

(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



(10) 国际公布号
WO 2022/148332 A1

(43) 国际公布日
2022 年 7 月 14 日 (14.07.2022)

(51) 国际专利分类号:

A61K 35/17 (2015.01) *A61K 48/00* (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

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)。

(21) 国际申请号: PCT/CN2022/070012

本国际公布:

(22) 国际申请日: 2022 年 1 月 4 日 (04.01.2022)

— 包括国际检索报告 (条约第 21 条 (3))。

(25) 申请语言: 中文

— 包括说明书序列表部分 (细则 5.2(a))。

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

202110017842.8 2021 年 1 月 7 日 (07.01.2021) CN

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

(72) 发明人: 杨选明 (YANG, Xuanming); 中国上海市闵行区东川路 800 号, Shanghai 200240 (CN)。王
海勇 (WANG, Haiyong); 中国上海市闵行区东川路 800 号, Shanghai 200240 (CN)。

(74) 代理人: 上海巔石知识产权代理事务所 (普通合伙) (SHANGHAI DIANSHI PARTNERS, P.C.); 中国上海市浦东新区盛夏路 608 号 2 号楼 103 室/张琤, 蒋昉玮, Shanghai 201210 (CN)。

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

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT,

(54) Title: MODIFIED IMMUNE EFFECTOR CELL AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 改造的免疫效应细胞及其用途

(57) Abstract: A modified immune effector cell, the immune effector cell may comprise and/or express a chimeric antigen receptor, and a BCL-2 protein or a functional active fragment thereof, and further provided is an application of the immune effector cell.

(57) 摘要: 一种经改造的免疫效应细胞, 该免疫效应细胞可以包含和/或表达嵌合抗原受体, 以及 Bcl-2 蛋白或其功能活性片段, 还提供了该免疫效应细胞的应用。

WO 2022/148332 A1

改造的免疫效应细胞及其用途

技术领域

本申请涉及生物医药领域，具体的涉及一种经改造的 CAR-T 细胞及其用途。

背景技术

CLDN18 属于 Claudins 蛋白家族成员，CLDN18.1 和 CLDN18.2 是 CLDN18 的可变剪切体。在正常组织中，CLDN18.1 主要表达在肺部，CLDN18.2 只表达于胃粘膜上皮细胞。但是 CLDN18.2 在多种肿瘤组织表达，譬如胃癌，胰腺癌，食管癌，卵巢癌，肺癌等，是理想的肿瘤 CAR-T 治疗靶点。

CD20 特异表达于 B 细胞或 B 细胞来源的白血病或淋巴瘤，已有靶向 CD20 的抗体药物美罗华上市，但治疗中存在耐药和复发现象。

Glypican-3 (GPC-3) 在正常肝组织中无表达，而在胎肝和肝癌组织高表达，是原发性肝细胞性肝癌特异标志物，并参与到肝癌的发生和发展进程，是肝癌小分子靶向治疗的靶点，也是免疫治疗的识别靶点。

过继性细胞疗法中如嵌合抗原受体 T 细胞 (CAR-T 细胞) 是一种经人工修饰的肿瘤杀伤细胞，其结合了抗体的靶向识别功能和 T 细胞的肿瘤杀伤功能，是肿瘤免疫治疗领域的一大突破。然而，CAR-T 对胃癌、胰腺癌等实体瘤的疗效尚不理想，新型 CAR-T 疗法治疗实体瘤的关键。

发明内容

本申请提供了一种免疫效应细胞，其包含和/或表达嵌合抗原受体 (CAR)，以及 Bcl-2 蛋白或其功能活性片段。所述免疫效应细胞具有下述性质中的一种或多种：1) 能够特异性结合抗原；2) 具有较强的体外扩增能力；3) 具有较强的体内抗肿瘤能力；4) 具有较强的体外抗肿瘤能力。

一方面，本申请提供了一种免疫效应细胞，其包含和/或表达嵌合抗原受体 (CAR)，以及 Bcl-2 蛋白或其功能活性片段。

在某些实施方式中，所述 CAR 包含抗原结合结构域，且所述抗原结合结构域包含特异性结合 CD20 的抗体或其抗原结合片段。

在某些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段包含 HCDR3，且所述 HCDR3 包含 SEQ

ID NO: 1 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段包含 HCDR2，且所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段包含 HCDR1，且所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段包含 LCDR3，且所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段包含 LCDR2，且所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段包含 LCDR1，且所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段包含 VH，所述 VH 包含 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段包含 VL，所述 VL 包含 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述 CAR 包含抗原结合结构域，且所述抗原结合结构域包含特异性结合 CLDN18.2 的抗体或其抗原结合片段。

在某些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段包含 HCDR3，且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段包含 HCDR2，且所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段包含 HCDR1，且所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 13 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段包含 LCDR3，且所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段包含 LCDR2，且所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 15 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段包含 LCDR1，且所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段包含 VH，所述 VH 包含 SEQ ID NO: 17 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段包含 VL，所述 VL 包含 SEQ ID NO: 18 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 19 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述 CAR 包含抗原结合结构域，且所述抗原结合结构域包含特异性结合 GPC-3 的抗体或其抗原结合片段。

在某些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段包含 HCDR3，且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 29 和 SEQ ID NO: 38 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段包含 HCDR2，且所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 30 和 SEQ ID NO: 39 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段包含 HCDR1，且所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 31 和 SEQ ID NO: 40 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段包含 LCDR3，且所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 32 和 SEQ ID NO: 41 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段包含 LCDR2，且所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 33 和 SEQ ID NO: 42 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段包含 LCDR1，且所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 34 和 SEQ ID NO: 43 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段包含 VH，所述 VH 包含 SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 35 和 SEQ ID NO: 44 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段包含 VL，所述 VL 包含 SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 36 和 SEQ ID NO: 45 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 37 和 SEQ ID NO: 46 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗体包含单链抗体。

在某些实施方式中，所述 CAR 包含跨膜结构域，所述跨膜结构域包含源自选自下述蛋白的跨膜结构域：CD28、CD3e、CD45、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137 和 CD154。

在某些实施方式中，所述跨膜结构域包含如 SEQ ID NO: 47 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述 CAR 包含共刺激域，且所述共刺激域包含一种或多种选自下述蛋白的共刺激域：CD28、4-1BB、CD40L、TIM1、CD226、DR3、SLAM、ICOS、OX40、NKG2D、2B4、CD244、FcεRIγ、BTLA、CD27、CD30、GITR、HVEM、DAP10、CD2、NKG2C、LIGHT 和 DAP12 中的共刺激信号传导区。

在某些实施方式中，所述共刺激域包含如 SEQ ID NO: 48 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述 CAR 包含胞内信号传导域，且所述胞内信号传导域包含源自 CD3ζ 的胞内信号传导域。

在某些实施方式中，所述胞内信号传导域包含如 SEQ ID NO: 49 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述 CAR 包含铰链区，所述铰链区位于所述抗原结合结构域和所述跨膜结构域之间。

在某些实施方式中，所述铰链区包含以下至少一项：CD8、CD28、4-1BB、CD4、CD27、CD7 和 PD-1 的铰链区。

在某些实施方式中，所述铰链区包含 SEQ ID NO: 50 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述 CAR 包含如 SEQ ID NO: 53、SEQ ID NO: 55、SEQ ID NO: 57、SEQ ID NO: 59 和 SEQ ID NO: 61 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述 Bcl-2 蛋白或其功能活性片段包含外源 Bcl-2 蛋白或其功能活性片段。

在某些实施方式中，所述 Bcl-2 蛋白或其功能活性片段包含 SEQ ID NO: 52 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述免疫效应细胞包括 T 细胞。

另一方面，本申请还提供了核酸分子，所述核酸分子编码所述的 CAR 和所述的 Bcl-2 蛋白或其功能活性片段。

在某些实施方式中，所述核酸分子包含编码自剪切肽的序列，所述编码自剪切肽的序列位于编码所述 CAR 的序列和编码所述 Bcl-2 蛋白的序列之间。

在某些实施方式中，所述自剪切肽包含 2A 肽。

在某些实施方式中，所述 2A 肽为选自下述的一种或多种：P2A，T2A，E2A 和 F2A。

在某些实施方式中，所述 2A 肽包含如 SEQ ID NO: 51 所示的氨基酸序列。

另一方面，本申请还提供了载体，其包含所述的核酸分子。

在某些实施方式中，所述载体选自质粒、逆转录病毒载体和慢病毒载体中的一种或多种。

另一方面，本申请还提供了免疫效应细胞，其包含所述的核酸分子或所述的载体。

另一方面，本申请还提供了制备所述免疫效应细胞的方法，所述方法包括在使得所述嵌合抗原受体表达的条件下，培养所述免疫效应细胞。

另一方面，本申请还提供了组合物，其包含所述免疫效应细胞。

另一方面，本申请还提供了所述免疫效应细胞、所述核酸分子、所述载体或所述组合物用于制备药物中的用途，所述药物用于预防和/或治疗疾病和/或病症。

另一方面，本申请还提供了所述免疫效应细胞、所述核酸分子、所述载体或所述组合物，其用于预防和/或治疗疾病和/或病症。

另一方面，本申请还提供了预防和/或治疗疾病和/或病症的方法，所述方法包括向有需要的受试者施用本申请所述免疫效应细胞、所述核酸分子、所述载体或所述组合物。

在某些实施方式中，所述疾病和/或病症与 CD20 表达相关。

在某些实施方式中，所述疾病和/或病症与 CLDN18.2 表达相关。

在某些实施方式中，所述疾病和/或病症与 GPC-3 表达相关。

在某些实施方式中，所述疾病和/或病症包括肿瘤。

在某些实施方式中，所述肿瘤包括实体瘤和/或血液瘤。

在某些实施方式中，所述肿瘤包括 CD20 阳性肿瘤。

在某些实施方式中，所述肿瘤包括 CLDN18.2 阳性肿瘤。

在某些实施方式中，所述肿瘤包括 GPC-3 阳性肿瘤。

在某些实施方式中，所述肿瘤包括淋巴瘤。

在某些实施方式中，所述肿瘤包括胰腺癌。

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

附图说明

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

图 1 显示的是本申请所述嵌合抗原受体的构建示意图。

图 2A-2B 显示的是本申请所述 CAR 的表达量情况。

图 3 显示的是本申请所述免疫效应细胞的 CAR 的表达情况。

图 4 显示的是抗 CD20 Bcl-2 CAR-T 细胞的扩增能力。

图 5 显示的是抗 CLDN18.2 Bcl-2 CAR-T 细胞的扩增能力。

图 6 显示的是抗 GPC-3 Bcl-2 CAR-T 细胞的扩增能力。

图 7 显示的是本申请所述免疫效应细胞的体外肿瘤杀伤能力。

图 8A-8B 显示的是本申请所述免疫效应细胞的体内肿瘤杀伤能力。

图 9 显示的是抗 CLDN18.2 Bcl-2 CAR-T 细胞对肿瘤体积的影响。

图 10 显示的是抗 GPC-3 Bcl-2 CAR-T 细胞的体内肿瘤杀伤能力。

具体实施方式

以下由特定的具体实施例说明本申请发明的实施方式，熟悉此技术的人士可由本说明书所公开的内容容易地了解本申请发明的其他优点及效果。

术语定义

在本申请中，术语“免疫效应细胞”通常是指参与免疫应答，行使效应功能的免疫细胞。例如所述行使效应功能可以包括清除异物抗原或促进免疫效应子应答等。免疫效应细胞可以包括浆细胞、T 细胞、B 细胞、自然杀伤（NK）细胞、自然杀伤 T（NKT）细胞、肥大细胞和骨髓源性吞噬细胞。本申请所述免疫效应细胞可以包括经工程化修饰的免疫效应细胞。例如，本申请所述免疫效应细胞可以包含嵌合抗原受体，同时可以表达 Bcl-2 蛋白或其功能活性片段。例如，所述 Bcl-2 蛋白为外源性 Bcl-2 蛋白或其功能活性片段。

在本申请中，术语“嵌合抗原受体”或“CAR”也称“嵌合受体”、“T 体”、嵌合免疫受体，通常是指包含至少一个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（也称“胞内信号传导结构域”）的重组多肽构建体。例如，所述嵌合抗原受体可以包括靶向部分（例如，结合肿瘤相关抗原的部分）、铰链区、跨膜结构域、共刺激域和胞内信号传导域。

术语“Bcl-2”与“Bcl-2 蛋白”可以互换使用，通常指 bcl-2 原癌基因的编码产物。在某些实施方式中，Bcl-2 蛋白的氨基酸序列可以如 SEQ ID NO: 52 所示。在本申请中，该术语涵盖全长 Bcl-2 蛋白及其同源物、类似物、截短体、突变体及功能活性片段。在本申请中，该术语涵盖外源 Bcl-2 蛋白或其功能活性片段。

在本申请中，术语“抗原结合结构域”通常指能够结合靶抗原的结构域。抗原结合结构域可以包含能（特异性）结合抗原的嵌合抗原受体及其片段、抗体或其抗原结合片段。所述抗原结合结构域可以为天然来源、合成来源、半合成来源或重组来源。在某些实施方式中，

