

(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
2017年12月28日(28.12.2017)



(10) 国际公布号
WO 2017/219933 A1

(51) 国际专利分类号:
C12N 5/10 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01) A61K 35/17 (2015.01)
C12N 15/85 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2017/088952

(22) 国际申请日: 2017年6月19日(19.06.2017)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201610445647.4 2016年6月20日(20.06.2016) CN

(71) 申请人: 上海细胞治疗研究院(SHANGHAI CELL THERAPY RESEARCH INSTITUTE) [CN/CN]; 中国上海市嘉定区园国路1585号, Shanghai 201805 (CN)。上海细胞治疗工程技术研究中心集团有限公司(SHANGHAI ENGINEERING RESEARCH CENTER FOR CELL THERAPY GROUP CO., LTD) [CN/CN]; 中国上海市嘉定区前杨路75号A座, Shanghai 201805 (CN)。

(72) 发明人: 钱其军(QIAN, Qijun); 中国上海市嘉定区前杨路75号A座, Shanghai 201805 (CN)。金华君(JIN, Huajun); 中国上海市嘉定区前杨路75号A座, Shanghai 201805 (CN)。胥阶英(XU, Jieying); 中国上海市嘉定区前杨路75号A座, Shanghai 201805 (CN)。李林芳(LI, Linfang); 中国上海市嘉定区前杨路75号A座, Shanghai 201805 (CN)。叶真龙

(YE, Zhenlong); 中国上海市嘉定区前杨路75号A座, Shanghai 201805 (CN)。王超(WANG, Chao); 中国上海市嘉定区前杨路75号A座, Shanghai 201805 (CN)。江芷青(JIANG, Duqing); 中国上海市嘉定区前杨路75号A座, Shanghai 201805 (CN)。吴红平(WU, Hongping); 中国上海市嘉定区前杨路75号A座, Shanghai 201805 (CN)。

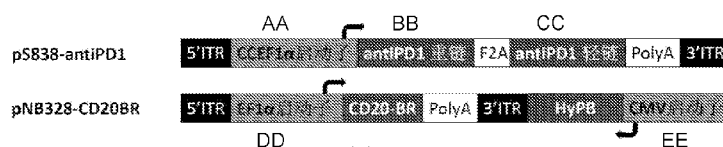
(74) 代理人: 上海专利商标事务所有限公司(SHANGHAI PATENT & TRADEMARK LAW OFFICE, LLC); 中国上海市桂平路435号, Shanghai 200233 (CN)。

(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,

(54) Title: T CELL FOR EFFICIENTLY AND STABLY EXPRESSING ANTIBODY AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 一种高效稳定表达抗体的T细胞及其用途



AA CCEF1α promoter
BB AntiPD1 heavy chain
CC AntiPD1 light chain
DD EF1α promoter
EE CMV promoter

(57) Abstract: Provided is a transgenic T cell. A genome of the T cell stably integrates an expression cassette comprising an encoding sequence of an antibody in a human FC fragment, and two ends of the expression cassette comprise an inverted terminal repeat sequence of transposons. Also provided are a pharmaceutical combination comprising the transgenic T cell and an application thereof.

(57) 摘要: 提供了一种转基因T细胞, 其基因组中稳定整合了包含人Fc段的抗体的编码序列的表达框及其两端包含转座子的反向末端重复序列。还提供了含有该转基因T细胞的药物组合物及其用途。



WO 2017/219933 A1

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))。

一种高效稳定表达抗体的 T 细胞及其用途

5 技术领域

本发明属于细胞生物学和肿瘤学领域，涉及一种高效稳定表达抗体的 T 细胞及其用途。

背景技术

10 癌症现在已成为人类健康的头号杀手，快速的生活节奏、巨大的工作压力、不健康的饮食习惯、糟糕的环境都是癌症发生的帮凶，使得癌症的高发率和年轻化趋势也越来越明显。目前传统治疗手段疗效已到瓶颈，亟需探索一个更加有效的治疗方法，来提高癌症患者的生存率和生存质量。针对恶性肿瘤的免疫治疗近年来发展迅速，取得令人瞩目的临床疗效。2011 年，Nature 及临床肿瘤最顶级杂志 JCO 分别发表相同
15 题目“肿瘤免疫治疗的时代已经来临”的评论文章（Nature. 2011; 480（7378）：480；J Clin Oncol. 2011; 29（36）：4828），肿瘤免疫细胞治疗迎来新一轮的研究高潮，未来有可能在肿瘤治疗中占据相当重要的地位。

“免疫作用”可分为细胞免疫及体液免疫，两者具有截然不同杀灭肿瘤或病毒的方式。细胞免疫是以细胞直接发挥效应来清除异物，它是机体免疫应答的参与者，也是免疫功能的执行者。目前用于临床治疗的效应免疫细胞主要包括细胞因子诱导的杀伤细胞（cytokine activated killer cells, CIK）、自然杀伤细胞（NK）、淋巴因子激活的杀伤细胞（lymphokine activated killer cell, LAK）、树突状细胞刺激的细胞因子诱导的杀伤细胞（DC-CIK）、细胞毒性 T 淋巴细胞（CTL）、 $\gamma\delta$ T 细胞、肿瘤浸润淋巴细胞（tumor infiltrating lymphocyte, TIL）、CD3AK 细胞（抗 CD3 单抗的杀伤细胞）
20 等，这些细胞都不表达抗体，它们直接杀灭或通过抗体依赖的细胞介导的细胞毒性细胞效应（antibody dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC）起作用。
25 起作用。

T 细胞是淋巴细胞的主要组分，具有多种生物学功能，如直接杀伤靶细胞，辅助或抑制 B 细胞产生抗体，对特异性抗原和促有丝分裂原的应答反应以及产生细胞因子等，是免疫系统抵御疾病感染、肿瘤的中坚力量。当前癌症免疫治疗中两大突破：1、
30 免疫检查点单抗是通过原位激活患者残留的肿瘤特异性 T 细胞发挥作用；2、转基因 CAR-T/TCR-T 是通过离体基因修饰的手段快速获得肿瘤特异性 T 细胞后，过继回输进行治疗。因而，激活、增强 T 细胞的功能对肿瘤、病毒感染治疗至关重要。按 T

细胞按照功能可以分成很多种类，主要包括：

1. 细胞毒 T 细胞（cytotoxic T cell）：消灭受感染的细胞。这些细胞的功能就像一个“杀手”或细胞毒素，因为它们可以对产生特殊抗原反应的目标细胞进行杀灭。细胞毒 T 细胞的主要表面标志是 CD8，也被称为杀手 T 细胞。

5 2. 辅助 T 细胞（helper T cell）在免疫反应中扮演中间过程的角色：它可以增生扩散来激活其它类型的产生直接免疫反应的免疫细胞。辅助 T 细胞的主要表面标志是 CD4。T 细胞调控或“辅助”其它淋巴细胞发挥功能。它们是已知的 HIV 的目标细胞，在艾滋病发病时会急剧减少。

10 3. 调节/抑制 T 细胞（regulatory/suppressor T cell）：负责调节机体免疫反应。通常起着维持自身耐受和避免免疫反应过度损伤机体的重要作用。调节/抑制 T 细胞有很多种，目前研究最活跃的是 CD25+ CD4+ T 细胞。

T 细胞的充分活化需要双信号。第一信号：抗原特异性信号 TCR--抗原肽-MHC-I 类分子复合物；CD8-MHC-I 类分子；第二信号：协同刺激信号 CD28--B7（CD80、CD86）；CD2（LFA-2）-CD58（LFA-3）；LFA-1--ICAM-1。T 细胞产生的免疫应
15 答是细胞免疫，细胞免疫的效应形式主要有两种：与靶细胞特异性结合，破坏靶细胞膜，直接杀伤靶细胞；另一种是释放淋巴因子，最终使免疫效应扩大和增强。

体液免疫是由抗体所介导产生作用，人体内的抗体是由 B 淋巴细胞产生。1997 年，第一个用于临床癌症治疗的单抗——抗人 CD20（rituximab）获得 FDA 批准。随着抗体技术的发展，至今全球已报道的抗体有 10 多万种，其中基因工程抗体有 1000
20 多种，人源化抗体 200 多种。截止 2016 年 3 月，FDA 至今已批准 50 个抗体上市，其中 26 个用于肿瘤治疗，这些抗体既有作用于肿瘤细胞本身直接发挥作用，也有作用于免疫细胞间接发挥作用。

然而，T 细胞虽然具有一定的抗肿瘤作用，但其临床治疗效果仍存缺陷；而大分子抗体对实体瘤的穿透力不足，且全身用药有可能引起系统性不良反应。例如，HER2
25 单抗具有心脏毒性，而 PD1 抗体打破机体免疫平衡，可引起自身免疫疾病。而且，由于抗体药物涉及复杂的体外生产与制备工艺，纯度要求高且用量大，导致用药费用高昂。因而，如果在细胞免疫效应细胞保持细胞杀伤毒性的前提下，能由其高效表达具有抗肿瘤活性的抗体，将同时克服细胞免疫治疗作用不足与大分子抗体难以进入实体瘤内部的困难，同时可以降低治疗成本。这些既具有细胞杀伤毒性、又能高水平表
30 达抗体的细胞，在趋化因子作用下，经过细胞变形主动进入肿瘤组织内部，从而在肿瘤组织局部高水平表达抗体，可以避免全身性用药带来的副作用。同时，作用于免疫细胞自身的抗体（如 HER2 抗体 Herceptin），由于抗体与细胞杀伤毒性免疫细胞双

重存在，可产生强烈的 ADCC 效应及 CDC 效应，高效杀灭肿瘤细胞；而作用于 T 细胞自身的抗体（如 PD1 抗体 Keytruda），可以避免肿瘤微环境对回输的效应性 T 细胞的抑制作用，并激活体内残留的肿瘤特异性 T 细胞，高效发挥治疗作用。

5 尽管已经有将外源基因转导入 T 细胞的报导，但目前常用基因转染载体系统对具有细胞杀伤毒性的 T 细胞转染率低，或者难以使外源基因在其细胞内高水平地表达。利用腺病毒载体（非整合型）可以介导外源基因在 T 细胞内较高效的短时表达，但活化的 T 细胞增殖速度非常快，携带的外源基因表达框在细胞传代中将快速丢失，表达难以持久；利用逆转录病毒或慢病毒可以介导外源基因在 T 细胞基因组中的整合，理论上可实现稳定表达，但抗体包含轻链与重链，编码序列长、分子量大，导致携带全长抗体表达框的逆转录病毒或慢病毒包装与制备存在较大困难、难以高效表达抗体，
10 一般只能用于表达结构简单的单链抗体（缺乏 Fc 段片段，功能不全且半衰期短）。因而在此之前，尚无具有细胞杀伤毒性并且能稳定、高水平地表达含有人 Fc 段的抗体的转基因 T 细胞的报道。

