

# (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  
2022年1月20日 (20.01.2022)



(10) 国际公布号  
**WO 2022/012531 A1**

(51) 国际专利分类号:  
*C12N 15/90* (2006.01) *C12N 15/85* (2006.01)  
*C12N 5/10* (2006.01) *A61K 35/17* (2015.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2021/106007

(22) 国际申请日: 2021年7月13日 (13.07.2021)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:  
202010676239.6 2020年7月14日 (14.07.2020) CN

(71) 申请人: 苏州克睿基因生物科技有限公司(CURE GENETICS CO., LTD) [CN/CN]; 中国江苏省苏州市苏州工业园区桑田街218号生物医药产业园二期B区20号楼101、201单元, Jiangsu 215123 (CN)。

(72) 发明人: 贾璐盈(JIA, Luying); 中国江苏省苏州市苏州工业园区桑田街218号生物医药产业园二期B区20号楼101、201单元, Jiangsu 215123 (CN)。林彦妮(LIN, Yanni); 中国江苏省苏州市苏州工业园区桑田街218号生物医药产业园二期B区20号楼101、201单元, Jiangsu 215123 (CN)。袁慧(YUAN, Hui); 中国江苏省苏州市苏州工业园

区桑田街218号生物医药产业园二期B区20号楼101、201单元, Jiangsu 215123 (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/蒋舫玮,张琤, Shanghai 201210 (CN)。

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

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG,

(54) Title: METHOD FOR PREPARING MODIFIED IMMUNE CELL

(54) 发明名称: 一种经修饰的免疫细胞的制备方法

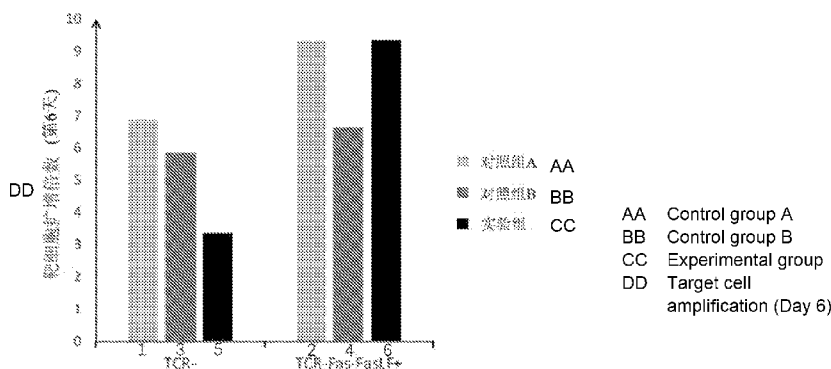


图5

(57) Abstract: A method for preparing a modified immune cell. The modification comprises the following steps: a) reducing the expression and/or activity of a Fas protein in the immune cell, and b) increasing the expression and/or activity of a FasL protein in the immune cell. Thus, compared to an immune cell which is not subjected to the modification, the expression and/or activity of the Fas protein in the modified immune cell are reduced or eliminated, and the expression and/or activity of the FasL protein in the modified immune cell are increased.

(57) 摘要: 一种制备经修饰的免疫细胞的方法, 该修饰包括以下步骤: a) 下调该免疫细胞中Fas蛋白的表达和/或活性, b) 上调该免疫细胞中FasL蛋白的表达和/或活性, 使得, 与未经该修饰的免疫细胞相比, 该经修饰的免疫细胞中Fas蛋白的表达和/或活性降低或消除, 且, 该经修饰的免疫细胞中FasL蛋白的表达和/或活性升高。



WO 2022/012531 A1

CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU,  
IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT,  
RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,  
CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

**本国际公布:**

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

## 一种经修饰的免疫细胞的制备方法

### 技术领域

本申请涉及生物医药领域，具体的涉及一种通用型嵌合抗原 T 细胞的制备方法，包括敲除 Fas 蛋白并转入 FasL 蛋白。

### 背景技术

免疫细胞在抗肿瘤免疫中发挥重要作用。免疫细胞治疗面临的巨大挑战是异体排斥作用，包括输入的细胞对病人体内细胞的排斥作用，即 GvHD，以及病人体内细胞对输入细胞的排斥作用，即 HvGR。避免 HvGR 的方法目前仍处于探索阶段，如果不采用一些策略抑制病人体内杀伤性细胞的异体排斥，输入的免疫细胞将会很快被清除。在人体中实施对外源细胞杀伤作用的细胞主要包括 T 细胞或 NK 细胞。

因此，需要采取策略抑制体内免疫细胞对输入的免疫细胞的杀伤，从而发挥输入型免疫细胞的治疗效果。

### 发明内容

本申请提供了一种制备经修饰的免疫细胞的方法，所述修饰包括以下步骤：a) 下调所述免疫细胞中 Fas 蛋白的表达和/或活性，b) 上调所述免疫细胞中 FasL 蛋白的表达和/或活性。根据所述方法制得的经修饰的免疫细胞可以具有较高的 Fas 蛋白敲除效率和较高的 FasL 蛋白表达效率，能有效抑制异体排斥作用。例如，能够抵抗 T 细胞和/或 PBMC 细胞的杀伤作用。

一方面，本申请提供了一种制备经修饰的免疫细胞的方法，所述修饰包括以下步骤：

a) 下调所述免疫细胞中 Fas 蛋白的表达和/或活性，b) 上调所述免疫细胞中 FasL 蛋白的表达和/或活性，使得，与所述免疫细胞相比，所述经修饰的免疫细胞中 Fas 蛋白的表达和/或活性降低或消除，且，所述经修饰的免疫细胞中 FasL 蛋白的表达和/或活性升高。

在某些实施方式中，所述步骤 a) 包括下调所述免疫细胞中编码 Fas 蛋白的核酸分子的表达和/或活性。

在某些实施方式中，所述步骤 a) 所述下调方式包括通过基因敲除 (knock out)、基因敲减 (knock down)、基因突变、基因缺失、基因沉默或上述的任意组合来下调。

在某些实施方式中，所述步骤 a) 的所述下调包括向所述免疫细胞施用一种或多种选自下

组的物质：反义 RNA、siRNA、shRNA、CRISPR/Cas 系统、RNA 编辑系统如 RNA 腺苷脱氨酶（ADAR）、RNA 指导的核酸内切酶、锌指核酸酶（ZFN）、Mega-TAL 核酸酶、转录激活子样效应物核酸酶（TALEN）、大范围核酸酶（Meganuclease）、碱基编辑、CRISPR 干扰，和，锌指蛋白（Zinc finger）基因阻遏物和/或转录激活子样效应物（TALE）基因阻遏物介导的转录抑制。

在某些实施方式中，所述步骤 a) 包括向所述免疫细胞施用靶向编码 Fas 蛋白的核酸分子的指导 RNA。

在某些实施方式中，所述步骤 a) 包括靶向所述免疫细胞中编码 Fas 蛋白的核酸分子的外显子 1-5 中的任意一个或多个。

在某些实施方式中，所述 Fas 蛋白包括 SEQ ID NO: 46 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述编码 Fas 蛋白的核酸分子包括 NCBI 数据库 gene ID: 355 下或 Ensembl 数据库 ENSG00000026103 下所示的核苷酸序列。

在某些实施方式中，所述靶向 Fas 蛋白的核酸分子的指导 RNA 包含如 SEQ ID NO: 1-15 中任一项所示的核苷酸序列。

在某些实施方式中，所述靶向编码 Fas 蛋白的核酸分子的指导 RNA 为单链指导 RNA。

在某些实施方式中，所述靶向编码 Fas 蛋白的核酸分子的指导 RNA 为包含 crRNA 和 tracrRNA 的双链指导 RNA。

在某些实施方式中，所述 crRNA 包含如 SEQ ID NO: 1-15 中任一项所示的核苷酸序列。

在某些实施方式中，所述的方法包括下调所述免疫细胞中 T 细胞受体（TCR）、T 细胞受体  $\alpha$  恒定区蛋白、T 细胞受体  $\beta$  恒定区蛋白和/或 PD-1 蛋白的表达和/或活性。

在某些实施方式中，所述的方法包括下调编码所述 TCR、T 细胞受体  $\alpha$  恒定区蛋白、T 细胞受体  $\beta$  恒定区蛋白和/或所述 PD-1 蛋白的核酸分子的表达和/或活性。

在某些实施方式中，所述的方法包括向所述免疫细胞施用靶向编码所述 T 细胞受体  $\alpha$  恒定区蛋白的核酸分子（TRAC）的指导 RNA。

在某些实施方式中，所述 T 细胞受体  $\alpha$  恒定区蛋白包括 SEQ ID NO: 49 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述靶向编码所述 T 细胞受体  $\alpha$  恒定区蛋白的核酸分子（TRAC）的指导 RNA 包含如 SEQ ID NO: 31-33 中任一项所示的核苷酸序列。

在某些实施方式中，所述的方法包括向所述免疫细胞施用靶向编码所述 PD-1 蛋白的核酸分子的指导 RNA。

在某些实施方式中，所述方法包括靶向所述免疫细胞中编码所述 PD-1 蛋白的核酸分子的外显子 1-3。

在某些实施方式中，所述 PD-1 蛋白包括 SEQ ID NO: 48 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述靶向编码所述 PD-1 蛋白的核酸分子的指导 RNA 包含如 SEQ ID NO: 16-30 中任一项所示的核苷酸序列。

在某些实施方式中，所述靶向编码所述 Fas 蛋白的核酸分子的指导 RNA、靶向编码所述 PD-1 蛋白的核酸分子和/或靶向编码所述 TCR 的核酸分子的指导 RNA 包含化学修饰。

在某些实施方式中，所述的方法包括向所述免疫细胞施用 Cas 蛋白。

在某些实施方式中，所述 Cas 蛋白为 Cas9 蛋白。

在某些实施方式中，所述步骤 b) 包括上调所述免疫细胞中编码 FasL 蛋白的核酸分子的表达和/或活性。

在某些实施方式中，所述步骤 b) 包括向所述免疫细胞施用编码 FasL 蛋白的核酸分子。

在某些实施方式中，所述的方法包括向所述免疫细胞施用包含编码 FasL 蛋白的核酸分子的载体。

在某些实施方式中，所述 FasL 蛋白包括胞外结构域。

在某些实施方式中，所述 FasL 蛋白的胞外结构域包括如 SEQ ID NO: 52 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述 FasL 蛋白包括铰链区。

在某些实施方式中，所述铰链区源自肿瘤坏死因子超家族。

在某些实施方式中，所述铰链区源自 FasL、TNFSF10 或 OX40L。

在某些实施方式中，所述 FasL 蛋白包括胞内结构域

在某些实施方式中，所述 FasL 蛋白包括如 SEQ ID NO: 50-52 和 63-64 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述编码 FasL 蛋白的核酸分子包括如 SEQ ID NO: 53-55 所示的核苷酸序列。

在某些实施方式中，所述的方法还包括上调所述免疫细胞中的 PD-L1 和/或 CD24 蛋白的表达和/或活性。

在某些实施方式中，所述的方法包括向所述免疫细胞施用编码 PD-L1 蛋白的核酸分子和/或编码 CD24 蛋白的核酸分子。

在某些实施方式中，所述的方法包括向所述免疫细胞施用包含编码 PD-L1 蛋白的核酸分

子和/或编码 CD24 蛋白的核酸分子的载体。

在某些实施方式中，所述 PD-L1 蛋白包括如 SEQ ID NO: 56-57 中任一项所示的氨基酸序列

在某些实施方式中，所述编码 PD-L1 蛋白的核酸分子包括如 SEQ ID NO: 58 所示的核苷酸序列。

在某些实施方式中，所述 CD24 蛋白包括如 SEQ ID NO: 59 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述编码 CD24 蛋白的核酸分子包括如 SEQ ID NO: 60 所示的核苷酸序列。

在某些实施方式中，所述载体包含病毒载体。

在某些实施方式中，所述免疫细胞包括 T 细胞、NK 细胞、NKT 细胞、单核细胞、巨噬细胞、B 细胞、浆细胞、粒细胞、树突状细胞、淋巴细胞、白细胞、干细胞和/或外周血单个核细胞。

在某些实施方式中，所述步骤 b) 在所述步骤 a) 之后进行。

在某些实施方式中，所述步骤 b) 在所述步骤 a) 中的下调成功后进行。

在某些实施方式中，所述下调成功包括，与经所述步骤 a) 前的免疫细胞相比，经过所述步骤 a) 后的所述免疫细胞中 Fas 蛋白的表达和/或活性降低至少 50%。

在某些实施方式中，所述下调成功包括基因编辑发生。

在某些实施方式中，所述步骤 b) 在所述步骤 a) 至少 6 小时后进行。在某些实施方式中，所述的方法还包括以下步骤：使所述经修饰的免疫细胞包括嵌合抗原受体 (CAR)、T 细胞受体 (TCR)、嵌合自身抗体受体 (CAAR) 和/或至少一种合成受体。

在某些实施方式中，所述的方法还包括以下步骤：使所述经修饰的免疫细胞包括表达嵌合抗原受体 (CAR)、T 细胞受体 (TCR)、嵌合自身抗体受体 (CAAR) 和/或至少一种合成受体的核酸分子。

另一方面，本申请提供了根据所述的方法制得的经修饰的免疫细胞，与未经所述修饰的免疫细胞相比，所述经修饰的免疫细胞中 Fas 蛋白的表达和/或活性降低或消除，且，所述经修饰的免疫细胞中 Fas 蛋白的表达和/或活性升高。

在某些实施方式中，所述的免疫细胞包括嵌合抗原受体 (CAR)、T 细胞受体 (TCR)、嵌合自身抗体受体 (CAAR) 和/或至少一种合成受体。

另一方面，本申请提供了细胞群，其包含所述的免疫细胞，且所述细胞群中至少 20% 的免疫细胞基本上不表达 Fas，至少 5% 的免疫细胞过表达 FasL。

在某些实施方式中，所述的细胞群中的至少 15%的免疫细胞基本上不表达 PD-1。

在某些实施方式中，所述的细胞群中的至少 5%的免疫细胞过表达 PD-L1。

在某些实施方式中，所述的细胞群中的至少 5%的免疫细胞过表达 CD24。

另一方面，本申请提供了药物组合物，其包含所述的免疫细胞和/或所述的细胞群，以及药学上可接受的载体。

另一方面，本申请提供了所述的免疫细胞、所述的细胞群和/或所述的药物组合物在制备药物中的用途，所述药物用于治疗肿瘤。

另一方面，本申请提供了靶向编码 Fas 蛋白的核酸分子的指导 RNA，其中所述指导 RNA 包含 SEQ ID NO: 1-15 中任一项所示的核苷酸序列。

另一方面，本申请提供了靶向编码 PD-1 蛋白的核酸分子的指导 RNA，其中所述指导 RNA 包含 SEQ ID NO: 16-30 中任一项所示的核苷酸序列。

另一方面，本申请提供了 CRISPR/Cas 系统，其包括所述靶向编码 Fas 蛋白的核酸分子的指导 RNA 和 Cas 蛋白。

在某些实施方式中，所述 Cas 蛋白包括 Cas9 蛋白。

另一方面，本申请提供了异体细胞移植的方法，其包括施用有效量的所述的免疫细胞、所述的细胞群和/或所述药物组合物。

另一方面，本申请提供了治疗肿瘤的方法，其包括施用有效量的所述的免疫细胞、所述的细胞群，和/或所述的药物组合物。

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修改而不脱离本申请所涉及发明的精神和范围。相应地，本申请的附图和说明书中的描述仅仅是示例性的，而非为限制性的。

## 附图说明

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

图 1 显示的是靶向 Fas 的指导 RNA 的敲除效率。

图 2 显示的是本申请所述经修饰的免疫细胞中 Fas 的敲除效率及 FasL 的表达效率。

图 3 显示的是本申请所述经修饰的免疫细胞的扩增效率。

图 4 显示的是本申请所述经修饰的免疫细胞与异体 T 细胞共同培养后的扩增倍数。

图 5 显示的是本申请所述经修饰的免疫细胞与异体 T 细胞共同培养第 6 天时的扩增倍数。

图 6 显示的是本申请所述经修饰的免疫细胞中 FasLF、FasL-M1 和 FasL-M2 的表达效率。

图 7 显示的是本申请所述经修饰的免疫细胞与异体 T 细胞共同培养后的扩增倍数。

## 具体实施方式

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

### 术语定义

在本申请中，术语“修饰”通常是指分子或细胞的状态或结构改变。分子可以以多种方式被修饰，包括化学、结构和功能修饰。细胞可以通过改变核苷酸或蛋白质序列而被修饰。在蛋白质的范围内，修饰可以指参照分子内至少一个氨基酸残基被置换，删除或添加的片段。在核酸范围内，修饰可以是指参照分子内至少一个核酸残基被置换，删除或添加的片段。所述修饰使得细胞中蛋白质的表达和/或活性被改变。

在本申请中，术语“下调”通常是指经本申请所述修饰后的免疫细胞中，编码一种或多种蛋白质或其功能性片段的核酸分子（例如，RNA 或 DNA）的水平或活性、或一种或多种蛋白质或其功能性片段的水平或活性降低或消除，低于未经本申请所述修饰的免疫细胞中的水平。

在本申请中，术语“上调”通常是指经本申请所述修饰后的免疫细胞中，编码一种或多种蛋白质或其功能性片段的核酸分子（例如，RNA 或 DNA）的水平或活性、或一种或多种蛋白质或其功能性片段的水平或活性增加，高于未经本申请所述修饰的免疫细胞中的水平。未经本申请所述修饰的免疫细胞中的水平也可以不存在所述编码一种或多种蛋白质或其功能性片段的核酸分子（例如，RNA 或 DNA），或所述编码一种或多种蛋白质或其功能性片段的核酸分子（例如，RNA 或 DNA）不表达。

在本申请中，术语“基因敲除（knock out）”通常是指使基因缺失或功能消除的基因工程技术。

在本申请中，术语“基因敲减（knock down）”通常是指使基因部分缺失或功能部分丧失

或降低的基因工程技术。

在本申请中，术语“基因突变”通常是指基因的核苷酸序列中一个或多个核苷酸的插入、取代、缺失、移码突变或错义突变，通常引起该基因功能的降低或缺失。

在本申请中，术语“基因缺失”通常是指基因的核苷酸序列中一个或多个核苷酸，例如，核苷酸片段的丢失，也包括编码蛋白的全部基因的丢失。

在本申请中，术语“基因沉默”通常是指基因的表达受到抑制，可通过阻碍该基因的转录或翻译来抑制。

在本申请中，术语“Fas”通常是指一种细胞表面的死亡受体，也可称为 Fas 受体、APT1、CD95、FAS1、APO-1、FASTM、ALPS1A 或肿瘤坏死因子受体超家族成员 6 (TNFRSF6)。成熟的 Fas 蛋白包括胞外结构域、跨膜区和/或胞内结构域。外显子 1 至外显子 5 编码胞外区域，外显子 6 编码跨膜区，外显子 7-9 编码胞内区域。该术语包含全长的未加工的 Fas、前体、成熟体，以及由细胞内加工或人为修饰的任何形式的 Fas 或其变体、衍生物、类似物、同源物、片段及其功能性变体，例如，可变剪切体和/或等位变体。示例性的人 Fas 蛋白的氨基酸序列可参见 NCBI 数据库登录号 NP\_000034.1 (变体 1)、NP\_001307548.1 (变体 4)、NP\_690610.1 (变体 2) 和/或 NP\_690611.1 (变体 3)。编码 Fas 蛋白的核酸分子可参见 NCBI 数据库 gene ID: 355 下或 Ensembl 数据库 ENSG00000026103 下所示的核苷酸序列。

