

(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
2024 年 5 月 10 日 (10.05.2024)



(10) 国际公布号
WO 2024/094165 A1

- (51) 国际专利分类号:
C07K 16/30 (2006.01) **C12N 5/10** (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2023/129566
- (22) 国际申请日: 2023 年 11 月 3 日 (03.11.2023)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
202211377234.9 2022年11月4日 (04.11.2022) CN
- (71) 申请人: 茂行制药(苏州)有限公司 (**T-MAXIMUM PHARMACEUTICAL (SUZHOU) CO., LTD.**) [CN/CN]; 中国江苏省苏州市中国(江苏)自由贸易试验区苏州片区苏州工业园区金谷路99号生物医药产业园三期B区4号楼201单元, Jiangsu 215000 (CN)。
- (72) 发明人: 尚小云(**SHANG, Xiaoyun**); 中国江苏省苏州市中国(江苏)自由贸易试验区苏州片区苏州工业园区金谷路99号生物医药产业园三期B区4号楼201单元, Jiangsu 215000 (CN)。 蒋海娟(**JIANG, Haijuan**); 中国江苏省苏州市中国(江苏)自由贸易试验区苏州片区苏州工业园区金谷路99号生物医药产业园三期B区4号楼201单元, Jiangsu 215000 (CN)。 马少文(**MA, Shaowen**); 中国江苏省苏州市中国(江苏)自由贸易试验区苏州片区苏州工业园区金谷路99号生物医药产业园三期B区4号楼201单元, Jiangsu 215000 (CN)。
- (74) 代理人: 上海巔石知识产权代理事务所(普通合伙) (**SHANGHAI DIANSHI PARTNERS, P.C.**); 中国上海市浦东新区盛夏路608号3号楼103室, Shanghai 201210 (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,

CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, 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))。

(54) **Title:** UNIVERSAL CAR-T CELL TARGETING B7H3, AND PREPARATION METHOD THEREFOR AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 靶向B7H3的通用型CAR-T细胞及其制备方法和应用

(57) **Abstract:** A B7H3 binding polypeptide, comprising two different anti-B7H3 single domain antibodies. The present invention further relates to a chimeric antigen receptor comprising the B7H3 binding polypeptide, and a universal CAR-T cell comprising the chimeric antigen receptor. An antigen on the surface of a tumor cell is recognized while the TCR and HLA-A genes expressed by cells are knocked out, so that an immune rejection reaction caused by allogeneic CAR-T treatment is reduced, the cell survival time is prolonged, and the anti-tumor effect is improved.

(57) 摘要: 一种B7H3结合多肽, 其包含两个不同抗B7H3单域抗体。还涉及包含所述B7H3结合多肽的嵌合抗原受体, 以及包含所述嵌合抗原受体的通用型CAR-T细胞, 识别肿瘤细胞表面抗原的同时, 敲除细胞表达的TCR和HLA-A基因, 从而降低异体CAR-T治疗引起的免疫排斥反应, 延长细胞存活时间, 提高抗肿瘤效果。

WO 2024/094165 A1

靶向 B7H3 的通用型 CAR-T 细胞及其制备方法和应用

技术领域

本发明涉及基因敲除策略，分子生物学及免疫治疗领域，具体涉及一种基于碱基编辑的通用型 B7H3 UCAR-T 细胞及其制备方法和应用。

背景技术

胶质母细胞瘤占有脑肿瘤的 15%，可起源于普通脑细胞，或由低级星形细胞瘤发展而来。通常诊断后的生存期为 12 至 15 个月，患者五年以上生存期只有 3%至 7%。在不加以治疗的情况下，生存期通常为 3 个月。每年每 10 万人中约有 3 人患胶质母细胞瘤，是最常见的脑起源癌症，是仅次于脑膜瘤的第二常见脑肿瘤。

随着肿瘤免疫理论的发展与技术的进步，细胞免疫治疗肿瘤吸引越来越多的关注。CAR-T 细胞技术是一种基于细胞的治疗手段，已经在肿瘤免疫治疗尤其是血液肿瘤的治疗中产生极佳的效果。CAR-T 免疫治疗使用基因改造的 T 细胞，可特异性地识别并杀死表达特定抗原的肿瘤细胞，而不受 MHC 限制性影响。CAR-T 免疫疗法在各种 B 细胞恶性肿瘤的治疗中取得良好效果，如靶向 CD19 的 CAR-T 细胞治疗急性淋巴白血病（ALL），慢性淋巴白血病（CLL）和非霍奇金淋巴瘤（NHL）。同时，CAR-T 细胞对多发性骨髓瘤和复发/难治多发性骨髓瘤的临床应用正在进行中，并显示出令人鼓舞的结果。

B7-H3，也称为 CD276，属于免疫调节蛋白 B7 家族，是一种 I 型膜蛋白，其胞外结构域序列与其他 B7 家族成员相似。B7-H3 基因位于人类的 15 号染色体上，该基因由十个外显子组成，其中外显子 4 至 7 编码细胞外 IgV-IgC 结构域。B7-H3 的 mRNA 在多种正常组织和一些肿瘤细胞系中表达，在外周血单个核细胞（PBMC）中则无法检测到，但是通过炎症细胞因子（IFN γ ）以及 PMA 和 ionomycin 组合物，可在树突细胞和单核细胞上诱导 B7-H3 表达。虽然 B7-H3 mRNA 在正常组织中广泛表达，但是 B7-H3 蛋白表达水平在正常组织中极低或缺失，表明 B7-H3 的蛋白表达受到严格的转录后调控。与之相对的是，B7-H3 蛋白在多种恶性肿瘤中过表达，且与不良预后、较高的肿瘤分级和肿瘤转移、耐药及整体生存率低相关。

B7-H3 在肿瘤与健康组织间的差异表达使其非常适合作为治疗靶点，因为靶向该抗原导致的副作用会非常有限。已开展的临床前研究结果表明，在肿瘤细胞中抑制或降低 B7-H3 蛋白表达，可降低细胞增殖和糖酵解，并增加肿瘤细胞的药物敏感性。

以 B7-H3 为靶点的 CAR-T 细胞疗法已经展开研究。一项临床前研究证明，B7-H3 CAR-T 细胞在体内表现出显著的抗肿瘤活性，可使多种异体移植模型（包括骨肉瘤，髓母细胞瘤

和尤因肉瘤)中已建立的实体肉瘤消退。

然而,病人自体 T 细胞在体外扩增困难或功能降低,导致制备的 CAR-T 细胞产品数量不足或质量差。通用型 CAR T 细胞是从健康供体分离获得 T 细胞,制备的 CAR-T 细胞不但扩增效率高、活力强,而且感染阳性率也有提高,但是通用型 CAR-T 也面临着移植物抗宿主疾病(GVHD)和免疫排斥的问题。CRISPR/Cas9 系统是最常用的基因编辑方法,可用于产生 TCR 缺陷和 HLA I 类分子缺陷的 T 细胞,降低同种异体细胞治疗引起的免疫排斥免疫反应。

本发明的目的在于制备一种靶向 B7H3 蛋白双表位的通用型 CAR-T 细胞,识别肿瘤细胞表面抗原的同时,敲除细胞表达的 TCR 和 HLA-A 基因,从而降低异体 CAR-T 治疗引起的免疫排斥反应,延长细胞存活时间,提高抗肿瘤效果。

发明内容

一方面,本申请提供了一种分离的 B7H3 结合多肽,其包含靶向 B7H3 的第一重链抗体重链可变区(VHH-1)和第二重链抗体重链可变区(VHH-2),其中所述 VHH-1 包含如 SEQ ID NO: 1 所示的 HCDR1,如 SEQ ID NO: 3 所示的 HCDR2,如 SEQ ID NO: 5 所示的 HCDR3;和/或所述 VHH-2 包含如 SEQ ID NO: 2 所示的 HCDR1,如 SEQ ID NO: 4 所示的 HCDR2,如 SEQ ID NO: 6 所示的 HCDR3。

在某些实施方式中,其中所述 VHH-1 和/或 VHH-2 包括人抗体、人源化抗体或嵌合抗体。

在某些实施方式中,其中所述 VHH-1 与 VHH-2 直接连接或者通过接头(linker)连接。

在某些实施方式中,自 N 端至 C 端,其中所述 B7H3 结合多肽依次包含:i) VHH-1-linker-VHH-2;或 ii) VHH-2-linker-VHH-1。

在某些实施方式中,其中所述接头包含 SEQ ID NO: 22 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中,其中所述 VHH-1 包含:

i) 包含 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列的 HFR1,包含 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列的 HFR2,包含 SEQ ID NO: 13 所示的氨基酸序列的 HFR3,包含 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列的 HFR4;或

ii) 包含 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列的 HFR1,包含 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列的 HFR2,包含 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列的 HFR3,包含 SEQ ID NO: 17 所示的氨基酸序列的 HFR4;

在某些实施方式中,其中所述 VHH-1 包含如 SEQ ID NO: 18 或 SEQ ID NO: 19 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，其中所述 VHH-2 包含

i) 包含 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列的 HFR1，包含 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列的 HFR2，包含 SEQ ID NO: 15 所示的氨基酸序列的 HFR3，包含 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列的 HFR4；或

ii) 包含 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列的 HFR1，包含 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列的 HFR2，包含 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列的 HFR3，包含 SEQ ID NO: 17 所示的氨基酸序列的 HFR4。

在某些实施方式中，其中所述 VHH-2 包含如 SEQ ID NO: 20 或 SEQ ID NO: 21 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述 B7H3 结合多肽包含 SEQ ID NO: 23，SEQ ID NO: 24，SEQ ID NO: 26 和 SEQ ID NO: 25 中任一项所示的氨基酸序列。

另一方面，本申请提供一种免疫缀合物，其包含本申请所述 B7H3 结合多肽。

另一方面，本申请提供一种嵌合抗原受体，其包含靶向 B7H3 的胞外抗原结合结构域，跨膜域，胞内共刺激信号传导结构域和胞内信号转导结构域，其中所述胞外抗原结合结构域包括至少两个结合 B7H3 不同表位的 VHH。

在某些实施方式中，所述胞外抗原结合结构域包含两个结合 B7H3 不同表位的 VHH。

另一方面，本申请提供一种嵌合抗原受体，其包含靶向 B7H3 的胞外抗原结合结构域，跨膜域，胞内共刺激信号传导结构域和胞内信号转导结构域，其中所述胞外抗原结合结构域包含本申请所述的 B7H3 结合多肽。

在某些实施方式中，其中所述跨膜域包含源自选自下组中的一种或多种蛋白的跨膜域：CD8A、CD8B、CD28、CD3 ϵ (CD3 ϵ)、4-1BB、CD4、CD27、CD7、PD-1、TRAC、TRBC、CD3 ζ 、CTLA-4、LAG-3、CD5、ICOS、OX40、NKG2D、2B4 (CD244)、Fc ϵ RI γ 、BTLA、CD30、GITR、HVEM、DAP10、CD2、NKG2C、LIGHT、DAP12、CD40L (CD154)、TIM1、CD226、DR3、CD45、CD80、CD86、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64 和 SLAM。

在某些实施方式中，其中所述跨膜域包含源自 CD8A 的跨膜域。

在某些实施方式中，其中所述跨膜域包含 SEQ ID NO: 62 至 SEQ ID NO: 110 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，其中所述跨膜域包含 SEQ ID NO: 62 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，其中所述胞内共刺激信号传导结构域包含源自选自下组中的一种或

多种蛋白的胞内共刺激信号传导结构域：CD28、CD137、CD27、CD2、CD7、CD8A、CD8B、OX40、CD226、DR3、SLAM、CDS、ICAM-1、NKG2D、NKG2C、B7-H3、2B4、Fc ϵ RI γ 、BTLA、GITR、HVEM、DAP10、DAP12、CD30、CD40、CD40L、TIM1、PD-1、LFA-1、LIGHT、JAML、CD244、CD100、ICOS、CD40 和 MyD88。

在某些实施方式中，其中所述胞内共刺激信号传导结构域源自 4-1BB 的共刺激信号传导结构域。

在某些实施方式中，其中所述胞内共刺激信号传导结构域包含 SEQ ID NO: 111 至 SEQ ID NO: 143 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，其中所述胞内共刺激信号传导结构域包含 SEQ ID NO: 112 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，其中所述胞内信号转导结构域包含源自选自下组中的一种或多种蛋白的胞内信号转导结构域：CD3 ζ 、CD3 δ 、CD3 γ 、CD3 ϵ 、CD79a、CD79b、Fc ϵ RI γ 、Fc ϵ RI β 、Fc γ RIIa、牛白血病病毒 gp30、Epstein-Barr 病毒(EBV)LMP2A、猿免疫缺陷病毒 PBj14 Nef、DAP10、DAP-12 和至少包含一个 ITAM 的结构域。

在某些实施方式中，其中所述胞内信号转导结构域包含源自 CD3 ζ 的信号传导结构域。

在某些实施方式中，其中所述胞内信号转导结构域包含 SEQ ID NO: 127、SEQ ID NO: 131、SEQ ID NO: 132、SEQ ID NO: 144 至 SEQ ID NO: 154 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，其中所述胞内信号转导结构域包含 SEQ ID NO: 144 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，其在胞外抗原结合结构域和跨膜域之间包括铰链区，所述铰链区包含源自选自下组中的一种或多种蛋白的铰链区：CD28、IgG1、IgG4、IgD、4-1BB、CD4、CD27、CD7、CD8A、PD-1、ICOS、OX40、NKG2D、NKG2C、Fc ϵ RI γ 、BTLA、GITR、DAP10、TIM1、SLAM、CD30 和 LIGHT。

在某些实施方式中，所述铰链区包含源自 CD8A 的铰链区。

在某些实施方式中，所述铰链区包含 SEQ ID NO: 155 至 SEQ ID NO: 176 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述铰链区包含 SEQ ID NO: 163 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述嵌合抗原受体的非靶向部分包含 CD8A 的铰链区、CD8A 分子跨膜域、4-1BB 的胞内共刺激信号传导结构域和 CD3 ζ 胞内信号传导结构域。

在某些实施方式中，所述嵌合抗原受体的非靶向部分包含 SEQ ID NO: 27 所示的氨基酸

序列。

在某些实施方式中，所述的嵌合抗原受体还包含信号肽片段，所述信号肽片段的 C 端与所述胞外抗原结合结构域的 N 端连接。

在某些实施方式中，自 N 端至 C 端，所述的嵌合抗原受体依次包含信号肽片段、胞外抗原结合结构域，跨膜域，胞内共刺激信号传导结构域和胞内信号转导结构域。

在某些实施方式中，所述信号肽片段包括 CD8A 信号肽片段。

在某些实施方式中，所述信号肽片段包含如 SEQ ID NO: 28 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述的嵌合抗原受体包含 SEQ ID NO: 33 至 SEQ ID NO: 36 中任一项所示的氨基酸序列。

另一方面，本申请提供一种或多种分离的多肽，其包含本申请所述的嵌合抗原受体和能够增强免疫效应细胞的一种或多种活性的增强子。

在某些实施方式中，其中所述增强子包括细胞因子和/或细胞因子受体。

在某些实施方式中，其中所述增强子是膜嵌合的细胞因子和/或细胞因子受体。

在某些实施方式中，其中所述增强子选自 IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-11, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-21, IL-23, 其受体，其功能变体及它们的组合。

在某些实施方式中，其中所述增强子包括 IL-15 或其功能变体，或包含 IL-15 受体(IL-15R)的嵌合细胞因子受体。

在某些实施方式中，其中所述增强子包括膜嵌合的 IL-15 (mIL-15)。

在某些实施方式中，其中所述增强子包含 SEQ ID NO: 46 或 SEQ ID NO: 54 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，其包含 i) SEQ ID NO: 33 至 SEQ ID NO: 36 中任一项所示的氨基酸序列；和 ii) SEQ ID NO: 46 或 SEQ ID NO: 54 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述嵌合抗原受体和所述增强子分别位于不同的多肽中。

在某些实施方式中，所述嵌合抗原受体和所述增强子位于同一多肽中。例如，所述嵌合抗原受体和所述增强子可以直接连接或间接连接。

在某些实施方式中，其中所述嵌合抗原受体和所述增强子通过接头连接。例如，自 N 端至 C 端，所述多肽可以包含如下结构：i) 嵌合抗原受体，接头和增强子；或 ii) 增强子，接头和嵌合抗原受体。

在某些实施方式中，其中所述接头包括自切割肽。

在某些实施方式中，其中所述自切割肽包括 P2A, F2A, E2A 或 T2A。

在某些实施方式中，其中所述 T2A 包含 SEQ ID NO: 44 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述多肽包含 SEQ ID NO: 241 或 SEQ ID NO: 243 所示的氨基酸序列。

另一方面，本申请提供一种或多种分离的核酸分子，其编码本申请所述的 B7H3 结合多肽，本申请所述的嵌合抗原受体，或本申请所述的多肽。

另一方面，本申请提供一种或多种分离的核酸分子，其包含编码本申请所述的嵌合抗原受体的第一核苷酸序列，和编码能够增强免疫效应细胞的一种或多种活性的增强子的第二核苷酸序列。

在某些实施方式中，其中所述增强子包括细胞因子和/或细胞因子受体。

在某些实施方式中，其中所述增强子是膜嵌合的细胞因子和/或细胞因子受体。

在某些实施方式中，其中所述增强子选自 IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-11, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-21, IL-23, 其受体，其功能变体及它们的组合。

在某些实施方式中，其中所述增强子包括 IL-15 或其功能变体，或包含 IL-15 受体(IL-15R)的嵌合细胞因子受体。

在某些实施方式中，其中所述增强子包括膜嵌合的 IL-15 (mIL-15)。

在某些实施方式中，其中所述增强子包含 SEQ ID NO: 46 或 SEQ ID NO: 54 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述的核酸分子包含 i) 编码 SEQ ID NO: 33 至 SEQ ID NO: 36 中任一项所示的氨基酸序列的核苷酸序列；和 ii) SEQ ID NO: 47 或 SEQ ID NO: 55 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，其中所述第一核苷酸序列与所述第二核苷酸序列位于不同的核酸分子中。

在某些实施方式中，其中所述第一核苷酸序列与所述第二核苷酸序列位于同一核酸分子中。

在某些实施方式中，其中所述第一核苷酸序列与所述第二核苷酸序列直接连接。

在某些实施方式中，其中所述第一核苷酸序列与所述第二核苷酸序列间接连接。

在某些实施方式中，其中所述第一核苷酸序列与所述第二核苷酸序列通过间隔序列连接。

在某些实施方式中，其中所述间隔序列包括内部核糖体进入位点(IRES)或编码自切割多肽。

在某些实施方式中，其中所述间隔序列编码病毒自切割多肽。

在某些实施方式中，其中所述间隔序列编码病毒自切割 2A 多肽 (2A)。

在某些实施方式中，其中病毒自切割 2A 多肽包括口蹄疫病毒(FMDV)(F2A)肽、马 A 型鼻病毒(ERAV)(E2A)肽、明脉扁刺蛾 β 四体病毒(Thoscaasigna virus)(TaV)(T2A)肽、猪捷申病毒-1(PTV-1)(P2A)肽、泰勒病毒 2A 肽或脑心肌炎病毒 2A 肽。

在某些实施方式中，其中间隔序列包含编码 T2A 的核苷酸序列。

在某些实施方式中，其中间隔序列包含 SEQ ID NO: 43 所示的核苷酸序列。

在某些实施方式中，其中所述 IRES 选自以下的至少一种：脊髓灰质炎 IRES，鼻病毒 IRES，脑心肌炎病毒 IRES(EMCV-IRES)，小核糖核酸病毒 IRES，口蹄疫病毒 IRES(FMDV-IRES)，口咽病毒 IRES，卡波西氏肉瘤相关疱疹病毒 IRES(KSHV-IRES)，甲型肝炎 IRES，丙型肝炎 IRES，经典猪瘟病毒 IRES，瘟病毒 IRES，牛病毒性腹泻病毒 IRES，弗云德鼠白血病 IRES，莫洛尼鼠白血病 IRES(MMLV-IRES)，劳斯肉瘤病毒 IRES，人类免疫缺陷病毒 IRES(HIV-IRES)，小珀椿象肠病毒 IRES，双顺反子病毒 IRES，蟋蟀麻痹病毒 IRES，锥蝾病毒 IRES，禾谷缢管蚜病毒 IRES，马立克氏病病毒 IRES，成纤维细胞生长因子(FGF-1 IRES 和 FGF-2 IRES)，血小板衍生生长因子 B(PDGF/c-sis IRES)，血管内皮生长因子(VEGF IRES) 和胰岛素样生长因子 2(IGF-II IRES)。

在某些实施方式中，自 5'端至 3'端，所述核酸分子依次包含：i) 第一核苷酸序列，间隔序列和第二核苷酸序列；或 ii) 第二核苷酸序列，间隔序列和第一核苷酸序列。

在某些实施方式中，自 5'端至 3'端，所述核酸分子依次包含：编码本申请所述 CAR 的核苷酸序列，间隔序列和编码增强子的核苷酸序列。

在某些实施方式中，其中所述核酸分子包含 SEQ ID NO: 240 或 SEQ ID NO: 242 所示的核苷酸序列。

另一方面，本申请提供了一种载体，其包含本申请所述的分离的核酸分子。

在某些实施方式中，其中所述载体是表达载体。

在某些实施方式中，其中所述载体选自 DNA 载体、RNA 载体、质粒、慢病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体和逆转录病毒载体。

另一方面，本申请提供了一种细胞，其包含本申请所述的分离的核酸分子或本申请所述的载体；和/或表达本申请所述的 B7H3 结合多肽或嵌合抗原受体。

另一方面，本申请提供了一种免疫效应细胞，其包含本申请所述的分离的核酸分子或本申请所述的载体；和/或表达本申请所述的嵌合抗原受体或多肽。

另一方面，本申请提供了一种免疫效应细胞，其包含靶向 B7H3 的嵌合抗原受体和膜嵌

合的 IL15 分子 (mIL15)。

在某些实施方式中，其中所述嵌合抗原受体的胞外抗原结合结构域包括至少两个结合 B7H3 不同表位的 VHH。

在某些实施方式中，其中所述胞外抗原结合结构域包含两个结合 B7H3 不同表位的 VHH。

在某些实施方式中，其中所述 mIL15 包含如 SEQ ID NO: 46 或 SEQ ID NO: 54 所述的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述免疫效应细胞包含本申请所述的嵌合抗原受体。

在某些实施方式中，所述嵌合抗原受体包含 SEQ ID NO: 29 至 SEQ ID NO: 36 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述的免疫效应细胞包括人细胞。

在某些实施方式中，所述免疫效应细胞包括 T 细胞、B 细胞、天然杀伤细胞(NK 细胞)、巨噬细胞、NKT 细胞、单核细胞、树突状细胞、粒细胞、淋巴细胞、白细胞和/或外周血单个核细胞。

在某些实施方式中，所述免疫效应细胞包括自体或非自体的免疫效应细胞。

在某些实施方式中，所述的免疫效应细胞包括经修饰的免疫效应细胞。

在某些实施方式中，其中所述经修饰的免疫效应细胞包括降低同种异体细胞治疗引起的免疫排斥反应的细胞。

在某些实施方式中，其中所述经修饰的免疫效应细胞中的 T 细胞抗原受体(TCR)和主要组织相容性复合体(MHCI, MHCII)在 T 细胞中的功能受到抑制。

在某些实施方式中，其中所述修饰包括与免疫排斥相关基因中的一个或多个的表达和/或活性被下调。

在某些实施方式中，其中所述与免疫排斥相关基因选自下组中的一种或多种基因：TRAC、TRBC、HLA-A、HLA-B、B2M 和 CIITA。

在某些实施方式中，所述经修饰的免疫效应细胞与未经修饰的相应细胞相比，TRAC 基因和 HLA-A 基因的表达和/或活性被下调。

在某些实施方式中，其中所述经修饰的免疫效应细胞与未经所述修饰的相应细胞相比，CIITA 基因的表达和/或活性未被下调。

在某些实施方式中，其中所述经修饰的免疫效应细胞与未经所述修饰的相应细胞相比，B2M 基因的表达和/或活性未被下调。

在某些实施方式中，其中所述经修饰的免疫效应细胞与相应的野生型细胞相比，TRAC

基因和 HLA-A 基因的表达和/或活性被下调。

在某些实施方式中，所述经修饰的免疫效应细胞与未经修饰的相应细胞相比，TRAC 基因，HLA-A 基因和 HLA-B 基因的表达和/或活性被下调。

在某些实施方式中，其中所述经修饰的免疫效应细胞与相应的野生型细胞相比，B2M 基因的表达和/或活性未被下调。

在某些实施方式中，其中所述经修饰的免疫效应细胞与相应的野生型细胞相比，CIITA 基因的表达和/或活性未被下调。

在某些实施方式中，其中所述基因的表达水平和/或活性被下调包括使编码所述基因的核酸分子的表达和/或活性下调；和/或使所述基因编码的蛋白质产物的表达和/或活性被下调。

在某些实施方式中，其中所述修饰包括：基因敲除、基因突变和/或基因沉默。

在某些实施方式中，所述修饰包括所述免疫效应细胞中两个 TRAC 等位基因中的任意一个被敲除并且两个 HLA-A 等位基因中的任意一个被敲除。

在某些实施方式中，所述修饰包括所述免疫细胞中两个 TRAC 等位基因被敲除并且两个 HLA-A 等位基因中的任意一个被敲除。

在某些实施方式中，所述修饰包括所述免疫细胞中 TRAC 基因外显子被敲除并且 HLA-A 基因外显子被敲除。

在某些实施方式中，其中所述修饰包括向所述免疫效应细胞施用一种或多种选自下组的物质：反义 RNA、siRNA、shRNA 和 CRISPR/Cas9 系统。

在某些实施方式中，其中所述修饰包括向所述免疫效应细胞施用 CRISPR/Cas9 系统。

在某些实施方式中，其中所述修饰还包括向所述免疫效应细胞施用靶向所述 TRAC 基因外显子部分的 sgRNA。

在某些实施方式中，其中所述靶向所述 TRAC 基因外显子部分的 sgRNA 包含 SEQ ID NO: 177 至 SEQ ID NO: 191 中任一项所示的核苷酸序列。

在某些实施方式中，其中所述修饰包括向所述免疫效应细胞施用靶向所述 HLA-A 基因外显子部分的 sgRNA。

在某些实施方式中，其中所述靶向所述 HLA-A 基因外显子部分的 sgRNA 包含 SEQ ID NO: 192 至 SEQ ID NO: 232 中任一项所示的核苷酸序列。

在某些实施方式中，其中所述修饰包括向所述免疫效应细胞施用靶向所述 HLA-B 基因外显子部分的 sgRNA。

在某些实施方式中，其中所述靶向所述 HLA-B 基因外显子部分的 sgRNA 包含 SEQ ID

NO: 237 至 SEQ ID NO: 239 中任一项所示的核苷酸序列。

在某些实施方式中，其中所述修饰还包括向所述细胞施用 Cas 酶。

在某些实施方式中，其中 Cas 酶包括 Cas9 蛋白。

在某些实施方式中，其中所述反义 RNA 包含 SEQ ID NO: 233 至 SEQ ID NO: 236 中任一项所示的核苷酸序列。

在某些实施方式中，其中所述免疫效应细胞为 HLA-B 纯合子细胞。

在某些实施方式中，其中所述 HLA-B 纯合子包括 HLA-B*40 纯合子，HLA-B*15 纯合子，HLA-B*46 纯合子，HLA-B*13 纯合子，HLA-B*51 纯合子，HLA-B*58 纯合子，HLA-B*07 纯合子，HLA-B*35 纯合子，HLA-B*44 纯合子，HLA-B*52 纯合子，HLA-B*57 纯合子，HLA-B*54 纯合子，HLA-B*55 纯合子。

在某些实施方式中，其中所述免疫效应细胞为 HLA-A 纯合子或杂合子细胞。

在某些实施方式中，其中所述 HLA-A 纯合子或杂合子包括 HLA-A*02 纯合子，HLA-A*11 纯合子，HLA-A*02/A*11 杂合子或 HLA-A*24 纯合子。

另一方面，本申请提供了一种制备免疫效应细胞的方法，其包括向免疫效应细胞中本申请所述的核酸分子或本申请所述的载体。

在某些实施方式中，所述方法还包括：在向免疫效应细胞中引入本申请所述的核酸分子或本申请所述的载体之前/之后，修饰所述免疫效应细胞，所述修饰包括与免疫排斥相关基因中的一个或多个的表达和/或活性被下调。

在某些实施方式中，其中所述与免疫排斥相关基因选自下组中的一种或多种基因：TRAC、TRBC、HLA-A、HLA-B、B2M 和 CIITA。

在某些实施方式中，与未经所述修饰的相应细胞中相应基因的表达和/或活性相比，下调所述免疫效应细胞中 TRAC 基因和 HLA-A 基因的表达和/或活性。

在某些实施方式中，与未经所述修饰的相应细胞中相应基因的表达和/或活性相比，CIITA 基因的表达和/或活性未被下调。

在某些实施方式中，与未经所述修饰的相应细胞中相应基因的表达和/或活性相比，B2M 基因的表达和/或活性未被下调。

在某些实施方式中，与相应的野生型细胞相比，所述免疫效应细胞的 TRAC 基因和 HLA-A 基因的表达和/或活性被下调。

在某些实施方式中，与相应的野生型细胞相比，所述免疫效应细胞的 TRAC 基因，HLA-A 基因和 HLA-B 基因的表达和/或活性被下调。

在某些实施方式中，与相应的野生型细胞相比，CIITA 基因的表达和/或活性未被下调。

在某些实施方式中，与相应的野生型细胞相比，B2M 基因的表达和/或活性未被下调。

在某些实施方式中，其中所述基因的表达水平和/或活性被下调包括使编码所述基因的核酸分子的表达和/或活性下调；和/或使所述基因编码的蛋白质产物的表达和/或活性被下调。

在某些实施方式中，其中所述修饰包括：基因敲除、基因突变和/或基因沉默。

在某些实施方式中，所述修饰包括所述免疫效应细胞中两个 TRAC 等位基因中的任意一个被敲除并且两个 HLA-A 等位基因中的任意一个被敲除。

在某些实施方式中，所述修饰包括所述免疫细胞中两个 TRAC 等位基因被敲除并且两个 HLA-A 等位基因中的任意一个被敲除。

在某些实施方式中，所述修饰包括所述免疫细胞中 TRAC 基因外显子被敲除并且 HLA-A 基因外显子被敲除。

在某些实施方式中，其中所述修饰包括向所述免疫效应细胞施用一种或多种选自下组的物质：反义 RNA、siRNA、shRNA 和 CRISPR/Cas9 系统。

在某些实施方式中，其中所述修饰包括向所述免疫效应细胞施用 CRISPR/Cas9 系统。

在某些实施方式中，其中所述修饰包括向所述免疫效应细胞施用靶向所述 TRAC 基因外显子部分的 sgRNA。

在某些实施方式中，其中所述靶向所述 TRAC 基因外显子部分的 sgRNA 包含 SEQ ID NO: 177 至 SEQ ID NO: 191 中任一项所示的核苷酸序列。

在某些实施方式中，其中所述修饰包括向所述免疫效应细胞施用靶向所述 HLA-A 基因外显子部分的 sgRNA。

在某些实施方式中，其中所述靶向所述 HLA-A 基因外显子部分的 sgRNA 包含 SEQ ID NO: 192 至 SEQ ID NO: 232 中任一项所示的核苷酸序列。

在某些实施方式中，其中所述修饰包括向所述免疫效应细胞施用靶向所述 HLA-B 基因外显子部分的 sgRNA。

在某些实施方式中，其中所述靶向所述 HLA-B 基因外显子部分的 sgRNA 包含 SEQ ID NO: 237 至 SEQ ID NO: 239 中任一项所示的核苷酸序列。

