

(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4月15日 (15.04.2021)



(10) 国际公布号
WO 2021/068108 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 19/00 (2006.01) *C12N 15/867* (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01) *A61K 35/17* (2015.01)
C12N 5/0783 (2010.01) *A61P 35/00* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2019/109960

(22) 国际申请日: 2019年10月8日 (08.10.2019)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人: 成都盛世君联生物技术有限公司 (ABLINK BIOTECH CO., LTD) [CN/CN]; 中国四川省成都市高新区科园南路88号c1-411, Sichuan 610041 (CN)。成都盛世锐科生物技术有限公司 (RAY SCIENCE BIOTECH CO., LTD) [CN/CN]; 中国四川省成都市高新区科园南路88号c1-412, Sichuan 610041 (CN)。

(72) 发明人: 曾昕 (ZENG, Xin); 中国四川省成都市高新区科园南路88号c1-411, Sichuan 610041 (CN)。刘江海 (LIU, Jianghai); 中国四川省成都市高新区科园南路88号c1-411, Sichuan 610041 (CN)。李欣樛 (LI, Xinlei); 中国四川省成都市高新区科园南路88号c1-411, Sichuan 610041 (CN)。刘彬 (LIU, Bin); 中国四川省成都市高新区科园南路88号c1-411, Sichuan 610041 (CN)。孔洋 (KONG, Yang); 中国四川省成都市高新区科园南路88号c1-411, Sichuan 610041 (CN)。曾顺泽 (ZENG, Shunze); 中国四川省成都市高新区科园南路88号c1-411, Sichuan 610041 (CN)。李玲芳 (LI, Lingfang); 中国四川省成都市高新区科园南路88号c1-411, Sichuan 610041 (CN)。

(74) 代理人: 北京三高永信知识产权代理有限责任公司 (BEIJING SAN GAO YONG XIN INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY CO., LTD.); 中国北京市

(54) Title: NKG2D CAR-T CELL, PREPARATION THEREFOR, AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: NKG2D CAR-T细胞及其制备和应用

(57) Abstract: The present invention provides a fusion protein, comprising an antigen-binding domain, a transmembrane domain, and a costimulatory signaling region. The antigen-binding domain can specifically bind to a tumor-specific antigen, that is an NKG2D ligand, and activate T cells by means of the transmembrane domain and the costimulatory signaling region. The fusion protein and an NKG2D CAR-T cell capable of expressing the fusion protein provided by the present invention can specifically kill tumor cells using the NKG2D CAR-T cell with the NKG2D ligand as a target antigen. The fusion protein and the NKG2D CAR-T cell can be used as a drug for treating tumor diseases and can be used to treat tumors in which a ligand of an NKG2D molecule is highly expressed, providing a new method for preventing or treating tumors.

(57) 摘要: 本发明提供一种融合蛋白, 其包含抗原结合结构域、跨膜结构域和共刺激信号传导区, 所述的抗原结合结构域能够特异性结合肿瘤特异性抗原NKG2D配体, 并通过跨膜结构域和共刺激信号传导区激活T细胞。本发明提供的融合蛋白和能够表达该融合蛋白的NKG2D CAR-T细胞, 其以NKG2D配体为靶抗原, 利用NKG2D CAR-T细胞特异性地杀伤肿瘤细胞。其可作为肿瘤类疾病的治疗药物, 用于NKG2D分子的配体高表达的肿瘤的治疗, 为肿瘤的预防和治疗提供了新的方法。



WO 2021/068108 A1

海淀区学院路蓟门里和景园A座1单元
102室, Beijing 100088 (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, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

NKG2D CAR-T 细胞及其制备和应用

技术领域

本发明涉及生物医药领域，具体涉及 NKG2D CAR-T 细胞及其制备和应用。

背景技术

嵌合抗原受体 (chimeric antigen receptor, 缩写 CAR) 修饰的免疫细胞使用遗传工程手段修饰免疫细胞使其表达外源性针对肿瘤基因。CAR 基因主要包括细胞外识别域和细胞内信号转导结构域：前者用于识别肿瘤表面特异性分子和后者用于启动识别肿瘤表面分子后的免疫细胞应答，发挥细胞毒作用。

T 细胞是淋巴细胞的一种，在细胞介导的免疫性中起重要作用。与其他淋巴细胞 (诸如 B 细胞及自然杀手细胞(NK 细胞))的区别在于细胞表面上存在 T 细胞受体(TCR)。T 辅助细胞，亦称为 CD4⁺T 或 CD4 T 细胞，在其表面上表达 CD4 糖蛋白。辅助 T 细胞在暴露于由 MHC (主要组织相容复合体)II 类分子呈递之肽抗原时活化。一旦活化，此类细胞快速增殖且分泌可调节免疫反应的细胞因子。细胞毒性 T 细胞，亦称为 CD8⁺ T 细胞或 CD8T 细胞，在细胞表面上表达 CD8 糖蛋白。CD8⁺T 细胞在暴露于由 MHC I 类分子呈递的肽抗原时活化。记忆 T 细胞是一 T 细胞亚群，长期存在且响应于相关抗原，因此向免疫系统提供针对过去感染及/或肿瘤细胞的记忆。

经基因改造后，T 细胞可在其表面产生嵌合抗原受体。CAR 为允许 T 细胞识别肿瘤细胞上的特定蛋白(抗原)的蛋白。经基因工程改造的 CAR T 细胞能实验室中生长直至其数目达到数十亿。然后可将扩增的 CART 细胞输注至患者中。

自然杀伤 (natural killer, 缩写 NK) 细胞是非特异性免疫系统的重要组成部分，先天免疫系统反应的关键性介质细胞。NK 细胞是一种广谱免疫细胞，具有快速发现和摧毁异常细胞 (如癌症或病毒感染的细胞) 的特异功能，

而且不需要提前致敏或 HLA 配型，即可展示强大的溶解异常细胞的活性。使用免疫细胞（包括 NK 细胞）来治疗癌症是近年来新趋势，这种新疗法有望为对传统手术、化疗和放疗无效的肿瘤提供了新的治愈希望。

NKG2D 是 NK 细胞的活化型受体，可识别 MHC-I 类分子，在天然免疫中发挥着重要的作用。NKG2D 参与病毒感染细胞的识别及 NK 对肿瘤细胞的杀伤。NKG2D 属于 C 型凝集素样受体家族，由于这个基因编码的受体存在于 NKG2(natural killer group 2)复合体中。NKG2 基因复合体位于人的 12 号染色体上。NKG2D 是 II 型跨膜蛋白，NKG2D 需要通过跨膜区域的带电残基结合一些转接蛋白(adaptor proteins)完成信号转导。人 NKG2D 都能结合 10kDa 的 DNAX 活化蛋白(DAP10)。DAP10 在胞浆内含有 YXXM 基序(Tyr-X-X-Meth)能够招募磷脂酰肌醇三羟基激酶(PI3K)和生长因子受体结合蛋白-2。所有的 NK 细胞、大多数 NKT 细胞、巨噬细胞都表达 NKG2D。另外，NKG2D 也存在于 CD8+T 细胞表面。在正常条件下，人和小鼠 CD4+T 细胞不表达 NKG2D。但是，在患者体内，表达 NKG2D 的 CD4+T 细胞比例有明显上升。NKG2D 可与许多不同的配体结合，这些配体属于主要组织相容性复合体 I 类(MHC-I)相关蛋白。人的 NKG2D 配体的另一家族是 MIC-A 和 MIC-B。MIC-A 和 MIC-B 都具有多态性。目前，MIC-A 有 61 个等位基因，MIC-B 有 30 个等位基因。NKG2D 分子的配体在正常细胞中不表达或者表达量非常少，但是当细胞受到感染或者发生癌变时，这些配体的表达量会大幅度上升。