在本申请中，术语“FasL”通常是指一种 II 型跨膜蛋白，属于肿瘤坏死因子 (TNF) 家族。Fas-FasL 相互作用在调节免疫系统和癌症进展中起重要作用，也称为 Fas 配体、TNFSF6、CD178、CD95L、FASLG、TNLG1A 或 APT1LG1。其受体可包括 Fas 受体和/或 DcR3。Fas-FasL 结合触发的凋亡在免疫系统的调节中起着基本作用。该术语包含全长的未加工的 FasL、前体、成熟体，以及由细胞内加工或人为修饰的任何形式的 FasL 或其变体、衍生物、类似物、同源物、片段及其功能性变体，例如，可变剪切体和/或等位变体。又例如，铰链区进行了突变或替换的变体。FasL 蛋白可包括胞内结构域、跨膜区、铰链区和/或胞外结构域；各个区域均可进行突变、替换、插入、或删除等改动，而不影响 Fas-FasL 结合，仍然起到抵抗抗体排斥的作用。示例性的人 FasL 蛋白的氨基酸序列可参见 NCBI 数据库登录号 NP\_001192172.1 (变体 2) 和/或 NP\_034307.1 (变体 1)。

在本申请中，术语“PD-1”通常是指程序性细胞死亡 1，也可称为 PDCD1、CD279、PD1 或 SLEB2，一种 I 型跨膜蛋白，并与 BTLA、CTLA-4、ICOS 和 CD28 一起构成 T 细胞共刺激受体的 CD28 家族。“PD-1”包括完整的 PD-1 及其片段，还包括人 PD-1 的功能性变体、同工型、物种同源物、衍生物、类似物，以及具有至少一个与 PD-1 共同表位的类似物。示例性

的人 PD-1 编码区序列可以在 NCBI GenBank 登录号 NM\_005018.3 下找到。

在本申请中，术语“PD-L1”通常是指程序性细胞死亡 1 配体 1，也可称为 B7 同源物 1、B7-H1 或 CD274，其与 PD-1 结合后下调 T 细胞活化和细胞因子分泌。“PD-L1”包括完整的 PD-L1 及其片段，还包括人 PD-1 的功能性变体、同工型、物种同源物、衍生物、类似物，以及具有至少一个与 PD-L1 共同表位的类似物。示例性的人 PD-L1 序列可在 NCBI GenBank 登录号 NM\_001267706.1、NM\_014143.4 或 NM\_001314029.2 下找到。

在本申请中，术语“CD24”通常是指一种细胞表面受体蛋白，也称为热稳定抗原 24(HSA)。“CD24”包括完整的 CD24 及其片段，还包括人 CD24 的功能性变体、同工型、物种同源物、衍生物、类似物，以及具有至少一个与 CD24 共同表位的类似物。示例性的人 CD24 序列可在 NCBI GenBank 登录号 NM\_001291737、NM\_001291738、NM\_001291739、NM\_013230 或 NM\_001359084 下找到。

在本申请中，术语“嵌合抗原受体 (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，其可包括靶向部分 (例如，结合肿瘤相关抗原 (tumor-associated antigen, TAA) 的部分)、铰链区、跨膜区和细胞内结构域。

在本申请中，术语“T 细胞表面受体 (TCR)”通常可以包括  $\alpha\beta$  形式或  $\gamma\delta$  形式的 TCR。根据 T 细胞表面受体 (TCR) 类型的不同，可将 T 细胞分为  $\alpha\beta$ T 细胞和  $\gamma\delta$ T 细胞。 $\alpha\beta$ T 细胞表达  $\alpha\beta$ TCR。 $\alpha\beta$ TCR 有很多亚型，其表达于  $\alpha\beta$ T 细胞表面，负责以主要组织相容性复合体 (MHC) 依赖的形式识别特异性抗原。 $\gamma\delta$ T 细胞是指 T 细胞的 TCR 由  $\gamma$  链和  $\delta$  链构成的 T 细胞，其免疫作用介于固有免疫和适应性免疫之间，为 MHC 非限制型 T 细胞，具有一定的非特异性杀伤肿瘤细胞的作用，并且具有广泛的抗癌谱。

在本申请中，术语“嵌合自身抗体受体 (CAAR)”通常是指包含自身抗原、能够被自身抗体识别的蛋白，英文名称为 chimeric autoantibody receptors。CAAR 可以指导经遗传修饰表达 CAAR 的免疫细胞攻击表达能够识别该抗原的抗体的 B 细胞 (可参见 Science. 2016 Jul 8;353(6295):179-84. doi: 10.1126/science.aaf6756. Epub 2016 Jun 30. Reengineering Chimeric Antigen Receptor T Cells for Targeted Therapy of Autoimmune Disease Christoph T Ellebrecht et al.)。

在本申请中，术语“合成受体”通常是指工程化的细胞表面蛋白或蛋白复合物，其包含 (1) 可以特异性结合靶分子的靶结合域，和 (2) 可以激活信号传导途径的功能域。在工程单元中，靶结合域可包含细胞外结构域，功能结构域可包含细胞内结构域。合成受体还可包

括跨膜序列。合成受体可以是蛋白质复合物，其包含从外源核酸表达的蛋白质。合成受体也可以是蛋白质复合物，其包含至少一种外源表达的蛋白质和至少一种内源表达的蛋白质。在一些实施方案中，工程细胞可以是免疫细胞，例如 T 细胞，自然杀伤 (NK) 细胞，B 细胞，巨噬细胞等，并且功能域可以直接或间接激活免疫细胞。在某些实施方案中，合成受体可以选自：嵌合抗原受体 (“CAR”)，T 细胞受体 (“TCR”)，TCR 受体融合构建体 (“TRuC”)，T 细胞抗原偶联剂 (“TAC”)，嵌合自身抗体受体 (“CAAR”)，抗体 TCR 受体 (“AbTCR”) 和嵌合 CD3 $\epsilon$  受体。在一些实施方案中，合成受体可以是 CAR。在一些实施方案中，合成受体可以是 TCR。在一些实施方案中，合成受体可以是 TRuC。在一些实施方案中，合成受体可以是 TAC。在一些实施方案中，合成受体可以是 AbTCR。在一些实施方案中，合成受体可以是嵌合 CD3 $\epsilon$  受体。

在本申请中，术语 “CRISPR/Cas 系统” 或 “CRISPR-Cas 系统” 通常是指由成簇规律间隔短回文重复序列 (CRISPR) 和 CRISPR 相关蛋白 (即 Cas 蛋白) 组成的核酸酶系统，能够对真核细胞中几乎所有与前间区序列邻近基序 (protospacer-adjacent motif, PAM) 相邻的基因组序列进行切割。“CRISPR/Cas 系统” 可用来统称涉及 CRISPR 相关 (“Cas”) 基因的转录物，以及涉及其表达或指导其活性的其他元件，可包括编码 Cas 基因的序列、tracr (反式激活 CRISPR) 序列 (例如 tracrRNA 或其活性部分)、tracr 配偶序列 (在内源 CRISPR/Cas 系统背景下，涵盖 “同向重复” 和加工的部分同向重复)、指导序列 (在内源 CRISPR/Cas 系统背景下也称为 “spacer”)、或来自 CRISPR 座位的其他序列和转录物。已经鉴定出五种类型的 CRISPR 系统 (例如，I 型、II 型、III 型、U 型和 V 型)。

在本申请中，术语 “Cas 蛋白” 也称为 “CRISPR 相关蛋白” 通常是指与 CRISPR 序列互补的一类酶，能够使用 CRISPR 序列作为指导 (guide)，从而识别和切割特定的 DNA 链。Cas 蛋白的非限制性实例包括：Cas1、Cas1B、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、Cas9 (也称为 Csn1 和 Csx12)、Cas10、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1、Cse2、Csc1、Csc2、Csa5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csl17、Csl14、Csl10、Csl16、CsaX、Csx3、Csl1、Csl15、Csf1、Csf2、Csf3、Csf4，和/或他们的同系物、或其修饰形式。在一些实施例中，该 Cas 蛋白是 Cas9 蛋白。

在本申请中，术语 “Cas9 蛋白” 或 “Cas9 核酸酶”，也称为 Csn1 或 Csx12，通常是指 II 型 CRISPR/Cas 系统中一类既参与 crRNA 生物合成又参与摧毁入侵 DNA 的蛋白质。Cas9 蛋白通常包括 RuvC 核酸酶结构域和 HNH 核酸酶结构域，分别切割双链 DNA 分子的两条不同的链。已经在不同的细菌物种如嗜热链球菌 (*S.thermophiles*)、无害利斯特氏菌 (*Listeria innocua*)

(Gasiunas, Barrangou et al.2012; Jinek, Chylinski et al.2012) 和化脓性链球菌 (S.Pyogenes) (Deltcheva, Chylinski et al.2011) 中描述了 Cas9 蛋白。例如, 化脓链球菌 (Streptococcus pyogenes) Cas9 蛋白, 其氨基酸序列参见 SwissProt 数据库登录号 Q99ZW2; 脑膜炎奈瑟氏菌 (Neisseria meningitides) Cas9 蛋白, 其氨基酸序列见 UniProt 数据库编号 A1IQ68; 嗜热链球菌 (Streptococcus thermophilus) Cas9 蛋白, 其氨基酸序列见 UniProt 数据库编号 Q03LF7; 金黄色葡萄球菌 (Staphylococcus aureus) Cas9 蛋白, 其氨基酸序列见 UniProt 数据库编号 J7RUA5。

在本申请中, 术语“指导 RNA”通常是指 CRISPR 中包含的 RNA 组分, 也可称为 guide RNA (gRNA)。指导 RNA 一般包含指导序列和骨架序列, 这两个序列可以在同一个分子中或不同的分子中。指导 RNA 的作用可以为指导 Cas9 蛋白切割与指导序列互补的 DNA 位点, 也即靶序列。一般而言, 指导序列是与靶序列具有足够互补性以便与该靶序列杂交、并且指导 CRISPR 复合物与该靶序列特异性结合的任何多核苷酸序列。指导序列与其相应的靶序列之间的互补程度是约或多于约 50%或更多。一般一个指导序列的长度为约或多于约 12 个核苷酸。骨架序列为指导 RNA 中必须的, 除指导序列之外的其余序列, 一般包含 tracr 序列和 tracr 配偶序列, 这些序列一般不会因为靶序列的变化而改变。该术语包括单链指导 RNA (sgRNA) 以及由 crRNA (CRISPR RNA) 和 tracrRNA (反式激活 crRNA) 组成的双链指导 RNA。

在本申请中, 术语“CRISPR 干扰”也称为 CRISPR interference 或 CRISPRi, 通常是指缺少内切核酸酶活性的 Cas 蛋白 (例如 Cas9), 该失活的 Cas 蛋白 (例如 Cas9) 会产生感兴趣基因的特异性沉默或减少。

在本申请中, 术语“siRNA”也可称为 siRNA 寡核苷酸”、“RNAi 寡核苷酸”或“短干扰 RNA”, 通常是指通过转录后基因剪接而起作用的寡核苷酸, 也称为 RNA 干扰 (RNAi)。

在本申请中, 术语“shRNA”也可称为短发夹 RNA, 通常是指人工单链干扰 RNA 分子, 其在茎环或发夹结构中包含“siRNA 双链体”的有义链和反义链。

在本申请中, 术语“RNA 腺苷脱氨酶 (ADAR)”通常是指一种可用于 RNA 编辑的酶, 其可将 RNA 中的腺苷转变为肌苷。

在本申请中, 术语“碱基编辑”通常是指在基因组上引起单个碱基改变的基因编辑技术。

在本申请中, 术语“互补”通常是指核酸 (例如 RNA) 包含使其能够非共价结合的核苷酸序列 (例如, Watson-Crick 碱基配对), 在适当的体外和/或体内温度和溶液离子强度条件下, 以序列特异性、反平行的方式 (即核酸特异性结合互补核酸) “杂交”或“互补”至另一个核酸。如本领域所知, 标准的 Watson-Crick 碱基配对包括: 腺嘌呤 (A) 与胸苷 (T) 配对, 腺

嘌呤（A）与尿嘧啶（U）配对，鸟嘌呤（G）与胞嘧啶（C）配对。

在本申请中，术语“多肽”、“肽”、“蛋白”和“蛋白质”可互换地使用，通常是指具有任何长度的氨基酸的聚合物。该聚合物可以是直链或支链的，它可以包含修饰的氨基酸，并且可以被非氨基酸中断。这些术语还涵盖已经被修饰的氨基酸聚合物。这些修饰可以包含：二硫键形成、糖基化、脂化（lipidation）、乙酰化、磷酸化、或任何其他操纵（如与标记组分结合）。术语“氨基酸”包括天然的和/或非天然的或者合成的氨基酸，包括甘氨酸以及 D 和 L 旋光异构体、以及氨基酸类似物和肽模拟物。

术语“多核苷酸”、“核苷酸”、“核苷酸序列”、“核酸”和“寡核苷酸”可互换地使用，通常是指具有任何长度的核苷酸的聚合形式，如脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸、或其类似物。多核苷酸可具有任何三维结构，并且可以执行已知或未知的任何功能。以下是多核苷酸的非限制性实例：基因或基因片段的编码区或非编码区、根据连接分析定义的多个座位（一个座位）、外显子、内含子、信使 RNA（mRNA）、转运 RNA、核糖体 RNA、短干扰 RNA（siRNA）、短发夹 RNA（shRNA）、micro-RNA（miRNA）、核酶、cDNA、重组多核苷酸、分支多核苷酸、质粒、载体、任何序列的分离的 DNA、任何序列的分离的 RNA、核酸探针、和引物。多核苷酸可以包含一个或多个经修饰的核苷酸，如甲基化的核苷酸和核苷酸类似物。如果存在，可以在聚合物组装之前或之后进行核苷酸结构的修饰。核苷酸的序列可以被非核苷酸组分中断。多核苷酸可以在聚合后，如通过与标记的组分缀合来进一步修饰。

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

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

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

因随机、稳定地整合入宿主细胞基因组中，例如，可将 CAR 分子整合进宿主细胞中。

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

除了本文提到的特定蛋白质和核苷酸之外，本申请还可包括其功能性变体、衍生物、类似物、同源物及其片段。

术语“功能性变体”指与天然存在序列具有基本上同一的氨基酸序列或由基本上同一的核苷酸序列编码并能够具有天然存在序列的一种或多种活性的多肽。在本申请的上下文中，任何给定序列的变体是指其中残基的特定序列（无论是氨基酸或核苷酸残基）已经经过修饰而使得所述多肽或多核苷酸基本上保留至少一种内源功能的序列。可以通过天然存在的蛋白质和/或多核苷酸中存在的至少一个氨基酸残基和/或核苷酸残基的添加、缺失、取代、修饰、替换和/或变异来获得变体序列，只要保持原来的功能活性即可。

在本申请中，术语“衍生物”通常是指本申请的多肽或多核苷酸而言包括自/对序列的一个（或多个）氨基酸残基的任何取代、变异、修饰、替换、缺失和/或添加，只要所得的多肽或多核苷酸基本上保留其至少一种内源功能。

在本申请中，术语“类似物”通常对多肽或多核苷酸而言，包括多肽或多核苷酸的任何模拟物，即拥有该模拟物模拟的多肽或多核苷酸的至少一种内源功能的化学化合物。

通常，可以进行氨基酸取代，例如至少 1 个（例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 或 20 个以上）氨基酸取代，只要经修饰的序列基本上保持需要的活性或能力。氨基酸取代可包括使用非天然存在的类似物。

用于本申请的蛋白质或多肽也可以具有氨基酸残基的缺失、插入或取代，所述氨基酸残基产生沉默的变化并导致功能上等同的蛋白质。可以根据残基的极性、电荷、溶解性、疏水性、亲水性和/或两性性质的相似性进行有意的氨基酸取代，只要保留内源性功能即可。例如，带负电荷的氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸；带正电荷的氨基酸包括赖氨酸和精氨酸；并且含有相似亲水性值的不带电极性头基的氨基酸包括天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸。

在本申请中，术语“同源物”通常是指与野生型氨基酸序列和野生型核苷酸序列具有一定同源性的氨基酸序列或核苷酸序列。术语“同源性”可以等同于序列“同一性”。同源序列

可以包括可以与主题序列是至少 80%、85%、90%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或 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，提及的氨基酸序列或核苷酸序列的 SEQ ID NO 中的任一项具有百分比同一性的序列是指在所提及的 SEQ ID NO 的整个长度上具有所述百分比同一性的序列。

为了确定序列同一性，可进行序列比对，其可通过本领域技术人员了解的各种方式进行，例如，使用 BLAST、BLAST-2、ALIGN、NEEDLE 或 Megalign (DNASTAR) 软件等。本领域技术人员能够确定用于比对的适当参数，包括在所比较的全长序列中实现最优比对所需要的任何算法。

在本申请中，术语“和/或”应理解为意指可选项中的任一项或可选项的两项。

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“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

一方面，本申请提供了一种制备经修饰的免疫细胞的方法，所述修饰包括以下步骤：a) 下调所述免疫细胞中 Fas 蛋白的表达和/或活性，b) 上调所述免疫细胞中 FasL 蛋白的表达和/或活性，使得，与未经所述修饰的免疫细胞相比，所述经修饰的免疫细胞中 Fas 蛋白的表达和/或活性降低或消除，且，所述经修饰的免疫细胞中 FasL 蛋白的表达和/或活性升高。

### 下调

在本申请中，所上述方法可包括下调所述免疫细胞中 Fas 蛋白的表达和/或活性。可以有多种方法来下调所述免疫细胞中 Fas 蛋白的表达和/或活性。例如，可以在基因或蛋白水平下调 Fas 蛋白的表达和/或活性。例如，可以通过改变 Fas 蛋白的结构和/或序列、编码 Fas 蛋白基因的转录、翻译和/或 Fas 蛋白的细胞运输。

在某些情形中，所述方法可包括下调所述免疫细胞中编码 Fas 蛋白的核酸分子的表达和/或活性。所述下调包括编码 Fas 蛋白的基因的功能表达在所述免疫细胞中被降低或消除。在某些情形中，可以通过基因敲除、基因敲减、基因突变、基因缺失、基因沉默或前述的任意组合来减少或消除。在某些情形中，可以通过，改变所述免疫细胞的基因组来实现下调效果。

在本申请中，所述免疫细胞中 Fas 蛋白的表达和/或活性可以通过基因敲除来下调。基因敲除是一种遗传技术，通过破坏基因功能使其无效。例如，在核酸中插入编码序列，从而破坏基因功能。此外，完整的编码 Fas 蛋白的基因或其部分可缺失，使得所述经修饰的免疫细胞不表达 Fas 蛋白或不表达功能性的 Fas 蛋白。另一可行的方法是向编码 Fas 蛋白的基因序列中引入一种或多种敲除突变，其提供非功能的或功能更少的表达产物。例如，可以引入一种或多种移码突变，其产生非功能的或功能更少的蛋白。替代或补充地，一个或多个终止密码子能引入编码序列，从而获得截短、非功能或功能更少的 Fas 蛋白。所述方法还可包括但不限于在编码 Fas 蛋白的基因的启动子、5' UTR、3' UTR 和/或其它调控元件中引入一种或多种突变。实现基因缺失以抑制或消除靶基因功能表达的方法为技术人员熟知，本文在此不做详述。

