

(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
2023 年 1 月 5 日 (05.01.2023)



(10) 国际公布号
WO 2023/274355 A1

(51) 国际专利分类号:

A61K 35/28 (2015.01) *C12N 5/0775* (2010.01)

A61K 35/17 (2015.01) *C12N 5/0783* (2010.01)

A61K 39/00 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2022/102733

(22) 国际申请日: 2022 年 6 月 30 日 (30.06.2022)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

202110752969.4 2021年7月2日 (02.07.2021) 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)。

王媛 (WANG, Yuan); 中国上海市闵行区东川路800号, Shanghai 200240 (CN)。

(74) 代理人: 上海巛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103室/张琤, 蒋舫玮, 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, IQ, IR, IS, IT, JM, 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, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

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

(54) Title: COMBINATION OF MODIFIED MESENCHYMAL STEM CELLS AND IMMUNE EFFECTOR CELLS FOR TUMOR TREATMENT

(54) 发明名称: 改造的间充质干细胞和免疫效应细胞联合治疗肿瘤

(57) Abstract: A modified mesenchymal stem cell (MSC), and a method for treating tumors by combining MSCs with anti-tumor T cells. The MSCs provide a first signal, a second signal and a third signal for T cell activation and/or an antigen-presenting cell activation signal; and the T cells may be CAR-T, TCR-T, TIL, and T cells derived from pleural fluid, ascites and PBMC.

(57) 摘要: 一种改造的间充质干细胞(MSC), 及其与抗肿瘤T细胞联合治疗肿瘤的方法, 其中所述间充质干细胞提供T细胞活化的第一信号、第二信号、第三信号和/或抗原呈递细胞活化信号; 其中所述T细胞可以是CAR-T, TCR-T, TIL、胸水腹水及PBMC来源的T细胞。



WO 2023/274355 A1

改造的间充质干细胞和免疫效应细胞联合治疗肿瘤

技术领域

本申请涉及生物医药领域，具体的涉及一种改造的间充质干细胞，及其与免疫效应细胞联合用于制备治疗肿瘤的药物用途。

背景技术

间充质干细胞是一种多能干细胞，具有自我更新和多向分化能力，可分化为骨骼、软骨、脂肪等。临床上应用包括组织损伤修复，自身免疫性疾病，基因治疗的载体等。间充质干细胞具有趋向炎性组织的特征，肿瘤被认为是一种慢性的炎性组织，因此间充质干细胞可以趋化并富集到肿瘤组织。

T 细胞过继性细胞疗法中如嵌合抗原受体 CAR-T 细胞，TCR-T，TIL 等是一种经人工修饰或体外扩增的肿瘤杀伤细胞，通过基因改造（CAR-T 或 TCR-T 等）的方式使其获得靶向识别和杀伤肿瘤的能力，或通过选择性扩增方式（TIL 等）富集肿瘤特异的内源性 T 细胞，是肿瘤免疫治疗领域的重要发展方向。然而，CAR-T 虽然在对造血来源的肿瘤治疗取得了显著的临床疗效，但是其对实体肿瘤的治疗疗效尚不理想，其主要原因是实体肿瘤的肿瘤微环境存在多种免疫抑制机理，不能有效提供 T 细胞活化信号，使得上述 CAR-T，TCR-T，TIL 等不能完全发挥功能，克服实体肿瘤微环境的免疫抑制。

发明内容

本申请提供了一种经改造的间充质干细胞，及包含所述经改造的间充质干细胞和抗肿瘤 T 细胞的药物组合。过继性 T 细胞治疗和间充质干细胞的联合治疗，一方面解决肿瘤特异的 T 细胞数量的不足，一方面弱化肿瘤微环境的抑制，提供 T 细胞活化的信号，从数量和质量上同时提高过继性 T 细胞治疗抗实体肿瘤的疗效。

一方面，本申请提供了一种间充质干细胞，其表达免疫调控分子，所述免疫调控分子包括参与 T 细胞活化的第一信号和/或第二信号的分子。

在某些实施方式中，所述参与 T 细胞活化的第一信号的分子包括参与抗原识别过程的分子。

在某些实施方式中，所述参与 T 细胞活化的第一信号的分子包括能够结合抗原的分子。

在某些实施方式中，所述能够结合抗原的分子包括抗原结合蛋白。

在某些实施方式中，所述能够结合抗原的分子包含抗体或其片段。

在某些实施方式中，所述抗原包括肿瘤相关抗原。

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，所述间充质干细胞表达的抗原包括 CLDN18.2。

在某些实施方式中，所述参与 T 细胞活化的第一信号的分子包括能够结合 CD3 的分子。

在某些实施方式中，所述 CD3 分子包含 CD3 的 γ 链、 δ 链、 ϵ 链、 ζ 链和/或 η 链。

在某些实施方式中，所述能够结合 CD3 的分子包含 anti-CD3 分子。

在某些实施方式中，所述 anti-CD3 分子包含抗 CD3 抗体或其片段。

在某些实施方式中，所述 T 细胞活化的第二信号包括共刺激信号。

在某些实施方式中，所述参与 T 细胞活化的第二信号的分子包括共刺激分子或能够结合共刺激分子的分子。

在某些实施方式中，所述共刺激分子包括选自 CD28 家族、CD2 家族和/或 TNFR 家族的一个或多个共刺激分子。

在某些实施方式中，所述共刺激分子包括选自下述蛋白的多肽：CD28、OX40 和/或 4-1BB。

在某些实施方式中，所述能够结合共刺激分子的分子包括所述共刺激分子的配体。

在某些实施方式中，所述能够结合共刺激分子的配体包括：OX40L 和/或 4-1BBL。

在某些实施方式中，所述能够结合共刺激分子的分子包括所述共刺激分子的受体。

在某些实施方式中，所述能够结合共刺激分子的分子包括 anti-CD28 分子。

在某些实施方式中，所述 anti-CD28 分子包含抗 CD28 抗体或其片段。

在某些实施方式中，所述能够结合共刺激分子的分子包括抗共刺激分子的抗体或其片段。

在某些实施方式中，所述间充质干细胞还表达参与 T 细胞活化的第三信号的分子。

在某些实施方式中，所述 T 细胞活化的第三信号包括细胞因子信号。

在某些实施方式中，所述参与 T 细胞活化的第三信号的分子包括细胞因子和/或能够结合所述细胞因子的分子。

在某些实施方式中，所述能够结合所述细胞因子的分子包括所述细胞因子的受体。

在某些实施方式中，所述细胞因子包括 IL-12、IL-2、IL-5、IL7 和/或 IL-15。

在某些实施方式中，所述细胞因子包含 IL-7。

在某些实施方式中，所述细胞因子包含 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述细胞因子包含 IL-2。

在某些实施方式中，所述细胞因子包含 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述间充质干细胞还包含能够提高间充质干细胞在肿瘤内的扩增能力的分子。

在某些实施方式中，所述能够提高间充质干细胞在肿瘤内扩增能力的分子包括酶。

在某些实施方式中，所述与间充质干细胞在肿瘤细胞内扩增相关的分子包括还原型辅酶/醌氧化还原酶（NQO1）。

在某些实施方式中，所述与间充质干细胞在肿瘤细胞内扩增相关的分子包括 5-甲基胞嘧啶双加氧酶（TET1）。

在某些实施方式中，所述间充质干细胞包含与启动子可操作地连接的核酸，所述启动子包含低氧响应元件（HRE）。

在某些实施方式中，所述间充质干细胞为异体间充质干细胞。

在某些实施方式中，所述间充质干细胞为自体间充质干细胞。

另一方面，本申请还提供了药物组合，其包含所述间充质干细胞和免疫效应细胞。

在某些实施方式中，所述免疫效应细胞包含 T 细胞。

在某些实施方式中，所述 T 细胞包含 CAR-T，TCR-T，TIL 和/或胸水、腹水和/或 PBMC 来源的 T 细胞。

在某些实施方式中，所述 T 细胞包含 CD8⁺T 细胞、CD4⁺T 细胞、 γ - δ T 细胞和/或 T 调节细胞。

在某些实施方式中，所述免疫效应细胞包含免疫调控分子，所述免疫调控分子能够与所述间充质干细胞表达的对应的免疫调控分子相结合，提供 T 细胞活化的第一信号、第二信号和/或第三信号。

在某些实施方式中，所述免疫效应细胞包含参与 T 细胞活化的第一信号的分子。

在某些实施方式中，所述免疫效应细胞包含的参与 T 细胞活化的第一信号的分子包含参与抗原识别过程的分子。

在某些实施方式中，所述免疫效应细胞包含能够结合所述抗原的分子。

在某些实施方式中，所述免疫效应细胞包含的能够结合抗原的分子与所述间充质干细胞表达的能够结合抗原的分子靶向相同的抗原。例如，所述抗原可选自间皮素，GPC-3，PSMA，EpCAM 和 GD2 的一种或多种。

在某些实施方式中，所述能够结合抗原的分子包含抗原结合蛋白。

在某些实施方式中，所述抗原结合蛋白包含抗体或其片段。

在某些实施方式中，所述抗体或其片段包含 scFv。

在某些实施方式中，所述免疫效应细胞包含抗 CLDN18.2 抗体或其片段。

在某些实施方式中，所述免疫效应细胞包含 CD3 分子。

在某些实施方式中，所述 CD3 分子包含 SEQ ID NO: 1 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含共刺激分子或能够结合共刺激分子的配体。

在某些实施方式中，所述免疫效应细胞包含的共刺激分子或能够结合共刺激分子的配体能够与所述间充质干细胞中包含的共刺激分子的配体或共刺激分子相结合。

在某些实施方式中，所述共刺激分子包括选自 CD28 家族、CD2 家族和/或 TNFR 家族的一个或多个共刺激分子。

在某些实施方式中，所述共刺激分子包括选自下述蛋白的多肽：OX40 和/或 4-1BB。

在某些实施方式中，所述共刺激分子包含 SEQ ID NO: 6 和/或 SEQ ID NO: 7 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含参与 T 细胞活化的第三信号的分子。

在某些实施方式中，所述免疫效应细胞包含细胞因子或能够结合细胞因子的分子。

在某些实施方式中，所述能够结合细胞因子的分子包含所述细胞因子的受体。

在某些实施方式中，所述免疫效应细胞表达的细胞因子或能够结合细胞因子的受体能够与所述间充质干细胞表达的细胞因子或能够结合细胞因子的受体相结合。

在某些实施方式中，所述细胞因子包括 IL-12、IL-2、和/或 IL7。

在某些实施方式中，所述细胞因子包含 SEQ ID NO: 10 和/或 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述能够结合细胞因子的受体包括 IL-12R、IL-2R 和/或 IL7R。

在某些实施方式中，所述能够结合细胞因子的受体包含 SEQ ID NO: 11 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含嵌合抗原受体 (CAR)，其中所述嵌合抗原受体包含抗原结合结构域、跨膜域、共刺激域和胞内信号传导域。例如，所述嵌合抗原受体的抗原结合结构域可靶向间皮素，GPC-3，PSMA，EpCAM 和 GD2 的一种或多种。

在某些实施方式中，所述抗原结合结构域包含能够特异性结合 CLDN18.2 的抗原结合蛋白。

在某些实施方式中，所述能够特异性结合 CLDN18.2 的抗原结合蛋白包含 SEQ ID NO: 15 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述跨膜域包含 SEQ ID NO: 17 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述共刺激域包含选自下述蛋白的多肽：OX40 和/或 4-1BB。

在某些实施方式中，所述共刺激域包含 SEQ ID NO: 18 所示的氨基酸序列。

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

在某些实施方式中，所述胞内信号传导域包含 SEQ ID NO: 19 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述 CAR 还包含铰链区。

在某些实施方式中，所述铰链区包含 SEQ ID NO: 20 所示的氨基酸序列。

另一方面，本申请还提供了药物组合物，其包含所述间充质干细胞或所述药物组合，以及任选地药学上可接受的载剂。

另一方面，本申请还提供了制备所述间充质干细胞或所述药物组合的方法。

另一方面，本申请还提供了所述间充质干细胞或所述药物组合在制备药物中的用途，所述药物用于预防和/或治疗肿瘤。

在某些实施方式中，所述肿瘤包括实体瘤。

在某些实施方式中，所述肿瘤包括选自下组的一种或多种：胰腺癌、胃癌、肺癌和前列腺癌。

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的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 显示的是所述靶向 CLDN18.2 的慢病毒（Ab10Z-OX40-IL7R，Ab10Z-4-1BB-IL7R）的滴度测定结果。

图 2 显示的是本申请所述 CLDN8.2 CAR-T 的 CAR（Ab10BBZ，Ab10Z-OX40-IL7R，Ab10Z-4-1BB-IL7R）表达分析检测结果。

图 3A-F 显示的是使用 ELISA 和 CBA 检测 IL-2 和 IL-7 的分泌表达结果。

图 4 显示的是使用 MSC 和 CAR-T 细胞治疗的小鼠的肿瘤负荷。

图 5 显示的是使用 MSC 和 CAR-T 细胞治疗的小鼠的肿瘤负荷。

图 6 显示的是接受治疗后第 10 天，小鼠外周血中 CAR-T 细胞的比例检测。

图 7 显示的是使用 MSC 和 CAR-T 细胞治疗后的小鼠的肿瘤负荷。

图 8 显示的是接受治疗后第 10 天，小鼠外周血中 CAR-T 细胞的比例检测。

图 9 显示的是 TET1, NQO1 的 mRNA 表达检测结果。

图 10 显示的是在正常培养和低氧诱导条件下检测 IL2 的表达。

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，本领域技术人员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“T 细胞活化信号”通常指 T 细胞活化所需要的信号，其包含第一信号、第二信号和/或第三信号。

在本申请中，术语“T 细胞活化的第一信号”可以与“抗原刺激信号”、“TCR 信号”互换使用，通常指 T 细胞表面 TCR-CD3 复合体与抗原肽-MHC 分子结合提供的 T 细胞活化信号。

在本申请中，术语“T 细胞活化的第二信号”可以与“共刺激信号分子”互换使用，通常指免疫细胞表面的一些共刺激分子，如 CD28、CD134/OX40、CD137/4-1BB、CD40 等，通过与其配体结合，激活免疫细胞的第二信号。

在本申请中，术语“抗体”通常是指一种能够特异性识别和/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“单链抗体（scFv）”通常指由所述重链可变区和所述轻链可变区通过连接肽连接而成的抗体。

