

(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  
2024年12月19日 (19.12.2024)



(10) 国际公布号  
**WO 2024/254775 A1**

(51) 国际专利分类号:

C07K 19/00 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)  
C12N 15/13 (2006.01) A61K 35/17 (2015.01)  
C12N 15/62 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)  
C12N 15/63 (2006.01) A61P 31/00 (2006.01)  
C12N 5/10 (2006.01) A61P 37/02 (2006.01)

业广场6楼603室, Hong Kong 999077 (CN)。郑冬 (ZHENG, Dong); 中国香港特别行政区九龙长沙湾道788号罗氏商业广场6楼603室, Hong Kong 999077 (CN)。任江涛 (REN, Jiangtao); 中国香港特别行政区九龙长沙湾道788号罗氏商业广场6楼603室, Hong Kong 999077 (CN)。

(21) 国际申请号: PCT/CN2023/100067

(22) 国际申请日: 2023年6月14日 (14.06.2023)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人: 香港北恒生物科技有限公司 (HONGKONG BIOHENG BIOTECH LIMITED) [CN/CN]; 中国香港特别行政区九龙长沙湾道788号罗氏商业广场6楼603室, Hong Kong 999077 (CN)。

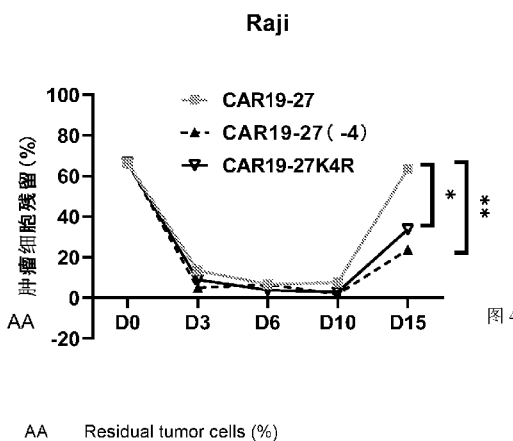
(74) 代理人: 成都超凡明远知识产权代理有限公司 (FOUNDIN INTELLECTUAL PROPERTY); 中国北京市海淀区北四环西路68号左岸工社1215-1218室, Beijing 100080 (CN)。

(72) 发明人: 周亚丽 (ZHOU, Yali); 中国香港特别行政区九龙长沙湾道788号罗氏商业广场6楼603室, Hong Kong 999077 (CN)。汤颖秀 (TANG, Yingxiu); 中国香港特别行政区九龙长沙湾道788号罗氏商

(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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD,

(54) Title: CHIMERIC ANTIGEN RECEPTOR COMPRISING NOVEL CO-STIMULATORY DOMAIN AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 包含新型共刺激结构域的嵌合抗原受体及其用途



(57) Abstract: The present invention relates to a chimeric antigen receptor, comprising a ligand binding domain, a transmembrane domain, a co-stimulatory domain, and an intracellular signaling domain, wherein the co-stimulatory domain comprises a mutated CD27 intracellular region. The present invention also relates to an engineered immune cell comprising the chimeric antigen receptor, and a use thereof in treatment of diseases, such as cancer, autoimmune diseases, infections.

(57) 摘要: 本发明涉及一种嵌合抗原受体, 其包含配体结合结构域、跨膜结构域、共刺激结构域和胞内信号传导结构域, 其中所述共刺激结构域包含突变的CD27胞内区。本发明还涉及包含此类嵌合抗原受体的工程化免疫细胞及其在治疗疾病, 例如癌症、自身免疫性疾病、感染中的用途。



WO 2024/254775 A1

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, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ,  
NA, RW, SC, 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, ME, 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))。

## 包含新型共刺激结构域的嵌合抗原受体及其用途

### 技术领域

本发明属于免疫治疗领域。更具体地，本发明涉及包含新型共刺激结构域的嵌合抗原受体，以及包含此类嵌合抗原受体的工程化免疫细胞及其用途。

### 背景技术

过继性细胞疗法是指通过对自体免疫细胞进行体外激活和扩增，然后将其重新输回至患者体内，从而达到直接杀伤肿瘤或激发机体的免疫应答杀伤肿瘤细胞的目的。常见的过继性细胞疗法包括 LAK、CIK 和 NK 等非特异性免疫疗法以及 TIL、CAR-T 和 TCR-T 等特异性免疫疗法。其中，CAR-T 细胞疗法由于在血液瘤领域的出色表现成功引起了广泛关注。鉴于 CAR-T 细胞疗法的飞速发展，也逐渐衍生出了 CAR-NK、CAR-NKT、CAR-Treg、CAR- $\gamma\delta$ T 等以 CAR 作为核心技术的一系列新型细胞疗法，共同引领 CAR 细胞疗法成为肿瘤细胞免疫治疗的一大趋势。

嵌合抗原受体 (CAR) 是一种细胞表面受体蛋白，它赋予了免疫细胞靶向特定抗原蛋白的能力。从结构上看，CAR 至少由抗原结合结构域、跨膜结构域和胞内信号传导结构域三个功能结构域组成，胞内信号传导结构域由共刺激结构域和/或初级信号传导结构域构成。CAR 结构的设计经历了以下过程：第一代 CAR 只有一个胞内信号组份 CD3 $\zeta$  或者 Fc $\gamma$ RI 分子，由于胞内只有一个活化结构域，因此它只能引起短暂的免疫细胞增殖和较少的细胞因子分泌，而并不能提供长时间的免疫细胞增殖信号和持续的体内抗肿瘤效应，所以并没有取得很好的临床疗效；第二代 CAR 在原有结构基础上引入一个共刺激分子，如 CD28、4-1BB、OX40、ICOS，与第一代 CAR 相比功能有很大提高，进一步加强 CAR-T 细胞的持续性和对肿瘤细胞的杀伤能力；第三代 CAR 包含 2 个共刺激分子，以 CD28 与 4-1BB、CD28 与 OX40 组合作为共刺激分子在第三代 CAR 中最为常见；第四代 CAR 主要为了克服肿瘤免疫微环境的抑制，在设计时引入了促炎症细胞因子 (IL-12、IL-15、IL-18 等) 和共刺激配体；第五代 CAR-T 在第二代的基础上添加了激活其它信号通路的共刺激结构域，比如 IL2-2R $\beta$  胞内结合 SAAT3/5 的结构域等。目前，大多数公司的 CAR 产品仍以第二代 CAR 结构为基础，进行探索开发。

研究表明，不同的功能结构域对 CAR 的功能有重要的影响。例如，国际申请 WO2016014789A 中，在不改变抗原结合结构域和胞内传导信号结构域的前提下，仅通过改变跨膜结构域，即可大幅度改善 CAR 的性能，降低 CAR-T 对非靶细胞的非特异杀伤作用。例如，目前在 CAR 细胞疗法领域中普遍认为，包含 CD28 共刺激结构域的 CAR 细胞显示出更好的细胞增殖活性，包含 4-1BB 共刺激结构域的 CAR 细胞显示出更好的持续性。

目前 CAR 细胞疗法在临床应用中仍存在一些问題，如对实体瘤疗效不佳、持续性差等。因此，有必要开发新的 CAR 结构，以进一步增强表达 CAR 细胞疗法的治疗效果。

### 发明内容

除非另有说明，否则本文中所使用的所有科学技术术语的含义与本发明所属领域的普通技术人员通常所了解到的相同。

## 嵌合抗原受体

如本文所用，术语“嵌合抗原受体”或“CAR”是指人工构建的杂合多肽，该杂合多肽一般包括配体结合结构域（例如抗体或其抗原结合部分）、跨膜结构域、共刺激结构域和胞内信号传导结构域，各个结构域之间通过接头连接。CAR 能够利用抗体的抗原结合特性以非 MHC 限制性的方式将 T 细胞和其它免疫细胞的特异性和反应性重定向至所选择的靶标。非 MHC 限制性的抗原识别给予表达 CAR 的免疫细胞与抗原处理无关的识别抗原的能力，因此绕过了肿瘤逃逸的主要机制。

在第一个方面，本发明提供一种嵌合抗原受体，其包含配体结合结构域、跨膜结构域、共刺激结构域和胞内信号传导结构域，其中所述共刺激结构域包含突变的 CD27 胞内区。

共刺激结构域是来自共刺激分子的细胞内功能性信号传导结构域，其包含所述共刺激分子的整个细胞内部分，或其功能性片段。“共刺激分子”是指在 T 细胞上与共刺激配体特异性结合，由此介导 T 细胞的共刺激反应（例如增殖）的同源结合配偶体。传统的嵌合抗原受体一般使用 CD28 和/或 4-1BB 作为共刺激结构域。本发明的嵌合抗原受体包含新型共刺激结构域，即突变的 CD27 胞内区。

CD27 是由二硫键连接的相对分子量为 55000 Da 的单体组成的二聚体跨膜糖蛋白，是肿瘤坏死因子 TNF 超家族的重要成员。CD27 广泛表达于原始 T 细胞和记忆 T 细胞表面。CD27 主要通过与其配体 CD70 结合，激活下游的 TRAF2 和 TRAF5 信号通路，进一步诱导 NF- $\kappa$ B 和 JNK 信号通路的激活，对于免疫细胞，尤其是 T 细胞的激活、增殖和凋亡发挥重要的调节功能。

与野生型 CD27 胞内区（SEQ ID NO:1）相比，本发明中所述突变的 CD27 胞内区包含至少 1 个赖氨酸突变（即氨基酸的缺失、取代或插入），例如包含 1 个赖氨酸突变、2 个赖氨酸突变、3 个赖氨酸突变。优选地，本发明中所述突变的 CD27 胞内区包含至少 1 个赖氨酸的取代。更优选地，所述取代是将赖氨酸替换为其他碱性氨基酸，如精氨酸或组氨酸。

或者，与野生型 CD27 胞内区（SEQ ID NO:1）相比，本发明中所述突变的 CD27 胞内区近 C-末端的第 1-6 个氨基酸位点包含至少 1 个（例如 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个或 6 个）氨基酸缺失。优选地，本发明中所述突变的 CD27 胞内区近 C-末端的第 1-6 个氨基酸位点包含至少 1 个氨基酸（例如 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个或 6 个）的连续缺失。更优选地，本发明中所述突变的 CD27 胞内区包含近 C-末端的第 1-4 个氨基酸位点包含 4 个氨基酸的连续缺失。

