202020146

(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 202020146 A

(43)公開日：中華民國 109 (2020) 年 06 月 01 日

(21)申請案號：108126647　(22)申請日：中華民國 108 (2019) 年 07 月 26 日

(51)Int. Cl.：*C12N5/0783 (2010.01)*　*C12N15/85 (2006.01)*
C12N15/86 (2006.01)　*C12N15/49 (2006.01)*
A61K35/17 (2015.01)　*A61P37/06 (2006.01)*
A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2018/07/26　世界智慧財產權組織　PCT/CN2018/097235

(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)；俞大偉 YU, DAWEI (CN)；支武吉南 ZHI, WUJINAN (CN)；王趁趁 WANG, CHENCHEN (CN)；莊秋傳 ZHUANG, QIUCHUAN (CN)；王平豔 WANG, PINGYAN (CN)；郭璇璇 GUO, XUANXUAN (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：66 項　圖式數：13　共 575 頁

(54)名稱

含 NEF 之 T 細胞及其產生方法

(57)摘要

本申請案提供一種產生具有經下調內源 T 細胞受體(TCR)之經修飾 T 細胞之方法。本申請案亦提供一種產生具有經下調內源 TCR 之經修飾 T 細胞之方法，該經修飾 T 細胞進一步表現功能性外源受體，諸如經工程改造 TCR(例如，嵌合 TCR)、T 細胞抗原偶合物(TAC)、TAC 樣嵌合受體或嵌合抗原受體(CAR)。進一步提供藉由本文所述之方法產生的經修飾 T 細胞，其可在組織不相容性個體中引發降低之移植物抗宿主疾病(GvHD)反應。亦提供醫藥組合物、套組及治療方法。

The present application provides a method of producing a modified T cell with down-modulated endogenous T cell receptor (TCR). The present application also provides a method of producing a modified T cell with down-modulated endogenous TCR, further expressing a functional exogenous receptor, such as an engineered TCR (e.g., chimeric TCR), T cell antigen coupler (TAC), TAC-like chimeric receptor, or a chimeric antigen receptor (CAR). Further provided are modified T cells produced by the methods described herein, which may elicit reduced graft-versus-host disease (GvHD) response in a histoincompatible individual. Pharmaceutical compositions, kits, and methods of treatment are also provided.

202020146

【發明摘要】

【中文發明名稱】含 NEF 之 T 細胞及其產生方法

【英文發明名稱】NEF-CONTAINING T CELLS AND METHODS OF PRODUCING THEREOF

【中文】

本申請案提供一種產生具有經下調內源 T 細胞受體(TCR)之經修飾 T 細胞之方法。本申請案亦提供一種產生具有經下調內源 TCR 之經修飾 T 細胞之方法，該經修飾 T 細胞進一步表現功能性外源受體，諸如經工程改造 TCR (例如，嵌合 TCR)、T 細胞抗原偶合物(TAC)、TAC 樣嵌合受體或嵌合抗原受體(CAR)。進一步提供藉由本文所述之方法產生的經修飾 T 細胞，其可在組織不相容性個體中引發降低之移植物抗宿主疾病(GvHD)反應。亦提供醫藥組合物、套組及治療方法。

【英文】

The present application provides a method of producing a modified T cell with down-modulated endogenous T cell receptor (TCR). The present application also provides a method of producing a modified T cell with down-modulated endogenous TCR, further expressing a functional exogenous receptor, such as an engineered TCR (*e.g.*, chimeric TCR), T cell antigen coupler (TAC), TAC-like chimeric receptor, or a chimeric antigen receptor (CAR). Further provided are modified T cells produced by the methods described herein, which may elicit reduced graft-versus-host disease (GvHD) response in a histoincompatible individual. Pharmaceutical compositions, kits, and methods of treatment are also provided.

【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】含 NEF 之 T 細胞及其產生方法

【英文發明名稱】NEF-CONTAINING T CELLS AND METHODS OF PRODUCING THEREOF

【技術領域】

【0001】　本申請案係關於一種產生具有經下調內源 T 細胞受體(TCR)之經修飾 T 細胞之方法。本申請案亦提供一種產生具有經下調內源 TCR 之經修飾 T 細胞之方法，該經修飾 T 細胞進一步表現外源受體，諸如經工程改造 TCR 或嵌合抗原受體(CAR)。進一步提供藉由本文所述之方法產生的經修飾 T 細胞、其醫藥組合物、套組及治療方法。

【先前技術】

【0002】　嵌合抗原受體(CAR)-T 細胞療法使用攜帶經工程改造受體之經遺傳修飾 T 細胞，該經工程改造受體特異性地識別標靶腫瘤抗原以引導 T 細胞至腫瘤位點。其已在治療血液科癌症及多發性骨髓瘤(MM)時顯示有希望的結果。然而，歸因於個體差異，自體 CAR-T 或 TCR-T 療法(使用患者自身之 T 細胞)在製造及標準化方面提供了顯著挑戰，具有極其昂貴的製造及治療成本。此外，癌症患者通常具有較低免疫功能，其中淋巴球具有降低之數目、較低免疫活性且難以活體外擴增。

【0003】　通用同種異體 CAR-T 或 TCR-T 療法被視為理想模型，其中 T 細胞源於健康供體。然而，關鍵挑戰在於如何有效地消除治療期間歸因於組織不相容性之移植物抗宿主疾病(GvHD)。TCR 為牽涉於回應於抗原呈遞之 T 細胞活化中的細胞表面受體。人類之 95% T 細胞具有由 α 鏈及 β 鏈組成之 TCR。TCRα 及 TCRβ 鏈組合形成雜二聚體且與 CD3 次單元締合以形成存在於細胞表面上之 TCR 複合物。當供體之 T 細胞經由 TCR 識別非自體主要組織相容性複合物

(MHC)分子且感知到宿主(移植接受者)組織在抗原性方面為外來的且攻擊該等組織時，GvHD 發生。為了消除來自供體 T 細胞之內源 TCR，由此預防 GvHD，人們已針對內源 TCRα 或 TCRβ 基因剔除(KO)使用基因編輯技術，諸如鋅指核酸酶(ZFN)、轉錄活化子樣效應子核酸酶(TALEN)及成簇的規律間隔的短回文重複序列(CRISPR)-CRISPR 相關(Cas) (CRISPR/Cas)，接著針對同種異體 CAR-T 或 TCR-T 產生經富集 TCR 陰性 T 細胞。然而，TCR 缺失可導致受損 CD3 下游信號轉導路徑，且影響 T 細胞擴增。

【0004】　本文所提及之所有出版物、專利、專利申請案及經公開專利申請案之揭示內容特此以引用之方式整體併入本文中。

【發明內容】

【0005】　本申請案提供一種產生表現 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之經修飾 T 細胞之方法，該 Nef 蛋白下調內源 TCR。本申請案亦提供一種產生表現 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)及外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、T 細胞抗原偶合物(TAC)、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR)之經修飾 T 細胞之方法。亦提供藉由本文所述之方法產生的經修飾 T 細胞、其醫藥組合物、套組及治療方法。

【0006】　在一些實施例中，提供一種產生經修飾 T 細胞之方法，該方法包括：將編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸引入至前驅體 T 細胞中，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 T 細胞受體(TCR)之下調。在一些實施例中，該下調包含下調內源 TCR 之細胞表面表現達至少約 50%。在一些實施例中，表現 Nef 之經修飾 T 細胞包含經修飾內源 TCR 基因座。

【0007】　在一些實施例中，本文所述之 Nef 蛋白係選自由 SIV Nef、HIV1 Nef、

HIV2 Nef及Nef同源蛋白組成之群。在一些實施例中，該Nef蛋白為野生型Nef。在一些實施例中，該Nef蛋白為突變型Nef，諸如包含SEQ ID NO: 18-22中任一者之胺基酸序列之突變型Nef。在一些實施例中，該Nef蛋白為突變型SIV Nef，其包含在表11中所列出之任何胺基酸殘基處之一或多種突變。在一些實施例中，該Nef蛋白為突變型SIV Nef，其包含在以下中之任一者之胺基酸殘基處之一或多種突變：(i) aa 2-4、aa 8-10、aa 11-13、aa 38-40、aa 44-46、aa 47-49、aa 50-52、aa 53-55、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 110-112、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、aa 178-179、179-181aa、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 191-193、aa 194-196、aa 203-205、aa 206-208、aa 212-214、aa 215-217、aa 218-220、aa 221-223、aa 8-13、aa 44-67、aa 107-112、aa 164-196、aa 203-208或aa 212-223；(ii) aa 2-4、aa 44-46、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 44-67、aa 164-169、aa 176-181、aa 185-190；(iii) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、178-179aa、aa 179-181、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67或aa 164-190；或(iv) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67、aa 164-169、aa 176-181或aa 185-190；其中該胺基酸殘基位置對應於野生型SIV Nef之彼位置。在一些實施例中，該突變型Nef (例如，突變型SIV Nef)下調內源TCR (例如，TCRα及/或TCRβ)之細胞表面表現。在一些實施例中，該突變型Nef蛋白(例如，突變型SIV Nef)對內

源 TCR (例如，TCRα 及/或 TCRβ)之細胞表面表現之下調與野生型 Nef 之彼下調相差不超過約 3% (諸如不超過約 2%或 1%中任一者)。在一些實施例中，該突變型 Nef 蛋白(例如，突變型 SIV Nef)對內源 TCR (例如，TCRα 及/或 TCRβ)之細胞表面表現之下調較野生型 Nef 之彼下調多至少約 3% (包括等於 3%；諸如至少約 3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或 95%中任一者)。在一些實施例中，該突變型 Nef 蛋白(例如，突變型 SIV Nef)不下調 CD4 之細胞表面表現。在一些實施例中，該突變型 Nef 蛋白(例如，突變型 SIV Nef)下調 CD4 之細胞表面表現。在一些實施例中，該突變型 Nef 蛋白(例如，突變型 SIV Nef)對 CD4 之細胞表面表現之下調較野生型 Nef 之彼下調少至少約 3% (諸如至少約 4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或 95%中任一者)。在一些實施例中，該突變型 Nef 蛋白(例如，突變型 SIV Nef)不下調 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該突變型 Nef 蛋白(例如，突變型 SIV Nef)下調 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該突變型 Nef 蛋白(例如，突變型 SIV Nef)對 CD28 之細胞表面表現之下調較野生型 Nef 之彼下調少至少約 3% (諸如至少約 4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或 95%中任一者)。在一些實施例中，該突變型 Nef 蛋白(例如，突變型 SIV Nef)對內源 TCR (例如，TCRα 及/或 TCRβ)之細胞表面表現之下調與野生型 Nef 之彼下調相差不超過約 3% (諸如不超過約 2%或 1%中任一者)(或對內源 TCR (例如，TCRα 及/或 TCRβ)之細胞表面表現之下調較野生型 Nef 之彼下調多至少約 3% (包括等於 3%；諸如至少約 3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或 95%中任一者))，且不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該突變型 Nef 蛋白(例如，突變型 SIV Nef)對內源 TCR (例如，TCRα 及/或 TCRβ)之細胞表面表現之下調與野生型

Nef之彼下調相差不超過約3% (諸如不超過約2%或1%中任一者)(或對內源TCR (例如，TCRα及/或TCRβ)之細胞表面表現之下調較野生型Nef之彼下調多至少約3% (包括等於3%；諸如至少約3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%中任一者))，且對CD4及/或CD28之細胞表面表現之下調較野生型Nef之彼下調少至少約3% (諸如至少約4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%中任一者)。

【0008】　在一些實施例中，該前驅體T細胞包含編碼包含細胞外配位體結合結構域及視情況存在之細胞內信號傳導結構域之功能性外源受體之第二核酸。例如，該前驅體T細胞可為經工程改造TCR-T細胞(例如，cTCR-T細胞)、TAC-T細胞、TAC樣T細胞或CAR-T細胞，其藉由表現Nef蛋白(例如wt Nef，或突變型Nef，諸如突變型SIV Nef)進一步經修飾。

【0009】　在一些實施例中，例如當該前驅體T細胞未經工程改造時，該方法可進一步包括將編碼包含細胞外配位體結合結構域及視情況存在之細胞內信號傳導結構域之功能性外源受體之第二核酸引入該前驅體T細胞中的步驟。在一些實施例中，該第一核酸及該第二核酸係在不同的載體上。在一些實施例中，該第一核酸及該第二核酸係在同一載體上，例如可操作性連接至同一啟動子。在一些實施例中，該第一核酸係在該第二核酸上游。在一些實施例中，該第一核酸及該第二核酸經由連接序列連接，諸如包含編碼P2A、T2A、E2A、F2A、BmCPV 2A、BmIFV 2A、$(GS)_n$、$(GSGGS)_n$、$(GGGS)_n$、$(GGGGS)_n$之核酸序列或IRES、SV40、CMV、UBC、EF1α、PGK、CAGG之核酸序列或其任何組合中任一者之連接序列，其中n係至少為1之整數。

【0010】　在一些實施例中，攜帶本文所述之第一及/或第二核酸之載體為病毒載體，諸如選自由腺病毒載體、腺相關病毒載體、逆轉錄病毒載體、慢病毒載體、

游離型載體表現載體、單純疱疹病毒載體及其衍生物組成之群的病毒載體。在一些實施例中，攜帶本文所述之第一及/或第二核酸之載體為非病毒載體，諸如 Piggybac 載體或睡美人載體。

【0011】　在根據任何本文所述方法之一些實施例中，如與藉由自該前驅體 T 細胞之供體分離的原代 T 細胞引發之移植物抗宿主疾病(GvHD)反應相比，表現 Nef 之經修飾 T 細胞在組織不相容性個體中不引發或引發降低之 GvHD 反應。

【0012】　在根據任何本文所述之方法的一些實施例中，該方法進一步包括分離或富集包含第一及/或第二核酸之 T 細胞。在一些實施例中，該方法進一步包括自表現 Nef 之經修飾 T 細胞分離或富集 TCR 陰性 T 細胞。在一些實施例中，該方法進一步包括用至少一種醫藥學上可接受之載劑調配表現 Nef 之經修飾 T 細胞。

【0013】　在根據使用包含功能性外源受體之前驅體 T 細胞或包含將功能性外源受體引入前驅體 T 細胞中之步驟的任一種本文所述之方法之一些實施例中，該功能性外源受體為嵌合 TCR (cTCR)，其包含：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之連接體；(c)第一 TCR 次單元(例如，CD3ε)的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；(d)包含第二 TCR 次單元(例如，CD3ε)的跨膜結構域之跨膜結構域；及(e)包含第三 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞內信號傳導結構域之細胞內信號傳導結構域；其中該第一、第二及第三 TCR 次單元均係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群。在一些實施例中，該第一、第二及第三 TCR 次單元為相同的(例如，均為 CD3ε)。在一些實施例中，該第一、第二及第三 TCR 次單元為不同的。在一些實施例中，該 cTCR 進一步包含位於該細胞外配位體結合結構域之 C 端與該跨膜結構域之 N 端之間的鉸鏈結構域。在一些實施例中，該鉸鏈結構域

係源於 CD8α。在一些實施例中，該 cTCR 進一步包含位於該 cTCR 之 N 端處的信號肽，諸如源於 CD8α 之信號肽。

【0014】　在根據使用包含功能性外源受體之前驅體 T 細胞或包含將功能性外源受體引入前驅體 T 細胞中之步驟的任一種本文所述之方法之一些實施例中，該功能性外源受體為 T 細胞抗原偶合物(TAC)，其包含：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；(e)第一 TCR 輔受體(例如，CD4)的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；(f)包含第二 TCR 輔受體(例如，CD4)的跨膜結構域之跨膜結構域；及(g)包含第三 TCR 輔受體(例如，CD4)的細胞內信號傳導結構域之視情況存在之細胞內信號傳導結構域；其中該 TCR 次單元係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群；且其中該第一、第二及第三 TCR 輔受體均係選自由 CD4、CD8 及 CD28 組成之群。在一些實施例中，該第一、第二及第三 TCR 輔受體為相同的。在一些實施例中，該第一、第二及第三 TCR 輔受體為不同的。在一些實施例中，該 TAC 進一步包含位於該細胞外配位體結合結構域之 C 端與該跨膜結構域之 N 端之間的鉸鏈結構域。在一些實施例中，該鉸鏈結構域係源於 CD8α。在一些實施例中，該 TAC 進一步包含位於該 TAC 之 N 端處的信號肽，諸如源於 CD8α 之信號肽。在一些實施例中，該細胞外配位體結合結構域係在細胞外 TCR 結合結構域之 N 端處。在一些實施例中，該細胞外配位體結合結構域係在細胞外 TCR 結合結構域之 C 端處。

【0015】　在根據使用包含功能性外源受體之前驅體 T 細胞或包含將功能性外源受體引入前驅體 T 細胞中之步驟的任一種本文所述之方法之一些實施例中，該功能性外源受體為 TAC 樣嵌合受體，其包含：(a)細胞外配位體結合結構域，

其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別第一 TCR 次單元(例如，TCRα)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；(e)第二 TCR 次單元(例如，CD3ε)的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；(f)包含第三 TCR 次單元(例如，CD3ε)的跨膜結構域之跨膜結構域；及(g)包含第四 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞內信號傳導結構域之視情況存在之細胞內信號傳導結構域；其中該第一、第二、第三及第四 TCR 次單元均係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群。在一些實施例中，該第二、第三及第四 TCR 次單元為相同的。在一些實施例中，該第一、第二、第三及第四 TCR 次單元為相同的。在一些實施例中，該第一、第二、第三及第四 TCR 次單元為不同的。在一些實施例中，該第二、第三及第四 TCR 次單元為相同的，但不同於該第一 TCR 次單元。在一些實施例中，該細胞外配位體結合結構域係在細胞外 TCR 結合結構域之 N 端處。在一些實施例中，該細胞外配位體結合結構域係在細胞外 TCR 結合結構域之 C 端處。在一些實施例中，該 TAC 樣嵌合受體進一步包含位於該細胞外配位體結合結構域之 C 端與該跨膜結構域之 N 端之間的鉸鏈結構域。在一些實施例中，該鉸鏈結構域係源於 CD8α。在一些實施例中，該 TAC 樣嵌合受體進一步包含位於該 TAC 樣嵌合受體之 N 端處的信號肽，諸如源於 CD8α 之信號肽。

【0016】　在根據使用包含功能性外源受體之前驅體 T 細胞或包含將功能性外源受體引入前驅體 T 細胞中之步驟的任一種本文所述之方法之一些實施例中，該功能性外源受體為嵌合抗原受體(CAR)，諸如包含多肽之 CAR，其包含：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域。在一些實施例中，該抗原結合片段係選自駱駝

Ig、Ig NAR、Fab 片段、單鏈 Fv 抗體及單結構域抗體(sdAb、奈米抗體(Nanobody))之群。在一些實施例中，該抗原結合片段為 sdAb 或 scFv。在一些實施例中，該細胞外配位體結合結構域為單價的。在一些實施例中，該細胞外配位體結合結構域為多價的，諸如多特異性或多抗原決定基。在一些實施例中，該腫瘤抗原係選自由間皮素、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、介白素-11 受體 a (IL-11Ra)、PSCA、PRSS21、VEGFR2、LewisY、CD24、血小板源性生長因子受體-β (PDGFR-β)、SSEA-4、CD20、葉酸鹽受體 α、ERBB2 (Her2/neu)、MUC1、表皮生長因子受體(EGFR)、NCAM、前列腺酶、PAP、ELF2M、Ephrin 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、葉酸鹽受體 β、TEM1/CD248、TEM7R、CLDN6、CLDN18.2、GPRC5D、CXORF61、CD97、CD179a、ALK、聚唾液酸、PLAC1、GloboH、NY-BR-1、UPK2、HAVCR1、ADRB3、PANX3、GPR20、LY6K、OR51E2、TARP、WT1、NY-ESO-1、LAGE-1a、MAGE-A1、天冬醯胺內肽酶、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、前列腺特異蛋白(prostein)、存活素及端粒酶、PCTA-1/半乳糖凝集素 8、MelanA/MART1、Ras 突變體、hTERT、肉瘤易位斷點、ML-IAP、ERG (TMPRSS2 ETS 融合基因)、NA17、PAX3、雄激素受體、週期蛋白 B1、MYCN、RhoC、TRP-2、CYP1B1、BORIS、SART3、PAX5、OY-TES1、LCK、AKAP-4、SSX2、RAGE-1、人類端粒酶逆轉錄酶、RU1、RU2、腸道羧酸酯酶、mut hsp70-2、CD79a、CD79b、CD72、LAIR1、FCAR、LILRA2、CD300LF、CLEC12A、BST2、EMR2、LY75、GPC3、FCRL5 及 IGLL1 組成之群。在一些實施例中，該腫瘤抗原為

BCMA、CD19 或 CD20。在一些實施例中，該跨膜結構域係源於選自由 T 細胞受體之 α、β 或 ζ 鏈、CD3ζ、CD3ε、CD4、CD5、CD8α、CD9、CD16、CD22、CD27、CD28、CD33、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137 (4-1BB)、CD152、CD154 及 PD-1 組成之群的分子。在一些實施例中，該跨膜結構域係源於 CD8α。在一些實施例中，該細胞內信號傳導結構域包含源於 CD3ζ、CD3γ、CD3ε、CD3δ、FcRγ (FCER1G)、FcRβ (Fc ε RIb)、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD66d、Fc γ RIIa、DAP10 及 DAP12 之一級細胞內信號傳導結構域。在一些實施例中，該一級細胞內信號傳導結構域係源於 CD3ζ、CD3γ 或 DAP12。在一些實施例中，該細胞內信號傳導結構域包含源於選自由 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 (淋巴球功能相關抗原-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、特異性地與 CD83 結合之配位體及其任何組合組成之群的共刺激分子之共刺激信號傳導結構域。在一些實施例中，該共刺激信號傳導結構域包含 CD137 (4-1BB)之細胞質結構域。在一些實施例中，該功能性外源受體進一步包含位於該細胞外配位體結合結構域之 C 端與該跨膜結構域之 N 端之間的鉸鏈結構域。在一些實施例中，該鉸鏈結構域係源於 CD8α。在一些實施例中，該功能性外源受體進一步包含位於該多肽之 N 端處的信號肽，諸如源於 CD8α 之信號肽。

【0017】　在一些實施例中，提供藉由本文所述之方法獲得之經修飾 T 細胞。在一些實施例中，提供一種醫藥組合物，其包含該經修飾 T 細胞及醫藥學上可

接受之載劑。在一些實施例中，提供一種治療個體(諸如人類)之疾病(諸如癌症)之方法，其包括向該個體投與有效量的該醫藥組合物。

【0018】　在另一態樣中，提供一種非天然存在之 Nef 蛋白(亦稱作突變型 Nef 蛋白或非天然存在之突變型 Nef 蛋白)，其可包含在肉豆蔻醯化位點、N 端 α-螺旋、基於酪胺酸之 AP 募集、CD4 結合位點、酸性簇、基於脯胺酸之重複序列、PAK 結合結構域、COP I 募集結構域、基於二-白胺酸之 AP 募集結構域、V-ATP 酶及 Raf-1 結合結構域或其任何組合中之一或多種突變，或在表 11 中列出的任何胺基酸殘基處之一或多種突變。在另一態樣中，該非天然存在之 Nef 蛋白為突變型 SIV Nef 蛋白。在一些實施例中，該非天然存在之 Nef 蛋白包含 SEQ ID NO: 18-22 中任一者之胺基酸序列。在一些實施例中，該非天然存在之 Nef 蛋白為突變型 SIV Nef，其包含在以下中之任一者之胺基酸殘基處之一或多種突變：(i) aa 2-4、aa 8-10、aa 11-13、aa 38-40、aa 44-46、aa 47-49、aa 50-52、aa 53-55、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 110-112、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、aa 178-179、179-181aa、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 191-193、aa 194-196、aa 203-205、aa 206-208、aa 212-214、aa 215-217、aa 218-220、aa 221-223、aa 8-13、aa 44-67、aa 107-112、aa 164-196、aa 203-208 或 aa 212-223；(ii) aa 2-4、aa 44-46、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 44-67、aa 164-169、aa 176-181、aa 185-190；(iii) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、178-179aa、aa 179-181、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67 或 aa 164-190；或(iv) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-

61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67、aa 164-169、aa 176-181 或 aa 185-190；其中該胺基酸殘基位置對應於野生型 SIV Nef 之彼位置。在一些實施例中，該非天然存在之 Nef(例如，突變型 SIV Nef)下調內源 TCR (例如，TCRα 及/或 TCRβ)之細胞表面表現。在一些實施例中，該非天然存在之 Nef 蛋白(例如，突變型 SIV Nef)對內源 TCR (例如，TCRα 及/或 TCRβ)之細胞表面表現之下調與野生型 Nef 之彼下調相差不超過約 3% (諸如不超過約 2%或 1%中任一者)。在一些實施例中，該非天然存在之 Nef 蛋白(例如，突變型 SIV Nef)對內源 TCR (例如，TCRα 及/或 TCRβ)之細胞表面表現之下調較野生型 Nef 之彼下調多至少約 3% (包括等於 3%；諸如至少約 3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或 95%中任一者)。在一些實施例中，該非天然存在之 Nef 蛋白(例如，突變型 SIV Nef)不下調 CD4 之細胞表面表現。在一些實施例中，該非天然存在之 Nef 蛋白(例如，突變型 SIV Nef)下調 CD4 之細胞表面表現。在一些實施例中，該非天然存在之 Nef 蛋白(例如，突變型 SIV Nef)對 CD4 之細胞表面表現之下調較野生型 Nef 之彼下調少至少約 3% (諸如至少約 4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或 95%中任一者)。在一些實施例中，該非天然存在之 Nef 蛋白(例如，突變型 SIV Nef)不下調 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該非天然存在之 Nef 蛋白(例如，突變型 SIV Nef)下調 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該非天然存在之 Nef 蛋白(例如，突變型 SIV Nef)對 CD28 之細胞表面表現之下調較野生型 Nef 之彼下調少至少約 3% (諸如至少約 4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或 95%中任一者)。在一些實施例中，該非天然存在之型 Nef 蛋白(例如，突變型 SIV Nef)對內源 TCR (例如，TCRα 及/或

TCRβ)之細胞表面表現之下調與野生型 Nef 之彼下調相差不超過約 3% (諸如不超過約 2%或 1%中任一者)(或對內源 TCR (例如，TCRα 及/或 TCRβ)之細胞表面表現之下調較野生型 Nef 之彼下調多至少約 3% (包括等於 3%；諸如至少約 3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或 95%中任一者))，且不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該非天然存在之 Nef 蛋白(例如，突變型 SIV Nef)對內源 TCR (例如，TCRα 及/或 TCRβ)之細胞表面表現之下調與野生型 Nef 之彼下調相差不超過約 3% (諸如不超過約 2%或 1%中任一者)(或對內源 TCR (例如，TCRα 及/或 TCRβ)之細胞表面表現之下調較野生型 Nef 之彼下調多至少約 3% (包括等於 3%；諸如至少約 3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或 95%中任一者))，且對 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現之下調較野生型 Nef 之彼下調少至少約 3% (諸如至少約 4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或 95%中任一者)。

【0019】　本文所述之非天然存在之 Nef 蛋白(例如，突變型 SIV Nef)可用於任一種本文所述之方法中。

【0020】　本發明進一步提供適用於本文所述之方法之套組及製造物件。

【圖式簡單說明】

【0021】　圖 1A-1B 證明 SIV Nef 表現可顯著地抑制 T 細胞活化。圖 1A 顯示在用編碼 SIV Nef-LNGFR (M071)之慢病毒轉導 Jurkat 細胞株之後，LNGFR+細胞比率為 66.1%，且磁性活化細胞分選(MACS)進一步將 LNGFR+細胞富集至 94.3%。圖 1B 顯示 T 細胞活化標記物 CD69 在經 PHA 刺激之 LNGFR+ Jurkat 細胞中顯著降低，但在經 PMA/ION 刺激之 LNGFR+ Jurkat 細胞中未受影響。「UnT」指示未經轉導 Jurkat 細胞。「TCRα KO」指示藉由 CRISPR/Cas 方法獲得之 TCRα 基因剔除 Jurkat 細胞株。「載體」指示經空載體轉導之 Jurkat 細胞。「M071」

表示表現 SIV Nef-P2A-LNGFR 且藉由 MACS 富集之 LNGFR+ Jurkat 細胞群體。

【0022】　圖 2 顯示 SIV Nef 表現藉由抑制 TCR/CD3 複合物之細胞表面表現而影響 TCR 介導之信號傳導路徑。「UnT」指示未經轉導 Jurkat 細胞。「TCRα KO」指示藉由 CRISPR/Cas 方法獲得之 TCRα 基因剔除 Jurkat 細胞株。「載體」指示經空載體轉導之 Jurkat 細胞。「M071」表示表現 SIV Nef-P2A-LNGFR 且藉由 MACS 富集之 LNGFR+ Jurkat 細胞群體。

【0023】　圖 3 顯示 HIV1 Nef 及 HIV2 Nef 表現藉由抑制 TCR/CD3 複合物之細胞表面表現而影響 TCR 介導之信號傳導路徑。「UnT」指示未經轉導 Jurkat 細胞。「TCRα KO」指示藉由 CRISPR/Cas 方法獲得之 TCRα 基因剔除 Jurkat 細胞株。「載體」指示經空載體轉導之 Jurkat 細胞。「M071」表示表現 SIV Nef-P2A-LNGFR 且藉由 MACS 富集之 LNGFR+ Jurkat 細胞群體。「HIV1 Nef」表示表現 HIV1 Nef-T2A-Puro 之 Jurkat 細胞。「HIV2 Nef」表示表現 HIV2 Nef-T2A-Puro 之 Jurkat 細胞。

【0024】　圖 4A-4D 顯示用於表現 SIV Nef 之 TCR 陰性 T 細胞之細胞分選策略及標靶細胞細胞溶解效應。圖 4A 顯示經 SIV Nef-P2A-LNGFR 及 BCMA CAR 慢病毒共轉染之 HEK 293T 細胞上的 BCMA CAR 及 LNGFR 表現在 3 天後之 FACS 結果。圖 4B 顯示經 SIV Nef-P2A-LNGFR 及 BCMA CAR-P2A-LNGFR 慢病毒共轉染且用 MACSelect LNGFR 微珠分選之 LNGFR+ T 細胞的 TCRαβ 陽性及陰性比率。圖 4C 顯示經 MACS 富集之 CD3ε 陰性 T 細胞中的 TCRαβ、CD3ε 及 LNGFR 表現比率，該等陰性 T 細胞經 SIV Nef-P2A-LNGFR 及 BCMA CAR 慢病毒共轉染。圖 4D 顯示 CAR+/CD3ε- T 細胞對 RPMI-8226 (BCMA+)及 K562 (BCMA-)細胞株之特異性及非特異性細胞溶解效應。「UnT」指示未經轉導原代 T 細胞。「NC」表示未與原代 T 細胞一起培育之經 Luc 標記細胞，作為陰性對照。「PC」表示 Triton X-100 以溶解所有經 Luc 標記細胞，作為陽性對照。「MACS CD3ε

陰性」表示經 MACS 富集之 CD3ε 陰性 T 細胞群體。「TCRαβ-」表示在 CD3ε 分選之後的 TCRαβ 陰性 T 細胞。「TCRαβ+」表示在 CD3ε 分選之後的 TCRαβ 陽性 T 細胞。

【0025】 圖 5A-5C 證明經諸如 BCMA CAR-P2A-LNGFR-SIV Nef (M072)、BCMA CAR-P2A-SIV Nef (M086)、BCMA CAR-P2A-$(GGGS)_3$-SIV Nef (M090)及 SIV Nef-P2A-BCMA CAR (M091)、SIV Nef-IRES-BCMA CAR (M126)、BCMA CAR-IRES-SIV Nef (M159)、BCMA CAR-PGK-SIV Nef (M160)及 SIV Nef-PGK-BCMA CAR (M161)之 SIV Nef+CAR 多合一慢病毒載體轉染之 T 細胞中的 BCMA CAR (CAR 陽性)、TCRαβ (TCRαβ 陰性)及 CD3ε (CD3ε 陰性)之表現率。SIV Nef-P2A-LNGFR (M071)用作非 CAR 編碼對照。「UnT」表示未經轉導 Jurkat 細胞。「CAR 陽性」表示 CAR 陽性 T 細胞。「TCRαβ 陰性」表示 TCRαβ 陰性 T 細胞。「CD3ε 陰性」表示 CD3ε 陰性 T 細胞。

【0026】 圖 6A-6D 顯示 Nef 亞型及突變體對 T 細胞上之 TCRαβ、CDε、CD28 及 CD4 表現的影響。

【0027】 圖 7 顯示 SIV Nef-IRES-CD20 scFv (利妥昔單抗(Rituximab)) CAR (M167) T 細胞(89.7%)、SIV Nef-IRES-CD20 scFv (Leu-16) CAR (M168) T 細胞 (93.3%)、SIV Nef-IRES-CD19×CD20 scFv CAR (M169) T 細胞(92.1%)、SIV Nef-IRES-CD19 scFv CAR (M170) T 細胞(93.6%)、SIV Nef-IRES-BCMA BiVHH CAR1 (M171) T 細胞(93.5%)、SIV Nef-IRES-BCMA BiVHH CAR2 (M172) T 細胞(87.9%)及 SIV Nef-IRES-BCMA mono-VHH CAR (M173) T 細胞(94.0%)之 MACS 富集後 TCRαβ 陰性 T 細胞比率。未經轉導 T 細胞(UnT)充當對照。

【0028】 圖 8A-8B 顯示經多種 SIV Nef+CAR 多合一構築體轉導之經 MACS 分選 TCRαβ 陰性 T 細胞、經多種 SIV Nef+CAR 多合一構築體轉導之經 MACS 分選 TCRαβ 陽性 T 細胞及作為對照的未經轉導 T 細胞(UnT)之 CAR 介導之特異

性腫瘤細胞毒性。M167：SIV Nef-IRES-CD20 scFv (利妥昔單抗) CAR T 細胞。M168：SIV Nef-IRES-CD20 scFv (Leu-16) CAR T 細胞。M169：SIV Nef-IRES-CD19×CD20 scFv CAR T 細胞。M170：SIV Nef-IRES-CD19 scFv CAR T 細胞。M171：SIV Nef-IRES-BCMA BiVHH CAR1 T 細胞。M172：SIV Nef-IRES-BCMA BiVHH CAR2 T 細胞。M173：SIV Nef-IRES-BCMA mono-VHH CAR T 細胞。

【0029】　圖 9A-9B 顯示經多種 SIV Nef+CAR 多合一構築體轉導之經 MACS 分選 TCRαβ 陽性及陰性 T 細胞之 TCR 介導之非特異性細胞毒性。經 MACS 分選 TCRαβ 陰性 T 細胞具有極少或沒有 TCR 介導之非特異性腫瘤細胞殺死活性。M167：SIV Nef-IRES-CD20 scFv (利妥昔單抗) CAR T 細胞。M168：SIV Nef-IRES-CD20 scFv (Leu-16) CAR T 細胞。M169：SIV Nef-IRES-CD19×CD20 scFv CAR T 細胞。M170：SIV Nef-IRES-CD19 scFv CAR T 細胞。M171：SIV Nef-IRES-BCMA BiVHH CAR1 T 細胞。M172：SIV Nef-IRES-BCMA BiVHH CAR2 T 細胞。M173：SIV Nef-IRES-BCMA mono-VHH CAR T 細胞。

【0030】　圖 10A 顯示經 BCMA BiVHH CAR1-IRES-SIV Nef M116 轉移質體(PLLV-M133 質體)轉導之 T 細胞之 MACS 富集後 TCRαβ 陰性 T 細胞比率。圖 10B 顯示經 PLLV-M133 質體轉導之經 MACS 分選 TCRαβ 陽性及陰性 T 細胞的 CAR 介導之特異性腫瘤細胞毒性(左圖)及 TCR 介導之非特異性細胞毒性(右圖)。未經轉導 T 細胞(UnT)充當對照。

【0031】　圖 11A 顯示經 SIV Nef M116-IRES-CD20 嵌合 TCR (抗 CD20 scFv (Leu-16)-$(GGGGS)_3$-CD3ε，稱作 M572)轉導之 T 細胞之 MACS 富集後 TCRαβ 陰性 T 細胞比率。圖 11B 顯示經 PLLV-M572 質體轉導之經 MACS 分選 TCRαβ 陽性及陰性 T 細胞的 CD20 嵌合 TCR 介導之特異性腫瘤細胞毒性(左圖)及內源 TCR 介導之非特異性細胞毒性(右圖)。未經轉導 T 細胞(UnT)充當對照。

【0032】　圖 12A 顯示經 SIV Nef M116-IRES-CD20 TAC (抗 CD20 scFv (Leu-

16)-(GGGGS)$_3$-huUCHT1.Y177T-GGGGS-CD4 序列，稱作 PLLV-M574)轉導之 T 細胞之 MACS 富集後 TCRαβ 陰性 T 細胞比率。圖 12B 顯示經 M574 質體轉導之經 MACS 分選 TCRαβ 陽性及陰性 T 細胞的抗 CD20 TAC 介導之特異性腫瘤細胞毒性(左圖)及內源 TCR 介導之非特異性細胞毒性(右圖)。未經轉導 T 細胞(UnT)充當對照。

【0033】 圖 13A-13C 顯示與野生型 SIV Nef (M071)相比，多種 SIV Nef 胺基酸殘基突變對 TCRαβ (圖 13A)、CD4 (圖 13B)及 CD28 (圖 13C)之表現的調節效應。未經轉導 Jurkat 細胞(UnT)充當陰性對照。經 M116 (SIV Nef M116，參見實例 6)轉導之 Jurkat 細胞充當陽性對照。

【實施方式】

相關申請案之交叉引用

【0034】 本申請案主張 2018 年 7 月 26 日提出申請之國際專利申請案第 PCT/CN2018/097235 號的優先權權益，該申請案之內容以引用之方式整體併入本文中。

呈 ASCII 文本文檔形式之序列表的提交

【0035】 呈 ASCII 文本文檔形式之以下提交的內容以引用之方式整體併入本文中：序列表之電腦可讀形式(CRF) (文檔名稱：761422001741SEQLIST.TXT，記錄日期：2019 年 7 月 25 日，大小：126 KB)。

【0036】 本申請案提供一種產生經修飾 T 細胞(諸如 TCR-T 細胞(例如，cTCR-T 細胞)、TAC-T 細胞、TAC 樣 T 細胞或 CAR-T)之方法，該等經修飾細胞可在組織不相容性個體中在諸如癌症免疫療法之治療期間引發降低之 GvHD 反應。簡言之，前驅體 T 細胞(亦即，欲經修飾之初始 T 細胞)經修飾以表現陰性調節因子(Nef)蛋白，該蛋白可下調內源 TCR (下文中稱作「TCR 缺乏 T 細胞」或「GvHD 降至最低之 T 細胞」)，諸如下調內源 TCRα 或 TCRβ 之細胞表面表現，由此抑

制內源 TCR 介導之信號轉導。此等含 Nef 之 TCR 缺乏 T 細胞可接著進一步經工程改造以表現外源受體，諸如經工程改造 TCR (例如，傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR)。本申請案亦提供一種產生 GvHD 降至最低之經修飾 T 細胞(諸如 TCR-T 細胞(例如，cTCR-T 細胞)、TAC-T 細胞、TAC 樣 T 細胞或 CAR-T)之一步方法，該方法係藉由用編碼 Nef 之載體及編碼外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如，傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))之載體共轉導前驅體 T 細胞，或藉由編碼 Nef 及外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如，傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))兩者之「多合一」載體轉導前驅體 T 細胞。源於本文所述方法之經修飾 T 細胞可有效地下調 TCR 之細胞表面表現，同時保持外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如，傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))之表現及功能。本發明有效地使同種異體移植期間之 GvHD 發生降至最低或消除同種異體移植期間之 GvHD 發生，且提供用於通用同種異體 CAR-T、TCR-T (例如，cTCR-T)、TAC-T 或 TAC 樣 T 療法之便利、有效且低成本之策略。

【0037】　因此，本申請案之一態樣提供一種產生經修飾 T 細胞之方法及藉由該等方法獲得之經修飾 T 細胞，該方法包括將編碼 Nef 蛋白(例如，wt Nef 或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸引入至前驅體 T 細胞中。在另一態樣中，提供經修飾 T 細胞，其包含編碼 Nef 蛋白(例如，wt Nef 或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸，及視情況存在之編碼功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合

受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR)之第二核酸。在另一態樣中，提供適用於製造本文所述之經修飾 T 細胞的非天然存在之 Nef 蛋白(例如，突變型 SIV Nef)。亦提供載體(諸如病毒載體)，其包含編碼 Nef 蛋白(例如，wt Nef 或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之核酸，及視情況存在之編碼功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR)之核酸。

I. 定義

【0038】　術語「抗體」包括單株抗體(包括全長 4-鏈抗體或具有免疫球蛋白 Fc 區之全長僅重鏈抗體)、具有多抗原決定基特異性之抗體組合物、多特異性抗體(例如，雙特異性抗體、雙功能抗體及單鏈分子)以及抗體片段(例如，Fab、$F(ab')_2$ 及 Fv)。術語「免疫球蛋白」(Ig)在本文中可與「抗體」互換使用。本文所涵蓋之抗體包括單結構域抗體，諸如僅重鏈抗體。

【0039】　術語「僅重鏈抗體」或「HCAb」係指功能性抗體，其包含重鏈，但缺乏通常發現於 4-鏈抗體中之輕鏈。已知駱駝科動物(諸如駱駝、美洲駝或羊駝)產生 HCAb。

【0040】　術語「單結構域抗體」或「sdAb」係指具有三個互補決定區(CDR)之單一抗原結合多肽。單獨 sdAb 能夠結合於抗原而不與相應含 CDR 多肽配對。在一些情況下，單結構域抗體自駱駝科動物 HCAb 經工程改造，且其重鏈可變結構域在本文中稱作「V_HH」。一些 V_HH 亦可稱作奈米抗體。駱駝科動物 sdAb 為最小的已知抗原結合抗體片段之一(參見例如 Hamers-Casterman 等人, Nature 363:446-8 (1993)；Greenberg 等人, Nature 374:168-73 (1995)；Hassanzadeh-Ghassabeh 等人, Nanomedicine (Lond), 8:1013-26 (2013))。基礎 V_HH 自 N 端至 C 端具有以下結構；FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4，其中 FR1 至 FR4 分別

係指構架區 1 至 4，且其中 CDR1 至 CDR3 係指互補決定區 1 至 3。

【0041】　抗體之「可變區」或「可變結構域」係指該抗體的重鏈或輕鏈之胺基端域。重鏈及輕鏈之可變結構域可分別稱作「V_H」及「V_L」。此等結構域一般為該抗體之最可變部分(相對於同一類別之其他抗體)且含有抗原結合位點。來自駱駝科動物物種之僅重鏈抗體具有單一重鏈可變區，其係稱作「V_HH」。

【0042】　術語「可變」係指如下事實，即在抗體之中，可變結構域之某些區段的序列廣泛地不同。V 結構域介導抗原結合且定義特定抗體針對其特定抗原之特異性。然而，變異性未均勻地分佈於可變結構域之整個範圍中。反而，其集中於輕鏈及重鏈可變結構域兩者中之三個稱作高變區(HVR)的區段中。可變結構域之更高度保守部分稱作構架區(FR)。原生重鏈及輕鏈之可變結構域各自包含四個 FR 區，該等 FR 區主要採用 β-摺疊組態，由三個 HVR 連接，該等 HVR 形成連接 β-摺疊結構之環且在一些情況下形成 β-摺疊結構之一部分。各鏈中之 HVR 藉由 FR 區緊密地保持在一起且與另一條鏈之 HVR 一起有助於形成抗體的抗原結合位點(參見 Kabat 等人, *Sequences of Immunological Interest*, 第五版, National Institute of Health, Bethesda, Md. (1991))。恆定結構域未直接牽涉於抗體與抗原之結合中，但展現多種效應子功能，諸如使抗體參與抗體依賴性細胞毒性。

【0043】　術語「全長抗體」、「完整抗體」或「全抗體」可互換使用以指呈其實質上完整形式之抗體，如與抗體片段相比。特定言之，全長 4-鏈抗體包括具有包括 Fc 區之重鏈及輕鏈之彼等。全長僅重鏈抗體包括重鏈(諸如 V_HH)及 Fc 區。恆定結構域可為原生序列恆定結構域(例如，人類原生序列恆定結構域)或其胺基酸序列變異體。在一些情況下，完整抗體可具有一或多種效應子功能。

【0044】　「抗體片段」或「抗原結合片段」包含完整抗體的一部分，較佳地完整抗體之抗原結合及/或可變區。抗體片段(或抗原結合片段)之實例包括 Fab、Fab′、$F(ab')_2$ 及 Fv 片段；雙功能抗體；線性抗體(參見美國專利第 5,641,870 號，

實例 2；Zapata 等人, *Protein Eng.* 8(10): 1057-1062 [1995])；單鏈抗體分子；單結構域抗體(諸如 V_HH)，及由抗體片段形成之多特異性抗體。抗體之木瓜蛋白酶消化產生兩個一致抗原結合片段(稱作「Fab」片段)，及殘餘「Fc」片段(反映容易結晶之能力的名稱)。Fab 片段由整個 L 鏈連同 H 鏈之可變區結構域(V_H)及一條重鏈之第一恆定結構域(C_H1)組成。各 Fab 片段關於抗原結合為單價的，亦即，其具有單一抗原結合位點。抗體之胃蛋白酶處理產生單一大 $F(ab')_2$ 片段，該片段粗略地對應於具有不同抗原結合活性的兩個二硫鍵連接之 Fab 片段且仍能夠與抗原交聯。Fab'片段與 Fab 片段的不同之處在於在 C_H1 結構域之羧基端處具有數個額外殘基，包括來自抗體鉸鏈區之一或多個半胱胺酸。Fab'-SH 在本文中係其中恆定結構域之半胱胺酸殘基具有游離硫醇基之 Fab'的名稱。$F(ab')_2$ 抗體片段最初作為 Fab'片段對產生，該等片段之間具有鉸鏈半胱胺酸。亦已知抗體片段之其他化學偶合。

【0045】 Fc 片段包含藉由二硫化物保持在一起之兩個 H 鏈的羧基端部分。抗體之效應子功能由 Fc 區中的序列決定，該 Fc 區亦由某些類型之細胞上發現的 Fc 受體(FcR)識別。

【0046】 「Fv」為含有完全抗原識別及抗原結合位點之最小抗體片段。此片段由一重鏈及一輕鏈可變區結構域呈緊密、非共價締合形式之二聚體組成。由這兩個結構域之摺疊發出六個高變環(來自 H 及 L 鏈的各自 3 個環)，該等高變環促進胺基酸殘基之抗原結合並且向抗體賦予抗原結合特異性。然而，即使單一可變結構域(或僅包含對抗原具特異性之三個 HVR 之 Fv 的一半)亦具有識別且結合抗原之能力，不過親和力低於完整結合位點。

【0047】 「單鏈 Fv」(亦縮寫為「sFv」或「scFv」)係包含連接至單一多肽鏈之 V_H 及 V_L 抗體結構域的抗體片段。較佳地，sFv 多肽進一步包含在 V_H 與 V_L 結構域之間的多肽連接體，其使得 sFv 能夠形成抗原結合所需之結構。

【0048】　本文所述抗體之「功能片段」包含完整抗體之一部分，一般包括完整抗體之抗原結合或可變區或保留或具有經修飾 FcR 結合能力的抗體 Fc 區。抗體片段之實例包括線性抗體、單鏈抗體分子及由抗體片段形成之多特異性抗體。

【0049】　如本文所用，術語「特異性結合」、「特異性識別」或「對.....具特異性」係指可量測且可再現之相互作用，諸如標靶與抗原結合蛋白(諸如抗原結合結構域、配位體、經工程改造 TCR、CAR 或嵌合受體)之間的結合，其決定了在包括生物分子之分子異源群體存在下標靶的存在。例如，特異性結合標靶(其可為抗原決定基)之抗原結合蛋白為如下抗原結合蛋白，與其結合其他標靶相比，其以較大親和力、親合力、更容易地及/或以較長持續時間結合此標靶。在一些實施例中，抗原結合蛋白與無關標靶之結合程度小於該抗原結合蛋白與該標靶之結合的約 10%，如例如藉由放射性免疫分析(RIA)所量測。在一些實施例中，特異性結合標靶之抗原結合蛋白具有≦1 μM、≦100 nM、≦10 nM、≦1 nM 或≦0.1 nM 之解離常數(Kd)。在一些實施例中，抗原結合蛋白特異性結合蛋白質上在來自不同物種之該蛋白質之間保守的抗原決定基。在一些實施例中，特異性結合可包括但不需要排他性結合。

【0050】　術語「特異性」係指抗原結合蛋白(諸如 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR)、經工程改造 TCR (例如，傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體、sdAb、scFv)對抗原之特定抗原決定基的選擇性識別。天然抗體例如為單特異性的。如本文所用，術語「多特異性」表示抗原結合蛋白(諸如任何本文所述之外源受體或 sdAb)具有兩個或更多個抗原結合位點，其中至少兩者結合不同抗原。如本文所用，「雙特異性」表示抗原結合蛋白(諸如任何本文所述之外源受體)具有兩種不同抗原結合特異性。如本文所用，術語「單特異性」CAR 表示抗原結合蛋白(諸如任何本文所述之外源受體或 sdAb、scFv)具有一或多個結合位點，其中每一者結合相同抗原。

【0051】　如本文所用，術語「價態」表示在抗原結合蛋白(諸如任何本文所述之外源受體或 sdAb、scFv)中存在規定數目之結合位點。例如天然抗體或全長抗體具有兩個結合位點且為二價的。因而，術語「三價」、「四價」、「五價」及「六價」表示在抗原結合蛋白(諸如任何本文所述之外源受體或 sdAb、scFv)中分別存在兩個結合位點、三個結合位點、四個結合位點、五個結合位點及六個結合位點。

【0052】　本文中術語「Fc 區」用於定義免疫球蛋白重鏈之 C 端區，包括原生序列 Fc 區及變異體 Fc 區。儘管免疫球蛋白重鏈之 Fc 區的邊界可能改變，人類 IgG 重鏈 Fc 區通常經界定以自位置 Cys226 處之胺基酸殘基或自 Pro230 延伸至其羧基端。Fc 區之 C 端離胺酸(根據 EU 編號系統的殘基 447)可例如在抗體之產生或純化期間，或藉由重組工程改造編碼抗體重鏈之核酸而經移除。因此，完整抗體之組合物可包含其中所有 K447 殘基均經移除之抗體群體、未移除 K447 殘基之抗體群體及具有含有及不含 K447 殘基的抗體之混合物之抗體群體。用於本文所述抗體之合適原生序列 Fc 區包括人類 IgG1、IgG2 (IgG2A、IgG2B)、IgG3 及 IgG4。

【0053】　「結合親和力」一般係指在分子(例如，抗體、任何本文所述之外源受體，諸如 CAR)之單一結合位點與其結合搭配物(例如，抗原)之間的非共價相互作用之合計強度。除非另外指示，否則如本文所用，「結合親和力」係指反映結合對之成員(例如，抗體及抗原，或任何本文所述之外源受體及抗原，諸如 CAR 及抗原)之間的 1:1 相互作用之固有結合親和力。分子 X 對其搭配物 Y 之親和力一般可由解離常數(Kd)表示。親和力可藉由此項技術中已知之常見方法，包括本文所述之彼等方法來量測。低親和力抗體一般緩慢地結合抗原且傾向於快速地解離，而高親和力抗體一般更快結合抗原且傾向於保持更久結合。此項技術中已知多種量測結合親和力之方法，其中任一者均可用於本申請案之目的。用於量測

結合親和力之特定說明性及例示性實施例描述於下文中。

【0054】　「阻斷」抗體或「拮抗劑」抗體係抑制或降低其結合之抗原的生物活性之抗體。在一些實施例中，阻斷抗體或拮抗劑抗體實質上或完全地抑制該抗原之生物活性。

【0055】　關於肽、多肽或抗體序列之「胺基酸序列一致性百分比(%)」及「同源性」係經定義為在比對序列並且引入空位(必要時)以實現最大序列一致性百分比之後，並且不考慮作為序列一致性之一部分的任何保守取代，候選序列中與該特定肽或多肽序列中之胺基酸殘基一致的胺基酸殘基之百分率。用於達成測定胺基酸序列一致性百分比之目的的比對可以熟習此項技術者習知之多種方式實現，例如使用公開可得之電腦軟體，諸如 BLAST、BLAST-2、ALIGN 或 MEGALIGN™ (DNASTAR)軟體實現。熟習此項技術者可確定用於量測比對之適當參數，包括在所比較之序列的全長內實現最大比對所需之任何算法。

【0056】　如本文所用，「嵌合抗原受體」或「CAR」係指經遺傳工程改造之受體，其可用於將一或多種抗原特異性移植至諸如 T 細胞之免疫效應子細胞上。一些 CAR 亦稱作「人工 T 細胞受體」、「嵌合 T 細胞受體」或「嵌合免疫受體」。在一些實施例中，CAR 包含對一或多種抗原(諸如腫瘤抗原)具特異性之細胞外配位體結合結構域、跨膜結構域及 T 細胞及/或其他受體之細胞內信號傳導結構域。「CAR-T」係指表現 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR、ACTR)之 T 細胞。「BCMA CAR」係指具有對 BCMA 具特異性之細胞外結合結構域之 CAR。「二-抗原決定基 CAR」係指具有對兩種不同抗原決定基具特異性之細胞外結合結構域之 CAR。

【0057】　本文所述之「經分離」核酸分子(例如，編碼 Nef 蛋白、經工程改造 TCR (例如，傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))係自至少

一種污染物核酸分子鑑別且分離之核酸分子，該核酸分子在其中產生該核酸分子之環境中通常與該污染物核酸分子締合。較佳地，該經分離核酸不與所有與產生環境締合之組分締合。編碼本文中之多肽及抗體的經分離核酸分子係呈不同於其在自然界中發現之形式或設定的形式。因此，經分離核酸分子有別於天然存在於細胞中的編碼本文中之多肽及抗體之核酸。

【0058】　術語「控制序列」係指在特定宿主生物體中可操作性連接之編碼序列之表現所必需的 DNA 序列。適用於原核生物之控制序列例如包括啟動子、視情況存在之操縱子序列及核糖體結合位點。已知真核細胞使用啟動子、聚腺苷酸化信號及增強子。

【0059】　當核酸置於與另一核酸序列之功能性關係中時，其「經可操作性連接」。例如，若用於前序列或分泌前導序列之 DNA 表現為參與多肽之分泌的前蛋白，則其可操作性連接至用於多肽之 DNA；若啟動子或增強子影響編碼序列之轉錄，則其可操作性連接至該序列；或若核糖體結合位點經定位以便促進轉譯，則其可操作性連接至編碼序列。一般而言，「可操作性連接」意謂所連接之 DNA 序列為鄰近的，且在分泌前導序列之情況下為鄰近的且在閱讀相中。然而，增強子不必為鄰近的。連接藉由在便利限制位點處之接合實現。若該等位點不存在，則根據常規實踐使用合成寡核苷酸接頭或連接體。

【0060】　除非另外規定，否則「編碼胺基酸序列之核苷酸序列」包括彼此呈簡併形式且編碼同一胺基酸序列之所有核苷酸序列。片語編碼蛋白質或 RNA 之核苷酸序列亦可包括內含子，致使編碼該蛋白質之核苷酸序列可在一些形式中含有內含子。

【0061】　如本文所用，術語「載體」係指能夠使與其連接之另一核酸繁殖的核酸分子。該術語包括呈自主複製核酸結構之載體以及併入已引入其的宿主細胞之基因體中之載體。某些載體能夠指導其可操作性連接之核酸的表現。該等載體

在本文中稱作「表現載體」。

【0062】　如本文所用，術語「經轉染」或「經轉型」或「經轉導」係指將外源核酸轉移或引入至宿主細胞中之過程。「經轉染」或「經轉型」或「經轉導」細胞係已用外源核酸轉染、轉型或轉導之細胞。該細胞包括原代個體細胞及其後代。

【0063】　如本文所用，「治療(treatment/treating)」為用於獲得有益或所需結果(包括臨床結果)之方法。出於本發明之目的，有益或所需臨床結果包括但不限於以下中之一或多者：減輕由該疾病引起之一或多種症狀、削弱疾病程度、使該疾病穩定化(例如，預防或延遲該疾病之惡化)、預防或延遲該疾病之擴散(例如，轉移)、預防或延遲該疾病之復發、延遲或減慢該疾病之進展、改善疾病狀態、提供該疾病之緩解(部分或全部)、減少治療該疾病所需的一或多種其他藥物之劑量、延遲該疾病之進展、增加生活品質及/或延長生存。「治療」亦涵蓋癌症之病理後果之減少。本申請案之方法涵蓋此等治療態樣中之任一或多者。

【0064】　如本文所用，「個體(individual/subject)」係指哺乳動物，」包括但不限於人類、牛、馬、貓科動物、犬科動物、嚙齒動物或靈長類動物。在一些實施例中，該個體為人類。

【0065】　本文所用之術語「有效量」係指劑(諸如本文所述之經修飾 T 細胞)或其醫藥組合物之足以治療所指定病症、疾患或疾病，諸如改善、減輕、減弱及/或延遲其一或多種症狀(例如，癌症、感染性疾病、GvHD、移植排斥、自體免疫病症或輻射病)的量。關於癌症，有效量包含足以使腫瘤縮小及/或減少該腫瘤之生長速率(諸如抑制腫瘤生長)或預防或延遲其他不想要細胞增殖之量。在一些實施例中，有效量係足以延遲發展之量。在一些實施例中，有效量係足以預防或延遲復發之量。有效量可在一或多次投與中經投與。該劑(例如，經修飾 T 細胞)或組合物之有效量可：(i)降低癌細胞之數目；(ii)降低腫瘤大小；(iii)在某種程度抑

制、延緩、減慢且較佳地停止癌細胞浸潤至周圍器官中；(iv)抑制(亦即，在某種程度上減慢且較佳地停止)腫瘤轉移；(v)抑制腫瘤生長；(vi)預防或延遲腫瘤之發生及/或復發；及/或(vii)在某種程度上減輕與該癌症相關之一或多種症狀。在諸如病毒感染之感染性疾病的情況下，治療有效量之本文所述之經修飾 T 細胞或其組合物可降低由病原體感染之細胞的數目；降低病原體源性抗原之產生或釋放；抑制(亦即，在某種程度上減慢且較佳地停止)病原體擴散至未經感染細胞；及/或在某種程度上減輕與該感染相關之一或多種症狀。在一些實施例中，治療有效量係延長患者之生存之量。

【0066】　如本文所用，「延遲」疾病之發展意謂推遲、阻礙、減慢、延緩、穩定化及/或拖延該疾病(例如，癌症、感染性疾病、GvHD、移植排斥、自體免疫病症或輻射病)之發展。此延遲可具有變化的時間長度，視該疾病之病史及/或所治療之個體而定。如熟習此項技術者應顯而易知，充足或顯著延遲可實際上涵蓋預防，因為個體不發展該疾病。「延遲」癌症之發展的方法係當與不使用該方法相比時，降低在既定時段內疾病發展之概率及/或降低在既定時段內該疾病之程度的方法。該等比較典型地基於使用統計學顯著數目之個體之臨床研究。癌症發展可使用標準方法，包括但不限於電腦軸向斷層掃描(CAT 掃描)、磁共振成像(MRI)、腹部超音波、凝血測試、動脈造影術或生檢來偵測。發展亦可指最初無法偵測之癌症進展且包括發生、復發及發作。

【0067】　如本文所用，術語「自體」意欲指源於同一個體之任何材料，該材料稍後再引入至該個體中。

【0068】　「同種異體」係指源於相同物種之不同個體之移植物。「同種異體 T 細胞」係指來自具有匹配接受者之組織人類白血球抗原(HLA)類型之供體的 T 細胞。典型地，匹配係基於 HLA 基因之三個或更多個基因座處之變異性實施的，且此等基因座處之完全匹配為較佳的。在一些情況下，同種異體移植供體可為相

關的(通常為緊密 HLA 匹配的兄弟姐妹)、同基因的(該患者之同卵「一致」雙胞胎)或無關的(不相關且發現具有極緊密 HLA 匹配程度之供體)。HLA 基因分為兩類(I 型及 II 型)。一般而言，I 型基因(亦即，HLA-A、HLA-B 或 HLA-C)之錯配增加移植物排斥之風險。HLA II 型基因(亦即，HLA-DR 或 HLA-DQB1)之錯配增加移植物抗宿主疾病(GvHD)之風險。

【0069】　如本文所用，「患者」包括罹患疾病(例如，癌症、病毒感染、GvHD)之任何人類。術語「個體(subject/individual)」及「患者」在本文中可互換使用。術語「供體個體」或「供體」在本文中係指獲得其細胞以用於進一步活體外工程改造之個體。供體個體可為欲經藉由本文所述方法產生之細胞群體治療的患者(亦即，自體供體)，或可為捐獻血液樣品(例如，淋巴球樣品)之個體，該血液樣品在藉由本文所述方法產生之細胞群體產生時將用於治療不同個體或患者(亦即，同種異體供體)。接受藉由本發明方法製備之細胞的彼等個體可稱作「接受者」或「接受者個體」。

【0070】　術語「T 細胞受體」或「TCR」係指由在 T 細胞表面上配對之 αβ 或 γδ 鏈構成的雜二聚體受體。各 α、β、γ 及 δ 鏈由兩個 Ig 樣結構域構成：經由互補決定區(CDR)賦予抗原識別之可變結構域(V)，隨後為藉由連接肽及跨膜(TM)區經錨定至細胞膜之恆定結構域(C)。該 TM 區與 CD3 信號傳導裝置之不變次單元締合。各 V 結構域具有三個 CDR。此等 CDR 與結合於藉由主要組織相容性複合物(pMHC)編碼之蛋白質的抗原肽之間之複合物相互作用(Davis 及 Bjorkman (1988) Nature, 334, 395-402；Davis 等人 (1998) Annu Rev Immunol, 16, 523-544；Murphy (2012), xix, 第 868 頁)。

【0071】　術語「TCR 締合之信號傳導分子」係指具有作為 TCR-CD3 複合物之一部分的細胞質基於免疫受體酪胺酸之活化基元(ITAM)之分子。TCR 締合之信號傳導分子包括 CD3γε、CD3δε 及 ζζ (亦稱作 CD3ζ 或 CD3ζζ)。

【0072】　如本文所用，術語「刺激」係指藉由細胞表面部分之接合誘導之一級反應。例如，在受體之情況下，該刺激需要受體之接合及後續信號轉導事件。關於 T 細胞之刺激，該刺激係指 T 細胞表面部分之接合，該接合在一實施例中隨後誘導信號轉導事件，諸如結合 TCR/CD3 複合物。此外，該刺激事件可活化細胞且上調或下調分子之表現或分泌，諸如下調 TGF-β。因此，細胞表面部分之接合即使在直接信號轉導事件不存在下亦可導致細胞骨架結構之重組，或導致細胞表面部分之聚結，其中每一者均可用於增強、修飾或改變後續細胞反應。

【0073】　如本文所用，術語「活化」係指在足以誘導可觀察到之生物化學或形態改變之細胞表面部分接合之後的細胞狀態。在 T 細胞之背景下，該活化係指已經充分刺激以誘導細胞增殖之 T 細胞狀態。T 細胞之活化亦可誘導細胞介素產生及調節或細胞溶解效應子功能之實施。在其他細胞之背景下，此術語推斷出特定物理化學過程之上調或下調。術語「經活化 T 細胞」指示 T 細胞目前正經歷細胞分裂、細胞介素產生、調節或細胞溶解效應子功能之實施，及/或最近已經歷「活化」過程。

【0074】　術語 T 細胞中之分子(例如，內源 TCR 或 CD4)的「下調」係指下調該分子之細胞表面表現，及/或干擾其信號轉導(例如，TCR、CD3、CD28 介導之信號轉導)、T 細胞活化及 T 細胞增殖。亦可涵蓋經由亦即細胞表面上之內化、剝離、加帽或其他的改變受體重排之形式來下調標靶受體。

【0075】　如本文所用，術語「功能性外源受體」係指在引入至 T 細胞或本文所述之表現 Nef 之 T 細胞中之後保留其生物活性的外源受體(諸如 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR、ACTR)、經工程改造 TCR (例如，傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、T 細胞抗原偶合物(TAC)或 TAC 樣嵌合受體)。生物活性包括但不限於該外源受體特異性結合於分子(例如，癌症抗原或針對 ACTR 之抗體)、適當地轉導下游信號(諸如誘導細胞增殖、細胞介素產

生及/或調節或細胞溶解效應子功能之實施)之能力。

【0076】　應理解，本文所述之本申請案之實施例包括「由實施例組成」及/或「基本上由實施例組成」。

【0077】　本文中對「約」值或參數之提及包括(且描述)有關彼值或參數本身之變化。例如，提及「約 X」之描述包括「X」之描述。

【0078】　如本文所用，對「非」值或參數之提及一般意謂且描述「除值或參數以外」。例如，該方法不用於治療類型 X 之癌症意謂該方法用於治療除 X 以外類型之癌症。

【0079】　本文所用之術語「約 X-Y」具有與「約 X 至約 Y」相同之含義。

【0080】　除非上下文另外清楚指示，否則如本文中及隨附申請專利範圍中所用，單數形式「一(a)」、「或(or)」及「該(the)」包括複數個指示物。

II. 表現 Nef 蛋白之經修飾 T 細胞

【0081】　本發明提供包含 Nef 之經修飾 T 細胞及產生該等經修飾 T 細胞之方法。在一些實施例中，該等 T 細胞進一步表現功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如，傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))。本申請案因此提供本文所述之共表現任一 Nef 蛋白(例如非天然存在之 Nef 蛋白，諸如突變型 SIV Nef)及視情況存在之任一功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))之經修飾 T 細胞。本文所述之 Nef 蛋白在一些實施例中為突變型 Nef，諸如任何本文所述之突變型 Nef 蛋白，例如突變型 SIV Nef。

【0082】　在一些實施例中，提供一種經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞)，其包含編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一

核酸，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR (例如，TCRα及/或 TCRβ)之下調。在一些實施例中，該下調包含下調內源 TCR 之細胞表面表現。在一些實施例中，內源 TCR 之細胞表面表現經下調達至少約 50%、60%、70%、80%、90%或 95%中任一者。在一些實施例中，內源 MHC、CD3ε、CD3γ及/或 CD3δ 之細胞表面表現由 Nef 蛋白下調達至少約 50%、60%、70%、80%、90%或 95%中任一者。在一些實施例中，該 Nef 蛋白不下調(例如，下調表現) CD3ζ，或下調 CD3ζ 達至多約 50%、40%、30%、20%、10%或 5%中任一者。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR、CD4 及 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 之細胞表面表現，但不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD4 之細胞表面表現，但不下調 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD28 之細胞表面表現，但不下調 CD4 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調內源 TCR 之細胞表面表現，但不下調(例如，下調細胞表面表現)外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))。在一些實施例中，該功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))由該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，

諸如突變型 SIV Nef)下調(例如，下調細胞表面表現)達至多約 50%、40%、30%、20%、10%或 5%中任一者。

【0083】　在一些實施例中，表現 Nef 之經修飾 T 細胞包含未經修飾內源 TCR 基因座。在一些實施例中，表現 Nef 之經修飾 T 細胞包含經修飾內源 TCR 基因座，諸如 TCRα 或 TCRβ。在一些實施例中，內源 TCR 基因座由選自 CRISPR-Cas、TALEN、shRNA 及 ZFN 之基因編輯系統修飾。在一些實施例中，內源 TCR 基因座由 CRISPR-Cas 系統修飾，該 CRISPR-Cas 系統包括包含核酸序列 SEQ ID NO: 23 之 gRNA。

【0084】　在一些實施例中，編碼該基因編輯系統之核酸及編碼該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸係在同一載體上。在一些實施例中，編碼該基因編輯系統之核酸及編碼該 Nef 蛋白之第一核酸係在不同載體上。

【0085】　在一些實施例中，該 Nef 蛋白係選自由 SIV Nef、HIV1 Nef、HIV2 Nef 及其同系物組成之群。在一些實施例中，該 Nef 蛋白為野生型 Nef。在一些實施例中，該 Nef 蛋白包含 SEQ ID NO: 12-17 中任一者之胺基酸序列。在一些實施例中，該 Nef 蛋白為突變型 Nef。在一些實施例中，該突變型 Nef 包含在肉豆蔻醯化位點、N 端 α-螺旋、基於酪胺酸之 AP 募集、CD4 結合位點、酸性簇、基於脯胺酸之重複序列、PAK 結合結構域、COP I 募集結構域、基於二-白胺酸之 AP 募集結構域、V-ATP 酶及 Raf-1 結合結構域或其任何組合中之一或多種突變，或在表 11 中列出的任何胺基酸殘基處之一或多種突變。在一些實施例中，該突變包含插入、缺失、點突變及/或重排。在一些實施例中，該突變型 Nef 包含 SEQ ID NO: 18-22 中任一者之胺基酸序列。在一些實施例中，該突變型 Nef 為突變型 SIV Nef，其包含在以下中之任一者之胺基酸殘基處之一或多種突變：(i) aa 2-4、aa 8-10、aa 11-13、aa 38-40、aa 44-46、aa 47-49、aa 50-52、aa 53-55、

aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 110-112、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、aa 178-179、179-181aa、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 191-193、aa 194-196、aa 203-205、aa 206-208、aa 212-214、aa 215-217、aa 218-220、aa 221-223、aa 8-13、aa 44-67、aa 107-112、aa 164-196、aa 203-208 或 aa 212-223；(ii) aa 2-4、aa 44-46、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 44-67、aa 164-169、aa 176-181、aa 185-190；(iii) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、178-179aa、aa 179-181、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67 或 aa 164-190；或(iv) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67、aa 164-169、aa 176-181 或 aa 185-190；其中該胺基酸殘基位置對應於野生型 SIV Nef 之彼位置。在一些實施例中，與野生型 Nef 蛋白相比，該突變型 Nef 降低對經修飾 T 細胞中之內源 CD4 及/或 CD28 的下調效應(例如，細胞表面表現之下調)。在一些實施例中，內源 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現之下調降低達至少約 50%、60%、70%、80%、90%或 95%中任一者。在一些實施例中，包含編碼 Nef 蛋白(例如，wt Nef 或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸的經修飾 T 細胞進一步包含編碼包含細胞外配位體結合結構域及視情況存在之細胞內信號傳導結構域之功能性外源受體之第二核酸。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之表現不下調(例如，下調細胞表面表現)功能性外源受體(例如經工程改造 TCR (例如傳

統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))。在一些實施例中，該功能性外源受體(例如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))由該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調(例如，下調細胞表面表現)達至多約 50%、40%、30%、20%、10%或 5%中任一者。在一些實施例中，該突變型 Nef (例如，突變型 SIV Nef)下調內源 TCR (例如，TCRα 及/或 TCRβ)之細胞表面表現。在一些實施例中，該突變型 Nef 蛋白(例如，突變型 SIV Nef)對內源 TCR (例如，TCRα 及/或 TCRβ)之細胞表面表現之下調與野生型 Nef 之彼下調相差不超過約 3% (諸如不超過約 2%或 1%中任一者)。在一些實施例中，該突變型 Nef 蛋白(例如，突變型 SIV Nef)對內源 TCR (例如，TCRα 及/或 TCRβ)之細胞表面表現之下調較野生型 Nef 之彼下調多至少約 3% (包括等於 3%；諸如至少約 3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或 95%中任一者)。在一些實施例中，該突變型 Nef 蛋白(例如，突變型 SIV Nef)不下調 CD4 之細胞表面表現。在一些實施例中，該突變型 Nef 蛋白(例如，突變型 SIV Nef)下調 CD4 之細胞表面表現。在一些實施例中，該突變型 Nef 蛋白(例如，突變型 SIV Nef)對 CD4 之細胞表面表現之下調較野生型 Nef 之彼下調少至少約 3% (諸如至少約 4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或 95%中任一者)。在一些實施例中，該突變型 Nef 蛋白(例如，突變型 SIV Nef)不下調 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該突變型 Nef 蛋白(例如，突變型 SIV Nef)下調 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該突變型 Nef 蛋白(例如，突變型 SIV Nef)對 CD28 之細胞表面表現之下調較野生型 Nef 之彼下調少至少約 3% (諸如至少約 4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、

50%、60%、70%、80%、90%或 95%中任一者)。在一些實施例中，該突變型 Nef 蛋白(例如，突變型 SIV Nef)對內源 TCR (例如，TCRα 及/或 TCRβ)之細胞表面表現之下調與野生型 Nef 之彼下調相差不超過約 3% (諸如不超過約 2%或 1%中任一者)(或對內源 TCR (例如，TCRα 及/或 TCRβ)之細胞表面表現之下調較野生型 Nef 之彼下調多至少約 3% (包括等於 3%；諸如至少約 3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或 95%中任一者))，且不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該突變型 Nef 蛋白(例如，突變型 SIV Nef)對內源 TCR (例如，TCRα 及/或 TCRβ)之細胞表面表現之下調與野生型 Nef 之彼下調相差不超過約 3% (諸如不超過約 2%或 1%中任一者)(或對內源 TCR (例如，TCRα 及/或 TCRβ)之細胞表面表現之下調較野生型 Nef 之彼下調多至少約 3% (包括等於 3%；諸如至少約 3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或 95%中任一者))，且對 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現之下調較野生型 Nef 之彼下調少至少約 3% (諸如至少約 4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或 95%中任一者)。在一些實施例中，該突變型 Nef 蛋白(例如突變型 SIV Nef)下調內源 TCR (例如，TCRα 及/或 TCRβ)之細胞表面表現，但不下調(例如，下調細胞表面表現)功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))。在一些實施例中，該突變型 Nef 蛋白(例如突變型 SIV Nef)下調內源 TCR (例如，TCRα 及/或 TCRβ)之細胞表面表現，且對功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))之細胞表面表現之下調與野生型 Nef 之彼下調相差至多約 3% (諸如至多約 2%或 1%

中任一者)。在一些實施例中，該突變型 Nef 蛋白(例如突變型 SIV Nef)下調內源 TCR (例如，TCRα 及/或 TCRβ)之細胞表面表現，且對功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))之細胞表面表現之下調較野生型 Nef 之彼下調少至少約 3% (諸如至少約 4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或 95%中任一者))。

【0086】　在一些實施例中，提供一種經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞)，其包含編碼 Nef 蛋白(例如，野生型 Nef 或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸，及編碼包含細胞外配位體結合結構域及視情況存在之細胞內信號傳導結構域之功能性外源受體之第二核酸，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，該功能性外源受體為經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))。在一些實施例中，該功能性外源受體為 T 細胞抗原偶合物(TAC)或 TAC 樣嵌合受體。在一些實施例中，該功能性外源受體為 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR)。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR、CD4 及 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 之細胞表面表現，但不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD4 之細胞表面表現，但不下調 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突

變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD28 之細胞表面表現，但不下調 CD4 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調內源 TCR 之細胞表面表現，但不下調(例如，下調細胞表面表現)外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))。在一些實施例中，該功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))由該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調(例如，下調細胞表面表現)達至多約 50%、40%、30%、20%、10%或 5%中任一者。

【0087】　在一些實施例中，提供一種經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞)，其包含編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸，及編碼包含以下之功能性嵌合 TCR (cTCR)之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)結合部分(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之連接體；(c)第一 TCR 次單元(例如，CD3ε)的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；(d)包含第二 TCR 次單元(例如，CD3ε)的跨膜結構域之跨膜結構域；及(e)包含第三 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞內信號傳導結構域之細胞內信號傳導結構域；其中該第一、第二及第三 TCR 次單元均係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群；且其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，該一或多個結合部分為抗體或其抗原結合片段。在一些實施例中，該第一、第二及第三 TCR 次單元為相同的(例如，均為 CD3ε)。在一些實施例中，該第一、第二及第三 TCR 次單元為不同的。在一些實施例中，該 cTCR 不

包含 TCR 次單元之細胞外結構域(或其一部分)(或任何 TCR 次單元之細胞外結構域)。在一些實施例中，提供一種經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞)，其包含編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸，及編碼包含以下之功能性嵌合 TCR (cTCR)之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)結合部分(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之連接體；及(c)全長 CD3ε (排除信號肽)；其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，該 cTCR 為包含胺基酸序列 SEQ ID NO: 64 之抗 CD20 cTCR。在一些實施例中，該 cTCR 進一步包含位於該細胞外配位體結合結構域之 C 端與該跨膜結構域之 N 端之間的鉸鏈結構域。在一些實施例中，該鉸鏈結構域係源於 CD8α。在一些實施例中，該 cTCR 進一步包含位於該 cTCR 之 N 端處的信號肽，諸如源於 CD8α 之信號肽。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR、CD4 及 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 之細胞表面表現，但不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD4 之細胞表面表現，但不下調 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD28 之細胞表面表現，但不下調 CD4 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調內源 TCR 之細胞表面表現，但不下調(例如，下調細胞表面表現) cTCR。

在一些實施例中，該功能性 cTCR 由該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調(例如，下調細胞表面表現)達至多約 50%、40%、30%、20%、10%或 5%中任一者。

【0088】　在一些實施例中，提供一種經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞)，其包含編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸，及編碼包含以下之功能性 T 細胞抗原偶合物(TAC)之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；(e)第一 TCR 輔受體(例如，CD4)的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；(f)包含第二 TCR 輔受體(例如，CD4)的跨膜結構域之跨膜結構域；及(g)包含第三 TCR 輔受體(例如，CD4)的細胞內信號傳導結構域之視情況存在之細胞內信號傳導結構域；其中該 TCR 次單元係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群；其中該第一、第二及第三 TCR 輔受體均係選自由 CD4、CD8 及 CD28 組成之群；且其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，該第一、第二及第三 TCR 輔受體為相同的。在一些實施例中，該第一、第二及第三 TCR 輔受體為不同的。在一些實施例中，該 TAC 不包含 TCR 輔受體之細胞外結構域(或其一部分)(或任何 TCR 輔受體之細胞外結構域)。在一些實施例中，提供一種經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞)，其包含編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸，及編碼包含以下之功能性 T 細胞抗原偶合物(TAC)之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞

外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；(e) CD4 之細胞外結構域或其一部分；(f) CD4 之跨膜結構域；及(g) CD4 之細胞內信號傳導結構域；其中該 TCR 次單元係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群；且其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，該 TAC 為包含胺基酸序列 SEQ ID NO: 66 之抗 CD20 TAC。在一些實施例中，該 TAC 進一步包含位於該細胞外配位體結合結構域之 C 端與該跨膜結構域之 N 端之間的鉸鏈結構域。在一些實施例中，該鉸鏈結構域係源於 CD8α。在一些實施例中，該 TAC 進一步包含位於該 TAC 之 N 端處的信號肽，諸如源於 CD8α 之信號肽。在一些實施例中，該細胞外配位體結合結構域係在細胞外 TCR 結合結構域之 N 端處。在一些實施例中，該細胞外配位體結合結構域係在細胞外 TCR 結合結構域之 C 端處。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR、CD4 及 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 之細胞表面表現，但不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD4 之細胞表面表現，但不下調 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD28 之細胞表面表現，但不下調 CD4 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調內源 TCR 之細胞表面表現，但不下調(例如，下調細胞表面表現) TAC。在一些實施例中，該功能性 TAC 由該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸

如突變型 SIV Nef)下調(例如，下調細胞表面表現)達至多約 50%、40%、30%、20%、10%或 5%中任一者。

【0089】　在一些實施例中，提供一種經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞)，其包含編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸，及編碼包含以下之功能性 TAC 樣嵌合受體之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別第一 TCR 次單元(例如，TCRα)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；(e)第二 TCR 次單元(例如，CD3ε)的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；(f)包含第三 TCR 次單元(例如，CD3ε)的跨膜結構域之跨膜結構域；及(g)包含第四 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞內信號傳導結構域之視情況存在之細胞內信號傳導結構域；其中該第一、第二、第三及第四 TCR 次單元均係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群；且其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，該第二、第三及第四 TCR 次單元為相同的。在一些實施例中，該第一、第二、第三及第四 TCR 次單元為相同的。在一些實施例中，該第一、第二、第三及第四 TCR 次單元為不同的。在一些實施例中，該第二、第三及第四 TCR 次單元為相同的，但不同於該第一 TCR 次單元。在一些實施例中，該細胞外配位體結合結構域係在細胞外 TCR 結合結構域之 N 端處。在一些實施例中，該細胞外配位體結合結構域係在細胞外 TCR 結合結構域之 C 端處。

在一些實施例中，提供一種經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞)，其包含編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸，及編碼包含以下之功能性 TAC 樣嵌合受體之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決

定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元(例如，TCRα)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；及(e)全長 CD3ε (排除信號肽)；其中該 TCR 次單元係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群；且其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，該 TAC 樣嵌合受體不包含 TCR 次單元之細胞外結構域(或其一部分)(或任何 TCR 次單元之細胞外結構域)。在一些實施例中，該 TAC 樣嵌合受體進一步包含位於該細胞外配位體結合結構域之 C 端與該跨膜結構域之 N 端之間的鉸鏈結構域。在一些實施例中，該鉸鏈結構域係源於 CD8α。在一些實施例中，該 TAC 樣嵌合受體進一步包含位於該 TAC 樣嵌合受體之 N 端處的信號肽，諸如源於 CD8α 之信號肽。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR、CD4 及 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 之細胞表面表現，但不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD4 之細胞表面表現，但不下調 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD28 之細胞表面表現，但不下調 CD4 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調內源 TCR 之細胞表面表現，但不下調(例如，下調細胞表面表現) TAC 樣嵌合受體。在一些實施例中，該功能性 TAC 樣嵌合受體由該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調(例如，下調細胞表面表現)達至多

約 50%、40%、30%、20%、10%或 5%中任一者。

【0090】　在一些實施例中，提供一種經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞)，其包含編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸，及編碼包含以下之功能性 CAR 之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)結合部分(例如，sdAb、scFv)；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR、CD4 及 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 之細胞表面表現，但不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD4 之細胞表面表現，但不下調 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD28 之細胞表面表現，但不下調 CD4 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調內源 TCR 之細胞表面表現，但不下調(例如，下調細胞表面表現) CAR。在一些實施例中，該 CAR 由該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調(例如，下調細胞表面表現)達至多約 50%、40%、30%、20%、10%或 5%中任一者。在一些實施例中，該一或多個結合部分為抗體或其抗原結合片段。在一些實施例中，該一或多個結合部分係選自由駱駝 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、

$(scFv)_2$、微型抗體、雙功能抗體、三功能抗體、四功能抗體、二硫化物穩定化 Fv 蛋白(dsFv)及單結構域抗體(sdAb、奈米抗體)組成之群。在一些實施例中，該一或多個結合部分為 sdAb (例如，抗 BCMA sdAb)。在一些實施例中，該細胞外配位體結合結構域包含連接在一起之兩個或更多個 sdAb。在一些實施例中，該一或多個結合部分為 scFv (例如，抗 CD19 scFv、抗 CD20 scFv 或 CD19×CD20 scFv)。在一些實施例中，該一或多個結合部分包含源於配位體之至少一個結構域或受體之細胞外結構域，其中該配位體或受體為細胞表面抗原。在一些實施例中，該配位體或受體係源於選自由 NKG2A、NKG2C、NKG2F、NKG2D、BCMA、APRIL、BAFF、IL-3、IL-13、LLT1、AICL、DNAM-1 及 NKp80 組成之群之分子。在一些實施例中，該配位體係源於 APRIL 或 BAFF。在一些實施例中，該受體係源於 Fc 結合結構域，諸如 Fc 受體之細胞外結構域。在一些實施例中，該 Fc 受體為 Fcγ 受體(FcγR)。在一些實施例中，該 FcγR 係選自由 CD16A (FcγRIIIa)、CD16B (FcγRIIIb)、CD64A、CD64B、CD64C、CD32A 及 CD32B 組成之群。在一些實施例中，該抗原係選自由間皮素、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、介白素-11 受體 a (IL-11Ra)、PSCA、PRSS21、VEGFR2、LewisY、CD24、血小板源性生長因子受體-β (PDGFR-β)、SSEA-4、CD20、葉酸鹽受體 α、ERBB2 (Her2/neu)、MUC1、表皮生長因子受體(EGFR)、NCAM、前列腺酶、PAP、ELF2M、Ephrin 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、葉酸鹽受體 β、TEM1/CD248、TEM7R、CLDN6、CLDN18.2、GPRC5D、CXORF61、CD97、CD179a、ALK、聚唾液酸、PLAC1、GloboH、NY-BR-1、UPK2、HAVCR1、ADRB3、PANX3、GPR20、LY6K、OR51E2、TARP、

WT1、NY-ESO-1、LAGE-1a、MAGE-A1、天冬醯胺內肽酶、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、前列腺特異蛋白、存活素及端粒酶、PCTA-1/半乳糖凝集素 8、MelanA/MART1、Ras 突變體、hTERT、肉瘤易位斷點、ML-IAP、ERG (TMPRSS2 ETS 融合基因)、NA17、PAX3、雄激素受體、週期蛋白 B1、MYCN、RhoC、TRP-2、CYP1B1、BORIS、SART3、PAX5、OY-TES1、LCK、AKAP-4、SSX2、RAGE-1、人類端粒酶逆轉錄酶、RU1、RU2、腸道羧酸酯酶、mut hsp70-2、CD79a、CD79b、CD72、LAIR1、FCAR、LILRA2、CD300LF、CLEC12A、BST2、EMR2、LY75、GPC3、FCRL5 及 IGLL1 及其任何組合組成之群。在一些實施例中，該抗原為 BCMA、CD19 或 CD20。

【0091】　在一些實施例中，提供一種經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞)，其包含編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸，及編碼包含以下之功能性 CAR 之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)抗 BCMA sdAb；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，該下調包含下調內源 TCR 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR、CD4 及 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 之細胞表面表現，但不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD4 之細胞表面表現，但不下調

CD28之細胞表面表現。在一些實施例中，該Nef蛋白(例如突變型Nef，諸如突變型SIV Nef)下調TCR及CD28之細胞表面表現，但不下調CD4之細胞表面表現。在一些實施例中，該Nef蛋白(例如wt Nef，或突變型Nef，諸如突變型SIV Nef)下調內源TCR之細胞表面表現，但不下調(例如，下調細胞表面表現)CAR。在一些實施例中，該CAR由該Nef蛋白(例如wt Nef，或突變型Nef，諸如突變型SIV Nef)下調(例如，下調細胞表面表現)達至多約50%、40%、30%、20%、10%或5%中任一者。

【0092】　在一些實施例中，提供一種經修飾T細胞(例如，同種異體T細胞)，其包含編碼Nef蛋白(例如wt Nef，或突變型Nef，諸如突變型SIV Nef)之第一核酸，及編碼包含以下之功能性CAR之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含一或多個(諸如1、2、3、4、5、6個或更多個中任一者)抗CD19 scFv；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾T細胞中的內源TCR之下調。在一些實施例中，提供一種經修飾T細胞(例如，同種異體T細胞)，其包含編碼Nef蛋白(例如wt Nef，或突變型Nef，諸如突變型SIV Nef)之第一核酸，及編碼包含以下之功能性CAR之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含一或多個(諸如1、2、3、4、5、6個或更多個中任一者)抗CD20 scFv；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域，其中該Nef蛋白在表現時導致該經修飾T細胞中的內源TCR之下調。在一些實施例中，提供一種經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞)，其包含編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸，及編碼包含以下之功能性 CAR 之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含直接地或間接地(例如，經由連接體)融合至抗 CD20 scFv 之抗 CD19 scFv；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源TCR之下調。在一些實施例中，該下調包含下調內源TCR之細胞表面表現。在

一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR、CD4 及 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 之細胞表面表現，但不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD4 之細胞表面表現，但不下調 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD28 之細胞表面表現，但不下調 CD4 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調內源 TCR 之細胞表面表現，但不下調(例如，下調細胞表面表現) CAR。在一些實施例中，該 CAR 由該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調(例如，下調細胞表面表現)達至多約 50%、40%、30%、20%、10%或 5%中任一者。

【0093】　在一些實施例中，內源 TCR 之細胞表面表現經下調達至少約 50%、60%、70%、80%、90%或 95%中任一者。在一些實施例中，內源 MHC、CD3ε、CD3γ 及/或 CD3δ 之細胞表面表現由該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調達至少約 50%、60%、70%、80%、90%或 95%中任一者。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)不下調(例如，下調表現) CD3ζ，或下調 CD3ζ 達至多約 50%、40%、30%、20%、10%或 5%中任一者。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之表現不下調(例如，下調細胞表面表現)功能性外源受體(例如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))。

在一些實施例中，該功能性外源受體(例如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))由該 Nef 蛋白下調(例如，下調細胞表面表現)達至多約 50%、40%、30%、20%、10%或 5%中任一者。

【0094】　在一些實施例中，表現 Nef (例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之經修飾 T 細胞包含未經修飾內源 TCR 基因座。在一些實施例中，表現 Nef 之經修飾 T 細胞包含經修飾內源 TCR 基因座，諸如 TCRα 或 TCRβ。在一些實施例中，內源 TCR 基因座由選自 CRISPR-Cas、TALEN 及 ZFN 之基因編輯系統修飾。在一些實施例中，內源 TCR 基因座由 CRISPR-Cas 系統修飾，該 CRISPR-Cas 系統包括包含核酸序列 SEQ ID NO: 23 之 gRNA。在一些實施例中，編碼該基因編輯系統之核酸及編碼該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸係在同一載體上。在一些實施例中，編碼該基因編輯系統之核酸及編碼該 Nef 蛋白之第一核酸係在不同載體上。

【0095】　在一些實施例中，該 Nef 蛋白係選自由 SIV Nef、HIV1 Nef、HIV2 Nef 及其同系物組成之群。在一些實施例中，該 Nef 蛋白為野生型 Nef。在一些實施例中，該 Nef 蛋白包含 SEQ ID NO: 12-17 中任一者之胺基酸序列。在一些實施例中，該 Nef 蛋白為突變型 Nef。在一些實施例中，該突變型 Nef 包含在肉豆蔻醯化位點、N 端 α-螺旋、基於酪胺酸之 AP 募集、CD4 結合位點、酸性簇、基於脯胺酸之重複序列、PAK 結合結構域、COP I 募集結構域、基於二-白胺酸之 AP 募集結構域、V-ATP 酶及 Raf-1 結合結構域或其任何組合中之一或多種突變，或在表 11 中列出的任何胺基酸殘基處之一或多種突變。在一些實施例中，該一或多種突變包含插入、缺失、點突變及/或重排。在一些實施例中，該突變型 Nef 蛋白為突變型 SIV Nef 蛋白。在一些實施例中，該突變型 Nef 包含 SEQ ID NO: 18-22 中任一者之胺基酸序列。在一些實施例中，該突變型 Nef 為突變型

SIV Nef，其包含在以下中之任一者之胺基酸殘基處之一或多種突變：(i) aa 2-4、aa 8-10、aa 11-13、aa 38-40、aa 44-46、aa 47-49、aa 50-52、aa 53-55、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 110-112、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、aa 178-179、179-181aa、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 191-193、aa 194-196、aa 203-205、aa 206-208、aa 212-214、aa 215-217、aa 218-220、aa 221-223、aa 8-13、aa 44-67、aa 107-112、aa 164-196、aa 203-208 或 aa 212-223；(ii) aa 2-4、aa 44-46、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 44-67、aa 164-169、aa 176-181、aa 185-190；(iii) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、178-179aa、aa 179-181、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67 或 aa 164-190；或(iv) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67、aa 164-169、aa 176-181 或 aa 185-190；其中該胺基酸殘基位置對應於野生型 SIV Nef之彼位置。在一些實施例中，與野生型 Nef 蛋白相比，該突變型 Nef 降低對經修飾 T 細胞中之內源 CD4 及/或 CD28 的下調效應(例如，細胞表面表現之下調)。在一些實施例中，內源 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現之下調降低達至少約 50%、60%、70%、80%、90%或 95%中任一者。在一些實施例中，該突變型 Nef (例如，突變型 SIV Nef)下調內源 TCR (例如，TCRα 及/或 TCRβ)之細胞表面表現。在一些實施例中，該突變型 Nef 蛋白(例如，突變型 SIV Nef)對內源 TCR (例如，TCRα 及/或 TCRβ)之細胞表面表現之下調與野生型 Nef之彼

下調相差不超過約 3% (諸如不超過約 2%或 1%中任一者)。在一些實施例中，該突變型 Nef 蛋白(例如，突變型 SIV Nef)對內源 TCR (例如，TCRα 及/或 TCRβ)之細胞表面表現之下調較野生型 Nef 之彼下調多至少約 3% (包括等於 3%；諸如至少約 3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或 95%中任一者)。在一些實施例中，該突變型 Nef 蛋白(例如，突變型 SIV Nef)不下調 CD4 之細胞表面表現。在一些實施例中，該突變型 Nef 蛋白(例如，突變型 SIV Nef)下調 CD4 之細胞表面表現。在一些實施例中，該突變型 Nef 蛋白(例如，突變型 SIV Nef)對 CD4 之細胞表面表現之下調較野生型 Nef 之彼下調少至少約 3% (諸如至少約 4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或 95%中任一者)。在一些實施例中，該突變型 Nef 蛋白(例如，突變型 SIV Nef)不下調 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該突變型 Nef 蛋白(例如，突變型 SIV Nef)下調 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該突變型 Nef 蛋白(例如，突變型 SIV Nef)對 CD28 之細胞表面表現之下調較野生型 Nef 之彼下調少至少約 3% (諸如至少約 4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或 95%中任一者)。在一些實施例中，該突變型 Nef 蛋白(例如，突變型 SIV Nef)對內源 TCR (例如，TCRα 及/或 TCRβ)之細胞表面表現之下調與野生型 Nef 之彼下調相差不超過約 3% (諸如不超過約 2%或 1%中任一者)(或對內源 TCR (例如，TCRα 及/或 TCRβ)之細胞表面表現之下調較野生型 Nef 之彼下調多至少約 3% (包括等於 3%；諸如至少約 3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或 95%中任一者))，且不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該突變型 Nef 蛋白(例如，突變型 SIV Nef)對內源 TCR (例如，TCRα 及/或 TCRβ)之細胞表面表現之下調與野生型 Nef 之彼下調相差不超過約 3% (諸如不超過約 2%或 1%中任一者)(或對內源 TCR

(例如，TCRα 及/或 TCRβ)之細胞表面表現之下調較野生型 Nef 之彼下調多至少約 3% (包括等於 3%；諸如至少約 3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或 95%中任一者))，且對 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現之下調較野生型 Nef 之彼下調少至少約 3% (諸如至少約 4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或 95%中任一者)。在一些實施例中，該突變型 Nef 蛋白(例如突變型 SIV Nef)下調內源 TCR (例如，TCRα 及/或 TCRβ)之細胞表面表現，但不下調(例如，下調細胞表面表現)功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))。在一些實施例中，該突變型 Nef 蛋白(例如突變型 SIV Nef)下調內源 TCR (例如，TCRα 及/或 TCRβ)之細胞表面表現，且對功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))之細胞表面表現之下調與野生型 Nef 之彼下調相差至多約 3% (諸如至多約 2%或 1%中任一者)。在一些實施例中，該突變型 Nef 蛋白(例如突變型 SIV Nef)下調內源 TCR (例如，TCRα 及/或 TCRβ)之細胞表面表現，且對功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))之細胞表面表現之下調較野生型 Nef 之彼下調少至少約 3% (諸如至少約 4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或 95%中任一者))。

【0096】　在一些實施例中，該 Nef 蛋白係在表 11 中所述之任何胺基酸突變位點處包含胺基酸突變(諸如胺基酸取代，例如突變為一或多個 Ala，諸如使 1、2、3、4、5、6、7、8、9 及 10 個胺基酸殘基中之任一者突變為 Ala)之突變型 SIV

Nef。在一些實施例中，該突變型 SIV Nef 在如表 11 中所述屬於同一組之多達任何 2、3、4、5、6、7、8、9 及 10 個胺基酸突變位點處包含突變(例如突變為一或多個 Ala，諸如使 1、2、3、4、5、6、7、8、9 及 10 個胺基酸殘基中之任一者突變為 Ala)。在一些實施例中，該突變(例如突變為一或多個 Ala，諸如使 1、2、3、4、5、6、7、8、9 及 10 個胺基酸殘基中之任一者突變為 Ala)僅在表 11 中所述之一個胺基酸突變位點內。在一些實施例中，該突變(例如突變為一或多個 Ala，諸如使 1、2、3、4、5、6、7、8、9 及 10 個胺基酸殘基中之任一者突變為 Ala)在如表 11 中所述屬於同一組之兩個或更多個胺基酸突變位點內。在一些實施例中，該突變在兩個或更多個連續胺基酸突變位點內，其中該兩個或更多個胺基酸突變位點係如表 11 中所述屬於同一組(例如，第 3 組之 aa 185-187 及 aa 188-190 中的突變)。在一些實施例中，該突變係使該一或多個胺基酸突變位點內之所有胺基酸殘基突變(例如，均突變為 Ala)，其中該等胺基酸突變位點係如表 11 中所述屬於同一組(例如，使第 3 組之 aa 185-187 及 aa 188-190 中的所有殘基突變為 Ala)。在一些實施例中，該突變係使來自第一胺基酸突變位點之一個胺基酸殘基突變(例如，突變為 Ala)，且使來自第二胺基酸突變位點之另一胺基酸殘基突變(例如，突變為 Ala)，其中該兩個胺基酸突變位點係如表 11 中所述屬於同一組。在一些實施例中，該等突變為鄰近的，亦即，至少 2 個突變位點彼此接近(例如，突變殘基係在 aa 8-10 及 aa 11-13 處)。在一些實施例中，該等突變為非鄰近的，亦即，無突變位點彼此接近(例如，突變殘基係在 aa 8-10 及 aa 44-46 處)。

【0097】 在一些實施例中，該 Nef 蛋白為突變型 SIV Nef，其下調內源 TCR (例如，TCRα 及/或 TCRβ)細胞表面表現。在一些實施例中，該突變型 Nef 蛋白(例如，突變型 SIV Nef)對內源 TCR (例如，TCRα 及/或 TCRβ)之細胞表面表現之下調與野生型 Nef 之彼下調相差不超過約 3% (諸如不超過約 2%或 1%中任一者)。在一些實施例中，該突變型 Nef 蛋白(例如，突變型 SIV Nef)對內源 TCR (例

如，TCRα 及/或 TCRβ)之細胞表面表現之下調較野生型 Nef 之彼下調多至少約 3% (包括等於 3%；諸如至少約 3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或 95%中任一者)。例如，在一些實施例中，該 Nef 蛋白為突變型 SIV Nef，其在以下中之任一者之胺基酸殘基處包含一或多種(諸如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 種中任一者，或多達 2、3、4、5、6、7、8、9、10 種或更多種中任一者)胺基酸突變(諸如胺基酸取代，例如突變為 Ala)：aa 2-4、aa 8-10、aa 11-13 (例如，aa 8-13)、aa 38-40、aa 44-46、aa 47-49、aa 50-52、aa 53-55、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67 (例如，aa 44-67)、aa 98-100、aa 107-109、aa 110-112 (例如，aa 107-112)、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、aa 178-179、179-181aa、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 191-193、aa 194-196 (例如，aa 164-196)、aa 203-205、aa 206-208 (例如，aa 203-208)、aa 212-214、aa 215-217、aa 218-220、aa 221-223 (例如，aa 212-223)，其中該胺基酸殘基位置對應於野生型 SIV Nef 之彼位置。在一些實施例中，該等突變(例如突變為一或多個 Ala，諸如使 1、2、3、4、5、6、7、8、9 及 10 個胺基酸殘基中之任一者突變為 Ala)係在多達任何 2、3、4、5、6、7、8、9 及 10 個胺基酸突變位點處(例如，突變殘基係在 aa 8-10 及 aa 44-46 處)。在一些實施例中，該突變(例如突變為一或多個 Ala，諸如使 1、2、3、4、5、6、7、8、9 及 10 個胺基酸殘基中之任一者突變為 Ala)僅在一個胺基酸突變位點內(例如，僅在 aa 8-10 內)。在一些實施例中，該突變(例如突變為一或多個 Ala，諸如使 1、2、3、4、5、6、7、8、9 及 10 個胺基酸殘基中之任一者突變為 Ala)在兩個或更多個胺基酸突變位點內。在一些實施例中，該等突變為鄰近的，亦即，至少兩個胺基酸突變位點彼此相鄰(例如，突變殘基係在 aa 8-10 及 aa 11-13 處)。在一些實施例中，該等突變為非鄰近的，亦即，胺基酸突變位點均不彼此接近(例如，突變殘基係在 aa 8-10 及 aa 44-46 處)。

在一些實施例中，該突變係使該一或多個胺基酸突變位點內之所有胺基酸殘基突變(例如，均突變為 Ala)。在一些實施例中，該突變係使來自第一胺基酸突變位點之一個胺基酸殘基突變(例如，突變為 Ala)，且使來自第二胺基酸突變位點之另一胺基酸殘基突變(例如，突變為 Ala)。

【0098】 在一些實施例中，該 Nef 蛋白為突變型 SIV Nef，其下調內源 TCR (例如，TCRα 及/或 TCRβ)及 CD4 細胞表面表現，其中該突變型 SIV Nef 對內源 TCR (例如，TCRα 及/或 TCRβ)細胞表面表現之下調不同於(小於或超過)野生型 SIV Nef 之彼下調，相差不超過約 3% (諸如不超過約 2%或 1%中任一者)且其中由該突變型 SIV Nef 對 CD4 細胞表面表現之下調小於野生型 SIV Nef 之彼下調，相差至少約 3% (諸如至少約 4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或 95%中任一者)。在一些實施例中，該突變型 Nef 蛋白(例如，突變型 SIV Nef)對內源 TCR (例如，TCRα 及/或 TCRβ)之細胞表面表現之下調較野生型 Nef 之彼下調多至少約 3% (包括等於 3%；諸如至少約 3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或 95%中任一者)，且對 CD4 之細胞表面表現之下調較野生型 Nef 之彼下調少至少約 3% (諸如至少約 4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或 95%中任一者)。在一些實施例中，該突變型 SIV Nef 下調 TCRαβ 細胞表面表現，但不下調 CD4 細胞表面表現。例如，在一些實施例中，該 Nef 蛋白為突變型 SIV Nef，其在以下中之任一者之胺基酸殘基處包含一或多種(諸如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 種中任一者，或多達 2、3、4、5、6、7、8、9、10 種或更多種中任一者)胺基酸突變(諸如胺基酸取代，例如突變為 Ala)：aa 2-4、aa 44-46、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67 (例如，aa 44-67)、aa 98-100、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169 (例如，aa 164-169)、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181

(例如，aa 176-181)、aa 185-187、aa 188-190 (例如，aa 185-190)、aa 194-196、aa 203-205，其中該胺基酸殘基位置對應於野生型 SIV Nef 之彼位置。在一些實施例中，該等突變(例如突變為一或多個 Ala，諸如使 1、2、3、4、5、6、7、8、9 及 10 個胺基酸殘基中之任一者突變為 Ala)係在多達任何 2、3、4、5、6、7、8、9 及 10 個胺基酸突變位點處(例如，突變殘基係在 aa 2-4 及 aa 44-46 處)。在一些實施例中，該突變(例如突變為一或多個 Ala，諸如使 1、2、3、4、5、6、7、8、9 及 10 個胺基酸殘基中之任一者突變為 Ala)僅在一個胺基酸突變位點內(例如，僅在 aa 2-4 內)。在一些實施例中，該突變(例如突變為一或多個 Ala，諸如使 1、2、3、4、5、6、7、8、9 及 10 個胺基酸殘基中之任一者突變為 Ala)在兩個或更多個胺基酸突變位點內。在一些實施例中，該等突變為鄰近的，亦即，至少兩個胺基酸突變位點彼此相鄰(例如，突變殘基係在 aa 62-64 及 aa 65-67 處)。在一些實施例中，該等突變為非鄰近的，亦即，胺基酸突變位點均不彼此接近(例如，突變殘基係在 aa 2-4 及 aa 44-46 處)。在一些實施例中，該突變係使該一或多個胺基酸突變位點內之所有胺基酸殘基突變(例如，均突變為 Ala)。在一些實施例中，該突變係使來自第一胺基酸突變位點之一個胺基酸殘基突變(例如，突變為 Ala)，且使來自第二胺基酸突變位點之另一胺基酸殘基突變(例如，突變為 Ala)。

【0099】　在一些實施例中，該 Nef 蛋白為突變型 SIV Nef，其下調內源 TCR (例如，TCRα 及/或 TCRβ)及 CD28 細胞表面表現，其中該突變型 SIV Nef 對內源 TCR (例如，TCRα 及/或 TCRβ)細胞表面表現之下調不同於(小於或超過)野生型 SIV Nef 之彼下調，相差不超過約 3% (諸如不超過約 2%或 1%中任一者)，且其中該突變型 SIV Nef 對 CD28 細胞表面表現之下調小於野生型 SIV Nef 之彼下調，相差至少約 3% (諸如至少約 4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或 95%中任一者)。在一些實施例中，該突變型 Nef 蛋白(例如，突變型 SIV Nef)對內源 TCR (例如，TCRα 及/或 TCRβ)

之細胞表面表現之下調較野生型 Nef 之彼下調多至少約 3% (包括等於 3%；諸如至少約 3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或 95%中任一者)，且對 CD28 之細胞表面表現之下調較野生型 Nef 之彼下調少至少約 3% (諸如至少約 4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或 95%中任一者)。在一些實施例中，該突變型 SIV Nef 下調 TCRαβ 細胞表面表現，但不下調 CD28 細胞表面表現。例如，在一些實施例中，該 Nef 蛋白為突變型 SIV Nef，其在以下中之任一者之胺基酸殘基處包含一或多種(諸如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 種中任一者，或多達 2、3、4、5、6、7、8、9、10 種或更多種中任一者)胺基酸突變(諸如胺基酸取代，例如突變為 Ala)：aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67 (例如，aa 56-67)、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、178-179aa、aa 179-181、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190 (例如，aa 164-190)、aa 194-196、aa 203-205，其中該胺基酸殘基位置對應於野生型 SIV Nef 之彼位置。在一些實施例中，該等突變(例如突變為一或多個 Ala，諸如使 1、2、3、4、5、6、7、8、9 及 10 個胺基酸殘基中之任一者突變為 Ala)係在多達任何 2、3、4、5、6、7、8、9 及 10 個胺基酸突變位點處(例如，突變殘基係在 aa 2-4 及 aa 56-58 處)。在一些實施例中，該突變(例如突變為一或多個 Ala，諸如使 1、2、3、4、5、6、7、8、9 及 10 個胺基酸殘基中之任一者突變為 Ala)僅在一個胺基酸突變位點內(例如，僅在 aa 2-4 內)。在一些實施例中，該突變(例如突變為一或多個 Ala，諸如使 1、2、3、4、5、6、7、8、9 及 10 個胺基酸殘基中之任一者突變為 Ala)在兩個或更多個胺基酸突變位點內。在一些實施例中，該等突變為鄰近的，亦即，至少兩個胺基酸突變位點彼此相鄰(例如，突變殘基係在 aa 62-64 及 aa 65-67 處)。在一些實施例中，該等突變為非鄰近的，亦即，胺基酸突變位點均不彼此接近(例如，突變殘基係在 aa

2-4 及 aa 62-64 處)。在一些實施例中，該突變係使該一或多個胺基酸突變位點內之所有胺基酸殘基突變(例如，均突變為 Ala)。在一些實施例中，該突變係使來自第一胺基酸突變位點之一個胺基酸殘基突變(例如，突變為 Ala)，且使來自第二胺基酸突變位點之另一胺基酸殘基突變(例如，突變為 Ala)。

【0100】　在一些實施例中，該 Nef 蛋白為突變型 SIV Nef，其下調內源 TCR (例如，TCRα 及/或 TCRβ)、CD4 及 CD28 細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白為突變型 SIV Nef，其下調內源 TCR (例如，TCRα 及/或 TCRβ)、CD4 及 CD28 細胞表面表現，其中該突變型 SIV Nef 對內源 TCR (例如，TCRα 及/或 TCRβ)細胞表面表現之下調不同於(小於或超過)野生型 SIV Nef 之彼下調，相差不超過約 3% (諸如不超過約 2%或 1%中任一者)，且其中該突變型 SIV Nef 對 CD4 及 CD28 細胞表面表現之下調小於野生型 SIV Nef 之彼下調，相差至少約 3% (諸如至少約 4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或 95%中任一者)。在一些實施例中，該突變型 Nef 蛋白(例如，突變型 SIV Nef)對內源 TCR (例如，TCRα 及/或 TCRβ)之細胞表面表現之下調較野生型 Nef 之彼下調多至少約 3% (包括等於 3%；諸如至少約 3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或 95%中任一者)，且對 CD4 及 CD28 之細胞表面表現之下調較野生型 Nef 之彼下調少至少約 3% (諸如至少約 4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或 95%中任一者)。例如，在一些實施例中，該 Nef 蛋白為突變型 SIV Nef，其在以下中之任一者之胺基酸殘基處包含一或多種(諸如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 種中任一者，或多達 2、3、4、5、6、7、8、9、10 種或更多種中任一者)胺基酸突變(諸如胺基酸取代，例如突變為 Ala)：aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67 (例如，aa 56-67)、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169 (例如，aa 164-169)、

aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181 (例如，aa 176-181)、aa 185-187、aa 188-190 (例如，aa 185-190)、aa 194-196、aa 203-205，其中該胺基酸殘基位置對應於野生型 SIV Nef 之彼位置。在一些實施例中，該等突變(例如突變為一或多個 Ala，諸如使 1、2、3、4、5、6、7、8、9 及 10 個胺基酸殘基中之任一者突變為 Ala)係在多達任何 2、3、4、5、6、7、8、9 及 10 個胺基酸突變位點處(例如，突變殘基係在 aa 2-4 及 aa 56-58 處)。在一些實施例中，該突變(例如突變為一或多個 Ala，諸如使 1、2、3、4、5、6、7、8、9 及 10 個胺基酸殘基中之任一者突變為 Ala)僅在一個胺基酸突變位點內(例如，僅在 aa 2-4 內)。在一些實施例中，該突變(例如突變為一或多個 Ala，諸如使 1、2、3、4、5、6、7、8、9 及 10 個胺基酸殘基中之任一者突變為 Ala)在兩個或更多個胺基酸突變位點內。在一些實施例中，該等突變為鄰近的，亦即，至少兩個胺基酸突變位點彼此相鄰(例如，突變殘基係在 aa 62-64 及 aa 65-67 處)。在一些實施例中，該等突變為非鄰近的，亦即，胺基酸突變位點均不彼此接近(例如，突變殘基係在 aa 2-4 及 aa 65-67 處)。在一些實施例中，該突變係使該一或多個胺基酸突變位點內之所有胺基酸殘基突變(例如，均突變為 Ala)。在一些實施例中，該突變係使來自第一胺基酸突變位點之一個胺基酸殘基突變(例如，突變為 Ala)，且使來自第二胺基酸突變位點之另一胺基酸殘基突變(例如，突變為 Ala)。

【0101】　在一些實施例中，該 Nef 蛋白為突變型 SIV Nef，其對 TCRαβ 細胞表面表現之下調多於(諸如多至少約 3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或 95%中任一者)野生型 SIV Nef，但與野生型 SIV Nef 相比，對 CD4 及 CD28 細胞表面表現之下調更少(諸如少至少約 3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或 95%中任一者)。例如，在一些實施例中，該 Nef 蛋白為突變型 SIV Nef，其在胺基酸殘基 178-179aa 處包含一個兩個胺基酸突變(諸如胺基酸

取代，例如使一或兩個 aa 突變為 Ala)，其中該胺基酸殘基位置對應於野生型 SIV Nef 之彼位置。在一些實施例中，該突變型 SIV Nef 包含胺基酸序列 SEQ ID NO: 18。

【0102】　在一些實施例中，該第一核酸及該第二核酸係在不同的載體上。在一些實施例中，該第一核酸及該第二核酸係在同一載體上。在一些實施例中，該第一核酸及該第二核酸可操作性連接至同一啟動子。在一些實施例中，該第一核酸及該第二核酸可操作性連接至不同啟動子。在一些實施例中，該啟動子係選自由勞氏肉瘤病毒(RSV)啟動子、猿病毒 40 (SV40)啟動子、細胞巨大病毒即刻早期基因啟動子(CMV IE)、延伸因子 1 α 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、細胞巨大病毒增強子/雞 β-肌動蛋白(CAG)啟動子、多瘤增強子/單純疱疹胸苷激酶(MC1)啟動子、β 肌動蛋白(β-ACT)啟動子、「骨髓增殖性肉瘤病毒增強子，陰性對照區缺失，d1587rev 引子-結合位點經取代(MND)」啟動子、NFAT 啟動子、TETON®啟動子及 NFκB 啟動子組成之群。在一些實施例中，該啟動子為 EF1-α 或 PGK。在一些實施例中，該第一核酸係在該第二核酸上游。在一些實施例中，該第一核酸係在該第二核酸下游。在一些實施例中，該第一核酸及該第二核酸經由連接序列連接。在一些實施例中，該連接序列包含編碼 P2A、T2A、E2A、F2A、BmCPV 2A、BmIFV 2A、$(GS)_n$、$(GSGGS)_n$、$(GGGS)_n$、$(GGGGS)_n$ 之核酸序列或 IRES、SV40、CMV、UBC、EF1α、PGK、CAGG 之核酸序列或其任何組合中任一者，其中 n 係至少為 1 之整數。

【0103】　在一些實施例中，該載體為病毒載體。在一些實施例中，該病毒載體係選自由腺病毒載體、腺相關病毒載體、逆轉錄病毒載體、慢病毒載體、單純疱疹病毒載體及其衍生物組成之群。在一些實施例中，該載體為非病毒載體，諸如游離型表現載體、增強游離型載體(EEV)、PiggyBac 轉座酶載體或睡美人(SB)轉座子系統。

【0104】　在一些實施例中，如與藉由自產生經修飾 T 細胞之前驅體 T 細胞之供體分離的原代 T 細胞引發之 GvHD 反應相比，表現 Nef 之該經修飾 T 細胞在組織不相容性個體中不引發或引發降低之 GvHD 反應。

【0105】　在一些實施例中，提供一種經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞)，其包含編碼 Nef 蛋白(例如，wt Nef 或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸，及編碼包含細胞外配位體結合結構域及視情況存在之細胞內信號傳導結構域之功能性外源受體之第二核酸，其中該第一核酸及該第二核酸係在同一載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)上，且其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，該功能性外源受體為經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))。在一些實施例中，該功能性外源受體為 TAC 或 TAC 樣嵌合受體。在一些實施例中，該功能性外源受體為 CAR (例如，抗-抗原 CAR、基於配位體/受體之 CAR、ACTR)。在一些實施例中，該功能性外源受體為單價及單特異性的。在一些實施例中，該功能性外源受體為多價及單特異性的。在一些實施例中，該功能性外源受體為多價及多特異性的。在一些實施例中，提供一種經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞)，其包含編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸，及編碼包含以下之功能性 CAR 之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)結合部分(例如，sdAb、scFv)；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域，其中該第一核酸及該第二核酸係在同一載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)上，且其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，提供一種經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞)，其包含編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸，及編碼包含以下之功能性 CAR 之第二核酸：(a)細胞外配位體

結合結構域，其包含一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)抗 BCMA sdAb；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域，其中該第一核酸及該第二核酸係在同一載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)上，且其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，提供一種經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞)，其包含編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸，及編碼包含以下之功能性嵌合 TCR (cTCR)之第二核酸：細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之連接體；(c)第一 TCR 次單元(例如，CD3ε)的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；(d)包含第二 TCR 次單元(例如，CD3ε)的跨膜結構域之跨膜結構域；及(e)包含第三 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞內信號傳導結構域之細胞內信號傳導結構域；其中該第一、第二及第三 TCR 次單元均係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群；其中該第一核酸及該第二核酸係在同一載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)上，且其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，該第一、第二及第三 TCR 次單元為相同的(例如，均為 CD3ε)。在一些實施例中，該第一、第二及第三 TCR 次單元為不同的。在一些實施例中，提供一種經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞)，其包含編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸，及編碼包含以下之功能性嵌合 TCR (cTCR)之第二核酸：細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之連接體；及(c)全長 CD3ε (排除信號肽)；其中該第一、第二及第三 TCR 次單元均係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群；其中該第一核酸及該第二核酸係在同一載體(例如病毒

載體，諸如慢病毒載體)上，且其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，該 cTCR 為包含胺基酸序列 SEQ ID NO: 64 之抗 CD20 cTCR。在一些實施例中，提供一種經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞)，其包含編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸，及編碼包含以下之功能性 T 細胞抗原偶合物(TAC)之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；(e)第一 TCR 輔受體(例如，CD4)的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；(f)包含第二 TCR 輔受體(例如，CD4)的跨膜結構域之跨膜結構域；及(g)包含第三 TCR 輔受體(例如，CD4)的細胞內信號傳導結構域之視情況存在之細胞內信號傳導結構域；其中該 TCR 次單元係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群；其中該第一、第二及第三 TCR 輔受體均係選自由 CD4、CD8 及 CD28 組成之群；其中該第一核酸及該第二核酸係在同一載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)上，且其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，該第一、第二及第三 TCR 輔受體為相同的。在一些實施例中，該第一、第二及第三 TCR 輔受體為不同的。在一些實施例中，提供一種經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞)，其包含編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸，及編碼包含以下之功能性 T 細胞抗原偶合物(TAC)之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接

體；(e) CD4 之細胞外結構域或其一部分；(f) CD4 之跨膜結構域；及(g) CD4 之細胞內信號傳導結構域；其中該 TCR 次單元係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群；其中該第一核酸及該第二核酸係在同一載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)上，且其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，該 TAC 為包含胺基酸序列 SEQ ID NO: 66 之抗 CD20 TAC。在一些實施例中，提供一種經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞)，其包含編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸，及編碼包含以下之功能性 TAC 樣嵌合受體之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別第一 TCR 次單元(例如，TCRα)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；(e)第二 TCR 次單元(例如，CD3ε)的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；(f)包含第三 TCR 次單元(例如，CD3ε)的跨膜結構域之跨膜結構域；及(g)包含第四 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞內信號傳導結構域之視情況存在之細胞內信號傳導結構域；其中該第一、第二、第三及第四 TCR 次單元均係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群；其中該第一核酸及該第二核酸係在同一載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)上，且其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，提供一種經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞)，其包含編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸，及編碼包含以下之功能性 TAC 樣嵌合受體之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識

別 TCR 次單元(例如，TCRα)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；及(e)全長 CD3ε (排除信號肽)；其中該 TCR 次單元係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群；其中該第一核酸及該第二核酸係在同一載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)上，且其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，表現 Nef 之經修飾 T 細胞包含未經修飾內源 TCR 基因座。在一些實施例中，表現 Nef 之經修飾 T 細胞包含經修飾內源 TCR 基因座，諸如 TCRα 或 TCRβ。在一些實施例中，編碼該基因編輯系統之核酸及編碼該 Nef 蛋白之第一核酸係在同一載體上。在一些實施例中，該 Nef 蛋白係選自由 SIV Nef、HIV1 Nef、HIV2 Nef 及其同系物組成之群。在一些實施例中，該 Nef 蛋白為野生型 Nef。在一些實施例中，該 Nef 蛋白包含 SEQ ID NO: 12-17 中任一者之胺基酸序列。在一些實施例中，該 Nef 蛋白為突變型 Nef。在一些實施例中，該突變型 Nef 包含 SEQ ID NO: 18-22 中任一者之胺基酸序列。在一些實施例中，該突變型 Nef 為突變型 SIV Nef，其包含在表 11 中所列出之任何胺基酸殘基處之一或多種突變。在一些實施例中，該突變型 Nef 為突變型 SIV Nef，其包含在以下中之任一者之胺基酸殘基處之一或多種突變：(i) aa 2-4、aa 8-10、aa 11-13、aa 38-40、aa 44-46、aa 47-49、aa 50-52、aa 53-55、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 110-112、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、aa 178-179、179-181aa、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 191-193、aa 194-196、aa 203-205、aa 206-208、aa 212-214、aa 215-217、aa 218-220、aa 221-223、aa 8-13、aa 44-67、aa 107-112、aa 164-196、aa 203-208 或 aa 212-223；(ii) aa 2-4、aa 44-46、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 44-67、aa 164-169、

aa 176-181、aa 185-190；(iii) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、178-179aa、aa 179-181、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67 或 aa 164-190；或(iv) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67、aa 164-169、aa 176-181 或 aa 185-190；其中該胺基酸殘基位置對應於野生型 SIV Nef 之彼位置。在一些實施例中，該第一核酸及該第二核酸可操作性連接至同一啟動子。在一些實施例中，該第一核酸係在該第二核酸上游。在一些實施例中，該第一核酸係在該第二核酸下游。在一些實施例中，該載體為病毒載體。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如野生型 Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如野生型 Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR、CD4 及 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 之細胞表面表現，但不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD4 之細胞表面表現，但不下調 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD28 之細胞表面表現，但不下調 CD4 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如野生型 Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調內源 TCR 之細胞表面表現，但不下調(例如，下調細胞表面表現)功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體

/受體之 CAR 或 ACTR))。在一些實施例中，該功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))由該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調(例如，下調細胞表面表現)達至多約 50%、40%、30%、20%、10%或 5%中任一者。

【0106】　在一些實施例中，提供一種包含載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)之經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞)，該載體自上游至下游：第一啟動子(例如，EF1-α)、編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸、第二啟動子(例如，PGK)及編碼包含細胞外配位體結合結構域及視情況存在之細胞內信號傳導結構域的功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))之第二核酸，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，提供一種包含載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)之經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞)，該載體自上游至下游：第一啟動子(例如，EF1-α)、編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸、第二啟動子(例如，PGK)及編碼包含以下之功能性 CAR 之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)結合部分(例如，sdAb、scFv)；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，提供一種包含載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)之經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞)，該載體自上游至下游：第一啟動子(例如，EF1-α)、編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸、第二啟動子(例如，PGK)及編碼包含以