所述抗原结合结构域可以包含抗体或其抗原结合片段。例如，所述抗原结合结构域可以包含单链抗体。

在本申请中，术语“特异性结合”或“特异性的”通常指可测量的和可再现的相互作用，例如靶标和抗体之间的结合，可在分子（包括生物分子）的异质群体存在的情况可决定靶标的存在。例如，特异性结合靶标（其可以为表位）的抗体可以是以比它结合其它靶标更大的亲和性、亲合力、更容易、和/或以更长的持续时间结合该靶标的抗体。在某些实施方案中，抗体特异性结合蛋白质上的表位，所述表位在不同种属的蛋白质中是保守的。在某些实施方案中，特异性结合可以包括但不要求排他性地结合。

在本申请中，术语“抗体”通常指能够特异性识别和/或中和特定抗原的多肽分子。例如，抗体可包含通过二硫键相互连接的至少两条重（H）链和两条轻（L）链组成的免疫球蛋白，并且包括任何包含其抗原结合部分的分子。术语“抗体”包括单克隆抗体、抗体片段或抗体衍生物，包括但不限于人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、单域抗体（例如，dAb），单链抗体（例如，scFv），以及与抗原结合的抗体片段（例如，Fab、Fab' 和(Fab)₂ 片段）。术语“抗体”还包括抗体的所有重组体形式，例如在原核细胞中表达的抗体、未糖基化的抗体以及本申请所述的任何与抗原结合的抗体片段及其衍生物。每条重链可由重链可变区（VH）和重链恒定区构成。每条轻链可由轻链可变区（VL）和轻链恒定区构成。VH 和 VL 区可进一步被区分为称为互补决定区（CDR）的高变区，它们散布在称为构架区（FR）的更保守的区域中。每个 VH 和 VL 可由三个 CDR 和四个 FR 区构成，它们从氨基端至羧基端可按以下顺序排列：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3 和 FR4。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。

在本申请中，术语“CDR”也称“互补决定区”，通常指抗体可变结构域中的区域，其序列是高度可变的和/或形成结构定义环。通常，抗体包括六个 CDR；在 VH 中三个(HCDR1、HCDR2、HCDR3)，和在 VL 中三个(LCDR1、LCDR2、LCDR3)。在某些实施方案中，仅由重链组成的天然存在的骆驼抗体在缺乏轻链的情况下，其功能也能够正常且稳定。参见，例如，Hamers-Casterman et al., *Nature* 363:446-448 (1993); Sheriff et al, *Nature Struct. Biol.* 3:733-736 (1996)。抗体 CDR 可以通过多种编码系统来确定，如 CCG、Kabat、Chothia、IMGT、综合考虑 Kabat/Chothia 等。这些编码系统为本领域内已知，具体可参见，例如，<http://www.bioinf.org.uk/abs/index.html#kabatnum>。例如，所述抗体的氨基酸序列编号可以按照 IMGT 编号方案（IMGT, the international ImMunoGeneTics information system@imgt.cines.fr; <http://imgt.cines.fr>; Lefranc 等, 1999, *Nucleic Acids Res.* 27: 209-212; Ruiz 等, 2000 *Nucleic Acids*

Res. 28: 219-221; Lefranc 等, 2001, Nucleic Acids Res. 29:207-209; Lefranc 等, 2003, Nucleic Acids Res. 31: 307-310; Lefranc 等, 2005, DevComp Immunol 29: 185-203)。例如, 所述抗体的 CDR 可以根据 Kabat 编号系统确定(参见例如 Kabat EA & Wu TT(1971)Ann NY AcadSci 190:382-391 和 Kabat EA et al.,(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest,Fifth Edition,U.S.Department of Health and Human Services,NIH Publication No.91-3242)。

在本申请中, 术语“FR”通常指抗体可变结构域的更高度保守的部分, 其被称为框架区。通常, 天然重链和轻链的可变结构域各自包含四个 FR 区, 即在 VH 中四个(H-FR1, H-FR2, H-FR3 和 H-FR4), 和在 VL 中四个(L-FR1, L-FR2, L-FR3 和 L-FR4)。

在本申请中, 术语“可变结构域”与“可变区”可以互换使用, 通常指抗体重链和/或轻链的一部分。重链和轻链的可变结构域可以分别称为“V_H”和“V_L”(或者分别称为“VH”和“VL”)。这些结构域通常是抗体的变化最大的部分(相对于相同类型的其它抗体), 且包含抗原结合位点。

在本申请中, 术语“单链抗体(scFv)”通常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, 所述轻链可变区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)。所述 scFv 能够以单链多肽形式表达, 也可以保留其所来源的完整抗体的特异性。在本申请中, 所述 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, 所述 scFv 也可以包括 VL-接头-VH 或可以包括 VH-接头-VL。

在本申请中, 术语“跨膜结构域”通常指能够跨越细胞质膜的结构域。所述跨膜结构域一般可以包含三个结构区: N 末端胞外区、中间的跨膜伸展区以及 C 末端胞质区。跨膜结构域可能还包含胞内区或胞质区。

在本申请中, 术语“共刺激结构域”通常是指可以提供免疫共刺激分子的胞内结构域。其中所述共刺激分子可以为淋巴细胞对抗原的有效应答所需要的细胞表面分子。在某些实施方式中, 所述共刺激域可以是共刺激分子的胞内部分或其截短形式。

在本申请中, 术语“胞内信号传导域”通常指位于细胞内部能够传导信号的结构域。在本申请中, 所述胞内信号传导结构域可以将信号传导至细胞内。该术语涵盖能够诱导效应子功能信号的胞内信号传导域及其任何截短部分。

在本申请中, 术语“4-1BB”也称“CD137”, 通常指一种肿瘤坏死因子(TNF)受体家族的成员, 由肿瘤坏死因子受体超家族成员 9(TNFRSF9)基因编码。人 4-1BB 的氨基酸序列可见于 GenBank 登录号 No. AAA62478.2 下。本申请所述 4-1BB 涵盖其同源物、类似物或突

变体。

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

在本申请中，术语“质粒”通常是指细菌、酵母菌等生物中染色体或拟核以外的 DNA 分子，存在于细胞质中，具有自主复制能力，使其能够在子代细胞中保持恒定的拷贝数，并表达所携带的遗传信息。质粒在遗传工程研究中被用作基因的载体。

在本申请中，术语“逆转录病毒载体”通常是指可以可控并表达外源基因，但不能自我包装成有增殖能力的病毒颗粒。此类病毒多具有反转录酶。反转录病毒至少含有三种基因：**gag**，包含组成病毒中心和结构的蛋白质的基因；**pol**，包含反转录酶的基因和 **env**，包含组成病毒外壳的基因。通过逆转录病毒转染，逆转录病毒载体可将自身基因组及其携带的外源基因随机、稳定地整合入宿主细胞基因组中，例如，可将 **CAR** 分子整合进宿主细胞中。

在本申请中，术语“慢病毒载体”通常是指属于逆转录病毒的一种二倍体 RNA 病毒载体。慢病毒载体是以慢病毒的基因组为基础，将其中多个和病毒活性相关的序列结构去除，使其具有生物学的安全性，然后再在这个基因组骨架中引入实验所需要的目标基因的序列和表达结构，并将之制备成载体。通过慢病毒载体转染，逆转录病毒载体可将自身基因组及其携带的外源基因随机、稳定地整合入宿主细胞基因组中，例如，可将 **CAR** 分子整合进宿主细胞中。

术语“肿瘤”通常指任何新的病理性的组织增生。肿瘤细胞可以局部地或通过血流和淋巴系统扩散到身体其他部分。在本申请中，所述肿瘤可以包括良性肿瘤和恶性肿瘤。在本申请中，所述肿瘤可以包括实体瘤和/或血液瘤。在本申请中，所述肿瘤可以包括癌症。在本申请中，所述肿瘤的实例包括但不限于：脑胶质瘤、乳腺癌、黑色素瘤、非小细胞肺癌、膀胱癌、卵巢癌和结直肠癌。

在本申请中，涉及的蛋白质、多肽和/或氨基酸序列，还应理解为至少包含以下的范围：与该所述蛋白质或多肽具备相同或类似功能的变体或同源物。

在本申请中，所述变体可以为，例如在所述蛋白质和/或所述多肽（例如，特异性结合 **CD73** 蛋白的抗体或其片段）的氨基酸序列中经过取代、缺失或添加一个或多个氨基酸的蛋白质或多肽。例如，所述功能性变体可包含已经通过至少 1 个，例如 1-30 个、1-20 个或 1-

10 个，又例如 1 个、2 个、3 个、4 个或 5 个氨基酸取代、缺失和/或插入而具有氨基酸改变的蛋白质或多肽。所述功能性变体可基本上保持改变（例如取代、缺失或添加）之前的所述蛋白质或所述多肽的生物学特性。例如，所述功能性变体可保持改变之前的所述蛋白质或所述多肽的至少 60%，70%，80%，90%，或 100% 的生物学活性（例如抗原结合能力）。例如，所述取代可以为保守取代。

在本申请中，所述同源物可以为与所述蛋白质和/或所述多肽（例如，特异性结合 CD73 蛋白的抗体或其片段）的氨基酸序列具有至少约 85%（例如，具有至少约 85%、约 90%、约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%、约 99% 或更高的）序列同源性的蛋白质或多肽。

在本申请中，所述同源性通常是指两个或多个序列之间的相似性、类似或关联。可以通过以下方式计算“序列同源性百分比”：将两条待比对的序列在比较窗中进行比较，确定两条序列中存在相同核酸碱基（例如，A、T、C、G、I）或相同氨基酸残基（例如，Ala、Pro、Ser、Thr、Gly、Val、Leu、Ile、Phe、Tyr、Trp、Lys、Arg、His、Asp、Glu、Asn、Gln、Cys 和 Met）的位置的数目以得到匹配位置的数目，将匹配位置的数目除以比较窗中的总位置数（即，窗大小），并且将结果乘以 100，以产生序列同源性百分比。为了确定序列同源性百分数而进行的比对，可以按本领域已知的多种方式实现，例如，使用可公开获得的计算机软件如 BLAST、BLAST-2、ALIGN 或 Megalign（DNASTAR）软件。本领域技术人员可以确定用于比对序列的适宜参数，包括为实现正在比较的全长序列范围内或目标序列区域内最大比对所需要的任何算法。所述同源性也可以通过以下的方法测定：FASTA 和 BLAST。对 FASTA 算法的描述可以参见 W. R. Pearson 和 D. J. Lipman 的“用于生物学序列比较的改进的工具”，美国国家科学院院刊（Proc. Natl. Acad. Sci.），85：2444-2448，1988；和 D. J. Lipman 和 W. R. Pearson 的“快速灵敏的蛋白质相似性搜索”，Science，227：1435-1441，1989。对 BLAST 算法的描述可参见 S. Altschul、W. Gish、W. Miller、E. W. Myers 和 D. Lipman 的“一种基本的局部对比（alignment）搜索工具”，分子生物学杂志，215：403-410，1990。

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

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

发明详述

免疫效应细胞

一方面，本申请提供一种免疫效应细胞，其可以包含和/或表达嵌合抗原受体（CAR），所述免疫效应细胞还可以包含和/或表达 Bcl-2 蛋白或其功能活性片段。所述 Bcl-2 蛋白或其功能活性片段可以是外源（例如，人工合成以下序列：铰链区，跨膜结构域，共刺激域，胞内信号传导域，剪切肽和 Bcl-2 或其功能活性片段，将各部分连接后加入 scFv，分子克隆，生产病毒载体，感染免疫效应细胞进行表达）引入所述免疫效应细胞中的。例如，所述免疫效应细胞（例如 T 细胞）可以是经工程化改造或经修饰的免疫效应细胞（例如 T 细胞），其中所述工程化改造可以包括向该免疫效应细胞（例如，源自受试者的其他天然来源的免疫效应细胞）中引入（例如，通过构建具有编码抗原结合蛋白、铰链区、跨膜结构域、共刺激域、胞内信号传导域、剪切肽、Bcl-2 的核酸序列，通过病毒载体感染免疫效应细胞表达）所述 CAR 和/或所述 Bcl-2 蛋白，和/或表达所述 CAR 和/或所述 Bcl-2 蛋白的核酸分子。在某些实施方式中，所述 CAR 包含抗原结合结构域、跨膜结构域、共刺激域、胞内信号传导域和/或铰链区。在某些实施方式中，所述免疫效应细胞过表达 Bcl-2 蛋白或其功能活性片段。

在某些实施方式中，所述 CAR 包含抗原结合结构域，且该抗原结合结构域包含靶向 CD20 的抗体或其抗原结合片段。

在某些实施方式中，所述靶向 CD20 的抗体或其抗原结合片段包含 HCDR3，且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列；在某些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段包含 HCDR2，且所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列；在某些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段包含 HCDR1，且所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列。在某些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段包含 LCDR3，且所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列；在某些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段包含 LCDR2，且所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列；在某些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段包含 LCDR1，且所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段包含 HCDR3，HCDR2 和 HCDR1，所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列，且所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段包含 LCDR3，LCDR2 和 LCDR1，所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列，所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列，且所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中,所述抗体或其抗原结合片段包含 HCDR3, HCDR2, HCDR1, LCDR3, LCDR2 和 LCDR1, 所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列, 所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列, 所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列, 所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列, 所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列, 且所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 所述抗体或其抗原结合片段包含 VH, 所述 VH 可包含 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列。在某些实施方式中, 所述抗体或其抗原结合片段包含 VL, 所述 VL 可包含 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 所述抗体或其抗原结合片段包含 VH 和 VL, 所述 VH 包含如 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列且所述 VL 包含如 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 所述抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 所述 CAR 包含抗原结合结构域, 且该抗原结合结构域包含靶向 CLDN18.2 的抗体或其抗原结合片段。

