的N末端。在一些實施例中，提供ITAM修飾的CAR，其從N'至C'包含：(a) 細胞外配體結合結構域，所述細胞外配體結合結構域包含特異性識別一種或多種靶抗原（例如，腫瘤抗原，如CD19、CD20或BCMA）的一個或多個表位的一個或多個scFv或sdAb，(b) 任選的鉸鏈結構域（例如，源自CD8α），(c) 跨膜結構域（例如，源自CD8α），以及 (d) ISD，所述ISD包含共刺激信號傳導結構域（例如，源自4-1BB或CD28）和CMSD（例如，包含選自SEQ ID NO: 41-74的序列的CMSD），其中所述CMSD包含一個或多個CMSD ITAM，其中所述多個CMSD ITAM任選地通過一個或多個CMSD連接子連接，並且其中共刺激信號傳導結構域位於CMSD的C末端。在一些實施例中，細胞外配體結合結構域包含特異性結合BCMA的一個或多個sdAb（即，抗BCMA sdAb），如PCT/CN2016/094408和PCT/CN2017/096938中披露的任何抗BCMA sdAb，所述文獻各自的內容通過引用以其整體併入本文。在一些實施例中，一個或多個抗BCMA sdAb部分（例如，V_HH）包含含有SEQ ID NO: 130的

胺基酸序列的CDR1、含有SEQ ID NO: 131的胺基酸序列的CDR2、和含有SEQ ID NO: 132的胺基酸序列的CDR3。在一些實施例中，一個或多個抗BCMA sdAb部分（例如，V_HH）包含SEQ ID NO: 128的胺基酸序列。在一些實施例中，一個或多個抗BCMA sdAb部分（例如，V_HH）包含含有SEQ ID NO: 133的胺基酸序列的CDR1、含有SEQ ID NO: 134的胺基酸序列的CDR2、和含有SEQ ID NO: 135的胺基酸序列的CDR3。在一些實施例中，一個或多個抗BCMA sdAb部分（例如，V_HH）包含SEQ ID NO: 129的胺基酸序列。在一些實施例中，共刺激信號傳導結構域包含SEQ ID NO: 124的序列。在一些實施例中，跨膜結構域包含SEQ ID NO: 126的序列。在一些實施例中，鉸鏈結構域包含SEQ ID NO: 125的序列。在一些實施例中，ITAM修飾的CAR還包含位於ITAM修飾的CAR的N末端（即，細胞外配體結合結構域的N末端）處的信號肽。在一些實施例中，信號肽源自CD8α。在一些實施例中，信號肽包含SEQ ID NO: 127的序列。在一些實施例中，在將ITAM修飾的CAR輸出至細胞表面後，去除信號肽。在一些實施例中，細胞外配體結合結構域（或ITAM修飾的CAR）是單價的，即，包含特異性識別靶（例如，腫瘤）抗原的一個表位的一個抗原結合片段（例如，scFv、sdAb）。在一些實施例中，細胞外配體結合結構域（或ITAM修飾的CAR）是多價的（例如，二價的）和多特異性的（例如，雙特異性的），即，包含特異性識別靶（例如，腫瘤）抗原的兩個或更多個（例如，2、3、4、5或更多個）表位的兩個或更多個（例如，

2、3、4、5或更多個）抗原結合片段（例如，scFv、sdAb）。在一些實施例中，兩個或更多個表位來自相同的靶（例如，腫瘤）抗原。在一些實施例中，兩個或更多個表位來自不同的靶（例如，腫瘤）抗原。在一些實施例中，細胞外配體結合結構域（或ITAM修飾的CAR）是多價的（例如，二價的）和單特異性的，其包含特異性識別靶（例如，腫瘤）抗原的相同表位的兩個或更多個（例如，2、3、4、5或更多個）抗原結合片段（例如，scFv、sdAb）。在一些實施例中，細胞外配體結合結構域包含特異性識別一種或多種靶抗原（例如，腫瘤抗原，如CD19、CD20或BCMA）的一個或多個表位的兩個或更多個抗原結合片段（例如，scFv、sdAb）。在一些實施例中，兩個或更多個抗原結合片段（例如，scFv、sdAb）是相同的，例如，兩個或更多個相同的抗BCMA sdAb或抗BCMA scFv。在一些實施例中，兩個或更多個抗原結合片段（例如，scFv、sdAb）是彼此不同的，例如，特異性識別相同BCMA表位的兩個或更多個抗BCMA sdAb或抗BCMA scFv，或者特異性識別不同BCMA表位的兩個或更多個抗BCMA sdAb或抗BCMA scFv。在一些實施例中，一個或多個抗原結合片段源自四鏈抗體。在一些實施例中，一個或多個抗原結合片段源自駱駝科動物抗體。在一些實施例中，一個或多個抗原結合片段源自人抗體。在一些實施例中，一個或多個抗原結合片段選自駱駝Ig、Ig NAR、Fab、scFv和sdAb。在一些實施例中，抗原結合片段是sdAb（例如，抗BCMA sdAb）或scFv（例如，抗BCMA scFv、抗CD20 scFv、抗CD19 scFv）。

在一些實施例中，細胞外配體結合結構域包含直接連接或經由肽連接子連接在一起的兩個或更多個sdAb（例如，抗BCMA sdAb）。在一些實施例中，提供ITAM修飾的CAR，其包含SEQ ID NO: 76-96、98-104和106-113中任一個的胺基酸序列。在一些實施例中，ITAM修飾的CAR是ITAM修飾的BCMA CAR。因此在一些實施例中，提供ITAM修飾的BCMA CAR，其從N'至C'包含：(a) CD8α信號肽，(b) 細胞外配體結合結構域，所述細胞外配體結合結構域包含抗BCMA scFv，(c) CD8α鉸鏈結構域，(d) CD8α跨膜結構域，(e) 4-1BB共刺激信號傳導結構域，以及 (f) CMSD（例如，包含選自SEQ ID NO: 41-74的序列的CMSD），其中所述CMSD包含一個或多個CMSD ITAM，其中所述多個CMSD ITAM任選地通過一個或多個CMSD連接子連接。在一些實施例中，提供ITAM修飾的BCMA CAR，其包含SEQ ID NO: 76-96中任一個的胺基酸序列。在一些實施例中，ITAM修飾的CAR是ITAM修飾的CD20 CAR。因此在一些實施例中，提供ITAM修飾的CD20 CAR，其從N'至C'包含：(a) CD8α信號肽，(b) 包含抗CD20 scFv的細胞外配體結合結構域，(c) CD8α鉸鏈結構域，(d) CD8α跨膜結構域，(e) 4-1BB共刺激信號傳導結構域，以及 (f) CMSD（例如，包含選自SEQ ID NO: 41-74的序列的CMSD），其中所述CMSD包含一個或多個CMSD ITAM，其中所述多個CMSD ITAM任選地通過一個或多個CMSD連接子連接。在一些實施例中，抗CD20 scFv源自抗CD20抗體，如利妥昔單抗（例如，Rituxan®、MabThera®）或Leu16。在一些實施例中，提供ITAM

修飾的CD20 CAR，其包含SEQ ID NO: 98-104中任一個的胺基酸序列。在一些實施例中，ITAM修飾的CAR沒有通過Nef蛋白（例如，野生型Nef如野生型SIV Nef、Nef亞型、或突變體Nef如突變體SIV Nef）下調（例如，下調細胞表面表現和/或效應子功能，如與細胞裂解活性相關的信號轉導）。在一些實施例中，與Nef不存在時相比，ITAM修飾的CAR通過Nef蛋白下調（例如，下調細胞表面表現和/或效應子功能，如參與細胞裂解活性的信號轉導）至多約80%（如至多約70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%或5%中的任一個）。在一些實施例中，ITAM修飾的CAR通過Nef蛋白進行的下調（例如，下調細胞表面表現和/或效應子功能，如參與細胞裂解活性的信號轉導）與包含CD3ζ ISD的相同CAR（例如，除了具有CD3ζ ISD以外全部相同的傳統CAR）的下調相同或相似。在一些實施例中，ITAM修飾的CAR通過Nef蛋白進行的下調（例如，下調細胞表面表現和/或效應子功能，如參與細胞裂解活性的信號轉導）比包含CD3ζ ISD的傳統CAR的下調少至少約3%（例如，少至少約4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%中的任一個）。在一些實施例中，ITAM修飾的CAR通過Nef蛋白進行的下調（例如，下調細胞表面表現和/或效應子功能，如參與細胞裂解活性的信號轉導）比包含CD3ζ ISD的相同CAR（例如，具有CD3ζ ISD的傳統CAR）的下調多至多約80%（例如，至多約70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%或5%中的任一個）。在一些實施例中，與包含CD3ζ

ISD的相同CAR（例如，具有CD3ζ ISD的傳統CAR）的效應子功能相比，ITAM修飾的CAR具有相同或相似的效應子功能（例如，參與細胞裂解活性的信號轉導）。在一些實施例中，與包含CD3ζ ISD的相同CAR（例如，具有CD3ζ ISD的傳統CAR）的效應子功能相比，ITAM修飾的CAR具有強至少約3%（例如，至少約4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%中的任一個）的效應子功能（例如，參與細胞裂解活性的信號轉導）。在一些實施例中，與包含CD3ζ ISD的相同CAR（例如，具有CD3ζ ISD的傳統CAR）的效應子功能相比，ITAM修飾的CAR具有低至多約80%（例如，至多約70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%或5%中的任一個）的效應子功能（例如，參與細胞裂解活性的信號轉導）。在一些實施例中，與包含CD3ζ ISD的相同CAR（例如，具有CD3ζ ISD的傳統CAR）的活性相比，ITAM修飾的CAR具有至少約20%（如至少約30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%中的任一個）的活性。

【0195】 在一些實施例中，ITAM修飾的CAR是「ITAM修飾的BCMA(基於配體/受體的)CAR」。因此在一些實施例中，提供ITAM修飾的BCMA(基於配體/受體的)CAR，其從N'至C'包含：(a) CD8α信號肽，(b) 細胞外配體結合結構域，所述細胞外配體結合結構域包含源自APRIL和/或BAFF的一個或多個結構域，(c) CD8α鉸鏈結構域，(d) CD8α跨膜結構域，(e) 4-1BB共刺激信號傳導結構域，以及 (f) CMSD（例如，包含選自SEQ ID NO: 41-74的序列的

CMSD），其中所述CMSD包含一個或多個CMSD ITAM，其中所述多個CMSD ITAM任選地通過一個或多個CMSD連接子連接。在一些實施例中，細胞外配體結合結構域包含細胞外APRIL結構域（或其功能部分）。在一些實施例中，細胞外配體結合結構域包含細胞外BAFF結構域（或其功能部分）。在一些實施例中，細胞外配體結合結構域包含細胞外APRIL結構域和細胞外BAFF結構域（或其功能部分）。在一些實施例中，細胞外配體結合結構域包含源自APRIL和/或BAFF的兩個或更多個細胞外結構域，它們彼此相同。在一些實施例中，細胞外配體結合結構域包含源自APRIL和/或BAFF的兩個或更多個結構域，它們彼此不同。

【0196】 在一些實施例中，ITAM修飾的CAR是ITAM修飾的ACTR。因此在一些實施例中，提供ITAM修飾的ACTR，其從N'至C'：(a) CD8α信號肽，(b) 細胞外配體結合結構域，所述細胞外配體結合結構域包含FcR（例如，FcγR），(c) CD8α鉸鏈結構域，(d) CD8α跨膜結構域，(e) 4-1BB共刺激信號傳導結構域，以及 (f) CMSD（例如，包含選自SEQ ID NO: 41-74的序列的CMSD），其中所述CMSD包含一個或多個CMSD ITAM，其中所述多個CMSD ITAM任選地通過一個或多個CMSD連接子連接。在一些實施例中，FcγR選自FcγRIA（CD64A）、FcγRIB（CD64B）、FcγRIC（CD64C）、FcγRIIA（CD32A）、FcγRIIB（CD32B）、FcγRIIIA（CD16a）和FcγRIIIB（CD16b）。在一些實施例中，FcR特異性識別含有Fc的分子（例如，全長抗體）。在一些實施例中，包含ITAM

修飾的ACTR的修飾的T細胞還表現含有Fc的分子（例如，抗BCMA、抗CD19或抗CD20全長抗體）。在一些實施例中，將包含ITAM修飾的ACTR的修飾的T細胞在用於治療時與含有Fc的分子（例如，抗BCMA、抗CD19或抗CD20全長抗體）組合施用。

【0197】 業內已知或由申請人開發的任何CAR（包括PCT/CN2017/096938和PCT/CN2016/094408（所述文獻各自的內容通過引用以其整體併入本文）中所述的CAR）可以用於構建本文所述的ITAM修飾的CAR，即，可以含有除了ITAM修飾的CAR的CMSD以外的任何結構組分。ITAM修飾的CAR的示例性結構顯示於PCT/CN2017/096938的圖15A-圖15D中（ISD將被轉換為本文所述的包含CMSD的ISD）。

【0198】 還提供編碼本文所述的任何ITAM修飾的CAR的分離的核酸。

【0199】 ***ITAM修飾的BCMA VHH-VHH CAR***

【0200】 在一些實施例中，ITAM修飾的BCMA CAR包含：a) 細胞外配體結合結構域，所述細胞外配體結合結構域包含與BCMA特異性結合的第一sdAb部分和與BCMA特異性結合的第二sdAb部分，以及b) 細胞內信號傳導結構域（ISD）。跨膜結構域（例如，源自CD8α的跨膜結構域）可以存在於細胞外配體結合結構域與ISD之間。第一sdAb部分和第二sdAb部分可以結合至BCMA的相同或不同表位。兩個sdAb部分可以串聯佈置，任選地通過連接子序列連接，所述連接子序列如包含GGGGS（SEQ ID NO: 29）的胺基酸序

列的連接子。

【0201】 在ITAM修飾的BCMA CAR的細胞外配體結合結構域與跨膜結構域之間，或者在ITAM修飾的BCMA CAR的ISD與跨膜結構域之間，可以存在間隔子結構域。間隔子結構域可以是任何寡肽或多肽，其功能是將跨膜結構域連接至多肽鏈中的細胞外配體結合結構域或ISD。間隔子結構域可以包含多達約300個胺基酸，包括例如約10至約100個、約5至約30個胺基酸、或約25至約50個胺基酸。

【0202】 跨膜結構域可以是本文所述用於含有CMSD的功能性外源受體的相同跨膜結構域，並且可以源自任何膜結合或跨膜蛋白。示例性跨膜結構域可以源自T細胞受體的α、β、δ或γ鏈、CD28、CD3ε、CD3ζ、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137或CD154（即，至少包含其一個或多個跨膜區）。在一些實施例中，跨膜結構域源自CD8α，如包含SEQ ID NO: 126的胺基酸序列。在一些實施例中，跨膜結構域可以是合成的，在這種情況下其可以主要包含疏水殘基，如白胺酸和撖胺酸。在一些實施例中，可以在合成跨膜結構域的每個末端發現苯丙胺酸、色胺酸和撖胺酸的三聯體。在一些實施例中，長度例如在約2與約10之間（如約2、3、4、5、6、7、8、9或10中的任一個）的胺基酸的短寡肽或多肽連接子可以在ITAM修飾的BCMA CAR的跨膜結構域與ISD之間形成連接。在一些實施例中，連接子是甘胺酸-絲胺酸雙聯體。

【0203】 在一些實施例中，使用ITAM修飾的BCMA CAR的ISD中的序列之一天然締合的跨膜結構域(例如，如果ITAM修飾的BCMA CAR ISD包含4-1BB共刺激序列，則ITAM修飾的BCMA CAR的跨膜結構域源自4-1BB跨膜結構域）。

【0204】 ITAM修飾的BCMA CAR的細胞內信號傳導結構域負責啟動其中已置入ITAM修飾的BCMA CAR的免疫細胞的至少一種正常效應子功能。例如，T細胞的效應子功能可以是細胞裂解活性或輔助細胞活性，包括細胞因數的分泌。因此，術語「細胞內信號傳導結構域」或「ISD」是指蛋白質中轉導效應子功能信號並引導細胞執行特化功能的部分。雖然通常可以採用完整ISD，但是在多種情況下不需要使用整條鏈。就使用ISD的截短部分而言，這種截短部分可以用於代替完整鏈，只要它轉導效應子功能信號即可。因此，術語「細胞內信號傳導序列」意在包括ISD中足以轉導效應子功能信號的任何截短部分。

【0205】 T細胞啟動可以通過兩種不同類別的細胞內信號傳導序列來介導：通過TCR（初級信號傳導序列）起始抗原依賴性初級啟動的那些，和以非抗原依賴性方式作用以提供次級或共刺激信號的那些（共刺激信號傳導序列）。本文所述的ITAM修飾的BCMA CAR可以包含所述信號傳導序列的一種或兩種。在一些實施例中，初級信號傳導序列包含本文所述的任何CMSD，如包含SEQ ID NO: 41-74中任一個的胺基酸序列的CMSD。

【0206】 本文所述的共刺激信號傳導序列（也稱為共刺激信號傳

導結構域）可以是共刺激分子的細胞內信號傳導結構域的部分，所述共刺激分子包括例如CD27、CD28、4-1BB（CD137）、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴細胞功能相關抗原-1（LFA-1）、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、與CD83特異性結合的配體等。本文所述的ITAM修飾的BCMA CAR的共刺激信號傳導結構域可以是本文所述用於含有CMSD的功能性外源受體的任何共刺激信號傳導結構域。在一些實施例中，共刺激結構域位於CMSD的N末端。在一些實施例中，共刺激結構域位於CMSD的C末端。在一些實施例中，共刺激信號傳導結構域源自CD137（4-1BB），如包含SEQ ID NO: 124的胺基酸序列。

【0207】 在一些實施例中，ITAM修飾的BCMA CAR的細胞內信號傳導結構域包含CMSD和4-1BB的細胞內信號傳導序列。在一些實施例中，ITAM修飾的BCMA CAR的跨膜結構域源自CD8α。在一些實施例中，ITAM修飾的BCMA CAR還在細胞外配體結合結構域與跨膜結構域（例如，源自CD8α的跨膜結構域）之間包含鉸鏈序列（例如，源自CD8α的鉸鏈序列）。在一些實施例中，鉸鏈結構域包含SEQ ID NO: 125的胺基酸序列。

【0208】 在一些實施例中，提供ITAM修飾的BCMA CAR，其包含：a) 細胞外配體結合結構域，所述細胞外配體結合結構域包含與BCMA特異性結合的一個或多個單結構域抗體（sdAb）部分（也稱為「抗BCMA sdAb」，如「抗BCMA V_HH」），b) 任選的鉸鏈結構域（例如，CD8α鉸鏈）；c) 跨膜結構域（例如，CD8α TM結構

域）；以及d) 包含CMSD（例如，包含選自SEQ ID NO: 41-74的序列的CMSD）的ISD，其中CMSD包含一個或多個CMSD ITAM，其中所述多個CMSD ITAM任選地通過一個或多個CMSD連接子連接。

【0209】 在一些實施例中，細胞外配體結合結構域從N'至C'包含：第一抗BCMA sdAb部分（例如，V_HH）、任選的連接子和第二抗BCMA sdAb部分（例如，V_HH）。

【0210】 在一些實施例中，第一（和/或第二）抗BCMA sdAb部分（例如，V_HH）包含含有SEQ ID NO: 130的胺基酸序列的CDR1、含有SEQ ID NO: 131的胺基酸序列的CDR2、和含有SEQ ID NO: 132的胺基酸序列的CDR3。在一些實施例中，第一（和/或第二）sdAb部分包含含有SEQ ID NO: 128的胺基酸序列的抗BCMA sdAb的CDR1、CDR2和CDR3。在一些實施例中，第一（和/或第二）sdAb部分與包含含有SEQ ID NO: 130的胺基酸序列的CDR1、含有SEQ ID NO: 131的胺基酸序列的CDR2、和含有SEQ ID NO: 132的胺基酸序列的CDR3的sdAb部分（例如，V_HH）一樣結合相同的BCMA表位。

【0211】 在一些實施例中，第二（和/或第一）抗BCMA sdAb部分（例如，V_HH）包含含有SEQ ID NO: 133的胺基酸序列的CDR1、含有SEQ ID NO: 134的胺基酸序列的CDR2、和含有SEQ ID NO: 135的胺基酸序列的CDR3。在一些實施例中，第二（和/或第一）sdAb部分包含含有SEQ ID NO: 129的胺基酸序列的抗BCMA sdAb

的CDR1、CDR2和CDR3。在一些實施例中，第二（和/或第一）sdAb部分與包含含有SEQ ID NO: 133的胺基酸序列的CDR1、含有SEQ ID NO: 134的胺基酸序列的CDR2、和含有SEQ ID NO: 135的胺基酸序列的CDR3的sdAb部分（例如，V_HH）一樣結合相同的BCMA表位。

【0212】 在一些實施例中，提供ITAM修飾的BCMA CAR，其從N'至C'包含： a) 細胞外配體結合結構域，所述細胞外配體結合結構域包含第一抗BCMA sdAb部分（例如，V_HH）、任選的連接子和第二抗BCMA sdAb部分（例如，V_HH）；b) 任選的鉸鏈結構域（例如，CD8α鉸鏈）；c) 跨膜結構域（例如，CD8α TM結構域）；以及d) 包含CMSD的ISD，其中CMSD包含SEQ ID NO: 41-74中任一個的胺基酸序列；其中所述第一抗BCMA sdAb部分包含含有SEQ ID NO: 130的胺基酸序列的CDR1、含有SEQ ID NO: 131的胺基酸序列的CDR2、和含有SEQ ID NO: 132的胺基酸序列的CDR3；並且其中所述第二抗BCMA sdAb部分包含含有SEQ ID NO: 133的胺基酸序列的CDR1、含有SEQ ID NO: 134的胺基酸序列的CDR2、和含有SEQ ID NO: 135的胺基酸序列的CDR3。在一些實施例中，提供BCMA CAR，其從N'至C'包含： a) 細胞外配體結合結構域，所述細胞外配體結合結構域包含第一抗BCMA sdAb部分（例如，V_HH）、任選的連接子和第二抗BCMA sdAb部分（例如，V_HH）；b) 任選的鉸鏈結構域（例如，CD8α鉸鏈）；c) 跨膜結構域（例如，CD8α TM結構域）；以及d) 包含CMSD的ISD，其中CMSD包含SEQ

ID NO: 41-74中任一個的胺基酸序列；其中所述第一抗BCMA sdAb部分包含SEQ ID NO: 128的胺基酸序列，並且其中所述第二抗BCMA sdAb部分包含SEQ ID NO: 129的胺基酸序列。在一些實施例中，ISD還包含共刺激信號傳導結構域，如源自CD137（4-1BB）或CD28的共刺激信號傳導結構域。在一些實施例中，共刺激信號傳導結構域包含SEQ ID NO: 124的胺基酸序列。在一些實施例中，任選的連接子包含SEQ ID NO: 29的胺基酸序列。在一些實施例中，鉸鏈結構域包含SEQ ID NO: 125的胺基酸序列。在一些實施例中，跨膜結構域包含SEQ ID NO: 126的胺基酸序列。在一些實施例中，ITAM修飾的BCMA CAR還包含位於N末端的包含SEQ ID NO: 127的胺基酸序列的信號肽。如上文所述的任何鉸鏈結構域、跨膜結構域、受體結構域連接子、信號肽和CMSD可以用於本文所述的ITAM修飾的BCMA CAR中。在一些實施例中，提供ITAM修飾的抗BCMA CAR，其包含SEQ ID NO: 106-112中任一個的胺基酸序列。

【0213】 在一些實施例中，提供ITAM修飾的抗BCMA CAR，其包含SEQ ID NO: 113的胺基酸序列。

【0214】 *共刺激信號傳導結構域*

【0215】 除了刺激抗原特異性信號外，多種免疫效應細胞（例如，T細胞）需要共刺激，以促進細胞增殖、分化和存活，以及啟動細胞的效應子功能。在一些實施例中，ITAM修飾的CAR包含至少一個共刺激信號傳導結構域。術語「共刺激分子」或「共刺激蛋白」

是指免疫細胞（例如，T細胞）上的同源結合配偶體，其與共刺激配體特異性結合，從而介導免疫細胞的共刺激反應，例如但不限於增殖和存活。如本文所用，術語「共刺激信號傳導結構域」是指共刺激分子的至少一部分，其介導細胞內的信號轉導以誘導免疫反應，如效應子功能。本文所述的ITAM修飾的CAR的共刺激信號傳導結構域可以是來自共刺激蛋白的胞質信號傳導結構域，其轉導信號並調節免疫細胞（如T細胞、NK細胞、巨噬細胞、嗜中性粒細胞或嗜酸性粒細胞）介導的反應。

【0216】 含共刺激信號傳導結構域。在一些實施例中，ITAM修飾的CAR的ISD包含單一共刺激信號傳導結構域。在一些實施例中，ITAM修飾的CAR的ISD包含兩個或更多個（如約2、3、4或更多個中的任一個）共刺激信號傳導結構域。在一些實施例中，ITAM修飾的CAR的ISD包含兩個或更多個相同的共刺激信號傳導結構域，例如，兩個拷貝的CD28或CD137（4-1BB）的共刺激信號傳導結構域。在一些實施例中，ITAM修飾的CAR的ISD包含來自不同共刺激蛋白的兩個或更多個共刺激信號傳導結構域。在一些實施例中，ITAM修飾的CAR的ISD包含本文所述的CMSD以及一個或多個共刺激信號傳導結構域（例如，源自4-1BB）。在一些實施例中，一個或多個共刺激信號傳導結構域和CMSD經由任選的肽連接子彼此融合。CMSD和一個或多個共刺激信號傳導結構域可以以任何合適的順序來佈置。在一些實施例中，一個或多個共刺激信號傳導結構域位於跨膜結構域與CMSD之間。在一些實施例中，一個或

多個共刺激信號傳導結構域位於CMSD的C末端。在一些實施例中，CMSD位於兩個或更多個共刺激信號傳導結構域之間。多個共刺激信號傳導結構域可以提供加性或協同刺激效應。在一些實施例中，跨膜結構域、一個或多個共刺激信號傳導結構域和/或CMSD經由任選的肽連接子連接，所述任選的肽連接子如在「CMSD連接子」和「受體結構域連接子」小節中所述的任何肽連接子。在一些實施例中，肽連接子包含SEQ ID NO: 17-39和116-120中任一個的胺基酸序列，如SEQ ID NO: 17-31中的任一個。

【0217】 宿主細胞（例如，免疫細胞，如T細胞）中的共刺激信號傳導結構域的啟動可以誘導細胞增加或減少細胞因數的產生和分泌、吞噬特性、增殖、分化、存活和/或細胞毒性。基於諸如以下的因素選擇共刺激信號傳導結構域的一種或多種類型用於本文所述的ITAM修飾的CAR：其中將表現ITAM修飾的CAR的免疫效應細胞類型（例如，T細胞、NK細胞、巨噬細胞、嗜中性粒細胞或嗜酸性粒細胞）和所需的免疫效應子功能（例如，ADCC效應）。用於ITAM修飾的CAR中的共刺激信號傳導結構域的例子可以是任何共刺激蛋白的胞質信號傳導結構域，包括但不限於：B7/CD28家族的成員（例如，B7-1/CD80、B7-2/CD86、B7-H1/PD-L1、B7-H2、B7-H3、B7-H4、B7-H6、B7-H7、BTLA/CD272、CD28、CTLA-4、GI24/VISTA/B7-H5、ICOS/CD278、PD-1、PD-L2/B7-DC和PDCD6）；TNF超家族的成員（例如，4-1BB/TNFSF9/CD137、4-1BB配體/TNFSF9、BAFF/BLyS/TNFSF13B、BAFF R/TNFRSF13C、

CD27/TNFRSF7、CD27配體/TNFSF7、CD30/TNFRSF8、CD30配體/TNFSF8、CD40/TNFRSF5、CD40/TNFSF5、CD40配體/TNFSF5、DR3/TNFRSF25、GITR/TNFRSF18、GITR配體/TNFSF18、HVEM/TNFRSF14、LIGHT/TNFSF14、淋巴毒素-α/TNF-β、OX40/TNFRSF4、OX40配體/TNFSF4、RELT/TNFRSF19L、TACI/TNFRSF13B、TL1A/TNFSF15、TNF-α和TNF RII/TNFRSF1B）；SLAM家族的成員（例如，2B4/CD244/SLAMF4、BLAME/SLAMF8、CD2、CD2F-10/SLAMF9、CD48/SLAMF2、CD58/LFA-3、CD84/SLAMF5、CD229/SLAMF3、CRACC/SLAMF7、NTB-A/SLAMF6和SLAM/CD150）；以及任何其他共刺激分子，如CD2、CD7、CD53、CD82/Kai-1、CD90/Thy1、CD96、CD160、CD200、CD300a/LMIR1、HLA I類、HLA- DR、Ikaros、整合素α4/CD49d、整合素α4β1、整合素α4β7/LPAM-1、LAG-3、TCL1A、TCL1B、CRTAM、DAP12、Dectin-1/CLEC7A、DPPIV/CD26、EphB6、TIM-1/KIM-1/HAVCR、TIM-4、TSLP、TSLPR、淋巴細胞功能相關抗原-1（LFA-1）和NKG2C。在一些實施例中，一個或多個共刺激信號傳導結構域源自選自以下的共刺激分子：CARD11、CD2（LFA-2）、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD54（ICAM-1）、CD134（OX40）、CD137（4-1BB）、CD162（SELPLG）、CD258（LIGHT）、CD270（HVEM、LIGHTR）、CD276（B7-H3）、CD278（ICOS）、CD279（PD-1）、CD319（SLAMF7）、LFA-1（淋巴細胞功能相關抗原-1）、NKG2C、CDS、GITR、BAFFR、

NKp80(KLRF1)、CD160、CD19、CD4、IPO-3、BLAME(SLAMF8)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、NKp44、NKp30、NKp46、NKG2D、CD83、CD150（SLAMF1）、CD152（CTLA-4）、CD223（LAG3）、CD273（PD-L2）、CD274（PD-L1）、DAP10、TRIM、ZAP70、與CD83特異性結合的配體及其任何組合。在一些實施例中，一個或多個共刺激信號傳導結構域源自4-1BB或CD28。在一些實施例中，共刺激信號傳導結構域包含SEQ ID NO: 124的胺基酸序列。

【0218】 在一些實施例中，ITAM修飾的CAR的ISD包含源自4-1BB的共刺激信號傳導結構域和本文所述的CMSD（例如，基本上由其組成，或由其組成）。在一些實施例中，ITAM修飾的CAR的ISD包含源自CD28的共刺激信號傳導結構域和本文所述的CMSD（例如，基本上由其組成，或由其組成）。在一些實施例中，ITAM修飾的CAR的ISD包含源自4-1BB的共刺激信號傳導結構域、源自CD28的共刺激信號傳導結構域和本文所述的CMSD（例如，基本上由其組成，或由其組成）。在一些實施例中，ITAM修飾的CAR的ISD從N'至C'包含：源自4-1BB的共刺激信號傳導結構域和CMSD（例如，基本上由其組成，或由其組成）。在一些實施例中，ITAM修飾的CAR的ISD從N'至C'包含：CMSD和源自4-1BB的共刺激信號傳導結構域（例如，基本上由其組成，或由其組成）。

【0219】 本公開文本的範圍內還包括本文所述的任何共刺激信號傳導結構域的變異體，使得共刺激信號傳導結構域能夠調節免疫

細胞（例如，T細胞）的免疫反應。在一些實施例中，如與野生型對應共刺激信號傳導結構域相比，共刺激信號傳導結構域包含多達約10個胺基酸殘基變異（例如，約1、2、3、4、5、6、7、8、9或10中的任一個）。可以將包含一個或多個胺基酸變異的此類共刺激信號傳導結構域稱為共刺激信號傳導結構域變異體。在一些實施例中，相對於不含突變的共刺激信號傳導結構域，共刺激信號傳導結構域的胺基酸殘基的突變可導致信號傳導轉導的增加和增強的對免疫反應的刺激。在一些實施例中，相對於不含突變的共刺激信號傳導結構域，共刺激信號傳導結構域的胺基酸殘基的突變可導致信號傳導轉導的減少和降低的對免疫反應的刺激。

【0220】 ITAM修飾的T細胞抗原偶聯劑（TAC）樣嵌合受體

【0221】 在一些實施例中，本文所述的包含CMSD的功能性外源受體是ITAM修飾的TAC樣嵌合受體。在一些實施例中，ITAM修飾的TAC樣嵌合受體包含含有本文所述的任何CMSD（如包含SEQ ID NO: 41-74中任一個的胺基酸序列的CMSD）的ISD。在一些實施例中，提供ITAM修飾的TAC樣嵌合受體，其包含：(a) 細胞外配體結合結構域（如特異性識別一種或多種靶抗原（例如，腫瘤抗原，如BCMA、CD19、CD20）的一個或多個表位的抗原結合片段（例如，scFv、sdAb）、受體（例如，FcR）的細胞外結構域（或其部分）、配體（例如，APRIL、BAFF）的細胞外結構域（或其部分）），(b) 任選的第一受體結構域連接子，(c) 特異性識別第一TCR亞基（例如，CD3ε）的細胞外結構域的細胞外TCR結合結構域，(d) 任

選的第二受體結構域連接子，(e) 任選的第二TCR亞基（例如，CD3ε）的細胞外結構域或其部分，(f) 包含第三TCR亞基（例如，CD3ε）的跨膜結構域的跨膜結構域，以及 (g) 包含CMSD（例如，包含選自SEQ ID NO: 41-74的序列的CMSD）的ISD，其中所述CMSD包含一個或多個CMSD ITAM，其中所述多個CMSD ITAM任選地通過一個或多個CMSD連接子連接，並且其中所述第一TCR亞基、所述第二TCR亞基和所述第三TCR亞基獨立地選自TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ和CD3δ。在一些實施例中，可以將ITAM修飾的TAC樣嵌合受體融合多肽與其他內源TCR亞基一起摻入功能性TCR複合物中，例如，通過特異性識別TCR亞基（例如，CD3ε、TCRα）的細胞外結構域來進行，並且將抗原特異性賦予TCR複合物。在一些實施例中，第二TCR亞基和第三TCR亞基是相同的，例如，都是CD3ε。在一些實施例中，第二TCR亞基和第三TCR亞基是不同的。在一些實施例中，第一TCR亞基、第二TCR亞基和第三TCR亞基是相同的，例如，都是CD3ε。在一些實施例中，第一TCR亞基以及第二TCR亞基和第三TCR亞基是不同的，例如，第一TCR亞基是TCRα，並且第二TCR亞基和第三TCR亞基均為CD3ε。在一些實施例中，第一TCR亞基、第二TCR亞基和第三TCR亞基都是不同的。在一些實施例中，第一TCR亞基是CD3ε，和/或第二TCR亞基是CD3ε，和/或第三TCR亞基是CD3ε。在一些實施例中，第一TCR亞基是CD3γ，和/或第二TCR亞基是CD3γ，和/或第三TCR亞基是CD3γ。在一些實施例中，第一TCR亞基是

CD3δ，和/或第二TCR亞基是CD3δ，和/或第三TCR亞基是CD3δ。在一些實施例中，第一TCR亞基是TCRα，和/或第二TCR亞基是TCRα，和/或第三TCR亞基是TCRα。在一些實施例中，第一TCR亞基是TCRβ，和/或第二TCR亞基是TCRβ，和/或第三TCR亞基是TCRβ。在一些實施例中，第一TCR亞基是TCRγ，和/或第二TCR亞基是TCRγ，和/或第三TCR亞基是TCRγ。在一些實施例中，第一TCR亞基是TCRδ，和/或第二TCR亞基是TCRδ，和/或第三TCR亞基是TCRδ。在一些實施例中，第一TCR亞基與第三TCR亞基是相同的。在一些實施例中，第一TCR亞基與第三TCR亞基是不同的。在一些實施例中，第一TCR亞基與第二TCR亞基是相同的。在一些實施例中，第一TCR亞基與第二TCR亞基是不同的。在一些實施例中，ITAM修飾的TAC樣嵌合受體不包含第二TCR亞基的細胞外結構域或其部分。在一些實施例中，ITAM修飾的TAC樣嵌合受體不包含任何TCR亞基的細胞外結構域。在一些實施例中，細胞外配體結合結構域位於細胞外TCR結合結構域的N末端。在一些實施例中，細胞外配體結合結構域位於細胞外TCR結合結構域的C末端。在一些實施例中，ITAM修飾的TAC樣嵌合受體還包含位於細胞外TCR結合結構域的C末端與跨膜結構域的N末端之間的鉸鏈結構域（例如，當不存在TCR亞基的細胞外結構域或其部分，並且細胞外TCR結合結構域位於細胞外配體結合結構域的C末端時）。在一些實施例中，ITAM修飾的TAC樣嵌合受體還包含位於細胞外配體結合結構域的C末端與跨膜結構域的N末端之間的鉸鏈結構域

（例如，當不存在TCR亞基的細胞外結構域或其部分，並且細胞外TCR結合結構域位於細胞外配體結合結構域的N末端時）。上文「鉸鏈」、「CMSD連接子」和「受體結構域連接子」小節中所述的任何鉸鏈結構域和連接子可以用於本文所述的ITAM修飾的TAC樣嵌合受體中。在一些實施例中，第一受體結構域連接子和/或第二受體結構域連接子選自SEQ ID NO: 17-39和116-120。在一些實施例中，鉸鏈結構域源自CD8α。在一些實施例中，鉸鏈結構域包含SEQ ID NO: 125的序列。在一些實施例中，細胞外配體結合結構域是單價的和單特異性的，例如，包含特異性識別靶抗原（例如，腫瘤抗原，如BCMA、CD19、CD20）的表位的單一抗原結合片段（例如，scFv、sdAb）。在一些實施例中，細胞外配體結合結構域是多價的和單特異性的，例如，包含特異性識別靶抗原（例如，腫瘤抗原，如BCMA、CD19、CD20）的相同表位的兩個或更多個抗原結合片段（例如，scFv、sdAb）。在一些實施例中，細胞外配體結合結構域是多價的和多特異性的，例如，包含特異性識別相同靶（例如，腫瘤）抗原或不同靶抗原（例如，腫瘤抗原，如BCMA、CD19、CD20）的兩個或更多個表位的兩個或更多個抗原結合片段（例如，scFv、sdAb）。在一些實施例中，ITAM修飾的TAC樣嵌合受體還包含第二細胞外TCR結合結構域（例如，scFv、sdAb），所述第二細胞外TCR結合結構域特異性識別由所述細胞外TCR結合結構域（例如，CD3ε）識別的TCR亞基（例如，TCRα）的不同細胞外結構域，其中第二細胞外TCR結合結構域位於所述細胞外TCR

結合結構域與細胞外配體結合結構域之間。在一些實施例中，細胞外配體結合結構域包含特異性結合BCMA的一個或多個sdAb（即，抗BCMA sdAb），如本文所述的任何抗BCMA sdAb，或PCT/CN2016/094408和PCT/CN2017/096938中披露的任何抗BCMA sdAb，所述文獻的內容通過引用以其整體併入本文。在一些實施例中，細胞外配體結合結構域包含一個或多個抗BCMA scFv。在一些實施例中，ITAM修飾的TAC樣嵌合受體還包含位於ITAM修飾的TAC樣嵌合受體的N末端處的信號肽，例如，如果細胞外配體結合結構域位於細胞外TCR結合結構域的N末端，則信號肽位於細胞外配體結合結構域的N末端；或者如果細胞外配體結合結構域位於細胞外TCR結合結構域的C末端，則信號肽位於細胞外TCR結合結構域的N末端。在一些實施例中，信號肽源自CD8α。在一些實施例中，信號肽包含SEQ ID NO: 127的序列。在一些實施例中，在將ITAM修飾的TAC樣嵌合受體輸出至細胞表面後，去除信號肽。在一些實施例中，多個（例如，2、3、4或更多個）CMSD ITAM彼此直接連接。在一些實施例中，CMSD包含通過並非源自含有ITAM的親本分子的一個或多個連接子（例如，G/S連接子）連接的兩個或更多個（例如，2、3、4或更多個）CMSD ITAM。在一些實施例中，CMSD包含源自含有ITAM的親本分子的一個或多個CMSD連接子，所述含有ITAM的親本分子與衍生出一個或多個所述CMSD ITAM的含有ITAM的親本分子不同。在一些實施例中，CMSD包含兩個或更多個（例如，2、3、4或更多個）相同的CMSD

ITAM。在一些實施例中，所述CMSD ITAM中的至少一個並非源自CD3ζ。在一些實施例中，所述CMSD ITAM中的至少一個並非CD3ζ的ITAM1或ITAM2。在一些實施例中，所述多個CMSD ITAM各自源自不同的含有ITAM的親本分子。在一些實施例中，所述CMSD ITAM中的至少一個源自選自以下的含有ITAM的親本分子：CD3ε、CD3δ、CD3γ、Igα（CD79a）、Igβ（CD79b）、FcεRIβ、FcεRIγ、DAP12、CNAIP/NFAM1、STAM-1、STAM-2和膜突蛋白。在一些實施例中，所述多個CMSD ITAM中的至少一個源自選自以下的含有ITAM的親本分子：CD3ε、CD3δ、CD3γ、CD3ζ、Igα（CD79a）、Igβ（CD79b）、FcεRIβ、FcεRIγ、DAP12、CNAIP/NFAM1、STAM-1、STAM-2和膜突蛋白。在一些實施例中，多個CMSD ITAM源自CD3ε、CD3δ、CD3γ、CD3ζ、DAP12、Igα（CD79a）、Igβ（CD79b）和FcεRIγ中的一種或多種。在一些實施例中，CMSD不包含CD3ζ ITAM1和/或CD3ζ ITAM2。在一些實施例中，CMSD包含CD3ζ ITAM3。在一些實施例中，CMSD不包含任何CD3ζ ITAM。在一些實施例中，ITAM修飾的TAC樣嵌合受體沒有通過Nef蛋白（例如，野生型Nef如野生型SIV Nef，或突變體Nef如突變體SIV Nef）下調（例如，下調細胞表面表現和/或效應子功能），如與細胞裂解活性相關的信號轉導）。在一些實施例中，與Nef不存在時相比，ITAM修飾的TAC樣嵌合受體通過Nef蛋白（例如，野生型Nef如野生型SIV Nef，或突變體Nef如突變體SIV Nef）下調（例如，下調細胞表面表現和/或效應子功能）至多約80%（如至多約70%、60%、

50%、40%、30%、20%、10%或5%中的任一個）。在一些實施例中，ITAM修飾的TAC樣嵌合受體通過Nef蛋白（例如，野生型Nef如野生型SIV Nef，或突變體Nef如突變體SIV Nef）進行的下調（例如，下調細胞表面表現和/或效應子功能，如參與細胞裂解活性的信號轉導）比包含CD3ε、CD3δ或CD3γ的ISD的TAC樣嵌合受體的下調少至少約3%（例如，少至少約4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%中的任一個）。在一些實施例中，CMSD ITAM源自CD3ζ。在一些實施例中，所述第二TCR亞基和所述第三TCR亞基均為CD3ε。在一些實施例中，CMSD ITAM源自CD3ε、CD3δ和CD3γ中的一個或多個。在一些實施例中，CMSD內的連接子源自CD3ε、CD3δ或CD3γ（例如，CD3ε、CD3δ或CD3γ的ISD的非ITAM序列），或者選自SEQ ID NO: 17-39和116-120。在一些實施例中，CMSD基本上由一個CD3ε ITAM組成（例如，由其組成）。在一些實施例中，CMSD包含至少兩個CD3ε ITAM。在一些實施例中，CMSD包含SEQ ID NO: 46、56、67或71中任一個的胺基酸序列。

【0222】 在一些實施例中，CMSD ITAM源自CD3ζ。因此在一些實施例中，提供ITAM修飾的TAC樣嵌合受體，其包含：(a) 細胞外配體結合結構域（如特異性識別一種或多種靶抗原（例如，腫瘤抗原，如BCMA、CD19、CD20）的一個或多個表位的抗原結合片段（例如，scFv、sdAb）、受體（例如，FcR）的細胞外結構域（或其部分）、配體（例如，APRIL、BAFF）的細胞外結構域（或其部

分）），(b) 任選的第一受體結構域連接子，(c) 特異性識別第一TCR亞基（例如，CD3ε）的細胞外結構域的細胞外TCR結合結構域，(d) 任選的第二受體結構域連接子，(e) 任選的第二TCR亞基（例如，CD3ε）的細胞外結構域或其部分，(f) 包含第三TCR亞基（例如，CD3ε)的跨膜結構域的跨膜結構域，以及 (g) 包含CMSD的ISD，其中所述CMSD包含源自CD3ζ的一個或多個CMSD ITAM，其中所述多個CMSD ITAM任選地通過一個或多個CMSD連接子連接，並且其中所述第一TCR亞基、所述第二TCR亞基和所述第三TCR亞基都獨立地選自TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ和CD3δ。在一些實施例中，CMSD包含選自SEQ ID NO: 41-44、54和55的序列。

【0223】 在一些實施例中，提供ITAM修飾的TAC樣嵌合受體，其包含：(a) 細胞外配體結合結構域（如特異性識別一種或多種靶抗原（例如，腫瘤抗原，如BCMA、CD19、CD20）的一個或多個表位的抗原結合片段（例如，scFv、sdAb）、受體（例如，FcR）的細胞外結構域（或其部分）、配體（例如，APRIL、BAFF）的細胞外結構域(或其部分））,(b) 任選的第一受體結構域連接子,(c) 特異性識別第一TCR亞基（例如，CD3ε）的細胞外結構域的細胞外TCR結合結構域，(d) 任選的第二受體結構域連接子，(e) 任選的第二TCR亞基（例如，CD3ε）的細胞外結構域或其部分，(f) 包含第三TCR亞基(例如,CD3ε)的跨膜結構域的跨膜結構域,以及 (g) 包含CMSD（例如，包含選自SEQ ID NO: 41-74的序列的CMSD）

的ISD，其中所述CMSD包含一個或多個CMSD ITAM，其中所述多個CMSD ITAM任選地通過一個或多個CMSD連接子連接，其中所述ITAM源自CD3ε、CD3δ和CD3γ中的一個或多個，並且其中所述第一TCR亞基、所述第二TCR亞基和所述第三TCR亞基獨立地選自TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ和CD3δ。在一些實施例中，CMSD包含一個或多個（例如，2、3或更多個）CD3ε ITAM（例如，基本上由其組成或由其組成），並且第二TCR亞基是CD3ε，和/或第三TCR亞基是CD3ε。在一些實施例中，CMSD包含一個或多個（例如，2、3或更多個）CD3δ ITAM（例如，基本上由其組成或由其組成），並且第二TCR亞基是CD3δ，和/或第三TCR亞基是CD3δ。在一些實施例中，CMSD包含一個或多個（例如，2、3或更多個）CD3γ ITAM（例如，基本上由其組成或由其組成），並且第二TCR亞基是CD3γ，和/或第三TCR亞基是CD3γ。在一些實施例中，第一TCR亞基與第二TCR亞基和/或第三TCR亞基是相同的。在一些實施例中，第二TCR亞基與第三TCR亞基是相同的，但是與第一TCR亞基不同。

【0224】 因此在一些實施例中，提供ITAM修飾的TAC樣嵌合受體，其包含：(a) 細胞外配體結合結構域，所述細胞外配體結合結構域包含特異性識別一種或多種靶抗原（例如，腫瘤抗原，如BCMA、CD20、CD19）的一個或多個表位的抗原結合片段（例如，scFv、sdAb），(b) 任選的第一受體結構域連接子，(c) 特異性識別TCR亞基（例如，TCRα）的細胞外結構域的細胞外TCR結合結

構域，(d) 任選的第二受體結構域連接子，(e) 任選的CD3ε的細胞外結構域或其部分，(f) 包含CD3ε的跨膜結構域的跨膜結構域，以及 (g) 包含CMSD（例如，包含選自SEQ ID NO: 41-74的序列的CMSD）的ISD，其中所述CMSD包含一個或多個CMSD ITAM，其中所述多個CMSD ITAM任選地通過一個或多個CMSD連接子連接，並且其中TCR亞基選自TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ和CD3δ。在一些實施例中，提供ITAM修飾的TAC樣嵌合受體，其包含：(a) 細胞外配體結合結構域，所述細胞外配體結合結構域包含特異性識別一種或多種靶抗原（例如，腫瘤抗原，如BCMA、CD20、CD19）的一個或多個表位的抗原結合片段（例如，scFv、sdAb），(b) 任選的第一受體結構域連接子，(c) 特異性識別TCR亞基（例如，TCRα）的細胞外結構域的細胞外TCR結合結構域，(d) 任選的第二受體結構域連接子，(e) 任選的CD3ε的細胞外結構域或其部分，(f) 包含CD3ε的跨膜結構域的跨膜結構域，以及 (g) 包含CMSD的ISD，其中所述CMSD包含一個或多個CD3ε ITAM，其中所述多個CD3ε ITAM任選地通過一個或多個CMSD連接子連接，並且其中TCR亞基選自TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ和CD3δ。在一些實施例中，CMSD包含選自SEQ ID NO: 46、56或67的序列。

【0225】 在一些實施例中，ITAM修飾的TAC樣嵌合受體不包含任何TCR亞基的細胞外結構域。在一些實施例中，ITAM修飾的TAC樣嵌合受體包含鉸鏈結構域。因此在一些實施例中，提供ITAM修

飾的TAC樣嵌合受體，其包含：(a) 細胞外配體結合結構域，所述細胞外配體結合結構域包含特異性識別一種或多種靶抗原（例如，腫瘤抗原，如BCMA、CD20、CD19）的一個或多個表位的抗原結合片段（例如，scFv、sdAb），(b) 任選的第一受體結構域連接子，(c) 特異性識別第一TCR亞基（例如，TCRα）的細胞外結構域的細胞外TCR結合結構域，(d) 任選的第二受體結構域連接子，(e) 任選的鉸鏈結構域，(f) 包含第二TCR亞基（例如，CD3ε）的跨膜結構域的跨膜結構域，以及 (g) 包含CMSD（例如，包含選自SEQ ID NO: 41-74的序列的CMSD）的ISD，其中所述CMSD包含一個或多個CMSD ITAM，其中所述多個CMSD ITAM任選地通過一個或多個CMSD連接子連接，並且其中所述第一TCR亞基和所述第二TCR亞基都選自TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ和CD3δ。

【0226】 ITAM修飾的TCR

【0227】 在一些實施例中，本文所述的包含CMSD的功能性外源受體是「ITAM修飾的TCR」。在一些實施例中，ITAM修飾的TCR包含含有本文所述的任何CMSD（如包含SEQ ID NO: 41-74中任一個的胺基酸序列的CMSD）的ISD。在一些實施例中，提供ITAM修飾的TCR，其包含：(a) 細胞外配體結合結構域，所述細胞外配體結合結構域包含一起特異性識別一種或多種靶抗原（例如，腫瘤抗原，如BCMA、CD19、CD20）或靶抗原肽/MHC複合物（例如，BCMA/MHC複合物）的一個或多個表位的源自野生型TCR的Vα和

Vβ，其中Vα、Vβ或二者相對於野生型TCR在一個或多個CDR中包含一個或多個突變，(b) 跨膜結構域，所述跨膜結構域包含TCRα的跨膜結構域和TCRβ的跨膜結構域，以及 (c) 包含CMSD（例如，包含選自SEQ ID NO: 41-74的序列的CMSD）的ISD，其中所述CMSD包含一個或多個CMSD ITAM，其中所述多個CMSD ITAM任選地通過一個或多個CMSD連接子連接。在一些實施例中，突變導致胺基酸取代，如保守胺基酸取代。在一些實施例中，ITAM修飾的TCR結合至野生型TCR所結合的相同的同源肽-MHC。在一些實施例中，與野生型TCR結合的同源肽-MHC相比，ITAM修飾的TCR以更高的親和力結合至相同的同源肽-MHC。在一些實施例中，與野生型TCR結合的同源肽-MHC相比，ITAM修飾的TCR以更低的親和力結合至相同的同源肽-MHC。在一些實施例中，ITAM修飾的TCR結合至野生型TCR不結合的非同源肽-MHC。在一些實施例中，ITAM修飾的TCR是單鏈TCR（scTCR）。在一些實施例中，ITAM修飾的TCR是二聚TCR（dTCR）。在一些實施例中，野生型TCR結合HLA-A2。在一些實施例中，多個（例如，2、3、4或更多個）CMSD ITAM彼此直接連接。在一些實施例中，CMSD包含通過並非源自含有ITAM的親本分子的一個或多個連接子（例如，G/S連接子）連接的兩個或更多個（例如，2、3、4或更多個）CMSD ITAM。在一些實施例中，CMSD包含源自含有ITAM的親本分子的一個或多個CMSD連接子，所述含有ITAM的親本分子與衍生出一個或多個所述CMSD ITAM的含有ITAM的親本分子不同。在一些實

施例中，CMSD包含兩個或更多個（例如，2、3、4或更多個）相同的CMSD ITAM。在一些實施例中，所述CMSD ITAM中的至少一個並非源自CD3ζ。在一些實施例中，所述CMSD ITAM中的至少一個並非CD3ζ的ITAM1或ITAM2。在一些實施例中，所述多個CMSD ITAM各自源自不同的含有ITAM的親本分子。在一些實施例中，所述CMSD ITAM中的至少一個源自選自以下的含有ITAM的親本分子：CD3ε、CD3δ、CD3γ、Igα（CD79a）、Igβ（CD79b）、FcεRIβ、FcεRIγ、DAP12、CNAIP/NFAM1、STAM-1、STAM-2和膜突蛋白。在一些實施例中，所述多個CMSD ITAM中的至少一個源自選自以下的含有ITAM的親本分子：CD3ε、CD3δ、CD3γ、CD3ζ、Igα（CD79a）、Igβ（CD79b）、FcεRIβ、FcεRIγ、DAP12、CNAIP/NFAM1、STAM-1、STAM-2和膜突蛋白。在一些實施例中，多個CMSD ITAM源自CD3ε、CD3δ、CD3γ、CD3ζ、DAP12、Igα（CD79a）、Igβ（CD79b）和FcεRIγ中的一種或多種。在一些實施例中，CMSD不包含CD3ζ ITAM1和/或CD3ζ ITAM2。在一些實施例中，CMSD包含CD3ζ ITAM3。在一些實施例中，CMSD不包含任何CD3ζ ITAM。在一些實施例中，ITAM修飾的TCR還包含位於細胞外配體結合結構域的C末端與跨膜結構域的N末端之間的鉸鏈結構域。上文「鉸鏈」小節中所述的任何鉸鏈結構域可以用於本文所述的ITAM修飾的TCR中。在一些實施例中，鉸鏈結構域源自CD8α。在一些實施例中，鉸鏈結構域包含SEQ ID NO: 125的序列。在一些實施例中，ITAM修飾的TCR還包含位於ITAM修飾的TCR的N末端（即，細胞外配

體結合結構域的N末端）處的信號肽。在一些實施例中，信號肽源自CD8α。在一些實施例中，信號肽包含SEQ ID NO: 127的序列。在一些實施例中，在將ITAM修飾的TCR輸出至細胞表面後，去除信號肽。在一些實施例中，ITAM修飾的TCR沒有通過Nef蛋白（例如，野生型Nef如野生型SIV Nef，或突變體Nef如突變體SIV Nef）下調（例如，不下調細胞表面表現和/或效應子功能，如與細胞裂解活性相關的信號轉導）。在一些實施例中，與Nef不存在時相比，ITAM修飾的TCR通過Nef蛋白（例如，野生型Nef如野生型SIV Nef，或突變體Nef如突變體SIV Nef）下調（例如，下調細胞表面表現和/或效應子功能，如參與細胞裂解活性的信號轉導）至多約80%（如至多約70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%或5%中的任一個）。在一些實施例中，ITAM修飾的TCR通過Nef蛋白（例如，野生型Nef如野生型SIV Nef，或突變體Nef如突變體SIV Nef）進行的下調（例如，下調細胞表面表現和/或效應子功能，如參與細胞裂解活性的信號轉導）比與內源CD3ζ複合的相同修飾的TCR的下調少至少約3%（例如，少至少約4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%中的任一個）。

【0228】 **ITAM修飾的嵌合TCR（cTCR）**

【0229】 在一些實施例中，本文所述的包含CMSD的功能性外源受體是ITAM修飾的cTCR。在一些實施例中，ITAM修飾的cTCR包含含有本文所述的任何CMSD（如包含SEQ ID NO: 41-74中任一個的

胺基酸序列的CMSD）的ISD。在一些實施例中，提供ITAM修飾的cTCR，其包含：(a) 細胞外配體結合結構域（如特異性識別一種或多種靶抗原（例如，腫瘤抗原，如BCMA、CD19、CD20）的一個或多個表位的抗原結合片段（例如，scFv、sdAb）、受體（例如，FcR）的細胞外結構域（或其部分）、配體（例如，APRIL、BAFF）的細胞外結構域（或其部分）），(b) 任選的受體結構域連接子，(c) 任選的第一TCR亞基（例如，CD3ε）的細胞外結構域或其部分，(d) 包含第二TCR亞基（例如，CD3ε）的跨膜結構域的跨膜結構域，以及 (e) 包含CMSD（例如，包含選自SEQ ID NO: 41-74的序列的CMSD）的ISD，其中所述CMSD包含一個或多個CMSD ITAM，其中所述多個CMSD ITAM任選地通過一個或多個CMSD連接子連接，並且其中所述第一TCR亞基和所述第二TCR亞基獨立地選自TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ和CD3δ。在一些實施例中，可以將ITAM修飾的cTCR融合多肽與其他內源TCR亞基一起摻入功能性TCR複合物中並將抗原特異性賦予TCR複合物。在一些實施例中，第一TCR亞基和第二TCR亞基是相同的，例如，都是CD3ε。在一些實施例中，第一TCR亞基和第二TCR亞基是不同的，例如，第一TCR亞基是TCRα，並且第二TCR亞基是CD3ε。在一些實施例中，第一TCR亞基是CD3ε，和/或第二TCR亞基是CD3ε。在一些實施例中，第一TCR亞基是CD3γ，和/或第二TCR亞基是CD3γ。在一些實施例中，第一TCR亞基是CD3δ，和/或第二TCR亞基是CD3δ。在一些實施例中，第一TCR亞基是TCRα，和/

或第二TCR亞基是TCRα。在一些實施例中，第一TCR亞基是TCRβ，和/或第二TCR亞基是TCRβ。在一些實施例中，第一TCR亞基是TCRγ，和/或第二TCR亞基是TCRγ。在一些實施例中，第一TCR亞基是TCRδ，和/或第二TCR亞基是TCRδ。在一些實施例中，ITAM修飾的cTCR不包含第一TCR亞基的細胞外結構域或其部分。在一些實施例中，ITAM修飾的cTCR不包含任何TCR亞基的細胞外結構域。在一些實施例中，ITAM修飾的cTCR還包含位於細胞外配體結合結構域的C末端與跨膜結構域的N末端之間的鉸鏈結構域（例如，當不存在TCR亞基的細胞外結構域或其部分時）。上文「鉸鏈」和「受體結構域連接子」小節中所述的任何鉸鏈結構域和受體結構域連接子可以用於本文所述的ITAM修飾的cTCR中。在一些實施例中，受體結構域連接子選自SEQ ID NO: 17-39和116-120。在一些實施例中，鉸鏈結構域源自CD8α。在一些實施例中，鉸鏈結構域包含SEQ ID NO: 125的序列。在一些實施例中，細胞外配體結合結構域是單價的和單特異性的，例如，包含特異性識別靶抗原（例如，腫瘤抗原，如BCMA、CD19、CD20）的表位的單一抗原結合片段（例如，scFv、sdAb）。在一些實施例中，細胞外配體結合結構域是多價的和單特異性的，例如，包含特異性識別靶抗原（例如，腫瘤抗原，如BCMA、CD19、CD20）的相同表位的兩個或更多個抗原結合片段（例如，scFv、sdAb）。在一些實施例中，細胞外配體結合結構域是多價的和多特異性的，例如，包含特異性識別相同靶抗原或不同靶抗原（例如，腫瘤抗原，

如BCMA、CD19、CD20）的兩個或更多個表位的兩個或更多個抗原結合片段（例如，scFv、sdAb）。在一些實施例中，細胞外配體結合結構域包含特異性結合BCMA的一個或多個sdAb（即，抗BCMA sdAb），如本文所述的任何抗BCMA sdAb，或PCT/CN2016/094408和PCT/CN2017/096938中披露的任何抗BCMA sdAb，所述文獻各自的內容通過引用以其整體併入本文。在一些實施例中，細胞外配體結合結構域包含一個或多個抗BCMA scFv。在一些實施例中，ITAM修飾的cTCR還包含位於ITAM修飾的cTCR的N末端處的信號肽，例如，信號肽位於細胞外配體結合結構域的N末端。在一些實施例中，信號肽源自CD8α。在一些實施例中，信號肽包含SEQ ID NO: 127的序列。在一些實施例中，在將ITAM修飾的cTCR輸出至細胞表面後，去除信號肽。在一些實施例中，多個（例如，2、3、4或更多個）CMSD ITAM彼此直接連接。在一些實施例中，CMSD包含通過並非源自含有ITAM的親本分子的一個或多個連接子（例如，G/S連接子）連接的兩個或更多個（例如，2、3、4或更多個）CMSD ITAM。在一些實施例中，CMSD包含源自含有ITAM的親本分子的一個或多個CMSD連接子，所述含有ITAM的親本分子與衍生出一個或多個所述CMSD ITAM的含有ITAM的親本分子不同。在一些實施例中，CMSD包含兩個或更多個（例如，2、3、4或更多個）相同的CMSD ITAM。在一些實施例中，所述CMSD ITAM中的至少一個並非源自CD3ζ。在一些實施例中，所述CMSD ITAM中的至少一個並非CD3ζ的

ITAM1或ITAM2。在一些實施例中，所述多個CMSD ITAM各自源自不同的含有ITAM的親本分子。在一些實施例中，所述CMSD ITAM中的至少一個源自選自以下的含有ITAM的親本分子：CD3ε、CD3δ、CD3γ、Igα（CD79a）、Igβ（CD79b）、FcεRIβ、FcεRIγ、DAP12、CNAIP/NFAM1、STAM-1、STAM-2和膜突蛋白。在一些實施例中，所述多個CMSD ITAM中的至少一個源自選自以下的含有ITAM的親本分子：CD3ε、CD3δ、CD3γ、CD3ζ、Igα（CD79a）、Igβ（CD79b）、FcεRIβ、FcεRIγ、DAP12、CNAIP/NFAM1、STAM-1、STAM-2和膜突蛋白。在一些實施例中，多個CMSD ITAM源自CD3ε、CD3δ、CD3γ、CD3ζ、DAP12、Igα（CD79a）、Igβ（CD79b）和FcεRIγ中的一種或多種。在一些實施例中，CMSD不包含CD3ζ ITAM1和/或CD3ζ ITAM2。在一些實施例中，CMSD包含CD3ζ ITAM3。在一些實施例中，CMSD不包含任何CD3ζ ITAM。在一些實施例中，ITAM修飾的cTCR沒有通過Nef蛋白（例如，野生型Nef如野生型SIV Nef，或突變體Nef如突變體SIV Nef）下調（例如，不下調細胞表面表現和/或效應子功能，如與細胞裂解活性相關的信號轉導）。在一些實施例中，與Nef不存在時相比，ITAM修飾的cTCR通過Nef蛋白（例如，野生型Nef如野生型SIV Nef，或突變體Nef如突變體SIV Nef）下調（例如，下調細胞表面表現和/或效應子功能，如與細胞裂解活性相關的信號轉導）至多約80%（如至多約70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%或5%中的任一個）。在一些實施例中，ITAM修飾的cTCR通過Nef蛋白（例如，野生型

Nef如野生型SIV Nef，或突變體Nef如突變體SIV Nef）進行的下調（例如，下調細胞表面表現和/或效應子功能）比包含CD3ε、CD3δ或CD3γ的ISD的相同cTCR的下調少至少約3%（例如，少至少約4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%中的任一個）。在一些實施例中，CMSD ITAM源自CD3ζ。在一些實施例中，所述第一TCR亞基和所述第二TCR亞基均為CD3ε。在一些實施例中，CMSD ITAM源自CD3ε、CD3δ和CD3γ中的一個或多個。在一些實施例中，CMSD內的連接子源自CD3ε、CD3δ或CD3γ（例如，CD3ε、CD3δ或CD3γ的ISD的非ITAM序列），或者選自SEQ ID NO: 17-39和116-120。在一些實施例中，CMSD基本上由一個CD3ε ITAM組成（例如，由其組成）。在一些實施例中，CMSD包含至少兩個CD3ε ITAM。在一些實施例中，CMSD包含SEQ ID NO: 46、56、67或71中任一個的序列。

【0230】 在一些實施例中，ITAM源自CD3ζ。因此，在一些實施例中，提供ITAM修飾的cTCR，其包含：(a) 細胞外配體結合結構域（如特異性識別一種或多種靶抗原（例如，腫瘤抗原，如BCMA、CD19、CD20）的一個或多個表位的抗原結合片段（例如，scFv、sdAb）、受體（例如，FcR）的細胞外結構域（或其部分）、配體（例如，APRIL、BAFF）的細胞外結構域（或其部分）），(b) 任選的受體結構域連接子，(c) 任選的第一TCR亞基（例如，CD3ε）的細胞外結構域或其部分，(d) 包含第二TCR亞基（例如，CD3ε）的跨膜結構域的跨膜結構域，以及 (e) 包含CMSD（例如，包含

選自SEQ ID NO: 41-74的序列的CMSD）的ISD，其中CMSD包含任選地通過一個或多個CMSD連接子連接的源自CD3ζ的多個CMSD ITAM，並且其中所述第一TCR亞基和所述第二TCR亞基獨立地選自TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ和CD3δ。在一些實施例中，CMSD包含選自SEQ ID NO: 41-44、54和55的序列。

【0231】 在一些實施例中，提供ITAM修飾的cTCR，其包含：(a) 細胞外配體結合結構域（如特異性識別一種或多種靶抗原（例如，腫瘤抗原，如BCMA、CD19、CD20）的一個或多個表位的抗原結合片段（例如，scFv、sdAb）、受體（例如，FcR）的細胞外結構域（或其部分）、配體（例如，APRIL、BAFF）的細胞外結構域（或其部分）），(b) 任選的受體結構域連接子，(c) 任選的第一TCR亞基（例如，CD3ε）的細胞外結構域或其部分，(d) 包含第二TCR亞基（例如，CD3ε）的跨膜結構域的跨膜結構域，以及 (e) 包含CMSD的ISD，其中所述CMSD包含一個或多個CMSD ITAM，其中所述多個CMSD ITAM任選地通過一個或多個CMSD連接子連接，其中CMSD ITAM源自CD3ε、CD3δ和CD3γ中的一個或多個，並且其中所述第一TCR亞基和所述第二TCR亞基獨立地選自TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ和CD3δ。在一些實施例中，CMSD包含一個或多個（例如，2、3或更多個）CD3ε ITAM（例如，基本上由其組成或由其組成），並且第一TCR亞基是CD3ε，和/或第二TCR亞基是CD3ε。在一些實施例中，CMSD包含一個或多個（例如，2、3或更多個）CD3δ ITAM（例如，基本上由其組成或

由其組成），並且第一TCR亞基是CD3δ，和/或第二TCR亞基是CD3δ。在一些實施例中，CMSD包含一個或多個（例如，2、3或更多個）CD3γ ITAM（例如，基本上由其組成或由其組成），並且第一TCR亞基是CD3γ，和/或第二TCR亞基是CD3γ。在一些實施例中，第一TCR亞基與第二TCR亞基相同。在一些實施例中，第一TCR亞基與第二TCR亞基不同。

【0232】 因此在一些實施例中，提供ITAM修飾的cTCR，其包含：(a) 細胞外配體結合結構域，所述細胞外配體結合結構域包含特異性識別一種或多種靶抗原（例如，腫瘤抗原，如BCMA、CD20、CD19）的一個或多個表位的抗原結合片段（例如，scFv、sdAb），(b) 任選的第一受體結構域連接子，(c) 任選的CD3ε的細胞外結構域或其部分，(d) 包含CD3ε的跨膜結構域的跨膜結構域，以及 (e) 包含CMSD（例如，包含選自SEQ ID NO: 41-74的序列的CMSD）的ISD，其中所述CMSD包含一個或多個CMSD ITAM，其中所述多個CMSD ITAM任選地通過一個或多個CMSD連接子連接。在一些實施例中，提供ITAM修飾的cTCR，其包含：(a) 細胞外配體結合結構域，所述細胞外配體結合結構域包含特異性識別一種或多種靶抗原（例如，腫瘤抗原，如BCMA、CD20、CD19）的一個或多個表位的抗原結合片段（例如，scFv、sdAb），(b) 任選的第一受體結構域連接子，(c) 任選的CD3ε的細胞外結構域或其部分，(d) 包含CD3ε的跨膜結構域的跨膜結構域，以及 (e) 包含CMSD的ISD，其中所述CMSD包含一個或多個CD3ε ITAM，其中所述多個

CD3ε ITAM任選地通過一個或多個CMSD連接子連接。在一些實施例中，CMSD包含SEQ ID NO: 46、56或67的序列。

【0233】 在一些實施例中，ITAM修飾的cTCR不包含任何TCR亞基的細胞外結構域。在一些實施例中，ITAM修飾的cTCR包含鉸鏈結構域。因此在一些實施例中，提供ITAM修飾的cTCR，其包含：(a) 細胞外配體結合結構域，所述細胞外配體結合結構域包含特異性識別一種或多種靶抗原（例如，腫瘤抗原，如BCMA、CD20、CD19）的一個或多個表位的抗原結合片段（例如，scFv、sdAb），(b) 任選的受體結構域連接子，(c) 任選的鉸鏈結構域（例如，源自CD8α），(d) 包含TCR亞基（例如，CD3ε）的跨膜結構域的跨膜結構域，以及 (e) 包含CMSD（例如，包含選自SEQ ID NO: 41-74的序列的CMSD）的ISD，其中所述CMSD包含一個或多個CMSD ITAM，其中所述多個CMSD ITAM任選地通過一個或多個CMSD連接子連接，並且其中TCR亞基選自TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ和CD3δ。

【0234】 **IV. Nef（負調節因數）蛋白**

【0235】 本文所述的Nef蛋白可以是野生型Nef如野生型SIV Nef，或突變體Nef如突變體SIV Nef。如PCT/CN2019/097969和PCT/CN2018/097235（所述文獻各自的內容通過引用以其整體併入本文）中所述的任何Nef蛋白（例如，野生型Nef、Nef亞型、突變體Nef如非天然存在的突變體Nef）、編碼其的核酸、包含其核酸的載體（例如，病毒載體）、表現外源Nef蛋白或包含編碼其的核酸

（或載體）的修飾的T細胞（例如，同種異體T細胞）都可以用於本發明中。在一些實施例中，包含本文所述的含有CMSD的功能性外源受體的修飾的T細胞還可以表現外源Nef蛋白（也稱為「含有Nef的ITAM修飾的T細胞」或「GvHD最小化的ITAM修飾的T細胞」）。

【0236】 野生型Nef是由靈長類動物慢病毒編碼的27-35 kDa的小型豆蔻醯化蛋白，所述靈長類動物慢病毒包括人免疫缺陷病毒（HIV-1和HIV-2）和猿猴免疫缺陷病毒（SIV）。Nef主要定位在胞質中，但也部分募集至質膜。其起毒力因數的作用，可操縱宿主的細胞機構，從而允許病原體的感染、存活或複製。

【0237】 Nef在所有靈長類動物慢病毒中是高度保守的。HIV-2和SIV Nef蛋白比HIV-1 Nef長10-60個胺基酸。從N末端至C末端，Nef蛋白包含以下結構域：豆蔻醯化位點（參與CD4下調、MHC I下調以及與信號傳導分子的締合，為Nef的內質膜靶向和病毒粒子摻入所需，並由此為感染性所需）、N末端α-螺旋（參與MHC I下調和蛋白質激酶募集）、基於酪胺酸的AP募集（HIV-2 /SIV Nef）、CD4結合位點（WL殘基，參與CD4下調，是HIV-1 Nef的特徵）、酸性簇（參與MHC I下調、與宿主PACS1和PACS2的相互作用）、基於脯胺酸的重複序列（參與MHC I下調和SH3結合）、PAK（p21啟動的激酶）結合結構域（參與與信號傳導分子的締合和CD4下調）、COP I募集結構域（參與CD4下調）、基於雙白胺酸的AP募集結構域（參與CD4下調、HIV-1 Nef）、以及V-ATP酶和Raf-1結合結構域

（參與CD4下調和與信號傳導分子的締合）。

【0238】 CD4是55 kDa的I型內在細胞表面糖蛋白。它是MHC II類限制性細胞（如輔助/誘導T-淋巴細胞和巨噬細胞/單核細胞譜系的細胞）上的TCR的組分。它用作HIV和SIV的主要細胞受體。CD4是TCR的共受體並在與抗原呈遞細胞（APC）通訊中輔助TCR，並且觸發TCR細胞內信號傳導。

【0239】 CD28在T細胞上表現並提供T細胞啟動和存活所需的共刺激信號。通過TCR和CD28的T細胞刺激可以觸發細胞因數如IL-6產生。CD28是在APC上表現的CD80（B7.1）和CD86（B7.2）蛋白的受體。

【0240】 主要組織相容性複合物（MHC）I類在除了紅細胞以外的所有細胞中表現。其將表位呈遞至殺傷T細胞或細胞毒性T淋巴細胞（CTL）。如果CTL的TCR識別經由CTL的CD8受體停泊的MHC I類分子呈遞的表位，則CTL將觸發細胞經歷細胞凋亡所致的程式性細胞死亡。因此較佳地下調在本文所述的修飾的T細胞上表現的MHC I類分子（例如，下調表現和/或功能），以在組織不相容個體中減少/避免GvHD反應。