本发明中的 CD27 胞内区经过上述突变，相比于野生型 CD27 胞内区，能够显著增加 CAR 细胞的扩增水平，进而提高对肿瘤的抑制效果。

在一些实施方案中，本发明中所述突变的 CD27 胞内区具有 SEQ ID NO:2 或 3 所示的氨基酸序列或与 SEQ ID NO:2 或 3 所示的氨基酸序列具有至少 90%、95%、97%或 99%或 100%的序列同一性。

除了本发明提供的突变的 CD27 胞内区外，本发明的嵌合抗原受体还可以包含一个或多个额外的共刺激结构域，其选自以下蛋白质的共刺激信号传导结构域：TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10、CARD11、CD2、CD7、CD8、CD18（LFA-1）、CD27、CD28、CD30、CD40、CD54(ICAM)、CD83、CD134(OX40)、CD137(4-1BB)、CD270(HVEM)、CD272(BTLA)、CD276(B7-H3)、CD278(ICOS)、CD357(GITR)、DAP10、DAP12、LAT、NKG2C、SLP76、PD-1、LIGHT、TRIM 或 ZAP70，优选选自 4-1BB、CD28、CD27、OX40、CD278 及其任意组合，更优选

选自 4-1BB 和 CD28。

在一些实施方案中，本发明的 CAR 包含突变的 CD27 胞内区作为共刺激结构域。在一些实施方案中，本发明的 CAR 包含突变的 CD27 胞内区和 4-1BB 胞内区作为共刺激结构域。在一些实施方案中，本发明的 CAR 包含突变的 CD27 胞内区和 CD28 胞内区作为共刺激结构域。

本领域技术人员已知的 4-1BB 和 CD28 共刺激结构域均可用于本发明。例如，4-1BB 共刺激结构域与 SEQ ID NO:17 或 18 所示的氨基酸序列具有至少 70%，优选至少 80%，更优选至少 90%、95%、97% 或 99% 或 100% 的序列同一性；CD28 共刺激结构域与 SEQ ID NO:16 所示的氨基酸序列具有至少 70%，优选至少 80%，更优选至少 90%、95%、97% 或 99% 或 100% 的序列同一性。

如本文所用，“配体结合结构域”是指可以与配体（例如抗原）结合的任何结构或其功能性变体。配体结合结构域可以是抗体结构，包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、重组抗体、人抗体、人源化抗体、鼠源抗体、嵌合抗体及其抗原结合片段。例如，配体结合结构域包括但不限于完整抗体、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv 片段、scFv 抗体片段、线性抗体、sdAb(例如 VH 或 VL)、纳米抗体(Nanobody, Nb)、重组纤连蛋白结构域、anticalin 和 DARPIN 等，优选选自 Fab、scFv、sdAb 和纳米抗体。在本发明中，配体结合结构域可以是单价或二价，且可以是单特异性、双特异性或多特异性的抗体。

“单链抗体”或“scFv”是由抗体重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)通过接头连接而成的抗体。可以选择接头的最佳长度和/或氨基酸组成。接头的长度会明显影响 scFv 的可变区折叠和相互作用情况。事实上，如果使用较短的接头(例如在 5-10 个氨基酸之间)，则可以防止链内折叠。关于接头的大小和组成的选择，参见例如，Hollinger 等人,1993Proc Natl Acad .Sci .U .S .A .90:6444-6448；美国专利申请公布号 2005/0100543、2005/0175606、2007/0014794；以及 PCT 公布号 WO2006/020258 和 WO2007/024715，其全文通过引用并入本文。scFv 可以包含以任何顺序连接的 VH 和 VL，例如 VH-接头-VL 或 VL-接头-VH。优选地，所述接头具有 SEQ ID NO:30 或 31 所示的氨基酸序列。

术语“功能性变体”或“功能性片段”是指基本上包含亲本的氨基酸序列但与该亲本氨基酸序列相比含有至少一个氨基酸修饰(即取代、缺失或插入)的变体，条件是所述变体保留亲本氨基酸序列的生物活性。例如，对于抗体，其功能性片段是其抗原结合部分。优选地，“功能性变体”或“功能性片段”与亲本氨基酸序列具有至少 75%，优选至少 76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 序列同一性，并且保留亲本氨基酸的生物活性，例如结合活性。

如本文所用，术语“序列同一性”表示两个(核苷酸或氨基酸)序列在比对中在相同位置处具有相同残基的程度，并且通常表示为百分数。优选地，同一性在被比较的序列的整体长度上确定。因此，具有完全相同序列的两个拷贝具有 100% 同一性。本领域技术人员将认识到，一些算法可以用于使用标准参数来确定序列同一性，例如 Blast (Altschul 等(1997)Nucleic Acids Res.25: 3389-3402)、Blast2(Altschul 等(1990)J.Mol.Biol.215: 403-410)、Smith-Waterman(Smith 等(1981)J.Mol.Biol .147: 195-197)和 ClustalW。

配体结合结构域的选择取决于待识别的与具体疾病状态相关的靶细胞上的细胞表面标记，例如肿瘤特异性抗原或肿瘤相关抗原。因此，在一些实施方案中，本发明的配体结合结构域与选自以下

的一个或多个靶标结合：ALK、ADRB3、AKAP-4、APRIL、ASGPR1、BCMA、B7H3、B7H4、B7H6、bcr-abl、BORIS、BST2、BAFF-R、BTLA、CD2、CD3、CD4、CD5、CD7、CD8、CD19、CD20、CD22、CD24、CD25、CD28、CD30、CD33、CD38、CD40、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD47、CD52、CD56、CD57、CD58、CD70、CD72、CD79a、CD79b、CD80、CD81、CD86、CD97、CD123、CD133、CD137、CD138、CD151、CD171、CD179a、CD300LF、CDH16、CSPG4、CS1、Claudin 6、Claudin 18.1、Claudin 18.2、CEA、CEACAM6、CLL1、c-Met、CAIX、CXORF61、CA125、CYP1B1、CS1、ELF2M、EGFR、EPCAM、EGFRvIII、EphA2、ERG/TMPRSS2ETS 融合基因、ETV6-AML、EMR2、EGP2、EGP40、FAP、FAR、FBP、FLT3、FOSL1、FCRL5、FCAR、Flt3、Flt4、Frizzled、GD2、GD3、gp100、gp130、GM3、GPC2、GPC3、GPC5D、GPR20、GloboH、GHRHR、GHR、GITR、Her2、HER3、HER-4、HMWMAA、HAVCR1、HPV E6,E7、HVEM、HIV-1Gag、HLA-A1、HLA-A2、IL6R、IL-11Ra、IL-13Ra、IGF-I 受体、LTPR、LIFRP、LRP5、IGLL1、IGF1R、KIT、Kappa Light Chain、KDR、LewisY、LMP2、LY6K、LAGE-1a、legumain、LCK、LAIR1、LILRA2、LY75、MSLN、MUC1、MUC16、MAGE-A1、MAGE3、MAD-CT-1、MelanA/MART1、ML-IAP、MYCN、mut hsp70-2、NCAM、NY-BR-1、NY-ESO-1、NA17、Notch-1-4、nAchR、NKG2D、NKG2D 配体、OY-TES1、OR51E2、OX40、PRSS21、PSCA、PD1、PD-L1、PD-L2、PSMA、Prostate、PAP、PDGFR-β、PCTA-1/半乳凝集素 8、p53、p53 突变体、prostein、PLAC1、PANX3、PAX3、PAX5、PTCH1、RANK、RAGE-1、ROR1、Ras 突变体、RhoC、RU1、RU2、Robo1、SSEA-4、SSX2、SART3、Sp17、TSHR、Tn Ag、TGS5、TEM1/CD248、TEM7R、TARP、TCR $\alpha$ 、TCR $\beta$ 、TGFB1、TGFB2、TNFRSF4、TWEAK-R、TLR7、TLR9、TAG72、TROP-2、Tie 2、TRP-2、TNFR1、TNFR2、TEM1、UPK2VEGFR、WT1、XAGE1、5T4、8H9、 $\alpha$ v $\beta$ 6 整合素、CA9、叶酸受体  $\alpha$ 、肝配蛋白 B2、酪氨酸酶、岩藻糖基 GM1、邻-乙酰-GD2、叶酸受体  $\beta$ 、多聚唾液酸、精子蛋白 17、存活蛋白和端粒酶、肉瘤易位断点、人端粒末端逆转录酶/hTERT、雄激素受体、肠羧基酯酶、细胞周期蛋白 B1、纤连蛋白、腱生蛋白、肿瘤坏死区的癌胚变体及其任意组合。优选地，所述配体结合结构域与选自以下的靶标结合：CD7、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD38、CD70、CD123、CD138、CD171、MUC1、MSLN、AFP、叶酸受体  $\alpha$ 、CEA、PSCA、PSMA、Her2、EGFR、IL-13Ra、GD2、NKG2D、Claudin 18.2、ROR1、EGFRvIII、CS1、BCMA 和 GPRC5D，更优选 CD19、Claudin 18.2、MSLN、GPRC5D、ROR1、CD7、CD70 和 BCMA。根据待靶向的抗原，本发明的 CAR 可以被设计为包括对该抗原具有特异性的配体结合结构域。例如，如果 CD19 是待靶向的抗原，则 CD19 抗体可用作本发明的配体结合结构域。

在一些实施方案中，本发明的嵌合抗原受体靶向 CD19。优选地，本发明的嵌合抗原受体包含抗 CD19 抗体。本领域中已知的靶向 CD19 的抗体均可用于本发明。在一些实施方案中，所述靶向 CD19 的抗体包含轻链可变区和重链可变区，其中所述重链可变区包含的 CDR1-H、CDR2-H 和 CDR3-H 与 SEQ ID NO:10 所包含的 CDR1-H、CDR2-H 和 CDR3-H 相同；其中所述轻链可变区包含的 CDR1-L、CDR2-L 和 CDR3-L 与 SEQ ID NO:11 所包含的 CDR1-L、CDR2-L 和 CDR3-L 相同。在一些实施方案中，所述重链可变区包含的 CDR1-H 如 SEQ ID NO:4 所示，CDR2-H 如 SEQ ID NO:5 所示，CDR3-H 如 SEQ ID NO:6 所示，所述轻链可变区包含的 CDR1-L 如 SEQ ID NO:7 所示，CDR2-L 如 SEQ ID NO:8