在某些实施方式中, 所述靶向 CLDN18.2 的抗体或其抗原结合片段包含 HCDR3, 且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列; 在某些实施方式中, 所述抗体或其抗原结合片段包含 HCDR2, 且所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列; 在某些实施方式中, 所述抗体或其抗原结合片段包含 HCDR1, 且所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 13 所示的氨基酸序列。在某些实施方式中, 所述抗体或其抗原结合片段包含 LCDR3, 且所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列; 在某些实施方式中, 所述抗体或其抗原结合片段包含 LCDR2, 且所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 15 所示的氨基酸序列; 在某些实施方式中, 所述抗体或其抗原结合片段包含 LCDR1, 且所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 所述抗体或其抗原结合片段包含 HCDR3, HCDR2 和 HCDR1, 所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列, 所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列, 且所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 13 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 所述抗体或其抗原结合片段包含 LCDR3, LCDR2 和 LCDR1, 所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列, 所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 15 所示的氨基酸序列, 且所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 所述抗体或其抗原结合片段包含 HCDR3, HCDR2, HCDR1, LCDR3, LCDR2 和 LCDR1, 所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列, 所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列, 所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 13 所示的氨基酸序列, 所

述 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列, 所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 15 所示的氨基酸序列, 且所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 所述抗体或其抗原结合片段包含 VH, 所述 VH 可包含 SEQ ID NO: 17 所示的氨基酸序列。在某些实施方式中, 所述抗体或其抗原结合片段包含 VL, 所述 VL 包含 SEQ ID NO: 18 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 所述抗体或其抗原结合片段包含 VH 和 VL, 所述 VH 包含如 SEQ ID NO: 17 所示的氨基酸序列且所述 VL 包含如 SEQ ID NO: 18 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 所述抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 19 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 所述 CAR 包含抗原结合结构域, 且该抗原结合结构域包含靶向 GPC-3 的抗体或其抗原结合片段。

在某些实施方式中, 所述靶向 GPC-3 的抗体或其抗原结合片段包含 HCDR3, 且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 20 所示的氨基酸序列; 在某些实施方式中, 所述抗体或其抗原结合片段包含 HCDR2, 且所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 21 所示的氨基酸序列; 在某些实施方式中, 所述抗体或其抗原结合片段包含 HCDR1, 且所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 22 所示的氨基酸序列。在某些实施方式中, 所述抗体或其抗原结合片段包含 LCDR3, 且所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 23 所示的氨基酸序列; 在某些实施方式中, 所述抗体或其抗原结合片段包含 LCDR2, 且所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 24 所示的氨基酸序列; 在某些实施方式中, 所述抗体或其抗原结合片段包含 LCDR1, 且所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 25 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 所述抗体或其抗原结合片段包含 HCDR3, HCDR2 和 HCDR1, 所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 20 所示的氨基酸序列, 所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 21 所示的氨基酸序列, 且所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 22 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 所述抗体或其抗原结合片段包含 LCDR3, LCDR2 和 LCDR1, 所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 23 所示的氨基酸序列, 所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 24 所示的氨基酸序列, 且所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 25 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 所述抗体或其抗原结合片段包含 HCDR3, HCDR2, HCDR1, LCDR3, LCDR2 和 LCDR1, 所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 20 所示的氨基酸序列, 所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 21 所示的氨基酸序列, 所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 22 所示的氨基酸序列, 所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 23 所示的氨基酸序列, 所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 24 所示的氨基酸序列, 且所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 25 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 所述抗体或其抗原结合片段包含 VH, 所述 VH 包含 SEQ ID NO: 26

所示的氨基酸序列。在某些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段包含 VL，所述 VL 包含 SEQ ID NO: 27 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段包含 VH 和 VL，所述 VH 包含如 SEQ ID NO: 26 所示的氨基酸序列且所述 VL 包含如 SEQ ID NO: 27 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 28 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述靶向 GPC-3 的抗体或其抗原结合片段包含 HCDR3，且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 29 所示的氨基酸序列；在某些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段包含 HCDR2，且所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 30 所示的氨基酸序列；在某些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段包含 HCDR1，且所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 31 所示的氨基酸序列。在某些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段包含 LCDR3，且所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 32 所示的氨基酸序列；在某些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段包含 LCDR2，且所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 33 所示的氨基酸序列；在某些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段包含 LCDR1，且所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 34 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段包含 HCDR3，HCDR2 和 HCDR1，所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 29 所示的氨基酸序列，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 30 所示的氨基酸序列，且所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 31 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段包含 LCDR3，LCDR2 和 LCDR1，所述 LCDR3 可以包含 SEQ ID NO: 32 所示的氨基酸序列，所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 33 所示的氨基酸序列，且所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 34 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段包含 HCDR3，HCDR2，HCDR1，LCDR3，LCDR2 和 LCDR1，所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 29 所示的氨基酸序列，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 30 所示的氨基酸序列，所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 31 所示的氨基酸序列，所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 32 所示的氨基酸序列，所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 33 所示的氨基酸序列，且所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 34 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段包含 VH，所述 VH 包含 SEQ ID NO: 35 所示的氨基酸序列。在某些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段包含 VL，所述 VL 包含 SEQ ID NO: 36 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段包含 VH 和 VL，所述 VH 包含如 SEQ ID NO: 35 所示的氨基酸序列且所述 VL 包含如 SEQ ID NO: 36 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 37 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述靶向 GPC-3 的抗体或其抗原结合片段可以包含 HCDR3，且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 38 所示的氨基酸序列；在某些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段包含 HCDR2，且所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 39 所示的氨基酸序列；在某些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段包含 HCDR1，且所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 40 所示的氨基酸序列。在某些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段包含 LCDR3，且所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 41 所示的氨基酸序列；在某些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段包含 LCDR2，且所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 42 所示的氨基酸序列；在某些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段包含 LCDR1，且所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 43 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段包含 HCDR3，HCDR2 和 HCDR1，所述 HCDR3 可以包含 SEQ ID NO: 38 所示的氨基酸序列，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 39 所示的氨基酸序列，且所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 40 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段包含 LCDR3，LCDR2 和 LCDR1，所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 41 所示的氨基酸序列，所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 42 所示的氨基酸序列，且所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 43 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段包含 HCDR3，HCDR2，HCDR1，LCDR3，LCDR2 和 LCDR1，所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 38 所示的氨基酸序列，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 39 所示的氨基酸序列，所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 40 所示的氨基酸序列，所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 41 所示的氨基酸序列，所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 42 所示的氨基酸序列，且所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 43 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段包含 VH，所述 VH 包含 SEQ ID NO: 44 所示的氨基酸序列。在某些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段包含 VL，所述 VL 包含 SEQ ID NO: 45 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段包含 VH 和 VL，所述 VH 包含如 SEQ ID NO: 44 所示的氨基酸序列且所述 VL 包含如 SEQ ID NO: 45 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 46 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述 CAR 的抗原结合结构域可以包括特异性结合 CD20、CLDN18.2 或 GPC-3 的抗体或其抗原结合片段。例如，本申请所述的抗体或其抗原结合片段可以包括但不限于重组抗体、单克隆抗体、人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、双特异性抗体、单链抗体、双抗体、三抗体、四抗体、Fv 片段，scFv 片段、Fab 片段、Fab' 片段、F(ab')₂ 片段。

在本申请中,所述抗原结合片段可以包括 Fab、Fab'、F(ab')₂、F(ab)₂、Fv 片段、scFv、di-scFv 和/或 dAb。

在本申请中,所述抗原结合结构域可以是单链抗体。例如,所述 CD20 结合结构域为 scFv。scFv 可包含 SEQ ID NO: 10 所示的序列。例如,CD20 结合结构域可包含抗体的 VH, VL 和连接肽。例如,所述连接肽包含 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列。

例如,所述 CLDN18.2 结合结构域为 scFv。scFv 可包含 SEQ ID NO: 19 所示的序列。例如,CLDN18.2 结合结构域可包含抗体的 VH, VL 和连接肽。例如,所述连接肽包含 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列。

例如,所述 GPC-3 结合结构域为 scFv。scFv 可包含 SEQ ID NO: 28 所示的序列。例如,GPC-3 结合结构域可包含抗体的 VH, VL 和连接肽。例如,所述连接肽包含 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列。

例如,所述 GPC-3 结合结构域为 scFv。scFv 可包含 SEQ ID NO: 37 所示的序列。例如,GPC-3 结合结构域可包含抗体的 VH, VL 和连接肽。例如,所述连接肽包含 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列。

例如,所述 GPC-3 结合结构域为 scFv。scFv 可包含 SEQ ID NO: 46 所示的序列。例如,GPC-3 结合结构域可包含抗体的 VH, VL 和连接肽。例如,所述连接肽包含 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列。

在本申请中,所述 CAR 可以包含跨膜结构域,该跨膜结构域可以包含选自下述蛋白的跨膜结构域: CD28、CD3e、CD45、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137 和 CD154。在某些实施方式中,所述跨膜结构域包含 SEQ ID NO: 47 所示的氨基酸序列。

在本申请中,所述 CAR 可以包含共刺激域,该共刺激域可以包含选自下述蛋白的共刺激域: CD28、4-1BB、CD40L、TIM1、CD226、DR3、SLAM、ICOS、OX40、NKG2D、2B4、CD244、FcεRIγ、BTLA、CD27、CD30、GITR、HVEM、DAP10、CD2、NKG2C、LIGHT 和 DAP12 中的共刺激信号传导区。在某些实施方式中,所述共刺激域包含 4-1BB 的共刺激域。在某些实施方式中,所述共刺激域包含 SEQ ID NO: 48 所示的氨基酸序列。

在本申请中,所述 CAR 可以包含胞内信号传导域,该胞内信号传导域可以包含源自 CD3 ζ 的信号传导域。例如,所述胞内信号传导域可以包含 SEQ ID NO: 49 所示的氨基酸序列。

在本申请中,所述 CAR 可以从 N 端到 C 端依次包含抗原结合结构域、跨膜结构域、共刺激域以及胞内信号传导域。例如,所述抗原结合结构域可以包含 SEQ ID NO: 10、SEQ ID

NO: 19、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 37 或 SEQ ID NO: 46 所示的氨基酸序列、所述跨膜结构域可以包含 SEQ ID NO: 47 所示的氨基酸序列、所述共刺激域可以包含 SEQ ID NO: 48 所示的氨基酸序列、所述胞内信号传导域可以包含 SEQ ID NO: 49 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述 CAR 还可以包含铰链区，所述铰链区连接所述抗原结合结构域和所述跨膜结构域。例如，所述铰链区来源于 IgG 家族。例如，所述铰链区来源于 IgG1。例如，所述铰链区来源于 IgG4。例如，所述铰链区来源于 IgD。例如，所述铰链区来源于 CD8。例如，所述铰链区可以包含 SEQ ID NO: 50 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述 CAR 还可以连接信号肽，例如，所述信号肽可以来源于 CD8。例如，所述信号肽可以为 CD8 α 。所述信号肽连接于所述抗原结合结构域的 N 端。

在本申请中，所述免疫效应细胞还可包含和/或表达 Bcl-2 蛋白或其功能活性片段。在某些实施方式中，所述 Bcl-2 蛋白或其功能活性片段包含 SEQ ID NO: 52 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述 Bcl-2 蛋白是外源引进的，例如，在编码所述嵌合抗原受体的核苷酸序列中加入剪切肽和编码 Bcl-2 蛋白或其功能活性片段的序列，使得 Bcl-2 蛋白或其功能活性片段在免疫效应细胞中表达。

在某些实施方式中，所述经改造的免疫效应细胞，其中对免疫效应细胞的改造包括使免疫效应细胞包含和/或表达嵌合抗原受体，以及，向免疫效应细胞中引入外源 Bcl-2 蛋白或其功能活性片段。

在本申请中，所述 Bcl-2 的功能活性片段包含能够使 Bcl-2 蛋白发挥抗凋亡功能的片段，例如，所述 Bcl-2 蛋白的功能活性片段包含其 BH4 结构域。

在某些实施方式中，所述 BBZ 包含铰链区、跨膜结构域、共刺激域、胞内信号传导域。

在某些实施方式中，所述 20BBZ 包含靶向 CD20 的 CAR 的序列。所述 20BBZ 包含 SEQ ID NO: 54 所示的氨基酸序列。所述 20BBZ-Bcl-2 包含能够表达靶向 CD20 的 CAR 和 Bcl-2 蛋白或其功能活性片段的序列。所述 20BBZ-Bcl-2 包含 SEQ ID NO: 53 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述 Ab10BBZ 包含靶向 CLDN18.2 的 CAR 的序列。所述 Ab10BBZ 包含 SEQ ID NO: 56 所示的氨基酸序列。所述 Ab10BBZ-Bcl-2 包含能够表达靶向 CLDN18.2 的 CAR 和 Bcl-2 蛋白或其功能活性片段的序列。所述 Ab10BBZ-Bcl-2 包含 SEQ ID NO: 55 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述 GC33BBZ 包含靶向 GPC-3 的 CAR 的序列。所述 GC33BBZ 包含 SEQ ID NO: 58 所示的氨基酸序列。所述 GC33BBZ-Bcl-2 包含能够表达靶向 GPC-3 的 CAR 和 Bcl-2 蛋白或其功能活性片段的序列。所述 GC33BBZ-Bcl-2 包含 SEQ ID NO: 57 所示的氨

