

(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
2018 年 7 月 5 日 (05.07.2018)



(10) 国际公布号
WO 2018/121679 A1

(51) 国际专利分类号:
A61K 35/17 (2015.01) *C12N 15/86* (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01) *C07K 19/00* (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2017/119451

(22) 国际申请日: 2017 年 12 月 28 日 (28.12.2017)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201611253681.8 2016 年 12 月 30 日 (30.12.2016) CN

(71) 申请人: 四川大学 (SICHUAN UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国四川省成都市武侯区一环路南一段 24 号, Sichuan 610065 (CN)。

(72) 发明人: 王永生 (WANG, Yongsheng); 中国四川省成都市武侯区一环路南一段 24 号, Sichuan 610065 (CN)。 魏于全 (WEI, Yuquan); 中国四川省成都市武侯区一环路南一段 24 号, Sichuan 610065 (CN)。 郭福春 (GUO, Fuchun); 中国四川省成都市武侯区一环路南一段 24 号, Sichuan 610065 (CN)。 王玮 (WANG, Wei); 中国四川省成都市武侯区一环路南一段 24 号, Sichuan 610065 (CN)。

(74) 代理人: 成都虹桥专利事务所 (普通合伙) (CHENGDU HONGQIAO PATENT LAW OFFICE); 中国四川省成都市高新区天仁路 259 号 1 栋 3 层 301-305 号、306-1 号、318-320 号, Sichuan 610000 (CN)。

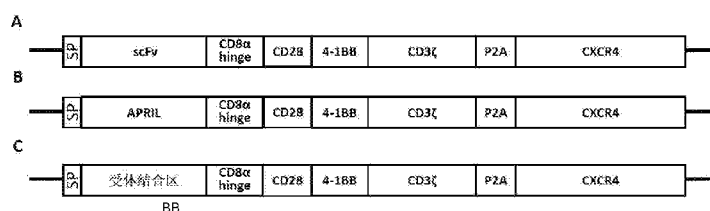
(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY,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

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

(54) Title: LYMPHOCYTE MODIFIED WITH CHIMERIC ANTIGEN RECEPTOR EXPRESSING CXCR4, PREPARATION METHOD, AND USE

(54) 发明名称: 表达 CXCR4 的嵌合抗原受体修饰的淋巴细胞及制备方法和用途

CAR/CXCR4 结构示意图 AA



AA SCHEMATIC DIAGRAM OF CAR/CXCR4 STRUCTURE
BB RECEPTOR BINDING REGION

图 1

(57) Abstract: The present invention belongs to the field of cell therapy. Particularly, the present invention provides a lymphocyte modified with a chimeric antigen receptor expressing a chemokine receptor, CXCR4. The present invention also provides a method for preparing a specific lymphocyte, comprising modifying a non-specific lymphocyte by means of genetic engineering to the specific lymphocyte capable of recognizing a tumor-associated surface antigen and expressing a chemokine receptor, CXCR4, thereby being enriched in a specific site, and targeting and killing a specific cell. The present invention also provides a use of the same in malignant tumor treatment.

(57) 摘要: 细胞治疗领域, 特别是一种表达趋化因子受体 CXCR4 的嵌合抗原受体修饰的淋巴细胞, 通过基因工程手段, 将非特异性的淋巴细胞改造为能够识别肿瘤表面相关抗原并表达趋化因子受体 CXCR4, 从而在特定部位富集并对特定细胞进行靶向杀伤的特异性淋巴细胞的制备方法及其在恶性肿瘤治疗中的用途。

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)。

根据细则4.17的声明：

- 关于申请人有权申请并被授予专利(细则
4.17(ii))

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))。

表达 CXCR4 的嵌合抗原受体修饰的淋巴细胞及制备方法和用途

技术领域

5 本发明涉及细胞领域，具体涉及通过基因工程手段，将非特异性的淋巴细胞定向改造为能够识别肿瘤表面相关抗原并表达趋化因子受体 CXCR4，从而在特定部位富集并对细胞进行杀伤的特异性淋巴细胞的制备方法及其在恶性肿瘤治疗中的用途。

背景技术

免疫治疗被认为是最具前景的肿瘤治疗方法。其中，免疫检查点抑制剂（如 CTLA-4、
10 PD-1 等）在多种肿瘤临床试验中显示出了明显优于现有疗法的效果，被批准用于非小细胞肺癌、膀胱癌等恶性肿瘤的治疗。不同于 CTLA-4 和 PD-1 抗体等通过重新激活机体免疫反应发挥抗肿瘤作用，嵌合抗原受体修饰的免疫细胞疗法不依赖于机体免疫状态，通过基因工程技术，将嵌合抗原受体表达于免疫细胞表面，识别肿瘤抗原，激活免疫效应细胞从而产生直接抗肿瘤作用。目前，以 CD19 为靶点的嵌合抗原受体修饰的淋巴细胞
15 在治疗急性淋巴细胞白血病、非霍奇金淋巴瘤临床试验中显示出良好的效果，有效率最高达 90%，显示出这种疗法巨大的治疗潜力。目前，超出 300 项与嵌合抗原受体修饰的淋巴细胞治疗相关的临床试验正在进行。

尽管嵌合抗原受体修饰的淋巴细胞在肿瘤免疫治疗中有着诱人的前景，但仍然存在几个问题：1.肿瘤特异性抗原缺乏。目前发现的肿瘤特异性表面抗原很少，且多数肿瘤
20 缺乏特异性抗原，大部分为肿瘤高表达但正常组织也表达的肿瘤相关抗原，从而限制了其作为嵌合抗原受体修饰的淋巴细胞治疗靶点。如在靶向 HER2 的嵌合抗原受体修饰的淋巴细胞临床研究中，由于人体正常肺组织同样表达 HER2，引起了非特异性细胞毒性杀伤反应，导致患者死亡。2.嵌合抗原受体修饰的淋巴细胞在肿瘤部位的富集。目前关于嵌合抗原受体修饰的淋巴细胞治疗进展均发生在血液系统肿瘤中，实体瘤尚无报道，
25 其中一个重要原因是体外扩增后的嵌合抗原受体修饰的淋巴细胞不能大量、有效进入实体瘤内，导致抗肿瘤作用不明显。3.肿瘤微环境对嵌合抗原受体修饰的淋巴细胞的抑制作用。相对于血液系统肿瘤，实体瘤内存在复杂的肿瘤免疫微环境，使嵌合抗原受体修饰的淋巴细胞无法发挥功能，而且最新的文献提示，坏死的肿瘤细胞还可以通过释放 K^+ 使淋巴细胞衰竭。因此，仍需要加强本领域的研究，以期进一步提高嵌合抗原受体修饰

的淋巴细胞的疗效。

淋巴细胞向肿瘤聚集迁移是一个依赖趋化因子的复杂过程，涉及循环淋巴细胞与内皮细胞间的相互作用。研究显示，CXCL12/SDF-1 α 是重要的 T 细胞和髓源单核细胞的趋化调节因子，通过与其受体 CXCR4 结合，驱使细胞沿着浓度梯度达到相关部位。放射治疗后，照射部位 CXCL12/SDF-1 α 表达升高，募集髓源单核细胞向照射部位迁移。在一些高表达 CXCL12 的胶质细胞肿瘤中也发现了这个现象。研究证实，HIV 感染可导致 T 细胞 CXCR4 表达下调，而且随时间延长，下降更明显。我们发现，T 细胞经慢病毒介导的基因修饰后，趋化因子受体 CXCR4 表达明显下降，趋化活性受限。

基于以上现象，我们设想通过在嵌合抗原受体修饰的淋巴细胞表达 CXCR4，可以使其在 CXCL12/SDF-1 α 高表达的脑胶质瘤或多发性骨髓瘤中聚集，增强抗肿瘤作用，也可以通过放疗等手段使肿瘤部位 CXCL12/SDF-1 α 表达升高，诱导嵌合抗原受体修饰的淋巴细胞产生归巢效应，从而产生更好的抗肿瘤作用。

发明内容

本发明要解决的技术问题是为恶性肿瘤的治疗提供一种新的有效手段。

本发明解决技术问题的技术方案是提供了一种嵌合抗原受体，包括胞外抗原结合区，跨膜区和胞内信号区。

其中，上述嵌合抗原受体中，所述的胞外抗原结合区是与肿瘤抗原结合的单克隆抗体单链可变区，受体或配体。

进一步的，所述的肿瘤抗原包括但不限于：(EGFR)、上皮细胞粘附分子 (EpCAM)、间皮素 (mesothelin)、白介素 13 受体 $\alpha 2$ (IL-13R $\alpha 2$)、表皮生长因子受体 2 (ERBB2)、表皮生长因子受体 3 (ERBB3)、表皮生长因子受体 4 (ERBB4)、血管内皮生长因子受体 1 (VEGFR1)、血管内皮生长因子受体 2 (VEGFR2)、神经节苷脂抗原 G_{D2}(GD2)、叶酸受体 1(FOLR1)、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、黑色素前体蛋白(gp100)、粘蛋白 1(MUC1)、粘蛋白 16(MUC16)、碳酸酐酶 9(CA9)、L1 细胞黏附分子(CD171)、肿瘤抗原 125(CA125)、肿瘤抗原 15-3 (CA15-3)、肿瘤抗原 19-9 (CA19-9)、NY-ESO-1、MART-1、MAGE4、B 细胞成熟抗原 (BCMA)、白细胞分化抗原 19 (CD19)、白细胞分化抗原 20 (CD20)、白细胞分化抗原 22 (CD22)、白细胞分化抗原 30 (CD30)、白细胞分化抗原 33 (CD33)、癌胚抗原 (CEA)、白细胞分化抗原 38 (CD38)、白细胞分化抗原 133 (CD133)、白细胞分化抗原 138 (CD138)、白细胞分化抗原 123 (CD123)、EPH 受体 A2 (EPHA2)、EPH 受体 A3 (EPHA3)。

其中，上述嵌合抗原受体中，所述的跨膜区为白细胞分化抗原 8（CD8）跨膜区或白细胞分化抗原 28（CD28）跨膜区。

其中，上述嵌合抗原受体中，所述的胞内信号区为白细胞分化抗原 28（CD28）、肿瘤坏死因子受体超家族成员 4（TNFRSF9/CD134/OX40）、肿瘤坏死因子受体超家族成员 9（TNFRSF9/CD137/4-1BB）、淋巴细胞特异性蛋白酪氨酸激酶（LCK）、诱导性 T 细胞共刺激分子（ICOS）、CD40、CD27 或 DAP10（DNAX 激活蛋白 10）中一种或多种的胞内结构域。

