

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织  
国际局

(43) 国际公布日  
2021年7月8日(08.07.2021)



(10) 国际公布号  
WO 2021/136040 A1

(51) 国际专利分类号:  
C07K 19/00 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)  
C12N 15/09 (2006.01) A61K 35/00 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2020/138691

(22) 国际申请日: 2020年12月23日(23.12.2020)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:  
201911422121.4 2019年12月31日(31.12.2019) CN

(71) 申请人: 华东师范大学(EAST CHINA NORMAL UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国上海市闵行区东川路500号, Shanghai 200241 (CN)。上海邦耀生物科技有限公司(BIORAY LABORATORIES INC.) [CN/CN]; 中国上海市闵行区元江路3699号12幢, Shanghai 201100 (CN)。

(72) 发明人: 谭炳合(TAN, Binghe); 中国上海市闵行区元江路3699号12幢, Shanghai 201109 (CN)。史秀娟(SHI, Xiujuan); 中国上海市闵行区元江路3699号12幢, Shanghai 201109 (CN)。杜冰(DU, Bing); 中国上海市闵行区元江路3699号12幢, Shanghai 201109 (CN)。刘明耀(LIU, Mingyao); 中国上海市闵行区元江路3699号12幢, Shanghai 201109 (CN)。席在喜(XI, Zaixi); 中国上海市闵行区元江路3699号12幢, Shanghai 201109 (CN)。

(74) 代理人: 上海一平知识产权代理有限公司(XU & PARTNERS, LLC); 中国上海市普陀区真北路958号天地科技广场1号楼106室, Shanghai 200333 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK,

LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:  
- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。  
- 包括说明书序列列表部分(细则5.2(a))。



WO 2021/136040 A1

(54) Title: PREPARATION AND APPLICATIONS OF CHIMERIC ANTIGEN RECEPTOR T-CELL CO-EXPRESSING IMMUNOMODULATORY MOLECULE

(54) 发明名称: 一种共表达免疫调节分子的嵌合抗原受体T细胞的制备及其应用

(57) Abstract: Provided in the present invention are a preparation and applications of a chimeric antigen receptor T-cell co-expressing an immunomodulatory molecule. Specifically, provided in the present invention are a CAR and the CAR-T-cell thereof specifically targeting a tumor cell surface antigen, the chimeric antigen receptor (CAR) comprises an antigen-binding structural domain and an immunomodulatory molecule. The CAR-T-cell of the present invention provides excellent tumor-killing effects.

(57) 摘要: 本发明提供了一种共表达免疫调节分子的嵌合抗原受体T细胞的制备及其应用, 具体地, 本发明提供了特异靶向肿瘤细胞表面抗原的CAR及其CAR-T细胞, 所述嵌合抗原受体CAR包含抗原结合结构域和免疫调节分子。本发明的CAR-T细胞具有良好的肿瘤杀伤效果。

一种共表达免疫调节分子的嵌合抗原受体 T 细胞的制备及其应用

## 技术领域

5 本发明涉及生物医药领域，具体地，涉及一种共表达免疫调节分子的嵌合抗原受体 T 细胞的制备及其应用。

## 背景技术

嵌合抗原受体(Chimeric antigen receptor, CAR)T 细胞疗法是近年来发展非常迅速的一种新的细胞免疫治疗技术，该技术是将抗原抗体的高亲和性和 T 淋巴细胞的杀伤作用相结合，构建特异性嵌合抗原受体，通过一定途径将编码嵌合抗原受体的基因插入到 T 淋巴细胞，使 T 淋巴细胞表达这种嵌合抗原受体，然后经体外扩增纯化这种基因修饰过的 T 细胞，输入到体内，CAR-T 细胞在体内特异性识别靶抗原，发生一系列免疫反应，T 细胞活化扩增以及分泌细胞因子，以非 MHC(Major histocompatibility complex, 主要组织相容性复合体)限制性的方式特异性杀伤靶细胞。对肿瘤而言，构建肿瘤相关抗原嵌合抗原受体，转入 T 细胞后使其表达嵌合抗原受体，可以特异性识别肿瘤细胞表面的抗原，从而激活 T 细胞发挥细胞免疫作用，清除肿瘤细胞，实现抗肿瘤的目的。

截至目前，CAR-T 技术虽然在血液瘤的治疗上获得了可喜的突破，但在占恶性肿瘤绝大多数实体瘤治疗上，其疗效却还不尽如人意。CAR-T 疗法在实体瘤的治疗中效果欠佳，与实体瘤组织屏障、肿瘤细胞高度异质性、缺乏良好的肿瘤特异性抗原或肿瘤相关抗原、高度抑制的肿瘤免疫微环境以及 CAR-T 细胞自身的激活信号密切相关。在治疗实体瘤过程中，CAR-T 细胞突破物理屏障识别肿瘤细胞后，要发挥高效的肿瘤细胞杀伤作用，有赖于克服所处的高度抑制的肿瘤微环境并保持稳定的激活状态和功能持续性。而目前的 CAR 结构设计虽然可以让 CAR-T 细胞较好地识别相关抗原并快速激活，但是肿瘤微环境强烈的抑制信号作用下，CAR-T 细胞往往出现激活强度不够、扩增能力差、持续性不强、快速走向衰竭和凋亡等状况，严重制约了实体瘤的治疗效果。

并且，现有技术中在 CAR 分子中整合表达细胞因子或趋化因子，虽然能够在表达 CAR 的同时提高具有抗肿瘤作用的细胞因子的表达，但是这种表达方式是全身性的，而且 CAR-T 细胞在治疗过程中的重要副作用之一便是细胞因子风暴，全身性提高细胞因子的表达无疑会提高 CAR-T 治疗相关细胞因子风暴发生的风险。



在 CAR 分子胞内激活结构域中整合表达不同的共刺激分子，尽管能够提供 CAR-T 细胞激活所需的共刺激信号，但是该激活过程依赖于肿瘤相关或肿瘤特异性抗原的表达，并且无法通过与肿瘤微环境中其它免疫细胞的相互作用进而重塑、改善肿瘤微环境，因而对实体瘤的治疗效果非常有限。

5 因此，本领域迫切需要开发一种新型的嵌合抗原受体分子，该 CAR 分子表达于 T 细胞后可以有效抵制肿瘤免疫微环境的抑制作用，维持或提高 CAR-T 细胞的效应功能及其扩增能力、持续能力，在实体瘤治疗中能够表现出明显优于现有 CAR 结构的治疗效果。

## 10 发明内容

本发明的目的在于提供一种新型的嵌合抗原受体分子，该 CAR 分子表达于 T 细胞后可以有效抵制肿瘤免疫微环境的抑制作用，维持或提高 CAR-T 细胞的效应功能及其扩增能力、持续能力，在实体瘤治疗中能够表现出明显优于现有 CAR 结构的治疗效果。

15

本发明第一方面提供了一种嵌合抗原受体 CAR，所述嵌合抗原受体 CAR 包括：抗原结合结构域、跨膜结构域和胞内结构域，其中所述抗原结合结构域特异性结合于肿瘤细胞表面抗原；

并且所述的嵌合抗原受体 CAR 还包括：与所述胞内结构域连接并可共表达的免疫调节分子。

20 在另一优选例中，所述肿瘤细胞抗原包括各种实体瘤和非实体瘤的细胞表面抗原。

在另一优选例中，所述肿瘤细胞表面抗原选自下组：CD19、BCMA、CD38、PSMA、HER2、GPC3、Mesothelin、Claudin18.2、EGFR、EGFRVIII、CEA、GD2、IL13R、FAP、CD171、或其组合。

25 在另一优选例中，所述肿瘤细胞表面抗原包括 CD19、和/或 PSMA。

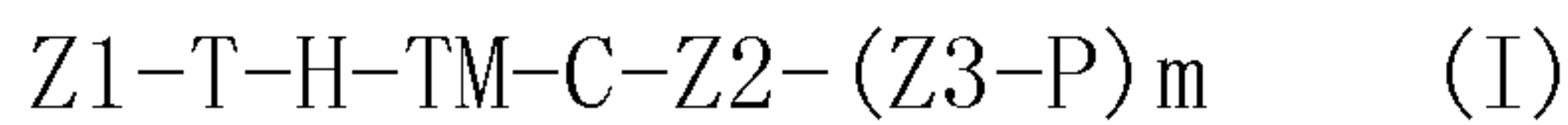
在另一优选例中，所述免疫调节分子选自下组：GITRL、4-1BBL、CD40、LIGHT、B7.1、B7.2、OX40L、CD70、或其组合。

在另一优选例中，所述免疫调节分子包括 GITRL。

30 在另一优选例中，所述抗原结合结构域为抗体或抗原结合片段。

在另一优选例中，所述抗原结合片段是 Fab 或 scFv 或单结构域抗体 sdFv。

在另一优选例中，所述 CAR 的结构如下式 I 所示：



式中，

各“-”独立地为连接肽或肽键；

5 Z1 为无或信号肽序列；

T 为靶向肿瘤细胞表面抗原的抗体单链可变区序列；

H 为无或铰链区；

TM 为跨膜结构域；

C 为共刺激信号分子；

10 Z2 为源于 CD3  $\zeta$  的胞浆信号传导序列；

Z3 为自剪切蛋白；

P 为免疫调节分子；

m 为 1、2、3、或 4。

15 在另一优选例中，所述的靶向肿瘤细胞表面抗原的抗体单链可变区序列的结构如式 A1 或 A2 所示：



其中， $V_{L1}$ 、 $V_{L2}$  为抗肿瘤细胞表面抗原的抗体的轻链可变区； $V_{H1}$ 、 $V_{H2}$  为抗肿瘤细胞表面抗原的抗体的重链可变区；“-”为连接肽(或柔性接头)或肽键。

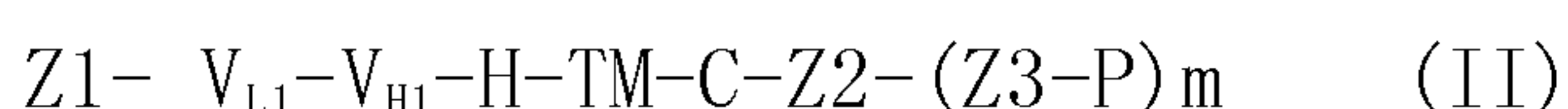
20 在另一优选例中，所述的  $V_{L1}$  和  $V_{H1}$  通过柔性接头相连。

在另一优选例中，所述的柔性接头为 1-5 个(较佳地，2-4 个)连续的 SEQ ID NO. : 4(GGGGS)所示的序列。

在另一优选例中， $V_{L1}$  的氨基酸序列如 SEQ ID NO. :2(PSMA 的 CAR)的第 22-128 位所示，且  $V_{H1}$  的氨基酸序列如 SEQ ID NO. :2 的第 144-258 位所示。

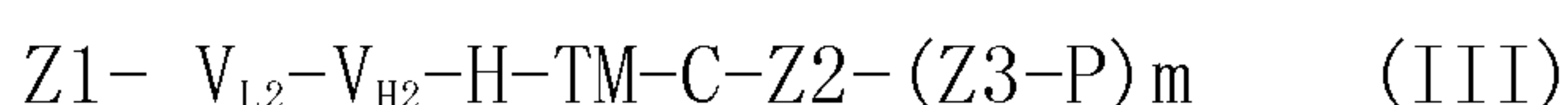
25 在另一优选例中， $V_{L2}$  的氨基酸序列如 SEQ ID NO. :3(CD19 的 CAR)的第 22-128 位所示，且  $V_{H2}$  的氨基酸序列如 SEQ ID NO. :3 的第 144-263 位所示。

在另一优选例中，所述的 CAR 的结构如式 II 所示：



式中，各元件分别如上所述。

30 在另一优选例中，所述的 CAR 的结构如式 III 所示：



式中，各元件分别如上所述。

在另一优选例中，所述的 Z1 为选自下组的蛋白的信号肽：CD8a、CSF1R、或其组合。

5 在另一优选例中，所述的 H 为选自下组的蛋白的铰链区：CD8a、IgG、CD28、或其组合。

在另一优选例中，所述的 TM 为选自下组的蛋白的跨膜区：CD8a、CD4、CD28、或其组合。

10 在另一优选例中，所述 C 为选自下组的蛋白的共刺激信号分子：4-1BB (CD137)、OX40、CD28、CD30、CD40、CD70、CD134、PD1、Dap10、CDS、ICAM-1、HVEM、GITR、或其组合。

在另一优选例中，所述 C 包括 4-1BB 来源的共刺激信号分子。

在另一优选例中，所述 Z3 的自剪切蛋白选自下组：T2A、P2A、E2A、F2A、或其组合。

在另一优选例中，所述 Z3 的自剪切蛋白包括 T2A。

15 在另一优选例中，所述 Z3 的自剪切蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO. :7 所示。

在另一优选例中，所述免疫调节分子包括野生型的免疫调节分子和突变型的免疫调节分子、或其活性片段。

在另一优选例中，所述免疫调节分子选自下组：GITRL、4-1BBL、CD40、LIGHT、B7.1、B7.2、OX40L、CD70、或其组合。

20 在另一优选例中，所述 GITRL 具有如 SEQ ID NO. :1 所示的氨基酸序列。

在另一优选例中，所述 GITRL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO. :1 所示。

在另一优选例中，所述 CAR 的氨基酸序列如 SEQ ID No. : 2 或 3 所示。

本发明第二方面提供了一种核酸分子，所述核酸分子编码本发明第一方面所述的嵌合抗原受体 (CAR)。

25 在另一优选例中，所述编码权利要求 1 所述的嵌合抗原受体 (CAR) 的核酸分子如 SEQ ID NO. : 5 或 6 所示。

本发明第三方面提供了一种载体，所述的载体含有本发明第二方面所述的核酸分子。

30 在另一优选例中，所述的载体选自下组：DNA、RNA、质粒、慢病毒载体、腺病毒载体、逆转录病毒载体、转座子、或其组合。

在另一优选例中，所述载体为慢病毒载体。



本发明第四方面提供了一种宿主细胞，所述的宿主细胞含有本发明第三方面所述的载体或染色体中整合有外源的本发明第二方面所述的核酸分子。

在另一优选例中，所述细胞为分离的细胞，和/或所述细胞为基因工程化的细胞。

5 在另一优选例中，所述细胞为哺乳动物细胞，优选人细胞。

在另一优选例中，所述的宿主细胞包括工程化的免疫细胞。

在另一优选例中，所述的免疫细胞还表达外源的免疫调节分子蛋白。

在另一优选例中，所述的外源免疫调节分子蛋白是独立表达的和/或与靶向肿瘤细胞表面抗原的 CAR 共表达的。

10 在另一优选例中，所述的与靶向肿瘤细胞表面抗原的 CAR 共表达包括免疫调节分子蛋白与靶向肿瘤细胞表面抗原的 CAR 的串联表达。

在另一优选例中，所述的工程化的免疫细胞包括 T 细胞、NK 细胞或巨噬细胞。

在另一优选例中，所述细胞为 T 细胞。

15 在另一优选例中，所述的工程化的免疫细胞选自下组：

(i) 嵌合抗原受体 T 细胞 (CAR-T 细胞)；

(ii) 嵌合抗原受体 NK 细胞 (CAR-NK 细胞)；或

(iii) 外源 T 细胞受体 (TCR) T 细胞 (TCR-T 细胞)。

在另一优选例中，所述免疫细胞为自体的。

20 在另一优选例中，所述免疫细胞为异体的。

在另一优选例中，所述的细胞是 CAR-T 细胞，所述 CAR-T 细胞表达权利要求 1 所述的嵌合抗原受体 CAR。

本发明第五方面提供了一种制备工程化免疫细胞的方法，所述的工程化免疫细胞表达本发明第一方面所述的 CAR，其中所述方法包括步骤：将本发明第二方面所述的核酸分子或本发明第三方面所述的载体转导入免疫细胞内，从而获得所述工程化免疫细胞。