基酸序列。

在某些实施方式中，所述 GC179BBZ 包含靶向 GPC-3 的 CAR 的序列。所述 GC179BBZ 包含 SEQ ID NO: 60 所示的氨基酸序列。所述 GC179BBZ-Bcl-2 包含能够表达靶向 GPC-3 的 CAR 和 Bcl-2 蛋白或其功能活性片段的序列。所述 GC179BBZ-Bcl-2 包含 SEQ ID NO: 59 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述 M3C11BBZ 包含靶向 GPC-3 的 CAR 的序列。所述 M3C11BBZ 包含 SEQ ID NO: 62 所示的氨基酸序列。所述 M3C11BBZ-Bcl-2 包含能够表达靶向 GPC-3 的 CAR 和 Bcl-2 蛋白或其功能活性片段的序列。所述 M3C11BBZ-Bcl-2 包含 SEQ ID NO: 61 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述 CAR 包含 SEQ ID NO: 53、SEQ ID NO: 55、SEQ ID NO: 57、SEQ ID NO: 59 和 SEQ ID NO: 61 中任一项所述的氨基酸序列。

核酸分子、载体、细胞、制备方法、组合物

另一方面，本申请还提供了分离的一种或多种核酸分子，其可以编码本申请所述的 CAR。本申请所述的分离的一种或多种核酸分子可以为任何长度的分离形式的核苷酸，脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸，或从其天然环境分离的或人工合成的类似物，但可以编码本申请所述的 CAR。

在本申请中，所述核酸分子编码所述嵌合抗原受体和所述 Bcl-2 蛋白或其功能活性片段。

在本申请中，所述核酸分子还包含编码剪切肽的核苷酸序列。例如，所述剪切肽可以是 2A 肽。例如，所述剪切肽可以选自 P2A，T2A，E2A 和 F2A 中的一种或多种。例如，所述剪切肽可以包含 SEQ ID NO: 51 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述核酸分子从 5' 端到 3' 端依次包含：编码抗原结合结构域的序列、编码跨膜结构域的序列、编码共刺激域的序列、编码胞内信号传导域的序列、编码 2A 肽的序列和编码 Bcl-2 蛋白或其功能活性片段的序列。

例如，所述核酸分子从 5' 端到 3' 端可依次包含编码靶向 CD20 的 scFv、4-1BB、CD3 ζ 、2A、Bcl-2 的核苷酸序列。所述各个部分的核酸序列可以直接或间接连接。所述间接连接可以通过接头连接。

例如，所述核酸分子从 5' 端到 3' 端可依次包含编码靶向 CLDN18.2 的 scFv、4-1BB、CD3 ζ 、2A、Bcl-2 的核苷酸序列。所述各个部分的核酸序列可以直接或间接连接。所述间接连接可以通过接头连接。

例如，所述核酸分子从 5' 端到 3' 端可依次包含编码靶向 GPC-3 的 scFv、4-1BB、CD3 ζ 、

2A、Bcl-2 的核苷酸序列。所述各个部分的核苷酸序列可以直接或间接连接。所述间接连接可以通过接头连接。例如，所述编码所述靶向 GPC-3 的 scFv 的核苷酸序列可以为实施例中提供的编码 GC33 scFv、GC179 scFv 或 M3C11scFv 的核苷酸序列。

另一方面，本申请还提供了载体，其可以包含本申请所述的核酸分子。所述载体可通过转化、转导或转染宿主细胞，使其携带的遗传物质元件在宿主细胞内得以表达。例如，载体可以包括：质粒；噬菌粒；柯斯质粒；人工染色体如酵母人工染色体（YAC）、细菌人工染色体（BAC）或 P1 来源的人工染色体（PAC）；噬菌体如 λ 噬菌体或 M13 噬菌体及动物病毒等。用作载体的动物病毒种类有逆转录酶病毒（包括慢病毒）、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒（如单纯疱疹病毒）、痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒、乳头多瘤空泡病毒（如 SV40）。又例如，所述载体可以含有多种控制表达的元件，包括启动子序列、转录起始序列、增强子序列、选择元件及报告基因。另外，所述载体还可以含有复制起始位点。此外，所述载体还可以包括有协助其进入细胞的成分，如病毒颗粒、脂质体或蛋白外壳，但不仅仅只有这些物质。例如，本申请所述载体可以选自质粒、逆转录病毒载体和慢病毒载体中的一种或多种。例如，本申请所述载体可以为慢病毒载体。

另一方面，本申请还提供了免疫效应细胞，其可以包含本申请所述的核酸分子或本申请所述的载体。所述细胞可以包括单个细胞的后代。由于天然、偶然或有意的突变，后代可以不一定与原始母细胞完全相同（在总 DNA 互补体的形态上或在基因组上）。例如，所述细胞还可以为哺乳动物细胞。在某些实施方式中，所述免疫效应细胞还包括 T 淋巴细胞，例如 α/β T 淋巴细胞和 γ/δ T 淋巴细胞。例如所述免疫效应细胞可以为 PBMC 来源。例如，所述 T 淋巴细胞可以为 CD4⁺T 细胞或 CD8⁺T 细胞。在某些实施方式中，所述免疫效应细胞包括自然杀伤细胞、自然杀伤 T 细胞、肥大细胞和骨髓源性吞噬细胞。

另一方面，本申请还提供了制备本申请所述的免疫效应细胞的方法，所述方法可以包括向免疫效应细胞中引入本申请所述的分离的核酸分子或本申请所述的载体。

另一方面，本申请还提供了组合物，其可以包含本申请所述的免疫效应细胞。在某些实施方式中，所述组合物还包括任选地药学上可接受的载剂。

在某些实施方式中，所述组合物的可接受成分在所用剂量和浓度下对接受者无毒。本发明的药物组合物包括但不限于液体、冷冻和冻干组合物。

在某些实施方式中，所述药学上可接受的佐剂包括与所述免疫效应细胞相容的任何和所有的溶剂、分散介质、等渗剂和吸收延迟剂，通常安全、无毒，且既不是生物学上也非其它方面不合需要的。

在某些实施方式中，所述组合物包含肠胃外、经皮、腔内、动脉内、鞘内和/或鼻内施用或直接注射到组织中。例如，所述组合物可以通过输注或注射施用于患者或者受试者。在某些实施方式中，所述药物组合物的施用通过不同的方式进行，例如静脉内、腹膜内、皮下、肌肉内、局部或真皮内施用。在某些实施方式中，所述组合物不间断施用。所述不间断（或连续）施用可以通过患者佩戴的小泵系统来实现，以测量流入患者体内的治疗剂，如 WO2015/036583 所述。

用途和应用

另一方面，本申请还提供了所述免疫效应细胞、所述核酸分子、所述载体、所述组合物在制备药物中的用途，所述药物可以用于预防和/或治疗疾病和/或病症。

另一方面，本申请还提供了预防和/或治疗疾病和/或病症的方法，所述方法可以包括向有需要的受试者施用本申请所述的免疫效应细胞或组合物。

在本申请中，所述受试者可以包括人类和非人类动物。例如，所述受试者可以包括但不限于猫、狗、马、猪、奶牛、羊、兔、小鼠、大鼠或猴。

另一方面，本申请所述的免疫效应细胞、本申请所述的核酸分子、本申请所述载体和/或本申请所述的组合物，其可以用于预防、缓解或治疗肿瘤。

在某些实施方式中，所述疾病和/或病症与 CD20 表达相关。

在某些实施方式中，所述疾病和/或病症与 CLDN18.2 表达相关。

在某些实施方式中，所述疾病和/或病症与 GPC-3 表达相关。

在某些实施方式中，所述疾病和/或病症包括肿瘤。

在某些实施方式中，所述肿瘤包括实体瘤和/或血液瘤。

在某些实施方式中，所述肿瘤包括 CD20 阳性肿瘤。

在某些实施方式中，所述肿瘤包括 CLDN18.2 阳性肿瘤。

在某些实施方式中，所述肿瘤包括 GPC-3 阳性肿瘤。

在某些实施方式中，所述肿瘤包括淋巴瘤。

在某些实施方式中，所述肿瘤包括胰腺癌。

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

实施例

实施例 1 抗 CD20 CAR-T 细胞、抗 CLDN18.2 CAR-T 细胞和抗 GPC-3 CAR-T 细胞的制备

制备靶向 CD20 的 CAR (20BBZ)，靶向 CLDN18.2 的 CAR (Ab10BBZ) 和靶向 GPC-3 的 CAR (GC33BBZ, GC179BBZ 和 M3C11BBZ)，所述 CAR 的结构如图 1 所示。人工合成以下序列：scFv 20，scFv Ab10，scFv GC33，scFv GC179，scFv M3C11，铰链区，跨膜结构域，4-1BB 共刺激域，CD3 ζ 胞内信号传导结构域。其中，将铰链区，跨膜结构域，4-1BB 共刺激域和 CD3 ζ 胞内信号传导结构域首尾相连可获得 BBZ。将可特异性结合 CD20 的 scFv 20，特异性结合 CLDN18.2 的 scFv Ab10，特异性结合 GPC-3 的 scFv GC33、scFv GC179 和 scFv M3C11 和 BBZ 通过 overlap PCR，两端加入 XbaI 和 BamHI 酶切位点克隆 pCDH-MSCVEF 载体。进行 PCR 扩增，并用延伸 PCR 在 5'端依次带上 XbaI 酶切位点（含保护碱基）、scFv 20/scFv Ab10/scFv GC33/scFv scFv GC179/scFv M3C11、铰链区、跨膜结构域、4-1BB 共刺激域、CD3 ζ 胞内信号传导结构域、BamHI 酶切位点，PCR 扩增得到所述 CAR: 20BBZ, Ab10BBZ, GC33BBZ, GC179BBZ 和 M3C11BBZ。

制备含有抗 CD20 的 CAR 的病毒 (20BBZ 病毒)，含有抗 CLDN18.2 的 CAR 的病毒 (Ab10BBZ 病毒) 和含有抗 GPC-3 的 CAR 的病毒 (GC33BBZ 病毒, GC179BBZ 病毒和 M3C11BBZ 病毒)。将测序正确的克隆用 NucleoBond Xtra Midi Plus EF 试剂盒无内毒素大提，和慢病毒包装质粒 (VSV-g, pMD Gag/Pol 或 RSV-REV) 共同转染 293 细胞，37°C、5%CO₂ 培养 48 小时后收取上清，0.45 μ M 过滤后，使用贝克曼超速离心机和 SW28 转头，以 25000RPM 的速度离心 2 小时以浓缩病毒，即为含有 pCDH-MSCVEF-20BBZ 的病毒，含有 pCDH-MSCVEF-Ab10BBZ 的病毒，含有 pCDH-MSCVEF-GC33BBZ 的病毒，含有 pCDH-MSCVEF-GC179BBZ 的病毒和含有 pCDH-MSCVEF-M3C11BBZ 的病毒（简称 20BBZ 病毒，Ab10BBZ 病毒，GC33BBZ 病毒，GC179BBZ 病毒和 M3C11BBZ 病毒），用于后续 CAR-T 细胞生产。将所得病毒感染 293 细胞，使用 anti-mouse Fab 抗体 (Jackson ImmunoResearch #115-605-006) 用流式检测的方法测病毒滴度。图 2 中显示的是在添加 1 μ L、3 μ L、9 μ L 的所述病毒的时候的流式检测结果，以不添加病毒作为空白对照。结果显示，随着所加病毒剂量的增加，所述 CAR: 20BBZ, Ab10BBZ, GC33BBZ, GC179BBZ 和 M3C11BBZ 的 CAR 表达量也随之增加。

制备抗 CD20 的 CAR-T 细胞(20BBZ CAR-T 细胞)，抗 CLDN18.2CAR-T 细胞(Ab10BBZ CAR-T 细胞)和抗 GPC-3CAR-T 细胞 (GC33BBZ CAR-T 细胞，GC179BBZ CAR-T 细胞和

M3C11BBZ CAR-T 细胞)。将人 PBMC 经过 Stemcell T 细胞分离试剂盒(购自 stem cell Catlog#19671)纯化后,接种到 anti-hCD3(购自 Bioxcell # BE0001-2)和 anti-hCD28(购自 Bioxcell# BE0248)包被的 96 孔培养板,2 天后,按照 MOI(感染复数,即病毒量与细胞数的比值)=10-20 感染本实施例制备的 20BBZ 病毒,Ab10BBZ 病毒,GC33BBZ 病毒,GC179BBZ 病毒和 M3C11BBZ 病毒,1 天后换液继续细胞培养,培养基为含 10%FBS 的 RPMI 完全培养基,IL2(50IU/ml),IL21(4ng/ml),按照每 6 天使用人工抗原呈递细胞(X 射线 100Gray 辐照后的 Raji-CLDN18.2 细胞)或 anti-hCD3(0.1 μ g/ml)或 anti-hCD28(0.25 μ g/ml)刺激,经过 2 轮刺激后,所得细胞即为 20BBZ CAR-T 细胞,Ab10BBZ CAR-T 细胞,GC33BBZ CAR-T 细胞,GC179BBZ CAR-T 细胞和 M3C11BBZ CAR-T 细胞,使用 Alexa Fluor® 647 AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Mouse IgG, Fab fragment specific 抗体染色和流式分析,其结果如图 3 所示,结果显示,所得细胞均为 CAR 阳性。

