



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118019842 A

(43) 申请公布日 2024. 05. 10

(21) 申请号 202280046726.1

(22) 申请日 2022.06.30

(66) 本国优先权数据

202110749475.0 2021.07.01 CN

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.12.29

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/CN2022/103102 2022.06.30

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/274387 ZH 2023.01.05

(71) 申请人 宁波茂行生物医药科技有限公司

地址 315336 浙江省宁波市杭州湾新区启
源路39号1号楼212-11室

(72) 发明人 尚小云 李甲璐 蒋海娟 王丹

马少文 马丽 李博 沈慧

(74) 专利代理机构 上海巛石知识产权代理事务
所(普通合伙) 31309

专利代理师 蒋舫玮

(51) Int.Cl.

C12N 5/10 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(54) 发明名称

靶向GD2的通用型CAR-T细胞及其制备方法和应用

(57) 摘要

一种经修饰的免疫效应细胞,其中所述经修饰的免疫效应细胞中的T细胞抗原受体(TCR)和主要组织相容性复合体(MHCI,MHCII)在T细胞中的功能受到抑制,且所述经修饰的免疫效应细胞包含靶向GD2的嵌合抗原受体(CAR)。经修饰的免疫效应细胞,识别肿瘤细胞表面抗原的同时,敲除细胞表达的TCR和HLA-A基因,达到提高CAR-T细胞的抗肿瘤作用,延长细胞存活时间,同时降低同种异体细胞治疗引起的免疫排斥反应的多重效果。

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2023 年 1 月 5 日 (05.01.2023)



(10) 国际公布号
WO 2023/274387 A1

(51) 国际专利分类号:

A61P 35/00 (2006.01) *A61P 31/00* (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01) *A61P 37/02* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2022/103102

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

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

202110749475.0 2021 年 7 月 1 日 (01.07.2021) CN

(71) 申请人: 宁波茂行生物医药科技有限公司
(**NINGBO T-MAXIMUM BIOPHARMACEUTICALS CO., LTD.**) [CN/CN]; 中国浙江省宁波市杭州湾新区启源路 39 号 1 号楼 212-11 室, Zhejiang 315336 (CN)。

(72) 发明人: 尚小云(**SHANG, Xiaoyun**); 中国浙江省宁波市杭州湾新区启源路 39 号 1 号楼 212-11 室, Zhejiang 315336 (CN)。李甲璐(**LI, Jialu**); 中国浙江省宁波市杭州湾新区启源路 39 号 1 号楼 212-11 室, Zhejiang 315336 (CN)。蒋海娟(**JIANG, Haijuan**); 中国浙江省宁波市杭州湾新区启源路 39 号 1 号楼 212-11 室, Zhejiang 315336 (CN)。王丹(**WANG, Dan**); 中国浙江省宁波市杭州湾新区启源路 39 号 1 号楼 212-11 室, Zhejiang 315336 (CN)。马少文(**MA, Shaowen**); 中国浙江省宁波市杭州湾新区启源路 39 号 1 号楼 212-11 室, Zhejiang 315336 (CN)。马丽(**MA, Li**); 中国浙江省宁波市杭州湾新区启源路 39 号 1 号楼 212-11 室, Zhejiang 315336 (CN)。李博(**LI, Bo**); 中国浙江省宁波市杭州湾新区启源路 39 号 1 号楼 212-11 室, Zhejiang 315336 (CN)。

楼 212-11 室, Zhejiang 315336 (CN)。沈慧(**SHEN, Hui**); 中国浙江省宁波市杭州湾新区启源路 39 号 1 号楼 212-11 室, Zhejiang 315336 (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/游琦; 张珍, Shanghai 201210 (CN)。

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

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则 4.17 的声明:

— 关于申请人有权要求在先申请的优先权 (细则 4.17(iii))

(54) **Title:** UNIVERSAL CAR-T CELL TARGETING GD2, PREPARATION METHOD THEREFOR, AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 靶向 GD2 的通用型 CAR-T 细胞及其制备方法和应用

(57) **Abstract:** A modified immune effector cell; the functions of a T-cell antigen receptor (TCR) and a major histocompatibility complex (MHC I, MHC II) in the modified immune effector cell in T cells are inhibited. Furthermore, the modified immune effector cell comprises a chimeric antigen receptor (CAR) targeting GD2. For the modified immune effector cell, when a tumor cell surface antigen is recognized, the TCR and HLA-A gene expressed by a cell are knocked out, thereby achieving multiple effects including an increased anti-tumor effect of CAR-T cells, prolonged cell survival time, and reduced immune rejection reactions caused by allogeneic cell therapy.

(57) 摘要: 一种经修饰的免疫效应细胞, 其中所述经修饰的免疫效应细胞中的 T 细胞抗原受体 (TCR) 和主要组织相容性复合体 (MHC I, MHC II) 在 T 细胞中的功能受到抑制, 且所述经修饰的免疫效应细胞包含靶向 GD2 的嵌合抗原受体 (CAR)。经修饰的免疫效应细胞, 识别肿瘤细胞表面抗原的同时, 敲除细胞表达的 TCR 和 HLA-A 基因, 达到提高 CAR-T 细胞的抗肿瘤作用, 延长细胞存活时间, 同时降低同种异体细胞治疗引起的免疫排斥反应的多重效果。

[见续页]

WO 2023/274387 A1

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))。

靶向 GD2 的通用型 CAR-T 细胞及其制备方法和应用

技术领域

本申请涉及生物医药领域，具体的涉及一种靶向 GD2 的通用型 CAR-T 细胞及其制备方法和应用。

背景技术

神经节苷脂 GD2 是一种富含糖链的糖脂化合物，是神经系统细胞膜的重要组成部分，属于神经节苷脂鞘脂类。GD2 抗原表达在神经外胚层生成的肿瘤表面，包括神经母细胞瘤、黑色素瘤、骨肉瘤、胶质瘤等肿瘤。其中神经母细胞瘤(neuroblastoma, NB)为节后交感神经系统胚胎性肿瘤，是儿童最常见的颅外实体恶性肿瘤。目前治疗手段以手术切除、放射治疗、化疗为主。NB 发病早、恶性程度高、预后差。化疗后仍有 10%~20% 的患儿发展为难治性 NB。弥漫性内生性脑桥胶质瘤(DIPG)为发生于脑干的高度侵袭性神经胶质瘤，好发于 5~9 岁患儿，预后极差，仅有不到 10% 的患儿生存期超过 2 年。H3K27M 突变在胶质瘤领域是目前较为前沿的研究热点。H3K27M 突变的弥漫性中线胶质瘤(DMG)大多数发生于儿童，偶见于成人。肿瘤常呈浸润性生长，常侵及丘脑、延髓和脊髓，患者预后极差。因此急需寻找新的治疗方法以降低相关肿瘤患者的病死率。

美国斯坦福大学医学院 Robbie G. Majzner 教授团队公布了一项新的研究结构：anti-GD2 CAR-T 治疗 DIPG 和 H3K27M 突变 DMG 儿童和年轻成人患者的疗效和安全性。研究纳入了 4 例受试者(3 例 DIPG, 1 例脊髓 DMG, 4~25 岁)，所有患者均置入 Ommaya 储液囊监测颅内压。3/4 患者神经功能缺损明显改善或恢复，部分患者的影像学结果改善。在另外一项新的研究中，来自美国洛杉矶儿童医院的研究人员开发出一种 CAR-T 细胞，它在靶向神经母细胞瘤方面显示出了希望：更有效地杀死了癌细胞，同时又不会伤害健康的脑组织。显示出 anti-GD2 CAR-T 的良好安全性和临床治疗应用前景。而与自体 CAR-T 细胞产品比较，通用型 CAR-T 细胞是从健康供体分离获得 T 细胞，制备的 CAR-T 细胞扩增效率高、活力强；同时同种异体通用型 CAR-T 细胞可以现货供应，大大降低了制备成本并缩短了制备周期。

然而，病人自体 T 细胞在体外扩增困难或功能降低，导致制备的 CAR-T 细胞产品数量不足或质量差。通用型 CAR-T 细胞是从健康供体分离获得 T 细胞，制备的 CAR-T 细胞不但扩增效率高、活力强，而且感染阳性率也有提高，但是通用型 CAR-T 也面临着移植物抗宿主疾病(GVHD)和免疫排斥的问题。CRISPR/Cas9 系统是最常用的基因编辑方法，可用于产生 TCR 缺陷和 HLA I 类分子缺陷的 T 细胞，降低同种异体细胞治疗引起的免疫排斥免疫反应。

而传统的 CAR-T 细胞产品比较，同种异体通用型 CAR-T 细胞大大降低了制备成本，缩短了制备周期。通用型 CAR-T 不仅扩大了抗原的识别范围，也可以通过基因敲除改变免疫抑制微环境，应用于恶性血液肿瘤与实体肿瘤的治疗。

发明内容

本发明的目的在于制备一种靶向 GD2 的通用型 CAR-T 细胞，识别肿瘤细胞表面抗原的同时敲除细胞表面的 TCR 和 HLA-A 基因，达到提高 CAR-T 细胞的抗肿瘤作用，延长细胞存活时间，同时降低同种异体细胞治疗引起的免疫排斥反应的多重效果。

一方面，本申请前提供一种免疫效应细胞，其中所述免疫效应细胞中的 T 细胞抗原受体 (TCR) 和主要组织相容性复合体 (MHC I, MHC II) 在细胞中的功能受到抑制，且所述免疫效应细胞包含靶向 GD2 的嵌合抗原受体 (CAR)。

在某些实施方式中，所述 CAR 包含靶向部分，所述靶向部分包含抗体重链可变区 (VH)，所述 VH 包含重链互补决定区 1 (HCDR1)、重链互补决定区 2 (HCDR2) 和重链互补决定区 3 (HCDR3)，所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述 VH 包含：包含 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列的 HCDR1、包含 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列的 HCDR2 和包含 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列的 HCDR3。

在某些实施方式中，所述 VH 包含重链框架区 1 (HFR1)、重链框架区 2 (HFR2)、重链框架区 3 (HFR3) 和重链框架区 4 (HFR4)，所述 HFR1 包含 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述 HFR2 包含 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述 HFR3 包含 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述 HFR4 包含 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述 VH 包含 HFR1、HFR2、HFR3 和 HFR4，且所述 HFR1、HFR2、HFR3 和 HFR4 选自：

包含 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列的 HFR1，包含 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列的 HFR2，包含 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列的 HFR3，包含 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列的 HFR4。

在某些实施方式中，所述 VH 包含 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述靶向部分包含抗体轻链可变区 (VL)，所述 VL 包含轻链互补决

定区 1 (LCDR1)、轻链互补决定区 2 (LCDR2)和轻链互补决定区 3 (LCDR3), 所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 所述 VL 包含: 包含 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列的 LCDR1、包含 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列的 LCDR2 和包含 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列的 LCDR3。

在某些实施方式中, 所述 VL 包含轻链框架区 1 (LFR1)、轻链框架区 2 (LFR2)、轻链框架区 3 (LFR3)和轻链框架区 4 (LFR4), 所述 LFR1 包含 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 所述 LFR2 包含 SEQ ID NO: 13 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 所述 LFR3 包含 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 所述 LFR4 包含 SEQ ID NO: 15 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 所述 VL 包含 LFR1、LFR2、LFR3 和 LFR4, 且所述 LFR1、LFR2、LFR3 和 LFR4 选自:

包含 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列的 LFR1, 包含 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列的 LFR2, 包含 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列的 LFR3, 包含 SEQ ID NO: 15 所示的氨基酸序列的 LFR4。

在某些实施方式中, 所述 VL 包含 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 所述靶向部分包含 VH 和 VL, 其中所述 VH 包含 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列, 所述 VL 包含 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 其中所述靶向部分包括全长抗体、Fab、单链可变片段(scFv)或单域抗体(VHH)。

在某些实施方式中, 其中所述靶向部分包括 scFv。

在某些实施方式中, 其中所述靶向部分包含位于 VH 与 VL 之间的接头多肽。

在某些实施方式中, 其中所述接头多肽包括 SEQ ID NO: 17 或 SEQ ID NO: 18 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 其中所述靶向部分包含 SEQ ID NO: 19 或 SEQ ID NO: 20 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 所述 CAR 包括跨膜域, 所述跨膜域包含源自选自下组中的一种或多种蛋白的跨膜域: CD8A、CD8B、CD28、CD3 ϵ (CD3e)、4-1BB、CD4、CD27、CD7、PD-1、

TRAC、TRBC、CD3 ζ 、CTLA-4、LAG-3、CD5、ICOS、OX40、NKG2D、2B4、CD244、Fc ϵ RI γ 、BTLA、CD30、GITR、HVEM、DAP10、CD2、NKG2C、LIGHT、DAP12、CD40L(CD154)、TIM1、CD226、DR3、CD45、CD80、CD86、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64 和 SLAM。

在某些实施方式中，其中所述跨膜域包含源自 CD8A 的跨膜域。

在某些实施方式中，其中所述跨膜域包含 SEQ ID NO: 29 至 SEQ ID NO: 77 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述 CAR 包括胞内共刺激信号传导结构域，所述胞内共刺激信号传导结构域包含源自选自下组中的一种或多种蛋白的胞内共刺激信号传导结构域：CD28、4-1BB (CD137)、CD27、CD2、CD7、CD8A、CD8B、OX40、CD226、DR3、SLAM、CDS、ICAM-1、NKG2D、NKG2C、B7-H3、2B4、Fc ϵ RI γ 、BTLA、GITR、HVEM、DAP10、DAP12、CD30、CD40、CD40L、TIM1、PD-1、LFA-1、LIGHT、JAML、CD244、CD100、ICOS、CD40 和 MyD88。

在某些实施方式中，其中所述胞内共刺激信号传导结构域源自 4-1BB 的共刺激信号传导结构域。

在某些实施方式中，其中所述胞内共刺激信号传导结构域包含 SEQ ID NO: 78 至 SEQ ID NO: 110 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述 CAR 包括胞内信号转导结构域，所述胞内信号转导结构域包含源自选自下组中的一种或多种蛋白的胞内信号转导结构域：CD3 ζ 、CD3 δ 、CD3 γ 、CD3 ϵ 、CD79a、CD79b、Fc ϵ RI γ 、Fc ϵ RI β 、Fc γ RIIa、牛白血病病毒 gp30、Epstein-Barr 病毒(EBV)LMP2A、猿免疫缺陷病毒 PBj14 Nef、DAP10、DAP-12 和至少包含一个 ITAM 的结构域。

在某些实施方式中，其中所述胞内信号转导结构域包含源自 CD3 ζ 的信号转导结构域。

在某些实施方式中，其中所述胞内信号转导结构域包含 SEQ ID NO: 94、SEQ ID NO: 98、SEQ ID NO: 99、SEQ ID NO: 111 至 SEQ ID NO: 121 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述 CAR 在靶向部分和跨膜域之间包括铰链区，所述铰链区包含源自选自下组中的一种或多种蛋白的铰链区：CD28、IgG1、IgG4、IgD、4-1BB、CD4、CD27、CD7、CD8A、PD-1、ICOS、OX40、NKG2D、NKG2C、Fc ϵ RI γ 、BTLA、GITR、DAP10、TIM1、SLAM、CD30 和 LIGHT。

在某些实施方式中，所述铰链区包含源自 CD8A 的铰链区。

在某些实施方式中，所述铰链区包含 SEQ ID NO: 122 至 SEQ ID NO: 143 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述嵌合抗原受体的非靶向部分包含 CD8A 分子跨膜域、CD8A 的铰链区、4-1BB 的胞内共刺激信号传导结构域和 CD3 ζ 胞内信号传导结构域。

在某些实施方式中，所述嵌合抗原受体的非靶向部分包含 SEQ ID NO: 21 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述的嵌合抗原受体还包含信号肽片段，所述信号肽片段的 C 端与所述靶向部分的 N 端连接。

在某些实施方式中，所述信号肽片段包括 CD8A 信号肽片段。

在某些实施方式中，所述信号肽片段包含 SEQ ID NO: 22 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述嵌合抗原受体包含 SEQ ID NO: 23 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述的免疫效应细胞包括人细胞。

在某些实施方式中，所述免疫效应细胞包括 T 细胞、B 细胞、天然杀伤细胞(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。

在某些实施方式中，其包括自体的或非自体的免疫效应细胞。

在某些实施方式中，所述免疫效应细胞包括经修饰的免疫效应细胞，其中所述修饰包括与免疫排斥相关基因中的一个或多个的表达和/或活性被下调。

在某些实施方式中，其中所述与免疫排斥相关基因选自下组中的一种或多种基因：TRAC、TRBC、HLA-A、HLA-B、B2M 和 CIITA。

在某些实施方式中，所述经修饰的免疫效应细胞与未经修饰的相应细胞相比，TRAC 基因和 HLA-A 基因的表达和/或活性被下调。

在某些实施方式中，其中所述经修饰的免疫效应细胞与未经所述修饰的相应细胞相比，CIITA 基因的表达和/或活性未被下调。

在某些实施方式中，其中所述经修饰的免疫效应细胞与未经所述修饰的相应细胞相比，B2M 基因的表达和/或活性未被下调。

在某些实施方式中，其中所述经修饰的免疫效应细胞与相应的野生型细胞相比，TRAC 基因和 HLA-A 基因的表达和/或活性被下调。

在某些实施方式中，其中所述经修饰的免疫效应细胞与相应的野生型细胞相比，B2M 基因的表达和/或活性未被下调。

在某些实施方式中，其中所述经修饰的免疫效应细胞与相应的野生型细胞相比，CIITA 基因的表达和/或活性未被下调。

在某些实施方式中，其中所述基因的表达水平和/或活性被下调包括使编码所述基因的核酸分子的表达和/或活性下调；和/或使所述基因编码的蛋白质产物的表达和/或活性被下调。

在某些实施方式中，其中所述修饰包括：基因敲除、基因突变和/或基因沉默。

在某些实施方式中，所述修饰包括所述免疫效应细胞中两个 TRAC 等位基因中的任意一个被敲除并且两个 HLA-A 等位基因中的任意一个被敲除。

在某些实施方式中，所述修饰包括所述免疫细胞中两个 TRAC 等位基因被敲除并且两个 HLA-A 等位基因中的任意一个被敲除。

在某些实施方式中，所述修饰包括所述免疫细胞中 TRAC 基因外显子被敲除并且 HLA-A 基因外显子被敲除。

在某些实施方式中，其中所述修饰包括向所述免疫效应细胞施用一种或多种选自下组的物质：反义 RNA、siRNA、shRNA 和 CRISPR/Cas9 系统。

在某些实施方式中，其中所述修饰包括向所述免疫效应细胞施用 CRISPR/Cas9 系统。

在某些实施方式中，其中所述修饰还包括向所述免疫效应细胞施用靶向所述 TRAC 基因外显子部分的 sgRNA。

在某些实施方式中，其中所述靶向所述 TRAC 基因外显子部分的 sgRNA 包含 SEQ ID NO: 144 至 SEQ ID NO: 158 中任一项所示的核苷酸序列。

在某些实施方式中，其中所述修饰包括向所述免疫效应细胞施用靶向所述 HLA-A 基因外显子部分的 sgRNA。

在某些实施方式中，其中所述靶向所述 HLA-A 基因外显子部分的 sgRNA 包含 SEQ ID NO: 159 至 SEQ ID NO: 199 中任一项所示的核苷酸序列。

在某些实施方式中，其中所述修饰还包括向所述细胞施用 Cas 酶。

在某些实施方式中，其中 Cas 酶包括 Cas9 蛋白。

在某些实施方式中，其中所述反义 RNA 包含 SEQ ID NO: 200 至 SEQ ID NO: 203 中任一项所示的核苷酸序列。

在某些实施方式中，其中所述免疫效应细胞为 HLA-B 纯合子细胞。

在某些实施方式中，其中所述 HLA-B 纯合子包括 HLA-B*40 纯合子，HLA-B*15 纯合子，HLA-B*46 纯合子，HLA-B*13 纯合子，HLA-B*51 纯合子，HLA-B*58 纯合子，HLA-B*07 纯合子，HLA-B*35 纯合子，HLA-B*44 纯合子，HLA-B*52 纯合子，HLA-B*57 纯合子，HLA-B*54 纯合子，HLA-B*55 纯合子。

在某些实施方式中，其中所述免疫效应细胞为 HLA-A 纯合子或杂合子细胞。

在某些实施方式中,其中所述 HLA-A 纯合子或杂合子包括 HLA-A*02 纯合子,HLA-A*11 纯合子,HLA-A*02/A*11 杂合子或 HLA-A*24 纯合子。

另一方面,本申请提供一种制备免疫效应细胞的方法,其包括:在向免疫效应细胞中引入编码前述靶向 GD2 的 CAR 的多核苷酸序列或包含前述靶向 GD2 的 CAR 的多核苷酸序列的载体之前/之后,修饰所述免疫效应细胞,所述修饰包括与免疫排斥相关基因中的一个或多个的表达和/或活性被下调。

在某些实施方式中,其中所述载体是表达载体。

在某些实施方式中,其中所述载体选自 DNA 载体、RNA 载体、质粒、慢病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体和逆转录病毒载体。