其中，上述嵌合抗原受体中，所述的单克隆抗体单链可变区为 scFv 单链抗体可变区。

10 其中，上述嵌合抗原受体中，所述的 scFv 单链抗体可变区的氨基酸序列为 SEQ ID No.1 所示。

SEQ ID No.1 scFv 单链抗体可变区的氨基酸序列

MVLLVTSLLLCELPHPAFLIPDIVLTQSPASLAMS LGERATISCRASESVSVIGAHLIHWYQQKPGQP
PKLLIYLASNLETGVPARFSGSGSGTDFTLTISR VQAEDAIIYSLQSRIFPRTFGQGTKLEIKGSTSGSGKPGS
15 GEGSTKGQIQLVQSGSELKKPGESVKISCKASGYTFTDYSINWVKQAPGQGLKWMGWINTETREPAYAYD
FRGRFVFSLDTSASTAYLQISSLKAEDTAVYFCALDYSYAMDYWGQGT LTVTVSS。

其中，上述嵌合抗原受体中，所述的 scFv 单链抗体可变区的编码核苷酸序列为 SEQ ID No.2 所示。

SEQ ID No.2 scFv 单链抗体可变区的编码核苷酸序列

20 ATGGTGCTGCTGGTGACCTCCCTGCTGCTGTGCGAACTGCCCCACCCTGCCTTCCTGCTGATTCCC
GACATCGTGCTGACCCAGAGCCCTGCCAGCCTGGCCATGTCCCTGGGCGAAAGGGCCACCATCTCCTG
CAGGGCCAGCGAGAGCGTGAGCGTTATTGGAGCCCACTTAATTCAGTGGTATCAACAGAAGCCCGGCC
AGCCCCCAAGCTGTTAATTTATCTGGCCTCCAACCTGGAGACAGGCGTGCCTGCCAGATTTAGCGGCA
GCGGCAGCGGCACCGATTTTACCCTGACCATCTCCAGGGTGCAGGCCGAAGACGCCGCCATCTACAGC
25 TGCCTGCAGAGCCGTATTTTCCCTAGGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAATTAAGGGCTCCAC
AAGCGGCAGCGGAAAGCCCGTTCTGGCGAGGGAAGCACAAAGGGACAAATTCAGCTCGTGCACTC
CGGCTCCGAGCTGAAGAAGCCCGGCGAGTCCGTGAAAATTAGCTGCAAGGCCTCCGGCTACACCTTC
ACCGACTACAGCATTAAATTGGGTGAAGCAGGCTCCTGGCCAGGGCCTGAAGTGGATGGGCTGGATTA
ACACCGAAACCAGGGAGCCCGCCTACGCCTACGACTTTAGGGGCAGGTTTCGTGTTACGCCTGGACAC
30 CTCCGCCAGCACCGCCTACCTCAAATTAGCTCCCTGAAGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTTCTGCGC

CCTGGACTACAGCTACGCCATGGACTACTGGGGACAGGGCACA CTGGTCACCGTGAGCTCC。

更具体的，上述嵌合抗原受体为通过氮端到碳端顺次联接信号肽、scFv 单链抗体、CD8 α 跨膜区、CD28 胞内段、4-1BB 胞内段、CD3 ζ 链得到的。

所述的信号肽的氨基酸序列为 SEQ ID No.3 所示。

5 MVLLVTSLLLCELPHPAFLIP。SEQ ID No.3

所述信号肽的编码核苷酸序列为 SEQ ID No.4 所示。

ATGGTGCTGCTGGTGACCTCCCTGCTGCTGTGCGAACTGCCCCACCCTGCCTTCCTGCTGATTCCC

。SEQ ID No.4

其中，所述的 CD8 跨膜区氨基酸序列为 SEQ ID No.5 所示。

10 AA AFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGT
CGVLLLSLVITLYCNHRN。SEQ ID No.5

所述的 CD8 跨膜区的编码核苷酸序列为 SEQ ID No.6 所示。

GCGGCCGCATTCGTGCCGGTCTTCCTGCCAGCGAAGCCCACCACGACGCCAGCGCCGCGACCA

CCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGG

15 CGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGC

CGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCTTTACTGCAACCACAGGAAC。SEQ ID

No.6

所述 CD28 胞内域的氨基酸序列为 SEQ ID No.7 所示。

RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS；SEQ ID No.7。

20 所述 CD28 胞内域的编码核苷酸序列为 SEQ ID No.8 所示。

AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGA CTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGG

CCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCC。SEQ ID

No.8。

所述 4-1BB 胞内域的氨基酸序列为 SEQ ID No.9 所示。

25 KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL；SEQ ID No.9。

所述 4-1BB 胞内域的编码核苷酸序列为 SEQ ID No.10 所示。

AGGTTTCAGCGTCGTGAAGAGAGGAAGGAAGAAGCTCCTGTATATCTTCAAGCAGCCTTTCATGA
GGCCCGTGCAGACCACCCAGGAAGAGGACGGCTGCTCCTGTAGGTTTCCCGAAGAGGAGGAGGGAG
GATGCGAGCTG。SEQ ID No.10。

5 所述 CD3 ζ 域的氨基酸序列为 SEQ ID No.11 所示。

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPQRRKNPQEGLYNELQ
KDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR。SEQ ID No.11。

所述 CD3 ζ 域的编码核苷酸序列为 SEQ ID No.12 所示。

SEQ ID No.12 CD3 ζ 域的编码核苷酸序列

10 AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTAT
AACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTG
AGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATA
AGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGAT
GGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCC
15 CCCTCGC。

进一步的，上述嵌合抗原受体中，所述的嵌合抗原受体为(1)具有 SEQ ID No.13 所示的氨基酸序列的蛋白；

或：(2)在 SEQ ID No.13 所示的蛋白的氨基酸序列中经过取代和/或缺失和/或添加至少一个氨基酸所得的与 SEQ ID No.13 所示的蛋白的功能相同或相似的蛋白。

20 SEQ ID No.13 嵌合抗原受体的氨基酸序列

MVLLVTSLLLCELPHPAFLIPDIVLTQSPASLMSLGERATISCRASESVSVIGAHLIHWYQQKPGQP
PKLLIYLASNLETGVPARFSGSGSGTDFLTISRVAEDAAIYSCLSRIFPRTFGQGKLEIKGSTSGSGKPGS
GEGSTKGQIQLVQSGSELKKPGESVKISKASGYTFTDYSINWVKQAPGQGLKWMGWINTETREPAYAYD
FRGRFVFSLDTSASTAYLQISSLKAEDTAVYFCALDYSYAMDYWGQGLTVTVSSAAAFVPVFLPAKPTTTPAP
25 RPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRSKRSR
LLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSC

RFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG
LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGHDLGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR。

进一步的，上述嵌合抗原受体中，所述嵌合抗原受体的编码基因的核苷酸序列为
(1)：如 SEQ ID No.14 所示的核苷酸序列或其简并序列；

5 或 (2)：在 (1)限定的核苷酸序列中经过取代、缺失或添加至少一个核苷酸衍生所得
的核苷酸序列，且与 SEQ ID NO.14 的核苷酸序列编码功能相同或相似的蛋白。

SEQ ID NO:14 编码嵌合抗原受体的基因的核苷酸序列

ATGGTGCTGCTGGTGACCTCCCTGCTGCTGTGCGAACTGCCCCACCCTGCCTTCCTGCTGATTCCC
GACATCGTGCTGACCCAGAGCCCTGCCAGCCTGGCCATGTCCCTGGGCGAAAGGGGCCACCATCTCCTG
10 CAGGGCCAGCGAGAGCGTGAGCGTTATTGGAGCCCACTTAATTCAGTGGTATCAACAGAAGCCCGGCC
AGCCCCCAAGCTGTTAATTTATCTGGCCTCCAACCTGGAGACAGGCGTGCCTGCCAGATTTAGCGGCA
GCGGCAGCGGCACCGATTTTACCCTGACCATCTCCAGGGTGCAGGCCGAAGACGCCGCCATCTACAGC
TGCCTGCAGAGCCGTATTTTCCCTAGGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAATTAAGGGCTCCAC
AAGCGGCAGCGGAAAGCCCGTTCTGGCGAGGGAAGCACAAAGGGACAAATTCAGCTCGTGAGTC
15 CGGCTCCGAGCTGAAGAAGCCCGGCGAGTCCGTGAAAATTAGCTGCAAGGCCTCCGGCTACACCTTC
ACCGACTACAGCATTAAATTGGGTGAAGCAGGCTCCTGGCCAGGGCCTGAAGTGGATGGGCTGGATTA
ACACCGAAACCAGGGAGCCCGCCTACGCCTACGACTTTAGGGGCAGGTTTCGTGTTACGCCTGGACAC
CTCCGCCAGCACCGCCTACCTCCAAATTAGCTCCCTGAAGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTTCTGCGC
CCTGGACTACAGCTACGCCATGGACTACTGGGGACAGGGCACACTGGTCACCGTGAGCTCCGCGGCC
20 GCATTTCGTGCCGGTCTTCCTGCCAGCGAAGCCCACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGG
CGCCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCG
CAGTGACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGT
GGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCTTTACTGCAACCACAGGAACAGGAGTAAGAGGAGCAG
GCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGGCCACCCGCAAGCATTACCAGC
25 CCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCGAGCCTATCGCTCCCGTTTCTCTGTTGTTAAACGGGGCAGAAAGA
AGCTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAG
CTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGA
CGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAG
TACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAAC
30 CCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGA

TGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCA
AGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAA。

特别的，上述嵌合抗原受体中，所述的配体为 APRIL 配体。

进一步的，上述嵌合抗原受体中，所述 APRIL 氨基酸序列为 SEQ ID NO.15 所示。

5 SVLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFTMGQ
VVSREGQGRQETLFR CIRSMPSHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARA KLNLSPHGTFLGFVKLSG
GGSDP。SEQ ID NO.15。

所述 APRIL 的编码核苷酸序列为 SEQ ID NO.16 所示。

AGCGTGCTGCACCTGGTGCCCATCAACGCCACCAGCAAGGACGATAGCGACGTGACCGAGGTG
10 ATGTGGCAGCCCGCCCTGAGGAGAGGAAGAGGCCTGCAGGCCAGGGCTACGGAGTGAGAATCCAG
GACGCCGGCGTGCTGCTGTACAGCCAGGTGCTGTTCCAGGACGTGACCTTCACTATGGGTCAGGT
GGTGAGCAGAGAGGGCCAGGGCAGACAGGAGACCCTGTTCAGGTGCATCAGAAGCATGCCCTCCCA
CCCCGACAGGGCCTACAACAGCTGCTACTCCGCCGGCGTGTTTCACCTGCACCAGGGCGACATCCTGA
GCGTTATTATCCCCAGAGCCAGGGCCAAGCTGAACCTGTCTCCTCATGGTACCTTCCTGGGCTTTGTGA
15 AGCTGAGCGGCGGCGGCTCCGACCC。SEQ ID NO.16。