实施例 2 抗 CD20 Bcl-2 CAR-T 细胞、抗 CLDN18.2 Bcl-2 CAR-T 细胞和抗 GPC-3 Bcl-2 CAR-T 细胞的制备

按照实施例 1 的方法制备表达 Bcl-2 的靶向 CD20 的 CAR(20BBZ-Bcl-2,结构如图 1 所示),CLDN18.2 的 CAR(Ab10BBZ-Bcl-2,结构如图 1 所示),GPC-3 的 CAR(GC33BBZ-Bcl-2、GC179BBZ-Bcl-2 和 M3C11BBZ-Bcl-2,结构如图 1 所示),和表达 Bcl-2 的抗 CD20 的 CAR-T 病毒(20BBZ-Bcl-2 病毒),CLDN18.2 的 CAR-T 病毒(Ab10BBZ-Bcl-2 病毒),GPC-3 的 CAR-T 病毒(GC33BBZ-Bcl-2 病毒、GC179BBZ-Bcl-2 病毒和 M3C11BBZ-Bcl-2 病毒)。

将 20BBZ, Ab10BBZ, GC33BBZ, GC179BBZ 和 M3C11BBZ 去除终止密码子,连接片段 2A、Bcl-2,通过 overlap PCR,分子克隆,及病毒生产获得 pCDH-MSCVEF-20BBZ-Bcl-2 病毒、pCDH-MSCVEF-Ab10BBZ-Bcl-2 病毒、pCDH-MSCVEF-GC33BBZ-Bcl-2 病毒、pCDH-MSCVEF-GC179BBZ-Bcl-2 病毒和 pCDH-MSCVEF-M3C11BBZ-Bcl-2 病毒(简称 20BBZ-Bcl-2 病毒、Ab10BBZ-Bcl-2 病毒、GC33BBZ-Bcl-2 病毒、GC179BBZ-Bcl-2 病毒和 M3C11BBZ-Bcl-2 病毒)。用实施例 1 中流式检测的方法测病毒滴度。图 2 显示的是在添加 1 μ L、3 μ L、9 μ L 的所述病毒的时候的流式检测结果,以不添加病毒作为空白对照。结果显示,随着所加病毒剂量的增加,所述 CAR: 20BBZ-Bcl-2、Ab10BBZ-Bcl-2、GC33BBZ-Bcl-2、GC179BBZ-Bcl-2 和 M3C11BBZ-Bcl-2 的 CAR 表达量也随之增加。

制备表达 Bcl-2 的抗 CD20 的 CAR-T 细胞(20BBZ-Bcl-2 CAR-T 细胞),抗 CLDN18.2 CAR-T 细胞(Ab10BBZ-Bcl-2 CAR-T 细胞)和抗 GPC-3 CAR-T 细胞(GC33BBZ-Bcl-2 CAR-T 细

胞, GC179BBZ-Bcl-2 CAR-T 细胞和 M3C11BBZ-Bcl-2 CAR-T 细胞)。将人 PBMC 来源的 T 细胞经过纯化, 活化, 使用 20BBZ-Bcl-2 病毒、Ab10BBZ-Bcl-2 病毒、GC33BBZ-Bcl-2 病毒、GC179BBZ-Bcl-2 病毒、M3C11BBZ-Bcl-2 病毒感染和扩增后, 分别获得 20BBZ-Bcl-2 CAR-T 细胞, Ab10BBZ-Bcl-2 CAR-T 细胞, GC33BBZ-Bcl-2 CAR-T 细胞, GC179BBZ-Bcl-2 CAR-T 细胞和 M3C11BBZ-Bcl-2 CAR-T 细胞, 通过流式染色, 用 Alexa Fluor® 647 AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Mouse IgG, Fab fragment specific 抗体染色, 其结果如图 3 所示。结果显示, 所得细胞均为 CAR 阳性。

实施例 3 抗 CD20 Bcl-2 CAR-T 细胞的扩增能力

将实施例 1 制备所得的 CD20BBZ CAR-T 细胞, 实施例 2 制备所得的 CD20BBZ-Bcl-2 CAR-T 细胞连续培养, 每隔 6 天用人工抗原呈递细胞刺激一次, 细胞计数, 其结果如图 4 所示。由图 4 可知, CD20BBZ-Bcl-2 CAR-T 细胞相比 CD20BBZ CAR-T 细胞有更强的扩增能力。

实施例 4 抗 CLDN18.2 Bcl-2 CAR-T 细胞的扩增能力

将实施例 1 制备所得的 Ab10BBZ CAR-T 细胞和实施例 2 制备所得的 Ab10BBZ-Bcl-2 CAR-T 细胞, 连续培养, 每隔 6 天用人工抗原呈递细胞刺激一次, 细胞计数, 其结果如图 5 所示。由图 5 可知, Ab10BBZ-Bcl-2 CAR-T 细胞相比 Ab10BBZ CAR-T 细胞有着更强的体外扩增能力。

实施例 5 抗 GPC-3 Bcl-2 CAR-T 细胞的扩增能力

将实施例 1 制备所得的 GC33BBZ CAR-T 细胞和实施例 2 制备所得的 GC33BBZ-Bcl-2 CAR-T 细胞, 连续培养, 每隔 6 天用人工抗原呈递细胞刺激一次, 细胞计数, 其结果如图 6 所示。由图 6 可知, GC33BBZ-Bcl-2 CAR-T 细胞相比 GC33BBZ CAR-T 细胞有着更强的体外扩增能力。

实施例 6 抗 CD20 Bcl-2 CAR-T 细胞的体外肿瘤杀伤能力

将实施例 1 制备所得的 20BBZ CAR-T 细胞, 实施例 2 制备所得的 20BBZ-Bcl-2 CAR-T 细胞, 接种到 96 孔板, 按照 CAR-T: 肿瘤细胞比例 1:1, 0.5:1 和 0.25:1 加入 CD20 阳性肿瘤细胞 (Raji), 24 小时后流式细胞仪检测 Raji 的存活。对体外肿瘤杀伤的效果检测如图 7 所示, 20BBZ-Bcl-2 CAR-T 细胞比 20BBZ CAR-T 细胞有着相似的体外肿瘤杀伤能力。

实施例 7 抗 CD20 Bcl-2 CAR-T 细胞的体内肿瘤杀伤能力

将 3×10^6 Raji 细胞静脉注射接种到 B-NDG 小鼠，6 天后给予 10^7 CD20BBZ CAR-T 细胞或 CD20BBZ-Bcl-2 CAR-T 细胞治疗，给予 PBS 作为空白对照，测量小鼠的骨髓中 T 细胞和 Raji 细胞的比例，其结果分别如图 8A 所示，在骨髓中 CD20BBZ-Bcl-2 CAR-T 细胞与 CD20BBZ CAR-T 细胞的比例具有显著性统计学差异 ($P < 0.01$)。与对照组 CD20BBZ CAR-T 细胞治疗相比，CD20BBZ-Bcl-2 CAR-T 细胞治疗使骨髓中 Raji 细胞比例显著减少，且具有显著性统计学差异 ($P < 0.001$)。

将 3×10^6 Raji 细胞静脉注射接种到 B-NDG 小鼠，6 天后给予 10^7 CD20BBZ CAR-T 细胞或 CD20BBZ-Bcl-2 CAR-T 细胞治疗，给予 PBS 作为空白对照，绘制小鼠的生存曲线，其结果如图 8B 所示，与对照组 CD20BBZ CAR-T 细胞治疗相比，CD20BBZ-Bcl-2 CAR-T 细胞治疗后的老鼠生存时间更长，最长可达 48 天，证明 CD20BBZ-Bcl-2 CAR-T 细胞在体外有着显著的抗肿瘤能力。

实施例 8 抗 CLDN18.2 Bcl-2 CAR-T 细胞的体内肿瘤杀伤能力

将 3×10^6 CFPAC-1 肿瘤细胞皮下接种到 B-NDG 小鼠，6 天后给予 10^7 Ab10BBZ CAR-T 细胞或 Ab10BBZ-Bcl-2 CAR-T 细胞治疗，测量小鼠的肿瘤负荷，其结果如图 9 所示，Ab10BBZ-Bcl-2 CAR-T 细胞相对 Ab10BBZ CAR-T 细胞能够更好的控制肿瘤负荷。结果显示，Ab10BBZ-Bcl-2 CAR-T 细胞治疗小鼠的肿瘤在第 16 天后开始缩小，而对照组 Ab10BBZ CAR-T 细胞治疗的肿瘤却不断快速生长，证明 Ab10BBZ-Bcl-2 CAR-T 细胞在体内有着明显的抗肿瘤能力。

实施例 9 抗 GPC-3 Bcl-2 CAR-T 细胞的体内肿瘤杀伤能力

将 3×10^6 Huh-7 肿瘤细胞皮下接种到 B-NDG 小鼠，7 天后给予 10^7 GC33BBZ CAR-T 细胞或 GC33BBZ-Bcl-2 CAR-T 细胞治疗，测量小鼠的肿瘤负荷，其结果如图 10 所示，GC33BBZ-Bcl-2 CAR-T 细胞相对 GC33BBZ CAR-T 细胞能够更好的控制肿瘤负荷，抑制肿瘤生长，证明 GC33BBZ-Bcl-2 CAR-T 细胞在体内有着明显的抗肿瘤能力。

1. 免疫效应细胞，其包含和/或表达嵌合抗原受体（CAR），以及 Bcl-2 蛋白或其功能活性片段。
 2. 根据权利要求 1 所述的免疫效应细胞，其中所述 CAR 包含抗原结合结构域，且所述抗原结合结构域包含特异性结合 CD20 的抗体或其抗原结合片段。
 3. 根据权利要求 2 所述的免疫效应细胞，其中所述抗体或其抗原结合片段包含 HCDR3，且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列。
 4. 根据权利要求 2-3 中任一项所述的免疫效应细胞，其中所述抗体或其抗原结合片段包含 HCDR2，且所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列。
 5. 根据权利要求 2-4 中任一项所述的免疫效应细胞，其中所述抗体或其抗原结合片段包含 HCDR1，且所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列。
 6. 根据权利要求 2-5 中任一项所述的免疫效应细胞，其中所述抗体或其抗原结合片段包含 LCDR3，且所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列。
 7. 根据权利要求 2-6 中任一项所述的免疫效应细胞，其中所述抗体或其抗原结合片段包含 LCDR2，且所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列。
 8. 根据权利要求 2-7 中任一项所述的免疫效应细胞，其中所述抗体或其抗原结合片段包含 LCDR1，且所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列。
 9. 根据权利要求 2-8 中任一项所述的免疫效应细胞，其中所述抗体或其抗原结合片段包含 VH，所述 VH 包含 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列。
 10. 根据权利要求 2-9 中任一项所述的免疫效应细胞，其中所述抗体或其抗原结合片段包含 VL，所述 VL 包含 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列。
 11. 根据权利要求 2-10 中任一项所述的免疫效应细胞，其中所述抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列。
 12. 根据权利要求 1 所述的免疫效应细胞，其中所述 CAR 包含抗原结合结构域，且所述抗原结合结构域包含特异性结合 CLDN18.2 的抗体或其抗原结合片段。
 13. 根据权利要求 12 所述的免疫效应细胞，其中所述抗体或其抗原结合片段包含 HCDR3，且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列。
 14. 根据权利要求 12-13 中任一项所述的免疫效应细胞，其中所述抗体或其抗原结合片段包含 HCDR2，且所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列。
 15. 根据权利要求 12-14 中任一项所述的免疫效应细胞，其中所述抗体或其抗原结合片段包含 HCDR1，且所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 13 所示的氨基酸序列。
 16. 根据权利要求 12-15 中任一项所述的免疫效应细胞，其中所述抗体或其抗原结合片段包
-

- 含 LCDR3, 且所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列。
17. 根据权利要求 12-16 中任一项所述的免疫效应细胞, 其中所述抗体或其抗原结合片段包含 LCDR2, 且所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 15 所示的氨基酸序列。
 18. 根据权利要求 12-17 中任一项所述的免疫效应细胞, 其中所述抗体或其抗原结合片段包含 LCDR1, 且所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列。
 19. 根据权利要求 12-18 中任一项所述的免疫效应细胞, 其中所述抗体或其抗原结合片段包含 VH, 所述 VH 包含 SEQ ID NO: 17 所示的氨基酸序列。
 20. 根据权利要求 12-19 中任一项所述的免疫效应细胞, 其中所述抗体或其抗原结合片段包含 VL, 所述 VL 包含 SEQ ID NO: 18 所示的氨基酸序列。
 21. 根据权利要求 12-20 中任一项所述的免疫效应细胞, 其中所述抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 19 所示的氨基酸序列。
 22. 根据权利要求 1 所述的免疫效应细胞, 其中所述 CAR 包含抗原结合结构域, 且所述抗原结合结构域包含特异性结合 GPC-3 的抗体或其抗原结合片段。
 23. 根据权利要求 22 所述的免疫效应细胞, 其中所述抗体或其抗原结合片段包含 HCDR3, 且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 29 和 SEQ ID NO: 38 中任一项所示的氨基酸序列。
 24. 根据权利要求 22-23 中任一项所述的免疫效应细胞, 其中所述抗体或其抗原结合片段包含 HCDR2, 且所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 30 和 SEQ ID NO: 39 中任一项所示的氨基酸序列。
 25. 根据权利要求 22-24 中任一项所述的免疫效应细胞, 其中所述抗体或其抗原结合片段包含 HCDR1, 且所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 31 和 SEQ ID NO: 40 中任一项所示的氨基酸序列。
 26. 根据权利要求 22-25 中任一项所述的免疫效应细胞, 其中所述抗体或其抗原结合片段包含 LCDR3, 且所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 32 和 SEQ ID NO: 41 中任一项所示的氨基酸序列。
 27. 根据权利要求 22-26 中任一项所述的免疫效应细胞, 其中所述抗体或其抗原结合片段包含 LCDR2, 且所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 33 和 SEQ ID NO: 42 中任一项所示的氨基酸序列。
 28. 根据权利要求 22-27 中任一项所述的免疫效应细胞, 其中所述抗体或其抗原结合片段包含 LCDR1, 且所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 34 和 SEQ ID NO: 43 中任一项所示的氨基酸序列。
-