【0241】 在一些實施例中，Nef蛋白選自SIV Nef、HIV1 Nef、HIV2 Nef和Nef亞型。在一些實施例中，Nef蛋白是野生型Nef。在一些實施例中，Nef亞型是HIV F2-Nef、HIV C2-Nef或HIV HV2NZ-Nef。在一些實施例中，Nef亞型是SIV Nef亞型。

【0242】 在一些實施例中，Nef蛋白獲自或源自初級HIV-1亞型C印

度分離物。在一些實施例中，Nef蛋白是從印度分離物的編碼全長蛋白的F2等位基因表現（HIV F2-Nef）。在一些實施例中，Nef蛋白是從印度分離物的C2等位基因表現，所述C2等位基因具有CD4結合位點、酸性簇、基於脯胺酸的重複序列和PAK結合結構域的框內缺失（HIV C2-Nef）。在一些實施例中，Nef蛋白是從印度分離物的D2等位基因表現，所述D2等位基因具有CD4結合位點的框內缺失（HIV D2-Nef）。

【0243】 在一些實施例中，Nef蛋白是突變體Nef，如包含一個或多個插入、缺失、一個或多個點突變和/或重排的Nef蛋白。在一些實施例中，本文所述的突變體Nef是非天然存在的突變體Nef，如在T細胞中表現時不下調本文所述的包含CMSD的功能性外源受體（例如，ITAM修飾的TCR、ITAM修飾的CAR、ITAM修飾的cTCR或ITAM修飾的TAC樣嵌合受體）（例如，不下調細胞表面表現和/或效應子功能）的非天然存在的突變體Nef。在一些實施例中，在T細胞中表現時，與野生型Nef相比，突變體Nef（例如，非天然存在的突變體Nef）導致不下調或較少下調本文所述的包含CMSD的功能性外源受體。突變體Nef可以在選自以下的一個或多個結構域或基序中包含一個或多個突變（例如，非天然存在的突變）：豆蔻醯化位點、N末端α-螺旋、基於酪胺酸的AP募集、CD4結合位點、酸性簇、基於脯胺酸的重複序列、PAK結合結構域、COP I募集結構域、基於雙白胺酸的AP募集結構域、V-ATP酶和Raf-1結合結構域或其任何組合。在一些實施例中，突變體Nef是突變體SIV Nef，

如包含SEQ ID NO: 121或122的序列的突變體SIV Nef。

【0244】 **V.載體**

【0245】 本申請案提供用於克隆和表現任何本文所述的包含CMSD的功能性外源受體（例如，ITAM修飾的TCR、ITAM修飾的CAR、ITAM修飾的cTCR或ITAM修飾的TAC樣嵌合受體）的載體。在一些實施例中，載體適合於在真核細胞如哺乳動物細胞中進行複製和整合。在一些實施例中，載體是病毒載體。病毒載體的例子包括但不限於腺病毒載體、腺相關病毒載體、慢病毒載體、逆轉錄病毒載體、單純皰疹病毒載體及其衍生物。病毒載體技術是業內熟知的，並且描述於例如Sambrook等人（2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory，紐約）中，以及其他病毒學和分子生物學手冊中。

【0246】 已經開發多種基於病毒的系統用於將基因轉移至哺乳動物細胞中。例如，逆轉錄病毒提供用於基因遞送系統的便捷平臺。可以使用業內已知的技術將異源核酸插入載體中並包裝在逆轉錄病毒顆粒中。然後可以分離重組病毒並在體外或離體將其遞送至工程化的哺乳動物細胞中。多種逆轉錄病毒系統是業內已知的。在一些實施例中，使用腺病毒載體。多種腺病毒載體是業內已知的。在一些實施例中，使用慢病毒載體。在一些實施例中，使用自滅活慢病毒載體。例如，可以按業內已知的方案將編碼本文所述的包含CMSD的功能性外源受體（例如，ITAM修飾的TCR、ITAM修飾的CAR、ITAM修飾的cTCR或ITAM修飾的TAC樣嵌合受體）

的自滅活慢病毒載體包裝至慢病毒中。可以使用業內已知的方法使用所得慢病毒轉導哺乳動物細胞（如原代人T細胞）。源自逆轉錄病毒如慢病毒的載體是實現長期基因轉移的合適工具，因為它們允許基因轉殖的長期穩定整合及所述基因轉殖在後代細胞中的傳播。慢病毒載體還具有低免疫原性，並且可以轉導非增殖細胞。

【0247】 在一些實施例中，載體是非病毒載體。在一些實施例中，載體是轉座子，如睡美人轉座子系統，或PiggyBac轉座子系統。在一些實施例中，載體是基於聚合物的非病毒載體，包括例如聚(乳酸-共-乙醇酸)（PLGA）和聚乳酸（PLA）、聚(乙烯亞胺)（PEI）和樹枝狀聚合物。在一些實施例中，載體是基於陽離子脂質的非病毒載體，如陽離子脂質體、脂質納米乳液和固體脂質納米顆粒（SLN）。在一些實施例中，載體是基於肽的基因非病毒載體，如聚-L-離胺酸。可以使用適合於基因組編輯的任何已知的非病毒載體將包含CMSD的功能性外源受體（例如，ITAM修飾的TCR、ITAM修飾的CAR、ITAM修飾的cTCR或ITAM修飾的TAC樣嵌合受體）編碼核酸引入免疫效應細胞（例如，T細胞，如修飾的T細胞、同種異體T細胞或CTL）中。參見例如，Yin H.等人 *Nature Rev. Genetics* (2014) 15:521-555；Aronovich EL等人 「The Sleeping Beauty transposon system: a non-viral vector for gene therapy.」 *Hum. Mol. Genet.* (2011) R1: R14-20；以及Zhao S.等人「PiggyBac transposon vectors: the tools of the human gene editing.」 *Transl. Lung Cancer Res.* (2016) 5(1): 120-125，所述文獻通過引用併入本

文。在一些實施例中，將編碼本文所述的包含CMSD的功能性外源受體（例如，ITAM修飾的TCR、ITAM修飾的CAR、ITAM修飾的cTCR或ITAM修飾的TAC樣嵌合受體）的任何一種或多種核酸通過物理方法引入免疫效應細胞（例如，T細胞，如修飾的T細胞、同種異體T細胞或CTL）中，所述物理方法包括但不限於電穿孔、聲孔效應、光致穿孔、磁性轉染、水穿孔（hydroporation）。

【0248】 在一些實施例中，提供載體（例如，病毒載體，如慢病毒載體），其包含編碼本文所述的包含CMSD的功能性外源受體（例如，ITAM修飾的TCR、ITAM修飾的CAR、ITAM修飾的cTCR或ITAM修飾的TAC樣嵌合受體）的任一種核酸。在一些實施例中，提供載體（例如，病毒載體，如慢病毒載體），其包含編碼功能性外源受體（例如，ITAM修飾的TCR、ITAM修飾的CAR、ITAM修飾的cTCR或ITAM修飾的TAC樣嵌合受體）的核酸，其中所述功能性外源受體包含：(a) 細胞外配體結合結構域（如特異性識別一種或多種靶抗原（例如，腫瘤抗原，如BCMA、CD19、CD20）的一個或多個表位的抗原結合片段（例如，scFv、sdAb）、受體（例如，FcR）的細胞外結構域（或其部分）、配體（例如，APRIL、BAFF）的細胞外結構域（或其部分）），(b) 跨膜結構域（例如，源自CD8α），以及 (c) 包含CMSD（例如，包含選自SEQ ID NO: 41-74的序列的CMSD）的ISD，其中CMSD包含一個或多個CMSD ITAM，其中所述多個CMSD ITAM任選地通過一個或多個CMSD連接子連接。可以使用業內任何已知的分子克隆方法將核酸克隆至

載體中，所述分子克隆方法包括例如使用限制性內切核酸酶位點和一種或多種選擇性標記。在一些實施例中，核酸與啟動子（例如，hEF1α啟動子）可操作地連接。已經探索多種啟動子用於哺乳動物細胞中的基因表現，並且業內已知的任何啟動子可以用於本發明中。可以將啟動子大致歸類為組成型啟動子或調節性啟動子，如誘導型啟動子。

【0249】 在一些實施例中，本文所述的載體（例如，病毒載體）還包含編碼本文所述的外源Nef蛋白（例如，wt、亞型或突變體Nef）的第二核酸，或者用於敲低（例如，通過siRNA、ZFN、TALEN或CRISPR/Cas系統）內源基因座（例如，TCR或B2M）表現的第二核酸。在一些實施例中，第二核酸和編碼含有CMSD的功能性外源受體的核酸各自與啟動子（例如，hEF1α或PGK啟動子）可操作地連接。在一些實施例中，第二核酸和編碼含有CMSD的功能性外源受體的核酸與一種啟動子（例如，hEF1α啟動子）可操作地連接。在一些實施例中，編碼含有CMSD的功能性外源受體的核酸和第二核酸是通過一個或多個連接序列來連接，所述連接序列如編碼P2A、T2A、E2A、F2A、BmCPV 2A、BmIFV 2A、$(GS)_n$、$(GGGS)_n$和$(GGGGS)_n$中任一個的核酸連接序列；或者IRES、SV40、CMV、UBC、EF1α、PGK和CAGG中任一個的核酸連接序列；或其任何組合，其中n是至少一的整數。在一些實施例中，連接序列是IRES（例如，包含SEQ ID NO: 123的核酸序列）。

【0250】 **啟動子**

【0251】 在一些實施例中，啟動子選自磷酸甘油酸激酶（PGK）啟動子（例如，PGK-1啟動子），勞斯肉瘤病毒（RSV）啟動子，猿猴病毒40（SV40）啟動子，巨細胞病毒（CMV）立即早期（IE）基因啟動子，延長因數1α（EF1-α）啟動子，泛素-C（UBQ-C）啟動子，巨細胞病毒（CMV）增強子/雞β肌動蛋白（CAG）啟動子，多瘤增強子/單純皰疹胸苷激酶（MC1）啟動子，β肌動蛋白（β-ACT）啟動子，骨髓增生性肉瘤病毒增強子、負控制區缺失的、d1587rev引物結合位點取代的（MND）啟動子，NFAT啟動子，TETON®啟動子和NFκB啟動子。

【0252】 在一些實施例中，編碼本文所述的包含CMSD的功能性外源受體（例如，ITAM修飾的TCR、ITAM修飾的CAR、ITAM修飾的cTCR或ITAM修飾的TAC樣嵌合受體）和/或外源Nef蛋白的核酸可操作地連接至組成型啟動子。組成型啟動子允許異源基因（也稱為基因轉殖）在宿主細胞中組成型表現。本文考慮的示例性啟動子包括但不限於巨細胞病毒立即早期啟動子（CMV IE）、人延長因數-1α（hEF1α）、泛素C啟動子（UbiC）、磷酸甘油酸激酶啟動子（PGK）、猿猴病毒40早期啟動子（SV40）、與CMV早期增強子偶聯的雞β-肌動蛋白啟動子（CAGG）、勞斯肉瘤病毒（RSV）啟動子、多瘤增強子/單純皰疹胸苷激酶（MC1）啟動子、β肌動蛋白（β-ACT）啟動子、「骨髓增生性肉瘤病毒增強子、負控制區缺失的、d1587rev引物結合位點取代的（MND）」啟動子。此類組成型啟動子驅動基因轉殖表現的效率已經在大量研究中進行了廣泛比

較。例如，Michael C. Milone等人比較了CMV、hEF1α、UbiC和PGK在原代人T細胞中驅動CAR表現的效率，並得出結論：hEF1α啟動子不僅誘導最高水準的基因轉殖表現，而且在CD4和CD8人T細胞中被最佳地維持（Molecular Therapy, 17(8): 1453-1464 (2009)）。在一些實施例中，編碼本文所述的包含CMSD的功能性外源受體（例如，ITAM修飾的TCR、ITAM修飾的CAR、ITAM修飾的cTCR或ITAM修飾的TAC樣嵌合受體）和/或外源Nef蛋白的核酸可操作地連接至hEF1α啟動子或PGK啟動子。

【0253】 在一些實施例中，編碼本文所述的包含CMSD的功能性外源受體（例如，ITAM修飾的TCR、ITAM修飾的CAR、ITAM修飾的cTCR或ITAM修飾的TAC樣嵌合受體）和/或外源Nef蛋白的核酸可操作地連接至誘導型啟動子。誘導型啟動子屬於調節性啟動子的類別。誘導型啟動子可以通過一種或多種條件來誘導，如身體狀況、工程化免疫效應細胞（例如，T細胞）的微環境、或工程化免疫效應細胞的生理狀態、誘導物（即，誘導劑）或其組合。在一些實施例中，誘導條件不誘導內源基因在工程化免疫效應細胞（例如，T細胞）中和/或在接受醫藥組合物的受試者中的表現。

在一些實施例中，誘導條件選自：誘導物、輻照（如電離輻射、光）、溫度（如熱）、氧化還原狀態、腫瘤環境以及工程化免疫效應細胞（例如，T細胞）的啟動狀態。在一些實施例中，誘導型啟動子可以是NFAT啟動子、TETON®啟動子或NFκB啟動子。

【0254】 在一些實施例中，載體還含有選擇性標記基因或報告基

因，以從通過載體（例如，慢病毒載體）轉染的宿主細胞群選擇表現本文所述的包含CMSD的功能性外源受體（例如，ITAM修飾的TCR、ITAM修飾的CAR、ITAM修飾的cTCR或ITAM修飾的TAC樣嵌合受體）和/或外源Nef蛋白的細胞。選擇性標記和報告基因二者可以側接適當的調節序列以使得能在宿主細胞中表現。例如，載體可以含有轉錄和翻譯終止子、起始序列以及可用於調節核酸序列的表現的啟動子。

【0255】 **VI.產生修飾的T細胞的方法**

【0256】 本發明的一方面提供產生上述任一種修飾的T細胞（例如，同種異體或自體T細胞）的方法，所述修飾的T細胞如表現本文所述的包含CMSD的功能性外源受體（例如，ITAM修飾的CAR、ITAM修飾的TCR、ITAM修飾的cTCR、或ITAM修飾的TAC樣嵌合受體）的修飾的T細胞，本文中也稱為「含有CMSD的功能性外源受體-T細胞」或「ITAM修飾的功能性外源受體-T細胞」。此類含有CMSD的功能性外源受體-T細胞可以被進一步修飾以表現本文所述的外源Nef蛋白（本文中也稱為「含有Nef的含有CMSD的功能性外源受體-T細胞」或「含有Nef的ITAM修飾的功能性外源受體-T細胞」）。可以在將編碼本文所述的任何含有CMSD的功能性外源受體的核酸引入T細胞中的同時（例如，經由分開的載體，或經由同一載體）、之前或之後將編碼外源Nef蛋白的核酸引入T細胞中。在一些實施例中，如與從衍生出修飾的T細胞的前體T細胞的供體分離的原代T細胞引發的GvHD反應或來自相同供體來源但不具有

Nef表現的ITAM修飾的功能性外源受體-T細胞引發的GvHD反應相比，在組織不相容個體中，含有Nef的ITAM修飾的功能性外源受體-T細胞不引發或引發降低（如降低至少約30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%中的任一個）的GvHD反應。儘管下文描述集中於產生ITAM修飾的功能性外源受體-T細胞的方法，但可想到，此類方法可以使用和/或修改以在所述修飾的T細胞中進一步表現外源Nef蛋白。

【0257】 產生表現本文所述的包含CMSD的功能性外源受體的修飾的T細胞的方法通常涉及將攜載編碼本文所述的包含CMSD的功能性外源受體的核酸的載體（例如，病毒載體，如慢病毒載體）引入天然或工程化T細胞（本文中稱為「前體T細胞」）中。產生表現本文所述的包含CMSD的功能性外源受體的修飾的T細胞的方法通常涉及將編碼本文所述的包含CMSD的功能性外源受體的核酸引入前體T細胞中。在一些實施例中，在使用前體T細胞群產生本文所述的修飾的T細胞時，所述方法還包括一個或多個分離和/或富集步驟，例如，從被修飾以表現包含CMSD的功能性外源受體的T細胞分離和/或富集ITAM修飾的功能性外源受體陽性T細胞（例如，ITAM修飾的CAR陽性、ITAM修飾的TCR陽性、ITAM修飾的cTCR陽性或ITAM修飾的TAC樣嵌合受體陽性）T細胞。此類分離和/或富集步驟可以使用業內的任何已知技術來進行，如磁啟動細胞分選（MACS）。簡單來說，將轉導/轉染的細胞懸浮液在室溫下離心，棄去上清液。將細胞用DPBS重懸，然後補充MACSelect

LNGFR MicroBeads（Miltenyi Biotec，#130-091-330），並在冰上孵育15 min用於磁性標記。在孵育後，添加PBE緩衝液（磷酸鈉/EDTA）以調整體積。然後使細胞懸浮液根據MACS套組方案經歷磁性分離和富集。也參見實例。在一些實施例中，如果修飾的T細胞還表現外源Nef蛋白，則所述方法還可以包括從被修飾以表現外源Nef蛋白的T細胞分離和/或富集Nef陽性、CD3ε/γ/δ陰性、TCRα/β陰性、MHC I陰性、CD4陽性和/或CD28陽性T細胞。還可想到，T細胞可以被修飾以表現外源Nef蛋白，針對前文提及的標記進行分離和/或富集，然後用於進一步表現含有CMSD的功能性外源受體。

【0258】 在一些實施例中，前體T細胞源自血液、骨髓、淋巴或淋巴器官。在一些實施例中，前體T細胞是免疫系統的細胞，如先天性或適應性免疫的細胞。在一些方面，細胞是人細胞。在一些實施例中，前體T細胞源自細胞株，例如，T細胞株。在一些實施例中，細胞是從異種來源獲得，例如，從小鼠、大鼠、非人靈長類動物或豬獲得。

【0259】 在一些實施例中，前體T細胞是CD4+/CD8-、CD4-/CD8+、CD4+/CD8+、CD4-/CD8-或其組合。在一些實施例中，T細胞是自然殺傷T（NKT）細胞。在一些實施例中，前體T細胞是修飾的T細胞，如表現本文所述的包含CMSD的功能性外源受體的修飾的T細胞、表現外源Nef蛋白的修飾的T細胞、或具有修飾的內源TCR或B2M基因座（例如，通過CRISPR/Cas系統）的T細胞。在一些實施例中，在本文所述的包含CMSD的功能性外源受體表現並

與靶細胞（例如，BCMA+或CD20+腫瘤細胞）結合後，前體T細胞產生IL-2、TFN和/或TNF。在一些實施例中，在本文所述的包含CMSD的功能性外源受體表現並與靶細胞結合後，CD8+ T細胞裂解抗原特異性靶細胞（例如，BCMA+或CD20+腫瘤細胞）。

【0260】 在一些實施例中，要修飾的T細胞是從幹細胞分化的，所述幹細胞如造血幹細胞、多能幹細胞、iPS或胚胎幹細胞。

【0261】 在一些實施例中，通過轉導/轉染本文所述的任一種核酸或任一種載體（例如，非病毒載體，或病毒載體，如慢病毒載體），將本文所述的包含CMSD的功能性外源受體（例如，ITAM修飾的TCR、ITAM修飾的CAR、ITAM修飾的cTCR或ITAM修飾的TAC樣嵌合受體）引入T細胞中。在一些實施例中，通過將蛋白質插入細胞膜中同時使細胞經過微流體系統如CELL SQUEEZE®，將本文所述的包含CMSD的功能性外源受體引入T細胞中（參見例如，美國專利申請案公開號20140287509）。

【0262】 將載體（例如，病毒載體）或分離的核酸引入哺乳動物細胞中的方法是業內已知的。可以通過物理、化學或生物學方法將本文所述的載體轉移至T細胞中。

【0263】 用於將載體（例如，病毒載體）引入T細胞中的物理方法包括磷酸鈣沉澱、脂轉染、粒子轟擊、顯微注射、電穿孔等。用於產生包含載體和/或外源核酸的細胞的方法是業內熟知的。參見例如，Sambrook等人 (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory，紐約。在一些實施例中，

通過電穿孔將載體（例如，病毒載體）引入細胞中。

【0264】 用於將載體引入T細胞中的生物學方法包括使用DNA和RNA載體。病毒載體已經成為使用最廣泛的將基因插入哺乳動物（例如，人）細胞中的方法。

【0265】 用於將載體（例如，病毒載體）引入T細胞中的化學手段包括膠體分散系統，如大分子複合物、納米膠囊、微球、珠和基於脂質的系統，包括水包油乳液、膠束、混合膠束和脂質體。用作體外遞送媒介物的示例性膠體系統是脂質體（例如，人造膜囊泡）。

【0266】 在一些實施例中，編碼任何本文所述的包含CMSD的功能性外源受體（例如，ITAM修飾的CAR、ITAM修飾的TCR、ITAM修飾的cTCR、或ITAM修飾的TAC樣嵌合受體）的RNA分子可以通過常規方法(例如，體外轉錄)來製備，然後通過已知方法如mRNA電穿孔引入T細胞中。參見例如，Rabinovich等人, Human Gene Therapy 17:1027-1035。

【0267】 在一些實施例中，在引入載體或分離的核酸後，使轉導/轉染的T細胞離體繁殖。在一些實施例中，培養轉導/轉染的T細胞以繁殖至少約1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、10天、12天或14天中任一個。在一些實施例中，進一步評價或篩選轉導/轉染的T細胞以選擇所需的工程化哺乳動物細胞，例如，本文所述的修飾的T細胞。

【0268】 可以使用報告基因鑒定潛在轉染/轉導的細胞，並評價調

節序列的功能性。通常，報告基因是如下基因：在接受者生物體或組織中不存在或不表現，並且編碼如下多肽：其表現表現為一些易於檢測的特性，例如酶活性。在已經將DNA/RNA引入接受者細胞中之後，於合適的時間測定報告基因的表現。合適的報告基因可以包括編碼以下的基因：螢光素酶、β-半乳糖苷酶、氯黴素乙醯轉移酶、分泌型鹼性磷酸酶或綠色螢光蛋白（GFP）基因（例如，Ui-Tei等人 FEBS Letters 479: 79-82 (2000)）。合適的表現系統是眾所周知的並且可以使用已知技術來製備或商業購得。

【0269】 用於確認編碼任何本文所述的包含CMSD的功能性外源受體（例如，ITAM修飾的CAR、ITAM修飾的TCR、ITAM修飾的cTCR、或ITAM修飾的TAC樣嵌合受體）的核酸在修飾的T細胞中的存在的其他方法包括例如熟習此項技術者熟知的分子生物學測定，如DNA印跡和RNA印跡、RT-PCR和PCR；生物化學測定，如檢測特定肽的存在或不存在，例如，通過免疫學方法（如ELISA和蛋白質印跡）、螢光啟動細胞分選（FACS）或磁啟動細胞分選（MACS）（也參見實例章節）。

【0270】 因此，在一些實施例中，提供產生修飾的T細胞（例如，同種異體T細胞、內源TCR缺陷性T細胞、GvHD最小化的T細胞或自體T細胞）的方法，所述方法包括向前體T細胞中引入編碼功能性外源受體（例如，ITAM修飾的CAR、ITAM修飾的TCR、ITAM修飾的cTCR、或ITAM修飾的TAC樣嵌合受體）的核酸，其中所述功能性外源受體包含：(a) 細胞外配體結合結構域（如特異性識別

一種或多種靶抗原（例如，腫瘤抗原，如BCMA、CD19、CD20）的一個或多個表位的抗原結合片段（例如，scFv、sdAb）、受體（例如，FcR）的細胞外結構域（或其部分）、配體（例如，APRIL、BAFF）的細胞外結構域（或其部分）），(b) 跨膜結構域（例如，源自CD8α），以及 (c) 包含CMSD（例如，包含選自SEQ ID NO: 41-74的序列的CMSD）的ISD，其中CMSD包含一個或多個CMSD ITAM，其中所述多個CMSD ITAM任選地通過一個或多個CMSD連接子連接。在一些實施例中，提供產生修飾的T細胞（例如，同種異體或自體T細胞）的方法，所述方法包括向前體T細胞中引入編碼任何本文所述的含有CMSD的功能性外源受體（如包含SEQ ID NO: 76-96、98-104和106-113中任一個的胺基酸序列的ITAM修飾的CAR）的核酸。在一些實施例中，修飾的T細胞還表現外源Nef蛋白（例如，wt、亞型或突變體Nef），如包含SEQ ID NO: 121、122、136或139的胺基酸序列的外源Nef蛋白。

【0271】 在一些實施例中，修飾的T細胞包含未修飾的內源TCR和/或B2M基因座。在一些實施例中，修飾的T細胞包含修飾的內源TCR基因座，如修飾的TCRα或TCRβ基因座。在一些實施例中，修飾的T細胞包含修飾的內源B2M基因座。在一些實施例中，內源TCR（或B2M）基因座是通過選自CRISPR-Cas、TALEN和ZFN的基因編輯系統來修飾。

【0272】 在一些實施例中，所述方法還包括分離和/或富集包含核酸的T細胞。在一些實施例中，所述方法還包括從表現本文所述的

包含CMSD的功能性外源受體的修飾的T細胞分離和/或富集ITAM修飾的功能性外源受體陽性T細胞。在一些實施例中，所述方法還包括從表現本文所述的包含CMSD的功能性外源受體的修飾的T細胞分離和/或富集CD3ε/γ/δ陰性、TCRα/β陰性、MHC I陰性、CD4陽性和/或CD28陽性T細胞。

【0273】 在一些實施例中，如與從衍生出修飾的T細胞的前體T細胞的供體分離的原代T細胞引發的GvHD反應相比，在組織不相容個體中，修飾的T細胞（例如，共表現外源Nef和含有CMSD的功能性外源受體）不引發或引發降低（如降低至少約30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%中的任一個）的GvHD反應。在一些實施例中，所述方法還包括用至少一種醫藥上可接受的載劑配製修飾的T細胞（表現功能性外源受體和/或外源Nef）。在一些實施例中，所述方法還包括向個體（例如，人）施用有效量的表現本文所述的包含CMSD的功能性外源受體（例如，ITAM修飾的TCR、ITAM修飾的CAR、ITAM修飾的cTCR或ITAM修飾的TAC樣嵌合受體）和/或外源Nef蛋白的修飾的T細胞，或有效量的其藥物配製品。在一些實施例中，所述方法包括向個體（例如，人）施用有效量的表現包含CMSD的功能性外源受體（例如，ITAM修飾的CAR、ITAM修飾的TCR、ITAM修飾的cTCR、或ITAM修飾的TAC樣嵌合受體）和/或外源Nef蛋白的修飾的T細胞，或有效量的其藥物配製品。在一些實施例中，個體患有癌症。在一些實施例中，個體是人。在一些實施例中，個體與衍生出修飾的T細胞的前體T

細胞的供體是組織不相容的。

【0274】 T細胞的來源、細胞增殖和培養

【0275】 在T細胞（例如，前體T細胞）的擴增和遺傳修飾之前，從個體獲得T細胞的來源。T細胞可以從多種來源獲得，包括外周血單核細胞、骨髓、淋巴結組織、臍帶血、胸腺組織、來自感染部位的組織、腹水、胸腔積液、脾組織和腫瘤。在一些實施例中，可以使用任何數量的業內可獲得的T細胞株。在一些實施例中，可以使用熟習此項技術者已知的任何數量的技術如FICOLL™分離從收集自受試者的血液單位獲得T細胞。在一些實施例中，來自個體的迴圈血液的細胞是通過單采術獲得的。單采術產物通常含有淋巴細胞，包括T細胞、單核細胞、粒細胞、B細胞、其他有核白細胞、紅細胞和血小板。在一些實施例中，可以洗滌通過單采術收集的細胞以去除血漿級分並將細胞置於適當緩衝液或培養基中用於後續處理步驟。在一些實施例中，用磷酸鹽緩衝鹽水（PBS）洗滌細胞。在一些實施例中，洗滌溶液缺少鈣並且可能缺少鎂或者可能缺少多種（如果不是全部）二價陽離子。在一些實施例中，在不存在鈣的情況下的初始啟動步驟導致放大的啟動。如一般熟習此項技術者可易於理解，洗滌步驟可以通過熟習此項技術者已知的方法來完成，如通過根據製造商的說明書使用半自動化「流通式」離心機（例如，Cobe 2991細胞處理器、Baxter CytoMate或Haemonetics Cell Saver 5）。洗滌後，可以將細胞重懸於多種生物相容的緩衝液中，如例如無Ca^{2+}、無Mg^{2+}的PBS、PlasmaLyte A或

者具有或沒有緩衝液的其他鹽水溶液。可替代地，可以去除單采術樣品的不希望組分，並將細胞直接重懸於培養基中。

【0276】 在一些實施例中，T細胞是從臍帶血庫、外周血庫提供，或者源自誘導型多能幹細胞（iPSC）、多潛能和多能幹細胞或人胚胎幹細胞。在一些實施例中，T細胞源自細胞株。在一些實施例中，T細胞是從異種來源獲得，例如，從小鼠、大鼠、非人靈長類動物和豬獲得。在一些實施例中，T細胞是人細胞。在一些方面，T細胞是原代細胞，如從受試者直接分離和/或從受試者分離並冷凍的那些。在一些實施例中，細胞包括T細胞的一個或多個子集，如全T細胞群、CD4+細胞、CD8+細胞及其亞群，如依據以下定義的那些：功能、啟動狀態、成熟度、分化潛力、擴增、再迴圈、定位和/或持久能力、抗原特異性、抗原受體的類型、在特定器官或區室中的存在、標記或細胞因數分泌譜和/或分化程度。關於要治療的受試者，細胞可以是同種異體的和/或自體的。在一些情況下，關於一個或多個計畫的接受者，T細胞是同種異體的。在一些情況下，T細胞適合於移植，如在接受者中不誘導GvHD。

【0277】 T細胞和/或CD4+和/或CD8+ T細胞的亞型和亞群包括幼稚T（T_N）細胞、效應T細胞（T_{EFF}）、記憶T細胞及其亞型（如幹細胞記憶T（TSC_M）、中樞記憶T（TC_M）、效應記憶T（T_{EM}）或終末分化效應記憶T細胞）、腫瘤浸潤性淋巴細胞（TIL）、不成熟T細胞、成熟T細胞、輔助T細胞、細胞毒性T細胞、粘膜相關恒定T（MAIT）細胞、天然存在的和適應性調節T（Treg）細胞、輔助T

細胞（如TH1細胞、TH2細胞、TH3細胞、TH17細胞、TH9細胞、TH22細胞、濾泡性輔助T細胞）、α/β T細胞和δ/γ T細胞。

【0278】 在一些實施例中，通過裂解紅細胞和耗盡單核細胞，例如，通過經由PERCOLL™梯度離心或通過逆流離心淘析法，從外周血淋巴細胞分離T細胞。T細胞的特定亞群，如CD3+、CD28+、CD4+、CD8+、CD45RA+和CD45RO+T細胞，可以通過陽性或陰性選擇技術進一步分離。例如，在一些實施例中，通過以下方式分離T細胞：與抗CD3/抗CD28（即，3×28）綴合的珠（如DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T）一起孵育持續足以進行所需T細胞的陽性選擇的時間段。在一些實施例中，所述時間段為約30分鐘。在另一實施例中，所述時間段的範圍為30分鐘至36小時或更長時間，以及其間的所有整數值。在另一實施例中，所述時間段為至少1、2、3、4、5或6小時。在一些實施例中，所述時間段為10至24小時。在一些實施例中，所述孵育時間段為24小時。對於從患有白血病的患者分離T細胞，使用更長孵育時間（如24小時）可以增加細胞產量。在T細胞少於其他細胞類型的任何情況下，如在從腫瘤組織或從免疫受損的個體分離腫瘤浸潤性淋巴細胞（TIL）時，可以使用更長的孵育時間分離T細胞。此外，使用更長的孵育時間可以增加捕獲CD8+ T細胞的效率。因此，通過簡單地縮短或延長允許T細胞與CD3/CD28珠結合的時間和/或通過增加或減小珠與T細胞的比率（如本文進一步描述），可以在培養起始時或在過程期間的其他時間點優先選擇或淘汰T細胞亞群。另

外，通過增加或減小抗CD3和/或抗CD28抗體在珠或其他表面上的比率，可以在培養起始時或在其他所需時間點優先選擇或淘汰T細胞亞群。熟習此項技術者將瞭解，還可以使用多輪選擇。在一些實施例中，可能需要進行選擇程式並在啟動和擴增過程中使用「未選擇的」細胞。還可以使「未選擇的」細胞進一步經歷多輪選擇。

【0279】 通過陰性選擇富集T細胞群可以用針對陰性選擇的細胞獨有的表面標記的抗體的組合來完成。一種方法是通過使用針對陰性選擇的細胞上存在的細胞表面標記的單株抗體混合物（cocktail）的陰性磁性免疫粘附或流式細胞術進行細胞分選和/或選擇。例如，為了通過陰性選擇富集CD4+細胞，單株抗體混合物通常包括針對CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR和CD8的抗體。在某些實施例中，可能期望富集或陽性選擇通常表現CD4+、CD25+、CD62Lhi、GITR+和FoxP3+的調節性T細胞。可替代地，在某些實施例中，T調節細胞被抗CD25綴合的珠或其他相似的選擇方法耗盡。

【0280】 對於通過陽性或陰性選擇分離所需細胞群，可以改變細胞和表面（例如，顆粒，如珠）的濃度。在某些實施例中，可能期望顯著減小將珠與細胞混合在一起的體積（即，增加細胞濃度），以確保細胞與珠的最大接觸。例如，在一個實施例中，使用20億個細胞/mL的濃度。在一個實施例中，使用10億個細胞/mL的濃度。在另一實施例中，使用大於1億個細胞/mL的濃度。在另一實施例中，使用1000萬、1500萬、2000萬、2500萬、3000萬、3500

萬、4000萬、4500萬或5000萬個細胞/mL的細胞濃度。在又一個實施例中，使用7500萬、8000萬、8500萬、9000萬、9500萬或1億個細胞/mL的細胞濃度。在其他實施例中，可以使用1.25或1.5億個細胞/mL的濃度。使用高濃度可以導致增加的細胞產量、細胞啟動和細胞擴增。此外，使用高細胞濃度允許更高效地捕獲可能弱表現目的靶抗原的細胞，如CD28陰性T細胞，或從存在許多腫瘤細胞的樣品（即，白血病血液、腫瘤組織等）捕獲。此類細胞群可具有治療價值並且將是期望獲得的。例如，使用高細胞濃度允許更高效地選擇通常具有較弱CD28表現的CD8+ T細胞。

【0281】 在一些實施例中，可能期望使用較低細胞濃度。通過顯著稀釋T細胞與表面（例如，顆粒，如珠）的混合物，使顆粒與細胞之間的相互作用降至最低。這樣選擇了表現大量有待結合至顆粒的期望的抗原的細胞。例如，在稀釋濃度下，與CD8+ T細胞相比，CD4+ T細胞表現更高水準的CD28並且更高效地被捕獲。在一些實施例中，所用細胞濃度為5×10^6/mL。在一些實施例中，所用濃度可以是約1×10^5/mL至1×10^6/mL，以及其間的任何整數值。

【0282】 在一些實施例中，可以在2°C-10°C下或在室溫下將細胞在旋轉器上以變化的速度孵育變化的時間長度。

【0283】 還可以在洗滌步驟後冷凍用於刺激的T細胞。不希望受限於理論，冷凍和後續解凍步驟通過去除細胞群中的粒細胞和在一定程度上去除單核細胞來提供更均勻的產物。在去除血漿和血小板的洗滌步驟之後，可以將細胞懸浮於冷凍溶液中。儘管許多冷

凍溶液和參數是業內已知的並且將可用於該情況下，一種方法涉及使用含有20% DMSO和8%人血清白蛋白的PBS；或含有以下的培養基：10%葡聚糖40和5%右旋糖，20%人血清白蛋白和7.5% DMSO，或31.25% Plasmalyte-A、31.25%右旋糖5%、0.45% NaCl、10%葡聚糖40和5%右旋糖，20%人血清白蛋白和7.5% DMSO；或含有例如Hespan和PlasmaLyte A的其他合適的細胞冷凍培養基，然後將細胞以1°/分鐘的速率冷凍至-80°C，並儲存在液氮儲存罐的氣相中。可以使用其他受控冷凍方法，以及在-20°C下或在液氮中立即不受控冷凍。

【0284】 在一些實施例中，如本文所述解凍並洗滌低溫保存的細胞，並使其在室溫下靜置一小時，之後啟動。

【0285】 本申請案中還考慮在可能需要如本文所述擴增的細胞時之前的時間段從受試者收集血液樣品或單采術產物。因此，可以在任何所需時間點收集待擴增細胞的來源，並且分離並冷凍所需細胞如T細胞，以供隨後用於針對任何數量的可受益於T細胞療法的疾病或病症（如本文所述的那些）的T細胞療法。在一個實施例中，血液樣品或單采術取自總體上健康的受試者。在某些實施例中，血液樣品或單采術取自總體上健康的受試者，其具有患上疾病的風險，但尚未患上疾病，並且分離並冷凍目的細胞以供隨後使用。在某些實施例中，可以擴增、冷凍並且隨後使用T細胞。在某些實施例中，在診斷出如本文所述的特定疾病後不久，但是在任何治療之前，從患者收集樣品。在另一實施例中，在任何數量

的相關治療方式之前，從來自受試者的血液樣品或單采術分離細胞，所述相關治療方式包括但不限於用諸如以下的藥劑治療：那他珠單抗、依法珠單抗、抗病毒劑、化學療法、輻射、免疫抑制劑（如環孢菌素、硫唑嘌呤、甲胺蝶呤、麥考酚酯和FK506）、抗體、或其他免疫清除劑（如CAMPATH、抗CD3抗體、環磷醯胺、氟達拉濱、環孢菌素、FK506、雷帕黴素、黴酚酸、類固醇、FR901228和輻照）。這些藥物抑制鈣依賴性磷酸酶鈣調磷酸酶（環孢菌素和FK506）或抑制對於生長因數誘導的信號傳導重要的p70S6激酶（雷帕黴素）（Liu等人, Cell 66:807-815, 1991；Henderson等人, Immun 73:316-321, 1991；Bierer等人, Curr. Opin. Immun. 5:763-773, 1993）。在另一實施例中，從患者分離細胞並冷凍，以供隨後與骨髓或幹細胞移植、T細胞清除療法結合（例如，在其之前、同時或之後）使用，所述T細胞清除療法使用化學治療劑（如氟達拉濱）、外射束輻射療法（XRT）、環磷醯胺或抗體如OKT3或CAMPATH。在另一實施例中，在按照B細胞清除療法（如與CD20反應的藥劑，例如，Rituxan）治療之前分離細胞並且可以將其冷凍以供隨後用於所述治療。

【0286】 在一些實施例中，T細胞是在治療後立刻從患者獲得。就此而言，已經觀察到，在某些癌症治療後，在使用損壞免疫系統的藥物的特定治療中，在治療後不久患者通常會從治療恢復的階段期間，所獲得的T細胞的品質可能是最佳的或者針對其離體擴增的能力有所改進。同樣，在使用本文所述的方法離體操作後，這

些細胞可以處於增強植入和體內擴增的較佳狀態。因此，在本發明的背景內考慮在此恢復期期間收集血液細胞，包括T細胞、樹突細胞或造血譜系的其他細胞。此外，在某些實施例中，可以使用動員（例如，用GM-CSF動員）和條件化方案在受試者中產生如下條件：其中有利於特定細胞類型的再增殖、再迴圈、再生和/或擴增，尤其在治療後的限定時間窗口期間。說明性細胞類型包括T細胞、B細胞、樹突細胞和免疫系統的其他細胞。

【0287】 T細胞的啟動和擴增

【0288】 在一些實施例中，在基因工程化之前或與基因工程化結合孵育和/或培養細胞。孵育步驟可以包括培養、培育、刺激、啟動和/或繁殖。在一些實施例中，在刺激條件或刺激劑的存在下孵育組合物或細胞。此類條件包括設計用於以下的那些條件：在群體中誘導細胞的增殖、擴增、啟動和/或存活，模擬抗原暴露，和/或引發細胞用於基因工程化（如用於引入基因工程化的抗原受體）。所述條件可以包括以下中的一種或多種：特定培養基、溫度、氧含量、二氧化碳含量、時間、藥劑（例如，營養素、胺基酸、抗生素、離子和/或刺激因數（如細胞因數、趨化因數、抗原、結合配偶體、融合蛋白、重組可溶性受體和設計為啟動細胞的任何其他藥劑））。

【0289】 不論在用外源核酸對T細胞進行遺傳修飾之前或之後，通常可以使用如例如以下文獻中所述的方法來啟動並擴增T細胞：美國專利號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；以及美國專利申請案公開號20060121005。

【0290】 通常，T細胞可以通過與表面接觸來擴增，所述表面附著有刺激CD3/TCR複合物相關信號的藥劑和刺激T細胞表面上的共刺激分子的配體。特定地，可以如本文所述刺激T細胞群，如通過與固定在表面上的抗CD3抗體或其抗原結合片段或抗CD3抗體接觸，或者通過與結合有鈣離子載體的蛋白質激酶C啟動劑（例如，苔蘚抑素）接觸。對於T細胞表面上的輔助分子的共刺激，使用結合所述輔助分子的配體。例如，可以使T細胞群與抗CD3抗體和抗CD28抗體在適合於刺激T細胞增殖的條件下接觸。為了刺激CD4+ T細胞或CD8+ T細胞的增殖，抗CD3抗體和抗CD28抗體。抗CD28抗體的例子包括9.3、B-T3、XR-CD28（Diaclone，貝桑松，法國），可以用作可以業內一般已知的其他方法（Berg等人，Transplant Proc. 30(8):3975-3977, 1998；Haanen等人，J. Exp. Med. 190(9):13191328, 1999；Garland等人，J. Immunol Meth. 227(1-2):53-63, 1999）。

【0291】 在一些實施例中，通過以下方式擴增T細胞：向培養起始組合物中添加飼養細胞，如非分裂外周血單核細胞（PBMC）（例如，使得對於待擴增的初始群體中的每個T淋巴細胞，所得細胞群含有至少約5、10、20或40或更多個PBMC飼養細胞）；以及孵育培養物（例如，持續足以擴增T細胞數量的時間）。在一些方面，非

分裂飼養細胞可以包含γ輻照的PBMC飼養細胞。在一些實施例中，用約3000至3600拉德範圍內的γ射線輻照PBMC以防止細胞分裂。在一些方面，在添加T細胞群之前將飼養細胞添加至培養基中。

【0292】 在一些實施例中，可以通過不同方案提供T細胞的初級刺激信號和共刺激信號。例如，提供每種信號的藥劑可以在溶液中或者偶聯至表面。在偶聯至表面時，所述藥劑可以偶聯至同一表面（即，呈「順式」構造）或分開的表面（即，呈「反式」構造）。可替代地，一種藥劑可以偶聯至表面，而另一種藥劑在溶液中。在一個實施例中，提供共刺激信號的藥劑結合至細胞表面，而提供初級啟動信號的藥劑在溶液中或偶聯至表面。在某些實施例中，兩種藥劑可以都在溶液中。在另一實施例中，所述藥劑可以呈可溶形式，然後與表面交聯，所述表面如表現Fc受體的細胞或將與所述藥劑結合的抗體或其他結合劑。就此而言，關於本發明中考慮用於啟動和擴增T細胞的人工抗原呈遞細胞（aAPC），參見例如美國專利申請案公開號20040101519和20060034810。

【0293】 在一些實施例中，將T細胞與藥劑包被的珠組合，隨後分離所述珠與所述細胞，然後培養細胞。在可替代的實施例中，在培養前，不分離藥劑包被的珠與細胞，而是將它們一起培養。在另一實施例中，首先通過施加力如磁力來濃縮珠和細胞，導致細胞表面標記的連接增加，從而誘導細胞刺激。

【0294】 例如，細胞表面蛋白可以通過允許抗CD3和抗CD28所附著的順磁珠（3×28個珠）接觸T細胞來連接。在一個實施例中，將

細胞（例如，10^4至10^9個T細胞）和珠（例如，DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T順磁珠，比率為1:1）在緩衝液、較佳地PBS（不含二價陽離子，如鈣和鎂）中組合。同樣，一般熟習此項技術者可以容易地瞭解，可以使用任何細胞濃度。例如，靶細胞可能在樣品中非常少見並且僅占樣品的0.01%，或者整個樣品（即，100%）可以包含目的靶細胞。因此，任何細胞數量都在本發明的情境中。在某些實施例中，可能期望顯著減小其中將顆粒與細胞混合在一起的體積（即，增加細胞濃度），以確保細胞與顆粒的最大接觸。例如，在一個實施例中，使用約20億個細胞/mL的濃度。在另一實施例中，使用大於1億個細胞/mL。在另一實施例中，使用1000萬、1500萬、2000萬、2500萬、3000萬、3500萬、4000萬、4500萬或5000萬個細胞/mL的細胞濃度。在又一個實施例中，使用7500萬、8000萬、8500萬、9000萬、9500萬或1億個細胞/mL的細胞濃度。在其他實施例中，可以使用1.25或1.5億個細胞/mL的濃度。使用高濃度可以導致增加的細胞產量、細胞啟動和細胞擴增。此外，使用高細胞濃度允許更高效地捕獲可能弱表現目的靶抗原的細胞，如CD28陰性T細胞。在某些實施例中，此類細胞群可能具有治療價值並且將是期望獲得的。例如，使用高細胞濃度允許更高效地選擇通常具有較弱CD28表現的CD8+ T細胞。

【0295】 在一些實施例中，可以將混合物培養幾小時（約3小時）至約14天或其間的任何小時整數值。在另一實施例中，可以將混合物培養21天。在本發明的一個實施例中，將珠和T細胞一起培養

約八天。在另一實施例中，將珠和T細胞一起培養2-3天。還可能需要幾個迴圈的刺激，使得T細胞的培養時間可以是60天或更多天。適合用於T細胞培養的條件包括適當的培養基（例如，極限必需培養基或RPMI培養基1640或X-vivo 15（Lonza）），其可以含有增殖和活力所需的因數，包括血清（例如，胎牛血清或人血清）、白介素-2（IL-2）、胰島素、IFN-γ、IL-4、IL-7、GM-CSF、IL-10、IL-12、IL-15、TGFβ和TNF-α或熟習此項技術者已知的用於細胞生長的任何其他添加劑。用於細胞生長的其他添加劑包括但不限於表面活性劑、plasmanate和還原劑（如N-乙醯基-半胱胺酸和2-巰基乙醇）。培養基可以包括RPMI 1640、AIM-V、DMEM、MEM、α-MEM、F-12、X-Vivo 15和X-Vivo 20、Optimizer，其添加有胺基酸、丙酮酸鈉和維生素，無血清或補充有適當量的血清（或血漿）或一組限定的激素和/或足夠用於T細胞生長和擴增的量的一種或多種細胞因數。抗生素（例如，青黴素和鏈黴素）僅包括於實驗培養物中，而不包括在要輸注到受試者體內的細胞培養物中。將靶細胞維持在支持生長所需的條件下，例如，適當溫度（例如，37°C）和氣氛（例如，空氣加5% CO_2）。已經暴露於變化的刺激時間的T細胞可以展現不同特徵。例如，典型的血液或單采術外周血單核細胞產物具有大於細胞毒性或抑制性T細胞群（TC、CD8）的輔助T細胞群（TH、CD4+）。通過刺激CD3和CD28受體使T細胞離體擴增產生如下T細胞群：其在約第8-9天前主要由TH細胞組成，而在約第8-9天后，所述T細胞群包含日益增大的TC細胞群。因此，

根據治療目的，向受試者輸注主要由TH細胞構成的T細胞群可以是有利的。相似地，如果已經分離TC細胞的抗原特異性子集，將該子集擴增至更高程度可以是有益的。

【0296】 此外，除了CD4和CD8標記，其他表型標記顯著不同，但是在細胞擴增過程期間很大程度上是可重現的。因此，這種重現性使得能夠使啟動的T細胞產物適應特定目的。

【0297】 在一些實施例中，所述方法包括評估修飾的細胞或待工程化的細胞的表面上一種或多種標記的表現。在一個實施例中，所述方法包括評估TCR、MHC I、CD4、CD28和/或CD3（例如，CD3ε）的表面表現，例如，通過基於親和力的檢測方法，如通過流式細胞術來進行。在一些實施例中，評估細胞表面標記，如T細胞耗竭標記或記憶標記。在一些方面，在所述方法揭示抗原或其他標記的表面表現的情況下，編碼抗原或其他標記的基因被破壞，或者表現以其他方式被阻遏，例如使用本文所述的方法。

【0298】 修飾的T細胞的分離和富集

【0299】 在一些實施例中，本文所述的方法還包括分離或富集包含核酸的T細胞。因此，在一些實施例中，本文所述的方法包括分離或富集表現本文所述的包含CMSD的功能性外源受體的修飾的T細胞。在一些實施例中，本文所述的方法還包括從修飾的T細胞（例如，還表現外源Nef蛋白）分離或富集CD3 ε / γ / δ 陰性T細胞。在一些實施例中，本文所述的方法還包括從修飾的T細胞分離或富集內源TCR α / β 陰性T細胞。在一些實施例中，本文所述的方法還包

括從修飾的T細胞分離或富集CD4+和/或CD28+ T細胞。在一些實施例中，本文所述的方法還包括從修飾的T細胞分離或富集MHC I陰性T細胞。在一些實施例中，T細胞的分離或富集包括本文所述的方法的任何組合。

【0300】 在一些實施例中，分離方法包括基於細胞中一種或多種特定分子的不存在或存在來分離不同的細胞類型，所述特定分子如表面標記（例如，表面蛋白）、細胞內標記或核酸。在一些實施例中，選擇標記是包含CMSD的功能性外源受體（例如，ITAM修飾的CAR、ITAM修飾的TCR、ITAM修飾的cTCR、或ITAM修飾的TAC樣嵌合受體）、CD4、CD28、CD3ε、CD3γ、CD3δ、CD3ζ、CD69、TCRα、TCRβ和/或MHC I。在一些實施例中，選擇標記是T細胞耗竭標記，如PD-1或LAG-3。在一些實施例中，選擇標記是T細胞記憶標記，如TEMRA、TEM或TCM。在一些實施例中，可以使用基於此類標記的任何已知的分離方法。在一些實施例中，分離是基於親和力或基於免疫親和力的分離。例如，在一些方面，分離包括基於細胞中一種或多種標記（通常是細胞表面標記）的表現或表現水準分離細胞和細胞群，例如，通過與特異性結合至此類標記的抗體或結合配偶體，之後通常進行洗滌步驟，並分離已經結合所述抗體或結合配偶體的細胞與尚未結合至所述抗體或結合配偶體的那些細胞。

【0301】 此類分離步驟可以基於陽性選擇（其中保留已結合試劑的細胞以供進一步使用）和/或陰性選擇（其中保留尚未結合至所

述抗體或結合配偶體的細胞）。在一些例子中，保留兩種級分以供進一步使用。在一些方面，在無法獲得特異性鑒定異質性群體中的細胞類型的抗體，使得最好基於除了所需群體以外的細胞表現的標記來進行分離的情況下，陰性選擇可以特別有用。

【0302】 分離不需要導致100%富集或去除特定細胞群或表現特定標記的細胞。例如，對特定類型的細胞（如表現標記的那些）的陽性選擇或富集是指增加此類細胞的數量或百分比，但不需要使不表現所述標記的細胞完全不存在。同樣，對特定類型的細胞（如表現標記的那些）的陰性選擇、去除或耗盡是指減少此類細胞的數量或百分比，但不需要使所有此類細胞完全去除。

【0303】 在一些例子中，進行多輪分離步驟，其中使來自一個步驟的陽性或陰性選擇的級分經受另一個分離步驟，如隨後的陽性或陰性選擇。在一些例子中，單一分離步驟可以同時耗盡表現多種標記的細胞，如通過將細胞與多種抗體或結合配偶體（各自對陰性選擇所靶向的標記具有特異性）一起孵育。同樣，可以通過將細胞與在各種細胞類型上表現的多種抗體或結合配偶體一起孵育來對多種細胞類型同時進行陽性選擇。

【0304】 例如，在一些方面，通過陽性或陰性選擇技術分離T細胞的特定亞群，如對一種或多種表面標記呈陽性或高水準表現的細胞，例如，$CD28^+$、$CD62L^+$、$CCR7^+$、$CD27^+$、$CD127^+$、$CD4^+$、$CD8^+$、$CD45RA^+$和/或$CD45RO^+$ T細胞。

【0305】 例如，可以使用CD3/CD28綴合的磁珠（例如，

DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T細胞擴增器）對$CD3^+$、$CD28^+$T細胞進行陽性選擇。

【0306】 在一些實施例中，通過以下方式進行分離：通過陽性選擇富集特定細胞群，或通過陰性選擇耗盡特定細胞群。在一些實施例中，通過以下方式完成陽性或陰性選擇：將細胞與特異性結合一種或多種表面標記的一種或多種抗體或其他結合劑一起孵育，所述一種或多種表面標記分別在陽性或陰性選擇的細胞上表現（標記$^+$）或以相對較高的水準表現（標記^{高}）。

【0307】 在一些方面，將待分離的細胞的樣品或組合物與小的可磁化或磁回應材料（如磁回應顆粒或微粒，如順磁珠（例如，如Dynabeads或MACS珠））一起孵育。磁響應材料（例如，顆粒）通常直接或間接地附著至結合配偶體（例如，抗體），所述結合配偶體與期望分離（例如，期望進行陰性或陽性選擇）的一種細胞、多種細胞或細胞群上存在的分子（例如，表面標記）特異性結合。

【0308】 在一些實施例中，磁性顆粒或磁珠包含與特異性結合成員（如抗體或其他結合配偶體）結合的磁回應材料。有多種熟知的磁回應材料用於磁分離方法中。合適的磁性顆粒包括在Molday的美國專利號4,452,773和歐洲專利說明書EP 452342 B中所述的那些，所述文獻通過引用特此併入。其他例子是膠體大小的顆粒，如在Owen的美國專利號4,795,698以及Liberti等人的美國專利號5,200,084中所述的那些。

【0309】 孵育通常在如下條件下進行：由此附著至磁性顆粒或磁

珠的抗體或結合配偶體或者與此類抗體或結合配偶體特異性結合的分子（如二抗或其他試劑）與細胞表面分子（如果在樣品內的細胞上存在）特異性結合。

【0310】 在一些實施例中，將樣品置於磁場中，並且附著有磁回應或可磁化顆粒的那些細胞會被吸引至磁體，並且與未標記的細胞分離。對於陽性選擇，保留被吸引至磁體的細胞；對於陰性選擇，保留未被吸引的細胞（未標記的細胞）。在一些方面，在同一選擇步驟期間進行陽性與陰性選擇的組合，其中保留陽性和陰性級分並進一步處理或使其經歷進一步的分離步驟。

【0311】 在某些實施例中，磁回應顆粒被包被在一抗或其他結合配偶體、二抗、凝集素、酶或鏈黴親和素中。在某些實施例中，磁性顆粒經由對一種或多種標記具有特異性的一抗的包被附著至細胞。在某些實施例中，用一抗或結合配偶體標記細胞而不是珠，然後添加細胞類型特異性二抗或其他結合配偶體（例如，鏈黴親和素）包被的磁性顆粒。在某些實施例中，將鏈黴親和素包被的磁性顆粒與生物素化的一抗或二抗結合使用。

【0312】 在一些實施例中，磁回應顆粒保持附著至隨後要進行孵育、培養和/或工程化的細胞；在一些方面，所述顆粒保持附著至用於施用患者的細胞。在一些實施例中，從細胞去除可磁化或磁回應顆粒。用於從細胞去除可磁化顆粒的方法是已知的，並且包括例如使用競爭性未標記的抗體、可磁化顆粒或與可切割連接子綴合的抗體等。在一些實施例中，可磁化顆粒是生物可降解的。

【0313】 在一些實施例中，基於親和力的選擇是通過磁啟動細胞分選（MACS）（Miltenyi Biotec，奧本，加利福尼亞州）進行的。磁啟動細胞分選（MACS）系統能夠對附著有磁化顆粒的細胞進行高純度選擇。在某些實施例中，MACS以如下模式操作：其中在施加外部磁場之後依序洗脫非靶種類和靶種類。也就是說，附著至磁化顆粒的細胞被保持在適當的位置，而未附著的種類被洗脫。然後，在完成該第一洗脫步驟之後，以某種方式釋放被捕獲在磁場中而免於被洗脫的種類，使得它們可以被洗脫和回收。在某些實施例中，標記非靶細胞並將其從異質性細胞群耗盡。

【0314】 在某些實施例中，使用如下系統、裝置或設備進行分離或分開，所述系統、裝置或設備進行所述方法的分離、細胞製備、分開、處理、孵育、培養和/或配製步驟中的一個或多個。在一些方面，使用所述系統在封閉或無菌環境中進行這些步驟中的每一個，例如以使錯誤、使用者操作和/或污染最小化。在一個例子中，所述系統是如國際專利申請案公開號WO2009/072003或US 20110003380 A1中所述的系統。

【0315】 在一些實施例中，所述系統或設備在集成或獨立系統中和/或以自動化或可程式設計方式進行分離、處理、工程化和配製步驟中的一個或多個（例如，全部）。在一些方面，所述系統或設備包括與所述系統或設備通信的電腦和/或電腦程式，其允許用戶對處理、分離、工程化和配製步驟的各個方面進行程式設計、控制、結果評估和/或調整。

【0316】 在一些方面，使用CliniMACS系統（Miltenyi Biotec）進行分離和/或其他步驟，例如用於在封閉和無菌系統中在臨床規模水準上的細胞的自動化分離。部件可以包括集成微電腦、磁分離單元、蠕動泵和各種夾管閥。在一些方面，集成電腦控制儀器的所有部件並引導系統以標準化循序執行重複程式。在一些方面，磁分離單元包括可移動的永磁體和用於選擇柱的支架。蠕動泵控制整個管組的流速，並且與夾管閥一起確保緩衝液在系統中的受控流動和細胞的持續懸浮。

【0317】 在一些方面，CliniMACS系統使用抗體偶聯的可磁化顆粒，其在無菌、無熱原的溶液中提供。在一些實施例中，在用磁性顆粒標記細胞之後，洗滌細胞以去除過量的顆粒。然後將細胞製備袋連接到管組，所述管組又連接到含有緩衝液的袋和細胞收集袋。管組由預裝配的無菌管路（包括預柱和分離柱）組成，並且僅供一次性使用。在啟動分離程式之後，系統自動地將細胞樣品施加到分離柱上。標記的細胞保留在柱內，而未標記的細胞通過一系列洗滌步驟去除。在一些實施例中，用於與本文描述的方法一起使用的細胞群是未標記的並且不保留在柱中。在一些實施例中，用於與本文描述的方法一起使用的細胞群被標記並保留在柱中。在一些實施例中，用於與本文所述方法一起使用的細胞群在去除磁場之後從柱中洗脫，並收集在細胞收集袋內。

【0318】 在某些實施例中，使用CliniMACS Prodigy系統（Miltenyi Biotec）進行分離和/或其他步驟。在一些方面，CliniMACS Prodigy

系統配備有細胞加工聯合體，其允許自動化洗滌和通過離心來分級分離細胞。CliniMACS Prodigy系統還可以包括機載相機和圖像識別軟體，所述圖像識別軟體通過辨識源細胞產品的宏觀層來確定最佳細胞分級終點。例如，將外周血自動分離成紅細胞、白細胞和血漿層。CliniMACS Prodigy系統還可以包括集成的細胞培育室，其實現細胞培養方案，如例如細胞分化和擴增、抗原載入和長期細胞培養。輸入埠可允許無菌移除和補充培養基，並且可以使用集成顯微鏡監測細胞。

【0319】 在一些實施例中，通過流式細胞術收集並富集（或耗盡）本文所述的細胞群，其中針對多種細胞表面標記染色的細胞攜載於流體流中。在一些實施例中，通過製備規模（FACS）分選來收集和富集（或耗盡）本文所述的細胞群。在某些實施例中，通過使用微機電系統（MEMS）晶片結合基於FACS的檢測系統來收集並富集（或耗盡）本文所述的細胞群（參見例如，WO 2010/033140, Cho等人 (2010) *Lab Chip* 10, 1567-1573；和Godin等人 (2008) J Biophoton. 1 (5):355-376）。在兩種情況下，可以用多種標記來標記細胞，從而允許以高純度分離明確限定的T細胞子集。

【0320】 在一些實施例中，用一種或多種可檢測標記來標記抗體或結合配偶體，以促進用於陽性和/或陰性選擇的分離。例如，分離可以基於與螢光標記的抗體的結合。在一些例子中，基於對一種或多種細胞表面標記具有特異性的抗體或其他結合配偶體的結合來分離細胞是攜載於流體流中，如通過螢光啟動細胞分選

（FACS），包括製備規模（FACS）和/或微機電系統（MEMS）晶片，例如，與流式細胞術檢測系統組合。此類方法允許同時基於多種標記進行陽性和陰性選擇。分離和/或富集方法也參見「實例」章節。

【0321】 內源基因座的基因編輯

【0322】 在一些實施例中，在修飾T細胞以表現本文所述的包含CMSD的功能性外源受體（例如，ITAM修飾的CAR、ITAM修飾的TCR、ITAM修飾的cTCR、或ITAM修飾的TAC樣嵌合受體）之前或同時，通過基因編輯方法修飾T細胞的內源基因座，如內源TCR基因座（例如，TCRα、TCRβ）或B2M （β-2-微球蛋白；可以導致MHC I類分子表現缺乏和/或CD8+ T細胞耗盡）基因座。在一些實施例中，對內源基因座的修飾是通過實現基因中的破壞來進行的，如基因的全部或部分（例如，一個或多個外顯子或其部分）的敲除、插入、錯義或移碼突變（如雙等位基因移碼突變）、缺失，和/或敲入。在一些實施例中，這種基因座修飾是使用與所述基因特異性結合或雜交的DNA靶向分子（如DNA結合蛋白或DNA結合核酸），或者含有所述分子的複合物、化合物或組合物來進行的。

在一些實施例中，DNA靶向分子包含DNA結合結構域，例如鋅指蛋白（ZFP）DNA結合結構域、轉錄啟動因數樣蛋白（TAL）或TAL效應子（TALE）DNA結合結構域、規律間隔成簇短回文重複序列（CRISPR）DNA結合結構域、或來自大範圍核酸酶的DNA結合結構域。

【0323】 在一些實施例中，對內源基因座（例如，TCR或B2M）的修飾是使用一種或多種DNA結合核酸來進行的，如經由RNA指導的核酸內切酶（RGEN）來破壞，或者通過另一種RNA指導的效應分子進行其他形式的阻遏。例如，在一些實施例中，使用規律間隔成簇短回文重複序列（CRISPR）和CRISPR相關（Cas）蛋白進行阻遏。參見Sander和Joung, *Nature Biotechnology*, 32 (4): 347-355。

【0324】 通常，「CRISPR系統」統指參與CRISPR相關（「Cas」）基因的表現或引導其活性的轉錄物和其他元件，包括編碼Cas基因的序列、tracr（反式啟動CRISPR）序列（例如，tracrRNA或活性部分tracrRNA）、tracr配對序列（涵蓋「同向重複序列（direct repeat）」和在內源CRISPR系統的背景下的tracrRNA處理的部分同向重複序列）、指導序列（在內源CRISPR系統的背景下也稱為「間隔子」）和/或來自CRISPR基因座的其他序列和轉錄物。

【0325】 在一些實施例中，CRISPR/Cas核酸酶或CRISPR/Cas核酸酶系統包括與DNA以序列特異性方式結合的非編碼RNA分子（指導）RNA，以及具有核酸酶功能性（例如，兩個核酸酶結構域）的Cas蛋白（例如，Cas9）。

【0326】 在一些實施例中，CRISPR系統的一種或多種元件源自I型、II型或III型CRISPR系統。在一些實施例中，CRISPR系統的一種或多種元件源自包含內源CRISPR系統的特定生物體，如釀膿鏈球菌（*Streptococcus pyogenes*）。

【0327】 在一些實施例中，將Cas核酸酶和gRNA（包括對靶序列具有特異性的crRNA與固定的tracrRNA的融合物）引入細胞中。通常，在gRNA的5'端的靶位點使用互補鹼基配對將Cas核酸酶靶向靶位點，例如，基因。在一些實施例中，靶位點是基於其緊鄰原型間隔子鄰近基序（PAM）序列5'的位置選擇的，如通常是NGG或NAG。就此而言，通過修飾指導RNA的前20個核苷酸以對應於靶DNA序列而使gRNA靶向期望的序列。

【0328】 在一些實施例中，CRISPR系統誘導靶位點處的DSB。在其他實施例中，使用被認為是「切口酶」的Cas9變異體將靶位點處的單鏈切口。在一些方面，使用成對的切口酶以例如提高特異性，所述切口酶各自由靶向序列的一對不同的gRNA引導，使得在同時引入切口時引入5'突出端。在其他實施例中，將無催化活性的Cas9與異源效應子結構域如轉錄阻遏因數或啟動因數融合，以影響基因表現。

【0329】 在一些實施例中，在修飾T細胞以表現本文所述的包含CMSD的功能性外源受體（例如，ITAM修飾的CAR、ITAM修飾的TCR、ITAM修飾的cTCR、或ITAM修飾的TAC樣嵌合受體）之前，通過CRISPR/Cas系統修飾T細胞的內源基因座（例如，內源TCR）。在一些實施例中，在修飾T細胞以表現本文所述的包含CMSD的功能性外源受體的同時，通過CRISPR/Cas系統修飾T細胞（例如，內源TCR）的內源基因座。在一些實施例中，編碼CRISPR/Cas系統的一種或多種核酸和編碼本文所述的包含CMSD的功能性外源受

體的一種或多種核酸在相同載體上，任選地由相同啟動子或不同啟動子控制。在一些實施例中，編碼CRISPR/Cas系統的一種或多種核酸和編碼本文所述的包含CMSD的功能性外源受體（例如，ITAM修飾的CAR、ITAM修飾的TCR、ITAM修飾的cTCR、或ITAM修飾的TAC樣嵌合受體）的一種或多種核酸在不同的載體上。

【0330】 **VII.醫藥組合物**

【0331】 本申請案還提供醫藥組合物，其包含任一種修飾的T細胞（例如，同種異體T細胞或自體T細胞）和任選地醫藥上可接受的載劑，所述修飾的T細胞表現本文所述的包含CMSD的功能性外源受體（例如，ITAM修飾的CAR、ITAM修飾的TCR、ITAM修飾的cTCR、或ITAM修飾的TAC樣嵌合受體）。在一些實施例中，修飾的T細胞還表現外源Nef蛋白。醫藥組合物可以通過將本文所述的修飾的T細胞的群體與任選的醫藥上可接受的載劑、賦形劑或穩定劑混合來製備（Remington's Pharmaceutical Sciences第16版, Osol, A.編輯(1980)），呈水溶液形式。在一些實施例中，修飾的T細胞的群體是同質的。例如，在一些實施例中，至少約70%（如至少約75%、80%、85%、90%或95%中的任一個）用攜載編碼本文所述的包含CMSD的功能性外源受體（例如，ITAM修飾的CAR、ITAM修飾的TCR、ITAM修飾的cTCR、或ITAM修飾的TAC樣嵌合受體）的核酸的載體轉導/轉染的修飾的T細胞的群體是ITAM修飾的功能性外源受體陽性的。在一些實施例中，至少約70%（如至少約75%、80%、85%、90%或95%中的任一個）用編碼本文所述的包含CMSD

的功能性外源受體的核酸轉導/轉染的修飾的T細胞的群體是TCRα/TCRβ陰性和ITAM修飾的功能性外源受體陽性的。在一些實施例中，至少約70%（如至少約75%、80%、85%、90%或95%中的任一個）用編碼本文所述的包含CMSD的功能性外源受體的核酸轉導/轉染的修飾的T細胞的群體是MHC I陰性和ITAM修飾的功能性外源受體陽性的。在一些實施例中，至少約70%（如至少約75%、80%、85%、90%或95%中的任一個）用編碼本文所述的包含CMSD的功能性外源受體的核酸轉導/轉染的修飾的T細胞的群體是CD3（例如，CD3ε/γ/δ）陰性和ITAM修飾的功能性外源受體陽性的。在一些實施例中，至少約70%（如至少約75%、80%、85%、90%或95%中的任一個）用編碼本文所述的包含CMSD的功能性外源受體的核酸轉導/轉染的修飾的T細胞的群體是CD4和/或CD28陽性和ITAM修飾的功能性外源受體陽性的。

【0332】 可接受的載劑、賦形劑或穩定劑在所用的劑量和濃度下對接受者無毒，並且包括緩衝液、抗氧化劑（包括抗壞血酸、甲硫胺酸、維生素E、焦亞硫酸鈉）、防腐劑、等滲劑、穩定劑、金屬絡合物（例如Zn-蛋白質絡合物）、螯合劑（如EDTA）和/或非離子表面活性劑。

【0333】 緩衝液用於將pH控制在優化治療有效性的範圍內，尤其在穩定性是pH依賴性的情況下。緩衝液較佳以在約50 mM至約250 mM範圍內的濃度存在。用於本發明的合適的緩衝劑包括有機酸和無機酸及其鹽。例如，檸檬酸鹽、磷酸鹽、琥珀酸鹽、酒石酸鹽、

富馬酸鹽、葡糖酸鹽、草酸鹽、乳酸鹽、乙酸鹽。另外，緩衝液可以包含組胺酸和三甲胺鹽如Tris。

【0334】 添加防腐劑以延緩微生物生長，並且通常以0.2%-1.0%（w/v）的範圍存在。用於本發明的合適防腐劑包括十八烷基二甲基苄基氯化銨；六甲氯銨；苯紮鹵銨（例如，苯紮氯銨、苯紮溴銨、苯紮碘銨）、苄索氯銨；硫柳汞、苯酚、丁基或苄基醇；對羥基苯甲酸烷基酯，如對羥基苯甲酸甲酯或對羥基苯甲酸丙酯；鄰苯二酚；間苯二酚；環己醇、3-戊醇和間甲酚。

【0335】 存在張力劑（有時稱為「穩定劑」），以調節或維持組合物中液體的張力。當與大的帶電生物分子（如蛋白質和抗體）一起使用時，通常將張力劑稱為「穩定劑」，因為它們可以與胺基酸側鏈的帶電基團相互作用，從而減少分子間和分子內相互作用的可能性。考慮到其他成分的相對量，張力劑可以以按重量計0.1%至25%、較佳地1%至5%之間的任何量存在。在一些實施例中，張力劑包括多元糖醇，較佳地三元糖醇或更高級糖醇，如丙三醇、赤蘚糖醇、阿拉伯糖醇、木糖醇、山梨糖醇和甘露糖醇。

【0336】 另外的賦形劑包括可以用作以下中的一種或多種的藥劑：(1) 膨脹劑，(2) 溶解度增強劑，(3) 穩定劑，以及 (4) 防止變性或粘附至容器壁的藥劑。此類賦形劑包括：多元糖醇（上文列舉的）；胺基酸，如丙胺酸、甘胺酸、麩醯胺酸、天門冬醯胺酸、組胺酸、精胺酸、離胺酸、鳥胺酸、白胺酸、2-苯丙胺酸、麩胺酸、蘇胺酸等；有機糖或糖醇，如蔗糖、乳糖、乳糖醇、海藻糖、

水蘇糖、甘露糖、山梨糖、木糖、核糖、核糖醇、肌糖、肌醇、半乳糖、半乳糖醇、甘油、環醇（例如肌醇）、聚乙二醇；含硫還原劑，如脲、谷胱甘肽、硫辛酸、硫代乙醇酸鈉、硫代甘油、α-單硫代甘油和硫代硫酸鈉；低分子量蛋白質，如人血清白蛋白、牛血清白蛋白、明膠或其他免疫球蛋白；親水性聚合物，如聚乙烯吡咯烷酮；單糖（例如，木糖、甘露糖、果糖、葡萄糖；二糖（例如，乳糖、麥芽糖、蔗糖）；三糖，如棉子糖；以及多糖，如糊精或葡聚糖。

【0337】 存在非離子表面活性劑或洗滌劑（也稱為「潤濕劑」）以幫助溶解治療劑以及保護治療性蛋白免受攪動誘導的聚集，這也允許配製品暴露於剪切表面應力而不引起活性治療蛋白或抗體的變性。非離子表面活性劑以約0.05 mg/mL至約1.0 mg/mL、較佳約0.07 mg/mL至約0.2 mg/mL的範圍存在。

【0338】 合適的非離子表面活性劑包括聚山梨醇酯（20、40、60、65、80等），泊洛沙姆（polyoxamer）（184、188等），PLURONIC®多元醇、TRITON®、聚氧乙烯脫水山梨糖醇單醚（TWEEN®-20、TWEEN®-80等）、聚桂醇400、聚烴氧40硬脂酸酯、聚氧乙烯氫化蓖麻油10、50和60、單硬脂酸甘油酯、蔗糖脂肪酸酯、甲基纖維素和羧甲基纖維素。可以使用的陰離子洗滌劑包括十二烷基硫酸鈉、二辛基磺基琥珀酸鈉和二辛基磺酸鈉。陽離子洗滌劑包括苯紮氯銨或苄索氯銨。

【0339】 為使醫藥組合物用於體內施用，其必須是無菌的。可以

通過經由無菌濾膜過濾使醫藥組合物無菌。通常將本文的醫藥組合物置入具有無菌進入口的容器中，所述容器例如靜脈溶液袋或具有可由皮下注射針刺穿的塞子的小瓶。

【0340】 施用途徑是根據已知且公認的方法，如通過單次或多次推注或以合適的方式長時間輸注，例如，通過皮下、靜脈內、腹膜內、肌內、動脈內、病灶內或關節內途徑注射或輸注，或者通過持續釋放或延長釋放的方式。

【0341】 可以製備持續釋放製劑。持續釋放製劑的合適的例子包括含有拮抗劑的固體疏水聚合物的半滲透性基質，所述基質呈成型製品的形式，例如薄膜或微膠囊。持續釋放基質的例子包括聚酯、水凝膠（例如，聚(2-羥乙基-甲基丙烯酸酯)或聚(乙烯醇)）、聚交酯（美國專利號3,773,919）、L-麩胺酸與L-麩胺酸乙酯的共聚物、不可降解的乙烯-乙酸乙烯酯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物如LUPRON DEPOT™（由乳酸-乙醇酸共聚物和醋酸亮丙瑞林構成的可注射微球）和聚-D-(-)-3-羥基丁酸。