进一步的，上述嵌合抗原受体为通过氮端到碳端顺次联接信号肽、APRIL、CD8 α 跨膜区、CD28 胞内段、4-1BB 胞内段、CD3 ζ 链得到的。

特别的，上述嵌合抗原受体中，所述的嵌合抗原受体为(1)具有 SEQ ID No.17 所示的氨基酸序列的蛋白；

20 或：(2)在 SEQ ID No.17 所示的蛋白的氨基酸序列中经过取代和/或缺失和/或添加至少一个氨基酸所得的与 SEQ ID No.17 所示的蛋白的功能相同或相似的蛋白。

SEQ ID No.17 嵌合抗原受体的氨基酸序列

METDTLLLWVLLLWVPGSTGSVLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQD
AGVYLLYSQVLFQDVTFTMGQVVSREGQGRQETLFR CIRSMPSHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIP
25 RARA KLNLSPHGTFLGFVKLSGGSDPAAAFVPVFLPAKPTTT PAPRPPTPAPT IASQPLSLRPEACRPAAG

GAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPY
APPRDFAAYRSRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQ
QGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR
GKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR。

5 进一步的，上述嵌合抗原受体中，所述嵌合抗原受体的编码基因的核苷酸序列为
(1)：如 SEQ ID No.18 所示的核苷酸序列或其简并序列；

或 (2)：在 (1)限定的核苷酸序列中经过取代、缺失或添加至少一个核苷酸衍生所得
的核苷酸序列，且与 SEQ ID NO.18 的核苷酸序列编码功能相同或相似的蛋白。

SEQ ID NO:18 编码嵌合抗原受体的基因的核苷酸序列

10 ATGGAGACCGACACCCTGCTGCTCTGGGTGCTGCTGCTGTGGGTGCCTGGAAGCACCGGAAGC
GTGCTGCACCTGGTGCCCATCAACGCCACCAGCAAGGACGATAGCGACGTGACCGAGGTGATGTGGC
AGCCCGCCCTGAGGAGAGGAAGAGGCCTGCAGGCCAGGGCTACGGAGTGAGAATCCAGGACGCC
GGCGTGACCTGCTGTACAGCCAGGTGCTGTTCCAGGACGTGACCTTCACTATGGGTGAGGTGGTGAG
CAGAGAGGGCCAGGGCAGACAGGAGACCCTGTTGAGGTGCATCAGAAGCATGCCCTCCACCCCGAC
15 AGGGCCTACAACAGCTGCTACTCCGCCGGCGTGTTTCACCTGCACCAGGGCGACATCCTGAGCGTTAT
TATCCCCAGAGCCAGGGCCAAGCTGAACCTGTCTCCTCATGGTACCTTCCTGGGCTTTGTGAAGCTGAG
CGGCGGCGGCTCCGACCCCGCGGCCGCATTCTGTGCCGGTCTTCCTGCCAGCGAAGCCACACGACG
CCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGG
CGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACAT
20 CTGGGCGCCCTTGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCTTTACTGCAACCA
CAGGAACAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGAATGACATGACTCCCCGCCGCCCC
GGGCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCCGTTTC
TCTGTTGTTAAACGGGGCAGAAAGAAGCTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAA
ACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAAGTGA
25 GAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGA
GCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATG
GGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATG
GCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCT
TTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTC
30 GCTAA。SEQ ID NO.18。

本发明还提供了一种上述嵌合抗原受体修饰的淋巴细胞，共表达趋化因子 CXCR4。进一步的，所述的 CXCR4 受体为(1)具有 SEQ ID No.19 所示的氨基酸序列的蛋白；或：(2)在 SEQ ID No.19 所示的蛋白的氨基酸序列中经过取代和/或缺失和/或添加至少一个氨基酸所得的与 SEQ ID No.19 所示的蛋白的功能相同或相似的蛋白。

5 SEQ ID No.19 CXCR4 的氨基酸序列

EGISYTS DNYTEEMGSGDYDSMKEPCFREENANFNKIFLPTIYSIIFLTGIVGNGLVILVMGYQKKLRS
MTDKYRLHLSVADLLFVITLPFWAVDAVANWYFGNFLCKAVHVIYTVNLYSSVLILAFISLDRYLAIVHATNS
QRPRKLLAEKVYVGVWIPALLLTIPDFIFANVSEADDRYICDRFYPNDLWVVFQFQHIMVGLILPGIVILS
CYCIIISKLSHSGHGHQKRKALKTTVILILAFFACWLPYYIGISIDSFILLEIKQGCEFENTVHKWISITEALAFFHC
10 CLNPILYAFLGAKFKTSAQHALTSVSRGSSLKILSKGKRGGHSSVSTESESSSFHSS。

进一步的，上述嵌合抗原受体修饰的淋巴细胞中，所述 CXCR4 的编码基因核苷酸序列为 (1)：如 SEQ ID No：20 所示的核苷酸序列或其简并序列；

或 (2)：在 (1)限定的核苷酸序列中经过取代、缺失或添加至少一个核苷酸衍生所得的核苷酸序列，且与 SEQ ID NO：20 的核苷酸序列编码功能相同或相似的蛋白。

15 SEQ ID No : 20 编码 CXCR4 基因的核苷酸序列
GGACCCGAGGGCATTTCATCTACACCTCCGACAACCTATACCGAGGAGATGGGCAGCGGCGACTACGA
TTCCATGAAGGAGCCCTGTTTCAGGGAGGAGAACGCCAACTTCAACAAAATTTTCTCCCCACCATCTA
CAGCATCATCTTCCTGACAGGCATCGTGGGAAACGGCCTGGTGATCCTGGTGATGGGCTACCAGAAGA
AGCTGAGGAGCATGACCGACAAGTACAGGCTCCACCTGAGCGTGGCCGACCTGCTGTTTGTCAATTACA
20 CTGCCCTTCTGGGCCGTGGACGCCGTGGCCAACTGGTATTTTCGGCAACTTTCTCTGCAAGGCCGTCCAT
GTGATCTACACCGTGAACCTCTACAGCAGCGTGCTGATTCTGGCCTTCATCAGCCTGGATAGGTACCTG
GCCATCGTCCACGCCACCAACTCCCAGAGGCCTAGAAAGCTGCTGGCCGAGAAGGTGGTGTATGTGG
GCGTCTGGATTCTGCCCTGCTCCTGACCATCCCTGACTTCATCTTCGCCAACGTGAGCGAAGCCGATG
ACAGGTACATCTGCGACAGGTTCTACCCTAACGATCTGTGGGTGGTGGTGTTCAGTTCCAGCACATCA
25 TGGTGGGCCTCATCCTGCCCGCATTGTCATCCTGTCCTGCTACTGCATCATCATCTCCAAGCTCAGCCA
CAGCAAGGGCCATCAAAAGAGGAAGGCCCTGAAGACCACAGTGATCCTGATCCTGGCCTTCTTTGCCT
GCTGGCTGCCTTACTACATCGGCATCAGCATCGACAGCTTCATCCTCCTGGAGATCATCAAGCAGGGCT
GCGAGTTTGAGAACACAGTCCACAAGTGGATCTCCATTACCGAAGCCCTCGCCTTCTTCCACTGCTGCC
TCAACCTATCCTGTACGCTTTCTCGGCGCCAAGTTCAAGACCTCCGCTCAGCATGCTCTCACCAGCGT
30 GTCCAGAGGCAGCAGCCTGAAGATCCTGAGCAAGGGCAAGAGAGGCGGCCACAGCAGCGTGAGCA

CAGAGTCCGAGAGCTCCAGCTTCCACTCCAGCTGA。

其中，所述的 CXCR4 通过 P2A 与嵌合抗原受体共表达，所述的 P2A 的氨基酸序列为 SEQ ID No.21 所示。

SEQ ID No.21 P2A 的氨基酸序列

5 GSGATNFSLLKQ AGDVEENPGP。

进一步的，所述的 P2A 的编码基因的核苷酸序列为 SEQ ID No.22 所示。

SEQ ID No.22 P2A 的编码核苷酸序列

GGAAGCGGAGCTACTAAGTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGG
ACC。

10 进一步的，所述的 P2A 可以有 T2A 替代，所述的 T2A 的氨基酸序列为 SEQ ID No.23 所示。

SEQ ID No.23 T2A 的氨基酸序列

RRKRSGSGEGRGSLTCDVEENPGP。

进一步的，所述 T2A 的编码基因的核苷酸序列为 SEQ ID No.24 所示。

15 SEQ ID No.24 T2A 的编码核苷酸序列

GGAAGCGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTGCTAACATGCGGTGACGTCGAGGAGAATCCTGGACC
T。

在本发明中，P2A 和 T2A 均可用于基因的共表达，其优势是剪切效率比较高。

其中，所述的嵌合抗原受体包括：胞外抗原结合区，跨膜区和胞内信号区，其中
20 胞外抗原结合区是结合肿瘤表面特异性抗原或相关抗原的配体，跨膜区为 CD8 跨膜区或
CD28 跨膜区，胞内信号区为 CD28、CD134/OX40、CD137/4-1BB、LCK、ICOS、CD40、CD27
或 DAP10 中的一种或几种的胞内结构域。

其中，所述的肿瘤表面特异性抗原或相关抗原包括但不限于：EGFR、EpCAM、
mesothelin、IL-13R α 2、ERBB2、ERBB3、ERBB4、VEGFR1、VEGFR2、GD2、FR、PSMA、
25 gp100、MUC1、MUC16、CA9、CD171、CD125、CD15-3、CD19-9、NY-ESO-1、MART-1、
MAGE4、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CEA、CD38、CD138、CD123、EphA2。

进一步的，上述嵌合抗原受体中，所述的嵌合抗原受体为(1)具有 SEQ ID No.13 所示的氨基酸序列的蛋白；

或：(2)在 SEQ ID No.13 所示的蛋白的氨基酸序列中经过取代和/或缺失和/或添加
30 至少一个氨基酸所得的与 SEQ ID No.13 所示的蛋白的功能相同或相似的蛋白。

其中，上述嵌合抗原受体中，所述嵌合抗原受体的编码基因的核苷酸序列为 (1)：
如 SEQ ID No.14 所示的核苷酸序列或其简并序列；

或 (2)：在 (1)限定的核苷酸序列中经过取代、缺失或添加至少一个核苷酸衍生所得的核苷酸序列，且与 SEQ ID NO.14 的核苷酸序列编码功能相同或相似的蛋白。

5 或者，上述嵌合抗原受体中，所述的嵌合抗原受体为(1)具有 SEQ ID No.17 所示的氨基酸序列的蛋白；

或：(2)在 SEQ ID No.17 所示的蛋白的氨基酸序列中经过取代和/或缺失和/或添加至少一个氨基酸所得的与 SEQ ID No.17 所示的蛋白的功能相同或相似的蛋白。