在某些实施方式中,其中所述与免疫排斥相关基因选自下组中的一种或多种基因:TRAC、TRBC、HLA-A、HLA-B、B2M 和 CIITA。

在某些实施方式中,与未经所述修饰的相应细胞中相应基因的表达和/或活性相比,下调所述免疫效应细胞中 TRAC 基因和 HLA-A 基因的表达和/或活性。

在某些实施方式中,与未经所述修饰的相应细胞中相应基因的表达和/或活性相比,CIITA 基因的表达和/或活性未被下调。

在某些实施方式中,与未经所述修饰的相应细胞中相应基因的表达和/或活性相比,B2M 基因的表达和/或活性未被下调。

在某些实施方式中,与相应的野生型细胞相比,所述免疫效应细胞的 TRAC 基因和 HLA-A 基因的表达和/或活性被下调。

在某些实施方式中,与相应的野生型细胞相比,CIITA 基因的表达和/或活性未被下调。

在某些实施方式中,与相应的野生型细胞相比,B2M 基因的表达和/或活性未被下调。

在某些实施方式中,其中所述基因的表达水平和/或活性被下调包括使编码所述基因的核酸分子的表达和/或活性下调;和/或使所述基因编码的蛋白质产物的表达和/或活性被下调。

在某些实施方式中,其中所述修饰包括:基因敲除、基因突变和/或基因沉默。

在某些实施方式中,所述修饰包括所述免疫效应细胞中两个 TRAC 等位基因中的任意一个被敲除并且两个 HLA-A 等位基因中的任意一个被敲除。

在某些实施方式中,所述修饰包括所述免疫细胞中两个 TRAC 等位基因被敲除并且两个 HLA-A 等位基因中的任意一个被敲除。

在某些实施方式中,所述修饰包括所述免疫细胞中 TRAC 基因外显子被敲除并且 HLA-A 基因外显子被敲除。

在某些实施方式中，其中所述修饰包括向所述免疫效应细胞施用一种或多种选自下组的物质：反义 RNA、siRNA、shRNA 和 CRISPR/Cas9 系统。

在某些实施方式中，其中所述修饰包括向所述免疫效应细胞施用 CRISPR/Cas9 系统。

在某些实施方式中，其中所述修饰包括向所述免疫效应细胞施用靶向所述 TRAC 基因外显子部分的 sgRNA。

在某些实施方式中，其中所述靶向所述 TRAC 基因外显子部分的 sgRNA 包含 SEQ ID NO: 144 至 SEQ ID NO: 158 中任一项所示的核苷酸序列。

在某些实施方式中，其中所述修饰包括向所述免疫效应细胞施用靶向所述 HLA-A 基因外显子部分的 sgRNA。

在某些实施方式中，其中所述靶向所述 HLA-A 基因外显子部分的 sgRNA 包含 SEQ ID NO: 159 至 SEQ ID NO: 199 中任一项所示的核苷酸序列。

在某些实施方式中，其中所述修饰还包括向所述细胞施用 Cas 酶。

在某些实施方式中，其中 Cas 酶包括 Cas9 蛋白。

在某些实施方式中，其中所述反义 RNA 包含 SEQ ID NO: 200 至 SEQ ID NO: 203 中任一项所示的核苷酸序列。

在某些实施方式中，其中所述免疫效应细胞包括人细胞。

在某些实施方式中，所述免疫效应细胞包括 T 细胞、B 细胞、天然杀伤细胞(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。

在某些实施方式中，所述免疫效应细胞包括自体的或非自体的免疫效应细胞。

在某些实施方式中，其中所述细胞为 HLA-B 纯合子细胞。

在某些实施方式中，其中所述 HLA-B 纯合子包括 HLA-B*40 纯合子，HLA-B*15 纯合子，HLA-B*46 纯合子，HLA-B*13 纯合子，HLA-B*51 纯合子，HLA-B*58 纯合子，HLA-B*07 纯合子，HLA-B*35 纯合子，HLA-B*44 纯合子，HLA-B*52 纯合子，HLA-B*57 纯合子，HLA-B*54 纯合子，HLA-B*55 纯合子。

在某些实施方式中，其中所述细胞为 HLA-A 纯合子或杂合子细胞。

在某些实施方式中，其中所述 HLA-A 纯合子或杂合子包括 HLA-A*02 纯合子，HLA-A*11 纯合子，HLA-A*02/A*11 杂合子或 HLA-A*24 纯合子。

另一方面，本申请提供前述的免疫效应细胞在制备 CAR-T 细胞中的应用。

另一方面，本申请提供一种药物组合物，其包含前述免疫效应细胞，以及任选地药学上

可接受的载剂。

另一方面，本申请提供前述的免疫效应细胞和/或前述的药物组合物，其用于治疗与 GD2 的表达相关的疾病或病症。

在某些实施方式中，其中所述与 GD2 的表达相关的疾病或病症包括与 GD2 的表达上调相关的疾病或病症。

在某些实施方式中，其中所述与 GD2 的表达相关的疾病或病症包括癌症。

在某些实施方式中，其中所述癌症包括 GD2 阳性肿瘤。

在某些实施方式中，其中所述癌症包括：神经母细胞瘤，黑色素瘤，视网膜母细胞瘤，小细胞肺癌，尤文肉瘤，成神经管细胞瘤，软组织肉瘤，骨肉瘤或胶质瘤。

另一方面，本申请提供前述的免疫效应细胞和/或前述的药物组合物在制备药物中的用途，所述药物用于治疗与 GD2 的表达相关的疾病或病症。

在某些实施方式中，所述与 GD2 的表达相关的疾病或病症包括与 GD2 的表达上调相关的疾病或病症。

在某些实施方式中，其中所述与 GD2 的表达相关的疾病或病症包括癌症。

在某些实施方式中，其中所述癌症包括 GD2 阳性肿瘤。

在某些实施方式中，其中所述癌症包括：神经母细胞瘤，黑色素瘤，视网膜母细胞瘤，小细胞肺癌，尤文肉瘤，成神经管细胞瘤，软组织肉瘤，骨肉瘤或胶质瘤。

另一方面，本申请提供一种预防或治疗与 GD2 的表达相关的疾病或病症的方法，其包括向有需要的受试者施用有效量的前述的免疫效应细胞和/或前述的药物组合物。

在某些实施方式中，其中所述与 GD2 的表达相关的疾病或病症包括与 GD2 的表达上调相关的疾病或病症。

在某些实施方式中，其中所述与 GD2 的表达相关的疾病或病症包括癌症。

在某些实施方式中，其中所述癌症包括 GD2 阳性肿瘤。

在某些实施方式中，其中所述癌症包括：神经母细胞瘤，黑色素瘤，视网膜母细胞瘤，小细胞肺癌，尤文肉瘤，成神经管细胞瘤，软组织肉瘤，骨肉瘤或胶质瘤。

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的实施方式和附图能够更好地理解本申请所涉及发明的特点和优势。对附图简要说明如下：

图 1 显示的是本申请所述 anti-GD2 CAR 基因慢病毒表达载体；

图 2 显示的是本申请所述 anti-GD2 UCAR-T 细胞的构建策略。

图 3A-3D 显示的是本申请所述 anti-GD2 UCAR-T 细胞表型检测结果（敲除效率，转染效率，扩增倍数，记忆 T 细胞比例）；

图 4 显示的是本申请所述 anti-GD2 UCAR-T 细胞对靶细胞的杀伤结果；

图 5A-5C 显示的是本申请所述 anti-GD2 UCAR-T 细胞与靶细胞共培养细胞因子分泌检测结果；

图 6 显示的是本申请所述 anti-GD2 UCAR-T 细胞体内抗肿瘤效果；

图 7 显示的是本申请所述 anti-GD2 UCAR-T 细胞体内半衰期检测结果；

图 8A-8B 显示的是本申请所述 anti-GD2 UCAR-T 细胞体内排异反应结果；

图 9 显示的是本申请所述 anti-GD2 UCAR-T 细胞脱靶分析；

图 10 显示的是本申请所述 anti-GD2 UCAR-T 细胞染色体易位分析；

图 11 显示的是本申请所述 anti-GD2 UCAR-T 细胞核型分析；

图 12 显示的是本申请所述 anti-GD2 UCAR-T 细胞 Cas9 残留分析；

图 13 显示的是本申请中 TRAC 基因在 Sg9RNA 编辑后 Sanger 测序的结果；

图 14 显示的是本申请中 TRAC 基因在 Sg9RNA 编辑后 TA 克隆检测的结果；

图 15 显示的是本申请中 TRAC 基因在 Sg9RNA 编辑后流式细胞检测的结果；

图 16 显示的是本申请中 HLA-A02 基因在 Sg2RNA 编辑后 Sanger 测序的结果；

图 17 显示的是本申请中 HLA-A02 基因在 Sg5RNA 编辑后 Sanger 测序的结果；

图 18 显示的是本申请中 HLA-A11 基因在 Sg21RNA 编辑后 Sanger 测序的结果；

图 19 显示的是本申请中 HLA-A11 基因在 Rsg2RNA 编辑后 Sanger 测序的结果；

图 20A-20B 显示的是本申请的经修饰的免疫效应细胞中同时敲除 HLA-A02 和 TRAC 的结果；

图 21A-21B 显示的是本申请的经修饰的免疫效应细胞中 HLA-A02 和 TRAC 的蛋白水平；

图 22 显示的是本申请的经修饰的免疫效应细胞中 TRAC、HLA-A、B2M 和 CIITA 的

mRNA 水平;

图 23A-23B 显示的是本申请的经修饰的免疫效应细胞中 B2M 和 CIITA 的蛋白水平;

图 24A-24D 显示的是本申请的经修饰的免疫效应细胞中 TRAC、HLA-A、B2M 和 CIITA 的蛋白水平;

图 25A-25B 显示的是本申请的经修饰的免疫效应细胞中 TRAC 和 HLA-A mRNA 水平的敲除情况;

图 26A-26B 显示的是本申请的经修饰的免疫效应细胞中 CD69 和 CD137 的蛋白水平;

图 27 显示的是本申请的经修饰的免疫效应细胞与 NK 细胞共培养的情况;

图 28 显示的是本申请的经修饰的免疫效应细胞表达 IFN- γ 的水平;

图 29A-29D 显示的是本申请的经修饰的免疫效应细胞中 TRAC、HLA-A、B2M 和 CIITA 的蛋白水平;

图 30 显示的是本申请的经修饰的免疫效应细胞对 CAR 的感染效率;

图 31 显示的是本申请的经修饰的免疫效应细胞的扩增倍数;

图 32 显示的是本申请的经修饰的免疫效应细胞对 CD19 阳性靶细胞的杀伤效果;

图 33 显示的是施用本申请的经修饰的免疫效应细胞的给药方案;

图 34 显示的是本申请的经修饰的免疫效应细胞对小鼠体内肿瘤的杀伤效果。

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“嵌合抗原受体”或“CAR”通常是指一组多肽,在最简单的实施方案中通常有两种,其当在免疫效应细胞中时,提供细胞对靶细胞(通常为癌细胞)的特异性,并产生细胞内信号。在一些实施方案中,CAR 包含至少一个细胞外抗原结合结构域(如 VHH、scFv 或其部分),跨膜结构域和胞质信号传导结构域(本文中也称为“胞内信号传导结构域”),其包含衍生自如下所定义的刺激分子和/或共刺激分子的功能性信号传导结构域。在一些实施方案中,该组多肽在相同的多肽链中(例如,包含嵌合融合蛋白)。在一些实施方案中,该组多肽彼此不连续,例如在不同的多肽链中。在一些方面,该组多肽包括二聚化开关,其在二聚化分子的存在下可将多肽彼此偶联,例如可将抗原结合结构域偶联至胞内信号传导结构域。一方面,CAR 的刺激分子是与 T 细胞受体复合物相关的 ζ 链。在一个方面,细胞质信号传导

结构域包含一级信号传导结构域(例如, CD3- ζ 的一级信号传导结构域)。在一个方面, 细胞质信号传导结构域还包含一个或多个衍生自如下定义的至少一种共刺激分子的功能性信号传导结构域。一方面, 共刺激分子可以选自 4-1BB(即 CD137), CD27, ICOS 和/或 CD28。一方面, CAR 包含嵌合融合蛋白, 其可以包含细胞外抗原识别结构域, 跨膜结构域和包含衍生自刺激分子的功能性信号传导结构域的细胞内信号传导结构域。一方面, CAR 包含嵌合融合蛋白, 其可以包含细胞外抗原识别结构域, 跨膜结构域和细胞内信号传导结构域, 细胞内信号传导结构域包含衍生自共刺激分子的功能性信号传导结构域和衍生自刺激分子的功能性信号传导结构域。一方面, CAR 包含嵌合融合蛋白, 其可以包含细胞外抗原识别结构域, 跨膜结构域和细胞内信号传导结构域, 细胞内信号传导结构域包含至少两个衍生自一个或多个共刺激分子的功能性信号传导结构域和衍生自刺激分子的功能性信号传导结构域。在一个方面, CAR 包含 CAR 融合蛋白的氨基末端(N-ter)上任选的前导序列。在一个方面, CAR 进一步包含在细胞外抗原识别结构域的 N 末端的前导序列, 其中前导序列任选地在细胞加工过程中从抗原识别结构域(例如 VHH)切除, 并将 CAR 定位于细胞膜。

在本申请中, 术语“双唾液酸神经节苷脂(GD2, pubchem:6450346)”通常是指一种含唾液酸的鞘糖脂, 其主要在细胞表面上表达。其在肿瘤细胞对细胞外基质蛋白的附着中发挥重要作用。GD2 在神经母细胞瘤(neuroblastoma)上密集, 同质且几乎普遍表达的。在正常组织中, GD2 的表达很大程度上限制在皮肤黑色素细胞, 和外周疼痛纤维髓鞘。在 CNS 中, GD2 似乎是胚胎抗原, 但发现在分散的少突胶质细胞中和在垂体后叶中暗淡地表达。这使得 GD2 非常适合用于靶向抗肿瘤疗法。已经描述了针对 GD2 的嵌合抗原受体, 其抗原结合域基于 scFv14g2a (WO 2013/040371 和 Yvon 等人(2009, Clin Cancer Res 15:5852-5860)), 靶向 GD2 的抗原结合片段还记载于国际专利申请公开 WO2004/055056, 其中的每一个以全文引用的方式并入本申请。

在本申请中, 术语“抗体”通常是指在最广泛的意义上加以使用并且具体地涵盖单克隆抗体、多克隆抗体、二聚体、多聚体、多特异性抗体(例如, 双特异性抗体)、和抗体片段, 只要它们显示所期望的生物活性(Miller et al (2003) Jour. of Immunology 170:4854-4861)。抗体可以是鼠、人、人源化、嵌合抗体, 或源于其它物种。

全长抗体典型地是指由两条“全长抗体重链”和两条“全长抗体轻链”组成的抗体。

“全长抗体重链”通常是这样的多肽，其在 N 端到 C 端方向由抗体重链可变结构域(VH)、抗体恒定重链结构域 1(CH1)，抗体铰链区(HR)，抗体重链恒定结构域 2(CH2)，和抗体重链恒定结构域 3(CH3)组成，缩写为 VH-CH1-HR-CH2-CH3；并且在 IgE 亚类的抗体的情形中，任选地还包括抗体重链恒定结构域 4(CH4)。在一些实施方式中，“全长抗体重链”是在 N 端到 C 端方向由 VH，CH1，HR，CH2 和 CH3 组成的多肽。“全长抗体轻链”通常是在 N 端到 C 端方向由抗体轻链可变结构域(VL)，和抗体轻链恒定结构域(CL)组成的多肽，缩写为 VL-CL。所述抗体轻链恒定结构域(CL)可以是 κ (kappa)或 λ (lambda)。两条全长抗体链通过在 CL 结构域和 CH1 结构域之间的多肽间二硫键和全长抗体重链的铰链区之间的多肽间二硫键连接在一起。典型的全长抗体的实例是天然抗体如 IgG(例如，IgG1 和 IgG2)，IgM，IgA，IgD，和 IgE)。

在本申请中，术语“抗原结合片段”(在本文中也被称作“靶向部分”或“抗原结合部分”)通常是指抗体分子的一部分，其包含负责抗体与抗原之间的特异性结合的氨基酸。抗原中由抗体特异性地识别和结合的部分是称作如上文所述的“表位”。抗原结合结构域可典型地包含抗体轻链可变区(VL)和抗体重链可变区(VH)；然而，其并非必须包含两者。Fd 片段例如具有两个 VH 区并且通常保留完整抗原结合结构域的一些抗原结合功能。抗体的抗原结合片段的实例包括(1)Fab 片段，具有 VL、VH、恒定轻链(CL)和 CH1 结构域的单价片段；(2) $F(ab')_2$ 片段，具有由铰链区的二硫桥连接的两个 Fab 片段的二价片段；(3)具有两个 VH 和 CH1 结构域的 Fd 片段；(4)具有抗体单臂的 VL 和 VH 结构域的 Fv 片段，(5)dAb 片段(Ward 等人,“Binding Activities of a Repertoire of Single Immunoglobulin Variable Domains Secreted From *Escherichia coli*,” *Nature* 341:544-546(1989)，其以引用的方式整体并入本申请)，其具有 VH 结构域；(6)分离的互补决定区(CDR)；(7)单链 Fv(scFv)，例如源于 scFV-文库。尽管 Fv 片段的两个结构域 VL 和 VH 是由独立基因编码，但其可通过合成连接子使用重组方法接合，合成连接子使得其被制备为其中 VL 和 VH 区配对以形成单价分子的单一蛋白链(称为单链 Fv(scFv))(可参见例如 Huston 等人,“Protein Engineering of Antibody Binding Sites: Recovery of Specific Activity in an Anti-Digoxin Single-Chain Fv Analogue Produced in *Escherichia coli*,” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883(1988))；和(8)VHH,“VHH”涉及来自骆驼科(骆驼、单峰骆驼、美洲驼、羊驼等)重链抗体的可变抗原结合结构域(参见 Nguyen V.K.等人,2000, *The EMBO Journal*, 19, 921-930; Muyldermans S., 2001, *J Biotechnol.*, 74, 277-302 以及综述 Vanlandschoot P.等人, 2011, *Antiviral Research* 92, 389-407)。VHH 也可称为纳米抗体(Nanobody)(Nb) 和/或单域抗体。这些抗体片段使用所属领域的技术人员已知的常规技术获得，且以与完整抗体相同的方式

式评估所述片段的功能。

在本申请中，术语“单域抗体”或“VHH”通常是指缺失抗体轻链而只有重链可变区的一类抗体。在某些情形中，单域抗体可以来自双峰驼、单峰驼、羊驼、美洲驼、护士鲨、大星鲨或鳐鱼（例如，可参见康晓圳等，生物工程学报，2018，34(12): 1974-1984）。例如，单域抗体可以来自羊驼。单域抗体可由重链可变区（VH）构成。术语“重链可变区”通常是指抗原结合片段的重链的氨基末端结构域。重链可变区可进一步被区分为称为互补决定区（CDR）的高变区，它们散布在成为框架区（FR）的更保守的区域中。每个重链可变区可由三个 CDR 和四个 FR 区构成，它们从氨基端至羧基端可按以下顺序排列：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3 和 FR4。重链可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。

在本申请中，术语“单链可变片段”或“scFv”具有其普通和常规的含义，并且可包括但不限于例如包含免疫球蛋白的重链（VH）可变区和轻链（VL）可变区的融合蛋白，其以短接头肽彼此连接。不受限制地，接头可包含甘氨酸（为了柔性）以及亲水性氨基酸（例如丝氨酸或苏氨酸）（为了可溶性）。接头可将 VH 的 N 端与 VL 的 C 端连接，或者可将 VH 的 C 端与 VL 的 N 端连接。在一些替代方式中，CAR 上存在的配体结合结构域为单链可变片段（scFv）。本申请的 CAR 可以构造为 VH-VL 或 VL-VH 构型，其中具有在接头、铰链、跨膜域、共刺激域和/或传导域的变异，并且该 CAR 仍然保持其功效。在一些实施方式中，CAR 上存在的 scFv 结构域对肿瘤细胞上存在的 GD2 而言具有特异性。

本申请的 CAR 可以包含为了分子的适当间隔和构象而添加的在各个域之间的接头残基，例如包含氨基酸序列的接头，其连接 VH 域和 VL 域并提供与两个亚结合域的相互作用相容的间隔区功能，使得所得多肽保持对与包含相同轻链和重链可变区的抗体相同的靶分子的特异性结合亲和力。本申请的 CAR 可包含一个、两个、三个、四个或五个或更多个接头。在特别的实施方式中，接头的长度为约 1 至约 25 个氨基酸、约 5 至约 20 个氨基酸、或约 10 至约 20 个氨基酸、或任何介入长度的氨基酸。接头的示例性实例包括甘氨酸聚合物；甘氨酸-丝氨酸聚合物；甘氨酸-丙氨酸聚合物；丙氨酸-丝氨酸聚合物；本领域已知的其他柔性接头，例如惠特洛接头。甘氨酸和甘氨酸-丝氨酸聚合物是相对非结构化的，因此可以作为融合蛋白的域（例如本申请的 CAR）之间的中性系链。

在本申请中，术语“互补决定区”（CDR）通常是指在抗原结合片段可变区内的互补性决定区。在本申请中，所述重链可变区存在 3 个 CDRs，所述 CDRs 对于每个可变区命名为 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3。这些 CDRs 的确切边界已根据不同系统不同地限定。由 Kabat (Kabat 等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health,

Bethesda, Md.(1987)和(1991))描述的系统, 不仅提供了可应用于抗原结合片段的任何可变区的明确残基编号系统, 还提供了限定 3 个 CDRs 的精确残基边界。这些 CDRs 可以被称为 Kabat CDRs。Chothia 和同事(Chothia 和 Lesk, J.Mol.Biol.196: 901-917(1987)以及 Chothia 等人, Nature 342: 877-883(1989))发现尽管在氨基酸序列水平上具有大的多样性, 但是 Kabat CDRs 内的某些亚部分采取几乎相同的肽主链构象。这些亚部分命名为 L1、L2 和 L3 或 H1、H2 和 H3, 其中“L”和“H”分别指轻链和重链区域。这些区域可以被称为 Chothia CDRs, 所述 Chothia CDRs 具有与 Kabat CDRs 重叠的边界。与 Kabat CDRs 重叠的限定 CDRs 的其他边界已由 Padlan(FASEB J.9: 133-139(1995))和 MacCallum(J Mol Biol 262(5): 732-45(1996))描述。另外, 其他的 CDR 边界定义可能不严格地遵循上述系统之一, 但仍将与 Kabat CDRs 重叠, 尽管按照特定残基或残基组或甚至整个 CDRs 并不显著影响抗原结合的预测或实验发现, 它们可以缩短或加长。在本申请中, 使用的是 IMGT 编号系统。