Celyad 公司利用 NKG2D 对 MICA、MICB 的识别作用，将 NKG2D 受体与 CD3 ζ 融合,构建了 NKG2D CAR (NKR-2)。当 NKR-2 转染的 NK 细胞或者 CD8+T 细胞，接触到肿瘤细胞上的 NKG2D 配体，就会被激活，进而杀死肿瘤细胞。2017 年 10 月 Celyad 宣布在接受 NKR-2 治疗的复发难治性 AML 患者中，出现第一个 CR(完全缓解)。NKR-2 CART 的技术优势包括:1) NKG2D 来源于人体,形成的 NKG2D CAR-T 免疫原性非常低,延长了 NKR-2 的药效周期; 2) NKG2D 受体可以识别在大多数血液瘤和实体瘤细胞表面表达的 8 种不同的配体 (MICA, MICB 和 ULBP1-6)，使 NKR-2 在肿瘤治疗中的广谱性; 3) Celyad 的临床 I 期试验结果表明 NKR-2 在 AML 和 MM 患者的治疗过程中安全性和耐受性表现良好，说明尽管 NKG2D 的配体种类广泛，但无明显脱靶效应。

尽管 NKR-2 效果良好，但其也存在一些不足: 1) NKG2D 主要在 NK 细

胞上表达，但在肿瘤病人的血液中 NK 细胞数目少，扩增困难，生产制备 NKG2D CAR-NK 难度大；2) NKG2D 在 CD8+T 上表达水平低，病毒转染可以促进其在 CD8+T 上的表达，但无论是 NKG2D 的表达，还是在与配体结合后对 T 细胞的激活，都依赖细胞内 DAP10 的浓度，一定程度上会影响 NKR-2 CAR-T 的药效；3) CD4+T 的细胞数目约占 T 细胞总数的 50%，但由于 NKG2D 和 DAP10 在 CD4+T 上都不表达，NKR-2 不适用于 CD4+T 细胞。

发明内容

针对这些问题，本发明对 NKR-2 进行了优化和改进。改进型 NKG2D CAR-T (NKG92) 仅保留了 NKG2D 受体的胞外 92-216 区域 (配体结合区)，并通过其 C216 末端与跨膜结构域和共刺激信号传导区连接形成融合蛋白。示例性地，本发明通过将 CD8a 的 hinge-transmembrane (TM) 区域、4-1BB 共刺激区域、CD3 zeta 的信号区域连接形成融合蛋白。数据显示，NKG92 转染能够在 CD4+T 细胞 (NKG2D 阴性) 和 CD4+T 细胞 (NKG2D 低表达) 中都显著增加细胞膜表面 NKG2D 92-216 的表达；NKG92 转染的 T 细胞，能够显著的杀死多种肿瘤细胞，包括血液瘤和实体瘤。有鉴于此，本发明提供了一种融合蛋白及能够表达该融合蛋白的 NKG2D CAR-T 细胞及其制备和应用，该细胞能够特异性识别和杀伤肿瘤，具有更高效的肿瘤杀伤活性。

本发明一方面提供一种融合蛋白，所述融合蛋白包含 NKG2D (92-216) 或其同源序列，优选地，所述融合蛋白是嵌合抗原受体 (CAR)，且包含抗原结合结构域、跨膜结构域和胞内信号传导域 (优选是共刺激信号传导区)，所述的抗原结合结构域能够特异性结合肿瘤特异性抗原 NKG2D 配体，并通过跨膜结构域和胞内信号传导域 (优选是共刺激信号传导区) 激活 T 细胞，且其中所述的抗原结合结构域包含或为 NKG2D (92-216) 或其同源序列 (优选为具至少 80%、至少 81%、至少 82%、至少 83%、至少 84%、至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、至少 99.5%、至少 99.6%、至少 99.7%、至少 99.8%、或至少 99.9% 同一性且具有结合 NKG2D 配体活性的同源序列)。

示例性地，所述 NKG2D 配体选自主要组织相容性复合体 I 类 (MHC-I) 分子、MIC-A 和 MIC-B 中的一种或多种。

任选地，本发明所述的 NKG2D 受体的胞外 92-216 区域为 SEQ ID NO: 3 (优选地，其编码序列为 SEQ ID NO: 4)，且任选地所述胞外 92-216 区域被替换为该配体结合区的同源性序列。

示例性地，所述的跨膜结构域选自：由 T 细胞受体的 α 、 β 或 ζ 链、CD3 ϵ 、CD4、CD5、CD8、CD8 α 、CD9、CD16、CD22、CD28、CD33、CD37、CD45、CD80、CD86、CD134、CD137、CD152、CD154 和 ICOS 组成的组中的一种或多种的跨膜结构域；优选地，所述的跨膜结构域为 CD8 跨膜结构域；和/或，

所述的胞内信号传导域 (优选是共刺激信号传导区) 选自：CD2、CD3 ζ 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD4、CD5、CD7、CD22、CD27、CD28、CD30、CD40、CD66d、CD79a、CD79b、CD83、CD134、CD137、ICOS、CD154、4-1BB 和 OX40、LFA-1、LIGHT、NKG2C 和 B7-H3 中的一种、或两种或多种的组合；优选地，所述的共刺激信号传导区包含 4-1BB 和 CD3 ζ 胞内结构域。

示例性地，所述融合蛋白的结构为 NKG2D (92-216) -CD8 α hinge-CD8TM-4-1BB-CD3 ζ ，该融合蛋白能够特异性识别 NKG2D 配体。

任选地，所述胞外抗原结合域和所述跨膜域之间是铰链域，且优选地所述铰链域来源于 CD8 α 。

在本发明的一些实施方式中，本发明的融合蛋白 (优选 CAR) 中 NKG2D (92-216) 的 216 位残基作为 C 端与铰链域或跨膜结构域的 N 端连接。对于 NKG2D (92-216) 的同源序列或其揭短的序列与铰链域或跨膜结构域的 N 端连接也是类似的。

在本发明的一些具体实施方式中，所述 NKG2D (92-216) -CD8 α hinge-CD8TM-4-1BB-CD3 ζ 融合蛋白氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示或其同源序列等。

示例性地，所述同源序列与原序列的同源性约 60%或以上、约 70%或以上、71%或以上、72%或以上、73%或以上、74%或以上、75%或以上、76%或以上、77%或以上、78%或以上、79%或以上、80%或以上、81%或以上、82%或以上、83%或以上、84%或以上、85%或以上、86%或以上、87%或以上、88%或以上、89%或以上、90%或以上、91%或以上、92%或以上、93%

或以上、94%或以上、95%或以上、96%或以上、97%或以上、98%或以上、99%或以上、99.1或以上、99.2或以上、99.3%或以上、99.4%或以上、99.5%或以上、99.6%或以上、99.7%或以上、99.8%或以上、或99.9%或以上。