在某些实施方式中，其中所述修饰还包括向所述细胞施用 Cas 酶。

在某些实施方式中，其中 Cas 酶包括 Cas9 蛋白。

在某些实施方式中，其中所述反义 RNA 包含 SEQ ID NO: 233 至 SEQ ID NO: 236 中任一项所示的核苷酸序列。

在某些实施方式中，其中所述免疫效应细胞包括人细胞。

在某些实施方式中，所述免疫效应细胞包括 T 细胞、B 细胞、天然杀伤细胞(NK 细胞)、巨噬细胞、NKT 细胞、单核细胞、树突状细胞、粒细胞、淋巴细胞、白细胞和/或外周血单个核细胞。

在某些实施方式中，所述免疫效应细胞包括自体或非自体的免疫效应细胞。

在某些实施方式中，其中所述细胞为 HLA-B 纯合子或杂合子细胞。

在某些实施方式中，其中所述 HLA-B 纯合子包括 HLA-B*40 纯合子，HLA-B*15 纯合子，HLA-B*46 纯合子，HLA-B*13 纯合子，HLA-B*51 纯合子，HLA-B*58 纯合子，HLA-B*07 纯合子，HLA-B*35 纯合子，HLA-B*44 纯合子，HLA-B*52 纯合子，HLA-B*57 纯合子，HLA-B*54 纯合子，HLA-B*55 纯合子。

在某些实施方式中，其中所述细胞为 HLA-A 纯合子或杂合子细胞。

在某些实施方式中，其中所述 HLA-A 纯合子或杂合子包括 HLA-A*02 纯合子，HLA-A*11 纯合子，HLA-A*02/A*11 杂合子或 HLA-A*24 纯合子。

另一方面，本申请提供了本申请所述的分离的核酸分子，本申请所述的载体，本申请所述的细胞，或本申请所述的免疫效应细胞在制备 CAR-T 细胞中的应用。

另一方面，本申请提供了一种药物组合物，其包含本申请所述的 B7H3 结合多肽，本申请所述的分离的核酸分子，本申请所述的载体，本申请所述的细胞，和/或本申请所述的免疫效应细胞，以及任选地药学上可接受的载剂。

另一方面，本申请提供了本申请所述的 B7H3 结合多肽，本申请所述的分离的核酸分子，本申请所述的载体，本申请所述的细胞，本申请所述的免疫效应细胞，和/或本申请所述的药物组合物，其用于治疗与 B7H3 的表达相关的疾病或病症。

在某些实施方式中，其中所述与 B7H3 的表达相关的疾病或病症包括与 B7H3 的表达上调相关的疾病或病症。

在某些实施方式中，其中所述与 B7H3 的表达相关的疾病或病症包括癌症。

在某些实施方式中，其中所述癌症包括肾上腺皮质癌，膀胱癌，乳腺癌，胆管癌，结肠癌，淋巴瘤，食管癌，脑胶质瘤，头颈鳞癌，肾癌，肝癌，肺癌，卵巢癌，胰腺癌，前列腺癌，肉瘤，黑色素瘤，胃癌，胸腺癌或子宫内膜癌。

另一方面，本申请提供了一种预防或治疗与 B7H3 的表达相关的疾病或病症的方法，其包括向有需要的受试者施用有效量的本申请所述的 B7H3 结合多肽，本申请所述的分离的核酸分子，本申请所述的载体，本申请所述的细胞，本申请所述的免疫效应细胞，和/或本申

请所述的药物组合物。

在某些实施方式中，其中所述与 B7H3 的表达相关的疾病或病症包括与 B7H3 的表达上调相关的疾病或病症。

在某些实施方式中，其中所述与 B7H3 的表达相关的疾病或病症包括癌症。

在某些实施方式中，其中所述癌症包括肾上腺皮质癌，膀胱癌，乳腺癌，胆管癌，结直肠癌，淋巴瘤，食管癌，脑胶质瘤，头颈鳞癌，肾癌，肝癌，肺癌，卵巢癌，胰腺癌，前列腺癌，肉瘤，黑色素瘤，胃癌，胸腺癌或子宫内膜癌。

本领域技术人员能够从下文的详细描述中容易地洞察到本申请的其它方面和优势。下文的详细描述中仅显示和描述了本申请的示例性实施方式。如本领域技术人员将认识到的，本申请的内容使得本领域技术人员能够对所公开的具体实施方式进行改动而不脱离本申请所涉及发明的精神和范围。相应地，本申请的附图和说明书中的描述仅仅是示例性的，而非为限制性的。

附图说明

本申请所涉及的发明的具体特征如所附权利要求书所显示。通过参考下文中详细描述示例性实施方式和附图能够更好地理解本申请所涉及发明的特点和优势。对附图简要说明书如下：

图 1 显示为本申请的双表位 B7H3 CAR 基因慢病毒表达载体。

图 2 显示为本申请所述的 B7H3 UCAR-T 细胞对靶细胞的杀伤效果。

图 3 显示为本申请所述的 B7H3 UCAR-T 细胞与靶细胞共培养细胞因子分泌检测。

图 4 显示为本申请所述的靶向 B7H3 CAR-T 细胞体内抗肿瘤效果。

图 5 显示为本申请所述的靶向 B7H3 UCAR-T 细胞体外安全性。

图 6 显示为本申请所述的靶向 B7H3 UCAR 细胞体内半衰期检测结果。

图 7 至图 12 显示了 TRAC，HLA-A 双敲 T 细胞的 GVHD 和体内排异反应结果。

图 13 显示为本申请所述的 TRAC，HLA-A 双敲 T 细胞的脱靶分析。

图 14 显示为本申请所述的 TRAC，HLA-A 双敲 T 细胞的染色体易位分析。

图 15 显示为本申请所述的 TRAC，HLA-A 双敲 T 细胞的核型分析。

图 16 显示为本申请所述的 TRAC，HLA-A 双敲 T 细胞的 Cas9 残留分析。

具体实施方式

以下由特定的具体实施例说明本申请发明的实施方式，熟悉此技术的人士可由本说明书

所公开的内容容易地了解本申请发明的其他优点及效果。

术语定义

在本申请中，术语“嵌合抗原受体”或“CAR”通常是指一组多肽，在最简单的实施方案中通常有两种，其当在免疫效应细胞中时，提供细胞对靶细胞(通常为癌细胞)的特异性，并产生细胞内信号。在一些实施方案中，CAR 包含至少一个细胞外抗原结合结构域(如 VHH、scFv 或其部分)，跨膜结构域和胞质信号传导结构域(本文中也称为“胞内信号传导结构域”)，其包含衍生自如下所定义的刺激分子和/或共刺激分子的功能性信号传导结构域。在一些实施方案中，该组多肽在相同的多肽链中(例如，包含嵌合融合蛋白)。在一些实施方案中，该组多肽彼此不连续，例如在不同的多肽链中。在一些方面，该组多肽包括二聚化开关，其在二聚化分子的存在下可将多肽彼此偶联，例如可将抗原结合结构域偶联至胞内信号传导结构域。一方面，CAR 的刺激分子是与 T 细胞受体复合物相关的 ζ 链。在一个方面，细胞质信号传导结构域包含一级信号传导结构域(例如，CD3- ζ 的一级信号传导结构域)。在一个方面，细胞质信号传导结构域还包含一个或多个衍生自如下定义的至少一种共刺激分子的功能性信号传导结构域。一方面，共刺激分子可以选自 4-1BB(即 CD137)，CD27，ICOS 和/或 CD28。一方面，CAR 包含嵌合融合蛋白，其可以包含细胞外抗原识别结构域，跨膜结构域和包含衍生自刺激分子的功能性信号传导结构域的细胞内信号传导结构域。一方面，CAR 包含嵌合融合蛋白，其可以包含细胞外抗原识别结构域，跨膜结构域和细胞内信号传导结构域，细胞内信号传导结构域包含衍生自共刺激分子的功能性信号传导结构域和衍生自刺激分子的功能性信号传导结构域。一方面，CAR 包含嵌合融合蛋白，其可以包含细胞外抗原识别结构域，跨膜结构域和细胞内信号传导结构域，细胞内信号传导结构域包含衍生自一个或多个共刺激分子的功能性信号传导结构域和衍生自刺激分子的功能性信号传导结构域。一方面，CAR 包括嵌合融合蛋白，其可以包含细胞外抗原识别结构域，跨膜结构域和细胞内信号传导结构域，细胞内信号传导结构域包含至少两个衍生自一个或多个共刺激分子的功能性信号传导结构域和衍生自刺激分子的功能性信号传导结构域。在一个方面，CAR 包含 CAR 融合蛋白的氨基末端(N-ter)上任选的前导序列。在一个方面，CAR 进一步包含在细胞外抗原识别结构域的 N 末端的前导序列，其中前导序列任选地在细胞加工过程中从抗原识别结构域(例如 VHH)切除，并将 CAR 定位于细胞膜。

在本申请中，术语“抗体”通常是指在最广泛的意义上加以使用并且具体地涵盖单克隆抗体、多克隆抗体、二聚体、多聚体、多特异性抗体(例如，双特异性抗体)、和抗体片段，只要它们显示所期望的生物活性(Miller et al (2003) *Jour. of Immunology* 170:4854-4861)。抗体可以

是鼠、人、人源化、嵌合抗体，或源于其它物种。

全长抗体典型地是指由两条“全长抗体重链”和两条“全长抗体轻链”组成的抗体。“全长抗体重链”通常是这样的多肽，其在 N 端到 C 端方向由抗体重链可变结构域(VH)、抗体恒定重链结构域 1(CH1)，抗体铰链区(HR)，抗体重链恒定结构域 2(CH2)，和抗体重链恒定结构域 3(CH3)组成，缩写为 VH-CH1-HR-CH2-CH3；并且在 IgE 亚类的抗体的情形中，任选地还包括抗体重链恒定结构域 4(CH4)。在一些实施方式中，“全长抗体重链”是在 N 端到 C 端方向由 VH，CH1，HR，CH2 和 CH3 组成的多肽。“全长抗体轻链”通常是在 N 端到 C 端方向由抗体轻链可变结构域(VL)，和抗体轻链恒定结构域(CL)组成的多肽，缩写为 VL-CL。所述抗体轻链恒定结构域(CL)可以是 κ (kappa)或 λ (lambda)。两条全长抗体链通过在 CL 结构域和 CH1 结构域之间的多肽间二硫键和全长抗体重链的铰链区之间的多肽间二硫键连接在一起。典型的全长抗体的实例是天然抗体如 IgG(例如，IgG1 和 IgG2)，IgM，IgA，IgD，和 IgE)。

在本申请中，术语“抗原结合片段”(在本文中也被称作“靶向部分”或“抗原结合部分”)通常是指抗体分子的一部分，其包含负责抗体与抗原之间的特异性结合的氨基酸。抗原中由抗体特异性地识别和结合的部分是称作如上文所述的“表位”。抗原结合结构域可典型地包含抗体轻链可变区(VL)和抗体重链可变区(VH)；然而，其并非必须包含两者。Fd 片段例如具有两个 VH 区并且通常保留完整抗原结合结构域的一些抗原结合功能。抗体的抗原结合片段的实例包括(1)Fab 片段，具有 VL、VH、恒定轻链(CL)和 CH1 结构域的单价片段；(2)F(ab')₂ 片段，具有由铰链区的二硫桥连接的两个 Fab 片段的二价片段；(3)具有两个 VH 和 CH1 结构域的 Fd 片段；(4)具有抗体单臂的 VL 和 VH 结构域的 Fv 片段，(5)dAb 片段(Ward 等人，“Binding Activities of a Repertoire of Single Immunoglobulin Variable Domains Secreted From *Escherichia coli*,” *Nature* 341:544-546(1989)，其以引用的方式整体并入本申请)，其具有 VH 结构域；(6)分离的互补决定区(CDR)；(7)单链 Fv(scFv)，例如源于 scFV-文库。尽管 Fv 片段的两个结构域 VL 和 VH 是由独立基因编码，但其可通过合成连接子使用重组方法接合，合成连接子使得其被制备为其中 VL 和 VH 区配对以形成单价分子的单一蛋白链(称为单链 Fv(scFv))(可参见例如 Huston 等人，“Protein Engineering of Antibody Binding Sites: Recovery of Specific Activity in an Anti-Digoxin Single-Chain Fv Analogue Produced in *Escherichia coli*,” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883(1988))；和 (8) VHH，“VHH”涉及来自骆驼科(骆驼、单峰骆驼、美洲驼、羊驼等)重链抗体的可变抗原结合结构域(参见 Nguyen V.K.等人，2000，*The EMBO Journal*, 19, 921-930; Muyldermans S., 2001, *J Biotechnol.*, 74, 277-302 以及

综述 Vanlandschoot P.等人, 2011, Antiviral Research 92, 389-407)。VHH 也可称为纳米抗体 (Nanobody)(Nb) 和/或单域抗体。这些抗体片段使用所属领域的技术人员已知的常规技术获得, 且以与完整抗体相同的方式评估所述片段的功能。

在本申请中, 术语“单域抗体”或“VHH”通常是指缺失抗体轻链而只有重链可变区的一类抗体。在某些情形中, 单域抗体可以来自双峰驼、单峰驼、羊驼、美洲驼、护士鲨、大星鲨或鳐鱼 (例如, 可参见康晓圳等, 生物工程学报, 2018, 34(12): 1974-1984)。例如, 单域抗体可以来自羊驼。单域抗体可由重链可变区 (VH) 构成。术语“重链可变区”通常是指抗原结合片段的重链的氨基末端结构域。重链可变区可进一步被区分为称为互补决定区 (CDR) 的高变区, 它们散布在成为框架区 (FR) 的更保守的区域中。每个重链可变区可由三个 CDR 和四个 FR 区构成, 它们从氨基端至羧基端可按以下顺序排列: FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3 和 FR4。重链可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。

在本申请中, 术语“互补决定区” (CDR) 通常是指在抗原结合片段可变区内的互补性决定区。在本申请中, 所述重链可变区存在 3 个 CDRs, 所述 CDRs 对于每个可变区命名为 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3。这些 CDRs 的确切边界已根据不同系统不同地限定。由 Kabat(Kabat 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest(National Institutes of Health, Bethesda, Md.(1987)和(1991))描述的系统, 不仅提供了可应用于抗原结合片段的任何可变区的明确残基编号系统, 还提供了限定 3 个 CDRs 的精确残基边界。这些 CDRs 可以被称为 Kabat CDRs。Chothia 和同事(Chothia 和 Lesk, J.Mol.Biol.196: 901-917(1987)以及 Chothia 等人, Nature 342: 877-883(1989))发现尽管在氨基酸序列水平上具有大的多样性, 但是 Kabat CDRs 内的某些亚部分采取几乎相同的肽主链构象。这些亚部分命名为 L1、L2 和 L3 或 H1、H2 和 H3, 其中“L”和“H”分别指轻链和重链区域。这些区域可以被称为 Chothia CDRs, 所述 Chothia CDRs 具有与 Kabat CDRs 重叠的边界。与 Kabat CDRs 重叠的限定 CDRs 的其他边界已由 Padlan(FASEB J.9: 133-139(1995))和 MacCallum(J Mol Biol 262(5): 732-45(1996))描述。另外, 其他的 CDR 边界定义可能不严格地遵循上述系统之一, 但仍将与 Kabat CDRs 重叠, 尽管按照特定残基或残基组或甚至整个 CDRs 并不显著影响抗原结合的预测或实验发现, 它们可以缩短或加长。在本申请中, 使用的是 IMGT 编号系统。

在本申请中, 术语“FR”通常是指抗体可变结构域的更高度保守的部分, 其被称为框架区。例如, 天然重链和轻链的可变结构域各自可以包含四个 FR 区, 即在 VH 中四个(H-FR1, H-FR2, H-FR3 和 H-FR4), 和在 VL 中四个(L-FR1, L-FR2, L-FR3 和 L-FR4)。“框架区”通常是指本领域识别的抗体可变区中存在于分歧性更高的(即高变)CDR 之间的部分。此类框架区

典型地称为框架 1 至 4(FR1、FR2、FR3 和 FR4)且提供用于在三维空间中呈现六个 CDR(三个来自重链且三个来自轻链)的骨架，以形成抗原结合表面。

在本申请中，术语“同源性”通常可以等同于序列“同一性”。同源序列可以包括可以与主题序列是至少 80%、85%、90%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或 99.9% 相同的氨基酸序列。通常，同源物将包含与主题氨基酸序列相同的活性位点等。同源性可以根据相似性（即具有相似化学性质/功能的氨基酸残基）来考虑，也可以在序列同一性方面表达同源性。在本申请中，提及的氨基酸序列或核苷酸序列的 SEQ ID NO 中的任一项具有百分比同一性的序列是指在所提及的 SEQ ID NO 的整个长度上具有所述百分比同一性的序列。为了确定序列同一性，可进行序列比对，其可通过本领域技术人员了解的各种方式进行，例如，使用 BLAST、BLAST-2、ALIGN、NEEDLE 或 Megalign (DNASTAR) 软件等。本领域技术人员能够确定用于比对的适当参数，包括在所比较的全长序列中实现最优比对所需要的任何算法。

本申请中，术语“功能性变体”通常是指包括与其具有基本上相同的功能(例如，可以具备所述嵌合抗原受体的性质)，且与其具有至少 85%(例如，至少 85%，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%，或至少 100%)序列同一性的氨基酸序列。在某些实施方式中，所述氨基酸序列的变体为与其具有基本上相同的功能(例如，可以具备所述嵌合抗原受体的性质)，且在其基础上包含一个或多个(例如，1-2 个、1-3 个、1-4 个、1-5 个、1-6 个、1-7 个、1-8 个、1-9 个、1-10 个或更多)氨基酸的取代、缺失或添加的氨基酸序列。

在本申请中，术语“特异性结合”在提及结合分子(例如抗体)与其结合配偶体(例如抗原)的相互作用时，通常是指该相互作用取决于结合配偶体上特定结构(例如抗原决定簇或表位)的存在。换言之，即使在结合配偶体存在于其他分子或有机体的混合物中时，抗体仍会优先结合或识别结合配偶体。结合可通过共价或非共价相互作用或二者的组合介导。换言之，术语“特异性结合”通常是指免疫特异性结合抗原决定簇或表位且不免疫特异性结合其他抗原决定簇或表位。免疫特异性结合抗原的结合分子可以较低亲和力结合其他肽或多肽，如通过(例如)放射免疫分析(RIA)、酶联免疫吸附分析(ELISA)、BIAcore 或本领域中已知的其他分析所测定。免疫特异性结合抗原的结合分子或其片段可与带有相同表位的相关抗原交叉反应。在某些情形中，免疫特异性结合抗原的结合分子或其片段不与其他抗原交叉反应。

在本申请中，术语“*KD*”可与“*K_D*”互换使用，通常是指特定的抗体-抗原相互作用的解离平衡常数，单位为 M (mol/L)。*KD* 可通过物质 AB 和其解离得到的物质 A 和物质 B 的浓度来

计算： $KD = c(A) * c(B) / c(AB)$ 。由该公式可知， KD 值越大，说明解离越多，代表物质A、B之间的亲和力越弱；反之， KD 值越小，说明解离越少，代表物质A、B之间的亲和力越强。

如本领域技术人员将理解的，多种 IL-15 分子的序列是本领域已知的。在一个方面，IL-15 是野生型 IL-15。在一些方面，IL-15 是哺乳类 IL-15(例如，人(*Homo sapiens*)白介素 15(IL15)、转录物变体 3、mRNA、NCBI 参考序列：NM_000585.4；家犬(*canis lupus familiaris*)白介素 15、mRNA、NCBI 参考序列：NM_001197188.1；家猫(*Felis catus*)白介素 15(IL15)、mRNA、NCBI 参考序列：NM_001009207.1)。“哺乳类”或“哺乳动物”的实例包括灵长类(例如，人)、犬科动物、猫科动物、啮齿动物、猪、反刍动物等。具体实例包括人、狗、猫、马、牛、绵羊、山羊、兔、豚鼠、大鼠和小鼠。在一个具体方面，哺乳类 IL-15 是人 IL-15。

在本申请中，术语“分离的”通常是指至少部分从在其天然状态中通常与其结合的其他分子中分离的分子(例如抗体、核酸等)。“分离的的多肽”基本上没有其他生物分子，如核酸、蛋白质、脂质、碳水化合物、细胞碎片和生长培养基。“分离的的核酸”至少部分从在其天然状态中通常位于多核苷酸侧翼的核酸分离。

在本申请中，术语“分离的多肽”通常指含有多于一条不同多肽链的任何多肽。在一些实施方案中，所述分离的多肽包含两条多肽链，其分别包含嵌合抗原受体和增强子。在一些实施方案中，包含嵌合抗原受体的多肽链和包含增强子的多肽链可以通过一个或多个分子间键(包括而限于二硫键)连接在一起形成两条或更多条多肽的大分子复合体。在一些实施方案中，所述分离的多肽可以包含多肽接头连接的两条不同多肽链(例如，嵌合抗原受体和增强子)的单一多肽。在这种情况下，所述多肽可以实体上代表单链，但是单链的两个或更多个部分可以在功能上如同它们作为两个独立多肽链那样发挥作用。在另一些实施方案中，所述接头是可切割的肽接头(例如 2A 肽)，在同一肽链上的嵌合抗原受体和增强子可以被切割为两条多肽链。

在本申请中，术语“分离的核酸分子”通常是指从其天然环境中分离的或人工合成的任何长度的分离形式的核苷酸、脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸或其类似物。

本文使用的“内部核糖体进入位点”或“IRES”指这样的元件：其促进内部核糖体直接进入顺反子(蛋白编码区域)的起始密码子如 ATG，从而导致不依赖帽的基因的翻译。参见，例如 Jackson 等，1990.Trends Biochem Sci 15(12):477-83)以及 Jackson 和 Kaminski.1995.RNA 1(10):985-1000。在具体实施方案中，本发明考虑的载体包含编码一种或多种多肽的一个或多个目标多核苷酸。在具体实施方案中，为了实现多种多肽各自的有效翻译，多核苷酸序列

可以被一个或多个 IRES 序列或者编码自身切割多肽的多核苷酸序列间隔。

在本申请中，术语“自切割肽”或“编码自切割肽的序列”通常是指在载体中用于纳入促进核糖体跳跃的位点并由此从单个启动子产生两个多肽的连接序列，这类自切割肽包括但不限于 T2A 和 P2A 肽或编码自切割肽的序列。

在本申请中，术语“载体”通常是指能够在合适的宿主中自我复制的核酸分子，其将插入的核酸分子转移到宿主细胞中和/或宿主细胞之间。所述载体可包括主要用于将DNA或RNA 插入细胞中的载体、主要用于复制DNA或RNA的载体，以及主要用于DNA或RNA 的转录和/或翻译的表达的载体。所述载体还包括具有多种上述功能的载体。所述载体可以是当引入合适的宿主细胞时能够转录并翻译成多肽的多核苷酸。通常，通过培养包含所述载体的合适的宿主细胞，所述载体可以产生期望的表达产物。

在本申请中，术语“病毒载体”广泛用于指核酸分子(例如转移质粒)或介导核酸转移的病毒颗粒，核酸分子包括病毒衍生的通常促进核酸分子转移或整合到细胞基因组中的核酸元件。病毒颗粒通常包括各种病毒组件，有时还包括除核酸外的宿主细胞组件。病毒载体可以指能够将核酸转移到细胞中的病毒或病毒颗粒，或被转移的核酸本身。

在本申请中，术语“慢病毒”通常是指复杂逆转录病毒的组(或属)。示例性慢病毒包括但不限于：HIV(人免疫缺陷病毒；包括HIV 1型和HIV 2型)；维斯那-梅迪病毒(visna-maedi virus, VMV)病毒；山羊关节炎-脑炎病毒(CAEV)；马传染性贫血病毒(EIAV)；猫免疫缺陷病毒(FIV)；牛免疫缺陷病毒(BIV)；和猿猴免疫缺陷病毒(SIV)。在一种实施方式中，基于HIV的载体骨架(即HIV顺式作用序列元件)是优选的。在特别的实施方式中，慢病毒用于将包含CAR的多核苷酸递送至细胞。

在本申请中，术语“宿主细胞”或“细胞”通常是指可以或已经含有包括本申请所述分离的核酸分子的载体，或者能够表达本申请所述分离的抗原结合片段的个体细胞，细胞系或细胞培养物。所述宿主细胞可以包括单个宿主细胞的子代。由于天然的，意外的或故意的突变，子代细胞与原始亲本细胞在形态上或在基因组上可能不一定完全相同，但能够表达本申请所述分离的抗原结合片段即可。所述宿主细胞可以通过使用本申请所述的载体体外转染细胞而得到。所述宿主细胞可以是原核细胞（例如大肠杆菌），也可以是真核细胞（例如酵母细胞，例如COS 细胞，中国仓鼠卵巢（CHO）细胞，HeLa 细胞，HEK293 细胞，COS-1 细胞，NS0 细胞或骨髓瘤细胞）。例如，所述的宿主细胞可以是大肠杆菌细胞。例如，所述的宿主细胞可以是酵母细胞。例如，所述的宿主细胞可以是哺乳动物细胞。例如，所述哺乳动物细胞可以是CHO-K1 细胞。

在本申请中，术语“T细胞”或“T淋巴细胞”可以是任何T细胞，如培养T细胞，例如原代T细胞，或来自培养T细胞系的T细胞，或获自哺乳动物的T细胞(优选灵长类动物，物种，包括猴、狗或人)。如果获自哺乳动物，那么T细胞可以获自诸多来源，包括但不限于血液、骨髓、淋巴结、胸腺或其它组织或流体。T细胞还可以被富集或被化。T细胞可以通过在体外或体内将造血干细胞成熟化成T细胞而获得。在示范性方面中，T细胞是人类T细胞。在示范性方面中，T细胞是从人类中分离的T细胞。T细胞可以是任何类型的T细胞，包括NKT细胞，并且可以具有任何发育阶段，包括但不限于CD4+/CD8+双阳性T细胞；CD4+辅助T细胞；例如Th1和Th2细胞，CD8+ T细胞(例如细胞毒性T细胞)；外周血液单核细胞(PBMC)；外周血液白细胞(PBL)；肿瘤浸润细胞(TIL)；记忆T细胞；未处理T细胞等等。优选地，T细胞是CD8+T细胞或CD4+T细胞。在一些替代方式中，T细胞与接受细胞或待接受细胞(例如所述细胞处于治疗组合物的形式)的接受受试者是同种异体的(来自相同物种的不同供体)；在一些替代方式中，T细胞是自体的(供体和接受者相同)；在一些替代方式中，T细胞是同基因的(syngeneic) (供体和接受者不同，但为同卵双胞胎)。

在本申请中，术语“自然杀伤细胞”(“NK 细胞”)通常是指免疫系统的一种细胞毒性淋巴细胞。NK 细胞对病毒感染的细胞提供迅速响应并且响应于转化细胞。通常来说，免疫细胞检测来自病原体的由被感染细胞表面上的主要组织相容性复合体(Major Histocompatibility Complex, MHC)分子呈递的肽，引发细胞因子释放、引起溶胞(lysis)或凋亡。然而，NK 细胞是独特的，因为其具有识别应激细胞的能力，而不管来自病原体的肽是否存在于 MHC 分子上。因为它们不需要预先活化以杀死目标的最初见解，故它们被命名为“自然杀伤细胞”。NK 细胞是大颗粒淋巴细胞(large granular lymphocyte, LGL)，并且已知在骨髓(然后它们在此进入循环)中分化并成熟。在一些实施方式中，NK 细胞是哺乳类 NK 细胞。“哺乳类”或“哺乳动物”的实例包括灵长类(例如，人)、犬科动物(canine)、猫科动物(feline)、啮齿动物、猪、反刍动物等。具体实例包括人、狗、猫、马、牛、绵羊、山羊、兔、豚鼠、大鼠和小鼠。在一个实施方式中，哺乳类 NK 细胞是人 NK 细胞。

在本申请中，术语“免疫效应细胞”通常是指参与免疫应答，行使效应功能的免疫细胞。例如所述行使效应功能可以包括清除异物抗原或促进免疫效应子应答等。免疫效应细胞可以包括浆细胞、T细胞、B细胞、自然杀伤(NK)细胞、自然杀伤 T(NKT)细胞、肥大细胞和骨髓源性吞噬细胞。

本申请的免疫效应细胞可以是自体/自身的(autologous/autogeneic) (“自己的”)或非自体的(“非自己的”，例如同种异体的、同基因的或异基因的)。在本申请中，术语“自体的”通常是

指来自相同受试者的细胞。“同种异体的”通常是指与相比较的为相同物种但在遗传上不同的细胞。“同基因的”通常是指在遗传上与相比较的细胞相同的不同受试者的细胞。“异基因的”通常是指物种与相比较的细胞不同的细胞。在一些实施方式中，本申请的细胞是自体的或同种异体的。

在本申请中，术语“修饰”通常是指改变细胞的状态或结构和/或细胞的状态或结构的改变。所述改变通常是与相应未经所述修饰的细胞的状态或结构相比，所述改变可以包括内源基因表达水平或功能的变化，例如通过基因工程手段使得细胞内源基因表达水平下调、上调或不表达，所述基因工程手段可以包括同源重组、CRISPR/Cas9 系统基因编辑等；所述改变还可以包括细胞蛋白质表达、结构或功能的变化，例如通过所述内源基因表达水平或功能的变化而实现的相应蛋白质表达的变化、结构或功能的变化，例如通过调节蛋白质翻译、翻译后修饰而实现的蛋白质表达的变化、结构或功能的变化；所述改变还可以包括引入外源基因、表达外源蛋白质等。

在本申请中，术语“TRAC”通常是指 T 细胞受体 α 链恒定区 (T cell receptor alpha constant)。T 细胞受体 (TCR) 通常是指位于 T 细胞表面的特异性受体，能够识别与主要组织相容性复合物 (MHC) 分子结合的抗原。TCR 通常由两条不同的蛋白质链组成 (即异源二聚体)。在人类中，多数 T 细胞中的 TCR 由一条 α 链和一个 β 链 (分别由 TRA 和 TRB 编码) 组成，这一类 T 细胞被称为 $\alpha\beta$ T 细胞，少数的 T 细胞中，TCR 由 γ 链和 δ 链 (分别由 TRG 和 TRD 编码) 组成，这一类 T 细胞被称为 $\gamma\delta$ T 细胞。通常情况下， $\alpha\beta$ T 细胞约占 T 细胞总数的 95%， $\gamma\delta$ T 细胞约占 T 细胞总数的 5%，该比率在个体发育过程中和患病状态 (例如白血病) 中发生变化，物种之间也有所不同。组成 TCR 的每一条链都含有可变区与恒定区，在人类中，编码 α 链的基因 (TRA，例如 HGNC:12027 所示的信息) 位于 14 号染色体，由多基因片段构成，包括可变段 (V)、连接段 (J) 以及恒定区 (C)，TRAC 基因通常是指编码 T 细胞受体 α 链恒定区 (C) 的基因序列 (例如 HGNC:12029 所示的信息)，其位于 14 号染色体 (14q11.2; 14: 22,547,505-22,552,131)。通常编码 N 段抗原识别域的可变段 (V) 基因中的 1 个与连接段 (J) 中的一个重排产生一个功能性 V 区外显子，该外显子被转录并通过剪接与恒定区 (C) 连接，从而形成 T 细胞受体 α 链编码序列。

