

(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
2022 年 1 月 20 日 (20.01.2022)



(10) 国际公布号
WO 2022/011651 A1

(51) 国际专利分类号:
C12N 5/10 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 35/28 (2015.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2020/102473

(22) 国际申请日: 2020 年 7 月 16 日 (16.07.2020)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人: 上海交通大学 (SHANGHAI JIAOTONG UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国上海市闵行区东川路 800 号, Shanghai 200240 (CN)。

(72) 发明人: 高维强 (GAO, Wei Qiang); 中国上海市闵行区东川路 800 号, Shanghai 200240 (CN)。
马斌 (MA, Bin); 中国上海市闵行区东川路 800 号, Shanghai 200240 (CN)。
印盼 (YIN, Pan); 中国上海市闵行区东川路 800 号, Shanghai 200240 (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))。

(54) Title: IMMUNOTHERAPY METHOD OF TARGETED CHEMOKINE AND CYTOKINE DELIVERY BY MESENCHYMAL STEM CELL

(54) 发明名称: 间充质干细胞靶向运输趋化因子和细胞因子的免疫疗法

(57) Abstract: Provided is an immunotherapy method of targeted chemokine and cytokine delivery by a mesenchymal stem cell. Specifically provided is a mesenchymal stem cell. The mesenchymal stem cell expresses an immunostimulatory factor. The immunostimulatory factor is selected from the following group: CCL3, CCL19, CCL21, XCL1, CXCL9, OX40L, 4-1BBL, GITRL, CD40L, or a combination thereof. At a tumor site, the mesenchymal stem cell specifically attracts and activates an immune cell that kills tumor tissue, and the mesenchymal stem cell has a synergistic effect with chemokines and/or cytokines, having an immunotherapeutic effect with higher efficiency and few side effects, and a significantly enhanced ability to kill tumor tissue, especially colorectal cancer cells.

(57) 摘要: 提供了一种间充质干细胞靶向运输趋化因子和细胞因子的免疫疗法。具体提供了一种间充质干细胞, 所述间充质干细胞表达免疫刺激因子, 所述免疫刺激因子选自下组: CCL3、CCL19、CCL21、XCL1、CXCL9、OX40L、4-1BBL、GITRL、CD40L、或其组合。上述间充质干细胞在肿瘤部位能够特异性地吸引并激活杀伤肿瘤组织的免疫细胞, 并且间充质干细胞与趋化因子和/或细胞因子具有协同作用, 具有更高效且副作用低的免疫疗效, 对肿瘤组织杀伤能力显著增强, 尤其是结直肠癌细胞。

WO 2022/011651 A1

间充质干细胞靶向运输趋化因子和细胞因子的免疫疗法

技术领域

- 5 本发明属于生物技术领域，具体地，本发明涉及间充质干细胞靶向运输趋化因子和细胞因子的免疫疗法。

背景技术

- 免疫疗法的飞速发展癌症带来了新的曙光，特别是嵌合抗原受体 T 细胞免疫疗法 (CAR-T) 和免疫调节检查点阻断是目前比较前沿的两种癌症免疫疗法。CAR-T 细胞疗法在一些类型的癌症中表现出一定的疗效，但是也遇到了 T 细胞到达实体瘤部位效率低下以及作用时间较短、肿瘤部位已有的免疫细胞数量少、全身性用药带来的副作用等的瓶颈。使用靶向 T 细胞抑制性受体 PD-1 或 CTLA-4 的抗体可以产生十分显著的抗肿瘤效果。然而，抗体的治疗效果通常受到许多因素的限制，例如实体瘤中 T 细胞的低浸润以及活性的丧失。此外全身性使用免疫治疗药物比如干扰素 α 、白介素 2 或者 PD-1 抗体等可能引起严重的副作用。

因此本领域迫切需要一种能特异性靶向肿瘤细胞的免疫疗法。

发明内容

- 20 本发明的目的是提供一种能特异性靶向肿瘤细胞的免疫疗法。
本发明的另一目的是提供一种间充质干细胞靶向运输趋化因子和细胞因子的免疫疗法。

- 本发明的第一方面，提供了一种间充质干细胞，所述间充质干细胞表达免疫刺激因子，所述免疫刺激因子选自下组：CCL3、CCL19、CCL21、XCL1、CXCL9、OX40L、4-1BBL、GITRL、CD40L、或其组合。

在另一优选例中，所述间充质干细胞含有外源核酸分子，所述外源核酸分子包括编码免疫刺激因子的核酸序列，所述免疫刺激因子选自下组：CXCL9、OX40L、CCL3、CCL19、CCL21、XCL1、CXCL9、OX40L、4-1BBL、GITRL、CD40L、或其组合。

- 30 在另一优选例中，所述外源核酸分子还包括启动子或启动子/增强子组合，所述编码免疫刺激因子的核酸序列可操作地连接于启动子或启动子/增强子组合。

在另一优选例中，所述启动子为组成型启动子或诱导型启动子，较佳地为组

成型启动子。

在另一优选例中，所述免疫刺激因子包括至少一种趋化因子，所述趋化因子包括：CCL3、CCL19、CCL21、XCL1、CXCL9、或其组合。

5 在另一优选例中，所述免疫刺激因子包括至少一种细胞因子，所述细胞因子包括：OX40L、4-1BBL、GITRL、CD40L、或其组合。

在另一优选例中，所述免疫刺激因子包括至少一种趋化因子和至少一种细胞因子，其中，所述趋化因子包括：CCL3、CCL19、CCL21、XCL1、CXCL9、或其组合，所述细胞因子包括：OX40L、4-1BBL、GITRL、CD40L、或其组合。

10 在另一优选例中，所述免疫刺激因子为 CCL3、CCL19、CCL21、XCL1 之中的一个或两个和 CD40L 组合。

在另一优选例中，所述免疫刺激因子为 OX40L、4-1BBL、GITRL 之中的一个或两个和 CXCL9 组合。

在另一优选例中，所述免疫刺激因子为 CXCL9 和/或 OX40L。

15 在另一优选例中，所述外源核酸分子包括第一表达盒和/或第二表达盒，所述第一表达盒含有编码趋化因子的核酸序列，所述第二表达盒含有编码细胞因子的核酸序列，其中，所述趋化因子包括：CCL3、CCL19、CCL21、XCL1、CXCL9、或其组合，所述细胞因子包括：OX40L、4-1BBL、GITRL、CD40L、或其组合。

在另一优选例中，所述外源核酸分子包括第一表达盒和第二表达盒，所述第一表达盒含有编码 CXCL9 的核酸序列，所述第二表达盒含有编码 OX40L 的核酸序列。

20 在另一优选例中，所述第一表达盒和第二表达盒为各自独立的、或合二为一的。

在另一优选例中，所述第一表达盒和第二表达盒分别还包含启动子和/或终止子。

25 在另一优选例中，所述第一表达盒和第二表达盒为同一表达盒，所述表达盒包含启动子、编码趋化因子的核酸序列和编码细胞因子的核酸序列。

在另一优选例中，所述的第一表达盒和第二表达盒位于载体上或整合在所述间充质干细胞的染色体中。

在另一优选例中，所述的第一表达盒和第二表达盒是独立的或相连的。

在另一优选例中，所述的第一表达盒和第二表达盒位于相同或不同的载体上。

30 在另一优选例中，所述的第一表达盒和第二表达盒位于同一载体。

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、其他基因转移系统、或其组合。

在另一优选例中，所述间充质干细胞包括：脂肪间充质干细胞、脐带间充质干细胞、或其组合。

在另一优选例中，所述间充质干细胞是离体的。

在另一优选例中，所述间充质干细胞是自体或异体的。

5

本发明的第二方面，提供了一种制备本发明第一方面所述的间充质干细胞的方法，包括以下步骤：

(1) 提供一待改造的间充质干细胞；和

(2) 将含有编码免疫刺激因子的核酸序列的外源核酸导入到所述待改造的间充质干细胞中，从而获得本发明第一方面所述的间充质干细胞；

其中，所述免疫刺激因子选自下组：CCL3、CCL19、CCL21、XCL1、CXCL9、OX40L、4-1BBL、GITRL、CD40L、或其组合。

本发明的第三方面，提供了一种制剂，所述制剂含有本发明第一方面所述的间充质干细胞，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，所述制剂为液态制剂。

在另一优选例中，所述制剂的剂型包括注射剂。

在另一优选例中，所述制剂中间充质干细胞的浓度为 $1 \times 10^3 - 1 \times 10^8$ 个细胞/ml，较佳地 $1 \times 10^4 - 1 \times 10^7$ 个细胞/ml。

20

本发明的第四方面，提供了如本发明第一方面所述的间充质干细胞的用途，用于制备预防和/或治疗癌症或肿瘤的药物或制剂。

在另一优选例中，所述肿瘤选自下组：血液肿瘤、实体瘤、或其组合。优选地，所述肿瘤为实体瘤。

在另一优选例中，所述血液肿瘤选自下组：急性髓细胞白血病(AML)、多发性骨髓瘤(MM)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、急性淋巴白血病(ALL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、或其组合。

在另一优选例中，所述实体瘤选自下组：胃癌、胃癌腹膜转移、肝癌、白血病、肾脏肿瘤、肺癌、小肠癌、骨癌、前列腺癌、结直肠癌、乳腺癌、大肠癌、宫颈癌、卵巢癌、淋巴瘤、鼻咽癌、肾上腺肿瘤、膀胱肿瘤、非小细胞肺癌(NSCLC)、脑胶质瘤、子宫内膜癌、肺鳞癌、肛门癌、头颈部肿瘤、或其组合。

在另一优选例中，所述实体瘤为结直肠癌。

在另一优选例中，所述肿瘤包括复发性、转移性肿瘤。

在另一优选例中，所述肿瘤包括 MHC-I 缺失的肿瘤。

本发明的第五方面，提供了一种药盒，所述药盒含有

5 (1) 第一容器，以及装于该第一容器中的本发明第一方面所述的间充质干细胞；和

(2) 第二容器，以及装于该第二容器中的抗肿瘤免疫治疗剂。

在另一优选例中，所述抗肿瘤免疫治疗剂选自下组：抗体、免疫细胞、或其组合。

10 在另一优选例中，所述免疫细胞为 T 细胞或 NK 细胞。

在另一优选例中，所述抗肿瘤免疫治疗剂为免疫检查点抗体。

在另一优选例中，所述免疫检查点抗体包括 PD-1 抗体和/或 CTLA-4 抗体。

15 本发明还提供了一种治疗疾病的方法，包括给需要治疗的对象施用适量的本发明第一方面所述的细胞、或本发明第三方面所述的制剂、或本发明第五方面所述的药物组合。

在另一优选例中，所述疾病为癌症或肿瘤，较佳地为实体瘤，更佳地为结直肠癌。

20 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，在此不再一一累述。

附图说明

25 图 1 显示了小鼠脂肪间充质干细胞表型与向肿瘤迁移特性的鉴定。A，流式细胞法检测脂肪间充质干细胞表面分子的表达。B，体内 MSC-GFP 在 CT26 皮下移植瘤小鼠模型中的迁移。免疫荧光检测肿瘤组织中 MSC-GFP 的浸润，绿色表示 MSC-GFP，蓝色(DAPI 染色)指示细胞核，比例尺：20 μ M。C，流式细胞法检测整个 CT26 皮下移植瘤中 MSC-GFP 的具体数量。数据代表平均值 \pm SEM(n = 3)。