在本申请中，术语“能够结合抗原的分子”可以与“抗原结合分子”互换使用，通常指包含能够与靶抗原结合的抗原结合区或抗原结合部分的分子。例如，抗原结合分子可为蛋白质或多肽。

在本申请中，术语“肿瘤相关抗原”可以与“肿瘤抗原”互换使用，通常指与肿瘤细胞相关的抗原，其包括肿瘤相关抗原和肿瘤特异性抗原。该术语包括存在于肿瘤细胞和非肿瘤细胞中/上的抗原。

在本申请中，术语“药物组合”通常指包含至少两种组分的组合。药物组合中的各组分可以搭配使用。其中搭配使用可以指同时使用，也可以指分别使用。组合中的各组分可以混合在一起，也可以放置在不同容器中。例如，所述药物组合包含所述间充质干细胞和所述免疫效应细胞。所述间充质干细胞可以和所述免疫效应细胞同时施用，也可以分别施用。所述间充质干细胞可以和所述免疫效应细胞混合在一起，也可以分别放置在不同容器中。

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，所述共刺激分子为淋巴细胞对抗原的有效应答所需要的细胞表面分子。所述共刺激结构域可包括 CD28 的共刺激结构域，还可包括 TNF 受体家族的共刺激结构域，例如 OX40 和 4-1BB 的共刺激结构域。

在本申请中，术语“共刺激分子”通常是指与共刺激配体特异性结合从而介导 T 细胞的共刺激应答，例如但不限于增殖的 T 细胞上的同源结合配偶体。共刺激分子是有效免疫应答所需的除抗原受体或其配体之外的细胞表面分子。共刺激分子包括但不限于 OX40，CD28，CD40，4-1BB(CD137)。

在本申请中，术语“胞内信号传导结构域”通常是指位于细胞内部能够转导信号的结构域。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。例如，所述胞内信号传导结构域是所述嵌合抗原受体的胞内信号传导结构域。例如，在某些实施方式中，所述胞内信号传导结构域可选自 CD3 ζ 胞内域，CD28 胞内域，CD28 胞内域，4-1BB 胞内域和 OX40 胞内域。

在本申请中，术语“嵌合抗原受体”（Chimeric Antigen Receptor, CAR）通常是指包含能够结合抗原的胞外结构域和至少一个胞内结构域的融合蛋白。CAR 是嵌合抗原受体 T 细胞（CAR-T）的核心部件，其可包括抗原（例如，肿瘤相关抗原（tumor-associated antigen, TAA））结合区、跨膜结构域、共刺激结构域和胞内信号结构域。

在本申请中，术语“免疫效应细胞”通常是指在免疫应答中参与清除异物抗原和行使效应功能的免疫细胞。例如，在某些实施方式中，所述免疫效应细胞可以为 T 细胞。

在本申请中，术语“低氧响应元件（HRE）”通常是指响应低氧诱导因子（HIF）的应答元件。

在本申请中，术语“跨膜域”（Transmembrane Domain）可以与“跨膜结构域”互换使用，通常是指 CAR 中穿过细胞膜的结构域，其与细胞内信号转导结构域相连接，起着传递信号的作用。

在本申请中，术语“自体”是指引用来自相同个体的任何材料，其随后被再次引入个体。

在本申请中，术语“药物组合物”通常指以允许活性成分的生物学活性有效的形式存在的制剂，并且其不含有对所述制剂待施用的受试者有不可接受的毒性的另外成分。在某些实施方案中，这些制剂可以包含药物的活性组分以及药学上可接受的载剂。在某些实施方式中，所述药物产品包含肠胃外、经皮、腔内、动脉内、鞘内和/或鼻内施用或直接注射到组织中的药物产品。所述药物产品可以通过不同方式给药，例如静脉内、腹膜内、皮下、肌肉内、局部或真皮内施用。

在本申请中，术语“肿瘤”通常是指任何新的病理性的组织增生。肿瘤可能是良性的，也可能是恶性的。在本申请中，所述肿瘤可以是实体瘤和/或血液瘤。

在本申请中，术语“联用”又称“共同施用”，通常指在另一个药物成分之前，或之后，或同时给药。联用的两个或多个药物成分可以通过相同的给药方式给药，也可以是通过不同给药方式给药，可以是同时施用，也可以是先后施用。例如，联用的一种治疗剂可以是所述间充质干细胞，第二种治疗剂可以是所述免疫效应细胞。联用也可以包含第三种甚至更多种治疗剂。

在本申请中，术语“预防”通常是指通过预先采取某些措施而防止疾病或其一种或多种症状的产生和发作，复发，和/或扩散。在本申请中，术语“治疗”通常指消除或改善疾病，或与疾病相关的一种或多种症状。在某些实施方案中，治疗通常指向患有这种疾病的患者施用一种或多种药物使得疾病消除或缓解。在某些实施方案中，“治疗”可以是在特定疾病的症状发作后，在其他药物存在或不存在的条件下施用所述药物组合和/或药物组合物。例如，使用本申请所述药物组合和/或药物组合物防止肿瘤的产生，发展，复发和/或转移。

在本申请中，术语“包含”通常是指包括明确指定的特征，但不排除其他要素。

在本申请中，术语“同源性”通常是指与比较的氨基酸序列和比较的核酸序列具有一定同源性的氨基酸序列或核酸序列。术语“同源性”可以等同于序列“同一性”。同源序列可以

包括与主题序列是至少约 80%、至少约 85%、至少约 90%、至少约 99.1%、至少约 99.2%、至少约 99.3%、至少约 99.4%、至少约 99.5%、至少约 99.6%、至少约 99.7%、至少约 99.8% 或至少约 99.9% 相同的氨基酸序列。通常，同源物将包含与主题氨基酸序列相同的活性位点等。同源性可以根据相似性（即具有相似化学性质/功能的氨基酸残基）来考虑，也可以在序列同一性方面表达同源性。

在本申请中，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

间充质干细胞

一方面，本申请提供一种间充质干细胞，其能够表达免疫调控分子，所述免疫调控分子可以包括参与 T 细胞活化的第一信号和/或第二信号的分子。

在本申请中，所述免疫调控分子可以是外源性的。

在本申请中，所述参与 T 细胞活化的第一信号的分子可以包括参与抗原识别过程的分子。

在本申请中，所述参与 T 细胞活化的第一信号的分子可以包括能够结合抗原的分子。

在本申请中，所述能够结合抗原的分子可以包括抗原结合蛋白。

在本申请中，所述抗原结合蛋白可以包括抗体或其片段。例如，所述片段可以包括 Fab，Fab'，Fv 片段，F(ab')₂，F(ab)₂，scFv，di-scFv 和/或 dAb。

在本申请中，所述抗原包括肿瘤相关抗原。在某些实施方式中，所述肿瘤相关抗原包括实体瘤。在某些实施方式中，所述肿瘤相关抗原包括血液瘤。在某些实施方式中，所述抗原包括 CLDN18.2。在某些实施方式中，所述 CLDN18.2 包括人 CLDN18.2。在某些实施方式中，所述抗原结合蛋白可以包含 anti-CLDN18.2 分子。在某些实施方式中，所述 anti-CLDN18.2 分子包含 CLDN18.2 抗体或其片段。在某些实施方式中，所述 CLDN18.2 抗体或其片段可以包含 VH 中的至少一个 CDR，所述 VH 包含 SEQ ID NO: 13 所示的氨基酸序列。在某些实施方式中，所述 CLDN18.2 抗体或其片段可以包含 VL 中的至少一个 CDR，所述 VL 可以包含 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列。在某些实施方式中，所述 CLDN18.2 抗体或其片段可以包含 HCDR1，HCDR2 和 HCDR3，所述 HCDR1，HCDR2 和 HCDR3 可以通过任何本领域技术人员已知的 CDR 划分方式划分 SEQ ID NO: 13 所示的氨基酸序列得到。在某些实施方式中，所述 CLDN18.2 抗体或其片段可以包含 LCDR1，LCDR2 和 LCDR3，所述 LCDR1，LCDR2 和 LCDR3 可以通过任何本领域技术人员已知的 CDR 划分方式划分 SEQ ID NO: 14 所示的氨基

酸序列得到。在某些实施方式中，所述 CLDN18.2 抗体或其片段包含 VH，所述 VH 包含 SEQ ID NO: 13 所示的氨基酸序列。在某些实施方式中，所述 CLDN18.2 抗体或其片段包含 VL，所述 VL 包含 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述 anti-CLDN18.2 包含 scFv，所述 scFv 包含 SEQ ID NO: 15 所示的氨基酸序列。在某些实施方式中，所述 anti-CLDN18.2 包含 scFv，所述 scFv 包含 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述参与 T 细胞活化第一信号的分子可以为外源性分子。

在本申请中，所述参与 T 细胞活化的第一信号的分子可以包括 CD3 分子。

在本申请中，所述参与 T 细胞活化的第一信号的分子可以包括能够结合 CD3 的分子。在本申请中，所述能够结合 CD3 的分子可以包括 anti-CD3 分子。

在某些实施方式中，所述 anti-CD3 的分子包含抗 CD3 抗体或其片段。

在某些实施方式中，所述抗 CD3 抗体或其片段包含 VH 中的至少一个 CDR，所述 VH 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 CD3 抗体或其片段可以包含 HCDR1，HCDR2 和 HCDR3。在某些实施方式中，所述 HCDR1，HCDR2 和 HCDR3 可以通过任何本领域技术人员已知的方式划分 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列得到。

在某些实施方式中，所述抗 CD3 抗体或其片段包含 VL 中的至少一个 CDR，所述 VL 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 CD3 抗体或其片段可以包含 LCDR1，LCDR2 和 LCDR3。在某些实施方式中，所述 LCDR1，LCDR2 和 LCDR3 可以通过任何本领域技术人员已知的方式划分 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列得到。

在某些实施方式中，所述抗 CD3 抗体或其片段包含 VH，所述 VH 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 CD3 抗体或其片段包含 VL，所述 VL 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 CD3 抗体或其片段包含 VH 和 VL，所述 VH 包含 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列，且所述 VL 包含 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述间充质干细胞能够表达参与 T 细胞活化的第二信号的分子。

在本申请中，所述参与 T 细胞活化的第二信号的分子可以为外源性分子。

在本申请中，所述第二信号包括共刺激信号。

在某些实施方式中，所述参与 T 细胞活化的第二信号的分子包括共刺激分子。例如，所述共刺激分子包括选自下述蛋白的多肽：CD28，OX40 和/或 4-1BB。

在某些实施方式中，所述参与 T 细胞活化的第二信号的分子包括能够结合共刺激分子的分子。

在本申请中，所述能够结合共刺激分子的分子包括所述共刺激分子的配体。例如，所述共刺激分子的配体可以包括 OX-40L 和/或 4-1BBL。在某些实施方式中，所述 OX-40L 包含 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列。在某些实施方式中，所述 4-1BBL 包含 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述能够结合共刺激分子的分子可以包括 anti-CD28 分子。

在某些实施方式中，所述 anti-CD28 分子可以包含抗 CD28 抗体或其片段

在本申请中，所述能够结合共刺激分子的分子可以包括抗共刺激分子的抗体。例如，所述抗共刺激分子的抗体可以包括抗 CD28 抗体或其片段。

在某些实施方式中，所述抗 CD28 抗体或其片段包含 VH 中的至少一个 CDR，所述 VH 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 CD28 抗体或其片段可以包含 HCDR1，HCDR2 和 HCDR3。在某些实施方式中，所述 HCDR1，HCDR2 和 HCDR3 可以通过任何本领域技术人员已知的方式划分 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列得到。

在某些实施方式中，所述抗 CD28 抗体包含 VL 中的至少一个 CDR，所述 VL 包含 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列。在某些实施方式中，所述抗 CD28 抗体或其片段可以包含 LCDR1，LCDR2 和 LCDR3。在某些实施方式中，所述 LCDR1，LCDR2 和 LCDR3 可以通过任何本领域技术人员已知的方式划分 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列得到。

在某些实施方式中，所述抗 CD28 抗体包含 VH，所述 VH 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 CD28 抗体包 VL，所述 VL 包含 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗 CD28 抗体包含 VH 和 VL，所述 VH 包含 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列，且所述 VL 包含 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述间充质干细胞还可以表达参与 T 细胞活化的第三信号的分子。

在本申请中，所述参与 T 细胞活化的第三信号的分子可以为外源性分子。

在本申请中，所述 T 细胞活化的第三信号可以包括细胞因子信号。

在本申请中，所述参与 T 细胞活化的第三信号的分子可以包括细胞因子。

在本申请中，所述细胞因子可以包括由淋巴细胞产生的细胞因子。

在本申请中，所述细胞因子可以包括由非淋巴细胞产生的细胞因子。

在本申请中，所述细胞因子可以包括白细胞介素。

在某些实施方式中，所述细胞因子可以包括 IL-12、IL-2、IL-5、IL7 和/或 IL-15。

例如，所述细胞因子可以为 IL-7。

例如，所述 IL-7 可以为 IL-7。

例如，所述 IL-7 可以包含 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列。

例如，所述细胞因子可以为 IL-2。

例如，所述 IL-2 可以为 IL-2。

例如，所述 IL-2 可以包含 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述间充质干细胞还可以包含其他改造。例如，所述改造能够提高间充质干细胞在肿瘤内的扩增能力。

在本申请中，所述能够提高间充质干细胞在肿瘤内的扩增能力的改造包含在间充质干细胞中表达能够提高间充质干细胞在肿瘤内扩增能力的分子。

在某些实施方式中，所述能够提高间充质干细胞在肿瘤内扩增能力的分子包含能够提高间充质干细胞在肿瘤内的扩增能力的酶。

在某些实施方式中，所述能够提高间充质干细胞在肿瘤内扩增能力的分子包括酶。例如，所述酶可以包括还原型辅酶/醌氧化还原酶 (NQO1)。例如，所述 NQO1 可以包含 SEQ ID NO: 22 所示的氨基酸序列。例如，所述酶可以包括 5-甲基胞嘧啶双加氧酶 (TET1)。例如，所述 TET1 可以包含 SEQ ID NO: 23 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述间充质干细胞还包含能够使得其在正常组织地表达，在低氧的肿瘤环境中高表达相应的免疫调控分子的改造。例如，可以在启动子中加入低氧响应元件。例如，可以在启动子中加入 HRE 元件。例如，所述 HRE 元件可以包含 SEQ ID NO: 24 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述间充质干细胞可以包含自体间充质干细胞。

