

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2021 年 12 月 2 日 (02.12.2021)



(10) 国际公布号
WO 2021/237456 A1

(51) 国际专利分类号:

A61K 31/7088 (2006.01) A61K 35/17 (2015.01)

A61K 45/06 (2006.01) A61P 31/18 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2020/092328

(22) 国际申请日: 2020 年 5 月 26 日 (26.05.2020)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人: 深圳先进研究院 (SHENZHEN INSTITUTES OF ADVANCED TECHNOLOGY) [CN/CN]; 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道1068号, Guangdong 518055 (CN)。

(72) 发明人: 万晓春 (WAN, Xiaochun); 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道1068号, Guangdong 518055 (CN)。 章桂忠 (ZHANG, Guizhong); 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道1068号, Guangdong 518055 (CN)。 程建 (CHENG, Jian); 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大

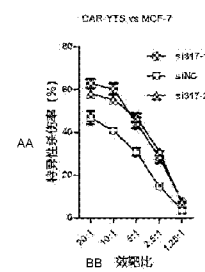
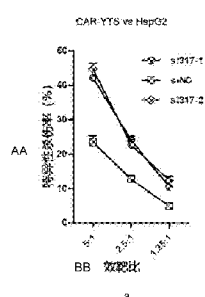
道1068号, Guangdong 518055 (CN)。 刘昱 (LIU, Zhao); 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道1068号, Guangdong 518055 (CN)。 逯晓旭 (LU, Xiaoxu); 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道1068号, Guangdong 518055 (CN)。 邓湉 (DENG, Tian); 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道1068号, Guangdong 518055 (CN)。

(74) 代理人: 北京市诚辉律师事务所 (BEIJING CHENGHUI LAW FIRM); 中国北京市朝阳区朝阳北路99号楼2单元905, Beijing 100123 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,

(54) Title: ANTI-TUMOR PHARMACEUTICAL COMPOSITION AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 一种抗肿瘤的药物治疗组合物及其应用



AA Specific killing rate (%)
BB Effector to target ratio

(57) Abstract: Disclosed in the present invention are an anti-tumor pharmaceutical composition and the use thereof. The pharmaceutical composition comprises a CD317 inhibitor and an engineered immune cell. The CD317 inhibitor in the present invention can greatly improve the anti-tumor effect of immune cells. The mode of action thereof is to weaken the resistance of tumor cells with respect to immune killing. More importantly, independent use of the inhibitor does not cause apoptosis, so the potential safety risk is lower than that of a traditional chemotherapy drug.

(57) 摘要: 本发明公开了一种抗肿瘤的药物治疗组合物及其应用。该药物治疗组合物包括CD317抑制剂和工程化免疫细胞。本发明中CD317抑制剂能够极大提高免疫细胞的抗肿瘤作用, 其作用方式是通过弱化肿瘤细胞对免疫杀伤的抵抗力。更重要的是单独使用抑制剂并不会引起细胞死亡, 安全隐患较传统化疗药物低。

ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

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

本国际公布:

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

一种抗肿瘤的药物组合物及其应用

技术领域

本发明属于肿瘤治疗技术领域，涉及一种抗肿瘤的药物组合物及其应用。

背景技术

随着肿瘤免疫学、分子和细胞生物学技术等研究领域研究的不断深入，肿瘤免疫治疗在临床前研究和临床应用中蓬勃发展，展现出越来越强的潜力，成为继手术、化疗和放疗之后的第四种有效治疗肿瘤的方法。

肿瘤免疫治疗是通过主动或被动方式使机体产生肿瘤特异性免疫应答，发挥其抑制和杀伤肿瘤功能的治疗方法。肿瘤免疫治疗主要包括免疫检查点抑制剂（ICB）、过继性细胞转移疗法（ACT）、肿瘤特异性疫苗、小分子免疫药物等。

ACT 是个体化的肿瘤治疗方法，通过从患者体内分离免疫活性细胞，在体外诱导分化、改造、扩增后回输到患者体内，靶向抗原特异性的肿瘤细胞，发挥抑制和杀伤肿瘤作用。目前，CAR-T 疗法（嵌合抗原受体 T 细胞疗法）、CAR-NK 和 TCR-T 疗法（T 细胞受体嵌合型 T 细胞疗法）是效果较为突出的疗法，在恶性血液肿瘤治疗中表现出强大持久的杀伤力，而在实体瘤治疗方面的效果却不尽如人意。