30 图 2 显示了肿瘤细胞中过表达 CXCL9 抑制肿瘤体内生长。A，WB 和 qPCR 检测 CT26 中 CCL3 和 CXCL9 的过表达。数据代表平均值 \pm SEM(n = 3)。B，CT26-Vector，CT26-CCL3 和 CT26-CXCL9 的细胞增殖实验。数据代表平均值 \pm SEM(n = 3)。C，皮

下注射 CT26-Vector、CT26-CCL3 或 CT26-CXCL9 肿瘤细胞 BALB/c 小鼠中的肿瘤生长曲线，每 3 天测量肿瘤大小。数据代表平均值 \pm SEM(n = 4)。D，总细胞内 CD8⁺、CD4⁺ T 和 NK 细胞的百分比。数据代表平均值 \pm SEM(n = 4)。

5 图 3 显示了肿瘤细胞中过表达 OX40L 抑制肿瘤体内生长。A，WB 检测 CT26 中 IL36 β 和 OX40L 的过表达。B，流式检测 CT26 中 OX40L 的过表达。C，CT26-Vector，CT26-IL36 β 和 CT26-OX40L 的细胞增殖实验。数据代表平均值 \pm SEM(n = 3)。D，皮下注射 CT26-Vector、CT26-CCL3 或 CT26-CXCL9 肿瘤细胞 BALB/c 小鼠中的肿瘤生长曲线，每 3 天测量肿瘤大小。每组四只只小鼠。数据代表平均值 \pm SEM(n = 4)。* p < 0.05，** p < 0.01。

10 图 4 显示了 CXCL9 与 OX40L 在间充质干细胞中过表达的鉴定。A，WB 检测 MSC 中 CXCL9 的过表达。B，ELISA 检测 MSC 中 CXCL9 的过表达。数据代表平均值 \pm SEM(n = 3)。*** p < 0.001。C，WB 检测 MSC 中 OX40L 的过表达。D，流式细胞法检测 MSC 中 OX40L 的过表达。

15 图 5 显示了过表达 CXCL9 与 OX40L 的间充质干细胞抑制皮下移植瘤的生长。A，ELISA 检测 CXCL9 的分泌。B，流式细胞法检测 OX40L 的表达。C，图中显示为不同时间点的 CT26 皮下移植瘤大小。箭头指示为相应的给小鼠注射的 PBS 或 MSC 的时间。数据代表平均值 \pm SEM(n = 5)。D，流式细胞法分析 MSC 治疗后肿瘤中免疫细胞的比例。* p < 0.05，** p < 0.01，*** p < 0.001，ns = not significant (无统计学显著性)。

20 图 6 显示了过表达 CXCL9 与 OX40L 的间充质干细胞抑制 AOM/DSS 诱导的结直肠癌。A，AOM/DSS 处理以及 MSC 治疗方案示意图。B，结直肠肿瘤的代表性图像。比例尺：5mm。C，平均肿瘤数量和大小。数据代表平均值 \pm SEM(n = 3 - 4)。* p < 0.05，** p < 0.01，*** p < 0.001，ns = not significant(无统计学显著性)。D，CD8 和 NK 细胞的免疫荧光染色。比例尺：50 μ m。

25 图 7 显示了 PD-1 和 CTLA-4 抗体联合治疗对 AOM/DSS 诱导的结直肠癌没有显著的治疗功效。A，AOM/DSS 处理以及抗体治疗方案示意图。B，平均肿瘤数量和大小。数据代表平均值 \pm SEM(n = 4)。ns = not significant (无统计学显著性)。

30 图 8 显示了过表达 CXCL9 和 OX40L 的间充质干细胞促进 PD-1 阻断疗法的功效。A，间充质干细胞 (MSC-CXCL9+OX40L) (每针 5×10^5 个细胞) 与 PD-1 抗体阻断 (α PD-1) 治疗示意图；B，过表达 CXCL9 和 OX40L 的间充质干细胞与 PD-1 抗体阻断联合治疗比两者的单独治疗有更显著的肿瘤抑制作用 (n = 7-8 只/组)。** p < 0.01。

图 9 显示了过表达 CXCL9 和 OX40L 的间充质干细胞可抑制 MHC-I 缺失的具有免

疫逃逸特性的肿瘤的生长。A, 对体内小鼠结直肠癌细胞 MC38 皮下移植瘤进行流式细胞分析, 确认敲除 B2m 基因的 MC38 肿瘤细胞 (sgB2m) 与对照 sgLacZ 相比不表达 MHC-I 分子 (H2Kb/H2Db) (n = 4 只/组); B, 体内建立过表达 OVA 的 MHC-I 缺失的 MC38-sgB2m 或对照 MC38-sgLacZ 肿瘤细胞的移植瘤模型, 发现 MC38-sgB2m 比 MHC-I 正常表达的对照 MC38-sgLacZ 细胞生长得更快, 利用肿瘤疫苗(OVA257-264 多肽加 poly:IC 佐剂) 进行治疗, 发现 MC38-sgLacZ 细胞被肿瘤疫苗显著抑制, 而 MHC-I 缺失的 MC38-sgB2m 的肿瘤对疫苗治疗无响应 (n = 5 只/组); C, 过表达 CXCL9 和 OX40L 的间充质干细胞可显著抑制 MHC-I 缺失的 MC38-sgB2m 肿瘤的生长 (n = 7 只/组)。 ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001。

10 图 10 显示了过表达免疫激活因子/细胞因子或者趋化因子的间充质干细胞 (MSC) 的治疗功效。每只小鼠每次接受 5×10^5 个过表达其中一个因子的间充质干细胞, 每三天一次治疗, 一共六次治疗。A, 过表达 GITRL、4-1BBL 或 CD40L 的间充质干细胞具有非常显著的肿瘤抑制作用, 而过表达 IL5 的间充质干细胞没有明显的治疗效果 (n = 5 只/组); B, 过表达 CCL3、CCL19、CCL21 或 XCL1 的间充质干细
15 胞具有显著的肿瘤抑制作用 (n = 5 只/组)。 ** p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001。

具体实施方式

20 本发明人经过广泛而深入的研究, 经过大量的筛选, 首次意外地发现间充质干细胞过表达趋化因子 CCL3、CCL19、CCL21、XCL1、CXCL9 和/或细胞因子 OX40L、4-1BBL、GITRL、CD40L 时, 在肿瘤部位能够特异地吸引并激活杀伤肿瘤组织的免疫细胞, 并且间充质干细胞与趋化因子和/或细胞因子具有协同作用, 具有更高效且副作用低的免疫疗效。尤其是间充质干细胞过表达 CXCL9 和 OX40L 时, 具有相互协同作用, 对肿瘤组织杀伤能力显著增强, 尤其是结直肠癌细胞。在此基础上, 发
25 明人完成了本发明。

近年来免疫疗法诸如细胞因子、CAR-T 细胞或者免疫检查点阻断等, 在一些癌症患者中产生良好的功效, 也遇到了许多障碍, 比如 T 细胞到达肿瘤部位的效率低、肿瘤部位已有的免疫细胞数量少、全身性用药带来的副作用等。间充质干细胞在体内可从多种组织中获取, 在体外易于培养扩增和利用基因工程的方法改造, 免疫原
30 性较低。本发明人在小鼠模型中的研究证实脂肪间充质干细胞可特异地向肿瘤部位迁移, 并不在其他脏器中富集, 因此可作为理想的药物载体。本发明利用脂肪间充质干细胞为载体过表达具有免疫调节作用的趋化因子 CXCL9 和细胞因子 OX40L, 通

过间充质干细胞向肿瘤的主动迁移,在肿瘤部位特异地吸引并激活杀伤肿瘤组织的免疫细胞,最终达到更高效且副作用低的免疫治疗功效。

术语说明

5 除非另外定义,否则本文中使用的全部技术与科学术语均具有如本发明所属领域的普通技术人员通常理解的不同含义。

如本文所用,在提到具体列举的数值中使用时,术语“约”意指该值可以从列举的值变动不多于1%。例如,如本文所用,表述“约100”包括99和101之间的全部值(例如,99.1、99.2、99.3、99.4等)。

10 如本文所用,术语“含有”或“包括(包含)”可以是开放式、半封闭式和封闭式的。换言之,所述术语也包括“基本上由...构成”、或“由...构成”。

如本文所用,术语“给予”是指使用本领域技术人员已知的各种方法和递送系统中的任一种将本发明的产品物理引入受试者,包括静脉内,肌内,皮下,腹膜内,脊髓或其它肠胃外给药途径,例如通过注射或输注。

15

间充质干细胞(MSC)

近近年来间充质干细胞(MSC)作为有潜力的细胞载体出现在人们的视野中,其在全身给药时具有针对许多不同肿瘤类型的主动迁移能力。它可以从许多不同的成体组织中提取,易于扩增培养,能避免免疫排斥。同时间充质干细胞肿瘤向性迁移的特性以及在靶向地点长期存活的能力,使其成为细胞治疗的一个重要资源。常用类型的MSC是骨髓来源的MSC(BM-MSC),脐带血来源的MSC(UCB-MSC)、脐带来源的MSC(UC-MSC)和脂肪组织来源的MSC(AT-MSC)。然而,BM-MSC和UCB-MSC的分离过程十分复杂且低效。因此脂肪组织或脐带组织MSC可以作为更理想的替代方案,因为它们相比骨髓和脐带血含有更多的MSC,组织更易于获取和收集。此外,关于用于个体化细胞疗法的自体干细胞来源,AT-MSC对供体具有最小的风险并且没有伦理问题。

25 通过MSCs的肿瘤归巢能力,本发明利用MSC靶向递送趋化因子CCL3、CCL21、XCL1、CXCL9和细胞因子OX40L、4-1BBL、GITRL、CD40L来吸引和激活肿瘤微环境中的效应T细胞、NK细胞和抗原呈递细胞,从而产生更精准和持续的免疫应答来杀伤肿瘤细胞。在目前的研究中,在小鼠模型中以脂肪间充质干细胞为载体来过表达趋化因子和细胞因子来治疗结直肠癌。

表达盒

如本文所用，“表达盒”或“本发明表达盒”包括第一表达盒和/或第二表达盒。所述第一表达盒含有趋化因子的核酸序列；所述第二表达盒含有编码细胞因子的核酸序列，其中，所述趋化因子包括：CCL3、CCL19、CCL21、XCL1、CXCL9、或其组合，所述细胞因子包括：OX40L、4-1BBL、GITRL、CD40L、或其组合。

在一个实施方式中，所述外源核酸分子包括第一表达盒和第二表达盒，所述第一表达盒含有编码CXCL9的核酸序列，所述第二表达盒含有编码OX40L的核酸序列。

在另一优选例中，所述第一表达盒和第二表达盒为各自独立的、或合二为一的。在另一优选例中，所述第一表达盒和第二表达盒分别还包含启动子和/或终止子。在另一优选例中，所述的第一表达盒和第二表达盒位于载体上或整合在所述间充质干细胞的染色体中。在另一优选例中，所述的第一表达盒和第二表达盒位于相同或不同的载体上。在另一优选例中，所述的第一表达盒和第二表达盒位于同一载体。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、其他基因转移系统、或其组合。

15

载体

本发明还提供了含有本发明表达盒的载体。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，通常通过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。