【0342】 本文所述的醫藥組合物還可以含有多於一種所治療的特定適應症所需的活性化合物或藥劑，較佳地具有互補活性且不會彼此不利影響的那些。可替代地或另外地，組合物可以包含細胞毒性劑、化學治療劑、細胞因數、免疫抑制劑、免疫檢查點調節劑或生長抑制劑。此類分子以對於預期目的有效的量以合適的方式組合存在。

【0343】 活性成分也可以包埋在例如通過凝聚技術或通過介面聚

合製備的微膠囊（例如，分別為羥甲基纖維素或明膠微膠囊以及聚-(甲基丙烯酸甲酯)微膠囊）中，包埋在膠體藥物遞送系統（例如，脂質體、白蛋白微球、微乳液、納米顆粒和納米膠囊）中，或包埋在粗乳液中。此類技術披露於*Remington's Pharmaceutical Sciences* 第18版中。

【0344】 VIII. 治療方法

【0345】 本申請案還提供治療個體（例如，人）的疾病（如癌症、感染性疾病、GvHD、移植排斥、自身免疫障礙或輻射病）的方法，所述方法包括向個體施用有效量的修飾的T細胞（例如，同種異體T細胞、內源TCR缺陷性T細胞、GvHD最小化的T細胞或自體T細胞）或其醫藥組合物，所述修飾的T細胞表現本文所述的包含CMSD的功能性外源受體（例如，ITAM修飾的CAR、ITAM修飾的TCR、ITAM修飾的cTCR、或ITAM修飾的TAC樣嵌合受體）。在一些實施例中，修飾的T細胞還表現外源Nef蛋白（例如，wt、亞型或突變體Nef），如包含SEQ ID NO: 121、122、136或139的胺基酸序列的外源Nef蛋白。本申請案還提供治療個體（例如，人）的疾病（如癌症、感染性疾病、自身免疫障礙、或輻射病）的方法，所述方法包括向個體施用有效量的修飾的T細胞（例如，同種異體或自體T細胞）或其醫藥組合物，所述修飾的T細胞表現本文所述的包含CMSD的功能性外源受體。在一些實施例中，修飾的T細胞表現ITAM修飾的CAR，例如，ITAM修飾的CD20 CAR（例如，包含SEQ ID NO: 98-104中任一個的序列），或ITAM修飾的BCMA CAR（例

如，包含SEQ ID NO: 76-96和106-113中任一個的序列）。

【0346】 本文所述的方法適合於治療各種癌症，包括實體癌和液體癌二者。所述方法適用於所有時期的癌症，包括早期、晚期和轉移癌症。本文所述的方法可以在輔助環境或新輔助環境中，用作第一療法、第二療法、第三療法、或與業內已知的其他類型的癌症療法的組合療法，所述其他類型的癌症療法如化學療法、手術、輻射、基因療法、免疫療法、骨髓移植、幹細胞移植、靶向療法、冷凍療法、超聲療法、光動力療法、射頻消融等。

【0347】 在一些實施例中，本文所述方法適合於治療選自以下的實體癌：結腸癌、直腸癌、腎細胞癌、肝癌、非小細胞肺癌、小腸癌、食管癌、黑色素瘤、骨癌、胰腺癌、皮膚癌、頭頸癌、皮膚或眼內惡性黑色素瘤、子宮癌、卵巢癌、直腸癌、肛區癌、胃癌、睾丸癌、子宮癌、輸卵管癌、子宮內膜癌、宮頸癌、陰道癌、外陰癌、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤、內分泌系統癌症、甲狀腺癌、甲狀旁腺癌、腎上腺癌、軟組織肉瘤、尿道癌、陰莖癌、兒童實體瘤、膀胱癌、腎或輸尿管癌、腎盂癌、中樞神經系統（CNS）腫瘤、原發性CNS淋巴瘤、腫瘤血管發生、脊軸腫瘤、腦幹神經膠質瘤、垂體腺瘤、卡波西肉瘤、表皮樣癌、鱗狀細胞癌、T細胞淋巴瘤、環境誘發的癌症、所述癌症的組合、以及所述癌症的轉移病灶。

【0348】 在一些實施例中，本文所述方法適合於治療選自以下中的一種或多種的血液癌症：慢性淋巴細胞白血病（CLL）、急性白

血病、急性淋巴樣白血病（ALL）、B細胞急性淋巴樣白血病（B-ALL）、T細胞急性淋巴樣白血病（T-ALL）、慢性髓性白血病（CML）、B細胞幼淋巴細胞白血病、母細胞性漿細胞樣樹突細胞腫瘤、伯基特淋巴瘤、彌漫大B細胞淋巴瘤、濾泡性淋巴瘤、多毛細胞白血病、小細胞濾泡性淋巴瘤或大細胞濾泡性淋巴瘤、惡性淋巴組織增生病症、MALT淋巴瘤、套細胞淋巴瘤、邊緣區淋巴瘤、多發性骨髓瘤、脊髓發育不良和骨髓增生異常症候群、非霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、漿母細胞淋巴瘤、漿細胞樣樹突細胞腫瘤、華氏巨球蛋白血症或白血病前期。

【0349】 在一些實施例中，癌症是多發性骨髓瘤。在一些實施例中，基於Durie-Salmon分期系統，癌症是I期、II期或III期和/或A期或B期多發性骨髓瘤。在一些實施例中，基於由國際骨髓瘤工作組（IMWG）公佈的國際分期系統，癌症是I期、II期或III期多發性骨髓瘤。在一些實施例中，癌症是意義未明的單株丙球蛋白病（MGUS）。在一些實施例中，癌症是無症狀性（冒煙型/惰性）骨髓瘤。在一些實施例中，癌症是症狀性或活動型骨髓瘤。在一些實施例中，癌症是難治性多發性骨髓瘤。在一些實施例中，癌症是轉移性多發性骨髓瘤。在一些實施例中，個體對針對多發性骨髓瘤的先前治療沒有反應。在一些實施例中，個體在多發性骨髓瘤的先前治療後具有疾病進展。在一些實施例中，個體先前已經接受至少約2、3、4或更多次中的任一個的多發性骨髓瘤的治療。在一些實施例中，癌症是復發性多發性骨髓瘤。

【0350】 在一些實施例中，個體患有活動型多發性骨髓瘤。在一些實施例中，個體具有至少10%的克隆骨髓漿細胞。在一些實施例中，個體患有活檢證實的骨性或髓外漿細胞瘤。在一些實施例中，個體具有可以歸因於潛在的漿細胞增殖障礙的終末器官損傷的證據。在一些實施例中，個體患有高鈣血症，例如，血鈣比正常值上限高> 0.25 mmol/L（> 1 mg/dL），或者> 2.75 mmol/L（> 11 mg/dL）。在一些實施例中，個體患有腎功能不全，例如，肌酸酐清除率< 40 mL/分鐘，或血清肌酸酐> 177 mol/L（> 2 mg/dL）。在一些實施例中，個體患有貧血，例如，血紅蛋白值比正常值下限低>20 g/L，或者血紅蛋白值< 100 g/L。在一些實施例中，個體具有一個或多個骨病灶，例如，骨骼放射攝影術、CT或PET/CT上的一個或多個溶骨性病灶。在一些實施例中，個體具有以下惡性腫瘤生物標記（MDE）中的一種或多種：(1) 骨髓檢查上60%或更多的克隆漿細胞；(2) 100或更大的血清受累/未受累遊離輕鏈比率，前提是受累輕鏈的絕對水準為至少100 mg/L；以及 (3) MRI上大小為至少5 mm或更大的多於一個局部病灶。

【0351】 在一些實施例中，本文所述方法適合於治療自身免疫疾病。自身免疫疾病或自身免疫是生物體未能將其自身組成部分（下至亞分子水準）識別為「自身的」，從而產生針對其自身細胞和組織的免疫反應。由這種異常免疫反應引發的任何疾病被稱為自身免疫疾病。重要的例子包括腹腔病、1型糖尿病（IDDM）、系統性紅斑狼瘡（SLE）、舍葛蘭症候群、多發性硬化症（MS）、橋本甲

狀腺炎、格雷夫斯病、特發性血小板減少性紫癜和類風濕性關節炎（RA）。

【0352】 炎性疾病一般用皮質類固醇和可能毒性極高的細胞毒性藥物治療。這些藥物也抑制整個免疫系統，可能導致嚴重感染，並且對骨髓、肝臟和腎臟具有不良影響。已經用於治療III類自身免疫疾病的其他治療藥迄今已經指向T細胞和巨噬細胞。存在對治療自身免疫疾病、特別是III類自身免疫疾病的更有效方法的需要。在一些實施例中，本文所述方法適合於治療炎性疾病，包括自身免疫疾病，其也是一類與B細胞障礙相關的疾病。自身免疫疾病的例子包括但不限於急性特發性血小板減少性紫癜、慢性特發性血小板減少性紫癜、皮肌炎、西登哈姆舞蹈病、重症肌無力、系統性紅斑狼瘡、狼瘡性腎炎、風濕熱、多腺性症候群、大皰性類天皰瘡、糖尿病、亨-舍二氏紫癜、鏈球菌感染後腎炎、結節性紅斑、高安動脈炎、艾迪生病、類風濕性關節炎、多發性硬化症、結節病、潰瘍性結腸炎、多形紅斑、IgA腎病、結節性多動脈炎、強直性脊柱炎、肺出血腎炎症候群、閉塞性血栓性血管炎。舍葛籣症候群、原發性膽汁性肝硬化、橋本甲狀腺炎、甲狀腺毒症、硬皮病、慢性活動型肝炎、多發性肌炎/皮肌炎、多軟骨炎、尋常天皰瘡、韋格納肉芽腫病、膜性腎病、肌萎縮側索硬化、脊髓癆、巨細胞動脈炎/多肌痛、惡性貧血、急進性腎小球腎炎、銀屑病和纖維化肺泡炎。

【0353】 醫藥組合物的施用可以以任何便捷的方式來進行，包括

通過注射、輸液、植入或移植。可以將組合物經動脈、皮下、皮內、腫瘤內、結內、髓內、肌內、靜脈內或腹膜內施用患者。在一些實施例中，醫藥組合物是全身施用的。在一些實施例中，通過輸注（如靜脈內輸注）將醫藥組合物施用個體。用於免疫療法的輸注技術是業內已知的（參見例如，Rosenberg等人, New Eng. J. of Med. 319: 1676 (1988)）。在一些實施例中，通過皮內或皮下注射將醫藥組合物施用個體。在一些實施例中，通過靜脈內注射施用組合物。在一些實施例中，將組合物直接注射至腫瘤或淋巴結中。在一些實施例中，將醫藥組合物局部施用腫瘤部位，如直接施用至腫瘤細胞中，或施用至具有腫瘤細胞的組織中。

【0354】 本發明的醫藥組合物的劑量和所需藥物濃度可以根據設想的具體用途而變化。一般技術者可以熟練地確定適當劑量或施用途徑。動物實驗為用於人類療法的有效劑量的確定提供了可靠的指導。有效劑量的種間縮放可以按照以下文獻中說明的原則來進行：Mordenti, J.和Chappell, W. 「The Use of Interspecies Scaling in Toxicokinetics,」 *Toxicokinetics and New Drug Development*, Yacobi等人編輯, Pergamon Press，紐約 1989, 第42-46頁。在本申請案的範圍內，不同配製品將對於不同的治療和不同的障礙有效，並且意圖治療特定器官或組織的施用可能使得需要以與遞送至另一器官或組織的方式不同的方式來遞送。

【0355】 在一些實施例中，對於包含表現本文所述的包含CMSD的功能性外源受體（例如，ITAM修飾的CAR、ITAM修飾的TCR、

ITAM修飾的cTCR、或ITAM修飾的TAC樣嵌合受體）的修飾的T細胞的群體的醫藥組合物，醫藥組合物是以至少約10^4、10^5、10^6、10^7、10^8或10^9個細胞/kg個體體重中任一個的劑量來施用。在一些實施例中，醫藥組合物是以以下中任一個的劑量來施用：約10^4至約10^5、約10^5至約10^6、約10^6至約10^7、約10^7至約10^8、約10^8至約10^9、約10^4至約10^9、約10^4至約10^6、約10^6至約10^8、或約10^5至約10^7個細胞/kg個體體重。在一些實施例中，醫藥組合物是以至少約以下中任一個的劑量來施用：1×10^5、2×10^5、3×10^5、4×10^5、5×10^5、6×10^5、7×10^5、8×10^5、9×10^5、1×10^6、2×10^6、3×10^6、4×10^6、5×10^6、6×10^6、7×10^6、8×10^6、9×10^6、1×10^7個細胞/kg或更多。在一些實施例中，醫藥組合物是以約3×10^5至約7×10^6個細胞/kg、或約3×10^6個細胞/kg的劑量來施用。

【0356】 在一些實施例中，單次施用醫藥組合物。在一些實施例中，多次（如2次、3次、4次、5次、6次或更多次中的任一個）施用醫藥組合物。在一些實施例中，每週一次、2週一次、3週一次、4週一次、每個月一次、每2個月一次、每3個月一次、每4個月一次、每5個月一次、每6個月一次、每7個月一次、每8個月一次、每9個月一次、或每年一次施用醫藥組合物。在一些實施例中，施用之間的間隔為約1周至2周、2周至1個月、2周至2個月、1個月至2個月、1個月至3個月、3個月至6個月、或6個月至1年中的任一個。醫學領域技術人員可以通過監測患者的疾病體征並相應地調整治療容易地確定用於特定患者的最佳劑量和治療方案。

【0357】 此外，劑量可以通過一個或多個分開施用或通過連續輸注來施用。在一些實施例中，醫藥組合物是以分割劑量來施用，如約2、3、4、5或更多個劑量中的任一個。在一些實施例中，分割劑量是在約一周內施用。在一些實施例中，將劑量等分。在一些實施例中，分割劑量是總劑量的約20%、約30%、約40%或約50%。在一些實施例中，相鄰分割劑量之間的間隔為約1天、2天、3天或更長時間。對於在幾天或更長時間內的重複施用，根據病症，治療持續至出現對疾病症狀的所需抑制為止。然而，其他劑量方案可能是有用的。通過常規技術和測定可以容易地監測此療法的進展。

【0358】 在一些實施例中，提供治療患有疾病（例如，癌症、感染性疾病、GvHD、移植排斥、自身免疫障礙或輻射病）的個體（例如，人）的方法，所述方法包括向個體施用有效量的醫藥組合物，所述醫藥組合物包含：(1) 修飾的T細胞（例如，同種異體T細胞、內源TCR缺陷性T細胞、GvHD最小化的T細胞），所述修飾的T細胞包含功能性外源受體（例如，ITAM修飾的CAR、ITAM修飾的TCR、ITAM修飾的cTCR、或ITAM修飾的TAC樣嵌合受體），所述功能性外源受體包含：(a) 細胞外配體結合結構域（如特異性識別一種或多種靶抗原（例如，腫瘤抗原，如BCMA、CD19、CD20）的一個或多個表位的抗原結合片段（例如，scFv、sdAb）、受體（例如，FcR）的細胞外結構域（或其部分）、配體（例如，APRIL、BAFF）的細胞外結構域（或其部分）），(b) 跨膜結構域（例如，源自

CD8α），以及 (c) 包含CMSD（例如，包含選自SEQ ID NO: 41-74的序列的CMSD）的ISD，其中CMSD包含一個或多個CMSD ITAM，其中所述多個CMSD ITAM任選地通過一個或多個CMSD連接子連接；以及 (2) 任選地醫藥上可接受的載劑。在一些實施例中，修飾的T細胞還表現外源Nef蛋白（例如，wt、亞型或突變體Nef），如包含SEQ ID NO: 121、122、136或139的胺基酸序列的外源Nef蛋白。在一些實施例中，疾病是癌症。在一些實施例中，個體與衍生出修飾的T細胞的前體T細胞的供體是組織不相容的。在一些實施例中，醫藥組合物是靜脈內施用的。在一些實施例中，功能性外源受體是ITAM修飾的CAR，例如，ITAM修飾的BCMA CAR或ITAM修飾的CD20 CAR。在一些實施例中，ITAM修飾的CAR包含SEQ ID NO: 76-96、98-104和106-113中任一個的序列。

【0359】 在一些實施例中，提供治療患有疾病（例如，癌症、感染性疾病、自身免疫障礙或輻射病）的個體（例如，人）的方法，所述方法包括向個體施用有效量的醫藥組合物，所述醫藥組合物包含：(1) 表現功能性外源受體（例如，ITAM修飾的CAR、ITAM修飾的TCR、ITAM修飾的cTCR或ITAM修飾的TAC樣嵌合受體）的修飾的T細胞（例如，同種異體或自體T細胞），所述功能性外源受體包含：(a) 細胞外配體結合結構域（如特異性識別一種或多種靶抗原（例如，腫瘤抗原，如BCMA、CD19、CD20）的一個或多個表位的抗原結合片段（例如，scFv、sdAb）、受體（例如，FcR）的細胞外結構域（或其部分）、配體（例如，APRIL、BAFF）的細

胞外結構域（或其部分）），(b) 跨膜結構域（例如，源自CD8α），以及 (c) 包含CMSD（例如，包含選自SEQ ID NO: 41-74的序列的CMSD）的ISD，其中所述CMSD包含一個或多個CMSD ITAM，其中所述多個CMSD ITAM任選地通過一個或多個CMSD連接子連接；以及 (2) 任選地醫藥上可接受的載劑。在一些實施例中，疾病是癌症。在一些實施例中，個體與衍生出修飾的T細胞的前體T細胞的供體是組織不相容的。在一些實施例中，醫藥組合物是靜脈內施用的。在一些實施例中，功能性外源受體是ITAM修飾的CAR，如本文所述的任何ITAM修飾的CAR，例如，ITAM修飾的BCMA CAR或ITAM修飾的CD20 CAR。在一些實施例中，ITAM修飾的CAR包含SEQ ID NO: 76-96、98-104和106-113中任一個的胺基酸序列。

【0360】 在一些實施例中，疾病是癌症。在一些實施例中，癌症是多發性骨髓瘤，如復發性或難治性多發性骨髓瘤。在一些實施例中，治療效果包括在個體中引起客觀的臨床反應。在一些實施例中，在個體中獲得嚴格臨床反應（sCR）。在一些實施例中，治療效果包括在個體中引起疾病緩解（部分或完全）。在一些中，臨床緩解是在個體接受醫藥組合物後不超過約6個月、5個月、4個月、3個月、2個月、1個月或更短時間中的任一個之後獲得的。在一些實施例中，治療效果包括在個體中預防癌症的復發或疾病進展。在一些實施例中，預防復發或疾病進展持續至少約6個月、1年、2年、3年、4年、5年或更長時間。在一些實施例中，治療效

果包括延長個體的存活（如無疾病存活）。在一些實施例中，治療效果包括改進個體的生活品質。在一些實施例中，治療效果包括抑制實體瘤或淋巴瘤的生長或減小其大小。

【0361】 在一些實施例中，使實體瘤或淋巴瘤的大小減小至少約10%（包括例如至少約20%、30%、40%、60%、70%、80%、90%或100%中的任一個）。在一些實施例中，提供在個體中抑制實體瘤或淋巴瘤的生長或減小其大小的方法。在一些實施例中，治療效果包括在個體中抑制腫瘤轉移。在一些實施例中，至少約10%（包括例如至少約20%、30%、40%、60%、70%、80%、90%或100%中的任一個）轉移被抑制。在一些實施例中，提供抑制轉移至淋巴結的方法。在一些實施例中，提供抑制轉移至肺的方法。在一些實施例中，提供抑制轉移至肝的方法。轉移可以通過業內任何已知的方法來評估，如通過血液測試、骨掃描、x射線掃描、CT掃描、PET掃描和活檢。

【0362】 本發明還涉及降低或改善或者預防或治療疾病和障礙的方法，所述方法使用表現本文所述的包含CMSD的功能性外源受體（例如，ITAM修飾的CAR、ITAM修飾的TCR、ITAM修飾的cTCR、或ITAM修飾的TAC樣嵌合受體）的修飾的T細胞（例如，同種異體或自體T細胞）、其分離的群體、或包含其的醫藥組合物。在一些實施例中，修飾的T細胞還表現外源Nef蛋白（例如，wt、亞型或突變體Nef）。在一些實施例中，使用表現本文所述的包含CMSD的功能性外源受體的修飾的T細胞（例如，同種異體或自體T細

胞）、其分離的群體、或包含其的醫藥組合物來降低或改善或者預防或治療癌症、感染、一種或多種自身免疫障礙、輻射病，或者在經歷移植手術的受試者中預防或治療移植物抗宿主病（GvHD）或移植排斥。

【0363】 表現本文所述的包含CMSD的功能性外源受體（例如，ITAM修飾的CAR、ITAM修飾的TCR、ITAM修飾的cTCR、或ITAM修飾的TAC樣嵌合受體）的修飾的T細胞（例如，同種異體或自體T細胞）、其分離的群體、或包含其的醫藥組合物可用於改變自身免疫或移植排斥，因為這些T細胞可以在發育期間在TGF-β中生長並且將分化以變為誘導的T調節細胞。在一個實施例中，使用本文所述的包含CMSD的功能性外源受體給予這些誘導的T調節細胞以其在疾病組織部位執行其抑制功能所需的功能特異性。因此，使大量抗原特異性調節性T細胞生長用於患者中。可以通過流式細胞術分析T調節細胞分化必需的FoxP3的表現，並且這些T調節細胞對T細胞增殖的功能抑制可以通過檢查共培養時抗CD3刺激後T細胞增殖的減少來分析。在一些實施例中，修飾的T細胞還表現外源Nef蛋白。

【0364】 本發明的另一實施例涉及表現本文所述的包含CMSD的功能性外源受體（例如，ITAM修飾的CAR、ITAM修飾的TCR、ITAM修飾的cTCR、或ITAM修飾的TAC樣嵌合受體）的修飾的T細胞（例如，同種異體或自體T細胞）、其分離的群體、或包含其的醫藥組合物用於預防或治療輻射病的用途。在輻射治療或暴露（例如，

髒彈暴露、輻射洩漏）或清除骨髓細胞的其他條件（某些藥物療法）後的一個挑戰是重構造血系統。在經歷骨髓移植的患者中，在移植後第15天的絕對淋巴細胞計數與成功的結果相關。那些具有高淋巴細胞計數的患者重構良好，因此具有良好的淋巴細胞重構是重要的。這種效應的原因不明，但可能是由於防止淋巴細胞感染和/或有利於造血重構的生長因數的產生所致。在一些實施例中，修飾的T細胞還表現外源Nef蛋白。

【0365】 在一些實施例中，本發明還提供在個體中增加供體T細胞的持久性和/或植入的方法，所述方法包括1) 提供同種異體T細胞；以及2) 向同種異體T細胞中引入編碼TCR和/或MHC I下調分子（如外源Nef蛋白（例如，野生型Nef如野生型SIV Nef，或突變體Nef如突變體SIV Nef））的第一核酸，其中所述TCR和/或MHC I下調分子（如外源Nef蛋白）在表現後導致同種異體T細胞的內源TCR、CD3和/或MHC I的下調（例如，下調細胞表面表現和/或效應子功能，如信號轉導）。在一些實施例中，同種異體T細胞是同種異體ITAM修飾的CAR-T細胞、ITAM修飾的TCR-T細胞、ITAM修飾的cTCR-T細胞或ITAM修飾的TAC樣T細胞。在一些實施例中，所述方法還包括向同種異體T細胞中引入編碼本文所述的包含CMSD的功能性外源受體的第二核酸。在一些實施例中，第二核酸編碼ITAM修飾的CAR。在一些實施例中，第一核酸和第二核酸在分開的載體上。在一些實施例中，第一核酸和第二核酸在相同載體上，在一種啟動子或不同啟動子的控制下。因此，在一些實施

例中，本發明提供在個體（例如，人）中增加供體T細胞的持久性和/或植入的方法，所述方法包括1) 提供同種異體T細胞；以及2)向同種異體T細胞中引入載體（例如，病毒載體，慢病毒載體），所述載體包含編碼TCR和/或MHC I下調分子（如外源Nef蛋白（例如，野生型Nef如野生型SIV Nef，或突變體Nef如突變體SIV Nef））的第一核酸和編碼含有CMSD的功能性外源受體（例如，ITAM修飾的CAR、ITAM修飾的TCR、ITAM修飾的cTCR、或ITAM修飾的TAC樣嵌合受體）的第二核酸；其中所述外源Nef蛋白在表現後導致同種異體T細胞的內源TCR、CD3和/或MHC I的下調（例如，下調細胞表面表現和/或效應子功能，如信號轉導）。在一些實施例中，外源Nef蛋白在表現後將內源TCR（例如，TCRα和/或TCRβ）、CD3ε/δ/γ和/或MHC I下調（例如，下調細胞表面表現和/或效應子功能）至少約40%（如至少約50%、60%、70%、80%、90%或95%中的任一個）。在一些實施例中，如與不具有Nef表現的相同的同種異體T細胞引發的GvHD反應相比，在組織不相容個體中，包含本文所述的外源Nef蛋白的同種異體T細胞不引發或引發降低（如降低至少約30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%中的任一個）的GvHD反應。在一些實施例中，外源Nef包含SEQ ID NO: 121、122、136或139的胺基酸序列。

【0366】 在一些實施例中，本發明還提供在接受同種異體T細胞移植物但沒有誘導GvHD或移植排斥的個體中治療疾病（如癌症、感染性疾病、自身免疫障礙或輻射病）的方法，所述方法包括向同

種異體T細胞中引入編碼TCR和/或MHC I下調分子（如外源Nef蛋白（例如，野生型Nef如野生型SIV Nef，或突變體Nef如突變體SIV Nef））的第一核酸，其中所述TCR和/或MHC I下調分子（如外源Nef蛋白）在表現後導致同種異體T細胞的內源TCR、CD3和/或MHC I的下調（例如，下調細胞表面表現和/或效應子功能，如信號轉導）。在一些實施例中，同種異體T細胞是同種異體ITAM修飾的CAR-T細胞、ITAM修飾的TCR-T細胞、ITAM修飾的cTCR-T細胞或ITAM修飾的TAC樣T細胞。在一些實施例中，所述方法還包括向同種異體T細胞中引入編碼本文所述的包含CMSD的功能性外源受體的第二核酸。在一些實施例中，第二核酸編碼ITAM修飾的CAR，例如，ITAM修飾的BCMA CAR或ITAM修飾的CD20 CAR。在一些實施例中，外源Nef蛋白在表現後將內源TCR（例如，TCRα和/或TCRβ）、CD3ε/δ/γ和/或MHC I下調（例如，下調細胞表面表現和/或效應子功能）至少約40%（如至少約50%、60%、70%、80%、90%或95%中的任一個）。在一些實施例中，外源Nef包含SEQ ID NO: 121、122、136或139的胺基酸序列。

【0367】 在一些實施例中，本發明還提供降低同種異體ITAM修飾的CAR-T細胞的GvHD或移植排斥的方法，所述方法包括向同種異體ITAM修飾的CAR-T細胞中引入編碼TCR和/或MHC I下調分子（如外源Nef蛋白（例如，野生型Nef如野生型SIV Nef，或突變體Nef如突變體SIV Nef））的核酸，其中所述TCR和/或MHC I下調分子（如外源Nef蛋白）在表現後導致同種異體ITAM修飾的CAR-T

細胞的內源TCR、CD3和/或MHC I的下調（例如，下調細胞表面表現和/或效應子功能，如信號轉導）。在一些實施例中，TCR和/或MHC I下調分子（如外源Nef蛋白（例如，野生型Nef如野生型SIV Nef，或突變體Nef如突變體SIV Nef））在表現後將內源TCR（例如，TCRα和/或TCRβ）、CD3和/或MHC I下調（例如，下調細胞表面表現和/或效應子功能）至少約40%（如至少約50%、60%、70%、80%、90%或95%中的任一個）。在一些實施例中，TCR和/或MHC I下調分子（如外源Nef蛋白（例如，野生型Nef如野生型SIV Nef，或突變體Nef如突變體SIV Nef））在表現後不下調ITAM修飾的CAR（例如，下調細胞表面表現和/或效應子功能），或者將ITAM修飾的CAR下調至多約80%（如至多約70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%或5%中的任一個）。在一些實施例中，外源Nef包含SEQ ID NO: 121、122、136或139的胺基酸序列。在一些實施例中，如與來自相同供體來源但不具有Nef表現的同種異體ITAM修飾的T細胞引發的GvHD反應相比，在組織不相容個體中，包含本文所述的外源Nef蛋白的同種異體ITAM修飾的T細胞不引發或引發降低（如降低至少約30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%中的任一個）的GvHD反應。

【0368】 **IX.套組和製品**

【0369】 進一步提供套組、單位劑量和製品，其包含任一種修飾的T細胞（例如，同種異體或自體T細胞），所述修飾的T細胞表現本文所述的包含CMSD的功能性外源受體（例如，ITAM修飾的

CAR、ITAM修飾的TCR、ITAM修飾的cTCR、或ITAM修飾的TAC樣嵌合受體）。在一些實施例中，提供套組，其含有本文所述的任一種醫藥組合物，並且較佳地提供其使用說明書。

【0370】 本申請案的套組處於合適的包裝中。合適的包裝包括但不限於小瓶、瓶子、廣口瓶、軟包裝（例如，密封的Mylar或塑膠袋）等。套組可以任選地提供另外的組分，如緩衝液和解釋性資訊。因此，本申請案還提供製品，其包括小瓶（如密封的小瓶）、瓶子、廣口瓶、軟包裝等。

【0371】 製品可以包含容器以及在容器上或與容器相關聯的標籤或包裝說明書。合適的容器包括例如瓶子、小瓶、注射器等。容器可以由多種材料如玻璃或塑膠形成。通常，容器容納對於治療如本文所述的疾病或障礙（如癌症、自身免疫疾病或感染性疾病）或者在治療疾病或障礙時降低/預防GvHD或移植排斥有效的組合物，並且可以具有無菌進入口（例如，容器可以是靜脈溶液袋或具有可由皮下注射針刺穿的塞子的小瓶）。標籤或包裝說明書指示使用組合物來治療個體的特定病症。標籤或包裝說明書將進一步包含將組合物施用個體的說明書。標籤可以指示重構和/或使用的指導。容納醫藥組合物的容器可以是多次使用的小瓶，其允許重構的配製品的重複施用（例如，2-6次施用）。包裝說明書是指在治療產品的商業包裝中常規包括的說明書，其含有關於使用此類治療產品的適應症、用法、劑量、施用、禁忌症和/或警告的資訊。另外，製品還可以包含第二容器，其包含藥學上可接受的緩衝液，

如抑菌性注射用水（BWFI）、磷酸鹽緩衝鹽水、林格氏溶液和右旋糖溶液。其還可以包括從商業和使用者的角度來看所需的其他材料，包括其他緩衝液、稀釋劑、篩檢程式、針和注射器。套組或製品可以包括多個單位劑量的醫藥組合物和使用說明書，其包裝量足以在藥房（例如，醫院藥房和配藥藥房）中儲存和使用。

【0372】 實例

【0373】 下文的實例和示例性實施例意圖僅是本發明的示例，並且因此不應認為其以任何方式限制本發明。以下實例和詳細描述是以說明而不是限制的方式來提供。

【0374】 實例1.CMSD ITAM啟動活性的評價

【0375】 ***1. ISD修飾的BCMA CAR的構建***

【0376】 為了測試含有各種細胞內信號傳導結構域（ISD）的CAR的啟動活性，構建ISD修飾的CAR。「ISD修飾的CAR」在本文中用於描述在ISD中具有任何修飾的CAR，其並不一定是本文所述的ITAM修飾的CAR。例如，表1中的構建體都是「ISD修飾的CAR」，但是只有M663、M665、M666、M667、M678、M679、M680、M681、M682、M683、M684、M685和M799是本文所述的「ITAM修飾的CAR」。

【0377】 pLVX-Puro（Clontech，#632164）是基於HIV-1的慢病毒表現載體，其包含位於緊鄰多株位點（MCS）上游的組成型活性人巨細胞病毒立即早期啟動子（$P_{CMV\ IE}$）。通過以下方式產生自製

慢病毒載體：用在C末端攜載*EcoR*I和*Cla*I限制性位點的人延長因數 1α（hEF1α）啟動子序列替代pLVX-Puro的初始$P_{CMV\ IE}$啟動子，下文稱為「pLVX-hEF1α-Puro慢病毒載體」。簡單來說，化學合成編碼具有如表1中所示的各種ISD結構的CD8α SP-BCMA scFv-CD8α鉸鏈-CD8α TM-ISD的多核苷酸以及編碼對照構建體CD8α SP-BCMA scFv-CD8α鉸鏈-CD8α TM-CD3ζ（「M660」）和CD8α SP-BCMA scFv-CD8α鉸鏈-CD8α TM-4-1BB-連接子2-4-1BB-連接子2-4-1BB（「M661」）的多核苷酸（相應ISD修飾的CAR構建體名稱參見表1），並將其分別克隆至pLVX-hEF1α-Puro慢病毒載體中，用於構建ISD修飾的CAR重組轉移質體。然後使這些轉移質體分別經歷下文的慢病毒包裝程式。

【0378】 將含有psPAX2（包裝；Addgene，#12260）和pMD2.G（包膜；Addgene，#12259）的慢病毒包裝質體混合物分別與上文ISD修飾的CAR轉移質體預混合，在室溫下孵育，然後分別轉導至HEK 293T細胞中。轉導後60小時，通過將細胞轉導混合物在4°C以3000 rpm離心5 min來收集含有慢病毒的上清液。使用0.45 μm篩檢程式過濾上清液，並使用500 KD中空纖維膜切向流過濾進一步濃縮，以獲得濃縮的慢病毒。將這些濃縮的慢病毒儲存在-80°C下，下文稱為M660慢病毒（對照）、M661慢病毒、M662慢病毒、M663慢病毒、M665慢病毒、M666慢病毒、M667慢病毒、M678慢病毒、M679慢病毒、M680慢病毒、M681慢病毒、M682慢病毒、M683慢病毒、M684慢病毒、M685慢病毒和M799慢病毒；或統稱為ISD

修飾的CAR慢病毒。

【0379】 在90% RPMI 1640培養基（Life Technologies，#22400-089）和10%胎牛血清（FBS，Life Technologies，#10099-141）中培養Jurkat細胞（ATCC®，#TIB152™）。將來自上文的ISD修飾的CAR慢病毒分別添加至Jurkat細胞培養上清液中用於轉導（下文稱為Jurkat-ISD修飾的CAR）。轉導後72小時，使用1 μg/mL嘌呤黴素選擇陽性細胞克隆，持續2周。

【0380】 表1.ISD修飾的CAR的細胞內信號傳導結構域結構

CAR構建體	**細胞內信號傳導結構域(ISD)構建體結構**	**ISD胺基酸序列**
M660 (對照)	CD3ζ	SEQ ID NO: 7
M661 (對照)	4-1BB-連接子2-4-1BB-連接子2-4-1BB	SEQ ID NO:137
M662	(CD3ζ細胞內信號傳導結構域，不具有3個ITAM和終止密碼子)-連接子2-(CD3ζ細胞內信號傳導結構域，不具有3個ITAM和終止密碼子)	SEQ ID NO: 40
M663	連接子6-CD3ζ ITAM1-連接子1-CD3ζ ITAM2-連接子7-CD3ζ ITAM3-連接子2	SEQ ID NO: 41
M665	連接子6-CD3ζ ITAM1-連接子1-CD3ζ ITAM1-連接子7-CD3ζ ITAM1-連接子2	SEQ ID NO: 42
M666	連接子6-CD3ζ ITAM2-連接子1-CD3ζ ITAM2-連接子7-CD3ζ ITAM2-連接子2	SEQ ID NO: 43
M667	連接子6-CD3ζ ITAM3-連接子1-CD3ζ ITAM3-連接子7-CD3ζ ITAM3-連接子2	SEQ ID NO: 44
M678	連接子6-CD3δ ITAM-連接子1-CD3δ ITAM-連接子7-CD3δ ITAM-連接子2	SEQ ID NO: 45
M679	連接子6-CD3ε ITAM-連接子1-CD3ε ITAM-連接子7-CD3ε ITAM-連接子2	SEQ ID NO: 46
M680	連接子6-CD3γ ITAM-連接子1-CD3γ ITAM-連接子7-CD3γ ITAM-連接子2	SEQ ID NO: 47
M681	連接子6-DAP12 ITAM-連接子1-DAP12 ITAM-連接子7-DAP12 ITAM-連接子2	SEQ ID NO: 48
M682	連接子6-Igα ITAM-連接子1-Igα ITAM-連接子7-Igα ITAM-連接子2	SEQ ID NO: 49

CAR 構建體	**細胞內信號傳導結構域(ISD)構建體結構**	**ISD胺基酸序列**
M683	連接子6-Igβ ITAM-連接子1-Igβ ITAM-連接子7-Igβ ITAM-連接子2	SEQ ID NO: 50
M684	連接子6-FcεRIβ ITAM-連接子1-FcεRIβ ITAM-連接子7-FcεRIβ ITAM-連接子2	SEQ ID NO: 51
M685	連接子6-FcεRIγ ITAM-連接子1-FcεRIγ ITAM-連接子7-FcεRIγ ITAM-連接子2	SEQ ID NO: 52
M799	連接子6-CNAIP/NFAM1 ITAM-連接子1-CNAIP/NFAM1 ITAM-連接子7-CNAIP/NFAM1 ITAM-連接子2	SEQ ID NO: 53

【0381】 ***2. ISD修飾的BCMA CAR特異性啟動活性的評價***

【0382】 將1×10^6個本文所述的Jurkat-ISD修飾的BCMA CAR細胞分別與靶細胞株RPMI8226（具有CFSE標記）和非靶細胞株K562（具有CFSE標記）在1:1的E:T比率下混合。將混合的細胞添加至24孔板中，補充RPMI 1640培養基（含有10% FBS）至1 mL/孔的最終體積，並且在37°C、5% CO_2孵育器中孵育。收集來自每個共培養測定的樣品，以在CFSE陰性細胞中分別評估2.5小時孵育後的CD69表現、24小時孵育後的CD25表現、和144小時孵育後的HLA-DR表現。未轉導的Jurkat細胞（「Jurkat」）用作對照。

【0383】 如圖1A-圖1C中所示，Jurkat-ITAM修飾的BCMA CAR細胞中的啟動分子CD69、CD25和HLA-DR的表現在靶細胞株RPMI8226的刺激下顯著增加（$P < 0.05$）。同時，在與非靶細胞株K562共培養的Jurkat-ITAM修飾的BCMA CAR細胞中沒有檢測到CD69、CD25和HLA-DR的表現。這些資料表明，CMSD ITAM在CAR-T細胞中的佈置具有CAR介導的特異性啟動活性。

【0384】 ***3. SIV Nef或SIV Nef M116經由CD3ζ ITAM1或CD3ζ***

ITAM2影響CAR表現

【0385】 將攜載野生型SIV Nef序列、SIV Nef M116序列和空載體的慢病毒分別添加至Jurkat-ISD修飾的CAR細胞培養物的懸浮液中用於轉導。轉導後3天、6天、7天和8天，收集5×10^5個細胞並在室溫下離心，棄去上清液。用1 mL DPBS使細胞重懸，添加1 μL FITC標記的人BCMA蛋白（ACROBIOSYSTEM，#BCA-HF254-200UG）並將懸浮液在4°C下孵育30 min。在孵育後，將離心和用DPBS重懸的步驟重複兩次。然後將細胞用DPBS重懸用於FACS以檢測BCMA ISD修飾的CAR表現。將每種Jurkat-ISD修飾的CAR-SIV Nef細胞和Jurkat-ISD修飾的CAR-SIV Nef M116細胞的相對的ISD修飾的CAR表現率在同一時間點用以空載體轉導的每種對照歸一化，並且使用下式來計算：相對的ISD修飾的CAR表現（%） = [樣品（%）] / [對照（%）] × 100%。例如，在第3天「Jurkat-M661-SIV Nef」的相對的ISD修飾的CAR表現值是如下來計算：相對的ISD修飾的CAR表現（%） = [Jurkat-M661-SIV Nef（%）] / [Jurkat-M661-空載體（%）] × 100%。

【0386】 如圖1D-圖1F中所示，將每種Jurkat-ISD修飾的CAR-SIV Nef細胞（圖1E）和Jurkat-ISD修飾的CAR-SIV Nef M116細胞（圖1F）的ISD修飾的CAR陽性率在同一時間點（如攜載SIV Nef序列、SIV Nef M116序列或空載體的慢病毒的第0天、第3天、第6天、第7天和第8天轉導）用Jurkat-ISD修飾的CAR-空載體細胞的對照（圖1D）歸一化。Nef/對照慢病毒轉導後3天，與第3天的對照相比，

Jurkat-M663-SIV Nef細胞、Jurkat-M665-SIV Nef細胞和Jurkat-M666-SIV Nef細胞的ISD修飾的CAR陽性率分別下降至46.72%、82.31%和57.04%；與第3天的對照相比，Jurkat-M663-SIV Nef M116細胞、Jurkat-M665-SIV Nef M116細胞和Jurkat-M666-SIV Nef M116細胞的ISD修飾的CAR陽性率分別下降至50.92%、70.35%和56.22%；而作為對照，Jurkat-ISD修飾的CAR-空載體細胞的ISD修飾的CAR陽性率都高於95%。Nef/對照慢病毒轉導後6天、7天和8天，ISD修飾的CAR表現在每個組中變得穩定，Jurkat-M663-SIV Nef細胞、Jurkat-M665-SIV Nef細胞和Jurkat-M666-SIV Nef細胞的ISD修飾的CAR陽性率下降至41.19%-69.84%；Jurkat-M663-SIV Nef M116細胞、Jurkat-M665-SIV Nef M116細胞和Jurkat-M666-SIV Nef M116細胞的ISD修飾的CAR陽性率下降至44.65%-64.94%；而作為對照，Jurkat-ISD修飾的CAR-空載體細胞的ISD修飾的CAR陽性率仍高於95%。

【0387】 如表1中所示，M663（ITAM1/2/3）、M665（ITAM1/1/1）、M666（ITAM2/2/2）和M667（ITAM3/3/3）的ISD包含CD3ζ的ITAM，而M662（0個ITAM）的ISD僅包含CD3ζ的非ITAM序列。上文所見的SIV Nef或SIV Nef M116對M663、M665和M666而不是M662和M667的下調證實，SIV Nef和SIV Nef M116通過與CD3ζ ITAM1和CD3ζ ITAM2而不是CD3ζ ITAM3或非ITAM CD3ζ序列的相互作用調節CAR表現；此外，與CD3ζ ITAM1相比，SIV Nef和SIV Nef M116似乎與CD3ζ ITAM2具有更強的相互作用（參見CAR+率，M663 <

M666 < M665）。所測試的其他ISD不含任何CD3ζ序列，並且SIV Nef和SIV Nef M116似乎不與4-1BB共刺激結構域、CD3ε ITAM、DAP12 ITAM、Igα ITAM、Igβ ITAM或FcεRIγ ITAM相互作用（圖1D-圖1F）。

【0388】 ***4. SIV Nef和SIV Nef M116分別與CD3δ ITAM、CD3γ ITAM、FcεRIβ ITAM和CNAIP/NFAM1 ITAM之間的相互作用***

【0389】 將攜載野生型SIV Nef序列、SIV Nef M116序列和空載體的慢病毒分別添加至Jurkat-ITAM修飾的BCMA CAR（Jurkat-M663、Jurkat-M678、Jurkat-M680、Jurkat-M684和Jurkat-M799）細胞培養物的懸浮液中用於轉導。轉導後3天、6天、7天和8天，收集5×10^5個細胞並在室溫下離心，棄去上清液。用1 mL DPBS使細胞重懸，添加1 μL FITC標記的人BCMA蛋白（Biolegend，#310906）並將懸浮液在4°C下孵育30 min。在孵育後，將離心和用DPBS重懸的步驟重複兩次。然後將細胞用DPBS重懸用於FACS以檢測BCMA CAR表現。

【0390】 如圖1G-圖1I中所示，每種Jurkat-ITAM修飾的BCMA CAR細胞的ITAM修飾的BCMA CAR陽性率高於95%；在分別用SIV Nef、SIV Nef M116和空載體轉導的Jurkat-M678細胞、Jurkat-M680細胞、Jurkat-M684細胞和Jurkat-M799細胞中，沒有觀察到CAR陽性率的顯著下調（$P > 0.05$）。分別用SIV Nef和SIV Nef M116轉導的Jurkat-M663的CAR陽性率隨著孵育時間增加而顯著下調（$P < 0.05$）。這些資料表明，SIV Nef和SIV Nef M116似乎不與M678

（CD3δ ITAM）、M680（CD3γ ITAM）、M684（FcεRIβ ITAM）或M799（CNAIP/NFAM1 ITAM）相互作用。

【0391】 **實例2.ITAM修飾的CAR-T細胞的體外細胞毒性分析**

【0392】 ***1. ITAM修飾的BCMA CAR-T細胞的體外細胞毒性評估***

【0393】 為了構建ITAM修飾的BCMA CAR，化學合成編碼以下的融合基因序列：CD8α SP-BCMA scFv-CD8α鉸鏈-CD8α TM-4-1BB（「BCMA-BB」；僅含4-1BB共刺激信號傳導結構域）、CD8α SP-BCMA scFv-CD8α 鉸 鏈 -CD8α TM-4-1BB-CD3ζ（「BCMA-BBz」，SEQ ID NO: 75）、CD8α SP-BCMA scFv-CD8α 鉸 鏈 -CD8α TM-4-1BB-ITAM007（「BCMA-BB007」）、CD8α SP-BCMA scFv-CD8α 鉸 鏈 -CD8α TM-4-1BB-ITAM008（「BCMA-BB008」）、CD8α SP-BCMA scFv-CD8α 鉸 鏈 -CD8α TM-4-1BB-ITAM009（「BCMA-BB009」）和CD8α SP-BCMA scFv-CD8α鉸鏈-CD8α TM-4-1BB-ITAM010（「BCMA-BB010」），並將其克隆至pLVX-hEF1α-Puro慢病毒載體中（參見實例1），分別用於構建重組轉移質體（ITAM構建體結構參見表2），下文稱為pLVX-BCMA-BB轉移質體（陰性對照）、pLVX-BCMA-BBz轉移質體（陽性對照）和pLVX-BCMA-（BB007-BB010）轉移質體。如實例1中所述將所有慢病毒轉移質體純化並包裝至慢病毒中，下文分別稱為BCMA-BB慢病毒、BCMA-BBz慢病毒和BCMA-（BB007-BB010）慢病毒。

【0394】 **表2.ITAM修飾的BCMA CAR的ITAM構建體結構**

ITAM修飾的CAR構建體	ITAM 構建體	ITAM構建體結構	ITAM 構建體胺基酸序列	CAR構建體胺基酸序列
BCMA-BB007	ITAM007	連接子5-CD3ζ ITAM1-連接子1-CD3ζ ITAM2-連接子3-CD3ζ ITAM3-連接子4	SEQ ID NO: 54	SEQ ID NO: 76
BCMA-BB008	ITAM008	連接子1-CD3ζ ITAM1-連接子2-CD3ζ ITAM1-連接子2-CD3ζ ITAM1-連接子2	SEQ ID NO: 55	SEQ ID NO: 77
BCMA-BB009	ITAM009	連接子1-CD3ε ITAM-連接子2-CD3ε ITAM-連接子2-CD3ε ITAM-連接子2	SEQ ID NO: 56	SEQ ID NO: 78
BCMA-BB010	ITAM010	連接子1-CD3δ ITAM-連接子2-CD3ε ITAM-連接子2-CD3γ ITAM-連接子2-DAP12 ITAM-連接子2	SEQ ID NO: 57	SEQ ID NO: 79

【0395】 從志願者提取50 mL外周血。通過密度梯度離心分離外周血單核細胞（PBMC）。使用全T細胞分離套組（Miltenyi Biotec，#130-096-535）對PBMC進行磁性標記，並且分離和純化T淋巴細胞。使用CD3/CD28綴合的磁珠進行純化的T淋巴細胞的啟動和擴增。收集啟動的T淋巴細胞並重懸於RPMI 1640培養基（Life Technologies，#22400-089）中。啟動後3天，分別用慢病毒BCMA-BB、BCMA-BBz、BCMA-BB007、BCMA-BB008、BCMA-BB009和BCMA-BB010轉導5×10^6個啟動的T淋巴細胞（下文分別稱為BCMA-BB T細胞、BCMA-BBz T細胞和BCMA-（BB007-BB010）T細胞）。將T細胞懸浮液添加至6孔板中，並且在37°C、5% CO_2孵育器中孵育過夜。轉導後3天，將修飾的T細胞分別在40:1的效應子與靶細胞(E:T)比率下與多發性骨髓瘤(MM)細胞株RPMI8226.Luc（BCMA+，具有螢光素酶（Luc）標記）混合，在Corning® 384孔實心白色板中孵育12小時。使用ONE-Glo™

螢光素酶測定系統（PROMEGA，#B6110）測量螢光素酶活性。將25 μL ONE-Glo™試劑添加至384孔板的每個孔，孵育，然後將其置於Spark™ 10M多功能酶標儀（TECAN）上用於螢光測量，以計算不同T淋巴細胞對靶細胞的細胞毒性。

【0396】 如圖2A中所示，不具有初級CD3ζ細胞內信號傳導結構域的陰性對照BCMA-BB未能介導腫瘤細胞殺傷。與UnT相比，ITAM修飾的BCMA CAR（BCMA-BB007、BCMA-BB008、BCMA-BB009和BCMA-BB010）都能夠介導對RPMI8226.Luc細胞株的腫瘤細胞殺傷（$P < 0.05$）。在ITAM修飾的BCMA CAR（BCMA-（BB007-BB010））與具有傳統CD3ζ細胞內信號傳導結構域的BCMA CAR（BCMA-BBz）之間，沒有觀察到細胞毒性的顯著差異（$P > 0.05$）。這些資料表明，本文所述的嵌合信號傳導結構域（例如，ITAM007-ITAM010）可以提供有前景的用於構建保留腫瘤細胞殺傷的ITAM修飾的CAR的策略。

【0397】 ***2. ITAM修飾的CD20 CAR-T細胞的體外細胞毒性評估***

【0398】 為了構建ITAM修飾的CD20 CAR，化學合成編碼以下的融合基因序列：CD8α SP-CD20 scFv（Leu16）-CD8α鉸鏈-CD8α TM-4-1BB-CD3ζ（「LCAR-L186S」，SEQ ID NO: 97）和CD8α SP-CD20 scFv（Leu16）-CD8α鉸鏈-CD8α TM-4-1BB-ITAM010（「CD20-BB010」，SEQ ID NO: 98），並將其克隆至pLVX-hEF1α-Puro慢病毒載體中（參見實例1），分別用於構建pLVX-LCAR-L186S和pLVX-CD20-BB010重組轉移質體。如實例1

中所述將慢病毒轉移質體純化並包裝至慢病毒中，下文分別稱為LCAR-L186S慢病毒和CD20-BB010慢病毒。

【0399】 根據上述方法製備PBMC和T淋巴細胞。啟動後3天，分別用慢病毒LCAR-L186S（稱為LCAR-L186S T細胞）和CD20-BB010（稱為CD20-BB010 T細胞）轉導5×10^6個啟動的T淋巴細胞。將T細胞懸浮液添加至6孔板中，並且在37°C、5% CO_2孵育器中孵育過夜。轉導後3天，將修飾的T細胞分別與淋巴瘤Raji.Luc（CD20+，具有螢光素酶（Luc）標記）細胞株在20:1的E:T比率下混合，在Corning® 384孔實心白色板中孵育12小時。使用ONE-Glo™螢光素酶測定系統（PROMEGA，#B6110）測量螢光素酶活性。將25 μL ONE-Glo™試劑添加至384孔板的每個孔，孵育，然後將其置於Spark™ 10M多功能酶標儀（TECAN）上用於螢光測量，以計算不同T淋巴細胞對靶細胞的細胞毒性。未轉導的T細胞（UnT）用作對照。

【0400】 如圖2B中所示，ITAM修飾的CD20 CAR（CD20-BB010）和LCAR-L186S二者展現與UnT相比更強的細胞毒性（$P < 0.05$），並且ITAM修飾的CD20 CAR（CD20-BB010）顯示與具有傳統CD3ζ細胞內信號傳導結構域的CD20 CAR相似的細胞毒性（LCAR-L186S；$P > 0.05$）。

【0401】 總之，上文資料表明，本文所述的嵌合信號傳導結構域（例如，ITAM007-ITAM010）可以提供有前景的用於構建保留腫瘤細胞殺傷的ITAM修飾的CAR的策略。

【0402】 **實例3.嵌合信號傳導結構域的CMSD連接子對CAR-T細胞活性的影響**

【0403】 ***1. ITAM修飾的BCMA CAR的構建***

【0404】 使ITAM010細胞內信號傳導結構域的CMSD連接子缺失或被替代，以形成ITAM024構建體、ITAM025構建體、ITAM026構建體、ITAM027構建體、ITAM028構建體和ITAM029構建體（相應的ITAM構建體參見表3）。為了構建ITAM修飾的BCMA CAR，將BCMA-BBz的CD3ζ細胞內信號傳導結構域（CD8α SP-BCMA scFv-CD8α鉸鏈-CD8α TM-4-1BB-CD3ζ）用上文構建體替代，分別用於構建pLVX-BCMA-BB024、pLVX-BCMA-BB025、pLVX-BCMA-BB026、pLVX-BCMA-BB027、pLVX-BCMA-BB028和pLVX-BCMA-BB029轉移質體。然後如實例1中所述將這些轉移質體純化並包裝至慢病毒中，下文分別稱為BCMA-BB024慢病毒、BCMA-BB025慢病毒、BCMA-BB026慢病毒、BCMA-BB027慢病毒、BCMA-BB028慢病毒和BCMA-BB029慢病毒。

【0405】 **表3.ITAM修飾的BCMA CAR的ITAM構建體結構**

ITAM修飾的CAR構建體	**ITAM構建體**	**ITAM構建體結構**	**ITAM構建體胺基酸序列**	**CAR構建體胺基酸序列**
BCMA-BB024	ITAM024	CD3δ ITAM-CD3ε ITAM-CD3γ ITAM-DAP12 ITAM	SEQ ID NO: 58	SEQ ID NO: 80
BCMA-BB025	ITAM025	連接子14-CD3δ ITAM-連接子13-CD3ε ITAM-連接子13-CD3γ ITAM-連接子13-DAP12 ITAM-連接子13	SEQ ID NO: 59	SEQ ID NO: 81
BCMA-BB026	ITAM026	連接子15-CD3δ ITAM-連接	SEQ ID	SEQ ID

ITAM 修飾的CAR構建體	ITAM構建體	ITAM構建體結構	ITAM 構建體胺基酸序列	CAR構建體胺基酸序列
		子11-CD3ε ITAM-連接子11-CD3γ ITAM-連接子11-DAP12 ITAM-連接子11	NO: 60	NO: 82
BCMA-BB027	ITAM027	連接子8-CD3δ ITAM-連接子9-CD3ε ITAM-連接子9-CD3γ ITAM-連接子9-DAP12 ITAM-連接子9	SEQ ID NO: 61	SEQ ID NO: 83
BCMA-BB028	ITAM028	連接子6-CD3δ ITAM-連接子10-CD3ε ITAM-連接子12-CD3γ ITAM-連接子11-DAP12 ITAM-連接子9	SEQ ID NO: 62	SEQ ID NO: 84
BCMA-BB029	ITAM029	連接子8-CD3δ ITAM-連接子9-CD3ε ITAM-連接子11-CD3γ ITAM-連接子10-DAP12 ITAM-連接子12	SEQ ID NO: 63	SEQ ID NO: 85

【0406】 ***2. ITAM修飾的BCMA CAR-T細胞的細胞毒性體外測定***

【0407】 根據實例2中所述的方法製備PBMC和T淋巴細胞。啟動後3天，分別用編碼ITAM修飾的BCMA CAR的慢病毒（來自實例2的BCMA-BB010慢病毒、BCMA-BB024慢病毒、BCMA-BB025慢病毒、BCMA-BB026慢病毒、BCMA-BB027慢病毒、BCMA-BB028慢病毒和BCMA-BB029慢病毒）和對照BCMA-BBz慢病毒轉導5×10^6個啟動的T淋巴細胞。將T細胞懸浮液添加至6孔板中，並且在37°C、5% CO_2孵育器中孵育過夜。轉導後3天，將修飾的T細胞分別與多發性骨髓瘤（MM）細胞株RPMI8226.Luc在2.5:1的E:T比率下混合，在Corning® 384孔實心白色板中孵育12小時。使用ONE-Glo™螢光素酶測定系統（TAKARA，#B6120）測量螢光素酶活性。將25 μL ONE-Glo™試劑添加至384孔板的每個孔，孵育，

然後將其置於Spark™ 10M多功能酶標儀（TECAN）上用於螢光測量，以計算不同T淋巴細胞對靶細胞的細胞毒性。未轉導的T細胞（「UnT」）用作對照。

【0408】 如圖3中所示，與UnT相比，CMSD ITAM彼此直接連接的BCMA-BB024；CMSD ITAM通過不同CMSD連接子連接的BCMA-BB010、BCMA-BB025、BCMA-BB026、BCMA-BB027、BCMA-BB028和BCMA-BB029；都能夠介導對RPMI8226.Luc細胞株的顯著特異性腫瘤細胞殺傷（$P < 0.05$）。與BCMA-BBz相比，BCMA-BB025、BCMA-BB028和BCMA-BB029顯示顯著CAR特異性細胞毒性（$P < 0.05$）。在BCMA-BB010、BCMA-BB024、BCMA-BB026、BCMA-BB027與具有傳統CD3ζ ISD的BCMA CAR（BCMA-BBz）之間，沒有觀察到細胞毒性的顯著差異（$P > 0.05$）。這些資料表明，嵌合信號傳導結構域的CMSD連接子不損害CAR介導的CAR-T細胞的特異性細胞毒性。

【0409】 實例4.CMSD ITAM的順序對CAR-T細胞活性的影響

【0410】 ***1. ITAM修飾的BCMA CAR的構建***

【0411】 為了構建ITAM修飾的BCMA CAR，將BCMA-BB010的ITAM010細胞內信號傳導結構域（CD8α SP-BCMA scFv-CD8α鉸鏈-CD8α TM-4-1BB-ITAM010）用包含來自ITAM010的不同順序的ITAM（如ITAM030、ITAM031和ITAM032）的ITAM構建體替代（相應ITAM構建體參見表4），分別用於構建pLVX-BCMA-BB030、pLVX-BCMA-BB031和pLVX-BCMA-BB032轉移質體。然後如實例

1中所述將這些轉移質體純化並包裝至慢病毒中，下文分別稱為BCMA-BB030慢病毒、BCMA-BB031慢病毒和BCMA-BB032慢病毒。

【0412】 表4.ITAM修飾的BCMA CAR的ITAM構建體結構

ITAM修飾的CAR構建體	ITAM構建體	ITAM構建體結構	ITAM構建體胺基酸序列	CAR構建體胺基酸序列
BCMA-BB030	ITAM030	連接子1-CD3ε ITAM-連接子2-CD3δ ITAM-連接子2-DAP12 ITAM-連接子2-CD3γ ITAM-連接子2	SEQ ID NO: 64	SEQ ID NO: 86
BCMA-BB031	ITAM031	連接子1-CD3γ ITAM-連接子2-DAP12 ITAM-連接子2-CD3δ ITAM-連接子2-CD3ε ITAM-連接子2	SEQ ID NO: 65	SEQ ID NO: 87
BCMA-BB032	ITAM032	連接子1-DAP12 ITAM-連接子2-CD3γ ITAM-連接子2-CD3ε ITAM-連接子2-CD3δ ITAM-連接子2	SEQ ID NO: 66	SEQ ID NO: 88

【0413】 *2. ITAM修飾的BCMA CAR-T細胞的細胞毒性體外測定*

【0414】 根據實例2中所述的方法製備PBMC和T淋巴細胞。啟動後3天，分別用編碼ITAM修飾的BCMA CAR的慢病毒（包括來自實例2的BCMA-BB010慢病毒、BCMA-BB030慢病毒、BCMA-BB031慢病毒和BCMA-BB032慢病毒）和對照BCMA-BBz慢病毒轉導5×10^6個啟動的T淋巴細胞。將T細胞懸浮液添加至6孔板中，並且在37°C、5% CO_2孵育器中孵育過夜。轉導後3天，將修飾的T細胞分別與多發性骨髓瘤（MM）細胞株RPMI8226.Luc在2.5:1的E:T比

率下混合，在Corning® 384孔實心白色板中孵育12小時。使用ONE-Glo™螢光素酶測定系統（TAKARA，#B6120）測量螢光素酶活性。將25 μL ONE-Glo™試劑添加至384孔板的每個孔，孵育，然後將其置於Spark™ 10M多功能酶標儀（TECAN）上用於螢光測量，以計算不同T淋巴細胞對靶細胞的細胞毒性。未轉導的T細胞（「UnT」）用作對照。

【0415】 如圖4中所示，與UnT相比，ITAM修飾的BCMA CAR-T細胞（BCMA-BB030至BCMA-BB032）都能夠介導對RPMI8226.Luc細胞株的顯著特異性腫瘤細胞殺傷（$P < 0.05$）。與BCMA-BBz相比，BCMA-BB031和BCMA-BB032顯示顯著CAR特異性細胞毒性（$P < 0.05$）。在BCMA-BB010和BCMA-BB030與BCMA-BBz之間，沒有觀察到細胞毒性的顯著差異（$P > 0.05$）。這些結果表明，CMSD ITAM的重排不損害CAR介導的CAR-T細胞的特異性細胞毒性。

【0416】 實例5.CMSD ITAM的數量和來源對CAR-T細胞活性的影響

【0417】 ***1. ITAM修飾的BCMA CAR的構建***

【0418】 對於ITAM修飾的BCMA CAR，細胞內信號傳導結構域分別由1、2、3或4個CMSD ITAM組成，同時測試不同來源。為了構建ITAM修飾的BCMA CAR，將BCMA-BBz的CD3ζ細胞內信號傳導結構域（CD8α SP-BCMA scFv-CD8α鉸鏈-CD8α TM-4-1BB-CD3ζ）用ITAM033構建體、ITAM034構建體、ITAM035構建體、ITAM036構建體、ITAM037構建體或ITAM038構建體替代（相應ITAM構建

體參見表5），分別用於構建pLVX-BCMA-BB033、pLVX-BCMA-BB034、pLVX-BCMA-BB035、pLVX-BCMA-BB036、pLVX-BCMA-BB037或pLVX-BCMA-BB038轉移質體。然後如實例1中所述將這些轉移質體純化並包裝至慢病毒中，下文分別稱為BCMA-BB033慢病毒、BCMA-BB034慢病毒、BCMA-BB035慢病毒、BCMA-BB036慢病毒、BCMA-BB037慢病毒和BCMA-BB038慢病毒。

【0419】 表5.ITAM修飾的BCMA CAR的ITAM構建體結構

ITAM修飾的CAR構建體	**ITAM 構建體**	**ITAM構建體結構**	**ITAM 構建體胺基酸序列**	**CAR構建體胺基酸序列**
BCMA-BB033	ITAM033	連接子1-CD3ε ITAM-連接子2	SEQ ID NO: 67	SEQ ID NO: 89
BCMA-BB034	ITAM034	連接子1-CD3δ ITAM-連接子2	SEQ ID NO: 68	SEQ ID NO: 90
BCMA-BB035	ITAM035	連接子1-CD3δ ITAM-連接子2-CD3ε ITAM-連接子2	SEQ ID NO: 69	SEQ ID NO: 91
BCMA-BB036	ITAM036	連接子1-CD3γ ITAM-連接子2-DAP12 ITAM-連接子2	SEQ ID NO: 70	SEQ ID NO: 92
BCMA-BB037	ITAM037	連接子1-CD3δ ITAM-連接子 2-CD3ε ITAM-連接子2-CD3ε ITAM-連接子2	SEQ ID NO: 71	SEQ ID NO: 93
BCMA-BB038	ITAM038	連接子1-CD3δ ITAM-連接子 2-CD3ε ITAM-連接子2-CD3γ ITAM-連接子2	SEQ ID NO: 72	SEQ ID NO: 94

【0420】 *2.CMSD ITAM的數量和來源對BCMA CAR-T細胞活性的影響的評價*

【0421】 根據實例2中所述的方法製備PBMC和T淋巴細胞。啟動後3天，分別用編碼ITAM修飾的BCMA CAR的慢病毒（包括BCMA-BB033慢病毒、BCMA-BB034慢病毒、BCMA-BB035慢病

毒、BCMA-BB036慢病毒、BCMA-BB037慢病毒、BCMA-BB038慢病毒、來自實例2的BCMA-BB010慢病毒、來自實例4的BCMA-BB030慢病毒、來自實例4的BCMA-BB031慢病毒和來自實例4的BCMA-BB032慢病毒）和來自實例2的對照BCMA-BBz慢病毒轉導5×10^6個啟動的T淋巴細胞。將T細胞懸浮液添加至6孔板中，並且在37°C、5% CO_2孵育器中孵育過夜。轉導後3天，將修飾的T細胞分別與多發性骨髓瘤（MM）細胞株RPMI8226.Luc在2.5:1的E:T比率下混合，在Corning® 384孔實心白色板中孵育12小時。使用ONE-Glo™螢光素酶測定系統（TAKARA，#B6120）測量螢光素酶活性。將25 μL ONE-Glo™試劑添加至384孔板的每個孔，孵育，然後將其置於Spark™ 10M多功能酶標儀（TECAN）上用於螢光測量，以計算不同T淋巴細胞對靶細胞的細胞毒性。未轉導的T細胞（「UnT」）用作對照。

【0422】 如圖5中所示，與UnT相比，細胞內信號傳導結構域由1至4份量和1至4種來源的CMSD ITAM組成的ITAM修飾的BCMA CAR-T細胞（BCMA-BB030至BCMA-BB038）都能夠介導對RPMI8226.Luc細胞株的顯著特異性腫瘤細胞殺傷（$P < 0.05$）。與BCMA-BBz相比，BCMA-BB037、BCMA-BB038、BCMA-BB031和BCMA-BB032顯示顯著CAR特異性細胞毒性（$P < 0.05$）。在BCMA-BB010、BCMA-BB030、BCMA-BB035、BCMA-BB036和具有傳統CD3ζ ISD的BCMA CAR（BCMA-BBz）之間，沒有觀察到細胞毒性的顯著差異（$P > 0.05$）。這些資料表明，1至4份量和1

至4種來源的CMSD ITAM的重排不損害CAR介導的CAR-T細胞的特異性細胞毒性。

【0423】 **實例6.CMSD ITAM生物活性的評價**

【0424】 ***1. 體外再攻毒模型建立***

【0425】 化學合成編碼以下的融合基因：CD8α SP-BCMA scFv-CD8α鉸鏈-CD8α TM-4-1BB-ITAM045(「BCMA-BB045」，SEQ ID NO: 95)、具有「連接子6-DAP12 ITAM-連接子1-CD3ε ITAM-連接子7-CD3δ ITAM-連接子2」的ITAM045構建體（SEQ ID NO: 73)；CD8α SP-BCMA scFv-CD8α鉸鏈-CD8α TM-4-1BB-ITAM046(「BCMA-BB046」，SEQ ID NO: 96)、具有「連接子6-DAP12 ITAM-連接子1-CD3δ ITAM-連接子7-CD3ε ITAM-連接子2」的ITAM046構建體（SEQ ID NO: 74)，然後將其克隆至pLVX-hEF1α-Puro慢病毒載體中（參見實例1)，分別用於構建pLVX-BCMA-BB045和pLVX-BCMA-BB046轉移質體。然後如實例1中所述將這些轉移質體純化並包裝至慢病毒中，下文分別稱為BCMA-BB045慢病毒和BCMA-BB046慢病毒。

【0426】 根據實例2中所述的方法製備PBMC和T淋巴細胞。啟動後3天，分別用慢病毒BCMA-BB、BCMA-BBz、BCMA-BB010、BCMA-BB030、BCMA-BB032、BCMA-BB035、BCMA-BB036、BCMA-BB045和BCMA-BB046轉導5×10^6個啟動的T淋巴細胞。將T細胞懸浮液添加至6孔板中，並且在37°C、5% CO_2孵育器中孵育過夜。轉導後3天，收集5×10^5個細胞並在室溫下離心，棄去上清液。

用1 mL DPBS使細胞重懸，添加1 μL FITC標記的人BCMA蛋白（Biolegend，#310906）並將懸浮液在4°C下孵育30 min。在孵育後，將離心和用DPBS重懸的步驟重複兩次。然後將細胞用DPBS重懸用於FACS以檢測BCMA CAR表現。未轉導的T細胞（UnT）用作對照。然後將每組中的CAR陽性率調整至一致。將修飾的T細胞與多發性骨髓瘤（MM）細胞株RPMI8226在1:1的E:T比率下單獨混合（表示為第0天），並且在37°C、5% CO_2孵育器中孵育過夜。在第3天、第5天和第7天，在細胞計數後在1:1的E:T比率下補充RPMI8226細胞株。

【0427】 在靶腫瘤細胞再攻毒後，分別在第0天、第3天、第7天、第9天和第11天計數上述ITAM修飾的BCMA CAR-T細胞（包括BCMA-BBz、BCMA-BB030、BCMA-BB032、BCMA-BB035、BCMA-BB036、BMCA-BB045和BCMA-BB046），製作T細胞增殖曲線。未轉導的T細胞（UnT）用作對照。

【0428】 如圖6中所示，在靶腫瘤細胞再攻毒後，ITAM修飾的BCMA CAR-T細胞（BCMA-BB030、BCMA-BB032、BCMA-BB035、BCMA-BB036、BCMA-BB045和BCMA-BB046）通常展現CAR依賴性細胞增殖。在ITAM修飾的BCMA CAR（BCMA-BB030、BCMA-BB032、BCMA-BB035、BCMA-BB036、BCMA-BB045和BCMA-BB046）與具有傳統CD3ζ細胞內信號傳導結構域的BCMA CAR（BCMA-BBz）之間，沒有觀察到細胞增殖的顯著差異（$P > 0.05$）。這些資料表明，含有CMSD ITAM的修飾

的T細胞提供更高的體外細胞增殖活性。

【0429】 在靶腫瘤細胞再攻毒後，收集5×10^5個上述ITAM修飾的BCMA CAR-T細胞（包括BCMA-BB、BCMA-BBz、BCMA-BB035、BCMA-BB036、BCMA-BB045、BCMA-BB046、BCMA-BB010、BCMA-BB030和BCMA-BB032），並在室溫下離心，棄去上清液。用1 mL DPBS使細胞重懸，添加1 μL FITC標記的人BCMA蛋白（Biolegend，#310906）、1 μL APC抗人CD279（PD-1）抗體（Biolegend，#621610）和1 μL APC抗人D223（LAG-3）抗體（Biolegend，#369212），並將懸浮液在4°C下孵育30 min。在孵育後，將離心和用DPBS重懸的步驟重複兩次。然後將細胞用DPBS重懸用於FACS檢測，以分別分析CAR陽性/PD-1陽性（CAR+/PD-1+）和CAR陽性/LAG-3陽性（CAR+/LAG-3+）細胞比率。

【0430】 在靶腫瘤細胞再攻毒後，收集5×10^5個上述ITAM修飾的BCMA CAR-T細胞（包括BCMA-BB、BCMA-BBz、BCMA-BB035、BCMA-BB036、BCMA-BB045、BCMA-BB046、BCMA-BB010、BCMA-BB030和BCMA-BB032），並在室溫下離心，棄去上清液。用1 mL DPBS使細胞重懸，添加1 μL FITC標記的人BCMA蛋白（Biolegend，#310906）、1 μL PE/Cy7抗人CD4抗體（Biolegend，#357409）、1 μL PerCP/Cy5.5抗人CD8抗體（Biolegend，#344709）、1 μL PE抗人CD197（CCR7）抗體（Biolegend，#353204）和1 μL APC抗人CD45RA抗體（Biolegend，#304150），並將懸浮液在4°C下孵

育30 min。在孵育後，將離心和用DPBS重懸的步驟重複兩次。然後將細胞用DPBS重懸用於FACS檢測，以分析CAR陽性T細胞中的TEMRA細胞（終末分化的效應T細胞，CD45RA陽性/CCR7陰性（CD45RA+/CCR7-））比率、TEM細胞（效應記憶T細胞，CD45RA陰性/CCR7陰性（CD45RA-/CCR7-））比率、TCM細胞（中樞記憶T細胞，CD45RA陰性/CCR7陽性（CD45RA-/CCR7+））比率、和幼稚細胞（幼稚T細胞，CD45RA陽性/CCR7陽性（CD45RA+/CCR7+））比率。

【0431】 如圖7A中所示，在CAR陽性BCMA-BBz T細胞、BCMA-BB035 T細胞、BCMA-BB036 T細胞、BCMA-BB045 T細胞、BCMA-BB046 T細胞、BCMA-BB010 T細胞、BCMA-BB030 T細胞和BCMA-BB032 T細胞中，T細胞耗竭標記的PD-1表現分別為7.07%、10.50%、5.24%、5.81%、5.80%、7.88%、6.26%和10.42%；T細胞耗竭標記的LAG-3表現分別為22.64%、11.81%、17.20%、17.66%、16.29%、24.54%、21.61%和18.68%。進一步研究表明（表6和表7），在每個CAR+ T細胞組（圖7B）和CAR+/CD8+ T細胞組（圖7C）中觀察到TEMRA細胞、TEM細胞、TCM細胞和幼稚細胞的表現譜的差異，並且在CAR+/CD4+ T細胞組（圖7D）中觀察到顯著差異（P <0 .05）。這些結果表明，CMSD ITAM在CAR-T細胞表型方面具有顯著影響，並且提供有前景的用於細胞/基因療法的策略。