下之功能性 CAR 之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)抗 BCMA sdAb；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，提供一種包含載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)之經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞)，該載體自上游至下游：第一啟動子(例如，EF1-α)、編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸、第二啟動子(例如，PGK)及編碼包含以下之功能性嵌合 TCR (cTCR)之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之連接體；(c)第一 TCR 次單元(例如，CD3ε)的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；(d)包含第二 TCR 次單元(例如，CD3ε)的跨膜結構域之跨膜結構域；及(e)包含第三 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞內信號傳導結構域之細胞內信號傳導結構域；其中該第一、第二及第三 TCR 次單元均係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，該第一、第二及第三 TCR 次單元為相同的(例如，均為 CD3ε)。在一些實施例中，該第一、第二及第三 TCR 次單元為不同的。在一些實施例中，提供一種包含載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)之經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞)，該載體自上游至下游：第一啟動子(例如，EF1-α)、編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸、第二啟動子(例如，PGK)及編碼包含以下之功能性嵌合 TCR (cTCR)之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之連接體；及(c)全長 CD3ε (排除信號肽)；其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中

的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，該 cTCR 為包含胺基酸序列 SEQ ID NO: 64 之抗 CD20 cTCR。在一些實施例中，提供一種包含載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)之經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞)，該載體自上游至下游：第一啟動子(例如，EF1-α)、編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸、第二啟動子(例如，PGK)及編碼包含以下之功能性 T 細胞抗原偶合物(TAC)之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；(e)第一 TCR 輔受體(例如，CD4)的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；(f)包含第二 TCR 輔受體(例如，CD4)的跨膜結構域之跨膜結構域；及(g)包含第三 TCR 輔受體(例如，CD4)的細胞內信號傳導結構域之視情況存在之細胞內信號傳導結構域；其中該 TCR 次單元係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群；且其中該第一、第二及第三 TCR 輔受體均係選自由 CD4、CD8 及 CD28 組成之群；其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，該第一、第二及第三 TCR 輔受體為相同的。在一些實施例中，該第一、第二及第三 TCR 輔受體為不同的。在一些實施例中，提供一種包含載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)之經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞)，該載體自上游至下游：第一啟動子(例如，EF1-α)、編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸、第二啟動子(例如，PGK)及編碼包含以下之功能性 T 細胞抗原偶合物(TAC)之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識

別 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；(e) CD4 之細胞外結構域或其一部分；(f) CD4 之跨膜結構域；及(g) CD4 之細胞內信號傳導結構域；其中該 TCR 次單元係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群；且其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，該 TAC 為包含胺基酸序列 SEQ ID NO: 66 之抗 CD20 TAC。在一些實施例中，提供一種包含載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)之經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞)，該載體自上游至下游：第一啟動子(例如，EF1-α)、編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸、第二啟動子(例如，PGK)及編碼包含以下之功能性 TAC 樣嵌合受體之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別第一 TCR 次單元(例如，TCRα)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；(e)第二 TCR 次單元(例如，CD3ε)的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；(f)包含第三 TCR 次單元(例如，CD3ε)的跨膜結構域之跨膜結構域；及(g)包含第四 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞內信號傳導結構域之視情況存在之細胞內信號傳導結構域；其中該第一、第二、第三及第四 TCR 次單元均係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群；且其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，該第二、第三及第四 TCR 次單元為相同的。在一些實施例中，該第一、第二、第三及第四 TCR 次單元為相同的。在一些實施例中，該第二、第三及第四 TCR 次單元為不同的。在一些實施例中，該第二、第三及第四 TCR 次單元為相同的，但不同於該第一 TCR 次單元。在一些實施例中，提供一種包含載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)之經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞)，該載

體自上游至下游：第一啟動子(例如，EF1-α)、編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸、第二啟動子(例如，PGK)及編碼包含以下之功能性 TAC 樣嵌合受體之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元(例如，TCRα)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；及(e)全長 CD3ε (排除信號肽)，其中該 TCR 次單元係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群；且其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，該 Nef 蛋白係選自由 SIV Nef、HIV1 Nef、HIV2 Nef 及其同系物組成之群。在一些實施例中，該 Nef 蛋白為野生型 Nef。在一些實施例中，該 Nef 蛋白包含 SEQ ID NO: 12-17 中任一者之胺基酸序列。在一些實施例中，該 Nef 蛋白為突變型 Nef。在一些實施例中，該突變型 Nef 包含 SEQ ID NO: 18-22 中任一者之胺基酸序列。在一些實施例中，該突變型 Nef 為突變型 SIV Nef，其包含在表 11 中所列出之任何胺基酸殘基處之一或多種突變。在一些實施例中，該突變型 Nef 為突變型 SIV Nef，其包含在以下中之任一者之胺基酸殘基處之一或多種突變：(i) aa 2-4、aa 8-10、aa 11-13、aa 38-40、aa 44-46、aa 47-49、aa 50-52、aa 53-55、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 110-112、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、aa 178-179、179-181aa、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 191-193、aa 194-196、aa 203-205、aa 206-208、aa 212-214、aa 215-217、aa 218-220、aa 221-223、aa 8-13、aa 44-67、aa 107-112、aa 164-196、aa 203-208 或 aa 212-223；(ii) aa 2-4、aa 44-46、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-

181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 44-67、aa 164-169、aa 176-181、aa 185-190；(iii) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、178-179aa、aa 179-181、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67 或 aa 164-190；或(iv) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67、aa 164-169、aa 176-181 或 aa 185-190；其中該胺基酸殘基位置對應於野生型 SIV Nef 之彼位置。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如野生型 Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如野生型 Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR、CD4 及 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 之細胞表面表現，但不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD4 之細胞表面表現，但不下調 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD28 之細胞表面表現，但不下調 CD4 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調內源 TCR 之細胞表面表現，但不下調(例如，下調細胞表面表現)外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))。在一些實施例中，該功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣

嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))由該 Nef 蛋白(例如野生型 Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調(例如，下調細胞表面表現)達至多約 50%、40%、30%、20%、10%或 5%中任一者。

【0107】　因此，在一些實施例中，提供一種包含載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)之經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞)，該載體自上游至下游：第二啟動子(例如，EF1-α)、編碼包含細胞外配位體結合結構域及視情況存在之細胞內信號傳導結構域的功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))之第二核酸、第一啟動子(例如，PGK)及編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，提供一種包含載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)之經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞)，該載體自上游至下游：第二啟動子(例如，EF1-α)；編碼包含以下之功能性 CAR 之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)結合部分(例如，sdAb、scFv)；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域；第一啟動子(例如，PGK)；及編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 SIV Nef)之第一核酸，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，提供一種包含載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)之經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞)，該載體自上游至下游：第二啟動子(例如，EF1-α)；編碼包含以下之功能性 CAR 之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)抗 BCMA sdAb；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域；第一啟動子(例如，PGK)；及編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型

Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，提供一種包含載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)之經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞)，該載體自上游至下游：第二啟動子(例如，EF1-α)；編碼包含以下之功能性嵌合 TCR (cTCR)之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之連接體；(c)第一 TCR 次單元(例如，CD3ε)的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；(d)包含第二 TCR 次單元(例如，CD3ε)的跨膜結構域之跨膜結構域；及(e)包含第三 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞內信號傳導結構域之細胞內信號傳導結構域；其中該第一、第二及第三 TCR 次單元均係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群；第一啟動子(例如，PGK)；及編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸；其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，該第一、第二及第三 TCR 次單元為相同的(例如，均為 CD3ε)。在一些實施例中，該第一、第二及第三 TCR 次單元為不同的。在一些實施例中，提供一種包含載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)之經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞)，該載體自上游至下游：第二啟動子(例如，EF1-α)；編碼包含以下之功能性嵌合 TCR (cTCR)之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之連接體；及(c)全長 CD3ε (排除信號肽)；第一啟動子(例如，PGK)；及編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸；其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，該 cTCR 為包含胺基酸序列 SEQ ID NO: 64 之抗 CD20 cTCR。在一些實施例中，提供一種包含載體(例如病毒載體，

諸如慢病毒載體)之經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞)，該載體自上游至下游：第二啟動子(例如，EF1-α)；編碼包含以下之功能性細胞抗原偶合物(TAC)之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；(e)第一 TCR 輔受體(例如，CD4)的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；(f)包含第二 TCR 輔受體(例如，CD4)的跨膜結構域之跨膜結構域；及(g)包含第三 TCR 輔受體(例如，CD4)的細胞內信號傳導結構域之視情況存在之細胞內信號傳導結構域；其中該 TCR 次單元係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群；且其中該第一、第二及第三 TCR 輔受體均係選自由 CD4、CD8 及 CD28 組成之群；第一啟動子(例如，PGK)；及編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸；其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，該第一、第二及第三 TCR 輔受體為相同的。在一些實施例中，該第一、第二及第三 TCR 輔受體為不同的。在一些實施例中，提供一種包含載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)之經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞)，該載體自上游至下游：第二啟動子(例如，EF1-α)；編碼包含以下之功能性細胞抗原偶合物(TAC)之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；(e) CD4 之細胞外結構域或其一部分；(f) CD4 之跨膜結構域；及(g) CD4 之細胞內信號傳導結構域，其中該 TCR 次單元係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群；

第一啟動子(例如，PGK)；及編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸；其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，該 TAC 為包含胺基酸序列 SEQ ID NO: 66 之抗 CD20 TAC。在一些實施例中，提供一種包含載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)之經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞)，該載體自上游至下游：第二啟動子(例如，EF1-α)；編碼包含以下之功能性 TAC 樣嵌合受體之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別第一 TCR 次單元(例如，TCRα)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；(e)第二 TCR 次單元(例如，CD3ε)的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；(f)包含第三 TCR 次單元(例如，CD3ε)的跨膜結構域之跨膜結構域；及(g)包含第四 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞內信號傳導結構域之視情況存在之細胞內信號傳導結構域，其中該第一、第二、第三及第四 TCR 次單元均係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群；第一啟動子(例如，PGK)；及編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸；其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，該第二、第三及第四 TCR 次單元為相同的。在一些實施例中，該第一、第二、第三及第四 TCR 次單元為相同的。在一些實施例中，該第一、第二、第三及第四 TCR 次單元為不同的。在一些實施例中，該第二、第三及第四 TCR 次單元為相同的，但不同於該第一 TCR 次單元。在一些實施例中，提供一種包含載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)之經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞)，該載體自上游至下游：第二啟動子(例如，EF1-α)；編碼包含以下之功能性 TAC 樣嵌合受體之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原

(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元(例如，TCRα)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；及(e)全長 CD3ε (排除信號肽)，其中該 TCR 次單元係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群；第一啟動子(例如，PGK)；及編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸；其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，該第一啟動子及該第二啟動子為相同的。在一些實施例中，該第一啟動子及該第二啟動子為不同的。在一些實施例中，該 Nef 蛋白係選自由 SIV Nef、HIV1 Nef、HIV2 Nef 及其同系物組成之群。在一些實施例中，該 Nef 蛋白為野生型 Nef。在一些實施例中，該 Nef 蛋白包含 SEQ ID NO: 12-17 中任一者之胺基酸序列。在一些實施例中，該 Nef 蛋白為突變型 Nef。在一些實施例中，該突變型 Nef 包含 SEQ ID NO: 18-22 中任一者之胺基酸序列。在一些實施例中，該突變型 Nef 為突變型 SIV Nef，其包含在表 11 中所列出之任何胺基酸殘基處之一或多種突變。在一些實施例中，該突變型 Nef 為突變型 SIV Nef，其包含在以下中之任一者之胺基酸殘基處之一或多種突變：(i) aa 2-4、aa 8-10、aa 11-13、aa 38-40、aa 44-46、aa 47-49、aa 50-52、aa 53-55、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 110-112、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、aa 178-179、179-181aa、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 191-193、aa 194-196、aa 203-205、aa 206-208、aa 212-214、aa 215-217、aa 218-220、aa 221-223、aa 8-13、aa 44-67、aa 107-112、aa 164-196、aa 203-208 或 aa 212-223；(ii) aa 2-4、aa 44-46、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-

196、aa 203-205、aa 44-67、aa 164-169、aa 176-181、aa 185-190；(iii) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、178-179aa、aa 179-181、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67 或 aa 164-190；或(iv) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67、aa 164-169、aa 176-181 或 aa 185-190；其中該胺基酸殘基位置對應於野生型 SIV Nef 之彼位置。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR、CD4 及 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 之細胞表面表現，但不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD4 之細胞表面表現，但不下調 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD28 之細胞表面表現，但不下調 CD4 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調內源 TCR 之細胞表面表現，但不下調(例如，下調細胞表面表現)外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))。在一些實施例中，該功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、

基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))由該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調(例如，下調細胞表面表現)達至多約 50%、40%、30%、20%、10%或 5%中任一者。

【0108】　在一些實施例中，該第一核酸及該第二核酸在同一啟動子下經轉錄。因此，在一些實施例中，提供一種包含載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)之經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞)，該載體自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)、編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸、第一連接序列(例如 IRES、編碼諸如 P2A 或 T2A 之自裂解 2A 肽之序列)、視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如$(GGGS)_3$ 連接體之撓性連接體之序列)及編碼包含細胞外配位體結合結構域及視情況存在之細胞內信號傳導結構域的功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))之第二核酸，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，提供一種包含載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)之經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞)，該載體自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)、編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸、第一連接序列 IRES、視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如$(GGGS)_3$ 連接體之撓性連接體之序列)及編碼包含細胞外配位體結合結構域及視情況存在之細胞內信號傳導結構域的功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))之第二核酸，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，提供一種包含載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)之經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞)，該載體自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)、

編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸、編碼 P2A 之第一連接序列、視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如$(GGGS)_3$ 連接體之撓性連接體之序列)及編碼包含細胞外配位體結合結構域及視情況存在之細胞內信號傳導結構域的功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))之第二核酸，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，提供一種包含載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)之經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞)，該載體自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)、編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸、第一連接序列(例如 IRES 或編碼諸如 P2A 或 T2A 之自裂解 2A 肽之核酸序列)、視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如$(GGGS)_3$ 連接體之撓性連接體之核酸序列)及編碼包含以下之功能性 CAR 之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)結合部分(例如，sdAb、scFv)；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，提供一種包含載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)之經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞)，該載體自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)、編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸、第一連接序列 IRES、視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如$(GGGS)_3$ 連接體之撓性連接體之核酸序列)及編碼包含以下之功能性 CAR 之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)結合部分(例如，sdAb、scFv)；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該

經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，提供一種包含載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)之經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞)，該載體自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)、編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸、編碼 P2A 之第一連接序列、視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如$(GGGS)_3$ 連接體之撓性連接體之核酸序列)及編碼包含以下之功能性 CAR 之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)結合部分(例如，sdAb、scFv)；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，提供一種包含載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)之經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞)，該載體自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)、編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸、第一連接序列(例如 IRES、編碼諸如 P2A 或 T2A 之自裂解 2A 肽之核酸序列)、視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如$(GGGS)_3$ 連接體之撓性連接體之核酸序列)及編碼包含以下之功能性 CAR 之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)抗 BCMA sdAb；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，提供一種包含載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)之經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞)，該載體自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)、編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸、第一連接序列 IRES、視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如$(GGGS)_3$ 連接體之撓性連接體之核酸序列)及編碼包含以下之功能性 CAR 之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)抗 BCMA sdAb；(b)跨膜結

構域；及(c)細胞內信號傳導結構域，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，提供一種包含載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)之經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞)，該載體自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)、編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸、編碼 P2A 之第一連接序列、視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如$(GGGS)_3$ 連接體之撓性連接體之核酸序列)及編碼包含以下之功能性 CAR 之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)抗 BCMA sdAb；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，提供一種包含載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)之經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞)，該載體自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)、編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸、第一連接序列(例如 IRES、編碼諸如 P2A 或 T2A 之自裂解 2A 肽之核酸序列)、視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如$(GGGS)_3$ 連接體之撓性連接體之核酸序列)及編碼包含以下之功能性嵌合 TCR (cTCR)之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之連接體；(c)第一 TCR 次單元(例如，CD3ε)的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；(d)包含第二 TCR 次單元(例如，CD3ε)的跨膜結構域之跨膜結構域；及(e)包含第三 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞內信號傳導結構域之細胞內信號傳導結構域；其中該第一、第二及第三 TCR 次單元均係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群；且其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，該第一、第二及第三 TCR 次單元為相同的(例如，均為 CD3ε)。在一些實施例中，該第一、

第二及第三 TCR 次單元為不同的。在一些實施例中，提供一種包含載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)之經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞)，該載體自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)、編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸、第一連接序列(例如 IRES、編碼諸如 P2A 或 T2A 之自裂解 2A 肽之核酸序列)、視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如 $(GGGS)_3$ 連接體之撓性連接體之核酸序列)及編碼包含以下之功能性嵌合 TCR (cTCR)之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之連接體；及(c)全長 CD3ε (排除信號肽)；其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，該 cTCR 為包含胺基酸序列 SEQ ID NO: 64 之抗 CD20 cTCR。在一些實施例中，提供一種包含載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)之經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞)，該載體自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)、編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸、第一連接序列(例如 IRES、編碼諸如 P2A 或 T2A 之自裂解 2A 肽之核酸序列)、視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如 $(GGGS)_3$ 連接體之撓性連接體之核酸序列)及編碼包含以下之功能性 T 細胞抗原偶合物(TAC)之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；(e)第一 TCR 輔受體(例如，CD4)的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；(f)包含第二 TCR 輔受體(例如，CD4)的跨膜結構域之跨膜結構域；及(g)包含第三 TCR 輔受體(例如，CD4)的細胞內信號傳導結構域之視情況存在之細胞內信號傳導結構域；其中該 TCR 次單元係選自由

TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群；其中該第一、第二及第三 TCR 輔受體均係選自由 CD4、CD8 及 CD28 組成之群；且其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，該第一、第二及第三 TCR 輔受體為相同的。在一些實施例中，該第一、第二及第三 TCR 輔受體為不同的。在一些實施例中，提供一種包含載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)之經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞)，該載體自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)、編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸、第一連接序列(例如 IRES、編碼諸如 P2A 或 T2A 之自裂解 2A 肽之核酸序列)、視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如$(GGGS)_3$連接體之撓性連接體之核酸序列)及編碼包含以下之功能性 T 細胞抗原偶合物(TAC)之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；(e) CD4 之細胞外結構域或其一部分；(f) CD4 之跨膜結構域；及(g) CD4 之細胞內信號傳導結構域；其中該 TCR 次單元係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群；且其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，該 TAC 為包含胺基酸序列 SEQ ID NO: 66 之抗 CD20 TAC。在一些實施例中，提供一種包含載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)之經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞)，該載體自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)、編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸、第一連接序列(例如 IRES、編碼諸如 P2A 或 T2A 之自裂解 2A 肽之核酸序列)、視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如$(GGGS)_3$連接體之撓性連接體之核酸序列)及編碼包含以下之功能性 TAC 樣嵌合受體之第二核酸：(a)

細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別第一 TCR 次單元(例如，TCRα)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；(e)第二 TCR 次單元(例如，CD3ε)的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；(f)包含第三 TCR 次單元(例如，CD3ε)的跨膜結構域之跨膜結構域；及(g)包含第四 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞內信號傳導結構域之視情況存在之細胞內信號傳導結構域；其中該第一、第二、第三及第四 TCR 次單元均係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群；且其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，該第二、第三及第四 TCR 次單元為相同的。在一些實施例中，該第一、第二、第三及第四 TCR 次單元為相同的。在一些實施例中，該第一、第二、第三及第四 TCR 次單元為不同的。在一些實施例中，該第二、第三及第四 TCR 次單元為相同的，但不同於該第一 TCR 次單元。在一些實施例中，提供一種包含載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)之經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞)，該載體自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)、編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸、第一連接序列(例如 IRES、編碼諸如 P2A 或 T2A 之自裂解 2A 肽之核酸序列)、視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如$(GGGS)_3$連接體之撓性連接體之核酸序列)及編碼包含以下之功能性 TAC 樣嵌合受體之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元(例如，TCRα)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；及(e)全長 CD3ε (排除信號肽)；其中該 TCR 次單元係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、

CD3γ及CD3δ組成之群；且其中該Nef蛋白在表現時導致該經修飾T細胞中的內源TCR之下調。在一些實施例中，該Nef蛋白係選自由SIV Nef、HIV1 Nef、HIV2 Nef及其同系物組成之群。在一些實施例中，該Nef蛋白為野生型Nef。在一些實施例中，該Nef蛋白包含SEQ ID NO: 12-17中任一者之胺基酸序列。在一些實施例中，該Nef蛋白為突變型Nef。在一些實施例中，該突變型Nef包含SEQ ID NO: 18-22中任一者之胺基酸序列。在一些實施例中，該突變型Nef為突變型Nef，其包含在表11中所列出之任何胺基酸殘基處之一或多種突變。在一些實施例中，該突變型Nef為突變型SIV Nef，其包含在以下中之任一者之胺基酸殘基處之一或多種突變：(i) aa 2-4、aa 8-10、aa 11-13、aa 38-40、aa 44-46、aa 47-49、aa 50-52、aa 53-55、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 110-112、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、aa 178-179、179-181aa、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 191-193、aa 194-196、aa 203-205、aa 206-208、aa 212-214、aa 215-217、aa 218-220、aa 221-223、aa 8-13、aa 44-67、aa 107-112、aa 164-196、aa 203-208或aa 212-223；(ii) aa 2-4、aa 44-46、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 44-67、aa 164-169、aa 176-181、aa 185-190；(iii) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、178-179aa、aa 179-181、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67或aa 164-190；或(iv) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67、aa 164-169、aa 176-181或aa 185-190；

其中該胺基酸殘基位置對應於野生型 SIV Nef 之彼位置。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR、CD4 及 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 之細胞表面表現，但不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD4 之細胞表面表現，但不下調 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD28 之細胞表面表現，但不下調 CD4 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調內源 TCR 之細胞表面表現，但不下調(例如，下調細胞表面表現)外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))。在一些實施例中，該功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))由該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調(例如，下調細胞表面表現)達至多約 50%、40%、30%、20%、10%或 5%中任一者。

【0109】　在一些實施例中，提供一種包含載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)之經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞)，該載體自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)、編碼包含細胞外配位體結合結構域及視情況存在之細胞內信號傳導結構域的功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌

合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))之第二核酸、第一連接序列(例如 IRES、編碼諸如 P2A 或 T2A 之自裂解 2A 肽之核酸序列)、視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如$(GGGS)_3$ 連接體之撓性連接體之核酸序列)及編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，提供一種包含載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)之經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞)，該載體自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)、編碼包含細胞外配位體結合結構域及視情況存在之細胞內信號傳導結構域的功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))之第二核酸、第一連接序列 IRES、視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如$(GGGS)_3$ 連接體之撓性連接體之核酸序列)及編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，提供一種包含載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)之經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞)，該載體自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)、編碼包含細胞外配位體結合結構域及視情況存在之細胞內信號傳導結構域的功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))之第二核酸、編碼 P2A 之第一連接序列、視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如$(GGGS)_3$ 連接體之撓性連接體之核酸序列)及編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，提供一種包含載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)之經修飾

T 細胞(例如，同種異體 T 細胞)，該載體自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)；編碼包含以下之功能性 CAR 之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)結合部分(例如，sdAb、scFv)；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域；第一連接序列(例如 IRES、編碼諸如 P2A 或 T2A 之自裂解 2A 肽之核酸序列)；視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如$(GGGS)_3$ 連接體之撓性連接體之核酸序列)；及編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，提供一種包含載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)之經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞)，該載體自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)；編碼包含以下之功能性 CAR 之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)結合部分(例如，sdAb、scFv)；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域；第一連接序列 IRES；視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如$(GGGS)_3$ 連接體之撓性連接體之核酸序列)；及編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，提供一種包含載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)之經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞)，該載體自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)；編碼包含以下之功能性 CAR 之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)結合部分(例如，sdAb、scFv)；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域；編碼 P2A 之第一連接序列；視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如$(GGGS)_3$ 連接體之撓性連接體之核酸序列)；及編碼 Nef 蛋白(例如 wt

Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，提供一種包含載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)之經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞)，該載體自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)；編碼包含以下之功能性 CAR 之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)抗 BCMA sdAb；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域；第一連接序列(例如 IRES、編碼諸如 P2A 或 T2A 之自裂解 2A 肽之核酸序列)；視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如$(GGGS)_3$連接體之撓性連接體之核酸序列)；及編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，提供一種包含載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)之經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞)，該載體自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)；編碼包含以下之功能性 CAR 之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)抗 BCMA sdAb；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域；第一連接序列 IRES；視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如$(GGGS)_3$連接體之撓性連接體之核酸序列)；及編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，提供一種包含載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)之經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞)，該載體自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)；編碼包含以下之功能性 CAR 之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)抗 BCMA sdAb；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域；編碼 P2A 之第一連接序列；視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如$(GGGS)_3$連接體之撓性連接體之核酸序列)；及編碼 Nef 蛋白(例

如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，提供一種包含載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)之經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞)，該載體自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)；編碼包含以下之功能性嵌合 TCR (cTCR)之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之連接體；(c)第一 TCR 次單元(例如，CD3ε)的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；(d)包含第二 TCR 次單元(例如，CD3ε)的跨膜結構域之跨膜結構域；及(e)包含第三 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞內信號傳導結構域之細胞內信號傳導結構域；其中該第一、第二及第三 TCR 次單元均係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群；第一連接序列(例如 IRES、編碼諸如 P2A 或 T2A 之自裂解 2A 肽之核酸序列)；視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如$(GGGS)_3$ 連接體之撓性連接體之核酸序列)；及編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，該第一、第二及第三 TCR 次單元為相同的(例如，均為 CD3ε)。在一些實施例中，該第一、第二及第三 TCR 次單元為不同的。在一些實施例中，提供一種包含載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)之經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞)，該載體自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)；編碼包含以下之功能性嵌合 TCR (cTCR)之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之連接體；及(c)全長 CD3ε (排除信號肽)；第一連接序列(例如 IRES、編碼諸如 P2A 或 T2A 之自裂解 2A 肽之核酸序列)；視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如$(GGGS)_3$ 連接體之撓性連接體

之核酸序列)；及編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，該 cTCR 為包含胺基酸序列 SEQ ID NO: 64 之抗 CD20 cTCR。在一些實施例中，提供一種包含載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)之經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞)，該載體自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)；編碼包含以下之功能性 T 細胞抗原偶合物(TAC)之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；(e)第一 TCR 輔受體(例如，CD4)的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；(f)包含第二 TCR 輔受體(例如，CD4)的跨膜結構域之跨膜結構域；及(g)包含第三 TCR 輔受體(例如，CD4)的細胞內信號傳導結構域之視情況存在之細胞內信號傳導結構域；其中該 TCR 次單元係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群；且其中該第一、第二及第三 TCR 輔受體均係選自由 CD4、CD8 及 CD28 組成之群；第一連接序列(例如 IRES、編碼諸如 P2A 或 T2A 之自裂解 2A 肽之核酸序列)；視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如$(GGGS)_3$ 連接體之撓性連接體之核酸序列)；及編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，該第一、第二及第三 TCR 輔受體為相同的。在一些實施例中，該第一、第二及第三 TCR 輔受體為不同的。在一些實施例中，提供一種包含載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)之經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞)，該載體自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)；編碼包含以下之功能性 T 細胞抗原偶合物(TAC)之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別

腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；(e) CD4 之細胞外結構域或其一部分；(f) CD4 之跨膜結構域；及(g) CD4 之細胞內信號傳導結構域；其中該 TCR 次單元係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群；第一連接序列(例如 IRES、編碼諸如 P2A 或 T2A 之自裂解 2A 肽之核酸序列)；視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如$(GGGS)_3$ 連接體之撓性連接體之核酸序列)；及編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，該 TAC 為包含胺基酸序列 SEQ ID NO: 66 之抗 CD20 TAC。在一些實施例中，提供一種包含載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)之經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞)，該載體自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)；編碼包含以下之功能性 TAC 樣嵌合受體之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別第一 TCR 次單元(例如，TCRα)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；(e)第二 TCR 次單元(例如，CD3ε)的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；(f)包含第三 TCR 次單元(例如，CD3ε)的跨膜結構域之跨膜結構域；及(g)包含第四 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞內信號傳導結構域之視情況存在之細胞內信號傳導結構域；其中該第一、第二、第三及第四 TCR 次單元均係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群；第一連接序列(例如 IRES、編碼諸如 P2A 或 T2A 之自裂解 2A 肽之核酸序列)；視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如$(GGGS)_3$ 連接體之撓性連接體之核酸序列)；及編碼

Nef蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸，其中該 Nef蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，該第二、第三及第四 TCR 次單元為相同的。在一些實施例中，該第一、第二、第三及第四 TCR 次單元為相同的。在一些實施例中，該第一、第二、第三及第四 TCR 次單元為不同的。在一些實施例中，該第二、第三及第四 TCR 次單元為相同的，但不同於該第一 TCR 次單元。在一些實施例中，提供一種包含載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)之經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞)，該載體自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)；編碼包含以下之功能性 TAC 樣嵌合受體之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元(例如，TCRα)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；及(e)全長 CD3ε(排除信號肽)；其中該 TCR 次單元係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群；第一連接序列(例如 IRES、編碼諸如 P2A 或 T2A 之自裂解 2A 肽之核酸序列)；視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如$(GGGS)_3$連接體之撓性連接體之核酸序列)；及編碼 Nef蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸，其中該 Nef蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，該 Nef蛋白係選自由 SIV Nef、HIV1 Nef、HIV2 Nef及其同系物組成之群。在一些實施例中，該 Nef蛋白為野生型 Nef。在一些實施例中，該 Nef蛋白包含 SEQ ID NO: 12-17 中任一者之胺基酸序列。在一些實施例中，該 Nef蛋白為突變型 Nef。在一些實施例中，該突變型 Nef包含 SEQ ID NO: 18-22 中任一者之胺基酸序列。在一些實施例中，該突變型 Nef 為突變型 SIV Nef，其包含在表 11 中所列出之任何胺基酸殘基處之一或多種突變。在一些實施例中，該突變型 Nef為突變型 SIV Nef，其包含在

以下中之任一者之胺基酸殘基處之一或多種突變：(i) aa 2-4、aa 8-10、aa 11-13、aa 38-40、aa 44-46、aa 47-49、aa 50-52、aa 53-55、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 110-112、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、aa 178-179、179-181aa、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 191-193、aa 194-196、aa 203-205、aa 206-208、aa 212-214、aa 215-217、aa 218-220、aa 221-223、aa 8-13、aa 44-67、aa 107-112、aa 164-196、aa 203-208 或 aa 212-223；(ii) aa 2-4、aa 44-46、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 44-67、aa 164-169、aa 176-181、aa 185-190；(iii) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、178-179aa、aa 179-181、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67 或 aa 164-190；或(iv) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67、aa 164-169、aa 176-181 或 aa 185-190；其中該胺基酸殘基位置對應於野生型 SIV Nef 之彼位置。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR、CD4 及 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 之細胞表面表現，但不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，

諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD4 之細胞表面表現，但不下調 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD28 之細胞表面表現，但不下調 CD4 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調內源 TCR 之細胞表面表現，但不下調(例如，下調細胞表面表現)外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))。在一些實施例中，該功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))由該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調(例如，下調細胞表面表現)達至多約 50%、40%、30%、20%、10%或 5%中任一者。

【0110】 在一些實施例中，該啟動子係選自由勞氏肉瘤病毒(RSV)啟動子、猿病毒 40 (SV40)啟動子、細胞巨大病毒即刻早期基因啟動子(CMV IE)、延伸因子 1 α 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、細胞巨大病毒增強子/雞 β-肌動蛋白(CAG)啟動子、多瘤增強子/單純疱疹胸苷激酶(MC1)啟動子、β 肌動蛋白(β-ACT)啟動子、「骨髓增殖性肉瘤病毒增強子，陰性對照區缺失，d1587rev 引子-結合位點經取代(MND)」啟動子、NFAT 啟動子、TETON®啟動子及 NFκB 啟動子組成之群。在一些實施例中，該啟動子為 EF1-α 或 PGK。

【0111】 在一些實施例中，該連接序列包含編碼 P2A、T2A、E2A、F2A、BmCPV 2A、BmIFV 2A、$(GS)_n$、$(GSGGS)_n$、$(GGGS)_n$、$(GGGGS)_n$之核酸序列或 IRES、SV40、CMV、UBC、EF1α、PGK、CAGG 之核酸序列或其任何組合中任一者，其中 n 係至少為 1 之整數。在一些實施例中，該連接序列為 IRES。在一些實施

例中，該連接序列為編碼 P2A 之核酸序列。

【0112】　在一些實施例中，該載體為病毒載體。在一些實施例中，該病毒載體係選自由腺病毒載體、腺相關病毒載體、逆轉錄病毒載體、慢病毒載體、單純疱疹病毒載體及其衍生物組成之群。在一些實施例中，該病毒載體為慢病毒載體。在一些實施例中，該載體為非病毒載體，諸如游離型表現載體、增強游離型載體(EEV)、PiggyBac 轉座酶載體或睡美人(SB)轉座子系統。進一步提供藉由引入任何本文所述之載體(例如，病毒載體)而獲得之 T 細胞。進一步提供藉由任何本文所述之方法而獲得之 T 細胞。

載體

【0113】　本申請案提供用於選殖及表現本文所述之任一 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)或功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))之載體。在一些實施例中，該載體適用於諸如哺乳動物細胞之真核細胞中之複製及整合。在一些實施例中，該載體為病毒載體。病毒載體之實例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、單純疱疹病毒載體及其衍生物。病毒載體技術為此項技術中熟知的且描述於例如 Sambrook 等人 (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)中，及其他病毒學及分子生物學手冊中。

【0114】　多種基於病毒之系統已經開發用於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之便利平台。異源核酸可使用此項技術中已知之技術插入至載體中且經封裝於逆轉錄病毒粒子中。重組病毒可接著經分離且活體外或離體遞送至經工程改造哺乳動物細胞中。多種逆轉錄病毒系統為此項技術中已知的。在一些實施例中，使用腺病毒載體。多種腺病毒載體為此項

技術中已知的。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，攜帶 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)編碼序列之自滅活慢病毒載體及/或攜帶外源受體(例如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))之自滅活慢病毒載體可用此項技術中已知之方案經封裝。所得慢病毒載體可用於使用此項技術中已知之方法轉導哺乳動物細胞(諸如原代人類 T 細胞)。源於逆轉錄病毒(諸如慢病毒)之載體為實現長期基因轉移之合適工具，乃因其允許轉殖基因之長期、穩定整合及其在後代細胞中之繁殖。慢病毒載體亦具有低免疫原性，且可轉導非增殖細胞。

【0115】　在一些實施例中，該載體為非病毒載體。在一些實施例中，該載體為轉座子，諸如睡美人(SB)轉座子系統或 PiggyBac 轉座子系統。在一些實施例中，該載體為基於聚合物之非病毒載體，包括例如聚(乳酸-共-乙醇酸) (PLGA)及聚乳酸(PLA)、聚(乙烯亞胺) (PEI)及樹突狀聚合物。在一些實施例中，該載體為基於陽離子性-脂質之非病毒載體，諸如陽離子性脂質體、脂質奈米乳液及固體脂質奈米粒子(SLN)。在一些實施例中，該載體為基於肽之基因非病毒載體，諸如聚-L-離胺酸。適用於基因體編輯之任何已知非病毒載體均可用於將 Nef 編碼核酸及/或外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))編碼核酸引入至經工程改造免疫效應子細胞(例如，T 細胞)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；及 Zhao S.等人「PiggyBac transposon vectors: the tools of the human gene editing.」*Transl.Lung Cancer Res.*(2016) 5(1):120-

125，其以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，編碼本文所述之 Nef 及/或外源受體(例如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))之核酸中的任一或多者係藉由物理方法，包括但不限於電穿孔、聲致穿孔、光穿孔、磁轉染、水致穿孔引入至經工程改造免疫效應子細胞(例如，T 細胞)中。

【0116】　在一些實施例中，該載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)包含編碼本文所述之 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)及/或外源受體(例如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))之核酸中的任一者。該核酸可使用此項技術中之任何已知分子選殖方法，包括例如使用限制核酸內切酶位點及一或多種可選擇標記物經選殖至該載體中。在一些實施例中，該核酸可操作性連接至啟動子。已在哺乳動物細胞中對多種啟動子進行了基因表現方面的探索之，且任何此項技術中已知之啟動子均可用於本發明。啟動子可粗略地經分類為組成型啟動子或調節型啟動子，諸如誘導型啟動子。

啟動子

【0117】　在一些實施例中，編碼本文所述之 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)及/或外源受體(例如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))之核酸可操作性連接至組成型啟動子。組成型啟動子允許異源基因(亦稱作轉殖基因)組成型表現於宿主細胞中。本文所涵蓋之例示性啟動子包括但不限於細胞巨大病毒即刻早期啟動子(CMV)、人類延伸因子-1α (hEF1α)、泛素 C 啟動子(UbiC)、磷酸甘油酸激酶啟動

子(PGK)、猿病毒 40 早期啟動子(SV40)、與 CMV 早期增強子聯合之雞 β-肌動蛋白啟動子(CAGG)、勞氏肉瘤病毒(RSV)啟動子、多瘤增強子/單純疱疹胸苷激酶(MC1)啟動子、β 肌動蛋白(β-ACT)啟動子、「骨髓增殖性肉瘤病毒增強子，陰性對照區缺失，d1587rev 引子-結合位點經取代(MND)」啟動子。該等組成型啟動子驅動轉殖基因表現之效率已在多項研究中經廣泛比較。例如，Michael C. Milone 等人比較了 CMV、hEF1α、UbiC 及 PGK 在原代人類 T 細胞中驅動 CAR 表現之效率，且推斷出 hEF1α 啟動子不僅誘導最高水準之轉殖基因表現，而且在 CD4 及 CD8 人類 T 細胞中得到最佳維持(Molecular Therapy, 17(8): 1453-1464 (2009))。在一些實施例中，編碼本文所述之 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)及/或外源受體(例如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))之核酸可操作性連接至 hEF1α 啟動子或 PGK 啟動子。

【0118】　在一些實施例中，該啟動子係選自由 EF-1 啟動子、CMV IE 基因啟動子、EF-la 啟動子、泛素 C 啟動子、磷酸甘油酸激酶(PGK)啟動子、勞氏肉瘤病毒(RSV)啟動子、猿病毒 40 (SV40)啟動子、細胞巨大病毒即刻早期基因啟動子(CMV)、延伸因子 1α 啟動子(EF1-α)、磷酸甘油酸激酶-1 啟動子(PGK)、泛素-C 啟動子(UBQ-C)、細胞巨大病毒增強子/雞 β-肌動蛋白啟動子(CAG)、多瘤增強子/單純疱疹胸苷激酶啟動子(MC1)、β 肌動蛋白啟動子(β-ACT)、猿病毒 40 啟動子(SV40)及骨髓增殖性肉瘤病毒增強子，陰性對照區缺失，d1587rev 引子-結合位點經取代(MND)啟動子、NFAT 啟動子、TETON®啟動子及 NFκB 啟動子組成之群。

【0119】　在一些實施例中，編碼本文所述之 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)及/或外源受體(例如經工程改造 TCR (例如傳統經工程

改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))之核酸可操作性連接至誘導型啟動子。誘導型啟動子屬於調節型啟動子之類別。誘導型啟動子可藉由一或多種條件，諸如經工程改造免疫效應子細胞(例如，T 細胞)之物理條件、微環境或經工程改造免疫效應子細胞之生理學狀態、誘導物(亦即，誘導劑)或其組合經誘導。在一些實施例中，該誘導條件不誘導經工程改造哺乳動物細胞中及/或接受該醫藥組合物之個體中之內源基因表現。在一些實施例中，該誘導條件係選自由以下組成之群：誘導物、輻照(諸如離子輻射、光)、溫度(諸如熱)、氧化還原狀態、腫瘤環境及經工程改造哺乳動物細胞之活化狀態。在一些實施例中，該誘導型啟動子可為 NFAT 啟動子、TETON®啟動子或 NFκB 啟動子。

【0120】　在一些實施例中，該載體亦含有可選擇標記基因或報告基因以自經由載體(例如，慢病毒載體)轉染之宿主細胞群體選擇表現本文所述之 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)及/或外源受體(例如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))之細胞。可選擇標記物及報告基因均可側接有適當調節序列以使得能夠在宿主細胞中表現。例如，該載體可含有轉錄及轉譯終止子、起始序列及適用於調節核酸序列之表現之啟動子。

連接序列

【0121】　在一些實施例中，該載體包含超過一種編碼本文所述之 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)及/或外源受體(例如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))之核酸。在一些實施例中，該載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)包含編碼 Nef 蛋白(例如

wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸及編碼包含細胞外配位體結合結構域及視情況存在之細胞內信號傳導結構域之功能性外源受體(例如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))之第二核酸，其中該第一核酸經由連接序列可操作性連接至該第二核酸。在一些實施例中，該連接序列為內部核糖體進入位點(IRES)。IRES 係允許以帽獨立方式進行轉譯起始之 RNA 元件。在一些實施例中，該連接序列包含(例如，為)編碼諸如 P2A、T2A、E2A、F2A、BmCPV 2A、BmIFV 2A 之自裂解 2A 肽之核酸序列。在一些實施例中，該連接序列為包含核酸序列 SEQ ID NO: 34 之 IRES。在一些實施例中，該連接序列為包含核酸序列 SEQ ID NO: 35 之 PGK。在一些實施例中，該連接序列為編碼包含胺基酸序列 SEQ ID NO: 36 之 P2A 肽之核酸序列。在一些實施例中，該連接序列為編碼包含胺基酸序列 SEQ ID NO: 37 之 T2A 肽之核酸序列。在一些實施例中，該連接序列係編碼如下文在「V. 功能性外源受體」下之「肽連接體」章節中所述之肽連接體(諸如撓性連接體)之核酸序列。在一些實施例中，該撓性連接序列係選自由編碼$(GS)_n$、$(GSGGS)_n$ $(GGGS)_n$ 及$(GGGGS)_n$之核酸序列組成之群，其中 n 係至少為 1 之整數)。在一些實施例中，該連接序列編碼可選擇標記物，諸如 LNGFR。在一些實施例中，該連接序列包含一或多種類型之本文所述之連接序列，諸如編碼自裂解 2A 肽(例如，P2A)隨後為 Gly-Ser 撓性連接體(例如，$(GGGS)_3$)之核酸序列，或編碼自裂解 2A 肽(例如，P2A)隨後為可選擇標記物(例如，LNGFR)之核酸序列。

【0122】　因此，在一些實施例中，提供包含編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸之載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調(例如，下調細胞表面表現)內源 TCR。在一些實施例中，該 Nef 蛋

白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR、CD4 及 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 之細胞表面表現，但不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD4 之細胞表面表現，但不下調 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD28 之細胞表面表現，但不下調 CD4 之細胞表面表現。

【0123】　在一些實施例中，該 Nef 蛋白在 T 細胞中表現時不下調(例如，下調表現) CD3ζ、CD4、CD28 及/或功能性外源受體(例如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))，或下調 CD3ζ、CD4、CD28 及/或功能性外源受體(例如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))達至多約 50%、40%、30%、20%、10%或 5%中任一者。在一些實施例中，該 Nef 蛋白係選自由 SIV Nef、HIV1 Nef、HIV2 Nef 及其同系物組成之群。在一些實施例中，該 Nef 蛋白為野生型 Nef。在一些實施例中，該 Nef 蛋白包含 SEQ ID NO: 12-17 中任一者之胺基酸序列。在一些實施例中，該 Nef 蛋白為突變型 Nef。在一些實施例中，該突變型 Nef 包含 SEQ ID NO: 18-22 中任一者之胺基酸序列。在一些實施例中，該突變型 Nef 為突變型 SIV Nef，其包含在表 11 中所列出之任何胺基酸殘基處之一或多種突變。在一些實施例中，該突變型 Nef 為突變型 SIV Nef，其包含在以下中之任一者之胺基酸

殘基處之一或多種突變：(i) aa 2-4、aa 8-10、aa 11-13、aa 38-40、aa 44-46、aa 47-49、aa 50-52、aa 53-55、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 110-112、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、aa 178-179、179-181aa、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 191-193、aa 194-196、aa 203-205、aa 206-208、aa 212-214、aa 215-217、aa 218-220、aa 221-223、aa 8-13、aa 44-67、aa 107-112、aa 164-196、aa 203-208 或 aa 212-223；(ii) aa 2-4、aa 44-46、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 44-67、aa 164-169、aa 176-181、aa 185-190；(iii) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、178-179aa、aa 179-181、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67 或 aa 164-190；或(iv) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67、aa 164-169、aa 176-181 或 aa 185-190；其中該胺基酸殘基位置對應於野生型 SIV Nef 之彼位置。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR、CD4 及 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 之細胞表面表現，但不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調

TCR 及 CD4 之細胞表面表現，但不下調 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD28 之細胞表面表現，但不下調 CD4 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調內源 TCR 之細胞表面表現，但不下調(例如，下調細胞表面表現)外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))。在一些實施例中，該功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))由該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調(例如，下調細胞表面表現)達至多約 50%、40%、30%、20%、10%或 5%中任一者。

【0124】 在一些實施例中，該載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)進一步包含編碼包含細胞外配位體結合結構域及視情況存在之細胞內信號傳導結構域之功能性外源受體(例如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))之第二核酸。在一些實施例中，該第一核酸及該第二核酸可操作性連接至同一啟動子。在一些實施例中，該第一核酸及該第二核酸可操作性連接至不同啟動子。

【0125】 在一些實施例中，提供一種載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)，其包含編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸及編碼包含細胞外配位體結合結構域及視情況存在之細胞內信號傳導結構域之功能性外源受體(例如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配

位體/受體之 CAR 或 ACTR))之第二核酸，其中該第一核酸及該第二核酸可操作性連接至不同啟動子(例如，EF1-α 及 PGK)。在一些實施例中，該第一核酸係在該第二核酸上游。在一些實施例中，該第一核酸係在該第二核酸下游。

【0126】　在一些實施例中，提供一種載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)，自上游至下游：第一啟動子(例如，EF1-α)、編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸、第二啟動子(例如，PGK)及編碼包含細胞外配位體結合結構域及視情況存在之細胞內信號傳導結構域例如的功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))之第二核酸。在一些實施例中，提供一種載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)，自上游至下游：第一啟動子(例如，EF1-α)、編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸、第二啟動子(例如，PGK)及編碼包含以下之功能性 CAR 之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)結合部分(例如，sdAb、scFv)；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域。在一些實施例中，提供一種載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)，自上游至下游：第一啟動子(例如，EF1-α)、編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸、第二啟動子(例如，PGK)及編碼包含以下之功能性 CAR 之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)抗 BCMA sdAb；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域。在一些實施例中，提供一種載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)，自上游至下游：第一啟動子(例如，EF1-α)、編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸、第二啟動子(例如，PGK)及編碼包含以下之功能性嵌合 TCR (cTCR)之第二核酸：

(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之連接體；(c)第一 TCR 次單元(例如，CD3ε)的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；(d)包含第二 TCR 次單元(例如，CD3ε)的跨膜結構域之跨膜結構域；及(e)包含第三 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞內信號傳導結構域之細胞內信號傳導結構域；其中該第一、第二及第三 TCR 次單元均係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群。在一些實施例中，該第一、第二及第三 TCR 次單元為相同的(例如，均為 CD3ε)。在一些實施例中，該第一、第二及第三 TCR 次單元為不同的。在一些實施例中，提供一種載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)，自上游至下游：第一啟動子(例如，EF1-α)、編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸、第二啟動子(例如，PGK)及編碼包含以下之功能性嵌合 TCR (cTCR)之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之連接體；及(c)全長 CD3ε (排除信號肽)。在一些實施例中，該 cTCR 為包含胺基酸序列 SEQ ID NO: 64 之抗 CD20 cTCR。在一些實施例中，提供一種載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)，自上游至下游：第一啟動子(例如，EF1-α)、編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸、第二啟動子(例如，PGK)及編碼包含以下之功能性 T 細胞抗原偶合物(TAC)之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；(e)第一 TCR 輔受體(例如，CD4)的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；(f)包含第二 TCR 輔

受體(例如，CD4)的跨膜結構域之跨膜結構域；及(g)包含第三 TCR 輔受體(例如，CD4)的細胞內信號傳導結構域之視情況存在之細胞內信號傳導結構域；其中該 TCR 次單元係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群；且其中該第一、第二及第三 TCR 輔受體均係選自由 CD4、CD8 及 CD28 組成之群。在一些實施例中，該第一、第二及第三 TCR 輔受體為相同的。在一些實施例中，該第一、第二及第三 TCR 輔受體為不同的。在一些實施例中，提供一種載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)，自上游至下游：第一啟動子(例如，EF1-α)、編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸、第二啟動子(例如，PGK)及編碼包含以下之功能性 T 細胞抗原偶合物(TAC)之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；(e) CD4 之細胞外結構域或其一部分；(f) CD4 之跨膜結構域；及(g) CD4 之細胞內信號傳導結構域；其中該 TCR 次單元係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群。在一些實施例中，該 TAC 為包含胺基酸序列 SEQ ID NO: 66 之抗 CD20 TAC。在一些實施例中，提供一種載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)，自上游至下游：第一啟動子(例如，EF1-α)、編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸、第二啟動子(例如，PGK)及編碼包含以下之功能性 TAC 樣嵌合受體之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別第一 TCR 次單元(例如，TCRα)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；(e)第二 TCR 次單元(例如，CD3ε)

的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；(f)包含第三 TCR 次單元(例如，CD3ε)的跨膜結構域之跨膜結構域；及(g)包含第四 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞內信號傳導結構域之視情況存在之細胞內信號傳導結構域；其中該第一、第二、第三及第四 TCR 次單元均係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群。在一些實施例中，該第二、第三及第四 TCR 次單元為相同的。在一些實施例中，該第一、第二、第三及第四 TCR 次單元為相同的。在一些實施例中，該第一、第二、第三及第四 TCR 次單元為不同的。在一些實施例中，該第二、第三及第四 TCR 次單元為相同的，但不同於該第一 TCR 次單元。在一些實施例中，提供一種載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)，自上游至下游：第一啟動子(例如，EF1-α)、編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸、第二啟動子(例如，PGK)及編碼包含以下之功能性 TAC 樣嵌合受體之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元(例如，TCRα)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；及(e)全長 CD3ε (排除信號肽)；其中該 TCR 次單元係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR、CD4 及 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 之細胞表面表現，但不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調

TCR 及 CD4 之細胞表面表現，但不下調 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD28 之細胞表面表現，但不下調 CD4 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調內源 TCR 之細胞表面表現，但不下調(例如，下調細胞表面表現)外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))。在一些實施例中，該功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))由該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調(例如，下調細胞表面表現)達至多約 50%、40%、30%、20%、10%或 5%中任一者。在一些實施例中，該 Nef 蛋白為突變型 SIV Nef，其包含在以下中之任一者之胺基酸殘基處之一或多種突變：(i) aa 2-4、aa 8-10、aa 11-13、aa 38-40、aa 44-46、aa 47-49、aa 50-52、aa 53-55、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 110-112、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、aa 178-179、179-181aa、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 191-193、aa 194-196、aa 203-205、aa 206-208、aa 212-214、aa 215-217、aa 218-220、aa 221-223、aa 8-13、aa 44-67、aa 107-112、aa 164-196、aa 203-208 或 aa 212-223；(ii) aa 2-4、aa 44-46、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 44-67、aa 164-169、aa 176-181、aa 185-190；(iii) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、178-179aa、

aa 179-181、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67 或 aa 164-190；或(iv) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67、aa 164-169、aa 176-181 或 aa 185-190；其中該胺基酸殘基位置對應於野生型 SIV Nef 之彼位置。在一些實施例中，該 Nef 蛋白包含 SEQ ID NO: 12-22 中任一者之胺基酸序列。

【0127】　在一些實施例中，提供一種載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)，自上游至下游：第二啟動子(例如，EF1-α)、編碼包含細胞外配位體結合結構域及視情況存在之細胞內信號傳導結構域的功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))之第二核酸、第一啟動子(例如，PGK)及編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸。在一些實施例中，提供一種載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)，自上游至下游：第二啟動子(例如，EF1-α)；編碼包含以下之功能性 CAR 之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)結合部分(例如，sdAb、scFv)；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域；第一啟動子(例如，PGK)；及編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸。在一些實施例中，提供一種載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)，自上游至下游：第二啟動子(例如，EF1-α)；編碼包含以下之功能性 CAR 之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)抗 BCMA sdAb；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域；第一啟動子(例如，PGK)；及編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突

變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸。在一些實施例中，提供一種載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)，自上游至下游：第二啟動子(例如，EF1-α)；編碼包含以下之功能性嵌合 TCR (cTCR)之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之連接體；(c)第一TCR 次單元(例如，CD3ε)的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；(d)包含第二 TCR 次單元(例如，CD3ε)的跨膜結構域之跨膜結構域；及(e)包含第三 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞內信號傳導結構域之細胞內信號傳導結構域；其中該第一、第二及第三 TCR 次單元均係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群；第一啟動子(例如，PGK)；及編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸。在一些實施例中，該第一、第二及第三 TCR 次單元為相同的(例如，均為 CD3ε)。在一些實施例中，該第一、第二及第三 TCR 次單元為不同的。在一些實施例中，提供一種載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)，自上游至下游：第二啟動子(例如，EF1-α)；編碼包含以下之功能性嵌合 TCR (cTCR)之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之連接體；及(c)全長 CD3ε(排除信號肽)；第一啟動子(例如，PGK)；及編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸。在一些實施例中，該 cTCR 為包含胺基酸序列 SEQ ID NO: 64 之抗 CD20 cTCR。在一些實施例中，提供一種載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)，自上游至下游：第二啟動子(例如，EF1-α)；編碼包含以下之功能性 T 細胞抗原偶合物(TAC)之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之第一連接體；

(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；(e)第一 TCR 輔受體(例如，CD4)的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；(f)包含第二 TCR 輔受體(例如，CD4)的跨膜結構域之跨膜結構域；及(g)包含第三 TCR 輔受體(例如，CD4)的細胞內信號傳導結構域之視情況存在之細胞內信號傳導結構域；其中該 TCR 次單元係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群；其中該第一、第二及第三 TCR 輔受體均係選自由 CD4、CD8 及 CD28 組成之群；第一啟動子(例如，PGK)；及編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸。在一些實施例中，該第一、第二及第三 TCR 輔受體為相同的。在一些實施例中，該第一、第二及第三 TCR 輔受體為不同的。在一些實施例中，提供一種載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)，自上游至下游：第二啟動子(例如，EF1-α)；編碼包含以下之功能性 T 細胞抗原偶合物(TAC)之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；(e) CD4 之細胞外結構域或其一部分；(f) CD4 之跨膜結構域；及(g) CD4 之細胞內信號傳導結構域；其中該 TCR 次單元係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群；第一啟動子(例如，PGK)；及編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸。在一些實施例中，該 TAC 為包含胺基酸序列 SEQ ID NO: 66 之抗 CD20 TAC。在一些實施例中，提供一種載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)，自上游至下游：第二啟動子(例如，EF1-α)；編碼包含以下之功能性 TAC 樣嵌合受體之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定

基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別第一 TCR 次單元(例如，TCRα)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；(e)第二 TCR 次單元(例如，CD3ε)的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；(f)包含第三 TCR 次單元(例如，CD3ε)的跨膜結構域之跨膜結構域；及(g)包含第四 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞內信號傳導結構域之視情況存在之細胞內信號傳導結構域；其中該第一、第二、第三及第四 TCR 次單元均係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群；第一啟動子(例如，PGK)；及編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸。在一些實施例中，該第二、第三及第四 TCR 次單元為相同的。在一些實施例中，該第一、第二、第三及第四 TCR 次單元為相同的。在一些實施例中，該第一、第二、第三及第四 TCR 次單元為不同的。在一些實施例中，該第二、第三及第四 TCR 次單元為相同的，但不同於該第一 TCR 次單元。在一些實施例中，提供一種載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)，自上游至下游：第二啟動子(例如，EF1-α)；編碼包含以下之功能性 TAC 樣嵌合受體之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元(例如，TCRα)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；及(e)全長 CD3ε (排除信號肽)；其中該 TCR 次單元係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群；第一啟動子(例如，PGK)；及編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸。在一些實施例中，該 Nef 蛋白包含 SEQ ID NO: 12-22 中任一者之胺基酸序列。在一些實施例中，該 Nef 蛋白為突變型 SIV Nef，其包含在以下中之任一者之胺基酸殘基處之一或多種突變：(i) aa 2-4、aa 8-10、aa 11-13、aa 38-40、aa 44-46、aa 47-49、

aa 50-52、aa 53-55、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 110-112、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、aa 178-179、179-181aa、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 191-193、aa 194-196、aa 203-205、aa 206-208、aa 212-214、aa 215-217、aa 218-220、aa 221-223、aa 8-13、aa 44-67、aa 107-112、aa 164-196、aa 203-208 或 aa 212-223；(ii) aa 2-4、aa 44-46、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 44-67、aa 164-169、aa 176-181、aa 185-190；(iii) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、178-179aa、aa 179-181、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67 或 aa 164-190；或(iv) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67、aa 164-169、aa 176-181 或 aa 185-190；其中該胺基酸殘基位置對應於野生型 SIV Nef 之彼位置。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR、CD4 及 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 之細胞表面表現，但不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD4 之細胞表面表現，但不下調 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例

中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD28 之細胞表面表現，但不下調 CD4 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調內源 TCR 之細胞表面表現，但不下調(例如，下調細胞表面表現)外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))。在一些實施例中，該功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))由該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調(例如，下調細胞表面表現)達至多約 50%、40%、30%、20%、10%或 5%中任一者。

【0128】　在一些實施例中，提供一種載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)，其包含編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef、突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸及編碼包含細胞外配位體結合結構域及視情況存在之細胞內信號傳導結構域之功能性外源受體(例如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))之第二核酸，其中該第一核酸及該第二核酸可操作性連接至同一啟動子(例如，EF1-α)。在一些實施例中，該第一核酸係在該第二核酸上游。在一些實施例中，該第一核酸係在該第二核酸下游。在一些實施例中，提供一種載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)，自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)、編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef、突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸、第一連接序列(例如 IRES、編碼諸如 P2A 或 T2A 之自裂解 2A 肽之核酸序列)、視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如$(GGGS)_3$連接體之撓性連接體之核酸序列)及編碼包含細胞外配位體結合結構域及視情況存在之細胞內信號傳導

結構域之功能性外源受體(例如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))之第二核酸。在一些實施例中，提供一種載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)，自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)、編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef、突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸、第一連接序列 IRES、視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如$(GGGS)_3$ 連接體之撓性連接體之核酸序列)及編碼包含細胞外配位體結合結構域及視情況存在之細胞內信號傳導結構域之功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))之第二核酸。在一些實施例中，提供一種載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)，自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)、編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef、突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸、編碼 P2A 之第一連接序列、視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如$(GGGS)_3$ 連接體之撓性連接體之核酸序列)及編碼包含細胞外配位體結合結構域及視情況存在之細胞內信號傳導結構域之功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))之第二核酸。在一些實施例中，提供一種載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)，自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)、編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸、第一連接序列(例如 IRES、編碼諸如 P2A 或 T2A 之自裂解 2A 肽之核酸序列)、視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如$(GGGS)_3$ 連接體之撓性連接體之核酸序列)及編碼包含以下之功能性 CAR 之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)結合部分(例如，sdAb、scFv)；

(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域。在一些實施例中，提供一種載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)，自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)、編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸、第一連接序列 IRES、視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如$(GGGS)_3$連接體之撓性連接體之核酸序列)及編碼包含以下之功能性 CAR 之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)結合部分(例如，sdAb、scFv)；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域。在一些實施例中，提供一種載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)，自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)、編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸、編碼 P2A 之第一連接序列、視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如$(GGGS)_3$連接體之撓性連接體之核酸序列)及編碼包含以下之功能性 CAR 之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)結合部分(例如，sdAb、scFv)；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域。在一些實施例中，提供一種載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)，自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)、編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸、第一連接序列(例如 IRES、編碼諸如 P2A 或 T2A 之自裂解 2A 肽之核酸序列)、視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如$(GGGS)_3$連接體之連接體之撓性核酸序列)及編碼包含以下之功能性 CAR 之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)抗 BCMA sdAb；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域。在一些實施例中，提供一種載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)，自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)、編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸、第一連接

序列 IRES、視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如$(GGGS)_3$ 連接體之撓性連接體之核酸序列)及編碼包含以下之功能性 CAR 之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)抗 BCMA sdAb；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域。在一些實施例中，提供一種載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)，自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)、編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸、編碼 P2A 之第一連接序列、視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如$(GGGS)_3$ 連接體之撓性連接體之核酸序列)及編碼包含以下之功能性 CAR 之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)抗 BCMA sdAb；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域。在一些實施例中，提供一種載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)，自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)、編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸、第一連接序列(例如 IRES、編碼諸如 P2A 或 T2A 之自裂解 2A 肽之核酸序列)、視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如$(GGGS)_3$ 連接體之撓性連接體之核酸序列)及編碼包含以下之功能性嵌合 TCR (cTCR)之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之連接體；(c)第一 TCR 次單元(例如，CD3ε)的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；(d)包含第二 TCR 次單元(例如，CD3ε)的跨膜結構域之跨膜結構域；及(e)包含第三 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞內信號傳導結構域之細胞內信號傳導結構域；其中該第一、第二及第三 TCR 次單元均係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群。在一些實施例中，該第一、第二及第三 TCR 次單元為相同的(例如，均為 CD3ε)。在一些實施例中，該第一、第二及第三 TCR 次單元為不同的。在一些實施例中，

提供一種載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)，自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)、編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸、第一連接序列(例如 IRES、編碼諸如 P2A 或 T2A 之自裂解 2A 肽之核酸序列)、視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如$(GGGS)_3$連接體之撓性連接體之核酸序列)及編碼包含以下之功能性嵌合 TCR (cTCR)之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之連接體；及(c)全長 CD3ε (排除信號肽)。在一些實施例中，該 cTCR 為包含胺基酸序列 SEQ ID NO: 64 之抗 CD20 cTCR。在一些實施例中，提供一種載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)，自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)、編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸、第一連接序列(例如 IRES、編碼諸如 P2A 或 T2A 之自裂解 2A 肽之核酸序列)、視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如$(GGGS)_3$連接體之撓性連接體之核酸序列)及編碼包含以下之功能性 T 細胞抗原偶合物(TAC)之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；(e)第一 TCR 輔受體(例如，CD4)的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；(f)包含第二 TCR 輔受體(例如，CD4)的跨膜結構域之跨膜結構域；及(g)包含第三 TCR 輔受體(例如，CD4)的細胞內信號傳導結構域之視情況存在之細胞內信號傳導結構域；其中該 TCR 次單元係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群；且其中該第一、第二及第三 TCR 輔受體均係選自由 CD4、CD8 及 CD28 組成之群。在一些實施例中，該第一、第二及第三 TCR 輔受體為相同的。在一些實施例中，該第一、

第二及第三 TCR 輔受體為不同的。在一些實施例中，提供一種載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)，自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)、編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸、第一連接序列(例如 IRES、編碼諸如 P2A 或 T2A 之自裂解 2A 肽之核酸序列)、視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如$(GGGS)_3$連接體之撓性連接體之核酸序列)及編碼包含以下之功能性 T 細胞抗原偶合物(TAC)之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；(e) CD4 之細胞外結構域或其一部分；(f) CD4 之跨膜結構域；及(g) CD4 之細胞內信號傳導結構域；其中該 TCR 次單元係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群。在一些實施例中，該 TAC 為包含胺基酸序列 SEQ ID NO: 66 之抗 CD20 TAC。在一些實施例中，提供一種載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)，自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)、編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸、第一連接序列(例如 IRES、編碼諸如 P2A 或 T2A 之自裂解 2A 肽之核酸序列)、視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如$(GGGS)_3$連接體之撓性連接體之核酸序列)及編碼包含以下之功能性 TAC 樣嵌合受體之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別第一 TCR 次單元(例如，TCRα)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；(e)第二 TCR 次單元(例如，CD3ε)的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；(f)包含第三 TCR 次單元(例如，CD3ε)的跨膜結構域之跨膜結構域；及(g)包含第四 TCR 次單元(例

如，CD3ε)的細胞內信號傳導結構域之視情況存在之細胞內信號傳導結構域；其中該第一、第二、第三及第四 TCR 次單元均係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群。在一些實施例中，該第二、第三及第四 TCR 次單元為相同的。在一些實施例中，該第一、第二、第三及第四 TCR 次單元為相同的。在一些實施例中，該第一、第二、第三及第四 TCR 次單元為不同的。在一些實施例中，該第二、第三及第四 TCR 次單元為相同的，但不同於該第一 TCR 次單元。在一些實施例中，提供一種載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)，自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)、編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸、第一連接序列(例如 IRES、編碼諸如 P2A 或 T2A 之自裂解 2A 肽之核酸序列)、視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如$(GGGS)_3$ 連接體之撓性連接體之核酸序列)及編碼包含以下之功能性 TAC 樣嵌合受體之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元(例如，TCRα)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；及(e)全長 CD3ε (排除信號肽)；其中該 TCR 次單元係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群。在一些實施例中，該 Nef 蛋白包含 SEQ ID NO: 12-22 中任一者之胺基酸序列。在一些實施例中，該 Nef 蛋白為突變型 SIV Nef，其包含在以下中之任一者之胺基酸殘基處之一或多種突變：(i) aa 2-4、aa 8-10、aa 11-13、aa 38-40、aa 44-46、aa 47-49、aa 50-52、aa 53-55、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 110-112、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、aa 178-179、179-181aa、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 191-193、aa 194-196、aa 203-205、aa 206-208、aa 212-214、aa 215-217、aa 218-

220、aa 221-223、aa 8-13、aa 44-67、aa 107-112、aa 164-196、aa 203-208 或 aa 212-223；(ii) aa 2-4、aa 44-46、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 44-67、aa 164-169、aa 176-181、aa 185-190；(iii) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、178-179aa、aa 179-181、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67 或 aa 164-190；或(iv) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67、aa 164-169、aa 176-181 或 aa 185-190；其中該胺基酸殘基位置對應於野生型 SIV Nef 之彼位置。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR、CD4 及 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 之細胞表面表現，但不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD4 之細胞表面表現，但不下調 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD28 之細胞表面表現，但不下調 CD4 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調內源 TCR 之細胞表面表現，但不下調(例如，下調細胞表面表現)外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經

工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))。在一些實施例中，該功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))由該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調(例如，下調細胞表面表現)達至多約 50%、40%、30%、20%、10%或 5%中任一者。

【0129】 在一些實施例中，提供一種載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)，自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)、編碼包含細胞外配位體結合結構域及視情況存在之細胞內信號傳導結構域的功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))之第二核酸、第一連接序列(例如 IRES、編碼諸如 P2A 或 T2A 之自裂解 2A 肽之核酸序列)、視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如$(GGGS)_3$ 連接體之撓性連接體之核酸序列)及編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸。在一些實施例中，提供一種載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)，自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)、編碼包含細胞外配位體結合結構域及視情況存在之細胞內信號傳導結構域的功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))之第二核酸、第一連接序列 IRES、視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如$(GGGS)_3$ 連接體之撓性連接體之核酸序列)及編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸。在一些實施例中，提供一種載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)，自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)、編碼包含細胞外配位體結合結構域及視

情況存在之細胞內信號傳導結構域的功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))之第二核酸、編碼 P2A 之第一連接序列、視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如$(GGGS)_3$ 連接體之撓性連接體之核酸序列)及編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸。在一些實施例中，提供一種載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)，自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)；編碼包含以下之功能性 CAR 之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)結合部分(例如，sdAb、scFv)；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域；第一連接序列(例如 IRES、編碼諸如 P2A 或 T2A 之自裂解 2A 肽之核酸序列)；視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如$(GGGS)_3$ 連接體之撓性連接體之核酸序列)；及編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸。在一些實施例中，提供一種載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)，自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)；編碼包含以下之功能性 CAR 之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)結合部分(例如，sdAb、scFv)；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域；第一連接序列 IRES；視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如$(GGGS)_3$ 連接體之撓性連接體之核酸序列)；及編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸。在一些實施例中，提供一種載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)，自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)；編碼包含以下之功能性 CAR 之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)結合部分(例如，

sdAb、scFv)；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域；編碼 P2A 之第一連接序列；視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如$(GGGS)_3$ 連接體之撓性連接體之核酸序列)；及編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸。在一些實施例中，提供一種載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)，自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)；編碼包含以下之功能性 CAR 之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)抗 BCMA sdAb；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域；第一連接序列(例如 IRES、編碼諸如 P2A 或 T2A 之自裂解 2A 肽之核酸序列)；視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如$(GGGS)_3$ 連接體之撓性連接體之核酸序列)；及編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸。在一些實施例中，提供一種載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)，自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)；編碼包含以下之功能性 CAR 之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)抗 BCMA sdAb；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域；第一連接序列 IRES；視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如$(GGGS)_3$ 連接體之撓性連接體之核酸序列)；及編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸。在一些實施例中，提供一種載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)，自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)；編碼包含以下之功能性 CAR 之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)抗 BCMA sdAb；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域；編碼 P2A 之第一連接序列；視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如$(GGGS)_3$ 連接體之撓性連接體之核酸序列)；及編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸。在一些實施例中，提供一種載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)，自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)；編

碼包含以下之功能性嵌合 TCR (cTCR)之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之連接體；(c)第一TCR 次單元(例如，CD3ε)的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；(d)包含第二 TCR 次單元(例如，CD3ε)的跨膜結構域之跨膜結構域；及(e)包含第三 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞內信號傳導結構域之細胞內信號傳導結構域，其中該第一、第二及第三 TCR 次單元均係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群；第一連接序列(例如 IRES、編碼諸如 P2A 或 T2A 之自裂解 2A 肽之核酸序列)；視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如$(GGGS)_3$ 連接體之撓性連接體之核酸序列)；及編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸。在一些實施例中，該第一、第二及第三 TCR 次單元為相同的(例如，均為 CD3ε)。在一些實施例中，該第一、第二及第三 TCR 次單元為不同的。在一些實施例中，提供一種載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)，自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)；編碼包含以下之功能性嵌合 TCR (cTCR)之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之連接體；及(c)全長 CD3ε (排除信號肽)；第一連接序列(例如 IRES、編碼諸如 P2A 或 T2A 之自裂解 2A 肽之核酸序列)；視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如$(GGGS)_3$ 連接體之撓性連接體之核酸序列)；及編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸。在一些實施例中，該 cTCR 為包含胺基酸序列 SEQ ID NO: 64 之抗 CD20 cTCR。在一些實施例中，提供一種載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)，自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)；編碼包含以下之功能性 T 細胞抗原偶合物(TAC)之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，

BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；(e)第一 TCR 輔受體(例如，CD4)的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；(f)包含第二 TCR 輔受體(例如，CD4)的跨膜結構域之跨膜結構域；及(g)包含第三 TCR 輔受體(例如，CD4)的細胞內信號傳導結構域之視情況存在之細胞內信號傳導結構域，其中該 TCR 次單元係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群，其中該第一、第二及第三 TCR 輔受體均係選自由 CD4、CD8 及 CD28 組成之群；第一連接序列(例如 IRES、編碼諸如 P2A 或 T2A 之自裂解 2A 肽之核酸序列)；視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如$(GGGS)_3$ 連接體之撓性連接體之核酸序列)；及編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸。在一些實施例中，該第一、第二及第三 TCR 輔受體為相同的。在一些實施例中，該第一、第二及第三 TCR 輔受體為不同的。在一些實施例中，提供一種載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)，自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)；編碼包含以下之功能性 T 細胞抗原偶合物(TAC)之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；(e) CD4 之細胞外結構域或其一部分；(f) CD4 之跨膜結構域；及(g) CD4 之細胞內信號傳導結構域，其中該 TCR 次單元係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群；第一連接序列(例如 IRES、編碼諸如 P2A 或 T2A 之自裂解 2A 肽之核酸序列)；視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如$(GGGS)_3$ 連接體之撓性連接體之核酸序列)；及編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第

一核酸。在一些實施例中，該 TAC 為包含胺基酸序列 SEQ ID NO: 66 之抗 CD20 TAC。在一些實施例中，提供一種載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)，自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)；編碼包含以下之功能性 TAC 樣嵌合受體之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別第一 TCR 次單元(例如，TCRα)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；(e)第二 TCR 次單元(例如，CD3ε)的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；(f)包含第三 TCR 次單元(例如，CD3ε)的跨膜結構域之跨膜結構域；及(g)包含第四 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞內信號傳導結構域之視情況存在之細胞內信號傳導結構域；其中該第一、第二、第三及第四 TCR 次單元均係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群；第一連接序列(例如 IRES、編碼諸如 P2A 或 T2A 之自裂解 2A 肽之核酸序列)；視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如$(GGGS)_3$ 連接體之撓性連接體之核酸序列)；及編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸。在一些實施例中，該第二、第三及第四 TCR 次單元為相同的。在一些實施例中，該第一、第二、第三及第四 TCR 次單元為相同的。在一些實施例中，該第一、第二、第三及第四 TCR 次單元為不同的。在一些實施例中，該第二、第三及第四 TCR 次單元為相同的，但不同於該第一 TCR 次單元。在一些實施例中，提供一種載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)，自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)；編碼包含以下之功能性 TAC 樣嵌合受體之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元(例如，TCRα)的細胞外結構域；(d)視情況存

在之第二連接體；及(e)全長 CD3ε (排除信號肽)，其中該 TCR 次單元係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群；第一連接序列(例如 IRES、編碼諸如 P2A 或 T2A 之自裂解 2A 肽之核酸序列)；視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如$(GGGS)_3$連接體之撓性連接體之核酸序列)；及編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸。在一些實施例中，該 Nef 蛋白包含 SEQ ID NO: 12-22 中任一者之胺基酸序列。在一些實施例中，該 Nef 蛋白為突變型 SIV Nef，其包含在以下中之任一者之胺基酸殘基處之一或多種突變：(i) aa 2-4、aa 8-10、aa 11-13、aa 38-40、aa 44-46、aa 47-49、aa 50-52、aa 53-55、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 110-112、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、aa 178-179、179-181aa、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 191-193、aa 194-196、aa 203-205、aa 206-208、aa 212-214、aa 215-217、aa 218-220、aa 221-223、aa 8-13、aa 44-67、aa 107-112、aa 164-196、aa 203-208 或 aa 212-223；(ii) aa 2-4、aa 44-46、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 44-67、aa 164-169、aa 176-181、aa 185-190；(iii) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、178-179aa、aa 179-181、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67 或 aa 164-190；或(iv) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67、aa 164-169、aa 176-181 或 aa 185-190；其中該胺基酸殘基位置對應於野生型 SIV Nef 之彼位置。在一些實施例中，該

Nef蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR、CD4 及 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 之細胞表面表現，但不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD4 之細胞表面表現，但不下調 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD28 之細胞表面表現，但不下調 CD4 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調內源 TCR 之細胞表面表現，但不下調(例如，下調細胞表面表現)外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))。在一些實施例中，該功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))由該 Nef蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調(例如，下調細胞表面表現)達至多約 50%、40%、30%、20%、10%或 5%中任一者。

III. 產生經修飾 T 細胞之方法

【0130】　本發明之一態樣提供產生上述經修飾 T 細胞中之任一者的方法。該方法一般而言涉及將編碼 Nef (諸如突變型 Nef)之第二核酸及視情況存在之編碼功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體

/受體之 CAR 或 ACTR))之第二核酸引入至原生或經工程改造 T 細胞(本文中稱作「前驅體 T 細胞」)中。

【0131】　在一些實施例中，該等前驅體 T 細胞係源於血液、骨髓、淋巴或淋巴器官，為免疫系統之細胞，諸如先天或適應性免疫性之細胞。在一些態樣中，該等細胞為人類細胞。

【0132】　在一些實施例中，該等前驅體 T 細胞係源於細胞株，例如 T 細胞株。在一些實施例中，該等細胞獲自異種來源，例如獲自小鼠、大鼠、非人類靈長類動物及豬。

【0133】　在一些實施例中，該等前驅體 T 細胞為 CD4+/CD8-、CD4-/CD8+、CD4+/CD8+、CD4-/CD8-或其組合。在一些實施例中，該 T 細胞為天然殺手 T (NKT)細胞。在一些實施例中，該前驅體 T 細胞為經工程改造 T 細胞，諸如任何本文所述之功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如，傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))。在一些實施例中，該等前驅體 T 細胞在表現本文所述之功能性外源受體(例如經工程改造 TCR (例如，傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))且結合於諸如 BCMA+腫瘤細胞之標靶細胞時產生 IL-2、TFN 及/或 TNF。在一些實施例中，CD8+ T 細胞在表現本文所述之功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如，傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))且結合於標靶細胞時溶解抗原特異性標靶細胞。

【0134】　在一些實施例中，該等 T 細胞係自諸如造血幹細胞、多能幹細胞、iPS 或胚胎幹細胞之幹細胞分化。

【0135】　在一些實施例中，該 Nef 及/或功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如，傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))係藉由轉染任一核酸或任一本文所述之載體(例如，非病毒載體及病毒載體，諸如慢病毒載體)引入至該等 T 細胞中。在一些實施例中，該功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如，傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))係藉由將蛋白質插入至細胞膜中，同時使細胞穿過微流體系統(諸如 CELL SQUEEZE®)引入至該等 T 細胞中(參見例如美國專利申請公開案第 20140287509 號)。

【0136】　將載體(例如，病毒載體)或經分離核酸引入至哺乳動物細胞中之方法為此項技術中已知的。本文所述之載體可藉由物理、化學或生物學方法轉移至 T 細胞中。

【0137】　用於將載體(例如，病毒載體)引入至 T 細胞中之物理方法包括磷酸鈣沈澱、脂質轉染、粒子轟擊、微注射、電穿孔及其類似方法。用於產生包含載體及/或外源核酸之細胞之方法為此項技術中熟知的。參見例如 Sambrook 等人 (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York。在一些實施例中，該載體(例如，病毒載體)係藉由電穿孔引入至細胞中。

【0138】　用於將載體引入至 T 細胞中之生物學方法包括使用 DNA 及 RNA 載體。病毒載體已成為用於將基因插入至哺乳動物(例如，人類細胞)中之最廣泛使用方法。

【0139】　用於將載體(例如，病毒載體)引入至 T 細胞中之化學方法包括膠體分散系統，諸如巨分子複合物、奈米膠囊、微球、珠粒及基於脂質之系統(包括水包油乳液、膠束、混合膠束及脂質體)。活體外用作遞送媒劑之例示性膠體系統

為脂質體(例如，人工膜囊)。

【0140】　在一些實施例中，可藉由習知方法(例如，活體外轉錄)製備編碼任何本文所述之 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)及/或功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))之 RNA 分子，且然後經由諸如 mRNA 電穿孔之已知方法將其引入至 T 細胞中。參見例如 Rabinovich 等人, Human Gene Therapy 17:1027-1035。

【0141】　在一些實施例中，在引入載體或經分離核酸之後，使經轉導或經轉染 T 細胞離體繁殖。在一些實施例中，將經轉導或經轉染 T 細胞培養以繁殖持續至少約 1 天、2 天、3 天、4 天、5 天、6 天、7 天、10 天、12 天或 14 天中任一者。在一些實施例中，對經轉導或經轉染 T 細胞進行進一步評估或篩選以選擇經工程改造哺乳動物細胞。

【0142】　報告基因可用於鑑別潛在經轉染細胞且用於評估調節序列之功能性。一般而言，報告基因係不存在於接受者生物體或組織中或不由接受者生物體或組織表現且所編碼多肽之表現係藉由一些可容易偵測之特性(例如，酶活性)顯現之基因。報告基因之表現在該 DNA 已經引入至接受者細胞中之後的合適時間加以分析。合適報告基因可包括編碼螢光素酶、β-半乳糖苷酶、氯黴素乙醯基轉移酶、分泌型鹼性磷酸酯酶之基因，或綠色螢光蛋白基因(例如，Ui-Tei 等人 FEBS Letters 479:79-82 (2000))。合適表現系統為熟知的且可使用已知技術製備或在商業上獲得。

【0143】　確認編碼任何本文所述之 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)及/或功能性外源受體(例如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗

體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))之核酸在經工程改造 T 細胞中之存在的其他方法包括例如熟習此項技術者熟知之分子生物學分析，諸如南方及北方印漬術(Southern and Northern blotting)、RT-PCR 及 PCR；生物化學分析，諸如偵測特定肽之存在或不存在，例如藉由免疫學方法(諸如 ELISA 及西方墨點(Western blot))、螢光活化細胞分選(FACS)或磁性活化細胞分選(MACS) (亦參見實例章節)。

【0144】 因此，在一些實施例中，提供一種產生經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞、內源 TCR 缺乏 T 細胞、GvHD 降至最低之 T 細胞)之方法，該方法包括：將編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸引入至前驅體 T 細胞中，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，該前驅體 T 細胞包含編碼包含細胞外配位體結合結構域及視情況存在之細胞內信號傳導結構域之功能性外源受體(例如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))之第二核酸。在一些實施例中，該方法進一步包括將編碼包含細胞外配位體結合結構域及視情況存在之細胞內信號傳導結構域之功能性外源受體之第二核酸引入該前驅體 T 細胞中。在一些實施例中，該第一核酸及該第二核酸係依序引入至該 T 細胞中。因此，在一些實施例中，提供一種產生經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞、內源 TCR 缺乏 T 細胞、GvHD 降至最低之 T 細胞)之方法，該方法包括：將編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸引入至前驅體 T 細胞中，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調；接著將編碼包含細胞外配位體結合結構域及視情況存在之細胞內信號傳導結構域的功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於

抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))之第二核酸引入至前驅體 T 細胞中。在一些實施例中，分離或富集 Nef 陽性及/或內源 TCR/CD3ε 陰性經修飾 T 細胞，接著將編碼包含細胞外配位體結合結構域及視情況存在之細胞內信號傳導結構域之功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))之第二核酸引入至經富集之經修飾 T 細胞中。在一些實施例中，將該第一核酸及該第二核酸同時引入至該 T 細胞中。在一些實施例中，該第一核酸及該第二核酸係在不同的載體上。因此，在一些實施例中，提供一種產生經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞、內源 TCR 缺乏 T 細胞、GvHD 降至最低之 T 細胞)之方法，該方法包括：將一載體上編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸及另一載體上編碼包含細胞外配位體結合結構域及視情況存在之細胞內信號傳導結構域的功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))之第二核酸同時引入至前驅體 T 細胞中，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，該 Nef 蛋白包含 SEQ ID NO: 12-22 中任一者之胺基酸序列。在一些實施例中，該 Nef 蛋白為突變型 SIV Nef，其包含在以下中之任一者之胺基酸殘基處之一或多種突變：(i) aa 2-4、aa 8-10、aa 11-13、aa 38-40、aa 44-46、aa 47-49、aa 50-52、aa 53-55、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 110-112、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、aa 178-179、179-181aa、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 191-193、aa 194-196、aa 203-205、aa 206-208、aa 212-214、aa 215-217、aa 218-220、aa 221-223、aa 8-13、aa 44-67、aa 107-112、aa 164-196、aa 203-208 或 aa 212-223；(ii)

aa 2-4、aa 44-46、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 44-67、aa 164-169、aa 176-181、aa 185-190；(iii) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、178-179aa、aa 179-181、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67 或 aa 164-190；或(iv) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67、aa 164-169、aa 176-181 或 aa 185-190；其中該胺基酸殘基位置對應於野生型 SIV Nef 之彼位置。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR、CD4 及 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 之細胞表面表現，但不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD4 之細胞表面表現，但不下調 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD28 之細胞表面表現，但不下調 CD4 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調內源 TCR 之細胞表面表現，但不下調(例如，下調細胞表面表現)外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體

/受體之 CAR 或 ACTR))。在一些實施例中，該功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))由該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調(例如，下調細胞表面表現)達至多約 50%、40%、30%、20%、10%或 5%中任一者。

【0145】 在一些實施例中，該第一核酸及該第二核酸係在同一載體上。在一些實施例中，該第一核酸及該第二核酸可操作性連接至不同啟動子。因此，在一些實施例中，提供一種產生經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞、內源 TCR 缺乏 T 細胞、GvHD 降至最低之 T 細胞)之方法，該方法包括將包含編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸及編碼包含細胞外配位體結合結構域及視情況存在之細胞內信號傳導結構域的功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))之第二核酸的載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)引入至前驅體 T 細胞中，其中該第一核酸及該第二核酸可操作性連接至不同啟動子(例如，EF1-α 及 PGK)，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，該第一核酸係在該第二核酸上游。在一些實施例中，該第一核酸係在該第二核酸下游。在一些實施例中，提供一種產生經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞、內源 TCR 缺乏 T 細胞、GvHD 降至最低之 T 細胞)之方法，該方法包括將載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)引入至前驅體 T 細胞中，該載體自上游至下游：第一啟動子(例如，EF1-α)、編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸、第二啟動子(例如，PGK)及編碼包含細胞外配位體結合結構域及視情況存在之細胞內信號傳導結構域的功能性外源受體(例如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、

TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))之第二核酸，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，提供一種產生經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞、內源 TCR 缺乏 T 細胞、GvHD 降至最低之 T 細胞)之方法，該方法包括將載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)引入至前驅體 T 細胞中，該載體自上游至下游：第二啟動子(例如，EF1-α)、編碼包含細胞外配位體結合結構域及視情況存在之細胞內信號傳導結構域的功能性外源受體(例如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))之第二核酸、第一啟動子(例如，PGK)、編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。

【0146】　在一些實施例中，該第一核酸及該第二核酸可操作性連接至同一啟動子。因此，在一些實施例中，提供一種產生經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞、內源 TCR 缺乏 T 細胞、GvHD 降至最低之 T 細胞)之方法，該方法包括將包含編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸及編碼包含細胞外配位體結合結構域及視情況存在之細胞內信號傳導結構域的功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))之第二核酸的載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)引入至前驅體 T 細胞中，其中該第一核酸及該第二核酸可操作性連接至同一啟動子(例如，EF1-α)，且其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，該第一核酸係在該第二核酸上游。在一些實施例中，該第一核酸係在該第二核酸下游。在一些實施例中，該第一核酸及該第二核酸經

由連接序列(例如 IRES、編碼諸如 P2A 或 T2A 之自裂解 2A 肽之核酸序列)連接。

【0147】　因此，在一些實施例中，提供一種產生經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞、內源 TCR 缺乏 T 細胞、GvHD 降至最低之 T 細胞)之方法，該方法包括將載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)引入至前驅體 T 細胞中，該載體自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)、編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸、第一連接序列(例如 IRES、編碼諸如 P2A 或 T2A 之自裂解 2A 肽之核酸序列)、視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如 $(GGGS)_3$ 連接體之撓性連接體之核酸序列)及編碼包含細胞外配位體結合結構域及視情況存在之細胞內信號傳導結構域的功能性外源受體(例如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))之第二核酸，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，提供一種產生經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞、內源 TCR 缺乏 T 細胞、GvHD 降至最低之 T 細胞)之方法，該方法包括將載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)引入至前驅體 T 細胞中，該載體自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)、編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸、第一連接序列 IRES、視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如 $(GGGS)_3$ 連接體之撓性連接體之核酸序列)及編碼包含細胞外配位體結合結構域及視情況存在之細胞內信號傳導結構域的功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))之第二核酸，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，提供一種產生經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞、內源 TCR 缺乏 T 細胞、GvHD 降至最低之 T 細胞)之方法，該方法包括將載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)

引入至前驅體 T 細胞中，該載體自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)、編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸、編碼 P2A 之第一連接序列、視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如$(GGGS)_3$ 連接體之撓性連接體之核酸序列)及編碼包含細胞外配位體結合結構域及視情況存在之細胞內信號傳導結構域的功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))之第二核酸，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，提供一種產生經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞、內源 TCR 缺乏 T 細胞、GvHD 降至最低之 T 細胞)之方法，該方法包括將載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)引入至前驅體 T 細胞中，該載體自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)、編碼包含細胞外配位體結合結構域及視情況存在之細胞內信號傳導結構域的功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))之第二核酸、第一連接序列(例如 IRES、編碼諸如 P2A 或 T2A 之自裂解 2A 肽之核酸序列)、視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如$(GGGS)_3$ 連接體之撓性連接體之核酸序列)及編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，提供一種產生經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞、內源 TCR 缺乏 T 細胞、GvHD 降至最低之 T 細胞)之方法，該方法包括將載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)引入至前驅體 T 細胞中，該載體自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)、編碼包含細胞外配位體結合結構域及視情況存在之細胞內信號傳導結構域的功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，

基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))之第二核酸、第一連接序列 IRES、視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如$(GGGS)_3$連接體之撓性連接體之核酸序列)及編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，提供一種產生經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞、內源 TCR 缺乏 T 細胞、GvHD 降至最低之 T 細胞)之方法，該方法包括將載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)引入至前驅體 T 細胞中，該載體自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)、編碼包含細胞外配位體結合結構域及視情況存在之細胞內信號傳導結構域的功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))之第二核酸、編碼 P2A 之第一連接序列、視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如$(GGGS)_3$連接體之撓性連接體之核酸序列)及編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，該 Nef 蛋白包含 SEQ ID NO: 12-22 中任一者之胺基酸序列。在一些實施例中，該 Nef 蛋白為突變型 SIV Nef，其包含在以下中之任一者之胺基酸殘基處之一或多種突變：(i) aa 2-4、aa 8-10、aa 11-13、aa 38-40、aa 44-46、aa 47-49、aa 50-52、aa 53-55、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 110-112、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、aa 178-179、179-181aa、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 191-193、aa 194-196、aa 203-205、aa 206-208、aa 212-214、aa 215-217、aa 218-220、aa 221-223、aa 8-13、aa 44-67、aa 107-112、aa 164-196、aa 203-208 或 aa 212-223；(ii) aa 2-4、aa 44-46、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa

167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 44-67、aa 164-169、aa 176-181、aa 185-190；(iii) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、178-179aa、aa 179-181、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67 或 aa 164-190；或(iv) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67、aa 164-169、aa 176-181 或 aa 185-190；其中該胺基酸殘基位置對應於野生型 SIV Nef 之彼位置。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR、CD4 及 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 之細胞表面表現，但不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD4 之細胞表面表現，但不下調 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD28 之細胞表面表現，但不下調 CD4 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調內源 TCR 之細胞表面表現，但不下調(例如，下調細胞表面表現)外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))。在一些實施例中，該功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、

嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))由該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調(例如，下調細胞表面表現)達至多約 50%、40%、30%、20%、10%或 5%中任一者。

【0148】　在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)在表現時下調經修飾 T 細胞中之內源 TCR、MHC、CD3ε、CD3γ 及/或 CD3δ，諸如下調內源 TCR、MHC、CD3ε、CD3γ 及/或 CD3δ 之細胞表現達至少約 50%、60%、70%、80%、90%或 95%中任一者。在一些實施例中，表現 Nef 之經修飾 T 細胞包含未經修飾內源 TCR 基因座。在一些實施例中，表現 Nef 之經修飾 T 細胞包含經修飾內源 TCR 基因座，諸如 TCRα 或 TCRβ。在一些實施例中，內源 TCR 基因座由選自 CRISPR-Cas、TALEN 及 ZFN 之基因編輯系統修飾。

【0149】　在一些實施例中，內源 TCR 基因座由 CRISPR-Cas 系統修飾，該 CRISPR-Cas 系統包括包含核酸序列 SEQ ID NO: 23 之 gRNA。在一些實施例中，該 Nef 蛋白係選自由 SIV Nef、HIV1 Nef、HIV2 Nef 及其同系物(諸如 HIV F2 Nef、HIVC2 Nef 及 HIV H2N2 Nef)組成之群。在一些實施例中，該 Nef 蛋白為野生型 Nef。在一些實施例中，該 Nef 蛋白包含 SEQ ID NO: 12-17 中任一者之胺基酸序列。在一些實施例中，該 Nef 蛋白為突變型 Nef。在一些實施例中，該突變型 Nef 包含在肉豆蔻醯化位點、N 端 α-螺旋、基於酪胺酸之 AP 募集、CD4 結合位點、酸性簇、基於脯胺酸之重複序列、PAK 結合結構域、COP I 募集結構域、基於二-白胺酸之 AP 募集結構域、V-ATP 酶及 Raf-1 結合結構域或其任何組合中之一或多種突變，或包含在表 11 中列出的任何胺基酸殘基處之一或多種突變。在一些實施例中，該突變包含插入、缺失、點突變及/或重排。在一些實施例中，該突變型 Nef 包含 SEQ ID NO: 18-22 中任一者之胺基酸序列。在一些實

施例中，該突變型 Nef 為突變型 SIV Nef，其包含在以下中之任一者之胺基酸殘基處之一或多種突變：(i) aa 2-4、aa 8-10、aa 11-13、aa 38-40、aa 44-46、aa 47-49、aa 50-52、aa 53-55、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 110-112、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、aa 178-179、179-181aa、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 191-193、aa 194-196、aa 203-205、aa 206-208、aa 212-214、aa 215-217、aa 218-220、aa 221-223、aa 8-13、aa 44-67、aa 107-112、aa 164-196、aa 203-208 或 aa 212-223；(ii) aa 2-4、aa 44-46、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 44-67、aa 164-169、aa 176-181、aa 185-190；(iii) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、178-179aa、aa 179-181、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67 或 aa 164-190；或(iv) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67、aa 164-169、aa 176-181 或 aa 185-190；其中該胺基酸殘基位置對應於野生型 SIV Nef 之彼位置。在一些實施例中，與野生型 Nef 蛋白相比，該突變型 Nef (例如，突變型 SIV Nef)在經修飾 T 細胞中表現時降低對內源 CD4 及/或 CD28 之下調效應(例如，細胞表面表現之下調)，諸如降低該下調效應達至少約 50%、60%、70%、80%、90%或 95%中任一者。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些

實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR、CD4 及 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 之細胞表面表現，但不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD4 之細胞表面表現，但不下調 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD28 之細胞表面表現，但不下調 CD4 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調內源 TCR 之細胞表面表現，但不下調(例如，下調細胞表面表現)外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))。在一些實施例中，該功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))由該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調(例如，下調細胞表面表現)達至多約 50%、40%、30%、20%、10%或 5%中任一者。

【0150】　在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)在表現時不下調(例如，下調表現) CD3ζ、CD4、CD28 及/或包含細胞外配位體結合結構域及視情況存在之細胞內信號傳導結構域的功能性外源受體(例如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))，或下調(例如，下調表現) CD3ζ、CD4、CD28 及/或包含細胞外配位體結合結構域及視情況存在之細胞內信號傳導結構域的功能性外源受體達至多約 50%、40%、30%、20%、10%或 5%中任一者。

【0151】　在一些實施例中，該啟動子係選自由勞氏肉瘤病毒(RSV)啟動子、猿病毒 40 (SV40)啟動子、細胞巨大病毒即刻早期基因啟動子(CMV IE)、延伸因子 1 α 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、細胞巨大病毒增強子/雞 β-肌動蛋白(CAG)啟動子、多瘤增強子/單純疱疹胸苷激酶(MC1)啟動子、β 肌動蛋白(β-ACT)啟動子、「骨髓增殖性肉瘤病毒增強子，陰性對照區缺失，d1587rev 引子-結合位點經取代(MND) 」啟動子、NFAT 啟動子、TETON®啟動子及 NFκB 啟動子組成之群。在一些實施例中，該啟動子為 EF1-α 或 PGK。

【0152】　在一些實施例中，該連接序列包含編碼 P2A、T2A、E2A、F2A、BmCPV 2A、BmIFV 2A、$(GS)_n$、$(GSGGS)_n$、$(GGGS)_n$、$(GGGGS)_n$ 之核酸序列或 IRES、SV40、CMV、UBC、EF1α、PGK、CAGG 之核酸序列或其任何組合中任一者，其中 n 係至少為 1 之整數。在一些實施例中，該連接序列為 IRES。在一些實施例中，該連接序列為編碼 P2A 之核酸序列。

【0153】　在一些實施例中，該載體為病毒載體。在一些實施例中，該病毒載體係選自由腺病毒載體、腺相關病毒載體、逆轉錄病毒載體、牛痘載體、慢病毒載體、單純疱疹病毒載體及其衍生物組成之群。在一些實施例中，該載體為非病毒載體，諸如游離型表現載體、增強游離型載體(EEV)、PiggyBac 轉座酶載體或睡美人(SB)轉座子系統。在一些實施例中，該功能性外源受體為經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR)。在一些實施例中，該功能性外源受體為 TAC、TAC 樣嵌合受體。在一些實施例中，該功能性外源受體為非 TCR 受體，諸如 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR、ACTR)。

【0154】　在一些實施例中，該功能性外源受體為包含以下之 CAR：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)結合部分(例如，sdAb、

scFv)；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域。在一些實施例中，該一或多個結合部分為抗體或其抗原結合片段。在一些實施例中，該一或多個結合部分係選自由駱駝 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、$(scFv)_2$、微型抗體、雙功能抗體、三功能抗體、四功能抗體、二硫化物穩定化 Fv 蛋白(dsFv)及單結構域抗體(sdAb、奈米抗體)組成之群。在一些實施例中，該一或多個結合部分為 sdAb (例如，抗 BCMA sdAb)或 scFv。在一些實施例中，該細胞外配位體結合結構域包含連接在一起之兩個或更多個 sdAb。在一些實施例中，該細胞外配位體結合結構域包含連接在一起之兩個或更多個 scFv。在一些實施例中，該一或多個結合部分包含源於配位體之至少一個結構域或受體之細胞外結構域，其中該配位體或受體為細胞表面抗原。在一些實施例中，該配位體或受體係源於選自由 NKG2A、NKG2C、NKG2F、NKG2D、BCMA、APRIL、BAFF、IL-3、IL-13、LLT1、AICL、DNAM-1 及 NKp80 組成之群之分子。在一些實施例中，該配位體係源於 APRIL 或 BAFF。在一些實施例中，該受體係源於 Fc 結合結構域，諸如 Fc 受體之細胞外結構域。在一些實施例中，該 Fc 受體為 Fcγ 受體(FcγR)。在一些實施例中，該 FcγR 係選自由 CD16A (FcγRIIIa)、CD16B (FcγRIIIb)、CD64A、CD64B、CD64C、CD32A 及 CD32B 組成之群。在一些實施例中，該 CAR 為單價及單特異性的。在一些實施例中，該 CAR 為多價(例如，雙特異性)及單特異性的。在一些實施例中，該 CAR 為多價(例如，二價)及多特異性(例如，雙特異性)。在一些實施例中，該抗原係選自由 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、醣脂 F77、PD-L1、PD-L2 及其任何組合組成之群。在一些實施例中，該抗原為 BCMA、CD19、CD20。在一些實施例中，該跨膜結構域係源於選自由 T 細胞受

體之 α、β 或 ζ 鏈、CD3ζ、CD3ε、CD4、CD5、CD8α、CD9、CD16、CD22、CD27、CD28、CD33、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137 (4-1BB)、CD152、CD154 及 PD-1 組成之群的分子。在一些實施例中，該跨膜結構域係源於 CD8α。在一些實施例中，該細胞內信號傳導結構域包含免疫效應子細胞之一級細胞內信號傳導結構域。在一些實施例中，該一級細胞內信號傳導結構域係源於 CD3ζ、CD3γ、CD3ε、CD3δ、FcRγ (FCER1G)、FcRβ (Fc ε RIb)、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD66d、Fc γ RIIa、DAP10 及 DAP12。在一些實施例中，該一級細胞內信號傳導結構域係源於 CD3ζ、DAP12 或 CD3γ。在一些實施例中，該細胞內信號傳導結構域包含共刺激信號傳導結構域。在一些實施例中，該共刺激信號傳導結構域係源於選自由 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 (淋巴球功能相關抗原-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、特異性地與 CD83 結合之配位體及其任何組合組成之群的共刺激分子。在一些實施例中，該共刺激信號傳導結構域包含 CD137 之細胞質結構域。在一些實施例中，本文所述之 CAR 進一步包含位於該細胞外配位體結合結構域之 C 端與該跨膜結構域之 N 端之間的鉸鏈結構域。在一些實施例中，該鉸鏈結構域係源於 CD8α。在一些實施例中，該 CAR 進一步包含位於該多肽之 N 端處的信號肽。在一些實施例中，該信號肽係源於 CD8α。在一些實施例中，該 CAR 自 N 端至 C 端包含：CD8α 信號肽、細胞外配位體結合結構域(例如，特異性地識別 BCMA、APRIL/BAFF 配位體或

Fc 受體之一或多種抗原決定基之一或多個 sdAb)、CD8α 鉸鏈結構域、CD8α 跨膜結構域、源於 CD137 之共刺激信號傳導結構域及源於 CD3ζ 之一級細胞內信號傳導結構域。

【0155】 在一些實施例中，該功能性外源受體為包含以下之嵌合 TCR (cTCR)：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之連接體；(c)第一 TCR 次單元(例如，CD3ε)的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；(d)包含第二 TCR 次單元(例如，CD3ε)的跨膜結構域之跨膜結構域；及(e)包含第三 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞內信號傳導結構域之細胞內信號傳導結構域；其中該第一、第二及第三 TCR 次單元均係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群。在一些實施例中，該第一、第二及第三 TCR 次單元為相同的(例如，均為 CD3ε)。在一些實施例中，該第一、第二及第三 TCR 次單元為不同的。在一些實施例中，該功能性外源受體為包含以下之 T 細胞抗原偶合物(TAC)：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；(e)第一 TCR 輔受體(例如，CD4)的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；(f)包含第二 TCR 輔受體(例如，CD4)的跨膜結構域之跨膜結構域；及(g)包含第三 TCR 輔受體(例如，CD4)的細胞內信號傳導結構域之視情況存在之細胞內信號傳導結構域；其中該 TCR 次單元係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群；且其中該第一、第二及第三 TCR 輔受體均係選自由 CD4、CD8 及 CD28 組成之群。在一些實施例中，該第一、第二及第三 TCR 輔受體為相同的。在一些實施例中，該第一、第二及第三 TCR 輔

受體為不同的。在一些實施例中，該功能性外源受體為包含以下之 TAC 樣嵌合受體：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別第一 TCR 次單元(例如，TCRα)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；(e)第二 TCR 次單元(例如，CD3ε)的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；(f)包含第三 TCR 次單元(例如，CD3ε)的跨膜結構域之跨膜結構域；及(g)包含第四 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞內信號傳導結構域之視情況存在之細胞內信號傳導結構域；其中該第一、第二、第三及第四 TCR 次單元均係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群。在一些實施例中，該第二、第三及第四 TCR 次單元為相同的。在一些實施例中，該第一、第二、第三及第四 TCR 次單元為相同的。在一些實施例中，該第一、第二、第三及第四 TCR 次單元為不同的。在一些實施例中，該第二、第三及第四 TCR 次單元為相同的，但不同於該第一 TCR 次單元。

【0156】　在一些實施例中，如與藉由自產生經修飾 T 細胞之前驅體 T 細胞之供體分離的原代 T 細胞引發之 GvHD 反應相比，表現 Nef (例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之經修飾 T 細胞在組織不相容性個體中不引發或引發降低之 GvHD 反應。在一些實施例中，該方法進一步包括分離或富集包含第一及/或第二核酸之 T 細胞。在一些實施例中，該方法進一步包括自表現 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之經修飾 T 細胞分離或富集 CD3ε 陰性 T 細胞。在一些實施例中，該方法進一步包括自表現 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之經修飾 T 細胞分離或富集內源 TCRα 陰性 T 細胞。在一些實施例中，該方法進一步包括用至少一種醫藥學上可接受之載劑調配表現 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)

之經修飾 T 細胞。在一些實施例中，該方法進一步包括向個體投與有效量的表現 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之經修飾 T 細胞，或有效量的包含表現 Nef 蛋白之經修飾 T 細胞及至少一種醫藥學上可接受之載劑之醫藥調配物。在一些實施例中，該個體患有癌症。在一些實施例中，該個體為人類。

【0157】 在一些實施例中，該功能性外源受體為包含以下之 CAR：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)結合部分(例如，sdAb、scFv)；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域。因此，在一些實施例中，提供一種產生經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞、內源 TCR 缺乏 T 細胞、GvHD 降至最低之 T 細胞)之方法，該方法包括：將編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸引入至前驅體 T 細胞中，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調；接著將編碼包含以下之 CAR 之第二核酸引入至前驅體 T 細胞中：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)結合部分(例如，sdAb、scFv)；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域。在一些實施例中，分離或富集 Nef 陽性及/或內源 TCR/CD3ε 陰性經修飾 T 細胞，接著將編碼該 CAR 之第二核酸引入至經富集之經修飾 T 細胞中。在一些實施例中，將該第一核酸及該第二核酸同時引入至該 T 細胞中。在一些實施例中，該第一核酸及該第二核酸係在不同的載體上。因此，在一些實施例中，提供一種產生經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞、內源 TCR 缺乏 T 細胞、GvHD 降至最低之 T 細胞)之方法，該方法包括：將一載體上編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸及另一載體上編碼包含以下之 CAR 之第二核酸同時引入至前驅體 T 細胞中：(a)細胞外配

位體結合結構域，其包含特異性地識別抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)結合部分(例如，sdAb、scFv)；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，該 Nef 蛋白包含 SEQ ID NO: 12-22 中任一者之胺基酸序列。在一些實施例中，該 Nef 蛋白為突變型 SIV Nef，其包含在以下中之任一者之胺基酸殘基處之一或多種突變：(i) aa 2-4、aa 8-10、aa 11-13、aa 38-40、aa 44-46、aa 47-49、aa 50-52、aa 53-55、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 110-112、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、aa 178-179、179-181aa、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 191-193、aa 194-196、aa 203-205、aa 206-208、aa 212-214、aa 215-217、aa 218-220、aa 221-223、aa 8-13、aa 44-67、aa 107-112、aa 164-196、aa 203-208 或 aa 212-223；(ii) aa 2-4、aa 44-46、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 44-67、aa 164-169、aa 176-181、aa 185-190；(iii) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、178-179aa、aa 179-181、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67 或 aa 164-190；或(iv) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67、aa 164-169、aa 176-181 或 aa 185-190；其中該胺基酸殘基位置對應於野生型 SIV Nef 之彼位置。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，

該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR、CD4 及 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 之細胞表面表現，但不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD4 之細胞表面表現，但不下調 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD28 之細胞表面表現，但不下調 CD4 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調內源 TCR 之細胞表面表現，但不下調(例如，下調細胞表面表現) CAR。在一些實施例中，該功能性 CAR 由該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調(例如，下調細胞表面表現)達至多約 50%、40%、30%、20%、10%或 5%中任一者。

【0158】 在一些實施例中，提供一種產生經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞、內源 TCR 缺乏 T 細胞、GvHD 降至最低之 T 細胞)之方法，該方法包括：將編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸引入至前驅體 T 細胞中，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調；接著將編碼包含以下之嵌合 TCR (cTCR)之第二核酸引入至前驅體 T 細胞中：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之連接體；(c)第一 TCR 次單元(例如，CD3ε)的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；(d)包含第二 TCR 次單元(例如，CD3ε)的跨膜結構域之跨膜結構域；及(e)包含第三 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞內信號傳導結構域之細胞內信號傳導結構域；其中該第一、第二及第三 TCR 次單元均係選自由 TCRα、

TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ及CD3δ組成之群。在一些實施例中，分離或富集Nef陽性及/或內源TCR/CD3ε陰性經修飾T細胞，接著將編碼該cTCR之第二核酸引入至經富集之經修飾T細胞中。在一些實施例中，該第一核酸及該第二核酸同時經引入至該T細胞中。在一些實施例中，該第一核酸及該第二核酸係在不同的載體上。因此，在一些實施例中，提供一種產生經修飾T細胞(例如，同種異體T細胞、內源TCR缺乏T細胞、GvHD降至最低之T細胞)之方法，該方法包括：將一載體上編碼Nef蛋白(例如wt Nef，或突變型Nef，諸如突變型SIV Nef)之第一核酸及另一載體上編碼包含以下之嵌合TCR (cTCR)之第二核酸同時引入至前驅體T細胞中：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之連接體；(c)第一TCR次單元(例如，CD3ε)的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；(d)包含第二TCR次單元(例如，CD3ε)的跨膜結構域之跨膜結構域；及(e)包含第三TCR次單元(例如，CD3ε)的細胞內信號傳導結構域之細胞內信號傳導結構域；其中該第一、第二及第三TCR次單元均係選自由TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ及CD3δ組成之群；且其中該Nef蛋白在表現時導致該經修飾T細胞中的內源TCR之下調。在一些實施例中，該第一、第二及第三TCR次單元為相同的(例如，均為CD3ε)。在一些實施例中，該第一、第二及第三TCR次單元為不同的。在一些實施例中，該Nef蛋白包含SEQ ID NO: 12-22中任一者之胺基酸序列。在一些實施例中，該Nef蛋白為突變型SIV Nef，其包含在以下中之任一者之胺基酸殘基處之一或多種突變：(i) aa 2-4、aa 8-10、aa 11-13、aa 38-40、aa 44-46、aa 47-49、aa 50-52、aa 53-55、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 110-112、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、aa 178-179、179-181aa、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-

190、aa 191-193、aa 194-196、aa 203-205、aa 206-208、aa 212-214、aa 215-217、aa 218-220、aa 221-223、aa 8-13、aa 44-67、aa 107-112、aa 164-196、aa 203-208 或 aa 212-223；(ii) aa 2-4、aa 44-46、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 44-67、aa 164-169、aa 176-181、aa 185-190；(iii) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、178-179aa、aa 179-181、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67 或 aa 164-190；或(iv) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67、aa 164-169、aa 176-181 或 aa 185-190；其中該胺基酸殘基位置對應於野生型 SIV Nef 之彼位置。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR、CD4 及 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 之細胞表面表現，但不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD4 之細胞表面表現，但不下調 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD28 之細胞表面表現，但不下調 CD4 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調內源 TCR 之細胞表面表現，

但不下調(例如，下調細胞表面表現) cTCR。在一些實施例中，該功能性 cTCR 由該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調(例如，下調細胞表面表現)達至多約 50%、40%、30%、20%、10%或 5%中任一者。

【0159】　在一些實施例中，提供一種產生經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞、內源 TCR 缺乏 T 細胞、GvHD 降至最低之 T 細胞)之方法，該方法包括：將編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸引入至前驅體 T 細胞中，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調；接著將編碼包含以下之 T 細胞抗原偶合物(TAC)之第二核酸引入至前驅體 T 細胞中：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；(e)第一 TCR 輔受體(例如，CD4)的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；(f)包含第二 TCR 輔受體(例如，CD4)的跨膜結構域之跨膜結構域；及(g)包含第三 TCR 輔受體(例如，CD4)的細胞內信號傳導結構域之視情況存在之細胞內信號傳導結構域；其中該 TCR 次單元係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群；且其中該第一、第二及第三 TCR 輔受體均係選自由 CD4、CD8 及 CD28 組成之群。在一些實施例中，分離或富集 Nef 陽性及/或內源 TCR/CD3ε 陰性經修飾 T 細胞，接著將編碼該 TAC 之第二核酸引入至經富集之經修飾 T 細胞中。在一些實施例中，該第一核酸及該第二核酸同時經引入至該 T 細胞中。在一些實施例中，該第一核酸及該第二核酸係在不同的載體上。因此，在一些實施例中，提供一種產生經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞、內源 TCR 缺乏 T 細胞、GvHD 降至最低之 T 細胞)之方法，該方法包括：將一載體上編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸

及另一載體上編碼包含以下之 T 細胞抗原偶合物(TAC)之第二核酸同時引入至前驅體 T 細胞中：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；(e)第一 TCR 輔受體(例如，CD4)的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；(f)包含第二 TCR 輔受體(例如，CD4)的跨膜結構域之跨膜結構域；及(g)包含第三 TCR 輔受體(例如，CD4)的細胞內信號傳導結構域之視情況存在之細胞內信號傳導結構域；其中該 TCR 次單元係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群；其中該第一、第二及第三 TCR 輔受體均係選自由 CD4、CD8 及 CD28 組成之群；且其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，該第一、第二及第三 TCR 輔受體為相同的(例如，均為 CD4)。在一些實施例中，該第一、第二及第三 TCR 輔受體為不同的。在一些實施例中，該 Nef 蛋白包含 SEQ ID NO: 12-22 中任一者之胺基酸序列。在一些實施例中，該 Nef 蛋白為突變型 SIV Nef，其包含在以下中之任一者之胺基酸殘基處之一或多種突變：(i) aa 2-4、aa 8-10、aa 11-13、aa 38-40、aa 44-46、aa 47-49、aa 50-52、aa 53-55、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 110-112、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、aa 178-179、179-181aa、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 191-193、aa 194-196、aa 203-205、aa 206-208、aa 212-214、aa 215-217、aa 218-220、aa 221-223、aa 8-13、aa 44-67、aa 107-112、aa 164-196、aa 203-208 或 aa 212-223；(ii) aa 2-4、aa 44-46、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、

aa 44-67、aa 164-169、aa 176-181、aa 185-190；(iii) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、178-179aa、aa 179-181、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67 或 aa 164-190；或(iv) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67、aa 164-169、aa 176-181 或 aa 185-190；其中該胺基酸殘基位置對應於野生型 SIV Nef 之彼位置。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR、CD4 及 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 之細胞表面表現，但不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD4 之細胞表面表現，但不下調 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD28 之細胞表面表現，但不下調 CD4 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調內源 TCR 之細胞表面表現，但不下調(例如，下調細胞表面表現) TAC。在一些實施例中，該功能性 TAC 由該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調(例如，下調細胞表面表現)達至多約 50%、40%、30%、20%、10%或 5%中任一者。

【0160】　在一些實施例中，提供一種產生經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞、內源 TCR 缺乏 T 細胞、GvHD 降至最低之 T 細胞)之方法，該方法包括：將

編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸引入至前驅體 T 細胞中，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調；接著將編碼包含以下之 TAC 樣嵌合受體之第二核酸引入至前驅體 T 細胞中：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別第一 TCR 次單元(例如，TCRα)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；(e)第二 TCR 次單元(例如，CD3ε)的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；(f)包含第三 TCR 次單元(例如，CD3ε)的跨膜結構域之跨膜結構域；及(g)包含第四 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞內信號傳導結構域之視情況存在之細胞內信號傳導結構域；其中該第一、第二、第三及第四 TCR 次單元均係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群。在一些實施例中，分離或富集 Nef 陽性及/或內源 TCR/CD3ε 陰性經修飾 T 細胞，接著將編碼該 TAC 樣嵌合受體之第二核酸引入至經富集之經修飾 T 細胞中。在一些實施例中，該第一核酸及該第二核酸同時經引入至該 T 細胞中。在一些實施例中，該第一核酸及該第二核酸係在不同的載體上。因此，在一些實施例中，提供一種產生經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞、內源 TCR 缺乏 T 細胞、GvHD 降至最低之 T 細胞)之方法，該方法包括：將一載體上編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸及另一載體上編碼包含以下之 TAC 樣嵌合受體之第二核酸同時引入至前驅體 T 細胞中：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別第一 TCR 次單元(例如，TCRα)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；(e)第二 TCR 次單元(例如，CD3ε)的視情況存在之細

胞外結構域或其一部分；(f)包含第三 TCR 次單元(例如，CD3ε)的跨膜結構域之跨膜結構域；及(g)包含第四 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞內信號傳導結構域之視情況存在之細胞內信號傳導結構域；其中該第一、第二、第三及第四 TCR 次單元均係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群；且其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，該第二、第三及第四 TCR 次單元為相同的。在一些實施例中，該第一、第二、第三及第四 TCR 次單元為相同的。在一些實施例中，該第一、第二、第三及第四 TCR 次單元為不同的。在一些實施例中，該第二、第三及第四 TCR 次單元為相同的，但不同於該第一 TCR 次單元。在一些實施例中，該 Nef 蛋白包含 SEQ ID NO: 12-22 中任一者之胺基酸序列。在一些實施例中，該 Nef 蛋白為突變型 SIV Nef，其包含在以下中之任一者之胺基酸殘基處之一或多種突變：(i) aa 2-4、aa 8-10、aa 11-13、aa 38-40、aa 44-46、aa 47-49、aa 50-52、aa 53-55、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 110-112、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、aa 178-179、179-181aa、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 191-193、aa 194-196、aa 203-205、aa 206-208、aa 212-214、aa 215-217、aa 218-220、aa 221-223、aa 8-13、aa 44-67、aa 107-112、aa 164-196、aa 203-208 或 aa 212-223；(ii) aa 2-4、aa 44-46、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 44-67、aa 164-169、aa 176-181、aa 185-190；(iii) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、178-179aa、aa 179-181、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67 或 aa 164-190；或(iv) aa 2-4、aa 56-

58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67、aa 164-169、aa 176-181 或 aa 185-190；其中該胺基酸殘基位置對應於野生型 SIV Nef 之彼位置。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR、CD4 及 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 之細胞表面表現，但不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD4 之細胞表面表現，但不下調 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD28 之細胞表面表現，但不下調 CD4 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調內源 TCR 之細胞表面表現，但不下調(例如，下調細胞表面表現) TAC 樣嵌合受體。在一些實施例中，該功能性 TAC 樣嵌合受體由該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調(例如，下調細胞表面表現)達至多約 50%、40%、30%、20%、10%或 5%中任一者。

【0161】　在一些實施例中，該第一核酸及該第二核酸係在同一載體上。在一些實施例中，該第一核酸及該第二核酸可操作性連接至不同啟動子。因此，在一些實施例中，提供一種產生經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞、內源 TCR 缺乏 T 細胞、GvHD 降至最低之 T 細胞)之方法，該方法包括將包含編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸及編碼包含以下之 CAR 之第二核酸的載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)引入至前驅體 T 細

胞中：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)結合部分(例如，sdAb、scFv)；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域，其中該第一核酸及該第二核酸可操作性連接至不同啟動子(例如，EF1-α 及 PGK)，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，該第一核酸係在該第二核酸上游。在一些實施例中，該第一核酸係在該第二核酸下游。在一些實施例中，提供一種產生經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞、內源 TCR 缺乏 T 細胞、GvHD 降至最低之 T 細胞)之方法，該方法包括將載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)引入至前驅體 T 細胞中，該載體自上游至下游：第一啟動子(例如，EF1-α)、編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸、第二啟動子(例如，PGK)及編碼包含以下之 CAR 之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別抗原(例如，BCMA、CD20、CD19)之一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)結合部分(例如，sdAb、scFv)；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，提供一種產生經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞、內源 TCR 缺乏 T 細胞、GvHD 降至最低之 T 細胞)之方法，該方法包括將載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)引入至前驅體 T 細胞中，該載體自上游至下游：第二啟動子(例如，EF1-α)；編碼包含以下之 CAR 之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)結合部分(例如，sdAb、scFv)；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域；第一啟動子(例如，PGK)；編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，該第一核酸及該第二核酸可操

作性連接至同一啟動子。因此，在一些實施例中，提供一種產生經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞、內源 TCR 缺乏 T 細胞、GvHD 降至最低之 T 細胞)之方法，該方法包括將包含編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸及編碼包含以下之 CAR 之第二核酸的載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)引入至前驅體 T 細胞中：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)結合部分(例如，sdAb、scFv)；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域，其中該第一核酸及該第二核酸可操作性連接至同一啟動子(例如，EF1-α)，且其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，該第一核酸係在該第二核酸上游。在一些實施例中，該第一核酸係在該第二核酸下游。在一些實施例中，該第一核酸及該第二核酸經由連接序列(例如 IRES、編碼諸如 P2A 或 T2A 之自裂解 2A 肽之核酸序列)連接。因此，在一些實施例中，提供一種產生經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞、內源 TCR 缺乏 T 細胞、GvHD 降至最低之 T 細胞)之方法，該方法包括將載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)引入至前驅體 T 細胞中，該載體自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)、編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸、第一連接序列(例如 IRES、編碼諸如 P2A 或 T2A 之自裂解 2A 肽之核酸序列)、視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如 $(GGGS)_3$ 連接體之撓性連接體之核酸序列)及編碼包含以下之 CAR 之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)結合部分(例如，sdAb、scFv)；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，提供一種產生經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞、內源 TCR 缺乏 T 細胞、GvHD 降至

最低之 T 細胞)之方法，該方法包括將載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)引入至前驅體 T 細胞中，該載體自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)、編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸、第一連接序列 IRES、視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如$(GGGS)_3$連接體之撓性連接體之核酸序列)及編碼包含以下之 CAR 之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)結合部分(例如，sdAb、scFv)；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，提供一種產生經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞、內源 TCR 缺乏 T 細胞、GvHD 降至最低之 T 細胞)之方法，該方法包括將載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)引入至前驅體 T 細胞中，該載體自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)、編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸、編碼 P2A 之第一連接序列、視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如$(GGGS)_3$連接體之撓性連接體之核酸序列)及編碼包含以下之 CAR 之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)結合部分(例如，sdAb、scFv)；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，提供一種產生經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞、內源 TCR 缺乏 T 細胞、GvHD 降至最低之 T 細胞)之方法，該方法包括將載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)引入至前驅體 T 細胞中，該載體自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)；編碼包含以下之 CAR 之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)結合部分(例如，sdAb、scFv)；(b)跨

膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域；第一連接序列(例如 IRES、編碼諸如 P2A 或 T2A 之自裂解 2A 肽之核酸序列)；視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如$(GGGS)_3$連接體之撓性連接體之核酸序列)；及編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，提供一種產生經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞、內源 TCR 缺乏 T 細胞、GvHD 降至最低之 T 細胞)之方法，該方法包括將載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)引入至前驅體 T 細胞中，該載體自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)；編碼包含以下之 CAR 之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)結合部分(例如，sdAb、scFv)；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域；第一連接序列 IRES；視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如$(GGGS)_3$連接體之撓性連接體之核酸序列)；及編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef、突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，提供一種產生經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞、內源 TCR 缺乏 T 細胞、GvHD 降至最低之 T 細胞)之方法，該方法包括將載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)引入至前驅體 T 細胞中，該載體自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)；編碼包含以下之 CAR 之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)結合部分(例如，sdAb、scFv)；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域；編碼 P2A 之第一連接序列；視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如$(GGGS)_3$連接體之撓性連接體之核酸序列)；及編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef、突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例