所述表达盒或核酸序列可被克隆入许多类型的载体。例如，该表达盒或核酸序列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。

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
5 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。
10

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
15 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早期巨细胞病毒(CMV)启动子序列。该启动子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 α (EF-1 α)。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、
20 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
25 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。

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
30 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。

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。

- 5 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、 β -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基因的基因（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。

- 15 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(如人 T 细胞)、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。

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)。

- 20 将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。

- 25 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)。

- 30 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。

制备方法

10 本发明提供了一种制备间充质干细胞的方法，包括将第一表达盒和/或第二表达盒导入到所述待改造的间充质干细胞，其中所述第一表达盒用于表达趋化因子，所述第二表达盒用于表达细胞因子，从而获得所述的间充质干细胞。

一般包括以下步骤：(1)用编码本发明免疫刺激因子的多核苷酸，或用含有该多核苷酸的重组表达载体转化或转导合适的宿主细胞；(2)在合适的培养基中培养的宿主细胞。

制剂

20 本发明提供了一种含有本发明第一方面所述的间充质干细胞，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，所述制剂中所述间充质干细胞的浓度为 $1 \times 10^3 - 1 \times 10^8$ 个细胞/ml，更优地 $1 \times 10^4 - 1 \times 10^7$ 个细胞/ml。

25 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。

治疗性应用

30 本发明包括含本发明表达盒的载体转导的间充质干细胞进行的治疗性应用。本发明间充质干细胞可主动向肿瘤部位迁移，并且不在肝、脾、肾等脏器中富集，具有作为肿瘤治疗药物载体的特异性和安全性，为在肿瘤中局部激活免疫反应避免全身性副作用提供了有效的手段。过表达趋化因子 CXCL9 和细胞因子 OX40L 的脂肪间充质干细胞治疗体系具有特异靶向肿瘤部位的特性，能够吸引并激活 T 细胞和 NK

细胞从而达到理想的抗肿瘤功效。

在一个实施方式中，本发明提供一类细胞疗法，包括给哺乳动物施用本发明的间充质干细胞。不像抗体疗法，本发明间充质干细胞能够体内复制，产生可导致持续肿瘤控制的长期持久性。

5 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）或可包括实体瘤。用本发明的间充质干细胞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。

10 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。

15 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。

20 本发明的间充质干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。

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) 扩展细胞， ii) 将本发明表达盒引入细胞， 和/或 iii) 冷冻保存细胞。

25 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）中分离并用含本发明表达盒的载体进行基因修饰（即，体外转导或转染）。本发明间充质干细胞可被施用给哺乳动物接受者，以提供治疗益处。哺乳动物接受者可为人，和本发明间充质干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。

30 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。

通常地，如本文所述活化和扩展的细胞可用于治疗和预防无免疫应答的个体中

产生的疾病。因此，本发明提供了治疗癌症的方法，其包括施用给需要其的对象治疗有效量的本发明间充质干细胞。

5 本发明的间充质干细胞可被单独施用或作为药物组合物与稀释剂和/或与其他组分诸如一些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或制剂可包括如本文所述的间充质干细胞，与一种或多种药学或生理学上可接受载体、稀释剂或赋形剂组合。

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程度——尽管适当的剂量可由临床试验确定。

10 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：包括本文描述的间充质干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。间充质干细
15 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。

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、
20 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。间充质干细胞的组合物可被直接注入肿瘤，淋巴结或感染位置。

25 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间充质干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
30 对 PML 患者的其他治疗。在进一步的实施方式中，本发明的间充质干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,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间充质干细胞的注入。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 1×10^3 个至 1×10^{10} 个本发明间充质干细胞,通过例如静脉回输的方式,施用于患者。

10

本发明的技术方案, 具有如下有益效果:

1. 本发明间充质干细胞在体内可从多种组织中获取, 在体外易于培养扩增和利用基因工程的方法改造, 免疫原性较低。

2. 与大多数免疫疗法的相比, 本发明方法不依赖于肿瘤浸润淋巴细胞的存在, 在临床中也适用于极低或抵制淋巴细胞浸润的肿瘤的治疗。

3. 本发明间充质干细胞过表达 CCL3、CCL19、CCL21、XCL1、CXCL9、OX40L、4-1BBL、GITRL、CD40L 中的一种或多种时, 在肿瘤部位能够特异地吸引并激活杀伤肿瘤组织的免疫细胞, 具有更高效且副作用低的免疫疗效。

4. 本发明间充质干细胞过表达 CXCL9 和 OX40L 时, 具有相互协同作用, 对肿瘤组织杀伤能力显著增强, 尤其是结直肠癌细胞。此方法对 MHC-I 阴性的具有传统免疫疗法(如 CAR-T 或 PD-1/PD-L1 抗体)抗性的肿瘤细胞也具有杀伤作用。

5. 本发明与其他临床中使用的免疫疗法如 CAR-T 或 PD-1/PD-L1 抗体联用时, 也可增强这些免疫疗法的功效。本发明的间充质干细胞和 PD-1 抗体的联合治疗比两者的单独治疗有更显著的肿瘤抑制作用, 二者表现出下协同作用。

25

下面结合具体实施, 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。

除非另外说明, 否则百分比和份数按重量计算。

材料和方法

细胞系

CT26 细胞是源自 BALB/c 小鼠的结肠腺癌细胞, MC38 是源自 C57BL/6 小鼠的结肠腺癌细胞系。CT26 和 MC38 细胞分别培养在含有 10%胎牛血清和 1%青霉素/链霉素的 RPMI 1640 和 DMEM 中。

5 抗体

流式细胞分析使用的抗体来着 BD Biosciences, BioLegend 或 eBioscience 公司。用于蛋白免疫印迹分析的抗体包括 anti-CXCL9 (Abcam), anti-Myc-tag (Cell Signaling Technology), anti-OX40L (Abcam) 和 anti-GAPDH (Abcam)。免疫荧光染色的抗体包括 anti-GFP (Abcam), anti-CD8a (BioLegend) 和 anti-NKp46 (CD335) (BioLegend)。

免疫检查点阻断抗体 anti-PD-1 (clone RMP1-4) 和 anti-CTLA-4 (clone 9D9) 购自 Bio X Cell 公司。这两种抗体 (anti-PD-1: 200 μ g/小鼠; anti-CTLA-4: 100 μ g/小鼠) 通过腹腔注射给小鼠。

从小鼠脂肪组织中分离、培养和鉴定间充质干细胞

15 使用 I 型胶原酶消化小鼠皮下脂肪组织分离出 AT-MSC。将细胞培养在含有 10%胎牛血清和 1%青霉素/链霉素的 α -MEM 培养基中。细胞贴壁培养三代之后利用流式细胞法鉴定细胞表面标记蛋白的表达。

慢病毒的产生和转导

20 将 cDNA 克隆到慢病毒载体中。慢病毒的包装和滴度测定由和元生物技术(上海)股份有限公司完成。在 6 μ g/ml 聚凝胺(Sigma-Aldrich)存在下, 用感染复数 (MOI) 为 60 的慢病毒感染间充质干细胞。

肿瘤细胞增殖实验

根据说明书的步骤, 利用 CCK-8 试剂盒(Dojindo Molecular Technologies) 测定肿瘤细胞的增殖。使用酶标仪(Tecan)测量吸光度。

25 蛋白免疫印迹法(Western Blotting)

30 收获细胞并用细胞裂解缓冲液(RIPA 缓冲液 + 1%蛋白酶抑制剂)(ThermoFisher Scientific)处理以制备细胞裂解物。利用 BCA 试剂盒(ThermoFisher Scientific)测定细胞裂解物中的蛋白质浓度。将 15 至 30 微克蛋白质上样到 5%至 15%SDS-PAGE 蛋白胶(ThermoFisher Scientific)上, 然后转移到 PVDF 膜(Millipore)上。用 TBST 缓冲液中配置的 5%脱脂牛奶封闭膜, 并在 4°C 下与 Myc 标签, OX40L, CXCL9 和 GAPDH 的抗体一起孵育过夜。用 TBS-T 缓冲液洗涤膜, 并在室温下与辣根过氧化物酶偶联的二抗一起孵育 1 小时。用增强的化学发光

试剂盒(Millipore)显影膜并暴露于膜。

酶联免疫吸附实验(ELISA)

收集慢病毒转导的 AT-MS C 的上清液并保存在-80℃的冰箱中直至测量。使用来自 Abcam 的 ELISA 试剂盒根据说明书测试 CXCL9 的分泌。

5 小鼠皮下移植瘤模型

分别在 8 至 10 周龄 BALB/c 或 C57BL/6 小鼠的右下背皮下注射 CT26 或 MC38 (0.5 或 1×10^6 /小鼠) 细胞。当肿瘤最大直径达到 0.5 至 0.7cm 时, 将小鼠随机分配至实验组。每只动物尾静脉注射 250 μ l PBS 或含有 5×10^5 AT-MS C 的 250 μ l PBS 悬液来进行全身给药。每三天用游标卡尺测量肿瘤大小一次, 并使用下式计算肿瘤体积: $V = L \times W^2 / 2$, 其中 L 和 W 分别是肿瘤的长径和短径。监测小鼠的肿瘤大小和存活率。当肿瘤体积达到 2 cm^3 或肿瘤变成溃疡或小鼠濒临死亡时, 处死小鼠。

流式分析

为了鉴定 AT-MS C, 使用 20 μ M EDTA 消化分离第 3 至第 5 代的贴壁细胞, 然后用 PBS 洗涤两次并用抗体染色。

为了分析肿瘤浸润性免疫细胞, 将皮下植入的肿瘤解剖并转移到 RPMI 培养基中, 用剪刀剪碎, 置于含有 0.25 mg/ml Liberase TL (Roche) 和 50 μ g/ml 的 DNase I (Sigma-Aldrich) 无血清 RPMI 培养基中, 使用 gentleMAC Octo Dissociator (Milteniy Biotec) 在 37℃ 下消化, 并通过 40 μ m 细胞过滤器 (BD Biosciences) 分散。进一步洗涤单细胞, 并用抗体染色。通过 Zombie Fixable Viability Kit (BioLegend) 染色排除死细胞。对于细胞因子的胞内染色, 在收获样品之前 4-6 小时给每只小鼠腹膜内注射 0.25mg 布雷菲德菌素 A (BFA) (Selleck)。在 5 μ g/ml BFA 存在下进行表面染色后, 用胞内固定和透化缓冲液组 (eBioscience) 进行胞内染色。进行表面染色后用 Foxp3 转录因子染色缓冲液 (eBioscience) 进行核染色。

在 BD LSRFortessa 细胞分析仪 (BD Biosciences) 上获得流式数据, 并使用 FlowJo 软件分析。用于流式细胞术的所有抗体均购自 BD Biosciences, BioLegend 或 eBioscience。

AOM/DSS 诱导小鼠结直肠癌模型

BALB/c 小鼠腹膜内注射 AOM (12.5 mg/kg 体重; Sigma-Aldrich) (14)。1 周后, 给小鼠喝含有 3% DSS (MP Biomedicals) 的饮用水 7 天, 然后是引用 2 周的正常水。DSS 继续诱导两个周期, 并且从 DSS 诱导周期的最后一周开始, 通过尾静脉注射五