本发明另一方面提供一种表达上述融合蛋白的核苷酸序列。

示例性地，所述核苷酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示或其简并序列等。

示例性地，所述简并序列与原序列的同源性约60%或以上、约70%或以上、71%或以上、72%或以上、73%或以上、74%或以上、75%或以上、76%或以上、77%或以上、78%或以上、79%或以上、80%或以上、81%或以上、82%或以上、83%或以上、84%或以上、85%或以上、86%或以上、87%或以上、88%或以上、89%或以上、90%或以上、91%或以上、92%或以上、93%或以上、94%或以上、95%或以上、96%或以上、97%或以上、98%或以上、99%或以上、99.1或以上、99.2或以上、99.3%或以上、99.4%或以上、99.5%或以上、99.6%或以上、99.7%或以上、99.8%或以上、或99.9%或以上。

本发明另一方面提供一种 NKG2D CAR-T 细胞，所述 NKG2D CAR-T 细胞能够表达上述融合蛋白。

在本发明的一个具体实施方式中，所述融合蛋白和/或所述 NKG2D CAR-T 细胞能够有效地杀伤和/或杀死肺癌细胞、乳腺癌细胞、结肠癌细胞、乳腺癌细胞和肺癌细胞等。

优选地，本发明的 CART 细胞为 CD4+T 细胞或包含 CD4+T 细胞和 CD8+T 细胞的细胞混合物。

本发明另一方面还提供了上述 NKG2D CAR-T 细胞的制备方法，其包括如下步骤：

(1) 合成和扩增 NKG2D-CD8 α hinge-CD8TM-4-1BB-CD3 ζ 融合蛋白基因，将所述 NKG2D-CD8 α hinge-CD8TM-4-1BB-CD3 ζ 融合蛋白基因克隆到慢病毒表达载体上；

(2) 利用慢病毒包装质粒和步骤 (1) 得到的慢病毒表达载体质粒感染 293T 细胞，包装和制备慢病毒；和

(3) 利用步骤 (2) 得到的慢病毒感染 NK-92 细胞，得到 CAR-T 细胞。

本发明还提供上述融合蛋白和/或 NKG2D CAR-T 细胞在制备治疗和/或预防癌症的药物中的应用。

示例性地，融合蛋白和/或 NKG2D CAR-T 细胞在制备治疗高表达 NKG2D 配体的肿瘤及相关疾病的药物中的应用。

示例性地，所述癌症为血癌、淋巴瘤、乳腺癌、宫颈、结肠癌或肺癌等。

本发明还提供了一种药物组合物，其包括上述 NKG2D CAR-T 细胞，以及任选地，药学上可接受的辅料。

本发明提供的一种融合蛋白和能够表达该融合蛋白的 NKG2D CAR-T 细胞。该融合蛋白能够特异性结合肿瘤特异性抗原 NKG2D 配体，并通过跨膜结构域和共刺激信号传导区激活该 T 细胞。该 NKG2D CAR-T 细胞是通过将 NKG2D 受体用于 CAR-T 细胞所构建。融合蛋白和能够表达该融合蛋白的 NKG2D CAR-T 细胞以 NKG2D 配体为靶抗原，能够特异性地杀伤肿瘤细胞，其可作为肿瘤类疾病的治疗药物，用于 NKG2D 配体高表达的肿瘤的治疗，为肿瘤的预防和治疗提供了新的方法。

附图说明

图 1 所示为本发明实施例提供的 NKG92-CART 结构中 CAR 的结构示意图，其中 A 为包含通过 CD8a 铰链-跨膜 (TM) 域和 4-1BB 共刺激结构域与 CD3 ζ 信号传导区融合的 NKG2D 92-216 的 NKG92-CAR 构建体结构示意图；B 为 NKG2D 92-216 同型二聚体的结构；C 为通过 CD8a 铰链结构域中的保守半胱氨酸在转导的 T 细胞表面上形成的 NKG92 同型二聚体。

图 2 (图 2A 和图 2B) 所示为本发明实施例提供的 NKG2D CAR-NK 流式检测 CAR 细胞阳性率的结果图，其中，图 2A 为对照组；图 2B 为实验组。

图 3 (图 3A 和图 3B) 为在用 NKG2D-CAR 编码的慢病毒载体转导 T 细胞后 5 天的细胞表面 NKG2D 表达的 FACS 分析，其中 A 为绘图，B 为直方图。

图 4 为本发明实施例提供的 NKG2D CAR-T 细胞杀伤不同肿瘤细胞的实验结果图，其中 (从左至右) 分别为针对髓性白血病细胞 K562、淋巴瘤 raji、乳腺癌细胞 MDA-MB-231、肺癌细胞 A549、乳腺癌 BT474 细胞和宫颈癌 Hela 的实验结果。

具体实施方式

除非另有定义，本发明中使用的所有技术和科学术语具有与本发明所述技术领域的普通技术人员通常理解的含义。

具体而言，本发明所述的编码 NKG2D-CD8 α hinge-CD8TM-4-1BB-CD3 ζ 融

合蛋白的核苷酸的序列是任何能够编码该融合蛋白的任何 DNA 序列，优选地，该序列为 SEQ ID NO: 2 或其互补序列。另一方面，本发明所述的编码 NKG2D-CD8 α hinge-CD8TM-4-1BB-CD3 ζ 融合蛋白的核苷酸的序列可为在严紧条件下与由 SEQ ID NO: 2 的核苷酸序列进行杂交、且编码该融合蛋白的多核苷酸或其互补序列；

本文所述的“严紧条件”，可以为低严紧条件、中严紧条件、高严紧条件中的任一种，优选为高严紧条件。示例性地，“低严紧条件”可为 30℃、5×SSC、5×Denhardt 液、0.5%SDS、52%甲酰胺的条件；“中严紧条件”可为 40℃、5×SSC、5×Denhardt 液、0.5%SDS、52%甲酰胺的条件；“高严紧条件”可为 50℃、5×SSC、5×Denhardt 液、0.5%SDS、52%甲酰胺的条件。本领域技术人员应当理解温度越高越能得到高同源性的多核苷酸。另外，本领域技术人员可以选择影响杂交的严紧度的温度、探针浓度、探针长度、离子强度、时间、盐浓度等多个因素形成的综合结果来实现相应的严紧度。

除此之外可杂交的多核苷酸还可以为，通过 FASTA、BLAST 等同源性检索软件用系统设定的默认参数进行计算时，与编码序列号 6 的多核苷酸具有约 60%或以上、约 70%或以上、71%或以上、72%或以上、73%或以上、74%或以上、75%或以上、76%或以上、77%或以上、78%或以上、79%或以上、80%或以上、81%或以上、82%或以上、83%或以上、84%或以上、85%或以上、86%或以上、87%或以上、88%或以上、89%或以上、90%或以上、91%或以上、92%或以上、93%或以上、94%或以上、95%或以上、96%或以上、97%或以上、98%或以上、99%或以上、99.1 或以上、99.2 或以上、99.3%或以上、99.4%或以上、99.5%或以上、99.6%或以上、99.7%或以上、99.8%或以上、或 99.9%或以上同一性的多核苷酸。

核苷酸序列的同一性，可以使用 Karlin 及 Altschul 的算法规则 BLAST (Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87 : 2264-2268,1990;Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:5873,1993)来确定。基于 BLAST 算法规则的程序 BLASTN、BLASTX 已被开发(Altschul SF,et al:J Mol Biol 215:403,1990)。使用 BLASTN 分析碱基序列时，如使参数为 score=100、wordlength=12；此外使用 BLASTX 分析氨基酸序列时，如使参数为 score=50、wordlength=3；使用 BLAST 和 Gapped BLAST 程序时，采用各程序的系统可设定默认参数值。