针对 ACT 的实体瘤困境，目前在研的策略主要有三个方面：1）改造过继转输的免疫细胞，如 CAR-T，TCR-T 或 CAR-NK 细胞，使其具备更强的杀伤能力；2）与免疫检测点阻断疗法相结合；3）与其他抗肿瘤药物，如化疗药物联合。这三种方案各有缺陷。首先，工程化免疫细胞杀伤功能太强，不仅无法提高抗肿瘤效果，反而更容易因为脱靶毒性误伤健康组织，引起严重的副作用【参见：1. Tan MP, Gerry AB, Brewer JE, Melchiori L, Bridgeman JS, Bennett AD, Pumphrey NJ, Jakobsen BK, Price DA, Ladell K, et al. T cell receptor binding affinity governs the functional profile of cancer-specific CD8⁺ T cells. *Clin Exp Immunol.* 2015;180(2):255–70; 2. Zhong S, Malecek K, Johnson LA, Yu Z, Vega-Saenz de Miera E, Darvishian F, McGary K, Huang K, Boyer J, Corse E, et al. T-cell receptor affinity and avidity defines antitumor response and autoimmunity in T-cell immunotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(17):6973–8; 3. Chmielewski M, Hombach A, Heuser C, Adams GP, Abken H. T cell activation by antibody-like immunoreceptors: increase in affinity of the single-chain fragment domain above threshold does not increase T cell activation against antigen-positive target cells but decreases selectivity. *J Immunol.* 2004;173(12):7647–53; 4. Caruso HG, Hurton LV, Najjar A, Rushworth D, Ang S, Olivares S, Mi T, Switzer K, Singh H, Huls H, et al. Tuning sensitivity of CAR to EGFR density limits recognition of

normal tissue while maintaining potent antitumor activity. *Cancer Res.* 2015;75(17):3505–18; 5. Liu X, Jiang S, Fang C, Yang S, Olalere D, Pequignot EC, Cogdill AP, Li N, Ramones M, Granda B, et al. Affinity-tuned ErbB2 or EGFR chimeric antigen receptor T cells exhibit an increased therapeutic index against tumors in mice. *Cancer Res.* 2015;75(17):3596–607】。Juno 公司的 JCAR015 结构与 Kite 的 KTEC019 类似，区别在于前者使用了 SJ25C1 来源的 scFv，后者采用与 Novartis 相同的 FMC63 scFv，最终 JCAR015 由于严重的神经毒性终止实验，损失惨重，而 Kite 的 KETC019 成功获批。虽然没有直接证据表明 SJ25C1 的亲和力比 FMC63 高，但是通过这两家公司产品临床缓解率的横向对比结果看（91% vs 61%），Juno 公司失败的原因与 SJ25C1 的亲和力过高脱不了干系（参见：Zhenguang Wang¹, Zhiqiang Wu¹, Yang Liu² and Weidong Han. New development in CAR-T cell therapy. *Journal of Hematology & Oncology* (2017) 10:53）。因此，一味的增强工程化免疫细胞的杀伤功能并不是增强其抗实体瘤效果的有利途径。其次，与免疫检测点阻断疗法相结合，目前也仅限于研究。免疫检测点阻断疗法本身就存在较严重的并发症，多数患者出现消化道、内分泌腺、皮肤、肝脏、中枢神经系统以及心血管等组织炎症性损伤【参见：1. Michael A. Postow, M.D., Robert Sidlow, M.D., and Matthew D. Hellmann, M.D. Immune-Related Adverse Events Associated with Immune Checkpoint Blockade. *N Engl J Med* 2018;378:158-68; 2. Ravneet Bajwa, Anmol Cheema, Taimoor Khan, Alireza Amirpour, Anju Paul, Saira Chaughtai, Shrinil Patel, Tejas Patel, Joshua Bramson, Varsha Gupta, Michael Levitt, Arif Asif, Mohammad A. Hossain. Adverse Effects of Immune Checkpoint Inhibitors (Programmed Death-1 Inhibitors and Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein-4 Inhibitors): Results of a Retrospective Study. *J Clin Med Res.* 2019;11(4):225-236】。目前对于这些并发症并没有太好的控制方法【参见：Michael A. Postow, M.D., Robert Sidlow, M.D., and Matthew D. Hellmann, M.D. Immune-Related Adverse Events Associated with Immune Checkpoint Blockade. *N Engl J Med* 2018;378:158-68.】，因此，将其与 CART 等免疫细胞疗法联合使用，且不说治疗效果是否有实质性的提升，其副作用就是首要考虑的重大安全隐患。不同于前两种方案，第三种方案将免疫细胞疗法与抗肿瘤药联用，通过弱化肿瘤细胞抵抗能力来间接增强治疗效果。这可能是未来研究的一个主流方向。但目前处于探索阶段，而且也无法规避放化疗药物的副作用，更重要的是并不能与免疫疗法形成直接的配合，使免疫细胞活化水平处于安全范围内即可对肿瘤细胞形成良好的杀伤效果。