在某些情形中，编码所述 Fas 蛋白的基因可通过遗传工程而在功能上敲除。示例包括但不限于基因编辑，如工程核酸酶介导的基因编辑（GEEN）。基因编辑通常是指使用人工工程核酸酶或“分子剪刀”，在基因组内插入、取代或移出 DNA。所述核酸酶在所需基因组位置产生特异双链断裂（DSB），利用细胞内源机制通过同源重组（HR）和非同源末端连接（NHEJ）天然过程修复所诱导的断裂。敲除基因或降低基因的表达水平的方法可包括进行基因敲除、条件性基因敲除法（例如，利用 Cre/LoxP 和/或 FLP-*frt* 系统）、诱导性基因敲除法（例如，以 Cre/*loxP* 系统为基础的敲除，包括四环素诱导、干扰素诱导、激素诱导、腺病毒诱导等）、利用随机插入突变进行基因敲除（例如，基因捕获法）、利用 RNAi 引起的基因敲除、锌指核酸内切酶（zinc finger nucleases, ZFN）介导的基因编辑技术、转录激活子样效应物核酸酶（transcription activator-like effector nucleases, TALEN）介导的基因编辑技术、成簇规律间隔短回文重复序列（clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR）/CRISPR 相关蛋白（CRISPR associated proteins, Cas）（CRISPR/Cas）系统介导的基因编辑技术和/或 NgAgo-gDNA 基因编辑技术。

在某些情形中，所述方法可包括向免疫细胞施用选自下组的一种或多种物质：反义 RNA、siRNA、shRNA、CRISPR/Cas 系统、RNA 编辑系统如 RNA 腺苷脱氨酶（ADAR）、RNA 指导的核酸内切酶、锌指核酸酶（ZFN）、Mega-TAL 核酸酶、转录激活子样效应物核酸酶（TALEN）、大范围核酸酶（Meganuclease）、碱基编辑、CRISPR 干扰（CRISPR interference, 或 CRISPRi），和，锌指蛋白（Zinc finger）基因阻遏物和/或转录激活子样效应物（TALE）基因阻遏物介导的转录抑制。在本申请中，所述方法可包括向免疫细胞施用使用抑制性蛋白，所述抑制性蛋白可包括能够抑制 Fas 蛋白活性或功能的物质，例如，Fas 蛋白的抑制性配体、

受体、抗体和/或酶。

在本申请中，编码 Fas 蛋白的核酸序列的外显子的可包括一种或多种突变。在本申请中，编码 Fas 蛋白的核酸序列的外显子可以被全部或部分删除。所述外显子可包括外显子 1-5 中任意一个或多个，例如，外显子 1、外显子 2、外显子 3、外显子 4 和外显子 5 中的一个或多个（例如，1 个、2 个、3 个、4 个或 5 个）。外显子 1-5 中任意一个或多个的突变或删除可涵盖数种不同的功能剪接变体。

在本申请中，所述 Fas 蛋白可包括 SEQ ID NO: 46 所示的氨基酸序列。例如，本申请所述 Fas 蛋白可包含与 SEQ ID NO: 46 所示的氨基酸序列具有至少 80%（例如，至少 85%，至少 90%，至少 91%，至少 92%，至少 93%，至少 94%，至少 95%，至少 96%，至少 97%，至少 98%，至少 99%，或至少 100%）序列同一性的氨基酸序列

在本申请中，所述编码 Fas 蛋白的核酸分子可参见 NCBI 数据库 gene ID: 355 下或 Ensembl 数据库 ENSG00000026103 下所示的核苷酸序列。例如，本申请所述编码 Fas 蛋白的核酸分子可包含与 NCBI 数据库 gene ID: 355 下或 Ensembl 数据库 ENSG00000026103 下所示的核苷酸序列具有至少 80%（例如，至少 85%，至少 90%，至少 91%，至少 92%，至少 93%，至少 94%，至少 95%，至少 96%，至少 97%，至少 98%，至少 99%，或至少 100%）序列同一性的核苷酸序列。

在本申请中，所述方法可包括下调所述免疫细胞中 T 细胞受体（TCR）、T 细胞受体  $\alpha$  恒定区蛋白、T 细胞受体  $\beta$  恒定区蛋白和/或 PD-1 蛋白的表达和/或活性。

在某些情形中，所述方法可包括靶向所述免疫细胞中编码所述 T 细胞受体  $\alpha$  恒定区蛋白的核酸分子（TRAC）的外显子 1-3。

例如，所述 T 细胞受体  $\alpha$  恒定区蛋白可包括如 SEQ ID NO: 49 所示的氨基酸序列。例如，所述 T 细胞受体  $\alpha$  恒定区蛋白可包含与 SEQ ID NO: 49 所示的氨基酸序列具有至少 80%（例如，至少 85%，至少 90%，至少 91%，至少 92%，至少 93%，至少 94%，至少 95%，至少 96%，至少 97%，至少 98%，至少 99%，或至少 100%）序列同一性的氨基酸序列。

在某些情形中，所述方法可包括靶向所述免疫细胞中 PD-1 蛋白的核酸分子的外显子 1-3。

例如，所述 PD-1 蛋白可包括如 SEQ ID NO: 48 所示的氨基酸序列。例如，所述 PD-1 蛋白可包含与 SEQ ID NO: 48 所示的氨基酸序列具有至少 80%（例如，至少 85%，至少 90%，至少 91%，至少 92%，至少 93%，至少 94%，至少 95%，至少 96%，至少 97%，至少 98%，至少 99%，或至少 100%）序列同一性的氨基酸序列。

### CRISPR 系统和指导 RNA

可以使用 CRISPR 系统下调所述 Fas 蛋白的表达和/或活性。在本申请中，所述方法包括向所述免疫细胞施用 CRISPR/Cas 系统，所述系统可包括 RNA 组分，有时被称为指导 RNA (gRNA)。

本申请所述的指导 RNA 可包括单链指导 RNA (sgRNA) 以及由 crRNA (CRISPR RNA) 和 tracrRNA (反式激活 crRNA) 组成的双链指导 RNA。在某些实施方式中，指导 RNA 是由一条 crRNA 和一条 tracrRNA 组成的双链结构。CrRNA 一般包含指导序列和 tracr 配偶序列，tracrRNA 一般包含 tracr 序列。在某些实施方式中，指导 RNA 可以为单链分子，该单链分子可包含指导序列、tracr 配偶序列和 tracr 序列，这个单链分子也称为嵌合型单链指导 RNA (sgRNA)。当 tracr 序列和 tracr 配偶序列被包含在单个转录物中，这两者之间的杂交产生具有二级结构 (如发夹) 的转录物。用于在发夹结构中使用的序列可以是环形成序列，例如，在长度上可以为四个核苷酸的序列，例如，用于在发夹结构中使用的序列可具有序列 GAAA 的序列。也可以使用更长或更短的环序列，例如可替代的序列。在某些情形种，这些序列可以包括三联体 (例如，AAA)，以及其他的核苷酸 (例如 C 或 G)。环形成序列的实例可包括 CAAA 和 AAAG。在某些情形中，该转录物或转录的多核苷酸序列可以具有至少两个或更多个发夹。在一些具体的情形中，该转录物可具有两个、三个、四个或五个发夹。在另外一些情形中，该转录物可以具有至多五个发夹。在某些情形中，该单个转录物还可包括一种转录终止序列，例如，为一个 Poly-U 序列，又例如，为六个 U 的核苷酸序列。

在某些情形中，本申请所述的指导 RNA 可以与靶核酸互补。在另一些情形中，所述的指导 RNA 可以与靶核酸相同 (当说到相同时，由于编码 RNA 和 DNA 的碱基的区别，RNA 中的“U”对应于 DNA 中的胸腺嘧啶“T”)。在另一些情形中，编码所述指导 RNA 的核酸序列 (例如，DNA) 可以与靶核酸相同或互补。所述指导 RNA 可以由编码其的序列进行转录或复制得到，例如，所述指导 RNA 可通过编码其的 DNA 序列转录得到。在本申请中，术语“靶核酸”、“靶核酸”和“靶区域”可以互换的使用，通常是指可以被 gRNA 识别的核酸序列，所述靶核酸可以指双链核酸，也可以指单链核酸。

所述指导 RNA 可以和靶序列杂交，并与一种或多种 Cas 蛋白复合，以形成 CRISPR 复合物。CRISPR 复合物的形成导致在该靶序列中或其附近 (例如在 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、50、或更多个碱基对之内) 的一条链或两条链的切割。tracr 序列 (其可以包含或其组成为野生型 tracr 序列的全部或部分 (例如野生型 tracr 序列的约或多于约 20、26、32、45、48、54、63、67、85 个、或更多个核苷酸)) 也可以形成 CRISPR 复合物的一部分，如通

过沿着该 tracr 序列的至少一部分杂交到与该指导序列可操作地连接的 tracr 配偶序列的全部或部分上。在某些情形中，该 tracr 序列与一个 tracr 配偶序列具有足够的互补性以进行杂交，并参与一种 CRISPR 复合物的形成。在某些实施方式中，当进行比对时，沿着该 tracr 配偶序列的长度，该 tracr 序列具有至少 50%、60%、70%、80%、90%、95%、或 99% 序列互补性。在一些实施方式中，将驱动 CRISPR 系统的一个或多个元件的表达的一个或多个载体引入到宿主细胞中，使得该 CRISPR 系统的这些元件的表达在一个或多个靶位点指导 CRISPR 复合物的形成。

一般而言，tracr 配偶序列包括与 tracr 序列具有足够互补性以促进 CRISPR 复合物在靶序列处的形成，其中该 CRISPR 复合物包含杂交到 tracr 序列上的 tracr 配偶序列。通常，互补程度是就 tracr 配偶序列与 tracr 序列沿着这两个序列的较短者的长度的最佳比对而言。可以通过任何适合的比对算法来确定最佳比对，并且可以进一步将二级结构造成的影响考虑进来，比如在该 tracr 序列或 tracr 配偶序列之内的自我互补性。在进行最佳比对时，在该 tracr 序列与 tracr 配偶序列之间沿着这两者的较短者的长度的互补程度是约或多于约 25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、97.5%、99%、或更高。该 tracr 序列在长度上为约或多于约 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、40、50 个、或更多个核苷酸。

在靶序列与指导序列之间的互补杂交促进 CRISPR 复合物的形成。完全互补性不是必需的，只要存在足够互补性以引起杂交并且促进一种 CRISPR 复合物的形成即可。CRISPR 复合物的靶多核苷酸可以是对真核细胞而言内源或外源的任何多核苷酸。例如，该靶多核苷酸可以是一种驻留在真核细胞的细胞核中的多核苷酸。该靶多核苷酸可以是一个编码基因产物（例如，蛋白质）的序列或一个非编码序列（例如，调节多核苷酸或无用 DNA）。不希望被理论所束缚，该靶序列应该与 PAM（原型间隔子邻近基序）相关；也就是说，由 CRISPR 复合物识别的短序列相关。

在一些情形中，指导 RNA 与靶核酸之间的互补百分比可为至少约 30%、至少约 40%、至少约 50%、至少约 60%、至少约 65%、至少约 70%、至少约 75%、至少约 80%、至少约 85%、至少约 90%、至少约 95%、至少约 97%、至少约 98%、至少约 99%，或 100%。在一些情形中，指导 RNA 与靶核酸之间的互补百分比可以为至多约 30%、至多约 40%、至多约 50%、至多约 60%、至多约 65%、至多约 70%、至多约 75%、至多约 80%、至多约 85%、至多约 90%、至多约 95%、至多约 97%、至多约 98%、至多约 99%，或 100%。

本申请的方法包括提供靶向免疫细胞基因组的核酸，其可以将相关活性多肽（例如 Cas

蛋白)引导至靶核酸内的特定靶序列(例如,编码 Fas 蛋白的基因)。靶向基因组的核酸可以是 RNA。

在本申请中,所述指导 RNA 可以包含一个可变长度的间隔子序列,该序列在指导 RNA 序列的 5'端具有 17-30 个核苷酸。在其他情形中,指导 RNA 可以包含可变长度的间隔区序列,其在指导 RNA 序列的 5'末端具有 17-24 个核苷酸。例如,所述指导 RNA 可以包含 21 个核苷酸的序列。例如,所述指导 RNA 可以包含 20 个核苷酸的序列。例如,所述指导 RNA 可以包含 19 个核苷酸的序列。例如,所述指导 RNA 可以包含 18 个核苷酸的序列。例如,所述指导 RNA 可以包含 17 个核苷酸的序列。例如,所述指导 RNA 可以包含 22 个核苷酸的序列。例如,所述指导 RNA 可以包含 23 个核苷酸的序列。例如,所述指导 RNA 可以包含 24 个核苷酸的序列。

在本申请中,所述指导 RNA 可以是靶向编码 Fas 蛋白的核酸分子的指导 RNA,且所述靶向编码所述 Fas 蛋白的核酸分子的指导 RNA 可包含 SEQ ID NO: 1-15 中任一项所示的核苷酸序列。例如,本申请所述靶向编码所述 Fas 蛋白的核酸分子的指导 RNA 可包含与 SEQ ID NO: 1-15 中任一项所示的核苷酸序列具有至少 80%(例如,至少 85%,至少 90%,至少 91%,至少 92%,至少 93%,至少 94%,至少 95%,至少 96%,至少 97%,至少 98%,至少 99%,或至少 100%)序列同一性的核苷酸序列。

例如,本申请所述靶向编码所述 Fas 蛋白的核酸分子的指导 RNA 可包含 SEQ ID NO: 2-4、7-10 和 12 中任一项所示的核苷酸序列。例如,本申请所述靶向编码所述 Fas 蛋白的核酸分子的指导 RNA 可包含与 SEQ ID NO: 2-4、7-10 和 12 中任一项所示的核苷酸序列具有至少 80%(例如,至少 85%,至少 90%,至少 91%,至少 92%,至少 93%,至少 94%,至少 95%,至少 96%,至少 97%,至少 98%,至少 99%,或至少 100%)序列同一性的核苷酸序列。

在本申请中,所述指导 RNA 可以是靶向免疫细胞中编码 T 细胞受体  $\alpha$  恒定区蛋白的核酸分子(TRAC)的指导 RNA,且所述靶向编码 T 细胞受体  $\alpha$  恒定区蛋白的核酸分子(TRAC)的指导 RNA 可包含 SEQ ID NO: 31-33 中任一项所示的核苷酸序列。例如,本申请所述靶向编码 T 细胞受体  $\alpha$  恒定区蛋白的核酸分子(TRAC)的指导 RNA 可包含与 SEQ ID NO: 31-33 中任一项所示的核苷酸序列具有至少 80%(例如,至少 85%,至少 90%,至少 91%,至少 92%,至少 93%,至少 94%,至少 95%,至少 96%,至少 97%,至少 98%,至少 99%,或至少 100%)序列同一性的核苷酸序列。

在本申请中,所述指导 RNA 可以是靶向编码 PD-1 的核酸分子的指导 RNA,且所述靶向编码 PD-1 的核酸分子的指导 RNA 可包含 SEQ ID NO: 16-30 中任一项所示的核苷酸序列。例

如，本申请所述靶向编码 PD-1 的核酸分子的指导 RNA 可包含与 SEQ ID NO: 16-30 中任一项所示的核苷酸序列具有至少 80%（例如，85%、90%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或 99.9%）序列同一性的核苷酸序列。

在某些情形中，所述指导 RNA 可包含骨架序列，骨架序列不影响所述 sgRNA 对靶序列的识别，因此，骨架序列可以是现有技术中任何可行的序列。骨架序列一般包含 tracr 配偶序列和 tracr 序列。骨架序列的结构可参见如文献 Nowak et al. Nucleic Acids Research 2016. 44:9555-9564 中的 Figure 1（图 1）中 A 和 B，Figure 3（图 3）中 A、B、C，以及 Figure 4（图 4）中 A、B、C、D、E 中所记载的除 spacer 序列之外的部分。

本申请的骨架序列可以来自 PCT 申请公布文本 WO2019011118A1 所记载的骨架序列，例如，可以为 SEQ ID NO: 34-45 中任一项所示的核苷酸序列（列出为 5' 到 3'），其中小写字体的第一区代表 tracr 配偶序列，且小写字体的第二区代表 tracr 序列，并且该最后的 poly-U 序列代表转录终止子。其中 poly-U 中 U 的个数不限于此例所示，可以增加或减少。在某些情形中，poly-U 可以被去掉而不影响活性。在某些情形中，可以使用与以下序列相似程度达到约或多于约 50%、60%、70%、80%、90%或更高的骨架序列。有些时候，该 tracr 序列可以是一个与包含该 tracr 配偶序列的转录物分开的转录物。在某些情形中，嵌合型单链指导 RNA（sgRNA）设计可以在同向重复与 tracrRNA 之间掺入至少 12bp 的双链体结构。在某些情形中，含有与 Cas9 蛋白结合的关键的 RNA 二级结构，但序列被突变、或含有插入序列的设计也可以被使用，如已经发表的文献 Nowak et al. Nucleic Acids Research 2016. 44:9555-9564 和 Adamson et al. Cell 2016. 167: 1867-1882 所示。

表 1 示例性的骨架序列

骨架序列	核苷酸序列	SEQ ID NO
1	GUUUUAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAUAGCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACC GAGUCGGUGCUUUU	34
2	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUUAAGGCUAG UCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC UUUU	35
3	guuuuagagcuaGAAAuagcaaguuaaaauaaggcuaguccguuaucaacuuga aaaaguggcaccgagucggugcUUUUUU	36
4	guuuuagagcuaGAAAuagcaaguuaaaauaaggcuaguccgUUUUUUU U	37

5	guuuuagagcuaGAAAuagcaaguuaaaauaaggcuaguccguuaucaUUUUU UUU	38
6	guuuuagagcuaGAAAuagcaaguuaaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaa aagugUUUUUUUU	39
7	guuuuagagcuaugcugGAAAcagcauagcaaguuaaaauaaggcuaguccguua ucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugcUUUUUU	40
8	guuucagagcuaugcugGAAAcagcauagcaaguugaaaauaaggcuaguccgu uaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugcUUUUUU	41
9	guuuuagagcuauGAAAuagcaaguuaaaauaaggcuaguccguuaucaacuug aaaaaguggcaccgagucggugcUUUUUU	42
10	guuuuagagcuaugcGAAAgcauagcaaguuaaaauaaggcuaguccguuaucaac uugaaaaaguggcaccgagucggugcUUUUUU	43
11	guuuuagagcuaugcuguuuGAAAaaacagcauagcaaguuaaaauaaggcuagu ccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugcUUUUUU	44
12	guuuuagagcuaugcuguuuugGAAACaaaacagcauagcaaguuaaaauaaggc uaguccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugcUUUUUU	45

本申请所述骨架序列可包含 SEQ ID NO: 34-45 中任一项所示的核苷酸序列，例如，所述骨架序列可包含 SEQ ID NO: 35 所示的核苷酸序列。

在本申请中，所述指导 RNA 可以为靶向编码 Fas 蛋白的核酸分子的双链指导 RNA，其可包含 crRNA 和 tracrRNA。所述靶向编码 Fas 蛋白的核酸分子的 crRNA 可包含 SEQ ID NO: 1-15 中任一项所示的核苷酸序列。例如，本申请所述靶向编码 Fas 蛋白的核酸分子的 crRNA 可包含与 SEQ ID NO: 1-15 中任一项所示的核苷酸序列具有至少 80%（例如，至少 85%，至少 90%，至少 91%，至少 92%，至少 93%，至少 94%，至少 95%，至少 96%，至少 97%，至少 98%，至少 99%，或至少 100%）序列同一性的核苷酸序列。