15 发明内容

本发明第一方面提供一种转基因 T 细胞，所述 T 细胞的基因组中稳定整合了包含人 Fc 段的抗体的编码序列的表达框，且表达框的两端包含转座子的反向末端重复序列。

20 在一个或多个实施方案中，每百万个所述 T 细胞在 48 小时内表达的抗体量高于 $2 \mu\text{g}$ 。

在一个或多个实施方案中，所述转座子选自：piggybac、sleeping beauty、frog prince、Tn5 和 Ty；优选地，所述转座子为 piggybac。

25 在一个或多个实施方案中，所述 T 细胞选自：外周血 T 淋巴细胞、细胞毒杀伤 T 细胞（CTL）、辅助 T 细胞、抑制/调节性 T 细胞、 $\gamma \delta$ T 细胞以及源自细胞因子诱导的杀伤细胞（CIK）、肿瘤浸润淋巴细胞（TIL）的 T 细胞，或其混合物；优选地，所述 T 细胞为外周血 T 淋巴细胞或源自 TIL 的 T 细胞。

30 在一个或多个实施方案中，所述 T 细胞还包含刹车分子，该刹车分子为可被已上市抗体药物识别的膜抗原；优选地，所述膜抗原选自 CD11a、CD15、CD19、CD20、CD25、CD44、CD47、CD52、EGFR、ERBB2、ERBB3、ERBB4、VEGFR1、VEGFR2、EpCAM、MSLN、GPIIb/IIIa、 $\alpha 4$ 整合素和 $\alpha 4\beta 7$ 整合素；优选地，所述膜抗原为 CD20。

在一个或多个实施方案中，所述抗体为抗肿瘤或抗病毒的抗体，优选自：免疫

检查点抗体、T 细胞共刺激信号抗体、抗新生血管生成的抗体、抗肿瘤细胞生长因子受体的抗体、抗肿瘤细胞膜抗原的抗体和抗病毒抗体。

在一个或多个实施方案中，所述抗体针对如下抗原中的一种或多种：PD-1、CTLA4、PDL1、PDL2、PDL3、TIM3、LAG3、CD28、CD137、CD40、CD40L、CD47、
 5 CD19、CD20、CEA、GD2（又称 B4GALNT1， β 1,4-乙酰基-氨基半乳糖基转移酶 1）、FR（Flavin 还原酶）、PSMA（前列腺特异性膜抗原、gp100（PMEL 前黑素小体蛋白）、CA9（碳酸酐酶 IX）、CD171/L1-CAM、IL-13R α 2、MART-1（又称粘蛋白-A）、ERBB2、NY-ESO-1（又称 CTAG1B，癌/睾丸抗原 1B）、MAGE（黑素瘤相关抗原 E1）家族蛋白、BAGE（B 黑素瘤抗原家族）家族蛋白、GAGE（生长激素释放因子）
 10 家族蛋白、AFP（ α -胎蛋白）、MUC1（粘蛋白 1，细胞表面相关）、CD22、CD23、CD30、CD33、CD44v7/8、CD70、VEGFR1、VEGFR2、IL-11R α 、EGP-2、EGP-40、FBP、GD3（又称 ST8SIA1，ST8 α -N-乙酰基-神经酰胺 α -2,8-唾液酸转换酶 1）、PSCA（前列腺干细胞抗原）、FSA（又称 KIAA1109）、PSA（又称 KLK3，激肽释放酶相关的肽酶 3）、HMGA2、胎儿型乙酰胆碱受体、LeY（又称 FUT3）、EpCAM、MSLN
 15（间皮素）、IGFR1、EGFR、EGFRvIII、ERBB3、ERBB4、CA125（又称 MUC16，粘蛋白 16，细胞表面相关）、CA15-3、CA19-9、CA72-4、CA242、CA50、CYFRA21-1、SCC（又称 SERPINB3）、AFU（又称 FUCA1）、EBV-VCA、POA（又称 VDR，维生素 D(1,25-二氢维生素 D₃)受体）、 β 2-MG（ β -2-微球蛋白）和 PROGRP（GRP 胃泌素释放肽）、乙肝病毒、艾滋病毒；优选地，所述抗体为 PD-1 抗体。

20 在一个或多个实施方案中，所述转基因 T 细胞转入了以下核酸构建物 A 和 B：

核酸构建物 A：含有转座子 5' 反向末端重复序列（5'ITR）、包含人 Fc 段的抗体的编码序列及控制该核酸序列表达的启动子、polyA 加尾信号序列和转座子 3' 反向末端重复序列（3'ITR）；

25 核酸构建物 B：含有转座子 5' 反向末端重复序列（5'ITR）、编码刹车分子的核酸序列及控制该核酸序列表达的启动子、polyA 加尾信号序列、转座子 3' 反向末端重复序列（3'ITR）、转座酶编码序列和任意的控制转座酶编码序列表达的启动子。

在一个或多个实施方案中，采用病毒转导、显微注射、粒子轰击、基因枪转化和电转中的一种或多种方法将所述核酸构建物转入所述细胞中，优选地采用电转。

30 本发明第二方面提供一种药物组合物，所述药物组合物含有本文所述的转基因 T 细胞和药学上可接受的辅料。

本发明第三方面提供本文所述的转基因 T 细胞或药物组合物的用途，其特征在于，所述用途选自：

制备用于抑制肿瘤细胞生长的药物、制备用于抑制病毒生长的药物、制备用于治疗肿瘤的药物、制备用于治疗病毒感染性疾病的药物、制备用于治疗细菌感染性疾病的药物和制备用于治疗自身免疫疾病的药物。

5 在一个或多个实施方案中，所述肿瘤选自：肝癌、肺癌、结肠癌、胰腺癌、胃癌、乳腺癌、鼻咽癌、淋巴瘤、卵巢癌、膀胱癌、前列腺癌和头颈部肿瘤。

本发明第四方面提供一种转染 T 细胞的方法，所述方法包括使用两种重组表达载体共转染所述 T 细胞；其中，一种重组表达载体含有感兴趣核酸序列的表达框，在该表达框的两端包含转座子的反向末端重复序列，且该重组表达载体不含有转座酶的编码序列；另一种重组表达载体含有任选的刹车分子的表达框，在该表达框的两端包含转座子的反向末端重复序列，且该重组表达载体含有转座酶的编码序列。

10 在一个或多个实施方案中，所述两种重组表达载体分别为本文所述的重组表达载体 A 和 B。

附图说明

15 图 1：抗体的表达框模式图。ITR 为转座子末端重复序列，HyPB 是 piggybac 转座酶。

图 2A-2C：不同供体来源的 PIK-T 细胞表达 PD1 抗体水平的 ELISA 检测图。对照为非转基因的同一来源 T 细胞。

图 3：不同供体来源的 PIK-T 细胞表达 PD1 抗体的 Western blotting 检测图。

20 图 4：PD1 抗体表达框在 PIK-T 细胞基因组中的检测。

图 5：PIK-T 细胞表面 PD1 分子的流式检测。

图 6：PIK-T 细胞的增殖检测。

25 图 7：PIK-T 细胞分泌 IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF α 和 IFN- γ 细胞因子的检测。图中针对每一种细胞因子，左边的柱为 PIK-T 细胞的结果，右边的柱为对照细胞的结果。

图 8：PIK-T 细胞在体外对肿瘤细胞的杀伤活性检测。

图 9：PIK-T 细胞对移植瘤的体内抑制作用检测。

图 10：PIK-T 细胞分子刹车系统的功能检测。

30 具体实施方式

下面对本发明涉及的部分术语进行解释。

在本发明中，术语“表达框”是指表达一个基因所需的完整元件，包括启动子、

基因编码序列和 PolyA 加尾信号序列。

术语“编码序列”在文中定义为核酸序列中直接确定其蛋白产物的氨基酸序列的部分。编码序列的边界通常是由紧邻 mRNA 5' 端开放读码框上游的核糖体结合位点（对于原核细胞）和紧邻 mRNA 3' 端开放读码框下游的转录终止序列确定。编码序列可以包括，但不限于 DNA、cDNA 和重组核酸序列。

术语“抗原结合片段”（antigen-binding fragment, Fab）是指位于抗体分子“Y”结构两臂末端，由高变区氨基酸序列组成，决定抗体结合抗原的特异性的肽段。

术语“Fc”即抗体的可结晶段（fragment crystallizable, Fc），是指位于抗体分子“Y”结构的柄部末端，包含抗体重链恒定区 CH2 和 CH3 结构域的肽段，是抗体与效应分子或者细胞相互作用的部位。

术语“抗原表位”，又称抗原决定簇（antigenic determinant, AD），指抗原分子中决定抗原特异性的特殊化学基团。一般情况下，一个多肽表位含 5~6 个氨基酸残基抗原表位，可被特定的抗体所识别。抗原表位的性质、数目和空间构型决定抗原的特异性。而根据抗原表位的氨基酸连续性的不同，可以分为线性表位与空间表位，线性表位是一段序列相邻的氨基酸组成的表位，而空间表位是数个不相邻，但在空间结构上相邻的氨基酸组成的表位。

术语“接头”或较链是连接不同蛋白或多肽之间的多肽片段，其目的是使所连接的蛋白或多肽保持各自的空间构象，以维持蛋白或多肽的功能或活性。

术语“特异性结合”是指抗体或者抗原结合片段与其所针对的抗原之间的反应。在某些实施方式中，特异性结合某抗原的抗体（或对某抗原具有特异性的抗体）是指，抗体以小于大约 10^{-5} M，例如小于大约 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M 或 10^{-10} M 或更小的亲和力（ K_D ）结合该抗原。“特异性识别”具有类似的含义。

术语“药学上可接受的辅料”是指在药理学和/或生理学上与受试者和活性成分相容的载体和/或赋形剂，其是本领域公知的（参见例如 Remington's Pharmaceutical Sciences, Gennaro AR 编，第 19 版，Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995），并且包括但不限于：pH 调节剂，表面活性剂，佐剂，离子强度增强剂。例如，pH 调节剂包括但不限于磷酸盐缓冲液；表面活性剂包括但不限于阳离子，阴离子或者非离子型表面活性剂，例如 Tween-80；离子强度增强剂包括但不限于氯化钠。