现有的增强免疫细胞治疗的策略或有不可控的副作用，或无法与免疫细胞形成直接的协同抗肿瘤效果，因此目前并不存在真正意义上的安全可靠的增强肿瘤细胞免疫疗法的组合方案。

发明内容

为了解决上述背景技术中所提出的问题，本发明的目的在于提供一种抗肿瘤的药物组合物及其应用。

为达到上述目的，本发明所采用的技术方案为：

本发明一方面提供了一种CD317抑制剂在增强肿瘤细胞对免疫杀伤的敏感性中的应用。

本发明另一方面提供了一种CD317抑制剂在制备增强肿瘤细胞对免疫杀伤的敏感性药物中的应用。

本发明另一方面提供了一种CD317抑制剂在增强肿瘤免疫细胞治疗效果方面的应用。

本发明再一方面提供了一种CD317抑制剂在制备增强肿瘤免疫细胞治疗效果药物中的应用。

本发明再一方面提供了一种CD317抑制剂在制备增强工程化免疫细胞抗肿瘤疗效的增效药物中的应用。

本发明再一方面提供了一种CD317抑制剂与工程化免疫细胞联用在增强肿瘤免疫细胞治疗效果方面的应用。

本发明再一方面提供了一种CD317抑制剂与工程化免疫细胞联用在制备抗肿瘤药物中的应用。

本发明再一方面提供了一种抗肿瘤的药物组合物，包括CD317抑制剂和工程化免疫细胞。

进一步地，所述工程化免疫细胞为通过穿孔素颗粒酶途径发挥作用的免疫细胞，优选地，所述工程化免疫细胞为CAR-T、CAR-NK、TCR-T。

进一步地，所述肿瘤为实体瘤。

进一步地，所述实体瘤为CD317高表达的实体瘤；

优选地，所述实体瘤包括肝癌、肺癌、乳腺癌、结肠癌、肾癌、子宫颈癌。

进一步地，所述CD317抑制剂为CD317 siRNA、CD317 shRNA、shRNA的编码DNA、CD317 sgRNA、PROTAC、抗体或阻断肽。

进一步地，所述CD317抑制剂为CD317 siRNA，所述CD317 siRNA根据CD317基因转录本NM_004335.3设计；

优选地，所述CD317 siRNA包括SEQ ID NO:1所示核苷酸序列的正义链和SEQ ID NO:2所示核苷酸序列的反义链，和/或，SEQ ID NO:3所示核苷酸序列的正义链和SEQ ID NO:4所示核苷酸序列的反义链。

本发明的有益效果为：本发明涉及的CD317抑制剂能显著增强肿瘤的免疫细胞治疗效果，

为临床肿瘤治疗提供了新的潜力方案。利用siRNA抑制肿瘤细胞CD317表达并不会直接导致细胞死亡，但是能够显著增强癌细胞对免疫杀伤的敏感性。

本发明公布的 CD317 抑制剂能够极大提高免疫细胞的抗肿瘤作用，其作用方式是通过弱化肿瘤细胞对免疫杀伤的抵抗力。更重要的是单独使用抑制剂并不会引起细胞死亡，安全隐患较传统化疗药物低。后续通过剂型/给药方式优化，有望开发出安全有效的增强肿瘤免疫细胞治疗的方案。

附图说明

图 1 为本发明实施例 2 中 FACS 检测 CD317 干扰效果图；

图 2 为本发明实施例 3 中 CD317 抑制剂（siRNA）对 YTS 细胞介导的 Hela 细胞死亡的影响；a 为 FACS 检测 CD317 siRNA 对 YTS 介导的肿瘤细胞杀伤的影响；b 为分析统计结果；

图 3 为本发明实施例 4 中 CD317 抑制剂（siRNA）对 YTS NK 细胞活化的影响；左边为 FACS 检测肿瘤细胞 CD317 对 YTS NK 细胞活化的影响；右边为统计分析结果；

图 4 为本发明实施例 5 中 CD317 抑制剂（siRNA）增强 HepG2、MCF-7 细胞对 CAR-YTS 杀伤敏感性；a 为 LDH 法检测 CD317 抑制剂对 CAR-YTS 杀伤 HepG2 细胞效果的影响；b 为 LDH 法检测 CD317 抑制剂对 CAR-YTS 杀伤 MCF7 细胞效果的影响。

具体实施方式

以下通过具体实施例对本发明作详细说明，以下实施例仅用于说明本发明，而不适用于限定本发明的范围。下述实施例中的试验方法，如无特殊说明，均为常规方法，所用实验材料均为市售产品。