29. 根据权利要求 22-28 中任一项所述的免疫效应细胞, 其中所述抗体或其抗原结合片段包含 VH, 所述 VH 包含 SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 35 和 SEQ ID NO: 44 中任一项所示的氨基酸序列。
30. 根据权利要求 22-29 中任一项所述的免疫效应细胞, 其中所述抗体或其抗原结合片段包含 VL, 所述 VL 包含 SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 36 和 SEQ ID NO: 45 中任一项所示的氨基酸序列。
31. 根据权利要求 22-30 中任一项所述的免疫效应细胞, 其中所述抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 37 和 SEQ ID NO: 46 中任一项所示的氨基酸序列。
32. 根据权利要求 2-31 中任一项所述的免疫效应细胞, 其中所述抗体包含单链抗体。
33. 根据权利要求 1-32 中任一项所述的免疫效应细胞, 其中所述 CAR 包含跨膜结构域, 所述跨膜结构域包含源自选自下述蛋白的跨膜结构域: CD28、CD3e、CD45、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137 和 CD154。
34. 根据权利要求 33 所述的免疫效应细胞, 其中所述跨膜结构域包含如 SEQ ID NO: 47 所示的氨基酸序列。
35. 根据权利要求 1-34 中任一项所述的免疫效应细胞, 其中所述 CAR 包含共刺激域, 且所述共刺激域包含一种或多种选自下述蛋白的共刺激域: CD28、4-1BB、CD40L、TIM1、CD226、DR3、SLAM、ICOS、OX40、NKG2D、2B4、CD244、FcεRIγ、BTLA、CD27、CD30、GITR、HVEM、DAP10、CD2、NKG2C、LIGHT 和 DAP12 中的共刺激信号传导区。
36. 根据权利要求 35 所述的免疫效应细胞, 其中所述共刺激域包含如 SEQ ID NO: 48 所示的氨基酸序列。
37. 根据权利要求 1-36 中任一项所述的免疫效应细胞, 其中所述 CAR 包含胞内信号传导域, 且所述胞内信号传导域包含源自 CD3ζ 的胞内信号传导域。
38. 根据权利要求 37 所述的免疫效应细胞, 其中所述胞内信号传导域包含如 SEQ ID NO: 49 所示的氨基酸序列。
39. 根据权利要求 1-38 中任一项所述的免疫效应细胞, 其中所述 CAR 包含铰链区, 所述铰链区位于所述抗原结合结构域和所述跨膜结构域之间。
40. 根据权利要求 39 所述的免疫效应细胞, 其中所述铰链区包含以下至少一项: CD8、CD28、4-1BB、CD4、CD27、CD7 和 PD-1 的铰链区。
41. 根据权利要求 38-39 中任一项所述的免疫效应细胞, 其中所述铰链区包含如 SEQ ID

- NO: 50 所示的氨基酸序列。
42. 根据权利要求 1-41 中任一项所述的免疫效应细胞，其中所述 CAR 包含如 SEQ ID NO: 53、SEQ ID NO: 55、SEQ ID NO: 57、SEQ ID NO: 59 和 SEQ ID NO: 61 中任一项所示的氨基酸序列。
43. 根据权利要求 1-42 中任一项所述的免疫效应细胞，其中所述 Bcl-2 蛋白或其功能活性片段为外源 Bcl-2 蛋白或其功能活性片段。
44. 根据权利要求 1-43 中任一项所述的免疫效应细胞，其中所述免疫效应细胞包括 T 细胞。
45. 根据权利要求 1-44 中任一项所述的免疫效应细胞，其中所述 Bcl-2 蛋白或其功能活性片段包含 SEQ ID NO: 52 所示的氨基酸序列。
46. 核酸分子，所述核酸分子编码权利要求 1-45 中任一项所述的 CAR 和权利要求 1-44 中任一项所述的 Bcl-2 蛋白或其功能活性片段。
47. 根据权利要求 46 所述的核酸分子，其包含编码自剪切肽的序列，所述编码自剪切肽的序列位于编码所述 CAR 的序列和编码所述 Bcl-2 蛋白的序列之间。
48. 根据权利要求 47 所述的核酸分子，其中所述自剪切肽包含 2A 肽。
49. 根据权利要求 48 所述的核酸分子，其中所述 2A 肽为选自下述的一种或多种：P2A，T2A，E2A 和 F2A。
50. 根据权利要求 48-49 中任一项所述的核酸分子，其中所述 2A 肽包含如 SEQ ID NO: 51 所示的氨基酸序列。
51. 载体，其包含权利要求 46-50 中任一项所述的核酸分子。
52. 根据权利要求 51 所述的载体，其选自质粒、逆转录病毒载体和慢病毒载体中的一种或多种。
53. 免疫效应细胞，其包含权利要求 46-50 中任一项所述的核酸分子或权利要求 51-52 中任一项所述的载体。
54. 制备权利要求 1-45 或权利要求 53 中任一项所述的免疫效应细胞的方法，所述方法包括在使得所述嵌合抗原受体表达的条件下，培养权利要求 53 所述的免疫效应细胞。
55. 组合物，其包含权利要求 1-45 或权利要求 53 中任一项所述的免疫效应细胞。
56. 权利要求 1-45 或权利要求 53 中任一项所述的免疫效应细胞、权利要求 46-50 中任一项所述的核酸分子、权利要求 51-52 中任一项所述的载体或权利要求 55 所述的组合物用于制备药物中的用途，所述药物用于预防和/或治疗疾病和/或病症。
57. 根据权利要求 56 所述的用途，其中所述疾病和/或病症与 CD20 表达相关。
-

58. 根据权利要求 56 所述的用途，其中所述疾病和/或病症与 CLDN18.2 表达相关。
 59. 根据权利要求 56 所述的用途，其中所述疾病和/或病症与 GPC-3 表达相关。
 60. 根据权利要求 56-59 中任一项所述的用途，其中所述疾病和/或病症包括肿瘤。
 61. 根据权利要求 60 所述的用途，其中所述肿瘤包括实体瘤和/或血液瘤。
 62. 根据权利要求 60-61 中任一项所述的用途，其中所述肿瘤包括 CD20 阳性肿瘤。
 63. 根据权利要求 60-61 中任一项所述的用途，其中所述肿瘤包括 CLDN18.2 阳性肿瘤。
 64. 根据权利要求 60-61 中任一项所述的用途，其中所述肿瘤包括 GPC-3 阳性肿瘤。
 65. 根据权利要求 60-64 中任一项所述的用途，其中所述肿瘤包括淋巴瘤。
 66. 根据权利要求 60-64 中任一项所述的用途，其中所述肿瘤包括胰腺癌。
-