例如，本申请所述靶向编码所述 Fas 蛋白的核酸分子的 crRNA 可包含 SEQ ID NO: 2-4、7-10 和 12 中任一项所示的核苷酸序列。例如，本申请所述靶向编码所述 Fas 蛋白的核酸分子的 crRNA 可包含与 SEQ ID NO: 2-4、7-10 和 12 中任一项所示的核苷酸序列具有至少 80%（例如，至少 85%，至少 90%，至少 91%，至少 92%，至少 93%，至少 94%，至少 95%，至少 96%，至少 97%，至少 98%，至少 99%，或至少 100%）序列同一性的核苷酸序列。

在本申请中，所述指导 RNA 可以是靶向编码 T 细胞受体的核酸分子的双链指导 RNA，其可包含 crRNA 和 tracrRNA。所述靶向编码 T 细胞受体的核酸分子的指导 RNA 可包含 SEQ

ID NO: 31-33 中任一项所示的核苷酸序列。例如，本申请所述靶向编码 T 细胞受体的核酸分子的指导 RNA 可包含与 SEQ ID NO: 31-33 中任一项所示的核苷酸序列具有至少 80% (例如，85%、90%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8% 或 99.9%) 序列同一性的核苷酸序列。

在本申请中，所述指导 RNA 可以是靶向编码 PD-1 的核酸分子的双链指导 RNA，其可包含 crRNA 和 tracrRNA。所述靶向编码 PD-1 的核酸分子的 crRNA 可包含 SEQ ID NO: 16-30 中任一项所示的核苷酸序列。例如，本申请所述靶向编码 PD-1 的核酸分子的 crRNA 可包含与 SEQ ID NO: 16-30 中任一项所示的核苷酸序列具有至少 80% (例如，85%、90%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8% 或 99.9%) 序列同一性的核苷酸序列。

在本申请中，所述 Cas 蛋白、sgRNA 和/或 tracr 配偶序列以及 tracrRNA 序列可操作地连接到相同的启动子上并且可以表达。在某些情形中，所述 Cas 酶、sgRNA、和/或 tracr 配偶序列以及 tracrRNA 序列可以各自可操作地连接到位于分开的载体上的分开的调节元件上。所述指导 RNA 和 Cas 蛋白可以形成 CRISPR 复合物。

本申请所述用于 CRISPR 系统的指导 RNA 可以通过化学方法合成，例如，高效液相色谱法。例如，将两个或两个以上的 RNA 分子连接在一起。长度较长的 RNA (例如编码 Cas9 的 RNA) 可以通过酶促反应得到。

本申请的指导 RNA 还可包含修饰 (例如，化学修饰)，例如，核苷酸的缺失、插入、转位、失活和/或激活。所述修饰可包括引入一个或多个突变 (包括单个或多个碱基对改变)、增加发夹的数目、交联、断开具体的核苷酸段以及其他修饰。修饰可以包括包含至少一个非天然存在的核苷酸、或一个经修饰的核苷酸、或其类似物。所述指导 RNA 可以在核糖、磷酸和/或碱基部分处被修饰。经修饰的指导 RNA 可以包括 2'-O-甲基类似物、2'-脱氧类似物或 2'-氟代类似物。可以修饰指导 RNA 的核酸骨架，例如，可以使用硫代磷酸骨架。还可以使用锁核酸 (LNA) 或桥联核酸 (BNA)。指导 RNA 中的修饰的实例还可包括但不限于：2-氨基嘌呤、5-溴代-尿苷、假尿苷、肌苷、7-甲基鸟苷。这些修饰可以应用于本申请 CRISPR 系统的任意组分。在某些情形中，可以对 RNA 组分 (例如该指导 RNA 或嵌合多核苷酸序列) 做出这些修饰。例如，所述指导 RNA 的化学修饰可包括 2'-甲氧基和/或 3'-硫代磷酸酯修饰。在某些情形中，含有与 Cas9 蛋白结合的关键的 RNA 二级结构，但序列被突变、或含有插入序列的设计也可以被使用，如已经发表的文献 Nowak et al. *Nucleic Acids Research* 2016. 44:9555-9564 和 Adamson et al. *Cell* 2016. 167: 1867-1882 所示。

在某些实施方式中，本申请的所述方法可包括向宿主细胞 (例如，免疫细胞) 施用一种

或多种所述 Cas 蛋白。

另一方面，本申请提供了一种 CRISPR 酶。在一些情形中，所述 CRISPR 酶可以是 II 型 CRISPR 系统酶。在某些情形中，所述 CRISPR 酶可以是 Cas9 蛋白。在某些实施例中，所述 Cas9 蛋白可以是肺炎链球菌、化脓链球菌或嗜热链球菌 Cas9 蛋白，并且可包括源自于这些生物体的突变的 Cas9 蛋白。所述 Cas 蛋白还可以是一种 Cas9 蛋白的同系物或直向同源物。本申请所述系统可包括所述的 Cas 蛋白。所述 Cas 蛋白可以包含任何其他蛋白质，以及任选地在任何两个结构域之间的连接序列。可以融合到 Cas 蛋白上的蛋白质的实例包括但不限于，表位标签、报告基因、以及具有下列活性的一者或多者的蛋白质结构域：甲基酶活性、脱甲基酶活性、转录激活活性、转录阻抑活性、转录释放因子活性、组蛋白修饰活性、RNA 切割活性和核酸结合活性。

本申请的 CRISPR 系统可以通过本领域已知的方法转入免疫细胞，例如：磷酸钙转染、原生质融合、电穿孔、脂质体转染、微注射、病毒感染（如杆状病毒、痘苗病毒、腺病毒和其他病毒）等。例如，可以使用点转的方法将所述 CRISPR 系统（例如，Cas 蛋白和/或指导 RNA）导入免疫细胞。电转方法请参见文献 Schumann et al. PNAS 2015.112:10437-10442。

### 上调

本申请所述方法还可包括上调所述免疫细胞中 FasL 蛋白的表达和/或活性。可以有多种方法来上调所述免疫细胞中 FasL 蛋白的表达和/或活性。上调可表现在，增强或提高 FasL 蛋白的表达水平或增强或提高 FasL 蛋白的活性，或两者的组合。可以在基因或蛋白水平上调 FasL 蛋白的表达和/或活性。例如，可以通过改变 FasL 蛋白的结构和/或序列、编码 Fas 蛋白基因的转录、翻译和/或 FasL 蛋白的细胞运输来提高 FasL 蛋白的表达和/或活性。

在某些情形中，所述方法可包括上调所述免疫细胞中编码 FasL 蛋白的核酸分子的表达和/或活性。所述上调包括编码 FasL 蛋白的基因的功能表达在所述免疫细胞中被增强或提高。在某些情形中，可以通过向所述免疫细胞施用编码 FasL 蛋白的核酸分子。

在本申请中，所述 FasL 蛋白可包括胞外结构域。例如，所述 FasL 蛋白的胞外结构域可包括如 SEQ ID NO: 52 所示的氨基酸序列。例如，所述 FasL 蛋白的胞外结构域可包含与 SEQ ID NO.52 所示的氨基酸序列具有至少 80%（例如，至少 85%，至少 90%，至少 91%，至少 92%，至少 93%，至少 94%，至少 95%，至少 96%，至少 97%，至少 98%，至少 99%，或至少 100%）序列同一性的氨基酸序列。

在本申请中，所述 FasL 蛋白可包含如 SEQ ID NO: 52 所示的氨基酸序列。例如，所述 FasL 蛋白可包含与 SEQ ID NO.52 所示的氨基酸序列具有至少 80%（例如，至少 85%，至少

90%，至少 91%，至少 92%，至少 93%，至少 94%，至少 95%，至少 96%，至少 97%，至少 98%，至少 99%，或至少 100%）序列同一性的氨基酸序列。

在本申请中，所述 FasL 蛋白还可以包含铰链区。与天然 FasL 蛋白的铰链区相比，所述铰链区可以包含较少的蛋白酶切位点。例如，所述铰链区可以是源自 FasL 以外的跨膜蛋白的铰链区。例如，所述铰链区可以是源自肿瘤坏死因子超家族的铰链区。例如，所述铰链区可以是源自 TNFSF10 或 OX40L 的铰链区。

在本申请中，所述 FasL 蛋白可包括胞内结构域。

在本申请中，所述 FasL 蛋白可包含如 SEQ ID NO: 50-51 和 63-64 中任一项所示的氨基酸序列。例如，所述 FasL 蛋白可包含与 SEQ ID NO: 50-51 和 63-64 中任一项所示的氨基酸序列具有至少 80%（例如，至少 85%，至少 90%，至少 91%，至少 92%，至少 93%，至少 94%，至少 95%，至少 96%，至少 97%，至少 98%，至少 99%，或至少 100%）序列同一性的氨基酸序列。

在本申请中，所述 FasL 蛋白可包含如 SEQ ID NO: 50-52 和 63-64 中任一项所示的氨基酸序列。例如，所述 FasL 蛋白可包含与 SEQ ID NO: 50-52 和 63-64 中任一项所示的氨基酸序列具有至少 80%（例如，至少 85%，至少 90%，至少 91%，至少 92%，至少 93%，至少 94%，至少 95%，至少 96%，至少 97%，至少 98%，至少 99%，或至少 100%）序列同一性的氨基酸序列。

例如，所述编码 FasL 的核酸分子可包括 SEQ ID NO: 53-55 中任一项所示的核苷酸序列。例如，所述编码 FasL 的核酸分子可包含与 SEQ ID NO: 53-55 中任一项所示的核苷酸序列具有至少 80%（例如，至少 85%，至少 90%，至少 91%，至少 92%，至少 93%，至少 94%，至少 95%，至少 96%，至少 97%，至少 98%，至少 99%，或至少 100%）序列同一性的核苷酸序列。

在某些情形中，所述方法可包括上调所述免疫细胞中编码 PD-L1 蛋白的核酸分子的表达和/或活性。所述上调包括编码 PD-L1 蛋白的基因的功能表达在所述免疫细胞中被增强或提高。

在某些情形中，可以通过向所述免疫细胞施用编码 PD-L1 蛋白的核酸分子。例如，所述 PD-L1 蛋白可包含全长 PD-L1 蛋白的胞外域和/或跨膜域。例如，所述 PD-L1 蛋白可包括如 SEQ ID NO: 56-57 中任一项所示的氨基酸序列。例如，所述 PD-L1 蛋白可包括与 SEQ ID NO: 56-57 中任一项所示的氨基酸序列具有至少 80%（例如，至少 85%，至少 90%，至少 91%，至少 92%，至少 93%，至少 94%，至少 95%，至少 96%，至少 97%，至少 98%，至少 99%，

或至少 100%) 序列同一性的氨基酸序列。

例如, 所述编码 PD-L1 蛋白的核酸分子可包括 SEQ ID NO: 58 所示的核苷酸序列。例如, 所述编码 PD-L1 的核酸分子可包括与 SEQ ID NO: 58 所示的核苷酸序列具有至少 80%(例如, 至少 85%, 至少 90%, 至少 91%, 至少 92%, 至少 93%, 至少 94%, 至少 95%, 至少 96%, 至少 97%, 至少 98%, 至少 99%, 或至少 100%) 序列同一性的核苷酸序列。

在某些情形中, 所述方法可包括上调所述免疫细胞中编码 CD24 的核酸分子的表达和/或活性。所述上调包括编码 CD24 的基因的功能表达在所述免疫细胞中被增强或提高。在某些情形中, 可以通过向所述免疫细胞施用编码 CD24 的核酸分子。

例如, 所述 CD24 可包括如 SEQ ID NO : 59 所示的氨基酸序列。例如, 所述 CD24 可包括与 SEQ ID NO: 59 所示的氨基酸序列具有至少 80% (例如, 至少 85%, 至少 90%, 至少 91%, 至少 92%, 至少 93%, 至少 94%, 至少 95%, 至少 96%, 至少 97%, 至少 98%, 至少 99%, 或至少 100%) 序列同一性的氨基酸序列。

例如, 所述编码 CD24 的核酸分子可包括 SEQ ID NO: 60 中任一项所示的核苷酸序列。例如, 所述编码 CD24 的核酸分子可包括与 SEQ ID NO: 60 中任一项所示的核苷酸序列具有至少 80% (例如, 至少 85%, 至少 90%, 至少 91%, 至少 92%, 至少 93%, 至少 94%, 至少 95%, 至少 96%, 至少 97%, 至少 98%, 至少 99%, 或至少 100%) 序列同一性的核苷酸序列。

所述修饰还可包括上调或下调其他可行的免疫相关分子的表达和/或活性水平。所述免疫相关分子包括但不限于, 主要组织相容复合体 (MHC) (例如, MHC I、MHC II 和/或 MHC III)、细胞因子 (IL2、IL10 和/或 IL12) 和/或免疫检查点抑制剂 (例如, CTLA-4、LAG-3、TIM-3 和/或 TIGIT)。

编码 FasL 蛋白 (或, PD-L1 和/或 CD24) 的核酸分子可利用在本领域中已知的重组方法获得, 诸如例如通过从表达基因的细胞中筛选文库, 通过从已知包括该基因的载体中得到该基因, 或通过利用标准的技术, 从包含该基因的细胞和组织中直接分离, 或所述核酸分子可以被合成生产以获得。

本申请也提供了包含所述 FasL 蛋白的核酸分子的载体。简单概括, 通常可通过可操作地连接编码目的多肽或其部分的核酸 (例如, FasL、PD-L1 和/或 CD24) 至启动子下游, 并将构建体并入表达载体, 实现编码目的多肽的天然或合成核酸的表达。该载体可以是在真核细胞中适于复制和整合的。典型的载体可包含可用于调节期望核酸序列表达的转录和翻译终止子、初始序列和启动子。

本申请所述核酸分子也可被连接至许多类型的载体。例如，该核酸可被连接至，包括但不限于质粒、噬菌粒、噬菌体、病毒和/或粘粒。特定的感兴趣载体可包括表达载体、复制载体、探针产生载体和测序载体。

可以将病毒载体直接给予至患者（体内）或可以通过间接的形式，例如，在体外使用病毒处理细胞，然后将处理过的细胞给予至患者（离体）。病毒载体技术在本领域中是公知的，并在例如 Sambrook 等（2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York）和其他病毒学和分子生物学手册中进行了描述。常规的基于病毒的系统可以包括用于基因转移的逆转录病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体以及单纯疱疹病毒载体。在某些情形中，可以用逆转录病毒、慢病毒和腺相关病毒的方法将基因转移整合进宿主基因组中，使插入的基因长期表达。慢病毒载体是能够转导或感染非分裂细胞并典型地产生较高病毒效价的逆转录病毒载体。慢病毒载体可包含长末端重复序列 5' LTR 和截短的 3' LTR、RRE、rev 应答元件（cPPT）、中央终止序列（CTS）和/或翻译后调控元件（WPRE）。

本申请的方法可包括向免疫效应细胞中引入本申请所述的载体。例如，可将本申请所述的载体引入所述免疫效应细胞中，例如 T 淋巴细胞、B 细胞、巨噬细胞或天然杀伤（NK）细胞。在某些实施方式中，每种或每个细胞可包含一个或一种本申请所述的载体。在某些实施方式中，每种或每个细胞可包含多个（例如，2 个或以上）或多种（例如，2 种或以上）本申请所述的载体。例如，可将本申请所述的载体引入所述细胞中。例如，可以通过逆转录病毒载体进行转染免疫效应细胞，将带有编码所述融合蛋白核酸的病毒基因组能整合到宿主基因组，保证目的基因长期、稳定地表达。又例如，利用转座子，通过携带编码所述融合蛋白的核酸的质粒和携带转座酶的质粒导入到靶细胞中。在本申请中，可通过本领域已知的方法将本申请所述的带有编码所述融合蛋白的核酸的载体引入所述细胞中，非限制性的实例包括病毒转导、电穿孔转染、脂质体递送、聚合物载体、化学载体、脂质复合物、聚合复合物、树枝状聚合物、纳米粒子、乳剂、天然内吞或吞噬途径、细胞穿透肽、显微注射法、微针递送法、粒子轰击法等。

例如，可采用电穿孔转染法，可以使用的电穿孔仪器的非限制性实例包括：Neon 转染系统（Thermo Fisher Scientific）、Gemini 仪器和 AgilePulse/CytoPulse 仪器（BTX-Harvard apparatus）、4D-Nucleofector 系统、Amaza Nucleofector II、Nucleofector 20 2b 仪器（Lonza）、CTX-1500A 仪器（Celetrix）、MaxCyte GT 或 VLX 仪器（MaxCyte）、Gene Pulser Xcell（Biorad）。在厂商的指导的基础上，可修改脉冲持续时间、强度，脉冲之间的间隔，脉冲次数，已达到高转染

效率而低死亡率的最佳条件。

在本申请中，首先，通过步骤 a) 下调所述免疫细胞中 Fas 蛋白的表达和/或活性，所述下调可以使用本领域任何可行的方法如上文提到的那些方法进行。

然后，在步骤 a) 下调所述免疫细胞中 Fas 蛋白的表达和/或活性成功之后，可以进行步骤 b)。所述下调成功可以包括，与经所述步骤 a) 前的免疫细胞相比，经过所述步骤 a) 的该免疫细胞中 Fas 蛋白的活性或水平降低至少 50% (例如，至少 51%、至少 52%、至少 53%、至少 54%、至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85% 或降低更多)。例如，在进行所述步骤 a) 前或进行所述步骤 a) 的过程中，免疫细胞的 Fas 蛋白的表达和/或活性为 100%，一定时间后，当该免疫细胞中 Fas 的表达和/或活性逐渐降低至起始阶段的 50% 时，此时可认为步骤 a) 的下调成功，可以进行步骤 b)。例如，进行步骤 a) 之后，可以通过检测免疫细胞中的 Fas 蛋白的含量和/或活性、Fas 基因含量和/或活性、Fas 基因的转录程度 (如，mRNA 的含量) 等判断 Fas 蛋白相对于进行步骤 a) 之前活性或水平下降的程度。

可以通过多种方法检测基因或蛋白质的表达水平，包括在核酸水平的方法 (包括通过逆转录酶聚合酶链式反应 (RT-PCR) 或通过 Southern 印迹、原位杂交的 mRNA 定量、二代测序) 和在蛋白质水平的方法 (包括免疫荧光标记并用流式细胞术分析、组织化学、免疫印迹分析和体外结合研究)。此外，可以通过本领域技术人员众所周知的 ELISA 技术来定量蛋白的表达水平。可以使用许多标准分析来完成定量测量。例如，可使用 RT-PCR 和包括 RNA 酶保护、Southern 印迹分析、RNA 斑点 (RNA dot) 分析在内的杂交方法测量转录水平。也可以使用免疫组织化学染色和流式细胞检测、Western 印迹分析来评估是否存在 Fas 蛋白和/或 Fas 基因，以及存在多少 Fas 蛋白和/或 Fas 基因。