实施例

1、siRNA 设计

根据 siRNA 靶序列基本原则，针对人 CD317 基因转录本（NM_004335.3）设计 2 条 21 个核苷酸的 siRNA 序列，即 si317-1 和 si317-2，包括正义链和反义链，其碱基序列如下：

si317-1

正义链：5'-CCAGGUCUUAAGCGUGAGAdTdT-3'， SEQ ID NO:1

反义链：5'-UCUCACGCUUAAGACCUGGdTdT-3'； SEQ ID NO:2

si317-2

正义链：5'-UCGCGGACAAGAAGUACUAdTdT-3'， SEQ ID NO:3

反义链：5'-UAGUACUUCUUGUCCGCGAdTdT-3'， SEQ ID NO:4

本实施例选择的阴性对照（NC）siRNA 碱基序列如下：

正义链：5'-UUCUCCGAACGUGUCACGdTdT-3'， SEQ ID NO:5

反义链：5'-ACGUGACACGUUCGGAGAAAdTdT-3'； SEQ ID NO:6

本申请中 si317 为 si317-1 和 si317-2 的等体积混合液。

本发明所述干扰片段的 3'端添加两个呈单链悬挂结构的脱氧核糖核苷酸，以增强 siRNA 在体内和体外的稳定性，防止降解。所述 siRNA 由上海吉玛公司合成。

根据本发明的优选实施例，选择目前较为常见的阳离子脂质体 Lipofectamine 3000 作为转染试剂。

2、细胞转染与效果验证

1) 根据 siRNA 合成报告，加入适量 DEPC 水（DEPC，Diethyl pyrocarbonate，焦碳酸二乙酯）配制 20 μ M 贮存液；

2) 接种 Hela、HepG2 或 MCF-7 细胞于 6 孔板，密度以过夜培养后细胞汇合度达到 60%-80% 为宜；

3) 用 50 μ L Opti-MEM 培养基稀释 4 μ L Lipofectamine 3000 转染试剂，充分混匀，室温静置 5 分钟；

4) 用 50 μ L Opti-MEM 培养基稀释 2 μ L siRNA，充分混匀，室温静置 5 分钟；

5) 将上述步骤 3) 跟步骤 4) 的稀释液混合，充分混匀后室温静置 10 分钟。此时混合液中 siRNA 与 Lipofectamine3000 的比例为 1:2；

6) 将步骤 5) 转染混合液逐滴加入细胞培养孔，然后交叉交叉法混匀；

7) 细胞继续培养 36 小时，取部分细胞通过流式染色验证干扰效果，其他细胞用于后续实验。

8) 干扰效果验证：Hela 细胞转染 siRNA 36 小时后，收集细胞，PBS 洗涤 2 遍，加入 5 μ L APC anti-human CD317 antibody (Biolegend) 或同型对照抗体 (Isotype)，冰上或 4℃ 染色 15 min；FACS 检测 APC 通道信号，信号峰越往右，说明 CD317 表达水平越高。如图 1 所示，与对照细胞（siNC）相比，转染 siRNA 的细胞（si317）的 APC 信号往左移，与同型对照抗体的信号接近。说明 siRNA 介导的 CD317 干扰成功。

3、流式细胞术检测 CD317 siRNA 增强肿瘤细胞（Hela）对免疫杀伤敏感性的作用

1) 收集转染后的肿瘤细胞，用 PBS 洗 2 遍，然后用 CFSE（1.25 μ M×10 min）标记肿瘤

细胞;

2) 用完全培养基终止, PBS 洗涤以去除残留的 CFSE, 然后计数、稀释 CFSE 标记的肿瘤细胞至 1×10^5 个/mL;

3) 吸取 50 μ L 置于圆底 96 孔板中, 然后按相应的效靶比分别加入 YTS-NK 细胞系或 CAR-YTS 细胞, 每个效靶比设置 3 个复孔; 同时设置只加靶细胞组, 来确定自然死亡细胞的比例;

4) 混匀后置于培养箱中, 培养 4-6 h;

5) 细胞转移至 1.5 mL EP 管中 (镜下观察, 如果有大量细胞贴壁, 需要用胰酶消化), 在每管中加入 3 μ L 7-AAD, 吹打混匀, 置于冰上、避光孵育 10 min;

6) 用流式细胞仪分析 CFSE⁺细胞中 7-AAD⁺细胞的比例, 即为死亡靶细胞的比例; 特异性杀伤率为各个效靶比的 7-AAD⁺细胞比例减去细胞本底死亡水平 (效靶比 0:1 组的 7-AAD⁺细胞比例)。如图 2 所示, si317 组中效靶比 1:1 和 0:1 的 7-AAD⁺细胞比例分别为 29.9% 和 13%, 所以效靶比 1:1 的特异性杀伤率就是 29.9%-13%=16.9%; 同理, si317 组中效靶比 5:1 的特异性杀伤率为 39.4; siNC 组中效靶比 1:1 的特异性杀伤率为 5.6%, 效靶比 5:1 的特异性杀伤率为 12.9%。以上结果可以说明 CD317 siRNA 具有增强肿瘤细胞对免疫杀伤敏感性的作用。

4、流式细胞术检测 CD317 抑制剂对免疫细胞活化的影响

1) 收集转染后的 Hela 细胞, 用完全培养基重悬, 计数;

2) 取 1×10^5 个肿瘤细胞 (悬于 100 μ L 培养基中) 和等量的 YTS 细胞混匀;

3) 置于培养箱中共孵育 30-60 min;