在本申请中, 术语“FR”通常是指抗体可变结构域的更高度保守的部分, 其被称为框架区。例如, 天然重链和轻链的可变结构域各自可以包含四个 FR 区, 即在 VH 中四个(H-FR1, H-FR2, H-FR3 和 H-FR4), 和在 VL 中四个(L-FR1, L-FR2, L-FR3 和 L-FR4)。“框架区”通常是指本领域识别的抗体可变区中存在于分歧性更高的(即高变)CDR 之间的部分。此类框架区典型地称为框架 1 至 4(FR1、FR2、FR3 和 FR4)且提供用于在三维空间中呈现六个 CDR(三个来自重链且三个来自轻链)的骨架, 以形成抗原结合表面。

在本申请中, 术语“同源性”通常可以等同于序列“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“ K_D ”可与“KD”互换使用, 通常是指特定的抗体-抗原相互作用的解离平衡常数, 单位为M (mol/L)。 K_D 可通过物质AB和其解离得到的物质A和物质B的浓

度来计算： $K_D = c(A) * c(B) / c(AB)$ 。由该公式可知， K_D 值越大，说明解离越多，代表物质A、B 之间的亲和力越弱；反之， K_D 值越小，说明解离越少，代表物质A、B 之间的亲和力越强。

在本申请中，术语“分离的核酸分子”通常是指从其天然环境中分离的或人工合成的任何长度的分离形式的核苷酸、脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸或其类似物。

在本申请中，术语“载体”通常是指能够在合适的宿主中自我复制的核酸分子，其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“病毒载体”广泛用于指核酸分子(例如转移质粒)或介导核酸转移的病毒颗粒，核酸分子包括病毒衍生的通常促进核酸分子转移或整合到细胞基因组中的核酸元件。病毒颗粒通常包括各种病毒组件，有时还包括除核酸外的宿主细胞组件。病毒载体可以指能够将核酸转移到细胞中的病毒或病毒颗粒，或被转移的核酸本身。

在本申请中，术语“慢病毒”通常是指复杂逆转录病毒的组(或属)。示例性慢病毒包括但不限于：HIV(人免疫缺陷病毒；包括HIV 1型和HIV 2型)；维斯那-梅迪病毒(visna-maedi virus, VMV)病毒；山羊关节炎-脑炎病毒(CAEV)；马传染性贫血病毒(EIAV)；猫免疫缺陷病毒(FIV)；牛免疫缺陷病毒(BIV)；和猿猴免疫缺陷病毒(SIV)。在一种实施方式中，基于HIV的载体骨架(即HIV顺式作用序列元件)是优选的。在特别的实施方式中，慢病毒用于将包含CAR的多核苷酸递送至细胞。

在本申请中，术语“宿主细胞”或“细胞”通常是指可以或已经含有包括本申请所述分离的核酸分子的载体，或者能够表达本申请所述分离的抗原结合片段的个体细胞，细胞系或细胞培养物。所述宿主细胞可以包括单个宿主细胞的子代。由于天然的，意外的或故意的突变，子代细胞与原始亲本细胞在形态上或在基因组上可能不一定完全相同，但能够表达本申请所述分离的抗原结合片段即可。所述宿主细胞可以通过使用本申请所述的载体体外转染细胞而得到。所述宿主细胞可以是原核细胞（例如大肠杆菌），也可以是真核细胞（例如酵母细胞，例如COS 细胞，中国仓鼠卵巢（CHO）细胞，HeLa 细胞，HEK293 细胞，COS-1 细胞，NS0 细胞或骨髓瘤细胞）。例如，所述的宿主细胞可以是大肠杆菌细胞。例如，所述的宿主细胞可以是酵母细胞。例如，所述的宿主细胞可以是哺乳动物细胞。例如，所述哺

乳动物细胞可以是CHO-K1 细胞。

在本申请中，术语“T细胞”或“T淋巴细胞”可以是任何T细胞，如培养T细胞，例如原代T细胞，或来自培养T细胞系的T细胞，例如Jurkat、SupT1等，或获自哺乳动物的T细胞(优选灵长类动物，物种，包括猴、狗或人)。如果获自哺乳动物，那么T细胞可以获自诸多来源，包括但不限于血液、骨髓、淋巴结、胸腺或其它组织或流体。T细胞还可以被富集或被化。T细胞可以通过在体外或体内将造血干细胞成熟化成T细胞而获得。在示范性方面中，T细胞是人类T细胞。在示范性方面中，T细胞是从人类中分离的T细胞。T细胞可以是任何类型的T细胞，包括NKT细胞，并且可以具有任何发育阶段，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)；外周血液单核细胞(PBMC)；外周血液白细胞(PBL)；肿瘤浸润细胞(TIL)；记忆T细胞；未处理T细胞等等。优选地，T细胞是CD8+T细胞或CD4+T细胞。在一些替代方式中，T细胞与接受细胞或待接受细胞(例如所述细胞处于治疗组合物的形式)的接受受试者是同种异体的(来自相同物种的不同供体)；在一些替代方式中，T细胞是自体的(供体和接受者相同)；在一些替代方式中，T细胞是同基因的(syngeneic) (供体和接受者不同，但为同卵双胞胎)。

在本申请中，术语“免疫效应细胞”通常是指参与免疫应答，行使效应功能的免疫细胞。例如所述行使效应功能可以包括清除异物抗原或促进免疫效应子应答等。免疫效应细胞可以包括浆细胞、T细胞、B细胞、自然杀伤(NK)细胞、自然杀伤 T(NKT)细胞、肥大细胞和骨髓源性吞噬细胞。

本申请的免疫效应细胞可以是自体/自身的(autologous/autogeneic) (“自己的”)或非自体的(“非自己的”，例如同种异体的、同基因的或异基因的)。在本申请中，术语“自体的”通常是指来自相同受试者的细胞。“同种异体的”通常是指与相比较的为相同物种但在遗传上不同的细胞。“同基因的”通常是指在遗传上与相比较的细胞相同的不同受试者的细胞。“异基因的”通常是指物种与相比较的细胞不同的细胞。在一些实施方式中，本申请的细胞是自体的或同种异体的。

在本申请中，术语“修饰”通常是指改变细胞的状态或结构和/或细胞的状态或结构的改变。所述改变通常是与相应未经所述修饰的细胞的状态或结构相比，所述改变可以包括内源基因表达水平或功能的变化，例如通过基因工程手段使得细胞内源基因表达水平下调、上调或不表达，所述基因工程手段可以包括同源重组、CRISPR/Cas9 系统基因编辑等；所述改变还可以包括细胞蛋白质表达、结构或功能的变化，例如通过所述内源基因表达水平或功能的变化而实现的相应蛋白质表达的变化、结构或功能的变化，例如通过调节蛋白质翻译、翻译

后修饰而实现的蛋白质表达的变化、结构或功能的变化；所述改变还可以包括引入外源基因、表达外源蛋白质等。

在本申请中，术语“TRAC”通常是指 T 细胞受体 α 链恒定区 (T cell receptor alpha constant)。T 细胞受体 (TCR) 通常是指位于 T 细胞表面的特异性受体，能够识别与主要组织相容性复合物 (MHC) 分子结合的抗原。TCR 通常由两条不同的蛋白质链组成 (即异源二聚体)。在人类中，多数 T 细胞中的 TCR 由一条 α 链和一个 β 链 (分别由 TRA 和 TRB 编码) 组成，这一类 T 细胞被称为 $\alpha\beta$ T 细胞，少数的 T 细胞中，TCR 由 γ 链和 δ 链 (分别由 TRG 和 TRD 编码) 组成，这一类 T 细胞被称为 $\gamma\delta$ T 细胞。通常情况下， $\alpha\beta$ T 细胞约占 T 细胞总数的 95%， $\gamma\delta$ T 细胞约占 T 细胞总数的 5%，该比率在个体发育过程中和患病状态 (例如白血病) 中发生变化，物种之间也有所不同。组成 TCR 的每一条链都含有可变区与恒定区，在人类中，编码 α 链的基因 (TRA，例如 HGNC:12027 所示的信息) 位于 14 号染色体，由多基因片段构成，包括可变段 (V)、连接段 (J) 以及恒定区 (C)，TRAC 基因通常是指编码 T 细胞受体 α 链恒定区 (C) 的基因序列 (例如 HGNC:12029 所示的信息)，其位于 14 号染色体 (14q11.2; 14: 22,547,505-22,552,131)。通常编码 N 段抗原识别域的可变段 (V) 基因中的 1 个与连接段 (J) 中的一个重排产生一个功能性 V 区外显子，该外显子被转录并通过剪接与恒定区 (C) 连接，从而形成 T 细胞受体 α 链编码序列。

在本申请中，术语“主要组织相容性复合物抗原” (“MHC”，在人类的情况下也称为“人类白细胞抗原” (“HLA”)) 通常是指在细胞表面上表达的赋予细胞独特抗原身份的蛋白质。MHC/HLA 抗原是被 T 细胞和 NK 细胞识别为源自于与免疫效应细胞相同的造血干细胞来源 (“自身”) 或识别为源自于另一种造血重建细胞来源 (“非自身”) 的靶分子。识别了两种主要类别的 HLA 抗原：HLA I 类和 HLA II 类。HLA I 类抗原 (人类中的 A、B、C) 使每个细胞都可被识别为 “自身”，而 HLA II 类抗原 (人类中的 DR、DP 和 DQ) 参与淋巴细胞和抗原呈递细胞之间的反应。两者都已经与移植器官的排斥有牵涉。HLA 基因系统的一个重要方面是其多态性。每个基因，MHC I 类 (A、B 和 C) 和 MHC II 类 (DP、DQ 和 DR) 存在着不同的等位基因。HLA 等位基因由数字和下标表示。例如，两个不相关的个体可能分别携带 I 类 HLA-B 基因 B5 和 Bw41。等位基因产物在 α 和/或 β 结构域的一个或更多个氨基酸中有差异。大量的特异性抗体或核酸试剂被用于使用表达 I 类和 II 类分子的白细胞对个体的 HLA 单倍型进行分型。通常用于 HLA 分型的基因是六种 MHC I 类和 II 类蛋白，即 HLA-A；HLA-B 和 HLA-DR 各自有两个等位基因。HLA 基因簇集在存在于染色体位置 6p21 上的 “超级基因座” 中，所述 “超级基因座” 编码在免疫系统以及一些其他的基本分子和细胞过程的调控中具有重要

作用的 6 个经典的移植 HLA 基因和至少 132 个蛋白质编码基因。完整的基因座粗略度量为 3.6Mb，具有至少 224 个基因座。这种簇集的一个效果是“单倍型”，即存在于单条染色体上的一组等位基因，是从一个亲本遗传来的，倾向于作为一组进行遗传。从每个亲本遗传来的一组等位基因形成一个单倍型，其中一些等位基因倾向于关联在一起。鉴定患者的单倍型可以帮助预测找到匹配供体的概率，并且帮助制定搜索策略，因为一些等位基因和单倍型比其他等位基因和单倍型更常见，而且它们在不同种族和民族中分布的频率不同。

在本申请中，“HLA-A”通常是指一类人类白细胞抗原(human leukocyte antigens)多肽链，由位于人类染色体 6p21.3 的 HLA-A 基因(例如 HGNC:4931 所示的信息)编码。HLA-A 是构成人类细胞表面 I 类 MHC 分子的三种主要多肽类型之一，其他还包括 HLA-B 和 HLA-C。由 HLA-A 基因编码的 α 链和 B2M 基因编码的 β 链(β 2-微球蛋白)组成的异二聚体即为 HLA-A 类 MHC I 分子。所述由 HLA-A 基因编码的 α 链可以包含 α 1 结构域、 α 2 结构域、 α 3 结构域、跨膜区以及胞质区，其中 α 1 结构域、 α 2 结构域可以与肽段结合从而由 MHC I 分子(例如 HLA-A 类)将所述肽段呈递给免疫系细胞。在人类中，与大多数哺乳动物相似，MHC I 分子的 α 链为多态性的，其一级结构有较多变化，截至 2013 年 12 月，共有 2432 个已知的 HLA-A 等位基因，编码 1740 个活性蛋白和 117 个无效蛋白。在本申请中，HLA-A 等位基因可以包括 IMGT/HLA 数据库 3.38.0 版(<https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/>)收录的由 WHO HLA 因子命名委员会命名的不同 HLA-A 等位基因的序列信息。

在本申请中，术语“HLA-B”通常是指人类白细胞抗原(HLA)复合物的基因家族的一部分。HLA 是主要组织相容性复合体(MHC)的人类版本，MHC 是一个存在于许多物种中的基因家族。在这个复杂的基因被分为三个基本组：I 类，II 类和 III 类。在人类中，HLA-B 基因和两个相关基因 HLA-A 和 HLA-C 是 MHC I 类的主要基因。HLA-B 基因位于 6 号染色体短(p)臂的细胞带 21.3，从碱基对 31,353,871 到 31,357,211。HLA-B 是供者和受者之间应匹配的三个主要 HLA 之一。它们是 HLA-A、HLA-B(均为 I 类 MHC)和 HLA-DR(II 类 MHC)。如果这两种组织具有编码这三种 HLA 的相同基因，那么排斥的可能性和严重程度就会降到最低。HLA-B 的数百个版本(等位基因)是已知的，每个版本都有一个特定的编号(例如 HLA-B27)。密切相关的等位基因被归类在一起；例如，至少有 28 个非常相似的等位基因是 HLA-B27 的亚型。这些亚型被指定为 HLA-B*2701 至 HLA-B*2728。

在本申请中，术语“HLA 匹配的”是指其中供体和受体之间 HLA 抗原没有不匹配的供体-受体对，所述供体诸如向需要造血干细胞移植疗法的受体提供造血干细胞移植物的供体。HLA 匹配的(即其中所有 6 个等位基因都是匹配的)供体-受体对具有降低的移植物排斥的风

险，原因是内源性 T 细胞和 NK 细胞不太可能将进入的移植物识别为外来的，并且因此不太可能产生针对移植物的免疫应答。

在本申请中，术语“HLA 不匹配的”是指其中供体和受体之间至少一种 HLA 抗原(特别是对于 HLA-A、HLA-B 和 HLA-DR)是不匹配的供体-受体对，所述供体诸如向需要造血干细胞移植疗法的受体提供造血干细胞移植物的供体。在一些实施方案中，一个单倍型是匹配的，而另一个是不匹配的。HLA 不匹配的供体-受体对相对于 HLA 匹配的供体-受体对可能具有增加的移植物排斥的风险，原因是在 HLA 不匹配的供体-受体对的情况下，内源性 T 细胞和 NK 细胞更可能将进入的移植物识别为外来的，并且这样的 T 细胞和 NK 细胞因此更可能产生针对移植物的免疫应答。

在本申请中，术语“B2M”通常是指是 $\beta 2$ 微球蛋白 ($\beta 2$ -microglobulin)，是 MHC I 类分子的组成部分之一。 $\beta 2$ 微球蛋白 (也称为 β 链) 可以与 HLA 编码的 α 链组成 MHC I 类的分子。B2M 通常在所有有核的细胞中都有表达。在人类中， $\beta 2$ 微球蛋白由位于 15q21.1 的 B2M 基因 (例如 HGNC:914 所示的信息) 所编码。

在本申请中，术语“CIITA”通常是指 II 类主要组织相容性复合体 (MHCII) 的反式激活因子。所述反式激活因子可以是具有酸性转录激活结构域、4 个 LRR (富含亮氨酸的重复序列) 和 GTP 结合结构域的蛋白质。所述蛋白质可位于细胞核中，作为 II 类主要组织相容性复合体 (MHCII) 基因转录的正向调节剂，被称为表达这些基因的“主控制因子”。该蛋白质还可结合 GTP，并利用与 GTP 结合来使其自身转运到细胞核中，在细胞核中，其通常使通过乙酰转移酶 (AT) 活性以类似共激活剂的方式起作用。在人类中，所述蛋白质由位于 16p13.13 的基因 (例如 HGNC:7067 所示的信息) 编码，能够产生几种编码不同同工型的转录物变体。

在本申请中，术语“野生型细胞”通常是指自然存在的或者自然来源的细胞。

在本申请中，术语“核酸”或“多核苷酸”或“核酸分子”通常指脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)及其单链形式或双链形式的聚合物。除非特别限定，否则该术语可以包括含天然核苷酸的类似物的核酸，所述核酸具有与参考核酸 (例如示出了序列信息) 相似的结合特性并且按照与天然存在核苷酸相似的方式代谢。除非另外说明，核酸的序列可以包括其保守方式修饰的变体，例如简并密码子置换、等位基因、直向同源物、SNP 和互补序列，以及明确指出的序列。

在本申请中，术语“表达”通常是指特定核苷酸序列的转录和/或翻译。

在本申请中，术语“基因突变”通常是指基因在结构上发生的碱基对组成或排列顺序的改变。例如单个碱基改变所引起的点突变，或多个碱基的缺失、重复和插入等。

在本申请中，术语“基因沉默”通常是指通过调节机制阻止某些基因的表达。主要可以包括两种：一种是由于 DNA 甲基化、异染色质化以及位置效应等因素引起的转录水平上的基因沉默 (transcriptional gene silencing, TGS)，另一种是转录后基因沉默(post-transcriptional gene silencing, PTGS)，即在基因转录后的水平上通过对靶标 RNA 进行特异性干预而影响基因的表达。通常情况下当基因沉默时，相应基因表达下调/减少。而当基因被敲除时则通常表现为不表达，例如在细胞中，某种特定基因的所有等位基因均被敲除后则表现为该基因的表达消失。基因沉默通常被认为是一种基因敲低机制，通用于沉默基因的方法可以如 RNAi 等。

在本申请中，术语“内源”指来自生物、细胞、组织或系统或在其内部产生的任何物质。

在本申请中，术语“外源”指从生物、细胞、组织或系统外部引入或在其外部产生的任何物质。

在本申请中，术语“反义 RNA”通常是指一种与转录产物 mRNA（信使 RNA）互补的单链 RNA。反义 RNA 可通过与 mRNA 的结合抑制基因的表达。例如，反义 RNA 与靶 mRNA 结合后引起该双链 RNA 分子对 RNA 酶 III 的敏感性增加，使其降解；例如，反义 RNA 与 mRNA 的上游非编码区结合，从而直接抑制靶 mRNA 的翻译。

在本申请中，术语“siRNA”通常是指 Small interfering RNA（小干扰 RNA）或 short interfering RNA（短干扰 RNA）的缩写。siRNA 是一类双链非编码 RNA 分子，长度约为 18-28 个碱基对，可通过与 mRNA 的互补结合引起 mRNA 的降解从而干扰特定基因的表达。在某些实施方式中，siRNA 可以是长双链 RNA 或 shRNA 经 Dicer 酶处理得到的产物。在某些实施方式中，siRNA 进入细胞与其他蛋白质形成 RNA 诱导沉默复合体 (RISC)，有义链发生降解，反义链可与互补的靶向序列结合，从而实现基因沉默。

在本申请中，术语“shRNA”通常是指 short hairpin RNA 的缩写，即“短发夹 RNA”。shRNA 通常包括两个短反向重复序列，中间由一茎环 (loop) 序列分隔，组成发夹结构。通常还可以包括 5-6 个 T 碱基作为 RNA 聚合酶 III 的转录终止子。在某些实施方式中，shRNA 可经由病毒载体或质粒进入细胞中，在聚合酶 II 或聚合酶 III 的作用下进行转录，转录产物自细胞核输出（通常可经由 Exportin 5）后经 Dicer 处理后输送至 RISC，有义链发生降解，反义链可与互补的靶向序列结合，从而实现基因沉默。

在本申请中，术语“CRISPR/Cas 系统”通常是指包含 RNA 引导的核酸酶或其他效应分子和 gRNA 分子的一组分子，所述分子能够指引和实现由 RNA 引导的核酸酶或其他效应分子在靶序列处修饰核酸，例如引起靶序列降解。在某些实施方式中，CRISPR 系统包含 gRNA 和 Cas 蛋白，例如，Cas9 蛋白。包含 Cas9 或其功能性突变体的系统在本申请中称作“Cas9 系

统”或“CRISPR/Cas9 系统”。在某些实施方式中，gRNA 分子和 Cas 分子可以复合，以形成核糖核蛋白(RNP)复合体。

在本申请中，术语“gRNA 分子”或“向导 RNA”、“指导 RNA”、“指引 RNA”、“向导 RNA 分子”、“gRNA”可互换使用，通常是指能够促进特异性指引 RNA 引导的核酸酶或其他效应分子（一般与 gRNA 分子复合）至靶序列上的核酸分子。在某些实施方案中，通过 gRNA 的一部分与 DNA（例如，通过 gRNA 导引结构域）杂交并且通过 gRNA 分子的一部分与 RNA 指导的核酸酶或其他效应分子结合（例如，至少通过 gRNA_{tracr}）实现所述引导。在某些实施方案中，gRNA 分子由单一连续多核苷酸分子组成，在本文中称作“单一向导 RNA”或“sgRNA”等。在其他实施方案中，gRNA 分子由本身能够缔合（一般通过杂交）的多个（例如二个）多核苷酸分子组成，在本文中称作“双重向导 RNA”或“dgRNA”等。