其中，上述嵌合抗原受体中，所述嵌合抗原受体的编码基因的核苷酸序列为 (1)：
10 如 SEQ ID No.18 所示的核苷酸序列或其简并序列；

或 (2)：在 (1)限定的核苷酸序列中经过取代、缺失或添加至少一个核苷酸衍生所得的核苷酸序列，且与 SEQ ID NO.18 的核苷酸序列编码功能相同或相似的蛋白。

其中，上述的嵌合抗原受体和 CXCR4，由一个载体共同表达。

本发明还提供了一种表达载体。

15 所述的表达载体为同时表达 SEQ ID NO： 13 所述的嵌合抗原受体和 SEQ ID NO： 19 所述的 CXCR4 的表达载体。或

所述的表达载体为同时表达 SEQ ID NO： 17 所述的嵌合抗原受体和 SEQ ID NO： 19 所述的 CXCR4 的表达载体。

进一步的，所述的表达载体为病毒载体。更进一步的，所述的表达载体为慢病毒
20 载体。

本发明还提供了一种病毒。该病毒包含上述的表达载体。

本发明还提供了含有上述的表达载体或病毒的宿主细胞。

进一步的，上述宿主细胞为淋巴细胞。更进一步的，所述淋巴细胞为 T 细胞或单核细胞，所述的 T 细胞为 $\alpha\beta$ T 细胞、NKT 细胞或 $\gamma\delta$ T 细胞。

25 本发明还提供了一种上述嵌合抗原受体，嵌合抗原受体修饰的淋巴细胞在单独或与放疗联合用于治疗恶性肿瘤的用途。主要用于制备治疗恶性肿瘤的药物或与放疗联合抑制肿瘤。所述的恶性肿瘤为肺癌、肝癌、淋巴瘤、结肠癌、直肠癌、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、胃癌、胆管癌、食管癌、肾癌、神经胶质瘤、黑色素瘤、胰腺癌、多发性骨髓瘤或前列腺癌。

30 更具体的，本发明包括三个方面，分述如下：

本发明的第一个方面涉及一种共表达 CXCR4 的嵌合抗原受体。其中嵌合抗原受体由能够结合肿瘤特异性或相关抗原的配体、跨膜区和胞内信号区组成，通过 P2A 序列或 T2A 序列与 CXCR4 表达基因相连。共同表达在同一个载体上。(例如如图 1 所示的结构)。

本发明的第二个方面涉及获得一种表达 CXCR4 的嵌合型抗原受体修饰的淋巴细胞。

- 5 利用本发明第一个方面提供的共表达 CXCR4 和嵌合型抗原受体的载体，转染人外周淋巴细胞，从而获得表达 CXCR4 的嵌合型抗原受体修饰的淋巴细胞。一般通过慢病毒包装体系，产生高滴度的慢病毒，转染人外周淋巴细胞，

本发明的第三个方面涉及本发明第一方面任一所述的共表达 CXCR4 的嵌合抗原受体或第二方面所述的淋巴细胞单独或与放疗联合用于治疗恶性肿瘤的用途。

- 10 在本发明中，类似于“在 SEQ ID NO: 14 中的核苷酸序列经过取代、缺失或添加至少一个核苷酸衍生序列”表述的基因序列一般是指编码具有 SEQ ID NO: 14 所编码的蛋白活性的多肽的核苷酸序列及其简并序列。该简并序列是指所述序列中有一个或多个密码子被编码相同氨基酸的简并密码子所取代后而产生的序列。由于密码子的简并性，所以与 SEQ ID NO: 14 同源性低至约 89%的简并序列也能编码出 SEQ ID NO: 14 所述的序列。
- 15 另外，“在 SEQ ID NO: 14 中的核苷酸序列经过取代、缺失或添加至少一个核苷酸衍生序列”的含义还包括能在中度严谨条件下，更佳的在高度严谨条件下与 SEQ ID NO: 14 核苷酸序列杂交的核苷酸序列。该术语还包括与 SEQ ID NO: 14 中的核苷酸序列的同源性至少 80%，较佳地至少 89%，更佳地至少 90%，最佳地至少 95%的核苷酸序列。

- 20 该术语“在 SEQ ID NO: 14 中的核苷酸序列经过取代、缺失或添加至少一个核苷酸衍生序列”还包括能编码具有与 SEQ ID NO: 14 所编码蛋白功能相同的蛋白的 SEQ ID NO: 14 中开放阅读框序列的变异形式。这些变异形式包括(但并不限于): 若干个(通常为 1~90 个，较佳地 1~60 个，更佳地 1~20 个，最佳地 1~10 个)核苷酸的缺失、插入和/或取代，以及在 5'和/或 3'端添加数个(通常为 60 个以内，较佳地为 30 个以内，更佳地为 10 个以内，最佳地为 5 个以内)核苷酸。

- 25 在本发明中，“在所述的氨基酸序列中经过取代和/或缺失和/或添加至少一个氨基酸衍生所得的氨基酸序列”的表述包括但并不限于若干个(通常为 1-50 个，较佳地 1-30 个，更佳地 1-20 个，最佳地 1-10 个)氨基酸的缺失、插入和/或取代，以及在 C 末端和/或 N 末端添加一个或数个(通常为 20 个以内，较佳地为 10 个以内，更佳地为 5 个以内)氨基酸。例如，在所述蛋白中，用性能相近或相似的氨基酸进行取代时，通常不会改变

蛋白质的功能。又比如，在 C 末端和/或 N 末端添加一个或数个氨基酸通常也不会改变蛋白质的功能。该术语还包括所述蛋白的活性片段和活性衍生物。

“在所述的氨基酸序列中经过取代、缺失或添加至少一个氨基酸衍生所得的氨基酸序列”的表述还包括但并不限于有至多 10 个（即一个或几个），较佳地至多 8 个，

- 5 更佳地至多 5 个氨基酸被性质相似或相近的氨基酸所替换而形成多肽，即保守性变异多肽。这些保守性变异多肽最好根据表 1 进行替换而产生。

表 1 氨基酸替换表

最初的残基	代表性的取代	优选的取代
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro; Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe	Leu
Leu (L)	Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala	Leu

本发明的有益效果为：

本发明通过构建共表达嵌合抗原受体和趋化因子受体 CXCR4 的病毒表达载体，生产慢病毒，转导淋巴细胞，得到一种共表达 CXCR4 的嵌合抗原受体 T 淋巴细胞，能够逆转病毒修饰导致的 T 细胞 CXCR4 表达下降，增强嵌合抗原受体 T 细胞的趋化活性，促进该淋巴细胞向 SDF-1 (CXCL12) 高浓度区域聚集，趋化性从 3% 提高至 9%，有利于增强嵌合抗原受体 T 淋巴细胞的抗肿瘤效应。当其与放射治疗联合使用时，还能诱导嵌合抗原受体 T 淋巴细胞产生归巢效应，从而产生更好的抗肿瘤作用。

附图说明

图 1 所示为共表达 CXCR4 的嵌合抗原受体示意图；A 表示胞外抗原结合区为 scFv 的嵌合抗原受体，B 表示胞外抗原结合区为 APRIL 的嵌合抗原受体，C 表示胞外抗原结合区为受体的嵌合抗原受体；其中，SP 为 GM-CSF 信号肽，scFv 表示抗原结合区，APRIL 表示配体结合区。CD8 α hinge 表示 CD8 α 跨膜区，CD28 和 4-1BB 表示共刺激信号域，CD3 ζ 表示 T 细胞激活域，P2A 为连接片段，CXCR4 为趋化因子受体；

图 2 所示为慢病毒感染后 T 细胞 CXCR4 表达；

图 3 所示为慢病毒感染后 T 细胞的趋化活性；

图 4 所示为共表达 CXCR4 后 CAR-T 细胞 CXCR4 表达；

图 5 所示为共表达 CXCR4 后 CAR-T 细胞趋化活性；A 表示 RPMI-8226 细胞培养上清诱导的 CAR-T 趋化活性，B 表示 SDF-1(即 CXCL12)诱导的 CAR-T 趋化活性；

图 6 所示为 CAR-T 和 CAR/CXCR4-T 细胞 CAR 表达；

图 7 所示为 CAR-T 和 CAR/CXCR4-T 细胞杀伤活性。

具体实施方式

以下通过具体实施方式结合附图对本发明进行详细说明。下述实施例中，凡未注明具体实验条件的，均为按照本领域技术人员熟知的常规条件，例如 Sambrook J, Russell D.W., 2001, Molecular Cloning: A laboratory manual(3rd ed), Spring Harbor Laboratory Press 中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。

实施例 1 获得 CAR、CAR/CXCR4 全长基因，完成重组质粒载体的构建

一、全长 scFv-CAR 和 scFv-CAR/CXCR4 基因的获得

采用全基因合成的方法得到 scFv-CAR，scFv-CAR-P2A-CXCR4 基因片段。

同时，设计如下引物扩增 scFv-CAR 片段：

5'引物：5' AGGTTTAACTACGGATGGTGCTGCTGGTGACCTCCC3' SEQ ID NO: 25

3'引物：5' ATGACTAGTCCCGGGTTAGCGAGGGGGCAGGGCCTGC3' SEQ ID NO: 26

反应条件如下：

PCR 反应：94℃变性 30 秒；60℃退火 30 秒；68℃延伸 1 分钟。反应 25 个循环。
然后 72℃再延伸 10 分钟。

设计如下引物扩增 scFv-CAR/CXCR4 片段：

5 5'引物：5' AGGTTTAAACTACGGATGGTGCTGCTGGTGACCTCCC3' SEQ ID NO: 27

3'引物：5' ATGACTAGTCCCGGGTCAGCTGGAGTGGAAGCTGGAG 3' SEQ ID NO: 28

反应条件如下：

PCR 反应：94℃变性 30 秒；60℃退火 30 秒；68℃延伸 2 分钟。反应 25 个循环。
然后 72℃再延伸 10 分钟。

10 二、全长 APRIL-CAR 和 APRIL-CAR/CXCR4 基因的获得

采用全基因合成的方法得到 APRIL-CAR，APRIL-CAR-P2A-CXCR4 基因片段。

同时，设计如下引物扩增 APRIL-CAR 片段：

5'引物：5' aggtttaaactacggATGGAGACCGACACCCTGCTGC3' SEQ ID NO: 29

3'引物：5' atgactagtcccggtTAGCGAGGGGGCAGGGCCTGC3' SEQ ID NO: 30

15 反应条件如下：

PCR 反应：94℃变性 30 秒；60℃退火 30 秒；68℃延伸 1 分钟。反应 25 个循环。
然后 72℃再延伸 10 分钟。

设计如下引物扩增 APRIL-CAR/CXCR4 片段：

5'引物：5' aggtttaaactacggATGGAGACCGACACCCTGCTGC3' SEQ ID NO: 31

20 3'引物：5' atgactagtcccggtTCAGCTGGAGTGGAAGCTGGAG 3' SEQ ID NO: 32

反应条件如下：

PCR 反应：94℃变性 30 秒；60℃退火 30 秒；68℃延伸 2 分钟。反应 25 个循环。
然后 72℃再延伸 10 分钟。

三、含全长 CAR 和 CAR/CXCR4 基因的慢病毒重组质粒的构建

25 如上所述，在全基因合成片段中的没有酶切位点，我们采用同源重组的方法将片段直接插入真核表达载体 pWPXLd（购自美国 addgene 公司）的多克隆位点 EcoR I/BamH I 中，重组后酶切位点将会消失。其构建过程如下：