中，該 Nef 蛋白包含 SEQ ID NO: 12-22 中任一者之胺基酸序列。在一些實施例中，該 Nef 蛋白為突變型 SIV Nef，其包含在以下中之任一者之胺基酸殘基處之一或多種突變：(i) aa 2-4、aa 8-10、aa 11-13、aa 38-40、aa 44-46、aa 47-49、aa 50-52、aa 53-55、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 110-112、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、aa 178-179、179-181aa、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 191-193、aa 194-196、aa 203-205、aa 206-208、aa 212-214、aa 215-217、aa 218-220、aa 221-223、aa 8-13、aa 44-67、aa 107-112、aa 164-196、aa 203-208 或 aa 212-223；(ii) aa 2-4、aa 44-46、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 44-67、aa 164-169、aa 176-181、aa 185-190；(iii) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、178-179aa、aa 179-181、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67 或 aa 164-190；或(iv) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67、aa 164-169、aa 176-181 或 aa 185-190；其中該胺基酸殘基位置對應於野生型 SIV Nef 之彼位置。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR、CD4 及 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型

SIV Nef)下調 TCR 之細胞表面表現，但不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD4 之細胞表面表現，但不下調 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD28 之細胞表面表現，但不下調 CD4 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調內源 TCR 之細胞表面表現，但不下調(例如，下調細胞表面表現) CAR。在一些實施例中，該功能性 CAR 由該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調(例如，下調細胞表面表現)達至多約 50%、40%、30%、20%、10%或 5%中任一者。

【0162】　在一些實施例中，該功能性外源受體為包含以下之 CAR：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)抗 BCMA sdAb；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域。因此，在一些實施例中，提供一種產生經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞、內源 TCR 缺乏 T 細胞、GvHD 降至最低之 T 細胞)之方法，該方法包括：將編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸引入至前驅體 T 細胞中，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調；接著將編碼包含以下之 CAR 之第二核酸引入至前驅體 T 細胞中：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)抗 BCMA sdAb；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域。在一些實施例中，分離或富集 Nef 陽性及/或內源 TCR/CD3ε 陰性經修飾 T 細胞，接著將編碼該 CAR 之第二核酸引入至經富集之經修飾 T 細胞中。在一些實施例中，該第一核酸及該第二核酸同時經引入至該 T 細胞中。在一些實施例中，該第一核酸及該第二核酸係在不同的載體上。因此，在一些實施例中，提供一種產生經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞、內源 TCR 缺乏 T 細胞、GvHD 降至最低之 T 細胞)之方法，該

方法包括：將一載體上編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸及另一載體上編碼包含以下之 CAR 之第二核酸同時引入至前驅體 T 細胞中：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)抗 BCMA sdAb；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，該 Nef 蛋白包含 SEQ ID NO: 12-22 中任一者之胺基酸序列。在一些實施例中，該 Nef 蛋白為突變型 SIV Nef，其包含在以下中之任一者之胺基酸殘基處之一或多種突變：(i) aa 2-4、aa 8-10、aa 11-13、aa 38-40、aa 44-46、aa 47-49、aa 50-52、aa 53-55、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 110-112、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、aa 178-179、179-181aa、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 191-193、aa 194-196、aa 203-205、aa 206-208、aa 212-214、aa 215-217、aa 218-220、aa 221-223、aa 8-13、aa 44-67、aa 107-112、aa 164-196、aa 203-208 或 aa 212-223；(ii) aa 2-4、aa 44-46、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 44-67、aa 164-169、aa 176-181、aa 185-190；(iii) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、178-179aa、aa 179-181、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67 或 aa 164-190；或(iv) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67、aa 164-169、aa 176-181 或 aa 185-190；其中該胺基酸殘基位置對應於野生型 SIV Nef 之彼位

置。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR、CD4 及 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 之細胞表面表現，但不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD4 之細胞表面表現，但不下調 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD28 之細胞表面表現，但不下調 CD4 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調內源 TCR 之細胞表面表現，但不下調(例如，下調細胞表面表現) CAR。在一些實施例中，該功能性 CAR 由該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調(例如，下調細胞表面表現)達至多約 50%、40%、30%、20%、10%或 5%中任一者。

【0163】　在一些實施例中，該第一核酸及該第二核酸係在同一載體上。在一些實施例中，該第一核酸及該第二核酸可操作性連接至不同啟動子。因此，在一些實施例中，提供一種產生經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞、內源 TCR 缺乏 T 細胞、GvHD 降至最低之 T 細胞)之方法，該方法包括將包含編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸及編碼包含以下之 CAR 之第二核酸的載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)引入至前驅體 T 細胞中：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)抗 BCMA sdAb；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域，其中該第一核酸及該第二核酸可操作性連接至不同啟動子(例如，EF1-α 及

PGK)，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，該第一核酸係在該第二核酸上游。在一些實施例中，該第一核酸係在該第二核酸下游。在一些實施例中，提供一種產生經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞、內源 TCR 缺乏 T 細胞、GvHD 降至最低之 T 細胞)之方法，該方法包括將載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)引入至前驅體 T 細胞中，該載體自上游至下游：第一啟動子(例如，EF1-α)、編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸、第二啟動子(例如，PGK)及編碼包含以下之 CAR 之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)抗 BCMA sdAb；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，提供一種產生經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞、內源 TCR 缺乏 T 細胞、GvHD 降至最低之 T 細胞)之方法，該方法包括將載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)引入至前驅體 T 細胞中，該載體自上游至下游：第二啟動子(例如，EF1-α)；編碼包含以下之 CAR 之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)抗 BCMA sdAb；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域；第一啟動子(例如，PGK)；編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，該第一核酸及該第二核酸可操作性連接至同一啟動子。因此，在一些實施例中，提供一種產生經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞、內源 TCR 缺乏 T 細胞、GvHD 降至最低之 T 細胞)之方法，該方法包括將包含編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸及編碼包含以下之 CAR 之第二核酸的載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)引入至前驅體 T 細胞中：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含一或多個(諸如 1、2、3、4、

5、6個或更多個中任一者)抗 BCMA sdAb；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域，其中該第一核酸及該第二核酸可操作性連接至同一啟動子(例如，EF1-α)，且其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，該第一核酸係在該第二核酸上游。在一些實施例中，該第一核酸係在該第二核酸下游。在一些實施例中，該第一核酸及該第二核酸經由連接序列(例如 IRES、編碼諸如 P2A 或 T2A 之自裂解 2A 肽之核酸序列)連接。因此，在一些實施例中，提供一種產生經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞、內源 TCR 缺乏 T 細胞、GvHD 降至最低之 T 細胞)之方法，該方法包括將載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)引入至前驅體 T 細胞中，該載體自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)、編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸、第一連接序列(例如 IRES、編碼諸如 P2A 或 T2A 之自裂解 2A 肽之核酸序列)、視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如$(GGGS)_3$連接體之撓性連接體之核酸序列)及編碼包含以下之 CAR 之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)抗 BCMA sdAb；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，提供一種產生經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞、內源 TCR 缺乏 T 細胞、GvHD 降至最低之 T 細胞)之方法，該方法包括將載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)引入至前驅體 T 細胞中，該載體自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)、編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef、突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸、第一連接序列 IRES、視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如$(GGGS)_3$連接體之撓性連接體之核酸序列)及編碼包含以下之 CAR 之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)抗 BCMA sdAb；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T

細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，提供一種產生經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞、內源 TCR 缺乏 T 細胞、GvHD 降至最低之 T 細胞)之方法，該方法包括將載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)引入至前驅體 T 細胞中，該載體自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)、編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef、突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸、編碼 P2A 之第一連接序列、視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如$(GGGS)_3$ 連接體之撓性連接體之核酸序列)及編碼包含以下之 CAR 之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)抗 BCMA sdAb；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，提供一種產生經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞、內源 TCR 缺乏 T 細胞、GvHD 降至最低之 T 細胞)之方法，該方法包括將載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)引入至前驅體 T 細胞中，該載體自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)；編碼包含以下之 CAR 之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)抗 BCMA sdAb；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域；第一連接序列(例如 IRES、編碼諸如 P2A 或 T2A 之自裂解 2A 肽之核酸序列)；視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如$(GGGS)_3$ 連接體之撓性連接體之核酸序列)；及編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，提供一種產生經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞、內源 TCR 缺乏 T 細胞、GvHD 降至最低之 T 細胞)之方法，該方法包括將載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)引入至前驅體 T 細胞中，該載體自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)；編碼包含以下之 CAR 之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)抗 BCMA

sdAb；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域；第一連接序列 IRES；視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如$(GGGS)_3$ 連接體之撓性連接體之核酸序列)；及編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef、突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，提供一種產生經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞、內源 TCR 缺乏 T 細胞、GvHD 降至最低之 T 細胞)之方法，該方法包括將載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)引入至前驅體 T 細胞中，該載體自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)；編碼包含以下之 CAR 之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)抗 BCMA sdAb；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域；編碼 P2A 之第一連接序列；視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如$(GGGS)_3$ 連接體之撓性連接體之核酸序列)；及編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef、突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，該細胞外配位體結合結構域包含連接在一起之兩個或更多個抗 BCMA sdAb。在一些實施例中，該 CAR 為單價及單特異性的。在一些實施例中，該 CAR 為多價(例如，雙特異性)及單特異性的。在一些實施例中，該 CAR 為多價(例如，二價)及多特異性(例如，雙特異性)。在一些實施例中，該 Nef 蛋白包含 SEQ ID NO: 12-22 中任一者之胺基酸序列。在一些實施例中，該 Nef 蛋白為突變型 SIV Nef，其包含在以下中之任一者之胺基酸殘基處之一或多種突變：(i) aa 2-4、aa 8-10、aa 11-13、aa 38-40、aa 44-46、aa 47-49、aa 50-52、aa 53-55、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 110-112、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、aa 178-179、179-181aa、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 191-193、aa 194-196、aa 203-205、aa 206-208、aa 212-214、aa 215-217、aa 218-220、aa 221-

223、aa 8-13、aa 44-67、aa 107-112、aa 164-196、aa 203-208 或 aa 212-223；(ii) aa 2-4、aa 44-46、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 44-67、aa 164-169、aa 176-181、aa 185-190；(iii) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、178-179aa、aa 179-181、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67 或 aa 164-190；或(iv) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67、aa 164-169、aa 176-181 或 aa 185-190；其中該胺基酸殘基位置對應於野生型 SIV Nef 之彼位置。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR、CD4 及 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 之細胞表面表現，但不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD4 之細胞表面表現，但不下調 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD28 之細胞表面表現，但不下調 CD4 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調內源 TCR 之細胞表面表現，但不下調(例如，下調細胞表面表現) CAR。在一些實施例中，該功能性 CAR 由該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，

或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調(例如，下調細胞表面表現)達至多約50%、40%、30%、20%、10%或 5%中任一者。

【0164】　在一些實施例中，提供一種產生經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞、內源 TCR 缺乏 T 細胞、GvHD 降至最低之 T 細胞)之方法，該方法包括將包含編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef、突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸及編碼包含以下之嵌合 TCR (cTCR)之第二核酸的載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)引入至前驅體 T 細胞中：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之連接體；(c)第一 TCR 次單元(例如，CD3ε)的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；(d)包含第二 TCR 次單元(例如，CD3ε)的跨膜結構域之跨膜結構域；及(e)包含第三 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞內信號傳導結構域之細胞內信號傳導結構域；其中該第一、第二及第三 TCR 次單元均係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群，其中該第一核酸及該第二核酸可操作性連接至不同啟動子(例如，EF1-α及 PGK)，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，該第一核酸係在該第二核酸上游。在一些實施例中，該第一核酸係在該第二核酸下游。在一些實施例中，提供一種產生經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞、內源 TCR 缺乏 T 細胞、GvHD 降至最低之 T 細胞)之方法，該方法包括將載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)引入至前驅體 T 細胞中，該載體自上游至下游：第一啟動子(例如，EF1-α)、編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef、突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸、第二啟動子(例如，PGK)及編碼包含以下之嵌合 TCR (cTCR)之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之連接體；(c)第一 TCR 次單元(例如，CD3ε)

的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；(d)包含第二 TCR 次單元(例如，CD3ε)的跨膜結構域之跨膜結構域；及(e)包含第三 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞內信號傳導結構域之細胞內信號傳導結構域；其中該第一、第二及第三 TCR 次單元均係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，提供一種產生經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞、內源 TCR 缺乏 T 細胞、GvHD 降至最低之 T 細胞)之方法，該方法包括將載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)引入至前驅體 T 細胞中，該載體自上游至下游：第二啟動子(例如，EF1-α)；編碼包含以下之嵌合 TCR (cTCR)之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之連接體；(c)第一 TCR 次單元(例如，CD3ε)的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；(d)包含第二 TCR 次單元(例如，CD3ε)的跨膜結構域之跨膜結構域；及(e)包含第三 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞內信號傳導結構域之細胞內信號傳導結構域；其中該第一、第二及第三 TCR 次單元均係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群；第一啟動子(例如，PGK)；編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef、突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，該第一核酸及該第二核酸可操作性連接至同一啟動子。因此，在一些實施例中，提供一種產生經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞、內源 TCR 缺乏 T 細胞、GvHD 降至最低之 T 細胞)之方法，該方法包括將包含編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef、突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸及編碼包含以下之嵌合 TCR (cTCR)之第二核酸的載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)引入至前驅體 T 細胞中：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之

一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之連接體；(c)第一 TCR 次單元(例如，CD3ε)的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；(d)包含第二 TCR 次單元(例如，CD3ε)的跨膜結構域之跨膜結構域；及(e)包含第三 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞內信號傳導結構域之細胞內信號傳導結構域；其中該第一、第二及第三 TCR 次單元均係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群，其中該第一核酸及該第二核酸可操作性連接至同一啟動子(例如，EF1-α)，且其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，該第一核酸係在該第二核酸上游。在一些實施例中，該第一核酸係在該第二核酸下游。在一些實施例中，該第一核酸及該第二核酸經由連接序列(例如 IRES、編碼諸如 P2A 或 T2A 之自裂解 2A 肽之核酸序列)連接。因此，在一些實施例中，提供一種產生經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞、內源 TCR 缺乏 T 細胞、GvHD 降至最低之 T 細胞)之方法，該方法包括將載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)引入至前驅體 T 細胞中，該載體自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)、編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef、突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸、第一連接序列(例如 IRES、編碼諸如 P2A 或 T2A 之自裂解 2A 肽之核酸序列)、視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如 $(GGGS)_3$ 連接體之撓性連接體之核酸序列)及編碼包含以下之嵌合 TCR (cTCR)之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之連接體；(c)第一 TCR 次單元(例如，CD3ε)的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；(d)包含第二 TCR 次單元(例如，CD3ε)的跨膜結構域之跨膜結構域；及(e)包含第三 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞內信號傳導結構域之細胞內信號傳導結構域；其中該第一、第二及第三 TCR 次單元均係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群，其中該 Nef 蛋白在表現

時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，提供一種產生經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞、內源 TCR 缺乏 T 細胞、GvHD 降至最低之 T 細胞)之方法，該方法包括將載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)引入至前驅體 T 細胞中，該載體自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)；編碼包含以下之嵌合 TCR (cTCR)之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之連接體；(c)第一 TCR 次單元(例如，CD3ε)的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；(d)包含第二 TCR 次單元(例如，CD3ε)的跨膜結構域之跨膜結構域；及(e)包含第三 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞內信號傳導結構域之細胞內信號傳導結構域；其中該第一、第二及第三 TCR 次單元均係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群；第一連接序列(例如 IRES、編碼諸如 P2A 或 T2A 之自裂解 2A 肽之核酸序列)；視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如$(GGGS)_3$連接體之撓性連接體之核酸序列)；及編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef、突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，該 Nef 蛋白包含 SEQ ID NO: 12-22 中任一者之胺基酸序列。在一些實施例中，該 Nef 蛋白為突變型 SIV Nef，其包含在以下中之任一者之胺基酸殘基處之一或多種突變：(i) aa 2-4、aa 8-10、aa 11-13、aa 38-40、aa 44-46、aa 47-49、aa 50-52、aa 53-55、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 110-112、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、aa 178-179、179-181aa、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 191-193、aa 194-196、aa 203-205、aa 206-208、aa 212-214、aa 215-217、aa 218-220、aa 221-223、aa 8-13、aa 44-67、aa 107-112、aa 164-196、aa 203-208 或 aa 212-223；(ii) aa 2-4、aa 44-46、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、

aa 98-100、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 44-67、aa 164-169、aa 176-181、aa 185-190；(iii) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、178-179aa、aa 179-181、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67 或 aa 164-190；或(iv) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67、aa 164-169、aa 176-181 或 aa 185-190；其中該胺基酸殘基位置對應於野生型 SIV Nef 之彼位置。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR、CD4 及 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 之細胞表面表現，但不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD4 之細胞表面表現，但不下調 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD28 之細胞表面表現，但不下調 CD4 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調內源 TCR 之細胞表面表現，但不下調(例如，下調細胞表面表現) cTCR。在一些實施例中，該功能性 cTCR 由該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調(例如，下調細胞表面表現)達至多約 50%、40%、30%、20%、10%或 5%中任一者。

【0165】　在一些實施例中，提供一種產生經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞、內源 TCR 缺乏 T 細胞、GvHD 降至最低之 T 細胞)之方法，該方法包括將包含編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef、突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸及編碼包含以下之 T 細胞抗原偶合物(TAC)之第二核酸的載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)引入至前驅體 T 細胞中：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；(e)第一 TCR 輔受體(例如，CD4)的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；(f)包含第二 TCR 輔受體(例如，CD4)的跨膜結構域之跨膜結構域；及(g)包含第三 TCR 輔受體(例如，CD4)的細胞內信號傳導結構域之視情況存在之細胞內信號傳導結構域；其中該 TCR 次單元係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群；其中該第一、第二及第三 TCR 輔受體均係選自由 CD4、CD8 及 CD28 組成之群，其中該第一核酸及該第二核酸可操作性連接至不同啟動子(例如，EF1-α 及 PGK)，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，該第一核酸係在該第二核酸上游。在一些實施例中，該第一核酸係在該第二核酸下游。在一些實施例中，提供一種產生經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞、內源 TCR 缺乏 T 細胞、GvHD 降至最低之 T 細胞)之方法，該方法包括將載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)引入至前驅體 T 細胞中，該載體自上游至下游：第一啟動子(例如，EF1-α)、編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef、突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸、第二啟動子(例如，PGK)及編碼包含以下之 T 細胞抗原偶合物(TAC)之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；

(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；(e)第一 TCR 輔受體(例如，CD4)的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；(f)包含第二 TCR 輔受體(例如，CD4)的跨膜結構域之跨膜結構域；及(g)包含第三 TCR 輔受體(例如，CD4)的細胞內信號傳導結構域之視情況存在之細胞內信號傳導結構域；其中該 TCR 次單元係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群；且其中該第一、第二及第三 TCR 輔受體均係選自由 CD4、CD8 及 CD28 組成之群，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，提供一種產生經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞、內源 TCR 缺乏 T 細胞、GvHD 降至最低之 T 細胞)之方法，該方法包括將載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)引入至前驅體 T 細胞中，該載體自上游至下游：第二啟動子(例如，EF1-α)；編碼包含以下之 T 細胞抗原偶合物(TAC)之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；(e)第一 TCR 輔受體(例如，CD4)的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；(f)包含第二 TCR 輔受體(例如，CD4)的跨膜結構域之跨膜結構域；及(g)包含第三 TCR 輔受體(例如，CD4)的細胞內信號傳導結構域之視情況存在之細胞內信號傳導結構域；其中該 TCR 次單元係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群；且其中該第一、第二及第三 TCR 輔受體均係選自由 CD4、CD8 及 CD28 組成之群；第一啟動子(例如，PGK)；編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef、突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，該第一核酸及該第二核酸可操作性

連接至同一啟動子。因此，在一些實施例中，提供一種產生經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞、內源 TCR 缺乏 T 細胞、GvHD 降至最低之 T 細胞)之方法，該方法包括將包含編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef、突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸及編碼包含以下之 T 細胞抗原偶合物(TAC)之第二核酸的載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)引入至前驅體 T 細胞中：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；(e)第一 TCR 輔受體(例如，CD4)的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；(f)包含第二 TCR 輔受體(例如，CD4)的跨膜結構域之跨膜結構域；及(g)包含第三 TCR 輔受體(例如，CD4)的細胞內信號傳導結構域之視情況存在之細胞內信號傳導結構域；其中該 TCR 次單元係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群；且其中該第一、第二及第三 TCR 輔受體均係選自由 CD4、CD8 及 CD28 組成之群，其中該第一核酸及該第二核酸可操作性連接至同一啟動子(例如，EF1-α)，且其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，該第一核酸係在該第二核酸上游。在一些實施例中，該第一核酸係在該第二核酸下游。在一些實施例中，該第一核酸及該第二核酸經由連接序列(例如 IRES、編碼諸如 P2A 或 T2A 之自裂解 2A 肽之核酸序列)連接。因此，在一些實施例中，提供一種產生經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞、內源 TCR 缺乏 T 細胞、GvHD 降至最低之 T 細胞)之方法，該方法包括將載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)引入至前驅體 T 細胞中，該載體自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)、編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef、突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸、第一連接序列(例如 IRES、編碼諸如 P2A 或 T2A 之自裂解 2A 肽之核酸序列)、視情況存在

之第二連接序列(例如編碼諸如$(GGGS)_3$ 連接體之撓性連接體之核酸序列)及編碼包含以下之 T 細胞抗原偶合物(TAC)之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；(e)第一 TCR 輔受體(例如，CD4)的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；(f)包含第二 TCR 輔受體(例如，CD4)的跨膜結構域之跨膜結構域；及(g)包含第三 TCR 輔受體(例如，CD4)的細胞內信號傳導結構域之視情況存在之細胞內信號傳導結構域；其中該 TCR 次單元係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群；且其中該第一、第二及第三 TCR 輔受體均係選自由 CD4、CD8 及 CD28 組成之群，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，提供一種產生經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞、內源 TCR 缺乏 T 細胞、GvHD 降至最低之 T 細胞)之方法，該方法包括將載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)引入至前驅體 T 細胞中，該載體自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)；編碼包含以下之 T 細胞抗原偶合物(TAC)之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；(e)第一 TCR 輔受體(例如，CD4)的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；(f)包含第二 TCR 輔受體(例如，CD4)的跨膜結構域之跨膜結構域；及(g)包含第三 TCR 輔受體(例如，CD4)的細胞內信號傳導結構域之視情況存在之細胞內信號傳導結構域；其中該 TCR 次單元係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群；且其中該第一、第二及

第三 TCR 輔受體均係選自由 CD4、CD8 及 CD28 組成之群；第一連接序列(例如 IRES、編碼諸如 P2A 或 T2A 之自裂解 2A 肽之核酸序列)；視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如$(GGGS)_3$連接體之撓性連接體之核酸序列)；及編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef、突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，該 Nef 蛋白包含 SEQ ID NO: 12-22 中任一者之胺基酸序列。在一些實施例中，該 Nef 蛋白為突變型 SIV Nef，其包含在以下中之任一者之胺基酸殘基處之一或多種突變：(i) aa 2-4、aa 8-10、aa 11-13、aa 38-40、aa 44-46、aa 47-49、aa 50-52、aa 53-55、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 110-112、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、aa 178-179、179-181aa、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 191-193、aa 194-196、aa 203-205、aa 206-208、aa 212-214、aa 215-217、aa 218-220、aa 221-223、aa 8-13、aa 44-67、aa 107-112、aa 164-196、aa 203-208 或 aa 212-223；(ii) aa 2-4、aa 44-46、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 44-67、aa 164-169、aa 176-181、aa 185-190；(iii) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、178-179aa、aa 179-181、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67 或 aa 164-190；或(iv) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67、aa 164-169、aa 176-181 或 aa 185-190；其中該胺基酸殘基位置對應於野生型 SIV Nef 之彼位置。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變

型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR、CD4 及 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 之細胞表面表現，但不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD4 之細胞表面表現，但不下調 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD28 之細胞表面表現，但不下調 CD4 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調內源 TCR 之細胞表面表現，但不下調(例如，下調細胞表面表現) TAC。在一些實施例中，該功能性 TAC 由該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調(例如，下調細胞表面表現)達至多約 50%、40%、30%、20%、10%或 5%中任一者。

【0166】 在一些實施例中，提供一種產生經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞、內源 TCR 缺乏 T 細胞、GvHD 降至最低之 T 細胞)之方法，該方法包括將包含編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef、突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸及編碼包含以下之 TAC 樣嵌合受體之第二核酸的載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)引入至前驅體 T 細胞中：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別第一 TCR 次單元(例如，TCRα)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；(e)第二 TCR 次單元(例如，CD3ε)的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；(f)包含第三 TCR 次單元(例如，CD3ε)的跨膜結構域之跨膜結

構域；及(g)包含第四 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞內信號傳導結構域之視情況存在之細胞內信號傳導結構域；其中該第一、第二、第三及第四 TCR 次單元均係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群，其中該第一核酸及該第二核酸可操作性連接至不同啟動子(例如，EF1-α 及 PGK)，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，該第一核酸係在該第二核酸上游。在一些實施例中，該第一核酸係在該第二核酸下游。在一些實施例中，提供一種產生經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞、內源 TCR 缺乏 T 細胞、GvHD 降至最低之 T 細胞)之方法，該方法包括將載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)引入至前驅體 T 細胞中，該載體自上游至下游：第一啟動子(例如，EF1-α)、編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef、突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸、第二啟動子(例如，PGK)及編碼包含以下之 TAC 樣嵌合受體之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別第一 TCR 次單元(例如，TCRα)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；(e)第二 TCR 次單元(例如，CD3ε)的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；(f)包含第三 TCR 次單元(例如，CD3ε)的跨膜結構域之跨膜結構域；及(g)包含第四 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞內信號傳導結構域之視情況存在之細胞內信號傳導結構域；其中該第一、第二、第三及第四 TCR 次單元均係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，提供一種產生經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞、內源 TCR 缺乏 T 細胞、GvHD 降至最低之 T 細胞)之方法，該方法包括將載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)引入至前驅體 T 細胞中，該載體自上游至下游：第二啟動子(例如，

EF1-α)；編碼包含以下之 TAC 樣嵌合受體之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別第一 TCR 次單元(例如，TCRα)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；(e)第二 TCR 次單元(例如，CD3ε)的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；(f)包含第三 TCR 次單元(例如，CD3ε)的跨膜結構域之跨膜結構域；及(g)包含第四 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞內信號傳導結構域之視情況存在之細胞內信號傳導結構域；其中該第一、第二、第三及第四 TCR 次單元均係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群；第一啟動子(例如，PGK)；編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef、突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，該第一核酸及該第二核酸可操作性連接至同一啟動子。因此，在一些實施例中，提供一種產生經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞、內源 TCR 缺乏 T 細胞、GvHD 降至最低之 T 細胞)之方法，該方法包括將包含編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef、突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸及編碼包含以下之 TAC 樣嵌合受體之第二核酸的載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)引入至前驅體 T 細胞中：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別第一 TCR 次單元(例如，TCRα)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；(e)第二 TCR 次單元(例如，CD3ε)的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；(f)包含第三 TCR 次單元(例如，CD3ε)的跨膜結構域之跨膜結構域；及(g)包含第四 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞內信號傳導結構域之視情況存在之細胞內信號傳導結構域；其中該第一、第二、第三

及第四 TCR 次單元均係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群，其中該第一核酸及該第二核酸可操作性連接至同一啟動子(例如，EF1-α)，且其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，該第一核酸係在該第二核酸上游。在一些實施例中，該第一核酸係在該第二核酸下游。在一些實施例中，該第一核酸及該第二核酸經由連接序列(例如 IRES、編碼諸如 P2A 或 T2A 之自裂解 2A 肽之核酸序列)連接。因此，在一些實施例中，提供一種產生經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞、內源 TCR 缺乏 T 細胞、GvHD 降至最低之 T 細胞)之方法，該方法包括將載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)引入至前驅體 T 細胞中，該載體自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)、編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef、突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸、第一連接序列(例如 IRES、編碼諸如 P2A 或 T2A 之自裂解 2A 肽之核酸序列)、視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如$(GGGS)_3$ 連接體之撓性連接體之核酸序列)及編碼包含以下之 TAC 樣嵌合受體之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別第一 TCR 次單元(例如，TCRα)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；(e)第二 TCR 次單元(例如，CD3ε)的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；(f)包含第三 TCR 次單元(例如，CD3ε)的跨膜結構域之跨膜結構域；及(g)包含第四 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞內信號傳導結構域之視情況存在之細胞內信號傳導結構域；其中該第一、第二、第三及第四 TCR 次單元均係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，提供一種產生經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞、內源 TCR 缺乏 T 細胞、GvHD 降至最低之 T 細胞)之方法，該方

法包括將載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)引入至前驅體 T 細胞中，該載體自上游至下游：啟動子(例如，EF1-α)；編碼包含以下之 TAC 樣嵌合受體之第二核酸：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別第一 TCR 次單元(例如，TCRα)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；(e)第二 TCR 次單元(例如，CD3ε)的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；(f)包含第三 TCR 次單元(例如，CD3ε)的跨膜結構域之跨膜結構域；及(g)包含第四 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞內信號傳導結構域之視情況存在之細胞內信號傳導結構域；其中該第一、第二、第三及第四 TCR 次單元均係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群；第一連接序列(例如 IRES、編碼諸如 P2A 或 T2A 之自裂解 2A 肽之核酸序列)；視情況存在之第二連接序列(例如編碼諸如$(GGGS)_3$連接體之撓性連接體之核酸序列)；及編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef、突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，該 Nef 蛋白包含 SEQ ID NO: 12-22 中任一者之胺基酸序列。在一些實施例中，該 Nef 蛋白為突變型 SIV Nef，其包含在以下中之任一者之胺基酸殘基處之一或多種突變：(i) aa 2-4、aa 8-10、aa 11-13、aa 38-40、aa 44-46、aa 47-49、aa 50-52、aa 53-55、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 110-112、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、aa 178-179、179-181aa、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 191-193、aa 194-196、aa 203-205、aa 206-208、aa 212-214、aa 215-217、aa 218-220、aa 221-223、aa 8-13、aa 44-67、aa 107-112、aa 164-196、aa 203-208 或 aa 212-223；(ii) aa 2-4、aa 44-46、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 137-

139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 44-67、aa 164-169、aa 176-181、aa 185-190；(iii) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、178-179aa、aa 179-181、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67 或 aa 164-190；或(iv) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67、aa 164-169、aa 176-181 或 aa 185-190；其中該胺基酸殘基位置對應於野生型 SIV Nef之彼位置。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR、CD4 及 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 之細胞表面表現，但不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD4 之細胞表面表現，但不下調 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD28 之細胞表面表現，但不下調 CD4 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調內源 TCR 之細胞表面表現，但不下調(例如，下調細胞表面表現) TAC 樣嵌合受體。在一些實施例中，該功能性 TAC 樣嵌合受體由該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調(例如，下調細胞表面表現)達至多約 50%、40%、30%、20%、10%或 5%中任一者。

【0167】　在一些實施例中，該方法進一步包括用至少一種醫藥學上可接受之載劑調配表現 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之經修飾 T 細胞。在一些實施例中，該方法進一步包括向個體投與有效量的表現 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之經修飾 T 細胞，或有效量的包含表現 Nef 蛋白之經修飾 T 細胞及至少一種醫藥學上可接受之載劑之醫藥調配物。在一些實施例中，該個體患有癌症。在一些實施例中，該個體為人類。

T 細胞來源、細胞製備及培養

【0168】　在 T 細胞(例如，前驅體 T 細胞)之擴增及遺傳修飾之前，自個體獲得 T 細胞來源。T 細胞可獲自多種來源，包括外周血單核細胞、骨髓、淋巴結組織、臍帶血、胸腺組織、來自感染位點之組織、腹水、胸膜積液、脾臟組織及腫瘤。在一些實施例中，可使用此項技術中可獲得之多種 T 細胞株。在一些實施例中，T 細胞可獲自使用熟習此項技術者已知之多種技術(諸如 FICOLL™分離)自個體收集之血液單位。在一些實施例中，藉由血球分離獲得來自個體之循環血之細胞。血球分離產物典型地含有淋巴球，包括 T 細胞、單核球、顆粒球、B 細胞、其他成核白血球、紅血球及血小板。在一些實施例中，藉由血球分離收集之細胞可經洗滌以移除血漿部分且將該等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，該等細胞係用磷酸鹽緩衝生理食鹽水(PBS)洗滌。在一些實施例中，該洗滌溶液缺乏鈣且可缺乏鎂或可缺乏多種(若非全部)二價陽離子。再者，令人意外的是，在鈣不存在下之最初活化步驟導致放大活化。如熟習此項技術者將容易理解，洗滌步驟可藉由熟習此項技術者已知之方法，諸如藉由使用半自動化「流過」離心機(例如，Cobe 2991 細胞處理器、Baxter CytoMate 或 Haemonetics Cell Saver 5)根據製造商之說明書實現。在洗滌之後，可將該等細胞再懸浮於多種生物可相容緩衝液中，諸如無 Ca^{2+}、無 Mg^{2+} PBS、PlasmaLyte A 或

具有或不具有緩衝液之其他生理食鹽水溶液。或者，可移除血球分離樣品之非所需組分且使該等細胞直接地再懸浮於培養基中。

【0169】　在一些實施例中，T 細胞係由臍帶血庫、外周血庫提供，或源於經誘導多能幹細胞(iPSC)、多能幹細胞或人類胚胎幹細胞。在一些實施例中，該等 T 細胞係源於細胞株。在一些實施例中，該等 T 細胞獲自異種來源，例如獲自小鼠、大鼠、非人類靈長類動物及豬。在一些實施例中，該等 T 細胞為人類細胞。在一些態樣中，該等 T 細胞為原代細胞，諸如自個體直接地分離及/或自個體分離且經冷凍之彼等細胞。在一些實施例中，該等細胞包括 T 細胞之一或多個子集，諸如全 T 細胞群體、CD4+細胞、CD8+細胞，及其子群體，諸如藉由功能、活化狀態、成熟度、關於分化、擴增、再循環、定位及/或持久能力之潛力、抗原特異性、抗原受體類型、特定器官或隔室之存在、標記物或細胞介素分泌概況及/或分化程度界定之彼等子群體。關於欲治療之個體，該等細胞可為同種異體及/或自體。在一些情況下，T 細胞就一或多個預期接受者而言為同種異體。在一些情況下，T 細胞適用於移植，諸如在未誘導接受者中之 GvHD 之情況下。

【0170】　在 T 細胞及/或 CD4+及/或 CD8+ T 細胞之亞型及子群體中有原生 T (T_N)細胞、效應子 T 細胞(T_{EFF})、記憶 T 細胞及其亞型(諸如幹細胞記憶 T (TSC_M)、中央記憶 T (TC_M)、效應子記憶 T (T_{EM})或終末分化效應子記憶 T 細胞)、腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)、不成熟 T 細胞、成熟 T 細胞、輔助性 T 細胞、細胞毒性 T 細胞、黏膜相關恆定 T (MAIT)細胞、天然存在及適應性調節 T (Treg)細胞、輔助性 T 細胞(諸如 TH1 細胞、TH2 細胞、TH3 細胞、TH17 細胞、TH9 細胞、TH22 細胞、濾泡輔助性 T 細胞)、α/β T 細胞及 δ/γ T 細胞。

【0171】　在一些實施例中，T 細胞係藉由溶解紅血球且耗盡單核球，例如藉由經由 PERCOLL™梯度離心或藉由對流離心淘析而自外周血淋巴球分離。T 細胞之特定子群體(諸如 CD3+、CD28+、CD4+、CD8+、CD45RA+及 CD45RO+T 細

胞)可進一步藉由陽性或陰性選擇技術來分離。例如，在一些實施例中，T 細胞係藉由與抗 CD3/抗 CD28 (亦即，3×28)結合珠粒(諸如 DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T)一起培育持續足以用於所需 T 細胞之陽性選擇之時期來分離。在一些實施例中，該時期為約 30 分鐘。在另一實施例中，該時期介於 30 分鐘至 36 小時或更久及其間所有整數值之範圍內。在另一實施例中，該時期為至少 1、2、3、4、5 或 6 小時。在一些實施例中，該時期為 10 至 24 小時。在另一實施例中，該培育時期為 24 小時。關於自患有白血病之患者分離 T 細胞，使用較長培育時間(諸如 24 小時)可增加細胞產率。較長培育時間可用於在其中如與其他細胞類型相比存在少量 T 細胞之任何情況下分離 T 細胞，諸如自腫瘤組織或自免疫受損個體分離腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)。此外，使用較長培育時間可增加 CD8+ T 細胞之捕捉效率。因此，藉由簡單地縮短或加長該時間，使 T 細胞結合於 CD3/CD28 珠粒，及/或藉由增加或減少珠粒與 T 細胞之比率(如本文進一步描述)，可在培養起始時或在該過程期間之其他時間點處優先地選擇支持或反對的 T 細胞子群體。另外，藉由增加或減少該等珠粒或其他表面上之抗 CD3 及/或抗 CD28 抗體的比率，可在培養起始時或在其他所需時間點處優先地選擇支持或反對的 T 細胞子群體。熟習此項技術者將認識到，亦可使用多輪選擇。在一些實施例中，可需要在活化及擴增過程中實施該選擇程序且使用「未經選擇」細胞。「未經選擇」細胞亦可經受其他數輪選擇。

【0172】　藉由陰性選擇經富集 T 細胞群體可用針對經陰性選擇細胞所特有之表面標記物的抗體之組合實現。一種方法係經由負磁性免疫黏附或流式細胞術進行細胞分選及/或選擇，其使用針對存在於經陰性選擇細胞上之細胞表面標記物的單株抗體之混合液。例如，為了藉由陰性選擇經富集 CD4+細胞，單株抗體混合液典型地包括針對 CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR 及 CD8 之抗體。在某些實施例中，可需要富集或陽性地選擇典型地表現 CD4+、CD25+、CD62Lhi、

GITR+及 FoxP3+之調節 T 細胞。或者，在某些實施例中，藉由抗 C25 結合珠粒或其他相似選擇方法使 T 調節細胞耗盡。

【0173】　關於藉由陽性或陰性選擇分離所需細胞群體，細胞及表面(例如粒子，諸如珠粒)之濃度可發生變化。在某些實施例中，可需要顯著地減少其中珠粒及細胞混合在一起之體積(亦即，增加細胞之濃度)，以確保細胞及珠粒之最大接觸。例如，在一實施例中，使用 20 億個細胞/mL 之濃度。在一實施例中，使用 10 億個細胞/mL 之濃度。在另一實施例中，使用超過 100 百萬個細胞/mL。在另一實施例中，使用 10、15、20、25、30、35、40、45 或 50 百萬個細胞/mL 之細胞濃度。在又一實施例中，使用 75、80、85、90、95 或 100 百萬個細胞/mL 之細胞濃度。在其他實施例中，使用 125 或 150 百萬個細胞/mL 之濃度。使用高濃度可導致增加之細胞產率、細胞活化及細胞擴增。另外，使用高細胞濃度允許更高效捕捉可微弱地表現相關標靶抗原之細胞(諸如 CD28 陰性 T 細胞)，或來自其中存在多種腫瘤細胞之樣品(亦即，白血病血液、腫瘤組織等)的細胞。該等細胞群體可具有治療價值且將需要獲得。例如，使用高細胞濃度允許更高效選擇通常具有較微弱 CD28 表現之 CD8+ T 細胞。

【0174】　在一些實施例中，可需要使用較低細胞濃度。藉由顯著地稀釋 T 細胞及表面(例如粒子，諸如珠粒)之混合物，使該等粒子與細胞之間的相互作用降至最低。此舉選擇表現大量欲結合於該等粒子之所需抗原之細胞。例如，CD4+ T 細胞表現較高水準之 CD28 且比稀濃度之 CD8+ T 細胞更高效地經捕捉。在一些實施例中，所用之細胞濃度為 5×10^6/mL。在一些實施例中，所用之濃度可為約 1×10^5/mL 至 1×10^6/mL，及其間之任何整數值。

【0175】　在一些實施例中，該等細胞可在 2-10℃下，或在室溫下，在旋轉器上以不同的速度培育不同的時間長度。

【0176】　用於刺激之 T 細胞亦可在洗滌步驟之後經冷凍。不希望受理論束縛，

冷凍及後續解凍步驟藉由移除細胞群體中之顆粒球及一定量之單核球而提供更均一產物。在移除血漿及血小板之洗滌步驟之後，該等細胞可懸浮於冷凍溶液中。雖然多種冷凍溶液及參數為此項技術中已知的且將適用於此上下文，但一種方法涉及使用含有 20% DMSO 及 8%人類血清白蛋白之 PBS，或含有 10%聚葡萄糖 40 及 5%右旋糖、20%人類血清白蛋白及 7.5% DMSO，或 31.25% Plasmalyte-A、31.25%右旋糖 5%、0.45% NaCl、10%聚葡萄糖 40 及 5%右旋糖、20%人類血清白蛋白及 7.5% DMSO 之培養基，或含有例如 Hespan 及 PlasmaLyte A 之其他合適細胞冷凍培養基，該等細胞接著以 1°/分鐘之速率經冷凍至-80℃且儲存於液氮儲存槽之氣相中。可使用其他控制冷凍方法，以及立即在-20℃下或液氮中之不受控冷凍。

【0177】　在一些實施例中，如本文所述將經冷凍保存之細胞解凍且洗滌且使其在室溫下靜置一小時，接著活化。

【0178】　本申請案亦涵蓋在可能需要如本文所述之經擴增細胞之前某一時期自個體收集血樣或血球分離產物。因而，可在必需之任何時間點收集欲擴增細胞之來源，且分離且冷凍諸如 T 細胞之所需細胞，以供稍後用於針對將受益於 T 細胞療法之任何數量之疾病或病症(諸如本文所述之彼等疾病或病症)的 T 細胞療法。在一實施例中，血樣或血球分離物係取自總體上健康之個體。在某些實施例中，血樣或血球分離物係取自處於發展疾病之風險中但尚未發展疾病之總體上健康之個體，且分離且冷凍相關細胞以供稍後使用。在某些實施例中，T 細胞可經擴增、冷凍且在稍後時間加以使用。在某些實施例中，在如本文所述之特定疾病之診斷之後不久，但在任何治療之前自患者收集樣品。在另一實施例中，在任何數量之相關治療形式之前自個體之血樣或血球分離物分離該等細胞，該等相關治療形式包括但不限於用諸如那他珠單抗(natalizumab)、依法利珠單抗(efalizumab)、抗病毒劑、化學療法、放射、免疫抑制劑(諸如環孢黴素(cyclosporin)、

硫唑嘌呤(azathioprine)、甲胺喋呤(methotrexate)、麥考酚酯(mycophenolate)及FK506)、抗體或其他免疫消融劑(諸如 CAMPATH)、抗 CD3 抗體、癌得星(cytoxan)、氟達拉濱(fludarabine)、環孢黴素、FK506、雷帕黴素(rapamycin)、黴酚酸(mycophenolic acid)、類固醇、FR901228 及輻照之劑治療。此等藥物抑制鈣依賴性磷酸酯酶鈣調磷酸酶(環孢黴素及 FK506)，或抑制對於生長因子誘導之信號傳導而言重要之 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，自患者分離該等細胞且冷凍以供稍後聯合(例如，在.....之前、同時或在.....之後)骨髓或幹細胞移植、使用諸如氟達拉濱、外射束放射療法(XRT)、環磷醯胺之化學治療劑或抗體(諸如 OKT3 或 CAMPATH)的 T 細胞消融療法使用。在另一實施例中，該等細胞係在 B 細胞消融療法(諸如與 CD20 反應之劑，例如 Rituxan)之前經分離且可經冷凍以供稍後在 B 細胞消融療法(諸如與 CD20 反應之劑，例如 Rituxan)之後用於治療。

【0179】　在一些實施例中，在治療之後直接地自患者獲得 T 細胞。就此而言，已觀察到在某些癌症治療、特別是使用損害免疫系統之藥物的治療之後，在治療之後不久在患者通常將自治療恢復之時期期間，所獲得之 T 細胞的品質就其離體擴增之能力而言可為最佳的或改良的。同樣，在使用本文所述方法之離體操縱之後，此等細胞就增強之植入及活體內擴增而言可處於較佳狀態下。因此，在本發明之上下文內涵蓋在此恢復期期間收集血細胞，包括 T 細胞、樹突狀細胞或造血譜系之其他細胞。此外，在某些實施例中，可使用動員(例如，用 GM-CSF 動員)及調理方案在個體中產生尤其是在療法之後的規定時間窗期間有利於特定細胞類型之再群體化、再循環、再生及/或擴增之條件。說明性細胞類型包括 T 細胞、B 細胞、樹突狀細胞及免疫系統之其他細胞。

T 細胞之活化及擴增

【0180】 在一些實施例中，該等細胞係在基因工程改造之前或結合基因工程改造培育及/或培養。培育步驟可包括培養、栽培、刺激、活化及/或繁殖。在一些實施例中，該等組合物或細胞係在刺激條件或刺激劑存在下培育。該等條件包括經設計以誘導該群體中之細胞增殖、擴增、活化及/或生存，模擬抗原暴露，及/或起動該等細胞進行遺傳工程改造(諸如用於引入經遺傳工程改造之抗原受體)之彼等條件。該等條件可包括特定培養基、溫度、氧含量、二氧化碳含量、時間、劑(例如營養物、胺基酸、抗生素、離子及/或刺激因子，諸如細胞介素、趨化介素、抗原、結合搭配物、融合蛋白、重組可溶性受體及經設計以活化該等細胞之任何其他劑)中之一或多者。

【0181】 無論是在用本文所述之 Nef (例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)或外源受體(例如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))對該等 T 細胞進行遺傳修飾之前抑或之後，該等 T 細胞一般可使用如例如美國專利第 6,352,694 號；第 6,534,055 號；第 6,905,680 號；第 6,692,964 號；第 5,858,358 號；第 6,887,466 號；第 6,905,681 號；第 7,144,575 號；第 7,067,318 號；第 7,172,869 號；第 7,232,566 號；第 7,175,843 號；第 5,883,223 號；第 6,905,874 號；第 6,797,514 號；第 6,867,041 號；及美國專利申請公開案第 20060121005 號所述之方法來活化及擴增。

【0182】 一般而言，T 細胞可藉由與其上已連接有刺激 CD3/TCR 複合物相關信號之劑及刺激該等 T 細胞之表面上的共刺激分子之配位體之表面接觸來擴增。詳言之，T 細胞群體可如本文所述，諸如藉由與固定於表面上之抗 CD3 抗體或其抗原結合片段或抗 CD2 抗體接觸，或藉由與聯合鈣離子載體之蛋白激酶 C 活化劑(例如，苔蘚抑素)接觸經刺激。關於該等 T 細胞之表面上的輔助分子之共刺激，使用結合該輔助分子之配位體。例如，T 細胞群體可在適用於刺激該等 T 細

胞之增殖的條件下與抗 CD3 抗體及抗 CD28 抗體接觸。為了刺激 CD4+ T 細胞或 CD8+ T 細胞之增殖，抗 CD3 抗體及抗 CD28 抗體。抗 CD28 抗體之實例包括 9.3、B-T3、XR-CD28 (Diaclone, Besancon, France)，其可如同此項技術中通常已知之其他方法般使用(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)。

【0183】　在一些實施例中，該等 T 細胞係藉由以下來擴增：將其添加至諸如非分裂外周血單核細胞(PBMC)之培養起始組合物飼養細胞中(例如，以致針對欲擴增之初始群體中的各 T 淋巴球，所得細胞群體含有至少約 5、10、20 或 40 個或更多個 PBMC 飼養細胞)；且培育該培養物(例如，持續足以擴增該等數目之 T 細胞之時間)。在一些態樣中，該等非分裂飼養細胞可包含經 γ 輻照之 PBMC 飼養細胞。在一些實施例中，PBMC 經介於約 3000 至 3600 拉德(rad)範圍內之 γ 射線輻照以預防細胞分裂。在一些態樣中，該等飼養細胞在添加 T 細胞群體之前添加至培養基中。

【0184】　在一些實施例中，針對 T 細胞之初始刺激信號及共刺激信號可由不同方案提供。例如，提供各信號之劑可在溶液中或偶合於表面。當偶合於表面時，該等劑可偶合於同一表面(亦即，呈「順式」形式)或偶合於單獨表面(亦即，呈「反式」形式)。或者，一種劑可偶合於表面且另一劑可在溶液中。在一實施例中，提供共刺激信號之劑結合於細胞表面且提供初始活化信號之劑係在溶液中或偶合於表面。在某些實施例中，兩種劑均可在溶液中。在另一實施例中，該等劑可呈可溶性形式，且接著交聯至表面，諸如表現 Fc 受體之細胞或將結合該等劑之抗體或其他結合劑。就此而言，關於本發明中預期用於活化及擴增 T 細胞之人工抗原呈遞細胞(aAPC)，參見例如美國專利申請公開案第 20040101519 號及第 20060034810 號。

【0185】　在一些實施例中，將該等 T 細胞與經劑塗佈之珠粒組合，隨後分離該等珠粒及該等細胞，且接著培養該等細胞。在一替代實施例中，在培養之前，該等經劑塗佈之珠粒及細胞未經分離，而是一起經培養。在另一實施例中，首先藉由應用諸如磁力之力濃縮該等珠粒及細胞，導致細胞表面標記物之增加的接合，由此誘導細胞刺激。

【0186】　舉例而言，細胞表面蛋白可藉由使連接抗 CD3 及抗 CD28 之順磁珠粒(3×28 個珠粒)接觸 T 細胞而經接合。在一實施例中，該等細胞(例如，10^4-10^9 個 T 細胞)及珠粒(例如，呈 1:1 比率之 DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T 順磁珠粒)經組合於緩衝液、較佳地 PBS (不具有二價陽離子，諸如鈣及鎂)中。另外，熟習此項技術者可容易地理解，可使用任何細胞濃度。例如，標靶細胞在樣品中可極少且僅佔該樣品之 0.01%，或整個樣品(亦即，100%)可包含相關標靶細胞。因此，在本發明之背景下任何細胞數目均可。在某些實施例中，可需要顯著地減少其中粒子及細胞混合在一起之體積(亦即，增加細胞之濃度)，以確保細胞及粒子之最大接觸。例如，在一實施例中，使用約 20 億個細胞/mL 之濃度。在另一實施例中，使用超過 100 百萬個細胞/mL。在另一實施例中，使用 10、15、20、25、30、35、40、45 或 50 百萬個細胞/mL 之細胞濃度。在又一實施例中，使用 75、80、85、90、95 或 100 百萬個細胞/mL 之細胞濃度。在其他實施例中，使用 125 或 150 百萬個細胞/mL 之濃度。使用高濃度可導致增加之細胞產率、細胞活化及細胞擴增。另外，使用高細胞濃度允許更有效捕捉可微弱地表現相關標靶抗原之細胞，諸如 CD28 陰性 T 細胞。在某些實施例中，該等細胞群體可具有治療價值且將需要獲得。例如，使用高細胞濃度允許更高效選擇通常具有較微弱 CD28 表現之 CD8+ T 細胞。

【0187】　在一些實施例中，該混合物可經培養持續數小時(約 3 小時)至約 14 天或其間任何按小時計之整數值。在另一實施例中，該混合物可經培養持續 21

天。在本發明之一實施例中，該等珠粒及該等 T 細胞一起經培養持續約八天。在另一實施例中，該等珠粒及 T 細胞一起經培養持續 2-3 天。亦可需要數個刺激週期，以致 T 細胞之培養時間可為 60 天或更多天。適用於 T 細胞培養之條件包括可含有增殖及活力所必需之因素的適當培養基(例如，最低必需培養基或 RPMI 培養基 1640 或 X-vivo 15 (Lonza))，該等因素包括血清(例如，胎牛或人類血清)、介白素-2 (IL-2)、胰島素、IFN-γ、IL-4、IL-7、GM-CSF、IL-10、IL-12、IL-15、TGFβ 及 TNF-α 或熟習此項技術者已知用於細胞生長之任何其他添加劑。用於細胞生長之其他添加劑包括但不限於界面活性劑、血漿製品及還原劑(諸如 N-乙醯基-半胱胺酸及 2-巰基乙醇)。培養基可包括 RPMI 1640、AIM-V、DMEM、MEM、α-MEM、F-12、X-Vivo 15 及 X-Vivo 20、Optimizer，添加有胺基酸、丙酮酸鈉及維他命，無血清，或補充有適量血清(或血漿)或一組確定的激素，及/或足以用於 T 細胞之生長及擴增之量的細胞介素。抗生素(例如，青黴素及鏈黴素)僅包括於實驗培養物中，而未包括於欲輸注至個體中之細胞培養物中。標靶細胞經維持於支持生長所必需之條件下，例如適當溫度(例如，37℃)及氣氛(例如，空氣加上 5% CO_2)。已暴露於變化之刺激時間之 T 細胞可展現不同特徵。例如，典型血液或血球分離外周血單核細胞產物具有輔助性 T 細胞群體(TH，CD4+)，其大於細胞毒性或抑制性 T 細胞群體(TC，CD8)。藉由刺激 CD3 及 CD28 受體離體擴增 T 細胞會產生如下 T 細胞群體，在約第 8-9 天之前，該 T 細胞群體主要地由 TH 細胞組成，而在約第 8-9 天之後，該 T 細胞群體包含日益增大之 TC 細胞群體。因此，視治療目的而定，對個體輸注主要地包含 TH 細胞之 T 細胞群體可為有利的。同樣，若已分離抗原特異性 TC 細胞之子集，則擴增此子集至較大程度可為有益的。

【0188】　此外，除了 CD4 及 CD8 標記物以外，其他表型標記物亦顯著地變化，但在細胞擴增過程期間很大程度上可再現。因此，該再現性使得能夠針對特

定目的調適經活化 T 細胞產物。

【0189】　在一些實施例中，該等方法包括分析經修飾細胞或欲經工程改造之細胞之表面上的一或多種標記物之表現。在一實施例中，該等方法包括分析 TCR 或 CD3ε 之表面表現，例如藉由基於親和力之偵測方法，諸如藉由流式細胞術分析。在一些態樣中，倘若該方法揭露該抗原或其他標記物之表面表現，則例如使用本文所述之方法破壞編碼該抗原或其他標記物之基因或以其他方式抑制表現。

內源基因座之基因編輯

【0190】　在一些實施例中，在修飾 T 細胞以表現本文所述之 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)及/或功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))之前或同時，藉由基因編輯方法修飾諸如內源 TCR 基因座(例如，TCRα、TCRβ)之 T 細胞內源基因座，。在一些實施例中，該等內源基因座之修飾係藉由實現基因之破壞，諸如剔除、插入、誤義或移碼突變(諸如雙等位基因移碼突變)、該基因之全部或一部分(例如，一或多個外顯子或其部分)的缺失及/或敲入來進行。在一些實施例中，該基因座修飾係使用與該基因特異性地結合或雜交之 DNA 靶向分子(諸如 DNA 結合蛋白或 DNA 結合核酸)或含其之複合物、化合物或組合物來實施。在一些實施例中，該 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、轉錄活化子樣蛋白(TAL)或 TAL 效應子(TALE) DNA 結合結構域、成簇的規律間隔的短回文重複序列(CRISPR) DNA 結合結構域或來自兆核酸酶之 DNA 結合結構域。

【0191】　在一些實施例中，內源基因座(例如，TCR)之修飾係使用一或多種 DNA 結合核酸來進行，諸如經由 RNA 指導核酸內切酶(RGEN)實現之破壞或藉

由另一 RNA 指導效應子分子實現之其他抑制形式來進行。例如，在一些實施例中，該抑制係使用成簇的規律間隔的短回文重複序列(CRISPR)及 CRISPR 相關(Cas)蛋白來進行。參見 Sander 及 Joung, *Nature Biotechnology,* 32 (4): 347-355。

【0192】　一般而言，「CRISPR 系統」統一係指牽涉於 CRISPR 相關(「Cas」)基因之表現中或指導該等基因之活性之轉錄物及其他元件，包括編碼 Cas 基因之序列、反式活化 CRISPR (tracr)序列(例如，tracrRNA 或活性部分 tracrRNA)、tracr-mate 序列(在內源 CRISPR 系統之背景中涵蓋「直接重複序列」及經 tracrRNA 處理之部分直接重複序列)、指導序列(在內源 CRISPR 系統之背景中亦稱作「間隔序列」)及/或來自 CRISPR 基因座之其他序列及轉錄物。

【0193】　在一些實施例中，CRISPR/Cas 核酸酶或 CRISPR/Cas 核酸酶系統包括非編碼 RNA 分子(指導) RNA，其序列特異性地結合於 DNA；及 Cas 蛋白(例如，Cas9)，具有核酸酶功能性(例如，兩個核酸酶結構域)。

【0194】　在一些實施例中，CRISPR 系統之一或多種元件係源於 I 型、II 型或 III 型 CRISPR 系統。在一些實施例中，CRISPR 系統之一或多種元件係源於包含內源 CRISPR 系統之特定生物體，諸如釀膿鏈球菌(*Streptococcus pyogenes*)。

【0195】　在一些實施例中，將 Cas 核酸酶及 gRNA (包括對標靶序列具特異性之 crRNA 及固定 tracrRNA 之融合物)引入至細胞中。一般而言，使用互補鹼基配對，在 gRNA 之 5′末端處之標靶位點使 Cas 核酸酶靶向該標靶位點(例如，基因)。在一些實施例中，該標靶位點係基於其緊挨前間隔序列鄰近基元(PAM)序列(諸如典型地 NGG 或 NAG)之 5′之位置經選擇。就此而言，該 gRNA 係藉由修飾指導 RNA 之最初 20 個核苷酸以對應於標靶 DNA 序列而靶向所需序列。在一些實施例中，該 gRNA 包含核酸序列 SEQ ID NO: 23。

【0196】　在一些實施例中，CRISPR 系統在標靶位點處誘導 DSB。在其他實施例中，使用 Cas9 變異體(被視為「切口酶」)使單一股在標靶位點處產生切口。在

一些態樣中，使用成對切口酶，例如以改良特異性，各切口酶由一對不同的 gRNA 靶向序列導向，以致在引入切口時同時引入 5′突出。在其他實施例中，及催化無活性 Cas9 融合至諸如轉錄抑制因子或活化子之異源效應子結構域，以實現基因表現。

【0197】　在一些實施例中，T 細胞之內源基因座(例如，內源 TCR)在修飾該 T 細胞以表現本文所述之 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)及/或功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))之前藉由 CRISPR/Cas 系統修飾。在一些實施例中，T 細胞之內源基因座(例如，內源 TCR)與修飾該 T 細胞以表現本文所述之 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)及/或功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))同時藉由 CRISPR/Cas 系統修飾。在一些實施例中，編碼 CRISPR/Cas 系統之核酸及編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)及/或功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))之核酸係在同一載體上。在一些實施例中，編碼 CRISPR/Cas 系統之核酸及編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)及/或功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))之核酸係在不同載體上。

經修飾 T 細胞之分離及富集

【0198】　在一些實施例中，本文所述方法進一步包括分離或富集包含第一及/

或第二核酸之 T 細胞。在一些實施例中，本文所述方法進一步包括自表現 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之經修飾 T 細胞分離或富集 CD3ε/γ/δ 陰性 T 細胞。在一些實施例中，本文所述方法進一步包括自表現 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之經修飾 T 細胞分離或富集內源 TCRα/β 陰性 T 細胞。在一些實施例中，本文所述方法進一步包括自表現 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之經修飾 T 細胞分離或富集 CD4+及/或 CD28+ T 細胞。在一些實施例中，T 細胞之分離或富集包含本文所述方法之任何組合。

【0199】　在一些實施例中，該等分離方法包括基於一或多種特異性分子(諸如表面標記物(例如表面蛋白)、細胞內標記物或核酸)在細胞中之不存在或存在分離不同細胞類型。在一些實施例中，選擇標記物為 Nef (例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)、外源受體(例如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))、CD4、CD28、CD3ε、CD3γ、CD3δ、CD3ζ、CD69、TCRα、TCRβ 或 MHC。在一些實施例中，可使用基於該等標記物進行分離之任何已知方法。在一些實施例中，該分離為基於親和力或免疫親和力之分離。例如，在一些態樣中，該分離包括基於細胞之一或多種標記物(典型地，細胞表面標記物)之表現或表現水準分離細胞及細胞群體，例如藉由用特異性地結合於該等標記物之抗體或結合搭配物培育，一般而言隨後進行洗滌步驟且使已結合該抗體或結合搭配物之細胞與尚未結合於該抗體或結合搭配物之彼等細胞分離。

【0200】　該等分離步驟可基於陽性選擇，其中已結合試劑之細胞經保持以供進一步使用；及/或陰性選擇，其中尚未結合於抗體或結合搭配物之細胞經保持。在一些實例中，兩個部分均經保持以供進一步使用。在一些態樣中，陰性選擇可

尤其適用，其中無法獲得特異性地鑑別異源群體中之細胞類型之抗體，以致最佳基於由除所需群體外的細胞表現之標記物進行分離。

【0201】　該分離無需引起表現特定標記物之特定細胞群體或細胞之 100%富集或移除。例如，特定類型之細胞(諸如表現標記物之彼等細胞)的陽性選擇或富集係指增加該等細胞之數目或百分率，但無需引起未表現該標記物之細胞的完全不存在。同樣，特定類型之細胞(諸如表現標記物之彼等細胞)的陰性選擇、移除或耗盡係指減少該等細胞之數目或百分率，但無需引起所有該等細胞之完全移除。

【0202】　在一些實例中，進行多輪分離步驟，其中使來自一步驟之經陽性或陰性選擇之部分經受另一分離步驟，諸如後續陽性或陰性選擇。在一些實例中，單一分離步驟可使同時表現多種標記物之細胞耗盡，諸如藉由與複數種抗體或結合搭配物一起培育細胞達成，各抗體或結合搭配物對旨在用於陰性選擇之標記物具特異性。同樣，多種細胞類型可藉由與在各種細胞類型上表現之複數種抗體或結合搭配物一起培育細胞而同時經陽性選擇。

【0203】　例如，在一些態樣中，藉由陽性或陰性選擇技術分離特定之 T 細胞子群體，諸如陽性或表現高水準之一或多種表面標記物之細胞，例如 $CD28^+$、$CD62L^+$、$CCR7^+$、$CD27^+$、$CD127^+$、$CD4^+$、$CD8^+$、$CD45RA^+$及/或 $CD45RO^+$ T 細胞。

【0204】　例如，可使用 CD3/CD28 結合磁珠(例如，DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T 細胞擴增器)陽性選擇 $CD3^+$、$CD28^+$ T 細胞。

【0205】　在一些實施例中，藉由經由陽性選擇富集特定細胞群體，或經由陰性選擇使特定細胞群體缺失來進行分離。在一些實施例中，藉由用特異性地結合於分別表現或以相對較高水準($標記物^{高}$)表現($標記物^+$)於經陽性或陰性選擇之細胞上的一或多種表面標記物之一或多種抗體或其他結合劑培育細胞來實現陽性

或陰性選擇。

【0206】　在一些態樣中，將欲分離之細胞之樣品或組合物與小型、可磁化或磁反應性材料，諸如磁反應性粒子或微粒，諸如順磁珠粒(例如 Dynalbeads 或 MACS 珠粒)一起培育。該磁反應性材料(例如，粒子)一般直接地或間接地連接於特異性地結合於存在於需要分離(例如，需要經陰性或陽性選擇)之一或多個細胞或細胞群體上之分子(例如，表面標記物)的結合搭配物(例如，抗體)。

【0207】　在一些實施例中，磁性粒子或珠粒包含結合於特異性結合成員(諸如抗體或其他結合搭配物)之磁反應性材料。多種熟知之磁反應性材料用於磁性分離方法中。合適磁性粒子包括描述於 Molday, 美國專利第 4,452,773 號及歐洲專利說明書 EP 452342 B 中之彼等磁性粒子，該等專利特此以引用之方式併入。其他實例係膠體大小粒子，諸如描述於 Owen, 美國專利第 4,795,698 號及 Liberti 等人, 美國專利第 5,200,084 號中之彼等膠體大小粒子。

【0208】　該培育一般地在如下條件下進行，其中連接於磁性粒子或珠粒之抗體或結合搭配物或特異性地結合於該等抗體或結合搭配物之分子(諸如二級抗體或其他試劑)特異性地結合於細胞表面分子(若存在於樣品內的細胞上)。

【0209】　在一些實施例中，該樣品係置於磁場中，且其上連接有磁反應性或可磁化粒子之彼等細胞將經吸引至磁體且與未經標記細胞分離。關於陽性選擇，經吸引至磁體之細胞經保持；關於陰性選擇，未經吸引之細胞(未經標記細胞)經保持。在一些態樣中，在同一選擇步驟期間執行陽性及陰性選擇之組合，其中陽性及陰性部分經保持且進一步經處理或經受進一步分離步驟。

【0210】　在某些實施例中，該等磁反應性粒子係在一級抗體或其他結合搭配物、二級抗體、凝集素、酶或抗生蛋白鏈菌素中經塗佈。在某些實施例中，該等磁性粒子係經由對一或多種標記物具特異性之一級抗體之塗層連接於細胞。在某些實施例中，該等細胞(而非珠粒)經一級抗體或結合搭配物標記，且接著添加

經細胞類型特異性二級抗體或其他結合搭配物(例如，抗生蛋白鏈菌素)塗佈之磁性粒子。在某些實施例中，經抗生蛋白鏈菌素塗佈之磁性粒子係聯合生物素標記之一級或二級抗體一起使用。

【0211】　在一些實施例中，使該等磁反應性粒子連接於後續欲經培育、培養及/或工程改造之細胞；在一些態樣中，使該等粒子連接於用於投與至患者之細胞。在一些實施例中，自細胞移除該等可磁化或磁反應性粒子。用於自細胞移除可磁化粒子之方法為已知的且包括例如使用競爭性非標記抗體、結合於可裂解連接體之可磁化粒子或抗體等。在一些實施例中，該等可磁化粒子為生物可降解的。

【0212】　在一些實施例中，基於親和力之選擇係經由磁性活化細胞分選(MACS) (Miltenyi Biotec, Auburn, Calif.)。磁性活化細胞分選(MACS)系統能夠高純度選擇其上連接有經磁化粒子之細胞。在某些實施例中，MACS 以其中非標靶及標靶物質在應用外部磁場之後依序經溶離之模式操作。亦即，連接於經磁化粒子之細胞經固持於適當位置中，而未經連接之物質經溶離。接著，在此第一溶離步驟完成之後，經俘獲於磁場中且避免經溶離之物質以某一方式經釋放，以致其可經溶離及回收。在某些實施例中，非標靶細胞經標記且自異源細胞群體耗盡。

【0213】　在某些實施例中，使用進行該等方法之分離(isolation)、細胞製備、分離(separation)、處理、培育、培養及/或調配步驟中之一或多者的系統、器件或裝置進行分離(isolation/separation)。在一些態樣中，該系統用於在封閉或無菌環境中進行此等步驟中之每一者，例如以使誤差、使用者處置及/或污染降至最低。在一實例中，該系統係如國際專利申請公開案第 WO2009/072003 號或 US 20110003380 A1 所述之系統。

【0214】　在一些實施例中，該系統或裝置在積體或自含式系統中，及/或以自動化或可編程方式進行該等分離、處理、工程改造及調配步驟中之一或多者(例

如，全部)。在一些態樣中，該系統或裝置包括與該系統或裝置連通之電腦及/或電腦程式，其允許使用者編程、控制、分析該等處理、分離、工程改造及調配步驟之結果及/或調節該等處理、分離、工程改造及調配步驟之多種態樣。

【0215】　在一些態樣中，使用 CliniMACS 系統(Miltenyi Biotec)進行該等分離及/或其他步驟，例如用於在封閉及無菌系統中以臨床規模水準自動化分離細胞。組件可包括積體微型電腦、磁性分離單元、蠕動泵及多種夾管閥。在一些態樣中，該積體電腦控制該儀器之所有組件且指導該系統以標準化順序實施重複程序。在一些態樣中，該磁性分離單元包括可移動永久磁體及用於選擇管柱之固持器。該蠕動泵控制藉助管組之流動速率且連同夾管閥一起，確保緩衝液受控流過該系統及細胞持續懸浮。

【0216】　在一些態樣中，CliniMACS 系統使用在無菌、無熱原溶液中供應之抗體偶合可磁化粒子。在一些實施例中，在用磁性粒子標記細胞之後，洗滌該等細胞以移除過量粒子。細胞準備袋接著連接至管組，該管組又連接至含有緩衝液之袋及細胞收集袋。該管組由預組裝之無菌管組成，包括前管柱及分離管柱，且僅用於單次使用。在起始分離程式之後，該系統自動地將細胞樣品施加至該分離管柱上。經標記細胞保持於該管柱內，而未經標記細胞藉由一系列洗滌步驟經移除。在一些實施例中，用於本文所述方法之細胞群體未經標記且未保持於該管柱中。在一些實施例中，用於本文所述方法之細胞群體經標記且保持於該管柱中。在一些實施例中，用於本文所述方法之細胞群體在移除磁場之後自該管柱溶離，且經收集於該細胞收集袋內。

【0217】　在某些實施例中，使用 CliniMACS Prodigy 系統(Miltenyi Biotec)進行分離及/或其他步驟。在一些態樣中，該 CliniMACS Prodigy 系統配備有細胞處理單元，其允許自動化洗滌及藉由離心分級分離細胞。該 CliniMACS Prodigy 系統亦可包括板上攝影機及圖像識別軟體，其藉由辨別源細胞產物之宏觀層來確定

最佳細胞分級分離終點。例如，外周血自動地分離成紅血球、白血球及血漿層。該 CliniMACS Prodigy 系統亦可包括積體細胞栽培腔室，其實現細胞培養方案，諸如細胞分化及擴增、抗原負載及長期細胞培養。輸入埠可允許培養基之無菌移除及補充且細胞可使用積體顯微鏡進行監測。

【0218】　在一些實施例中，經由流式細胞術收集且富集(或缺失)本文所述之細胞群體，其中流體流中攜帶針對多種細胞表面標記物經染色之細胞。在一些實施例中，經由製備級(FACS)-分選收集且富集(或耗盡)本文所述之細胞群體。在某些實施例中，藉由使用與基於 FACS 之偵測系統組合的微機電系統(MEMS)晶片收集且富集(或耗盡)本文所述之細胞群體(參見例如 WO 2010/033140, Cho 等人 (2010) *Lab Chip* 10, 1567-1573；及 Godin 等人 (2008) J Biophoton. 1 (5):355-376。在兩種情況下，細胞均可經多種標記物標記，從而允許以高純度分離充分確定之 T 細胞子集。

【0219】　在一些實施例中，該等抗體或結合搭配物經一或多種可偵測標記物標記，以促進針對陽性及/或陰性選擇之分離。例如，分離可基於與經螢光標記抗體之結合。在一些實例中，在流體流中進行基於對一或多種細胞表面標記物具特異性之抗體或其他結合搭配物之結合的細胞分離，諸如藉由螢光活化細胞分選(FACS)，包括製備級(FACS)，及/或例如與流式細胞術偵測系統組合之微機電系統(MEMS)晶片。該等方法允許同時基於多種標記物進行陽性及陰性選擇。

【0220】　關於分離及富集方法，亦參見「實例」章節。

IV. Nef 蛋白

【0221】　本文所述方法涉及 Nef 蛋白之表現。亦提供尤其適用於製造本文所述之經修飾 T 細胞的非天然存在之突變型 Nef 蛋白(例如，突變型 SIV Nef)。

【0222】　野生型 Nef (陰性調節因子)係由包括人類免疫缺乏病毒(HIV-1 及 HIV-2)及猿免疫缺乏病毒(SIV)在內之靈長類動物慢病毒編碼之小型 27-35 kDa

肉豆蔻醯化蛋白。Nef 主要地定位於細胞質，但亦部分地經募集至細胞質膜(PM)。其充當毒力因子，該毒力因子可操縱宿主之細胞機構且因此允許病原體之感染、生存或複製

【0223】 Nef 在所有靈長類動物慢病毒中均高度保守。HIV-2 及 SIV Nef 蛋白比 HIV-1 Nef 長 10-60 個胺基酸。自 N 端至 C 端，Nef 蛋白包含以下結構域：肉豆蔻醯化位點(牽涉於 CD4 下調、MHC I 下調及與信號傳導分子之締合中，為 Nef 之內部細胞質膜靶向及病毒體併入所需，且由此為感染性所需)、N 端 α-螺旋(牽涉於 MHC I 下調及蛋白激酶募集中)、基於酪胺酸之 AP 募集(HIV-2 /SIV Nef)、CD4 結合位點(WL 殘基，牽涉於 CD4 下調中，針對 HIV-1 Nef 經表徵)、酸性簇(牽涉於 MHC I 下調、與宿主 PACS1 及 PACS2 之相互作用中)、基於脯胺酸之重複序列(牽涉於 MHC I 下調及 SH3 結合中)、PAK (p21 活化激酶)結合結構域(牽涉於與信號傳導分子之締合及 CD4 下調中)、COP I 募集結構域(牽涉於 CD4 下調中)、基於二-白胺酸之 AP 募集結構域(牽涉於 CD4 下調中，HIV-1 Nef)、V-ATP 酶及 Raf-1 結合結構域(牽涉於 CD4 下調及與信號傳導分子之締合中)。

【0224】 CD4 為 55 kDa I 型完整細胞表面醣蛋白。其為 MHC II 類限制性細胞(諸如輔助性/誘導性 T-淋巴球及巨噬細胞/單核球譜系之細胞)上的 T 細胞受體之組分。其充當 HIV 及 SIV 之主要細胞受體。

【0225】 在一些實施例中，該 Nef 蛋白係選自由 SIV Nef、HIV1 Nef 及 HIV2 Nef 組成之群。在一些實施例中，該 Nef 蛋白為野生型 Nef。在一些實施例中，該 Nef 蛋白包含 SEQ ID NO: 12-17 中任一者之胺基酸序列。

【0226】 在一些實施例中，該 Nef 蛋白獲自或源於原發 C 亞型 HIV-1 印度分離株。在一些實施例中，該 Nef 蛋白由編碼該全長蛋白之印度分離株之 F2 等位基因表現(HIV F2-Nef)。在一些實施例中，該 Nef 蛋白由具有 CD4 結合位點、酸性簇、基於脯胺酸之重複序列及 PAK 結合結構域之框內缺失的印度分離株之 C2

等位基因表現(HIV C2-Nef)。在一些實施例中，該 Nef 蛋白由具有 CD4 結合位點之框內缺失的印度分離株之 D2 等位基因表現(HIV D2-Nef)。

【0227】　在一些實施例中，該 Nef 蛋白為突變型 Nef，諸如包含插入、缺失、點突變及/或重排中之一或多者之 Nef 蛋白。在一些實施例中，本申請案提供非天然存在之突變型 Nef 蛋白，諸如當表現於 T 細胞中時不下調外源受體(諸如 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR、ACTR)或經工程改造 TCR (例如，傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR、TAC 樣嵌合受體))之非天然存在之突變型 Nef 蛋白。因此，在一些實施例中，提供與野生型 Nef 相比包含一或多種突變之非天然存在之突變型 Nef 蛋白，其中當表現於 T 細胞中時，與野生型 Nef 相比，該非天然存在之突變型 Nef 不會或很少下調外源受體。該 Nef 蛋白可包含在選自由肉豆蔻醯化位點、N 端 α-螺旋、基於酪胺酸之 AP 募集、CD4 結合位點、酸性簇、基於脯胺酸之重複序列、PAK 結合結構域、COP I 募集結構域、基於二-白胺酸之 AP 募集結構域、V-ATP 酶及 Raf-1 結合結構域及其任何組合組成之群的一或多個結構域或基元中之一或多種突變(例如，非天然存在之突變)。

【0228】　例如，在一些實施例中，該突變型(例如，非天然存在之突變型) Nef 包含在基於二-白胺酸之 AP 募集結構域中的一或多種突變。在一些實施例中，該突變型(例如，非天然存在之突變型) Nef 包含在基於二-白胺酸之 AP 募集結構域及 PAK 結合結構域中的突變。在一些實施例中，該突變型(例如，非天然存在之突變型) Nef 包含在基於二-白胺酸之 AP 募集結構域、PAK 結合結構域、COP I 募集結構域及 V-ATP 酶及 Raf-1 結合結構域中的突變。在一些實施例中，該突變型(例如，非天然存在之突變型) Nef 包含在基於二-白胺酸之 AP 募集結構域、COP I 募集結構域及 V-ATP 酶及 Raf-1 結合結構域中的一或多種突變。在一些實施例中，該突變型(例如，非天然存在之突變型) Nef 包含在基於二-白胺酸之

AP 募集結構域及 V-ATP 酶及 Raf-1 結合結構域中的一或多種突變。在一些實施例中，該突變型(例如，非天然存在之突變型) Nef 包含截斷缺失部分或整個結構域。

【0229】　在一些實施例中，該突變型(例如，非天然存在之突變型) Nef 蛋白包含 SEQ ID NO: 18-22 中任一者之胺基酸序列。在一些實施例中，該 Nef 蛋白包含並非在任何前述結構域/基元中之一或多種突變(例如，非天然存在之突變)。在一些實施例中，該突變型(例如，非天然存在之突變型) Nef 為突變型 SIV Nef，其包含在表 11 中列出的任何胺基酸殘基處之一或多種突變(例如，使 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 種胺基酸殘基中的至少任一者突變，諸如突變為 Ala)。在一些實施例中，該突變型(例如，非天然存在之突變型) Nef 為突變型 SIV Nef，其包含在以下中之任一者之胺基酸殘基處之一或多種突變(例如，使 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 種胺基酸殘基中的至少任一者突變，諸如突變為 Ala)：(i) aa 2-4、aa 8-10、aa 11-13、aa 38-40、aa 44-46、aa 47-49、aa 50-52、aa 53-55、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 110-112、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、aa 178-179、179-181aa、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 191-193、aa 194-196、aa 203-205、aa 206-208、aa 212-214、aa 215-217、aa 218-220、aa 221-223、aa 8-13、aa 44-67、aa 107-112、aa 164-196、aa 203-208 或 aa 212-223；(ii) aa 2-4、aa 44-46、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 44-67、aa 164-169、aa 176-181、aa 185-190；(iii) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、178-179aa、aa 179-181、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、

aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67 或 aa 164-190；或(iv) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67、aa 164-169、aa 176-181 或 aa 185-190；其中該胺基酸殘基位置對應於野生型 SIV Nef 之彼位置。

【0230】 在一些實施例中，本文所述之 Nef 蛋白(野生型或突變型，例如非天然存在之突變型)在 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞)中的表現下調內源 TCR。在一些實施例中，內源 TCR 下調包含下調內源 TCR、CD3ε、CD3δ 及/或 CD3γ 之細胞表面表現，及/或干擾 TCR 介導之信號轉導，諸如 T 細胞活化或 T 細胞增殖(例如，藉由調節控制諸如 Lck 及 LAT 之必需 TCR 近端機構轉運至細胞質膜的囊泡轉運途徑，及/或藉由破壞 TCR 近端信號傳導機構之時空協調所必需的 TCR 誘導之肌動蛋白重塑事件)。在一些實施例中，與來自同一供體來源之 T 細胞之彼下調相比，內源 TCR、CD3ε、CD3δ 及/或 CD3γ 在表現本文所述之 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之 T 細胞中的細胞表面表現經下調達至少約 50%、60%、70%、80%、90%或 95%中任一者。在一些實施例中，下調(例如，下調表現)內源 TCR 之突變型(例如，非天然存在之突變型) Nef 為突變型 SIV Nef，其包含在以下中之任一者之胺基酸殘基處之一或多種突變：(i) aa 2-4、aa 8-10、aa 11-13、aa 38-40、aa 44-46、aa 47-49、aa 50-52、aa 53-55、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 110-112、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、aa 178-179、179-181aa、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 191-193、aa 194-196、aa 203-205、aa 206-208、aa 212-214、aa 215-217、aa 218-220、aa 221-223、aa 8-13、aa 44-67、aa 107-112、aa 164-196、aa 203-208 或 aa 212-223；(ii) aa 2-4、aa 44-46、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、

aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 44-67、aa 164-169、aa 176-181、aa 185-190；(iii) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、178-179aa、aa 179-181、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67 或 aa 164-190；或(iv) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67、aa 164-169、aa 176-181 或 aa 185-190；其中該胺基酸殘基位置對應於野生型 SIV Nef 之彼位置。在一些實施例中，該 Nef 蛋白包含選自 SEQ ID NO: 12-14 及 18-22 中任一者之胺基酸序列。在一些實施例中，該突變型 Nef (例如，突變型 SIV Nef)下調內源 TCR (例如，TCRα 及/或 TCRβ)之細胞表面表現。在一些實施例中，該突變型 Nef 蛋白(例如，突變型 SIV Nef)對內源 TCR (例如，TCRα 及/或 TCRβ)之細胞表面表現之下調與野生型 Nef 之彼下調相差不超過約 3% (諸如不超過約 2%或 1%中任一者)。在一些實施例中，該突變型 Nef 蛋白(例如，突變型 SIV Nef)對內源 TCR (例如，TCRα 及/或 TCRβ)之細胞表面表現之下調較野生型 Nef 之彼下調多至少約 3% (包括等於 3%；諸如至少約 3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或 95%中任一者)。在一些實施例中，該突變型 Nef 蛋白(例如，突變型 SIV Nef)不下調 CD4 之細胞表面表現。在一些實施例中，該突變型 Nef 蛋白(例如，突變型 SIV Nef)下調 CD4 之細胞表面表現。在一些實施例中，該突變型 Nef 蛋白(例如，突變型 SIV Nef)對 CD4 之細胞表面表現之下調較野生型 Nef 之彼下調少至少約 3% (諸如至少約 4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或 95%中任一者)。在一些實施例中，該突變型 Nef

蛋白(例如，突變型 SIV Nef)不下調 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該突變型 Nef 蛋白(例如，突變型 SIV Nef)下調 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該突變型 Nef 蛋白(例如，突變型 SIV Nef)對 CD28 之細胞表面表現之下調較野生型 Nef 之彼下調少至少約 3% (諸如至少約 4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或 95%中任一者)。在一些實施例中，該突變型 Nef 蛋白(例如，突變型 SIV Nef)對內源 TCR (例如，TCRα 及/或 TCRβ)之細胞表面表現之下調與野生型 Nef 之彼下調相差不超過約 3% (諸如不超過約 2%或 1%中任一者)(或對內源 TCR (例如，TCRα 及/或 TCRβ)之細胞表面表現之下調較野生型 Nef 之彼下調多至少約 3% (包括等於 3%；諸如至少約 3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或 95%中任一者))，且不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該突變型 Nef 蛋白(例如，突變型 SIV Nef)對內源 TCR (例如，TCRα 及/或 TCRβ)之細胞表面表現之下調與野生型 Nef 之彼下調相差不超過約 3% (諸如不超過約 2%或 1%中任一者)(或對內源 TCR (例如，TCRα 及/或 TCRβ)之細胞表面表現之下調較野生型 Nef 之彼下調多至少約 3% (包括等於 3%；諸如至少約 3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或 95%中任一者))，且對 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現之下調較野生型 Nef 之彼下調少至少約 3% (諸如至少約 4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或 95%中任一者)。在一些實施例中，該突變型 Nef 蛋白(例如突變型 SIV Nef)下調內源 TCR (例如，TCRα 及/或 TCRβ)之細胞表面表現，但不下調(例如，下調細胞表面表現)功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))。在一些實施例中，該突變型 Nef 蛋

白(例如突變型 SIV Nef)下調內源 TCR (例如，TCRα 及/或 TCRβ)之細胞表面表現，且對功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))之細胞表面表現之下調與野生型 Nef 之彼下調相差至多約 3% (諸如至多約 2%或 1%中任一者)。在一些實施例中，該突變型 Nef 蛋白(例如突變型 SIV Nef)下調內源 TCR (例如，TCRα 及/或 TCRβ)之細胞表面表現，且對功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))之細胞表面表現之下調較野生型 Nef 之彼下調少至少約 3% (諸如至少約 4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或 95%中任一者))。

【0231】　在一些實施例中，T 細胞(例如，同種異體 T 細胞)中本文所述之 Nef 蛋白(野生型或突變型，例如非天然存在之突變型)的表現不改變內源 CD3ζ 表現或 CD3ζ 介導之信號轉導，或與來自同一供體來源之 T 細胞之彼下調相比，下調內源 CD3ζ 表現及/或下調 CD3ζ 介導之信號轉導達至多約 50%、40%、30%、20%、10%、5%或 5%以下中任一者。在一些實施例中，該 Nef 蛋白包含選自 SEQ ID NO: 12-14 及 18-22 中任一者之胺基酸序列。在一些實施例中，該 Nef 蛋白為突變型 SIV Nef，其包含在以下中之任一者之胺基酸殘基處之一或多種突變：(i) aa 2-4、aa 8-10、aa 11-13、aa 38-40、aa 44-46、aa 47-49、aa 50-52、aa 53-55、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 110-112、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、aa 178-179、179-181aa、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 191-193、aa 194-196、aa 203-205、aa 206-208、aa 212-214、aa 215-217、aa 218-220、aa 221-223、aa 8-13、aa 44-67、aa 107-112、aa 164-196、aa 203-208 或 aa 212-223；(ii)

aa 2-4、aa 44-46、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 44-67、aa 164-169、aa 176-181、aa 185-190；(iii) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、178-179aa、aa 179-181、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67 或 aa 164-190；或(iv) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67、aa 164-169、aa 176-181 或 aa 185-190；其中該胺基酸殘基位置對應於野生型 SIV Nef之彼位置。Nef不影響或以最小程度影響 CD3ζ介導之信號轉導的能力在本發明中至關重要，乃因 Nef表現意欲用於下調內源 TCR，同時對引入至同一細胞中之外源受體(諸如 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR、ACTR)、經工程改造 TCR (例如，傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR、TAC 樣嵌合受體)，例如或包含配位體結合結構域之嵌合受體)的信號轉導造成極少或沒有影響。亦需要 Nef 表現對引入至同一細胞中之外源受體(諸如 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR、ACTR)、經工程改造 TCR (例如，傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR、TAC 樣嵌合受體)或包含配位體結合結構域之嵌合受體)的表現造成極少或沒有影響。

【0232】　在一些實施例中，本文所述之 Nef蛋白(野生型或突變型，例如非天然存在之突變型)在 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞)中的表現不下調(例如，下調細胞表面表現)同一 T 細胞中之外源受體(諸如 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR、ACTR)、經工程改造 TCR (例如，傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR、TAC 樣嵌合受體)或包含配位體結合結構域之嵌合受體)。在一些實

施例中，與外源受體在來自不具有 Nef 表現之同一供體來源之 T 細胞中表現時相比，表現本文所述之 Nef 蛋白之經修飾 T 細胞中的外源受體(諸如 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR、ACTR)、經工程改造 TCR (例如，傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR、TAC 樣嵌合受體)或包含配位體結合結構域之嵌合受體)經下調(例如，下調細胞表面表現)達至多約 50%、40%、30%、20%、10%或 5%中任一者。在一些實施例中，當經修飾 T 細胞表現本文所述之 Nef 蛋白時，該外源受體(諸如 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR、ACTR)、經工程改造 TCR (例如，傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR、TAC 樣嵌合受體)或包含配位體結合結構域之嵌合受體)的細胞表面表現及/或信號轉導未受影響，或經下調達至多約 50%、40%、30%、20%、10%或 5%中任一者。在一些實施例中，該 Nef 蛋白包含選自 SEQ ID NO: 12-14 及 18-22 中任一者之胺基酸序列。在一些實施例中，該 Nef 蛋白為突變型 SIV Nef，其包含在以下中之任一者之胺基酸殘基處之一或多種突變：(i) aa 2-4、aa 8-10、aa 11-13、aa 38-40、aa 44-46、aa 47-49、aa 50-52、aa 53-55、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 110-112、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、aa 178-179、179-181aa、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 191-193、aa 194-196、aa 203-205、aa 206-208、aa 212-214、aa 215-217、aa 218-220、aa 221-223、aa 8-13、aa 44-67、aa 107-112、aa 164-196、aa 203-208 或 aa 212-223；(ii) aa 2-4、aa 44-46、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 44-67、aa 164-169、aa 176-181、aa 185-190；(iii) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、178-179aa、aa 179-

181、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67 或 aa 164-190；或(iv) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67、aa 164-169、aa 176-181 或 aa 185-190；其中該胺基酸殘基位置對應於野生型 SIV Nef 之彼位置。

【0233】 在一些實施例中，本文所述之 Nef 蛋白(野生型或突變型，例如非天然存在之突變型)在 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞)中的表現下調內源 MHC I、CD4 及/或 CD28，諸如下調內源 MHC I、CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現(例如，經由內吞及降解)。在一些實施例中，與來自同一供體來源之 T 細胞之彼下調相比，內源 MHC I、CD4 及/或 CD28 在表現本文所述之 Nef 蛋白之 T 細胞中的細胞表面表現經下調達至少約 50%、60%、70%、80%、90%或 95%中任一者。

【0234】 在一些實施例中，與野生型 Nef 蛋白表現於來自同一供體來源之 T 細胞中時相比，本文所述之突變型(例如，非天然存在之突變型) Nef 蛋白(例如，具有牽涉於 CD4 或 CD28 下調中之突變結構域/基元)在 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞)中的表現下調內源 TCR (及/或 MHC I)，同時對內源 CD4 或 CD28 具有降低之下調效應(少至少約 3% (諸如至少約 4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或 95%中任一者)之下調)。在一些實施例中，對內源 CD4/CD28 之下調效應包含下調 CD4/CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，突變型 Nef 不下調(例如，下調細胞表面表現)內源 CD4。在一些實施例中，突變型 Nef 不下調(例如，下調細胞表面表現)內源 CD28。在一些實施例中，與野生型 Nef 蛋白表現於來自同一供體來源之 T 細胞中時相比，當突變型 Nef 表現於 T 細胞中時，內源 CD4 (及/或 CD28)之細胞表面表現的下調降低達至少約 3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、

50%、60%、70%、80%、90%或 95%中任一者。在一些實施例中，與野生型 Nef 蛋白表現於來自同一供體來源之 T 細胞中時相比，與來自同一供體來源之 T 細胞之彼下調相比，突變型 Nef 在 T 細胞中的表現下調內源 TCR (及/或 MHC I)之細胞表面表現達至少約 50%、60%、70%、80%、90%、95%中任一者，同時內源 CD4 (及/或 CD28)之細胞表面表現的下調降低達至少約 50%、60%、70%、80%、90%或 95%中任一者。在一些實施例中，該突變型 Nef 蛋白(例如，突變型 SIV Nef)對內源 TCR (例如，TCRα 及/或 TCRβ)之細胞表面表現之下調與野生型 Nef 之彼下調相差不超過約 3% (諸如不超過約 2%或 1%中任一者) (或對內源 TCR (例如，TCRα 及/或 TCRβ)之細胞表面表現之下調較野生型 Nef 之彼下調多至少約 3% (包括等於 3%；諸如至少約 3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或 95%中任一者))，且對 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現之下調較野生型 Nef 之彼下調少至少約 3% (諸如至少約 4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或 95%中任一者)。在一些實施例中，該突變型 Nef 蛋白包含 SEQ ID NO: 18-22 中任一者之胺基酸序列。在一些實施例中，具有較少 CD4 及/或 CD28 下調效應之突變型 Nef 為突變型 SIV Nef，其包含在以下中之任一者之胺基酸殘基處之一或多種突變：(ii) aa 2-4、aa 44-46、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 44-67、aa 164-169、aa 176-181、aa 185-190；(iii) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、178-179aa、aa 179-181、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67 或 aa 164-190；或(iv) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-

154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67、aa 164-169、aa 176-181 或 aa 185-190；其中該胺基酸殘基位置對應於野生型 SIV Nef 之彼位置。

【0235】 在一些實施例中，提供一種非天然存在之 Nef 蛋白，其包含在肉豆蔻醯化位點、N 端 α-螺旋、基於酪胺酸之 AP 募集、CD4 結合位點、酸性簇、基於脯胺酸之重複序列、PAK 結合結構域、COP I 募集結構域、基於二-白胺酸之 AP 募集結構域、V-ATP 酶及 Raf-1 結合結構域或其任何組合中之一或多種突變，或包含並非在任何前述結構域/基元內之一或多種突變。在一些實施例中，提供一種非天然存在之 Nef 蛋白，其包含在以下中之任一者之處之一或多種突變：(i) aa 2-4、aa 8-10、aa 11-13、aa 38-40、aa 44-46、aa 47-49、aa 50-52、aa 53-55、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 110-112、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、aa 178-179、179-181aa、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 191-193、aa 194-196、aa 203-205、aa 206-208、aa 212-214、aa 215-217、aa 218-220、aa 221-223、aa 8-13、aa 44-67、aa 107-112、aa 164-196、aa 203-208 或 aa 212-223；(ii) aa 2-4、aa 44-46、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 44-67、aa 164-169、aa 176-181、aa 185-190；(iii) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、178-179aa、aa 179-181、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67 或 aa 164-190；或(iv) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、

aa 203-205、aa 56-67、aa 164-169、aa 176-181 或 aa 185-190；其中該胺基酸殘基位置對應於野生型 SIV Nef 之彼位置。在一些實施例中，提供一種非天然存在之 Nef 蛋白，其包含 SEQ ID NO: 18-22 中任一者之胺基酸序列。

【0236】　亦提供編碼任何本文所述之 Nef 蛋白(例如 wt Nef 或突變型 Nef，諸如非天然存在之 Nef 蛋白、突變型 SIV Nef)的核酸(例如，經分離核酸)。進一步提供包含編碼任何本文所述之 Nef 蛋白(例如 wt Nef 或突變型 Nef，諸如非天然存在之 Nef 蛋白、突變型 SIV Nef)的核酸之載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體、細菌表現載體)。此等載體可置於任何本文所述之載體中。

V. 功能性外源受體

【0237】　在一些實施例中，表現本文所述之 Nef 蛋白(例如 wt Nef 或突變型 Nef，諸如非天然存在之 Nef 蛋白、突變型 SIV Nef)的經修飾 T 細胞進一步表現功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))。編碼該功能性外源受體之核酸可先前存在於前驅體 T 細胞中，或連同(例如，同時)編碼該 Nef 蛋白之核酸一起經引入至前驅體 T 細胞中。該功能性外源受體可包含細胞外配位體結合結構域及視情況存在之細胞內信號傳導結構域。在一些實施例中，該功能性外源受體係包含細胞外配位體結合結構域之經工程改造 TCR，諸如傳統經工程改造 TCR (例如特異性地識別 BCMA 或 BCMA/MHC 複合物之經工程改造 TCR，稱作「抗 BCMA TCR」)，該細胞外配位體結合結構域包含源於野生型 TCR 之 Vα 及 Vβ，其合起來特異性地識別抗原(諸如腫瘤抗原，例如 BCMA)，其中相對於野生型 TCR，Vα、Vβ 或兩者包含一或多個 CDR 中之一或多種突變。表現傳統經工程改造 TCR 之 T 細胞在本文中稱作「傳統 TCR-T」。在一些實施例中，該功能性外源受體為嵌合 TCR (cTCR)，其包含(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，

BCMA、CD20、CD19)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，scFv、sdAb)；(b)視情況存在之連接體；(c)第一 TCR 次單元的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；(d)包含第二 TCR 次單元的跨膜結構域之跨膜結構域；及(e)包含第三 TCR 次單元的細胞內信號傳導結構域之細胞內信號傳導結構域；其中該第一、第二及第三 TCR 次單元均係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群。在一些實施例中，該第一、第二及第三 TCR 次單元為相同的(例如，CD3ε)。在一些實施例中，該第一、第二及第三 TCR 次單元為不同的。表現嵌合 TCR 之 T 細胞在本文中稱作「cTCR-T」。在一些實施例中，該功能性外源受體為包含以下之 T 細胞抗原偶合物(TAC)：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD20、CD19)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，scFv、sdAb)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；(e)源於第一 TCR 輔受體(諸如 CD4、CD28 或 CD8，例如 CD8α)的視情況存在之細胞外結構域；(f)包含第二 TCR 輔受體(諸如 CD4、CD28 或 CD8，例如 CD8α)的跨膜之跨膜；及(g)包含第三 TCR 輔受體(諸如 CD4、CD28 或 CD8，例如 CD8α)的細胞內信號傳導結構域之視情況存在之細胞內信號傳導結構域。在一些實施例中，該第一、第二及第三 TCR 輔受體為相同的(例如，均為 CD4)。在一些實施例中，該第一、第二及第三 TCR 輔受體為不同的。例如，在一些實施例中，該 TAC 包含：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD20、CD19)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，scFv、sdAb)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；及(e)全長 TCR 輔受體(例如，CD4、CD8 (例如，CD8α)或 CD28)。表現 TAC 之 T 細胞在本文中稱作「TAC-T」。在一些實

施例中，該功能性外源受體為包含以下之 T 細胞抗原偶合物(TAC)樣嵌合受體：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD20、CD19)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，scFv、sdAb)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別第一 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；(e)第二 TCR 次單元(例如，CD3ε)的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；(f)包含第三 TCR 次單元(例如，CD3ε)的跨膜結構域之跨膜結構域；及(g)包含第四 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞內信號傳導結構域之視情況存在之細胞內信號傳導結構域；其中該第一、第二、第三及第四 TCR 次單元均係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群。在一些實施例中，該第一、第二、第三及第四 TCR 次單元為相同的(例如，CD3ε)。在一些實施例中，該第二、第三及第四 TCR 次單元為相同的(例如，CD3ε)。在一些實施例中，該第一、第二、第三及第四 TCR 次單元為不同的(例如，CD3ε)。在一些實施例中，該第二、第三及第四 TCR 次單元為相同的(例如，CD3ε)，但不同於該第一 TCR 次單元(例如，TCRα)。在一些實施例中，該 TAC 樣嵌合受體包含：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD20、CD19)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，scFv、sdAb)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別第一 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；及(e)全長第二 TCR 次單元(例如，CD3ε)；其中該第一及第二 TCR 次單元均選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群。在一些實施例中，該第一及第二 TCR 次單元為相同的(例如，均為 CD3ε)。在一些實施例中，該第一(例如，TCRα)及第二(例如，CD3ε) TCR 次單元為不同的。表現 TAC 樣嵌合受體之 T 細胞在本文中稱作「TAC 樣-T」。在一些實施例中，該功能性外源受體為非 TCR 受體。在一些實施例中，該

非 TCR 受體為包含以下之嵌合抗原受體(CAR)：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別抗原(例如任何本文所述之抗原，諸如 BCMA、CD20、CD19)之一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)結合部分(例如受體結構域或基於抗體之結合結構域，諸如 sdAb、scFv)；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域。在一些實施例中，該 CAR 之細胞外配位體結合結構域包括包含抗原結合片段之一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)結合部分(下文中稱作「抗抗原 CAR」或「基於抗體之 CAR」，例如「抗 BCMA CAR」)，諸如 sdAb (例如，抗 BCMA sdAb)或 scFv (例如，抗 CD20 scFv、抗 CD19 scFv)。在一些實施例中，該 CAR 之細胞外配位體結合結構域包括包含源於配位體之至少一個結構域或受體之細胞外結構域的一或多個結合部分(下文中亦稱作「基於配位體/受體之 CAR」)，其中該配位體或受體為細胞表面抗原。在一些實施例中，該配位體係源於 APRIL 或 BAFF (BCMA 之配位體)。表現 CAR 之 T 細胞在本文中稱作「CAR-T」。包含包括包含 APRIL 或 BAFF 之一或多個結合部分之細胞外配位體結合結構域的 CAR 在下文中稱作「BCMA-配位體 CAR」。在一些實施例中，該受體係源於 Fc 結合結構域，諸如 Fc 受體(例如，FcγR)之細胞外結構域。包含包括包含 Fc 結合結構域(例如，FcγR)之一或多個結合部分之細胞外配位體結合結構域的 CAR 在下文中亦稱作「抗體偶合 T 細胞受體(ACTR)」。表現 ACTR 之 T 細胞在本文中稱作「ACTR-T」。在一些實施例中，當含 Fc 蛋白質經投與至 ACTR-T 細胞或共表現於 ACTR-T 細胞中時，該含 Fc 蛋白質賦予表現 ACTR 之 T 細胞對本文所述之抗原的結合特異性。在一些實施例中，該含 Fc 蛋白質為含 Fc 抗體(例如全長抗體，諸如抗 BCMA 全長抗體)或 Fc-融合蛋白，諸如抗原結合片段-Fc 融合蛋白(例如，抗 BCMA sdAb-Fc 融合蛋白或抗 BCMA HCAb)、Fc-受體/配位體融合蛋白(例如，APRIL-Fc 融合蛋白)、包含融合至免疫球蛋白 G (IgG)之 Fc 區之 TCR 可變區的 Fc 融合蛋白(「TCR-Fc 融合蛋白」，諸

如抗 BCMA TCR-Fc 融合蛋白)。含 ACTR/Fc 蛋白系統在下文中稱作「抗抗原 ACTR」，諸如「抗 BCMA ACTR」。

【0238】　亦提供編碼任何本文所述之功能性外源受體(例如經工程改造 TCR (例如，傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))的核酸(例如，經分離核酸)。進一步提供包含編碼任何本文所述之功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如，傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))的核酸之載體(例如病毒載體，諸如慢病毒載體)。

抗原

【0239】　本文所述之功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如，傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))的細胞外配位體結合結構域可特異性地識別標靶細胞上之任何抗原。在一些實施例中，該抗原為細胞表面分子。在一些實施例中，該抗原充當與特殊疾病狀態相關之標靶細胞上的細胞表面標記物。在一些實施例中，該抗原為腫瘤抗原。在一些實施例中，該細胞外配位體結合結構域特異性地識別單一腫瘤抗原。在一些實施例中，該細胞外配位體結合結構域特異性地識別單一腫瘤抗原之一或多種抗原決定基。在一些實施例中，該細胞外配位體結合結構域特異性地識別兩種或更多種腫瘤抗原。在一些實施例中，該腫瘤抗原與 B 細胞惡性疾病，諸如 B-細胞淋巴瘤或多發性骨髓瘤(MM)相關。腫瘤表現多種蛋白質，該等蛋白質可充當關於免疫反應、尤其 T 細胞介導之免疫反應之標靶抗原。由該細胞外配位體結合結構域特異性地識別之抗原可為單一患病細胞上之抗原，或在各自促進該疾病之不同細胞上表現的抗原。由該細胞外配位體結合結構域特異性地識別之抗原可直接地或間接地牽涉於該等疾

病中。

【0240】　腫瘤抗原係由腫瘤細胞產生之蛋白質，其可引起免疫反應、尤其是 T 細胞介導之免疫反應。本發明之標靶抗原的選擇將取決於欲治療之癌症之特定類型。例示性腫瘤抗原包括例如神經膠質瘤相關抗原、B-細胞成熟抗原(BCMA)、癌胚抗原(CEA)、β-人類絨毛膜促性腺激素、甲胎蛋白(AFP)、凝集素反應性 AFP、甲狀腺球蛋白、RAGE-1、MN-CAIX、人類端粒酶逆轉錄酶、RU1、RU2 (AS)、腸道羧酸酯酶、mut hsp70-2、M-CSF、前列腺酶、前列腺特異性抗原(PSA)、PAP、NY-ESO-1、LAGE-la、p53、前列腺特異蛋白、PSMA、HER2/neu、存活素及端粒酶、前列腺癌腫瘤抗原-1 (PCTA-1)、MAGE、ELF2M、嗜中性顆粒球彈性蛋白酶、ephrinB2、CD22、胰島素生長因子(IGF)-I、IGF-II、IGF-I 受體及間皮素。

【0241】　在一些實施例中，該腫瘤抗原包含與惡性腫瘤相關之一或多種抗原癌症抗原決定基。惡性腫瘤表現多種蛋白質，該等蛋白質可充當關於免疫攻擊之標靶抗原。此等分子包括但不限於組織特異性抗原，諸如黑色素瘤中之 MART-1、酪胺酸酶及 gp100 以及前列腺癌中之前列腺酸磷酸酯酶(PAP)及前列腺特異性抗原(PSA)。其他標靶分子屬於轉型相關分子之群，諸如致癌基因 HER2/Neu/ErbB-2。又一群標靶抗原為腫瘤胚胎抗原，諸如癌胚抗原(CEA)。在 B-細胞淋巴瘤中，該腫瘤特異性個體基因型免疫球蛋白構成該個別腫瘤所特有之真實腫瘤特異性免疫球蛋白抗原。諸如 CD19、CD20 及 CD37 之 B-細胞分化抗原係 B-細胞淋巴瘤中之標靶抗原的其他候選物。

【0242】　在一些實施例中，腫瘤抗原為腫瘤特異性抗原(TSA)或腫瘤相關抗原(TAA)。TSA 為腫瘤細胞所特有且不出現於身體其他細胞上。TAA 相關抗原並非腫瘤細胞所特有，且反而亦在無法誘導對該抗原之免疫耐受性狀態的條件下表現於正常細胞上。該抗原在腫瘤上之表現可發生於使得免疫系統能夠對該抗原作出反應之條件下。TAA 可為當免疫系統不成熟且無法作出反應時在胎兒發

育期間表現於正常細胞上之抗原，或其可為通常以極低水準存在於正常細胞上，但以高得多之水準表現於腫瘤細胞上之抗原。

【0243】　TSA 或 TAA 抗原之非限制性實例包括以下：分化抗原，諸如 MART-1/MelanA (MART-I)、gp 100 (Pmel 17)、酪胺酸酶、TRP-1、TRP-2 及腫瘤特異性多譜系抗原，諸如 MAGE-1、MAGE-3、BAGE、GAGE-1、GAGE-2、pl5；過表現之胚胎抗原，諸如 CEA；過表現之致癌基因及突變型腫瘤-抑制基因，諸如 p53、Ras、HER2/neu；由染色體易位引起之獨特腫瘤抗原；諸如 BCR-ABL、E2A-PRL、H4-RET、IGH-IGK、MYL-RAR；及病毒抗原，諸如艾斯坦-巴爾病毒(Epstein Barr virus)抗原 EBVA 及人類乳頭瘤病毒(HPV)抗原 E6 及 E7。其他大型、基於蛋白質之抗原包括 TSP-180、MAGE-4、MAGE-5、MAGE-6、RAGE、NY-ESO、pl85erbB2、pl80erbB-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、α-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 及 TPS。

【0244】　在一些實施例中，該腫瘤抗原係選自由 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、醣脂 F77、PD-L1、PD-L2 及其任何組合組成之群。在一些實施例中，該抗原表現於 B 細胞上。在一些實施例中，該抗原為 BCMA、CD19 或 CD20。

【0245】　在一些實施例中，該抗原為病原體抗原，諸如真菌、病毒或細菌抗

原。在一些實施例中，該真菌抗原係來自麴菌屬(Aspergillus)或念珠菌屬(Candida)。在一些實施例中，該病毒抗原係來自單純疱疹病毒(HSV)、呼吸道融合病毒(RSV)、間質性肺炎病毒(hMPV)、鼻病毒、副流感病毒(PIV)、艾斯坦-巴爾病毒(EBV)、細胞巨大病毒(CMV)、JC 病毒(John Cunningham 病毒)、BK 病毒、HIV、Zika 病毒、人類冠狀病毒、諾羅病毒(norovirus)、腦炎病毒或埃博拉病毒(Ebola)。

【0246】　在一些實施例中，該細胞表面抗原為配位體或受體。在一些實施例中，該細胞外配位體結合結構域包括包含源於配位體之至少一個結構域或受體之細胞外結構域的一或多個結合部分，其中該配位體或受體為本文所述之細胞表面抗原。在一些實施例中，該配位體或受體係源於選自由 NKG2A、NKG2C、NKG2F、NKG2D、BCMA、APRIL、BAFF、IL-3、IL-13、LLT1、AICL、DNAM-1 及 NKp80 組成之群之分子。在一些實施例中，該配位體係源於 APRIL 或 BAFF，其可結合於 BCMA。在一些實施例中，該受體係源於 Fc 結合結構域，諸如 Fc 受體之細胞外結構域。在一些實施例中，該 Fc 受體為 Fcγ 受體(FcγR)。在一些實施例中，該 FcγR 係選自由 CD16A (FcγRIIIa)、CD16B (FcγRIIIb)、CD64A、CD64B、CD64C、CD32A 及 CD32B 組成之群。

嵌合抗原受體(CAR)

【0247】　在一些實施例中，表現本文所述之 Nef 蛋白(例如 wt Nef 或突變型 Nef，諸如非天然存在之 Nef 蛋白、突變型 SIV Nef)的經修飾 T 細胞進一步表現包含以下之 CAR：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別抗原(諸如任何本文所述之抗原，例如 BCMA、CD19、CD20)之一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)結合部分；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域。在一些實施例中，該一或多個結合部分為抗體或其抗原結合片段。在一些實施例中，該一或多個結合部分係源於四鏈抗體。在一些實施例中，該一或多

個結合部分係源於駱駝科動物抗體。在一些實施例中，該一或多個結合部分係源於人類抗體。在一些實施例中，該一或多個結合部分係選自由駱駝 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、$(scFv)_2$、微型抗體、雙功能抗體、三功能抗體、四功能抗體、二硫化物穩定化 Fv 蛋白(dsFv)及單結構域抗體(sdAb、奈米抗體)組成之群。在一些實施例中，該一或多個結合部分為 sdAb (例如，抗 BCMA sdAb)。在一些實施例中，該細胞外配位體結合結構域包含連接在一起之兩個或更多個 sdAb。在一些實施例中，該一或多個結合部分為 scFv (例如，抗 CD19 scFv、抗 CD20 scFv 或 CD19×CD20 雙特異性 scFv)。在一些實施例中，該一或多個結合部分為非抗體結合蛋白，諸如結合於抗原之多肽配位體或經工程改造蛋白。在一些實施例中，該一或多個結合部分包含源於配位體之至少一個結構域或受體之細胞外結構域，其中該配位體或受體為細胞表面抗原。在一些實施例中，該配位體或受體係源於選自由 NKG2A、NKG2C、NKG2F、NKG2D、BCMA、APRIL、BAFF、IL-3、IL-13、LLT1、AICL、DNAM-1 及 NKp80 組成之群之分子。在一些實施例中，該配位體係源於 APRIL 或 BAFF，其可結合於 BCMA。在一些實施例中，該受體係源於 Fc 結合結構域，諸如 Fc 受體之細胞外結構域。在一些實施例中，該 Fc 受體為 Fcγ 受體(FcγR)。在一些實施例中，該 FcγR 係選自由 CD16A (FcγRIIIa)、CD16B (FcγRIIIb)、CD64A、CD64B、CD64C、CD32A 及 CD32B 組成之群。在一些實施例中，該 CAR 為單價及單特異性的。在一些實施例中，該 CAR 為多價(例如，雙特異性)及單特異性的。在一些實施例中，該 CAR 為多價(例如，二價)及多特異性(例如，雙特異性)。在一些實施例中，該抗原係選自由 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、醣脂

F77、PD-L1、PD-L2 及其任何組合組成之群。在一些實施例中，該抗原為 BCMA、CD19 或 CD20。在一些實施例中，該跨膜結構域係源於選自由 T 細胞受體之 α、β 或 ζ 鏈、CD3ζ、CD3ε、CD4、CD5、CD8α、CD9、CD16、CD22、CD27、CD28、CD33、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137 (4-1BB)、CD152、CD154 及 PD-1 組成之群的分子。在一些實施例中，該跨膜結構域係源於 CD8α。在一些實施例中，該細胞內信號傳導結構域包含免疫效應子細胞之一級細胞內信號傳導結構域。在一些實施例中，該一級細胞內信號傳導結構域係源於 CD3ζ、CD3γ、CD3ε、CD3δ、FcRγ (FCER1G)、FcRβ (Fc ε RIb)、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD66d、Fc γ RIIa、DAP10 及 DAP12。在一些實施例中，該一級細胞內信號傳導結構域係源於 DAP12、CD3ζ 或 CD3γ。在一些實施例中，該一級細胞內信號傳導結構域係源於 CD3ζ。在一些實施例中，該細胞內信號傳導結構域包含共刺激信號傳導結構域。在一些實施例中，該共刺激信號傳導結構域係源於選自由 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 (淋巴球功能相關抗原-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、特異性地與 CD83 結合之配位體及其任何組合組成之群的共刺激分子。在一些實施例中，該共刺激信號傳導結構域包含 CD137 之細胞質結構域。在一些實施例中，本文所述之 CAR 進一步包含位於該細胞外配位體結合結構域之 C 端與該跨膜結構域之 N 端之間的鉸鏈結構域。在一些實施例中，該鉸鏈結構域係源於 CD8α。在一些實施例中，該 CAR 進一步

包含位於該多肽之 N 端處的信號肽。在一些實施例中，該信號肽係源於 CD8α。在一些實施例中，該 CAR 包含如下多肽，其自 N 端至 C 端包含：CD8α 信號肽、細胞外配位體結合結構域(例如，特異性地識別 BCMA、APRIL/BAFF 配位體或 Fc 受體之一或多種抗原決定基之一或多個 sdAb)、CD8α 鉸鏈結構域、CD8α 跨膜結構域、源於 CD137 之共刺激信號傳導結構域及源於 CD3ζ 之一級細胞內信號傳導結構域。

【0248】　在一些實施例中，本申請案之 CAR 為「抗 BCMA CAR」。在一些實施例中，該 CAR 包含如下多肽，其自 N 端至 C 端包含：CD8α 信號肽、包含抗 BCMA sdAb 之細胞外配位體結合結構域、CD8α 鉸鏈結構域、CD8α 跨膜結構域、源於 CD137 之共刺激信號傳導結構域及源於 CD3ζ 之一級細胞內信號傳導結構域。在一些實施例中，該 CAR 包含如下多肽，其自 N 端至 C 端包含：CD8α 信號肽、包含第一抗 BCMA sdAb 及第二抗 BCMA sdAb 之細胞外配位體結合結構域、CD8α 鉸鏈結構域、CD8α 跨膜結構域、源於 CD137 之共刺激信號傳導結構域及源於 CD3ζ 之一級細胞內信號傳導結構域。在一些實施例中，該第一抗 BCMA sdAb 及該第二抗 BCMA sdAb 為相同的。在一些實施例中，該第一抗 BCMA sdAb 及該第二抗 BCMA sdAb 為不同的。在一些實施例中，該第一抗 BCMA sdAb 及該第二抗 BCMA sdAb 特異性地結合於同一 BCMA 抗原決定基。在一些實施例中，該第一抗 BCMA sdAb 及該第二抗 BCMA sdAb 特異性地結合於不同 BCMA 抗原決定基。在一些實施例中，該抗 BCMA CAR 包含選自 SEQ ID NO: 59-61 之胺基酸序列。

【0249】　在一些實施例中，本申請案之 CAR 為抗 CD19 CAR。在一些實施例中，該抗 CD19 CAR 之細胞外配位體結合結構域包含抗 CD19 scFv。在一些實施例中，該抗 CD19 CAR 包含胺基酸序列 SEQ ID NO: 58。

【0250】　在一些實施例中，本申請案之 CAR 為抗 CD20 CAR。在一些實施例

中，該抗 CD20 CAR 之細胞外配位體結合結構域包含抗 CD20 scFv。在一些實施例中，該抗 CD20 scFv 係源於抗 CD20 抗體，諸如利妥昔單抗(例如，Rituxan®、MabThera®)或 Leu-16。在一些實施例中，該抗 CD20 CAR 包含胺基酸序列 SEQ ID NO: 55 或 56。

【0251】　在一些實施例中，本申請案之 CAR 為抗 CD19/抗 CD20 雙特異性 CAR (本文中亦稱作 CD19×CD20 CAR)。在一些實施例中，該 CD19×CD20 CAR 之細胞外配位體結合結構域包含抗 CD20 scFv 及/或抗 CD19 scFv。在一些實施例中，該 CD19×CD20 CAR 包含胺基酸序列 SEQ ID NO: 57。

【0252】　在一些實施例中，本申請案之 CAR 為「BCMA-配位體 CAR」。在一些實施例中，該 CAR 包含如下多肽，其自 N 端至 C 端包含：CD8α 信號肽、包括包含源於 APRIL 或 BAFF 之至少一個結構域之一或多個結合部分的細胞外配位體結合結構域、CD8α 鉸鏈結構域、CD8α 跨膜結構域、源於 CD137 之共刺激信號傳導結構域及源於 CD3ζ 之一級細胞內信號傳導結構域。在一些實施例中，該細胞外配位體結合結構域包含 APRIL 域。在一些實施例中，該細胞外配位體結合結構域包含 BAFF 域。在一些實施例中，該細胞外配位體結合結構域包含 APRIL 域及 BAFF 域。

【0253】　在一些實施例中，本申請案之 CAR 為抗體偶合 TCR (ACTR)。具有 ACTR 之經工程改造 T 細胞可結合於含 Fc 蛋白質(諸如單株抗體，例如抗 BCMA 抗體)，該含 Fc 蛋白質接著充當與腫瘤細胞之橋。在一些實施例中，該 CAR 包含如下多肽，其自 N 端至 C 端包含：CD8α 信號肽、包括包含 Fc 結合結構域(諸如 Fc 受體，例如 FcγR)之一或多個結合部分的細胞外配位體結合結構域、CD8α 鉸鏈結構域、CD8α 跨膜結構域、源於 CD137 之共刺激信號傳導結構域及源於 CD3ζ 之一級細胞內信號傳導結構域。在一些實施例中，該 FcγR 係選自由 CD16A (FcγRIIIa)、CD16B (FcγRIIIb)、CD64A、CD64B、CD64C、CD32A 及 CD32B 組

成之群。

【0254】　此項技術中已知或由本發明人開發之任何 CAR，包括描述於 PCT/CN2017/096938 及 PCT/CN2016/094408 (其內容以引用之方式整體併入本文中)中之 CAR 均可用於構築本文所述之 CAR。CAR 之例示性結構顯示於 PCT/CN2017/096938 之圖 15A-15D 中。

多價及/或多特異性 CAR

【0255】　在一些實施例中，本文所述之 CAR 為包含以下之多價 CAR：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別抗原(例如任何本文所述之抗原)之兩個或更多個(諸如 2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)結合部分；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域。在一些實施例中，該等結合部分中之一或多者為抗原結合片段。在一些實施例中，該等結合部分中之一或多者包含單結構域抗體(例如，抗 BCMA sdAb、BCMA VHH)。在一些實施例中，該等結合部分中之一或多者係源於駱駝科動物抗體。在一些實施例中，該等結合部分中之一或多者係源於四鏈抗體。在一些實施例中，該等結合部分中之一或多者為 scFv (例如，抗 CD20 scFv、抗 CD19 scFv)。在一些實施例中，該等結合部分中之一或多者係源於人類抗體。在一些實施例中，該等結合部分中之一或多者為特異性地結合於抗原之多肽配位體或其他非抗體多肽。在一些實施例中，該多價 CAR 為單特異性，亦即該多價 CAR 靶向單一抗原，且包含該單一抗原之兩個或更多個結合位點。在一些實施例中，該多價 CAR 為多特異性，亦即該多價 CAR 靶向超過一種抗原，且該多價 CAR 包含至少一種抗原之兩個或更多個結合位點。對同一抗原具特異性之結合部分可結合於該抗原之同一抗原決定基(亦即，「單-抗原決定基 CAR」)或結合於該抗原之不同抗原決定基(亦即，「多-抗原決定基 CAR」，諸如二-抗原決定基 CAR 或三-抗原決定基 CAR)。對同一抗原具特異性之結合位點可包含相同或不同 sdAb。在一些實施例中，該抗原係選自由 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、醣脂 F77、PD-L1、PD-L2 及其任何組合組成之群。在一些實施例中，該抗原為 BCMA、CD19 或 CD20。

【0256】 在一些實施例中，本文所述之 CAR 為包含以下之多價(諸如二價、三價或更高數目之價態) CAR：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地結合於抗原(諸如腫瘤抗原，例如 BCMA、CD19、CD20)之複數個(諸如至少約 2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)結合部分(例如，sdAb、scFv)；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域。在一些實施例中，本文所述之 CAR 為包含以下之多價(諸如二價、三價或更高數目之價態) CAR：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地結合於抗原(諸如腫瘤抗原，例如 BCMA、CD19、CD20)之複數個(諸如至少約 2、3、4、5、6 個或更多個中任一者) sdAb；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域。在一些實施例中，本文所述之 CAR 為包含以下之多價(諸如二價、三價或更高數目之價態) CAR：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地結合於抗原(諸如腫瘤抗原，例如 BCMA、CD19、CD20)之第一抗原決定基的第一結合部分(例如，sdAb、scFv)，及特異性地結合於該抗原(諸如腫瘤抗原，例如 BCMA、CD19、CD20)之第二抗原決定基的第二結合部分(例如，sdAb、scFv)；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域。在一些實施例中，該第一抗原決定基及該第二抗原決定基為不同的。在一些實施例中，該第一抗原決定基及該第二抗原決定基為相同的。在一些實施例中，該第一結合部分為 sdAb 且該第二結合部分係源於人類抗體(例如，scFv)。在一些實施例中，該第一及第二結合部分同時為 sdAb 或 scFv。在一些實施例中，該第一結合部分為 sdAb 且該第二結合部分為多肽配位體或受體(例如，APRIL、BAFF、Fc 受體)。在一些實施例中，

該多價 CAR 特異性地結合於抗原上之兩種不同抗原決定基。在一些實施例中，該多價 CAR 特異性地結合於抗原上之三種或更多種不同抗原決定基。在一些實施例中，本文所述之 CAR 為包含以下之二價 CAR：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地結合於抗原(諸如腫瘤抗原，例如 BCMA)之第一抗原決定基的第一 sdAb，及特異性地結合於該抗原(諸如腫瘤抗原，例如 BCMA)之第二抗原決定基的第二 sdAb；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域。在一些實施例中，本文所述之 CAR 為包含以下之二價 CAR：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地結合於抗原(諸如腫瘤抗原，例如 BCMA、CD19、CD20)之第一抗原決定基的第一 scFv，及特異性地結合於該抗原(諸如腫瘤抗原，例如 BCMA、CD19、CD20)之第二抗原決定基的第二 scFv；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域(本文中亦稱作 CD19×CD20 CAR)。在一些實施例中，該第一抗原決定基及該第二抗原決定基為不同的。在一些實施例中，該第一抗原決定基及該第二抗原決定基為相同的。在一些實施例中，本文所述之 CAR 為包含以下之二價及雙特異性 CAR：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地結合於 CD19 之第一 scFv，及特異性地結合於 CD20 之第二 scFv；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域。例如，在一些實施例中，該抗原係選自由 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、醣脂 F77、PD-L1、PD-L2 及其任何組合組成之群。在一些實施例中，該抗原為 BCMA、CD19 或 CD20。

