

(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10月10日(10.10.2019)

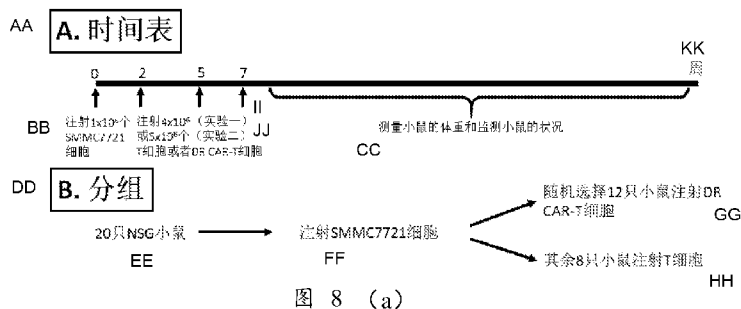


(10) 国际公布号
WO 2019/192526 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12N 15/62 (2006.01) A61K 35/17 (2015.01)
C12N 15/63 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01) C07K 19/00 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2019/081286
- (22) 国际申请日: 2019年4月3日(03.04.2019)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201810299324.8 2018年4月4日(04.04.2018) CN
- (71) 申请人: 达仁生物科技有限公司(DAREN BIOTECH LIMITED) [CN/CN]; 中国香港特别行政区西贡区清水湾坑口永隆路42号, Hong Kong (CN)。
- (72) 发明人: 谢雍(XIE, Yong); 中国香港特别行政区西贡区大网仔路706C, Hong Kong (CN)。
- (74) 代理人: 北京启坤知识产权代理有限公司 (BEIJING QIKUN INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY LTD.); 中国北京市朝阳区东三环北路3号中远幸福大厦A座1105室黄可峻, Beijing 100027 (CN)。
- (81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,

(54) Title: CHIMERIC ANTIGEN RECEPTOR AND METHOD FOR TREATING CANCERS

(54) 发明名称: 嵌合抗原受体和其治疗癌症的方法



- AA A. Time schedule
- BB Inject 1*10⁶ SMMC7721 cells
- CC Measure mice weight and monitor conditions in mice
- DD B. Grouping
- EE 20 NSG mice
- FF Inject SMMC7721 cells
- GG Randomly select 12 mice to be injected with DR CAR-T cells
- HH Inject the remaining 8 mice with T cells
- II Inject 4*10⁶ T cells or DR CAR-T cells (Test 1)
- JJ Inject 5*10⁶ T cells or DR CAR-T cells (Test 2)
- KK Week

(57) Abstract: The present invention provides a new chimeric antigen receptor and a composition of the chimeric antigen receptor and DAP10. The present invention provides an expression vector and a host cell for expressing the chimeric antigen receptor and the composition of the chimeric antigen receptor and DAP10. The present invention also provides use of the chimeric antigen receptor and the composition of the chimeric antigen receptor and DAP10 in the treatment of cancers or in the preparation of drugs for treating cancers. The chimeric antigen receptor and the drugs provided in the present invention can effectively treat liver cancer, lung cancer and the like.



WO 2019/192526 A1

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))。

(57) 摘要: 本发明提供了新的嵌合抗原受体以及其与DAP10的组合。本发明提供了表达所述嵌合抗原受体以及其与DAP10的组合物的表达载体和宿主细胞。本发明还提供了嵌合抗原受体及其与DAP10的组合物在治疗癌症或制备治疗癌症的药物中的用途。本发明提供的嵌合抗原受体和药物能够有效地治疗肝癌和肺癌等癌症。

嵌合抗原受体和其治疗癌症的方法

本申请要求 2018 年 4 月 4 日提交的、申请号为 201810299324.8、
5 发明名称为“NKG2D 嵌合抗原受体和其治疗癌症的方法”的中国专利申请
的优先权，其全部内容通过引用结合在本申请中。

技术领域

本发明涉及免疫学和医药领域。具体的，本发明提供了新的嵌合
10 抗原受体以及其与 DAP10 的组合。本发明还提供了所述新的嵌合抗原受
体及其与 DAP10 的组合在治疗癌症或制备治疗癌症的药物中的用途。

背景技术

NKG2D (natural-killer group 2 member D, 或 NKG2D 受体), 即
15 杀伤细胞凝集素样受体亚家族 K 成员 1, 是在所有自然杀伤细胞, 自
然杀伤 T 细胞和 $\gamma\delta^+$ T 细胞表达的 II 型跨膜蛋白。在人体中, NKG2D
受体主要与两种配体结合, 这两种配体分别是 UL16-结合蛋白
(UL16-binding protein, ULBP)和 MHC I 型链相关蛋白 A/B(MHC class
I-chain-related protein, MICA/B)。人类 NKG2D 配体的表达很少在健
20 康组织中检测到, 但在肿瘤细胞中以及在细胞应激和病毒感染期间上
调。NKG2D 及其配体的结合作为针对肿瘤和病毒感染的免疫应答中
的激活信号。

近年在使用利用基因工程化产生的嵌合抗原受体 (CAR) T 细胞
进行自体治疗的 B 细胞淋巴瘤和白血病中获得了空前的效果, 所以已
25 经开始将该方法应用至实体肿瘤。经 CAR 修饰的 T 细胞将单克隆抗

体的独立于 HLA 的靶向特异性与被激活的 T 细胞的溶细胞活性、增殖和归巢性质相结合，但是不响应于检查点抑制。但是，由于其直接杀死表达靶标的抗原的能力，CAR T 细胞对于任何抗原阳性的细胞或组织是高度毒性的，这使得有需要通过高度肿瘤特异性的结构构建
5 CAR。

2005年，NKG2D 受体-NKG2D 配体系统首次用于嵌合抗原受体 (CAR) 治疗 (T. Zhang 等, Blood, vol. 106, no. 5, pp. 1544–1551, Sep. 2005)。在自然杀伤细胞和 T 细胞中，DNAX 活化蛋白10 (DAP10) 是 NKG2D 受体的细胞表面衔接子。

10 癌症，特别是肺癌和肝癌是全球相关死亡的主要原因。作为典型的实体瘤，肺癌和肝癌治疗中存在多重障碍。复发往往出现在实体瘤治疗中。

因此，本领域需要更有效以及更安全的用于治疗癌症的 CAR T 细胞。

15

发明内容

本发明提供了一种新的嵌合抗原受体，其包含：(a) 抗原结合结构域，其包括 NKG2D 或其活性片段；(b) 跨膜结构域和 (c) 胞内信号传导结构域。本发明还提供了新的嵌合抗原受体和其辅助蛋白 DAP10或其活性片段的联合。本发明还提供了编码所述嵌合抗原受体和/或 DAP10的核酸和表达
20 载体，以及表达所述嵌合抗原受体和/或 DAP10的细胞。本发明还提供了采用所述嵌合抗原受体和/或 DAP10的、其表达载体和细胞在治疗癌症的方法和制备治疗癌症的药物中的用途。

本发明提供了一种嵌合抗原受体 (CAR)，其包含：(a) 抗原结合结构
25 域，其包括 NKG2D 或其活性片段；(b) 跨膜结构域和 (c) 胞内信号传导

结构域。

本发明还提供了一种前面所述的嵌合抗原受体 (CAR) 和一种辅助蛋白的组合, 其中所述 CAR 包含: (a) 抗原结合结构域, 其包括 NKG2D 或其活性片段; (b) 跨膜结构域和 (c) 胞内信号传导结构域, 以及其中所述
5 辅助蛋白为 DAP10或其活性片段。在本发明的其中一个方面, 所述 DAP10 具有 SEQ ID NO: 4的氨基酸序列。

“NKG2D”或“NKG2D 受体”, 亦称“NKG2-D”、“CD314”、“KLRK1”、“杀伤细胞凝集素样受体亚家族 K 成员1”, 是指哺乳动物特别是人的杀伤细胞激活性受体基因 (其 mRNA 如 NCBI RefSeq
10 NM_007360) 或其基因产物(如 NCBI RefSeq NP_031386) 或其天然存在的变体。在人类 NK 细胞和 T 细胞中, 配体结合形式的 NKG2D 受体是同二聚体(Li 等, Nat Immunol 2001; 2: 443-451)。NKG2D 活性, 包括细胞活化、抗体识别等, 还包括与两种配体结合, 这两种配体分别是 UL16-结合蛋白 (UL16-binding protein, ULBP) 和 MHC I 型链
15 相关蛋白 A / B (MHC class I-chain-related protein MICA / B)。

DAP10 (membrane protein 10) 是指哺乳动物特别是人的表面蛋白基因或其基因产物(如 GenBank: AAG29425.1所示)。 DAP10的活性包括与 NKG2D 形成复合体 (Wu,J.等, Science 285 (5428), 730-732, 1999)。

20 在本发明的其中一个方面, 所述嵌合抗原受体 (CAR) 的抗原结合结构域包含 NKG2D 的活性片段。所述活性片段例如为 NKG2D 的 a.a.82-216 片段, 即具有 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列的第 82-216 个氨基酸:
LFNQEVQIPLTESYCGPCPKNWICYKNNCYQFFDESKNWYESQASCMSQNASLLKV
YSKEDQDLLKLVKSYHWMGLVHIPTNGSWQWEDGSILSPNLLTIIEMQKGDICALYA
25 SSFKGYIENCSTPNTYICMQRTV。

在本发明的其中一个方面，所述抗原结合结构域可包含前导序列 (leading peptide)。前导序列可协助蛋白在细胞膜上的表达或进出膜。本领域已知的前导序列可用于本发明的 CAR。在本发明中，前导序列可以位于所述 NKG2D 或其活性片段的上游。在本发明的其中一种实施方案中，在所述前导序列为 CD33 的前导序列，其具有 SEQ ID NO: 18 的氨基酸序列。前导序列可以促进 CAR 在细胞表面上的表达，但是在表达的 CAR 中存在前导序列不是 CAR 发挥作用所必需的。在本发明的实施方案中，CAR 在细胞表面上表达后，前导序列可以从 CAR 上切除。因此，在本发明的实施方案中，CAR 可以没有前导序列。

在本发明的其中一个方面，所述 CAR 包括跨膜结构域。本领域已知的跨膜结构域可用于本发明。跨膜结构域包括 T 细胞受体的 α 、 β 、或 ζ 、CD28, CD3 ϵ , CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, KIRDS2, OX40, CD2, CD27, LFA-1(CD11a, CD18), ICOS(CD278), 4-1BB(CD137), GITR, CD40, BAFFR, HVEM(LIGHTR), SLAMF7, NKp80(KLRF1), 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, NKp44, NKp30, NKp46 等的跨膜结构域。

在本发明的其中一个方面，本发明的 CAR 的跨膜结构域包含 i) CD8 和 / 或 ii) CD28 的跨膜结构域。在本发明的其中又一个方面，本发明的 CAR

的跨膜结构域为 CD28 的跨膜结构域，例如，其可具有 SEQ ID NO: 8 的氨基酸序列。

在本发明的其中一个方面，所述 CAR 包括胞内信号传导结构域。包含可用于本发明的胞内信号传导结构域的实例包括来自 CD2、CD4、CD5、
5 CD8 α 、CD8 β 、CD28、CD134、CD137、ICOS 和 CD154 的胞内信号传导结构域。其具体实例包括具有以下序列的肽：CD2 (NCBI RefSeq: NP_001758.2) 的氨基酸编号 236-351、CD4(NCBI RefSeq: NP_000607.1) 的氨基酸编号 421-458、CD5 (NCBI RefSeq: NP_055022.2)的氨基酸编号 402-495、CD8 α (NCBI RefSeq: NP_001759.3)的氨基酸编号 207-235、CD8
10 β (GenBank: AAA35664.1) 的氨基酸编号 196-210、CD28 (NCBI RefSeq: NP_006130.1) 的氨基酸编号 181-220 (SEQ ID NO: : 25)、CD137 (4-1BB, NCBI RefSeq: NP_001552.2) 的氨基酸编号 214-255、CD134 (OX40, NCBI RefSeq: NP_003318.1) 的氨基酸编号 241-277 和 ICOS (NCBI RefSeq: NP_036224.1)的氨基酸编号 166-199 等，及其与这些肽具有相同功能的变体。

15 优选的，本发明 CAR 的细胞内 T 细胞信号传导结构域包含以下任何一种或多种的：i) CD28，ii) 4-1BB，和/ 或 iii) CD3 ζ 的胞内信号传导结构域。在优选的实施方案中，本发明 CAR 的细胞内 T 细胞信号传导结构域为 CD28、4-1BB 和 CD3 ζ 的胞内信号传导结构域。更优选的，本发明 CAR 的细胞内 T 细胞信号传导结构域从氨基端到羧基端按顺序为 CD28、4-1BB 和
20 CD3 ζ 。其中，CD28 为 T 细胞共刺激中重要的 T 细胞标志物，其胞内信号传导结构域的序列例如可以包含 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列。4-1BB，也被称为 CD137，向 T 细胞传送有效的共刺激信号，从而促进 T 淋巴细胞的分化并增强其长期存活。CD3 ζ 与 TCR 联合以产生信号并含有基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)。在本发明的其中一个方面，所述 CAR
25 的细胞内 T 细胞信号传导结构域包含的 CD28、4-1BB 和 CD3 ζ 的胞内信

号传导结构域分别具有 SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 14 的氨基酸序列。在本发明的其中又一个方面，所述 CAR 的细胞内 T 细胞信号传导结构域包含的 CD28 的胞内信号传导结构域具有例如 SEQ ID NO: 10 的氨基酸序列。在本发明的其中又一个方面，所述 CAR 的细胞内 T 细胞信号传导结构域包含的 4-1BB 的胞内信号传导结构域具有例如 SEQ ID NO: 12 的氨基酸序列。在本发明的其中又一个方面，所述 CAR 的细胞内 T 细胞信号传导结构域包含的 CD3 ζ 的胞内信号传导结构域具有例如 SEQ ID NO: 14 的氨基酸序列。

在包含多个胞内信号传导结构域的 CAR 中，可在胞内结构域之间插入寡肽接头或多肽接头以连接各结构域。优选地，可使用长度为 2-10 个氨基酸的接头。尤其是，可使用具有甘氨酸-丝氨酸连续序列的接头。

在本发明的其中一种实施方案中，所述 CAR 包含 (a) 抗原结合结构域，其为 NKG2D 的 a.a.82-216 片段；(b) CD28 的跨膜结构域和 (c) 从氨基端按顺序为 CD28、4-1BB 和 CD3 ζ 的胞内信号传导结构域。

在本发明的其中一个方面，其中所述 CAR 中，(a) 抗原结构域和 (b) 跨膜结构域之间还具有铰链区。本领域已知的铰链区可用于本发明，包括 IgG1H, IgG2H, IgG3H, IgG4H。在本发明的其中又一个方面，(a) 抗原结构域和 (b) 跨膜结构域之间的铰链区包含 IgG1H 或其片段或变体，其氨基酸序列例如为 SEQ ID NO: 6。