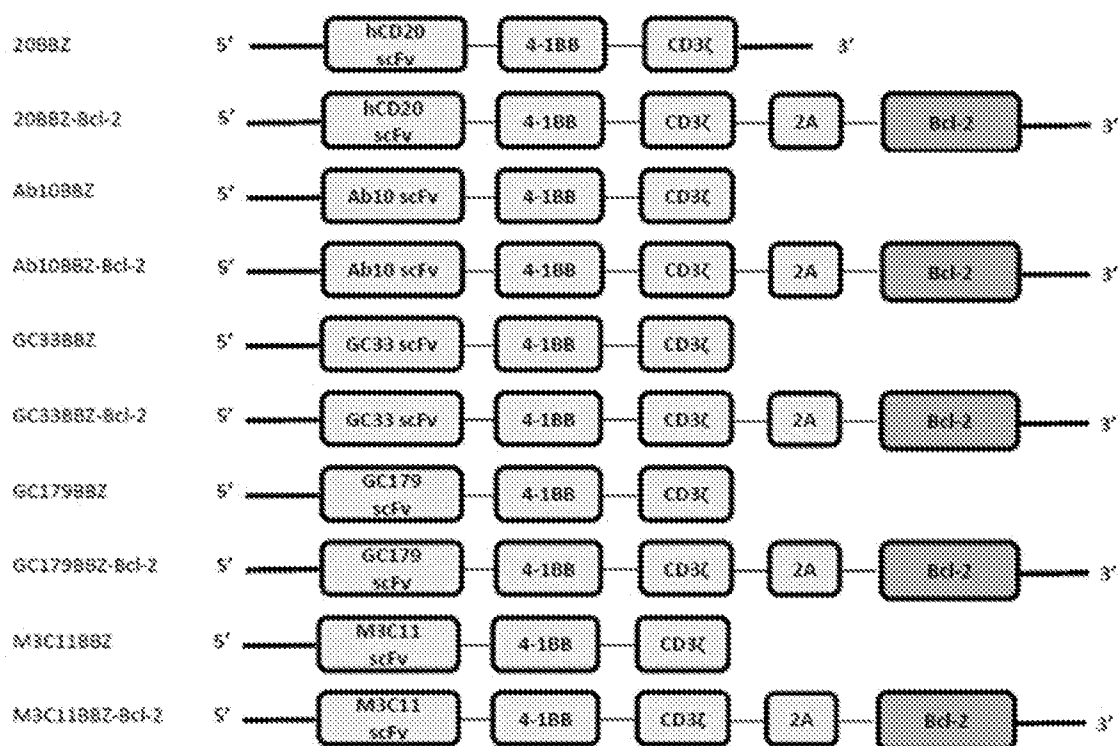


图 1

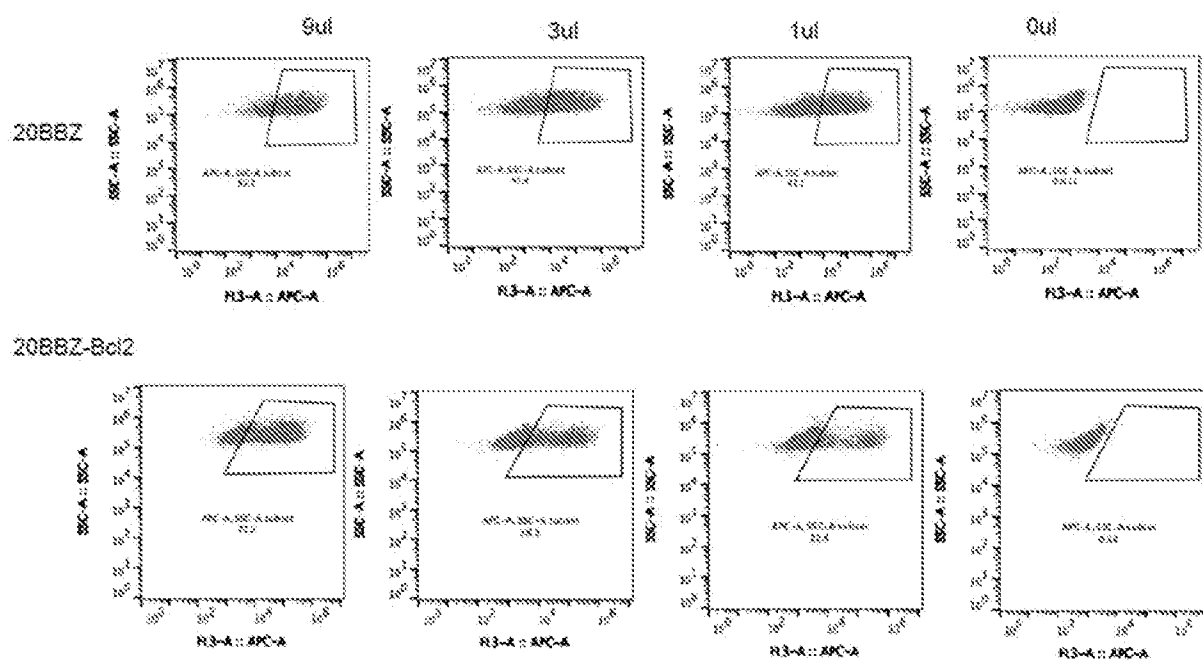


图 2A

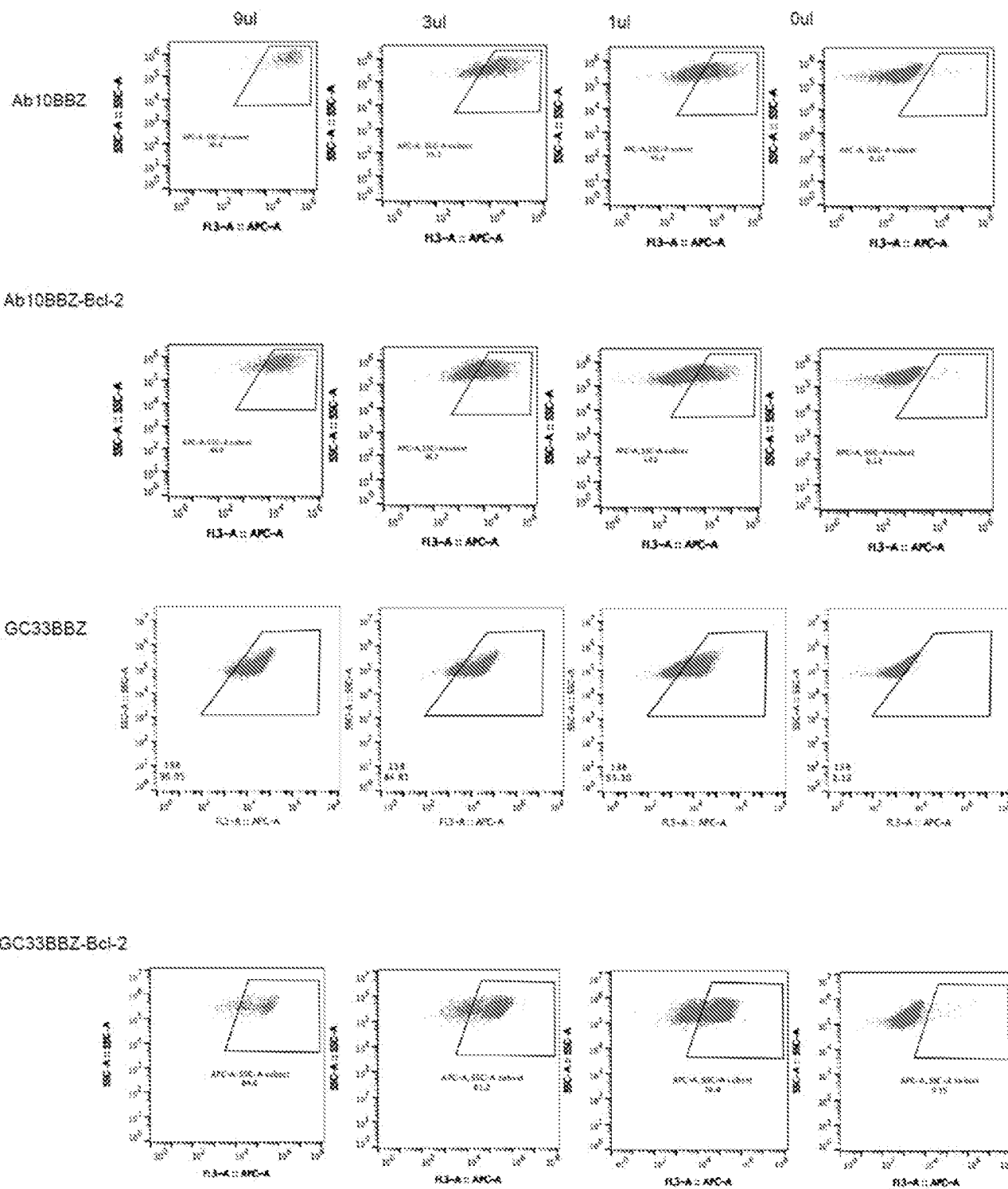


图 2B

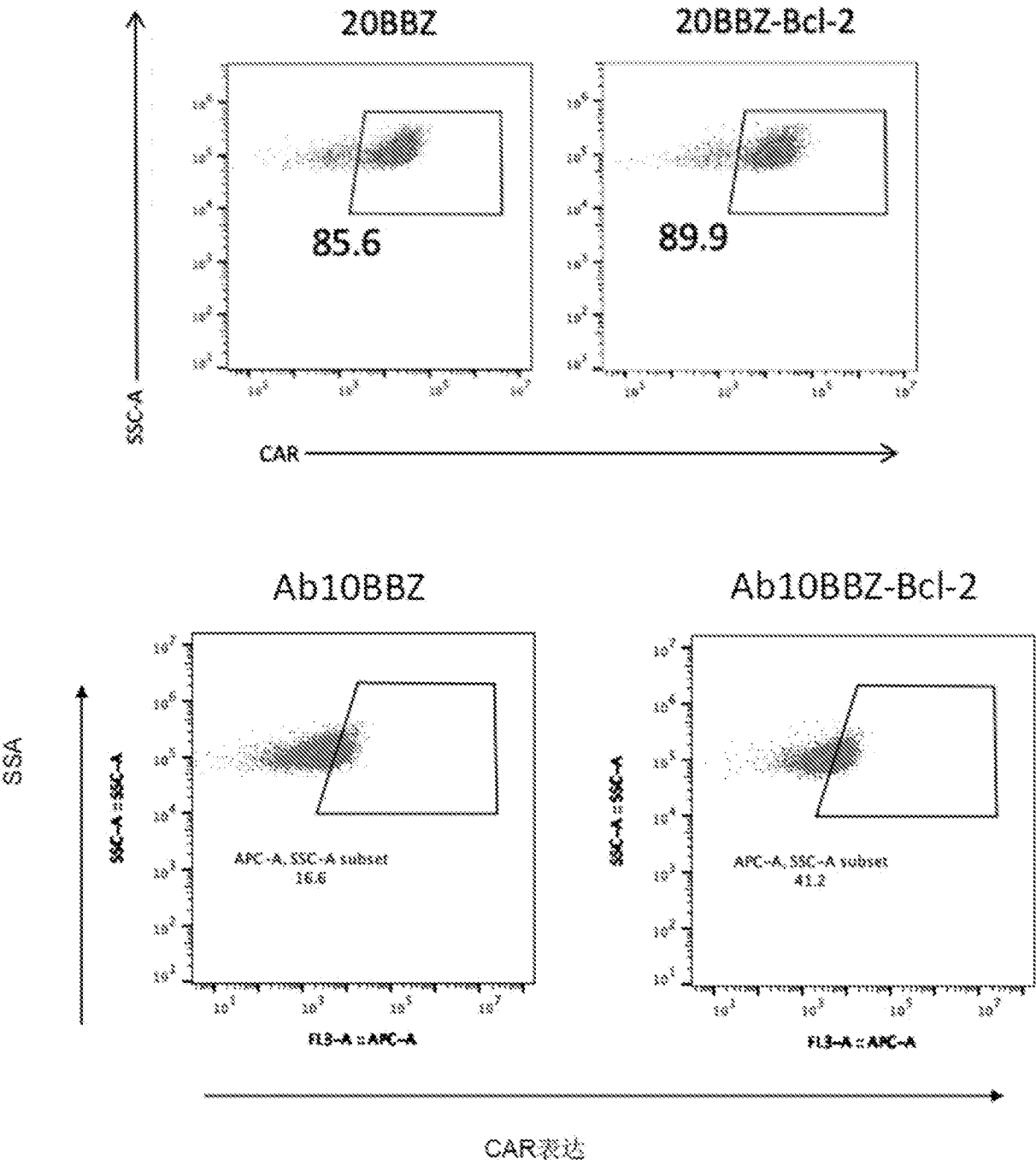


图 3

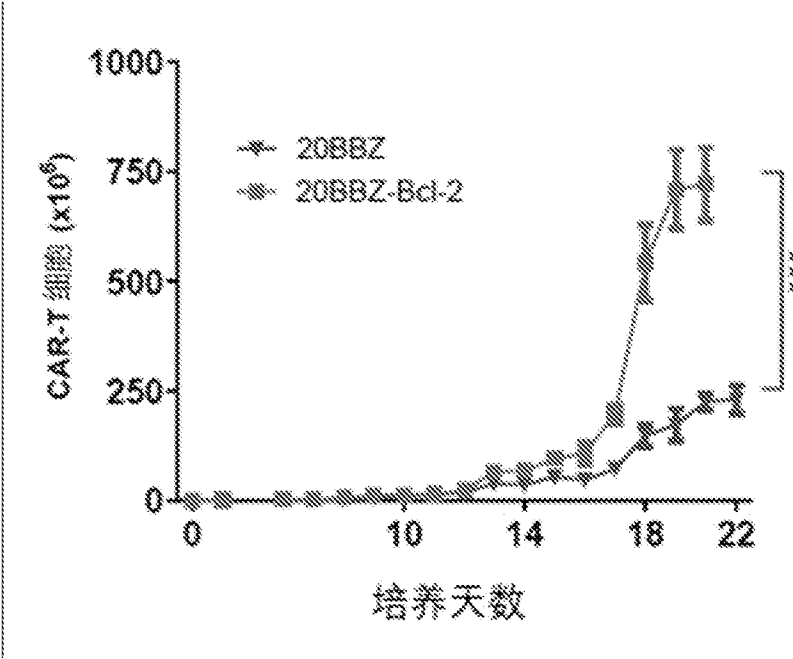


图 4

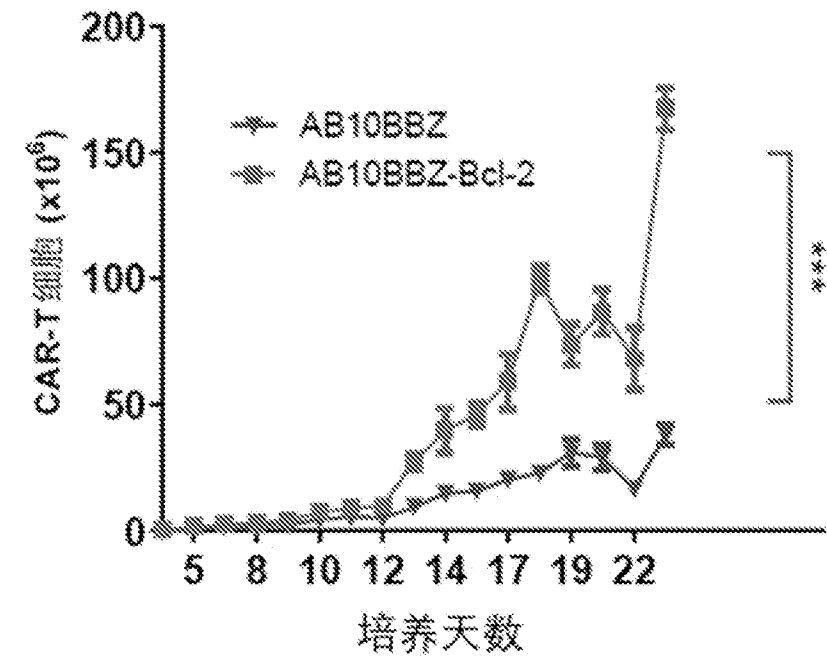


图 5

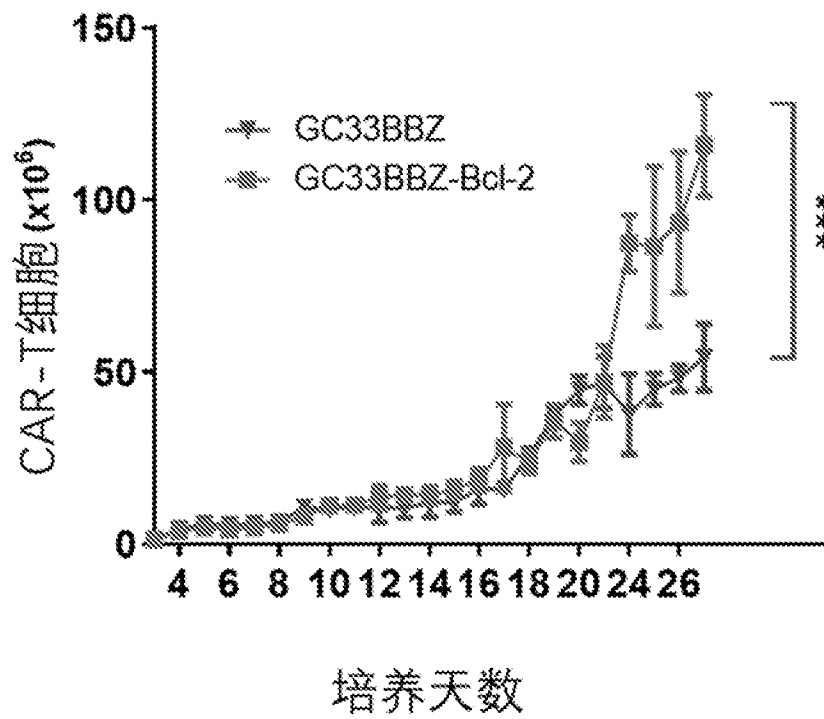


图 6

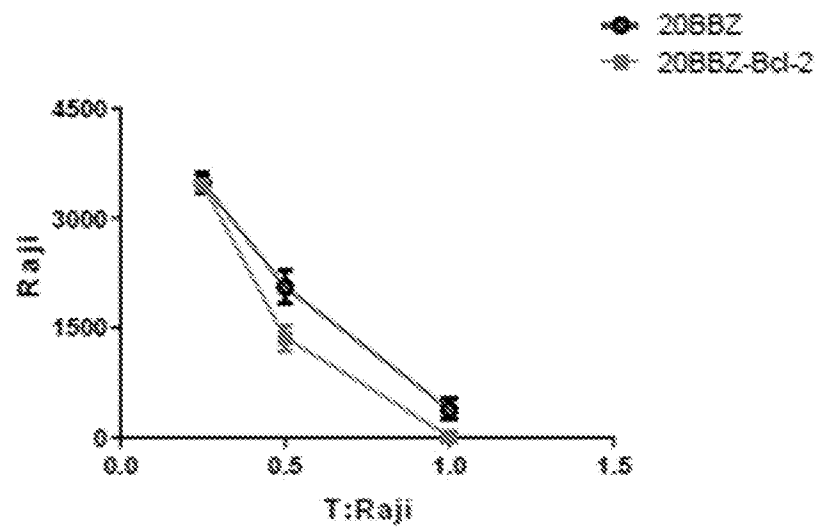


图 7

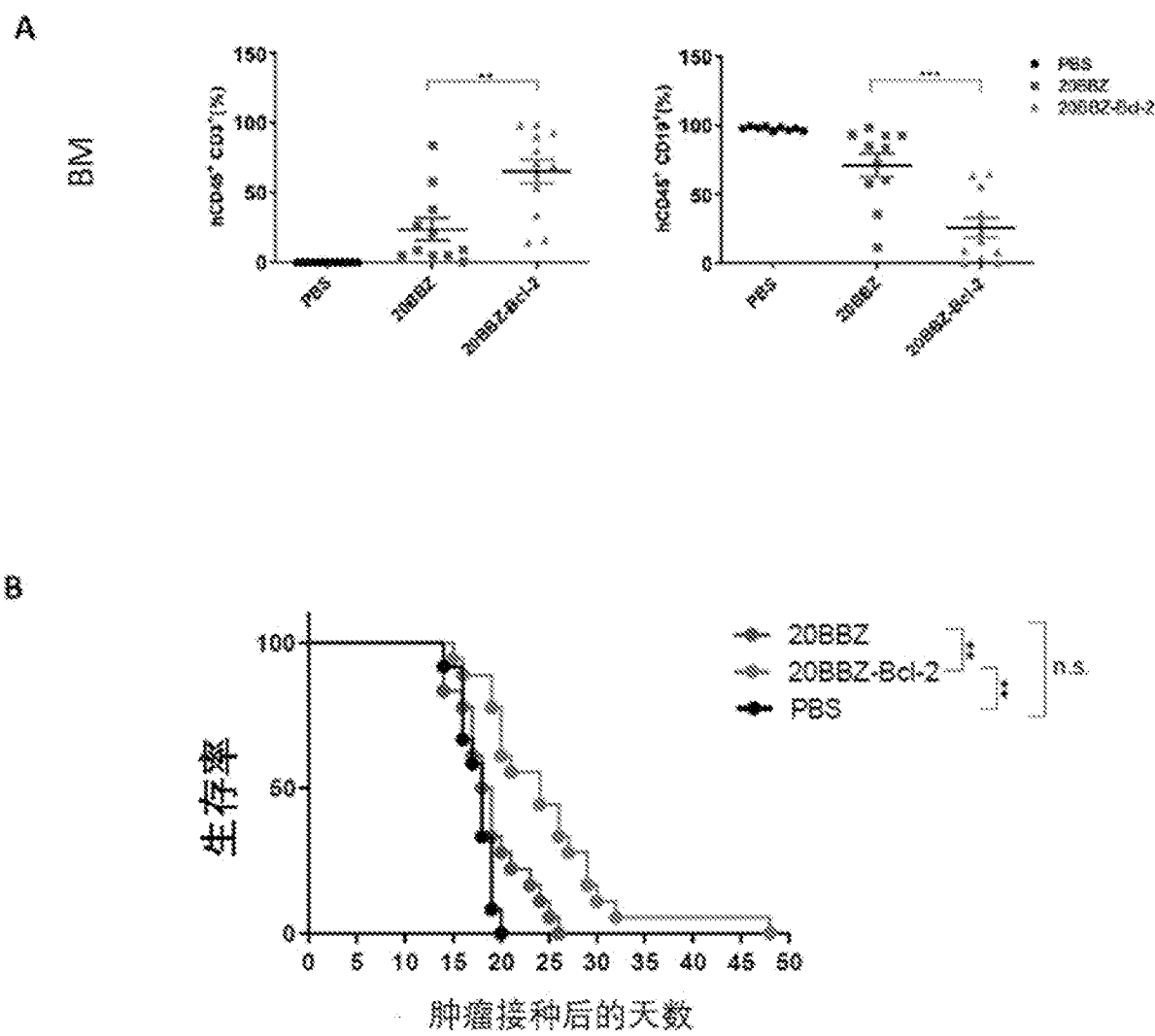


图 8

CFPAC1 肿瘤生长曲线

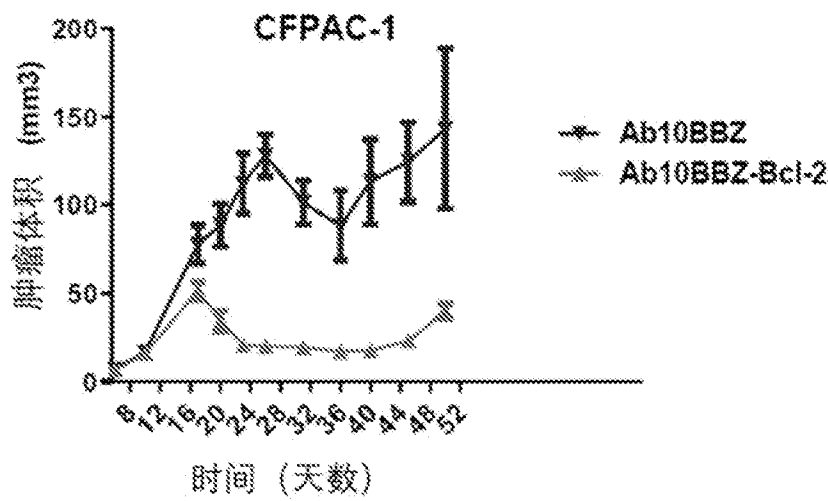


图 9

Huh-7肿瘤生长曲线

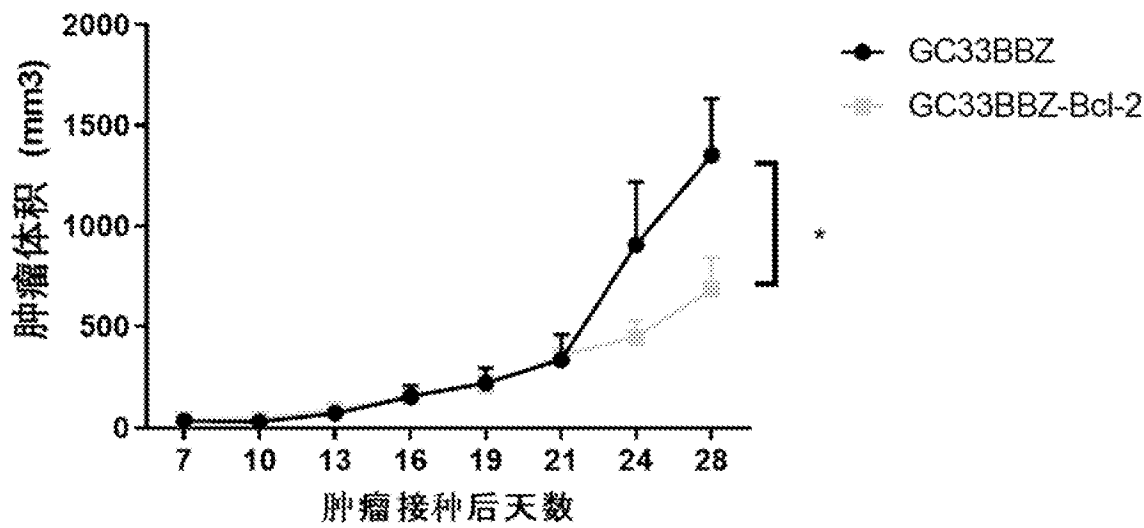


图 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/070012

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 35/17(2015.01)i; A61K 39/00(2006.01)i; A61K 48/00(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

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, DWPI, SIPOABS, CNTXT, WOTXT, JPTXT, USTXT, EPTXT, 万方, CNKI, PubMed, GenBank, ISI web of knowledge; CAR, CAR-T, 免疫效应细胞, Bcl-2, CD20, CLDN18.2, 抗体

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	WANG, H. Y. et al. "Bcl-2 Enhances Chimeric Antigen Receptor T Cell Persistence by Reducing Activation-Induced Apoptosis" <i>Cancers (Basel)</i> , Vol. 13, No. 2, 08 January 2021 (2021-01-08), entire document	1-2, 32-33, 35, 37, 39-40, 43-44, 47-49
X	WO 2020219504 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 29 October 2020 (2020-10-29) description paragraphs [0079]- [0085], [00131]	1-2
Y	WO 2020219504 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 29 October 2020 (2020-10-29) description paragraphs [0079]- [0085], [00131], [00371]- [00373]	3-11, 32-66
Y	CN 110305220 A (SUN, Jialin) 08 October 2019 (2019-10-08) claim 1, and sequence list	3-11, 32-66
Y	CN 111848809 A (L&L BIOPHARMA, CO., LTD.) 30 October 2020 (2020-10-30) abstract, description paragraphs [0009]- [0047], sequence table	12-21, 32-66
Y	CN 108164600 A (SHANGHAI JIBEI BIOLOGICAL TECHNOLOGY CO., LTD.) 15 June 2018 (2018-06-15) abstract, description paragraphs [0054]- [0055], sequence table	22-66



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

17 March 2022

Date of mailing of the international search report

30 March 2022

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/CN2022/070012**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2016361360 A1 (IMMUNOMEDICS INC.) 15 December 2016 (2016-12-15) claims 1-47	1-2
A	US 2020338128 A1 (GENCYTE THERAPEUTICS, INC.) 29 October 2020 (2020-10-29) entire document	1-66

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/070012

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/CN2022/070012

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2020219504	A1	29 October 2020	None			