在本申请中，当使用基因编辑 (例如，施用 CRISPR/Cas 系统) 进行下调时，可以在基因编辑发生以后进行步骤 b)。可以通过多种方法判断基因编辑是否成功，例如，包括但不限于，免疫荧光标记所编辑基因编码的蛋白并用流式细胞术分析、二代测序 (NGS)、琼脂糖凝胶进行基因组编辑检测、毛细管电泳进行基因编辑检测、TIDE 分析方法 (利用 gRNA 序列以及未修饰和已编辑 DNA 的扩增子测序数据来确定不同 indel 长度的曲线对混合曲线的贡献度) 或数字 PCR (dPCR)。例如，当通过本领域的技术手段检测到目的基因被敲除后，可进行步骤 b)。

在本申请中，所述步骤 b) 在所述步骤 a) 至少 6 小时后 (例如，之后 6 小时、8 小时、12 小时、24 小时、2 天、3 天、4 天、1 周、2 周或更久后) 进行。

在本申请中，所述方法可包括 a) 下调所述免疫细胞中 Fas 蛋白的表达和/或活性，b) 上调所述免疫细胞中 FasL 蛋白的表达和/或活性。在某些情形中，所述步骤 b) 在实施所述步骤 a) 之后（例如，之后 6 小时、8 小时、12 小时、24 小时、2 天、3 天、4 天、1 周、2 周或更久后进行）实施。

### 修饰的免疫细胞

另一方面，本申请提供了一种经修饰的免疫细胞。所述免疫细胞可包括 T 细胞、B 细胞、天然杀伤 (NK) 细胞、巨噬细胞、NKT 细胞、单核细胞、树突状细胞、粒细胞、淋巴细胞、白细胞和/或外周血单个核细胞。在某些情形中，所述免疫细胞可包括 T 淋巴细胞。所述 T 淋巴细胞可包括胸腺细胞、天然 T 淋巴细胞、未成熟 T 淋巴细胞、成熟 T 淋巴细胞、静息 T 淋巴细胞或活化的 T 淋巴细胞。所述 T 细胞可以是辅助 T 细胞 (Th)，例如辅助 T 细胞 1 (Th1) 或辅助 T 细胞 2 (Th2) 细胞。所述 T 淋巴细胞可以是 CD4+ 辅助 T 细胞 (HTL; CD4+T 细胞)、细胞毒性 T 细胞 (CTL; CD8+T 细胞)、肿瘤浸润细胞毒性 T 细胞 (TIL; CD8+T 细胞)、CD4+/CD8+T 细胞、CD4-/CD8+T 细胞或任何其他 T 淋巴细胞亚型。在某些情形中，所述经修饰的 T 细胞是人类 T 细胞。

在某些情形中，所述免疫细胞可包括 B 细胞。在某些情形中，所述 B 细胞可包括效应 B 细胞 (浆细胞)、记忆 B 细胞。所述 B 细胞可包括 B2 细胞、B1 细胞、边缘区 B 细胞、滤泡 B 细胞、调节性 B 细胞。在某些情形中，所述免疫细胞可包括巨噬细胞。所述 B 细胞可包括 I 型巨噬细胞 (M1)、II 型巨噬细胞 (如 M2a、M2B、M2c)。在某些情形中，所述免疫细胞可包括 NK 细胞。在某些情形中，所述 NK 细胞可包括 CD56bright 和 CD56dim。在某些情形中，所述 NK 细胞可包括 NK1 和 NK2。在某些情形中，所述 NK 细胞可包括 A-NK 和 NA-NK。

所述免疫细胞中的 T 细胞受体、T 细胞受体  $\alpha$  恒定区蛋白和/或 T 细胞受体  $\beta$  恒定区蛋白的表达和/或活性下调。在本申请中，下调 T 细胞受体、T 细胞受体  $\alpha$  恒定区蛋白和/或 T 细胞受体  $\beta$  恒定区蛋白的表达和/或活性的操作可以在步骤 a) 之前、同时或之后进行，也可以在步骤 b) 之前、同时或之后进行。在某些情形中，所述下调可包括下调编码所述 T 细胞受体、T 细胞受体  $\alpha$  恒定区蛋白和/或 T 细胞受体  $\beta$  恒定区蛋白的核酸分子的表达和/或活性；和/或，包括下调所述 T 细胞受体、T 细胞受体  $\alpha$  恒定区蛋白和/或 T 细胞受体  $\beta$  恒定区蛋白的表达和/或活性。

本申请的经修饰的免疫细胞可以在任何修饰步骤之前或之后被活化和扩增。免疫细胞可以在体外或体内扩增。通常，本申请的免疫细胞可以例如通过与刺激 CD3-TCR 复合物和免疫细胞表面上的共刺激分子以产生免疫细胞活化信号的试剂接触来扩增。例如，在适合于刺激

免疫细胞增殖的条件下，免疫细胞群可与抗 CD3 抗体和抗 CD28 抗体接触。适用于免疫细胞培养的条件包括可能含有增殖和活力所必需的因子的合适培养基细胞可以保持在支持生长所必需的条件，例如适当的温度（例如 37°C）和环境（例如，空气加 5%CO<sub>2</sub>）。

本申请所述经修饰的免疫细胞，与未经所述修饰的免疫细胞相比，所述经修饰的免疫细胞中的 Fas 蛋白的表达和/或降低或消除，且 FasL 蛋白的表达和/或活性升高。

使用本申请所述的方法得到的经修饰的免疫细胞可以具有好的扩增效率。例如，与采用首先进行步骤 b)，之后进行步骤 a) 的方法得到的经修饰的免疫细胞相比，使用本申请所述的方法得到的经修饰的免疫细胞的扩增效率可以增加至少 20%（例如，至少 20%、至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 99%或更高）。例如，可使用流式细胞检测所述免疫细胞的扩增效率。

使用本申请所述的方法得到的经修饰的免疫细胞中的 Fas 蛋白可以具有好的敲除效率。例如，与采用首先进行步骤 b)，之后进行步骤 a) 的方法得到的经修饰的免疫细胞相比，使用本申请所述的方法得到的经修饰的免疫细胞中的 Fas 蛋白的敲除效率可以增加至少 10%（例如，至少 10%，至少 20%、至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 99%或更高）。例如，可使用流式细胞检测 Fas 蛋白的敲除效率。

在本申请中，所述经修饰的免疫细胞具有与未经所述修饰的免疫细胞相当或更高的扩增能力和类似或更高的免疫特性，和抗肿瘤活性，尤其是抑制或杀伤瘤细胞的活性。

本申请中，所述免疫细胞可以是敲除了 T 细胞受体（TCR）的通用型 T 细胞，或者所述 T 细胞可以是包含嵌合抗原受体（CAR）的 T 细胞（CAR-T 细胞）。

在扩增和遗传修饰本申请的细胞之前，可以通过各种非限制性方法从受试者，例如患者，获得细胞来源。免疫细胞可以获自许多非限制性来源，包括外周血单核细胞、骨髓、淋巴结组织、脐带血、胸腺组织、感染位点的组织、腹水、胸腔积液、脾脏组织和肿瘤。在某些情形中，可以使用本领域技术人员可利用的和已知的任何数量的免疫细胞系。在另一些情形中，所述细胞可以源自健康供体、源自确诊患有癌症的患者或获自确诊感染的患者。在另一些情形中，所述细胞是存在不同表型特性的细胞的混合群体的一部分。在某些情形中，所述免疫细胞可以是衍生自对象的自体细胞。如本文所用，“自体”通常是指用于治疗对象的细胞、细胞系或细胞群源自所述对象。在某些情形中，所述免疫细胞可以衍生自异体细胞，例如源自与所述对象人类白细胞抗原（HLA）相容的供体。可以使用标准方案将来自供体的细胞转化为非同种异体反应性细胞，并根据需要进行复制，从而产生可以施用至一个或多个患者的细胞。

另一方面，本申请提供了一种细胞群，所述细胞群可包含所述的免疫细胞，且所述细胞群中至少 20%（例如，至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%或更多）的免疫细胞基本上不表达 Fas 蛋白。基本上不表达可以指，与未经所述修饰的免疫细胞相比，所述经修饰的免疫细胞中 Fas 蛋白的表达程度降低至少约 50%（例如，约 50%、约 60%、约 70%、约 80%、约 90%，或 99%或更多），或者，施用本领域常规技术检测不到所述 Fas 蛋白的表达。

在本申请中，所述细胞群中至少 15%（例如，至少 16%、至少 17%、至少 18%、至少 19%、至少 20%、至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 98%、至少 99%或更多）的免疫细胞基本上不表达 PD-1 蛋白。基本上不表达可以指，与未经所述修饰的免疫细胞相比，所述经下调 PD-1 修饰的免疫细胞中，PD-1 蛋白的表达程度降低至少约 50%（例如，约 50%、约 60%、约 70%、约 80%、约 90%，或 99%或更多），或者，施用本领域常规技术检测不到所述 PD-1 蛋白的表达。

在本申请中，所述细胞群中至少 5%（例如，至少 10%、至少 20%、至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 98%、至少 99%或更多）的免疫细胞过表达 FasL 蛋白。

在本申请中，所述细胞群中至少 5%（例如，至少 10%、至少 20%、至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 98%、至少 99%或更多）的免疫细胞过表达 PD-L1 蛋白。

在本申请中，所述细胞群中至少 5%（例如，至少 10%、至少 20%、至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 98%、至少 99%或更多）的免疫细胞过表达 CD24 蛋白。

过表达可以指，与未经所述修饰的免疫细胞相比，所述经修饰的免疫细胞中蛋白的表达程度提高至少约 10%（例如，约 10%、约 20%、约 30%、约 40%、约 50%、约 60%、约 70%、约 80%、约 90%，或 99%或更多）。

#### 药物组合物和用途

另一方面，本申请提供了药物组合物，其包含所述的免疫细胞和/或所述的细胞群，以及药学上可接受的载体。

本申请所述的“药学上可接受的载体”可包括生理学相容的任何和所有的溶剂、分散介

质、包衣、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。在某些情形中，该载体适合于静脉内、肌肉、皮下、肠胃外、脊柱或表皮施用（如通过注射或输注）。所述“有效量”通常是指施用于受试者之后至少足以产生疗效的物质、化合物、材料或细胞的量。因此，其为防止、治愈、改善、阻滞或部分阻滞疾病或病症的症状所必需的量。

所述方法还进一步包括给所述受试者施用放疗和/或化疗和/或另外的肿瘤靶向药物（例如靶向其它抗原的抗体或小分子化合物）。

例如，“有效量”的本本身的细胞或药物组合物导致疾病症状的严重性降低，疾病无症状期的频率和持续时间增加，或者防止因疾病痛苦而引起的损伤或失能。在实际应用中，本申请的药物组合物中细胞的剂量水平可能改变，以获得可有效实现对特定患者、组合物和给药方式的所需治疗反应，而对患者无毒性的活性成分的量。选择的剂量水平取决于多种药物代谢动力学因素，包括应用的本申请免疫细胞和/或药物组合物的活性，给药途径，给药时间，应用的特定化合物的排泄速率，治疗的持续时间，与应用的特定组合物联合应用的其他药物、化合物和/或材料，接受治疗的患者的年龄、性别、体重、状况、总体健康情况和病史，以及医学领域中公知的类似因素。

另一方面，本申请提供了所述的免疫细胞、所述的细胞群和/或所述的药物组合物在制备药物中的用途，所述药物用于治疗肿瘤。

本申请还提供一种用于治疗肿瘤的方法，所述方法包括给有需要的受试者施用治疗有效量的所述经修饰的免疫细胞、细胞群和/或所述药物组合物。

本申请还提供一种异体细胞移植的方法，所述方法包括给有需要的受试者施用治疗有效量的所述经修饰的免疫细胞、细胞群和/或所述药物组合物。所述方法可以降低受试者体内免疫系统对输入的异体细胞的杀伤。

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

## 实施例

### 实施例 1 分离和激活人原代 T 细胞

将人外周血单个核细胞（PBMCs，购自上海妙顺生物）稀释到  $2 \times 10^6/\text{ml}$ ，按照细胞与磁珠 1:3 的比例使用抗人的 CD3/CD28 磁珠（Thermo Fisher Scientific）激活 T 细胞。

## 实施例 2 设计并制备 gRNA

根据 Fas 的基因序列设计了 15 个指导 RNA (gRNA) 的 spacer (核酸序列分别为 SEQ ID NO: 1-15), 并合成了包含这些序列和 gRNA 骨架序列 (SEQ ID NO:35) 的 PCR 引物。PCR 扩增合成转录模板, 反应体系为 20 $\mu$ l, 如下表 2, 反应条件如下表 3。合成指导 RNA1 至指导 RNA20 (分别称为 gRNA1 至 gRNA20)。

表 2 PCR 反应体系

试剂	体积 ( $\mu$ l)
Q5 hot start HF 2X mix	10
正向引物 (10 $\mu$ M) : sgRNA 引物	1
反向引物 (10 $\mu$ M) : 通用引物	1
ddH <sub>2</sub> O	8

表 3 PCR 反应条件

温度 ( $^{\circ}$ C)	时间	循环数
98	30s	
98	10s	35
55	20s	
72	20s	
72	2min	
12	$\infty$	

然后进行 gRNA 体外转录, 反应体系为 20 $\mu$ l, 见表 4。加入试剂在冰上操作, 然后 37 $^{\circ}$ C 反应 2-4h, 结束后加入 1 $\mu$ l 的 DNAase 酶, 在 37 $^{\circ}$ C 反应 15min。具体操作步骤可参见 PCT 专利申请公布文本 WO2019011118A1。

表 4 转录反应体系

试剂	体积 ( $\mu$ l)
上一步的 PCR 产物	8
转录 buffer	10
T7 转录酶	2

接下来纯化 gRNA, 将磁珠 (Beckman, A63987) 从冰箱取出后上下颠倒 8-10 次, 并且多次震荡, 直到所有磁珠都充分悬浮。然后按照 1:1.8 倍体积在 gRNA 产物中加入磁珠, 并在

室温下孵育 5-10 分钟。孵育后放置在磁性分离器上 2 分钟，吸出上清液，将 EP 管继续留在磁性分离器上。在每管中加入 200 $\mu$ l 80%的乙醇清洗，无需震荡并保持 EP 管在磁性分离器上，吸出上清液，重复此步骤一次，最后尽可能吸尽上清液。室温下风干 5 分钟后加入 100 $\mu$ l RNAase free 水混匀，室温下静置 2-5 分钟，将 EP 管放在磁性分离器上 1-2 分钟直到磁珠被磁铁吸附，将带有 gRNA 的上清液转移到新的 EP 管中。最后使用 Nanodrop 根据操作说明测定纯化的 gRNA 浓度。

### 实施例 3 制备敲除 Fas 的 T 细胞

将激活的 T 细胞去除磁珠后，使用 CRISPR/Cas9 电转敲除 T 细胞中的 Fas。细胞处理操作流程参考专利 WO2019011118A1 进行。简而言之，用实施例 2 中的 gRNA 与从 IDT 购买的 Cas9 蛋白在 Neon 试剂盒 (Thermo, MPK1096) 提供的 T 缓冲液中混合，室温孵育 5 到 10 分钟，然后按照厂家提供的 T 细胞电转指南与重悬在 T 缓冲液的数量为  $0.2 \times 10^6$ /ml 的 6 $\mu$ l T 细胞混合，在 Neon 的 10 $\mu$ l 移液器枪头中进行电转。电转方法请参见文献 Schumann et al.PNAS 2015.112:10437-10442。

将电转后的 T 细胞放置于 37 摄氏度、5%CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中 48 小时后，摇晃并收取悬浮细胞，用识别 Fas 的抗体对细胞进行染色，并用流式细胞仪 (Beckman Coulter CytoFLEX) 进行分析。

图 1 和表 5 为 gRNA 剪切效率结果。结果显示，所有指导 RNA 均能剪切 Fas，且其中 SEQ ID NO: 2-4、7-10 和 12 的敲除效率均大于 30%。后续实验均采用敲除效率大于 30%的 gRNA 进行。

表 5 Fas gRNA 的敲除效率

SEQ ID NO	Fas 敲除效率%	SEQ ID NO	Fas 敲除效率%	SEQ ID NO	Fas 敲除效率%
阴性对照	0.67%	6	5.25%	12	80.96%
1	6.12%	7	49.19%	13	5.36%
2	42.33%	8	47.17%	14	1.04%
3	87.93%	9	37.68%	15	1.24%
4	62.09%	10	58.70%	-	-
5	14.07%	11	15.70%	-	-

#### 实施例 4 表达 FasL 的慢病毒包装

用全合成的方法得到慢病毒载体质粒 pELPs (序列参考专利 US9499629B2 中的 Sequence 1), 合成 FasL 及截短序列 FasLF。其中, FasL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 50 所示, 编码 FasL 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 53 所示, FasLF 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 51 所示, 编码 FasL 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 54 所示。

其中, FasL 序列参考 GenBank ID AY225406.1, 但突变了第 376 个-第 390 个核酸序列, 改变了相应氨基酸序列, 使之不会被分泌至细胞外环境。

将编码 FasL 及 FasLF 的核酸连接到 pELPs 中 EF-1 $\alpha$  启动子下游, 得到质粒 pELPs-FasL 及 pELPs-FasLF, 并进行慢病毒包装。

#### 实施例 5 Fas 敲除和/或转染病毒

用表 6 所示条件, 分别处理 PBMC 细胞, 将冻存的 PBMC 复苏的时间记为第 0 天, 使用实施例 3 的方法敲除 T 细胞的 Fas 或使用实施例 4 的病毒将 FasL 转入细胞。在进行 Fas 敲除以及加入表达 FasL 或 FasLF 的病毒的处理后, 将细胞放置于 37 摄氏度, 5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中继续培养, 第 3 天及第 6 天用识别 Fas、FasL 的抗体染色并用流式细胞仪 (Beckman Coulter CytoFLEX) 检测细胞生长情况及 Fas 敲除效率、FasL 表达效率。

表 6 处理条件

条件	CD3/CD28 磁珠激活	电转 Cas9/gRNA 敲除 Fas	加入包含编码 FasL/FasLF 的核酸分子的病毒
1	第 0 天	第 4 天	第 1 天
2	第 0 天	第 2 天	第 1 天
3	第 0 天	第 3 天	第 4 天
4	第 1 天	第 0 天	第 2 天
C1	第 0 天	第 3 天 (无 gRNA)	N/A
C2	第 1 天	第 0 天 (无 gRNA)	N/A

结果如图 2、3 所示, 如果先加入包含编码 FasL/FasLF 的核酸分子的病毒, 再敲除 Fas (条件 1-2), 则细胞扩增效率低, Fas 敲除效果较差。而先敲除 Fas, 再表达 FasL/FasLF (条件 3-4), 能制备出 Fas 敲除效果好, 扩增效率更高的表达 FasL/FasLF 的 T 细胞。

#### 实施例 6 表达 FasL 的 T 细胞对异体 T 细胞的杀伤有抵抗作用

为证明表达 FasL/FasLF 的 T 细胞可以抵抗异体 T 细胞杀伤, 本实施例采用体外细胞混合培养的方法, 对比表达或不表达 FasL/FasLF 的细胞在异体 T 细胞存在的情况下的细胞数量变化趋势。

(1) 按照实施例 5 的条件 3 制备表达 FasLF 的 T 细胞, 在细胞复苏时激活 T 细胞, 第 3 天电转 Cas9/gRNA 的步骤中同时加入了靶向 Fas 和 TRAC 的 gRNA, 以达到同时敲除 Fas 和 TCR 的目的。其中, 靶向 TRAC 的 gRNA 序列如 SEQ ID NO: 31-33 所示。然后在第 4 天加入表达 FasL/FasLF 的病毒。