包括在本发明范围内的是本文描述的本发明的蛋白质的功能变体，如 CAR 或其中各功能片段（包括抗原结合结构域，跨膜结构域，胞内信号传导结构域，铰链区，前导序列等）的功能变体。本文使用的术语“功能变体”是指具有与亲本蛋白质，如 CAR 大量的或显著的序列同一性或相似性的 CAR、多肽或蛋白质，所述功能变体保留了 CAR 变体的生物活性。功能变体涵盖，例如，本文描述的 CAR(亲本 CAR) 的那些变体，其保留了

能够以与亲本 CAR 类似的程度、以与亲本 CAR 相同的程度或以比亲本 CAR 更高的程度识别靶细胞。关于亲本 CAR，功能变体的氨基酸序列与亲本 CAR 的氨基酸序列可，例如，具有至少约 30%、约 50%、约 75%、约 80%、约 90%、约 98%、约 99% 或更高的同一性。

5 功能变体可，例如，包含具有至少一个保守性氨基酸置换的亲本 CAR 的氨基酸序列。替代地或另外地，功能变体可包含具有至少一个非保守性氨基酸置换的亲本 CAR 的氨基酸序列。在这种情况下，优选的是不会干扰或抑制功能变体的生物活性的非保守性氨基酸置换。非保守性氨基酸置换可以增强功能变体的生物活性，使得功能变体的生物活性与亲本 CAR 相比有所增加。

本发明的实施方案还提供包含编码本文描述的任何 CAR 的核苷酸序列的分离的核酸。本发明的核酸可包含编码本文描述的任何前导序列、抗原结合结构域、跨膜结构域和/或细胞内 T 细胞信号传导结构域的核苷酸序列。

15 在本发明的其中一个方面，提供了分离的核酸，其包括编码前面所述的嵌合抗原受体 (CAR) 的核苷酸序列，所述 CAR 包含：(a) 抗原结合结构域，其包括 NKG2D 或其活性片段；(b) 跨膜结构域和 (c) 胞内信号传导结构域，

在本发明的其中又一个方面，其中编码所述 CAR 的抗原结合结构域的核苷酸序列包含编码 NKG2D 的活性片段，优选为编码 NKG2D 的 a.a.82-216 片段的核苷酸序列，例如其具有 SEQ ID NO: 1 所示的核苷酸序列。

在本发明的其中又一个方面，其中编码所述跨膜结构域的核苷酸序列包括编码 CD8 和/或 CD28 的跨膜结构域，优选为 CD28 的跨膜结构域的核苷酸序列，例如为 SEQ ID NO: 7 的核苷酸序列。

25 在本发明的其中又一个方面，其中编码所述胞内信号传导结构域的核

核苷酸序列包括编码 CD28, 4-1BB 和 CD3 ζ 的胞内信号传导结构域中的一个或多个的核苷酸序列, 优选包括编码 CD28, 4-1BB 和 CD3 ζ 的胞内信号传导结构域的核苷酸序列, 更优选包括编码从氨基端到羧基端按顺序为 CD28、4-1BB 和 CD3 ζ 的蛋白质的核酸序列;

5 本发明的其中又一个方面, 所述编码 CD28 的胞内信号传导结构域的核酸具有例如 SEQ ID NO: 9 的核苷酸序列;

本发明的其中又一个方面, 所述编码 4-1BB 的胞内信号传导结构域具有例如 SEQ ID NO: 11 的核苷酸序列;

本发明的其中又一个方面, 所述编码 CD3 ζ 的胞内信号传导结构域具有例如 SEQ ID NO: 13 的核苷酸序列;

本发明的其中又一个方面, 其中编码所述 CAR 的胞内信号传导结构域的核苷酸序列具有如 SEQ ID NO: 20 的核苷酸序列, 其包括编码 CD28, 4-1BB 和 CD3 ζ 的胞内信号传导结构域的核苷酸序列。

本发明的其中又一个方面, 本发明提供的核酸中还包括编码 (a) 抗原结构域和 (b) 跨膜结构域之间还具有的铰链区的核苷酸序列, 优选为编码 IgGH1 的核苷酸序列, 其具有例如 SEQ ID NO: 5 的核苷酸序列。

本发明的其中又一个方面, 本发明提供的核酸中还包括编码位于所述 NKG2D 或其活性片段的上游的前导序列的核苷酸序列, 优选为编码 CD33 的前导序列的核苷酸序列, 例如为 SEQ ID NO: 17 所示的核苷酸序列。

20 如前所述, 本发明还提供了前面定义的嵌合抗原受体 (CAR) 和一种辅助蛋白的组合, 所述辅助蛋白为 DAP10 或其活性片段。

本发明的其中又一个方面, 本发明提供的核酸中还包括编码该嵌合抗原受体 (CAR) 和所述辅助蛋白的核苷酸序列, 所述 CAR 包含: (a) 抗原结合结构域, 其包括 NKG2D 或其活性片段; (b) 跨膜结构域和 (c) 胞内信号传导结构域, 以及所述辅助蛋白为 DAP10 或其活性片段。其中, 编码

所述 CAR 的抗原结合结构域的核苷酸序列包含编码 NKG2D 的活性片段，例如为 NKG2D 的 a.a.82-216 片段的核苷酸序列，例如为 SEQ ID NO: 1 所示的核苷酸序列。以及，其中编码所述 DAPI10 的核酸具有序列为 SEQ ID NO: 3 的核苷酸序列。

5 本文使用的“核酸”包括“多核苷酸”、“寡核苷酸”和“核酸分子”，并且通常意指 DNA 或 RNA 的聚合物，其可为单链或双链的，由天然来源合成或获得(如分离和/或纯化)的，可含有天然的、非天然的或改变的核苷酸，以及可含有天然的、非天然的或改变的核苷酸间连接，如氨基磷酸酯键或硫代磷酸酯键替代未修饰的寡核苷酸的核苷酸之间存在的磷酸二
10 酯。在一些实施方案中，核酸不包含任何插入、缺失、倒置和/或置换。然而，在一些情况下，如本文所讨论的，包含一个或多个插入、缺失、倒置和/或置换的核酸可能为合适的。在一些实施方案中，核酸可以编码不会影响 CAR 的功能并且在宿主细胞表达核酸之后可以被翻译或不被翻译的另外的氨基酸序列。

15 本发明的实施方案还提供分离或纯化的核酸，所述核酸包含与本文描述的任何核酸的核苷酸序列互补的核苷酸序列或在严格条件下与本文描述的任何核酸的核苷酸序列杂交的核苷酸序列。

在严格条件下杂交的核苷酸序列可以在高严格条件下杂交。“高严格条件”意指核苷酸序列以强于非特异性杂交可检测的量与靶序列(本文描述的任何核酸的核苷酸序列)特异性杂交。高严格条件包括区分多核苷酸与精确的互补序列，或仅含有来自随机序列的一些分散的错配的互补序列的条件，
20 所述随机序列碰巧具有匹配核苷酸序列的一些小区域(如 3-10 个碱基)。此类互补性的小区域比 14-17 个或更多个碱基的全长互补更容易熔融，并且高严格杂交使得它们易于被区分。相对地高严格条件将包括，例如，低盐
25 和/或高温条件，如在约 50-70°C 的温度下通过约 0.02-0.1M NaCl 或等价物

提供。此类高严格条件容许如果有的话，核苷酸序列与模板或靶链之间很少的错配，并且特别适于检测任何本发明 CAR 的表达。通常应理解可通过加入增加量的甲酰胺使条件更严格。

本发明还提供包含与本文描述的任何核酸具有至少约 70% 或更高，如
5 约 80%、约 90%、约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98% 或约 99% 的同一性的核苷酸序列的核酸。

在实施方案中，本发明的核酸可掺入至重组表达载体中。在这方面，本发明的实施方案提供包含本发明的任何核酸的重组表达载体。为了本文的目的，术语“重组表达载体”意指基因修饰的寡核苷酸或多核苷酸构建体，
10 当构建体包含编码 mRNA、蛋白质、多肽或肽的核苷酸序列，并且在足以在细胞内表达 mRNA、蛋白质、多肽或肽的条件下载体与细胞接触时，所述基因修饰的寡核苷酸或多核苷酸构建体允许宿主细胞表达 mRNA、蛋白质、多肽或肽。本发明的载体并非是整个天然存在的。然而，载体的一部分可为天然存在的。本发明的重组表达载体可包含任何类型的核苷酸，包
15 括但不限于 DNA 和 RNA，所述 DNA 和 RNA 可为单链或双链，部分由天然来源合成或获得，并且可含有天然的、非天然的或改变的核苷酸。重组表达载体可包含天然存在的或非天然存在的核苷酸间连键或者这两种类型的连键。优选地，非天然存在的或改变的核苷酸或核苷酸间连键不会阻碍载体的转录或复制。

20 在实施方案中，本发明的重组表达载体可为任何合适的重组表达载体，并且可用于转化或转染任何合适的宿主细胞。本发明的合适的载体包括设计用于繁殖和扩增或用于表达或这两者的那些载体，如质粒和病毒。载体可选自 pUC 系列(FermentasLife Sciences,Glen Burnie,MD)、pBluescript 系列(Stratagene,LaJolla,CA)、pET 系列(Novagen,Madison,WI)、pGEX 系列
25 (Pharmacia Biotech,Uppsala,Sweden)和 pEX 系列(Clontech,Palo Alto,CA)。也

可使用噬菌体载体, 如 λ GT10、 λ GT11、 λ ZapII(Stratagene)、 λ EMBL4 和 λ NM1149。植物表达载体的实例包括 pBI01、pBI101.2、pBI101.3、pBI121 和 pBIN19(Clontech)。动物表达载体的实例包括 pEUK-C1、pMAM 和 pMAMneo(Clontech)。重组表达载体可以为病毒载体, 如逆转录病毒载体或慢病毒载体。

重组表达载体可包含天然或非天然的启动子, 其可操作地连接至编码 CAR(包括其功能部分和功能变体) 的核苷酸序列或至与编码 CAR 的核苷酸序列互补或杂交的核苷酸序列。启动子的选择, 如强、弱、可诱导的、组织特异的和发育特异的, 在本领域技术人员的能力内。类似地, 核苷酸序列与启动子的组合也在本领域技术人员的普通技术内。启动子可为非病毒启动子或病毒启动子, 如 EF1 α 启动子, 巨细胞病毒(CMV) 启动子、SV40 启动子、RSV 启动子。EF1 α 启动子来源于 EF1 α 启动子来自人类靶向延长因子 1 α (EF1A)基因。在本发明的其中又一个方面, 本发明的重组表达载体中采用 EF1 α 启动子, 其具有例如为 SEQ ID NO: 15 的核苷酸序列。

在本发明的一个方面, 提供了前述本发明的嵌合抗原受体 (CAR) 表达载体, 包含编码所述 CAR 的核酸, 所述 CAR 包含: (a) 抗原结合结构域, 其包括 NKG2D 或其活性片段; (b) 跨膜结构域和 (c) 胞内信号传导结构域。

在本发明的一个方面, 还提供了前述本发明的嵌合抗原受体 (CAR) 和辅助蛋白的表达载体, 其包含编码所述 CAR 的核酸和编码辅助蛋白的核酸, 所述 CAR 包含: (a) 抗原结合结构域, 其包括 NKG2D 或其活性片段; (b) 跨膜结构域和 (c) 胞内信号传导结构域, 以及所述辅助蛋白为 DAP10 或其活性片段。在本发明的其中又一个方面, 本发明的嵌合抗原受体 (CAR) 和辅助蛋白的表达载体可以在不同载体上具有编码所述嵌合抗原受体 (CAR) 或所述辅助蛋白的核酸。优选的, 本发明的嵌合抗原受体 (CAR)

和辅助蛋白的表达载体在同一个载体上具有编码所述嵌合抗原受体 (CAR) 和所述辅助蛋白的核酸。

在本发明的一个方面, 本发明的表达载体中编码所述 CAR 的抗原结合结构域的核苷酸序列包含编码 NKG2D 的活性片段, 例如为 NKG2D 的
5 a.a.82-216片段的核苷酸序列, 例如为 SEQ ID NO: 1所示的核苷酸序列。

在本发明的一个方面, 本发明的表达载体中中编码所述跨膜结构域的核苷酸序列包括编码 CD8 和/ 或 CD28的跨膜结构域, 优选为 CD28的跨膜结构域的核苷酸序列, 例如为 SEQ ID NO: 7的核苷酸序列。

在本发明的一个方面, 本发明的表达载体中中编码所述胞内信号传导
10 结构域的核苷酸序列包括编码 CD28, 4-1BB 和 CD3 ζ 的胞内信号传导结构域中的一个或多个的核苷酸序列, 优选包括编码 CD28, 4-1BB 和 CD3 ζ 的胞内信号传导结构域的核苷酸序列, 更优选包括编码从氨基端到羧基端按顺序为 CD28、4-1BB 和 CD3 ζ 的蛋白质的核酸序列。

其中, 编码 CD28的胞内信号传导结构域的核酸可具有例如 SEQ ID NO:
15 9的核苷酸序列。

其中, 编码4-1BB 的胞内信号传导结构域可具有例如 SEQ ID NO: 11 的核苷酸序列;

其中, 编码 CD3 ζ 的胞内信号传导结构域可具有例如 SEQ ID NO: 13 的核苷酸序列;

20 在本发明的又一个方面, 其中编码所述 CAR 的胞内信号传导结构域的核苷酸序列具有如 SEQ ID NO: 20的核苷酸序列。

在本发明的一个方面, 本发明的表达载体中还包括编码 (a) 抗原结构域和 (b) 跨膜结构域之间的铰链区的核苷酸序列, 优选为编码 IgGH1的核苷酸序列, 其具有例如 SEQ ID NO: 5的核苷酸序列。

25 在本发明的一个方面, 本发明的表达载体中还包括编码位于所述

NKG2D 或其活性片段的上游的前导序列的核苷酸序列，优选为编码 CD33 的前导序列的核苷酸序列，例如为 SEQ ID NO: 17 所示的核苷酸序列。

在本发明的一个方面，本发明的表达载体中还包括编码所述抗原结构域的引导肽的序列的上游的转录子，优选为 Kozak 片段的核苷酸序列，例如为 SEQ ID NO: 16 的核苷酸序列。

在本发明的一个方面，本发明的表达载体中编码所述抗原结构域的引导肽的序列的上游具有启动子，优选为 EF1 α 启动子，例如其序列为 SEQ ID NO: 15 的核苷酸序列。

在本发明的一个方面，本发明的表达载体中编码所述 DAP10 的核酸具有序列为 SEQ ID NO: 3 的核苷酸序列。

在本发明的一个方面，本发明的表达载体中，编码 CAR 和 DAP10 的片段之间还具有 IRES 的核苷酸序列，例如为 SEQ ID NO: 19 的核苷酸序列。