在本申请中，所述间充质干细胞可以包含异体间充质干细胞。

间充质干细胞和免疫效应细胞联合

另一方面，本申请提供了一种药物组合，所述药物组合包含本申请所述的间充质干细胞和免疫效应细胞。

在本申请中，所述免疫效应细胞可以包含 T 细胞。例如，所述 T 细胞可以包含 CAR-T，TCR-T，TIL 和/或胸水、腹水和/或 PBMC 来源的 T 细胞。例如，所述 T 细胞可以包含 CD8+T 细胞、CD4+T 细胞、 γ - δ T 细胞和/或 T 调节细胞。

在本申请中，所述免疫效应细胞可以包含经改造的免疫效应细胞。

在本申请中，所述经改造的免疫效应细胞可以接收所述间充质干细胞提供的 T 细胞活化的第一信号、第二信号和/或第三信号。

在本申请中，所述免疫效应细胞包含免疫调控分子，所述免疫调控分子能够与所述间充质干细胞表达的对应的免疫调控分子相结合，提供 T 细胞活化的第一信号、第二信号和/或第三信号。例如，所述间充质干细胞表达参与 T 细胞活化的第一信号的分子，所述 T 细胞能够表达另一种分子，与所述间充质干细胞表达的相应的分子相结合，接收间充质干细胞提供的第一信号。例如，所述间充质干细胞表达 anti-CD3 分子，所述免疫效应细胞表达 CD3 分子。例如，所述免疫效应细胞表达共刺激分子，所述间充质干细胞表达相应的共刺激分子的配体。例如，所述间充质干细胞表达细胞因子，所述免疫效应细胞表达相应的细胞因子受体。

在本申请中，所述免疫细胞包含的免疫调控分子可以为外源分子。

在本申请中，所述免疫效应细胞可以包含与所述间充质干细胞具有相同靶点的抗原结合蛋白。在本申请中，所述靶点可以为本领域任何已知的靶点，例如，肿瘤靶点。例如，所述靶点可以选自间皮素（Mesothelin），GPC-3（Glypican-3，磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3），PSMA（前列腺特异性膜抗原），EpCAM（上皮细胞粘附分子）和 GD2（神经节苷脂）的一种或多种。

例如，所述免疫效应细胞可以包含靶向选自下组的一种或多种靶点的抗原结合蛋白：间皮素，GPC-3，PSMA，EpCAM 和 GD2。例如，所述靶向间皮素的抗原结合蛋白的抗原结合部分可包含 SEQ ID NO: 29 或 SEQ ID NO: 30 所示的氨基酸序列。例如，所述靶向 GPC-3 的抗原结合蛋白的抗原结合部分可包含 SEQ ID NO: 25 或 26 所示的氨基酸序列。例如，所述靶向 PSMA 的抗原结合蛋白的抗原结合部分可包含 SEQ ID NO: 31 所示的氨基酸序列。例如，所述靶向 GD2 的抗原结合蛋白的抗原结合部分可包含 SEQ ID NO: 27 或 SEQ ID NO: 28 所示的氨基酸序列。

例如，所述免疫效应细胞可以包含靶向 CLDN18.2 的抗原结合蛋白，同时，所述间充质干细胞也可以包含靶向 CLDN18.2 的抗原结合蛋白。在本申请中，所述免疫效应细胞还可以包含与所述间充质干细胞相同的分子。

在本申请中，所述免疫效应细胞包含抗原或能够结合所述抗原的分子。在本申请中，所述免疫效应细胞包含的能够结合抗原的分子能够与所述间充质干细胞表达的能够结合抗原的分子靶向相同的抗原。在某些实施方式中，所述能够结合抗原的分子包含抗原结合蛋白。在某些实施方式中，所述抗原结合蛋白包含抗体或其片段。在某些实施方式中，所述抗体或其片段包含 scFv。

在某些实施方式中，所述免疫效应细胞包含的能够结合抗原的分子包含抗 CLDN18.2 抗体或其片段。

在某些实施方式中，所述抗 CLDN18.2 抗体或其片段包含 VH 中的至少一个 CDR，所述 VH 包含 SEQ ID NO: 13 所示的氨基酸序列。在某些实施方式中，所述 CLDN18.2 抗体或其片段可以包含 HCDR1, HCDR2 和 HCDR3。在某些实施方式中，所述 HCDR1, HCDR2 和 HCDR3 可以通过任何本领域技术人员已知的方式划分 SEQ ID NO: 13 所示的氨基酸序列得到。

在某些实施方式中，所述抗 CLDN18.2 抗体或其片段包含 VL 中的至少一个 CDR，所述 VL 包含 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列。在某些实施方式中，所述 CLDN18.2 抗体或其片段可以包含 LCDR1, LCDR2 和 LCDR3。在某些实施方式中，所述 LCDR1, LCDR2 和 LCDR3 可以通过任何本领域技术人员已知的方式划分 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列得到。

在某些实施方式中，所述抗 CLDN18.2 抗体或其片段包含 VH，所述 VH 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 CLDN18.2 抗体或其片段包含 VL，所述 VL 包含 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述免疫效应细胞可以表达 CD3 分子。例如，所述 CD3 分子可以包含 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述免疫效应细胞可以包含共刺激分子或能够结合共刺激分子的配体。

在本申请中，所述免疫效应细胞包含的共刺激分子或能够结合共刺激分子的配体能够与所述间充质干细胞表达的能够结合共刺激分子的配体或共刺激分子相结合。在某些实施方式中，所述共刺激分子选自 CD28 家族、CD2 家族和/或 TNFR 家族的一种或多种共刺激分子。所述共刺激分子包括选自下述蛋白的多肽：OX40 和/或 4-1BB。例如，所述 OX40 可以包含 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列。例如，所述 4-1BB 可以包含 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列。所述共刺激分子的配体包括：OX40L 和/或 4-1BBL。例如，所述 OX40L 可以包含 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列。例如，所述 4-1BBL 可以包含 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述免疫效应细胞可以包含所述共刺激分子的受体。

在本申请中，所述免疫效应细胞可以包含参与 T 细胞活化的第三信号的分子。在本申请中，所述 T 细胞活化的第三信号可以包含细胞因子信号。

在本申请中，所述免疫效应细胞可以包含细胞因子或能够结合细胞因子的分子。

在本申请中，所述细胞因子可以包括由淋巴细胞产生的细胞因子。

在本申请中，所述细胞因子可以包括由非淋巴细胞产生的细胞因子。

在本申请中，所述细胞因子可以包括白细胞介素。

在某些实施方式中，所述细胞因子可以包括 IL-12、IL-2、和/或 IL7。在某些实施方式中，所述能够结合细胞因子的分子，包括所述细胞因子的受体。例如，所述细胞因子的受体可以包括 IL-12R、IL-2R 和/或 IL7R。例如，所述 IL-7R 可以包含 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述免疫效应细胞可以包含嵌合抗原受体（CAR），其中所述 CAR 可以包含抗原结合结构域、跨膜域、共刺激域和胞内信号传导域。

在某些实施方式中，所述抗原结合结构域包含抗原结合蛋白。在某些实施方式中，所述抗原结合蛋白可以包含抗体或抗原结合片段。例如，所述抗原结合蛋白可以包含 scFv。例如，所述 scFv 可以包含 SEQ ID NO: 15 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗原结合结构域包含能够结合 CLDN18.2 的抗原结合蛋白。在某些实施方式中，所述能够结合 CLDN18.2 的抗原结合蛋白包含 VH 中的至少一个 CDR，所述 VH 包含 SEQ ID NO: 13 所示的氨基酸序列。在某些实施方式中，所述能够结合 CLDN18.2 的抗原结合蛋白可以包含 HCDR1，HCDR2 和 HCDR3。在某些实施方式中，所述 HCDR1，HCDR2 和 HCDR3 可以通过任何本领域技术人员已知的方式划分 SEQ ID NO: 13 所示的氨基酸序列得到。

在某些实施方式中，所述能够结合 CLDN18.2 的抗原结合蛋白包含 VL 中的至少一个 CDR，所述 VL 包含 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列。在某些实施方式中，所述能够结合 CLDN18.2 的抗原结合蛋白可以包含 LCDR1，LCDR2 和 LCDR3。在某些实施方式中，所述 LCDR1，LCDR2 和 LCDR3 可以通过任何本领域技术人员已知的方式划分 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列得到。

在某些实施方式中，所述能够结合 CLDN18.2 的抗原结合蛋白包含 VH，所述 VH 包含 SEQ ID NO: 13 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述能够结合 CLDN18.2 的抗原结合蛋白包含 VL，所述 VL 包含 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述跨膜域可以包含源自选自下述蛋白的跨膜结构域：T 细胞受体的 α ， β 或 ζ 链、CD28、CD3e、CD45、CD4、CD5、CD8 α 、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137 和 CD154。

在本申请中，所述跨膜域可以包含 SEQ ID NO: 17 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述嵌合抗原受体的共刺激域可以包含选自下述蛋白的多肽：CD28、4-1BB、

OX-40 和 ICOS。在某些实施方式中，所述共刺激域可以包含 SEQ ID NO: 18 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述嵌合抗原受体的胞内信号传导域可以包含源自 CD3 ζ 的信号传导结构域。在某些实施方式中，所述胞内信号传导域可以包含 SEQ ID NO: 19 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述嵌合抗原受体还可以包含铰链区。例如，所述铰链区可以包含源自选自下组中的一种或多种蛋白的铰链区：CD28、IgG1、IgG4、IgD、4-1BB、CD4、CD27、CD7、CD8A、PD-1、ICOS、OX40、NKG2D、NKG2C、Fc ϵ RI γ 、BTLA、GITR、DAP10、TIM1、SLAM、CD30 和 LIGHT。例如，所述铰链区可以包含 SEQ ID NO: 20 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述嵌合抗原受体还可以包含信号肽。在某些实施方式中，所述信号肽的 C 端与所述靶向部分的 N 端连接。

在本申请中，所述免疫效应细胞可以包括人细胞。

在本申请中，所述免疫效应细胞可以包括自体免疫效应细胞。

在本申请中，所述免疫效应细胞可以包括异体免疫效应细胞。

在某些实施方式中，所述嵌合抗原受体包含抗原结合结构域、跨膜域、共刺激域和胞内信号传导域。在某些实施方式中，所述嵌合抗原受体的抗原结合结构域包含 SEQ ID NO: 15 所示的氨基酸序列，所述跨膜域包含 SEQ ID NO: 17 所示的氨基酸序列，所述共刺激域包含 SEQ ID NO: 18 所示的氨基酸序列，且所述胞内信号传导域包含 SEQ ID NO: 19 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述间充质干细胞可以和表达相应分子的免疫效应细胞联用。例如，MSC-4-1BBL 和 MSC-IL7 可以和 Ab10Z-4-1BB-IL7R CAR-T 细胞联用。例如，MSC-OX40L 和 MSC-IL7 可以和本申请实施例中制备的 Ab10Z-OX40-IL7R CAR-T 细胞联用。例如，MSC-anti-CD3 和 MSC-IL-2 可以和本申请实施例中制备的 CLDN18.2 CAR-T 细胞联用。例如，MSC-anti-CD3 和 MSC-IL-2 可以和本申请实施例中制备的 CLDN18.2 CAR-T 细胞联用。例如，MSC-anti-CD3，MSC-IL-2 和 MSC-anti-CD28 可以和本申请实施例中制备的 CLDN18.2 CAR-T 细胞联用。

药物组合物、制备方法及用途

另一方面，本申请还提供了一种药物组合物，其包含本申请所述的间充质干细胞，及任选地药学上可接受的载剂。

另一方面，本申请还提供了一种药物组合物，其包含本申请所述的间充质干细胞，以及本申请所述的免疫效应细胞，及任选地药学上可接受的载剂。

在本申请中，所述药物组合物可以被配制用于局部、肠胃外、全身、腔内、静脉内、动脉内、肌肉内、鞘内、眼内、结膜内、瘤内、皮下、皮内、鞘内、口服或透皮给药途径，其可包括注射或输注。合适的制剂可以在无菌或等渗培养基中包含病毒和/或细胞。组合物、药物组合物和试剂盒还可以配制成流体，包括凝胶形式。可配制流体制剂用于通过注射或输注（例如通过导管）施用于人体或动物体的选定区域。

另一方面，本申请所述的间充质干细胞可以和本申请所述的免疫效应细胞可以联合使用。在某些实施方式中，所述间充质干细胞可以和所述免疫效应细胞同时施用。同时施用可以是各组分混合在一起施用，也可以是分开施用。可以以相同方式施用，例如施用于同一条静脉或其他血管，也可以是不同方式施用，例如静脉内施用和瘤内施用同时进行。

在某些实施方式中，所述间充质干细胞可以和所述免疫效应细胞先后施用。施用的顺序可以是先施用所述间充质干细胞，再施用所述免疫效应细胞；也可以是先施用所述免疫效应细胞，再施用所述溶瘤病毒。可以以相同方式施用，也可以以不同方式施用。各组分可以一次施用，也可以分多次施用。在某些实施方案中，先后施用可以是以任何时间间隔施用，包括分钟、小时、天、周、月或年。在某些实施方案中，先后施用是指以至少 2 分钟、5 分钟、10 分钟、30 分钟、1 小时、6 小时、8 小时、12 小时、24 小时、36 小时、48 小时、3 天、4 天、5 天、6 天、1 周、2 周、3 周、1 个月、6 周、2 个月、3 个月、4 个月、5 个月或 6 个月之一的时间间隔分开的施用。

在某些实施方式中，施用的剂量可以为治疗有效量。

另一方面，本申请还提供了所述间充质干细胞和/或所述免疫效应细胞的制备方法。其中所述间充质干细胞和/或免疫效应细胞的制备方法可以包括合成包含所述参与 T 细胞活化的第一信号、第二信号和/或第三信号分子的病毒载体、制备病毒，转染细胞后，感染间充质干细胞和/或免疫效应细胞。

另一方面，本申请还提供所述间充质干细胞和/或药物组合在制备药物中的用途，所述药物用于预防和/或治疗疾病和/或病症。

另一方面，本申请还提供了一种治疗疾病和/或病症的方法，其包括向有需要的受试者施用本申请所述的间充质干细胞和/或药物组合。

另一方面，本申请还提供了所述间充质干细胞和/或药物组合，其用于治疗疾病和/或病症。在本申请中，所述疾病和/或病症可以包括肿瘤。

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，所述肿瘤包括选自下组的一种或多种：胰腺癌、胃癌、肺癌和前列