4) 收集细胞, 重悬于 100 μ L PBS 中, 并加入抗 LFA-1 活化型的抗体;

5) 4 °C 孵育 30 min, 然后再加入抗人 CD56 的抗体标记 NK 细胞;

6) PBS 洗涤后, 用流式细胞仪分析 CD56⁺ LFA-1⁺的细胞百分比。CD56 是 NK 细胞的标记物, LFA 是 NK 细胞活化的标记物。因此, 可以通过 CD56⁺ LFA-1⁺的细胞百分比来判断细胞群活化水平。如图 2 所示, siNC 和 si317 组的 CD56⁺ LFA-1⁺的细胞百分比分别为 23.3% 和 21.5%, 没有明显差别, 说明敲减肿瘤细胞 CD317 不会影响与之共培养的 NK 细胞的活化, 排除 CD317 作为免疫检测点或者影响免疫检测点信号抑制效应细胞活化的可能性。。

5、LDH 法检测 CD317 抑制剂增强肿瘤细胞对免疫细胞杀伤敏感性的作用

1) 靶细胞制备: 收集转染后的 HepG2 或 MCF7 细胞, 洗涤后用无酚红 KBM581 培养基

重悬；

- 2) 接种：按 1×10^4 cells/well 接种到 U 底 96 孔板；
- 3) 效应细胞制备：CAR-YTS 细胞洗涤后，用无酚红 KBM581 培养基重悬备用；
- 4) 按效靶比将 CAR-YTS 加入各孔中，设置效应细胞、靶细胞单独对照孔；
- 5) 混匀， $300\text{ g} \times 5\text{ min}$ 离心，然后放回培养箱培养 4-6 h；

6) 利用 LDH 检测试剂盒（碧云天，C0017）检测细胞杀伤情况，如图 4。从 a 中可以看出，在相同的效靶比下，CD317 抑制剂组（Si317-1 和 Si317-2）中 CAR-YTS 杀伤 HepG2 细胞的特异性杀伤率均高于 SiNC 组；从 b 中可以看出，在相同的效靶比下，CD317 抑制剂组（Si317-1 和 Si317-2）中 CAR-YTS 杀伤 MCF-7 细胞的特异性杀伤率均高于 SiNC 组。以上结果可以说明 CD317 siRNA 具有增强肿瘤细胞对免疫细胞杀伤敏感性的作用。

综上，本申请利用 siRNA 抑制肿瘤细胞 CD317 表达能够显著增强癌细胞对免疫杀伤的敏感性。

以上所述仅为本发明的具体实施方式，不是全部的实施方式，本领域普通技术人员通过阅读本发明说明书而对本发明技术方案采取的任何等效的变换，均为本发明的权利要求所涵盖。

权 利 要 求 书

- 1、CD317 抑制剂在制备增强肿瘤细胞对免疫杀伤的敏感性药物中的应用。
- 2、CD317 抑制剂在制备增强肿瘤免疫细胞治疗效果药物中的应用。
- 3、CD317 抑制剂在制备增强工程化免疫细胞抗肿瘤疗效的增效药物中的应用。
- 4、CD317 抑制剂与工程化免疫细胞联用在制备抗肿瘤药物中的应用。
- 5、一种抗肿瘤的药物组合物，其特征在于，包括 CD317 抑制剂和工程化免疫细胞。
- 6、根据权利要求 3-4 任一所述的应用或权利要求 5 所述的药物组合物，其特征在于，所述工程化免疫细胞为通过穿孔素颗粒酶途径发挥作用的免疫细胞，优选地，所述工程化免疫细胞为 CAR-T、CAR-NK、TCR-T。
- 7、根据权利要求 1-4 任一所述的应用或权利要求 5 所述的药物组合物，其特征在于，所述肿瘤为实体瘤。
- 8、根据权利要求 7 所述的应用或药物组合物，其特征在于，所述实体瘤为 CD317 高表达的实体瘤；
优选地，所述实体瘤包括肝癌、肺癌、乳腺癌、结肠癌、肾癌、子宫颈癌。
- 9、根据权利要求 1-4 任一所述的应用或权利要求 5 所述的药物组合物，其特征在于，所述 CD317 抑制剂为 CD317 siRNA、CD317 shRNA、shRNA 的编码 DNA、CD317 sgRNA、PROTAC、抗体或阻断肽。
- 10、根据权利要求 9 所述的应用或药物组合物，其特征在于，所述 CD317 抑制剂为 CD317 siRNA，所述 CD317 siRNA 根据 CD317 基因转录本 NM_004335.3 设计；
优选地，所述 CD317 siRNA 包括 SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列的正义链和 SEQ ID NO:2 所示核苷酸序列的反义链，和/或，SEQ ID NO:3 所示核苷酸序列的正义链和 SEQ ID NO:4 所示核苷酸序列的反义链。