术语“有效量”是指可在受试者中实现治疗、预防、减轻和/或缓解本发明所述疾病或病症的剂量。

术语“疾病和/或病症”是指所述受试者的一种身体状态，该身体状态与本发明所述疾病和/或病症有关。

术语“受试者”可以指患者或者其它接受本发明药物组合物以治疗、预防、减轻和/或缓解本发明所述疾病或病症的动物，特别是哺乳动物，例如人、狗、猴、牛、马等。

5 本文提供一类核酸构建物（本文也称为“核酸构建物 A”），该类核酸构建物含有转座子 5' 反向末端重复序列（5'ITR）、感兴趣的核酸序列及任意的控制该感兴趣的核酸序列表达的启动子、polyA 加尾信号序列和转座子 3' 反向末端重复序列（3'ITR）。

10 本文还提供另一类核酸构建物（本文也称为“核酸构建物 B”），该类核酸构建物含有转座子 5' 反向末端重复序列（5'ITR）、任意的编码刹车分子的核酸序列及任意的控制该核酸序列表达的启动子、polyA 加尾信号序列、转座子 3' 反向末端重复序列（3'ITR）、转座酶编码序列和任意的控制转座酶编码序列表达的启动子。

本文中，“感兴趣的核酸序列”可以是编码本领域周知的各种功能蛋白的核酸序列。这类功能蛋白包括各类抗体，尤其是抗体的恒定区段和/或可变区，包括但不限于重链恒定区段、轻链恒定区段、重链可变区和轻链可变区。在某些实施方案中，所述感兴趣的核酸序列编码抗体的 Fc 段的全长序列或其功能性片段。在某些实施方案中，所述感兴趣的核酸序列编码抗体的重链恒定区段（如 Fc）和轻链。在某些实施方案中，所述感兴趣的核酸序列编码抗体的重链全长序列和轻链全长序列。在某些实施方案中，编码重链区段和轻链区段的核酸序列可通过本领域常用的接头序列（如 Furin 2A 的编码序列）连接。“区段”在本文中指抗体的基础结构单元，例如抗体的
15
20 C_H1、C_H2、C_H3、C_L、V_L、V_H 等部分。

感兴趣的抗体可以是人抗体，包括人鼠嵌合抗体和人源化抗体。感兴趣的抗体可选自：免疫检查点抗体、T 细胞共刺激信号抗体、抗新生血管生成的抗体、抗肿瘤细胞生长因子受体的抗体、抗肿瘤细胞膜抗原的抗体以及抗病毒的抗体。

在某些实施方案中，感兴趣的抗体可以是针对如下抗原中的一种或多种的抗体：
25 PD-1、CTLA4、PDL1、PDL2、PDL3、TIM3、LAG3、CD28、CD137、CD40、CD40L、CD47、CD19、CD20、CEA、GD2（又称 B4GALNT1，β 1,4-乙酰基-氨基半乳糖基转移酶 1）、FR（Flavin 还原酶）、PSMA（前列腺特异性膜抗原）、gp100（PMEL 前黑素小体蛋白）、CA9（碳酸酐酶 IX）、CD171/L1-CAM、IL-13R α 2、MART-1（又称粘蛋白-A）、ERBB2、NY-ESO-1（又称 CTAG1B，癌/睾丸抗原 1B）、MAGE（黑
30 素瘤相关抗原 E1）家族蛋白、BAGE（B 黑素瘤抗原家族）家族蛋白、GAGE（生长激素释放因子）家族蛋白、AFP（ α -胎蛋白）、MUC1（粘蛋白 1，细胞表面相关）、CD22、CD23、CD30、CD33、CD44v7/8、CD70、VEGFR1、VEGFR2、IL-11R α 、

EGP-2、EGP-40、FBP、GD3（又称 ST8SIA1，ST8 α -N-乙酰基-神经酰胺 α -2,8-唾液酸转换酶 1）、PSCA（前列腺干细胞抗原）、FSA（又称 KIAA1109）、PSA（又称 KLK3，激肽释放酶相关的肽酶 3）、HMGA2、胎儿型乙酰胆碱受体、LeY（又称 FUT3）、EpCAM、MSLN（间皮素）、IGFR1、EGFR、EGFRvIII、ERBB3、ERBB4、CA125
5（又称 MUC16，粘蛋白 16，细胞表面相关）、CA15-3、CA19-9、CA72-4、CA242、CA50、CYFRA21-1、SCC（又称 SERPINB3）、AFU（又称 FUCA1）、EBV-VCA、POA（又称 VDR，维生素 D(1,25-二氢维生素 D3)受体）、 β 2-MG（ β -2-微球蛋白）和 PROGRP（GRP 胃泌素释放肽）、乙肝病毒和艾滋病毒。

在某些实施方案中，抗体为作用于 T 细胞自身的抗体，在 T 细胞表达抗体后，
10 保护自身不受肿瘤微环境的抑制，在肿瘤局部表达抗体减低毒副作用。在某些实施方案中，抗体为分泌型抗体。在其它实施方案中，抗体为膜锚定型抗体。在一个或多个实施方案中，所述抗体为 PD-1 抗体。

本文中，“PD1”是指程序性死亡受体 1，它在 NCBI GeneBank 的官方名称为 PDCD1，ID 号为 5133，其 cDNA 序列/蛋白序列为 NM_005018.2/NP_005009.2。

15 “CD20”是指人白细胞分化抗原 20，它在 NCBI GeneBank 的官方名称为 MS4A1，ID 号为 931，有 2 个异构体(cDNA 序列/蛋白序列)，分别为 NM_021950.3/NP_068769.2，NM_152866.2/NP_690605.1。当提及 CD20 的氨基酸序列时，其包括 CD20 蛋白的全长或者具有 CD20 功能的 CD20 的片段；还包括所述全长或片段的融合蛋白。并且，本领域技术人员理解，在 CD20 的氨基酸序列中，可天然产生或人工引入突变或变异
20（包括但不限于置换，缺失和/或添加），而不影响其生物学功能。并且，当描述 CD20 的蛋白序列片段时，还包括其天然或人工变体中的相应序列片段。

可根据所选的感兴趣核酸序列选择相应的启动子序列。这类启动子的例子包括但不限于 EF1 α 启动子。如 CN201510021408.1 所述（本文将其全部内容以引用的方式纳入本文），启动子上游还可包括增强子，如 mCMV 增强子、hCMV 增强子和 CD3e
25 增强子中的一个、任意两个或全部三个。

因此，在某些实施方案中，本文使用 CN201510021408.1 所公布的各种启动子序列，包括但不限于该申请 SEQ ID NO:1 所示的含 mCMV 增强子、hCMV 增强子和 EF1 α 启动子的 CCEF 启动子；SEQ ID NO:2 所示的含 CD3e 增强子和 EF1 α 启动子的 TEF 启动子；SEQ ID NO:3 所示的含 CD3e 增强子、mCMV 增强子、hCMV 增强子和 EF1
30 α 启动子的 TCEF 启动子；SEQ ID NO:4 所示的含 mCMV 增强子、hCMV 增强子和含内含子的 EF1 α 启动子的 CCEFI 启动子；SEQ ID NO:5 所示的含 CD3e 增强子和含内含子的 EF1 α 启动子的 TEFI 启动子；以及 SEQ ID NO:5 所示的含 CD3e 增强子、

mCMV 增强子、hCMV 增强子和含内含子的 EF1 α 启动子的 TCEFI 启动子。

本文中，转座酶可以是来自 piggybac、sleeping beauty、frog prince、Tn5 或 Ty 转座系统的转座酶。当使用来自不同转座系统的转座酶时，本发明核酸构建物中的 5'ITR 和 3'ITR 的序列也相应改变为与该转座系统适配的序列，这可由本领域技术人员容易地确定。

在某些实施方案中，转座酶是来自 piggybac 转座系统的转座酶。因此，在这些实施方案中，转座子 5' 反向末端重复序列和 3' 反向末端重复序列分别为 piggybac 的转座子 5' 反向末端重复序列和 3' 反向末端重复序列。在某些实施方案中，转座子 5' 反向末端重复序列如 CN 201510638974.7 (本文将其内容以引用的方式纳入本文) SEQ ID NO:1 所示。在某些实施方案中，转座子 3' 反向末端重复序列如 CN 201510638974.7 SEQ ID NO:4 所示。在某些实施方案中，piggybac 转座酶为含 c-myc 核定位信号编码序列的转座酶。在某些实施方案中，piggybac 转座酶的编码序列如 CN 201510638974.7 SEQ ID NO:5 所示。

转座酶编码序列的启动子可以是本领域已知的用于控制转座酶编码序列表达的各种启动子。在某些实施方案中，使用 CMV 启动子控制转座酶编码序列的表达。CMV 启动子的序列可如 CN 201510638974.7 SEQ ID NO:6 所示。

可使用本领域周知的 polyA 加尾信号序列。在某些实施方案中，所述 polyA 来自 SV40。在某些实施方式中，可使用 CN 201510638974.7 SEQ ID NO:3 所示的序列。

本文所用“刹车分子”或“分子刹车”可互换使用，指可被已上市抗体药物识别的膜抗原。通过加入识别该“刹车分子”的抗体药物，携带该“刹车分子”的细胞能被快速清除，从而提高治疗安全性。合适的刹车分子(膜抗原)可选自：CD11a、CD15、CD19、CD20、CD25、CD44、CD47、CD52、EGFR、ERBB2、ERBB3、ERBB4、VEGFR1、VEGFR2、EpCAM、MSLN (间皮素)、GPIIb/IIIa、 $\alpha 4$ 整合素和 $\alpha 4 \beta 7$ 整合素。在某些实施方案中，膜抗原为 CD20。在某些实施方案中，可使用所述膜抗原的线性表位或空间表位。

可针对所选膜抗原选择合适的启动子，用以控制膜抗原的表达。在某些实施方案中，启动子是 EF1 α 启动子。在某些实施方案中，EF1 α 启动子的序列如 CN 201510638974.7 SEQ ID NO:8 所示。

在某些实施方案中，本文的核酸构建物 A 含有依次连接的转座子 5' 反向末端重复序列 (5'ITR)、控制感兴趣的核酸序列表达的启动子、感兴趣的核酸序列、polyA 加尾信号序列和转座子 3' 反向末端重复序列 (3'ITR)。