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发明的各个技术方案，而不适用于限制本申请发明的范围。

实施例

实施例 1 抗 CLDN18.2 CAR-T 细胞 (Ab10BBZ, Ab10Z-OX40-IL7R, Ab10Z-4-1BB-IL7R CAR-T 细胞) 的制备

1.1 慢病毒载体 pCDH-MSCVEF- Ab10BBZ, Ab10Z-OX40-IL7R, Ab10Z-4-1BB-IL7R 的构建及病毒生产

为构建本申请所述的 CAR-T 细胞，首先制备靶向 CLDN18.2 的 CAR。人工合成以下序列：scFv Ab10 (SEQ ID NO: 15)，铰链区 (SEQ ID NO: 20)，跨膜区 (SEQ ID NO: 17)，4-1BB 共刺激因子 (SEQ ID NO: 18)，CD3 ζ 胞内信号传导结构域 (SEQ ID NO: 19)。其中，将铰链区，跨膜区，4-1BB 共刺激因子和 CD3 ζ 胞内信号传导结构域首尾相连可获得 BBZ，其序列如 SEQ ID NO: 21 所示。

将可特异性结合 CLDN18.2 的 scFv Ab10 (氨基酸序列 SEQ ID NO: 15，核苷酸序列 SEQ ID NO: 16) 和 BBZ (SEQ ID NO: 21) 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)、铰链区、跨膜区、4-1BB 共刺激因子、CD3 ζ 胞内信号传导结构域、BamHI 酶切位点，PCR 扩增得到所述 CAR Ab10BBZ。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 293X 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 pCDH-MSCVEF-Ab10BBZ 病毒 (简称为 Ab10BBZ 病毒)，用于后续 CAR-T 细胞生产。

同时用与制备 Ab10BBZ 病毒相同的方法生产 pCDH-MSCVEF-Ab10Z-OX40-IL7R, Ab10Z-4-1BB-IL7R 病毒 (简称 Ab10Z-OX40-IL7R 和 Ab10Z-4-1BB-IL7R 病毒)，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，如图 1 所示。图 1 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 Ab10Z-OX40-IL7R 和 Ab10Z-4-1BB-IL7R 的表达量也随之增加。

1.2 Ab10BBZ, Ab10Z-OX40-IL7R, Ab10Z-4-1BB-IL7R CAR-T 细胞的制备

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=10-20 感染本实施例步骤 1.1 制备的 Ab10BBZ, Ab10Z-OX40-IL7R, Ab10Z-4-1BB-IL7R 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（0.1μg/ml）或 anti-hCD28（0.25μg/ml）刺激，经过 2 轮刺激后，所得细胞即为 Ab10BBZ, Ab10Z-OX40-IL7R, Ab10Z-4-1BB-IL7R CAR-T 细胞，通过流式染色，对 Ab10BBZ, Ab10Z-OX40-IL7R, Ab10Z-4-1BB-IL7R CAR-T 细胞用 Alexa Fluor® 647 AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Mouse IgG, Fab fragment specific 二抗染色，其结果如图 2 所示。

结果显示，所得细胞均为 CAR 阳性。

实施例 2 MSC-CLDN18.2, MSC-CLDN18.2-IL2, MSC-OX40L, MSC-4-1BBL, MSC-IL-2, MSC-anti-CD3, MSC-anti-CD28 细胞的制备

2.1. CLDN18.2, CLDN18.2-IL2, OX40L, 4-1BBL, IL-2, anti-CD3, anti-CD28 病毒的生产

参考实施例 1，合成 CLDN18.2, CLDN18.2-IL2, OX40L, 4-1BBL, IL-2, anti-CD3, anti-CD28，分子克隆到 pCDHEF-MSCV-puro 载体，制备病毒 pCDH-MSCVEF-CLDN18.2, pCDH-MSCVEF-CLDN18.2-IL2, pCDH-MSCVEF-OX40L, pCDH-MSCVEF-4-1BBL, pCDH-MSCVEF-IL-2, pCDH-MSCVEF-anti-CD3, pCDH-MSCVEF-anti-CD28。

利用与实施例 1 中的方法，转染 293 细胞获得病毒上清，保存于 -80 度，用于后续间充质干细胞的感染。

2.2 CLDN18.2, CLDN18.2-IL2, OX40L, 4-1BBL, IL-2, IL-7, anti-CD3, anti-CD28 间充质干细胞 CAR-T 细胞的制备

将人脐带来源的间充质干细胞，培养于 6 孔板，加入实施例 2.1 中所得的病毒上清，病毒感染增强剂 polybrene 10 μg/ml，24 小时后换新鲜培养基，48 小时后加入 puromycin 筛选获得稳定表达 CLDN18.2, CLDN18.2-IL2, OX40L, 4-1BBL, IL-2, IL-7, anti-CD3, anti-CD28 的间充质干细胞。通过流式染色，用 CLDN18.2, OX40L, 4-1BBL, 或 Alexa Fluor® 647 AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Mouse IgG, Fab fragment specific 二抗染色检测 CLDN18.2, OX40L, 4-1BBL, anti-CD3, anti-CD28 分子的膜表面表达，通过 ELISA 和 CBA 检测 IL-2 和 IL-7 的分泌表达。其结果如图 3A-F 所示。图 3A-E 显示的是本申请所述 MSCs（MSC-CLDN18.2,

MSC-CLDN18.2-IL2, MSC-OX40L, MSC-4-1BBL, MSC-IL-2, MSC-anti-CD3, MSC-anti-CD28) 的对应 T 细胞活化分子的表达。图 3F 显示的是 ELISA 检测 IL-7 的分泌表达。

实施例 3 MSC-OX40L, MSC-4-1BBL, MSC-IL-7 和 CLDN18.2 CART 联合治疗小鼠肿瘤

将 2×10^6 CFPAC-1 肿瘤细胞皮下接种到 B-NDG 小鼠, 6 天后给予 5×10^6 Ab10Z-OX40-IL7R, Ab10Z-4-1BB-IL7R CAR-T 细胞和 10^6 MSC-OX40L, MSC-4-1BBL 和 MSC-IL7 细胞治疗, 测量小鼠的肿瘤负荷, 其结果如图 4 所示。由图可知, Ab10Z-OX40-IL7R/MSC-OX40L/MSC-IL7 治疗组和 Ab10Z-4-1BB-IL7R/MSC-4-1BBL/MSC-IL7 细胞相对于 PBS 组能够更好的控制肿瘤负荷。结果显示, 与对照 PBS 相比, Ab10Z-OX40-IL7R/MSC-OX40L/MSC-IL7 治疗组和 Ab10Z-4-1BB-IL7R/MSC-4-1BBL/MSC-IL7 治疗使得小鼠肿瘤体积减少了 80.7% 和 80.8% (201.55 mm^3 到 38.75 mm^3 和 38.55 mm^3)。

实施例 4 MSC-anti-CD3, MSC-IL-2 和 CLDN18.2 CART 联合治疗小鼠肿瘤

将 2×10^6 CFPAC-1 肿瘤细胞皮下接种到 B-NDG 小鼠, 6 天后给予 5×10^6 Ab10BBZ CAR-T 细胞和 10^6 MSC, MSC-anti-CD3, MSC-IL-2 细胞治疗, 测量小鼠的肿瘤负荷。其结果分别如图 5 所示。由图可知, MSC-anti-CD3, MSC-IL-2 相对对照 MSC, 能够和 Ab10BBZ CAR-T 细胞协同作用, 发挥更强的抗肿瘤作用。结果显示, 与对照 Ab10BBZ/MSC 相比, Ab10BBZ/MSC-IL2/MSC-anti-CD3 细胞治疗使得小鼠肿瘤体积减少了 90.8% (5.46 mm^3 到 0.5 mm^3)。

实施例 5 MSC-anti-CD3, MSC-IL-2 和增强 CLDN18.2 CART 体内增殖能力

参照实施例 4, 接种肿瘤并进行同样的治疗后, 第 10 天取外周血, 流式细胞仪检测其中 CAR-T 细胞的比例。其结果分别如图 6 所示。由图可知, MSC-anti-CD3, MSC-IL-2 相对对照 MSC, 能够显著增强 Ab10BBZ CAR-T 细胞在小鼠体内的增值。如图 6 所示, 与对照 MSC 相比, MSC-IL2/MSC-anti-CD3 细胞增强了 Ab10BBZ CAR-T 的增值 2.32 倍, 从 1.08% 增加到 2.51%。

实施例 6 MSC-anti-CD3, MSC-IL-2, MSC-anti-CD28 增强 CLDN18.2 CART 体内增殖能力

将 2×10^6 CFPAC-1 肿瘤细胞皮下接种到 B-NDG 小鼠, 6 天后给予 5×10^6 Ab10BBZ CAR-T 细胞和 10^6 MSC, MSC-anti-CD3, MSC-IL-2, MSC-anti-CD28, MSC-IL-2-HRE 细胞治疗,

测量小鼠的肿瘤负荷。其结果如图 7 所示。由图可知，MSC-anti-CD3，MSC-IL-2，MSC-anti-CD28 相对对照 MSC，能够和 Ab10BBZ CAR-T 细胞协同作用，发挥更强的抗肿瘤作用。结果显示，与对照 Ab10BBZ/MSC 相比，Ab10BBZ/MSC-IL2，Ab10BBZ/MSC-anti-CD3，Ab10BBZ/MSC-anti-CD28，Ab10BBZ/MSC-IL2-HRE，细胞治疗使得小鼠肿瘤减少了 22.7%，32.9%，41.5%，41.7%（ 1.42 mm^3 到 1.09 mm^3 ， 0.95 mm^3 ， 0.83 mm^3 ， 0.75 mm^3 ）。

实施例 7 MSC-anti-CD3，MSC-IL-2，MSC-anti-CD28 增强 CLDN18.2 CART 体内增殖能力

和实施例 6 同样地接种和治疗小鼠，第 10 天取外周血，流式细胞仪检测其中 CAR-T 细胞的比例。其结果分别如图 8 所示。由图可知，MSC-anti-CD3，MSC-IL-2，MSC-anti-CD28 相对对照 MSC，能够显著增强 Ab10BBZ CAR-T 细胞在小鼠体内的增值。如图 XX 所示，与对照 MSC 相比，MSC-anti-CD3，MSC-IL-2，MSC-anti-CD28 细胞增强了 Ab10BBZ CAR-T 的增殖。

实施例 8 NQO1 和 TET1 增强 MSC 在肿瘤内富集及持续扩增能力

参考实施例 2 的方法，合成 TET1，NQO1，TET1-2A-NQO1，分子克隆到 pCDHEF-MSCV-puro 载体，制备病毒 pCDH-MSCVEF-TET1，pCDH-MSCVEF-NQO1，pCDH-MSCVEF-TET1-2A-NQO1。

采用实施例 2 中的方法，转染 293 细胞获得病毒上清，保存于-80 度，用于后续间充质干细胞的感染。将人脐带来源的间充质干细胞，培养于 6 孔板，加入包含 TET1，NQO1，TET1-2A-NQO1 的病毒上清，病毒感染增强剂 polybrene $10 \mu\text{g/ml}$ ，24 小时后换新鲜培养基，48 小时后加入 puromycin 筛选获得稳定表达 TET1，NQO1，TET1-2A-NQO1 的间充质干细胞。通过 q-PCR，检测 TET1，NQO1 的 mRNA 表达。其结果如图 9 所示。

实施例 9 HRE 启动子选择性增强 IL-2 在低氧条件下的表达

参考实施例 2 的方法，合成 IL2 分子克隆到 pCDH-HRE-puro 载体，制备病毒 pCDH-HRE-IL2。

参考实施例 2 的方法，转染 293 细胞获得病毒上清，保存于-80 度，用于后续间充质干细胞的感染。将人脐带来源的间充质干细胞，培养于 6 孔板，加入包含 HRE-IL2 的病毒上清，病毒感染增强剂 polybrene $10 \mu\text{g/ml}$ ，24 小时后换新鲜培养基，48 小时后加入 puromycin 筛选获得稳定表达 HRE-IL2 的间充质干细胞。分别在正常培养和低氧诱导条件下检测 IL2 的表达。

其结果如图 10 所示。结果显示，与常氧组相比，IL-2 的表达在低氧条件下显著增强。

前述详细说明是以解释和举例的方式提供的，并非要限制所附权利要求的范围。目前本申请所列举的实施方式的多种变化对本领域普通技术人员来说是显而易见的，且保留在所附的权利要求和其等同方式的范围内。

权 利 要 求 书

1. 间充质干细胞，其表达免疫调控分子，所述免疫调控分子包括参与 T 细胞活化的第一信号和/或第二信号的分子。
2. 根据权利要求 1 所述的间充质干细胞，其中所述参与 T 细胞活化的第一信号的分子包括参与抗原识别过程的分子。
3. 根据权利要求 1-2 中任一项所述的间充质干细胞，其中所述参与 T 细胞活化的第一信号的分子包括能够结合抗原的分子。
4. 根据权利要求 3 所述的间充质干细胞，其中所述能够结合抗原的分子包括抗原结合蛋白。
5. 根据权利要求 3-4 中任一项所述的间充质干细胞，其中所述能够结合抗原的分子包含抗体或其片段。
6. 根据权利要求 3-5 中任一项所述的间充质干细胞，其中所述抗原包括肿瘤相关抗原。
7. 根据权利要求 6 所述的间充质干细胞，其中所述肿瘤包括实体瘤和/或血液瘤。
8. 根据权利要求 3-7 中任一项所述的间充质干细胞，其中所述抗原包括 CLDN18.2。
9. 根据权利要求 1-8 中任一项所述的间充质干细胞，其中所述参与 T 细胞活化的第一信号的分子包括能够结合 CD3 的分子。
10. 根据权利要求 9 所述的间充质干细胞，其中所述 CD3 分子包含 CD3 的 γ 链、 δ 链、 ϵ 链、 ζ 链和/或 η 链。
11. 根据权利要求 9-10 中任一项所述的间充质干细胞，其中所述能够结合 CD3 的分子包含 anti-CD3 分子。
12. 根据权利要求 11 所述的间充质干细胞，其中所述 anti-CD3 分子包含抗 CD3 抗体或其片段。
13. 根据权利要求 1-12 中任一项所述的间充质干细胞，其中所述 T 细胞活化的第二信号包括共刺激信号。
14. 根据权利要求 1-13 中任一项所述的间充质干细胞，其中所述参与 T 细胞活化的第二信号的分子包括共刺激分子或能够结合共刺激分子的分子。
15. 根据权利要求 14 所述的间充质干细胞，其中所述共刺激分子包括选自 CD28 家族、CD2 家族和/或 TNFR 家族的一个或多个共刺激分子。
16. 根据权利要求 14-15 中任一项所述的间充质干细胞，其中所述共刺激分子包括选自下述蛋白的多肽：CD28、OX40 和/或 4-1BB。
17. 根据权利要求 14-16 中任一项所述的间充质干细胞，其中所述能够结合共刺激分子的分子包括所述共刺激分子的配体。