在本申请中，术语“主要组织相容性复合物抗原”(“MHC”，在人类的情况下也称为“人类白细胞抗原”(“HLA”)) 通常是指在细胞表面上表达的赋予细胞独特抗原身份的蛋白质。MHC/HLA 抗原是被 T 细胞和 NK 细胞识别为源自于与免疫效应细胞相同的造血干细胞来源 (“自身”) 或识别为源自于另一种造血重建细胞来源 (“非自身”) 的靶分子。识别了两种主要类别

的 HLA 抗原：HLA I 类和 HLA II 类。HLA I 类抗原(人类中的 A、B、C)使每个细胞都可被识别为“自身”，而 HLA II 类抗原(人类中的 DR、DP 和 DQ)参与淋巴细胞和抗原呈递细胞之间的反应。两者都已经与移植器官的排斥有牵涉。HLA 基因系统的一个重要方面是其多态性。每个基因，MHC I 类(A、B 和 C)和 MHC II 类(DP、DQ 和 DR)存在着不同的等位基因。HLA 等位基因由数字和下标表示。例如，两个不相关的个体可能分别携带 I 类 HLA-B 基因 B5 和 Bw41。等位基因产物在 α 和/或 β 结构域的一个或更多个氨基酸中有差异。大量的特异性抗体或核酸试剂被用于使用表达 I 类和 II 类分子的白细胞对个体的 HLA 单倍型进行分型。通常用于 HLA 分型的基因是六种 MHC I 类和 II 类蛋白，即 HLA-A；HLA-B 和 HLA-DR 各自有两个等位基因。HLA 基因簇集在存在于染色体位置 6p21 上的“超级基因座”中，所述“超级基因座”编码在免疫系统以及一些其他的基本分子和细胞过程的调控中具有重要作用的 6 个经典的移植 HLA 基因和至少 132 个蛋白质编码基因。完整的基因座粗略度量为 3.6Mb，具有至少 224 个基因座。这种簇集的一个效果是“单倍型”，即存在于单条染色体上的一组等位基因，是从一个亲本遗传来的，倾向于作为一组进行遗传。从每个亲本遗传来的一组等位基因形成一个单倍型，其中一些等位基因倾向于关联在一起。鉴定患者的单倍型可以帮助预测找到匹配供体的概率，并且帮助制定搜索策略，因为一些等位基因和单倍型比其他等位基因和单倍型更常见，而且它们在不同种族和民族中分布的频率不同。

在本申请中，“HLA-A”通常是指一类人类白细胞抗原(human leukocyte antigens)多肽链，由位于人类染色体 6p21.3 的 HLA-A 基因(例如 HGNC:4931 所示的信息)编码。HLA-A 是构成人类细胞表面 I 类 MHC 分子的三种主要多肽类型之一，其他还包括 HLA-B 和 HLA-C。由 HLA-A 基因编码的 α 链和 B2M 基因编码的 β 链(β 2-微球蛋白)组成的异二聚体即为 HLA-A 类 MHC I 分子。所述由 HLA-A 基因编码的 α 链可以包含 α 1 结构域、 α 2 结构域、 α 3 结构域、跨膜区以及胞质区，其中 α 1 结构域、 α 2 结构域可以与肽段结合从而由 MHC I 分子(例如 HLA-A 类)将所述肽段呈递给免疫系细胞。在人类中，与大多数哺乳动物相似，MHC I 分子的 α 链为多态性的，其一级结构有较大变化，截至 2013 年 12 月，共有 2432 个已知的 HLA-A 等位基因，编码 1740 个活性蛋白和 117 个无效蛋白。在本申请中，HLA-A 等位基因可以包括 IMGT/HLA 数据库 3.38.0 版(<https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/>)收录的由 WHO HLA 因子命名委员会命名的不同 HLA-A 等位基因的序列信息。

在本申请中，术语“HLA-B”通常是指人类白细胞抗原(HLA)复合物的基因家族的一部分。HLA 是主要组织相容性复合体(MHC)的人类版本，MHC 是一个存在于许多物种中的基因家族。在这个复杂的基因被分为三个基本组：I 类，II 类和 III 类。在人类中，HLA-B 基因和两

个相关基因 HLA-A 和 HLA-C 是 MHC I 类的主要基因。HLA-B 基因位于 6 号染色体短 (p) 臂的细胞带 21.3, 从碱基对 31,353,871 到 31,357,211。HLA-B 是供者和受者之间应匹配的三个主要 HLA 之一。它们是 HLA-A、HLA-B (均为 I 类 MHC) 和 HLA-DR (II 类 MHC)。如果这两种组织具有编码这三种 HLA 的相同基因, 那么排斥的可能性和严重程度就会降到最低。HLA-B 的数百个版本 (等位基因) 是已知的, 每个版本都有一个特定的编号 (例如 HLA-B27)。密切相关的等位基因被归类在一起; 例如, 至少有 28 个非常相似的等位基因是 HLA-B27 的亚型。这些亚型被指定为 HLA-B*2701 至 HLA-B*2728。

在本申请中, 术语“HLA 匹配的”是指其中供体和受体之间 HLA 抗原没有不匹配的供体-受体对, 所述供体诸如向需要造血干细胞移植疗法的受体提供造血干细胞移植物的供体。HLA 匹配的 (即其中所有 6 个等位基因都是匹配的) 供体-受体对具有降低的移植物排斥的风险, 原因是内源性 T 细胞和 NK 细胞不太可能将进入的移植物识别为外来的, 并且因此不太可能产生针对移植物的免疫应答。

在本申请中, 术语“HLA 不匹配的”是指其中供体和受体之间至少一种 HLA 抗原 (特别是对于 HLA-A、HLA-B 和 HLA-DR) 是不匹配的供体-受体对, 所述供体诸如向需要造血干细胞移植疗法的受体提供造血干细胞移植物的供体。在一些实施方案中, 一个单倍型是匹配的, 而另一个是不匹配的。HLA 不匹配的供体-受体对相对于 HLA 匹配的供体-受体对可能具有增加的移植物排斥的风险, 原因是在 HLA 不匹配的供体-受体对的情况下, 内源性 T 细胞和 NK 细胞更可能将进入的移植物识别为外来的, 并且这样的 T 细胞和 NK 细胞因此更可能产生针对移植物的免疫应答。

在本申请中, 术语“B2M”通常是指是 $\beta 2$ 微球蛋白 ($\beta 2$ -microglobulin), 是 MHC I 类分子的组成部分之一。 $\beta 2$ 微球蛋白 (也称为 β 链) 可以与 HLA 编码的 α 链组成 MHC I 类的分子。B2M 通常在所有有核的细胞中都有表达。在人类中, $\beta 2$ 微球蛋白由位于 15q21.1 的 B2M 基因 (例如 HGNC:914 所示的信息) 所编码。

在本申请中, 术语“CIITA”通常是指 II 类主要组织相容性复合体 (MHCII) 的反式激活因子。所述反式激活因子可以是具有酸性转录激活结构域、4 个 LRR (富含亮氨酸的重复序列) 和 GTP 结合结构域的蛋白质。所述蛋白质可位于细胞核中, 作为 II 类主要组织相容性复合体 (MHCII) 基因转录的正向调节剂, 被称为表达这些基因的“主控制因子”。该蛋白质还可结合 GTP, 并利用与 GTP 结合来使其自身转运到细胞核中, 在细胞核中, 其通常使通过乙酰转移酶 (AT) 活性以类似共激活剂的方式起作用。在人类中, 所述蛋白质由位于 16p13.13 的基因 (例如 HGNC:7067 所示的信息) 编码, 能够产生几种编码不同同工型的转录物变体。

在本申请中，术语“野生型细胞”通常是指自然存在的或者自然来源的细胞。

在本申请中，术语“核酸”或“多核苷酸”或“核酸分子”通常时指脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)及其单链形式或双链形式的聚合物。除非特别限定，否则该术语可以包括含天然核苷酸的类似物的核酸，所述核酸具有与参考核酸（例如示出了序列信息）相似的结合特性并且按照与天然存在核苷酸相似的方式代谢。除非另外说明，核酸的序列可以包括其保守方式修饰的变体，例如简并密码子置换、等位基因、直向同源物、SNP 和互补序列，以及明确指出的序列。

在本申请中，术语“表达”通常是指特定核苷酸序列的转录和/或翻译。

在本申请中，术语“基因突变”通常是指基因在结构上发生的碱基对组成或排列顺序的改变。例如单个碱基改变所引起的点突变，或多个碱基的缺失、重复和插入等。

在本申请中，术语“基因沉默”通常是指通过调节机制阻止某些基因的表达。主要可以包括两种：一种是由于 DNA 甲基化、异染色质化以及位置效应等因素引起的转录水平上的基因沉默（transcriptional gene silencing, TGS），另一种是转录后基因沉默(post-transcriptional gene silencing, PTGS)，即在基因转录后的水平上通过对靶标 RNA 进行特异性干预而影响基因的表达。通常情况下当基因沉默时，相应基因表达下调/减少。而当基因被敲除时则通常表现为不表达，例如在细胞中，某种特定基因的所有等位基因均被敲除后则表现为该基因的表达消失。基因沉默通常被认为是一种基因敲低机制，通用于沉默基因的方法可以如 RNAi 等。

在本申请中，术语“内源”指来自生物、细胞、组织或系统或在其内部产生的任何物质。

在本申请中，术语“外源”指从生物、细胞、组织或系统外部引入或在其外部产生的任何物质。

在本申请中，术语“反义 RNA”通常是指一种与转录产物 mRNA（信使 RNA）互补的单链 RNA。反义 RNA 可通过与 mRNA 的结合抑制基因的表达。例如，反义 RNA 与靶 mRNA 结合后引起该双链 RNA 分子对 RNA 酶III的敏感性增加，使其降解；例如，反义 RNA 与 mRNA 的上游非编码区结合，从而直接抑制靶 mRNA 的翻译。

在本申请中，术语“siRNA”通常是指 Small interfering RNA（小干扰 RNA）或 short interfering RNA（短干扰 RNA）的缩写。siRNA 是一类双链非编码 RNA 分子，长度约为 18-28 个碱基对，可通过与 mRNA 的互补结合引起 mRNA 的降解从而干扰特定基因的表达。在某些实施方式中，siRNA 可以是长双链 RNA 或 shRNA 经 Dicer 酶处理得到的产物。在某些实施方式中，siRNA 进入细胞与其他蛋白质形成 RNA 诱导沉默复合体（RISC），有义链发生降

解，反义链可与互补的靶向序列结合，从而实现基因沉默。

在本申请中，术语“shRNA”通常是指 short hairpin RNA 的缩写，即“短发夹 RNA”。shRNA 通常包括两个短反向重复序列，中间由一茎环（loop）序列分隔，组成发夹结构。通常还可以包括 5-6 个 T 碱基作为 RNA 聚合酶III的转录终止子。在某些实施方式中，shRNA 可经由病毒载体或质粒进入细胞中，在聚合酶II或聚合酶III的作用下进行转录，转录产物自细胞核输出（通常可经由 Exportin 5）后经 Dicer 处理后输送至 RISC，有义链发生降解，反义链可与互补的靶向序列结合，从而实现基因沉默。

在本申请中，术语“CRISPR/Cas 系统”通常是指包含 RNA 引导的核酸酶或其他效应分子和 gRNA 分子的一组分子，所述分子能够指引和实现由 RNA 引导的核酸酶或其他效应分子在靶序列处修饰核酸，例如引起靶序列降解。在某些实施方式中，CRISPR 系统包含 gRNA 和 Cas 蛋白，例如，Cas9 蛋白。包含 Cas9 或其功能性突变体的系统在本申请中称作“Cas9 系统”或“CRISPR/Cas9 系统”。在某些实施方式中，gRNA 分子和 Cas 分子可以复合，以形成核糖核蛋白(RNP)复合体。

在本申请中，术语“gRNA 分子”或“向导 RNA”、“指导 RNA”、“指引 RNA”、“向导 RNA 分子”、“gRNA”可互换使用，通常是指能够促进特异性指引 RNA 引导的核酸酶或其他效应分子（一般与 gRNA 分子复合）至靶序列上的核酸分子。在某些实施方案中，通过 gRNA 的一部分与 DNA（例如，通过 gRNA 导引结构域）杂交并且通过 gRNA 分子的一部分与 RNA 引导的核酸酶或其他效应分子结合（例如，至少通过 gRNAtracr）实现所述引导。在某些实施方案中，gRNA 分子由单一连续多核苷酸分子组成，在本文中称作“单一向导 RNA”或“sgRNA”等。在其他实施方案中，gRNA 分子由本身能够缔合(一般通过杂交)的多个（例如二个）多核苷酸分子组成，在本文中称作“双重向导 RNA”或“dgRNA”等。

在本申请中，术语“Cas 蛋白”通常是指 CRISPR/Cas 系统中负责剪切 DNA 的酶。可以包括来自I、II、III型 CRISPR/Cas 系统的酶。例如，Cas3、Cas9、Cas10。

在本申请中，术语“Cas9 蛋白”通常是指负责剪切 DNA 的来自细菌 II 型 CRISPR/Cas 系统的酶。Cas9 可以包括野生型蛋白及其有功能性突变体。

在本申请中，“等位基因”通常是指基因座上的基因序列可能具有的不同变化的形式。基因座也称作基因位点或位点，是指染色体上的固定位置，例如某个基因所在。基因座在基因组中的排列位置称为基因图谱（genetic map）。

在本申请中，术语“纯合子”通常是指同源染色体在同一基因座上的两个等位基因相同的基因型个体。一对相对基因可以有AA和aa两种基因型的个体。

在本申请中，术语“杂合子”通常是指二倍体中同源染色体同一位点上的两个等位基因不相同的基因型个体，如Aa。杂合基因型一般比纯合显性或纯合隐性基因型的适应性都要高，这种现象被称为杂合子优势。

在本申请中，术语“肿瘤”和“癌症”可以互换地使用，通常是指以异常细胞快速且失控生长为特征的疾病。癌细胞可以局部地或通过血流和淋巴系统扩散到身体其他部分。本文中描述了各种癌症的例子并且它们包括但不限于乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、宫颈癌、皮肤癌、胰腺癌、结直肠癌、肾癌、肝癌、脑癌、淋巴瘤、白血病、肺癌等。术语“癌症”或“肿瘤”包括恶变前以及恶性癌症和肿瘤，还涵盖实体瘤和非实体肿瘤。

在本申请中，术语“药学上可接受的”通常是指代与合理的益处/风险比相称、在合理医学判断范围内适合用于与人类和动物的组织接触而不具有过度毒性、刺激、过敏应答或其它问题或并发症的那些化合物、材料、组合物和/或剂型。

在本申请中，术语“药学上可接受的载剂”通常是指常规使用的那些载剂中的任一种，并且仅受到物理-化学考虑因素（如溶解性和与活性结合剂的反应性的缺乏）限制，并且受给药途径限制。本文所描述的药学上可接受的载剂，例如媒剂、佐剂、赋形剂和稀释剂为所属领域的技术人员所熟知并且公众可容易获得。在一个方面中，药学上可接受的载剂是对医药组合物的活性成分具有化学惰性的载剂，并且是在使用条件下不具有不利的副作用或毒性的载剂。在一些实施例中，当向动物或人类给予时，载剂不产生不良、过敏或其它不适当的反应。在一些方面中，医药组合物不含热原质以及会对人类或动物有害的其它杂质。药学上可接受的载剂包括任何和所有溶剂、分散介质、涂料、抗菌剂和抗真菌剂、等张剂和吸收延迟剂等等；其用途在所属领域中是众所周知。

可接受的载剂、赋形剂或稳定剂对接受者无毒性并且优选在所采用的剂量和浓度下是惰性的，并且包括缓冲液，如磷酸盐、柠檬酸盐或其它有机酸；抗氧化剂，如抗坏血酸；低分子量多肽/蛋白质，如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白；亲水性聚合物，如聚乙烯吡咯烷酮；氨基酸，如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸；单糖、双糖和其它碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合剂，如EDTA；糖醇，如甘露糖醇或山梨糖醇；盐形成抗衡离子，如钠；和/或非离子表面活性剂，如Tween、Pluronic或聚乙二醇(PEG)。

在本申请中，术语“有效量”或“有效剂量”通常是指足以实现或至少部分实现所需效果的量。药物或治疗剂的“治疗有效量”或“治疗有效剂量”通常是当单独使用或与另一种治疗剂组合使用时促进疾病消退(这通过疾病症状严重程度的降低、疾病无症状期的频度和持续时间的增加、或者由于罹患疾病而引起的损害或残疾的预防来证明)的任何药物量。

抗 B7H3 CAR-T 细胞的“治疗有效量”或“有效量”也是治疗有益效果超过抗 B7H3 CAR-T 细胞的任何毒性或有害作用例如 CRS 的量或剂量。术语“治疗有效量”包含有效“治疗”受试者(例如, 患者)的量。在一个实施例中, 治疗有效剂量是用于治疗受试者的多发性骨髓瘤的抗 B7H3 CAR-T 细胞的最小有效剂量(MED)。在一个实施例中, 治疗有效剂量是不会导致受试者有无法解决的 CRS 的抗 B7H3 CAR-T 细胞的最大耐受剂量(MTD)。

在本申请中, 术语“包括”通常是指包含、总括、含有或包涵的含义。在某些情况下, 也表示“为”、“由.....组成”的含义。

在本申请中, 术语“约”通常是指在指定数值以上或以下0.5%-10%的范围内变动, 例如在指定数值以上或以下0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、5.5%、6%、6.5%、7%、7.5%、8%、8.5%、9%、9.5%、或10%的范围内变动。

在本申请中, 术语“受试者”通常是指人类或非人类动物, 包括但不限于猫、狗、马、猪、奶牛、羊、兔、小鼠、大鼠或猴等。

发明详述

B7H3 结合多肽

一方面, 本申请提供一种分离的 B7H3 结合多肽, 其包含靶向 B7H3 的第一重链抗体重链可变区 (VHH-1) 和第二重链抗体重链可变区 (VHH-2), 其中所述 VHH-1 包含与 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列具有至少约 90%, 约 91%, 约 92%, 约 93%, 约 94%, 约 95%, 约 96%, 约 97%, 约 98%, 约 99%, 约 99.5%同一性的氨基酸序列的 HCDR1, 与 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列具有至少约 90%, 约 91%, 约 92%, 约 93%, 约 94%, 约 95%, 约 96%, 约 97%, 约 98%, 约 99%, 约 99.5%同一性的氨基酸序列的 HCDR2, 与 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列具有至少约 90%, 约 91%, 约 92%, 约 93%, 约 94%, 约 95%, 约 96%, 约 97%, 约 98%, 约 99%, 约 99.5%同一性的氨基酸序列的 HCDR3;

所述 VHH-2 包含与 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列具有至少约 90%, 约 91%, 约 92%, 约 93%, 约 94%, 约 95%, 约 96%, 约 97%, 约 98%, 约 99%, 约 99.5%同一性的氨基酸序列的 HCDR1, 与 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列具有至少约 90%, 约 91%, 约 92%, 约 93%, 约 94%, 约 95%, 约 96%, 约 97%, 约 98%, 约 99%, 约 99.5%同一性的氨基酸序列的 HCDR2, 与 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列具有至少约 90%, 约 91%, 约 92%, 约 93%, 约 94%, 约 95%, 约 96%, 约 97%, 约 98%, 约 99%, 约 99.5%同一性的氨基酸序列的 HCDR3。

例如, 所述 B7H3 结合多肽包含靶向 B7H3 的第一重链抗体重链可变区 (VHH-1) 和第二重链抗体重链可变区 (VHH-2), 其中所述 VHH-1 可以包含如 SEQ ID NO: 1 所示的 HCDR1, 如 SEQ ID NO: 3 所示的 HCDR2, 如 SEQ ID NO: 5 所示的 HCDR3; 所述 VHH-2 可以包含如 SEQ ID NO: 2 所示的 HCDR1, 如 SEQ ID NO: 4 所示的 HCDR2, 如 SEQ ID NO: 6 所示的 HCDR3。

在某些实施方式中, 所述 VHH-1 包含重链框架区 1 (HFR1)、重链框架区 2 (HFR2)、重链框架区 3 (HFR3) 和重链框架区 4 (HFR4), 所述 HFR1 包含与 SEQ ID NO: 7 或 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列具有至少约 90%, 约 91%, 约 92%, 约 93%, 约 94%, 约 95%, 约 96%, 约 97%, 约 98%, 约 99%, 约 99.5% 同一性的氨基酸序列。所述 HFR2 包含与 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列具有至少约 90%, 约 91%, 约 92%, 约 93%, 约 94%, 约 95%, 约 96%, 约 97%, 约 98%, 约 99%, 约 99.5% 同一性的氨基酸序列。所述 HFR3 包含与 SEQ ID NO: 13 或 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列具有至少约 90%, 约 91%, 约 92%, 约 93%, 约 94%, 约 95%, 约 96%, 约 97%, 约 98%, 约 99%, 约 99.5% 同一性的氨基酸序列。所述 HFR4 包含与 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列具有至少约 90%, 约 91%, 约 92%, 约 93%, 约 94%, 约 95%, 约 96%, 约 97%, 约 98%, 约 99%, 约 99.5% 同一性的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 所述 VHH-2 包含重链框架区 1 (HFR1)、重链框架区 2 (HFR2)、重链框架区 3 (HFR3) 和重链框架区 4 (HFR4), 所述 HFR1 包含 SEQ ID NO: 9 或 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列具有至少约 90%, 约 91%, 约 92%, 约 93%, 约 94%, 约 95%, 约 96%, 约 97%, 约 98%, 约 99%, 约 99.5% 同一性的氨基酸序列。所述 HFR2 包含与 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列具有至少约 90%, 约 91%, 约 92%, 约 93%, 约 94%, 约 95%, 约 96%, 约 97%, 约 98%, 约 99%, 约 99.5% 同一性的氨基酸序列。所述 HFR3 包含与 SEQ ID NO: 14 或 SEQ ID NO: 15 所示的氨基酸序列具有至少约 90%, 约 91%, 约 92%, 约 93%, 约 94%, 约 95%, 约 96%, 约 97%, 约 98%, 约 99%, 约 99.5% 同一性的氨基酸序列。所述 HFR4 包含与 SEQ ID NO: 17 所示的氨基酸序列具有至少约 90%, 约 91%, 约 92%, 约 93%, 约 94%, 约 95%, 约 96%, 约 97%, 约 98%, 约 99%, 约 99.5% 同一性的氨基酸序列。

例如, 所述 VHH-1 包含 HFR1、HFR2、HFR3 和 HFR4, 且所述 HFR1、HFR2、HFR3 和 HFR4 可以选自:

i) 包含 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列的 HFR1, 包含 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列的 HFR2, 包含 SEQ ID NO: 13 所示的氨基酸序列的 HFR3, 包含 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列的 HFR4; 和

ii) 包含 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列的 HFR1, 包含 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列的 HFR2, 包含 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列的 HFR3, 包含 SEQ ID NO: 17 所示的氨基酸序列的 HFR4。

例如, 所述 VHH-2 包含 HFR1、HFR2、HFR3 和 HFR4, 且所述 HFR1、HFR2、HFR3 和 HFR4 可以选自:

i) 包含 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列的 HFR1, 包含 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列的 HFR2, 包含 SEQ ID NO: 15 所示的氨基酸序列的 HFR3, 包含 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列的 HFR4; 和

ii) 包含 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列的 HFR1, 包含 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列的 HFR2, 包含 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列的 HFR3, 包含 SEQ ID NO: 17 所示的氨基酸序列的 HFR4。

在某些实施方式中, 所述 VHH-1 包含与 SEQ ID NO: 18 或 SEQ ID NO: 19 所示的氨基酸序列具有至少约 90%, 约 91%, 约 92%, 约 93%, 约 94%, 约 95%, 约 96%, 约 97%, 约 98%, 约 99%, 约 99.5% 同一性的氨基酸序列。例如, 所述 VHH-1 可以包含 SEQ ID NO: 18 或 SEQ ID NO: 19 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 所述 VHH-2 包含与 SEQ ID NO: 20 或 SEQ ID NO: 21 所示的氨基酸序列具有至少约 90%, 约 91%, 约 92%, 约 93%, 约 94%, 约 95%, 约 96%, 约 97%, 约 98%, 约 99%, 约 99.5% 同一性的氨基酸序列。例如, 所述 VHH-2 可以包含 SEQ ID NO: 20 或 SEQ ID NO: 21 所示的氨基酸序列。

例如, 所述 B7H3 结合多肽包含靶向 B7H3 的第一重链抗体重链可变区 (VHH-1) 和第二重链抗体重链可变区 (VHH-2), 其中所述 VHH-1 包含如 SEQ ID NO: 18 或 SEQ ID NO: 19 所示的氨基酸序列, 和/或所述 VHH-2 包含如 SEQ ID NO: 20 或 SEQ ID NO: 21 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 其中所述 VHH-1 和/或 VHH-2 包括人抗体、人源化抗体或嵌合抗体。

在某些实施方式中, 其中所述 VHH-1 与 VHH-2 直接连接或者通过接头 (linker) 连接。

在某些实施方式中, 自 N 端至 C 端, 其中所述 B7H3 结合多肽依次包含: i) VHH-1-linker-VHH-2; 或 ii) VHH-2-linker-VHH-1。

根据本发明的术语“肽连接子”或“linker”定义这样的氨基酸序列: 通过所述氨基酸序列, 本发明的 B7H3 结合多肽的 VHH-1 和第 VHH-2 的氨基酸序列彼此相连。这种肽连接子的必要技术特征在于所述肽连接子不包含任何的聚合活性。对肽连接子优选的氨基酸残基

包括 Gly、Ser 和 Thr，特征在于长度为 5 至 25 个氨基酸残基。合适的肽连接子包括在美国专利 4,751,180 和 4,935,233 或 WO88/09344 中描述的那些。肽连接子的优选实施方案的特征在于氨基酸序列 Gly-Gly-Gly-Gly-Ser，即 Gly₄Ser，或其聚合物，即(Gly₄Ser)_x，其中 x 是整数 1 或更大。所述肽连接子的特征，包括不促进二级结构，是本领域中已知的并且例如描述于 Dall'Acqua 等人(Biochem.(1998)37,9266-9273)、Cheadle 等人(MolImmunol(1992)29,21-30)以及 Raag 和 Whitlow(FASEB(1995)9(1),73-80)。还不促进任何二级结构的肽连接子是优选的。如实施例所述，例如通过基因工程提供所述结构域与彼此的连接。用于制备融合和可操作地连接双特异性单链构建体和哺乳动物细胞或细菌中表达它们的方法在本领域中是公知的(例如 WO99/54440 或 Sambrook 等人, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001)。

在某些实施方式中，其中所述接头包含 SEQ ID NO: 22 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述 B7H3 结合多肽包含与 SEQ ID NO: 23，SEQ ID NO: 24，SEQ ID NO: 26 和 SEQ ID NO: 25 中任一项具有至少约 90%，约 91%，约 92%，约 93%，约 94%，约 95%，约 96%，约 97%，约 98%，约 99%，约 99.5% 同一性的氨基酸序列。

例如，所述 B7H3 结合多肽包含 SEQ ID NO: 23，SEQ ID NO: 24，SEQ ID NO: 26 和 SEQ ID NO: 25 中任一项所示的氨基酸序列。

嵌合抗原受体

一方面，本申请提供一种靶向 B7H3 的嵌合抗原受体 (CAR)，其包含胞外抗原结合结构域 (靶向部分)，其中所述胞外抗原结合结构域包含至少两个结合 B7H3 不同表位的 VHH。例如，所述胞外抗原结合结构域可以包含两个结合 B7H3 不同表位的 VHH。

在某些实施方式中，其中所述胞外抗原结合结构域包括前述的 B7H3 结合多肽。

例如，所述胞外抗原结合结构域包含第一重链抗体重链可变区 (VHH-1) 和第二重链抗体重链可变区 (VHH-2)，其中所述 VHH-1 包含如 SEQ ID NO: 1 所示的 HCDR1，如 SEQ ID NO: 3 所示的 HCDR2，如 SEQ ID NO: 5 所示的 HCDR3；和/或所述 VHH-2 包含如 SEQ ID NO: 2 所示的 HCDR1，如 SEQ ID NO: 4 所示的 HCDR2，如 SEQ ID NO: 6 所示的 HCDR3。

又例如，所述胞外抗原结合结构域包含 VHH-1 和 VHH-2，其中所述 VHH-1 可以包含如 SEQ ID NO: 18 或 SEQ ID NO: 19 所示的氨基酸序列，和/或所述 VHH-2 可以包含如 SEQ ID NO: 20 或 SEQ ID NO: 21 所示的氨基酸序列。

又例如，所述胞外抗原结合结构域可以包含 SEQ ID NO: 23，SEQ ID NO: 24，SEQ ID NO: 26 和 SEQ ID NO: 25 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述嵌合抗原受体还包含跨膜域，胞内共刺激信号传导结构域和胞内信号转导结构域。

在某些实施方式中，所述跨膜域包含源自选自下组中的一种或多种蛋白的跨膜域：CD8A、CD8B、CD28、CD3 ϵ (CD3e)、4-1BB、CD4、CD27、CD7、PD-1、TRAC、TRBC、CD3 ζ 、CTLA-4、LAG-3、CD5、ICOS、OX40、NKG2D、2B4 (CD244)、Fc ϵ RI γ 、BTLA、CD30、GITR、HVEM、DAP10、CD2、NKG2C、LIGHT、DAP12、CD40L (CD154)、TIM1、CD226、DR3、CD45、CD80、CD86、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64 和 SLAM。

在某些实施方式中，其中所述跨膜域包含源自 CD8A 的跨膜域。

在某些实施方式中，其中所述跨膜域包含与 SEQ ID NO: 62 至 SEQ ID NO: 110 中任一项所示的氨基酸序列具有至少约 90%，约 91%，约 92%，约 93%，约 94%，约 95%，约 96%，约 97%，约 98%，约 99%，约 99.5% 同一性的氨基酸序列。

在某些实施方式中，其中所述跨膜域包含与 SEQ ID NO: 62 所示的氨基酸序列具有至少约 90%，约 91%，约 92%，约 93%，约 94%，约 95%，约 96%，约 97%，约 98%，约 99%，约 99.5% 同一性的氨基酸序列。

例如，其中所述跨膜域可以包含 SEQ ID NO: 62 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述胞内共刺激信号传导结构域包含源自选自下组中的一种或多种蛋白的胞内共刺激信号传导结构域：CD28、CD137、CD27、CD2、CD7、CD8A、CD8B、OX40、CD226、DR3、SLAM、CDS、ICAM-1、NKG2D、NKG2C、B7-H3、2B4、Fc ϵ RI γ 、BTLA、GITR、HVEM、DAP10、DAP12、CD30、CD40、CD40L、TIM1、PD-1、LFA-1、LIGHT、JAML、CD244、CD100、ICOS、CD40 和 MyD88。

在某些实施方式中，其中所述胞内共刺激信号传导结构域源自 4-1BB 的共刺激信号传导结构域。

在某些实施方式中，其中所述胞内共刺激信号传导结构域包含与 SEQ ID NO: 111 至 SEQ ID NO: 143 中任一项所示的氨基酸序列具有至少约 90%，约 91%，约 92%，约 93%，约 94%，约 95%，约 96%，约 97%，约 98%，约 99%，约 99.5% 同一性的氨基酸序列。

在某些实施方式中，其中所述胞内共刺激信号传导结构域包含与 SEQ ID NO: 112 所示的氨基酸序列具有至少约 90%，约 91%，约 92%，约 93%，约 94%，约 95%，约 96%，约 97%，约 98%，约 99%，约 99.5% 同一性的氨基酸序列。