【0257】　在一些實施例中，本文所述之 CAR 為包含以下之二價 CAR：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地結合於 BCMA 之第一抗原決定基的第一 sdAb (「抗 BCMA sdAb1」或「抗 BCMA VHH1」)，及特異性地結合於 BCMA

之第二抗原決定基的第二 sdAb(「抗 BCMA sdAb2」或「抗 BCMA VHH2」)；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域。在一些實施例中，抗 BCMA sdAb1 及抗 BCMA sdAb2 為相同的。在一些實施例中，抗 BCMA sdAb1 及抗 BCMA sdAb2 為不同的。

細胞外配位體結合結構域

【0258】 本文所述之功能性外源受體(例如，嵌合 TCR、TAC、TAC 樣嵌合受體、CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))之細胞外配位體結合結構域包含一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)結合部分，諸如 sdAb。在一些實施例中，該一或多個結合部分為抗體或其抗原結合片段。在一些實施例中，該一或多個結合部分係源於四鏈抗體。在一些實施例中，該一或多個結合部分係源於駱駝科動物抗體。在一些實施例中，該一或多個結合部分係源於人類抗體。在一些實施例中，該一或多個結合部分係選自由駱駝 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、$(scFv)_2$、微型抗體、雙功能抗體、三功能抗體、四功能抗體、二硫化物穩定化 Fv 蛋白(dsFv)及單結構域抗體(sdAb、奈米抗體)組成之群。在一些實施例中，該一或多個結合部分為 sdAb (例如，抗 BCMA sdAb)。在一些實施例中，該一或多個結合部分為 scFv (例如，抗 CD19 scFv、抗 CD20 scFv 或 CD19×CD20 scFv)。在一些實施例中，該一或多個結合部分為非抗體結合蛋白，諸如結合於抗原之多肽配位體或經工程改造蛋白。在一些實施例中，該一或多個結合部分包含源於配位體之至少一個結構域或受體之細胞外結構域，其中該配位體或受體為細胞表面抗原。在一些實施例中，該配位體或受體係源於選自由 NKG2A、NKG2C、NKG2F、NKG2D、BCMA、APRIL、BAFF、IL-3、IL-13、LLT1、AICL、DNAM-1 及 NKp80 組成之群之分子。在一些實施例中，該配位體係源於 APRIL 或 BAFF，其可結合於 BCMA。在一些實施例中，該受體係源

於 Fc 結合結構域，諸如 Fc 受體之細胞外結構域。在一些實施例中，該 Fc 受體為 Fcγ 受體(FcγR)。在一些實施例中，該 FcγR 係選自由 CD16A (FcγRIIIa)、CD16B (FcγRIIIb)、CD64A、CD64B、CD64C、CD32A 及 CD32B 組成之群。該等結合部分可直接地經由肽鍵，或經由肽連接體彼此融合。

單結構域抗體(sdAb)

【0259】 在一些實施例中，該功能性外源受體(例如，嵌合 TCR、TAC、TAC 樣嵌合受體、CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR)) 包括包含一或多個 sdAb 之細胞外配位體結合結構域。該等 sdAb 可具有相同或不同起源，且具有相同或不同大小。例示性 sdAb 包括但不限於來自僅重鏈抗體之重鏈可變結構域(例如，V_HH 或 V_{NAR})、天然地不含輕鏈之結合分子、源於習知 4-鏈抗體之單結構域(諸如 V_H 或 V_L)、人類化僅重鏈抗體、藉由表現人類重鏈區段之轉殖基因小鼠或大鼠產生的人類 sdAb 及除源於抗體之彼等外的經工程改造域及單結構域骨架。此項技術中已知或由本發明人開發之任何 sdAb，包括描述於 PCT/CN2017/096938 及 PCT/CN2016/094408 (其內容以引用之方式整體併入本文中)中之 sdAb 均可用於構築本文所述之功能性外源受體(例如，嵌合 TCR、TAC、TAC 樣嵌合受體、CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))。CAR 之例示性結構顯示於 PCT/CN2017/096938 之圖 15A-15D 中。該等 sdAb 可源於任何物種，包括但不限於小鼠、大鼠、人類、駱駝、美洲駝、八目鰻、魚、鯊魚、山羊、兔及牛。本文所涵蓋之單結構域抗體亦包括來自除駱駝科及鯊魚外之物種的天然存在之 sdAb 分子。

【0260】 在一些實施例中，該 sdAb 係源於稱作缺乏輕鏈之重鏈抗體的天然存在之單結構域抗原結合分子(本文中亦稱作「僅重鏈抗體」)。該等單結構域分子揭示於例如 WO 94/04678 及 Hamers-Casterman, C.等人 (1993) *Nature* 363:446-448 中。為了清楚起見，源於天然地缺乏輕鏈之重鏈分子的可變結構域在本文中稱作

V_HH 以使其與四鏈免疫球蛋白之習知 V_H 區別開來。此一 V_HH 分子可源於駱駝科物種(例如，駱駝、美洲駝、駱馬、單峰駱駝、羊駝及原駝)中產生之抗體。除駱駝科以外之其他物種可產生天然地缺乏輕鏈之重鏈分子，且該等 V_HH 係在本申請案之範圍內。

【0261】　來自駱駝科動物之 V_HH 分子比 IgG 分子小約 10 倍。其為單一多肽且可極其穩定，抵抗極端 pH 及溫度條件。此外，其可抵抗蛋白酶之作用，而就習知 4-鏈抗體而言，情況並非如此。此外，V_HH 之活體外表現產生高產率、經適當摺疊之功能性 V_HH。另外，在駱駝科動物中產生之抗體可識別除經由使用抗體文庫或經由除駱駝科動物外之哺乳動物的免疫化活體外產生之抗體所識別之彼等抗原決定基外的抗原決定基(參見例如 WO9749805)。因而，包含一或多個 V_HH 域之多特異性或多價 CAR 可比包含源於習知 4-鏈抗體之抗原結合片段的多特異性或多價 CAR 更高效地與標靶相互作用。由於已知 V_HH 結合於諸如空腔或小溝之『不常見』抗原決定基，包含該等 V_HH 之 CAR 的親和力可比習知多特異性多肽更適合用於治療性治療。

【0262】　在一些實施例中，該 sdAb 係源於在軟骨魚中發現之免疫球蛋白之可變區。例如，該 sdAb 可源於在鯊魚之血清中發現的稱作新型抗原受體(NAR)之免疫球蛋白同型。產生源於 NAR (「IgNAR」)之可變區之單結構域分子的方法描述於 WO 03/014161 及 Streltsov (2005) *Protein Sci.* 14:2901-2909 中。

【0263】　在一些實施例中，該 sdAb 係重組、CDR 移植、人類化、駱駝化、去免疫化及/或活體外產生的(例如，藉由噬菌體展示來選擇)。在一些實施例中，該等構架區之胺基酸序列可藉由該等構架區中之特定胺基酸殘基的「駱駝化」發生改變。駱駝化係指用出現於重鏈抗體之 V_HH 結構域中之相應位置處的一或多種胺基酸殘基置換或取代來自習知 4-鏈抗體之(天然存在之) V_H 結構域之胺基酸序列中的一或多種胺基酸殘基。此可以熟習此項技術者將清楚之本身已知之方式，

例如基於本文之進一步描述來實施。該等「駱駝化」取代較佳地插入形成及/或存在於 V_H-V_L界面處之胺基酸位置處，及/或插入如本文所定義之所謂的駱駝科標記殘基處(參見例如 WO 94/04678，Davies 及 Riechmann FEBS Letters 339: 285-290, 1994；Davies 及 Riechmann Protein Engineering 9 (6): 531-537, 1996；Riechmann J. Mol. Biol. 259: 957-969, 1996；及 Riechmann 及 Muyldermans J. Immunol. Meth. 231: 25-38, 1999)。

【0264】 在一些實施例中，該 sdAb 為藉由表現人類重鏈區段之轉殖基因小鼠或大鼠產生的人類 sdAb。參見例如 US20090307787A1、美國專利第 8,754,287 號、US20150289489A1、US20100122358A1 及 WO2004049794。在一些實施例中，該 sdAb 為親和力成熟的。

【0265】 在一些實施例中，針對特定抗原或標靶之天然存在之 V_HH 域可獲自駱駝科動物 V_HH 序列之(原生或免疫)文庫。該等方法可或可不涉及使用本身已知之一或多種篩選技術篩選使用該抗原或標靶或其至少一部分、片段、抗原決定子或抗原決定基之此一文庫。該等文庫及技術例如描述於 WO 99/37681、WO 01/90190、WO 03/025020 及 WO 03/035694 中。或者，可使用源於(原生或免疫) V_HH 文庫之經改良合成或半合成文庫，諸如藉由諸如隨機突變誘發及/或 CDR 改組之技術自(原生或免疫) V_HH 文庫獲得之 V_HH 文庫，如例如 WO 00/43507 中所述。

【0266】 在一些實施例中，該等 sdAb 由習知四鏈抗體產生。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；及 WO 06/003388。

肽連接體

【0267】 本文所述之多特異性或多價功能性外源受體(例如，嵌合 TCR、TAC、TAC 樣嵌合受體、CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或

ACTR))中的各個結合部分(諸如 sdAb、配位體/受體結構域)可經由肽連接體彼此融合。在一些實施例中，該等結合部分(諸如 sdAb、配位體/受體結構域)無需任何肽連接體即可直接地彼此融合。連接不同結合部分(諸如 sdAb、配位體/受體結構域)之肽連接體可為相同或不同的。該等功能性外源受體(例如，嵌合 TCR、TAC、TAC 樣嵌合受體、CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))之不同結構域亦可經由肽連接體彼此融合。

【0268】　功能性外源受體(例如，嵌合 TCR、TAC、TAC 樣嵌合受體、CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))中之各肽連接體可具有相同或不同的長度及/或序列，視該等 sdAb 及/或多種結構域(例如，配位體/受體結構域)之結構及/或功能特徵而定。各肽連接體可獨立地經選擇及最佳化。用於該等功能性外源受體(例如，嵌合 TCR、TAC、TAC 樣嵌合受體、CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))的肽連接體之長度、撓性程度及/或其他特性可對包括但不限於對一或多種特定抗原或抗原決定基之親和力、特異性或親合力之特性具有一些影響。例如，可選擇較長肽連接體以確保兩個相鄰結構域不會在空間上彼此干擾。例如，在包含針對多聚體抗原之 sdAb 的本文所述之多價或多特異性功能性外源受體(例如，嵌合 TCR、TAC、TAC 樣嵌合受體、CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))中，該等肽連接體之長度及撓性較佳地使得其允許該多價功能性外源受體(例如，嵌合 TCR、TAC、TAC 樣嵌合受體、CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))中的各 sdAb 結合於該多聚體之各次單元上之抗原決定子。在一些實施例中，短肽連接體可經安置於功能性外源受體(例如，嵌合 TCR、TAC、TAC 樣嵌合受體、CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))之跨膜結構域與細胞內信號傳導結構域之間。在一些實施例中，肽連接體包含撓性殘基(諸如甘胺酸及絲胺酸)，使得相鄰結構域相對於彼此自由移

動。例如，甘胺酸-絲胺酸雙聯體可為合適肽連接體。

【0269】　該肽連接體可具有任何合適長度。在一些實施例中，該肽連接體之長度為至少約 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、75、100 個或更多個胺基酸中任一者。在一些實施例中，該肽連接體之長度為不超過約 100、75、50、40、35、30、25、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5 個或更少個胺基酸中任一者。在一些實施例中，該肽連接體之長度為約 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 個胺基酸中任一者。

【0270】　肽連接體可具有天然存在之序列，或非天然存在之序列。例如，源於僅重鏈抗體之鉸鏈區之序列可用作連接體。參見例如 WO1996/34103。在一些實施例中，肽連接體為撓性連接體。例示性撓性連接體包括甘胺酸聚合物$(G)_n$、甘胺酸-絲胺酸聚合物(包括例如$(GS)_n$、$(GSGGS)_n$、$(GGGS)_n$及$(GGGGS)_n$，其中 n 係至少為 1 之整數)、甘胺酸-丙胺酸聚合物、丙胺酸-絲胺酸聚合物及此項技術中已知之其他撓性連接體。在一些實施例中，肽連接體包含胺基酸序列 GGGGS (SEQ ID NO: 40)、$(GGGGS)_2$ (SEQ ID NO: 41)、$(GGGS)_3$ (SEQ ID NO: 42)、$(GGGS)_4$ (SEQ ID NO: 43)、GGGGSGGGGSGGGGGGSGSGGGGS (SEQ ID NO: 44)、GGGGSGGGGSGGGGGGSGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 45)、$(GGGGS)_3$ (SEQ ID NO: 46)或$(GGGGS)_4$ (SEQ ID NO: 47)。

【0271】　在一些實施例中，本文所述之各種肽連接體及其特性亦適用於由用於該功能性外源受體(例如經工程改造 TCR (例如，傳統經工程改造 TCR、嵌合

TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))與本文所述之 Nef 蛋白(例如 wt Nef 或突變型 Nef，諸如非天然存在之突變型 Nef、突變型 SIV Nef)之間的連接序列編碼之肽。例如，當編碼該功能性外源受體(例如，嵌合 TCR、TAC、TAC 樣嵌合受體、CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))與該 Nef 蛋白(例如，wt Nef、突變型 Nef)之核酸在同一載體上時，包含撓性殘基(諸如甘胺酸及絲胺酸)之肽連接體可添加於該功能性外源受體與該 Nef 蛋白之間，以提供用於該功能性外源受體及該 Nef 蛋白兩者之適當摺疊的足夠空間，及/或促進裂解其間之連接序列(例如，P2A、T2A)。例如，$(GGGS)_3$ 連接體用於本文所述之 BCMA CAR-P2A-$(GGGS)_3$-SIV Nef 構築體。

跨膜結構域

【0272】　本申請案之功能性外源受體(例如，嵌合 TCR、TAC、TAC 樣嵌合受體、CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))包含可直接地或間接地融合至細胞外配位體結合結構域之跨膜結構域。該跨膜結構域可源於天然來源或合成來源。如本文所用，「跨膜結構域」係指在細胞膜、較佳地真核細胞膜中熱力學穩定之任何蛋白質結構。可相容用於本文所述之 CAR 中的跨膜結構域可獲自天然存在之蛋白質。或者，其可為合成、非天然存在之蛋白質區段，例如在細胞膜中熱力學穩定之疏水性蛋白質區段。

【0273】　跨膜結構域係基於該跨膜結構域之三維結構來分類。例如，跨膜結構域可形成 α 螺旋、超過一種 α 螺旋之複合物、β-桶或能夠跨細胞之磷脂雙層的任何其他穩定結構。此外，跨膜結構域亦可或替代地基於跨膜結構域拓撲學(包括該跨膜結構域跨膜之程數及該蛋白質之定向)來分類。例如，單程膜蛋白跨細胞膜一次，且多程膜蛋白跨細胞膜至少兩次(例如，2、3、4、5、6、7 次或更多次)。膜蛋白可經定義為 I 型、II 型或 III 型，視其末端之拓撲學及相對於細胞內

部及外部之穿膜區段而定。I 型膜蛋白具有單一跨膜區且經定向以致該蛋白質之 N 端存在於該細胞之脂質雙層的細胞外側上且該蛋白質之 C 端存在於細胞質側上。II 型膜蛋白亦具有單一跨膜區，但經定向以致該蛋白質之 C 端存在於該細胞之脂質雙層的細胞外側上且該蛋白質之 N 端存在於細胞質側上。III 型膜蛋白具有多個跨膜區段且可基於跨膜區段之數目及 N 端及 C 端之位置來進一步細分類。

【0274】　在一些實施例中，本文所述之 CAR 之跨膜結構域係源於 I 型單程膜蛋白。在一些實施例中，來自多程膜蛋白之跨膜結構域亦可相容用於本文所述之 CAR。多程膜蛋白可包含複合(至少 2、3、4、5、6、7 個或更多個) α 螺旋或 β 摺疊結構。較佳地，多程膜蛋白之 N 端及 C 端存在於脂質雙層之相對側上，例如該蛋白質之 N 端存在於脂質雙層之細胞質側上且該蛋白質之 C 端存在於細胞外側上。

【0275】　在一些實施例中，該 CAR 之跨膜結構域包含選自 T-細胞受體之 α、β 或 ζ 鏈、CD28、CD3 ε、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、KIRDS2、OX40、CD2、CD27、LFA-1 (CDIIa、CD18)、ICOS (CD278)、4-1BB (CD137)、GITR、CD40、BAFFR、HVEM (LIGHTR)、SLAMF7、NKp80 (KLRFl)、CD160、CD19、IL-2R β、IL-2R γ、IL-7R a、ITGA1、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CDIIa、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、TNFR2、DNAM1 (CD226)、SLAMF4 (CD244、2B4)、CD84、CD96 (Tactile)、CEACAM1、CRT AM、Ly9 (CD229)、CD160 (BY55)、PSGL1、CDIOO (SEMA4D)、SLAMF6 (NTB-A、Lyl08)、SLAM (SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME (SLAMF8)、SELPLG (CD162)、LTBR、PAG/Cbp、NKp44、NKp30、NKp46、NKG2D 及/或

NKG2C 之跨膜結構域的跨膜結構域。在一些實施例中，該跨膜結構域係源於選自由 T 細胞受體之 α、β 或 ζ 鏈、CD3ζ、CD3ε、CD4、CD5、CD8α、CD9、CD16、CD22、CD27、CD28、CD33、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137 (4-1BB)、CD152、CD154 及 PD-1 組成之群的分子。在一些實施例中，該跨膜結構域係源於 CD8α。在一些實施例中，該跨膜結構域係源於 CD28。

【0276】　用於本文所述之功能性外源受體(例如，嵌合 TCR、TAC、TAC 樣嵌合受體、CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))的跨膜結構域亦可包含合成、非天然存在之蛋白質區段之至少一部分。在一些實施例中，該跨膜結構域為合成、非天然存在之 α 螺旋或 β 摺疊。在一些實施例中，該蛋白質區段為至少大約 20 個胺基酸，例如至少 18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30 個或 30 個以上胺基酸。合成跨膜結構域之實例為此項技術中(例如美國專利第 7,052,906 B1 號及 PCT 公開案第 WO 2000/032776 A2 號中)已知的，該等專利之相關揭示內容以引用之方式併入本文中。

【0277】　該跨膜結構域可包含跨膜區及位於該跨膜結構域之 C 端側之細胞質區。該跨膜結構域之細胞質區可包含三個或更多個胺基酸且在一些實施例中幫助定向脂質雙層中之跨膜結構域。在一些實施例中，一或多個半胱胺酸殘基存在於該跨膜結構域之跨膜區中。在一些實施例中，一或多個半胱胺酸殘基存在於該跨膜結構域之細胞質區中。在一些實施例中，該跨膜結構域之細胞質區包含帶正電胺基酸。在一些實施例中，該跨膜結構域之細胞質區包含胺基酸精胺酸、絲胺酸及離胺酸。

【0278】　在一些實施例中，該跨膜結構域之跨膜區包含疏水性胺基酸殘基。在一些實施例中，該等功能性外源受體(例如，嵌合 TCR、TAC、TAC 樣嵌合受體、CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))之跨膜結構域包含人工疏水性序列。例如，苯丙胺酸、色胺酸及纈胺酸之三聯體可存在

於該跨膜結構域之 C 端處。在一些實施例中，該跨膜區主要地包含疏水性胺基酸殘基，諸如丙胺酸、白胺酸、異白胺酸、甲硫胺酸、苯丙胺酸、色胺酸或纈胺酸。在一些實施例中，該跨膜區為疏水性的。在一些實施例中，該跨膜區包含聚-白胺酸-丙胺酸序列。蛋白質或蛋白質區段之嗜水性或疏水性或親水性特徵可藉由此項技術中已知之任何方法，例如 Kyte 及 Doolittle 嗜水性分析來評價。

細胞內信號傳導結構域

【0279】　本申請案之功能性外源受體(例如，嵌合 TCR、TAC、TAC 樣嵌合受體、CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))包含細胞內信號傳導結構域。該細胞內信號傳導結構域負責活化表現該等 CAR 之免疫效應子細胞之正常效應子功能中的至少一者。術語「效應子功能」係指細胞之特殊功能。例如，T 細胞之效應子功能可為細胞溶解活性或輔助活性，包括細胞介素之分泌。因此，術語「細胞質信號傳導結構域」係指蛋白質中轉導效應子功能信號且指導該細胞實施專門功能之部分。雖然通常可使用整個細胞質信號傳導結構域，但在多種情況下，不必使用整個鏈。就使用該細胞質信號傳導結構域之經截短部分而言，該經截短部分可替代整個鏈使用，只要其轉導效應子功能信號即可。因此，術語細胞質信號傳導結構域意欲包括該細胞質信號傳導結構域中足以轉導效應子功能信號之任何經截短部分。

【0280】　在一些實施例中，該細胞內信號傳導結構域包含免疫效應子細胞之一級細胞內信號傳導結構域。在一些實施例中，該 CAR 包含基本上由免疫效應子細胞之一級細胞內信號傳導結構域組成的細胞內信號傳導結構域。「一級細胞內信號傳導結構域」係指以刺激方式用於誘導免疫效應子功能之細胞質信號傳導序列。在一些實施例中，該一級細胞內信號傳導結構域含有稱作基於免疫受體酪胺酸之活化基元或 ITAM 之信號傳導基元。如本文所用，「ITAM」係一般存在於在許多免疫細胞中表現之信號傳導分子之尾部分中的保守蛋白質基元。該

基元可包含胺基酸序列 YxxL/I 中由 6-8 個胺基酸分離之兩個重複序列，其中各 x 獨立地為任何胺基酸，從而產生保守基元 YxxL/Ix(6-8)YxxL/I。信號傳導分子內之 ITAM 對於細胞內之信號轉導很重要，該信號轉導至少部分地藉由在該信號傳導分子的活化之後 ITAM 中之酪胺酸殘基之磷酸化介導。ITAM 亦可用作牽涉於信號傳導路徑中之其他蛋白質的對接位點。例示性含 ITAM 之一級細胞質信號傳導序列包括源於 CD3ζ、CD3γ、CD3ε、CD3δ、FcRγ (FCER1G)、FcRβ (FcεRIb)、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD66d、FcγRIIa、DAP10 及 DAP12 之彼等含 ITAM 之一級細胞質信號傳導序列。在一些實施例中，含 ITAM 之一級細胞質信號傳導序列係源於 CD3γ、DAP12 或 CD3ζ。

【0281】　在一些實施例中，該一級細胞內信號傳導結構域係源於 CD3ζ。在一些實施例中，該細胞內信號傳導結構域由 CD3ζ 之細胞質信號傳導結構域組成。在一些實施例中，該一級細胞內信號傳導結構域為野生型 CD3ζ 之細胞質信號傳導結構域。

共刺激信號傳導結構域

【0282】　除了抗原特異性信號之刺激以外，許多免疫效應子細胞(例如，T 細胞)亦需要共刺激，以促進細胞增殖、分化及生存，以及活化該細胞之效應子功能。在一些實施例中，該 CAR 包含至少一個共刺激信號傳導結構域。如本文所用，術語「共刺激信號傳導結構域」係指蛋白質中介導細胞內之信號轉導以誘導諸如效應子功能之免疫反應的至少一部分。本文所述之嵌合受體之共刺激信號傳導結構域可為來自共刺激蛋白之細胞質信號傳導結構域，其轉導信號且調節藉由諸如 T 細胞、NK 細胞、巨噬細胞、嗜中性顆粒球或嗜酸性球之免疫細胞介導的反應。「共刺激信號傳導結構域」可為共刺激分子之細胞質部分。術語「共刺激分子」係指免疫細胞(諸如 T 細胞)上之同源結合搭配物，其特異性地與共刺激配位體結合，由此藉由該免疫細胞介導共刺激反應，諸如但不限於增殖及生

存。

【0283】　在一些實施例中，該細胞內信號傳導結構域包含單一共刺激信號傳導結構域。在一些實施例中，該細胞內信號傳導結構域包含兩個或更多個(諸如約 2、3、4 個或更多個中任一者)共刺激信號傳導結構域。在一些實施例中，該細胞內信號傳導結構域包含兩個或更多個相同共刺激信號傳導結構域，例如 CD28 或 CD137 (4-1BB)之共刺激信號傳導結構域的兩個拷貝。在一些實施例中，該細胞內信號傳導結構域包含來自不同共刺激蛋白(諸如本文所述之任何兩種或更多種共刺激蛋白)之兩個或更多個共刺激信號傳導結構域。在一些實施例中，該細胞內信號傳導結構域包含一級細胞內信號傳導結構域(諸如 CD3ζ 之細胞質信號傳導結構域)及一或多個共刺激信號傳導結構域(例如，4-1BB)。在一些實施例中，該一或多個共刺激信號傳導結構域及該一級細胞內信號傳導結構域(諸如 CD3ζ 之細胞質信號傳導結構域)經由視情況存在之肽連接體彼此融合。該一級細胞內信號傳導結構域及該一或多個共刺激信號傳導結構域可以任何合適次序排列。在一些實施例中，該一或多個共刺激信號傳導結構域位於該跨膜結構域與該一級細胞內信號傳導結構域(諸如 CD3ζ 之細胞質信號傳導結構域)之間。多個共刺激信號傳導結構域可提供相加或協同刺激效應。

【0284】　宿主細胞(例如，免疫細胞)中之共刺激信號傳導結構域的活化可誘導該細胞增加或減少細胞介素之產生及分泌、吞噬細胞特性、增殖、分化、生存及/或細胞毒性。任何共刺激分子之共刺激信號傳導結構域均可相容用於本文所述之 CAR。共刺激信號傳導結構域之類型係基於如下因素加以選擇，諸如其中將表現效應子分子之免疫效應子細胞的類型(例如，T 細胞、NK 細胞、巨噬細胞、嗜中性顆粒球或嗜酸性球)及所需免疫效應子功能(例如，ADCC 效應)。用於該等 CAR 之共刺激信號傳導結構域之實例可為共刺激蛋白之細胞質信號傳導結構域，該等共刺激蛋白包括但不限於 B7/CD28 家族之成員(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 及 PDCD6)；TNF 超家族之成員(例如，4- 1BB/TNFSF9/CD137、4-1BB 配位體/TNFSF9、BAFF/BLyS/TNFSF13B、BAFF R/TNFRSF13C、CD27/TNFRSF7、CD27 配位體/TNFSF7、CD30/TNFRSF8、CD30 配位體/TNFSF8、CD40/TNFRSF5、CD40/TNFSF5、CD40 配位體/TNFSF5、DR3/TNFRSF25、GITR/TNFRSF18、GITR 配位體/TNFSF18、HVEM/TNFRSF14、LIGHT/TNFSF14、淋巴毒素-α/TNF-β、OX40/TNFRSF4、OX40 配位體/TNFSF4、RELT/TNFRSF19L、TACI/TNFRSF13B、TL1A/TNFSF15、TNF-α 及 TNF RII/TNFRSF1B)；SLAM 家族之成員(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 及 SLAM/CD150)；及任何其他共刺激分子，諸如 CD2、CD7、CD53、CD82/Kai-1、CD90/Thy1、CD96、CD160、CD200、CD300a/LMIR1、HLA I 類、HLA- DR、Ikaros、整合素 α 4/CD49d、整合素 α 4 β 1、整合素 α 4 β 7/LPAM-1、LAG-3、TCL1A、TCL1B、CRTAM、DAP12、Dectin-1/CLEC7A、DPPIV/CD26、EphB6、TIM-1/KIM-1/HAVCR、TIM-4、TSLP、TSLP R、淋巴球功能相關抗原-1 (LFA-1)及 NKG2C。

【0285】 在一些實施例中，該一或多個共刺激信號傳導結構域係源於選自由 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 (淋巴球功能相關抗原-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、特異性地與 CD83 結合之配位體及其任何組合組成之群的共刺激分子。在一些實施例中，該一或多個共刺激信號傳導結構域係源於選自由 CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、CD3、LFA-1、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3 及特異性地結合於 CD83 之配位體組成之群的共刺激分子。

【0286】　在一些實施例中，本申請案之 CAR 中的細胞內信號傳導結構域包含源於 4-1BB (CD137)之共刺激信號傳導結構域。在一些實施例中，該細胞內信號傳導結構域包含 CD3ζ 之細胞質信號傳導結構域及 4-1BB 之共刺激信號傳導結構域。

【0287】　在一些實施例中，本申請案之 CAR 中的細胞內信號傳導結構域包含源於 CD28 之共刺激信號傳導結構域。在一些實施例中，該細胞內信號傳導結構域包含 CD3ζ之細胞質信號傳導結構域及 CD28 之共刺激信號傳導結構域。

【0288】　在一些實施例中，本申請案之 CAR 中的細胞內信號傳導結構域包含 CD28 之共刺激信號傳導結構域及 CD137 之共刺激信號傳導結構域。在一些實施例中，該細胞內信號傳導結構域包含 CD3ζ 之細胞質信號傳導結構域、CD28 之共刺激信號傳導結構域及 CD137 之共刺激信號傳導結構域。在一些實施例中，該細胞內信號傳導結構域包含如下多肽，其自 N 端至 C 端包含：CD28 之共刺激信號傳導結構域、CD137 之共刺激信號傳導結構域及 CD3ζ之細胞質信號傳導結構域。

【0289】　本文所述之任何共刺激信號傳導結構域之變異體亦在本發明之範圍內，以致該共刺激信號傳導結構域能夠調節免疫細胞之免疫反應。在一些實施例中，如與野生型配對物相比，該等共刺激信號傳導結構域包含多達 10 種胺基酸殘基變異(例如，1、2、3、4、5 或 8 種)。包含一或多種胺基酸變異之該等共刺

激信號傳導結構域可稱作變異體。相對於不包含突變之共刺激信號傳導結構域，該共刺激信號傳導結構域之胺基酸殘基突變可導致信號傳導轉導之增加及增強的免疫反應刺激。相對於不包含突變之共刺激信號傳導結構域，該共刺激信號傳導結構域之胺基酸殘基突變可導致信號傳導轉導之減少及降低的免疫反應刺激。

鉸鏈

【0290】　本申請案之功能性外源受體(例如，嵌合 TCR、TAC、TAC 樣嵌合受體、CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))可包含位於該細胞外配位體結合結構域之 C 端與該跨膜結構域之 N 端之間的鉸鏈結構域。鉸鏈結構域係一般地發現於蛋白質之兩個結構域之間的胺基酸區段且可允許該蛋白質之撓性及該等結構域中之一或兩者相對於彼此的移動。可使用提供細胞外抗原結合結構域相對於效應子分子之跨膜結構域之該撓性及移動的任何胺基酸序列。

【0291】　鉸鏈結構域可含有約 10-100 個胺基酸，例如約 15-75 個胺基酸、20-50 個胺基酸或 30-60 個胺基酸中任一者。在一些實施例中，該鉸鏈結構域之長度可為至少約 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 或 75 個胺基酸中任一者。

【0292】　在一些實施例中，該鉸鏈結構域為天然存在之蛋白質之鉸鏈結構域。此項技術中已知包含鉸鏈結構域之任何蛋白質之鉸鏈結構域均可相容用於本文所述之功能性外源受體(例如，嵌合 TCR、TAC、TAC 樣嵌合受體、CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))。在一些實施例中，該鉸鏈結構域為天然存在之蛋白質之鉸鏈結構域的至少一部分且向該嵌合受體賦予撓性。在一些實施例中，該鉸鏈結構域係源於 CD8α。在一些實施例中，該鉸鏈

結構域為 CD8α 之鉸鏈結構域的一部分，例如含有 CD8α 之鉸鏈結構域之至少 15 個(例如，20、25、30、35 或 40 個)連續胺基酸的片段。

【0293】　諸如 IgG、IgA、IgM、IgE 或 IgD 抗體之抗體的鉸鏈結構域亦可相容用於本文所述之 pH 依賴性嵌合受體系統。在一些實施例中，該鉸鏈結構域為接合抗體之恆定結構域 CH1 及 CH2 之鉸鏈結構域。在一些實施例中，該鉸鏈結構域屬於抗體且包含該抗體之鉸鏈結構域及該抗體之一或多個恆定區。在一些實施例中，該鉸鏈結構域包含抗體之鉸鏈結構域及該抗體之 CH3 恆定區。在一些實施例中，該鉸鏈結構域包含抗體之鉸鏈結構域及該抗體之 CH2 及 CH3 恆定區。在一些實施例中，該抗體為 IgG、IgA、IgM、IgE 或 IgD 抗體。在一些實施例中，該抗體為 IgG 抗體。在一些實施例中，該抗體為 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 抗體。在一些實施例中，該鉸鏈區包含 IgG1 抗體之鉸鏈區及 CH2 及 CH3 恆定區。在一些實施例中，該鉸鏈區包含 IgG1 抗體之鉸鏈區及 CH3 恆定區。

【0294】　非天然存在之肽亦可用作本文所述之嵌合受體之鉸鏈結構域。在一些實施例中，在 Fc 受體之細胞外配位體-結合結構域之 C 端與跨膜結構域之 N 端之間的鉸鏈結構域為肽連接體，諸如$(G_xS)n$ 連接體，其中 x 及 n 可獨立地為 3 與 12 之間的整數，包括 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 或更大。

信號肽

【0295】　本申請案之功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統的經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))可在該多肽之 N 端處包含信號肽(亦稱作信號序列)。一般而言，信號肽係使多肽靶向細胞中之所需位點處之肽序列。在一些實施例中，該信號肽使效應子分子靶向細胞之分泌路徑且將允許效應子分子整合及錨定至脂質雙層中。包括天然存在之蛋白質之信號序列或合成、非天然存在之信號序列的信號肽將為熟習此項技術者顯而易知的，其可相容

用於本文所述之功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))。在一些實施例中，該信號肽係源於選自由 CD8α、GM-CSF 受體 α 及 IgG1 重鏈組成之群的分子。在一些實施例中，該信號肽係源於 CD8α。

【0296】 ACTR 係組合 Fc 受體(CD16)與信號轉導結構域(4-1BB/CD3ζ)之嵌合蛋白。具有 ACTR 之經工程改造 T 細胞可結合於單株抗體，該單株抗體接著充當與腫瘤細胞之橋。

【0297】 在一些實施例中，該功能性外源受體為如下嵌合受體，其包含(a)細胞外配位體結合結構域，其包含源於配位體之至少一個結構域或受體之細胞外結構域，其中該配位體或受體為細胞表面抗原(例如，NKG2D、BCMA、IL-3、IL-13)；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域。

【0298】 在一些實施例中，該細胞外配位體結合結構域包含源於 BCMA 之配位體(例如，APRIL 或 BAFF)之至少一個結構域。在一些實施例中，該細胞外配位體結合結構域包含特異性地識別 BCMA 之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb)。

T 細胞抗原偶合物(TAC)

【0299】 在一些實施例中，本申請案之功能性外源受體為 T 細胞抗原偶合物(TAC)。在一些實施例中，該 TAC 包含：a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，scFv、sdAb)；b)視情況存在之第一連接體；c)細胞外 TCR 結合結構域(例如，scFv、sdAb)，其特異性地識別 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞外結構域；d)視情況存在之第二連接體；e)包含第一 TCR 輔受體(諸如 CD4、CD28 或 CD8，例如 CD8α)的跨膜結構域之跨膜結構域；及 f)包含第二 TCR 輔受體(諸

如 CD4、CD28 或 CD8，例如 CD8α)的細胞內信號傳導結構域之細胞內信號傳導結構域。在一些實施例中，該第一及第二 TCR 輔受體均係選自 CD4、CD28 及 CD8 (例如，CD8α)。在一些實施例中，該第一及第二 TCR 輔受體為相同的。在一些實施例中，該第一及第二 TCR 輔受體為不同的，例如該第一 TCR 輔受體為 CD4 且該第二 TCR 輔受體為 CD8 (例如，CD8)，或該第二 TCR 輔受體為 CD4 且該第一 TCR 輔受體為 CD8 (例如，CD8α)。在一些實施例中，該 TAC 包含：a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，scFv、sdAb)；b)視情況存在之第一連接體；c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞外結構域；d)視情況存在之第二連接體；及 e)包含 TCR 輔受體(諸如 CD4、CD28 或 CD8，例如 CD8α)的跨膜結構域之跨膜結構域。在一些實施例中，該 TAC 包含：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD20、CD19)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，scFv、sdAb)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；(e)源於第一 TCR 輔受體(諸如 CD4、CD28 或 CD8，例如 CD8α)的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；(f)包含第二 TCR 輔受體(諸如 CD4、CD28 或 CD8，例如 CD8α)的跨膜結構域之跨膜結構域；及(g)包含第三 TCR 輔受體(諸如 CD4、CD28 或 CD8，例如 CD8α)的細胞內信號傳導結構域之視情況存在之細胞內信號傳導結構域。在一些實施例中，該第一、第二及第三 TCR 輔受體均係選自 CD4、CD28 及 CD8 (例如，CD8α)。在一些實施例中，該第一、第二及第三 TCR 輔受體為相同的(例如，均為 CD4)。在一些實施例中，該第一、第二及第三 TCR 輔受體為不同的。在一些實施例中，該 TAC 之細胞內信號傳導結構域包含諸如 CD4、CD28 或 CD8 (例如，CD8α)之 TCR 輔受體的細胞內信號

傳導結構域。在一些實施例中，該 TAC 之跨膜結構域包含諸如 CD4、CD28 或 CD8 (例如，CD8α)之 TCR 輔受體的跨膜結構域。在一些實施例中，該 TAC 不包含 TCR 輔受體(諸如 CD4、CD28 或 CD8 (例如，CD8α))之細胞外結構域(或其一部分)。在一些實施例中，該 TAC 不包含任何 TCR 輔受體之細胞外結構域或其一部分。在一些實施例中，該 TAC 進一步包含位於該細胞外 TCR 結合結構域(例如，scFv 或 sdAb)之 C 端與該跨膜結構域之 N 端之間的鉸鏈結構域(例如，當不存在 TCR 輔受體之細胞外結構域，且該細胞外 TCR 結合結構域處於該細胞外配位體結合結構域之 C 端處時)。在一些實施例中，該 TAC 進一步包含位於該細胞外配位體結合結構域之 C 端與該跨膜結構域之 N 端之間的鉸鏈結構域(例如，當不存在 TCR 輔受體之細胞外結構域，且該細胞外 TCR 結合結構域處於該細胞外配位體結合結構域之 N 端處時)。上文「鉸鏈」及「肽連接體」子章節中所述之任何鉸鏈結構域及連接體均可在本文中用於 TAC。在一些實施例中，該 TAC 不包含細胞內共刺激結構域。在一些實施例中，該細胞外標靶結合結構域係在細胞外 TCR 結合結構域之 N 端。在一些實施例中，該細胞外配位體結合結構域係在細胞外 TCR 結合結構域之 C 端。在一些實施例中，該細胞外配位體結合結構域係在細胞外 TCR 結合結構域之 N 端。在一些實施例中，該 TCR 次單元係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群。在一些實施例中，該細胞外配位體結合結構域為單價及單特異性的，亦即包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之抗原決定基之單一抗原結合片段(例如，scFv、sdAb)。在一些實施例中，該細胞外配位體結合結構域為單體的，亦即包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之抗原決定基之單一抗原結合片段(例如，scFv、sdAb)。在一些實施例中，該細胞外配位體結合結構域為多價及單特異性的，亦即包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之同一抗原決定基之兩個或更多個抗原結合片段(例如，scFv、

sdAb)。在一些實施例中，該細胞外配位體結合結構域為多價及多特異性的，亦即包含特異性地識別同一腫瘤抗原或不同腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之兩種或更多種抗原決定基之兩個或更多個抗原結合片段(例如，scFv、sdAb)。在一些實施例中，該 TAC 進一步包含特異性地識別由該細胞外 TCR 結合結構域(例如，CD3ε)識別之 TCR 次單元(例如，TCRα)之不同細胞外結構域的第二細胞外 TCR 結合結構域(例如，scFv、sdAb)，其中該第二細胞外 TCR 結合結構域位於該細胞外 TCR 結合結構域與該細胞外配位體結合結構域之間。在一些實施例中，細胞外配位體結合結構域包含特異性地結合 BCMA 之抗原結合片段 sdAb(亦即，抗 BCMA sdAb)，諸如揭示於 PCT/CN2016/094408 及 PCT/CN2017/096938(其內容以引用之方式整體併入本文中)中之任何抗 BCMA sdAb。

【0300】　因此，在一些實施例中，該 TAC 包含：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD20、CD19)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，scFv、sdAb)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；(e)視情況存在之源於 CD4 之細胞外結構域(完全或部分結構域)；(f)源於 CD4 之跨膜；及(g)視情況存在之源於 CD4 之細胞內信號傳導結構域。在一些實施例中，該 TAC 為包含胺基酸序列 SEQ ID NO: 66 之抗 CD20 TAC。在一些實施例中，該 TAC 包含：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD20、CD19)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，scFv、sdAb)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；(e)視情況存在之源於 CD8 (例如，CD8α)之細胞外結構域(完全或部分結構域)；(f)源於 CD8 (例如，CD8α)之跨膜；及(g)視情況存在之源於 CD8 (例如，CD8α)之細胞內信號傳導結構域。在一些實施例中，

該 TAC 包含：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD20、CD19)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，scFv、sdAb)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；(e)視情況存在之源於 CD28 之細胞外結構域(完全或部分結構域)；(f)源於 CD28 之跨膜；及(g)視情況存在之源於 CD28 之細胞內信號傳導結構域。在一些實施例中，該 TAC 包含：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD20、CD19)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，scFv、sdAb)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；及(e)全長 CD4 (排除信號肽)。在一些實施例中，該 TAC 包含：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD20、CD19)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，scFv、sdAb)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；及(e)全長 CD8 (例如 CD8α；排除信號肽)。在一些實施例中，該 TAC 包含：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD20、CD19)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，scFv、sdAb)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；及(e)全長 CD28 (排除信號肽)。在一些實施例中，該細胞外配位體結合結構域為單價及單特異性的，亦即包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之抗原決定基之單一抗原結合片段(例如，scFv、sdAb)。在一些實施例中，該細胞外配位體結合結構域為單體，亦即包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之抗原決定基之單一抗原結合片

段(例如，scFv、sdAb)。在一些實施例中，該細胞外配位體結合結構域為多價及單特異性的，亦即包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之同一抗原決定基之兩個或更多個抗原結合片段(例如，scFv、sdAb)。在一些實施例中，該細胞外配位體結合結構域為多價及多特異性，亦即包含特異性地識別同一腫瘤抗原或不同腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之兩種或更多種抗原決定基之兩個或更多個抗原結合片段(例如，scFv、sdAb)。在一些實施例中，該 TAC 進一步包含特異性地識別由該細胞外 TCR 結合結構域(例如，CD3ε)識別之 TCR 次單元(例如，TCRα)之不同細胞外結構域的第二細胞外 TCR 結合結構域(例如，scFv、sdAb)，其中該第二細胞外 TCR 結合結構域位於該細胞外 TCR 結合結構域與該細胞外配位體結合結構域之間。

【0301】 在一些實施例中，該 TAC 包含以下結構(自 N 端至 C 端)：抗 CD20 scFv-$(GGGGS)_3$-抗 CD3 scFv-(GGGGS)-CD4 序列。在一些實施例中，該抗 CD20 scFv 係源於 Leu-16 抗體。在一些實施例中，該抗 CD3 scFv 係源於 UCHT1 (例如，huUCHT1)、F6A、L2K 或 OKT3。在一些實施例中，該 CD4 序列包含 CD4 之部分細胞外結構域、完全跨膜結構域及完全細胞內結構域，諸如全長 CD4 之 375-458 (aa 1 自 CD4 之信號肽開始計數)。在一些實施例中，該 TAC 包含胺基酸序列 SEQ ID NO: 66。

T 細胞抗原偶合物(TAC)樣嵌合受體

【0302】 在一些實施例中，本申請案之功能性外源受體為 T 細胞抗原偶合物(TAC)樣嵌合受體。在一些實施例中，該 TAC 樣嵌合受體包含：a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，scFv、sdAb)；b)視情況存在之第一連接體；c)細胞外 TCR 結合結構域(例如，scFv、sdAb)，其特異性地識別第一 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞外結構域；d)視情況存在之第二連接體；e)包含第二

TCR 次單元(例如，CD3ε)的跨膜結構域之跨膜結構域；及 f)包含第三 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞內結構域之細胞內結構域；其中該第一、第二及第三 TCR 次單元均係選自由 CD3ε、CD3γ、CD3δ、TCRα、TCRβ、TCRγ 及 TCRδ 組成之群。在一些實施例中，該第二及第三 TCR 次單元為相同的(例如，均為 CD3ε)。在一些實施例中，該第一、第二及第三 TCR 次單元為相同的(例如，均為 CD3ε)。在一些實施例中，該第一 TCR 次單元與該第二及第三 TCR 次單元為不同的，例如該第一 TCR 次單元為 TCRα 且該第二及第三 TCR 次單元為 CD3ε。在一些實施例中，該第一、第二及第三 TCR 次單元均為不同的。在一些實施例中，該 TAC 樣嵌合受體包含：a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，scFv、sdAb)；b)視情況存在之第一連接體；c)細胞外 TCR 結合結構域(例如，scFv、sdAb)，其特異性地識別第一 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞外結構域；d)視情況存在之第二連接體；及 e)包含第二 TCR 次單元(例如，CD3ε)的跨膜結構域之跨膜結構域；其中該第一及第二 TCR 次單元均係選自由 CD3ε、CD3γ、CD3δ、TCRα、TCRβ、TCRγ 及 TCRδ 組成之群。在一些實施例中，該第一及第二 TCR 次單元為相同的(例如，均為 CD3ε)。在一些實施例中，該第一及第二 TCR 次單元為不同的，例如該第一 TCR 次單元為 TCRα 且該第二 TCR 次單元為 CD3ε。在一些實施例中，該 TAC 樣嵌合受體包含：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD20、CD19)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，scFv、sdAb)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別第一 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；(e)第二 TCR 次單元(例如，CD3ε)的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；(f)包含第三 TCR 次單元(例如，CD3ε)的跨膜結構域之跨膜結構域；及(g)包含第四 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞內信號傳導結構

域之視情況存在之細胞內信號傳導結構域；其中該第一、第二、第三及第四 TCR 次單元均係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群。在一些實施例中，該第二、第三及第四 TCR 次單元為相同的(例如，均為 CD3ε)。在一些實施例中，該第一 TCR 次單元與該第二、第三及第四 TCR 次單元為不同的，例如該第一 TCR 次單元為 TCRα 且該第二、第三及第四 TCR 次單元為 CD3ε。在一些實施例中，該第一、第二、第三及第四 TCR 次單元均為不同的。在一些實施例中，該 TAC 樣嵌合受體之細胞內信號傳導結構域包含 TCR 次單元之細胞內信號傳導結構域，其中該 TCR 次單元係選自由 CD3ε、CD3γ、CD3δ、TCRα、TCRβ、TCRγ 及 TCRδ 組成之群。在一些實施例中，該 TAC 樣嵌合受體之跨膜結構域包含 TCR 次單元之跨膜結構域，其中該 TCR 次單元係選自由 CD3ε、CD3γ、CD3δ、TCRα、TCRβ、TCRγ 及 TCRδ 組成之群。在一些實施例中，該 TAC 樣嵌合受體不包含 TCR 次單元之細胞外結構域或其一部分。在一些實施例中，該 TAC 樣嵌合受體不包含任何 TCR 次單元之細胞外結構域。在一些實施例中，該 TAC 樣嵌合受體進一步包含位於該細胞外 TCR 結合結構域之 C 端與該跨膜結構域之 N 端之間的鉸鏈結構域(例如，當不存在 TCR 次單元之細胞外結構域或其一部分，且該細胞外 TCR 結合結構域處於該細胞外配位體結合結構域之 C 端處時)。在一些實施例中，該 TAC 樣嵌合受體進一步包含位於該細胞外配位體結合結構域之 C 端與該跨膜結構域之 N 端之間的鉸鏈結構域(例如，當不存在 TCR 次單元之細胞外結構域或其一部分，且該細胞外 TCR 結合結構域處於該細胞外配位體結合結構域之 N 端處時)。上文「鉸鏈」及「肽連接體」子章節中所述之任何鉸鏈結構域及連接體均可在本文中用於 TAC 樣嵌合受體。在一些實施例中，該 TAC 樣嵌合受體不包含細胞內信號傳導結構域。在一些實施例中，該 TAC 樣嵌合受體不包含細胞內共刺激結構域。在一些實施例中，該細胞外配位體結合結構域係在細胞外 TCR 結合結構域之 N 端。在一些實施例中，

該細胞外配位體結合結構域係在細胞外 TCR 結合結構域之 C 端。在一些實施例中，該細胞外配位體結合結構域為單價及單特異性，亦即包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之抗原決定基之單一抗原結合片段(例如，scFv、sdAb)。在一些實施例中，該細胞外配位體結合結構域為單體，亦即包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之抗原決定基之單一抗原結合片段(例如，scFv、sdAb)。在一些實施例中，該細胞外配位體結合結構域為多價及單特異性的，亦即包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之抗原決定基之兩個或更多個抗原結合片段(例如，scFv、sdAb)。在一些實施例中，該細胞外配位體結合結構域為多價及多特異性的，亦即包含特異性地識別同一腫瘤抗原或不同腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之兩種或更多種抗原決定基之兩個或更多個抗原結合片段(例如，scFv、sdAb)。在一些實施例中，該 TAC 樣嵌合受體進一步包含特異性地識別由該細胞外 TCR 結合結構域(例如，CD3ε)識別之 TCR 次單元(例如，TCRα)之不同細胞外結構域的第二細胞外 TCR 結合結構域(例如，scFv、sdAb)，其中該第二細胞外 TCR 結合結構域位於該細胞外 TCR 結合結構域與該細胞外配位體結合結構域之間。在一些實施例中，細胞外配位體結合結構域包含特異性地結合 BCMA 之抗原結合片段 sdAb (亦即，抗 BCMA sdAb)，諸如揭示於 PCT/CN2016/094408 及 PCT/CN2017/096938 (其內容以引用之方式整體併入本文中)中之任何抗 BCMA sdAb。

【0303】　因此，在一些實施例中，該 TAC 樣嵌合受體包含：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD20、CD19)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，scFv、sdAb)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元(例如，TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ、CD3δ 中任一者)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；(e)視情況存在之源於 CD3ε 之細胞外結構域；(f)源於 CD3ε

之跨膜；及(g)視情況存在之源於 CD3ε 之細胞內信號傳導結構域。在一些實施例中，該 TAC 樣嵌合受體包含：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD20、CD19)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，scFv、sdAb)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元(例如，TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ、CD3δ 中任一者)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；(e)視情況存在之源於 CD3γ 之細胞外結構域；(f)源於 CD3γ 之跨膜；及(g)視情況存在之源於 CD3γ 之細胞內信號傳導結構域。在一些實施例中，該 TAC 樣嵌合受體包含：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD20、CD19)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，scFv、sdAb)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元(例如，TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ、CD3δ 中任一者)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；(e)視情況存在之源於 CD3δ 之細胞外結構域；(f)源於 CD3δ 之跨膜；及(g)視情況存在之源於 CD3δ 之細胞內信號傳導結構域。在一些實施例中，該 TAC 樣嵌合受體包含：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD20、CD19)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，scFv、sdAb)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元(例如，TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ、CD3δ 中任一者)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；(e)視情況存在之源於 TCRα 之細胞外結構域；(f)源於 TCRα 之跨膜；及(g)視情況存在之源於 TCRα 之細胞內信號傳導結構域。在一些實施例中，該 TAC 樣嵌合受體包含：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD20、CD19)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，scFv、sdAb)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其

特異性地識別 TCR 次單元(例如，TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ、CD3δ 中任一者)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；(e)視情況存在之源於 TCRβ 之細胞外結構域；(f)源於 TCRβ 之跨膜；及(g)視情況存在之源於 TCRβ 之細胞內信號傳導結構域。在一些實施例中，該 TAC 樣嵌合受體包含：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD20、CD19)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，scFv、sdAb)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元(例如，TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ、CD3δ 中任一者)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；(e)視情況存在之源於 TCRγ 之細胞外結構域；(f)源於 TCRγ 之跨膜；及(g)視情況存在之源於 TCRγ 之細胞內信號傳導結構域。在一些實施例中，該 TAC 樣嵌合受體包含：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD20、CD19)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，scFv、sdAb)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元(例如，TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ、CD3δ 中任一者)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；(e)視情況存在之源於 TCRδ 之細胞外結構域；(f)源於 TCRδ 之跨膜；及(g)視情況存在之源於 TCRδ 之細胞內信號傳導結構域。在一些實施例中，該 TAC 樣嵌合受體包含：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD20、CD19)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，scFv、sdAb)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元(例如，TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ、CD3δ 中任一者)的細胞外結構域；及(e)全長 CD3ε(排除信號肽)。在一些實施例中，該 TAC 樣嵌合受體包含：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD20、CD19)之一或

多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，scFv、sdAb)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元(例如，TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ、CD3δ 中任一者)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；及(e)全長 CD3γ。在一些實施例中，該 TAC 樣嵌合受體包含:(a)細胞外配位體結合結構域,其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如,BCMA、CD20、CD19)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，scFv、sdAb)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元(例如，TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ、CD3δ 中任一者)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；及(e)全長 CD3δ。在一些實施例中，該 TAC 樣嵌合受體包含：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD20、CD19)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，scFv、sdAb)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元(例如，TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ、CD3δ 中任一者)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；及(e)全長 TCRα。在一些實施例中，該 TAC 樣嵌合受體包含：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD20、CD19)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，scFv、sdAb)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元(例如，TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ、CD3δ 中任一者)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；及(e)全長 TCRβ。在一些實施例中，該 TAC 樣嵌合受體包含：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD20、CD19)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，scFv、sdAb)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元(例如，TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ、CD3δ 中任一者)的細胞外結構域；(d)視情

況存在之第二連接體；及(e)全長 TCRγ。在一些實施例中，該 TAC 樣嵌合受體包含:(a)細胞外配位體結合結構域,其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如,BCMA、CD20、CD19)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，scFv、sdAb)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元(例如，TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ、CD3δ 中任一者)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；及(e)全長 TCRδ。在一些實施例中，該 TAC 樣嵌合受體包含：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如,BCMA、CD20、CD19)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，scFv、sdAb)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別第一 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；(e)視情況存在之鉸鏈；(f)源於第二 TCR 次單元(例如，CD3ε)之跨膜；及(g)源於第二 TCR 次單元(例如，CD3ε)之細胞內信號傳導結構域；其中該第一及第二 TCR 次單元均選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群。在一些實施例中，該細胞外配位體結合結構域為單價及單特異性，亦即包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之抗原決定基之單一抗原結合片段(例如，scFv、sdAb)。在一些實施例中，該細胞外配位體結合結構域為單體，亦即包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之抗原決定基之單一抗原結合片段(例如，scFv、sdAb)。在一些實施例中，該細胞外配位體結合結構域為多價及單特異性,亦即包含特異性地識別腫瘤抗原(例如,BCMA、CD19、CD20)之同一抗原決定基之兩個或更多個抗原結合片段(例如，scFv、sdAb)。在一些實施例中，該細胞外配位體結合結構域為多價及多特異性，亦即包含特異性識別地同一腫瘤抗原或不同腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之兩種或更多種抗原決定基之兩個或更多個抗原結合片段(例如，scFv、sdAb)。在一些實施例中，該 TAC 樣嵌合受體進一步包含特異性地識別由該細胞

外 TCR 結合結構域(例如，CD3ε)識別之 TCR 次單元(例如，TCRα)之不同細胞外結構域的第二細胞外 TCR 結合結構域(例如，scFv、sdAb)，其中該第二細胞外 TCR 結合結構域位於該細胞外 TCR 結合結構域與該細胞外配位體結合結構域之間。

【0304】 在一些實施例中，該 TAC 樣嵌合受體包含：a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD20、CD19)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，scFv、sdAb)；b)視情況存在之第一連接體；c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞外結構域；d)視情況存在之第二連接體；e)包含第一 TCR 次單元的跨膜結構域之跨膜結構域；及 f)包含第二 TCR 次單元的細胞內結構域之細胞內結構域，其中該第一 TCR 次單元及該第二 TCR 次單元均係選自由 CD3ε、CD3γ、CD3δ、TCRα、TCRβ、TCRγ 及 TCRδ 組成之群。在一些實施例中，該第一 TCR 次單元為 CD3ε及/或該第二 TCR 次單元為 CD3ε。在一些實施例中，該第一 TCR 次單元為 CD3γ及/或該第二 TCR 次單元為 CD3γ。在一些實施例中，該第一 TCR 次單元為 CD3δ及/或該第二 TCR 次單元為 CD3δ。在一些實施例中，該第一 TCR 次單元為 TCRα及/或該第二 TCR 次單元為 TCRα。在一些實施例中，該第一 TCR 次單元為 TCRβ及/或該第二 TCR 次單元為 TCRβ。在一些實施例中，該第一 TCR 次單元為 TCRγ及/或該第二 TCR 次單元為 TCRγ。在一些實施例中，該第一 TCR 次單元為 TCRδ及/或該第二 TCR 次單元為 TCRδ。在一些實施例中，該第一 TCR 次單元及該第二 TCR 次單元為相同的。在一些實施例中，該第一 TCR 次單元及該第二 TCR 次單元為不同的。在一些實施例中，該 TAC 樣嵌合受體不包含該第一及/或該第二 TCR 次單元之細胞外結構域。在一些實施例中，該 TAC 樣嵌合受體不包含任何 TCR 次單元之細胞外結構域。在一些實施例中，該 TAC 樣嵌合受體多肽不包含細胞內共刺激結構域。在一些實施例中，該細胞外配位體結合結構域係在細胞

外 TCR 結合結構域之 N 端。在一些實施例中，該細胞外配位體結合結構域係在細胞外 TCR 結合結構域之 C 端。在一些實施例中，該 TAC 樣嵌合受體包含：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD20、CD19)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，scFv、sdAb)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；及(e)全長 CD3ε(排除信號肽)；其中該 TCR 次單元係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群。在一些實施例中，該細胞外配位體結合結構域為單價及單特異性，亦即包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之抗原決定基之單一抗原結合片段(例如，scFv、sdAb)。在一些實施例中，該細胞外配位體結合結構域為單體，亦即包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之抗原決定基之單一抗原結合片段(例如，scFv、sdAb)。在一些實施例中，該細胞外配位體結合結構域為多價及單特異性，亦即包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之同一抗原決定基之兩個或更多個抗原結合片段(例如，scFv、sdAb)。在一些實施例中，該細胞外配位體結合結構域為多價及多特異性，亦即包含特異性地識別同一腫瘤抗原或不同腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之兩種或更多種抗原決定基之兩個或更多個抗原結合片段(例如，scFv、sdAb)。在一些實施例中，該 TAC 樣嵌合受體進一步包含特異性地識別由該細胞外 TCR 結合結構域(例如，CD3ε)識別之 TCR 次單元(例如，TCRα)之不同細胞外結構域的第二細胞外 TCR 結合結構域(例如，scFv、sdAb)，其中該第二細胞外 TCR 結合結構域位於該細胞外 TCR 結合結構域與該細胞外配位體結合結構域之間。

經工程改造 TCR

【0305】　在一些實施例中，表現本文所述之 Nef 蛋白(例如 wt Nef 或突變型

Nef，諸如非天然存在之 Nef 蛋白，諸如突變型 SIV Nef)的經修飾 T 細胞進一步表現包含細胞外配位體結合結構域之經工程改造 TCR (例如，特異性地識別 BCMA 或 BCMA/MHC 複合物之經工程改造 TCR)，該細胞外配位體結合結構域包含源於野生型 TCR 之 Vα 及 Vβ，其合起來特異性地識別抗原(諸如任何本文所述之抗原，例如腫瘤抗原、BCMA)，其中相對於野生型 TCR，Vα、Vβ 或兩者包含一或多個 CDR 中之一或多種突變(下文中亦稱作「傳統經工程改造 TCR」)。在一些實施例中，該突變導致胺基酸取代，諸如保守胺基酸取代。在一些實施例中，該經工程改造 TCR 結合於由野生型 TCR 結合之相同同源肽-MHC。在一些實施例中，該經工程改造 TCR 以與由野生型 TCR 結合之親和力相比更高之親和力結合於相同同源肽-MHC。在一些實施例中，該經工程改造 TCR 以與由野生型 TCR 結合之親和力相比更低之親和力結合於相同同源肽-MHC。在一些實施例中，該經工程改造 TCR 結合於未由野生型 TCR 結合之非同源肽-MHC。在一些實施例中，該經工程改造 TCR 為單鏈 TCR (scTCR)。在一些實施例中，該經工程改造 TCR 為二聚體 TCR (dTCR)。在一些實施例中，該野生型 TCR 結合 HLA-A2。在一些實施例中，該經工程改造 TCR 進一步包含細胞內信號傳導結構域，諸如源於 CD3ζ 之一級細胞內信號傳導結構域。

【0306】 在一些實施例中，表現本文所述之 Nef 蛋白(例如 wt Nef 或突變型 Nef，諸如非天然存在之 Nef 蛋白、突變型 SIV Nef)的經修飾 T 細胞進一步表現包含細胞外配位體結合結構域之經工程改造 TCR，該細胞外配位體結合結構域包含源於野生型 TCR 之 Vα 及 Vβ，其合起來特異性地識別 BCMA 或 BCMA-MHC 複合物，其中相對於野生型 TCR，Vα、Vβ 或兩者包含一或多個 CDR 中之一或多種突變。在一些實施例中，與野生型抗 BCMA TCR 相比，該經工程改造抗 BCMA TCR 對 BCMA 具有更高結合親和力。在一些實施例中，該經工程改造 TCR 進一步包含細胞內信號傳導結構域，諸如源於 CD3ζ 之一級細胞內信號

傳導結構域。

【0307】　在一些實施例中，本申請案之經工程改造 TCR 為嵌合 TCR (cTCR)。在一些實施例中，cTCR 包含細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(諸如基於抗體之抗原結合結構域，例如 scFv 或 sdAb)，該細胞外配位體結合結構域融合(直接地或間接地)至 TCR 次單元之全長或一部分，其中該 TCR 次單元係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3γ、CD3ε 及 CD3δ 組成之群。該融合多肽可連同其他內源 TCR 次單元一起併入至功能性 TCR 複合物中且向該 TCR 複合物賦予抗原特異性。在一些實施例中，該 cTCR 細胞外配位體結合結構域融合至 CD3ε 次單元之全長或一部分。該 cTCR 之細胞內信號傳導結構域可源於 TCR 次單元之細胞內信號傳導結構域，諸如 CD3ε 之細胞內信號傳導結構域。cTCR 之跨膜結構域可源於 TCR 次單元。在一些實施例中，該 cTCR 細胞內信號傳導結構域及該 cTCR 跨膜結構域係源於同一 TCR 次單元，例如均來自 CD3ε。在一些實施例中，該 cTCR 細胞外配位體結合結構域及該 TCR 次單元(完全或其一部分)可經由連接體(諸如 GS 連接體)融合。在一些實施例中，該 cTCR 進一步包含 TCR 次單元之細胞外結構域或其一部分，該 TCR 次單元可與其中產生該 cTCR 細胞內信號傳導結構域及/或 cTCR 跨膜結構域之 TCR 次單元相同或不同。因此，在一些實施例中，該 cTCR 包含：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD20、CD19)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，scFv、sdAb)；(b)視情況存在之連接體；(c)第一 TCR 次單元的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；(d)包含第二 TCR 次單元的跨膜結構域之跨膜結構域；及(e)包含第三 TCR 次單元的細胞內信號傳導結構域之細胞內信號傳導結構域；其中該第一、第二及第三 TCR 次單元均係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群。在一些實施例中，該第一、第

二及第三 TCR 次單元為相同的(例如，CD3ε)。在一些實施例中，該第一、第二及第三 TCR 次單元為不同的。在一些實施例中，該 cTCR 進一步包含位於該細胞外配位體結合結構域之 C 端與該跨膜結構域之 N 端之間的鉸鏈結構域(例如，當不存在 TCR 次單元之細胞外結構域或其一部分時)。上文「鉸鏈」及「肽連接體」子章節中所述之任何鉸鏈結構域及連接體均可在此處用於 cTCR。在一些實施例中，該細胞外配位體結合結構域為單價及單特異性，亦即包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之抗原決定基之單一抗原結合片段(例如，scFv、sdAb)。在一些實施例中，該細胞外配位體結合結構域為單體，亦即包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之抗原決定基之單一抗原結合片段(例如，scFv、sdAb)。在一些實施例中，該細胞外配位體結合結構域為多價及單特異性的，亦即包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之同一抗原決定基之兩個或更多個抗原結合片段(例如，scFv、sdAb)。在一些實施例中，該細胞外配位體結合結構域為多價及多特異性的，亦即包含特異性地識別同一腫瘤抗原或不同腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之兩種或更多種抗原決定基之兩個或更多個抗原結合片段(例如，scFv、sdAb)。在一些實施例中，細胞外配位體結合結構域包含特異性地結合 BCMA 之抗原結合片段 sdAb (亦即，抗 BCMA sdAb)，諸如揭示於 PCT/CN2016/094408 及 PCT/CN2017/096938 (其內容以引用之方式整體併入本文中)中之任何抗 BCMA sdAb。

【0308】　因此，例如，在一些實施例中，表現本文所述之 Nef 蛋白(例如 wt Nef 或突變型 Nef，諸如非天然存在之 Nef 蛋白、突變型 SIV Nef)的經修飾 T 細胞進一步表現如下抗 CD20 嵌合 TCR，其包含：a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別 CD20 之抗原結合片段(例如，scFv、sdAb)；b)視情況存在之連接體(諸如 GS 連接體，例如$(GGGGS)_3$)；c)第一 TCR 次單元的視情況存在之細胞外結構域或其一部分(例如，CD3ε)；d)包含第二 TCR 次單元(例如，CD3ε)的跨

膜結構域之跨膜結構域，及 e)包含第三 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞內信號傳導結構域之細胞內信號傳導結構域，其中該第一、第二及第三 TCR 次單元均係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群。在一些實施例中，該第一、第二及第三 TCR 次單元為相同的。在一些實施例中，該第一、第二及第三 TCR 次單元為不同的。在一些實施例中，該抗 CD20 cTCR 包含：a)抗 CD20 scFv；b)連接體(諸如 GS 連接體，例如$(GGGGS)_3$)；及 c)全長 CD3ε(排除信號肽)。在一些實施例中，該 cTCR 為包含胺基酸序列 SEQ ID NO: 64 之抗 CD20 cTCR。在一些實施例中，表現本文所述之 Nef 蛋白(例如 wt Nef 或突變型 Nef，諸如非天然存在之 Nef 蛋白、突變型 SIV Nef)的經修飾 T 細胞進一步表現如下抗 BCMA 嵌合 TCR，其包含：a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別 BCMA 之抗原結合片段(例如，scFv、sdAb)；b)視情況存在之連接體(諸如 GS 連接體，例如$(GGGGS)_3$)；c)第一 TCR 次單元的視情況存在之細胞外結構域或其一部分(例如，CD3ε)；d)包含第二 TCR 次單元(例如，CD3ε)的跨膜結構域之跨膜結構域，及 e)包含第三 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞內信號傳導結構域之細胞內信號傳導結構域，其中該第一、第二及第三 TCR 次單元均係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群。在一些實施例中，該第一、第二及第三 TCR 次單元為相同的。在一些實施例中，該第一、第二及第三 TCR 次單元為不同的。在一些實施例中，該抗 BCMA cTCR 包含：a)抗 BCMA sdAb；b)連接體(諸如 GS 連接體，例如$(GGGGS)_3$)；及 c)全長 CD3ε(排除信號肽)。在一些實施例中，該 cTCR 跨膜結構域、該 cTCR 細胞內信號傳導結構域及 TCR 次單元的視情況存在之細胞外結構域或其一部分係源於同一 TCR 次單元。在一些實施例中，該 cTCR 跨膜結構域、該 cTCR 細胞內信號傳導結構域及 TCR 次單元的視情況存在之細胞外結構域或其一部分係源於 CD3ε。在一些實施例中，該 cTCR 包含融合至全長 CD3ε(排除信號肽)之 N 端之細胞外

配位體結合結構域。在一些實施例中，該抗 CD20 cTCR 具有抗 CD20 scFv-$(GGGGS)_3$-CD3ε 之結構，諸如 SEQ ID NO: 64。在一些實施例中，該抗 BCMA cTCR 具有抗 BCMA sdAb-$(GGGGS)_3$-CD3ε 之結構。

VI. 醫藥組合物

【0309】　本申請案進一步提供醫藥組合物，其包含表現本文所述之 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)及/或功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))的經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞、內源 TCR 缺乏 T 細胞、GvHD 降至最低之 T 細胞)中任一者，及醫藥學上可接受之載劑。醫藥組合物可藉由使具有所需純度程度之嵌合抗體免疫效應子細胞銜接子與視情況存在的醫藥學上可接受之載劑、賦形劑或穩定劑混合而製備(Remington's Pharmaceutical Sciences 第 16 版，Osol, A.編(1980))，呈凍乾調配物或水溶液之形式。

【0310】　可接受之載劑、賦形劑或穩定劑在所用之劑量及濃度下對接受者無毒，且包括緩衝液、抗氧化劑(包括抗壞血酸、甲硫胺酸、維他命 E、偏亞硫酸氫鈉)；防腐劑、等張劑(isotonicifier)、穩定劑、金屬錯合物(Zn-蛋白錯合物)；螯合劑，諸如 EDTA 及/或非離子界面活性劑。

【0311】　緩衝液用於將 pH 控制在最佳化治療有效性之範圍內，尤其在穩定性為 pH 依賴性之情況下。緩衝液較佳地以介於約 50 mM 至約 250 mM 範圍內之濃度存在。用於本發明之合適緩衝劑包括有機酸及無機酸兩者及其鹽。例如，檸檬酸鹽、磷酸鹽、丁二酸鹽、酒石酸鹽、反丁烯二酸鹽、葡糖酸鹽、草酸鹽、乳酸鹽、乙酸鹽。另外，緩衝液可包含組胺酸及三甲胺鹽(諸如 Tris)。

【0312】　添加防腐劑以延緩微生物生長，且其典型地在 0.2%-1.0% (w/v)範圍內存在。用於本發明之合適防腐劑包括十八烷基二甲基苯甲基氯化銨；氯化六羥

季銨；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、酚、丁醇或苯甲醇；對羥基苯甲酸烷基酯，諸如對羥基苯甲酸甲酯或對羥基苯甲酸丙酯；兒茶酚；間苯二酚；環己醇、3-戊醇及間-甲酚。

【0313】　存在張力劑(有時稱作「穩定劑」)以調節或維持組合物中之液體張力。當與諸如蛋白質及抗體之大型、帶電生物分子一起使用時，其通常被稱作「穩定劑」，乃因其可與胺基酸側鏈之帶電基團相互作用，由此減弱分子間及分子內相互作用之潛能。考慮其他成分之相對量，張力劑可以 0.1 重量%至 25 重量%、較佳地 1%至 5%之間的任何量存在。較佳張力劑包括多元糖醇，較佳地三元或更多元糖醇，諸如甘油、赤藻糖醇、阿拉伯糖醇、木糖醇、山梨糖醇及甘露糖醇。

【0314】　額外賦形劑包括可充當以下中之一或多者之劑：(1)增積劑，(2)溶解度增強劑，(3)穩定劑，及(4)及預防變性或黏附至容器壁之劑。該等賦形劑包括：多元糖醇(上文所列舉)；胺基酸，諸如丙胺酸、甘胺酸、麩醯胺、天冬醯胺、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，諸如蔗糖、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、肌糖醇、半乳糖、半乳糖醇、甘油、環多醇(例如，肌醇)、聚乙二醇；含硫還原劑，諸如脲、麩胱甘肽、硫辛酸、硫代乙醇酸鈉、硫代甘油、α-單硫代甘油及硫代硫酸鈉；低分子量蛋白，諸如人類血清白蛋白、牛血清白蛋白、明膠或其他免疫球蛋白；親水性聚合物，諸如聚乙烯吡咯啶酮；單醣(例如，木糖、甘露糖、果糖、葡萄糖)；二醣(例如，乳糖、麥芽糖、蔗糖)；三醣，諸如蜜三糖；及多醣，諸如糊精或聚葡萄糖。

【0315】　存在非離子性界面活性劑或清潔劑(亦稱作「濕潤劑」)以幫助溶解該治療劑以及保護該治療蛋白免於攪拌誘導之聚集，其亦允許該調配物暴露於剪切表面應力而不引起該活性治療蛋白或抗體之變性。非離子性界面活性劑在約 0.05 mg/mL 至約 1.0 mg/mL、較佳地約 0.07 mg/mL 至約 0.2 mg/mL 範圍內存在。

【0316】　合適非離子性界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®、聚氧乙烯山梨醇酐單醚(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及60、甘油單硬脂酸酯、蔗糖脂肪酸酯、甲基纖維素及羧基甲基纖維素。可使用之陰離子性清潔劑包括月桂基硫酸鈉、二辛基磺基丁二酸鈉及二辛基磺酸鈉。陽離子性清潔劑包括苯紮氯銨或苄索氯銨。

【0317】　為使該等醫藥組合物用於活體內投與，其必須為無菌的。可藉由經由無菌濾膜過濾使該等醫藥組合物無菌。在本文中，該等醫藥組合物一般地置於具有無菌存取埠之容器(例如，靜脈內溶液袋或具有可由皮下注射針刺穿之塞子的小瓶)中。

【0318】　投與途徑係根據已知且接受之方法，諸如藉由在很長一段時期內以合適方式進行單一或多次濃注或輸注，例如藉由皮下、靜脈內、腹膜內、肌肉內、動脈內、病變內或關節內途徑進行注射或輸注、局部投與、吸入或藉由持續釋放或延長釋放方式進行。

【0319】　可製備持續釋放製劑。持續釋放製劑之合適實例包括含有拮抗劑之固體疏水性聚合物的半透性基質，該等基質呈成型物件之形式，例如膜或微膠囊。持續釋放基質之實例包括聚酯、水凝膠(例如，聚(2-羥基乙基-甲基丙烯酸酯)或聚(乙烯醇))、聚乳酸(美國專利第3,773,919號)、L-麩胺酸與L-麩胺酸乙酯之共聚物、不可降解乙烯-乙酸乙烯酯、可降解乳酸-乙醇酸共聚物(諸如LUPRON DEPOT™(由乳酸-乙醇酸共聚物及乙酸亮丙瑞林構成之可注射微球))及聚-D-(-)-3-羥基丁酸。

【0320】　本文所述之醫藥組合物亦可含有所治療的特定適應症所必需之超過一種活性化合物或劑，較佳地具有不會不利地彼此影響的互補活性之彼等活性化合物或劑。或者或另外，該組合物可包含細胞毒性劑、化學治療劑、細胞介素、

免疫抑制劑或生長抑制劑。該等分子合適地以對預期目的有效之量組合存在。

【0321】　活性成分亦可經包埋於例如藉由共凝聚技術或藉由界面聚合製備之微膠囊中，例如分別在膠體藥物遞送系統中(例如，脂質體、白蛋白微球、微乳液、奈米粒子及奈米膠囊)或在巨乳液中之羥基甲基纖維素或明膠-微膠囊及聚-(甲基丙烯酸甲酯)微膠囊。該等技術揭示於 *Remington's Pharmaceutical Sciences* 第 18 版中。

VII. 治療方法

【0322】　本申請案進一步提供治療個體之疾病(諸如癌症、感染性疾病、GvHD、移植排斥、自體免疫病症或輻射病)之方法，該等方法包括向該個體投與有效量的該等醫藥組合物或表現本文所述之 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)及/或功能性外源受體(諸如 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR、ACTR)或經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR、TAC 樣嵌合受體))的經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞、內源 TCR 缺乏 T 細胞、GvHD 降至最低之 T 細胞)中任一者。

【0323】　本文所述之方法適用於治療各種癌症，包括實體癌症及液體癌症兩者。該等方法可適用於所有階段之癌症，包括早期階段、晚期階段及轉移性癌症。本文所述之方法可在輔助設定或新輔助設定中用作第一療法、第二療法、第三療法或與此項技術中已知之其他類型之癌症療法(諸如化學療法、手術、放射、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、超音波療法、光動力療法、射頻消融或其類似療法)的組合療法。

【0324】　在一些實施例中，本文所述之方法適用於治療選自由以下組成之群的實體癌症：結腸癌、直腸癌、腎細胞癌、肝癌、非小細胞肺癌、小腸癌、食道癌、黑色素瘤、骨癌、胰臟癌、皮膚癌、頭頸部癌、皮膚或眼內惡性黑色素瘤、子宮癌、卵巢癌、直腸癌、肛門區癌、胃癌、睪丸癌、子宮癌、輸卵管癌、子宮

內膜癌、子宮頸癌、陰道癌、外陰癌、霍奇金氏病(Hodgkin's Disease)、非霍奇金氏淋巴瘤、內分泌系統癌、甲狀腺癌、副甲狀腺癌、腎上腺癌、軟組織肉瘤、尿道癌、陰莖癌、兒童實體腫瘤、膀胱癌、腎或輸尿管癌、腎盂癌、中樞神經系統(CNS)贅瘤、原發性 CNS 淋巴瘤、腫瘤血管生成、脊軸腫瘤、腦幹神經膠質瘤、垂體腺瘤、卡波西氏肉瘤(Kaposi's sarcoma)、表皮樣癌、鱗狀細胞癌、T-細胞淋巴瘤、環境誘導性癌、該等癌症之組合及該等癌症之轉移性病變。

【0325】　在一些實施例中，本文所述之方法適用於治療選自以下中之一或多者之血液科癌症：慢性淋巴球白血病(CLL)、急性白血病、急性淋巴白血病(ALL)、B-細胞急性淋巴白血病(B-ALL)、T-細胞急性淋巴白血病(T-ALL)、慢性骨髓性白血病(CML)、B 細胞幼淋巴球白血病、母細胞性漿細胞樣樹突狀細胞贅瘤、伯基特氏淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)、瀰漫性大 B 細胞淋巴瘤、濾泡性淋巴瘤、毛細胞白血病、小細胞或大細胞濾泡性淋巴瘤、惡性淋巴增殖性病狀、MALT 淋巴瘤、套細胞淋巴瘤、邊緣區淋巴瘤、多發性骨髓瘤、骨髓發育不良及骨髓發育不良症候群、非霍奇金氏淋巴瘤、霍奇金氏淋巴瘤、漿母細胞性淋巴瘤、漿細胞樣樹突狀細胞贅瘤、華氏巨球蛋白血症(Waldenstrom macroglobulinemia)或白血病前期。

【0326】　在一些實施例中，該癌症為多發性骨髓瘤。在一些實施例中，基於 Durie-Salmon 分期系統，該癌症為 I 期、II 期或 III 期及/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)公開之國際分期系統，該癌症為 I 期、II 期或 III 期多發性骨髓瘤。在一些實施例中，該癌症為意義未明單株 γ-球蛋白症(MGUS)。在一些實施例中，該癌症為無症狀(冒煙型/無痛性)骨髓瘤。在一些實施例中，該癌症為症狀性或活動性骨髓瘤。在一些實施例中，該癌症為難治性多發性骨髓瘤。在一些實施例中，該癌症為轉移性多發性骨髓瘤。在一些實施例中，該個體對多發性骨髓瘤之先前治療沒有反應。在一些實施

例中，該個體在多發性骨髓瘤之先前治療之後患有進行性疾病。在一些實施例中，該個體先前已接受針對多發性骨髓瘤之至少約 2、3、4 種或更多種治療中任一者。在一些實施例中，該癌症為復發性多發性骨髓瘤。

【0327】　在一些實施例中，該個體患有活動性多發性骨髓瘤。在一些實施例中，該個體患有至少 10%之同源骨髓漿細胞。在一些實施例中，該個體患有經生檢證明之骨或髓外漿細胞瘤。在一些實施例中，該個體具有末端器官損傷之跡象，末端器官損傷可歸因於潛在漿細胞增殖性病症。在一些實施例中，該個體患有高鈣血癥，例如血清鈣>0.25 mmol/L (>1 mg/dL)，高於正常值上限，或>2.75 mmol/L (>11 mg/dL)。在一些實施例中，該個體患有腎功能不全，例如肌胺酸酐清除率<40 mL/分鐘或血清肌胺酸酐>177 mol/L (>2 mg/dL)。在一些實施例中，該個體患有貧血，例如血紅素值>20 g/L，低於正常值最低限，或血紅素值<100 g/L。在一些實施例中，該個體患有一或多種骨病變，例如根據骨骼放射照相、CT 或 PET/CT 發現之一或多種溶骨性病變。在一些實施例中，該個體具有以下惡性病生物標記物(MDE)中之一或多者：(1)根據骨髓檢查發現之 60%或更多之同源漿細胞；(2) 100 或更大之血清累及/未累及游離輕鏈，其限制條件在於累及輕鏈之絕對水準為至少 100 mg/L；及(3)根據 MRI 發現之超過一個局灶性病變，其大小為至少 5 mm 或更大。

【0328】　在一些實施例中，本文所述之方法適用於治療自體免疫疾病。自體免疫疾病或自體免疫性係生物體無法將其自身組成部分(下至亞分子層面)識別為「自己」，從而導致對其自身細胞及組織之免疫反應。由該種異常免疫反應引起之任何疾病均被稱為自體免疫疾病。顯著實例包括乳糜瀉、1 型糖尿病(IDDM)、全身性紅斑狼瘡(SLE)、休格連氏症候群(Sjögren's syndrome)、多發性硬化(MS)、橋本氏甲狀腺炎(Hashimoto's thyroiditis)、格雷夫斯氏病(Graves' disease)、特發性血小板減少性紫癜及類風濕性關節炎(RA)。

【0329】　在一些實施例中，本文所述之方法適用於治療發炎疾病，包括自體免疫疾病亦為一類與 B-細胞病症相關之疾病。自體免疫疾病之實例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、西登哈姆氏舞蹈病(Sydenham's chorea)、重症肌無力、全身性紅斑狼瘡、狼瘡腎炎、風濕熱、多腺性症候群、大皰性類天疱瘡、糖尿病、Henoch-Schonlein 二氏紫癜、鏈球菌感染後腎炎、結節性紅斑、高安氏動脈炎(Takayasu's arteritis)、阿狄森氏病(Addison's disease)、類風濕性關節炎、多發性硬化、肉狀瘤病、潰瘍性結腸炎、多形性紅斑、IgA 腎病、結節性多動脈炎、僵直性脊椎炎、古巴士德氏症候群(Goodpasture's syndrome)、血栓閉塞性脈管炎。休格連氏症候群、原發性膽汁性肝硬化、橋本氏甲狀腺炎、甲狀腺毒症、硬皮病、慢性活動性肝炎、多肌炎/皮肌炎、多軟骨炎、尋常型天疱瘡、韋格納氏肉芽腫(Wegener's granulomatosis)、膜性腎病、肌萎縮性側索硬化、脊髓癆、巨細胞性動脈炎/多肌痛、惡性貧血(perniciousanemia)、快速進行性腎小球腎炎、牛皮癬及纖維化肺泡炎。最常見治療為皮質類固醇及可極具毒性之細胞毒性藥物。此等藥物亦抑制整個免疫系統，可導致嚴重感染，且對骨髓、肝及腎具有不良效應。迄今已用於治療 III 類自體免疫疾病之其他治療劑已針對 T 細胞及巨噬細胞。需要治療自體免疫疾病、尤其 III 類自體免疫疾病之更有效方法。

【0330】　該等醫藥組合物之投與可以任何便利方式進行，包括藉由注射、攝取、輸血、植入或移植來進行。該等組合物可經動脈、皮下、皮內、腫瘤內、結內、髓內、肌肉內、靜脈內或腹膜內投與至患者。在一些實施例中，該醫藥組合物係全身性投與。在一些實施例中，該醫藥組合物係藉由輸注(諸如靜脈內輸注)投與至個體。用於免疫療法之輸注技術為此項技術中已知的(參見例如 Rosenberg 等人, New Eng. J. of Med. 319: 1676 (1988))。在一些實施例中，該醫藥組合物係藉由皮內或皮下注射投與至個體。在一些實施例中，該等組合物係藉由靜脈內注

射投與。在一些實施例中，該等組合物係直接地注射至腫瘤或淋巴結中。在一些實施例中，該醫藥組合物係局部地投與至腫瘤位點，諸如直接地投與至腫瘤細胞中，或投與至具有腫瘤細胞之組織。

【0331】　本發明之醫藥組合物的劑量及所需藥物濃度可視預想之特定用途而改變。適當劑量或投與途徑之確定為熟習此項技術者所熟知。動物實驗提供了用於確定針對人類療法之有效劑量的可靠指導。有效劑量之種間換算可根據由 Mordenti, J.及 Chappell, W. 「The Use of Interspecies Scaling in Toxicokinetics,」 *Toxicokinetics and New Drug Development*, Yacobi 等人編, Pergamon Press, New York 1989, 第 42-46 頁規定之原則來實施。在本申請案之範圍內，不同調配物將對不同治療及不同病症有效，且意欲治療特定器官或組織之投與可能需要以不同於另一器官或組織之遞送方式的方式遞送。

【0332】　在其中醫藥組合物包含表現本文所述之 Nef (例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)及/或外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))的經修飾 T 細胞中任一者之一些實施例中，該醫藥組合物係以至少約 10^4、10^5、10^6、10^7、10^8 或 10^9 個細胞/kg 個體體重中任一者之劑量投與。在一些實施例中，該醫藥組合物係以約 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 個體體重中任一者之劑量投與。在一些實施例中，該醫藥組合物係以至少約 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 或更高中任一者之劑量投與。在一些實施例中，該醫藥組合物係以約 3×10^5 至約 7×10^6 個細胞/kg 或約 3×10^6 個細胞/kg 之劑量投與。

【0333】　在一些實施例中，該醫藥組合物係投與單次。在一些實施例中，該醫藥組合物係投與多次(諸如 2、3、4、5、6 次或更多次中任一者)。在一些實施例中，該醫藥組合物係每週一次、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投與。在一些實施例中，投與之間的時間間隔為約 1 週至 2 週、2 週至 1 個月、2 週至 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 個月至一年中任一者。針對特定患者之最佳劑量及治療方案可容易地由熟習醫藥技術者藉由監測該患者之疾病病徵且相應地調節治療來確定。

【0334】　此外，劑量可藉由一或多次單獨投與，或藉由連續輸注來投與。在一些實施例中，該醫藥組合物係以分開劑量(諸如約 2、3、4、5 個或更多個劑量中任一者)投與。在一些實施例中，該等分開劑量經約一週投與。在一些實施例中，該劑量係相等地分開。在一些實施例中，該等分開劑量為總劑量之約 20%、約 30%、約 40%或約 50%。在一些實施例中，連續分次劑量之間的時間間隔為約 1 天、2 天、3 天或更久。對於經數天或更久之重複投與，視疾患而定，治療持續直至出現疾病症狀之所需抑制為止。然而，其他給藥方案亦可適用。此療法之進展容易地藉由習知技術及分析監測。

【0335】　在一些實施例中，提供一種治療患有疾病(例如，癌症、感染性疾病、GvHD、移植排斥、自體免疫病症或輻射病)之個體之方法，該方法包括向該個體投與有效量的包含以下之醫藥組合物：(1)包含 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)及 CAR 之經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞、內源 TCR 缺乏 T 細胞、GvHD 降至最低之 T 細胞)，該 CAR 包括包含以下之多肽：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)結合部分(例如，

sdAb、scFv)；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域；及(2)醫藥學上可接受之載劑。在一些實施例中，該 CAR 包括包含以下之多肽：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)抗 BCMA sdAb；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域。在一些實施例中，該 CAR 為單特異性的。在一些實施例中，該 CAR 為多價的。在一些實施例中，該 CAR 為多特異性的。在一些實施例中，該 Nef 蛋白包含 SEQ ID NO: 12-22 中任一者之胺基酸序列。在一些實施例中，該 Nef 蛋白為突變型 SIV Nef，其包含在以下中之任一者之胺基酸殘基處之一或多種突變：(i) aa 2-4、aa 8-10、aa 11-13、aa 38-40、aa 44-46、aa 47-49、aa 50-52、aa 53-55、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 110-112、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、aa 178-179、179-181aa、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 191-193、aa 194-196、aa 203-205、aa 206-208、aa 212-214、aa 215-217、aa 218-220、aa 221-223、aa 8-13、aa 44-67、aa 107-112、aa 164-196、aa 203-208 或 aa 212-223；(ii) aa 2-4、aa 44-46、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 44-67、aa 164-169、aa 176-181、aa 185-190；(iii) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、178-179aa、aa 179-181、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67 或 aa 164-190；或(iv) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67、aa 164-169、aa 176-181 或 aa 185-190；其中該胺基酸殘基位置對應於野生型 SIV Nef 之

彼位置。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR、CD4 及 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 之細胞表面表現，但不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD4 之細胞表面表現，但不下調 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD28 之細胞表面表現，但不下調 CD4 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調內源 TCR 之細胞表面表現，但不下調(例如，下調細胞表面表現) CAR。在一些實施例中，該功能性 CAR 由該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調(例如，下調細胞表面表現)達至多約 50%、40%、30%、20%、10%或 5%中任一者。

【0336】　在一些實施例中，提供一種治療患有疾病(例如，癌症、感染性疾病、GvHD、移植排斥、自體免疫病症或輻射病)之個體之方法，該方法包括向該個體投與有效量的包含以下之醫藥組合物：(1)包含 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)及嵌合 TCR (cTCR)之經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞、內源 TCR 缺乏 T 細胞、GvHD 降至最低之 T 細胞)，該嵌合 TCR 包含：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之連接體；(c)第一 TCR 次單元(例如，CD3ε)的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；(d)包含第二 TCR 次單元(例如，CD3ε)的跨膜結構域之跨膜結

構域；及(e)包含第三 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞內信號傳導結構域之細胞內信號傳導結構域；其中該第一、第二及第三 TCR 次單元均係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群；及(2)醫藥學上可接受之載劑。在一些實施例中，該第一、第二及第三 TCR 次單元為相同的(例如，均為 CD3ε)。在一些實施例中，該第一、第二及第三 TCR 次單元為不同的。在一些實施例中，提供一種治療患有疾病(例如，癌症、感染性疾病、GvHD、移植排斥、自體免疫病症或輻射病)之個體之方法，該方法包括向該個體投與有效量的包含以下之醫藥組合物：(1)包含 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)及嵌合 TCR (cTCR)之經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞、內源 TCR 缺乏 T 細胞、GvHD 降至最低之 T 細胞)，該嵌合 TCR 包含：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之連接體；及(c)全長 CD3ε (排除信號肽)；及(2)醫藥學上可接受之載劑。在一些實施例中，該 cTCR 為單特異性。在一些實施例中，該 cTCR 為多價的。在一些實施例中，該 cTCR 為多特異性。在一些實施例中，該 cTCR 為包含胺基酸序列 SEQ ID NO: 64 之抗 CD20 cTCR。在一些實施例中，該 Nef 蛋白包含 SEQ ID NO: 12-22 中任一者之胺基酸序列。在一些實施例中，該 Nef 蛋白為突變型 SIV Nef，其包含在以下中之任一者之胺基酸殘基處之一或多種突變：(i) aa 2-4、aa 8-10、aa 11-13、aa 38-40、aa 44-46、aa 47-49、aa 50-52、aa 53-55、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 110-112、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、aa 178-179、179-181aa、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 191-193、aa 194-196、aa 203-205、aa 206-208、aa 212-214、aa 215-217、aa 218-220、aa 221-223、aa 8-13、aa 44-67、aa 107-112、aa 164-196、aa 203-208 或 aa 212-223；(ii) aa 2-4、aa 44-46、aa 56-58、aa

59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 44-67、aa 164-169、aa 176-181、aa 185-190；(iii) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、178-179aa、aa 179-181、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67 或 aa 164-190；或(iv) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67、aa 164-169、aa 176-181 或 aa 185-190；其中該胺基酸殘基位置對應於野生型 SIV Nef 之彼位置。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR、CD4 及 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 之細胞表面表現，但不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD4 之細胞表面表現，但不下調 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD28 之細胞表面表現，但不下調 CD4 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調內源 TCR 之細胞表面表現，但不下調(例如，下調細胞表面表現) cTCR。在一些實施例中，該功能性 cTCR 由該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調(例如，下調細胞表面表現)達至多約 50%、40%、30%、20%、10%

或 5%中任一者。

【0337】　在一些實施例中，提供一種治療患有疾病(例如，癌症、感染性疾病、GvHD、移植排斥、自體免疫病症或輻射病)之個體之方法，該方法包括向該個體投與有效量的包含以下之醫藥組合物：(1)包含 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)及 T 細胞抗原偶合物(TAC)之經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞、內源 TCR 缺乏 T 細胞、GvHD 降至最低之 T 細胞)，該 TAC 包含：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；(e)第一 TCR 輔受體(例如，CD4)的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；(f)包含第二 TCR 輔受體(例如，CD4)的跨膜結構域之跨膜結構域；及(g)包含第三 TCR 輔受體(例如，CD4)的細胞內信號傳導結構域之視情況存在之細胞內信號傳導結構域；其中該 TCR 次單元係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群；其中該第一、第二及第三 TCR 輔受體均係選自由 CD4、CD8 及 CD28 組成之群；及(2)醫藥學上可接受之載劑。在一些實施例中，該第一、第二及第三 TCR 輔受體為相同的。在一些實施例中，該第一、第二及第三 TCR 輔受體為不同的。在一些實施例中，提供一種治療患有疾病(例如，癌症、感染性疾病、GvHD、移植排斥、自體免疫病症或輻射病)之個體之方法，該方法包括向該個體投與有效量的包含以下之醫藥組合物：(1)包含 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)及 T 細胞抗原偶合物(TAC)之經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞、內源 TCR 缺乏 T 細胞、GvHD 降至最低之 T 細胞)，該 TAC 包含：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視

情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；(e) CD4 之細胞外結構域或其一部分；(f) CD4 之跨膜結構域；及(g) CD4 之細胞內信號傳導結構域；其中該 TCR 次單元係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群；及(2)醫藥學上可接受之載劑。在一些實施例中，該 TAC 為包含胺基酸序列 SEQ ID NO: 66 之抗 CD20 TAC。在一些實施例中，該 TAC 為單特異性的。在一些實施例中，該 TAC 為多價的。在一些實施例中，該 TAC 為多特異性的。在一些實施例中，該 Nef 蛋白包含 SEQ ID NO: 12-22 中任一者之胺基酸序列。在一些實施例中，該 Nef 蛋白為突變型 SIV Nef，其包含在以下中之任一者之胺基酸殘基處之一或多種突變：(i) aa 2-4、aa 8-10、aa 11-13、aa 38-40、aa 44-46、aa 47-49、aa 50-52、aa 53-55、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 110-112、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、aa 178-179、179-181aa、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 191-193、aa 194-196、aa 203-205、aa 206-208、aa 212-214、aa 215-217、aa 218-220、aa 221-223、aa 8-13、aa 44-67、aa 107-112、aa 164-196、aa 203-208 或 aa 212-223；(ii) aa 2-4、aa 44-46、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 44-67、aa 164-169、aa 176-181、aa 185-190；(iii) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、178-179aa、aa 179-181、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67 或 aa 164-190；或(iv) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-

181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67、aa 164-169、aa 176-181 或 aa 185-190；其中該胺基酸殘基位置對應於野生型 SIV Nef之彼位置。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR、CD4 及 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 之細胞表面表現，但不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD4 之細胞表面表現，但不下調 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD28 之細胞表面表現，但不下調 CD4 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調內源 TCR 之細胞表面表現，但不下調(例如，下調細胞表面表現) TAC。在一些實施例中，該功能性 TAC 由該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調(例如，下調細胞表面表現)達至多約 50%、40%、30%、20%、10%或 5%中任一者。

【0338】　在一些實施例中，提供一種治療患有疾病(例如，癌症、感染性疾病、GvHD、移植排斥、自體免疫病症或輻射病)之個體之方法，該方法包括向該個體投與有效量的包含以下之醫藥組合物：(1)包含 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)及 TAC 樣嵌合受體之經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞、內源 TCR 缺乏 T 細胞、GvHD 降至最低之 T 細胞)，該 TAC 樣嵌合受體包含：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；

(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別第一 TCR 次單元(例如，TCRα)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；(e)第二 TCR 次單元(例如，CD3ε)的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；(f)包含第三 TCR 次單元(例如，CD3ε)的跨膜結構域之跨膜結構域；及(g)包含第四 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞內信號傳導結構域之視情況存在之細胞內信號傳導結構域；其中該第一、第二、第三及第四 TCR 次單元均係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群；及(2)醫藥學上可接受之載劑。在一些實施例中，該第二、第三及第四 TCR 次單元為相同的。在一些實施例中，該第一、第二、第三及第四 TCR 次單元為相同的。在一些實施例中，該第一、第二、第三及第四 TCR 次單元為不同的。在一些實施例中，該第二、第三及第四 TCR 次單元為相同的，但不同於該第一 TCR 次單元。在一些實施例中，提供一種治療患有疾病(例如，癌症、感染性疾病、GvHD、移植排斥、自體免疫病症或輻射病)之個體之方法，該方法包括向該個體投與有效量的包含以下之醫藥組合物：(1)包含 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)及 TAC 樣嵌合受體之經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞、內源 TCR 缺乏 T 細胞、GvHD 降至最低之 T 細胞)，該 TAC 樣嵌合受體包含：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元(例如，TCRα)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；及(e)全長 CD3ε(排除信號肽)；其中該 TCR 次單元係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群；及(2)醫藥學上可接受之載劑。在一些實施例中，該 TAC 為單特異性的。在一些實施例中，該 TAC 為多價的。在一些實施例中，該 TAC 為多特異性的。在一些實施例中，該 Nef 蛋白包含 SEQ ID NO: 12-22 中任一者之胺基酸序列。在一些

實施例中，該 Nef 蛋白為突變型 SIV Nef，其包含在以下中之任一者之胺基酸殘基處之一或多種突變：(i) aa 2-4、aa 8-10、aa 11-13、aa 38-40、aa 44-46、aa 47-49、aa 50-52、aa 53-55、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 110-112、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、aa 178-179、179-181aa、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 191-193、aa 194-196、aa 203-205、aa 206-208、aa 212-214、aa 215-217、aa 218-220、aa 221-223、aa 8-13、aa 44-67、aa 107-112、aa 164-196、aa 203-208 或 aa 212-223；(ii) aa 2-4、aa 44-46、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 44-67、aa 164-169、aa 176-181、aa 185-190；(iii) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、178-179aa、aa 179-181、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67 或 aa 164-190；或(iv) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67、aa 164-169、aa 176-181 或 aa 185-190；其中該胺基酸殘基位置對應於野生型 SIV Nef 之彼位置。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR、CD4 及 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 之細胞表面表現，但不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表

現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD4 之細胞表面表現，但不下調 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD28 之細胞表面表現，但不下調 CD4 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調內源 TCR 之細胞表面表現，但不下調(例如，下調細胞表面表現) TAC 樣嵌合受體。在一些實施例中，該功能性 TAC 樣嵌合受體由該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調(例如，下調細胞表面表現)達至多約 50%、40%、30%、20%、10%或 5%中任一者。

【0339】　在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調經修飾 T 細胞中之內源 TCR、MHC、CD3ε、CD3γ 及/或 CD3δ，諸如下調內源 TCR、MHC、CD3ε、CD3γ 及/或 CD3δ 之細胞表現達至少約 50%、60%、70%、80%、90%或 95%中任一者。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)不下調(例如，下調表現) CD3ζ、CD4、CD28 及/或外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))，或下調 CD3ζ、CD4、CD28 及/或外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR)達至多約 50%、40%、30%、20%、10%或 5%中任一者。

【0340】　在一些實施例中，該 Nef 蛋白係選自由 SIV Nef、HIV1 Nef、HIV2 Nef 及其同系物組成之群。在一些實施例中，該 Nef 蛋白為野生型 Nef。在一些實施例中，該 Nef 蛋白為突變型 Nef。在一些實施例中，該突變型 Nef 包含在肉豆蔻醯化位點、N 端 α-螺旋、基於酪胺酸之 AP 募集、CD4 結合位點、酸性簇、

基於脯胺酸之重複序列、PAK 結合結構域、COP I 募集結構域、基於二-白胺酸之 AP 募集結構域、V-ATP 酶及 Raf-1 結合結構域或其任何組合中之一或多種突變。在一些實施例中，該突變包含插入、缺失、點突變及/或重排。在一些實施例中，該 Nef 蛋白包含 SEQ ID NO: 12-22 中任一者之胺基酸序列。在一些實施例中，該 Nef 蛋白為突變型 SIV Nef，其包含在表 11 中列出的任何胺基酸殘基處之一或多種突變(例如，使至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 種或更多種胺基酸殘基突變，諸如突變為 Ala)。在一些實施例中，該 Nef 蛋白為突變型 SIV Nef，其包含在以下中之任一者之胺基酸殘基處之一或多種突變：(i) aa 2-4、aa 8-10、aa 11-13、aa 38-40、aa 44-46、aa 47-49、aa 50-52、aa 53-55、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 110-112、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、aa 178-179、179-181aa、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 191-193、aa 194-196、aa 203-205、aa 206-208、aa 212-214、aa 215-217、aa 218-220、aa 221-223、aa 8-13、aa 44-67、aa 107-112、aa 164-196、aa 203-208 或 aa 212-223；(ii) aa 2-4、aa 44-46、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 44-67、aa 164-169、aa 176-181、aa 185-190；(iii) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、178-179aa、aa 179-181、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67 或 aa 164-190；或(iv) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67、aa 164-169、aa 176-181 或 aa 185-190；其中該胺基酸殘基位置對

應於野生型 SIV Nef 之彼位置。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR、CD4 及 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 之細胞表面表現，但不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD4 之細胞表面表現，但不下調 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD28 之細胞表面表現，但不下調 CD4 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調內源 TCR 之細胞表面表現，但不下調(例如，下調細胞表面表現)外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))。在一些實施例中，該功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))由該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調(例如，下調細胞表面表現)達至多約 50%、40%、30%、20%、10%或 5%中任一者。

【0341】　在一些實施例中，該疾病為癌症。在一些實施例中，該癌症為多發性骨髓瘤，諸如復發性或難治性多發性骨髓瘤。在一些實施例中，治療效應包含引起個體之客觀臨床反應。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，治療效果包含引起個體之疾病緩解(部分或全部)。在一些中，在個體接受該醫藥組合物之後不超過約 6 個月、5 個月、4 個月、3 個月、2 個

月、1 個月或不足 1 個月中任一者之後即獲得臨床緩解。在一些實施例中，治療效應包含預防個體之癌症的復發或疾病進展。在一些實施例中，該復發或疾病進展係預防持續至少約 6 個月、1 年、2 年、3 年、4 年、5 年或更多年。在一些實施例中，治療效應包含延長個體之存活(諸如無疾病存活)。在一些實施例中，治療效應包含改良個體之生活品質。在一些實施例中，治療效應包含抑制實體瘤或淋巴腫瘤之生長或降低實體瘤或淋巴腫瘤之大小。

【0342】　在一些實施例中，該實體瘤或淋巴腫瘤之大小降低至少約 10% (包括例如至少約 20%、30%、40%、60%、70%、80%、90%或 100%中任一者)。在一些實施例中，提供一種抑制個體之實體瘤或淋巴腫瘤之生長或降低實體瘤或淋巴腫瘤之大小的方法。在一些實施例中，治療效應包含抑制個體之腫瘤轉移。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%中任一者)轉移受到抑制。在一些實施例中，提供一種抑制轉移至淋巴結之方法。在一些實施例中，提供一種抑制轉移至肺之方法。在一些實施例中，提供一種抑制轉移至肝之方法。轉移可藉由此項技術中之任何已知方法，諸如藉由血液測試、骨掃描、x-射線掃描、CT 掃描、PET 掃描及生檢來評價。

【0343】　本發明亦係關於使用表現本文所述之 Nef (或 Nef +功能性外源受體)之經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞)、其分離群體或包含其之醫藥組合物來降低或改善或預防或治療疾病及病症的方法。在一些實施例中，使用表現本文所述之 Nef (或 Nef +功能性外源受體)之經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞)、其分離群體或包含其之醫藥組合物來降低或改善或預防或治療癌症、感染、一或多種自體免疫病症、輻射病，或預防或治療經歷移植手術的個體之移植物抗宿主疾病(GvHD)或移植排斥。

【0344】　表現 Nef (或 Nef +功能性外源受體)之經修飾 T 細胞(例如，同種異體

T 細胞)、其分離群體或包含其之醫藥組合物適用於改變自體免疫或移植排斥，乃因此等 T 細胞可在發育期間在 TGF-β 中生長且將分化以變成經誘導 T 調節細胞。在一實施例中，使用該功能性外源受體(例如經工程改造 TCR (例如，傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))對此等經誘導 T 調節細胞給予其在疾病之組織位點處實施其抑制功能所需的功能性特異性。因此，使大量抗原特異性調節 T 細胞生長用於患者。T 調節細胞分化所必需之 FoxP3 的表現可藉由流式細胞術分析，且此等 T 調節細胞對 T 細胞增殖之功能性抑制可藉由檢查在共培養時在抗 CD3 刺激之後 T 細胞增殖之減少來分析。

【0345】　本發明之另一實施例係關於表現 Nef (或 Nef +功能性外源受體)之經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞)、其分離群體或包含其之醫藥組合物用於預防或治療輻射病的用途。在放射治療或暴露(例如，髒彈暴露、放射洩漏)或消融骨髓細胞之其他條件(某些藥物療法)之後的一項挑戰在於重建造血系統。在經歷骨髓移植之患者中，移植後第 15 天之絕對淋巴球計數與成功結果有關。具有高淋巴球計數之彼等患者充分重建，因此重要的是具有良好淋巴球重建。此效應之原因尚不清楚，但其可歸因於免於感染之淋巴球保護及/或促進造血重建之生長因子的產生。

【0346】　在一些實施例中，本發明亦提供一種增加個體之供體 T 細胞之持久性及/或植入的方法，該方法包括 1)提供同種異體 T 細胞；及 2)將編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸引入至該同種異體 T 細胞中，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該同種異體 T 細胞的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，該同種異體 T 細胞為同種異體 CAR-T 細胞、經工程改造 TCR-T 細胞(例如，cTCR-T 細胞)、TAC-T 細胞、TAC 樣-T 細胞。在一些實施例中，該方法進一步包括將編碼包含細胞外配位體結合結構域及視情況存在之細

胞內信號傳導結構域之功能性外源受體(例如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))之第二核酸引入至該同種異體 T 細胞中。在一些實施例中，該第二核酸編碼 CAR。在一些實施例中，該 CAR 包括包含以下之多肽：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)結合部分(例如，sdAb、scFv)；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域。在一些實施例中，該 CAR 包括包含以下之多肽：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)抗 BCMA sdAb；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域。在一些實施例中，該 CAR 包括包含以下之多肽：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)抗 CD19 scFv；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域。在一些實施例中，該 CAR 包括包含以下之多肽：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)抗 CD20 scFv；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域。在一些實施例中，該 CAR 包括包含以下之多肽：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含直接地或間接地(例如，經由連接體)融合在一起之一抗 CD20 scFv 及一抗 CD19 scFv；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域。在一些實施例中，該第二核酸編碼傳統經工程改造 TCR。在一些實施例中，該第二核酸編碼 ACTR。在一些實施例中，該第二核酸編碼 cTCR。在一些實施例中，該 cTCR 包含(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD20、CD19)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，scFv、sdAb)；(b)視情況存在之連接體；(c)第一 TCR 次單元的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；(d)包含第二 TCR 次單元的跨膜結構域之跨膜結構域；及(e)包含第三 TCR 次單元的細胞內信號傳導結構域之

細胞內信號傳導結構域;其中該第一、第二及第三 TCR 次單元均係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群。在一些實施例中，該 cTCR 包含(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD20、CD19)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，scFv、sdAb)；(b)視情況存在之連接體；及(e)全長 CD3ε (排除信號肽)。在一些實施例中，該 cTCR 為包含胺基酸序列 SEQ ID NO: 64 之抗 CD20 cTCR。在一些實施例中，該第二核酸編碼 TAC。在一些實施例中，該 TAC 包含(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD20、CD19)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，scFv、sdAb)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；(e)源於第一 TCR 輔受體(諸如 CD4、CD28 或 CD8，例如 CD8α)的視情況存在之細胞外結構域；(f)包含第二 TCR 輔受體(諸如 CD4、CD28 或 CD8，例如 CD8α)的跨膜之跨膜；及(g)包含第三 TCR 輔受體(諸如 CD4、CD28 或 CD8，例如 CD8α)的細胞內信號傳導結構域之視情況存在之細胞內信號傳導結構域。在一些實施例中，該 TAC 包含：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD20、CD19)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，scFv、sdAb)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；(e) CD4 之細胞外結構域或其一部分；(f) CD4 之跨膜結構域；及(g) CD4 之細胞內信號傳導結構域；其中該 TCR 次單元係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群。在一些實施例中，該 TAC 為包含胺基酸序列 SEQ ID NO: 66 之抗 CD20 TAC。在一些實施例中，該第二核酸編碼 TAC 樣嵌合受體。在一些實施例中，該 TAC 樣嵌合受體包含：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例

如，BCMA、CD20、CD19)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，scFv、sdAb)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別第一 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；(e)第二 TCR 次單元(例如，CD3ε)的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；(f)包含第三 TCR 次單元(例如，CD3ε)的跨膜結構域之跨膜結構域；及(g)包含第四 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞內信號傳導結構域之視情況存在之細胞內信號傳導結構域；其中該第一、第二、第三及第四 TCR 次單元均係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群。在一些實施例中，該 TAC 樣嵌合受體包含：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD20、CD19)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，scFv、sdAb)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；及(e)全長 CD3ε(排除信號肽)；其中該 TCR 次單元係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群。在一些實施例中，該功能性外源受體(諸如 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR、ACTR)、經工程改造 TCR (例如，傳統經工程改造 TCR、cTCR)、TAC、TAC 樣嵌合受體)為單價及單特異性。在一些實施例中，該功能性外源受體(諸如 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR、ACTR)、經工程改造 TCR (例如，傳統經工程改造 TCR、cTCR)、TAC、TAC 樣嵌合受體)為多價及單特異性。在一些實施例中，該功能性外源受體(諸如 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR、ACTR)、經工程改造 TCR (例如，傳統經工程改造 TCR、cTCR)、TAC、TAC 樣嵌合受體)為多特異性(及多價)。在一些實施例中，該第一核酸及該第二核酸係在不同的載體上。在一些實施例中，該第一核酸及該第二核酸係在同一載體上。因此，在一些實施例中，本發明提供一種增加個體之供體 T 細胞之

持久性及/或植入的方法，該方法包括 1)提供同種異體 T 細胞；及 2)將包含編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸及編碼例如例如本文所述之功能性外源受體(諸如 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR、ACTR)、經工程改造 TCR (例如，傳統經工程改造 TCR、cTCR)、TAC、TAC 樣嵌合受體)之第二核酸的載體(例如，病毒載體、慢病毒載體)引入至該同種異體 T 細胞中；其中該 Nef 蛋白在表現時導致該同種異體 T 細胞的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，該 Nef 蛋白包含 SEQ ID NO: 12-22 中任一者之胺基酸序列。在一些實施例中，該 Nef 蛋白為突變型 SIV Nef，其包含在以下中之任一者之胺基酸殘基處之一或多種突變：(i) aa 2-4、aa 8-10、aa 11-13、aa 38-40、aa 44-46、aa 47-49、aa 50-52、aa 53-55、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 110-112、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、aa 178-179、179-181aa、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 191-193、aa 194-196、aa 203-205、aa 206-208、aa 212-214、aa 215-217、aa 218-220、aa 221-223、aa 8-13、aa 44-67、aa 107-112、aa 164-196、aa 203-208 或 aa 212-223；(ii) aa 2-4、aa 44-46、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 44-67、aa 164-169、aa 176-181、aa 185-190；(iii) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、178-179aa、aa 179-181、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67 或 aa 164-190；或(iv) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-

67、aa 164-169、aa 176-181 或 aa 185-190；其中該胺基酸殘基位置對應於野生型 SIV Nef 之彼位置。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR、CD4 及 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 之細胞表面表現，但不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD4 之細胞表面表現，但不下調 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD28 之細胞表面表現，但不下調 CD4 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調內源 TCR 之細胞表面表現，但不下調(例如，下調細胞表面表現)外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))。在一些實施例中，該功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))由該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調(例如，下調細胞表面表現)達至多約 50%、40%、30%、20%、10%或 5%中任一者。

【0347】　在一些實施例中，該第一核酸及該第二核酸可操作性連接至同一啟動子。在一些實施例中，該第一核酸及該第二核酸可操作性連接至不同啟動子。在一些實施例中，該啟動子係選自由勞氏肉瘤病毒(RSV)啟動子、猿病毒 40 (SV40)啟動子、細胞巨大病毒即刻早期基因啟動子(CMV IE)、延伸因子 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、細胞巨大病毒增強子/雞 β-肌動蛋白(CAG)啟動子、多瘤增強子/單純疱疹胸苷激酶(MC1)啟動子、β 肌動蛋白(β-ACT)啟動子、「骨髓增殖性肉瘤病毒增強子，陰性對照區缺失，d1587rev 引子-結合位點經取代(MND)」啟動子、NFAT 啟動子、TETON® 啟動子及 NFκB 啟動子組成之群。在一些實施例中，該啟動子為 EF1-α 或 PGK。

在一些實施例中，該第一核酸係在該第二核酸上游。在一些實施例中，該第一核酸係在該第二核酸下游。在一些實施例中，該第一核酸及該第二核酸經由連接序列連接。在一些實施例中，該連接序列為編碼 P2A、T2A、E2A、F2A、BmCPV 2A、BmIFV 2A、$(GS)_n$、$(GSGGS)_n$、$(GGGS)_n$、$(GGGGS)_n$ 之核酸序列或 IRES、SV40、CMV、UBC、EF1α、PGK、CAGG 之核酸序列或其任何組合中任一者，其中 n 係至少為 1 之整數。在一些實施例中，該連接序列為 IRES 或編碼 P2A 之核酸。在一些實施例中，該載體為病毒載體。

【0348】 在一些實施例中，該病毒載體係選自由腺病毒載體、腺相關病毒載體、逆轉錄病毒載體、牛痘載體、慢病毒載體、單純疱疹病毒載體及其衍生物組成之群。在一些實施例中，該載體為非病毒載體，諸如游離型表現載體、增強游離型載體(EEV)、PiggyBac 轉座酶載體或睡美人(SB)轉座子系統。

【0349】 在一些實施例中，本發明亦提供一種治療接受同種異體 T 細胞移植而未誘導 GvHD 或移植排斥之個體之疾病(諸如癌症、感染性疾病、自體免疫病症或輻射病)的方法，該方法包括將編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸引入至該同種異體 T 細胞中，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該同種異體 T 細胞的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，該同種異體 T 細胞為同種異體 CAR-T 細胞、TCR-T 細胞(例如，cTCR-T 細胞)、TAC-T 細胞或 TAC 樣-T 細胞。在一些實施例中，該方法進一步包括將編碼包含細胞外配位體結合結構域及視情況存在之細胞內信號傳導結構域之功能性外源受體(例

如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR)) 之第二核酸引入至該同種異體 T 細胞中。在一些實施例中，該第二核酸編碼 CAR。在一些實施例中，該 CAR 包括包含以下之多肽：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)結合部分(例如，sdAb、scFv)；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域。在一些實施例中，該 CAR 包括包含以下之多肽：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)抗 BCMA sdAb；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域。在一些實施例中，該第二核酸編碼包含以下之 cTCR：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之連接體；(c)第一 TCR 次單元(例如，CD3ε)的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；(d)包含第二 TCR 次單元(例如，CD3ε)的跨膜結構域之跨膜結構域；及(e)包含第三 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞內信號傳導結構域之細胞內信號傳導結構域；其中該第一、第二及第三 TCR 次單元均係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群。在一些實施例中，該第一、第二及第三 TCR 次單元為相同的(例如，均為 CD3ε)。在一些實施例中，該第一、第二及第三 TCR 次單元為不同的。在一些實施例中，該第二核酸編碼包含以下之 T 細胞抗原偶合物(TAC)：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；(e)第一 TCR 輔受體(例如，CD4)的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；(f)包含第二 TCR

輔受體(例如，CD4)的跨膜結構域之跨膜結構域；及(g)包含第三 TCR 輔受體(例如，CD4)的細胞內信號傳導結構域之視情況存在之細胞內信號傳導結構域；其中該 TCR 次單元係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群；且其中該第一、第二及第三 TCR 輔受體均係選自由 CD4、CD8 及 CD28 組成之群。在一些實施例中，該第一、第二及第三 TCR 輔受體為相同的。在一些實施例中，該第二核酸編碼包含以下之 T 細胞抗原偶合物(TAC)：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；(e) CD4 之細胞外結構域或其一部分；(f) CD4 之跨膜結構域；及(g) CD4 之細胞內信號傳導結構域；其中該 TCR 次單元係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群。在一些實施例中，該 TAC 為包含胺基酸序列 SEQ ID NO: 66 之抗 CD20 TAC。在一些實施例中，該第二核酸編碼包含以下之 TAC 樣嵌合受體：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別第一 TCR 次單元(例如，TCRα)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；(e)第二 TCR 次單元(例如，CD3ε)的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；(f)包含第三 TCR 次單元(例如，CD3ε)的跨膜結構域之跨膜結構域；及(g)包含第四 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞內信號傳導結構域之視情況存在之細胞內信號傳導結構域；其中該第一、第二、第三及第四 TCR 次單元均係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群。在一些實施例中，該第二、第三及第四 TCR 次單元為相同的。

在一些實施例中，該第一、第二、第三及第四 TCR 次單元為相同的。在一些實施例中，該第一、第二、第三及第四 TCR 次單元為不同的。在一些實施例中，該第二、第三及第四 TCR 次單元為相同的，但不同於該第一 TCR 次單元。在一些實施例中，該第二核酸編碼包含以下之 TAC 樣嵌合受體：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元(例如，TCRα)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；及(e)全長 CD3ε(排除信號肽)；其中該 TCR 次單元係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群。在一些實施例中，該功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如，傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))為單特異性。在一些實施例中，該功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如，傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))為多價的。在一些實施例中，該功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如，傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))為多特異性。在一些實施例中，該第一核酸及該第二核酸係在不同的載體上。在一些實施例中，該第一核酸及該第二核酸係在同一載體上。因此，在一些實施例中，本發明亦提供一種治療接受同種異體 T 細胞移植而未誘導 GvHD 或移植排斥之個體之疾病(諸如癌症、感染性疾病、自體免疫病症或輻射病)的方法，該方法包括將包含編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸及編碼包含以下之 CAR 之第二核酸的載體引入至該同種異體 T 細胞中：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別抗

原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)結合部分(例如，sdAb、scFv)；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該同種異體 T 細胞的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，提供一種治療接受同種異體 T 細胞移植而未誘導 GvHD 或移植排斥之個體之疾病(諸如癌症、感染性疾病、自體免疫病症或輻射病)的方法，該方法包括將包含編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸及編碼包含以下之嵌合 TCR (cTCR)之第二核酸的載體引入至該同種異體 T 細胞中：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之連接體；(c)第一 TCR 次單元(例如，CD3ε)的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；(d)包含第二 TCR 次單元(例如，CD3ε)的跨膜結構域之跨膜結構域；及(e)包含第三 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞內信號傳導結構域之細胞內信號傳導結構域；其中該第一、第二及第三 TCR 次單元均係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群；其中該 Nef 蛋白在表現時導致該同種異體 T 細胞的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，提供一種治療接受同種異體 T 細胞移植而未誘導 GvHD 或移植排斥之個體之疾病(諸如癌症、感染性疾病、自體免疫病症或輻射病)的方法，該方法包括將包含編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸及編碼包含以下之 T 細胞抗原偶合物(TAC)之第二核酸的載體引入至該同種異體 T 細胞中：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；(e)第一 TCR 輔受體(例如，CD4)的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；(f)包含

第二 TCR 輔受體(例如，CD4)的跨膜結構域之跨膜結構域；及(g)包含第三 TCR 輔受體(例如，CD4)的細胞內信號傳導結構域之視情況存在之細胞內信號傳導結構域；其中該 TCR 次單元係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群；且其中該第一、第二及第三 TCR 輔受體均係選自由 CD4、CD8 及 CD28 組成之群；其中該 Nef 蛋白在表現時導致該同種異體 T 細胞的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，提供一種治療接受同種異體 T 細胞移植而未誘導 GvHD 或移植排斥之個體之疾病(諸如癌症、感染性疾病、自體免疫病症或輻射病)的方法，該方法包括將包含編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之第一核酸及編碼包含以下之 TAC 樣嵌合受體之第二核酸的載體引入至該同種異體 T 細胞中：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別第一 TCR 次單元(例如，TCRα)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；(e)第二 TCR 次單元(例如，CD3ε)的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；(f)包含第三 TCR 次單元(例如，CD3ε)的跨膜結構域之跨膜結構域；及(g)包含第四 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞內信號傳導結構域之視情況存在之細胞內信號傳導結構域；其中該第一、第二、第三及第四 TCR 次單元均係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群；其中該 Nef 蛋白在表現時導致該同種異體 T 細胞的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，該 Nef 蛋白包含 SEQ ID NO: 12-22 中任一者之胺基酸序列。在一些實施例中，該 Nef 蛋白為突變型 SIV Nef，其包含在以下中之任一者之胺基酸殘基處之一或多種突變：(i) aa 2-4、aa 8-10、aa 11-13、aa 38-40、aa 44-46、aa 47-49、aa 50-52、aa 53-55、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 110-112、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-

