

(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
2019年8月8日 (08.08.2019)



(10) 国际公布号
WO 2019/149279 A1

- (51) 国际专利分类号:
A61K 31/33 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2019/074535
- (22) 国际申请日: 2019年2月2日 (02.02.2019)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201810107786.5 2018年2月2日 (02.02.2018) CN
201810129611.4 2018年2月8日 (08.02.2018) CN
201910008444.2 2019年1月4日 (04.01.2019) CN
- (71) 申请人: 科济生物医药(上海)有限公司
(CARSGEN THERAPEUTICS CO., LTD.) [CN/CN];
中国上海市徐汇区银都路388号B栋, Shanghai
- 200231 (CN)。上海市肿瘤研究所(SHANGHAI CANCER INSTITUTE) [CN/CN]; 中国上海市徐汇区斜土路2200弄25号, Shanghai 200032 (CN)。
- (72) 发明人: 李宗海(LI, Zonghai); 中国上海市徐汇区银都路388号B栋, Shanghai 200231 (CN)。吴秀奇(WU, Xiuqi); 中国上海市徐汇区斜土路2200弄25号, Shanghai 200032 (CN)。
- (74) 代理人: 北京彩和律师事务所(BEIJING CAI HE LAW FIRM); 中国北京市海淀区大柳树路17号富海国际港1602室, Beijing 100081 (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,

(54) Title: COMBINATION OF CELLULAR IMMUNOTHERAPY

(54) 发明名称: 细胞免疫治疗的组合

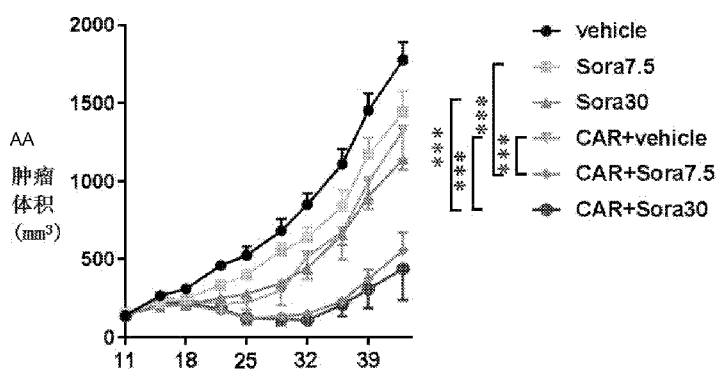
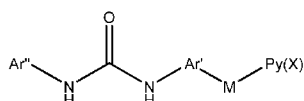


图 9A

AA Tumor volume (mm3)



(I)

(57) Abstract: Provided in the present invention is a method for treating tumor. An immune effector cell and a second treatment agent are applied to individuals suffering from tumor, wherein the immune effector cell expresses a receptor for recognizing tumor antigen, and wherein the second treatment agent is a compound shown in formula I or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

(57) 摘要: 本发明提供了一种治疗肿瘤的方法, 对患有肿瘤的个体施用免疫效应细胞和第二治疗剂, 所述免疫效应细胞表达有识别肿瘤抗原的受体, 所述的第二治疗剂为式I所示的化合物, 或其医药学上可接受的盐。

GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

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

本国际公布:

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

细胞免疫治疗的组合

5 技术领域

本发明属于细胞免疫治疗领域，具体涉及免疫效应细胞和激酶抑制剂类化疗剂联合用于抗肿瘤治疗。

背景技术

10 近年来，细胞免疫治疗如 CAR-T 细胞治疗在血液瘤治疗中显示出惊人的治疗效果，目前已经超过 200 项 CAR-T 细胞用于血液瘤治疗的临床实验 (Clinical development of CAR T cells-challenges and opportunities in translating innovative treatment concepts, Jessica Hartmann et al., EMBO Molecule Medicine, Published on line, August 1, 2017) 。然而对于实体瘤的治疗却难以
15 达到血液瘤治疗的效果。

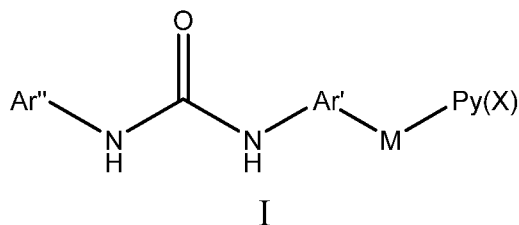
这是因为对于血液瘤而言，CAR-T 细胞通过静脉输入能够更容易的接触到肿瘤细胞实现杀伤，而 CAR-T 细胞想要归巢到实体瘤的肿瘤组织则具有更大的难度。并且，实体瘤通常具有复杂的动态的肿瘤微环境，能够使肿瘤细胞、良性细胞、基质细胞、血管细胞等相互作用，另外，肿瘤微环境中
20 还存在由细胞因子和生长因子相互作用的网络，因此，CAR-T 治疗在用于实体瘤治疗时，通常疗效不佳。

发明内容

本发明的目的在于提供一种肿瘤治疗方法，以提高免疫细胞治疗特别是
25 CAR-T 细胞治疗在实体瘤中应用效果。

在本发明得第一方面，提供了一种治疗肿瘤的方法，对患有肿瘤的个体施用免疫效应细胞和第二治疗剂，所述免疫效应细胞表达有识别肿瘤抗原的受体，所述第二治疗剂为激酶抑制剂。

在具体实施方式中，所述的第二治疗剂为式 I 所示的化合物，或其医药
30 学上可接受的盐，



其中, Ar'是非取代或取代的苯基, 取代基选自卤素和 C1-10 烷基,
M 是一个或多个桥连基, 选自-O-或-S-,

5 Py(X)是 X 取代的吡啶基, X 为-C(O)R_x, 其中, R_x 是 NR_aR_b, 其中的 R_a 和 R_b 各自是:

a)氢,

b)C1-10 烷基,

c)羟基取代的 C1-10 烷基,

10 d)含 1-3 个 N, S 或 O 的杂原子的 C3-12 环烷基, 或

e)-OSi(R_f)₃, R_f 是 C1-10 烷基,

Ar''是非取代或取代苯基, 取代基选自卤素或 W_n, n=0-3, W 选自:

a)C1-10 烷基,

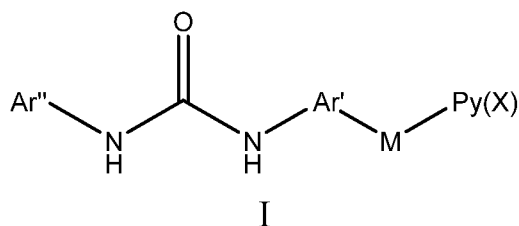
b)C1-10 烷氧基,

15 c)C1-10 卤代烷基

d)含 1-3 个 N, S 或 O 杂原子的 C3-12 杂芳基, 该杂芳基可被 C1-10 烷基取代。

在本发明的第二方面, 还提供了一种降低癌细胞生长、存活或活力的方法, 其特征在于, 对患有肿瘤的个体施用免疫效应细胞和第二治疗剂, 所述
20 免疫效应细胞表达有识别肿瘤抗原的受体,

所述的第二治疗剂为式 I 所示的化合物, 或其医药学上可接受的盐,



其中, Ar'是非取代或取代的苯基, 取代基选自卤素和 C1-10 烷基,
25 M 是一个或多个桥连基, 选自-O-或-S-,

Py(X)是 X 取代的吡啶基, X 为-C(O)R_x, 其中, R_x 是 NR_aR_b, 其中的 R_a 和 R_b 各自是:

- a)氢,
- b)C1-10 烷基,
- c)羟基取代的 C1-10 烷基,
- d)含 1-3 个 N, S 或 O 的杂原子的 C3-12 环烷基, 或
- e)-OSi(R_f)₃, R_f 是 C1-10 烷基,

5

Ar''是非取代或取代苯基, 取代基选自卤素或 W_n, n=0-3, W 选自:

- a)C1-10 烷基,
- b)C1-10 烷氧基,
- c)C1-10 卤代烷基

- 10 d)含 1-3 个 N, S 或 O 杂原子的 C3-12 杂芳基, 该杂芳基可被 C1-10 烷基取代。

在一优选方案中, 采用上述治疗肿瘤的方法, 或者降低癌细胞生长、存活或活力的方法, 在对患有肿瘤的个体施用免疫效应细胞之前, 所述的个体不进行淋巴细胞清除。

- 15 在一优选方案中, 采用上述治疗肿瘤的方法, 或者降低癌细胞生长、存活或活力的方法时, 所述免疫效应细胞和第二治疗剂的治疗效果大于所述免疫效应细胞和第二治疗剂任一单独使用的效果。

在另一优选方案中, 所述的 Ar''是取代苯基, 取代基选自氯、溴、氟、三氟甲基, 甲氧基和叔丁基中的任意一种或其组合。

- 20 在另一优选方案中, 所述的 M 是-O-。

在另一优选方案中, 所述的 Ra 和 Rb 各自是 H 或 C1-10 烷基, 优选的, Ra 和 Rb 分别为 H 和甲基。

- 25 在另一优选方案中, 所述医药学上可接受的盐选自: a)无机酸和有机酸的碱式盐, 所述酸选自: 盐酸、氢溴酸、硫酸、磷酸、甲磺酸、三氟甲磺酸、苯磺酸, 对甲苯磺酸, 1-萘磺酸, 2-萘磺酸, 乙酸、三氟乙酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸、乳酸、草酸、琥珀酸、富马酸, 马来酸、苯甲酸、水杨酸、苯基乙酸和杏仁酸; b)有机和无机碱的酸式盐, 所述阳离子选自: 碱金属阳离子, 碱土金属阳离子, 铵阳离子, 脂族基取代的铵阳离子, 和芳香基取代的铵阳离子。

- 30 在具体实施方式中, 所述的第二治疗剂选自下列任一所示的化合物或其医药学上可接受的盐:

N-(2-甲氧基-(5-三氟甲基)苯基)-N¹-(3-(2-氨基甲酰基-4-吡啶氧基)苯基)脲,

N-(2-甲氧基-(5-三氟甲基)苯基)-N¹-(3-(2-(N-甲基氨基甲酰基)-4-吡啶氧基)苯基)脲,

5 N-(2-甲氧基-(5-三氟甲基)苯基)-N¹-(4-(2-氨基甲酰基-4-吡啶氧基)苯基)脲,

N-(2-甲氧基-(5-三氟甲基)苯基)-N¹-(4-(2-(N-甲基氨基甲酰基)-4-吡啶氧基)苯基)脲,

10 N-(2-甲氧基-(5-三氟甲基)苯基)-N¹-(4-(2-(N-甲基氨基甲酰基)-4-吡啶基硫)苯基)脲,

N-(2-甲氧基-(5-三氟甲基)苯基)-N¹-(2-氯-4-(2-(N-甲基氨基甲酰基)(4-吡啶氧基))苯基)脲,

N-(2-甲氧基-(5-三氟甲基)苯基)-N¹-(3-氯-4-(2-(N-甲基氨基甲酰基)(4-吡啶氧基))苯基)脲,

15 N-(4-氯-3-(三氟甲基)苯基)-N¹-(3-(2-氨基甲酰基-4-吡啶氧基)苯基)脲,

N-(4-氯-3-(三氟甲基)苯基)-N¹-(3-(2-(N-甲基氨基甲酰基)-4-吡啶氧基)苯基)脲,

N-(4-氯-3-(三氟甲基)苯基)-N¹-(4-(2-氨基甲酰基-4-吡啶氧基)苯基)脲,

20 N-(4-氯-3-(三氟甲基)苯基)-N¹-(4-(2-(N-甲基氨基甲酰基)-4-吡啶氧基)苯基)脲,

N-(4-氯-3-(三氟甲基)苯基)-N¹-2-氟-(4-(2-(N-甲基氨基甲酰基)-4-吡啶氧基)苯基)脲,

N-(4-溴-3-(三氟甲基)苯基)-N¹-(3-(2-(N-甲基氨基甲酰基)-4-吡啶氧基)苯基)脲,

25 N-(4-溴-3-(三氟甲基)苯基)-N¹-(4-(2-(N-甲基氨基甲酰基)-4-吡啶氧基)苯基)脲,

N-(4-溴-3-(三氟甲基)苯基)-N¹-(3-(2-(N-甲基氨基甲酰基)-4-吡啶基硫)苯基)脲,

30 N-(4-溴-3-(三氟甲基)苯基)-N¹-(2-氯-4-(2-(N-甲基氨基甲酰基)(4-吡啶氧基))苯基)脲,

N-(4-溴-3-(三氟甲基)苯基)-N¹-(3-氯-4-(2-(N-甲基氨基甲酰基)(4-吡啶氧

基))苯基)脲,

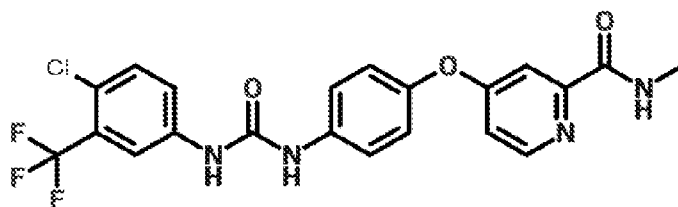
N-(2-甲氧基-4-氯-5-(三氟甲基)苯基)-N'-(3-(2-(N-甲基氨基甲酰基)-4-吡啶氧基)苯基)脲,

5 N-(2-甲氧基-4-氯-5-(三氟甲基)苯基)-N'-(4-(2-(N-甲基氨基甲酰基)-4-吡啶氧基)苯基)脲,

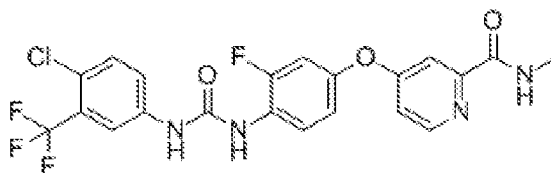
N-(2-甲氧基-4-氯-5-(三氟甲基)苯基)-N'-(2-氯-4-(2-(N-甲基氨基甲酰基)(4-吡啶氧基))苯基)脲,

N-(2-甲氧基-4-氯-5-(三氟甲基)苯基)-N'-(3-氯-4-(2-(N-甲基氨基甲酰基)(4-吡啶氧基))苯基)脲。

10 在具体实施方式中, 所述的第二治疗剂选自下列式 II 或式 III 所示的化合物, 或其医药学上可接受的盐。



II



III

15

在具体实施方式中, 所述的第二治疗剂的医药学上可接受的盐选自甲苯磺酸盐、苯磺酸盐、盐酸盐、甲磺酸盐。

在具体实施方式中, 所述的第二治疗剂为式 II 化合物或者式 II 化合物的水合物, 优选的为一水合物。

20 在另一优选方案中, 针对受试者个体, 第二治疗剂每天的给药量为 100-1000mg, 优选的, 每天的给药量为 200-800mg, 更优选的, 每天的给药量为 400-800mg。

在另一优选方案中, 针对受试者个体, 所述第二治疗剂每天给予 1-3 次, 优选每天给予第二治疗剂 2 次。

25 在另一优选方案中, 针对受试者个体, 所述免疫效应细胞每次的给予量为约 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^8$ 细胞/千克受试者体重, 进一步优选, 每次的给予量为约

$1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ 细胞/千克受试者体重。

在另一优选方案中，免疫效应细胞和第二治疗剂给予时间不分先后；可以先给予第二治疗剂再给予免疫效应细胞；也可以同时给药；还可以先给予免疫效应细胞再给予第二治疗剂，优选在给予所述第二治疗剂的期间给予所述免疫效应细胞。

在具体实施方式中，所述的第二治疗剂为口服给药。

在另一优选方案中，所述受体选自：嵌合抗原受体（Chimeric Antigen Receptor, CAR）、T 细胞受体（T cell receptor, TCR）、T 细胞融合蛋白（T cell fusion protein, TFP）、T 细胞抗原耦合器（T cell antigen coupler, TAC）或其组合。

在具体的实施方式中，所述的嵌合抗原受体包括：

(i) 特异性结合所述抗原的抗体或其片段、CD28 或 CD8 的跨膜区、CD28 的共刺激信号结构域和 CD3 ζ 的胞内域；或

(ii) 特异性结合所述抗原的抗体或其片段、CD28 或 CD8 的跨膜区、CD137 的共刺激信号结构域和 CD3 ζ 的胞内域；或

(iii) 特异性结合所述抗原的抗体或其片段、CD28 或 CD8 的跨膜区、CD28 的共刺激信号结构域、CD137 的共刺激信号结构域和 CD3 ζ 的胞内域。

在具体的实施方式中，所述肿瘤抗原选自：促甲状腺激素受体(TSHR)；CD171；CS-1；C 型凝集素样分子-1；神经节苷脂 GD3；Tn 抗原；CD19；CD20；CD 22；CD 30；CD 70；CD 123；CD 138；CD33；CD44；CD44v7/8；CD38；CD44v6；B7H3(CD276)，B7H6；KIT(CD117)；白介素 13 受体亚单位 α (IL-13R α)；白介素 11 受体 α (IL-11R α)；前列腺干细胞抗原(PSCA)；前列腺特异性膜抗原 (PSMA)；癌胚抗原 (CEA)；NY-ESO-1；HIV-1 Gag；MART-1；gp100；酪氨酸酶；间皮素；EpCAM；蛋白酶丝氨酸 21(PRSS21)；血管内皮生长因子受体；路易斯(Y)抗原；CD24；血小板衍生生长因子受体 β (PDGFR- β)；阶段 特异性胚胎抗原-4(SSEA-4)；细胞表面相关的粘蛋白 1(MUC1)，MUC6；表皮生长因子受体家族及其突变体(EGFR, EGFR2, ERBB3, ERBB4, EGFRvIII)；神经细胞粘附分子(NCAM)；碳酸酐酶 IX(CAIX)；LMP2；肝配蛋白 A 型受体 2(EphA2)；岩藻糖基 GM1；唾液酸基路易斯粘附分子 (sLe)；神经节苷脂 GM3(aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-4)bDGIcp(1-1)Cer)；TGS5；高分子量黑素瘤相

关抗原 (HMWMAA); 邻乙酰基 GD2 神经节苷脂(OAcGD2); 叶酸受体; 肿瘤血管内皮标记 1(TEM1/ CD248); 肿瘤血管内皮标记 7 相关的(TEM7R); Claudin 6, Claudin18.2、Claudin18.1; ASGPR1; CDH16; 5T4; 8H9; $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ 整合素; B 细胞成熟抗原 (BCMA); CA9; κ 轻链 (kappa light chain); CSPG4;

5 EGP2, EGP40; FAP; FAR; FBP; 胚胎型 AchR; HLA-A1, HLA-A2; MAGEA1, MAGE3; KDR; MCSP; NKG2D 配体; PSC1; ROR1; Sp17; SURVIVIN; TAG72; TEM1; 纤连蛋白; 腱生蛋白; 肿瘤坏死区的癌胚变体; G 蛋白偶联受体 C 类 5 组-成员 D(GPRC5D); X 染色体开放阅读框 61(CXORF61); CD97; CD179a; 间变性淋巴瘤激酶(ALK); 聚唾液酸; 胎盘特异性 1(PLAC1);

10 globoH glycosphingolipid 的己糖部分(GloboH); 乳腺分化抗原 (NY-BR-1); uroplakin 2(UPK2); 甲型肝炎病毒细胞受体 1(HAVCR1); 肾上腺素受体 β3 (ADRB3); pannexin 3(PANX3); G 蛋白偶联受体 20(GPR20); 淋巴细胞抗原 6 复合物基因座 K9 (LY6K); 嗅觉受体 51E2(OR51E2); TCR γ 交替阅读框蛋白(TARP); 肾母细胞瘤蛋白(WT1); ETS 易位变异基因 6 (ETV6-AML); 精子蛋白 17(SPA17); X 抗原家族成员 1A (XAGE1); 血管生成素结合细胞表面受体 2(Tie2); 黑素瘤癌睾丸抗原-1(MAD-CT-1); 黑素瘤癌睾丸抗原-2(MAD-CT-2); Fos 相关抗原 1; p53 突变体; 人端粒酶逆转录酶(hTERT); 肉瘤易位断点; 细胞凋亡的黑素瘤抑制剂(ML-IAP); ERG(跨膜蛋白酶丝氨酸 2(TMPRSS2)ETS 融合基因); N-乙酰葡萄糖胺基转移酶 V(NA17); 配对盒蛋白 Pax-3(PAX3); 雄激素受体; 细胞周期蛋白 B1; V-myc 鸟髓细胞瘤病毒癌基因神经母细胞瘤衍生的同源物(MYCN); Ras 同源物家族成员 C(RhoC); 细胞色素 P450 1B1(CYP1B1); CCCTC 结合因子(锌指蛋白)样(BORIS); 由 T 细胞识别的鳞状细胞癌抗原 3(SART3); 配对盒蛋白 Pax-5(PAX5); proacrosin 结合蛋白 sp32(OYTES1); 淋巴细胞特异性蛋白酪氨酸激酶(LCK); A 激酶锚定蛋白 4(AKAP-4); 滑膜肉瘤, X 断点 2(SSX2); CD79a; CD79b; CD72;

20 白细胞相关免疫球蛋白样受体 1(LAIR1); IgA 受体的 Fc 片段 (FCAR); 白细胞免疫球蛋白样受体亚家族成员 2(LILRA2); CD300 分子样家族成员 f (CD300LF); C 型凝集素结构域家族 12 成员 A(CLEC12A); 骨髓基质细胞抗原 2(BST2); 含有 EGF 样模块粘蛋白样激素受体样 2(EMR2); 淋巴细胞抗原

30 75(LY75); 磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 (GPC3); Fc 受体样 5(FCRL5); 免疫球蛋白 λ 样多肽 1(IGLL1)。

在具体实施方式中，所述肿瘤抗原为实体瘤抗原。优选的所述实体瘤抗原为血管内皮生长因子受体、EGFR、EGFRvIII、GPC3、或 Claudin18.2。更优选的，所述实体瘤抗原为 GPC3、EGFR、EGFRvIII、或血管内皮生长因子受体。

- 5 在具体实施方式中，所述的血管内皮生长因子受体为血管内皮生长因子受体 2(VEGFR2)。

在具体实施方式中，所述实体瘤抗原为 GPC3。

在具体实施方式中，所述特异性识别肿瘤抗原的抗体是靶向磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3(GPC3)的抗体。

- 10 在一优选方案中，特异性识别肿瘤抗原的抗体含有 SEQ ID NO:17、18、19 所示的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，和 SEQ ID NO:20、21、22 所示的 LCDR1、LCDR2、LCDR3。

在具体实施方案中，特异性识别肿瘤抗原的抗体的氨基酸序列与 SEQ ID NO:14 所示的序列具有至少 90% 的同一性。

- 15 在具体实施方案中，所述嵌合抗原受体的氨基酸序列与 SEQ ID NO:21、22、23 或 24 所示的序列具有至少 90% 的同一性。

在一优选方案中，所述治疗由临床结果：通过免疫效应细胞的抗肿瘤活性增加、增强或延长；与治疗前的数目相比较，抗肿瘤免疫效应细胞或活化免疫效应细胞数目的增加，或其组合决定。

- 20 在具体的实施方式中，所述临床结果选自肿瘤消退；肿瘤缩小；肿瘤坏死；通过免疫系统的抗肿瘤应答；肿瘤扩大、复发或扩散或其组合。

在具体的实施方式中，治疗效应通过免疫效应细胞的存在、或指示 T 细胞炎症的基因标记的存在或其组合预测，优选地，通过检测 IFN- γ 、TNF α 水平变化来预测。

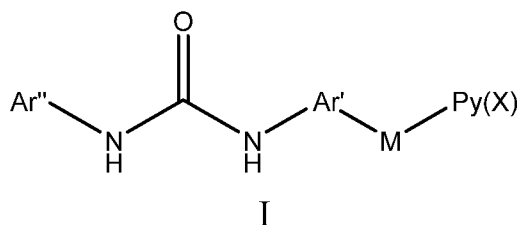
- 25 在具体的实施方式中，其中所述肿瘤包括：血液癌症，乳腺癌，脑胶质瘤，结肠癌，直肠癌，肾细胞癌，肝癌，肺癌，小肠癌，食道癌，黑素瘤，骨癌，胰腺癌，皮肤癌，头颈癌，皮肤或眼内恶性黑素瘤，子宫癌，卵巢癌，直肠癌，肛区癌，胃癌，睾丸癌，子宫癌，输卵管癌，子宫内膜癌，宫颈癌，阴道癌，阴户癌，霍奇金氏病，非霍奇金淋巴瘤，内分泌系统癌，甲状腺癌，
30 甲状旁腺癌，肾上腺癌，软组织肉瘤，尿道癌，阴茎癌，儿童实体瘤，膀胱癌，肾或输尿管癌，肾盂癌，中枢神经系统(CNS)瘤，原发性 CNS 淋巴瘤，