除非另有规定，“编码核苷酸”包括为彼此简并版本并编码相同的氨基酸序列的所有核苷酸序列。编码蛋白质的核苷酸序列可包括内含子。

术语“慢病毒”指的是逆转录病毒科的属，其能够有效感染非周期性和有丝分裂后的细胞；它们可传递显著量的遗传信息进入宿主细胞的 DNA，以便它们是基因传递载体的最有效的方法之一。

术语“启动子”被定义为开始多核苷酸序列的特异性转录需要的，由细胞的合成机器识别或引导合成机器的 DNA 序列。

术语“特异性结合”指识别特异性抗原但基本上不识别或结合样本中的其他分子。

术语“载体”为物质组合物，其包括分离的核酸，并且其可用于传递分离的核酸至细胞内部。很多载体在本领域中是已知的，包括但不限于线性多核苷酸、与离子或两性分子化合物相关的多核苷酸、质粒和病毒。因此，术语“载体”包括自主复制的质粒或病毒。该术语也应被解释为包括便于将核酸转移入细胞的非质粒和非病毒化合物，诸如例如聚赖氨酸化合物、脂质体等等。病毒载体的例子包括但不限于，腺病毒载体、腺伴随病毒载体、逆转录病毒载体等等。

术语“癌症”被定义为以畸变细胞的快速和失控生长为特征的疾病。癌症细胞可局部蔓延或通过血流和淋巴系统蔓延至身体的其他部分。各种癌症的例子包括但不限于乳腺癌结肠直肠癌、肝癌、肺癌等等。

如本文所使用的，“包含”与“包括”、“含有”或“特征在于”同义，并且是包括在内的或开放性的，并且不排除另外的未陈述的元件或方法步骤。术语“包含”在本文中的任何表述，特别是在描述本发明的方法、用途或产品时，应理解为包括基本上由所述组分或元件或步骤组成和由所述组分或元件或步骤组成的那些产品、方法和用途。本文示例性描述的本发明适当地可以在不存在本文未具体公开的任何一种或多种元件、一种或多种限制的情况下进行实践。

本文已采用的术语和表述用作描述性而不是限制性术语，并且在此种术语和表述的使用中不预期排除所示和所述特征或其部分的任何等价物，但应认识到各种修饰在请求保护的本发明的范围内是可能的。因此，应当理解尽管本发明已通过优选实施方案和任选特征具体公开，但本领域技术人员可以采用本文公开的概念的修饰和变化，并且此类修饰和变化被视为在如由附加权利要求定义的本发明的范围内。

尽管本发明在 CAR 的实施例中使用了 NKG2D (92-216) 或其同源序列作为抗原结合结构域，但是本领域技术人员可以理解，能够通过进一步截短 NKG2D (92-216) 或其同源序列，进而制备出能更高效杀灭肿瘤的 CAR-T

细胞。例如，可以在 NKG2D (92-216) 的氨基酸序列中缺失 1-20 个氨基酸残基，或者对部分氨基酸残基进行替换修饰。

本文中出现的英文名称不区分大小写；NKG2D CAR-T、nkg2D-car T 代表的含义相同，表示表达 NKG2D 分子的 CAR-T 细胞；CD8TM 表示跨膜结构域。

为更清楚地说明本发明，现结合如下实施例进行详细说明，但这些实施例仅仅是对本发明的示例性描述，并不能解释为对本申请的限制。

实施例 1 慢病毒载体的制备

基因合成 NKG2D-CD8TM-4-1BB-CD3 ζ 融合基因序列（其氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示，基因序列如 SEQ ID NO: 2 所示，其结构示意图见图 1a、图 1b 和图 1c），通过酶切，将 NKG2D-CD8TM-4-1BB-CD3 ζ 融合基因序列转化连接到 PWPXLD-kana 载体中，基因上游为 EF-1 α 启动子。将所述载体转化至大肠杆菌菌株 Stb13，卡那霉素筛选，获得阳性克隆，提取质粒，酶切鉴定克隆，获得目的基因转染载体，即含 CAR 基因片段的 PWPXLD 质粒载体。将慢病毒包装辅助质粒 psPax2 和 PMD2.0G 分别转化 DH5 α ，氨苄青霉素筛选，并提取质粒。

实施例 2 慢病毒的制备

接种 3×10^5 个/ml 的 293T 细胞 10ml 于新的 10cm 培养皿中，24h 后配制如下溶液：

CaCl₂: 2.5M;

2×BBS: 50mM BES, 280mM NaCl, 1.5mM Na₂HP04;

质粒体系：含 CAR 基因片段的 PWPXLD 质粒载体：9 μ g；psPax2: 9 μ g；和 PMD2.0G: 4.5 μ g。

将质粒体系中的质粒加入到 0.45mL 的无菌 ddH₂O 中，加入 50 μ L CaCl₂ 溶液；逐滴加入 500 μ L 2×BBS 并保持溶液涡旋混合；室温放置 15-30 分钟。

将混合后的液体加入至培养基中，轻柔混匀培养基，使转染体系均匀分布，18h 后更换 2%FBS DMEM 培养基。48 小时后收取培养上清，将上清 1000xg 离心 10min 后除去细胞碎片，用 0.45 μ m 滤器过滤。过滤后的病毒液加入病毒液三分之一体积的 TAKR 慢病毒浓缩试剂 concentrator，颠倒混匀后 4° C 静置过夜。过夜后的病毒液 4° C 1500g 45min 离心，弃上清，PBS 重悬分装，-80° C 保存。

实施例 3 NKG2D CAR-T 细胞的制备

1. 预先准备与外周血等体积 Ficoll-Paque Plus 置于离心管内, 室温静置;
2. 【Day 0】外周血采集;
3. 即时将采集后的外周血沿管壁小心加入该离心管。20°C, 840g 离心 20 分钟; 升降速设置为最慢一档;
4. 吸取血浆成分置于新的无菌试管, 56°C 灭活 30 分钟;
5. PBMC 用生理盐水洗涤两次, 20°C, 500g 离心 7 分钟;
6. 灭活血浆离心, 4000rpm, 20°C, 6min, 转移, 4°C 保存;
7. 4ml 生理盐水重悬 PBMC 计数, 4°C, 400g 离心 7 分钟;
8. 配置分选缓冲液: 40mM EDTA (1ml), PBS (38ml), 20% BSA (1ml); 置于 4°C 预冷;
9. 弃上清, 40 μ L/ 10^7 个细胞加缓冲液, 10 μ L/ 10^7 个细胞加 Antibody Cocktail, 混匀 4°C, 孵育 5min;
10. 30 μ L/ 10^7 个细胞加缓冲液和 20 μ L/ 10^7 个细胞加 Microbead Cocktail, 混匀 4°C 孵育 10min;
11. T 细胞培养基配制: 培养基 (MACS); 细胞因子 (IL-2 (200U/ml)); 血浆 (5% 灭活);
12. 架 LS 柱于磁力分选器, 加缓冲液 3mL;
13. PBMC 过 LS 柱, 3mL 缓冲液洗, 收集未结合余液;
14. 300g, 7min, 离心;
15. 弃上清, 培养基重悬, 计数, 计算回收率;
16. 1×10^6 个/ml 加入 12 孔板中;
17. 加入 T 细胞刺激因子 (去除缓冲液的 dynabeads 磁珠), 细胞: 磁珠=1: 2;
18. 37°C, 5% CO₂ 条件下培养; 血样和细胞培养液细菌培养检测;
19. 预铺 12 孔板, 加入生理盐水稀释的 fibronectin 溶液, 至终浓度为 5 μ g/cm², 4°C 过夜;
20. 【Day 1】慢病毒感染 T 淋巴细胞;
21. 配制封闭液: 20%BSA+生理盐水=2%BSA;
22. 弃孔板中 fibronectin 溶液, 用封闭液封闭 30 分钟;
23. 生理盐水清洗板子 1 次;
24. 配制病毒液: 750 μ l/4.5cm², 铺板;
25. 37°C, 静置 4-6 小时;
26. 取 T 细胞, 1×10^6 /mL 加入孔板中; 37°C, 5% CO₂ 培养;
27. 【Day 3】记录 T 细胞状态, 调节 T 细胞浓度至 5×10^5 /ml, 全部更换新