次 MSC 后处死小鼠。在 DSS 治疗期间记录体重。从小鼠中取出结肠，用冰 PBS 冲洗，纵向打开，在室温下在 4%多聚甲醛溶液(Sigma-Aldrich)中固定过夜，并石蜡包埋。在固定之前，使用数字卡尺进行尺寸测量。

免疫荧光

5 用 10%正常羊血清封闭组织切片，然后在 4°C 下与一抗一起孵育过夜，在室温下与二抗孵育 1 小时。将载玻片安装在具有 DAPI(ThermoFisher Scientific)的抗褪色封固剂中，并在 Nikon Eclipse Ti 荧光显微镜下观察。用于免疫荧光的抗体是 GFP 抗体 (Abcam)，CD8a 抗体 (BioLegend) 和 NKp46 抗体 (CD335) (BioLegend)。

10 统计

所有结果表示为平均值±SEM。通过 Student t 检验评估差异，或者当比较两组以上的平均值时，通过双向 ANOVA，然后进行 Bonferroni 多重比较检验。用 Prism 软件(GraphPad)进行数据分析。统计学显著性设定在 $p < 0.05$ 的水平。

研究批准

15 所有动物程序均经上海交通大学动物护理和使用委员会批准。

实施例 1 脂肪间充质干细胞向肿瘤迁移的特性

从小鼠皮下脂肪提取了间充质干细胞，经过流式细胞法检测，这些细胞表达特异的间充质干细胞标志分子，不表达其他细胞类型的标志分子(图 1A)，证实了用于实验的脂肪间充质干细胞的纯度。利用慢病毒转染使脂肪间充质干细胞表达 GFP，再将 5×10^5 个细胞通过尾静脉注射到荷瘤小鼠(CT26 肠癌皮下瘤)，7 天之后对肿瘤及其他脏器进行组织切片的免疫荧光染色，结果表明 GFP 阳性的间充质干细胞只在肿瘤中驻留，在其他脏器如肝、脾、肾中均未发现(图 1B)。利用流式细胞法对肿瘤中 GFP 阳性的间充质干细胞进行检测，在细胞注入后 14 天依然能检测到一定数量的细胞(图 1C)。这些结果都证明了脂肪间充质干细胞能够特异地向肿瘤部位迁移并驻留较长时间的特性，支持了其作为治疗分子的载体的潜能。

实施例 2 CXCL9 和 OX40L 的抗肿瘤特性

为了探寻具有较高功效的免疫激活型治疗分子，选取了有潜在抗肿瘤功能的趋化因子以及细胞因子，将基因克隆到慢病毒载体中包装出携带这些基因的慢病毒。将转导了这些载有基因或者空白对照的慢病毒的 CT26 肠癌细胞系，进行皮下移植瘤实验检测这些分子的抗肿瘤功效。将具有潜在抗肿瘤功效的趋化因子 CCL3

和 CXCL9 在 CT26 中过表达(图 2A)之后,细胞的体外增殖均不受影响(图 2B),而体内皮下移植瘤的生长受到了显著性的抑制(图 2C),说明这些趋化因子可能是通过体内免疫系统的作用实现了对肿瘤生长的抑制。其中 CXCL9 的抗肿瘤效果最为显著。通过流式细胞法检测肿瘤中的免疫细胞的构成揭示了 CXCL9 的确能提高 CD8、
5 CD4 和 NK 等抗肿瘤的免疫细胞的浸润(图 2D)。

在过表达两种免疫激活型细胞因子 IL36 β 和 OX40L 的 CT26 细胞中(图 3A&B),同样发现过表达这两种细胞因子对肿瘤细胞的体外增殖没有影响(图 3C),而且皮下移植瘤的生长有着明显的抑制作用(图 3D),也说明可能是通过体内免疫系统起到了抗肿瘤的功。其中 OX40L 表现出了较强的抗肿瘤功效。

10

实施例 3 过表达趋化因子 CXCL9 与细胞因子 OX40L 的间充质干细胞的抗肿瘤功效

利用慢病毒感染建立了过表达 CXCL9 和 OX40L 的脂肪间充质干细胞体系。通过蛋白免疫印迹与 ELISA 技术鉴定了 CXCL9 的成功表达与分泌(图 4A&B),蛋白免疫印迹与流式细胞法证实了 OX40L 在细胞膜上的成功表达(图 4C&D)。之后建立了
15 同时过表达 CXCL9 和 OX40L 的 MSC(图 5A&B)在 CT26 皮下移植瘤模型中,通过尾静脉每次给小鼠注射 5×10^5 个间充质干细胞或者 PBS,经过每次间隔四天共三次的治疗,同时携带有 CXCL9 和 OX40L 的间充质干细胞表现出了最强的抗肿瘤功效(图 5C)。流式细胞法分析发现肿瘤中淋巴细胞特别是抗肿瘤的 CD8 T 细胞和 NK 细胞的比例显著上升(图 5D),说明该疗法有效地激活了抗肿瘤免疫应答。
20

为了进一步探究间充质干细胞免疫治疗体系的功效,利用 AOM/DSS 诱导出炎症导致原位肠癌模型,在第三个 DSS 处理循环的最后一周开始,对小鼠进行为期 4 周共 5 次治疗(图 6A),每次通过尾静脉注入 PBS 或 5×10^5 个间充质干细胞,载有 CXCL9 和 OX40L 的间充质干细胞使小鼠的肠肿瘤有了极为显著的减少(图 6B&C)。免疫荧光染色证明抗肿瘤的 CD8 T 细胞和 NK 细胞的浸润显著上升(图 6D),同移植瘤模型中观测到的结果一致。
25

相比较,在 AOM/DSS 诱导的原位肠癌模型中联合使用 PD-1 抗体(200 μ g/小鼠)和 CTLA-4(100 μ g/小鼠)抗体对小鼠进行治疗(图 7A),肿瘤生长并没有显著变化(图 7B)。

上述结果均可表明,过表达 CXCL9 和 OX40L 的脂肪间充质干细胞在小鼠皮下移植瘤与炎症诱导的原位发生的肠癌模型中均展现出了极为显著的治疗效果。同时携带有 CXCL9 和 OX40L 的间充质干细胞,表达 CXCL9 和 OX40L,两者具有协同作用,
30

抗肿瘤效果明显好于单独表达 CXCL9 或 OX40L 的间充质干细胞的抗肿瘤效果。而且在炎症诱导的原位发生的肠癌模型中间充质干细胞治疗的功效明显优于免疫检查点阻断疗法。

实施例 4 过表达趋化因子 CXCL9 与细胞因子 OX40L 的间充质干细胞提高 PD-1

5 阻断疗法的治疗功效

在 CT26 皮下移植瘤小鼠模型中,给小鼠注射共计四次的过表达 CXCL9 和 OX40L 的间充质干细胞 (MSC)、PD-1 阻断抗体 (α PD-1) 或者两者 (图 8A)。

结果如图 8B 所示, MSC 和 α PD-1 各自单独均能显著抑制肿瘤生长, 而 MSC 和 α PD-1 联合治疗比两种单独治疗更有效地抑制肿瘤生长, 说明 MSC 疗法对于 PD-1 阻断疗法有明显的增强作用。

实施例 5 过表达趋化因子 CXCL9 与细胞因子 OX40L 的间充质干细胞对于 MHC-I 缺失的肿瘤的抑制作用

利用 CRISPR 技术敲除 MC38 中的 B2m 基因 (sgB2m) 成功建立了 MHC-I 缺失的肿瘤模型 (图 9A)。在此基础上过表达 OVA 基因使肿瘤细胞表达特异的 OVA 抗原。相对于对照 sgLacZ, MHC-I 缺失的 MC38-sgBm 生长更快并且对 OVA 多肽疫苗治疗不敏感 (图 9B)。而过表达 CXCL9 和 OX40L 的间充质干细胞依然可以显著地抑制 MHC-I 缺失的 MC38-sgBm 肿瘤的生长 (图 9C)。说明在肿瘤 MHC-I 缺失的情况下, 间充质干细胞治疗比肿瘤疫苗有更大优越性。

实施例 6 过表达其他趋化因子或细胞因子的间充质干细胞的抗肿瘤功效

在 CT26 移植瘤模型中, 给小鼠通过尾静脉注射共计六次的表达不同细胞因子或趋化因子的间充质干细胞 (5×10^5 个/小鼠/次) 或 PBS, 过表达 IL15 的间充质干细胞没有表现出明显的抗肿瘤功效, 而过表达 GITRL、4-1BBL、CD40L 的间充质干细胞均展现出了高效的抗肿瘤作用 (图 10A)。同样的, 过表达其他几种趋化因子 CCL3、CCL19、CCL21、XCL1 均表现出了显著的抗肿瘤功效 (图 10B)。

讨论

免疫疗法使得癌症的治疗产生了革新。尽管一些细胞因子以及免疫检查点阻断剂等 30 在肿瘤的临床治疗中表现出显著的疗效, 全身性地系统使用这些药物会非特异地激活免疫系统而影响大多数的器官。为了解决全身性给药带来的副作用, 选取了间充质干细胞作为药物载体。研究结果表明了脂肪间充质干细胞可主动向肿瘤部位迁移, 并且不在肝、脾、肾等脏器中富集, 充分支持了间充质干细胞作为肿瘤治疗药物载体的特异性和安全性, 为在肿瘤中局部激活免疫反应避免全身性副作用提

供了有效的手段。

T 细胞和 NK 细胞在肿瘤中的浸润是实体瘤的免疫治疗功效的一个关键决定因素。肿瘤可以通过不同机制限制淋巴细胞的浸入。T 细胞浸润较多的肿瘤通常也高表达能够吸引 T 细胞的趋化因子，包括 CCL3、CCL4 和 CXCL10 等。本发明意外地发现，利用间充质干细胞为载体表达 CXCL9 并运输到肿瘤部位继而吸引抗肿瘤的淋巴细胞，表现出更强的 T 细胞和 NK 细胞吸引能力，解决了淋巴细胞难以进入实体瘤的难题。此外，间充质干细胞体系中搭载 OX40L 也能够更高效地激活 T 细胞和 NK 细胞。OX40 受体的激活型抗体已经进入临床阶段 (ClinicalTrials.gov)，但潜在的问题也是系统用药带来的副作用。OX40 的配体 OX40L 是一种膜蛋白，在间充质干细胞中表达既可以定向运输到肿瘤部位也不会像分泌性细胞因子一样分泌出来而转移到其他部位，减少了分泌带来的扩散，可在肿瘤部位激活已有的或者新迁移来的淋巴细胞。本发明还意外地发现，过表达 CXCL9 和 OX40L 的脂肪间充质干细胞在小鼠皮下移植瘤与炎症诱导的原位发生的肠癌模型中均展现出了极为显著的治疗效果。

15 总地来看，本发明建立的过表达趋化因子 CXCL9 和细胞因子 OX40L 的脂肪间充质干细胞治疗体系具有特异靶向肿瘤部位的特性，能够吸引并激活 T 细胞和 NK 细胞从而达到理想的抗肿瘤功效。与大多数免疫疗法的相比，该疗法不依赖于肿瘤浸润淋巴细胞的存在，在临床中也适用于极低或抵制淋巴细胞浸润的肿瘤的治疗。脂肪或者脐带间充质干细胞易于提取和培养，易应用于个体化治疗。其低免疫源性也使异体间使用具有可行性。因此，建立的基于间充质干细胞的免疫疗法具有极高的临床转化价值。