所示，CDR3-L 如 SEQ ID NO:9 所示。

在一些实施方案中，所述靶向 CD19 的抗体包含轻链可变区和重链可变区，所述重链可变区与 SEQ ID NO:10 具有至少 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 100%同一性，所述轻链可变区与 SEQ ID NO:11 具有至少 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 100%同一性。优选地，本发明中靶向 CD19 的抗体包含如 SEQ ID NO:10 所示的重链可变区和如 SEQ ID NO:11 所示的轻链可变区。

在一些实施方案中，所述靶向 CD19 的抗体与 SEQ ID NO:12 具有至少 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 100%同一性。优选地，所述靶向 CD19 的抗体如 SEQ ID NO:12 所示。

如本文所用，术语“跨膜结构域”是指能够使嵌合抗原受体在免疫细胞（例如淋巴细胞、NK 细胞或 NKT 细胞）表面上表达，并且引导免疫细胞针对靶细胞的细胞应答的多肽结构。跨膜结构域可以是天然或合成的，也可以源自任何膜结合蛋白或跨膜蛋白。当嵌合抗原受体与靶抗原结合时，跨膜结构域能够进行信号传导。特别适用于本发明中的跨膜结构域可以源自例如 TCR $\alpha$  链、TCR $\beta$  链、TCR $\gamma$  链、TCR $\delta$  链、CD3 $\zeta$  亚基、CD3 $\epsilon$  亚基、CD3 $\gamma$  亚基、CD3 $\delta$  亚基、CD45、CD4、CD5、CD8 $\alpha$ 、CD9、CD16、CD22、CD33、CD28、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154 及其功能性片段。或者，跨膜结构域可以是合成的并且可以主要地包含疏水性残基如亮氨酸和缬氨酸。优选地，所述跨膜结构域源自 CD8 $\alpha$  链或 CD28，其与 SEQ ID NO:13-15 任一所示的氨基酸序列具有至少 70%，优选至少 80%，更优选至少 90%、95%、97%或 99%或 100%的序列同一性。

如本文所用，术语“胞内信号传导结构域”是指转导效应子功能信号并指导细胞进行指定功能的蛋白质部分。胞内信号传导结构域负责在配体结合结构域结合抗原以后的细胞内信号传递，从而导致免疫细胞和免疫反应的活化。换言之，胞内信号传导结构域负责活化其中表达 CAR 的免疫细胞的正常的效应子功能的至少一种。例如，T 细胞的效应子功能可以是细胞溶解活性或辅助活性，包括细胞因子的分泌。

在一些实施方案中，本发明的嵌合抗原受体包含的胞内信号传导结构域可以是 T 细胞受体和共受体的细胞质序列，其在抗原受体结合以后一同起作用以引发信号传导，以及这些序列的任何衍生物或变体和具有相同或相似功能的任何合成序列。胞内信号传导结构域可以包含许多免疫受体酪氨酸激活基序 (ITAM)。本发明的胞内信号传导结构域的非限制性实施例包括但不限于源自 FcR $\gamma$ 、FcR $\beta$ 、CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 、CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\zeta$ 、CD22、CD79a、CD79b 和 CD66d 的那些。在优选的实施方式中，本发明 CAR 的信号传导结构域可以包含 CD3 $\zeta$  信号传导结构域，该信号传导结构域与 SEQ ID NO:19-22 任一所示的氨基酸序列具有至少 70%，优选至少 80%，更优选至少 90%、95%、97%或 99%或 100%的序列同一性。

在一些实施方案中，共刺激结构域和胞内信号传递结构域可以任何顺序可操作连接。例如，共刺激结构域可以位于近膜端，而胞内信号传导结构域位于远膜端，或者刺激结构域位于远膜端，而胞内信号传导结构域位于近膜端。当含有两个或更多个共刺激结构域时，共刺激结构域可以位于胞

内信号传递结构域的一侧或两侧。

在一些实施方案中，本发明的嵌合抗原受体还可以包含位于配体结合结构域和跨膜结构域之间的铰链区。如本文所用，术语“铰链区”一般是指作用为连接跨膜结构域至配体结合结构域的任何寡肽或多肽。具体地，铰链区用来为配体结合结构域提供更大的灵活性和可及性。铰链区可以包含最多达 300 个氨基酸，优选 10 至 100 个氨基酸并且最优选 25 至 50 个氨基酸。铰链区可以全部或部分源自天然分子，如全部或部分源自 CD8、CD4 或 CD28 的胞外区，或全部或部分源自抗体恒定区。或者，铰链区可以是对应于天然存在的铰链序列的合成序列，或可以是完全合成的铰链序列。在优选的实施方式中，所述铰链区包含 CD8 $\alpha$  链、Fc $\gamma$ RIII $\alpha$  受体、CD28、IgG4 或 IgG1 的铰链区部分，更优选来自 CD8 $\alpha$ 、CD28 或 IgG4 的铰链，其与 SEQ ID NO:23-26 任一所示的氨基酸序列具有至少 70%，优选至少 80%，更优选至少 90%、95%、97% 或 99% 或 100% 的序列同一性。

在一些实施方案中，本发明的 CAR 还可以包含信号肽，使得当其在细胞例如 T 细胞中表达时，新生蛋白质被引导至内质网并随后引导至细胞表面。信号肽的核心可以含有长的疏水性氨基酸区段，其具有形成单个  $\alpha$ -螺旋的倾向。在信号肽的末端，通常有被信号肽酶识别和切割的氨基酸区段。信号肽酶可以在移位期间或完成后切割，以产生游离信号肽和成熟蛋白。然后，游离信号肽被特定蛋白酶消化。可用于本发明的信号肽是本领域技术人员熟知的，例如衍生自 CD8 $\alpha$ 、IgG1、GM-CSFR $\alpha$ 、B2M 等的信号肽。在一些实施方案中，可用于本发明的信号肽与 SEQ ID NO:27-29 任一所示的氨基酸序列具有至少 70%，优选至少 80%，更优选至少 90%、95%、97% 或 99% 或 100% 的序列同一性。

在一些实施方案中，本发明的 CAR 还可以包含开关结构，以调控 CAR 的表达时间。例如，开关结构可以是二聚化结构域的形式，通过与其相应配体的结合引起构象变化，暴露胞外结合结构域，使其与被靶向抗原结合，从而激活信号传导通路。或者，也可以使用开关结构域分别连接结合结构域和信号传导结构域，仅当开关结构域互相结合（例如在诱导化合物的存在下）时，结合结构域和信号传导结构域才能通过二聚体连接在一起，从而激活信号通路。开关结构还可以是掩蔽肽的形式。掩蔽肽可以遮蔽胞外结合结构域，阻止其与被靶向抗原的结合，当通过例如蛋白酶切割掩蔽肽后，就可以暴露胞外结合结构域，使其成为一个“普通”的 CAR 结构。本领域技术人员知晓的各种开关结构均可用于本发明。

在一些实施方案中，本发明的 CAR 还可以包含自杀基因，即，使其表达一个可通过外源物质诱导的细胞死亡信号，以在需要时（例如产生严重的毒副作用时）清除 CAR 细胞。例如，自杀基因可以是插入的表位的形式，例如 CD20 表位、RQR8 等，当需要时，可以通过加入靶向这些表位的抗体或试剂来消除 CAR 细胞。自杀基因也可以是单纯疱疹病毒胸苷激酶（HSV-TK），该基因可使细胞在接受更昔洛韦治疗诱导下死亡。自杀基因还可以是 iCaspase-9，可以通过化学诱导药物如 AP1903、AP20187 等诱导 iCaspase-9 发生二聚化，从而激活下游的 Caspase3 分子，导致细胞凋亡。本领域技术人员知晓的各种自杀基因均可用于本发明。

### 核酸

本发明还提供一种核酸分子，其包含编码本发明的嵌合抗原受体的核酸序列。优选地，所述核酸是 DNA 或 RNA，更优选 DNA。

如本文所用，术语“核酸分子”包括核糖核苷酸和脱氧核糖核苷酸的序列，如经修饰的或未经修饰的 RNA 或 DNA，各自为单链和/或双链形式的线性或环状，或它们的混合物(包括杂合分子)。因此，根据本发明的核酸包括 DNA (比如 dsDNA、ssDNA、cDNA)、RNA(比如 dsRNA、ssRNA、mRNA、ivtRNA)，它们的组合或衍生物(比如 PNA)。优选地，所述核酸是 DNA 或 RNA，更优选 mRNA。

核酸可以包含常规的磷酸二酯键或非常规的键(如酰胺键，比如在肽核酸(PNA)中发现的)。本发明的核酸还可含有一种或多种经修饰的碱基，比如，例如三苯甲基化的碱基和不常见的碱基(比如肌苷)。也可以想到其它修饰，包括化学、酶促或代谢修饰，只要本发明的多链 CAR 可以从多核苷酸表达即可。核酸可以以分离的形式提供。在一些实施方案中，核酸也可以包括调节序列，比如转录控制元件(包括启动子、增强子、操纵子、抑制子和转录终止信号)、核糖体结合位点、内含子等。

可以对本发明的核酸序列进行密码子优化以在所需的宿主细胞(如，免疫细胞)中进行最佳表达；或者用于在细菌、酵母菌或昆虫细胞中表达。密码子优化是指将目标序列中存在的在给定物种的高度表达的基因中一般罕见的密码子替换为在这类物种的高度表达的基因中一般常见的密码子，而替换前后的密码子编码相同的氨基酸。因此，最佳密码子的选择取决于宿主基因组的密码子使用偏好。