在本发明的其中一个方面，还提供了表达前面描述的嵌合抗原受体 (CAR) 的宿主细胞。在本发明的其中一个方面，还提供了表达前面描述的嵌合抗原受体 (CAR) 和辅助蛋白的组别的宿主细胞。在本发明的其中一个方面，还提供包含前面描述的任何重组表达载体的宿主细胞。

如本文所用，术语“宿主细胞”是指可含有本发明重组表达载体的任何类型的细胞。宿主细胞可为真核细胞，如植物、动物、真菌或藻类，或者可为原核细胞，如细菌或原生动物。宿主细胞可为培养的细胞或原代细胞，即直接分离自生物体，如人。宿主细胞可为粘附细胞或悬浮细胞，即在悬浮液中生长的细胞。合适的宿主细胞为本领域中已知的并且包括，例如 DH5 α 大肠杆菌细胞、中国仓鼠卵巢细胞、猴 VERO 细胞、COS 细胞、HEK293 细胞等。为了扩增或复制重组表达载体的目的，宿主细胞可以为原核细胞，如 DH5 α 细胞。为了产生重组 CAR 的目的，宿主细胞可以为哺乳动物细胞。宿主细胞可以为人类细胞。宿主细胞可为任何细胞类型，可来源于任何

类型的组织并且可为任何发育阶段。例如，宿主细胞可以为外周血淋巴细胞(PBL) 或外周血单核细胞(PBMC)。

在本发明的其中一个方面，宿主细胞为 T 细胞。为了本文的目的，T 细胞可为任何 T 细胞，如培养的 T 细胞，例如原代 T 细胞或来自培养的 T 细胞系的 T 细胞，如 Jurkat、SupT1 等，或从哺乳动物获得的 T 细胞。如果
5 从哺乳动物获得，则 T 细胞可从许多来源获得，包括但不限于血液、骨髓、淋巴结、胸腺或其它组织或液体。T 细胞也可被富集或纯化。T 细胞可以为人 T 细胞。T 细胞可以为分离自人的 T 细胞。T 细胞可为任何类型的 T 细胞并且可为任何发育阶段，包括但不限于 CD4+/CD8+双阳性 T 细胞、
10 CD4+辅助 T 细胞如 Th 1 和 Th 2 细胞、CD8 +T 细胞(如细胞毒性 T 细胞)、肿瘤浸润细胞、记忆 T 细胞、初始 T 细胞等。T 细胞可以为 CD8+T 细胞或 CD4+T 细胞。

在本发明的其中一个方面，宿主细胞是自然杀伤(NK)细胞。术语“NK 细胞”(也被称为自然杀伤细胞)是指起源于骨髓并且在先天免疫系统中起
15 重要作用的一类淋巴细胞。NK 细胞提供针对病毒感染的细胞、肿瘤细胞或其他应激细胞的快速免疫反应，即使是细胞表面上不存在抗体和主要组织相容性复合体。NK 细胞可以是被分离的，也可以从商业上可获得的来源得到。

术语“分离的细胞”通常是指细胞基本上和组织的其他细胞分离。“免疫细胞”包括例如衍生自在骨髓中产生的造血干细胞(HSC)的白血细胞(白细胞)、淋巴细胞(T 细胞、B 细胞、自然杀伤(NK)细胞)和骨髓来源的
20 细胞(嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞)。“T 细胞”包括表达 CD3 的所有类型的免疫细胞，包括 T 辅助细胞(CD4+细胞)、细胞毒性 T 细胞(CD8+细胞)、自然杀伤 T 细胞、
25 T 调节细胞(Treg)和 $\gamma\delta$ T 细胞。“细胞毒性细胞”包括 CD8+ T 细胞、自

然杀伤 (NK) 细胞和嗜中性粒细胞, 这些细胞能够介导细胞毒性反应。

本发明的 CAR 物质可以配制成药物组合物。在这方面, 本发明的实施方案提供包含任何 CAR、功能部分、功能变体、核酸、表达载体、宿主细胞(包括其群体)和抗体(包括其抗原结合部分)以及药学上可接受的载体的药物组合物。含有任何本发明的 CAR 物质的本发明药物组合物可包含多
5 于一种的本发明 CAR 物质, 如 CAR 和核酸, 或两种或更多种不同的 CAR。可选地, 药物组合物可包含与其它药物活性剂或药物如化学治疗剂, 如天冬酰胺酶、白消安、卡铂、顺铂、柔红霉素、阿霉素、氟尿嘧啶、吉西他滨(gemcitabine)、羟基脲、甲氨蝶呤、紫杉醇、利妥昔单抗(rituximab)、长
10 春碱、长春新碱等组合的本发明的 CAR 物质。在优选的实施方案中, 药物组合物包含本发明的宿主细胞或其群体。

关于药物组合物, 药学上可接受的载体可为任何常规使用的那些载体并且仅受限于化学-物理考虑因素, 如溶解性和与活性剂缺乏反应性以及给予途径。本文描述的药学上可接受的载体, 例如媒介物、佐剂、赋形剂和稀
15 释剂, 为本领域技术人员熟知的并且公众容易获得。优选的是对活性剂为化学惰性的药学上可接受的载体和在使用条件下无有害的副作用或毒性的药学上可接受的载体。

用于制备可给予的(如可胃肠外给予的)组合物的方法为已知的或对本领域技术人员为显而易见的, 且更详细地描述于, 例如 Remington:The
20 Science and Practice of Pharmacy,Lippincott Williams&Wilkins ; 第 21 版(2005 年 5 月 1 日)。

用于口服、气雾、胃肠外(如皮下、静脉内、动脉内、肌内、皮内、腹膜内和硬膜内)和外用给予的以下制剂仅为示例性的而非限制。可使用多于
25 一种途径来给予本发明的 CAR 物质, 并且在某些情况下, 特定的途径可提供比另一途径更直接且更有效的应答。

为了本发明方法的目的，其中给予宿主细胞或细胞群体时，所述细胞可为与哺乳动物同种异体或哺乳动物自体的细胞。优选地，所述细胞为哺乳动物自体的。

本文提及的哺乳动物可为任何哺乳动物。如本文所用，术语“哺乳动物”是指任何哺乳动物，包括但不限于啮齿目的哺乳动物，如小鼠和仓鼠，以及兔形目的哺乳动物，如兔子。哺乳动物可以来自食肉目，包括猫科动物(猫)和犬科动物(犬)。哺乳动物可以来自偶蹄目，包括牛科动物(牛)和猪科动物(猪)或奇蹄目，包括马科动物(马)。哺乳动物可以为灵长目、猿目或猴目(猴)或猿猴亚目(人和猿)。优选地，哺乳动物为人。

10 本发明的药物组合物和用于治疗或预防癌症。

本发明还提供了采用前面所述的本发明的嵌合抗原受体(CAR)、或所述嵌合抗原受体(CAR)和辅助蛋白的组合，或所述核酸或是所述表达载体，或所述宿主细胞治疗或预防癌症的方法。本发明还提供了前面所述的本发明的嵌合抗原受体(CAR)、或所述嵌合抗原受体(CAR)和辅助蛋白的组
15 合，或所述核酸或是所述表达载体，或所述宿主细胞在制备用于治疗或预防癌症的药物中的用途。所述癌症可为任何癌症，包括白血病、淋巴瘤、多发性骨髓瘤或实体瘤，例如白血病为急性淋巴细胞性白血病，急性骨髓性白血病，急性早幼粒细胞白血病，急性淋巴细胞性白血病，慢性骨髓性白血病，慢性淋巴细胞性白血病，单核细胞白血病和毛细胞白血病；淋巴
20 瘤为：霍奇金淋巴瘤；非霍奇金淋巴瘤；伯基特淋巴瘤；和小淋巴细胞性淋巴瘤；实体瘤为膀胱癌、尿道、输尿管以及肾盂的尿道上皮细胞癌、多发性骨髓瘤、肾脏癌、乳癌、结肠癌、头颈癌、肺癌、前列腺癌、神经胶质细胞瘤、骨肉瘤、脂肪肉瘤、软组织肉瘤、卵巢癌、黑色素瘤、肝癌、食道癌、胰脏癌和胃癌等。在本发明的其中一个方面，所述癌症为 NKG2D
25 相关癌症。在所述癌症中，NKG2D 受体-NKG2D 配体系统在癌症细

胞中表达和发挥生理生化作用。在这些癌症的细胞上，通常表达 NKG2D 配体，包括 UL16-结合蛋白（UL16-binding protein, ULBP）或 MHC I 型链相关蛋白 A/B（MHC class I-chain-related protein, MICA/B）。

- 5 在本发明的其中一个方面，所述癌症为肝癌。
在本发明的其中一个方面，所述癌症为肺癌。
在本发明的其中一个方面，所述癌症为骨髓瘤。
在本发明的其中一个方面，所述癌症为白血病。

10 附图说明

图 1 在 Raji 细胞株上检测 NKG2D 配体的表达的流式细胞仪分析结果图。

图 2 表达载体构建图。A: pCCL-DRCAR-IRES-DAP10 表达载体； B: pHAGE-DRCAR 表达载体。

15 图 3 表达载体 pCCL-DRCAR-IRES-DAP10 插入片段核苷酸序列和说明示意图。

图 4 表达载体 pHAGE-DRCAR 插入片段核苷酸序列和说明示意图。

20 图 5 质粒共转染 293T 细胞表达 DRCAR 的流式细胞仪分析结果图。最左边为对照（仅加入慢病毒包装质粒，不包括重组质粒）。中间为加入 pHAGE-DRCAR 重组质粒后包装慢病毒感染。右边为加入 pCCL-DRCAR-IRES-DAP10 重组质粒后包装慢病毒感染。

图 6 表达 DRCAR 的慢病毒的滴定。（A）为用不同量表达 DRCAR 的慢病毒的比例的流式细胞仪分析结果。（B）为对应柱状图。（C）根据流式细胞仪分析数据计算慢病毒滴度公式和结果。

25 图 7. DRCAR-T 细胞杀灭癌细胞效果图。图 7 (a) -图 7 (u) 显示对 21 种表达 NKG2D 配体的细胞的效果。图 7 (v) 显示对不表达 NKG2D 配体的

Raji 细胞的效果。用流式细胞仪分析癌细胞的死亡率。

图 8. DRCAR T 细胞在人肝癌移植动物模型体内抑制肿瘤。图 8 (a) 是实验设计图。图 8 (b) 是注射 4×10^6 个的 DRCAR T 细胞的实验组的肝癌移植小鼠的存活结果图。图 8 (c) 是注射 5×10^6 个的 DRCAR T 细胞的实验组的肝癌移植小鼠的存活结果图。

图 9. 在肺癌移植小鼠注射 DRCAR T 细胞的动物存活结果图。

具体实施方式

实施例 1 实验和方法

10 细胞

白细胞层 (buffy coat) 从香港红十字会输血服务组织 (Hong Kong Red Cross Blood Transfusion Service) 获得。通过使用 Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare) 从白细胞层中分离外周血单核细胞 (PBMC)。通过使用 CD3 / CD28 Dynabeads (Thermo) 从 PBMC 分离 T 细胞。将分离自 PBMC 的 T 细胞在由补充有 5% 人血清 (Sigma), 2mM L-谷氨酰胺 (Thermo) 和 50U / ml IL-2 (Peprotech) 的 AIM-V 培养基 (Thermo) 组成的起始培养基或由补充有 5% 人血清, 2mM L-谷氨酰胺和 300U / ml IL-2 的 AIM-V 培养基组成的扩增培养基 (expansion medium)。

所有以下细胞系来自 ATCC、ECACC 或中国科学院细胞库。

20 在补充有 10%FBS (Thermo), 100U/ml 青霉素和 100U/ml 链霉素 (Thermo) 的 DMEM 培养基 (Thermo) 中培养人胚胎肾上皮细胞系-293T (ATCC#CRL-3216)。

在补充有 10%FBS, 100U/ml 青霉素和 100U/ml 链霉素的 IMDM 培养基中培养慢性骨髓性白血病细胞系-K562 (ATCC#CCL-243)。

25 在补充有 10%FBS, 100U/ml 青霉素和 100U/ml 链霉素的 RPMI1640 培

培养基 (Thermo) 中培养急性淋巴细胞白血病细胞系 -MOLT-4 (ATCC#CRL-1582), 非霍奇金淋巴瘤细胞系 -KARPAS299 (ECACC# 06072604), 骨髓瘤细胞系 -RPMI8226 (ATCC#CRM-CCL-155)、NCI-H929 (ATCC#CRL-9608) 和 U266B1 (ATCC#TIB-196), 急性 T 细胞白血病细胞系 -Jurkat (ATCC#TIB-152), 胃癌细胞系 -HGC27 (ECACC# 94042256), 肺癌细胞系 -NCI-H522 (ATCC#CRL-5810), 乳腺癌细胞系 -MDA-MB-435S (ATCC#HTB-129) 和 MDA-MB-231 (ATCC#HTB-26), 膀胱癌细胞系 -5637 (ATCC#HTB-9), 肝癌细胞系 -QGY7703、SMMC7721 和 BEL7402。

在补充有 10%FBS, 100U/ml 青霉素和 100U/ml 链霉素的 MEM 培养基 (Thermo) 中培养宫颈癌细胞系 -Hela (ATCC#CCL-2), 神经母细胞瘤细胞系 -SK-N-SH (ATCC#HTB-11)。

在补充有 10%FBS, 100U/ml 青霉素和 100U/ml 链霉素的 F12 培养基 (Thermo) 中培养肺癌细胞系 -A549 (ATCC#CCL-185), 前列腺癌细胞系 -PC3 (ATCC#CRL-1435)。

在无血清 ACL-4 培养基 (Thermo) 中培养肺癌细胞系 -NCI-H1155 (ATCC#CRL-5818) 和腺癌细胞系 -NCI-H1355 (ATCC#CRL-5865)。

逆转录病毒质粒构建

慢病毒包装, 浓缩和纯化

通过磷酸钙转染法将第三代慢病毒质粒 pMDLg / pRRE, pMD2.G, pRSV-Rev 和构建的表达载体以 2: 1: 1: 4 的比例将质粒共转染 293T 细胞产生慢病毒。将新收集或解冻的含有慢病毒的上清液以 300g 离心 3 分钟以排除上清液中的细胞碎片。将上清液通过连接至 30-ml 注射器 (TERUMO) 的 0.45- μ m 微型注射器过滤器过滤。将上清液在 20000g, 4 $^{\circ}$ C 下离心 90 分钟。超速离心后, 除去上清液。将 1/10 起始慢病毒体积的 AIM-V 培养基加入离心管中重新悬浮沉淀。通过移液将慢病毒悬浮液混合。