172、aa 173-175、aa 176-178、aa 178-179、179-181aa、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 191-193、aa 194-196、aa 203-205、aa 206-208、aa 212-214、aa 215-217、aa 218-220、aa 221-223、aa 8-13、aa 44-67、aa 107-112、aa 164-196、aa 203-208 或 aa 212-223；(ii) aa 2-4、aa 44-46、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67、aa 164-169、aa 176-181 或 aa 185-190；(iii) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、178-179aa、aa 179-181、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67 或 aa 164-190；或(iv) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67、aa 164-169、aa 176-181 或 aa 185-190；其中該胺基酸殘基位置對應於野生型 SIV Nef 之彼位置。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR、CD4 及 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 之細胞表面表現，但不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD4 之細胞表面表現，但不下調 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD28 之細胞表面表現，但不下調 CD4 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例

如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調內源 TCR 之細胞表面表現，但不下調(例如，下調細胞表面表現)外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))。在一些實施例中，該功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))由該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調(例如，下調細胞表面表現)達至多約 50%、40%、30%、20%、10%或 5%中任一者。

【0350】　在一些實施例中，本發明亦提供一種降低同種異體 CAR-T 細胞之 GvHD 或移植排斥的方法，該方法包括將編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之核酸引入至該同種異體 CAR-T 細胞中，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該同種異體 CAR-T 細胞的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，該 CAR 包括包含以下之多肽：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別抗原(例如，BCMA、CD20、CD19)之一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)結合部分(例如，sdAb、scFv)；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域。在一些實施例中，該 CAR 包括包含以下之多肽：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含一或多個(諸如 1、2、3、4、5、6 個或更多個中任一者)抗 BCMA sdAb；(b)跨膜結構域；及(c)細胞內信號傳導結構域。在一些實施例中，該 CAR 為單特異性。在一些實施例中，該 CAR 為多價的。在一些實施例中，該 CAR 為多特異性。在一些實施例中，該 Nef 蛋白包含 SEQ ID NO: 12-22 中任一者之胺基酸序列。在一些實施例中，該 Nef 蛋白為突變型 SIV Nef，其包含在以下中之任一者之胺基酸殘基處之一或多種突變：(i) aa 2-4、aa 8-10、aa 11-13、aa 38-40、aa 44-46、aa 47-49、aa 50-52、aa 53-55、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、

aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 110-112、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、aa 178-179、179-181aa、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 191-193、aa 194-196、aa 203-205、aa 206-208、aa 212-214、aa 215-217、aa 218-220、aa 221-223、aa 8-13、aa 44-67、aa 107-112、aa 164-196、aa 203-208 或 aa 212-223；(ii) aa 2-4、aa 44-46、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 44-67、aa 164-169、aa 176-181、aa 185-190；(iii) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、178-179aa、aa 179-181、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67 或 aa 164-190；或(iv) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67、aa 164-169、aa 176-181 或 aa 185-190；其中該胺基酸殘基位置對應於野生型 SIV Nef 之彼位置。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR、CD4 及 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 之細胞表面表現，但不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD4 之細胞表面表現，但不下調 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)

下調 TCR 及 CD28 之細胞表面表現，但不下調 CD4 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調內源 TCR 之細胞表面表現，但不下調(例如，下調細胞表面表現) CAR。在一些實施例中，該功能性 CAR 由該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調(例如，下調細胞表面表現)達至多約 50%、40%、30%、20%、10%或 5%中任一者。

【0351】 在一些實施例中，本發明亦提供一種降低同種異體 cTCR-T 細胞之 GvHD 或移植排斥的方法，該方法包括將編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之核酸引入至該同種異體 cTCR-T 細胞中，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該同種異體 cTCR-T 細胞的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，該 cTCR 包含：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之連接體；(c)第一 TCR 次單元(例如，CD3ε)的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；(d)包含第二 TCR 次單元(例如，CD3ε)的跨膜結構域之跨膜結構域；及(e)包含第三 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞內信號傳導結構域之細胞內信號傳導結構域；其中該第一、第二及第三 TCR 次單元均係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群。在一些實施例中，該第一、第二及第三 TCR 次單元為相同的(例如，均為 CD3ε)。在一些實施例中，該第一、第二及第三 TCR 次單元為不同的。在一些實施例中，該 cTCR 包含：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之連接體；及(c)全長 CD3ε (排除信號肽)。在一些實施例中，該 cTCR 為單特異性。在一些實施例中，該 cTCR 為多價的。在一些實施例中，該 cTCR 為多特異性。在一些實施例中，該 cTCR 為包含胺基酸序列 SEQ ID NO: 64 之抗

CD20 cTCR。在一些實施例中，該 Nef 蛋白包含 SEQ ID NO: 12-22 中任一者之胺基酸序列。在一些實施例中，該 Nef 蛋白為突變型 SIV Nef，其包含在以下中之任一者之胺基酸殘基處之一或多種突變：(i) aa 2-4、aa 8-10、aa 11-13、aa 38-40、aa 44-46、aa 47-49、aa 50-52、aa 53-55、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 110-112、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、aa 178-179、179-181aa、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 191-193、aa 194-196、aa 203-205、aa 206-208、aa 212-214、aa 215-217、aa 218-220、aa 221-223、aa 8-13、aa 44-67、aa 107-112、aa 164-196、aa 203-208 或 aa 212-223；(ii) aa 2-4、aa 44-46、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 44-67、aa 164-169、aa 176-181、aa 185-190；(iii) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、178-179aa、aa 179-181、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67 或 aa 164-190；或(iv) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67、aa 164-169、aa 176-181 或 aa 185-190；其中該胺基酸殘基位置對應於野生型 SIV Nef 之彼位置。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR、CD4 及 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突

變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 之細胞表面表現，但不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD4 之細胞表面表現，但不下調 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD28 之細胞表面表現，但不下調 CD4 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調內源 TCR 之細胞表面表現，但不下調(例如，下調細胞表面表現) cTCR。在一些實施例中，該功能性 cTCR 由該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調(例如，下調細胞表面表現)達至多約 50%、40%、30%、20%、10%或 5%中任一者。

【0352】　在一些實施例中，本發明亦提供一種降低同種異體 TAC-T 細胞之 GvHD 或移植排斥的方法，該方法包括將編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之核酸引入至該同種異體 TAC-T 細胞中，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該同種異體 TAC-T 細胞的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，該 TAC 包含：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；(e)第一 TCR 輔受體(例如，CD4)的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；(f)包含第二 TCR 輔受體(例如，CD4)的跨膜結構域之跨膜結構域；及(g)包含第三 TCR 輔受體(例如，CD4)的細胞內信號傳導結構域之視情況存在之細胞內信號傳導結構域；其中該 TCR 次單元係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群；且其中該第一、第二及第三 TCR 輔受體均係選自由 CD4、CD8 及 CD28 組成之群。在一些實施例中，該第一、第二及第三 TCR 輔受體為

相同的。在一些實施例中，該第一、第二及第三 TCR 輔受體為不同的。在一些實施例中，該 TAC 包含：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；(e) CD4 之細胞外結構域或其一部分；(f) CD4 之跨膜結構域；及(g) CD4 之細胞內信號傳導結構域；其中該 TCR 次單元係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群。在一些實施例中，該 TAC 為包含胺基酸序列 SEQ ID NO: 66 之抗 CD20 TAC。在一些實施例中，該 TAC 為單特異性。在一些實施例中，該 TAC 為多價的。在一些實施例中，該 TAC 為多特異性。在一些實施例中，該 Nef 蛋白包含 SEQ ID NO: 12-22 中任一者之胺基酸序列。在一些實施例中，該 Nef 蛋白為突變型 SIV Nef，其包含在以下中之任一者之胺基酸殘基處之一或多種突變：(i) aa 2-4、aa 8-10、aa 11-13、aa 38-40、aa 44-46、aa 47-49、aa 50-52、aa 53-55、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 110-112、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、aa 178-179、179-181aa、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 191-193、aa 194-196、aa 203-205、aa 206-208、aa 212-214、aa 215-217、aa 218-220、aa 221-223、aa 8-13、aa 44-67、aa 107-112、aa 164-196、aa 203-208 或 aa 212-223；(ii) aa 2-4、aa 44-46、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 44-67、aa 164-169、aa 176-181、aa 185-190；(iii) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、178-179aa、aa 179-181、aa 182-184、aa 185-

187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67 或 aa 164-190；或(iv) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67、aa 164-169、aa 176-181 或 aa 185-190；其中該胺基酸殘基位置對應於野生型 SIV Nef 之彼位置。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR、CD4 及 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 之細胞表面表現，但不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD4 之細胞表面表現，但不下調 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD28 之細胞表面表現，但不下調 CD4 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調內源 TCR 之細胞表面表現，但不下調(例如，下調細胞表面表現) TAC。在一些實施例中，該功能性 TAC 由該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調(例如，下調細胞表面表現)達至多約 50%、40%、30%、20%、10%或 5%中任一者。

【0353】　在一些實施例中，本發明亦提供一種降低同種異體 TAC 樣-T 細胞之 GvHD 或移植排斥的方法，該方法包括將編碼 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)之核酸引入至該同種異體 TAC 樣-T 細胞中，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該同種異體 TAC 樣-T 細胞的內源 TCR 之下調。在一些實施例中，該 TAC 樣嵌合受體包含：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性

地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別第一 TCR 次單元(例如，TCRα)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；(e)第二 TCR 次單元(例如，CD3ε)的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；(f)包含第三 TCR 次單元(例如，CD3ε)的跨膜結構域之跨膜結構域；及(g)包含第四 TCR 次單元(例如，CD3ε)的細胞內信號傳導結構域之視情況存在之細胞內信號傳導結構域；其中該第一、第二、第三及第四 TCR 次單元均係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群。在一些實施例中，該第二、第三及第四 TCR 次單元為相同的。在一些實施例中，該第一、第二、第三及第四 TCR 次單元為相同的。在一些實施例中，該第一、第二、第三及第四 TCR 次單元為不同的。在一些實施例中，該第二、第三及第四 TCR 次單元為相同的，但不同於該第一 TCR 次單元。在一些實施例中，該 TAC 樣嵌合受體包含：(a)細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原(例如，BCMA、CD19、CD20)之一或多種抗原決定基之抗原結合片段(例如，sdAb、scFv)；(b)視情況存在之第一連接體；(c)細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元(例如，TCRα)的細胞外結構域；(d)視情況存在之第二連接體；及(e)全長 CD3ε(排除信號肽)；其中該 TCR 次單元係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群。在一些實施例中，該 TAC 樣嵌合受體為單特異性。在一些實施例中，該 TAC 樣嵌合受體為多價的。在一些實施例中，該 TAC 樣嵌合受體為多特異性。在一些實施例中，該 Nef 蛋白包含 SEQ ID NO: 12-22 中任一者之胺基酸序列。在一些實施例中，該 Nef 蛋白為突變型 SIV Nef，其包含在以下中之任一者之胺基酸殘基處之一或多種突變：(i) aa 2-4、aa 8-10、aa 11-13、aa 38-40、aa 44-46、aa 47-49、aa 50-52、aa 53-55、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 110-112、aa 137-139、

aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、aa 178-179、179-181aa、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 191-193、aa 194-196、aa 203-205、aa 206-208、aa 212-214、aa 215-217、aa 218-220、aa 221-223、aa 8-13、aa 44-67、aa 107-112、aa 164-196、aa 203-208 或 aa 212-223；(ii) aa 2-4、aa 44-46、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 44-67、aa 164-169、aa 176-181、aa 185-190；(iii) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、178-179aa、aa 179-181、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67 或 aa 164-190；或(iv) aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67、aa 164-169、aa 176-181 或 aa 185-190；其中該胺基酸殘基位置對應於野生型 SIV Nef 之彼位置。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR、CD4 及 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 之細胞表面表現，但不下調 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD4 之細胞表面表現，但不下調 CD28 之細胞表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調 TCR 及 CD28 之細胞表面表現，但不下調 CD4 之細胞

表面表現。在一些實施例中，該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調內源 TCR 之細胞表面表現，但不下調(例如，下調細胞表面表現) TAC 樣嵌合受體。在一些實施例中，該功能性 TAC 樣嵌合受體由該 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)下調(例如，下調細胞表面表現)達至多約 50%、40%、30%、20%、10%或 5%中任一者。

VIII. 套組及製造物件

【0354】　進一步提供套組、單位劑量及製造物件，其包含表現本文所述之 Nef 蛋白(例如 wt Nef，或突變型 Nef，諸如突變型 SIV Nef)及/或功能性外源受體(諸如經工程改造 TCR (例如傳統經工程改造 TCR、嵌合 TCR (cTCR))、TAC、TAC 樣嵌合受體或 CAR (例如，基於抗體之 CAR、基於配位體/受體之 CAR 或 ACTR))的經修飾 T 細胞(例如，同種異體 T 細胞、內源 TCR 缺乏 T 細胞、GvHD 降至最低之 T 細胞)中任一者。在一些實施例中，提供一種套組，其含有本文所述之醫藥組合物中任一者且較佳地提供其使用說明書。

【0355】　本申請案之套組係在合適包裝中。合適包裝包括但不限於小瓶、瓶、罐、撓性包裝(例如，經密封 Mylar 或塑膠袋)及其類似包裝。套組可視情況提供額外組分，諸如緩衝液及解釋性資訊。因此，本申請案亦提供製造物件，其包括小瓶(諸如經密封小瓶)、瓶、罐、撓性包裝及其類似包裝。

【0356】　該製造物件可包含容器及在該容器上或與該容器相關聯之標籤或包裝插頁。合適容器包括例如瓶、小瓶、注射器等。該等容器可由多種材料，諸如玻璃或塑膠形成。一般而言，該容器容納有效用於治療如本文所述之疾病或病症(諸如癌症、自體免疫疾病或感染性疾病)或當治療疾病或病症時降低/預防 GvHD 或移植排斥之組合物，且可具有無菌存取埠(例如，該容器可為靜脈內溶液袋或具有可由皮下注射針刺穿之塞子的小瓶)。該標籤或包裝插頁指示該組合物用於治療個體之特定病狀。該標籤或包裝插頁將進一步包含關於投與該組合物至該

個體之說明書。該標籤可指示關於復原及/或使用之說明書。容納該醫藥組合物之容器可為多用途小瓶，其允許重複投與(例如，2-6 次投與)經復原調配物。包裝插頁係指治療產品之商業包裝中慣常包括的說明書，其含有關於適應症、用法、劑量、投與、禁忌症及/或有關該等治療產品的用途之警告之資訊。另外，該製造物件可進一步包含第二容器，該第二容器包含醫藥學上可接受之緩衝液，諸如抑菌性注射用水(BWFI)、磷酸鹽緩衝生理食鹽水、林格氏溶液(Ringer's solution)及右旋糖溶液。其可進一步包括自商業及使用者觀點來看可需要之其他材料，包括其他緩衝液、稀釋劑、過濾器、針及注射器。

【0357】　該等套組或製造物件可包括該醫藥組合物之多個單位劑量及使用說明書，以足以用於儲存及用於藥房(例如，醫院藥房及混配藥房)之量經包裝。

例示性實施例

【0358】　實施例 1. 一種產生經修飾 T 細胞之方法，該方法包括：將編碼 Nef 蛋白之第一核酸引入至前驅體 T 細胞中，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 T 細胞受體(TCR)之下調。

【0359】　實施例 2. 如實施例 1 之方法，其中該下調包含下調內源 TCR 之細胞表面表現。

【0360】　實施例 3. 如實施例 2 之方法，其中內源 TCR 之細胞表面表現經下調達至少約 50%。

【0361】　實施例 4. 如實施例 2 或 3 之方法，其中內源 TCR 之細胞表面表現經下調達至少約 60%。

【0362】　實施例 5. 如實施例 2 至 4 中任一者之方法，其中內源 TCR 之細胞表面表現經下調達至少約 70%。

【0363】　實施例 6. 如實施例 2 至 5 中任一者之方法，其中內源 TCR 之細胞表面表現經下調達至少約 80%。

【0364】　實施例 7. 如實施例 2 至 6 中任一者之方法，其中內源 TCR 之細胞表面表現經下調達至少約 90%。

【0365】　實施例 8. 如實施例 2 至 7 中任一者之方法，其中內源 TCR 之細胞表面表現經下調達至少約 95%。

【0366】　實施例 9. 如實施例 1 至 8 中任一者之方法，其中該經修飾 T 細胞包含未經修飾內源 TCR 基因座。

【0367】　實施例 10. 如實施例 1 至 8 中任一者之方法，其中該經修飾 T 細胞包含經修飾內源 TCR 基因座。

【0368】　實施例 11. 如實施例 10 之方法，其中該經修飾 T 細胞包含經修飾內源 TCRα 基因座。

【0369】　實施例 12. 如實施例 10 或 11 之方法，其中該內源 TCR 基因座藉由 CRISPR-Cas (成簇的規律間隔的短回文重複序列(CRISPR)-CRISPR 相關(Cas))系統修飾。

【0370】　實施例 13. 如實施例 12 之方法，其中該 CRISPR-Cas 系統包括包含核酸序列 SEQ ID NO: 23 之指導 RNA (gRNA)。

【0371】　實施例 14. 如實施例 1 至 13 中任一者之方法，其中該 Nef 蛋白係選自由 SIV Nef、HIV1 Nef 及 HIV2 Nef 組成之群。

【0372】　實施例 15. 如實施例 1 至 14 中任一者之方法，其中該 Nef 蛋白為野生型 Nef。

【0373】　實施例 16. 如實施例 15 之方法，其中該野生型 Nef 包含 SEQ ID NO: 12-17 中任一者之胺基酸序列。

【0374】　實施例 17. 如實施例 1 至 14 中任一者之方法，其中該 Nef 蛋白為突變型 Nef。

【0375】　實施例 18. 如實施例 17 之方法，其中該突變型 Nef 包含在肉豆蔻醯

化位點、N 端 α-螺旋、基於酪胺酸之 AP 募集、CD4 結合位點、酸性簇、基於脯胺酸之重複序列、PAK 結合結構域、COP I 募集結構域、基於二-白胺酸之 AP 募集結構域、V-ATP 酶及 Raf-1 結合結構域或其任何組合中之一或多種突變，或在表 11 中列出的任何胺基酸殘基處之一或多種突變。

【0376】　實施例 19. 如實施例 17 或 18 之方法，其中該突變包含插入、缺失、點突變及/或重排。

【0377】　實施例 20. 如實施例 17 至 19 中任一者之方法，其中該突變型 Nef 包含：

(i) SEQ ID NO: 18-22 中任一者之胺基酸序列；

(ii) 在以下中之任一者之胺基酸殘基處的一或多種突變：aa 2-4、aa 8-10、aa 11-13、aa 38-40、aa 44-46、aa 47-49、aa 50-52、aa 53-55、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 110-112、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、aa 178-179、179-181aa、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 191-193、aa 194-196、aa 203-205、aa 206-208、aa 212-214、aa 215-217、aa 218-220、aa 221-223、aa 8-13、aa 44-67、aa 107-112、aa 164-196、aa 203-208 或 aa 212-223，其中該胺基酸殘基位置對應於野生型 SIV Nef 之彼位置；

(iii) 在以下中之任一者之胺基酸殘基處的一或多種突變：aa 2-4、aa 44-46、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 44-67、aa 164-169、aa 176-181、aa 185-190，其中該胺基酸殘基位置對應於野生型 SIV Nef 之彼位置；

(iv) 在以下中之任一者之胺基酸殘基處的一或多種突變：aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-

169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、178-179aa、aa 179-181、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67 或 aa 164-190，其中該胺基酸殘基位置對應於野生型 SIV Nef 之彼位置；或

(v) 在以下中之任一者之胺基酸殘基處的一或多種突變：aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67、aa 164-169、aa 176-181 或 aa 185-190，其中該胺基酸殘基位置對應於野生型 SIV Nef 之彼位置。

【0378】　實施例 21. 如實施例 1 至 20 中任一者之方法，其中該前驅體 T 細胞包含編碼包含細胞外配位體結合結構域及視情況存在之細胞內信號傳導結構域之功能性外源受體之第二核酸。

【0379】　實施例 22. 如實施例 1 至 20 中任一者之方法，其進一步包括將編碼包含細胞外配位體結合結構域及視情況存在之細胞內信號傳導結構域之功能性外源受體之第二核酸引入至該前驅體 T 細胞中。

【0380】　實施例 23. 如實施例 22 之方法，其中該第一核酸及該第二核酸係依序引入至該 T 細胞中。

【0381】　實施例 24. 如實施例 22 之方法，其中該第一核酸及該第二核酸係同時引入至該 T 細胞中。

【0382】　實施例 25. 如實施例 24 之方法，其中該第一核酸及該第二核酸係在不同的載體上。

【0383】　實施例 26. 如實施例 24 之方法，其中該第一核酸及該第二核酸係在同一載體上。

【0384】　實施例 27. 如實施例 26 之方法，其中該第一核酸及該第二核酸可操作性連接至同一啟動子。

【0385】　實施例 28. 如實施例 27 之方法，其中該第一核酸係在該第二核酸上游。

【0386】　實施例 29. 如實施例 27 之方法，其中該第一核酸係在該第二核酸下游。

【0387】　實施例 30. 如實施例 26 至 29 中任一者之方法，其中該第一核酸及該第二核酸經由連接序列連接。

【0388】　實施例 31. 如實施例 30 之方法，其中該連接序列為編碼 P2A、T2A、E2A、F2A、BmCPV 2A、BmIFV 2A、$(GS)_n$、$(GSGGS)_n$、$(GGGS)_n$、$(GGGGS)_n$ 之核酸序列或 IRES、SV40、CMV、UBC、EF1α、PGK、CAGG 之核酸序列或其任何組合中任一者，其中 n 係至少為 1 之整數。

【0389】　實施例 32. 如實施例 25 至 31 中任一者之方法，其中該載體為病毒載體或非病毒載體。

【0390】　實施例 33. 如實施例 1 至 32 中任一者之方法，其中如與藉由自該前驅體 T 細胞之供體分離的原代 T 細胞引發之移植物抗宿主疾病(GvHD)反應相比，該經修飾 T 細胞在組織不相容性個體中不引發或引發降低之 GvHD 反應。

【0391】　實施例 34. 如實施例 1 至 33 中任一者之方法，其進一步包括分離或富集包含第一及/或第二核酸之 T 細胞。

【0392】　實施例 35. 如實施例 1 至 34 中任一者之方法，其進一步包括自表現該 Nef 蛋白之經修飾 T 細胞分離或富集 CD3ε 陰性 T 細胞。

【0393】　實施例 36. 如實施例 1 至 35 中任一者之方法，其進一步包括自表現該 Nef 蛋白之經修飾 T 細胞分離或富集內源 TCRα 陰性 T 細胞。

【0394】　實施例 37. 如實施例 1 至 36 中任一者之方法，其進一步包括用至少一種醫藥學上可接受之載劑調配表現該 Nef 蛋白之經修飾 T 細胞。

【0395】　實施例 38. 如實施例 1 至 37 中任一者之方法，其進一步包括向個體

投與有效量的表現該 Nef 蛋白之經修飾 T 細胞。

【0396】　實施例 39. 如實施例 38 之方法，其中該個體患有癌症。

【0397】　實施例 40. 如實施例 38 或 39 之方法，其中該個體為人類。

【0398】　實施例 41. 如實施例 21 至 40 中任一者之方法，其中該功能性外源受體為經工程改造 TCR。

【0399】　實施例 42. 如實施例 41 之方法，其中該經工程改造 TCR 為包含以下之嵌合 TCR (cTCR)：

(a) 細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原之一或多種抗原決定基之抗原結合片段；

(b) 視情況存在之連接體；

(c) 第一 TCR 次單元的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；

(d) 包含第二 TCR 次單元的跨膜結構域之跨膜結構域；及

(e) 包含第三 TCR 次單元的細胞內信號傳導結構域之細胞內信號傳導結構域；

其中該第一、第二及第三 TCR 次單元均係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群。

【0400】　實施例 43. 如實施例 42 之方法，其中該第一、第二及第三 TCR 次單元為相同的。

【0401】　實施例 44. 如實施例 42 之方法，其中該第一、第二及第三 TCR 次單元為不同的。

【0402】　實施例 45. 如實施例 21 至 40 中任一者之方法，其中該功能性外源受體為包含以下之 T 細胞抗原偶合物(TAC)：

(a) 細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原之一或多種抗原決定基之抗原結合片段；

(b) 視情況存在之第一連接體；

(c) 細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元的細胞外結構域；

(d) 視情況存在之第二連接體；

(e) 第一 TCR 輔受體的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；

(f) 包含第二 TCR 輔受體的跨膜結構域之跨膜結構域；及

(g) 包含第三 TCR 輔受體的細胞內信號傳導結構域之視情況存在之細胞內信號傳導結構域；

其中該 TCR 次單元係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群；且

其中該第一、第二及第三 TCR 輔受體係選自由 CD4、CD8 及 CD28 組成之群。

【0403】　實施例 46. 如實施例 45 之方法，其中該第一、第二及第三 TCR 輔受體為相同的。

【0404】　實施例 47. 如實施例 45 之方法，其中該第一、第二及第三 TCR 輔受體為不同的。

【0405】　實施例 48. 如實施例 21 至 40 中任一者之方法，其中該功能性外源受體為包含以下之 T 細胞抗原偶合物(TAC)樣嵌合受體：

(a) 細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原之一或多種抗原決定基之抗原結合片段；

(b) 視情況存在之第一連接體；

(c) 細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別第一 TCR 次單元的細胞外結構域；

(d) 視情況存在之第二連接體；

(e) 第二 TCR 次單元的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；

(f) 包含第三 TCR 次單元的跨膜結構域之跨膜結構域；及

(g) 包含第四 TCR 次單元的細胞內信號傳導結構域之視情況存在之細胞內信號傳導結構域；

其中該第一、第二、第三及第四 TCR 次單元均係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群。

【0406】　實施例 49. 如實施例 48 之方法，其中至少該第二、第三及第四 TCR 次單元為相同的。

【0407】　實施例 50. 如實施例 48 之方法，其中該第一、第二、第三及第四 TCR 次單元為不同的。

【0408】　實施例 51. 如實施例 21 至 40 中任一者之方法，其中該功能性外源受體為非 TCR 受體。

【0409】　實施例 52. 如實施例 51 之方法，其中該非 TCR 受體為嵌合抗原受體(CAR)。

【0410】　實施例 53. 如實施例 52 之方法，其中該 CAR 包括包含以下之多肽：

(a) 細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原之一或多種抗原決定基之抗原結合片段；

(b) 跨膜結構域；及

(c) 細胞內信號傳導結構域。

【0411】　實施例 54. 如實施例 52 之方法，其中該 CAR 為包含以下之抗體偶合 TCR (ACTR)：

(a) 細胞外配位體結合結構域，其包含作為 Fc 受體之抗原結合片段；

(b) 跨膜結構域；及

(c) 細胞內信號傳導結構域。

【0412】　實施例 55. 如實施例 42 至 53 中任一者之方法，其中該抗原結合片段係選自由駱駝 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、$(scFv)_2$、微型抗體、雙功能抗體、三功能抗體、四功能抗體、二硫化物穩定化 Fv 蛋白(dsFv)及單結構域抗體(sdAb、奈米抗體)組

成之群。

【0413】　實施例 56. 如實施例 55 之方法，其中該抗原結合片段為 sdAb 或 scFv。

【0414】　實施例 57. 如實施例 42 至 56 中任一者之方法，其中該細胞外配位體結合結構域為單價的。

【0415】　實施例 58. 如實施例 42 至 57 中任一者之方法，其中該細胞外配位體結合結構域為多價的。

【0416】　實施例 59. 如實施例 58 之方法，其中該細胞外配位體結合結構域為多特異性。

【0417】　實施例 60. 如實施例 42 至 53、55、56、58 及 59 中任一者之方法，其中該細胞外配位體結合結構域包含第一 sdAb 及第二 sdAb。

【0418】　實施例 61. 如實施例 42 至 53、55、56、58 及 59 中任一者之方法，其中該細胞外配位體結合結構域包含第一 scFv 及第二 scFv。

【0419】　實施例 62. 如實施例 42 至 53 及 55 至 61 中任一者之方法，其中該腫瘤抗原係選自由 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、醣脂 F77、PD-L1、PD-L2 及其任何組合組成之群。

【0420】　實施例 63. 如實施例 62 之方法，其中該腫瘤抗原為 BCMA、CD19 或 CD20。

【0421】　實施例 64. 如實施例 63 之方法，其中該細胞外配位體結合結構域包含特異性地識別 BCMA、CD19 或 CD20 之一或多種抗原決定基之一或多個 sdAb 或 scFv。

【0422】　實施例 65. 如實施例 53 至 64 中任一者之方法，其中該跨膜結構域係

源於選自由 T 細胞受體之 α、β 或 ζ 鏈、CD3ζ、CD3ε、CD4、CD5、CD8α、CD9、CD16、CD22、CD27、CD28、CD33、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137 (4-1BB)、CD152、CD154 及 PD-1 組成之群的分子。

【0423】　實施例 66. 如實施例 65 之方法，其中該跨膜結構域係源於 CD8α。

【0424】　實施例 67. 如實施例 42 至 66 中任一者之方法，其中該細胞內信號傳導結構域包含免疫效應子細胞之一級細胞內信號傳導結構域。

【0425】　實施例 68. 如實施例 67 之方法，其中該一級細胞內信號傳導結構域係源於 CD3ζ、CD3γ、CD3ε、CD3δ、FcRγ (FCER1G)、FcRβ (Fc ε RIb)、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD66d、Fc γ RIIa、DAP10 及 DAP12。

【0426】　實施例 69. 如實施例 68 之方法，其中該一級細胞內信號傳導結構域係源於 CD3ζ、CD3γ 或 DAP12。

【0427】　實施例 70. 如實施例 53 至 69 中任一者之方法，其中該細胞內信號傳導結構域包含共刺激信號傳導結構域。

【0428】　實施例 71. 如實施例 70 之方法，其中該共刺激信號傳導結構域係源於選自由 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 (淋巴球功能相關抗原-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、特異性地與 CD83 結合之配位體及其任何組合組成之群的共刺激分子。

【0429】　實施例 72. 如實施例 71 之方法，其中該共刺激信號傳導結構域包含

CD137 (4-1BB)之細胞質結構域。

【0430】　實施例 73. 如實施例 42 至 72 中任一者之方法，其進一步包含位於該細胞外配位體結合結構域之 C 端與該跨膜結構域之 N 端之間的鉸鏈結構域。

【0431】　實施例 74. 如實施例 73 之方法，其中該鉸鏈結構域係源於 CD8α。

【0432】　實施例 75. 如實施例 42 至 74 中任一者之方法，其進一步包含位於該功能性外源受體之 N 端處的信號肽。

【0433】　實施例 76. 如實施例 75 之方法，其中該信號肽係源於 CD8α。

【0434】　實施例 77. 如實施例 53 及 55 至 76 中任一者之方法，其中該 CAR 包含如下多肽，其自 N 端至 C 端包含：源於 CD8α 之信號肽、特異性地識別 BCMA 之一或多種抗原決定基之一或多個 sdAb、源於 CD8α 之鉸鏈結構域、源於 CD8α 之跨膜結構域、源於 CD137 (4-1BB)之共刺激信號傳導結構域及源於 CD3ζ 之一級細胞內信號傳導結構域。

【0435】　實施例 78. 一種藉由如實施例 1 至 77 中任一者之方法獲得之經修飾 T 細胞。

【0436】　實施例 79. 一種包含編碼 Nef 蛋白之第一核酸之經修飾 T 細胞，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 TCR 之下調。

【0437】　實施例 80. 如實施例 79 之經修飾 T 細胞，其中該下調包含下調內源 TCR 之細胞表面表現。

【0438】　實施例 81. 如實施例 80 之經修飾 T 細胞，其中內源 TCR 之細胞表面表現經下調達至少約 50%。

【0439】　實施例 82. 如實施例 80 或 81 之經修飾 T 細胞，其中內源 TCR 之細胞表面表現經下調達至少約 60%。

【0440】　實施例 83. 如實施例 80 至 82 中任一者之經修飾 T 細胞，其中內源 TCR 之細胞表面表現經下調達至少約 70%。

【0441】　實施例 84. 如實施例 80 至 83 中任一者之經修飾 T 細胞，其中內源 TCR 之細胞表面表現經下調達至少約 80%。

【0442】　實施例 85. 如實施例 80 至 84 中任一者之經修飾 T 細胞，其中內源 TCR 之細胞表面表現經下調達至少約 90%。

【0443】　實施例 86. 如實施例 80 至 85 中任一者之經修飾 T 細胞，其中內源 TCR 之細胞表面表現經下調達至少約 95%。

【0444】　實施例 87. 如實施例 79 至 86 中任一者之經修飾 T 細胞，其中該經修飾 T 細胞包含未經修飾內源 TCR 基因座。

【0445】　實施例 88. 如實施例 79 至 86 中任一者之經修飾 T 細胞，其中該經修飾 T 細胞包含經修飾內源 TCR 基因座。

【0446】　實施例 89. 如實施例 88 之經修飾 T 細胞，其中該經修飾 T 細胞包含經修飾內源 TCRα 基因座。

【0447】　實施例 90. 如實施例 88 或 89 之經修飾 T 細胞，其中該內源 TCR 基因座藉由 CRISPR-Cas 系統修飾。

【0448】　實施例 91. 如實施例 90 之經修飾 T 細胞，其中該 CRISPR-Cas 系統包括包含核酸序列 SEQ ID NO: 23 之 gRNA。

【0449】　實施例 92. 如實施例 79 至 91 中任一者之經修飾 T 細胞，其中該 Nef 蛋白係選自由 SIV Nef、HIV1 Nef 及 HIV2 Nef 組成之群。

【0450】　實施例 93. 如實施例 79 至 92 中任一者之經修飾 T 細胞，其中該 Nef 蛋白為野生型 Nef。

【0451】　實施例 94. 如實施例 93 之經修飾 T 細胞，其中該野生型 Nef 包含 SEQ ID NO: 12-17 中任一者之胺基酸序列。

【0452】　實施例 95. 如實施例 79 至 92 中任一者之經修飾 T 細胞，其中該 Nef 蛋白為突變型 Nef。

【0453】　實施例 96. 如實施例 95 之經修飾 T 細胞，其中該突變型 Nef 包含在肉豆蔻醯化位點、N 端 α-螺旋、基於酪胺酸之 AP 募集、CD4 結合位點、酸性簇、基於脯胺酸之重複序列、PAK 結合結構域、COP I 募集結構域、基於二-白胺酸之 AP 募集結構域、V-ATP 酶及 Raf-1 結合結構域或其任何組合中之一或多種突變，或在表 11 中列出的任何胺基酸殘基處之一或多種突變。

【0454】　實施例 97. 如實施例 95 或 96 之經修飾 T 細胞，其中該突變包含插入、缺失、點突變及/或重排。

【0455】　實施例 98. 如實施例 95 至 97 中任一者之經修飾 T 細胞，其中該突變型 Nef 包含：

(i) SEQ ID NO: 18-22 中任一者之胺基酸序列；

(ii) 在以下中之任一者之胺基酸殘基處的一或多種突變：aa 2-4、aa 8-10、aa 11-13、aa 38-40、aa 44-46、aa 47-49、aa 50-52、aa 53-55、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 110-112、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、aa 178-179、179-181aa、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 191-193、aa 194-196、aa 203-205、aa 206-208、aa 212-214、aa 215-217、aa 218-220、aa 221-223、aa 8-13、aa 44-67、aa 107-112、aa 164-196、aa 203-208 或 aa 212-223，其中該胺基酸殘基位置對應於野生型 SIV Nef 之彼位置；

(iii) 在以下中之任一者之胺基酸殘基處的一或多種突變：aa 2-4、aa 44-46、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 44-67、aa 164-169、aa 176-181、aa 185-190，其中該胺基酸殘基位置對應於野生型 SIV Nef 之彼位置；

(iv) 在以下中之任一者之胺基酸殘基處的一或多種突變：aa 2-4、aa 56-58、aa 59-

61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、178-179aa、aa 179-181、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67 或 aa 164-190，其中該胺基酸殘基位置對應於野生型 SIV Nef 之彼位置；或

(v) 在以下中之任一者之胺基酸殘基處的一或多種突變：aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67、aa 164-169、aa 176-181 或 aa 185-190，其中該胺基酸殘基位置對應於野生型 SIV Nef 之彼位置。

【0456】　實施例 99. 如實施例 79 至 98 中任一者之經修飾 T 細胞，其進一步包含編碼包含細胞外配位體結合結構域及視情況存在之細胞內信號傳導結構域之功能性外源受體之第二核酸。

【0457】　實施例 100. 如實施例 99 之經修飾 T 細胞，其中該第一核酸及該第二核酸係在不同的載體上。

【0458】　實施例 101. 如實施例 99 之經修飾 T 細胞，其中該第一核酸及該第二核酸係在同一載體上。

【0459】　實施例 102. 如實施例 101 之經修飾 T 細胞，其中該第一核酸及該第二核酸可操作性連接至同一啟動子。

【0460】　實施例 103. 如實施例 102 之經修飾 T 細胞，其中該第一核酸係在該第二核酸上游。

【0461】　實施例 104. 如實施例 102 之經修飾 T 細胞，其中該第一核酸係在該第二核酸下游。

【0462】　實施例 105. 如實施例 101 至 104 中任一者之經修飾 T 細胞，其中該第一核酸及該第二核酸經由連接序列連接。

【0463】　實施例 106. 如實施例 105 之經修飾 T 細胞，其中該連接序列為編碼 P2A、T2A、E2A、F2A、BmCPV 2A、BmIFV 2A、$(GS)_n$、$(GSGGS)_n$、$(GGGS)_n$、$(GGGGS)_n$ 之核酸序列或 IRES、SV40、CMV、UBC、EF1α、PGK、CAGG 之核酸序列或其任何組合中任一者，其中 n 係至少為 1 之整數。

【0464】　實施例 107. 如實施例 100 至 106 中任一者之經修飾 T 細胞，其中該載體為病毒載體。

【0465】　實施例 108. 如實施例 107 之經修飾 T 細胞，其中該病毒載體係選自由腺病毒載體、腺相關病毒載體、逆轉錄病毒載體及慢病毒載體組成之群。

【0466】　實施例 109. 如實施例 108 之經修飾 T 細胞，其中該病毒載體為慢病毒載體。

【0467】　實施例 110. 如實施例 79 至 109 中任一者之經修飾 T 細胞，其中如與藉由自產生該經修飾 T 細胞之該前驅體 T 細胞之供體分離的原代 T 細胞引發之 GvHD 反應相比，該經修飾 T 細胞在組織不相容性個體中不引發或引發降低之 GvHD 反應。

【0468】　實施例 111. 如實施例 99 至 110 中任一者之經修飾 T 細胞，其中該功能性外源受體為經工程改造 TCR。

【0469】　實施例 112. 如實施例 111 之方法，其中該經工程改造 TCR 為包含以下之嵌合 TCR (cTCR)：

(a) 細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原之一或多種抗原決定基之抗原結合片段；

(b) 視情況存在之連接體；

(c) 第一 TCR 次單元的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；

(d) 包含第二 TCR 次單元的跨膜結構域之跨膜結構域；及

(e) 包含第三 TCR 次單元的細胞內信號傳導結構域之細胞內信號傳導結構域；

其中該第一、第二及第三 TCR 次單元均係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群。

【0470】　實施例 113. 如實施例 112 之方法，其中該第一、第二及第三 TCR 次單元為相同的。

【0471】　實施例 114. 如實施例 112 之方法，其中該第一、第二及第三 TCR 次單元為不同的。

【0472】　實施例 115. 如實施例 99 至 110 中任一者之方法，其中該功能性外源受體為包含以下之 T 細胞抗原偶合物(TAC)：

(a) 細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原之一或多種抗原決定基之抗原結合片段；

(b) 視情況存在之第一連接體；

(c) 細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元的細胞外結構域；

(d) 視情況存在之第二連接體；

(e) 第一 TCR 輔受體的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；

(f) 包含第二 TCR 輔受體的跨膜結構域之跨膜結構域；及

(g) 包含第三 TCR 輔受體的細胞內信號傳導結構域之視情況存在之細胞內信號傳導結構域；

其中該 TCR 次單元係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群；且

其中該第一、第二及第三 TCR 輔受體係選自由 CD4、CD8 及 CD28 組成之群。

【0473】　實施例 116. 如實施例 115 之方法，其中該第一、第二及第三 TCR 輔受體為相同的。

【0474】　實施例 117. 如實施例 115 之方法，其中該第一、第二及第三 TCR 輔受體為不同的。

【0475】　實施例 118. 如實施例 99 至 110 中任一者之方法，其中該功能性外源受體為包含以下之 T 細胞抗原偶合物(TAC)樣嵌合受體：

(a) 細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原之一或多種抗原決定基之抗原結合片段；

(b) 視情況存在之第一連接體；

(c) 細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別第一 TCR 次單元的細胞外結構域；

(d) 視情況存在之第二連接體；

(e) 第二 TCR 次單元的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；

(f) 包含第三 TCR 次單元的跨膜結構域之跨膜結構域；及

(g) 包含第四 TCR 次單元的細胞內信號傳導結構域之視情況存在之細胞內信號傳導結構域；

其中該第一、第二、第三及第四 TCR 次單元均係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群。

【0476】　實施例 119. 如實施例 118 之方法，其中至少該第二、第三及第四 TCR 次單元為相同的。

【0477】　實施例 120. 如實施例 118 之方法，其中該第一、第二、第三及第四 TCR 次單元為不同的。

【0478】　實施例 121. 如實施例 99 至 110 中任一者之經修飾 T 細胞，其中該功能性外源受體為非 TCR 受體。

【0479】　實施例 122. 如實施例 121 之經修飾 T 細胞，其中該非 TCR 受體為 CAR。

【0480】　實施例 123. 如實施例 122 之經修飾 T 細胞，其中該 CAR 包括包含以下之多肽：

(a) 細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原之一或多種抗原決

定基之抗原結合片段；

(b) 跨膜結構域；及

(c) 細胞內信號傳導結構域。

【0481】　實施例 124. 如實施例 122 之方法，其中該 CAR 為包含以下之抗體偶合 TCR (ACTR)：

(a) 細胞外配位體結合結構域，其包含作為 Fc 受體之抗原結合片段；

(b) 跨膜結構域；及

(c) 細胞內信號傳導結構域。

【0482】　實施例 125. 如實施例 112 至 124 中任一者之經修飾 T 細胞，其中該抗原結合片段係選自由駱駝 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、$(scFv)_2$、微型抗體、雙功能抗體、三功能抗體、四功能抗體、二硫化物穩定化 Fv 蛋白(dsFv)及單結構域抗體(sdAb、奈米抗體)組成之群。

【0483】　實施例 126. 如實施例 125 之經修飾 T 細胞，其中該抗原結合片段為 sdAb 或 scFv。

【0484】　實施例 127. 如實施例 112 至 126 中任一者之經修飾 T 細胞，其中該細胞外配位體結合結構域為單價的。

【0485】　實施例 128. 如實施例 112 至 126 中任一者之經修飾 T 細胞，其中該細胞外配位體結合結構域為多價的。

【0486】　實施例 129. 如實施例 128 之經修飾 T 細胞，其中該細胞外配位體結合結構域為多特異性。

【0487】　實施例 130. 如實施例 128 或 129 之經修飾 T 細胞，其中該細胞外配位體結合結構域包含第一 sdAb 及第二 sdAb。

【0488】　實施例 131. 如實施例 128 或 129 之經修飾 T 細胞，其中該細胞外配

位體結合結構域包含第一 scFv 及第二 scFv。

【0489】　實施例 132. 如實施例 112 至 123 及 125 至 131 中任一者之經修飾 T 細胞，其中該腫瘤抗原係選自由 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、醣脂 F77、PD-L1、PD-L2 及其任何組合組成之群。

【0490】　實施例 133. 如實施例 132 之經修飾 T 細胞，其中該腫瘤抗原為 BCMA、CD19 或 CD20。

【0491】　實施例 134. 如實施例 133 之經修飾 T 細胞，其中該細胞外配位體結合結構域包含特異性地識別 BCMA 之一或多種抗原決定基之一或多個 sdAb。

【0492】　實施例 135. 如實施例 123 至 134 中任一者之經修飾 T 細胞，其中該跨膜結構域係源於選自由 T 細胞受體之 α、β 或 ζ 鏈、CD3ζ、CD3ε、CD4、CD5、CD8α、CD9、CD16、CD22、CD27、CD28、CD33、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137 (4-1BB)、CD152、CD154 及 PD-1 組成之群的分子。

【0493】　實施例 136. 如實施例 135 之經修飾 T 細胞，其中該跨膜結構域係源於 CD8α。

【0494】　實施例 137. 如實施例 112 至 136 中任一者之經修飾 T 細胞，其中該細胞內信號傳導結構域包含免疫效應子細胞之一級細胞內信號傳導結構域。

【0495】　實施例 138. 如實施例 137 之經修飾 T 細胞，其中該一級細胞內信號傳導結構域係源於 CD3ζ、CD3γ、CD3ε、CD3δ、FcRγ (FCER1G)、FcRβ (Fc ε RIb)、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD66d、Fc γ RIIa、DAP10 及 DAP12。

【0496】　實施例 139. 如實施例 138 之經修飾 T 細胞，其中該一級細胞內信號傳導結構域係源於 CD3ζ、CD3γ 或 DAP12。

【0497】　實施例 140. 如實施例 123 至 139 中任一者之經修飾 T 細胞，其中該細胞內信號傳導結構域包含共刺激信號傳導結構域。

【0498】　實施例 141. 如實施例 140 之經修飾 T 細胞，其中該共刺激信號傳導結構域係源於選自由 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 (淋巴球功能相關抗原-1)、NKG2C、CDS、GITR、BAFFR、NKp80 (KLRF1)、CD160、CD19、CD4、IPO-3、CD353 (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、特異性地與 CD83 結合之配位體及其任何組合組成之群的共刺激分子。

【0499】　實施例 142. 如實施例 141 之經修飾 T 細胞，其中該共刺激信號傳導結構域包含 CD137 (4-1BB)之細胞質結構域。

【0500】　實施例 143. 如實施例 112 至 142 中任一者之經修飾 T 細胞，其進一步包含位於該細胞外配位體結合結構域之 C 端與該跨膜結構域之 N 端之間的鉸鏈結構域。

【0501】　實施例 144. 如實施例 143 之經修飾 T 細胞，其中該鉸鏈結構域係源於 CD8α。

【0502】　實施例 144. 如實施例 112 至 144 中任一者之經修飾 T 細胞，其進一步包含位於該功能性外源受體之 N 端處的信號肽。

【0503】　實施例 145. 如實施例 144 之經修飾 T 細胞，其中該信號肽係源於 CD8α。

【0504】　實施例 146. 如實施例 123 及 125 至 145 中任一者之經修飾 T 細胞，

其中該 CAR 包含如下多肽，其自 N 端至 C 端包含：源於 CD8α 之信號肽、特異性地識別 BCMA 之一或多種抗原決定基之一或多個 sdAb、源於 CD8α 之鉸鏈結構域、源於 CD8α 之跨膜結構域、源於 CD137 (4-1BB)之共刺激信號傳導結構域及源於 CD3ζ 之一級細胞內信號傳導結構域。

【0505】　實施例 147. 一種醫藥組合物，其包含實施例 78 至 147 中任一者之經修飾 T 細胞及醫藥學上可接受之載劑。

【0506】　實施例 148. 一種治療個體之疾病之方法，其包括向該個體投與有效量的實施例 147 之醫藥組合物。

【0507】　實施例 149. 如實施例 148 之方法，其中該疾病為癌症。

【0508】　實施例 150. 如實施例 148 或 149 之方法，其中該個體與產生該經修飾 T 細胞之該前驅體 T 細胞之供體組織不相容。

【0509】　實施例 151. 如實施例 148 至 150 中任一者之方法，其中該個體為人類。

【0510】　實施例 152. 一種非天然存在之 Nef 蛋白，其包含在肉豆蔻醯化位點、N 端 α-螺旋、基於酪胺酸之 AP 募集、CD4 結合位點、酸性簇、基於脯胺酸之重複序列、PAK 結合結構域、COP I 募集結構域、基於二-白胺酸之 AP 募集結構域、V-ATP 酶及 Raf-1 結合結構域或其任何組合中之一或多種突變，或在表 11 中列出的任何胺基酸殘基處之一或多種突變。

【0511】　實施例 153. 如實施例 152 之非天然存在之 Nef 蛋白，其中該突變係選自插入、缺失、點突變及/或重排。

【0512】　實施例 154. 如實施例 152 或 153 之非天然存在之 Nef 蛋白，其中與野生型 Nef 蛋白相比，該非天然存在之 Nef 蛋白在 T 細胞中表現時對該 T 細胞中之內源 CD4 及/或 CD28 具有降低的下調影響。

【0513】　實施例 155. 如實施例 154 之非天然存在之 Nef 蛋白，其中該下調包

含下調該內源 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現。

【0514】　實施例 156. 如實施例 155 之非天然存在之 Nef 蛋白，其中內源 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現之該下調降低達至少約 50%。

【0515】　實施例 157. 如實施例 155 或 156 之非天然存在之 Nef 蛋白，其中內源 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現之該下調降低達至少約 60%。

【0516】　實施例 158. 如實施例 155 至 157 中任一者之非天然存在之 Nef 蛋白，其中內源 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現之該下調降低達至少約 70%。

【0517】　實施例 159. 如實施例 155 至 158 中任一者之非天然存在之 Nef 蛋白，其中內源 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現之該下調降低達至少約 80%。

【0518】　實施例 160. 如實施例 155 至 159 中任一者之非天然存在之 Nef 蛋白，其中內源 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現之該下調降低達至少約 90%。

【0519】　實施例 161. 如實施例 155 至 160 中任一者之非天然存在之 Nef 蛋白，其中內源 CD4 及/或 CD28 之細胞表面表現之該下調降低達至少約 95%。

【0520】　實施例 162. 如實施例 152 至 161 中任一者之非天然存在之 Nef 蛋白，其中該經分離 Nef 蛋白在 T 細胞中表現時導致該 T 細胞中的內源 TCR 之下調。

【0521】　實施例 163. 如實施例 162 之非天然存在之 Nef 蛋白，其中該下調包含下調該內源 TCR 之細胞表面表現。

【0522】　實施例 164. 如實施例 163 之非天然存在之 Nef 蛋白，其中內源 TCR 之細胞表面表現經下調達至少約 50%。

【0523】　實施例 165. 如實施例 163 或 164 之非天然存在之 Nef 蛋白，其中內源 TCR 之細胞表面表現經下調達至少約 60%。

【0524】　實施例 166. 如實施例 163 至 165 中任一者之非天然存在之 Nef 蛋白，其中內源 TCR 之細胞表面表現經下調達至少約 70%。

【0525】　實施例 167. 如實施例 163 至 166 中任一者之非天然存在之 Nef 蛋白，其中內源 TCR 之細胞表面表現經下調達至少約 80%。

【0526】　實施例 168. 如實施例 163 至 167 中任一者之非天然存在之 Nef 蛋白，其中內源 TCR 之細胞表面表現經下調達至少約 90%。

【0527】　實施例 169. 如實施例 163 至 168 中任一者之非天然存在之 Nef 蛋白，其中內源 TCR 之細胞表面表現經下調達至少約 95%。

【0528】　實施例 170. 如實施例 152 至 169 中任一者之非天然存在之 Nef 蛋白，其中該 Nef 蛋白係選自由 SIV Nef、HIV1 Nef 及 HIV2 Nef 組成之群。

【0529】　實施例 171. 如實施例 152 至 170 中任一者之非天然存在之 Nef 蛋白，其包含：

(i) SEQ ID NO: 18-22 中任一者之胺基酸序列；

(ii) 在以下中之任一者之胺基酸殘基處的一或多種突變：aa 2-4、aa 8-10、aa 11-13、aa 38-40、aa 44-46、aa 47-49、aa 50-52、aa 53-55、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 110-112、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、aa 178-179、179-181aa、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 191-193、aa 194-196、aa 203-205、aa 206-208、aa 212-214、aa 215-217、aa 218-220、aa 221-223、aa 8-13、aa 44-67、aa 107-112、aa 164-196、aa 203-208 或 aa 212-223，其中該胺基酸殘基位置對應於野生型 SIV Nef 之彼位置；

(iii) 在以下中之任一者之胺基酸殘基處的一或多種突變：aa 2-4、aa 44-46、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 44-67、aa 164-169、aa 176-181、aa 185-190，其中該胺基酸殘基位置對應於野生型 SIV Nef 之彼位置；

(iv) 在以下中之任一者之胺基酸殘基處的一或多種突變：aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、178-179aa、aa 179-181、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67 或 aa 164-190，其中該胺基酸殘基位置對應於野生型 SIV Nef 之彼位置；或

(v) 在以下中之任一者之胺基酸殘基處的一或多種突變：aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67、aa 164-169、aa 176-181 或 aa 185-190，其中該胺基酸殘基位置對應於野生型 SIV Nef 之彼位置。

【0530】 實施例 172. 一種包含編碼 Nef 蛋白之第一核酸之病毒載體。

【0531】 實施例 173. 如實施例 172 之病毒載體，其中該 Nef 蛋白係選自由 SIV Nef、HIV1 Nef 及 HIV2 Nef 組成之群。

【0532】 實施例 174. 如實施例 172 或 173 之病毒載體，其中該 Nef 蛋白為野生型 Nef。

【0533】 實施例 175. 如實施例 174 之病毒載體，其中該野生型 Nef 包含 SEQ ID NO: 12-17 中任一者之胺基酸序列。

【0534】 實施例 176. 如實施例 172 或 173 之病毒載體，其中該 Nef 蛋白為突變型 Nef。

【0535】 實施例 177. 如實施例 176 之病毒載體，其中該突變型 Nef 包含在肉豆蔻醯化位點、N 端 α-螺旋、基於酪胺酸之 AP 募集、CD4 結合位點、酸性簇、基於脯胺酸之重複序列、PAK 結合結構域、COP I 募集結構域、基於二-白胺酸之 AP 募集結構域、V-ATP 酶及 Raf-1 結合結構域或其任何組合中之一或多種突變，或在表 11 中列出的任何胺基酸殘基處之一或多種突變。

【0536】　實施例 178. 如實施例 176 或 177 之病毒載體，其中該突變包含插入、缺失、點突變及/或重排。

【0537】　實施例 179. 如實施例 176 至 178 中任一者之病毒載體，其中該突變型 Nef 包含：

(i) SEQ ID NO: 18-22 中任一者之胺基酸序列；

(ii) 在以下中之任一者之胺基酸殘基處的一或多種突變：aa 2-4、aa 8-10、aa 11-13、aa 38-40、aa 44-46、aa 47-49、aa 50-52、aa 53-55、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 110-112、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、aa 178-179、179-181aa、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 191-193、aa 194-196、aa 203-205、aa 206-208、aa 212-214、aa 215-217、aa 218-220、aa 221-223、aa 8-13、aa 44-67、aa 107-112、aa 164-196、aa 203-208 或 aa 212-223，其中該胺基酸殘基位置對應於野生型 SIV Nef 之彼位置；

(iii) 在以下中之任一者之胺基酸殘基處的一或多種突變：aa 2-4、aa 44-46、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 44-67、aa 164-169、aa 176-181、aa 185-190，其中該胺基酸殘基位置對應於野生型 SIV Nef 之彼位置；

(iv) 在以下中之任一者之胺基酸殘基處的一或多種突變：aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、178-179aa、aa 179-181、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67 或 aa 164-190，其中該胺基酸殘基位置對應於野生型 SIV Nef 之彼位置；或

(v) 在以下中之任一者之胺基酸殘基處的一或多種突變：aa 2-4、aa 56-58、aa 59-

61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67、aa 164-169、aa 176-181 或 aa 185-190，其中該胺基酸殘基位置對應於野生型 SIV Nef之彼位置。

【0538】　實施例 180. 如實施例 172 至 179 中任一者之病毒載體，其進一步包含編碼包含細胞外配位體結合結構域及視情況存在之細胞內信號傳導結構域之功能性外源受體之第二核酸。

【0539】　實施例 181. 如實施例 180 之病毒載體，其中該第一核酸及該第二核酸可操作性連接至同一啟動子。

【0540】　實施例 182. 如實施例 181 之病毒載體，其中該啟動子係選自由 EF-1 啟動子、CMV IE 基因啟動子、EF-la 啟動子、泛素 C 啟動子及磷酸甘油酸激酶(PGK)啟動子組成之群。

【0541】　實施例 183. 如實施例 181 或 182 之病毒載體，其中該第一核酸係在該第二核酸上游。

【0542】　實施例 184. 如實施例 181 或 182 之病毒載體，其中該第一核酸係在該第二核酸下游。

【0543】　實施例 185. 如實施例 180 至 184 中任一者之病毒載體，其中該第一核酸及該第二核酸經由連接序列連接。

【0544】　實施例 186. 如實施例 185 之病毒載體，其中該連接序列為編碼 P2A、T2A、E2A、F2A、BmCPV 2A、BmIFV 2A、$(GS)_n$、$(GSGGS)_n$、$(GGGS)_n$、$(GGGGS)_n$之核酸序列或 IRES、SV40、CMV、UBC、EF1α、PGK、CAGG 之核酸序列或其任何組合中任一者，其中 n 係至少為 1 之整數。

【0545】　實施例 187. 如實施例 172 至 186 中任一者之病毒載體，其中該病毒載體係選自由腺病毒載體、腺相關病毒載體、逆轉錄病毒載體及慢病毒載體組成

之群。

【0546】　實施例 188. 如實施例 187 之病毒載體，其中該病毒載體為慢病毒載體。

【0547】　實施例 189. 如實施例 180 至 188 中任一者之病毒載體，其中該功能性外源受體為經工程改造 TCR。

【0548】　實施例 190. 如實施例 189 之方法，其中該經工程改造 TCR 為包含以下之嵌合 TCR (cTCR)：

(a) 細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原之一或多種抗原決定基之抗原結合片段；

(b) 視情況存在之連接體；

(c) 第一 TCR 次單元的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；

(d) 包含第二 TCR 次單元的跨膜結構域之跨膜結構域；及

(e) 包含第三 TCR 次單元的細胞內信號傳導結構域之細胞內信號傳導結構域；

其中該第一、第二及第三 TCR 次單元均係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群。

【0549】　實施例 191. 如實施例 190 之方法，其中該第一、第二及第三 TCR 次單元為相同的。

【0550】　實施例 192. 如實施例 190 之方法，其中該第一、第二及第三 TCR 次單元為不同的。

【0551】　實施例 193. 如實施例 180 至 188 中任一者之方法，其中該功能性外源受體為包含以下之 T 細胞抗原偶合物(TAC)：

(a) 細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原之一或多種抗原決定基之抗原結合片段；

(b) 視情況存在之第一連接體；

(c) 細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元的細胞外結構域；

(d) 視情況存在之第二連接體；

(e) 第一 TCR 輔受體的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；

(f) 包含第二 TCR 輔受體的跨膜結構域之跨膜結構域；及

(g) 包含第三 TCR 輔受體的細胞內信號傳導結構域之視情況存在之細胞內信號傳導結構域；

其中該 TCR 次單元係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群；且

其中該第一、第二及第三 TCR 輔受體係選自由 CD4、CD8 及 CD28 組成之群。

【0552】　實施例 194. 如實施例 193 之方法，其中該第一、第二及第三 TCR 輔受體為相同的。

【0553】　實施例 195. 如實施例 193 之方法，其中該第一、第二及第三 TCR 輔受體為不同的。

【0554】　實施例 196. 如實施例 180 至 188 中任一者之方法，其中該功能性外源受體為包含以下之 T 細胞抗原偶合物(TAC)樣嵌合受體：

(a) 細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原之一或多種抗原決定基之抗原結合片段；

(b) 視情況存在之第一連接體；

(c) 細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別第一 TCR 次單元的細胞外結構域；

(d) 視情況存在之第二連接體；

(e) 第二 TCR 次單元的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；

(f) 包含第三 TCR 次單元的跨膜結構域之跨膜結構域；及

(g) 包含第四 TCR 次單元的細胞內信號傳導結構域之視情況存在之細胞內信號傳導結構域；

其中該第一、第二、第三及第四 TCR 次單元均係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群。

【0555】　實施例 197. 如實施例 196 之方法，其中至少該第二、第三及第四 TCR 次單元為相同的。

【0556】　實施例 198. 如實施例 196 之方法，其中該第一、第二、第三及第四 TCR 次單元為不同的。

【0557】　實施例 199. 如實施例 180 至 188 中任一者之病毒載體，其中該功能性外源受體為非 TCR 受體。

【0558】　實施例 200. 如實施例 199 之病毒載體，其中該非 TCR 受體為 CAR。

【0559】　實施例 201. 如實施例 200 之病毒載體，其中該 CAR 包括包含以下之多肽：

(a) 細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原之一或多種抗原決定基之抗原結合片段；

(b) 跨膜結構域；及

(c) 細胞內信號傳導結構域。

【0560】　實施例 202. 如實施例 200 之方法，其中該 CAR 為包含以下之抗體偶合 TCR (ACTR)：

(a) 細胞外配位體結合結構域，其包含作為 Fc 受體之抗原結合片段；

(b) 跨膜結構域；及

(c) 細胞內信號傳導結構域。

【0561】　實施例 203. 如實施例 190 至 201 中任一者之病毒載體，其中該抗原結合片段係選自由駱駝 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、$(scFv)_2$、微型抗體、雙功能抗體、三功能抗體、四功能抗體、二硫化物穩定化 Fv 蛋白(dsFv)及單結構域抗體(sdAb、

奈米抗體)組成之群。

【0562】　實施例 204. 如實施例 203 之病毒載體，其中該抗原結合片段為 sdAb 或 scFv。

【0563】　實施例 205. 如實施例 190 至 204 中任一者之病毒載體，其中該細胞外配位體結合結構域為單價的。

【0564】　實施例 206. 如實施例 190 至 204 中任一者之病毒載體，其中該細胞外配位體結合結構域為多價的。

【0565】　實施例 207. 如實施例 206 之病毒載體，其中該細胞外配位體結合結構域為多特異性。

【0566】　實施例 208. 如實施例 206 或 207 之病毒載體，其中該細胞外配位體結合結構域包含第一 sdAb 及第二 sdAb。

【0567】　實施例 209. 如實施例 206 或 207 之病毒載體，其中該細胞外配位體結合結構域包含第一 scFv 及第二 scFv。

【0568】　實施例 210. 如實施例 190 至 201 及 203 至 209 中任一者之病毒載體，其中該腫瘤抗原係選自由 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、醣脂 F77、PD-L1、PD-L2 及其任何組合組成之群。

【0569】　實施例 211. 如實施例 210 之病毒載體，其中該腫瘤抗原為 BCMA、CD19 或 CD20。

【0570】　實施例 212. 如實施例 211 之病毒載體，其中該細胞外配位體結合結構域包含特異性地識別 BCMA 之一或多種抗原決定基之一或多個 sdAb。

【0571】　實施例 213. 如實施例 211 之病毒載體，其中該細胞外配位體結合結

構域包含特異性地識別 CD19 或 CD20 之一或多種抗原決定基之一或多個 scFv。

【0572】　實施例 214. 如實施例 201 至 213 中任一者之病毒載體，其中該跨膜結構域係源於選自由 T 細胞受體之 α、β 或 ζ 鏈、CD3ζ、CD3ε、CD4、CD5、CD8α、CD9、CD16、CD22、CD27、CD28、CD33、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137 (4-1BB)、CD152、CD154 及 PD-1 組成之群的分子。

【0573】　194. 如實施例 193 之病毒載體，其中該跨膜結構域係源於 CD8α。

【0574】　實施例 215. 如實施例 190 至 214 中任一者之病毒載體，其中該細胞內信號傳導結構域包含免疫效應子細胞之一級細胞內信號傳導結構域。

【0575】　實施例 216. 如實施例 215 之病毒載體，其中該一級細胞內信號傳導結構域係源於 CD3ζ、CD3γ、CD3ε、CD3δ、FcRγ (FCER1G)、FcRβ (Fc ε RIb)、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD66d、Fc γ RIIa、DAP10 及 DAP12。

【0576】　實施例 217. 如實施例 216 之病毒載體，其中該一級細胞內信號傳導結構域係源於 CD3ζ、CD3γ 或 DAP12。

【0577】　實施例 218. 如實施例 201 至 217 中任一者之病毒載體，其中該細胞內信號傳導結構域包含共刺激信號傳導結構域。

【0578】　實施例 219. 如實施例 218 之病毒載體，其中該共刺激信號傳導結構域係源於選自由 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 (淋巴球功能相關抗原-1)、NKG2C、CDS、GITR、BAFFR、NKp80 (KLRF1)、CD160、CD19、CD4、IPO-3、CD353 (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、特異性地與 CD83 結合之配

位體及其任何組合組成之群的共刺激分子。

【0579】　實施例 220. 如實施例 219 之病毒載體，其中該共刺激信號傳導結構域包含 CD137 (4-1BB)之細胞質結構域。

【0580】　實施例 221. 如實施例 190 至 220 中任一者之病毒載體，其進一步包含位於該細胞外配位體結合結構域之 C 端與該跨膜結構域之 N 端之間的鉸鏈結構域。

【0581】　實施例 222. 如實施例 221 之病毒載體，其中該鉸鏈結構域係源於 CD8α。

【0582】　實施例 223. 如實施例 190 至 222 中任一者之病毒載體，其進一步包含位於該功能性外源受體之 N 端處的信號肽。

【0583】　實施例 224. 如實施例 23 之病毒載體，其中該信號肽係源於 CD8α。

【0584】　實施例 225. 如實施例 201 及 203 至 224 中任一者之病毒載體，其中該 CAR 包含如下多肽，其自 N 端至 C 端包含：源於 CD8α 之信號肽、特異性地識別 BCMA 之一或多種抗原決定基之一或多個 sdAb、源於 CD8α 之鉸鏈結構域、源於 CD8α 之跨膜結構域、源於 CD137 (4-1BB)之共刺激信號傳導結構域及源於 CD3ζ 之一級細胞內信號傳導結構域。

【0585】　實施例 226. 如實施例 201 及 203 至 225 中任一者之病毒載體，其自上游至下游包含：編碼該 Nef 蛋白之第一核酸、編碼 P2A、IRES 或 PGK 之第三核酸、視情況存在之編碼$(GGGS)_3$連接體之第四核酸及編碼包括包含特異性地識別 BCMA 之一或多種抗原決定基之一或多個 sdAb 的細胞外配位體結合結構域之 CAR 之第二核酸。

【0586】　實施例 227. 如實施例 201 及 203 至 225 中任一者之病毒載體，其自上游至下游包含：編碼包括包含特異性地識別 BCMA 之一或多種抗原決定基之一或多個 sdAb 的細胞外配位體結合結構域之 CAR 之第二核酸、編碼 P2A、IRES

或 PGK 之第三核酸、視情況存在之編碼$(GGGS)_3$連接體之第四核酸及編碼該 Nef 蛋白之第一核酸。

【0587】　實施例 228. 一種藉由將實施例 172 至 227 中任一者之病毒載體引入至前驅體 T 細胞中獲得之經修飾 T 細胞。

【0588】　實施例 229. 如實施例 228 之經修飾 T 細胞，其中如與藉由自產生該經修飾 T 細胞之該前驅體 T 細胞之供體分離的原代 T 細胞引發之 GvHD 反應相比，該經修飾 T 細胞在組織不相容性個體中不引發或引發降低之 GvHD 反應。

【0589】　實施例 230. 一種醫藥組合物，其包含實施例 228 或 229 之經修飾 T 細胞及醫藥學上可接受之載劑。

【0590】　實施例 231. 一種治療個體之疾病之方法，其包括向該個體投與有效量的實施例 230 之醫藥組合物。

【0591】　實施例 232. 如實施例 231 之方法，其中該疾病為癌症。

【0592】　實施例 233. 如實施例 231 或 232 之方法，其中該個體與產生該經修飾 T 細胞之該前驅體 T 細胞之供體組織不相容。

【0593】　實施例 234. 如實施例 231 至 233 中任一者之方法，其中該個體為人類。

實例

【0594】　以下實例及例示性實施例意欲僅例示本發明且因此不應被視為以任何方式限制本發明。以下實例及詳細描述作為說明而非作為限制提供。

實例 1. SIV Nef 抑制 TCR 介導之信號轉導

【0595】　此實例描述表現 SIV Nef 之例示性 T 細胞的設計及製備，及 SIV Nef 對 TCR 介導之信號轉導的效應。

1. SIV Nef-P2A-LNGFR 轉移質體及表現 SIV Nef-P2A-LNGFR 之 Jurkat 細胞株之構築

【0596】　pLVX-Puro 係基於 HIV-1 之慢病毒表現載體。為了構築 pLVX-hEF1α 載體，使用 *Cla*I 及 *EcoR*I 酶促消化 pLVX-Puro (Clontech)載體以移除剛好位於多選殖位點(MCS)上游之組成型活性人類細胞巨大病毒即刻早期啟動子($P_{CMV\ IE}$)，接著將人類 EF1α 啟動子(GenBank：J04617.1)選殖至該經消化載體中。接著，依序構築編碼 SIV Nef、P2A 及 LNGFR (低親和力神經生長因子受體)之融合基因。接著將該 SIV Nef-P2A-LNGFR 融合基因(SEQ ID NO: 24)選殖至 pLVX-hEF1α 質體中，產生重組 SIV Nef-P2A-LNGFR 轉移質體(下文中稱作「PLLV-M071」，縮寫為「M071」)。對 M071 重組轉移質體進行純化，按比例與包裝質體 psPAX2 及包膜質體 pMD2.G 混合，接著共轉導至 HEK 293T 細胞中。轉導後 60 h，收集病毒上清液，且在 4℃、3000 rpm 下離心持續 5 min。使用 0.45 μm 過濾器過濾該上清液，接著使用 500 KD 中空纖維膜切向流過濾進一步濃縮以獲得經濃縮慢病毒，將該等慢病毒儲存於-80℃下。

【0597】　將 Jurkat 細胞(純系 E6-1，ATCC® TIB-152™)在 90% RPMI 1640 培養基(Life Technologies, 編號 22400-089)、10%胎牛血清(FBS, Life Technologies, 編號 10099-141)及 1%青黴素-鏈黴素(Life Technologies, 編號 15140-122)中培養。將攜帶 SIV nef-P2A-LNGFR 融合基因之慢病毒添加至 Jurkat 細胞培養物之上清液中以用於轉導。使用 LNGFR 作為針對 SIV Nef+細胞之選擇標記物。轉導後 60 h，如下使用 Life Attune NxT FACS (FACS)使 5×10^5 個 Jurkat 細胞經受流式細胞術分析，LNGFR+細胞百分率為 66.1%。用 DPBS 使 1×10^7 個細胞之另一部分再懸浮，接著補充 20 μL MACSelect LNGFR MicroBeads (Miltenyi Biotec，編號 130-091-330)，且在冰上培育持續 15 min 以用於磁性標記。在培育之後，添加 PBE 緩衝液(磷酸鈉/EDTA)以調節體積至 500 μL。接著根據 MACS 套組方案(Miltenyi Biotec 套組，編號 130-091-330)使該細胞懸浮液經受磁性分離及富集，產生 94.3%表現 SIV Nef-P2A-LNGFR 之 LNGFR+ Jurkat 細胞株(圖 1A)。

FACS (螢光活化細胞分選儀)

【0598】　簡言之，將細胞懸浮液在室溫下以 1000 rpm/min 離心，且棄去上清液。用 DPBS 使細胞再懸浮，接著添加抗體且在 4℃下培育持續 30 min。在此實例中，所用抗體為 1 μL PerCP/Cy5.5 抗人類 CD271 NGFR 抗體(BioLegend®，編號 345111)。在培育之後，將細胞懸浮液在室溫下以 1000 rpm/min 離心，棄去上清液，接著用 1 mL DPBS 使細胞再懸浮。將離心且用 DPBS 再懸浮之步驟重複一次。接著，用 0.4 mL DPBS 使細胞再懸浮以用於 FACS。

MACS (磁性活化細胞分選)

【0599】　簡言之，將細胞懸浮液在室溫下以 1000 rpm/min 離心，棄去上清液。用 DPBS 使細胞再懸浮，接著補充 20 μL MACSelect LNGFR MicroBeads (Miltenyi Biotec，編號 130-091-330)，且在冰上培育持續 15 min 以用於磁性標記。在培育之後，添加 PBE 緩衝液(磷酸鈉/EDTA)以調節體積至 500 μL。接著根據 MACS 套組方案使該細胞懸浮液經受磁性分離及富集。

2. TCRα 剔除(KO)構築體及 TCRα 缺乏 Jurkat 細胞株之構築

【0600】　將靶向人類 *TRAC* (T 細胞受體 α 恆定；GenBank：NC_018925.2)之 gRNA 序列設計用於 CRISPR/Cas9 技術(SEQ ID NO: 23)，且次選殖至 lentiCRISPR v2 載體(Addgene 質體，編號 52961，含有嘌呤黴素可選擇標記物)中以構築 TCRα KO 重組質體。對 TCRα KO 重組質體進行純化，按比例與包裝質體 psPAX2 及包膜質體 pMD2.G 混合，接著共轉導至 HEK 293T 細胞中。轉導後 60 h，收集病毒上清液，且在 4℃、3000 rpm 下離心持續 5 min。使用 0.45 μm 過濾器過濾該上清液，接著使用 500 KD 中空纖維膜切向流過濾進一步濃縮以獲得經濃縮慢病毒，將該等慢病毒儲存於-80℃下。

【0601】　如上文培養 Jurkat 細胞(純系 E6-1，ATCC® TIB-152™)。將攜帶 TCRα KO 序列之慢病毒添加至 Jurkat 細胞培養物之上清液中以用於轉導。轉導後 72

h，添加嘌呤黴素，最終濃度為 1 μg/mL。每三天更換培養基且補充相同濃度之嘌呤黴素以進一步篩選單一細胞純系。

3. SIV Nef 抑制 TCR/CD3 介導之信號轉導

【0602】　為了測試 SIV Nef 過表現是否影響經由 TCR/CD3 實現之信號轉導，如上所述藉由 MACS 分離 LNGFR+ Jurkat 細胞、未經轉導 Jurkat 細胞(UnT)、TCRα KO Jurkat 細胞及經空載體轉導之 Jurkat 細胞，接著用植物血凝素(PHA，2 μg/mL)誘導用於 T 細胞活化。PHA 結合於糖基化表面蛋白(包括 TCR)上之糖，且由此使其交聯。此觸發了鈣依賴性信號傳導路徑，導致經活化 T 細胞之核因子(NFAT)活化。PHA 刺激之後 3 天，使用 FACS 針對 CD69+比率測試來自各 Jurkat 細胞類型之 5×10^5 個細胞。如上文實施 FACS，使用 1 μL PE 抗人類 CD69 抗體(BioLegend®，編號 310906)。

【0603】　如圖 1B (圖之左側 2 欄)所示，在 PHA 刺激之後，CD69 陽性比率就未經轉導 Jurkat 細胞而言為 41.1%，就 TCRα KO Jurkat 細胞而言為 1.09%，就表現空載體之 Jurkat 細胞而言為 60.1%，且就 M071 (SIV Nef-P2A-LNGFR) LNGFR+富集之 Jurkat 細胞而言為 7.05%。此等結果證明了 TCR 介導之 T 細胞活化在 SIV Nef 過表現時受到顯著抑制($P<0.05$)。

4. SIV Nef 不抑制 TCR/CD3 複合物下游之信號轉導

【0604】　為了測試 SIV Nef 過表現是否影響 TCR/CD3 下游之信號轉導，用 PMA (佛波醇 12-肉豆蔻酸 13-乙酸酯，10 ng/mL)及 ION (離子黴素，250 ng/mL)之混合物誘導 Jurkat 細胞株，接著用 FACS 測試 T-細胞活化標記物 CD69 之表現(參見上文方法)。PMA 為蛋白激酶 C (PKC)之特異性活化劑且因此為 NF-κB 之特異性活化劑。ION 係促進 Ca^{2+}轉移至細胞中及自細胞轉移出之膜可滲透鈣離子載體，且可用於增加細胞內鈣水準。PMA 及 ION 之組合避開信號轉導裝置且活化轉錄因子 NF-κB 及 NFAT，引起 T-細胞活化。如圖 1B (參見圖之右側兩

欄)所證明，在 PMA/ION 刺激時，未經轉導 Jurkat 細胞(UnT)、TCRα KO Jurkat 細胞、表現空載體之 Jurkat 細胞及 M071 LNGFR+富集之 Jurkat 細胞之 CD69+比率分別為 96.7%、97.1%、98.5%及 87.4%。此等結果證明了下游核內信號轉導在 SIV Nef 過表現時未受到顯著影響。

【0605】　總而言之，上述結果證明了 Nef 顯著抑制 TCR 介導之上游 T-細胞活化，但不影響 TCR 下游之核內信號轉導。

實例 2. SIV Nef 下調 T 細胞表面上之 TCR/CD3 複合物表現

【0606】　獲得 5×10^5 個如實例 1 所述之未經轉導 Jurkat 細胞(UnT)、TCRα KO Jurkat 細胞、表現空載體之 Jurkat 細胞及 M071 LNGFR+富集之 Jurkat 細胞且使其經受 FACS 以用於 CD3ε 及 TCRαβ 陽性比率檢查。如實例 1 中實施 FACS。使用 1 μL PE/Cy7 抗人類 CD3 抗體(BioLegend®，編號 300316)或 1 μL PE/Cy5 抗人類 TCR α/β 抗體(BioLegend®，編號 306710)進行 FACS。

【0607】　作為單獨實驗，收集 1×10^6 個如實例 1 所述之未經轉導 Jurkat 細胞(UnT)、TCRα KO Jurkat 細胞、表現空載體之 Jurkat 細胞及 M071 LNGFR+富集之 Jurkat 細胞，在室溫下以 1000 rpm/min 離心，棄去上清液。用 DPBS 使細胞再懸浮，添加 100 μL 免疫染色固定溶液(Beyotime，編號 P0098)以在室溫下固定持續 20 min。接著將細胞懸浮液在室溫下以 1500 rpm/min 離心，棄去上清液。用 200 μL DPBS+Triton X-100 (0.1%)使細胞再懸浮，在室溫下持續 20 min。接著添加 1 μL FITC 結合之 CD3ζ/CD247 抗體(Life Technologies，編號 A15754)且將細胞懸浮液在室溫下培育持續 15 min。在培育之後，將細胞懸浮液在室溫下以 1500 rpm/min 離心，棄去上清液，接著用 1 mL DPBS 使細胞再懸浮。將離心且用 DPBS 再懸浮之步驟重複一次。接著，用 0.4 mL DPBS 使細胞再懸浮以用於 FACS，從而進行 CD3ζ 陽性比率檢查。

【0608】　如圖 2 所示，具有高 CD3ε 表現之 Jurkat 細胞及表現 TCRαβ 之細胞

在 SIV Nef 表現時顯著降低。比較 M071 LNGFR+富集之 Jurkat 細胞之 CD3ε+比率(15.6%)及 TCRαβ+比率(15.3%)與未經轉導(UnT) Jurkat 細胞之彼等比率(分別為 85.9%及 90.0%)。M071 LNGFR+富集之 Jurkat 細胞之 CD3ζ+比率為 93.2%，其未顯著不同於未經轉導 Jurkat 細胞之彼比率(95.6%)。作為對照，如與未經轉導(UnT) Jurkat 細胞中之彼影響相比，空載體表現未影響 CD3ε、TCRαβ 及 CD3ζ 之 Jurkat 細胞表現。

【0609】 此等結果證明了 SIV Nef 過表現顯著下調 TCR/CD3 複合物之 T 細胞表面表現(而 CD3ζ 表現未受影響)，此又影響 TCR 介導之 T 細胞活化。

實例 3. SIV Nef 同系物 HIV1 Nef 及 HIV2 Nef 抑制 TCR/CD3 介導之信號轉導

1. HIV1 Nef/HIV2 Nef-T2A-Puro 轉移質體及細胞株之構築

【0610】 基於 UniProt 資料庫分析，HIV1 Nef 及 HIV2 Nef 作為 SIV Nef 同系物經收錄。構築融合基因 HIV1 nef-T2A-Puro (SEQ ID NO: 25)及 HIV2 nef-T2A-Puro (SEQ ID NO: 26)，且選殖至 pLVX-hEF1α 表現載體(如實例 1 中經構築)中以分別形成重組轉移質體 HIV1 Nef-T2A-Puro (下文中稱作「HIV1」轉移質體)及 HIV2 Nef-T2A-Puro (下文中稱作「HIV2」轉移質體)。對 HIV1 轉移質體進行純化，按比例與包裝質體 psPAX2 及包膜質體 pMD2.G 混合，接著共轉導至 HEK 293T 細胞中。對 HIV2 轉移質體進行純化且用 psPAX2 及 pMD2.G 質體同樣轉導至 HEK 293T 細胞中。轉導後 60 h，收集病毒上清液，且在 4℃、3000 rpm 下離心持續 5 min。使用 0.45 μm 過濾器過濾該上清液，接著使用 500 KD 中空纖維膜切向流過濾進一步濃縮以獲得經濃縮慢病毒，將該等慢病毒儲存於-80℃下。

【0611】 如實例 1 中培養 Jurkat 細胞(純系 E6-1，ATCC® TIB-152™)。將攜帶 HIV1 Nef-T2A-Puro 或 HIV2 Nef-T2A-Puro 融合序列之慢病毒添加至 Jurkat 細胞培養物之上清液中以用於轉導。使用嘌呤黴素作為針對 HIV1/HIV2 Nef+細胞之可選擇標記物。轉導後 72 h，添加嘌呤黴素，最終濃度為 1 μg/mL。每三天更換

培養基且補充相同濃度之嘌呤黴素以進一步篩選單一細胞純系。

2. HIV1 Nef/HIV2 Nef 下調 T 細胞表面上之 TCR/CD3 複合物表現

【0612】　使 5×10^5 個如實例 1 所述之 HIV1 Nef+ Jurkat 細胞、HIV2 Nef+ Jurkat 細胞、未經轉導 Jurkat 細胞(UnT)、TCRα KO Jurkat 細胞、表現空載體之 Jurkat 細胞、M071 LNGFR+富集之 Jurkat 細胞經受 FACS 以用於 CD3ε 及 TCRαβ 陽性比率檢查。如實例 1 中實施 FACS，使用 1 μL PE/Cy7 抗人類 CD3 抗體(BioLegend®，編號 300316)或 1 μL PE/Cy5 抗人類 TCR α/β 抗體(BioLegend®，編號 306710)進行 FACS。作為單獨實驗，收集 1×10^6 個如實例 1 所述之 HIV1 Nef+ Jurkat 細胞、HIV2 Nef+ Jurkat 細胞、未經轉導(UnT) Jurkat 細胞、TCRα KO Jurkat 細胞、表現空載體之 Jurkat 細胞及 M071 LNGFR+富集之 Jurkat 細胞，固定，且如實例 2 中使其經受 FACS 以用於 CD3ζ 陽性比率檢查。使用 1 μL FITC 結合之 CD3ζ/CD247 抗體(Life Technologies，編號 A15754)進行 FACS。

【0613】　如圖 3 所示，M071 LNGFR+富集之 Jurkat 細胞、HIV1 Nef+ Jurkat 細胞及 HIV2 Nef+ Jurkat 細胞之 TCRαβ+比率分別為 16.1%、15.1%及 26.2%，其顯著低於表現空載體之 Jurkat 細胞之彼比率(96.5%；$P<0.05$)。M071 LNGFR+富集之 Jurkat 細胞、HIV1 Nef+ Jurkat 細胞及 HIV2 Nef+ Jurkat 細胞之 CD3ε+比率分別為 19.4%、18.1%及 30.6%，其顯著低於表現空載體之 Jurkat 細胞之彼比率(98.2%；$P<0.05$)。TCRα KO Jurkat 細胞充當陽性對照，其顯示顯著減少之 TCRα+及 CD3ε+比率。另一方面，M071 LNGFR+富集之 Jurkat 細胞、HIV1 Nef+ Jurkat 細胞及 HIV2 Nef+ Jurkat 細胞之 CD3ζ+比率分別為 99.0%、94.3%及 95.0%，其未顯著不同於未經轉導(UnT) Jurkat 細胞或表現空載體之 Jurkat 細胞之彼比率(分別為 98.0%及 99.7%；$P>0.05$)。

【0614】　此等結果證明了 SIV Nef 同系物 HIV1 Nef 及 HIV2 Nef 之過表現可有效地下調 TCR/CD3 之細胞表面表現(而 CD3ζ 表現未受影響)，此又抑制

TCR/CD3 介導之 T 細胞活化。HIV1 Nef 及 HIV2 Nef 之抑制效率可與 SIV Nef 之彼效率相當。

實例 4. SIV Nef 抑制 TCR 介導之標靶細胞之細胞溶解

1. 抗 BCMA CAR 及抗 BCMA CAR-LNGFR 轉移質體之構築

【0615】　如 WO2017025038 及 WO2018028647 實例所述構築抗 BCMA CAR (下文中稱作「BCMA CAR」)。WO2018028647 之完整內容(包括本文所述之所有 BCMA CAR 構築體的序列)特定地以引用之方式併入本文中。

【0616】　簡言之，以化學方式合成編碼自 N 端至 C 端包含以下之 CAR 骨架多肽之核酸序列：CD8α 鉸鏈結構域(「CD8α 鉸鏈」)、CD8 跨膜結構域(「CD8 TM」)、CD28 細胞質結構域(「CD28 cyto」)及/或 4-1BB (CD137)細胞質結構域(「4-1BB cyto」)及 CD3ζ 細胞質結構域(「CD3ζ」)，且將其選殖至下游經預修飾之慢病毒載體中且可操作性連接至組成型 hEF1α 啟動子(如實例 1 中構築之 pLVX-hEF1α)。

【0617】　為了構築攜帶融合序列 BCMA CAR-P2A-LNGFR 之 BCMA CAR-P2A-LNGFR 轉移質體，直接地藉由 Genscript 構築 BCMA CAR-P2A-LNGFR 基因。

【0618】　對 *BCMA CAR-P2A-LNGFR* 轉移質體進行純化，將其按比例與包裝質體 psPAX2 及包膜質體 pMD2.G 混合，接著共轉導至 HEK 293T 細胞中。轉導後 60 h，收集病毒上清液，且在 4℃、3000 rpm 下離心持續 5 min。使用 0.45 μm 過濾器過濾該上清液，接著使用 500 KD 中空纖維膜切向流過濾進行進一步濃縮以獲得經濃縮慢病毒，將該等慢病毒儲存於-80℃下。

2. SIV Nef 及抗 BCMA CAR 共表現之測試

【0619】　使用常規聚乙烯亞胺(PEI)轉導方案將 BCMA CAR 及 SIV Nef-P2A-LNGFR 質體共轉染至 HEK 293T 細胞中。轉染後 3 天，用 FACS 檢查 5×10^5 個

細胞之 BCMA CAR+及 LNGFR+表現。如實例 1 所述實施 FACS。將 1 μL FITC 標記之人類 BCMA/TNFRSF17 蛋白 Fc Tag (ACROBiosystems 編號 BCA-HF254) 及 1 μL PerCP/Cy5.5 抗人類 CD271 NGFR 抗體(BioLegend®，編號 345111)混合且用於 FACS。

【0620】 如圖 4A 所示，共轉染至 HEK 293T 細胞中之 BCMA CAR 及 SIV Nef-P2A-LNGFR 質體產生 17.3% BCMA CAR+/LNGFR+雙重陽性細胞。這指示 BCMA CAR 在 SIV Nef之過表現時可能仍有效地表現於細胞表面上。

3. SIV Nef 顯著抑制原代 T 淋巴球中之 TCR 細胞表面表現

【0621】 自志願者抽取 50 mL 外周血。經由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，編號 130-096-535)磁性標記 PBMC 且分離且純化 T 淋巴球。人類 T 細胞活化/擴增套組(Miltenyi Biotec，編號 130-091-441)用於經純化 T 淋巴球之活化及擴增。收集經活化 T 淋巴球且再懸浮於 RPMI 1640 培養基(Thermo Fisher SCIENTIFIC，編號 22400-089)中。活化之後 3 天，5×10^6 個經活化 T 淋巴球用編碼 SIV Nef-P2A-LNGFR 之慢病毒及編碼 BCMA CAR-P2A-LNGFR 之慢病毒共轉導。T 細胞懸浮液添加至 6 孔板中，且在 37℃、5% CO_2 培育器中培育隔夜。轉導後 5 天，收集 1×10^7 個 T 細胞且使用 MACS (如實例 1 所述，使用 MACSelect LNGFR MicroBeads (Miltenyi Biotec，編號 130-091-330))進行分離以獲得 LNGFR+ T 細胞。使經分選 LNGFR+ T 細胞擴增且富集持續 2 天，接著藉由 FACS 測試 5×10^5 個 LNGFR+ T 細胞之 TCRαβ 陽性比率。如實例 1 中執行 FACS，使用 1 μL PE/Cy5 抗人類 TCR α/β 抗體 (BioLegend®，編號 306710)。

【0622】 如圖 4B 所示 ,用編碼 BCMA CAR-P2A-LNGFR 之慢病毒及編碼 SIV Nef-P2A-LNGFR 之慢病毒共轉導 T 細胞導致 LNGFR+ T 細胞群體中之 35.8% TCRαβ-細胞。這指示 BCMA CAR-P2A-LNGFR 及 SIV Nef-P2A-LNGFR 共轉導

可能有效地產生 TCRαβ 陰性 CAR-T 細胞。

4. 分選且富集 TCR/CD3 缺失之 T 淋巴球

【0623】　使用編碼 BCMA CAR-P2A-LNGFR 之慢病毒及編碼 SIV Nef-P2A-LNGFR 之慢病毒共轉導 5×10^7 個原代 T 淋巴球。轉導後 5 天，使用全 T 細胞分離套組(Miltenyi Biotec，編號 130-096-535)根據套組方案磁性標記細胞，且分離且純化 CD3ε 陰性 T 淋巴球。使經分選 CD3ε 陰性 T 細胞擴增且富集持續 2 天，接著收集 5×10^5 個細胞(用於各 FACS 實驗)且藉由 FACS 檢查 CD3ε 陰性 T 細胞群體內之 TCRαβ、CD3ε 及 LNGFR 陽性比率。如實例 1 中實施 FACS，使用 1 μL PE/Cy5 抗人類 TCR α/β 抗體(BioLegend®，編號 306710)進行 TCRαβ+測試，使用 1 μL PE/Cy7 抗人類 CD3 抗體(BioLegend®，編號 300316)進行 CD3ε+測試，且使用 1 μL PerCP/Cy5.5 抗人類 CD271 NGFR 抗體(BioLegend®，編號 345111)進行 LNGFR+測試。

【0624】　如圖 4C 所示，關於經編碼 BCMA CAR-P2A-LNGFR 之慢病毒及編碼 SIV Nef-P2A-LNGFR 之慢病毒共轉導的經 MACS 分選 CD3ε 陰性 T 細胞群體，TCRαβ+比率為 5.35%，CD3ε+比率為 2.27%，且 LNGFR+比率為 88.5% (參見「MACS CD3 陰性組」)；而關於經 MACS 分選之未經轉導(UnT) T 細胞，TCRαβ+比率為 80.9%，CD3ε+比率為 91.9%，且 LNGFR+比率僅為 1.25%。這指示藉由 MACS 實現之 CD3ε 陰性細胞分選可能進一步分離且富集 TCR 陰性原代 T 淋巴球。

5. 在 TCR/CD3 耗盡之 T 淋巴球中 TCR 介導之針對標靶細胞之細胞溶解活性顯著降低

【0625】　將獲自上述步驟之經編碼 BCMA CAR-P2A-LNGFR 之慢病毒及編碼 SIV Nef-P2A-LNGFR 之慢病毒共轉導的經分選 CD3ε 陰性 T 細胞之不同群以 20: 1 或 10: 1 之效應子: 標靶(E: T)細胞比率與多發性骨髓瘤(MM)細胞株 RPMI-8226

(BCMA+，具有螢光素酶(Luc)標記物)或慢性骨髓性白血病(CML)細胞株 K562 (BCMA-，具有 Luc 標記物)混合，且在 Corning® 384 孔實心白板中培育持續 12 h。使用 ONE-Glo™螢光素酶分析系統(Promega，編號 E6120)來量測螢光素酶產生。將 25 μL ONE-Glo™試劑添加至該 384 孔板之各孔中，培育，接著置於 Spark™ 10M 多模式微板讀取器(TECAN)上用於螢光素酶量測，以便計算不同 T 淋巴球對標靶細胞之細胞溶解效應。

【0626】 進一步研究 CAR+/CD3ε- T 細胞對 RPMI-8226 及 K562 細胞株之特異性及非特異性細胞溶解效應。如圖 4D 所示，無論 TCR 表現水準(CD3ε+/TCRαβ+，「TCR 陽性」，或 CD3ε-/TCRαβ-，「TCR 陰性」)如何，經富集之表現 BCMA CAR-P2A-LNGFR 及 SIV Nef-P2A-LNGFR 之 CD3ε 陰性 T 細胞均有效地介導 RPMI-8226 細胞(BCMA+)上的抗 BCMA CAR 特異性腫瘤細胞殺死，其中溶解率高於 90%，顯著高於未經轉導 T 細胞(「UnT」；$P<0.05$)中之彼溶解率。另一方面，經富集之表現 BCMA CAR-P2A-LNGFR 及 SIV Nef-P2A-LNGFR 之 CD3ε 陰性 T 細胞在 K562 細胞株(BCMA-)中誘導 TCR 介導之非特異性腫瘤細胞殺死，乃因表現 TCRαβ 之細胞(CD3ε+/TCRαβ+)具有高於未表現 TCRαβ 之細胞(CD3ε-/TCRαβ-)的細胞溶解，且該細胞溶解效應可與未經轉導 T 細胞(UnT；$P>0.05$)中之彼細胞溶解效應相當。未與原代 T 細胞一起培育之經 Luc 標記細胞充當陰性對照(NC)。0.25% Triton X-100 化學溶解群充當陽性對照(PC)。較高 E: T 比率導致 RPMI-8226 及 K562 細胞株兩者上之較多細胞殺死，這可能歸因於慢病毒介導之腫瘤細胞殺死。此等結果指示 SIV Nef 之表現有效地抑制 TCRαβ 介導之 T 細胞活化，導致降低的 TCR 介導之對標靶細胞之細胞溶解效應。

實例 5. 以一個步驟獲得 TCR/CD3 耗盡之 CAR-T 細胞

1. SIV Nef+CAR 多合一載體及 Jurkat 細胞株之構築

【0627】　以化學方式合成融合基因序列 BCMA CAR-P2A-LNGFR-SIV Nef、BCMA CAR-P2A-SIV Nef、BCMA CAR-P2A-(GGGS)3-SIV Nef、SIV Nef-P2A-BCMA CAR、SIV Nef-IRES-CAR、CAR-IRES-SIV Nef、CAR-PGK-SIV Nef 及 SIV Nef-PGK-CAR，且將其選殖至 pLVX-hEF1α 載體(參見實例 1)中以用於構築重組轉移質體 BCMA CAR-P2A-LNGFR-SIV Nef(「PLLV-M072」或「M072」)、BCMA CAR-P2A-SIV Nef(「PLLV-M086」或「M086」)、BCMA CAR-P2A-$(GGGS)_3$-SIV Nef(「PLLV-M090」或「M090」)、SIV Nef-P2A-BCMA CAR(「PLLV-M091」或「M091」)、SIV Nef-IRES-BCMA CAR(「PLLV-M126」或「M126」)、BCMA CAR-IRES-SIV Nef(「PLLV-M159」或「M159」)、BCMA CAR-PGK-SIV Nef(「PLLV-M160」或「M160」)及 SIV Nef-PGK-BCMA CAR(「PLLV-M161」或「M161」)。對該等轉移質體進行純化，按比例與包裝質體 psPAX2 及包膜質體 pMD2.G 混合，接著共轉導至 HEK 293T 細胞中。轉導後 60 h，收集病毒上清液，且在 4℃、3000 rpm 下離心持續 5 min。使用 0.45 μm 過濾器過濾該上清液，接著使用 500 KD 中空纖維膜切向流過濾進一步濃縮以獲得經濃縮慢病毒，將該等慢病毒儲存於-80℃下。

2. 以一個步驟獲得 TCR/CD3 耗盡之 CAR-T 細胞

【0628】　將攜帶 BCMA CAR-P2A-LNGFR-SIV Nef、BCMA CAR-P2A-SIV Nef、BCMA CAR-P2A-$(GGGS)_3$-SIV Nef、SIV Nef-P2A-BCMA CAR、SIV Nef-IRES-BCMA CAR、BCMA CAR-IRES-SIV Nef、BCMA CAR-PGK-SIV Nef 及 SIV Nef-PGK-BCMA CAR 序列之慢病毒分別添加至經培養 Jurkat 細胞懸浮液中以用於轉導。慢病毒 SIV Nef-P2A-LNGFR (M071)用作非 CAR 編碼對照。未經轉導 Jurkat 細胞(「UnT」)用作陰性對照。轉導後 72 h，收集含有 5×10^5 個細胞之懸浮液且準備如實例 1 所述進行 FACS 以檢查 CD3ε、TCRαβ 及 BCMA CAR 之陽性比率。使用 1 μL PE/Cy7 抗人類 CD3 抗體(BioLegend®，編號 300316)、1 μL

PE/Cy5 抗人類 TCR α/β 抗體(BioLegend®，編號 306710)或 1 μL FITC 標記之人類 BCMA / TNFRSF17 蛋白 Fc Tag (ACROBiosystems，編號 BCA-HF254)進行 FACS。

【0629】 如自圖 5A-5C 可見，SIV Nef-P2A-CAR (M091)、SIV Nef-IRES-CAR (M126)、CAR-IRES-SIV Nef (M159)、CAR-PGK-SIV Nef (M160)、SIV Nef-PGK-CAR (M161)之 TCRαβ-比率分別為 59.1%、82.7%、50.4%、43.5%、95.0%，與 UnT 組(12.6%)相比，TCRαβ 經顯著下調。同時，CAR-P2A-LNGFR-SIV Nef (M072)、CAR-P2A-SIV Nef (M086)、CAR-P2A-$(GGGS)_3$-SIV Nef (M090) TCRαβ-比率分別為 7.94%、16.3%、15.4%，與未經轉導(UnT)群(12.6%)相比不具有顯著差異。此等上述結果指示經由自裂解肽 P2A (M091)在 SIV Nef 之 C'端處構築的 CAR 可能下調 TCR/CD3 之細胞表面表現，同時保持足夠的 CAR 表現。然而，同時，有可能的是 SIV Nef 蛋白之 N 端空間結構在下調 TCR/CD3 複合物之細胞表面表現中至關重要，且在 M072、M086 及 M090 載體中經裂解的 P2A 胺基酸殘留在 Nef 蛋白 N 段會顯著地影響其功能。下表 5 概述了 SIV Nef CAR 多合一質體對 CD3ε、TCRαβ 及 BCMA CAR 之表現的效應。

表 5. 多合一質體及對 TCR/CD3 複合物及 CAR 之表現的效應

群	結構	CAR 表現%	TCR/CD3 複合物表現		
			下調	TCRαβ 陰性%	CD3ε 陰性%
UnT	陽性對照	0.124	N/A	12.6	9.68
M071	SIV Nef-P2A-LNGFR	0.959	是	94.7	89.0
M072	CAR-P2A-LNGFR -SIV Nef	97.3	否	7.94	4.17
M086	CAR-P2A-SIV Nef	97.5	否	16.3	8.26
M090	CAR-P2A-$(GGGS)_3$-SIV Nef	97.6	否	15.4	7.36
M091	SIV Nef-P2A-CAR	85.5	是	59.1	42.5
M126	SIV Nef-IRES-CAR	21.4	是	82.7	71.5
M159	CAR-IRES-SIV Nef	79.6	是	50.4	34.6
M160	CAR-PGK-SIV Nef	94.3	是	43.5	35.6
M161	SIV Nef-PGK-CAR	5.44	是	95.0	89.6

實例 6. 對 T 細胞 CD4 及 CD28 表現具有降低之不利效應的 Nef 突變體及亞型

【0630】 Nef 蛋白上之某些胺基酸可結合於 CD4 及 CD28，且接著下調 T 細胞上之 CD4、CD28 表現(參見表 6)。為了降低 Nef 對 CD4 及 CD28 表現及功能之不利效應，吾人進一步設計及構築亞型 Nef (HIV F2-Nef、HIV C2-Nef、HIV HV2NZ-Nef)及突變型 Nef (稱作「mutNef」)。

表 6. Nef 胺基酸之功能

(源於 V. Piguet 及 D. Trono, 「A Structure-function Analysis of the Nef Protein of Primate Lentiviruses」, 1999, [Rev Med Virol] 448-459)

胺基酸	結構域	功能
G	肉豆蔻醯化位點	CD4 下調+ MHC I 下調+ 與信號傳導分子之締合
RGKP	N 端 α-螺旋(MHC I 下調+ 蛋白激酶募集)	MHC I 下調+ 與信號傳導分子之締合
DDEEE	酸性簇(MHC-I 下調)	MHC I 下調
PVQPRVPLRQMTY	基於脯胺酸之重複序列 (MHC-I 下調+ SH3 結合)	MHC I 下調+ 與信號傳導分子之締合
RR	PAK 結合	CD4 下調+與信號傳導分子之締合
AR	COP I 募集	CD4 下調
LM	基於二-白胺酸之 AP 募集 (HIV-1 Nef)	CD4 下調
ED	V-ATP 酶及 Raf-1 結合	CD4 下調+與信號傳導分子之締合

1. 亞型或突變型 Nef 質體及各種表現 Nef 之細胞株之構築

【0631】 吾人設計具有對於 CD4 及 CD28 結合至關重要之突變型胺基酸之 SIV Nef 序列。吾人亦設計一些其他 SIV Nef 突變體及 HIV Nef 同系物。以化學方式合成亞型 Nef-P2A-LNGFR 或 mutNef-P2A-LNGFR 融合序列，接著如實例 1 所述選殖至 pLVX-hEF1α 質體中，產生亞型 Nef-P2A-LNGFR 及 mutNef-P2A-LNGFR 轉移質體(關於亞型或突變型 Nef 結構參見表 7 且關於突變型序列參見「序列表」章節)。M016 (無序序列)充當陰性對照。如實例 1 中構築之 M071 (野生型 SIV Nef-P2A-LNGFR)用作陽性對照。

表 7. Nef 突變體及亞型之結構

載體	蛋白質	類型	Nef資訊
M016	陰性對照	-	陰性對照，無序序列
M071	SIV Nef	-	陽性對照，野生型 SIV Nef蛋白
M116	SIV Nef突變體 1 或 SIV Nef M116	突變	SIV Nef「基於二-白胺酸之 AP 募集結構域」突變
M117	SIV Nef突變體 2	突變	SIV Nef「基於二-白胺酸之 AP 募集結構域」突變
		突變	SIV Nef「PAK 結合結構域」突變
M118	SIV Nef突變體 3	突變	SIV Nef「PAK 結合結構域」突變
			SIV Nef「COP I 募集結構域」突變
			SIV Nef「基於二-白胺酸之 AP 募集結構域」突變
			SIV Nef「V-ATP 酶及 Raf-1 結合結構域」突變
M119	HIV F2-Nef	亞型	HIV F2-Nef蛋白
M120	HIV C2-Nef	亞型	HIV C2-Nef蛋白
M121	HIV HV2NZ-Nef	亞型	HIV HV2NZ-Nef蛋白
M142	SIV Nef突變體 4	突變	SIV Nef「COP I 募集結構域」突變
			SIV Nef「基於二-白胺酸之 AP 募集結構域」突變
			SIV Nef「V-ATP 酶及 Raf-1 結合結構域」突變
M143	SIV Nef突變體 5	突變	SIV Nef「基於二-白胺酸之 AP 募集結構域」突變
			SIV Nef「V-ATP 酶及 Raf-1 結合結構域」突變

* M119、M120 及 M121 mutNef序列係源於 S.R. Das 及 S. Jameel, 2005 (Biology of the HIV Nef protein, *Indian J Med Res.*, 121(4):315-332)。其他突變體經自設計。

【0632】　對來自表 7 之轉移質體進行純化，按比例與包裝質體 psPAX2 及包膜質體 pMD2.G 混合，接著共轉導至 HEK 293T 細胞中。轉導後 60 h，收集病毒上清液，且在 4℃、3000 rpm 下離心持續 5 min。使用 0.45 μm 過濾器過濾該上清液，接著使用 500 KD 中空纖維膜切向流過濾進一步濃縮以獲得經濃縮慢病毒，接著儲存於-80℃下。

【0633】　如實例 1 中培養 Jurkat 細胞(純系 E6-1，ATCC®TIB-152™)。將攜帶如表 6 中之融合序列之慢病毒添加至 Jurkat 細胞培養物之上清液中以用於轉導。嘌呤黴素用作針對 Nef+細胞之可選擇標記物。轉導後 72 h，添加嘌呤黴素，最終濃度為 1 μg/mL。每三天更換培養基且補充相同濃度之嘌呤黴素以進一步篩選單一細胞純系。

2. 測試亞型或突變型 Nef 對 T 細胞上之 CD4 及 CD28 表現的效應

【0634】　轉導後 72 h，收集含有 5×10^5 個 Jurkat 細胞之懸浮液且準備如實例 1

所述進行 FACS 以檢查 CD3ε、TCRαβ、CD4 及 CD28 之陽性比率。使用 1 μL PE/Cy7 抗人類 CD3 抗體(BioLegend®，編號 300316)、1 μL PE/Cy5 抗人類 TCR α/β 抗體(BioLegend®，編號 306710)、1 μL PE-CD4 或 APC 抗人類 CD28 抗體進行 FACS。

【0635】　如自圖 6A-6D 可見，經 M116 (SIV Nef 突變體 1 或 SIV Nef M116)轉導之 Jurkat 細胞展現 88.5% TCRαβ 陰性比率、86.6% CD3ε 陰性比率，其未顯著不同於經 M071 (wt SIV Nef；P>0.05)轉導之細胞的彼等陰性比率，該等經 M071 (wt SIV Nef；P>0.05)轉導之細胞展現 73.3% TCRαβ 陰性比率、87.3% CD3ε 陰性比率。另一方面，經 M116 (SIV Nef 突變體 1 或 SIV Nef M116)轉導之 Jurkat 細胞僅展現 7.44% CD4 陰性比率及 1.67% CD28 陰性比率，其顯著低於經 M071 (wt SIV Nef；P<0.05)轉導之 Jurkat 細胞中的 53.3% CD4 陰性比率及 72.9% CD28 陰性比率。此結果指示與野生型 SIV Nef 蛋白相比，M116 質體中之 SIV Nef 突變體 1 可能有效地下調 T 細胞表面上之 TCR/CD3 複合物表現，同時對 CD4 及 CD28 表現具有極少下調效應。M117 (SIV Nef 突變體 2)、M118 (SIV Nef 突變體 3)、M142 (SIV Nef 突變體 4)及 M143 (SIV Nef 突變體 5)具有相似效應，有效地下調 TCR/CD3 複合物表現，同時保持 T 細胞表面上之 CD4 及 CD28 表現(亦即，具有少得多之 CD4 下調效應及/或 CD28 下調效應)。HIV 亞型 Nef 蛋白(M119、M120 及 M121)亦對 CD4 表現具有極少下調效應，但其對 T 細胞表面上之 TCR/CD3 複合物的下調效應不如 SIV Nef 突變體(M116、M117、M118、M142 及 M143)好。表 8 概述了不同 Nef 亞型及突變體對 T 細胞上之 TCRαβ、CD3ε、CD4 及 CD28 表現的效應。

表 8. Nef 亞型或突變體對 T 細胞上之 TCRαβ、CD3ε、CD4 及 CD28 表現的效應

標記物	UnT	M016	M071	M116	M117	M118	M119	M120	M121	M142	M143
TCRαβ	10.5%	19.0%	73.3%	88.5%	35.0%	26.5%	5.82%	5.34%	6.85%	82.9%	81.8%

陰性										
CD3ε 陰性	12.4%	8.54%	87.3%	86.6%	8.83%	6.28%	2.55%	3.57%	6.85%	89.3%	90.0%
CD4 陰性	17.0%	12.8%	53.3%	7.44%	3.85%	4.79%	3.97%	11.8%	9.62%	19.3%	21.5%
CD28 陰性	2.13%	2.08%	72.9%	1.67%	0.54%	1.36%	1.06%	3.73%	2.21%	8.81%	5.52%

實例 7. SIV Nef 在 CAR-T 細胞免疫療法中之使用

1. SIV Nef+CAR 多合一載體之構築

【0636】 以化學方式合成融合基因序列 SIV Nef-IRES-CD20 scFv (利妥昔單抗) CAR (SEQ ID NO: 48)、SIV Nef-IRES-CD20 scFv (Leu-16) CAR (SEQ ID NO: 49)、SIV Nef-IRES-CD19×CD20 scFv CAR (SEQ ID NO: 50)、SIV Nef-IRES-CD19 scFv CAR (SEQ ID NO: 51)、SIV Nef-IRES-BCMA BiVHH CAR1 (SEQ ID NO: 52)、SIV Nef-IRES-BCMA BiVHH CAR2 (SEQ ID NO: 53)、SIV Nef-IRES-BCMA mono-VHH CAR (SEQ ID NO: 54)，接著選殖至 pLVX-hEF1α 表現載體(參見實例 1)中以用於分別構築重組轉移質體 PLLV-M167、PLLV-M168、PLLV-M169、PLLV-M170、PLLV-M171、PLLV-M172 及 PLLV-M173 (參見表 9)。

【0637】 對轉移質體進行純化且用 psPAX2 及 pMD2.G 質體同樣方法轉導至 HEK 293T 細胞中。轉導後 60 小時，收集病毒上清液且在 4℃、3000 rpm 下離心持續 5 min。使用 0.45 μm 過濾器過濾該上清液，且使用 500 KD 中空纖維膜切向流過濾進一步濃縮以獲得經濃縮慢病毒，接著儲存於-80℃下。

表 9. 例示性 SIV Nef+CAR 多合一載體

載體名稱	融合基因	融合基因結構	核酸序列	CAR 胺基酸序列
PLLV-M167	M167	SIV Nef-IRES-CD20 scFv (利妥昔單抗) CAR	SEQ ID NO:48	SEQ ID NO:55
PLLV-M168	M168	SIV Nef-IRES-CD20 scFv (Leu-16) CAR	SEQ ID NO:49	SEQ ID NO:56
PLLV-M169	M169	SIV Nef-IRES-CD19×CD20 scFv CAR	SEQ ID NO:50	SEQ ID NO:57
PLLV-M170	M170	SIV Nef-IRES-CD19 scFv CAR	SEQ ID NO:51	SEQ ID NO:58
PLLV-M171	M171	SIV Nef-IRES-BCMA BiVHH CAR1	SEQ ID NO:52	SEQ ID NO:59
PLLV-M172	M172	SIV Nef-IRES-BCMA BiVHH CAR2	SEQ ID NO:53	SEQ ID NO:60
PLLV-M173	M173	SIV Nef-IRES-BCMA mono-VHH CAR	SEQ ID NO:54	SEQ ID NO:61

2. 以一個步驟獲得 TCR 陰性 CAR-T 細胞

【0638】　使用全 T 細胞分離套組(Miltenyi Biotec，編號 130-096-535)自經解凍 PBMC 獲得 T 細胞。將經分離 T 細胞接種於 10 cm 細胞培養皿中，接著根據製造商之說明書補充 MicroBeads (Miltenyi Biotec，編號 130-111-160)，且在 37℃、5% CO_2 培育器中培育持續 72 h。

【0639】　將攜帶 SIV Nef-IRES-CD19 scFv CAR、SIV Nef-IRES-CD20 scFv CAR、SIV Nef-IRES-CD19×CD20 scFv CAR、SIV Nef-IRES-BCMA BiVHH CAR1、SIV Nef-IRES-BCMA BiVHH CAR2 或 SIV Nef-IRES-BCMA mono-VHH CAR 序列之慢病毒分別添加至經培養原代 T 細胞懸浮液中以用於轉導。在轉導之後，使用 TCRαβ 細胞分離套組(Miltenyi Biotec，編號 130-092-614)用 MACS 分離且富集 TCR 陰性 CAR-T 細胞。

【0640】　在 MACS 之後一天，收集含有經富集之 5×10^5 個 TCRαβ 陰性細胞之懸浮液且準備用於 FACS 以檢查 TCRαβ 表現。

【0641】　如自圖 7 可見，對於經 SIV Nef+CAR 多合一構築體轉導之 T 細胞，MACS 富集後 TCRαβ 陰性 T 細胞比率非常高，而在 MACS 後未經轉導 T 細胞(UnT)僅產生 1.14% TCRαβ 陰性比率。參見 SIV Nef-IRES-CD20 scFv (利妥昔單抗) CAR (M167) T 細胞(89.7%)、SIV Nef-IRES-CD20 scFv (Leu-16) CAR (M168) T 細胞(93.3%)、SIV Nef-IRES-CD19×CD20 scFv CAR (M169) T 細胞(92.1%)、SIV Nef-IRES-CD19 scFv CAR (M170) T 細胞(93.6%)、SIV Nef-IRES-BCMA BiVHH CAR1 (M171) T 細胞(93.5%)、SIV Nef-IRES-BCMA BiVHH CAR2 (M172) T 細胞(87.9%)及 SIV Nef-IRES-BCMA mono-VHH CAR (M173) T 細胞(94.0%)之 MACS 後 TCRαβ 陰性比率。

【0642】　接著將來自上述步驟之經 MACS 分選 TCRαβ 陰性 T 細胞、經 MACS 分選 TCRαβ 陽性 T 細胞及未經轉導 T 細胞(UnT)分別以不同效應子: 標靶(E: T)細胞比率與標靶細胞或腫瘤細胞混合，且在 Corning® 384 孔實心白板中培育持

續 12 h。K562-CD20 係經 CD20 轉導之骨髓性白血病細胞株。Raji 為 B 細胞淋巴瘤細胞株(CD19+、CD20+、BCMA-)。K562-CD19 係經 CD19 轉導之骨髓性白血病細胞株。RPMI-8226 係表現 BCMA 之多發性骨髓瘤細胞株。使用 One-Glo™ 螢光素酶分析系統(TAKARA，編號 B6120)來量測螢光素酶活性。將 25 μL One-Glo™ 試劑添加至該 384 孔板之各孔中。在培育之後，使用 Spark™ 10M 多模式微板讀取器(TECAN)量測螢光，以便計算不同 T 淋巴球對標靶細胞之細胞毒性比率。該方案證明經 MACS 分選 TCRαβ 陽性 T 細胞將顯示 TCR 介導之非特異性殺死活性，乃因 SIV Nef 未使 TCR 耗盡，而經 MACS 分選 TCRαβ 陰性 T 細胞幾乎耗盡 TCR，因此將主要顯示 CAR 介導之特異性殺死活性。

【0643】　圖 8A-8B 證明經多種 SIV Nef+CAR 多合一構築體轉導之經 MACS 分選 TCRαβ 陰性 T 細胞、經多種 SIV Nef+CAR 多合一構築體轉導之經 MACS 分選 TCRαβ 陽性 T 細胞及作為對照的未經轉導 T 細胞(UnT)之 CAR 介導之特異性腫瘤細胞毒性。如自圖 8A-8B 可見，經 MACS 分選 TCRαβ 陰性 T 細胞顯示與經 MACS 分選 TCRαβ 陽性 T 細胞及未經轉導 T 細胞相比顯著更高之腫瘤細胞殺死活性，且腫瘤細胞殺死活性與 E:T 比率正相關(E:T 愈高，CAR 介導之殺死功效愈好)。

【0644】　圖 9A-9B 證明經多種 SIV Nef+CAR 多合一構築體轉導之經 MACS 分選 TCRαβ 陽性及陰性 T 細胞之 TCR 介導之非特異性殺死效率。H929 為人類多發性骨髓瘤細胞株(CD19-、CD20-)。KG1 為人類急性骨髓白血病細胞株(CD19-)。Raji 為伯基特淋巴瘤細胞株(CD19+、CD20+、BCMA-)。K562 為骨髓性白血病細胞株(CD20-、CD19-、BCMA-)。如自圖 9A-9B 可見，如所預期，經 MACS 分選 TCRαβ 陰性 T 細胞(表現 CAR 及極少或無 TCR)對標靶細胞幾乎具有極少或沒有殺死活性，乃因相應 CAR-抗原(例如，CD19、CD20、BCMA)未在相應經測試標靶細胞上表現；而經 MACS 分選 TCRαβ 陽性 T 細胞(僅表現 TCR)

引起高得多的 TCR 介導之非特異性腫瘤細胞殺死。

【0645】　此等結果指示 SIV Nef+CAR 多合一載體有效且容易產生 TCRαβ 陰性 CAR-T 細胞，該等細胞可有效地引起 CAR 介導之特異性腫瘤細胞殺死(P<0.05)且不引起 TCR 介導之非特異性細胞毒性。因此，如本文所例示之 SIV Nef+CAR 多合一載體可有效地降低原代 T 細胞上之 TCRαβ 表現及功能，同時維持標靶細胞上之 CAR 表現及 CAR 介導之特異性細胞毒性。

實例 8. SIV Nef 突變體在 CAR-T 細胞免疫療法中之使用

【0646】　此實驗中使用 SIV Nef M116 序列(參見實例 6 中之 SIV Nef 突變體 1)來構築 SIV Nef+CAR 多合一載體。以化學方式合成融合基因序列 BCMA BiVHH CAR1-IRES-SIV Nef M116 (SEQ ID NO: 62)，且選殖至 PLVX-hEF1α 表現質體中(參見實例 1)，產生重組 BCMA BiVHH CAR1-IRES-SIV Nef M116 轉移質體(下文中稱作「PLLV-M133」)。對 PLLV-M133 重組轉移質體進行純化，按比例與包裝質體 psPAX2 及包膜質體 pMD2.G 混合，接著共轉導至 HEK 293T 細胞中。轉導後 60 小時，收集病毒上清液，且在 4℃、3000 rpm 下離心持續 5 min。使用 0.45 μm 過濾器過濾該上清液，接著使用 500 KD 中空纖維膜切向流過濾進一步濃縮以獲得經濃縮慢病毒，接著儲存於-80℃下。

【0647】　如實例 7 所述獲得原代 T 細胞，接著經攜帶 PLLV-M133 之慢病毒轉導。在轉導之後，使用 TCRαβ 細胞分離套組(Miltenyi Biotec，編號 130-092-614)用 MACS 分離且富集 TCR 陰性 CAR-T 細胞。在 MACS 之後一天，收集含有經富集之 5×10^5 個 TCRαβ 陰性細胞之懸浮液且準備用於 FACS 以檢查 TCRαβ 表現。

【0648】　如圖 10A 所示，MACS 富集後 TCRαβ 陰性 M133 CAR-T 細胞比率為 99.7%。未經轉導 T 細胞充當對照，其僅顯示 1.38% TCRαβ 陰性比率。

【0649】　如實例 7 所述進行細胞毒性分析。K562 為骨髓性白血病細胞株

(BCMA-)。RPMI-8226 係表現 BCMA 之多發性骨髓瘤細胞株。如自圖 10B 左圖可見，與經 MACS 分選 TCRαβ 陽性 M133 CAR-T 細胞及未經轉導 T 細胞相比，經 MACS 分選 TCRαβ 陰性 M133 CAR-T 細胞在 RPMI-8226 細胞(BCMA+)上引起顯著更高之細胞毒性(34.99±6.20%)，反映 CAR-T 介導之特異性腫瘤細胞殺死。經 MACS 分選 TCRαβ 陰性 M133 CAR-T 細胞對 K562 細胞(BCMA-)幾乎不具有 TCR 介導之非特異性細胞殺死(0.90±3.45%)，經 MACS 分選 TCRαβ 陽性 T 細胞引起高得多的 TCR 介導之非特異性細胞殺死(圖 10B 右圖)。

【0650】　此等結果指示攜帶突變型 SIV Nef 序列之 SIV Nef+CAR 多合一載體亦有效且容易產生 TCRαβ 陰性 CAR-T 細胞，且 SIV Nef-IRES-CAR 及 CAR-IRES-SIV Nef 之組織均有效地工作(比較實例 7 及 8)。兩種序列組織均可有效地降低原代 T 細胞上之 TCRαβ 表現及功能，同時維持 CAR 表現及標靶細胞上 CAR 介導之特異性細胞毒性。

實例 9. SIV Nef 突變體在嵌合 TCR-T (cTCR-T)細胞免疫療法中之使用

【0651】　此實驗中使用 SIV Nef M116 序列(參見 M116，實例 6 中之 SIV NEF 突變體 1)及抗 CD20 嵌合 TCR (cTCR)序列來構築 SIV-Nef+嵌合 TCR 多合一載體。抗 CD20 cTCR 具有抗 CD20 scFv (Leu-16)-$(GGGGS)_3$-CD3ε (除信號肽外之全長)之結構，具有胺基酸序列 SEQ ID NO:64。藉由將抗 CD20 cTCR 融合多肽併入至原生 TCR 複合物中，該經修飾 TCR 複合物可識別表現 CD20 之腫瘤細胞而無需 HLA，且銜接完整 TCR 體系以驅動有效、經調節且持久腫瘤殺死所需之完整 T 細胞功能。以化學方式合成融合基因序列 SIV Nef M116-IRES-CD20 cTCR (SEQ ID NO: 63)，且選殖至 PLVX-hEF1α 表現質體中(參見實例 1)，產生重組 SIV Nef M116-IRES-CD20 cTCR 轉移質體(下文中稱作「PLLV-M572」)。對 PLLV-M572 重組轉移質體進行純化，按比例與包裝質體 psPAX2 及包膜質體 pMD2.G 混合，接著共轉導至 HEK 293T 細胞中。轉導後 60 小時，收集病毒上清液，且

在 4℃、3000 rpm 下離心持續 5 min。使用 0.45 μm 過濾器過濾該上清液，接著使用 500 KD 中空纖維膜切向流過濾進一步濃縮以獲得經濃縮慢病毒，接著儲存於-80℃下。藉由用攜帶 PLLV-M572 之慢病毒轉導原代 T 細胞且接著如實例 7 所述進行 MACS 富集來製備 TCRαβ 陰性 CD20-cTCR 陽性 T 細胞。根據如上文所述之相似方法檢查 TCRαβ 表現。如圖 11A 所示，對於經 PLLV-M572 轉導之 T 細胞，MACS 富集後 TCRαβ 陰性 T-細胞比率為 94.9%，而未經轉導 T 細胞僅具有 0.599% TCRαβ 陰性比率。