在本申请中，术语“Cas 蛋白”通常是指 CRISPR/Cas 系统中负责剪切 DNA 的酶。可以包括来自 I、II、III 型 CRISPR/Cas 系统的酶。例如，Cas3、Cas9、Cas10。

在本申请中，术语“Cas9 蛋白”通常是指负责剪切 DNA 的来自细菌 II 型 CRISPR/Cas 系统的酶。Cas9 可以包括野生型蛋白及其有功能性突变体。

在本申请中，术语“等位基因”通常是指基因座上的基因序列可能具有的不同变化的形式。基因座也称作基因位点或位点，是指染色体上的固定位置，例如某个基因所在。基因座在基因组中的排列位置称为基因图谱（genetic map）。

在本申请中，术语“纯合子”通常是指同源染色体在同一基因座上的两个等位基因相同的基因型个体。一对相对基因可以有 AA 和 aa 两种基因型的个体。

在本申请中，术语“杂合子”通常是指二倍体中同源染色体同一位点上的两个等位基因不相同的基因型个体，如 Aa。杂合基因型一般比纯合显性或纯合隐性基因型的适应性都要高，这种现象被称为杂合子优势。

在本申请中，术语“肿瘤”和“癌症”可以互换地使用，通常是指以异常细胞快速且失控生长为特征的疾病。癌细胞可以局部地或通过血流和淋巴系统扩散到身体其他部分。本文中描述了各种癌症的例子并且它们包括但不限于乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、宫颈癌、皮肤癌、胰腺癌、结直肠癌、肾癌、肝癌、脑癌、淋巴瘤、白血病、肺癌等。术语“癌症”或“肿瘤”包括恶变前以及恶性癌症和肿瘤，还涵盖实体瘤和非实体肿瘤。

在本申请中，术语“药学上可接受的”通常是指代与合理的益处/风险比相称、在合理医学判断范围内适合用于与人类和动物的组织接触而不具有过度毒性、刺激、过敏应答或其

它问题或并发症的那些化合物、材料、组合物和/或剂型。

在本申请中，术语“药学上可接受的载剂”通常是指常规使用的那些载剂中的任一种，并且仅受到物理-化学考虑因素（如溶解性和与活性结合剂的反应性的缺乏）限制，并且受给药途径限制。本文所描述的药学上可接受的载剂，例如媒剂、佐剂、赋形剂和稀释剂为所属领域的技术人员所熟知并且公众可容易获得。在一个方面中，药学上可接受的载剂是对医药组合物的活性成分具有化学惰性的载剂，并且是在使用条件下不具有不利的副作用或毒性的载剂。在一些实施例中，当向动物或人类给予时，载剂不产生不良、过敏或其它不适当的反应。在一些方面中，医药组合物不含热原质以及会对人类或动物有害的其它杂质。药学上可接受的载剂包括任何和所有溶剂、分散介质、涂料、抗细菌剂和抗真菌剂、等张剂和吸收延迟剂等等；其用途在所属领域中是众所周知。

可接受的载剂、赋形剂或稳定剂对接受者无毒性并且优选在所采用的剂量和浓度下是惰性的，并且包括缓冲液，如磷酸盐、柠檬酸盐或其它有机酸；抗氧化剂，如抗坏血酸；低分子量多肽/蛋白质，如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白；亲水性聚合物，如聚乙烯吡咯烷酮；氨基酸，如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸；单糖、双糖和其它碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合剂，如EDTA；糖醇，如甘露糖醇或山梨糖醇；盐形成抗衡离子，如钠；和/或非离子表面活性剂，如Tween、Pluronic或聚乙二醇(PEG)。

在本申请中，术语“有效量”或“有效剂量”通常是指足以实现或至少部分实现所需效果的量。药物或治疗剂的“治疗有效量”或“治疗有效剂量”通常是当单独使用或与另一种治疗剂组合使用时促进疾病消退(这通过疾病症状严重程度的降低、疾病无症状期的频度和持续时间的增加、或者由于罹患疾病而引起的损害或残疾的预防来证明)的任何药物量。

抗 GD2 CAR-T 细胞的“治疗有效量”或“有效量”也是治疗有益效果超过抗 GD2 CAR-T 细胞的任何毒性或有害作用例如 CRS 的量或剂量。术语“治疗有效量”包含有效“治疗”受试者(例如，患者)的量。在一个实施例中，治疗有效剂量是用于治疗受试者的多发性骨髓瘤的抗 GD2 CAR-T 细胞的最小有效剂量(MED)。在一个实施例中，治疗有效剂量是不会导致受试者有无法解决的 CRS 的抗 GD2 CAR-T 细胞的最大耐受剂量(MTD)。

在本申请中，术语“表达上调”通常是指核酸 mRNA 水平表达的增加或多肽水平表达的增加。该术语也可以涉及增加的多肽活性和/或功能所需的翻译后修饰，例如加上糖部分，磷酸化等。

在本申请中，术语“包括”通常是指包含、总括、含有或包涵的含义。在某些情况下，也表示“为”、“由……组成”的含义。

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。

在本申请中，术语“受试者”通常是指人类或非人类动物，包括但不限于猫、狗、马、猪、奶牛、羊、兔、小鼠、大鼠或猴等。

发明详述

免疫效应细胞

一方面，本申请前提供一种免疫效应细胞，其中所述免疫效应细胞中的 T 细胞抗原受体 (TCR) 和主要组织相容性复合体 (MHCI, MHCII) 在细胞中的功能受到抑制，且所述免疫效应细胞包含靶向 GD2 的嵌合抗原受体 (CAR)。

在某些实施方式中，所述 VH 包含重链互补决定区 1 (HCDR1)、重链互补决定区 2 (HCDR2) 和重链互补决定区 3 (HCDR3)，所述 HCDR1 包含与 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列具有至少约 90%，约 91%，约 92%，约 93%，约 94%，约 95%，约 96%，约 97%，约 98%，约 99%，约 99.5% 同一性的氨基酸序列。例如，所述 HCDR1 可以包含 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述 HCDR2 包含与 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列具有至少约 90%，约 91%，约 92%，约 93%，约 94%，约 95%，约 96%，约 97%，约 98%，约 99%，约 99.5% 同一性的氨基酸序列。例如，所述 HCDR2 可以包含 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述 HCDR3 包含与 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列具有至少约 90%，约 91%，约 92%，约 93%，约 94%，约 95%，约 96%，约 97%，约 98%，约 99%，约 99.5% 同一性的氨基酸序列。例如，所述 HCDR3 可以包含 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述 VH 包含：包含与 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列具有至少约 90%，约 91%，约 92%，约 93%，约 94%，约 95%，约 96%，约 97%，约 98%，约 99%，约 99.5% 同一性的氨基酸序列的 HCDR1、包含与 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列具有至少约 90%，约 91%，约 92%，约 93%，约 94%，约 95%，约 96%，约 97%，约 98%，约 99%，约 99.5% 同一性的氨基酸序列的 HCDR2 和包含与 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列具有至少约 90%，约 91%，约 92%，约 93%，约 94%，约 95%，约 96%，约 97%，约 98%，约 99%，约 99.5% 同一性的氨基酸序列的 HCDR3。

例如，所述免疫效应细胞中的 T 细胞抗原受体 (TCR) 和主要组织相容性复合体 (MHCI, MHCII) 在细胞中的功能受到抑制，且所述免疫效应细胞包含靶向 GD2 的嵌合抗原受体 (CAR)，

所述靶向 GD2 的嵌合抗原受体(CAR)包含靶向部分,所述靶向部分包含抗体重链可变区(VH),所述 VH 可以包含: 包含 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列的 HCDR1、包含 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列的 HCDR2 和包含 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列的 HCDR3。

在某些实施方式中,所述 VH 包含重链框架区 1 (HFR1)、重链框架区 2 (HFR2)、重链框架区 3 (HFR3)和重链框架区 4 (HFR4),所述 HFR1 包含与 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列具有至少约 90%, 约 91%, 约 92%, 约 93%, 约 94%, 约 95%, 约 96%, 约 97%, 约 98%, 约 99%, 约 99.5%同一性的氨基酸序列。

在某些实施方式中,所述 HFR2 包含与 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列具有至少约 90%, 约 91%, 约 92%, 约 93%, 约 94%, 约 95%, 约 96%, 约 97%, 约 98%, 约 99%, 约 99.5%同一性的氨基酸序列。

在某些实施方式中,所述 HFR3 包含与 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列具有至少约 90%, 约 91%, 约 92%, 约 93%, 约 94%, 约 95%, 约 96%, 约 97%, 约 98%, 约 99%, 约 99.5%同一性的氨基酸序列。

在某些实施方式中,所述 HFR4 包含与 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列具有至少约 90%, 约 91%, 约 92%, 约 93%, 约 94%, 约 95%, 约 96%, 约 97%, 约 98%, 约 99%, 约 99.5%同一性的氨基酸序列。

在某些实施方式中,所述 VH 包含 HFR1、HFR2、HFR3 和 HFR4,且所述 HFR1、HFR2、HFR3 和 HFR4 选自:

包含与 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列具有至少约 90%, 约 91%, 约 92%, 约 93%, 约 94%, 约 95%, 约 96%, 约 97%, 约 98%, 约 99%, 约 99.5%同一性的氨基酸序列的 HFR1, 包含与 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列具有至少约 90%, 约 91%, 约 92%, 约 93%, 约 94%, 约 95%, 约 96%, 约 97%, 约 98%, 约 99%, 约 99.5%同一性的氨基酸序列的 HFR2, 包含与 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列具有至少约 90%, 约 91%, 约 92%, 约 93%, 约 94%, 约 95%, 约 96%, 约 97%, 约 98%, 约 99%, 约 99.5%同一性的氨基酸序列的 HFR3, 包含与 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列具有至少约 90%, 约 91%, 约 92%, 约 93%, 约 94%, 约 95%, 约 96%, 约 97%, 约 98%, 约 99%, 约 99.5%同一性的氨基酸序列的 HFR4。

在某些实施方式中,所述 VH 包含与 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列具有至少约 90%, 约 91%, 约 92%, 约 93%, 约 94%, 约 95%, 约 96%, 约 97%, 约 98%, 约 99%, 约 99.5%同一性的氨基酸序列。

例如,所述免疫效应细胞中的 T 细胞抗原受体(TCR)和主要组织相容性复合体(MHCI,

MHCII)在细胞中的功能受到抑制,且所述免疫效应细胞包含靶向 GD2 的嵌合抗原受体(CAR),所述靶向 GD2 的嵌合抗原受体(CAR)包含靶向部分,所述靶向部分包含抗体重链可变区(VH),所述 VH 可以包含 VH 包含 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中,所述 VL 包含轻链互补决定区 1(LCDR1)、轻链互补决定区 2(LCDR2)和轻链互补决定区 3(LCDR3),所述 LCDR1 包含与 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列具有至少约 90%,约 91%,约 92%,约 93%,约 94%,约 95%,约 96%,约 97%,约 98%,约 99%,约 99.5%同一性的氨基酸序列。例如,所述 LCDR1 可以包含 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中,所述 LCDR2 包含与 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列具有至少约 90%,约 91%,约 92%,约 93%,约 94%,约 95%,约 96%,约 97%,约 98%,约 99%,约 99.5%同一性的氨基酸序列。例如,所述 LCDR2 可以包含 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中,所述 LCDR3 包含与 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列具有至少约 90%,约 91%,约 92%,约 93%,约 94%,约 95%,约 96%,约 97%,约 98%,约 99%,约 99.5%同一性的氨基酸序列。例如,所述 LCDR3 可以包含 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中,所述 VL 包含:包含与 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列具有至少约 90%,约 91%,约 92%,约 93%,约 94%,约 95%,约 96%,约 97%,约 98%,约 99%,约 99.5%同一性的氨基酸序列的 LCDR1、包含与 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列具有至少约 90%,约 91%,约 92%,约 93%,约 94%,约 95%,约 96%,约 97%,约 98%,约 99%,约 99.5%同一性的氨基酸序列的 LCDR2 和包含 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列具有至少约 90%,约 91%,约 92%,约 93%,约 94%,约 95%,约 96%,约 97%,约 98%,约 99%,约 99.5%同一性的氨基酸序列的 LCDR3。

例如,所述免疫效应细胞中的 T 细胞抗原受体(TCR)和主要组织相容性复合体(MHCI, MHCII)在细胞中的功能受到抑制,且所述免疫效应细胞包含靶向 GD2 的嵌合抗原受体(CAR),所述靶向 GD2 的嵌合抗原受体(CAR)包含靶向部分,所述靶向部分包含 VH 和 VL,所述 VH 可以包含:包含 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列的 HCDR1、包含 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列的 HCDR2 和包含 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列的 HCDR3;所述 VL 可以包含:包含与 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列的 LCDR1、包含与 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列的 LCDR2 和包含 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列的 LCDR3。

在某些实施方式中,所述 VL 包含轻链框架区 1(LFR1)、轻链框架区 2(LFR2)、轻链框架区 3(LFR3)和轻链框架区 4(LFR4),所述 LFR1 包含与 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列

具有至少约 90%，约 91%，约 92%，约 93%，约 94%，约 95%，约 96%，约 97%，约 98%，约 99%，约 99.5%同一性的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述 LFR2 包含与 SEQ ID NO: 13 所示的氨基酸序列具有至少约 90%，约 91%，约 92%，约 93%，约 94%，约 95%，约 96%，约 97%，约 98%，约 99%，约 99.5%同一性的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述 LFR3 包含与 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列具有至少约 90%，约 91%，约 92%，约 93%，约 94%，约 95%，约 96%，约 97%，约 98%，约 99%，约 99.5%同一性的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述 LFR4 包含与 SEQ ID NO: 15 所示的氨基酸序列具有至少约 90%，约 91%，约 92%，约 93%，约 94%，约 95%，约 96%，约 97%，约 98%，约 99%，约 99.5%同一性的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述 VL 包含 LFR1、LFR2、LFR3 和 LFR4，且所述 LFR1、LFR2、LFR3 和 LFR4 选自：

包含与 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列具有至少约 90%，约 91%，约 92%，约 93%，约 94%，约 95%，约 96%，约 97%，约 98%，约 99%，约 99.5%同一性的氨基酸序列的 LFR1，包含与 SEQ ID NO: 13 所示的氨基酸序列具有至少约 90%，约 91%，约 92%，约 93%，约 94%，约 95%，约 96%，约 97%，约 98%，约 99%，约 99.5%同一性的氨基酸序列的 LFR2，包含与 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列具有至少约 90%，约 91%，约 92%，约 93%，约 94%，约 95%，约 96%，约 97%，约 98%，约 99%，约 99.5%同一性的氨基酸序列的 LFR3，包含与 SEQ ID NO: 15 所示的氨基酸序列具有至少约 90%，约 91%，约 92%，约 93%，约 94%，约 95%，约 96%，约 97%，约 98%，约 99%，约 99.5%同一性的氨基酸序列的 LFR4。

在某些实施方式中，所述 VL 包含与 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列具有至少约 90%，约 91%，约 92%，约 93%，约 94%，约 95%，约 96%，约 97%，约 98%，约 99%，约 99.5%同一性的氨基酸序列。

例如，所述免疫效应细胞中的 T 细胞抗原受体(TCR)和主要组织相容性复合体(MHCI, MHCII)在细胞中的功能受到抑制，且所述免疫效应细胞包含靶向 GD2 的嵌合抗原受体(CAR)，所述靶向 GD2 的嵌合抗原受体(CAR)包含靶向部分，所述靶向部分包含 VH 和 VL，所述 VH 可以包含 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列；所述 VL 可以包含 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，其中所述靶向部分包括全长抗体、Fab、单链可变片段(scFv)或单域

抗体(VHH)。例如,所述靶向部分包括 scFv。

在某些实施方式中,其中所述靶向部分包含位于 VH 与 VL 之间的接头多肽。

在某些实施方式中,其中所述接头多肽包括 SEQ ID NO: 17 或 SEQ ID NO: 18 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中,其中所述靶向部分包含与 SEQ ID NO: 19 或 SEQ ID NO: 20 所示的氨基酸序列具有至少约 90%, 约 91%, 约 92%, 约 93%, 约 94%, 约 95%, 约 96%, 约 97%, 约 98%, 约 99%, 约 99.5% 同一性的氨基酸序列。

例如,其中所述靶向部分可以包含 SEQ ID NO: 19 或 SEQ ID NO: 20 所示的氨基酸序列。

又例如,所述免疫效应细胞中的 T 细胞抗原受体(TCR)和主要组织相容性复合体(MHCI, MHCII)在细胞中的功能受到抑制,且所述免疫效应细胞包含靶向 GD2 的嵌合抗原受体(CAR),所述靶向 GD2 的嵌合抗原受体(CAR)包含靶向部分,所述靶向部分可以包含 SEQ ID NO: 19 或 SEQ ID NO: 20 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中,所述 CAR 包括跨膜域,所述跨膜域包含源自选自下组中的一种或多种蛋白的跨膜域: CD8A、CD8B、CD28、CD3 ϵ (CD3 ϵ)、4-1BB、CD4、CD27、CD7、PD-1、TRAC、TRBC、CD3 ζ 、CTLA-4、LAG-3、CD5、ICOS、OX40、NKG2D、2B4、CD244、Fc ϵ RI γ 、BTLA、CD30、GITR、HVEM、DAP10、CD2、NKG2C、LIGHT、DAP12、CD40L(CD154)、TIM1、CD226、DR3、CD45、CD80、CD86、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64 和 SLAM。

在某些实施方式中,其中所述跨膜域包含源自 CD8A 的跨膜域。例如,所述跨膜域可以包含源自 CD8A 的跨膜域。

在某些实施方式中,其中所述跨膜域包含与 SEQ ID NO: 29 至 SEQ ID NO: 77 中任一项所示的氨基酸序列具有至少约 90%, 约 91%, 约 92%, 约 93%, 约 94%, 约 95%, 约 96%, 约 97%, 约 98%, 约 99%, 约 99.5% 同一性的氨基酸序列。例如,所述跨膜域可以包含 SEQ ID NO: 29 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中,所述 CAR 包括胞内共刺激信号传导结构域,所述胞内共刺激信号传导结构域包含源自选自下组中的一种或多种蛋白的胞内共刺激信号传导结构域: CD28、4-1BB(CD137)、CD27、CD2、CD7、CD8A、CD8B、OX40、CD226、DR3、SLAM、CDS、ICAM-1、NKG2D、NKG2C、B7-H3、2B4、Fc ϵ RI γ 、BTLA、GITR、HVEM、DAP10、DAP12、CD30、CD40、CD40L、TIM1、PD-1、LFA-1、LIGHT、JAML、CD244、CD100、ICOS、CD40 和 MyD88。

在某些实施方式中,其中所述胞内共刺激信号传导结构域源自 4-1BB 的共刺激信号传导

结构域。

在某些实施方式中，其中所述胞内共刺激信号传导结构域包含与 SEQ ID NO: 78 至 SEQ ID NO: 110 中任一项所示的氨基酸序列具有至少约 90%，约 91%，约 92%，约 93%，约 94%，约 95%，约 96%，约 97%，约 98%，约 99%，约 99.5% 同一性的氨基酸序列。例如，所述胞内共刺激信号传导结构域可以包含 SEQ ID NO: 79 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述 CAR 包括胞内信号转导结构域，所述胞内信号转导结构域包含源自选自下组中的一种或多种蛋白的胞内信号转导结构域：CD3 ζ 、CD3 δ 、CD3 γ 、CD3 ϵ 、CD79a、CD79b、Fc ϵ RI γ 、Fc ϵ RI β 、Fc γ RIIIa、牛白血病病毒 gp30、Epstein-Barr 病毒(EBV)LMP2A、猿免疫缺陷病毒 PBj14 Nef、DAP10、DAP-12 和至少包含一个 ITAM 的结构域。

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

在某些实施方式中，其中所述胞内信号转导结构域包含与 SEQ ID NO: 94、SEQ ID NO: 98、SEQ ID NO: 99、SEQ ID NO: 111 至 SEQ ID NO: 121 中任一项所示的氨基酸序列具有至少约 90%，约 91%，约 92%，约 93%，约 94%，约 95%，约 96%，约 97%，约 98%，约 99%，约 99.5% 同一性的氨基酸序列。例如，所述胞内信号转导结构域可以包含 SEQ ID NO: 111 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述 CAR 在靶向部分和跨膜域之间包括铰链区，所述铰链区包含源自选自下组中的一种或多种蛋白的铰链区：CD28、IgG1、IgG4、IgD、4-1BB、CD4、CD27、CD7、CD8A、PD-1、ICOS、OX40、NKG2D、NKG2C、Fc ϵ RI γ 、BTLA、GITR、DAP10、TIM1、SLAM、CD30 和 LIGHT。

在某些实施方式中，所述铰链区包含源自 CD8A 的铰链区。

在某些实施方式中，所述铰链区包含与 SEQ ID NO: 122 至 SEQ ID NO: 143 中任一项所示的氨基酸序列具有至少约 90%，约 91%，约 92%，约 93%，约 94%，约 95%，约 96%，约 97%，约 98%，约 99%，约 99.5% 同一性的氨基酸序列。例如，铰链区可以包含 SEQ ID NO: 130 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述嵌合抗原受体的非靶向部分包含 CD8A 分子跨膜域、CD8A 的铰链区、4-1BB 的胞内共刺激信号传导结构域和 CD3 ζ 胞内信号传导结构域。

在某些实施方式中，所述嵌合抗原受体的非靶向部分包含与 SEQ ID NO: 21 所示的氨基酸序列具有至少约 90%，约 91%，约 92%，约 93%，约 94%，约 95%，约 96%，约 97%，约 98%，约 99%，约 99.5% 同一性的氨基酸序列。例如，所述嵌合抗原受体的非靶向部分可以包含 SEQ ID NO: 21 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，其还包含信号肽片段，所述信号肽片段的 C 端与所述靶向部分的 N 端连接。例如，所述嵌合抗原受体可以包括 CAR 包括信号肽、抗 GD2 scFv、CD8A 铰链结构域、CD8A 跨膜结构域、4-1BB 共刺激结构域和 CD3 ζ 主信号传导结构域。