肿瘤血管发生，脊椎肿瘤，脑干神经胶质瘤，垂体腺瘤，卡波西肉瘤，表皮样癌，鳞状细胞癌，T 细胞淋巴瘤，环境诱发的癌症，所述癌症的组合和所述癌症的转移性病灶。优选的，选自肝癌、肾细胞癌、肺鳞癌、甲状腺癌。

在具体的实施方式中，所述的免疫效应细胞包括：T 细胞、B 细胞、自然杀伤(NK)细胞、自然杀伤 T(NKT)细胞、肥大细胞或骨髓源性吞噬细胞或其组合；优选地，所述免疫效应细胞选自自体 T 细胞、同种异体 T 细胞或同种异体 NK 细胞，更优选地，所述 T 细胞为自体 T 细胞。

在本发明的第三方面，本发明提供了一种给药系统，所述给药系统中包含有免疫效应细胞和第二治疗剂，所述免疫效应细胞表达有识别肿瘤抗原的受体。

所述的第二治疗剂为式 I 所示的化合物，或其医药学上可接受的盐，



其中，Ar'是非取代或取代的苯基，取代基选自卤素和 C1-10 烷基，M 是一个或多个桥连基，选自-O-或-S-

Py(X)是 X 取代的吡啶基，X 为-C(O)R_x，其中，R_x 是 NR_aR_b，其中的 R_a 和 R_b 各自是：

- a) 氢，
- b) C1-10 烷基，
- 20 c) 羟基取代的 C1-10 烷基，
- d) 含 1-3 个 N, S 或 O 的杂原子的 C3-12 环烷基，或
- e) -OSi(R_f)₃，R_f 是 C1-10 烷基，

Ar''是非取代或取代苯基，取代基选自卤素或 W_n，n=0-3，W 选自：

- a) C1-10 烷基，
- 25 b) C1-10 烷氧基，
- c) C1-10 卤代烷基

d) 含 1-3 个 N, S 或 O 杂原子的 C3-12 杂芳基，该杂芳基可被 C1-10 烷基取代。

在一优选方案中，所述的 Ar''是取代苯基，取代基选自氯、溴、氟、三

氟甲基，甲氧基和叔丁基中的任意一种或其组合。

在另一优选方案中，所述的 M 是-O-。

在另一优选方案中，所述的 Ra 和 Rb 各自是 H 或 C1-10 烷基，优选的，Ra 和 Rb 分别为 H 和甲基。

- 5 在另一优选方案中，所述医药学上可接受的盐选自：a)无机酸和有机酸的碱式盐，所述酸选自：盐酸、氢溴酸、硫酸、磷酸、甲磺酸、三氟甲磺酸、苯磺酸，对甲苯磺酸，1-萘磺酸，2-萘磺酸，乙酸、三氟乙酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸、乳酸、草酸、琥珀酸、富马酸，马来酸、苯甲酸、水杨酸、苯基乙酸和杏仁酸；b)有机和无机碱的酸式盐，所述阳离子选自：碱金属阳离子，碱土金属阳离子，铵阳离子，脂族基取代的铵阳离子，和芳香基取代的铵阳离子。

在具体实施方式中，所述的第二治疗剂选自下列任一所示的化合物或其医药学上可接受的盐：

- 15 N-(2-甲氧基-(5-三氟甲基)苯基)-N'-(3-(2-氨基甲酰基-4-吡啶氧基)苯基)脲，
- N-(2-甲氧基-(5-三氟甲基)苯基)-N'-(3-(2-(N-甲基氨基甲酰基)-4-吡啶氧基)苯基)脲，
- N-(2-甲氧基-(5-三氟甲基)苯基)-N'-(4-(2-氨基甲酰基-4-吡啶氧基)苯基)脲，
- 20 N-(2-甲氧基-(5-三氟甲基)苯基)-N'-(4-(2-(N-甲基氨基甲酰基)-4-吡啶氧基)苯基)脲，
- N-(2-甲氧基-(5-三氟甲基)苯基)-N'-(4-(2-(N-甲基氨基甲酰基)-4-吡啶基硫)苯基)脲，
- 25 N-(2-甲氧基-(5-三氟甲基)苯基)-N'-(2-氯-4-(2-(N-甲基氨基甲酰基)(4-吡啶氧基))苯基)脲，
- N-(2-甲氧基-(5-三氟甲基)苯基)-N'-(3-氯-4-(2-(N-甲基氨基甲酰基)(4-吡啶氧基))苯基)脲，
- N-(4-氯-3-(三氟甲基)苯基)-N'-(3-(2-氨基甲酰基-4-吡啶氧基)苯基)脲，
- N-(4-氯-3-(三氟甲基)苯基)-N'-(3-(2-(N-甲基氨基甲酰基)-4-吡啶氧基)苯基)脲，
- 30 N-(4-氯-3-(三氟甲基)苯基)-N'-(4-(2-氨基甲酰基-4-吡啶氧基)苯基)脲，

N-(4-氯-3-(三氟甲基)苯基)-N'-(4-(2-(N-甲基氨基甲酰基)-4-吡啶氧基)苯基)脲,

N-(4-氯-3-(三氟甲基)苯基)-N'-(2-氟-(4-(2-(N-甲基氨基甲酰基)-4-吡啶氧基)苯基)脲,

5 N-(4-溴-3-(三氟甲基)苯基)-N'-(3-(2-(N-甲基氨基甲酰基)-4-吡啶氧基)苯基)脲,

N-(4-溴-3-(三氟甲基)苯基)-N'-(4-(2-(N-甲基氨基甲酰基)-4-吡啶氧基)苯基)脲,

10 N-(4-溴-3-(三氟甲基)苯基)-N'-(3-(2-(N-甲基氨基甲酰基)-4-吡啶基硫)苯基)脲,

N-(4-溴-3-(三氟甲基)苯基)-N'-(2-氯-4-(2-(N-甲基氨基甲酰基)(4-吡啶氧基))苯基)脲,

N-(4-溴-3-(三氟甲基)苯基)-N'-(3-氯-4-(2-(N-甲基氨基甲酰基)(4-吡啶氧基))苯基)脲,

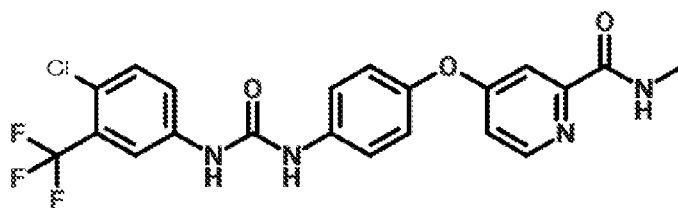
15 N-(2-甲氧基-4-氯-5-(三氟甲基)苯基)-N'-(3-(2-(N-甲基氨基甲酰基)-4-吡啶氧基)苯基)脲,

N-(2-甲氧基-4-氯-5-(三氟甲基)苯基)-N'-(4-(2-(N-甲基氨基甲酰基)-4-吡啶氧基)苯基)脲,

20 N-(2-甲氧基-4-氯-5-(三氟甲基)苯基)-N'-(2-氯-4-(2-(N-甲基氨基甲酰基)(4-吡啶氧基))苯基)脲,

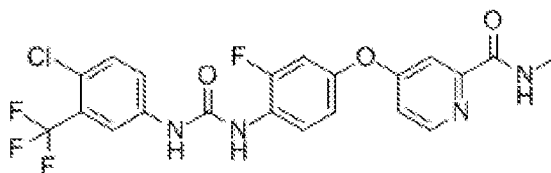
N-(2-甲氧基-4-氯-5-(三氟甲基)苯基)-N'-(3-氯-4-(2-(N-甲基氨基甲酰基)(4-吡啶氧基))苯基)脲。

在具体实施方式中, 所述的第二治疗剂选自下列式 II 或式 III 所示的化合物, 或其医药学上可接受的盐。



II

25



III

式 II 或式 III 所示的化合物的化学名称分别是：

5 N-(4-氯-3-(三氟甲基)苯基)-N'-(3-(2-(N-甲基氨基甲酰基)-4-吡啶氧基)苯基)脲、

N-(4-氯-3-(三氟甲基)苯基)-N'-2-氟-(4-(2-(N-甲基氨基甲酰基)-4-吡啶氧基)苯基)脲。

在具体实施方式中，所述的医药学上可接受的盐为甲苯磺酸盐、苯磺酸盐、盐酸盐、甲磺酸盐。

10 在另一优选方案中，针对受试者个体，第二治疗剂每天给药量为 100-1000mg，优选的，每天给药量为 200-800mg，更优选的，每天给药量为 400-800mg。

在另一优选方案中，针对受试者个体，所述第二治疗剂每天给予 1-3 次，优选每天给予第二治疗剂 2 次。

15 在另一优选方案中，针对受试者个体，所述免疫效应细胞每次的给予量为约 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^8$ 细胞/千克受试者体重，进一步优选，每次的给予量为约 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ 细胞/千克受试者体重。

20 在另一优选方案中，免疫效应细胞和第二治疗剂给予时间不分先后；可以先给予第二治疗剂再给予免疫效应细胞；也可以同时给药；还可以先给予免疫效应细胞再给予第二治疗剂，优选在给予所述第二治疗剂的期间给予所述免疫效应细胞。

在具体实施方式中，所述的第二治疗剂为口服给药。

25 在另一优选方案中，所述受体选自：嵌合抗原受体 (Chimeric Antigen Receptor, CAR)、T 细胞受体 (T cell receptor, TCR)、T 细胞融合蛋白 (T cell fusion protein, TFP)、T 细胞抗原耦合器 (T cell antigen coupler, TAC) 或其组合。

在具体的实施方式中，所述的嵌合抗原受体包括：

(i) 特异性结合所述抗原的抗体或其片段、CD28 或 CD8 的跨膜区、CD28 的共刺激信号结构域和 CD3 ζ 的胞内域；或

(ii) 特异性结合所述抗原的抗体或其片段、CD28 或 CD8 的跨膜区、CD137 的共刺激信号结构域和 CD3 ζ 的胞内域；或

(iii) 特异性结合所述抗原的抗体或其片段、CD28 或 CD8 的跨膜区、CD28 的共刺激信号结构域、CD137 的共刺激信号结构域和 CD3 ζ 的胞内域。

5 在具体的实施方式中，所述肿瘤抗原选自：促甲状腺激素受体(TSHR)；CD171；CS-1；C 型凝集素样分子-1；神经节苷脂 GD3；Tn 抗原；CD19；CD20；CD 22；CD 30；CD 70；CD 123；CD 138；CD33；CD44；CD44v7/8；CD38；CD44v6；B7H3(CD276)，B7H6；KIT(CD117)；白介素 13 受体亚单位 α (IL-13R α)；白介素 11 受体 α (IL-11R α)；前列腺干细胞抗原(PSCA)；前
10 列腺特异性膜抗原 (PSMA)；癌胚抗原 (CEA)；NY-ESO-1；HIV-1 Gag；MART-1；gp100；酪氨酸酶；间皮素；EpCAM；蛋白酶丝氨酸 21(PRSS21)；血管内皮生长因子受体；路易斯(Y)抗原；CD24；血小板衍生生长因子受体 β (PDGFR- β)；阶段 特异性胚胎抗原-4(SSEA-4)；细胞表面相关的粘蛋白 1(MUC1)，MUC6；表皮生长因子受体家族及其突变体(EGFR，EGFR2，
15 ERBB3，ERBB4，EGFRvIII)；神经细胞粘附分子(NCAM)；碳酸酐酶 IX(CAIX)；LMP2；肝配蛋白 A 型受体 2(EphA2)；岩藻糖基 GM1；唾液酸基路易斯粘附分子 (sLe) ；神经节苷脂 GM3(aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-4)bDGlc(1-1)Cer；TGS5；高分子量黑素瘤相关抗原 (HMWMAA)；邻乙酰基 GD2 神经节苷脂(OAcGD2)；叶酸受体；肿
20 瘤血管内皮标记 1(TEM1/ CD248)；肿瘤血管内皮标记 7 相关的(TEM7R)；Claudin 6，Claudin18.2、Claudin18.1；ASGPR1；CDH16；5T4；8H9； α v β 6 整合素；B 细胞成熟抗原 (BCMA)；CA9； κ 轻链 (kappa light chain)；CSPG4；EGP2，EGP40；FAP；FAR；FBP；胚胎型 AchR；HLA-A1，HLA-A2；MAGEA1，MAGE3；KDR；MCSP；NKG2D 配体；PSC1；ROR1；Sp17；SURVIVIN；
25 TAG72；TEM1；纤连蛋白；腱生蛋白；肿瘤坏死区的癌胚变体；G 蛋白偶联受体 C 类 5 组-成员 D(GPRC5D)；X 染色体开放阅读框 61(CXORF61)；CD97；CD179a；间变性淋巴瘤激酶(ALK)；聚唾液酸；胎盘特异性 1(PLAC1)；globoH glycoceramide 的己糖部分(GloboH)；乳腺分化抗原 (NY-BR-1)；uroplakin 2(UPK2)；甲型肝炎病毒细胞受体 1(HAVCR1)；肾上腺素受体 β 3
30 (ADRB3)；pannexin 3(PANX3)；G 蛋白偶联受体 20(GPR20)；淋巴细胞抗原 6 复合物基因座 K9 (LY6K)；嗅觉受体 51E2(OR51E2)；TCR γ 交替阅读框蛋

白(TARP); 肾母细胞瘤蛋白(WT1); ETS 易位变异基因 6 (ETV6-AML); 精子蛋白 17(SPA17); X 抗原家族成员 1A (XAGE1); 血管生成素结合细胞表面受体 2(Tie2); 黑素瘤癌睾丸抗原-1(MAD-CT-1); 黑素瘤癌睾丸抗原-2(MAD-CT-2); Fos 相关抗原 1; p53 突变体; 人端粒酶逆转录酶(hTERT);

5 肉瘤易位断点; 细胞凋亡的黑素瘤抑制剂(ML-IAP); ERG(跨膜蛋白酶丝氨酸 2(TMPS2)ETS 融合基因); N-乙酰葡萄糖胺基转移酶 V(NA17); 配对盒蛋白 Pax-3(PAX3); 雄激素受体; 细胞周期蛋白 B1; V-myc 鸟髓细胞瘤病毒癌基因神经母细胞瘤衍生的同源物(MYCN); Ras 同源物家族成员 C(RhoC); 细胞色素 P450 1B1(CYP1B1); CCCTC 结合因子(锌指蛋白)样(BORIS); 由 T

10 细胞识别的鳞状细胞癌抗原 3(SART3); 配对盒蛋白 Pax-5(PAX5); proacrosin 结合蛋白 sp32(OYTES1); 淋巴细胞特异性蛋白酪氨酸激酶(LCK); A 激酶锚定蛋白 4(AKAP-4); 滑膜肉瘤, X 断点 2(SSX2); CD79a; CD79b; CD72; 白细胞相关免疫球蛋白样受体 1(LAIR1); IgA 受体的 Fc 片段 (FCAR); 白细胞免疫球蛋白样受体亚家族成员 2(LILRA2); CD300 分子样家族成员 f

15 (CD300LF); C 型凝集素结构域家族 12 成员 A(CLEC12A); 骨髓基质细胞抗原 2(BST2); 含有 EGF 样模块粘蛋白样激素受体样 2(EMR2); 淋巴细胞抗原 75(LY75); 磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 (GPC3); Fc 受体样 5(FCRL5); 免疫球蛋白 λ 样多肽 1(IGLL1)。

在具体实施方式中, 所述肿瘤抗原为实体瘤抗原, 优选的所述实体瘤抗原为血管内皮生长因子受体、EGFR、EGFRvIII、GPC3、或 Claudin18.2, 更优选的, 所述实体瘤抗原为 GPC3、EGFR、EGFRvIII、或血管内皮生长因子受体。

20

在一实施方式中, 所述的血管内皮生长因子受体为血管内皮生长因子受体 2(VEGFR2)。

25 在具体实施方式中, 所述肿瘤抗原为 GPC3。

在具体实施方式中, 所述特异性识别肿瘤抗原的抗体是靶向磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3(GPC3)的抗体。

在一优选方案中, 特异性识别肿瘤抗原的抗体含有 SEQ ID NO:15、16、17 所示的 HCDR1、HCDR2、HCDR3, 和 SEQ ID NO:18、19、20 所示的 LCDR1、LCDR2、LCDR3。

30

在具体实施方案中, 特异性识别肿瘤抗原的抗体的氨基酸序列与 SEQ ID

NO:14 所示的序列具有至少 90% 的同一性。

在具体实施方案中，所述嵌合抗原受体的氨基酸序列与 SEQ ID NO:21、22、23 或 24 所示的序列具有至少 90% 的同一性。

在一优选方案中，所述治疗由临床结果：通过免疫效应细胞的抗肿瘤活性增加、增强或延长；与治疗前的数目相比较，抗肿瘤免疫效应细胞或活化免疫效应细胞数目的增加，或其组合决定。

在具体的实施方式中，所述临床结果选自肿瘤消退；肿瘤缩小；肿瘤坏死；通过免疫系统的抗肿瘤应答；肿瘤扩大、复发或扩散或其组合。

在具体的实施方式中，治疗效应通过免疫效应细胞的存在、或指示 T 细胞炎症的基因标记的存在或其组合预测，优选地，通过检测 IFN- γ 、TNF α 水平变化来预测。

在具体的实施方式中，其中所述肿瘤包括：血液癌症，乳腺癌，脑胶质瘤，结肠癌，直肠癌，肾细胞癌，肝癌，肺癌，小肠癌，食道癌，黑素瘤，骨癌，胰腺癌，皮肤癌，头颈癌，皮肤或眼内恶性黑素瘤，子宫癌，卵巢癌，直肠癌，肛区癌，胃癌，睾丸癌，子宫癌，输卵管癌，子宫内膜癌，宫颈癌，阴道癌，阴户癌，霍奇金氏病，非霍奇金淋巴瘤，内分泌系统癌，甲状腺癌，甲状旁腺癌，肾上腺癌，软组织肉瘤，尿道癌，阴茎癌，儿童实体瘤，膀胱癌，肾或输尿管癌，肾盂癌，中枢神经系统(CNS)瘤，原发性 CNS 淋巴瘤，肿瘤血管发生，脊椎肿瘤，脑干神经胶质瘤，垂体腺瘤，卡波西肉瘤，表皮样癌，鳞状细胞癌，T 细胞淋巴瘤，环境诱发的癌症，所述癌症的组合和所述癌症的转移性病灶。优选的，选自肝癌、肾细胞癌、肺鳞癌、甲状腺癌。

在具体的实施方式中，所述的免疫效应细胞包括：T 细胞、B 细胞、自然杀伤(NK)细胞、自然杀伤 T(NKT)细胞、肥大细胞或骨髓源性吞噬细胞或其组合；优选地，所述免疫效应细胞选自自体 T 细胞、同种异体 T 细胞或同种异体 NK 细胞，更优选地，所述 T 细胞为自体 T 细胞。

在本发明的第四方面，提供了表达有识别肿瘤抗原的受体的免疫效应细胞在制备药物中的应用，其特征在于，所述药物与索拉非尼联用。

在具体实施方式中，上述应用时用于在人类患者中治疗肿瘤，其中将所述细胞和索拉非尼配制成能提供单独使用所述细胞和索拉非尼获得的效果更好或更大的治疗效果，即所述细胞和索拉非尼配制成能提供比所述试剂各自单独使用时的效果更大的治疗效果。

在本发明的第五方面，提供了一种用于治疗肿瘤的试剂盒，其特征在于，所述试剂盒包含：

- 1) 表达有识别肿瘤抗原的受体的免疫效应细胞；
- 2) 索拉非尼；
- 5 3) 用于包含以上 1)和 2)所述物质的容器；和
- 4) 利用所述试剂盒治疗肿瘤的给药说明书；

其中，所述免疫效应细胞和索拉非尼配制成能提供比所述试剂各自单独使用时的效果更大的治疗效果；优选地，所述免疫效应细胞为 CAR T 细胞，更优选地，所述 CAR T 细胞特异性识别 EGFR、EGFRvIII，磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3、claudin 18.2、BCMA。

在具体实施方式中，所述 CAR T 细胞特异性识别磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3。

在本发明的第六方面，提供了一种用于治疗肿瘤的制品，其特征在于，所述制品包含：免疫效应细胞和第二治疗剂，所述免疫效应细胞表达有识别肿瘤抗原的受体。

所述制品包含：

- 1) 表达有识别肿瘤抗原的受体的免疫效应细胞；
- 2) 索拉非尼式 II 所示的化合物；
- 3) 用于包含以上 1)和 2)所述物质的容器；和
- 20 4) 利用所述制品治疗肿瘤的给药说明书；

其中免疫效应细胞表达有识别肿瘤抗原的嵌合抗原受体，所述免疫效应细胞和第二治疗剂与上述本发明第一方面、第二方面、以及第三方面中涉及的定义相同。

在本发明的第六方面，提供表达有识别肿瘤抗原的受体的免疫效应细胞和第二治疗剂在制备药物或制品中的用途，所述药物用于在人类患者中治疗肿瘤，其中将所述细胞和第二治疗剂配制成的药物能提供比所述细胞和第二治疗剂各自单独使用时更优或更大的治疗效果。

免疫效应细胞和第二治疗剂与上述本发明第一方面、第二方面、以及第三方面中涉及的定义相同。

在本发明的一个具体的实施方式中，提供治疗肿瘤或者降低癌细胞生长、存活或活力的方法，其特征在于，对患有肿瘤的个体施用免疫效应细胞

和索拉非尼，所述免疫效应细胞表达有识别肿瘤抗原的嵌合抗原受体。该嵌合抗原受体具有特异性识别肿瘤抗原的抗体或其片段、跨膜结构域和细胞质信号传导结构域。其中所述特异性识别肿瘤抗原的抗体或其片段含有 SEQ ID NO:15、16、17 所示的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，和 SEQ ID NO:18、19、20 所示的 LCDR1、LCDR2、LCDR3。其中，所述肿瘤为肝癌，所述癌细胞为肝癌细胞。

在本发明的一个具体的实施方式中，提供治疗肿瘤或者降低癌细胞生长、存活或活力的方法，其特征在于，对患有肿瘤的个体施用免疫效应细胞和瑞戈非尼，所述免疫效应细胞表达有识别肿瘤抗原的嵌合抗原受体。该嵌合抗原受体具有特异性识别肿瘤抗原的抗体或其片段、跨膜结构域和细胞质信号传导结构域。其中所述特异性识别肿瘤抗原的抗体或其片段含有 SEQ ID NO:15、16、17 所示的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，和 SEQ ID NO:18、19、20 所示的 LCDR1、LCDR2、LCDR3。其中，所述肿瘤为肝癌，所述癌细胞为肝癌细胞。

在本发明的一个具体的实施方式中，提供了一种用于治疗肿瘤的制品或试剂盒，其特征在于，所述制品或试剂盒包含：

- 1) 免疫效应细胞，
- 2) 索拉非尼或瑞戈非尼，
- 3) 用于包含以上 1)和 2)所述物质的容器；和
- 4) 利用所述制品治疗肿瘤的给药说明书；

其中，所述免疫效应细胞表达有识别肿瘤抗原的嵌合抗原受体。该嵌合抗原受体具有特异性识别肿瘤抗原的抗体或其片段、跨膜结构域和细胞质信号传导结构域。其中所述特异性识别肿瘤抗原的抗体或其片段含有 SEQ ID NO:15、16、17 所示的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，和 SEQ ID NO:18、19、20 所示的 LCDR1、LCDR2、LCDR3。其中，所述肿瘤为肝癌，所述癌细胞为肝癌细胞。

应理解，在本发明范围内中，本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合，从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅，在此不再一一累述。

本发明的有益效果：

- 1、本发明所提供的式 I 所示的化合物和免疫效应细胞联用，能够显著

提高杀伤肿瘤细胞的能力。

2、采用本发明的治疗方案能够对抗癌症微环境中的免疫抑制，从而对于实体瘤的作用显著增强，对于难治性和进行性的癌症也具有较好的效果。

5 附图说明

图 1A 为 PRRLSIN- hu9F2-28Z 质粒图谱；图 1B 为 CAR T 细胞阳性率检测。

图 2 显示了索拉非尼对肝癌细胞及 CAR T 细胞的毒性检测。

10 图 3 显示了体外检测 CAR T 细胞对经索拉非尼处理后的肿瘤细胞的杀伤能力。

图 4 显示了流式检测 Hepa1-6 细胞上 GPC3 的表达。

图 5 显示了索拉非尼与 CAR T 细胞联用对 hepa1-6-GPC3 皮下瘤的肿瘤体积的抑制效果。

15 图 6 显示了索拉非尼与 CAR T 细胞联用对 hepa1-6-GPC3 皮下瘤的肿瘤重量的抑制效果。

图 7 显示了体外检测索拉非尼处理后的 CAR T 细胞的脱颗粒能力（图 7A）、增殖能力（图 7B）及杀伤能力（图 7C）。

图 8 显示了检测索拉非尼对人 CAR T 细胞的细胞因子分泌 IL-2(图 8A)、IFN- γ （图 8B）和 TNF- α （图 8C）的影响。

20 图 9 显示了索拉非尼和人 CAR T 细胞联合治疗肝癌的肿瘤体积（9A）和肿瘤重量（9B）。

图 10 显示了 CAR T 细胞瘤内浸润情况（图 10A）和细胞凋亡情况（图 10B、10C）。

25 图 11 显示了体外检测索拉非尼联合人 CAR T 细胞协同促进 PLC/RPF/5 细胞的凋亡情况。

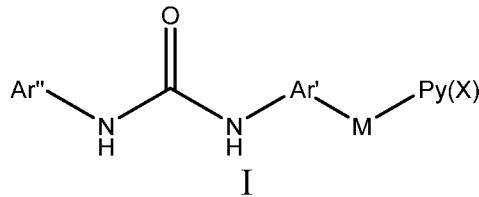
图 12 显示了 CAR T 细胞与瑞戈非尼联用对小鼠肝癌移植瘤的治疗结果。

图 13 显示了利用 CAR T 细胞与索拉非尼联合治疗后受试者的影像学图像。

30

具体实施方式

本发明涉及免疫效应细胞和第二治疗剂（式 I 所示的化合物）联合应用于治疗肿瘤，应理解本发明并不限于所述的方法和实验条件。除非本文中专门定义，所使用的所有技术和科学术语具有在基因治疗、生物化学、遗传学、分子生物学、以及药物化学领域内的技术人员通常理解的不同含义。