将浓缩的慢病毒分装并储存在-80°C冰箱中。

慢病毒滴度测定

在补充有 10%FBS, 100U / ml 青霉素和 100U/ ml 链霉素的 1ml RPMI1640 培养基中, 将 1×10^5 个 Jurkat 细胞接种到 12 孔板的每个孔中。过夜培养后, 将不同量的 (5 μ l 至 100 μ l) 浓缩的慢病毒分别加入孔中。样品重复三次以提高准确性。加入聚凝胺 (Sigma) 至每个孔中 6ug/ul 的终浓度。24 小时后, 通过离心收集细胞并重悬于 1ml 补充有 10%FBS, 100U / ml 青霉素和 100U / ml 链霉素的新鲜 RPMI1640 培养基中。另外 48 小时后, 收集细胞并通过流式细胞术测定表达 CAR 的 Jurkat 细胞的百分比。慢病毒滴度按下式计算。

$$\text{慢病毒滴度(TU/ml)} = \frac{\text{细胞个数} \times \text{阳性报告子细胞}\% \times \text{稀释因子}}{\text{载体体积(ml)} \times 100}$$

T 细胞分离, 转导和培养

通过使用包被有 CD3 和 CD28 抗体的 Dynabeads, 以 3: 1 的磁珠与细胞比率用于分离 1×10^7 个 PBMC 的 CD³⁺ 细胞。将细胞和磁珠混合物在摇床上在室温下孵育 1 小时。用磁铁进行 CD³⁺ 细胞富集, 并以 1×10^6 个细胞/ ml 重新悬浮在起始培养基中。24 小时后, 通过离心 (300xg, 3 分钟) 收集细胞。丢弃上清液。将 500 μ l AIM-V 培养基中 5×10^8 TU 慢病毒加入细胞并以 2000 \times g 离心 2 小时。将细胞重悬于慢病毒培养物中并加入 1.5ml 起始培养基。将细胞放回 6 孔板并置于培养箱 (37 度, 5%CO₂) 中。24 小时后, 再次进行转导。另外 24 小时后, 通过离心 (300xg, 3 分钟) 收集细胞并重悬于 2ml 扩增培养基中。将细胞放回 6 孔板并置于培养箱 (37 度, 5%CO₂) 中。72 小时后, 将细胞转移至 100-cm 培养皿并以 4×10^5 个细胞/ ml 的浓度重新悬浮于扩增培养基中。转导率可以通过使用流式细胞仪来确定, 并且当 T 细胞足够时可以进行细胞毒性测定。

蛋白表达和流式细胞术分析

为了检测细胞表面上的 CAR 表达 (T 细胞和 Jurkat 细胞), 将 1×10^6 个细胞重悬于 1ml PBS 缓冲液中并用生物素山羊抗人 IgG(H+L) (Jason Lab) 染色, 随后用链霉亲和素-Apc (eBioscience)。

细胞毒性分析

通过离心收集靶细胞并以 1×10^6 个细胞/ ml 的浓度重悬于 PBS 中。将 5ml 细胞用 2.5ul Oregon Green 488 (Thermo) 在 37 度下染色 20 分钟。加入 20ml 培养基以吸收过量的染料。将靶细胞以 4×10^5 个细胞/ ml 的浓度重新悬浮于培养基中。

通过离心收集 T 细胞并用靶细胞所需的培养基重新悬浮, 浓度为 1.6×10^7 个细胞/ ml。

将 T 细胞和靶细胞以 5, 10, 20 和 40 的比率混合。

E:T 比例 ^[注]	40:1	20:1	10:1	5:1	0:1
靶细胞	500 μ L	500 μ L	500 μ L	500 μ L	500 μ L
T 细胞	500 μ L	250 μ L	125 μ L	62.5 μ L	0 μ L
靶细胞培养基	0 μ L	250 μ L	375 μ L	437.5 μ L	500 μ L

[注: E:T 比例即效应细胞 (T 细胞) 与靶细胞的比例。]

将细胞在培养箱中相应地孵育 5~8 小时。通过离心收集细胞并重悬于 500 μ l 7-AAD 溶液 (1 μ g/ml) 中。细胞在冰上孵育 30 分钟。用流式细胞仪分析死亡率 (7-AAD: 激发波长 561nm, 发射波长 670nm)。

20 实施例 2 NKG2D 配体在各种癌症细胞株上的表达

在不同癌症细胞株上检测 NKG2D 配体 (人 MICA/B 和人 ULBP1-ULBP6) 的表达, 以判断以 NKG2D 作为抗原结构域的 CAR 是否

可用于杀伤这些细胞株。

为了检测人 MICA/B, 将 1×10^6 个待测细胞重悬于 0.5ml PBS 缓冲液中, 并用单克隆小鼠抗人 MICA/B (R&D Cat#MAB13001), 然后用生物素山羊抗小鼠 IgG(H+L)和链霉亲和素-APC 染色。

5 为了检测人 ULBP2/5/6, 将 1×10^6 个待测细胞重悬于 0.5ml PBS 缓冲液中, 并用单克隆小鼠抗人 ULBP2/5/6 (R&D Cat#MAB1298), 然后用生物素山羊抗小鼠 IgG(H+L)和链霉亲和素-APC 染色。

为了检测人 ULBP1, 将 1×10^6 个待测细胞重悬于 0.5ml PBS 缓冲液中, 并用单克隆小鼠抗人 ULBP1 (R&D Cat#MAB1380), 然后用生物素山羊抗
10 小鼠 IgG(H+L)和链霉亲和素-APC 染色。

为了检测人 ULBP3, 将 1×10^6 个待测细胞重悬于 0.5ml PBS 缓冲液中, 并用单克隆小鼠抗人 ULBP3 (R&D Cat#MAB1517), 然后用生物素山羊抗小鼠 IgG(H+L)和链霉亲和素-APC 染色。

为了检测人 ULBP4, 将 1×10^6 个待测细胞重悬于 0.5ml PBS 缓冲液中, 并用单克隆小鼠抗人 ULBP4 (R&D Cat#AF6285), 然后用生物素牛抗山羊
15 IgG(H+L)和链霉亲和素-APC 染色。

对以下 21 种癌细胞株进行检测 NKG2D 配体 (人 MICA/B 和人 ULBP1-ULBP6) 的表达的检测:

慢性骨髓性白血病细胞系-K562 (ATCC#CCL-243), 急性淋巴细胞白血病细胞系-MOLT-4(ATCC#CRL-1582), 非霍奇金淋巴瘤细胞系-KARPAS299 (ECACC# 06072604), 骨髓瘤细胞系-RPMI8226 (ATCC#CRM-CCL-155)、
20 NCI-H929 (ATCC#CRL-9608) 和 U266B1 (ATCC#TIB-196), 急性 T 细胞白血病细胞系-Jurkat (ATCC#TIB-152), 胃癌细胞系-HGC27 (ECACC# 94042256), 肺癌细胞系-NCI-H522 (ATCC#CRL-5810), 乳腺癌细胞系
25 -MDA-MB-435S (ATCC#HTB-129) 和 MDA-MB-231 (ATCC#HTB-26), 膀

膀胱癌细胞系-5637 (ATCC#HTB-9), 肝癌细胞系-QGY7703、SMMC7721 和 BEL7402, 宫颈癌细胞系-Hela (ATCC#CCL-2), 神经母细胞瘤细胞系-SK-N-SH (ATCC#HTB-11), 肺癌细胞系-A549 (ATCC#CCL-185), 前列腺癌细胞系-PC3 (ATCC#CRL-1435), 肺癌细胞系-NCI-H1155 (ATCC#CRL-5818) 和腺癌细胞系-NCI-H1355 (ATCC#CRL-5865)。

实验结果证明, 在上述 21 种癌症细胞株中, 表达了 NKG2D 配体 (人 MICA/B 或人 ULBP1-ULBP6)。将上述 21 种癌症细胞株在下面的 CAR T 细胞杀伤实验作为靶细胞进行测试。

另外, 如图 1 所示, Raji 细胞不表达 NKG2D 配体 (人 MICA/B 和人 ULBP1-ULBP6)。Raji 细胞在 CAR T 细胞杀伤实验中作为阴性对照。

实施例 3 表达 DRCAR 的慢病毒载体的构建

1. 构建 pCCL-DRCAR-IRES-DAP10

pCCL-DRCAR-IRES-DAP10 具有如图 2A 所示的结构。pCCL-DRCAR-IRES-DAP10 的构建通过以下方法。

合成核苷酸序列如图 3 所示的编码 DRCAR 和 DAP10 的核酸插入片段。该插入片段从 5'端到 3'端包括: 1. HpaI 酶切位点; 2. EF1 α 启动子; 3. Kozak; 4. CD33 前导序列; 5. NKG2D 的 a.a.82-216 片段; 6. 作为铰链区的 IgG1H; 7. CD28 跨膜结构域; 8. CD28 的胞内信号传导结构域; 9. 4-1BB 胞内信号传导结构域; 10. CD3 ζ 的胞内信号传导结构域; 11. 连接片段; 12. IRES; 13. 连接片段; 14. DAP10; 15. Sal I 酶切位点。

将上述插入片段与质粒 Pax5 (Addgene, plasmid#35003) 用限制性内切酶 HpaI 和 Sal I 进行双酶切, 酶切产物切胶回收后, 用 T4 连接酶 16 $^{\circ}$ C 过夜连接。连接后转化大肠杆菌感受态, 涂布平板, 次日挑取单克隆进行双酶切及测序鉴定, 得到 pCCL-DRCAR-IRES-DAP10。

25

2. 构建 pHAGE-DRCAR

pHAGE-DRCAR 具有如图 2B 所示的结构。pHAGE-DRCAR 的构建通过以下方法。

合成核苷酸序列如图 4 所示的编码 DRCAR 的核酸插入片段。该插入片
5 段从 5'端到 3'端包括：1. HpaI 酶切位点；2. EF1 α 启动子；3. Kozak； 4. CD33
前导序列；5. NKG2D 的 a.a.82-216 片段；6. 作为铰链区的 IgG1H；7. CD28
跨膜结构域； 8. CD28 的胞内信号传导结构域；9. 4-1BB 胞内信号传导结构
域；10. CD3 ζ 的胞内信号传导结构域； 11. Sal I 酶切位点。

将上述插入片段与质粒 Pax5 用限制性内切酶 HpaI 和 Sal I 进行双酶切，
10 酶切产物切胶回收后，用 T4 连接酶 16 $^{\circ}$ C 过夜连接。连接后转化大肠杆菌感
受态，涂布平板，次日挑取单克隆进行双酶切及测序鉴定，得到
pHAGE-DRCAR。

3. 产生慢病毒载体

15 分别以 pHAGE-DRCAR 和 pCCL-DRCAR-IRES-DAP10 作为表达质粒，
与第三代慢病毒质粒 pMDLg / pRRE, pMD2.G, pRSV-Rev, 共转染 293T
细胞制备得到对应的慢病毒载体。

根据实施例 1 记载方法计算慢病毒表达 DRCAR 的能力。图 5 是质粒共
转染 293T 细胞表达 DRCAR 的流式细胞仪分析结果图。结果显示，与
20 pHAGE-DRCAR 相比，含有 pCCL-DRCAR-IRES-DAP10 的慢病毒的
DRCAR 表达水平明显较高。

根据实施例 1 记载方法计算含 pCCL-DRCAR-IRES-DAP10 的慢病毒的
滴度。图 6 显示 pCCL-DRCAR-IRES-DAP10 包装慢病毒的滴度为约
2 $\times 10^7$ TU/ml。与 pHAGE-DRCAR 相比，含有 pCCL-DRCAR-IRES-DAP10
25 的慢病毒，慢病毒效价较高。

实施例 4 DRCAR-T 细胞体外杀伤癌细胞

根据实施例 1 记载的方法, 从人的 PBMC 中提取和获得 T 细胞。然后用实施例 3 制备得到的含有 pCCL-DRCAR-IRES-DAP10 的慢病毒转染 T 细胞。

5 根据实施例 1 记载的方法进行细胞毒性测定, 检查表达 DRCAR 的 T 细胞对各种肿瘤细胞的特异性细胞毒性作用。其中, 分别以含有 pCCL-DRCAR-IRES-DAP10 的 T 细胞和未用慢病毒转染的 T 细胞作为效应细胞, 以 21 种癌细胞作为靶细胞。

使用不表达 NKG2D 配体的 Raji 细胞株作为阴性对照。

10 结果如图 7 (a) -图 7 (u) 所示, 在相同实验条件下, 与不含有 DRCAR 的正常 T 细胞相比, 表达 DRCAR 的 T 细胞能够诱导显著更多的靶肿瘤细胞死亡。所述肿瘤细胞包括:

慢性骨髓性白血病细胞系-K562 (ATCC#CCL-243), 急性淋巴细胞白血病细胞系-MOLT-4 (ATCC#CRL-1582), 非霍奇金淋巴瘤细胞系-KARPAS299
15 (ECACC# 06072604), 骨髓瘤细胞系-RPMI8226 (ATCC#CRM-CCL-155)、NCI-H929 (ATCC#CRL-9608) 和 U266B1 (ATCC#TIB-196), 急性 T 细胞白血病细胞系-Jurkat (ATCC#TIB-152), 胃癌细胞系-HGC27 (ECACC# 94042256), 肺癌细胞系-NCI-H522 (ATCC#CRL-5810), 乳腺癌细胞系-MDA-MB-435S (ATCC#HTB-129) 和 MDA-MB-231 (ATCC#HTB-26), 膀
20 胱癌细胞系-5637 (ATCC#HTB-9), 肝癌细胞系-QGY7703、SMMC7721 和 BEL7402, 宫颈癌细胞系-Hela (ATCC#CCL-2), 神经母细胞瘤细胞系-SK-N-SH (ATCC#HTB-11), 肺癌细胞系-A549 (ATCC#CCL-185), 前列腺癌细胞系-PC3 (ATCC#CRL-1435), 肺癌细胞系-NCI-H1155 (ATCC#CRL-5818) 和腺癌细胞系-NCI-H1355 (ATCC#CRL-5865)。

25 如图 7(v)所示, 在不表达 NKG2D 配体的 Raji 细胞株的阴性对照中,

DRCAR-T 细胞没有表现出比对照的天然 T 细胞有所区别。

实施例 5 DRCAR T 细胞在人肝癌移植动物模型体内抑制肿瘤

图 8 (a) 是实验设计图。

5 实验小鼠 (NSG 小鼠, 6-8 周龄, 香港科技大学动物房提供) 共 20 只, 分为 DRCAR T 细胞治疗组 (随机选择 12 只) 和对照组 (8 只)。所有小鼠在实验第 0 天注射肝癌细胞 SMMC7721 (1×10^6 个), 各组在实验第 2 周、第 5 周和第 7 周分三次注射同样个数的 DRCAR T 细胞 (治疗组) 或 T 细胞 (对照组)。每天观察小鼠肿瘤生长情况和生存情况, 并记录数
10 据。实验终点的小鼠特征为死亡, 或体重减轻 20% 或以上, 眼睛凹陷或眼睑闭合, 反应迟钝或离群。