【0652】　如實例 7 所述進行細胞毒性分析。K562 為骨髓性白血病細胞株(CD20-、CD19-、BCMA-)。Raji 為伯基特淋巴瘤細胞株(CD19+、CD20+、BCMA-)。如自圖 11B 左圖可見，與經 MACS 分選 TCRαβ 陽性 M572 T 細胞及未經轉導 T 細胞相比，經 MACS 分選 TCRαβ 陰性 CD20 cTCR-T 細胞在 Raji 細胞(CD20+)上引起顯著更高之細胞毒性(49.21±22.96%)，反映 CD20 cTCR 介導之特異性腫瘤細胞殺死。此外，在較高 E: T 比率下，經 MACS 分選 TCRαβ 陰性 CD20 cTCR-T 細胞之殺死功效較高。經 MACS 分選 TCRαβ 陰性 CD20 cTCR-T 細胞對 K562 細胞(CD20-)具有極少內源 TCR 介導之非特異性細胞殺死(3.76±4.31%)，而經 MACS 分選 TCRαβ 陽性 M572 T 細胞引起高得多的內源 TCR 介導之非特異性細胞殺死(圖 11B 右圖)。

【0653】　此等令人驚訝的結果指示 SIV Nef+cTCR 多合一載體可能有效地下調原代 T 細胞上之內源 TCRαβ 表現及功能，而不影響與外源 cTCR 整合之 TCR 複合物的功能。此外，TCRαβ 陰性 cTCR-T 細胞在腫瘤細胞(P<0.05)上有效地介導 cTCR 特異性細胞毒性，且具有極少或沒有內源 TCR 介導之非特異性細胞毒性。

實例 10. SIV Nef 突變體在 TAC-T 細胞免疫療法中之使用

【0654】　此實驗中使用 SIV Nef M116 (參見 M116，實例 6 中之 SIV NEF 突變

體 1)來構築 SIV Nef+CD20 TAC 多合一載體。抗 CD20 TAC 包含抗 CD20 scFv (Leu-16)-$(GGGGS)_3$-huUCHT1.Y177T-GGGGS-CD4 (部分細胞外結構域+跨膜結構域+細胞內結構域)之結構，具有胺基酸序列 SEQ ID NO:66。huUCHT1 靶向 CD3ε。以化學方式合成融合基因序列 SIV Nef M116-IRES-CD20 TAC (SEQ ID NO: 65)，且選殖至 PLVX-hEF1α 表現質體中(參見實例 1)，產生重組 SIV Nef-IRES-CD20 TAC 轉移質體(下文中稱作「PLLV-M574」)。對 PLLV-M574 重組轉移質體進行純化，按比例與包裝質體 psPAX2 及包膜質體 pMD2.G 混合，接著共轉導至 HEK 293T 細胞中。轉導後 60 小時，收集病毒上清液，且在 4℃、3000 rpm 下離心持續 5 min。使用 0.45 μm 過濾器過濾該上清液，接著使用 500 KD 中空纖維膜切向流過濾進一步濃縮以獲得經濃縮慢病毒，接著儲存於-80℃下。藉由用攜帶 PLLV-M574 之慢病毒轉導原代 T 細胞且接著如實例 7 所述進行 MACS 富集來製備 TCRαβ 陰性 TAC-T 細胞。根據如上文所述之相似方法檢查 TCRαβ 表現。如圖 12A 所示，MACS 富集後經 PLLV-M574 轉導之 T 細胞之 TCRαβ 陰性比率為 95.5%，而未經轉導 T 細胞(UnT)僅具有 0.971% TCRαβ 陰性比率。

【0655】　如實例 7 所述進行細胞毒性分析。Raji 為伯基特淋巴瘤細胞株(CD20+)。H929 為人類多發性骨髓瘤細胞株(CD20-)。如自圖 12B 左圖可見，與經 MACS 分選 TCRαβ 陽性 M574 T 細胞及未經轉導 T 細胞相比，經 MACS 分選 TCRαβ 陰性 CD20 TAC-T 細胞在 Raji 細胞(CD20+)上引起顯著更高之細胞毒性(54.58±20.03%)，反映抗 CD20 TAC 介導之特異性腫瘤細胞殺死。此外，在較高 E: T 比率下，經 MACS 分選 TCRαβ 陰性 CD20 TAC-T 細胞之殺死功效較高。經 MACS 分選 TCRαβ 陰性 CD20 TAC-T 細胞對 H929 細胞(CD20-)具有極少內源 TCR 介導之非特異性細胞殺死(3.33±2.80%)，而經 MACS 分選 TCRαβ 陽性 M574 T 細胞引起高得多的內源 TCR 介導之非特異性細胞殺死(圖 12B 右圖)。

【0656】　此等令人驚訝的結果指示 SIV Nef+TAC 多合一載體可有效地下調原

代 T 細胞上之內源 TCRαβ 表現及功能，而不影響 TAC 的表現及功能。此外，TCRαβ 陰性 TAC-T 細胞在腫瘤細胞(P<0.05)上有效地介導 TAC 特異性細胞毒性，具有極少或沒有內源 TCR 介導之非特異性細胞毒性。

實例 11. 有關 TCRαβ、CD4 及 CD28 調節之 SIV Nef 結構域元件之測試

【0657】　全長 SIV Nef 具有 223 個胺基酸。Nef 蛋白上之某些胺基酸可結合於 CD4 及 CD28，且接著下調 T 細胞上之 CD4、CD28 表現(參見實例 6，表 6)。為了測試各種 Nef 結構域元件對 TCRαβ、CD4 及 CD28 表現及功能之效應，藉由使除了第一甲硫胺酸外之全長序列中之每三個連續胺基酸突變為丙胺酸-丙胺酸-丙胺酸(AAA)來設計 74 種突變體。以化學方式合成此等突變型胺基酸序列，且選殖至 PLVX-hEF1α 表現質體(參見實例 1)中，產生 74 種重組 SIV Nef 突變型轉移質體。如上文所述(參見例如實例 7)製備攜帶各重組轉移質體之慢病毒。分別藉由 74 種慢病毒感染 Jurkat 細胞，且使用 1 μg/mL 嘌呤黴素選擇陽性細胞純系持續 2 週。藉由如上文所述(參見例如實例 1)之 FACS 檢查 Jurkat 細胞上之 TCRαβ、CD4 及 CD28 表現。未經轉導 Jurkat 細胞充當陰性對照。經 M071 (野生型 SIV Nef)或 M116 (SIV Nef M116，參見實例 6)轉導之 Jurkat 細胞充當陽性對照。至少 3%調節被視為截止值以用於進一步評估 SIV Nef 突變體對 TCRαβ、CD4 及 CD28 表現之調節的效應。例如，若突變型 SIV Nef 對 TCRαβ 之下調水準與藉由野生型 SIV Nef 下調之彼水準相差 0% (包括 0%)至小於 3%，或若該突變型 SIV Nef 對 TCRαβ 之下調較野生型 SIV Nef 之彼下調多(或等於) 3%，則該突變型 SIV Nef 被視為具有「與野生型 SIV Nef 相比相似(或更多) 之 TCRαβ 下調」。若該突變型 SIV Nef 對 CD4 (及/或 CD28) 之下調較野生型 SIV Nef 之彼下調少 3%，則該突變型 SIV Nef 被視為具有「與野生型 SIV Nef 相比更少之 CD4 下調」(及/或「與野生型 SIV Nef 相比更少之 CD28 下調」)。

【0658】　如圖 13A-13C 所示，針對與野生型 SIV Nef (M071)相比調節 TCRαβ、

CD4 及 CD28 表現之能力對 74 種 SIV Nef 突變體進行並行篩選。突變位置及其相應功能列於表 10 中。此篩選實驗產生多組具有不同調節功能之 SIV Nef 突變體。與野生型 SIV Nef (M071)相比，34 種 SIV Nef 突變體維持對 TCRαβ 表現之下調效應。其中，與野生型 SIV Nef 相比，18 種突變體進一步顯示對 CD4 之下調更少；與野生型 SIV Nef 相比，19 種突變體進一步顯示對 CD28 之下調更少；且與野生型 SIV Nef (M071)相比，發現 16 種突變體不僅維持野生型 SIV Nef (M071)之 TCRαβ 下調效應，而且對 CD4 及 CD28 具有更少下調效應。關於詳細概述，參見表 11。

表 10. 與野生型 SIV Nef (M071)相比 SIV Nef 突變體之調節效應

構築體/胺基酸突變位點	與野生型 SIV Nef 相比對 TCRαβ 之下調相似(或更多)	與野生型 SIV Nef 相比對 CD4 之下調更少	與野生型 SIV Nef 相比對 CD28 之下調更少
M116 (aa 178-179)	+	+	+
aa 2-4	+	+	+
aa 5-7	-	+	+
aa 8-10	+	-	-
aa 11-13	+	-	-
aa 14-16	-	-	-
aa 17-19	-	-	-
aa 20-22	-	-	-
aa 23-25	-	-	-
aa 26-28	-	-	+
aa 29-31	-	+	+
aa 32-34	-	+	+
aa 35-37	-	-	-
aa 38-40	+	-	-
aa 41-43	-	-	-
aa 44-46	+	+	-
aa 47-49	+	-	-
aa 50-52	+	-	-
aa 53-55	+	-	-
aa 56-58	+	+	+
aa 59-61	+	+	+
aa 62-64	+	+	+
aa 65-67	+	+	+

構築體/胺基酸突變位點	與野生型 SIV Nef 相比對 TCRαβ 之下調相似(或更多)	與野生型 SIV Nef 相比對 CD4 之下調更少	與野生型 SIV Nef 相比對 CD28 之下調更少
aa 68-70	-	+	+
aa 71-73	-	+	+
aa 74-76	-	+	+
aa 77-79	-	+	+
aa 80-82	-	-	-
aa 83-85	-	+	+
aa 86-88	-	+	+
aa 89-91	-	+	+
aa 92-94	-	+	+
aa 95-97	-	+	+
aa 98-100	+	+	-
aa 101-103	-	+	+
aa 104-106	-	+	+
aa 107-109	+	+	+
aa 110-112	+	-	-
aa 113-115	-	+	+
aa 116-118	-	+	+
aa 119-121	-	+	+
aa 122-124	-	+	+
aa 125-127	-	+	+
aa 128-130	-	+	+
aa 131-133	-	+	+
aa 134-136	-	+	+
aa 137-139	+	+	+
aa 140-142	-	+	+
aa 143-145	-	+	+
aa 146-148	-	+	+
aa 149-151	-	+	+
aa 152-154	+	+	+
aa 155-157	-	+	+
aa 158-160	-	+	+
aa 161-163	-	+	+
aa 164-166	+	+	+
aa 167-169	+	+	+
aa 170-172	+	-	+
aa 173-175	+	-	+
aa 176-178	+	+	+
aa 179~181	+	+	+
aa 182-184	+	-	+
aa 185-187	+	+	+

構築體/胺基酸突變位點	與野生型 SIV Nef 相比對 TCRαβ 之下調相似(或更多)	與野生型 SIV Nef 相比對 CD4 之下調更少	與野生型 SIV Nef 相比對 CD28 之下調更少
aa 188-190	+	+	+
aa 191-193	+	-	-
aa 194-196	+	+	+
aa 197-199	-	+	+
aa 200-202	-	+	+
aa 203-205	+	+	+
aa 206-208	+	-	-
aa 209-211	-	-	-
aa 212-214	+	-	-
aa 215-217	+	-	-
aa 218-220	+	-	-
aa 221-223	+	-	-

表 11. SIV Nef 胺基酸突變位點對 TCRαβ、CD4 及 CD8 表現之效應的概述

群	效應(與野生型 SIV Nef 相比)	胺基酸(aa)突變位點
1	相似(或更多) TCRαβ 下調	aa 2-4、aa 8-10、aa 11-13 (例如，aa 8-13)、aa 38-40、aa 44-46、aa 47-49、aa 50-52、aa 53-55、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67 (例如，aa 44-67)、aa 98-100、aa 107-109、aa 110-112 (例如，aa 107-112)、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、aa 178-179、179-181aa、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 191-193、aa 194-196 (例如，aa 164-196)、aa 203-205、aa 206-208 (例如，aa 203-208)、aa 212-214、aa 215-217、aa 218-220、aa 221-223 (例如，aa 212-223)
2	相似(或更多) TCRαβ 下調、更少 CD4 下調	aa 2-4、aa 44-46、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67 (例如，aa 44-67)、aa 98-100、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169 (例如，aa 164-169)、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181 (例如，aa 176-181)、aa 185-187、aa 188-190 (例如，aa 185-190)、aa 194-196、aa 203-205
3	相似(或更多) TCRαβ 下調、更少 CD28 下調	aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67 (例如，aa 56-67)、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、178-179aa、aa 179-181、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190 (例如，aa 164-190)、aa 194-196、aa 203-205
4	相似(或更多) TCRαβ 下調、更少 CD4 下調、更少 CD28 下調	aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67 (例如，aa 56-67)、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169 (例如，aa 164-169)、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181 (例如，aa 176-181)、aa 185-187、aa 188-190 (例如，aa 185-190)、aa 194-196、aa 203-205

序列表

SEQ ID NO:1 (野生型 SIV Nef 核酸序列)

ATGGGCTCCAGCAACTCCAAGAGGCAGCAACAGGGCTTGCTCAAGCTCTG

GCGAGGGCTGCGAGGGAAGCCTGGGGCAGACTGGGTGCTATTGTCCGAT

CCGCTTATCGGGCAGTCATCAACAGTCCAAGAAGAGTGCGGCAAGGCCTT

GAAAAAGTCCTGGGGTAAAGGTAAAATGACTCCAGACGGCCGCCGCCTG

CAAGAAGGAGACACCTTTGATGAGTGGGATGATGATGAAGAAGAAGTAG

GCTTCCCTGTGCAACCTCGAGTCCCCTTAAGACAGATGACCTATAAATTA

GCAGTGGACTTTTCCCACTTTTTAAAATCAAAGGGGGGGACTGGATGGGAT

ATATTACTCTGAAAGAAGAGAAAAGATCCTGAATTTGTATGCCTTGAACG

AGTGGGGAATAATAGATGATTGGCAAGCTTACTCACCAGGCCCGGGGAT

AAGGTACCCGAGAGTCTTTGGCTTCTGCTTTAAGCTAGTCCCAGTGGACC

TGCATGAGGAGGCACGCAACTGTGAGAGACACTGTCTGATGCATCCAGC

ACAGATGGGGGAAGATCCTGATGGAATAGATCATGGAGAAGTCTTGGTC

TGGAAGTTTGACCCGAAGTTGGCGGTGGAGTACCGCCCGGACATGTTTAA

GGACATGCACGAACATGCAAAGCGC

SEQ ID NO:2 (HIV1 Nef 核酸序列)

ATGGGTGGCAAGTGGTCAAAAAGTAGTGTGATTGGATGGCCTACTGTAAG

GGAAAGAATGAGACGAGCTGAGCCAGCAGCAGATAGGGTGGGAGCAGC

ATCTCGAGACCTGGAAAAACATGGAGCAATCACAAGTAGCAATACAGCA

GCTACCAATGCTGCTTGTGCCTGGCTAGAAGCACAAGAGGAGGAGGAGG

TGGGTTTTCCAGTCACACCTCAGGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAG

GCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGGACTGGAAG

GGCTAATTCACTCCCAAAGAAGACAAGATATCCTTGATCTGTGGATCTAC

CACACACAAGGCTACTTCCCTGATTgGCAGAACTACACACCAGGGCCAGG

GGTCAGATATCCACTGACCTTTGGATGGTGCTACAAGCTAGTACCAGTTG

AGCCAGATAAGATAGAAGAGGCCAATAAAGGAGAGAACACCAGCTTGTT

ACACCCTGTGAGCCTGCATGGGATGGATGACCCGGAGAGAGAAGTGTTA

GAGTGGAGGTTTGACAGCCGCCTAGCATTTCATCACGTGGCCCGAGAGCT

GCATCCGGAGTACTTCAAGAACTGC

SEQ ID NO:3 (HIV2 Nef 核酸序列)

ATGGGTGCGAGTGGATCCAAGAAGCTTTCCAAGCATTCGCGAGGACTACG

AGAGAGACTCTTGCGGGCGCGTGGGGATGGTTATGGGAAGCAGCGCGAC

GCATCGGGAGGGGAATACTCGCAGTTCCAAGAAGAATCAGGCAGGGAGC

AGAACTCGCCCTCCTGTGAGGGACAGCAGTATCAGCAGGGAGAGTACAT

GAACAGCCCATGGAGAAACCCAGCAACAGAAAGACAGAAAGATTTGTAT

AGGCAGCAAAATATGGATGATGTAGATTCTGATGATGATGACCTAATAGG

AGTTCCTGTTACACCAAGAGTACCACGGAGAGAAATGACCTATAAATTGG

CAATAGATATGTCACATTTTATAAAAGAAAAAGGGGGACTGCAAGGGAT

GTTTTACAGTAGGAGGAGACATAGAATCCTAGACATATACCTAGAAAAA

GAGGAAGGGATAATACCAGATTGGCAGAATTATACTCATGGGCCAGGAG

TAAGGTACCCAATGTACTTCGGGTGGCTGTGGAAGCTAGTATCAGTAGAA

CTCTCACAAGAGGCAGAGGAAGATGAGGCCAACTGCTTAGTACACCCAG

CACAAACAAGCAGACATGATGATGAGCATGGGGAGACATTAGTGTGGCA

GTTTGACTCCATGCTGGCCTATAACTACAAGGCCTTCACTCTGTACCCAGA

AGAGTTTGGGCACAAGTCAGGATTGCCAGAGAAAGAATGGAAGGCAAAA

CTGAAAGCAAGAGGGATACCATATAGTGAA

SEQ ID NO:4 (HIV F2-Nef 核酸序列)

ATGGGTGGCAAGTGGTCAAAATGCAGCATAGTTGGATGGCCTGATATAA

GAGAGAGAATGAGACGAACTGAGCCAGCAGCAGAGCCAGCAGCAGAAG

GAGTAGGAGCAGCGTCTCAAGACTTAGATAAACATGGAGCACTTACAAG

TAGCAACACAAACACCACTAATGCTGATTGTGCTTGGCCGGAAGCGCAAG

AGGATGAAGGAGAAGTAGGCTTTGCAGTCAGACCTCAGAGTCCTTTAAG

ACCAATGACTTATAAGGGAGCATTTGATCTCGGCTTCTTTTTAAAAGAAG

GGGGACTGGAAGGGTTAATTTACTCTAAGAAAAGGCAAGAGATCCTTGA

TTTGTGGGTCTATCATACACAAGGCTACTTCCCTGATTGGCAAAACTACA

CACCGGGACCAGGGGTCAGATACCCACTGACTTTTGGGTGGTGCTTCAAG

CTGGTACCAGTTGACCCAAAGGCAGTAGAAGAGGCCAACGAAGGAGAAG

ACAACTGTCTGCTACACCCAGTGTGCCAGCATGGAATGGAGGATGAACAC

AGAGAAGTATTAATGTGGAAGTTTGACAGTCAACTAGCACGCAGACACA

TGGCCCGAGAGCTACATCCGGAGTTCTACAAAGACTGC

SEQ ID NO:5 (HIV C2-Nef 核酸序列)

ATGGGTGGCAAGTGGTCAAAATGCAGCATAGGTGGATGGCCTCAGATAA

GAGAGAGAATGAGACGAACTGAGCCAGCAGTAGAGCCAGCAGCAGAGC

CAGCAGCAGAAGGAGTAGGAGCAGCGTGGCTACTTCCTGATTGGCAAAA

CTACACACCGGGACCAGGAGTCAGATACCCACTGACTTTTGGGTGGTGCT

TCAAGCTGGTACCAGTAGACCCAGGGGCAGTAGAAGAGGCCAACGAAGG

AGAAAACAACTGTTTGCTACACCCGGTGTGCCAGCATGGAATGGAGGAT

GAGCAAAGAGAAGTATTAGTGTGCAAGTTTGACAGTCTACTAGCACGCA

GACACATGGCCCGCGAGCTACATCCGGAGTTCTACAAAGACTGC

SEQ ID NO:6 (HIV HV2NZ-Nef 核酸序列)

ATGGGTGCGAGTGGATCCAAGAAGCGTTCCAAGCCCTTGCAAGGACTAC

AAGAGAGACTCTTGCAGGCGCGGGGAGAGACTTGTGGAGGGCGCTGCAA

CGAATCGGGAGGGGGATACTTGCAGTCCCACGAAGGATCAGGCAGGGAG

CAGAACTCGCCCTCCTGTGAGGGACAGCGATATCAGCAGGGAGATTTTGT

AAATACCCCATGGAGAACCCCAGCAGCAGAAAGGGAGAAAGAATTGTAC

AAACAGCAAAATATGGATGATGTAGATCTAGATGATGATGACCAAGTAG

GATTCCCTGTCACACCAAGAGTACCATTAAGACCAATGACATTCAAATTG

GCAGTAGATATGTCTCATTTTATAAAAGAAAAAGGGGGACTGGAAGGGC

TGTTTTATAGTCAGAGAAGACATAGAATCTTAGACTTATACTTAGACAAG

GCTTTTACTCTGTACCCAGAGGAATTTGGGCATAATTCAGGACTGCCAGA

GAAAGAGTGGAAGGCGAGACTGAAAGCAAGGGGAATACCATTTAGT

SEQ ID NO:7 (SIV Nef 突變體 1/ SIV Nef M116 核酸序列)

ATGGGCTCCAGCAACTCCAAGAGGCAGCAACAGGGCTTGCTCAAGCTCTG

GCGAGGGCTGCGAGGGAAGCCTGGGGCAGACTGGGTGCTATTGTCCGAT

CCGCTTATCGGGCAGTCATCAACAGTCCAAGAAGAGTGCGGCAAGGCCTT

GAAAAAGTCCTGGGGTAAAGGTAAAATGACTCCAGACGGCCGCCGCCTG

CAAGAAGGAGACACCTTTGATGAGTGGGATGATGATGAAGAAGAAGTAG

GCTTCCCTGTGCAACCTCGAGTCCCCTTAAGACAGATGACCTATAAATTA

GCAGTGGACTTTTCCCACTTTTTAAAATCAAAGGGGGGACTGGATGGGAT

ATATTACTCTGAAAGAAGAGAAAAGATCCTGAATTTGTATGCCTTGAACG

AGTGGGGGAATAATAGATGATTGGCAAGCTTACTCACCAGGCCCGGGGAT

AAGGTACCCGAGAGTCTTTGGCTTCTGCTTTAAGCTAGTCCCAGTGGACC

TGCATGAGGAGGCACGCAACTGTGAGAGACACTGTgctgcaCATCCAGCACA

GATGGGGGAAGATCCTGATGGAATAGATCATGGAGAAGTCTTGGTCTGG

AAGTTTGACCCGAAGTTGGCGGTGGAGTACCGCCCGGACATGTTTAAGGA

CATGCACGAACATGCAAAGCGC

SEQ ID NO:8 (SIV Nef 突變體 2 核酸序列)

ATGGGCTCCAGCAACTCCAAGAGGCAGCAACAGGGCTTGCTCAAGCTCTG

GCGAGGGCTGCGAGGGAAGCCTGGGGCAGACTGGGTGCTATTGTCCGAT

CCGCTTATCGGGCAGTCATCAACAGTCCAAGAAGAGTGCGGCAAGGCCTT

GAAAAAGTCCTGGGGTAAAGGTAAAATGACTCCAGACGGCCGCCGCCTG

CAAGAAGGAGACACCTTTGATGAGTGGGATGATGATGAAGAAGAAGTAG

GCTTCCCTGTGCAACCTCGAGTCCCCTTAAGACAGATGACCTATAAATTA

GCAGTGGACTTTTCCCACTTTTTAAAATCAAAGGGGGGGACTGGATGGGAT

ATATTACTCTGAAgctgcaGAAAAGATCCTGAATTTGTATGCCTTGAACGAG

TGGGGAATAATAGATGATTGGCAAGCTTACTCACCAGGCCCGGGGATAA

GGTACCCGAGAGTCTTTGGCTTCTGCTTTAAGCTAGTCCCAGTGGACCTGC

ATGAGGAGGCACGCAACTGTGAGAGACACTGTgctgcaCATCCAGCACAGA

TGGGGGGAAGATCCTGATGGAATAGATCATGGAGAAGTCTTGGTCTGGAA

GTTTGACCCGAAGTTGGCGGTGGAGTACCGCCCGGACATGTTTAAGGACA

TGCACGAACATGCAAAGCGC

SEQ ID NO:9 (SIV Nef 突變體 3 核酸序列)

ATGGGCTCCAGCAACTCCAAGAGGCAGCAACAGGGCTTGCTCAAGCTCTG

GCGAGGGCTGCGAGGGAAGCCTGGGGCAGACTGGGTGCTATTGTCCGAT

CCGCTTATCGGGCAGTCATCAACAGTCCAAGAAGAGTGCGGCAAGGCCTT

GAAAAAGTCCTGGGGTAAAGGTAAAATGACTCCAGACGGCCGCCGCCTG

CAAGAAGGAGACACCTTTGATGAGTGGGATGATGATGAAGAAGAAGTAG

GCTTCCCTGTGCAACCTCGAGTCCCCTTAAGACAGATGACCTATAAATTA

GCAGTGGACTTTTCCCACTTTTTAAAATCAAAGGGGGGGACTGGATGGGAT

ATATTACTCTGAAgctgcaGAAAAGATCCTGAATTTGTATGCCTTGAACGAG

TGGGGAATAATAGATGATTGGCAAGCTTACTCACCAGGCCCGGGGATAA

GGTACCCGAGAGTCTTTGGCTTCTGCTTTAAGCTAGTCCCAGTGGACCTGC

ATGAGGAGcatcacAACTGTGAGAGACACTGTgctgcaCATCCAGCACAGATGG

GGgcggcaCCTGATGGAATAGATCATGGAGAAGTCTTGGTCTGGAAGTTTGA

CCCGAAGTTGGCGGTGGAGTACCGCCCGGACATGTTTAAGGACATGCACG

AACATGCAAAGCGC

SEQ ID NO:10 (SIV Nef 突變體 4 核酸序列)

ATGGGCTCCAGCAACTCCAAGAGGCAGCAACAGGGCTTGCTCAAGCTCTG

GCGAGGGCTGCGAGGGAAGCCTGGGGCAGACTGGGTGCTATTGTCCGAT

CCGCTTATCGGGCAGTCATCAACAGTCCAAGAAGAGTGCGGCAAGGCCTT

GAAAAAGTCCTGGGGTAAAGGTAAAATGACTCCAGACGGCCGCCGCCTG

CAAGAAGGAGACACCTTTGATGAGTGGGATGATGATGAAGAAGAAGTAG

GCTTCCCTGTGCAACCTCGAGTCCCCTTAAGACAGATGACCTATAAATTA

GCAGTGGACTTTTCCCACTTTTTAAAATCAAAGGGGGGACTGGATGGGAT

ATATTACTCTGAAAGAAGAGAAAAGATCCTGAATTTGTATGCCTTGAACG

AGTGGGGAATAATAGATGATTGGCAAGCTTACTCACCAGGCCCGGGGAT

AAGGTACCCGAGAGTCTTTGGCTTCTGCTTTAAGCTAGTCCCAGTGGACC

TGCATGAGGAGcatcacAACTGTGAGAGACACTGTgctgcaCATCCAGCACAGA

TGGGGGgcggcaCCTGATGGAATAGATCATGGAGAAGTCTTGGTCTGGAAGTT

TGACCCGAAGTTGGCGGTGGAGTACCGCCCGGACATGTTTAAGGACATGC

ACGAACATGCAAAGCGC

SEQ ID NO:11 (SIV Nef 突變體 5 核酸序列)

ATGGGCTCCAGCAACTCCAAGAGGCAGCAACAGGGCTTGCTCAAGCTCTG

GCGAGGGCTGCGAGGGAAGCCTGGGGCAGACTGGGTGCTATTGTCCGAT

CCGCTTATCGGGCAGTCATCAACAGTCCAAGAAGAGTGCGGCAAGGCCTT

GAAAAAGTCCTGGGGTAAAGGTAAAATGACTCCAGACGGCCGCCGCCTG

CAAGAAGGAGACACCTTTGATGAGTGGGATGATGATGAAGAAGAAGTAG

GCTTCCCTGTGCAACCTCGAGTCCCCTTAAGACAGATGACCTATAAATTA

GCAGTGGACTTTTCCCACTTTTTAAAATCAAAGGGGGGACTGGATGGGAT

ATATTACTCTGAAAGAAGAGAAAAGATCCTGAATTTGTATGCCTTGAACG

AGTGGGGAATAATAGATGATTGGCAAGCTTACTCACCAGGCCCGGGGAT

AAGGTACCCGAGAGTCTTTGGCTTCTGCTTTAAGCTAGTCCCAGTGGACC

TGCATGAGGAGGCACGCAACTGTGAGAGACACTGTgctgcaCATCCAGCACA

GATGGGGGgcggcaCCTGATGGAATAGATCATGGAGAAGTCTTGGTCTGGAA

GTTTGACCCGAAGTTGGCGGTGGAGTACCGCCCGGACATGTTTAAGGACA

TGCACGAACATGCAAAGCGC

SEQ ID NO:12 (野生型 SIV Nef 胺基酸序列)

MGSSNSKRQQQGLLKLWRGLRGKPGADWVLLSDPLIGQSSTVQEECGKALK

KSWGKGKMTPDGRRLQEGDTFDEWDDDEEEVGFPVQPRVPLRQMTYKLAV

DFSHFLKSKGGLDGIYYSERREKILNLYALNEWGIIDDWQAYSPGPGIRYPRV

FGFCFKLVPVDLHEEARNCERHCLMHPAQMGEDPDGIDHGEVLVWKFDPKL

AVEYRPDMFKDMHEHAKR

SEQ ID NO:13 (HIV1 Nef 胺基酸序列)

MGGKWSKSSVIGWPTVRERMRRAEPAADRVGAASRDLEKHGAITSSNTAAT

NAACAWLEAQEEEEVGFPVTPQVPLRPMTYKAAVDLSHFLKEKGGLEGLIH

SQRRQDILDLWIYHTQGYFPDWQNYTPGPGVRYPLTFGWCYKLVPVEPDKIE

EANKGENTSLLHPVSLHGMDDPEREVLEWRFDSRLAFHHVARELHPEYFKN

C

SEQ ID NO:14 (HIV2 Nef 胺基酸序列)

MGASGSKKLSKHSRGLRERLLRARGDGYGKQRDASGGEYSQFQEESGREQN

SPSCEGQQYQQGEYMNSPWRNPATERQKDLYRQQNMDDVDSDDDDLIGVP

VTPRVPRREMTYKLAIDMSHFIKEKGGLQGMFYSRRRHRILDIYLEKEEGIIPD

WQNYTHGPGVRYPMYFGWLWKLVSVELSQEAEEDEANCLVHPAQTSRHDD

EHGETLVWQFDSMLAYNYKAFTLYPEEFGHKSGLPEKEWKAKLKARGIPYS

E

SEQ ID NO:15 (HIV F2-Nef 胺基酸序列)

MGGKWSKCSIVGWPDIRERMRRTEPAAEPAAEGVGAASQDLDKHGALTSSN

TNTTNADCAWPEAQEDEGEVGFAVRPQSPLRPMTYKGAFDLGFFLKEGGLE

GLIYSKKRQEILDLWVYHTQGYFPDWQNYTPGPGVRYPLTFGWCFKLVPVD

PKAVEEANEGEDNCLLHPVCQHGMEDEHREVLMWKFDSQLARRHMARELH

PEFYKDC

SEQ ID NO:16 (HIV C2-Nef 胺基酸序列)

MGGKWSKCSIGGWPQIRERMRRTEPAVEPAAEPAAEGVGAAWLLPDWQNY

TPGPGVRYPLTFGWCFKLVPVDPGAVEEANEGENNCLLHPVCQHGMEDEQR

EVLVCKFDSLLARRHMARELHPEFYKDC

SEQ ID NO:17 (HIV HV2NZ-Nef 胺基酸序列)

MGASGSKKRSKPLQGLQERLLQARGETCGGRCNESGGGYLQSHEGSGREQN

SPSCEGQRYQQGDFVNTPWRTPAAEREKELYKQQNMDDVDLDDDDQVGFP

VTPRVPLRPMTFKLAVDMSHFIKEKGGLEGLFYSQRRHRILDLYLDKAFTLY

PEEFGHNSGLPEKEWKARLKARGIPFS

SEQ ID NO:18 (SIV Nef 突變體 1/ SIV Nef M116 胺基酸序列)

MGSSNSKRQQQGLLKLWRGLRGKPGADWVLLSDPLIGQSSTVQEECGKALK

KSWGKGKMTPDGRRLQEGDTFDEWDDDEEEVGFPVQPRVPLRQMTYKLAV

DFSHFLKSKGGLDGIYYSERREKILNLYALNEWGIIDDWQAYSPGPGIRYPRV

FGFCFKLVPVDLHEEARNCERHCAAHPAQMGEDPDGIDHGEVLVWKFDPKL

AVEYRPDMFKDMHEHAKR

SEQ ID NO:19 (SIV Nef 突變體 2 胺基酸序列)

MGSSNSKRQQQGLLKLWRGLRGKPGADWVLLSDPLIGQSSTVQEECGKALK

KSWGKGKMTPDGRRLQEGDTFDEWDDDEEEVGFPVQPRVPLRQMTYKLAV

DFSHFLKSKGGLDGIYYSEAAEKILNLYALNEWGIIDDWQAYSPGPGIRYPRV

FGFCFKLVPVDLHEEARNCERHCAAHPAQMGEDPDGIDHGEVLVWKFDPKL

AVEYRPDMFKDMHEHAKR

SEQ ID NO:20 (SIV Nef 突變體 3 胺基酸序列)

MGSSNSKRQQQGLLKLWRGLRGKPGADWVLLSDPLIGQSSTVQEECGKALK

KSWGKGKMTPDGRRLQEGDTFDEWDDDEEEVGFPVQPRVPLRQMTYKLAV

DFSHFLKSKGGLDGIYYSEAAEKILNLYALNEWGIIDDWQAYSPGPGIRYPRV

FGFCFKLVPVDLHEEHHNCERHCAAHPAQMGAAPDGIDHGEVLVWKFDPKL

AVEYRPDMFKDMHEHAKR

SEQ ID NO:21 (SIV Nef 突變體 4 胺基酸序列)

MGSSNSKRQQQGLLKLWRGLRGKPGADWVLLSDPLIGQSSTVQEECGKALK

KSWGKGKMTPDGRRLQEGDTFDEWDDDEEEVGFPVQPRVPLRQMTYKLAV

DFSHFLKSKGGLDGIYYSERREKILNLYALNEWGIIDDWQAYSPGPGIRYPRV

FGFCFKLVPVDLHEEHHNCERHCAAHPAQMGAAPDGIDHGEVLVWKFDPKL

AVEYRPDMFKDMHEHAKR

SEQ ID NO:22 (SIV Nef 突變體 5 胺基酸序列)

MGSSNSKRQQQGLLKLWRGLRGKPGADWVLLSDPLIGQSSTVQEECGKALK

KSWGKGKMTPDGRRLQEGDTFDEWDDDEEEVGFPVQPRVPLRQMTYKLAV

DFSHFLKSKGGLDGIYYSERREKILNLYALNEWGIIDDWQAYSPGPGIRYPRV

FGFCFKLVPVDLHEEARNCERHCAAHPAQMGAAPDGIDHGEVLVWKFDPKL

AVEYRPDMFKDMHEHAKR

SEQ ID NO:23 (gRNA 核酸序列)

GAGAATCAAAATCGGTGAAT

SEQ ID NO:24 (SIV Nef-P2A-LNGFR 核酸序列；SIV Nef 序列加粗，P2A 序列加下劃線，LNGFR 序列呈斜體，限制位點呈小寫字體)

gaattc**ATGGGCTCCAGCAACTCCAAGAGGCAGCAACAGGGCTTGCTCA**

AGCTCTGGCGAGGGCTGCGAGGGAAGCCTGGGGCAGACTGGGTGCT

ATTGTCCGATCCGCTTATCGGGCAGTCATCAACAGTCCAAGAAGAGT

GCGGCAAGGCCTTGAAAAAGTCCTGGGGTAAAGGTAAAATGACTCCA

GACGGCCGCCGCCTGCAAGAAGGAGACACCTTTGATGAGTGGGATG

ATGATGAAGAAGAAGTAGGCTTCCCTGTGCAACCTCGAGTCCCCTTA

AGACAGATGACCTATAAATTAGCAGTGGACTTTTCCCACTTTTTAAAA

TCAAAGGGGGGACTGGATGGGATATATTACTCTGAAAGAAGAGAAAA

GATCCTGAATTTGTATGCCTTGAACGAGTGGGGAATAATAGATGATT

GGCAAGCTTACTCACCAGGCCCGGGGATAAGGTACCCGAGAGTCTTT

GGCTTCTGCTTTAAGCTAGTCCCAGTGGACCTGCATGAGGAGGCACG

CAACTGTGAGAGACACTGTCTGATGCATCCAGCACAGATGGGGGAAG

ATCCTGATGGAATAGATCATGGAGAAGTCTTGGTCTGGAAGTTTGAC

CCGAAGTTGGCGGTGGAGTACCGCCCGGACATGTTTAAGGACATGCA

CGAACATGCAAAGCGCacgcgt<u>GGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCT</u>

GAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGACCTggatcc*ATGGGGGC*

AGGTGCCACCGGCCGCGCCATGGACGGGCCGCGCCTGCTGCTGTTGCTGCTT

CTGGGGGTGTCCCTTGGAGGTGCCAAGGAGGCATGCCCCACAGGCCTGTACA

CACACAGCGGTGAGTGCTGCAAAGCCTGCAACCTGGGCGAGGGTGTGGCCCA

GCCTTGTGGAGCCAACCAGACCGTGTGTGAGCCCTGCCTGGACAGCGTGACG

TTCTCCGACGTGGTGAGCGCGACCGAGCCGTGCAAGCCGTGCACCGAGTGCG

TGGGGCTCCAGAGCATGTCGGCGCCGTGCGTGGAGGCCGACGACGCCGTGT

GCCGCTGCGCCTACGGCTACTACCAGGATGAGACGACTGGGCGCTGCGAGG

CGTGCCGCGTGTGCGAGGCGGGCTCGGGCCTCGTGTTCTCCTGCCAGGACAA

GCAGAACACCGTGTGCGAGGAGTGCCCCGACGGCACGTATTCCGACGAGGCC

AACCACGTGGACCCGTGCCTGCCCTGCACCGTGTGCGAGGACACCGAGCGCC

AGCTCCGCGAGTGCACACGCTGGGCCGACGCCGAGTGCGAGGAGATCCCTG

GCCGTTGGATTACACGGTCCACACCCCCAGAGGGCTCGGACAGCACAGCCCC

CAGCACCCAGGAGCCTGAGGCACCTCCAGAACAAGACCTCATAGCCAGCACG

GTGGCAGGTGTGGTGACCACAGTGATGGGCAGCTCCCAGCCCCGTGGTGACCC

GAGGCACCACCGACAACCTCATCCCTGTCTATTGCTCCATCCTGGCTGCTGTG

*GTTGTGGGCCTTGTGGCCTACATAGCCTTC*tgatctaga

SEQ ID NO:25 (HIV1 Nef-T2A-Puro 核酸序列；HIV1 Nef 序列加粗，T2A 序列加下劃線，Puro 序列呈斜體，限制位點呈小寫字體)

gaattc**ATGGGTGGCAAGTGGTCAAAAAGTAGTGTGATTGGATGGCCTA**

CTGTAAGGGAAAGAATGAGACGAGCTGAGCCAGCAGCAGATAGGGT

GGGAGCAGCATCTCGAGACCTGGAAAAACATGGAGCAATCACAAGTA

GCAATACAGCAGCTACCAATGCTGCTTGTGCCTGGCTAGAAGCACAA

GAGGAGGAGGAGGTGGGTTTTCCAGTCACACCTCAGGTACCTTTAAG

ACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAAGA

AAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAATTCACTCCCAAAGAAGACAAGATA

TCCTTGATCTGTGGATCTACCACACACAAGGCTACTTCCCTGATTgGC

AGAACTACACACCAGGGCCAGGGGTCAGATATCCACTGACCTTTGGA

TGGTGCTACAAGCTAGTACCAGTTGAGCCAGATAAGATAGAAGAGGC

CAATAAAGGAGAGAACACCAGCTTGTTACACCCTGTGAGCCTGCATG

GGATGGATGACCCGGAGAGAGAAGTGTTAGAGTGGAGGTTTGACAG

CCGCCTAGCATTTCATCACGTGGCCCGAGAGCTGCATCCGGAGTACT

TCAAGAACTGCactagtGGCAGTGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTGCTAACAT

GCGGTGACGTCGAGGAGAATCCTGGCCCAacgcgt*ATGACCGAGTACAAGCCC*

ACGGTGCGCCTCGCCACCCGCGACGACGTCCCCAGGGCCGTACGCACCCTC

GCCGCCGCGTTCGCCGACTACCCCGCCACGCGCCACACCGTCGATCCGGAC

CGCCACATCGAGCGGGTCACCGAGCTGCAAGAACTCTTCCTCACGCGCGTCG

GGCTCGACATCGGCAAGGTGTGGGTCGCGGACGACGGCGCCGCGGTGGCGG

TCTGGACCACGCCGGAGAGCGTCGAAGCGGGGGCGGTGTTCGCCGAGATCG

GCCCGCGCATGGCCGAGTTGAGCGGTTCCCGGCTGGCCGCGCAGCAACAGA

TGGAAGGCCTCCTGGCGCCGCACCGGCCCAAGGAGCCCGCGTGGTTCCTGG

CCACCGTCGGCGTCTCGCCCGACCACCAGGGCAAGGGTCTGGGCAGCGCCG

TCGTGCTCCCCGGAGTGGAGGCGGCCGAGCGCGCCGGGGTGCCCGCCTTCC

TGGAGACCTCCGCGCCCCGCAACCTCCCCTTCTACGAGCGGCTCGGCTTCAC

CGTCACCGCCGACGTCGAGGTGCCCGAAGGACCGCGCACCTGGTGCATGAC

*CCGCAAGCCCGGTGCCTGA*ggatcc

SEQ ID NO:26 (HIV2 Nef-T2A-Puro 核酸序列；HIV1 Nef 序列加粗，T2A 序列加下劃線，Puro 序列呈斜體，限制位點呈小寫字體)

gaattc**ATGGGTGCGAGTGGATCCAAGAAGCTTTCCAAGCATTCGCGAG**

GACTACGAGAGAGACTCTTGCGGGCGCGTGGGGATGGTTATGGGAA

GCAGCGCGACGCATCGGGAGGGGAATACTCGCAGTTCCAAGAAGAA

TCAGGCAGGGAGCAGAACTCGCCCTCCTGTGAGGGACAGCAGTATCA

GCAGGGAGAGTACATGAACAGCCCATGGAGAAACCCAGCAACAGAA

AGACAGAAAGATTTGTATAGGCAGCAAAATATGGATGATGTAGATTC

TGATGATGATGACCTAATAGGAGTTCCTGTTACACCAAGAGTACCAC

GGAGAGAAATGACCTATAAATTGGCAATAGATATGTCACATTTTATAA

AAGAAAAAGGGGGACTGCAAGGGATGTTTTACAGTAGGAGGAGACA

TAGAATCCTAGACATATACCTAGAAAAAGAGGAAGGGATAATACCAG

ATTGGCAGAATTATACTCATGGGCCAGGAGTAAGGTACCCAATGTAC

TTCGGGTGGCTGTGGAAGCTAGTATCAGTAGAACTCTCACAAGAGGC

AGAGGAAGATGAGGCCAACTGCTTAGTACACCCAGCACAAACAAGCA

GACATGATGATGAGCATGGGGAGACATTAGTGTGGCAGTTTGACTCC

ATGCTGGCCTATAACTACAAGGCCTTCACTCTGTACCCAGAAGAGTT

TGGGCACAAGTCAGGATTGCCAGAGAAAGAATGGAAGGCAAAACTG

AAAGCAAGAGGGATACCATATAGTGAAactagtGGCAGTGGAGAGGGCAG

AGGAAGTCTGCTAACATGCGGTGACGTCGAGGAGAATCCTGGCCCAacgcgt

ATGACCGAGTACAAGCCCACGGTGCGCCTCGCCACCCGCGACGACGTCCCCA

GGGCCGTACGCACCCTCGCCGCCGCGTTCGCCGACTACCCCCGCCACGCGCC

ACACCGTCGATCCGGACCGCCACATCGAGCGGGTCACCGAGCTGCAAGAACT

CTTCCTCACGCGCGTCGGGCTCGACATCGGCAAGGTGTGGGTCGCGGACGAC

GGCGCCGCGGTGGCGGTCTGGACCACGCCGGAGAGCGTCGAAGCGGGGGC

GGTGTTCGCCGAGATCGGCCCGCGCATGGCCGAGTTGAGCGGTTCCCGGCT

GGCCGCGCAGCAACAGATGGAAGGCCTCCTGGCGCCGCACCGGCCCAAGGA

GCCCGCGTGGTTCCTGGCCACCGTCGGCGTCTCGCCCGACCACCAGGGCAA

GGGTCTGGGCAGCGCCGTCGTGCTCCCCGGAGTGGAGGCGGCCGAGCGCG

CCGGGGTGCCCGCCTTCCTGGAGACCTCCGCGCCCCGCAACCTCCCCTTCTA

CGAGCGGCTCGGCTTCACCGTCACCGCCGACGTCGAGGTGCCCGAAGGACC

*GCGCACCTGGTGCATGACCCGCAAGCCCGGTGCCTGA*ggatcc

SEQ ID NO:27 (SIV Nef-P2A-LNGFR 胺基酸序列；SIV Nef 序列加粗，P2A 序列加下劃線，LNGFR 序列呈斜體，限制位點呈灰色)

EFMGSSNSKRQQQGLLKLWRGLRGKPGADWVLLSDPLIGQSSTVQEEC

GKALKKSWGKGKMTPDGRRLQEGDTFDEWDDDEEEVGFPVQPRVPLR

QMTYKLAVDFSHFLKSKGGLDGIYYSERREKILNLYALNEWGIIDDWQA

YSPGPGIRYPRVFGFCFKLVPVDLHEEARNCERHCLMHPAQMGEDPDGI

DHGEVLVWKFDPKLAVEYRPDMFKDMHEHAKRTRGSGATNFSLLKQAG

DVEENPGPGS*MGAGATGRAMDGPRLLLLLLLGVSLGGAKEACPTGLYTHSGECC*

KACNLGEGVAQPCGANQTVCEPCLDSVTFSDVVSATEPCKPCTECVGLQSMSAP

CVEADDAVCRCAYGYYQDETTGRCEACRVCEAGSGLVFSCQDKQNTVCEECPD

GTYSDEANHVDPCLPCTVCEDTERQLRECTRWADAECEEIPGRWITRSTPPEGSD

STAPSTQEPEAPPEQDLIASTVAGVVTTVMGSSQPVVTRGTTDNLIPVYCSILAAVV

*VGLVAYIAF*SR

SEQ ID NO:28 (HIV1 Nef-T2A-Puro 胺基酸序列；HIV1 Nef 序列加粗，T2A 序列加下劃線，Puro 序列呈斜體，限制位點呈灰色)

EFMGGKWSKSSVIGWPTVRERMRRAEPAADRVGAASRDLEKHGAITSSN

TAATNAACAWLEAQEEEEVGFPVTPQVPLRPMTYKAAVDLSHFLKEKG

GLEGLIHSQRRQDILDLWIYHTQGYFPDWQNYTPGPGVRYPLTFGWCY

KLVPVEPDKIEEANKGENTSLLHPVSLHGMDDPEREVLEWRFDSRLAFH

HVARELHPEYFKNCTSGSGEGRGSLLTCGDVEENPGP**TR***MTEYKPTVRLATR*

DDVPRAVRTLAAAFADYPATRHTVDPDRHIERVTELQELFLTRVGLDIGKVWVAD

DGAAVAVWTTPESVEAGAVFAEIGPRMAELSGSRLAAQQQMEGLLAPHRPKEPA

WFLATVGVSPDHQGKGLGSAVVLPGVEAAERAGVPAFLETSAPRNLPFYERLGFT

VTADVEVPEGPRTWCMTRKPGA-**GS**

SEQ ID NO:29 (HIV2 Nef-T2A-Puro 胺基酸序列；HIV2 Nef 序列加粗，T2A 序列加下劃線，Puro 序列呈斜體，限制位點呈灰色)

EFMGASGSKKLSKHSRGLRERLLRARGDGYGKQRDASGGEYSQFQEES

GREQNSPSCEGQQYQQGEYMNSPWRNPATERQKDLYRQQNMDDVDSD

DDDLIGVPVTPRVPRREMTYKLAIDMSHFIKEKGGLQGMFYSRRRHRIL

DIYLEKEEGIIPDWQNYTHGPGVRYPMYFGWLWKLVSVELSQEAEEDE

ANCLVHPAQTSRHDDEHGETLVWQFDSMLAYNYKAFTLYPEEFGHKSG

LPEKEWKAKLKARGIPYSETSGSGEGRGSLLTCGDVEENPGP**TR***MTEYKPT*

VRLATRDDVPRAVRTLAAAFADYPATRHTVDPDRHIERVTELQELFLTRVGLDIGK

VWVADDGAAVAVWTTPESVEAGAVFAEIGPRMAELSGSRLAAQQQMEGLLAPHR

PKEPAWFLATVGVSPDHQGKGLGSAVVLPGVEAAERAGVPAFLETSAPRNLPFYE

RLGFTVTADVEVPEGPRTWCMTRKPGA-**GS**

SEQ ID NO:30 (P2A 核酸序列)

GGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGG

AGGAGAACCCTGGACCT

SEQ ID NO:31 (T2A 核酸序列)

GGCAGTGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTGCTAACATGCGGTGACGTCGAGG

AGAATCCTGGCCCA

SEQ ID NO:32 (E2A 核酸序列)

GGAAGCGGACAGTGTACTAATTATGCTCTCTTGAAATTGGCTGGAGATGT

TGAGAGCAACCCTGGACCT

SEQ ID NO:33 (F2A 核酸序列)

GGAAGCGGAGTGAAACAGACTTTGAATTTTGACCTTCTCAAGTTGGCGGG

AGACGTGGAGTCCAACCCTGGACCT

SEQ ID NO:34 (IRES 核酸序列)

GCCCCTCTCCCTCCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGGAAT

AAGGCCGGTGTGCGTTTGTCTATATGTTATTTTCCACCATATTGCCGTCTT

TTGGCAATGTGAGGGCCCGGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATT

CCTAGGGGTCTTTCCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGT

CGTGAAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTCTG

TAGCGACCCTTTGCAGGCAGCGGAACCCCCCACCTGGCGACAGGTGCCTC

TGCGGCCAAAAGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAAC

CCCAGTGCCACGTTGTGAGTTGGATAGTTGTGGAAAGAGTCAAATGGCTC

TCCTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGATGCCCAGAAGGTACCCC

ATTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTGCACATGCTTTACATGTGTTT

AGTCGAGGTTAAAAAAACGTCTAGGCCCCCCGAACCACGGGGACGTGGT

TTTCCTTTGAAAAACACGATGATAATATGGCCACA

SEQ ID NO:35 (PGK 核酸序列)

GGGTAGGGGAGGCGCTTTTCCCAAGGCAGTCTGGAGCATGCGCTTTAGCA

GCCCCGCTGGGCACTTGGCGCTACACAAGTGGCCTCTGGCCTCGCACACA

TTCCACATCCACCGGTAGGCGCCAACCGGCTCCGTTCTTTGGTGGCCCCTT

CGCGCCACCTTCTACTCCTCCCCTAGTCAGGAAGTTCCCCCCCCGCCCCGCA

GCTCGCGTCGTGCAGGACGTGACAAATGGAAGTAGCACGTCTCACTAGTC

TCGTGCAGATGGACAGCACCGCTGAGCAATGGAAGCGGGTAGGCCTTTG

GGGCAGCGGCCAATAGCAGCTTTGCTCCTTCGCTTTCTGGGCTCAGAGGC

TGGGAAGGGGTGGGTCCGGGGGCGGGCTCAGGGGCGGGCTCAGGGGCGG

GGCGGGCGCCCGAAGGTCCTCCGGAGGCCCGGCATTCTGCACGCTTCAAA

AGCGCACGTCTGCCGCGCTGTTCTCCTCTTCCTCATCTCCGGGCCTTTCGA

CCTGCAGCCCAAGCTTACC

SEQ ID NO:36 (P2A 胺基酸序列)

GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP

SEQ ID NO:37 (T2A 胺基酸序列)

GSGEGRGSLLTCGDVEENPGP

SEQ ID NO:38 (E2A 胺基酸序列)

GSGQCTNYALLKLAGDVESNPGP

SEQ ID NO:39 (F2A 胺基酸序列)

GSGVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP

SEQ ID NO:40 (連接體胺基酸序列)

GGGGS

SEQ ID NO:41 (連接體胺基酸序列)

$(GGGGS)_2$

SEQ ID NO:42 (連接體胺基酸序列)

$(GGGS)_3$

SEQ ID NO:43 (連接體胺基酸序列)

$(GGGS)_4$

SEQ ID NO:44 (連接體胺基酸序列)

GGGGSGGGGSGGGGGGSGSGGGGS

SEQ ID NO:45 (連接體胺基酸序列)

GGGGSGGGGSGGGGGGSGSGGGGSGGGGSGGGGS

SEQ ID NO:46 (連接體胺基酸序列)

$(GGGGS)_3$

SEQ ID NO:47 (連接體胺基酸序列)

$(GGGGS)_4$

SEQ ID NO:48 (M167，SIV Nef-IRES-CD20 scFv (利妥昔單抗) CAR 核酸序列)

ATGGGCTCCAGCAACTCCAAGAGGCAGCAACAGGGCTTGCTCAAGCTCTG

GCGAGGGCTGCGAGGGAAGCCTGGGGCAGACTGGGTGCTATTGTCCGAT

CCGCTTATCGGGCAGTCATCAACAGTCCAAGAAGAGTGCGGCAAGGCCTT

GAAAAAGTCCTGGGGTAAAGGTAAAATGACTCCAGACGGCCGCCGCCTG

CAAGAAGGAGACACCTTTGATGAGTGGGATGATGATGAAGAAGAAGTAG

GCTTCCCTGTGCAACCTCGAGTCCCCTTAAGACAGATGACCTATAAATTA

GCAGTGGACTTTTCCCACTTTTTAAAATCAAAGGGGGGACTGGATGGGAT

ATATTACTCTGAAAGAAGAGAAAAGATCCTGAATTTGTATGCCTTGAACG

AGTGGGGAATAATAGATGATTGGCAAGCTTACTCACCAGGCCCGGGGAT

AAGGTACCCGAGAGTCTTTGGCTTCTGCTTTAAGCTAGTCCCAGTGGACC

TGCATGAGGAGGCACGCAACTGTGAGAGACACTGTCTGATGCATCCAGC

ACAGATGGGGGAAGATCCTGATGGAATAGATCATGGAGAAGTCTTGGTC

TGGAAGTTTGACCCGAAGTTGGCGGTGGAGTACCGCCCGGACATGTTTAA

GGACATGCACGAACATGCAAAGCGCtgaacgcgtGCCCCTCTCCCTCCCCCCC

CCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGGAATAAGGCCGGTGTGCGTTTG

TCTATATGTTATTTTCCACCATATTGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCC

GGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCCTAGGGGTCTTTCCCCTC

TCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCCT

CTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTCTGTAGCGACCCTTTGCAGGCA

GCGGAACCCCCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGT

GTATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCCAGTGCCACGTTGTGA

GTTGGATAGTTGTGGAAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAAC

AAGGGGCTGAAGGATGCCCAGAAGGTACCCCATTGTATGGGATCTGATCT

GGGGCCTCGGTGCACATGCTTTACATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAAAAC

GTCTAGGCCCCCCGAACCACGGGGACGTGGTTTTCCTTTGAAAAACACGA

TGATAATATGGCCACAggatccgccgccaccATGGCCCTGCCAGTGACCGCCTTG

CTCCTTCCCCTGGCTCTTCTGCTGCACGCTGCTAGACCTCAGGTGCAGCTT

CAGCAGCCTGGCGCTGAGCTGGTGAAGCCCGGAGCTAGCGTGAAGATGT

CCTGCAAGGCCAGCGGCTATACCTTCACCTCATACAACATGCACTGGGTG

AAGCAGACCCCTGGAAGAGGCCTCGAGTGGATTGGAGCTATCTACCCTGG

AAACGGAGACACCAGCTATAACCAGAAGTTCAAGGGAAAGGCTACCCTG

ACCGCTGACAAGAGCAGCAGCACCGCTTACATGCAGCTGAGCAGCCTTAC

AAGCGAGGACTCTGCCGTGTACTACTGCGCCAGAAGCACCTATTACGGCG

GCGACTGGTACTTCAACGTGTGGGGAGCTGGAACCACCGTGACCGTTAGC

GCCGGCGGCGGAGGCTCTGGCGGCGGAGGAAGCGGCGGCGGCGGCTCCC

AGATCGTGCTGTCTCAGAGCCCCGCTATCTTGAGCGCCTCCCCTGGAGAG

AAGGTGACCATGACTTGCAGAGCTAGCAGCAGCGTGAGCTACATCCACTG

GTTCCAACAGAAGCCAGGCAGCTCCCCTAAGCCTTGGATCTACGCTACCA

GCAACCTTGCCTCAGGCGTTCCCGTGAGATTCTCTGGATCTGGAAGCGGC

ACATCCTACTCCCTGACCATCTCCCGGGTCGAGGCTGAGGACGCTGCTAC

TTACTACTGCCAGCAGTGGACTAGCAACCCCCCCACATTTGGCGGCGGCA

CCAAACTGGAGATCAAGactagtaccacgacgccagcgccgcgaccaccaacaccggcgcccaccat

cgcgtcgcagcccctgtccctgcgcccagaggcgtgccggccagcggcgggggggcgcagtgcacacgagggggct

ggacttcgcctgtgatatctacatctgggcgcccttggccgggacttgtggggtccttctcctgtcactggttatcacccttta

ctgcaaacggggcagaaagaaactcctgtatatattcaaacaaccatttatgagaccagtacaaactactcaagaggaaga

tggctgtagctgccgatttccagaagaagaagaaggaggatgtgaactgagagtgaagttcagcaggagcgcagacgc

ccccgcgtaccagcagggccagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgttttggac

aagagacgtggccgggaccctgagatgggggggaaagccgagaaggaagaaccctcaggaaggcctgtacaatgaact

gcagaaagataagatggcggaggcctacagtgagattgggatgaaaggcgagcgccggaggggcaaggggcacgat

ggcctttaccagggtctcagtacagccaccaaggacacctacgacgcccttcacatgcaggccctgcccccctcgctaa

SEQ ID NO:49 (M168，SIV Nef-IRES-CD20 scFv (Leu-16) CAR 核酸序列)

ATGGGCTCCAGCAACTCCAAGAGGCAGCAACAGGGCTTGCTCAAGCTCTG

GCGAGGGCTGCGAGGGAAGCCTGGGGCAGACTGGGTGCTATTGTCCGAT

CCGCTTATCGGGCAGTCATCAACAGTCCAAGAAGAGTGCGGCAAGGCCTT

GAAAAAGTCCTGGGGTAAAGGTAAAATGACTCCAGACGGCCGCCGCCTG

CAAGAAGGAGACACCTTTGATGAGTGGGATGATGATGAAGAAGAAGTAG

GCTTCCCTGTGCAACCTCGAGTCCCCTTAAGACAGATGACCTATAAATTA

GCAGTGGACTTTTCCCACTTTTTAAAATCAAAGGGGGGACTGGATGGGAT

ATATTACTCTGAAAGAAGAGAAAAGATCCTGAATTTGTATGCCTTGAACG

AGTGGGGAATAATAGATGATTGGCAAGCTTACTCACCAGGCCCGGGGAT

AAGGTACCCGAGAGTCTTTGGCTTCTGCTTTAAGCTAGTCCCAGTGGACC

TGCATGAGGAGGCACGCAACTGTGAGAGACACTGTCTGATGCATCCAGC

ACAGATGGGGGAAGATCCTGATGGAATAGATCATGGAGAAGTCTTGGTC

TGGAAGTTTGACCCGAAGTTGGCGGTGGAGTACCGCCCGGACATGTTTAA

GGACATGCACGAACATGCAAAGCGCtgaacgcgtGCCCCTCTCCCTCCCCCCCC

CCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGGAATAAGGCCGGTGTGCGTTTG

TCTATATGTTATTTTCCACCATATTGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCC

GGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCCTAGGGGTCTTTCCCCTC

TCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCCT

CTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTCTGTAGCGACCCTTTGCAGGCA

GCGGAACCCCCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGT

GTATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCCAGTGCCACGTTGTGA

GTTGGATAGTTGTGGAAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAAC

AAGGGGCTGAAGGATGCCCAGAAGGTACCCCATTGTATGGGATCTGATCT

GGGGCCTCGGTGCACATGCTTTACATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAAAAC

GTCTAGGCCCCCCGAACCACGGGGACGTGGTTTTCCTTTGAAAAACACGA

TGATAATATGGCCACAggatccgccgccaccATGGCCCTGCCAGTGACCGCCTTG

CTCCTTCCCCTGGCTCTTCTGCTGCACGCTGCTAGACCTGAGGTGCAGCTG

CAGCAGAGCGGAGCTGAGCTGGTGAAGCCTGGCGCTAGCGTGAAGATGA

GCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCAGCTATAACATGCACTGGGTG

AAGCAGACCCCTGGACAGGGACTGGAGTGGATCGGAGCTATCTACCCTG

GAAACGGAGACACCTCATACAACCAGAAGTTCAAGGGAAAGGCTACCCT

GACCGCTGACAAGAGCAGCAGCACCGCTTACATGCAGCTGAGCTCACTG

ACCAGCGAGGACTCCGCCGACTACTACTGCGCCAGAAGCAACTACTACG

GAAGCAGCTACTGGTTCTTCGACGTGTGGGGAGCTGGAACCACCGTGACC

GTGTCAAGCGGCGGCGGAGGcTCCGGAGGCGGAGGATCTGGCGGCGGCG

GCAGCGACATCGTGCTGACCCAGAGCCCTGCTATCCTGTCTGCCAGCCCT

GGAGAGAAGGTGACCATGACCTGCAGAGCTAGCAGCAGCGTGAACTACA

TGGACTGGTATCAGAAAAAGCCCGGCAGCTCACCTAAGCCTTGGATCTAC

GCTACCAGCAACTTAGCCAGCGGCGTGCCTGCTAGATTCTCCGGAAGCGG

CTCTGGAACCAGCTACTCCCTTACCATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGACG

CTGCTACCTACTACTGCCAGCAGTGGAGCTTCAACCCTCCTACCTTCGGA

GGAGGAACCAAGCTGGAGATCAAGactagtaccacgacgccagcgccgcgaccaccaacaccg

gcgcccaccatcgcgtcgcagcccctgtccctgcgcccagaggcgtgccggccagcggcgggggggcgcagtgcaca

cgagggggctggacttcgcctgtgatatctacatctgggcgcccttggccgggacttgtggggtccttctcctgtcactggt

tatcacccttactgcaaacggggcagaaagaaactcctgtatatattcaaacaaccatttatgagaccagtacaaactactc

aagaggaagatggctgtagctgccgatttccagaagaagaagaaggaggatgtgaactgagagtgaagttcagcagga

gcgcagacgcccccgcgtaccagcagggccagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtac

gatgttttggacaagagacgtggccgggaccctgagatgggggggaaagccgagaaggaagaaccctcaggaaggcct

gtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctacagtgagattgggatgaaaggcgagcgccggaggggca

aggggcacgatggcctttaccagggtctcagtacagccaccaaggacacctacgacgcccttcacatgcaggccctgcc

ccctcgctaa

SEQ ID NO:50 (M169，SIV Nef-IRES-CD19×CD20 scFv CAR 核酸序列)

ATGGGCTCCAGCAACTCCAAGAGGCAGCAACAGGGCTTGCTCAAGCTCTG

GCGAGGGCTGCGAGGGAAGCCTGGGGCAGACTGGGTGCTATTGTCCGAT

CCGCTTATCGGGCAGTCATCAACAGTCCAAGAAGAGTGCGGCAAGGCCTT

GAAAAAGTCCTGGGGTAAAGGTAAAATGACTCCAGACGGCCGCCGCCTG

CAAGAAGGAGACACCTTTGATGAGTGGGATGATGATGAAGAAGAAGTAG

GCTTCCCTGTGCAACCTCGAGTCCCCTTAAGACAGATGACCTATAAATTA

GCAGTGGACTTTTCCCACTTTTTAAAATCAAAGGGGGGACTGGATGGGAT

ATATTACTCTGAAAGAAGAGAAAAGATCCTGAATTTGTATGCCTTGAACG

AGTGGGGAATAATAGATGATTGGCAAGCTTACTCACCAGGCCCGGGGAT

AAGGTACCCGAGAGTCTTTGGCTTCTGCTTTAAGCTAGTCCCAGTGGACC

TGCATGAGGAGGCACGCAACTGTGAGAGACACTGTCTGATGCATCCAGC

ACAGATGGGGGAAGATCCTGATGGAATAGATCATGGAGAAGTCTTGGTC

TGGAAGTTTGACCCGAAGTTGGCGGTGGAGTACCGCCCGGACATGTTTAA

GGACATGCACGAACATGCAAAGCGCtgaacgcgtGCCCCTCTCCCTCCCCCCC

CCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGGAATAAGGCCGGTGTGCGTTTG

TCTATATGTTATTTTCCACCATATTGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCC

GGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCCTAGGGGTCTTTCCCCTC

TCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCCT

CTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTCTGTAGCGACCCTTTGCAGGCA

GCGGAACCCCCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGT

GTATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCCAGTGCCACGTTGTGA

GTTGGATAGTTGTGGAAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAAC

AAGGGGCTGAAGGATGCCCAGAAGGTACCCCATTGTATGGGATCTGATCT

GGGGCCTCGGTGCACATGCTTTACATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAAAAC

GTCTAGGCCCCCCCGAACCACGGGGACGTGGTTTTCCTTTGAAAAACACGA

TGATAATATGGCCACAggatccgccgccaccATGGCCCTGCCTGTCACCGCCCTG

CTGCTGCCCCTGGCTCTGCTGCTGCACGCCGCAAGACCTGAAGTCCAGCT

GCAGCAGTCCGGGGCAGAGCTGGTGAAGCCAGGAGCCTCCGTGAAGATG

TCTTGTAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACATCCTATAACATGCACTGGGT

GAAGCAGACCCCTGGACAGGGCCTGGAGTGGATCGGAGCAATCTACCCA

GGCAACGGCGACACAAGCTATAATCAGAAGTTTAAGGGCAAGGCCACCC

TGACAGCCGATAAGAGCTCCTCTACCGCCTACATGCAGCTGAGCTCCCTG

ACAAGCGAGGACTCCGCCGATTACTATTGCGCCCGGTCCAATTACTATGG

CTCTAGCTACTGGTTCTTTGACGTGTGGGGAGCAGGAACCACAGTGACCG

TGTCCTCTGGAGGAGGAGGAAGCGGAGGAGGAGGATCTGGCGGCGGCGG

CTCTGATATCGTGCTGACACAGAGCCCAGCAATCCTGTCCGCCTCTCCAG

GAGAGAAGGTGACCATGACATGTCGGGCCAGCTCCTCTGTGAACTACATG

GACTGGTATCAGAAGAAGCCCGGCAGCTCCCCTAAGCCATGGATCTACGC

CACCTCCAATCTGGCATCTGGAGTGCCTGCAAGGTTCAGCGGcTCCGGAT

CTGGCACCAGCTATTCCCTGACAATCTCTCGCGTGGAGGCAGAGGATGCA

GCAACCTACTATTGCCAGCAGTGGAGCTTCAACCCCCCTACCTTTGGCGG

CGGCACAAAGCTGGAGATCAAGGGCGGCGGCGGCTCCGGCGGCGGCGGG

AGCGGCGGCGGCGGCTCTGGCGGCGGCGGCAGCGGCGGCGGCGGCTCCG

ACATCCAGATGACCCAGACCACATCTAGCCTGTCTGCCAGCCTGGGCGAC

AGGGTGACAATCAGCTGTCGCGCCTCCCAGGATATCTCTAAGTACCTGAA

TTGGTATCAGCAGAAGCCAGATGGCACCGTGAAGCTGCTGATCTACCACA

CAAGCCGGCTGCACTCCGGAGTGCCAAGCCGGTTCAGCGGCTCTGGCAGC

GGCACCGACTATAGCCTGACAATCTCCAACCTGGAGCAGGAGGATATCGC

CACCTACTTCTGCCAGCAGGGCAATACCCTGCCTTATACATTTGGCGGAG

GAACAAAGCTGGAGATCACCGGCTCCACATCTGGAAGCGGCAAGCCAGG

ATCTGGAGAGGGAAGCACCAAGGGAGAGGTGAAGCTGCAGGAGTCCGGA

CCAGGCCTGGTGGCACCTTCCCAGTCTCTGAGCGTGACCTGTACAGTGTC

TGGCGTGAGCCTGCCTGACTACGGCGTGTCCTGGATCAGGCAGCCACCAA

GAAAGGGCCTGGAGTGGCTGGGCGTGATCTGGGGCAGCGAGACAACATA

CTATAACTCCGCCCTGAAGAGCCGGCTGACCATCATCAAGGATAACTCCA

AGTCTCAGGTGTTCCTGAAGATGAATAGCCTGCAGACCGACGATACAGCC

ATCTACTATTGCGCCAAGCACTACTATTATGGAGGCAGTTATGCTATGGA

CTATTGGGGGCAGGGCACAAGCGTCACCGTCTCATCAactagtaccacgacgccagc

gccgcgaccaccaacaccggcgcccaccatcgcgtcgcagcccctgtccctgcgcccagaggcgtgccggccagcg

gcgggggcgcagtgcacacgaggggctggacttcgcctgtgatatctacatctgggcgcccttggccgggacttgtg

gggtccttctcctgtcactggttatcacccttactgcaaacggggcagaaagaaactcctgtatatattcaaacaaccatttat

gagaccagtacaaactactcaagaggaagatggctgtagctgccgatttccagaagaagaagaaggaggatgtgaactg

agagtgaagttcagcaggagcgcagacgcccccgcgtaccagcagggccagaaccagctctataacgagctcaatcta

ggacgaagagaggagtacgatgttttggacaagagacgtggccgggaccctgagatgggggggaaagccgagaagga

agaaccctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctacagtgagattgggatgaaag

gcgagcgccggaggggcaaggggcacgatggcctttaccagggtctcagtacagccaccaaggacacctacgacgcc

cttcacatgcaggccctgcccctcgctaa

SEQ ID NO:51 (M170，SIV Nef-IRES-CD19 scFv CAR 核酸序列)

ATGGGCTCCAGCAACTCCAAGAGGCAGCAACAGGGCTTGCTCAAGCTCTG

GCGAGGGCTGCGAGGGAAGCCTGGGGCAGACTGGGTGCTATTGTCCGAT

CCGCTTATCGGGCAGTCATCAACAGTCCAAGAAGAGTGCGGCAAGGCCTT

GAAAAAGTCCTGGGGTAAAGGTAAAATGACTCCAGACGGCCGCCGCCTG

CAAGAAGGAGACACCTTTGATGAGTGGGATGATGATGAAGAAGAAGTAG

GCTTCCCTGTGCAACCTCGAGTCCCCTTAAGACAGATGACCTATAAATTA

GCAGTGGACTTTTCCCACTTTTTAAAATCAAAGGGGGGACTGGATGGGAT

ATATTACTCTGAAAGAAGAGAAAAGATCCTGAATTTGTATGCCTTGAACG

AGTGGGGAATAATAGATGATTGGCAAGCTTACTCACCAGGCCCGGGGAT

AAGGTACCCGAGAGTCTTTGGCTTCTGCTTTAAGCTAGTCCCAGTGGACC

TGCATGAGGAGGCACGCAACTGTGAGAGACACTGTCTGATGCATCCAGC

ACAGATGGGGGAAGATCCTGATGGAATAGATCATGGAGAAGTCTTGGTC

TGGAAGTTTGACCCGAAGTTGGCGGTGGAGTACCGCCCGGACATGTTTAA

GGACATGCACGAACATGCAAAGCGCtgaacgcgtGCCCCTCTCCCTCCCCCCCC

CCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGGAATAAGGCCGGTGTGCGTTTG

TCTATATGTTATTTTCCACCATATTGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCC

GGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCCTAGGGGTCTTTCCCCTC

TCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCCT

CTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTCTGTAGCGACCCTTTGCAGGCA

GCGGAACCCCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGT

GTATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCCAGTGCCACGTTGTGA

GTTGGATAGTTGTGGAAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAAC

AAGGGGCTGAAGGATGCCCAGAAGGTACCCCATTGTATGGGATCTGATCT

GGGGCCTCGGTGCACATGCTTTACATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAAAAC

GTCTAGGCCCCCCGAACCACGGGGACGTGGTTTTCCTTTGAAAAACACGA

TGATAATATGGCCACAggatccgccgccaccATGGCCCTGCCTGTGACCGCCCTG

CTGCTGCCCCTGGCCCTGCTGCTGCACGCTGCTAGACCTGATATTCAGATG

ACCCAGACCACTAGCTCCCTGTCCGCCTCTCTGGGCGACAGAGTGACAAT

CAGCTGCAGGGCCTCCCAGGATATCTCTAAGTATCTGAACTGGTACCAGC

AGAAGCCAGACGGCACAGTGAAGCTGCTGATCTATCACACCAGCCGCCT

GCACTCCGGAGTGCCATCTCGGTTCAGCGGcTCCGGATCTGGCACAGACT

ACAGCCTGACCATCTCCAACCTGGAGCAGGAGGATATCGCCACCTATTTC

TGCCAGCAGGGCAATACACTGCCCTACACCTTTGGCGGCGGCACAAAGCT

GGAGATCACCGGAGGAGGAGGAAGCGGCGGAGGAGGCTCCGGCGGCGG

CGGCTCTGAGGTGAAGCTGCAGGAGTCCGGACCTGGCCTGGTGGCACCA

AGCCAGTCCCTGTCTGTGACATGTACCGTGTCCGGCGTGTCTCTGCCTGAT

TACGGCGTGTCTTGGATCAGGCAGCCACCTAGGAAGGGCCTGGAGTGGCT

GGGCGTGATCTGGGGCAGCGAGACAACATACTATAATTCTGCCCTGAAGA

GCAGACTGACCATCATCAAGGACAACAGCAAGTCCCAGGTGTTCCTGAA

GATGAATAGCCTGCAGACAGACGATACCGCCATCTACTATTGCGCCAAGC

ACTACTATTACGGCGGCAGCTATGCCATGGATTACTGGGGCCAGGGCACA

TCCGTGACCGTGTCTAGCactagtaccacgacgccagcgccgcgaccaccaacaccggcgcccaccat

cgcgtcgcagcccctgtccctgcgcccagaggcgtgccggccagcggcgggggggcgcagtgcacacgagggggct

ggacttcgcctgtgatatctacatctgggcgcccttggccgggacttgtggggtccttctcctgtcactggttatcacccttta

ctgcaaacggggcagaaagaaactcctgtatatattcaaacaaccatttatgagaccagtacaaactactcaagaggaaga

tggctgtagctgccgatttccagaagaagaagaaggaggatgtgaactgagagtgaagttcagcaggagcgcagacgc

ccccgcgtaccagcagggccagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgttttggac

aagagacgtggccgggaccctgagatgggggggaaagccgagaaggaagaaccctcaggaaggcctgtacaatgaact

gcagaaagataagatggcggaggcctacagtgagattgggatgaaaggcgagcgccggaggggcaaggggcacgat

ggccttaccagggtctcagtacagccaccaaggacacctacgacgcccttcacatgcaggccctgccccctcgctaa

SEQ ID NO:52 (M171，SIV Nef-IRES-BCMA BiVHH CAR1 核酸序列)

ATGGGCTCCAGCAACTCCAAGAGGCAGCAACAGGGCTTGCTCAAGCTCTG

GCGAGGGCTGCGAGGGAAGCCTGGGGCAGACTGGGTGCTATTGTCCGAT

CCGCTTATCGGGCAGTCATCAACAGTCCAAGAAGAGTGCGGCAAGGCCTT

GAAAAAGTCCTGGGGTAAAGGTAAAATGACTCCAGACGGCCGCCGCCTG

CAAGAAGGAGACACCTTTGATGAGTGGGATGATGATGAAGAAGAAGTAG

GCTTCCCTGTGCAACCTCGAGTCCCCTTAAGACAGATGACCTATAAATTA

GCAGTGGACTTTTCCCACTTTTTAAAATCAAAGGGGGGACTGGATGGGAT

ATATTACTCTGAAAGAAGAGAAAAGATCCTGAATTTGTATGCCTTGAACG

AGTGGGGAATAATAGATGATTGGCAAGCTTACTCACCAGGCCCGGGGAT

AAGGTACCCGAGAGTCTTTGGCTTCTGCTTTAAGCTAGTCCCAGTGGACC

TGCATGAGGAGGCACGCAACTGTGAGAGACACTGTCTGATGCATCCAGC

ACAGATGGGGGAAGATCCTGATGGAATAGATCATGGAGAAGTCTTGGTC

TGGAAGTTTGACCCGAAGTTGGCGGTGGAGTACCGCCCGGACATGTTTAA

GGACATGCACGAACATGCAAAGCGCtgaacgcgtGCCCCTCTCCCTCCCCCCC

CCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGGAATAAGGCCGGTGTGCGTTTG

TCTATATGTTATTTTCCACCATATTGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCC

GGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCCTAGGGGTCTTTCCCCTC

TCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCCT

CTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTCTGTAGCGACCCTTTGCAGGCA

GCGGAACCCCCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGT

GTATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCCAGTGCCACGTTGTGA

GTTGGATAGTTGTGGAAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAAC

AAGGGGCTGAAGGATGCCCAGAAGGTACCCCATTGTATGGGATCTGATCT

GGGGCCTCGGTGCACATGCTTTACATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAAAAC

GTCTAGGCCCCCCGAACCACGGGGACGTGGTTTTCCTTTGAAAAACACGA

TGATAATATGGCCACAggatccgccgccaccatggctctgcccgtcaccgctctgctgctgcctctggctc

tgctgctgcacgctgctcgccctcaggtcaaactggaagaatctggcggaggcctggtgcaggcaggacggagcctgc

gcctgagctgcgcagcatccgagcacaccttcagctcccacgtgatgggctggtttcggcaggccccaggcaaggaga

gagagagcgtggccgtgatcggctggagggacatctccacatcttacgccgattccgtgaagggccggttcaccatcag

ccgggacaacgccaagaagacactgtatctgcagatgaacagcctgaagcccgaggacaccgccgtgtactattgcgca

gcaaggagaatcgacgcagcagactttgattcctggggccagggcacccaggtgacagtgtctagcggaggaggagg

atctgaggtgcagctggtggagagcggaggcggcctggtgcaggccggaggctctctgaggctgagctgtgcagcatc

cggaagaaccttcacaatgggctggtttaggcaggcaccaggaaaggagagggagttcgtggcagcaatcagcctgtc

ccctaccctggcctactatgccgagagcgtgaagggcaggtttaccatctcccgcgataacgccaagaatacagtggtgc

tgcagatgaactccctgaaacctgaggacacagccctgtactattgtgccgccgatcggaagagcgtgatgagcattaga

ccagactattgggggcagggaacacaggtgaccgtgagcagcactagtaccacgacgccagcgccgcgaccaccaac

accggcgcccaccatcgcgtcgcagcccctgtccctgcgcccagaggcgtgccggccagcggcgggggggcgcagtg

cacacgagggggctggacttcgcctgtgatatctacatctgggcgcccttggccgggacttgtggggtccttctcctgtcac

tggttatcacccttactgcaaacggggcagaaagaaactcctgtatatattcaaacaaccatttatgagaccagtacaaact

actcaagaggaagatggctgtagct.gccgatttccagaagaagaagaaggaggatgtgaactgagagtgaagttcagc

aggagcgcagacgcccccgcgtaccagcagggccagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagagagga

gtacgatgttttggacaagagacgtggccgggaccctgagatgggggggaaagccgagaaggaagaaccctcaggaag

gcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctacagtgagattgggatgaaaggcgagcgccggagg

ggcaaggggcacgatggcctttaccagggtctcagtacagccaccaaggacacctacgacgcccttcacatgcaggccc

tgcccccctcgctaa

SEQ ID NO:53 (M172，SIV Nef-IRES-BCMA BiVHH CAR2 核酸序列)

ATGGGCTCCAGCAACTCCAAGAGGCAGCAACAGGGCTTGCTCAAGCTCTG

GCGAGGGCTGCGAGGGAAGCCTGGGGCAGACTGGGTGCTATTGTCCGAT

CCGCTTATCGGGCAGTCATCAACAGTCCAAGAAGAGTGCGGCAAGGCCTT

GAAAAAGTCCTGGGGTAAAGGTAAAATGACTCCAGACGGCCGCCGCCTG

CAAGAAGGAGACACCTTTGATGAGTGGGATGATGATGAAGAAGAAGTAG

GCTTCCCTGTGCAACCTCGAGTCCCCTTAAGACAGATGACCTATAAATTA

GCAGTGGACTTTTCCCACTTTTTAAAATCAAAGGGGGGACTGGATGGGAT

ATATTACTCTGAAAGAAGAGAAAAGATCCTGAATTTGTATGCCTTGAACG

AGTGGGGAATAATAGATGATTGGCAAGCTTACTCACCAGGCCCGGGGAT

AAGGTACCCGAGAGTCTTTGGCTTCTGCTTTAAGCTAGTCCCAGTGGACC

TGCATGAGGAGGCACGCAACTGTGAGAGACACTGTCTGATGCATCCAGC

ACAGATGGGGGAAGATCCTGATGGAATAGATCATGGAGAAGTCTTGGTC

TGGAAGTTTGACCCGAAGTTGGCGGTGGAGTACCGCCCGGACATGTTTAA

GGACATGCACGAACATGCAAAGCGCtgaacgcgtGCCCCTCTCCCTCCCCCCCC

CCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGGAATAAGGCCGGTGTGCGTTTG

TCTATATGTTATTTTCCACCATATTGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCC

GGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCCTAGGGGTCTTTCCCCTC

TCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCCT

CTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTCTGTAGCGACCCTTTGCAGGCA

GCGGAACCCCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGT

GTATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCCAGTGCCACGTTGTGA

GTTGGATAGTTGTGGAAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAAC

AAGGGGCTGAAGGATGCCCAGAAGGTACCCCATTGTATGGGATCTGATCT

GGGGCCTCGGTGCACATGCTTTACATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAAAAC

GTCTAGGCCCCCCCGAACCACGGGGACGTGGTTTTCCTTTGAAAAACACGA

TGATAATATGGCCACAggatccgccgccaccATGGCTCTGCCCGTCACCGCACTG

CTGCTGCCTCTGGCTCTGCTGCTGCACGCTGCTCGCCCTCAGGTCAAACTG

GAAGAATCTGGCGGAGGCCTGGTGCAGGCAGGCAGGTCCCTGAGGCTGT

CTTGCGCAGCAAGCGAGCACACCTTTAGCTCCCACGTGATGGGATGGTTC

AGGCAGGCACCAGGCAAGGAGAGAGAGTCCGTGGCCGTGATCGGCTGGA

GGGACATCTCCACATCTTACGCCGATTCTGTGAAGGGCCGGTTTACCATC

AGCAGAGACAACGCCAAGAAGACACTGTATCTGCAGATGAATAGCCTGA

AGCCTGAGGACACCGCCGTGTACTATTGCGCAGCAAGGAGAATCGATGC

AGCAGACTTCGATTCCTGGGGACAGGGAACCCAGGTGACAGTGTCTAGC

GGAGGAGGAGGAAGCGCCGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGCGGCGGCCTGG

TGCAGGCCGGCGATTCTCTGCGGCTGACCTGTACAGCCTCCGGCAGAGCC

TTCTCTACCTACTTTATGGCCTGGTTTAGACAGGCCCCTGGCAAGGAGAG

GGAGTTTGTGGCAGGAATCGCATGGAGCGGAGGcTCCACAGCATACGCCG

ACTCCGTGAAGGGCAGGTTCACCATCTCTCGCGATAACGCCAAGAATACA

GTGTATCTGCAGATGAACTCTCTGAAGAGCGAGGACACAGCCGTGTACTA

TTGTGCCAGCCGGGGAATCGAGGTGGAGGAATTTGGGGCTTGGGGGCAG

GGAACTCAGGTGACCGTCTCATCAactagtaccacgacgccagcgccgcgaccaccaacaccgg

cgcccaccatcgcgtcgcagcccctgtccctgcgcccagaggcgtgccggccagcggcgggggggcgcagtgcacac

gaggggctggacttcgcctgtgatatctacatctgggcgcccttggccgggacttgtggggtccttctcctgtcactggtt

atcacccctttactgcaaacggggcagaaagaaactcctgtatatattcaaacaaccatttatgagaccagtacaaactactca

agaggaagatggctgtagctgccgatttccagaagaagaagaaggaggatgtgaactgagagtgaagttcagcaggag

cgcagacgcccccgcgtaccagcagggccagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacg

atgttttggacaagagacgtggccgggaccctgagatgggggggaaagccgagaaggaagaaccctcaggaaggcctg

tacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctacagtgagattgggatgaaaggcgagcgccggaggggcaa

ggggcacgatggcctttaccagggtctcagtacagccaccaaggacacctacgacgcccttcacatgcaggccctgccc

cctcgctaa

SEQ ID NO:54 (M173，SIV Nef-IRES-BCMA mono-VHH CAR 核酸序列)

ATGGGCTCCAGCAACTCCAAGAGGCAGCAACAGGGCTTGCTCAAGCTCTG

GCGAGGGCTGCGAGGGAAGCCTGGGGCAGACTGGGTGCTATTGTCCGAT

CCGCTTATCGGGCAGTCATCAACAGTCCAAGAAGAGTGCGGCAAGGCCTT

GAAAAAGTCCTGGGGTAAAGGTAAAATGACTCCAGACGGCCGCCGCCTG

CAAGAAGGAGACACCTTTGATGAGTGGGATGATGATGAAGAAGAAGTAG

GCTTCCCTGTGCAACCTCGAGTCCCCTTAAGACAGATGACCTATAAATTA

GCAGTGGACTTTTCCCACTTTTTAAAATCAAAGGGGGGACTGGATGGGAT

ATATTACTCTGAAAGAAGAGAAAAGATCCTGAATTTGTATGCCTTGAACG

AGTGGGGAATAATAGATGATTGGCAAGCTTACTCACCAGGCCCGGGGAT

AAGGTACCCGAGAGTCTTTGGCTTCTGCTTTAAGCTAGTCCCAGTGGACC

TGCATGAGGAGGCACGCAACTGTGAGAGACACTGTCTGATGCATCCAGC

ACAGATGGGGGAAGATCCTGATGGAATAGATCATGGAGAAGTCTTGGTC

TGGAAGTTTGACCCGAAGTTGGCGGTGGAGTACCGCCCGGACATGTTTAA

GGACATGCACGAACATGCAAAGCGCtgaacgcgtGCCCCTCTCCCTCCCCCCC

CCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGGAATAAGGCCGGTGTGCGTTTG

TCTATATGTTATTTTCCACCATATTGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCC

GGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCCTAGGGGTCTTTCCCCTC

TCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCCT

CTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTCTGTAGCGACCCTTTGCAGGCA

GCGGAACCCCCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGT

GTATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCCAGTGCCACGTTGTGA

GTTGGATAGTTGTGGAAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAAC

AAGGGGCTGAAGGATGCCCAGAAGGTACCCCATTGTATGGGATCTGATCT

GGGGCCTCGGTGCACATGCTTTACATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAAAAC

GTCTAGGCCCCCCGAACCACGGGGACGTGGTTTTCCTTTGAAAAACACGA

TGATAATATGGCCACAggatccgccgccaccatggctctgcccgtcaccgctctgctgctgcctctggctc

tgctgctgcacgctgctcgccctcaggtcaaactggaagaatctggcggaggcctggtgcaggcaggacggagcctgc

gcctgagctgcgcagcatccgagcacaccttcagctcccacgtgatgggctggtttcggcaggccccaggcaaggaga

gagagagcgtggccgtgatcggctggagggacatctccacatcttacgccgattccgtgaagggccggttcaccatcag

ccgggacaacgccaagaagacactgtatctgcagatgaacagcctgaagcccgaggacaccgccgtgtactattgcgca

gcaaggagaatcgacgcagcagactttgattcctggggccagggcacccaggtgacagtgtctagcactagtaccacga

cgccagcgccgcgaccaccaacaccggcgcccaccatcgcgtcgcagcccctgtccctgcgcccagaggcgtgccgg

ccagcggcgggggcgcagtgcacacgaggggctggacttcgcctgtgatatctacatctgggcgcccttggccggg

acttgtggggtccttctcctgtcactggttatcacccttactgcaaacggggcagaaagaaactcctgtatatattcaaacaa

ccatttatgagaccagtacaaactactcaagaggaagatggctgtagctgccgatttccagaagaagaagaaggaggatg

tgaactgagagtgaagttcagcaggagcgcagacgcccccgcgtaccagcagggccagaaccagctctataacgagct

caatctaggacgaagagaggagtacgatgttttggacaagagacgtggccgggaccctgagatgggggggaaagccga

gaaggaagaaccctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctacagtgagattggga

tgaaaggcgagcgccggaggggcaaggggcacgatggcctttaccagggtctcagtacagccaccaaggacacctac

gacgcccttcacatgcaggccctgcccccctcgctaa

SEQ ID NO:55 (抗 CD20 scFv (利妥昔單抗) CAR 胺基酸序列)

MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFT

SYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAY

MQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAGGGGSGGGG

SGGGGSQIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQQKPGSSPKPWIY

ATSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGT

KLEIKTSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI

WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCR

FPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRG

RDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLY

QGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO:56 (抗 CD20 scFv (Leu-16) CAR 胺基酸序列)

MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFT

SYNMHWVKQTPGQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAY

MQLSSLTSEDSADYYCARSNYYGSSYWFFDVWGAGTTVTVSSGGGGSGGG

GSGGGGSDIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVNYMDWYQKKPGSSPKP

WIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSFNPPTFG

GGTKLEIKTSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFAC

DIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC

SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDK

RRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD

GLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO:57 (CD19×CD20 scFv CAR 胺基酸序列)

MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFT

SYNMHWVKQTPGQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAY

MQLSSLTSEDSADYYCARSNYYGSSYWFFDVWGAGTTVTVSSGGGGSGGG

GSGGGGSDIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVNYMDWYQKKPGSSPKP

WIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSFNPPTFG

GGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQTTSSLSASLGDR

VTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDY

SLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKG

EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIW

GSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGS

YAMDYWGQGTSVTVSSTSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV

HTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPV

QTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRR

EEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGE

RRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO:58 (抗 CD19 scFv CAR 胺基酸序列)

MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKY

LNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIAT

YFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPS

QSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRL

TIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTV

SSTSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWA

PLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPE

EEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP

EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGL

STATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO:59 (抗 BCMA BiVHH CAR1 胺基酸序列)

MALPVTALLLPLALLLHAARPQVKLEESGGGLVQAGRSLRLSCAASEHTFSS

HVMGWFRQAPGKERESVAVIGWRDISTSYADSVKGRFTISRDNAKKTLYLQ

MNSLKPEDTAVYYCAARRIDAADFDSWGQGTQVTVSSGGGGSEVQLVESG

GGLVQAGGSLRLSCAASGRTFTMGWFRQAPGKEREFVAAISLSPTLAYYAES

VKGRFTISRDNAKNTVVLQMNSLKPEDTALYYCAADRKSVMSIRPDYWGQG

TQVTVSSTSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD

IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCS

CRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR

RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDG

LYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO:60 (抗 BCMA BiVHH CAR2 胺基酸序列)

MALPVTALLLPLALLLHAARPQVKLEESGGGLVQAGRSLRLSCAASEHTFSS

HVMGWFRQAPGKERESVAVIGWRDISTSYADSVKGRFTISRDNAKKTLYLQ

MNSLKPEDTAVYYCAARRIDAADFDSWGQGTQVTVSSGGGGSAVQLVESG

GGLVQAGDSLRLTCTASGRAFSTYFMAWFRQAPGKEREFVAGIAWSGGSTA

YADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKSEDTAVYYCASRGIEVEEFGAWG

QGTQVTVSSTSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFA

CDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDG

CSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLD

KRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH

DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO:61 (抗 BCMA mono-VHH CAR 胺基酸序列)

MALPVTALLLPLALLLHAARPQVKLEESGGGLVQAGRSLRLSCAASEHTFSS

HVMGWFRQAPGKERESVAVIGWRDISTSYADSVKGRFTISRDNAKKTLYLQ

MNSLKPEDTAVYYCAARRIDAADFDSWGQGTQVTVSSTSTTTPAPRPPTPAP

TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVIT

LYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSA

DAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGL

YNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ

ALPPR

SEQ ID NO:62 (M133，BCMA BiVHH CAR1-IRES-SIV Nef M116 核酸序列)

gccgccaccatggctctgcccgtcaccgctctgctgctgcctctggctctgctgctgcacgctgctcgccctcaggtcaaa

ctggaagaatctggcggaggcctggtgcaggcaggacggagcctgcgcctgagctgcgcagcatccgagcacaccttc

agctcccacgtgatgggctggtttcggcaggccccaggcaaggagagagagagcgtggccgtgatcggctggaggga

catctccacatcttacgccgattccgtgaagggccggttcaccatcagccgggacaacgccaagaagacactgtatctgc

agatgaacagcctgaagcccgaggacaccgccgtgtactattgcgcagcaaggagaatcgacgcagcagactttgattc

ctggggccagggcacccaggtgacagtgtctagcggaggaggaggatctgaggtgcagctggtggagagcggaggc

ggcctggtgcaggccggaggctctctgaggctgagctgtgcagcatccggaagaaccttcacaatgggctggtttaggc

aggcaccaggaaaggagagggagttcgtggcagcaatcagcctgtcccctaccctggcctactatgccgagagcgtga

agggcaggtttaccatctcccgcgataacgccaagaatacagtggtgctgcagatgaactccctgaaacctgaggacaca

gccctgtactattgtgccgccgatcggaagagcgtgatgagcattagaccagactattgggggcagggaacacaggtga

ccgtgagcagcactagtaccacgacgccagcgccgcgaccaccaacaccggcgcccaccatcgcgtcgcagcccctg

tccctgcgcccagaggcgtgccggccagcggcgggggggcgcagtgcacacgaggggctggacttcgcctgtgatat

ctacatctgggcgcccttggccgggacttgtggggtccttctcctgtcactggttatcacccttactgcaaacggggcaga

aagaaactcctgtatatattcaaacaaccatttatgagaccagtacaaactactcaagaggaagatggctgtagctgccgatt

tccagaagaagaagaaggaggatgtgaactggttaacagagtgaagttcagcaggagcgcagacgcccccgcgtacca

gcagggccagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgttttggacaagagacgtggc

cgggaccctgagatgggggggaaagccgagaaggaagaaccctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataa

gatggcggaggcctacagtgagattgggatgaaaggcgagcgccggaggggcaaggggcacgatggcctttaccag

ggtctcagtacagccaccaaggacacctacgacgcccttcacatgcaggccctgcccccctcgctaatgaacgcgtGCC

CCTCTCCCTCCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGGAATAA

GGCCGGTGTGCGTTTGTCTATATGTTATTTTCCACCATATTGCCGTCTTTTG

GCAATGTGAGGGCCCGGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCCT

AGGGGTCTTTCCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTCGT

GAAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTCTGTAG

CGACCCTTTGCAGGCAGCGGAACCCCCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGC

GGCCAAAAGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCC

AGTGCCACGTTGTGAGTTGGATAGTTGTGGAAAGAGTCAAATGGCTCTCC

TCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGATGCCCAGAAGGTACCCCATT

GTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTGCACATGCTTTACATGTGTTTAGT

CGAGGTTAAAAAAACGTCTAGGCCCCCCGAACCACGGGGACGTGGTTTTC

CTTTGAAAAACACGATGATAATATGGCCACAggatccgccaccATGGGCTCCAG

CAACTCCAAGAGGCAGCAACAGGGCTTGCTCAAGCTCTGGCGAGGGCTG

CGAGGGAAGCCTGGGGCAGACTGGGTGCTATTGTCCGATCCGCTTATCGG

GCAGTCATCAACAGTCCAAGAAGAGTGCGGCAAGGCCTTGAAAAAGTCC

TGGGGTAAAGGTAAAATGACTCCAGACGGCCGCCGCCTGCAAGAAGGAG

ACACCTTTGATGAGTGGGATGATGATGAAGAAGAAGTAGGCTTCCCTGTG

CAACCTCGAGTCCCCTTAAGACAGATGACCTATAAATTAGCAGTGGACTT

TTCCCACTTTTTAAAATCAAAGGGGGGGACTGGATGGGATATATTACTCTG

AAAGAAGAGAAAAGATCCTGAATTTGTATGCCTTGAACGAGTGGGGAAT

AATAGATGATTGGCAAGCTTACTCACCAGGCCCGGGGATAAGGTACCCG

AGAGTCTTTGGCTTCTGCTTTAAGCTAGTCCCAGTGGACCTGCATGAGGA

GGCACGCAACTGTGAGAGACACTGTgctgcaCATCCAGCACAGATGGGGGA

AGATCCTGATGGAATAGATCATGGAGAAGTCTTGGTCTGGAAGTTTGACC

CGAAGTTGGCGGTGGAGTACCGCCCGGACATGTTTAAGGACATGCACGA

ACATGCAAAGCGCtaa

SEQ ID NO:63 (M572，SIV Nef M116-IRES-CD20 嵌合 TCR 核酸序列)

ATGGGCTCCAGCAACTCCAAGAGGCAGCAACAGGGCTTGCTCAAGCTCTG

GCGAGGGCTGCGAGGGAAGCCTGGGGCAGACTGGGTGCTATTGTCCGAT

CCGCTTATCGGGCAGTCATCAACAGTCCAAGAAGAGTGCGGCAAGGCCTT

GAAAAAGTCCTGGGGTAAAGGTAAAATGACTCCAGACGGCCGCCGCCTG

CAAGAAGGAGACACCTTTGATGAGTGGGATGATGATGAAGAAGAAGTAG

GCTTCCCTGTGCAACCTCGAGTCCCCTTAAGACAGATGACCTATAAATTA

GCAGTGGACTTTTCCCACTTTTTAAAATCAAAGGGGGGACTGGATGGGAT

ATATTACTCTGAAAGAAGAGAAAAGATCCTGAATTTGTATGCCTTGAACG

AGTGGGGAATAATAGATGATTGGCAAGCTTACTCACCAGGCCCGGGGAT

AAGGTACCCGAGAGTCTTTGGCTTCTGCTTTAAGCTAGTCCCAGTGGACC

TGCATGAGGAGGCACGCAACTGTGAGAGACACTGTgctgcaCATCCAGCACA

GATGGGGGAAGATCCTGATGGAATAGATCATGGAGAAGTCTTGGTCTGG

AAGTTTGACCCGAAGTTGGCGGTGGAGTACCGCCCGGACATGTTTAAGGA

CATGCACGAACATGCAAAGCGCtgaacgcgtGCCCCTCTCCCTCCCCCCCCCCT

AACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGGAATAAGGCCGGTGTGCGTTTGTCTA

TATGTTATTTTCCACCATATTGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGGAA

ACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCCTAGGGGTCTTTCCCCTCTCGC

CAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCCTCTGG

AAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTCTGTAGCGACCCTTTGCAGGCAGCGG

AACCCCCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTATA

AGATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCCAGTGCCACGTTGTGAGTTGG

ATAGTTGTGGAAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACAAGGG

GCTGAAGGATGCCCAGAAGGTACCCCATTGTATGGGATCTGATCTGGGGC

CTCGGTGCACATGCTTTACATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAAAACGTCTA

GGCCCCCCCGAACCACGGGGACGTGGTTTTCCTTTGAAAAACACGATGATA

ATATGGCCACAGgatccgccgccaccatgcagtctggaacccactggagggtgctgggactgtgcctgctga

gcgtgggcgtgtggggacagGAGGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGAGCTGAGCTGGTG

AAGCCTGGCGCTAGCGTGAAGATGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCT

TCACCAGCTATAACATGCACTGGGTGAAGCAGACCCCTGGACAGGGACT

GGAGTGGATCGGAGCTATCTACCCTGGAAACGGAGACACCTCATACAAC

CAGAAGTTCAAGGGAAAGGCTACCCTGACCGCTGACAAGAGCAGCAGCA

CCGCTTACATGCAGCTGAGCTCACTGACCAGCGAGGACTCCGCCGACTAC

TACTGCGCCAGAAGCAACTACTACGGAAGCAGCTACTGGTTCTTCGACGT

GTGGGGAGCTGGAACCACCGTGACCGTGTCAAGCGGCGGCGGAGGcTCC

GGAGGCGGAGGATCTGGCGGCGGCGGCAGCGACATCGTGCTGACCCAGA

GCCCTGCTATCCTGTCTGCCAGCCCTGGAGAGAAGGTGACCATGACCTGC

AGAGCTAGCAGCAGCGTGAACTACATGGACTGGTATCAGAAAAAGCCCG

GCAGCTCACCTAAGCCTTGGATCTACGCTACCAGCAACTTAGCCAGCGGC

GTGCCTGCTAGATTCTCCGGAAGCGGCTCTGGAACCAGCTACTCCCTTAC

CATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGACGCTGCTACCTACTACTGCCAGCAGT

GGAGCTTCAACCCTCCTACCTTCGGAGGAGGAACCAAGCTGGAGATCAA

GactagtGGCGGCGGAGGCTCTGGCGGCGGAGGAAGCGGCGGCGGCGGCTC

Cgatggcaacgaggagatgggcggcatcacccagacaccctacaaggtgtccatctctggcaccacagtgatcctgac

ctgtccacagtatcccggctctgagatcctgtggcagcacaacgacaagaatatcggcggcgatgaggacgataagaata

tcggcagcgacgaggatcacctgtctctgaaggagttcagcgagctggagcagtccggctactacgtgtgctaccctcgg

ggctccaagccagaggacgccaacttttacctgtatctgcgggccagagtgtgcgagaattgtatggagatggacgtgat

gtccgtggccaccatcgtgatcgtggatatctgtatcacaggcggcctgctgctggtgtactattggagcaagaaccg

gaaggccaaggccaagcctgtgaccagaggagcaggagcaggaggcaggcagaggggacagaacaaggagaggc

cacctccagtgcccaatcctgactacgagccaatcaggaagggccagcgcgatctgtatagcggcctgaatcagaggcg

catctgataa

SEQ ID NO:64 (抗 CD20 嵌合 TCR 胺基酸序列；CD3ε ([無信號肽]細胞外-螺旋-細胞質)胺基酸序列加下劃線)

MQSGTHWRVLGLCLLSVGVWGQEVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGY

TFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSST

AYMQLSSLTSEDSADYYCARSNYYGSSYWFFDVWGAGTTVTVSSGGGGSG

GGGSGGGGSDIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVNYMDWYQKKPGSSP

KPWIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSFNPPT

FGGGTKLEIKTSGGGGSGGGGSGGGGSDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILT

CPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYP

RGSKPEDANFYLYLRARVCENCMEMDVMSVATIVIVDICITGGLLLLVYYWS

KNRKAKAKPVTRGAGAGGRQRGQNKERPPPVPNPDYEPIRKGQRDLYSGLN

QRRI

SEQ ID NO:65 (M574，SIV Nef M116-IRES-CD20 TAC 核酸序列)

ATGGGCTCCAGCAACTCCAAGAGGCAGCAACAGGGCTTGCTCAAGCTCTG

GCGAGGGCTGCGAGGGAAGCCTGGGGCAGACTGGGTGCTATTGTCCGAT

CCGCTTATCGGGCAGTCATCAACAGTCCAAGAAGAGTGCGGCAAGGCCTT

GAAAAAGTCCTGGGGTAAAGGTAAAATGACTCCAGACGGCCGCCGCCTG

CAAGAAGGAGACACCTTTGATGAGTGGGATGATGATGAAGAAGAAGTAG

GCTTCCCTGTGCAACCTCGAGTCCCCTTAAGACAGATGACCTATAAATTA

GCAGTGGACTTTTCCCACTTTTTAAAATCAAAGGGGGGACTGGATGGGAT

ATATTACTCTGAAAGAAGAGAAAAGATCCTGAATTTGTATGCCTTGAACG

AGTGGGGAATAATAGATGATTGGCAAGCTTACTCACCAGGCCCGGGGAT

AAGGTACCCGAGAGTCTTTGGCTTCTGCTTTAAGCTAGTCCCAGTGGACC

TGCATGAGGAGGCACGCAACTGTGAGAGACACTGTgctgcaCATCCAGCACA

GATGGGGGAAGATCCTGATGGAATAGATCATGGAGAAGTCTTGGTCTGG

AAGTTTGACCCGAAGTTGGCGGTGGAGTACCGCCCGGACATGTTTAAGGA

CATGCACGAACATGCAAAGCGCtgaacgcgtGCCCCTCTCCCTCCCCCCCCCCT

AACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGGAATAAGGCCGGTGTGCGTTTGTCTA

TATGTTATTTTCCACCATATTGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGGAA

ACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCCTAGGGGTCTTTCCCCTCTCGC

CAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCCTCTGG

AAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTCTGTAGCGACCCTTTGCAGGCAGCGG

AACCCCCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTATA

AGATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCCAGTGCCACGTTGTGAGTTGG

ATAGTTGTGGAAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACAAGGG

GCTGAAGGATGCCCAGAAGGTACCCCATTGTATGGGATCTGATCTGGGGC

CTCGGTGCACATGCTTTACATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAAAACGTCTA

GGCCCCCCCGAACCACGGGGACGTGGTTTTCCTTTGAAAAACACGATGATA

ATATGGCCACAGGATCCgccgccaccatgcagtctggaacccactggagggtgctgggactgtgcctgc

tgagcgtgggcgtgtggggacagGAGGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGAGCTGAGCTGG

TGAAGCCTGGCGCTAGCGTGAAGATGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACAC

CTTCACCAGCTATAACATGCACTGGGTGAAGCAGACCCCTGGACAGGGAC

TGGAGTGGATCGGAGCTATCTACCCTGGAAACGGAGACACCTCATACAAC

CAGAAGTTCAAGGGAAAGGCTACCCTGACCGCTGACAAGAGCAGCAGCA

CCGCTTACATGCAGCTGAGCTCACTGACCAGCGAGGACTCCGCCGACTAC

TACTGCGCCAGAAGCAACTACTACGGAAGCAGCTACTGGTTCTTCGACGT

GTGGGGAGCTGGAACCACCGTGACCGTGTCAAGCGGCGGCGGAGGcTCC

GGAGGCGGAGGATCTGGCGGCGGCGGCAGCGACATCGTGCTGACCCAGA

GCCCTGCTATCCTGTCTGCCAGCCCTGGAGAGAAGGTGACCATGACCTGC

AGAGCTAGCAGCAGCGTGAACTACATGGACTGGTATCAGAAAAAGCCCG

GCAGCTCACCTAAGCCTTGGATCTACGCTACCAGCAACTTAGCCAGCGGC

GTGCCTGCTAGATTCTCCGGAAGCGGCTCTGGAACCAGCTACTCCCTTAC

CATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGACGCTGCTACCTACTACTGCCAGCAGT

GGAGCTTCAACCCTCCTACCTTCGGAGGAGGAACCAAGCTGGAGATCAA

Gactagtggcggcggcggctctggaggaggaggcagcggcggcggaggctccggcggcggcggctctatggacatt

cagatgacccagtccccaagctccctgtctgccagcgtgggagacagagtgaccatcacatgcagggccagccaggat

atccgcaactatctgaattggtatcagcagaaacccggcaaggcccctaagctgctgatctattacaccagcaggctggag

tccggagtgccatcaagattctccggctctggcagcggaaccgactacaccctgacaatctctagcctgcagccagagga

tttcgccacatattactgccagcagggcaacaccctgccctggacatttggccagggcaccaaggtggagatcaaggga

ggaggaggcagcgggggcggcggctccggaggaggcggctctgaggtgcagctggtggagagcggaggaggact

ggtgcagcctggaggcagcctgcggctgtcctgtgccgccagcggctattccttcaccggctacacaatgaattgggtca

gacaggcaccaggaaagggactggagtgggtggccctgatcaaccctaccaagggcgtgtccacatataatcagaagtt

caaggacaggtttaccatctctgtggataagagcaagaacacagcctacctgcagatgaatagcctgagggccgaggac

accgccgtgtattactgcgcacgcagcggatattacggagactccgattggtactttgacgtgtggggccagggcaccct

ggtgacagtgtcctccggcggaggaggcagctccggacaggtgctgctggagtccaatatcaaggtgctgccaacctgg

tctacacctgtgcagccaatggcactgatcgtgctgggaggagtggcaggactgctgctgttcatcggactgggcatcttct

tttgcgtgcgctgtaggcaccggagaaggcaggcagagaggatgtctcagatcaagagactgctgagcgagaagaaga

cctgccagtgtcctcaccgctttcagaagacatgtagcccaatctgataa

SEQ ID NO:66 (抗 CD20 TAC 胺基酸序列；CD4 (部分細胞外-螺旋-細胞質)胺基酸序列加下劃線)

MQSGTHWRVLGLCLLSVGVWGQEVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGY

TFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSST

AYMQLSSLTSEDSADYYCARSNYYGSSYWFFDVWGAGTTVTVSSGGGGSG

GGGSGGGGSDIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVNYMDWYQKKPGSSP

KPWIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSFNPPT

FGGGTKLEIKTSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSMDIQMTQSPSSLSASVGDRV

TITCRASQDIRNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLESGVPSRFSGSGSGTDYT

LTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSEV

QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYTMNWVRQAPGKGLEWVALINP

TKGVSTYNQKFKDRFTISVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGYYGD

SDWYFDVWGQGTLVTVSSGGGGSSGQVLLESNIKVLPTWSTPVQPMALIVL

GGVAGLLLFIGLGIFFCVRCRHRRRQAERMSQIKRLLSEKKTCQCPHRFQKTC

SPI

091821-TW-PA-序列表

序列表

<110> 南京傳奇生物科技有限公司(Nanjing Legend Biotech Co., Ltd.)