### 载体

本发明还提供一种载体，包含如本发明所述的核酸分子。

如本文所用，术语“载体”是用作将(外源)遗传材料转移到宿主细胞中的媒介核酸分子，在该宿主细胞中所述核酸分子可以例如复制和/或表达。

载体一般包括靶向载体和表达载体。“靶向载体”是通过例如同源重组或使用特异性靶向位点处序列的杂合重组酶将分离的核酸递送至细胞内部的介质。“表达载体”是用于异源核酸序列(例如编码本发明的嵌合抗原受体多肽的那些序列)在合适的宿主细胞中的转录以及它们的 mRNA 的翻译的载体。可用于本发明的合适载体是本领域已知的，并且许多可商购获得。在一些实施方案中，本发明的载体包括但不限于质粒、病毒例如逆转录病毒、慢病毒、腺病毒、牛痘病毒、劳氏肉瘤病毒(RSV)、多瘤病毒和腺相关病毒(AAV)等、噬菌体、噬菌粒、粘粒和人工染色体(包括 BAC 和 YAC)。载体本身通常是核苷酸序列，通常是包含插入物(转基因)的 DNA 序列和作为载体“骨架”的较大序列。工程化载体通常还包含在宿主细胞中自主复制的起点(如果需要多核苷酸的稳定表达)、选择标记和限制酶切割位点(如多克隆位点 MCS)。载体可另外包含启动子、多聚腺苷酸尾(polyA)、3' UTR、增强子、终止子、绝缘子、操纵子、选择标记、报告基因、靶向序列和/或蛋白质纯化标签等元件。在一个具体的实施方案中，所述载体是体外转录的载体。

### 工程化免疫细胞

本发明提供工程化免疫细胞，其包含嵌合抗原受体或其编码核酸。

如本文所用，术语“免疫细胞”是指免疫系统的具有一种或多种效应子功能(例如，细胞毒性细胞杀伤活性、分泌细胞因子、诱导 ADCC 和/或 CDC)的任何细胞。免疫细胞可以从多种来源获得，包括外周血单核细胞、骨髓、淋巴结组织、脐血、胸腺组织、来自感染部位的组织、腹水、胸膜积液、脾组织及肿瘤。免疫细胞还可以衍生自成体干细胞、胚胎干细胞、脐带血干细胞、祖细胞、骨髓干细胞、诱导多能干细胞、全能干细胞或造血干细胞等干细胞。例如，免疫细胞可以是 T 细胞、巨噬

细胞、树突状细胞、中性粒细胞、单核细胞、NK 细胞和/或 NKT 细胞。优选地，免疫细胞是 T 细胞。T 细胞可以是任何 T 细胞，如体外培养的 T 细胞，例如原代 T 细胞，或者来自体外培养的 T 细胞系例如 Jurkat、SupT1 等的 T 细胞，或获得自受试者的 T 细胞。受试者的实例包括人、狗、猫、小鼠、大鼠及其转基因物种。T 细胞也可以被浓缩或纯化。T 细胞可以是任何类型的 T 细胞并且可以处于任何发育阶段，包括但不限于，CD4+/CD8+ 双阳性 T 细胞、CD4+ 辅助 T 细胞（例如 Th1 和 Th2 细胞）、CD8+ T 细胞（例如，细胞毒性 T 细胞）、肿瘤浸润细胞、记忆 T 细胞、幼稚 T 细胞、 $\gamma\delta$ -T 细胞、 $\alpha\beta$ -T 细胞等。优选地，免疫细胞是人 T 细胞、NK 细胞或 NKT 细胞。可以使用本领域技术人员已知的多种技术，如 Ficoll 分离从受试者的血液获得 T 细胞。在本发明中，免疫细胞被工程化以表达嵌合抗原受体多肽。

采用本领域已知的常规方法（如通过转导、转染、转化等）可以将编码嵌合抗原受体多肽的核酸序列引入免疫细胞，使其表达本发明的嵌合抗原受体多肽。“转染”是将核酸分子或多核苷酸（包括载体）引入靶细胞的过程。一个例子是 RNA 转染，即将 RNA（比如体外转录的 RNA，ivtRNA）引入宿主细胞的过程。该术语主要用于真核细胞中的非病毒方法。术语“转导”通常用于描述病毒介导的核酸分子或多核苷酸的转移。动物细胞的转染通常涉及在细胞膜中打开瞬时的孔或“洞”，以允许摄取材料。可以使用磷酸钙、通过电穿孔、通过细胞挤压或通过将阳离子脂质与材料混合以产生与细胞膜融合并将它们的运载物沉积入内部的脂质体，进行转染。用于转染真核宿主细胞的示例性技术包括脂质囊泡介导的摄取、热休克介导的摄取、磷酸钙介导的转染（磷酸钙/DNA 共沉淀）、显微注射和电穿孔。术语“转化”用于描述核酸分子或多核苷酸（包括载体）向细菌中、也向非动物真核细胞（包括植物细胞）中的非病毒转移。因此，转化是细菌或非动物真核细胞的基因改变，其通过细胞膜从其周围直接摄取并随后并入外源遗传材料（核酸分子）而产生。转化可以通过人工手段实现。为了发生转化，细胞或细菌必须处于感受态的状态。对于原核转化，技术可包括热休克介导的摄取、与完整细胞的细菌原生质体融合、显微注射和电穿孔。

在一些实施方案中，本发明的工程化免疫细胞的内源性 HLA-I 类基因和/或 HLA-II 类基因的表达未被修饰。即，没有通过任何人工干预的方法（基因编辑或非基因编辑）来改变任何一种内源性 HLA-I 类基因和/或 HLA-II 类基因的表达水平。

在一些实施方案中，本发明的工程化免疫细胞的至少一种内源性 HLA-I 类基因的表达被抑制或沉默。在一些实施方案中，本发明的工程化免疫细胞的至少一种内源性 HLA-II 类基因的表达被抑制或沉默。在一些实施方案中，本发明的工程化免疫细胞的至少一种内源性 TCR/CD3 基因的表达被抑制或沉默。在一些实施方案中，本发明的工程化免疫细胞的至少一种内源性 TCR/CD3 基因和至少一种内源性 HLA-I 类基因的表达被抑制或沉默。在一些实施方案中，本发明的工程化免疫细胞的至少一种内源性 HLA-I 类和 HLA-II 类基因的表达被抑制或沉默。在一些实施方案中，本发明的工程化免疫细胞的至少一种内源性 TCR/CD3 基因，至少一种内源性 HLA-I 类基因和至少一种内源性 HLA-II 类基因的表达被抑制或沉默。优选地，所述 HLA-I 类基因选自 HLA-A、HLA-B、HLA-C 和 B2M。优选地，所述 HLA-II 类基因选自 HLA-DPA、HLA-DQ、HLA-DRA、TAP1、TAP2、LMP2、LMP7、RFX5、RFXAP、RFXANK 和 CIITA，优选选自 RFX5、RFXAP、RFXANK 和 CIITA。优选地，所述

TCR/CD3 基因选自 TRAC、TRBC、CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 、CD3 $\epsilon$  和 CD3 $\zeta$ 。

在一些实施方案中，本发明的工程化免疫细胞的一个或多个选自以下内源性基因的表达被抑制或沉默：CD52、GR、dCK 和免疫检查点基因，如 PD1、LAG3、TIM3、CTLA4、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、HAVCR2、BTLA、CD160、TIGIT、CD96、CRTAM、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、TGFBRII、TGFRBRI、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、EIF2AK4、CSK、PAG1、SIT、FOXP3、PRDM1、BATF、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2 和 GUCY1B3。

抑制基因表达或使基因沉默的方法是本领域技术人员熟知的，包括但不限于例如通过大范围核酸酶、锌指核酸酶、TALEN、CRISPR/Cas 系统、碱基编辑器介导 DNA 或 RNA 断裂，或通过反义寡核苷酸、RNAi、shRNA、转座子、突变等技术使基因失活。

### 药物组合物

在第三个方面，本发明还提供一种药物组合物，其包含本发明所述的嵌合抗原受体、核酸、载体或工程化免疫细胞作为活性剂，和一种或多种药学上可接受的赋型剂。因此，本发明还涵盖所述嵌合抗原受体、核酸、载体或工程化免疫细胞在制备药物组合物或药物中的用途。

如本文所用，术语“药学上可接受的赋型剂”是指在药理学和/或生理学上与受试者和活性成分相容（即，能够引发所需的治疗效果而不会引起任何不希望的局部或全身作用）的载体和/或赋型剂，其是本领域公知的（参见例如 Remington's Pharmaceutical Sciences, Edited by Gennaro AR, 19th ed. Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995）。药学上可接受的赋型剂的实例包括但不限于填充剂、粘合剂、崩解剂、包衣剂、吸附剂、抗粘附剂、助流剂、抗氧化剂、调味剂、着色剂、甜味剂、溶剂、共溶剂、缓冲剂、螯合剂、表面活性剂、稀释剂、润湿剂、防腐剂、乳化剂、包覆剂、等渗剂、吸收延迟剂、稳定剂和张力调节剂。本领域技术人员已知选择合适的赋型剂以制备本发明期望的药物组合物。用于本发明的药物组合物中的示例性赋型剂包括盐水、缓冲盐水、葡萄糖和水。通常，合适的赋型剂的选择尤其取决于所使用的活性剂、待治疗的疾病和药物组合物的期望剂型。

根据本发明的药物组合物可适用于多种途径施用。通常，通过胃肠外完成施用。胃肠外递送方法包括局部、动脉内、肌内、皮下、髓内、鞘内、心室内、静脉内、腹膜内、子宫内、阴道内、舌下或鼻内施用。

根据本发明的药物组合物也可以制备成各种形式，如固态、液态、气态或冻干形式，特别可以是软膏、乳膏、透皮贴剂、凝胶、粉末、片剂、溶液、气雾剂、颗粒、丸剂、混悬剂、乳剂、胶囊、糖浆、酏剂、浸膏剂、酊剂或流浸膏提取物的形式，或者是特别适用于所需施用方法的形式。本发明已知的用于生产药物的过程可包括例如常规混合、溶解、制粒、制糖衣、研磨、乳化、包封、包埋或冻干过程。包含例如本文所述的免疫细胞的药物组合物通常以溶液形式提供，并且优选包含药学上可接受的缓冲剂。