在某些实施方案中，本文的核酸构建物 B 含有依次连接的转座子 5' 反向末端重

复序列（5'ITR）、控制编码刹车分子的核酸序列表达的启动子、编码刹车分子的核酸序列、polyA 加尾信号序列、转座子 3' 反向末端重复序列（3'ITR）、转座酶编码序列以及控制该转座酶编码序列表达的启动子。

在某些实施方案中，所述核酸构建物 A 含有 SEQ ID NO:3 所示的核酸序列。在
5 某些实施方案中，所述核酸构建物 B 含有 SEQ ID NO:4 所示的核酸序列。

本文的核酸构建物 A 和 B 各自可以是种重组表达载体（重组表达载体 A 和 B），用于表达感兴趣的核酸序列和所述任选的编码刹车分子的核酸序列。优选的是，表达载体是转座子载体。在某些实施方案中，载体为选自如下转座子载体中的一种或多种：
10 piggybac、sleeping beauty、frog prince、Tn5 和 Ty。除核酸构建物 A、B 和 C 所含的核酸序列外，表达载体中通常还含有载体通常所含的其它元件，例如多克隆位点、抗性基因、复制起始位点等。应理解，通常，本发明的核酸构建物 A/重组表达载体 A 不含有转座酶的编码序列。

在某些实施方案中，所述重组表达载体采用 pUC18、pUC19、pMD18-T、pMD19-T、pGM-T 载体、pUC57、pMAX 或 pDC315 系列载体作为骨架。在其它实施方案中，
15 所述重组表达载体采用 pCDNA3 系列载体、pCDNA4 系列载体、pCDNA5 系列载体、pCDNA6 系列载体、pRL 系列载体、pUC57 载体、pMAX 载体或 pDC315 系列载体作为骨架。在某些实施方案中，本发明使用 CN 201510638974.7 构建的 pSN 载体，其载体结构如该申请图 1 所示。

可将本发明的核酸构建物 A/重组表达载体 A 和核酸构建物 B/重组表达载体 B 转
20 入感兴趣的细胞中。转入的方法为本领域常规的方法，包括但不限于：病毒转导、显微注射、粒子轰击、基因枪转化和电转等。在某些实施方案中，采用电转将所述核酸构建物或重组表达载体。

感兴趣的细胞可以是本领域周知的各种 T 细胞。示例性的 T 细胞包括但不限于：
25 外周血 T 淋巴细胞、细胞毒杀伤 T 细胞（CTL）、辅助 T 细胞、抑制/调节性 T 细胞、 γ δ T 细胞、细胞因子诱导的杀伤细胞（CIK）和肿瘤浸润淋巴细胞（TIL）等。T 细胞也可以是上述细胞的任意混合物。在本发明的一个实施方案中，所述 T 细胞为外周血 T 淋巴细胞或源自 TIL 的 T 细胞。

由于核酸构建物 A/重组表达载体 A 含有转座所需的 ITR 元件但不含有转座酶，而核酸构建物 B/重组表达载体 B 含有外源基因整合所需的转座酶，因此，只有同时
30 转染了核酸构建物 A/重组表达载体 A 和核酸构建物 B/重组表达载体 B 的细胞中才能实现含感兴趣核酸序列的表达框整合。更进一步地，核酸构建物 A 或重组表达载体 A 中转座子 5' 反向末端重复序列和转座子 3' 反向末端重复序列之间的核酸序列，包

括 5' 和 3' 反向末端重复序列本身，都整合到细胞的基因组中。当核酸构建物 B/重组表达载体 B 含有编码刹车分子的核酸序列时，细胞将进一步表达刹车分子。同样地，核酸构建物 B 或重组表达载体 B 中转座子 5' 反向末端重复序列和转座子 3' 反向末端重复序列之间的核酸序列，包括 5' 和 3' 反向末端重复序列本身，也都整合到细胞的基因组中。

因此，本文还提供一类转基因 T 细胞，所述转基因 T 细胞的基因组中稳定整合了包含所述感兴趣的核酸序列的表达框。更进一步地，所述 T 细胞的基因组中稳定整合了依次连接的转座子 5' 反向末端重复序列 (5' ITR)、控制感兴趣的核酸序列表达的启动子、感兴趣的核酸序列、polyA 加尾信号序列和转座子 3' 反向末端重复序列 (3' ITR)。在优选的实施方案中，所述转基因 T 细胞的基因组中还进一步整合有依次连接的转座子 5' 反向末端重复序列 (5' ITR)、控制编码刹车分子的核酸序列表达的启动子、编码刹车分子的核酸序列、polyA 加尾信号序列、以及转座子 3' 反向末端重复序列 (3' ITR)。

在某些实施方案中，本文的转基因 T 细胞稳定表达抗体 Fc 段的全长序列或其功能性片段。在某些实施方案中，本文的转基因 T 细胞稳定表达抗体的重链恒定区段 (如 Fc) 和轻链。在某些实施方案中，本文的转基因 T 细胞稳定表达抗体的重链和轻链。在某些实施方案中，本文的转基因 T 细胞转入了本文所述的核酸构建物 A/重组表达载体 A 和核酸构建物 B/重组表达载体 B。在其它实施方案中，每百万个本文的转基因 T 细胞在 48 小时的时间内表达的抗体量高于 2 μ g。

根据所表达的抗体的生物学功能，本文的转基因 T 细胞可具有不同的生物学活性，包括但不限于抑制肿瘤、抑制病毒、抑制细菌等。因此，本文的转基因 T 细胞可用于抑制肿瘤细胞的生长、抑制病毒的生长、治疗肿瘤、治疗病毒感染性疾病、治疗细菌感染性疾病、以及治疗自身免疫疾病。本文中，肿瘤包括但不限于：肝癌、肺癌、结肠癌、胰腺癌、胃癌、乳腺癌、鼻咽癌、淋巴瘤、卵巢癌、膀胱癌、前列腺癌和头颈部肿瘤。

因此，本文也提供一种药物组合物，该药物组合物含有本文转基因 T 细胞和药学上可接受的载体或赋形剂。本文还提供本文所述的转基因 T 细胞在制备用于抑制肿瘤细胞生长的药物、制备用于抑制病毒生长的药物、制备用于治疗肿瘤的药物、制备用于治疗病毒感染性疾病的药物、制备用于治疗细菌感染性疾病的药物、或制备用于治疗自身免疫疾病的药物中的用途。

本发明还提供一种转染 T 细胞的方法，所述方法包括使用两种重组表达载体共转染所述 T 细胞；其中，一种重组表达载体含有感兴趣核酸序列的表达框，在该表达框

的两端包含转座子的反向末端重复序列，且该重组表达载体不含有转座酶的编码序列；另一种重组表达载体含有任选的刹车分子的表达框，在该表达框的两端包含转座子的反向末端重复序列，且该重组表达载体含有转座酶的编码序列。在一个或多个实施方案中，所述两种重组表达载体分别为本文所述的重组表达载体 A 和 B。转染的方法为本文周知的方法，包括但不限于病毒转导、显微注射、粒子轰击、基因枪转化和电转中的一种或多种。转染时，两种重组表达载体的用量可根据实际情况调整，通常不含转座酶编码序列的重组表达载体与含转座酶编码序列的表达载体的用量配比可在 1~5: 1 的范围之内。

因此，本发明还提供了一种试剂盒，所述试剂盒含有两种重组表达载体：一种重组表达载体含有感兴趣核酸序列的表达框，在该表达框的两端包含转座子的反向末端重复序列，且该重组表达载体不含有转座酶的编码序列；另一种重组表达载体含有任选的刹车分子的表达框，在该表达框的两端包含转座子的反向末端重复序列，且该重组表达载体含有转座酶的编码序列。在一个或多个实施方案中，所述两种重组表达载体分别为本文所述的重组表达载体 A 和 B。试剂盒还可含有适用于将所述重组表达载体转染入细胞中的各种试剂，以及任选的指导本领域技术人员将所述重组表达载体转染入细胞的说明书。试剂盒中，两种重组表达载体可独立包装，也可以混合物的形式包装在同一容器中。

因此，在某些实施方案中，本发明也涉及一种重组表达载体的组合物，该组合物至少含有两种重组表达载体：一种重组表达载体含有感兴趣核酸序列的表达框，在该表达框的两端包含转座子的反向末端重复序列，且该重组表达载体不含有转座酶的编码序列；另一种重组表达载体含有任选的刹车分子的表达框，在该表达框的两端包含转座子的反向末端重复序列，且该重组表达载体含有转座酶的编码序列。在一个或多个实施方案中，所述两种重组表达载体分别为本文所述的重组表达载体 A 和 B。组合物中还可含有相应的溶剂或载体。

本发明克服了目前常用基因转染载体系统对 T 细胞转染率低、介导抗体表达水平低的缺陷，使 T 细胞高水平稳定地表达来自人 Fc 段全长的抗体，克服了细胞免疫治疗作用不足与大分子抗体难以进入实体瘤内部的困难。本发明制得的转基因 T 细胞在保持细胞杀伤毒性作用的同时又能够高水平、稳定表达包含人 Fc 段的全长抗体，具有细胞免疫与体液免疫双重功能，其一方面能发挥抗肿瘤细胞免疫（主要由 T 细胞介导），另一方面则发挥体液免疫（主要由抗体介导），能够有效地抑制肿瘤及病毒的增殖。

此外，为了防止稳定表达抗体的 T 细胞在体内不断增殖，导致抗体过量表达，进

而造成系统性毒性和自身免疫病，可通过引入分子刹车系统（如 CD20-美罗华分子刹车系统（CD20BR））。应用相应的上市单抗药物（如美罗华），可通过其介导的 ADCC 效应与 CDC 效应，能快速清除整合有全长抗体表达框的 T 细胞，有效提高了其治疗的安全性。而且，根据所表达的抗体，本发明制得的转基因 T 细胞能够用于如前文所述

5 所述的多种恶性肿瘤与病毒的治疗。

下面将结合实施案例对本发明所涉及的实施方案进行详细描述。本领域技术人员将会理解，下面的实施案例仅用于说明本发明，而不应视为限定本发明的范围。实施案例中未注明具体技术或条件者，按照本领域内的文献所描述的技术或条件（例如参

10 考 J.萨姆布鲁克等著，黄培堂等译的《分子克隆实验指南》，第三版，科学出版社）或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市购获得的常规产品。