实验一:

在实验第 2 周、第 5 周和第 7 周分三次注射 4×10^6 个的 DRCAR T 细胞 (治疗组) 或 T 细胞 (空白组)

15 实验结果如图 8 (b) 所示。

实验二:

在实验第 2 周、第 5 周和第 7 周分三次注射 5×10^6 个的 DRCAR T 细胞 (治疗组) 或 T 细胞 (空白组)

实验结果如图 8 (c) 所示。

20 从实验结果得出, 和对照组比较, 本发明的 DRCAR T 细胞能够比不含有 DRCAR 的天然 T 细胞更有效地保护患癌动物的存活。

实施例 6 DRCAR T 细胞在人肺癌移植动物模型体内抑制肿瘤

根据和实施例 7 类似的实验安排, 实验小鼠实验小鼠 (NSG 小鼠, 25 6-8 周龄, 北京大学免疫系动物饲养室提供) 共 24 只, 分为 DRCAR T 细胞治疗组 (随机选择 16 只, 分为治疗组 1 和治疗组 2) 和对照组 (8 只)。所有小鼠在实验第 0 天注射肺癌细胞系 A549 细胞 (1×10^6 个), 各组在实验第 2 周 (14 天)、第 4 周 (第 28 天) 和第 6 周 (第 42 天) 分三

次注射 DRCAR T 细胞（治疗组）或 T 细胞（对照组）。每天观察小鼠肿瘤生长情况和生存情况，并记录数据。

治疗组 1：在实验第 2 周、第 4 周和第 6 周分三次注射 2.5×10^6 个的 DRCAR T 细胞

5 治疗组 2：在实验第 2 周、第 4 周和第 6 周分三次注射 5×10^6 个的 DRCAR T 细胞

对照组：在实验第 2 周、第 4 周和第 6 周分三次注射 5×10^6 个 T 细胞

实验结果如图 9 所示。

10 从实验结果得出，和对照组比较，本发明的 DRCAR T 细胞能够比不含有 DRCAR 的天然 T 细胞更有效地保护患癌动物的存活。

以上各实验结果表明，本发明提供的具有 NKG2D 抗原受体结构的 DRCAR 和 DRCAR-T 细胞，能够有效地识别具有 NKG2D 配体的癌症细胞，并激活肿瘤细胞特异性的抗肿瘤细胞免疫应答和杀伤相关肿瘤细胞。实验还证明，本发明提供的 DRCAR 和 DRCAR-T 细胞能够广谱地杀伤各种癌症细胞，并在动物体内证明了其抑制各种癌症的效果。

上面是对本发明进行的说明，不能将其看成是对本发明进行的限制。除非另外指出，本发明的实践将使用有机化学、聚合物化学、生物技术等的常规技术，显然除在上述说明和实施例中所特别描述之外，还可以别的方式实现本发明。其它在本发明范围内的方面与改进将对本发明所属领域的技术人员显而易见。根据本发明的教导，许多改变和变化是可行的，因此其在本发明的范围之内。以下

25 如无特别表示，本文中出现的温度的单位“度”是指摄氏度，即 $^{\circ}\text{C}$ 。
以下文献以全文引入方式在本申请进行参考。

权 利 要 求 书

1. 分离的核酸，其包括编码嵌合抗原受体（CAR）的核苷酸序列，所述 CAR 包含：(a) 抗原结合结构域，其包括 NKG2D 的 a.a.82-216 片段；(b) 跨膜结构域和 (c) 胞内信号传导结构域。
2. 权利要求1的核酸，其中编码所述跨膜结构域的核苷酸序列包括编码 CD8 和/或 CD28 的跨膜结构域。
3. 权利要求1的核酸，其中编码所述胞内信号传导结构域的核苷酸序列包括编码 CD28，4-1BB 和 CD3 ζ 的胞内信号传导结构域的核苷酸序列。
4. 权利要求3的核酸，其中编码所述胞内信号传导结构域的核苷酸序列编码从氨基端到羧基端按顺序为 CD28、4-1BB 和 CD3 ζ 的蛋白质的核酸序列。
5. 权利要求1的核酸，其中还包括编码 (a) 抗原结构域和 (b) 跨膜结构域之间的铰链区的核苷酸序列。
6. 权利要求1的核酸，其中还包括编码位于所述 NKG2D 片段的上游的前导序列的核苷酸序列。
7. 权利要求1的核酸，其中还包括编码 DAP10 或其活性片段的核苷酸序列。
8. 权利要求7的表达载体，其中编码 CAR 和 DAP10 的片段之间具有 IRES 的核苷酸序列。
9. 嵌合抗原受体（CAR）表达载体，其包含编码根据权利要求1中任一项的 CAR 的核酸，所述 CAR 包含：(a) 抗原结合结构域，其包括 a.a.82-216 片段；(b) 跨膜结构域和 (c) 胞内信号传导结构域。
10. 权利要求9的表达载体，其中还包括编码 DAP10 的核酸。
11. 权利要求9的表达载体，其中包括编码位于所述 NKG2D 片段的上游的前导序列的核苷酸序列，所述前导序列的上游具有转录子。

12. 权利要求9的表达载体，其中编码所述抗原结构域的上游具有启动子。

13. 权利要求9的表达载体，其为病毒载体。

14. 宿主细胞，其包含权利要求1的核酸或是权利要求9的表达载体。

5 15. 权利要求14的宿主细胞，其为T细胞。

16. 权利要求14的宿主细胞，其由分离自受试者的T细胞衍生。

17. 药物组合物，其含有权利要求1的核酸，或权利要求9的表达载体，或含有权利要求14的宿主细胞。

18. 权利要求17的药物组合物，其用于治疗或预防癌症。

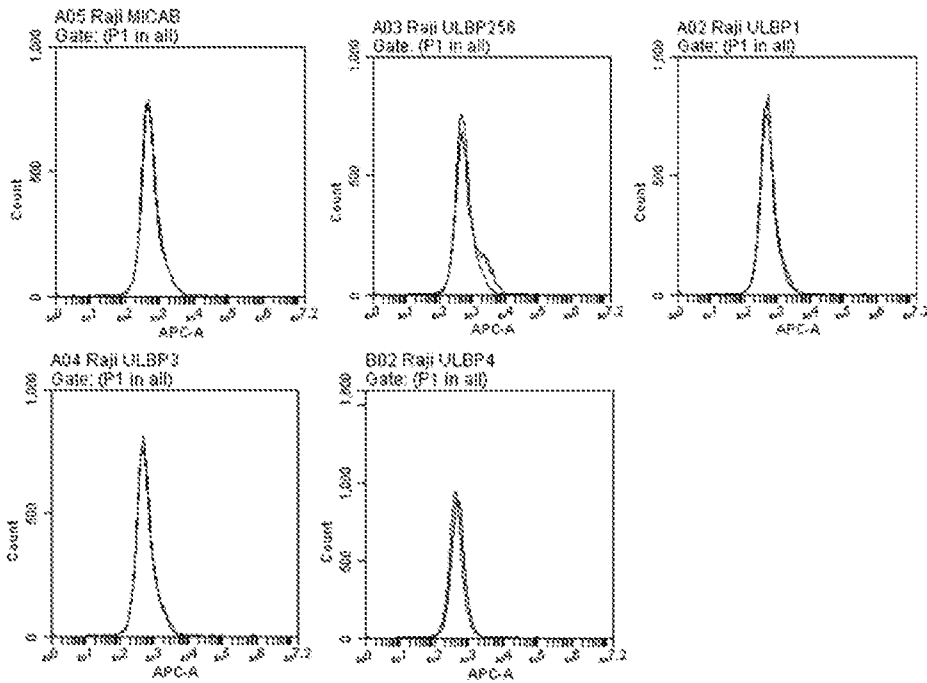
10 19. 权利要求18的药物组合物，其中所述癌症为白血病、淋巴瘤、多发性骨髓瘤或实体瘤，例如白血病为急性淋巴细胞性白血病，急性骨髓性白血病，急性早幼粒细胞白血病，急性淋巴细胞性白血病，慢性骨髓性白血病，慢性淋巴细胞性白血病，单核细胞白血病和毛细胞白血病；淋巴瘤为：霍奇金淋巴瘤；非霍奇金淋巴瘤；伯基特淋巴瘤；和小淋巴细胞性淋巴瘤；实体
15 瘤为膀胱癌、尿道、输尿管以及肾盂的尿道上皮细胞癌、多发性骨髓瘤、肾脏癌、乳癌、结肠癌、头颈癌、肺癌、前列腺癌、神经胶母细胞瘤、骨肉瘤、脂肪肉瘤、软组织肉瘤、卵巢癌、黑色素瘤、肝癌、食道癌、胰脏癌和胃癌。

20. 权利要求19的药物组合物，其中所述癌症为肝癌。

21. 权利要求19的药物组合物，其中所述癌症为肺癌。

20 22. 权利要求1的核酸，或权利要求9的表达载体，或含有权利要求14的宿主细胞在用于制备治疗或预防癌症的药物中的用途。

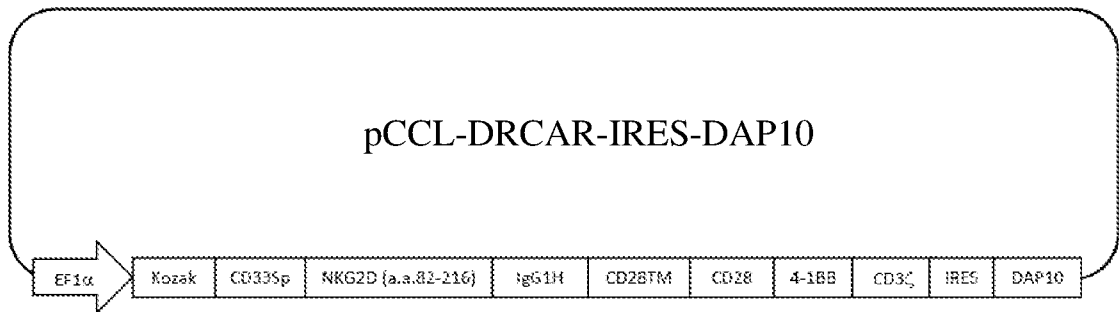
23. 权利要求1的核酸，或权利要求9的表达载体，或含有权利要求14的宿主细胞用于治疗或预防癌症的方法。



5

图 1

A



10

B

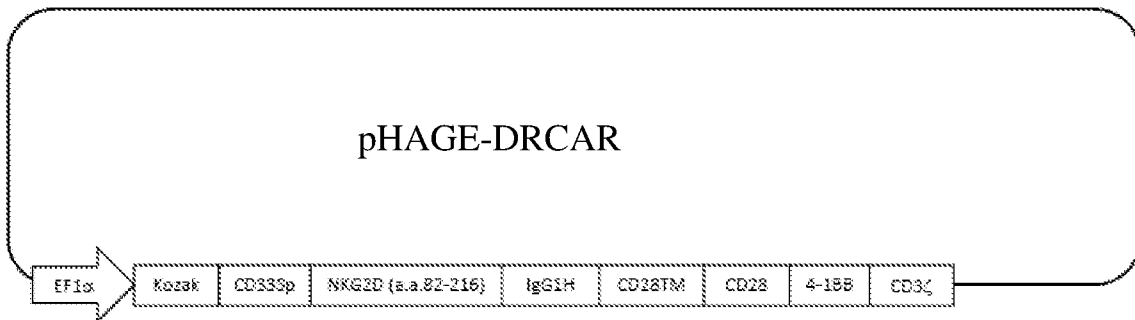


图 2

15

GTTAACGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAACGGGTGCCT
 AGAGAAGGTGGCGCGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGACTGGCTCCGCCTTTTCCCGAGGGTGGGGGA
 GAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTCGCAACGGGTTTCCGCCAGAACACAGGAAGGAGA
 GGCCACCATGATGCCGCTGCTGCTACTGCTGCCCTGCTGTGGGCAGGGGGCCCTGGCTATGTTATTCAACCAAGAAGTTC
 5 AAATTCCTTGACCGAAAGTTACTGTGGCCATGTCTAAAAACTGGATATGTTACAAAAATAACTGCTACCAATTTTTTGATGAG
 AGTAAAACTGGTATGAGAGCCAGGCTTCTTGTATGTCTCAAAATGCCAGCCTTCTGAAAGTATACAGCAAAGAGGACCAGGATTT
 ACTTAACTGGTGAAGTCATATCATTGGATGGGACTAGTACACATTCCAACAAATGGATCTTGGCAGTGGGAAGATGGCTCCATTC
 TCTCACCCAACTACTAACAATAATTGAAATGCAGAAGGGAGACTGTGCACCTATGCCTCGAGCTTTAAAGGCTATATAGAAAAC
 TGTTCACTCCAATACATACATCTGCATGCAAAGGACTGTGCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCCTGGCC
 10 CAGCACCTGAACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGG
 ACCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGAC
 GCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCCTGTGGTCAGCGT
 CCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCC
 CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGG
 15 ATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG
 GGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCCT
 TACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCT
 CTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAATACTACATCTGGCGGCCCTGGCCGGGACTTG
 TGGGGTCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTTACTGCTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACA
 20 TGAACATGACTCCCCGCGCCCCGGGCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCC
 TATCGCTCCAAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAAACTACTCAAGAGGAAGA
 TGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGAGCCCCC
 CGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGA
 CAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAAT
 25 GAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGG
 GGCACGATGGCCTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTACATGCAGGCCCTGCC
 CCCTCGCTAAATCGGATCCCTCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGAATAAGGCCGGTGTGCGTTG
 TCTATATGTTATTTCCACCATATTGCCGTCTTTGGCAATGTGAGGGCCCGGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGA
 GCATTCTAGGGGTCTTTCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCCTCT
 30 GGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTCTGTAGCGACCCTTTCAGGCGAGCGGAACCCCCACCTGGCGACAGGTG
 CCTCTGCGGCCAAAGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAGGCGGCACAACCCCAAGTCCACGTTGTGAGTTG
 GATAGTTGTGAAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGATGCCAGAAGGTACC
 CCATTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTGCACATGCTTACATGTGTTAGTCCGAGGTTAAAAAACGTCTA
 GGCCCCCGAACCACGGGGACGTGGTTTTCTTTGAAAAACACGATGATAATATGGCCACACATCTCGAGATGATCC
 35 ATCTGGGTACATCCTTCTCTGCTTTTGTCTCCAGTGGCTGCAGCTCAGACGACTCCAGGAGAGAGATCATCACTC
 CCTGCCTTTACCCTGGCACTTCAAGGCTTGTTCGGATGTGGGTCCCTCTCTGCCGCTCCTGGCAGGCCTCGTG
 GCTGCTGATGCGGTGGCATCGCTGCTCATCGTGGGGCGGTGTTCTGTGCGCACGCCACGCCGAGCCCCGCC
 AAGAAGATGGCAAAGTCTACATCAACATGCCAGGCAGGGGCTGAGTCGAC