根据本发明的药物组合物还可以与一种或多种适用于治疗和/或预防待治疗疾病的其它药剂组合施用。适用于组合的药剂的优选实例包括已知的抗癌药物，比如顺铂、美登素衍生物、雷查霉素 (rachelmycin)、卡里奇霉素 (calicheamicin)、多西紫杉醇、依托泊苷、吉西他滨、异环磷酰胺、伊立

替康、美法仑、米托蒽醌、sorfimer 吡啉钠 II(sorfimer sodiumphotofrin II)、替莫唑胺、拓扑替康、葡萄糖醛酸曲美沙特(trimetreate glucuronate)、奥利斯他汀 E(auristatin E)、长春新碱和阿霉素；肽细胞毒素，比如蓖麻毒素、白喉毒素、假单胞菌细菌外毒素 A、DNA 酶和 RNA 酶；放射性核素，比如碘 131、铯 137、铟 111、铪 90、铋 210 和 213、钷 225 和钷 213；前药，比如抗体定向的酶前药；免疫刺激剂，比如 IL-2，趋化因子比如 IL-8、血小板因子 4、黑色素瘤生长刺激蛋白等；抗体或其片段，比如抗 CD3 抗体或其片段，补体活化剂，异种蛋白结构域，同种蛋白结构域，病毒/细菌蛋白结构域和病毒/细菌肽。此外，本发明的药物组合物还可以与其他一种或多种治疗方法，例如化疗、放疗组合使用。

#### 制备工程化免疫细胞的方法

在第四个方面，本发明还提供一种制备工程化免疫细胞的方法，包括将本发明的嵌合抗原受体或其编码核酸序列引入免疫细胞，以使所述免疫细胞表达本发明的嵌合抗原受体。

在一些实施方案中，所述免疫细胞是人免疫细胞，更优选人 T 细胞、巨噬细胞、树突状细胞、中性粒细胞、单核细胞、NK 细胞和/或 NKT 细胞。

将核酸或载体引入免疫细胞并进行表达的方法是本领域已知的。例如，可以通过物理方法，如磷酸钙沉淀法、脂质转染法、粒子轰击法、显微注射法、电穿孔法等将核酸或载体导入免疫细胞。或者，也可以采用化学方法，如通过胶体分散系统，如大分子复合物、纳米胶囊、微球、珠粒以及基于脂质的系统，包括水包油乳液、胶束、混合胶束及脂质体引入核酸或载体。此外，还可以使用生物方法引入核酸或载体。例如，病毒载体，尤其是逆转录病毒载体等已经成为将基因插入哺乳动物，例如人细胞中的最常用方法。其它病毒载体可以来源于慢病毒、痘病毒、单纯疱疹病毒 I、腺病毒及腺相关病毒等。

将核酸或载体引入免疫细胞后，本领域技术人员可以通过常规技术对所得免疫细胞进行扩增和活化。

#### 制药用途/治疗应用

本发明还提供一种治疗患有癌症、感染或自身免疫性疾病的受试者的方法，包括向所述受试者施用有效量的根据本发明所述的嵌合抗原受体、核酸分子、载体、工程化免疫细胞或药物组合物。因此，本发明还涵盖所述嵌合抗原受体、核酸分子、载体或工程化免疫细胞在制备治疗癌症、感染或自身免疫性疾病的药物中的用途。

在一些实施方案中，直接向受试者施用有效量的本发明的免疫细胞和/或药物组合物。

在另一个实施方案中，本发明的治疗方法是离体治疗。具体地，该方法包括以下步骤：(a) 提供受试者的样品，所述样品包含免疫细胞；(b) 在体外将本发明的嵌合抗原受体引入所述免疫细胞，获得经修饰的免疫细胞，(c) 向有此需要的受试者施用所述经修饰的免疫细胞。优选地，步骤(a)中提供的免疫细胞选自 T 细胞、NK 细胞和/或 NKT 细胞；并且所述免疫细胞可以通过本领域已知的常规方法从受试者的样品(特别是血液样品)中获得。然而，也可以使用能够表达本发明的嵌合抗原受体并发挥如本文所述的所需生物效应功能的其它免疫细胞。此外，通常选择的免疫细胞与受试者的免疫系统相容，即优选所述免疫细胞不引发免疫原性响应。例如，可以使用“通用接受体细胞”，即发挥所

需生物效应功能的普遍相容的可在体外生长和扩增的淋巴细胞。使用此类细胞将不需要获得和/或提供受试者自身淋巴细胞。步骤(c)的离体引入可以通过经由电穿孔将本文所述的核酸或载体引入免疫细胞或通过用病毒载体感染免疫细胞来实施,所述病毒载体为如前所述的慢病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体或逆转录病毒载体。其它可想到的方法包括使用转染试剂(比如脂质体)或瞬时 RNA 转染。

在一些实施方案中,所述免疫细胞是自体或同种异体的细胞,优选 T 细胞、巨噬细胞、树突状细胞、中性粒细胞、单核细胞、NK 细胞和/或 NKT 细胞,更优选 T 细胞、NK 细胞或 NKT 细胞。

如本文所用,术语“自体”是指来源于个体的任何材料稍后将被再引入该相同个体中。

如本文所用,术语“同种异体”是指任何材料来源于与引入该材料的个体相同物种的不同动物或不同患者。当在一个或多个基因座处的基因不同时,认为两个或更多个体彼此为同种异体的。在一些情况下,来自同一物种的各个体的同种异体材料在基因上的不同可能足以发生抗原相互作用。

如本文所用,术语“受试者”是哺乳动物。哺乳动物可以是人、非人灵长类动物、小鼠、大鼠、狗、猫、马或牛,但不限于这些实例。除人以外的哺乳动物可以有利地用作代表癌症动物模型的受试者。优选地,所述受试者是人。

在一些实施方案中,所述癌症是与配体结合结构域结合的靶标表达有关的癌症。例如,所述癌症包括但不限于:脑神经胶质瘤、胚细胞瘤、肉瘤、基底细胞癌、胆道癌、膀胱癌、骨癌、脑和 CNS 癌症、乳腺癌、腹膜癌、宫颈癌、绒毛膜癌、结肠和直肠癌、结缔组织癌症、消化系统的癌症、子宫内膜癌、食管癌、眼癌、头颈癌、胃癌(包括胃肠癌)、胶质母细胞瘤(GBM)、肝癌、肝细胞瘤、上皮内肿瘤、肾癌、喉癌、肝肿瘤、肺癌(例如小细胞肺癌、非小细胞肺癌、腺状肺癌和鳞状肺癌)、黑色素瘤、骨髓瘤、神经母细胞瘤、口腔癌(例如唇、舌、口和咽)、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、间皮瘤、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、直肠癌、呼吸系统的癌症、唾液腺癌、皮肤癌、鳞状细胞癌、胃癌、睾丸癌、甲状腺癌、子宫或子宫内膜癌、泌尿系统的恶性肿瘤、外阴癌、Waldenstrom 巨球蛋白血症、淋巴瘤(包括霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤,例如 B 细胞淋巴瘤(包括低级/滤泡性非霍奇金淋巴瘤(NHL)、小淋巴细胞性(SL)NHL、中间级/滤泡性 NHL、中间级扩散性 NHL、高级成免疫细胞性 NHL、高级成淋巴细胞性 NHL、高级小型非裂化细胞性 NHL、大肿块病 NHL)、套细胞淋巴瘤、AIDS 相关淋巴瘤、伯基特氏淋巴瘤、弥散性大 B 细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、MALT 淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、浆母细胞性淋巴瘤、浆细胞样树突状细胞瘤等)、白血病(包括急性白血病,例如急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞白血病、急性非淋巴细胞白血病诸如急性粒细胞白血病(包括未分化型和部分分化型)、急性早幼粒细胞白血病、急性粒-单核细胞白血病、急性单核细胞白血病、红白血病、急性巨核细胞白血病;慢性白血病,例如慢性髓细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、慢性单核细胞白血病;和其他特殊类型的白血病例如毛细胞白血病、幼淋巴细胞白血病、浆细胞白血病、成人 T 细胞白血病、嗜酸性粒细胞白血病、嗜碱性粒细胞白血病等)、母细胞性浆细胞样树突状细胞瘤、恶性淋巴组织增生疾病、骨髓发育不良、多发性骨髓瘤、骨髓增生异常、以及移植后淋巴细胞增生性紊乱(PTLD);以及其他与靶标表达有关的疾病。优选地,可以用本发明的工程化免疫细胞或药物组合物治疗的疾病选自:白血病、淋巴瘤、多发性骨髓瘤、脑神经胶质瘤、胰腺癌、卵巢癌、

间皮瘤、乳腺癌、肺癌、前列腺癌、黑色素瘤、骨髓瘤、肉瘤、胃癌等。

在一些实施方案中，所述感染包括但不限于由病毒、细菌、真菌和寄生虫引起的感染。

在一些实施方案中，所述自身免疫性疾病包括但不限于 I 型糖尿病、腹腔疾病、格雷夫斯病、炎症性肠病、多发性硬化症、银屑病、类风湿性关节炎、艾迪生病、干燥综合征、桥本甲状腺炎、重症肌无力、血管炎、恶性贫血与系统性红斑狼疮等。

在一些实施方案中，所述方法还进一步包括向所述受试者施用一种或多种额外的化疗剂、生物制剂、药物或治疗。在该实施方案中，化疗剂、生物制剂、药物或治疗选自放射疗法、手术、抗体试剂和/或小分子和它们的任意组合。

下面结合具体实施例和附图，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例和附图仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，或按照制造厂商所建议的条件。