在某些实施方式中，所述信号肽片段包括 CD8A 信号肽片段。

在某些实施方式中，所述信号肽片段包含与 SEQ ID NO: 22 所示的氨基酸序列具有至少约 90%，约 91%，约 92%，约 93%，约 94%，约 95%，约 96%，约 97%，约 98%，约 99%，约 99.5% 同一性的氨基酸序列。例如，所述信号肽片段可以包含 SEQ ID NO: 22 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述嵌合抗原受体包含与 SEQ ID NO: 23 所示的氨基酸序列具有至少约 90%，约 91%，约 92%，约 93%，约 94%，约 95%，约 96%，约 97%，约 98%，约 99%，约 99.5% 同一性的氨基酸序列。例如，所述嵌合抗原受体可以包含 SEQ ID NO: 23 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述的免疫效应细胞包括人细胞。

在某些实施方式中，所述免疫效应细胞包括 T 细胞、B 细胞、天然杀伤细胞(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。例如，所述免疫效应细胞可以是 T 细胞，如人 T 细胞。

在某些实施方式中，所述免疫效应细胞包括自体的或非自体的免疫效应细胞。例如，所述免疫效应细胞可以是非自体的人 T 细胞。

在某些实施方式中，所述免疫效应细胞包括经修饰的免疫效应细胞，其中所述修饰包括与免疫排斥相关基因中的一个或多个的表达和/或活性被下调。

在某些实施方式中，其中所述与免疫排斥相关基因选自下组中的一种或多种基因：TRAC、TRBC、HLA-A、HLA-B、B2M 和 CIITA。

在某些实施方式中，所述经修饰的免疫效应细胞与未经修饰的相应细胞相比，TRAC 基因和 HLA-A 基因的表达和/或活性被下调。

在某些实施方式中，其中所述经修饰的免疫效应细胞与未经所述修饰的相应细胞相比，CIITA 基因的表达和/或活性未被下调。

在某些实施方式中，其中所述经修饰的免疫效应细胞与未经所述修饰的相应细胞相比，B2M 基因的表达和/或活性未被下调。

例如，所述经修饰的免疫效应细胞与未经所述修饰的相应细胞相比，TRAC 基因和 HLA-A 基因的表达和/或活性可以被下调，CIITA 基因和 B2M 基因的表达和/或活性可以未被下调。

在某些实施方式中，其中所述经修饰的免疫效应细胞与相应的野生型细胞相比，TRAC 基因和 HLA-A 基因的表达和/或活性被下调。

在某些实施方式中，其中所述经修饰的免疫效应细胞与相应的野生型细胞相比，B2M 基因的表达和/或活性未被下调。

在某些实施方式中，其中所述经修饰的免疫效应细胞与相应的野生型细胞相比，CIITA 基因的表达和/或活性未被下调。

例如，所述经修饰的免疫效应细胞与相应的野生型细胞相比，TRAC 基因和 HLA-A 基因的表达和/或活性可以被下调，CIITA 基因和 B2M 基因的表达和/或活性可以未被下调。

在某些实施方式中，其中所述基因的表达水平和/或活性被下调包括使编码所述基因的核酸分子的表达和/或活性下调；和/或使所述基因编码的蛋白质产物的表达和/或活性被下调。

在某些实施方式中，其中所述修饰包括：基因敲除、基因突变和/或基因沉默。

在某些实施方式中，所述修饰包括所述免疫效应细胞中两个 TRAC 等位基因中的任意一个被敲除并且两个 HLA-A 等位基因中的任意一个被敲除。

在某些实施方式中，所述修饰包括所述免疫细胞中两个 TRAC 等位基因被敲除并且两个 HLA-A 等位基因中的任意一个被敲除。

在某些实施方式中，所述修饰包括所述免疫细胞中 TRAC 基因外显子被敲除并且 HLA-A 基因外显子被敲除。

在某些实施方式中，其中所述修饰包括向所述免疫效应细胞施用一种或多种选自下组的物质：反义 RNA、siRNA、shRNA 和 CRISPR/Cas9 系统。

在某些实施方式中，其中所述修饰包括向所述免疫效应细胞施用 CRISPR/Cas9 系统。

在某些实施方式中，其中所述修饰还包括向所述免疫效应细胞施用靶向所述 TRAC 基因外显子部分的 sgRNA。

在某些实施方式中，其中所述靶向所述 TRAC 基因外显子部分的 sgRNA 包含与 SEQ ID NO: 144 至 SEQ ID NO: 158 中任一项所示的核苷酸序列具有至少约 90%，约 91%，约 92%，约 93%，约 94%，约 95%，约 96%，约 97%，约 98%，约 99%，约 99.5% 同一性的氨基酸序列。

在某些实施方式中，其中所述修饰包括向所述免疫效应细胞施用靶向所述 HLA-A 基因外显子部分的 sgRNA。

在某些实施方式中，其中所述靶向所述 HLA-A 基因外显子部分的 sgRNA 包含与 SEQ ID NO: 159 至 SEQ ID NO: 199 中任一项所示的核苷酸序列具有至少约 90%，约 91%，约 92%，

约 93%，约 94%，约 95%，约 96%，约 97%，约 98%，约 99%，约 99.5%同一性的氨基酸序列。

在某些实施方式中，其中所述修饰还包括向所述细胞施用 Cas 酶。

在某些实施方式中，其中 Cas 酶包括 Cas9 蛋白。

在某些实施方式中，其中所述反义 RNA 包含与 SEQ ID NO: 200 至 SEQ ID NO: 203 中任一项所示的核苷酸序列具有至少约 90%，约 91%，约 92%，约 93%，约 94%，约 95%，约 96%，约 97%，约 98%，约 99%，约 99.5%同一性的氨基酸序列。

在某些实施方式中，其中所述免疫效应细胞为 HLA-B 纯合子细胞。

在某些实施方式中，其中所述 HLA-B 纯合子包括 HLA-B*40 纯合子，HLA-B*15 纯合子，HLA-B*46 纯合子，HLA-B*13 纯合子，HLA-B*51 纯合子，HLA-B*58 纯合子，HLA-B*07 纯合子，HLA-B*35 纯合子，HLA-B*44 纯合子，HLA-B*52 纯合子，HLA-B*57 纯合子，HLA-B*54 纯合子，HLA-B*55 纯合子。

在某些实施方式中，其中所述免疫效应细胞为 HLA-A 纯合子或杂合子细胞。

在某些实施方式中，其中所述 HLA-A 纯合子或杂合子包括 HLA-A*02 纯合子，HLA-A*11 纯合子，HLA-A*02/A*11 杂合子或 HLA-A*24 纯合子。

例如，所述免疫效应细胞可以为 T 细胞，且所述 T 细胞可以为 HLA-B 纯合子细胞。

免疫效应细胞的制备方法

另一方面，本申请提供制备前述免疫效应细胞的方法，其包括：在向免疫效应细胞中引入编码前述靶向 GD2 的 CAR 的多核苷酸序列或包含编码前述靶向 GD2 的 CAR 的多核苷酸序列的载体之前/之后，修饰所述免疫效应细胞，所述修饰包括与免疫排斥相关基因中的一个或多个的表达和/或活性被下调。

例如，所述制备免疫效应细胞的方法可以包括：

- (1) 向免疫效应细胞中引入前述的核酸分子或前述的载体；
- (2) 修饰所述免疫效应细胞，所述修饰包括与免疫排斥相关基因中的一个或多个的表达和/或活性被下调。

例如，所述制备免疫效应细胞的方法可以包括：

(1) 采集健康人的外周血，进行 PBMC 的分离，按照比例加入 CD3 磁珠孵育，进行 CD3+T 细胞分选；将 CD3/CD28 抗体偶联磁珠混匀，按计算的量取出适量磁珠悬液加入到 T 细胞培养体系中，激活 T 细胞，过夜培养；

- (2) 根据 GD2 CAR 病毒的滴度感染 T 细胞；

(3) 同时敲除 TRAC 和 HLA-A 基因;

(4) CD3 阴性 T 细胞分选: 按照比例加入 CD3 磁珠, 收集 CD3-T 细胞 (磁珠未结合的细胞)。

在某些实施方式中, 其中所述载体是表达载体。

在某些实施方式中, 其中所述载体选自 DNA 载体、RNA 载体、质粒、慢病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体和逆转录病毒载体。

在某些实施方式中, 其中所述载体还包含 EF-1 α 启动子。

在某些实施方式中, 其中所述载体还包含土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件(WPRE)。

在某些实施方式中, 其中所述与免疫排斥相关基因选自下组中的一种或多种基因: TRAC、TRBC、HLA-A、HLA-B、B2M 和 CIITA。例如, 所述与免疫排斥相关基因可以包括 TRAC 和/或 HLA-A。

在某些实施方式中, 与未经所述修饰的相应细胞中相应基因的表达和/或活性相比, 下调所述免疫效应细胞中 TRAC 基因和 HLA-A 基因的表达和/或活性。

在某些实施方式中, 与未经所述修饰的相应细胞中相应基因的表达和/或活性相比, CIITA 基因的表达和/或活性未被下调。

在某些实施方式中, 与未经所述修饰的相应细胞中相应基因的表达和/或活性相比, B2M 基因的表达和/或活性未被下调。

例如, 所述经修饰的免疫效应细胞与未经所述修饰的相应细胞相比, TRAC 基因和 HLA-A 基因的表达和/或活性可以被下调, CIITA 基因和 B2M 基因的表达和/或活性可以未被下调。

在某些实施方式中, 与相应的野生型细胞相比, 所述免疫效应细胞的 TRAC 基因和 HLA-A 基因的表达和/或活性被下调。

在某些实施方式中, 与相应的野生型细胞相比, CIITA 基因的表达和/或活性未被下调。

在某些实施方式中, 与相应的野生型细胞相比, B2M 基因的表达和/或活性未被下调。

在某些实施方式中, 其中所述基因的表达水平和/或活性被下调包括使编码所述基因的核酸分子的表达和/或活性下调; 和/或使所述基因编码的蛋白质产物的表达和/或活性被下调。

例如, 所述经修饰的免疫效应细胞与相应的野生型细胞相比, TRAC 基因和 HLA-A 基因的表达和/或活性可以被下调, CIITA 基因和 B2M 基因的表达和/或活性可以未被下调。

在某些实施方式中, 其中所述修饰包括: 基因敲除、基因突变和/或基因沉默。

在某些实施方式中, 所述修饰包括所述免疫效应细胞中两个 TRAC 等位基因中的任意一个被敲除并且两个 HLA-A 等位基因中的任意一个被敲除。

在某些实施方式中，所述修饰包括所述免疫细胞中两个 TRAC 等位基因被敲除并且两个 HLA-A 等位基因中的任意一个被敲除。

在某些实施方式中，所述修饰包括所述免疫细胞中 TRAC 基因外显子被敲除并且 HLA-A 基因外显子被敲除。

在某些实施方式中，其中所述修饰包括向所述免疫效应细胞施用一种或多种选自下组的物质：反义 RNA、siRNA、shRNA 和 CRISPR/Cas9 系统。

在某些实施方式中，其中所述修饰包括向所述免疫效应细胞施用 CRISPR/Cas9 系统。

在某些实施方式中，其中所述修饰包括向所述免疫效应细胞施用靶向所述 TRAC 基因外显子部分的 sgRNA。

在某些实施方式中，其中所述靶向所述 TRAC 基因外显子部分的 sgRNA 包含与 SEQ ID NO: 144 至 SEQ ID NO: 158 中任一项所示的核苷酸序列具有至少约 90%，约 91%，约 92%，约 93%，约 94%，约 95%，约 96%，约 97%，约 98%，约 99%，约 99.5% 同一性的氨基酸序列。

在某些实施方式中，其中所述修饰包括向所述免疫效应细胞施用靶向所述 HLA-A 基因外显子部分的 sgRNA。

在某些实施方式中，其中所述靶向所述 HLA-A 基因外显子部分的 sgRNA 包含与 SEQ ID NO: 159 至 SEQ ID NO: 199 中任一项所示的核苷酸序列具有至少约 90%，约 91%，约 92%，约 93%，约 94%，约 95%，约 96%，约 97%，约 98%，约 99%，约 99.5% 同一性的氨基酸序列。

在某些实施方式中，其中所述修饰还包括向所述细胞施用 Cas 酶。

在某些实施方式中，其中 Cas 酶包括 Cas9 蛋白。

在某些实施方式中，其中所述反义 RNA 包含与 SEQ ID NO: 200 至 SEQ ID NO: 203 中任一项所示的核苷酸序列具有至少约 90%，约 91%，约 92%，约 93%，约 94%，约 95%，约 96%，约 97%，约 98%，约 99%，约 99.5% 同一性的氨基酸序列。

在某些实施方式中，其中所述免疫效应细胞包括人细胞。

在某些实施方式中，所述免疫效应细胞包括 T 细胞、B 细胞、天然杀伤细胞(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。例如，所述免疫效应细胞可以是 T 细胞，如人 T 细胞。

在某些实施方式中，所述免疫效应细胞包括自体的或非自体的免疫效应细胞。

在某些实施方式中，其中所述细胞为 HLA-B 纯合子细胞。例如，所述免疫效应细胞可以

为人细胞，且所述人细胞可以为 HLA-B 纯合子细胞。又例如，所述免疫效应细胞可以为 T 细胞，且所述人细胞可以为 HLA-B 纯合子细胞。

在某些实施方式中，其中所述 HLA-B 纯合子包括 HLA-B*40 纯合子，HLA-B*15 纯合子，HLA-B*46 纯合子，HLA-B*13 纯合子，HLA-B*51 纯合子，HLA-B*58 纯合子，HLA-B*07 纯合子，HLA-B*35 纯合子，HLA-B*44 纯合子，HLA-B*52 纯合子，HLA-B*57 纯合子，HLA-B*54 纯合子，HLA-B*55 纯合子。

在某些实施方式中，其中所述细胞为 HLA-A 纯合子或杂合子细胞。

在某些实施方式中，其中所述 HLA-A 纯合子或杂合子包括 HLA-A*02 纯合子，HLA-A*11 纯合子，HLA-A*02/A*11 杂合子或 HLA-A*24 纯合子。

用途、药物组合物、治疗方法

另一方面，本申请提供前述的免疫效应细胞在制备 CAR-T 细胞中的应用。

另一方面，本申请提供一种药物组合物，其包含前述免疫效应细胞，以及任选地药学上可接受的载剂。

另一方面，本申请提供前述的免疫效应细胞和/或前述的药物组合物，其用于治疗与 GD2 的表达相关的疾病或病症。

在某些实施方式中，其中所述与 GD2 的表达相关的疾病或病症包括与 GD2 的表达上调相关的疾病或病症。

在某些实施方式中，其中所述与 GD2 的表达相关的疾病或病症包括癌症。

在某些实施方式中，其中所述癌症包括 GD2 阳性肿瘤。

在某些实施方式中，其中所述癌症包括：神经母细胞瘤，黑色素瘤，视网膜母细胞瘤，小细胞肺癌，尤文肉瘤，成神经管细胞瘤，软组织肉瘤，骨肉瘤或胶质瘤。

另一方面，本申请提供前述的免疫效应细胞和/或前述的药物组合物在制备药物中的用途，所述药物用于治疗与 GD2 的表达相关的疾病或病症。

在某些实施方式中，所述与 GD2 的表达相关的疾病或病症包括与 GD2 的表达上调相关的疾病或病症。

在某些实施方式中，其中所述与 GD2 的表达相关的疾病或病症包括癌症。

在某些实施方式中，其中所述癌症包括 GD2 阳性肿瘤。

在某些实施方式中，其中所述癌症包括：神经母细胞瘤，黑色素瘤，视网膜母细胞瘤，小细胞肺癌，尤文肉瘤，成神经管细胞瘤，软组织肉瘤，骨肉瘤或胶质瘤。

另一方面，本申请提供一种预防或治疗与 GD2 的表达相关的疾病或病症的方法，其包括

向有需要的受试者施用有效量的前述的免疫效应细胞和/或前述的药物组合物。

在某些实施方式中，其中所述与 GD2 的表达相关的疾病或病症包括与 GD2 的表达上调相关的疾病或病症。

在某些实施方式中，其中所述与 GD2 的表达相关的疾病或病症包括癌症。

在某些实施方式中，其中所述癌症包括 GD2 阳性肿瘤。

在某些实施方式中，其中所述癌症包括：神经母细胞瘤，黑色素瘤，视网膜母细胞瘤，小细胞肺癌，尤文肉瘤，成神经管细胞瘤，软组织肉瘤，骨肉瘤或胶质瘤。

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嵌合抗原受体、免疫效应细胞、制备方法和用途等，而不适用于限制本申请发明的范围。

实施例

实施例 1

1.1 抗 GD2 嵌合抗原受体 (CAR) 的设计

抗 GD2 CAR VLVH(鼠源)结构包括：一个 GD2 抗原结合区（来源于抗 GD2 单克隆抗体 Scfv），一个 CD8A 胞外铰链区，一个 CD8A 跨膜区，一个 4-1BB 胞内共刺激域和一个 CD3 ζ 激活信号域，其 DNA 序列如 SEQ ID NO: 28 所示和氨基酸序列如 SEQ ID NO: 23 所示。

1.2 GD2 CAR 的慢病毒载体构建

根据 GD2 序列信息及 CAR 载体结构，构建 GD2 CAR 慢病毒表达载体，载体示意图（见图 1）。进行优化：选择商业化慢病毒表达载体 pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP 为骨架，在此载体基础上进行元件改造。首先，将载体的氨苄抗性基因 β -内酰胺酶替换为源自 Tn5 的氨基糖苷磷酸转移酶，使载体具有卡那霉素抗性。其次，我们删除了在体内应用中具有潜在威胁性的 CMV 启动子及其临近的下游多克隆位点。最后，将原载体中由 EF1 启动子启动表达的 copGFP 基因删除，保留 SalI 酶切位点，并在 SalI 5' 端加入 SmaI 酶切位点供载体构建用，形成最终目的载体。加入的 SmaI 酶切位点是最终目的载体的单一酶切位点，载体的其他序列部分不具有该酶切位点。优化后构建嵌合抗原受体慢病毒表达载体，经 sanger 测序确证序列无误后，进行慢病毒包装。

1.3 设计导向 RNA

通过网站 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>，查找并下载相应基因序列，使用 SnapGene 软件打开基因序列，可在目的基因的不同外显子上设计 sgRNA。在本实施例中采用的 CRISPR/Cas9 系统的 sgRNA 非限制性的设计原则为：5'-NNN (20) -NGG-3'，NGG 被称为原间隔子相邻

基序 (PAM)，其中，N 表示 A、T、C 或 G。由于在同一外显子上可以设计出较多 sgRNA，并且由 20 个核苷酸序列组成的 sgRNA 可能会在基因组中重复出现，所以利用网站 <http://crispr.cos.uni-heidelberg.de> 来进行 sgRNA 的设计与评估，将外显子序列粘贴至该网站，网站设计出 sgRNA 并进行预测评估，在评估中得分越高，则说明可能存在较高的编辑效率和较低的脱靶风险，从中选择得分较高的 sgRNA 进行试验。靶向 TRAC 基因的 sgRNA 如 SEQ ID NO: 144 至 SEQ ID NO: 158 所示，靶向 HLA-A02 基因的 sgRNA 如 SEQ ID NO: 159 至 SEQ ID NO: 180 所示，靶向 HLA-A11 基因的 sgRNA 如 SEQ ID NO: 181 至 SEQ ID NO: 191 所示，靶向 HLA-A24 基因的 sgRNA 如 SEQ ID NO: 192 至 SEQ ID NO: 199 所示，由金斯瑞生物科技公司合成。

实施例 2

2.1 供体筛选

根据受体的 HLA-B 分型，选择与受体 HLA-B 分型匹配的 HLA-B 纯合子。

首先供者来源基于人群中的 HLA-B 纯合子，患者 HLA-B 的其中一个等位基因和供者 HLA-B 纯合子一致即可，来源于这些供者的细胞能覆盖高数量的患者人群。降低 HLA-B 亚型不一致引起的排异反应。HLA-B 主要选择人群中频率较高的 B*40 纯合子，B*15 纯合子，B*46 纯合子，B*13 纯合子，B*51 纯合子，B*58 纯合子，B*07 纯合子，B*35 纯合子，B*44 纯合子，B*52 纯合子，B*57 纯合子，B*54 纯合子，B*55 纯合子。HLA-A 选择人群中频率较高的 A*02 纯合子，A*11 纯合子及 A*02/A11 杂合子。

2.2 CD3+ T 细胞制备

(1) 从外周血中分离 PBMC

从健康捐献者中采集外周血，用 PBS 缓冲液按照 1: 1 进行外周血稀释。在新的 50mL 离心管中先加入稀释后血量 1/3 的细胞分离液 (Ficoll)，然后沿着管壁非常缓慢加入血细胞稀释液，800g 常温离心 20min (离心机设置升速 1、降速 0)。离心后离心管中的液体自上而下分为 PBS 与血清层、白细胞层、淋巴细胞分离液、红细胞层。去除 PBS 与血清层，将白细胞层移至新的 50ml 离心管中，加入 PBS 至 40ml 清洗细胞，450g 离心 10min。离心后弃上清，即得到外周血单个核细胞。细胞重悬后进行细胞计数。