40 说明：以两种字体（分别为正常字体或**粗体+下划线**）为区分标记，将插入片段中各部分进行间隔
 和标示。从 5'端到 3'端（图中从左到右）的各部分分别为：1. 酶切位点或连接片段；2. EF1α启动子；
 3. Kozak；4. CD33 前导序列；5. NKG2D (a.a.82-216)；6. IgG1H；7. CD28 跨膜结构域；8. CD28 的胞
 内信号传导结构域；9. 4-1BB 胞内信号传导结构域；10. CD3ζ 的胞内信号传导结构域；11. 酶切位
 点或连接片段；12. IRES；13. 酶切位点或连接片段；14. DAP10；15. 酶切位点序列。

45

图 3

GTTAACGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAACGGGTGCCT
 AGAGAAGGTGGCGCGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGA
 GAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTCGCAACGGGTTTCCGCCAGAACACAGGAAGGAGA
 GGCCACCATGATGCCGCTGCTGCTACTGCTGCCCTGCTGTGGGCAGGGGGCCCTGGCTATGTTATTCAACCAAGAAGTTC
 5 AAATTCCTTGACCGAAAGTTACTGTGGCCATGTCTAAAACTGGATATGTTACAAAAATAACTGCTACCAATTTTTTGTATGAG
 AGTAAAACTGGTATGAGAGCCAGGCTTCTTGTATGTCTCAAAATGCCAGCCTTCTGAAAGTATACAGCAAAGAGGACCAGGATTT
 ACTTAACTGGTGAAGTCATATCATTGGATGGGACTAGTACACATTCCAACAAATGGATCTTGGCAGTGGGAAGATGGCTCCATTC
 TCTCACCCAACTACTAACAATAATTGAAATGCAGAAGGGAGACTGTGCACCTATGCCTCGAGCTTTAAAGGCTATATAGAAAAC
 TGTTCACTCCAATACATACATCTGCATGCAAAGGACTGTGCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCCTGTC
 10 CAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGG
 ACCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGAC
 GCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCCTGTGGTCAGCGT
 CCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCC
 CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCAGG
 15 ATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG
 GGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTC
 TACAGCAAGCTCACCGTGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCT
 CTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAATACTACATCTGGGCGCCCTGGCCGGGACTTG
 TGGGTCTTCTCTGTCACTGGTTATCACCCCTTACTGCGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACA
 20 TGAACATGACTCCCCGCGCCCCGGGCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCC
 TATCGCTCCAAACGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATCAAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAAACTACTCAAGAGGAAGA
 TGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAAGTGAAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGAGCCCCC
 CGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGA
 CAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCTCAGGAAGGCCTGTACAAT
 25 GAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGG
 GGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTACATGCAGGCCCTGCC
 CCCTCGCTAAGTCGAC

说明：以两种字体（分别为正常字体或**粗体+下划线**）为区分标记，将插入片段中各部分进行间隔
 和标示。从 5'端到 3'端（图中从左到右）的各部分分别为：1. 酶切位点或连接片段；2. EF1 α 启动子；
 3. Kozak；4. CD33 前导序列；5. NKG2D (a.a.82-216)；6. IgG1H；7. CD28 跨膜结构域；8. CD28 的胞
 30 内信号传导结构域；9. 4-1BB 胞内信号传导结构域；10. CD3 ζ 的胞内信号传导结构域；11. 酶切位点
 或连接片段。

图 4

35

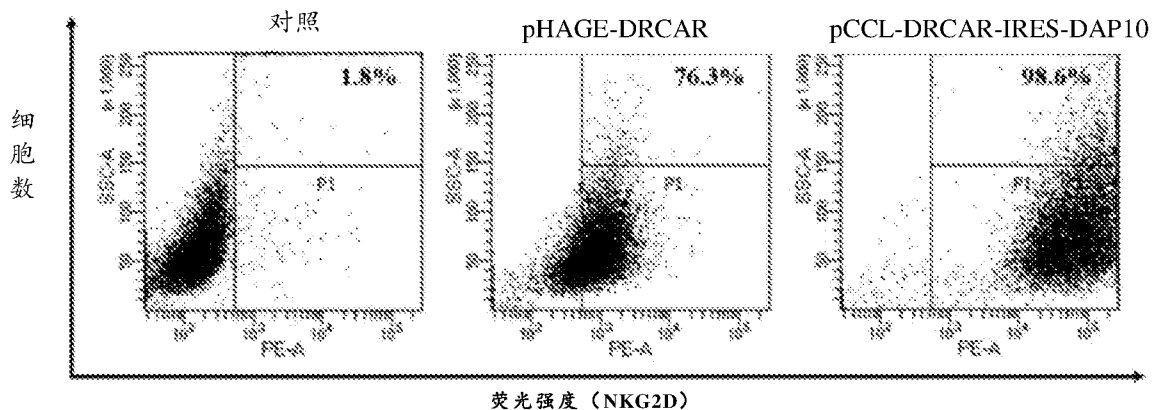
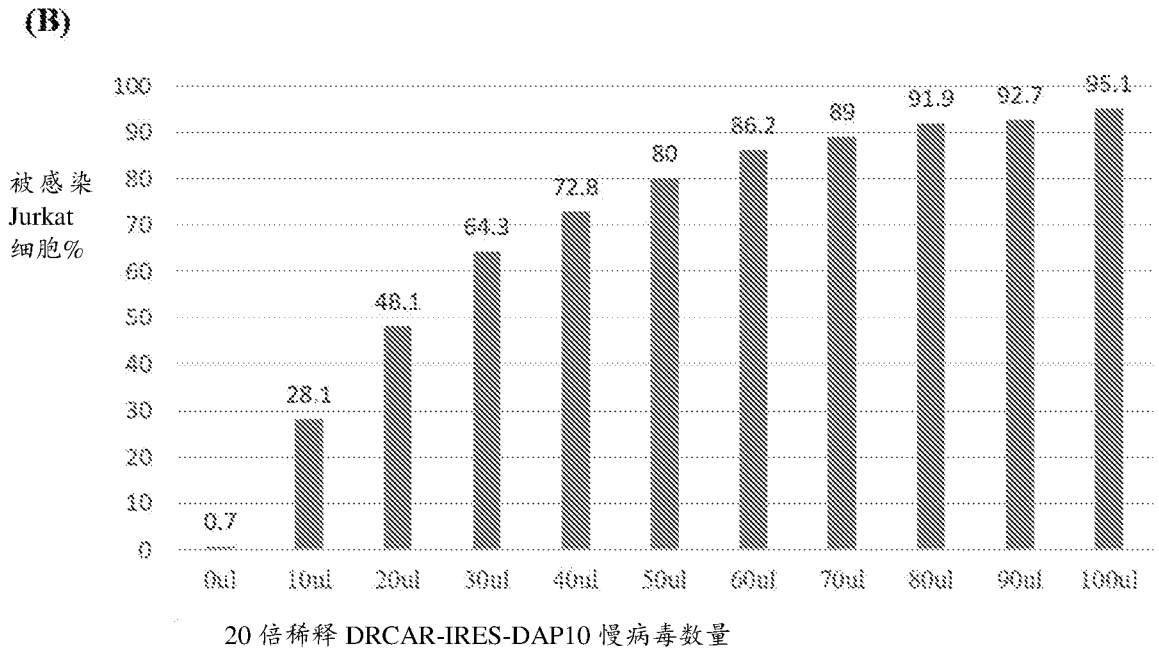
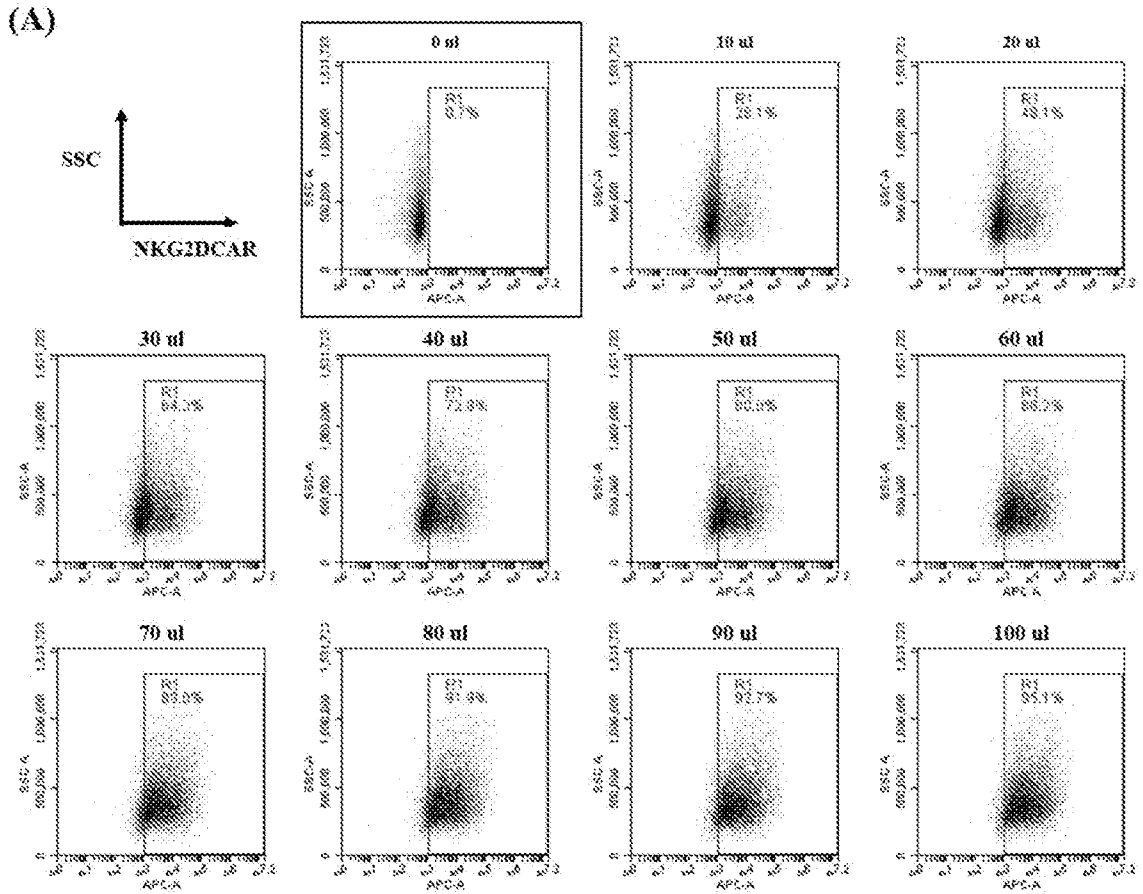


图 5

40

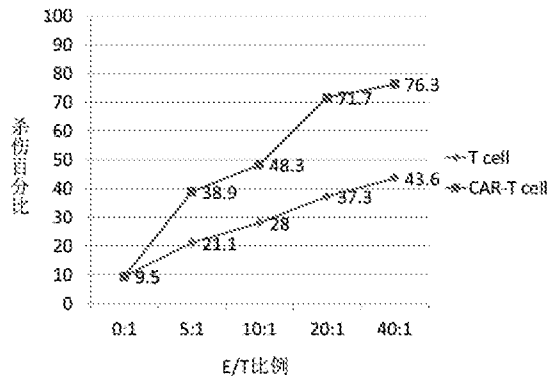


(C)

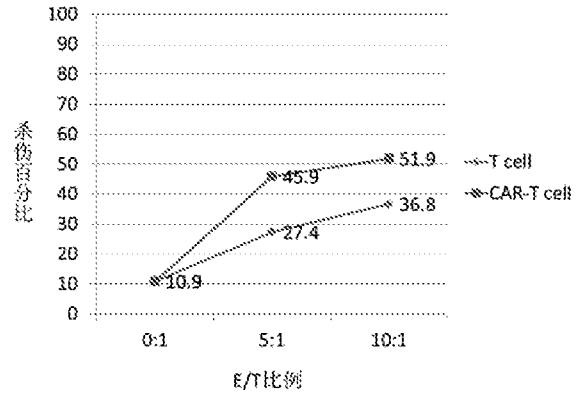
$$\text{慢病毒滴度(TU/ml)} = \frac{\text{细胞个数} \times \text{阳性报告子细胞}\% \times \text{稀释因子}}{\text{载体体积(ml)} \times 100} = 2 \times 10^7 \text{ TU/ml}$$

图 6

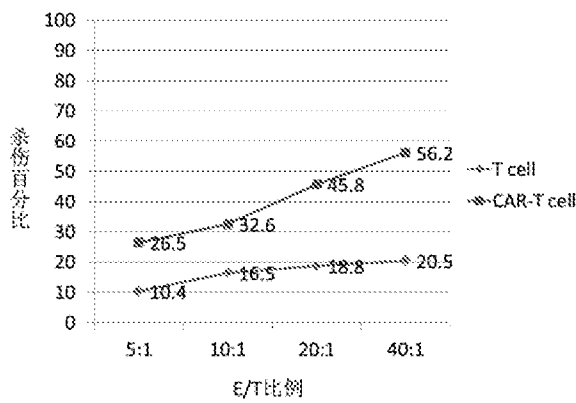
5 (a) MOLT-4 (急性淋巴细胞白血病细胞系)



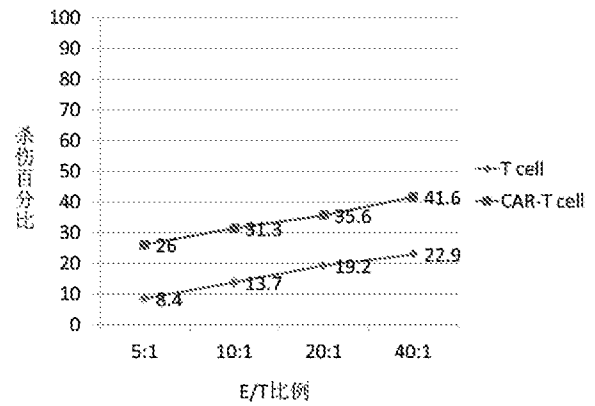
(b) KARPAS299 (非霍奇金淋巴瘤细胞系)



(c) K562 (慢性粒细胞白血病细胞系)

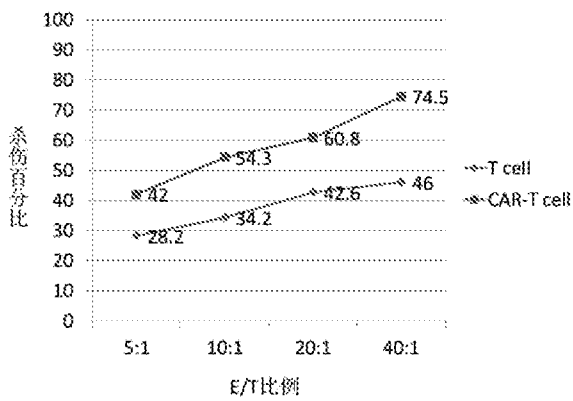


(d) RPMI8226 (骨髓瘤细胞系)