#### 附图说明

图 1: 通过流式细胞术测定的 CAR-T 细胞的 scFv 表达水平。

图 2: CAR-T 细胞对靶细胞的杀伤效果。

图 3: CAR-T 细胞分别与靶细胞共培养后的 IL-2 释放水平。

图 4: CAR-T 细胞体外长期对靶细胞的杀伤效果。

图 5: CAR-T 细胞多次与肿瘤细胞共培养后扩增曲线。

#### 具体实施方式

##### 实施例 1: 构建 CAR T 细胞

合成以下编码序列，并将其依次克隆至 pGEM-T Easy 载体：CD8 $\alpha$  信号肽（SEQ ID NO:28）、抗 CD19 scFv（SEQ ID NO:12）、CD8 $\alpha$  铰链区（SEQ ID NO:24）、CD8 $\alpha$  跨膜区（SEQ ID NO:14）、CD27 共刺激结构域（SEQ ID NO:1）、CD3 $\zeta$  胞内信号传导结构域（SEQ ID NO:20），获得 CAR19-27 质粒，并通过测序确认目标序列的正确插入。用同样的方法获得 CAR19-27 (-4)、CAR19-27K4R 质粒，其与 CAR19-27 质粒的区别在于，胞内段分别减掉 4 个氨基酸（SEQ ID NO:3）或将胞内段第四个氨基酸 K 突变为 R（SEQ ID NO:2）。

在无菌管中加入 3ml Opti-MEM（Gibco，货号 31985-070）稀释上述质粒后，再根据质粒：病毒包装载体：病毒包膜载体=4:2:1 的比例加入包装载体 psPAX2（Addgene，货号 12260）和包膜载体 pMD2.G（Addgene，货号 12259）。然后，加入 120ul X-treme GENE HP DNA 转染试剂（Roche，货号 06366236001），立即混匀，于室温下孵育 15min，然后将质粒/载体/转染试剂混合物逐滴加入到 293T 细胞的培养瓶中。在 24 小时和 48 小时收集病毒，将其合并后，超速离心（25000g，4 $^{\circ}$ C，2.5 小时）获得浓缩的慢病毒。

用 DynaBeads CD3/CD28 CTSTM（Gibco, 货号 40203D）激活 T 细胞，并在 37 $^{\circ}$ C 和 5%CO $_2$  下培养 1 天。然后，加入浓缩的慢病毒，持续培养 3 天后，分别获得靶向 CD19 的 CAR19-27 T 细胞、CAR19-27 (-4) T 细胞和 CAR19-27K4R T 细胞。

在 37°C 和 5% CO<sub>2</sub> 下培养 12 天之后，使用 Fluorescein (FITC) AffiniPure Rabbit Anti-Mouse IgG, F(ab')<sub>2</sub> fragment specific (Jackson ImmunoResearch, 货号 315-095-006) 作为一抗，通过流式细胞仪检测 CAR T 细胞上的 scFv 的表达水平，结果如图 1 所示 (NT 是未经修饰的野生型 T 细胞)。

可以看出，包含不同的突变的 CD27 胞内区的 CAR T 细胞均可以有效表达 scFv。

## 实施例 2: CAR T 细胞对靶细胞的杀伤效果和细胞因子释放

### 2.1 CAR T 细胞对靶细胞的杀伤效果

当 T 细胞对靶细胞有杀伤时，靶细胞的数量就会减少。将 T 细胞和带有可表达荧光素酶的靶细胞共培养后，靶细胞数量减少的同时，分泌的荧光素酶也会随之减少。荧光素酶可以催化荧光素转化为氧化性荧光素，而在此氧化过程中，会产生生物发光，并且这种发光的强度将取决于靶细胞表达的荧光素酶的水平。因此，检测的荧光强度能够反应 T 细胞对靶细胞的杀伤能力。

为了检测 CAR T 细胞对靶细胞的杀伤能力，首先以  $1 \times 10^4$ /孔将携带荧光素基因的 Raji 靶细胞铺入 96 孔板中，然后以分别以不同的效靶比 (即效应 T 细胞与靶细胞之比) 将 CAR19-27 T 细胞、CAR19-27 (-4) T 细胞、CAR19-27K4R T 细胞和 NT 细胞铺入到 96 孔板进行共培养，16-18 小时后利用酶标仪测定 Raji 靶细胞的荧光值。根据计算公式: (靶细胞荧光均值-样品荧光均值)/靶细胞荧光均值  $\times 100\%$ ，计算得到杀伤效率，结果如图 2 所示。

可以看出，与 NT 组相比，CAR19-27 T 细胞、CAR19-27 (-4) T 细胞、CAR19-27K4R T 细胞对靶细胞均有特异性杀伤的能力，且无显著性差异。

### 2.2 CAR T 细胞的细胞因子释放

T 细胞杀伤靶细胞时，靶细胞数量减少的同时也会释放细胞因子 (例如 IL-2 和 IFN- $\gamma$  等)。根据以下步骤，使用酶联免疫吸附法 (ELISA) 来测定 CAR T 细胞杀伤靶细胞时细胞因子 IL-2 的释放水平。

#### (1) 收集细胞共培养上清液

以  $1 \times 10^5$ /孔将靶细胞 (Raji) 铺于 96 孔板中，然后以 1:1 的比例将 CAR19-27 T 细胞、CAR19-27 (-4) T 细胞、CAR19-27K4R T 细胞和 NT 细胞分别与 Raji 细胞共培养，18-24 小时后收集细胞共培养上清液。

#### (2) ELISA 检测上清中 IL-2 分泌量

使用捕获抗体 Purified anti-human IL-2 Antibody (R&D, 货号 DY202) 包被 96 孔板 4°C 孵育过夜，然后移除抗体溶液，加入 250  $\mu$ L 含有 2% BSA (Sigma, 货号 V900933-1kg) 的 PBST (含 0.1% 吐温的 1XPBS) 溶液，37°C 孵育 2 小时。然后用 250  $\mu$ L PBST (含 0.1% 吐温的 1XPBS) 清洗板 3 次。每孔加入 50  $\mu$ L 细胞共培养上清液或标准品，并在 37°C 孵育 1 小时，然后用 250  $\mu$ L PBST (含 0.1% 吐温的 1XPBS) 清洗板 3 次。然后向各孔分别加入 50  $\mu$ L 检测抗体 Anti-IL-2 抗体 (R&D, 货号 DY202)，在 37°C 孵育 1 小时后，用 250  $\mu$ L PBST (含 0.1% 吐温的 1XPBS) 清洗板 3 次。再加入 HRP Streptavidin (Biolegend, 货号 405210)，在 37°C 孵育 30 分钟后，弃上清液，加入 250  $\mu$ L PBST (含 0.1% 吐温的 1XPBS)，清洗 5 次。向各孔加入 50  $\mu$ L TMB 底物溶液。使反应在室温下于暗处发生 30 分钟，之后向各孔中加入 50  $\mu$ L 1mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 以停止反应。在停止反应的 30 分钟内，使用酶标仪检测 450nm

处吸光度，并根据标准曲线（根据标准品的读值和浓度绘制）计算细胞因子的含量，结果如图 3 所示。

可以看出，与 NT 组相比，CAR19-27 T 细胞、CAR19-27 (-4) T 细胞和 CAR19-27K4R T 均可特异性分泌 IL-2，且 CAR19-27 (-4) T 细胞和 CAR19-27K4R T 细胞 IL-2 的释放水平均显著高于 CAR19-27 T 细胞。值得关注的是，CAR19-27 (-4) T 细胞的 IL-2 的释放水平相较于 CAR19-27 T 细胞和 CAR19-27K4R T 均显著提高。

### 实施例 3 CAR T 长期杀伤肿瘤细胞的能力

以  $5 \times 10^5$ /孔将靶细胞(Raji)铺于 48 孔板中，然后以 E:T=1:2 的比例将 CAR19-27 T 细胞、CAR19-27 (-4) T 细胞、CAR19-27K4R T 细胞与 Raji 细胞共培养，并分别在培养后 D3，D6 和 D10 补加 Raji 细胞 (E:T=1:1)，每次补加 Raji 细胞前通过流式检测肿瘤细胞残留评估各组 CAR T 对肿瘤的杀伤能力，并同时记录各组 CAR T 的扩增曲线，结果如图 4 和图 5 所示。

可以看出，CAR19-27 (-4) T 细胞、CAR19-27K4R T 细胞长期杀伤肿瘤的能力和扩增曲线均显著优于 CAR19-27 T 组，且 CAR19-27K4R T 细胞优于 CAR19-27K4R T 细胞。

以上结果表明，与野生型 CD27 胞内区相比，本发明中包含突变的 CD27 胞内区的 CAR-T 细胞，能够促进细胞因子的分泌和免疫细胞的扩增，增强免疫细胞长期杀伤肿瘤的能力。

需要说明的是，以上仅为本发明的优选实施例而已，并不用于限制本发明，对于本领域的技术人员来说，本发明可以有各种更改和变化。本领域技术人员理解的是，凡在本发明的精神和原则之内，所作的任何修改、等同替换、改进等，均应包含在本发明的保护范围之内。

## 权利要求书

1.一种嵌合抗原受体,其包含配体结合结构域、跨膜结构域、共刺激结构域和胞内信号传导结构域,其中所述共刺激结构域包含突变的CD27胞内区;与野生型CD27胞内区相比,所述突变的CD27胞内区包含至少1个赖氨酸突变,或近C-末端的第1-6个氨基酸位点包含至少1个氨基酸缺失。

2.权利要求1所述的嵌合抗原受体,其中所述突变的CD27胞内区包含C-末端的第4位赖氨酸残基的缺失或取代,或近C-末端的第1-6个氨基酸位点包含至少1个氨基酸的连续缺失。

3.权利要求1或2所述的嵌合抗原受体,其中所述突变的CD27胞内区具有SEQ ID NO:2或3所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:2或3所示的氨基酸序列具有至少90%的序列同一性。

4.权利要求1-3任一项所述的嵌合抗原受体,其中所述共刺激结构域进一步包含选自以下蛋白的信号传导结构域:TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10、CARD11、CD2、CD7、CD8、CD18(LFA-1)、CD27、CD28、CD30、CD40、CD54(ICAM)、CD83、CD134(OX40)、CD137(4-1BB)、CD270(HVEM)、CD272(BTLA)、CD276(B7-H3)、CD278(ICOS)、CD357(GITR)、DAP10、DAP12、LAT、NKG2C、SLP76、PD-1、LIGHT、TRIM、ZAP70以及它们的组合。