类似或等效于本文中描述的方法和材料都可以在本发明的实践或测试中使用。本文提及的所有出版物、专利申请、专利和其他参考文献都以其全部内容结合于本文中作为参考。在冲突的情况下，以本说明书包括定义为准。

10 此外，除非另有说明，材料、方法和实施例仅是说明性的，而并非进行限制。

除非另有说明，本发明的实践将采用细胞生物学、细胞培养、分子生物学、转基因生物学、微生物学、重组 DNA 和免疫学的传统技术，这都属于本领域的技术范围。这些技术充分解释于文献中。参见，例如，Current Protocols in Molecular Biology (Frederick M. AUSUBEL, 2000, Wiley and son Inc, Library of Congress, USA); Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition, (Sambrook et al, 2001, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gaited., 1984); Mullis et al. U.S. Pat. No. 4,683,195; Nucleic Acid Hybridization (B. D. Harries & S. J. Higgins eds. 1984); Transcription And Translation (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Culture Of Animal Cells (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); the series, Methods In ENZYMOLOGY (J. Abelson 和 M. Simon, eds.-in-chief, Academic Press, Inc., New York), 尤其是 Vols. 154 和 155 (Wu et al. eds.) 和 Vol. 185, "Gene Expression Technology" (D. Goeddel, ed.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller 和 M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer 和 Walker, eds., Academic Press, London, 1987); Hand book Of Experimental Immunology, 卷 I-IV (D. M. Weir 和 C. C. Blackwell, eds., 1986); 和 Manipulating the Mouse Embryo (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986)。

25

30

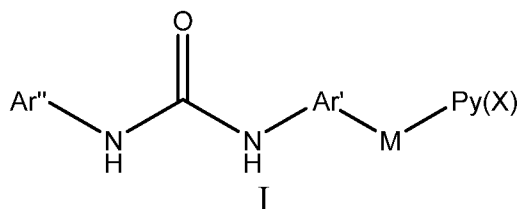
本发明至少部分源于下述认知：连续地、以任一次序地或基本上同时地给予第二治疗剂和免疫效应细胞的一个或多个周期和/或剂量的组合治疗方案，在治疗一些受试者的癌症时可以是更有效的增加、增强或延长免疫细胞的活性和/或数目，从而达到抗肿瘤效果。

5 本文使用的术语约是指本技术领域技术人员容易知晓的各值的通常误差范围。本文中述及“约”值或参数，包括(并描述)指向该值或参数本身的实施方式。例如，关于“约 X”的描述包括“X”的描述。例如，“约”或“包含”可意指按照在该领域中的实际的标准偏差在 1 以内或多于 1。或者“约”或“包含”可意指至多 10% (即 $\pm 10\%$) 的范围。例如，约 5mg 可包括在 4.5mg 与 5.5mg
10 之间的任何数目。当在申请案与申请专利范围中提供特定值或组成时，除非另外指出，否则“约”或“包含”应假定为在该特定值或组成的可接受误差范围内。

本文中所述任何浓度范围、百分比范围、比例范围或整数范围应理解为包括在所述范围内的任何整数，以及在合适情况下，其分数（例如整数的十分之一与百分之一）的数值，除非另外指出。
15

本文中所述的“剂量”，可以是以重量为基础计算的剂量或以体表面积 (BSA) 为基础计算的剂量表示。以重量为基础计算的剂量是以患者体重为基础所计算出的对于患者给予的剂量，例如 mg/kg。以 BSA 为基础计算的剂量是以患者的表面积为基础所计算出的对患者给予的剂量，例如 mg/m²。

20 在具体实施方式中，本发明采用的第二治疗剂为式 I 所示的化合物，或其医药学上可接受的盐。



其中，Ar' 是非取代或取代的苯基，取代基选自卤素和 C1-10 烷基，
25 M 是一个或多个桥连基，选自 -O- 或 -S-，
Py(X) 是 X 取代的吡啶基，X 为 -C(O)R_x，其中，R_x 是 NR_aR_b，其中的 R_a 和 R_b 各自是：

- a) 氢，
- b) C1-10 烷基，

- c)羟基取代的 C1-10 烷基,
- d)含 1-3 个 N, S 或 O 的杂原子的 C3-12 环烷基, 或
- e)-OSi(R_f)₃, R_f是 C1-10 烷基,

Ar”是非取代或取代苯基, 取代基选自卤素或 W_n, n=0-3, W 选自:

5

- a)C1-10 烷基,
- b)C1-10 烷氧基,
- c)C1-10 卤代烷基

d)含 1-3 个 N, S 或 O 杂原子的 C3-12 杂芳基, 该杂芳基可被 C1-10 烷基取代。

10

在本发明中, 术语“C1-10 烷基”指的是任意的含有 1—10 个碳原子的直链或支链基团, 例如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、仲丁基、正戊基、叔戊基、正己基、正庚基、正辛基、异辛基、2-乙基己基、正壬基、异壬基、正癸基等。

15

术语“C1-10 烷氧基”指的是任意上述 C1-C10 烷基其通过氧原子(-O-)连接到分子的其余部分。

术语“卤素”是指氟元素、氯元素、溴元素、碘元素。

术语“卤代烷基”是指氟代烷基、氯代烷基、溴代烷基、碘代烷基。

20

术语“C3-12 环烷基”是指具有 3 至 12 个碳原子的非芳族、饱和或不饱和、单环或双环烃环。示例“环烷基”包括但不限于环丙基、环丁基、环戊基、环己基和环庚基等。

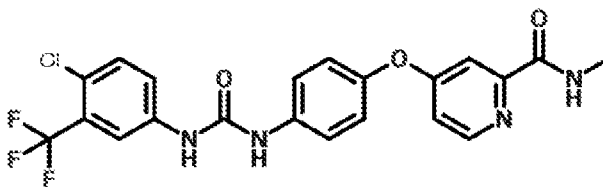
25

术语“杂芳基”是指芳族的杂环, 通常为具有 1 至 3 个选自 N、O 或 S 的杂原子的 5-至 8-元的杂环; 杂芳基环可以任选地进一步稠合或连接于芳族和非芳族的碳环和杂环。所述杂芳基的非限制性的实例为例如吡啶基、吡嗪基、嘧啶基、哒嗪基、吡咯基、咪唑基、噻唑基、异噻唑基、噻吩基、吡咯基、苯基-吡咯基、呋喃基、苯基-呋喃基、噁唑基、异噁唑基、吡唑基、噻吩基、苯并噻吩基、异二氢吡啶基、苯并咪唑基、吡唑基、喹啉基、异喹啉基、1,2,3-三唑基、1-苯基-1,2,3-三唑基、2,3-二氢吡啶基、2,3-二氢苯并呋喃基、2,3-二氢苯并噻吩基、苯并吡喃基、2,3-二氢苯并噁嗪基、2,3-二氢喹啉基等。

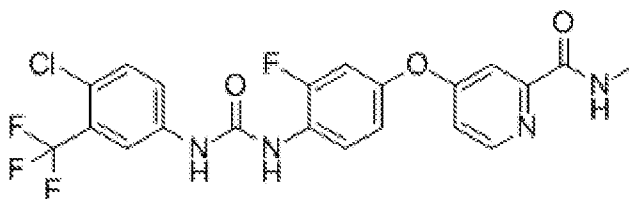
30

从所有上述描述中, 对本领域技术人员显而易见的是, 其名称是复合名称的任意基团, 例如“芳基氨基”, 应该指的是常规地从其衍生的部分例如从被芳基取代的氨基来构建, 其中芳基如上文所定义。

在具体实施方式中，式 I 所示的化合物包括但不限于为式 II 和式 III 所示的化合物。



II



III

在具体实施方案中，第二治疗剂可以为式 II 化合物的医药学上可接受的盐，如甲苯磺酸盐、苯磺酸盐、盐酸盐、甲磺酸盐等。

在具体实施方案中，式 III 化合物还可采用其水合物，如一水合物、二水合物；还可采用其医药学上可接受的盐，如盐酸盐等。

申请人发现，第二治疗剂如化合物 II 不仅能促进 CAR T 细胞分泌细胞因子 IL2，还能够促进 CAR T 细胞在肿瘤组织的浸润、还能提高抗肿瘤作用。因此，第二治疗剂如化合物 II 与靶向肿瘤特异性抗原的免疫细胞治疗联用可以显著提高抗肿瘤作用。

申请人还发现，本发明不仅可以提高难治型癌症的抗癌效果，在使用 CAR-T 细胞时，即使没有进行淋巴细胞清除，也能达到很好的抗肿瘤效果，从而大大减轻清淋造成的抗癌治疗效果低以及减轻对正常组织的损伤所造成的毒副作用，尤其是对骨髓的严重抑制。

在具体实施方式中，第二治疗剂如化合物 II 能以其本身安全的口服或非口服给药，或者以和药学上可接受的载体赋形剂及其他添加剂形成的化合物(如片剂、缓释制剂、胶囊剂、注射剂、溶液剂)安全的口服或非口服给药。当口服给药时，组合物可配制成片剂、糖衣剂或胶囊。为制备口服组合物可采用乳糖或淀粉做载体，明胶，羧甲基纤维素钠，甲基纤维素聚乙烯吡咯烷酮等是合适的结合剂或成颗剂。作为崩解剂可选用淀粉或微晶纤维素，常以滑石粉，胶体硅胶，硬脂酸甘油酯，硬脂酸钙或镁等作为合适的抗黏合剂和润滑剂。例如，可通过压制湿颗粒来制备

片剂。活性成分与载体以及选择性的与一份崩解添加剂组成混合物，该混合物与黏合剂的含水溶液，醇性或含水醇性溶液在合适的设备中进行颗粒化，干燥颗粒随后加入其他的崩解剂，润滑剂和抗黏剂将此混合物压片。为增加溶解性可将杂环类衍生物游离后制成药学上可接受的有机酸，较好地为甲磺酸，富马酸等以有利于以注射剂形式给药，虽然剂量依治疗对象、给药方式、症状及其它因素而改变。

在具体实施方式中，第二治疗剂为索拉非尼（Sorafenib）（具有式 II 化合物所示的结构），优选的，为甲苯磺酸索拉非尼。

在具体实施方式中，第二治疗剂为瑞戈非尼（Regorafenib）（具有式 III 化合物所示的结构），优选的，为甲苯磺酸索拉非尼。

申请人发现，由于索拉非尼与 CAR-T 细胞的协同作用，即使使用低剂量的索拉非尼也能实现较好的效果，故本发明的技术方案可以降低索拉非尼的毒副作用。

在具体实施方式中，低剂量的第二治疗剂是指低于单独用药能达到临床治疗效果的剂量，如低剂量的索拉非尼是指低于索拉非尼单独用药能达到临床治疗效果的剂量，具体是指临床上索拉非尼的推荐剂量：推荐服用索拉非尼为每次 0.4 g（2x0.2g），每日两次；或者是指低于化合物 II 单独用药后临床实验中病人体内大约的浓度 6.5uM。

本发明中索拉非尼用药剂量可以为低于临床的有效剂量。在某些实施方案中，患有肿瘤的个体的体内索拉非尼平均浓度约为 6、5.5、5、4.5、4、3.5、3、2.5、2、1.5、1、0.95、0.9、0.85、0.8、0.75、0.7、0.65、0.6、0.55、0.5、0.45、0.4、0.35、0.3、0.25、0.2、0.15、0.1、0.095、0.09、0.085、0.08、0.075、0.07、0.065、0.06、0.055、0.05、0.045、0.04、0.035、0.034、0.033、0.032、0.031、0.03、0.029、0.028、0.027、0.026、0.025、0.024、0.023、0.022、0.021、0.02、0.019、0.018、0.017、0.016、0.015、0.014、0.013、0.012、0.011、0.01、0.009、0.008、0.007、0.006、0.005、0.004、0.003、0.002 或 0.001 uM。在某些实施方案中，患有肿瘤的个体每天口服索拉非尼的剂量约为 700、650、600、550、500、450、400、350、300、290、280、270、260、250、240、230、220、210、200、190、180、170、160、150、140、130、120、110、100、90、80、70、60、50、40、30、20、10、9、8、7、6、5、4、3、2 或 1mg，优选的，为 400-800mg/

天。

本发明中索拉非尼用药可以一天一次，也可以一天多次，如一天两次。

就索拉非尼而言，每天给药量可以在 100-1000mg，优选的，每天给药 200-800mg，更有选的，每天给药 400-800mg。

本发明中免疫效应细胞和第二治疗剂给予时间不分先后；可以先给予第二治疗剂再给予免疫效应细胞；也可以同时给药；还可以先给予免疫效应细胞再给予第二治疗剂。

在某些实施方案中，免疫效应细胞在第二治疗剂给予之前 1 小时、2 小时、3 小时、4 小时、5 小时、6 小时、7 小时、8 小时、9 小时、10 小时、11 小时、12 小时、1 天、2 天、3 天、4 天、5 天、6 天、7 天、8 天、9 天、10 天、11 天、12 天、13 天、14 天、15 天、16 天、17 天、18 天、19 天、20 天、21 天、22 天、23 天、24 天、25 天、26 天、27 天、28 天、29 天、1 个月或其任何组合施用。

在某些实施方案中，免疫效应细胞在第二治疗剂给予之后 1 小时、2 小时、3 小时、4 小时、5 小时、6 小时、7 小时、8 小时、9 小时、10 小时、11 小时、12 小时、1 天、2 天、3 天、4 天、5 天、6 天、7 天、8 天、9 天、10 天、11 天、12 天、13 天、14 天、15 天、16 天、17 天、18 天、19 天、20 天、21 天、22 天、23 天、24 天、25 天、26 天、27 天、28 天、29 天、1 个月或其任何组合施用。

在某些实施方案中，第二治疗剂持续给予直至医生评估需要停药或者可以停药，如医生评估达到完全缓解后停药，或者疾病进展停药。在某些实施例中，第二治疗剂持续给予 1 个月、2 个月、3 个月、4 个月、5 个月、6 个月、7 个月、8 个月、9 个月、10 个月、11 个月、12 个月甚至更久。。免疫效应细胞在第二治疗剂持续给予期间给予。

术语“免疫效应细胞”，是指参与免疫应答，例如，促进免疫效应的细胞。免疫效应细胞的实例包括 T 细胞，例如， α/β 的 T 细胞和 γ/δ 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。优选地，所述 T 细胞包括自体 T 细胞、异种 T 细胞、同种异体 T 细胞，所述的自然杀伤细胞是同种异体 NK 细胞。正如本文中使用的的那样，术语“免疫效应功能或免疫效应应答”是指免疫效应细胞，例如增强或促进靶细胞的

免疫攻击的功能或反应。例如，免疫效应功能或应答是指促进靶细胞的杀伤或者抑制生长或增殖的 T 细胞或 NK 细胞的属性。

术语“治疗有效量”、“治疗有效的”、“有效量”在本文中可互换地使用，并且是指如本文中所述有效地实现特定生物学结果的化合物、制剂、物质或组合物的量，例如但不限于足以促进 T 细胞应答的量或剂量。当指示“免疫学上有效量”、“抗肿瘤有效量”、“抑制肿瘤有效量”或“治疗有效量”时，将要被施用的本发明的免疫效应细胞、治疗剂的精确数量可以由医师在考虑个体在年龄、体重、肿瘤大小、感染或转移的程度以及患者(受试者)的状况的情况下确定。有效量的免疫效应细胞是指但不限于能使免疫效应细胞抗肿瘤活性增加、增强或延长；抗肿瘤免疫效应细胞或活化免疫效应细胞数目的增加；促进 IFN- γ 、TNF α 分泌；肿瘤消退、肿瘤缩小、肿瘤坏死的免疫效应细胞的数量。

术语“不清淋”或“不进行淋巴细胞清除”，即不清除受试者体内的淋巴细胞。包括但不限于不给予淋巴细胞清除剂、全身辐射治疗或其组合或其他引起淋巴细胞数量清除的手段；但是，在给予了淋巴细胞清除剂、全身辐射治疗或其组合或其他引起淋巴细胞数量清除的手段后，当受试者体内淋巴细胞清除率低于 60%，例如，体内淋巴细胞清除率为 55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%或 10%，也将以等同落入本申请“不清淋”的范畴。

在本文中，淋巴细胞清除率可通过检测清除淋巴细胞之前的淋巴细胞数量和检测清除淋巴细胞的淋巴细胞数量计算得到，如给予清淋药前的淋巴细胞数量-给予清淋药后的淋巴细胞数量/给予清淋药前的淋巴细胞数量。淋巴细胞的检测可以通过医务人员常用的淋巴细胞数量检测方法检测，如血常规等。

术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”可互换地使用，并且是指由肽键共价连接的氨基酸残基组成的化合物。蛋白质或肽必须含有至少两个氨基酸，并且对于可以包括蛋白质或肽的序列的氨基酸的最大数量没限制。多肽包括含有彼此通过肽键结合的两个或多个氨基酸的任何肽或蛋白质。本文所用的“嵌合受体”，即用基因重组技术将不同来源的 DNA 片段或蛋白质相应的 cDNA 连接而成的融合分子，包括胞外域、跨膜域和胞内域。嵌合受体包括但不限于：嵌合抗原受体 (CAR)、修饰的 T 细胞 (抗原) 受体 (TCR)、T 细胞融合蛋

白 (TFP)、T 细胞抗原耦合器 (TAC)。

本文所用的“嵌合抗原受体”或“CAR”是指一组多肽，当其在免疫效应细胞中时，给所述的细胞提供针对靶细胞(通常是癌细胞)的特异性，并且具有细胞内信号产生。CAR 通常包括至少一个细胞外抗原结合结构域、跨膜结构域和细胞质信号传导结构域(本文中也称为“胞内信号传导结构域”)，其包括来源于如下定义的刺激性分子和/或共刺激性分子的功能信号传导结构域。在某些方面，多肽组彼此邻接。多肽组包括在存在二聚化分子时可以使多肽彼此偶联的二聚化开关，例如，可以使抗原结合结构域偶联至胞内信号传导结构域。在一个方面，刺激性分子为与 T 细胞受体复合体结合的 ζ 链。在一个方面，细胞质信号传导结构域进一步包括一种或多种来源于至少一个如下定义的共刺激性分子的功能性信号传导结构域。在一个方面，共刺激性分子选自本文所述共刺激性分子，例如 4-1BB(即 CD137)、CD27 和/或 CD28。在一个方面，CAR 包括嵌合融合蛋白，该融合蛋白包含细胞外抗原结合结构域、跨膜结构域和包含来源于刺激性分子的功能性信号传导结构域的胞内信号传导结构域。在一个方面，CAR 包含嵌合融合蛋白，该融合蛋白包含细胞外抗原结合结构域、跨膜结构域和包含来源于共刺激性分子的功能性信号传导结构域和来源于刺激性分子的功能性信号传导结构域的胞内信号传导结构域。在一个方面中，CAR 包含嵌合融合蛋白，该融合蛋白包含细胞外抗原结合结构域、跨膜结构域和包含来源于一个或更多个共刺激性分子的两个功能性信号传导。

在一个方面，本发明设想产生功能等同分子的起始抗体或片段(例如 scFv)氨基酸序列的修饰。例如，本文所述的癌症相关抗原的抗原结合结构域的 VH 或 VL，例如 CAR 中包含的 scFv，可以被修饰以保留本文所述的癌症相关抗原的抗原结合结构域的起始 VH 或 VL 构架区(例如 scFv)的至少约 70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性。本发明设想整个 CAR 构建体的修饰，例如 CAR 构建体的多个结构域的一个或更多个氨基酸序列的修饰，以产生功能等同分子。CAR 构建体可以被修饰以保留起始 CAR 构建体的至少约 70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、

90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性。

本文所用的“跨膜结构域”，可以包括一个或更多个邻接跨膜区域的另外氨基酸，例如一个或更多个与所述跨膜所源自的蛋白质的胞外区域相关联的氨基酸(例如，胞外区域的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10直至15个氨基酸)和/或与所述跨膜蛋白所源自的蛋白质的胞外区域相关联的一个或更多个另外的氨基酸(例如，胞内区域的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10直至15个氨基酸)。在一个方面，跨膜结构域是与嵌合受体的其它结构域中的一个有关的结构域，例如，在一种实施方式中，所述跨膜结构域可以来自信号传导结构域、共刺激结构域或铰链结构域所源自的相同蛋白质。在某些情况下，跨膜结构域可以被选择或通过氨基酸取代修饰以避免这样的结构域与相同或不同表面膜蛋白的跨膜结构域结合，例如以使与受体复合体的其它成员的相互作用最小化。在一个方面，跨膜结构域能够与表达嵌合受体的细胞的细胞表面上的另一个嵌合受体同型二聚化。在一个不同的方面，跨膜结构域的氨基酸序列可以被修饰或取代，以便使与存在于表达相同嵌合受体的细胞中的天然结合配偶体的结合结构域的相互作用最小化。跨膜结构域可以来源于天然或重组来源。当所述来源是天然的时，所述结构域可以来源于任何膜结合的蛋白质或跨膜蛋白质。在一个方面，只要所述嵌合受体与所述靶抗原结合时，跨膜结构域能够向胞内结构域传导信号。在本发明中特别使用的跨膜结构域可以包括至少以下的跨膜结构域:例如，T-细胞受体的 α 、 β 或 ζ 链、CD28、CD27、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154。在某些实施方式中，跨膜结构域可以包括至少下述跨膜区域:例如 KIRDS2、OX40、CD2、CD27、LFA-1(CD11a、CD18)、ICOS(CD278)、4-1BB(CD137)、GITR、CD40、BAFFR、HVEM(LIGHTR)、SLAMF7、NKp80(KLRP1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD160、CD19、IL2R β 、IL2R γ 、IL7R α 、ITGA1、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、TNFR2、DNAM1(CD226)、SLAMF4(CD244、2B4)、CD84、CD96(Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9(CD229)、CD160(BY55)、PSGL1、CD100(SEMA4D)、SLAMF6(NTB-A、Ly108)、SLAM(SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME(SLAMF8)、SELPLG(CD162)、

LTBR、PAG/Cbp、NKG2D、NKG2C。

在某些情况下，跨膜结构域可以经由铰链(例如，来自人蛋白质的铰链)连接至 CAR 的胞外区域，例如 CAR 的抗原结合结构域。例如，在一种实施方式中，铰链可以是人 Ig(免疫球蛋白)铰链(例如，IgG4 铰链、IgD 铰链)、GS 接头(例如，本文所述的 GS 接头)、KIR2DS2 铰链或 CD8a 铰链。在一个方面，跨膜结构域可以是重组的，在这样情况下，其将会主要包含疏水性残基，比如亮氨酸和缬氨酸。在一个方面，在重组跨膜结构域的每个末端可以发现苯丙氨酸、色氨酸和缬氨酸的三联体。任选地，长度在 2 至 10 个氨基酸之间的短的寡肽或多肽接头可以在 CAR 的跨膜结构域与细胞质区之间形成键。甘氨酸-丝氨酸二联体提供一种特别合适的接头。

本文所用的“细胞质结构域”，包括胞内信号传导结构域。胞内信号传导结构域通常负责其中已经引入嵌合受体的免疫细胞的正常效应子功能中至少一个的活化。术语“效应子功能”是指细胞的特化功能。T 细胞的效应子功能例如可以是细胞溶解活性或辅助活性，包括分泌细胞因子。因此，术语“胞内信号传导结构域”是指转导效应子功能信号且引导细胞执行特定功能的蛋白质的部分。虽然通常可以应用全部胞内信号传导结构域，但是在许多情况下不必使用整个链。就使用胞内信号传导结构域的截短部分来说，可以使用这样的截短部分代替完整的链，只要其转导效应子功能信号。因此，术语胞内信号传导结构域意味着包括足以转导效应子功能信号的胞内信号传导结构域的截短部分。