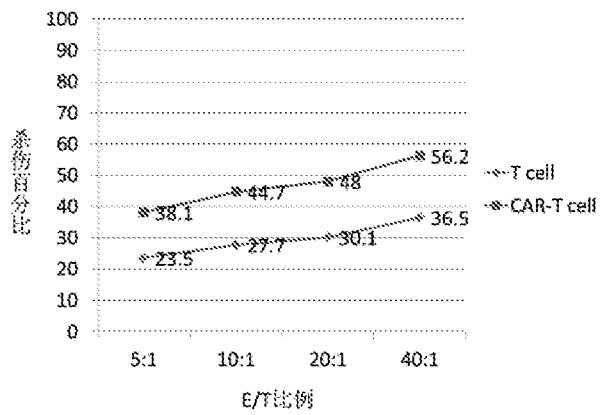


10

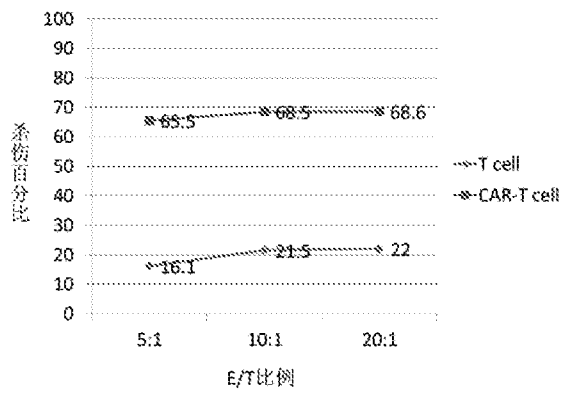
(e) NCI-H929 (骨髓瘤细胞系)



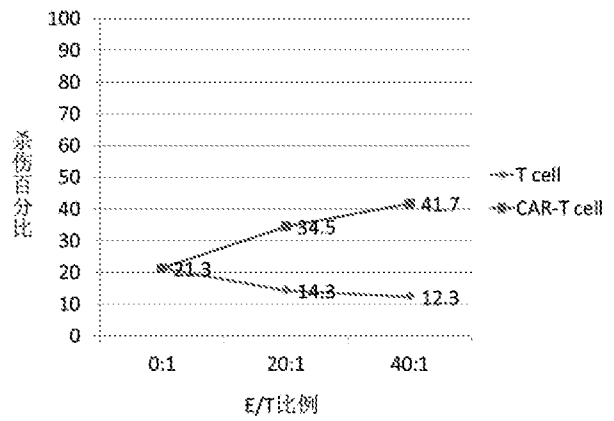
(f) U266B1 (骨髓瘤细胞系)



(g) Jurkat (T 细胞淋巴瘤细胞系)

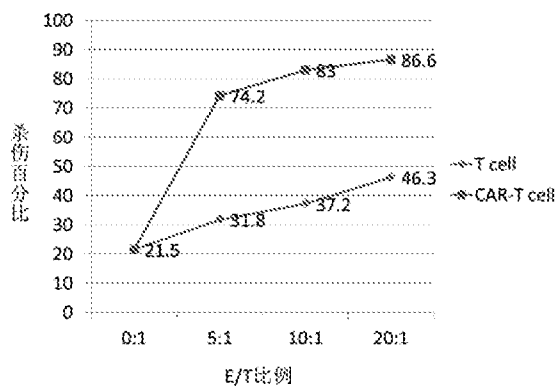


(h) HGC27 (胃癌细胞系)

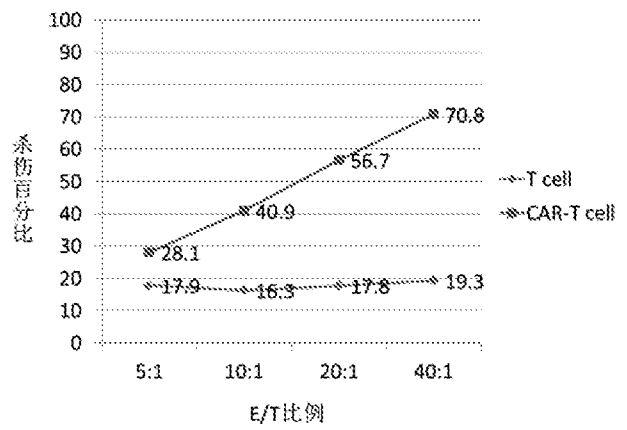


5

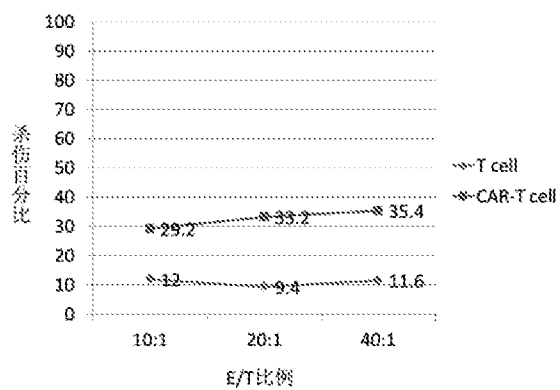
(i) Hela (宫颈癌细胞系)



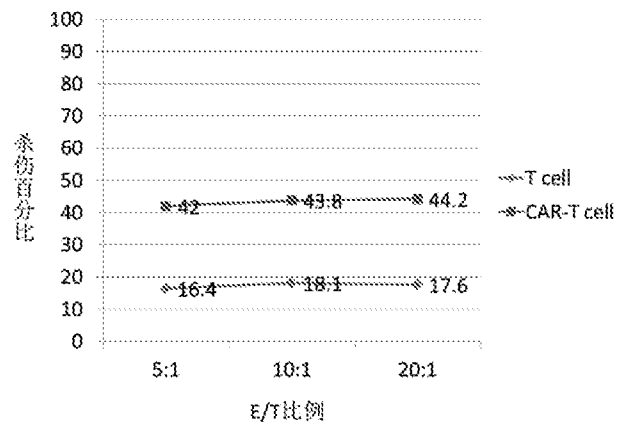
(j) A549 (肺癌细胞系)



(k) NCI-H522 (肺癌细胞系)

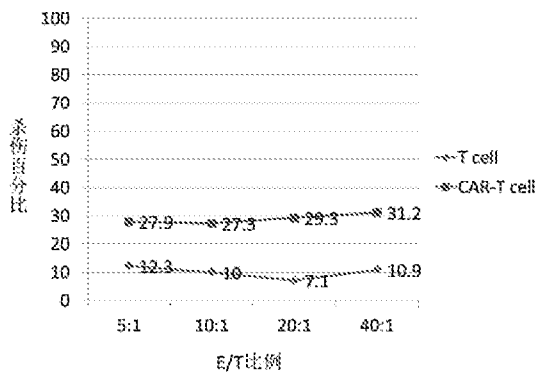


(l) NCI-H1155 (肺癌细胞系)

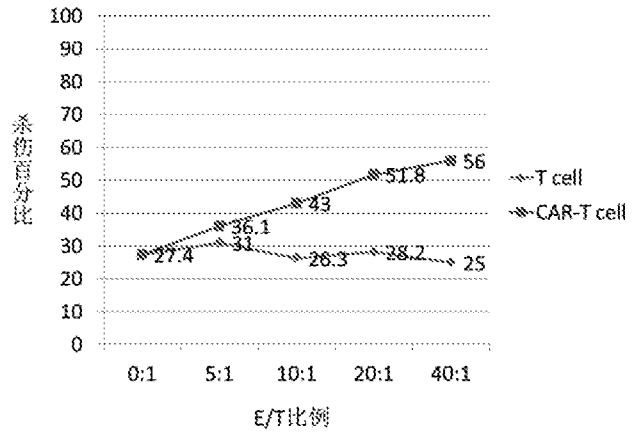


10

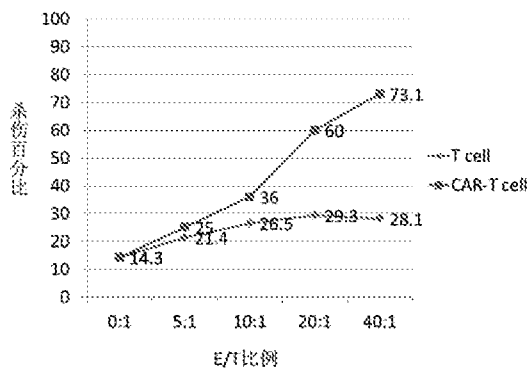
(m) NCI-H1355 (肺癌细胞系)



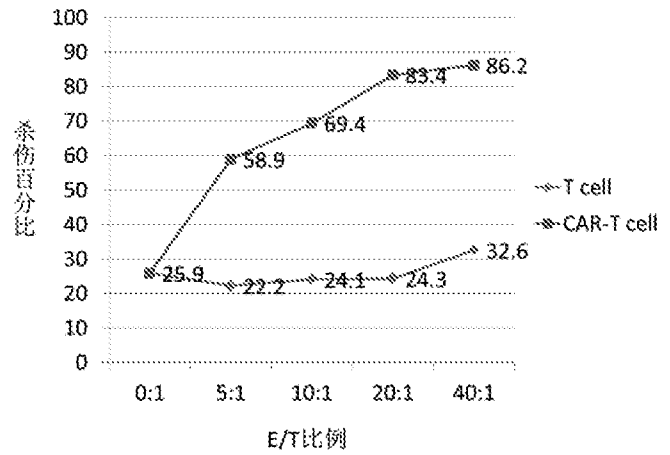
(n) MDA-MB-435S (乳腺癌细胞系)



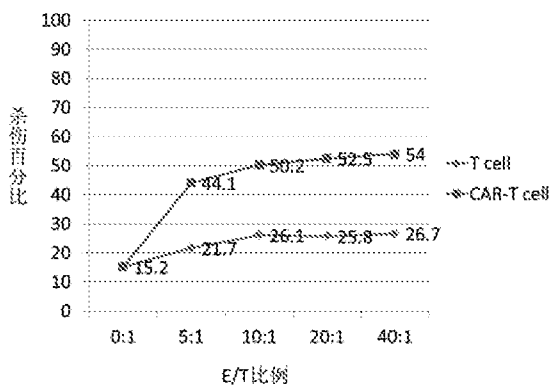
5 (o) MDA-MB-231 (乳腺癌细胞系)



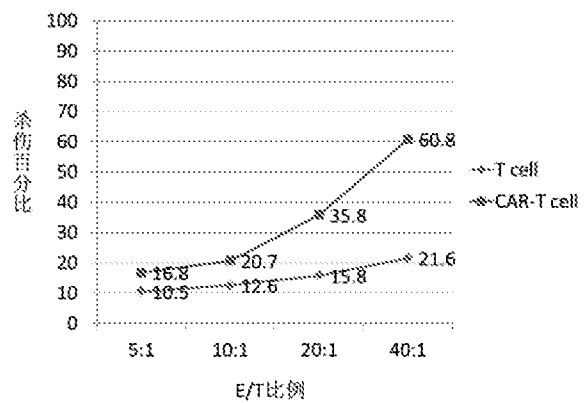
(p) 5637 (膀胱癌细胞系)



(q) SK-N-SH (神经母细胞瘤细胞系)



(r) QGY7703 (肝癌细胞系)



10

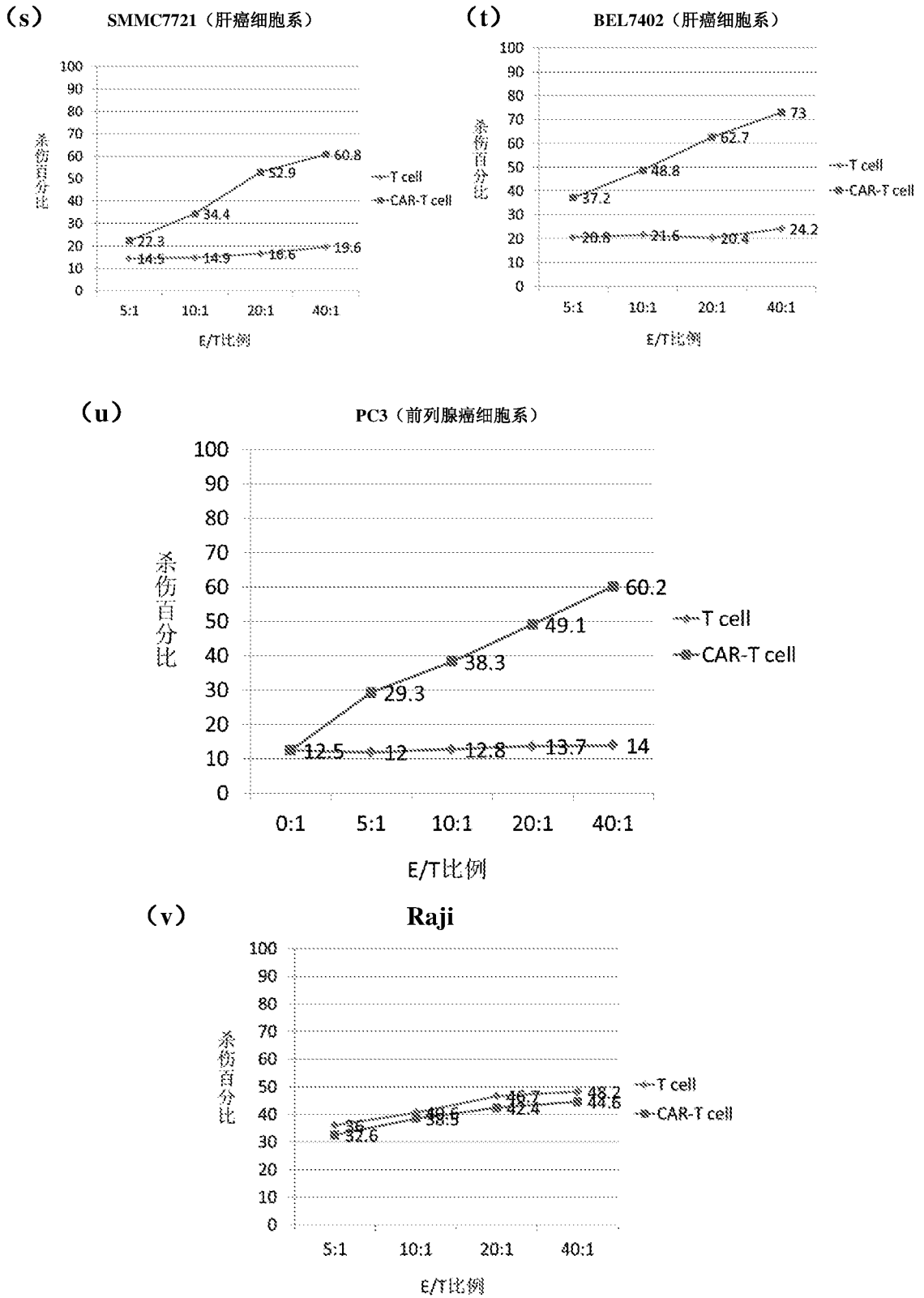


图 7

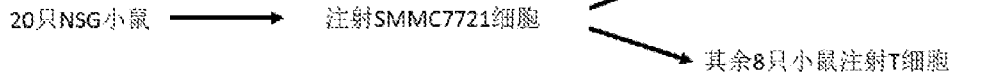
5

10

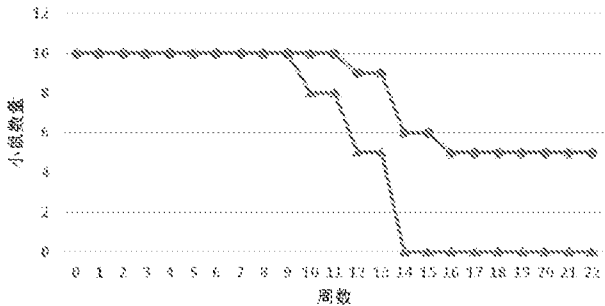
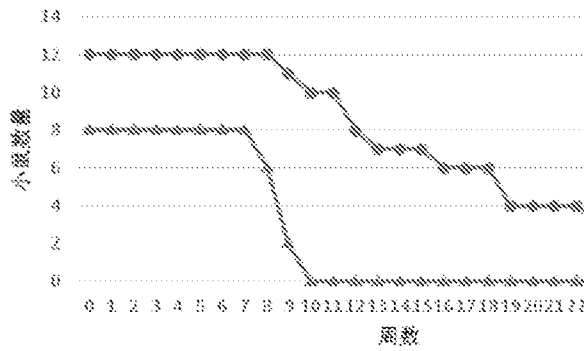
A. 时间表