在另一优选例中，所述导入包括同时、先后、或依次导入。

在另一优选例中，所述免疫细胞为 T 细胞或 NK 细胞。

30 在另一优选例中，所述的方法还包括对获得的工程化免疫细胞进行功能和有效性检测的步骤。

本发明第六方面提供了一种药物组合物，所述药物组合物含有本发明第一方面

所述的 CAR、本发明第二方面所述的核酸分子、本发明第三方面所述的载体、或本发明第四方面所述的宿主细胞，以及药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

在另一优选例中，所述药物组合物为液态制剂。

在另一优选例中，所述药物组合物的剂型为注射剂。

5 在另一优选例中，所述宿主细胞包括工程化免疫细胞。

在另一优选例中，所述的工程化免疫细胞是 (i) 嵌合抗原受体 T 细胞 (CAR-T 细胞)；或 (ii) 嵌合抗原受体 NK 细胞 (CAR-NK 细胞)。

在另一优选例中，所述药物组合物中，所述细胞的浓度为  $1 \times 10^3 - 1 \times 10^8$  个细胞/mL，较佳地  $1 \times 10^6 - 1 \times 10^7$  个细胞/mL。

10 在另一优选例中，所述药物组合物还包括免疫调节分子激动剂。

在另一优选例中，所述免疫调节分子激动剂选自下组：抗体、小分子化合物、合成或重组多肽、或其组合。

在另一优选例中，所述药物组合物还含有杀伤肿瘤细胞的其他药物 (如抗体药物、化疗药物或其他 CAR-T 药物)。

15 本发明第七方面提供了一种本发明第一方面所述的 CAR、本发明第二方面所述的核酸分子、本发明第三方面所述的载体、本发明第四方面所述的宿主细胞、或本发明第六方面所述的药物组合物的用途，用于制备杀伤肿瘤细胞的药物或制剂。

在另一优选例中，所述肿瘤细胞包括 CD19 阳性的肿瘤细胞。

在另一优选例中，所述肿瘤细胞包括 PSMA 阳性的肿瘤细胞。

20 在另一优选例中，所述肿瘤细胞来源于实体瘤。

在另一优选例中，所述实体瘤选自下组：乳腺癌、胰腺癌、结肠癌、胃癌、肺癌、肾细胞癌、肝癌、卵巢癌、食管腺癌、前列腺癌、宫颈癌、多发性骨肉瘤、黑色素瘤、鼻咽癌、或其组合。

25 本发明第八方面提供了一种用于杀伤肿瘤细胞的试剂盒，所述试剂盒含有容器，以及位于容器内的本发明第一方面所述的 CAR、本发明第二方面所述的核酸分子、本发明第三方面所述的载体、或本发明第四方面所述的宿主细胞。

在另一优选例中，所述试剂盒还含有标签或使用说明书。

本发明第九方面提供了一种杀伤肿瘤细胞的方法，包括：

30 给需要治疗的对象施用安全有效量的本发明第一方面所述的 CAR、本发明第二方面所述的核酸分子、本发明第三方面所述的载体、本发明第四方面所述的宿主细胞、或本发明第六方面所述的药物组合物。

在另一优选例中，所述对象包括人或非人哺乳动物。

在另一优选例中，所述非人哺乳动物包括啮齿动物(如小鼠、大鼠、兔)、灵长类动物(如猴)。

在另一优选例中，所述方法为非治疗性和非诊断性的。

5 本发明第十方面提供了一种治疗癌症或肿瘤的方法，包括：

给需要治疗的对象施用安全有效量的本发明第一方面所述的 CAR、本发明第二方面所述的核酸分子、本发明第三方面所述的载体、本发明第四方面所述的宿主细胞、或本发明第六方面所述的药物组合物。

在另一优选例中，所述肿瘤细胞包括 CD19 阳性的肿瘤细胞。

10 在另一优选例中，所述肿瘤细胞包括 PSMA 阳性的肿瘤细胞。

在另一优选例中，所述肿瘤包括实体瘤。

在另一优选例中，所述实体瘤选自下组：乳腺癌、胰腺癌、结肠癌、胃癌、肺癌、肾细胞癌、肝癌、卵巢癌、食管腺癌、前列腺癌、宫颈癌、多发性骨肉瘤、黑色素瘤、鼻咽癌、或其组合。

15

应理解，在本发明范围内中，本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合，从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅，在此不再一一赘述。

## 20 附图说明

图 1 显示了 GITRL-CAR 表达框架。

图 2 显示了 GITRL-CAR 在人原代 T 细胞中高效表达。

图 3 显示了 GITRL-CART 的抗肿瘤效果和增殖能力显著优于现有二代 CART。

图 4 显示了 GITRL 促进 CAR-T 细胞中 Th9 亚群的分化。

25 图 5 显示了 GITRL-CART 耗竭能力降低，持续性显著增强。

图 6 显示了 GITRL-CART 具备更强的体内抗肿瘤效果。

## 具体实施方式

30 本发明人通过广泛而深入的研究，经过大量筛选，意外地发现在 T 细胞或 NK 细胞中共表达 CAR 和免疫调节分子(比如 GITRL)，能够显著提高抗肿瘤(尤其是实体瘤)的活性。本发明的嵌合抗原受体(CAR) 可用于 PSMA 或 CD19 阳性



的肿瘤患者的治疗。在此基础上，本发明人完成了本发明。

本发明以 CAR-T 细胞为例，代表性地对本发明的工程化的免疫细胞进行详细说明。本发明的工程化的免疫细胞不限于上下文所述的 CAR-T 细胞，本发明的工程化的免疫细胞具有与上下文所述的 CAR-T 细胞相同或类似的技术特征和有益效果。具体地，当免疫细胞表达嵌合抗原受体 CAR 时，NK 细胞等同于 T 细胞(或 T 细胞可替换 NK 细胞)；当免疫细胞为 T 细胞时，TCR 等同于 CAR(或 CAR 可替换为 TCR)。

## 术语

为了可以更容易地理解本公开，首先定义某些术语。如本申请中所使用的，除非本文另有明确规定，否则以下术语中的每一个应具有下面给出的含义。在整个申请中阐述了其它定义。

术语“约”可以是指在本领域普通技术人员确定的特定值或组成的可接受误差范围内的值或组成，其将部分地取决于如何测量或测定值或组成。

如本文所用，“嵌合抗原受体(CAR)”是一种融合蛋白，其包含能够结合抗原的胞外结构域，与胞外结构域衍生自不同多肽的跨膜结构域，以及至少一个胞内结构域。“嵌合抗原受体(CAR)”也称为“嵌合受体”、“T-body”或“嵌合免疫受体(CIR)”。所述的“能够结合抗原的胞外结构域”是指能够结合某一抗原的任何寡肽或多肽。“胞内结构域”是指已知的作为传递信号以激活或抑制细胞内生物过程的结构域的任何寡肽或多肽。

如本文所用，“结构域”是指多肽中独立于其它区域且折叠成特异结构的区域。

如本文所用，“肿瘤抗原”是指具有抗原性的生物分子，其表达导致癌症。

如本文所用，术语“给予”和“处理”是指外源性药物、治疗剂、诊断剂或组合物应用于动物、人、受试者、细胞、组织、器官或生物流体。“给予”和“处理”可以指治疗、药物代谢动力学、诊断、研究和实验方法。细胞的处理包括试剂与细胞的接触、以及试剂与流体的接触、流体与细胞的接触。“给予”和“处理”还意指通过试剂、诊断、结合组合物或通过另一种细胞体外和离体处理。“处理”当应用于人、动物或研究受试者时，是指治疗处理、预防或预防性措施，研究和诊断；包括抗人 LAG-3 抗体与人或动物、受试者、细胞、组织、生理区室或生理流体的接触。

如本文所用，术语“治疗”指给予患者内用或外用治疗剂，包含本发明的

任何一种 CAR 及其组合物，所述患者具有一种或多种疾病症状，而已知所述治疗剂对这些症状具有治疗作用。通常，以有效缓解一种或多种疾病症状的治疗剂的量(治疗有效量)给予患者。

如本文所用，术语“任选”或“任选地”意味着随后所描述的事件或情况  
5 可以发生但不是必须发生。例如，“任选包含 1-3 个抗体重链可变区”是指特定序列的抗体重链可变区可以有但不是必须有，可以是 1 个、2 个或 3 个。

本发明所述的“序列同一性”表示当具有适当的替换、插入或缺失等突变的情况下最佳比对和比较时，两个核酸或两个氨基酸序列之间的同一性程度。  
本发明中所述的序列和其具有同一性的序列之间的序列同一性可以至少为  
10 85%、90%或 95%，优选至少为 95%。非限制性实施例包括 85%，86%，87%，88%，89%，90%，91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%，99%，100%。

### 免疫调节分子

免疫调节分子是由免疫细胞或其他细胞产生的对免疫应答发挥调节作用的物质，包括抗体、淋巴因子、多糖、多肽、溶菌酶甚至某些小分子化合物。  
15

在一优选实施方式中，本发明的免疫调节分子包括但不限于：GITRL、4-1BBL、CD40、LIGHT、B7.1、B7.2、OX40L、CD70。

在一优选实施方式中，本发明的免疫调节分子包括 GITRL。

在一优选实施方式中，本发明的 GITRL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO. :1 所示。  
20

### 肿瘤细胞表面抗原

本发明的肿瘤细胞表面抗原包括不限于 CD19、BCMA、CD38、PSMA、HER2、GPC3、Mesothelin、Claudin18.2、EGFR、EGFRVIII、CEA、GD2、IL13R、FAP、  
25 CD171。

以 CD19 和 PSMA 为例。

CD19 是参与 B 细胞活化与增殖的重要膜抗原之一，是所有 B 细胞共有的表面标志，B 细胞活化后不消失，是最重要的 B 细胞标记因子，同时 CD19 也是 B 细胞表面的传达信号复合体的构成部分。以 CD19 为靶向的 CAR-T 主要应用于 B 细胞恶性  
30 性肿瘤治疗领域。CD19 可广泛表达在多种 B 细胞恶性肿瘤细胞表面，却不在其他组织和血液细胞中表达，血液中也未曾检测到 CD19 可溶性蛋白的存在。因此它被

认为是 CAR-T 治疗 B 细胞肿瘤的理想靶点。临床试验结果显示，CD19 CAR-T 对急性 B-淋巴细胞白血病 (B-ALL) 的治愈率已经达到了 90%。

PSMA 是前列腺特异性膜表面抗原，在大多数前列腺癌组织中高表达，是前列腺癌的肿瘤相关抗原及诊断的新型标志物。

5

### 抗原结合结构域

在本发明中，嵌合抗原受体 CAR 的抗原结合结构域特异性结合于肿瘤细胞表面抗原。

在一优选实施方式中，本发明的嵌合抗原受体 CAR 的抗原结合结构域靶向 CD19  
10 和/或 PSMA。

### 铰链区和跨膜区

对于铰链区和跨膜区(跨膜结构域)，CAR 可被设计以包括融合至 CAR 的胞外结构域的跨膜结构域。在一个实施方式中，使用天然与 CAR 中的结构域之一相关联的  
15 跨膜结构域。在一些例子中，可选择跨膜结构域，或通过氨基酸置换进行修饰，以避免将这样的结构域结合至相同或不同的表面膜蛋白的跨膜结构域，从而最小化与受体复合物的其他成员的相互作用。

跨膜结构域可源于天然来源或合成来源。在天然来源中，该结构域可源于任何膜结合蛋白或跨膜蛋白。优选地，本发明的 CAR 中的铰链区为 CD8a 的铰链区，本  
20 发明的跨膜区为 CD8a 的跨膜区。

### 胞内结构域

本发明的 CAR 的胞内结构域或另外的细胞内信号传导结构域是造成其中已放置 CAR 的免疫细胞的至少一种正常效应子功能的活化的原因。术语“效应子功能”  
25 指的是细胞的专有功能。例如，T 细胞的效应子功能可为包括细胞因子分泌的细胞溶解活性或辅助活性。因此术语“细胞内信号传导结构域”指的是转导效应子功能信号并指导细胞实施专有功能的蛋白部分。尽管通常可使用整个细胞内信号传导结构域，但在很多例子中，不必使用整个链。就使用细胞内信号传导结构域的截短部分而言，这种截短部分可用于代替完整的链，只要它转导效应子功能信号。术语细胞内信号传导结构域因此指包括足以转导效应子功能信号的细胞内信号传导结构域的任何截短部分。  
30



用于本发明的 CAR 的细胞内信号传导结构域的优选例子包括 T 细胞受体 (TCR) 的胞浆序列和协同行动以在抗原受体结合后开始信号转导的共受体, 以及这些序列的任何衍生物或变体和具有相同的功能能力的任何合成序列。

在优选的实施方式中, CAR 的胞浆结构域可被设计以本身包括 CD3- $\zeta$  信号传导结构域, 或可与在本发明的 CAR 的内容中有用的任何其他期望的胞浆结构域(一个或多个)联合。例如, CAR 的胞浆结构域可包括 CD3  $\zeta$  链部分和共刺激信号传导区。共刺激信号传导区指的是包括共刺激分子的细胞内结构域的一部分 CAR。共刺激分子是淋巴细胞对抗原的有效应答所需的细胞表面分子, 而不是抗原受体或它们的配体。优选地, 包括 4-1BB (CD137) 等。

10 本发明的 CAR 的胞浆信号传导部分内的胞浆信号传导序列可以随机或以规定的顺序相互连接。任选地, 短的寡肽或多肽连接体, 优选长度在 2 和 10 个氨基酸, 可形成该连接。甘氨酸-丝氨酸双联体提供了特别合适的连接体。