1. 重组慢病毒质粒 pWPXLd-CAR 的构建

通过限制性内切酶 EcoR1 和 BamH1 将慢病毒载体 pWPXLd 线性化，利用天根
30 EasyGeno 快速重组克隆试剂盒（天根生化科技有限公司、VI201）将全长 CAR 基因扩增

片段插入 pWPXLd 的 EcoR I/BamH I 位点, 重组产物 pWPXLd-CAR 转化大肠杆菌 Stbl3, 随机挑选 30 个克隆进行测序鉴定。测序结果与设计的 CAR 全长序列一致。

2. 重组慢病毒质粒 pWPXLd-CAR/CXCR4 的构建

通过限制性内切酶 EcoR1 和 BamH1 将慢病毒载体 pWPXLd 线性化, 利用天根 EasyGeno 快速重组克隆试剂盒 (天根生化科技有限公司、VI201) 将全长 CAR/CXCR4 基因扩增片段插入 pWPXLd 的 EcoR I/BamH I 位点, 重组产物 pWPXLd-CAR/CXCR4 转化大肠杆菌 Stbl3, 随机挑选 30 个克隆进行测序鉴定。测序结果与设计的 CAR/CXCR4 全长序列一致。

构建的慢病毒重组载体结构示意图如图 1 所示, 图 1A、图 1B 和图 1C 分别表示嵌合抗原受体的胞外抗原结合区为 scFv、配体和受体结合区时的重组载体结构。

实施例 2 慢病毒包装及 CAR-T 细胞的生产

1、慢病毒包装

293T 细胞采用 DMEM+10%胎牛血清 (FBS) 培养, 待生长至 70-90%密度时用于病毒包装, 步骤如下: 转染前 2h 更换新鲜预热的 DMEM 培养基 (含 10%FBS), 在 15ml 离心管中配制转染体系: 实验条件如表 2 和 3 所示。

表 2 质粒体系

核心质粒 (5 皿×15cm)	CAR	21μg/皿	共 105μg
	CAR/CXCR4	21μg/皿	共 105μg
辅助质粒 (5 皿×15cm)	Pspax2	15μg/皿	共 75μg
	Pmd2.g	7μg/皿	共 35μg

表 3 转染体系:

转染体系 5ml (1ml/皿)	DMEM	4.1ml
	DNA	0.1ml
	PEI	0.8ml

混匀后, 将转染液均匀滴加至平皿中, 37℃, 5%CO₂ 培养箱中继续培养。12h 后更换为 DMEM+2%FBS 培养基。分别于 48h 和 72h 收集病毒上清, 0.45μm 滤膜过滤病毒液, 4℃, 160000g, 超速离心 90min, PBS 重悬, 分装保存于-80°。

2、T 细胞感染

采用 Ficoll-Hypaque (sigma) 分离人外周血单核细胞 (PBMC), 步骤如下: 将等体

积的外周血缓慢加入 Ficoll-Hypaque 中，1000g，18°离心 30 分钟，吸取中间层白膜，红细胞裂解液作用 2 分钟，300g 离心 5 分钟，1640 培养基洗两次，计数，加入 CD3/CD28 Dynabeads(life technologies 11131D) (cells: beads=1: 3) 共培养。24h 后，慢病毒感染激活的 PBMC，步骤如下：离心细胞，用含病毒上清的培养基（感染复数 MOI=1: 10）

5 重悬细胞， 1×10^6 /ml 细胞，加入凝聚胺（polybrene），终浓度为 8mg/ml，混匀，32°条件下 1000g 离心 90 分钟，然后 37°C 5%CO₂ 培养箱中继续培养。

实施例 3 T 细胞 CXCR4 表达检测

将实施例 1 构建的慢病毒感染或未感染的 T 细胞和外周血单核细胞，24h 后换液，用 X-VIVO 15 (04-418Q, LONZA 公司) 完全培养基+10%人 AB 血清 (H4522, sigma 公司)

10 继续培养 5 天，同时加入重组人白介素 2(IL-2)细胞因子 100U/ml(C013, novaprotein 公司)。然后收集细胞，PBS 洗两次，APC 标记的抗人 CXCR4 抗体（货号 306510, biolegend 公司）染色，流式细胞术检测细胞膜 CXCR4 表达，结果显示：感染了含 CAR 全长基因的慢病毒后，外周血单核细胞 CXCR4 表达明显下降，其荧光强度（对数值）由 238 下降至 174（图 4），T 细胞感染慢病毒后 CXCR4 表达下降更明显，其荧光强度（对数值）由 239

15 降至 108，降低超过一半（如图 2 所示）。

实施例 4 慢病毒感染的 T 细胞趋化活性检测

在实施例 3 中感染的外周血单核细胞和 T 细胞观察到 CXCR4 表达下降后，为评估其影响，进一步对其介导的趋化活性进行检测。具体操作步骤如下：

淋巴细胞趋化活性检测通过细胞迁移试验评估。采用 5μm 孔径的（货号 3421; Costar, Cambridge, MA）transwell 检测，transwell 中聚碳酸酯膜在含 20μg/ ml BSA 的 PBS 中 4°C 浸泡过夜，使用前置于 24 孔板中晾干。

20

试验前，感染（CAR-T 组）或未感染（对照组）慢病毒细胞 T 细胞和外周血单核细胞在 RPMI1640 完全培养基（含有 1%BSA，10mM HEPES 缓冲液，pH6.9）中血清饥饿 4 小时。

25 试验时，在 24 孔板中加入 500ul 含 100ng/mlSDF-1 的无血清 RPMI1640 完全培养基；晾干的 transwell 放入孔内，然后将 200ul Far red 标记的血清饥饿细胞（ 5×10^5 ）加入 transwell 上室。在 37°C，5%CO₂ 条件下孵育 4h，收集下室的迁细胞，离心沉淀，并重悬于 300ul 预冷的 FACS 缓冲液（含 10%小牛血清和 0.2%叠氮钠），每个样品中加入 1×10^5 数量的 9 微米的乳胶珠（BCR167, sigma 公司）和 25 微升浓度为 50ug/ml 的 Propidium

30 Iodide/碘化丙啉工作液（ST511, 碧云天生物技术有限公司），流式细胞仪检测样品。

因各组中乳胶珠数量相同，以其作为参照。统计 PI 染色阴性细胞，可以计算出迁

$$\text{移的 Far red 标记的 T 细胞数量} = \left(\frac{APC(-)\%}{APC(+)\%} \times 10^5 \right), \text{迁移率} (\%) = 100 \times \frac{\text{迁移细胞数}}{5 \times 10^5}。$$

分析发现：感染慢病毒后，在 SDF-1 趋化作用下，外周单核细胞的迁移率由 16.7% 下降至 9.2%，T 细胞迁移率由 19.3% 降至 4.1%（图 3），结果表明随着 CXCR4 表达的降

5 实施例 5 表达 CXCR4 增强嵌合抗原受体修饰 T 细胞趋化活性

为逆转 T 细胞的趋化活性，我们在 T 细胞中过表达 CXCR4 以增强慢病毒感染的 CAR-T 细胞趋化活性。

首先，在 CAR-T 细胞中共表达 CXCR4。含全长 CAR（CAR-T 组）或 CAR/CXCR4
10 （CAR/CXCR4-T 组）的慢病毒感染 T 细胞，48h 后收集细胞，PBS 洗两次，APC 标记的抗人 CXCR4 抗体（货号 306510，biolegend 公司）染色，流式细胞术检测细胞膜 CXCR4 表达，结果显示：与 CAR-T 组相比，CAR/CXCR4 组 T 细胞 CXCR4 表达明显升高，平均荧光强度（对数值）由 108 升高至 229（如图 4 所示）。

其次，趋化活性检测，试验方法同实施例 4：采用 5μm 孔径的（货号 3421; Costar，
15 Cambridge, MA）transwell 检测，transwell 中聚碳酸酯膜在含 20μg/ml BSA 的 PBS 中 4℃ 浸泡过夜，使用前置于 24 孔板中晾干。

试验前，表达（CAR/CXCR4-T 组）或不表达（CAR-T 组）CXCR4 的 T 细胞在 RPMI1640 完全培养基（含有 1%BSA，10mM HEPES 缓冲液，pH6.9）中血清饥饿 4 小时。

试验时，在 24 孔板中加入 500ul 含 100ng/ml SDF-1 的无血清 RPMI1640 完全培养基
20 或 RPMI-8226 细胞培养上清；晾干的 transwell 放入孔内，然后将 200ul Far red 标记的血清饥饿细胞（ 5×10^5 ）加入 transwell 上室。在 37℃，5%CO₂ 条件下孵育 4h，收集下室的迁细胞，离心沉淀，并重悬于 300ul 预冷的 FACS 缓冲液（含 10% 小牛血清和 0.2% 叠氮钠），每个样品中加入 1×10^5 数量的 9 微米的乳胶珠（BCR167，sigma 公司）和 25 微升浓度为 50ug/ml 的 Propidium Iodide/碘化丙啉工作液（ST511，碧云天生物技术有限公司），流式细胞仪检测样品。

因各组中乳胶珠数量相同，以其作为参照。统计 PI 染色阴性细胞，可以计算出迁

$$\text{移的 Far red 标记的 T 细胞数量} = \left(\frac{APC(-)\%}{APC(+)\%} \times 10^5 \right), \text{迁移率} (\%) = 100 \times \frac{\text{迁移细胞数}}{5 \times 10^5}。$$

结果显示：RPMI-8226 细胞（高表达并分泌 SDF-1）培养上清可促进 CAR/CXCR4-T

细胞迁移,从不足 2.9%增加到 4.15%(图 5A);在趋化因子 SDF-1(CXCL12)浓度为 100ng/ml 时,可明显增加共表达 CXCR4 的 CAR-T 细胞趋化效率,由 CAR-T 组的 3%左右升高到 9%,提升了三倍(图 5B);充分说明共表达 CXCR4 可以增强 CAR-T 细胞向 SDF-1 高浓度部位迁移的趋化活性。