<120> 含NEF之T細胞及其產生方法

<130> 76142-20017.41

<140> 尚未分配
<141> 同時隨同提交

<150> PCT/CN2018/097235
<151> 2018-07-26

<160> 66

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
<211> 669
<212> DNA
<213> 猿免疫缺乏病毒(Simian Immunodeficiency Virus)

<400> 1
atgggctcca gcaactccaa gaggcagcaa cagggcttgc
tcaagctctg gcgagggctg 60
cgagggaagc ctggggcaga ctgggtgcta ttgtccgatc
cgcttatcgg gcagtcatca 120
acagtccaag aagagtgcgg caaggccttg aaaaagtcct
ggggtaaagg taaaatgact 180
ccagacggcc gccgcctgca agaaggagac acctttgatg
agtgggatga tgatgaagaa 240
gaagtaggct tccctgtgca acctcgagtc cccttaagac
agatgaccta taaattagca 300

gtggactttt cccacttttt aaaatcaaag gggggactgg
atgggatata ttactctgaa 360
agaagagaaa agatcctgaa tttgtatgcc ttgaacgagt
ggggaataat agatgattgg 420
caagcttact caccaggccc ggggataagg tacccgagag
tctttggctt ctgctttaag 480
ctagtcccag tggacctgca tgaggaggca cgcaactgtg
agagacactg tctgatgcat 540
ccagcacaga tgggggaaga tcctgatgga atagatcatg
gagaagtctt ggtctggaag 600
tttgacccga agttggcggt ggagtaccgc ccggacatgt
ttaaggacat gcacgaacat 660
gcaaagcgc
669

<210> 2
<211> 618
<212> DNA
<213> 人類免疫缺乏病毒(Human Immunodeficiency Virus)

<400> 2
atgggtggca agtggtcaaa aagtagtgtg attggatggc
ctactgtaag ggaaagaatg 60
agacgagctg agccagcagc agatagggtg ggagcagcat
ctcgagacct ggaaaaacat 120
ggagcaatca caagtagcaa tacagcagct accaatgctg
cttgtgcctg gctagaagca 180
caagaggagg aggaggtggg ttttccagtc acacctcagg
taccttaag accaatgact 240
tacaaggcag ctgtagatct tagccacttt ttaaaagaaa
agggggggact ggaagggcta 300
attcactccc aaagaagaca agatatcctt gatctgtgga
tctaccacac acaaggctac 360
ttccctgatt ggcagaacta cacaccaggg ccaggggtca
gatatccact gacctttgga 420
tggtgctaca agctagtacc agttgagcca gataagatag

aagaggccaa taaaggagag 480
aacaccagct tgttacaccc tgtgagcctg catgggatgg
atgacccgga gagagaagtg 540
ttagagtgga ggtttgacag ccgcctagca tttcatcacg
tggcccgaga gctgcatccg 600
gagtacttca agaactgc
618

<210> 3
<211> 771
<212> DNA
<213> 人類免疫缺乏病毒(Human Immunodeficiency Virus)

<400> 3
atgggtgcga gtggatccaa gaagctttcc aagcattcgc
gaggactacg agagagactc 60
ttgcgggcgc gtggggatgg ttatgggaag cagcgcgacg
catcgggagg ggaatactcg 120
cagttccaag aagaatcagg cagggagcag aactcgccct
cctgtgaggg acagcagtat 180
cagcagggag agtacatgaa cagcccatgg agaaacccag
caacagaaag acagaaagat 240
ttgtataggc agcaaaatat ggatgatgta gattctgatg
atgatgacct aataggagtt 300
cctgttacac caagagtacc acggagagaa atgacctata
aattggcaat agatatgtca 360
cattttataa aagaaaaagg gggactgcaa gggatgtttt
acagtaggag gagacataga 420
atcctagaca tatacctaga aaaagaggaa gggataatac
cagattggca gaattatact 480
catgggccag gagtaaggta cccaatgtac ttcgggtggc
tgtggaagct agtatcagta 540
gaactctcac aagaggcaga ggaagatgag gccaactgct
tagtacaccc agcacaaaca 600
agcagacatg atgatgagca tggggagaca ttagtgtggc
agtttgactc catgctggcc 660

tataactaca aggccttcac tctgtaccca gaagagtttg
ggcacaagtc aggattgcca 720
gagaaagaat ggaaggcaaa actgaaagca agagggatac
catatagtga a 771

<210> 4
<211> 630
<212> DNA
<213> 人類免疫缺乏病毒(Human Immunodeficiency Virus)

<400> 4
atgggtggca agtggtcaaa atgcagcata gttggatggc
ctgatataag agagagaatg 60
agacgaactg agccagcagc agagccagca gcagaaggag
taggagcagc gtctcaagac 120
ttagataaac atggagcact tacaagtagc aacacaaaca
ccactaatgc tgattgtgct 180
tggccggaag cgcaagagga tgaaggagaa gtaggctttg
cagtcagacc tcagagtcct 240
ttaagaccaa tgacttataa gggagcattt gatctcggct
tctttttaaa agaaggggga 300
ctggaagggt taatttactc taagaaaagg caagagatcc
ttgatttgtg ggtctatcat 360
acacaaggct acttccctga ttggcaaaac tacacaccgg
gaccaggggt cagataccca 420
ctgacttttg ggtggtgctt caagctggta ccagttgacc
caaaggcagt agaagaggcc 480
aacgaaggag aagacaactg tctgctacac ccagtgtgcc
agcatggaat ggaggatgaa 540
cacagagaag tattaatgtg gaagtttgac agtcaactag
cacgcagaca catggcccga 600
gagctacatc cggagttcta caaagactgc
630

<210> 5
<211> 387

091821-TW-PA-序列表

<212> DNA
<213> 人類免疫缺乏病毒(Human Immunodeficiency Virus)

<400> 5
atgggtggca agtggtcaaa atgcagcata ggtggatggc
ctcagataag agagagaatg 60
agacgaactg agccagcagt agagccagca gcagagccag
cagcagaagg agtaggagca 120
gcgtggctac ttcctgattg gcaaaaactac acaccgggac
caggagtcag atacccactg 180
acttttgggt ggtgcttcaa gctggtacca gtagacccag
gggcagtaga agaggccaac 240
gaaggagaaa acaactgttt gctacacccg gtgtgccagc
atggaatgga ggatgagcaa 300
agagaagtat tagtgtgcaa gtttgacagt ctactagcac
gcagacacat ggcccgcgag 360
ctacatccgg agttctacaa agactgc
387

<210> 6
<211> 540
<212> DNA
<213> 人類免疫缺乏病毒(Human Immunodeficiency Virus)

<400> 6
atgggtgcga gtggatccaa gaagcgttcc aagcccttgc
aaggactaca agagagactc 60
ttgcaggcgc ggggagagac ttgtggaggg cgctgcaacg
aatcgggagg gggatacttg 120
cagtcccacg aaggatcagg cagggagcag aactcgccct
cctgtgaggg acagcgatat 180
cagcagggag attttgtaaa taccccatgg agaaccccag
cagcagaaag ggagaaagaa 240
ttgtacaaac agcaaaatat ggatgatgta gatctagatg
atgatgacca agtaggattc 300
cctgtcacac caagagtacc attaagacca atgacattca

aattggcagt agatatgtct 360
cattttataa aagaaaaagg gggactggaa gggctgtttt
atagtcagag aagacataga 420
atcttagact tatacttaga caaggctttt actctgtacc
cagaggaatt tgggcataat 480
tcaggactgc cagagaaaga gtggaaggcg agactgaaag
caaggggaat accatttagt 540

<210> 7
<211> 669
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 7
atgggctcca gcaactccaa gaggcagcaa cagggcttgc
tcaagctctg gcgagggctg 60
cgagggaagc ctggggcaga ctgggtgcta ttgtccgatc
cgcttatcgg gcagtcatca 120
acagtccaag aagagtgcgg caaggccttg aaaaagtcct
ggggtaaagg taaaatgact 180
ccagacggcc gccgcctgca agaaggagac acctttgatg
agtgggatga tgatgaagaa 240
gaagtaggct tccctgtgca acctcgagtc cccttaagac
agatgaccta taaattagca 300
gtggactttt cccacttttt aaaatcaaag gggggactgg
atgggatata ttactctgaa 360
agaagagaaa agatcctgaa tttgtatgcc ttgaacgagt
ggggaataat agatgattgg 420
caagcttact caccaggccc ggggataagg tacccgagag
tctttggctt ctgctttaag 480
ctagtcccag tggacctgca tgaggaggca cgcaactgtg
agagacactg tgctgcacat 540

ccagcacaga tgggggaaga tcctgatgga atagatcatg
gagaagtctt ggtctggaag 600
tttgacccga agttggcggt ggagtaccgc ccggacatgt
ttaaggacat gcacgaacat 660
gcaaagcgc
669

<210> 8
<211> 669
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 8
atgggctcca gcaactccaa gaggcagcaa cagggcttgc
tcaagctctg gcgagggctg 60
cgagggaagc ctggggcaga ctgggtgcta ttgtccgatc
cgcttatcgg gcagtcatca 120
acagtccaag aagagtgcgg caaggccttg aaaaagtcct
ggggtaaagg taaaatgact 180
ccagacggcc gccgcctgca agaaggagac acctttgatg
agtgggatga tgatgaagaa 240
gaagtaggct tccctgtgca acctcgagtc cccttaagac
agatgaccta taaattagca 300
gtggactttt cccacttttt aaaatcaaag gggggactgg
atgggatata ttactctgaa 360
gctgcagaaa agatcctgaa tttgtatgcc ttgaacgagt
ggggaataat agatgattgg 420
caagcttact caccaggccc ggggataagg tacccgagag
tctttggctt ctgctttaag 480
ctagtcccag tggacctgca tgaggaggca cgcaactgtg
agagacactg tgctgcacat 540
ccagcacaga tgggggaaga tcctgatgga atagatcatg
gagaagtctt ggtctggaag 600

tttgacccga agttggcggt ggagtaccgc ccggacatgt
ttaaggacat gcacgaacat 660
gcaaagcgc
669

<210> 9
<211> 669
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 9
atgggctcca gcaactccaa gaggcagcaa cagggcttgc
tcaagctctg gcgagggctg 60
cgagggaagc ctggggcaga ctgggtgcta ttgtccgatc
cgcttatcgg gcagtcatca 120
acagtccaag aagagtgcgg caaggccttg aaaaagtcct
ggggtaaagg taaaatgact 180
ccagacggcc gccgcctgca agaaggagac acctttgatg
agtgggatga tgatgaagaa 240
gaagtaggct tccctgtgca acctcgagtc cccttaagac
agatgaccta taaattagca 300
gtggactttt cccacttttt aaaatcaaag gggggactgg
atgggatata ttactctgaa 360
gctgcagaaa agatcctgaa tttgtatgcc ttgaacgagt
ggggaataat agatgattgg 420
caagcttact caccaggccc ggggataagg tacccgagag
tctttggctt ctgctttaag 480
ctagtcccag tggacctgca tgaggagcat cacaactgtg
agagacactg tgctgcacat 540
ccagcacaga tgggggcggc acctgatgga atagatcatg
gagaagtctt ggtctggaag 600
tttgacccga agttggcggt ggagtaccgc ccggacatgt
ttaaggacat gcacgaacat 660

gcaaagcgc
669

<210> 10
<211> 669
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 10
atgggctcca gcaactccaa gaggcagcaa cagggcttgc
tcaagctctg gcgagggctg 60
cgagggaagc ctggggcaga ctgggtgcta ttgtccgatc
cgcttatcgg gcagtcatca 120
acagtccaag aagagtgcgg caaggccttg aaaaagtcct
ggggtaaagg taaaatgact 180
ccagacggcc gccgcctgca agaaggagac acctttgatg
agtgggatga tgatgaagaa 240
gaagtaggct tccctgtgca acctcgagtc cccttaagac
agatgaccta taaattagca 300
gtggactttt cccacttttt aaaatcaaag gggggactgg
atgggatata ttactctgaa 360
agaagagaaa agatcctgaa tttgtatgcc ttgaacgagt
ggggaataat agatgattgg 420
caagcttact caccaggccc ggggataagg tacccgagag
tctttggctt ctgctttaag 480
ctagtcccag tggacctgca tgaggagcat cacaactgtg
agagacactg tgctgcacat 540
ccagcacaga tgggggcggc acctgatgga atagatcatg
gagaagtctt ggtctggaag 600
tttgacccga agttggcggt ggagtaccgc ccggacatgt
ttaaggacat gcacgaacat 660
gcaaagcgc
669

091821-TW-PA-序列表

<210> 11
<211> 669
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 11
atgggctcca gcaactccaa gaggcagcaa cagggcttgc
tcaagctctg gcgagggctg 60
cgagggaagc ctggggcaga ctgggtgcta ttgtccgatc
cgcttatcgg gcagtcatca 120
acagtccaag aagagtgcgg caaggccttg aaaaagtcct
ggggtaaagg taaaatgact 180
ccagacggcc gccgcctgca agaaggagac acctttgatg
agtgggatga tgatgaagaa 240
gaagtaggct tccctgtgca acctcgagtc cccttaagac
agatgaccta taaattagca 300
gtggactttt cccacttttt aaaatcaaag gggggactgg
atgggatata ttactctgaa 360
agaagagaaa agatcctgaa tttgtatgcc ttgaacgagt
ggggaataat agatgattgg 420
caagcttact caccaggccc ggggataagg tacccgagag
tctttggctt ctgctttaag 480
ctagtcccag tggacctgca tgaggaggca cgcaactgtg
agagacactg tgctgcacat 540
ccagcacaga tgggggcggc acctgatgga atagatcatg
gagaagtctt ggtctggaag 600
tttgacccga agttggcggt ggagtaccgc ccggacatgt
ttaaggacat gcacgaacat 660
gcaaagcgc
669

<210> 12

<211> 223
<212> PRT
<213> 猿免疫缺乏病毒(Simian Immunodeficiency Virus)

<400> 12
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

<210> 13
<211> 206
<212> PRT
<213> 人類免疫缺乏病毒(Human Immunodeficiency Virus)

<400> 13
Met Gly Gly Lys Trp Ser Lys Ser Ser Val Ile Gly Trp
Pro Thr Val
1 5 10

15
Arg Glu Arg Met Arg Arg Ala Glu Pro Ala Ala Asp Arg
Val Gly Ala
20 25
30
Ala Ser Arg Asp Leu Glu Lys His Gly Ala Ile Thr Ser
Ser Asn Thr
35 40 45

Ala Ala Thr Asn Ala Ala Cys Ala Trp Leu Glu Ala Gln
Glu Glu Glu
50 55 60

Glu Val Gly Phe Pro Val Thr Pro Gln Val Pro Leu Arg
Pro Met Thr
65 70 75
80
Tyr Lys Ala Ala Val Asp Leu Ser His Phe Leu Lys Glu
Lys Gly Gly
85 90
95
Leu Glu Gly Leu Ile His Ser Gln Arg Arg Gln Asp Ile
Leu Asp Leu
100 105
110
Trp Ile Tyr His Thr Gln Gly Tyr Phe Pro Asp Trp Gln
Asn Tyr Thr
115 120 125

Pro Gly Pro Gly Val Arg Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Trp
Cys Tyr Lys
130 135 140

Leu Val Pro Val Glu Pro Asp Lys Ile Glu Glu Ala Asn
Lys Gly Glu
145 150 155

160
Asn Thr Ser Leu Leu His Pro Val Ser Leu His Gly Met
Asp Asp Pro
165 170
175
Glu Arg Glu Val Leu Glu Trp Arg Phe Asp Ser Arg Leu
Ala Phe His
180 185
190
His Val Ala Arg Glu Leu His Pro Glu Tyr Phe Lys Asn
Cys
195 200 205

<210> 14
<211> 257
<212> PRT
<213> 人類免疫缺乏病毒(Human Immunodeficiency Virus)

<400> 14
Met Gly Ala Ser Gly Ser Lys Lys Leu Ser Lys His Ser
Arg Gly Leu
1 5 10
15
Arg Glu Arg Leu Leu Arg Ala Arg Gly Asp Gly Tyr Gly
Lys Gln Arg
20 25
30
Asp Ala Ser Gly Gly Glu Tyr Ser Gln Phe Gln Glu Glu
Ser Gly Arg
35 40 45

Glu Gln Asn Ser Pro Ser Cys Glu Gly Gln Gln Tyr Gln
Gln Gly Glu
50 55 60

Tyr Met Asn Ser Pro Trp Arg Asn Pro Ala Thr Glu Arg Gln Lys Asp
65 70 75 80
Leu Tyr Arg Gln Gln Asn Met Asp Asp Val Asp Ser Asp Asp Asp Asp
85 90 95
Leu Ile Gly Val Pro Val Thr Pro Arg Val Pro Arg Arg Glu Met Thr
100 105 110
Tyr Lys Leu Ala Ile Asp Met Ser His Phe Ile Lys Glu Lys Gly Gly
115 120 125

Leu Gln Gly Met Phe Tyr Ser Arg Arg Arg His Arg Ile Leu Asp Ile
130 135 140

Tyr Leu Glu Lys Glu Glu Gly Ile Ile Pro Asp Trp Gln Asn Tyr Thr
145 150 155 160
His Gly Pro Gly Val Arg Tyr Pro Met Tyr Phe Gly Trp Leu Trp Lys
165 170 175
Leu Val Ser Val Glu Leu Ser Gln Glu Ala Glu Glu Asp Glu Ala Asn
180 185 190
Cys Leu Val His Pro Ala Gln Thr Ser Arg His Asp Asp Glu His Gly
195 200 205

Glu Thr Leu Val Trp Gln Phe Asp Ser Met Leu Ala Tyr
Asn Tyr Lys
210 215 220

Ala Phe Thr Leu Tyr Pro Glu Glu Phe Gly His Lys Ser
Gly Leu Pro
225 230 235
240
Glu Lys Glu Trp Lys Ala Lys Leu Lys Ala Arg Gly Ile
Pro Tyr Ser
245 250
255
Glu

<210> 15
<211> 210
<212> PRT
<213> 人類免疫缺乏病毒(Human Immunodeficiency Virus)

<400> 15
Met Gly Gly Lys Trp Ser Lys Cys Ser Ile Val Gly Trp
Pro Asp Ile
1 5 10
15
Arg Glu Arg Met Arg Arg Thr Glu Pro Ala Ala Glu Pro
Ala Ala Glu
20 25
30
Gly Val Gly Ala Ala Ser Gln Asp Leu Asp Lys His Gly
Ala Leu Thr
35 40 45

Ser Ser Asn Thr Asn Thr Thr Asn Ala Asp Cys Ala Trp

Pro Glu Ala
50 55 60

Gln Glu Asp Glu Gly Glu Val Gly Phe Ala Val Arg Pro
Gln Ser Pro
65 70 75
80

Leu Arg Pro Met Thr Tyr Lys Gly Ala Phe Asp Leu Gly
Phe Phe Leu
85 90
95

Lys Glu Gly Gly Leu Glu Gly Leu Ile Tyr Ser Lys Lys
Arg Gln Glu
100 105
110

Ile Leu Asp Leu Trp Val Tyr His Thr Gln Gly Tyr Phe
Pro Asp Trp
115 120 125

Gln Asn Tyr Thr Pro Gly Pro Gly Val Arg Tyr Pro Leu
Thr Phe Gly
130 135 140

Trp Cys Phe Lys Leu Val Pro Val Asp Pro Lys Ala Val
Glu Glu Ala
145 150 155
160

Asn Glu Gly Glu Asp Asn Cys Leu Leu His Pro Val Cys
Gln His Gly
165 170
175

Met Glu Asp Glu His Arg Glu Val Leu Met Trp Lys Phe
Asp Ser Gln
180 185
190

Leu Ala Arg Arg His Met Ala Arg Glu Leu His Pro Glu

Phe Tyr Lys
195 200 205

Asp Cys
210

<210> 16
<211> 129
<212> PRT
<213> 人類免疫缺乏病毒(Human Immunodeficiency Virus)

<400> 16
Met Gly Gly Lys Trp Ser Lys Cys Ser Ile Gly Gly Trp
Pro Gln Ile
1 5 10
15
Arg Glu Arg Met Arg Arg Thr Glu Pro Ala Val Glu Pro
Ala Ala Glu
20 25
30
Pro Ala Ala Glu Gly Val Gly Ala Ala Trp Leu Leu Pro
Asp Trp Gln
35 40 45

Asn Tyr Thr Pro Gly Pro Gly Val Arg Tyr Pro Leu Thr
Phe Gly Trp
50 55 60

Cys Phe Lys Leu Val Pro Val Asp Pro Gly Ala Val Glu
Glu Ala Asn
65 70 75
80
Glu Gly Glu Asn Asn Cys Leu Leu His Pro Val Cys Gln
His Gly Met
85 90

95
Glu Asp Glu Gln Arg Glu Val Leu Val Cys Lys Phe Asp
Ser Leu Leu
100 105
110
Ala Arg Arg His Met Ala Arg Glu Leu His Pro Glu Phe
Tyr Lys Asp
115 120 125

Cys

<210> 17
<211> 180
<212> PRT
<213> 人類免疫缺乏病毒(Human Immunodeficiency Virus)

<400> 17
Met Gly Ala Ser Gly Ser Lys Lys Arg Ser Lys Pro Leu
Gln Gly Leu
1 5 10
15
Gln Glu Arg Leu Leu Gln Ala Arg Gly Glu Thr Cys Gly
Gly Arg Cys
20 25
30
Asn Glu Ser Gly Gly Gly Tyr Leu Gln Ser His Glu Gly
Ser Gly Arg
35 40 45

Glu Gln Asn Ser Pro Ser Cys Glu Gly Gln Arg Tyr Gln
Gln Gly Asp
50 55 60

Phe Val Asn Thr Pro Trp Arg Thr Pro Ala Ala Glu Arg

Glu Lys Glu
65 70 75
80
Leu Tyr Lys Gln Gln Asn Met Asp Asp Val Asp Leu Asp
Asp Asp Asp
85 90
95
Gln Val Gly Phe Pro Val Thr Pro Arg Val Pro Leu Arg
Pro Met Thr
100 105
110
Phe Lys Leu Ala Val Asp Met Ser His Phe Ile Lys Glu
Lys Gly Gly
115 120 125

Leu Glu Gly Leu Phe Tyr Ser Gln Arg Arg His Arg Ile
Leu Asp Leu
130 135 140

Tyr Leu Asp Lys Ala Phe Thr Leu Tyr Pro Glu Glu Phe
Gly His Asn
145 150 155
160
Ser Gly Leu Pro Glu Lys Glu Trp Lys Ala Arg Leu Lys
Ala Arg Gly
165 170
175
Ile Pro Phe Ser
180

<210> 18
<211> 223
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 18
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

091821-TW-PA-序列表

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
195 200 205

Tyr Arg Pro Asp Met Phe Lys Asp Met His Glu His Ala Lys Arg
210 215 220

<210> 19
<211> 223
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 19
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 Ala Ala 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
195 200 205

Tyr Arg Pro Asp Met Phe Lys Asp Met His Glu His Ala
Lys Arg
210 215 220

<210> 20
<211> 223
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 20
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 Ala Ala 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 His His Asn Cys Glu Arg His

165 170
175
Cys Ala Ala His Pro Ala Gln Met Gly Ala Ala 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

<210> 21
<211> 223
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 21
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 His His Asn Cys Glu Arg His
165 170 175

Cys Ala Ala His Pro Ala Gln Met Gly Ala Ala 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

<210> 22
<211> 223
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 22
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 Ala Ala 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

<210> 23
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 23
gagaatcaaa atcggtgaat
20

<210> 24
<211> 1578
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 24
gaattcatgg gctccagcaa ctccaagagg cagcaacagg gcttgctcaa gctctggcga 60
gggctgcgag ggaagcctgg ggcagactgg gtgctattgt ccgatccgct tatcgggcag 120
tcatcaacag tccaagaaga gtgcggcaag gccttgaaaa agtcctgggg taaaggtaaa 180
atgactccag acggccgccg cctgcaagaa ggagacacct ttgatgagtg ggatgatgat 240
gaagaagaag taggcttccc tgtgcaacct cgagtcccct

taagacagat gacctataaa 300
ttagcagtgg acttttccca cttttaaaa tcaaaggggg
gactggatgg gatatattac 360
tctgaaagaa gagaaaagat cctgaatttg tatgccttga
acgagtgggg aataatagat 420
gattggcaag cttactcacc aggcccgggg ataaggtacc
cgagagtctt tggcttctgc 480
tttaagctag tcccagtgga cctgcatgag gaggcacgca
actgtgagag acactgtctg 540
atgcatccag cacagatggg ggaagatcct gatggaatag
atcatggaga agtcttggtc 600
tggaagtttg acccgaagtt ggcggtggag taccgcccgg
acatgtttaa ggacatgcac 660
gaacatgcaa agcgcacgcg tggaagcgga gctactaact
tcagcctgct gaagcaggct 720
ggagacgtgg aggagaaccc tggacctgga tccatggggg
caggtgccac cggccgcgcc 780
atggacgggc cgcgcctgct gctgttgctg cttctggggg
tgtcccttgg aggtgccaag 840
gaggcatgcc ccacaggcct gtacacacac agcggtgagt
gctgcaaagc ctgcaacctg 900
ggcgagggtg tggcccagcc ttgtggagcc aaccagaccg
tgtgtgagcc ctgcctggac 960
agcgtgacgt tctccgacgt ggtgagcgcg accgagccgt
gcaagccgtg caccgagtgc 1020
gtggggctcc agagcatgtc ggcgccgtgc gtggaggccg
acgacgccgt gtgccgctgc 1080
gcctacggct actaccagga tgagacgact gggcgctgcg
aggcgtgccg cgtgtgcgag 1140
gcgggctcgg gcctcgtgtt ctcctgccag gacaagcaga
acaccgtgtg cgaggagtgc 1200
cccgacggca cgtattccga cgaggccaac cacgtggacc
cgtgcctgcc ctgcaccgtg 1260
tgcgaggaca ccgagcgcca gctccgcgag tgcacacgct
gggccgacgc cgagtgcgag 1320
gagatccctg gccgttggat tacacggtcc acacccccag

agggctcgga cagcacagcc 1380
cccagcaccc aggagcctga ggcacctcca gaacaagacc
tcatagccag cacggtggca 1440
ggtgtggtga ccacagtgat gggcagctcc cagcccgtgg
tgacccgagg caccaccgac 1500
aacctcatcc ctgtctattg ctccatcctg gctgctgtgg
ttgtgggcct tgtggcctac 1560
atagccttct gatctaga
1578

<210> 25
<211> 1305
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 25
gaattcatgg gtggcaagtg gtcaaaaagt agtgtgattg
gatggcctac tgtaagggaa 60
agaatgagac gagctgagcc agcagcagat agggtgggag
cagcatctcg agacctggaa 120
aaacatggag caatcacaag tagcaataca gcagctacca
atgctgcttg tgcctggcta 180
gaagcacaag aggaggagga ggtgggtttt ccagtcacac
ctcaggtacc tttaagacca 240
atgacttaca aggcagctgt agatcttagc cacttttaa
aagaaaaggg gggactggaa 300
gggctaattc actcccaaag aagacaagat atccttgatc
tgtggatcta ccacacacaa 360
ggctacttcc ctgattggca gaactacaca ccagggccag
gggtcagata tccactgacc 420
tttggatggt gctacaagct agtaccagtt gagccagata
agatagaaga ggccaataaa 480
ggagagaaca ccagcttgtt acaccctgtg agcctgcatg

ggatggatga cccggagaga 540
gaagtgttag agtggaggtt tgacagccgc ctagcatttc
atcacgtggc ccgagagctg 600
catccggagt acttcaagaa ctgcactagt ggcagtggag
agggcagagg aagtctgcta 660
acatgcggtg acgtcgagga gaatcctggc ccaacgcgta
tgaccgagta caagcccacg 720
gtgcgcctcg ccacccgcga cgacgtcccc agggccgtac
gcaccctcgc cgccgcgttc 780
gccgactacc ccgccacgcg ccacaccgtc gatccggacc
gccacatcga gcgggtcacc 840
gagctgcaag aactcttcct cacgcgcgtc gggctcgaca
tcggcaaggt gtgggtcgcg 900
gacgacggcg ccgcggtggc ggtctggacc acgccggaga
gcgtcgaagc gggggcggtg 960
ttcgccgaga tcggcccgcg catggccgag ttgagcggtt
cccggctggc cgcgcagcaa 1020
cagatggaag gcctcctggc gccgcaccgg cccaaggagc
ccgcgtggtt cctggccacc 1080
gtcggcgtct cgcccgacca ccagggcaag ggtctgggca
gcgccgtcgt gctccccgga 1140
gtggaggcgg ccgagcgcgc cggggtgccc gccttcctgg
agacctccgc gccccgcaac 1200
ctccccttct acgagcggct cggcttcacc gtcaccgccg
acgtcgaggt gcccgaagga 1260
ccgcgcacct ggtgcatgac ccgcaagccc ggtgcctgag gatcc
1305

<210> 26
<211> 1458
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 26
gaattcatgg gtgcgagtgg atccaagaag ctttccaagc
attcgcgagg actacgagag 60
agactcttgc gggcgcgtgg ggatggttat gggaagcagc
gcgacgcatc gggaggggaa 120
tactcgcagt tccaagaaga atcaggcagg gagcagaact
cgccctcctg tgagggacag 180
cagtatcagc agggagagta catgaacagc ccatggagaa
acccagcaac agaaagacag 240
aaagatttgt ataggcagca aaatatggat gatgtagatt
ctgatgatga tgacctaata 300
ggagttcctg ttacaccaag agtaccacgg agagaaatga
cctataaatt ggcaatagat 360
atgtcacatt ttataaaaga aaaagggggga ctgcaaggga
tgttttacag taggaggaga 420
catagaatcc tagacatata cctagaaaaa gaggaaggga
taataccaga ttggcagaat 480
tatactcatg ggccaggagt aaggtaccca atgtacttcg
ggtggctgtg gaagctagta 540
tcagtagaac tctcacaaga ggcagaggaa gatgaggcca
actgcttagt acacccagca 600
caaacaagca gacatgatga tgagcatggg gagacattag
tgtggcagtt tgactccatg 660
ctggcctata actacaaggc cttcactctg tacccagaag
agtttgggca caagtcagga 720
ttgccagaga aagaatggaa ggcaaaactg aaagcaagag
ggataccata tagtgaaact 780
agtggcagtg gagagggcag aggaagtctg ctaacatgcg
gtgacgtcga ggagaatcct 840
ggcccaacgc gtatgaccga gtacaagccc acggtgcgcc
tcgccacccg cgacgacgtc 900
cccagggccg tacgcaccct cgccgccgcg ttcgccgact
accccgccac gcgccacacc 960
gtcgatccgg accgccacat cgagcgggtc accgagctgc
aagaactctt cctcacgcgc 1020
gtcgggctcg acatcggcaa ggtgtgggtc gcggacgacg

gcgccgcggt ggcggtctgg 1080
accacgccgg agagcgtcga agcgggggcg gtgttcgccg
agatcggccc gcgcatggcc 1140
gagttgagcg gttcccggct ggccgcgcag caacagatgg
aaggcctcct ggcgccgcac 1200
cggcccaagg agcccgcgtg gttcctggcc accgtcggcg
tctcgcccga ccaccagggc 1260
aagggtctgg gcagcgccgt cgtgctcccc ggagtggagg
cggccgagcg cgccggggtg 1320
cccgccttcc tggagacctc cgcgccccgc aacctccgct
tctacgagcg gctcggcttc 1380
accgtcaccg ccgacgtcga ggtgcccgaa ggaccgcgca
cctggtgcat gacccgcaag 1440
cccggtgcct gaggatcc
1458

<210> 27
<211> 525
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 27
Glu Phe Met Gly Ser Ser Asn Ser Lys Arg Gln Gln Gln Gly Leu Leu
1 5 10 15
Lys Leu Trp Arg Gly Leu Arg Gly Lys Pro Gly Ala Asp Trp Val Leu
20 25 30
Leu Ser Asp Pro Leu Ile Gly Gln Ser Ser Thr Val Gln Glu Glu Cys
35 40 45

091821-TW-PA-序列表

Gly Lys Ala Leu Lys Lys Ser Trp Gly Lys Gly Lys Met
Thr Pro Asp
50 55 60

Gly Arg Arg Leu Gln Glu Gly Asp Thr Phe Asp Glu Trp
Asp Asp Asp
65 70 75
80
Glu Glu Glu Val Gly Phe Pro Val Gln Pro Arg Val Pro
Leu Arg Gln
85 90
95
Met Thr Tyr Lys Leu Ala Val Asp Phe Ser His Phe Leu
Lys Ser Lys
100 105
110
Gly Gly Leu Asp Gly Ile Tyr Tyr Ser Glu Arg Arg Glu
Lys Ile Leu
115 120 125

Asn Leu Tyr Ala Leu Asn Glu Trp Gly Ile Ile Asp Asp
Trp Gln Ala
130 135 140

Tyr Ser Pro Gly Pro Gly Ile Arg Tyr Pro Arg Val Phe
Gly Phe Cys
145 150 155
160
Phe Lys Leu Val Pro Val Asp Leu His Glu Glu Ala Arg
Asn Cys Glu
165 170
175
Arg His Cys Leu Met His Pro Ala Gln Met Gly Glu Asp
Pro Asp Gly
180 185

190
Ile Asp His Gly Glu Val Leu Val Trp Lys Phe Asp Pro
Lys Leu Ala
195 200 205

Val Glu Tyr Arg Pro Asp Met Phe Lys Asp Met His Glu
His Ala Lys
210 215 220

Arg Thr Arg Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu
Lys Gln Ala
225 230 235
240
Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Gly Ser Met Gly
Ala Gly Ala
245 250
255
Thr Gly Arg Ala Met Asp Gly Pro Arg Leu Leu Leu Leu
Leu Leu Leu
260 265
270
Gly Val Ser Leu Gly Gly Ala Lys Glu Ala Cys Pro Thr
Gly Leu Tyr
275 280 285

Thr His Ser Gly Glu Cys Cys Lys Ala Cys Asn Leu Gly
Glu Gly Val
290 295 300

Ala Gln Pro Cys Gly Ala Asn Gln Thr Val Cys Glu Pro
Cys Leu Asp
305 310 315
320
Ser Val Thr Phe Ser Asp Val Val Ser Ala Thr Glu Pro
Cys Lys Pro
325 330

335
Cys Thr Glu Cys Val Gly Leu Gln Ser Met Ser Ala Pro
Cys Val Glu
340 345
350
Ala Asp Asp Ala Val Cys Arg Cys Ala Tyr Gly Tyr Tyr
Gln Asp Glu
355 360 365

Thr Thr Gly Arg Cys Glu Ala Cys Arg Val Cys Glu Ala
Gly Ser Gly
370 375 380

Leu Val Phe Ser Cys Gln Asp Lys Gln Asn Thr Val Cys
Glu Glu Cys
385 390 395
400
Pro Asp Gly Thr Tyr Ser Asp Glu Ala Asn His Val Asp
Pro Cys Leu
405 410
415
Pro Cys Thr Val Cys Glu Asp Thr Glu Arg Gln Leu Arg
Glu Cys Thr
420 425
430
Arg Trp Ala Asp Ala Glu Cys Glu Glu Ile Pro Gly Arg
Trp Ile Thr
435 440 445

Arg Ser Thr Pro Pro Glu Gly Ser Asp Ser Thr Ala Pro
Ser Thr Gln
450 455 460

Glu Pro Glu Ala Pro Pro Glu Gln Asp Leu Ile Ala Ser
Thr Val Ala
465 470 475

480
Gly Val Val Thr Thr Val Met Gly Ser Ser Gln Pro Val
Val Thr Arg
485 490
495
Gly Thr Thr Asp Asn Leu Ile Pro Val Tyr Cys Ser Ile
Leu Ala Ala
500 505
510
Val Val Val Gly Leu Val Ala Tyr Ile Ala Phe Ser Arg
515 520 525

<210> 28
<211> 434
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 28
Glu Phe Met Gly Gly Lys Trp Ser Lys Ser Ser Val Ile
Gly Trp Pro
1 5 10
15
Thr Val Arg Glu Arg Met Arg Arg Ala Glu Pro Ala Ala
Asp Arg Val
20 25
30
Gly Ala Ala Ser Arg Asp Leu Glu Lys His Gly Ala Ile
Thr Ser Ser
35 40 45

Asn Thr Ala Ala Thr Asn Ala Ala Cys Ala Trp Leu Glu
Ala Gln Glu

50 55 60

Glu Glu Glu Val Gly Phe Pro Val Thr Pro Gln Val Pro
Leu Arg Pro
65 70 75
80
Met Thr Tyr Lys Ala Ala Val Asp Leu Ser His Phe Leu
Lys Glu Lys
85 90
95
Gly Gly Leu Glu Gly Leu Ile His Ser Gln Arg Arg Gln
Asp Ile Leu
100 105
110
Asp Leu Trp Ile Tyr His Thr Gln Gly Tyr Phe Pro Asp
Trp Gln Asn
115 120 125

Tyr Thr Pro Gly Pro Gly Val Arg Tyr Pro Leu Thr Phe
Gly Trp Cys
130 135 140

Tyr Lys Leu Val Pro Val Glu Pro Asp Lys Ile Glu Glu
Ala Asn Lys
145 150 155
160
Gly Glu Asn Thr Ser Leu Leu His Pro Val Ser Leu His
Gly Met Asp
165 170
175
Asp Pro Glu Arg Glu Val Leu Glu Trp Arg Phe Asp Ser
Arg Leu Ala
180 185
190
Phe His His Val Ala Arg Glu Leu His Pro Glu Tyr Phe
Lys Asn Cys

195 200 205

Thr Ser Gly Ser Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp

210 215 220

Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Thr Arg Met Thr Glu Tyr Lys Pro Thr

225 230 235 240

Val Arg Leu Ala Thr Arg Asp Asp Val Pro Arg Ala Val Arg Thr Leu

245 250 255

Ala Ala Ala Phe Ala Asp Tyr Pro Ala Thr Arg His Thr Val Asp Pro

260 265 270

Asp Arg His Ile Glu Arg Val Thr Glu Leu Gln Glu Leu Phe Leu Thr

275 280 285

Arg Val Gly Leu Asp Ile Gly Lys Val Trp Val Ala Asp Asp Gly Ala

290 295 300

Ala Val Ala Val Trp Thr Thr Pro Glu Ser Val Glu Ala Gly Ala Val

305 310 315 320

Phe Ala Glu Ile Gly Pro Arg Met Ala Glu Leu Ser Gly Ser Arg Leu

325 330 335

Ala Ala Gln Gln Gln Met Glu Gly Leu Leu Ala Pro His Arg Pro Lys

340 345 350

Glu Pro Ala Trp Phe Leu Ala Thr Val Gly Val Ser Pro Asp His Gln

355 360 365

Gly Lys Gly Leu Gly Ser Ala Val Val Leu Pro Gly Val Glu Ala Ala

370 375 380

Glu Arg Ala Gly Val Pro Ala Phe Leu Glu Thr Ser Ala Pro Arg Asn

385 390 395 400

Leu Pro Phe Tyr Glu Arg Leu Gly Phe Thr Val Thr Ala Asp Val Glu

405 410 415

Val Pro Glu Gly Pro Arg Thr Trp Cys Met Thr Arg Lys Pro Gly Ala

420 425 430

Gly Ser

<210> 29
<211> 485
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 29
Glu Phe Met Gly Ala Ser Gly Ser Lys Lys Leu Ser Lys

His Ser Arg
1 5 10
15
Gly Leu Arg Glu Arg Leu Leu Arg Ala Arg Gly Asp Gly
Tyr Gly Lys
20 25
30
Gln Arg Asp Ala Ser Gly Gly Glu Tyr Ser Gln Phe Gln
Glu Glu Ser
35 40 45

Gly Arg Glu Gln Asn Ser Pro Ser Cys Glu Gly Gln Gln
Tyr Gln Gln
50 55 60

Gly Glu Tyr Met Asn Ser Pro Trp Arg Asn Pro Ala Thr
Glu Arg Gln
65 70 75
80
Lys Asp Leu Tyr Arg Gln Gln Asn Met Asp Asp Val Asp
Ser Asp Asp
85 90
95
Asp Asp Leu Ile Gly Val Pro Val Thr Pro Arg Val Pro
Arg Arg Glu
100 105
110
Met Thr Tyr Lys Leu Ala Ile Asp Met Ser His Phe Ile
Lys Glu Lys
115 120 125

Gly Gly Leu Gln Gly Met Phe Tyr Ser Arg Arg Arg His
Arg Ile Leu
130 135 140

Asp Ile Tyr Leu Glu Lys Glu Glu Gly Ile Ile Pro Asp

Trp Gln Asn
145 150 155
160
Tyr Thr His Gly Pro Gly Val Arg Tyr Pro Met Tyr Phe
Gly Trp Leu
165 170
175
Trp Lys Leu Val Ser Val Glu Leu Ser Gln Glu Ala Glu
Glu Asp Glu
180 185
190
Ala Asn Cys Leu Val His Pro Ala Gln Thr Ser Arg His
Asp Asp Glu
195 200 205

His Gly Glu Thr Leu Val Trp Gln Phe Asp Ser Met Leu
Ala Tyr Asn
210 215 220

Tyr Lys Ala Phe Thr Leu Tyr Pro Glu Glu Phe Gly His
Lys Ser Gly
225 230 235
240
Leu Pro Glu Lys Glu Trp Lys Ala Lys Leu Lys Ala Arg
Gly Ile Pro
245 250
255
Tyr Ser Glu Thr Ser Gly Ser Gly Glu Gly Arg Gly Ser
Leu Leu Thr
260 265
270
Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Thr Arg Met
Thr Glu Tyr
275 280 285

Lys Pro Thr Val Arg Leu Ala Thr Arg Asp Asp Val Pro

Arg Ala Val
290 295 300

Arg Thr Leu Ala Ala Ala Phe Ala Asp Tyr Pro Ala Thr
Arg His Thr
305 310 315
320

Val Asp Pro Asp Arg His Ile Glu Arg Val Thr Glu Leu
Gln Glu Leu
325 330
335

Phe Leu Thr Arg Val Gly Leu Asp Ile Gly Lys Val Trp
Val Ala Asp
340 345
350

Asp Gly Ala Ala Val Ala Val Trp Thr Thr Pro Glu Ser
Val Glu Ala
355 360 365

Gly Ala Val Phe Ala Glu Ile Gly Pro Arg Met Ala Glu
Leu Ser Gly
370 375 380

Ser Arg Leu Ala Ala Gln Gln Gln Met Glu Gly Leu Leu
Ala Pro His
385 390 395
400

Arg Pro Lys Glu Pro Ala Trp Phe Leu Ala Thr Val Gly
Val Ser Pro
405 410
415

Asp His Gln Gly Lys Gly Leu Gly Ser Ala Val Val Leu
Pro Gly Val
420 425
430

Glu Ala Ala Glu Arg Ala Gly Val Pro Ala Phe Leu Glu

Thr Ser Ala
435 440 445

Pro Arg Asn Leu Pro Phe Tyr Glu Arg Leu Gly Phe Thr
Val Thr Ala
450 455 460

Asp Val Glu Val Pro Glu Gly Pro Arg Thr Trp Cys Met
Thr Arg Lys
465 470 475
480
Pro Gly Ala Gly Ser
485

<210> 30
<211> 66
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 30
ggaagcggag ctactaactt cagcctgctg aagcaggctg
gagacgtgga ggagaaccct 60
ggacct
66

<210> 31
<211> 63
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 31
ggcagtggag agggcagagg aagtctgcta acatgcggtg
acgtcgagga gaatcctggc 60
cca
63

<210> 32
<211> 69
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 32
ggaagcggac agtgtactaa ttatgctctc ttgaaattgg
ctggagatgt tgagagcaac 60
cctggacct
69

<210> 33
<211> 75
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 33
ggaagcggag tgaaacagac tttgaatttt gaccttctca
agttggcggg agacgtggag 60
tccaaccctg gacct
75

<210> 34

091821-TW-PA-序列表

<211> 585
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 34
gcccctctcc ctccccccccc cctaacgtta ctggccgaag
ccgcttggaa taaggccggt 60
gtgcgtttgt ctatatgtta ttttccacca tattgccgtc
ttttggcaat gtgagggccc 120
ggaaacctgg ccctgtcttc ttgacgagca ttcctagggg
tctttccccct 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> 35
<211> 520
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 35
gggtagggga ggcgcttttc ccaaggcagt ctggagcatg cgctttagca gccccgctgg 60
gcacttggcg ctacacaagt ggcctctggc ctcgcacaca ttccacatcc accggtaggc 120
gccaaccggc tccgttcttt ggtggcccct tcgcgccacc ttctactcct cccctagtca 180
ggaagttccc ccccgccccg cagctcgcgt cgtgcaggac gtgacaaatg gaagtagcac 240
gtctcactag tctcgtgcag atggacagca ccgctgagca atggaagcgg gtaggccttt 300
ggggcagcgg ccaatagcag ctttgctcct tcgctttctg ggctcagagg ctgggaaggg 360
gtgggtccgg gggcgggctc aggggcgggc tcaggggcgg ggcgggcgcc cgaaggtcct 420
ccggaggccc ggcattctgc acgcttcaaa agcgcacgtc tgccgcgctg ttctcctctt 480
cctcatctcc gggcctttcg acctgcagcc caagcttacc 520

<210> 36
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 36
Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val
1 5 10 15
Glu Glu Asn Pro Gly Pro
20

091821-TW-PA-序列表

<210> 37
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 37
Gly Ser Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly
Asp Val Glu
 1   5   10
  15
Glu Asn Pro Gly Pro
            20

<210> 38
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 38
Gly Ser Gly Gln Cys Thr Asn Tyr Ala Leu Leu Lys Leu
Ala Gly Asp
 1   5   10
  15
Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro
            20

091821-TW-PA-序列表

<210> 39
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 39
Gly Ser Gly Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu
Lys Leu Ala
 1   5   10
  15
Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro
            20   25

<210> 40
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 40
Gly Gly Gly Gly Ser
 1   5

<210> 41
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成構築體

<400> 41
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1   5   10

<210> 42
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 42
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 1   5   10

<210> 43
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 43
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
Gly Gly Ser
 1   5   10
  15

<210> 44

091821-TW-PA-序列表

<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 44
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> 45
<211> 34
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 45
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

091821-TW-PA-序列表

<210> 46
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 46
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
Gly Ser
 1   5   10
  15

<210> 47
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 47
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> 48
<211> 2745
<212> DNA

091821-TW-PA-序列表

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 48
atgggctcca gcaactccaa gaggcagcaa cagggcttgc
tcaagctctg gcgagggctg 60
cgagggaagc ctggggcaga ctgggtgcta ttgtccgatc
cgcttatcgg gcagtcatca 120
acagtccaag aagagtgcgg caaggccttg aaaaagtcct
ggggtaaagg taaaatgact 180
ccagacggcc gccgcctgca agaaggagac acctttgatg
agtgggatga tgatgaagaa 240
gaagtaggct tccctgtgca acctcgagtc cccttaagac
agatgaccta taaattagca 300
gtggactttt cccacttttt aaaatcaaag gggggactgg
atgggatata ttactctgaa 360
agaagagaaa agatcctgaa tttgtatgcc ttgaacgagt
ggggaataat agatgattgg 420
caagcttact caccaggccc ggggataagg tacccgagag
tctttggctt ctgctttaag 480
ctagtcccag tggacctgca tgaggaggca cgcaactgtg
agagacactg tctgatgcat 540
ccagcacaga tgggggaaga tcctgatgga atagatcatg
gagaagtctt ggtctggaag 600
tttgacccga agttggcggt ggagtaccgc ccggacatgt
ttaaggacat gcacgaacat 660
gcaaagcgct gaacgcgtgc ccctctccct ccccccccccc
taacgttact ggccgaagcc 720
gcttggaata aggccggtgt gcgtttgtct atatgttatt
ttccaccata ttgccgtctt 780
ttggcaatgt gagggcccgg aaacctggcc ctgtcttctt
gacgagcatt cctaggggtc 840
tttcccctct cgccaaagga atgcaaggtc tgttgaatgt
cgtgaaggaa gcagttcctc 900

tggaagcttc ttgaagacaa acaacgtctg tagcgaccct
ttgcaggcag cggaacccccc 960
cacctggcga caggtgcctc tgcggccaaa agccacgtgt
ataagataca cctgcaaagg 1020
cggcacaacc ccagtgccac gttgtgagtt ggatagttgt
ggaaagagtc aaatggctct 1080
cctcaagcgt attcaacaag gggctgaagg atgcccagaa
ggtaccccat tgtatgggat 1140
ctgatctggg gcctcggtgc acatgcttta catgtgttta
gtcgaggtta aaaaaacgtc 1200
taggcccccc gaaccacggg gacgtggttt tcctttgaaa
aacacgatga taatatggcc 1260
acaggatccg ccgccaccat ggccctgcca gtgaccgcct
tgctccttcc cctggctctt 1320
ctgctgcacg ctgctagacc tcaggtgcag cttcagcagc
ctggcgctga gctggtgaag 1380
cccggagcta gcgtgaagat gtcctgcaag gccagcggct
ataccttcac ctcatacaac 1440
atgcactggg tgaagcagac ccctggaaga ggcctcgagt
ggattggagc tatctaccct 1500
ggaaacggag acaccagcta taaccagaag ttcaagggaa
aggctaccct gaccgctgac 1560
aagagcagca gcaccgctta catgcagctg agcagcctta
caagcgagga ctctgccgtg 1620
tactactgcg ccagaagcac ctattacggc ggcgactggt
acttcaacgt gtggggagct 1680
ggaaccaccg tgaccgttag cgccggcggc ggaggctctg
gcggcggagg aagcggcggc 1740
ggcggctccc agatcgtgct gtctcagagc cccgctatct
tgagcgcctc ccctggagag 1800
aaggtgacca tgacttgcag agctagcagc agcgtgagct
acatccactg gttccaacag 1860
aagccaggca gctcccctaa gccttggatc tacgctacca
gcaaccttgc ctcaggcgtt 1920
cccgtgagat tctctggatc tggaagcggc acatcctact
ccctgaccat ctcccgggtc 1980

gaggctgagg acgctgctac ttactactgc cagcagtgga
ctagcaaccc ccccacattt 2040
ggcggcggca ccaaactgga gatcaagact agtaccacga
cgccagcgcc gcgaccacca 2100
acaccggcgc ccaccatcgc gtcgcagccc ctgtccctgc
gcccagaggc gtgccggcca 2160
gcggcggggg gcgcagtgca cacgaggggg ctggacttcg
cctgtgatat ctacatctgg 2220
gcgcccttgg ccgggacttg tggggtcctt ctcctgtcac
tggttatcac cctttactgc 2280
aaacggggca gaaagaaact cctgtatata ttcaaacaac
catttatgag accagtacaa 2340
actactcaag aggaagatgg ctgtagctgc cgatttccag
aagaagaaga aggaggatgt 2400
gaactgagag tgaagttcag caggagcgca gacgcccccg
cgtaccagca gggccagaac 2460
cagctctata acgagctcaa tctaggacga agagaggagt
acgatgtttt ggacaagaga 2520
cgtggccggg accctgagat ggggggaaag ccgagaagga
agaaccctca ggaaggcctg 2580
tacaatgaac tgcagaaaga taagatggcg gaggcctaca
gtgagattgg gatgaaaggc 2640
gagcgccgga ggggcaaggg gcacgatggc ctttaccagg
gtctcagtac agccaccaag 2700
gacacctacg acgcccttca catgcaggcc ctgccccctc gctaa
2745

<210> 49
<211> 2748
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 49

atgggctcca gcaactccaa gaggcagcaa cagggcttgc
tcaagctctg gcgagggctg 60
cgagggaagc ctggggcaga ctgggtgcta ttgtccgatc
cgcttatcgg gcagtcatca 120
acagtccaag aagagtgcgg caaggccttg aaaaagtcct
ggggtaaagg taaaatgact 180
ccagacggcc gccgcctgca agaaggagac acctttgatg
agtgggatga tgatgaagaa 240
gaagtaggct tccctgtgca acctcgagtc cccttaagac
agatgaccta taaattagca 300
gtggactttt cccacttttt aaaatcaaag gggggactgg
atgggatata ttactctgaa 360
agaagagaaa agatcctgaa tttgtatgcc ttgaacgagt
ggggaataat agatgattgg 420
caagcttact caccaggccc ggggataagg tacccgagag
tctttggctt ctgctttaag 480
ctagtcccag tggacctgca tgaggaggca cgcaactgtg
agagacactg tctgatgcat 540
ccagcacaga tgggggaaga tcctgatgga atagatcatg
gagaagtctt ggtctggaag 600
tttgacccga agttggcggt ggagtaccgc ccggacatgt
ttaaggacat gcacgaacat 660
gcaaagcgct gaacgcgtgc ccctctccct ccccccccccc
taacgttact ggccgaagcc 720
gcttggaata aggccggtgt gcgtttgtct atatgttatt
ttccaccata ttgccgtctt 780
ttggcaatgt gagggcccgg aaacctggcc ctgtcttctt
gacgagcatt cctaggggtc 840
tttcccctct cgccaaagga atgcaaggtc tgttgaatgt
cgtgaaggaa gcagttcctc 900
tggaagcttc ttgaagacaa acaacgtctg tagcgaccct
ttgcaggcag cggaacccccc 960
cacctggcga caggtgcctc tgcggccaaa agccacgtgt
ataagataca cctgcaaagg 1020
cggcacaacc ccagtgccac gttgtgagtt ggatagttgt
ggaaagagtc aaatggctct 1080

cctcaagcgt attcaacaag gggctgaagg atgcccagaa
ggtaccccat tgtatgggat 1140
ctgatctggg gcctcggtgc acatgcttta catgtgttta
gtcgaggtta aaaaaacgtc 1200
taggcccccc gaaccacggg gacgtggttt tcctttgaaa
aacacgatga taatatggcc 1260
acaggatccg ccgccaccat ggccctgcca gtgaccgcct
tgctccttcc cctggctctt 1320
ctgctgcacg ctgctagacc tgaggtgcag ctgcagcaga
gcggagctga gctggtgaag 1380
cctggcgcta gcgtgaagat gagctgcaag gccagcggct
acaccttcac cagctataac 1440
atgcactggg tgaagcagac ccctggacag ggactggagt
ggatcggagc tatctaccct 1500
ggaaacggag acacctcata caaccagaag ttcaagggaa
aggctaccct gaccgctgac 1560
aagagcagca gcaccgctta catgcagctg agctcactga
ccagcgagga ctccgccgac 1620
tactactgcg ccagaagcaa ctactacgga agcagctact
ggttcttcga cgtgtgggga 1680
gctggaacca ccgtgaccgt gtcaagcggc ggcggaggct
ccggaggcgg aggatctggc 1740
ggcggcggca gcgacatcgt gctgacccag agccctgcta
tcctgtctgc cagccctgga 1800
gagaaggtga ccatgacctg cagagctagc agcagcgtga
actacatgga ctggtatcag 1860
aaaaagcccg gcagctcacc taagccttgg atctacgcta
ccagcaactt agccagcggc 1920
gtgcctgcta gattctccgg aagcggctct ggaaccagct
actcccttac catcagcaga 1980
gtggaggctg aggacgctgc tacctactac tgccagcagt
ggagcttcaa ccctcctacc 2040
ttcggaggag gaaccaagct ggagatcaag actagtacca
cgacgccagc gccgcgacca 2100
ccaacaccgg cgcccaccat cgcgtcgcag cccctgtccc
tgcgcccaga ggcgtgccgg 2160

ccagcggcgg ggggcgcagt gcacacgagg gggctggact
tcgcctgtga tatctacatc 2220
tgggcgccct tggccgggac ttgtggggtc cttctcctgt
cactggttat caccctttac 2280
tgcaaacggg gcagaaagaa actcctgtat atattcaaac
aaccatttat gagaccagta 2340
caaactactc aagaggaaga tggctgtagc tgccgatttc
cagaagaaga agaaggagga 2400
tgtgaactga gagtgaagtt cagcaggagc gcagacgccc
ccgcgtacca gcagggccag 2460
aaccagctct ataacgagct caatctagga cgaagagagg
agtacgatgt tttggacaag 2520
agacgtggcc gggaccctga gatgggggga aagccgagaa
ggaagaaccc tcaggaaggc 2580
ctgtacaatg aactgcagaa agataagatg gcggaggcct
acagtgagat tgggatgaaa 2640
ggcgagcgcc ggaggggcaa ggggcacgat ggcctttacc
agggtctcag tacagccacc 2700
aaggacacct acgacgccct tcacatgcag gccctgcccc ctcgctaa
2748

<210> 50
<211> 3558
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 50
atgggctcca gcaactccaa gaggcagcaa cagggcttgc
tcaagctctg gcgagggctg 60
cgagggaagc ctggggcaga ctgggtgcta ttgtccgatc
cgcttatcgg gcagtcatca 120
acagtccaag aagagtgcgg caaggccttg aaaaagtcct
ggggtaaagg taaaatgact 180

ccagacggcc gccgcctgca agaaggagac acctttgatg
agtgggatga tgatgaagaa 240
gaagtaggct tccctgtgca acctcgagtc cccttaagac
agatgaccta taaattagca 300
gtggactttt cccacttttt aaaatcaaag gggggactgg
atgggatata ttactctgaa 360
agaagagaaa agatcctgaa tttgtatgcc ttgaacgagt
ggggaataat agatgattgg 420
caagcttact caccaggccc ggggataagg tacccgagag
tctttggctt ctgctttaag 480
ctagtcccag tggacctgca tgaggaggca cgcaactgtg
agagacactg tctgatgcat 540
ccagcacaga tgggggaaga tcctgatgga atagatcatg
gagaagtctt ggtctggaag 600
tttgacccga agttggcggt ggagtaccgc ccggacatgt
ttaaggacat gcacgaacat 660
gcaaagcgct gaacgcgtgc ccctctccct ccccccccccc
taacgttact ggccgaagcc 720
gcttggaata aggccggtgt gcgtttgtct atatgttatt
ttccaccata ttgccgtctt 780
ttggcaatgt gagggcccgg aaacctggcc ctgtcttctt
gacgagcatt cctaggggtc 840
tttccccctct cgccaaagga atgcaaggtc tgttgaatgt
cgtgaaggaa gcagttcctc 900
tggaagcttc ttgaagacaa acaacgtctg tagcgaccct
ttgcaggcag cggaaccccc 960
cacctggcga caggtgcctc tgcggccaaa agccacgtgt
ataagataca cctgcaaagg 1020
cggcacaacc ccagtgccac gttgtgagtt ggatagttgt
ggaaagagtc aaatggctct 1080
cctcaagcgt attcaacaag gggctgaagg atgcccagaa
ggtaccccat tgtatgggat 1140
ctgatctggg gcctcggtgc acatgcttta catgtgttta
gtcgaggtta aaaaaacgtc 1200
taggcccccc gaaccacggg gacgtggttt tcctttgaaa
aacacgatga taatatggcc 1260

acaggatccg ccgccaccat ggccctgcct gtcaccgccc
tgctgctgcc cctggctctg 1320
ctgctgcacg ccgcaagacc tgaagtccag ctgcagcagt
ccggggcaga gctggtgaag 1380
ccaggagcct ccgtgaagat gtcttgtaag gccagcggct
acaccttcac atcctataac 1440
atgcactggg tgaagcagac ccctggacag ggcctggagt
ggatcggagc aatctaccca 1500
ggcaacggcg acacaagcta taatcagaag tttaagggca
aggccaccct gacagccgat 1560
aagagctcct ctaccgccta catgcagctg agctccctga
caagcgagga ctccgccgat 1620
tactattgcg cccggtccaa ttactatggc tctagctact
ggttctttga cgtgtgggga 1680
gcaggaacca cagtgaccgt gtcctctgga ggaggaggaa
gcggaggagg aggatctggc 1740
ggcggcggct ctgatatcgt gctgacacag agcccagcaa
tcctgtccgc ctctccagga 1800
gagaaggtga ccatgacatg tcgggccagc tcctctgtga
actacatgga ctggtatcag 1860
aagaagcccg gcagctcccc taagccatgg atctacgcca
cctccaatct ggcatctgga 1920
gtgcctgcaa ggttcagcgg ctccggatct ggcaccagct
attccctgac aatctctcgc 1980
gtggaggcag aggatgcagc aacctactat tgccagcagt
ggagcttcaa ccccccctacc 2040
tttggcggcg gcacaaagct ggagatcaag ggcggcggcg
gctccggcgg cggcgggagc 2100
ggcggcggcg gctctggcgg cggcggcagc ggcggcggcg
gctccgacat ccagatgacc 2160
cagaccacat ctagcctgtc tgccagcctg ggcgacaggg
tgacaatcag ctgtcgcgcc 2220
tcccaggata tctctaagta cctgaattgg tatcagcaga
agccagatgg caccgtgaag 2280
ctgctgatct accacacaag ccggctgcac tccggagtgc
caagccggtt cagcggctct 2340

ggcagcggca ccgactatag cctgacaatc tccaacctgg
agcaggagga tatcgccacc 2400
tacttctgcc agcagggcaa taccctgcct tatacatttg
gcggaggaac aaagctggag 2460
atcaccggct ccacatctgg aagcggcaag ccaggatctg
gagagggaag caccaaggga 2520
gaggtgaagc tgcaggagtc cggaccaggc ctggtggcac
cttcccagtc tctgagcgtg 2580
acctgtacag tgtctggcgt gagcctgcct gactacggcg
tgtcctggat caggcagcca 2640
ccaagaaagg gcctggagtg gctgggcgtg atctggggca
gcgagacaac atactataac 2700
tccgccctga agagccggct gaccatcatc aaggataact
ccaagtctca ggtgttcctg 2760
aagatgaata gcctgcagac cgacgataca gccatctact
attgcgccaa gcactactat 2820
tatggaggca gttatgctat ggactattgg gggcagggca
caagcgtcac cgtctcatca 2880
actagtacca cgacgccagc gccgcgacca ccaacaccgg
cgcccaccat cgcgtcgcag 2940
cccctgtccc tgcgcccaga ggcgtgccgg ccagcggcgg
ggggcgcagt gcacacgagg 3000
gggctggact tcgcctgtga tatctacatc tgggcgccct
tggccgggac ttgtggggtc 3060
cttctcctgt cactggttat caccctttac tgcaaacggg
gcagaaagaa actcctgtat 3120
atattcaaac aaccatttat gagaccagta caaactactc
aagaggaaga tggctgtagc 3180
tgccgatttc cagaagaaga agaaggagga tgtgaactga
gagtgaagtt cagcaggagc 3240
gcagacgccc ccgcgtacca gcagggccag aaccagctct
ataacgagct caatctagga 3300
cgaagagagg agtacgatgt tttggacaag agacgtggcc
gggaccctga gatgggggga 3360
aagccgagaa ggaagaaccc tcaggaaggc ctgtacaatg
aactgcagaa agataagatg 3420

gcggaggcct acagtgagat tgggatgaaa ggcgagcgcc
ggaggggcaa ggggcacgat 3480
ggcctttacc agggtctcag tacagccacc aaggacacct
acgacgccct tcacatgcag 3540
gccctgcccc ctcgctaa
3558

<210> 51
<211> 2745
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 51
atgggctcca gcaactccaa gaggcagcaa cagggcttgc
tcaagctctg gcgagggctg 60
cgagggaagc ctggggcaga ctgggtgcta ttgtccgatc
cgcttatcgg gcagtcatca 120
acagtccaag aagagtgcgg caaggccttg aaaaagtcct
ggggtaaagg taaaatgact 180
ccagacggcc gccgcctgca agaaggagac acctttgatg
agtgggatga tgatgaagaa 240
gaagtaggct tccctgtgca acctcgagtc cccttaagac
agatgaccta taaattagca 300
gtggactttt cccacttttt aaaatcaaag gggggactgg
atgggatata ttactctgaa 360
agaagagaaa agatcctgaa tttgtatgcc ttgaacgagt
ggggaataat agatgattgg 420
caagcttact caccaggccc ggggataagg tacccgagag
tctttggctt ctgctttaag 480
ctagtcccag tggacctgca tgaggaggca cgcaactgtg
agagacactg tctgatgcat 540
ccagcacaga tgggggaaga tcctgatgga atagatcatg
gagaagtctt ggtctggaag 600

tttgacccga agttggcggt ggagtaccgc ccggacatgt
ttaaggacat gcacgaacat 660
gcaaagcgct gaacgcgtgc ccctctccct ccccccccccc
taacgttact ggccgaagcc 720
gcttggaata aggccggtgt gcgtttgtct atatgttatt
ttccaccata ttgccgtctt 780
ttggcaatgt gagggcccgg aaacctggcc ctgtcttctt
gacgagcatt cctaggggtc 840
tttcccctct cgccaaagga atgcaaggtc tgttgaatgt
cgtgaaggaa gcagttcctc 900
tggaagcttc ttgaagacaa acaacgtctg tagcgaccct
ttgcaggcag cggaacccccc 960
cacctggcga caggtgcctc tgcggccaaa agccacgtgt
ataagataca cctgcaaagg 1020
cggcacaacc ccagtgccac gttgtgagtt ggatagttgt
ggaaagagtc aaatggctct 1080
cctcaagcgt attcaacaag gggctgaagg atgcccagaa
ggtacccccat tgtatgggat 1140
ctgatctggg gcctcggtgc acatgcttta catgtgttta
gtcgaggtta aaaaaacgtc 1200
taggcccccc gaaccacggg gacgtggttt tcctttgaaa
aacacgatga taatatggcc 1260
acaggatccg ccgccaccat ggccctgcct gtgaccgccc
tgctgctgcc cctggccctg 1320
ctgctgcacg ctgctagacc tgatattcag atgacccaga
ccactagctc cctgtccgcc 1380
tctctgggcg acagagtgac aatcagctgc agggcctccc
aggatatctc taagtatctg 1440
aactggtacc agcagaagcc agacggcaca gtgaagctgc
tgatctatca caccagccgc 1500
ctgcactccg gagtgccatc tcggttcagc ggctccggat
ctggcacaga ctacagcctg 1560
accatctcca acctggagca ggaggatatc gccacctatt
tctgccagca gggcaataca 1620
ctgccctaca cctttggcgg cggcacaaag ctggagatca
ccggaggagg aggaagcggc 1680

ggaggaggct ccggcggcgg cggctctgag gtgaagctgc
aggagtccgg acctggcctg 1740
gtggcaccaa gccagtccct gtctgtgaca tgtaccgtgt
ccggcgtgtc tctgcctgat 1800
tacggcgtgt cttggatcag gcagccacct aggaagggcc
tggagtggct gggcgtgatc 1860
tggggcagcg agacaacata ctataattct gccctgaaga
gcagactgac catcatcaag 1920
gacaacagca agtcccaggt gttcctgaag atgaatagcc
tgcagacaga cgataccgcc 1980
atctactatt gcgccaagca ctactattac ggcggcagct
atgccatgga ttactggggc 2040
cagggcacat ccgtgaccgt gtctagcact agtaccacga
cgccagcgcc gcgaccacca 2100
acaccggcgc ccaccatcgc gtcgcagccc ctgtccctgc
gcccagaggc gtgccggcca 2160
gcggcggggg gcgcagtgca cacgaggggg ctggacttcg
cctgtgatat ctacatctgg 2220
gcgcccttgg ccgggacttg tggggtcctt ctcctgtcac
tggttatcac cctttactgc 2280
aaacggggca gaaagaaact cctgtatata ttcaaacaac
catttatgag accagtacaa 2340
actactcaag aggaagatgg ctgtagctgc cgatttccag
aagaagaaga aggaggatgt 2400
gaactgagag tgaagttcag caggagcgca gacgcccccg
cgtaccagca gggccagaac 2460
cagctctata acgagctcaa tctaggacga agagaggagt
acgatgtttt ggacaagaga 2520
cgtggccggg accctgagat gggggggaaag ccgagaagga
agaaccctca ggaaggcctg 2580
tacaatgaac tgcagaaaga taagatggcg gaggcctaca
gtgagattgg gatgaaaggc 2640
gagcgccgga ggggcaaggg gcacgatggc ctttaccagg
gtctcagtac agccaccaag 2700
gacacctacg acgcccttca catgcaggcc ctgccccctc gctaa
2745

091821-TW-PA-序列表

<210> 52
<211> 2743
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 52
atgggctcca gcaactccaa gaggcagcaa cagggcttgc
tcaagctctg gcgagggctg 60
cgagggaagc ctggggcaga ctgggtgcta ttgtccgatc
cgcttatcgg gcagtcatca 120
acagtccaag aagagtgcgg caaggccttg aaaaagtcct
ggggtaaagg taaaatgact 180
ccagacggcc gccgcctgca agaaggagac acctttgatg
agtgggatga tgatgaagaa 240
gaagtaggct tccctgtgca acctcgagtc cccttaagac
agatgaccta taaattagca 300
gtggacttttt cccacttttt aaaatcaaag gggggactgg
atgggatata ttactctgaa 360
agaagagaaa agatcctgaa tttgtatgcc ttgaacgagt
ggggaataat agatgattgg 420
caagcttact caccaggccc ggggataagg tacccgagag
tctttggctt ctgctttaag 480
ctagtcccag tggacctgca tgaggaggca cgcaactgtg
agagacactg tctgatgcat 540
ccagcacaga tgggggaaga tcctgatgga atagatcatg
gagaagtctt ggtctggaag 600
tttgacccga agttggcggt ggagtaccgc ccggacatgt
ttaaggacat gcacgaacat 660
gcaaagcgct gaacgcgtgc ccctctccct ccccccccccc
taacgttact ggccgaagcc 720
gcttggaata aggccggtgt gcgtttgtct atatgttatt
ttccaccata ttgccgtctt 780

ttggcaatgt gagggcccgg aaacctggcc ctgtcttctt
gacgagcatt cctaggggtc 840
tttccccctct cgccaaagga atgcaaggtc tgttgaatgt
cgtgaaggaa gcagttcctc 900
tggaagcttc ttgaagacaa acaacgtctg tagcgaccct
ttgcaggcag cggaaccccc 960
cacctggcga caggtgcctc tgcggccaaa agccacgtgt
ataagataca cctgcaaagg 1020
cggcacaacc ccagtgccac gttgtgagtt ggatagttgt
ggaaagagtc aaatggctct 1080
cctcaagcgt attcaacaag gggctgaagg atgcccagaa
ggtaccccat tgtatgggat 1140
ctgatctggg gcctcggtgc acatgcttta catgtgttta
gtcgaggtta aaaaaacgtc 1200
taggcccccc gaaccacggg gacgtggttt tcctttgaaa
aacacgatga taatatggcc 1260
acaggatccg ccgccaccat ggctctgccc gtcaccgctc
tgctgctgcc tctggctctg 1320
ctgctgcacg ctgctcgccc tcaggtcaaa ctggaagaat
ctggcggagg cctggtgcag 1380
gcaggacgga gcctgcgcct gagctgcgca gcatccgagc
acaccttcag ctcccacgtg 1440
atgggctggt ttcggcaggc cccaggcaag gagagagaga
gcgtggccgt gatcggctgg 1500
agggacatct ccacatctta cgccgattcc gtgaagggcc
ggttcaccat cagccgggac 1560
aacgccaaga agacactgta tctgcagatg aacagcctga
agcccgagga caccgccgtg 1620
tactattgcg cagcaaggag aatcgacgca gcagactttg
attcctgggg ccagggcacc 1680
caggtgacag tgtctagcgg aggaggagga tctgaggtgc
agctggtgga gagcggaggc 1740
ggcctggtgc aggccggagg ctctctgagg ctgagctgtg
cagcatccgg aagaaccttc 1800
acaatgggct ggtttaggca ggcaccagga aaggagaggg
agttcgtggc agcaatcagc 1860

ctgtccccta ccctggccta ctatgccgag agcgtgaagg
gcaggtttac catctcccgc 1920
gataacgcca agaatacagt ggtgctgcag atgaactccc
tgaaacctga ggacacagcc 1980
ctgtactatt gtgccgccga tcggaagagc gtgatgagca
ttagaccaga ctattggggg 2040
cagggaacac aggtgaccgt gagcagcact agtaccacga
cgccagcgcc gcgaccacca 2100
acaccggcgc ccaccatcgc gtcgcagccc ctgtccctgc
gcccagaggc gtgccggcca 2160
gcggcggggg gcgcagtgca cacgaggggg ctggacttcg
cctgtgatat ctacatctgg 2220
gcgcccttgg ccgggacttg tggggtcctt ctcctgtcac
tggttatcac cctttactgc 2280
aaacggggca gaaagaaact cctgtatata ttcaaacaac
catttatgag accagtacaa 2340
actactcaag aggaagatgg ctgtagctcg atttccagaa
gaagaagaag gaggatgtga 2400
actgagagtg aagttcagca ggagcgcaga cgcccccgcg
taccagcagg gccagaacca 2460
gctctataac gagctcaatc taggacgaag agaggagtac
gatgttttgg acaagagacg 2520
tggccgggac cctgagatgg ggggaaagcc gagaaggaag
aaccctcagg aaggcctgta 2580
caatgaactg cagaaagata agatggcgga ggcctacagt
gagattggga tgaaaggcga 2640
gcgccggagg ggcaaggggc acgatggcct ttaccagggt
ctcagtacag ccaccaagga 2700
cacctacgac gcccttcaca tgcaggccct gccccctcgc taa
2743

<210> 53
<211> 2748
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 53
atgggctcca gcaactccaa gaggcagcaa cagggcttgc
tcaagctctg gcgagggctg 60
cgagggaagc ctggggcaga ctgggtgcta ttgtccgatc
cgcttatcgg gcagtcatca 120
acagtccaag aagagtgcgg caaggccttg aaaaagtcct
ggggtaaagg taaaatgact 180
ccagacggcc gccgcctgca agaaggagac acctttgatg
agtgggatga tgatgaagaa 240
gaagtaggct tccctgtgca acctcgagtc cccttaagac
agatgaccta taaattagca 300
gtggactttt cccacttttt aaaatcaaag gggggactgg
atgggatata ttactctgaa 360
agaagagaaa agatcctgaa tttgtatgcc ttgaacgagt
ggggaataat agatgattgg 420
caagcttact caccaggccc ggggataagg tacccgagag
tctttggctt ctgctttaag 480
ctagtcccag tggacctgca tgaggaggca cgcaactgtg
agagacactg tctgatgcat 540
ccagcacaga tgggggaaga tcctgatgga atagatcatg
gagaagtctt ggtctggaag 600
tttgacccga agttggcggt ggagtaccgc ccggacatgt
ttaaggacat gcacgaacat 660
gcaaagcgct gaacgcgtgc ccctctccct ccccccccccc
taacgttact ggccgaagcc 720
gcttggaata aggccggtgt gcgtttgtct atatgttatt
ttccaccata ttgccgtctt 780
ttggcaatgt gagggcccgg aaacctggcc ctgtcttctt
gacgagcatt cctaggggtc 840
tttcccctct cgccaaagga atgcaaggtc tgttgaatgt
cgtgaaggaa gcagttcctc 900
tggaagcttc ttgaagacaa acaacgtctg tagcgaccct
ttgcaggcag cggaacccccc 960

cacctggcga caggtgcctc tgcggccaaa agccacgtgt
ataagataca cctgcaaagg 1020
cggcacaacc ccagtgccac gttgtgagtt ggatagttgt
ggaaagagtc aaatggctct 1080
cctcaagcgt attcaacaag gggctgaagg atgcccagaa
ggtaccccat tgtatgggat 1140
ctgatctggg gcctcggtgc acatgcttta catgtgttta
gtcgaggtta aaaaaacgtc 1200
taggcccccc gaaccacggg gacgtggttt tcctttgaaa
aacacgatga taatatggcc 1260
acaggatccg ccgccaccat ggctctgccc gtcaccgcac
tgctgctgcc tctggctctg 1320
ctgctgcacg ctgctcgccc tcaggtcaaa ctggaagaat
ctggcggagg cctggtgcag 1380
gcaggcaggt ccctgaggct gtcttgcgca gcaagcgagc
acacctttag ctcccacgtg 1440
atgggatggt tcaggcaggc accaggcaag gagagagagt
ccgtggccgt gatcggctgg 1500
agggacatct ccacatctta cgccgattct gtgaagggcc
ggtttaccat cagcagagac 1560
aacgccaaga agacactgta tctgcagatg aatagcctga
agcctgagga caccgccgtg 1620
tactattgcg cagcaaggag aatcgatgca gcagacttcg
attcctgggg acagggaacc 1680
caggtgacag tgtctagcgg aggaggagga agcgccgtgc
agctggtgga gtccggcggc 1740
ggcctggtgc aggccggcga ttctctgcgg ctgacctgta
cagcctccgg cagagccttc 1800
tctacctact ttatggcctg gtttagacag gcccctggca
aggagaggga gtttgtggca 1860
ggaatcgcat ggagcggagg ctccacagca tacgccgact
ccgtgaaggg caggttcacc 1920
atctctcgcg ataacgccaa gaatacagtg tatctgcaga
tgaactctct gaagagcgag 1980
gacacagccg tgtactattg tgccagccgg ggaatcgagg
tggaggaatt tggggcttgg 2040

gggcagggaa ctcaggtgac cgtctcatca actagtacca
cgacgccagc gccgcgacca 2100
ccaacaccgg cgcccaccat cgcgtcgcag cccctgtccc
tgcgcccaga ggcgtgccgg 2160
ccagcggcgg ggggcgcagt gcacacgagg gggctggact
tcgcctgtga tatctacatc 2220
tgggcgccct tggccgggac ttgtggggtc cttctcctgt
cactggttat caccctttac 2280
tgcaaacggg gcagaaagaa actcctgtat atattcaaac
aaccatttat gagaccagta 2340
caaactactc aagaggaaga tggctgtagc tgccgatttc
cagaagaaga agaaggagga 2400
tgtgaactga gagtgaagtt cagcaggagc gcagacgccc
ccgcgtacca gcagggccag 2460
aaccagctct ataacgagct caatctagga cgaagagagg
agtacgatgt tttggacaag 2520
agacgtggcc gggaccctga gatgggggga aagccgagaa
ggaagaaccc tcaggaaggc 2580
ctgtacaatg aactgcagaa agataagatg gcggaggcct
acagtgagat tgggatgaaa 2640
ggcgagcgcc ggaggggcaa ggggcacgat ggcctttacc
agggtctcag tacagccacc 2700
aaggacacct acgacgccct tcacatgcag gccctgcccc ctcgctaa
2748

<210> 54
<211> 2376
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 54
atgggctcca gcaactccaa gaggcagcaa cagggcttgc
tcaagctctg gcgagggctg 60

cgagggaagc ctggggcaga ctgggtgcta ttgtccgatc
cgcttatcgg gcagtcatca 120
acagtccaag aagagtgcgg caaggccttg aaaaagtcct
ggggtaaagg taaaatgact 180
ccagacggcc gccgcctgca agaaggagac acctttgatg
agtgggatga tgatgaagaa 240
gaagtaggct tccctgtgca acctcgagtc cccttaagac
agatgaccta taaattagca 300
gtggacttttt cccacttttt aaaatcaaag gggggactgg
atgggatata ttactctgaa 360
agaagagaaa agatcctgaa tttgtatgcc ttgaacgagt
ggggaataat agatgattgg 420
caagcttact caccaggccc ggggataagg tacccgagag
tctttggctt ctgctttaag 480
ctagtcccag tggacctgca tgaggaggca cgcaactgtg
agagacactg tctgatgcat 540
ccagcacaga tgggggaaga tcctgatgga atagatcatg
gagaagtctt ggtctggaag 600
tttgacccga agttggcggt ggagtaccgc ccggacatgt
ttaaggacat gcacgaacat 660
gcaaagcgct gaacgcgtgc ccctctccct ccccccccccc
taacgttact ggccgaagcc 720
gcttggaata aggccggtgt gcgtttgtct atatgttatt
ttccaccata ttgccgtctt 780
ttggcaatgt gagggcccgg aaacctggcc ctgtcttctt
gacgagcatt cctaggggtc 840
tttcccctct cgccaaagga atgcaaggtc tgttgaatgt
cgtgaaggaa gcagttcctc 900
tggaagcttc ttgaagacaa acaacgtctg tagcgaccct
ttgcaggcag cggaacccccc 960
cacctggcga caggtgcctc tgcggccaaa agccacgtgt
ataagatacа cctgcaaagg 1020
cggcacaacc ccagtgccac gttgtgagtt ggatagttgt
ggaaagagtc aaatggctct 1080
cctcaagcgt attcaacaag gggctgaagg atgcccagaa
ggtaccccat tgtatgggat 1140

ctgatctggg gcctcggtgc acatgcttta catgtgttta
gtcgaggtta aaaaaacgtc 1200
taggcccccc gaaccacggg gacgtggttt tcctttgaaa
aacacgatga taatatggcc 1260
acaggatccg ccgccaccat ggctctgccc gtcaccgctc
tgctgctgcc tctggctctg 1320
ctgctgcacg ctgctcgccc tcaggtcaaa ctggaagaat
ctggcggagg cctggtgcag 1380
gcaggacgga gcctgcgcct gagctgcgca gcatccgagc
acaccttcag ctcccacgtg 1440
atgggctggt ttcggcaggc cccaggcaag gagagagaga
gcgtggccgt gatcggctgg 1500
agggacatct ccacatctta cgccgattcc gtgaagggcc
ggttcaccat cagccgggac 1560
aacgccaaga agacactgta tctgcagatg aacagcctga
agcccgagga caccgccgtg 1620
tactattgcg cagcaaggag aatcgacgca gcagactttg
attcctgggg ccagggcacc 1680
caggtgacag tgtctagcac tagtaccacg acgccagcgc
cgcgaccacc aacaccggcg 1740
cccaccatcg cgtcgcagcc cctgtccctg cgcccagagg
cgtgccggcc agcggcgggg 1800
ggcgcagtgc acacgagggg gctggacttc gcctgtgata
tctacatctg ggcgcccttg 1860
gccgggactt gtggggtcct tctcctgtca ctggttatca
ccctttactg caaacggggc 1920
agaaagaaac tcctgtatat attcaaacaa ccatttatga
gaccagtaca aactactcaa 1980
gaggaagatg gctgtagctg ccgatttcca gaagaagaag
aaggaggatg tgaactgaga 2040
gtgaagttca gcaggagcgc agacgccccc gcgtaccagc
agggccagaa ccagctctat 2100
aacgagctca atctaggacg aagagaggag tacgatgttt
tggacaagag acgtggccgg 2160
gaccctgaga tgggggggaaa gccgagaagg aagaaccctc
aggaaggcct gtacaatgaa 2220

ctgcagaaag ataagatggc ggaggcctac agtgagattg ggatgaaagg cgagcgccgg 2280
aggggcaagg ggcacgatgg cctttaccag ggtctcagta cagccaccaa ggacacctac 2340
gacgcccttc acatgcaggc cctgccccct cgctaa 2376

<210> 55
<211> 488
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 55
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 Gln Leu Gln Gln Pro 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 Arg
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 Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly
Asp Trp Tyr
115 120 125

Phe Asn Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
Ala Gly Gly
130 135 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
Gln Ile Val
145 150 155
160
Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly
Glu Lys Val
165 170
175
Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile
His Trp Phe
180 185
190
Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
Ala Thr Ser
195 200 205

Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser
Gly Ser Gly
210 215 220

Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
Asp Ala Ala
225 230 235
240
Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr
Phe Gly Gly
245 250
255
Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys 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

Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala
370 375 380

Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu
385 390 395 400

Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly
405 410 415

Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu
420 425 430

Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser
435 440 445

Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly
450 455 460

Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu
465 470 475 480

His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
485

<210> 56
<211> 489
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

091821-TW-PA-序列表

<220>
<223> 合成構築體

<400> 56
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> 57
<211> 759
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 57
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 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 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

260 265

270

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

275 280 285

Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu

290 295 300

Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys

305 310 315
320
Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val
Lys Leu Leu
325 330
335
Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser
Arg Phe Ser
340 345
350
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser
Asn Leu Glu
355 360 365

Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn
Thr Leu Pro
370 375 380

Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr Gly
Ser Thr Ser
385 390 395
400
Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys
Gly Glu Val
405 410
415
Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser
Gln Ser Leu
420 425
430
Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp
Tyr Gly Val
435 440 445

Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp
Leu Gly Val

450 455 460

Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu
Lys Ser Arg
465 470 475
480

Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe
Leu Lys Met
485 490
495

Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
Ala Lys His
500 505
510

Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
Gln Gly Thr
515 520 525

Ser Val Thr Val Ser Ser Thr Ser Thr Thr Thr Pro Ala
Pro Arg Pro
530 535 540

Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser
Leu Arg Pro
545 550 555
560

Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr
Arg Gly Leu
565 570
575

Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala
Gly Thr Cys
580 585
590

Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys
Lys Arg Gly

595 600 605

Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
Arg Pro Val

610 615 620

Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
Pro Glu Glu

625 630 635

640

Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg
Ser Ala Asp

645 650

655

Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn
Glu Leu Asn

660 665

670

Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg
Arg Gly Arg

675 680 685

Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro
Gln Glu Gly

690 695 700

Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala
Tyr Ser Glu

705 710 715

720

Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His
Asp Gly Leu

725 730

735

Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp
Ala Leu His

740 745

750

Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

755

<210> 58
<211> 488
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 58
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 Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu
20 25 30
Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln
35 40 45

Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr
50 55 60

Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro
65 70 75 80
Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser

Leu Thr Ile
85 90
95
Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys
Gln Gln Gly
100 105
110
Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
Glu Ile Thr
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
Gly Ser Glu
130 135 140

Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro
Ser Gln Ser
145 150 155
160
Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro
Asp Tyr Gly
165 170
175
Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu
Trp Leu Gly
180 185
190
Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala
Leu Lys Ser
195 200 205

Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val
Phe Leu Lys
210 215 220

Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr

Cys Ala Lys
225 230 235
240
His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
Gly Gln Gly
245 250
255
Thr Ser 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

Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser

Arg Ser Ala
370 375 380

Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr
Asn Glu Leu
385 390 395
400

Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys
Arg Arg Gly
405 410
415

Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn
Pro Gln Glu
420 425
430

Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu
Ala Tyr Ser
435 440 445

Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly
His Asp Gly
450 455 460

Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr
Asp Ala Leu
465 470 475
480

His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
485

<210> 59
<211> 488
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

091821-TW-PA-序列表

<220>
<223> 合成構築體

<400> 59
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

Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser
Arg Ser Ala
370 375 380

Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr
Asn Glu Leu
385 390 395
400

Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys
Arg Arg Gly
405 410
415

Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn
Pro Gln Glu
420 425
430
Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu
Ala Tyr Ser
435 440 445

Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly
His Asp Gly
450 455 460

Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr
Asp Ala Leu
465 470 475
480
His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
485

<210> 60
<211> 489
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 60
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 Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
Gln Ala Gly
145 150 155
160
Asp Ser Leu Arg Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Arg Ala
Phe Ser Thr
165 170

175
Tyr Phe Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu
Arg Glu Phe
180 185
190
Val Ala Gly Ile Ala Trp Ser Gly Gly Ser Thr Ala Tyr
Ala Asp Ser
195 200 205

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys
Asn Thr Val
210 215 220

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala
Val Tyr Tyr
225 230 235
240
Cys Ala Ser Arg Gly Ile Glu Val Glu Glu Phe Gly Ala
Trp Gly Gln
245 250
255
Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser 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> 61
<211> 365
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 61
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 Thr Ser Thr Thr

130 135 140

Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln

145 150 155

160

Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala

165 170

175

Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala

180 185

190

Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr

195 200 205

Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln

210 215 220

Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp
Gly Cys Ser
225 230 235
240
Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
Arg Val Lys
245 250
255
Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
Gln Asn Gln
260 265
270
Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
Asp Val Leu
275 280 285

Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
Pro Arg Arg
290 295 300

Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
Asp Lys Met
305 310 315
320
Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
Arg Arg Gly
325 330
335
Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
Thr Lys Asp
340 345
350
Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
355 360 365

091821-TW-PA-序列表

<210> 62
<211> 2760
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 62
gccgccacca tggctctgcc cgtcaccgct ctgctgctgc
ctctggctct gctgctgcac 60
gctgctcgcc ctcaggtcaa actggaagaa tctggcggag
gcctggtgca ggcaggacgg 120
agcctgcgcc tgagctgcgc agcatccgag cacaccttca
gctcccacgt gatgggctgg 180
tttcggcagg ccccaggcaa ggagagagag agcgtggccg
tgatcggctg gagggacatc 240
tccacatctt acgccgattc cgtgaagggc cggttcacca
tcagccggga caacgccaag 300
aagacactgt atctgcagat gaacagcctg aagcccgagg
acaccgccgt gtactattgc 360
gcagcaagga gaatcgacgc agcagacttt gattcctggg
gccagggcac ccaggtgaca 420
gtgtctagcg gaggaggagg atctgaggtg cagctggtgg
agagcggagg cggcctggtg 480
caggccggag gctctctgag gctgagctgt gcagcatccg
gaagaacctt cacaatgggc 540
tggtttaggc aggcaccagg aaaggagagg gagttcgtgg
cagcaatcag cctgtccccct 600
accctggcct actatgccga gagcgtgaag ggcaggttta
ccatctcccg cgataacgcc 660
aagaatacag tggtgctgca gatgaactcc ctgaaacctg
aggacacagc cctgtactat 720
tgtgccgccg atcggaagag cgtgatgagc attagaccag

actattgggg gcagggaaca 780
caggtgaccg tgagcagcac tagtaccacg acgccagcgc
cgcgaccacc aacaccggcg 840
cccaccatcg cgtcgcagcc cctgtccctg cgcccagagg
cgtgccggcc agcggcgggg 900
ggcgcagtgc acacgagggg gctggacttc gcctgtgata
tctacatctg ggcgcccttg 960
gccgggactt gtggggtcct tctcctgtca ctggttatca
ccctttactg caaacggggc 1020
agaaagaaac tcctgtatat attcaaacaa ccatttatga
gaccagtaca aactactcaa 1080
gaggaagatg gctgtagctg ccgatttcca gaagaagaag
aaggaggatg tgaactggtt 1140
aacagagtga agttcagcag gagcgcagac gccccccgcgt
accagcaggg ccagaaccag 1200
ctctataacg agctcaatct aggacgaaga gaggagtacg
atgttttgga caagagacgt 1260
ggccgggacc ctgagatggg gggaaagccg agaaggaaga
accctcagga aggcctgtac 1320
aatgaactgc agaaagataa gatggcggag gcctacagtg
agattgggat gaaaggcgag 1380
cgccggaggg gcaaggggca cgatggcctt taccagggtc
tcagtacagc caccaaggac 1440
acctacgacg cccttcacat gcaggccctg cccccctcgct
aatgaacgcg tgcccctctc 1500
cctccccccc ccctaacgtt actggccgaa gccgcttgga
ataaggccgg tgtgcgtttg 1560
tctatatgtt attttccacc atattgccgt cttttggcaa
tgtgagggcc cggaaacctg 1620
gccctgtctt cttgacgagc attcctaggg gtctttcccc
tctcgccaaa ggaatgcaag 1680
gtctgttgaa tgtcgtgaag gaagcagttc ctctggaagc
ttcttgaaga caaacaacgt 1740
ctgtagcgac cctttgcagg cagcggaacc ccccacctgg
cgacaggtgc ctctgcggcc 1800
aaaagccacg tgtataagat acacctgcaa aggcggcaca

accccagtgc cacgttgtga 1860
gttggatagt tgtggaaaga gtcaaatggc tctcctcaag
cgtattcaac aaggggctga 1920
aggatgccca gaaggtaccc cattgtatgg gatctgatct
ggggcctcgg tgcacatgct 1980
ttacatgtgt ttagtcgagg ttaaaaaaac gtctaggccc
cccgaaccac ggggacgtgg 2040
ttttcctttg aaaaacacga tgataatatg gccacaggat
ccgccaccat gggctccagc 2100
aactccaaga ggcagcaaca gggcttgctc aagctctggc
gagggctgcg agggaagcct 2160
ggggcagact gggtgctatt gtccgatccg cttatcgggc
agtcatcaac agtccaagaa 2220
gagtgcggca aggccttgaa aaagtcctgg ggtaaaggta
aaatgactcc agacggccgc 2280
cgcctgcaag aaggagacac ctttgatgag tgggatgatg
atgaagaaga agtaggcttc 2340
cctgtgcaac ctcgagtccc cttaagacag atgacctata
aattagcagt ggacttttcc 2400
cacttttaa aatcaaaggg gggactggat gggatatatt
actctgaaag aagagaaaag 2460
atcctgaatt tgtatgcctt gaacgagtgg ggaataatag
atgattggca agcttactca 2520
ccaggcccgg ggataaggta cccgagagtc tttggcttct
gctttaagct agtcccagtg 2580
gacctgcatg aggaggcacg caactgtgag agacactgtg
ctgcacatcc agcacagatg 2640
ggggaagatc ctgatggaat agatcatgga gaagtcttgg
tctggaagtt tgacccgaag 2700
ttggcggtgg agtaccgccc ggacatgttt aaggacatgc
acgaacatgc aaagcgctaa 2760

<210> 63
<211> 2685
<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 63
atgggctcca gcaactccaa gaggcagcaa cagggcttgc
tcaagctctg gcgagggctg 60
cgagggaagc ctggggcaga ctgggtgcta ttgtccgatc
cgcttatcgg gcagtcatca 120
acagtccaag aagagtgcgg caaggccttg aaaaagtcct
ggggtaaagg taaaatgact 180
ccagacggcc gccgcctgca agaaggagac acctttgatg
agtgggatga tgatgaagaa 240
gaagtaggct tccctgtgca acctcgagtc cccttaagac
agatgaccta taaattagca 300
gtggactttt cccacttttt aaaatcaaag gggggactgg
atgggatata ttactctgaa 360
agaagagaaa agatcctgaa tttgtatgcc ttgaacgagt
ggggaataat agatgattgg 420
caagcttact caccaggccc ggggataagg tacccgagag
tctttggctt ctgctttaag 480
ctagtcccag tggacctgca tgaggaggca cgcaactgtg
agagacactg tgctgcacat 540
ccagcacaga tgggggaaga tcctgatgga atagatcatg
gagaagtctt ggtctggaag 600
tttgacccga agttggcggt ggagtaccgc ccggacatgt
ttaaggacat gcacgaacat 660
gcaaagcgct gaacgcgtgc ccctctccct ccccccccccc
taacgttact ggccgaagcc 720
gcttggaata aggccggtgt gcgtttgtct atatgttatt
ttccaccata ttgccgtctt 780
ttggcaatgt gagggcccgg aaacctggcc ctgtcttctt
gacgagcatt cctaggggtc 840
tttcccctct cgccaaagga atgcaaggtc tgttgaatgt
cgtgaaggaa gcagttcctc 900

tggaagcttc ttgaagacaa acaacgtctg tagcgaccct
ttgcaggcag cggaacccccc 960
cacctggcga caggtgcctc tgcggccaaa agccacgtgt
ataagataca cctgcaaagg 1020
cggcacaacc ccagtgccac gttgtgagtt ggatagttgt
ggaaagagtc aaatggctct 1080
cctcaagcgt attcaacaag gggctgaagg atgcccagaa
ggtaccccat tgtatgggat 1140
ctgatctggg gcctcggtgc acatgcttta catgtgttta
gtcgaggtta aaaaaacgtc 1200
taggcccccc gaaccacggg gacgtggttt tcctttgaaa
aacacgatga taatatggcc 1260
acaggatccg ccgccaccat gcagtctgga acccactgga
gggtgctggg actgtgcctg 1320
ctgagcgtgg gcgtgtgggg acaggaggtg cagctgcagc
agagcggagc tgagctggtg 1380
aagcctggcg ctagcgtgaa gatgagctgc aaggccagcg
gctacacctt caccagctat 1440
aacatgcact gggtgaagca gacccctgga cagggactgg
agtggatcgg agctatctac 1500
cctggaaacg gagacacctc atacaaccag aagttcaagg
gaaaggctac cctgaccgct 1560
gacaagagca gcagcaccgc ttacatgcag ctgagctcac
tgaccagcga ggactccgcc 1620
gactactact gcgccagaag caactactac ggaagcagct
actggttctt cgacgtgtgg 1680
ggagctggaa ccaccgtgac cgtgtcaagc ggcggcggag
gctccggagg cggaggatct 1740
ggcggcggcg gcagcgacat cgtgctgacc cagagccctg
ctatcctgtc tgccagccct 1800
ggagagaagg tgaccatgac ctgcagagct agcagcagcg
tgaactacat ggactggtat 1860
cagaaaaagc ccggcagctc acctaagcct tggatctacg
ctaccagcaa cttagccagc 1920
ggcgtgcctg ctagattctc cggaagcggc tctggaacca
gctactccct taccatcagc 1980

agagtggagg ctgaggacgc tgctacctac tactgccagc
agtggagctt caaccctcct 2040
accttcggag gaggaaccaa gctggagatc aagactagtg
gcggcggagg ctctggcggc 2100
ggaggaagcg gcggcggcgg ctccgatggc aacgaggaga
tgggcggcat cacccagaca 2160
ccctacaagg tgtccatctc tggcaccaca gtgatcctga
cctgtccaca gtatcccggc 2220
tctgagatcc tgtggcagca caacgacaag aatatcggcg
gcgatgagga cgataagaat 2280
atcggcagcg acgaggatca cctgtctctg aaggagttca
gcgagctgga gcagtccggc 2340
tactacgtgt gctaccctcg gggctccaag ccagaggacg
ccaactttta cctgtatctg 2400
cgggccagag tgtgcgagaa ttgtatggag atggacgtga
tgtccgtggc caccatcgtg 2460
atcgtggata tctgtatcac aggcggcctg ctgctgctgg
tgtactattg gagcaagaac 2520
cggaaggcca aggccaagcc tgtgaccaga ggagcaggag
caggaggcag gcagagggga 2580
cagaacaagg agaggccacc tccagtgccc aatcctgact
acgagccaat caggaagggc 2640
cagcgcgatc tgtatagcgg cctgaatcag aggcgcatct gataa
2685

<210> 64
<211> 467
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 64
Met Gln Ser Gly Thr His Trp Arg Val Leu Gly Leu Cys
Leu Leu Ser

1 5 10 15
Val Gly Val Trp Gly Gln Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu
20 25 30
Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly
35 40 45
Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly
50 55 60
Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr
65 70 75 80
Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys
85 90 95
Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp
100 105 110
Ser Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr
115 120 125
Trp Phe Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
130 135 140
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp

145 150 155

160

Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu

165 170

175

Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met Asp

180 185

190

Trp Tyr Gln Lys Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala

195 200 205

Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly

210 215 220

Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp

225 230 235

240

Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe

245 250

255

Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Thr Ser Gly Gly Gly Gly Ser

260 265

270

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Gly Asn Glu Glu Met

275 280 285

Gly Gly Ile Thr Gln Thr Pro Tyr Lys Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr

290 295 300

Val Ile Leu Thr Cys Pro Gln Tyr Pro Gly Ser Glu Ile Leu Trp Gln
305 310 315 320

His Asn Asp Lys Asn Ile Gly Gly Asp Glu Asp Asp Lys Asn Ile Gly
325 330 335

Ser Asp Glu Asp His Leu Ser Leu Lys Glu Phe Ser Glu Leu Glu Gln
340 345 350

Ser Gly Tyr Tyr Val Cys Tyr Pro Arg Gly Ser Lys Pro Glu Asp Ala
355 360 365

Asn Phe Tyr Leu Tyr Leu Arg Ala Arg Val Cys Glu Asn Cys Met Glu
370 375 380

Met Asp Val Met Ser Val Ala Thr Ile Val Ile Val Asp Ile Cys Ile
385 390 395 400

Thr Gly Gly Leu Leu Leu Leu Val Tyr Tyr Trp Ser Lys Asn Arg Lys
405 410 415

Ala Lys Ala Lys Pro Val Thr Arg Gly Ala Gly Ala Gly Gly Arg Gln
420 425 430

Arg Gly Gln Asn Lys Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr

435 440 445

Glu Pro Ile Arg Lys Gly Gln Arg Asp Leu Tyr Ser Gly
Leu Asn Gln
450 455 460

Arg Arg Ile
465

<210> 65
<211> 3147
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 65
atgggctcca gcaactccaa gaggcagcaa cagggcttgc
tcaagctctg gcgagggctg 60
cgagggaagc ctggggcaga ctgggtgcta ttgtccgatc
cgcttatcgg gcagtcatca 120
acagtccaag aagagtgcgg caaggccttg aaaaagtcct
ggggtaaagg taaaatgact 180
ccagacggcc gccgcctgca agaaggagac acctttgatg
agtgggatga tgatgaagaa 240
gaagtaggct tccctgtgca acctcgagtc cccttaagac
agatgaccta taaattagca 300
gtggactttt cccacttttt aaaatcaaag gggggactgg
atgggatata ttactctgaa 360
agaagagaaa agatcctgaa tttgtatgcc ttgaacgagt
ggggaataat agatgattgg 420
caagcttact caccaggccc ggggataagg tacccgagag
tctttggctt ctgctttaag 480
ctagtcccag tggacctgca tgaggaggca cgcaactgtg

agagacactg tgctgcacat 540
ccagcacaga tgggggaaga tcctgatgga atagatcatg
gagaagtctt ggtctggaag 600
tttgacccga agttggcggt ggagtaccgc ccggacatgt
ttaaggacat gcacgaacat 660
gcaaagcgct gaacgcgtgc ccctctccct ccccccccccc
taacgttact ggccgaagcc 720
gcttggaata aggccggtgt gcgtttgtct atatgttatt
ttccaccata ttgccgtctt 780
ttggcaatgt gagggcccgg aaacctggcc ctgtcttctt
gacgagcatt cctaggggtc 840
tttccccctct cgccaaagga atgcaaggtc tgttgaatgt
cgtgaaggaa gcagttcctc 900
tggaagcttc ttgaagacaa acaacgtctg tagcgaccct
ttgcaggcag cggaacccccc 960
cacctggcga caggtgcctc tgcggccaaa agccacgtgt
ataagataca cctgcaaagg 1020
cggcacaacc ccagtgccac gttgtgagtt ggatagttgt
ggaaagagtc aaatggctct 1080
cctcaagcgt attcaacaag gggctgaagg atgcccagaa
ggtaccccat tgtatgggat 1140
ctgatctggg gcctcggtgc acatgcttta catgtgttta
gtcgaggtta aaaaaacgtc 1200
taggcccccc gaaccacggg gacgtggttt tcctttgaaa
aacacgatga taatatggcc 1260
acaggatccg ccgccaccat gcagtctgga acccactgga
gggtgctggg actgtgcctg 1320
ctgagcgtgg gcgtgtgggg acaggaggtg cagctgcagc
agagcggagc tgagctggtg 1380
aagcctggcg ctagcgtgaa gatgagctgc aaggccagcg
gctacacctt caccagctat 1440
aacatgcact gggtgaagca gacccctgga cagggactgg
agtggatcgg agctatctac 1500
cctggaaacg gagacacctc atacaaccag aagttcaagg
gaaaggctac cctgaccgct 1560
gacaagagca gcagcaccgc ttacatgcag ctgagctcac

tgaccagcga ggactccgcc 1620
gactactact gcgccagaag caactactac ggaagcagct
actggttctt cgacgtgtgg 1680
ggagctggaa ccaccgtgac cgtgtcaagc ggcggcggag
gctccggagg cggaggatct 1740
ggcggcggcg gcagcgacat cgtgctgacc cagagccctg
ctatcctgtc tgccagccct 1800
ggagagaagg tgaccatgac ctgcagagct agcagcagcg
tgaactacat ggactggtat 1860
cagaaaaagc ccggcagctc acctaagcct tggatctacg
ctaccagcaa cttagccagc 1920
ggcgtgcctg ctagattctc cggaagcggc tctggaacca
gctactccct taccatcagc 1980
agagtggagg ctgaggacgc tgctacctac tactgccagc
agtggagctt caaccctcct 2040
accttcggag gaggaaccaa gctggagatc aagactagtg
gcggcggcgg ctctggagga 2100
ggaggcagcg gcggcggagg ctccggcggc ggcggctcta
tggacattca gatgacccag 2160
tccccaagct ccctgtctgc cagcgtggga gacagagtga
ccatcacatg cagggccagc 2220
caggatatcc gcaactatct gaattggtat cagcagaaac
ccggcaaggc ccctaagctg 2280
ctgatctatt acaccagcag gctggagtcc ggagtgccat
caagattctc cggctctggc 2340
agcggaaccg actacaccct gacaatctct agcctgcagc
cagaggattt cgccacatat 2400
tactgccagc agggcaacac cctgccctgg acatttggcc
agggcaccaa ggtggagatc 2460
aagggaggag gaggcagcgg gggcggcggc tccggaggag
gcggctctga ggtgcagctg 2520
gtggagagcg gaggaggact ggtgcagcct ggaggcagcc
tgcggctgtc ctgtgccgcc 2580
agcggctatt ccttcaccgg ctacacaatg aattgggtca
gacaggcacc aggaaaggga 2640
ctggagtggg tggccctgat caaccctacc aagggcgtgt

ccacatataa tcagaagttc 2700
aaggacaggt ttaccatctc tgtggataag agcaagaaca
cagcctacct gcagatgaat 2760
agcctgaggg ccgaggacac cgccgtgtat tactgcgcac
gcagcggata ttacggagac 2820
tccgattggt actttgacgt gtggggccag ggcaccctgg
tgacagtgtc ctccggcgga 2880
ggaggcagct ccggacaggt gctgctggag tccaatatca
aggtgctgcc aacctggtct 2940
acacctgtgc agccaatggc actgatcgtg ctgggaggag
tggcaggact gctgctgttc 3000
atcggactgg gcatcttctt ttgcgtgcgc tgtaggcacc
ggagaaggca ggcagaggag 3060
atgtctcaga tcaagagact gctgagcgag aagaagacct
gccagtgtcc tcaccgcttt 3120
cagaagacat gtagcccaat ctgataa
3147

<210> 66
<211> 621
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 66
Met Gln Ser Gly Thr His Trp Arg Val Leu Gly Leu Cys
Leu Leu Ser
1 5 10
15
Val Gly Val Trp Gly Gln Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser
Gly Ala Glu
20 25
30
Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys

Ala Ser Gly
35 40 45

Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln
Thr Pro Gly
50 55 60

Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn
Gly Asp Thr
65 70 75
80

Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr
Ala Asp Lys
85 90
95

Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr
Ser Glu Asp
100 105
110

Ser Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Asn Tyr Tyr Gly
Ser Ser Tyr
115 120 125

Trp Phe Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr
Val Ser Ser
130 135 140

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
Gly Ser Asp
145 150 155
160

Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser
Pro Gly Glu
165 170
175

Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Asn

Tyr Met Asp
180 185
190
Trp Tyr Gln Lys Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp
Ile Tyr Ala
195 200 205

Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
Gly Ser Gly
210 215 220

Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu
Ala Glu Asp
225 230 235
240
Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Phe Asn Pro
Pro Thr Phe
245 250
255
Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Thr Ser Gly Gly
Gly Gly Ser
260 265
270
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
Gly Ser Met
275 280 285

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
Ser Val Gly
290 295 300

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile
Arg Asn Tyr
305 310 315
320
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys

Leu Leu Ile
325 330
335
Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg
Phe Ser Gly
340 345
350
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser
Leu Gln Pro
355 360 365

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr
Leu Pro Trp
370 375 380

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly
Gly Gly Ser
385 390 395
400
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln
Leu Val Glu
405 410
415
Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg
Leu Ser Cys
420 425
430
Ala Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Thr Met Asn
Trp Val Arg
435 440 445

Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Leu Ile
Asn Pro Thr
450 455 460

Lys Gly Val Ser Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Arg

Phe Thr Ile
465 470 475
480
Ser Val Asp Lys Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met
Asn Ser Leu
485 490
495
Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser
Gly Tyr Tyr
500 505
510
Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly
Thr Leu Val
515 520 525

Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gln Val
Leu Leu Glu
530 535 540

Ser Asn Ile Lys Val Leu Pro Thr Trp Ser Thr Pro Val
Gln Pro Met
545 550 555
560
Ala Leu Ile Val Leu Gly Gly Val Ala Gly Leu Leu Leu
Phe Ile Gly
565 570
575
Leu Gly Ile Phe Phe Cys Val Arg Cys Arg His Arg Arg
Arg Gln Ala
580 585
590
Glu Arg Met Ser Gln Ile Lys Arg Leu Leu Ser Glu Lys
Lys Thr Cys
595 600 605

Gln Cys Pro His Arg Phe Gln Lys Thr Cys Ser Pro Ile

091821-TW-PA-序列表

610 615 620

【發明申請專利範圍】

【第 1 項】一種產生經修飾 T 細胞之方法，其包括：將編碼 Nef 蛋白之第一核酸引入至前驅體 T 細胞中，其中該 Nef 蛋白在表現時導致該經修飾 T 細胞中的內源 T 細胞受體(TCR)之下調。

【第 2 項】如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該下調包含下調內源 TCR 之細胞表面表現達至少約 50%。

【第 3 項】如申請專利範圍第 1 項或第 2 項之方法，其中該表現 Nef 之經修飾 T 細胞包含經修飾內源 TCR 基因座。

【第 4 項】如申請專利範圍第 1 項至第 3 項中任一項之方法，其中該 Nef 蛋白係選自由 SIV Nef、HIV1 Nef、HIV2 Nef 及 Nef 同源蛋白組成之群。

【第 5 項】如申請專利範圍第 1 項至第 4 項中任一項之方法，其中該 Nef 蛋白為野生型 Nef。

【第 6 項】如申請專利範圍第 1 項至第 4 項中任一項之方法，其中該 Nef 蛋白為突變型 Nef。

【第 7 項】如申請專利範圍第 6 項之方法，其中該突變型 Nef 包含：

(i) SEQ ID NO: 18-22 中任一者之胺基酸序列；

(ii) 在以下中之任一者之胺基酸殘基處的一或多種突變：aa 2-4、aa 8-10、aa 11-13、aa 38-40、aa 44-46、aa 47-49、aa 50-52、aa 53-55、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 110-112、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、aa 178-179、179-181aa、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 191-193、aa 194-196、aa 203-205、aa 206-208、aa 212-214、aa 215-217、aa 218-220、aa 221-223、aa 8-13、aa 44-67、aa 107-112、aa 164-196、aa 203-208 或 aa 212-223，其中該胺基酸殘基位置對應於野生型 SIV Nef 之彼位置；

(iii) 在以下中之任一者之胺基酸殘基處的一或多種突變：aa 2-4、aa 44-46、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 44-67、aa 164-169、aa 176-181、aa 185-190，其中該胺基酸殘基位置對應於野生型 SIV Nef 之彼位置；

(iv) 在以下中之任一者之胺基酸殘基處的一或多種突變：aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、178-179aa、aa 179-181、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67 或 aa 164-190，其中該胺基酸殘基位置對應於野生型 SIV Nef 之彼位置；或

(v) 在以下中之任一者之胺基酸殘基處的一或多種突變：aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67、aa 164-169、aa 176-181 或 aa 185-190，其中該胺基酸殘基位置對應於野生型 SIV Nef 之彼位置。

【第 8 項】如申請專利範圍第 1 項至第 7 項中任一項之方法，其中該前驅體 T 細胞包含編碼包含細胞外配位體結合結構域及視情況存在之細胞內信號傳導結構域之功能性外源受體的第二核酸。

【第 9 項】如申請專利範圍第 1 項至第 7 項中任一項之方法，其進一步包括將編碼包含細胞外配位體結合結構域及視情況存在之細胞內信號傳導結構域之功能性外源受體的第二核酸引入至該前驅體 T 細胞中。

【第 10 項】　如申請專利範圍第 9 項之方法，其中該第一核酸及該第二核酸係在不同的載體上。

【第 11 項】　如申請專利範圍第 9 項之方法，其中該第一核酸及該第二核酸係在同一載體上。

【第 12 項】　如申請專利範圍第 11 項之方法，其中該第一核酸及該第二核酸可操作性連接至同一啟動子。

【第 13 項】　如申請專利範圍第 12 項之方法，其中該第一核酸係在該第二核酸上游。

【第 14 項】　如申請專利範圍第 8 項至第 13 項中任一項之方法，其中該第一核酸及該第二核酸經由連接序列連接。

【第 15 項】　如申請專利範圍第 14 項之方法，其中該連接序列包含編碼 P2A、T2A、E2A、F2A、BmCPV 2A、BmIFV 2A、$(GS)_n$、$(GSGGS)_n$、$(GGGS)_n$、$(GGGGS)_n$ 之核酸序列，或 IRES、SV40、CMV、UBC、EF1α、PGK、CAGG 之核酸序列，或其任何組合，其中 n 係至少為 1 之整數。

【第 16 項】　如申請專利範圍第 10 項至第 15 項中任一項之方法，其中該載體為病毒載體。

【第 17 項】　如申請專利範圍第 16 項之方法，其中該病毒載體係選自由腺病毒載體、腺相關病毒載體、逆轉錄病毒載體、慢病毒載體、游離型載體表現載體、單純疱疹病毒載體及其衍生物組成之群。

【第 18 項】　如申請專利範圍第 10 項至第 15 項中任一項之方法，其中該載體為非病毒載體。

【第 19 項】　如申請專利範圍第 18 項之方法，其中該非病毒載體為 Piggybac 載體或睡美人載體。

【第 20 項】　如申請專利範圍第 1 項至第 19 項中任一項之方法，其中如與藉由自該前驅體 T 細胞之供體分離的原代 T 細胞引發之移植物抗宿主疾病(GvHD)反應相比，該表現 Nef 之經修飾 T 細胞在組織不相容性個體中不引

發或引發降低之 GvHD 反應。

【第 21 項】　如申請專利範圍第 1 項至第 20 項中任一項之方法，其進一步包括分離或富集包含該第一及/或該第二核酸之 T 細胞。

【第 22 項】　如申請專利範圍第 1 項至第 21 項中任一項之方法，其進一步包括自該等表現 Nef 之經修飾 T 細胞分離或富集 TCR 陰性 T 細胞。

【第 23 項】　如申請專利範圍第 1 項至第 22 項中任一項之方法，其進一步包括用至少一種醫藥學上可接受之載劑調配該等表現 Nef 之經修飾 T 細胞。

【第 24 項】　如申請專利範圍第 8 項至第 23 項中任一項之方法，其中該功能性外源受體為包含以下之嵌合 TCR (cTCR)：

(a) 細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原之一或多種抗原決定基之抗原結合片段；

(b) 視情況存在之連接體；

(c) 第一 TCR 次單元的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；

(d) 包含第二 TCR 次單元的跨膜結構域之跨膜結構域；及

(e) 包含第三 TCR 次單元的細胞內信號傳導結構域之細胞內信號傳導結構域；

其中該第一、第二及第三 TCR 次單元均係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群。

【第 25 項】　如申請專利範圍第 24 項之方法，其中該第一、第二及第三 TCR 次單元均為 CD3ε。

【第 26 項】　如申請專利範圍第 8 項至第 23 項中任一項之方法，其中該功能性外源受體為包含以下之 T 細胞抗原偶合物(TAC)：

(a) 細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原之一或多種抗原決定基之抗原結合片段；

(b) 視情況存在之第一連接體；

(c) 細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別 TCR 次單元的細胞外結構域；

(d) 視情況存在之第二連接體；

(e) 第一 TCR 輔受體的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；

(f) 包含第二 TCR 輔受體的跨膜結構域之跨膜結構域；及

(g) 包含第三 TCR 輔受體的細胞內信號傳導結構域之視情況存在之細胞內信號傳導結構域；

其中該 TCR 次單元係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群；且

其中該第一、第二及第三 TCR 輔受體均係選自由 CD4、CD8 及 CD28 組成之群。

【第 27 項】　如申請專利範圍第 26 項之方法，其中該第一、第二及第三 TCR 輔受體為相同的。

【第 28 項】　如申請專利範圍第 8 項至第 23 項中任一項之方法，其中該功能性外源受體為包含以下之 T 細胞抗原偶合物(TAC)樣嵌合受體：

(a) 細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原之一或多種抗原決定基之抗原結合片段；

(b) 視情況存在之第一連接體；

(c) 細胞外 TCR 結合結構域，其特異性地識別第一 TCR 次單元的細胞外結構域；

(d) 視情況存在之第二連接體；

(e) 第二 TCR 次單元的視情況存在之細胞外結構域或其一部分；

(f) 包含第三 TCR 次單元的跨膜結構域之跨膜結構域；及

(g) 包含第四 TCR 次單元的細胞內信號傳導結構域之視情況存在之細胞內信號傳導結構域；

其中該第一、第二、第三及第四 TCR 次單元均係選自由 TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、CD3ε、CD3γ 及 CD3δ 組成之群。

【第 29 項】　如申請專利範圍第 28 項之方法，其中該第二、第三及第四 TCR 次單元為相同的。

【第 30 項】　如申請專利範圍第 8 項至第 23 項中任一項之方法，其中該功能性外源受體為包含以下之嵌合抗原受體(CAR)：

(a) 細胞外配位體結合結構域，其包含特異性地識別腫瘤抗原之一或多種抗原決定基之抗原結合片段；

(b) 跨膜結構域；及

(c) 細胞內信號傳導結構域。

【第 31 項】　如申請專利範圍第 24 項至第 30 項中任一項之方法，其中該抗原結合片段係選自由駱駝 Ig、Ig NAR、Fab 片段、單鏈 Fv 抗體及單結構域抗體(sdAb、奈米抗體(Nanobody))組成之群。

【第 32 項】　如申請專利範圍第 31 項之方法，其中該抗原結合片段為 sdAb 或 scFv。

【第 33 項】　如申請專利範圍第 24 項至第 32 項中任一項之方法，其中該細胞外配位體結合結構域為單價的。

【第 34 項】　如申請專利範圍第 24 項至第 32 項中任一項之方法，其中該細胞外配位體結合結構域為多價的。

【第 35 項】　如申請專利範圍第 34 項之方法，其中該細胞外配位體結合結構域為多特異性的。

【第 36 項】　如申請專利範圍第 24 項至第 35 項中任一項之方法，其中該腫瘤

抗原係選自由間皮素、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、介白素-11 受體 a (IL-11Ra)、PSCA、PRSS21、VEGFR2、LewisY、CD24、血小板源性生長因子受體-β (PDGFR-β)、SSEA-4、CD20、葉酸鹽受體 α、ERBB2 (Her2/neu)、MUC1、表皮生長因子受體(EGFR)、NCAM、前列腺酶、PAP、ELF2M、Ephrin 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、葉酸鹽受體 β、TEM1/CD248、TEM7R、CLDN6、CLDN18.2、GPRC5D、CXORF61、CD97、CD179a、ALK、聚唾液酸、PLAC1、GloboH、NY-BR-1、UPK2、HAVCR1、ADRB3、PANX3、GPR20、LY6K、OR51E2、TARP、WT1、NY-ESO-1、LAGE-1a、MAGE-A1、天冬醯胺內肽酶、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、前列腺特異蛋白(prostein)、存活素及端粒酶、PCTA-1/半乳糖凝集素 8、MelanA/MART1、Ras 突變體、hTERT、肉瘤易位斷點、ML-IAP、ERG (TMPRSS2 ETS 融合基因)、NA17、PAX3、雄激素受體、週期蛋白 B1、MYCN、RhoC、TRP-2、CYP1B1、BORIS、SART3、PAX5、OY-TES1、LCK、AKAP-4、SSX2、RAGE-1、人類端粒酶逆轉錄酶、RU1、RU2、腸道羧酸酯酶、mut hsp70-2、CD79a、CD79b、CD72、LAIR1、FCAR、LILRA2、CD300LF、CLEC12A、BST2、EMR2、LY75、GPC3、FCRL5 及 IGLL1 組成之群。

【第 37 項】　如申請專利範圍第 36 項之方法，其中該腫瘤抗原為 BCMA、CD19 或 CD20。

【第 38 項】　如申請專利範圍第 30 項至第 37 項中任一項之方法，其中該跨膜

結構域係源於選自由 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 及 PD-1 組成之群的分子。

【第 39 項】　如申請專利範圍第 38 項之方法，其中該跨膜結構域係源於 CD8α。

【第 40 項】　如申請專利範圍第 30 項至第 39 項中任一項之方法，其中該細胞內信號傳導結構域包含源於 CD3ζ、CD3γ、CD3ε、CD3δ、FcRγ (FCER1G)、FcRβ (Fc ε RIb)、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD66d、Fc γ RIIa、DAP10 及 DAP12 之一級細胞內信號傳導結構域。

【第 41 項】　如申請專利範圍第 40 項之方法，其中該一級細胞內信號傳導結構域係源於 CD3ζ、DAP12 或 CD3γ。

【第 42 項】　如申請專利範圍第 30 項至第 41 項中任一項之方法，其中該細胞內信號傳導結構域包含源於選自由 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 (淋巴球功能相關抗原-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、特異性地與 CD83 結合之配位體及其任何組合組成之群的共刺激分子之共刺激信號傳導結構域。

【第 43 項】　如申請專利範圍第 42 項之方法，其中該共刺激信號傳導結構域

包含 CD137 (4-1BB)之細胞質結構域。

【第 44 項】　如申請專利範圍第 24 項至第 43 項中任一項之方法，其進一步包含位於該細胞外配位體結合結構域之 C 端與該跨膜結構域之 N 端之間的鉸鏈結構域。

【第 45 項】　如申請專利範圍第 44 項之方法，其中該鉸鏈結構域係源於 CD8α。

【第 46 項】　如申請專利範圍第 24 項至第 45 項中任一項之方法，其進一步包含位於該多肽之 N 端處的信號肽。

【第 47 項】　如申請專利範圍第 46 項之方法，其中該信號肽係源於 CD8α。

【第 48 項】　一種藉由如申請專利範圍第 1 項至第 47 項中任一項之方法獲得之經修飾 T 細胞。

【第 49 項】　一種醫藥組合物，其包含如申請專利範圍第 48 項之經修飾 T 細胞及醫藥學上可接受之載劑。

【第 50 項】　一種治療個體之疾病之方法，其包括向該個體投與有效量的如申請專利範圍第 49 項之醫藥組合物。

【第 51 項】　如申請專利範圍第 50 項之方法，其中該疾病為癌症。

【第 52 項】　一種非天然存在之 Nef 蛋白，其包含在肉豆蔻醯化位點、N 端 α-螺旋、基於酪胺酸之 AP 募集、CD4 結合位點、酸性簇、基於脯胺酸之重複序列、PAK 結合結構域、COP I 募集結構域、基於二-白胺酸之 AP 募集結構域、V-ATP 酶及 Raf-1 結合結構域或其任何組合中之一或多種突變，或在表 11 中列出的任何胺基酸殘基處之一或多種突變。

【第 53 項】　如申請專利範圍第 52 項之非天然存在之 Nef 蛋白，其為突變型 SIV Nef 蛋白。

【第 54 項】　如申請專利範圍第 52 項或第 53 項之非天然存在之 Nef 蛋白，其

包含：

(i) SEQ ID NO: 18-22 中任一者之胺基酸序列；

(ii) 在以下中之任一者之胺基酸殘基處的一或多種突變：aa 2-4、aa 8-10、aa 11-13、aa 38-40、aa 44-46、aa 47-49、aa 50-52、aa 53-55、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 110-112、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、aa 178-179、179-181aa、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 191-193、aa 194-196、aa 203-205、aa 206-208、aa 212-214、aa 215-217、aa 218-220、aa 221-223、aa 8-13、aa 44-67、aa 107-112、aa 164-196、aa 203-208 或 aa 212-223，其中該胺基酸殘基位置對應於野生型 SIV Nef 之彼位置；

(iii) 在以下中之任一者之胺基酸殘基處的一或多種突變：aa 2-4、aa 44-46、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 98-100、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 44-67、aa 164-169、aa 176-181、aa 185-190，其中該胺基酸殘基位置對應於野生型 SIV Nef 之彼位置；

(iv) 在以下中之任一者之胺基酸殘基處的一或多種突變：aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 170-172、aa 173-175、aa 176-178、178-179aa、aa 179-181、aa 182-184、aa 185-187、aa 188-190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67 或 aa 164-190，其中該胺基酸殘基位置對應於野生型 SIV Nef 之彼位置；或

(v) 在以下中之任一者之胺基酸殘基處的一或多種突變：aa 2-4、aa 56-58、aa 59-61、aa 62-64、aa 65-67、aa 107-109、aa 137-139、aa 152-154、aa 164-166、aa 167-169、aa 176-178、aa 178-179、aa 179-181、aa 185-187、aa 188-

190、aa 194-196、aa 203-205、aa 56-67、aa 164-169、aa 176-181 或 aa 185-190，其中該胺基酸殘基位置對應於野生型 SIV Nef 之彼位置。

【第 55 項】　如申請專利範圍第 52 項至第 54 項中任一項之非天然存在之 Nef 蛋白，其下調內源 TCR 之細胞表面表現。

【第 56 項】　如申請專利範圍第 52 項至第 55 項中任一項之非天然存在之 Nef 蛋白，其對內源 TCR 之細胞表面表現之下調與該野生型 SIV Nef 之彼下調相差不超過約 3%。

【第 57 項】　如申請專利範圍第 52 項至第 56 項中任一項之非天然存在之 Nef 蛋白，其不下調 CD4 之細胞表面表現。

【第 58 項】　如申請專利範圍第 52 項至第 56 項中任一項之非天然存在之 Nef 蛋白，其下調 CD4 之細胞表面表現。

【第 59 項】　如申請專利範圍第 58 項之非天然存在之 Nef 蛋白，其對 CD4 之細胞表面表現之下調與該野生型 SIV Nef 之彼下調相差不超過約 3%。

【第 60 項】　如申請專利範圍第 58 項之非天然存在之 Nef 蛋白，其對 CD4 之細胞表面表現之下調較該野生型 SIV Nef 之彼下調少至少約 3%。

【第 61 項】　如申請專利範圍第 52 項至第 60 項中任一項之非天然存在之 Nef 蛋白，其不下調 CD28 之細胞表面表現。

【第 62 項】　如申請專利範圍第 52 項至第 60 項中任一項之非天然存在之 Nef 蛋白，其下調 CD28 之細胞表面表現。

【第 63 項】　如申請專利範圍第 62 項之非天然存在之 Nef 蛋白，其對 CD28 之細胞表面表現之下調與該野生型 SIV Nef 之彼下調相差不超過約 3%。

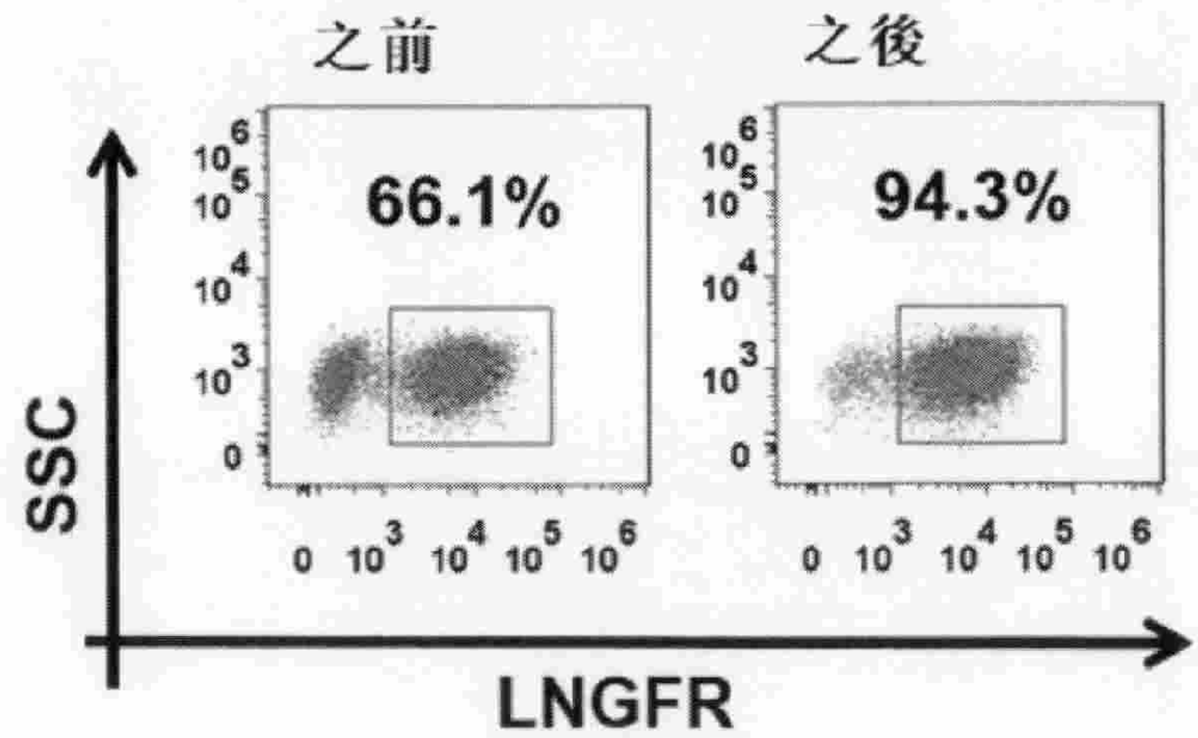
【第 64 項】　如申請專利範圍第 62 項之非天然存在之 Nef 蛋白，其對 CD28 之細胞表面表現之下調較該野生型 SIV Nef 之彼下調少至少約 3%。