5.权利要求4所述的嵌合抗原受体,其中所述共刺激结构域进一步包含CD28、CD134、CD137或CD278的信号传导结构域或它们的组合。

6.权利要求1-5任一项所述的嵌合抗原受体,其中所述胞内信号传导结构域选自以下蛋白的信号传导结构域:FcR $\gamma$ 、FcR $\beta$ 、CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 、CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\zeta$ 、CD22、CD79a、CD79b和CD66d。

7.权利要求1-6任一项所述的嵌合抗原受体,其中所述跨膜结构域选自以下蛋白质的跨膜结构域:TCR $\alpha$ 链、TCR $\beta$ 链、TCR $\gamma$ 链、TCR $\delta$ 链、CD3 $\zeta$ 亚基、CD3 $\epsilon$ 亚基、CD3 $\gamma$ 亚基、CD3 $\delta$ 亚基、CD45、CD4、CD5、CD8 $\alpha$ 、CD9、CD16、CD22、CD33、CD28、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137和CD154。

8.权利要求1-7任一项所述的嵌合抗原受体,其中所述配体结合结构域是抗体或其抗原结合部分。

9.权利要求8所述的嵌合抗原受体,其中所述抗原结合部分选自完整抗体、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fd、Fd'、Fv、scFv、sdFv、线性抗体、纳米抗体、双体和sdAb。

10.权利要求1-9任一项所述的嵌合抗原受体,其中所述配体结合结构域与选自以下的靶标结合:ALK、ADRB3、AKAP-4、APRIL、ASGPR1、BCMA、B7H3、B7H4、B7H6、bcr-abl、BORIS、BST2、BAFF-R、BTLA、CD2、CD3、CD4、CD5、CD7、CD8、CD19、CD20、CD22、CD24、CD25、CD28、CD30、CD33、CD38、CD40、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD47、CD52、CD56、CD57、CD58、CD70、CD72、CD79a、CD79b、CD80、CD81、CD86、CD97、CD123、CD133、CD137、CD138、CD151、CD171、CD179a、CD300LF、CDH16、CSPG4、CS1、Claudin 6、Claudin 18.1、Claudin 18.2、CEA、CEACAM6、CLL1、c-Met、CAIX、CXORF61、CA125、CYP1B1、CS1、ELF2M、EGFR、EPCAM、EGFRvIII、EphA2、ERG/TMPRSS2ETS融合基因、ETV6-AML、EMR2、EGP2、EGP40、FAP、FAR、FBP、FLT3、FOSL1、FCRL5、FCAR、Flt3、Flt4、Frizzled、GD2、GD3、gp100、gp130、GM3、GPC2、GPC3、GPC5D、GPR20、GloboH、GHRHR、GHR、GITR、Her2、HER3、HER-4、

HMWMAA、HAVCR1、HPV E6,E7、HVEM、HIV-1Gag、HLA-A1、HLA-A2、IL6R、IL-11Ra、IL-13Ra、IGF-I 受体、LTPR、LIFRP、LRP5、IGLL1、IGF1R、KIT、Kappa Light Chain、KDR、LewisY、LMP2、LY6K、LAGE-1a、legumain、LCK、LAIR1、LILRA2、LY75、MSLN、MUC1、MUC16、MAGE-A1、MAGE3、MAD-CT-1、MelanA/MART1、ML-IAP、MYCN、mut hsp70-2、NCAM、NY-BR-1、NY-ESO-1、NA17、Notch-1-4、nAchR、NKG2D、NKG2D 配体、OY-TES1、OR51E2、OX40、PRSS21、PSCA、PD1、PD-L1、PD-L2、PSMA、Prostate、PAP、PDGFR- $\beta$ 、PCTA-1/半乳凝集素 8、p53、p53 突变体、prostein、PLAC1、PANX3、PAX3、PAX5、PTCH1、RANK、RAGE-1、ROR1、Ras 突变体、RhoC、RU1、RU2、Robo1、SSEA-4、SSX2、SART3、Sp17、TSHR、Tn Ag、TGS5、TEM1/CD248、TEM7R、TARP、TCR $\alpha$ 、TCR $\beta$ 、TGFB1、TGFB2、TNFRSF4、TWEAK-R、TLR7、TLR9、TAG72、TROP-2、Tie 2、TRP-2、TNFR1、TNFR2、TEM1、UPK2VEGFR、WT1、XAGE1、5T4、8H9、 $\alpha\beta$ 6 整合素、CA9、叶酸受体  $\alpha$ 、肝配蛋白 B2、酪氨酸酶、岩藻糖基 GM1、邻-乙酰-GD2、叶酸受体  $\beta$ 、多聚唾液酸、精子蛋白 17、存活蛋白和端粒酶、肉瘤易位断点、人端粒末端逆转录酶/hTERT、雄激素受体、肠羧基酯酶、细胞周期蛋白 B1、纤连蛋白、髓生蛋白、肿瘤坏死区的癌胚变体及其任意组合。

11.一种核酸分子，其编码权利要求 1-10 任一项所述的嵌合抗原受体。

12.一种载体，其包含权利要求 11 所述的核酸分子。

13.一种工程化免疫细胞，其包含权利要求 1-10 任一项所述的嵌合抗原受体或权利要求 11 所述的核酸分子。

14.权利要求 13 所述的工程化免疫细胞，其中所述免疫细胞选自 T 细胞、巨噬细胞、树突状细胞、中性粒细胞、单核细胞、NK 细胞或 NKT 细胞。

15.权利要求 14 所述的工程化免疫细胞，其中所述 T 细胞是 CD4+/CD8+ 双阳性 T 细胞、CD4+ 辅助 T 细胞、CD8+T 细胞、肿瘤浸润细胞、记忆 T 细胞、幼稚 T 细胞、 $\gamma\delta$ -T 细胞或  $\alpha\beta$ -T 细胞。

16.权利要求 13-15 任一项所述的工程化免疫细胞，其中所述免疫细胞衍生自成体干细胞、胚胎干细胞、脐带血干细胞、祖细胞、骨髓干细胞、诱导多能干细胞、全能干细胞或造血干细胞。

17.根据权利要求 13-16 任一项所述的工程化细胞，其中所述工程化细胞中，内源性 HLA-I 类基因、HLA-II 类基因、TCR/CD3 基因中的一种或多种基因的表达被抑制或沉默。

18.根据权利要求 17 所述的工程化细胞，其中所述 HLA-I 类基因选自 HLA-A、HLA-B、HLA-C、B2M 及其任意组合；所述 HLA-II 类基因选自 HLA-DPA、HLA-DQ、HLA-DRA、TAP1、TAP2、LMP2、LMP7、RFX5、RFXAP、RFXANK、CIITA 及其任意组合；所述 TCR/CD3 基因选自 TRAC、TRBC、CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 、CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\zeta$  及其任意组合。

19.一种药物组合物，其包含权利要求 13-18 任一项所述的工程化免疫细胞，和一种或多种药理学上可接受的赋型剂。

20.权利要求 1-10 任一项所述的嵌合抗原受体、权利要求 11 所述的核酸分子、权利要求 12 所述的载体、权利要求 13-18 任一项所述的工程化免疫细胞、或权利要求 19 所述的药物组合物在制备用于治疗癌症、感染或自身免疫性疾病的药物中的用途。