5 实施例 6 CAR 表达和活性检测

含全长 CAR 或 CAR/CXCR4 的慢病毒感染 T 细胞,培养 5 天后,收集细胞,采用 FITC 标记的重组人 BCMA 蛋白(novaprotein 公司)染色,检测 T 细胞 CAR 表达。结果显示,相对于对照组(小于 5%),CAR 组和 CAR/CXCR4 组中 CAR 表达明显升高(达 40%),荧光峰值发生偏移(图 6)。

10 不同浓度的上述 T 细胞、CAR-T 细胞或 CAR/CXCR4-T 细胞(即效应细胞)分别与 CFSE 标记的人骨髓瘤细胞系 RPMI-8226 细胞(靶细胞,BCMA 高表达)共培养,24h 后,每组中加入数量为 1×10^5 的 Far red 标记 K562 细胞,PBS 洗 2 次,流式细胞仪 FITC 和 APC 通道检测荧光细胞比例。因各组中 Far red 标记的 K562 细胞数量相同,因此,以 K562 细胞为参照,可以计算出 FITC 标记的靶细胞(RPMI-8226)数量($=10^5 \times \frac{FITC\%}{APC\%}$);杀伤

15 效率(百分比%) $=100 \times (1 - \frac{\text{试验组靶细胞数量}}{\text{阴性组靶细胞数量}})$,其中阴性组未加 T 细胞)。

结果显示:在效应细胞数量/靶细胞数量(E/T)=1:1 时,对照组细胞对 RPMI-8226 细胞的杀伤效率为 23.7%,而 CAR-T 细胞和 CAR/CXCR4-T 细胞分别达 45.3%和 51%;在效应细胞数量/靶细胞数量(E/T)=5:1 时,对照组细胞对 RPMI-8226 细胞的杀伤效率约为 44.7%,而 CAR-T 细胞和 CAR/CXCR4-T 细胞分别达 75.1%和 82.3%(图 7),结果表明,
20 嵌合抗原受体(CAR)可以增强 T 细胞对 RPMI-8226 的杀伤活性,而共表达 CXCR4 可以增强 CAR-T 细胞的杀伤活性。

综上所述,由上述试验可知,本发明通过构建共表达嵌合抗原受体和 CXCR4 慢病毒表达载体,并导入 T 细胞中,能够消除 T 细胞表达 CAR-T 时存在的趋化性降低的缺陷,提供一种杀伤活性和趋化活性都提高的淋巴细胞,有利于增强嵌合抗原受体修饰的淋巴细胞的抗肿瘤效应。
25

权利要求书

1、一种嵌合抗原受体修饰的淋巴细胞，共表达趋化因子 CXCR4。

2、根据权利要求 1 所述的嵌合抗原受体修饰的淋巴细胞，其特征在于：所述的 CXCR4 受体为(1)具有 SEQ ID No.19 所示的氨基酸序列的蛋白；

5 或：(2)在 SEQ ID No.19 所示的蛋白的氨基酸序列中经过取代和/或缺失和/或添加至少一个氨基酸所得的与 SEQ ID No.19 所示的蛋白的功能相同或相似的蛋白。

3、根据权利要求 2 所述的嵌合抗原受体修饰的淋巴细胞，其特征在于：所述的 CXCR4 的编码核苷酸序列为 (1)：如 SEQ ID No.20 所示的核苷酸序列或其
10 简并序列；

 或 (2)：在 (1)限定的核苷酸序列中经过取代、缺失或添加至少一个核苷酸衍生所得的核苷酸序列，且与 SEQ ID NO.20 的核苷酸序列编码功能相同或相似的蛋白。

4、根据权利要求 1 所述的嵌合抗原受体修饰的淋巴细胞，其特征在于，所
15 述的 CXCR4 通过 P2A 与嵌合抗原受体共表达。

5、根据权利要求 4 所述的嵌合抗原受体修饰的淋巴细胞，其特征在于：所述的 P2A 的氨基酸序列为 SEQ ID No.21 所示。

6、根据权利要求 4 所述的嵌合抗原受体修饰的淋巴细胞，其特征在于：所述的 P2A 的编码基因的核苷酸序列为 SEQ ID No.22 所示。

20 7、根据权利要求 1 所述的嵌合抗原受体修饰的淋巴细胞，其特征在于，所述的嵌合抗原受体包括：胞外抗原结合区，跨膜区和胞内信号区。

8、根据权利要求 1 所述的嵌合抗原受体修饰的淋巴细胞，其特征在于：

 所述的胞外抗原结合区是与肿瘤抗原结合的单克隆抗体单链可变区，受体或配体；

25 所述跨膜区为 CD8 跨膜区或 CD28 跨膜区；

 所述胞内信号区为 CD28、CD134/OX40、CD137/4-1BB、LCK、ICOS、CD40、CD27 或 DAP10 中一种或多种的胞内结构域。

9、根据权利要求 8 所述的嵌合抗原受体修饰的淋巴细胞，其特征在于，所述的肿瘤抗原包括但不限于：EGFR、EpCAM、mesothelin、IL-13R α 2、ERBB2、

ERBB3、ERBB4、VEGFR1、VEGFR2、GD2、FR、PSMA、gp100、MUC1、MUC16、CA9、CD171、CD125、CD15-3、CD19-9、NY-ESO-1、MART-1、MAGE4、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CEA、CD38、CD138、CD123、EphA2。

10 10、根据权利要求 8 所述的嵌合抗原受体修饰的淋巴细胞，其特征在于：所述的单克隆抗体单链可变区为 scFv 单链抗体。

11、根据权利要求 8 所述的嵌合抗原受体修饰的淋巴细胞，其特征在于：所述的 scFv 单链抗体的氨基酸序列为 SEQ ID No.1 所示。

12、根据权利要求 8 所述的嵌合抗原受体修饰的淋巴细胞，其特征在于：所述的 scFv 单链抗体的编码核苷酸序列为 SEQ ID No.2 所示。

10 13、根据权利要求 8 所述的嵌合抗原受体修饰的淋巴细胞，其特征在于：所述的嵌合抗原受体为通过氮端到碳端顺次联接信号肽、scFv 单链抗体、CD8 α 跨膜区、CD28 胞内段、4-1BB 胞内段、CD3 ζ 链得到的。

14、根据权利要求 8 所述的嵌合抗原受体修饰的淋巴细胞，其特征在于：所述的嵌合抗原受体为(1)具有 SEQ ID No.13 所示的氨基酸序列的蛋白；

15 或：(2)在 SEQ ID No.13 所示的蛋白的氨基酸序列中经过取代和/或缺失和/或添加至少一个氨基酸所得的与 SEQ ID No.13 所示的蛋白的功能相同或相似的蛋白。

15、根据权利要求 8 所述的嵌合抗原受体修饰的淋巴细胞，其特征在于：

20 所述嵌合抗原受体的编码基因的核苷酸序列为 (1)：如 SEQ ID No.14 所示的核苷酸序列或其简并序列；

或 (2)：在 (1)限定的核苷酸序列中经过取代、缺失或添加至少一个核苷酸衍生所得的核苷酸序列，且与 SEQ ID NO.14 的核苷酸序列编码功能相同或相似的蛋白。

25 16、根据权利要求 8 所述的嵌合抗原受体修饰的淋巴细胞，其特征在于：所述的配体为 APRIL。

17、根据权利要求 8 所述的嵌合抗原受体修饰的淋巴细胞，其特征在于：所述的 APRIL 的氨基酸序列为 SEQ ID NO.15 所示。

18、根据权利要求 8 所述的嵌合抗原受体修饰的淋巴细胞，其特征在于：所述的 APRIL 的编码核苷酸序列为 SEQ ID NO.16 所示。

30 19、根据权利要求 8 所述的嵌合抗原受体修饰的淋巴细胞，其特征在于：所

述的嵌合抗原受体为通过氮端到碳端顺次联接信号肽、APRIL、CD8 α 跨膜区、CD28 胞内段、4-1BB 胞内段、CD3 ζ 链得到的。

20、根据权利要求 8 所述的嵌合抗原受体修饰的淋巴细胞，其特征在于：

所述的嵌合抗原受体为(1)具有 SEQ ID No.17 所示的氨基酸序列的蛋白；

5 或：(2)在 SEQ ID No.17 所示的蛋白的氨基酸序列中经过取代和/或缺失和/或添加至少一个氨基酸所得的与 SEQ ID No.17 所示的蛋白的功能相同或相似的蛋白。

21、根据权利要求 8 所述的嵌合抗原受体修饰的淋巴细胞，其特征在于：

10 所述嵌合抗原受体的编码基因的核苷酸序列为 (1)：如 SEQ ID No.18 所示的核苷酸序列或其简并序列；

或 (2)：在 (1)限定的核苷酸序列中经过取代、缺失或添加至少一个核苷酸衍生所得的核苷酸序列，且与 SEQ ID NO.18 的核苷酸序列编码功能相同或相似的蛋白。

15 22、权利要求 1-21 中任一项的嵌合抗原受体，其与 CXCR4 由一个载体共同表达。

23、一种表达载体，含有权利要求 1-21 任一项所述的编码核酸的表达载体。

24、根据权利要求 23 所述的表达载体，其特征在于，所述表达载体为慢病毒载体。

20 25、一种病毒系统，其特征在于，所述病毒系统中包含权利要求 23 或 24 所述的表达载体。

26、权利要求 23 或 24 所述的表达载体的用途，其特征在于：用于制备靶向肿瘤细胞的嵌合抗原受体修饰的淋巴细胞。

27、含有权利要求 23~24 任一项所述的表达载体或病毒的宿主细胞。

25 28、根据权利要求 27 所述的宿主细胞，其特征在于：所述宿主细胞为 T 淋巴细胞。

29、根据权利要求 28 所述的宿主细胞，其特征在于：所述的 T 淋巴细胞为 $\alpha\beta$ T 细胞、NKT 细胞或 $\gamma\delta$ T 细胞。

30 30、一种制备权利要求 28 或 29 所述的宿主细胞的方法，其包括在淋巴细胞表达权利要求 1-21 任一所述的嵌合抗原受体的步骤。

31、权利要求 1-21 所述的嵌合抗原受体修饰的淋巴细胞的用途，用于制备

治疗恶性肿瘤药物。

32、权利要求 1-21 任一项所述的嵌合抗原受体修饰的淋巴细胞的用途，用于与放射治疗联合抑制肿瘤。

- 33、根据权利要求 32 的用途，其特征在于：所述的恶性肿瘤为肺癌、肝癌、
- 5 淋巴瘤、结肠癌、直肠癌、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、胃癌、胆管癌、食管癌、肾癌、神经胶质瘤、黑色素瘤、胰腺癌、多发性骨髓瘤或前列腺癌。