实施例 1：重组质粒 pS838-AntiPD1 与 pNB328-CD20BR 的构建

15 委托上海杰瑞生物公司合成两段 DNA 序列，序列如下：

Seq1: CGATAGGACGCTGATCTTAAT (SEQ ID NO: 1)；

Seq2: TACCTGCGACTAGAAT (SEQ ID NO: 2)。

98℃变性 5 分钟，随后自然降温，形成上下游分别具有 *ClaI* 与 *PacI* 粘性末端的双链 DNA 接头。

20 pNB 载体经 *CalI* 与 *PacI* 双酶切（构建过程参考 CN201510638974.7），装入上述双链 DNA，获得 pS 载体。

按 CN201510021408.1 所公布的 CCEF 启动子序列，委托上海杰瑞生物公司合成，并在上下游分别引入 *XbaI* 与 *EcoRI* 酶切位点，装入经 *XbaI* 与 *EcoRI* 双酶切的 pS 载体。获得 pS838 载体。

25 按 SEQ ID NO:3 所示 PD1 抗体编码序列，委托上海杰瑞生物公司合成，并在其上下游分别引入 *EcoRI* 与 *SalI* 酶切位点，装入 pS838 载体，命名为 pS838-AntiPD1。

antiPD1 编码序列：

GAATTCGCCACCATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTG
GCTCCAGATAACCGGACAGGTGTACTTGGTAGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTC
30 CAGCCTGGGAGGTCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAA
CTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCA
CTTATATGGTATGATGGAAGTAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGAT

TCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGACCAGTCT
GAGAGTCGAGGACACGGCTGTGTATTATTGTGCGAGCAACGTTGACCATTGGGGC
CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTTCCACCAAGGGCCCATCCGTCTTCCC
CCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTG
5 GTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGA
CCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTC
AGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCA
ACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAAT
ATGGTCCCCCATGCCACCATGCCAGCACCTGAGTTCCTGGGGGGACCATCAGT
10 CTTCTGTTCCCCCAAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGG
TCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTG
GTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCA
GTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGG
CTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCCTCCA
15 TCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACA
CCCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCT
GGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCA
GCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTC
TTCCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCT
20 TCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCT
CTCCCTGTCTCTGGGTAAACCGTAAAAGGCGAGCTCCTGTAAACAGACTTTGAATT
TTGACCTTCTCAAGTTGGCGGGAGACGTCGAGTCCAACCCTGGGCCCATGGAAGC
CCCAGCTCAGCTTCTCTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATAACCACGGAGAAA
TTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACC
25 CTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGTAGTTACTTAGCCTGGTACCAACAGA
AACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCACTGG
CATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATC
AGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGAGTAGCAACT
GGCCTCGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGAACTGTGGCTG
30 CACCATCTGTCTTCATCTTCCC GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCC
TCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGA
AGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGG

ACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAG
 ACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTC
 GCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTGATAAGTCGAC (SEQ ID NO:
 3), 其中双下划线表示酶切位点, 单下划线表示 Furin 2A 的编码序列。

5 按 SEQ ID NO: 4 所示 CD20BR 的编码序列, 委托上海杰瑞生物公司合成, 并在
 其上下游分别引入 *EcoRI* 与 *SalI* 酶切位点, 装入 pNB328 载体 (构建过程参考
 CN201510638974.7), 命名为 pNB328-CD20BR。

CD20BR 编码序列:

GAATTCGCCACCATGGAGTTTTGGCTGAGCTGGGTTTTCTTGTGCTATTTT
 10 AAAAGGTGTCCAGTGTAACATATACAACCTGTGAACCAGCTAATCCCTCTGAGAA
AAACTCCCCATCTACCCAATACTGTTACAGCATAACAATCTCTGGGTGGAGGTGG
 AGGTGGAGGTGGAGGTATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGT
 CCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCTTTACTGCAACCACAGGAACCGTAAAAG
 GCGAGCTCCTGTTAAACAGACTTTGAATTTTGACCTTCTCAAGTTGGCGGGAGA
 15 CGTCGAGTCCAACCCTGGGCCCATGGTGAGCAAGCAGATCCTGAAGAACACCG
 GCCTGCAGGAGATCATGAGCTTCAAGGTGAACCTGGAGGGCGTGGTGAACAAC
 CACGTGTTACCATGGAGGGCTGCGGCAAGGGCAACATCCTGTTTCGGCAACCAG
 CTGGTGCAGATCCGCGTGACCAAGGGCGCCCCCTGCCCTTCGCCTTCGACATC
 CTGAGCCCCGCCTTCCAGTACGGCAACCGCACCTTACCAAGTACCCCGAGGAC
 20 ATCAGCGACTTCTTCATCCAGAGCTTCCCCGCCGGCTTCGTGTACGAGCGCACC
 CTGCGCTACGAGGACGGCGGCCTGGTGGAGATCCGCAGCGACATCAACCTGAT
 CGAGGAGATGTTTCGTGTACCGCGTGGAGTACAAGGGCCGCAACTTCCCCAACG
 ACGGCCCCGTGATGAAGAAGACCATCACCGGCCTGCAGCCAGCTTCGAGGTG
 GTGTACATGAACGACGGCGTGCTGGTGGGCCAGGTGATCCTGGTGTACCGCCTG
 25 AACAGCGGCAAGTTCTACAGCTGCCACATGCGCACCCCTGATGAAGAGCAAGGG
 CGTGGTGAAGGACTTCCCCGAGTACCACTTCATCCAGCACCGCCTGGAGAAGAC
 CTACGTGGAGGACGGCGGCTTCGTGGAGCAGCACGAGACCGCCATCGCCCAGC
 TGACCAGCCTGGGCAAGCCCCTGGGCAGCCTGCACGAGTGGGTGTGAGTCGAC

(SEQ ID NO: 4), 其中双下划线表示酶切位点, 单划线表示美罗华抗体识别的 CD20
 30 表位。

pNB328-CD20BR 与 pS838-antiPD1 载体模式图见图 1。

实施例 2: 外周血 T 淋巴细胞的遗传修饰

准备 1×10^7 新鲜分离获得的外周血单个核细胞(Peripheral blood mononuclear cell, PBMC), 通过 Lonza 2b-Nucleofector 仪器, 按 1:2 的比例将 pNB328-CD20BR 与 pS838-antiPD1 共转染到细胞核中, 置 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 孵箱培养; 6 小时后转移到含 30 ng/mL 抗 CD3 抗体、3000 IU/mL IL-2 (购自 Novoprotein 公司) 的 6 孔板中, 置 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 孵箱培养。待细胞健康生长后, 即获得表达 PD1 抗体的多能 T 细胞, 简称 PIK-T。未转染的 PBMC 通过铺在含 30 ng/mL 抗 CD3 抗体、3000 IU/mL IL-2 (购自 Novoprotein 公司) 培养板, 置 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 孵箱培养, 作为对照。由于只有 pNB328 载体中含有外源基因整合所需的转座酶, pS838 载体中只含转座所需的 ITR 元件, 只有同时转染了 pNB328-CD20BR 与 pS838-antiPD1 载体的细胞中才能实现 PD1 抗体表达框的整合, 保证了 PIK-T 细胞中均包含 CD20 分子刹车。

实施例 3: PIK-T 细胞中 PD1 抗体表达量的定量检测

将实施例 2 制备得到的 PIK-T 和对照 T 细胞按 1:3 的稀释比例传代培养, 两周后, 按 1.0×10^6 细胞/孔铺在加有 4ml AIM-V 培液 (购自 Gibco 公司) 的 6 孔板中, 置于 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 培养箱培养, 并于培养 24 小时、48 小时、72 小时、96 小时后收集 800 μl 细胞上清, -20°C 保存备用。应用人源的 PD1 重组蛋白包被酶标板 (购自 SinoBiological 公司), 带 HRP 标记的鼠抗人 IgG mAb (购自 Abcam 公司) 检测, 以商品化的抗 PD1 抗体 (购自 Merck 公司) 作为标准品, 用双夹心 ELISA 方法检测 PD1 抗体的表达量。结果发现, 3 个不同供体来源的 PIK-T 细胞均能够高水平稳定的表达 PD1 抗体, 具体如图 2 所示。

实施例 4: PIK-T 细胞中 PD1 抗体表达量的定性检测

将实施例 2 制备得到的 PIK-T 按 1.0×10^6 细胞/孔铺在加有 4ml AIM-V 培液的 6 孔板中, 置于 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 培养箱培养, 并于培养 48h、72h、96h 后收集细胞上清, 每个时间点各取 120ul 的细胞上清, 加入 30ul 的 5X SDS-PAGE Loading 缓冲液 100°C 煮沸 10min, 将样品 -20°C 保存备用。蛋白质印迹 (使用羊抗人 IgG (H+L) 作为一抗, HRP-兔抗羊为二抗, 一抗和二抗都购买于 Jackson ImmunoResearch 公司) 实验检测抗 PD1 抗体的表达。结果发现, PIK 细胞表达的抗 PD1 抗体包含正确的重链 (50kD) 和轻链 (25kD), 具体如图 3 所示。

实施例 5: PIK-T 细胞基因组中 PD1 抗体表达框的检测。

提取实施例 2 制备得到的 PIK-T 细胞和对照 T 细胞的基因组 DNA，实验步骤参照试剂盒内附带的说明书，测定 PIK-T 细胞和对照 T 细胞 DNA 的浓度，采用荧光实时定量 PCR 检测抗 PD1 抗体基因组的表达水平，反应程序为：95℃，15s；95℃，5s；60℃，15s；40 个循环。结果发现，PD1 抗体表达框被整合到 T 细胞基因组中，具体如图 4 所示。

引物序列：

F: ATCTCCAAAGCCAAAGGGCA (SEQ ID NO: 5)；

R: CGATGTCGCTGGGGTAGAAG (SEQ ID NO: 6)。

10 实施例 6：PIK-T 细胞表面 PD1 分子的流式检测

收集悬浮的实施例 2 制备得到的 PIK-T 细胞和对照 T 细胞，计数后以 1×10^6 个细胞/管分别加入 2 个 1.5ml 的 EP 管中，PBS 清洗两遍，1200rpm 离心 5min，弃上清；分别加入 2 μ l 的同型对照抗体 IgG1-PE，anti-CD279-PE 抗体（均购自 BD 公司），轻弹沉淀使其混合均匀，室温避光孵育 30min，PBS 清洗一遍，1200rpm 离心 5min，弃上清加入 400 μ l 的生理盐水将细胞转移至流式管中，上机检测。实验结果发现，相对于对照细胞 PIK-T 细胞 PD1 分子显著降低，表明 PIK-T 细胞通过自分泌或旁分泌 PD1 抗体，可有效封闭细胞表面 PD1 分子，具体如图 5 所示。