为了尽量保证实验结果反映的是敲除了 TCR 的靶细胞被异体 T 细胞细胞杀伤的效果, 用 MACS 磁珠分选的方法去除靶细胞中 CD3 阳性的细胞, 缺失了 TCR 的 T 细胞不能被异体的效应细胞激活导致扩增。

(2) 然后制备来自与表达 FasLF 的 T 细胞相同来源 (供体 1) 及不同来源 (供体 2) 的 T 细胞: 将用 CD3/CD28 磁珠激活的 PBMC 培养 10 天后用 MACS 磁珠分选的方法去除 CD56 阳性的细胞, 排除 NK 细胞的干扰。

(3) 按照表 7 所示, 分别将按照步骤 (2) 制备的不同来源的效应细胞与来自步骤 (1) 的来自供体 1 的靶细胞按照 5:1 的比例混合, 其中组 1、2 为空白对照组, 将靶细胞单独培养。并在混合后当天 (第 0 天)、第 2 天、第 4 天、第 6 天分别对效应细胞和靶细胞进行计数。

表 7 混合条件

组别	效应细胞	靶细胞
1	无	供体 1 (敲除 TCR)
2	无	供体 1 (敲除 TCR、Fas, 表达 FasLF)
3	供体 1	供体 1 (敲除 TCR)
4	供体 1	供体 1 (敲除 TCR、Fas, 表达 FasLF)
5	供体 2	供体 1 (敲除 TCR)
6	供体 2	供体 1 (敲除 TCR、Fas, 表达 FasLF)

然后用识别 Fas、FasL、CD3 的抗体对细胞进行染色, 并用流式细胞仪 (Beckman Coulter CytoFLEX) 进行分析。由于靶细胞为 CD3 阴性, 而效应细胞中 98% 以上为 CD3 阳性, 因此可以用 CD3 染色来区分靶细胞群和效应细胞群, 并分别对两群细胞进行计数, 再通过体积换算为每个样品孔中效靶细胞的总细胞数。统计细胞扩增倍数时, 将第 0 天的细胞数设为 1 倍, 其余时间点的总细胞数与第 0 天的细胞数相除得到细胞扩增倍数。

结果显示, 在第 6 天时, 可以比较明显地看出各组样品中靶细胞扩增倍数的区别 (图 4)。在单独培养的对照组 1、2 中 (图 5 中的对照组 A), 扩增倍数区别不大, 2 扩增稍快于 1, 证明敲除 Fas 并表达 FasLF 的处理不会影响细胞生长。在与自体细胞共培养的对照组 3、4 中 (即图 5 的对照组 B), 细胞生长状况差别也不大。但在与异体细胞共培养的实验组 5、6 中 (即图 5 的实验组), 没有敲除 Fas、表达 FasLF 的实验组 5 表现出明显的扩增缓慢, 而敲除 Fas、表达 FasLF 的实验组 6 仍然正常扩增。实验证明敲除 Fas、表达 FasL 的 T 细胞在与异

体 T 细胞共同培养时可以抵抗异体 T 细胞的杀伤。

### 实施例 7 表达 FasL 及 PDL1/CD24 的 T 细胞对异体 PBMC 的杀伤有抵抗作用

为证明同时表达 FasL 和 PDL1, 或 FasL 和 CD24, 或 FasL 和 PDL1、CD24 的 T 细胞可以抵抗异体 PBMC 细胞的杀伤作用, 本实施例采用体外细胞混合培养的方法, 对比不表达外源蛋白, 以及表达 FasL、PDL1、CD24 的细胞在异体 PBMC 细胞存在的情况下的细胞数量变化趋势。在本实施例中均使用截短的蛋白进行实验。此外, 本实验还敲除了 PD-1。

(1) PD-1 gRNA 筛选: 根据 PD-1 的基因序列设计并合成了 15 个 gRNA (核酸序列分别为 SEQ ID NO: 16-30), 将 gRNA 分别与 Cas9 蛋白混合后, 对 Jurkat 细胞进行电转。将 Jurkat 细胞培养 24 小时后, 在培养基中加入 anti-CD3 抗体, 培养 30 小时后检测 PD-1 的表达情况, 结果如表 8 所示, 所有 gRNA 均能成功敲除 PD-1。

表 8 PD-1 gRNA 的敲除效率

	PD-1 敲除效率%		PD-1 敲除效率%		PD-1 敲除效率%		PD-1 敲除效率%
阴性对照	20.93%	SEQ ID NO:19	85.69%	SEQ ID NO:23	20.58%	SEQ ID NO:27	18.67%
SEQ ID NO: 16	24.03%	SEQ ID NO:20	20.00%	SEQ ID NO:24	19.42%	SEQ ID NO:28	19.09%
SEQ ID NO:17	35.52%	SEQ ID NO:21	68.66%	SEQ ID NO:25	58.18%	SEQ ID NO:29	28.97%
SEQ ID NO:17	23.84%	SEQ ID NO:22	95.37%	SEQ ID NO:26	20.35%	SEQ ID NO:30	19.95%

(2) 构建同时表达 FasLF+PDL1F、FasLF+CD24、FasLF+PDL1F+CD24 的慢病毒载体并包装慢病毒: 在实施例 4 的基础上, 合成 P2A-PDL1F (SEQ ID NO: 61), P2A-CD24 (SEQ ID NO: 62), 用 Gibson 同源重组的方法将基因片段构建到质粒 pELPs-FasLF 上, 得到慢病毒载体 pELPs-FasLF-P2A-PDL1F 和 pELPs-FasLF-P2A-CD24。另外合成 CD24-P2A-PDL1F-IRES-FasLF (SEQ ID NO: 47), 用限制性内切酶同时处理质粒 pELPs 和基因片段, 将合成的基因片段连接到 pELPs 中 EF-1 $\alpha$  启动子下游, 得到慢病毒载体 pELPs-CD24-P2A-PDL1F-IRES-FasLF。用所得到的慢病毒载体分别进行慢病毒包装。

(3) 制备表达 FasLF, FasLF+PDL1F, FasLF+CD24, FasLF+PDL1F+CD24 的 T 细胞:

采用实施例 5 中的条件 3，在加入慢病毒时对应样品分别加入包含编码 FasLF 的核酸分子的慢病毒及步骤（2）中得到的三种慢病毒。

（4）按照表 9 所示，将按照步骤（3）制备的靶细胞用 CellTrace 染料染色。将不同来源的 PBMC 和靶细胞按 20:1 的比例混合，并在混合后当天（第 0 天）、第 2 天、第 4 天、第 6 天分别对效应细胞和靶细胞进行计数。

表 9 混合条件

组别	效应细胞	靶细胞
1	无	供体 1（敲除 TCR）
2	无	供体 1（敲除 TCR、Fas，表达 FasLF）
3	无	供体 1（敲除 TCR、Fas、PD-1，表达 FasLF+PDL1F）
4	无	供体 1（敲除 TCR、Fas，表达 FasLF+CD24）
5	无	供体 1（敲除 TCR、Fas、PD-1，表达 FasLF+PDL1F+CD24）
6	供体 1	供体 1（敲除 TCR）
7	供体 1	供体 1（敲除 TCR、Fas，表达 FasLF）
8	供体 1	供体 1（敲除 TCR、Fas、PD-1，表达 FasLF+PDL1F）
9	供体 1	供体 1（敲除 TCR、Fas，表达 FasLF+CD24）
10	供体 1	供体 1（敲除 TCR、Fas、PD-1，表达 FasLF+PDL1F+CD24）
11	供体 2	供体 1（敲除 TCR）
12	供体 2	供体 1（敲除 TCR、Fas，表达 FasLF）
13	供体 2	供体 1（敲除 TCR、Fas、PD-1，表达 FasLF+PDL1F）
14	供体 2	供体 1（敲除 TCR、Fas，表达 FasLF+CD24）
15	供体 2	供体 1（敲除 TCR、Fas、PD-1，表达 FasLF+PDL1F+CD24）
16	供体 3	供体 1（敲除 TCR）
17	供体 3	供体 1（敲除 TCR、Fas，表达 FasLF）
18	供体 3	供体 1（敲除 TCR、Fas、PD-1，表达 FasLF+PDL1F）
19	供体 3	供体 1（敲除 TCR、Fas，表达 FasLF+CD24）
20	供体 3	供体 1（敲除 TCR、Fas、PD-1，表达 FasLF+PDL1F+CD24）

用识别 CD3、Fas、FasL、PD-1、PDL1、CD24 的抗体对细胞进行染色，并用流式细胞仪（Beckman Coulter CytoFLEX）进行分析靶细胞的扩增倍数，作为检测抵抗杀伤能力的指标。靶细胞可用 CellTrace 染料与效应细胞 PBMC 区分。

如表 10 所示, FasLF 对 PBMC 细胞杀伤有一定抵抗作用, 这种抵抗作用在同时有 PDL1F 或 CD24 表达时更强, 而同时表达 FasLF、PDL1F 及 CD24 三种蛋白时, 抵抗 PBMC 杀伤的效果好, 这三种蛋白在抵抗 PBMC 杀伤的功能上有协同作用。

表 10 抵抗 PBMC 杀伤能力

靶细胞	抵抗 PBMC 杀伤能力
供体 1 (敲除 TCR)	--
供体 1 (敲除 TCR、Fas, 表达 FasLF)	+
供体 1 (敲除 TCR、Fas、PD-1, 表达 FasLF+PDL1F)	++
供体 1 (敲除 TCR、Fas, 表达 FasLF+CD24)	++
供体 1 (敲除 TCR、Fas、PD-1, 表达 FasLF+PDL1F+CD24)	+++

### 实施例 8 FasL 铰链区进行了替换的变体同样对异体 T 细胞的杀伤有抵抗作用

对 FasL 铰链区进行了替换得到两个 FasL 变体 FasL-M1 (氨基酸序列如 SEQ ID NO: 63 所示) 和 FasL-M2 (氨基酸序列如 SEQ ID NO: 64 所示), 胞外区不变。按照实施例 4 和实施例 5 的方法进行慢病毒包装, 转染 T 细胞。如图 6 所示, FasL-M1 及 FasL-M2 均可在 T 细胞中表达。

然后按照实施例 6, 采用体外细胞混合培养的方法, 对比表达 FasL、FasL-M1、FasL-M2 与不表达外源蛋白的 T 细胞在异体 T 细胞存在的情况下的细胞数量变化趋势。

(1) 按照实施例 6 (1) 的方法用来自供体 1 的 T 细胞制备对照组 T 细胞及表达 FasL、FasL-M1、FasL-M2 的 T 细胞, 并用 MACS 分选出 CD3 阴性的细胞。

(2) 按照实施例 6 (2) 的方法制备与 (1) 中所用 T 细胞不同来源 (供体 2) 的 T 细胞, 用 MACS 分选的方法去除 CD56 阳性的细胞。

(3) 按照表 11 所示, 将 (2) 中的效应 T 细胞与 (1) 中的靶细胞按照 5: 1 的比例混合。

表 11 混合条件

组别	效应细胞	靶细胞
1	无	供体 1 (敲除 TCR、Fas)
2	无	供体 1 (敲除 TCR、Fas, 表达 FasLF)
3	无	供体 1 (敲除 TCR、Fas, 表达 FasL-M1)
4	无	供体 1 (敲除 TCR、Fas, 表达 FasL-M2)

5	供体 2	供体 1 (敲除 TCR、Fas)
6	供体 2	供体 1 (敲除 TCR、Fas, 表达 FasLF)
7	供体 2	供体 1 (敲除 TCR、Fas, 表达 FasL-M1)
8	供体 2	供体 1 (敲除 TCR、Fas, 表达 FasL-M2)

然后用识别 Fas、FasL、CD3 的抗体对细胞进行染色,并用流式细胞仪 (Beckman Coulter CytoFLEX) 进行分析。由于靶细胞为 CD3 阴性,而效应细胞中 98%以上为 CD3 阳性,因此可以用 CD3 染色来区分靶细胞群和效应细胞群,并分别对两群细胞进行计数,再通过体积换算为每个样品孔中效靶细胞的总细胞数。统计细胞扩增倍数时,将第 0 天的细胞数设为 1 倍,其余时间点的总细胞数与第 0 天的细胞数相除得到细胞扩增倍数。

如图 7,在单独培养的组 1-4 中,靶细胞正常扩增,4 组细胞扩增倍数相似。而在与异体 T 细胞共培养的组 5-8 中,组 5 扩增明显较差,组 6-8 扩增情况相似。可见 FasL 及变体 FasL-M1、FasL-M2 均可对异体 T 细胞杀伤起到保护作用,使表达了 FasL、FasL-M1、FasLF-M2 的 T 细胞在异体 T 细胞的杀伤作用下存活更多。

## 权 利 要 求 书

1. 制备经修饰的免疫细胞的方法，所述修饰包括以下步骤。
  - a) 下调所述免疫细胞中 Fas 蛋白的表达和/或活性，
  - b) 上调所述免疫细胞中 FasL 蛋白的表达和/或活性，使得，与未经所述修饰的免疫细胞相比，所述经修饰的免疫细胞中 Fas 蛋白的表达和/或活性降低或消除，且，所述经修饰的免疫细胞中 FasL 蛋白的表达和/或活性升高。
2. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述步骤 a) 包括下调所述免疫细胞中编码 Fas 蛋白的核酸分子的表达和/或活性。
3. 根据权利要求 1-2 中任一项所述的方法，其中所述步骤 a) 的所述下调包括通过基因敲除 (knock out)、基因敲减 (knock down)、基因突变、基因缺失、基因沉默或上述的任意组合来下调。
4. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的方法，其中所述步骤 a) 的所述下调包括向所述免疫细胞施用一种或多种选自下组的物质：反义 RNA、siRNA、shRNA、CRISPR/Cas 系统、RNA 编辑系统如 RNA 腺苷脱氨酶 (ADAR)、RNA 指导的核酸内切酶、锌指核酸酶 (ZFN)、Mega-TAL 核酸酶、转录激活子样效应物核酸酶 (TALEN)、大范围核酸酶 (Meganuclease)、碱基编辑、CRISPR 干扰，和，锌指蛋白 (Zinc finger) 基因阻遏物和/或转录激活子样效应物 (TALE) 基因阻遏物介导的转录抑制。
5. 根据权利要求 1-4 中任一项所述的方法，其中所述步骤 a) 包括向所述免疫细胞施用靶向编码 Fas 蛋白的核酸分子的指导 RNA。
6. 根据权利要求 1-5 中任一项所述的方法，其中所述步骤 a) 包括靶向所述免疫细胞中编码 Fas 蛋白的核酸分子的外显子 1-5 中的任意一个或多个。
7. 根据权利要求 1-6 中任一项所述的方法，其中所述 Fas 蛋白包括 SEQ ID NO: 46 示的氨基酸序列。
8. 根据权利要求 2-7 中任一项所述的方法，其中所述编码 Fas 蛋白的核酸分子包括 NCBI 数据库 gene ID: 355 下或 Ensembl 数据库 ENSG00000026103 下所示的核苷酸序列。
9. 根据权利要求 5-8 中任一项所述的方法，其中所述靶向编码 Fas 蛋白的核酸分子的指导 RNA 包含如 SEQ ID NO: 1-15 中任一项所示的核苷酸序列。
10. 根据权利要求 5-9 中任一项所述的方法，其中所述靶向编码 Fas 蛋白的核酸分子的指导 RNA 为单链指导 RNA。
11. 根据权利要求 5-10 中任一项所述的方法，其中所述靶向编码 Fas 蛋白的核酸分子的指导 RNA 为包含 crRNA 和 tracrRNA 的双链指导 RNA。

12. 根据权利要求 11 所述的方法，其中所述 crRNA 包含如 SEQ ID NO: 1-15 中任一项所示的核苷酸序列。
13. 根据权利要求 1-12 中任一项所述的方法，其包括下调所述免疫细胞中 T 细胞受体（TCR）复合物、T 细胞受体  $\alpha$  恒定区蛋白、T 细胞受体  $\beta$  恒定区蛋白、CD3-epsilon、CD3-gamma、CD3-delta、CD3-zeta、CD3-eta、和/或 PD-1 蛋白的表达和/或活性。
14. 根据权利要求 13 所述的方法，其包括下调编码所述 TCR 复合物、T 细胞受体  $\alpha$  恒定区蛋白、T 细胞受体  $\beta$  恒定区蛋白、CD3-epsilon、CD3-gamma、CD3-delta、CD3-zeta、CD3-eta、和/或所述 PD-1 蛋白的核酸分子的表达和/或活性。
15. 根据权利要求 13-14 中任一项所述的方法，其包括向所述免疫细胞施用靶向编码所述 T 细胞受体  $\alpha$  恒定区蛋白的核酸分子（TRAC）的指导 RNA。
16. 权利要求 15 所述的方法，其包括靶向所述免疫细胞中编码所述 T 细胞受体  $\alpha$  恒定区蛋白的核酸分子（TRAC）的外显子 1-3。
17. 根据权利要求 13-16 中任一项所述的方法，其中所述 T 细胞受体  $\alpha$  恒定区蛋白包括如 SEQ ID NO: 49 所示的氨基酸序列。
18. 根据权利要求 15-17 中任一项所述的方法，其中所述靶向编码所述 T 细胞受体  $\alpha$  恒定区蛋白的核酸分子（TRAC）的指导 RNA 包含如 SEQ ID NO: 31-33 所示的核苷酸序列。
19. 根据权利要求 13-18 中任一项所述的方法，其包括向所述免疫细胞施用靶向编码所述 PD-1 蛋白的核酸分子的指导 RNA。
20. 权利要求 19 所述的方法，其包括靶向所述免疫细胞中编码所述 PD-1 蛋白的核酸分子的外显子 1-3。
21. 根据权利要求 13-20 中任一项所述的方法，其中所述 PD-1 蛋白包括 SEQ ID NO: 48 所示的氨基酸序列。
22. 根据权利要求 19-21 中任一项所述的方法，其中所述靶向所述 PD-1 蛋白的核酸分子的指导 RNA 包含如 SEQ ID NO: 16-30 中任一项所示的核苷酸序列。
23. 根据权利要求 5-22 中任一项所述的方法，其中所述指导 RNA 包含化学修饰。
24. 根据权利要求 1-23 中任一项所述的方法，其包括向所述免疫细胞施用 Cas 蛋白。
25. 根据权利要求 24 所述的方法，其中所述 Cas 蛋白为 Cas9 蛋白。
26. 根据权利要求 1-25 中任一项所述的方法，其中所述步骤 b) 包括上调所述免疫细胞中编码 FasL 蛋白的核酸分子的表达和/或活性。
27. 根据权利要求 1-26 中任一项所述的方法，其中所述步骤 b) 包括向所述免疫细胞施用编码 FasL 蛋白的核酸分子。