例如，其中所述胞内共刺激信号传导结构域可以包含 SEQ ID NO: 112 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述胞内信号转导结构域包含源自选自下组中的一种或多种蛋白的胞内信号转导结构域：CD3 ζ 、CD3 δ 、CD3 γ 、CD3 ϵ 、CD79a、CD79b、Fc ϵ RI γ 、Fc ϵ RI β 、Fc γ RIIa、牛白血病病毒 gp30、Epstein-Barr 病毒(EBV)LMP2A、猿免疫缺陷病毒 PBj14 Nef、DAP10、DAP-12 和至少包含一个 ITAM 的结构域。

在某些实施方式中，其中所述胞内信号转导结构域包含源自 CD3 ζ 的信号传导结构域。

在某些实施方式中，其中所述胞内信号转导结构域包含与 SEQ ID NO: 127、SEQ ID NO: 131、SEQ ID NO: 132、SEQ ID NO: 144 至 SEQ ID NO: 154 中任一项所示的氨基酸序列中任一项所示的氨基酸序列具有至少约 90%，约 91%，约 92%，约 93%，约 94%，约 95%，约 96%，约 97%，约 98%，约 99%，约 99.5% 同一性的氨基酸序列。

在某些实施方式中，其中所述胞内信号转导结构域包含与 SEQ ID NO: 144 所示的氨基酸序列具有至少约 90%，约 91%，约 92%，约 93%，约 94%，约 95%，约 96%，约 97%，约 98%，约 99%，约 99.5% 同一性的氨基酸序列。

例如，其中所述胞内信号转导结构域可以包含 SEQ ID NO: 144 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，其在靶向部分和跨膜域之间包括铰链区，所述铰链区包含源自选自下组中的一种或多种蛋白的铰链区：CD28、IgG1、IgG4、IgD、4-1BB、CD4、CD27、CD7、CD8A、PD-1、ICOS、OX40、NKG2D、NKG2C、Fc ϵ RI γ 、BTLA、GITR、DAP10、TIM1、SLAM、CD30 和 LIGHT。

在某些实施方式中，所述铰链区包含源自 CD8A 的铰链区。

在某些实施方式中，所述铰链区包含与 SEQ ID NO: 155 至 SEQ ID NO: 176 中任一项所示的氨基酸序列具有至少约 90%，约 91%，约 92%，约 93%，约 94%，约 95%，约 96%，约 97%，约 98%，约 99%，约 99.5% 同一性的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述铰链区包含与 SEQ ID NO: 155 所示的氨基酸序列具有至少约 90%，约 91%，约 92%，约 93%，约 94%，约 95%，约 96%，约 97%，约 98%，约 99%，约 99.5% 同一性的氨基酸序列。

例如，所述铰链区可以包含 SEQ ID NO: 163 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述嵌合抗原受体的非靶向部分包括铰链区，跨膜域，胞内共刺激信号传导结构域与胞内信号转导结构域。例如，所述嵌合抗原受体的非靶向部分可以包含 CD8A 分子跨膜域、CD8A 的铰链区、4-1BB 的胞内共刺激信号传导结构域和 CD3 ζ 胞内信号传导结构域。

例如，所述嵌合抗原受体以本申请的 B7H3 结合多肽为胞外抗原结合结构域，通过

CD8A 分子铰链区和跨膜域与胞内信号传导结构域相连接，胞内信号传导结构域由 4-1BB 胞内共刺激信号传导结构域与 CD3 ζ 胞内信号转导结构域组成。

在某些实施方式中，所述嵌合抗原受体的非靶向部分包含与 SEQ ID NO: 27 所示的氨基酸序列具有至少约 90%，约 91%，约 92%，约 93%，约 94%，约 95%，约 96%，约 97%，约 98%，约 99%，约 99.5% 同一性的氨基酸序列。例如，所述嵌合抗原受体的非靶向部分可以包含 SEQ ID NO: 27 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述的嵌合抗原受体还包含信号肽片段，所述信号肽片段的 C 端与所述靶向部分的 N 端连接。例如，所述嵌合抗原受体可以包括 CAR 包括信号肽、抗 B7H3 VHH、CD8A 铰链结构域、CD8A 跨膜结构域、4-1BB 共刺激结构域和 CD3 ζ 主信号传导结构域。

在某些实施方式中，所述信号肽片段包括 CD8A 信号肽片段。

在某些实施方式中，所述的嵌合抗原受体，所述信号肽片段包含与 SEQ ID NO: 28 所示的氨基酸序列具有至少约 90%，约 91%，约 92%，约 93%，约 94%，约 95%，约 96%，约 97%，约 98%，约 99%，约 99.5% 同一性的氨基酸序列。例如所述信号肽片段可以包含 SEQ ID NO: 28 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述的嵌合抗原受体依次包含，信号肽，胞外抗原结合结构域，铰链区，跨膜域，胞内共刺激信号传导结构域和胞内信号转导结构域，其中所述胞外抗原结合结构域为本申请所述的 B7H3 结合多肽。

例如，所述嵌合抗原受体的可以包含 CD8A 信号肽，本申请的 B7H3 结合多肽，CD8A 分子跨膜域、CD8A 的铰链区、4-1BB 的胞内共刺激信号传导结构域和 CD3 ζ 胞内信号传导结构域。

在某些实施方式中，所述嵌合抗原受体包含与 SEQ ID NO: 33 至 SEQ ID NO: 36 中任一项所示的氨基酸序列具有至少约 90%，约 91%，约 92%，约 93%，约 94%，约 95%，约 96%，约 97%，约 98%，约 99%，约 99.5% 同一性的氨基酸序列。

例如，所述嵌合抗原受体可以包含 SEQ ID NO: 33 至 SEQ ID NO: 36 中任一项所示的氨基酸序列。

分离的多肽

另一方面，本申请提供了一种或多种分离多肽，其包含本申请所述的嵌合抗原受体和能够增强免疫效应细胞的一种或多种活性的增强子。

在某些实施方式中，其中所述增强子包括细胞因子和/或细胞因子受体。

在某些实施方式中，其中所述增强子是膜嵌合的细胞因子和/或细胞因子受体。

在某些实施方式中，其中所述增强子选自 IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-11, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-21, IL-23, 其受体，其功能变体及它们的组合。

在某些实施方式中，其中所述增强子包括 IL-15 或其功能变体，或包含 IL-15 受体(IL-15R)的嵌合细胞因子受体。

在某些实施方式中，其中所述增强子包括膜嵌合的 IL-15 (mIL-15)。

例如，所述多肽可以包含所述的嵌合抗原受体，其中所述嵌合抗原受体包含抗原结合结构域和非抗原结合结构域，其中所述非抗原结合结构域包括 CD28 的胞外域、跨膜域和胞内共刺激结构域或其功能性变体，以及 CD3 ζ 的信号传导结构域或其功能性变体；和膜嵌合的 IL-15。

例如，所述多肽可以包含所述的嵌合抗原受体，其中所述嵌合抗原受体包含 B7H3 结合结构域和非抗原结合结构域，其中所述非抗原结合结构域包括 CD28 的胞外域、跨膜域和胞内共刺激结构域或其功能性变体，以及 CD3 ζ 的信号传导结构域或其功能性变体；和膜嵌合的 IL-15。

在某些实施方式中，其中所述增强子包含 SEQ ID NO: 46 所示的氨基酸序列或与 SEQ ID NO: 46 所示的氨基酸序列具有至少约 50%，约 60%，约 70%，约 80%，约 90%，约 91%，约 92%，约 93%，约 94%，约 95%，约 96%，约 97%，约 98%，约 99%，约 99.5% 同一性的氨基酸序列。

例如，所述多肽可以包含所述的嵌合抗原受体，其中所述嵌合抗原受体可以包含 SEQ ID NO: 54 所示的氨基酸序列；和增强子，所述增强子可以包含 SEQ ID NO: 54 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述嵌合抗原受体和所述增强子分别位于不同的多肽中。

在某些实施方式中，所述嵌合抗原受体和所述增强子位于同一多肽中。例如，所述嵌合抗原受体和所述增强子可以直接连接或间接连接。

在某些实施方式中，其中所述嵌合抗原受体和所述增强子通过接头连接。例如，自 N 端至 C 端，所述多肽可以包含如下结构：i) 嵌合抗原受体，接头和增强子；或 ii) 增强子，接头和嵌合抗原受体。

在某些实施方式中，其中所述接头包括可切割的接头。

在某些实施方式中，其中所述接头包括自切割肽。

在某些实施方式中，所述自切割肽包含 2A 肽的自切割氨基酸序列，所述 2A 肽是来自猪捷申病毒-1(P2A)、马鼻炎 A 病毒(E2A)、明脉扁刺蛾(*Thosea asigna*)病毒(T2A)、口蹄疫病毒(F2A)或它们的任意组合(参见，例如，Kim 等人，PLOS One 6: e18556, 2011, 所述 2A 核酸和氨基酸序列通过引用整体并入本文)。

例如，所述多肽可以包含所述的嵌合抗原受体，其中所述嵌合抗原受体包含抗原结合结构域和非抗原结合结构域，其中所述非抗原结合结构域包括 CD8A 的铰链区、CD8A 分子跨膜域、4-1BB 的胞内共刺激信号传导结构域和 CD3 ζ 胞内信号传导结构域；和 IL-15 或其功能变体，所述嵌合抗原受体和所述 mIL-15 可以通过 T2A 连接。

在某些实施方式中，其中所述接头包含 SEQ ID NO: 44 所示的氨基酸序列或与 SEQ ID NO: 44 所示的氨基酸序列具有至少约 50%，约 60%，约 70%，约 80%，约 90%，约 91%，约 92%，约 93%，约 94%，约 95%，约 96%，约 97%，约 98%，约 99%，约 99.5% 同一性的氨基酸序列。

例如，所述多肽可以包含所述的嵌合抗原受体，其中所述嵌合抗原受体可以包含 SEQ ID NO: 33-36 中任一项所示的氨基酸序列；和增强子，所述增强子可以包含 SEQ ID NO: 46 或 54 所示的氨基酸序列；所述嵌合抗原受体和所述增强子可以通过自切割肽连接，所述接头可以包含 SEQ ID NO: 44 所示的氨基酸序列。

又例如，其中所述多肽包含 SEQ ID NO: 241 或 243 所示的氨基酸序列或与 SEQ ID NO: 241 或 243 所示的氨基酸序列具有至少约 50%，约 60%，约 70%，约 80%，约 90%，约 91%，约 92%，约 93%，约 94%，约 95%，约 96%，约 97%，约 98%，约 99%，约 99.5% 同一性的氨基酸序列。

核酸分子、载体、细胞

另一方面，本申请提供一种或多种分离的核酸分子，其编码前述的 B7H3 结合多肽，前述的嵌合抗原受体，或前述多肽。

在某些实施方式中，所述的分离的核酸分子包含与 SEQ ID NO: 240 或 SEQ ID NO: 242 所示的核苷酸序列具有至少约 90%，约 91%，约 92%，约 93%，约 94%，约 95%，约 96%，约 97%，约 98%，约 99%，约 99.5% 同一性的氨基酸序列。

另一方面，本申请提供一种载体，其包含前述的分离的核酸分子。

在某些实施方式中，其中所述载体是表达载体。

在某些实施方式中，其中所述载体选自 DNA 载体、RNA 载体、质粒、慢病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体和逆转录病毒载体。例如，所述载体可以是慢病毒载体。

另一方面，本申请提供一种细胞，i) 包含前述的分离的核酸分子或前述的载体；和/或 ii)

表达前述的 B7H3 结合多肽或嵌合抗原受体。

免疫效应细胞

另一方面，本申请提供一种免疫效应细胞，其包含前述的所述的核酸分子或前述的载体，和/或表达前述的 CAR。

在某些实施方式中，所述的免疫效应细胞包括人细胞。

在某些实施方式中，所述免疫效应细胞包括 T 细胞、B 细胞、天然杀伤细胞(NK 细胞)、巨噬细胞、NKT 细胞、单核细胞、树突状细胞、粒细胞、淋巴细胞、白细胞和/或外周血单个核细胞。例如，所述免疫效应细胞可以是 T 细胞。又例如，所述免疫效应细胞可以是人 T 细胞。

在某些实施方式中，所述免疫效应细胞包括自体或非自体的免疫效应细胞。

在某些实施方式中，所述的免疫效应细胞包括经修饰的免疫效应细胞。

在某些实施方式中，其中所述经修饰的免疫效应细胞包括降低同种异体细胞治疗引起的免疫排斥反应的细胞。

在某些实施方式中，其中所述经修饰的免疫效应细胞中的 T 细胞抗原受体(TCR)和主要组织相容性复合体(MHCI, MHCII)在 T 细胞中的功能受到抑制。

在某些实施方式中，其中所述修饰包括与免疫排斥相关基因中的一个或多个的表达和/或活性被下调。

在某些实施方式中，其中所述与免疫排斥相关基因选自下组中的一种或多种基因：TRAC、TRBC、HLA-A、HLA-B、B2M 和 CIITA。

在某些实施方式中，其中所述与免疫排斥相关基因选自下组中的一种或多种基因：TRAC、TRBC、HLA-A 和 HLA-B。

在某些实施方式中，其中所述与免疫排斥相关基因选自下组中的一种或多种基因：TRAC、TRBC 和 HLA-A。

在某些实施方式中，其中所述与免疫排斥相关基因选自下组中的一种或多种基因：TRAC 和 HLA-A。

在某些实施方式中，所述经修饰的免疫效应细胞与未经修饰的相应细胞相比，TRAC 基因和 HLA-A 基因的表达和/或活性被下调。

在某些实施方式中，所述经修饰的免疫效应细胞与未经修饰的相应细胞相比，TRAC 基因，HLA-A 基因和 HLA-B 基因的表达和/或活性被下调。

在某些实施方式中，其中所述经修饰的免疫效应细胞与未经所述修饰的相应细胞相比，

CIITA 基因的表达和/或活性未被下调。

在某些实施方式中，其中所述经修饰的免疫效应细胞与未经所述修饰的相应细胞相比，B2M 基因的表达和/或活性未被下调。

在某些实施方式中，其中所述经修饰的免疫效应细胞与相应的野生型细胞相比，TRAC 基因和 HLA-A 基因的表达和/或活性被下调。

在某些实施方式中，其中所述经修饰的免疫效应细胞与相应的野生型细胞相比，TRAC 基因，HLA-A 基因和 HLA-B 基因的表达和/或活性被下调。

在某些实施方式中，其中所述经修饰的免疫效应细胞与相应的野生型细胞相比，B2M 基因的表达和/或活性未被下调。

在某些实施方式中，其中所述经修饰的免疫效应细胞与相应的野生型细胞相比，CIITA 基因的表达和/或活性未被下调。

在某些实施方式中，其中所述基因的表达水平和/或活性被下调包括使编码所述基因的核酸分子的表达和/或活性下调；和/或使所述基因编码的蛋白质产物的表达和/或活性被下调。

在某些实施方式中，其中所述修饰包括：基因敲除、基因突变和/或基因沉默。

在某些实施方式中，所述修饰包括所述免疫效应细胞中两个 TRAC 等位基因中的任意一个被敲除并且两个 HLA-A 等位基因中的任意一个被敲除。

在某些实施方式中，所述修饰包括所述免疫细胞中两个 TRAC 等位基因被敲除并且两个 HLA-A 等位基因中的任意一个被敲除。

在某些实施方式中，所述修饰包括所述免疫细胞中 TRAC 基因外显子被敲除并且 HLA-A 基因外显子被敲除。

在某些实施方式中，其中所述修饰包括向所述免疫效应细胞施用一种或多种选自下组的物质：反义 RNA、siRNA、shRNA 和 CRISPR/Cas9 系统。

在某些实施方式中，其中所述修饰包括向所述免疫效应细胞施用 CRISPR/Cas9 系统。

在某些实施方式中，其中所述修饰还包括向所述免疫效应细胞施用靶向所述 TRAC 基因外显子部分的 sgRNA。

在某些实施方式中，其中所述靶向所述 TRAC 基因外显子部分的 sgRNA 包含与 SEQ ID NO: 177 至 SEQ ID NO: 191 中任一项所示的核苷酸序列具有至少约 90%，约 91%，约 92%，约 93%，约 94%，约 95%，约 96%，约 97%，约 98%，约 99%，约 99.5% 同一性的氨基酸序列。

在某些实施方式中，其中所述修饰包括向所述免疫效应细胞施用靶向所述 HLA-A 基因

外显子部分的 sgRNA。

在某些实施方式中，其中所述靶向所述 HLA-A 基因外显子部分的 sgRNA 包含与 SEQ ID NO: 192 至 SEQ ID NO: 232 中任一项所示的核苷酸序列具有至少约 90%，约 91%，约 92%，约 93%，约 94%，约 95%，约 96%，约 97%，约 98%，约 99%，约 99.5% 同一性的氨基酸序列。

在某些实施方式中，其中所述修饰包括向所述免疫效应细胞施用靶向所述 HLA-B 基因外显子部分的 sgRNA。

在某些实施方式中，其中所述靶向所述 HLA-B 基因外显子部分的 sgRNA 包含与 SEQ ID NO: 237 至 SEQ ID NO: 239 中任一项所示的核苷酸序列具有至少约 90%，约 91%，约 92%，约 93%，约 94%，约 95%，约 96%，约 97%，约 98%，约 99%，约 99.5% 同一性的氨基酸序列。

在某些实施方式中，其中所述修饰还包括向所述细胞施用 Cas 酶。

在某些实施方式中，其中 Cas 酶包括 Cas9 蛋白。

在某些实施方式中，其中所述反义 RNA 包含与 SEQ ID NO: 233 至 SEQ ID NO: 236 中任一项所示的核苷酸序列具有至少约 90%，约 91%，约 92%，约 93%，约 94%，约 95%，约 96%，约 97%，约 98%，约 99%，约 99.5% 同一性的氨基酸序列。

在某些实施方式中，其中所述免疫效应细胞为 HLA-B 纯合子或杂合子细胞。

在某些实施方式中，其中所述 HLA-B 纯合子包括 HLA-B*40 纯合子，HLA-B*15 纯合子，HLA-B*46 纯合子，HLA-B*13 纯合子，HLA-B*51 纯合子，HLA-B*58 纯合子，HLA-B*07 纯合子，HLA-B*35 纯合子，HLA-B*44 纯合子，HLA-B*52 纯合子，HLA-B*57 纯合子，HLA-B*54 纯合子，HLA-B*55 纯合子。

在某些实施方式中，其中所述免疫效应细胞为 HLA-A 纯合子或杂合子细胞。

在某些实施方式中，其中所述 HLA-A 纯合子或杂合子包括 HLA-A*02 纯合子，HLA-A*11 纯合子，HLA-A*02/A*11 杂合子或 HLA-A*24 纯合子。

另一方面，本申请提供一种制备免疫效应细胞的方法，其包括向免疫效应细胞中引入前述的核酸分子或前述的载体。

在某些实施方式中，所述的方法还包括：在向免疫效应细胞中引入前述的核酸分子或前述的载体之前/之后，修饰所述免疫效应细胞，所述修饰包括与免疫排斥相关基因中的一个或多个的表达和/或活性被下调。

在某些实施方式中，所述的方法包括：在向免疫效应细胞中引入前述的核酸分子或前述

的载体之后，修饰所述免疫效应细胞，所述修饰包括与免疫排斥相关基因中的一个或多个的表达和/或活性被下调。

例如，所述制备免疫效应细胞的方法可以包括：

- (1) 向免疫效应细胞中引入前述的核酸分子或前述的载体；
- (2) 修饰所述免疫效应细胞，所述修饰包括与免疫排斥相关基因中的一个或多个的表达和/或活性被下调。

在某些实施方式中，其中所述与免疫排斥相关基因选自下组中的一种或多种基因：TRAC、TRBC、HLA-A、HLA-B、B2M 和 CIITA。

在某些实施方式中，与未经所述修饰的相应细胞中相应基因的表达和/或活性相比，下调所述免疫效应细胞中 TRAC 基因和 HLA-A 基因的表达和/或活性。

在某些实施方式中，与未经所述修饰的相应细胞中相应基因的表达和/或活性相比，CIITA 基因的表达和/或活性未被下调。

在某些实施方式中，与未经所述修饰的相应细胞中相应基因的表达和/或活性相比，B2M 基因的表达和/或活性未被下调。

在某些实施方式中，与相应的野生型细胞相比，所述免疫效应细胞的 TRAC 基因和 HLA-A 基因的表达和/或活性被下调。

在某些实施方式中，与相应的野生型细胞相比，CIITA 基因的表达和/或活性未被下调。

在某些实施方式中，与相应的野生型细胞相比，B2M 基因的表达和/或活性未被下调。

在某些实施方式中，其中所述基因的表达水平和/或活性被下调包括使编码所述基因的核酸分子的表达和/或活性下调；和/或使所述基因编码的蛋白质产物的表达和/或活性被下调。

在某些实施方式中，其中所述修饰包括：基因敲除、基因突变和/或基因沉默。

在某些实施方式中，所述修饰包括所述免疫效应细胞中两个 TRAC 等位基因中的任意一个被敲除并且两个 HLA-A 等位基因中的任意一个被敲除。

在某些实施方式中，所述修饰包括所述免疫细胞中两个 TRAC 等位基因被敲除并且两个 HLA-A 等位基因中的任意一个被敲除。

在某些实施方式中，所述修饰包括所述免疫细胞中 TRAC 基因外显子被敲除并且 HLA-A 基因外显子被敲除。

在某些实施方式中，所述修饰包括所述免疫细胞中 TRAC 基因外显子被敲除，HLA-A 基因外显子被敲除，并且 HLA-B 基因外显子被敲除。

在某些实施方式中，其中所述修饰包括向所述免疫效应细胞施用一种或多种选自下组的

物质：反义 RNA、siRNA、shRNA 和 CRISPR/Cas9 系统。

在某些实施方式中，其中所述修饰包括向所述免疫效应细胞施用 CRISPR/Cas9 系统。

在某些实施方式中，其中所述修饰包括向所述免疫效应细胞施用靶向所述 TRAC 基因外显子部分的 sgRNA。

在某些实施方式中，其中所述靶向所述 TRAC 基因外显子部分的 sgRNA 包含 SEQ ID NO: 177 至 SEQ ID NO: 191 中任一项所示的核苷酸序列。

在某些实施方式中，其中所述修饰包括向所述免疫效应细胞施用靶向所述 HLA-A 基因外显子部分的 sgRNA。

在某些实施方式中，其中所述靶向所述 HLA-A 基因外显子部分的 sgRNA 包含与 SEQ ID NO: 192 至 SEQ ID NO: 232 中任一项所示的核苷酸序列具有至少约 90%，约 91%，约 92%，约 93%，约 94%，约 95%，约 96%，约 97%，约 98%，约 99%，约 99.5% 同一性的氨基酸序列。

在某些实施方式中，其中所述修饰包括向所述免疫效应细胞施用靶向所述 HLA-B 基因外显子部分的 sgRNA。

在某些实施方式中，其中所述靶向所述 HLA-B 基因外显子部分的 sgRNA 包含与 SEQ ID NO: 237 至 SEQ ID NO: 239 中任一项所示的核苷酸序列具有至少约 90%，约 91%，约 92%，约 93%，约 94%，约 95%，约 96%，约 97%，约 98%，约 99%，约 99.5% 同一性的氨基酸序列。

在某些实施方式中，其中所述修饰还包括向所述细胞施用 Cas 酶。

在某些实施方式中，其中 Cas 酶包括 Cas9 蛋白。

在某些实施方式中，其中所述反义 RNA 包含与 SEQ ID NO: 233 至 SEQ ID NO: 236 中任一项所示的核苷酸序列具有至少约 90%，约 91%，约 92%，约 93%，约 94%，约 95%，约 96%，约 97%，约 98%，约 99%，约 99.5% 同一性的氨基酸序列。

在某些实施方式中，其中所述免疫效应细胞包括人细胞。

在某些实施方式中，所述免疫效应细胞包括 T 细胞、B 细胞、天然杀伤细胞(NK 细胞)、巨噬细胞、NKT 细胞、单核细胞、树突状细胞、粒细胞、淋巴细胞、白细胞和/或外周血单个核细胞。例如，所述免疫效应细胞可以是 T 细胞。

在某些实施方式中，所述免疫效应细胞包括自体或非自体的免疫效应细胞。

在某些实施方式中，其中所述细胞为 HLA-B 纯合子或杂合子细胞。

在某些实施方式中，其中所述 HLA-B 纯合子包括 HLA-B*40 纯合子，HLA-B*15 纯合

子, HLA-B*46 纯合子, HLA-B*13 纯合子, HLA-B*51 纯合子, HLA-B*58 纯合子, HLA-B*07 纯合子, HLA-B*35 纯合子, HLA-B*44 纯合子, HLA-B*52 纯合子, HLA-B*57 纯合子, HLA-B*54 纯合子, HLA-B*55 纯合子。

在某些实施方式中, 其中所述细胞为 HLA-A 纯合子或杂合子细胞。

在某些实施方式中, 其中所述 HLA-A 纯合子或杂合子包括 HLA-A*02 纯合子, HLA-A*11 纯合子, HLA-A*02/A*11 杂合子或 HLA-A*24 纯合子。

例如, 所述制备免疫效应细胞的方法可以包括:

(1) 采集健康人的外周血, 进行 HLA 分型检测, 选取符合我们需要的分型, 进行 PBMC 的分离, 按照比例加入 CD3 磁珠孵育, 进行 CD3+T 细胞分选; 将 CD3/CD28 抗体偶联磁珠混匀, 按计算的量取出适量磁珠悬液加入到 T 细胞培养体系中, 激活 T 细胞, 过夜培养;

(2) 根据 B7H3 CAR 病毒的滴度感染 T 细胞;

(3) 同时敲除 TRAC 和 HLA-A 基因;

(4) CD3 阴性 T 细胞分选: 按照比例加入 CD3 磁珠, 收集 CD3-T 细胞 (磁珠未结合的细胞)。

用途、药物组合物与治疗方法

另一方面, 本申请提供前述的嵌合抗原受体, 前述的分离的核酸分子, 前述的载体, 前述的细胞, 或前述的免疫效应细胞在制备 CAR-T 细胞中的应用。

另一方面, 本申请提供一种药物组合物, 其包含前述的 B7H3 结合多肽, 前述的嵌合抗原受体, 前述的分离的核酸分子, 前述的载体, 前述的细胞, 和/或前述的免疫效应细胞, 以及任选地药学上可接受的载剂。

例如, 药物组合物可以包括: 缓冲液, 如中性缓冲盐水、磷酸盐缓冲盐水等; 糖类, 如葡萄糖、甘露糖、蔗糖或葡聚糖、甘露醇; 蛋白质; 多肽或如甘氨酸等氨基酸; 抗氧化剂; 螯合剂, 如 EDTA 或谷胱甘肽; 佐剂(例如, 氢氧化铝); 以及防腐剂。

例如, 所述药物组合物包括前述的免疫效应细胞以及任选地药学上可接受的载剂。

另一方面, 本申请提供前述的 B7H3 结合多肽, 前述的抗原嵌合受体, 前述的分离的核酸分子, 前述的载体, 前述的细胞, 前述的免疫效应细胞, 和/或前述的药物组合物, 其用于治疗与 B7H3 的表达相关的疾病或病症。

在某些实施方式中, 其中所述与 B7H3 的表达相关的疾病或病症包括与 B7H3 的表达上调相关的疾病或病症。

在某些实施方式中，其中所述与 B7H3 的表达相关的疾病或病症包括癌症。

在某些实施方式中，其中所述癌症包括肾上腺皮质癌，膀胱癌，乳腺癌，胆管癌，结直肠癌，淋巴瘤，食管癌，脑胶质瘤，头颈鳞癌，肾癌，肝癌，肺癌，卵巢癌，胰腺癌，前列腺癌，肉瘤，黑色素瘤，胃癌，胸腺癌或子宫内膜癌。

另一方面，本申请提供前述的 B7H3 结合多肽，前述的抗原嵌合受体，前述的分离的核酸分子，前述的载体，前述的细胞，前述的免疫效应细胞，和/或前述的药物组合物在制备药物中的用途，所述药物用于治疗与 B7H3 的表达相关的疾病或病症。

在某些实施方式中，其中所述与 B7H3 的表达相关的疾病或病症包括与 B7H3 的表达上调相关的疾病或病症。

在某些实施方式中，其中所述与 B7H3 的表达相关的疾病或病症包括癌症。

在某些实施方式中，其中所述癌症包括肾上腺皮质癌，膀胱癌，乳腺癌，胆管癌，结直肠癌，淋巴瘤，食管癌，脑胶质瘤，头颈鳞癌，肾癌，肝癌，肺癌，卵巢癌，胰腺癌，前列腺癌，肉瘤，黑色素瘤，胃癌，胸腺癌或子宫内膜癌。

另一方面，本申请提供一种预防或治疗与 B7H3 的表达相关的疾病或病症的方法，其包括向有需要的受试者施用有效量的前述的 B7H3 结合多肽，前述的抗原嵌合受体，前述的分离的核酸分子，前述的载体，前述的细胞，前述的免疫效应细胞，和/或前述的药物组合物。

在某些实施方式中，其中所述与 B7H3 的表达相关的疾病或病症包括与 B7H3 的表达上调相关的疾病或病症。

在某些实施方式中，其中所述与 B7H3 的表达相关的疾病或病症包括癌症。

在某些实施方式中，其中所述癌症包括肾上腺皮质癌，膀胱癌，乳腺癌，胆管癌，结直肠癌，淋巴瘤，食管癌，脑胶质瘤，头颈鳞癌，肾癌，肝癌，肺癌，卵巢癌，胰腺癌，前列腺癌，肉瘤，黑色素瘤，胃癌，胸腺癌或子宫内膜癌。

经修饰的免疫效应细胞

另一方面，本申请提供一种经修饰的免疫效应细胞，其中与未经所述修饰的相应细胞中相应基因的表达和/或活性相比，TRAC 基因和 HLA-A 基因的表达和/或活性被下调，B2M 基因的表达和/或活性未被下调，且 CIITA 基因的表达和/或活性未被下调；且所述经修饰的免疫效应细胞的 HLA-B 分型与受试者的 HLA-B 分型是匹配的。

在某些实施方式中，其中所述经修饰的免疫效应细胞为 HLA-B 杂合子且与受试者的 HLA-B 的两个等位基因均一致，或所述经修饰的免疫效应细胞为 HLA-B 纯合子且与受试者的 HLA-B 的其中一个等位基因一致。

在某些实施方式中，其中所述 HLA-B 纯合子包括 HLA-B*40 纯合子，HLA-B*15 纯合子，HLA-B*46 纯合子，HLA-B*13 纯合子，HLA-B*51 纯合子，HLA-B*58 纯合子，HLA-B*07 纯合子，HLA-B*35 纯合子，HLA-B*44 纯合子，HLA-B*52 纯合子，HLA-B*57 纯合子，HLA-B*54 纯合子，HLA-B*55 纯合子。

在某些实施方式中，其中所述修饰使得两种基因的表达和/或活性被下调，其中所述两种基因由 TRAC 基因和 HLA-A 基因组成。

在某些实施方式中，其中与相应的野生型细胞相比，TRAC 基因和 HLA-A 基因的表达和/或活性被下调，B2M 基因的表达和/或活性未被下调，且 CIITA 基因的表达和/或活性未被下调。

在某些实施方式中，其中与相应的野生型细胞相比，两种基因的表达和/或活性被下调，其中所述两种基因由 TRAC 基因和 HLA-A 基因组成。

在某些实施方式中，其中所述基因的表达水平和/或活性被下调包括使编码所述基因的核酸分子的表达和/或活性下调；和/或使所述基因编码的蛋白质产物的表达和/或活性被下调。