(2) 复苏冻存的健康人 PBMC

将冻存的健康人 PBMC 细胞在 37°C 水浴锅中进行复苏，完全融化后将细胞吸到含有 10ml 含 10% FBS 的 X-VIVO15 培养基 (购自 LONZA) 的 15ml 离心管中，400g 离心 8min；去上

清, 加入 2ml X-VIVO15 培养基(含 10% FBS 和终浓度 100 μ g/ml 的 DNase I) 室温孵育 15min, 孵育的过程中不断振荡; 将孵育结束后的溶液用 40 μ m 的滤网进行过滤, 并吸取 10ml PBS 缓冲液重悬底部的细胞再加到滤网上, 过滤后 400g 离心 8min, 离心后弃上清, 细胞重悬后进行细胞计数。

(3) CD3⁺T 细胞分选

使用 EasySep™ 人 T 细胞分选试剂盒(购自 StemCell Technologies, 货号: 17951) 提取外周血单个核细胞(PBMC)中的 T 细胞。将 PBMC 密度调整至 5×10^7 细胞/ml, PBS 缓冲液的添加范围在 0.25-2ml; 先加 cocktail 混匀再按照 50 μ l/ml 加入 isolation cocktail, 混匀后室温放置 5min; 将 RapidSpheres 用旋涡振荡仪涡旋 30s 后加按照 40 μ l/ml 加入至细胞中混匀; 补加缓冲液至 2.5ml 的倍数, 上下轻轻吹打 2-3 次; 按照每管 2.5ml 分别加到冻存管中, 将冻存管置于磁力架上, 室温放置 3min; 轻轻打开冻存管盖, 小心持两边拿起磁力架, 倒置保持 2-3s, 将细胞液一次性倒入新的离心管中; 用 10-20 ml 缓冲液(视细胞量)重悬细胞后, 300g 离心 10min, 弃掉上清, 得到 CD3⁺T 细胞。

(4) T 细胞激活

激活试剂按培养基:Transact=99:1 体积比进行配置, 培养基为 X-VIVO15 培养基(含 5% FBS、200U/ml IL2、10ng/ml IL7 和 5ng/ml IL15)、Transact 购自美天旎。T 细胞按每 1×10^6 个细胞用 1ml 激活试剂(含有 10 μ l Transact)充分重悬后, 放置于 37°C、5% CO₂ 培养箱中孵育 1 天。

实施例 3

3.1 转病毒

按照实施例 2 的方式获得 CD3⁺T 细胞(D0 天), 并用 CD3/CD28 抗体磁珠激活, 激活后于 D1 天进行慢病毒载体(实施例 1 制备的 GD2 CAR 慢病毒表达载体)转染, D2 天洗去慢病毒载体, D3 天进行电转。

3.2 基因敲除

使用电转试剂盒(购自 LONZA, 货号 V4XXP-3024)通过电转方式将 RNP 复合体转入 3.1 制备的激活后 T 细胞(取 D3 天的 CAR-T 细胞为初始细胞)。取样计数后收集细胞离心, 用 PBS 重悬细胞沉淀。提前 30min 在孔板中预热培养基(X-VIVO15 培养基+10% FBS+IL2 (200U/ml)+IL7 (10ng/ml)+IL15(5ng/ml))。准备电转缓冲液: Nucleofector Solution: Supplement 按照 82:18 进行配置; 根据每个电转体系使用 1×10^7 的细胞进行分配

RNP 复合物 (Cas9:sgRNA=2:1)，先将 10 μ g sgRNA 加入到 PCR 管 (无 RNA 酶) 中，再加入 20 μ g Cas9 蛋白 (购自 thermo，货号 A36499)，轻轻混匀后，室温孵育 12min。将上述细胞进行计数，300g 离心 8min 弃上清，加入 PBS 重悬细胞，吸取 1E7 个细胞重新 300g 离心 8min，弃上清后用 100 μ l 配置好的电转缓冲液重悬细胞。将孵育好的 RNP 复合体加入上述细胞悬液中，轻柔混匀，然后将混合物轻轻地转移到电转杯中。将电转杯放在 Lonza-4D 电转仪上，选用 EO-115 电转程序进行电转。往电转杯中加入预热的培养基，然后用配套吸管将细胞转入孔板中预热的培养基中，然后放置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养 48 小时后收细胞，sanger 测序检测编辑效率，同时收细胞 FACS 检测敲除效率。

其中 sgRNA 序列 TRAC sgRNA: AGAGTCTCTCAGCTGGTACA (SEQ ID NO: 144)，A02 sgRNA: CTGACCATGAAGCCACCCTG (SEQ ID NO: 161)，A11 sgRNA: GGCCCCCTCCTGCTCTATCCA (SEQ ID NO: 191)。

3.3 CD3 阴性 T 细胞分选

进行 CD3 阴性 T 细胞分选，细胞计数后离心，弃上清；用 buffer 重悬细胞并混匀，按 20ul CD3 磁珠/10⁷ 的细胞加 CD3 磁珠，混合均匀后放 4 度冰箱孵育，加 buffer 洗涤细胞离心后进行磁珠分离，首先将 column 放在磁极上，下面对应放离心管，用 buffer 浸润 column (LD)，将细胞加到 column 上，不要产生气泡，用 buffer 清洗 column 2 次，收集清洗下来的液体 (CD3-T) 于 15ml 离心管中，取部分细胞进行细胞计数。

3.4 细胞培养

镜下观察细胞状态，取细胞进行稀释计数，补充全培养基维持细胞密度在 3 $\times 10^5$ -1 $\times 10^6$ 个/ml，中间补/换液，放入 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养。细胞收获：收集到细胞离心管中离心后弃上，用生理盐水再次洗涤细胞，离心，配制冻存液，冻存液重悬离心后的细胞，用注射器吸取细胞悬液至终制品用细胞冻存袋中，在细胞冻存袋上贴好标签，进行下一步冻存。

3.5 基因敲除效率检测

(1) Sanger 测序检测

细胞计数，取 3~5 $\times 10^4$ 细胞，2000r/min 离心 5min，尽量去干净上清，然后每管加 20 μ l DE 裂解液，细胞裂解后加到 PCR 管中，瞬时离心后上 PCR 仪，上机条件：65 $^{\circ}$ C 30min，4 $^{\circ}$ C 30s、95 $^{\circ}$ C 2min、16 $^{\circ}$ C 无限。使用引物对 TRAC-For/TRAC-Rev，或 HLA-A For/HLA-A Rev，将裂解产物作为模板进行 PCR，将 PCR 产物交送金唯智进行 Sanger 测序。得到 sanger 测序结果后，使用网站：https://moriaritylab.shinyapps.io/editr_v10/ 中的 EditR 编辑器预测编辑发生的位置以及编辑效率。

(2) 流式检测细胞计数

取 10E5 至 10E8 细胞，2000rpm 离心 5min，去上清，然后每管加 100μl 的 PBS 缓冲液重悬细胞，再加入 anti-human AB TCR-APC（购自 eBioscience）抗体 5μl，HLA-A02 Monoclonal Antibody（BB7.2），APC，eBioscience™（购自 invitrogen）抗体 5μl，混合均匀后于室温孵育 10min。2000rpm 离心 5min 后再以 PBS 缓冲液洗 2 遍，重悬细胞并通过 BD FACSAria 流式细胞仪进行检测，可得细胞表面 TCR、HLA-A02 表达阳性率。敲除效率=(A-B)/A×100%；A 为对照组表达阳性率；B 为敲除组表达阳性率。

结果如图 3A-3D 所示，anti-GD2 UCAR-T 细胞 CAR 阳性率可达 60%以上（图 3A），anti-GD2 UCAR-T 细胞中心记忆比例达 45%左右（图 3B），anti-GD2 UCAR-T 细胞双敲效率高达 95%以上（图 3C），平均扩增倍数 150X 以上（图 3D）。

实施例 4 anti-GD2 UCAR-T 细胞体外细胞毒性分析

4.1 anti-GD2 UCAR-T 细胞对靶细胞的杀伤

(1) GD2 靶细胞：IMR-32-Luciferase-GFP；调整靶细胞状态至对数生长期，在进行实验前需连续传代 2 次；

(2) 制备 anti-GD2 UCAR-T 细胞及对照组 anti-GD2 CAR-T，T 细胞，流式检测敲除效率，转染效率，CD3-T 分选效率及记忆 T 细胞的比例，统计扩增倍数；

(3) 离心收集制备的几组细胞，每组 6×10^6 的细胞；

(4) 将靶细胞重悬于 1640+10%FBS 中，每个靶点取 3 块 24 孔板，按照 2×10^5 /孔的量接种靶细胞。（靶细胞和效应细胞都是 2×10^6 /ml 的密度接种）。然后按照 E/T（效靶比，效应细胞：靶细胞）比例，加入效应细胞。每孔补液到最大体积（如 600ul）。对照接种同样数量的靶细胞，不加效应细胞（600ul）。将孔板置于 5% CO₂、37° C 培养箱中，培养 24 小时。E/T：1:2，1:1，2:1，5:1，10:1 铺板，重复三次。

(5) 培养 24 小时，将孔板从培养箱中取出，收集 200ul 上清。然后通过检测 Luciferase 活性反映重组 CAR-T 细胞对靶细胞的裂解能力。

靶细胞裂解百分数计算公式：

$$Lysis\% = (1 - \frac{Luc_{\text{活性混合样本}}}{Luc_{\text{活性对照样本}}}) \times 100\%$$

结果分析：anti-GD2 UCAR-T 对 IMR-32-LG 细胞有显著的杀伤作用，在效靶比 2:1 时即可达到 95%以上的杀伤效率（见图 4）。

4.2 anti-GD2 UCAR-T 细胞与靶细胞共培养细胞因子分泌检测

收集上述共培养体系的上清，检测细胞因子分泌水平。结果分析（图 5A-5C）：anti-GD2 UCAR-T 显著激活，大量分泌 IL-2，IFN- γ 和 TNF- α 细胞因子。

实施例 5 anti-GD2 UCAR-T 细胞体内抗肿瘤效果

8-10 周大的 NSG 小鼠静脉注射肿瘤细胞 IMR-32- Luciferase-GFP (1×10^6 - 1×10^7)，小鼠分成三组，每组 5 只。肿瘤成功建立后第 7 天分别向小鼠瘤内注射 anti-GD2 UCAR-T 细胞，anti-GD2 CAR-T 细胞，无基因敲除的 T 细胞各 5×10^6 ，通过荧光素酶监测小鼠肿瘤消退情况。

结果分析（图 6）：回输 anti-GD2 UCAR-T 细胞的小鼠，肿瘤生长速度明显减缓，anti-GD2 UCAR-T 细胞表现出卓越的抗肿瘤效果。

实施例 6 anti-GD2 UCAR-T 细胞体内半衰期检测

准备人源化免疫系统小鼠(hHSC-NCG)15 只，分成 3 组。制备细胞，实验组 anti-GD2 UCAR-T 细胞（敲除 TRAC+HLA-A02）；对照组 1：anti-GD2 CAR-T；对照组 2：anti-GD2 UCAR-T 细胞（敲除 TRAC+B2M）；每只小鼠注射 1×10^7 细胞，不同的时间点采血 D0，2h，D3，D7，D14，D21，D28，D35，D42，D49，D56，D60。提取不同时间点血样中基因组，用 QPCR 绝对定量的方法计算 copy/ng genome DNA，阳性对照用第 14 天收获的 UCAR-T 细胞，阴性对照用 DEPC 水。

结果分析（图 7）：anti-GD2 UCAR-T 细胞（敲除 TRAC+HLA-A02）在小鼠体内存活时间超过 7 周，并在 week4 进行二次扩增。

实施例 7 通用型 T 细胞的体外安全性验证

（1）GVHD 反应：制备 TRAC，HLA-A 双敲 T 细胞，无基因敲除的 T 细胞，辐照同种异体 PBMC，分别刺激制备的 2 组细胞，检测 IFN- γ 的水平。

结果分析：TRAC，HLA-A 双敲 T 细胞组 IFN- γ 分泌水平很低，表明 TRAC 敲除降低了 GVHD 反应。

（2）同种异体反应：同种异体 PBMC 刺激辐照后的 2 组细胞，检测 IFN- γ 的水平。

结果分析：TRAC，HLA-A 双敲 T 细胞组 IFN- γ 分泌水平很低，表明 HLA-A 的敲除降低了同种异体反应。

实施例 8 通用型 T 细胞的体内安全性验证

(1) GVHD 反应：制备 TRAC, HLA-A 双敲 T 细胞, 无基因敲除的 T 细胞。取 8-10 周 NSG 小鼠分别注射 1×10^7 , 通过临床指标：存活率, 皮毛纹理和皮肤完整性等, 观察移植物抗宿主反应。细胞因子检测：取外周血血清, 检测 IL6、IL-2、TNF- α 、IFN- γ 等细胞因子的水平。取血时间点：回输前, 24h, D3, D7, D14, D28, 2M。脏器病变检测：观察期结束时 (2 个月左右), 取小鼠的脾脏, 肝脏, 皮肤、胃肠道, 肺, 肾脏进行 HE 切片染色分析。

结果分析：注射未经处理的 T 细胞的 5 只小鼠中, 有 4 只在注入后 2 个月内发生了致死性异种移植物抗宿主病 (GVHD)。而接受 TRAC, HLA-A 双敲细胞的小鼠中没有一个出现 GVHD ; TRAC, HLA-A 双敲 T 细胞组细胞因子 IL6、IL-2、TNF- α 、IFN- γ 分泌水平很低; 并且小鼠不同器官形态正常。说明 TRAC, HLA-A 双敲 T 细胞组很大程度上降低了 GVHD 反应。

(2) 同种异体反应：制备 TRAC, HLA-A 双敲 CAR-T 细胞, 共同注射 1×10^7 TCR-HLA-A-双敲 CAR-T 细胞 (辐照) 和 2×10^6 同种异型 T 细胞到 NSG 小鼠体内。对照组：注射 1×10^7 TCR-CAR-T 细胞到 NSG 小鼠体内。

不同时间点取血测 CAR 拷贝数。比较两组 CAR 的拷贝数变化。时间点：D1, D5, D7, D10, D14, D24。

结论：D24 天, 对照组小鼠排异反应明显, 基本检测不到拷贝数; 而实验组拷贝数仍处在相对稳定水平, 说明排异反应明显减弱, 实验组细胞在小鼠体内存活时间延长说明 TRAC, HLA-A 双敲 CAR-T 细胞组很大程度上降低了排异反应 (见图 8A-8B)。

实施例 9 基因编辑的安全性分析

制备 TRAC, HLA-A 双敲 T 细胞, 无基因敲除的 T 细胞, 检测敲除效率后, 进行以下分析：

(1) 脱靶：

对照组：转 CAS9+ODN 标签

实验组：转 CAS9+sgRNA(TRAC+HLA-A)+ODN 标签

On-target and off-target-WGS: (Whole genome sequencing): 分别取无基因敲除的 T 细胞、TRAC, HLA-A 双敲的 T 细胞各 1×10^6 送苏州金维智生物科技有限公司检测。

结果分析：实验组脱靶率很低, 而且脱靶主要集中在基因之间和内含子上, 对基因功能

的影响不大（见图 9）。

（2）染色体易位：采用 qPCR 方法对同时编辑 TRAC 和 HLA 基因座时可能发生重排进行了定量。两个易位被标记为 TRAC:HLA, HLA:TRAC。合成的模板质粒中的阳性参考样品作为检测对照进行评估。以 HLA 基因组靶区两侧的扩增片段作为内对照。提取基因组 DNA 进行实时定量 PCR，根据标准曲线和 Cq 值计算基因组 DNA 的基因拷贝数。

结果分析：双敲 T 细胞(TRAC+HLA-A)在 D14(收获)检测是否发生染色体易位，检测结果：两种易位方式检测值都接近零检值，提示基因座没有发生重排（见图 10）。

（3）核型分型：分别取铺满度在 70-80%的无基因敲除的 T 细胞、TRAC, HLA-A 双敲的 T 细胞各 1×10^6 装于 2 个 T25 瓶中，加满培养液，盖上全密封盖子，缠上封口膜，送至浙江如耀生物科技有限公司检测。

结果分析：和对照组比，实验组核型正常（见 11）。

（4）Cas9 蛋白残留：细胞制备时，取敲除前、敲除后以及收获前三个时间点的细胞各 1×10^6 进行裂解，随后用蛋白定量试剂盒（NOVATEINBIO，货号 NB-E1372PR）进行定量，将各组样品调整至相同上样量 $2\mu\text{g}$ ，根据说明书用 CRISPR/Cas9 蛋白 ELISA 试剂盒进行检测。样品中的 Cas9 蛋白被牢固稳定地点在试纸孔上。然后使用检测抗体识别被绑定的 Cas9 蛋白，然后显影剂进行显影。Cas9 比值与吸光度成正比，通过与 Cas9 对照品比较来定量 Cas9 蛋白的绝对量。

结果分析：双敲 T 细胞(TRAC+HLA-A)分别在电转前（D3）、电转后换液前（D5）、D9、D14(收获)四个时间点检测 spCas9 的残留，除了电转后换液前（D5）检测到微量残留，其余三个时间点均未检出。（见图 12）。

实施例 10 制备单基因敲除的 T 细胞

使用电转试剂盒（购自 LONZA，货号 V4XXP-3024）通过电转方式将 RNP 复合体转入实施例 2 制备的激活后 T 细胞。提前 30min 在孔板中预热培养基（X-VIVO15 培养基+10% FBS+IL2 (200U/ml)+IL7 (10n g/ml)+IL15(5ng/ml)）。电转缓冲液按照 Nucleofector Solution: Supplement=82:18 进行配置。准备 RNP 复合体：TRAC 的 sgRNA 序列为 sg9（如 SEQ ID NO: 144 所示），HLA-A 的 sgRNA 序列为 HLA-A02 Sg2（如 SEQ ID NO: 160 所示）或 HLA-A02 Sg5（如 SEQ ID NO: 161 所示）或 HLA-A11 sg21（如 SEQ ID NO: 191 所示）或 HLA-A11 Rsg2（如 SEQ ID NO: 190 所示），先将 $20\mu\text{g}$ sgRNA 加入到 PCR 管（无 RNA 酶）中，再加入 $10\mu\text{g}$ Cas9 蛋白（购自 thermo，货号 A36499），轻轻混匀后，室温孵育 12min。将实施例 2 培养的激活后 T 细胞进行计数，300g 离心 8min 弃上清，加入 PBS 重悬细胞，吸取 1×10^7 个

细胞重新 300g 离心 8min, 弃上清后用 100 μ l 配置好的电转缓冲液重悬细胞。将孵育好的 RNP 复合体加入上述细胞悬液中, 轻柔混匀, 然后将混合物轻轻地转移到电转杯中。将电转杯放在 Lonza-4D 电转仪上, 选用 EO-115 电转程序进行电转。往电转杯中加入预热的培养基, 然后用配套吸管将细胞转入孔板中预热的培养基中, 然后放置于 37°C、5% CO₂ 培养箱中培养。

实施例 11 基因敲除效率检测方法的比较

(1) Sanger 测序检测

细胞计数, 取 $3\sim5 \times 10^4$ 细胞, 2000r/min 离心 5min, 尽量去干净上清, 然后每管加 20 μ l DE 裂解液, 细胞裂解后加到 PCR 管中, 瞬时离心后上 PCR 仪, 上机条件: 65°C 30min, 4°C 30s、95°C 2min、16°C 无限。使用引物对 TRAC-For/TRAC-Rev, 或 HLA-A For/HLA-A Rev, 将裂解产物作为模板进行 PCR, 将 PCR 产物交送金唯智进行 Sanger 测序。得到 sanger 测序结果后, 使用网站: https://moriaritylab.shinyapps.io/editr_v10/ 中的 EditR 编辑器预测编辑发生的位置以及编辑效率。

(2) TA 克隆测序检测

利用 AxyPrep™ PCR 产物清洁试剂盒 (购自 AXYGEN), 将 PCR 产物纯化, 随后用试剂盒 (DNA A-Tailing Kit, 购自 TaKaRa) 将纯化后的 PCR 产物加粘性末端, 通过 DNA Ligation Kit Ver2.1 (购自 TaKaRa) 将产物连接至 T 载体 (pMDTM19-T Vector Cloning Kit 购自 TaKaRa), 连接产物转化感受态细胞 (DH5 α), 然后涂布于含氨苄抗性的 LB 板, 在 37°C 培养箱培养约 12 小时后挑单菌落, 并将单菌落菌液交由金维智进行测序。敲除效率=突变克隆数/总克隆数。

(3) 流式检测细胞计数

取 10E5 至 10E8 细胞, 2000rpm 离心 5min, 去上清, 然后每管加 100 μ l 的 PBS 缓冲液重悬细胞, 再加入 anti-human AB TCR-APC (购自 eBioscience) 抗体 5 μ l, HLA-A02 Monoclonal Antibody (BB7.2), APC, eBioscience™ (购自 invitrogen) 抗体 5 μ l, 混合均匀后于室温孵育 10min。2000rpm 离心 5min 后再以 PBS 缓冲液洗 2 遍, 重悬细胞并通过 BD FACSAria 流式细胞仪进行检测, 可得细胞表面 TCR、HLA-A02 表达阳性率。敲除效率=(A-B)/A $\times$ 100%; A 为对照组表达阳性率; B 为敲除组表达阳性率。

TRAC 单基因敲除的三种检测结果如图 13 至图 15 所示, 敲除效率计算结果如表 1 所示, 三种检测方法基本相同, 后续试验仅采用 Sanger 测序方法检测编辑效率。

表 1 基因敲除效率检测方法结果

靶基因	sgRNA	检测方法	敲除效率%
TRAC	Sg9	Sanger 测序	90
		TA 克隆测序	95
		流式	93

针对 HLA-A02 基因编辑的 Sanger 测序方法结果如图 16-17 所示，编辑效率均为 90%；针对 HLA-A11 基因编辑的 Sanger 测序方法结果如图 18-19 所示。