20 实施例 7：PIK-T 细胞的增殖检测

将实施例 2 制备得到的 PIK-T 细胞和对照 T 细胞按 4×10^4 /孔铺在 96 孔板中，每种细胞铺 3 个复孔，总体积为 200 μ l，置于 37℃，5% CO₂ 培养箱培养，分别在培养 24h，48h，72h，96h 后加入 20 μ l 的 CCK8 试剂，37℃避光孵育 6h，酶标仪上 450nm 测 OD 值。结果发现，PIK-T 细胞的增殖速度明显高于对照 T 细胞，说明 PIK-T 细胞分泌的抗体能够促进 T 细胞的增殖，具体如图 6 所示。

25 实施例 8：PIK-T 细胞的细胞因子分泌检测

用 5 μ g/ml 的 CD3 抗体（购自 Novoprotein 公司）包被 24 孔板，4℃包被过夜，PBS 清洗 3 遍，加入 3×10^5 的实施例 2 制备得到的 PIK-T 细胞和对照 T 细胞，培养 24h 后收集细胞上清。用 BD™CBA Human Th1/Th2 Cytokine Kit II（购自 BD 公司）检测 PIK-T 细胞和对照 T 细胞受 CD3 抗体刺激后细胞因子的分泌情况。结果发现，PIK-T 细胞分泌的 IL-4，IL-6，TNF α 和 IFN- γ 相对于对照 T 细胞显著增强，而 IL-2，IL-10 两种细胞因子的分泌量无明显差异，具体如图 7 所示。

实施例 9: TIL 来源的 PIK-T 细胞在体外对肿瘤细胞的杀伤实验

收集新切除的肺癌标本，立即在无菌条件下进行处理。具体方法如下：去除肺癌标本周围的正常组织和坏死区域，从标本的不同区域取下大小为 1-2 mm³ 的小组织块，24 孔板的每一孔放置一块。每孔加 2 mL 完全培养基（含 10% FBS 的 GT-T551 培养基）和 3000 IU/mL 的 IL-2。将 24 孔板置于 37°C，5% CO₂ 培养箱中培养。培养起始后的第 5-6 天为所有孔进行半量换液。之后，根据肿瘤浸润淋巴细胞（tumor infiltrating lymphocyte, TIL）生长情况，每隔 1-2 天进行一次半量换液。一旦孔内 TIL 长满，且所有贴壁细胞已除去，就将各个长满孔内的 TIL 收集起来。随后，1×10⁶ TIL 重悬于含 150 mL 完全培养基、30 ng/mL 抗 CD3 抗体、不少于 200 倍于 TIL 的照射过的饲养细胞（来自 3 个不同健康人的 PBMC）和 6000 IU/mL IL-2 的 T175 培养瓶中，将培养瓶垂直培养。培养至第 5 天，瓶内 65% 液体换为新的完全培养基和 IL-2。培养至第 7 天，2 个 T175 培养瓶内的细胞悬液转移至细胞培养袋内，加入 300 mL 完全培养基和 IL-2。从第 6 天开始，每隔 1 天进行一次台盼蓝染色计数，通过加入新的完全培养基和 IL-2 控制细胞密度至 0.5-2×10⁶/mL。随后，按实施例 2 的方法，转染 pNB328-CD20BR 与 pS838-antiPD1 质粒，获得 TIL 来源的 PIK-T 细胞。

选取 MHC class I 分型匹配的肺癌细胞株 NCI-H460（购自美国典型物保藏中心，ATCC），在 RTCA 细胞增殖板（购自美国 ACEA Biosciences 公司）上按 10000 个/孔的比例铺孔，随后按照操作说明书，应用实时无标记细胞功能分析仪（RTCA）检测细胞的体外杀伤活性，效靶比分别设置为 8:1、4:1、2:1，以未转染质粒的 TIL 细胞作为对照（效靶比 8:1），观察细胞增殖曲线。结果发现，PIK-T 细胞相对于对照细胞，能更高效的杀伤 H446 肿瘤细胞。具体如图 8 所示。

实施例 10: TIL 来源的 PIK-T 细胞用于治疗移植瘤的体内实验

在 NOD-SCID 小鼠（购自上海斯莱克实验动物有限公司）中皮下注射 5×10⁶ 的 H446 恶性肺癌细胞，10 天后经尾静脉分别注射实施例 9 制备得到的 TIL 来源的 PIK-T 细胞、对照 TIL 细胞（注射剂量 2×10⁵）或 PBS 缓冲液，测定移植瘤的生长状况。结果表明，相对于对照组，PIK-T 细胞对肺癌的抑制作用具有显著差异（图 9）。

实施例 11: PIK-T 细胞的体内清除试验（分子刹车功能的验证）

在 BABL/c 裸鼠（购自上海斯莱克实验动物有限公司）尾静脉注射实施例 2 制备得到的 PIK-T 细胞（注射剂量 5×10⁶），3 天后静脉注射 100 μg 的美罗华抗体（Rituxan）

或人IgG对照抗体。12个小时后，采集血液及骨髓样品，用流式细胞仪检测PIK-T细胞的比例（CD20与CD3双阳性细胞）。

结果表明，相对于注射人IgG抗体的对照组，在注射美罗华抗体后，输注的PIK-T细胞在血液与骨髓中的比例显著降低（图10）。可见，CD20分子刹车在体内能有效发挥作用，可以通过ADCC及CDC效应将含有CD20表位的PIK-T细胞清除。

尽管本发明的具体实施方式已经得到详细的描述，本领域技术人员将会理解。根据已经公开的所有教导，可以对那些细节进行各种修改和替换，这些改变均在本发明的保护范围之内。本发明的全部范围由所附权利要求及其任何等同物给出。

权利要求书

1、一种转基因 T 细胞，其特征在于，所述 T 细胞的基因组中稳定整合了包含人 Fc 段的抗体的编码序列的表达框，且表达框的两端包含转座子的反向末端重复序列。

5

2、如权利要求 1 所述的转基因 T 细胞，其特征在于，每百万的所述 T 细胞在 48 小时内表达的抗体量高于 2 μ g。

3、如权利要求 1 所述的转基因 T 细胞，其特征在于，所述转座子选自：piggybac、
10 sleeping beauty、frog prince、Tn5 和 Ty；优选地，所述转座子为 piggybac。

4、如权利要求 1 所述的转基因 T 细胞，其特征在于，所述 T 细胞选自：外周血 T 淋巴细胞、细胞毒杀伤 T 细胞（CTL）、辅助 T 细胞、抑制/调节性 T 细胞、 γ δ T 细胞以及源自细胞因子诱导的杀伤细胞（CIK）、肿瘤浸润淋巴细胞（TIL）的 T 细胞，
15 或其混合物；优选地，所述 T 细胞为外周血 T 淋巴细胞或源自 TIL 的 T 细胞。

5、如权利要求 1 所述的转基因 T 细胞，其特征在于，所述 T 细胞还包含刹车分子，该刹车分子为可被已上市抗体药物识别的膜抗原；优选地，所述膜抗原选自 CD11a、
20 CD15、CD19、CD20、CD25、CD44、CD47、CD52、EGFR、ERBB2、ERBB3、ERBB4、VEGFR1、VEGFR2、EpCAM、MSLN、GPIIb/IIIa、 α 4 整合素和 α 4 β 7 整合素；优选地，所述膜抗原为 CD20。

6、如权利要求 1 所述转基因 T 细胞，其特征在于，所述抗体为抗肿瘤或抗病毒的抗体，优选自：免疫检查点抗体、T 细胞共刺激信号抗体、抗新生血管生成的抗体、
25 抗肿瘤细胞生长因子受体的抗体、抗肿瘤细胞膜抗原的抗体和抗病毒抗体。

7、如权利要求 1 所述的转基因 T 细胞，其特征在于，所述抗体针对如下抗原中的一种或多种：PD-1、CTLA4、PDL1、PDL2、PDL3、TIM3、LAG3、CD28、CD137、
30 CD40、CD40L、CD47、CD19、CD20、CEA、GD2（又称 B4GALNT1， β 1,4-乙酰基-氨基半乳糖基转移酶 1）、FR（Flavin 还原酶）、PSMA（前列腺特异性膜抗原、gp100（PMEL 前黑素小体蛋白）、CA9（碳酸酐酶 IX）、CD171/L1-CAM、IL-13R α 2、MART-1（又称粘蛋白-A）、ERBB2、NY-ESO-1（又称 CTAG1B，癌/睾丸抗

原 1B)、MAGE(黑素瘤相关抗原 E1) 家族蛋白、BAGE(B 黑素瘤抗原家族) 家族蛋白、GAGE(生长激素释放因子) 家族蛋白、AFP(α -胎蛋白)、MUC1(粘蛋白 1, 细胞表面相关)、CD22、CD23、CD30、CD33、CD44v7/8、CD70、VEGFR1、VEGFR2、IL-11R α 、EGP-2、EGP-40、FBP、GD3(又称 ST8SIA1, ST8 α -N-乙酰基-神经酰胺 α -2,8-唾液酸转换酶 1)、PSCA(前列腺干细胞抗原)、FSA(又称 KIAA1109)、PSA(又称 KLK3, 激肽释放酶相关的肽酶 3)、HMGA2、胎儿型乙酰胆碱受体、LeY(又称 FUT3)、EpCAM、MSLN(间皮素)、IGFR1、EGFR、EGFRvIII、ERBB3、ERBB4、CA125(又称 MUC16, 粘蛋白 16, 细胞表面相关)、CA15-3、CA19-9、CA72-4、CA242、CA50、CYFRA21-1、SCC(又称 SERPINB3)、AFU(又称 FUCA1)、
5 EBV-VCA、POA(又称 VDR, 维生素 D(1,25-二氢维生素 D₃)受体)、 β 2-MG(β -2-微球蛋白)和 PROGRP(GRP 胃泌素释放肽)、乙肝病毒、艾滋病毒; 优选地, 所述抗体为 PD-1 抗体。
10

8、如权利要求 1-7 中任一项所述的转基因 T 细胞, 其特征在于, 所述转基因 T
15 细胞转入了以下核酸构建物 A 和 B:

核酸构建物 A: 含有转座子 5' 反向末端重复序列(5'ITR)、包含人 Fc 段的抗体的编码序列及控制该核酸序列表达的启动子、polyA 加尾信号序列和转座子 3' 反向末端重复序列(3'ITR);