在一个实施方式中, 本发明的 CAR 中的胞浆结构域被设计以包括 4-1BB 的信号传导结构域(共刺激分子)以及 CD3  $\zeta$  的信号传导结构域。

15

### 嵌合抗原受体 (CAR)

嵌合免疫抗原受体 (Chimeric antigen receptors, CARs) 由胞外抗原识别区域, 通常是 scFv (single-chain variable fragment), 跨膜区以及胞内共刺激信号区域组成。CARs 的设计经历了以下过程: 第一代 CAR 只有一个胞内信号组份 CD3  $\zeta$  或者 Fc  $\gamma$  RI 分子, 由于胞内只有一个活化结构域, 因此它只能引起短暂的 T 细胞增殖和较少的细胞因子分泌, 而并不能提供长时间的 T 细胞增殖信号和持续的体内抗肿瘤效应, 所以并没有取得很好地临床疗效。第二代 CARs 在原有结构基础上引入一个共刺激分子, 如 CD28、4-1BB、OX40、ICOS, 与一代 CARs 相比功能有很大提高, 进一步加强 CAR-T 细胞的持续性和对肿瘤细胞的杀伤能力。在二代 CARs 基础上串联一些新的免疫共刺激分子如 CD27、CD134, 发展成为三代和四代 CARs。

25 CARs 的胞外段可识别一个特异的抗原, 随后通过胞内结构域转导该信号, 引起细胞的活化增殖、细胞溶解毒性和分泌细胞因子, 进而清除靶细胞。首先分离病人自体细胞(或者异源供体), 激活并进行基因改造产生 CAR 的免疫细胞, 随后注入同一病人体内。这种方式患移植物抗宿主病概率极低, 抗原被免疫细胞以非 MHC 30 限制方式识别。

CAR-免疫细胞治疗在血液恶性肿瘤治疗中取得了非常高的临床反应率, 这样的

高反应率是以往任何一种治疗手段都无法达到的，在世界各引发了临床研究的热潮。

具体地，本发明的嵌合抗原受体(CAR)包括细胞外结构域、跨膜结构域、和细胞内结构域。胞外结构域包括靶-特异性结合元件(也称为抗原结合结构域)。细胞  
5 内结构域包括共刺激信号传导区和/或  $\zeta$  链部分。共刺激信号传导区指包括共刺激分子的细胞内结构域的一部分。共刺激分子为淋巴细胞对抗原的有效应答所需要的细胞表面分子，而不是抗原受体或它们的配体。

在 CAR 的胞外结构域和跨膜结构域之间，或在 CAR 的胞浆结构域和跨膜结构域之间，可并入接头。如本文所用的，术语“接头”通常指起到将跨膜结构域连接至  
10 多肽链的胞外结构域或胞浆结构域作用的任何寡肽或多肽。接头可包括 0-300 个氨基酸，优选地 2 至 100 个氨基酸和最优选地 3 至 50 个氨基酸。

本发明的 CAR 当在 T 细胞中表达时，能够基于抗原结合特异性进行抗原识别。当其结合其关联抗原时，影响肿瘤细胞，导致肿瘤细胞不生长、被促使死亡或以其他方式被影响，并导致患者的肿瘤负荷缩小或消除。抗原结合结构域优选与来自共  
15 刺激分子和/或  $\zeta$  链中的一个或多个的细胞内结构域融合。优选地，抗原结合结构域与 4-1BB 信号传导结构域和/或 CD3  $\zeta$  信号结构域组合的细胞内结构域融合。

如本文所用，“抗原结合结构域”“单链抗体片段”均指具有抗原结合活性的 Fab 片段，Fab' ' 片段，F(ab' ' )<sub>2</sub> 片段，或单一 Fv 片段。Fv 抗体含有抗体重链可变区、轻链可变区，但没有恒定区，并具有全部抗原结合位点的最小抗体片段。  
20 一般的，Fv 抗体还包含 VH 和 VL 结构域之间的多肽接头，且能够形成抗原结合所需的结构。抗原结合结构域通常是 scFv(single-chain variable fragment)。scFv 的大小一般是一个完整抗体的 1/6。单链抗体优选是由一条核苷酸链编码的一条氨基酸链序列。作为本发明的优选方式，所述 scFv 包含特异性识别肿瘤高表达抗原 CD19 和 PSMA 的抗体，较佳地为单链抗体。

25 在本发明中，本发明的 scFv 还包括其保守性变异体，指与本发明 scFv 的氨基酸序列相比，有至多 10 个，较佳地至多 8 个，更佳地至多 5 个，最佳地至多 3 个氨基酸被性质相似或相近的氨基酸所替换而形成多肽。

在本发明中，所述添加、缺失、修饰和/或取代的氨基酸数量，优选为不超过初始氨基酸序列总氨基酸数量的 40%，更优选为不超过 35%，更优选为 1-33%，更  
30 优选为 5-30%，更优选为 10-25%，更优选为 15-20%。

在本发明中，所述添加、缺失、修饰和/或取代的氨基酸数量通常是 1、2、3、



4 或 5 个，较佳地为 1-3 个，更佳地为 1-2 个，最佳地为 1 个。

对于铰链区和跨膜区(跨膜结构域)，CAR 可被设计以包括融合至 CAR 的胞外结构域的跨膜结构域。在一个实施方式中，使用天然与 CAR 中的结构域之一相关联的跨膜结构域。在一些例子中，可选择跨膜结构域，或通过氨基酸置换进行修饰，以  
5 避免将这样的结构域结合至相同或不同的表面膜蛋白的跨膜结构域，从而最小化与受体复合物的其他成员的相互作用。

本发明的 CAR 的胞外结构域包括靶向肿瘤细胞表面抗原的抗体单链可变区序列白，优选具有特定序列的靶向肿瘤细胞表面抗原的抗体单链可变区序列。

在本发明中，本发明的 CAR 中的胞内结构域包括 CD8a 的跨膜区、4-1BB 的共  
10 刺激因子、CD3  $\zeta$  的信号传导结构域。

在本发明的一优选实施方式中，所述 CAR 的氨基酸序列(含免疫调节分子(比如 GITRL)的 CAR 的氨基酸序列)如 SEQ ID NO. :2 或 3 所示：

含免疫调节分子(比如 GITRL)的 PSMA CAR 氨基酸序列：

MALPVTALLLPLALLLHAARPDI VMTQSPSSLSASV GDRVTITCKASQDCGTAVDWYQQKPGKAPK  
15 LLIYWASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQPEDFADYFCQQYNSYPLTFGGGTKLEIKGGGSGGGG  
SGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKTSGYTFTEYTIHWVKQASGKGLEWIGNINPNNGGTTYNQKFE  
DRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAAGWNFDYWGQGTTVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLS  
LRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQ  
EEDGCSCRFPEEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRK  
20 NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPREGRGSLTTCGD  
VEENPGPTLHPSPITCEFLFSTALISPKMCLSHLENMPLSHSRTQGAQRSSWKLWLFCSIVMLLFLCSFSW  
LIFIFLQLETAKEPCMAKFGPLPSKWQMASSEPPCVNKVSDWKLEILQNGLYLIYGQVAPNANYNDVAPFE  
VRLYKNKDMIQTLTNKSKIQNVGGTYELHVGDTIDLIFNSEHQVLKNNTYWGIIILLANPQFIS (SEQ ID  
NO. :2)

25 含免疫调节分子(比如 GITRL)的 CD19 CAR 氨基酸序列：

MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTV  
KLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGK  
PGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIVGSETTYNS  
ALKSRLTI IKDNSKSQVFLKMNSLQTD DTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGT SVTVSSAAATTPAPRPP  
30 TPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIF  
KQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRG



RDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPP  
 REGRGSLLTCGDVEENPGPTLHPSPITCEFLFSTALISPKMCLSHLENMPLSHSRTQGAQRSSWKLWLFCS  
 IVMLLFLCSFSWLIFIFLQLETAKEPCMAKFGPLPSKWQMASSEPPCVNKVSDWKLEILQNGLYLIYGQVA  
 PNANYNDVAPFEVRLYKNKDMIQTLTNKSKIQNVGGTYELHVGDTIDLIFNSEHQVLKNNTYWGIILLANP  
 5 QFIS (SEQ ID NO. :3)

在本发明的一优选实施方式中，所述 CAR 的核苷酸序列(含免疫调节分子(比如 GITRL)的 CAR 的核苷酸序列)如 SEQ ID NO. :5 或 6 所示：

含免疫调节分子(比如 GITRL)的 PSMA CAR 的核苷酸序列：

10 atggccttaccagtgaccgccttgctcctgcccgtggccttgctgctccacgccgccaggccgGAC  
 ATCGTGATGACCCAGTCCCCCTCCTCCCTGTCTGCCTCCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACATGCAAGGC  
 CTCCCAGGATTGTGGCACCGCCGTGGACTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCT  
 ACTGGGCCTCCACCAGACACACCGGCGTGCCTGACAGATTCACCGGCTCCGGCTCTGGCACCGACTTCACC  
 CTGACCATCTCCAGCCTGCAGCCTGAGGACTTCGCCGACTACTTCTGCCAGCAGTACAACCTCCTACCCTCT  
 15 GACCTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAAGGCGGAGGCGGATCAGGTGGTGGCGGATCTGGAGGTG  
 GCGGAAGCGAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGATCTCC  
 TGCAAGACCTCCGGCTACACCTTCACCGAGTACACCATCCACTGGGTGAAACAGGCCTCCGGCAAGGGCCT  
 GGAATGGATCGGCAACATCAACCCTAACAACGGCGGCACCACCTACAACCAGAAGTTCGAGGACCGGGCCA  
 CCCTGACCGTGGACAAGTCCACCTCCACCGCCTACATGGAAGTGTCTCCCTGCGGTCTGAGGACACCGCC  
 20 GTGTACTACTGCGCCGCTGGCTGGAAGTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCACAGTGACAGTCTCGAGCAC  
 CACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCACAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAG  
 AGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGACACAGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATC  
 TGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTTTACTGCAAACGGGG  
 CAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATG  
 25 GCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCA  
 GACGCCCCCGCGTACAAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTA  
 CGATGTTTTTGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGG  
 AAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAG  
 CGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGC  
 30 CCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCgagggcagaggcagtcctgctgacatgcccgtgacgtggaagaga  
 atcccggccctACATTGCATCCTTCACCCATCACTTGTGAATTTTTGTTTTCCACAGCTCTCATTCTCCA

AAAATGTGTTTGAGCCACTTGGAAAATATGCCTTTAAGCCATTCAAGAACTCAAGGAGCTCAGAGATCATC  
 CTGGAAGCTGTGGCTCTTTTGCTCAATAGTTATGTTGCTATTTCTTTGCTCCTTCAGTTGGCTAATCTTTA  
 TTTTCTCCAATTAGAGACTGCTAAGGAGCCCTGTATGGCTAAGTTTGGACCATTACCCTCAAATGGCAA  
 ATGGCATCTTCTGAACCTCCTTGCGTGAATAAGGTGTCTGACTGGAAGCTGGAGATACTTCAGAATGGCTT  
 5 ATATTTAATTTATGGCCAAGTGGCTCCCAATGCAAACACTACAATGATGTAGCTCCTTTTGAGGTGCGGCTGT  
 ATAAAAACAAAGACATGATACAAACTCTAACAAACAAATCTAAAATCCAAAATGTAGGAGGGACTTATGAA  
 TTGCATGTTGGGGACACCATAGACTTGATATTCAACTCTGAGCATCAGGTTCTAAAAATAATACATACTG  
 GGTATCATTTTACTAGCAAATCCCAATTCATCTCCTAA (SEQ ID NO. : 5)

10 含免疫调节分子(比如 GITRL)的 CD19 CAR 的核苷酸序列:

ATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTCTGCTCTGTGAGTTACCACACCCAGCATTCCCTCCTGATCCCA  
 GACATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGCAG  
 GGCAAGTCAGGACATTAGTAAATATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAAGTGTAAACTCCTGA  
 TCTACCATACATCAAGATTAACTCAGGAGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGATTAT  
 15 TCTCTCACCATTAGCAACCTGGAGCAAGAAGATATTGCCACTTACTTTTGCCAACAGGGTAATACGCTTCC  
 GTACACGTTCCGAGGGGGGACTAAGTTGGAAATAACAGGCTCCACCTCTGGATCCGGCAAGCCCGGATCTG  
 GCGAGGGATCCACCAAGGGCGAGGTGAAACTGCAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGC  
 CTGTCCGTCACATGCACTGTCTCAGGGGTCTCATTACCCGACTATGGTGTAAGCTGGATTCGCCAGCCTCC  
 ACGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTAATATGGGGTAGTGAAACCACATACTATAATTCAGCTCTCAAAT  
 20 CCAGACTGACCATCATCAAGGACAACTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCAAACCTGAT  
 GACACAGCCATTTACTACTGTGCCAAACATTATTACTACGGTGGTAGCTATGCTATGGACTACTGGGGTCA  
 AGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCGGCCGCAACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGGCGC  
 CCACCATCGCGTCACAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGGCGGGGGGCGCAGTGCAC  
 ACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCTTCT  
 25 CCTGTCACTGGTTATCACCTTTACTGCAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCAT  
 TTATGAGACCAGTACAAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGA  
 GGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGGTACAAGCAGGGCCAGAACCAGCT  
 CTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTG  
 AGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATG  
 30 GCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCA  
 GGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCgagggea

gaggcagtcctgctgacatgcggtgacgtggaagagaatcccggccctACATTGCATCCTTCACCCATCACT  
 TGTGAATTTTTGTTTTCCACAGCTCTCATTCTCCAAAAATGTGTTTGAGCCACTTGAAAAATATGCCTTT  
 AAGCCATTCAAGAACTCAAGGAGCTCAGAGATCATCCTGGAAGCTGTGGCTCTTTTGCTCAATAGTTATGT  
 TGCTATTTCTTTGCTCCTTCAGTTGGCTAATCTTTATTTTTCTCCAATTAGAGACTGCTAAGGAGCCCTGT  
 5 ATGGCTAAGTTTGGACCATTACCCTCAAAATGGCAAATGGCATCTTCTGAACCTCCTTGCGTGAATAAGGT  
 GTCTGACTGGAAGCTGGAGATACTTCAGAATGGCTTATATTTAATTTATGGCCAAGTGGCTCCCAATGCAA  
 ACTACAATGATGTAGCTCCTTTTGAGGTGCGGCTGTATAAAAAACAAAGACATGATACAAACTCTAACAAAC  
 AAATCTAAAATCCAAAATGTAGGAGGGACTTATGAATTGCATGTTGGGGACACCATAGACTTGATATTCAA  
 CTCTGAGCATCAGGTTCTAAAAAATAATACATACTGGGGTATCATTTTACTAGCAAATCCCCAATTCATCT  
 10 CCTAA (SEQ ID NO. :6)。

### 嵌合抗原受体 T 细胞 (CAR-T 细胞)

如本文所用，术语“CAR-T 细胞”、“CAR-T”、“本发明 CAR-T 细胞”均指  
 本发明所述的 CAR-T 细胞，本发明 CAR-T 细胞可靶向肿瘤表面抗原(如 CD19、PSMA)，  
 15 用来治疗肿瘤细胞表面抗原(如 CD19、PSMA)高表达或阳性的肿瘤，尤其是实体瘤。