25 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. 一种间充质干细胞，其特征在于，所述间充质干细胞表达免疫刺激因子，所述免疫刺激因子选自下组：CCL3、CCL19、CCL21、XCL1、CXCL9、OX40L、4-1BBL、
5 GITRL、CD40L、或其组合。

2. 如权利要求 1 所述的间充质干细胞，其特征在于，所述免疫刺激因子包括至少一种趋化因子，所述趋化因子包括：CCL3、CCL19、CCL21、XCL1、CXCL9、或其组合；和/或

所述免疫刺激因子包括至少一种细胞因子，所述细胞因子包括：OX40L、
10 4-1BBL、GITRL、CD40L、或其组合。

3. 如权利要求 1 所述的间充质干细胞，其特征在于，所述免疫刺激因子为 CCL3、CCL19、CCL21、XCL1 之中的一个或两个和 CD40L 组合；或者

所述免疫刺激因子为 OX40L、4-1BBL、GITRL 之中的一个或两个和 CXCL9 组合。

4. 如权利要求 1 所述的间充质干细胞，其特征在于，所述间充质干细胞包括：
15 脂肪间充质干细胞、脐带间充质干细胞、或其组合。

5. 一种制备权利要求 1 所述的间充质干细胞的方法，其特征在于，包括以下步骤：

(1) 提供一待改造的间充质干细胞；和

(2) 将含有编码免疫刺激因子的核酸序列的外源核酸导入到所述待改造的间充
20 质干细胞中，从而获得权利要求 1 所述的间充质干细胞；

其中，所述免疫刺激因子选自下组：CCL3、CCL19、CCL21、XCL1、CXCL9、OX40L、4-1BBL、GITRL、CD40L、或其组合。

6. 一种制剂，其特征在于，所述制剂含有权利要求 1 所述的间充质干细胞，以及药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