核酸构建物 B: 含有转座子 5' 反向末端重复序列(5'ITR)、编码刹车分子的核
20 酸序列及控制该核酸序列表达的启动子、polyA 加尾信号序列、转座子 3' 反向末端重复序列(3'ITR)、转座酶编码序列和任意的控制转座酶编码序列表达的启动子;

任选地, 采用病毒转导、显微注射、粒子轰击、基因枪转化和电转中的一种或多种方法将所述核酸构建物转入所述细胞中, 优选地采用电转。

25 9、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 1-8 中任一项所述的转基因 T 细胞和药学上可接受的辅料。

10、权利要求 1-8 中任一项所述的转基因 T 细胞或权利要求 9 所述的药物组合物的用途, 其特征在于, 所述用途选自:

30 制备用于抑制肿瘤细胞生长的药物、制备用于抑制病毒生长的药物、制备用于治疗肿瘤的药物、制备用于治疗病毒感染性疾病的药物、制备用于治疗细菌感染性疾病的药物和制备用于治疗自身免疫疾病的药物;

优选地，所述肿瘤选自：肝癌、肺癌、结肠癌、胰腺癌、胃癌、乳腺癌、鼻咽癌、淋巴瘤、卵巢癌、膀胱癌、前列腺癌和头颈部肿瘤。

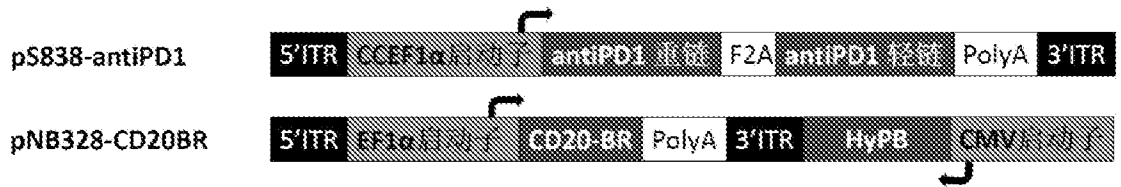


图 1

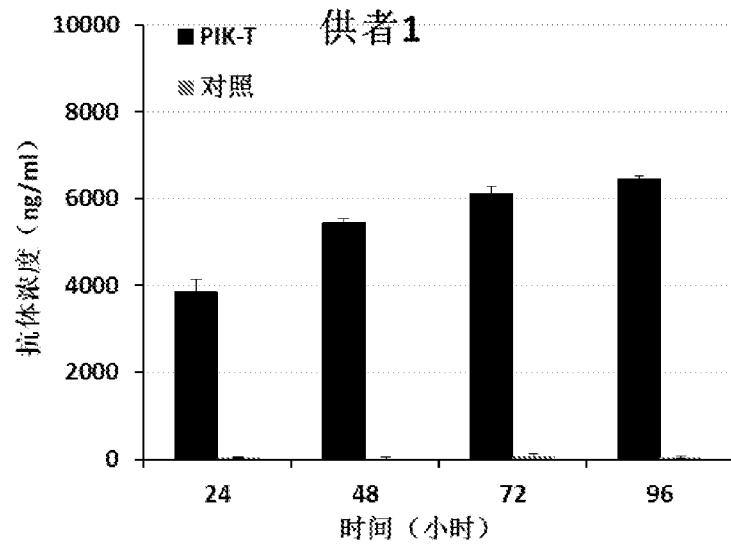


图 2A

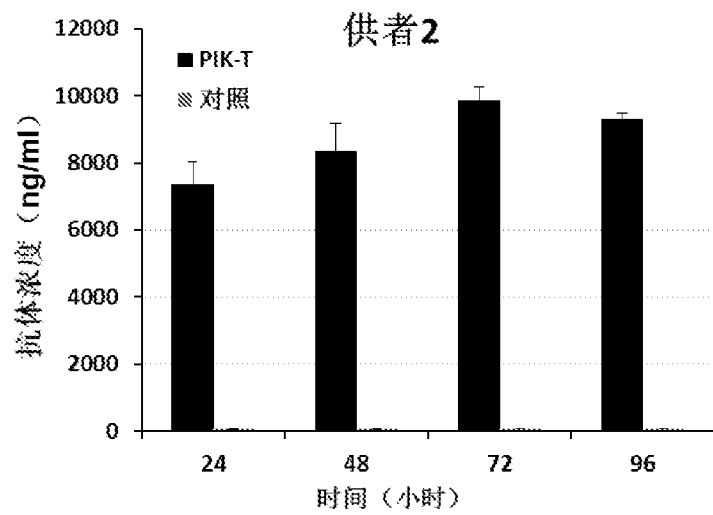


图 2B

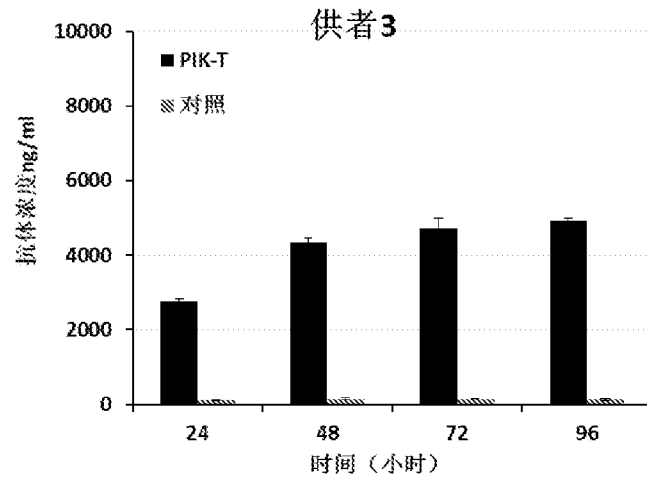


图 2C

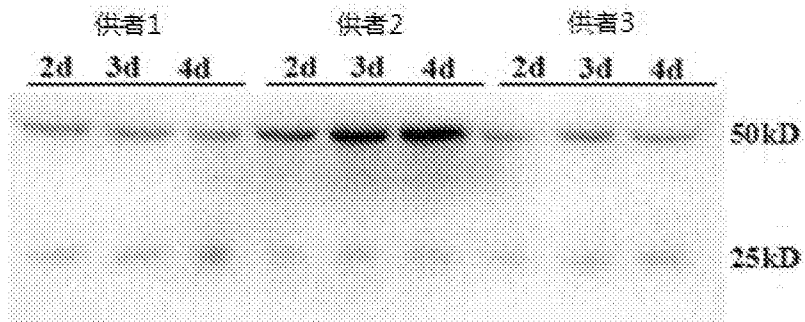


图 3

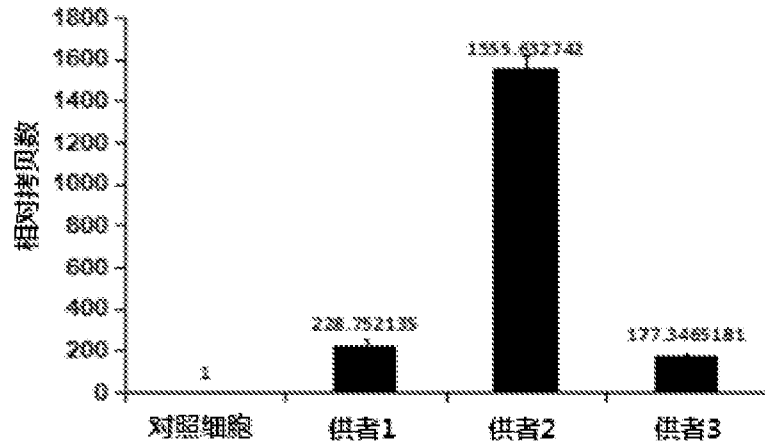


图 4

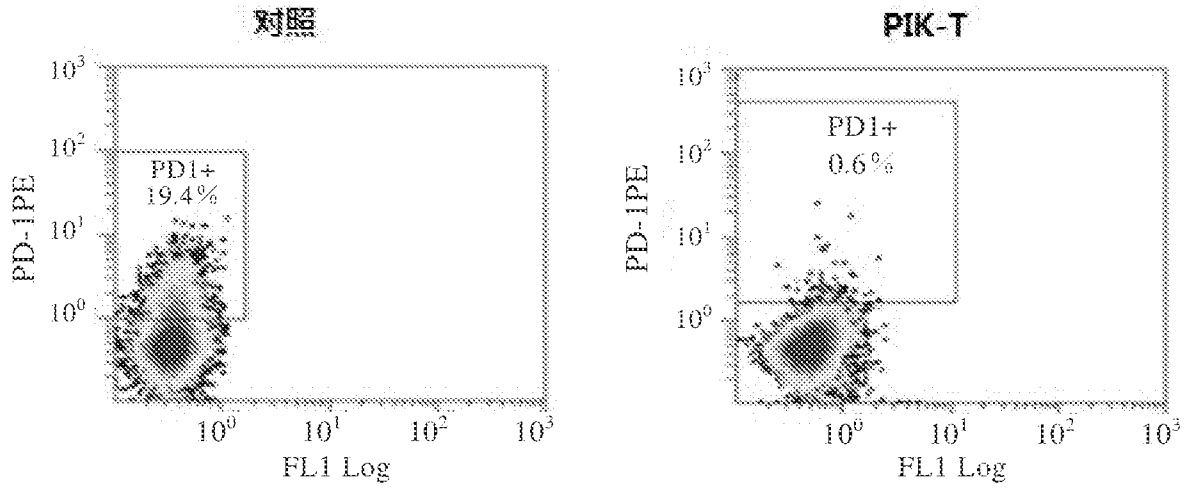


图 5

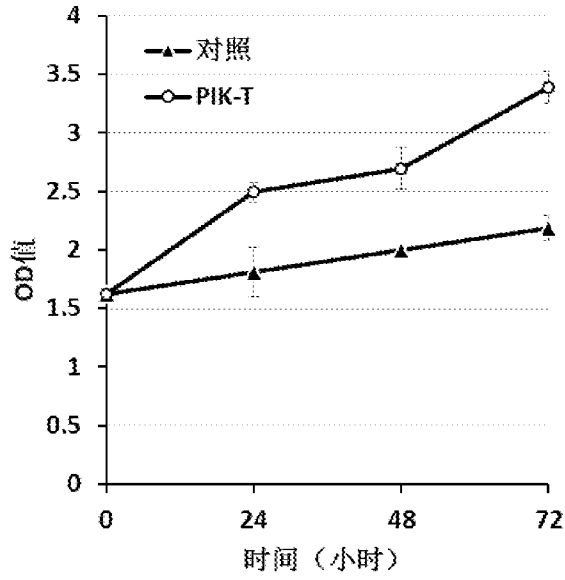


图 6

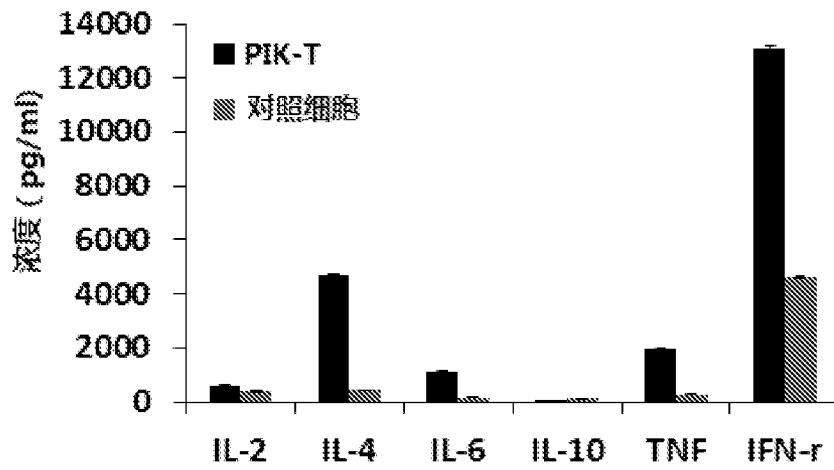


图 7

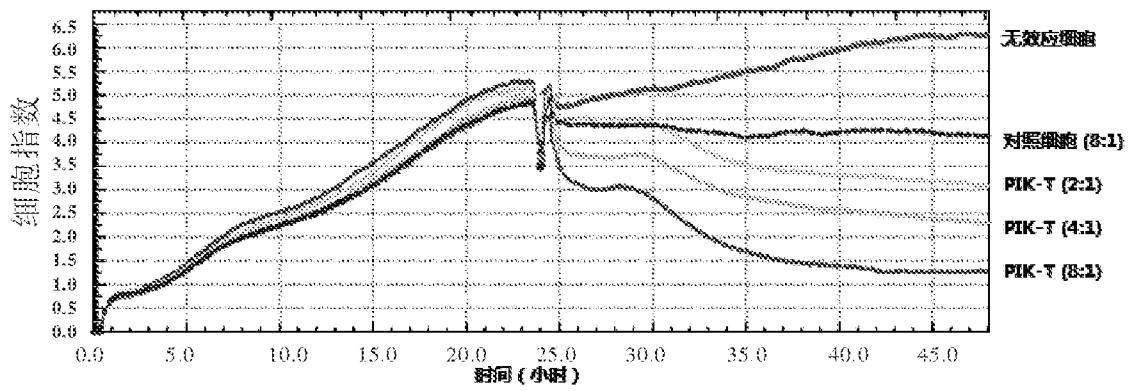


图 8

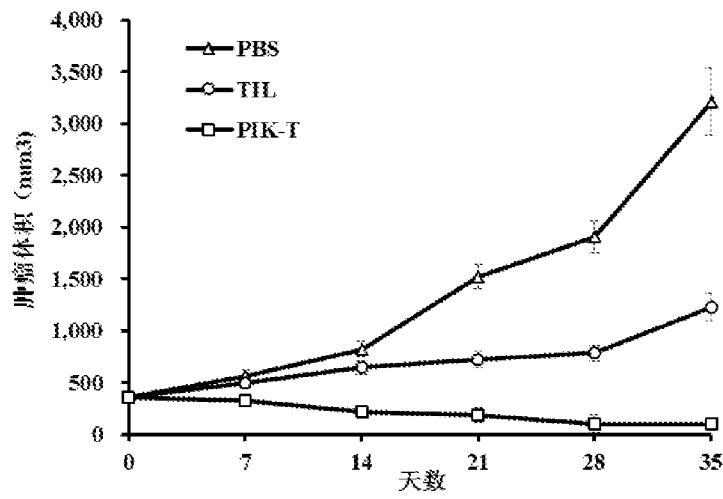


图 9

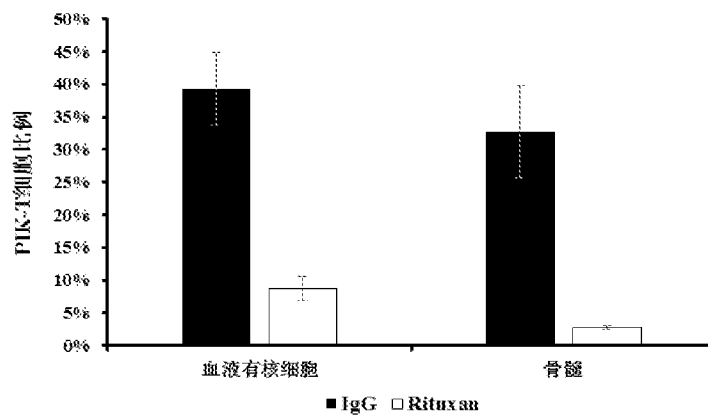


图 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2017/088952

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/10 (2006.01) i; C12N 15/13 (2006.01) i; C12N 15/85 (2006.01) i; A61K 48/00 (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)

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)

DWPI, EPODOC, CPRSABS, CNABS, CNTXT, WOTXT, CNKI, PUBMED: T lymphocyte, full-length antibody, FC, inverted terminal repeat sequence, molecular brake, antibody+, complete, t cell, transposon, piggybac, CD20, PD-1, ITR, tumour, medicine, 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 105154473 A (SHANGHAI CELL THERAPY RESEARCH INSTITUTE et al.), 16 December 2015 (16.12.2015), see claims 1-10	1-4, 9-10
Y		5-10
Y	CN 104745581 A (SHANGHAI CELL THERAPY RESEARCH INSTITUTE et al.), 01 July 2015 (01.07.2015), see abstract, and claim 4	5, 8-10
Y	CN 105330750 A (SHANGHAI CELL THERAPY RESEARCH INSTITUTE et al.), 17 February 2016 (17.02.2016), see claims 1-13, and description, embodiments 5 and 6	6-10
A	SAHA, S. et al., "piggyBac Transposon System Modification of Primary Human T Cells", JOURNAL OF VISUALIZED EXPERIMENTS, vol. 69, no. e4235, 11 May 2012 (11.05.2012), ISSN: 1940-087X, pages 1-5, see the whole document	1-10

Further documents are listed in the continuation of Box C. 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>"&" document member of the same patent family</p>
---	---

Date of the actual completion of the international search 18 August 2017 (18.08.2017)	Date of mailing of the international search report 26 September 2017 (26.09.2017)
--	---

<p>Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451</p>	<p>Authorized officer LI, Zhenpeng Telephone No.: (86-10) 62411085</p>
---	--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2017/088952

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 105154473 A	16 December 2015	WO 2017054647 A1	06 April 2017