众所周知通过单独的 TCR 产生的信号不足以完全活化 T 细胞，并且也需要二级和/或共刺激信号。因此，T 细胞活化可以被称为是由两个不同种类的细胞质信号传导序列介导的:通过 TCR 引发抗原依赖性一级活化的那些(一级胞内信号传导结构域)以及以抗原独立方式起作用以提供二级或共刺激信号的那些(二级细胞质结构域，例如共刺激结构域)。

术语“刺激”是指由刺激性分子(例如，TCR/CD3 复合体或 CAR)与其同源配体(或在 CAR 的情况下为肿瘤抗原)的结合，由此介导信号转导事件(比如但不限于经由 TCR/CD3 复合体的信号转导或经由适合的 NK 受体或 CAR 的信号传导结构域的信号转导)而诱导的初次应答。刺激可以介导某些分子的改变的表达。

术语“刺激性分子”是指由免疫细胞(例如，T 细胞、NK 细胞、B 细胞)

表达的提供细胞质信号传导序列的分子，该信号传导序列以刺激性方式调节用于免疫细胞信号传导途径的至少一些方面的免疫细胞的活化。在一个方面，信号是通过例如 TCR/CD3 复合体与负载有肽的 MHC 分子的结合启动的初级信号，并且其导致介导 T 细胞应答，包括，但不限于增殖、活化、分化等。以刺激方式起作用的一级细胞质信号传导序列(也称为“一级信号传导结构域”)可以含有被称为基于免疫受体酪氨酸的活化基序或 ITAM 的信号传导基序。特别地用于本发明的含有 ITAM 的细胞质信号传导序列的实例包括，但不限于来源于下述的那些：CD3 ζ 、常见的 FcR γ (FCER1G)、Fc γ RIIa、FcR β (FcEpsilon R1b)、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD79a、CD79b、DAP10 和 DAP12。

5 在本发明的特异性 CAR 中，在本发明的任一个或更多个 CAR 中的胞内信号传导结构域包括细胞内信号传导序列，例如 CD3- ζ 的初级信号传导序列。在本发明的特异性 CAR 中，CD3- ζ 的初级信号传导序列是来自人或非人类种类例如小鼠、啮齿类动物、猴、猿等的等同残基。

术语“共刺激性分子”是指 T 细胞上的同源结合配偶体，其特异性地结合共刺激配体，从而介导 T 细胞的共刺激反应，比如但不限于增殖。共刺激性分子为除了抗原受体或其配体之外的细胞表面分子，其促进有效的免疫应答。共刺激性分子包括但不限于 MHC I 类分子，BTLA 和 Toll 配体受体，以及 OX40、CD27、CD28、CDS、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)、ICOS(CD278)和 4-1BB(CD137)。这样的共刺激性分子的进一步实例包括 CDS、ICAM-1、

15 G1TR、BAFFR、HVEM(LIGHTR)、SLAMF7、NKp80(KLRF1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD160、CD19、CD4、CD8 α 、CD8 β 、IL2R β 、IL2R γ 、IL7R α 、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、

20 NKG2D、NKG2C、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1(CD226)、SLAMF4(CD244、2B4)、CD84、CD96(Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9(CD229)、CD160(BY55)、PSGL1、CD100(SEMA4D)、CD69、SLAMF6(NTB-A、Ly108)、SLAM(SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME(SLAMF8)、SELPLG(CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19a，以及特异性地结合 CD83

25 的配体。

共刺激性胞内信号传导结构域可以为共刺激性分子的细胞内部分。共刺

激性分子可以以下述蛋白质家族代表：TNF 受体蛋白、免疫球蛋白样蛋白质、细胞因子受体、整联蛋白、信号传导淋巴细胞活化分子(SLAM 蛋白质)、和 NK 细胞受体。这样的分子的实例包括 CD27、CD28、4-1BB(CD137)、OX40、GITR、CD30、CD40、ICOS、BAFFR、HVEM、ICAM-1、与淋巴细胞功能相关的抗原-1(LFA-1)、CD2、CDS、CD7、CD287、LIGHT、NKG2C、NKG2D、SLAMF7、NKp80、NKp30、NKp44、NKp46、CD160、B7-H3、以及特异性地结合 CD83 的配体等。

胞内信号传导结构域可以包括分子的全部细胞内部分或全部天然胞内信号传导结构域、或其功能片段或衍生物。

术语“4-1BB”是指具有如 GenBank Accession No.AAA62478.2 提供的氨基酸序列的 TNFR 超家族的成员，或来自非人类物种例如小鼠、啮齿类动物、猴子、猿等的等同残基；并且“4-1BB 共刺激结构域”被定义为 GenBank Accession No.AAA62478.2 的氨基酸残基 214~255，或来自非人类物种例如小鼠、啮齿类动物、猴子、猿等的等同残基。在一个方面，“4-1BB 共刺激结构域”为来自人或者来自非人类物种例如小鼠、啮齿类动物、猴子、猿等的等同残基。

术语“scFv”是指包含至少一个包括轻链的可变区抗体片段和至少一个包括重链的可变区的抗体片段的融合蛋白，其中所述轻链和重链可变区是邻接的(例如经由合成接头例如短的柔性多肽接头)，并且能够以单链多肽形式表达，且其中所述 scFv 保留其所来源的完整抗体的特异性。除非指定，否则如正如本文中使用的的那样，scFv 可以以任何顺序(例如相对于多肽的 N-末端和 C 末端)具有所述的 VL 和 VH 可变区，scFv 可以包括 VL-接头-VH 或可以包括 VH-接头-VL。

术语“抗体重链”是指以其天然存在的构型存在于抗体分子中且通常决定抗体所属类型的两种多肽链中较大者。

术语“抗体轻链”是指以其天然存在构型存在于抗体分子中的两种多肽链的较小者。 κ (k)和 λ (l)轻链是指两种主要的抗体轻链的同种型。

术语“重组抗体”是指使用重组 DNA 技术产生的抗体，比如例如由噬菌体或酵母菌表达系统表达的抗体。该术语也应当解释为指已经通过合成编码抗体的 DNA 分子(且其中 DNA 分子表达抗体蛋白质)或指定抗体的氨基酸序列产生的抗体，其中所述 DNA 或氨基酸序列已经使用重组 DNA 或本领域可

获得且熟知的氨基酸序列技术获得。

术语“抗原”或“Ag”是指引起免疫应答的分子。该免疫应答可以涉及抗体产生或有特异性免疫能力的细胞的活化。本领域技术人员应当理解并且实际上所有蛋白质或肽的任何大分子都可以充当抗原。此外，抗原可以来源于重组或基因组 DNA。当在本文中使用该术语时，本领域技术人员应当理解包括编码引起免疫应答的蛋白质的核苷酸序列或部分核苷酸序列的任何 DNA。此外，本领域技术人员应当理解抗原无需仅通过基因的全长核苷酸序列编码。本发明包括但不限于使用超过一个基因的部分核苷酸序列，并且这些核苷酸序列以不同组合排列以编码引发期望免疫应答的多肽。而且，本领域技术人员应当理解抗原根本无需由“基因”编码。抗原可以合成产生，或者可以来源于生物样品，或者可以是除了多肽之外的大分子。这样的生物样品可以包括，但不限于组织样品、肿瘤样品、具有其它生物组分的细胞或液体。

“肿瘤抗原”指细胞癌变过程中所表达的新生物或过量表达产物。在某些方面，本发明的过度增生性病征抗原源自癌症。本发明的肿瘤抗原包括但不限于：促甲状腺激素受体(TSHR)；CD171；CS-1；C型凝集素样分子-1；神经节苷脂 GD3；Tn 抗原；CD19；CD20；CD 22；CD 30；CD70；CD123；CD138；CD33；CD44；CD44v7/8；CD38；CD44v6；B7H3(CD276)，B7H6；KIT(CD117)；白介素 13 受体亚单位 α (IL-13R α)；白介素 11 受体 α (IL-11R α)；前列腺干细胞抗原(PSCA)；前列腺特异性膜抗原(PSMA)；癌胚抗原(CEA)；NY-ESO-1；HIV-1 Gag；MART-1；gp100；酪氨酸酶；间皮素；EpCAM；蛋白酶丝氨酸 21(PRSS21)；血管内皮生长因子受体，血管内皮生长因子受体 2(VEGFR2)；路易斯(Y)抗原；CD24；血小板衍生生长因子受体 β (PDGFR- β)；阶段特异性胚胎抗原-4(SSEA-4)；细胞表面相关的粘蛋白 1(MUC1)，MUC6；表皮生长因子受体家族及其突变体(EGFR，EGFR2，ERBB3，ERBB4，EGFRvIII)；神经细胞粘附分子(NCAM)；碳酸酐酶 IX(CAIX)；LMP2；肝配蛋白 A 型受体 2(EphA2)；岩藻糖基 GM1；唾液酸基路易斯粘附分子(sLe)；神经节苷脂 GM3；TGS5；高分子量黑素瘤相关抗原(HMWMAA)；邻乙酰基 GD2 神经节苷脂；叶酸受体；肿瘤血管内皮标记 1(TEM1/CD248)；肿瘤血管内皮标记 7 相关的(TEM7R)；Claudin6，Claudin18.2、Claudin18.1；ASGPR1；CDH16；5T4；8H9； α v β 6 整合素；B 细胞成熟抗原 (BCMA)；CA9； κ 轻链 (kappa light chain)；CSPG4；EGP2，EGP40；FAP；FAR；FBP；胚胎型

AchR; HLA-A1, HLA-A2; MAGEA1, MAGE3; KDR; MCSP; NKG2D
 配体; PSC1; ROR1; Sp17; SURVIVIN; TAG72; TEM1; 纤连蛋白; 腱生
 蛋白; 肿瘤坏死区的癌胚变体; G 蛋白偶联受体 C 类 5 组-成员 D(GPRC5D);
 X 染色体开放阅读框 61(CXORF61); CD97; CD179a; 间变性淋巴瘤激酶
 5 (ALK); 聚唾液酸; 胎盘特异性 1(PLAC1); globoH glycosphingolipid 的己糖部
 分(GloboH); 乳腺分化抗原 (NY-BR-1); uroplakin 2(UPK2); 甲型肝炎病毒
 细胞受体 1(HAVCR1); 肾上腺素受体 β 3 (ADRB3); pannexin 3(PANX3); G
 蛋白偶联受体 20(GPR20); 淋巴细胞抗原 6 复合物基因座 K9 (LY6K); 嗅觉
 受体 51E2(OR51E2); TCR γ 交替阅读框蛋白(TARP); 肾母细胞瘤蛋白(WT1);
 10 ETS 易位变异基因 6 (ETV6-AML); 精子蛋白 17(SPA17); X 抗原家族成员
 1A (XAGE1); 血管生成素结合细胞表面受体 2(Tie2); 黑素瘤癌睾丸抗原
 -1(MAD-CT-1); 黑素瘤癌睾丸抗原-2(MAD-CT-2); Fos 相关抗原 1; p53 突
 变体; 人端粒酶逆转录酶(hTERT); 肉瘤易位断点; 细胞凋亡的黑素瘤抑制
 剂(ML-IAP); ERG(跨膜蛋白酶丝氨酸 2(TMPS2)ETS 融合基因); N-乙酰
 15 葡萄糖胺基转移酶 V(NA17); 配对盒蛋白 Pax-3(PAX3); 雄激素受体; 细胞周
 期蛋白 B1; V-myc 鸟髓细胞瘤病毒癌基因神经母细胞瘤衍生的同源物
 (MYCN); Ras 同源物家族成员 C(RhoC); 细胞色素 P450 1B1(CYP1B1);
 CCCTC 结合因子(锌指蛋白)样(BORIS); 由 T 细胞识别的鳞状细胞癌抗原
 3(SART3); 配对盒蛋白 Pax-5(PAX5); proacrosin 结合蛋白 sp32(OYTES1);
 20 淋巴细胞特异性蛋白酪氨酸激酶(LCK); A 激酶锚定蛋白 4(AKAP-4); 滑膜
 肉瘤 X 断点 2(SSX2); CD79a; CD79b; CD72; 白细胞相关免疫球蛋白样受
 体 1(LAIR1); IgA 受体的 Fc 片段(FCAR); 白细胞免疫球蛋白样受体亚家族
 成员 2(LILRA2); CD300 分子样家族成员 f (CD300LF); C 型凝集素结构域
 家族 12 成员 A(CLEC12A); 骨髓基质细胞抗原 2(BST2); 含有 EGF 样模块
 25 粘蛋白样激素受体样 2(EMR2); 淋巴细胞抗原 75(LY75); 磷脂酰肌醇蛋白聚
 糖-3(GPC3); Fc 受体样 5(FCRL5); 免疫球蛋白 λ 样多肽 1(IGLL1)。

术语“癌症”指特征在于在体外(例如经转化的细胞)或体内的过度增殖性
 细胞生长的广泛病症类别。可以通过本发明的方法治疗或预防的病况包括例
 如各种赘生物, 包括良性或恶性肿瘤, 各种增生等等。本发明的方法可以实
 30 现这样的病况中所牵涉的不希望有的过度增殖性细胞生长的抑制和/或逆转。
 癌症包括但不限于: 乳腺癌, 脑胶质瘤, 血液癌症, 结肠癌, 直肠癌, 肾细

胞癌，肝癌，肺癌，小肠癌，食道癌，黑素瘤，骨癌，胰腺癌，皮肤癌，头
颈癌，皮肤或眼内恶性黑素瘤，子宫癌，卵巢癌，直肠癌，肛区癌，胃癌，
5 睾丸癌，子宫癌，输卵管癌，子宫内膜癌，宫颈癌，阴道癌，阴户癌，霍奇
金氏病，非霍奇金淋巴瘤，内分泌系统癌，甲状腺癌，甲状旁腺癌，肾上腺
癌，软组织肉瘤，尿道癌，阴茎癌，儿童实体瘤，膀胱癌，肾或输尿管癌，
肾盂癌，中枢神经系统(CNS)瘤，原发性 CNS 淋巴瘤，肿瘤血管发生，脊椎
肿瘤，脑干神经胶质瘤，垂体腺瘤，卡波西肉瘤，表皮样癌，鳞状细胞癌，
T 细胞淋巴瘤，环境诱发的癌症，所述癌症的组合和所述癌症的转移性病灶。

术语“转染”或“转导”是指外源性核酸转移或引入到宿主细胞中的过程。

10 “转染的”或“转导的”细胞是已经用外源性核酸转染、转化或转导的细胞。所
述细胞包括原发性受试者细胞及其后代。

术语“特异性地结合”、“特异性地识别”在本文中具有相同的含义，是指
识别并且结合存在于样品中的抗原（例如肿瘤抗原）的抗体或配体，但是该抗
体或配体基本上不会识别或结合样品中的其它分子。

15 这里使用的“难治”指的是一种疾病，例如，癌症，其不应答治疗。在实
施方案中，难治性癌症可以是对治疗开始前或开始时的治疗有抗性。在其他
实施方案中，难治性癌症可以成为治疗期间抗性的。难治性癌症也称为抗性
癌症。在本发明中，难治性癌症包括但不限于放疗不敏感、放疗后复发、化
疗不敏感、化疗后复发、对 CAR-T 治疗不敏感或治疗后复发的癌症。难治
20 性或复发性恶性肿瘤可以使用本文中描述的治疗方案。

如本文所用“复发的”是指在一段改进期，例如，在疗法，例如癌症疗法的
先前治疗后，返回疾病(例如癌症)或疾病如癌症的体征和症状。

术语“个体”和“受试者”在本文中具有同等含义，可以是人和来自其他种
属的动物。

25 术语“增强”指允许受试者或肿瘤细胞改善其响应本文公开的治疗的能
力。例如，增强的应答可以包含应答性中 5%、10%、15%、20%、25%、
30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、
85%、90%、95%或 98%或更多的增加。如本文使用的，“增强”还可以指增
加响应治疗例如免疫效应细胞疗法的受试者数目。例如，增强的应答可以指
30 响应治疗的受试者总百分比，其中百分比是 5%、10%、15%、20%、25%、
30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、

85%、90%、95%或98%更多。

5 在一个方面，治疗由临床结果；通过 T 细胞的抗肿瘤活性增加、增强或延长；与治疗前的数目相比较，抗肿瘤 T 细胞或活化 T 细胞数目的增加，促进 IFN- γ 、TNFa 分泌，或其组合决定。在另一个方面，临床结果是肿瘤消
退；肿瘤缩小；肿瘤坏死；通过免疫系统的抗肿瘤应答；肿瘤扩大，复发或扩散或其组合。在一个另外方面，治疗效应通过 T 细胞的存在、指示 T 细胞炎症的基因标记的存在，促进 IFN- γ 、TNFa 分泌，或其组合预测。在一个方面，治疗肿瘤包括通过治疗降低癌细胞生长、存活或活力。

10 如本文公开的免疫效应细胞可以通过各种途径施用于个体，包括例如经口或肠胃外，例如静脉内、肌内、皮下、眶内、囊内、腹膜内、直肠内、脑池内、瘤内、鼻内(intravasally)、皮内或者分别使用例如皮肤贴片或透皮离子电渗疗法通过皮肤的被动或促进吸收。

15 在实践本发明的方法中待施用的试剂总量可以作为单一剂量以推注或通过相对短时间段的输注，施用于受试者，或可以使用分级治疗方案进行施用，其中在延长时间段施用多个剂量。本领域技术人员将知道治疗受试者中的病理状况的组合物的量取决于许多因素，包括受试者的年龄和一般健康、以及施用途径和待施用的治疗次数。考虑到这些因素，技术人员将根据需要调整具体剂量。一般而言，最初，使用 I 期和 II 期临床试验测定组合物的配制以及施用途径和频率。

20 范围：在整个公开中，本发明的各个方面都可以以范围形式存在。应当理解，范围形式的描述仅仅为方便和简洁起见，而不应当被看作是对本发明的范围不可改变的限制。因此，范围的描述应当被认为特别地公开了所有可能的子范围以及该范围内的单独数值。例如，范围的描述比如从 1 至 6 就应当被认为具体地公开了子范围比如 1 至 3、1 至 4、1 至 5、2 至 4、2 至 6、3
25 至 6 等，以及该范围内的单独数值，例如 1、2、2.7、3、4、5、5.3、和 6。作为另一个实例，范围比如 95-99% 的同一性包括具有 95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的范围，并且包括子范围比如 96~99%、96~98%、96~97%、97~99%、97~98% 和 98~99% 的同一性。不考虑范围的宽度，这均适用。

30 根据本公开内容，本领域技术人员应了解在所公开的具体实施方案中可以作出许多变化或改变，并且仍获得相同或相似结果，而不背离本发明的精

神和范围。本发明在范围上并不受限于本文描述的具体实施方案(其仅预期作为本发明的各方面的举例说明),并且功能等价的方法和组分在本发明的范围内。事实上,本发明的各种修饰加上本文显示且描述的那些,根据前述描述对于本领域技术人员将变得明显。

5 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件如 J.萨姆布鲁克等编著,《分子克隆实验指南(第三版)》(科学出版社,2002)中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。

本发明的示例性的抗原受体,包括 CAR,以及用于工程改造和将受体
10 导入细胞中的方法,参考例如中国专利申请公开号 CN107058354A、
CN107460201A、CN105194661A、CN105315375A、CN105713881A、
CN106146666A、CN106519037A、CN106554414A、CN105331585A、
CN106397593A、CN106467573A、CN104140974A、国际专利申请公开号
WO2017186121A1、WO2018006882A1、WO2015172339A8、
15 WO2018/018958A1 中公开的那些。

实施例一. CAR-T 细胞的构建

参照图 1A 所示的质粒图,采用本领域常规分子生物学方法,构建了表
20 达人源化抗体 hu9F2(核苷酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示,氨基酸序列如 SEQ
ID NO: 14 所示)的二代嵌合抗原受体的慢病毒质粒 PRRLSIN-hu9F2-28Z。

抗体 hu9F2 具有 SEQ ID NO:15、16、17 所示的 HCDR1、HCDR2、HCDR3,
和 SEQ ID NO:18、19、20 所示的 LCDR1、LCDR2、LCDR3。

Hu9F2-28Z 序列由 CD8 α 信号肽 (SEQ ID NO:6)、hu9F2 scFv (SEQ ID
NO:5)、CD8 hinge (SEQ ID NO:7)、CD28 跨膜区 (SEQ ID NO:10) 和胞内
25 信号传导结构域 (SEQ ID NO:8) 以及 CD3 的胞内段 CD3 ξ (SEQ ID NO:9)
组成。将 PRRLSIN-hu9F2-28Z 转染 293T 包装慢病毒,得到慢病毒。

T 细胞活化:取人 PBMC 培养于 AIM-V 培养基,添加 2%人 AB 型血清,
500 U/mL 重组人 IL-2,并加入 CD3/CD28 抗体结合磁珠活化 48 h。将所得
的慢病毒感染活化的 T 细胞,得到 hu9F2-28Z CART 细胞,流式检测结果如
30 图 1B 所示,其 CAR 的序列如 SEQ ID NO: 22 所示。

实施例二. CCK8 实验检测索拉非尼对肝癌细胞、CAR-T 细胞的毒性

取实施例 1 中的 hu9F2-28Z CAR T 细胞, 将其铺于 96 孔板中, 每孔 4×10^4 个细胞, 100ul 培养基。取肝癌细胞 PLC/RPF/5 (低表达 GPC3)、SK-HEP-1 (不表达 GPC3)、Huh7 (高表达 GPC3), 将其铺于 96 孔板中, 每孔 4000 个细胞, 100ul 培养基。分别取不同溶度的索拉非尼分别加入到细胞中, 做成六个梯度 (即 $10\mu\text{M}$ 、 $5\mu\text{M}$ 、 $1\mu\text{M}$ 、 $0.5\mu\text{M}$ 、 $0.1\mu\text{M}$ 、 $0\mu\text{M}$ 六种溶度梯度, $10\mu\text{M}$ 、 $5\mu\text{M}$ 、 $1\mu\text{M}$ 、 $0.5\mu\text{M}$ 、 $0.1\mu\text{M}$ 为加药组, $0\mu\text{M}$ 为 0 加药组), 此外设立一组只有培养基的孔, 为空白组。48h 后每孔加入 10ul CCK8 试剂 (Dojindo 公司) 37°C 孵育 1h 后酶标仪测定 450nm 处吸光度, 分别计算细胞活力。

5 计算公式为: 细胞活力 (%) = $[A(\text{加药}) - A(\text{空白})] / [A(0 \text{加药}) - A(\text{空白})]$
10 结果如图 2 所示, 索拉非尼对 CAR T 细胞没有明显的抑制作用。

实施例三、CAR T 细胞对索拉非尼预处理后的肿瘤细胞的杀伤活性

将含有 Huh7 细胞的培养基中分别加入不同浓度的索拉非尼 ($1\mu\text{M}$ 、 $0.1\mu\text{M}$ 、 $0\mu\text{M}$), 37°C 培养 24h 后, 胰酶消化, PBS 洗净残留的药物。取实施例 1 中的 hu9F2-28Z CAR T 细胞分别与上述不同浓度索拉非尼预处理后的 Huh7 细胞 1:1 共孵育, 18h 后使用 Cytox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega 公司, REF: G1782) 检测 hu9F2-28Z CAR T 细胞对不同浓度索拉非尼预处理后的肿瘤细胞的杀伤。

20 结果如图 3 所示, 相比较不加索拉非尼的组别, 经 $0.1\mu\text{M}$ 索拉非尼处理后的肿瘤细胞对 CAR T 细胞的杀伤的敏感性增强了 11%, 经 $1\mu\text{M}$ 索拉非尼处理后的肿瘤细胞对 CAR T 细胞的杀伤的敏感性增强了 16.8%。

实施例四: 索拉非尼与 CAR T 细胞联用对 hepa1-6-GPC3 皮下瘤的抑制效果

25 本实施例采用鼠的基因序列构建 CAR 的跨膜域和胞内域。将 C57BL/6 小鼠 (免疫系统正常的小鼠) 分为 5 组:

Vehicle 组: 不给予索拉非尼组;

Sorafenib 组: 索拉非尼单独给药组;

30 CAR T+vehicle 组: 给予 hu9F2-m28Z CAR T 细胞和溶剂组;

UTD+sorafenib 组: 给予未感染 CAR 的 T 细胞和索拉非尼组;

CAR T+ sorafenib 组：给予 hu9F2-m28Z CAR T 细胞和索拉非尼组。

1、利用分子生物学常规手段建立人鼠嵌合的 GPC3 (SEQ ID NO:11) 过表达的鼠肝癌细胞 Hepa1 细胞模型 (Hepa1-6-GPC3)。如图 4 所示，通过流式细胞术确认过表达 GPC3 的 Hepa1-6 细胞。