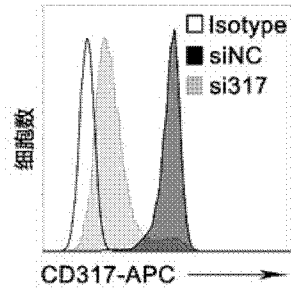
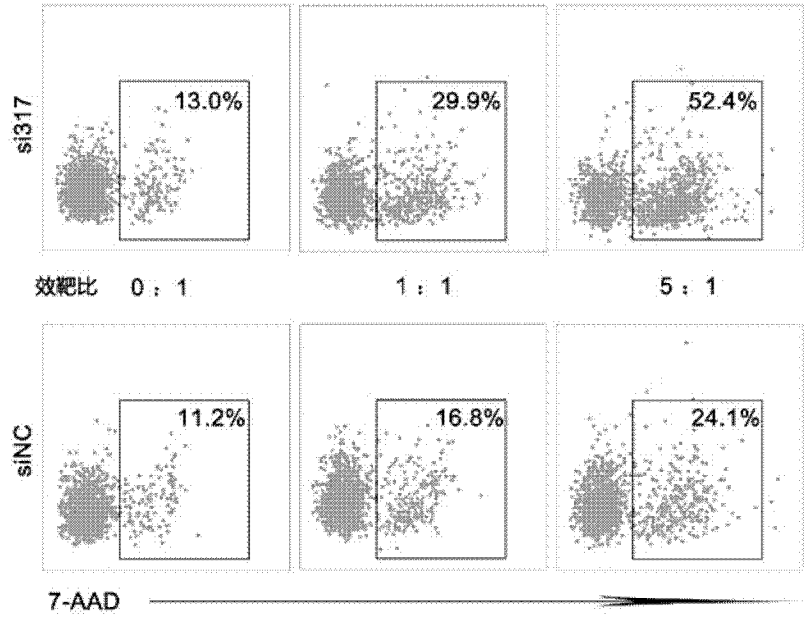
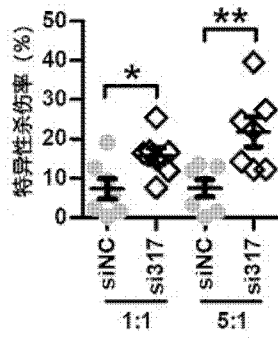


图 1



a



b

图 2

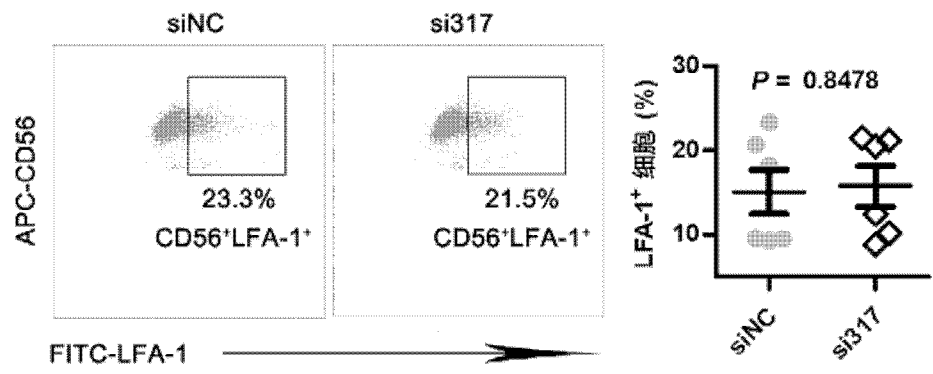
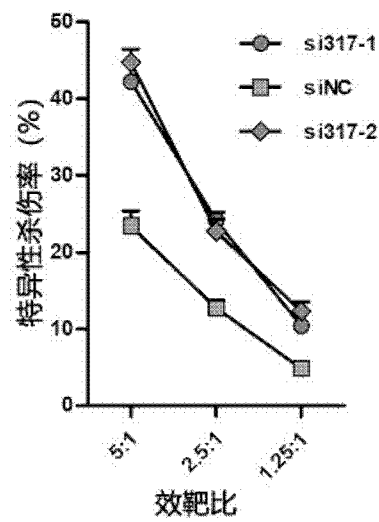


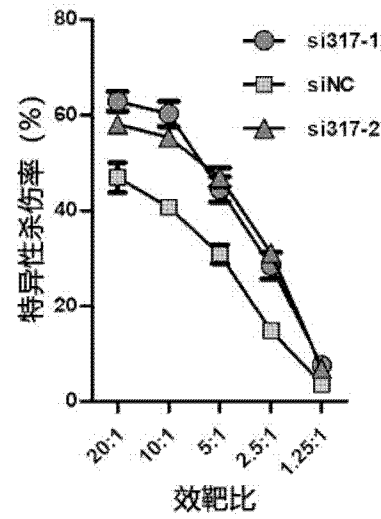
图 3

CAR-YTS vs HepG2



a

CAR-YTS vs MCF-7



b

图 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/092328

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/7088(2006.01)i; A61K 45/06(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61K 35/17(2015.01)i; A61P 31/18(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)