CAR/CXCR4结构示意图

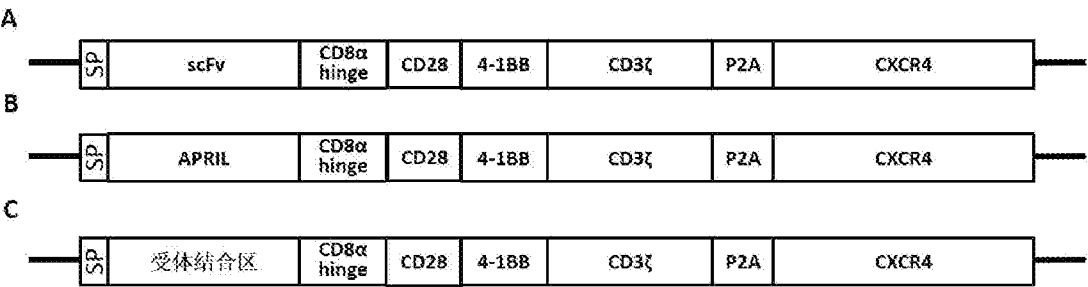


图 1

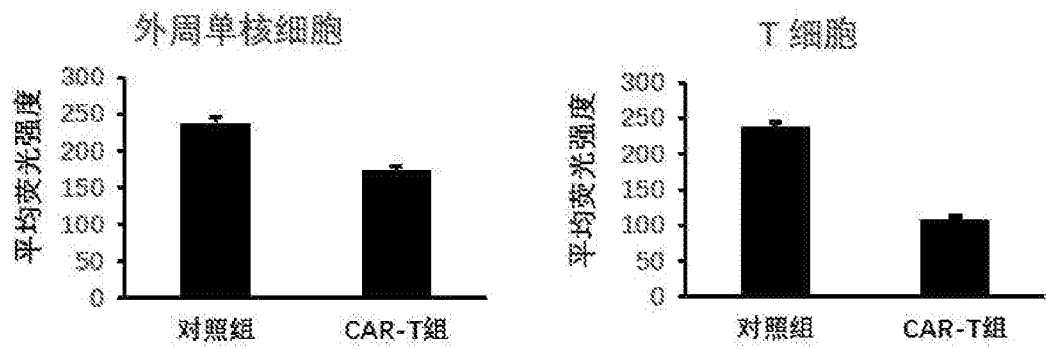


图 2

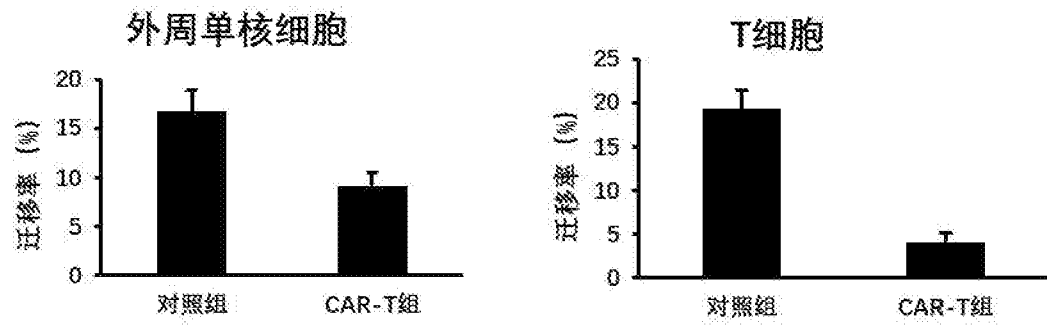


图 3

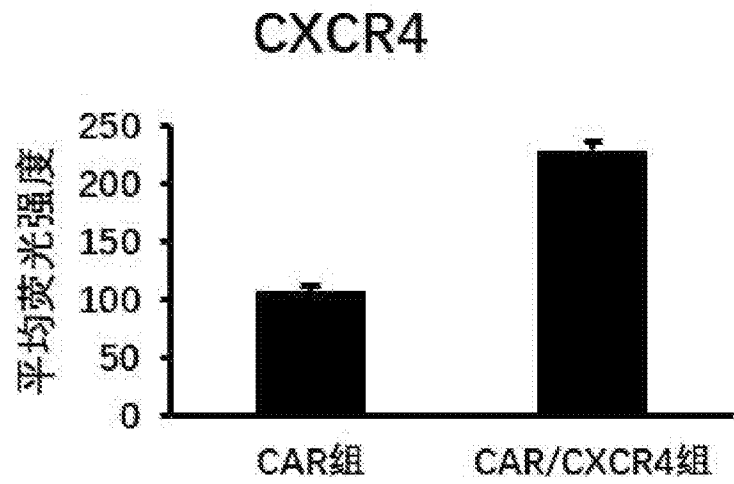


图 4

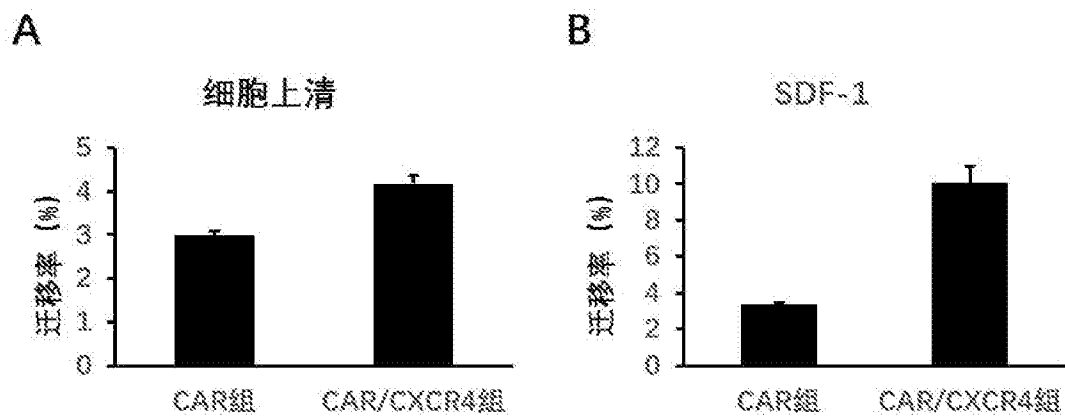


图 5

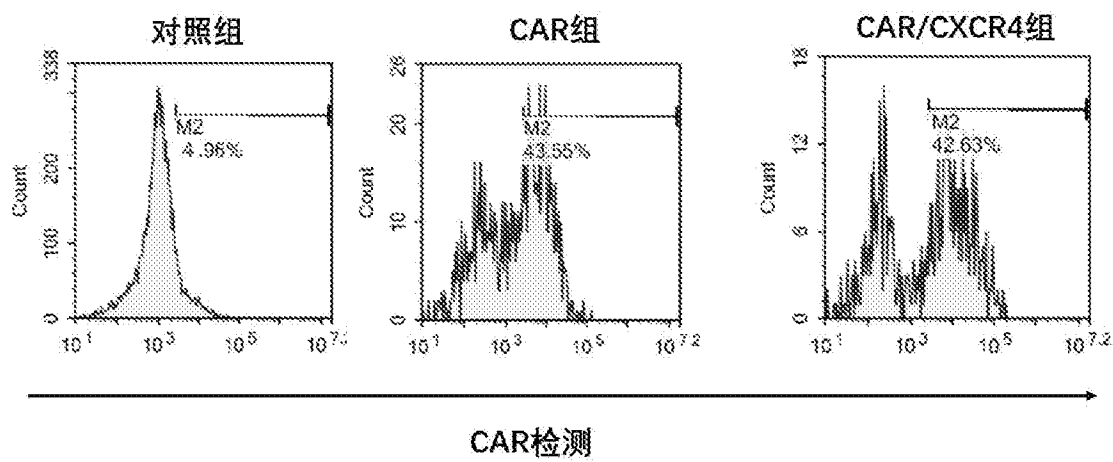


图 6

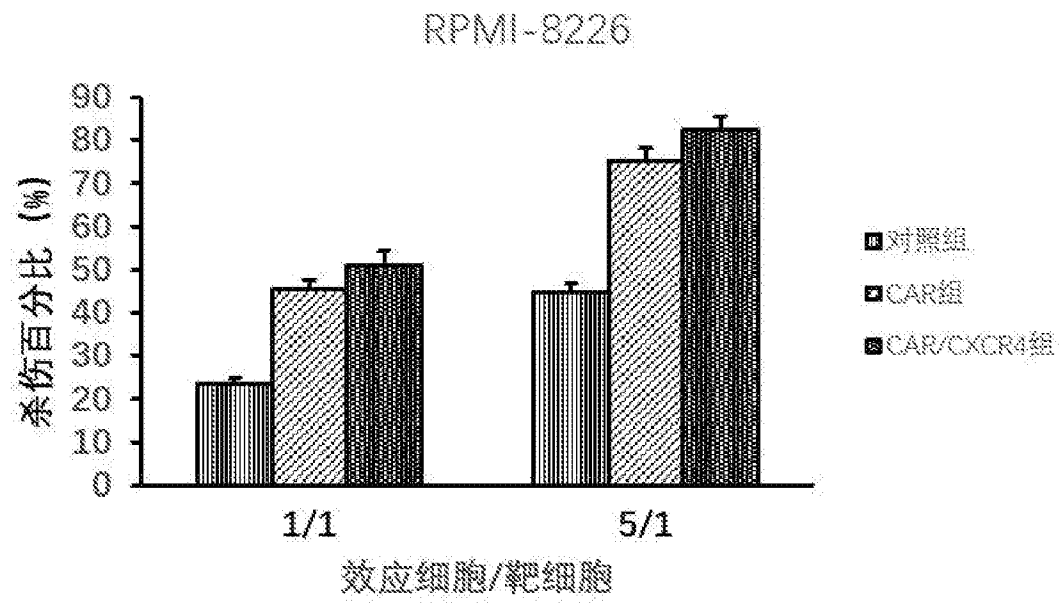


图 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2017/119451

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 35/17 (2015.01) i; C12N 5/10 (2006.01) i; C12N 15/62 (2006.01) i; C12N 15/86 (2006.01) i; C07K 19/00 (2006.01) i
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K; C12N; C07K

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

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

CNABS, CPRSABS, DWPI, SIPOABS, CNTXT, WOTXT, USTXT, EPTXT, CNKI, WANFANG DATA, BAIDU, PUBMED, BIOSIS, EMBASE, WEB OF KNOWLEDGE, DUXIU: 四川大学, 王永生, 魏于全, 郭福春, 王玮, 嵌合抗原受体, CAR, CXCR4, 归巢受体, 趋化因子, P2A, APRIL, BCMA, chimeric antigen receptor, homing receptor, chemokine