在某些实施方式中，其中所述修饰包括：基因突变和/或基因沉默。

在某些实施方式中，其中所述修饰包括向所述免疫效应细胞施用一种或多种选自下组的物质：反义 RNA、siRNA、shRNA 和 CRISPR/Cas9 系统。

在某些实施方式中，其中所述修饰包括向所述免疫效应细胞施用 CRISPR/Cas9 系统。

在某些实施方式中，其中所述修饰包括向所述免疫效应细胞施用靶向所述 HLA-A 基因外显子部分的 sgRNA。

在某些实施方式中，其中所述靶向所述 HLA-A 基因外显子部分的 sgRNA 包含 SEQ ID NO: 192 至 SEQ ID NO: 232 中任一项所示的核苷酸序列。

在某些实施方式中，其中所述修饰包括向所述免疫效应细胞施用靶向所述 HLA-B 基因外显子部分的 sgRNA。

在某些实施方式中，其中所述靶向所述 HLA-B 基因外显子部分的 sgRNA 包含 SEQ ID NO: 237 至 SEQ ID NO: 239 中任一项所示的核苷酸序列。

在某些实施方式中，其中所述修饰还包括向所述免疫效应细胞施用靶向所述 TRAC 基因外显子部分的 sgRNA。

在某些实施方式中，其中所述靶向所述 TRAC 基因外显子部分的 sgRNA 包含 SEQ ID NO: 177 至 SEQ ID NO: 191 中任一项所示的核苷酸序列。

在某些实施方式中，其中所述修饰还包括向所述细胞施用 Cas 酶。

在某些实施方式中，其中 Cas 酶包括 Cas9 蛋白。

在某些实施方式中，其中所述反义 RNA 包含 SEQ ID NO: 233 至 SEQ ID NO: 236 中任一项所示的核苷酸序列。

在某些实施方式中，所述的经修饰的免疫效应细胞表达 CAR。

在某些实施方式中，其中所述 CAR 包括抗原结合结构域、铰链区、跨膜域、胞内共刺激信号传导结构域和胞内信号转导结构域。

在某些实施方式中，其中所述抗原结合结构域特异性地结合肿瘤抗原。

在某些实施方式中，其中所述肿瘤抗原选自以下组：CD19，CD20，CD22，CD33，BCMA，IL13Ra2，EGFR，Her2，GD2 和 B7H3。

在某些实施方式中，其中所述抗原结合结构域选自以下组：单克隆抗体、多克隆抗体、二聚体、多聚体、多特异性抗体、完整抗体、抗体片段、人抗体、人源化抗体，嵌合抗体，Fv 片段，F(ab')₂，单链 Fv(scFv)和单域抗体(VHH)。

在某些实施方式中，所述跨膜域包含源自选自下组中的一种或多种蛋白的跨膜域：CD8A、CD8B、CD28、CD3 ϵ (CD3 ϵ)、4-1BB、CD4、CD27、CD7、PD-1、TRAC、TRBC、CD3 ζ 、CTLA-4、LAG-3、CD5、ICOS、OX40、NKG2D、2B4 (CD244)、Fc ϵ RI γ 、BTLA、CD30、GITR、HVEM、DAP10、CD2、NKG2C、LIGHT、DAP12、CD40L (CD154)、TIM1、CD226、DR3、CD45、CD80、CD86、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64 和 SLAM。

在某些实施方式中，所述胞内共刺激信号传导结构域包含源自选自下组中的一种或多种蛋白的胞内共刺激信号传导结构域：CD28、CD137、CD27、CD2、CD7、CD8A、CD8B、OX40、CD226、DR3、SLAM、CDS、ICAM-1、NKG2D、NKG2C、B7-H3、2B4、Fc ϵ RI γ 、BTLA、GITR、HVEM、DAP10、DAP12、CD30、CD40、CD40L、TIM1、PD-1、LFA-1、LIGHT、JAML、CD244、CD100、ICOS、CD40 和 MyD88。

在某些实施方式中，所述胞内信号转导结构域包含源自选自下组中的一种或多种蛋白的胞内信号转导结构域：CD3 ζ 、CD3 δ 、CD3 γ 、CD3 ϵ 、CD79a、CD79b、Fc ϵ RI γ 、Fc ϵ RI β 、Fc γ RIIa、牛白血病病毒 gp30、Epstein-Barr 病毒(EBV)LMP2A、猿免疫缺陷病毒 PBj14 Nef、DAP10、DAP-12 和至少包含一个 ITAM 的结构域。

在某些实施方式中，所述铰链区包含源自选自下组中的一种或多种蛋白的铰链区：CD28、IgG1、IgG4、IgD、4-1BB、CD4、CD27、CD7、CD8A、PD-1、ICOS、OX40、NKG2D、NKG2C、Fc ϵ RI γ 、BTLA、GITR、DAP10、TIM1、SLAM、CD30 和 LIGHT。

在某些实施方式中，所述 CAR 还包含信号肽片段，所述信号肽片段的 C 端与所述靶向

部分的 N 端连接。

在某些实施方式中，所述信号肽片段包括 CD8A 信号肽片段。

在某些实施方式中，其中所述免疫效应细胞包括人细胞。

在某些实施方式中，所述免疫效应细胞包括 T 细胞、B 细胞、天然杀伤细胞(NK 细胞)、巨噬细胞、NKT 细胞、单核细胞、树突状细胞、粒细胞、淋巴细胞、白细胞和/或外周血单个核细胞。

在某些实施方式中，所述免疫效应细胞包括非自体的免疫效应细胞。

另一方面，本申请提供一种制备前述的经修饰的免疫效应细胞的方法，其包括以下的步骤：

1) 选择与受试者 HLA-B 分型匹配的免疫效应细胞；

2) 与未经所述修饰的相应细胞中相应基因的表达和/或活性相比，下调所述免疫效应细胞中 TRAC 基因和 HLA-A 基因的表达和/或活性；不下调 B2M 基因的表达和/或活性，且不下调 CIITA 基因的表达和/或活性。

在某些实施方式中，其中所述经修饰的免疫效应细胞为 HLA-B 杂合子且与受试者的 HLA-B 的两个等位基因均一致，或所述经修饰的免疫效应细胞为 HLA-B 纯合子且与受试者的 HLA-B 的其中一个等位基因一致。

在某些实施方式中，其中所述 HLA-B 纯合子包括 HLA-B*40 纯合子，HLA-B*15 纯合子，HLA-B*46 纯合子，HLA-B*13 纯合子，HLA-B*51 纯合子，HLA-B*58 纯合子，HLA-B*07 纯合子，HLA-B*35 纯合子，HLA-B*44 纯合子，HLA-B*52 纯合子，HLA-B*57 纯合子，HLA-B*54 纯合子，HLA-B*55 纯合子。

在某些实施方式中，其中所述修饰使得两种基因的表达和/或活性被下调，其中所述两种基因由 TRAC 基因和 HLA-A 基因组成。

在某些实施方式中，其中所述修饰使得三种基因的表达和/或活性被下调，其中所述两种基因由 TRAC 基因，HLA-A 基因和 HLA-B 基因组成。

在某些实施方式中，与相应的野生型细胞相比，TRAC 基因和 HLA-A 基因的表达和/或活性被下调，B2M 基因的表达和/或活性未被下调，且 CIITA 基因的表达和/或活性未被下调。

在某些实施方式中，与相应的野生型细胞相比，两种基因的表达和/或活性被下调，其中所述两种基因由 TRAC 基因和 HLA-A 基因组成。

在某些实施方式中，其中所述下调基因的表达水平和/或活性包括使编码所述基因的核酸分子的表达和/或活性下调；和/或使所述基因编码的蛋白质产物的表达和/或活性被下调。

在某些实施方式中，其中所述修饰包括：基因突变和/或基因沉默。

在某些实施方式中，其中所述修饰包括向所述免疫效应细胞施用一种或多种选自下组的物质：反义 RNA、siRNA、shRNA 和 CRISPR/Cas9 系统。

在某些实施方式中，其中所述修饰包括向所述免疫效应细胞施用 CRISPR/Cas9 系统。

在某些实施方式中，其中所述修饰包括向所述免疫效应细胞施用靶向所述 HLA-A 基因外显子部分的 sgRNA。

在某些实施方式中，其中所述靶向所述 HLA-A 基因外显子部分的 sgRNA 包含 SEQ ID NO: 192 至 SEQ ID NO: 232 中任一项所示的核苷酸序列。

在某些实施方式中，其中所述修饰包括向所述免疫效应细胞施用靶向所述 HLA-B 基因外显子部分的 sgRNA。

在某些实施方式中，其中所述靶向所述 HLA-B 基因外显子部分的 sgRNA 包含 SEQ ID NO: 237 至 SEQ ID NO: 239 中任一项所示的核苷酸序列。

在某些实施方式中，其中所述修饰包括向所述免疫效应细胞施用靶向所述 TRAC 基因外显子部分的 sgRNA。

在某些实施方式中，其中所述靶向所述 TRAC 基因外显子部分的 sgRNA 包含 SEQ ID NO: 177 至 SEQ ID NO: 191 中任一项所示的核苷酸序列。

在某些实施方式中，其中所述修饰还包括向所述细胞施用 Cas 酶。

在某些实施方式中，其中 Cas 酶包括 Cas9 蛋白。

在某些实施方式中，其中所述反义 RNA 包含 SEQ ID NO: 233 至 SEQ ID NO: 236 中任一项所示的核苷酸序列。

在某些实施方式中，其中所述免疫效应细胞包括人细胞。

在某些实施方式中，所述免疫效应细胞包括 T 细胞、B 细胞、天然杀伤细胞(NK 细胞)、巨噬细胞、NKT 细胞、单核细胞、树突状细胞、粒细胞、淋巴细胞、白细胞和/或外周血单个核细胞。

在某些实施方式中，所述免疫效应细胞包括非自体的免疫效应细胞。

另一方面本申请提供一种组合物，其包括前述的经修饰的免疫效应细胞和药学上可接受的载剂。

另一方面本申请提供前述的经修饰的免疫效应细胞在制备 CAR-T 细胞中的应用。

另一方面本申请提供前述经修饰的免疫效应细胞在制备药物中的应用，所述药物用于异体治疗。

另一方面本申请提供前述经修饰的免疫效应细胞在制备药物中的应用，所述药物用于治疗肿瘤。

在某些实施方式中，其中所述肿瘤包括实体瘤和非实体瘤。

在某些实施方式中，其中所述肿瘤选自以下组：肝癌、胃癌、肺癌、乳腺癌、非小细胞肺癌、B 淋巴细胞瘤、霍奇金淋巴瘤、胶质瘤、慢性髓性白血病和急性髓样白血病。

不欲被任何理论所限，下文中的实施例仅仅是为了阐释本申请的 B7H3 结合多肽、制备方法和用途等，而不适用于限制本申请发明的范围。

实施例

实施例 1 抗 B7H3 嵌合抗原受体 (CAR) 的设计

如图 1 所示，抗 B7H3 CAR 结构包括：两个 B7H3 抗原结合区 (1G7 和 1A5)，一个 CD8A 胞外铰链区，一个 CD8A 跨膜区，一个 4-1BB 胞内共刺激域和一个 CD3 ζ 激活信号域。

B7H3 CAR 的序列如下：

B7H3 抗体可变区序列

1G7:

```
GCTGTCCAGCTTGTGGAGTCTGGGGGGGGCCTCGTCCAGACAGGCGGTTCTCTCCG
CCTCTCCTGTGCTGATTCTGGCAGAATCTTTTCAAACACTACGCAATGGGCTGGTTCAGGCA
GGCACCAGGCAAGGAGCGGGAGTTCGTGGCTGCTATCATTGGATCTACTGGCACCGTTA
ACTACGCAGACAGCATGAAAGGCAGATTTACCATCTCAAGAGATAACGCCAAAAATACT
GTAGTCCTCCAGATGAACTCTCTGAAGCCTGAGGATACCGCTATATATTATTGTGCGGCGT
CATTCAAGGTACAGCGGCATCTATGGCCGCGAAGCGGATTTTGTTAGTTGGGGACAAGGG
ACCCAAGTGACAGTGTCTTCA
```

hu1G7:

```
GCTGTTCAGCTGGTGGAGTCTGGTGGCGGGCTCGTTCAGCCGGGCGGCAGCCTCA
GACTGAGCTGTGCAGCCTCCGGAAGGATCTTTTCAAATTACGCAATGGGGTGGTTTAGG
CAGGCACCAGGAAAGGAGCGAGAGTTTGTGGCAGCAATAATCGGTTCTACCGGCACAG
TGTATTACGCTGATAGCGTGAAAGGCAGGTTCACCATTTCAAGGGATAACAGTAAAAAC
ACACTATACTTACAGATGAACTCCTTACGAGCCGAAGACACGGCGGTGTACTACTGTGC
CGCATCCTTTAGATACTCTGGAATTTACGGACGCGAGGCCGACTTTGTCAGCTGGGGTCA
GGGGACTCTTGTTACCGTATCCTCT
```

1A5:

CAGGCTCAACTGGTGGAGTCGGGAGGTGGCTTGGTGCAGACAGGAGGGAGCCTGC
GACTCTCCTGTGCGGCTTCCGGAAGGATTTTCTCTAATTATTCTGTCCGATGGTTCCGGC
AGGCCCCAGGCAAAGAGCGTGAATTCGTTGCGGCGATAATCTGGTCGACCGGAACAAC
GAATCTGGCCGATCCCATGAAGGGGAGATTCACCATTAGTAGAGACAACGCAAAAAAC
ACAGTAGTCCTGCAGATGAACAGCCTCAAACCCGAGGATACAGCTATCTATTACTGCGC
AGCTTCCTTTAAATATTCTGGCATATATGGCAGAGAAGCAGATTTTGGGAGTTGGGGGCA
GGGCACCCAGGTGACAGTCAGTTCT

hu1A5:

CAGGTCCAATTAGTGGAAGTGGTGGGGGATTAGTGCAACCGGGCGGCTCCCTCCG
CCTTTCCTGCGCCGCTTCTGGCAGAATCTTCTCCAATACTCCGTTGGATGGTTTCGTCA
GGCCCCAGGAAAAGAGAGAGAATTCGTGGCTGCTATCATATGGAGCACGGGGACCACC
TACTATGCCGATAGCGTCAAAGGCAGGTTCACTATCAGCAGGGATAATAGCAAGAATACA
CTATACTTGCAAATGAACTCGCTGCGAGCCGAAGACACAGCCGTCTACTACTGTGCGGC
GTCATTAAATACAGCGGCATTTACGGCCGAGAGGCAGATTTTCGGAAGTTGGGGGCAGG
GAACCTTGGTGACAGTCTCCTCG

B7H3 CAR 的非抗原结合序列 (DNA 和氨基酸序列)

DNA 序列:

TTCGTCCCCGTGTTCTGCTGCCAAGCCAACAATACTACCCCTGCTCCACGACCACC
TACTCCAGCACCTACCATCGCAAGTCAGCCCCTGTCACTGCGACCTGAGGCTTGCCGGC
CAGCAGCTGGAGGAGCAGTGCACACCCGAGGCCTGGACTTCGCATGCGATATCTACATT
TGGGCACCACTGGCTGGAACCTGTGGGGTCCTGCTGCTGAGCCTGGTCATCACCTGTA
TTGTAACCACAGAAATAAAAGGGGGCGCAAGAACTGCTGTACATCTTCAAGCAGCCTT
TTATGCGCCCAGTGCAGACAACTCAGGAGGAAGACGGATGCTCTTGTCGGTTCCCAGAG
GAGGAGGAAGGAGGCTGCGAGCTGAGAGTGAAGTTCAGCCGGAGCGCCGATGCACCA
GCATATCAGCAGGGACAGAATCAGCTGTACAACGAGCTGAATCTGGGCAGGCGCGAGG
AATATGACGTGCTGGATAAGCGACGAGGACGGGACCCCGAAATGGGAGGAAAACCCAG
AAGGAAGAACCCTCAGGAGGGGCTGTATAATGAACTGCAGAAAGACAAGATGGCTGAG
GCATACAGCGAAATTGGAATGAAAGGAGAGCGCCGACGGGGGAAGGGACACGATGGG
CTGTACCAGGGACTGTCAACCGCCACTAAAGATACCTACGACGCACTGCACATGCAGGC

TCTGCCCCCAAGA

氨基酸序列：

FVPVFLPAKPTTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAP
LAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGC
ELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGL
YNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

实施例 2 抗 B7H3 CAR 的慢病毒载体构建

根据 B7H3 序列信息及 CAR 载体结构，构建 B7H3 CAR 慢病毒表达载体，载体示意图见图 1。进行优化：选择商业化慢病毒表达载体 pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP 为骨架，在此载体基础上进行元件改造。首先，将载体的氨苄抗性基因 β -内酰胺酶替换为源自 Tn5 的氨基糖苷磷酸转移酶，使载体具有卡那霉素抗性。其次，我们删除了在体内应用中具有潜在威胁性的 CMV 启动子及其临近的下游多克隆位点。最后，将原载体中由 EF1 启动子启动表达的 copGFP 基因删除，保留 SalI 酶切位点，并在 SalI 5'端加入 SmaI 酶切位点供载体构建用，形成最终目的载体。加入的 SmaI 酶切位点是最终目的载体的单一酶切位点，载体的其他序列部分不具有该酶切位点。优化后构建嵌合抗原受体慢病毒表达载体，经 sanger 测序确证序列无误后，进行慢病毒包装。

实施例 3 靶向 B7H3 UCAR-T 细胞的制备

本申请提供一种安全性更高的 B7H3 UCAR-T 细胞，主要表现在两个策略：

第一供者来源筛查策略：首先供者来源基于人群中的 HLA-A 和/或 HLA-B 纯合子，患者 HLA-A 或 HLA-B 的其中一个等位基因和供者 HLA-A 或 HLA-B 纯合子一致即可，来源于这些供者的细胞能覆盖高数量的患者人群。降低 HLA-A 和/或 HLA-B 亚型不一致引起的排异反应。HLA-A 选择人群中频率较高的 A*02 纯合子，A*11 纯合子，A*02/A11 杂合子及 A*24 纯合子。HLA-B 主要选择人群中频率较高的 B*40 纯合子，B*15 纯合子，B*46 纯合子，B*13 纯合子，B*51 纯合子，B*58 纯合子，B*07 纯合子，B*35 纯合子，B*44 纯合子，B*52 纯合子，B*57 纯合子，B*54 纯合子，B*55 纯合子。

第二敲除策略：针对 TCR 和排异高度相关的 HLA-A 和/或 HLA-B 分子进行敲除，而保留了其他 HLA-I 类分子，既减少了异体细胞的排异，也避免了 HLA 分子完全敲除被 NK 细胞清除的发生，大大延长了同种异体 CAR-T 细胞在体内的半衰期。同时敲除 TCR 可以降低同种异体细胞治疗引起的 GVHD 反应。TCR 基因选择编码 TCR α 链的基因 TRAC，HLA-A

选择人群中频率较高的 A*02 纯合子, A*11 纯合子及 A*02/A11 杂合子, HLA-B 主要选择人群中频率较高的 B*40 纯合子, B*46 纯合子。

实施例 4 靶向 B7H3 CAR-T 细胞的制备方法

4-1. 制备 TRAC, HLA-A 双敲的 B7H3 特异性 UCAR-T 细胞

采集健康人的外周血, 进行 HLA 分型检测, 选取符合需要的分型。

PBMC 分离: 将采血管或采血袋中的血液转移到 50ml 的离心管中, 进行离心, 弃上层血浆, 下层血细胞层加入等体积 PBS 混匀, 然后吸取该混合液缓慢加入到装有淋巴细胞分离液的离心管中, DPBS: 血液: 淋巴细胞分离液=1: 1: 1, 离心后取白膜层, 用 PBS 离心洗涤, 稀释计数, 并留取 1×10^6 细胞放入 EP 管中进行流式检测。

PBMC 冻存: 根据实际情况确定是否冻存。**CD3+T 细胞分选:** 用一定量 buffer 重悬细胞, 混匀, 按 20ul CD3 磁珠/107 的细胞加 CD3 磁珠, 混合均匀后放 4 度冰箱孵育, 加入 buffer 洗涤细胞并且离心, 重悬细胞进行磁珠分离, 首先将 column 放在磁极上, 下面对应放离心管, 用 buffer 浸润 column (LS); 将细胞加到 column 上, 不要产生气泡, 用 buffer 清洗 column 3 次, 将 column 拿下后放在干净的 15ml 离心管中收集 CD3+ 的 T 细胞; 吸取 buffer 加到 column 上, 将 CD3 标记的细胞用活塞推洗脱下来, 取部分细胞进行细胞计数。

CD3/CD28 磁珠激活: 根据细胞计数结果按照 1×10^6 /ml 的密度进行重悬细胞, 并配制激活试剂, 加入全培养基 (含细胞因子 IL2、IL7、IL15) 中, 充分重悬细胞, 37°C、5%CO₂ 孵育。

转病毒: 磁珠激活后 24 小时, 根据 B7H3 病毒的 MOI 加入病毒 (即实施例 2 制备的慢病毒载体, B7H3 VHH1 为 1G7, B7H3 VHH2 为 1A5), 常温离心, 离心结束后放入 37°C、5%CO₂ 培养 24h。

基因敲除: 取样计数后收集细胞离心, 用 PBS 重悬细胞沉淀, 准备电转缓冲液: Nucleofector Solution: Supplement 按照 82:18 进行配置; 根据每个电转体系使用 1×10^7 的细胞进行分配 RNP 复合物 (Cas9:sgRNA=2:1), 进行电转, 电转 48 小时后收细胞, sanger 测序检测编辑效率, 同时收细胞 FACS 检测敲除效率。

其中 sgRNA 序列 TRAC sgRNA: AGAGTCTCTCAGCTGGTACA, A02 sgRNA: CTGACCATGAAGCCACCCTG, A11 sgRNA: GGCCCTCCTGCTCTATCCA。

CD3 阴性 T 细胞分选: 进行 CD3 阴性 T 细胞分选, 细胞计数后离心, 弃上清; 用 buffer 重悬细胞并混匀, 按 20ul CD3 磁珠/107 的细胞加 CD3 磁珠, 混合均匀后放 4 度冰箱孵育, 加 buffer 洗涤细胞离心后进行磁珠分离, 首先将 column 放在磁极上, 下面对应放离心管, 用

buffer 浸润 column (LD), 将细胞加到 column 上, 不要产生气泡, 用 buffer 清洗 column 2 次, 收集清洗下来的液体 (CD3-T) 于 15ml 离心管中, 取部分细胞进行细胞计数。细胞培养: 镜下观察细胞状态, 取细胞进行稀释计数, 补充全培养基维持细胞密度在 3×10^5 - 1×10^6 个/ml, 中间补/换液, 放入 37°C、5%CO₂ 培养。

细胞收获: 收集到细胞离心管中离心后弃上, 用生理盐水再次洗涤细胞, 离心, 配制冻存液, 冻存液重悬离心后的细胞, 用注射器吸取细胞悬液至冻制品用细胞冻存袋中, 在细胞冻存袋上贴好标签, 进行下一步冻存。

4-2. 制备 TRAC, HLA-B 双敲的 B7H3 特异性 UCAR-T 细胞

制备步骤与实施例 4-1 相似, 只需要将使用的 HLA-A 基因敲除用 sgRNA 更换为 HLA-B sgRNA, 具体为 HLA-B40 Sg6: 5-CATGTCCCGGCCCGGCCGCG-3; HLA-B40 Sg19: 5-CCGGACGGGCGCCTCCTCCG-3; HLA-B46 Sg14: 5-GTGAGCCTGCGGAACCTGCG-3。

4-3. 制备 TRAC, HLA-A/B 三敲的 B7H3 特异性 UCAR-T 细胞

制备步骤与实施例 4-1 相似, 只需要将使用的 HLA-A 基因敲除用 sgRNA 更换为 HLA-A sgRNA 与 HLA-B sgRNA 的等量混合物即可。

4-4. 制备 TRAC, HLA-A/B 三敲并表达膜结合 IL15 的 B7H3 特异性 UCAR-T 细胞

制备步骤与实施例 4-3 相似, 只需要将 T 细胞转染用的慢病毒更换为表达膜结合 IL15 的 B7H3 特异性 CAR 慢病毒载体。

4-5. 制备自体 B7H3 特异性 CAR-T 细胞

制备步骤与实施例 4-3 相似, 去除基因敲除与 CD3 阴性 T 细胞分选步骤。

4-6. 制备 TRAC, HLA-A 双敲的单表位 B7H3 UCAR-T 细胞(1G7)

制备步骤与实施例 4-1 相似, 区别在于, CAR 的结构从两个 B7H3 抗原结合区变为一个 B7H3 抗原结合区 1G7。

4-7. 制备 TRAC, HLA-A 双敲的单表位 B7H3 UCAR-T 细胞(1A5)

制备步骤与实施例 4-1 相似, 区别在于, CAR 的结构从两个 B7H3 抗原结合区变为一个 B7H3 抗原结合区 1A5。

实施例 5 靶向 B7H3 CAR-T 细胞体外细胞毒性分析

1. 制备不同类型 T 细胞如下:

A: TRAC, HLA-A 双敲的双表位 B7H3 UCAR-T 细胞, 如实施例 4-1 所述;

B: TRAC, HLA-B 双敲的双表位 B7H3 UCAR-T 细胞, 如实施例 4-2 所述;

- C: TRAC, HLA-A/B 三敲的双表位 B7H3 UCAR-T 细胞, 如实施例 4-3 所述;
- D: TRAC, HLA-A 双敲的单表位 B7H3 UCAR-T 细胞(1G7), 如实施例 4-6 所述;
- E: TRAC, HLA-A 双敲的单表位 B7H3 UCAR-T 细胞(1A5), 如实施例 4-7 所述;
- G: 双表位靶向 B7H3 CAR-T 细胞 (自体);
- H: 野生型 T 细胞。

2. B7H3 CAR-T 细胞对靶细胞的杀伤:

- 1) B7H3 靶细胞: B7-H3 高表达的 U251-LG 细胞系 (通过对 U251 细胞系进行改造使其表达 luciferase 和 GFP); 调整靶细胞状态至对数生长期, 在进行实验前需连续传代 2 次;
- 2) 制备 A-G 组 B7H3 CAR-T 细胞与对照 T 细胞, 流式检测敲除效率, 转染效率, CD3-T 分选效率及记忆 T 细胞的比例, 统计扩增倍数。

实验组	敲除效率(%)	转染效率(%)
A	97	54
B	98	50
C	98	54
D	98	82
E	96	73
G	-	60

- 3) 离心收集制备的几组细胞, 每组 6×10^6 的细胞;
- 4) 将效应细胞和靶细胞分别重悬于 1640+10%FBS 中, 并调整密度至 2×10^6 cell/ml。将靶细胞接种至 24 孔板中, 每孔 2×10^5 细胞, 随后按照不同 E/T (效靶比, 效应细胞: 靶细胞) 比例, 加入效应细胞, 并添加 1640+10%FBS 培养基, 将总体积不足 1ml 的培养孔补至 1ml。将孔板置于 5% CO₂、37°C 培养箱中, 培养 24 小时。E/T: 0.5:1, 1:1, 2:1, 5:1, 10:1; 重复三次。
- 5) 培养 24 小时, 将孔板从培养箱中取出, 收集 200ul 上清。然后通过检测 Luciferase 活性 (即 Luc 活性) 反映重组 CAR-T 细胞对靶细胞的裂解能力。
- 6) 靶细胞裂解百分数计算公式:

$$Lysis\% = (1 - \frac{Luc_{\text{活性混合样本}}}{Luc_{\text{活性对照样本}}}) \times 100\%$$

结果分析：TRAC，HLA-A 双敲的双表位靶向 B7H3 UCAR-T 以及双表位 B7H3 CAR-T 细胞对 U251 细胞有显著的杀伤作用（见图 2）。通过体外杀伤结果可以发现双表位的 UCAR-T 和 CAR-T 细胞具有更强的靶细胞杀伤能力。

3. 靶向 B7H3 CAR-T 细胞（自体与同种异体）与靶细胞共培养细胞因子分泌检测（见图 3）

收集上述共培养体系的上清，检测细胞因子分泌水平，实验结果如图 3 所示。

结果分析：B7H3 UCAR-T 与 B7H3 CAR-T 显著激活，大量分泌 IL-2 和 IFN- γ 细胞因子。相同效靶比时双表位的 UCAR-T 和 CAR-T 细胞的 IL-2、INF- γ 分泌高于其他各组测试细胞，说明相较单表位 UCAR-T，双表位更容易被激活，并且激活后具有更好的细胞活性。

实施例 6 靶向 B7H3 CAR-T 细胞体内抗肿瘤效果

8-10 周大的 NSG 小鼠静脉注射肿瘤细胞 U251-LG 2×10^6 ，小鼠分成 A-G 组，每组 5 只。肿瘤成功建立后第 7 天分别向小鼠瘤内注射 A-G 组细胞各 5×10^6 ，通过荧光素酶监测小鼠肿瘤消退情况。

结果分析（图 4）：荷瘤小鼠回输 TRAC、HLA-A 双敲的双表位 B7H3 UCAR-T 细胞或双表位 B7H3 CAR-T 细胞后，肿瘤生长速度明显减缓。双表位细胞的体内肿瘤抑制效果更明显，并且在实验后期未出现复发现象。

实施例 7 靶向 B7-H3 CAR-T 的安全性分析

我们筛选的 B7H3 抗体的亲和力相对 CN106279416B 专利中 B7-H3 抗体（Hbrca84d-2）的亲和力较弱，因此对两者的安全性进行分析。

1. 制备不同类型 T 细胞如下：

A：TRAC，HLA-A 双敲的双表位 B7H3 UCAR-T 细胞；

B：TRAC，HLA-A 双敲的单表位 B7H3 UCAR-T 细胞(1G7)；

C：TRAC，HLA-A 双敲的单表位 B7H3 UCAR-T 细胞(1A5)；

D：双表位 B7H3 CAR-T 细胞；

E：TRAC，HLA-A 双敲的 B7H3 UCAR-T 细胞（Hbrca84d-2）；

F：B7H3 CAR-T 细胞（Hbrca84d-2）；

G：野生 T 细胞。

其中，E 的制备步骤与实施例 4-1 相似，区别在于，CAR 的结构从两个 B7H3 抗原结合区变为一个 B7H3 抗原结合区 Hbrca84d-2。

F 的制备步骤与实施例 4-5 相似，区别在于，CAR 的结构从两个 B7H3 抗原结合区变为一个 B7H3 抗原结合区 Hbrca84d-2。

其中 Hbrca84d-2 的序列如下所述：

Hbrca84d-2 序列：

MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWV
RQAPGKGLEWVAYISSDSSAIYYADTVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCGR
GRENIYYGSRLDYWGQGTITVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQSPSFLSASVGDRVTIT
CKASQNVDNTNAWYQQKPGKAPKALIYSASYRYSYGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA
TYYCQQYNNYPFTFGQGTKLEIK

2. B7H3 CAR-T 细胞对弱表达 B7-H3 靶细胞的杀伤：

1) 选择 B7H3 弱表达靶细胞：K562 肿瘤细胞作为靶细胞；调整靶细胞状态至对数生长期，在进行实验前需连续传代 2 次；

2) 制备 A-G 组细胞。

3) 离心收集制备的几组细胞，每组 6×10^6 的细胞；

4) 将靶细胞重悬于 1640+10%FBS 中，每个靶点取 3 块 24 孔板，按照 2×10^5 /孔的量接种靶细胞。（靶细胞和效应细胞都是 2×10^6 /ml 的密度接种）。然后按照 E/T（效靶比，效应细胞：靶细胞）比例，加入效应细胞。每孔补液到最大体积（600ul）。对照接种同样数量的靶细胞，不加效应细胞（600ul）。将孔板置于 5% CO₂、37° C 培养箱中，培养 24 小时。E/T：0.5：1，1：1，2：1，5：1，10：1；铺板，重复三次。