7. 如权利要求 1 所述的间充质干细胞的用途，其特征在于，用于制备预防和/或治疗癌症或肿瘤的药物或制剂。

8. 如权利要求 7 所述的用途，其特征在于，在另一优选例中，所述肿瘤为实体瘤，较佳地为结直肠癌。

9. 一种药盒，其特征在于，所述药盒含有

(1) 第一容器，以及装于该第一容器中的权利要求 1 所述的间充质干细胞；和
30 (2) 第二容器，以及装于该第二容器中的抗肿瘤免疫治疗剂。

10. 如权利要求 9 所述的药盒，其特征在于，所述抗肿瘤免疫治疗剂为免疫检查点抗体。

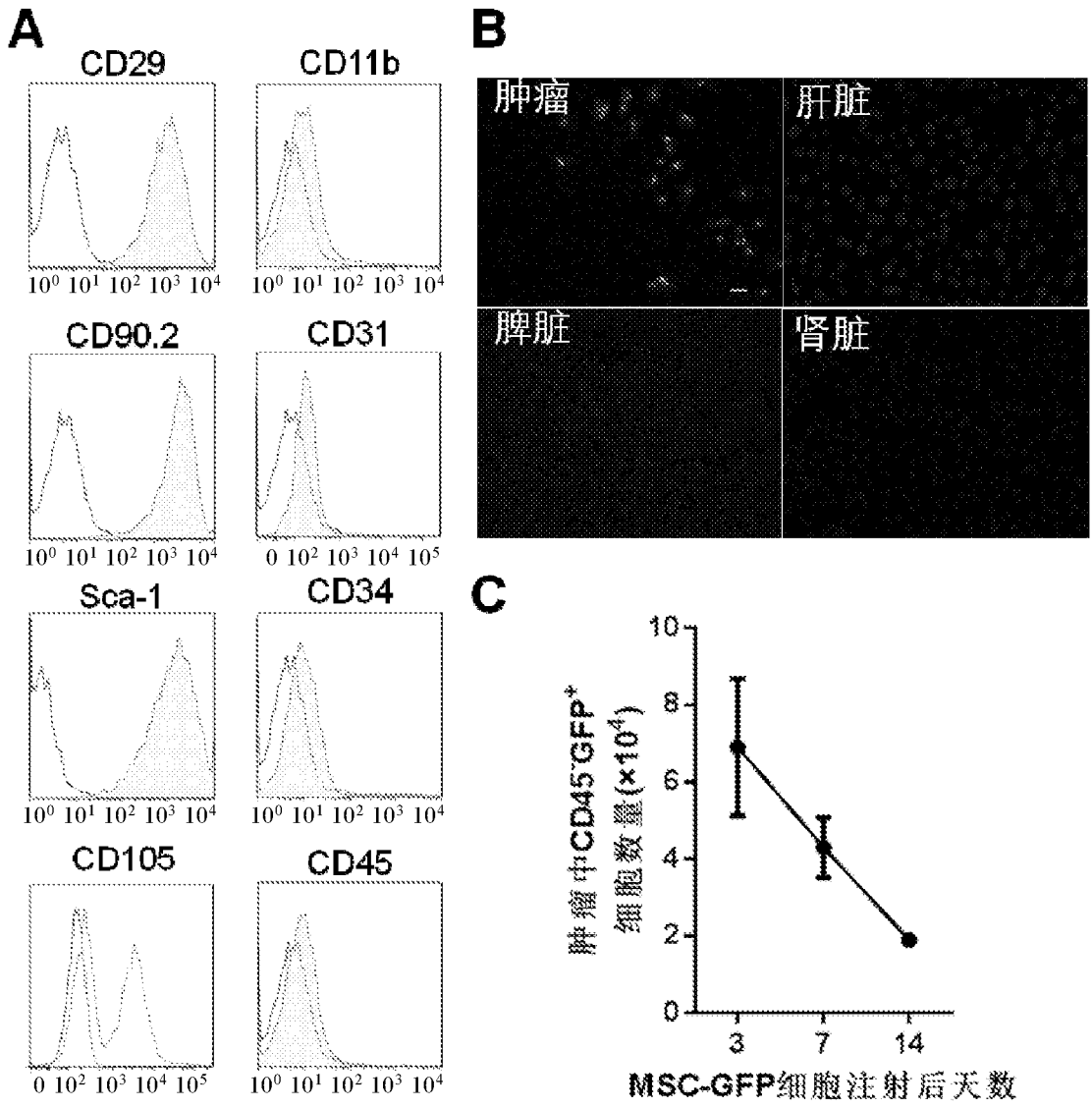


图 1

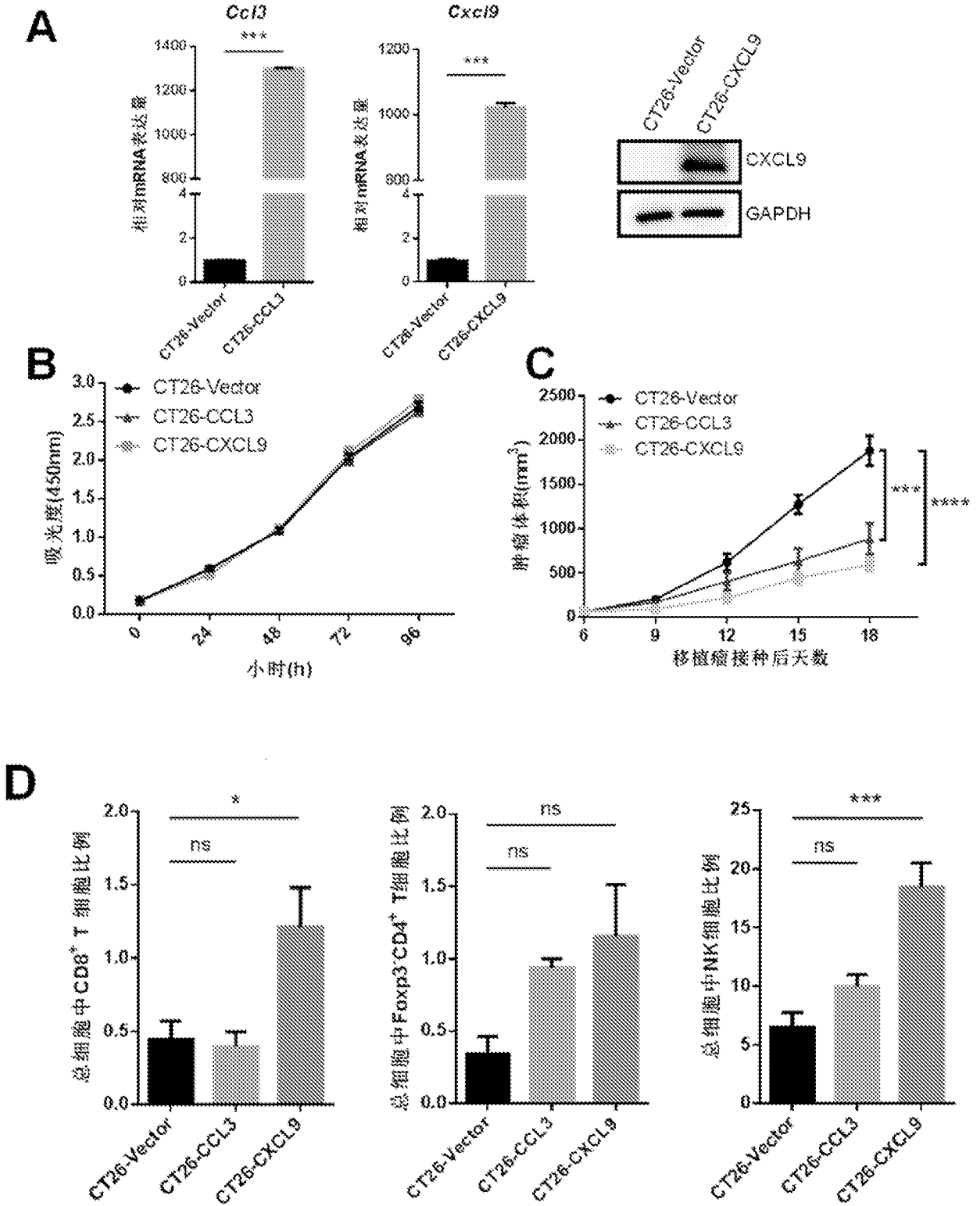