CAR-T 细胞较其它基于 T 细胞的治疗方式存在以下优势：(1)CAR-T 细胞的作用  
 过程不受 MHC 的限制；(2)鉴于很多肿瘤细胞表达相同的肿瘤抗原，针对某一种肿  
 瘤抗原的 CAR 基因构建一旦完成，便可以广泛利用；(3)CAR 既可以利用肿瘤蛋  
 白质抗原，又可利用糖脂类非蛋白质抗原，扩大了肿瘤抗原的靶点范围；(4)使用  
 20 患者自体细胞降低了排异反应的风险；(5)CAR-T 细胞具有免疫记忆功能，可以长  
 期在体内存活。

在本发明中，本发明的 CAR 包含(i)胞外结构域，其包含靶向肿瘤细胞表面  
 抗原的抗体单链可变区序列；(ii)跨膜域；(iii)共刺激因子；和(iv) CD3  $\zeta$  的  
 信号传导结构域；以及；(v)自剪切蛋白；(vi)免疫调节分子(比如 GITRL、4-1BBL、  
 25 CD40、LIGHT、B7.1、B7.2、OX40L、CD70)。

### 嵌合抗原受体 NK 细胞 (CAR-NK 细胞)

如本文所用，术语“CAR-NK 细胞”、“CAR-NK”、“本发明 CAR-NK 细胞”均  
 指本发明所述的 CAR-NK 细胞。本发明 CAR-NK 细胞可靶向肿瘤表面抗原(如 CD19、  
 30 PSMA)，用于治疗肿瘤细胞表面抗原(如 CD19、PSMA)高表达或阳性的肿瘤，尤其  
 是实体瘤。



自然杀伤(NK)细胞是一类主要的免疫效应细胞,通过非抗原特异性途径去保护机体免受病毒感染和肿瘤细胞的侵袭。通过工程化(基因修饰)的NK细胞可能获得新的功能,包括特异性识别肿瘤抗原的能力及具有增强的抗肿瘤细胞毒作用。

与自体 CAR-T 细胞相比, CAR-NK 细胞还具有一下优点,例如:(1)通过释放穿孔素和颗粒酶直接杀伤肿瘤细胞,而对机体正常的细胞没有杀伤作用;(2)它们释放很少量的细胞因子从而降低了细胞因子风暴的危险;(3)体外极易扩增及发展为“现成的”产品。除此之外,与 CAR-T 细胞治疗类似。

### 外源 T 细胞抗原受体

如本文所用,外源 T 细胞抗原受体(T cell receptor, TCR)为通过基因转移技术从肿瘤反应性 T 细胞中克隆出 TCR 的  $\alpha$  链和  $\beta$  链,通过基因工程的手段,以慢病毒或逆转录病毒为载体,外源性转入到 T 细胞内的 TCR。

外源 TCR 修饰的 T 细胞能够特异性识别和杀伤肿瘤细胞,并通过优化 TCR 与肿瘤性特异性抗原的亲和力,可以提高 T 细胞与肿瘤的亲和力,提高抗肿瘤效果。

15

### 载体

编码期望分子的核酸序列可利用在本领域中已知的重组方法获得,诸如例如通过从表达基因的细胞中筛选文库,通过从已知包括该基因的载体中得到该基因,或通过利用标准的技术,从包含该基因的细胞和组织中直接分离。可选地,感兴趣的基因可被合成生产。

本发明也提供了其中插入本发明的表达盒的载体。源于逆转录病毒诸如慢病毒的载体是实现长期基因转移的合适工具,因为它们允许转基因长期、稳定的整合并且其在子细胞中增殖。慢病毒载体具有超过源自致癌逆转录病毒诸如鼠科白血病病毒的载体的优点,因为它们可转导非增殖的细胞,诸如肝细胞。它们也具有低免疫原性的优点。

简单概括,通常可操作地连接本发明的表达盒或核酸序列至启动子,并将其并入表达载体。该载体适合于复制和整合真核细胞。典型的克隆载体包含可用于调节期望核酸序列表达的转录和翻译终止子、初始序列和启动子。

本发明的表达构建体也可利用标准的基因传递方案,用于核酸免疫和基因疗法。基因传递的方法在本领域中是已知的。见例如美国专利号 5,399,346、5,580,859、5,589,466,在此通过引用全文并入。在另一个实施方式中,本发明提

供了基因疗法载体。

该核酸可被克隆入许多类型的载体。例如，该核酸可被克隆入如此载体，其包括但不限于质粒、噬菌粒、噬菌体衍生物、动物病毒和粘粒。特定的感兴趣载体包括表达载体、复制载体、探针产生载体和测序载体。

5 进一步地，表达载体可以以病毒载体形式提供给细胞。病毒载体技术在本领域中是公知的并在例如 Sambrook 等 (2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York) 和其他病毒学和分子生物学手册中进行了描述。可用作载体的病毒包括但不限于逆转录病毒、腺病毒、腺伴随病毒、疱疹病毒和慢病毒。通常，合适的载体包含在至少一种有机体中起作用的复制  
10 起点、启动子序列、方便的限制酶位点和一个或多个可选择的标记(例如，W001/96584; W001/29058; 和美国专利号 6,326,193)。

已经开发许多基于病毒的系统，用于将基因转移入哺乳动物细胞。例如，逆转录病毒提供了用于基因传递系统的方便的平台。可利用在本领域中已知的技术将选择的基因插入载体并包装入逆转录病毒颗粒。该重组病毒可随后被分离和传递至  
15 体内或离体的对象细胞。许多逆转录病毒系统在本领域中是已知的。在一些实施方式中，使用腺病毒载体。许多腺病毒载体在本领域中是已知的。在一个实施方式中，使用慢病毒载体。

额外的启动子元件，例如增强子，可以调节转录开始的频率。通常地，这些位于起始位点上游的 30-110bp 区域中，尽管最近已经显示许多启动子也包含起始  
20 位点下游的功能元件。启动子元件之间的间隔经常是柔性的，以便当元件相对于另一个被倒置或移动时，保持启动子功能。在胸苷激酶(tk)启动子中，启动子元件之间的间隔可被增加隔开 50bp，活性才开始下降。取决于启动子，表现出单个元件可合作或独立地起作用，以启动转录。

合适的启动子的一个例子为即时早期巨细胞病毒(CMV)启动子序列。该启动子  
25 序列为能够驱动可操作地连接至其上的任何多核苷酸序列高水平表达的强组成型启动子序列。合适的启动子的另一个例子为延伸生长因子-1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ )。然而，也可使用其他组成型启动子序列，包括但不限于类人猿病毒 40 (SV40) 早期启动子、小鼠乳癌病毒(MMTV)、人免疫缺陷病毒(HIV)长末端重复(LTR)启动子、MoMuLV 启动子、鸟类白血病毒启动子、艾伯斯坦-巴尔(Epstein-Barr)病毒即时早期启动  
30 子、鲁斯氏肉瘤病毒启动子、以及人基因启动子，诸如但不限于肌动蛋白启动子、肌球蛋白启动子、血红素启动子和肌酸激酶启动子。进一步地，本发明不应被限于



组成型启动子的应用。诱导型启动子也被考虑为本发明的一部分。诱导型启动子的使用提供了分子开关，其能够当这样的表达是期望的时，打开可操作地连接诱导型启动子的多核苷酸序列的表达，或当表达是不期望的时关闭表达。诱导型启动子的例子包括但不限于金属硫蛋白启动子、糖皮质激素启动子、孕酮启动子和四环素启动子。

5 为了评估 CAR 多肽或其部分的表达，被引入细胞的表达载体也可包含可选择的标记基因或报道基因中的任一个或两者，以便于从通过病毒载体寻求被转染或感染的细胞群中鉴定和选择表达细胞。在其他方面，可选择的标记可被携带在单独一段 DNA 上并用于共转染程序。可选择的标记和报道基因两者的侧翼都可具有适当的调节序列，以便能够在宿主细胞中表达。有用的可选择标记包括例如抗生素抗性基因，诸如 neo 等等。

10 报道基因用于鉴定潜在转染的细胞并用于评价调节序列的功能性。通常地，报道基因为以下基因：其不存在于受体有机体或组织或由受体有机体或组织进行表达，并且其编码多肽，该多肽的表达由一些可容易检测的性质例如酶活性清楚表示。在 DNA 已经被引入受体细胞后，报道基因的表达在合适的时间下进行测定。合适的报道基因可包括编码荧光素酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶、氯霉素乙酰转移酶、分泌型碱性磷酸酶或绿色萤光蛋白的基因(例如，Ui-Tei 等，2000FEBS Letters479:79-82)。合适的表达系统是公知的并可利用已知技术制备或从商业上获得。通常，显示最高水平的报道基因表达的具有最少 5 个侧翼区的构建体被鉴定为启动子。这样的启动子区可被连接至报道基因并用于评价试剂调节启动子-驱动转录的能力。

20 将基因引入细胞和将基因表达入细胞的方法在本领域中是已知的。在表达载体的内容中，载体可通过在本领域中的任何方法容易地引入宿主细胞，例如，哺乳动物、细菌、酵母或昆虫细胞。例如，表达载体可通过物理、化学或生物学手段转移入宿主细胞。

25 将多核苷酸引入宿主细胞的物理方法包括磷酸钙沉淀、脂质转染法、粒子轰击、微注射、电穿孔等等。生产包括载体和/或外源核酸的细胞的方法在本领域中是公知的。见例如 Sambrook 等 (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)。将多核苷酸引入宿主细胞的优选方法为磷酸钙转染。

30 将感兴趣的多核苷酸引入宿主细胞的生物学方法包括使用 DNA 和 RNA 载体。病毒载体，特别是逆转录病毒载体，已经成为最广泛使用的将基因插入哺乳动物例



如人细胞的方法。其他病毒载体可源自慢病毒、痘病毒、单纯疱疹病毒 I、腺病毒和腺伴随病毒等等。见例如美国专利号 5,350,674 和 5,585,362。

将多核苷酸引入宿主细胞的化学手段包括胶体分散系统，诸如大分子复合物、纳米胶囊、微球、珠；和基于脂质的系统，包括水包油乳剂、胶束、混合胶束和脂质体。用作体外和体内传递工具 (delivery vehicle) 的示例性胶体系统为脂质体 (例如，人造膜囊)。

在使用非病毒传递系统的情况下，示例性传递工具为脂质体。考虑使用脂质制剂，以将核酸引入宿主细胞 (体外、离体 (ex vivo) 或体内)。在另一方面，该核酸可与脂质相关联。与脂质相关联的核酸可被封装入脂质体的水性内部中，散布在脂质体的脂双层内，经与脂质体和寡核苷酸两者都相关联的连接分子附接至脂质体，陷入脂质体，与脂质体复合，分散在包含脂质的溶液中，与脂质混合，与脂质联合，作为悬浮液包含在脂质中，包含在胶束中或与胶束复合，或以其他方式与脂质相关联。与组合物相关联的脂质、脂质/DNA 或脂质/表达载体不限于溶液中的任何具体结构。例如，它们可存在于双分子层结构中，作为胶束或具有“坍塌的 (collapsed)”结构。它们也可简单地被散布在溶液中，可能形成大小或形状不均一的聚集体。脂质为脂肪物质，其可为天然发生或合成的脂质。例如，脂质包括脂肪小滴，其天然发生在细胞质以及包含长链脂肪族烃和它们的衍生物诸如脂肪酸、醇类、胺类、氨基醇类和醛类的该类化合物中。

在本发明的一个优选地实施方式中，所述载体为慢病毒载体。

20

## 制剂

本发明提供了一种本发明第一方面所述的 CAR、本发明第二方面所述的核酸分子、本发明第三方面所述的载体、或本发明第四方面所述的宿主细胞，以及药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。在一个实施方式中，所述制剂为液态制剂。优选地，所述制剂为注射剂。优选地，所述制剂中所述 CAR-T 细胞的浓度为  $1 \times 10^3 - 1 \times 10^8$  个细胞/Kg 体重，更优地  $1 \times 10^6 - 1 \times 10^7$  个细胞/Kg 体重。

在一个实施方式中，所述制剂可包括缓冲液诸如中性缓冲盐水、硫酸盐缓冲盐水等等；碳水化合物诸如葡萄糖、甘露糖、蔗糖或葡聚糖、甘露醇；蛋白质；多肽或氨基酸诸如甘氨酸；抗氧化剂；螯合剂诸如 EDTA 或谷胱甘肽；佐剂 (例如，氢氧化铝)；和防腐剂。本发明的制剂优选配制用于静脉内施用。

30

## 治疗性应用

本发明包括用编码本发明表达盒的慢病毒载体 (LV) 转导的细胞 (例如, T 细胞) 进行的治疗性应用。转导的 T 细胞可靶向肿瘤细胞的标志物 (比如 CD19、和/或 PSMA) 蛋白, 协同激活 T 细胞, 引起细胞免疫应答, 从而显著提高其对来自恶性  
5 肿瘤的肿瘤细胞的杀伤效率。

因此, 本发明也提供了刺激对哺乳动物的靶细胞群或组织的 T 细胞-介导的免疫应答的方法, 其包括以下步骤: 给哺乳动物施用本发明的 CAR-T 细胞。

在一个实施方式中, 本发明包括一类细胞疗法, 分离病人自体 T 细胞 (或者异源供体), 激活并进行基因改造产生 CAR-T 细胞, 随后注入同一病人体内。  
10 这种方式患移植物抗宿主病概率极低, 抗原被 T 细胞以无 MHC 限制方式识别。此外, 一种 CAR-T 就可以治疗表达该抗原的所有癌症。不像抗体疗法, CAR-T 细胞能够体内复制, 产生可导致持续肿瘤控制的长期持久性。

在一个实施方式中, 本发明的 CAR-T 细胞可经历稳固的体内 T 细胞扩展并可持续延长的时间量。另外, CAR 介导的免疫应答可为过继免疫疗法步骤的一部分, 其中 CAR-修饰 T 细胞诱导对 CAR 中的抗原结合结构域特异性的免疫应答。  
15 例如, 肿瘤细胞的标志物 (比如 CD19、和/或 PSMA) 的 CAR-T 细胞引起抗表达肿瘤细胞的标志物 (比如 CD19、和/或 PSMA) 的细胞的特异性免疫应答。

尽管本文公开的数据具体公开了包括靶向肿瘤细胞表面抗原的抗体单链可变区序列、铰链和跨膜区、和 4-1BB 和 CD3  $\zeta$  信号传导结构域、T2A、免疫调节  
20 分子 (比如 GITRL、4-1BBL、CD40、LIGHT、B7.1、B7.2、OX40L、CD70) 的慢病毒载体, 但本发明应被解释为包括对构建体组成部分中的每一个的任何数量的变化。