5) 培养 24 小时，将孔板从培养箱中取出，收集 200ul 上清。然后通过检测 U251 活性反映重组 CAR-T 细胞对靶细胞的裂解能力。

6) 靶细胞裂解百分数计算公式：

$$Lysis\% = (1 - \frac{Luc_{\text{活性混合样本}}}{Luc_{\text{活性对照样本}}}) \times 100\%$$

结果分析：单表位或双表位的靶向 B7-H3 UCAR-T（A、B、C 组）及 CAR-T 组（D 组）对弱表达 B7-H3 的靶细胞杀伤作用均弱于 E、F 组，并且与野生 T 细胞对弱表达 B7-H3 的靶细胞的杀伤作用无显著差异（如图 5 所示）。说明本申请中相对低亲和力抗体的 CAR-T 细胞对人体正常组织无/低毒副作用，比高亲和力抗体的 CAR-T 细胞在体内具有更好的安全性。

实施例 8 靶向 B7H3 UCAR 细胞体内半衰期检测

准备人源化免疫系统小鼠(hHSC-NCG)3 只, 制备 A-D 组 B7H3 CAR-T 或 T 细胞, 注射 1×10^7 到人源化免疫小鼠体内, 不同的时间点采血, D0, 2h, D3, D7, D10, D14, D21, D28, D33, D42, D49, D56 提取不同时间点血样中基因组, 用 QPCR 绝对定量的方法计算 copy/ng genome DNA, 阳性对照用第 14 天收获的 UCAR-T 细胞, 阴性对照用 DEPC 水。

其中实施例 8 中 A-D 制备不同类型 T 细胞如下:

A: TRAC, HLA-A 双敲的双表位靶向 B7H3 UCAR-T 细胞, 如实施例 4-1 所述;

B: TRAC, HLA-A/B 三敲的双表位靶向 B7H3 UCAR-T 细胞, 如实施例 4-3 所述;

C: TRAC, B2M 双敲的双表位靶向 B7H3 UCAR-T 细胞野生 T 细胞, 与实施例 4-5 所述类似, 不同点在于进一步敲除了 TRAC 和 B2M;

D: 双表位靶向 B7H3 UCAR-T 细胞野生 T 细胞, 如实施例 4-5 所述。

结果分析: A 组和 B 组的 UCAR-T 出现了最多的体内扩增, 并且在 D56 时仍可以在小鼠体内检测出存续, 体内存续时间、存续数量优于其余两组 (见图 6)。

实施例 9 通用型 T 细胞的体外安全性验证

1) GVHD 反应: 制备 TRAC, HLA-A 双敲 T 细胞、TRAC、HLA-B 双敲 T 细胞和 TRAC、HLA-A/B 三敲 T 细胞, 以及无基因敲除的 T 细胞, 使用辐照同种异体 PBMC 分别刺激制备的各组细胞, 检测 IFN- γ 的水平。

结果分析: TRAC, HLA-A 双敲 T 细胞组, TRAC、HLA-B 双敲 T 细胞和 TRAC、HLA-A/B 三敲 T 细胞组 IFN- γ 分泌水平很低, 表明 TRAC 敲除降低了 GVHD 反应。

2) 同种异体反应: 同种异体 PBMC 刺激辐照后的 4 组细胞, 检测 IFN- γ 的水平。

结果分析: TRAC、HLA-A 双敲 T 细胞组, TRAC、HLA-B 双敲 T 细胞组和 TRAC、HLA-A/B 三敲 T 细胞组 IFN- γ 分泌水平很低, 表明 HLA-A 的敲除降低了同种异体反应。

实施例 10 通用型 T 细胞的体内安全性验证

1) GVHD 反应: 制备 TRAC, HLA-A 双敲双表位 B7H3 CAR-T 细胞 (TRAC-/HLA-A-组), TRAC、HLA-B 双敲双表位 B7H3 CAR-T 细胞 (TRAC-/HLA-B-组) 和 TRAC、HLA-A/B 三敲双表位 B7H3 CAR-T 细胞 (TRAC, HLA-A-/HLA-B-组)。取 8-10 周 NSG 小鼠分别注射 1×10^7 , 通过临床指标: 存活率, 皮毛纹理和皮肤完整性等, 观察移植物抗宿主反应。细胞因子检测: 取外周血血清, 检测 IL-2、TNF- α 、IFN- γ 等细胞因子的水平。取血时间点: 回输前, D1, D3, D7, D14, D21, D28, D35, D42, D49, D56, D63。脏器病变检测: 观察期结束时 (2

个月左右), 取小鼠的脾脏, 肝脏, 皮肤、胃肠道, 肺, 肾脏进行 HE 切片染色分析。

结果分析: 不同的基因敲除策略均能有效的降低 GVHD 风险, 进行回输后, 短时间出现细胞因子大量分泌, 随后各组细胞因子均维持在较低水平 (见图 7 至图 9), 同时小鼠笼旁观察未出现异常。

根据生存率分析 (如图 10), 回输后 60 天 TRAC-/HLA-A-组、TRAC-/HLA-B-组和 TRAC-/HLA-A-/HLA-B-组生存率分别为 80%、60%和 60%, 说明 TRAC-/HLA-A-组能够更好的提高小鼠的生存率, 进一步降低 GVHD 风险。

2) 同种异体反应: 制备 TRAC, HLA-A 双敲双表位 B7H3 CAR-T 细胞, TRAC、HLA-A/B 三敲双表位 B7H3 CAR-T 细胞, TRAC、B2M 双敲双表位 B7H3 CAR-T 细胞和 TRAC 单敲的双表位 B7H3 CAR-T 细胞四组细胞, 分别注射 1×10^7 到 huHSC-NCG-hIL15 小鼠体内。使用的 huHSC-NCG-hIL5 小鼠模型, 通过回输人源造血干细胞达到重建人源免疫系统的目的, 该模型可以有效的重建人源的 T、B、NK 细胞。对照组: 注射 PBS 缓冲液到 NSG 小鼠体内。

不同时间点取血测 CAR 拷贝数。比较 CAR 的拷贝数变化。时间点: 回输 2h, D2, D4, D8, D15, D22, D31。细胞因子检测: 取外周血血清, 检测 IL6 等细胞因子的水平。时间点: 回输 2h, D2, D4, D8, D13, D17, D22, D29, D36。

结论: 根据 IL-6 的检测结果 (如图 11), TRAC-/HLA-A-的 UCAR-T 细胞的分泌量少于其余各组, 可以有效减少细胞因子风暴的风险。通过拷贝数检测, TRAC-/HLA-A-的 UCAR-T 细胞在小鼠体内存在明显的扩增情况, 并且存续的拷贝数高于其他各组。(见图 12)

实施例 11 基因编辑的安全性分析

制备 TRAC, HLA-A 双敲 T 细胞, 无基因敲除的 T 细胞, 检测敲除效率后, 进行以下分析:

1) 脱靶: 脱靶: **On-target and off-target: (GUIDE-seq):** 对照组: 转 CAS9+ODN 标签; 实验组: 转 CAS9+sgRNA(TRAC+HLA-A)+ODN 标签。D14 分别提取两组细胞 DNA, 送苏州金维智生物科技有限公司检测。

结果分析: 实验组脱靶率很低, 而且脱靶主要集中在基因之间和内含子上, 对基因功能的影响不大 (见图 13)。

2) 染色体易位: 采用 qPCR 方法对同时编辑 TRAC 和 HLA 基因座时可能发生重排进行了定量。两个易位被标记为 TRAC:HLA, HLA:TRAC。合成的模板质粒中的阳性参考样品作为检测对照进行评估。以 HLA 基因组靶区两侧的扩增片段作为内对照。提取基因组 DNA

进行实时定量 PCR，根据标准曲线和 Cq 值计算基因组 DNA 的基因拷贝数。

结果分析：基因座没有发生重排（见图 14）。两种易位方式检测值都接近零检值。

3) 核型分型：分别取铺满度在 70-80% 的无基因敲除的 T 细胞（对照组）、TRAC，HLA-A 双敲的 T 细胞（实验组）各 1×10^6 装于 2 个 T25 瓶中，加满培养液，盖上全密封盖子，缠上封口膜，寄送至浙江如耀生物科技有限公司检测。

结果分析：和对照组比，实验组核型正常（见图 15）。

4) Cas9 蛋白残留：细胞制备时，取敲除前、敲除后以及收获前三个时间点的细胞各 1×10^6 进行裂解，随后用蛋白定量试剂盒（NOVATEINBIO，货号 NB-E1372PR）进行定量，将各组样品调整至相同上样量 $2 \mu\text{g}$ ，根据说明书用 CRISPR/Cas9 蛋白 ELISA 试剂盒进行检测。样品中的 Cas9 蛋白被牢固稳定地点在试纸孔上。然后使用检测抗体识别被绑定的 Cas9 蛋白，然后显影剂进行显影。Cas9 比值与吸光度成正比，通过与 Cas9 对照品比较来定量 Cas9 蛋白的绝对量。

结果分析：双敲 T 细胞(TRAC+HLA-A)分别在电转前 (D3)、电转后换液前(D5)、D9、D14(收获)四个时间点检测 spCas9 的残留，除了电转后换液前(D5)检测到微量残留，其余三个时间点均未检出（见图 16）。

权利要求书

1. 分离的 B7H3 结合多肽，其包含靶向 B7H3 的第一重链抗体重链可变区（VHH-1）和第二重链抗体重链可变区（VHH-2），其中所述 VHH-1 包含如 SEQ ID NO: 1 所示的 HCDR1，如 SEQ ID NO: 3 所示的 HCDR2，如 SEQ ID NO: 5 所示的 HCDR3；和/或所述 VHH-2 包含如 SEQ ID NO: 2 所示的 HCDR1，如 SEQ ID NO: 4 所示的 HCDR2，如 SEQ ID NO: 6 所示的 HCDR3。
2. 根据权利要求 1 所述的 B7H3 结合多肽，其中所述 VHH-1 和/或 VHH-2 包括人抗体、人源化抗体或嵌合抗体。
3. 根据权利要求 1-2 中任一项所述的 B7H3 结合多肽，其中所述 VHH-1 与 VHH-2 直接连接或者通过接头（linker）连接。
4. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的 B7H3 结合多肽，自 N 端至 C 端，其中所述 B7H3 结合多肽依次包含：i) VHH-1-linker-VHH-2；或 ii) VHH-2-linker-VHH-1。
5. 根据权利要求 1-4 中任一项所述的 B7H3 结合多肽，其中所述接头包含 SEQ ID NO: 22 所示的氨基酸序列。
6. 根据权利要求 1-4 中任一项所述的 B7H3 结合多肽，其中所述 VHH-1 包含：
 - i) 包含 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列的 HFR1，包含 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列的 HFR2，包含 SEQ ID NO: 13 所示的氨基酸序列的 HFR3，包含 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列的 HFR4；或
 - ii) 包含 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列的 HFR1，包含 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列的 HFR2，包含 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列的 HFR3，包含 SEQ ID NO: 17 所示的氨基酸序列的 HFR4；
7. 根据权利要求 1-6 中任一项所述的 B7H3 结合多肽，其中所述 VHH-1 包含如 SEQ ID NO: 18 或 SEQ ID NO: 19 所示的氨基酸序列。
8. 根据权利要求 1-7 中任一项所述的 B7H3 结合多肽，其中所述 VHH-2 包含
 - i) 包含 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列的 HFR1，包含 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列的 HFR2，包含 SEQ ID NO: 15 所示的氨基酸序列的 HFR3，包含 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列的 HFR4；或
 - ii) 包含 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列的 HFR1，包含 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列的 HFR2，包含 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列的 HFR3，包含 SEQ ID NO: 17 所示的氨基酸序列的 HFR4。
9. 根据权利要求 1-8 中任一项所述的 B7H3 结合多肽，其中所述 VHH-2 包含如 SEQ ID NO:

- 20 或 SEQ ID NO: 21 所示的氨基酸序列。
10. 根据权利要求 1-9 中任一项所述的 B7H3 结合多肽，其包含 SEQ ID NO: 23，SEQ ID NO: 24，SEQ ID NO: 26 和 SEQ ID NO: 25 中任一项所示的氨基酸序列。
 11. 免疫缀合物，其包含权利要求 1-10 中任一项所述 B7H3 结合多肽。
 12. 嵌合抗原受体，其包含靶向 B7H3 的胞外抗原结合结构域，跨膜域，胞内共刺激信号传导结构域和胞内信号转导结构域，其中所述胞外抗原结合结构域包括至少两个结合 B7H3 不同表位的 VHH。
 13. 根据权利要求 12 所述的嵌合抗原受体，其中所述胞外抗原结合结构域包含两个结合 B7H3 不同表位的 VHH。
 14. 嵌合抗原受体，其包含靶向 B7H3 的胞外抗原结合结构域，跨膜域，胞内共刺激信号传导结构域和胞内信号转导结构域，其中所述胞外抗原结合结构域包含权利要求 1-10 中任一项所述的 B7H3 结合多肽。
 15. 根据权利要求 12-14 中任一项所述的嵌合抗原受体，其中所述跨膜域包含源自选自下组中的一种或多种蛋白的跨膜域：CD8A、CD8B、CD28、CD3 ϵ (CD3e)、4-1BB、CD4、CD27、CD7、PD-1、TRAC、TRBC、CD3 ζ 、CTLA-4、LAG-3、CD5、ICOS、OX40、NKG2D、2B4 (CD244)、Fc ϵ RI γ 、BTLA、CD30、GITR、HVEM、DAP10、CD2、NKG2C、LIGHT、DAP12、CD40L (CD154)、TIM1、CD226、DR3、CD45、CD80、CD86、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64 和 SLAM。
 16. 根据权利要求 15 所述的嵌合抗原受体，其中所述跨膜域包含源自 CD8A 的跨膜域。
 17. 根据权利要求 12-16 中任一项所述的嵌合抗原受体，其中所述跨膜域包含 SEQ ID NO: 62 至 SEQ ID NO: 110 中任一项所示的氨基酸序列。
 18. 根据权利要求 12-17 中任一项所述的嵌合抗原受体，其中所述跨膜域包含 SEQ ID NO: 62 所示的氨基酸序列。
 19. 根据权利要求 12-18 中任一项所述的嵌合抗原受体，其中所述胞内共刺激信号传导结构域包含源自选自下组中的一种或多种蛋白的胞内共刺激信号传导结构域：CD28、CD137、CD27、CD2、CD7、CD8A、CD8B、OX40、CD226、DR3、SLAM、CDS、ICAM-1、NKG2D、NKG2C、B7-H3、2B4、Fc ϵ RI γ 、BTLA、GITR、HVEM、DAP10、DAP12、CD30、CD40、CD40L、TIM1、PD-1、LFA-1、LIGHT、JAML、CD244、CD100、ICOS、CD40 和 MyD88。

20. 根据权利要求 19 所述的嵌合抗原受体, 其中所述胞内共刺激信号传导结构域源自 4-1BB 的共刺激信号传导结构域。
21. 根据权利要求 12-20 中任一项所述的嵌合抗原受体, 其中所述胞内共刺激信号传导结构域包含 SEQ ID NO: 111 至 SEQ ID NO: 143 中任一项所示的氨基酸序列。
22. 权利要求 12-21 中任一项所述的嵌合抗原受体, 其中所述胞内共刺激信号传导结构域包含 SEQ ID NO: 112 所示的氨基酸序列。
23. 根据权利要求 12-22 中任一项所述的嵌合抗原受体, 其中所述胞内信号转导结构域包含源自选自下组中的一种或多种蛋白的胞内信号转导结构域: CD3 ζ 、CD3 δ 、CD3 γ 、CD3 ϵ 、CD79a、CD79b、Fc ϵ RI γ 、Fc ϵ RI β 、Fc γ RIIa、牛白血病病毒 gp30、Epstein-Barr 病毒(EBV)LMP2A、猿免疫缺陷病毒 PBj14 Nef、DAP10、DAP-12 和至少包含一个 ITAM 的结构域。
24. 根据权利要求 12-23 所述的嵌合抗原受体, 其中所述胞内信号转导结构域包含源自 CD3 ζ 的信号传导结构域。
25. 根据权利要求 12-23 中任一项所述的嵌合抗原受体, 其中所述胞内信号转导结构域包含 SEQ ID NO: 127、SEQ ID NO: 131、SEQ ID NO: 132、SEQ ID NO: 144 至 SEQ ID NO: 154 中任一项所示的氨基酸序列。
26. 根据权利要求 12-25 中任一项所述的嵌合抗原受体, 其中所述胞内信号转导结构域包含 SEQ ID NO: 144 所示的氨基酸序列。
27. 根据权利要求 12-26 中任一项所述的嵌合抗原受体, 其在胞外抗原结合结构域和跨膜域之间包括铰链区, 所述铰链区包含源自选自下组中的一种或多种蛋白的铰链区: CD28、IgG1、IgG4、IgD、4-1BB、CD4、CD27、CD7、CD8A、PD-1、ICOS、OX40、NKG2D、NKG2C、Fc ϵ RI γ 、BTLA、GITR、DAP10、TIM1、SLAM、CD30 和 LIGHT。
28. 根据权利要求 12-27 中任一项所述的嵌合抗原受体, 所述铰链区包含源自 CD8A 的铰链区。
29. 根据权利要求 12-28 中任一项所述的嵌合抗原受体, 所述铰链区包含 SEQ ID NO: 155 至 SEQ ID NO: 176 中任一项所示的氨基酸序列。
30. 根据权利要求 12-29 中任一项所述的嵌合抗原受体, 所述铰链区包含 SEQ ID NO: 163 所示的氨基酸序列。
31. 根据权利要求 12-30 中任一项所述的嵌合抗原受体, 所述嵌合抗原受体的非靶向部分包含 CD8A 的铰链区、CD8A 分子跨膜域、4-1BB 的胞内共刺激信号传导结构域和 CD3 ζ 胞内

信号传导结构域。

32. 根据权利要求 12-31 中任一项所述的嵌合抗原受体，所述嵌合抗原受体的非靶向部分包含 SEQ ID NO: 27 所示的氨基酸序列。
33. 根据权利要求 12-32 中任一项所述的嵌合抗原受体，其还包含信号肽片段，所述信号肽片段的 C 端与所述胞外抗原结合结构域的 N 端连接。
34. 根据权利要求 12-33 中任一项所述的嵌合抗原受体，自 N 端至 C 端，其依次包含信号肽片段、胞外抗原结合结构域，跨膜域，胞内共刺激信号传导结构域和胞内信号转导结构域。
35. 根据权利要求 33-34 中任一项所述的嵌合抗原受体，所述信号肽片段包括 CD8A 信号肽片段。
36. 根据权利要求 33-35 中任一项所述的嵌合抗原受体，所述信号肽片段包含如 SEQ ID NO: 28 所示的氨基酸序列。
37. 根据权利要求 12-36 中任一项所述的嵌合抗原受体，其包含 SEQ ID NO: 33 至 SEQ ID NO: 36 中任一项所示的氨基酸序列。
38. 一种或多种分离的多肽，其包含 12-37 中任一项所述的嵌合抗原受体和能够增强免疫效应细胞的一种或多种活性的增强子。
39. 根据权利要求 38 所述的多肽，其中所述增强子包括细胞因子和/或细胞因子受体。
40. 根据权利要求 38-39 中任一项所述的多肽，其中所述增强子是膜嵌合的细胞因子和/或细胞因子受体。
41. 根据权利要求 38-40 中任一项所述的多肽，其中所述增强子选自 IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-11, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-21, IL-23, 其受体，其功能变体及它们的组合。
42. 根据权利要求 38-41 中任一项所述的多肽，其中所述增强子包括 IL-15 或其功能变体，或包含 IL-15 受体(IL-15R)的嵌合细胞因子受体。
43. 根据权利要求 38-42 中任一项所述的多肽，其中所述增强子包括膜嵌合的 IL-15 (mIL-15)。
44. 根据权利要求 38-43 中任一项所述的多肽，其中所述增强子包含 SEQ ID NO: 46 或 SEQ ID NO: 54 所示的氨基酸序列。
45. 根据权利要求 38-44 中任一项所述的多肽，其包含 i) SEQ ID NO: 33 至 SEQ ID NO: 36 中任一项所示的氨基酸序列；和 ii) SEQ ID NO: 46 或 SEQ ID NO: 54 所示的氨基酸序列。

46. 根据权利要求 38-45 中任一项所述的多肽，其中所述嵌合抗原受体和所述增强子分别位于不同的多肽中。
47. 根据权利要求 38-45 中任一项所述的多肽，其中所述嵌合抗原受体和所述增强子位于同一多肽中。
48. 根据权利要求 47 所述的多肽，其中所述嵌合抗原受体和所述增强子可以直接连接或间接连接。
49. 根据权利要求 47-48 中任一项所述的多肽，其中所述嵌合抗原受体和所述增强子通过接头连接。
50. 根据权利要求 47-50 中任一项所述的多肽，自 N 端至 C 端，所述多肽包含如下结构：i) 嵌合抗原受体，接头和增强子；或 ii) 增强子，接头和嵌合抗原受体。
51. 根据权利要求 49-51 中任一项所述的多肽，其中所述接头包括自切割肽。
52. 根据权利要求 51 所述的多肽，其中所述自切割肽包括 P2A，F2A，E2A 或 T2A。
53. 根据权利要求 51 所述的多肽，其中所述 T2A 包含 SEQ ID NO: 44 所示的氨基酸序列。
54. 根据权利要求 38-53 所述的多肽，其包含 SEQ ID NO: 241 或 SEQ ID NO: 243 所示的氨基酸序列。
55. 一种或多种分离的核酸分子，其编码权利要求 1-10 中任一项所述的 B7H3 结合多肽，权利要求 12-37 中任一项所述的嵌合抗原受体，或权利要求 38-54 中任一项所述的多肽。
56. 一种或多种分离的核酸分子，其包含编码权利要求 12-37 中任一项所述的嵌合抗原受体的第一核苷酸序列，和编码能够增强免疫效应细胞的一种或多种活性的增强子的第二核苷酸序列。
57. 根据权利要求 56 所述的核酸分子，其中所述增强子包括细胞因子和/或细胞因子受体。
58. 根据权利要求 56-57 中任一项所述的核酸分子，其中所述增强子是膜嵌合的细胞因子和/或细胞因子受体。
59. 根据权利要求 56-58 中任一项所述的核酸分子，其中所述增强子选自 IL-2，IL-3，IL-4，IL-6，IL-7，IL-8，IL-10，IL-11，IL-12，IL-15，IL-17，IL-18，IL-21，IL-23，其受体，其功能变体及它们的组合。
60. 根据权利要求 56-59 中任一项所述的核酸分子，其中所述增强子包括 IL-15 或其功能变体，或包含 IL-15 受体(IL-15R)的嵌合细胞因子受体。
61. 根据权利要求 56-60 中任一项所述的核酸分子，其中所述增强子包括膜嵌合的 IL-15 (mIL-15)。

62. 根据权利要求 56-61 中任一项所述的核酸分子，其中所述增强子包含 SEQ ID NO: 46 或 SEQ ID NO: 54 所示的氨基酸序列。
63. 根据权利要求 56-62 中任一项所述的核酸分子，其包含 i) 编码 SEQ ID NO: 33 至 SEQ ID NO: 36 中任一项所示的氨基酸序列的核苷酸序列；和 ii) SEQ ID NO: 47 或 SEQ ID NO: 55 所示的氨基酸序列。
64. 根据权利要求 56-63 中任一项所述的核酸分子，其中所述第一核苷酸序列与所述第二核苷酸序列位于不同的核酸分子中。
65. 根据权利要求 56-63 中任一项所述的核酸分子，其中所述第一核苷酸序列与所述第二核苷酸序列位于同一核酸分子中。
66. 根据权利要求 65 所述的核酸分子，其中所述第一核苷酸序列与所述第二核苷酸序列直接连接或间接连接。
67. 根据权利要求 65-66 中任一项所述的核酸分子，其中所述第一核苷酸序列与所述第二核苷酸序列通过间隔序列连接。
68. 根据权利要求 67 所述的核酸分子，其中所述间隔序列包括内部核糖体进入位点(IRES)或所述间隔序列编码自切割多肽。
69. 根据权利要求 68 所述的核酸分子，其中所述间隔序列编码病毒自切割多肽。
70. 根据权利要求 69 所述的核酸分子，其中所述间隔序列编码病毒自切割 2A 多肽 (2A)。
71. 根据权利要求 70 所述的核酸分子，其中病毒自切割 2A 多肽包括口蹄疫病毒 (FMDV)(F2A)肽、马 A 型鼻炎病毒(ERAV)(E2A)肽、明脉扁刺蛾 β 四体病毒 (Thoseaassigna virus)(TaV)(T2A)肽、猪捷申病毒-1(PTV-1)(P2A)肽、泰勒病毒 2A 肽或脑心肌炎病毒 2A 肽。
72. 根据权利要求 67-71 中任一项所述的核酸分子，其中间隔序列包含编码 T2A 的核苷酸序列。
73. 根据权利要求 67-72 中任一项所述的核酸分子，其中间隔序列包含 SEQ ID NO: 43 所示的核苷酸序列。
74. 根据权利要求 68-73 中任一项所述的核酸分子，其中所述 IRES 选自以下的至少一种：脊髓灰质炎 IRES，鼻病毒 IRES，脑心肌炎病毒 IRES(EMCV-IRES)，小核糖核酸病毒 IRES，口蹄疫病毒 IRES(FMDV-IRES)，口咽病毒 IRES，卡波西氏肉瘤相关疱疹病毒 IRES(KSHV-IRES)，甲型肝炎 IRES，丙型肝炎 IRES，经典猪瘟病毒 IRES，瘟病毒 IRES，牛病毒性腹泻病毒 IRES，弗云德鼠白血病 IRES，莫洛尼鼠白血病 IRES(MMLV-

IRES), 劳斯肉瘤病毒 IRES, 人类免疫缺陷病毒 IRES(HIV-IRES), 小珀椿象肠病毒 IRES, 双顺反子病毒 IRES, 蟋蟀麻痹病毒 IRES, 锥蝻病毒 IRES, 禾谷缢管蚜病毒 IRES, 马立克氏病病毒 IRES, 成纤维细胞生长因子(FGF-1 IRES 和 FGF-2 IRES), 血小板衍生生长因子 B(PDGF/c-sis IRES), 血管内皮生长因子(VEGF IRES)和胰岛素样生长因子 2(IGF-II IRES)。

75. 根据权利要求 56-74 中任一项所述的核酸分子, 自 5'端至 3'端, 所述核酸分子依次包含: i) 第一核苷酸序列, 间隔序列和第二核苷酸序列; 或 ii) 第二核苷酸序列, 间隔序列和第一核苷酸序列。
76. 根据权利要求 56-75 中任一项所述的核酸分子, 自 5'端至 3'端, 所述核酸分子依次包含: 编码权利要求 12-37 中任一项所述 CAR 的核苷酸序列, 间隔序列和编码增强子的核苷酸序列。
77. 根据权利要求 56-76 所述的分离的核酸分子, 其包含 SEQ ID NO: 240 或 SEQ ID NO: 242 所示的核苷酸序列。
78. 载体, 其包含权利要求 55-77 中任一项所述的分离的核酸分子。
79. 根据权利要求 78 所述的载体, 其中所述载体是表达载体。
80. 根据权利要求 78-79 中任一项所述的载体, 其中所述载体选自 DNA 载体、RNA 载体、质粒、慢病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体和逆转录病毒载体。
81. 细胞, 其包含权利要求 55-77 中任一项所述的分离的核酸分子或权利要求 78-80 中任一项所述的载体; 和/或表达权利要求 1-10 中任一项所述的 B7H3 结合多肽, 权利要求 12-37 中任一项所述的嵌合抗原受体或权利要求 38-54 中任一项所述的多肽。
82. 免疫效应细胞, 其包含权利要求 55-77 中任一项所述的分离的核酸分子或权利要求 78-80 中任一项所述的载体; 和/或表达权利要求 1-10 中任一项所述的 B7H3 结合多肽, 权利要求 12-37 中任一项所述的嵌合抗原受体或权利要求 38-54 中任一项所述的多肽。
83. 免疫效应细胞, 其包含靶向 B7H3 的嵌合抗原受体和膜嵌合的 IL15 分子 (mIL15)。
84. 根据权利要求 83 所述的免疫效应细胞, 其中所述嵌合抗原受体的胞外抗原结合结构域包括至少两个结合 B7H3 不同表位的 VHH。
85. 根据权利要求 83-84 中任一项所述的免疫效应细胞, 其中所述胞外抗原结合结构域包含两个结合 B7H3 不同表位的 VHH。
86. 根据权利要求 83-85 中任一项所述的免疫效应细胞, 其中所述 mIL15 包含如 SEQ ID NO: 46 或 SEQ ID NO: 54 中任一项所述的氨基酸序列。

87. 根据权利要求 83-86 中任一项所述的免疫效应细胞，其包含权利要求 12-37 中任一项所述的嵌合抗原受体。
88. 根据权利要求 83-87 中任一项所述的免疫效应细胞，其所述嵌合抗原受体包含 SEQ ID NO: 29 至 SEQ ID NO: 36 中任一项所示的氨基酸序列。
89. 根据权利要求 82-88 所述的免疫效应细胞，所述的免疫效应细胞包括人细胞。
90. 根据权利要求 82-89 中任一项所述的免疫效应细胞，所述免疫效应细胞包括 T 细胞、B 细胞、天然杀伤细胞(NK 细胞)、巨噬细胞、NKT 细胞、单核细胞、树突状细胞、粒细胞、淋巴细胞、白细胞和/或外周血单个核细胞。
91. 根据权利要求 82-90 中任一项所述的免疫效应细胞，所述免疫效应细胞包括自体或非自体的免疫效应细胞。
92. 根据权利要求 82-91 中任一项所述的免疫效应细胞，所述的免疫效应细胞包括经修饰的免疫效应细胞。
93. 根据权利要求 92 所述的免疫效应细胞，其中所述经修饰的免疫效应细胞包括降低同种异体细胞治疗引起的免疫排斥反应的细胞。
94. 根据权利要求 92-93 中任一项所述的免疫效应细胞，其中所述经修饰的免疫效应细胞中的 T 细胞抗原受体(TCR)和主要组织相容性复合体(MHCI, MHCII)在 T 细胞中的功能受到抑制。
95. 根据权利要求 92-94 中任一项所述的免疫效应细胞，其中所述修饰包括与免疫排斥相关基因中的一个或多个的表达和/或活性被下调。
96. 根据权利要求 95 所述的免疫效应细胞，其中所述与免疫排斥相关基因选自下组中的一种或多种基因：TRAC、TRBC、HLA-A、HLA-B、B2M 和 CIITA。
97. 根据权利要求 92-96 中任一项所述的免疫效应细胞，所述经修饰的免疫效应细胞与未经修饰的相应细胞相比，TRAC 基因和 HLA-A 基因的表达和/或活性被下调。
98. 根据权利要求 92-97 中任一项所述的免疫效应细胞，所述经修饰的免疫效应细胞与未经修饰的相应细胞相比，TRAC 基因，HLA-A 基因和 HLA-B 基因的表达和/或活性被下调。
99. 根据权利要求 92-98 中任一项所述的免疫效应细胞，其中所述经修饰的免疫效应细胞与未经所述修饰的相应细胞相比，CIITA 基因的表达和/或活性未被下调。
100. 根据权利要求 92-99 中任一项所述的免疫效应细胞，其中所述经修饰的免疫效应细胞与未经所述修饰的相应细胞相比，B2M 基因的表达和/或活性未被下调。