【第 65 項】　一種經修飾 T 細胞，其包含編碼如申請專利範圍第 52 項至第 64

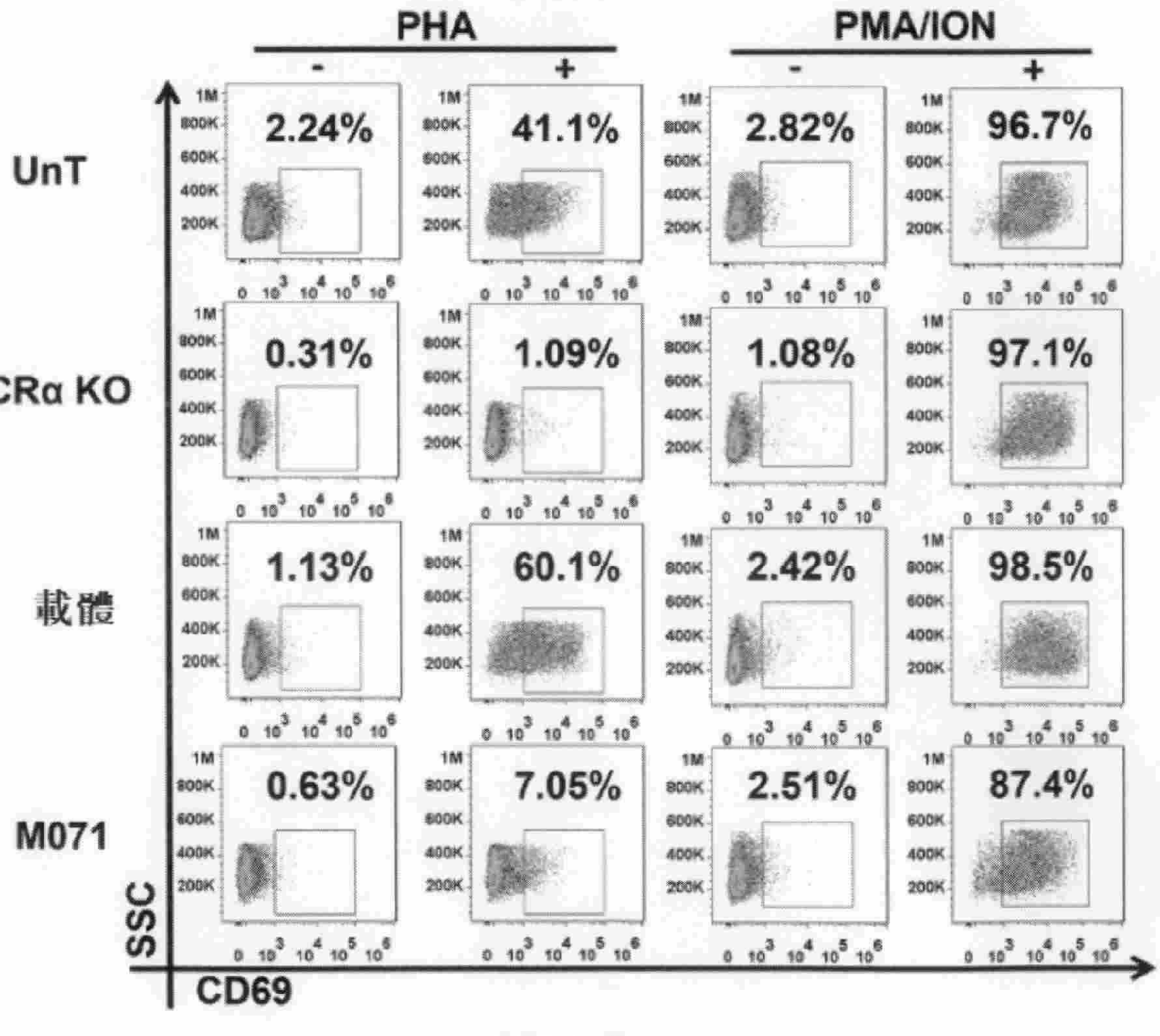
項中任一項之非天然存在之 Nef 蛋白的核酸。

【第 66 項】　如申請專利範圍第 65 項之經修飾 T 細胞，其進一步包含功能性外源受體。

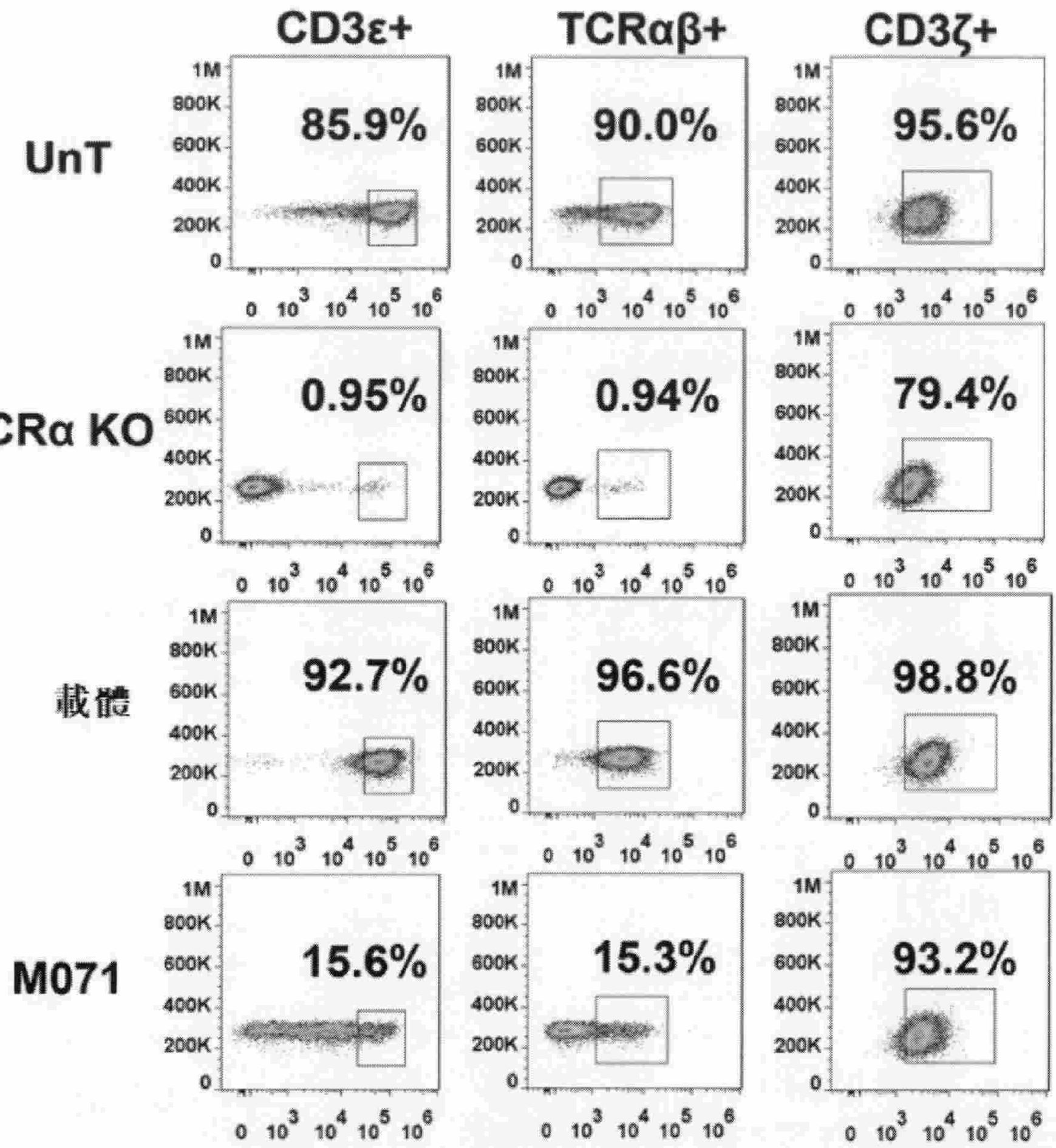
【發明圖式】


之前
之後
66.1%
94.3%
SSC
LNGFR

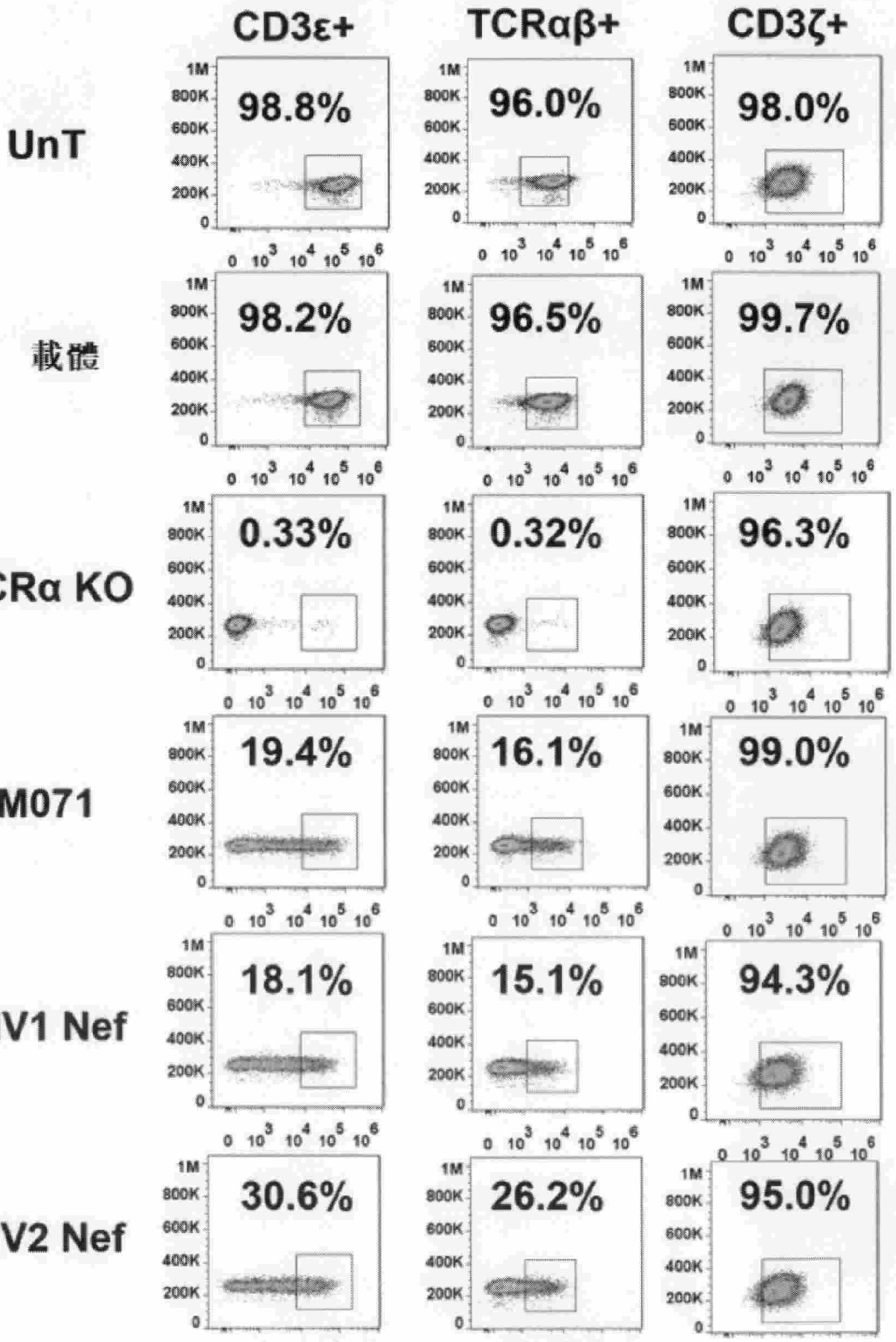
【圖 1A】


PHA
PMA/ION
-
+
-
+
UnT
2.24%
41.1%
2.82%
96.7%
TCRα KO
0.31%
1.09%
1.08%
97.1%
載體
1.13%
60.1%
2.42%
98.5%
M071
0.63%
7.05%
2.51%
87.4%
SSC
CD69

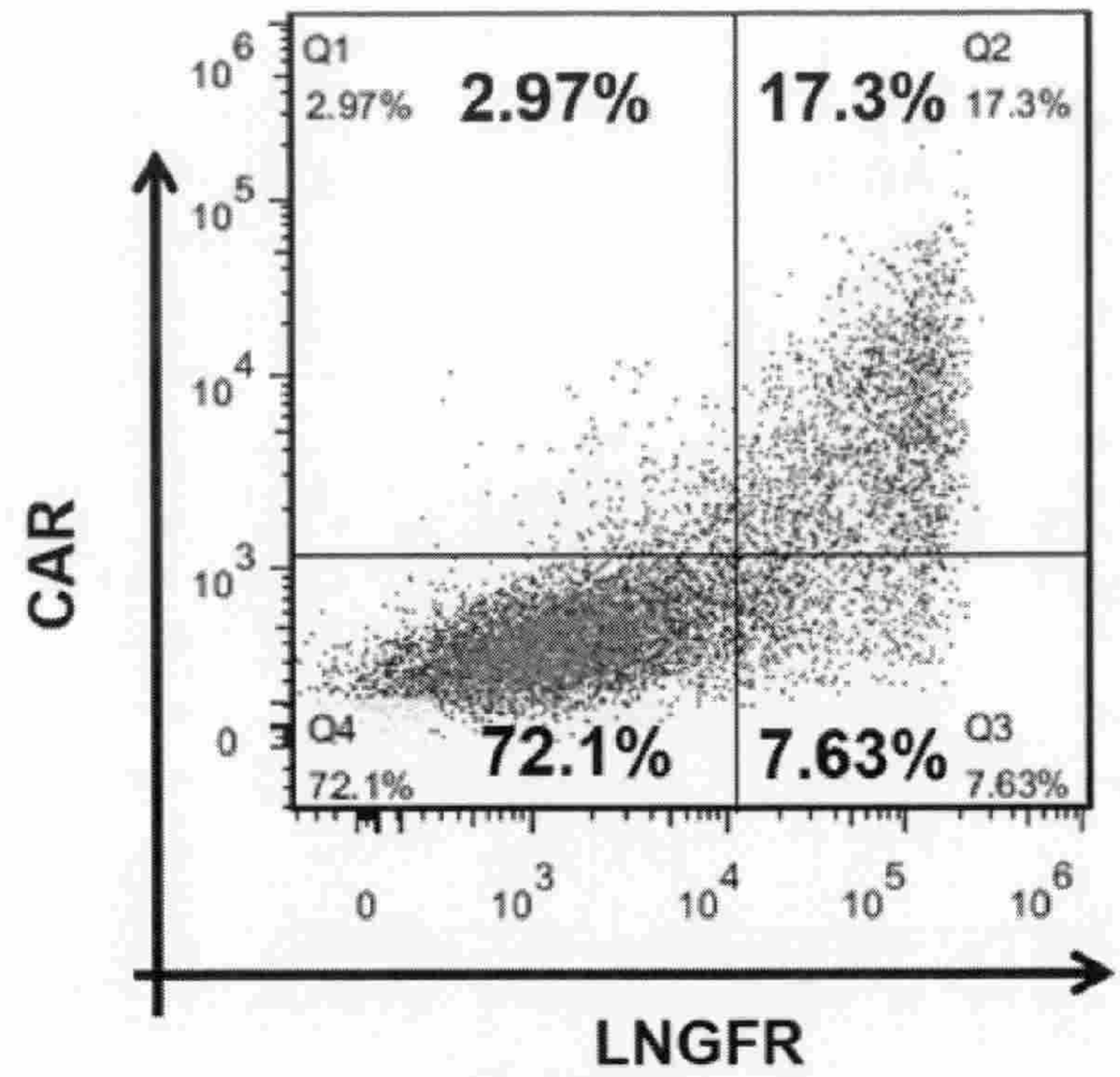
【圖 1B】


CD3ε+
TCRαβ+
CD3ζ+
UnT
85.9%
90.0%
95.6%
TCRα KO
0.95%
0.94%
79.4%
載體
92.7%
96.6%
98.8%
M071
15.6%
15.3%
93.2%
1M
800K
600K
400K
200K
0
0 10^3 10^4 10^5 10^6

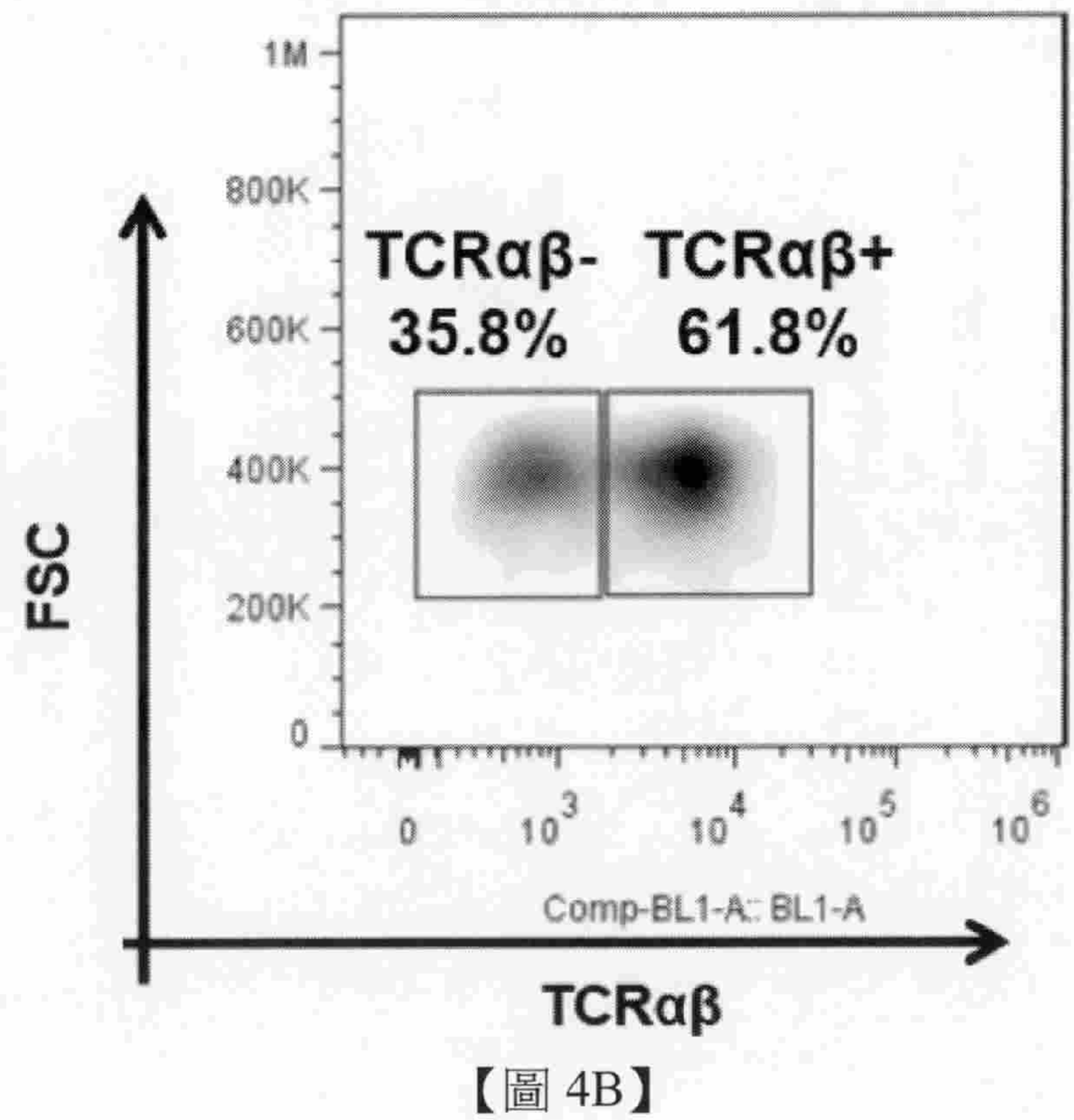
【圖 2】


CD3ε+
TCRαβ+
CD3ζ+
UnT
98.8%
96.0%
98.0%
載體
98.2%
96.5%
99.7%
TCRα KO
0.33%
0.32%
96.3%
M071
19.4%
16.1%
99.0%
HIV1 Nef
18.1%
15.1%
94.3%
HIV2 Nef
30.6%
26.2%
95.0%
1M
800K
600K
400K
200K
0
0 10^3 10^4 10^5 10^6

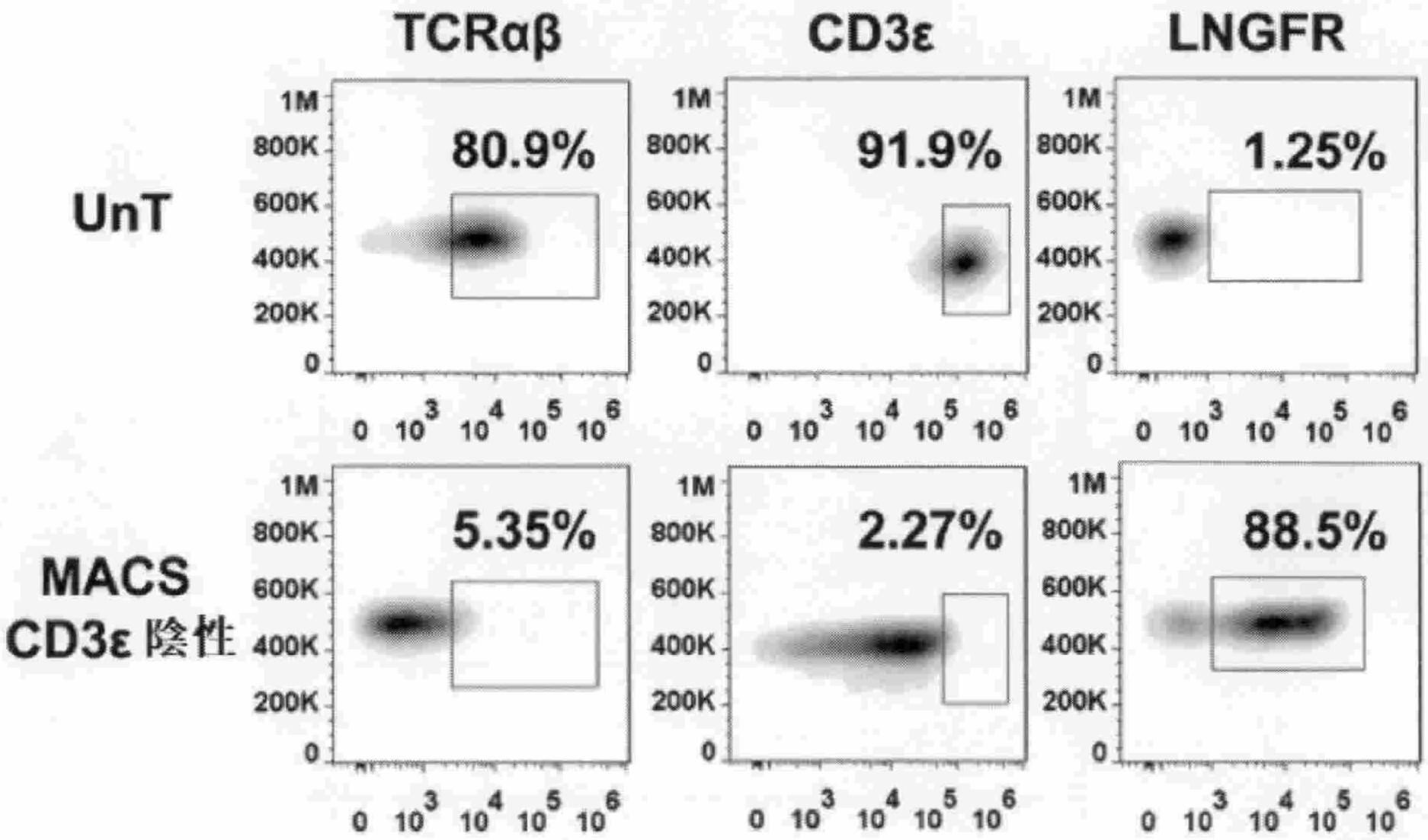
【圖 3】


Q1
2.97%
2.97%
Q2
17.3%
17.3%
Q4
72.1%
72.1%
Q3
7.63%
7.63%
CAR
LNGFR
10^6
10^5
10^4
10^3
0

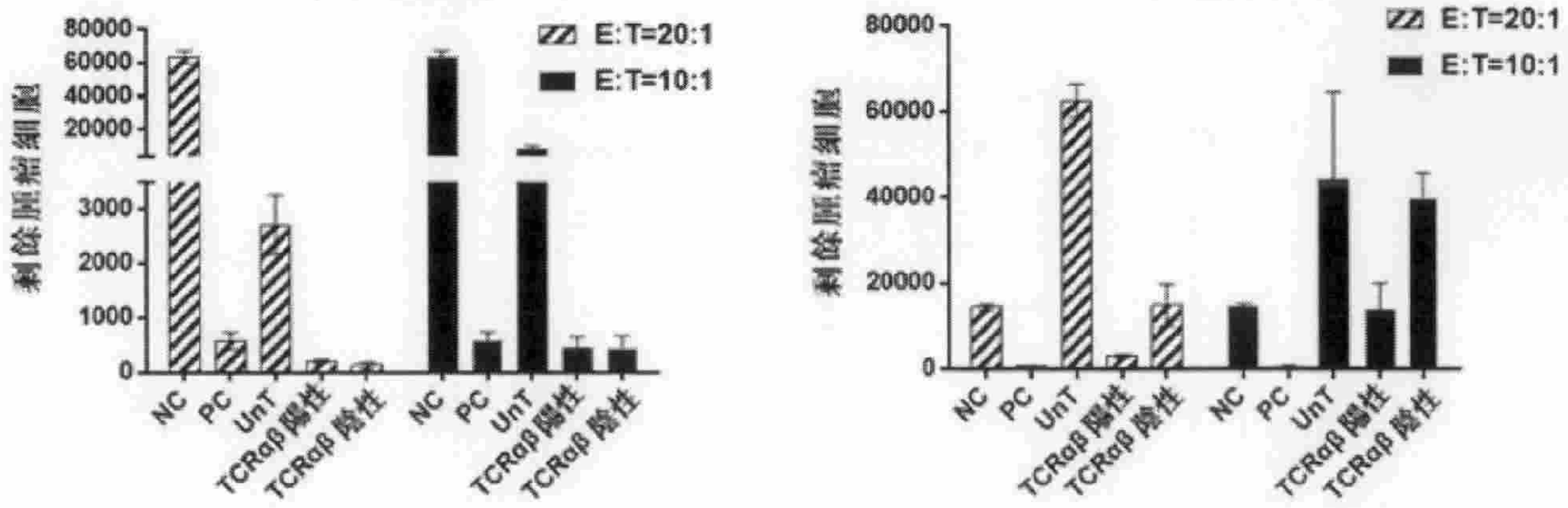
【圖 4A】


1M
800K
600K
400K
200K
0
TCRαβ-
35.8%
TCRαβ+
61.8%
FSC
TCRαβ
Comp-BL1-A:: BL1-A

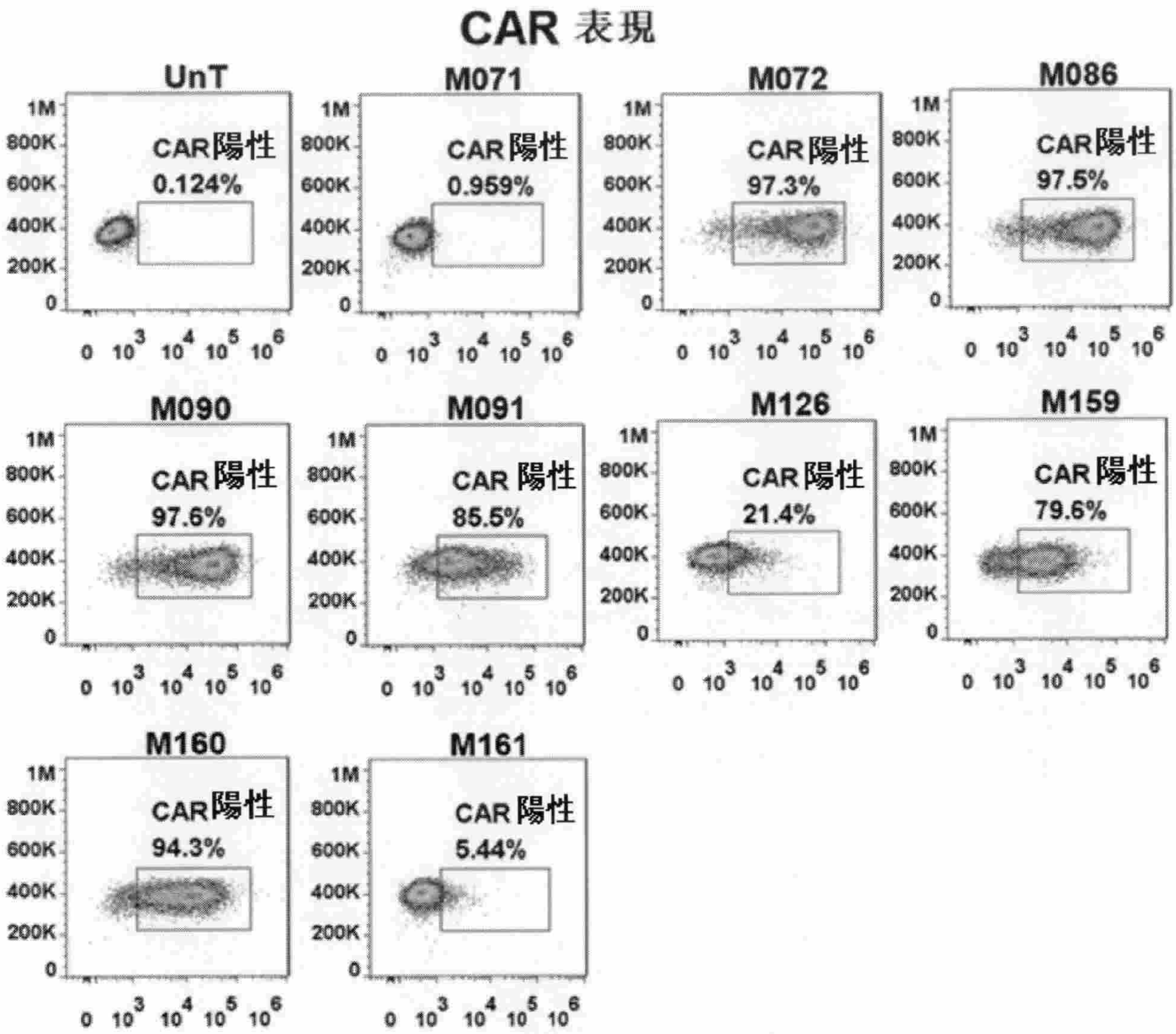
【圖 4B】


TCRαβ
CD3ε
LNGFR
UnT
80.9%
91.9%
1.25%
MACS
CD3ε 陰性
5.35%
2.27%
88.5%
1M
800K
600K
400K
200K
0
0 10^3 10^4 10^5 10^6

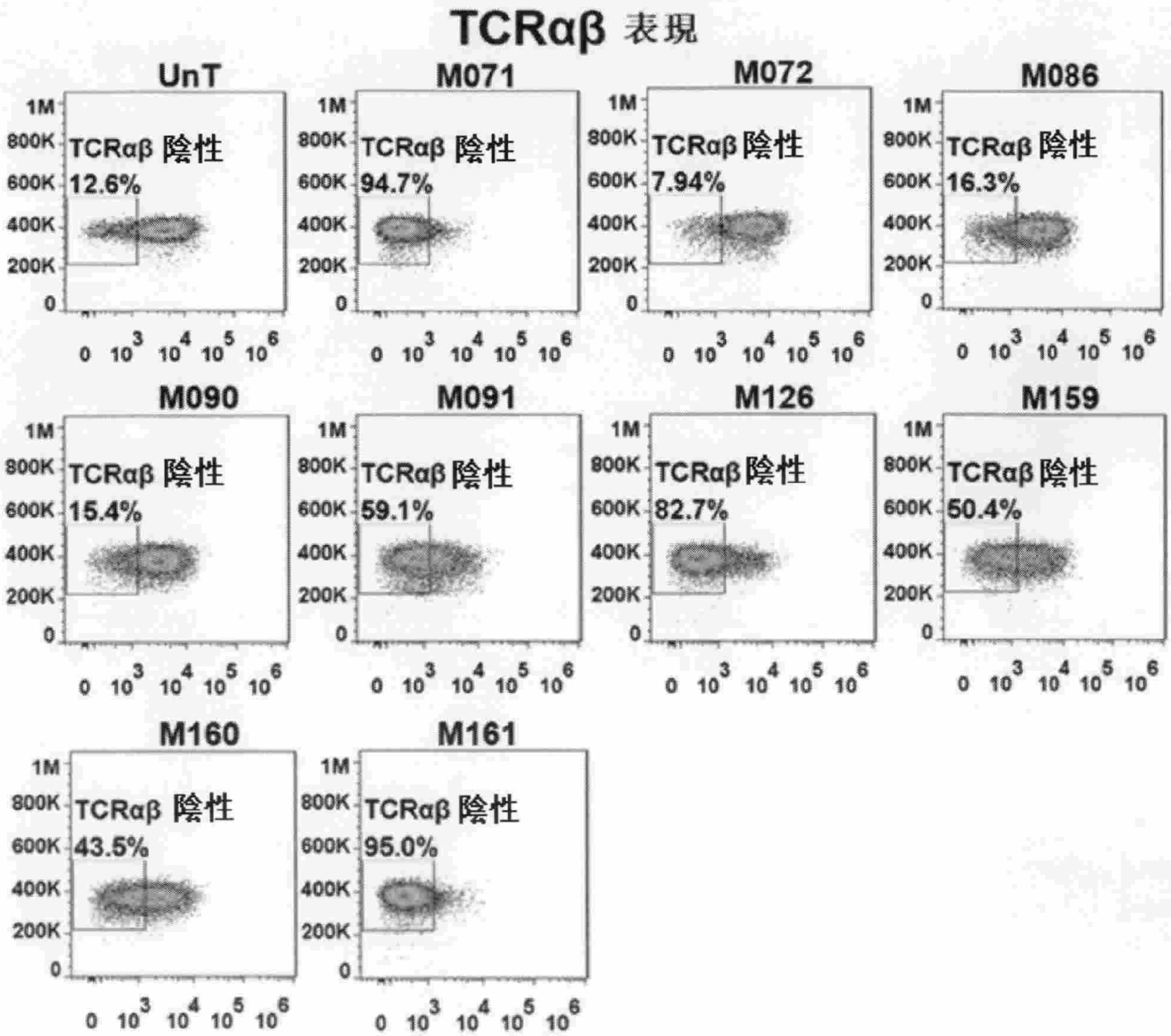
【圖 4C】


CAR介導之特異性細胞殺傷
(RPMI-8226)
TCR介導之非特異性細胞殺傷
(K562)
剩餘腫瘤細胞
E:T=20:1
E:T=10:1
80000
60000
40000
20000
3000
2000
1000
0
NC
PC
UnT
TCRαβ 陽性
TCRαβ 陰性

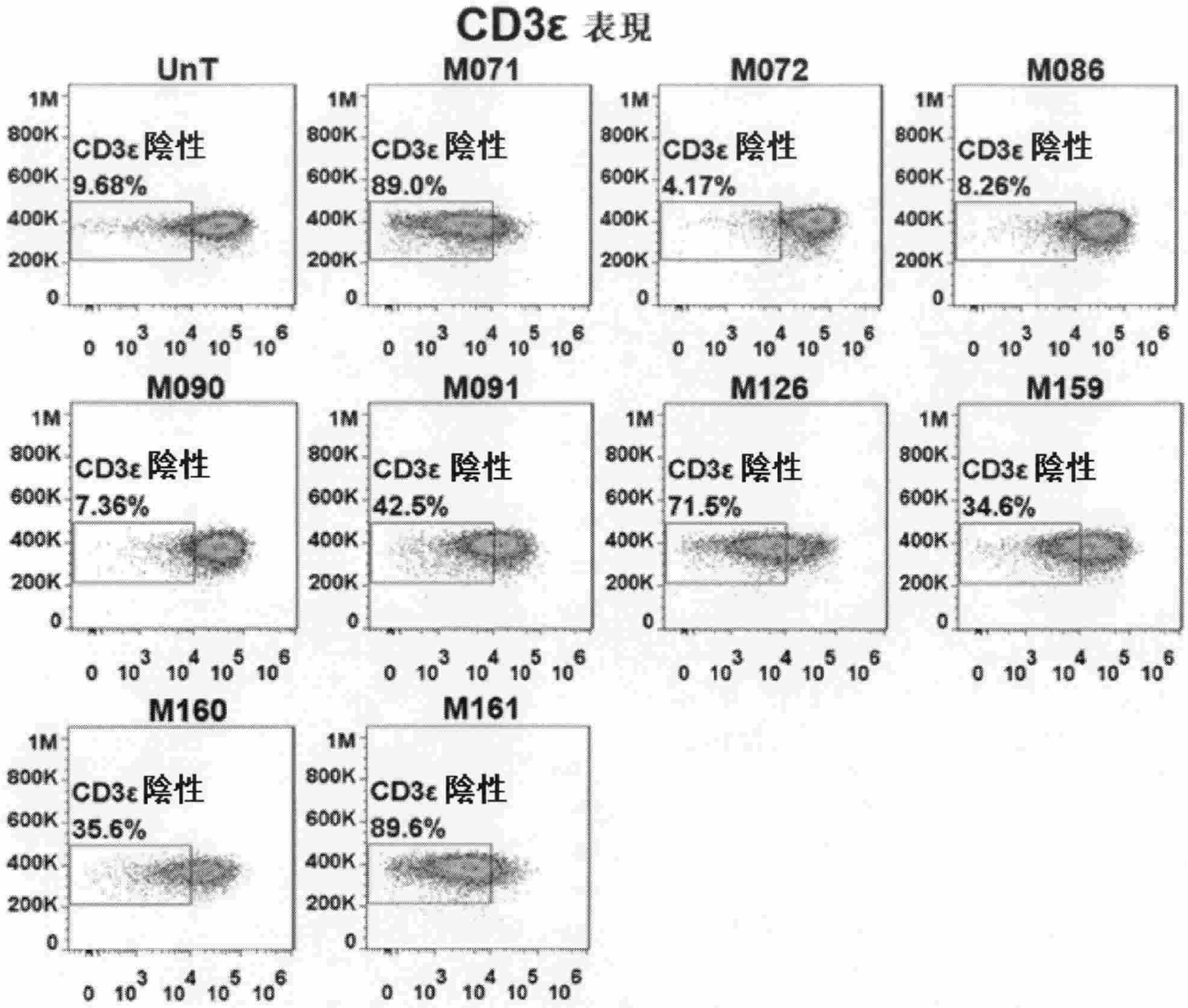
【圖 4D】


CAR 表現
UnT
CAR陽性
0.124%
M071
CAR陽性
0.959%
M072
CAR陽性
97.3%
M086
CAR陽性
97.5%
M090
CAR陽性
97.6%
M091
CAR 陽性
85.5%
M126
CAR陽性
21.4%
M159
CAR 陽性
79.6%
M160
CAR陽性
94.3%
M161
CAR 陽性
5.44%
1M
800K
600K
400K
200K
0
0 10^3 10^4 10^5 10^6

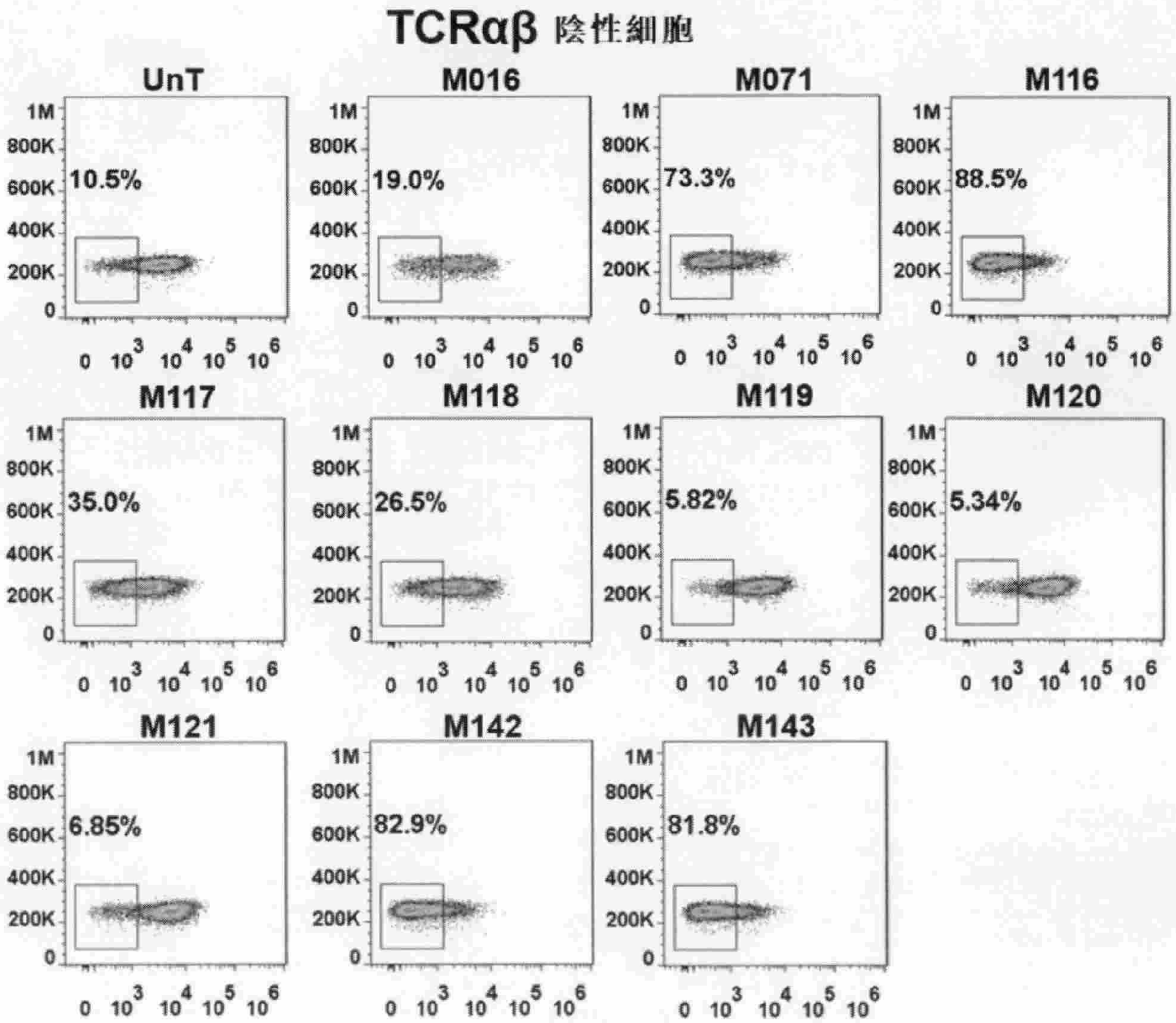
【圖 5A】


TCRαβ 表現
UnT
TCRαβ 陰性
12.6%
M071
TCRαβ 陰性
94.7%
M072
TCRαβ 陰性
7.94%
M086
TCRαβ 陰性
16.3%
M090
TCRαβ 陰性
15.4%
M091
TCRαβ 陰性
59.1%
M126
TCRαβ 陰性
82.7%
M159
TCRαβ 陰性
50.4%
M160
TCRαβ 陰性
43.5%
M161
TCRαβ 陰性
95.0%
1M
800K
600K
400K
200K
0
0 10^3 10^4 10^5 10^6

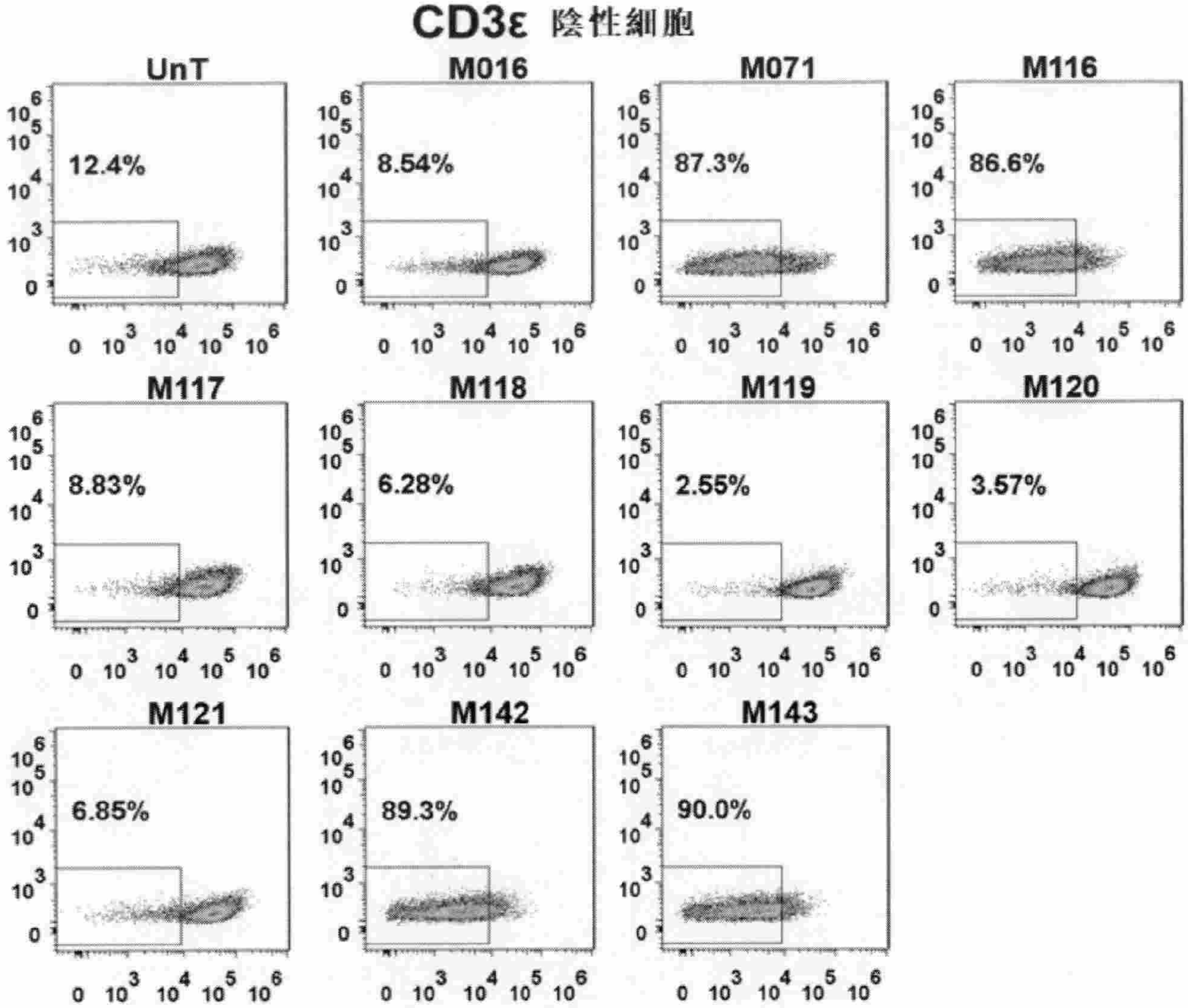
【圖 5B】


CD3ε 表現
UnT
CD3ε 陰性
9.68%
M071
CD3ε 陰性
89.0%
M072
CD3ε 陰性
4.17%
M086
CD3ε 陰性
8.26%
M090
CD3ε 陰性
7.36%
M091
CD3ε 陰性
42.5%
M126
CD3ε 陰性
71.5%
M159
CD3ε 陰性
34.6%
M160
CD3ε 陰性
35.6%
M161
CD3ε 陰性
89.6%
1M
800K
600K
400K
200K
0
0 10^3 10^4 10^5 10^6

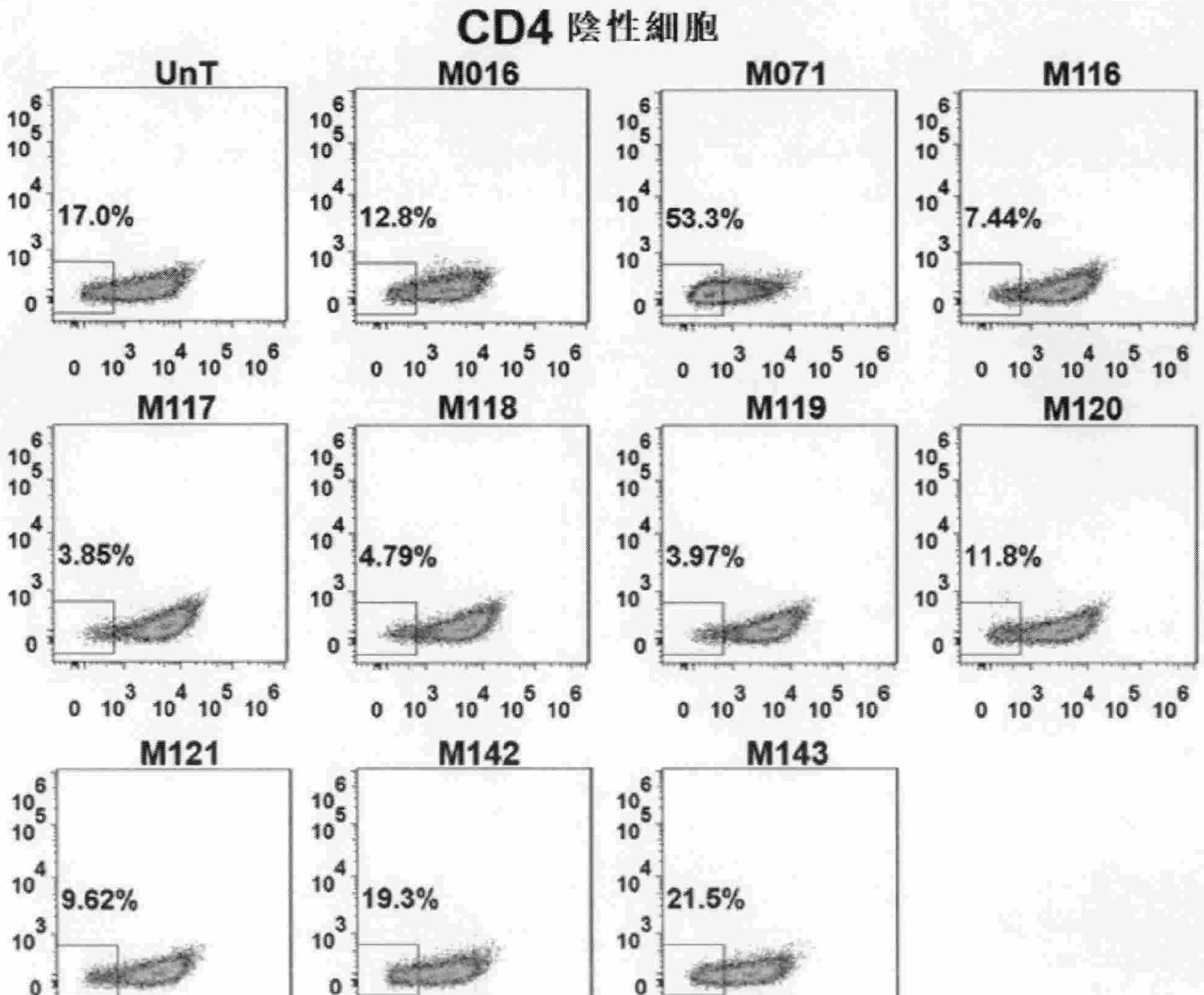
【圖 5C】


TCRαβ 陰性細胞
UnT
10.5%
M016
19.0%
M071
73.3%
M116
88.5%
M117
35.0%
M118
26.5%
M119
5.82%
M120
5.34%
M121
6.85%
M142
82.9%
M143
81.8%
1M
800K
600K
400K
200K
0
0 10^3 10^4 10^5 10^6

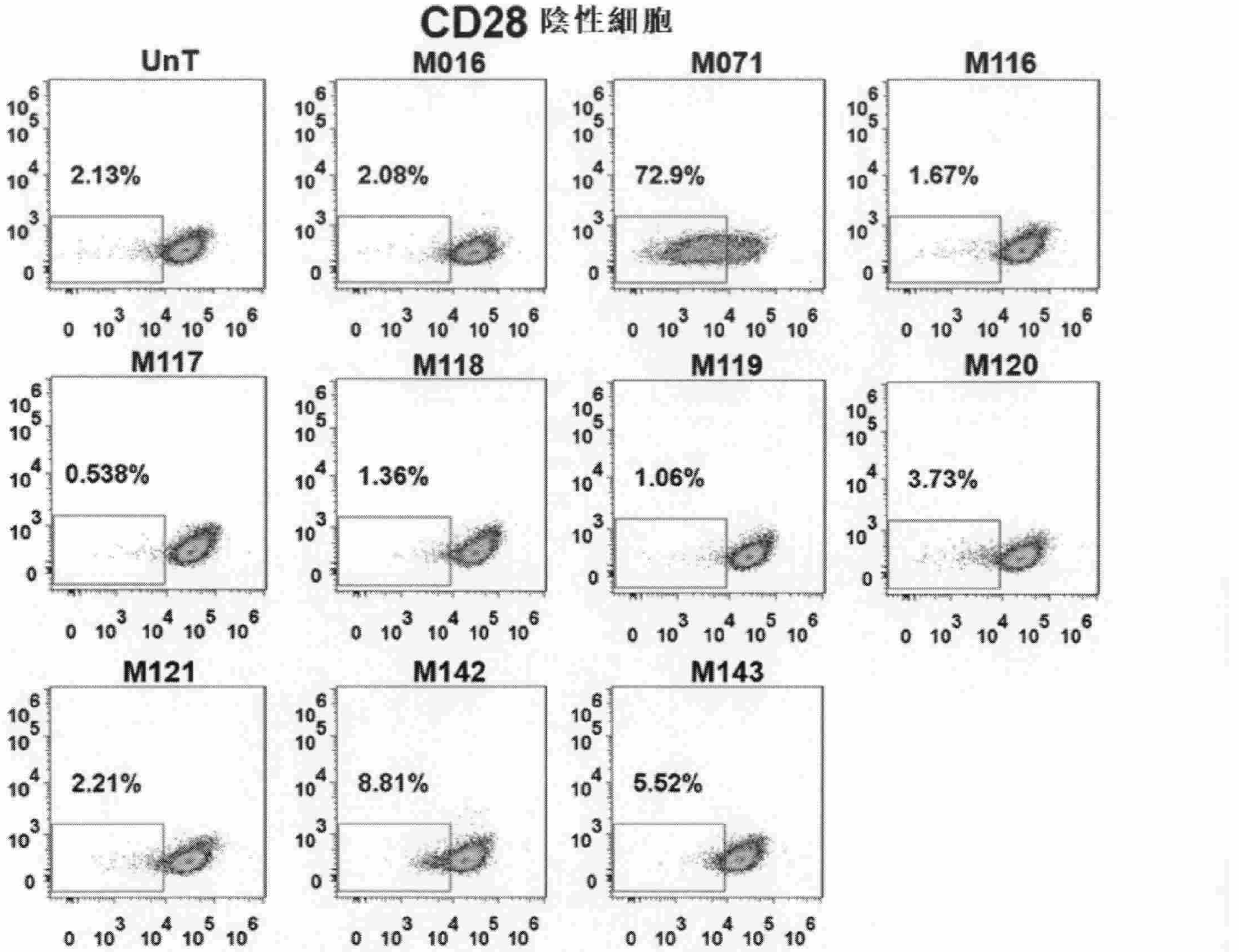
【圖 6A】


CD3ε 陰性細胞
UnT
12.4%
M016
8.54%
M071
87.3%
M116
86.6%
M117
8.83%
M118
6.28%
M119
2.55%
M120
3.57%
M121
6.85%
M142
89.3%
M143
90.0%
0 10^3 10^4 10^5 10^6
10^6 10^5 10^4 10^3 0

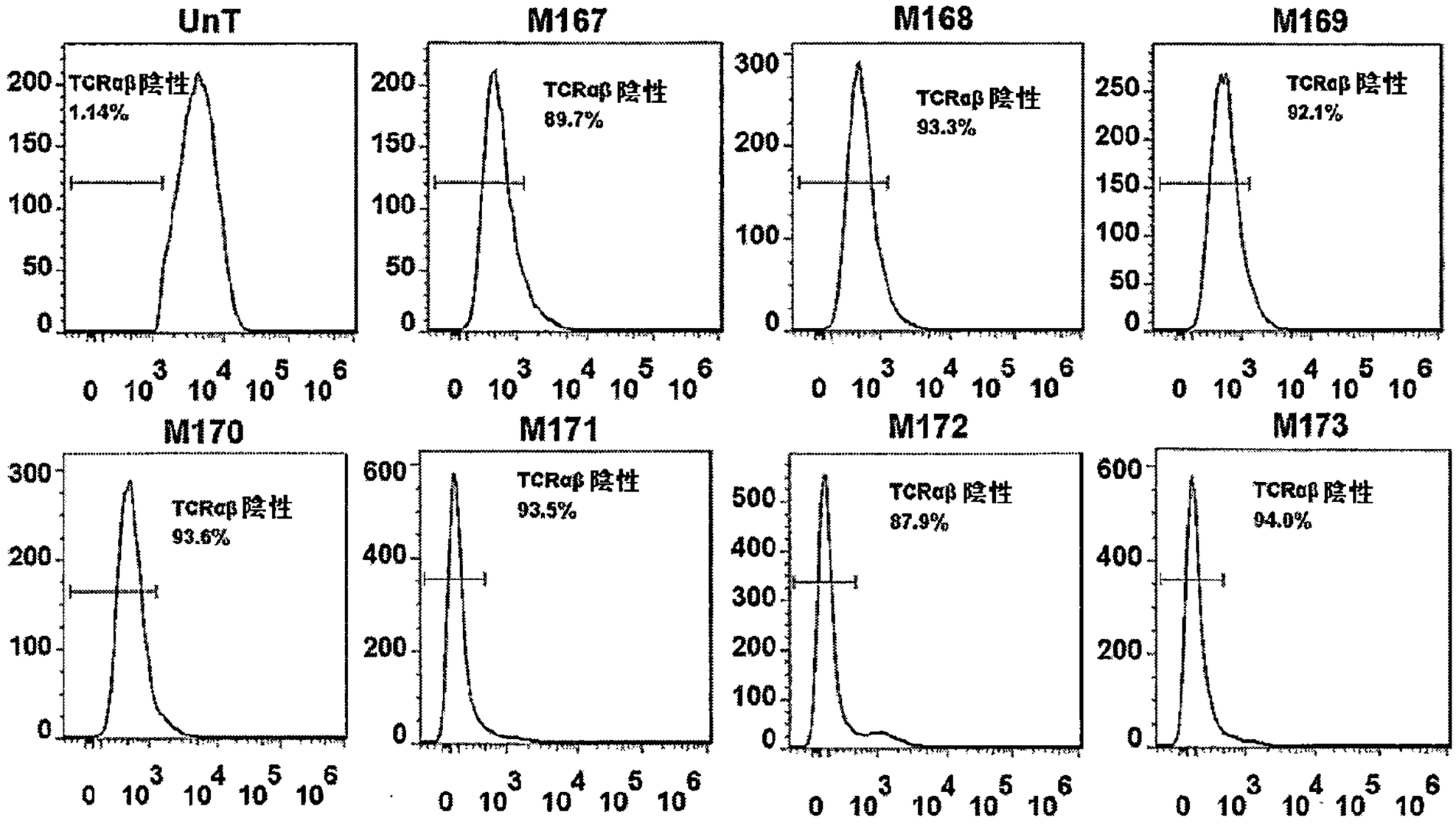
【圖 6B】


CD4 陰性細胞
UnT
17.0%
M016
12.8%
M071
53.3%
M116
7.44%
M117
3.85%
M118
4.79%
M119
3.97%
M120
11.8%
M121
9.62%
M142
19.3%
M143
21.5%

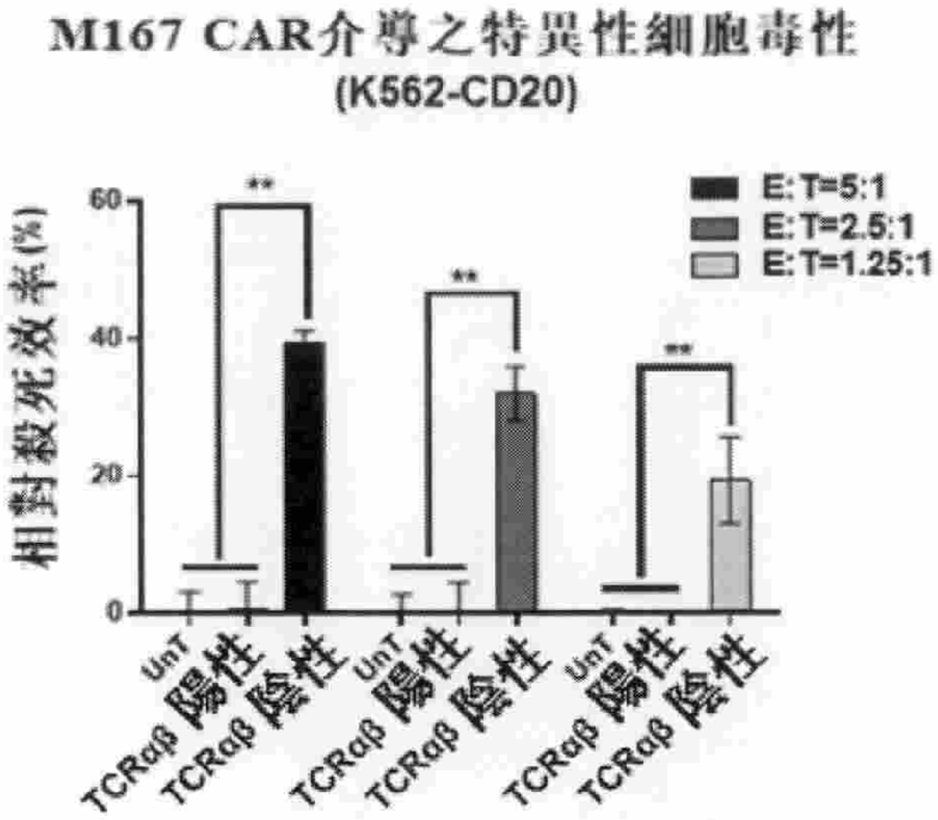
【圖 6C】

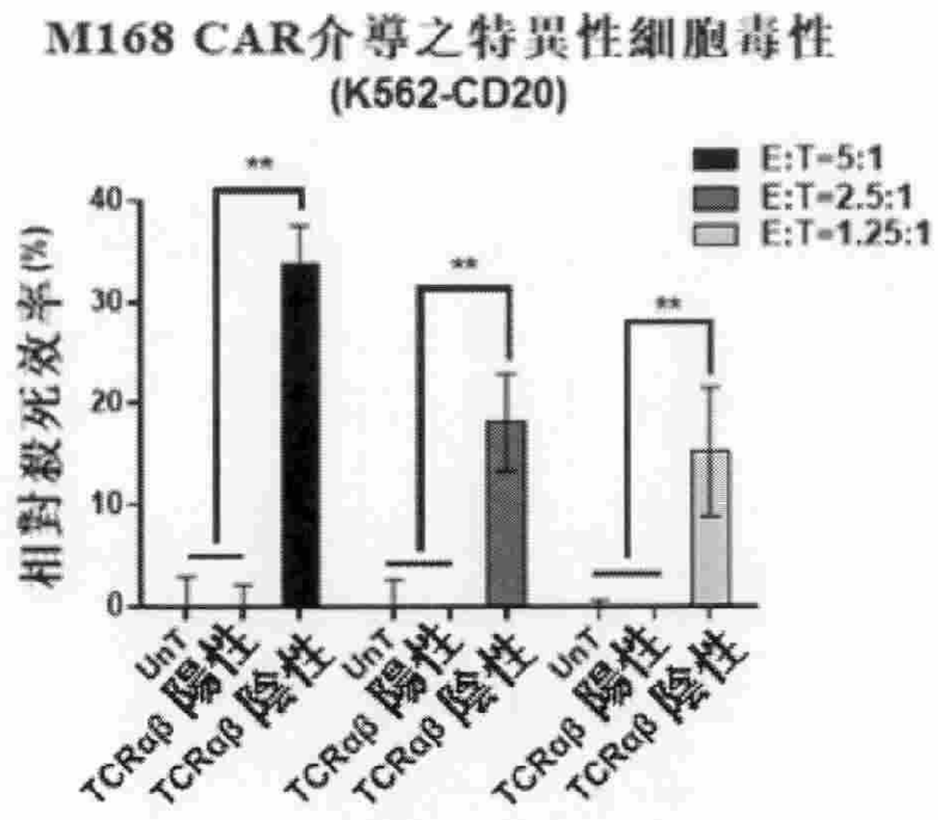

CD28 陰性細胞
UnT
2.13%
M016
2.08%
M071
72.9%
M116
1.67%
M117
0.538%
M118
1.36%
M119
1.06%
M120
3.73%
M121
2.21%
M142
8.81%
M143
5.52%
0 10^3 10^4 10^5 10^6
10^6 10^5 10^4 10^3 0

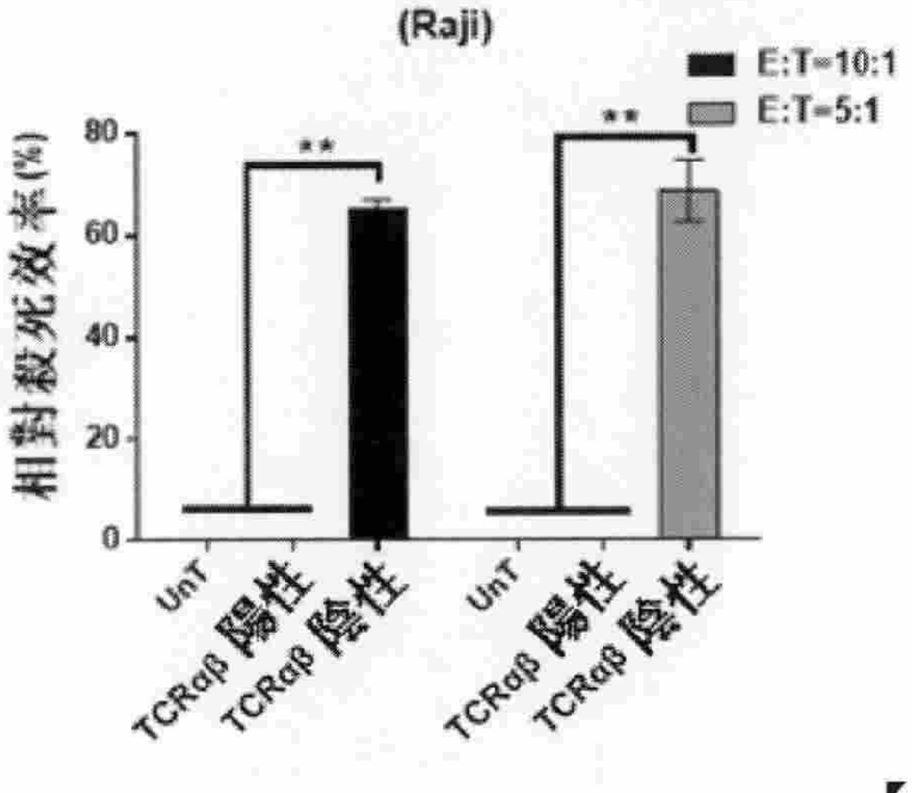
【圖 6D】

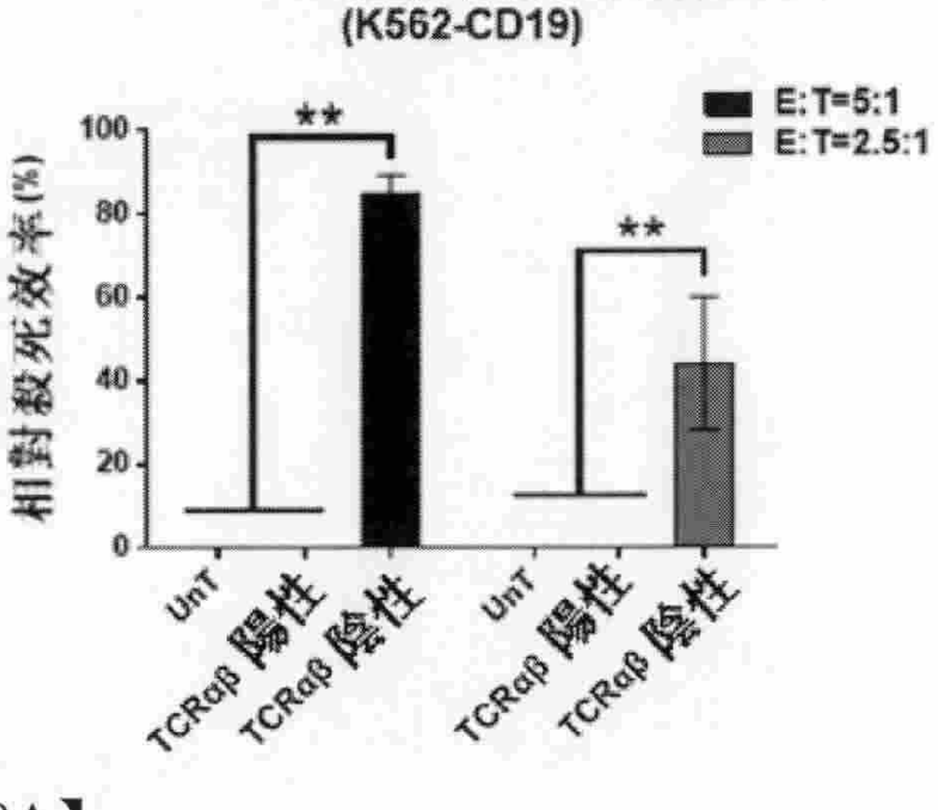

UnT
TCRαβ陰性
1.14%
M167
TCRαβ陰性
89.7%
M168
TCRαβ陰性
93.3%
M169
TCRαβ陰性
92.1%
M170
TCRαβ陰性
93.6%
M171
TCRαβ陰性
93.5%
M172
TCRαβ陰性
87.9%
M173
TCRαβ陰性
94.0%

【圖 7】

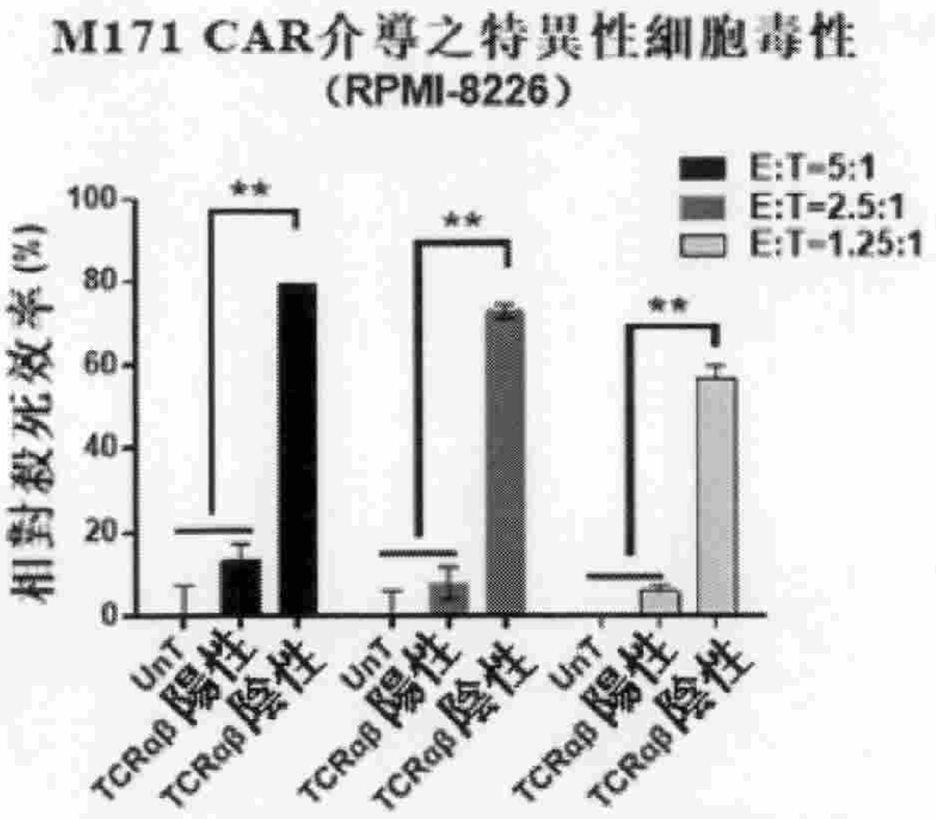

M167 CAR介導之特異性細胞毒性
(K562-CD20)
相對殺死效率(%)
E:T=5:1
E:T=2.5:1
E:T=1.25:1
UnT
TCRαβ 陽性
TCRαβ 陰性

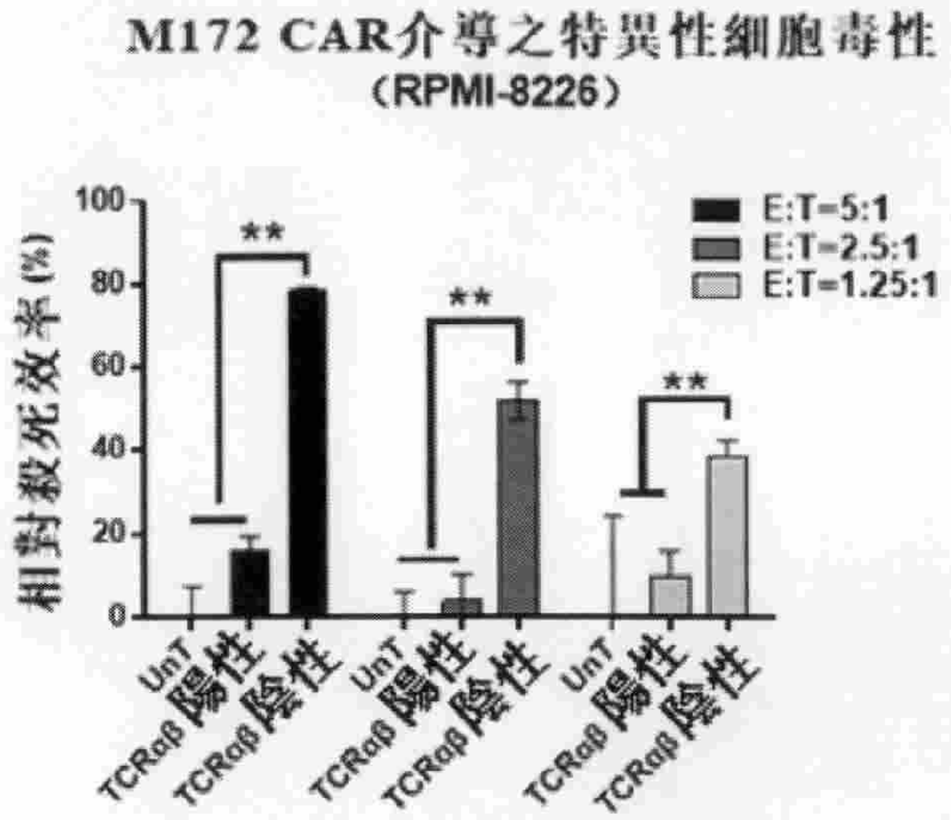

M168 CAR介導之特異性細胞毒性
(K562-CD20)
相對殺死效率(%)
E:T=5:1
E:T=2.5:1
E:T=1.25:1
UnT
TCRαβ 陽性
TCRαβ 陰性

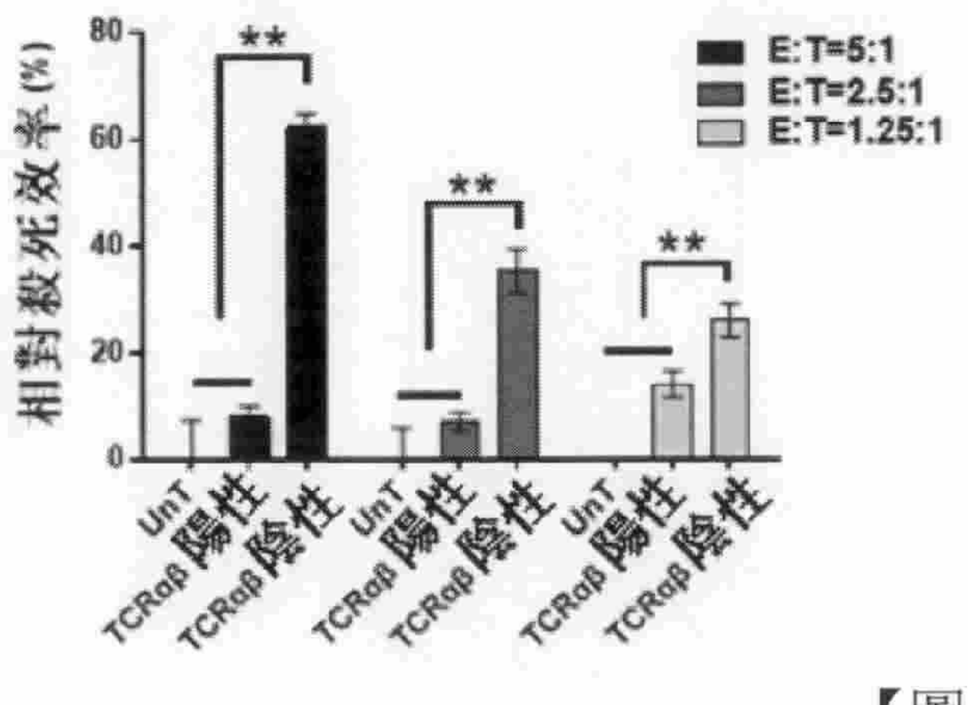

M169 CAR介導之特異性細胞毒性
(Raji)
相對殺死效率(%)
E:T=10:1
E:T=5:1
UnT
TCRαβ 陽性
TCRαβ 陰性


M170 CAR介導之特異性細胞毒性
(K562-CD19)
相對殺死效率(%)
E:T=5:1
E:T=2.5:1
UnT
TCRαβ 陽性
TCRαβ 陰性

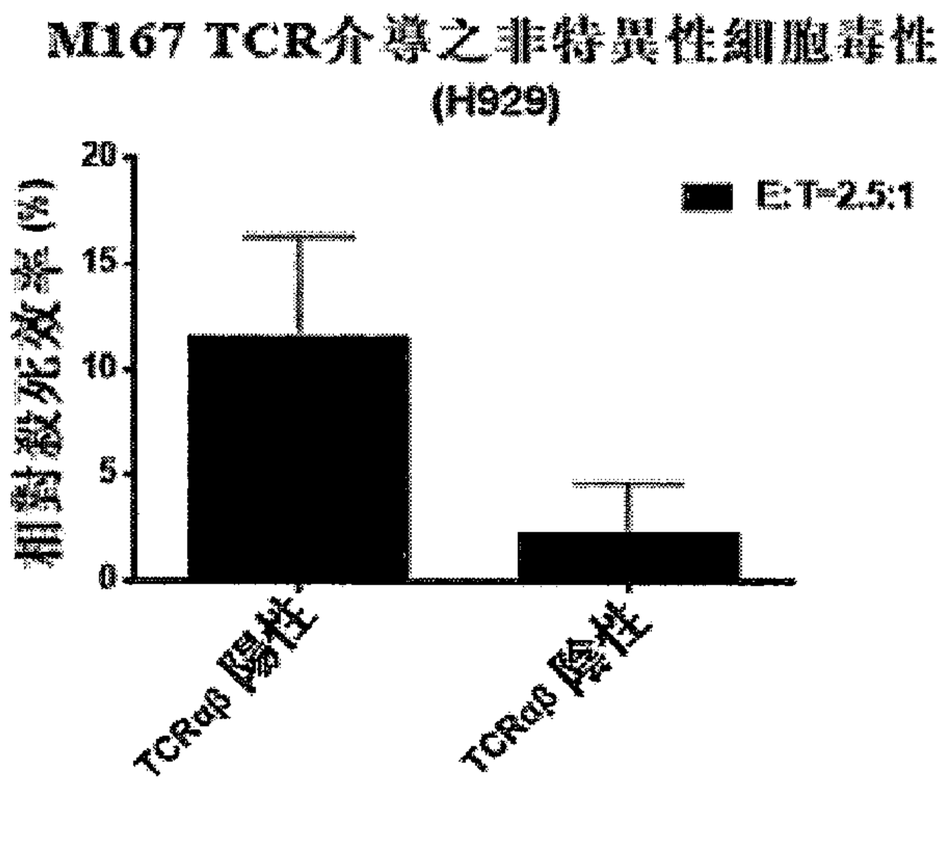
【圖 8A】

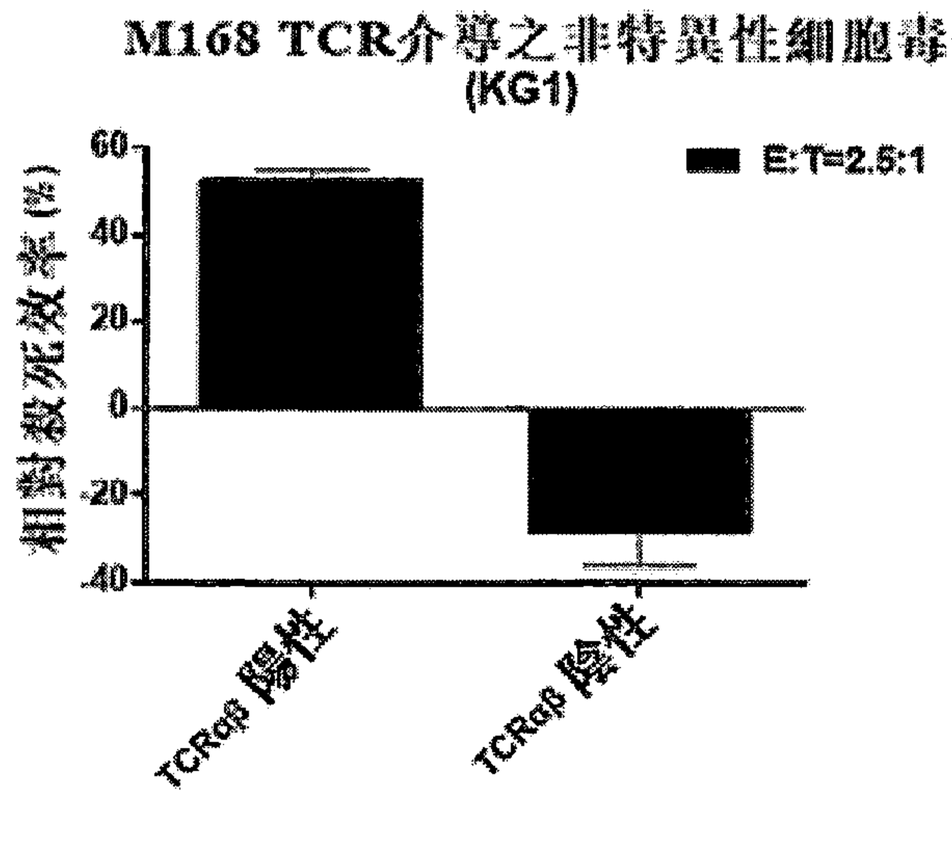

M171 CAR介導之特異性細胞毒性
(RPMI-8226)
相對殺死效率(%)
E:T=5:1
E:T=2.5:1
E:T=1.25:1
**
UnT
TCRαβ陽性
TCRαβ陰性

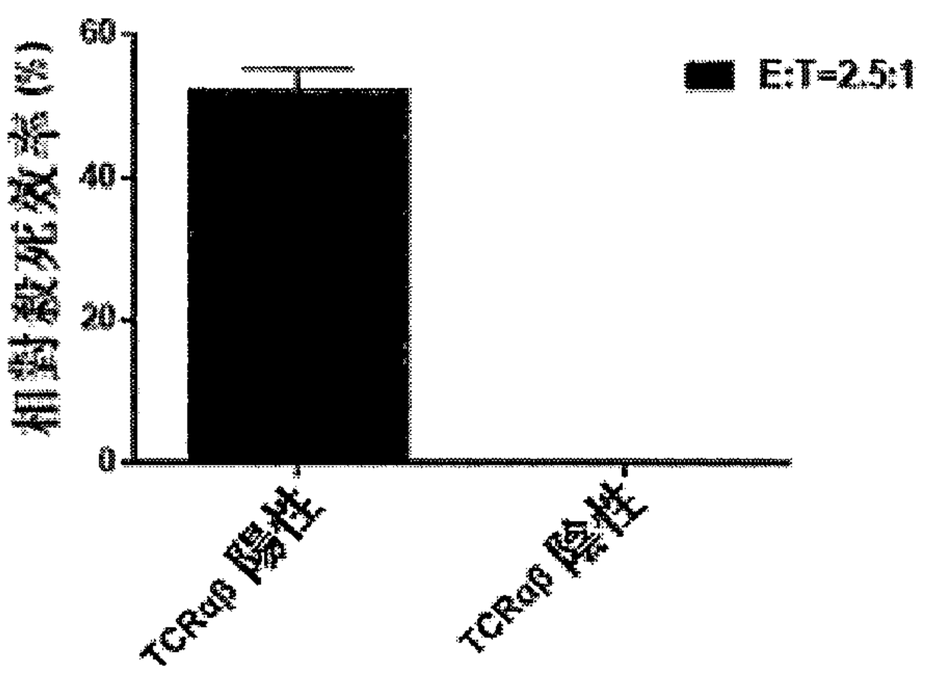

M172 CAR介導之特異性細胞毒性
(RPMI-8226)
相對殺死效率(%)
E:T=5:1
E:T=2.5:1
E:T=1.25:1
**
UnT
TCRαβ陽性
TCRαβ陰性

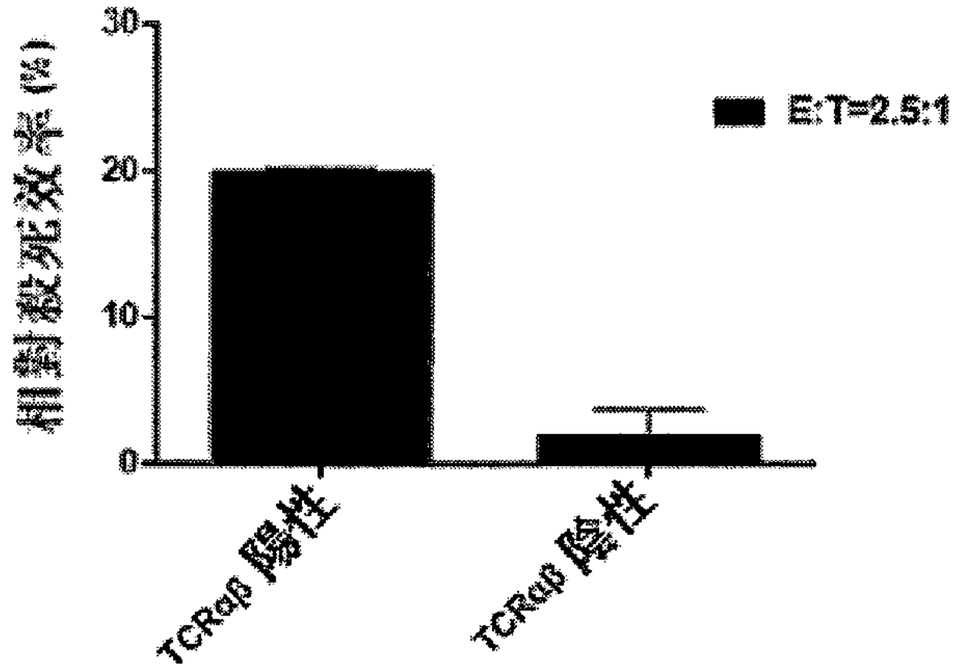

M173 CAR介導之特異性細胞毒性
(RPMI-8226)
相對殺死效率(%)
E:T=5:1
E:T=2.5:1
E:T=1.25:1
**
UnT
TCRαβ陽性
TCRαβ陰性

【圖 8B】

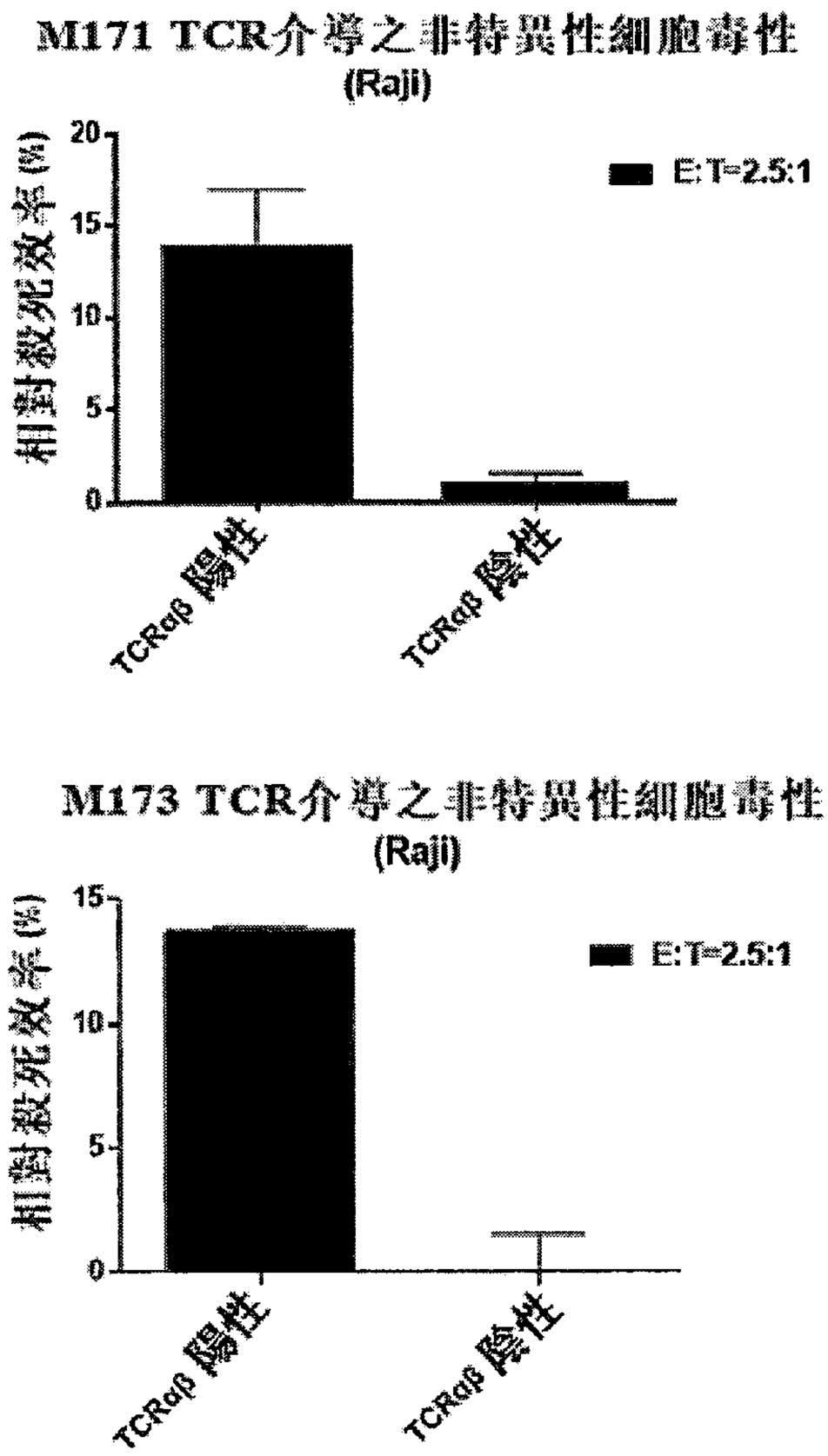

M167 TCR介導之非特異性細胞毒性
(H929)
E:T=2.5:1
相對殺死效率 (%)
20
15
10
5
0
TCRαβ 陽性
TCRαβ 陰性

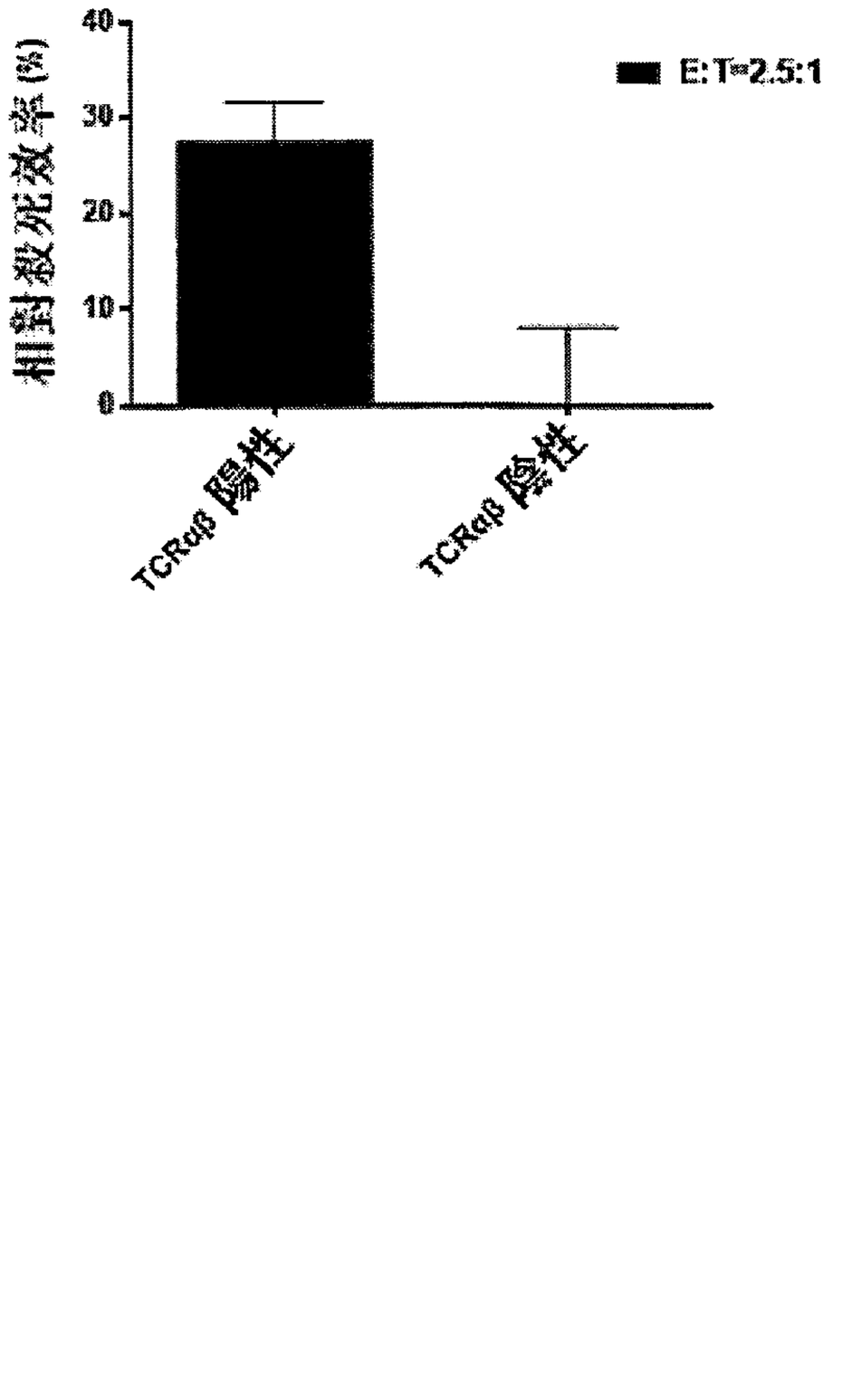

M168 TCR介導之非特異性細胞毒性
(KG1)
E:T=2.5:1
相對殺死效率 (%)
60
40
20
0
-20
-40
TCRαβ 陽性
TCRαβ 陰性


M169 TCR介導之非特異性細胞毒性
(KG1)
E:T=2.5:1
相對殺死效率 (%)
60
40
20
0
TCRαβ 陽性
TCRαβ 陰性


M170 TCR介導之非特異性細胞毒性
(H929)
E:T=2.5:1
相對殺死效率 (%)
30
20
10
0
TCRαβ 陽性
TCRαβ 陰性

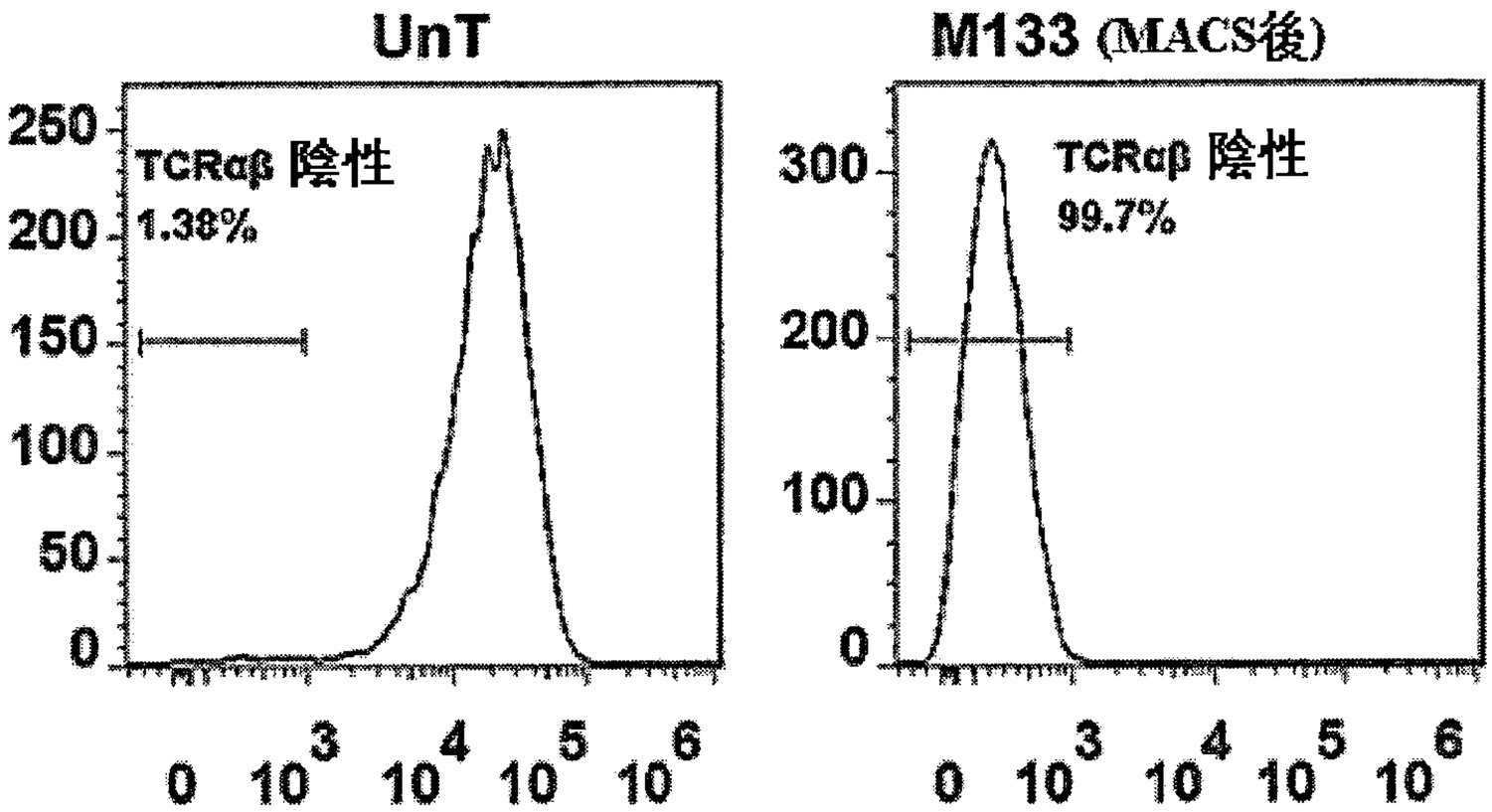
【圖 9A】


M171 TCR介導之非特異性細胞毒性
(Raji)
相對殺死效率 (%)
20
15
10
5
0
E:T=2.5:1
TCRαβ 陽性
TCRαβ 陰性

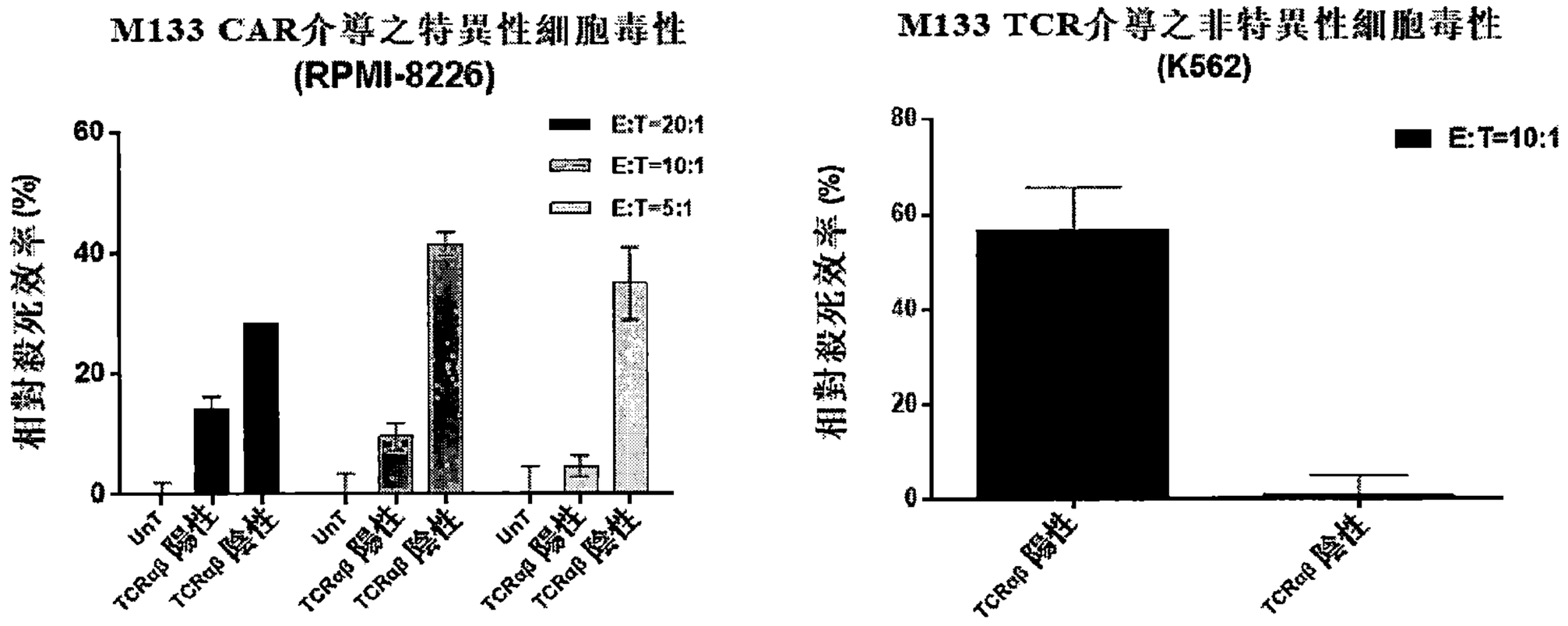

M172 TCR介導之非特異性細胞毒性
(K562)
相對殺死效率 (%)
40
30
20
10
0
E:T=2.5:1
TCRαβ 陽性
TCRαβ 陰性

M173 TCR介導之非特異性細胞毒性
(Raji)
相對殺死效率 (%)
15
10
5
0
E:T=2.5:1
TCRαβ 陽性
TCRαβ 陰性

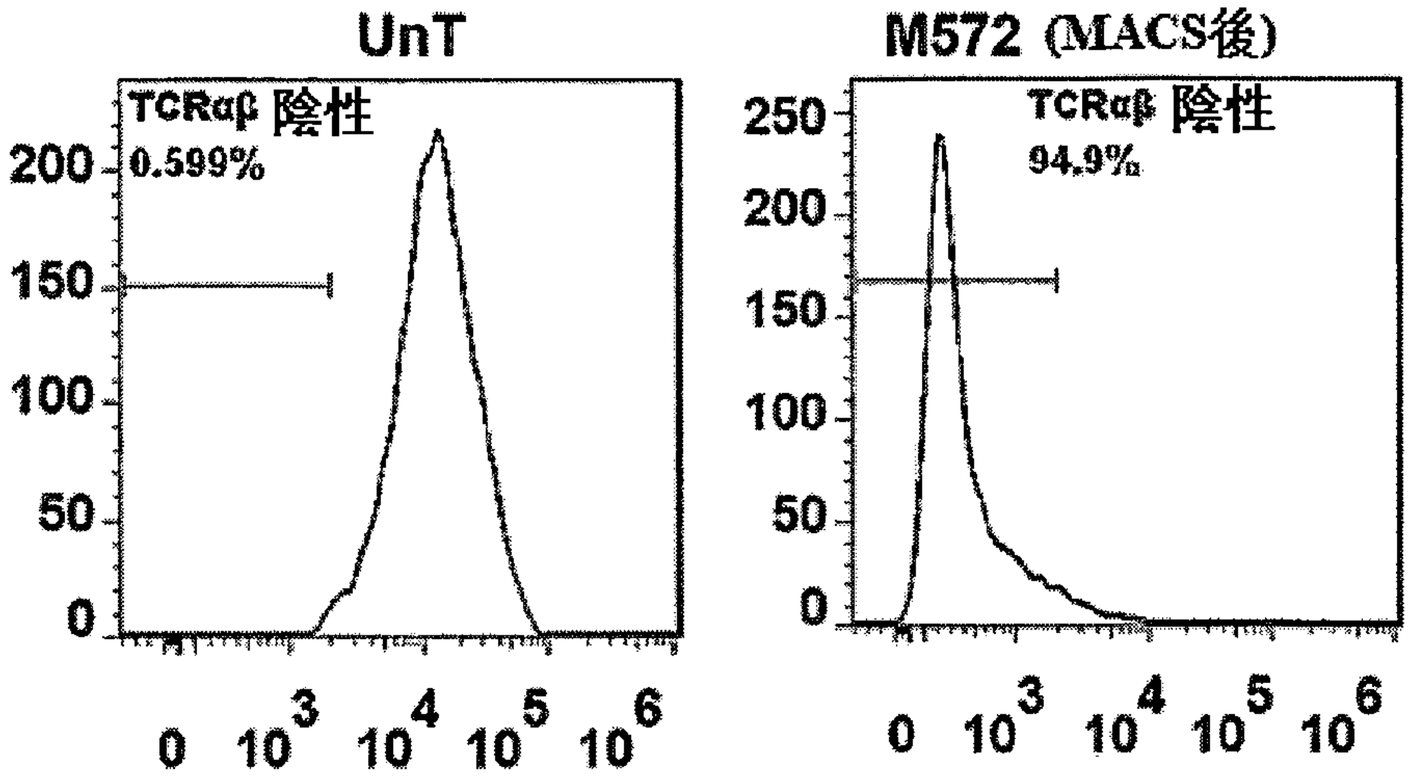
【圖 9B】


UnT
TCRαβ 陰性
1.38%
250
200
150
100
50
0
0 10^3 10^4 10^5 10^6
M133 (MACS後)
TCRαβ 陰性
99.7%
300
200
100
0
0 10^3 10^4 10^5 10^6

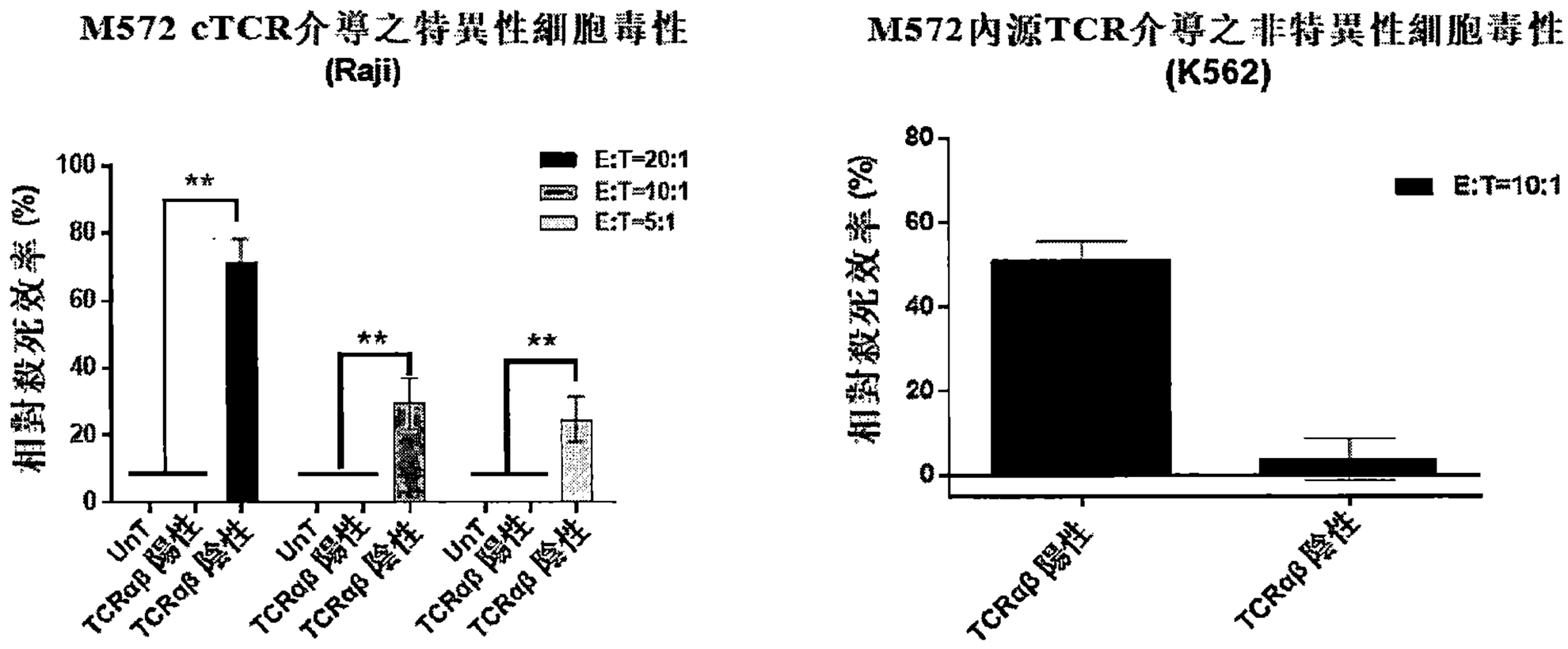
【圖 10A】


M133 CAR介導之特異性細胞毒性
(RPMI-8226)
相對殺死效率 (%)
E:T=20:1
E:T=10:1
E:T=5:1
60
40
20
0
UnT
TCRαβ 陽性
TCRαβ 陰性
M133 TCR介導之非特異性細胞毒性
(K562)
相對殺死效率 (%)
E:T=10:1
80
60
40
20
0
TCRαβ 陽性
TCRαβ 陰性

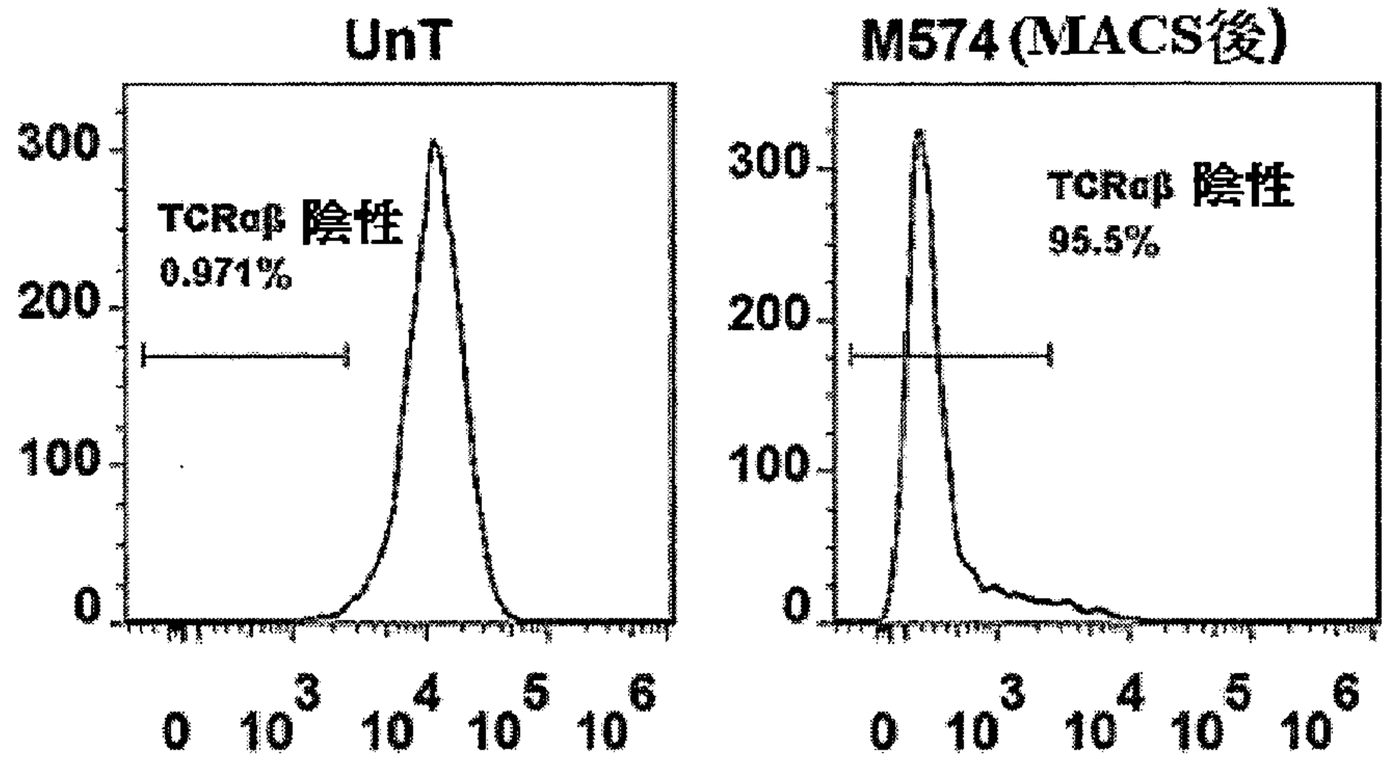
【圖 10B】


UnT
TCRαβ 陰性
0.599%
M572 (MACS後)
TCRαβ 陰性
94.9%
250
200
150
100
50
0
0 10^3 10^4 10^5 10^6

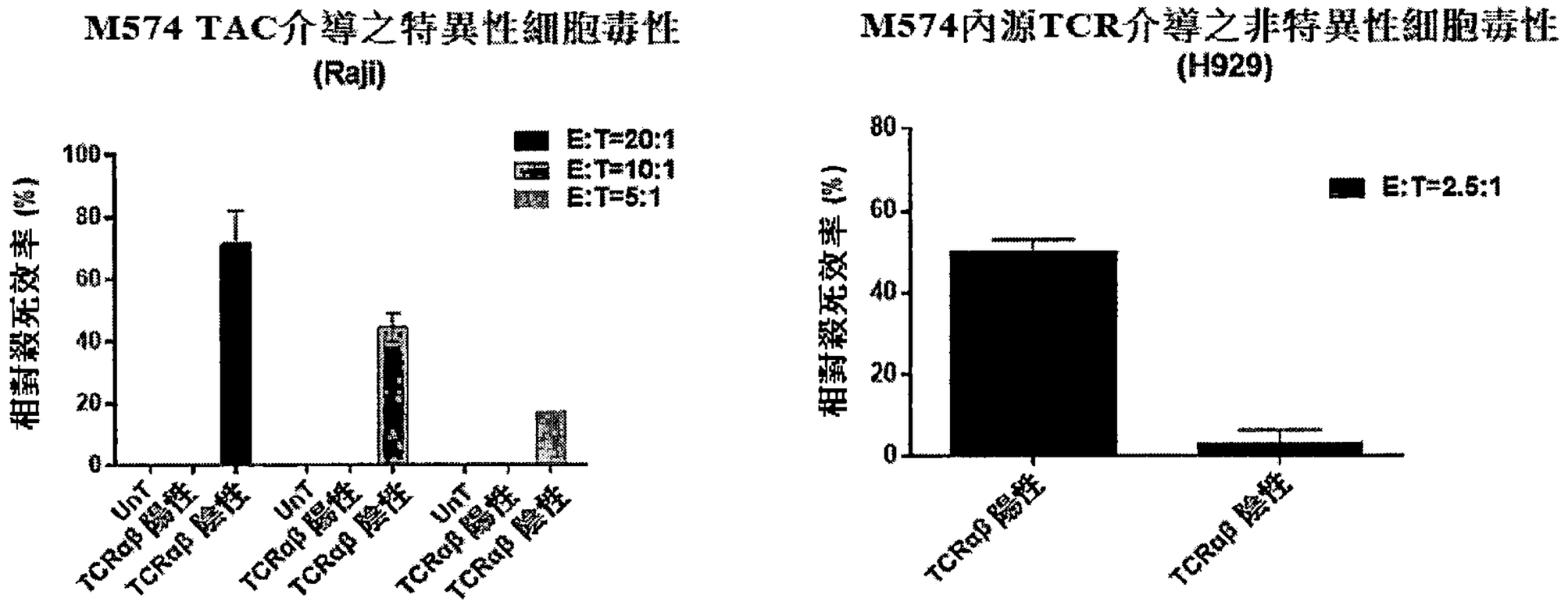
【圖 11A】


M572 cTCR介導之特異性細胞毒性
(Raji)
相對殺死效率 (%)
E:T=20:1
E:T=10:1
E:T=5:1
**
UnT
TCRαβ 陽性
TCRαβ 陰性
M572內源TCR介導之非特異性細胞毒性
(K562)
E:T=10:1

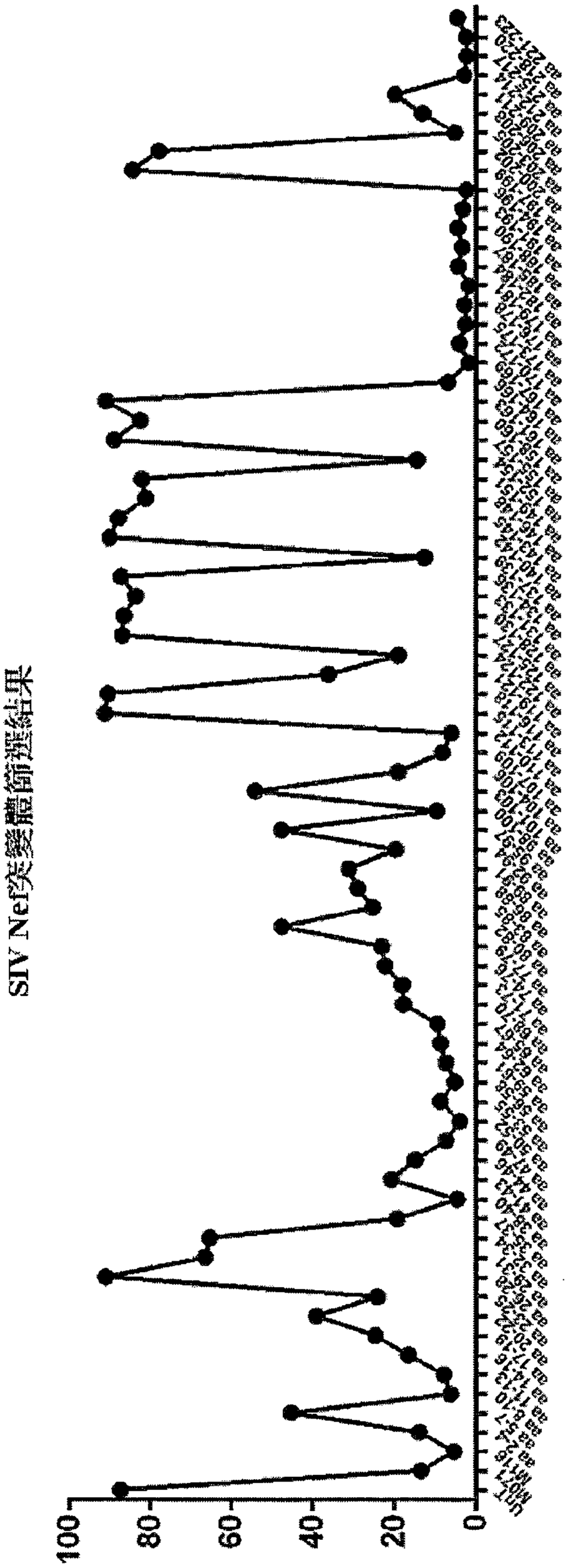
【圖 11B】


UnT
M574 (MACS後)
TCRαβ 陰性
0.971%
TCRαβ 陰性
95.5%
300
200
100
0
0 10^3 10^4 10^5 10^6

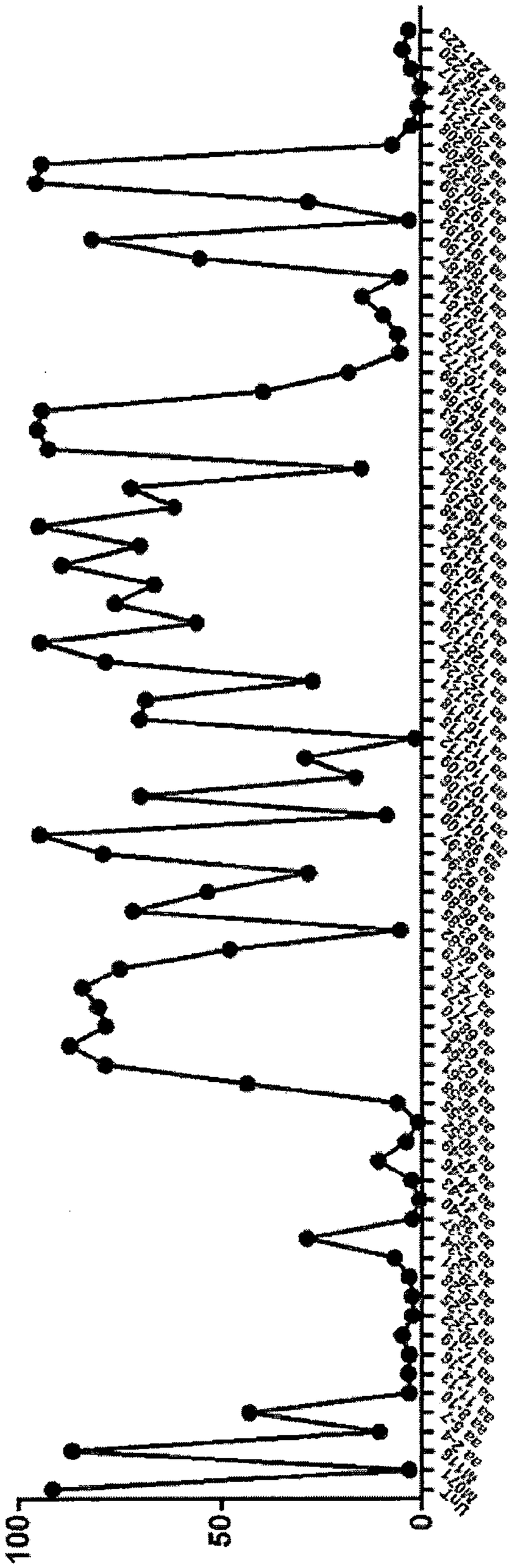
【圖 12A】


M574 TAC介導之特異性細胞毒性
(Raji)
E:T=20:1
E:T=10:1
E:T=5:1
相對殺死效率 (%)
UnT
TCRαβ 陽性
TCRαβ 陰性
M574內源TCR介導之非特異性細胞毒性
(H929)
E:T=2.5:1

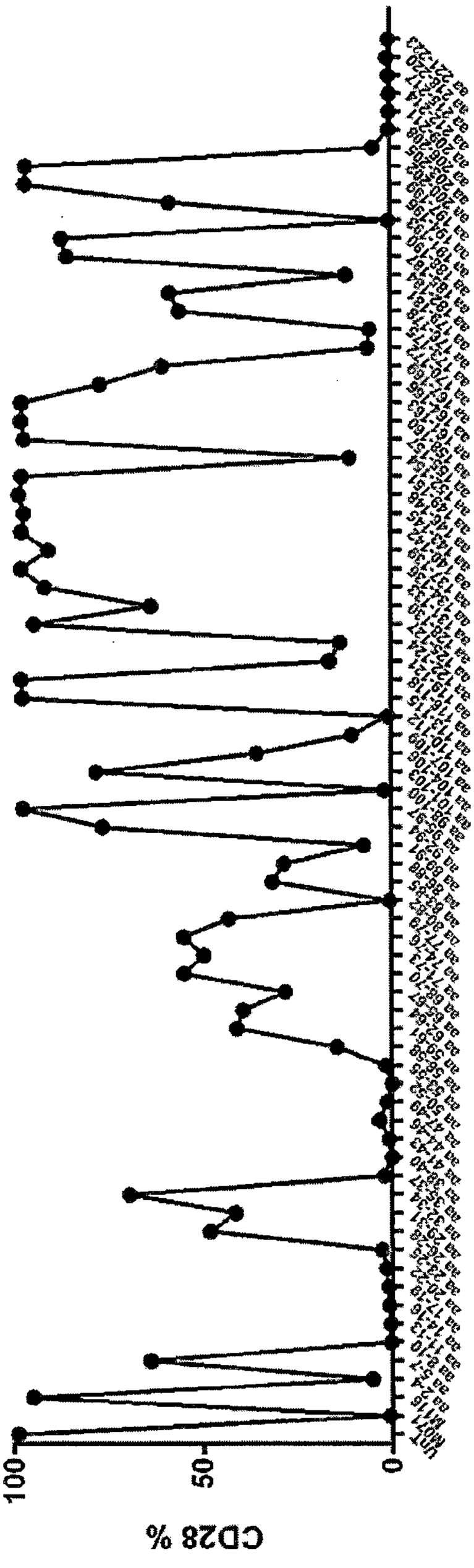
【圖 12B】



【圖 13A】



【圖 13B】



【圖 13C】