【0432】 表6.含有CMSD ITAM的T細胞表型監測

CAR構建體	TEMRA細胞 (CD45RA+/CCR7-)			TEM細胞 (CD45RA-/CCR7-)		
	CAR+	CAR+/ CD8+	CAR+/ CD4+	CAR+	CAR+/ CD8+	CAR+/ CD4+
BCMA-BB	32.02%	37.26%	8.50%	15.31%	9.17%	21.19%
BCMA-BBz	20.48%	25.44%	14.29%	31.86%	40.61%	27.22%
BCMA-BB035	15.13%	27.15%	4.90%	28.28%	38.07%	16.86%
BCMA-BB036	21.67%	35.69%	6.43%	19.58%	26.47%	10.32%
BCMA-BB045	21.53%	34.84%	8.62%	24.94%	33.01%	14.98%
BCMA-BB046	18.63%	29.79%	5.84%	25.14%	32.59%	14.18%
BCMA-BB010	21.59%	33.51%	5.98%	31.85%	39.44%	18.01%
BCMA-BB030	27.13%	41.76%	11.87%	27.63%	35.00%	17.97%
BCMA-BB032	15.95%	26.99%	5.04%	27.65%	33.92%	17.72%

【0433】 表7.含有CMSD ITAM的T細胞表型監測

CAR構建體	TCM細胞 (CD45RA-/CCR7+)			幼稚細胞 (CD45RA+/CCRR7+)		
	CAR+	CAR+/ CD8+	CAR+/ CD4+	CAR+	CAR+/ CD8+	CAR+/ CD4+
BCMA-BB	2.16%	0.48%	11.01%	50.51%	53.09%	59.30%
BCMA-BBz	36.97%	24.57%	47.20%	10.69%	9.37%	11.29%
BCMA-BB035	43.04%	23.90%	61.65%	13.55%	10.89%	16.59%
BCMA-BB036	35.85%	20.52%	53.33%	22.90%	17.33%	29.92%
BCMA-BB045	36.40%	19.70%	53.73%	17.12%	12.45%	22.68%
BCMA-BB046	40.52%	23.73%	61.62%	15.71%	13.89%	18.36%
BCMA-BB010	33.57%	16.51%	58.29%	12.99%	10.54%	17.71%
BCMA-BB030	28.82%	12.99%	46.50%	16.42%	10.25%	23.66%
BCMA-BB032	43.30%	25.43%	63.61%	13.11%	13.65%	13.64%

【0434】 實例7.CD20 CAR-T和ITAM修飾的CD20 CAR-T細胞毒性和細胞因數釋放誘導的體外分析

【0435】 *1.體外測定中的細胞毒性*

【0436】 抗CD20 scFv（Leu16）是小鼠抗體。化學合成融合基因序列CD8α SP-CD20 scFv（Leu16）-CD8α鉸鏈-CD8α TM-4-1BB-CD3ζ（下文稱為「LCAR-L186S」，SEQ ID NO: 97）和SIV Nef M116-IRES-CD8α SP-CD20 scFv(Leu16)-CD8α鉸鏈-CD8α

TM-4-1BB-ITAM010（下文稱為「LCAR-UL186S」，SEQ ID NO: 98），然後將其克隆至pLVX-hEF1α-Puro慢病毒載體中（參見實例1），分別用於構建LCAR-L186S和LCAR-UL186S慢病毒轉移質體。純化慢病毒轉移質體，然後與含有psPAX2（包裝；Addgene，#12260）和pMD2.G（包膜；Addgene，#12259）的慢病毒包裝質體混合物混合，在室溫下孵育，然後分別轉導至HEK 293T細胞中。轉導後60小時，通過將細胞轉導混合物在4°C以3000 rpm離心5 min來收集含有慢病毒的上清液。使用0.45 μm篩檢程式過濾上清液，並使用500 KD中空纖維膜切向流過濾進一步濃縮，以獲得濃縮的慢病毒，然後將其儲存在-80°C下。

【0437】 根據實例2中所述的方法製備PBMC和T淋巴細胞。分別用編碼LCAR-L186S（稱為「LCAR-L186S T細胞」）和LCAR-UL186S（稱為「LCAR-UL186S T細胞」）的慢病毒轉導5×10^6個啟動的T淋巴細胞，並且在37°C、5% CO_2孵育器中孵育過夜。轉導後3天，收集5×10^5個細胞懸浮液並在室溫下離心，棄去上清液。用1 mL DPBS使細胞重懸並將1 μL山羊F(ab')2抗小鼠IgG (Fab')2（FITC）（Abcam，#AB98658）添加至懸浮液中，然後在4°C下孵育30 min。在孵育後，將離心和用DPBS重懸的步驟重複兩次。然後將細胞用DPBS重懸並補充1 μL鏈黴親和素（NEW ENGLAND BIOLABS，#N7021S），然後在4°C下孵育30 min。在孵育後，將離心和用DPBS重懸的步驟重複兩次。然後將細胞用DPBS重懸並使其經歷FACS用於CD20 CAR表現檢測。

【0438】 如圖9A中所示，用LCAR-L186S慢病毒和LCAR-UL186S慢病毒轉導的原代T淋巴細胞分別顯示35.60%和36.49% CAR陽性率。未處理的T淋巴細胞用作陰性對照（0.59% CAR pos）。該結果證實，SIV Nef M116共表現不影響包含ITAM010嵌合信號傳導結構域的ITAM修飾的CD20 CAR（LCAR-UL186S）的表現；CAR表現水準與具有傳統CD3ζ細胞內信號傳導結構域的CD20 CAR（LCAR-L186S）相似。

【0439】 將LCAR-L186S T細胞和LCAR-UL186S T細胞分別在20:1、10:1和5:1的不同的效應子與靶細胞（E:T）比率下與淋巴瘤Raji.Luc細胞株（CD20陽性，具有螢光素酶標記）混合。未處理的T細胞用作對照(「UnT」)。將混合的細胞在384孔板中孵育12-24小時。根據實例2中所述的相似方法檢測不同T淋巴細胞對靶細胞的細胞毒性。

【0440】 如圖9B中所示，用LCAR-L186S慢病毒和LCAR-UL186S慢病毒轉導的原代T淋巴細胞二者都展現對Raji.Luc細胞株的強細胞毒性，並且是E:T濃度依賴性的。在所有E:T比率下在LCAR-L186S T細胞與LCAR-UL186S T細胞之間沒有顯著的細胞毒性差異，而與未轉導的T細胞相比，在細胞殺傷測定的第3天，LCAR-L186S T細胞和LCAR-UL186S T細胞二者都展現顯著更強的細胞毒性（「UnT」, $P < 0.05$）。該結果證實，SIV Nef M116共表現不影響包含ITAM010嵌合信號傳導結構域的ITAM修飾的CD20 CAR（LCAR-UL186S）的細胞毒性；並且ITAM修飾的CD20 CAR

顯示與具有傳統CD3ζ細胞內信號傳導結構域的CD20 CAR（LCAR-L186S）相似的細胞毒性。

【0441】 **2.** ***細胞因數釋放體外測定***

【0442】 將LCAR-L186S T細胞和LCAR-UL186S T細胞分別與淋巴瘤Raji.Luc細胞株在上述不同E:T比率下一起孵育。收集來自共培養測定的上清液以評估17種細胞因數分子（包括促炎因數（圖10A）、趨化因數（圖10B）和細胞因數（圖10C））的CAR誘導的細胞因數釋放。未轉導的T（「UnT」）細胞用作對照。

【0443】 如圖10A中所示，在將LCAR-L186S T細胞或LCAR-UL186S T細胞與CD20陽性Raji.Luc細胞在不同的E:T比率下共培養20-24小時後，促炎因數（如穿孔素、顆粒酶A、顆粒酶B、IFNγ、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10和IL-13）的分泌與UnT細胞相比顯著增加（$P < 0.05$），並且所述分泌水準是E:T比率依賴性的，表明LCAR-L186S T細胞和LCAR-UL186S T細胞二者可以起始靶向Raji的強細胞毒性作用。在這些促炎因數中，顆粒酶A、IFNγ、IL-6和IL-13在LCAR-L186S T細胞中顯示比在LCAR-UL186S T細胞中顯著更高的分泌（$P < 0.05$），表明ITAM修飾的CD20 CAR/SIV Nef M116共表現可以誘導更少促炎因數釋放和更低的細胞因數釋放症候群（CRS）的風險。

【0444】 如圖10B中所示，在將LCAR-L186S T細胞或LCAR-UL186S T細胞與CD20陽性Raji.Luc細胞在不同的E:T比率下共培養20-24小時後，趨化因數（如MIP-1α、MIP-1β、sFas和sFasL）

的分泌與UnT細胞相比顯著增加（$P < 0.05$），並且所述分泌水準是E:T比率依賴性的，表明LCAR-L186S T細胞和LCAR-UL186S T細胞二者可以起始靶向Raji的強細胞毒性作用。在這些趨化因數中，MIP-1α和MIP-1β（並且在一些情況下還有sFas）在LCAR-L186S T細胞中顯示比在LCAR-UL186S T細胞中顯著更高的分泌（$P < 0.05$），表明ITAM修飾的CD20 CAR/SIV Nef M116共表現可以誘導更少趨化因數釋放和更低的CRS風險。

【0445】如圖10C中所示，在將LCAR-L186S T細胞或LCAR-UL186S T細胞與CD20陽性Raji.Luc細胞在不同的E:T比率下共培養20-24小時後，細胞因數（如TNFα、GM-CSF和sCD137）的分泌與UnT細胞相比顯著增加（$P < 0.05$），表明LCAR-L186S T細胞和LCAR-UL186S T細胞二者可以起始靶向Raji的強細胞毒性作用。在這些細胞因數中，TNFα分泌達到檢出限；GM-CSF和sCD137分泌在LCAR-L186S T細胞中比在LCAR-UL186S T細胞中顯著更高（$P < 0.05$），表明ITAM修飾的CD20 CAR/SIV Nef M116共表現可以誘導更少細胞因數釋放和更低的CRS風險。

【0446】總之，上文結果表明，在LCAR-L186S T細胞與LCAR-UL186S T細胞之間對靶細胞的細胞毒性沒有顯著差異，而LCAR-UL186S T細胞誘導的促炎因數、趨化因數和細胞因數釋放顯著低於LCAR-L186S T細胞，表明ITAM修飾的CD20 CAR/SIV Nef M116共表現構建體有效並且更安全，具有更低的細胞因數釋放，顯示更廣泛的臨床應用前景。

【0447】 實 例 8.LCAR-L186S T 細 胞 和 LCAR-UL186S CAR+/TCRαβ- T細胞的體內功效評價

【0448】 *1. 淋巴瘤異種移植小鼠模型建立和存活指數監測*

【0449】 使用嚴重免疫缺陷型小鼠模型研究CD20 CAR-T細胞或ITAM修飾的CD20 CAR-T細胞對腫瘤細胞的體內細胞毒性。將來自實例3的LCAR-UL186S T細胞針對TCRαβ-細胞進行MACS富集，得到TCRαβ- MACS分選的「LCAR-UL186S CAR+/TCRαβ- T細胞」。在這個實例中使用LCAR-L186S T細胞（未經MACS富集，來自實例3）和TCRαβ- MACS分選的LCAR-UL186S CAR+/TCRαβ- T細胞。在第-4天經由尾靜脈向免疫缺陷型NCG小鼠植入CD20+腫瘤細胞（3×10^4個人Raji.Luc細胞/小鼠），然後在第0天每只小鼠接受2×10^6個LCAR-L186S T細胞（第4組小鼠，8只小鼠）或LCAR-UL186S CAR+/TCRαβ- T細胞（第3組小鼠，8只小鼠）的單一注射。第1組小鼠（8只小鼠）接受HBSS注射，第2組小鼠（8只小鼠）接受未轉導的T細胞（UnT）注射，用作陰性對照。每天監測小鼠，並且每週通過生物發光成像進行評估，以監測腫瘤生長和體重。參加圖11A。監測小鼠存活並通過Kaplan-Meier存活圖進行記錄。

【0450】 *2. LCAR-L186S T細胞和LCAR-UL186S CAR+/TCRαβ- T細胞的體內功效*

【0451】 如圖11A-圖11D中所示，在Raji.Luc（CD20+）細胞植入後，媒介物（HBSS，漢克平衡鹽溶液；第1組）或未轉導的T細胞

治療（第2組）沒有抑制腫瘤細胞的生長。由於腫瘤負荷、痰、體重減輕（圖11C）、身體寒冷和其他症狀，從接受治療的第15天開始將這2組中的小鼠安樂死。與這些對照小鼠相比，在自治療起20天內，在用LCAR-L186S T細胞或LCAR-UL186S CAR+/TCRαβ- T細胞治療的小鼠中，沒有觀察到生物發光。這些結果表明，LCAR-L186S T細胞和LCAR-UL186S CAR+/TCRαβ- T細胞可以在體內有效抑制B細胞淋巴瘤的生長。

【0452】 CAR-T細胞注射後28天，第3組（LCAR-UL186S CAR+/TCRαβ-）和第4組（LCAR-L186S）中的一些小鼠顯示腫瘤復發（圖11A-圖11B）。在第31天，由於復發性腫瘤，將第4組中1/8的小鼠安樂死（圖11A和圖11D）。第41天的生物發光成像顯示，第3組中1/8的小鼠和第4組中4/7的小鼠（一隻在第31天安樂死）發生腫瘤復發，具有大量光子（圖11A-圖11B）。由於癱瘓和體重減輕，將這些小鼠安樂死。存活曲線反映CAR-T細胞的總體活性。如圖11D中所示，LCAR-UL186S CAR+/TCRαβ- T細胞和LCAR-L186S T細胞二者都可以顯著延長腫瘤移植小鼠的存活，從而顯示優良的體內抗腫瘤功效，且對體重減輕的影響極小或無影響（圖11C）。此外，與LCAR-L186S T細胞（具有傳統CD3ζ細胞內信號傳導結構域的CAR）相比，LCAR-UL186S CAR+/TCRαβ- T細胞（ITAM修飾的CAR/SIV Nef M116共表現）似乎展現更好的治療功效和存活率。

【0453】 為了進一步研究LCAR-L186S T細胞和LCAR-UL186S

CAR+/TCRαβ- T細胞的長期抗腫瘤活性，隨後將在41天的CAR-T施用後沒有復發的小鼠（第3組LCAR-UL186S治療的6只小鼠、第4組LCAR-L186S治療的2只小鼠）用3×10^{4}個Raji.Luc細胞再攻毒（表示為第0天；圖12A）。在第0天向5只健康的免疫缺陷型NCG小鼠植入3×10^{4}個Raji.Luc細胞並注射HBSS（第5組），作為對照。監測移植腫瘤細胞的小鼠的狀況並且每週記錄（參見圖12A-圖12C）。在再攻毒後第14天，第4組接受LCAR-L186S T細胞治療的所有小鼠（2/2）都發生腫瘤復發（圖12A），並且Raji.Luc光子的數量增加（圖12B）。在第20天，由於癱瘓和體重減輕，將第4組中的一隻小鼠（1/2）安樂死（圖12A、圖12B和圖12D），所有小鼠於第27天死亡（圖12D）。在再攻毒後第14天，第3組只有3/6接受LCAR-UL186S CAR+/TCRαβ- T細胞治療的小鼠具有增加的Raji.Luc光強度（圖12B）和腫瘤負荷擴大（圖12A）。儘管第3組的腫瘤負荷在第21天增加（圖12A-圖12B），但是沒有因為癱瘓或體重減輕而發生死亡（圖12C-圖12D）。甚至在第27天，第3組小鼠仍然具有67%的存活率（圖12D）。對於接受HBSS的對照第5組小鼠，在腫瘤再攻毒後14天，腫瘤負荷開始逐漸增加（圖12A-圖12B），並且在第21天-第26天，由於癱瘓和體重減輕，將5只小鼠安樂死（圖12A-圖12D）。

【0454】 這些結果表明，LCAR-UL186S CAR+/TCRαβ- T細胞和LCAR-L186S T細胞二者都可以在體內有效抑制B淋巴瘤細胞的生長。此外，LCAR-UL186S CAR+/TCRαβ- T細胞在兩種腫瘤模型和腫瘤復發模型中都可以延長小鼠存活，並且對體重減輕的影響極

小或無影響（圖11C和圖12C），並且顯示比LCAR-L186S T細胞更強的體內功效和持久性。這些表明，與具有傳統CD3ζ細胞內信號傳導結構域的CAR相比，LCAR-UL186S CAR+/TCRαβ- T細胞（ITAM修飾的CAR/SIV Nef M116共表現）可以提供更有前景的治療方案。

【0455】 實例9.LIC948A22 CAR-T細胞和LUC948A22 UCAR-T細胞對多發性骨髓瘤（MM）細胞株的特異性細胞毒性

【0456】 化學合成融合基因序列CD8α SP-BCMA VHH1-連接子-BCMA VHH2-CD8α鉸鏈-CD8α TM-4-1BB-CD3ζ（「LIC948A22 CAR」，SEQ ID NO: 105用於CAR構建體）和SIV Nef M116-IRES-CD8α SP-BCMA VHH1-連接子-BCMA VHH2-CD8α鉸鏈-CD8α TM-4-1BB-ITAM010（「LUC948A22 UCAR」，SEQ ID NO: 106用於CAR構建體），並將其克隆至pLVX-hEF1α-Puro慢病毒載體中，分別用於構建重組轉移質體。將所有慢病毒轉移質體純化並包裝至慢病毒中。

【0457】 外周血單核細胞（PBMC）購自TPCS®。使用全T細胞分離套組（Miltenyi Biotec，#130-096-535）對解凍的PBMC進行磁性標記，並且分離和純化T淋巴細胞。使用CD3/CD28綴合的磁珠進行純化的T淋巴細胞的啟動和擴增。將啟動的T淋巴細胞在37°C、5% CO_2孵育器中孵育24小時。然後分別用編碼LIC948A22 CAR和LUC948A22 UCAR的慢病毒轉導T淋巴細胞。轉導後12天，收集細胞並使其經歷磁啟動細胞分選（MACS）。LIC948A22 CAR-T細胞

是在BCMA+ MACS富集後產生，並且LUC948A22 UCAR-T細胞是在TCRαβ- MACS富集後產生。收集每5×10^5個MACS分選的細胞懸浮液並在室溫下離心，棄去上清液。用DPBS使細胞重懸，並且將1 μL FITC標記的人BCMA蛋白（Biolegend，#310906）和1 μL APC抗人TCRαβ抗體（Biolegend，#B259839）添加至懸浮液中，然後在4°C下孵育30 min。在孵育後，將離心和用1 mL DPBS重懸的步驟重複兩次。然後將細胞用DPBS重懸並使其經歷螢光啟動細胞分選（FACS），用於CAR和TCRαβ的陽性率檢測。

【0458】 將從上文步驟獲得的LIC948A22 CAR-T細胞、TCRαβ MACS分選的LUC948A22 UCAR-T細胞（CAR+/TCRαβ-）或未處理的T細胞（UnT）分別在2.5:1或1.25:1的效應子與靶細胞比率（E:T）下與多發性骨髓瘤（MM）細胞株RPMI8226.Luc（具有螢光素酶（Luc）標記，BCMA+）混合，並且在Corning® 384孔實心白色板中孵育18-20小時。使用ONE-Glo™螢光素酶測定系統（TAKARA，#B6120）測量螢光素酶活性。將25 μL ONE-Glo™試劑添加至384孔板的每個孔。在孵育後，使用Spark™ 10M多功能酶標儀（TECAN）測量螢光，以計算不同T淋巴細胞對靶細胞的細胞裂解作用。

【0459】 如圖13中所示，LIC948A22 CAR-T細胞和LUC948A22 UCAR-T細胞（CAR+/TCRαβ-）的BCMA CAR陽性率分別為86.5%和85.9%。分別進一步評價LIC948A22 CAR-T細胞和LUC948A22 UCAR-T細胞（CAR+/TCRαβ-）對RPMI8226.Luc細胞株的特異性

殺傷活性。如圖14中所示，LIC948A22 CAR-T細胞和LUC948A22 UCAR-T細胞（CAR+/TCRαβ-）都可以有效介導以高於15%的相對殺傷效率對RPMI8226.Luc細胞株的CAR特異性腫瘤細胞殺傷，並且在其間沒有觀察到顯著細胞毒性差異。

【0460】 實例10.LIC948A22 CAR-T細胞和LUC948A22 UCAR-T細胞細胞因數釋放的體外分析

【0461】 將LIC948A22 CAR-T細胞和LUC948A22 UCAR-T細胞（CAR+/TCRαβ-）分別與多發性骨髓瘤細胞株RPMI8226.Luc在不同的E:T比率（2.5:1和1.25:1）下一起孵育18-20小時。收集來自共培養測定的上清液，以使用MILLIPORE MILLIPLEX® MAP 人CD8+ T細胞磁珠板根據製造商的說明書來評估17種細胞因數分子的CAR誘導的細胞因數釋放，所述細胞因數分子包括促炎因數（圖15A）、趨化因數（圖15B）和細胞因數（圖15C）。未處理的T細胞（UnT）用作對照。

【0462】 如圖15A中所示，在將LIC948A22 CAR-T細胞或LUC948A22 UCAR-T細胞（CAR+/TCRαβ-）與RPMI8226.Luc細胞株在不同的E:T比率下共培養後，促炎因數（如穿孔素、顆粒酶A、顆粒酶B、IFNγ、IL-2、IL-4、IL-5、IL-10和IL-13）的分泌與UnT組相比顯著增加（ $P< 0.05$ ）。LUC948A22 UCAR-T細胞比LIC948A22 CAR-T細胞分泌更多的IL-2。

【0463】 如圖15B中所示，在將LIC948A22 CAR-T細胞或LUC948A22 UCAR-T細胞（CAR+/TCRαβ-）與RPMI8226.Luc細胞

株在不同的E:T比率下共培養後，趨化因數（如MIP-1α、MIP-1β、sFas和sFasL）的分泌與UnT組相比顯著增加（$P < 0.05$）。同時，LUC948A22 UCAR-T細胞比LIC948A22 CAR-T細胞分泌更多的sFasL。

【0464】如圖15C中所示，在將LIC948A22 CAR-T細胞和LUC948A22 UCAR-T細胞（CAR+/TCRαβ-）與RPMI8226.Luc細胞株在不同的E:T比率下共培養後，細胞因數（如TNFα、GM-CSF和sCD137）的分泌與UnT組相比顯著增加（$P< 0.05$）。同時，LUC948A22 UCAR-T細胞比LIC948A22 CAR-T細胞分泌更多的TNFα。

【0465】總之，上文結果顯示，LUC948A22 UCAR-T細胞（CAR+/TCRαβ-）具有與自體LIC948A22 CAR-T細胞相當的作用，如細胞毒性和細胞因數釋放，表明LUC948A22 UCAR-T細胞將是有效且安全的，具有廣泛的臨床應用前景。

【0466】 實例11.SIV Nef M116在CD20 CAR-T細胞免疫療法中的用途

【0467】 ***1. SIV Nef M116+CAR一體化載體的構建***

【0468】化學合成表8中的融合基因序列，然後將其克隆至pLVX-hEF1α載體中（參見實例1），分別用於構建重組轉移質體pLVX-M1185、pLVX-M1218、pLVX-M1219、pLVX-M1124、pLVX-M1125、pLVX-M1126和pLVX-M1127。然後如實例1中所述將這些轉移質體純化並包裝至慢病毒中，下文分別稱為M1185慢病

毒、M1218慢病毒、M1219慢病毒、M1124慢病毒、M1125慢病毒、M1126慢病毒和M1127慢病毒。

【0469】 表8.示例性SIV Nef M116+CAR一體化載體

載體名稱	融合基因	融合基因結構	CAR胺基酸序列
pLVX-M1185	M1185	SIV Nef M116-IRES-CD8α SP-CD20 scFv(Leu16)-CD8α 鉸鏈 -CD8α TM-4-1BB-CD3ζ	SEQ ID NO: 97
pLVX-M1218	M1218	SIV Nef M116-IRES-CD8α SP-CD20 scFv(Leu16)-CD8α 鉸鏈 -CD8α TM-4-1BB-ITAM035	SEQ ID NO: 99
pLVX-M1219	M1219	SIV Nef M116-IRES-CD8α SP-CD20 scFv(Leu16)-CD8α 鉸鏈 -CD8α TM-4-1BB-ITAM036	SEQ ID NO: 100
pLVX-M1124	M1124	SIV Nef M116-IRES-CD8α SP-CD20 scFv(Leu16)-CD8α 鉸鏈 -CD8α TM-4-1BB-ITAM045	SEQ ID NO: 101
pLVX-M1125	M1125	SIV Nef M116-IRES-CD8α SP-CD20 scFv(Leu16)-CD8α 鉸鏈 -CD8α TM-4-1BB-ITAM046	SEQ ID NO: 102
pLVX-M1126	M1126	SIV Nef M116-IRES-CD8α SP-CD20 scFv(Leu16)-CD8α 鉸鏈 -CD8α TM-4-1BB-ITAM030	SEQ ID NO: 103
pLVX-M1127	M1127	SIV Nef M116-IRES-CD8α SP-CD20 scFv(Leu16)-CD8α 鉸鏈 -CD8α TM-4-1BB-ITAM032	SEQ ID NO: 104

【0470】 *2. SIV Nef M116對TCR的調節的評價*

【0471】 將來自實例3的慢病毒M1185、M1218、M1219、M1124、M1125、M1126、M1127和LCAR-UL186S分別添加至Jurakt細胞培養物的懸浮液中用於轉導。轉導後3天，收集5×10^5個細胞懸浮液並在室溫下離心，棄去上清液。用1 mL DPBS使細胞重懸，添加1 μL PE/Cy5抗人TCRα/β抗體（Biolegend，#306710）並將懸浮液在4°C下孵育30 min。在孵育後，將離心和用DPBS重懸的步驟重複兩次。

然後將細胞用DPBS重懸用於FACS以檢測TCRαβ表現。未轉導的Jurkat細胞（「Jurkat」）用作對照。

【0472】 如圖16A中所示，與未轉導的Jurkat細胞相比，SIV Nef M116+ITAM修飾的CD20 CAR一體化構建體轉導的Jurkat細胞顯著下調TCRαβ表現（$P < 0.05$）。

【0473】 ***3. CD20 CAR-T細胞的細胞毒性的體外測定***

【0474】 根據實例2中所述的方法製備PBMC和T淋巴細胞。啟動後3天，分別用攜載一體化構建體（包括M1185、M1218、M1219、M1124、M1125、M1126、M1127和LCAR-UL186S）的慢病毒轉導5×10^6個啟動的T淋巴細胞。將T細胞懸浮液添加至6孔板中，並且在37°C、5% CO_2孵育器中孵育過夜。轉導後3天，將修飾的T細胞分別與淋巴瘤細胞株Raji.Luc在20:1的E:T比率下混合，在Corning® 384孔實心白色板中孵育12小時。使用ONE-Glo™螢光素酶測定系統（TAKARA，#B6120）測量螢光素酶活性。將25 μL ONE-Glo™試劑添加至384孔板的每個孔，孵育，然後將其置於Spark™ 10M多功能酶標儀（TECAN）上用於螢光測量，以計算不同T淋巴細胞對靶細胞的細胞毒性。未轉導的T細胞（「UnT」）用作對照。

【0475】 如圖16B中所示，與UnT相比，SIV Nef M116+ITAM修飾的CD20 CAR一體化構建體轉導的T細胞顯示對Raji.Luc細胞株的顯著CAR介導的特異性殺傷活性（$P < 0.05$）。在M1219、M1125-M1127、LCAR-UL186S與具有傳統CD3ζ ISD的CD20 CAR

（M1185）之間，沒有觀察到細胞毒性的顯著差異（$P > 0.05$）。

【0476】 **實例12.SIV Nef M116在BCMA CAR-T細胞免疫療法中的用途**

【0477】 ***1. SIV Nef M116+CAR一體化載體的構建***

【0478】 化學合成表9中的融合基因序列，然後將其克隆至pLVX-hEF1α載體（參見實例1），分別用於構建重組轉移質體pLVX-M1215、pLVX-M1216、pLVX-M1217、pLVX-M985、pLVX-M986、pLVX-M989和pLVX-M990。然後如實例1中所述將這些轉移質體純化並包裝至慢病毒中，下文分別稱為M1215慢病毒、M1216慢病毒、M1217慢病毒、M985慢病毒、M986慢病毒、M989慢病毒和M990慢病毒。

【0479】 **表9.示例性SIV Nef M116+CAR一體化載體**

載體名稱	融合基因	融合基因結構	CAR胺基酸序列
pLVX-M1215	M1215	SIV Nef M116-IRES-CD8α SP-BCMA VHH1-連接子-BCMA VHH2-CD8α 鉸鏈 -CD8α TM-4-1BB-CD3ζ	SEQ ID NO: 105
pLVX-LUC948A22 UCAR	LUC948A22 UCAR	SIV Nef M116-IRES-CD8α SP-BCMA VHH1-連接子-BCMA VHH2-CD8α 鉸鏈 -CD8α TM-4-1BB-ITAM010	SEQ ID NO: 106
pLVX-M1216	M1216	SIV Nef M116-IRES-CD8α SP-BCMA VHH1-連接子-BCMA VHH2-CD8α 鉸鏈 -CD8α TM-4-1BB-ITAM035	SEQ ID NO: 107
pLVX-M1217	M1217	SIV Nef M116-IRES-CD8α SP-BCMA VHH1-連接子-BCMA VHH2-CD8α 鉸鏈 -CD8α TM-4-1BB-ITAM036	SEQ ID NO: 108
pLVX-M985	M985	SIV Nef M116-IRES-CD8α	SEQ ID NO:

載體名稱	融合基因	融合基因結構	CAR胺基酸序列
		SP-BCMA VHH1-連接子-BCMA VHH2-CD8α 鉸鏈-CD8α TM-4-1BB-ITAM045	109
pLVX-M986	M986	SIV Nef M116-IRES-CD8α SP-BCMA VHH1-連接子-BCMA VHH2-CD8α 鉸鏈-CD8α TM-4-1BB-ITAM046	SEQ ID NO: 110
pLVX-M989	M989	SIV Nef M116-IRES-CD8α SP-BCMA VHH1-連接子-BCMA VHH2-CD8α 鉸鏈-CD8α TM-4-1BB-ITAM030	SEQ ID NO: 111
pLVX-M990	M990	SIV Nef M116-IRES-CD8α SP-BCMA VHH1-連接子-BCMA VHH2-CD8α 鉸鏈-CD8α TM-4-1BB-ITAM032	SEQ ID NO: 112

【0480】 ***2. SIV Nef M116對TCR的調節的評價***

【0481】 將慢病毒M1215、M1216、M1217、M985、M986、M989、M990和LUC948A22 UCAR（參見實例7）分別添加至Jurakt細胞培養物的懸浮液中用於轉導。轉導後3天，收集5×10^5個細胞懸浮液並在室溫下離心，棄去上清液。用1 mL DPBS使細胞重懸，添加1 μL PE/Cy5抗人TCRα/β抗體（Biolegend，#306710）並將懸浮液在4°C下孵育30 min。在孵育後，將離心和用DPBS重懸的步驟重複兩次。然後將細胞用DPBS重懸用於FACS以檢測TCRαβ表現。未轉導的Jurakt細胞（「Jurkat」）用作對照。

【0482】 如圖17A中所示，與未轉導的Jurkat細胞相比，SIV Nef M116+ITAM修飾的BCMA CAR一體化構建體轉導的Jurkat細胞顯著下調TCRαβ表現（$P < 0.05$）。

【0483】 ***3. BCMA CAR-T細胞的細胞毒性的體外測定***

【0484】 根據實例2中所述的方法製備PBMC和T淋巴細胞。啟動後3天，分別用攜載一體化構建體（包括M1215、M1216、M1217、M985、M986、M989、M990和LUC948A22 UCAR（參見實例9））的慢病毒轉導5×10^6個啟動的T淋巴細胞。將T細胞懸浮液添加至6孔板中，並且在37°C、5% CO_2孵育器中孵育過夜。轉導後3天，將修飾的T細胞分別與多發性骨髓瘤（MM）細胞株RPMI8226.Luc在4:1的E:T比率下混合，在Corning® 384孔實心白色板中孵育12小時。使用ONE-Glo™螢光素酶測定系統（TAKARA，#B6120）測量螢光素酶活性。將25 μL ONE-Glo™試劑添加至384孔板的每個孔，孵育，然後將其置於Spark™ 10M多功能酶標儀（TECAN）上用於螢光測量，以計算不同T淋巴細胞對靶細胞的細胞毒性。未轉導的T細胞（「UnT」）用作對照。

【0485】 如圖17B中所示，與UnT相比，SIV Nef M116+ITAM修飾的BCMA CAR一體化構建體轉導的T細胞顯示對RPMI8226.Luc細胞株的顯著CAR介導的特異性殺傷活性（$P < 0.05$）。與BCMA-BBz相比，M1217、M985、M986和M989顯示顯著CAR特異性細胞毒性（$P < 0.05$）。在M1216、LUC948A22 UCAR、M990與具有傳統CD3ζ ISD的BCMA CAR（M1215）之間，沒有觀察到細胞毒性的顯著差異（$P > 0.05$）。

【0486】 實例13.SIV Nef M708在BCMA CAR-T細胞免疫療法中的用途

【0487】 ***1. SIV Nef M708+ITAM修飾的CAR一體化載體的構建***

【0488】 化學合成融合基因序列SIV Nef M708-IRES-CD8α SP-BCMA VHH1-連接子-BCMA VHH2-CD8α鉸鏈-CD8α TM-4-1BB-ITAM010（下文稱為M598，SIV Nef M708包含SEQ ID NO: 122的序列），然後將其克隆至pLVX-hEF1α載體中（參見實例1），用於構建重組轉移質體pLVX-M598。然後如實例1中所述將轉移質體純化並包裝至慢病毒中，下文稱為M598慢病毒。ITAM修飾的BCMA CAR構建體「CD8α SP-BCMA VHH1-連接子-BCMA VHH2-CD8α鉸鏈-CD8α TM-4-1BB-ITAM010」在本文中稱為「M598 ITAM010修飾的BCMA CAR」或「M598 BCMA CAR」，其包含SEQ ID NO: 113的序列。M598 BCMA CAR的抗BCMA VHH1和VHH2以及其中所含的CDR已經披露於PCT/CN2016/094408和PCT/CN2017/096938中，所述文獻各自的內容通過引用以其整體併入本文。

【0489】 ***2. SIV Nef M708+CAR一體化載體的體外TCRαβ調節和細胞毒性分析***

【0490】 根據實例2中所述的方法製備PBMC和T淋巴細胞。啟動後3天，用攜載M598的慢病毒轉導5×10^6個啟動的T淋巴細胞。將T細胞懸浮液添加至6孔板中，並且在37°C、5% CO_2孵育器中孵育過夜，得到M598-T細胞。轉導後3天，使用FACS檢測TCRαβ表現和CAR表現。轉導後5天，然後根據TCRα/β分離套組方案（TCRα/β-生物素，CliniMACS，#6190221004；抗生物素試劑，CliniMACS，#6190312010）使細胞懸浮液經歷分離和富集，得到MACS分選的

TCRαβ陰性M598-T細胞。使用FACS檢測MACS分選的TCRαβ陰性M598-T細胞的TCRαβ表現和CAR表現。將MACS分選的TCRαβ陰性M598-T細胞分別與多發性骨髓瘤（MM）細胞株RPMI8226.Luc在2.5:1、1.25:1和1:1.25的不同的E:T比率下混合，在Corning® 384孔實心白色板中孵育18-24小時。使用ONE-Glo™螢光素酶測定系統（TAKARA，#B6120）測量螢光素酶活性。將25 μL ONE-Glo™試劑添加至384孔板的每個孔，孵育，然後將其置於Spark™ 10M多功能酶標儀（TECAN）上用於螢光測量，以計算不同T淋巴細胞對靶細胞的細胞毒性。未轉導的T細胞（「UnT」）用作對照。

【0491】 如圖18A-圖18B中所示，M598-T細胞的TCRαβ陽性率（TCRαβ陽性率為59.7%）顯著低於UnT（TCRαβ陽性率為88.6%）；M598-T細胞的CAR陽性率（CAR陽性率為37.5%）顯著高於UnT（CAR陽性率為1.11%）；MACS分選的TCRαβ陽性M598-T細胞展現2.64% TCRαβ陽性率和88.0% CAR陽性率。這些結果表明，M598轉導的T細胞表現CAR，同時有效抑制TCRαβ表現。

【0492】 如圖18C中所示，與UnT相比，在不同的E:T比率下，MACS分選的TCRαβ陰性M598-T細胞顯示對RPMI8226.Luc細胞株的顯著CAR介導的特異性殺傷活性（$P < 0.05$），其具有50.32% ± 2.56%的殺傷效率。

【0493】 總之，上文結果表明，截短的SIV Nef的SIV Nef M708與CAR表現T細胞的組合可以有效抑制TCRαβ表現，同時不影響CAR介導的特異性細胞毒性活性。

【0494】 **實例14.在CAR-T細胞免疫療法中具有對TCRαβ和MHC表現的雙重調節的SIV Nef亞型**

【0495】 ***1. SIV Nef M1275+ITAM修飾的CD20 CAR一體化載體的構建***

【0496】 然後將融合基因SIV Nef M1275-IRES-CD8α SP-CD20 scFv（Leu16）-CD8α鉸鏈-CD8α TM-4-1BB-ITAM010（下文稱為M1392，SIV Nef M1275包含SEQ ID NO: 136的序列）克隆至pLVX-hEF1α載體中（參見實例1），用於構建重組轉移質體pLVX-M1392。然後如實例1中所述將轉移質體純化並包裝至慢病毒中，下文稱為M1392慢病毒。所編碼的ITAM修飾的CD20 CAR構建體「CD8α SP-CD20 scFv（Leu16）-CD8α鉸鏈-CD8α TM-4-1BB-ITAM010」包含SEQ ID NO: 98的序列，也稱為「ITAM010修飾的CD20 CAR」。

【0497】 ***2. SIV Nef M1275+ITAM修飾的CD20 CAR一體化構建體轉導的CAR-T細胞的TCRαβ和MHC I類分子表現***

【0498】 根據實例2中所述的方法製備PBMC和T淋巴細胞。啟動後3天，分別用慢病毒M1392（下文稱為M1392-T細胞）和LCAR-UL186S（來自實例3；下文稱為LCAR-UL186S T細胞）轉導5×10^6個啟動的T淋巴細胞。將T細胞懸浮液添加至6孔板中，並且在37°C、5% CO_2孵育器中孵育過夜。轉導後3天，分別收集M1392-T和LCAR-UL186S T的5×10^5個細胞懸浮液並在室溫下離心，棄去上清液。用1 mL DPBS使細胞重懸並將1 μL山羊F(ab')2

抗小鼠IgG (Fab')2（FITC）（Abcam，#AB98658）添加至懸浮液中，然後在4°C下孵育30 min。在孵育後，將離心和用DPBS重懸的步驟重複兩次。然後用1 mL DPBS使細胞重懸，然後添加1 μL鏈黴親和素（NEW ENGLAND BIOLABS，#N7021S）和1 μL APC抗人TCRα/β抗體（Biolegend，#306718），將懸浮液在4°C下孵育30 min。在孵育後，將離心和用DPBS重懸的步驟重複兩次。然後將細胞用DPBS重懸用於FACS以檢測TCRαβ和CD20 CAR的表現。轉導後3天，分別收集M1392-T和LCAR-UL186S T的5×10^5個細胞懸浮液並在室溫下離心，棄去上清液。用1 mL DPBS使細胞重懸，然後添加1 μL APC抗人TCRα/β抗體（Biolegend，#306718）和1 μL PE抗人HLA-B7抗體（Biolegend，#372404），並將懸浮液在4°C下孵育30 min。在孵育後，將離心和用DPBS重懸的步驟重複兩次。然後將細胞用DPBS重懸用於FACS以檢測TCRαβ和HLA-B7的表現。未轉導的T細胞（「UnT」）用作對照。

【0499】 如圖19A中所示，UnT、LCAR-UL186S T細胞和M1392-T細胞的CAR陽性和TCRαβ陰性（CAR+/TCRαβ-）率分別為0.745%、13.7%和21.3%。如圖19B中所示，UnT、LCAR-UL186S T細胞和M1392-T細胞的HLA-B7陰性和TCRαβ陰性（HLA-B7-/TCRαβ-）率分別為0.641%、0.723%和22.7%。這些結果表明，SIV Nef M1275+ITAM修飾的CD20 CAR構建體（M1392）轉導的T細胞表現CAR，同時有效下調TCRαβ和MHC I類分子的表現。

【0500】 ***3. 用SIV Nef 1275+ITAM修飾的CD20 CAR一體化構建***

體轉導的CAR-T細胞中的MHC I類交叉反應性的評價

【0501】 根據實例2中所述的方法製備PBMC和T淋巴細胞。啟動後3天，用慢病毒LCAR-L186S（來自實例3，下文稱為LCAR-L186S T細胞）轉導5×10^6個啟動的T淋巴細胞。

【0502】 轉導後3天，使50% LCAR-L186S T細胞經歷CRISPR/Cas9技術（SEQ ID NO: 138）和分離，以構建B2M敲除（B2M KO）細胞（下文稱為B2M KO LCAR-L186S T細胞）。然後根據TCRα/β分離套組方案（TCRα/β-生物素，CliniMACS，#6190221004；抗生物素試劑，CliniMACS，#6190312010）使上文獲得的M1392-T細胞懸浮液經歷分離和富集，得到MACS分選的TCRαβ陰性M1392-T細胞（下文稱為TCRαβ- M1392-T細胞）。參考混合淋巴細胞反應（MLR，參見Jiangtao Ren, 2017）對LCAR-L186S T細胞、B2M KO LCAR-L186S T細胞和TCRαβ- M1392-T細胞的MHC I類交叉反應性進行評價。

【0503】 如圖19C中所示，在與效應細胞以1:1的E:T比率一起孵育後48小時，TCRαβ- M1392-T細胞釋放的IFN-γ的水準顯著低於LCAR-L186S（$P < 0.05$），並且與B2M KO LCAR-L186S T細胞相似（$P > 0.05$）。這些結果表明，M1392（SIV Nef M1215/ITAM010修飾的CD20 CAR共表現）可以顯著降低效應細胞的MHC I類交叉反應性。

【0504】 ***4. 用SIV Nef M1275+ITAM修飾的CD20 CAR一體化構建體轉導的CAR-T細胞的體外細胞毒性測定***

【0505】 將上文獲得的MACS分選的TCRαβ- M1392-T細胞分別與淋巴瘤Raji.Luc細胞株在20:1、10:1和5:1的不同的E:T比率下混合，在Corning® 384孔實心白色板中孵育12小時。使用ONE-Glo™螢光素酶測定系統（TAKARA，#B6120）測量螢光素酶活性。將25 μL ONE-Glo™試劑添加至384孔板的每個孔，孵育，然後將其置於Spark™ 10M多功能酶標儀（TECAN）上用於螢光測量，以計算不同T淋巴細胞對靶細胞的細胞毒性。未轉導的T細胞（「UnT」）用作對照。

【0506】 如圖19D中所示，與UnT相比，MACS分選的TCRαβ-M1392-T細胞顯示對Raji.Luc細胞株的顯著CAR介導的特異性殺傷活性（$P < 0.05$）。

【符號說明】

【0507】

無

761422002042ITAMSEQLIST

序列表

<110> 南京傳奇生物科技有限公司(NANJING LEGEND BIOTECH CO., LTD.)

<120> 工程化的T細胞及其產生方法

<130> 76142-20020.42 ITAM

<140> 109129629
<141> 2020-08-28

<150> PCT/CN2019/125681
<151> 2019-12-16

<150> PCT/CN2019/103041
<151> 2019-08-28

<160> 139

<170> 用於Windows 4.0版的FastSEQ

<210> 1
<211> 29
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 1
Asp Thr Gln Ala Leu Leu Arg Asn Asp Gln Val Tyr Gln Pro Leu Arg
 1   5   10   15
Asp Arg Asp Asp Ala Gln Tyr Ser His Leu Gly Gly Asn
            20   25

<210> 2
<211> 28
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 2
Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys
 1   5   10   15
Gly Gln Arg Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg
            20   25

<210> 3
<211> 29
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 3
Asp Lys Gln Thr Leu Leu Pro Asn Asp Gln Leu Tyr Gln Pro Leu Lys
 1   5   10   15
Asp Arg Glu Asp Asp Gln Tyr Ser His Leu Gln Gly Asn

20 25

<210> 4
<211> 29
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 4
Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn
1 5 10 15
Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg
20 25

<210> 5
<211> 29
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 5
Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
1 5 10 15
Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys
20 25

<210> 6
<211> 29
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 6
Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser
1 5 10 15
Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln
20 25

<210> 7
<211> 112
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 7
Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
1 5 10 15
Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
20 25 30
Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
35 40 45
Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
50 55 60
Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
65 70 75 80

761422002042ITAMSEQLIST

Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
85 90 95
Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
100 105 110

<210> 8
<211> 29
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 8
Arg Lys Gln Arg Ile Thr Glu Thr Glu Ser Pro Tyr Gln Glu Leu Gln
1 5 10 15
Gly Gln Arg Ser Asp Val Tyr Ser Asp Leu Asn Thr Gln
20 25

<210> 9
<211> 29
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 9
Asp Ala Gly Asp Glu Tyr Glu Asp Glu Asn Leu Tyr Glu Gly Leu Asn
1 5 10 15
Leu Asp Asp Cys Ser Met Tyr Glu Asp Ile Ser Arg Gly
20 25

<210> 10
<211> 29
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 10
Asp Ser Lys Ala Gly Met Glu Glu Asp His Thr Tyr Glu Gly Leu Asp
1 5 10 15
Ile Asp Gln Thr Ala Thr Tyr Glu Asp Ile Val Thr Leu
20 25

<210> 11
<211> 29
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 11
Ala Ile Thr Ser Tyr Glu Lys Ser Asp Gly Val Tyr Thr Gly Leu Ser
1 5 10 15
Thr Arg Asn Gln Glu Thr Tyr Glu Thr Leu Lys His Glu
20 25

<210> 12

761422002042ITAMSEQLIST

<211> 17
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 12
Asp Arg Val Tyr Glu Glu Leu Asn Ile Tyr Ser Ala Thr Tyr Ser Glu
 1   5   10   15
Leu

<210> 13
<211> 29
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 13
Ser Ser Pro Lys Gln His Pro Ser Glu Ser Val Tyr Thr Ala Leu Gln
 1   5   10   15
Arg Arg Glu Thr Glu Val Tyr Ala Cys Ile Glu Asn Glu
            20   25

<210> 14
<211> 18
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 14
Leu Tyr Thr Lys Leu Met Asn Glu Asp Pro Met Tyr Ser Met Tyr Ala
 1   5   10   15
Lys Leu

<210> 15
<211> 18
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 15
Leu Tyr Asn Lys Leu Val Asn Glu Ala Pro Val Tyr Ser Val Tyr Ser
 1   5   10   15
Lys Leu

<210> 16
<211> 21
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 16
Val Leu Glu Tyr Leu Lys Ile Ala Gln Asp Leu Glu Met Tyr Gly Val
 1   5   10   15

Asn Tyr Phe Ser Ile
20

<210> 17
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 17
Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser Gly Gly
1 5 10

<210> 18
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 18
Gly Gly Ser Gly
1

<210> 19
<211> 2
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 19
Gly Ser
1

<210> 20
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 20
Gly Ser Gly Ser Gly Ser
1 5

761422002042ITAMSEQLIST

<210> 21
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 21
Pro Pro Pro Tyr Gln Pro Leu Gly Gly Gly Gly Ser
 1   5   10

<210> 22
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 22
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1   5   10

<210> 23
<211> 1
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 23
Gly
 1

<210> 24
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 24
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 1   5   10

<210> 25
<211> 5

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 25
Cys Pro Pro Cys Pro
1 5

<210> 26
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 26
Cys Pro Arg Cys Pro
1 5

<210> 27
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 27
Cys Pro Ser Cys Pro
1 5

<210> 28
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 28
Thr Val Ala Ala Pro
1 5

<210> 29
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 29
Gly Gly Gly Gly Ser
 1   5

<210> 30
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 30
Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser
 1   5   10

<210> 31
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 31
Ser Ala Cys Tyr Cys Glu Leu Ser
 1   5

<210> 32
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 32
Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr
1   5   10   15
Lys Gly

<210> 33
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

761422002042ITAMSEQLIST

<400> 33
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 34
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 34
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 35
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 35
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15
Ser Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20

<210> 36
<211> 34
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 36
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15
Ser Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
20 25 30
Gly Ser

<210> 37
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 37
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 38
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 38
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
Gly Gly Gly Ser
20

<210> 39
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 39
Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Arg Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 40
<211> 54
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 40
Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met
1 5 10 15
Gly Gly Lys Gly Ala Leu Pro Pro Arg Gly Gly Ser Gly Arg Val Lys
20 25 30
Phe Ser Arg Ser Ala Asp Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
35 40 45
Gly Ala Leu Pro Pro Arg
50

<210> 41
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 41
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Ala Tyr Gln Gln
1 5 10 15
Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu
20 25 30
Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser Gly
35 40 45
Gly Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln
50 55 60
Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu
65 70 75 80
Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr
85 90 95
Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Gly Gly Ser Gly
100 105 110

<210> 42
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 42
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Ala Tyr Gln Gln
1 5 10 15
Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu
20 25 30
Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser Gly
35 40 45
Gly Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu
50 55 60
Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Gly Ala
65 70 75 80
Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu
85 90 95
Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Gly Gly Ser Gly
100 105 110

<210> 43
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 43
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Pro Arg Arg Lys Asn Pro
1 5 10 15
Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala
20 25 30
Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser Gly
35 40 45
Gly Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln
50 55 60
Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Pro
65 70 75 80
Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp
85 90 95
Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Gly Ser Gly
100 105 110

<210> 44
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 44
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Arg Arg Arg Gly Lys
1 5 10 15
Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr
20 25 30
Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser Gly
35 40 45
Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu
50 55 60
Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Gly Glu
65 70 75 80
Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr
85 90 95
Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Gly Gly Ser Gly
100 105 110

<210> 45
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 45

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

<210> 46
<211> 109
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 46
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Arg Pro Pro Pro Val
1 5 10 15
Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys Gly Gln Arg Asp Leu Tyr
20 25 30
Ser Gly Leu Asn Gln Arg Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser Gly Gly
35 40 45
Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys
50 55 60
Gly Gln Arg Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Gly Glu Arg Pro
65 70 75 80
Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys Gly Gln Arg
85 90 95
Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Gly Gly Ser Gly
100 105

<210> 47
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 47
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Lys Gln Thr Leu Leu
1 5 10 15
Pro Asn Asp Gln Leu Tyr Gln Pro Leu Lys Asp Arg Glu Asp Asp Gln
20 25 30
Tyr Ser His Leu Gln Gly Asn Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser Gly

35 40 45
Gly Asp Lys Gln Thr Leu Leu Pro Asn Asp Gln Leu Tyr Gln Pro Leu
50 55 60
Lys Asp Arg Glu Asp Asp Gln Tyr Ser His Leu Gln Gly Asn Gly Asp
65 70 75 80
Lys Gln Thr Leu Leu Pro Asn Asp Gln Leu Tyr Gln Pro Leu Lys Asp
85 90 95
Arg Glu Asp Asp Gln Tyr Ser His Leu Gln Gly Asn Gly Gly Ser Gly
100 105 110

<210> 48
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 48
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Lys Gln Arg Ile Thr
1 5 10 15
Glu Thr Glu Ser Pro Tyr Gln Glu Leu Gln Gly Gln Arg Ser Asp Val
20 25 30
Tyr Ser Asp Leu Asn Thr Gln Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser Gly
35 40 45
Gly Arg Lys Gln Arg Ile Thr Glu Thr Glu Ser Pro Tyr Gln Glu Leu
50 55 60
Gln Gly Gln Arg Ser Asp Val Tyr Ser Asp Leu Asn Thr Gln Gly Arg
65 70 75 80
Lys Gln Arg Ile Thr Glu Thr Glu Ser Pro Tyr Gln Glu Leu Gln Gly
85 90 95
Gln Arg Ser Asp Val Tyr Ser Asp Leu Asn Thr Gln Gly Gly Ser Gly
100 105 110

<210> 49
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 49
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ala Gly Asp Glu Tyr
1 5 10 15
Glu Asp Glu Asn Leu Tyr Glu Gly Leu Asn Leu Asp Asp Cys Ser Met
20 25 30
Tyr Glu Asp Ile Ser Arg Gly Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser Gly
35 40 45
Gly Asp Ala Gly Asp Glu Tyr Glu Asp Glu Asn Leu Tyr Glu Gly Leu
50 55 60
Asn Leu Asp Asp Cys Ser Met Tyr Glu Asp Ile Ser Arg Gly Gly Asp
65 70 75 80

Ala Gly Asp Glu Tyr Glu Asp Glu Asn Leu Tyr Glu Gly Leu Asn Leu
85 90 95
Asp Asp Cys Ser Met Tyr Glu Asp Ile Ser Arg Gly Gly Gly Ser Gly
100 105 110

<210> 50
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 50
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ser Lys Ala Gly Met
1 5 10 15
Glu Glu Asp His Thr Tyr Glu Gly Leu Asp Ile Asp Gln Thr Ala Thr
20 25 30
Tyr Glu Asp Ile Val Thr Leu Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser Gly
35 40 45
Gly Asp Ser Lys Ala Gly Met Glu Glu Asp His Thr Tyr Glu Gly Leu
50 55 60
Asp Ile Asp Gln Thr Ala Thr Tyr Glu Asp Ile Val Thr Leu Gly Asp
65 70 75 80
Ser Lys Ala Gly Met Glu Glu Asp His Thr Tyr Glu Gly Leu Asp Ile
85 90 95
Asp Gln Thr Ala Thr Tyr Glu Asp Ile Val Thr Leu Gly Gly Ser Gly
100 105 110

<210> 51
<211> 76
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 51
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Arg Val Tyr Glu Glu
1 5 10 15
Leu Asn Ile Tyr Ser Ala Thr Tyr Ser Glu Leu Gly Glu Asn Leu Tyr
20 25 30
Phe Gln Ser Gly Gly Asp Arg Val Tyr Glu Glu Leu Asn Ile Tyr Ser
35 40 45
Ala Thr Tyr Ser Glu Leu Gly Asp Arg Val Tyr Glu Glu Leu Asn Ile
50 55 60
Tyr Ser Ala Thr Tyr Ser Glu Leu Gly Gly Ser Gly
65 70 75

<210> 52
<211> 112
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 52
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ile Thr Ser Tyr Glu
1 5 10 15
Lys Ser Asp Gly Val Tyr Thr Gly Leu Ser Thr Arg Asn Gln Glu Thr
20 25 30
Tyr Glu Thr Leu Lys His Glu Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser Gly
35 40 45
Gly Ala Ile Thr Ser Tyr Glu Lys Ser Asp Gly Val Tyr Thr Gly Leu
50 55 60
Ser Thr Arg Asn Gln Glu Thr Tyr Glu Thr Leu Lys His Glu Gly Ala
65 70 75 80
Ile Thr Ser Tyr Glu Lys Ser Asp Gly Val Tyr Thr Gly Leu Ser Thr
85 90 95
Arg Asn Gln Glu Thr Tyr Glu Thr Leu Lys His Glu Gly Gly Ser Gly
100 105 110

<210> 53
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 53
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Ser Pro Lys Gln His
1 5 10 15
Pro Ser Glu Ser Val Tyr Thr Ala Leu Gln Arg Arg Glu Thr Glu Val
20 25 30
Tyr Ala Cys Ile Glu Asn Glu Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser Gly
35 40 45
Gly Ser Ser Pro Lys Gln His Pro Ser Glu Ser Val Tyr Thr Ala Leu
50 55 60
Gln Arg Arg Glu Thr Glu Val Tyr Ala Cys Ile Glu Asn Glu Gly Ser
65 70 75 80
Ser Pro Lys Gln His Pro Ser Glu Ser Val Tyr Thr Ala Leu Gln Arg
85 90 95
Arg Glu Thr Glu Val Tyr Ala Cys Ile Glu Asn Glu Gly Gly Ser Gly
100 105 110

<210> 54
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 54
Pro Pro Pro Tyr Gln Pro Leu Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Ala Tyr
1 5 10 15
Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg
20 25 30
Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln
35 40 45
Ser Gly Gly Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu
50 55 60
Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys
65 70 75 80
Gly Ser Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly
85 90 95
Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Gly
100 105 110
Ser Gly Ser Gly Ser
115

<210> 55
<211> 109
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 55
Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser Gly Gly Ala Pro Ala Tyr Gln Gln
1 5 10 15
Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu
20 25 30
Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Gly Gly Ser Gly Ala Pro Ala Tyr Gln
35 40 45
Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu
50 55 60
Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Gly Gly Ser Gly Ala Pro Ala Tyr
65 70 75 80
Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg
85 90 95
Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Gly Gly Ser Gly
100 105

<210> 56
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 56
Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser Gly Gly Glu Arg Pro Pro Pro Val
1 5 10 15

Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys Gly Gln Arg Asp Leu Tyr
20 25 30
Ser Gly Leu Asn Gln Arg Gly Gly Ser Gly Glu Arg Pro Pro Pro Val
35 40 45
Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys Gly Gln Arg Asp Leu Tyr
50 55 60
Ser Gly Leu Asn Gln Arg Gly Gly Ser Gly Glu Arg Pro Pro Pro Val
65 70 75 80
Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys Gly Gln Arg Asp Leu Tyr
85 90 95
Ser Gly Leu Asn Gln Arg Gly Gly Ser Gly
100 105

<210> 57
<211> 141
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 57
Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser Gly Gly Asp Thr Gln Ala Leu Leu
1 5 10 15
Arg Asn Asp Gln Val Tyr Gln Pro Leu Arg Asp Arg Asp Asp Ala Gln
20 25 30
Tyr Ser His Leu Gly Gly Asn Gly Gly Ser Gly Glu Arg Pro Pro Pro
35 40 45
Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys Gly Gln Arg Asp Leu
50 55 60
Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Gly Gly Ser Gly Asp Lys Gln Thr Leu
65 70 75 80
Leu Pro Asn Asp Gln Leu Tyr Gln Pro Leu Lys Asp Arg Glu Asp Asp
85 90 95
Gln Tyr Ser His Leu Gln Gly Asn Gly Gly Ser Gly Arg Lys Gln Arg
100 105 110
Ile Thr Glu Thr Glu Ser Pro Tyr Gln Glu Leu Gln Gly Gln Arg Ser
115 120 125
Asp Val Tyr Ser Asp Leu Asn Thr Gln Gly Gly Ser Gly
130 135 140

<210> 58
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 58
Asp Thr Gln Ala Leu Leu Arg Asn Asp Gln Val Tyr Gln Pro Leu Arg
1 5 10 15
Asp Arg Asp Asp Ala Gln Tyr Ser His Leu Gly Gly Asn Glu Arg Pro

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

<210> 59
<211> 145
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 59
Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Gln Ala Leu Leu
1 5 10 15
Arg Asn Asp Gln Val Tyr Gln Pro Leu Arg Asp Arg Asp Asp Ala Gln
20 25 30
Tyr Ser His Leu Gly Gly Asn Gly Gly Gly Gly Ser Glu Arg Pro Pro
35 40 45
Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys Gly Gln Arg Asp
50 55 60
Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Gly Gly Gly Gly Ser Asp Lys Gln
65 70 75 80
Thr Leu Leu Pro Asn Asp Gln Leu Tyr Gln Pro Leu Lys Asp Arg Glu
85 90 95
Asp Asp Gln Tyr Ser His Leu Gln Gly Asn Gly Gly Gly Gly Ser Arg
100 105 110
Lys Gln Arg Ile Thr Glu Thr Glu Ser Pro Tyr Gln Glu Leu Gln Gly
115 120 125
Gln Arg Ser Asp Val Tyr Ser Asp Leu Asn Thr Gln Gly Gly Gly Gly
130 135 140
Ser
145

<210> 60
<211> 143
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 60

761422002042ITAMSEQLIST

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

<210> 61
<211> 145
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 61
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Asp Thr Gln Ala Leu Leu
1 5 10 15
Arg Asn Asp Gln Val Tyr Gln Pro Leu Arg Asp Arg Asp Asp Ala Gln
20 25 30
Tyr Ser His Leu Gly Gly Asn Cys Pro Pro Cys Pro Glu Arg Pro Pro
35 40 45
Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys Gly Gln Arg Asp
50 55 60
Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Cys Pro Pro Cys Pro Asp Lys Gln
65 70 75 80
Thr Leu Leu Pro Asn Asp Gln Leu Tyr Gln Pro Leu Lys Asp Arg Glu
85 90 95
Asp Asp Gln Tyr Ser His Leu Gln Gly Asn Cys Pro Pro Cys Pro Arg
100 105 110
Lys Gln Arg Ile Thr Glu Thr Glu Ser Pro Tyr Gln Glu Leu Gln Gly
115 120 125
Gln Arg Ser Asp Val Tyr Ser Asp Leu Asn Thr Gln Cys Pro Pro Cys
130 135 140
Pro
145

<210> 62
<211> 145
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 62
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Thr Gln Ala Leu Leu
1 5 10 15
Arg Asn Asp Gln Val Tyr Gln Pro Leu Arg Asp Arg Asp Asp Ala Gln
20 25 30
Tyr Ser His Leu Gly Gly Asn Cys Pro Arg Cys Pro Glu Arg Pro Pro
35 40 45
Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys Gly Gln Arg Asp
50 55 60
Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Thr Val Ala Ala Pro Asp Lys Gln
65 70 75 80
Thr Leu Leu Pro Asn Asp Gln Leu Tyr Gln Pro Leu Lys Asp Arg Glu
85 90 95
Asp Asp Gln Tyr Ser His Leu Gln Gly Asn Cys Pro Ser Cys Pro Arg
100 105 110
Lys Gln Arg Ile Thr Glu Thr Glu Ser Pro Tyr Gln Glu Leu Gln Gly
115 120 125
Gln Arg Ser Asp Val Tyr Ser Asp Leu Asn Thr Gln Cys Pro Pro Cys
130 135 140
Pro
145

<210> 63
<211> 145
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 63
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Asp Thr Gln Ala Leu Leu
1 5 10 15
Arg Asn Asp Gln Val Tyr Gln Pro Leu Arg Asp Arg Asp Asp Ala Gln
20 25 30
Tyr Ser His Leu Gly Gly Asn Cys Pro Pro Cys Pro Glu Arg Pro Pro
35 40 45
Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys Gly Gln Arg Asp
50 55 60
Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Cys Pro Ser Cys Pro Asp Lys Gln
65 70 75 80
Thr Leu Leu Pro Asn Asp Gln Leu Tyr Gln Pro Leu Lys Asp Arg Glu
85 90 95
Asp Asp Gln Tyr Ser His Leu Gln Gly Asn Cys Pro Arg Cys Pro Arg
100 105 110
Lys Gln Arg Ile Thr Glu Thr Glu Ser Pro Tyr Gln Glu Leu Gln Gly
115 120 125
Gln Arg Ser Asp Val Tyr Ser Asp Leu Asn Thr Gln Thr Val Ala Ala
130 135 140
Pro

761422002042ITAMSEQLIST

145

<210> 64
<211> 141
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 64
Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser Gly Gly Glu Arg Pro Pro Pro Val
1 5 10 15
Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys Gly Gln Arg Asp Leu Tyr
20 25 30
Ser Gly Leu Asn Gln Arg Gly Gly Ser Gly Asp Thr Gln Ala Leu Leu
35 40 45
Arg Asn Asp Gln Val Tyr Gln Pro Leu Arg Asp Arg Asp Asp Ala Gln
50 55 60
Tyr Ser His Leu Gly Gly Asn Gly Gly Ser Gly Arg Lys Gln Arg Ile
65 70 75 80
Thr Glu Thr Glu Ser Pro Tyr Gln Glu Leu Gln Gly Gln Arg Ser Asp
85 90 95
Val Tyr Ser Asp Leu Asn Thr Gln Gly Gly Ser Gly Asp Lys Gln Thr
100 105 110
Leu Leu Pro Asn Asp Gln Leu Tyr Gln Pro Leu Lys Asp Arg Glu Asp
115 120 125
Asp Gln Tyr Ser His Leu Gln Gly Asn Gly Gly Ser Gly
130 135 140

<210> 65
<211> 141
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 65
Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser Gly Gly Asp Lys Gln Thr Leu Leu
1 5 10 15
Pro Asn Asp Gln Leu Tyr Gln Pro Leu Lys Asp Arg Glu Asp Asp Gln
20 25 30
Tyr Ser His Leu Gln Gly Asn Gly Gly Ser Gly Arg Lys Gln Arg Ile
35 40 45
Thr Glu Thr Glu Ser Pro Tyr Gln Glu Leu Gln Gly Gln Arg Ser Asp
50 55 60
Val Tyr Ser Asp Leu Asn Thr Gln Gly Gly Ser Gly Asp Thr Gln Ala
65 70 75 80
Leu Leu Arg Asn Asp Gln Val Tyr Gln Pro Leu Arg Asp Arg Asp Asp
85 90 95
Ala Gln Tyr Ser His Leu Gly Gly Asn Gly Gly Ser Gly Glu Arg Pro
100 105 110

761422002042ITAMSEQLIST

Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys Gly Gln Arg
115 120 125
Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Gly Gly Ser Gly
130 135 140

<210> 66
<211> 141
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 66
Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser Gly Gly Arg Lys Gln Arg Ile Thr
1 5 10 15
Glu Thr Glu Ser Pro Tyr Gln Glu Leu Gln Gly Gln Arg Ser Asp Val
20 25 30
Tyr Ser Asp Leu Asn Thr Gln Gly Gly Ser Gly Asp Lys Gln Thr Leu
35 40 45
Leu Pro Asn Asp Gln Leu Tyr Gln Pro Leu Lys Asp Arg Glu Asp Asp
50 55 60
Gln Tyr Ser His Leu Gln Gly Asn Gly Gly Ser Gly Glu Arg Pro Pro
65 70 75 80
Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys Gly Gln Arg Asp
85 90 95
Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Gly Gly Ser Gly Asp Thr Gln Ala
100 105 110
Leu Leu Arg Asn Asp Gln Val Tyr Gln Pro Leu Arg Asp Arg Asp Asp
115 120 125
Ala Gln Tyr Ser His Leu Gly Gly Asn Gly Gly Ser Gly
130 135 140

<210> 67
<211> 42
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 67
Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser Gly Gly Glu Arg Pro Pro Pro Val
1 5 10 15
Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys Gly Gln Arg Asp Leu Tyr
20 25 30
Ser Gly Leu Asn Gln Arg Gly Gly Ser Gly
35 40

<210> 68
<211> 43
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 68
Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser Gly Gly Asp Thr Gln Ala Leu Leu
1 5 10 15
Arg Asn Asp Gln Val Tyr Gln Pro Leu Arg Asp Arg Asp Asp Ala Gln
20 25 30
Tyr Ser His Leu Gly Gly Asn Gly Gly Ser Gly
35 40

<210> 69
<211> 75
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 69
Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser Gly Gly Asp Thr Gln Ala Leu Leu
1 5 10 15
Arg Asn Asp Gln Val Tyr Gln Pro Leu Arg Asp Arg Asp Asp Ala Gln
20 25 30
Tyr Ser His Leu Gly Gly Asn Gly Gly Ser Gly Glu Arg Pro Pro Pro
35 40 45
Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys Gly Gln Arg Asp Leu
50 55 60
Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Gly Gly Ser Gly
65 70 75

<210> 70
<211> 76
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

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

<210> 71
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 71
Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser Gly Gly Asp Thr Gln Ala Leu Leu
1 5 10 15
Arg Asn Asp Gln Val Tyr Gln Pro Leu Arg Asp Arg Asp Asp Ala Gln
20 25 30
Tyr Ser His Leu Gly Gly Asn Gly Gly Ser Gly Glu Arg Pro Pro Pro
35 40 45
Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys Gly Gln Arg Asp Leu
50 55 60
Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Gly Gly Ser Gly Glu Arg Pro Pro Pro
65 70 75 80
Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys Gly Gln Arg Asp Leu
85 90 95
Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Gly Gly Ser Gly
100 105

<210> 72
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 72
Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser Gly Gly Asp Thr Gln Ala Leu Leu
1 5 10 15
Arg Asn Asp Gln Val Tyr Gln Pro Leu Arg Asp Arg Asp Asp Ala Gln
20 25 30
Tyr Ser His Leu Gly Gly Asn Gly Gly Ser Gly Glu Arg Pro Pro Pro
35 40 45
Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys Gly Gln Arg Asp Leu
50 55 60
Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Gly Gly Ser Gly Asp Lys Gln Thr Leu
65 70 75 80
Leu Pro Asn Asp Gln Leu Tyr Gln Pro Leu Lys Asp Arg Glu Asp Asp
85 90 95
Gln Tyr Ser His Leu Gln Gly Asn Gly Gly Ser Gly
100 105

<210> 73
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 73
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Lys Gln Arg Ile Thr
1 5 10 15
Glu Thr Glu Ser Pro Tyr Gln Glu Leu Gln Gly Gln Arg Ser Asp Val
20 25 30
Tyr Ser Asp Leu Asn Thr Gln Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser Gly
35 40 45
Gly Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg
50 55 60
Lys Gly Gln Arg Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Gly Asp Thr
65 70 75 80
Gln Ala Leu Leu Arg Asn Asp Gln Val Tyr Gln Pro Leu Arg Asp Arg
85 90 95
Asp Asp Ala Gln Tyr Ser His Leu Gly Gly Asn Gly Gly Ser Gly
100 105 110

<210> 74
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 74
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Lys Gln Arg Ile Thr
1 5 10 15
Glu Thr Glu Ser Pro Tyr Gln Glu Leu Gln Gly Gln Arg Ser Asp Val
20 25 30
Tyr Ser Asp Leu Asn Thr Gln Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser Gly
35 40 45
Gly Asp Thr Gln Ala Leu Leu Arg Asn Asp Gln Val Tyr Gln Pro Leu
50 55 60
Arg Asp Arg Asp Asp Ala Gln Tyr Ser His Leu Gly Gly Asn Gly Glu
65 70 75 80
Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys Gly
85 90 95
Gln Arg Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Gly Gly Ser Gly
100 105 110

<210> 75
<211> 499
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 75

761422002042ITAMSEQLIST

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15
His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Pro Ser Leu
20 25 30
Ala Met Ser Leu Gly Lys Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu
35 40 45
Ser Val Thr Ile Leu Gly Ser His Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys
50 55 60
Pro Gly Gln Pro Pro Thr Leu Leu Ile Gln Leu Ala Ser Asn Val Gln
65 70 75 80
Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe
85 90 95
Thr Leu Thr Ile Asp Pro Val Glu Glu Asp Asp Val Ala Val Tyr Tyr
100 105 110
Cys Leu Gln Ser Arg Thr Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
115 120 125
Leu Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly
130 135 140
Glu Gly Ser Thr Lys Gly Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu
145 150 155 160
Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly
165 170 175
Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ser Ile Asn Trp Val Lys Arg Ala Pro Gly
180 185 190
Lys Gly Leu Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro
195 200 205
Ala Tyr Ala Tyr Asp Phe Arg Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr
210 215 220
Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Tyr Glu Asp
225 230 235 240
Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
245 250 255
Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Phe Val Pro Val Phe
260 265 270
Leu Pro Thr Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala
275 280 285
Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg
290 295 300
Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys
305 310 315 320
Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu
325 330 335
Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu
340 345 350
Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln
355 360 365
Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly
370 375 380
Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr
385 390 395 400
Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg
405 410 415
Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met
420 425 430
Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu

435 440 445
Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys
450 455 460
Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu
465 470 475 480
Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu
485 490 495
Pro Pro Arg

<210> 76
<211> 504
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 76
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15
His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Pro Ser Leu
20 25 30
Ala Met Ser Leu Gly Lys Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu
35 40 45
Ser Val Thr Ile Leu Gly Ser His Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys
50 55 60
Pro Gly Gln Pro Pro Thr Leu Leu Ile Gln Leu Ala Ser Asn Val Gln
65 70 75 80
Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe
85 90 95
Thr Leu Thr Ile Asp Pro Val Glu Glu Asp Asp Val Ala Val Tyr Tyr
100 105 110
Cys Leu Gln Ser Arg Thr Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
115 120 125
Leu Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly
130 135 140
Glu Gly Ser Thr Lys Gly Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu
145 150 155 160
Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly
165 170 175
Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ser Ile Asn Trp Val Lys Arg Ala Pro Gly
180 185 190
Lys Gly Leu Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro
195 200 205
Ala Tyr Ala Tyr Asp Phe Arg Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr
210 215 220
Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Tyr Glu Asp
225 230 235 240
Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
245 250 255
Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Phe Val Pro Val Phe
260 265 270
Leu Pro Thr Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala

275 280 285
Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg
290 295 300
Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys
305 310 315 320
Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu
325 330 335
Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu
340 345 350
Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln
355 360 365
Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly
370 375 380
Cys Glu Leu Pro Pro Pro Tyr Gln Pro Leu Gly Gly Gly Gly Ser Ala
385 390 395 400
Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu
405 410 415
Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Gly Glu Asn Leu
420 425 430
Tyr Phe Gln Ser Gly Gly Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu
435 440 445
Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile
450 455 460
Gly Met Lys Gly Ser Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu
465 470 475 480
Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His
485 490 495
Met Gln Gly Ser Gly Ser Gly Ser
500

<210> 77
<211> 496
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 77
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15
His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Pro Ser Leu
20 25 30
Ala Met Ser Leu Gly Lys Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu
35 40 45
Ser Val Thr Ile Leu Gly Ser His Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys
50 55 60
Pro Gly Gln Pro Pro Thr Leu Leu Ile Gln Leu Ala Ser Asn Val Gln
65 70 75 80
Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe
85 90 95
Thr Leu Thr Ile Asp Pro Val Glu Glu Asp Asp Val Ala Val Tyr Tyr
100 105 110
Cys Leu Gln Ser Arg Thr Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys

115 120 125
Leu Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly
130 135 140
Glu Gly Ser Thr Lys Gly Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu
145 150 155 160
Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly
165 170 175
Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ser Ile Asn Trp Val Lys Arg Ala Pro Gly
180 185 190
Lys Gly Leu Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro
195 200 205
Ala Tyr Ala Tyr Asp Phe Arg Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr
210 215 220
Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Tyr Glu Asp
225 230 235 240
Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
245 250 255
Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Phe Val Pro Val Phe
260 265 270
Leu Pro Thr Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala
275 280 285
Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg
290 295 300
Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys
305 310 315 320
Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu
325 330 335
Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu
340 345 350
Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln
355 360 365
Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly
370 375 380
Cys Glu Leu Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser Gly Gly Ala Pro Ala
385 390 395 400
Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg
405 410 415
Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Gly Gly Ser Gly Ala Pro
420 425 430
Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly
435 440 445
Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Gly Gly Ser Gly Ala
450 455 460
Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu
465 470 475 480
Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Gly Gly Ser Gly
485 490 495

<210> 78
<211> 493
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構建體

<400> 78

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15
His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Pro Ser Leu
20 25 30
Ala Met Ser Leu Gly Lys Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu
35 40 45
Ser Val Thr Ile Leu Gly Ser His Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys
50 55 60
Pro Gly Gln Pro Pro Thr Leu Leu Ile Gln Leu Ala Ser Asn Val Gln
65 70 75 80
Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe
85 90 95
Thr Leu Thr Ile Asp Pro Val Glu Glu Asp Asp Val Ala Val Tyr Tyr
100 105 110
Cys Leu Gln Ser Arg Thr Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
115 120 125
Leu Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly
130 135 140
Glu Gly Ser Thr Lys Gly Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu
145 150 155 160
Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly
165 170 175
Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ser Ile Asn Trp Val Lys Arg Ala Pro Gly
180 185 190
Lys Gly Leu Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro
195 200 205
Ala Tyr Ala Tyr Asp Phe Arg Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr
210 215 220
Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Tyr Glu Asp
225 230 235 240
Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
245 250 255
Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Phe Val Pro Val Phe
260 265 270
Leu Pro Thr Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala
275 280 285
Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg
290 295 300
Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys
305 310 315 320
Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu
325 330 335
Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu
340 345 350
Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln
355 360 365
Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly
370 375 380
Cys Glu Leu Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser Gly Gly Glu Arg Pro
385 390 395 400
Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys Gly Gln Arg
405 410 415

761422002042ITAMSEQLIST

Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Gly Gly Ser Gly Glu Arg Pro
420 425 430
Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys Gly Gln Arg
435 440 445
Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Gly Gly Ser Gly Glu Arg Pro
450 455 460
Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys Gly Gln Arg
465 470 475 480
Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Gly Gly Ser Gly
485 490

<210> 79
<211> 528
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 79
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15
His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Pro Ser Leu
20 25 30
Ala Met Ser Leu Gly Lys Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu
35 40 45
Ser Val Thr Ile Leu Gly Ser His Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys
50 55 60
Pro Gly Gln Pro Pro Thr Leu Leu Ile Gln Leu Ala Ser Asn Val Gln
65 70 75 80
Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe
85 90 95
Thr Leu Thr Ile Asp Pro Val Glu Glu Asp Asp Val Ala Val Tyr Tyr
100 105 110
Cys Leu Gln Ser Arg Thr Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
115 120 125
Leu Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly
130 135 140
Glu Gly Ser Thr Lys Gly Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu
145 150 155 160
Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly
165 170 175
Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ser Ile Asn Trp Val Lys Arg Ala Pro Gly
180 185 190
Lys Gly Leu Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro
195 200 205
Ala Tyr Ala Tyr Asp Phe Arg Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr
210 215 220
Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Tyr Glu Asp
225 230 235 240
Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
245 250 255
Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Phe Val Pro Val Phe
260 265 270

Leu Pro Thr Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala
275 280 285
Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg
290 295 300
Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys
305 310 315 320
Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu
325 330 335
Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu
340 345 350
Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln
355 360 365
Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly
370 375 380
Cys Glu Leu Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser Gly Gly Asp Thr Gln
385 390 395 400
Ala Leu Leu Arg Asn Asp Gln Val Tyr Gln Pro Leu Arg Asp Arg Asp
405 410 415
Asp Ala Gln Tyr Ser His Leu Gly Gly Asn Gly Gly Ser Gly Glu Arg
420 425 430
Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys Gly Gln
435 440 445
Arg Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Gly Gly Ser Gly Asp Lys
450 455 460
Gln Thr Leu Leu Pro Asn Asp Gln Leu Tyr Gln Pro Leu Lys Asp Arg
465 470 475 480
Glu Asp Asp Gln Tyr Ser His Leu Gln Gly Asn Gly Gly Ser Gly Arg
485 490 495
Lys Gln Arg Ile Thr Glu Thr Glu Ser Pro Tyr Gln Glu Leu Gln Gly
500 505 510
Gln Arg Ser Asp Val Tyr Ser Asp Leu Asn Thr Gln Gly Gly Ser Gly
515 520 525

<210> 80
<211> 502
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

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

Thr Leu Thr Ile Asp Pro Val Glu Glu Asp Asp Val Ala Val Tyr Tyr
100 105 110
Cys Leu Gln Ser Arg Thr Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
115 120 125
Leu Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly
130 135 140
Glu Gly Ser Thr Lys Gly Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu
145 150 155 160
Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly
165 170 175
Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ser Ile Asn Trp Val Lys Arg Ala Pro Gly
180 185 190
Lys Gly Leu Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro
195 200 205
Ala Tyr Ala Tyr Asp Phe Arg Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr
210 215 220
Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Tyr Glu Asp
225 230 235 240
Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
245 250 255
Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Phe Val Pro Val Phe
260 265 270
Leu Pro Thr Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala
275 280 285
Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg
290 295 300
Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys
305 310 315 320
Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu
325 330 335
Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu
340 345 350
Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln
355 360 365
Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly
370 375 380
Cys Glu Leu Asp Thr Gln Ala Leu Leu Arg Asn Asp Gln Val Tyr Gln
385 390 395 400
Pro Leu Arg Asp Arg Asp Asp Ala Gln Tyr Ser His Leu Gly Gly Asn
405 410 415
Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys
420 425 430
Gly Gln Arg Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Asp Lys Gln Thr
435 440 445
Leu Leu Pro Asn Asp Gln Leu Tyr Gln Pro Leu Lys Asp Arg Glu Asp
450 455 460
Asp Gln Tyr Ser His Leu Gln Gly Asn Arg Lys Gln Arg Ile Thr Glu
465 470 475 480
Thr Glu Ser Pro Tyr Gln Glu Leu Gln Gly Gln Arg Ser Asp Val Tyr
485 490 495
Ser Asp Leu Asn Thr Gln
500

<210> 81

761422002042ITAMSEQLIST

<211> 532
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 81

Met	Ala	Leu	Pro	Val	Thr	Ala	Leu	Leu	Leu	Pro	Leu	Ala	Leu	Leu	Leu
1				5				10					15		
His	Ala	Ala	Arg	Pro	Asp	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Pro	Ser	Leu
			20					25					30		
Ala	Met	Ser	Leu	Gly	Lys	Arg	Ala	Thr	Ile	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu
		35					40					45			
Ser	Val	Thr	Ile	Leu	Gly	Ser	His	Leu	Ile	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys
	50					55					60				
Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	Thr	Leu	Leu	Ile	Gln	Leu	Ala	Ser	Asn	Val	Gln
65					70					75					80
Thr	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Arg	Thr	Asp	Phe
				85					90					95	
Thr	Leu	Thr	Ile	Asp	Pro	Val	Glu	Glu	Asp	Asp	Val	Ala	Val	Tyr	Tyr
			100					105					110		
Cys	Leu	Gln	Ser	Arg	Thr	Ile	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys
		115					120					125			
Leu	Glu	Ile	Lys	Gly	Ser	Thr	Ser	Gly	Ser	Gly	Lys	Pro	Gly	Ser	Gly
	130					135					140				
Glu	Gly	Ser	Thr	Lys	Gly	Gln	Ile	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu
145					150					155					160
Leu	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu	Thr	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly
				165					170					175	
Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr	Ser	Ile	Asn	Trp	Val	Lys	Arg	Ala	Pro	Gly
			180					185					190		
Lys	Gly	Leu	Lys	Trp	Met	Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Glu	Thr	Arg	Glu	Pro
		195					200					205			
Ala	Tyr	Ala	Tyr	Asp	Phe	Arg	Gly	Arg	Phe	Ala	Phe	Ser	Leu	Glu	Thr
	210					215					220				
Ser	Ala	Ser	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Ile	Asn	Asn	Leu	Lys	Tyr	Glu	Asp
225					230					235					240
Thr	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	Ala	Leu	Asp	Tyr	Ser	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr
				245					250					255	
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Phe	Val	Pro	Val	Phe
			260					265					270		
Leu	Pro	Thr	Ser	Thr	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala
		275					280					285			
Pro	Thr	Ile	Ala	Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg
	290					295					300				
Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Val	His	Thr	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys
305					310					315					320
Asp	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala	Pro	Leu	Ala	Gly	Thr	Cys	Gly	Val	Leu	Leu
				325					330					335	
Leu	Ser	Leu	Val	Ile	Thr	Leu	Tyr	Cys	Lys	Arg	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu
			340					345					350		
Leu	Tyr	Ile	Phe	Lys	Gln	Pro	Phe	Met	Arg	Pro	Val	Gln	Thr	Thr	Gln
		355					360					365			
Glu	Glu	Asp	Gly	Cys	Ser	Cys	Arg	Phe	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly

370 375 380
Cys Glu Leu Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Gln
385 390 395 400
Ala Leu Leu Arg Asn Asp Gln Val Tyr Gln Pro Leu Arg Asp Arg Asp
405 410 415
Asp Ala Gln Tyr Ser His Leu Gly Gly Asn Gly Gly Gly Gly Ser Glu
420 425 430
Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys Gly
435 440 445
Gln Arg Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Gly Gly Gly Gly Ser
450 455 460
Asp Lys Gln Thr Leu Leu Pro Asn Asp Gln Leu Tyr Gln Pro Leu Lys
465 470 475 480
Asp Arg Glu Asp Asp Gln Tyr Ser His Leu Gln Gly Asn Gly Gly Gly
485 490 495
Gly Ser Arg Lys Gln Arg Ile Thr Glu Thr Glu Ser Pro Tyr Gln Glu
500 505 510
Leu Gln Gly Gln Arg Ser Asp Val Tyr Ser Asp Leu Asn Thr Gln Gly
515 520 525
Gly Gly Gly Ser
530

<210> 82
<211> 530
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 82
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15
His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Pro Ser Leu
20 25 30
Ala Met Ser Leu Gly Lys Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu
35 40 45
Ser Val Thr Ile Leu Gly Ser His Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys
50 55 60
Pro Gly Gln Pro Pro Thr Leu Leu Ile Gln Leu Ala Ser Asn Val Gln
65 70 75 80
Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe
85 90 95
Thr Leu Thr Ile Asp Pro Val Glu Glu Asp Asp Val Ala Val Tyr Tyr
100 105 110
Cys Leu Gln Ser Arg Thr Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
115 120 125
Leu Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly
130 135 140
Glu Gly Ser Thr Lys Gly Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu
145 150 155 160
Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly
165 170 175
Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ser Ile Asn Trp Val Lys Arg Ala Pro Gly

180 185 190
Lys Gly Leu Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro
195 200 205
Ala Tyr Ala Tyr Asp Phe Arg Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr
210 215 220
Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Tyr Glu Asp
225 230 235 240
Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
245 250 255
Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Phe Val Pro Val Phe
260 265 270
Leu Pro Thr Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala
275 280 285
Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg
290 295 300
Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys
305 310 315 320
Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu
325 330 335
Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu
340 345 350
Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln
355 360 365
Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly
370 375 380
Cys Glu Leu Ser Ala Cys Tyr Cys Glu Leu Ser Asp Thr Gln Ala Leu
385 390 395 400
Leu Arg Asn Asp Gln Val Tyr Gln Pro Leu Arg Asp Arg Asp Asp Ala
405 410 415
Gln Tyr Ser His Leu Gly Gly Asn Cys Pro Ser Cys Pro Glu Arg Pro
420 425 430
Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys Gly Gln Arg
435 440 445
Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Cys Pro Ser Cys Pro Asp Lys
450 455 460
Gln Thr Leu Leu Pro Asn Asp Gln Leu Tyr Gln Pro Leu Lys Asp Arg
465 470 475 480
Glu Asp Asp Gln Tyr Ser His Leu Gln Gly Asn Cys Pro Ser Cys Pro
485 490 495
Arg Lys Gln Arg Ile Thr Glu Thr Glu Ser Pro Tyr Gln Glu Leu Gln
500 505 510
Gly Gln Arg Ser Asp Val Tyr Ser Asp Leu Asn Thr Gln Cys Pro Ser
515 520 525
Cys Pro
530

<210> 83
<211> 532
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 83

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15
His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Pro Ser Leu
20 25 30
Ala Met Ser Leu Gly Lys Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu
35 40 45
Ser Val Thr Ile Leu Gly Ser His Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys
50 55 60
Pro Gly Gln Pro Pro Thr Leu Leu Ile Gln Leu Ala Ser Asn Val Gln
65 70 75 80
Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe
85 90 95
Thr Leu Thr Ile Asp Pro Val Glu Glu Asp Asp Val Ala Val Tyr Tyr
100 105 110
Cys Leu Gln Ser Arg Thr Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
115 120 125
Leu Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly
130 135 140
Glu Gly Ser Thr Lys Gly Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu
145 150 155 160
Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly
165 170 175
Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ser Ile Asn Trp Val Lys Arg Ala Pro Gly
180 185 190
Lys Gly Leu Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro
195 200 205
Ala Tyr Ala Tyr Asp Phe Arg Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr
210 215 220
Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Tyr Glu Asp
225 230 235 240
Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
245 250 255
Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Phe Val Pro Val Phe
260 265 270
Leu Pro Thr Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala
275 280 285
Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg
290 295 300
Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys
305 310 315 320
Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu
325 330 335
Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu
340 345 350
Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln
355 360 365
Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly
370 375 380
Cys Glu Leu Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Asp Thr Gln
385 390 395 400
Ala Leu Leu Arg Asn Asp Gln Val Tyr Gln Pro Leu Arg Asp Arg Asp
405 410 415
Asp Ala Gln Tyr Ser His Leu Gly Gly Asn Cys Pro Pro Cys Pro Glu
420 425 430

Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys Gly
435 440 445
Gln Arg Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Cys Pro Pro Cys Pro
450 455 460
Asp Lys Gln Thr Leu Leu Pro Asn Asp Gln Leu Tyr Gln Pro Leu Lys
465 470 475 480
Asp Arg Glu Asp Asp Gln Tyr Ser His Leu Gln Gly Asn Cys Pro Pro
485 490 495
Cys Pro Arg Lys Gln Arg Ile Thr Glu Thr Glu Ser Pro Tyr Gln Glu
500 505 510
Leu Gln Gly Gln Arg Ser Asp Val Tyr Ser Asp Leu Asn Thr Gln Cys
515 520 525
Pro Pro Cys Pro
530

<210> 84
<211> 532
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 84
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15
His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Pro Ser Leu
20 25 30
Ala Met Ser Leu Gly Lys Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu
35 40 45
Ser Val Thr Ile Leu Gly Ser His Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys
50 55 60
Pro Gly Gln Pro Pro Thr Leu Leu Ile Gln Leu Ala Ser Asn Val Gln
65 70 75 80
Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe
85 90 95
Thr Leu Thr Ile Asp Pro Val Glu Glu Asp Asp Val Ala Val Tyr Tyr
100 105 110
Cys Leu Gln Ser Arg Thr Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
115 120 125
Leu Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly
130 135 140
Glu Gly Ser Thr Lys Gly Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu
145 150 155 160
Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly
165 170 175
Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ser Ile Asn Trp Val Lys Arg Ala Pro Gly
180 185 190
Lys Gly Leu Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro
195 200 205
Ala Tyr Ala Tyr Asp Phe Arg Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr
210 215 220
Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Tyr Glu Asp
225 230 235 240

Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
245 250 255
Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Phe Val Pro Val Phe
260 265 270
Leu Pro Thr Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala
275 280 285
Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg
290 295 300
Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys
305 310 315 320
Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu
325 330 335
Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu
340 345 350
Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln
355 360 365
Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly
370 375 380
Cys Glu Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Thr Gln
385 390 395 400
Ala Leu Leu Arg Asn Asp Gln Val Tyr Gln Pro Leu Arg Asp Arg Asp
405 410 415
Asp Ala Gln Tyr Ser His Leu Gly Gly Asn Cys Pro Arg Cys Pro Glu
420 425 430
Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys Gly
435 440 445
Gln Arg Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Thr Val Ala Ala Pro
450 455 460
Asp Lys Gln Thr Leu Leu Pro Asn Asp Gln Leu Tyr Gln Pro Leu Lys
465 470 475 480
Asp Arg Glu Asp Asp Gln Tyr Ser His Leu Gln Gly Asn Cys Pro Ser
485 490 495
Cys Pro Arg Lys Gln Arg Ile Thr Glu Thr Glu Ser Pro Tyr Gln Glu
500 505 510
Leu Gln Gly Gln Arg Ser Asp Val Tyr Ser Asp Leu Asn Thr Gln Cys
515 520 525
Pro Pro Cys Pro
530

<210> 85
<211> 532
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 85
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15
His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Pro Ser Leu
20 25 30
Ala Met Ser Leu Gly Lys Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu
35 40 45

Ser Val Thr Ile Leu Gly Ser His Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys
50 55 60
Pro Gly Gln Pro Pro Thr Leu Leu Ile Gln Leu Ala Ser Asn Val Gln
65 70 75 80
Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe
85 90 95
Thr Leu Thr Ile Asp Pro Val Glu Glu Asp Asp Val Ala Val Tyr Tyr
100 105 110
Cys Leu Gln Ser Arg Thr Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
115 120 125
Leu Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly
130 135 140
Glu Gly Ser Thr Lys Gly Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu
145 150 155 160
Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly
165 170 175
Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ser Ile Asn Trp Val Lys Arg Ala Pro Gly
180 185 190
Lys Gly Leu Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro
195 200 205
Ala Tyr Ala Tyr Asp Phe Arg Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr
210 215 220
Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Tyr Glu Asp
225 230 235 240
Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
245 250 255
Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Phe Val Pro Val Phe
260 265 270
Leu Pro Thr Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala
275 280 285
Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg
290 295 300
Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys
305 310 315 320
Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu
325 330 335
Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu
340 345 350
Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln
355 360 365
Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly
370 375 380
Cys Glu Leu Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Asp Thr Gln
385 390 395 400
Ala Leu Leu Arg Asn Asp Gln Val Tyr Gln Pro Leu Arg Asp Arg Asp
405 410 415
Asp Ala Gln Tyr Ser His Leu Gly Gly Asn Cys Pro Pro Cys Pro Glu
420 425 430
Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys Gly
435 440 445
Gln Arg Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Cys Pro Ser Cys Pro
450 455 460
Asp Lys Gln Thr Leu Leu Pro Asn Asp Gln Leu Tyr Gln Pro Leu Lys
465 470 475 480
Asp Arg Glu Asp Asp Gln Tyr Ser His Leu Gln Gly Asn Cys Pro Arg

485 490 495
Cys Pro Arg Lys Gln Arg Ile Thr Glu Thr Glu Ser Pro Tyr Gln Glu
500 505 510
Leu Gln Gly Gln Arg Ser Asp Val Tyr Ser Asp Leu Asn Thr Gln Thr
515 520 525
Val Ala Ala Pro
530

<210> 86
<211> 528
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 86
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15
His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Pro Ser Leu
20 25 30
Ala Met Ser Leu Gly Lys Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu
35 40 45
Ser Val Thr Ile Leu Gly Ser His Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys
50 55 60
Pro Gly Gln Pro Pro Thr Leu Leu Ile Gln Leu Ala Ser Asn Val Gln
65 70 75 80
Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe
85 90 95
Thr Leu Thr Ile Asp Pro Val Glu Glu Asp Asp Val Ala Val Tyr Tyr
100 105 110
Cys Leu Gln Ser Arg Thr Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
115 120 125
Leu Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly
130 135 140
Glu Gly Ser Thr Lys Gly Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu
145 150 155 160
Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly
165 170 175
Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ser Ile Asn Trp Val Lys Arg Ala Pro Gly
180 185 190
Lys Gly Leu Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro
195 200 205
Ala Tyr Ala Tyr Asp Phe Arg Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr
210 215 220
Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Tyr Glu Asp
225 230 235 240
Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
245 250 255
Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Phe Val Pro Val Phe
260 265 270
Leu Pro Thr Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala
275 280 285
Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg

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

<210> 87
<211> 528
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 87
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15
His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Pro Ser Leu
20 25 30
Ala Met Ser Leu Gly Lys Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu
35 40 45
Ser Val Thr Ile Leu Gly Ser His Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys
50 55 60
Pro Gly Gln Pro Pro Thr Leu Leu Ile Gln Leu Ala Ser Asn Val Gln
65 70 75 80
Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe
85 90 95
Thr Leu Thr Ile Asp Pro Val Glu Glu Asp Asp Val Ala Val Tyr Tyr
100 105 110
Cys Leu Gln Ser Arg Thr Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys

115 120 125
Leu Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly
130 135 140
Glu Gly Ser Thr Lys Gly Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu
145 150 155 160
Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly
165 170 175
Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ser Ile Asn Trp Val Lys Arg Ala Pro Gly
180 185 190
Lys Gly Leu Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro
195 200 205
Ala Tyr Ala Tyr Asp Phe Arg Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr
210 215 220
Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Tyr Glu Asp
225 230 235 240
Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
245 250 255
Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Phe Val Pro Val Phe
260 265 270
Leu Pro Thr Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala
275 280 285
Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg
290 295 300
Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys
305 310 315 320
Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu
325 330 335
Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu
340 345 350
Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln
355 360 365
Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly
370 375 380
Cys Glu Leu Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser Gly Gly Asp Lys Gln
385 390 395 400
Thr Leu Leu Pro Asn Asp Gln Leu Tyr Gln Pro Leu Lys Asp Arg Glu
405 410 415
Asp Asp Gln Tyr Ser His Leu Gln Gly Asn Gly Gly Ser Gly Arg Lys
420 425 430
Gln Arg Ile Thr Glu Thr Glu Ser Pro Tyr Gln Glu Leu Gln Gly Gln
435 440 445
Arg Ser Asp Val Tyr Ser Asp Leu Asn Thr Gln Gly Gly Ser Gly Asp
450 455 460
Thr Gln Ala Leu Leu Arg Asn Asp Gln Val Tyr Gln Pro Leu Arg Asp
465 470 475 480
Arg Asp Asp Ala Gln Tyr Ser His Leu Gly Gly Asn Gly Gly Ser Gly
485 490 495
Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys
500 505 510
Gly Gln Arg Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Gly Gly Ser Gly
515 520 525

<210> 88
<211> 528

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 88
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15
His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Pro Ser Leu
20 25 30
Ala Met Ser Leu Gly Lys Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu
35 40 45
Ser Val Thr Ile Leu Gly Ser His Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys
50 55 60
Pro Gly Gln Pro Pro Thr Leu Leu Ile Gln Leu Ala Ser Asn Val Gln
65 70 75 80
Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe
85 90 95
Thr Leu Thr Ile Asp Pro Val Glu Glu Asp Asp Val Ala Val Tyr Tyr
100 105 110
Cys Leu Gln Ser Arg Thr Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
115 120 125
Leu Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly
130 135 140
Glu Gly Ser Thr Lys Gly Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu
145 150 155 160
Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly
165 170 175
Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ser Ile Asn Trp Val Lys Arg Ala Pro Gly
180 185 190
Lys Gly Leu Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro
195 200 205
Ala Tyr Ala Tyr Asp Phe Arg Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr
210 215 220
Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Tyr Glu Asp
225 230 235 240
Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
245 250 255
Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Phe Val Pro Val Phe
260 265 270
Leu Pro Thr Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala
275 280 285
Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg
290 295 300
Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys
305 310 315 320
Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu
325 330 335
Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu
340 345 350
Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln
355 360 365
Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly
370 375 380

Cys Glu Leu Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser Gly Gly Arg Lys Gln
385 390 395 400
Arg Ile Thr Glu Thr Glu Ser Pro Tyr Gln Glu Leu Gln Gly Gln Arg
405 410 415
Ser Asp Val Tyr Ser Asp Leu Asn Thr Gln Gly Gly Ser Gly Asp Lys
420 425 430
Gln Thr Leu Leu Pro Asn Asp Gln Leu Tyr Gln Pro Leu Lys Asp Arg
435 440 445
Glu Asp Asp Gln Tyr Ser His Leu Gln Gly Asn Gly Gly Ser Gly Glu
450 455 460
Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys Gly
465 470 475 480
Gln Arg Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Gly Gly Ser Gly Asp
485 490 495
Thr Gln Ala Leu Leu Arg Asn Asp Gln Val Tyr Gln Pro Leu Arg Asp
500 505 510
Arg Asp Asp Ala Gln Tyr Ser His Leu Gly Gly Asn Gly Gly Ser Gly
515 520 525

<210> 89
<211> 429
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 89
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15
His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Pro Ser Leu
20 25 30
Ala Met Ser Leu Gly Lys Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu
35 40 45
Ser Val Thr Ile Leu Gly Ser His Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys
50 55 60
Pro Gly Gln Pro Pro Thr Leu Leu Ile Gln Leu Ala Ser Asn Val Gln
65 70 75 80
Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe
85 90 95
Thr Leu Thr Ile Asp Pro Val Glu Glu Asp Asp Val Ala Val Tyr Tyr
100 105 110
Cys Leu Gln Ser Arg Thr Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
115 120 125
Leu Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly
130 135 140
Glu Gly Ser Thr Lys Gly Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu
145 150 155 160
Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly
165 170 175
Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ser Ile Asn Trp Val Lys Arg Ala Pro Gly
180 185 190
Lys Gly Leu Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro
195 200 205

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

<210> 90
<211> 430
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 90
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15
His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Pro Ser Leu
20 25 30
Ala Met Ser Leu Gly Lys Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu
35 40 45
Ser Val Thr Ile Leu Gly Ser His Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys
50 55 60
Pro Gly Gln Pro Pro Thr Leu Leu Ile Gln Leu Ala Ser Asn Val Gln
65 70 75 80
Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe
85 90 95
Thr Leu Thr Ile Asp Pro Val Glu Glu Asp Asp Val Ala Val Tyr Tyr
100 105 110
Cys Leu Gln Ser Arg Thr Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
115 120 125

Leu Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly
130 135 140
Glu Gly Ser Thr Lys Gly Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu
145 150 155 160
Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly
165 170 175
Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ser Ile Asn Trp Val Lys Arg Ala Pro Gly
180 185 190
Lys Gly Leu Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro
195 200 205
Ala Tyr Ala Tyr Asp Phe Arg Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr
210 215 220
Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Tyr Glu Asp
225 230 235 240
Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
245 250 255
Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Phe Val Pro Val Phe
260 265 270
Leu Pro Thr Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala
275 280 285
Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg
290 295 300
Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys
305 310 315 320
Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu
325 330 335
Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu
340 345 350
Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln
355 360 365
Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly
370 375 380
Cys Glu Leu Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser Gly Gly Asp Thr Gln
385 390 395 400
Ala Leu Leu Arg Asn Asp Gln Val Tyr Gln Pro Leu Arg Asp Arg Asp
405 410 415
Asp Ala Gln Tyr Ser His Leu Gly Gly Asn Gly Gly Ser Gly
420 425 430

<210> 91
<211> 462
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 91
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15
His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Pro Ser Leu
20 25 30
Ala Met Ser Leu Gly Lys Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu
35 40 45

761422002042ITAMSEQLIST

Ser Val Thr Ile Leu Gly Ser His Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys
50 55 60
Pro Gly Gln Pro Pro Thr Leu Leu Ile Gln Leu Ala Ser Asn Val Gln
65 70 75 80
Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe
85 90 95
Thr Leu Thr Ile Asp Pro Val Glu Glu Asp Asp Val Ala Val Tyr Tyr
100 105 110
Cys Leu Gln Ser Arg Thr Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
115 120 125
Leu Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly
130 135 140
Glu Gly Ser Thr Lys Gly Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu
145 150 155 160
Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly
165 170 175
Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ser Ile Asn Trp Val Lys Arg Ala Pro Gly
180 185 190
Lys Gly Leu Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro
195 200 205
Ala Tyr Ala Tyr Asp Phe Arg Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr
210 215 220
Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Tyr Glu Asp
225 230 235 240
Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
245 250 255
Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Phe Val Pro Val Phe
260 265 270
Leu Pro Thr Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala
275 280 285
Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg
290 295 300
Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys
305 310 315 320
Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu
325 330 335
Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu
340 345 350
Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln
355 360 365
Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly
370 375 380
Cys Glu Leu Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser Gly Gly Asp Thr Gln
385 390 395 400
Ala Leu Leu Arg Asn Asp Gln Val Tyr Gln Pro Leu Arg Asp Arg Asp
405 410 415
Asp Ala Gln Tyr Ser His Leu Gly Gly Asn Gly Gly Ser Gly Glu Arg
420 425 430
Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys Gly Gln
435 440 445
Arg Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Gly Gly Ser Gly
450 455 460

<210> 92

761422002042ITAMSEQLIST

<211> 463
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 92

Met	Ala	Leu	Pro	Val	Thr	Ala	Leu	Leu	Leu	Pro	Leu	Ala	Leu	Leu	Leu
1				5				10					15		
His	Ala	Ala	Arg	Pro	Asp	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Pro	Ser	Leu
			20					25					30		
Ala	Met	Ser	Leu	Gly	Lys	Arg	Ala	Thr	Ile	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu
		35					40					45			
Ser	Val	Thr	Ile	Leu	Gly	Ser	His	Leu	Ile	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys
	50					55					60				
Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	Thr	Leu	Leu	Ile	Gln	Leu	Ala	Ser	Asn	Val	Gln
65					70					75					80
Thr	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Arg	Thr	Asp	Phe
				85					90					95	
Thr	Leu	Thr	Ile	Asp	Pro	Val	Glu	Glu	Asp	Asp	Val	Ala	Val	Tyr	Tyr
			100					105					110		
Cys	Leu	Gln	Ser	Arg	Thr	Ile	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys
		115					120					125			
Leu	Glu	Ile	Lys	Gly	Ser	Thr	Ser	Gly	Ser	Gly	Lys	Pro	Gly	Ser	Gly
	130					135					140				
Glu	Gly	Ser	Thr	Lys	Gly	Gln	Ile	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu
145					150					155					160
Leu	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu	Thr	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly
				165					170					175	
Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr	Ser	Ile	Asn	Trp	Val	Lys	Arg	Ala	Pro	Gly
			180					185					190		
Lys	Gly	Leu	Lys	Trp	Met	Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Glu	Thr	Arg	Glu	Pro
		195					200					205			
Ala	Tyr	Ala	Tyr	Asp	Phe	Arg	Gly	Arg	Phe	Ala	Phe	Ser	Leu	Glu	Thr
	210					215					220				
Ser	Ala	Ser	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Ile	Asn	Asn	Leu	Lys	Tyr	Glu	Asp
225					230					235					240
Thr	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	Ala	Leu	Asp	Tyr	Ser	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr
				245					250					255	
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Phe	Val	Pro	Val	Phe
			260					265					270		
Leu	Pro	Thr	Ser	Thr	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala
		275					280					285			
Pro	Thr	Ile	Ala	Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg
	290					295					300				
Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Val	His	Thr	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys
305					310					315					320
Asp	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala	Pro	Leu	Ala	Gly	Thr	Cys	Gly	Val	Leu	Leu
				325					330					335	
Leu	Ser	Leu	Val	Ile	Thr	Leu	Tyr	Cys	Lys	Arg	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu
			340					345					350		
Leu	Tyr	Ile	Phe	Lys	Gln	Pro	Phe	Met	Arg	Pro	Val	Gln	Thr	Thr	Gln
		355					360					365			
Glu	Glu	Asp	Gly	Cys	Ser	Cys	Arg	Phe	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly

370 375 380
Cys Glu Leu Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser Gly Gly Asp Lys Gln
385 390 395 400
Thr Leu Leu Pro Asn Asp Gln Leu Tyr Gln Pro Leu Lys Asp Arg Glu
405 410 415
Asp Asp Gln Tyr Ser His Leu Gln Gly Asn Gly Gly Ser Gly Arg Lys
420 425 430
Gln Arg Ile Thr Glu Thr Glu Ser Pro Tyr Gln Glu Leu Gln Gly Gln
435 440 445
Arg Ser Asp Val Tyr Ser Asp Leu Asn Thr Gln Gly Gly Ser Gly
450 455 460

<210> 93
<211> 494
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 93
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15
His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Pro Ser Leu
20 25 30
Ala Met Ser Leu Gly Lys Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu
35 40 45
Ser Val Thr Ile Leu Gly Ser His Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys
50 55 60
Pro Gly Gln Pro Pro Thr Leu Leu Ile Gln Leu Ala Ser Asn Val Gln
65 70 75 80
Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe
85 90 95
Thr Leu Thr Ile Asp Pro Val Glu Glu Asp Asp Val Ala Val Tyr Tyr
100 105 110
Cys Leu Gln Ser Arg Thr Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
115 120 125
Leu Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly
130 135 140
Glu Gly Ser Thr Lys Gly Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu
145 150 155 160
Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly
165 170 175
Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ser Ile Asn Trp Val Lys Arg Ala Pro Gly
180 185 190
Lys Gly Leu Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro
195 200 205
Ala Tyr Ala Tyr Asp Phe Arg Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr
210 215 220
Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Tyr Glu Asp
225 230 235 240
Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
245 250 255
Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Phe Val Pro Val Phe

260 265 270
Leu Pro Thr Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala
275 280 285
Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg
290 295 300
Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys
305 310 315 320
Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu
325 330 335
Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu
340 345 350
Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln
355 360 365
Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly
370 375 380
Cys Glu Leu Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser Gly Gly Asp Thr Gln
385 390 395 400
Ala Leu Leu Arg Asn Asp Gln Val Tyr Gln Pro Leu Arg Asp Arg Asp
405 410 415
Asp Ala Gln Tyr Ser His Leu Gly Gly Asn Gly Gly Ser Gly Glu Arg
420 425 430
Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys Gly Gln
435 440 445
Arg Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Gly Gly Ser Gly Glu Arg
450 455 460
Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys Gly Gln
465 470 475 480
Arg Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Gly Gly Ser Gly
485 490

<210> 94
<211> 495
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 94
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15
His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Pro Ser Leu
20 25 30
Ala Met Ser Leu Gly Lys Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu
35 40 45
Ser Val Thr Ile Leu Gly Ser His Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys
50 55 60
Pro Gly Gln Pro Pro Thr Leu Leu Ile Gln Leu Ala Ser Asn Val Gln
65 70 75 80
Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe
85 90 95
Thr Leu Thr Ile Asp Pro Val Glu Glu Asp Asp Val Ala Val Tyr Tyr
100 105 110
Cys Leu Gln Ser Arg Thr Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys

115 120 125
Leu Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly
130 135 140
Glu Gly Ser Thr Lys Gly Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu
145 150 155 160
Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly
165 170 175
Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ser Ile Asn Trp Val Lys Arg Ala Pro Gly
180 185 190
Lys Gly Leu Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro
195 200 205
Ala Tyr Ala Tyr Asp Phe Arg Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr
210 215 220
Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Tyr Glu Asp
225 230 235 240
Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
245 250 255
Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Phe Val Pro Val Phe
260 265 270
Leu Pro Thr Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala
275 280 285
Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg
290 295 300
Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys
305 310 315 320
Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu
325 330 335
Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu
340 345 350
Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln
355 360 365
Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly
370 375 380
Cys Glu Leu Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser Gly Gly Asp Thr Gln
385 390 395 400
Ala Leu Leu Arg Asn Asp Gln Val Tyr Gln Pro Leu Arg Asp Arg Asp
405 410 415
Asp Ala Gln Tyr Ser His Leu Gly Gly Asn Gly Gly Ser Gly Glu Arg
420 425 430
Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys Gly Gln
435 440 445
Arg Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Gly Gly Ser Gly Asp Lys
450 455 460
Gln Thr Leu Leu Pro Asn Asp Gln Leu Tyr Gln Pro Leu Lys Asp Arg
465 470 475 480
Glu Asp Asp Gln Tyr Ser His Leu Gln Gly Asn Gly Gly Ser Gly
485 490 495

<210> 95
<211> 498
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構建體

<400> 95

Met	Ala	Leu	Pro	Val	Thr	Ala	Leu	Leu	Leu	Pro	Leu	Ala	Leu	Leu	Leu
1				5					10					15	
His	Ala	Ala	Arg	Pro	Asp	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Pro	Ser	Leu
			20					25					30		
Ala	Met	Ser	Leu	Gly	Lys	Arg	Ala	Thr	Ile	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu
		35					40					45			
Ser	Val	Thr	Ile	Leu	Gly	Ser	His	Leu	Ile	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys
	50					55					60				
Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	Thr	Leu	Leu	Ile	Gln	Leu	Ala	Ser	Asn	Val	Gln
65					70					75					80
Thr	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Arg	Thr	Asp	Phe
				85					90					95	
Thr	Leu	Thr	Ile	Asp	Pro	Val	Glu	Glu	Asp	Asp	Val	Ala	Val	Tyr	Tyr
			100					105					110		
Cys	Leu	Gln	Ser	Arg	Thr	Ile	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys
		115					120					125			
Leu	Glu	Ile	Lys	Gly	Ser	Thr	Ser	Gly	Ser	Gly	Lys	Pro	Gly	Ser	Gly
	130					135					140				
Glu	Gly	Ser	Thr	Lys	Gly	Gln	Ile	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu
145					150					155					160
Leu	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu	Thr	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly
				165					170					175	
Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr	Ser	Ile	Asn	Trp	Val	Lys	Arg	Ala	Pro	Gly
			180					185					190		
Lys	Gly	Leu	Lys	Trp	Met	Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Glu	Thr	Arg	Glu	Pro
		195					200					205			
Ala	Tyr	Ala	Tyr	Asp	Phe	Arg	Gly	Arg	Phe	Ala	Phe	Ser	Leu	Glu	Thr
	210					215					220				
Ser	Ala	Ser	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Ile	Asn	Asn	Leu	Lys	Tyr	Glu	Asp
225					230					235					240
Thr	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	Ala	Leu	Asp	Tyr	Ser	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr
				245					250					255	
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Phe	Val	Pro	Val	Phe
			260					265					270		
Leu	Pro	Thr	Ser	Thr	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala
		275					280					285			
Pro	Thr	Ile	Ala	Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg
	290					295					300				
Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Val	His	Thr	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys
305					310					315					320
Asp	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala	Pro	Leu	Ala	Gly	Thr	Cys	Gly	Val	Leu	Leu
				325					330					335	
Leu	Ser	Leu	Val	Ile	Thr	Leu	Tyr	Cys	Lys	Arg	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu
			340					345					350		
Leu	Tyr	Ile	Phe	Lys	Gln	Pro	Phe	Met	Arg	Pro	Val	Gln	Thr	Thr	Gln
		355					360					365			
Glu	Glu	Asp	Gly	Cys	Ser	Cys	Arg	Phe	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly
	370					375					380				
Cys	Glu	Leu	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Arg	Lys	Gln
385					390					395					400
Arg	Ile	Thr	Glu	Thr	Glu	Ser	Pro	Tyr	Gln	Glu	Leu	Gln	Gly	Gln	Arg
				405					410					415	

Ser Asp Val Tyr Ser Asp Leu Asn Thr Gln Gly Glu Asn Leu Tyr Phe
420 425 430
Gln Ser Gly Gly Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu
435 440 445
Pro Ile Arg Lys Gly Gln Arg Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg
450 455 460
Gly Asp Thr Gln Ala Leu Leu Arg Asn Asp Gln Val Tyr Gln Pro Leu
465 470 475 480
Arg Asp Arg Asp Asp Ala Gln Tyr Ser His Leu Gly Gly Asn Gly Gly
485 490 495
Ser Gly

<210> 96
<211> 498
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 96
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15
His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Pro Ser Leu
20 25 30
Ala Met Ser Leu Gly Lys Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu
35 40 45
Ser Val Thr Ile Leu Gly Ser His Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys
50 55 60
Pro Gly Gln Pro Pro Thr Leu Leu Ile Gln Leu Ala Ser Asn Val Gln
65 70 75 80
Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe
85 90 95
Thr Leu Thr Ile Asp Pro Val Glu Glu Asp Asp Val Ala Val Tyr Tyr
100 105 110
Cys Leu Gln Ser Arg Thr Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
115 120 125
Leu Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly
130 135 140
Glu Gly Ser Thr Lys Gly Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu
145 150 155 160
Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly
165 170 175
Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ser Ile Asn Trp Val Lys Arg Ala Pro Gly
180 185 190
Lys Gly Leu Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro
195 200 205
Ala Tyr Ala Tyr Asp Phe Arg Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr
210 215 220
Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Tyr Glu Asp
225 230 235 240
Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
245 250 255

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Phe Val Pro Val Phe
260 265 270
Leu Pro Thr Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala
275 280 285
Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg
290 295 300
Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys
305 310 315 320
Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu
325 330 335
Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu
340 345 350
Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln
355 360 365
Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly
370 375 380
Cys Glu Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Lys Gln
385 390 395 400
Arg Ile Thr Glu Thr Glu Ser Pro Tyr Gln Glu Leu Gln Gly Gln Arg
405 410 415
Ser Asp Val Tyr Ser Asp Leu Asn Thr Gln Gly Glu Asn Leu Tyr Phe
420 425 430
Gln Ser Gly Gly Asp Thr Gln Ala Leu Leu Arg Asn Asp Gln Val Tyr
435 440 445
Gln Pro Leu Arg Asp Arg Asp Asp Ala Gln Tyr Ser His Leu Gly Gly
450 455 460
Asn Gly Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile
465 470 475 480
Arg Lys Gly Gln Arg Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Gly Gly
485 490 495
Ser Gly

<210> 97
<211> 489
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 97
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15
His Ala Ala Arg Pro Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu
20 25 30
Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr
35 40 45
Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln
50 55 60
Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser
65 70 75 80
Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser
85 90 95

Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser
100 105 110
Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Trp
115 120 125
Phe Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly
130 135 140
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile
145 150 155 160
Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys
165 170 175
Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met Asp Trp
180 185 190
Tyr Gln Lys Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr
195 200 205
Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
210 215 220
Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala
225 230 235 240
Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly
245 250 255
Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Thr Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro
260 265 270
Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu
275 280 285
Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg
290 295 300
Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly
305 310 315 320
Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys
325 330 335
Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg
340 345 350
Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro
355 360 365
Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser
370 375 380
Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu
385 390 395 400
Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg
405 410 415
Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln
420 425 430
Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr
435 440 445
Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp
450 455 460
Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala
465 470 475 480
Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
485

<210> 98
<211> 518
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 98

Met	Ala	Leu	Pro	Val	Thr	Ala	Leu	Leu	Leu	Pro	Leu	Ala	Leu	Leu	Leu
1				5				10					15		
His	Ala	Ala	Arg	Pro	Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu
			20					25					30		
Val	Lys	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Met	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr
		35					40					45			
Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr	Asn	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Thr	Pro	Gly	Gln
	50					55					60				
Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Ala	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asn	Gly	Asp	Thr	Ser
65					70					75					80
Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser
				85					90					95	
Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser
			100					105					110		
Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Ser	Asn	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Ser	Tyr	Trp
		115					120					125			
Phe	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Ala	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly
	130					135					140				
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile
145					150					155					160
Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ile	Leu	Ser	Ala	Ser	Pro	Gly	Glu	Lys
				165					170					175	
Val	Thr	Met	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Asn	Tyr	Met	Asp	Trp
			180					185					190		
Tyr	Gln	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser	Ser	Pro	Lys	Pro	Trp	Ile	Tyr	Ala	Thr
		195					200					205			
Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser
	210					215					220				
Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Ala
225					230					235					240
Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp	Ser	Phe	Asn	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly
				245					250					255	
Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Thr	Ser	Thr	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro
			260					265					270		
Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala	Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu
		275					280					285			
Arg	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Val	His	Thr	Arg
	290					295					300				
Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala	Pro	Leu	Ala	Gly
305					310					315					320
Thr	Cys	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Val	Ile	Thr	Leu	Tyr	Cys	Lys
				325					330					335	
Arg	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile	Phe	Lys	Gln	Pro	Phe	Met	Arg
			340					345					350		
Pro	Val	Gln	Thr	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp	Gly	Cys	Ser	Cys	Arg	Phe	Pro
		355					360					365			
Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	Cys	Glu	Leu	Gly	Glu	Asn	Leu	Tyr	Phe	Gln
	370					375					380				
Ser	Gly	Gly	Asp	Thr	Gln	Ala	Leu	Leu	Arg	Asn	Asp	Gln	Val	Tyr	Gln

385 390 395 400
Pro Leu Arg Asp Arg Asp Asp Ala Gln Tyr Ser His Leu Gly Gly Asn
405 410 415
Gly Gly Ser Gly Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu
420 425 430
Pro Ile Arg Lys Gly Gln Arg Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg
435 440 445
Gly Gly Ser Gly Asp Lys Gln Thr Leu Leu Pro Asn Asp Gln Leu Tyr
450 455 460
Gln Pro Leu Lys Asp Arg Glu Asp Asp Gln Tyr Ser His Leu Gln Gly
465 470 475 480
Asn Gly Gly Ser Gly Arg Lys Gln Arg Ile Thr Glu Thr Glu Ser Pro
485 490 495
Tyr Gln Glu Leu Gln Gly Gln Arg Ser Asp Val Tyr Ser Asp Leu Asn
500 505 510
Thr Gln Gly Gly Ser Gly
515

<210> 99
<211> 452
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 99
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15
His Ala Ala Arg Pro Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu
20 25 30
Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr
35 40 45
Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln
50 55 60
Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser
65 70 75 80
Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser
85 90 95
Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser
100 105 110
Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Trp
115 120 125
Phe Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly
130 135 140
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile
145 150 155 160
Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys
165 170 175
Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met Asp Trp
180 185 190
Tyr Gln Lys Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr
195 200 205
Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser

210 215 220
Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala
225 230 235 240
Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly
245 250 255
Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Thr Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro
260 265 270
Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu
275 280 285
Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg
290 295 300
Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly
305 310 315 320
Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys
325 330 335
Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg
340 345 350
Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro
355 360 365
Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln
370 375 380
Ser Gly Gly Asp Thr Gln Ala Leu Leu Arg Asn Asp Gln Val Tyr Gln
385 390 395 400
Pro Leu Arg Asp Arg Asp Asp Ala Gln Tyr Ser His Leu Gly Gly Asn
405 410 415
Gly Gly Ser Gly Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu
420 425 430
Pro Ile Arg Lys Gly Gln Arg Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg
435 440 445
Gly Gly Ser Gly
450

<210> 100
<211> 453
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 100
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15
His Ala Ala Arg Pro Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu
20 25 30
Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr
35 40 45
Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln
50 55 60
Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser
65 70 75 80
Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser
85 90 95
Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser

100 105 110
Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Trp
115 120 125
Phe Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly
130 135 140
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile
145 150 155 160
Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys
165 170 175
Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met Asp Trp
180 185 190
Tyr Gln Lys Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr
195 200 205
Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
210 215 220
Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala
225 230 235 240
Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly
245 250 255
Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Thr Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro
260 265 270
Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu
275 280 285
Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg
290 295 300
Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly
305 310 315 320
Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys
325 330 335
Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg
340 345 350
Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro
355 360 365
Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln
370 375 380
Ser Gly Gly Asp Lys Gln Thr Leu Leu Pro Asn Asp Gln Leu Tyr Gln
385 390 395 400
Pro Leu Lys Asp Arg Glu Asp Asp Gln Tyr Ser His Leu Gln Gly Asn
405 410 415
Gly Gly Ser Gly Arg Lys Gln Arg Ile Thr Glu Thr Glu Ser Pro Tyr
420 425 430
Gln Glu Leu Gln Gly Gln Arg Ser Asp Val Tyr Ser Asp Leu Asn Thr
435 440 445
Gln Gly Gly Ser Gly
450

<210> 101
<211> 488
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

761422002042ITAMSEQLIST

<400> 101

Met	Ala	Leu	Pro	Val	Thr	Ala	Leu	Leu	Leu	Pro	Leu	Ala	Leu	Leu	Leu
1				5				10					15		
His	Ala	Ala	Arg	Pro	Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu
			20					25					30		
Val	Lys	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Met	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr
		35					40					45			
Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr	Asn	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Thr	Pro	Gly	Gln
	50					55					60				
Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Ala	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asn	Gly	Asp	Thr	Ser
65					70					75					80
Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser
				85					90					95	
Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser
			100					105					110		
Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Ser	Asn	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Ser	Tyr	Trp
		115					120					125			
Phe	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Ala	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly
	130					135					140				
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile
145					150					155					160
Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ile	Leu	Ser	Ala	Ser	Pro	Gly	Glu	Lys
				165					170					175	
Val	Thr	Met	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Asn	Tyr	Met	Asp	Trp
			180					185					190		
Tyr	Gln	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser	Ser	Pro	Lys	Pro	Trp	Ile	Tyr	Ala	Thr
		195					200					205			
Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser
	210					215					220				
Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Ala
225					230					235					240
Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp	Ser	Phe	Asn	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly
				245					250					255	
Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Thr	Ser	Thr	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro
			260					265					270		
Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala	Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu
		275					280					285			
Arg	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Val	His	Thr	Arg
	290					295					300				
Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala	Pro	Leu	Ala	Gly
305					310					315					320
Thr	Cys	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Val	Ile	Thr	Leu	Tyr	Cys	Lys
				325					330					335	
Arg	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile	Phe	Lys	Gln	Pro	Phe	Met	Arg
			340					345					350		
Pro	Val	Gln	Thr	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp	Gly	Cys	Ser	Cys	Arg	Phe	Pro
		355					360					365			
Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	Cys	Glu	Leu	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
	370					375					380				
Gly	Gly	Ser	Arg	Lys	Gln	Arg	Ile	Thr	Glu	Thr	Glu	Ser	Pro	Tyr	Gln
385					390					395					400
Glu	Leu	Gln	Gly	Gln	Arg	Ser	Asp	Val	Tyr	Ser	Asp	Leu	Asn	Thr	Gln
				405					410					415	
Gly	Glu	Asn	Leu	Tyr	Phe	Gln	Ser	Gly	Gly	Glu	Arg	Pro	Pro	Pro	Val
			420					425					430		

761422002042ITAMSEQLIST

Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys Gly Gln Arg Asp Leu Tyr
435 440 445
Ser Gly Leu Asn Gln Arg Gly Asp Thr Gln Ala Leu Leu Arg Asn Asp
450 455 460
Gln Val Tyr Gln Pro Leu Arg Asp Arg Asp Asp Ala Gln Tyr Ser His
465 470 475 480
Leu Gly Gly Asn Gly Gly Ser Gly
485

<210> 102
<211> 488
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 102
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15
His Ala Ala Arg Pro Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu
20 25 30
Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr
35 40 45
Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln
50 55 60
Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser
65 70 75 80
Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser
85 90 95
Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser
100 105 110
Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Trp
115 120 125
Phe Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly
130 135 140
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile
145 150 155 160
Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys
165 170 175
Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met Asp Trp
180 185 190
Tyr Gln Lys Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr
195 200 205
Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
210 215 220
Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala
225 230 235 240
Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly
245 250 255
Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Thr Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro
260 265 270
Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu
275 280 285

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

<210> 103
<211> 518
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 103
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15
His Ala Ala Arg Pro Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu
20 25 30
Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr
35 40 45
Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln
50 55 60
Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser
65 70 75 80
Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser
85 90 95
Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser
100 105 110
Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Trp
115 120 125
Phe Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly
130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile
145 150 155 160
Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys
165 170 175
Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met Asp Trp
180 185 190
Tyr Gln Lys Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr
195 200 205
Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
210 215 220
Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala
225 230 235 240
Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly
245 250 255
Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Thr Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro
260 265 270
Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu
275 280 285
Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg
290 295 300
Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly
305 310 315 320
Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys
325 330 335
Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg
340 345 350
Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro
355 360 365
Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln
370 375 380
Ser Gly Gly Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro
385 390 395 400
Ile Arg Lys Gly Gln Arg Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Gly
405 410 415
Gly Ser Gly Asp Thr Gln Ala Leu Leu Arg Asn Asp Gln Val Tyr Gln
420 425 430
Pro Leu Arg Asp Arg Asp Asp Ala Gln Tyr Ser His Leu Gly Gly Asn
435 440 445
Gly Gly Ser Gly Arg Lys Gln Arg Ile Thr Glu Thr Glu Ser Pro Tyr
450 455 460
Gln Glu Leu Gln Gly Gln Arg Ser Asp Val Tyr Ser Asp Leu Asn Thr
465 470 475 480
Gln Gly Gly Ser Gly Asp Lys Gln Thr Leu Leu Pro Asn Asp Gln Leu
485 490 495
Tyr Gln Pro Leu Lys Asp Arg Glu Asp Asp Gln Tyr Ser His Leu Gln
500 505 510
Gly Asn Gly Gly Ser Gly
515

<210> 104
<211> 518
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 104
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15
His Ala Ala Arg Pro Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu
20 25 30
Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr
35 40 45
Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln
50 55 60
Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser
65 70 75 80
Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser
85 90 95
Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser
100 105 110
Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Trp
115 120 125
Phe Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly
130 135 140
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile
145 150 155 160
Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys
165 170 175
Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met Asp Trp
180 185 190
Tyr Gln Lys Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr
195 200 205
Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
210 215 220
Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala
225 230 235 240
Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly
245 250 255
Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Thr Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro
260 265 270
Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu
275 280 285
Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg
290 295 300
Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly
305 310 315 320
Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys
325 330 335
Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg
340 345 350
Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro
355 360 365
Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln
370 375 380
Ser Gly Gly Arg Lys Gln Arg Ile Thr Glu Thr Glu Ser Pro Tyr Gln
385 390 395 400
Glu Leu Gln Gly Gln Arg Ser Asp Val Tyr Ser Asp Leu Asn Thr Gln

405 410 415
Gly Gly Ser Gly Asp Lys Gln Thr Leu Leu Pro Asn Asp Gln Leu Tyr
420 425 430
Gln Pro Leu Lys Asp Arg Glu Asp Asp Gln Tyr Ser His Leu Gln Gly
435 440 445
Asn Gly Gly Ser Gly Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr
450 455 460
Glu Pro Ile Arg Lys Gly Gln Arg Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln
465 470 475 480
Arg Gly Gly Ser Gly Asp Thr Gln Ala Leu Leu Arg Asn Asp Gln Val
485 490 495
Tyr Gln Pro Leu Arg Asp Arg Asp Asp Ala Gln Tyr Ser His Leu Gly
500 505 510
Gly Asn Gly Gly Ser Gly
515

<210> 105
<211> 487
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 105
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15
His Ala Ala Arg Pro Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
20 25 30
Val Gln Ala Gly Asp Ser Leu Arg Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Arg
35 40 45
Ala Phe Ser Thr Tyr Phe Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys
50 55 60
Glu Arg Glu Phe Val Ala Gly Ile Ala Trp Ser Gly Gly Ser Thr Ala
65 70 75 80
Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
85 90 95
Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr
100 105 110
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Arg Gly Ile Glu Val Glu Glu Phe Gly
115 120 125
Ala Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
130 135 140
Ser Gln Val Gln Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly
145 150 155 160
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Tyr Thr Tyr Ser Thr Tyr Ser Asn
165 170 175
Tyr Tyr Met Gly Trp Phe Arg Glu Ala Pro Gly Lys Ala Arg Thr Ser
180 185 190
Val Ala Ile Ile Ser Ser Asp Thr Thr Ile Thr Tyr Lys Asp Ala Val
195 200 205
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
210 215 220
Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Ser Ala Met Tyr Arg Cys

225 230 235 240
Ala Ala Trp Thr Ser Asp Trp Ser Val Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
245 250 255
Gln Val Thr Val Ser Ser Thr Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro
260 265 270
Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro
275 280 285
Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu
290 295 300
Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys
305 310 315 320
Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly
325 330 335
Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val
340 345 350
Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu
355 360 365
Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp
370 375 380
Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn
385 390 395 400
Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg
405 410 415
Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly
420 425 430
Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu
435 440 445
Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu
450 455 460
Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His
465 470 475 480
Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
485

<210> 106
<211> 516
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 106
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15
His Ala Ala Arg Pro Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
20 25 30
Val Gln Ala Gly Asp Ser Leu Arg Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Arg
35 40 45
Ala Phe Ser Thr Tyr Phe Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys
50 55 60
Glu Arg Glu Phe Val Ala Gly Ile Ala Trp Ser Gly Gly Ser Thr Ala
65 70 75 80
Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala

85 90 95
Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr
100 105 110
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Arg Gly Ile Glu Val Glu Glu Phe Gly
115 120 125
Ala Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
130 135 140
Ser Gln Val Gln Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly
145 150 155 160
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Tyr Thr Tyr Ser Thr Tyr Ser Asn
165 170 175
Tyr Tyr Met Gly Trp Phe Arg Glu Ala Pro Gly Lys Ala Arg Thr Ser
180 185 190
Val Ala Ile Ile Ser Ser Asp Thr Thr Ile Thr Tyr Lys Asp Ala Val
195 200 205
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
210 215 220
Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Ser Ala Met Tyr Arg Cys
225 230 235 240
Ala Ala Trp Thr Ser Asp Trp Ser Val Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
245 250 255
Gln Val Thr Val Ser Ser Thr Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro
260 265 270
Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro
275 280 285
Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu
290 295 300
Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys
305 310 315 320
Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly
325 330 335
Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val
340 345 350
Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu
355 360 365
Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser Gly
370 375 380
Gly Asp Thr Gln Ala Leu Leu Arg Asn Asp Gln Val Tyr Gln Pro Leu
385 390 395 400
Arg Asp Arg Asp Asp Ala Gln Tyr Ser His Leu Gly Gly Asn Gly Gly
405 410 415
Ser Gly Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile
420 425 430
Arg Lys Gly Gln Arg Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Gly Gly
435 440 445
Ser Gly Asp Lys Gln Thr Leu Leu Pro Asn Asp Gln Leu Tyr Gln Pro
450 455 460
Leu Lys Asp Arg Glu Asp Asp Gln Tyr Ser His Leu Gln Gly Asn Gly
465 470 475 480
Gly Ser Gly Arg Lys Gln Arg Ile Thr Glu Thr Glu Ser Pro Tyr Gln
485 490 495
Glu Leu Gln Gly Gln Arg Ser Asp Val Tyr Ser Asp Leu Asn Thr Gln
500 505 510
Gly Gly Ser Gly
515

761422002042ITAMSEQLIST

<210> 107
<211> 450
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 107

Met	Ala	Leu	Pro	Val	Thr	Ala	Leu	Leu	Leu	Pro	Leu	Ala	Leu	Leu
1				5				10					15	
His	Ala	Ala	Arg	Pro	Ala	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu
			20					25					30		
Val	Gln	Ala	Gly	Asp	Ser	Leu	Arg	Leu	Thr	Cys	Thr	Ala	Ser	Gly	Arg
		35					40					45			
Ala	Phe	Ser	Thr	Tyr	Phe	Met	Ala	Trp	Phe	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys
	50					55					60				
Glu	Arg	Glu	Phe	Val	Ala	Gly	Ile	Ala	Trp	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Ala
65					70					75					80
Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala
				85					90					95	
Lys	Asn	Thr	Val	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Ser	Glu	Asp	Thr
			100					105					110		
Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Ser	Arg	Gly	Ile	Glu	Val	Glu	Glu	Phe	Gly
		115					120					125			
Ala	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly
	130					135					140				
Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Glu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Val	Gln	Ala	Gly
145					150					155					160
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Tyr	Thr	Tyr	Ser	Thr	Tyr	Ser	Asn
				165					170					175	
Tyr	Tyr	Met	Gly	Trp	Phe	Arg	Glu	Ala	Pro	Gly	Lys	Ala	Arg	Thr	Ser
			180					185					190		
Val	Ala	Ile	Ile	Ser	Ser	Asp	Thr	Thr	Ile	Thr	Tyr	Lys	Asp	Ala	Val
		195					200					205			
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
	210					215					220				
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Ser	Ala	Met	Tyr	Arg	Cys
225					230					235					240
Ala	Ala	Trp	Thr	Ser	Asp	Trp	Ser	Val	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
				245					250					255	
Gln	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Thr	Ser	Thr	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro
			260					265					270		
Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala	Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg	Pro
		275					280					285			
Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Val	His	Thr	Arg	Gly	Leu
	290					295					300				
Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala	Pro	Leu	Ala	Gly	Thr	Cys
305					310					315					320
Gly	Val	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Val	Ile	Thr	Leu	Tyr	Cys	Lys	Arg	Gly
				325					330					335	
Arg	Lys	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile	Phe	Lys	Gln	Pro	Phe	Met	Arg	Pro	Val
			340					345					350		

Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu
355 360 365
Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser Gly
370 375 380
Gly Asp Thr Gln Ala Leu Leu Arg Asn Asp Gln Val Tyr Gln Pro Leu
385 390 395 400
Arg Asp Arg Asp Asp Ala Gln Tyr Ser His Leu Gly Gly Asn Gly Gly
405 410 415
Ser Gly Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile
420 425 430
Arg Lys Gly Gln Arg Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Gly Gly
435 440 445
Ser Gly
450

<210> 108
<211> 451
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 108
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15
His Ala Ala Arg Pro Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
20 25 30
Val Gln Ala Gly Asp Ser Leu Arg Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Arg
35 40 45
Ala Phe Ser Thr Tyr Phe Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys
50 55 60
Glu Arg Glu Phe Val Ala Gly Ile Ala Trp Ser Gly Gly Ser Thr Ala
65 70 75 80
Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
85 90 95
Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr
100 105 110
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Arg Gly Ile Glu Val Glu Glu Phe Gly
115 120 125
Ala Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
130 135 140
Ser Gln Val Gln Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly
145 150 155 160
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Tyr Thr Tyr Ser Thr Tyr Ser Asn
165 170 175
Tyr Tyr Met Gly Trp Phe Arg Glu Ala Pro Gly Lys Ala Arg Thr Ser
180 185 190
Val Ala Ile Ile Ser Ser Asp Thr Thr Ile Thr Tyr Lys Asp Ala Val
195 200 205
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
210 215 220
Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Ser Ala Met Tyr Arg Cys
225 230 235 240

Ala Ala Trp Thr Ser Asp Trp Ser Val Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
245 250 255
Gln Val Thr Val Ser Ser Thr Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro
260 265 270
Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro
275 280 285
Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu
290 295 300
Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys
305 310 315 320
Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly
325 330 335
Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val
340 345 350
Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu
355 360 365
Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser Gly
370 375 380
Gly Asp Lys Gln Thr Leu Leu Pro Asn Asp Gln Leu Tyr Gln Pro Leu
385 390 395 400
Lys Asp Arg Glu Asp Asp Gln Tyr Ser His Leu Gln Gly Asn Gly Gly
405 410 415
Ser Gly Arg Lys Gln Arg Ile Thr Glu Thr Glu Ser Pro Tyr Gln Glu
420 425 430
Leu Gln Gly Gln Arg Ser Asp Val Tyr Ser Asp Leu Asn Thr Gln Gly
435 440 445
Gly Ser Gly
450

<210> 109
<211> 486
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 109
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15
His Ala Ala Arg Pro Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
20 25 30
Val Gln Ala Gly Asp Ser Leu Arg Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Arg
35 40 45
Ala Phe Ser Thr Tyr Phe Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys
50 55 60
Glu Arg Glu Phe Val Ala Gly Ile Ala Trp Ser Gly Gly Ser Thr Ala
65 70 75 80
Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
85 90 95
Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr
100 105 110
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Arg Gly Ile Glu Val Glu Glu Phe Gly
115 120 125

Ala Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
130 135 140
Ser Gln Val Gln Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly
145 150 155 160
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Tyr Thr Tyr Ser Thr Tyr Ser Asn
165 170 175
Tyr Tyr Met Gly Trp Phe Arg Glu Ala Pro Gly Lys Ala Arg Thr Ser
180 185 190
Val Ala Ile Ile Ser Ser Asp Thr Thr Ile Thr Tyr Lys Asp Ala Val
195 200 205
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
210 215 220
Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Ser Ala Met Tyr Arg Cys
225 230 235 240
Ala Ala Trp Thr Ser Asp Trp Ser Val Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
245 250 255
Gln Val Thr Val Ser Ser Thr Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro
260 265 270
Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro
275 280 285
Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu
290 295 300
Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys
305 310 315 320
Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly
325 330 335
Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val
340 345 350
Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu
355 360 365
Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
370 375 380
Ser Arg Lys Gln Arg Ile Thr Glu Thr Glu Ser Pro Tyr Gln Glu Leu
385 390 395 400
Gln Gly Gln Arg Ser Asp Val Tyr Ser Asp Leu Asn Thr Gln Gly Glu
405 410 415
Asn Leu Tyr Phe Gln Ser Gly Gly Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn
420 425 430
Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys Gly Gln Arg Asp Leu Tyr Ser Gly
435 440 445
Leu Asn Gln Arg Gly Asp Thr Gln Ala Leu Leu Arg Asn Asp Gln Val
450 455 460
Tyr Gln Pro Leu Arg Asp Arg Asp Asp Ala Gln Tyr Ser His Leu Gly
465 470 475 480
Gly Asn Gly Gly Ser Gly
485

<210> 110
<211> 486
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 110

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15
His Ala Ala Arg Pro Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
20 25 30
Val Gln Ala Gly Asp Ser Leu Arg Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Arg
35 40 45
Ala Phe Ser Thr Tyr Phe Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys
50 55 60
Glu Arg Glu Phe Val Ala Gly Ile Ala Trp Ser Gly Gly Ser Thr Ala
65 70 75 80
Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
85 90 95
Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr
100 105 110
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Arg Gly Ile Glu Val Glu Glu Phe Gly
115 120 125
Ala Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
130 135 140
Ser Gln Val Gln Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly
145 150 155 160
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Tyr Thr Tyr Ser Thr Tyr Ser Asn
165 170 175
Tyr Tyr Met Gly Trp Phe Arg Glu Ala Pro Gly Lys Ala Arg Thr Ser
180 185 190
Val Ala Ile Ile Ser Ser Asp Thr Thr Ile Thr Tyr Lys Asp Ala Val
195 200 205
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
210 215 220
Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Ser Ala Met Tyr Arg Cys
225 230 235 240
Ala Ala Trp Thr Ser Asp Trp Ser Val Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
245 250 255
Gln Val Thr Val Ser Ser Thr Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro
260 265 270
Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro
275 280 285
Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu
290 295 300
Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys
305 310 315 320
Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly
325 330 335
Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val
340 345 350
Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu
355 360 365
Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
370 375 380
Ser Arg Lys Gln Arg Ile Thr Glu Thr Glu Ser Pro Tyr Gln Glu Leu
385 390 395 400
Gln Gly Gln Arg Ser Asp Val Tyr Ser Asp Leu Asn Thr Gln Gly Glu
405 410 415
Asn Leu Tyr Phe Gln Ser Gly Gly Asp Thr Gln Ala Leu Leu Arg Asn

420 425 430
Asp Gln Val Tyr Gln Pro Leu Arg Asp Arg Asp Asp Ala Gln Tyr Ser
435 440 445
His Leu Gly Gly Asn Gly Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp
450 455 460
Tyr Glu Pro Ile Arg Lys Gly Gln Arg Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn
465 470 475 480
Gln Arg Gly Gly Ser Gly
485

<210> 111
<211> 516
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 111
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15
His Ala Ala Arg Pro Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
20 25 30
Val Gln Ala Gly Asp Ser Leu Arg Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Arg
35 40 45
Ala Phe Ser Thr Tyr Phe Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys
50 55 60
Glu Arg Glu Phe Val Ala Gly Ile Ala Trp Ser Gly Gly Ser Thr Ala
65 70 75 80
Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
85 90 95
Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr
100 105 110
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Arg Gly Ile Glu Val Glu Glu Phe Gly
115 120 125
Ala Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
130 135 140
Ser Gln Val Gln Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly
145 150 155 160
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Tyr Thr Tyr Ser Thr Tyr Ser Asn
165 170 175
Tyr Tyr Met Gly Trp Phe Arg Glu Ala Pro Gly Lys Ala Arg Thr Ser
180 185 190
Val Ala Ile Ile Ser Ser Asp Thr Thr Ile Thr Tyr Lys Asp Ala Val
195 200 205
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
210 215 220
Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Ser Ala Met Tyr Arg Cys
225 230 235 240
Ala Ala Trp Thr Ser Asp Trp Ser Val Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
245 250 255
Gln Val Thr Val Ser Ser Thr Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro
260 265 270
Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro

275 280 285
Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu
290 295 300
Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys
305 310 315 320
Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly
325 330 335
Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val
340 345 350
Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu
355 360 365
Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser Gly
370 375 380
Gly Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg
385 390 395 400
Lys Gly Gln Arg Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Gly Gly Ser
405 410 415
Gly Asp Thr Gln Ala Leu Leu Arg Asn Asp Gln Val Tyr Gln Pro Leu
420 425 430
Arg Asp Arg Asp Asp Ala Gln Tyr Ser His Leu Gly Gly Asn Gly Gly
435 440 445
Ser Gly Arg Lys Gln Arg Ile Thr Glu Thr Glu Ser Pro Tyr Gln Glu
450 455 460
Leu Gln Gly Gln Arg Ser Asp Val Tyr Ser Asp Leu Asn Thr Gln Gly
465 470 475 480
Gly Ser Gly Asp Lys Gln Thr Leu Leu Pro Asn Asp Gln Leu Tyr Gln
485 490 495
Pro Leu Lys Asp Arg Glu Asp Asp Gln Tyr Ser His Leu Gln Gly Asn
500 505 510
Gly Gly Ser Gly
515

<210> 112
<211> 516
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 112
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15
His Ala Ala Arg Pro Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
20 25 30
Val Gln Ala Gly Asp Ser Leu Arg Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Arg
35 40 45
Ala Phe Ser Thr Tyr Phe Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys
50 55 60
Glu Arg Glu Phe Val Ala Gly Ile Ala Trp Ser Gly Gly Ser Thr Ala
65 70 75 80
Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
85 90 95
Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr

```
                100                 105                 110
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Arg Gly Ile Glu Val Glu Glu Phe Gly
        115                 120                 125
Ala Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
    130                 135                 140
Ser Gln Val Gln Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly
145                 150                 155                 160
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Tyr Thr Tyr Ser Thr Tyr Ser Asn
                165                 170                 175
Tyr Tyr Met Gly Trp Phe Arg Glu Ala Pro Gly Lys Ala Arg Thr Ser
            180                 185                 190
Val Ala Ile Ile Ser Ser Asp Thr Thr Ile Thr Tyr Lys Asp Ala Val
        195                 200                 205
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
    210                 215                 220
Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Ser Ala Met Tyr Arg Cys
225                 230                 235                 240
Ala Ala Trp Thr Ser Asp Trp Ser Val Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
                245                 250                 255
Gln Val Thr Val Ser Ser Thr Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro
            260                 265                 270
Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro
        275                 280                 285
Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu
    290                 295                 300
Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys
305                 310                 315                 320
Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly
                325                 330                 335
Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val
            340                 345                 350
Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu
        355                 360                 365
Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser Gly
    370                 375                 380
Gly Arg Lys Gln Arg Ile Thr Glu Thr Glu Ser Pro Tyr Gln Glu Leu
385                 390                 395                 400
Gln Gly Gln Arg Ser Asp Val Tyr Ser Asp Leu Asn Thr Gln Gly Gly
                405                 410                 415
Ser Gly Asp Lys Gln Thr Leu Leu Pro Asn Asp Gln Leu Tyr Gln Pro
            420                 425                 430
Leu Lys Asp Arg Glu Asp Asp Gln Tyr Ser His Leu Gln Gly Asn Gly
        435                 440                 445
Gly Ser Gly Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro
    450                 455                 460
Ile Arg Lys Gly Gln Arg Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Gly
465                 470                 475                 480
Gly Ser Gly Asp Thr Gln Ala Leu Leu Arg Asn Asp Gln Val Tyr Gln
                485                 490                 495
Pro Leu Arg Asp Arg Asp Asp Ala Gln Tyr Ser His Leu Gly Gly Asn
            500                 505                 510
Gly Gly Ser Gly
        515
```

761422002042ITAMSEQLIST

<210> 113
<211> 517
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 113
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15
His Ala Ala Arg Pro Gln Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu
20 25 30
Val Gln Ala Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu His
35 40 45
Thr Phe Ser Ser His Val Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys
50 55 60
Glu Arg Glu Ser Val Ala Val Ile Gly Trp Arg Asp Ile Ser Thr Ser
65 70 75 80
Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
85 90 95
Lys Lys Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr
100 105 110
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg Arg Ile Asp Ala Ala Asp Phe Asp
115 120 125
Ser Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
130 135 140
Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly
145 150 155 160
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Thr Met
165 170 175
Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala
180 185 190
Ile Ser Leu Ser Pro Thr Leu Ala Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly
195 200 205
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Val Leu Gln
210 215 220
Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Ala
225 230 235 240
Asp Arg Lys Ser Val Met Ser Ile Arg Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
245 250 255
Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Thr Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg
260 265 270
Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg
275 280 285
Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly
290 295 300
Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr
305 310 315 320
Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg
325 330 335
Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro
340 345 350
Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu
355 360 365

761422002042ITAMSEQLIST

Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser
370 375 380
Gly Gly Asp Thr Gln Ala Leu Leu Arg Asn Asp Gln Val Tyr Gln Pro
385 390 395 400
Leu Arg Asp Arg Asp Asp Ala Gln Tyr Ser His Leu Gly Gly Asn Gly
405 410 415
Gly Ser Gly Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro
420 425 430
Ile Arg Lys Gly Gln Arg Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Gly
435 440 445
Gly Ser Gly Asp Lys Gln Thr Leu Leu Pro Asn Asp Gln Leu Tyr Gln
450 455 460
Pro Leu Lys Asp Arg Glu Asp Asp Gln Tyr Ser His Leu Gln Gly Asn
465 470 475 480
Gly Gly Ser Gly Arg Lys Gln Arg Ile Thr Glu Thr Glu Ser Pro Tyr
485 490 495
Gln Glu Leu Gln Gly Gln Arg Ser Asp Val Tyr Ser Asp Leu Asn Thr
500 505 510
Gln Gly Gly Ser Gly
515

<210> 114
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<220>
<221> 變異體
<222> 2、3、14、15
<223> Xaa = 任何胺基酸