可治疗的癌症包括没有被血管化或基本上还没有被血管化的肿瘤, 以及血管化的肿瘤。癌症可包括非实体瘤 (诸如血液学肿瘤, 例如白血病和淋巴瘤) 或  
25 可包括实体瘤。用本发明的 CAR 治疗的癌症类型包括但不限于癌、胚细胞瘤和肉瘤, 和某些白血病或淋巴恶性肿瘤、良性和恶性肿瘤、和恶性瘤, 例如肉瘤、癌和黑素瘤。也包括成人肿瘤/癌症和儿童肿瘤/癌症。

血液学癌症为血液或骨髓的癌症。血液学 (或血原性) 癌症的例子包括白血病, 包括急性白血病 (诸如急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞白血病、急性骨髓性白血病和成髓细胞性、前髓细胞性、粒-单核细胞型、单核细胞性和红白血  
30 病)、慢性白血病 (诸如慢性髓细胞 (粒细胞性) 白血病、慢性骨髓性白血病和



慢性淋巴细胞白血病)、真性红细胞增多症、淋巴瘤、霍奇金氏疾病、非霍奇金氏淋巴瘤(无痛和高等级形式)、多发性骨髓瘤、瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症、重链疾病、骨髓增生异常综合征、多毛细胞白血病和脊髓发育不良。

5 实体瘤为通常不包含囊肿或液体区的组织的异常肿块。实体瘤可为良性或恶性的。不同类型的实体瘤以形成它们的细胞类型命名(诸如肉瘤、癌和淋巴瘤)。实体瘤诸如肉瘤和癌的例子包括纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤间皮瘤、淋巴恶性肿瘤、胰腺癌卵巢癌。

本发明的 CAR-修饰 T 细胞也可用作对哺乳动物离体免疫和/或体内疗法的疫苗类型。优选地,哺乳动物为人。

10 对于离体免疫,以下中的至少一项在将细胞施用进入哺乳动物前在体外发生: i) 扩增细胞, ii) 将编码 CAR 的核酸引入细胞, 和/或 iii) 冷冻保存细胞。

离体程序在本领域中是公知的,并在以下更完全地进行讨论。简单地说,细胞从哺乳动物(优选人)中分离并用表达本文公开的 CAR 的载体进行基因修饰(即,体外转导或转染)。CAR-修饰的细胞可被施用给哺乳动物接受者,以提供15 治疗益处。哺乳动物接受者可为人,和 CAR-修饰的细胞可相对于接受者为自体的。可选地,细胞可相对于接受者为同种异基因的、同基因的(syngeneic)或异种的。

除了就离体免疫而言使用基于细胞的疫苗之外,本发明也提供了体内免疫以引起针对患者中抗原的免疫应答的组合物和方法。

20 本发明提供了治疗肿瘤的方法,其包括施用给需要其的对象治疗有效量的本发明的 CAR-修饰的 T 细胞。

本发明的 CAR-修饰的 T 细胞可被单独施用或作为药物组合物与稀释剂和/或与其他组分或其他细胞因子或细胞群结合施用。简单地说,本发明的药物组合物可包括如本文所述的靶细胞群,与一种或多种药学或生理学上可接受载体、25 稀释剂或赋形剂结合。这样的组合物可包括缓冲液诸如中性缓冲盐水、硫酸盐缓冲盐水等等;碳水化合物诸如葡萄糖、甘露糖、蔗糖或葡聚糖、甘露醇;蛋白质;多肽或氨基酸诸如甘氨酸;抗氧化剂;螯合剂诸如 EDTA 或谷胱甘肽;佐剂(例如,氢氧化铝);和防腐剂。本发明的组合物优选配制用于静脉内施用。

本发明的药物组合物可以以适于待治疗(或预防)的疾病的方式施用。施用的数量和频率将由这样的因素确定,如患者的病症、和患者疾病的类型和严重30 度——尽管适当的剂量可由临床试验确定。



当指出“免疫学上有效量”、“抗肿瘤有效量”、“肿瘤-抑制有效量”或“治疗量”时，待施用的本发明组合物的精确量可由医师确定，其考虑患者(对象)的年龄、重量、肿瘤大小、感染或转移程度和病症的个体差异。可通常指出：包括本文描述的 T 细胞的药物组合物可以以  $10^4$  至  $10^9$  个细胞/kg 体重的剂量，优选  $10^5$  至  $10^6$  个细胞/kg 体重的剂量(包括那些范围内的所有整数值)施用。T 细胞组合物也可以以这些剂量多次施用。细胞可通过使用免疫疗法中公知的注入技术(见例如 Rosenberg 等, NewEng. J. of Med. 319:1676, 1988)施用。对于具体患者的最佳剂量和治疗方案可通过监测患者的疾病迹象并因此调节治疗由医学领域技术人员容易地确定。

10 对象组合物的施用可以以任何方便的方式进行，包括通过喷雾法、注射、吞咽、输液、植入或移植。本文描述的组合物可被皮下、皮内、瘤内、结内、脊髓内、肌肉内、通过静脉内(i. v.)注射或腹膜内施用给患者。在一个实施方式中，本发明的 T 细胞组合物通过皮内或皮下注射被施用给患者。在另一个实施方式中，本发明的 T 细胞组合物优选通过 i. v. 注射施用。T 细胞的组合物可  
15 被直接注入肿瘤，淋巴结或感染位置。

在本发明的某些实施方式中，利用本文描述的方法或本领域已知的其他将 T 细胞扩展至治疗性水平的方法活化和扩展的细胞，与任何数量的有关治疗形式结合(例如，之前、同时或之后)施用给患者，所述治疗形式包括但不限于用以下试剂进行治疗：所述试剂诸如抗病毒疗法、西多福韦和白细胞介素-2、阿糖胞苷(也已知为 ARA-C)或对 MS 患者的那他珠单抗治疗或对牛皮癣患者的厄法珠单抗治疗或对 PML 患者的其他治疗。在进一步的实施方式中，本发明的 T 细胞可与以下结合使用：化疗、辐射、免疫抑制剂，诸如，环孢菌素、硫唑嘌呤、甲氨喋呤、麦考酚酯和 FK506，抗体或其他免疫治疗剂。在进一步的实施方式中，本发明的细胞组合物与骨髓移植、利用化疗剂诸如氟达拉滨、外部光束放射疗法(XRT)、环磷酰胺结合(例如，之前、同时或之后)而施用给患者。例如，  
20 在一个实施方式中，对象可经历高剂量化疗的标准治疗，之后进行外周血干细胞移植。在一些实施方式中，在移植后，对象接受本发明的扩展的免疫细胞的注入。在一个额外的实施方式中，扩展的细胞在外科手术前或外科手术后施用。

施用给患者的以上治疗的剂量将随着治疗病症的精确属性和治疗的接受者而变化。人施用的剂量比例可根据本领域接受的实践实施。通常，每次治疗或每个疗程，可将  $1 \times 10^6$  个至  $1 \times 10^{10}$  个本发明经修饰的 T 细胞(如，本发明的  
30

CAR-T 细胞), 通过例如静脉回输的方式, 施用于患者。

### 本发明的主要优点包括:

5 (1) 本发明的工程化免疫细胞可特异性的靶向肿瘤细胞表面抗原(比如 CD19、PSMA)的抗体单链可变区序列, 从而高效杀伤肿瘤(尤其是实体瘤)。

(2) 本发明首次发现, 表达免疫调节分子(比如 GITRL)的 CAR 可更加特异性的杀伤肿瘤细胞, 尤其是 CD19、和/或 PSMA 高表达或阳性的肿瘤细胞。

10 (3) 本发明首次发现, 在 CAR 修饰的 T 细胞或 NK 细胞内, 随 CAR 一起表达外源的免疫调节分子(比如 GITRL)能够显著提高肿瘤抑制活性, 并具有协同效果。

(4) 本发明首次开发了一种新型的嵌合抗原受体分子, 该 CAR 分子表达于 T 细胞后可以有效抵制肿瘤免疫微环境的抑制作用, 维持或提高 CAR-T 细胞的效应功能及其扩增能力、持续能力, 在以前列腺癌为代表的实体瘤治疗中表现出明显优于现有 CAR 结构的治疗效果。

15 (5) 本发明首次发现, 通过在 CAR 分子中表达糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子受体(GITR)配体 GITRL 的表达序列, 以 2A 连接的方式进行融合表达。由于激活的 T 细胞高表达 GITR, 共表达的 GITRL 通过 CAR-T 细胞间的相互作用增强各自的效应功能。

20 (6) 本发明首次发现, 表达 GITRL 能够显著促进 CAR-T 细胞中 Th9 亚群的分化, 同时抑制调节性 T 细胞 Treg 的形成, 显著改善 CAR-T 细胞的亚群构成, 体现出更强的抗肿瘤效应功能。

(7) 本发明首次在 CAR 分子中引入重要免疫调节分子 GITRL, 通过 2A 连接的方式与 CAR 共表达, 该分子在促进 CAR-T 细胞激活、增强 CD4+ T 细胞向 Th9 分化的同时, 又抑制了 Treg T 细胞的分化形成, 对于克服实体瘤免疫抑制性微环境具有重要作用, 在靶向 PSMA 的前列腺癌 CAR-T 治疗中表现出显著优于

25 现有 CAR-T 技术的效果, 在多种实体瘤的免疫治疗中具有巨大的应用潜力。

(8) 本发明所提供的共表达 GITRL 的 CAR-T 细胞, 具备调节其它表达其受体 GITR 的免疫细胞的功能的作用, 所述的免疫细胞包括但不限于 B 细胞、巨噬细胞、自然杀伤细胞、粒细胞、肥大细胞, 通过综合且多方位调节肿瘤免疫微环境, 达到

30 增强患者抗肿瘤免疫应答的作用。



下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，例如 Sambrook 等人，分子克隆：实验室手册 (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) 中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。

5 除非另外说明，否则百分比和份数是重量百分比和重量份数。

除非特别说明，否则本发明实施例中所用材料和试剂均为市售产品。

### 实施例 1：GITRL-CART 细胞制备及 CAR 表达鉴定

10 将 GITRL-CAR 按如下顺序构建(图 1)：抗原识别区→连接/跨膜区→4-1BB 共刺激→CD3  $\zeta$  →P2A→GITRL 编码序列，之后整合至 pELPS 慢病毒载体的 5、3 端 LTR 序列之间，构建成 CAR 表达主质粒，随后进行慢病毒包装。

#### 1、慢病毒包装

##### 转染前细胞培养

15 转染前一天，消化生长状态良好的 293T 细胞，1200rpm 离心 3min 后弃上清。加培养基重悬细胞，使细胞悬液均匀接种到含有 9ml DMEM 完全培养基的 10cm 细胞培养皿内，并轻轻晃动培养皿，使细胞在培养皿内分布均匀。37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱内培养。定期观察细胞的生长密度及状态，细胞融合率达到 70%~80% 左右即可用于转染。用于转染的 293T 细胞传代培养应不超过 24 小时。

##### 转染

20 1) 稀释三质粒 (psPAX2、pMD2.G 和整合有 CAR-GITRL 表达框的目的质粒)，在 500  $\mu$  L 不含血清的培养基 DMEM 中加入 psPAX2 5  $\mu$  g, pMD2.G 3  $\mu$  g 和目的质粒 5  $\mu$  g, 轻轻混匀。室温孵育 5min;

2) 稀释转染试剂 PEI, 在 450  $\mu$  L 不含血清的 DMED 培养基中加入 50  $\mu$  L 的 PEI, 轻轻混匀。室温孵育 5min;

25 3) 将孵育好的 PEI 稀释液滴加到稀释好的三质粒内，轻轻吹打混匀。室温静置孵育 20min, 配制形成三质粒-PEI 混合物，根据加入的不同质粒做好标记;

4) 将质粒混合液均匀滴加至用于转染的 293T 细胞内，37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱内培养。培养 6~8h 后，细胞更换新鲜完全培养基 DMEM (记为转染 0h)。37℃、5%CO<sub>2</sub> 继续培养。

##### 30 收获慢病毒

转染 48h 后，将细胞上清液分别收集到干净的 50ml 离心管内，做好标记，



并向培养皿内补加 10mL 完全培养基 DMEM, 37°C、5%CO<sub>2</sub> 继续培养。转染 72h 后, 再次收集细胞培养上清, 将所收集病毒原液至于 250ml 离心管中。在继续培养过程中, 定期观察细胞生长状态, 确保细胞产毒效率。

### 浓缩纯化慢病毒

5 1) 超滤: 将收集好的病毒原液加入到 100KD 的超滤管中, 配平后以 4000rpm 离心 30 分钟。

2) 超离: 将超滤后的病毒浓缩液, 转移到到经过灭菌处理的快封超速离心管中, 严格配平后, 40000rpm, 4 摄氏度低温离心 3 小时。

3) 纯化: 病毒液离心结束之后, 弃去废液, 向超速离心管中加入 1-3ml 空白 X-vivo 培养基, 将病毒浓缩 100-300 倍左右, 吹打直至病毒沉淀完全溶解。250ul 每管分装至无菌 EP 管中, 于-80 摄氏度超低温冰箱中保存。

### 慢病毒滴度测定

取生长状态良好的 HEK-293T 细胞, 消化后计数, 按  $2 \times 10^5$  孔均匀铺至 24 孔板中, 培养 8 小时左右至细胞贴壁, 向 24 孔板细胞培养上清中按 3 倍稀释梯度加入不同体积的病毒浓缩液, 总共设置 8 个梯度, 于培养箱中感染 48 小时, 感染 48 小时后, 消化并收集细胞。

### 流式检测阳性细胞百分比

1) 收集  $1 \times 10^5$  个左右感染后的 293T 细胞置于干净的 1.5ml 的 EP 管中, 用 PBS 漂洗两遍, 1200rpm, 离心 3min;

20 2) 弃上清, 加入 100  $\mu$ L 流式上样缓冲液, 加入 PSMA Protein-Human, Recombinant (His Tag) 0.6 微升, 蛋白浓度为 (0.15mg/mL), 吹打混匀, 4°C 避光孵育 45min

3) 用 PBS 漂洗两遍, 1200rpm, 离心 3min;

25 4) 弃上清, 加入 100  $\mu$ L 的流式上样缓冲液重悬细胞沉淀, 加入 0.6ul 的 APC-Anti-Streptavidin 流式抗体。4°C 避光孵育 30min;

5) 用 PBS 漂洗两遍, 1200rpm, 离心 3min;

6) 弃上清, 加入 300  $\mu$ L 的流式上样缓冲液重悬细胞沉淀

7) 流式上机检测。

30 并根据以下公式计算病毒滴度:

Titer= 铺板时细胞数 \* 阳性细胞百分数 \* 1000 / 加入的病毒液体积

( $\mu$  L)TU/mL。

## 2、GITRL-CART 细胞制备及流式鉴定

### 分选及活化 T 细胞

X-VIVO 完全培养基：X-VIVO 基础培养基+10%FBS+1%P/S+10  $\mu$  g/mLIL-2

- 5 1) 用 75%酒精对采血袋，接口处等严格消毒后转移至生物安全柜内，用无菌的剪刀剪开采血袋，将血样转移至干净的 50mL 离心管中，做好标记；
- 2) 取干净的 50mL 离心管，加入 15mL 淋巴细胞分离液，做好标记；
- 3) 将 30mL 血样缓慢加入上述离心管中，注意加入时动作应尽量缓慢，以保持界面清晰，800g 离心 25min，且离心时缓升缓降，升速为 1，降速为 0；
- 10 4) 离心结束后，用移液枪小心吸取中间的白膜层至新的 50mL 离心管中，做好标记，注意尽量不要吸取到杂质，加入 PBS 至 50mL，轻轻吹打均匀，500g 离心 10min；
- 5) 离心结束后，弃上清，用 50mLPBS 重悬细胞团，吹匀，血细胞分析仪读取 WBC 数目；
- 6) 细胞离心，300g 离心 10min；
- 15 7) 离心结束后，弃上清。根据计数仪结束结果，每  $10^7$  个细胞中加入 70  $\mu$  l 缓冲液 (x-vivo 基础培养基+10%FBS) 重悬细胞沉淀，轻轻吹打混匀，并转移至干净的 15mL 离心管内，做好标记；
- 8) 根据细胞数，每  $10^7$  细胞中各加入 20  $\mu$  l 的 CD4+和 CD8+磁珠，4 $^{\circ}$ C 孵育 15min；
- 9) 孵育结束后，向细胞悬液内加入缓冲液至 15mL，做好标记，用移液器轻轻
- 20 吹打混匀，清洗细胞，1200g 离心 5min；
- 10) 离心后弃上清，加入 500  $\mu$  L 缓冲液重悬细胞；
- 11) 将分离柱放入磁场，下端连干净 15mL 心管，3mL 缓冲液润洗分离柱，将细胞悬液分批次缓慢加入分离柱中，让液体缓慢下滴，待细胞悬液液面接近磁柱上端时加入 3mL 缓冲液冲洗 2 次；
- 25 12) 冲洗后，将柱子移出磁场，加入 5mL 缓冲液，迅速用活塞将细胞推入新的 15mL 离心管中，做好标记，300g 离心 10min；
- 13) 离心结束后，弃上清，加入 5mL 的 X-vivo 完全培养基，计数；
- 14) 根据细胞计数仪计数结果，用含 0.1%IL-2 和 1%CD3、CD28 复合物的 X-vivo 完全培养基重悬细胞，调整细胞密度为  $1 \times 10^6$  细胞/mL，接种于 T75 培养瓶
- 30 中，轻轻吹打混匀，放入培养箱培养；
- 15) 培养 48h 后，将细胞吸到干净的 50mL 离心管内，1200rpm，离心 3min。

## T 细胞感染

将上述实验中获得的 GITRL 病毒浓缩液按 MOI=50 感染分离得到的原代 T 细胞，感染 12 小时之后离心换液，继续培养 48 小时，阳性感染的 T 细胞即为目的 CAR-T 细胞。

### 5 收集细胞，流式检测相应 CAR-T 细胞百分比

1) 收集  $1 \times 10^5$  个左右感染后的 T 细胞置于干净的 1.5ml 的 EP 管中，用 PBS 漂洗两遍，1200rpm，离心 3min；

2) 弃上清，加入 100  $\mu$ L 流式上样缓冲液，加入 PSMA Protein, Human, Recombinant (His Tag) 0.6 微升，蛋白浓度为 (0.15mg/mL)，同时加入 1  $\mu$ l

10 PE-anti-human GITRL 抗体，吹打混匀，4 $^{\circ}$ C 避光孵育 45min；

3) 用 PBS 漂洗两遍，1200rpm，离心 3min；

4) 弃上清，加入 100  $\mu$ L 的流式上样缓冲液重悬细胞沉淀，加入 0.6  $\mu$ l 的 APC-Anti-Streptavidin 流式抗体。4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30min；

5) 用 PBS 漂洗两遍，1200rpm，离心 3min；

15 6) 弃上清，加入 300  $\mu$ L 的流式上样缓冲液重悬细胞沉淀

7) 流式上机检测 PSMA-CAR 和 GITRL 的表达(图 2)。

## 实施例 2：GITRL-CART 细胞 luciferase 杀伤检测及扩增检测 共培养

20 1. 取生长状态良好的各组 GITRL-CAR-T、对照 CART 细胞和靶细胞 PC-3，离心后计数，根据各组 CAR-T 细胞阳性率差异，在 CAR-T 中加入 T 细胞调整至各组 CAR-T 细胞阳性率保持一致。

2. 调整靶细胞密度为  $2 \times 10^5$  个/mL，根据实验目的，设计不同的效靶比，调整 T 细胞和各组 CAR-T 细胞密度，共培养实验可参考以下表格进行。

25 3. 按照效应细胞：靶细胞比例(效靶比)，计算每孔所需效应细胞数目，加入低吸附 96 孔板中，每个效靶比做三个复孔，使体系都为 150 微升体系。共培养实验效靶比 2: 1 如表 1 进行。

表 1

E:T=2:1 效应 T 细胞(包括未经转导 CAR 的 T 细胞、对照 CART 细胞和 GITRL-CART 细胞) $2 \times 10^4$ 个(100 $\mu$ L)+靶细胞 $1 \times 10^4$ (50 $\mu$ L)	效应 T 细胞 $2 \times 10^4$ 个 (150 $\mu$ L) 培养基为空白 X-VIVO 培养基
---	---



培养基为空白 X-VIVO 培养基	
E:T=2:1 效应 T 细胞 $2 \times 10^4$ 个 (100 $\mu$ L)+靶细胞 $1 \times 10^4$ (50 $\mu$ L) 培养基为空白 X-VIVO 培养基	效应 T 细胞 $2 \times 10^4$ 个 <b>(150 <math>\mu</math> L)</b> 培养基为空白 X-VIVO 培 养基
E:T=2:1 效应 T 细胞 $2 \times 10^4$ 个 (100 $\mu$ L)+靶细胞 $1 \times 10^4$ (50 $\mu$ L) 培养基为空白 X-VIVO 培养基	效应 T 细胞 $2 \times 10^4$ 个 <b>(150 <math>\mu</math> L)</b> 培养基为空白 X-VIVO 培 养基
靶细胞 $1 \times 10^4$ (50 $\mu$ L)+100 $\mu$ L 空白 X-VIVO 培养基	
靶细胞 $1 \times 10^4$ (50 $\mu$ L)+100 $\mu$ L 空白 X-VIVO 培养基	
靶细胞 $1 \times 10^4$ (50 $\mu$ L)+100 $\mu$ L 空白 X-VIVO 培养基	

4. 各组加好需细胞数目之后，放入培养箱中培养相应时间(12小时，16小时，20小时，24小时等)。

5. 将96孔板中每孔所对应的细胞，每孔吹打混匀后，吸100  $\mu$  L细胞悬液转移至新的96孔荧光酶标板中。

6. 每孔加入荧光素酶底物10  $\mu$  L。

7. 荧光读值测定。

8. 杀伤率计算公式=(靶细胞荧光值-效应细胞荧光值-靶细胞与效应细胞共孵育荧光值)/(靶细胞荧光值-效应细胞荧光值)\*100%。

## 10 多轮杀伤检测

1) 细胞共培养 铺板方式参考上面检测一轮杀伤的方法进行，效靶比=0.5:1，同时铺三块一模一样的96孔板(一块为超低吸附96孔板，另外两块为正常贴壁96孔板分别编号为板一，板二，板三)

2) 共孵育24小时之后，将板一拿出，按照细胞 luciferase 杀伤测定方法，分别计算出对照 CAR-T 细胞和 GITRL-CART 细胞对靶细胞的杀伤率，即为一轮杀伤率

3) 将板二中悬浮细胞转移至另外一块新的超低吸附96孔板中(编号为板四)，再根据0.5:1的效靶比在相应孔中加入PC-3细胞，将板三中的悬浮细胞按照同样

的方式转移至一块正常贴壁的 96 孔板中(编号为板五), 并加入相应的靶细胞

4) 共培养 24 小时之后, 将板四中的细胞, 按照细胞 luciferase 杀伤测定方法, 计算出对靶细胞的杀伤率, 即为二轮杀伤率

5) 将板五中相应孔中悬浮细胞全部转移至另外一块新的超低吸附 96 孔板中  
5 (编号为板 6), 并加入 PC-3 细胞

6) 共培养 24 小时之后, 将板 6 中的细胞, 按照细胞 luciferase 杀伤测定方法, 计算出对靶细胞的杀伤率, 即为三轮杀伤率。

### **GITRL-CART 细胞本底扩增**

10 将用相应病毒感染之后再培养两天获得的对照 CART 和 GITRL-CART 细胞和同批次分选得到的 T 细胞严格按照相同的培养条件培养(x-vivo 培养基+10%FBS+1%P/S+10  $\mu$ g/mL IL-2)。

1) 调整细胞初始密度为  $1 \times 10^6$  个/mL, 做三个复孔, 调整细胞初始数目为  $2 \times 10^6$  个

15 2) 根据细胞生长状态及时给细胞补液或换液, 保证细胞在良好的营养环境下生长

3) 每隔两天, 细胞离心后重悬混匀计数(细胞计数仪), 记录, 作图, 描绘细胞生长曲线。

### **GITRL-CART 细胞与靶细胞共孵育后扩增**

20 1) 按照效靶比=2: 1 的条件调整靶细胞 PC-3 细胞和对照 T 细胞、对照 CART 以及 GITRL-CART 细胞, 靶细胞与效应细胞数目分别为  $1 \times 10^6$  和  $2 \times 10^6$  个, 加入 X-VIVO 完全培养基, 放入六孔板中培养

2) 共孵育 24 小时之后, 将孔中悬浮细胞离心后计数, 再转移至新的培养板中培养

25 3) 根据细胞生长状态及时给细胞补液或换液, 保证细胞在良好的营养环境下生长

每隔两天, 细胞离心后重悬混匀计数(细胞计数仪), 记录, 作图, 描绘细胞生长曲线(图 3)。

### **实施例 3: GITRL-CART 细胞与靶细胞共培养后 IL-9 细胞因子表达检测**

30 **酶联免疫吸附实验法(ELISA)**

将对照 T、对照 CART 以及 GITRL-CART 细胞与 PC-3 靶细胞共培养 24 小时

之后的细胞上清，转移至新的离心管中，4000rpm 离心 10 分钟，去除细胞碎片，转移至新的离心管中，分装，-80℃ 保存。

1) 使用前，将所有试剂充分混匀，避免产生泡沫。

2) 根据实验孔(空白和标准品)数量，确定所需的板条数目。样本(含标准品)

5 和空白都应做三个复孔。

3) 包被：100  $\mu$  L /well 加入稀释后的包被抗体(4℃过夜)

4) 洗板：扣去孔内液体，300  $\mu$  L /well 加入 1×Washing buffer 工作液；停留 1 分钟后弃去孔内液体。重复 3 次，每一次在滤纸上扣干。

5) 加样：100  $\mu$  L /well 加入稀释后的 IL-9 标准品至标准品孔，100/well 加入样本至样本孔，100  $\mu$  L /well 加入 Dilution buffer(1×)至空白对照孔。盖上封板膜，室温(18-25℃)孵育 2 小时。

6) 洗板：重复步骤 4。

7) 加检测抗体：100  $\mu$  L /well 加入检测抗体工作液。盖上封板膜，室温(18-25℃)孵育 1 小时。

15 8) 洗板：重复步骤 4。

9) 加酶：100  $\mu$  L /well 加入 Streptavidin-HRP 工作液。盖上封板膜，室温(18-25℃)孵育 30 分钟。

10) 洗板：重复步骤 4。

11) 显色：100  $\mu$  L /well 加入 TMB，室温(18-25℃)避光孵育 5-30 分钟，根据孔内颜色的深浅(深蓝色)来判定终止反应。通常显色 10-20 分钟可以达到很好的效果。

12) 终止反应：100  $\mu$  L /well 迅速加入 Stop solution 终止反应。

13) 读板：终止后 10 分钟内，用检测波长 450nm 读值。

### 流式细胞法

25 1) 每管收集  $1 \times 10^5$  个共孵育细胞置于干净的 1.5ml 的 EP 管中，用 PBS 漂洗两遍，1200rpm，离心 3min；

2) 弃上清，加入 100  $\mu$  L 破膜固定液，轻轻吹匀，4℃避光孵育 2h；

3) 用 PBS 漂洗两遍，1200rpm 离心 3min；

4) 依次加入 0.6ul 的 PE-anti-human IL-9 和 1ul 的 APC-anti-human CD4 抗体，吹打混匀，4℃避光孵育 45min；

5) 弃上清，加入 100  $\mu$  L 的流式上样缓冲液(含 2%胎牛血清的 PBS)重悬细



胞沉淀；

- 6) 用 PBS 漂洗两遍，1200rpm，离心 3min；
- 7) 弃上清，加入 300  $\mu$  L 的流式上样缓冲液重悬细胞沉淀；
- 8) 流式上机检测 IL-9 和 CD4 的共表达(图 4)。

5

#### **实施例 4：GITRL-CART 细胞耗竭，指标检测 共培养**

- 1) 取对照 T 细胞、对照 CART、GITRL-CART 细胞和靶细胞 PC-3, 离心后计数，根据各种 CAR-T 细胞阳性率差异，在 CAR-T 中加入 T 细胞调整至各种 CAR-T 细胞阳性率保持一致。  
10
- 2) 按照效靶比=1: 1 的比例，在六孔板的孔中加入效应细胞和靶细胞各  $1 \times 10^6$  个，每种 CAR-T 做三个复孔，调整细胞初始密度都为  $1 \times 10^6$ /mL。
- 3) 共孵育 24 小时之后，将各种 CAR-T 细胞转移至新的培养板中培养。
- 4) 正常培养 7 天后，进行 PD-1、TIM3 流式染色。

#### **15 流式检测 GITRL-CART 细胞耗竭的 marker**

- 1) 收集  $3 \times 10^5$  个左右的细胞置于干净的 1.5ml 的 EP 管中，用 PBS 漂洗两遍，1200rpm，离心 3min；
- 2) 弃上清，加入 100  $\mu$  L 上样缓冲液，依次加入 0.6 微升的 APC-anti-human PD-1、PE-anti-human TIM3 流式抗体，吹打混匀，4 $^{\circ}$ C 避光孵育 45min；  
20
- 3) 用 PBS 漂洗两遍，1200rpm，离心 3min；
- 4) 弃上清，加入 300  $\mu$  L 的流式上样缓冲液重悬细胞沉淀
- 5) 流式上机检测。
- 6) Flowjo 流式分析软件分析各种 GITRL-CART 细胞与 PC-3 共培养后 PD-1、TIM3 的表达情况(图 5)。