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2016109668 A1 (ANTHROGENESIS CORPORATION), 07 July 2016 (07.07.2016), description, paragraphs 00311-00335, 00352-00359 and 00367, and table 1	1-3, 7-10, 13, 22-33
Y	WO 2016109668 A1 (ANTHROGENESIS CORPORATION), 07 July 2016 (07.07.2016), description, paragraphs 00311-00335, 00352-00359 and 00367, and table 1	4-6, 11-12, 14-21
Y	WO 2016062898 A1 (BCRT HOLDING BV), 28 April 2016 (28.04.2016), description, figure 2	4-6
Y	WO 2016014789 A2 (BLUEBIRD BIO, INC.), 28 January 2016 (28.01.2016), sequences 28 and 29	11-12, 14-15
X	WO 2015128653 A2 (UCL BUSINESS PLC), 03 September 2015 (03.09.2015), sequences 90-95, and pages 197-210	1-3, 7-10, 13, 22-33
Y	MÜLLER, N. et al. "Engineering NK Cells Modified with an EGFRvIII-Specific Chimeric Antigen Receptor to Overexpress CXCR4 Improves Immunotherapy of CXCL12/SDF-1 α -Secreting Glioblastoma", J. Immunother., 38(5), 30 June 2015 (30.06.2015), pages 197-210	4-6, 11-12, 14-21

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"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	"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
"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)	"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
"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	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
28 February 2018

Date of mailing of the international search report
23 March 2018

Name and mailing address of the ISA
State Intellectual Property Office of the P. R. China
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao
Haidian District, Beijing 100088, China
Facsimile No. (86-10) 62019451

Authorized officer
YANG, Jiaqian
Telephone No. (86-10) 53961939

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2017/119451

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.: 32, 33
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
[1] claims 32 and 33 relate to a treatment method for diseases, which do not comply with the requirements of PCT Rule 39.1(iv). This report is made based on that the subject matter of claims 32 and 33 is modified as the pharmaceutical purposes.
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/CN2017/119451

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 2016109668 A1	07 July 2016	US 2018021378 A1	25 January 2018
		EP 3240551 A1	08 November 2017
		KR 20170100653 A	04 September 2017
		AU 2015374062 A1	13 July 2017
		CA 2972806 A1	07 July 2016
		JP 2018502114 A	25 January 2018
		CN 107249604 A	13 October 2017
WO 2016062898 A1	28 April 2016	JP 2017533729 A	16 November 2017
		AU 2015334847 A1	08 June 2017
		US 2017354681 A1	14 December 2017
		CN 107108752 A	29 August 2017
		CA 2965224 A1	28 April 2016
		EP 3209679 A1	30 August 2017
		AU 2015292590 A1	16 February 2017
WO 2016014789 A2	28 January 2016	US 2017226216 A1	10 August 2017
		CN 106795217 A	31 May 2017
		KR 20170036021 A	31 March 2017
		EP 3172231 A4	10 January 2018
		WO 2016014789 A3	17 March 2016
		JP 2017522882 A	17 August 2017
		EP 3172231 A2	31 May 2017
		CA 2956002 A1	28 January 2016
		MX 2017001079 A	12 September 2017
		SG 11201700492S A	27 February 2017
WO 2015128653 A2	03 September 2015	CA 2939411 A1	03 September 2015
		EP 3243831 A1	15 November 2017
		CN 106414502 A	15 February 2017
		US 2017334964 A1	23 November 2017
		JP 2017514787 A	08 June 2017
		US 2016362467 A1	15 December 2016
		EP 3110838 A2	04 January 2017
		AU 2015221933 A1	01 September 2016
		JP 2017145258 A	24 August 2017
		WO 2015128653 A3	05 November 2015

A. 主题的分类 A61K 35/17(2015.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C12N 15/62(2006.01)i; C12N 15/86(2006.01)i; C07K 19/00(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; C07K 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNABS, CPRSABS, DWPI, SIPOABS, CNTXT, WOTXT, USTXT, EPTXT, CNKI, 万方数据资源系统, 百度, PUBMED, BIOSIS, EMBASE, WEB OF KNOWLEDGE, 读秀, 四川大学, 王永生, 魏于全, 郭福春, 王玮, 嵌合抗原受体, CAR, CXCR4, 归巢受体, 趋化因子, P2A, APRIL, BCMA, chimeric antigen receptor, homing receptor, chemokine																							
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>WO 2016109668 A1 (ANTHROGENESIS CORPORATION) 2016年 7月 7日 (2016 - 07 - 07) 说明书第00311-00335、00352-00359、00367段, 表1</td> <td>1-3, 7-10, 13, 22-33</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2016109668 A1 (ANTHROGENESIS CORPORATION) 2016年 7月 7日 (2016 - 07 - 07) 说明书第00311-00335、00352-00359、00367段, 表1</td> <td>4-6, 11-12, 14-21</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2016062898 A1 (BCRT HOLDING BV) 2016年 4月 28日 (2016 - 04 - 28) 说明书附图图2</td> <td>4-6</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2016014789 A2 (BLUEBIRD BIO, INC.) 2016年 1月 28日 (2016 - 01 - 28) 序列28、29</td> <td>11-12, 14-15</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>WO 2015128653 A2 (UCL BUSINESS PLC) 2015年 9月 3日 (2015 - 09 - 03) 序列90-95 pages 197-210</td> <td>1-3, 7-10, 13, 22-33</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>MÜLLER, N. et al. "Engineering NK cells modified with an EGFRvIII-specific chimeric antigen receptor to overexpress CXCR4 improves immunotherapy of CXCL12/SDF-1α-secreting glioblastoma" J. IMMUNOTHER., 第38卷, 第5期, 2015年 6月 30日 (2015 - 06 - 30), pages 197-210</td> <td>4-6, 11-12, 14-21</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	WO 2016109668 A1 (ANTHROGENESIS CORPORATION) 2016年 7月 7日 (2016 - 07 - 07) 说明书第00311-00335、00352-00359、00367段, 表1	1-3, 7-10, 13, 22-33	Y	WO 2016109668 A1 (ANTHROGENESIS CORPORATION) 2016年 7月 7日 (2016 - 07 - 07) 说明书第00311-00335、00352-00359、00367段, 表1	4-6, 11-12, 14-21	Y	WO 2016062898 A1 (BCRT HOLDING BV) 2016年 4月 28日 (2016 - 04 - 28) 说明书附图图2	4-6	Y	WO 2016014789 A2 (BLUEBIRD BIO, INC.) 2016年 1月 28日 (2016 - 01 - 28) 序列28、29	11-12, 14-15	X	WO 2015128653 A2 (UCL BUSINESS PLC) 2015年 9月 3日 (2015 - 09 - 03) 序列90-95 pages 197-210	1-3, 7-10, 13, 22-33	Y	MÜLLER, N. et al. "Engineering NK cells modified with an EGFRvIII-specific chimeric antigen receptor to overexpress CXCR4 improves immunotherapy of CXCL12/SDF-1 α -secreting glioblastoma" J. IMMUNOTHER., 第38卷, 第5期, 2015年 6月 30日 (2015 - 06 - 30), pages 197-210	4-6, 11-12, 14-21
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																					
X	WO 2016109668 A1 (ANTHROGENESIS CORPORATION) 2016年 7月 7日 (2016 - 07 - 07) 说明书第00311-00335、00352-00359、00367段, 表1	1-3, 7-10, 13, 22-33																					
Y	WO 2016109668 A1 (ANTHROGENESIS CORPORATION) 2016年 7月 7日 (2016 - 07 - 07) 说明书第00311-00335、00352-00359、00367段, 表1	4-6, 11-12, 14-21																					
Y	WO 2016062898 A1 (BCRT HOLDING BV) 2016年 4月 28日 (2016 - 04 - 28) 说明书附图图2	4-6																					
Y	WO 2016014789 A2 (BLUEBIRD BIO, INC.) 2016年 1月 28日 (2016 - 01 - 28) 序列28、29	11-12, 14-15																					
X	WO 2015128653 A2 (UCL BUSINESS PLC) 2015年 9月 3日 (2015 - 09 - 03) 序列90-95 pages 197-210	1-3, 7-10, 13, 22-33																					
Y	MÜLLER, N. et al. "Engineering NK cells modified with an EGFRvIII-specific chimeric antigen receptor to overexpress CXCR4 improves immunotherapy of CXCL12/SDF-1 α -secreting glioblastoma" J. IMMUNOTHER., 第38卷, 第5期, 2015年 6月 30日 (2015 - 06 - 30), pages 197-210	4-6, 11-12, 14-21																					
☐ 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 2018年 2月 28日		国际检索报告邮寄日期 2018年 3月 23日																					
ISA/CN的名称和邮寄地址 中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		受权官员 杨佳倩 电话号码 (86-10)53961939																					

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： 32, 33
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] 权利要求32、33涉及疾病的治疗方法，不符合PCT第39.1 (iv) 的规定。本报告基于权利要求32、33修改为制药用途而做出。
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/CN2017/119451

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
WO	2016109668	A1	2016年 7月 7日	US	2018021378	A1	2018年 1月 25日
				EP	3240551	A1	2017年 11月 8日
				KR	20170100653	A	2017年 9月 4日
				AU	2015374062	A1	2017年 7月 13日
				CA	2972806	A1	2016年 7月 7日
				JP	2018502114	A	2018年 1月 25日
				CN	107249604	A	2017年 10月 13日
WO	2016062898	A1	2016年 4月 28日	JP	2017533729	A	2017年 11月 16日
				AU	2015334847	A1	2017年 6月 8日
				US	2017354681	A1	2017年 12月 14日
				CN	107108752	A	2017年 8月 29日
				CA	2965224	A1	2016年 4月 28日
				EP	3209679	A1	2017年 8月 30日
WO	2016014789	A2	2016年 1月 28日	AU	2015292590	A1	2017年 2月 16日
				US	2017226216	A1	2017年 8月 10日
				CN	106795217	A	2017年 5月 31日
				KR	20170036021	A	2017年 3月 31日
				EP	3172231	A4	2018年 1月 10日
				WO	2016014789	A3	2016年 3月 17日
				JP	2017522882	A	2017年 8月 17日
				EP	3172231	A2	2017年 5月 31日
				CA	2956002	A1	2016年 1月 28日
				MX	2017001079	A	2017年 9月 12日
				SG	11201700492S	A	2017年 2月 27日
WO	2015128653	A2	2015年 9月 3日	CA	2939411	A1	2015年 9月 3日
				EP	3243831	A1	2017年 11月 15日
				CN	106414502	A	2017年 2月 15日
				US	2017334964	A1	2017年 11月 23日
				JP	2017514787	A	2017年 6月 8日
				US	2016362467	A1	2016年 12月 15日
				EP	3110838	A2	2017年 1月 4日
				AU	2015221933	A1	2016年 9月 1日
				JP	2017145258	A	2017年 8月 24日
				WO	2015128653	A3	2015年 11月 5日