<220>
<221> 變異體
<222> 4, 16
<223> Xaa = Leu或Ile

<220>
<221> 變異體
<222> 5、6、7、8、9、10、11、12
<223> Xaa = 任何胺基酸，並且最多兩個可以存在或不存在

<400> 114
Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

<210> 115
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<220>
<221> 變異體
<222> 1
<223> Xaa = Asp或Glu

<220>
<221> 變異體
<222> 2, 3
<223> Xaa = 任何胺基酸，並且最多兩個可以存在或不存在

<220>
<221> 變異體
<222> 5, 6, 17, 18
<223> Xaa = 任何胺基酸

<220>
<221> 變異體
<222> 7, 19
<223> Xaa = Leu或Ile

<220>
<221> 變異體
<222> 8、9、10、11、12、13、14、15
<223> Xaa = 任何胺基酸，並且最多兩個可以存在或不存在

<400> 115
Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr
 1   5   10   15
Xaa Xaa Xaa

<210> 116
<211> 1
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<220>
<221> 變異體
<222> 1
<223> 可以存在於任何整數的重複序列中

<400> 116
Gly
 1

<210> 117
<211> 2

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<220>
<221> 變異體
<222> (1)..(2)
<223> 可以存在於任何整數的重複序列中

<400> 117
Gly Ser
 1

<210> 118
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<220>
<221> 變異體
<222> (1)..(4)
<223> 可以存在於任何整數的重複序列中

<400> 118
Gly Gly Gly Ser
 1

<210> 119
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<220>
<221> 變異體
<222> (1)..(5)
<223> 可以存在於任何整數的重複序列中

<400> 119
Gly Gly Gly Gly Ser
 1   5

<210> 120
<211> 13
<212> PRT

761422002042ITAMSEQLIST

<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<220>
<221> 變異體
<222> (1)..(12)
<223> 最多九個可以存在或不存在

<220>
<221> 變異體
<222> (1)..(13)
<223> 可以存在於至少3且最多12的任何整數的重複序列中（位置1至12中最多九個Gly存在或不存在）

<400> 120
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser
 1   5   10

<210> 121
<211> 223
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 121
Met Gly Ser Ser Asn Ser Lys Arg Gln Gln Gln Gly Leu Leu Lys Leu
 1   5   10   15
Trp Arg Gly Leu Arg Gly Lys Pro Gly Ala Asp Trp Val Leu Leu Ser
            20   25   30
Asp Pro Leu Ile Gly Gln Ser Ser Thr Val Gln Glu Glu Cys Gly Lys
        35   40   45
Ala Leu Lys Lys Ser Trp Gly Lys Gly Lys Met Thr Pro Asp Gly Arg
    50   55   60
Arg Leu Gln Glu Gly Asp Thr Phe Asp Glu Trp Asp Asp Asp Glu Glu
65   70   75   80
Glu Val Gly Phe Pro Val Gln Pro Arg Val Pro Leu Arg Gln Met Thr
                85   90   95
Tyr Lys Leu Ala Val Asp Phe Ser His Phe Leu Lys Ser Lys Gly Gly
            100   105   110
Leu Asp Gly Ile Tyr Tyr Ser Glu Arg Arg Glu Lys Ile Leu Asn Leu
        115   120   125
Tyr Ala Leu Asn Glu Trp Gly Ile Ile Asp Asp Trp Gln Ala Tyr Ser
    130   135   140
Pro Gly Pro Gly Ile Arg Tyr Pro Arg Val Phe Gly Phe Cys Phe Lys
145   150   155   160
Leu Val Pro Val Asp Leu His Glu Glu Ala Arg Asn Cys Glu Arg His
                165   170   175
Cys Ala Ala His Pro Ala Gln Met Gly Glu Asp Pro Asp Gly Ile Asp
            180   185   190
His Gly Glu Val Leu Val Trp Lys Phe Asp Pro Lys Leu Ala Val Glu

761422002042ITAMSEQLIST

195 200 205
Tyr Arg Pro Asp Met Phe Lys Asp Met His Glu His Ala Lys Arg
210 215 220

<210> 122
<211> 181
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 122
Met Gly Ser Ser Asn Ser Lys Arg Gln Gln Gln Gly Leu Leu Lys Leu
1 5 10 15
Trp Arg Gly Leu Arg Gly Lys Pro Gly Ala Asp Trp Val Leu Leu Ser
20 25 30
Asp Pro Leu Ile Gly Gln Ser Ser Thr Val Gln Glu Glu Cys Gly Lys
35 40 45
Ala Leu Arg Gln Met Thr Tyr Lys Leu Ala Val Asp Phe Ser His Phe
50 55 60
Leu Lys Ser Lys Gly Gly Leu Asp Gly Ile Tyr Tyr Ser Glu Arg Arg
65 70 75 80
Glu Lys Ile Leu Asn Leu Tyr Ala Leu Asn Glu Trp Gly Ile Ile Asp
85 90 95
Asp Trp Gln Ala Tyr Ser Pro Gly Pro Gly Ile Arg Tyr Pro Arg Val
100 105 110
Phe Gly Phe Cys Phe Lys Leu Val Pro Val Asp Leu His Glu Glu Ala
115 120 125
Arg Asn Cys Glu Arg His Cys Leu Met His Pro Ala Gln Met Gly Glu
130 135 140
Asp Pro Asp Gly Ile Asp His Gly Glu Val Leu Val Trp Lys Phe Asp
145 150 155 160
Pro Lys Leu Ala Val Glu Tyr Arg Pro Asp Met Phe Lys Asp Met His
165 170 175
Glu His Ala Lys Arg
180

<210> 123
<211> 585
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 123
gcccctctcc ctcccccccc cctaacgtta ctggccgaag ccgcttggaa taaggccggt 60
gtgcgtttgt ctatatgtta ttttccacca tattgccgtc ttttggcaat gtgagggccc 120
ggaaacctgg ccctgtcttc ttgacgagca ttcctagggg tctttccgct ctcgccaaag 180
gaatgcaagg tctgttgaat gtcgtgaagg aagcagttcc tctggaagct tcttgaagac 240
aaacaacgtc tgtagcgacc ctttgcaggc agcggaaccc cccacctggc gacaggtgcc 300
tctgcggcca aaagccacgt gtataagata cacctgcaaa ggcggcacaa ccccagtgcc 360

acgttgtgag ttggatagtt gtggaaagag tcaaatggct ctcctcaagc gtattcaaca 420
aggggctgaa ggatgcccag aaggtacccc attgtatggg atctgatctg gggcctcggt 480
gcacatgctt tacatgtgtt tagtcgaggt taaaaaaacg tctaggcccc ccgaaccacg 540
gggacgtggt tttcctttga aaaacacgat gataatatgg ccaca 585

<210> 124
<211> 42
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 124
Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
1 5 10 15
Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
20 25 30
Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
35 40

<210> 125
<211> 45
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 125
Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala
1 5 10 15
Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly
20 25 30
Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp
35 40 45

<210> 126
<211> 24
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 126
Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu
1 5 10 15
Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys
20

<210> 127
<211> 21
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 127
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15
His Ala Ala Arg Pro
20

761422002042ITAMSEQLIST

<210> 128
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 128
Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Asp
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Arg Ala Phe Ser Thr Tyr
20 25 30
Phe Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45
Ala Gly Ile Ala Trp Ser Gly Gly Ser Thr Ala Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ser Arg Gly Ile Glu Val Glu Glu Phe Gly Ala Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 129
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 129
Gln Val Gln Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Tyr Thr Tyr Ser Thr Tyr Ser Asn Tyr
20 25 30
Tyr Met Gly Trp Phe Arg Glu Ala Pro Gly Lys Ala Arg Thr Ser Val
35 40 45
Ala Ile Ile Ser Ser Asp Thr Thr Ile Thr Tyr Lys Asp Ala Val Lys
50 55 60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Ser Ala Met Tyr Arg Cys Ala
85 90 95
Ala Trp Thr Ser Asp Trp Ser Val Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 130
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 130
Ser Thr Tyr Phe Met Ala
 1   5

<210> 131
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 131
Gly Ile Ala Trp Ser Gly Gly Ser Thr Ala Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1   5   10   15
Gly

<210> 132
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 132
Ser Arg Gly Ile Glu Val Glu Glu Phe Gly Ala
 1   5   10

<210> 133
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 133
Ser Asn Tyr Tyr Met Gly
 1   5

761422002042ITAMSEQLIST

<210> 134
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 134
Ile Ile Ser Ser Asp Thr Thr Ile Thr Tyr Lys Asp Ala Val Lys Gly
1 5 10 15

<210> 135
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 135
Ala Trp Thr Ser Asp Trp Ser Val Ala Tyr
1 5 10

<210> 136
<211> 240
<212> PRT
<213> 猿猴免疫缺陷病毒
<400> 136
Met Gly Ser Val Lys Ser Lys Leu Leu Gly Glu Thr Ala Ser Gln Arg
1 5 10 15
Leu Gln Gly Ser His Gly Gly Gly Arg Met Val Tyr Trp Arg Leu Arg
20 25 30
Asp Gly Gln Val Lys Arg Ser Gln Leu Ser Pro Gly Ala Arg Gly Lys
35 40 45
Asp Leu Asn Ile Ala Leu Leu Asp Glu Glu Trp Gln Ala Thr Gly Ala
50 55 60
Asp Tyr Met Gly Lys Ala Leu Thr Gln Gly Glu Val Trp Tyr Glu Lys
65 70 75 80
Glu Gln Glu Glu Asn Asp Met Glu Leu Val Gly Phe Pro Val Arg Pro
85 90 95
Lys Val Pro Leu Arg Thr Cys Thr Tyr Lys Leu Gly Ile Asp Phe Ser
100 105 110
Phe Phe Leu Lys Glu Lys Gly Gly Leu Lys Gly Ile Phe Tyr Asn Lys
115 120 125
Arg Arg His Ala Ile Leu Asn Leu Tyr Ala His Asn Glu Trp Gly Ile
130 135 140
Leu Pro Asp Trp Gln Asn Tyr Thr Glu Gly Pro Gly Thr Arg Tyr Pro
145 150 155 160
Leu Cys Phe Gly Ile Leu Trp Lys Leu Cys Pro Val Glu Ile His Glu
165 170 175
Asp Asp Thr Glu Asp Gly His Leu Leu Pro His Pro Ala Tyr Asp Gly
180 185 190

761422002042ITAMSEQLIST

Gln Ala Glu Asp Pro Trp Gly Glu Ser Leu Val Trp Val Phe Asp Glu
195 200 205
Lys Leu Ala Tyr Thr Pro Gly Ala Lys Met Ala Glu Trp Asp Arg Leu
210 215 220
Glu Arg Glu Lys Arg Met Leu Leu Ala Pro Pro Gln Thr Ala Ser Ser
225 230 235 240

<210> 137
<211> 134
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 137
Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
1 5 10 15
Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
20 25 30
Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Gly Gly Ser Gly Lys Arg
35 40 45
Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro
50 55 60
Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu
65 70 75 80
Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Gly Gly Ser Gly Lys Arg Gly Arg
85 90 95
Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln
100 105 110
Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu
115 120 125
Glu Gly Gly Cys Glu Leu
130

<210> 138
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 138
actcacgctg gatagcctcc 20

<210> 139
<211> 223
<212> PRT
<213> 猿猴免疫缺陷病毒

<400> 139

761422002042ITAMSEQLIST

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

【發明申請專利範圍】

【請求項1】一種修飾的T細胞，所述修飾的T細胞包含：

功能性外源受體，所述功能性外源受體包含：

(a) 細胞外配體結合結構域，

(b) 跨膜結構域，以及

(c) 細胞內信號傳導結構域（「ISD」），所述細胞內信號傳導結構域包含嵌合信號傳導結構域（「CMSD」），

其中所述 CMSD 包含一個或多個免疫受體酪胺酸啟動基序（「CMSD ITAM」），其中所述多個 CMSD ITAM 任選地通過一個或多個連接子（「CMSD 連接子」）連接。

【請求項2】如請求項1所述的修飾的T細胞，其中：

(a) 所述多個 CMSD ITAM 彼此直接連接；

(b) 所述 CMSD 包含通過並非源自含有 ITAM 的親本分子的一個或多個 CMSD 連接子連接的兩個或更多個 CMSD ITAM；

(c) 所述 CMSD 包含源自含有 ITAM 的親本分子的一個或多個 CMSD 連接子，所述含有 ITAM 的親本分子與衍生出一個或多個所述 CMSD ITAM 的含有 ITAM 的親本分子不同；

(d) 所述 CMSD 包含兩個或更多個相同的 CMSD ITAM；

(e) 所述 CMSD ITAM 中的至少一個並非源自 CD3ζ；

(f) 所述 CMSD ITAM 中的至少一個並非 CD3ζ 的 ITAM1 或 ITAM2；

(g) 所述多個 CMSD ITAM 各自源自不同的含有 ITAM 的親

本分子；和/或

(h) 所述 CMSD ITAM 中的至少一個源自選自以下的含有 ITAM 的親本分子：CD3ε、CD3δ、CD3γ、Igα(CD79a)、Igβ(CD79b)、FcεRIβ、FcεRIγ、DAP12、CNAIP/NFAM1、STAM-1、STAM-2 和膜突蛋白。

【請求項3】如請求項1所述的修飾的T細胞，其中所述CMSD ITAM中的至少一個源自選自以下的含有ITAM的親本分子：CD3ε、CD3δ、CD3γ、CD3ζ、Igα（CD79a）、Igβ（CD79b）、FcεRIβ、FcεRIγ、DAP12、CNAIP/NFAM1、STAM-1、STAM-2和膜突蛋白。

【請求項4】如請求項1-3中任一項所述的修飾的T細胞，其中所述CMSD不包含CD3ζ的ITAM1和/或ITAM2。

【請求項5】如請求項1-4中任一項所述的修飾的T細胞，其中所述CMSD包含CD3ζ的ITAM3。

【請求項6】如請求項1-5中任一項所述的修飾的T細胞，其中所述CMSD ITAM中的至少兩個源自相同的含有ITAM的親本分子。

【請求項7】如請求項6所述的修飾的T細胞，其中所述CMSD ITAM中的所述至少兩個彼此相同。

【請求項8】如請求項1-6中任一項所述的修飾的T細胞，其中所述CMSD ITAM中的至少兩個彼此不同。

【請求項9】如請求項8所述的修飾的T細胞，其中所述兩個不同的CMSD ITAM各自源自不同的含有ITAM的親本分子。

【請求項10】如請求項1-9中任一項所述的修飾的T細胞，其中所

述CMSD連接子中的至少一個源自CD3ζ。

【請求項11】如請求項1-10中任一項所述的修飾的T細胞，其中所述CMSD連接子中的至少一個對於所述含有ITAM的親本分子是異源的。

【請求項12】如請求項1-11中任一項所述的修飾的T細胞，其中所述CMSD還包含在最C末端CMSD ITAM的C末端處的C末端序列（「CMSD C末端序列」）。

【請求項13】如請求項1-12中任一項所述的修飾的T細胞，其中所述CMSD還包含在最N末端CMSD ITAM的N末端處的N末端序列（「CMSD N末端序列」）。

【請求項14】如請求項1-13中任一項所述的修飾的T細胞，其中所述一個或多個CMSD連接子、所述CMSD C末端序列和/或所述CMSD N末端序列獨立地選自SEQ ID NO: 17-39和116-120。

【請求項15】如請求項1-14中任一項所述的修飾的T細胞，其中所述功能性外源受體是ITAM修飾的T細胞受體（TCR）、ITAM修飾的嵌合抗原受體（CAR）、ITAM修飾的嵌合TCR（cTCR）、或ITAM修飾的T細胞抗原偶聯劑（TAC）樣嵌合受體。

【請求項16】如請求項15所述的修飾的T細胞，其中所述功能性外源受體是ITAM修飾的CAR。

【請求項17】如請求項16所述的修飾的T細胞，其中所述跨膜結構域源自CD8α。

【請求項18】如請求項16或17所述的修飾的T細胞，其中所述ISD

還包含共刺激信號傳導結構域。

【請求項19】如請求項18所述的修飾的T細胞，其中所述共刺激信號傳導結構域源自CD137（4-1BB）或CD28。

【請求項20】如請求項18或19所述的修飾的T細胞，其中所述共刺激信號傳導結構域包含SEQ ID NO: 124的胺基酸序列。

【請求項21】如請求項18-20中任一項所述的修飾的T細胞，其中所述共刺激結構域位於所述CMSD的N末端。

【請求項22】如請求項18-20中任一項所述的修飾的T細胞，其中所述共刺激結構域位於所述CMSD的C末端。

【請求項23】如請求項15所述的修飾的T細胞，其中所述功能性外源受體是ITAM修飾的cTCR。

【請求項24】如請求項23所述的修飾的T細胞，其中所述ITAM修飾的cTCR包含：

(a) 細胞外配體結合結構域，

(b) 任選的受體結構域連接子，

(c) 任選的第一 TCR 亞基的細胞外結構域或其部分，

(d) 跨膜結構域，所述跨膜結構域包含第二 TCR 亞基的跨膜結構域，以及

(e) ISD，所述 ISD 包含所述 CMSD，

其中所述第一 TCR 亞基和所述第二 TCR 亞基選自 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 和 CD3δ。

【請求項25】如請求項24所述的修飾的T細胞，其中所述第一TCR

亞基和所述第二TCR亞基均為CD3ε。

【請求項26】如請求項24或25所述的修飾的T細胞，其中所述一個或多個CMSD ITAM源自CD3ε、CD3δ和CD3γ中的一個或多個。

【請求項27】如請求項15所述的修飾的T細胞，其中所述功能性外源受體是ITAM修飾的TAC樣嵌合受體。

【請求項28】如請求項27所述的修飾的T細胞，其中所述ITAM修飾的TAC樣嵌合受體包含：

(a) 細胞外配體結合結構域，

(b) 任選的第一受體結構域連接子，

(c) 細胞外 TCR 結合結構域，所述細胞外 TCR 結合結構域特異性識別第一 TCR 亞基的細胞外結構域，

(d) 任選的第二受體結構域連接子，

(e) 任選的第二 TCR 亞基的細胞外結構域或其部分，

(f)跨膜結構域，所述跨膜結構域包含第三 TCR 亞基的跨膜結構域，以及

(g) ISD，所述 ISD 包含所述 CMSD，

其中所述第一 TCR 亞基、所述第二 TCR 亞基和所述第三 TCR 亞基都選自 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 和 CD3δ。

【請求項29】如請求項28所述的修飾的T細胞，其中所述第二TCR亞基和所述第三TCR亞基均為CD3ε。

【請求項30】如請求項28或29所述的修飾的T細胞，其中所述一個或多個CMSD ITAM源自CD3ε、CD3δ和CD3γ中的一個或多個。

【請求項31】如請求項1-30中任一項所述的修飾的T細胞，其中所述細胞外配體結合結構域包含特異性識別一種或多種靶抗原的一個或多個表位的一個或多個抗原結合片段。

【請求項32】如請求項31所述的修飾的T細胞，其中所述抗原結合片段是sdAb或scFv。

【請求項33】如請求項31或32所述的修飾的T細胞，其中所述靶抗原是BCMA、CD19或CD20。

【請求項34】如請求項1-33中任一項所述的修飾的T細胞，其進一步包含位於所述細胞外配體結合結構域的C末端與所述跨膜結構域的N末端之間的鉸鏈結構域。

【請求項35】如請求項34所述的修飾的T細胞，其中所述鉸鏈結構域源自CD8α。

【請求項36】如請求項1-35中任一項所述的修飾的T細胞，其中包含含有所述CMSD的ISD的所述功能性外源受體的效應子功能比包含含有CD3ζ的細胞內信號傳導結構域的ISD的功能性外源受體少至多約80%。

【請求項37】一種產生修飾的T細胞的方法，所述方法包括向前體T細胞中引入編碼功能性外源受體的核酸，

其中所述功能性外源受體包含：

(a) 細胞外配體結合結構域，

(b) 跨膜結構域，以及

(c) 包含 CMSD 的 ISD，

其中所述 CMSD 包含一個或多個 CMSD ITAM，其中所述多個 CMSD ITAM 任選地通過一個或多個 CMSD 連接子連接。

【請求項38】如請求項37所述的方法，其中所述核酸在病毒載體上。

【請求項39】如請求項37或38所述的方法，其進一步包括從所述修飾的T細胞分離和/或富集功能性外源受體陽性T細胞。

【請求項40】如請求項37-39中任一項所述的方法，其進一步包括用至少一種醫藥上可接受的載劑配製所述修飾的T細胞。

【請求項41】如請求項37-40中任一項所述的方法，其中：

(a) 所述多個 CMSD ITAM 彼此直接連接；

(b) 所述 CMSD 包含通過並非源自含有 ITAM 的親本分子的一個或多個 CMSD 連接子連接的兩個或更多個 CMSD ITAM；

(c) 所述 CMSD 包含源自含有 ITAM 的親本分子的一個或多個 CMSD 連接子，所述含有 ITAM 的親本分子與衍生出一個或多個所述 CMSD ITAM 的含有 ITAM 的親本分子不同；

(d) 所述 CMSD 包含兩個或更多個相同的 CMSD ITAM；

(e) 所述 CMSD ITAM 中的至少一個並非源自 CD3ζ；

(f) 所述 CMSD ITAM 中的至少一個並非 CD3ζ 的 ITAM1 或 ITAM2；

(g) 所述多個 CMSD ITAM 各自源自不同的含有 ITAM 的親本分子；和/或

(h) 所述 CMSD ITAM 中的至少一個源自選自以下的含有

ITAM 的親本分子：CD3ε、CD3δ、CD3γ、Igα(CD79a)、Igβ(CD79b)、FcεRIβ、FcεRIγ、DAP12、CNAIP/NFAM1、STAM-1、STAM-2 和膜突蛋白。

【請求項42】如請求項37-41中任一項所述的方法，其中所述CMSD ITAM中的至少一個源自選自以下的含有ITAM的親本分子：CD3ε、CD3δ、CD3γ、CD3ζ、Igα（CD79a）、Igβ（CD79b）、FcεRIβ、FcεRIγ、DAP12、CNAIP/NFAM1、STAM-1、STAM-2和膜突蛋白。

【請求項43】一種通過如請求項37-42中任一項所述的方法獲得的修飾的T細胞。

【請求項44】一種醫藥組合物，所述醫藥組合物包含如請求項1-36和43中任一項所述的修飾的T細胞，以及醫藥上可接受的載劑。

【請求項45】一種治療個體的疾病的方法，所述方法包括向所述個體施用有效量的如請求項1-36和43中任一項所述的修飾的T細胞或如請求項44所述的醫藥組合物。

【請求項46】如請求項45所述的方法，其中所述疾病是癌症。

【請求項47】如請求項45或46所述的方法，其中所述個體與衍生出所述修飾的T細胞的前體T細胞的供體是組織不相容的。

【請求項48】如請求項45-47中任一項所述的方法，其中所述個體是人。

【請求項49】一種分離的核酸，所述分離的核酸編碼功能性外源

受體，

其中所述功能性外源受體包含：

(a) 細胞外配體結合結構域，

(b) 跨膜結構域，以及

(c) 包含 CMSD 的 ISD，

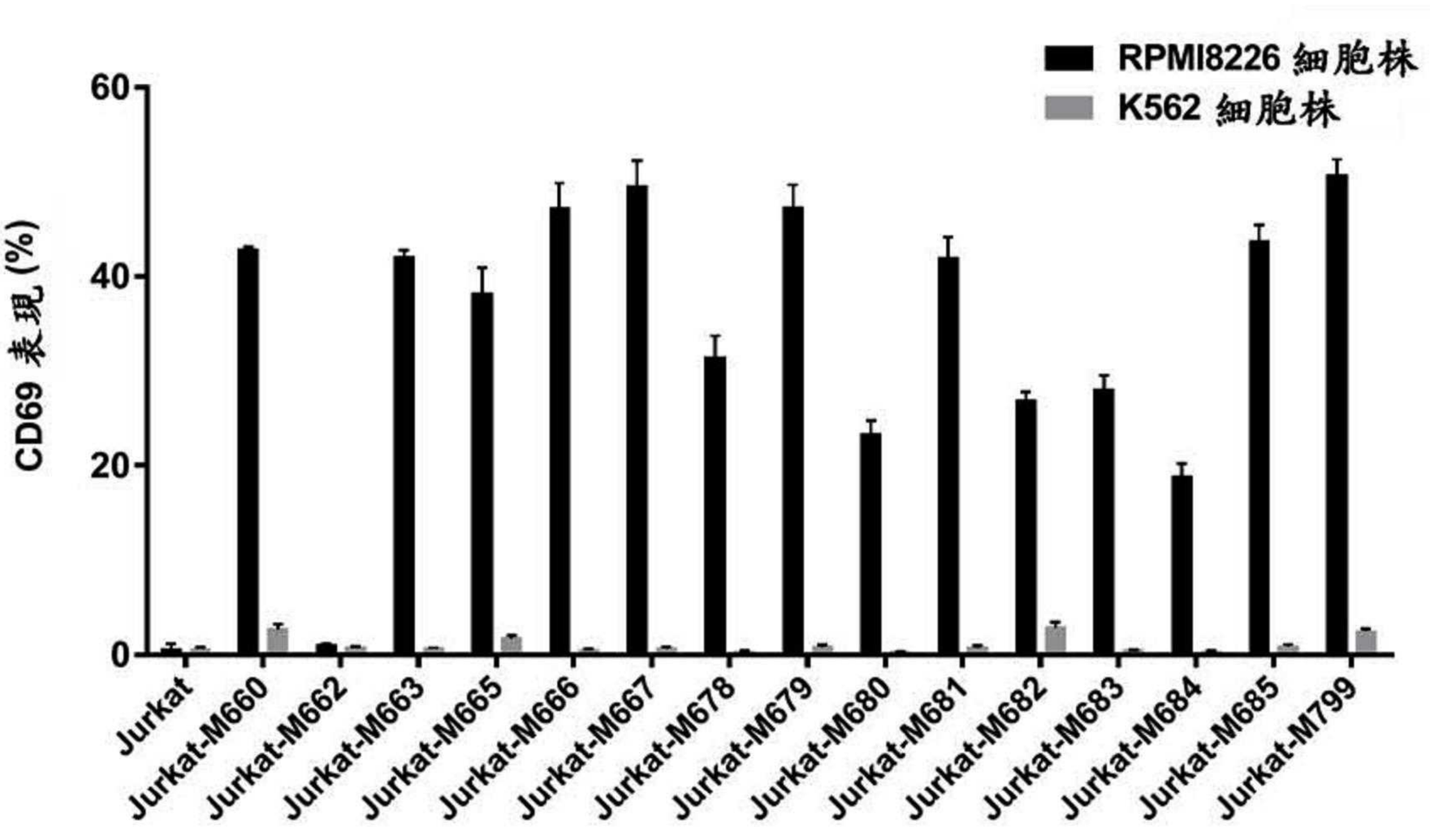
其中所述 CMSD 包含一個或多個 CMSD ITAM，其中所述多個 CMSD ITAM 任選地通過一個或多個 CMSD 連接子連接。

【請求項50】如請求項49所述的分離的核酸，其中所述CMSD ITAM中的至少一個源自選自以下的含有ITAM的親本分子：CD3ε、CD3δ、CD3γ、CD3ζ、Igα（CD79a）、Igβ（CD79b）、FcεRIβ、FcεRIγ、DAP12、CNAIP/NFAM1、STAM-1、STAM-2和膜突蛋白。

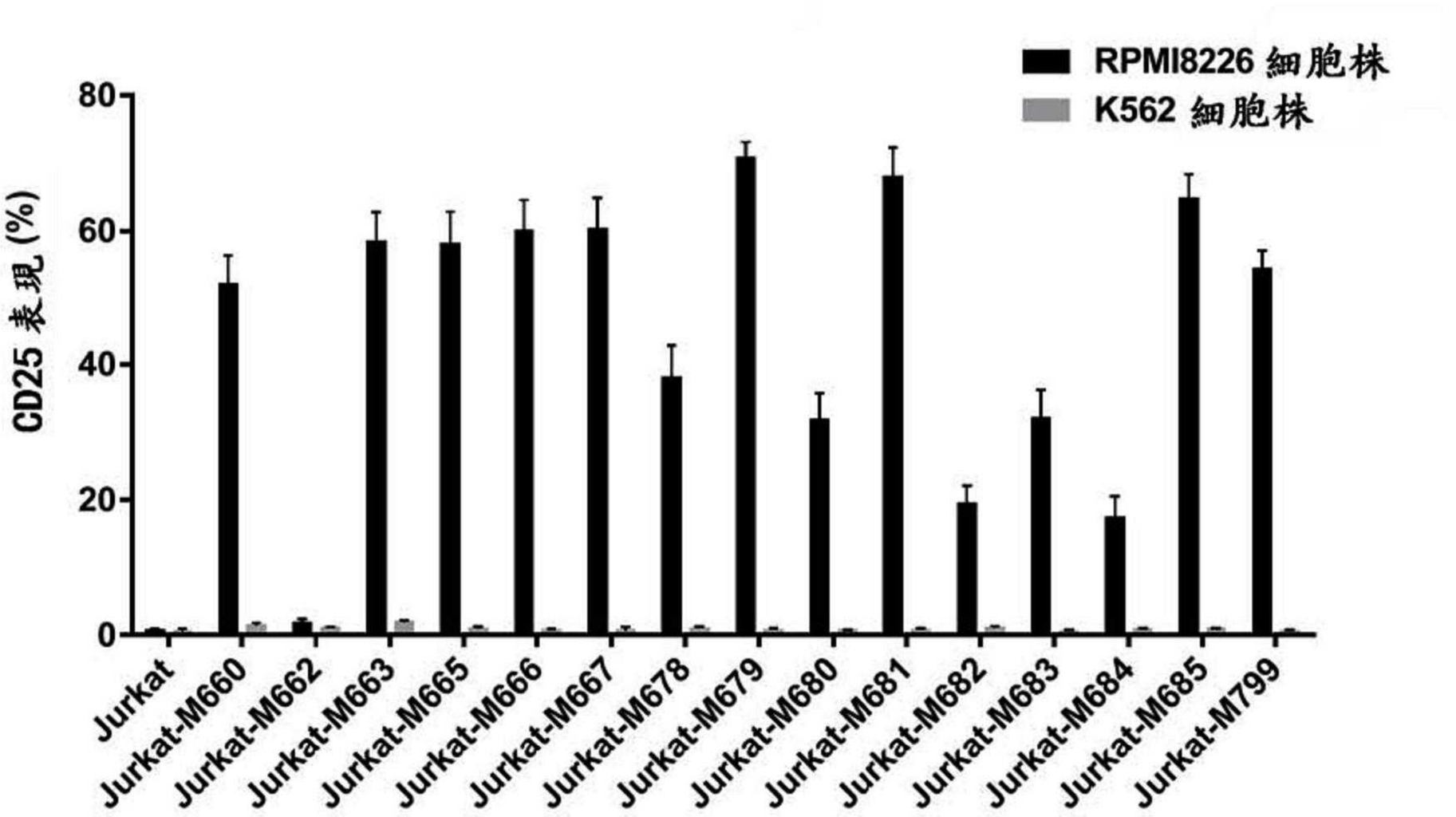
【請求項51】一種載體，所述載體包含如請求項49或50所述的核酸。

【請求項52】如請求項51所述的載體，其是病毒載體。

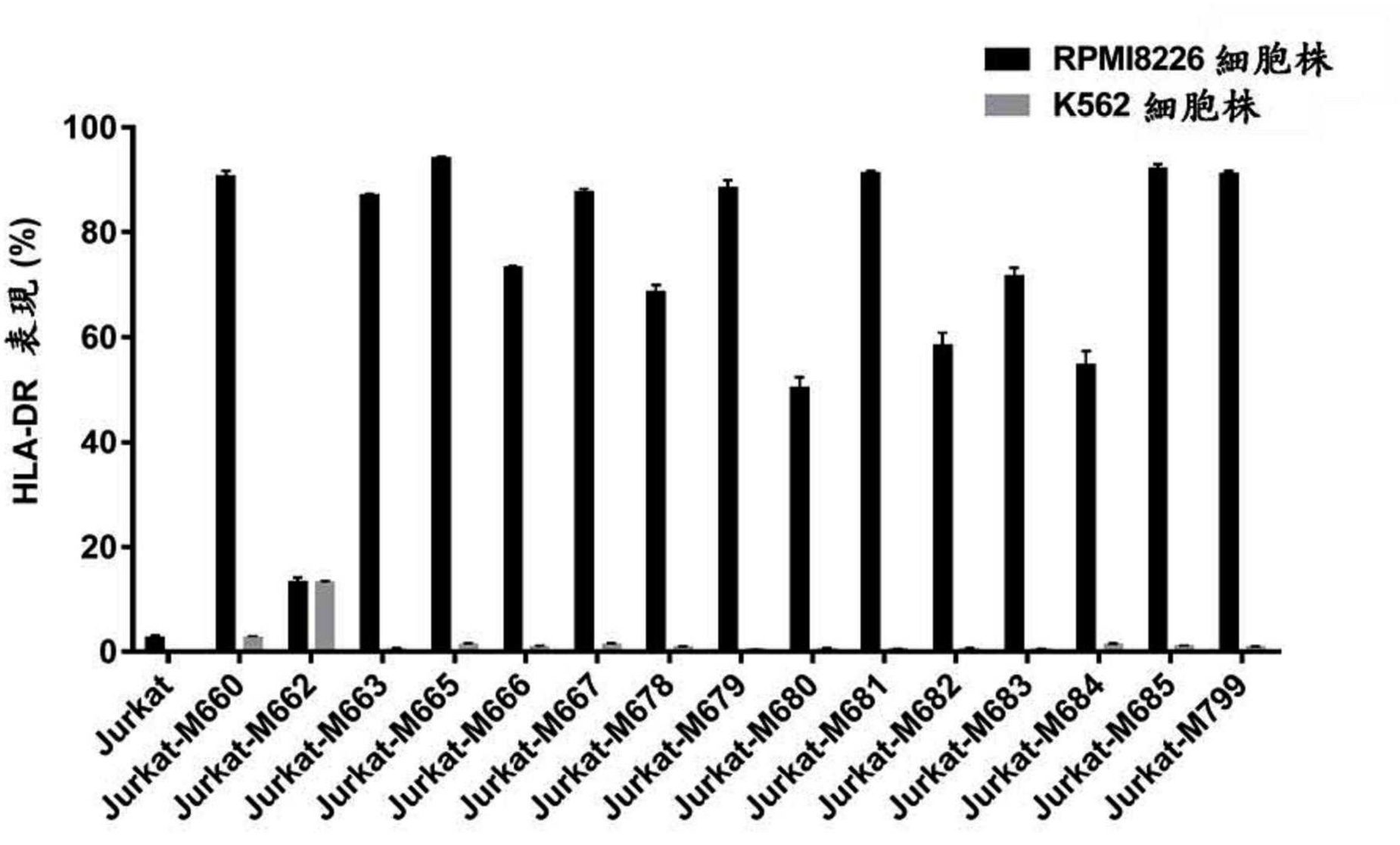
【發明圖式】


RPMI8226 細胞株
K562 細胞株
CD69 表現 (%)
60
40
20
0
Jurkat
Jurkat-M660
Jurkat-M662
Jurkat-M663
Jurkat-M665
Jurkat-M666
Jurkat-M667
Jurkat-M678
Jurkat-M679
Jurkat-M680
Jurkat-M681
Jurkat-M682
Jurkat-M683
Jurkat-M684
Jurkat-M685
Jurkat-M799

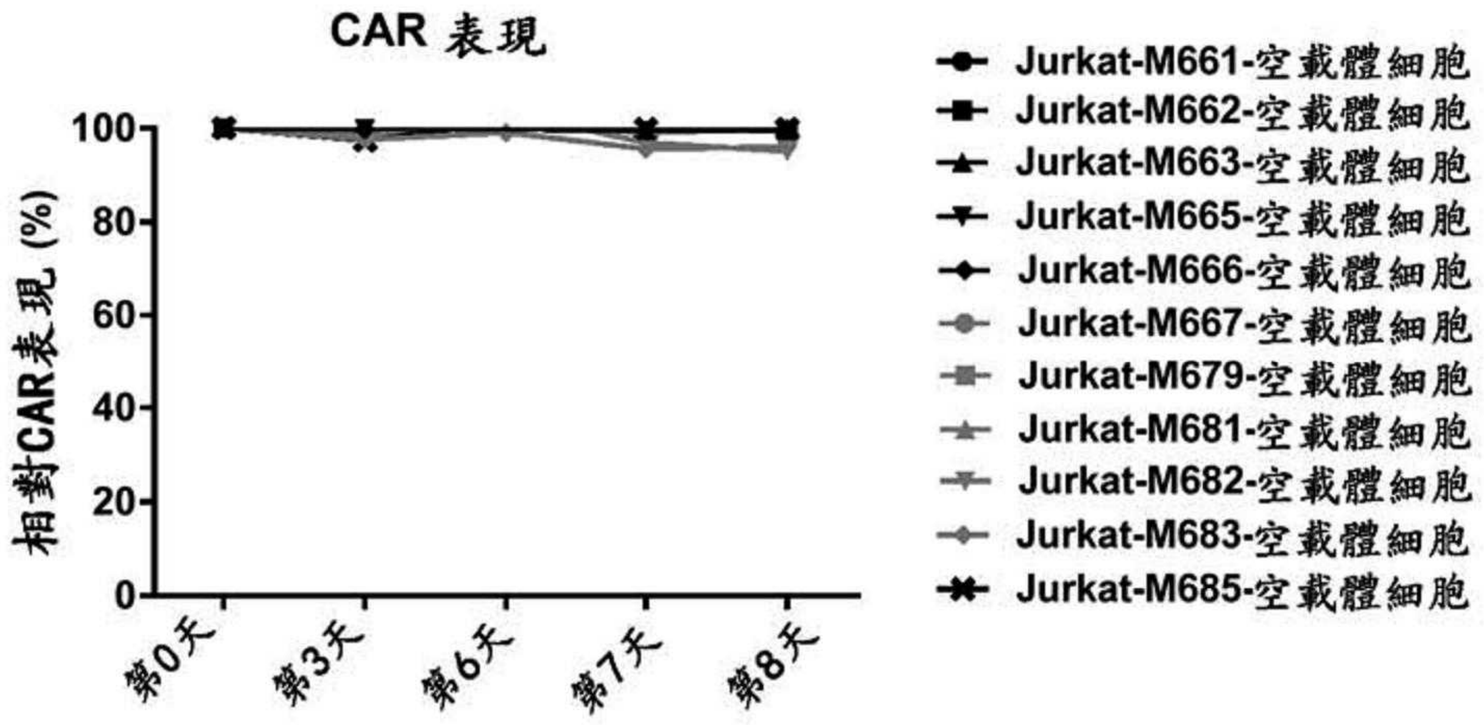
【圖1A】


RPMI8226 細胞株
K562 細胞株
CD25 表現 (%)
80
60
40
20
0
Jurkat
Jurkat-M660
Jurkat-M662
Jurkat-M663
Jurkat-M665
Jurkat-M666
Jurkat-M667
Jurkat-M678
Jurkat-M679
Jurkat-M680
Jurkat-M681
Jurkat-M682
Jurkat-M683
Jurkat-M684
Jurkat-M685
Jurkat-M799

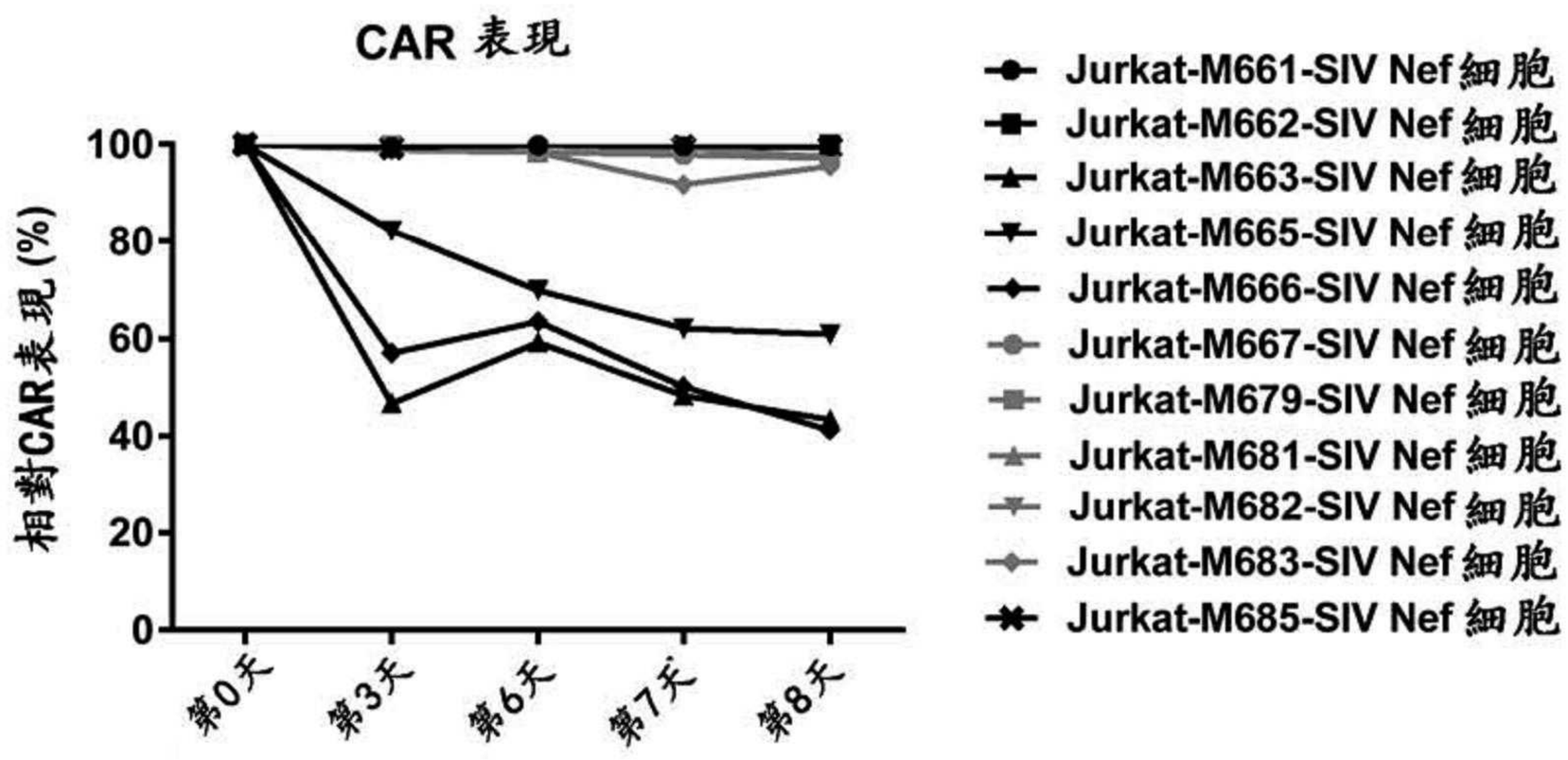
【圖1B】


RPMI8226 細胞株
K562 細胞株
HLA-DR 表現 (%)
100
80
60
40
20
0
Jurkat
Jurkat-M660
Jurkat-M662
Jurkat-M663
Jurkat-M665
Jurkat-M666
Jurkat-M667
Jurkat-M678
Jurkat-M679
Jurkat-M680
Jurkat-M681
Jurkat-M682
Jurkat-M683
Jurkat-M684
Jurkat-M685
Jurkat-M799

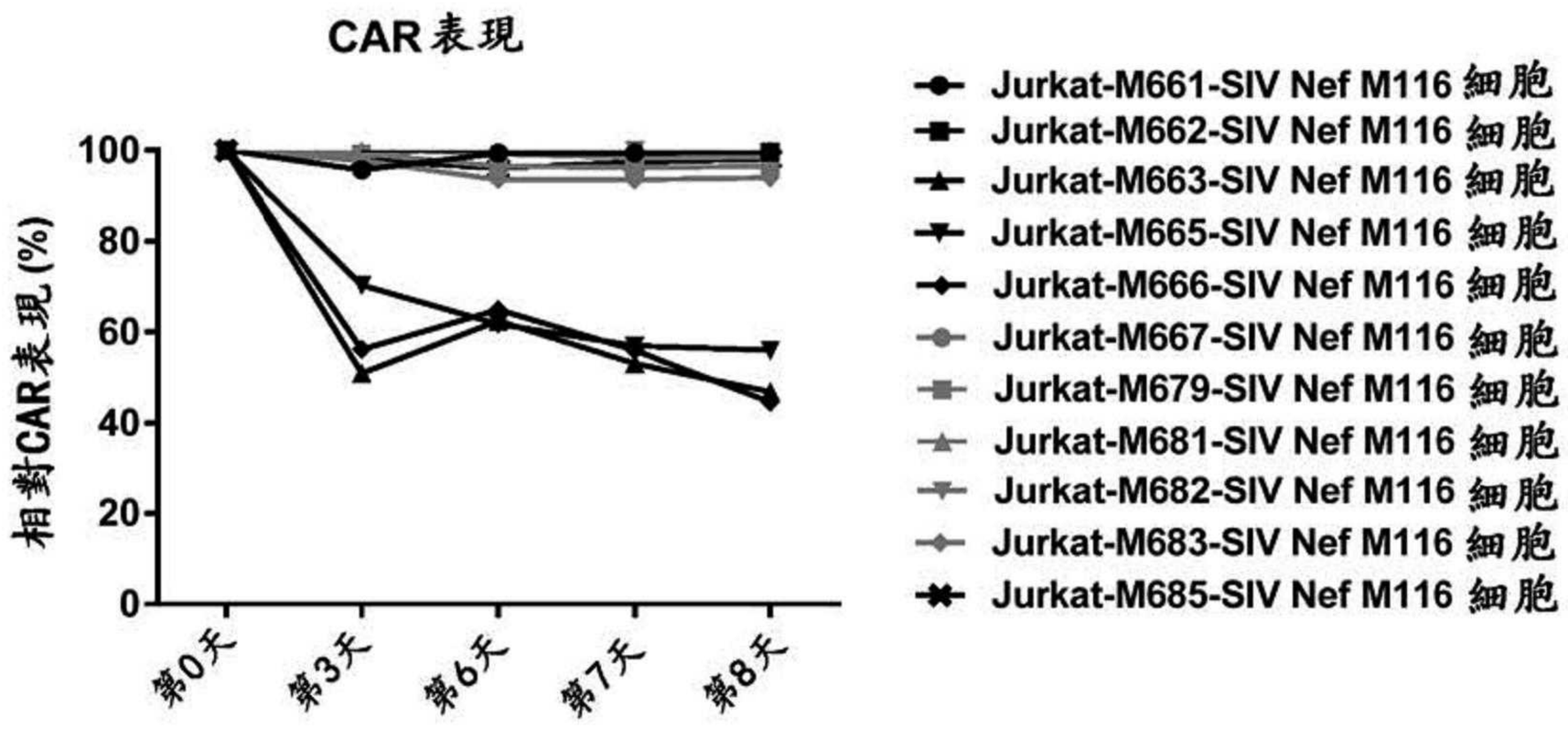
【圖1C】


CAR 表現
相對CAR表現 (%)
100
80
60
40
20
0
第0天
第3天
第6天
第7天
第8天
Jurkat-M661-空載體細胞
Jurkat-M662-空載體細胞
Jurkat-M663-空載體細胞
Jurkat-M665-空載體細胞
Jurkat-M666-空載體細胞
Jurkat-M667-空載體細胞
Jurkat-M679-空載體細胞
Jurkat-M681-空載體細胞
Jurkat-M682-空載體細胞
Jurkat-M683-空載體細胞
Jurkat-M685-空載體細胞

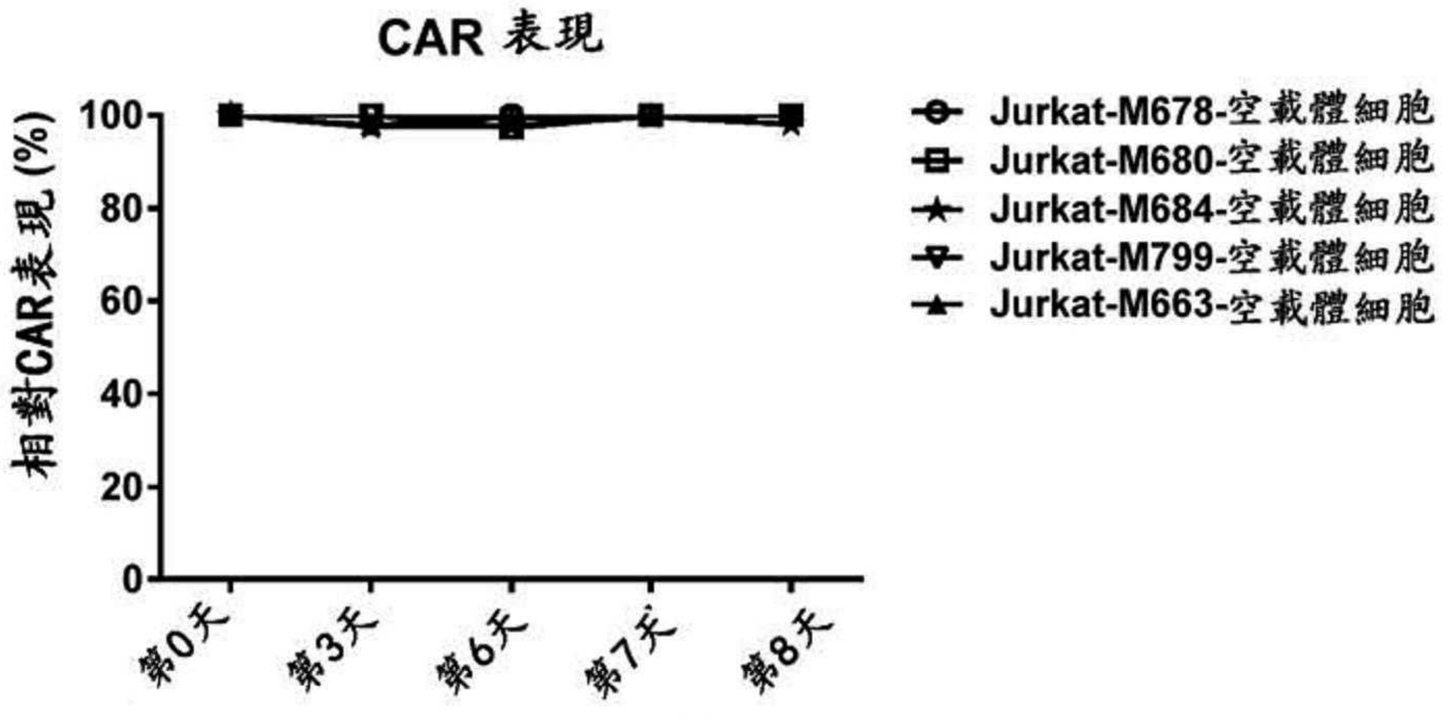
【圖1D】


CAR 表現
相對CAR表現 (%)
100
80
60
40
20
0
第0天
第3天
第6天
第7天
第8天
Jurkat-M661-SIV Nef細胞
Jurkat-M662-SIV Nef 細胞
Jurkat-M663-SIV Nef 細胞
Jurkat-M665-SIV Nef 細胞
Jurkat-M666-SIV Nef 細胞
Jurkat-M667-SIV Nef 細胞
Jurkat-M679-SIV Nef 細胞
Jurkat-M681-SIV Nef 細胞
Jurkat-M682-SIV Nef 細胞
Jurkat-M683-SIV Nef 細胞
Jurkat-M685-SIV Nef 細胞

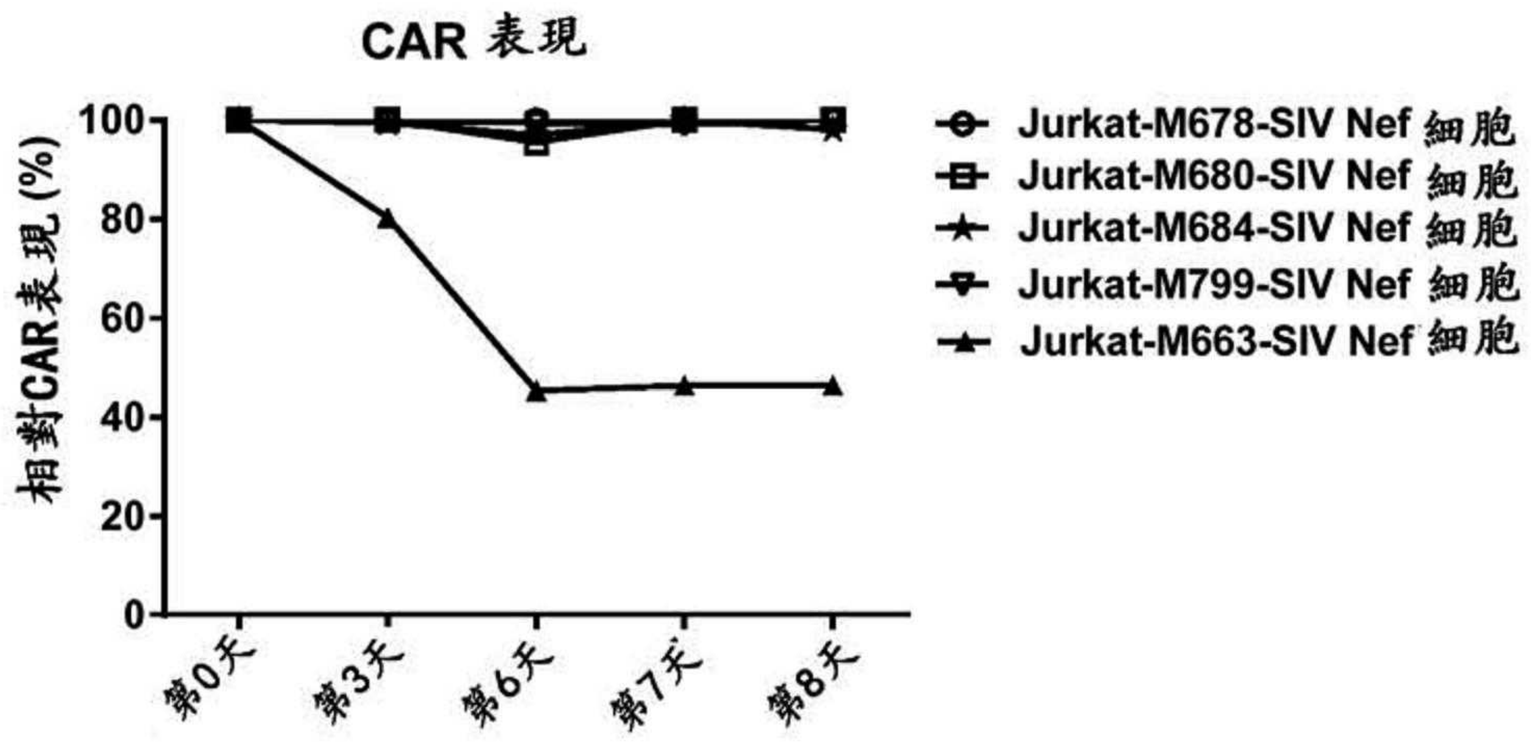
【圖1E】


CAR表現
相對CAR表現 (%)
100
80
60
40
20
0
第0天
第3天
第6天
第7天
第8天
Jurkat-M661-SIV Nef M116 細胞
Jurkat-M662-SIV Nef M116 細胞
Jurkat-M663-SIV Nef M116 細胞
Jurkat-M665-SIV Nef M116 細胞
Jurkat-M666-SIV Nef M116 細胞
Jurkat-M667-SIV Nef M116 細胞
Jurkat-M679-SIV Nef M116 細胞
Jurkat-M681-SIV Nef M116 細胞
Jurkat-M682-SIV Nef M116 細胞
Jurkat-M683-SIV Nef M116 細胞
Jurkat-M685-SIV Nef M116 細胞

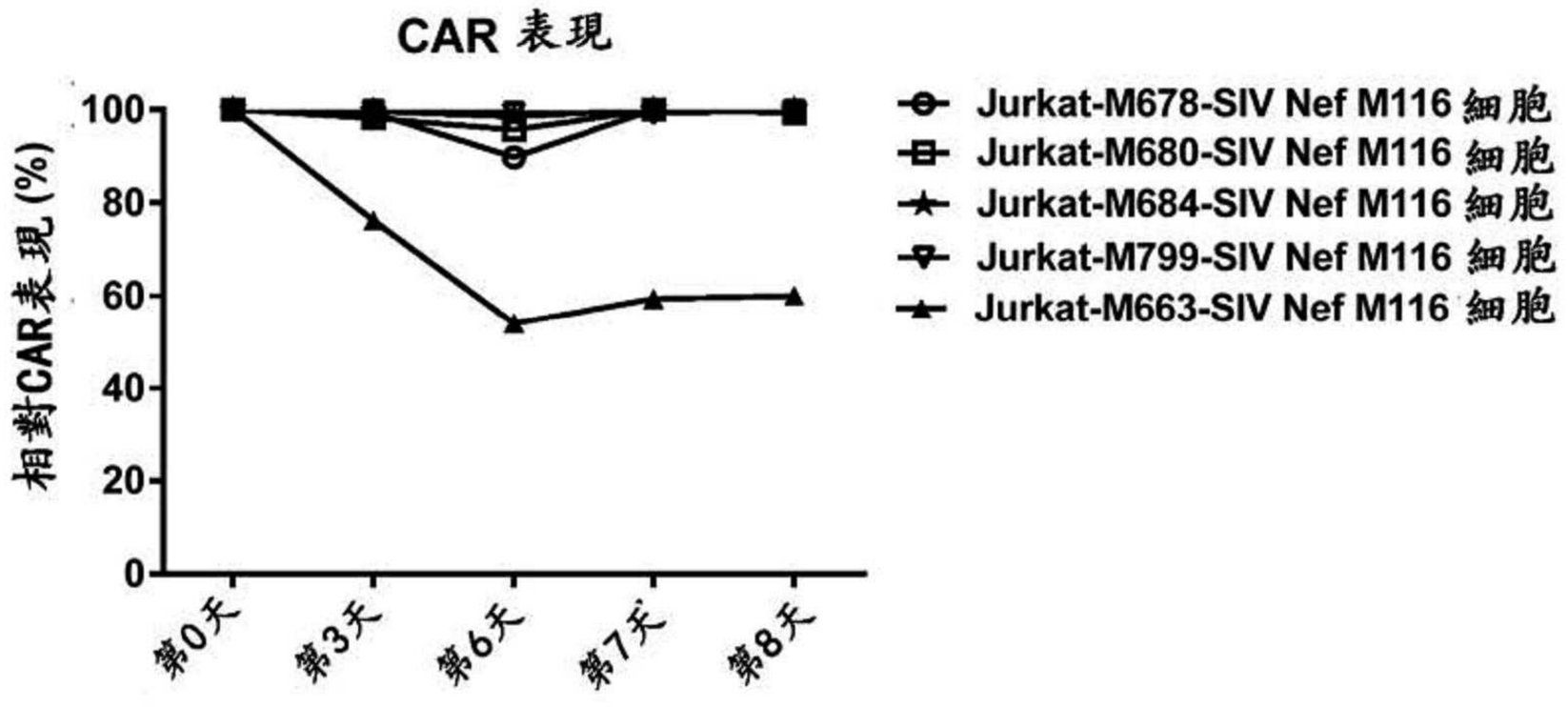
【圖1F】


CAR 表現
相對CAR表現 (%)
100
80
60
40
20
0
第0天
第3天
第6天
第7天
第8天
Jurkat-M678-空載體細胞
Jurkat-M680-空載體細胞
Jurkat-M684-空載體細胞
Jurkat-M799-空載體細胞
Jurkat-M663-空載體細胞

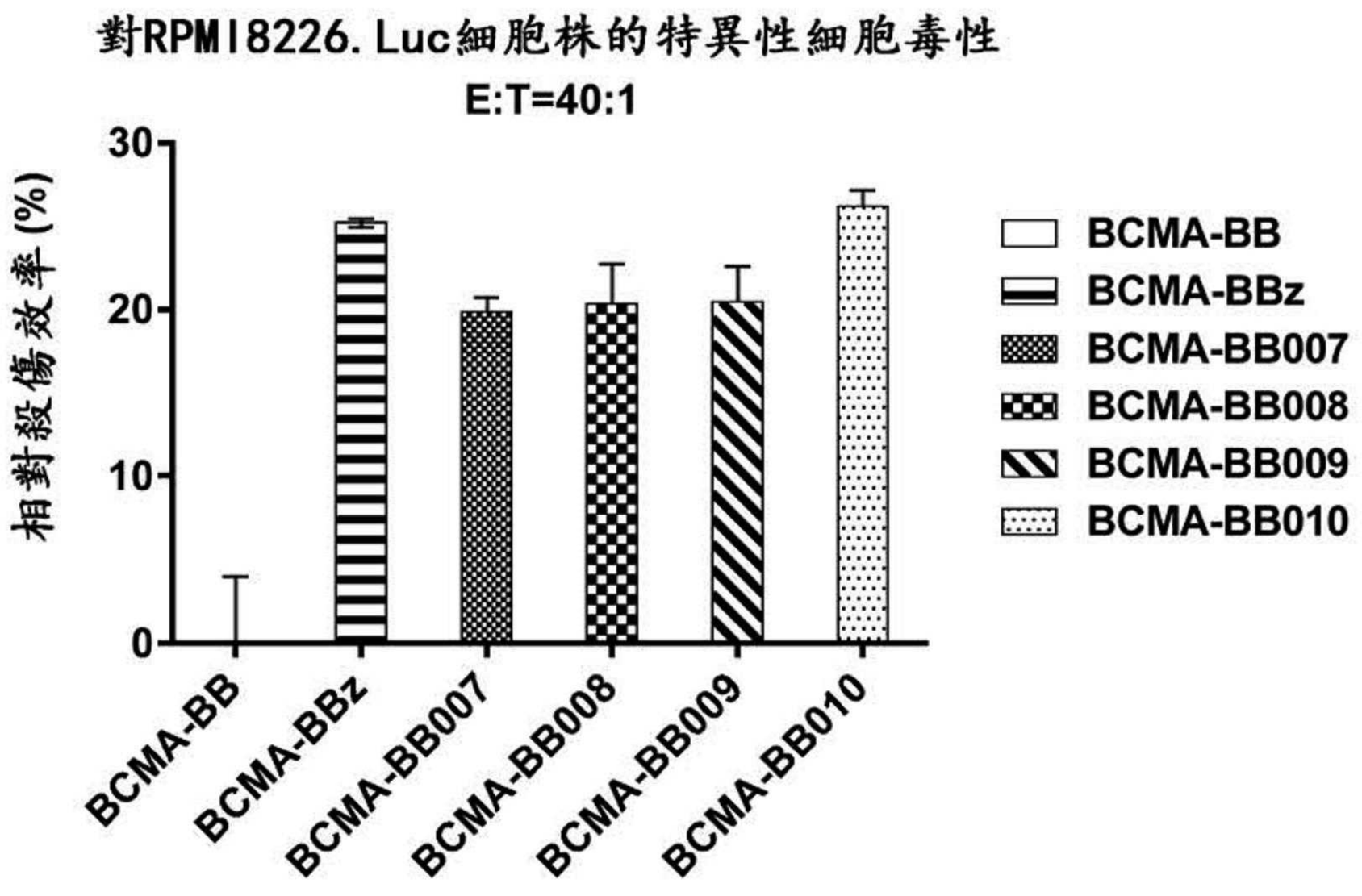
【圖1G】


CAR 表現
相對CAR表現 (%)
100
80
60
40
20
0
第0天
第3天
第6天
第7天
第8天
Jurkat-M678-SIV Nef 細胞
Jurkat-M680-SIV Nef 細胞
Jurkat-M684-SIV Nef 細胞
Jurkat-M799-SIV Nef 細胞
Jurkat-M663-SIV Nef 細胞

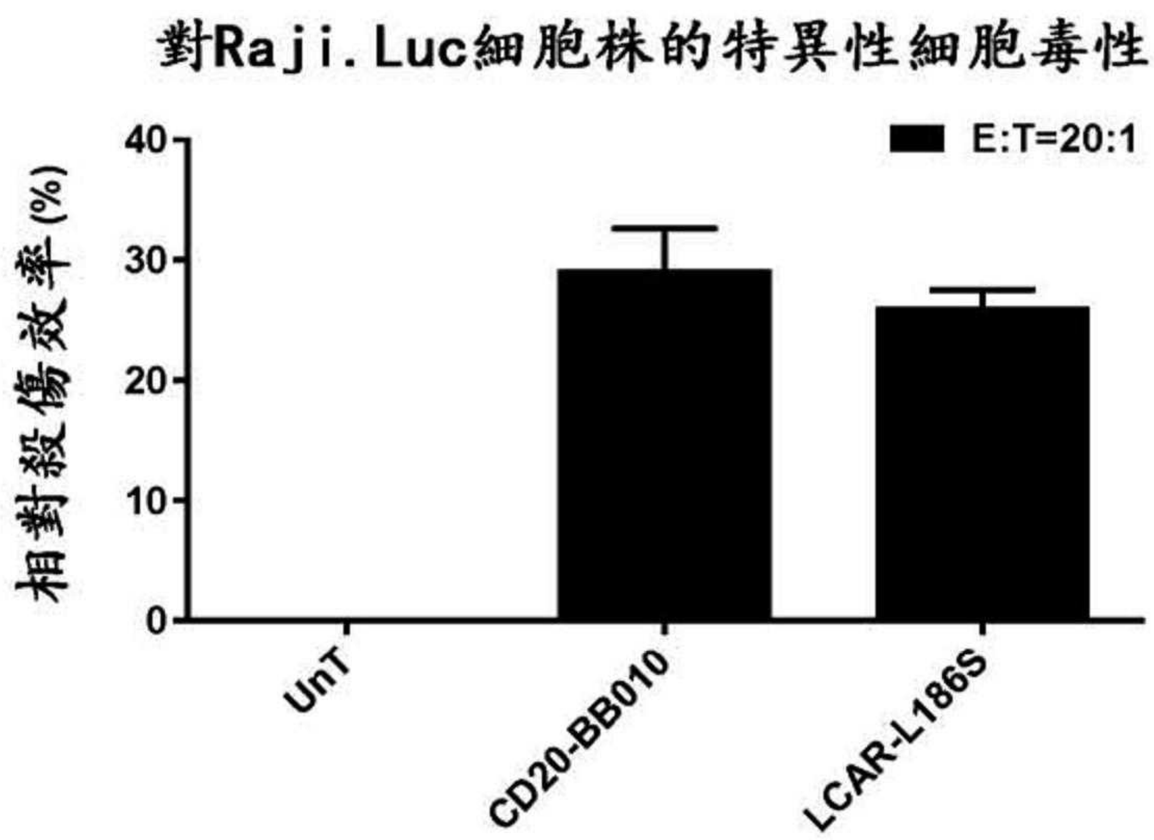
【圖1H】


CAR 表現
相對CAR表現 (%)
100
80
60
40
20
0
第0天
第3天
第6天
第7天
第8天
Jurkat-M678-SIV Nef M116 細胞
Jurkat-M680-SIV Nef M116 細胞
Jurkat-M684-SIV Nef M116 細胞
Jurkat-M799-SIV Nef M116 細胞
Jurkat-M663-SIV Nef M116 細胞

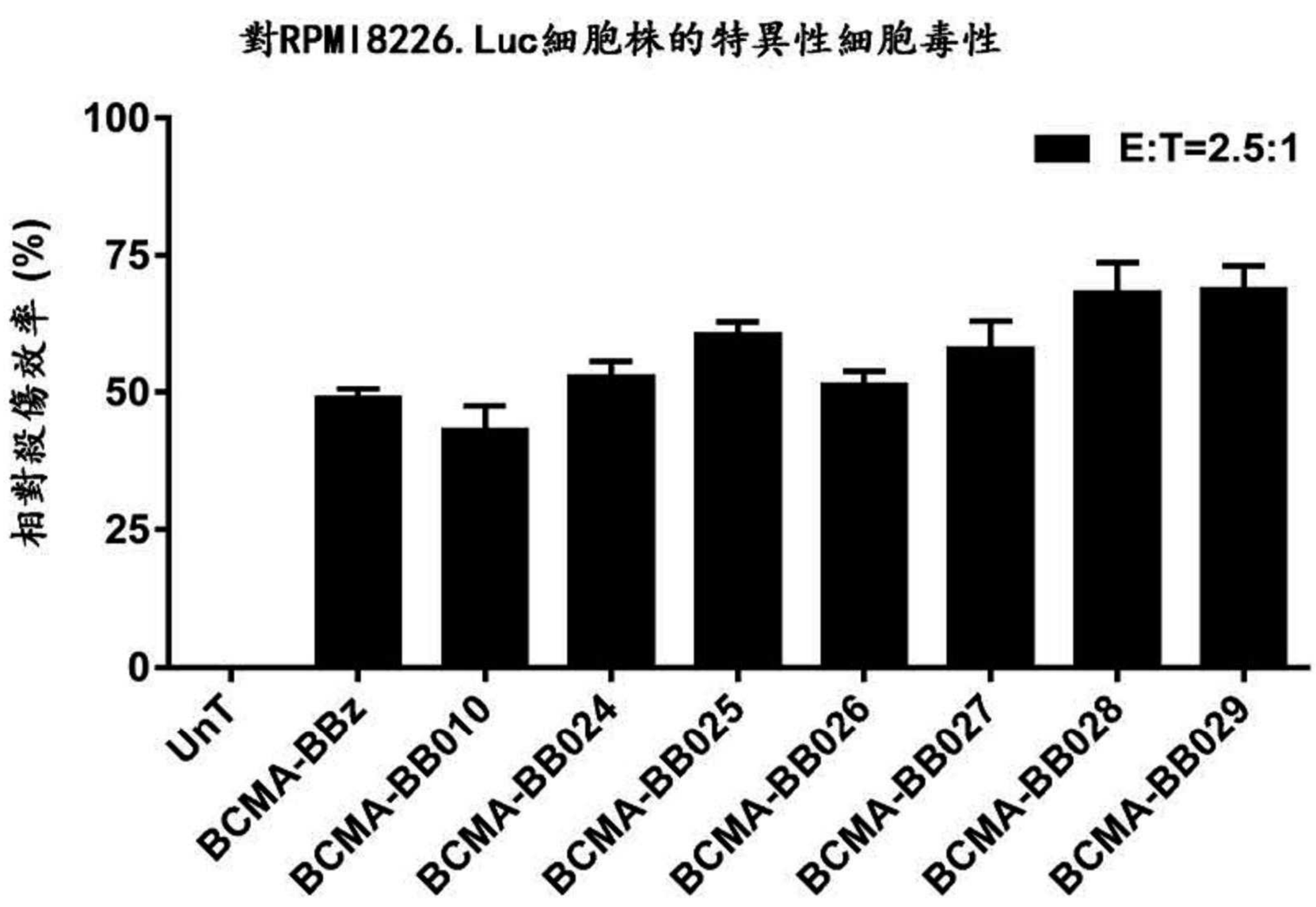
【圖1I】


對RPMI8226.Luc細胞株的特異性細胞毒性
E:T=40:1
相對殺傷效率 (%)
30
20
10
0
BCMA-BB
BCMA-BBz
BCMA-BB007
BCMA-BB008
BCMA-BB009
BCMA-BB010