B. 分组



(a)



(b)

(c)

— DR CAR-T 细胞

— T 细胞

图 8

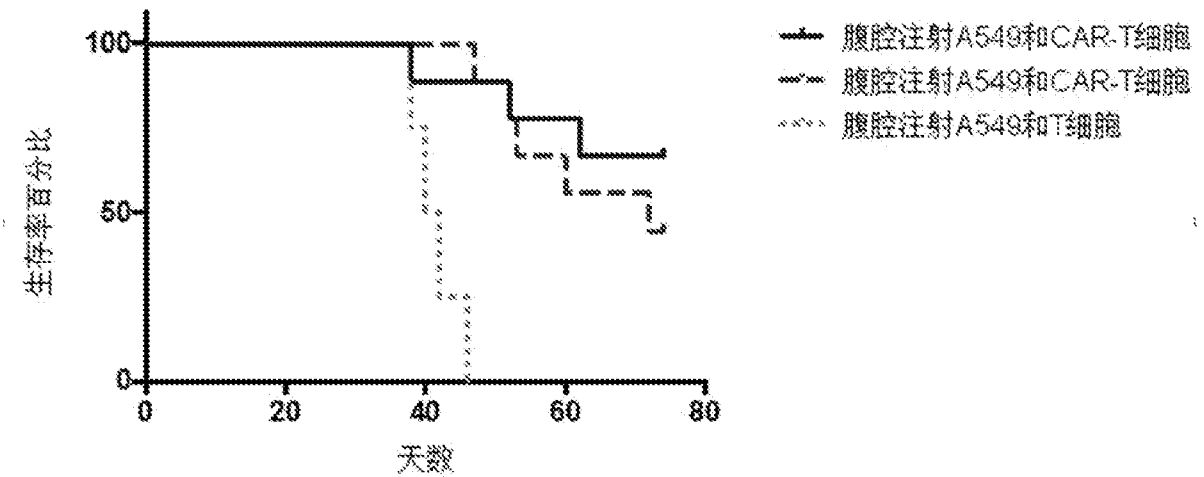


图 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/081286

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C12N 15/62(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; A61K 31/7088(2006.01)i; A61K 35/17(2015.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; C07K 19/00(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N; A61K; A61P; C07K		
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, VEN (DWPI+SIPOABS), CNTXT, EPTXT, USTXT, WOTXT, CNKI, 百度搜索, BAIDU SCHOLAR SEARCH, ISI-WEB OF SCIENCE: 嵌合抗原受体, NKG2D, DAP10, chimeric antigen receptor, CAR, CD8, CD28, 4-1BB, CD3, IRES, 82, 216; GENBANK, EMBL, 中国专利生物序列检索系统: 对SEQ ID NOS:1-20的序列检索, GENBANK, EMBL, NATIONAL BIO-SEQUENCE DATABASE OF CHINESE PATENT: search for SEQ ID NOS: 1-20		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	WO 2018183385 A1 (NAT UNIV SINGAPORE ET AL.) 04 October 2018 (2018-10-04) see claims 1-132, and figures 1-28B	1-22
X	WO 2014117121 A1 (ST JUDE CHILDRENS RES HOSPITAL ET AL.) 31 July 2014 (2014-07-31) see abstract, claims 1-37, description, paragraphs 7 and 230-262, and figure 1A	1-22
Y	WO 2014117121 A1 (ST JUDE CHILDRENS RES HOSPITAL ET AL.) 31 July 2014 (2014-07-31) see abstract, claims 1-37, description, paragraphs 7 and 230-262, and figure 1A	7-8, 10, 20-21
X	SONG, D.G. et al. "Chimeric NKG2D CAR-Expressing T Cell-Mediated Attack of Human Ovarian Cancer Is Enhanced by Histone Deacetylase Inhibition" <i>Human Gene Therapy</i> , Vol. 24, No. (3), 31 March 2013 (2013-03-31), ISSN: 1043-0342, pages 295-305, see abstract, page 296, left-hand column, last paragraph to right-hand column, paragraph 3, and figure 2A	1-6, 9, 11-19, 22
<input checked="" 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 22 June 2019		Date of mailing of the international search report 08 July 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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/081286

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SONG, D.G. et al. "Chimeric NKG2D CAR-Expressing T Cell-Mediated Attack of Human Ovarian Cancer Is Enhanced by Histone Deacetylase Inhibition" <i>Human Gene Therapy</i> , Vol. 24, No. (3), 31 March 2013 (2013-03-31), ISSN: 1043-0342, pages 295-305, see abstract, page 296, left-hand column, last paragraph to right-hand column, paragraph 3, and figure 2A	7-8, 10, 20-21
X	LEHNER, M. et al. "Redirecting T Cells to Ewing's Sarcoma Family of Tumors by a Chimeric NKG2D Receptor Expressed by Lentiviral Transduction or mRNA Transfection" <i>PLoS One</i> , Vol. 7, No. (2), 15 February 2012 (2012-02-15), ISSN: 1932-6203, document number: e31210, see abstract, page 2, left-hand column, paragraph 3 to page 10, left-hand column, paragraph 2, and figure 2A	1-6, 9, 11-19, 22
Y	LEHNER, M. et al. "Redirecting T Cells to Ewing's Sarcoma Family of Tumors by a Chimeric NKG2D Receptor Expressed by Lentiviral Transduction or mRNA Transfection" <i>PLoS One</i> , Vol. 7, No. (2), 15 February 2012 (2012-02-15), ISSN: 1932-6203, document number: e31210, see abstract, page 2, left-hand column, paragraph 3 to page 10, left-hand column, paragraph 2, and figure 2A	7-8, 10, 20-21

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.: **23**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
 - [1] The subject matter of claim 23 relates to a method for treatment of the human or animal body, which falls within the case set out in PCT Rule 39.1(iv), for which a search is not required.

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/CN2019/081286

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2018183385	A1	04 October 2018	None			
WO	2014117121	A1	31 July 2014	US	2016000828	A1	07 January 2016
				EP	2948544	A4	03 August 2016
				US	2018135016	A1	17 May 2018
				US	2018135015	A1	17 May 2018
				US	2018135014	A1	17 May 2018
				SG	11201505858V	A	29 September 2015
				US	9511092	B2	06 December 2016
				EP	2948544	A1	02 December 2015
				US	2018135013	A1	17 May 2018
				US	2017107491	A1	20 April 2017

<p>A. 主题的分类</p> <p>C12N 15/62(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; A61K 31/7088(2006.01)i; A61K 35/17(2015.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; C07K 19/00(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																	
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C12N; A61K; A61P; C07K</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, VEN(DWPI+SIPOABS), CNTXT, EPTXT, USTXT, WOTXT, CNKI, 百度学术搜索, ISI-WEB OF SCIENCE: 嵌合抗原受体, NKG2D, DAP10, chimeric antigen receptor, CAR, CD8, CD28, 4-1BB, CD3, IRES, 82, 216; Genbank, EMBL, 中国专利生物序列检索系统: 对SEQ ID NOs:1-20的序列检索。</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>PX</td> <td>WO 2018183385 A1 (NAT UNIV SINGAPORE等) 2018年 10月 4日 (2018 - 10 - 04) 参见权利要求1-132, 图1-28B</td> <td>1-22</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>WO 2014117121 A1 (ST JUDE CHILDRENS RES HOSPITAL等) 2014年 7月 31日 (2014 - 07 - 31) 参见摘要, 权利要求1-37, 说明书第7和230-262段, 图1A</td> <td>1-22</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2014117121 A1 (ST JUDE CHILDRENS RES HOSPITAL等) 2014年 7月 31日 (2014 - 07 - 31) 参见摘要, 权利要求1-37, 说明书第7和230-262段, 图1A</td> <td>7-8, 10, 20-21</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>SONG, D.G.等. "Chimeric NKG2D CAR-Expressing T Cell-Mediated Attack of Human Ovarian Cancer Is Enhanced by Histone Deacetylase Inhibition" HUMAN GENE THERAPY, 第24卷, 第3期, 2013年 3月 31日 (2013 - 03 - 31), ISSN: 1043-0342, 第295-305页, 参见摘要, 第296页左栏最后1段至第右栏第3段, 图2A</td> <td>1-6, 9, 11-19, 22</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	PX	WO 2018183385 A1 (NAT UNIV SINGAPORE等) 2018年 10月 4日 (2018 - 10 - 04) 参见权利要求1-132, 图1-28B	1-22	X	WO 2014117121 A1 (ST JUDE CHILDRENS RES HOSPITAL等) 2014年 7月 31日 (2014 - 07 - 31) 参见摘要, 权利要求1-37, 说明书第7和230-262段, 图1A	1-22	Y	WO 2014117121 A1 (ST JUDE CHILDRENS RES HOSPITAL等) 2014年 7月 31日 (2014 - 07 - 31) 参见摘要, 权利要求1-37, 说明书第7和230-262段, 图1A	7-8, 10, 20-21	X	SONG, D.G.等. "Chimeric NKG2D CAR-Expressing T Cell-Mediated Attack of Human Ovarian Cancer Is Enhanced by Histone Deacetylase Inhibition" HUMAN GENE THERAPY, 第24卷, 第3期, 2013年 3月 31日 (2013 - 03 - 31), ISSN: 1043-0342, 第295-305页, 参见摘要, 第296页左栏最后1段至第右栏第3段, 图2A	1-6, 9, 11-19, 22
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求															
PX	WO 2018183385 A1 (NAT UNIV SINGAPORE等) 2018年 10月 4日 (2018 - 10 - 04) 参见权利要求1-132, 图1-28B	1-22															
X	WO 2014117121 A1 (ST JUDE CHILDRENS RES HOSPITAL等) 2014年 7月 31日 (2014 - 07 - 31) 参见摘要, 权利要求1-37, 说明书第7和230-262段, 图1A	1-22															
Y	WO 2014117121 A1 (ST JUDE CHILDRENS RES HOSPITAL等) 2014年 7月 31日 (2014 - 07 - 31) 参见摘要, 权利要求1-37, 说明书第7和230-262段, 图1A	7-8, 10, 20-21															
X	SONG, D.G.等. "Chimeric NKG2D CAR-Expressing T Cell-Mediated Attack of Human Ovarian Cancer Is Enhanced by Histone Deacetylase Inhibition" HUMAN GENE THERAPY, 第24卷, 第3期, 2013年 3月 31日 (2013 - 03 - 31), ISSN: 1043-0342, 第295-305页, 参见摘要, 第296页左栏最后1段至第右栏第3段, 图2A	1-6, 9, 11-19, 22															
<p><input checked="" 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>																	
国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期																
2019年 6月 22日	2019年 7月 8日																
ISA/CN的名称和邮寄地址	授权官员																
中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088	林峻凯																
传真号 (86-10)62019451	电话号码 86-(10)-62412317																

C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
Y	SONG, D.G. 等. "Chimeric NKG2D CAR-Expressing T Cell-Mediated Attack of Human Ovarian Cancer Is Enhanced by Histone Deacetylase Inhibition" HUMAN GENE THERAPY, 第24卷, 第3期, 2013年 3月 31日 (2013 - 03 - 31), ISSN: 1043-0342, 第295-305页, 参见摘要, 第296页左栏最后1段至第右栏第3段, 图2A	7-8, 10, 20-21
X	LEHNER, M. 等. "Redirecting T Cells to Ewing' s Sarcoma Family of Tumors by a Chimeric NKG2D Receptor Expressed by Lentiviral Transduction or mRNA Transfection" PLOS ONE, 第7卷, 第2期, 2012年 2月 15日 (2012 - 02 - 15), ISSN: 1932-6203, 文献号: e31210, 参见摘要, 第2页左栏第3段至第10页左栏第2段, 图2A	1-6, 9, 11-19, 22
Y	LEHNER, M. 等. "Redirecting T Cells to Ewing' s Sarcoma Family of Tumors by a Chimeric NKG2D Receptor Expressed by Lentiviral Transduction or mRNA Transfection" PLOS ONE, 第7卷, 第2期, 2012年 2月 15日 (2012 - 02 - 15), ISSN: 1932-6203, 文献号: e31210, 参见摘要, 第2页左栏第3段至第10页左栏第2段, 图2A	7-8, 10, 20-21

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： 23
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23的主题涉及人体或动物体的治疗方法，属于PCT实施细则第39.1(iv)规定的无须检索的情况。
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/CN2019/081286

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	2018183385	A1	2018年 10月 4日	无			
WO	2014117121	A1	2014年 7月 31日	US	2016000828	A1	2016年 1月 7日
				EP	2948544	A4	2016年 8月 3日
				US	2018135016	A1	2018年 5月 17日
				US	2018135015	A1	2018年 5月 17日
				US	2018135014	A1	2018年 5月 17日
				SG	11201505858V	A	2015年 9月 29日
				US	9511092	B2	2016年 12月 6日
				EP	2948544	A1	2015年 12月 2日
				US	2018135013	A1	2018年 5月 17日
				US	2017107491	A1	2017年 4月 20日