鲜培养基;

28. 【Day 5】记录 T 细胞状态, 调节 T 细胞浓度至 $5 \times 10^5/\text{ml}$, 用 FACS 分析检测 CAR-T 细胞 CAR 表达情况 (见图 3A 和图 3B);

29. LDH 体外细胞毒性实验铺板;

30. 细胞培养液细菌, 真菌, 内毒素, 支原体检测实验;

31. 【Day 6】记录 T 细胞状态, 调节 T 细胞浓度至 $5 \times 10^5/\text{ml}$;

32. LDH 体外细胞毒性实验结果检测及数据分析;

33. 【Day 8】记录 T 细胞状态, 调节 T 细胞浓度至 $5 \times 10^5/\text{ml}$, 用 FACS 分析检测 CAR-T 细胞表面的 CD4+ T 和 CD8+ T 细胞数, 见图 2, 其中图 2A 和 2B 分别是慢病毒感染前 (day 0) 和感染后 (day 8) 的 CD4+ T 和 CD8+ T 的细胞数。

实施例 4 NKG2D CAR-T 细胞对体外肿瘤杀伤效果的评估

LDH 实验方法

以下提到的“培养基”成分均为 MACS+200U/mL 细胞因子白介素-2, LDH=乳酸脱氢酶, 专用反应试剂均来自 Promega 生产的 CytoTox96 试剂盒。

1: 各取 4mL 靶细胞和生长至 Day 5 以后的 CAR T 细胞, 分别加入到 5mL 流式管中, 离心 300g, 3min, 20°C ;

2: 弃去上清, 4mL 培养基重悬细胞, 离心 300g, 3min, 20°C ; 重复一次

3: 弃去上清, 4mL 培养基重悬细胞, 计数, 用培养基调节靶细胞浓度到 $2 \times 10^5/\text{mL}$, 调节 CAR T 细胞到 $4 \times 10^5/\text{mL}$;

4: 设置 200 微升培养基为空白组, 100 微升 CAR T 细胞+100 微升培养基为自发组 A, 取靶细胞 100 微升+100 微升培养基为自发组 B, 100 微升 CAR T 细胞+100 微升靶细胞为实验组; 另设置 200 微升培养基为体积校正组, 靶细胞 100 微升+100 微升培养基为最大释放组; 每组 3 个平行数据点; 分别置于 96 孔 U 型板中, 37°C , 5%CO₂ 孵育 24 小时;

5: 检测最大释放: 向最大释放组和体积校正组中每孔分别加入 20 微升 LDH 最大释放试剂, 37°C , 5%CO₂, 孵育 45min;

6: LDH 检测试剂配制: 取 LDH 缓冲液, 37°C 充分溶解后取 12ml 加入到 LDH 检测试剂瓶中, 避光充分混匀;

7: 取出 96 孔 U 型板, 混匀各孔, 500g, 3min 离心;

8: 取 ELISA 检测 96 孔板, 避光加入 LDH 检测试剂 50 微升/孔;

9: 取离心好的 96 孔 U 型板中 50 微升/孔加入相对应的 ELISA 检测 96 孔

板中；（不要吸到细胞）（避光）；

10：将 ELISA 检测 96 孔板放入酶标仪中，摇晃混匀 30min；

11：避光向 ELISA 检测 96 孔板中加入 LDH 反应终止试剂 50 微升/孔；

12：将 ELISA 检测 96 孔板放入酶标仪中，摇晃 10s 后检测波长 492nm，排除 620nm 以上，读数记录；

13：计算杀伤率：杀伤率=（实验组-自发组 A-自发组 B+空白组）/（最大释放值-体积校正-自发组 B+空白组）

14：作图分析，如附图 4 所示。

从图 4 可以明显看出，本发明的 CART 可以对髓性白血病、乳腺癌、肺癌、乳腺癌和宫颈癌具有显著的疗效或抑制作用。

以上所述仅为本发明的较佳实施例而已，并不用以限制本发明，凡在本发明的精神和原则之内，所作的任何修改、等同替换等，均应包含在本发明的保护范围之内。

权 利 要 求 书

1. 融合蛋白，其特征在于，其包含 NKG2D (92-216) 或其同源序列，优选地，所述融合蛋白是嵌合抗原受体(CAR)，且包含抗原结合结构域、跨膜结构域和胞内信号传导域（优选是共刺激信号传导区），所述的抗原结合结构域能够特异性结合肿瘤特异性抗原 NKG2D 配体，并通过跨膜结构域和胞内信号传导域（优选是共刺激信号传导区）激活 T 细胞，且其中所述的抗原结合结构域包含或为 NKG2D (92-216) 或其同源序列（优选为具至少 80%、至少 81%、至少 82%、至少 83%、至少 84%、至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、至少 99.5%、至少 99.6%、至少 99.7%、至少 99.8%、或至少 99.9%同一性且具有结合 NKG2D 配体活性的同源序列）。

2. 如权利要求 1 所述的融合蛋白，其特征在于，所述 NKG2D 配体选自主要组织相容性复合体 I 类 (MHC-I) 分子、MIC-A 和 MIC-B。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的融合蛋白，其特征在于，所述的跨膜结构域选自由 T 细胞受体的 α 、 β 或 ζ 链、CD3 ϵ 、CD4、CD5、CD8、CD8 α 、CD9、CD16、CD22、CD28、CD33、CD37、CD45、CD80、CD86、CD134、CD137、CD152、CD154 和 ICOS 组成的组中的一种或多种的跨膜结构域；优选地，所述的跨膜结构域为 CD8 跨膜结构域；和/或，

所述的胞内信号传导域（优选是共刺激信号传导区）选自：CD2、CD3 ζ 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD4、CD5、CD7、CD22、CD27、CD28、CD30、CD40、CD66d、CD79a、CD79b、CD83、CD134、CD137、ICOS、CD154、4-1BB 和 OX40、LFA-1、LIGHT、NKG2C 和 B7-H3 中的一种、或两种或多种的组合；优选地，所述的共刺激信号传导区包含 4-1BB 和 CD3 ζ 胞内结构域；和/或，