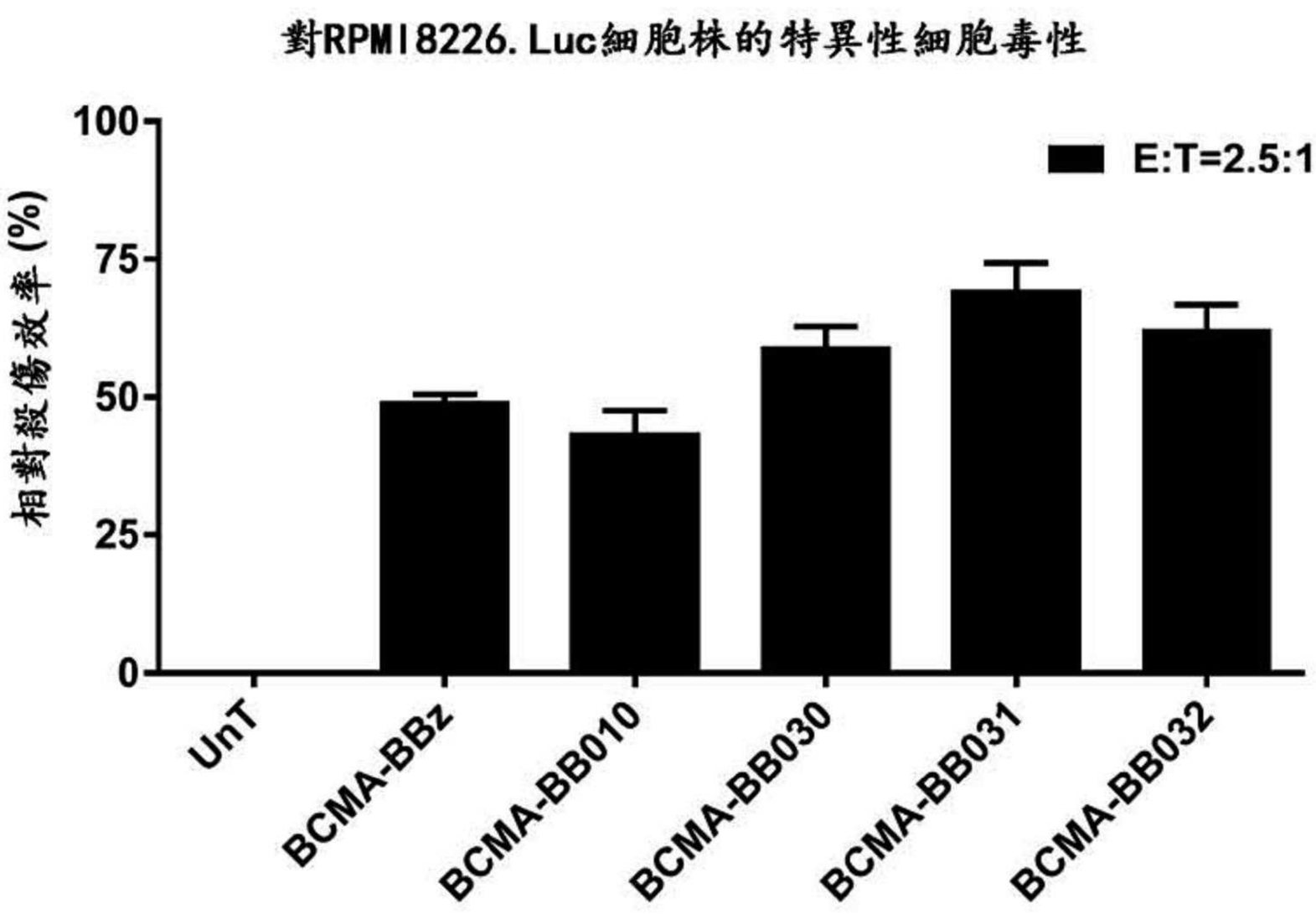
【圖2A】


對Raji.Luc細胞株的特異性細胞毒性
E:T=20:1
相對殺傷效率(%)
40
30
20
10
0
UnT
CD20-BB010
LCAR-L186S

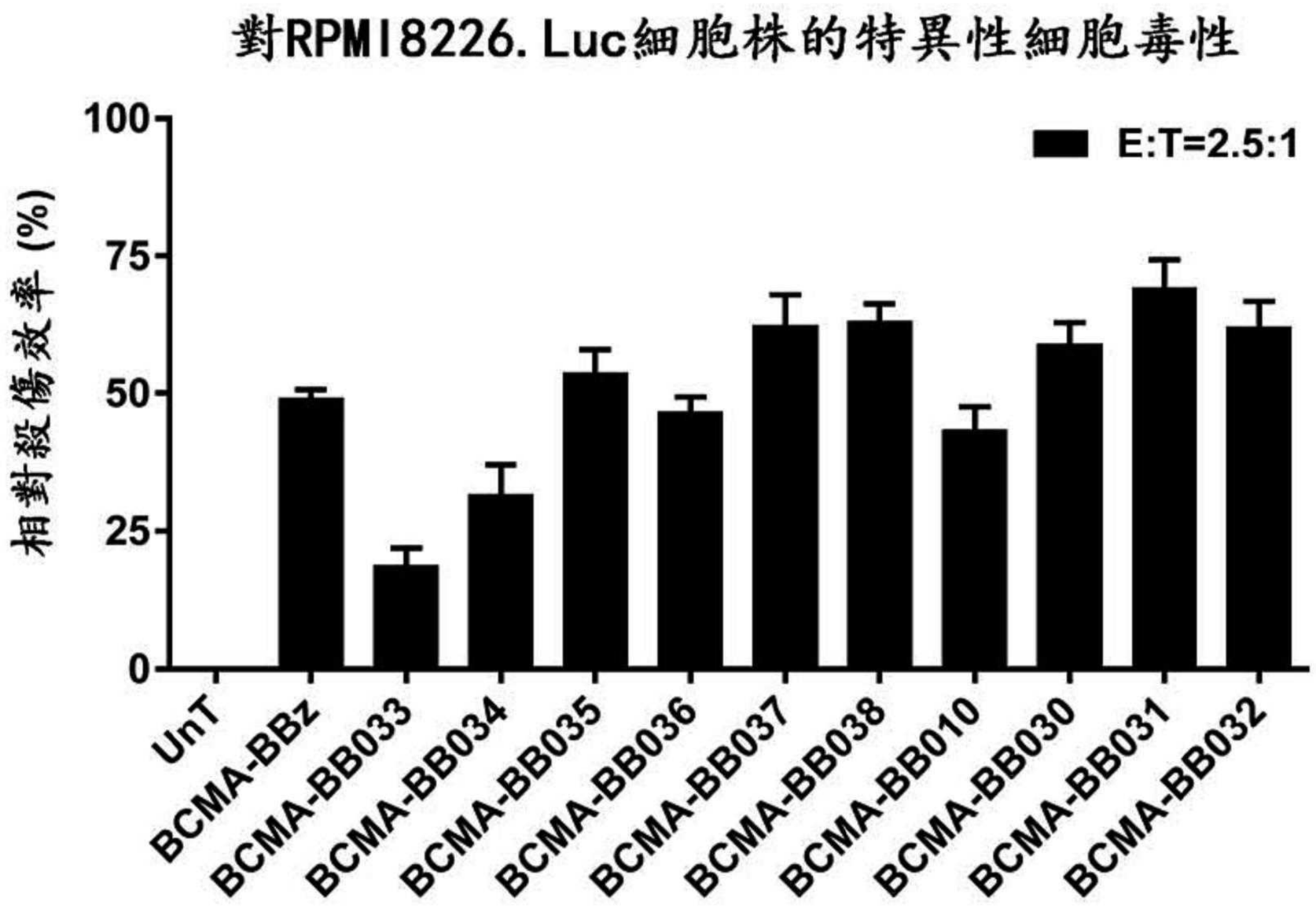
【圖2B】


對RPMI8226.Luc細胞株的特異性細胞毒性
相對殺傷效率 (%)
100
75
50
25
0
E:T=2.5:1
UnT
BCMA-BBz
BCMA-BB010
BCMA-BB024
BCMA-BB025
BCMA-BB026
BCMA-BB027
BCMA-BB028
BCMA-BB029

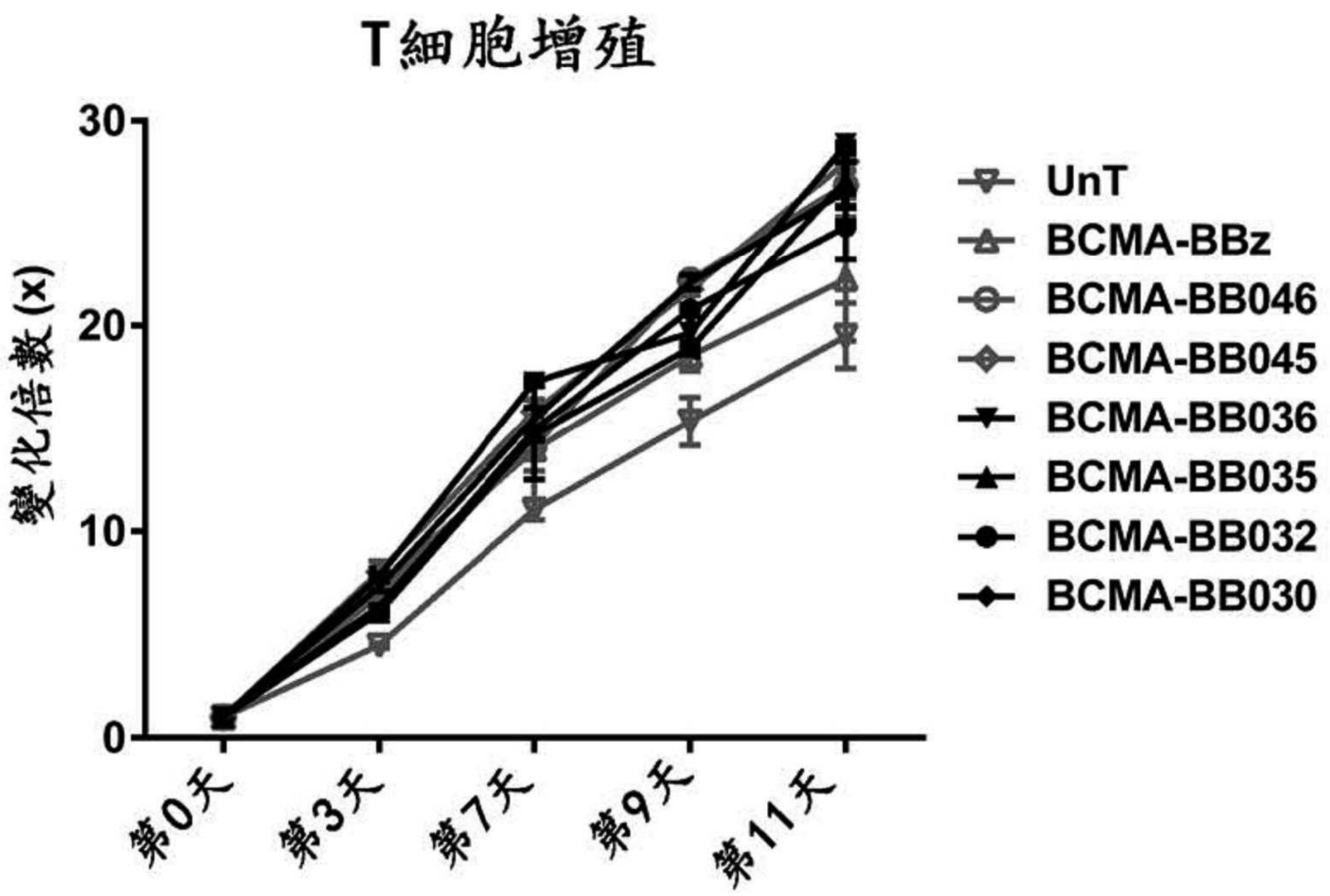
【圖3】


對RPMI8226.Luc細胞株的特異性細胞毒性
相對殺傷效率 (%)
100
75
50
25
0
E:T=2.5:1
UnT
BCMA-BBz
BCMA-BB010
BCMA-BB030
BCMA-BB031
BCMA-BB032

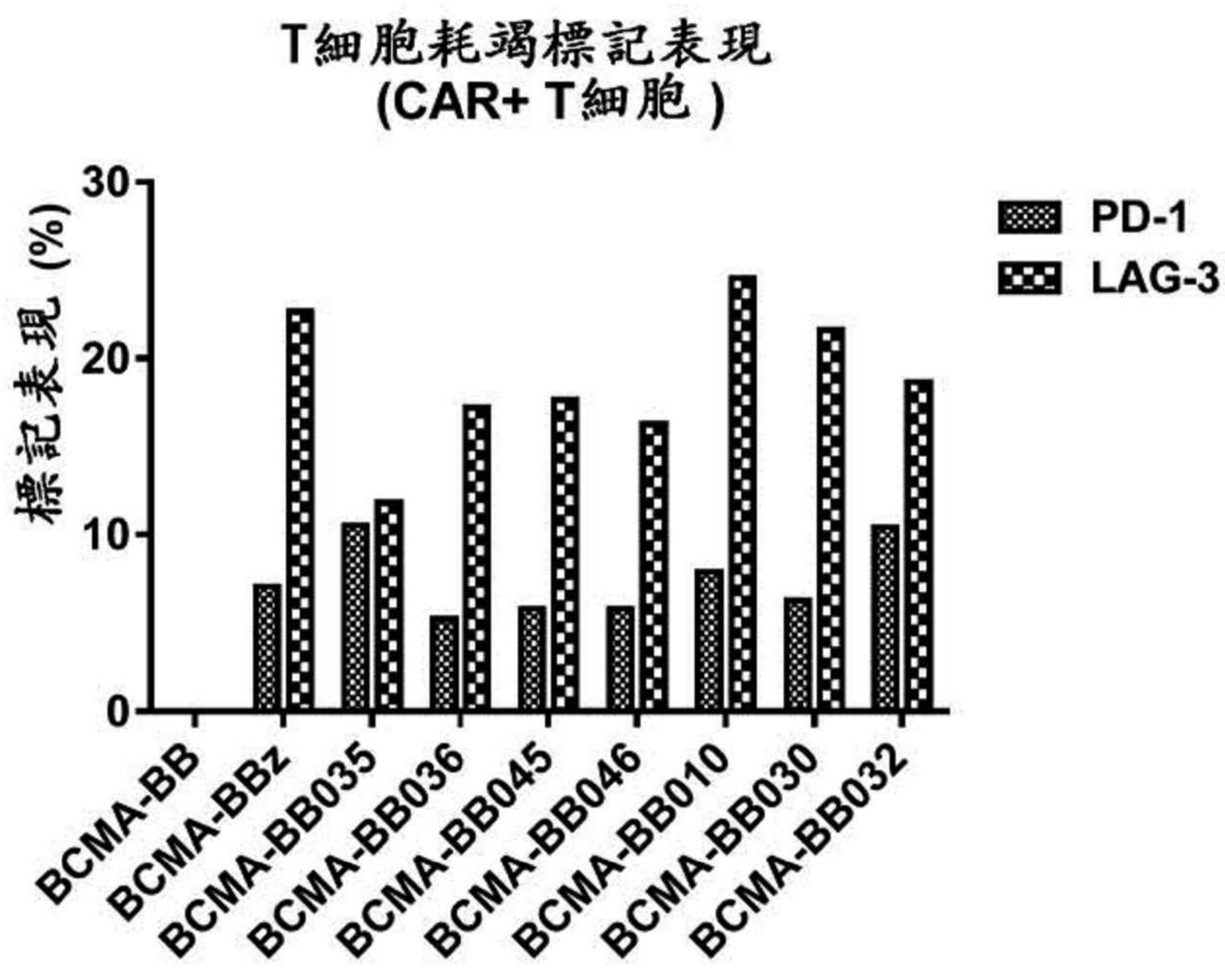
【圖4】


對RPMI8226.Luc細胞株的特異性細胞毒性
E:T=2.5:1
相對殺傷效率 (%)
100
75
50
25
0
UnT
BCMA-BBz
BCMA-BB033
BCMA-BB034
BCMA-BB035
BCMA-BB036
BCMA-BB037
BCMA-BB038
BCMA-BB010
BCMA-BB030
BCMA-BB031
BCMA-BB032

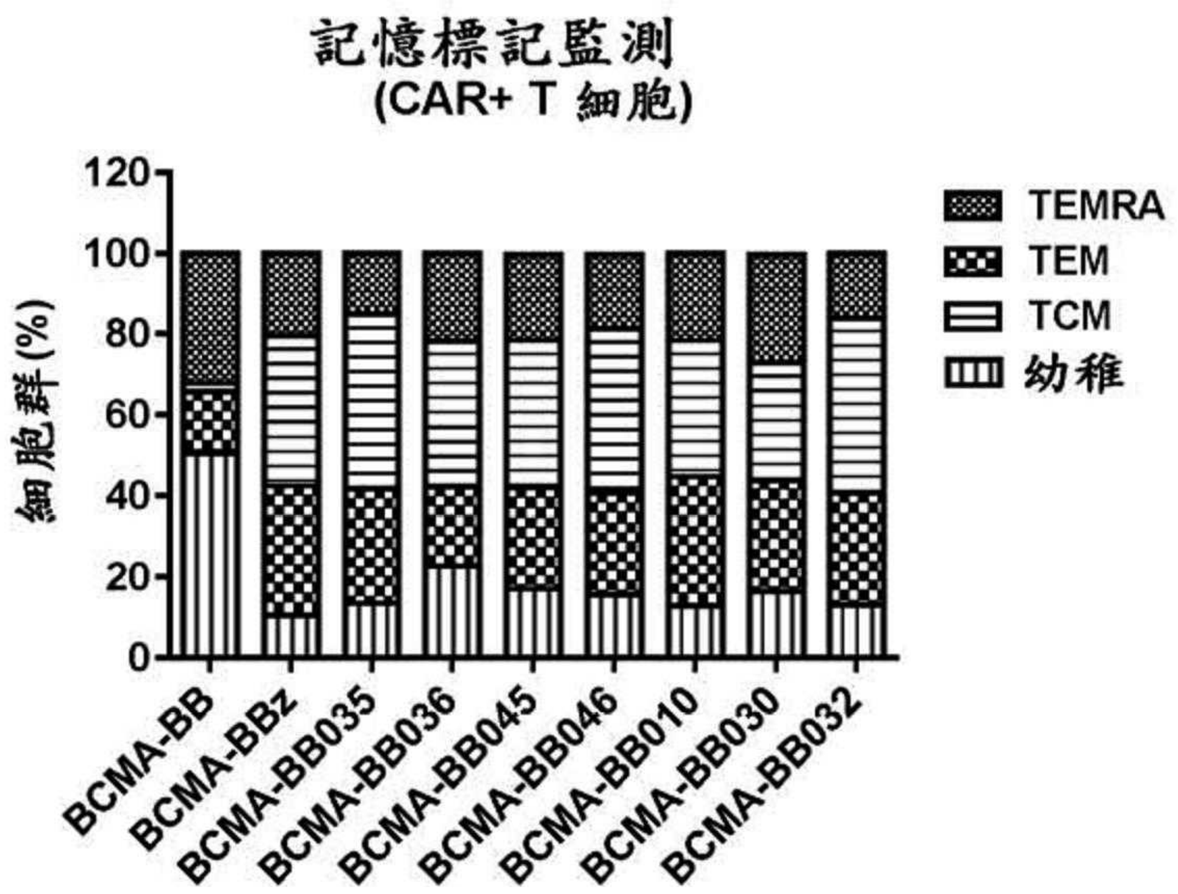
【圖5】


T細胞增殖
變化倍數(x)
30
20
10
0
第0天
第3天
第7天
第9天
第11天
UnT
BCMA-BBz
BCMA-BB046
BCMA-BB045
BCMA-BB036
BCMA-BB035
BCMA-BB032
BCMA-BB030

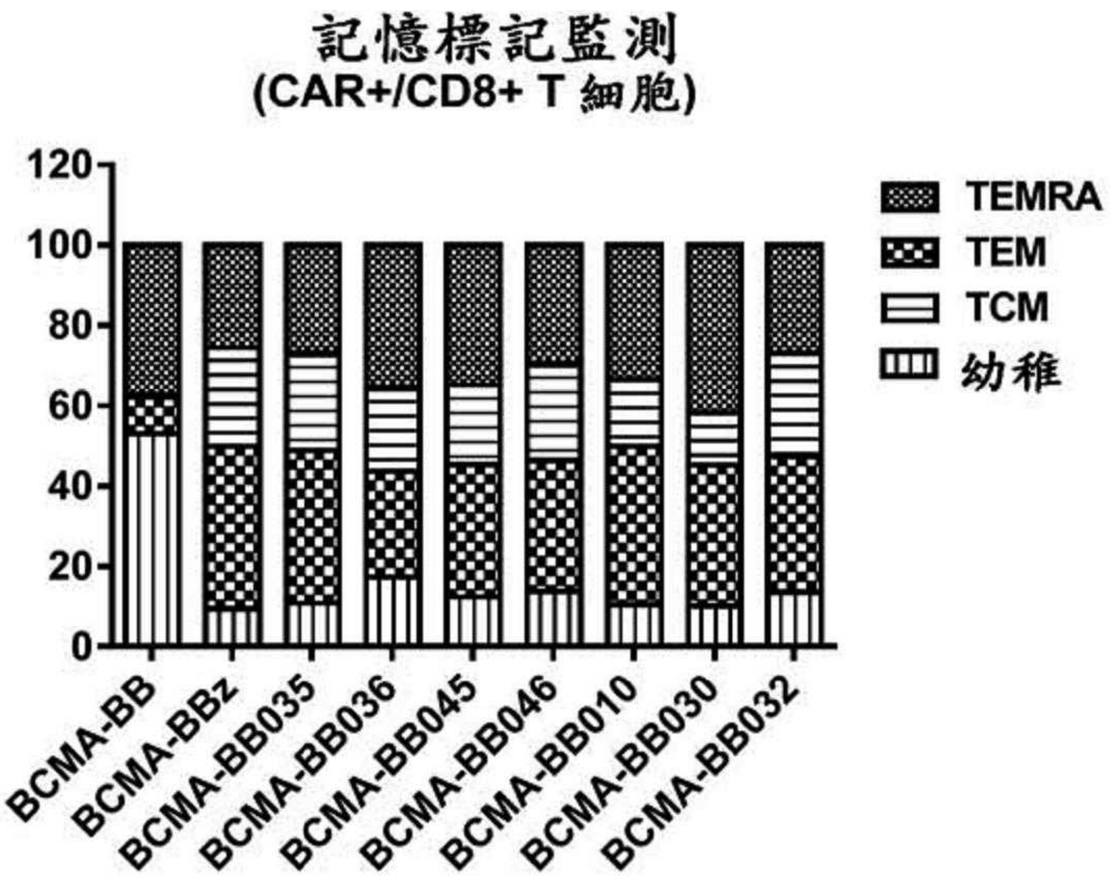
【圖6】


T細胞耗竭標記表現
(CAR+ T細胞)
標記表現 (%)
30
20
10
0
PD-1
LAG-3
BCMA-BB
BCMA-BBz
BCMA-BB035
BCMA-BB036
BCMA-BB045
BCMA-BB046
BCMA-BB010
BCMA-BB030
BCMA-BB032

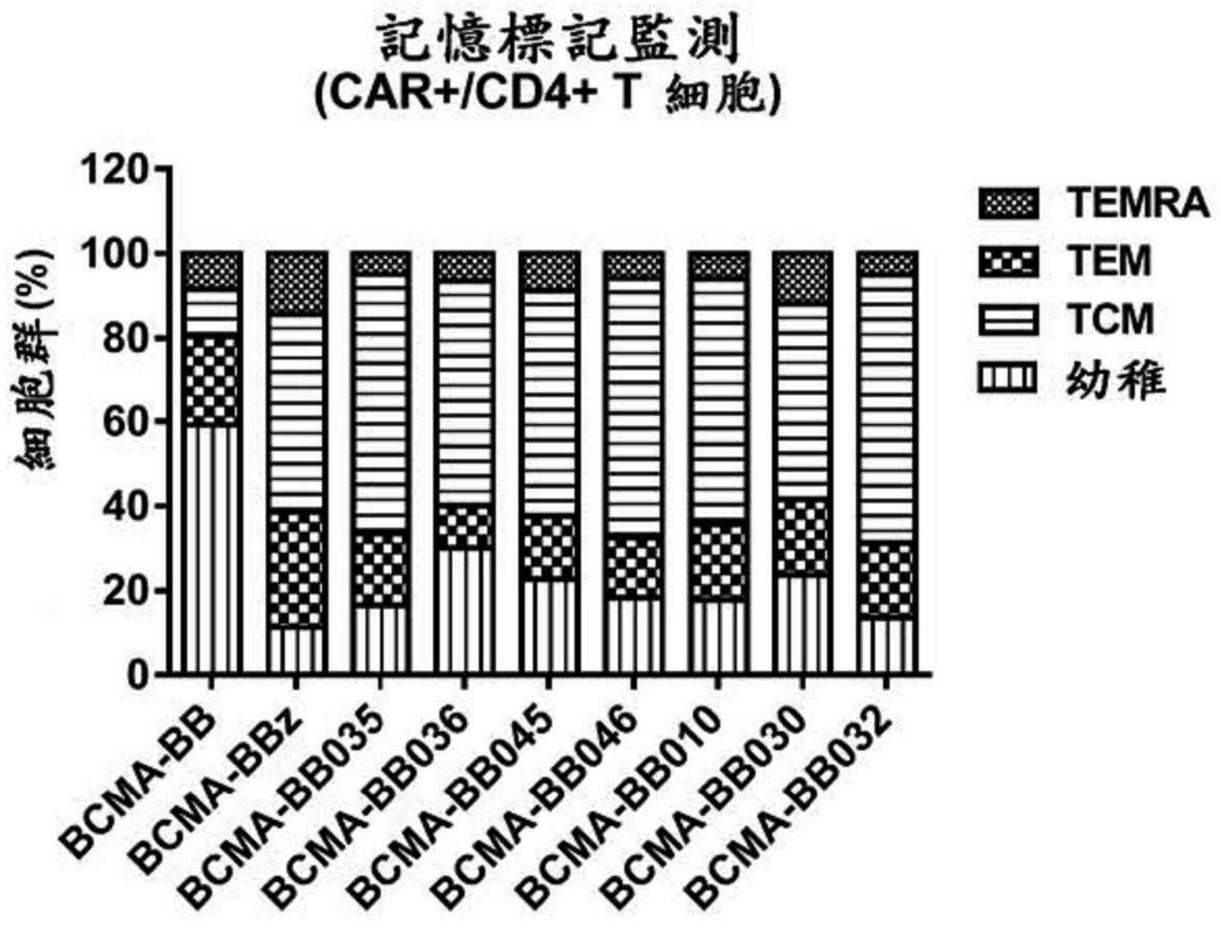
【圖7A】


記憶標記監測
(CAR+ T 細胞)
細胞群(%)
120
100
80
60
40
20
0
TEMRA
TEM
TCM
幼稚
BCMA-BB
BCMA-BBz
BCMA-BB035
BCMA-BB036
BCMA-BB045
BCMA-BB046
BCMA-BB010
BCMA-BB030
BCMA-BB032

【圖7B】

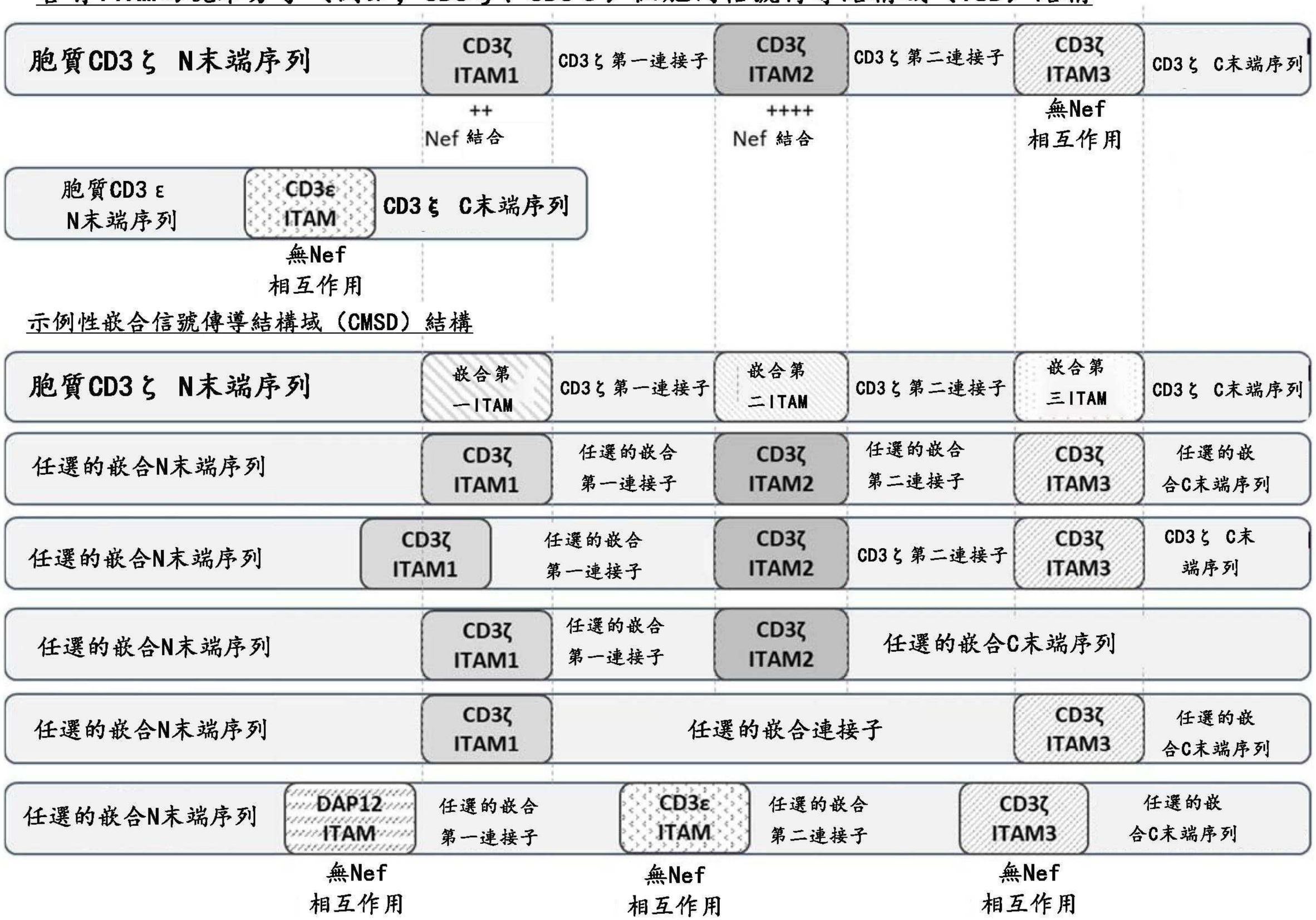

記憶標記監測
(CAR+/CD8+ T 細胞)
120
100
80
60
40
20
0
TEMRA
TEM
TCM
幼稚
BCMA-BB
BCMA-BBz
BCMA-BB035
BCMA-BB036
BCMA-BB045
BCMA-BB046
BCMA-BB010
BCMA-BB030
BCMA-BB032

【圖7C】

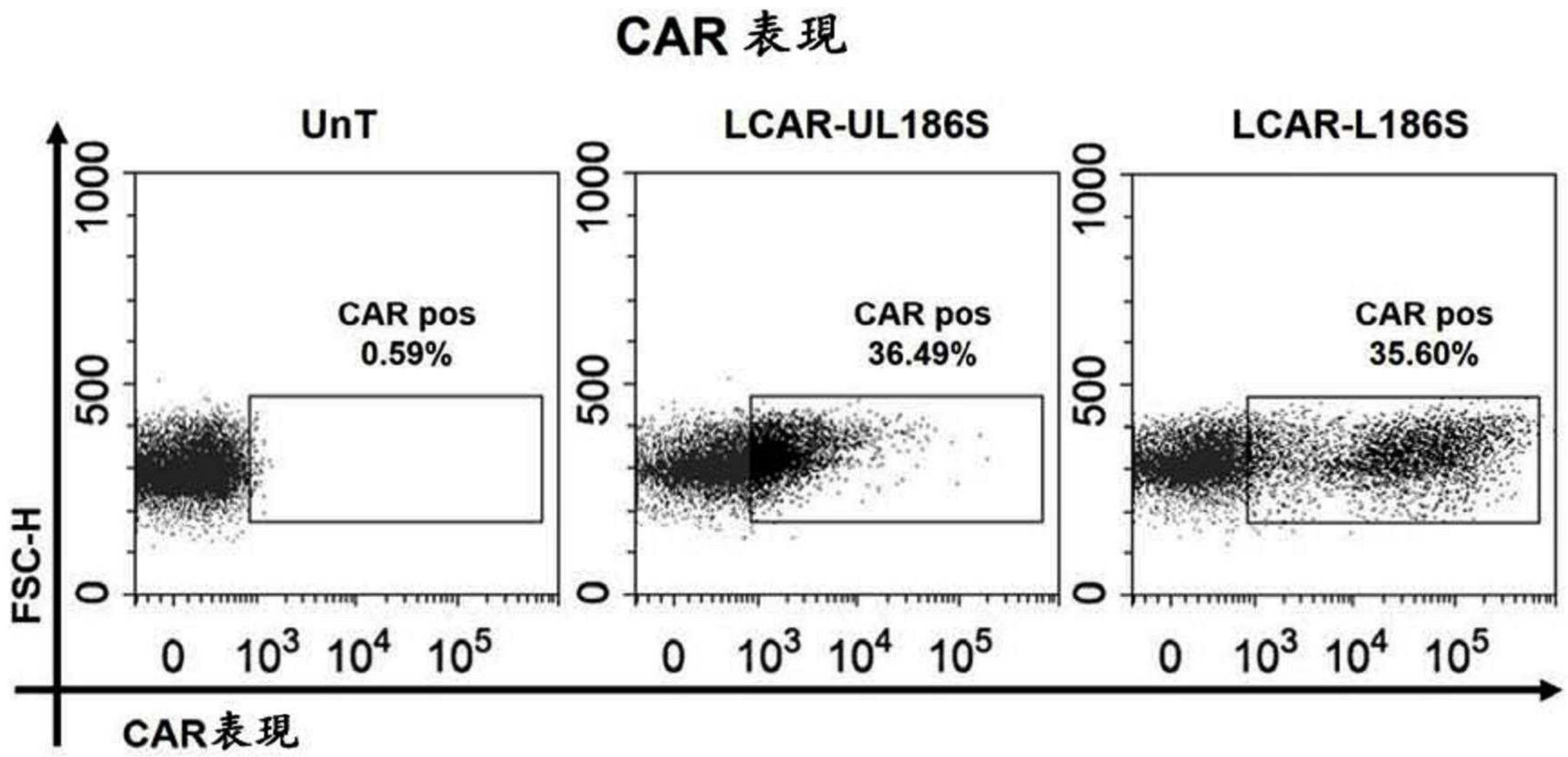

記憶標記監測
(CAR+/CD4+ T 細胞)
細胞群(%)
120
100
80
60
40
20
0
TEMRA
TEM
TCM
幼稚
BCMA-BB
BCMA-BBz
BCMA-BB035
BCMA-BB036
BCMA-BB045
BCMA-BB046
BCMA-BB010
BCMA-BB030
BCMA-BB032

【圖7D】

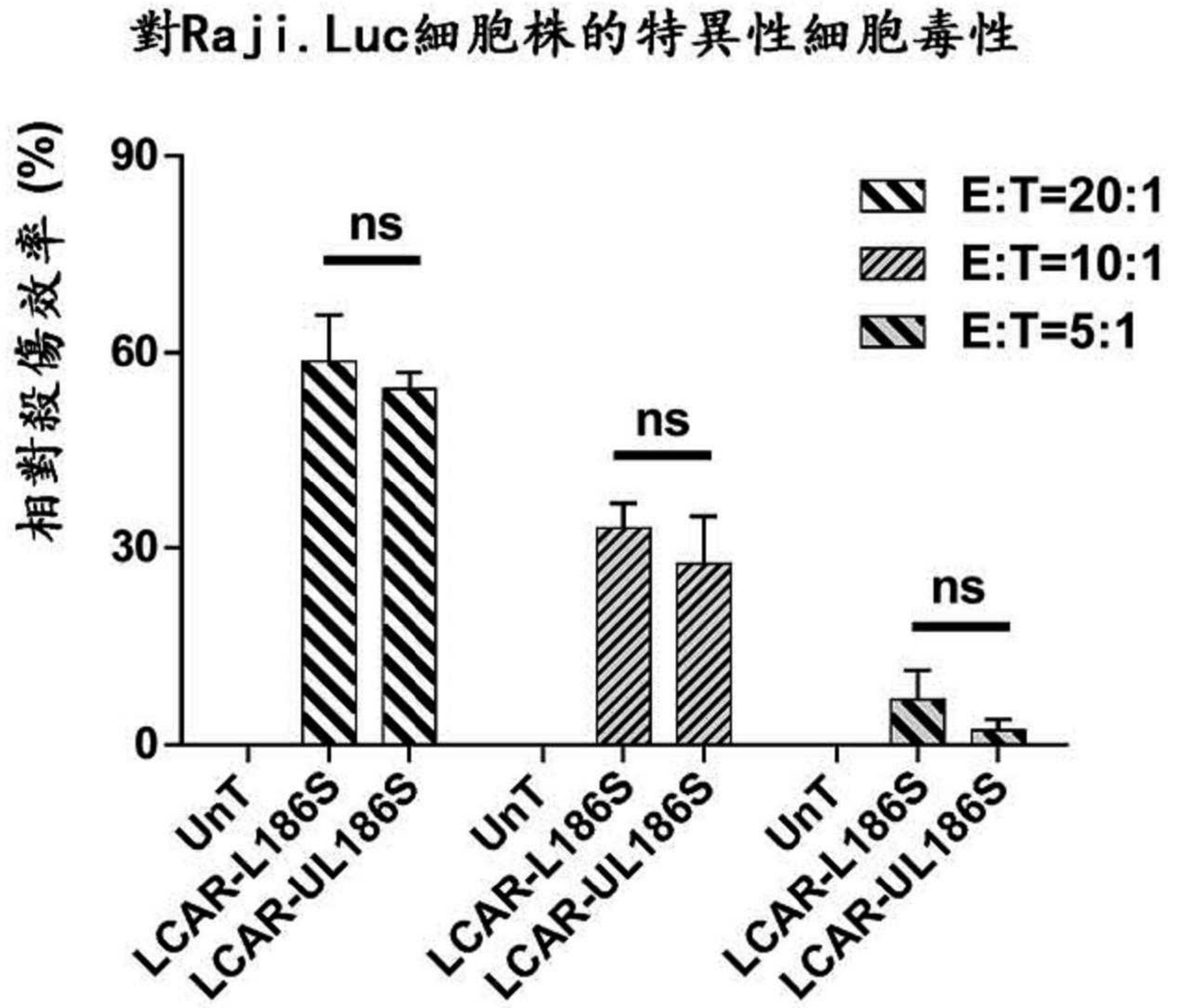
含有ITAM的親本分子（例如，CD3ζ、CD3ε）細胞內信號傳導結構域（ISD）結構



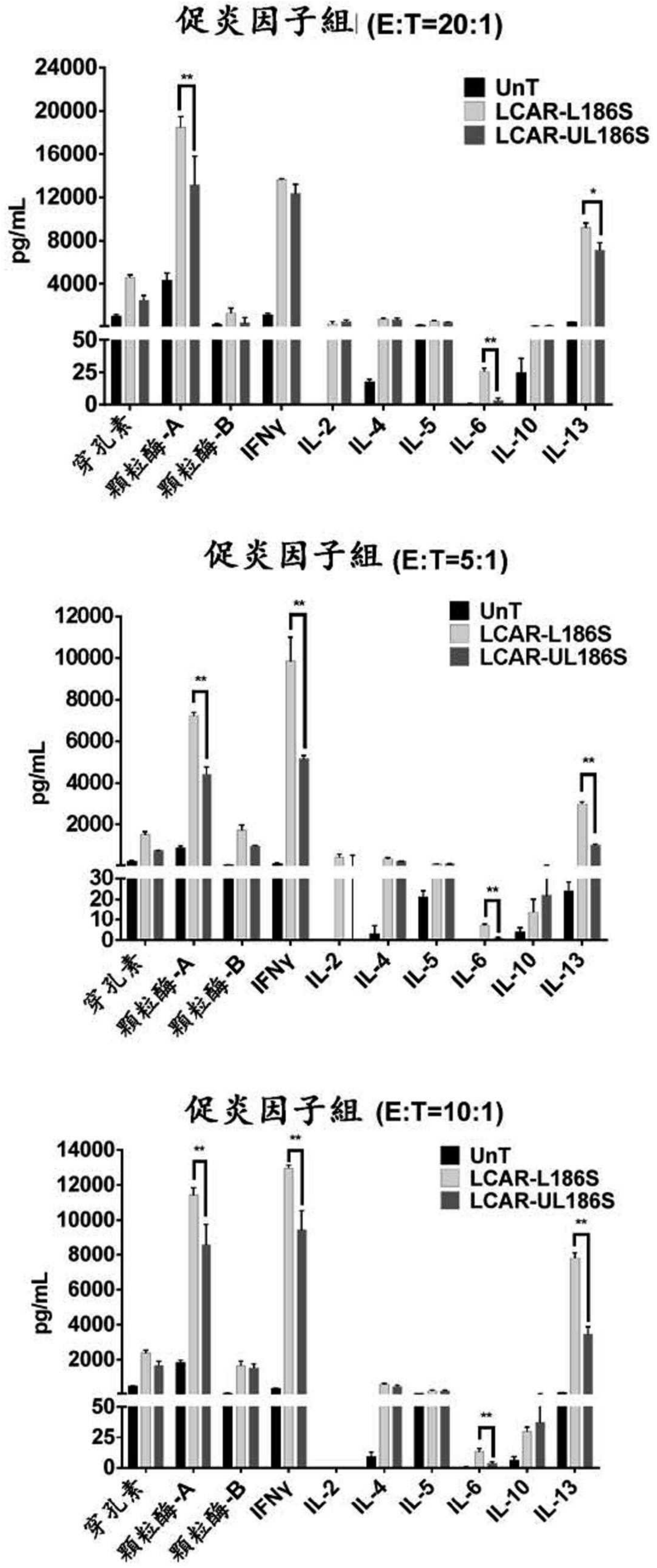
【圖8】


CAR表現
UnT
LCAR-UL186S
LCAR-L186S
CAR pos
0.59%
CAR pos
36.49%
CAR pos
35.60%
FSC-H
1000
500
0
0
10^3
10^4
10^5
CAR表現

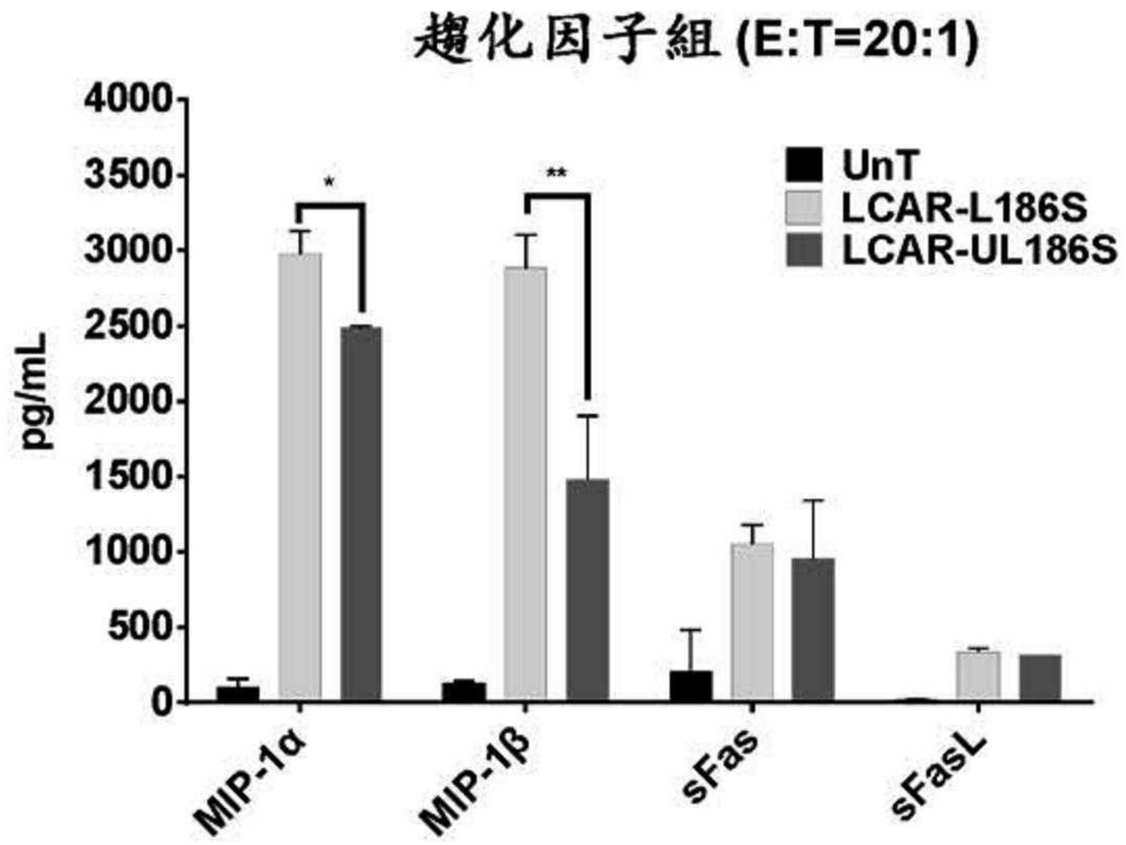
【圖9A】

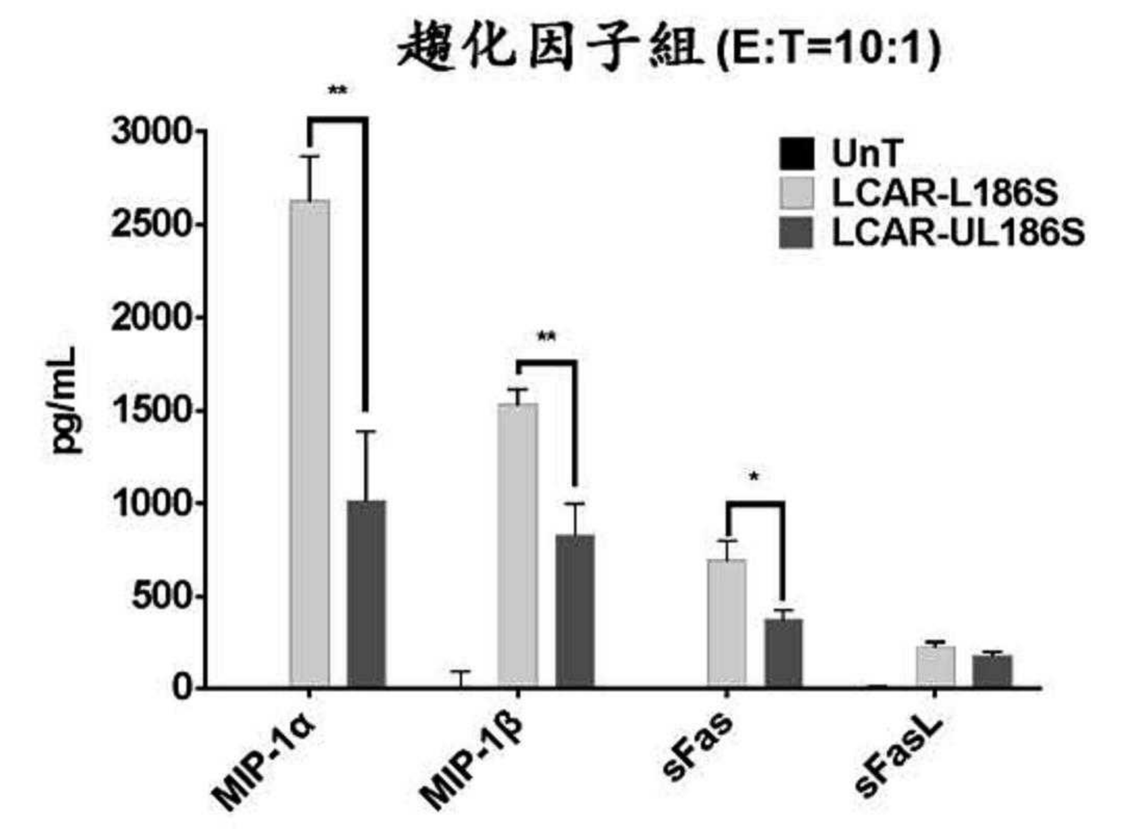

對Raji.Luc細胞株的特異性細胞毒性
相對殺傷效率 (%)
90
60
30
0
ns
ns
ns
E:T=20:1
E:T=10:1
E:T=5:1
UnT
LCAR-L186S
LCAR-UL186S

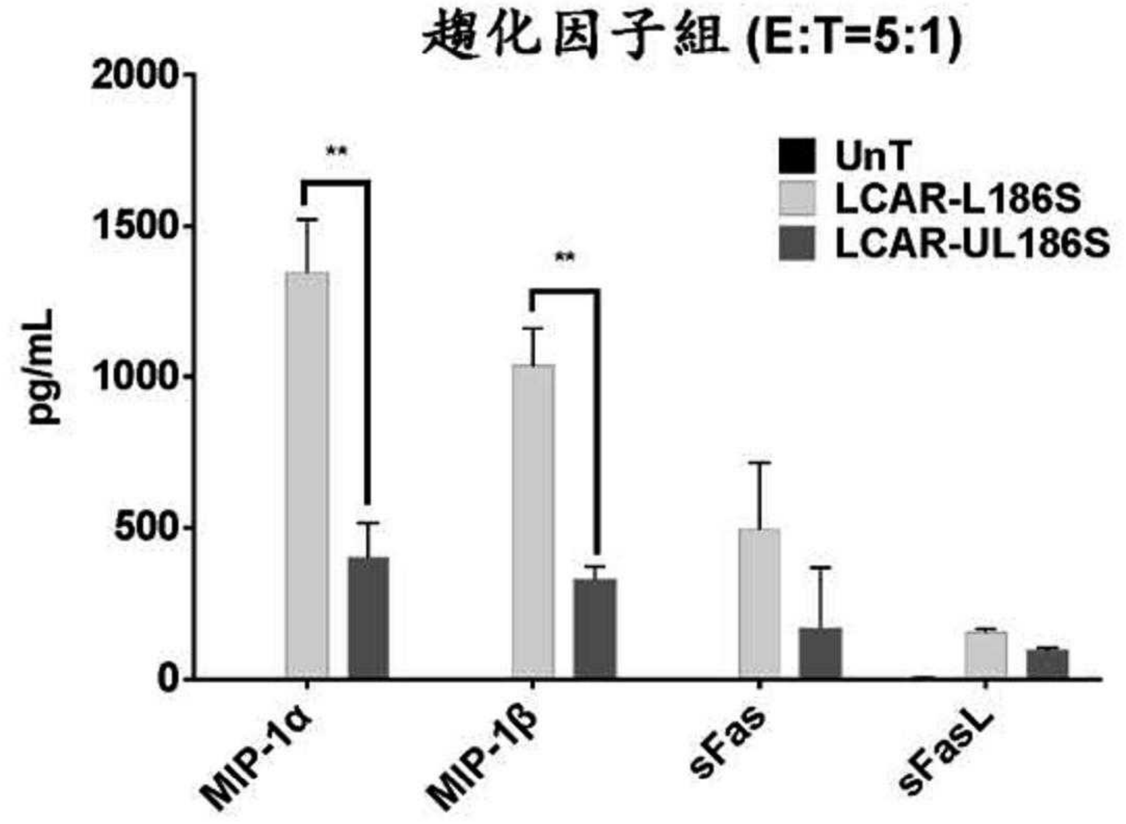
【圖9B】


促炎因子組 (E:T=20:1)
pg/mL
UnT
LCAR-L186S
LCAR-UL186S
穿孔素
顆粒酶-A
顆粒酶-B
IFNγ
IL-2
IL-4
IL-5
IL-6
IL-10
IL-13
促炎因子組 (E:T=5:1)
促炎因子組 (E:T=10:1)

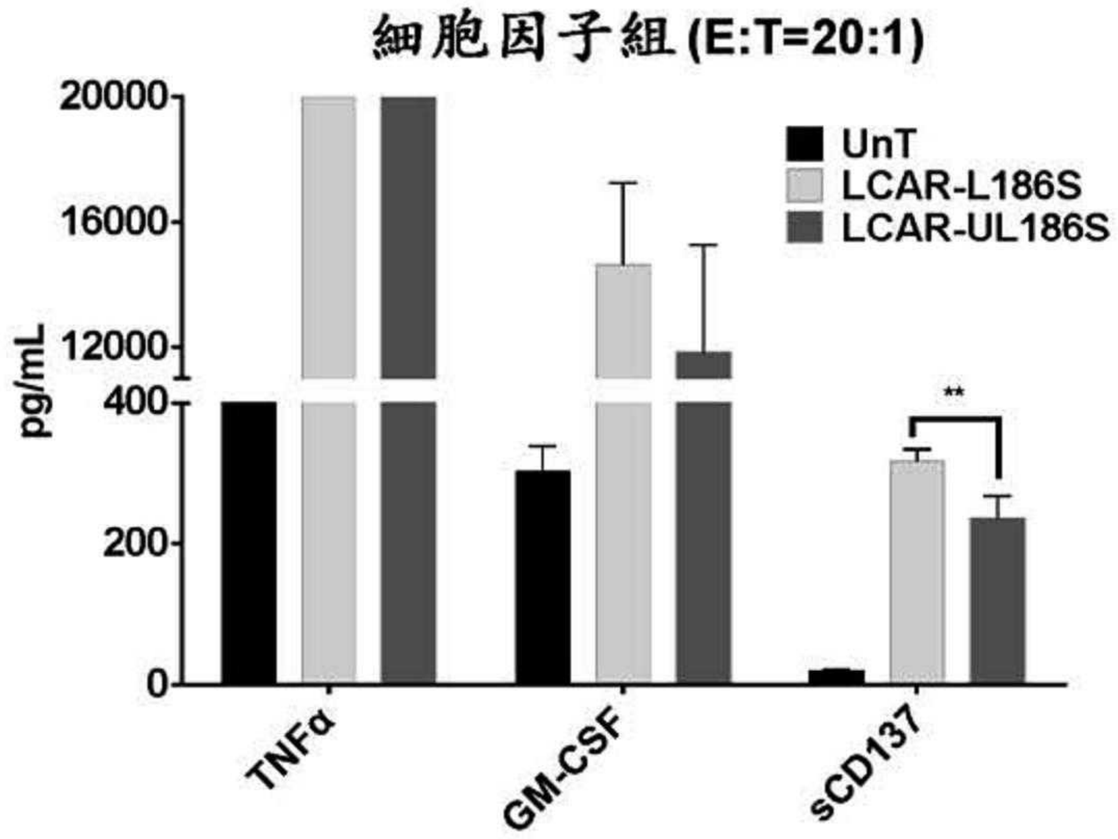
【圖10A】

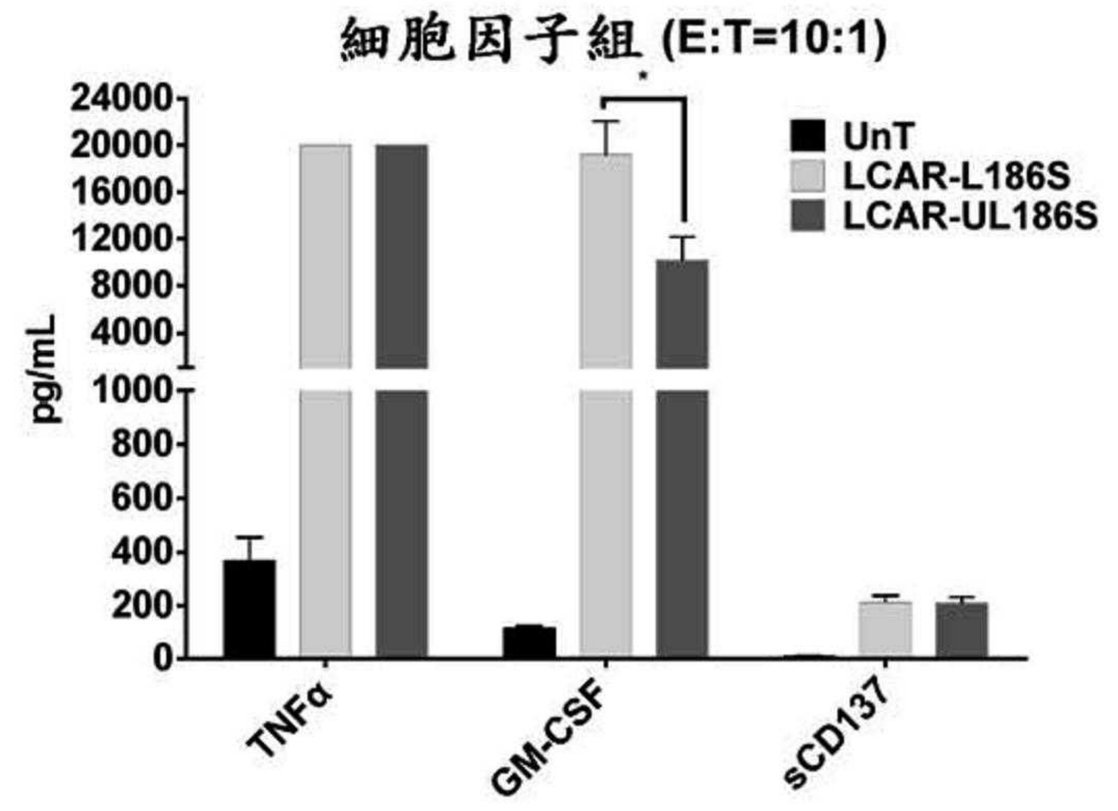

趨化因子組 (E:T=20:1)
pg/mL
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
UnT
LCAR-L186S
LCAR-UL186S
*
**
MIP-1α
MIP-1β
sFas
sFasL

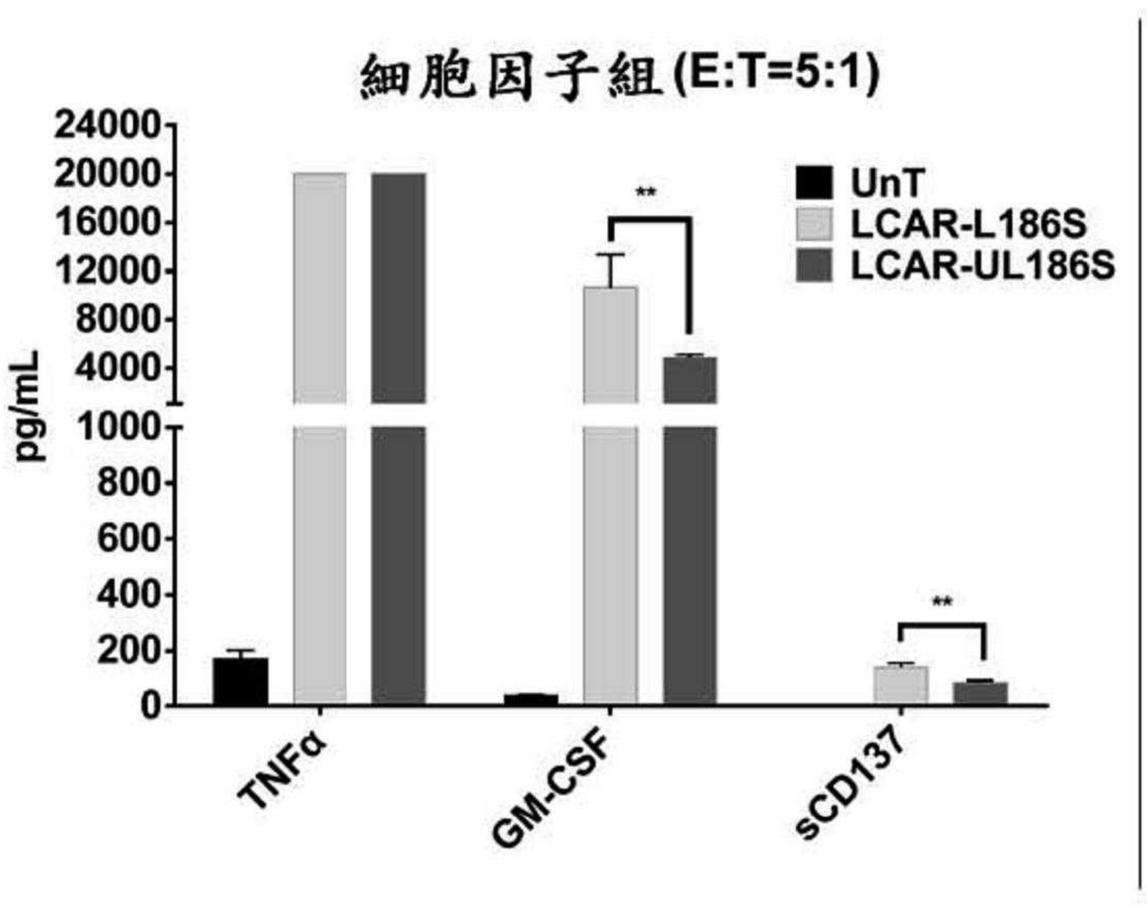

趨化因子組 (E:T=10:1)
pg/mL
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
UnT
LCAR-L186S
LCAR-UL186S
**
**
*
MIP-1α
MIP-1β
sFas
sFasL


趨化因子組 (E:T=5:1)
pg/mL
2000
1500
1000
500
0
UnT
LCAR-L186S
LCAR-UL186S
**
**
MIP-1α
MIP-1β
sFas
sFasL

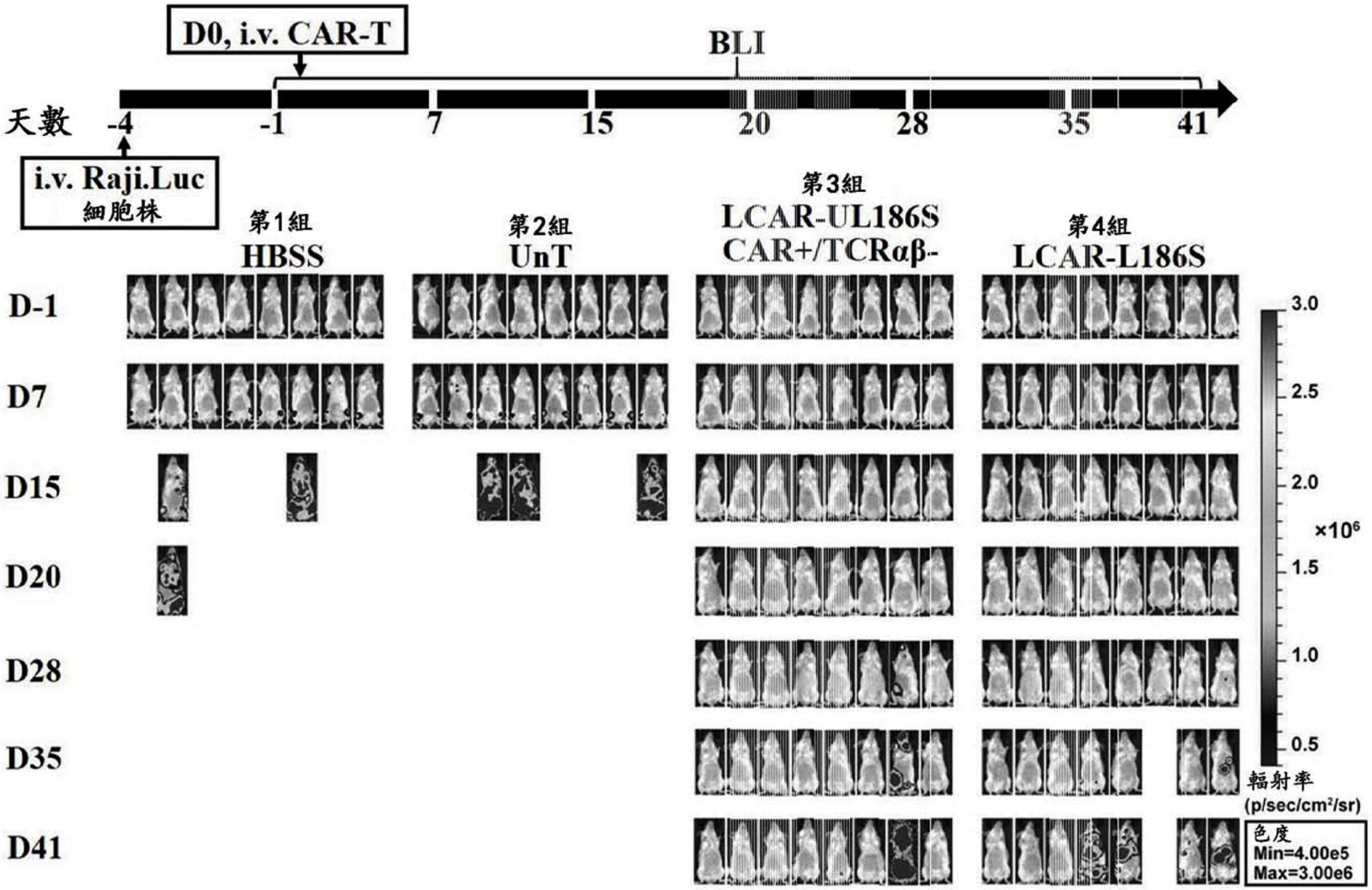
【圖10B】


細胞因子組 (E:T=20:1)
pg/mL
20000
16000
12000
400
200
0
UnT
LCAR-L186S
LCAR-UL186S
**
TNFα
GM-CSF
sCD137

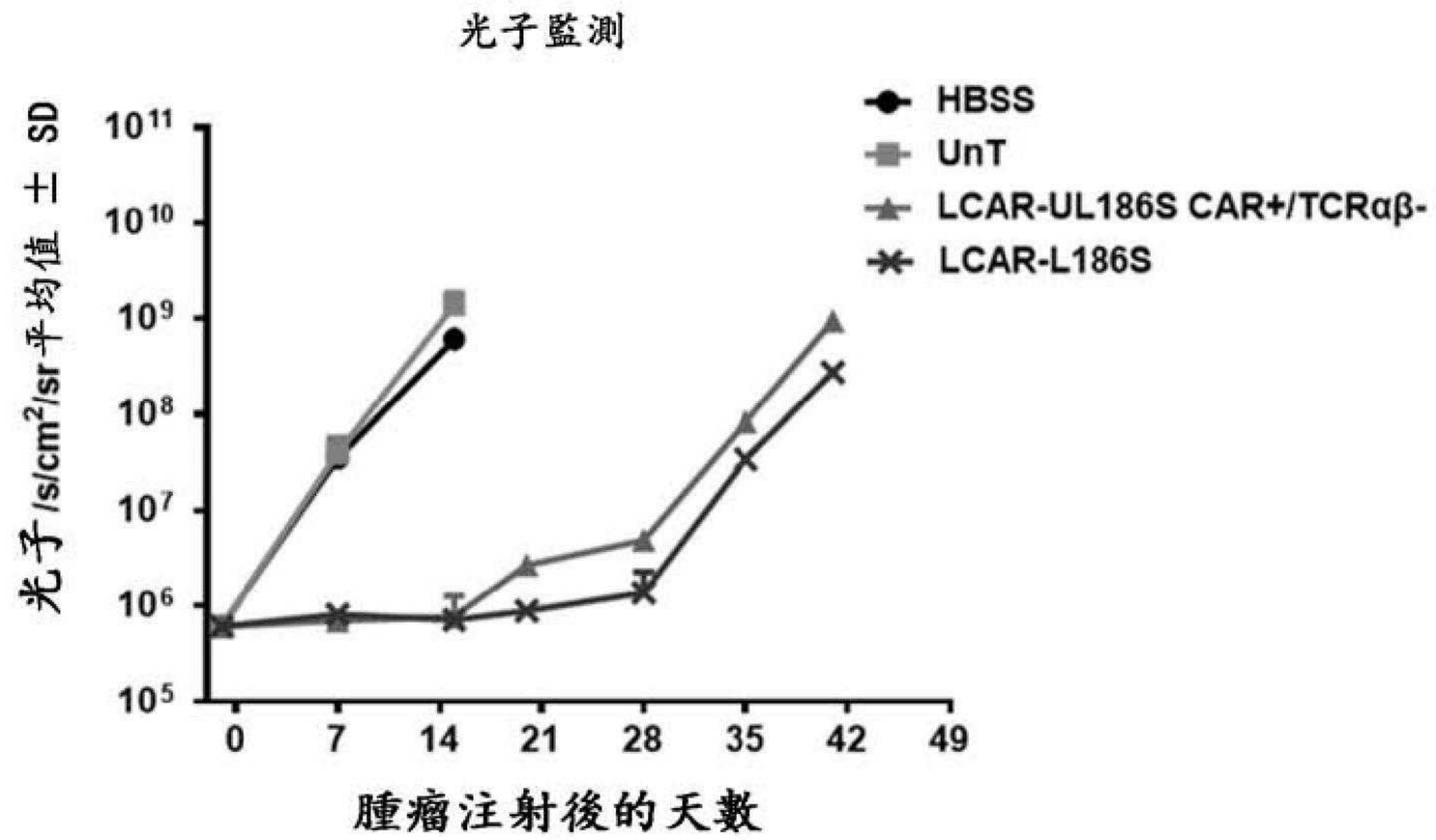

細胞因子組 (E:T=10:1)
pg/mL
24000
20000
16000
12000
8000
4000
1000
800
600
400
200
0
*
UnT
LCAR-L186S
LCAR-UL186S
TNFα
GM-CSF
sCD137


細胞因子組 (E:T=5:1)
pg/mL
24000
20000
16000
12000
8000
4000
1000
800
600
400
200
0
**
**
UnT
LCAR-L186S
LCAR-UL186S
TNFα
GM-CSF
sCD137

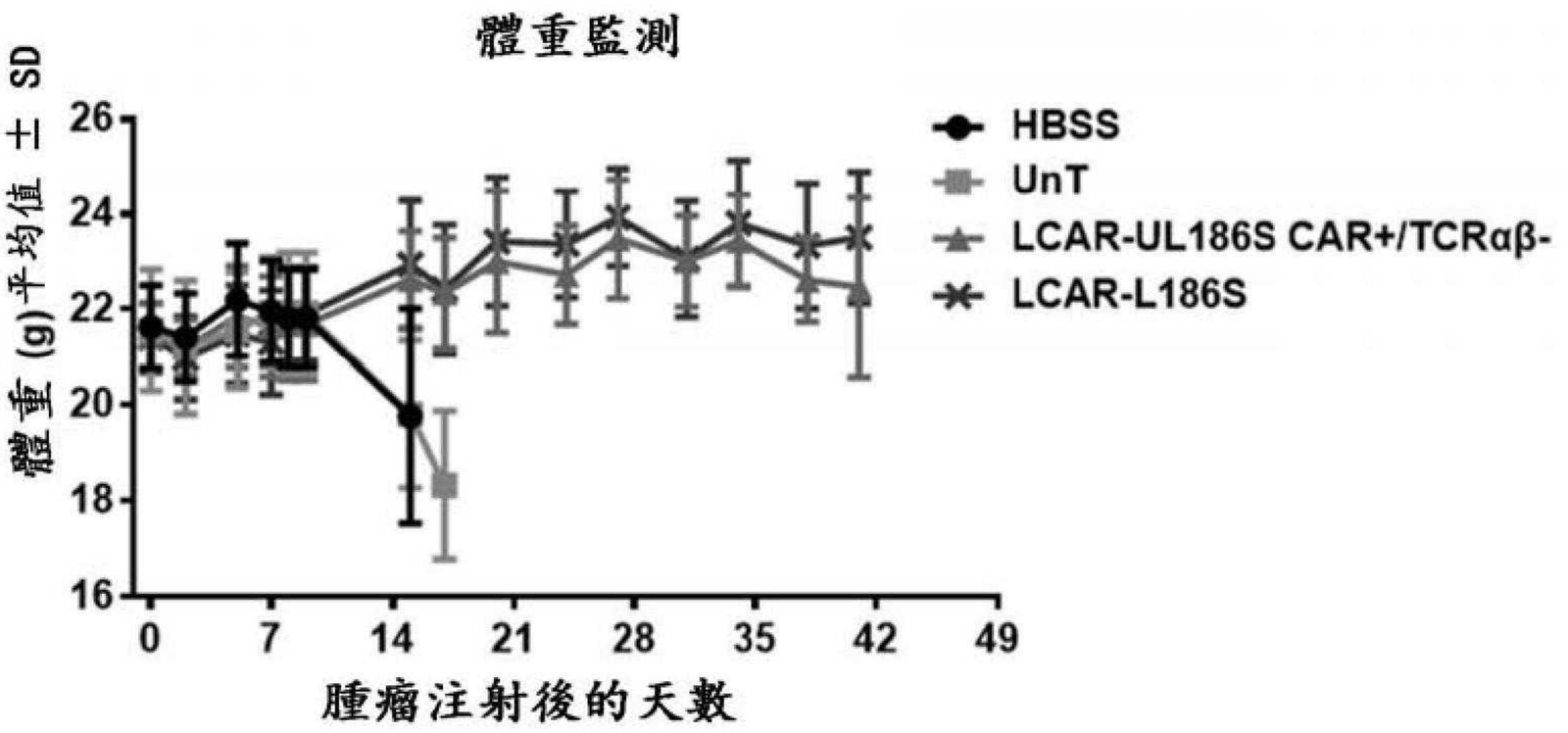
【圖10C】


D0, i.v. CAR-T
BLI
天數
-4
-1
7
15
20
28
35
41
i.v. Raji.Luc
細胞株
第1組
HBSS
第2組
UnT
第3組
LCAR-UL186S
CAR+/TCRαβ-
第4組
LCAR-L186S
D-1
D7
D15
D20
D28
D35
D41
3.0
2.5
2.0
×10⁶
1.5
1.0
0.5
輻射率
(p/sec/cm²/sr)
色度
Min=4.00e5
Max=3.00e6