18. 根据权利要求 17 所述的间充质干细胞，其中所述能够结合共刺激分子的配体包括：OX40L 和/或 4-1BBL。
19. 根据权利要求 14-18 中任一项所述的间充质干细胞，其中所述能够结合共刺激分子的分子包括所述共刺激分子的受体。
20. 根据权利要求 14-19 中任一项所述的间充质干细胞，其中所述能够结合共刺激分子的分子包括 anti-CD28 分子。
21. 根据权利要求 20 所述的间充质干细胞，其中所述 anti-CD28 分子包含抗 CD28 的抗体或其片段。
22. 根据权利要求 14-21 中任一项所述的间充质干细胞，其中所述能够结合共刺激分子的分子包括抗共刺激分子的抗体或其片段。
23. 根据权利要求 1-22 中任一项所述的间充质干细胞，其还表达参与 T 细胞活化的第三信号的分子。
24. 根据权利要求 23 所述的间充质干细胞，其中所述 T 细胞活化的第三信号包括细胞因子信号。
25. 根据权利要求 23-24 中任一项所述的间充质干细胞，其中所述参与 T 细胞活化的第三信号的分子包括细胞因子和/或能够结合所述细胞因子的分子。
26. 根据权利要求 25 所述的间充质干细胞，其中所述能够结合所述细胞因子的分子包括所述细胞因子的受体。
27. 根据权利要求 25-26 中任一项所述的间充质干细胞，其中所述细胞因子包括 IL-12、IL-2、IL-5、IL-7 和/或 IL-15。
28. 根据权利要求 25-27 中任一项所述的间充质干细胞，其中所述细胞因子包含 IL-7。
29. 根据权利要求 28 所述的间充质干细胞，其中所述细胞因子包含 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列。
30. 根据权利要求 25-29 中任一项所述的间充质干细胞，其中所述细胞因子包含 IL-2。
31. 根据权利要求 30 所述的间充质干细胞，其中所述细胞因子包含 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列。
32. 根据权利要求 1-31 中任一项所述的间充质干细胞，其还包含能够提高间充质干细胞在肿瘤内的扩增能力的分子。
33. 根据权利要求 32 所述的间充质干细胞，其中所述能够提高间充质干细胞在肿瘤内扩增能力的分子包括酶。
34. 根据权利要求 32-33 中任一项所述的间充质干细胞，其中所述与间充质干细胞在肿瘤细

胞内扩增相关的分子包括还原型辅酶/醌氧化还原酶 (NQO1)。

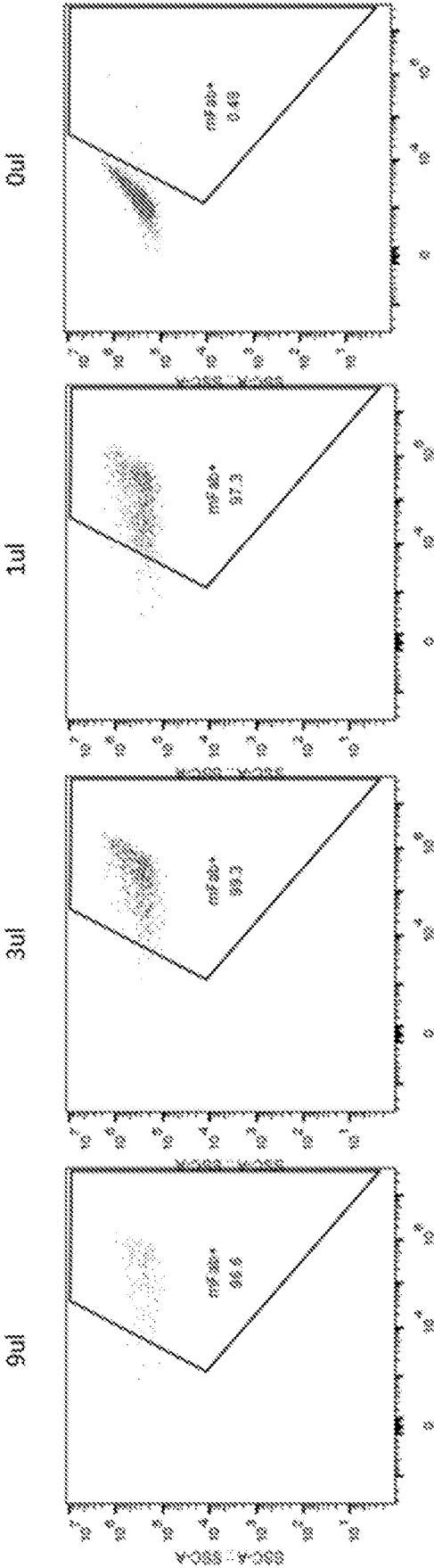
35. 根据权利要求 32-34 中任一项所述的间充质干细胞，其中所述与间充质干细胞在肿瘤细胞内扩增相关的酶包括 5-甲基胞嘧啶双加氧酶 (TET1)。
36. 根据权利要求 1-35 中任一项所述的间充质干细胞，其包含与启动子可操作地连接的核酸，所述启动子包含低氧响应元件 (HRE)。
37. 根据权利要求 1-36 中任一项所述的间充质干细胞，其为异体间充质干细胞。
38. 根据权利要求 1-37 中任一项所述的间充质干细胞，其为自体间充质干细胞。
39. 药物组合，其包含权利要求 1-38 中任一项所述的间充质干细胞和免疫效应细胞。
40. 根据权利要求 39 所述的药物组合，其中所述免疫效应细胞包含 T 细胞。
41. 根据权利要求 40 所述的药物组合，其中所述 T 细胞包含 CAR-T，TCR-T，TIL 和/或胸水、腹水和/或 PBMC 来源的 T 细胞。
42. 根据权利要求 40-41 中任一项所述的药物组合，其中所述 T 细胞包含 CD8⁺T 细胞、CD4⁺T 细胞、 γ - δ T 细胞和/或 T 调节细胞。
43. 根据权利要求 39-42 中任一项所述的药物组合，其中所述免疫效应细胞包含免疫调控分子，所述免疫调控分子能够与所述间充质干细胞表达的对应的免疫调控分子相结合，提供 T 细胞活化的第一信号、第二信号和/或第三信号。
44. 根据权利要求 39-43 中任一项所述的药物组合，其中所述免疫效应细胞包含参与 T 细胞活化的第一信号的分子。
45. 根据权利要求 44 所述的药物组合，其中所述参与 T 细胞活化的第一信号的分子包含参与抗原识别过程的分子。
46. 根据权利要求 39-45 中任一项所述的药物组合，其中所述免疫效应细胞包含能够结合所述抗原的分子。
47. 根据权利要求 46 所述的药物组合，其中所述免疫效应细胞包含的能够结合抗原的分子与所述间充质干细胞表达的能够结合抗原的分子所靶向的抗原相同。
48. 根据权利要求 46-47 中任一项所述的药物组合，其中所述能够结合抗原的分子包含抗原结合蛋白。
49. 根据权利要求 48 所述的药物组合，其中所述抗原结合蛋白包含抗体或其片段。
50. 根据权利要求 49 所述的药物组合，其中所述抗体或其片段包含 scFv。
51. 根据权利要求 39-50 中任一项所述的药物组合，其中所述免疫效应细胞包含抗 CLDN18.2 抗体或其片段。
52. 根据权利要求 39-51 中任一项所述的药物组合，其中所述免疫效应细胞包含 CD3 分子。

53. 根据权利要求 52 所述的药物组合，其中所述 CD3 分子包含 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列。
54. 根据权利要求 39-53 中任一项所述的药物组合，其中所述免疫效应细胞包含共刺激分子或能够结合共刺激分子的配体。
55. 根据权利要求 54 所述的药物组合，其中所述免疫效应细胞包含的共刺激分子或能够结合共刺激分子的配体能够与所述间充质干细胞中包含的共刺激分子的配体或共刺激分子相结合。
56. 根据权利要求 54-55 中任一项所述的药物组合，其中所述共刺激分子包括选自 CD28 家族、CD2 家族和/或 TNFR 家族的一个或多个共刺激分子。
57. 根据权利要求 56 所述的药物组合，其中所述共刺激分子包括选自下述蛋白的多肽：OX40 和/或 4-1BB。
58. 根据权利要求 54-57 中任一项所述的药物组合，其中所述共刺激分子包含 SEQ ID NO: 6 和/或 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列。
59. 根据权利要求 39-58 中任一项所述的药物组合，其中所述免疫效应细胞包含参与 T 细胞活化的第三信号的分子。
60. 根据权利要求 59 所述的药物组合，其中所述 T 细胞活化的第三信号包含细胞因子信号。
61. 根据权利要求 39-60 中任一项所述的药物组合，其中所述免疫效应细胞包含细胞因子或能够结合细胞因子的分子。
62. 根据权利要求 61 所述的药物组合，其中所述能够结合细胞因子的分子包含所述细胞因子的受体。
63. 根据权利要求 60-62 中任一项所述的药物组合，其中所述免疫效应细胞表达的细胞因子或能够结合细胞因子的受体能够与所述间充质干细胞表达的细胞因子或能够结合细胞因子的受体相结合。
64. 根据权利要求 61-63 中任一项所述的药物组合，其中所述细胞因子包括 IL-12、IL-2、和/或 IL7。
65. 根据权利要求 64 所述的药物组合，其中所述细胞因子包含 SEQ ID NO: 12 和/或 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列。
66. 根据权利要求 62-65 中任一项所述的药物组合，其中所述能够结合细胞因子的受体包括 IL-12R、IL-2R 和/或 IL7R。
67. 根据权利要求 62-66 中任一项所述的药物组合，其中所述能够结合细胞因子的受体包含

SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列。

68. 根据权利要求 39-67 中任一项所述的药物组合，其中所述免疫效应细胞包含嵌合抗原受体（CAR），其中所述嵌合抗原受体包含抗原结合结构域、跨膜域、共刺激域和胞内信号传导域。
69. 根据权利要求 68 所述的药物组合，其中所述抗原结合结构域包含能够特异性结合 CLDN18.2 的抗原结合蛋白。
70. 根据权利要求 69 所述的药物组合，其中所述抗原结合蛋白包含 SEQ ID NO: 15 所示的氨基酸序列。
71. 根据权利要求 68-70 中任一项所述的药物组合，其中所述跨膜域包含 SEQ ID NO: 17 所示的氨基酸序列。
72. 根据权利要求 68-71 中任一项所述的药物组合，其中所述共刺激域包含选自下述蛋白的多肽：OX40 和/或 4-1BB。
73. 根据权利要求 72 所述的药物组合，其中所述共刺激域包含 SEQ ID NO: 18 所示的氨基酸序列。
74. 根据权利要求 68-73 中任一项所述的药物组合，其中所述胞内信号传导域包含源自 CD3 ζ 的信号传导结构域。
75. 根据权利要求 74 所述的药物组合，其中所述胞内信号传导域包含 SEQ ID NO: 19 所示的氨基酸序列。
76. 根据权利要求 68-75 中任一项所述的药物组合，其中所述 CAR 还包含铰链区。
77. 根据权利要求 76 所述的药物组合，其中所述铰链区包含 SEQ ID NO: 20 所示的氨基酸序列。
78. 药物组合物，其包含权利要求 1-38 中任一项所述的间充质干细胞或权利要求 39-77 中任一项所述的药物组合，以及任选地药学上可接受的载剂。
79. 制备权利要求 1-38 中任一项所述的间充质干细胞或权利要求 39-77 中任一项所述的药物组合的方法。
80. 根据权利要求 1-38 中任一项所述的间充质干细胞或权利要求 39-77 中任一项所述的药物组合在制备药物中的用途，所述药物用于预防和/或治疗肿瘤。
81. 根据权利要求 80 所述的用途，其中所述肿瘤包括实体瘤。
82. 根据权利要求 80-81 中任一项所述的用途，其中所述肿瘤包括选自下组的一种或多种：胰腺癌、胃癌、肺癌和前列腺癌。