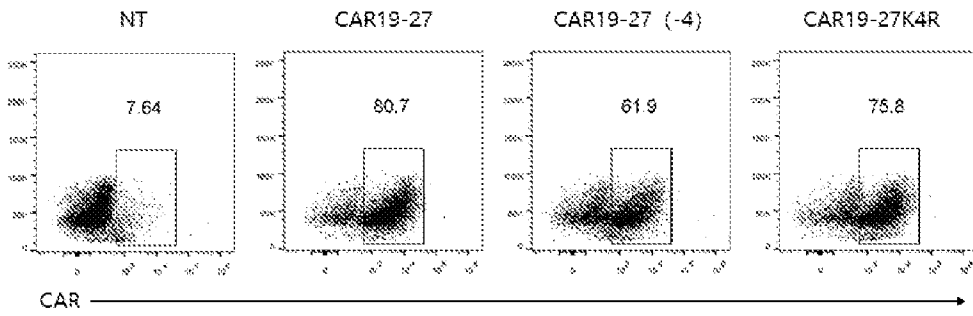


图 1

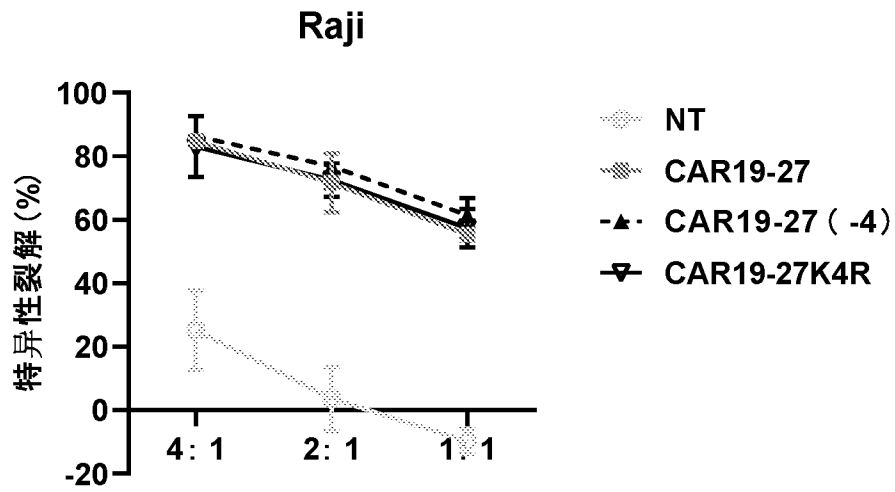


图 2

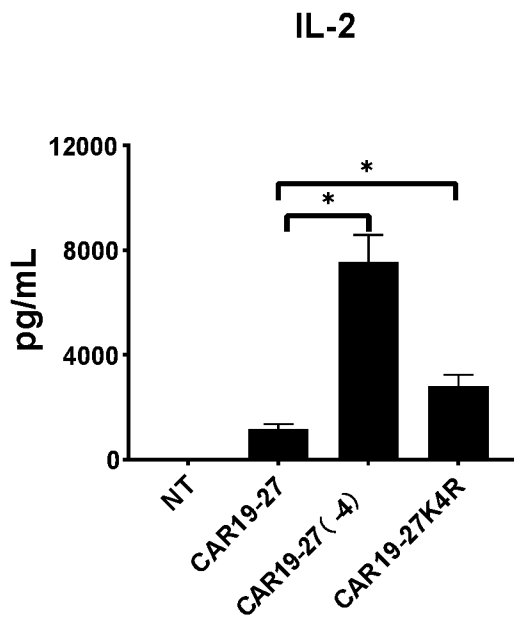


图 3

### Raji

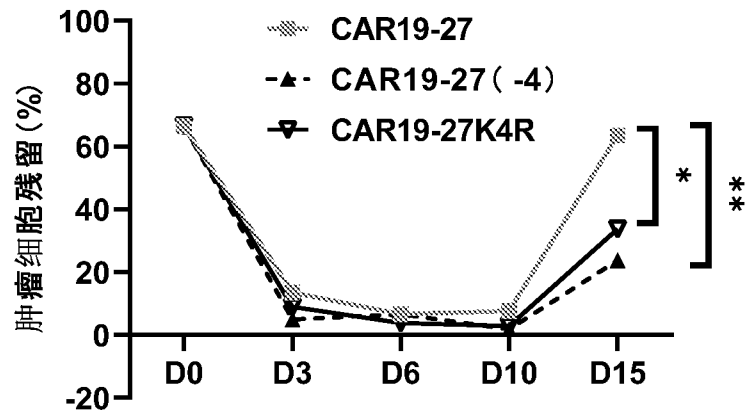


图 4

### CAR T

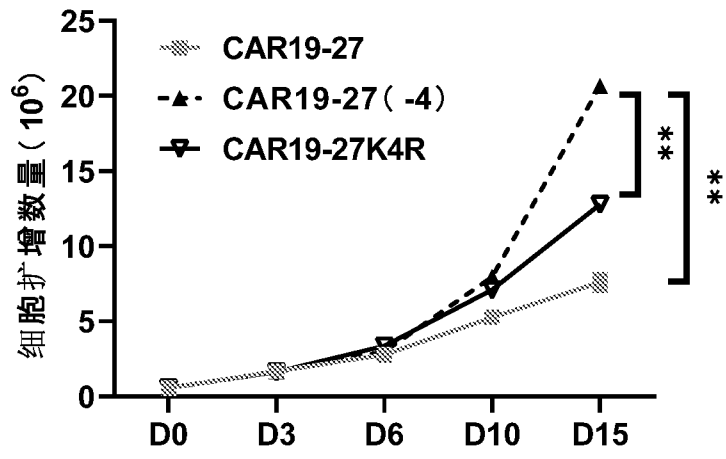


图 5

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/100067

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
C07K 19/00 (2006.01)i; C12N15/13(2006.01)i; C12N15/62(2006.01)i; C12N15/63(2006.01)i; C12N5/10(2006.01)i; A61K39/00 (2006.01)i; A61K35/17 (2015.01)i; A61P35/00 (2006.01)i; A61P31/00 (2006.01)i; A61P37/02(2006.01)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) IPC: C07K, C12N, A61K, A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNABS; CNMED; CNTXT; VEN; DWPI; SIPOABS; EPTXT; WOTXT; USTXT; JPTXT; CNKI; 中国专利生物序列检索系统, China Patents Biological Sequence Search System; 必应搜索, BING SEARCH; Genbank; NCBI; EMBL; STN; Elsevier; WEB OF SCIENCE; Pubmed: 嵌合抗原受体, CAR, chimericantigenreceptor, CD27, 共刺激结构域, 跨膜结构域, SEQ ID Nos: 2-3等		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 110526991 A (SHENZHEN BINDE BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 03 December 2019 (2019-12-03) see claim 1, and description, nucleotide and amino acid sequence listings	1-20
A	CN 105949325 A (CHONGQING PRECISION BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 21 September 2016 (2016-09-21) see claims 1-4	1-20
A	CN 114835817 A (WEST CHINA HOSPITAL, SICHUAN UNIVERSITY) 02 August 2022 (2022-08-02) see claims 1-10	1-20
A	CN 113272016 A (ADICET BIO, INC.) 17 August 2021 (2021-08-17) see claims 1-50	1-20
A	WO 2018103734 A1 (BEIJING ZHONGBIO BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 14 June 2018 (2018-06-14) see abstract, and claims 1-37	1-20
<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 "D" document cited by the applicant in the international application "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>22 January 2024</b>		Date of mailing of the international search report <b>06 March 2024</b>
Name and mailing address of the ISA/CN <b>China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088</b>		Authorized officer  Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Keith Schutsky et al. "Rigorous optimization and validation of potent RNA CAR T cell therapy for the treatment of common epithelial cancers expressing folate receptor" <i>Oncotarget.</i> , Vol. 6, No. 30, 06 October 2015 (2015-10-06), see abstract, page 28913, left-hand column, paragraph 1 and page 28914, figure A	1-20
A	CHEN, Huanpeng et al. "CD27 enhances the killing effect of CAR T cells targeting trophoblast cell surface antigen 2 in the treatment of solid tumors" <i>Cancer Immunol Immunother.</i> , Vol. 70, No. 7, 31 July 2021 (2021-07-31), see abstract, page 2060, right-hand column, last paragraph and page 2062, figure 1	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/100067

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.
  - b.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),  
 accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2.  With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/CN2023/100067**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN	110526991	A	03 December 2019	None	
-----					
CN	105949325	A	21 September 2016	None	
-----					
CN	114835817	A	02 August 2022	None	
-----					
CN	113272016	A	17 August 2021	EP	3860716 A2 11 August 2021
				AU	2019354395 A1 06 May 2021
				CA	3115059 A1 09 April 2020
				WO	2020072546 A2 09 April 2020
				WO	2020072546 A3 23 July 2020
				US	2021388109 A1 16 December 2021
				BR	112021006254 A2 27 July 2021
				KR	20210087458 A 12 July 2021
				SG	11202103234 RA 29 April 2021
				JP	2022513321 A 07 February 2022
				EA	202190915 A1 17 August 2021
				IL	281943 A 31 May 2021
				MX	2021003744 A 23 June 2021
-----					
WO	2018103734	A1	14 June 2018	None	
-----					

<b>A. 主题的分类</b> C07K 19/00 (2006.01)i; C12N15/13(2006.01)i; C12N15/62(2006.01)i; C12N15/63(2006.01)i; C12N5/10(2006.01)i; A61K39/00 (2006.01)i; A61K35/17 (2015.01)i; A61P35/00 (2006.01)i; A61P31/00 (2006.01)i; A61P37/02(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>B. 检索领域</b> 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) IPC: C07K, C12N, A61K, A61P 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNABS;CNMED; CNTXT; VEN;DWPI;SIPOABS;EPTXT;WOTXT;USTXT;JPTXT;CNKI;中国专利生物序列检索系统;必应搜索;Genbank;NCBI;EMBL;STN;Elsevier;WEB OF SCIENCE; Pubmed和检索项: 嵌合抗原受体, CAR, chimericantigenreceptor, CD27, 共刺激结构域, 跨膜结构域, SEQ ID Nos:2-3等		
<b>C. 相关文件</b>		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 110526991 A (深圳宾德生物技术有限公司) 2019年12月3日 (2019 - 12 - 03) 见权利要求1, 说明书核苷酸和氨基酸序列表	1-20
A	CN 105949325 A (重庆精准生物技术有限公司) 2016年9月21日 (2016 - 09 - 21) 见权利要求1-4	1-20
A	CN 114835817 A (四川大学华西医院) 2022年8月2日 (2022 - 08 - 02) 见权利要求1-10	1-20
A	CN 113272016 A (阿迪塞特生物股份有限公司) 2021年8月17日 (2021 - 08 - 17) 见权利要求1-50	1-20
A	WO 2018103734 A1 (BEIJING ZHONGBIO BIOTECHNOLOGY CO LTD) 2018年6月14日 (2018 - 06 - 14) 见摘要, 权利要求1-37	1-20
<input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。		
<input checked="" type="checkbox"/> 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 “D” 申请人在国际申请中引证的文件 “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	2024年1月22日	国际检索报告邮寄日期
		2024年3月6日
ISA/CN的名称和邮寄地址	授权官员	
中国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088	张金丽	
	电话号码 (+86) 010-62411124	

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	Keith Schutsky等. "Rigorous optimization and validation of potent RNA CAR T cell therapy for the treatment of common epithelial cancers expressing folate receptor" Oncotarget., 第6卷, 第30期, 2015年10月6日 (2015 - 10 - 06), 见摘要, 第28913页左栏第1段, 第28914页图A	1-20
A	Huanpeng Chen等. "CD27 enhances the killing effect of CAR T cells targeting trophoblast cell surface antigen 2 in the treatment of solid tumors" Cancer Immunol Immunother., 第70卷, 第7期, 2021年7月31日 (2021 - 07 - 31), 见摘要, 第2060页右栏最后1段, 第2062页图1	1-20

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:
  - b.  为国际检索的目的在国际申请日之后提交(细则13之三.1(a)),  
 附有说明序列列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。
2.  本报告是在没有收到符合WIPO ST.26标准的序列列表的情况下,考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列,在可进行有意义检索的范围内做出的。
3. 补充意见:

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2023/100067

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	110526991	A	2019年12月3日	无			
CN	105949325	A	2016年9月21日	无			
CN	114835817	A	2022年8月2日	无			
CN	113272016	A	2021年8月17日	EP	3860716	A2	2021年8月11日
				AU	2019354395	A1	2021年5月6日
				CA	3115059	A1	2020年4月9日
				WO	2020072546	A2	2020年4月9日
				WO	2020072546	A3	2020年7月23日
				US	2021388109	A1	2021年12月16日
				BR	112021006254	A2	2021年7月27日
				KR	20210087458	A	2021年7月12日
				SG	11202103234	RA	2021年4月29日
				JP	2022513321	A	2022年2月7日
				EA	202190915	A1	2021年8月17日
				IL	281943	A	2021年5月31日
				MX	2021003744	A	2021年6月23日
WO	2018103734	A1	2018年6月14日	无			