28. 根据权利要求 1-27 中任一项所述的方法，其包括向所述免疫细胞施用包含编码 FasL 蛋白的核酸分子的载体。
29. 根据权利要求 1-28 中任一项所述的方法，其中所述 FasL 蛋白包括胞外结构域。
30. 根据权利要求 29 所述的方法，其中所述 FasL 蛋白的胞外结构域包括如 SEQ ID NO: 52 所示的氨基酸序列。
31. 根据权利要求 1-30 中任一项所述的方法，其中所述 FasL 蛋白包括铰链区。
32. 根据权利要求 31 所述的方法，其中所述铰链区源自肿瘤坏死因子超家族。
33. 根据权利要求 31-32 中任一项所述的方法，其中所述铰链区源自 FasL、TNFSF10 或 OX40L。
34. 根据权利要求 1-33 中任一项所述的方法，其中所述 FasL 蛋白包括胞内结构域。
35. 根据权利要求 1-34 中任一项所述的方法，其中所述 FasL 蛋白包括如 SEQ ID NO: 50-52 和 63-64 中任一项所示的氨基酸序列。
36. 根据权利要求 26-35 中任一项所述的方法，其中所述编码 FasL 蛋白的核酸分子包括如 SEQ ID NO: 53-55 中任一项所示的核苷酸序列。
37. 根据权利要求 1-36 中任一项所述的方法，其还包括上调所述免疫细胞中的 PD-L1 蛋白和/或 CD24 蛋白的表达和/或活性。
38. 根据权利要求 37 所述的方法，其包括向所述免疫细胞施用编码所述 PD-L1 的核酸分子和/或编码 CD24 蛋白的核酸分子。
39. 根据权利要求 37-38 中任一项所述的方法，其包括向所述免疫细胞施用包含所述编码 PD-L1 蛋白的核酸分子和/或所述编码 CD24 蛋白的核酸分子的载体。
40. 根据权利要求 37-39 中任一项所述的方法，其中所述 PD-L1 蛋白包括如 SEQ ID NO: 56-57 中任一项所示的氨基酸序列。
41. 根据权利要求 38-40 中任一项所述的方法，其中所述编码 PD-L1 蛋白的核酸分子包括如 SEQ ID NO: 58 所示的核苷酸序列。
42. 根据权利要求 37-41 中任一项所述的方法，其中所述 CD24 蛋白包括如 SEQ ID NO: 59 所示的氨基酸序列。
43. 根据权利要求 38-42 中任一项所述的方法，其中所述编码 CD24 蛋白的核酸分子包括 SEQ ID NO: 60 所示的核苷酸序列。
44. 根据权利要求 28-43 中任一项所述的方法，其中所述载体包含病毒载体。
45. 根据权利要求 1-44 中任一项所述的方法，其中所述免疫细胞包括 T 细胞、NK 细胞、NKT 细胞、单核细胞、巨噬细胞、B 细胞、浆细胞、粒细胞、树突状细胞、淋巴细

- 胞、白细胞、干细胞和/或外周血单个核细胞。
46. 根据权利要求 1-45 中任一项所述的方法，其中所述步骤 b) 在所述步骤 a) 之后进行。
  47. 根据权利要求 1-46 中任一项所述的方法，其中所述步骤 b) 在所述步骤 a) 中的下调成功后进行。
  48. 根据权利要求 47 所述的方法，其中所述下调成功包括，与经所述步骤 a) 前的免疫细胞相比，经过所述步骤 a) 后的所述免疫细胞中 Fas 蛋白的表达和/或活性降低至少 50%。
  49. 根据权利要求 47-48 中任一项所述的方法，其中所述下调成功包括基因编辑发生。
  50. 根据权利要求 1-49 中任一项所述的方法，其中所述步骤 b) 在所述步骤 a) 至少 6 小时后进行。
  51. 根据权利要求 1-50 中任一项所述的方法，其还包括以下步骤：使所述经修饰的免疫细胞包括嵌合抗原受体 (CAR)、T 细胞受体 (TCR)、嵌合自身抗体受体 (CAAR) 和/或至少一种合成受体。
  52. 根据权利要求 1-51 中任一项所述的方法，其还包括以下步骤：使所述经修饰的免疫细胞包括表达嵌合抗原受体 (CAR)、T 细胞受体 (TCR)、嵌合自身抗体受体 (CAAR) 和/或至少一种合成受体的核酸分子。
  53. 根据权利要求 1-52 中任一项所述的方法制得的经修饰的免疫细胞，与未经所述修饰的免疫细胞相比，所述经修饰的免疫细胞中 Fas 蛋白的表达和/或活性降低或消除，且，所述经修饰的免疫细胞中 FasL 蛋白的表达和/或活性升高。
  54. 根据权利要求 53 所述的免疫细胞，其包括嵌合抗原受体 (CAR)、T 细胞表面受体 (TCR)、嵌合自身抗体受体 (CAAR) 和/或至少一种合成受体。
  55. 细胞群，其包含权利要求 53-54 中任一项所述的免疫细胞，且所述细胞群中至少 20% 的免疫细胞基本上不表达 Fas，至少 5% 的免疫细胞过表达 FasL。
  56. 根据权利要求 55 所述的细胞群，其中的至少 15% 的免疫细胞基本上不表达 PD-1。
  57. 根据权利要求 55-56 中任一项所述的细胞群，其中的至少 5% 的免疫细胞过表达 PD-L1。
  58. 根据权利要求 55-57 中任一项所述的细胞群，其中的至少 5% 的免疫细胞过表达 CD24。
  59. 药物组合物，其包含权利要求 53-54 中任一项所述的免疫细胞和/或权利要求 55-58 中任一项所述的细胞群，以及药学上可接受的载体。
  60. 权利要求 53-54 中任一项所述的免疫细胞、权利要求 55-58 中任一项所述的细胞群和/或权利要求 59 所述的药物组合物在制备药物中的用途，所述药物用于治疗肿瘤。

61. 靶向编码 Fas 蛋白的核酸分子的指导 RNA，其中所述指导 RNA 包含 SEQ ID NO: 1-15 中任一项所示的核苷酸序列。
62. 靶向编码 PD-1 蛋白的核酸分子的指导 RNA，其中所述指导 RNA 包含 SEQ ID NO: 16-30 中任一项所示的核苷酸序列。
63. CRISPR/Cas 系统，其包括权利要求 61-62 中任一项所述的指导 RNA 和 Cas 蛋白。
64. 根据权利要求 63 所述的系统，其中所述 Cas 蛋白包括 Cas9 蛋白。
65. 异体细胞移植的方法，其包括施用有效量的权利要求 53-54 中任一项所述的免疫细胞、权利要求 55-58 中任一项所述的细胞群，和/或权利要求 59 所述的药物组合物。
66. 治疗肿瘤的方法，其包括施用有效量的权利要求 53-54 中任一项所述的免疫细胞、权利要求 55-58 中任一项所述的细胞群，和/或权利要求 59 所述的药物组合物。