Ab10Z-OX40-IL7R



Ab10Z-4-1B8-IL7R

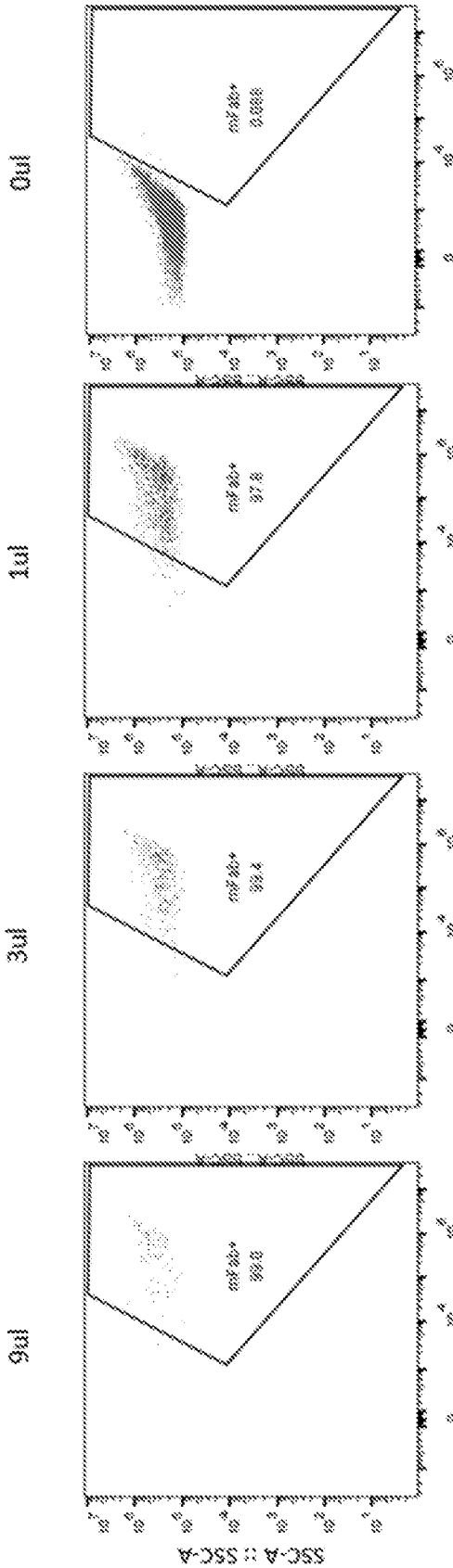


图 1

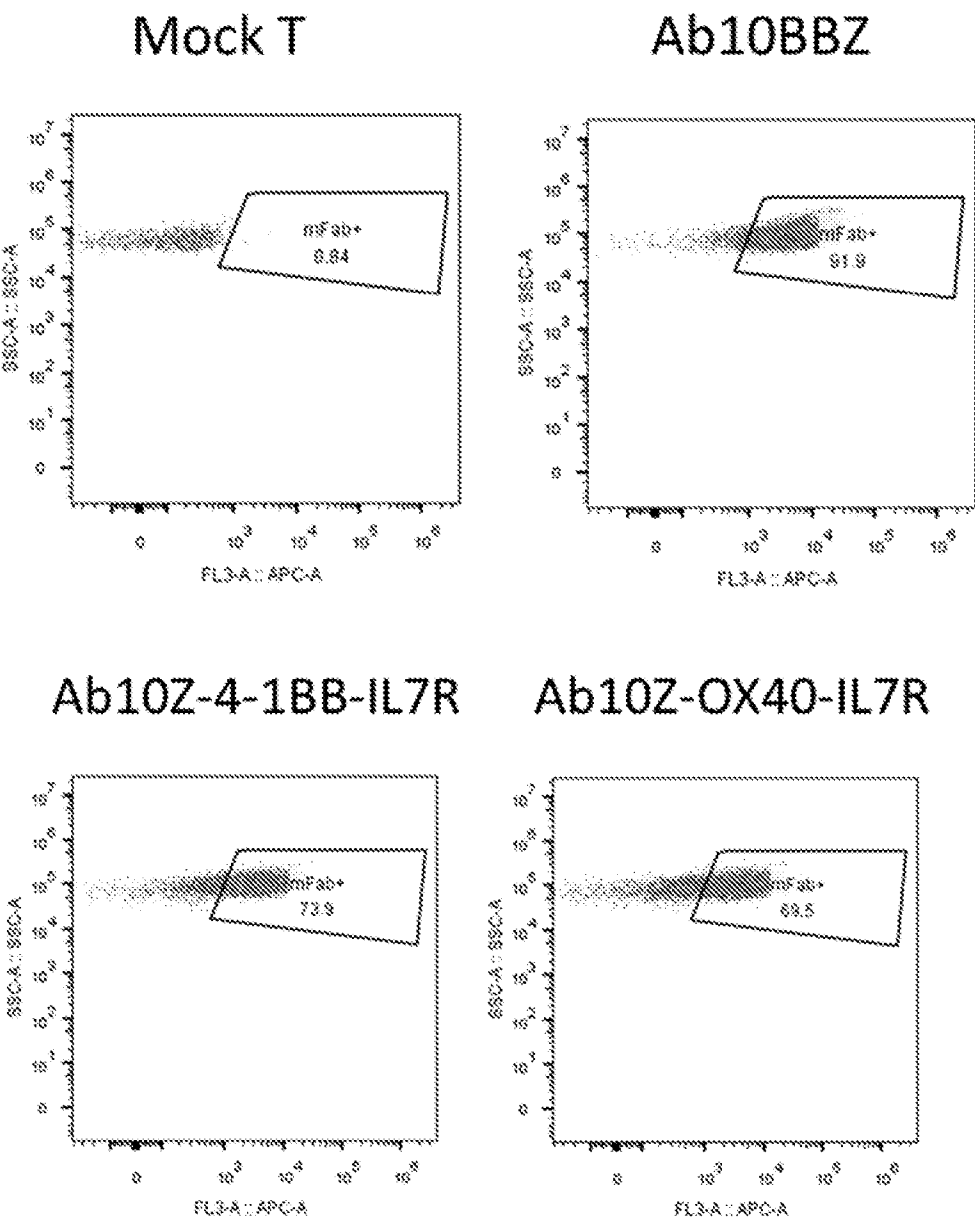


图 2

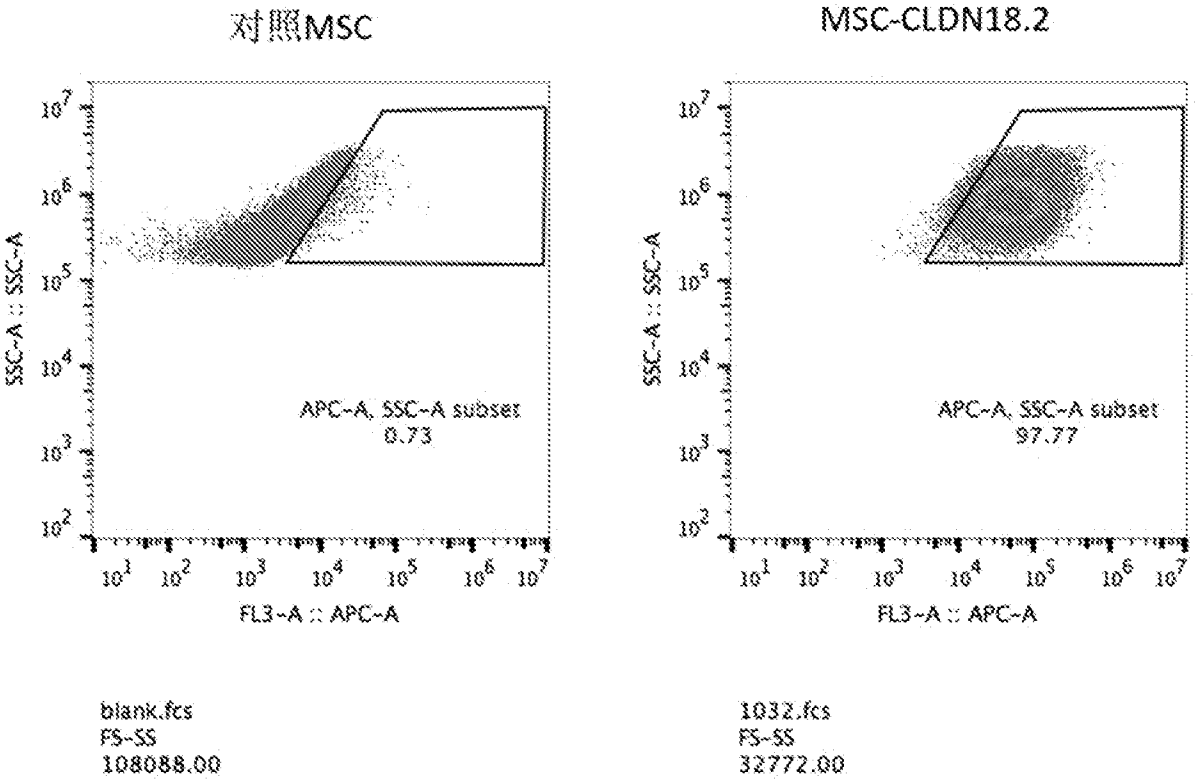


图 3A

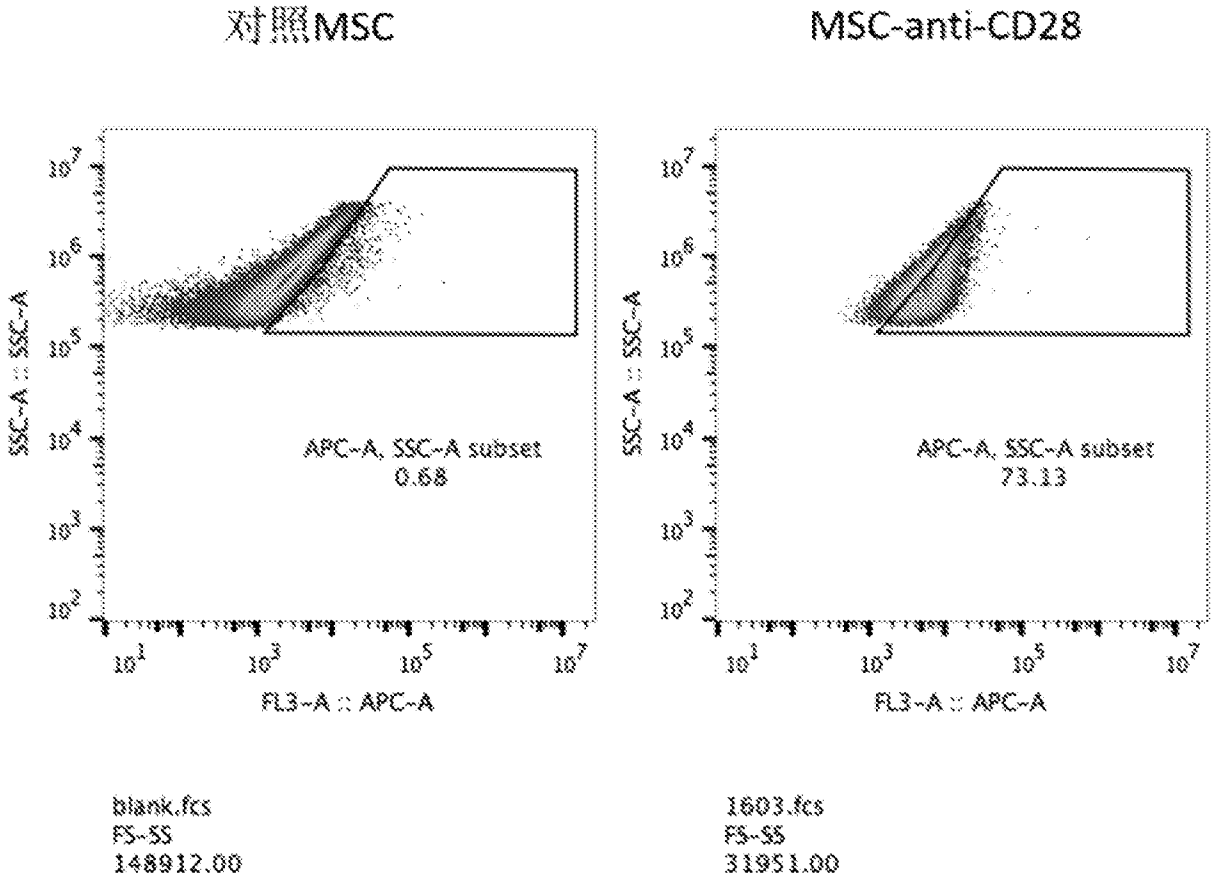


图 3B

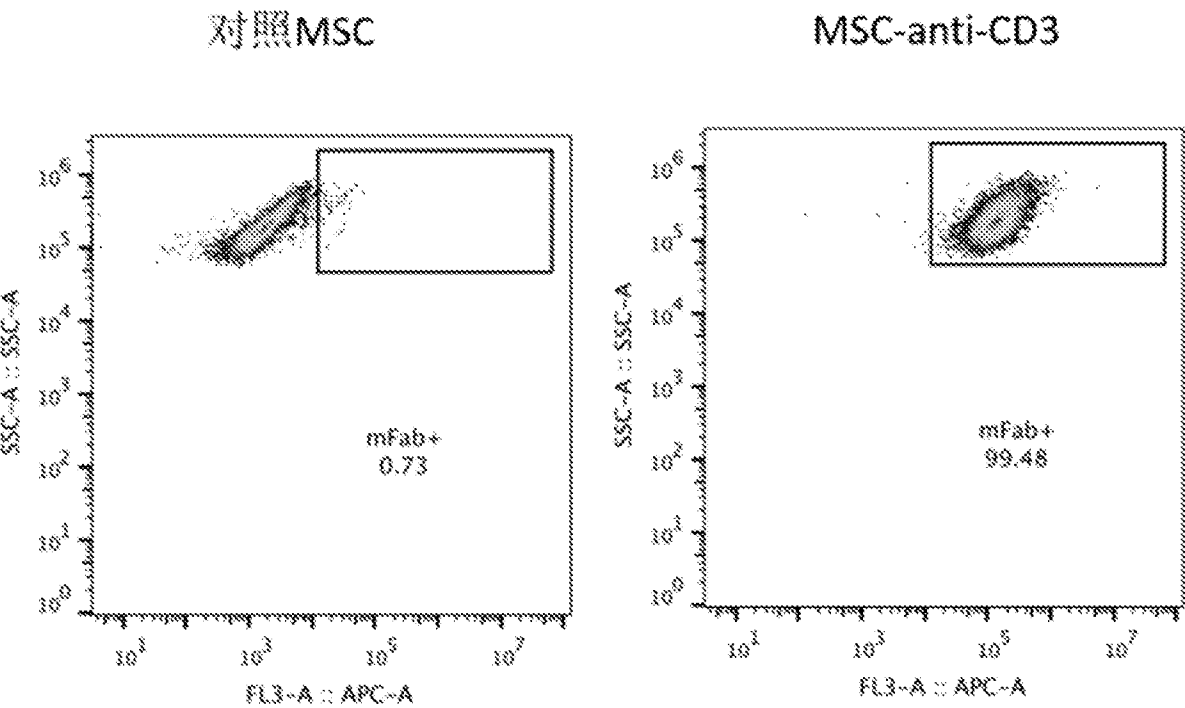


图 3C

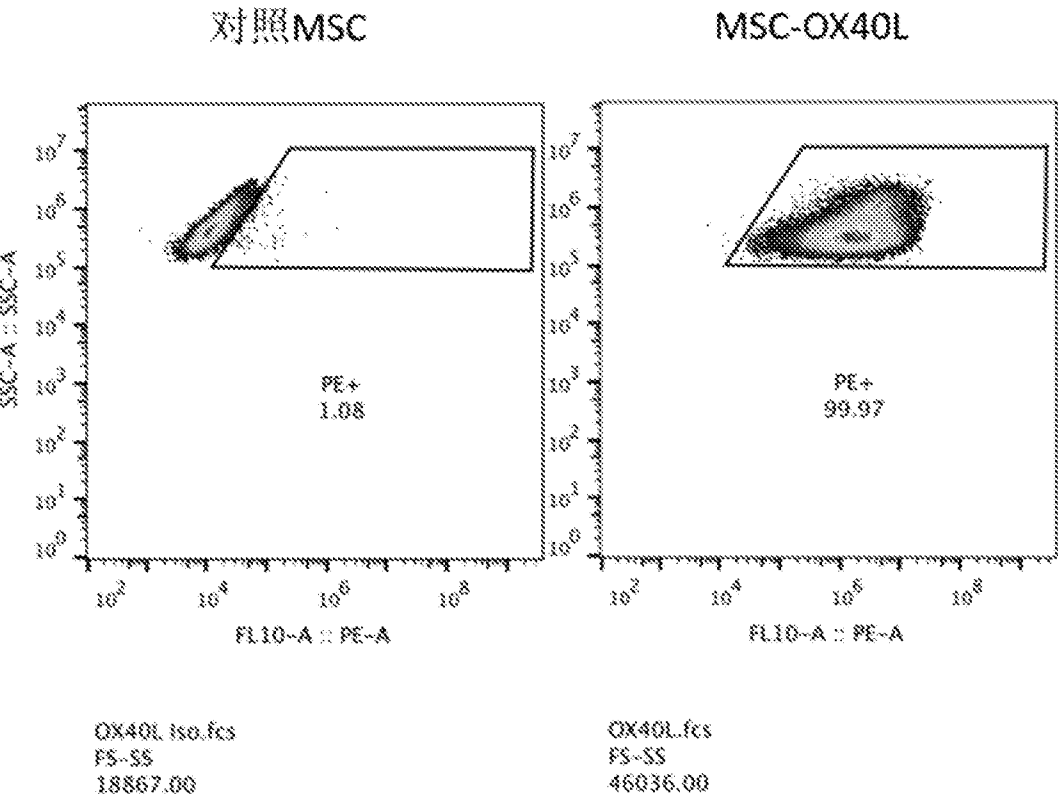


图 3D

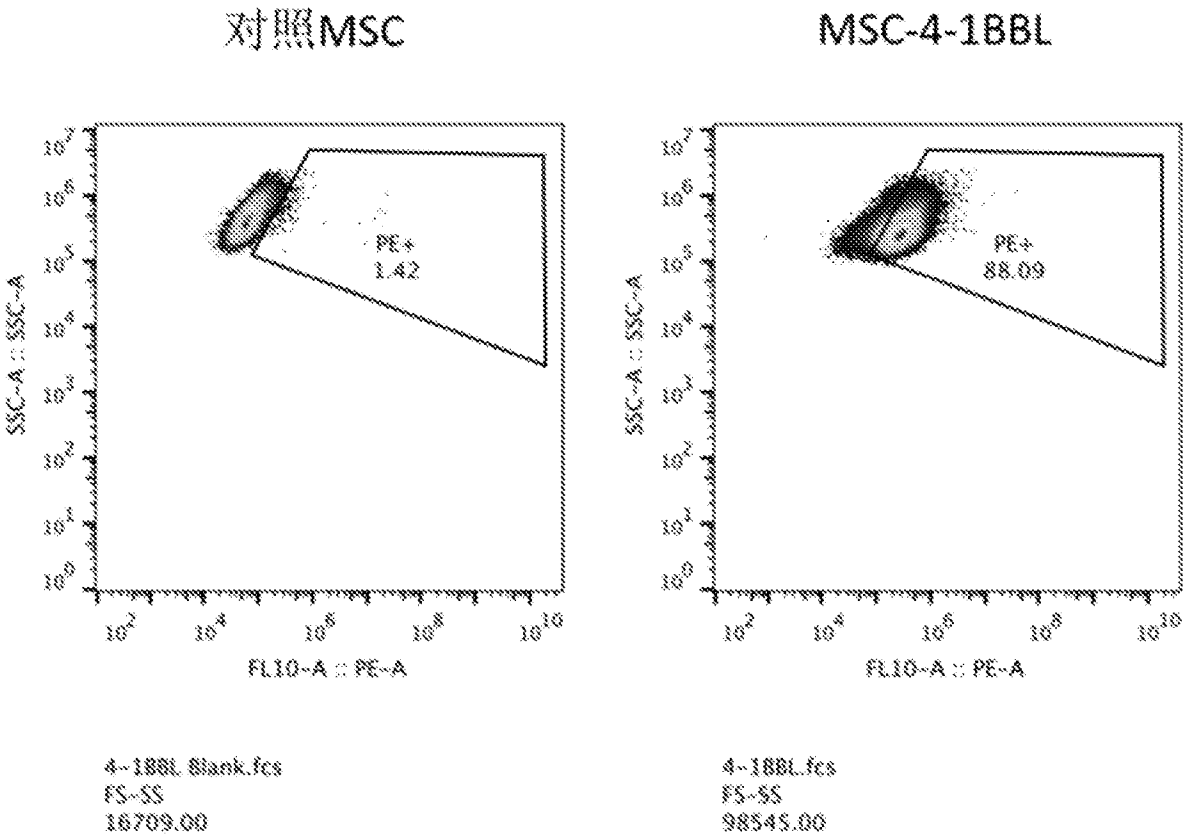


图 3E

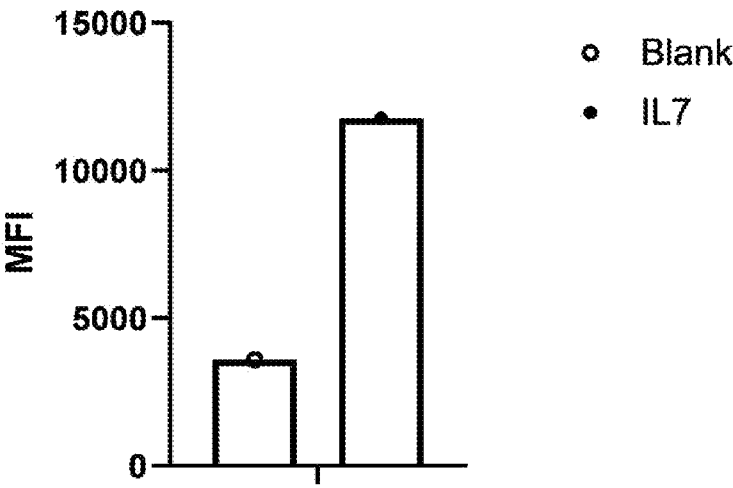


图 3F

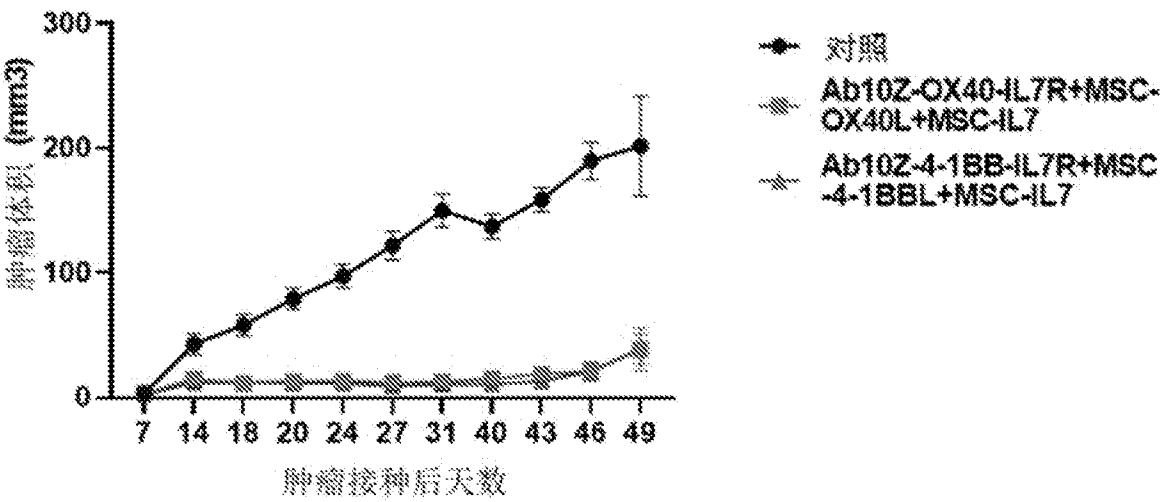


图 4

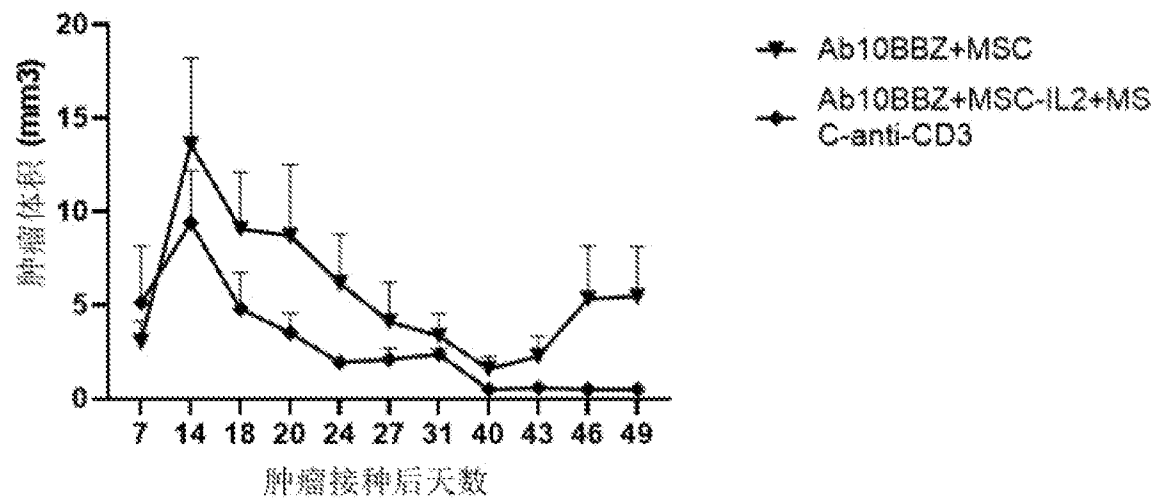


图 5

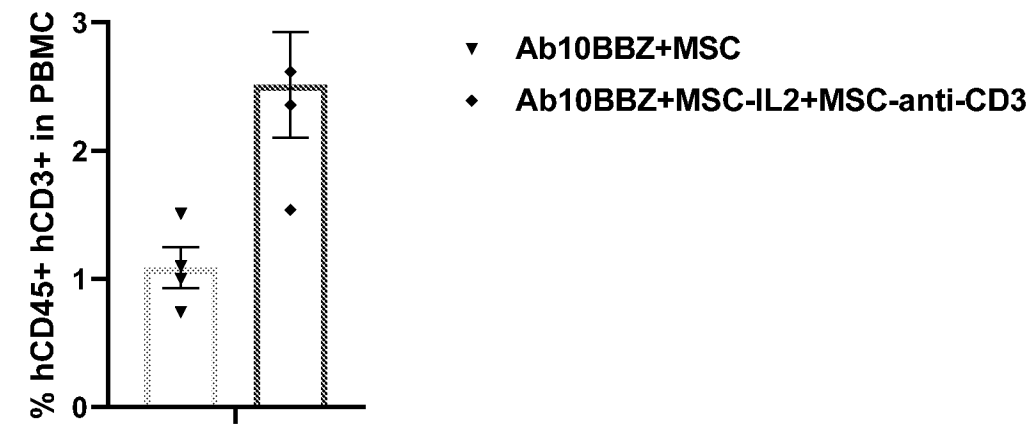


图 6

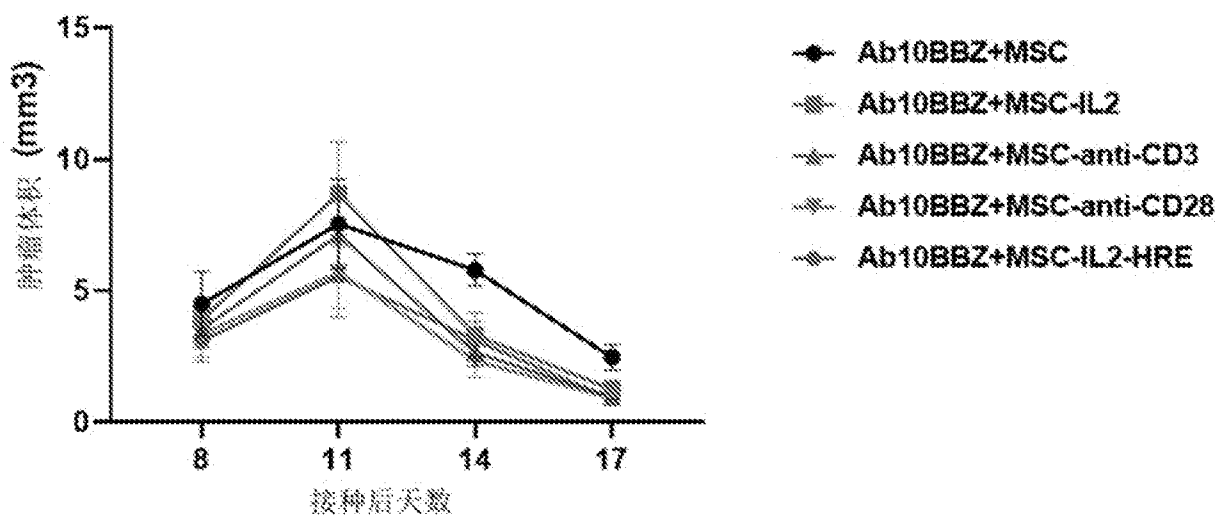


图 7

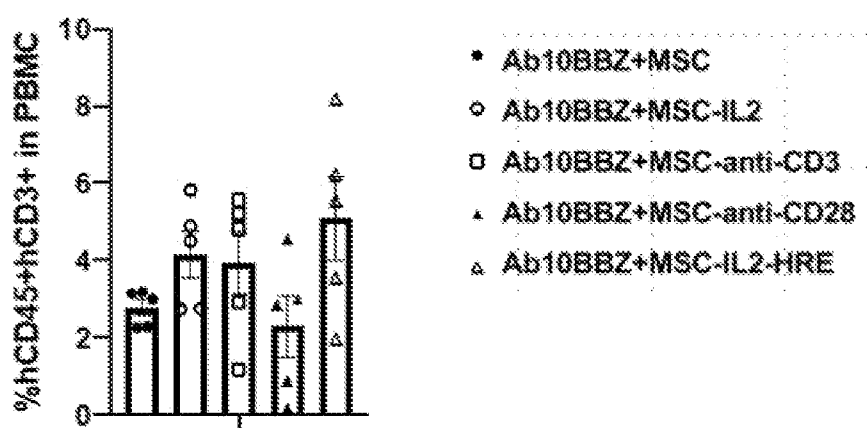


图 8

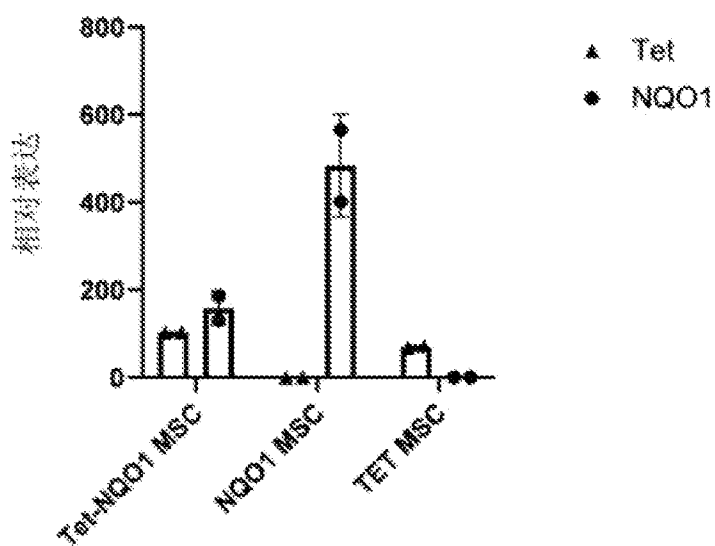


图 9

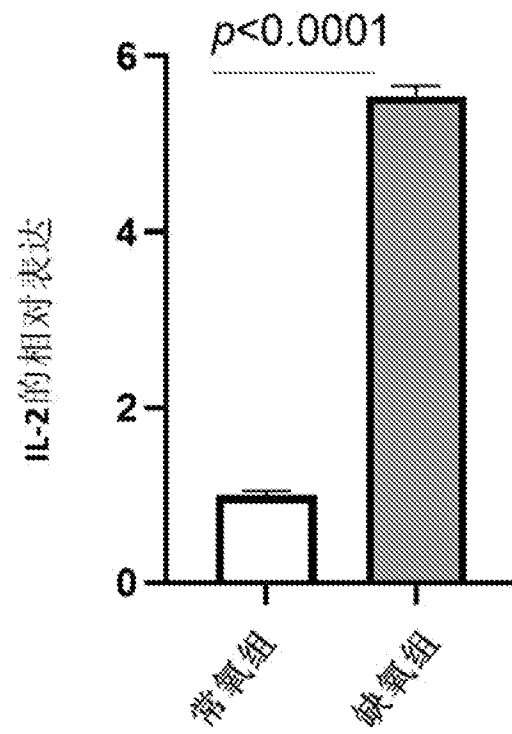


图 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/102733

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 35/28(2015.01)i; A61K 35/17(2015.01)i; A61K 39/00(2006.01)i; C12N 5/0775(2010.01)i; C12N 5/0783(2010.01)i; A61P 35/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K; C12N; A61P

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

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

CNTEXT, ENTXT, VCN, DWPI, VEN, 超星读秀学术, CHAOXING DUXIU SCHOLAR, 中国专利生物序列检索系统, China Patent Biological Sequence Search System, CNKI, 万方, WANFANG, ISI web of knowledge, Elsevier Science Direct, Springerlink, pubmed, genbank, ENA, EMBL, Uniport, STN, 百度, BAIDU, 百度学术, BAIDU SCHOLAR, patents: 间充质干细胞, 嵌合抗原受体, T细胞, 活化, 共刺激, 密蛋白, 白细胞介素, 酶, 低氧, CD3, CD28, OX40, 4-1BB, IL-7, IL-2, IL-12, IL-5, IL-15, CLDN18.2, HRE, SEQ ID NO.1-31

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 106659742 A (APCETH GMBH & CO. KG) 10 May 2017 (2017-05-10) claims 1-38, and description, paragraphs 138 and 147	1-31, 37-68, 71-82
Y	CN 106659742 A (APCETH GMBH & CO. KG) 10 May 2017 (2017-05-10) claims 1-38, and description, paragraphs 138 and 147	32-36, 69-70
Y	MAHAIRA, L. G. et al. "TGF2BP1 expression in human mesenchymal stem cells significantly affects their proliferation and is under the epigenetic control of TET1/2 demethylases" <i>Stem Cells Dev.</i> , Vol. 23, No. 20, 14 July 2014 (2014-07-14), pp. 2501-2512	32-35
Y	ALLJANI, N. et al. "A review on transcriptional regulation responses to hypoxia in mesenchymal stem cells" <i>Cell Biology International</i> , Vol. 44, 28 August 2019 (2019-08-28), pp. 14-26	36
Y	WO 2019242505 A1 (L&L BIOPHARMA CO., LTD.) 26 December 2019 (2019-12-26) abstract, and claims 1-34	69-70



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

02 September 2022

Date of mailing of the international search report

28 September 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/CN2022/102733

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 111386123 A (THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, INC.) 07 July 2020 (2020-07-07) claims 1-45	1-31, 37-68, 71-82
Y	CN 111386123 A (THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, INC.) 07 July 2020 (2020-07-07) claims 1-45	32-36, 69-70
X	HOMBACH, A. A. et al. "IL7-IL12 Engineered Mesenchymal Stem Cells (MSCs) Improve A CAR T Cell Attack Against Colorectal Cancer Cells" <i>Cells</i> , 03 April 2020 (2020-04-03), pp. 1-15	1-31, 37-68, 71-82
Y	HOMBACH, A. A. et al. "IL7-IL12 Engineered Mesenchymal Stem Cells (MSCs) Improve A CAR T Cell Attack Against Colorectal Cancer Cells" <i>Cells</i> , 03 April 2020 (2020-04-03), pp. 1-15	32-36, 69-70