图 2

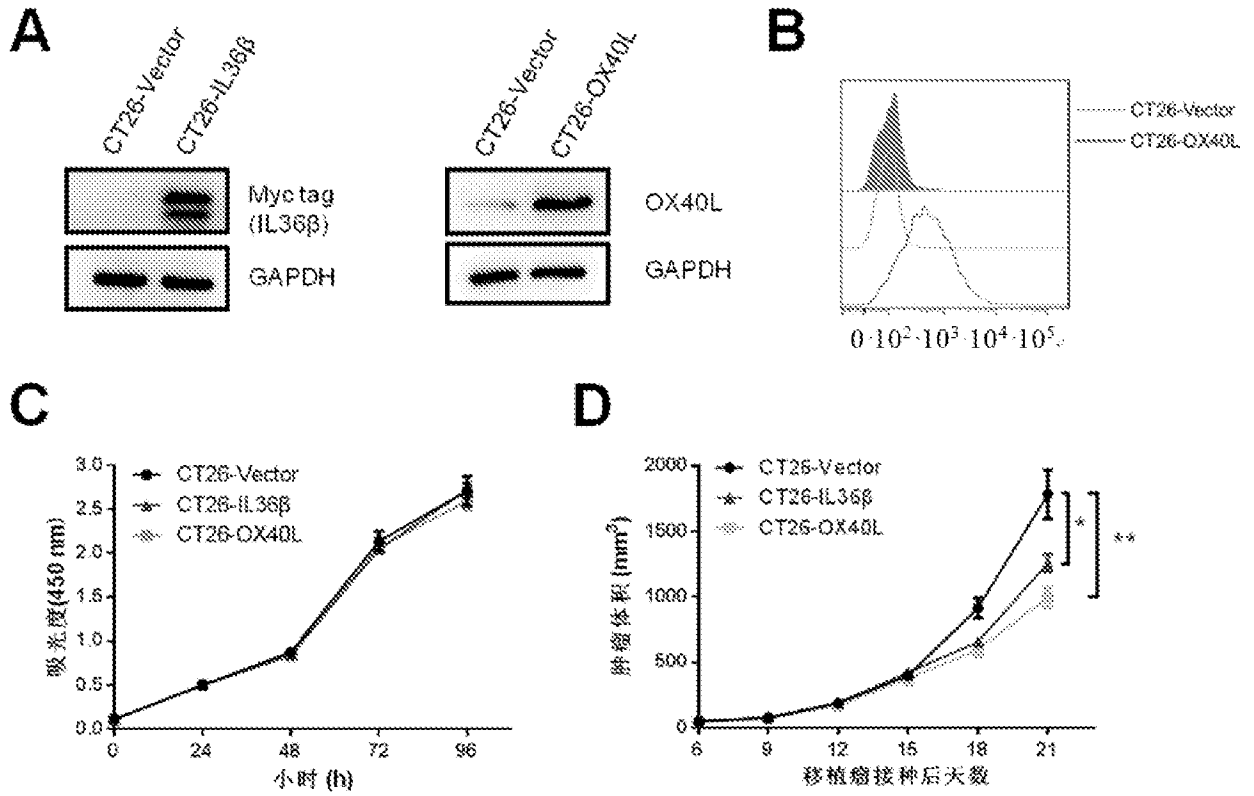


图 3

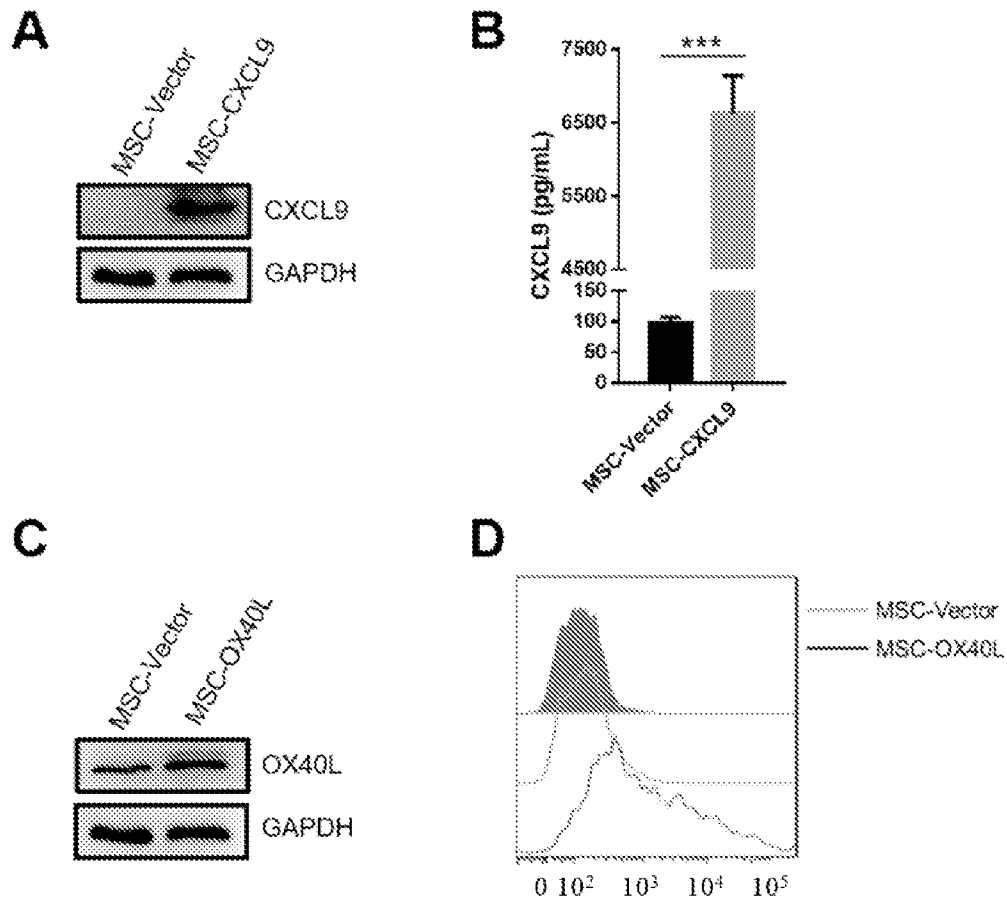


图 4

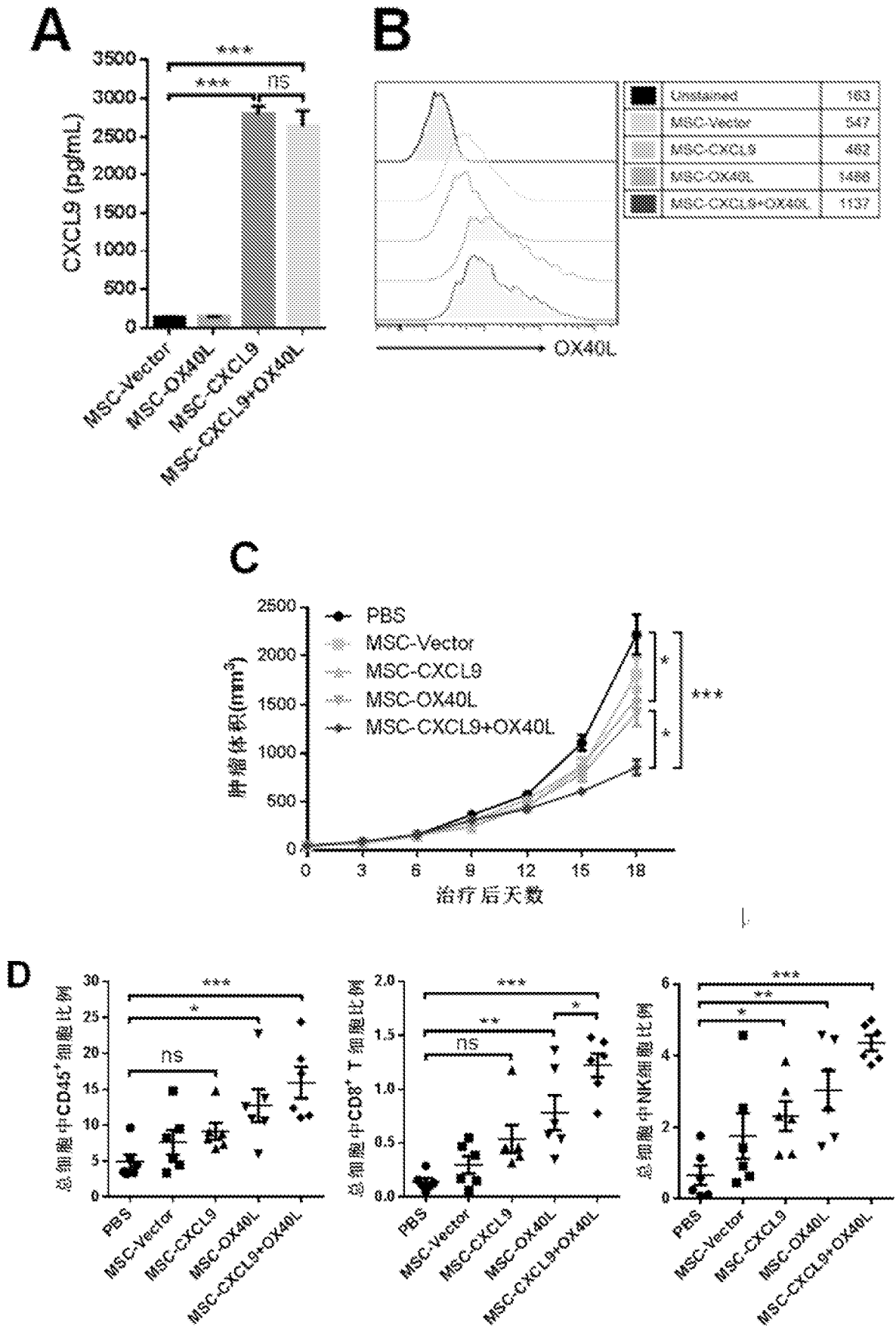


图 5

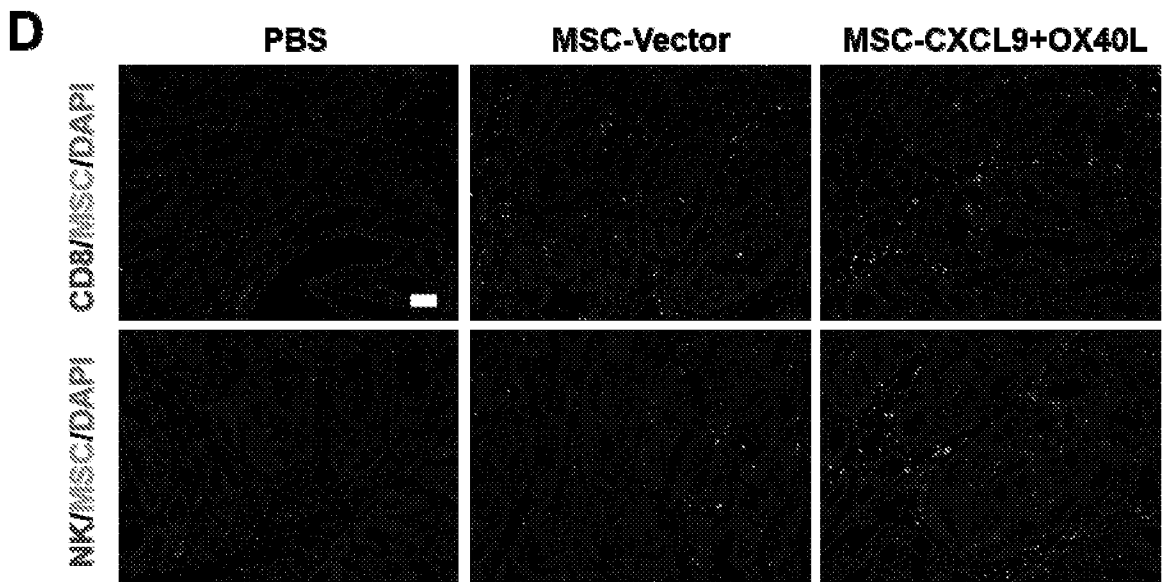
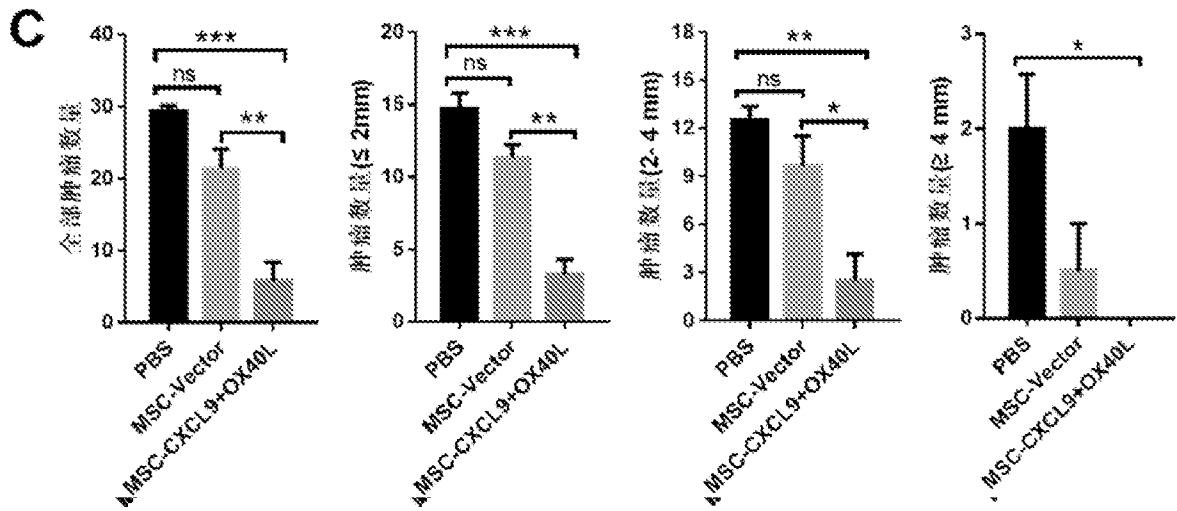
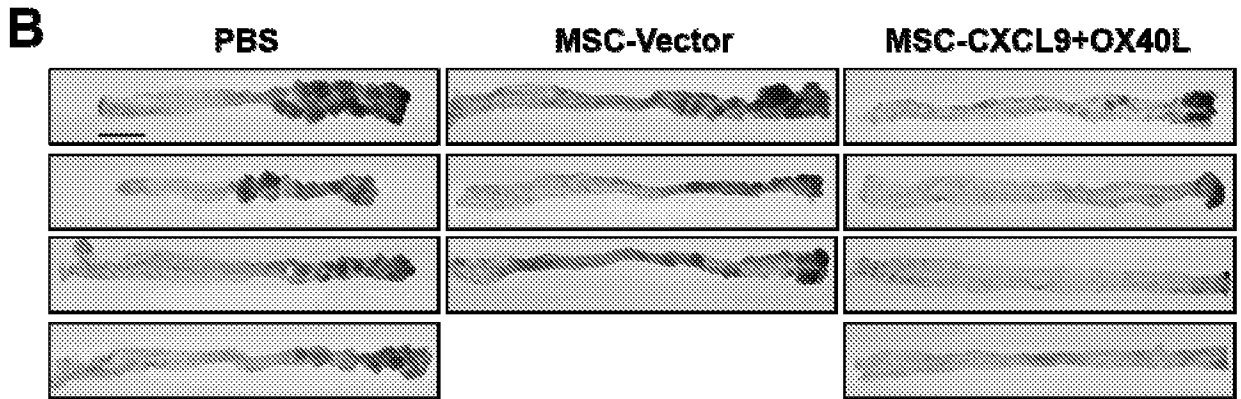
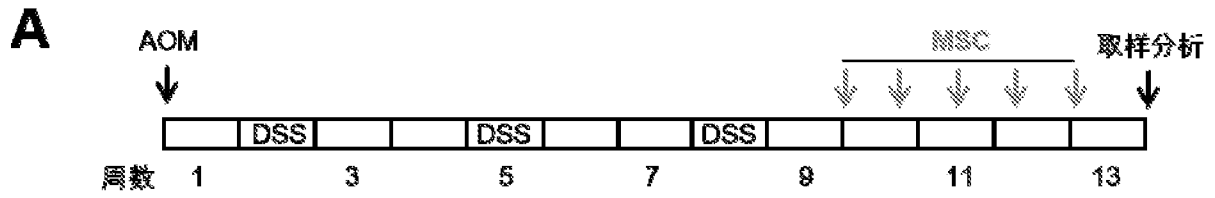