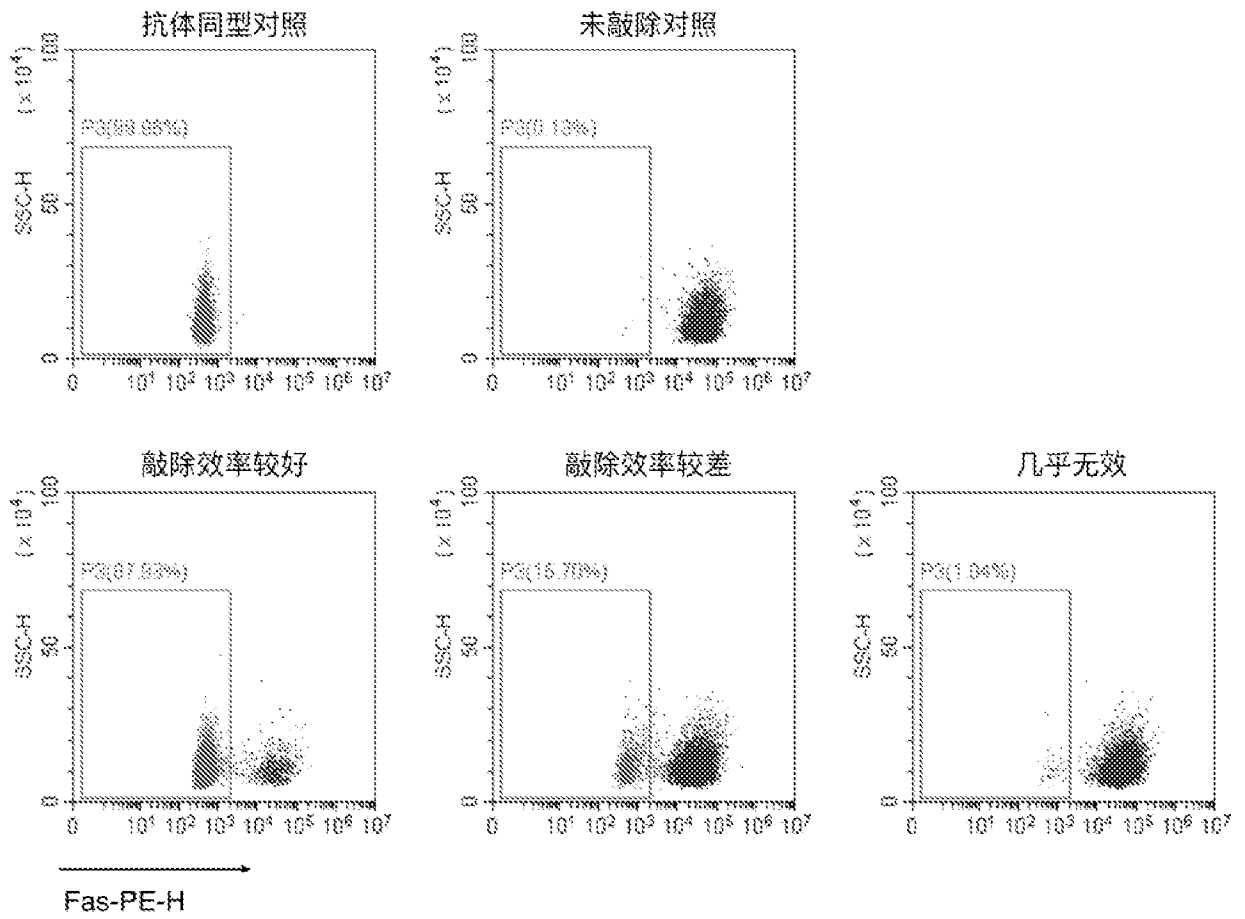


图 1

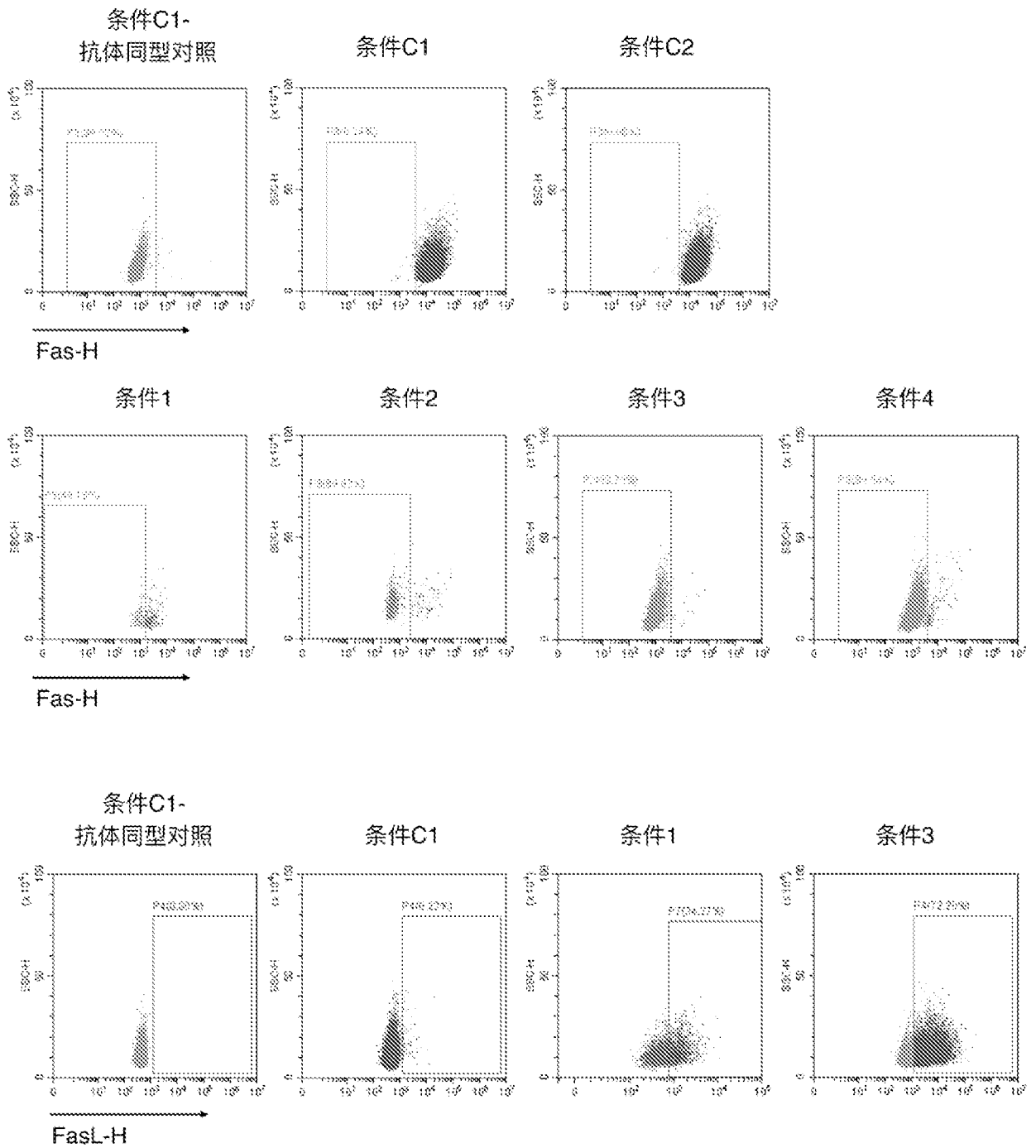


图 2

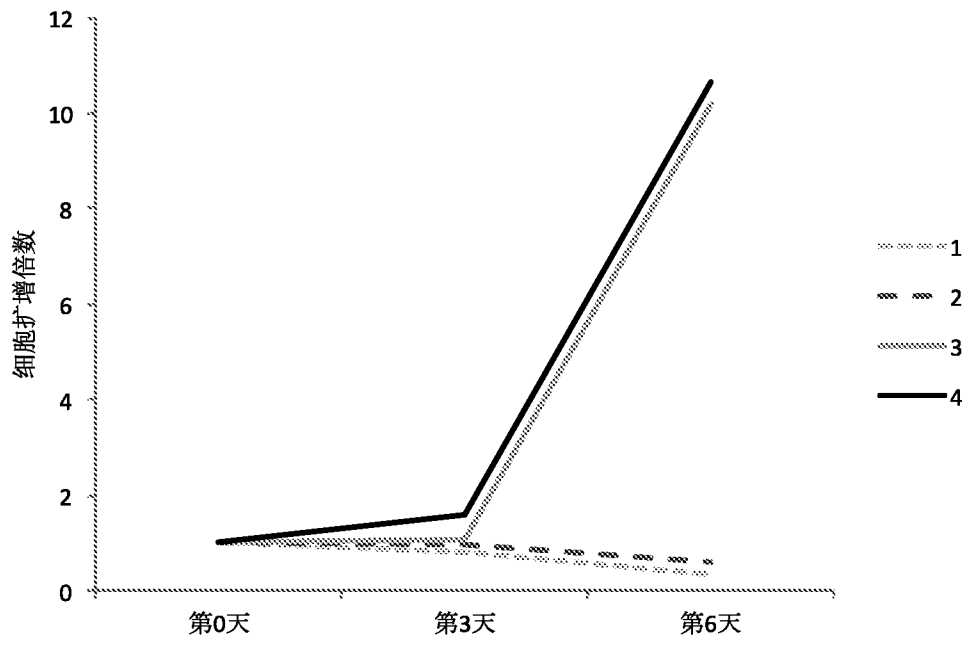


图 3

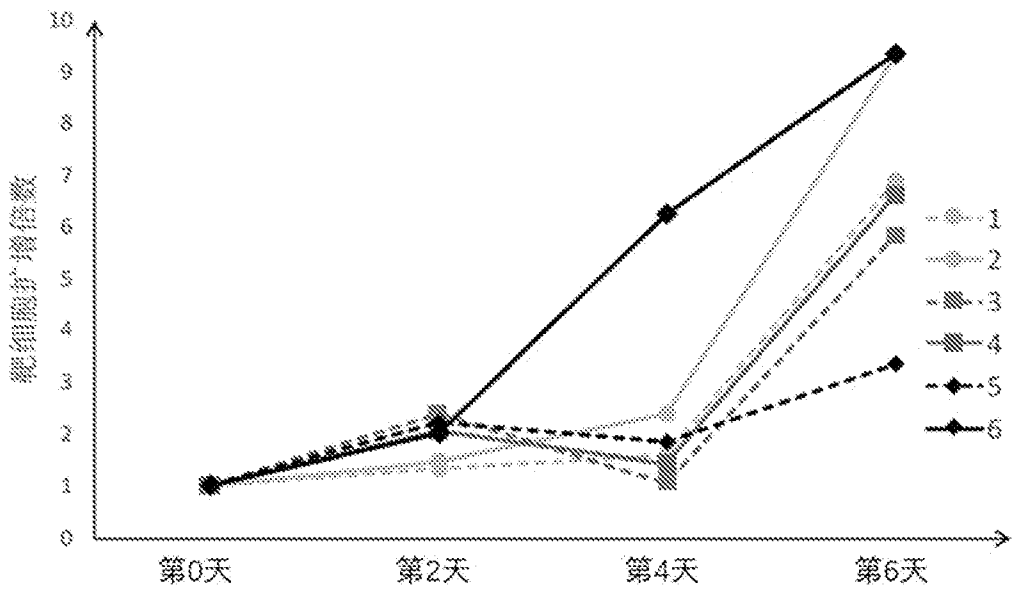


图 4

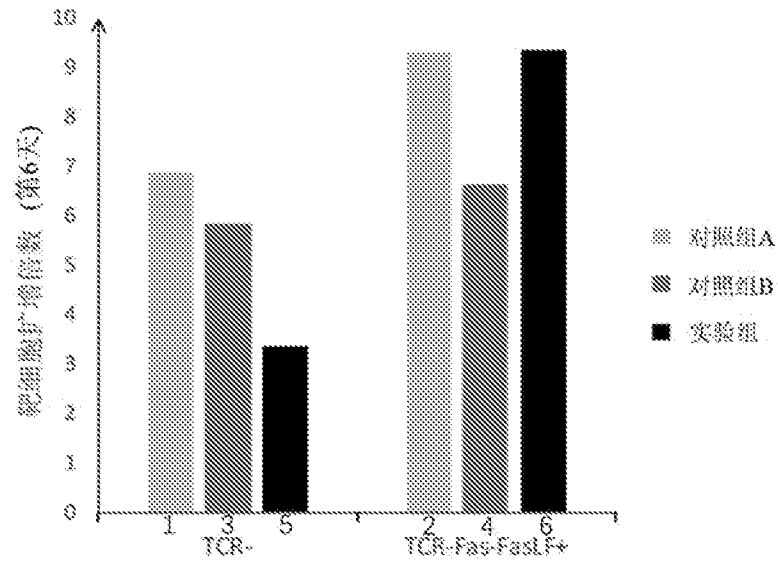


图 5

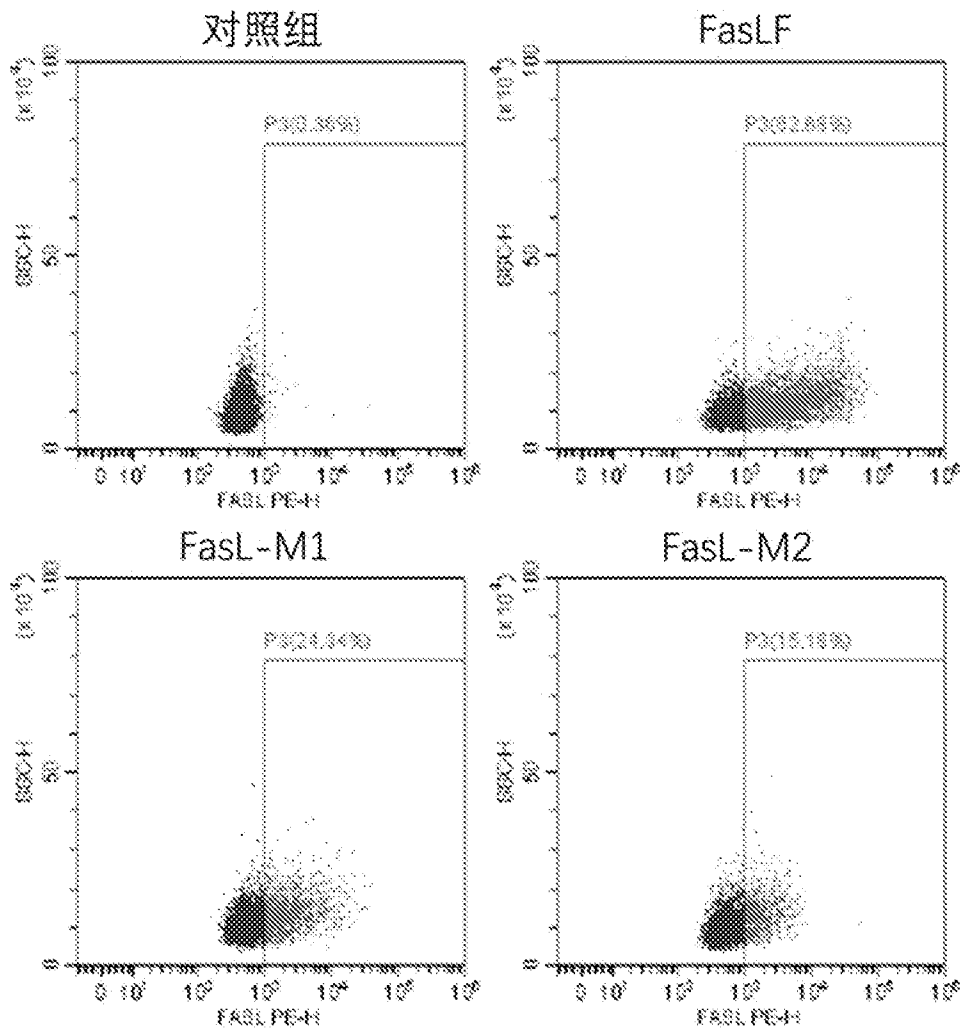


图 6

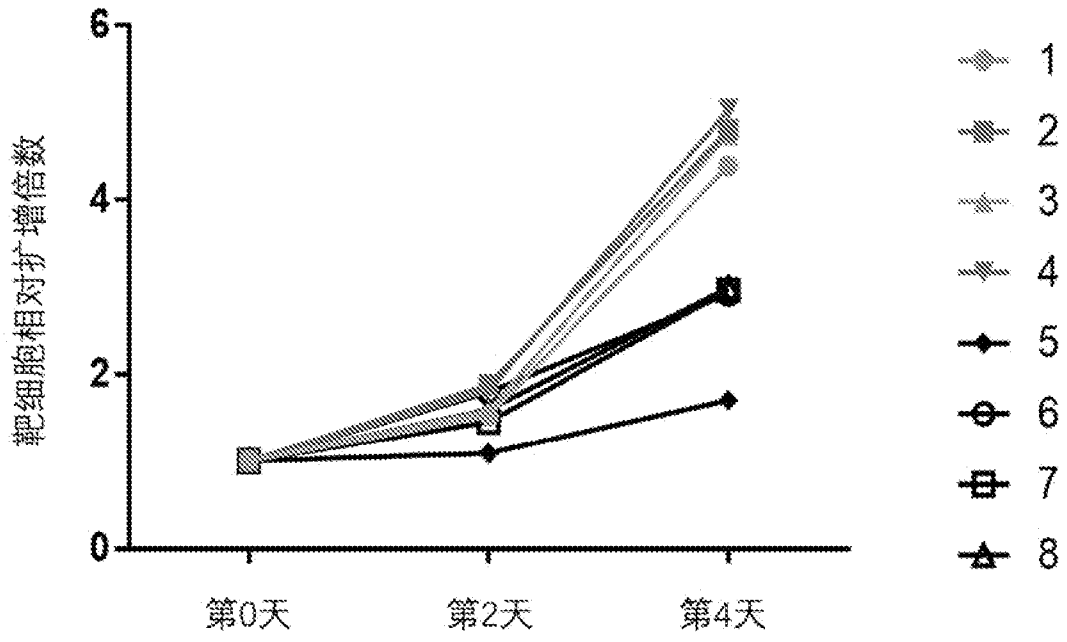


图 7

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/106007

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
C12N 15/90(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C12N 15/85(2006.01)i; A61K 35/17(2015.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N; A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNPAT, CNKI, WPI, EPODOC, PUBMED, NCBI BLAST: 克睿基因, 贾璐盈, 林彦妮, 袁慧, 免疫细胞, T细胞, 免疫治疗, 嵌合抗原受体, 下调 s Fas, 上调 s FasL, 下调 s PD1, 上调 s PD-L1, 引导RNA, 指导RNA, immuno w cell?, T w cell?, immunotherap+, CAR-T, CART, (down w regulat+) s Fas, (up w regulat+) s FasL, (down w regulat+) s PD1, (up w regulat+) s PD-L1, guide RNA, gRNA, nucleotide sequence search		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 107206024 A (THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA) 26 September 2017 (2017-09-26) description paragraphs [0010]-[0012], [0043]-[0045], [0181]-[0183], [0203]-[0204], [0268]-[0272], [0407]-[0412]	61-64
Y	CN 107206024 A (THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA) 26 September 2017 (2017-09-26) description paragraphs [0010]-[0012], [0043]-[0045], [0181]-[0183], [0203]-[0204], [0268]-[0272], [0407]-[0412]	1-60
Y	DRANITZKI-ELHALEL, M. et al. "CD40 FasL inhibits human T cells: evidence for an auto-inhibitory loop-back mechanism" <i>International Immunology</i> , Vol. 19, No. 4, 20 February 2007 (2007-02-20), ISSN: 0953-8178, abstract	1-60
A	CN 104046593 A (ZHEJIANG UNIVERSITY) 17 September 2014 (2014-09-17) entire document	1-64
<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 <b>24 September 2021</b>		Date of mailing of the international search report <b>12 October 2021</b>
Name and mailing address of the ISA/CN <b>China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088 China</b> Facsimile No. (86-10)62019451		Authorized officer  Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/106007

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 106480027 A (CHONGQING GAOSHENG BIOL PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 08 March 2017 (2017-03-08) entire document	1-64
A	CN 103215223 A (THE FOURTH MILITARY MEDICAL UNIVERSITY OF PLA.) 24 July 2013 (2013-07-24) entire document	1-64
A	CN 104822384 A (UNIVERSITY OF SOUTHERN CALIFORNIA) 05 August 2015 (2015-08-05) entire document	1-64
A	CN 109722437 A (GUANGZHOU BIO-GENE TECHNOLOGY CO., LTD.) 07 May 2019 (2019-05-07) entire document	1-64
A	CN 110904045 A (INSTITUTE OF ZOOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 24 March 2020 (2020-03-24) entire document	1-64
A	US 2019345446 A1 (THE BROAD INSTITUTE, INC. et al.) 14 November 2019 (2019-11-14) entire document	1-64
A	WO 9920308 A1 (BIOCRYSTAL LTD.) 29 April 1999 (1999-04-29) entire document	1-64

**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.: **65,66**  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  - [1] A method for treatment of the human or animal body by surgery or therapy as defined in PCT Rule 39.1(4). Specifically, claim 65 relates to a method for allogeneic cell transplantation, comprising administering an effective amount of immune cells as claimed in any one of the claims 53-54, of cell groups as claimed in any one of the claims 55-58, and/or of pharmaceutical compositions as claimed in claim 59. Claim 66 relates to a method for treating tumor, comprising administering an effective amount of immune cells as claimed in any one of the claims 53-54, of cell groups as claimed in any one of the claims 55-58, and/or of pharmaceutical compositions as claimed in claim 59. The claimed method comprises: treating tumor on a human or animal body by transplanting allogeneic cells into a human or animal body, or applying cells and/or drugs. Therefore, the technical solution set forth in claims 65 and 66 pertains to methods of treatment of a human or animal body by surgery or therapy.
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/CN2021/106007**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	107206024	A	26 September 2017	AU	2015339744	A1	27 April 2017
				CA	2964953	A1	06 May 2016
				US	2020407728	A1	31 December 2020
				AU	2015339743	C1	22 April 2021
				JP	2017535261	A	30 November 2017
				MX	2017005698	A	29 June 2017
				US	2017335331	A1	23 November 2017
				KR	20170074245	A	29 June 2017
				JP	6879910	B2	02 June 2021
				CA	2964948	A1	06 May 2016
				EP	3215168	A1	13 September 2017
				JP	2021058196	A	15 April 2021
				US	2017290858	A1	12 October 2017
				EP	3215166	A1	13 September 2017
				AU	2015339743	B2	05 November 2020
				BR	112017008693	A2	27 February 2018
				WO	2016069283	A1	06 May 2016
				US	2018312848	A1	01 November 2018
				HK	1243332	A1	13 July 2018
				JP	2018500006	A	11 January 2018
				AU	2015339744	B2	25 March 2021
				KR	20170075013	A	30 June 2017
				WO	2016069282	A1	06 May 2016
				EA	201790953	A1	31 October 2017
				AU	2021200118	A1	25 March 2021
				CN	107249606	A	13 October 2017
				AU	2015339743	A1	27 April 2017
CN	104046593	A	17 September 2014	WO	2014139443	A1	18 September 2014
CN	106480027	A	08 March 2017		None		
CN	103215223	A	24 July 2013	CN	103215223	B	29 October 2014
CN	104822384	A	05 August 2015	WO	2013149211	A2	03 October 2013
				EP	2833896	A2	11 February 2015
				US	2015104428	A1	16 April 2015
CN	109722437	A	07 May 2019	CN	109722437	B	07 January 2020
CN	110904045	A	24 March 2020	WO	2020057486	A1	26 March 2020
US	2019345446	A1	14 November 2019		None		
WO	9920308	A1	29 April 1999	AU	1273699	A	10 May 1999
				US	6268350	B1	31 July 2001

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2021/106007

<p><b>A. 主题的分类</b></p> <p>C12N 15/90(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C12N 15/85(2006.01)i; A61K 35/17(2015.01)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>B. 检索领域</b></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</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>CNPAT, CNKI, WPI, EPODOC, PUBMED, NCBI BLAST: 克睿基因, 贾璐盈, 林彦妮, 袁慧, 免疫细胞, T细胞, 免疫治疗, 嵌合抗原受体, 下调 s Fas, 上调 s FasL, 下调 s PD1, 上调 s PD-L1, 引导RNA, 指导RNA, immuno w cell?, T w cell?, immunotherap+, CAR-T, CART, (down w regulat+) s Fas, (up w regulat+) s FasL, (down w regulat+) s PD1, (up w regulat+) s PD-L1, guide RNA, gRNA, 核苷酸序列检索</p>																				
<p><b>G. 相关文件</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>CN 107206024 A (宾夕法尼亚大学董事会) 2017年 9月 26日 (2017 - 09 - 26) 说明书[0010]-[0012]段、[0043]-[0045]、[0181]-[0183]、[0203]-[0204]、 [0268]-[0272]、[0407]-[0412]段</td> <td>61-64</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 107206024 A (宾夕法尼亚大学董事会) 2017年 9月 26日 (2017 - 09 - 26) 说明书[0010]-[0012]段、[0043]-[0045]、[0181]-[0183]、[0203]-[0204]、 [0268]-[0272]、[0407]-[0412]段</td> <td>1-60</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>DRANITZKI-ELHALEL, M. 等. "CD40 FasL inhibits human T cells: evidence for an auto-inhibitory loop-back mechanism" International Immunology, 第19卷, 第4期, 2007年 2月 20日 (2007 - 02 - 20), ISSN: 0953-8178, 摘要</td> <td>1-60</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 104046593 A (浙江大学) 2014年 9月 17日 (2014 - 09 - 17) 全文</td> <td>1-64</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 106480027 A (重庆高圣生物医药有限责任公司) 2017年 3月 8日 (2017 - 03 - 08) 全文</td> <td>1-64</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 107206024 A (宾夕法尼亚大学董事会) 2017年 9月 26日 (2017 - 09 - 26) 说明书[0010]-[0012]段、[0043]-[0045]、[0181]-[0183]、[0203]-[0204]、 [0268]-[0272]、[0407]-[0412]段	61-64	Y	CN 107206024 A (宾夕法尼亚大学董事会) 2017年 9月 26日 (2017 - 09 - 26) 说明书[0010]-[0012]段、[0043]-[0045]、[0181]-[0183]、[0203]-[0204]、 [0268]-[0272]、[0407]-[0412]段	1-60	Y	DRANITZKI-ELHALEL, M. 等. "CD40 FasL inhibits human T cells: evidence for an auto-inhibitory loop-back mechanism" International Immunology, 第19卷, 第4期, 2007年 2月 20日 (2007 - 02 - 20), ISSN: 0953-8178, 摘要	1-60	A	CN 104046593 A (浙江大学) 2014年 9月 17日 (2014 - 09 - 17) 全文	1-64	A	CN 106480027 A (重庆高圣生物医药有限责任公司) 2017年 3月 8日 (2017 - 03 - 08) 全文	1-64
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																		
X	CN 107206024 A (宾夕法尼亚大学董事会) 2017年 9月 26日 (2017 - 09 - 26) 说明书[0010]-[0012]段、[0043]-[0045]、[0181]-[0183]、[0203]-[0204]、 [0268]-[0272]、[0407]-[0412]段	61-64																		
Y	CN 107206024 A (宾夕法尼亚大学董事会) 2017年 9月 26日 (2017 - 09 - 26) 说明书[0010]-[0012]段、[0043]-[0045]、[0181]-[0183]、[0203]-[0204]、 [0268]-[0272]、[0407]-[0412]段	1-60																		
Y	DRANITZKI-ELHALEL, M. 等. "CD40 FasL inhibits human T cells: evidence for an auto-inhibitory loop-back mechanism" International Immunology, 第19卷, 第4期, 2007年 2月 20日 (2007 - 02 - 20), ISSN: 0953-8178, 摘要	1-60																		
A	CN 104046593 A (浙江大学) 2014年 9月 17日 (2014 - 09 - 17) 全文	1-64																		
A	CN 106480027 A (重庆高圣生物医药有限责任公司) 2017年 3月 8日 (2017 - 03 - 08) 全文	1-64																		
<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>"&amp;" 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																			
2021年 9月 24日	2021年 10月 12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	苗君叶																			
传真号 (86-10)62019451	电话号码 86-(10)-53962365																			

## 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
A	CN 103215223 A (中国人民解放军第四军医大学) 2013年 7月 24日 (2013 - 07 - 24) 全文	1-64
A	CN 104822384 A (南加州大学) 2015年 8月 5日 (2015 - 08 - 05) 全文	1-64
A	CN 109722437 A (广州百暨基因科技有限公司) 2019年 5月 7日 (2019 - 05 - 07) 全文	1-64
A	CN 110904045 A (中国科学院动物研究所) 2020年 3月 24日 (2020 - 03 - 24) 全文	1-64
A	US 2019345446 A1 (THE BROAD INSTITUTE, INC. 等) 2019年 11月 14日 (2019 - 11 - 14) 全文	1-64
A	WO 9920308 A1 (BIOCRYSTAL LTD.) 1999年 4月 29日 (1999 - 04 - 29) 全文	1-64

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

## 第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1.  权利要求： 65, 66  
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：  
[1] PCT细则39.1(4)规定的通过外科手术或治疗对人体或动物体进行处置的方法。具体而言，权利要求65请求保护异体细胞移植的方法，其包括施用有效量的权利要求53-54中任一项所述的免疫细胞、权利要求55-58中任一项所述的细胞群，和/或权利要求59所述的药物组合物。权利要求66请求保护治疗肿瘤的方法，其包括施用有效量的权利要求53-54中任一项所述的免疫细胞、权利要求55-58中任一项所述的细胞群，和/或权利要求59所述的药物组合物。上述方法包括了将异体细胞移植进入人体或动物体或通过施用细胞和/或药物对人体或动物体的肿瘤进行治疗的步骤，因此，权利要求65、66请求保护的技术方案涉及PCT细则39.1(4)规定的通过外科手术或治疗对人体或动物体进行处置的方法。
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/CN2021/106007

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	107206024	A	2017年 9月 26日	AU	2015339744	A1	2017年 4月 27日
				CA	2964953	A1	2016年 5月 6日
				US	2020407728	A1	2020年 12月 31日
				AU	2015339743	C1	2021年 4月 22日
				JP	2017535261	A	2017年 11月 30日
				MX	2017005698	A	2017年 6月 29日
				US	2017335331	A1	2017年 11月 23日
				KR	20170074245	A	2017年 6月 29日
				JP	6879910	B2	2021年 6月 2日
				CA	2964948	A1	2016年 5月 6日
				EP	3215168	A1	2017年 9月 13日
				JP	2021058196	A	2021年 4月 15日
				US	2017290858	A1	2017年 10月 12日
				EP	3215166	A1	2017年 9月 13日
				AU	2015339743	B2	2020年 11月 5日
				BR	112017008693	A2	2018年 2月 27日
				WO	2016069283	A1	2016年 5月 6日
				US	2018312848	A1	2018年 11月 1日
				HK	1243332	A1	2018年 7月 13日
				JP	2018500006	A	2018年 1月 11日
				AU	2015339744	B2	2021年 3月 25日
				KR	20170075013	A	2017年 6月 30日
				WO	2016069282	A1	2016年 5月 6日
				EA	201790953	A1	2017年 10月 31日
				AU	2021200118	A1	2021年 3月 25日
				CN	107249606	A	2017年 10月 13日
				AU	2015339743	A1	2017年 4月 27日
CN	104046593	A	2014年 9月 17日	WO	2014139443	A1	2014年 9月 18日
CN	106480027	A	2017年 3月 8日		无		
CN	103215223	A	2013年 7月 24日	CN	103215223	B	2014年 10月 29日
CN	104822384	A	2015年 8月 5日	WO	2013149211	A2	2013年 10月 3日
				EP	2833896	A2	2015年 2月 11日
				US	2015104428	A1	2015年 4月 16日
CN	109722437	A	2019年 5月 7日	CN	109722437	B	2020年 1月 7日
CN	110904045	A	2020年 3月 24日	WO	2020057486	A1	2020年 3月 26日
US	2019345446	A1	2019年 11月 14日		无		
WO	9920308	A1	1999年 4月 29日	AU	1273699	A	1999年 5月 10日
				US	6268350	B1	2001年 7月 31日