A	CN 110615843 A (SHANGHAI LONGYAO BIOLOGICAL TECHNOLOGY INC.) 27 December 2019 (2019-12-27) entire document	1-82

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/102733

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/CN2022/102733

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)
CN	106659742	A	10 May 2017	EP	3656387 A2	27 May 2020
				AU	2015306231 A1	23 February 2017
				CA	2956987 A1	25 February 2016
				IL	250388 D0	30 March 2017
				EP	3182984 A2	28 June 2017
				WO	2016026854 A2	25 February 2016
				JP	2017525364 A	07 September 2017
				US	2020268802 A1	27 August 2020
				US	2017239297 A1	24 August 2017
WO	2019242505	A1	26 December 2019	JP	2021527441 A	14 October 2021
				US	2021230272 A1	29 July 2021
				EP	3808376 A1	21 April 2021
				CN	111867630 A	30 October 2020
CN	111386123	A	07 July 2020	EP	3713585 A1	30 September 2020
				US	2020345775 A1	05 November 2020
				WO	2019104037 A1	31 May 2019
CN	110615843	A	27 December 2019	CN	114516922 A	20 May 2022
				KR	20210023991 A	04 March 2021
				US	2021169933 A1	10 June 2021
				EP	3812401 A1	28 April 2021
				JP	2021529176 A	28 October 2021
				WO	2019242339 A1	26 December 2019
				CN	112673025 A	16 April 2021

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2022/102733

A. 主题的分类 A61K 35/28(2015.01)i; A61K 35/17(2015.01)i; A61K 39/00(2006.01)i; C12N 5/0775(2010.01)i; C12N 5/0783(2010.01)i; A61P 35/00(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; C12N; A61P 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNTXT, ENTXT, VCN, DWPI, VEN, 超星读秀学术, 中国专利生物序列检索系统, CNKI, 万方, ISI web of knowledge, Elsevier Science Direct, Springerlink, pubmed, genbank, ENA, EMBL, Uniport, STN, 百度, 百度学术, patentics: 间充质干细胞、嵌合抗原受体、T细胞、活化、共刺激、密蛋白、白细胞介素、酶、低氧、CD3、CD28、OX40、4-1BB、IL-7、IL-2、IL-12、IL-5、IL-15、CLDN18.2、HRE、SEQ ID NO.1-31																				
C. 相关文件 <table border="1"> <thead> <tr> <th>类 型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>CN 106659742 A (埃普塞斯有限责任两合公司) 2017年5月10日 (2017 - 05 - 10) 权利要求1-38, 说明书第138, 147段</td> <td>1-31, 37-68, 71-82</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 106659742 A (埃普塞斯有限责任两合公司) 2017年5月10日 (2017 - 05 - 10) 权利要求1-38, 说明书第138, 147段</td> <td>32-36, 69-70</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>MAHAIRA, L.G. 等. "IGF2BP1 expression in human mesenchymal stem cells significantly affects their proliferation and is under the epigenetic control of TET1/2 demethylases" Stem Cells Dev., 第23卷, 第20期, 2014年7月14日 (2014 - 07 - 14), 第2501-2512页</td> <td>32-35</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>ALIJANI, N. 等. "A review on transcriptional regulation responses to hypoxia in mesenchymal stem cells" Cell Biology International, 第44卷, 2019年8月28日 (2019 - 08 - 28), 第14-26页</td> <td>36</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2019242505 A1 (L&L BIOPHARMA CO LTD) 2019年12月26日 (2019 - 12 - 26) 摘要, 权利要求1-34</td> <td>69-70</td> </tr> </tbody> </table>			类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	X	CN 106659742 A (埃普塞斯有限责任两合公司) 2017年5月10日 (2017 - 05 - 10) 权利要求1-38, 说明书第138, 147段	1-31, 37-68, 71-82	Y	CN 106659742 A (埃普塞斯有限责任两合公司) 2017年5月10日 (2017 - 05 - 10) 权利要求1-38, 说明书第138, 147段	32-36, 69-70	Y	MAHAIRA, L.G. 等. "IGF2BP1 expression in human mesenchymal stem cells significantly affects their proliferation and is under the epigenetic control of TET1/2 demethylases" Stem Cells Dev., 第23卷, 第20期, 2014年7月14日 (2014 - 07 - 14), 第2501-2512页	32-35	Y	ALIJANI, N. 等. "A review on transcriptional regulation responses to hypoxia in mesenchymal stem cells" Cell Biology International, 第44卷, 2019年8月28日 (2019 - 08 - 28), 第14-26页	36	Y	WO 2019242505 A1 (L&L BIOPHARMA CO LTD) 2019年12月26日 (2019 - 12 - 26) 摘要, 权利要求1-34	69-70