101. 根据权利要求 92-100 中任一项所述的免疫效应细胞，其中所述经修饰的免疫效应细胞与相应的野生型细胞相比，TRAC 基因和 HLA-A 基因的表达和/或活性被下调。
102. 根据权利要求 92-101 中任一项所述的免疫效应细胞，其中所述经修饰的免疫效应细胞与相应的野生型细胞相比，B2M 基因的表达和/或活性未被下调。
103. 根据权利要求 92-102 中任一项所述的免疫效应细胞，其中所述经修饰的免疫效应细胞与相应的野生型细胞相比，CIITA 基因的表达和/或活性未被下调。
104. 根据权利要求 92-103 中任一项所述的免疫效应细胞，其中所述基因的表达水平和/或活性被下调包括使编码所述基因的核酸分子的表达和/或活性下调；和/或使所述基因编码的蛋白质产物的表达和/或活性被下调。
105. 根据权利要求 92-104 中任一项所述的免疫效应细胞，其中所述修饰包括：基因敲除、基因突变和/或基因沉默。
106. 根据权利要求 92-105 中任一项所述的免疫效应细胞，所述修饰包括所述免疫细胞中 TRAC 基因外显子被敲除并且 HLA-A 基因外显子被敲除。
107. 根据权利要求 92-106 中任一项所述的免疫效应细胞，所述修饰包括所述免疫细胞中 TRAC 基因外显子被敲除，HLA-A 基因外显子被敲除并且 HLA-B 基因外显子被敲除。
108. 根据权利要求 92-107 中任一项所述的免疫效应细胞，其中所述修饰包括向所述免疫效应细胞施用一种或多种选自下组的物质：反义 RNA、siRNA、shRNA 和 CRISPR/Cas9 系统。
109. 根据权利要求 92-108 中任一项所述的免疫效应细胞，其中所述修饰包括向所述免疫效应细胞施用 CRISPR/Cas9 系统。
110. 根据权利要求 92-109 所述的免疫效应细胞，其中所述修饰还包括向所述免疫效应细胞施用靶向所述 TRAC 基因外显子部分的 sgRNA。
111. 根据权利要求 110 所述的免疫效应细胞，其中所述靶向所述 TRAC 基因外显子部分的 sgRNA 包含 SEQ ID NO: 177 至 SEQ ID NO: 191 中任一项所示的核苷酸序列。
112. 根据权利要求 92-111 中任一项所述的免疫效应细胞，其中所述修饰包括向所述免疫效应细胞施用靶向所述 HLA-A 基因外显子部分的 sgRNA。
113. 根据权利要求 112 所述的免疫效应细胞，其中所述靶向所述 HLA-A 基因外显子部分的 sgRNA 包含 SEQ ID NO: 192 至 SEQ ID NO: 232 中任一项所示的核苷酸序列。
114. 根据权利要求 92-113 中任一项所述的免疫效应细胞，其中所述修饰包括向所述免疫效应细胞施用靶向所述 HLA-B 基因外显子部分的 sgRNA。

115. 根据权利要求 112 所述的免疫效应细胞, 其中所述靶向所述 HLA-B 基因外显子部分的 sgRNA 包含 SEQ ID NO: 237 至 SEQ ID NO: 239 中任一项所示的核苷酸序列。
116. 根据权利要求 92-115 中任一项所述的免疫效应细胞, 其中所述修饰还包括向所述细胞施用 Cas 酶。
117. 根据权利要求 116 所述的免疫效应细胞, 其中 Cas 酶包括 Cas9 蛋白。
118. 根据权利要求 108 所述的免疫效应细胞, 其中所述反义 RNA 包含 SEQ ID NO: 233 至 SEQ ID NO: 236 中任一项所示的核苷酸序列。
119. 根据权利要求 82-118 中任一项所述的免疫效应细胞, 其中所述免疫效应细胞为 HLA-B 纯合子细胞或杂合子细胞。
120. 根据权利要求 119 所述的免疫效应细胞, 其中所述 HLA-B 纯合子包括 HLA-B*40 纯合子, HLA-B*15 纯合子, HLA-B*46 纯合子, HLA-B*13 纯合子, HLA-B*51 纯合子, HLA-B*58 纯合子, HLA-B*07 纯合子, HLA-B*35 纯合子, HLA-B*44 纯合子, HLA-B*52 纯合子, HLA-B*57 纯合子, HLA-B*54 纯合子, HLA-B*55 纯合子。
121. 根据权利要求 82-120 中任一项所述的免疫效应细胞, 其中所述免疫效应细胞为 HLA-A 纯合子或杂合子细胞。
122. 根据权利要求 82-121 所述的免疫效应细胞, 其中所述 HLA-A 纯合子或杂合子包括 HLA-A*02 纯合子, HLA-A*11 纯合子, HLA-A*02/A*11 杂合子或 HLA-A*24 纯合子。
123. 一种制备免疫效应细胞的方法, 其包括向免疫效应细胞中引入权利要求 55-77 中任一项所述的核酸分子或权利要求 78-80 中任一项所述的载体。
124. 根据权利要求 123 所述的方法, 其还包括: 在向免疫效应细胞中引入权利要求 55-77 中任一项所述的核酸分子或权利要求 78-80 中任一项所述的载体之前/之后, 修饰所述免疫效应细胞, 所述修饰包括与免疫排斥相关基因中的一个或多个的表达和/或活性被下调。
125. 根据权利要求 124 所述的方法, 其中所述与免疫排斥相关基因选自下组中的一种或多种基因: TRAC、TRBC、HLA-A、HLA-B、B2M 和 CIITA。
126. 根据权利要求 124-125 中任一项所述的方法, 与未经所述修饰的相应细胞中相应基因的表达和/或活性相比, 下调所述免疫效应细胞中 TRAC 基因和 HLA-A 基因的表达和/或活性。
127. 根据权利要求 124-126 中任一项所述的方法, 与未经所述修饰的相应细胞中相应基因的表达和/或活性相比, 下调所述免疫效应细胞中 TRAC 基因, HLA-A 基因和 HLA-B 基因的表达和/或活性。

128. 根据权利要求 124-127 中任一项所述的方法，与未经所述修饰的相应细胞中相应基因的表达和/或活性相比，CIITA 基因的表达和/或活性未被下调。
129. 根据权利要求 124-128 中任一项所述的方法，与未经所述修饰的相应细胞中相应基因的表达和/或活性相比，B2M 基因的表达和/或活性未被下调。
130. 根据权利要求 124-129 中任一项所述的方法，与相应的野生型细胞相比，所述免疫效应细胞的 TRAC 基因和 HLA-A 基因的表达和/或活性被下调。
131. 根据权利要求 124-130 中任一项所述的方法，与相应的野生型细胞相比，所述免疫效应细胞的 TRAC 基因，HLA-A 基因和 HLA-B 基因的表达和/或活性被下调。
132. 根据权利要求 124-131 中任一项所述的方法，与相应的野生型细胞相比，CIITA 基因的表达和/或活性未被下调。
133. 根据权利要求 124-132 中任一项所述的方法，与相应的野生型细胞相比，B2M 基因的表达和/或活性未被下调。
134. 根据权利要求 124-133 中任一项所述的方法，其中所述基因的表达水平和/或活性被下调包括使编码所述基因的核酸分子的表达和/或活性下调；和/或使所述基因编码的蛋白质产物的表达和/或活性被下调。
135. 根据权利要求 124-134 中任一项所述的方法，其中所述修饰包括：基因敲除、基因突变和/或基因沉默。
136. 根据权利要求 124-135 中任一项所述的方法，所述修饰包括所述免疫细胞中 TRAC 基因外显子被敲除并且 HLA-A 基因外显子被敲除。
137. 根据权利要求 124-136 中任一项所述的方法，所述修饰包括所述免疫细胞中 TRAC 基因外显子被敲除，HLA-A 基因外显子被敲除并且 HLA-B 基因外显子被敲除。
138. 根据权利要求 124-137 中任一项所述的方法，其中所述修饰包括向所述免疫效应细胞施用一种或多种选自下组的物质：反义 RNA、siRNA、shRNA 和 CRISPR/Cas9 系统。
139. 根据权利要求 124-138 中任一项所述的方法，其中所述修饰包括向所述免疫效应细胞施用 CRISPR/Cas9 系统。
140. 根据权利要求 127-139 所述的方法，其中所述修饰包括向所述免疫效应细胞施用靶向所述 TRAC 基因外显子部分的 sgRNA。
141. 根据权利要求 140 所述的方法，其中所述靶向所述 TRAC 基因外显子部分的 sgRNA 包含 SEQ ID NO: 177 至 SEQ ID NO: 191 中任一项所示的核苷酸序列。
142. 根据权利要求 124-141 中任一项所述的方法，其中所述修饰包括向所述免疫效应细胞施

用靶向所述 HLA-A 基因外显子部分的 sgRNA。

143. 根据权利要求 142 所述的方法，其中所述靶向所述 HLA-A 基因外显子部分的 sgRNA 包含 SEQ ID NO: 192 至 SEQ ID NO: 232 中任一项所示的核苷酸序列。

144. 根据权利要求 124-143 中任一项所述的方法，其中所述修饰包括向所述免疫效应细胞施用靶向所述 HLA-B 基因外显子部分的 sgRNA。

145. 根据权利要求 144 所述的方法，其中所述靶向所述 HLA-B 基因外显子部分的 sgRNA 包含 SEQ ID NO: 237 至 SEQ ID NO: 239 中任一项所示的核苷酸序列。

146. 根据权利要求 124-145 任一项所述的方法，其中所述修饰还包括向所述细胞施用 Cas 酶。

147. 根据权利要求 146 所述的方法，其中 Cas 酶包括 Cas9 蛋白。

148. 根据权利要求 138 所述的方法，其中所述反义 RNA 包含 SEQ ID NO: 233 至 SEQ ID NO: 236 中任一项所示的核苷酸序列。

149. 根据权利要求 123-148 中任一项所述的方法，其中所述免疫效应细胞包括人细胞。

150. 根据权利要求 123-149 中任一项所述的方法，所述免疫效应细胞包括 T 细胞、B 细胞、天然杀伤细胞(NK 细胞)、巨噬细胞、NKT 细胞、单核细胞、树突状细胞、粒细胞、淋巴细胞、白细胞和/或外周血单个核细胞。

151. 根据权利要求 123-150 中任一项所述的方法，所述免疫效应细胞包括自体或非自体的免疫效应细胞。

152. 根据权利要求 123-151 中任一项所述的方法，其中所述细胞为 HLA-B 纯合子或杂合子细胞。

153. 根据权利要求 152 所述的方法，其中所述 HLA-B 纯合子包括 HLA-B*40 纯合子，HLA-B*15 纯合子，HLA-B*46 纯合子，HLA-B*13 纯合子，HLA-B*51 纯合子，HLA-B*58 纯合子，HLA-B*07 纯合子，HLA-B*35 纯合子，HLA-B*44 纯合子，HLA-B*52 纯合子，HLA-B*57 纯合子，HLA-B*54 纯合子，HLA-B*55 纯合子。

154. 根据权利要求 123-153 中任一项所述的方法，其中所述细胞为 HLA-A 纯合子或杂合子细胞。

155. 根据权利要求 154 所述的方法，其中所述 HLA-A 纯合子或杂合子包括 HLA-A*02 纯合子，HLA-A*11 纯合子，HLA-A*02/A*11 杂合子或 HLA-A*24 纯合子。

156. 权利要求 55-77 中任一项所述的分离的核酸分子，权利要求 78-80 中任一项所述的载体，权利要求 81 所述的细胞，或权利要求 82-122 中任一项所述的免疫效应细胞在制备 CAR-

T 细胞中的应用。

157. 药物组合物，其包含权利要求 1-10 中任一项所述的 B7H3 结合多肽，权利要求 55-77 中任一项所述的分离的核酸分子，权利要求 78-80 中任一项所述的载体，权利要求 81 所述的细胞，和/或权利要求 82-122 中任一项所述的免疫效应细胞，以及任选地药学上可接受的载剂。
158. 权利要求 1-10 中任一项所述的 B7H3 结合多肽，权利要求 55-77 中任一项所述的分离的核酸分子，权利要求 78-80 中任一项所述的载体，权利要求 81 所述的细胞，权利要求 82-122 中任一项所述的免疫效应细胞，和/或权利要求 157 所述的药物组合物，其用于治疗与 B7H3 的表达相关的疾病或病症。
159. 根据权利要求 158 所述的用途，其中所述与 B7H3 的表达相关的疾病或病症包括与 B7H3 的表达上调相关的疾病或病症。
160. 根据权利要求 158-159 所述的用途，其中所述与 B7H3 的表达相关的疾病或病症包括癌症。
161. 根据权利要求 160 所述的用途，其中所述癌症包括肾上腺皮质癌，膀胱癌，乳腺癌，胆管癌，结直肠癌，淋巴瘤，食管癌，脑胶质瘤，头颈鳞癌，肾癌，肝癌，肺癌，卵巢癌，胰腺癌，前列腺癌，肉瘤，黑色素瘤，胃癌，胸腺癌或子宫内膜癌。
162. 预防和/或治疗与 B7H3 的表达相关的疾病或病症的方法，其包括向有需要的受试者施用有效量的权利要求 1-10 中任一项所述的 B7H3 结合多肽，权利要求 55-77 中任一项所述的分离的核酸分子，权利要求 78-80 中任一项所述的载体，权利要求 81 所述的细胞，权利要求 82-122 中任一项所述的免疫效应细胞，和/或权利要求 157 所述的药物组合物。
163. 根据权利要求 162 所述的方法，其中所述与 B7H3 的表达相关的疾病或病症包括与 B7H3 的表达上调相关的疾病或病症。
164. 根据权利要求 162-163 中任一项所述的方法，其中所述与 B7H3 的表达相关的疾病或病症包括癌症。
165. 根据权利要求 164 所述的方法，其中所述癌症包括肾上腺皮质癌，膀胱癌，乳腺癌，胆管癌，结直肠癌，淋巴瘤，食管癌，脑胶质瘤，头颈鳞癌，肾癌，肝癌，肺癌，卵巢癌，胰腺癌，前列腺癌，肉瘤，黑色素瘤，胃癌，胸腺癌或子宫内膜癌。

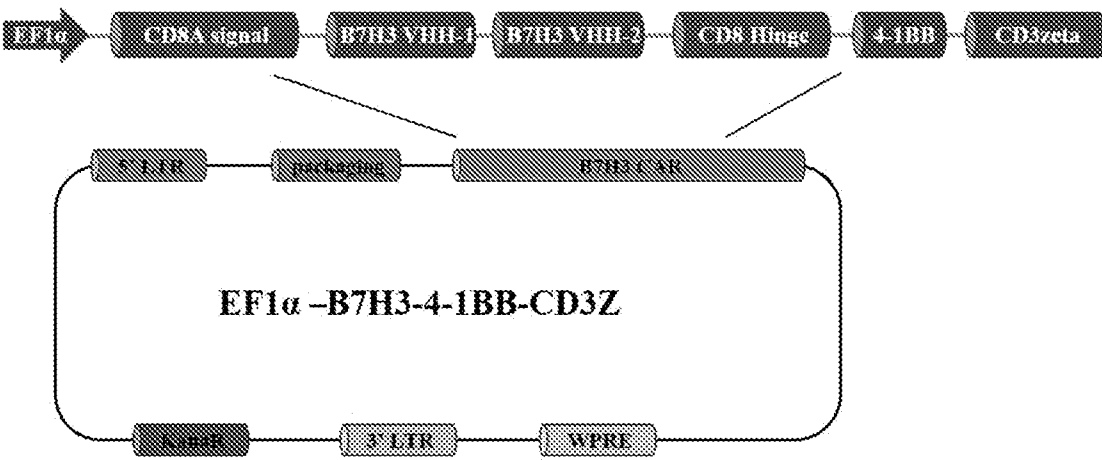


图 1

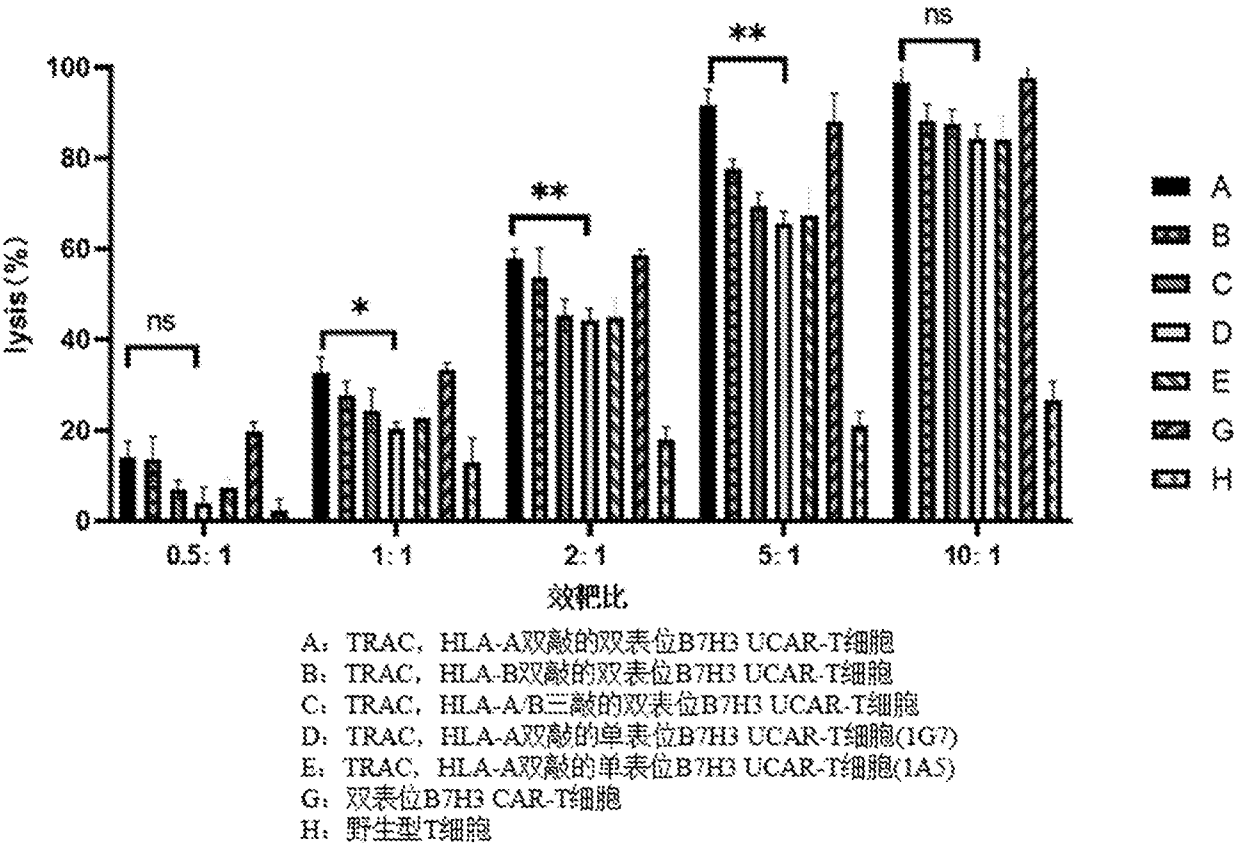
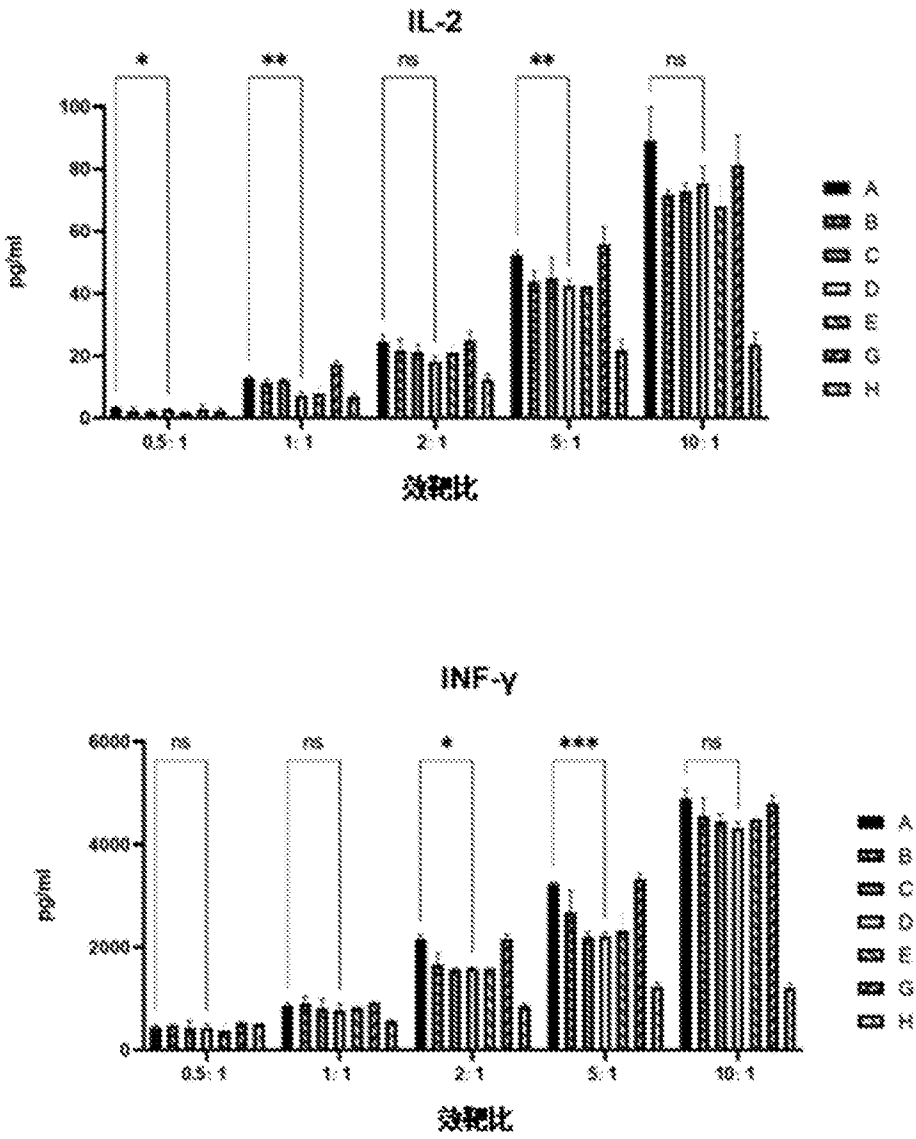
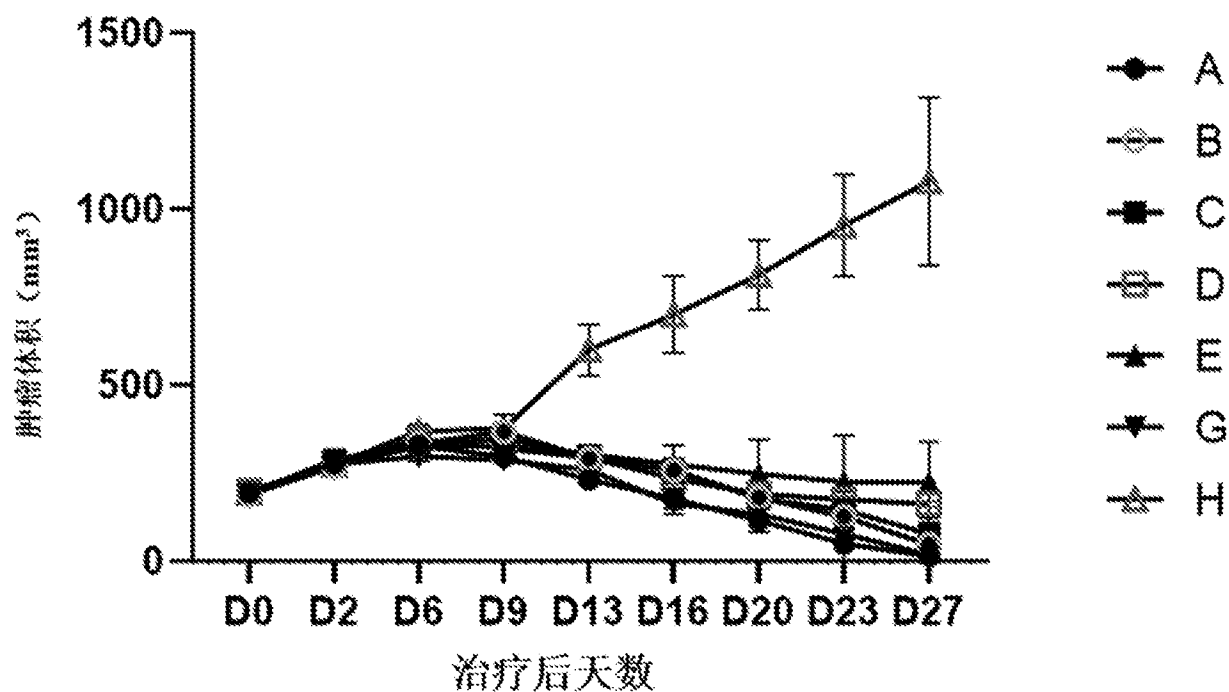


图 2



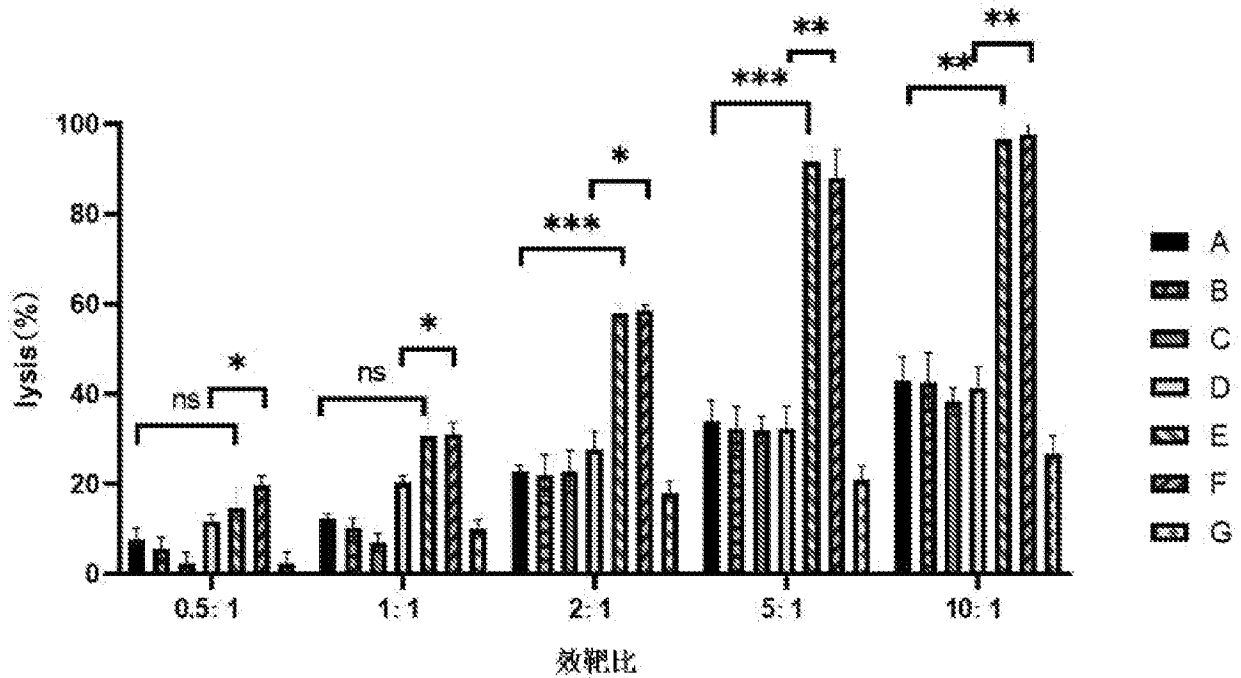
A: TRAC, HLA-A双融合的双表位B7H3 UCAR-T细胞
B: TRAC, HLA-B双融合的双表位B7H3 UCAR-T细胞
C: TRAC, HLA-A/B三融合的双表位B7H3 UCAR-T细胞
D: TRAC, HLA-A双融合的单表位B7H3 UCAR-T细胞(IG7)
E: TRAC, HLA-A双融合的单表位B7H3 UCAR-T细胞(1A5)
G: 双表位B7H3 CAR-T细胞
H: 野生型T细胞

图 3



- A: TRAC, HLA-A双敲的双表位B7H3 UCAR-T细胞
B: TRAC, HLA-B双敲的双表位B7H3 UCAR-T细胞
C: TRAC, HLA-A/B三敲的双表位B7H3 UCAR-T细胞
D: TRAC, HLA-A双敲的单表位B7H3 UCAR-T细胞(1G7)
E: TRAC, HLA-A双敲的单表位B7H3 UCAR-T细胞(1A5)
G: 双表位B7H3 CAR-T细胞
H: 野生型T细胞

图 4



- A: TRAC, HLA-A双敲的双表位B7H3 UCAR-T细胞
 B: TRAC, HLA-A双敲的单表位B7H3 UCAR-T细胞(1G7)
 C: TRAC, HLA-A双敲的单表位B7H3 UCAR-T细胞(1A5)
 D: 双表位B7H3 CAR-T细胞
 E: TRAC, HLA-A双敲的B7H3 UCAR-T细胞 (序列Hbrca84d-2)
 F: B7H3 CAR-T细胞 (序列Hbrca84d-2)
 G: 野生T细胞