5 2、收集处于对数生长期且生长良好的 Hepa1-6-GPC3 细胞，接种 1×10^7 靶细胞于 C57BL/6 小鼠（免疫系统正常的小鼠）的右侧腋部皮下。

3、接种肿瘤后第 4 天，取小鼠脾脏 T 淋巴细胞，构建 hu9F2-m28Z CAR T 细胞，构建方法如下：

10 将小鼠 CD8 α 信号肽的编码序列 (SEQ ID NO: 4)、hu9F2 scFv (SEQ ID NO: 5)、鼠 CD8 α 铰链区及跨膜区的编码序列 (SEQ ID NO: 1)、鼠 CD28 胞内域的编码序列 (SEQ ID NO: 2)、鼠 CD3 ζ 胞内域的编码序列 (SEQ ID NO: 3) 依次连接，通过体外基因合成的方法获得 hu9F2-m28Z 基因片段，并用 Mlu I 和 Sal I 双酶切位点置换逆转录病毒载体 MSCV-IRES-GFP (购自 Addgene) 中的 IRES-GFP 片段，获得重组载体 MSCV-hu9F2-m28Z。用
15 MSCV-hu9F2-m28Z 感染 293T 细胞，得到包装后的逆转录病毒。

取小鼠脾脏 T 淋巴细胞，采用 Dynabeads Mouse T-activator CD3/CD28 活化，活化后加入逆转录病毒感染 12 小时，得到 hu9F2-m28Z CAR T 细胞。

4、接种肿瘤后第 7 天，给予索拉非尼或溶剂：将索拉非尼溶解于溶剂 (5%DMSO、45%PEG400、50%H₂O) 中，对 Sorafenib 组、UTD+sorafenib
20 组、CAR T+ sorafenib 组小鼠进行灌胃，每只小鼠给药量为 7.5mg/kg。Vehicle 组和 CAR T+vehicle 组给予溶剂灌胃。索拉非尼第一次给药日记为第 0 天，每天给药一次，连续给药 5 天。

5、接种肿瘤后第 8 天，CAR T+vehicle 组和 CAR T+ sorafenib 组，每只
25 小鼠给 3×10^6 个 hu9F2-m28Z CAR T 细胞；UTD+sorafenib 组给予 3×10^6 未感染 CAR 的 T 细胞。

持续观察瘤体积变化，每周测量三次，瘤体积计算公式为： $(\text{长} \times \text{宽}^2) / 2$ 。肿瘤体积检测结果如图 5 所示，与其他组相比，CAR T+sorafenib 组具有显著的抑制肿瘤生长的作用 (Two-way ANOVA with Bonferroni post-tests, * 表示 $p < 0.05$, **表示 $p < 0.01$, ***表示 $p < 0.001$)。

30 到治疗后的 22 天，CAR T+ sorafenib 联合治疗组 6 只小鼠中有 4 只小鼠肿瘤消失，而其他各组均没有小鼠肿瘤消失。在治疗后 22 天 (即 Day 22)，

将小鼠引颈处死，剥离小鼠皮下肿瘤并称量瘤重，结果如图 6 所示，结果表明相比较 Vehicle 组，Sorafenib 组、CAR T+vehicle 组，UTD+sorafenib 组而言，CAR T+ sorafenib 联合治疗组具有显著的肿瘤抑制作用（Unpaired t test, *表示 $p < 0.05$, **表示 $p < 0.01$, ***表示 $p < 0.001$ ）。

5

实施例五：检测索拉非尼对 CAR T 细胞的脱颗粒、增殖及杀伤的影响

1、索拉非尼对脱颗粒标志物 CD107a 的影响

将实施例 1 中的 hu9F2-28Z CAR T 细胞和不同浓度索拉非尼及与 PLC/RPF/5 细胞共孵育 24 小时后，收取处理后的 CAR T 细胞，孵育抗人 CD107a-PerCP 抗体（eBioscience）及带 GFP 荧光蛋白的 GPC3 标签蛋白，流式检测 PerCP 及 GFP 的荧光强度，分别代表人 CD107a 及 CAR 的表达情况，结果如图 7A 所示，未加索拉非尼组和索拉非尼处理组的 CD107a 表达能力没有显著变化。

2、索拉非尼对 CAR T 细胞增殖的影响

15 采用 CellTrace Violet 试剂盒（Thermofisher）监测不同代数的细胞增殖情况。取 hu9F2-28Z CAR T 细胞，加入 CellTrace 染料工作液，37℃孵育，中和染料。

将上述处理后的 hu9F2-28Z CAR T 细胞和 PLC/RPF/5 细胞按照 1:1 的比例铺在 24 孔板中，分别加入不同浓度的索拉非尼（0、1、5、10 μ M）共培养 24 小时，各组均设 3 个复孔。

20 流式检测各组细胞，索拉非尼结果如图 7B 所示，未加索拉非尼组和索拉非尼处理组与表达 GPC3 的肿瘤细胞共孵育后，CAR T 细胞增殖能力没有显著变化。

3、体外细胞毒性实验

25 a) 以 PLC/RPF/5 细胞为靶细胞，实施例 1 中的 hu9F2-28Z CAR T 细胞为效应细胞。取适量 hu9F2-28Z CAR T 细胞，经不同浓度索拉非尼（0、1、5、10 μ M）处理 4 小时后，分别离心收集。

实验组铺板：靶细胞数量为 10000/孔，效应细胞为索拉非尼处理后的 hu9F2-28Z CAR T 细胞。效靶比分别为 20: 1, 10: 1, 5: 1, 2.5: 1, 30 根据不同效靶比加入不同数量效应细胞。各组均设 5 个复孔。

对照组铺板：本实验中还需要设置其他对照组来排除效应细胞、靶

细胞中自发性释放的 LDH 的干扰，以及培养基中包含的 LDH 的干扰。分别为：靶细胞最大释放 LDH 对照组；靶细胞自发释放 LDH 对照组；效应细胞自发释放 LDH 对照组；空培养基背景组；空培养基背景加入裂解液组。各组均设 5 个复孔。

5 上述细胞铺板完成后，37℃、5% CO₂ 恒温培养箱中孵育，转入酶标板中，进行底物显色。酶标仪测定 490nm 处吸光度，分别计算细胞杀伤毒性。

b) 计算公式为：细胞毒性 (%) = (实验组 - 效应细胞自发组 - 靶细胞自发组 - 背景组) / (靶细胞最大组 - 靶细胞自发组 - 裂解液背景组)。

10 结果如图 7C 所示，索拉非尼处理后的 hu9F2-28Z CAR T 细胞对 GPC3 阳性的肿瘤细胞的杀伤毒性没有显著变化。

上述结果说明索拉非尼不影响 CAR T 细胞脱颗粒能力、增殖和对肿瘤细胞的杀伤毒性。

15 实施例六：索拉非尼对 CAR T 细胞的细胞因子分泌的影响

具体步骤参考 cytometric bead array system (BD, USA) 说明书中的步骤，简述如下：

a) 收集上清：将实施例 1 中的 1×10^5 hu9F2-28Z CAR T 细胞铺在 GPC3 蛋白包板的 24 孔板中，加入不同浓度索拉非尼 (0、1、5、10 μM) 处理，
20 37℃、5% CO₂ 培养箱培养后离心收集细胞上清，检测其中人的细胞因子 IL2、IFN-γ、TNF-α 的浓度。

b) 取人细胞因子 IL2、IFN-γ、TNF-α 的捕获微球 (cytometric bead array system, BD, USA) 悬液混合。

c) 标准品或上清样品添加捕获微球混合液以及检测抗体，室温避光孵
25 育。孵育完成后用洗涤缓冲液洗涤，离心，弃上清。

流式检测 IL-2、IFN-γ 及 TNF-α 的分泌水平，结果从图 8A、8B、8C 所示，其中，ns 表示 $p > 0.05$ ；* $p < 0.05$ ；** $p < 0.01$ ；*** $p < 0.001$ ，1way ANOVA。

30

实施例七：索拉非尼和人 CAR T 细胞联合治疗肝癌

1.建立人肝癌细胞移植瘤模型：取对数生长期的 PLC/RPF/5 细胞 5×10^6 细胞接种到 NSG 小鼠腋下皮肤中，接种日当天为第 0 天 (Day0)。

2.第 11 天 (Day11)：小鼠皮下瘤的体积约在 150mm^3 左右，将小鼠按照肿瘤体积随机分 6 组,每组 5-6 只。索拉非尼溶解于溶剂 (5%DMSO、5 45%PEG400、50%H₂O) 中。不给索拉非尼的组别中给予溶剂。

(1) 对照组(Vehicle): Day11 给予溶剂，每天一次，给药体积与实验组相同，持续两周。

(2) 单独治疗组 (共 3 组)：

Sora 7.5: Day11 给予小鼠灌胃 7.5mg/kg 的索拉非尼，每天一次，持 10 续两周。

Sora 30: Day11 给予小鼠灌胃 30mg/kg 的索拉非尼，每天一次，持续两周。

CAR+ Vehicle: Day11 给予溶剂每天一次，给药体积与实验组相同，持续两周；当天 (Day11)，溶剂给予后，尾静脉注射实施例 1 中的 2×10^6 15 hu9F2-28Z CAR T 细胞。

(3) 联合治疗组 (共 2 组)：

CAR+Sora7.5: Day11 给予小鼠灌胃 7.5mg/kg 的索拉非尼，每天一次，持续两周；当天 (Day11)，索拉非尼给予后，尾静脉注射实施例 1 中的 2×10^6 hu9F2-28Z CAR T 细胞。

20 CAR+Sora30: Day11 给予小鼠灌胃 30mg/kg 的索拉非尼，每天一次，持续两周；当天 (Day11)，索拉非尼给予后，尾静脉注射实施例 1 中的 2×10^6 hu9F2-28Z CAR T 细胞。

3.每周测量并记录两次小鼠皮下瘤的体积变化情况，瘤体积计算公式为：肿瘤体积 = (肿瘤长 \times 肿瘤宽²) / 2，结果如图 9A 所示，与单独治疗 25 组相比，索拉非尼和 hu9F2-28Z CAR T 细胞联合治疗能显著抑制肿瘤生长 (P<0.001, 2way ANOVA)。

参照对照组计算肿瘤抑制率，在肿瘤接种后的第 43 天 (Day43)，各组的肿瘤抑制率为：Sora 7.5 为 18.8%， Sora30 为 35.8%，CAR+ Vehicle 为 25.3%， CAR+Sora7.5 为 68.7%，CAR+Sora30 为 75.2%。

30 第 43 天 (Day43) 时给予小鼠安乐死处理，剥离皮下瘤，称量肿瘤重量，结果如图 9B 所示，相比单独治疗组，索拉非尼和 hu9F2-28Z CAR

T 细胞联合治疗 (7.5mg/kg 或 30mg/kg) 中肿瘤重量显著降低 (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ 或 *** $p < 0.001$, 1way ANOVA)。

4. CAR T 细胞瘤内浸润及瘤内细胞的凋亡情况

5 1) 采用常规组织切片制备方法, 将安乐死后小鼠的肿瘤组织制成组织切片。

2) 采用抗人 CD3 抗体 (Thermo Scientific) 来检测步骤 1) 中准备好的肿瘤组织切片中人的 CAR T 细胞。结果如图 10A 所示, 与 hu9F2-28Z CAR T 细胞单独治疗的小鼠相比, 联合 hu9F2-28Z CAR T 细胞与索拉非尼 (7.5mg/kg 或 30mg/kg) 治疗的小鼠在肿瘤组织中有更多 CD3+ 的人 CAR T 细胞 (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, 1way ANOVA), 没有接受 hu9F2-28Z CAR T 细胞治疗的组中没有观察到 CD3+ 的人 CAR T 细胞的染色。结果说明索拉非尼能促进 CAR T 细胞在肿瘤组织的浸润。

3) 采用抗 cleaved caspase-3 抗体 (Cell Signaling Technology) 检测步骤 1 中肿瘤组织切片中发生凋亡的细胞

15 将组织切片进行免疫组化染色, 使用苏木素对肿瘤组织中的细胞核进行复染, 结果如图 10B 所示, 与对照组和 hu9F2-28Z CAR T 细胞单独治疗的小鼠相比, 联合 hu9F2-28Z CAR T 细胞与索拉非尼 (7.5mg/kg 或 30mg/kg) 治疗的小鼠在肿瘤组织中有更多 cleaved caspase-3 阳性的细胞。

20 采用两只小鼠肿瘤切片中总计 5 个不同视野进行观察统计, 结果如图 10C 所示索拉非尼和 CAR T 细胞联合使用时, 肿瘤细胞发生凋亡数量显著增加 (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, 1way ANOVA)。

实施例八: 体外检测索拉非尼与人 CAR T 细胞的协同作用

25 参照 CellTrace Violet 试剂盒实验操作, 将人肝癌细胞 PLC/RPF/5 使用 CellTrace 染料标记。将标记好的 PLC/RPF/5 按照 1:1 比例与 hu9F2-28z CAR T 细胞混合, 同时分别添加不同浓度索拉非尼 (0、1、5、10 μ M) 于细胞培养箱共孵育 48 小时, 离心并收集细胞, 使用 FITC Annexin V 凋亡检测试剂盒 (购自 BD) 中染色缓冲液对细胞沉淀进行重悬, 加入 AnnexinV-FITC 染料进行染色。上机检测: 离心收集完成染色的细胞, 染色缓冲液重悬, 流式上机检测。BV421 通道中收集紫光信号, 代表所有的肿瘤细胞。FITC 通道中收集绿光, 代表发生凋亡的肿瘤细胞。FlowJo

软件处理数据。

结果如图 11 所示，联合 hu9F2-28Z CAR T 细胞与索拉非尼治疗后肿瘤细胞的凋亡比例明显升高，肿瘤细胞发生凋亡数量显著增加 (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ 或 *** $p < 0.001$, 1way ANOVA)。

- 5 上述体外实验结果说明索拉非尼和 CAR T 细胞联合治疗能协同地促进肿瘤细胞的凋亡。

实施例九：CAR T 细胞与瑞戈非尼联用对小鼠肝癌移植瘤的治疗的影响

- 10 参照实施例 4 的操作，构建 Hepa1-6-chGPC3 细胞 C57BL/6 的移植瘤模型和 hu9F2-m28Z CAR T 细胞。

肿瘤细胞植入后第 8 天，将小鼠按照肿瘤体积随机分为三组，瑞戈非尼治疗组及瑞戈非尼+CAR T 联合组的小鼠灌胃给予 10mg/kg 的瑞戈非尼，对照组给予溶媒，每天一次，持续十天。

- 15 肿瘤细胞植入后第 9 天，对 CAR T 治疗组小鼠及瑞戈非尼+CAR T 联合组尾静脉注射 2×10^6 CAR T 细胞，此后每周两次测量并记录小鼠皮下瘤的体积变化，结果如图 12 所示。

实施例十：索拉非尼和 CAR T 细胞联合治疗的临床研究

- 20 受试者 A 年龄 60 岁，体重 77kg，身高：170cm，诊断为肝细胞癌后经手术治疗 7 个月后，仍处于进展状态，免疫组化显示 GPC3 阳性 (70%，++~+++)。在该情况下，患者接受了本发明的技术方案的治疗。

- 25 单采后给予患者持续口服索拉非尼，服用量为一日两次，一次 200mg-400mg (以患者可耐受剂量为准，在该受试者中，一次 200mg)，并持续每天给予。

参照实施例一的操作，将慢病毒感染患者的 T 细胞后，制备得到 hu9F2-28Z CAR T 细胞。

- 30 在开始给予索拉非尼两周后，且在给予 CAR-T 细胞前，患者先接受淋巴细胞清除处理，包括氟达拉滨约 39mg/日×4 日 (约 20mg/m²/日)，环磷酰胺约 1000mg/日×2 日 (约 500mg/m²/日)。

淋巴细胞清除处理后的第 3 天开始, 连续两天分别给予大约 5×10^8 个 CAR-T 细胞 (约为 6.49×10^6 个 CAR-T 细胞/kg 患者体重, 总剂量约为 0.13×10^8 个 CAR-T 细胞)。

CAR-T 细胞给予后第 3 天, AFP 相比给予 CAR-T 细胞之前降低了 35%,
 5 CAR-T 细胞给予后第 13 天, AFP 相比给予 CAR-T 细胞之前降低了 58.2%。

治疗 4 周后 CT 检查, 影像学如图 13 所示, 相对于基线, 3 个可能的靶病灶都明显缩小, 达到时间点部分缓解 (PR)。

在上述实施例中, 示例性的, 采用了靶向 GPC3 的 CAR-T 细胞的 CAR
 10 具有 SEQ ID NO: 22 所示的氨基酸序列, 本领域技术人员可以依据上述实施例的教导, 采用如 SEQ ID NO: 21、23、或 24 所示的序列。

在上述实施例中, 示例性的, 采用了靶向 GPC3 的 CAR-T 细胞, 本领域技术人员可以依据本申请的教导, 采用靶向其他靶点的 CAR-T 细胞, 如靶向 EGFR 的 CAR-T 细胞(示例性的, 靶向 EGFR 的 CAR-T 细胞
 15 的 scFv 的序列如 SEQ ID NO: 12 所示), 如靶向 CLD18A2 的 CAR-T 细胞(示例性的, 靶向 CLD18A2 的 CAR-T 细胞的 scFv 的序列如 SEQ ID NO: 13 所示)。

本发明所涉及的序列信息如下:

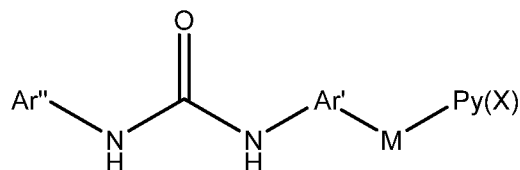
名称	序列号	序列
Mouse CD8 α 胶链区及跨膜区	1	actactaccaagccagtgtcgcgaactccctcacctgtgcaccctaccgggacatctcagccccagagac cagaagattgtcgccccgtggctcagtgaagggaccggattggacttcgcctgtgatattacatctg ggcacccttgccggaatctcgtggcccttctgctgtccttgatcatcactctcatctgctaccacagg agccga
mouse CD28 胞内域	2	aatagtagaaggaacagactccttcaaagtgactacatgaacatgactccccggaggcctgggctcactc gaaagccttaccagccctacgcccctgcccagagactttgcagcgtaccgcccc
mouse CD3 ζ 胞内域	3	agcaggagtgcagagactgctgccaacctgcaggaccccaaccagctctacaatgagctcaatctagggc gaagagaggaatatgacgtcttgagaagaagcgggctcgggatccagagatgggaggcaaacagcagag gaggaggaacccccaggaaggcgtatacaatgcactgcagaaagacaagatggcagaagcctacagtgag atcggcacaaaaggcgagaggcggagaggcaaggggcacgatggcctttaccagggtctcagcactgcc ccaaggacacctatgatgccctgcatatgcagacacctggcc
Mouse CD8 α 信号肽	4	atggcctcaccgttgacccgcttctgtcgtgaacctgctgctgctgggtgagtcgattatcctgggga gtggagaagct
GPC3 scFv	5	gagggtgcagctggtgcagagcggcgccgaggtgaagaagccggcgccagcgtgaaggtgagctgcaag gccagcggctacacctcagcactacagatgcactgggtgcccagggccccggcagggctggag tggatggcgccatccacccccgagcggcgacaccgcctacaaccagcgggtcaaggcggtgacc atcaccgccacaagagcaccagcaccgcctacatggagctgagcagcctcggagcagggacaccgcc gtgtactactgcggcggttctacagctacgcctactggggccagggcaccctgtgaccgtgagcggc ggtggagcgggtcaggcggaggtgttctggcggtggcgatcggacatcgtgatgaccagaccccc ctgagcctgcccgtgacccccggcgagccccgagcatcagctgccggagcagccagagcctgtgac

		agcaacggcaacacctacctgcaagtggctacctgcagaagcccggccagagccccagctgctgatctac aaggtgagcaaccgggtcagcggcgtccccaccgggtcagcggcagcggcagccgacttcacc ctgaagatcagccgggtggaggccgaggacgtggcgctgtactactgcagccagagcatctacgtgcc tacacctcggccagggcaccagctggagatcaaacgt
human CD8α 信号肽	6	atggccttaccagtaccgccttgctcctgccgctggccttgctgctccacgccgccaggccg
human CD8α 胶链区	7	accacgacgccagcggcggaccaccaacaccggcgcccaccatcgcgtcgcagcccctgtccctgcg cccagaggcgtgccggcagcggcggggggcgcagtgccacagagggggctggacttcgctgtgat
human CD28 胞内域	8	aggagtaagaggagcaggctcctgcacagtactacatgaacatgactccccgcccccgggccaacc cgcaagcattaccagccctatgccccaccacgcacttcgcagcctatcgtcc
human CD3ζ 胞内域	9	agagtgaagttcagcaggagcgcagacgcccccgctaccagcaggggcagaaccagctctataacga gctcaatctaggacgaagagaggatcagatgtttggacaagagacgtggcgggaccctgagatgg ggggaagccgcagagaaggaagaacctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaagataagatg gaggagcctacagtgagattgggatgaaaggcagcggcggaggggcaaggggcacgatggccttta ccagggtcagtagaccaccaaggacactacgacgcccttcacatgcaggccctgccccctcgc
human CD28 跨膜域	10	ttttgggtgctggtggtggtggtgagtcctgctgctatagctgctagtagtaacagtggccttatt atttctgggtg
人鼠嵌合的 GPC3	11	magtvrtaclivamllglcglqqaqpppppdatcqhvrffqrlqpglkwvpetvpvpsdlqvlcpkgptcc srkmeekyqltarlnmeqllqsasmelkfliaqnaavfqaefeivvrhaknytnamfknypsltpqafefv gefftdvslyilgsdinvddmvnelfdsfpviyqmnnpplpesvldineclrgarrdlkvfgspklimt qvskslqvtriflqalnlgievinttdhlfkskdcgrmltrmwycsyqcqlmmvkcpggycnvvmqgcmag v veidkywreyilsleelvnngmyriydmenvllglfstihdsiqyvqknggkltttigklcahsqqrqysay ypedlfidkkilkvahveheetlssrrreliqklksfinfysalpgyicshspvaendtlewngqelvery qkaarnmknqfnlhelkmgpepvvsqiidklkhinqllrtmsvpkgkvlkksldeeglesgdcgddedec igssgdgmvkknqlrlaelaydlvdvdapngsqatpkdneistfhnlgnvhspkilsivaiyvaccff lvh
EGFR-antibody	12	diqmtqspsslsasvdrvtitchasqdinvnigwlqqkpgkafkgllyhgknledgvpsrfsqsgsgtdft ltisslqpedfatyycnqyenipltfgqtkveikrgggsgggsgggsgsdvqlvesggglvppgslrls cavsgysitsdyawnwirqapkglewlgvisyrgrtqynpslksrisitrdnsknffllqnlraedtav yycarmgknwdywgqgtlvvss
18A2-antibody	13	qvqlqesgpglikpsqtlslctvsqgsissgynwhwirqppgkglewiyihytstnynpalrsrvtisv dtsknqfslklssvtaadaiyycariyngnsfpywgqgtvtvsqggsgggsgggsgdivmtqspdsl avslgeratinckssqslfnsnqknyltwyqqkpgppklliywastresgvpdrfsqsgsgtdftltiss lqaedvavyycqnaysfpytfgggtkleikr
GPC3-antibody	14	evqlvqsgaevkkpgasvkvscasgytfsdyemhvwraqpqqglewmgaihpgsgdtaynqrfkgrvtit ad kfststaymelsslrstedavyycarfysyaywgqgtlvtsagggsgggsgggsgdivmtqtplslpvtpg epasiscrssqslvhsngntylqwyllqkpgqspqlliykvsnrfsvypdrfsqsgsgtdftlkisrveadv vyycsqsiyvpvtfgggtkleikr
GPC3-antibody HCDR1	15	DYEMH
GPC3-antibody HCDR2	16	AIHPGSGDTAYNQRFKG
GPC3-antibody HCDR3	17	FYSYAY
GPC3-antibody LCDR1	18	RSSQSLVHSNGNTYLQ
GPC3-antibody LCDR2	19	KVSNRFS
GPC3-antibody LCDR3	20	SQSIYVPYT
GPC3-CD3Z	21	evqlvqsgaevkkpgasvkvscasgytfsdyemhvwraqpqqglewmgaihpgsgdtaynqrfkgrvtitadkfst staymelsslrstedavyycarfysyaywgqgtlvtsagggsgggsgggsgdivmtqtplslpvtpg epasiscrssqslvhsngntylqwyllqkpgqspqlliykvsnrfsvypdrfsqsgsgtdftlkisrveadv vyycsqsiyvpvtfgggtkleikrvkfsrsadapayqqgnqlynelnlgreeydvldkrgrdpemggkppqrkn pqeglynelqkdkmaeays eigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr
GPC3-28z	22	evqlvqsgaevkkpgasvkvscasgytfsdyemhvwraqpqqglewmgaihpgsgdtaynqrfkgrvtitadkfst staymelsslrstedavyycarfysyaywgqgtlvtsagggsgggsgggsgdivmtqtplslpvtpg epasiscrssqslvhsngntylqwyllqkpgqspqlliykvsnrfsvypdrfsqsgsgtdftlkisrveadv vyycsqsiyvpvtfgggtkleikr