实施例 12 制备 TRAC 基因和 HLA-A 基因双基因敲除的 T 细胞

使用电转试剂盒（购自 LONZA，货号：V4XXP-3024）通过电转方式将 RNP 复合体转入实施例 2 制备的激活后 T 细胞。提前 30min 在孔板中预热培养基（X-VIVO15 培养基+10% FBS+IL2（200U/ml）+IL7(10ng/ml)+IL15(5ng/ml)）。电转缓冲液按照 Nucleofector Solution: Supplement =82:18 进行配置。准备 RNP 复合体：分别将 20μg TRAC sgRNA（TRAC Sg9），20μg HLA-A sgRNA（HLA-A02 Sg2 或 HLA-A02 Sg5 或 HLA-A11 sg21 或者靶向 HLA-A*24:02:01、HLA-A*30:01:01:01、HLA-A*33:01:01:01、HLA-A*03:01:01:01、HLA-A*01:01:01:01 或 HLA-A*26:01:01:01 的 sgRNA）加入到 PCR 管（无 RNA）中，再各自加入 10μg Cas9 蛋白（购自 thermo，货号 A36499），轻轻混匀后，室温孵育 12min。将实施例 2 培养的激活后 T 细胞进行计数，300g 离心 8min 弃上清，加入 PBS 重悬细胞，吸取 1E7 个细胞重新 300g 离心 8min，弃上清后用 100μl 配置好的电转缓冲液重悬细胞。将孵育好的 TRAC 与 HLA-A 的 RNP 复合体加入上述细胞悬液中，轻柔混匀，然后将混合物轻轻地转移到电转杯中。将电转杯放在 Lonza-4D 电转仪上，选用 EO-115 电转程序进行电转。往电转杯中加入预热的培养基，然后用配套吸管将细胞转入孔板中预热的培养基中，然后放置于 37°C、5% CO₂ 培养箱中培养。

通过测序检测双基因敲除效率，可得到双基因敲除效率均不低于 80%的 TRAC 阴性、HLA-A 阴性的 T 细胞。结果如图 20-21 所示。其中图 20A 显示的是利用 HLA-A02 Sg5 敲除 HLA-A02 的结果，其中上一行显示的是对照组结果（即没有使用 HLA-A02 Sg5 进行敲除）；下一行显示的是同时敲除 HLA-A02 和 TRAC 的结果；其中图 20B 显示的是利用 TRAC Sg9 敲除 TRAC 的结果，其中上一行显示的是对照组结果（即没有使用 TRAC Sg9 进行敲除）；下一行显示的是同时敲除 HLA-A02 和 TRAC 的结果。图 21A-21B 显示了敲除 HLA-A02 和

TRAC 蛋白水平的敲除情况，其中 NEG 指阴性对照，WT 指没有经任何敲除处理的情况，TRAC+HLA-A 双敲指同时敲除 HLA-A02 和 TRAC 的结果。

实施例 13 双基因敲除的 T 细胞中 TRAC 基因，HLA-A 基因，B2M 基因和 CIITA 基因与相应细胞中的相应基因的表达区别

(1) 利用实施例 2 制备的激活后 T 细胞，分为两组，一组作为对照，另一组按照实施例 5 的方法制备 TRAC 基因和 HLA-A 基因双基因敲除的 T 细胞，按照实施例 4 步骤 (1) 的方式进行 Sanger 测序。依据测序结果获得 TRAC 和 HLA-A 双基因敲除的细胞。将制备的双基因敲除 T 细胞与相应 TRAC 和 HLA-A 抗体孵育，通过流式分选或磁珠分选，可以得到双基因敲除的细胞株。

(2) 检测双基因敲除的 T 细胞与对照组相比 mRNA 表达水平的变化。使用 RNA 提取试剂盒(购自 QIAGEN, 货号: 74004)提取 RNA, 使用逆转录试剂盒(购自 Applied Biosystems, 货号: 4368814)对 RNA 进行逆转录得到 cDNA, 以 cDNA 为模板进行定量 PCR 检测。

(3) 检测双基因敲除的 T 细胞与对照组相比蛋白表达水平的变化。使用全蛋白提取试剂(购自 Thermo Scientific, 货号: 87787)提取蛋白, 通过 Western Blot 方法或流式方法检测蛋白表达水平, 使用的抗体分别为 TRAC 抗体(购自 eBioscience 货号: 17-9986-42)、HLA-A 抗体(购自 Merck 货号: 17-9876-41)、B2M 抗体(购自 Invitrogen 货号: A15770)和 CIITA 抗体(购自 OriGene 货号: CF812200)。

Sanger 测序检测双基因敲除的 T 细胞中 TRAC 和/或 HLA-A 基因的核苷酸序列相对于对照组发生了变化; 定量 PCR 显示双基因敲除的 T 细胞中 TRAC 和/或 HLA-A 基因 mRNA 表达量下调, 而 B2M 和/或 CIITA 基因的 mRNA 表达量没有下调。FACS 和 Western Blot 结果显示双基因敲除的 T 细胞中蛋白表量下调, B2M 和/或 CIITA 蛋白表达量没有下调。

结果如图 22-23 所示。其中, 图 22 显示的是基因表达的 mRNA 水平测定, 其中图 22 显示了 TRAC、HLA-A、B2M 和 CIITA 的 mRNA 水平; 其中 WT 指没有经任何敲除处理的情况, 双敲组指 TRAC 基因和 HLA-A 基因双基因敲除的 T 细胞的结果。图 23 显示的是基因表达的蛋白水平测定, 其中图 23A-23B 分别显示了 B2M 和 CIITA 的蛋白表达水平; 其中 NEG 指阴性对照, WT 指没有经任何敲除处理的情况, TRAC+HLA-A 双敲指 TRAC 基因和 HLA-A 基因双基因敲除的 T 细胞的结果。

实施例 14 制备 TRAC 基因、HLA-A/B2M 基因和 CIITA 基因三基因敲除的 T 细胞并验证其中相应三种基因的表达变化

(1) 按照实施例 13 步骤 (1) 的方式准备对照组和 TRAC 基因、HLA-A 基因和 CIITA 基因三基因敲除的细胞, 以及 TRAC 基因、B2M 基因和 CIITA 基因三基因敲除的细胞。

(2) 按照实施例 13 步骤 (3) 的方式通过 FACS 和 Western Blot 方法检测蛋白表达水平变化。

相对于对照组细胞, TRAC、HLA-A 和 CIITA 三基因敲除的 T 细胞中 TRAC、HLA-A 和 CIITA 基因的蛋白表达量下调; 相对于对照组细胞, TRAC、B2M 和 CIITA 三基因敲除的 T 细胞中 TRAC、HLA-A 和 CIITA 基因的蛋白表达量下调。

(3) 使用 TRAC (购自 eBioscience, 货号: 17-9986-42)、HLA-A (购自 Merck, 货号: 17-9876-41)、B2M (购自: Invitrogen, 货号: A15770) 抗体通过流式细胞术检测实施例 13 中的双基因敲除细胞和本实施例中的两种三基因敲除细胞的敲除效率, 结果显示在单细胞水平同时实现多基因敲除的效率, 双基因敲除明显高于三基因敲除。

结果如图 24A-24D 所示。其中图 24A-24C 依次为 TRAC、HLA-A 和 B2M 蛋白质水平的敲除情况。其中, WT 指没有经任何敲除处理的情况, TRAC+HLA-A 双敲指 TRAC 基因和 HLA-A 基因双基因敲除的 T 细胞的结果; TRAC+HLA-A+CIITA 三敲指 TRAC、HLA-A 和 CIITA 三基因敲除的 T 细胞的结果; 其中 TRAC+B2M+CIITA 三敲指 B2M、CIITA 和 TRAC 三基因敲除的 T 细胞的结果; TRAC+HLA-A 敲低指实施例 16 制备的 TRAC 基因和 HLA-A 基因敲低的 T 细胞的结果。图 24D 显示了 CIITA 蛋白质水平的敲除情况。

图 24 的结果显示, 和 WT 对照组相比, TRAC、HLA-A、CIITA 和 B2M 的蛋白质水平下调。同时, 与 TRAC+HLA-A+CIITA 三敲或 TRAC+B2M+CIITA 三敲相比, TRAC+HLA-A 双敲的敲除效率更高。

实施例 15 设计反义 RNA 序列

通过数据库 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> 或 www.ensembl.org/, 获得相应基因 (TRAC 基因和 HLA-A 基因) 的转录 RNA 序列, 参考如下原则设计 siRNA:

尽量避免起始密码子下游 50-100 个核苷酸与终止密码子上游 100 个核苷酸的序列; 选择长度小于 30 个核苷酸的序列; 避免 4 个或以上的连续相同碱基; 避免内含子区域; 避免重复序列; 避免单核苷酸多态性 (SNP) 位点; 序列 GC 含量 30%-60% 之间, 优先选择序列模式 AA(N_{₁₉)、NA(N_{₂₁) 或 NAR(N_{₁₇)YNN, A 为腺苷酸; T 为胸腺苷酸; R 为}}}

腺苷酸或鸟苷酸(嘌呤类); Y 为胸腺苷酸或胞苷酸(嘧啶类); N 为腺苷酸、胸腺苷酸、鸟苷酸或胞苷酸; 对选择的序列进行同源性比较分析, 避免反义 RNA 与其他基因或序列具有显著的同源性, 由此造成脱靶效应。同源性分析利用 NCBI Blast tool: Nucleotide-nucleotide BLAST(blastn), UCSC Blat tool 或 Ensembl Blast 进行。

设计获得的反义 RNA 序列包括 HLA-A-homo-551 (其包含 SEQ ID NO: 200 所示的核苷酸序列); HLA-A-homo-NEG (其包含 SEQ ID NO: 201 所示的核苷酸序列); TRAC-homo-375 (其包含 SEQ ID NO: 202 所示的核苷酸序列); TRAC-homo-NEG (其包含 SEQ ID NO: 203 所示的核苷酸序列)。

实施例 16 制备 TRAC 基因和 HLA-A 基因敲低的 T 细胞

利用通过实施例 15 设计的反义 RNA 进行双基因敲低。公司制备 TRAC 基因和 HLA-A 基因反义 RNA 序列的慢病毒(吉玛)。按照实施例 2 的方式制备 CD3⁺T 细胞(D0 天), 并用 CD3/CD28 抗体磁珠激活, 将携带 TRAC 基因和 HLA-A 基因的反义 RNA 序列的慢病毒转染激活的 T 细胞(D1 天), D2 天洗去慢病毒载体, 继续培养至 D5 天。收集培养至 D5 天的 T 细胞, 通过定量 PCR 或 Western Blot 等方法对基因敲低效率进行检测。对获得的 T 细胞进行相应 TRAC 和 HLA-A 抗体标记, 通过流式分选或磁珠分选的方式可以得到 TRAC 基因和 HLA-A 基因敲低的 T 细胞。结果显示, TRAC 和 HLA-A 基因敲低组中 TRAC 和 HLA-A 的 mRNA 和蛋白表达水平平均下调。其中, 图 25A-25B 依次为 TRAC 和 HLA-A mRNA 水平的敲除情况。其中, WT 指没有经任何敲除处理的情况, TRAC+HLA-A 双敲指 TRAC 基因和 HLA-A 基因双基因敲除的 T 细胞的结果。其中, 为 TRAC 和 HLA-A 蛋白质水平的敲除水平可以参见图 24 的结果。

实施例 17 不同 T 细胞活性的区别

制备实施例 2、12、14 和 16 中的无基因敲除、双基因敲除、三种基因敲除和双基因敲低的 T 细胞, 比较几种 T 细胞活性各组细胞计数并分别各取 1×10^6 细胞接种 24 孔板中, 每孔加入 PHA(0.3 μ g/ml) (离子霉素+) 或 5ng/ml 的 PMA 和 50ng/ml 的 ionomycin 于细胞中, 继续培养 5 小时后, 使用 CD69 (早期活化) (购自 BD Biosciences, 货号: FN50)、CD137 (偏晚期) (购自 BD Biosciences, 货号: 4B4-1) 抗体, 流式检测细胞的活化状态。结果表明, 双基因敲除、双基因敲低的 T 细胞活性优于三基因敲除的 T 细胞。

CD69 和 CD137 的蛋白质水平表达情况分别参见图 26A-26B。其中, WT 指没有经任何敲除处理的情况, TRAC+HLA-A 双敲指 TRAC 基因和 HLA-A 基因双基因敲除的 T 细胞的结果。

果；TRAC+HLA-A+CIITA 三敲指 TRAC、HLA-A 和 CIITA 三基因敲除的 T 细胞的结果；其中 TRAC+B2M+CIITA 三敲指 B2M、CIITA 和 TRAC 三基因敲除的 T 细胞的结果；TRAC+HLA-A 敲低指实施例 16 制备的 TRAC 基因和 HLA-A 基因敲低的 T 细胞的结果。

实施例 18 不同 T 细胞对异体 NK 细胞反应性的区别

对实施例 2、12、14 和 16 中的无基因敲除、双基因敲除、三种基因敲除和双基因敲低的 T 细胞进行 CFSE (invitrogen, C34554) 标记，细胞计数，分别取 1×10^6 细胞并以 1:1 比例与 NK 细胞 (NK92MI) 进行共培养，24 小时后收集共培养的各組细胞，流式细胞检测混合细胞中 CFSE 阳性细胞的比率。

结果表明，NK 细胞对双基因敲除、双基因敲低的 T 细胞的杀伤毒性低于三基因敲除的 T 细胞。结果如图 27 所示。其中，NK+T 指将 NK 细胞与没有经任何敲除处理的 T 细胞共培养的情况；NK+TRAC+HLA-A 敲低指将 NK 细胞与实施例 16 制备的 TRAC 基因和 HLA-A 基因敲低的 T 细胞的结果共培养的情况；NK+TRAC+HLA-A 双敲指将 NK 细胞与 TRAC 基因和 HLA-A 基因双基因敲除的 T 细胞共培养的情况；NK+TRAC+HLA-A+CIITA 三敲指将 NK 细胞与 TRAC、HLA-A 和 CIITA 三基因敲除的 T 细胞共培养的情况；NK+TRAC+B2M+CIITA 三敲指将 NK 细胞与 B2M、CIITA 和 TRAC 三基因敲除的 T 细胞共培养的情况。

实施例 19 不同的 T 细胞异体免疫排斥反应的区别

供者 1 来源的外周血制备实施例 2、12、14 和 16 中的无基因敲除、双基因敲除、三种基因敲除和双基因敲低的 T 细胞。供者 2 来源的外周血制备 CD3⁺T 细胞。将供者 1 外周血制备的各組细胞分别与供者 2 外周血按照实施例 2 制备的 CD3⁺T 细胞等比例混合，24 小时后检测细胞混合体系中的 IFN- γ 的表达水平。结果显示，双基因敲除的 T 细胞组 IFN- γ 的表达水平低于三基因敲除的 T 细胞组。

结果如图 28 所示，WT 指没有经任何敲除处理的情况，TRAC+HLA-A 双敲指 TRAC 基因和 HLA-A 基因双基因敲除的 T 细胞的结果；TRAC+HLA-A+CIITA 三敲指 TRAC、HLA-A 和 CIITA 三基因敲除的 T 细胞的结果；其中 TRAC+B2M+CIITA 三敲指 B2M、CIITA 和 TRAC 三基因敲除的 T 细胞的结果；TRAC+HLA-A 敲低指实施例 16 制备的 TRAC 基因和 HLA-A 基因敲低的 T 细胞的结果。

实施例 20 制备 TRAC 基因和 HLA-A 基因双基因敲除的 CAR-T 细胞，TRAC 基因，HLA-A 基因和 CIITA 基因三基因敲除的 CAR-T 细胞以及 TRAC 基因，B2M 基因和 CIITA 基因敲除的 CAR-T 细胞

(1) 按照实施例 2 的方式获得 CD3⁺T 细胞 (D0 天)，并用 CD3/CD28 抗体磁珠激活，激活后于 D1 天进行慢病毒载体 (包含 CD19-CAR、CD20-CAR 或 BCMA-CAR 等的慢病毒) 转染，D2 天洗去慢病毒载体，D3 天对 CAR 阳性的 T 细胞进行分选并继续培养至 D5 天。

(2) 取 D5 天的 CAR-T 细胞为初始细胞，分别按照实施例 12 和实施例 14 中的方式制备 TRAC 基因和 HLA-A 基因双基因敲除的细胞，TRAC 基因、HLA-A 基因和 CIITA 基因以及 TRAC 基因、B2M 基因和 CIITA 基因三基因敲除的 CAR-T 细胞。

(3) 通过流式细胞技术检测可得到上述双基因敲除和三基因敲除的 CAR-T 细胞，其中双基因敲除 CAR-T 细胞的得率高于三基因敲除 CAR-T 细胞。

结果如图 29A-29D 所示。其中，图 29A-29C 依次为 TRAC、HLA-A 和 B2M 蛋白质水平的敲除情况。图 29D 显示了 CIITA 蛋白质水平的敲除情况。其中，WT 指没有经任何敲除处理的情况，TRAC+HLA-A 双敲指 TRAC 基因和 HLA-A 基因双基因敲除的 CAR-T 细胞的结果；TRAC+HLA-A+CIITA 三敲指 TRAC、HLA-A 和 CIITA 三基因敲除的 CAR-T 细胞的结果；其中 TRAC+B2M+CIITA 三敲指 B2M、CIITA 和 TRAC 三基因敲除的 CAR-T 细胞的结果。

其中，CD19CAR 的转染效率如图 30A-30B 所示。其中，CAR30%+即代表 CD19CAR 的转染效率。

图 31 显示了不同细胞的扩增倍数。其中，TRAC 基因和 HLA-A 基因双基因敲除的 CAR-T 细胞扩增倍数最高。

实施例 21 TRAC 基因和 HLA-A 基因双基因敲除的 CAR-T 细胞抗肿瘤效果

制备实施例 21 中的 TRAC 基因和 HLA-A 基因双敲除的 CAR-T 细胞 (靶向 CD19、CD20 或 BCMA)，接种表达荧光素酶基因的靶细胞 (靶基因阳性的白血病或淋巴瘤细胞系，如 Raji、Jurkat、MM1S 等) 至孔板中，再分别以不同效靶比 (1:2.5, 1:1, 5:1, 10:1) 加入双基因敲除的 CAR-T 细胞、三基因敲除的 CAR-T 细胞或无基因敲除的 T 细胞，共培养 24 小时后将细胞转移至检测孔板中，加入荧光素酶底物，酶标仪检测荧光值。杀伤效率=1-靶细胞 T 细胞共培养荧光值/单独培养的靶细胞荧光值。

结果显示 TRAC 基因和 HLA-A 基因双敲除的 CAR-T 细胞对肿瘤细胞有显著的杀伤效

果。

图 32 显示了对 CD19 靶细胞 Raji-Luciferase 的杀伤效果，其中 TRAC 基因和 HLA-A 基因双敲除的 CAR-T 细胞的杀伤效果最为显著。其中每个 E/T 比下从左到右依次是 A-D 的图注所对应的结果。

实施例 22 TRAC 基因和 HLA-A 基因双基因敲除的 CAR-T 细胞抗肿瘤效果

NSG 小鼠静脉注射肿瘤细胞，肿瘤成功建立后向小鼠体内回输 TRAC 基因和 HLA-A 基因双基因敲除的 CAR-T 细胞、三基因敲除的 CAR-T 细胞或无基因敲除的 T 细胞，监测小鼠肿瘤体积。

回输双基因敲除 CAR-T 细胞的小鼠，肿瘤生长速度明显减缓。

结果如图 33-34 所示。其中，图 33 显示了对小鼠的给药方式，i.v.表示静脉注射，CAR-T 细胞代表表达 CD19 CAR 的双基因敲除的 CAR-T 细胞、三基因敲除的 CAR-T 细胞。图 34 显示了小鼠在施用 CAR-T 细胞后体内肿瘤的体积情况。其中，图 34 从左至右列依次显示了分别施用生理盐水、未改造的 T 细胞、TRAC 基因和 HLA-A 基因双基因敲除的 CD19 CAR-T 细胞、TRAC、HLA-A 和 CIITA 三基因敲除的 CD19 CAR-T 细胞、B2M、CIITA 和 TRAC 三基因敲除的 CD19 CAR-T 细胞后，小鼠体内肿瘤的体积情况。结果发现回输 TRAC 基因和 HLA-A 基因双基因敲除的 CAR-T 细胞的小鼠，肿瘤生长的速度明显减缓。

综上，

1. 本申请首次构建了高效率双敲除 TCR，HLA-A 的 GD2-UCAR-T 细胞，做到一种安全型货架式即用型治疗剂，提高了抗肿瘤效果，用于神经母细胞瘤、骨肉瘤、胶质瘤等肿瘤的治疗。

2. 本申请提供了一种慢病毒表达载体。以 pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP 为骨架，将载体的氨苄抗性基因 β -内酰胺酶替换为源自 Tn5 的氨基糖苷磷酸转移酶，使载体具有卡那霉素抗性；删除了在体内应用中具有潜在威胁性的 CMV 启动子及其临近的下游多克隆位点；将原载体中由 EF1 启动子启动表达的 copGFP 基因删除，保留 SalI 酶切位点，并在 SalI 5' 端加入 SmaI 酶切位点供载体构建用，形成最终目的载体。

3. 本申请优化了蛋白质 RNA 复合体电转染技术。获得了原代 T 细胞中 90%以上的双基因敲除效率。

4. 本申请供者来源基于人群中高频出现的 HLA-B 纯合子，患者 HLA-B 其中一个等位基因和供者纯合子一致即可，来源于这些供者的细胞能覆盖高数量的患者人群，且能够降低 HLA-B 引起的排异反应。