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																		
X	CN 106659742 A (埃普塞斯有限责任两合公司) 2017年5月10日 (2017 - 05 - 10) 权利要求1-38, 说明书第138, 147段	1-31, 37-68, 71-82																		
Y	CN 106659742 A (埃普塞斯有限责任两合公司) 2017年5月10日 (2017 - 05 - 10) 权利要求1-38, 说明书第138, 147段	32-36, 69-70																		
Y	MAHAIRA, L.G. 等. "IGF2BP1 expression in human mesenchymal stem cells significantly affects their proliferation and is under the epigenetic control of TET1/2 demethylases" Stem Cells Dev., 第23卷, 第20期, 2014年7月14日 (2014 - 07 - 14), 第2501-2512页	32-35																		
Y	ALIJANI, N. 等. "A review on transcriptional regulation responses to hypoxia in mesenchymal stem cells" Cell Biology International, 第44卷, 2019年8月28日 (2019 - 08 - 28), 第14-26页	36																		
Y	WO 2019242505 A1 (L&L BIOPHARMA CO LTD) 2019年12月26日 (2019 - 12 - 26) 摘要, 权利要求1-34	69-70																		
☒ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。																				
* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 "T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件																				
国际检索实际完成的日期		国际检索报告邮寄日期																		
2022年9月2日		2022年9月28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 传真号 (86-10)62019451		王慧 电话号码 86-(10)-53962103																		

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	CN 111386123 A (布里格姆及妇女医院股份有限公司) 2020年7月7日 (2020 - 07 - 07) 权利要求1-45	1-31, 37-68, 71-82
Y	CN 111386123 A (布里格姆及妇女医院股份有限公司) 2020年7月7日 (2020 - 07 - 07) 权利要求1-45	32-36, 69-70
X	HOMBACH, A.A. 等. "IL7-IL12 Engineered Mesenchymal Stem Cells (MSCs) Improve A CAR T Cell Attack Against Colorectal Cancer Cells" Cells, 2020年4月3日 (2020 - 04 - 03), 第1-15页	1-31, 37-68, 71-82
Y	HOMBACH, A.A. 等. "IL7-IL12 Engineered Mesenchymal Stem Cells (MSCs) Improve A CAR T Cell Attack Against Colorectal Cancer Cells" Cells, 2020年4月3日 (2020 - 04 - 03), 第1-15页	32-36, 69-70
A	CN 110615843 A (上海隆耀生物科技有限公司) 2019年12月27日 (2019 - 12 - 27) 全文	1-82

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/CN2022/102733

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	106659742	A	2017年5月10日	EP	3656387	A2	2020年5月27日
				AU	2015306231	A1	2017年2月23日
				CA	2956987	A1	2016年2月25日
				IL	250388	D0	2017年3月30日
				EP	3182984	A2	2017年6月28日
				WO	2016026854	A2	2016年2月25日
				JP	2017525364	A	2017年9月7日
				US	2020268802	A1	2020年8月27日
				US	2017239297	A1	2017年8月24日
WO	2019242505	A1	2019年12月26日	JP	2021527441	A	2021年10月14日
				US	2021230272	A1	2021年7月29日
				EP	3808376	A1	2021年4月21日
				CN	111867630	A	2020年10月30日
CN	111386123	A	2020年7月7日	EP	3713585	A1	2020年9月30日
				US	2020345775	A1	2020年11月5日
				WO	2019104037	A1	2019年5月31日
CN	110615843	A	2019年12月27日	CN	114516922	A	2022年5月20日
				KR	20210023991	A	2021年3月4日
				US	2021169933	A1	2021年6月10日
				EP	3812401	A1	2021年4月28日
				JP	2021529176	A	2021年10月28日
				WO	2019242339	A1	2019年12月26日
				CN	112673025	A	2021年4月16日