A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

DWPI; EPTXT; USTXT; WOTXT; SIPOABS; CNABS; CNTXT; CNKI; CJFD; NCBI; STNext: 深圳先进技术研究院, 章桂忠, 万晓春, 程建, 刘, 逯晓旭, 邓, CD317, 分化抗原簇317, Tetherin, HM1.24, 骨髓基质细胞抗原2, BST-2, 嵌合抗原受体, 工程化免疫细胞, 免疫细胞治疗, NK细胞, 敏感, 抑制, 敲出, CAR, YTS, TCR, CART, TCRT, CHIMERIC ANTIGEN RECEPTOR, knocking down, knockdown, inhibitor, sensitivity, sensitive, siRNA, STNext nucleotide sequence search: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ZHANG, Guizhong et al. "CD317-mediated Cell Cytoskeleton Regulation as a Novel Means of Tumor Immune Evasion" <i>The Journal of Immunology</i> , Vol. 204, No. 1Supplement, 01 May 2020 (2020-05-01), pp. 1-5	1-9
Y	ZHANG, Guizhong et al. "CD317-mediated Cell Cytoskeleton Regulation as a Novel Means of Tumor Immune Evasion" <i>The Journal of Immunology</i> , Vol. 204, No. 1Supplement, 01 May 2020 (2020-05-01), pp. 1-5	10
Y	LI, Xin et al. "CD317 Promotes the Survival of Cancer Cells Through Apoptosis-inducing Factor" <i>Journal of Experimental & Clinical Cancer Research</i> , Vol. 35, No. 117, 22 July 2016 (2016-07-22), pp. 1-10	10



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
 "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

20 January 2021

Date of mailing of the international search report

20 February 2021

Name and mailing address of the ISA/CN

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

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/092328

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 109453385 A (SHENZHEN INSTITUTES OF ADVANCED TECHNOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 12 March 2019 (2019-03-12) description, embodiment 1	10
Y	CN 109481685 A (SHENZHEN INSTITUTES OF ADVANCED TECHNOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 19 March 2019 (2019-03-19) description, embodiments	10
Y	CN 107541513 A (SHENZHEN INSTITUTES OF ADVANCED TECHNOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 05 January 2018 (2018-01-05) description, embodiment 1	10
A	CN 107619443 A (SHENZHEN INSTITUTES OF ADVANCED TECHNOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 23 January 2018 (2018-01-23) entire document	1-10
A	CN 109705224 A (SHENZHEN INSTITUTES OF ADVANCED TECHNOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 03 May 2019 (2019-05-03) entire document	1-10
A	CN 107708741 A (IMMUNOMEDICS INC.) 16 February 2018 (2018-02-16) entire document	1-10
A	YOON, Dok Hyun et al. "Incorporation of Immune Checkpoint Blockade into Chimeric Antigen Receptor T Cells (CAR-Ts): Combination or Built-In CAR-T" <i>International Journal of Molecular Sciences</i> , Vol. 19, No. vol. 340, 24 January 2018 (2018-01-24), pp. 1-16	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/092328

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

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/092328

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	109453385	A	12 March 2019	None			
CN	109481685	A	19 March 2019	None			
CN	107541513	A	05 January 2018	None			
CN	107619443	A	23 January 2018	CN	107619443	B	14 August 2020
CN	109705224	A	03 May 2019	None			
CN	107708741	A	16 February 2018	JP	2018522833	A	16 August 2018
				CA	2983456	A1	15 December 2016
				AU	2016274989	A1	02 November 2017
				EP	3307282	A4	01 May 2019
				US	2016361360	A1	15 December 2016
				EP	3307282	A1	18 April 2018
				WO	2016201300	A1	15 December 2016
				IN	201717046260	A	09 February 2018