权 利 要 求 书

1. 治疗肿瘤的方法，其特征在于，对患有肿瘤的个体施用免疫效应细胞
5 和第二治疗剂，所述免疫效应细胞表达有识别肿瘤抗原的受体，

所述的第二治疗剂包括式 I 所示的化合物，或其医药学上可接受的盐，



I

其中，Ar'是非取代或取代的苯基，取代基选自卤素和 C1-10 烷基，
10 M 是一个或多个桥连基，选自-O-或-S-

Py(X)是 X 取代的吡啶基，X 为-C(O)R_x，其中，R_x是 NR_aR_b，其中的
R_a和 R_b各自是：

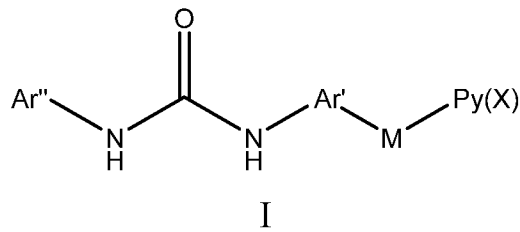
- a) 氢，
- b) C1-10 烷基，
- 15 c) 羟基取代的 C1-10 烷基，
- d) 含 1-3 个 N, S 或 O 的杂原子的 C3-12 环烷基，或
- e) -OSi(R_f)₃，R_f是 C1-10 烷基，

Ar''是非取代或取代苯基，取代基选自卤素或 W_n，n=0-3，W 选自：

- a) C1-10 烷基，
- 20 b) C1-10 烷氧基，
- c) C1-10 卤代烷基
- d) 含 1-3 个 N, S 或 O 杂原子的 C3-12 杂芳基，该杂芳基可被 C1-10
烷基取代。

25 2. 降低癌细胞生长、存活或活力的方法，其特征在于，对患有肿瘤的个体施用免疫效应细胞和第二治疗剂，所述免疫效应细胞表达有识别肿瘤抗原的受体，

所述的第二治疗剂为式 I 所示的化合物，或其医药学上可接受的盐，



其中，Ar'是非取代或取代的苯基，取代基选自卤素和 C1-10 烷基，
M 是一个或多个桥连基，选自-O-或-S-

5 Py(X)是 X 取代的吡啶基，X 为-C(O)R_x，其中，R_x是 NR_aR_b，其中的 R_a和 R_b各自选自：

a)氢，

b)C1-10 烷基，

c)羟基取代的 C1-10 烷基，

10 d)含 1-3 个 N, S 或 O 的杂原子的 C3-12 环烷基，以及

e)-OSi(R_f)₃，R_f是 C1-10 烷基，

Ar''是非取代或取代苯基，取代基选自卤素或 W_n， n=0-3，W 选自：

a)C1-10 烷基，

b)C1-10 烷氧基，

15 c)C1-10 卤代烷基，以及

d)含 1-3 个 N, S 或 O 杂原子的 C3-12 杂芳基，该杂芳基可被 C1-10 烷基取代。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的方法，其特征在于，在对患有肿瘤的个体施用免疫效应细胞之前，对所述的个体不进行淋巴细胞清除。

4. 如权利要求 1 或 2 所述的方法，其特征在于，所述免疫效应细胞和第二治疗剂的治疗效果大于所述免疫效应细胞和第二治疗剂任一单独使用的效果。

25

5. 如权利要求 1 或 2 所述的方法，其特征在于，所述的 Ar''是取代苯基，取代基选自氯、溴、氟、三氟甲基，甲氧基和叔丁基中的任意一种或其组合。

6. 如权利要求 1 或 2 所述的方法，其特征在于，所述的 M 是-O-。

7. 如权利要求 1 或 2 所述的方法，其特征在于，所述的 Ra 和 Rb 各自是 H 或 C1-10 烷基，优选的，Ra 和 Rb 分别为 H 和甲基。

5 8. 如权利要求 1 或 2 所述的方法，其特征在于，所述医药学上可接受的盐选自：a)无机酸和有机酸的碱式盐，所述酸选自：盐酸、氢溴酸、硫酸、磷酸、甲磺酸、三氟甲磺酸、苯磺酸，对甲苯磺酸，1-萘磺酸，2-萘磺酸，乙酸、三氟乙酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸、乳酸、草酸、琥珀酸、富马酸，马来酸、苯甲酸、水杨酸、苯基乙酸和杏仁酸；b)有机和无机碱的酸式盐，
10 所述阳离子选自：碱金属阳离子，碱土金属阳离子，铵阳离子，脂族基取代的铵阳离子，和芳香基取代的铵阳离子。

9. 如权利要求 1-8 所述的方法，其特征在于，所述的第二治疗剂选自下列任一所示的化合物或其医药学上可接受的盐：

15 N-(2-甲氧基-(5-三氟甲基)苯基)-N'-(3-(2-氨基甲酰基-4-吡啶氧基)苯基)脲，

N-(2-甲氧基-(5-三氟甲基)苯基)-N'-(3-(2-(N-甲基氨基甲酰基)-4-吡啶氧基)苯基)脲，

20 N-(2-甲氧基-(5-三氟甲基)苯基)-N'-(4-(2-氨基甲酰基-4-吡啶氧基)苯基)脲，

N-(2-甲氧基-(5-三氟甲基)苯基)-N'-(4-(2-(N-甲基氨基甲酰基)-4-吡啶氧基)苯基)脲，

N-(2-甲氧基-(5-三氟甲基)苯基)-N'-(4-(2-(N-甲基氨基甲酰基)-4-吡啶基硫)苯基)脲，

25 N-(2-甲氧基-(5-三氟甲基)苯基)-N'-(2-氯-4-(2-(N-甲基氨基甲酰基)(4-吡啶氧基))苯基)脲，

N-(2-甲氧基-(5-三氟甲基)苯基)-N'-(3-氯-4-(2-(N-甲基氨基甲酰基)(4-吡啶氧基))苯基)脲，

N-(4-氯-3-(三氟甲基)苯基)-N'-(3-(2-氨基甲酰基-4-吡啶氧基)苯基)脲，

30 N-(4-氯-3-(三氟甲基)苯基)-N'-(3-(2-(N-甲基氨基甲酰基)-4-吡啶氧基)苯基)脲，

N-(4-氯-3-(三氟甲基)苯基)-N'-(4-(2-氨基甲酰基-4-吡啶氧基)苯基)脲,

N-(4-氯-3-(三氟甲基)苯基)-N'-(4-(2-(N-甲基氨基甲酰基)-4-吡啶氧基)苯基)脲,

5 N-(4-氯-3-(三氟甲基)苯基)-N'-2-氟-(4-(2-(N-甲基氨基甲酰基)-4-吡啶氧基)苯基)脲,

N-(4-溴-3-(三氟甲基)苯基)-N'-(3-(2-(N-甲基氨基甲酰基)-4-吡啶氧基)苯基)脲,

N-(4-溴-3-(三氟甲基)苯基)-N'-(4-(2-(N-甲基氨基甲酰基)-4-吡啶氧基)苯基)脲,

10 N-(4-溴-3-(三氟甲基)苯基)-N'-(3-(2-(N-甲基氨基甲酰基)-4-吡啶基硫)苯基)脲,

N-(4-溴-3-(三氟甲基)苯基)-N'-(2-氯-4-(2-(N-甲基氨基甲酰基)(4-吡啶氧基))苯基)脲,

15 N-(4-溴-3-(三氟甲基)苯基)-N'-(3-氯-4-(2-(N-甲基氨基甲酰基)(4-吡啶氧基))苯基)脲,

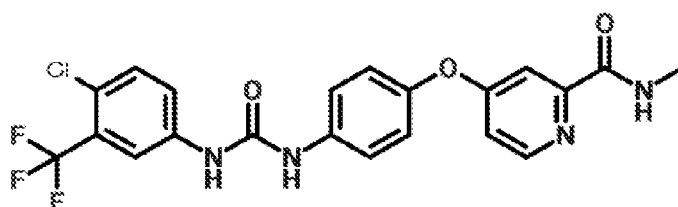
N-(2-甲氧基-4-氯-5-(三氟甲基)苯基)-N'-(3-(2-(N-甲基氨基甲酰基)-4-吡啶氧基)苯基)脲,

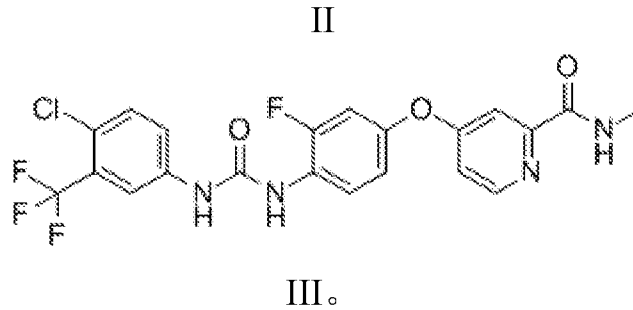
N-(2-甲氧基-4-氯-5-(三氟甲基)苯基)-N'-(4-(2-(N-甲基氨基甲酰基)-4-吡啶氧基)苯基)脲,

20 N-(2-甲氧基-4-氯-5-(三氟甲基)苯基)-N'-(2-氯-4-(2-(N-甲基氨基甲酰基)(4-吡啶氧基))苯基)脲,

N-(2-甲氧基-4-氯-5-(三氟甲基)苯基)-N'-(3-氯-4-(2-(N-甲基氨基甲酰基)(4-吡啶氧基))苯基)脲。

25 10. 如权利要求 9 所述的方法, 其特征在于, 所述的第二治疗剂选自下列式 II 或式 III 所示的化合物, 或其医药学上可接受的盐:





5 11. 如权利要求 10 所述的方法，其特征在于，所述的医药学上可接受的盐选自甲苯磺酸盐、苯磺酸盐、盐酸盐、甲磺酸盐。

 12. 如权利要求 10 所述的方法，其特征在于，所述的第二治疗剂为式 III 化合物或者式 III 化合物的水合物，优选的为一水合物。

10

 13. 如权利要求 1-12 任一所述的方法，其特征在于，所述的第二治疗剂每天给药 100-1000mg，优选的，每天给药 200-800mg，更优选的，每天给药 400-800mg，

 优选所述第二治疗剂每天给予 1-3 次，

15

 进一步优选，每天给予第二治疗剂 2 次，

 再优选所述第二治疗剂持续给予直至医生评估需要停药或者可以停药，如医生评估达到完全缓解后停药，或者疾病进展停药。

20

 14. 如权利要求 13 所述的方法，其特征在于，所述免疫效应细胞每次的给予量为约 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^8$ 细胞/千克受试者体重，

 优选地，每次的给予量为约 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ 细胞/千克受试者体重。

 15. 如权利要求 1-14 任一所述的方法，其特征在于，免疫效应细胞和第二治疗剂给予时间不分先后，

25

 优选在给予所述第二治疗剂的期间给予所述免疫效应细胞。

 16. 如权利要求 1-15 任一所述的方法，其特征在于，所述的第二治疗剂为口服给药。

17. 如权利要求 1-16 任一所述的方法，其特征在于，所述受体选自：嵌合抗原受体 (Chimeric Antigen Receptor, CAR)、T 细胞受体 (T cell receptor, TCR)、T 细胞融合蛋白 (T cell fusion protein, TFP)、T 细胞抗原耦合器 (T cell antigen coupler, TAC) 或其组合。

18. 如权利要求 17 所述的方法，其特征在于，所述的嵌合抗原受体具有：

(i) 特异性识别肿瘤抗原的抗体或其片段、CD28 或 CD8 的跨膜区、CD28 的共刺激信号结构域和 CD3 ζ 的胞内域；或

10 (ii) 特异性识别肿瘤抗原的抗体或其片段、CD28 或 CD8 的跨膜区、CD137 的共刺激信号结构域和 CD3 ζ 的胞内域；或

(iii) 特异性识别肿瘤抗原的抗体或其片段、CD28 或 CD8 的跨膜区、CD28 的共刺激信号结构域、CD137 的共刺激信号结构域和 CD3 ζ 的胞内域。

15 19. 如权利要求 1-18 任一所述的方法，其特征在于：

所述肿瘤抗原选自：促甲状腺激素受体(TSHR)；CD171；CS-1；C 型凝集素样分子-1；神经节苷脂 GD3；Tn 抗原；CD19；CD20；CD 22；CD 30；CD 70；CD 123；CD 138；CD33；CD44；CD44v7/8；CD38；CD44v6；B7H3(CD276)，B7H6；KIT(CD117)；白介素 13 受体亚单位 α (IL-13R α)；白介素 11 受体 α (IL-11R α)；前列腺干细胞抗原(PSCA)；前列腺特异性膜抗原 (PSMA)；癌胚抗原 (CEA)；NY-ESO-1；HIV-1 Gag；MART-1；gp100；酪氨酸酶；间皮素；EpCAM；蛋白酶丝氨酸 21(PRSS21)；血管内皮生长因子受体；路易斯(Y)抗原；CD24；血小板衍生生长因子受体 β (PDGFR- β)；阶段特异性胚胎抗原-4(SSEA-4)；细胞表面相关的粘蛋白 1(MUC1)，MUC6；表皮生长因子受体家族及其突变体(EGFR, EGFR2, ERBB3, ERBB4, EGFRvIII)；神经细胞粘附分子(NCAM)；碳酸酐酶 IX(CAIX)；LMP2；肝配蛋白 A 型受体 2(EphA2)；岩藻糖基 GM1；唾液酸基路易斯粘附分子(sLe)；神经节苷脂 GM3(aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-4)bDGlc(1-1)Cer)；TGS5；高分子量黑素瘤相关抗原 (HMWMAA)；邻乙酰基 GD2 神经节苷脂(OAcGD2)；叶酸受体；肿瘤血管内皮标记 1(TEM1/ CD248)；肿瘤血管内皮标记 7 相关的 (TEM7R)；Claudin 6, Claudin18.2、Claudin18.1；ASGPR1；CDH16；5T4；

8H9; $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ 整合素; B 细胞成熟抗原(BCMA); CA9; κ 轻链(kappa light chain); CSPG4; EGP2, EGP40; FAP; FAR; FBP; 胚胎型 AchR; HLA-A1, HLA-A2; MAGEA1, MAGE3; KDR; MCSP; NKG2D 配体; PSC1; ROR1; Sp17; SURVIVIN; TAG72; TEM1; 纤连蛋白; 腱生蛋白; 肿瘤坏死区的癌胚变体;

5 G 蛋白偶联受体 C 类 5 组-成员 D(GPRC5D); X 染色体开放阅读框 61(CXORF61); CD97; CD179a; 间变性淋巴瘤激酶(ALK); 聚唾液酸; 胎盘特异性 1(PLAC1); globoH glycosphingolipid 的己糖部分(GloboH); 乳腺分化抗原 (NY-BR-1); uroplakin 2(UPK2); 甲型肝炎病毒细胞受体 1(HAVCR1); 肾上腺素受体 β3 (ADRB3); pannexin 3(PANX3); G 蛋白偶联受体 20(GPR20);

10 淋巴细胞抗原 6 复合物基因座 K9 (LY6K); 嗅觉受体 51E2(OR51E2); TCR γ 交替阅读框蛋白(TARP); 肾母细胞瘤蛋白(WT1); ETS 易位变异基因 6(ETV6-AML); 精子蛋白 17(SPA17); X 抗原家族成员 1A (XAGE1); 血管生成素结合细胞表面受体 2(Tie2); 黑素瘤癌睾丸抗原-1(MAD-CT-1); 黑素瘤癌睾丸抗原-2(MAD-CT-2); Fos 相关抗原 1; p53 突变体; 人端粒酶逆转录酶(hTERT); 肉瘤易位断点; 细胞凋亡的黑素瘤抑制剂(ML-IAP); ERG(跨膜蛋白酶丝氨酸 2(TMPRSS2)ETS 融合基因); N-乙酰葡萄糖胺基转移酶 V(NA17); 配对盒蛋白 Pax-3(PAX3); 雄激素受体; 细胞周期蛋白 B1; V-myc 鸟髓细胞瘤病毒癌基因神经母细胞瘤衍生的同源物(MYCN); Ras 同源物家族成员 C(RhoC); 细胞色素 P450 1B1(CYP1B1); CCCTC 结合因子(锌指蛋白)样(BORIS); 由 T 细胞识别的鳞状细胞癌抗原 3(SART3); 配对盒蛋白 Pax-5(PAX5); proacrosin 结合蛋白 sp32(OYTES1); 淋巴细胞特异性蛋白酪氨酸激酶(LCK); A 激酶锚定蛋白 4(AKAP-4); 滑膜肉瘤, X 断点 2(SSX2); CD79a; CD79b; CD72; 白细胞相关免疫球蛋白样受体 1(LAIR1); IgA 受体的 Fc 片段 (FCAR); 白细胞免疫球蛋白样受体亚家族成员 2 (LILRA2);

25 CD300 分子样家族成员 f (CD300LF); C 型凝集素结构域家族 12 成员 A(CLEC12A); 骨髓基质细胞抗原 2(BST2); 含有 EGF 样模块粘蛋白样激素受体样 2(EMR2); 淋巴细胞抗原 75(LY75); 磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 (GPC3); Fc 受体样 5(FCRL5); 免疫球蛋白 λ 样多肽 1(IGLL1)。

30 20. 如权利要求 1-18 任一所述的方法, 其特征在于: 所述肿瘤抗原为实体瘤抗原; 优选的所述实体瘤抗原为血管内皮生长因子受体、EGFR、

EGFRvIII、GPC3、或 Claudin18.2；更优选的，所述实体瘤抗原为 GPC3、EGFR、EGFRvIII、或血管内皮生长因子受体。

21. 如权利要求 18 所述的方法，其特征在于，所述特异性识别肿瘤抗原的抗体含有 SEQ ID NO:15、16、17 所示的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，和 SEQ ID NO:18、19、20 所示的 LCDR1、LCDR2、LCDR3。

22. 如权利要求 21 所述的方法，其特征在于，所述的特异性识别肿瘤抗原的抗体的氨基酸序列与 SEQ ID NO:14 所示的序列具有至少 90% 的同一性。

23. 如权利要求 22 所述的方法，其特征在于，具有所述特异性识别肿瘤抗原的抗体的嵌合抗原受体的氨基酸序列与 SEQ ID NO:21、22、23 或 24 所示的序列具有至少 90% 的同一性。

24. 如权利要求 17 所述的方法，其特征在于，所述的嵌合抗原受体具有：特异性识别肿瘤抗原的抗体或其片段、跨膜结构域和细胞质信号传导结构域，

其中所述特异性识别肿瘤抗原的抗体或其片段含有 SEQ ID NO:15、16、17 所示的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，和 SEQ ID NO:18、19、20 所示的 LCDR1、LCDR2、LCDR3。

25. 如权利要求 24 所述的方法，其特征在于，所述的嵌合抗原受体具有：

(i) 特异性识别肿瘤抗原的抗体或其片段，CD28 或 CD8 的跨膜区、CD28 的共刺激信号结构域和 CD3 ζ 的胞内域；或

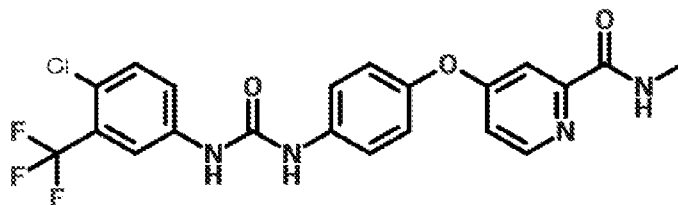
(ii) 特异性识别肿瘤抗原的片段、CD28 或 CD8 的跨膜区、CD137 的共刺激信号结构域和 CD3 ζ 的胞内域；或

(iii) 特异性识别肿瘤抗原的片段、CD28 或 CD8 的跨膜区、CD28 的共刺激信号结构域、CD137 的共刺激信号结构域和 CD3 ζ 的胞内域；

其中所述特异性识别肿瘤抗原的抗体或其片段含有 SEQ ID NO:15、16、

17 所示的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，和 SEQ ID NO:18、19、20 所示的 LCDR1、LCDR2、LCDR3。

26. 如权利要求 24 所述的方法，其特征在于，所述第二治疗剂为式 II 所示的化合物，或其医药学上可接受的盐：



II

所述第二治疗剂每次的给药剂量是每天给药 100-1000mg，优选的，每天给药 200-800mg，更优选的，每天给药 400-800mg，

10 优选，所述第二治疗剂每天给药 1-3 次，进一步优选的，每天给药 2 次，再优选所述第二治疗剂持续给予直至医生评估需要停药或者可以停药，如医生评估达到完全缓解后停药，或者疾病进展停药。

27. 如权利要求 1-26 任一所述的方法，其特征在于，其中所述肿瘤包括：
15 乳腺癌，脑胶质瘤，血液癌症，结肠癌，直肠癌，肾细胞癌，肝癌，肺癌，小肠癌，食道癌，黑素瘤，骨癌，胰腺癌，皮肤癌，头颈癌，皮肤或眼内恶性黑素瘤，子宫癌，卵巢癌，直肠癌，肛区癌，胃癌，睾丸癌，子宫癌，输卵管癌，子宫内膜癌，宫颈癌，阴道癌，阴户癌，霍奇金氏病，非霍奇金淋巴瘤，内分泌系统癌，甲状腺癌，甲状旁腺癌，肾上腺癌，软组织肉瘤，尿道癌，阴茎癌，儿童实体瘤，膀胱癌，肾或输尿管癌，肾盂癌，中枢神经系统(CNS)瘤，原发性 CNS 淋巴瘤，肿瘤血管发生，脊椎肿瘤，脑干神经胶质瘤，垂体腺瘤，卡波西肉瘤，表皮样癌，鳞状细胞癌，T 细胞淋巴瘤，环境诱发的癌症，所述癌症的组合和所述癌症的转移性病灶；

优选的，所述肿瘤选自肝癌、肾细胞癌、肺鳞癌、甲状腺癌。

25

28. 如权利要求 1-27 任一所述的方法，其特征在于，所述的免疫效应细胞选自：T 细胞、B 细胞、自然杀伤细胞(NK 细胞)、自然杀伤 T 细胞(NKT 细胞)、肥大细胞或骨髓源性吞噬细胞或其组合；

优选地，所述免疫效应细胞选自 T 细胞或 NK 细胞；
进一步优选，所述免疫效应细胞为自体免疫效应细胞。

29. 表达有识别肿瘤抗原的受体的免疫效应细胞在制备药物中的应用，
5 其特征在于，所述药物与索拉非尼联用，用于治疗肿瘤，其中将所述药物和索拉非尼配制成能提供优于所述药物和索拉非尼各自单独使用时的效果。

30. 一种用于治疗肿瘤的试剂盒，其特征在于，所述试剂盒包含：

- 10
- 1) 表达有识别肿瘤抗原的受体的免疫效应细胞；
 - 2) 索拉非尼；
 - 3) 用于包含以上 1)和 2)所述物质的容器；和
 - 4) 利用所述试剂盒治疗肿瘤的给药说明书；

其中，所述免疫效应细胞和索拉非尼配制成能提供优于所述免疫效应细胞和索拉非尼各自单独使用时的效果；

15 优选地，所述免疫效应细胞为 CAR T 细胞，

更优选地，所述 CAR T 细胞特异性识别 EGFR、EGFRvIII，磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3、claudin 18.2、BCMA 中的任一种或多种。