NKG2D (92-216) 的氨基酸的序列包含或为 SEQ ID NO: 3 所示的序列或其同源序列；和/或

所述胞外抗原结合域和所述跨膜域之间是铰链域，且优选地所述铰链域来源于 CD8 α 。

4. 如权利要求 3 所述的融合蛋白，其特征在于，其结构为 NKG2D-CD8 α hinge-CD8TM-4-1BB-CD3 ζ ，其中所述的 NKG2D 能够特异性结合肿瘤特异性的 NKG2D 配体，优选地，所述 NKG2D 配体为主要组织相容性复合体 I 类 (MHC-I) 分子、MIC-A 和 MIC-B 中的一种或多种。

5. 根据权利要求 4 所述的融合蛋白，所述 NKG2D-CD8TM α

hinge-CD8-4-1BB-CD3 ζ 融合蛋白的氨基酸的序列包含或为 SEQ ID NO: 1 所示的序列或其同源序列（优选为具至少 80%、至少 81%、至少 82%、至少 83%、至少 84%、至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、至少 99.5%、至少 99.6%、至少 99.7%、至少 99.8%、或至少 99.9%同一性且具有 CAR 活性的同源序列）。

6. 编码权利要求 1-5 中任一项所述融合蛋白的核苷酸序列。

7. 如权利要求 6 所述的核苷酸序列，其特征在于，所述核苷酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示或其简并序列。

8. 分离的 NKG2D CAR-T 细胞，其特征在于，所述 NKG2D CAR-T 细胞能够表达特异性结合肿瘤特异性抗原 NKG2D 配体的 NKG2D(92-216)或其同源序列（优选地，所述 NKG2D (92-216) 的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 3 所示；更优选地，其编码序列包含或由 SEQ ID NO: 4 所示的序列组成），或表达权利要求 1-5 中任一项所述的融合蛋白，或表达权利要求 6 或 7 中所述核苷酸序列所编码的融合蛋白，优选地，所述 NKG2D CAR-T 细胞为 CD4⁺T 细胞或包含 CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞的细胞混合物，其中所述细胞混合物中 CD4⁺T 细胞与 CD8⁺T 细胞的比例为 1:2-2:1，优选为 1:1.5-1.5: 1，更优选为 1:1。

9. 权利要求 1-5 中任一项所述的融合蛋白，和/或权利要求 6 或 7 所述核苷酸序列所编码的融合蛋白，和/或权利要求 8 所述的 NKG2D CAR-T 细胞，其能够有效地杀伤和/或杀死肺癌细胞、乳腺癌细胞、结肠癌细胞、乳腺癌细胞、宫颈癌细胞、淋巴癌细胞和/或肺癌细胞。

10. 权利要求 8 所述 NKG2D CAR-T 细胞的制备方法，其包括如下步骤：

(1) 合成和扩增编码权利要求 4 或 5 或 7 中任一项所述的 NKG2D-CD8 α hinge-CD8TM-4-1BB-CD3 ζ 融合蛋白的核苷酸，并将所述核苷酸克隆到慢病毒表达载体上；

(2) 利用慢病毒包装质粒和步骤 (1) 得到的慢病毒表达载体质粒感染细胞，包装和制备慢病毒；和

(3) 利用步骤 (2) 得到的慢病毒感染 T-92 细胞，得到 CAR-T 细胞。

11. 一种药物组合物，其包含根据权利要求 1-5 中任一项所述的融合蛋白，和/或权利要求 6-7 中所述的核苷酸序列所编码的融合蛋白，和/或权利要求 8 所述的 NKG2D CAR-T 细胞，和/或权利要求 10 所制备的 NKG2D CAR-T 细胞。

12. 如权利要求 11 所述的药物组合物，其还包括药学可接受的辅料。

13. 权利要求 1-5 中任一项所述的融合蛋白，和/或权利要求 6-7 中所述的核苷

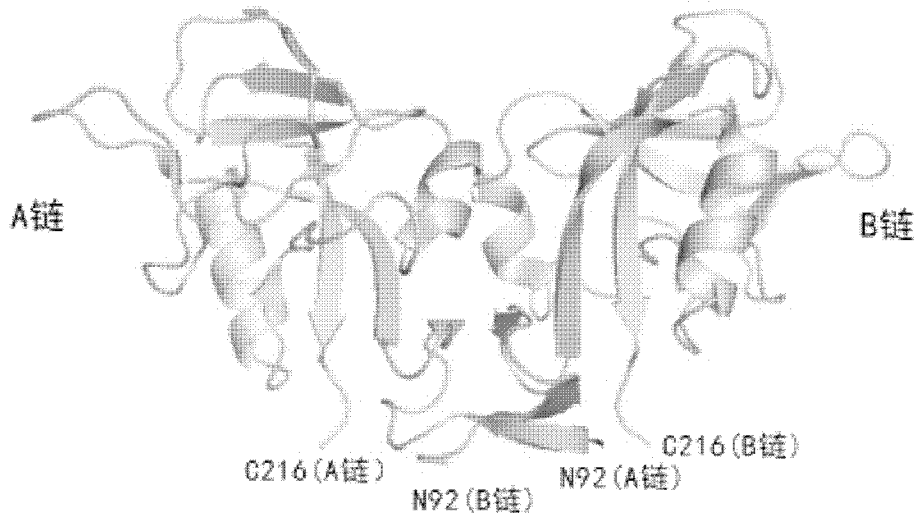
酸序列所编码的融合蛋白，和/或权利要求 8 所述的 NKG2D CAR-T 细胞，和/或权利要求 10 所制备的 NKG2D CAR-T 细胞在制备治疗和/或预防癌症的药物中的用途；优选的，所述的癌症为高表达 NKG2D 的配体的肿瘤及相关疾病。

14. 根据权利要求 13 所述的用途，所述癌症为肺癌、乳腺癌、血癌、淋巴瘤、宫颈癌、或结肠癌。

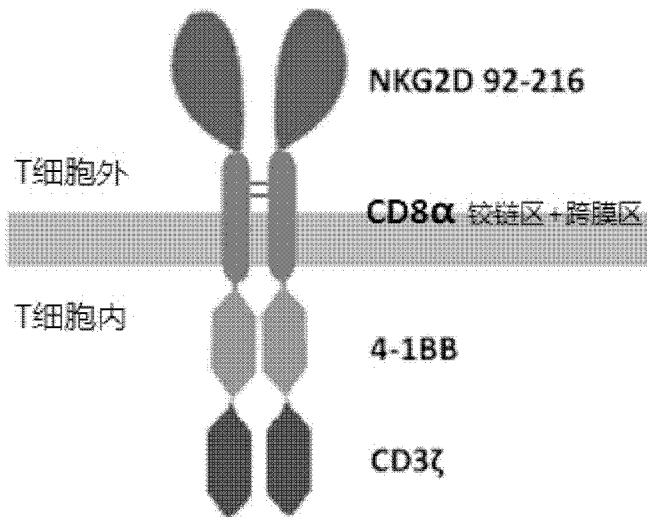
CD8 α 引导片段	NKG2D (92-216)	CD8 α 铰链区+跨膜区	4-1BB	CD3 ζ
----------------------	----------------	-------------------------	-------	-------------