CN	110305220	A	08 October 2019	None			
CN	111848809	A	30 October 2020	None			
CN	108164600	A	15 June 2018	None			
US	2016361360	A1	15 December 2016	WO	2016201300	A1	15 December 2016
				CA	2983456	A1	15 December 2016
				EP	3307282	A1	18 April 2018
				EP	3307282	A4	01 May 2019
				JP	2018522833	A	16 August 2018
				AU	2016274989	A1	02 November 2017
				CN	107708741	A	16 February 2018
US	2020338128	A1	29 October 2020	WO	2019136335	A1	11 July 2019

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2022/070012

A. 主题的分类 A61K 35/17(2015.01)i; A61K 39/00(2006.01)i; A61K 48/00(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 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)) CNABS, DWPI, SIPOABS, CNTXT, WOTXT, JPTXT, USTXT, EPTXT, 万方, CNKI, PubMed, GenBank, ISI web of knowledge:CAR, CAR-T, 免疫效应细胞, Bcl-2, CD20, CLDN18.2, 抗体		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
PX	WANG, H.Y. 等. "Bcl-2 Enhances Chimeric Antigen Receptor T Cell Persistence by Reducing Activation-Induced Apoptosis" Cancers (Basel), 第13卷, 第2期, 2021年1月8日 (2021 - 01 - 08), 全文	1-2、32-33、35、37、39-40、43-44、47-49
X	WO 2020219504 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 2020年10月29日 (2020 - 10 - 29) 说明书第[0079]- [0085]、[00131]段	1-2
Y	WO 2020219504 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 2020年10月29日 (2020 - 10 - 29) 说明书第[0079]- [0085]、[00131]、[00371]- [00373]段	3-11、32-66
Y	CN 110305220 A (孙嘉琳) 2019年10月8日 (2019 - 10 - 08) 权利要求1, 序列表	3-11、32-66
Y	CN 111848809 A (上海健信生物医药科技有限公司) 2020年10月30日 (2020 - 10 - 30) 摘要, 说明书第[0009]- [0047]段、序列表	12-21、32-66
Y	CN 108164600 A (上海吉倍生物技术有限公司) 2018年6月15日 (2018 - 06 - 15) 摘要, 说明书第[0054]- [0055]段、序列表	22-66
☒ 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 2022年3月17日		国际检索报告邮寄日期 2022年3月30日
ISA/CN的名称和邮寄地址 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		受权官员 刘新蕾 电话号码 86-(10)-53962097

C. 相关文件		
类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
X	US 2016361360 A1 (IMMUNOMEDICS INC) 2016年12月15日 (2016 - 12 - 15) 权利要求1-47	1-2
A	US 2020338128 A1 (GENCYTE THERAPEUTICS, INC.) 2020年10月29日 (2020 - 10 - 29) 全文	1-66

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/CN2022/070012

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
WO	2020219504	A1	2020年10月29日	无			
CN	110305220	A	2019年10月8日	无			
CN	111848809	A	2020年10月30日	无			
CN	108164600	A	2018年6月15日	无			
US	2016361360	A1	2016年12月15日	WO	2016201300	A1	2016年12月15日
				CA	2983456	A1	2016年12月15日
				EP	3307282	A1	2018年4月18日
				EP	3307282	A4	2019年5月1日
				JP	2018522833	A	2018年8月16日
				AU	2016274989	A1	2017年11月2日
				CN	107708741	A	2018年2月16日
US	2020338128	A1	2020年10月29日	WO	2019136335	A1	2019年7月11日