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2020/092328

A. 主题的分类 A61K 31/7088(2006.01)i; A61K 45/06(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61K 35/17(2015.01)i; A61P 31/18(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) A61K A61P 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)) DWPI;EPTXT;USTXT;WOTXT;SIPOABS;CNABS;CNTXT;CNKI;CJFD;NCBI;STNext: 深圳先进技术研究院, 章桂忠, 万晓春, 程建, 刘翌, 逯晓旭, 邓湑, CD317, 分化抗原簇317, Tetherin, HM1.24, 骨髓基质细胞抗原2, BST-2, 嵌合抗原受体, 工程化免疫细胞, 免疫细胞治疗, NK细胞, 敏感, 抑制, 敲出, CAR, YTS, TCR, CART, TCRT, CHIMERIC ANTI-GEN RECEPTOR, knocking down, knockdown, inhibitor, sensitivity, sensitive, siRNA, STNext核苷酸序列检索: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4														
C. 相关文件 <table border="1"> <thead> <tr> <th>类 型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>ZHANG, Guizhong 等. "CD317-mediated Cell Cytoskeleton Regulation as a Novel Means of Tumor Immune Evasion" The Journal of Immunology, 第204卷, 第1Supplement期, 2020年 5月 1日 (2020 - 05 - 01), 第1-5页</td> <td>1-9</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>ZHANG, Guizhong 等. "CD317-mediated Cell Cytoskeleton Regulation as a Novel Means of Tumor Immune Evasion" The Journal of Immunology, 第204卷, 第1Supplement期, 2020年 5月 1日 (2020 - 05 - 01), 第1-5页</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>LI, Xin 等. "CD317 Promotes the Survival of Cancer Cells Through Apoptosis-inducing Factor" Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 第35卷, 第117期, 2016年 7月 22日 (2016 - 07 - 22), 第1-10页</td> <td>10</td> </tr> </tbody> </table>			类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	X	ZHANG, Guizhong 等. "CD317-mediated Cell Cytoskeleton Regulation as a Novel Means of Tumor Immune Evasion" The Journal of Immunology, 第204卷, 第1Supplement期, 2020年 5月 1日 (2020 - 05 - 01), 第1-5页	1-9	Y	ZHANG, Guizhong 等. "CD317-mediated Cell Cytoskeleton Regulation as a Novel Means of Tumor Immune Evasion" The Journal of Immunology, 第204卷, 第1Supplement期, 2020年 5月 1日 (2020 - 05 - 01), 第1-5页	10	Y	LI, Xin 等. "CD317 Promotes the Survival of Cancer Cells Through Apoptosis-inducing Factor" Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 第35卷, 第117期, 2016年 7月 22日 (2016 - 07 - 22), 第1-10页	10
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求												
X	ZHANG, Guizhong 等. "CD317-mediated Cell Cytoskeleton Regulation as a Novel Means of Tumor Immune Evasion" The Journal of Immunology, 第204卷, 第1Supplement期, 2020年 5月 1日 (2020 - 05 - 01), 第1-5页	1-9												
Y	ZHANG, Guizhong 等. "CD317-mediated Cell Cytoskeleton Regulation as a Novel Means of Tumor Immune Evasion" The Journal of Immunology, 第204卷, 第1Supplement期, 2020年 5月 1日 (2020 - 05 - 01), 第1-5页	10												
Y	LI, Xin 等. "CD317 Promotes the Survival of Cancer Cells Through Apoptosis-inducing Factor" Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 第35卷, 第117期, 2016年 7月 22日 (2016 - 07 - 22), 第1-10页	10												
☒ 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 "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		国际检索报告邮寄日期												
2021年 1月 20日		2021年 2月 20日												
ISA/CN的名称和邮寄地址		受权官员												
中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		刘明 电话号码 (86-512)88996430												

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 109453385 A (深圳先进技术研究院) 2019年 3月 12日 (2019 - 03 - 12) 说明书实施例1	10
Y	CN 109481685 A (深圳先进技术研究院) 2019年 3月 19日 (2019 - 03 - 19) 说明书实施例	10
Y	CN 107541513 A (深圳先进技术研究院) 2018年 1月 5日 (2018 - 01 - 05) 说明书实施例1	10
A	CN 107619443 A (深圳先进技术研究院) 2018年 1月 23日 (2018 - 01 - 23) 全文	1-10
A	CN 109705224 A (深圳先进技术研究院) 2019年 5月 3日 (2019 - 05 - 03) 全文	1-10
A	CN 107708741 A (免疫医疗公司) 2018年 2月 16日 (2018 - 02 - 16) 全文	1-10
A	Y00N, Dok Hyun 等. "Incorporation of Immune Checkpoint Blockade into Chimeric Antigen Receptor T Cells (CAR-Ts): Combination or Built-In CAR-T" International Journal of Molecular Sciences, 第19卷, 第340期, 2018年 1月 24日 (2018 - 01 - 24), 第1-16页	1-10

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:

☒ 附件C/ST. 25文本文件形式

☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:

☐ 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))

☐ 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b)和行政规程第713段)

2. ☐ 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。

3. 补充意见:

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/092328

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	109453385	A	2019年 3月 12日	无			
CN	109481685	A	2019年 3月 19日	无			
CN	107541513	A	2018年 1月 5日	无			
CN	107619443	A	2018年 1月 23日	CN	107619443	B	2020年 8月 14日
CN	109705224	A	2019年 5月 3日	无			
CN	107708741	A	2018年 2月 16日	JP	2018522833	A	2018年 8月 16日
				CA	2983456	A1	2016年 12月 15日
				AU	2016274989	A1	2017年 11月 2日
				EP	3307282	A4	2019年 5月 1日
				US	2016361360	A1	2016年 12月 15日
				EP	3307282	A1	2018年 4月 18日
				WO	2016201300	A1	2016年 12月 15日
				IN	201717046260	A	2018年 2月 9日