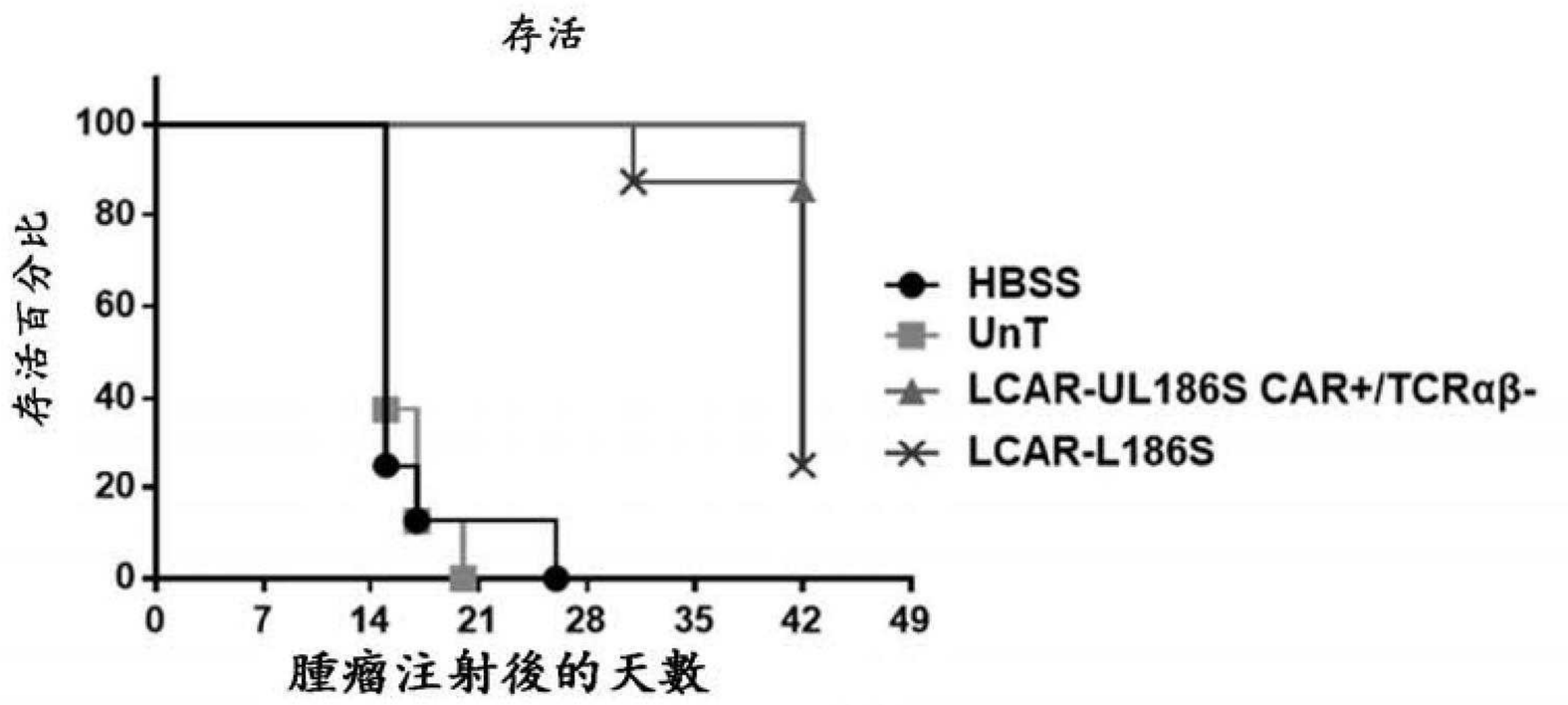
【圖11A】



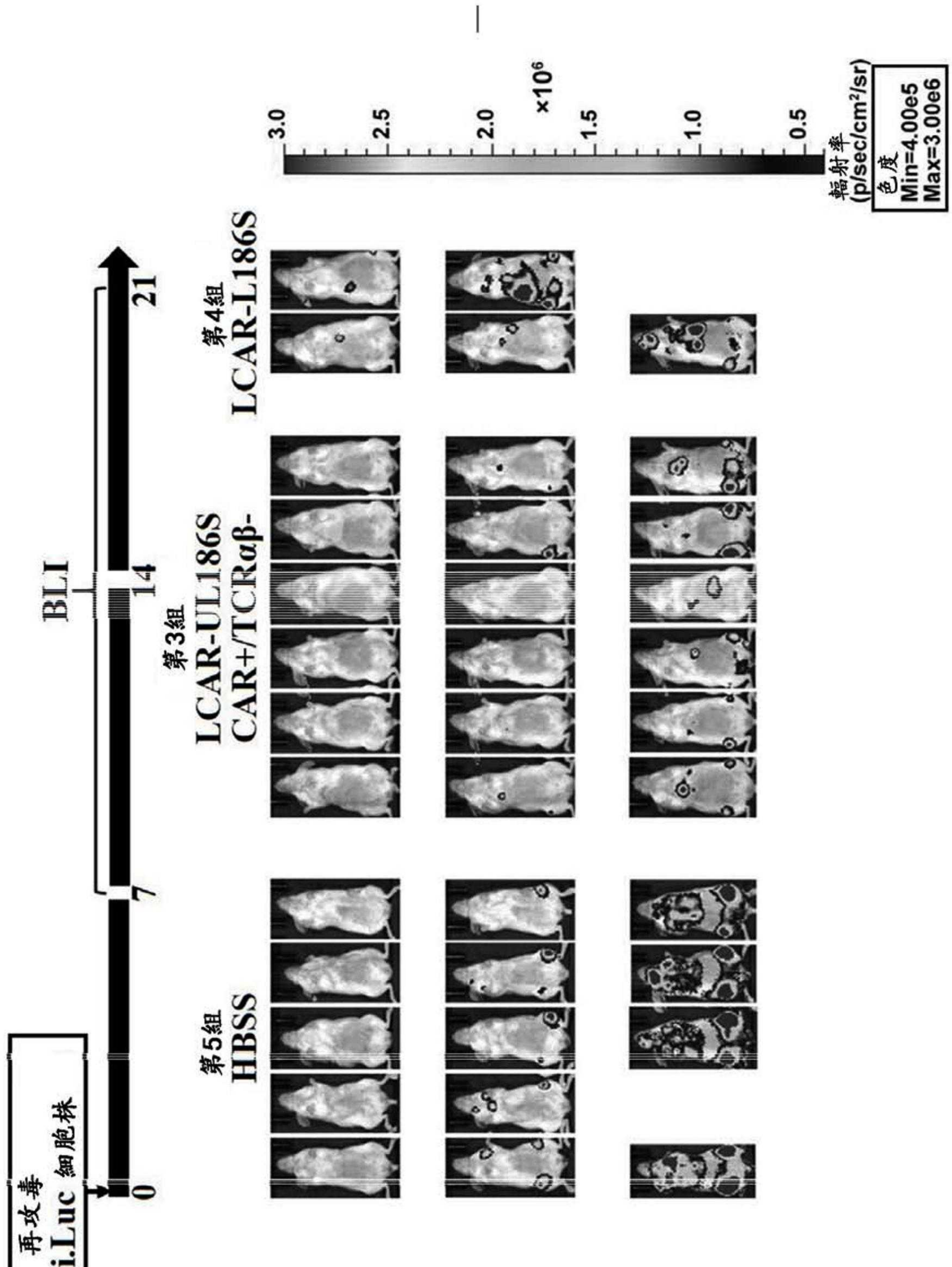
【圖11B】



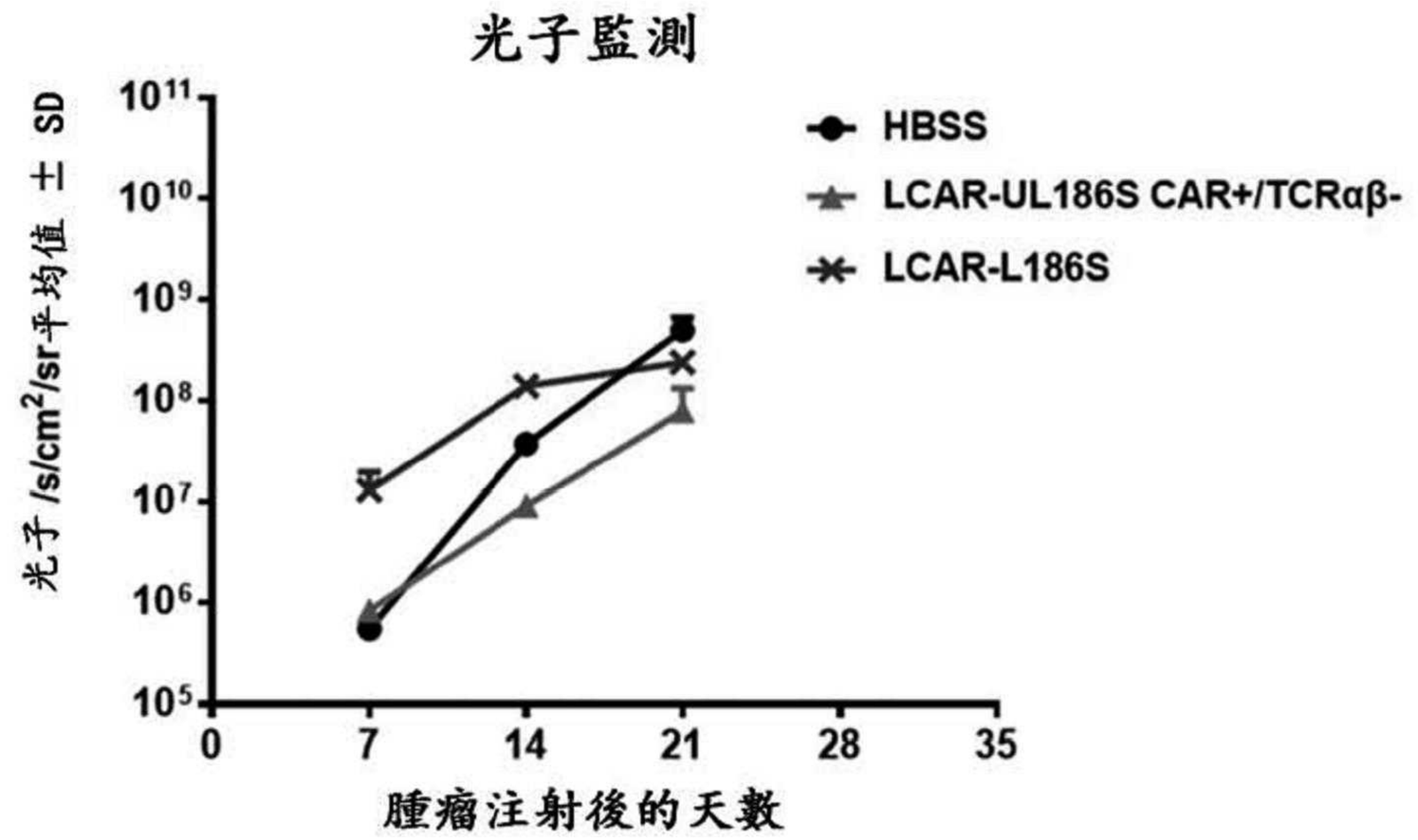
【圖11C】



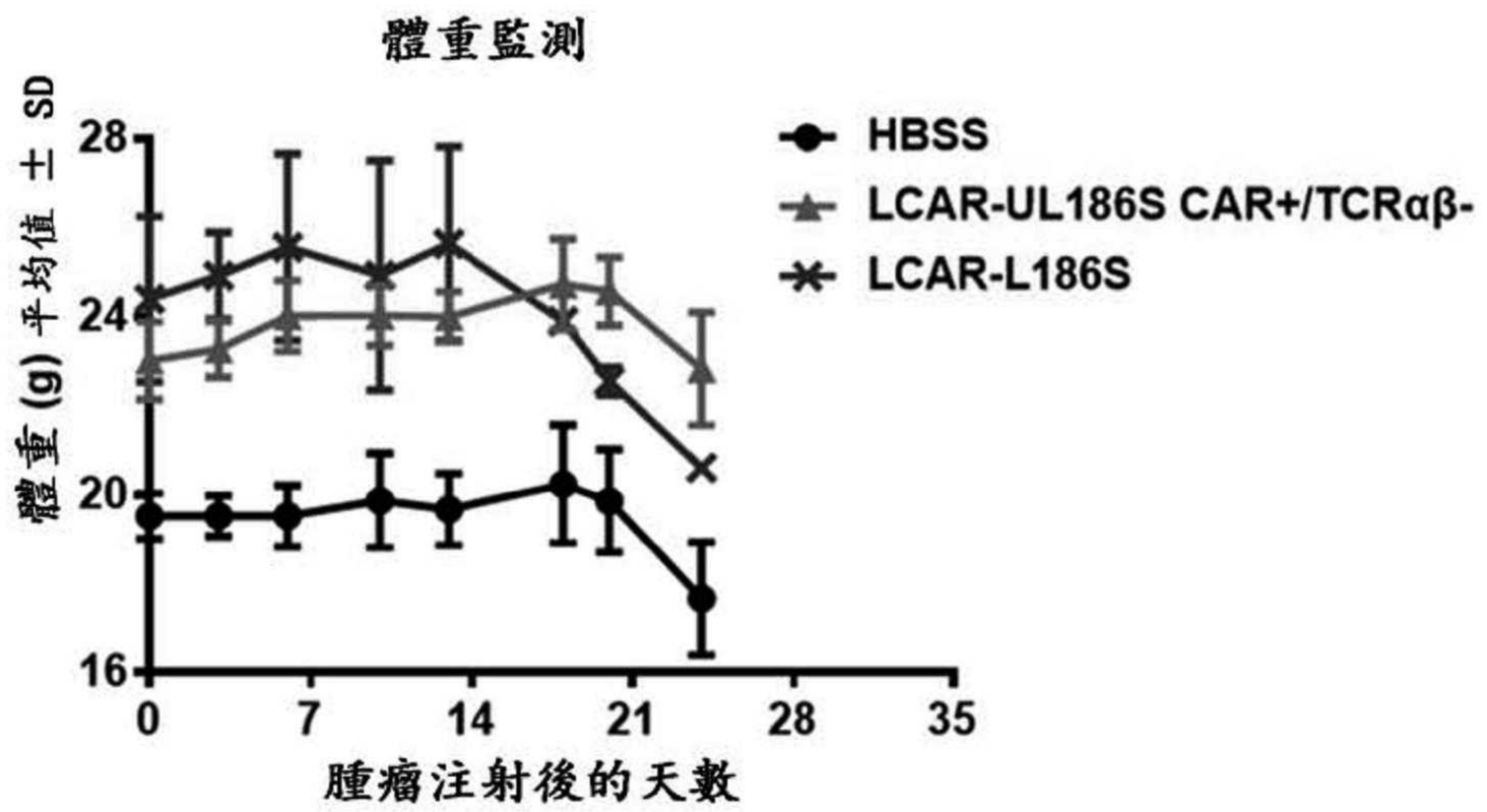
【圖11D】


3.0
2.5
2.0
×10⁶
1.5
1.0
0.5
輻射率
(p/sec/cm²/sr)
色度
Min=4.00e5
Max=3.00e6
BLI
21
14
7
0
Raji.Luc 細胞株
再攻毒
天數
D7
D14
D21
第3組
LCAR-UL186S
CAR+/TCRαβ-
第4組
LCAR-L186
第5組
HBSS

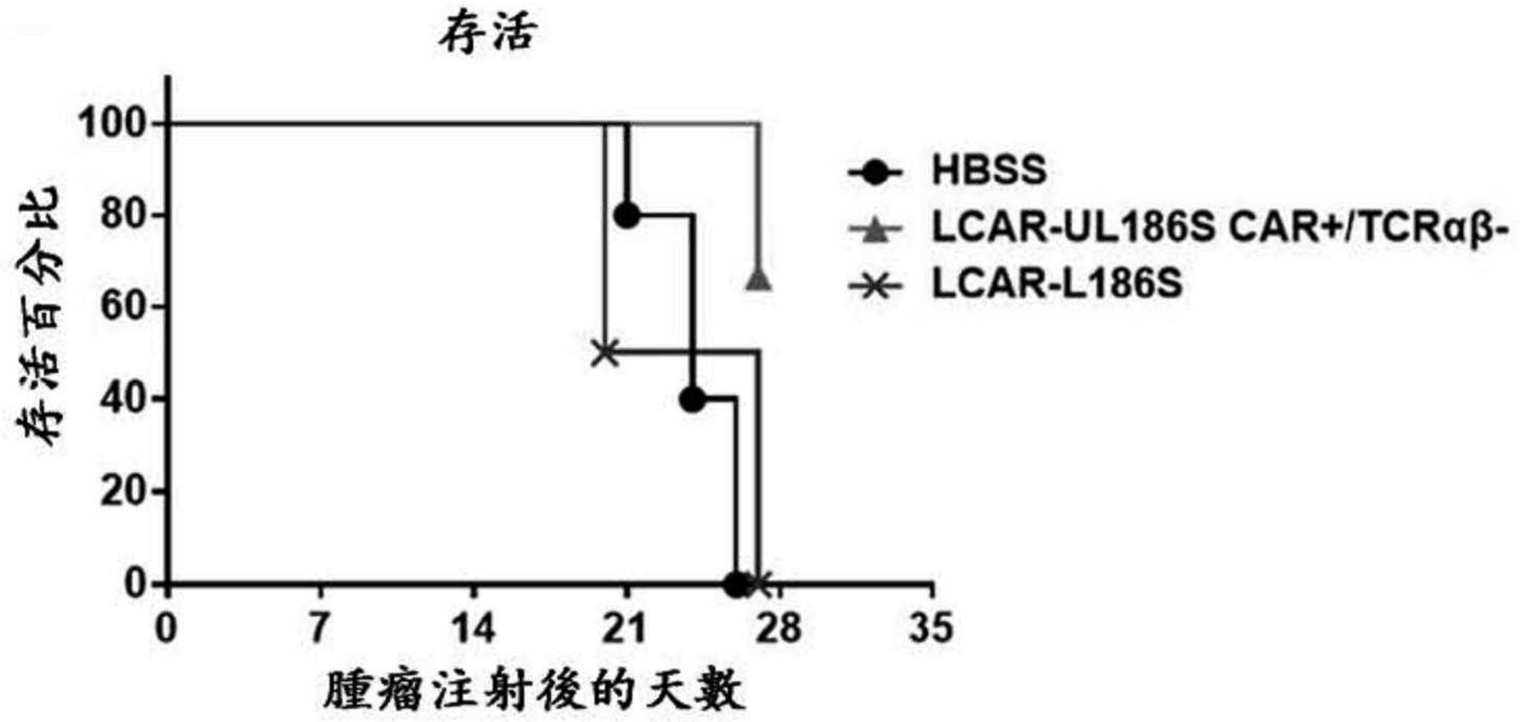
【圖12A】



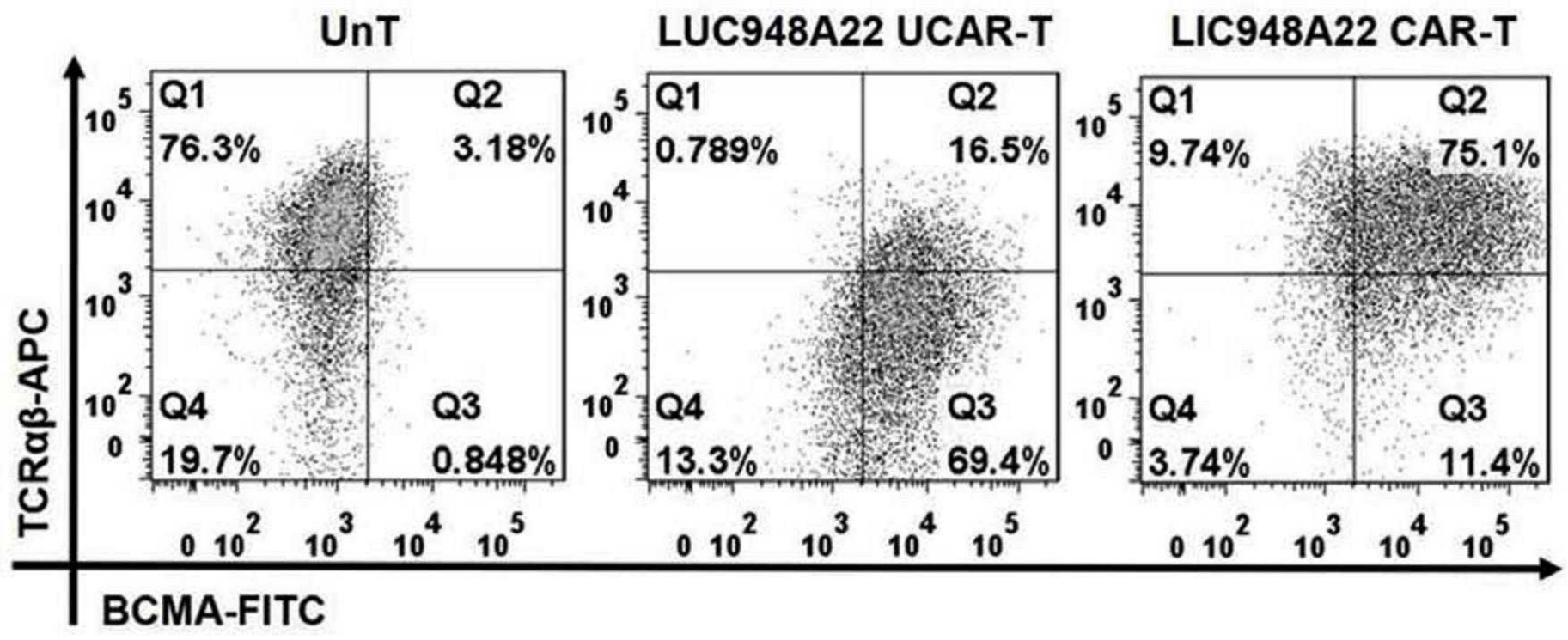
【圖12B】



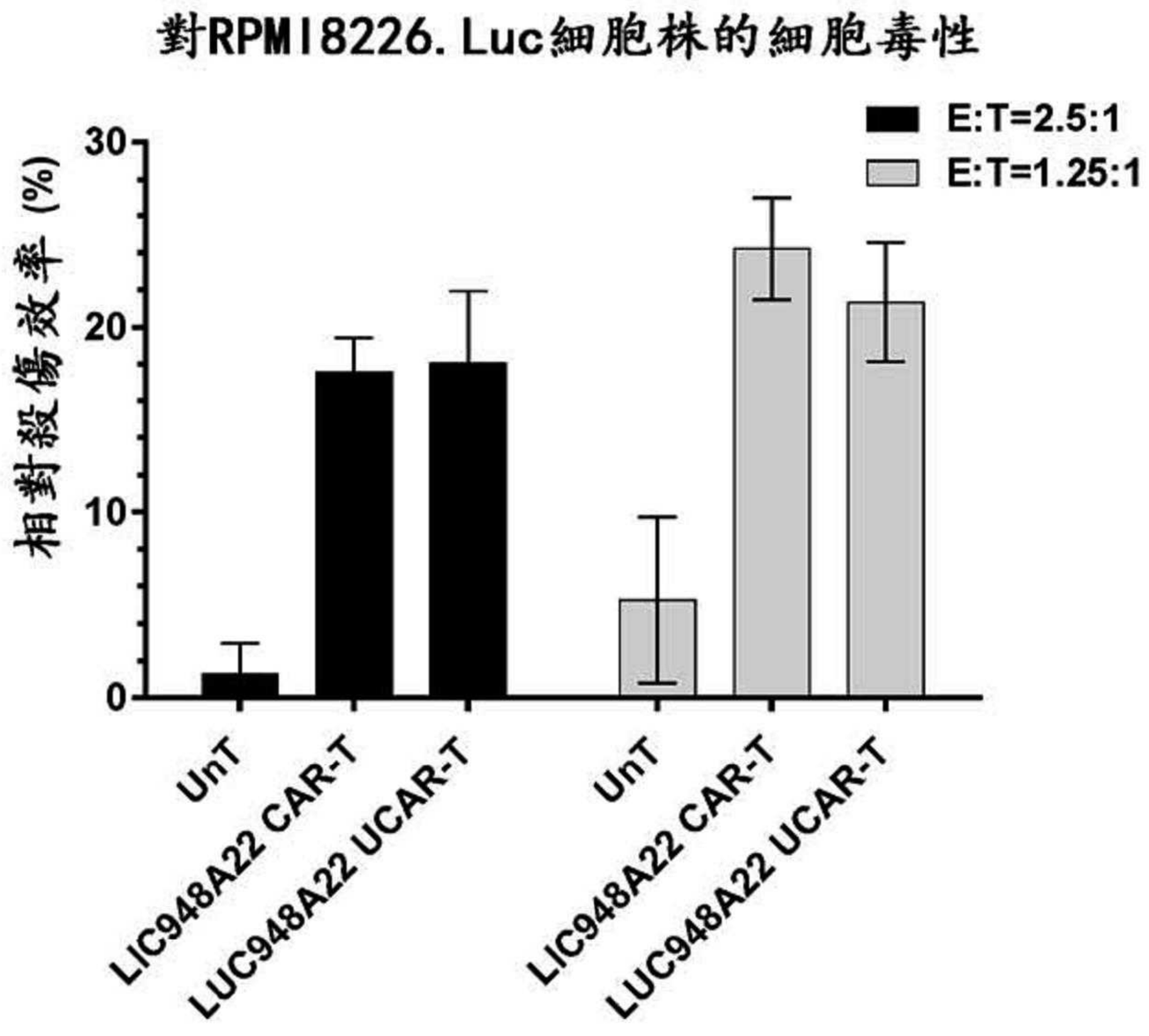
【圖12C】



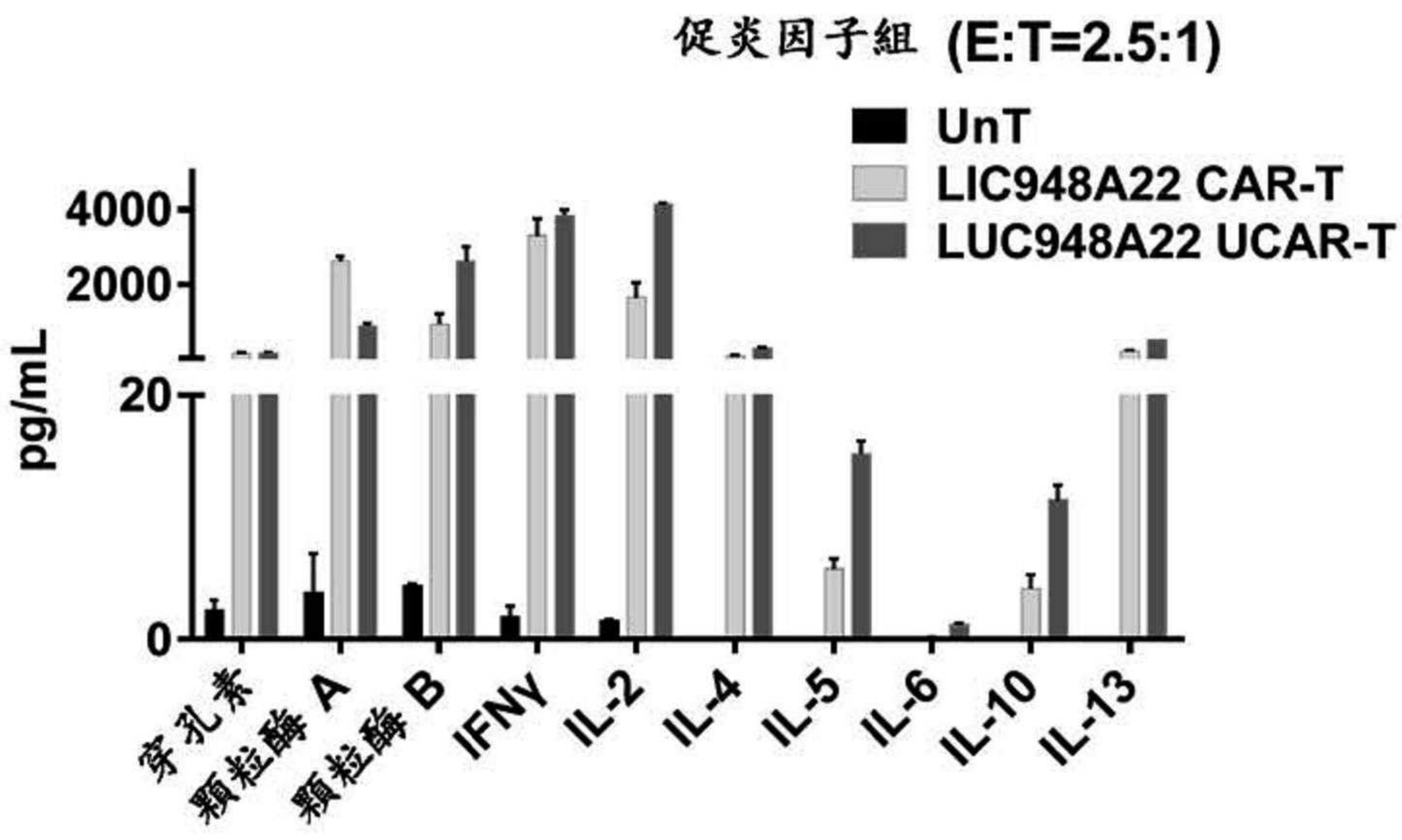
【圖12D】


UnT
LUC948A22 UCAR-T
LIC948A22 CAR-T
Q1
76.3%
Q2
3.18%
Q4
19.7%
Q3
0.848%
Q1
0.789%
Q2
16.5%
Q4
13.3%
Q3
69.4%
Q1
9.74%
Q2
75.1%
Q4
3.74%
Q3
11.4%
TCRαβ-APC
BCMA-FITC
0
10^2
10^3
10^4
10^5

【圖13】

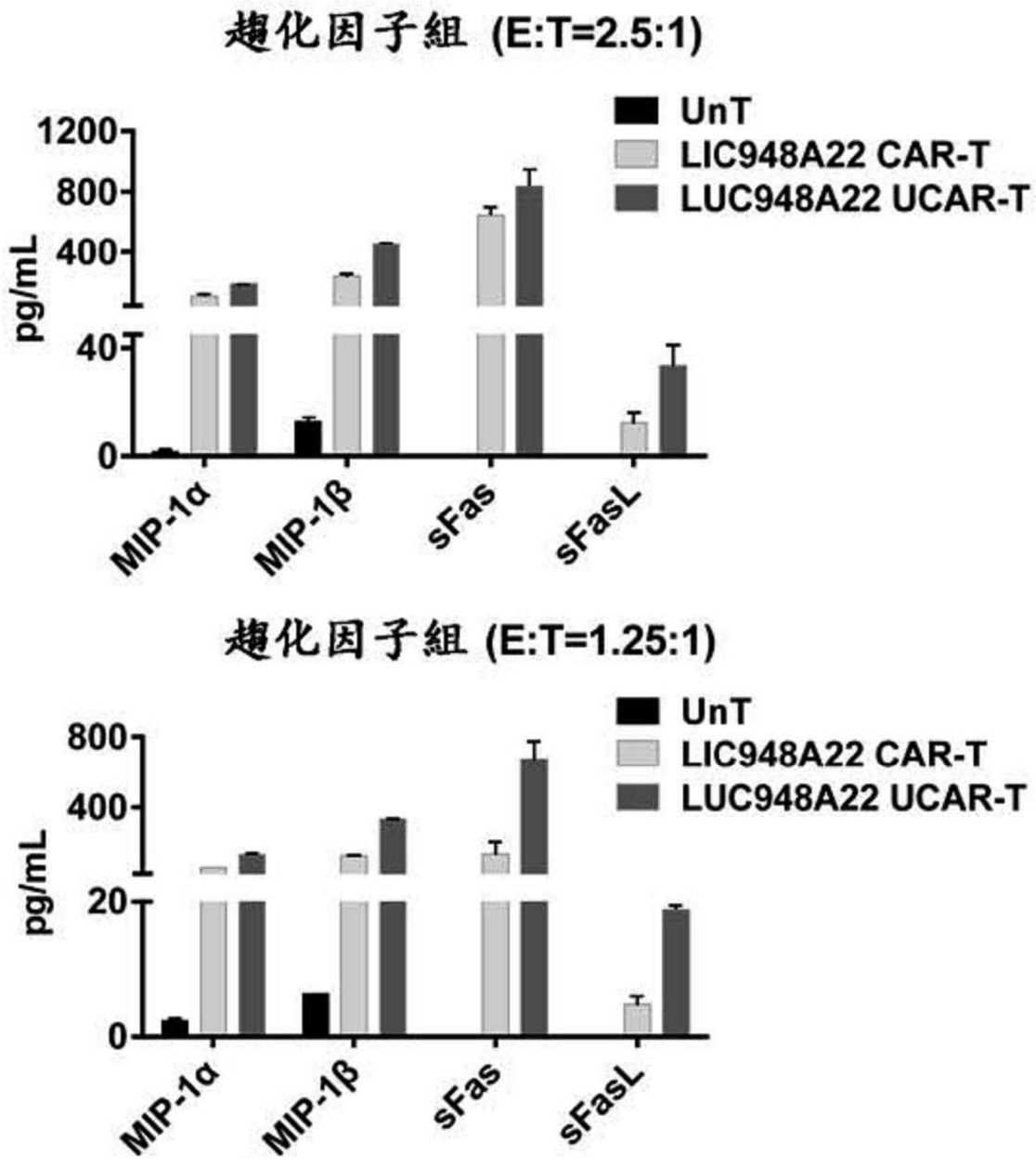

對RPMI8226.Luc細胞株的細胞毒性
E:T=2.5:1
E:T=1.25:1
相對殺傷效率 (%)
30
20
10
0
UnT
LIC948A22 CAR-T
LUC948A22 UCAR-T
UnT
LIC948A22 CAR-T
LUC948A22 UCAR-T

【圖14】

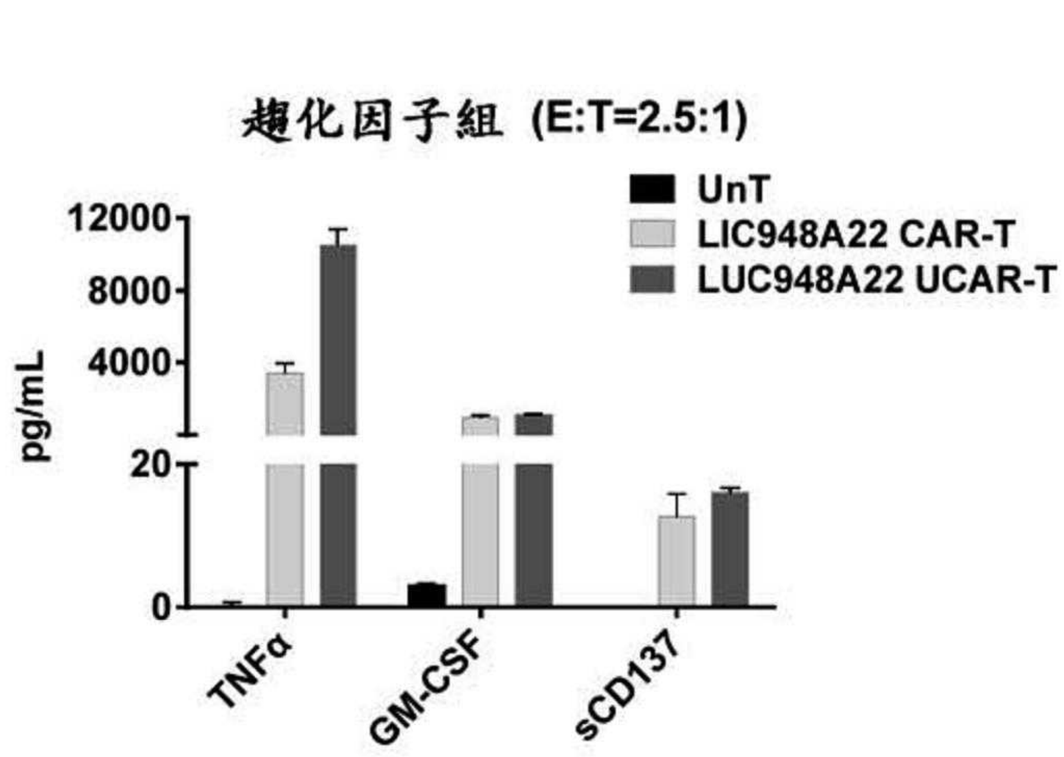

促炎因子組 (E:T=2.5:1)
UnT
LIC948A22 CAR-T
LUC948A22 UCAR-T
pg/mL
4000
2000
20
0
穿孔素
顆粒酶 A
顆粒酶 B
IFNγ
IL-2
IL-4
IL-5
IL-6
IL-10
IL-13

促炎因子組 (E:T=1.25:1)
UnT
LIC948A22 CAR-T
LUC948A22 UCAR-T
pg/mL
4000
2000
20
0
穿孔素
顆粒酶 A
顆粒酶 B
IFNγ
IL-2
IL-4
IL-5
IL-6
IL-10
IL-13

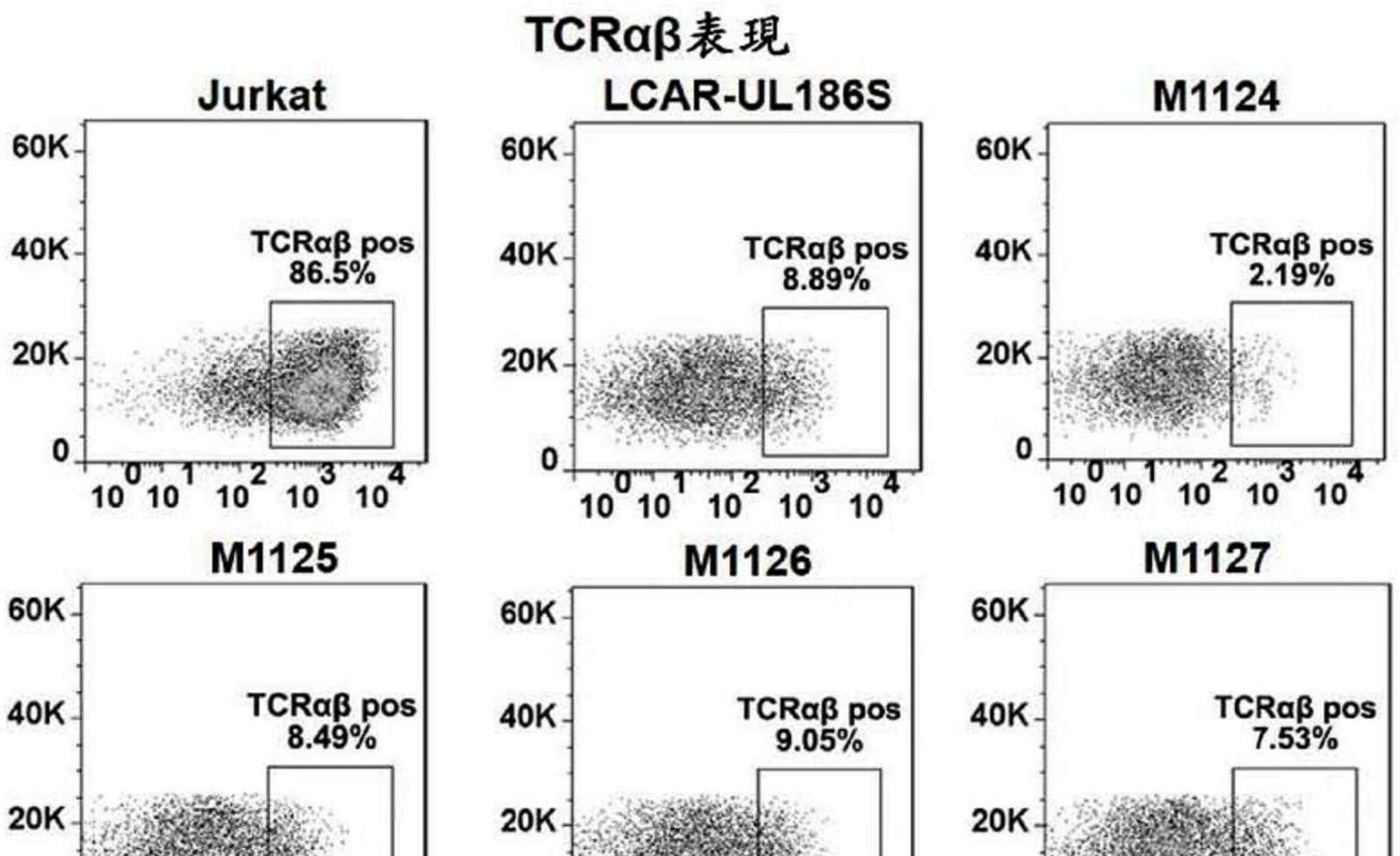
【圖15A】


趨化因子組 (E:T=2.5:1)
UnT
LIC948A22 CAR-T
LUC948A22 UCAR-T
pg/mL
1200
800
400
40
0
MIP-1α
MIP-1β
sFas
sFasL
趨化因子組 (E:T=1.25:1)
UnT
LIC948A22 CAR-T
LUC948A22 UCAR-T
pg/mL
800
400
20
0
MIP-1α
MIP-1β
sFas
sFasL

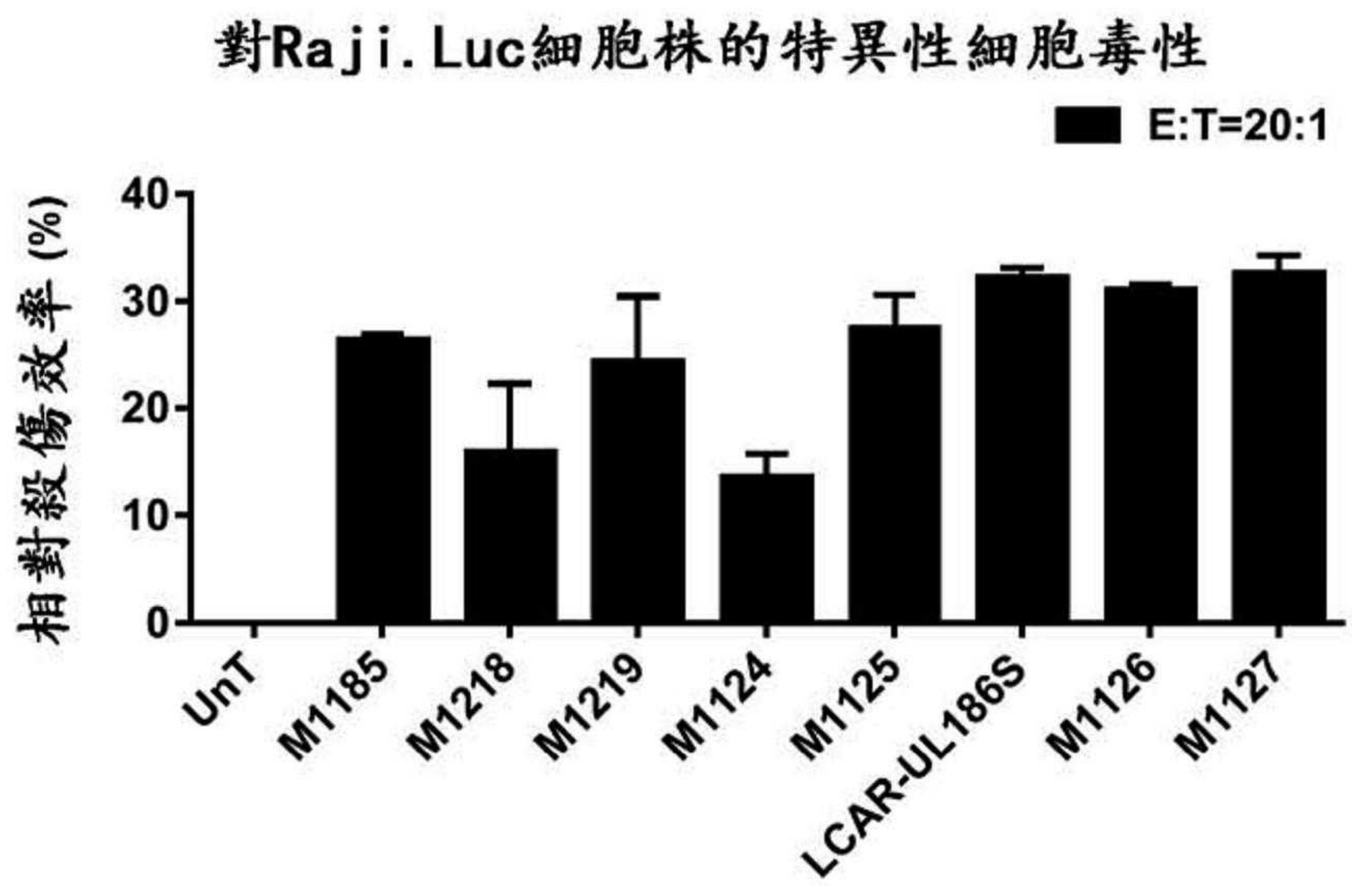
【圖15B】


趨化因子組 (E:T=2.5:1)
UnT
LIC948A22 CAR-T
LUC948A22 UCAR-T
pg/mL
12000
8000
4000
20
0
TNFα
GM-CSF
sCD137
趨化因子組 (E:T=1.25:1)
UnT
LIC948A22 CAR-T
LUC948A22 UCAR-T
pg/mL
8000
4000
10
0
TNFα
GM-CSF
sCD137

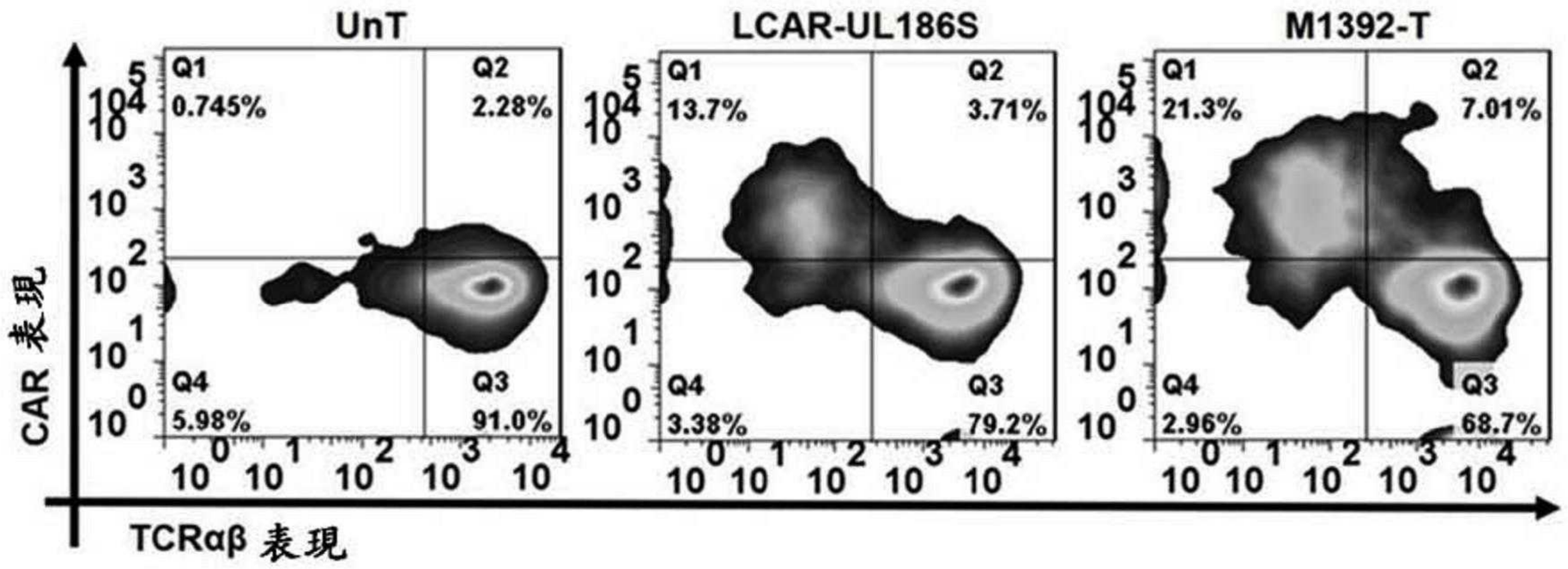
【圖15C】


TCRαβ表現
Jurkat
TCRαβ pos
86.5%
LCAR-UL186S
TCRαβ pos
8.89%
M1124
TCRαβ pos
2.19%
M1125
TCRαβ pos
8.49%
M1126
TCRαβ pos
9.05%
M1127
TCRαβ pos
7.53%
M1185
TCRαβ pos
10.2%
M1218
TCRαβ pos
6.21%
M1219
TCRαβ pos
6.75%
60K
40K
20K
0
10 10 10 10 10

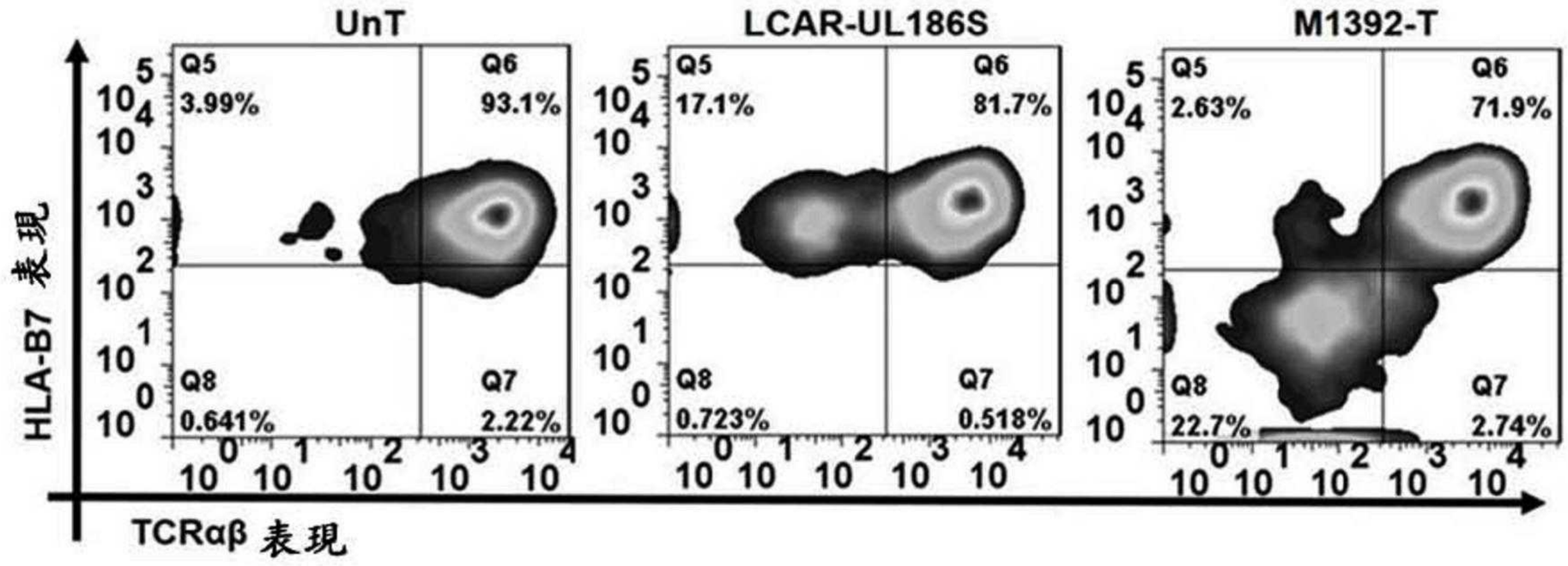
【圖16A】


對Raji.Luc細胞株的特異性細胞毒性
E:T=20:1
相對殺傷效率 (%)
40
30
20
10
0
UnT
M1185
M1218
M1219
M1124
M1125
LCAR-UL186S
M1126
M1127

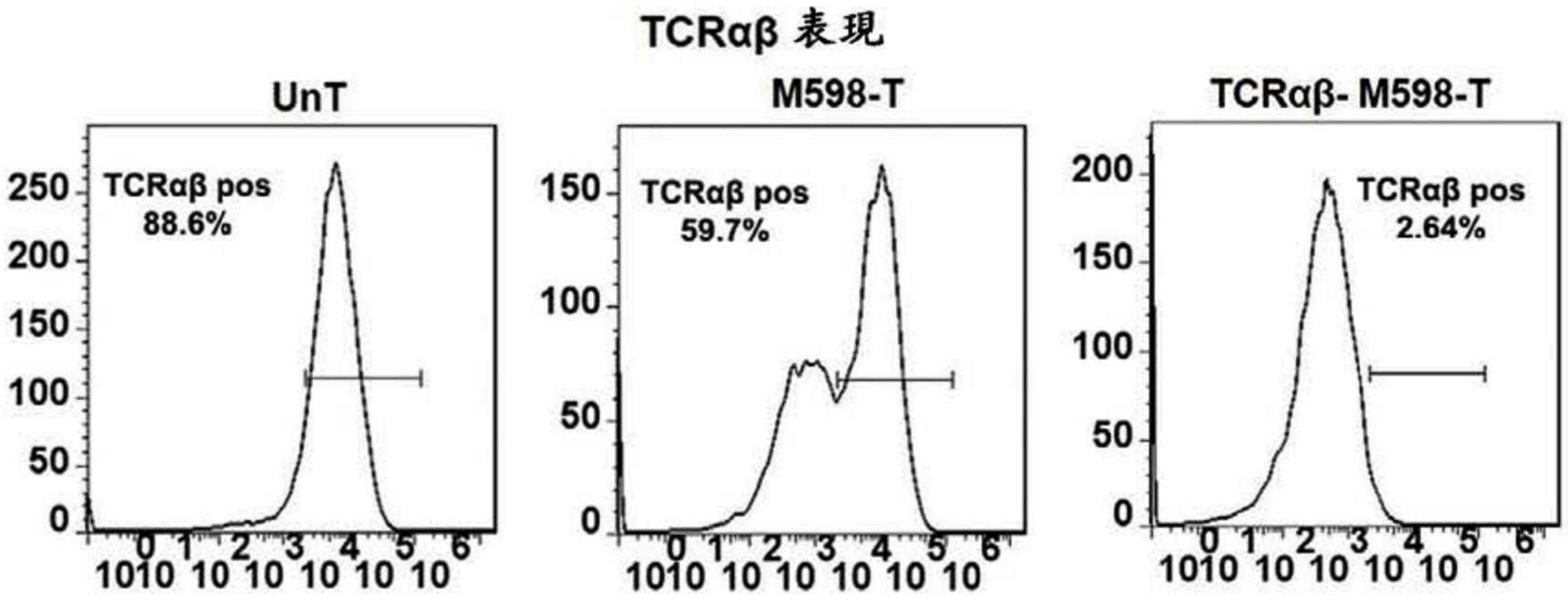
【圖16B】


UnT
LCAR-UL186S
M1392-T
Q1
0.745%
Q2
2.28%
Q4
5.98%
Q3
91.0%
Q1
13.7%
Q2
3.71%
Q4
3.38%
Q3
79.2%
Q1
21.3%
Q2
7.01%
Q4
2.96%
Q3
68.7%
CAR 表現
TCRαβ 表現

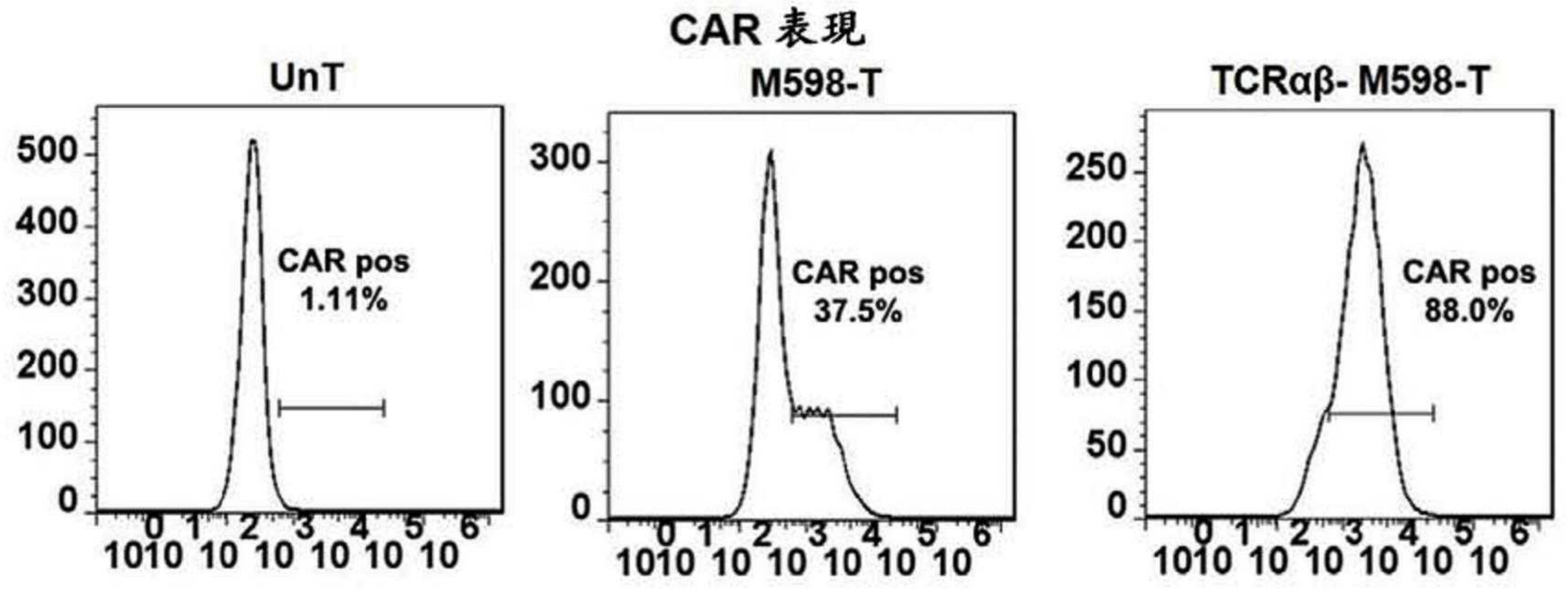
【圖17A】


UnT
LCAR-UL186S
M1392-T
Q5
3.99%
Q6
93.1%
Q8
0.641%
Q7
2.22%
Q5
17.1%
Q6
81.7%
Q8
0.723%
Q7
0.518%
Q5
2.63%
Q6
71.9%
Q8
22.7%
Q7
2.74%
HLA-B7 表現
TCRαβ 表現

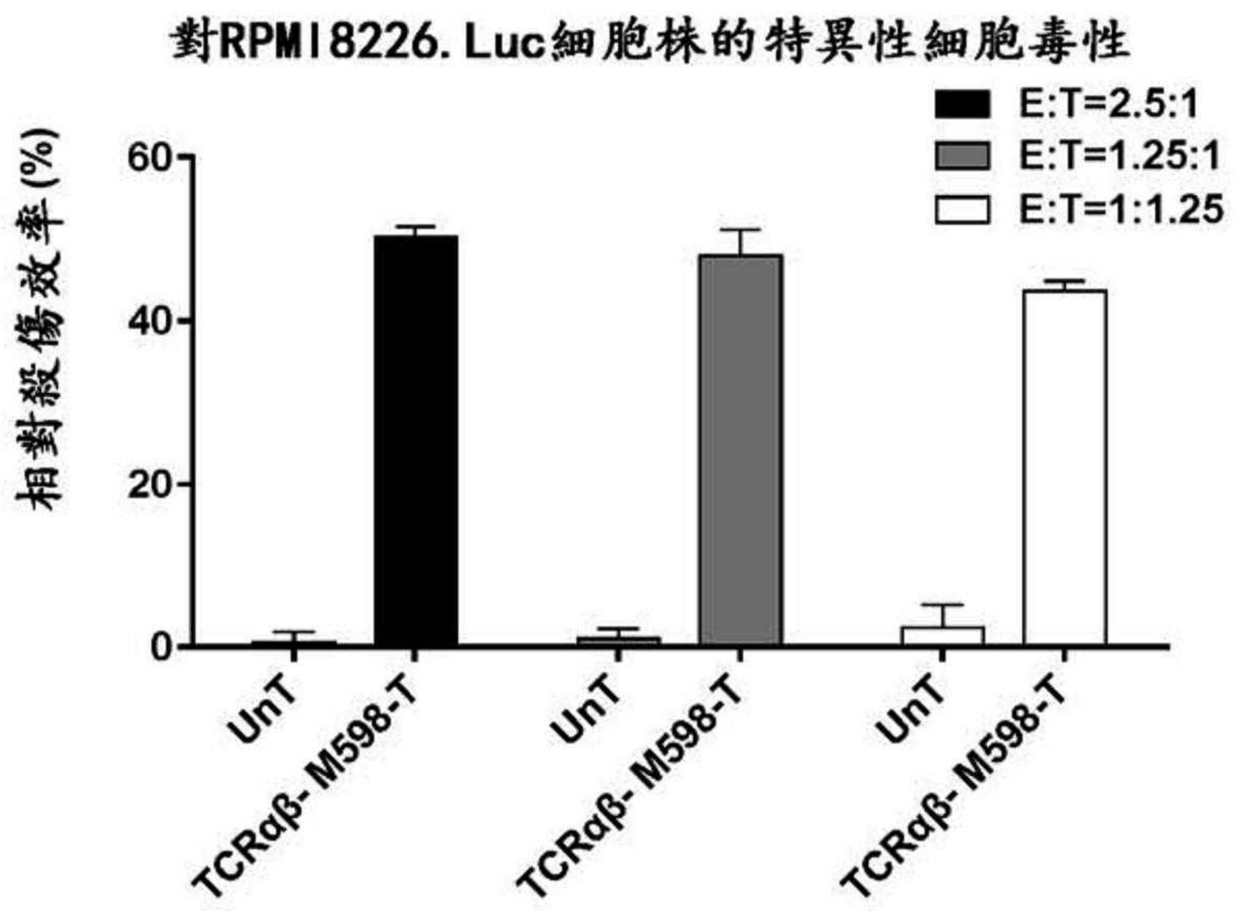
【圖17B】



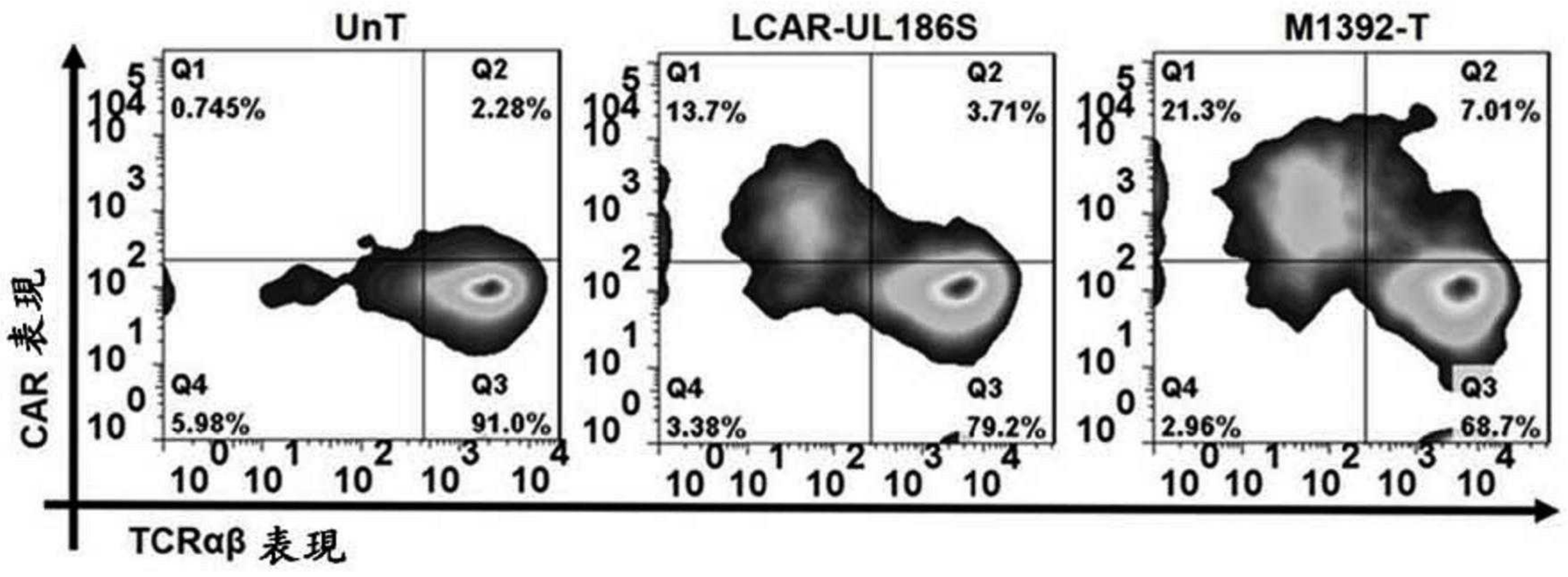
【圖18A】



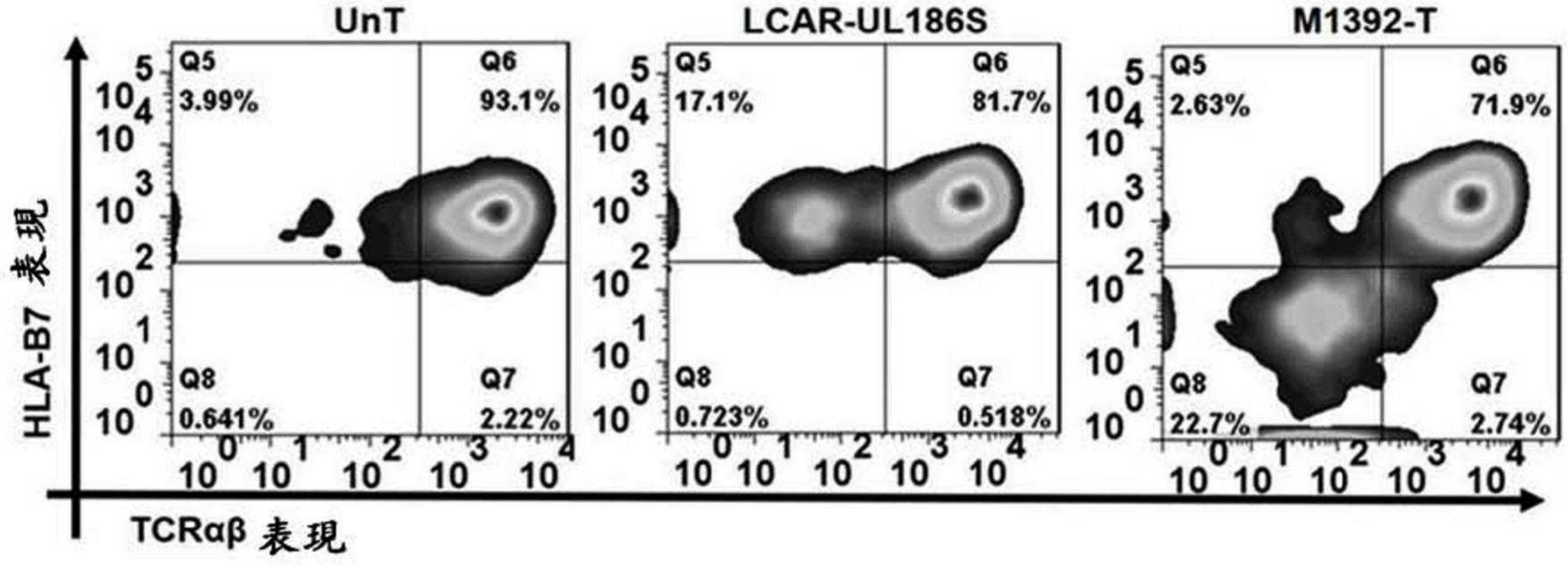
【圖18B】



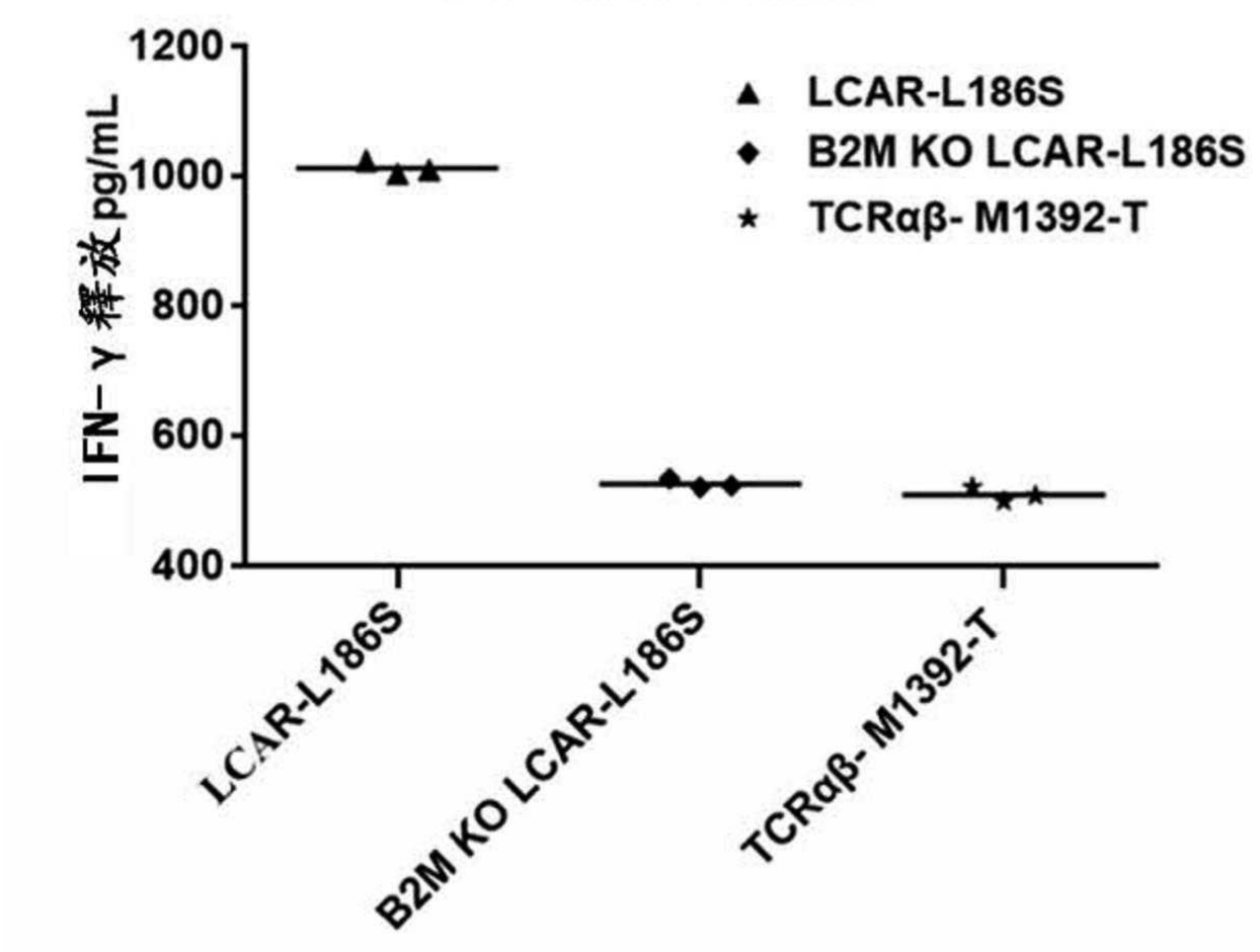
【圖18C】


UnT
LCAR-UL186S
M1392-T
Q1
0.745%
Q2
2.28%
Q4
5.98%
Q3
91.0%
Q1
13.7%
Q2
3.71%
Q4
3.38%
Q3
79.2%
Q1
21.3%
Q2
7.01%
Q4
2.96%
Q3
68.7%
CAR 表現
TCRαβ 表現

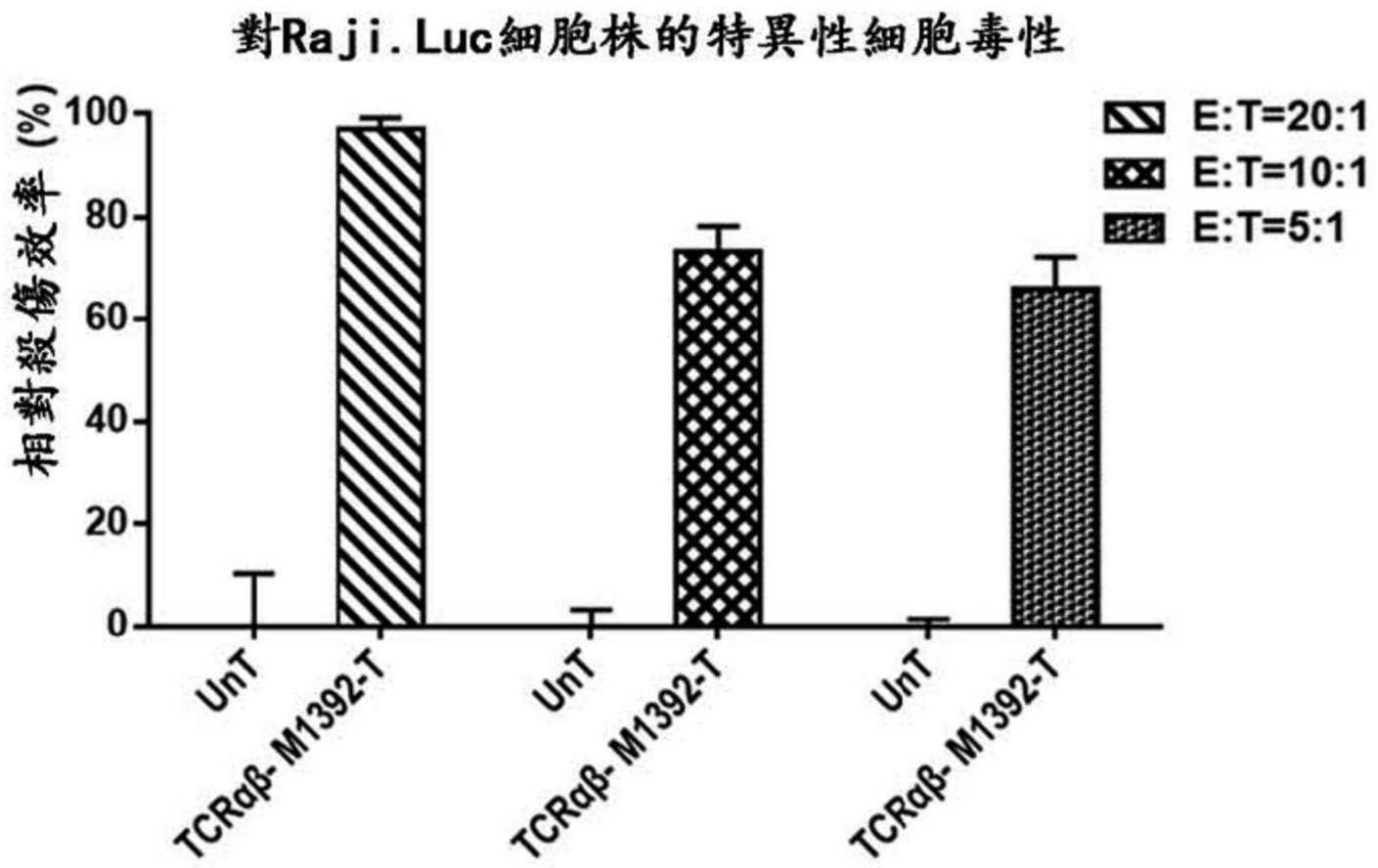
【圖19A】


UnT
LCAR-UL186S
M1392-T
Q5
3.99%
Q6
93.1%
Q8
0.641%
Q7
2.22%
Q5
17.1%
Q6
81.7%
Q8
0.723%
Q7
0.518%
Q5
2.63%
Q6
71.9%
Q8
22.7%
Q7
2.74%
HLA-B7 表現
TCRαβ 表現

【圖19B】


MHC I類交叉反應性
IFN-γ釋放pg/mL
1200
1000
800
600
400
LCAR-L186S
B2M KO LCAR-L186S
TCRαβ- M1392-T
LCAR-L186S
B2M KO LCAR-L186S
TCRαβ- M1392-T

【圖19C】


對Raji.Luc細胞株的特異性細胞毒性
相對殺傷效率(%)
100
80
60
40
20
0
E:T=20:1
E:T=10:1
E:T=5:1
UnT
TCRαβ- M1392-T
UnT
TCRαβ- M1392-T
UnT
TCRαβ- M1392-T

【圖19D】