25

#### **实施例 5：GITRL-CART 动物体内功能评价**

本实施例使用的评价工具小鼠为 6~8 周龄的 NSG 小鼠，饲养于 SPF 级层流室，标准颗粒饲养，垫料等一切与小鼠相关物品皆经过灭菌处理。按如下步骤开展 GITRL-CART 的体内功能评价。

- 1) 配制 1640 完全培养基，消化在养的 PC-3-luciferase 靶细胞并计数，调整细胞浓度为  $2 \times 10^7$ /mL (细胞用无菌 PBS+基质胶=3:1 重悬)。  
30

2) 选择 6-8 周的 NSG 小鼠, 每只小鼠腹腔注射 400  $\mu$  L 的戊巴比妥钠麻醉小鼠, 并用剃毛刀将小鼠背部毛发除去。

3) 用酒精棉球对小鼠右侧背部进行擦拭消毒, 然后用 1 mL 注射器经右侧背部皮下缓慢注射 100  $\mu$  L ( $2 \times 10^6$  细胞) 的 PC-3-luciferase 细胞悬液, 停针数秒后拔  
5 针。待小鼠快苏醒时, 将小鼠放回笼中。

4) 注射结束之后, 使用医用棉花止血即可。

5) 剪小鼠脚趾, 依次编号, 继续饲养。

6) 靶细胞注射十五天后, 使用活体成像仪对小鼠进行活体成像, 观察肿瘤生长情况, 并根据成像结果剔除未构建成功的小鼠模型, 其余小鼠根据实验安排随机  
10 分组, 做好标记。

小鼠活体成像 IVIS (图 6)

称取底物 D-Luciferin potassium salt 溶于 PBS 中, 避光保存, 经传递窗进入 SPF 级系统。按照小鼠体重 3m/每只进行腹腔注射底物, 3min 后将小鼠进行异氟烷气麻。待小鼠麻醉后, 将其放入成像仪进行成像和拍照, 对图片进行统计和处理,  
15 同时记录读取的荧光数值。

小鼠尾静脉注射 CAR-T 效应细胞

1) 根据分组, 在注射效应 CAR-T 细胞之前, 再次进行小鼠活体成像, 并计入小鼠体重。

2) 准备 Mock T、对照 CART 和 GITRL-CART 细胞悬液, 用生理盐水调整细胞密度为  $5 \times 10^7$  个/mL, 分装至 EP 管内, 装入冰盒, 待用。  
20

3) 尾静脉注射相应的 CAR-T 效应细胞, 每只注射 100  $\mu$  L, 做好标记。

4) 每隔 3-4 天进行活体成像检测, 记录和统计数据。

在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考, 就如同每一篇文献  
25 被单独引用作为参考那样。此外应理解, 在阅读了本发明的上述讲授内容之后, 本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改, 这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

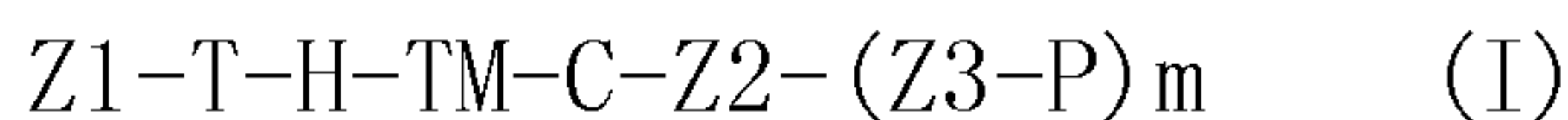
## 权 利 要 求

1. 一种嵌合抗原受体 CAR，其特征在于，所述嵌合抗原受体 CAR 包括：抗原结合结构域、跨膜结构域和胞内结构域，其中所述抗原结合结构域特异性结合于肿瘤细胞表面抗原；

并且所述的嵌合抗原受体 CAR 还包括：与所述胞内结构域连接并可共表达的免疫调节分子。

2. 如权利要求 1 所述的嵌合抗原受体 CAR，其特征在于，所述免疫调节分子选自下组：GITRL、4-1BBL、CD40、LIGHT、B7.1、B7.2、OX40L、CD70、或其组合。

3. 如权利要求 1 所述的嵌合抗原受体 CAR，其特征在于，所述 CAR 的结构如下式 I 所示：



式中，

各“-”独立地为连接肽或肽键；

Z1 为无或信号肽序列；

T 为靶向肿瘤细胞表面抗原的抗体单链可变区序列；

H 为无或铰链区；

TM 为跨膜结构域；

C 为共刺激信号分子；

Z2 为源于 CD3  $\zeta$  的胞浆信号传导序列；

Z3 为自剪切蛋白；

P 为免疫调节分子；

m 为 1、2、3、或 4。

4. 一种核酸分子，其特征在于，所述核酸分子编码本权利要求 1 所述的嵌合抗原受体 (CAR)。

5. 一种载体，其特征在于，所述的载体含有权利要求 4 所述的核酸分子。

6. 一种宿主细胞，其特征在于，所述的宿主细胞含有权利要求 5 所述的载体或染色体中整合有外源的权利要求 4 所述的核酸分子。

7. 一种制备工程化免疫细胞的方法，其特征在于，所述的工程化免疫细胞表达权利要求 1 所述的 CAR，其中所述方法包括步骤：将权利要求 4 所述的核酸分子



或权利要求 5 所述的载体转导入免疫细胞内，从而获得所述工程化免疫细胞。

8. 一种药物组合物，其特征在于，所述药物组合物含有权利要求 1 所述的 CAR、权利要求 4 所述的核酸分子、权利要求 5 所述的载体、或权利要求 6 所述的宿主细胞，以及药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

5 9. 一种权利要求 1 所述的 CAR、权利要求 4 所述的核酸分子、权利要求 5 所述的载体、权利要求 6 所述的宿主细胞、或权利要求 8 所述的药物组合物的用途，其特征在于，用于制备杀伤肿瘤细胞的药物或制剂。

10 10. 一种用于杀伤肿瘤细胞的试剂盒，其特征在于，所述试剂盒含有容器，以及位于容器内的权利要求 1 所述的 CAR、权利要求 4 所述的核酸分子、权利要求 5 所述的载体、或权利要求 6 所述的宿主细胞。