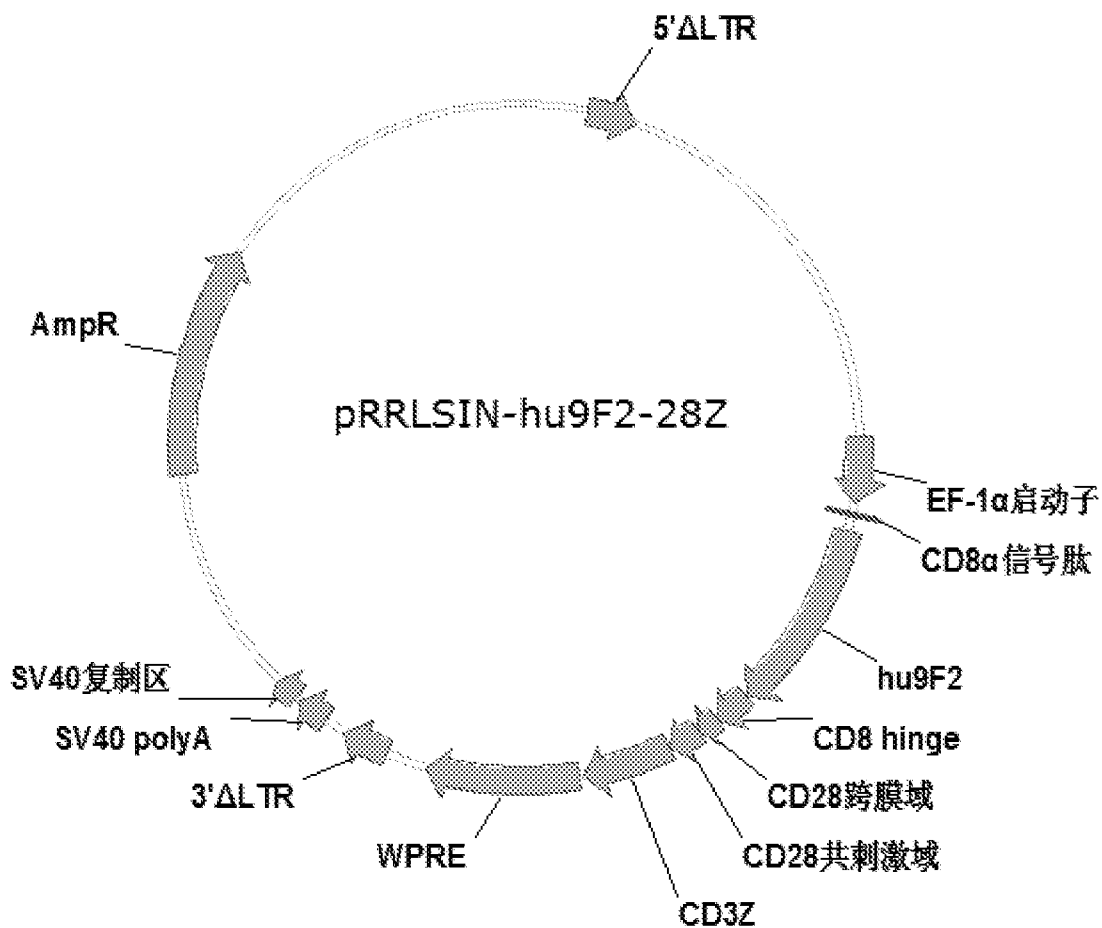


图 1A

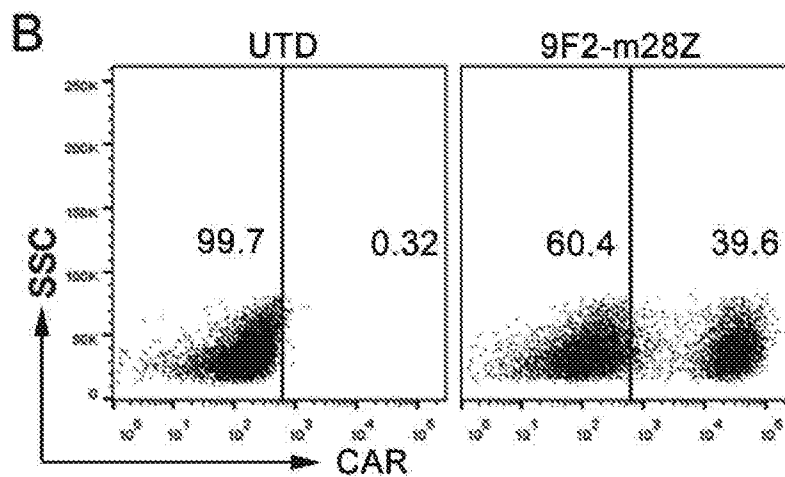


图 1B

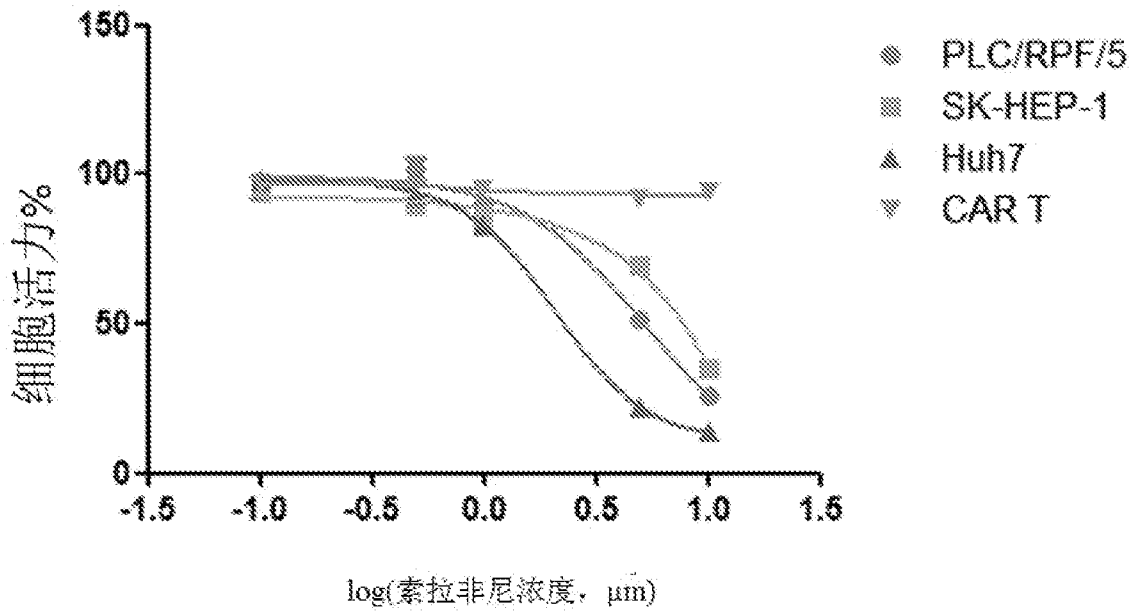


图 2

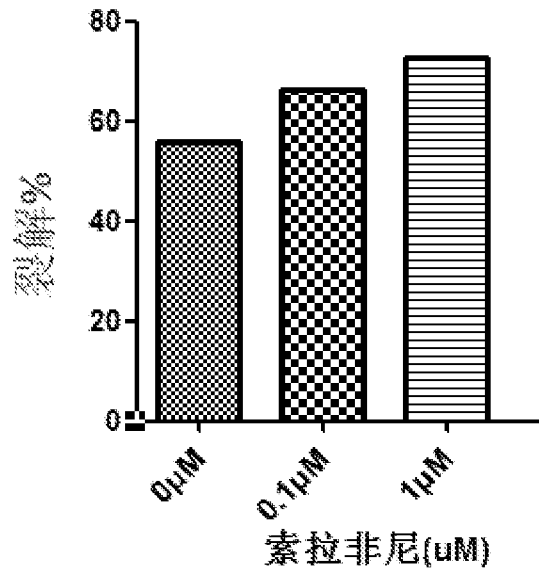


图 3

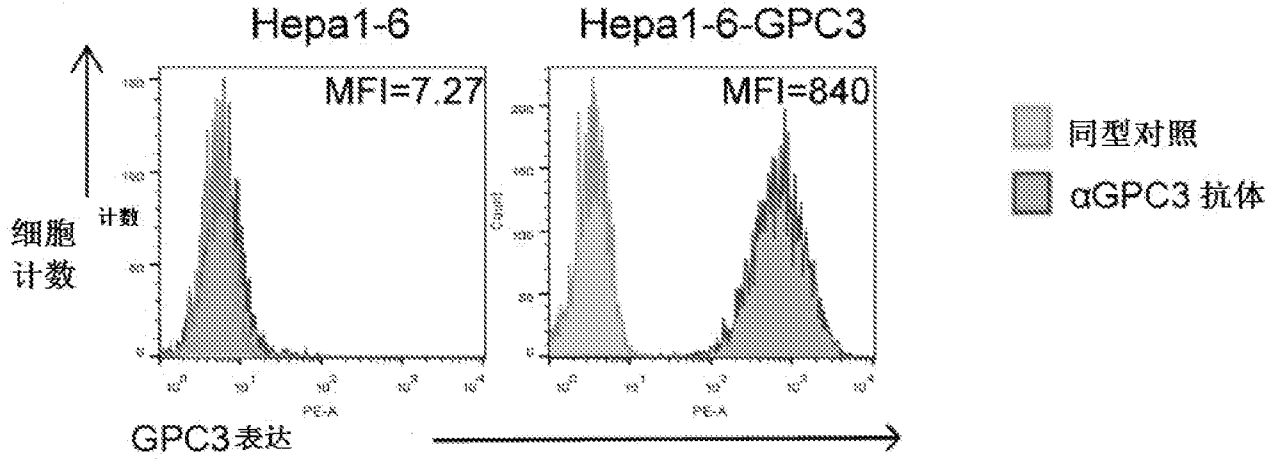


图 4

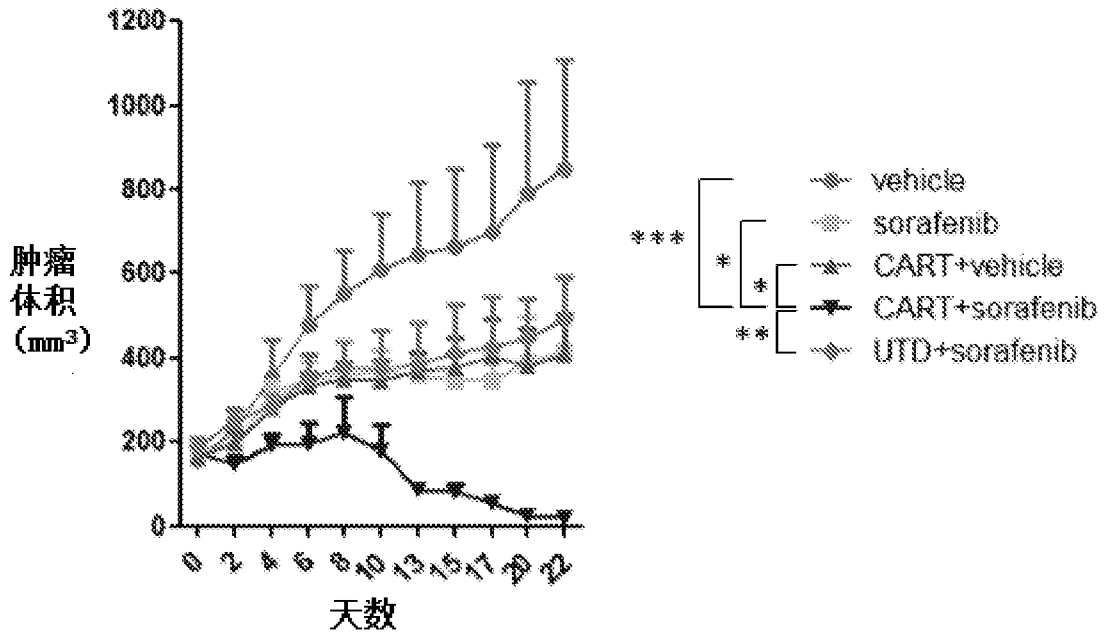


图 5

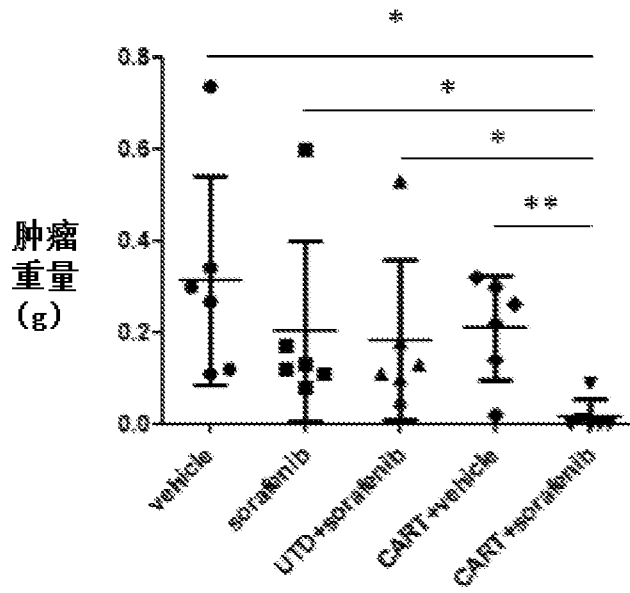


图 6

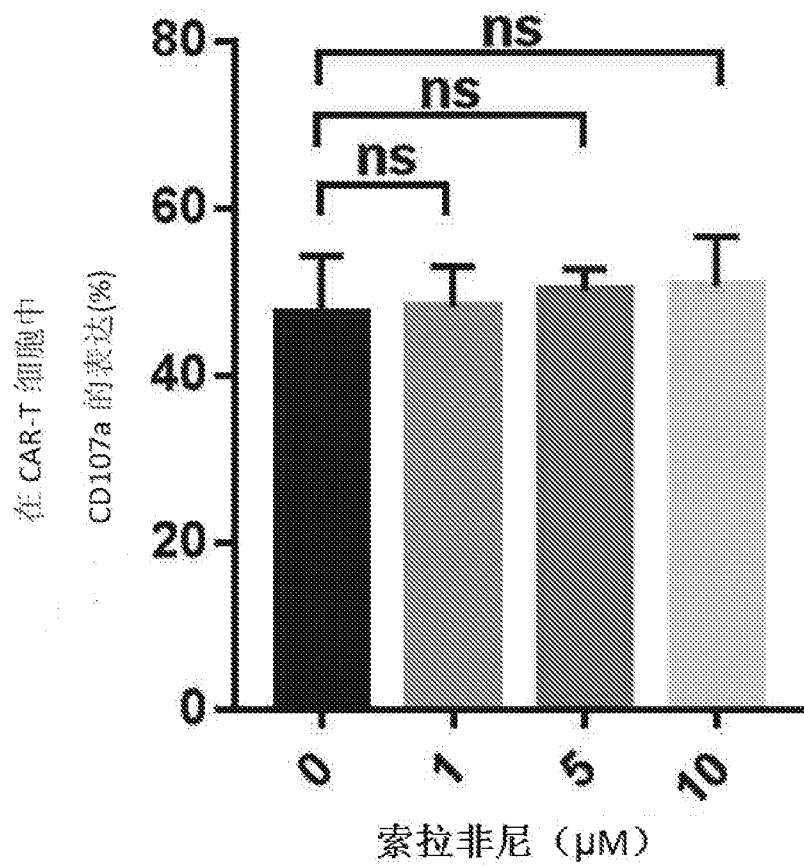


图 7A

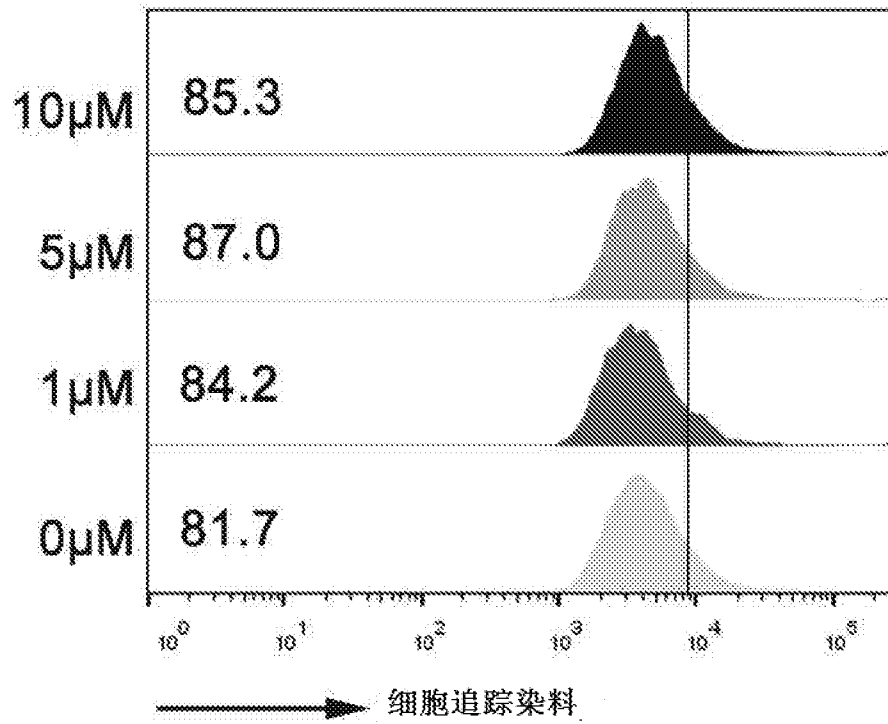


图 7B

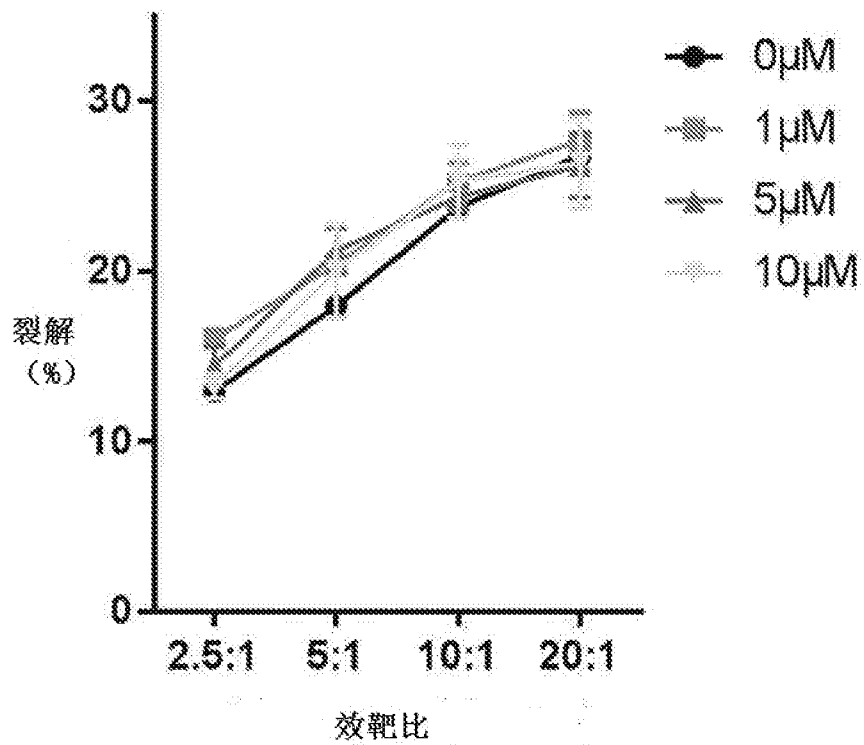


图 7C

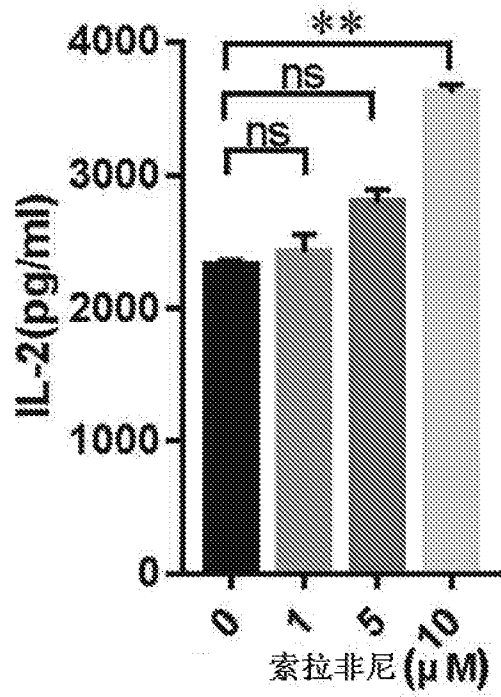


图 8A

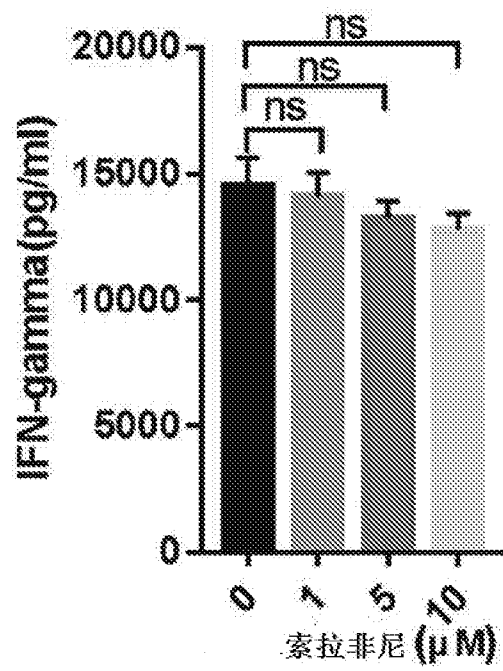


图 8B

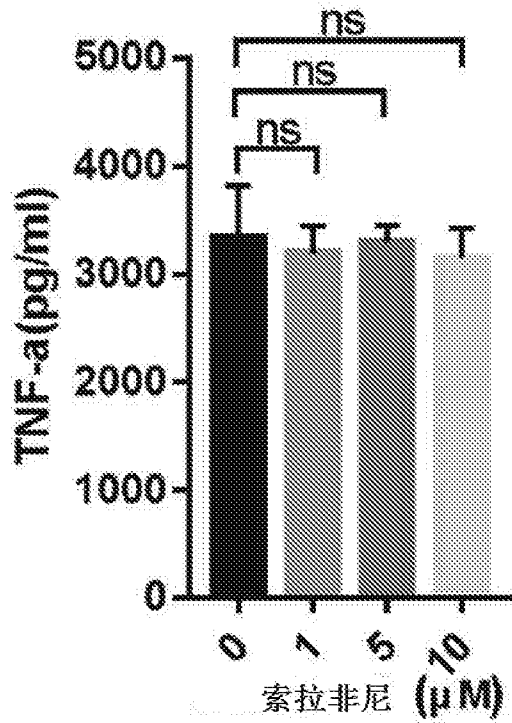


图 8C

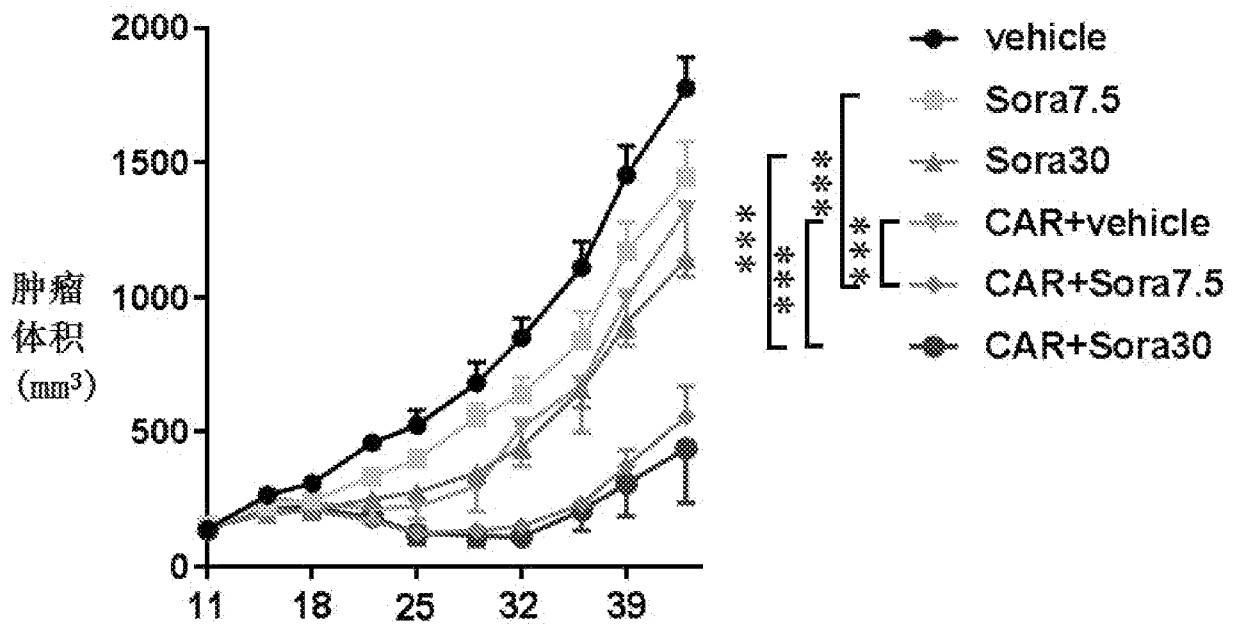


图 9A

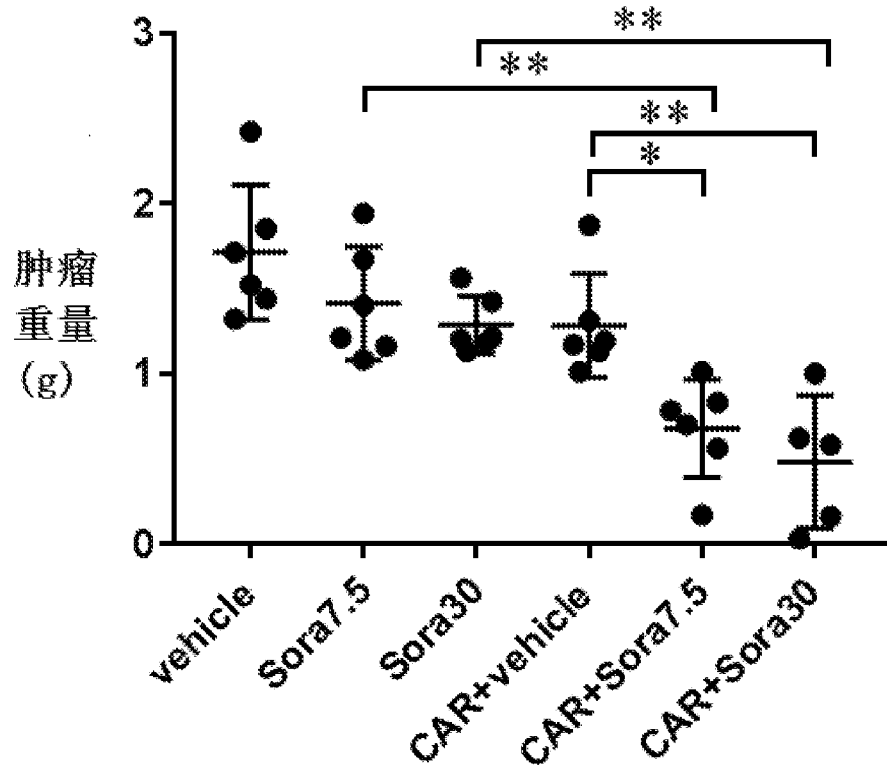


图 9B

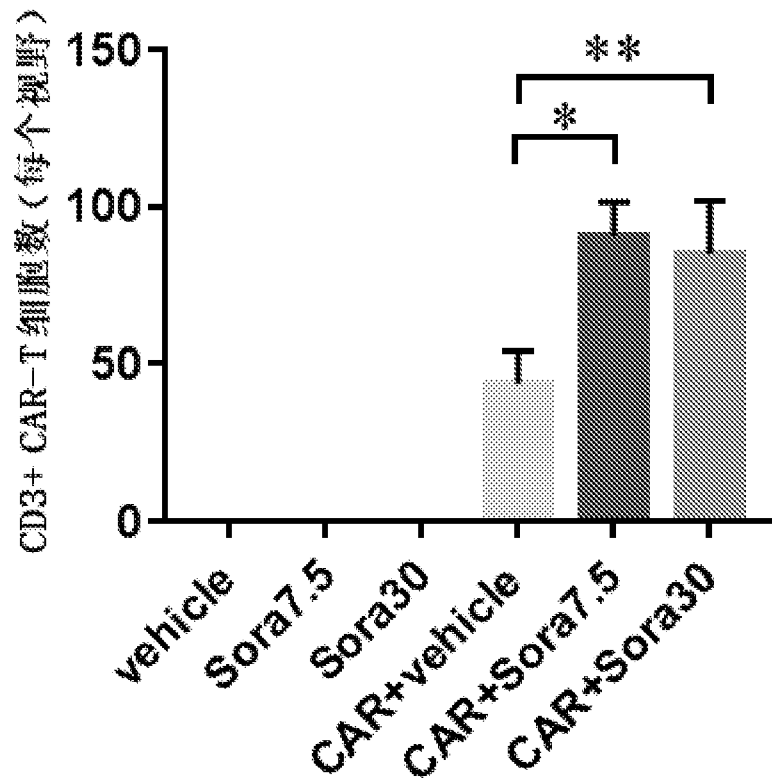


图 10A

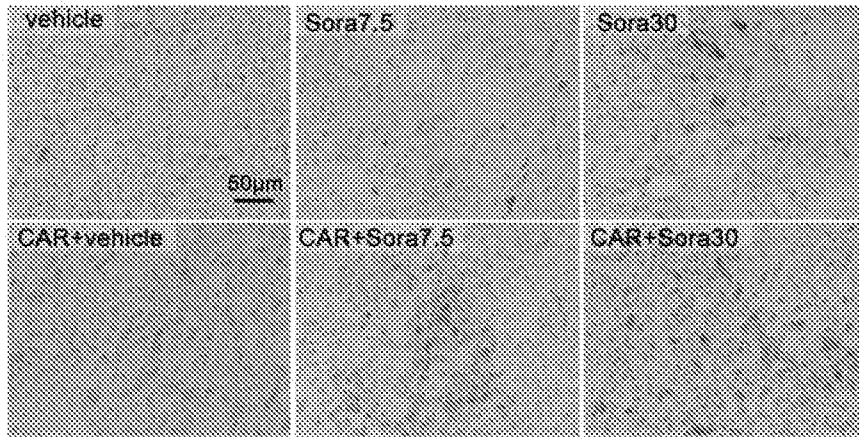


图 10B

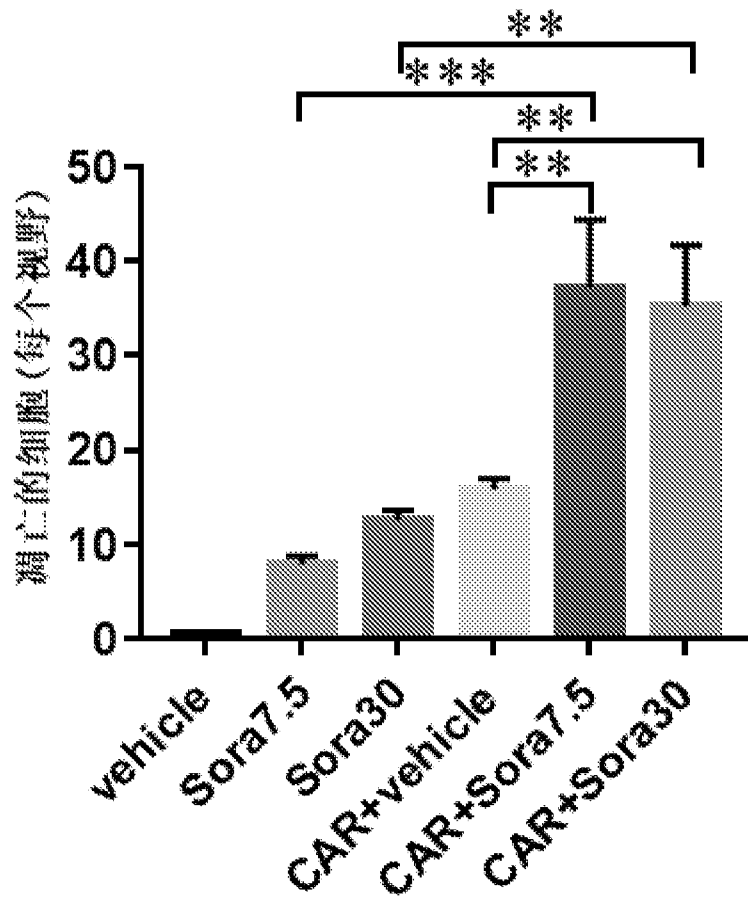


图 10C

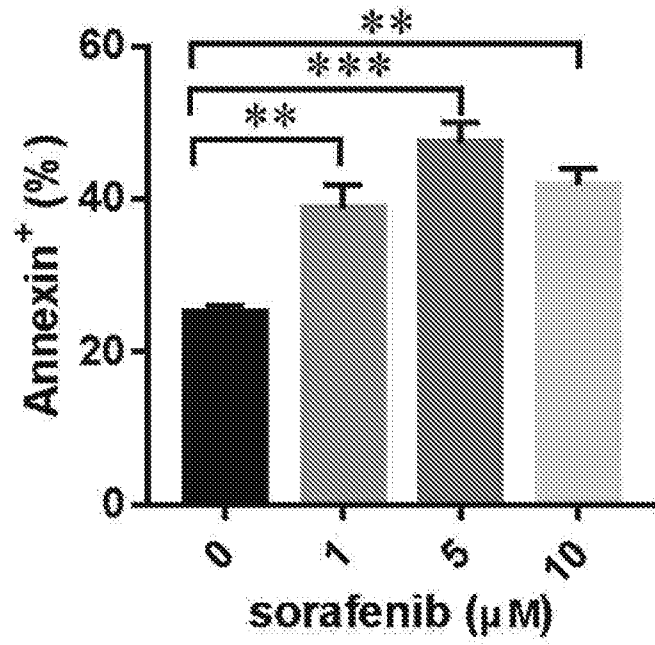


图 11

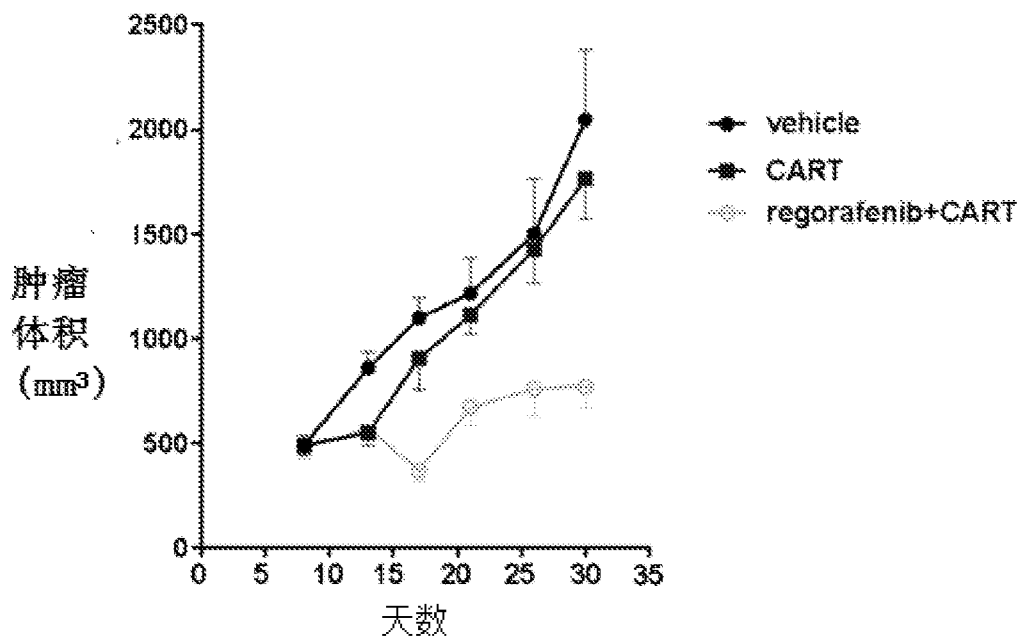


图 12

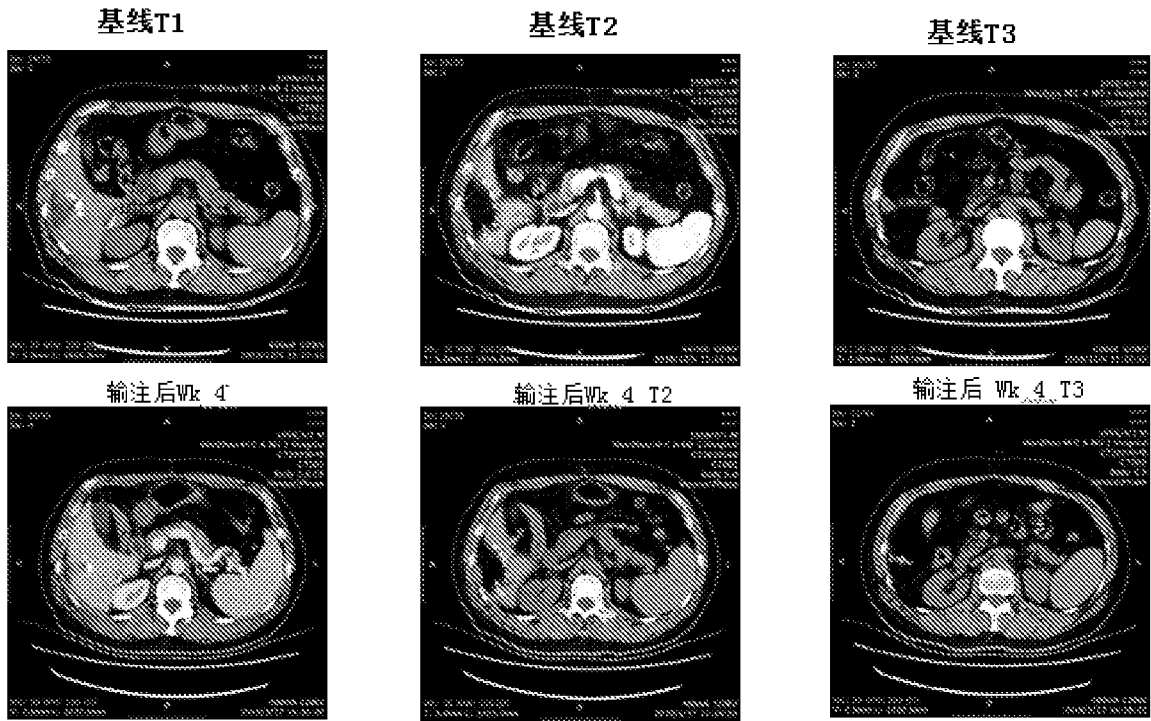


图 13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/074535

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
A61K 31/33(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K; A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNABS, CPRSABS, SIPOABS, DWPI, CNTXT, WOTXT, EPTXT, USTXT, CNKI, BAIDU SCHOLAR SEARCH, WEB OF SCIENCE, PubMed: 癌, 瑞戈非尼, 效应细胞, 瘤, 索拉非尼, 免疫, 抗原, 受体, sorafen+, ragorafen+, cancer, tumor, effect cell, immun+, antigen, receptor EMBL, BENBANK: search based on SEQ ID NO: 14-24		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 106471004 A (THE ROYAL INSTITUTION FOR THE ADVANCEMENT OF LEARNING / MCGILL UNIVERSITY) 01 March 2017 (2017-03-01) see claims 65, 74 and 77	1-30
A	CN 105457021 A (PFIZER INC.) 06 April 2016 (2016-04-06) see claims 1-8	1-30
A	CN 102325548 A (GANYMED PHARMACEUTICALS AG ET AL.) 18 January 2012 (2012-01-18) see claim 5	1-30
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 10 April 2019		Date of mailing of the international search report 06 May 2019
Name and mailing address of the ISA/CN State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088 China		Authorized officer
Facsimile No. (86-10)62019451		Telephone No.

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

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

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.: **1-28**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
 - [1] Claims 1-28 relate to a treatment method performed on a human or animal body under PCT Rule 39.1(iv). However, the examiner still carries out a search based on “a use of an immune effector cell and a compound as shown in formula I or a pharmaceutically acceptable salt thereof in preparing a drug for treating a tumour or reducing the growth, survival or vitality of cancer cells”.
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/CN2019/074535

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	106471004	A	01 March 2017	US	9828399	B2	28 November 2017
				US	2018072763	A1	15 March 2018
				US	2017015690	A1	19 January 2017
				US	10005804	B2	26 June 2018
				JP	2017513812	A	01 June 2017
				US	10150787	B2	11 December 2018
				EP	3110824	A1	04 January 2017
				US	2018265531	A1	20 September 2018
				EP	3110824	A4	29 November 2017
				WO	2015127548	A1	03 September 2015
				CA	2977839	A1	03 September 2015
				CN	105457021	A	06 April 2016
MX	2014013366	A	22 January 2015				
EP	2844282	A2	11 March 2015				
PH	12014502438	A1	26 January 2015				
CO	7111302	A2	10 November 2014				
KR	20170045363	A	26 April 2017				
US	2016375115	A1	29 December 2016				
TW	201348447	A	01 December 2013				
AU	2013255511	B2	28 January 2016				
PE	24062014	A1	23 January 2015				
AU	2018200483	A1	08 February 2018				
IL	255938	D0	31 January 2018				
RU	2609651	C2	02 February 2017				
NZ	701324	A	30 September 2016				
AR	090941	A1	17 December 2014				
IL	235501	A	31 December 2018				
WO	2013164754	A2	07 November 2013				
BR	112014027128	A2	08 August 2017				
WO	2013164754	A3	13 March 2014				
US	2015246106	A1	03 September 2015				
CA	2871711	A1	07 November 2013				
TW	1513820	B	21 December 2015				
US	9066898	B2	30 June 2015				
MX	359257	B	19 September 2018				
SG	10201603896R	A	28 July 2016				
AU	2016202651	A1	19 May 2016				
TW	I643870	B	11 December 2018				
US	2013295110	A1	07 November 2013				
CN	107746852	A	02 March 2018				
HK	1205940	A1	31 December 2015				
TW	201718634	A	01 June 2017				
US	2019038728	A1	07 February 2019				
KR	20150003911	A	09 January 2015				
SG	11201406592Q	A	27 November 2014				
AU	2013255511	A1	30 October 2014				
CN	104284674	A	14 January 2015				
TW	I581804	B	11 May 2017				
JP	2015517460	A	22 June 2015				
RU	2017101868	A	20 December 2018				

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2019/074535

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
				US 9468672 B2	18 October 2016
				AU 2016202651 B2	09 November 2017
				TW 201601757 A	16 January 2016
				JP 6434905 B2	05 December 2018
				RU 2014144133 A	27 June 2016
CN	102325548	A	18 January 2012	IL 214255 D0	27 September 2011
				ZA 201105472 B	31 October 2012
				AU 2010215691 B2	03 September 2015
				US 2011318264 A1	29 December 2011
				EP 2221063 A1	25 August 2010
				EP 2398497 A1	28 December 2011
				WO 2010094490 A1	26 August 2010
				JP 2016040253 A	24 March 2016
				BR PI1008566 A8	02 January 2018
				AU 2010215691 A1	18 August 2011
				SG 10201402491Y A	30 July 2014
				KR 20110128315 A	29 November 2011
				IL 214255 A	31 May 2018
				NZ 594479 A	28 June 2013
				MX 2011008429 A	29 September 2011
				NZ 601793 A	29 November 2013
				EP 3170511 A1	24 May 2017
				MX 349996 B	23 August 2017
				CA 2750980 A1	26 August 2010
				SG 173033 A1	29 August 2011
				US 9637548 B2	02 May 2017
				BR PI1008566 A2	06 June 2017