CN 104745581 A	01 July 2015	None	
CN 105330750 A	17 February 2016	None	

<p>A. 主题的分类</p> <p>C12N 5/10(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; C12N 15/85(2006.01)i; A61K 48/00(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>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>DWPI, EPODOC, CPRSABS, CNABS, CNTXT, WOTXT, CNKI, PUBMED; T细胞, T淋巴细胞, 抗体, 全长抗体, FC, 转座子, 反向末端重复序列, 分子刹车, 药物, 肿瘤, 癌, antibod+, complete, t cell, transposon, piggybac, CD20, PD-1, ITR, tumor, medicine, 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 105154473 A (上海细胞治疗研究院等) 2015年 12月 16日 (2015 - 12 - 16) 参见权利要求1-10</td> <td>1-4, 9-10</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td></td> <td>5-10</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 104745581 A (上海细胞治疗研究院等) 2015年 7月 1日 (2015 - 07 - 01) 参见摘要, 权利要求4</td> <td>5, 8-10</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 105330750 A (上海细胞治疗研究院等) 2016年 2月 17日 (2016 - 02 - 17) 参见权利要求1-13, 说明书实施例5-6</td> <td>6-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>Sunandan Saha等. "piggyBac Transposon System Modification of Primary Human T Cells" Journal of Visualized Experiments, 第69卷, 第e4235期, 2012年 5月 11日 (2012 - 05 - 11), ISSN: 1940-087X, 第1-5页, 参见全文</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 105154473 A (上海细胞治疗研究院等) 2015年 12月 16日 (2015 - 12 - 16) 参见权利要求1-10	1-4, 9-10	Y		5-10	Y	CN 104745581 A (上海细胞治疗研究院等) 2015年 7月 1日 (2015 - 07 - 01) 参见摘要, 权利要求4	5, 8-10	Y	CN 105330750 A (上海细胞治疗研究院等) 2016年 2月 17日 (2016 - 02 - 17) 参见权利要求1-13, 说明书实施例5-6	6-10	A	Sunandan Saha等. "piggyBac Transposon System Modification of Primary Human T Cells" Journal of Visualized Experiments, 第69卷, 第e4235期, 2012年 5月 11日 (2012 - 05 - 11), ISSN: 1940-087X, 第1-5页, 参见全文	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 105154473 A (上海细胞治疗研究院等) 2015年 12月 16日 (2015 - 12 - 16) 参见权利要求1-10	1-4, 9-10																		
Y		5-10																		
Y	CN 104745581 A (上海细胞治疗研究院等) 2015年 7月 1日 (2015 - 07 - 01) 参见摘要, 权利要求4	5, 8-10																		
Y	CN 105330750 A (上海细胞治疗研究院等) 2016年 2月 17日 (2016 - 02 - 17) 参见权利要求1-13, 说明书实施例5-6	6-10																		
A	Sunandan Saha等. "piggyBac Transposon System Modification of Primary Human T Cells" Journal of Visualized Experiments, 第69卷, 第e4235期, 2012年 5月 11日 (2012 - 05 - 11), ISSN: 1940-087X, 第1-5页, 参见全文	1-10																		
<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>2017年 8月 18日</p>	<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2017年 9月 26日</p>																			
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中华人民共和国国家知识产权局(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>受权官员</p> <p>李振鹏</p> <p>电话号码 (86-10)62411085</p>																			

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2017/088952

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	105154473	A	2015年 12月 16日	WO	2017054647	A1	2017年 4月 6日
CN	104745581	A	2015年 7月 1日	无			
CN	105330750	A	2016年 2月 17日	无			