A

NKG2D 92-216 同源二聚体



B



C

图 1

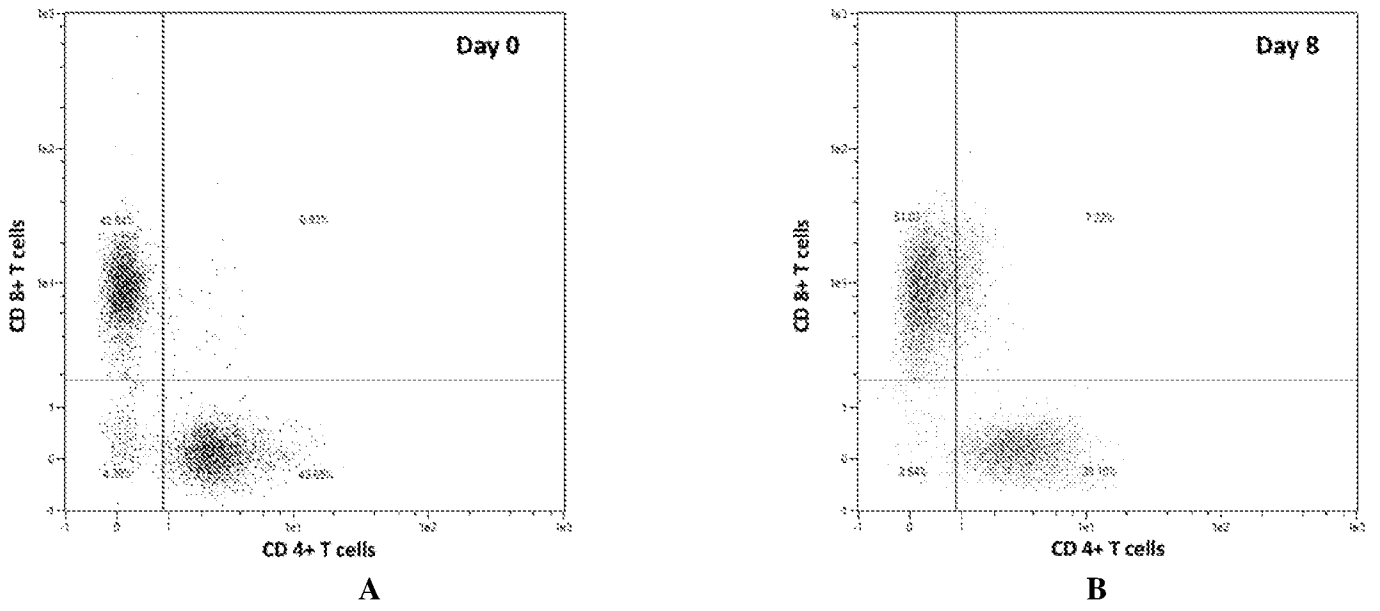
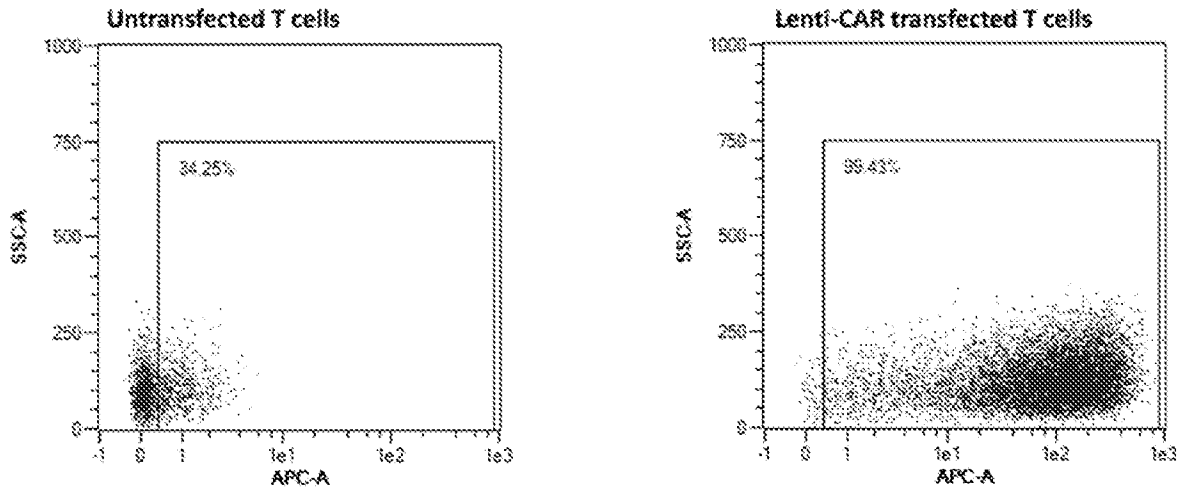