				JP 2012518608 A	16 August 2012
				JP 5809067 B2	10 November 2015

<p>A. 主题的分类</p> <p>A61K 31/33 (2006.01) i; A61P 35/00 (2006.01) i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>														
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>A61K; A61P</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNABS, CPRSABS, SIPOABS, DWPI, CNTXT, WOTXT, EPTXT, USTXT, CNKI, 百度学术搜索, WEB OF SCIENCE, PubMed: 癌, 瑞戈非尼, 效应细胞, 瘤, 索拉非尼, 免疫, 抗原, 受体, sorafen+, ragorafen+, cancer, tumor, effect cell, immun+, antigen, receptor EMBL, BENBANK:基于序列SEQ ID NO: 14-24的检索</p>														
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>CN 106471004 A (麦吉尔大学学术发展皇家学院) 2017年 3月 1日 (2017 - 03 - 01) 参见权利要求65, 74, 77</td> <td>1-30</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 105457021 A (辉瑞公司) 2016年 4月 6日 (2016 - 04 - 06) 参见权利要求1-8</td> <td>1-30</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 102325548 A (加尼梅德药物公司等) 2012年 1月 18日 (2012 - 01 - 18) 参见权利要求5</td> <td>1-30</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	X	CN 106471004 A (麦吉尔大学学术发展皇家学院) 2017年 3月 1日 (2017 - 03 - 01) 参见权利要求65, 74, 77	1-30	A	CN 105457021 A (辉瑞公司) 2016年 4月 6日 (2016 - 04 - 06) 参见权利要求1-8	1-30	A	CN 102325548 A (加尼梅德药物公司等) 2012年 1月 18日 (2012 - 01 - 18) 参见权利要求5	1-30
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求												
X	CN 106471004 A (麦吉尔大学学术发展皇家学院) 2017年 3月 1日 (2017 - 03 - 01) 参见权利要求65, 74, 77	1-30												
A	CN 105457021 A (辉瑞公司) 2016年 4月 6日 (2016 - 04 - 06) 参见权利要求1-8	1-30												
A	CN 102325548 A (加尼梅德药物公司等) 2012年 1月 18日 (2012 - 01 - 18) 参见权利要求5	1-30												
<p><input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>														
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p> <p>“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>“&” 同族专利的文件</p>														
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2019年 4月 10日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2019年 5月 6日</p>												
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>授权官员</p> <p>赵彦豪</p> <p>电话号码 62411043</p>												

第1栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1. c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列列表进行的:
- a. 作为国际申请的一部分提交的:
- 附件C/ST. 25文本文件形式
 - 纸件或图形文件形式
- b. 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:
- c. 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:
- 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))
 - 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b)和行政规程第713段)
2. 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。
3. 补充意见:

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: 1-28
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题, 即:
[1] 权利要求1-28涉及人体或动物体的治疗方法(PCT实施细则39.1(iv)), 但审查员还是基于“免疫效应细胞和包括式I所示的化合物, 或其医药学上可接受的盐在制备治疗肿瘤或降低癌细胞生长、存活或活力的药物中的用途”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。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2019/074535

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	106471004	A	2017年 3月 1日	US	9828399	B2	2017年 11月 28日
				US	2018072763	A1	2018年 3月 15日
				US	2017015690	A1	2017年 1月 19日
				US	10005804	B2	2018年 6月 26日
				JP	2017513812	A	2017年 6月 1日
				US	10150787	B2	2018年 12月 11日
				EP	3110824	A1	2017年 1月 4日
				US	2018265531	A1	2018年 9月 20日
				EP	3110824	A4	2017年 11月 29日
				WO	2015127548	A1	2015年 9月 3日
				CA	2977839	A1	2015年 9月 3日
<hr/>							
CN	105457021	A	2016年 4月 6日	KR	101728483	B1	2017年 4月 19日
				MX	2014013366	A	2015年 1月 22日
				EP	2844282	A2	2015年 3月 11日
				PH	12014502438	A1	2015年 1月 26日
				CO	7111302	A2	2014年 11月 10日
				KR	20170045363	A	2017年 4月 26日
				US	2016375115	A1	2016年 12月 29日
				TW	201348447	A	2013年 12月 1日
				AU	2013255511	B2	2016年 1月 28日
				PE	24062014	A1	2015年 1月 23日
				AU	2018200483	A1	2018年 2月 8日
				IL	255938	D0	2018年 1月 31日
				RU	2609651	C2	2017年 2月 2日
				NZ	701324	A	2016年 9月 30日
				AR	090941	A1	2014年 12月 17日
				IL	235501	A	2018年 12月 31日
				WO	2013164754	A2	2013年 11月 7日
				BR	112014027128	A2	2017年 8月 8日
				WO	2013164754	A3	2014年 3月 13日
				US	2015246106	A1	2015年 9月 3日
				CA	2871711	A1	2013年 11月 7日
				TW	1513820	B	2015年 12月 21日
				US	9066898	B2	2015年 6月 30日
				MX	359257	B	2018年 9月 19日
				SG	10201603896R	A	2016年 7月 28日
				AU	2016202651	A1	2016年 5月 19日
				TW	I643870	B	2018年 12月 11日
				US	2013295110	A1	2013年 11月 7日
				CN	107746852	A	2018年 3月 2日
				HK	1205940	A1	2015年 12月 31日
				TW	201718634	A	2017年 6月 1日
				US	2019038728	A1	2019年 2月 7日
				KR	20150003911	A	2015年 1月 9日
				SG	11201406592Q	A	2014年 11月 27日
				AU	2013255511	A1	2014年 10月 30日
				CN	104284674	A	2015年 1月 14日
				TW	1581804	B	2017年 5月 11日
				JP	2015517460	A	2015年 6月 22日
				RU	2017101868	A	2018年 12月 20日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2015年1月)

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2019/074535

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)
				US	9468672	B2	2016年 10月 18日
				AU	2016202651	B2	2017年 11月 9日
				TW	201601757	A	2016年 1月 16日
				JP	6434905	B2	2018年 12月 5日
				RU	2014144133	A	2016年 6月 27日
CN	102325548	A	2012年 1月 18日	IL	214255	D0	2011年 9月 27日
				ZA	201105472	B	2012年 10月 31日
				AU	2010215691	B2	2015年 9月 3日
				US	2011318264	A1	2011年 12月 29日
				EP	2221063	A1	2010年 8月 25日
				EP	2398497	A1	2011年 12月 28日
				WO	2010094490	A1	2010年 8月 26日
				JP	2016040253	A	2016年 3月 24日
				BR	PI1008566	A8	2018年 1月 2日
				AU	2010215691	A1	2011年 8月 18日
				SG	10201402491Y	A	2014年 7月 30日
				KR	20110128315	A	2011年 11月 29日
				IL	214255	A	2018年 5月 31日
				NZ	594479	A	2013年 6月 28日
				MX	2011008429	A	2011年 9月 29日
				NZ	601793	A	2013年 11月 29日
				EP	3170511	A1	2017年 5月 24日
				MX	349996	B	2017年 8月 23日
				CA	2750980	A1	2010年 8月 26日
				SG	173033	A1	2011年 8月 29日
				US	9637548	B2	2017年 5月 2日
				BR	PI1008566	A2	2017年 6月 6日
				JP	2012518608	A	2012年 8月 16日
				JP	5809067	B2	2015年 11月 10日