图 5

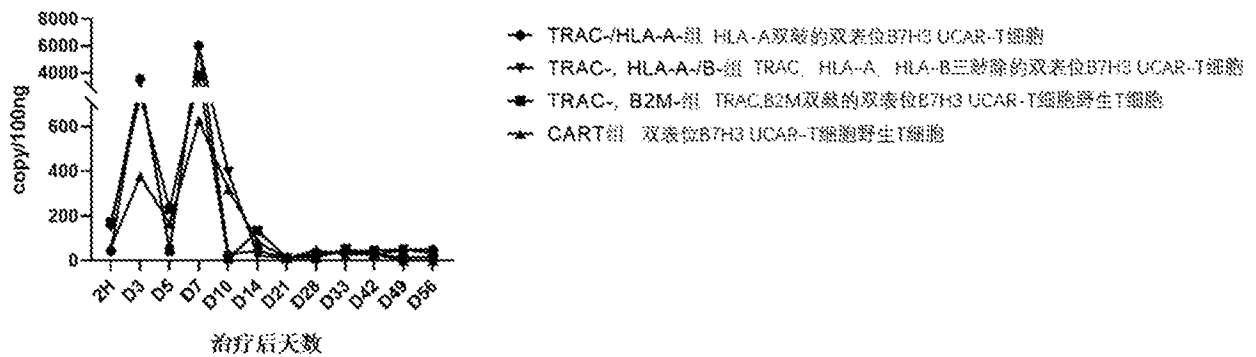


图 6

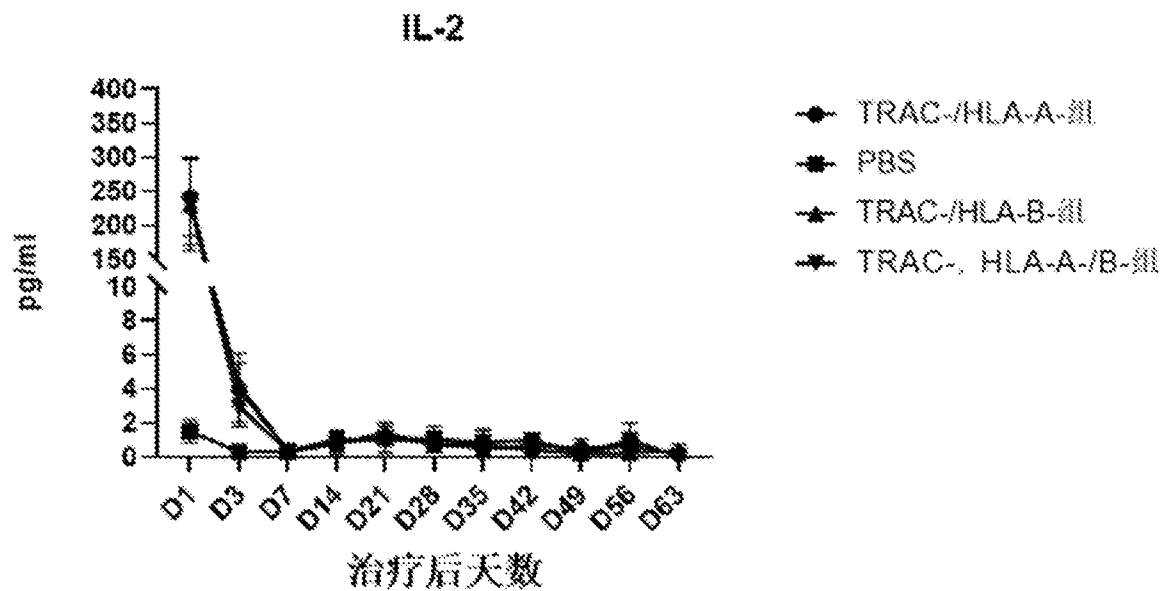


图 7

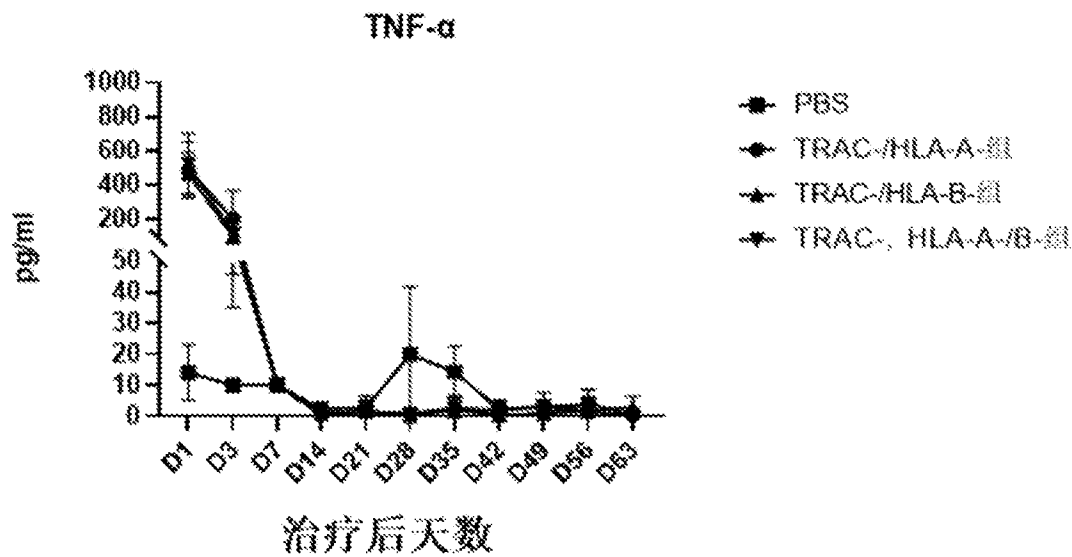


图 8

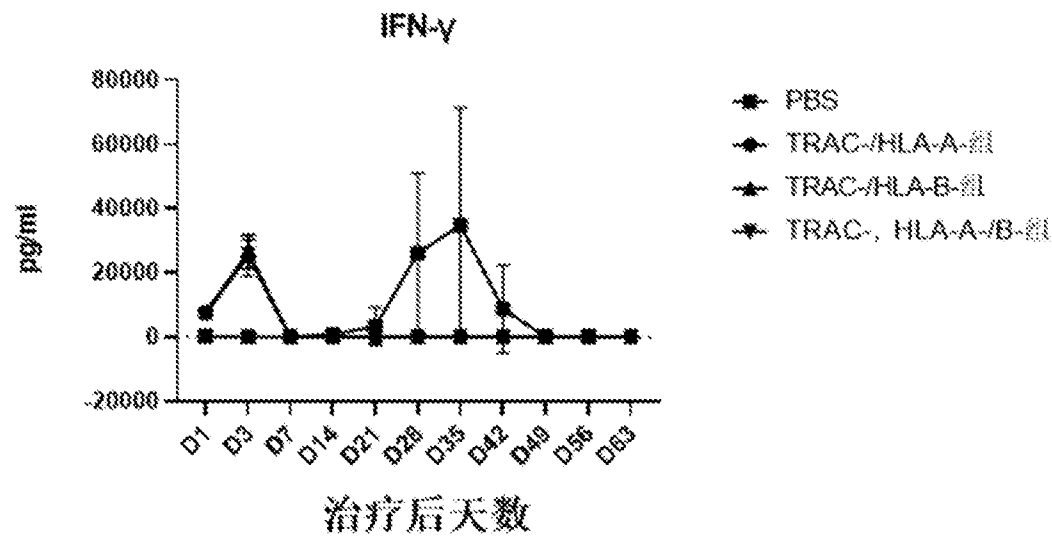


图 9

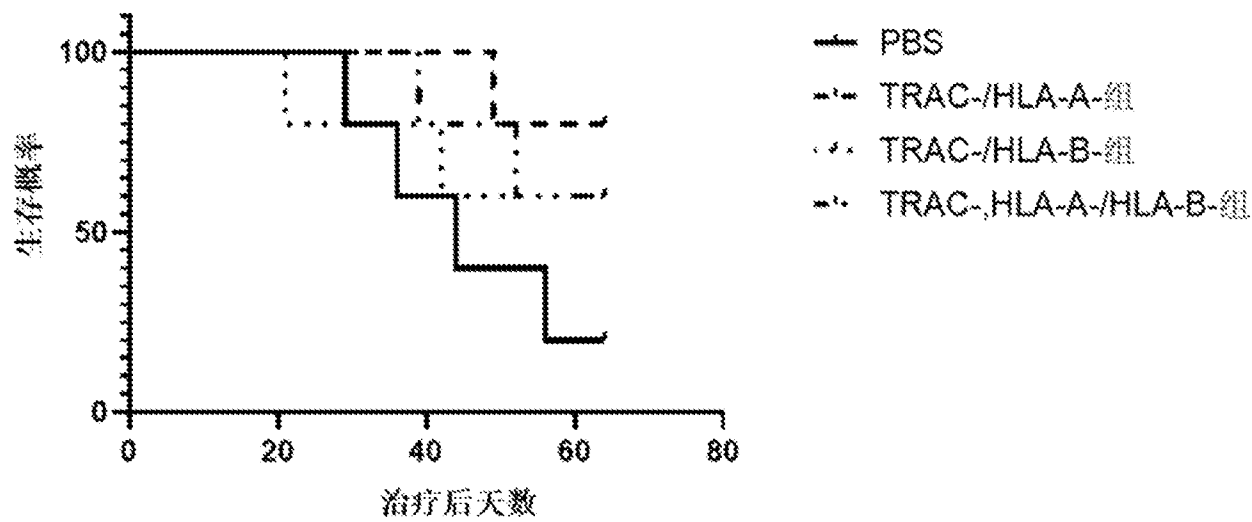


图 10

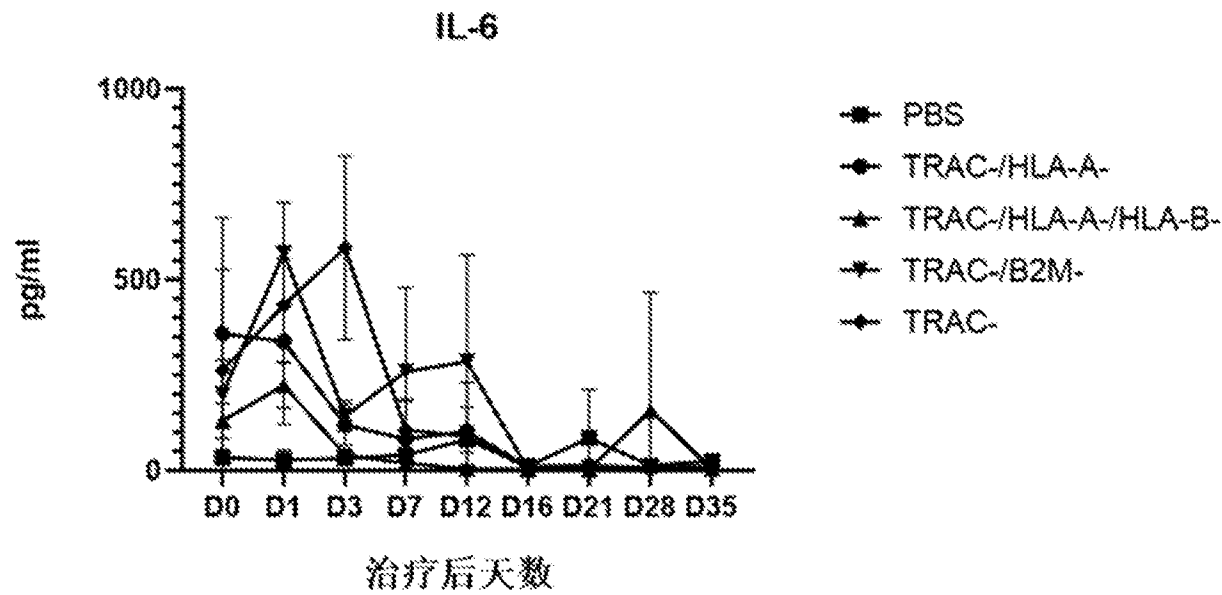


图 11

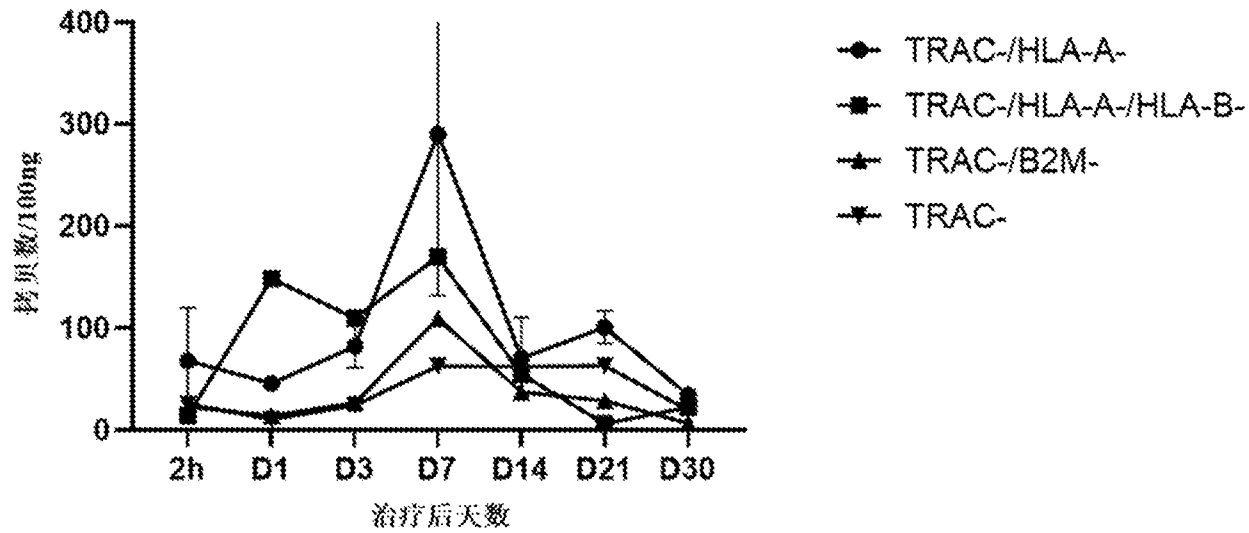
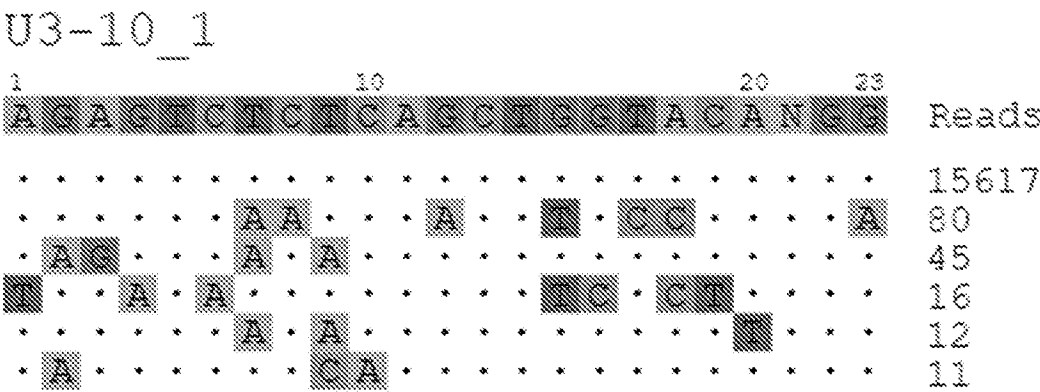


图 12

U3-10_1: TRAC

去除对照背景后的脱靶展示



U3-10_2: HLA-A02

去除对照背景后的脱靶展示

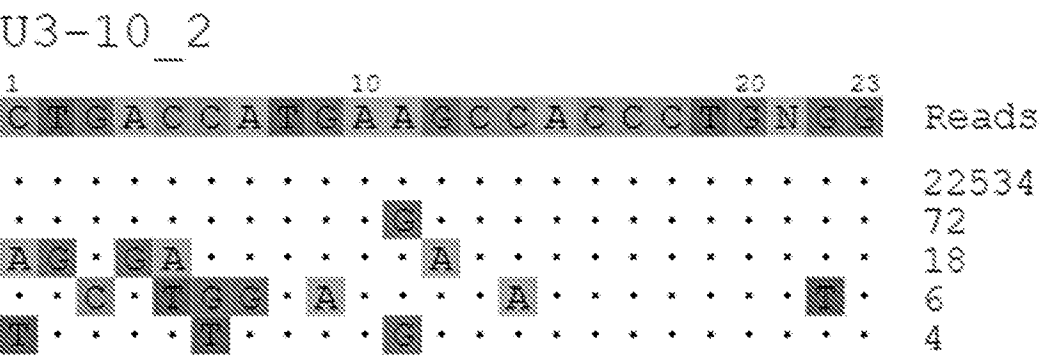


图 13

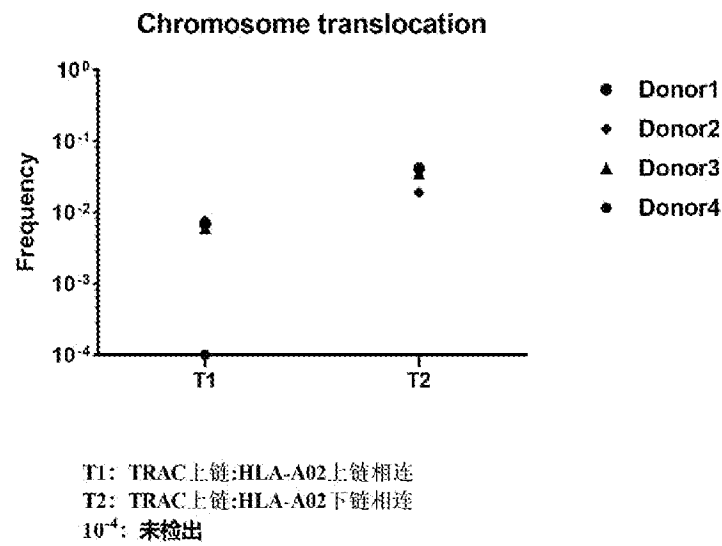
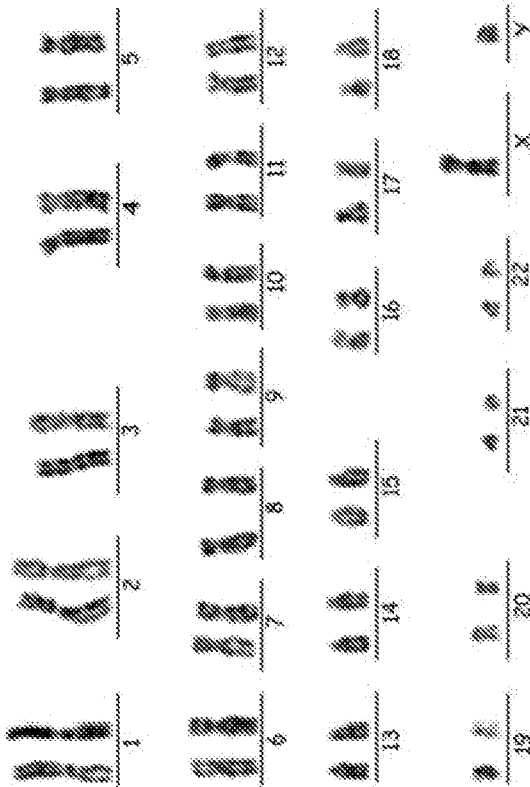
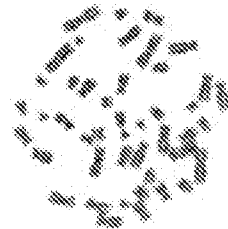


图 14

样本编号: A21-006-U



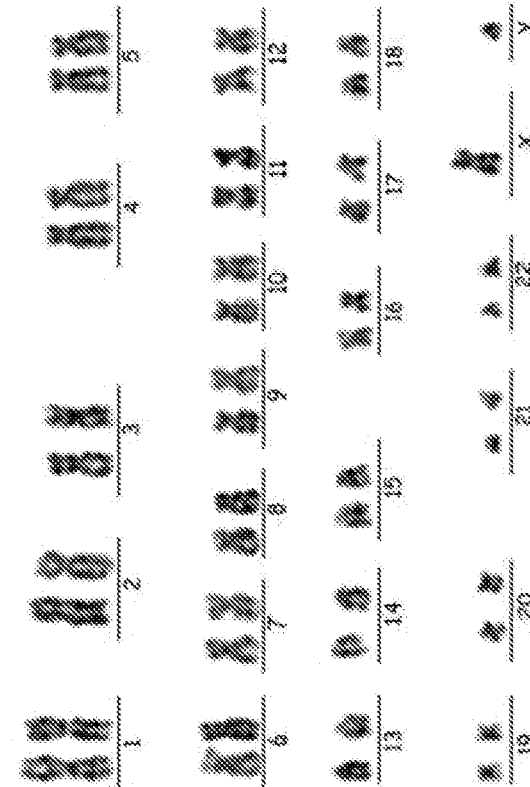
样本编号: A21-006-MT



分析结果: 46, XY

分析日期: 2022-04-18

备注: 未见染色体异常



分析结果: 46, XY

分析日期: 2022-04-18

备注: 未见染色体异常

图 15

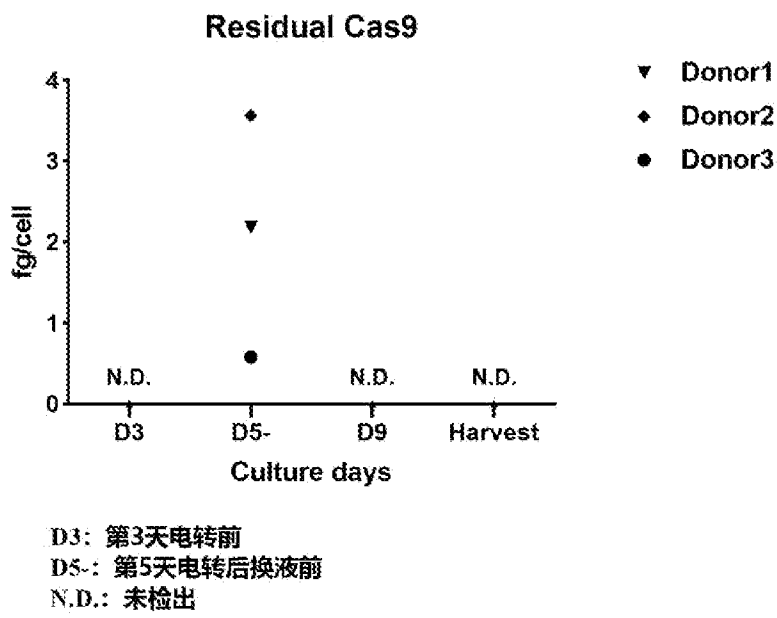


图 16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/129566

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K16/30(2006.01)i; C12N5/10(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)

IPC: C07K, C12N

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)

CNTXT, CNABS, VEN, ENTXT, 万方, WANFANG, CNKI, PubMed, GenBank, ISI web of knowledge: B7H3, CD276, 抗体, VHH, 纳米抗体, CAR, 嵌合抗原受体, 茂行制药(苏州)有限公司, 尚小云, 蒋海娟, 马少文, SEQ ID NOs: 1-244

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	WO 2023274384 A1 (NINGBO T-MAXIMUM BIOPHARMACEUTICALS CO., LTD.) 05 January 2023 (2023-01-05) claims 1-126	1-165
X	CN 114729041 A (THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES) 08 July 2022 (2022-07-08) claims 1 and 19-20, and description, paragraph [113]	12-13, 15-36, 38-82
X	CN 113501884 A (XUZHOU MEDICAL UNIVERSITY) 15 October 2021 (2021-10-15) abstract	83
Y	CN 113501884 A (XUZHOU MEDICAL UNIVERSITY) 15 October 2021 (2021-10-15) abstract	84-87, 89-165
Y	CN 114729041 A (THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES) 08 July 2022 (2022-07-08) description, paragraph [113]	84-87, 89-165



Further documents are listed in the continuation of Box C.



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

“D” document cited by the applicant in the international application

“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

07 December 2023

Date of mailing of the international search report

14 December 2023

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District,
Beijing 100088

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/129566

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2011028695 A1 (REVETS, H.A.P. et al.) 03 February 2011 (2011-02-03) claims 1-22	12-13, 15-36, 38-82, 84-87, 89-165
Y	CN 113061580 A (JIANGSU T- MAXIMUM BIOTECH CO., LTD.) 02 July 2021 (2021-07-02) claims 1-10, and description, paragraph [244]	94-165
A	CN 113039206 A (SEATTLE CHILDREN'S HOSPITAL (DBA SEATTLE CHILDREN'S RESEARCH INSTITUTE)) 25 June 2021 (2021-06-25) entire document	1-165
A	CN 113402619 A (XUZHOU MEDICAL UNIVERSITY) 17 September 2021 (2021-09-17) entire document	1-165
A	WO 2022126689 A1 (GUANGZHOU BIO-GENE TECHNOLOGY CO., LTD.) 23 June 2022 (2022-06-23) entire document	1-165

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/129566

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.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/129566

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

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

1. ☒ Claims Nos.: **158-165**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 158-165 relate to a method for treating a living human body or animal body, which falls within the cases set out in PCT Rule 39.1(iv) for which an international search is not required. In the present report, a search is conducted on the basis of "the uses in preparation of a pharmaceutical composition".
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2023/129566

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2023274384	A1	05 January 2023	None			
CN	114729041	A	08 July 2022	CA	3156761	A1	29 April 2021
				JP	2022552875	A	20 December 2022
				US	2022380471	A1	01 December 2022
				AU	2020370125	A1	19 May 2022
				EP	4031250	A1	27 July 2022
				WO	2021081052	A1	29 April 2021
CN	113501884	A	15 October 2021	None			
US	2011028695	A1	03 February 2011	EP	2215123	A1	11 August 2010
				CA	2706200	A1	04 June 2009
				KR	20100097716	A	03 September 2010
				EP	2215125	A1	11 August 2010
				JP	2011504740	A	17 February 2011
				EP	2650311	A2	16 October 2013
				EP	2650311	A3	04 June 2014
				US	2015232562	A1	20 August 2015
				US	9969805	B2	15 May 2018
				WO	2009068631	A1	04 June 2009
				US	2011059090	A1	10 March 2011
				US	8975382	B2	10 March 2015
				WO	2009068630	A1	04 June 2009
				AU	2008328784	A1	04 June 2009
				AU	2008328784	B2	27 March 2014
				US	2011053865	A1	03 March 2011
				ZA	201004057	B	28 April 2011
				WO	2009068628	A1	04 June 2009
				BRPI	0819656	A2	23 June 2015
				WO	2009068627	A2	04 June 2009
				WO	2009068627	A3	01 October 2009
				US	2011189203	A1	04 August 2011
				WO	2009068625	A2	04 June 2009
				WO	2009068625	A3	06 August 2009
				EP	2220120	A2	25 August 2010
				CA	2705890	A1	04 June 2009
				MX	2010005783	A	10 August 2010
				EP	2225278	A2	08 September 2010
				AU	2008328785	A1	04 June 2009
				AU	2008328781	A1	04 June 2009
				CA	2706675	A1	04 June 2009
				IL	205734	A0	30 November 2010
				AU	2008328779	A1	04 June 2009
				AU	2008328779	B2	05 June 2014
				CA	2706425	A1	04 June 2009
CN	113061580	A	02 July 2021	WO	2021136263	A1	08 July 2021
				CA	3163304	A1	08 July 2021
				EP	4086342	A1	09 November 2022
				AU	2020418199	A1	21 July 2022
				KR	20220124197	A	13 September 2022
				JP	2023508740	A	03 March 2023
				US	2022193135	A1	23 June 2022

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2023/129566

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	113039206	A	25 June 2021	AU	2019333149	A1	25 March 2021
				IL	281129	A	29 April 2021
				WO	2020047257	A1	05 March 2020
				JP	2021534784	A	16 December 2021
				EP	3844191	A1	07 July 2021
				EP	3844191	A4	15 June 2022
				US	2021324083	A1	21 October 2021
				CA	3110858	A1	05 March 2020
CN	113402619	A	17 September 2021	None			
WO	2022126689	A1	23 June 2022	None			

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列表进行的:

- a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:
- b. ☐ 为国际检索的目的在国际申请日之后提交(细则13之三.1(a)),
☐ 附有说明序列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。

2. ☐ 本报告是在没有收到符合WIPO ST.26标准的序列表的情况下,考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列,在可进行有意义检索的范围内做出的。

3. 补充意见:

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☒ 权利要求： 158-165
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
权利要求158-165涉及对有生命的人体或动物体的治疗方法，属于PCT细则39.1（IV）中所列的无需进行国际检索的情形。本报告基于“制备药物组合物中的用途”进行检索。
2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说：
3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

A. 主题的分类 C07K16/30(2006.01)i; C12N5/10(2006.01)i 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		
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) IPC: C07K, C12N 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 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)) CNTXT, CNABS, VEN, ENTXT, 万方, CNKI, PubMed, GenBank, ISI web of knowledge:B7H3, CD276, 抗体, VHH, 纳米抗体, CAR, 嵌合抗原受体, 茂行制药(苏州)有限公司, 尚小云, 蒋海娟, 马少文, SEQ ID NOs:1-244		
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
PX	WO 2023274384 A1 (宁波茂行生物医药科技有限公司) 2023年1月5日 (2023 - 01 - 05) 权利要求1-126	1-165
X	CN 114729041 A (美国政府(由卫生和人类服务部的部长所代表)) 2022年7月8日 (2022 - 07 - 08) 权利要求1、19-20, 说明书第[113]段	12-13、15-36、38-82
X	CN 113501884 A (徐州医科大学) 2021年10月15日 (2021 - 10 - 15) 摘要	83
Y	CN 113501884 A (徐州医科大学) 2021年10月15日 (2021 - 10 - 15) 摘要	84-87、89-165
Y	CN 114729041 A (美国政府(由卫生和人类服务部的部长所代表)) 2022年7月8日 (2022 - 07 - 08) 说明书第[113]段	84-87、89-165
Y	US 2011028695 A1 (REVETS, H.A.P. 等) 2011年2月3日 (2011 - 02 - 03) 权利要求1-22	12-13、15-36、38-82、84-87、89-165
☒ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。		
★ 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “D” 申请人在国际申请中引证的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “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) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “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 “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 “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 “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 “&” 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期 2023年12月7日	国际检索报告邮寄日期 2023年12月14日	
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088	授权官员 刘新蕾 电话号码 (+86) 010-53962097	

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
Y	CN 113061580 A (江苏茂行科技有限公司) 2021年7月2日 (2021 - 07 - 02) 权利要求1-10，说明书第[244]段	94-165
A	CN 113039206 A (西雅图儿童医院(DBA西雅图儿童研究所)) 2021年6月25日 (2021 - 06 - 25) 全文	1-165
A	CN 113402619 A (徐州医科大学) 2021年9月17日 (2021 - 09 - 17) 全文	1-165
A	WO 2022126689 A1 (广州百暨基因科技有限公司) 2022年6月23日 (2022 - 06 - 23) 全文	1-165

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2023/129566

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)
WO	2023274384	A1	2023年1月5日	无			
CN	114729041	A	2022年7月8日	CA	3156761	A1	2021年4月29日
				JP	2022552875	A	2022年12月20日
				US	2022380471	A1	2022年12月1日
				AU	2020370125	A1	2022年5月19日
				EP	4031250	A1	2022年7月27日
				WO	2021081052	A1	2021年4月29日
CN	113501884	A	2021年10月15日	无			
US	2011028695	A1	2011年2月3日	EP	2215123	A1	2010年8月11日
				CA	2706200	A1	2009年6月4日
				KR	20100097716	A	2010年9月3日
				EP	2215125	A1	2010年8月11日
				JP	2011504740	A	2011年2月17日
				EP	2650311	A2	2013年10月16日
				EP	2650311	A3	2014年6月4日
				US	2015232562	A1	2015年8月20日
				US	9969805	B2	2018年5月15日
				WO	2009068631	A1	2009年6月4日
				US	2011059090	A1	2011年3月10日
				US	8975382	B2	2015年3月10日
				WO	2009068630	A1	2009年6月4日
				AU	2008328784	A1	2009年6月4日
				AU	2008328784	B2	2014年3月27日
				US	2011053865	A1	2011年3月3日
				ZA	201004057	B	2011年4月28日
				WO	2009068628	A1	2009年6月4日
				BR-PI	0819656	A2	2015年6月23日
				WO	2009068627	A2	2009年6月4日
				WO	2009068627	A3	2009年10月1日
				US	2011189203	A1	2011年8月4日
				WO	2009068625	A2	2009年6月4日
				WO	2009068625	A3	2009年8月6日
				EP	2220120	A2	2010年8月25日
				CA	2705890	A1	2009年6月4日
				MX	2010005783	A	2010年8月10日
				EP	2225278	A2	2010年9月8日
				AU	2008328785	A1	2009年6月4日
				AU	2008328781	A1	2009年6月4日
				CA	2706675	A1	2009年6月4日
				IL	205734	A0	2010年11月30日
				AU	2008328779	A1	2009年6月4日
				AU	2008328779	B2	2014年6月5日
				CA	2706425	A1	2009年6月4日
CN	113061580	A	2021年7月2日	WO	2021136263	A1	2021年7月8日
				CA	3163304	A1	2021年7月8日
				EP	4086342	A1	2022年11月9日
				AU	2020418199	A1	2022年7月21日
				KR	20220124197	A	2022年9月13日
				JP	2023508740	A	2023年3月3日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2023/129566

检索报告引用的专利文件				同族专利			公布日 (年/月/日)
							公布日 (年/月/日)
				US	2022193135	A1	2022年6月23日
CN	113039206	A	2021年6月25日	AU	2019333149	A1	2021年3月25日
				IL	281129	A	2021年4月29日
				WO	2020047257	A1	2020年3月5日
				JP	2021534784	A	2021年12月16日
				EP	3844191	A1	2021年7月7日
				EP	3844191	A4	2022年6月15日
				US	2021324083	A1	2021年10月21日
				CA	3110858	A1	2020年3月5日
CN	113402619	A	2021年9月17日	无			
WO	2022126689	A1	2022年6月23日	无			