图 2

A



B

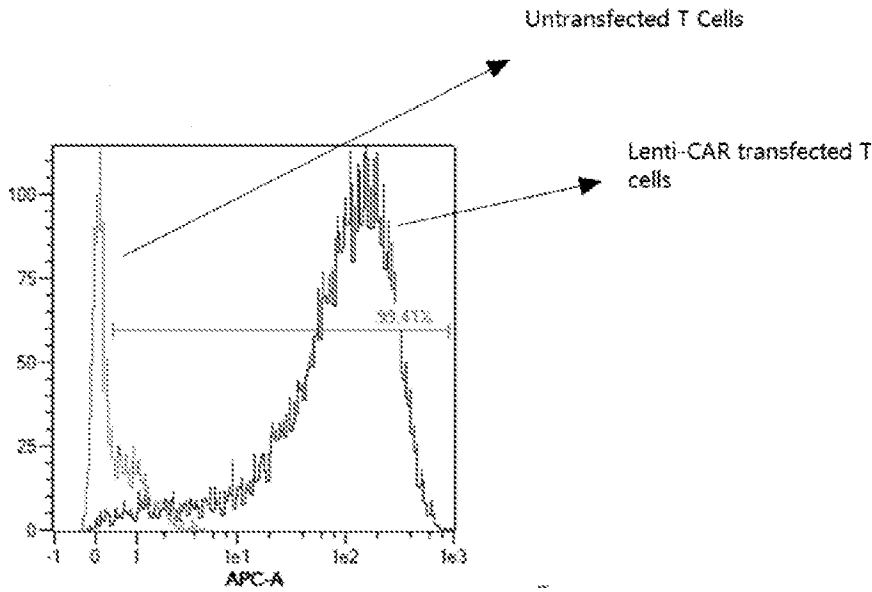


图 3

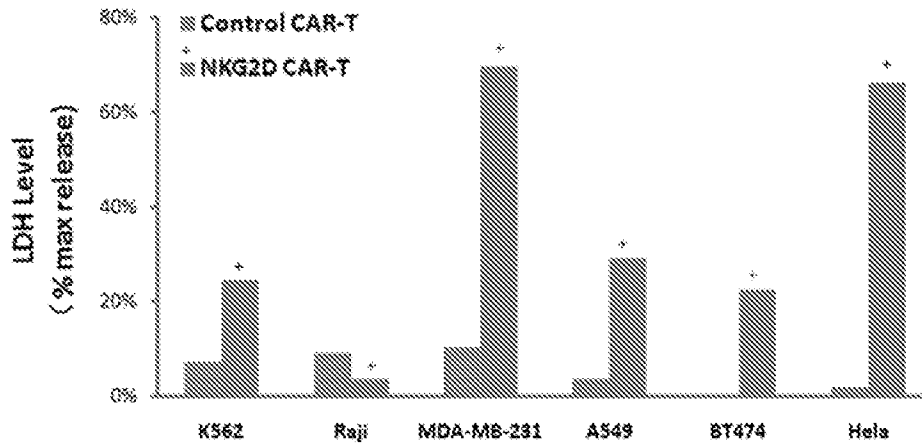


图 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/109960

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C07K 19/00(2006.01)i; C12N 15/62(2006.01)i; C12N 5/0783(2010.01)i; C12N 15/867(2006.01)i; A61K 35/17(2015.01)i; A61P 35/00(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
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; VEN; CNKI; NCBI; CNTXT; EPTXT; USTXT; WOTXT; ISI web of knowledge: 嵌合抗原受体, NKG2D, CAR, chimeric antigen receptor, natural killer group 2 et al. 中国专利生物序列检索系统; Genbank; EMBL and sequence searched: SEQ ID NOS: 1-4		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E	CN 110724199 A (CHENGDU ABLINK BIOTECHNOLOGY CO., LTD. et al.) 24 January 2020 (2020-01-24) see claims 1-14	1-14
X	CN 110028589 A (ASCLEPIUS (SUZHOU) BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 19 July 2019 (2019-07-19) see abstract, claims 1-10, embodiments 1-5	1-14
X	WO 2018183385 A1 (NAT UNIV SINGAPORE et al.) 04 October 2018 (2018-10-04) see claims 1-132, embodiments 1-3	1-14
X	CN 110121505 A (GREEN GROSS LAB CELL CORP) 13 August 2019 (2019-08-13) see embodiment 1	1-14
X	CN 109306016 A (EAST CHINA NORMAL UNIVERSITY et al.) 05 February 2019 (2019-02-05) see claims 1-10, embodiments 1-6	1-14
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "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) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "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 "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 "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 "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 24 June 2020		Date of mailing of the international search report 15 July 2020
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088 China Facsimile No. (86-10)62019451		Authorized officer Telephone No.

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:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2019/109960

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	110724199	A	24 January 2020	None			
CN	110028589	A	19 July 2019	WO	2019154391	A1	15 August 2019
WO	2018183385	A1	04 October 2018	SG	11201908492 P	A	30 October 2019
				JP	2020512005	A	23 April 2020
				KR	20200006046	A	17 January 2020
				CA	3056439	A1	04 October 2018
				EP	3600356	A1	05 February 2020
				CN	110636851	A	31 December 2019
				IL	269553	D0	28 November 2019
				AU	2018246235	A1	17 October 2019
				US	2020131244	A1	30 April 2020
				BR	112019019917	A2	22 April 2020
CN	110121505	A	13 August 2019	WO	2018124766	A9	17 January 2019
				CA	3061898	A1	29 October 2019
				EP	3567049	A2	13 November 2019
				AU	2017384900	A1	20 June 2019
				US	2019336533	A1	07 November 2019
				WO	2018124766	A3	13 December 2018
				WO	2018124766	A2	05 July 2018
CN	109306016	A	05 February 2019	None			

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2019/109960

<p>A. 主题的分类</p> <p>C07K 19/00(2006.01)i; C12N 15/62(2006.01)i; C12N 5/0783(2010.01)i; C12N 15/867(2006.01)i; A61K 35/17(2015.01)i; A61P 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. 检索领域</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; VEN; CNKI; NCBI; CNTXT; EPTXT; USTXT; WOTXT; ISI web of knowledge和关键词: 嵌合抗原受体, NKG2D, CAR, chimeric antigen receptor, natural killer group 2等 中国专利生物序列检索系统; Genbank; EMBL和检索的序列: SEQ ID NOs:1-4</p>																				
<p>C. 相关文件</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>E</td> <td>CN 110724199 A (成都盛世君联生物技术有限公司等) 2020年 1月 24日 (2020 - 01 - 24) 见权利要求1-14</td> <td>1-14</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 110028589 A (阿思科力苏州生物科技有限公司) 2019年 7月 19日 (2019 - 07 - 19) 见摘要、权利要求1-10、实施例1-5</td> <td>1-14</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>WO 2018183385 A1 (NAT UNIV SINGAPORE等) 2018年 10月 4日 (2018 - 10 - 04) 见权利要求1-132、实施例1-3</td> <td>1-14</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 110121505 A (株式会社绿十字细胞治疗) 2019年 8月 13日 (2019 - 08 - 13) 见实施例1</td> <td>1-14</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 109306016 A (华东师范大学等) 2019年 2月 5日 (2019 - 02 - 05) 见权利要求1-10、实施例1-6</td> <td>1-14</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	E	CN 110724199 A (成都盛世君联生物技术有限公司等) 2020年 1月 24日 (2020 - 01 - 24) 见权利要求1-14	1-14	X	CN 110028589 A (阿思科力苏州生物科技有限公司) 2019年 7月 19日 (2019 - 07 - 19) 见摘要、权利要求1-10、实施例1-5	1-14	X	WO 2018183385 A1 (NAT UNIV SINGAPORE等) 2018年 10月 4日 (2018 - 10 - 04) 见权利要求1-132、实施例1-3	1-14	X	CN 110121505 A (株式会社绿十字细胞治疗) 2019年 8月 13日 (2019 - 08 - 13) 见实施例1	1-14	X	CN 109306016 A (华东师范大学等) 2019年 2月 5日 (2019 - 02 - 05) 见权利要求1-10、实施例1-6	1-14
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																		
E	CN 110724199 A (成都盛世君联生物技术有限公司等) 2020年 1月 24日 (2020 - 01 - 24) 见权利要求1-14	1-14																		
X	CN 110028589 A (阿思科力苏州生物科技有限公司) 2019年 7月 19日 (2019 - 07 - 19) 见摘要、权利要求1-10、实施例1-5	1-14																		
X	WO 2018183385 A1 (NAT UNIV SINGAPORE等) 2018年 10月 4日 (2018 - 10 - 04) 见权利要求1-132、实施例1-3	1-14																		
X	CN 110121505 A (株式会社绿十字细胞治疗) 2019年 8月 13日 (2019 - 08 - 13) 见实施例1	1-14																		
X	CN 109306016 A (华东师范大学等) 2019年 2月 5日 (2019 - 02 - 05) 见权利要求1-10、实施例1-6	1-14																		
<p><input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。</p> <p><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, 但为了理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>“&” 同族专利的文件</p>																				
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2020年 6月 24日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2020年 7月 15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>王金凤</p> <p>电话号码 (86-10)-62412282</p>																		

第1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)和行政规程第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:

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2019/109960

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	110724199	A	2020年 1月 24日	无			
CN	110028589	A	2019年 7月 19日	WO	2019154391	A1	2019年 8月 15日
WO	2018183385	A1	2018年 10月 4日	SG	11201908492P	A	2019年 10月 30日
				JP	2020512005	A	2020年 4月 23日
				KR	20200006046	A	2020年 1月 17日
				CA	3056439	A1	2018年 10月 4日
				EP	3600356	A1	2020年 2月 5日
				CN	110636851	A	2019年 12月 31日
				IL	269553	D0	2019年 11月 28日
				AU	2018246235	A1	2019年 10月 17日
				US	2020131244	A1	2020年 4月 30日
				BR	112019019917	A2	2020年 4月 22日
CN	110121505	A	2019年 8月 13日	WO	2018124766	A9	2019年 1月 17日
				CA	3061898	A1	2019年 10月 29日
				EP	3567049	A2	2019年 11月 13日
				AU	2017384900	A1	2019年 6月 20日
				US	2019336533	A1	2019年 11月 7日
				WO	2018124766	A3	2018年 12月 13日
				WO	2018124766	A2	2018年 7月 5日
CN	109306016	A	2019年 2月 5日	无			