图 6

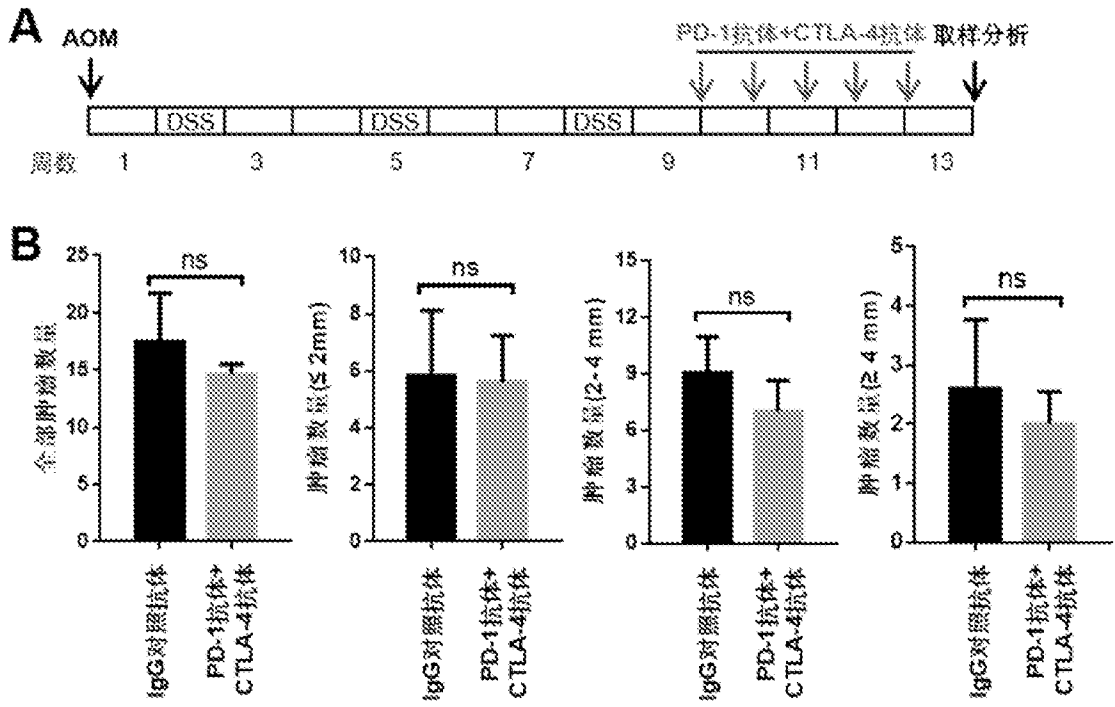


图 7

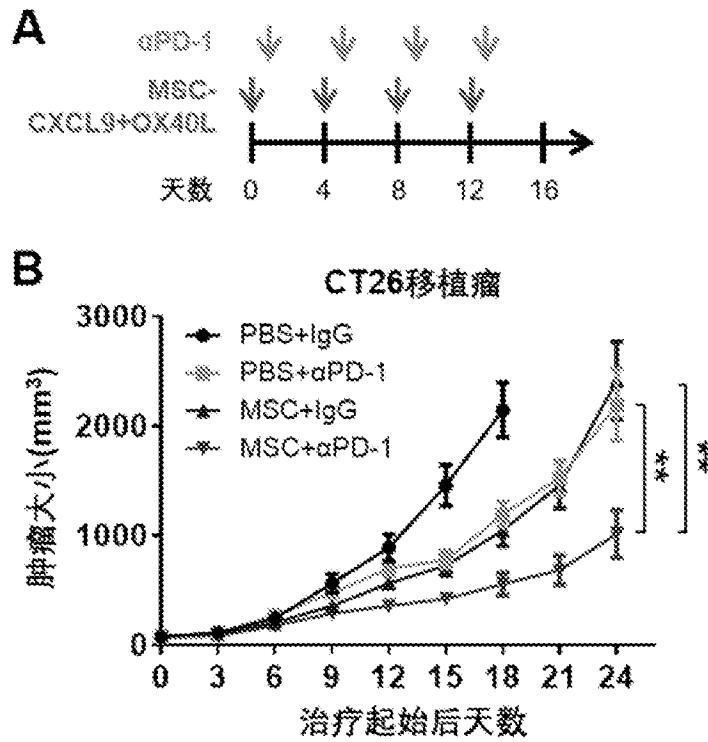


图 8

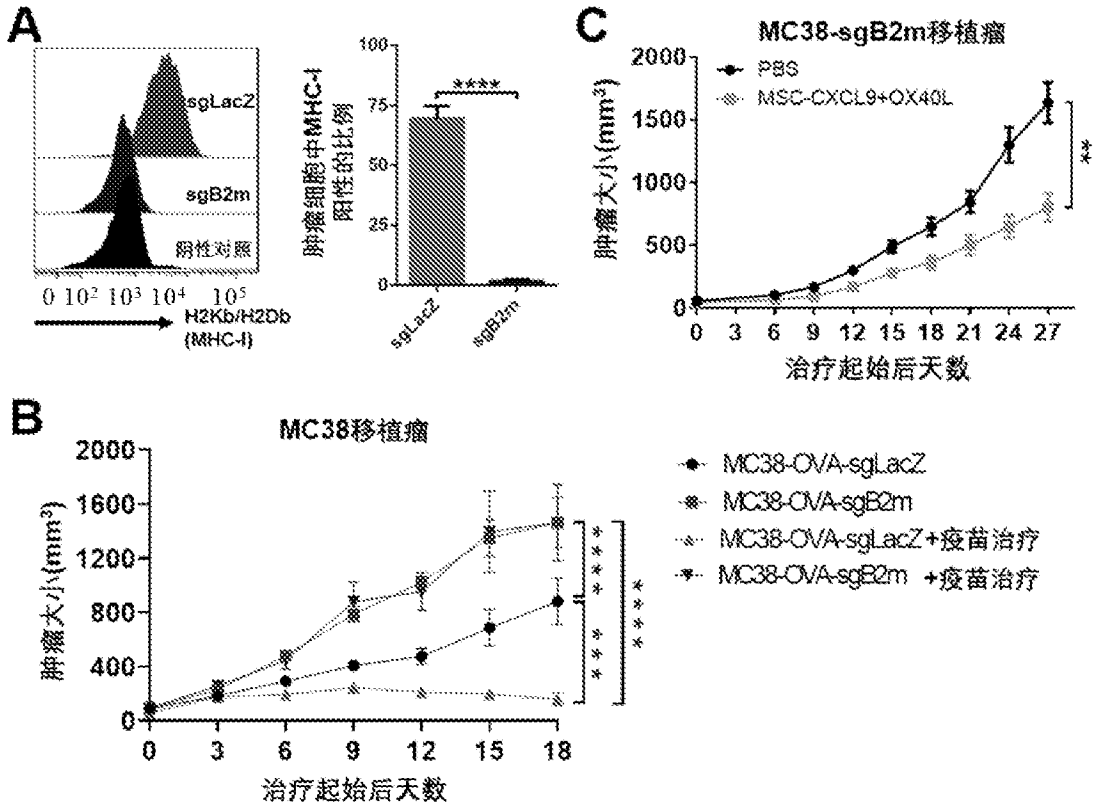


图 9

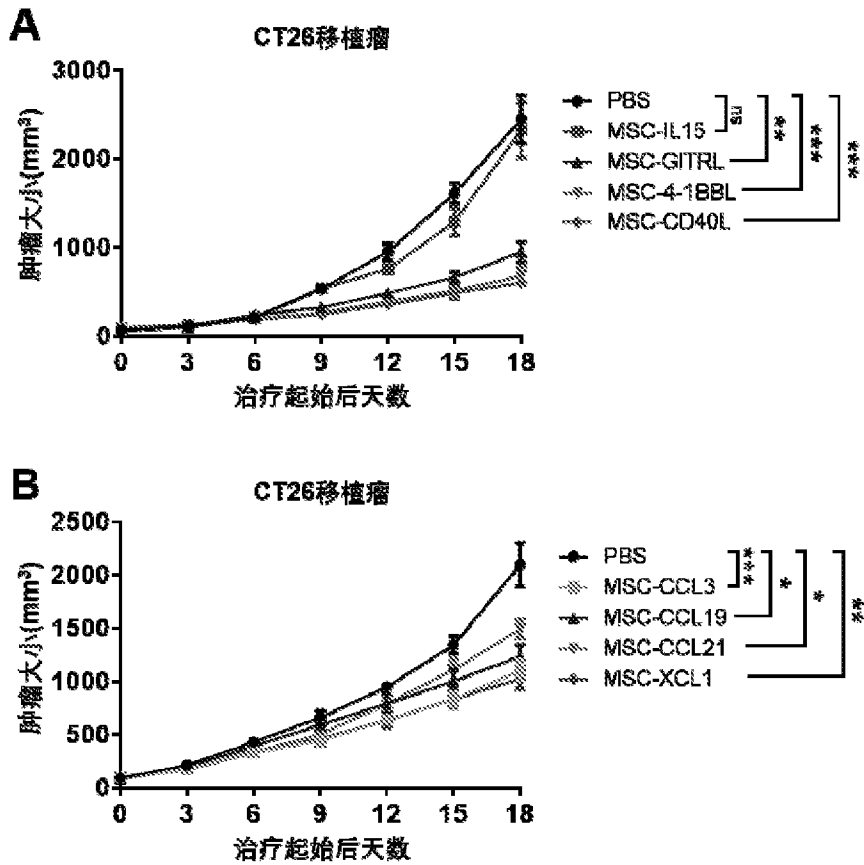


图 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/102473

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C12N 5/10(2006.01)i; A61K 35/28(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) C12N 5/-;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, CNTXT, EPTXT, USTXT, WOTXT, CJFD, CNKI, 万方, 百度, PUBMED, ISI Web of Knowledge, 读秀: 间充质干细胞, msc, Mesenchymal stem cells, CCL3, MIP1A, MIP1 α , CCL19, CCL21, XCL1, lptn, CXCL9, MIG, OX40L, tnfsf4, tnfr家族, tnfr, tnfsf, 4-1BBL, GITRL, CD40L, 表达, express, 改造, 修饰, modif+, 癌症, cancer, Carcinoma, 肿瘤, tumor, 免疫检查点, Immune checkpoint, pd1, 抗体, Cytokines, Chemokine, 细胞因子, 趋化因子, 细胞刺激因子, 免疫, 抗瘤, Immunity, anti-tumor, anti cancer		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 110996975 A (SENTI BIOSCIENCES INC.) 10 April 2020 (2020-04-10) claims 1-39, description paragraphs 5-42, 97-181, 247-325	1-10
X	CN 111139222 A (BEIJING SHUANGYIN BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 12 May 2020 (2020-05-12) claims 1-9	1-10
A	CN 107916253 A (SHANGHAI LONGYAO BIOLOGICAL TECHNOLOGY INC.) 17 April 2018 (2018-04-17) entire document	1-10
A	WO 2016026854 A2 (APCETH GMBH & CO. KG) 25 February 2016 (2016-02-25) entire document	1-10
<input checked="" 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 29 March 2021		Date of mailing of the international search report 15 April 2021
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		Authorized officer
Facsimile No. (86-10)62019451		Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	张海旺 等 (ZHANG, Haiwang et al.). "间充质干细胞载体基因治疗恶性胶质瘤研究进展. (non-official translation: Advances in Mesenchymal Stem Cell-Mediated Gene Therapy for Malignant Glioma)" <i>国际神经病学神经外科学杂志 (Journal of International Neurology and Neurosurgery)</i> , Vol. 40, No. 3, 31 December 2013 (2013-12-31), pp. 251-254	1-10
A	KIM, S. K. et al. "Gene Therapy Using TRAIL-Secreting Human Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells against Intracranial Glioma." <i>Cancer Research</i> , Vol. 68, No. 23, 01 December 2008 (2008-12-01), pp. 9614-9623	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/102473

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	110996975	A	10 April 2020	AU	2018251898	A1	31 October 2019
				WO	2018191619	A1	18 October 2018
				JP	2020516654	A	11 June 2020
				KR	20190141695	A	24 December 2019
				US	2020206271	A1	02 July 2020
				EP	3610000	A1	19 February 2020
				IL	269810	D0	28 November 2019
				CA	3059634	A1	18 October 2018

CN	111139222	A	12 May 2020	CN	111139222	B	29 December 2020

CN	107916253	A	17 April 2018	None			

WO	2016026854	A2	25 February 2016	AU	2015306231	A1	23 February 2017
				CN	106659742	A	10 May 2017
				EP	3182984	B1	30 October 2019
				US	2020268802	A1	27 August 2020
				WO	2016026854	A3	14 April 2016
				US	2017239297	A1	24 August 2017
				CA	2956987	A1	25 February 2016
				JP	6712993	B2	24 June 2020
				EP	3656387	A2	27 May 2020
				AU	2015306231	B2	21 November 2019
				IL	250388	D0	30 March 2017
				EP	3182984	A2	28 June 2017
				EP	3656387	A3	01 July 2020
				JP	2017525364	A	07 September 2017

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2020/102473

<p>A. 主题的分类</p> <p>C12N 5/10(2006.01)i; A61K 35/28(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>C12N 5/-;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, CNTXT, EPTXT, USTXT, WOTXT, CJFD, CNKI, 万方, 百度, PUBMED, ISI Web of Knowledge, 读秀: 间充质干细胞, msc, Mesenchymal stem cells, CCL3, MIP1A, MIP1α, CCL19, CCL21, XCL1, lptn, CXCL9, MIG, OX40L, tnfsf4, tnfr超家族, tnfr, tnfsf, 4-1BBL, GITRL, CD40L, 表达, express, 改造, 修饰, modif+, 癌症, cancer, Carcinoma, 肿瘤, tumor, 免疫检查点, Immune checkpoint, pd1, 抗体, Cytokines, Chemokine, 细胞因子, 趋化因子, 细胞刺激因子, 免疫, 抗瘤, Immunity, anti-tumor, anti cancer</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>X</td> <td>CN 110996975 A (森迪生物科学公司) 2020年 4月 10日 (2020 - 04 - 10) 权利要求1-39, 说明书第5-42、97-181、247-325段</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 111139222 A (北京双因生物科技有限公司) 2020年 5月 12日 (2020 - 05 - 12) 权利要求1-9</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 107916253 A (上海隆耀生物科技有限公司) 2018年 4月 17日 (2018 - 04 - 17) 全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2016026854 A2 (APCETH GMBH & CO. KG) 2016年 2月 25日 (2016 - 02 - 25) 全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>张海旺等. "间充质干细胞载体基因治疗恶性胶质瘤研究进展." 国际神经病学神经外科学杂志, 第40卷, 第3期, 2013年 12月 31日 (2013 - 12 - 31), 第251-254页</td> <td>1-10</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 110996975 A (森迪生物科学公司) 2020年 4月 10日 (2020 - 04 - 10) 权利要求1-39, 说明书第5-42、97-181、247-325段	1-10	X	CN 111139222 A (北京双因生物科技有限公司) 2020年 5月 12日 (2020 - 05 - 12) 权利要求1-9	1-10	A	CN 107916253 A (上海隆耀生物科技有限公司) 2018年 4月 17日 (2018 - 04 - 17) 全文	1-10	A	WO 2016026854 A2 (APCETH GMBH & CO. KG) 2016年 2月 25日 (2016 - 02 - 25) 全文	1-10	A	张海旺等. "间充质干细胞载体基因治疗恶性胶质瘤研究进展." 国际神经病学神经外科学杂志, 第40卷, 第3期, 2013年 12月 31日 (2013 - 12 - 31), 第251-254页	1-10
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																		
X	CN 110996975 A (森迪生物科学公司) 2020年 4月 10日 (2020 - 04 - 10) 权利要求1-39, 说明书第5-42、97-181、247-325段	1-10																		
X	CN 111139222 A (北京双因生物科技有限公司) 2020年 5月 12日 (2020 - 05 - 12) 权利要求1-9	1-10																		
A	CN 107916253 A (上海隆耀生物科技有限公司) 2018年 4月 17日 (2018 - 04 - 17) 全文	1-10																		
A	WO 2016026854 A2 (APCETH GMBH & CO. KG) 2016年 2月 25日 (2016 - 02 - 25) 全文	1-10																		
A	张海旺等. "间充质干细胞载体基因治疗恶性胶质瘤研究进展." 国际神经病学神经外科学杂志, 第40卷, 第3期, 2013年 12月 31日 (2013 - 12 - 31), 第251-254页	1-10																		
<p><input checked="" 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>2021年 3月 29日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2021年 4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>沈晶晶</p> <p>电话号码 86-(10)-53961944</p>																		

C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	KIM, S. K.等. "Gene Therapy Using TRAIL-Secreting Human Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells against Intracranial Glioma." CANCER RESEARCH, 第68卷, 第23期, 2008年 12月 1日 (2008 - 12 - 01), 第9614-9623页	1-10

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/102473

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	110996975	A	2020年 4月 10日	AU	2018251898	A1	2019年 10月 31日
				WO	2018191619	A1	2018年 10月 18日
				JP	2020516654	A	2020年 6月 11日
				KR	20190141695	A	2019年 12月 24日
				US	2020206271	A1	2020年 7月 2日
				EP	3610000	A1	2020年 2月 19日
				IL	269810	D0	2019年 11月 28日
				CA	3059634	A1	2018年 10月 18日
CN	111139222	A	2020年 5月 12日	CN	111139222	B	2020年 12月 29日
CN	107916253	A	2018年 4月 17日	无			
WO	2016026854	A2	2016年 2月 25日	AU	2015306231	A1	2017年 2月 23日
				CN	106659742	A	2017年 5月 10日
				EP	3182984	B1	2019年 10月 30日
				US	2020268802	A1	2020年 8月 27日
				WO	2016026854	A3	2016年 4月 14日
				US	2017239297	A1	2017年 8月 24日
				CA	2956987	A1	2016年 2月 25日
				JP	6712993	B2	2020年 6月 24日
				EP	3656387	A2	2020年 5月 27日
				AU	2015306231	B2	2019年 11月 21日
				IL	250388	D0	2017年 3月 30日
				EP	3182984	A2	2017年 6月 28日
				EP	3656387	A3	2020年 7月 1日
				JP	2017525364	A	2017年 9月 7日