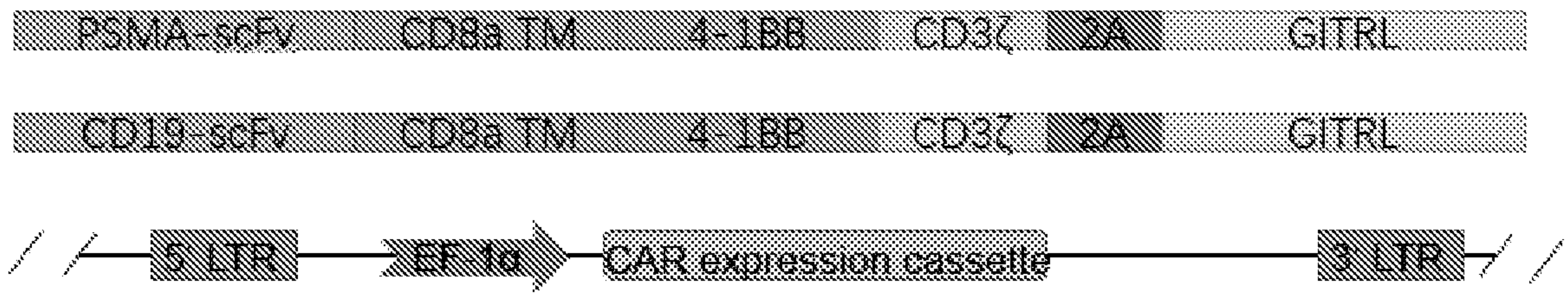


图 1

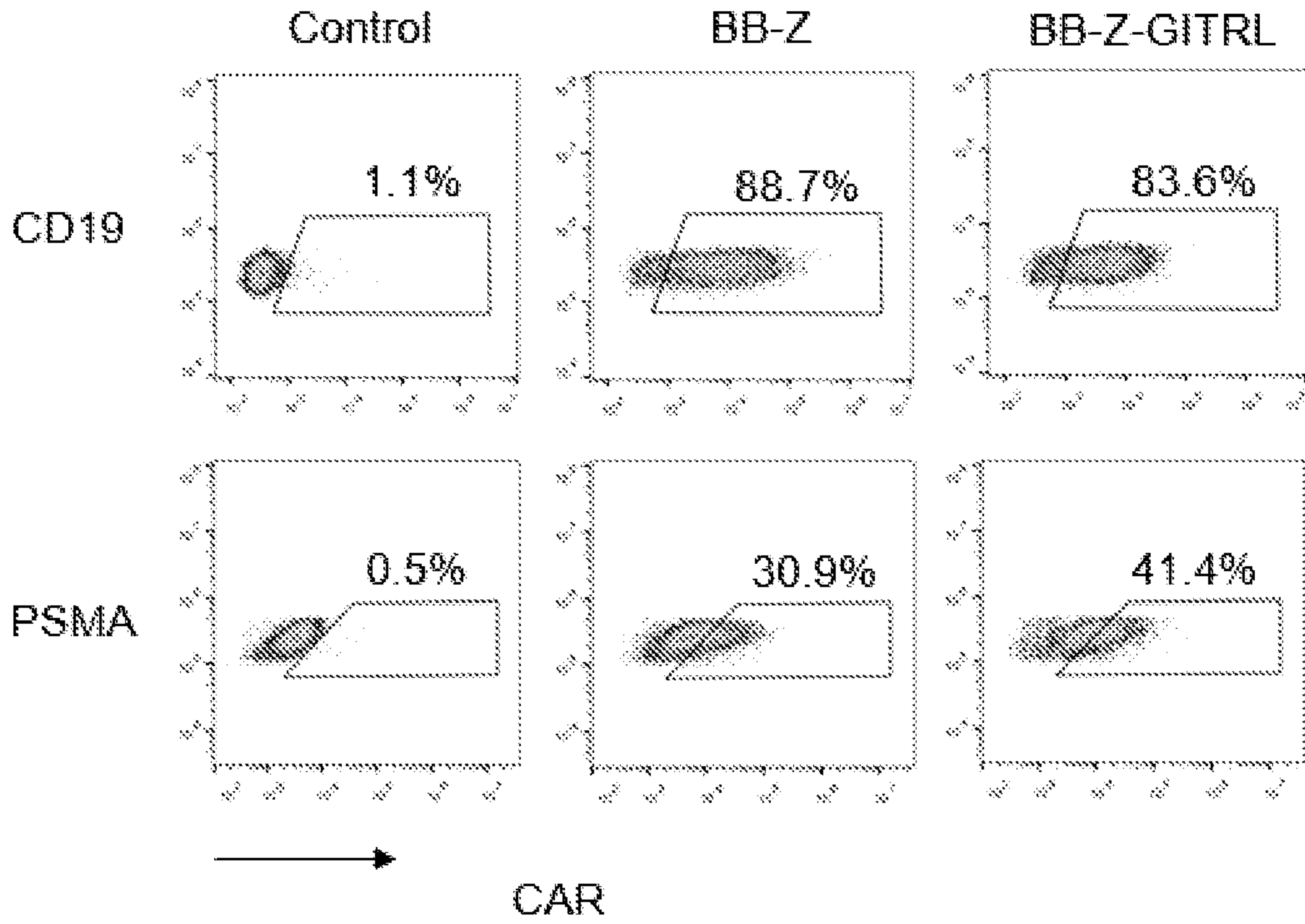


图 2

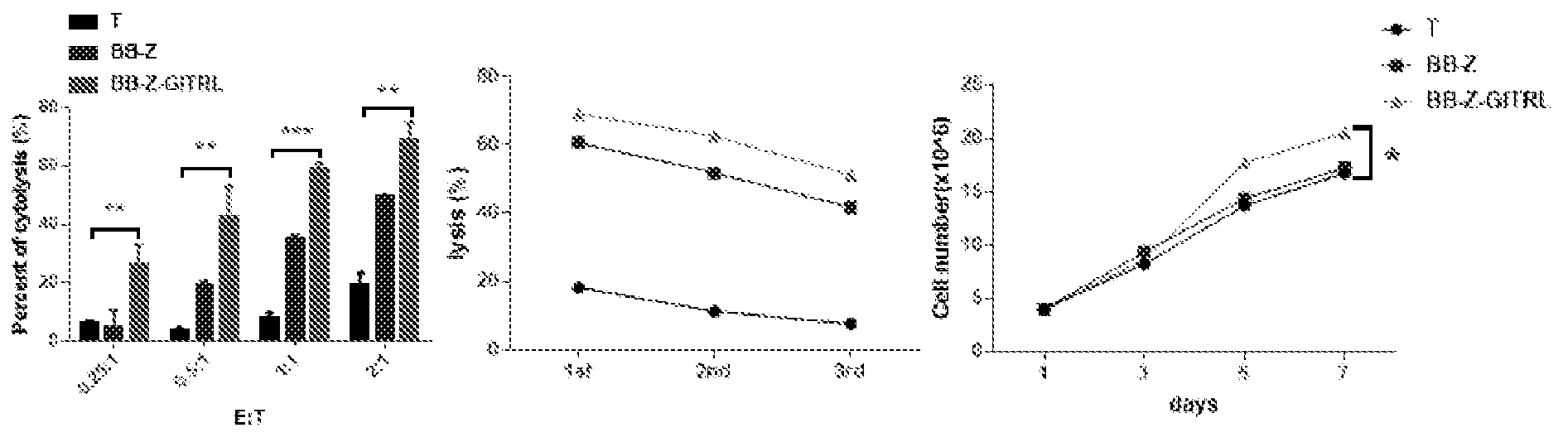


图 3

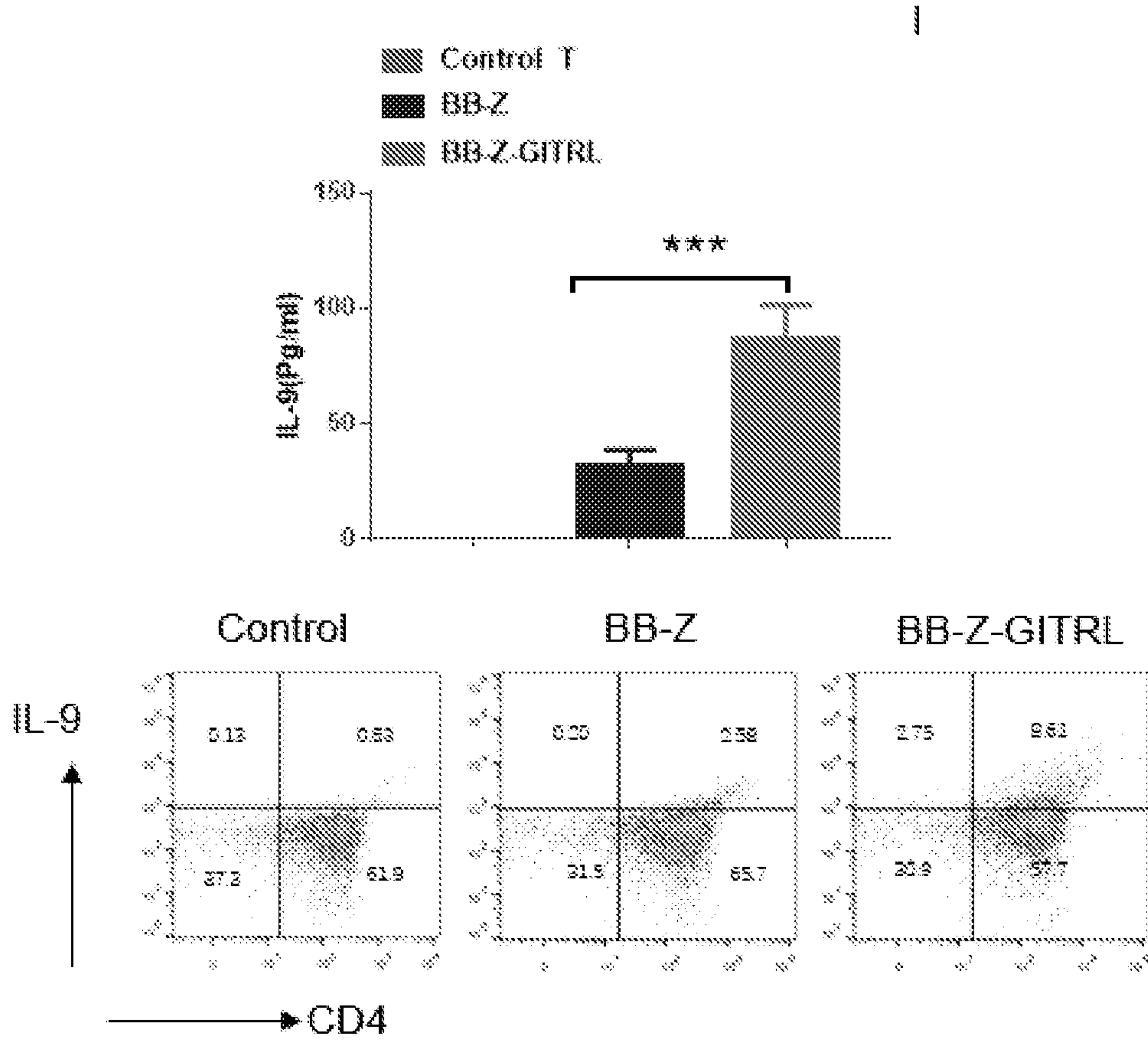


图 4

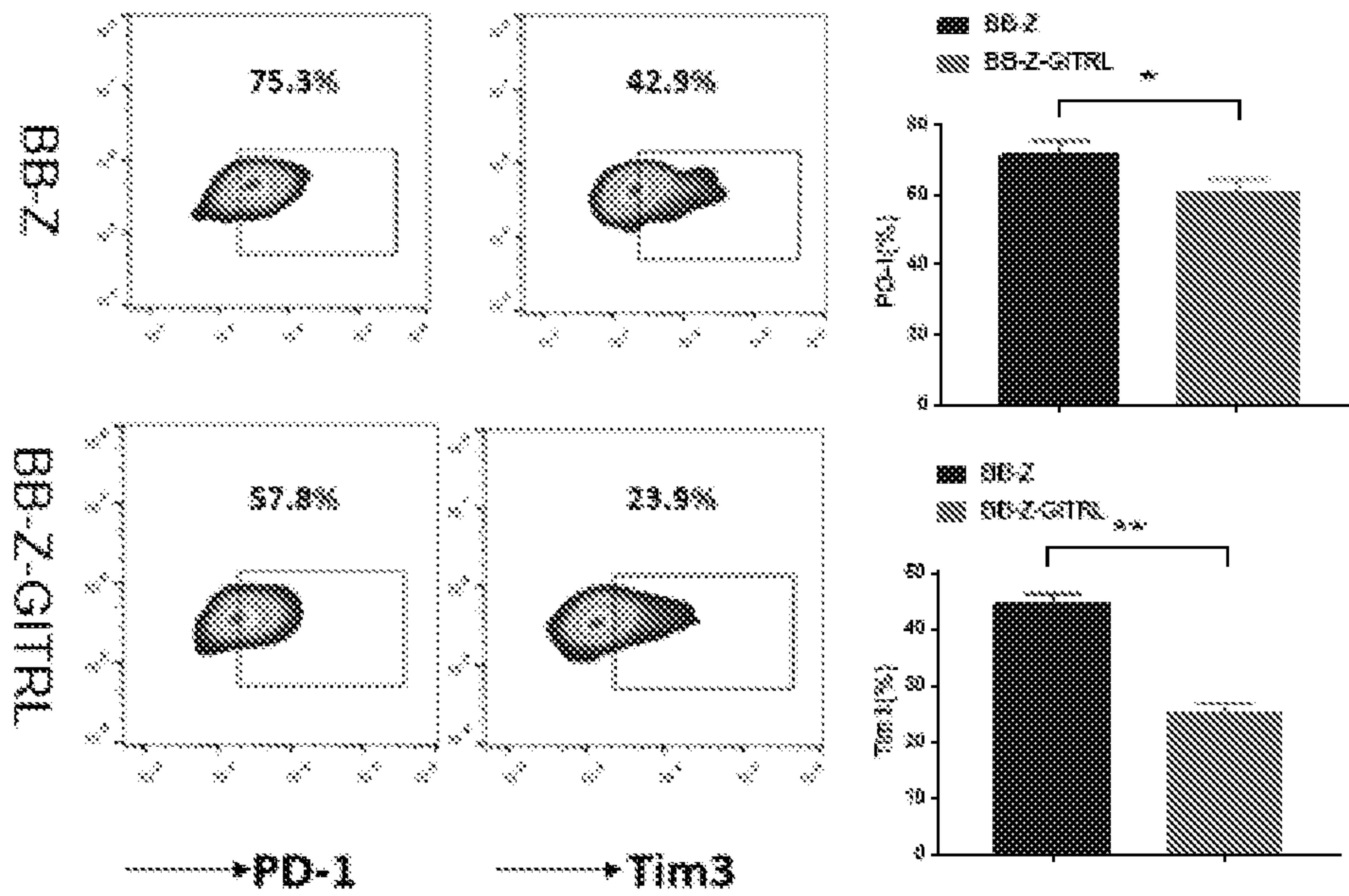


图 5



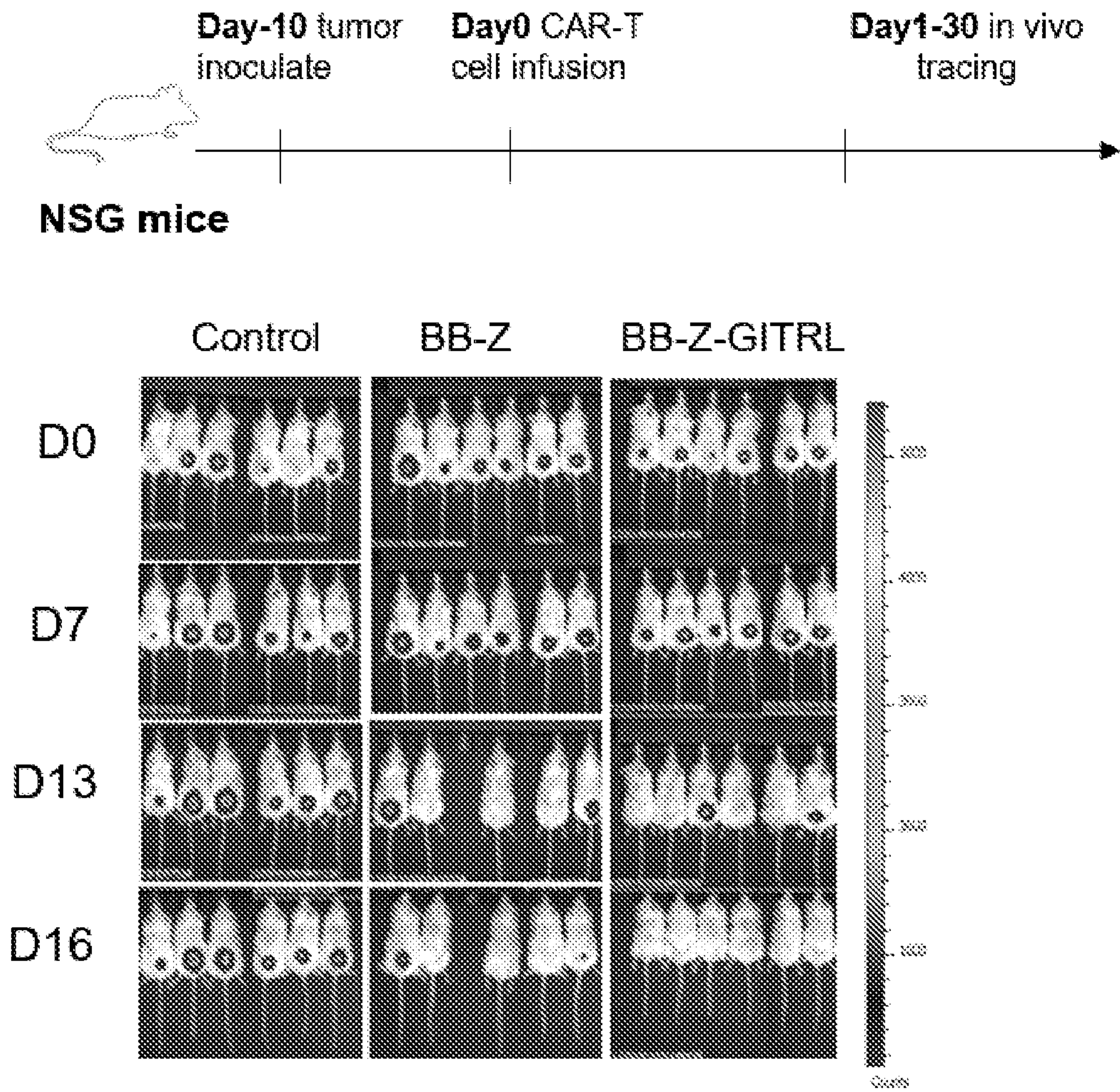


图 6

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/CN2020/138691**

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
C07K 19/00(2006.01)i; C12N 15/09(2006.01)i; A61K 48/00(2006.01)i; A61K 35/00(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
C07K; C12N; A61K; A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
CNABS, DWPI, SIPOABS, CNKI, NCBI, ISI Web of Science: 嵌合抗原受体, 共刺激, 融合, CAR, chimeric, antigen, receptor, co-stimulatory, fusion, 2a, t2a		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 106467906 A (BEIJING MARINO BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 01 March 2017 (2017-03-01) entire document, especially claims, description, paragraphs [0027] and [0028], figure 2, and the abstract	1 (in part), 2 and 3-10 (in part)
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>“&amp;” document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
21 January 2021		30 March 2021
Name and mailing address of the ISA/CN		Authorized officer
China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088 China		
Facsimile No. (86-10)62019451		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/138691

**Box No. I**      **Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
  - a.  forming part of the international application as filed:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
    - on paper or in the form of an image file.
  - b.  furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
  - c.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
    - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
  
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
  
3. Additional comments:



**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.: **1** (部分) 和**3-10** (部分)  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  

[1] The "immunomodulatory molecules" limited in claims 1 and 3 relate to a very large number of possible compounds, including any co-stimulatory molecules, cytokines, enzymes, and even another chimeric antigen receptor in epitope, antigen, and tandem, which does not comply with PCT Articles 5 and 6. Moreover, such a limitation leads to novelty overflow. Therefore, the search on claims 1 (in part) and 3-10 (in part) is limited to technical solutions on the basis of co-stimulatory molecules.
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.  
**PCT/CN2020/138691**

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN 106467906 A	01 March 2017	CN 106467906 B	27 September 2019
		WO 2017028374 A1	23 February 2017

---

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2020/138691

<p><b>A. 主题的分类</b></p> <p>C07K 19/00(2006.01)i; C12N 15/09(2006.01)i; A61K 48/00(2006.01)i; A61K 35/00(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>								
<p><b>B. 检索领域</b></p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C07K; C12N; A61K; A61P</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNABS、DWPI、SIPOABS、CNKI、NCBI、ISI Web of Science: 嵌合抗原受体, 共刺激, 融合, CAR, chimeric, anti-gen, receptor, co-stimulatory, fusion, 2a, t2a</p>								
<p><b>C. 相关文件</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>CN 106467906 A (BEIJING MARINO BIOTECHNOLOGY CO LTD) 2017年 3月 1日 (2017 - 03 - 01) 全文, 尤其是权利要求书、说明书第[0027]、[0028]段、图2和摘要</td> <td>1 (部分)、2、3-10 (部分)</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	X	CN 106467906 A (BEIJING MARINO BIOTECHNOLOGY CO LTD) 2017年 3月 1日 (2017 - 03 - 01) 全文, 尤其是权利要求书、说明书第[0027]、[0028]段、图2和摘要	1 (部分)、2、3-10 (部分)
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求						
X	CN 106467906 A (BEIJING MARINO BIOTECHNOLOGY CO LTD) 2017年 3月 1日 (2017 - 03 - 01) 全文, 尤其是权利要求书、说明书第[0027]、[0028]段、图2和摘要	1 (部分)、2、3-10 (部分)						
<p><input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>								
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p> <p>“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>“&amp;” 同族专利的文件</p>								
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2021年 1月 21日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2021年 3月 30日</p>						
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>授权官员</p> <p>吴永庆</p> <p>电话号码 +86-10-62089161</p>						



## 第I栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列列表进行的:
  - a.  作为国际申请的一部分提交的:
    - 附件C/ST. 25文本文件形式
    - 纸件或图形文件形式
  - b.  根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:
  - c.  仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:
    - 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))
    - 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b)和行政法规第713段)
2.  另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。
3. 补充意见:

## 第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1.  权利要求：  
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
  
2.  权利要求： 1（部分）和3-10（部分）  
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：  
[1] 权利要求1和3限定的“免疫调节分子”涉及极大数量的可能的化合物，包括任何具有免疫作用的共刺激分子、细胞因子、酶，甚至包括了表位、抗原和串联的另一个嵌合抗原受体，违反了《PCT条约》第5条和第6条的要求。而且，这样的限定也导致了新颖性溢出。所以，权利要求1（部分）和3-10（部分）的检索限制到基于共刺激分子的技术方案。
  
3.  权利要求：  
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/138691

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN 106467906 A	2017年 3月 1日	CN 106467906 B	2019年 9月 27日
		WO 2017028374 A1	2017年 2月 23日

---