5. 本申请筛选出了与排异高度相关的 HLA-A 分子进行敲除，而保留了其他 HLA-I 类分子，既减少了异体细胞的排异，也避免了 HLA 分子完全敲除被 NK 细胞清除的发生，大大延长了同种异体 CAR-T 细胞在体内的半衰期。

权 利 要 求 书

- 1.免疫效应细胞，其中所述免疫效应细胞中的 T 细胞抗原受体(TCR)和主要组织相容性复合体(MHCI, MHCII)在细胞中的功能受到抑制，且所述免疫效应细胞包含靶向 GD2 的嵌合抗原受体(CAR)。
- 2.根据权利要求 1 所述的免疫效应细胞，所述 CAR 包含靶向部分，所述靶向部分包含抗体重链可变区(VH)，所述 VH 包含重链互补决定区 1 (HCDR1)、重链互补决定区 2 (HCDR2)和重链互补决定区 3 (HCDR3)，所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列。
- 3.根据权利要求 2 所述的免疫效应细胞，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列。
- 4.根据权利要求 2-3 中任一项所述的免疫效应细胞，所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列。
- 5.根据权利要求 2-4 中任一项所述的免疫效应细胞，所述 VH 包含：包含 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列的 HCDR1、包含 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列的 HCDR2 和包含 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列的 HCDR3。
- 6.根据权利要求 2-5 中任一项所述的免疫效应细胞，所述 VH 包含重链框架区 1 (HFR1)、重链框架区 2 (HFR2)、重链框架区 3 (HFR3)和重链框架区 4 (HFR4)，所述 HFR1 包含 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列。
- 7.根据权利要求 6 所述的免疫效应细胞，所述 HFR2 包含 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列。
- 8.根据权利要求 6-7 中任一项所述的免疫效应细胞，所述 HFR3 包含 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列。
- 9.根据权利要求 6-8 中任一项所述的免疫效应细胞，所述 HFR4 包含 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列。
- 10.根据权利要求 2-9 中任一项所述的免疫效应细胞，所述 VH 包含 HFR1、HFR2、HFR3 和 HFR4，且所述 HFR1、HFR2、HFR3 和 HFR4 选自：
包含 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列的 HFR1，包含 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列的 HFR2，包含 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列的 HFR3，包含 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列的 HFR4。
- 11.根据权利要求 2-10 中任一项所述的免疫效应细胞，所述 VH 包含 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列。

- 12.根据权利要求 2-11 中任一项所述的免疫效应细胞,所述靶向部分包含抗体轻链可变区(VL),所述 VL 包含轻链互补决定区 1(LCDR1)、轻链互补决定区 2(LCDR2)和轻链互补决定区 3(LCDR3),所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列。
- 13.根据权利要求 12 所述的免疫效应细胞,所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列。
- 14.根据权利要求 12-13 中任一项所述的免疫效应细胞,所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列。
- 15.根据权利要求 12-14 中任一项所述的免疫效应细胞,所述 VL 包含:包含 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列的 LCDR1、包含 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列的 LCDR2 和包含 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列的 LCDR3。
- 16.根据权利要求 12-15 中任一项所述的免疫效应细胞,所述 VL 包含轻链框架区 1(LFR1)、轻链框架区 2(LFR2)、轻链框架区 3(LFR3)和轻链框架区 4(LFR4),所述 LFR1 包含 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列。
- 17.根据权利要求 16 所述的免疫效应细胞,所述 LFR2 包含 SEQ ID NO: 13 所示的氨基酸序列。
- 18.根据权利要求 16-17 中任一项所述的免疫效应细胞,所述 LFR3 包含 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列。
- 19.根据权利要求 16-18 中任一项所述的免疫效应细胞,所述 LFR4 包含 SEQ ID NO: 15 所示的氨基酸序列。
- 20.根据权利要求 16-19 中任一项所述的免疫效应细胞,所述 VL 包含 LFR1、LFR2、LFR3 和 LFR4,且所述 LFR1、LFR2、LFR3 和 LFR4 选自:
包含 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列的 LFR1,包含 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列的 LFR2,包含 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列的 LFR3,包含 SEQ ID NO: 15 所示的氨基酸序列的 LFR4。
- 21.根据权利要求 16-20 中任一项所述的免疫效应细胞,所述 VL 包含 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列。
- 22.根据权利要求 2-21 中任一项所述的免疫效应细胞,所述靶向部分包含 VH 和 VL,其中所述 VH 包含 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列,所述 VL 包含 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列。

- 23.根据权利要求 2-22 中任一项所述的免疫效应细胞,其中所述靶向部分包括全长抗体、Fab、单链可变片段(scFv)或单域抗体(VHH)。
- 24.根据权利要求 2-23 中任一项所述的免疫效应细胞,其中所述靶向部分包括 scFv。
- 25.根据权利要求 2-24 中任一项所述的免疫效应细胞,其中所述靶向部分包含位于 VH 与 VL 之间的接头多肽。
- 26.根据权利要求 25 所述的免疫效应细胞,其中所述接头多肽包括 SEQ ID NO: 17 或 SEQ ID NO: 18 所示的氨基酸序列。
- 27.根据权利要求 2-26 中任一项所述的免疫效应细胞,其中所述靶向部分包含 SEQ ID NO: 19 或 SEQ ID NO: 20 所示的氨基酸序列。
- 28.根据权利要求 1-27 中任一项所述的免疫效应细胞,所述 CAR 包括跨膜域,所述跨膜域包含源自选自下组中的一种或多种蛋白的跨膜域: CD8A、CD8B、CD28、CD3 ϵ (CD3e)、4-1BB、CD4、CD27、CD7、PD-1、TRAC、TRBC、CD3 ζ 、CTLA-4、LAG-3、CD5、ICOS、OX40、NKG2D、2B4、CD244、Fc ϵ RI γ 、BTLA、CD30、GITR、HVEM、DAP10、CD2、NKG2C、LIGHT、DAP12、CD40L (CD154)、TIM1、CD226、DR3、CD45、CD80、CD86、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64 和 SLAM。
- 29.根据权利要求 28 所述的免疫效应细胞,其中所述跨膜域包含源自 CD8A 的跨膜域。
- 30.根据权利要求 28-29 中任一项所述的免疫效应细胞,其中所述跨膜域包含 SEQ ID NO: 29 至 SEQ ID NO: 77 中任一项所示的氨基酸序列。
- 31.根据权利要求 1-30 中任一项所述的免疫效应细胞,所述 CAR 包括胞内共刺激信号传导结构域,所述胞内共刺激信号传导结构域包含源自选自下组中的一种或多种蛋白的胞内共刺激信号传导结构域: CD28、4-1BB (CD137)、CD27、CD2、CD7、CD8A、CD8B、OX40、CD226、DR3、SLAM、CDS、ICAM-1、NKG2D、NKG2C、B7-H3、2B4、Fc ϵ RI γ 、BTLA、GITR、HVEM、DAP10、DAP12、CD30、CD40、CD40L、TIM1、PD-1、LFA-1、LIGHT、JAML、CD244、CD100、ICOS、CD40 和 MyD88。
- 32.根据权利要求 31 所述的免疫效应细胞,其中所述胞内共刺激信号传导结构域源自 4-1BB 的共刺激信号传导结构域。
- 33.权利要求 31-32 中任一项所述的免疫效应细胞,其中所述胞内共刺激信号传导结构域包含 SEQ ID NO: 78 至 SEQ ID NO: 110 中任一项所示的氨基酸序列。
- 34.根据权利要求 1-33 中任一项所述的免疫效应细胞,所述 CAR 包括胞内信号转导结构域,所述胞内信号转导结构域包含源自选自下组中的一种或多种蛋白的胞内信号转导结构

- 域：CD3 ζ 、CD3 δ 、CD3 γ 、CD3 ϵ 、CD79a、CD79b、Fc ϵ RI γ 、Fc ϵ RI β 、Fc γ RIIa、牛白血病病毒 gp30、Epstein-Barr 病毒(EBV)LMP2A、猿免疫缺陷病毒 PBj14 Nef、DAP10、DAP-12 和至少包含一个 ITAM 的结构域。
- 35.根据权利要求 34 所述的免疫效应细胞，其中所述胞内信号转导结构域包含源自 CD3 ζ 的信号传导结构域。
- 36.根据权利要求 34-35 中任一项所述的免疫效应细胞，其中所述胞内信号转导结构域包含 SEQ ID NO: 94、SEQ ID NO: 98、SEQ ID NO: 99、SEQ ID NO: 111 至 SEQ ID NO: 121 中任一项所示的氨基酸序列。
- 37.根据权利要求 1-36 中任一项所述的免疫效应细胞，所述 CAR 在靶向部分和跨膜域之间包括铰链区，所述铰链区包含源自选自下组中的一种或多种蛋白的铰链区：CD28、IgG1、IgG4、IgD、4-1BB、CD4、CD27、CD7、CD8A、PD-1、ICOS、OX40、NKG2D、NKG2C、Fc ϵ RI γ 、BTLA、GITR、DAP10、TIM1、SLAM、CD30 和 LIGHT。
- 38.根据权利要求 37 中任一项所述的免疫效应细胞，所述铰链区包含源自 CD8A 的铰链区。
- 39.根据权利要求 37-38 中任一项所述的免疫效应细胞，所述铰链区包含 SEQ ID NO: 122 至 SEQ ID NO: 143 中任一项所示的氨基酸序列。
- 40.根据权利要求 1-39 中任一项所述的免疫效应细胞，所述嵌合抗原受体的非靶向部分包含 CD8A 分子跨膜域、CD8A 的铰链区、4-1BB 的胞内共刺激信号传导结构域和 CD3 ζ 胞内信号传导结构域。
- 41.根据权利要求 1-40 中任一项所述的免疫效应细胞，所述嵌合抗原受体的非靶向部分包含 SEQ ID NO: 21 所示的氨基酸序列。
- 42.根据权利要求 1-41 中任一项所述的免疫效应细胞，所述嵌合抗原受体还包含信号肽片段，所述信号肽片段的 C 端与所述靶向部分的 N 端连接。
- 43.根据权利要求 42 所述的免疫效应细胞，所述信号肽片段包括 CD8A 信号肽片段。
- 44.根据权利要求 42-43 中任一项所述的免疫效应细胞，所述信号肽片段包含 SEQ ID NO: 22 所示的氨基酸序列。
- 45.根据权利要求 1-44 中任一项所述的免疫效应细胞，所述嵌合抗原受体包含 SEQ ID NO: 23 所示的氨基酸序列。
- 46.根据权利要求 1-45 中任一项所述的免疫效应细胞，所述的免疫效应细胞包括人细胞。

- 47.根据权利要求 1-46 中任一项所述的免疫效应细胞，所述免疫效应细胞包括 T 细胞、B 细胞、天然杀伤细胞(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。
- 48.根据权利要求 1-47 中任一项所述的免疫效应细胞，其包括自体的或非自体的免疫效应细胞。
- 49.根据权利要求 1-48 中任一项所述的免疫效应细胞，所述免疫效应细胞包括经修饰的免疫效应细胞，其中所述修饰包括与免疫排斥相关基因中的一个或多个的表达和/或活性被下调。
- 50.根据权利要求 49 所述的免疫效应细胞，其中所述与免疫排斥相关基因选自下组中的一种或多种基因：TRAC、TRBC、HLA-A、HLA-B、B2M 和 CIITA。
- 51.根据权利要求 49-50 中任一项所述的免疫效应细胞，所述经修饰的免疫效应细胞与未经修饰的相应细胞相比，TRAC 基因和 HLA-A 基因的表达和/或活性被下调。
- 52.根据权利要求 49-51 中任一项所述的免疫效应细胞，其中所述经修饰的免疫效应细胞与未经所述修饰的相应细胞相比，CIITA 基因的表达和/或活性未被下调。
- 53.根据权利要求 49-52 中任一项所述的免疫效应细胞，其中所述经修饰的免疫效应细胞与未经所述修饰的相应细胞相比，B2M 基因的表达和/或活性未被下调。
- 54.根据权利要求 49-53 中任一项所述的免疫效应细胞，其中所述经修饰的免疫效应细胞与相应的野生型细胞相比，TRAC 基因和 HLA-A 基因的表达和/或活性被下调。
- 55.根据权利要求 49-54 中任一项所述的免疫效应细胞，其中所述经修饰的免疫效应细胞与相应的野生型细胞相比，B2M 基因的表达和/或活性未被下调。
- 56.根据权利要求 49-55 中任一项所述的免疫效应细胞，其中所述经修饰的免疫效应细胞与相应的野生型细胞相比，CIITA 基因的表达和/或活性未被下调。
- 57.根据权利要求 49-56 中任一项所述的免疫效应细胞，其中所述基因的表达水平和/或活性被下调包括使编码所述基因的核酸分子的表达和/或活性下调；和/或使所述基因编码的蛋白质产物的表达和/或活性被下调。
- 58.根据权利要求 49-57 中任一项所述的免疫效应细胞，其中所述修饰包括：基因敲除、基因突变和/或基因沉默。
- 59.根据权利要求 49-58 中任一项所述的免疫效应细胞，所述修饰包括所述免疫效应细胞中两个 TRAC 等位基因中的任意一个被敲除并且两个 HLA-A 等位基因中的任意一个被敲除。
- 60.根据权利要求 49-59 中任一项所述的免疫效应细胞，所述修饰包括所述免疫细胞中两个

TRAC 等位基因被敲除并且两个 HLA-A 等位基因中的任意一个被敲除。

61. 根据权利要求 49-60 中任一项所述的免疫效应细胞，所述修饰包括所述免疫细胞中 TRAC 基因外显子被敲除并且 HLA-A 基因外显子被敲除。
62. 根据权利要求 49-61 中任一项所述的免疫效应细胞，其中所述修饰包括向所述免疫效应细胞施用一种或多种选自下组的物质：反义 RNA、siRNA、shRNA 和 CRISPR/Cas9 系统。
63. 根据权利要求 49-62 中任一项所述的免疫效应细胞，其中所述修饰包括向所述免疫效应细胞施用 CRISPR/Cas9 系统。
64. 根据权利要求 63 所述的免疫效应细胞，其中所述修饰还包括向所述免疫效应细胞施用靶向所述 TRAC 基因外显子部分的 sgRNA。
65. 根据权利要求 64 所述的免疫效应细胞，其中所述靶向所述 TRAC 基因外显子部分的 sgRNA 包含 SEQ ID NO: 144 至 SEQ ID NO: 158 中任一项所示的核苷酸序列。
66. 根据权利要求 63-65 中任一项所述的免疫效应细胞，其中所述修饰包括向所述免疫效应细胞施用靶向所述 HLA-A 基因外显子部分的 sgRNA。
67. 根据权利要求 66 所述的免疫效应细胞，其中所述靶向所述 HLA-A 基因外显子部分的 sgRNA 包含 SEQ ID NO: 159 至 SEQ ID NO: 199 中任一项所示的核苷酸序列。
68. 根据权利要求 63-67 中任一项所述的免疫效应细胞，其中所述修饰还包括向所述细胞施用 Cas 酶。
69. 根据权利要求 68 所述的免疫效应细胞，其中 Cas 酶包括 Cas9 蛋白。
70. 根据权利要求 62 所述的免疫效应细胞，其中所述反义 RNA 包含 SEQ ID NO: 200 至 SEQ ID NO: 203 中任一项所示的核苷酸序列。
71. 根据权利要求 1-71 任一项所述的免疫效应细胞，其中所述免疫效应细胞为 HLA-B 纯合子细胞。
72. 根据权利要求 71 所述的免疫效应细胞，其中所述 HLA-B 纯合子包括 HLA-B*40 纯合子，HLA-B*15 纯合子，HLA-B*46 纯合子，HLA-B*13 纯合子，HLA-B*51 纯合子，HLA-B*58 纯合子，HLA-B*07 纯合子，HLA-B*35 纯合子，HLA-B*44 纯合子，HLA-B*52 纯合子，HLA-B*57 纯合子，HLA-B*54 纯合子，HLA-B*55 纯合子。
73. 根据权利要求 1-72 中任一项所述的免疫效应细胞，其中所述免疫效应细胞为 HLA-A 纯合子或杂合子细胞。
74. 根据权利要求 73 所述的免疫效应细胞，其中所述 HLA-A 纯合子或杂合子包括 HLA-A*02 纯合子，HLA-A*11 纯合子，HLA-A*02/A*11 杂合子或 HLA-A*24 纯合子。

- 75.一种制备免疫效应细胞的方法，其包括：在向免疫效应细胞中引入编码权利要求 1-74 中任一项靶向 GD2 的 CAR 的多核苷酸序列或包含编码权利要求 1-74 中任一项靶向 GD2 的 CAR 的多核苷酸序列的载体之前/之后，修饰所述免疫效应细胞，所述修饰包括与免疫排斥相关基因中的一个或多个的表达和/或活性被下调。
- 76.根据权利要求 75 所述的方法，其中所述载体是表达载体。
- 77.根据权利要求 75-76 中任一项所述的方法，其中所述载体选自 DNA 载体、RNA 载体、质粒、慢病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体和逆转录病毒载体。
- 78.根据权利要求 75-77 中任一项所述的方法，其中所述与免疫排斥相关基因选自下组中的一种或多种基因：TRAC、TRBC、HLA-A、HLA-B、B2M 和 CIITA。
- 79.根据权利要求 75-78 中任一项所述的方法，与未经所述修饰的相应细胞中相应基因的表达和/或活性相比，下调所述免疫效应细胞中 TRAC 基因和 HLA-A 基因的表达和/或活性。
- 80.根据权利要求 75-79 中任一项所述的方法，与未经所述修饰的相应细胞中相应基因的表达和/或活性相比，CIITA 基因的表达和/或活性未被下调。
- 81.根据权利要求 75-80 中任一项所述的方法，与未经所述修饰的相应细胞中相应基因的表达和/或活性相比，B2M 基因的表达和/或活性未被下调。
- 82.根据权利要求 75-81 中任一项所述的方法，与相应的野生型细胞相比，所述免疫效应细胞的 TRAC 基因和 HLA-A 基因的表达和/或活性被下调。
- 83.根据权利要求 75-82 中任一项所述的方法，与相应的野生型细胞相比，CIITA 基因的表达和/或活性未被下调。
- 84.根据权利要求 75-83 中任一项所述的方法，与相应的野生型细胞相比，B2M 基因的表达和/或活性未被下调。
- 85.根据权利要求 75-84 中任一项所述的方法，其中所述基因的表达水平和/或活性被下调包括使编码所述基因的核酸分子的表达和/或活性下调；和/或使所述基因编码的蛋白质产物的表达和/或活性被下调。
- 86.根据权利要求 75-85 中任一项所述的方法，其中所述修饰包括：基因敲除、基因突变和/或基因沉默。
- 87.根据权利要求 75-86 中任一项所述的方法，所述修饰包括所述免疫效应细胞中两个 TRAC 等位基因中的任意一个被敲除并且两个 HLA-A 等位基因中的任意一个被敲除。
- 88.根据权利要求 75-87 中任一项所述的方法，所述修饰包括所述免疫细胞中两个 TRAC 等位基因被敲除并且两个 HLA-A 等位基因中的任意一个被敲除。

- 89.根据权利要求 75-88 中任一项所述的方法,所述修饰包括所述免疫细胞中 TRAC 基因外显子被敲除并且 HLA-A 基因外显子被敲除。
- 90.根据权利要求 75-89 中任一项所述的方法,其中所述修饰包括向所述免疫效应细胞施用一种或多种选自下组的物质:反义 RNA、siRNA、shRNA 和 CRISPR/Cas9 系统。
- 91.根据权利要求 75-90 中任一项所述的方法,其中所述修饰包括向所述免疫效应细胞施用 CRISPR/Cas9 系统。
- 92.根据权利要求 91 所述的方法,其中所述修饰包括向所述免疫效应细胞施用靶向所述 TRAC 基因外显子部分的 sgRNA。
- 93.根据权利要求 92 所述的方法,其中所述靶向所述 TRAC 基因外显子部分的 sgRNA 包含 SEQ ID NO: 144 至 SEQ ID NO: 158 中任一项所示的核苷酸序列。
- 94.根据权利要求 91-93 中任一项所述的方法,其中所述修饰包括向所述免疫效应细胞施用靶向所述 HLA-A 基因外显子部分的 sgRNA。
- 95.根据权利要求 94 所述的方法,其中所述靶向所述 HLA-A 基因外显子部分的 sgRNA 包含 SEQ ID NO: 159 至 SEQ ID NO: 199 中任一项所示的核苷酸序列。
- 96.根据权利要求 91-95 任一项所述的方法,其中所述修饰还包括向所述细胞施用 Cas 酶。
- 97.根据权利要求 96 所述的方法,其中 Cas 酶包括 Cas9 蛋白。
- 98.根据权利要求 90 所述的方法,其中所述反义 RNA 包含 SEQ ID NO: 200 至 SEQ ID NO: 203 中任一项所示的核苷酸序列。
- 99.根据权利要求 75-98 中任一项所述的方法,其中所述免疫效应细胞包括人细胞。
- 100.根据权利要求 75-99 中任一项所述的方法,所述免疫效应细胞包括 T 细胞、B 细胞、天然杀伤细胞(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。
- 101.根据权利要求 75-100 中任一项所述的方法,所述免疫效应细胞包括自体的或非自体的免疫效应细胞。
- 102.根据权利要求 75-101 中任一项所述的方法,其中所述细胞为 HLA-B 纯合子细胞。
- 103.根据权利要求 102 所述的方法,其中所述 HLA-B 纯合子包括 HLA-B*40 纯合子,HLA-B*15 纯合子,HLA-B*46 纯合子,HLA-B*13 纯合子,HLA-B*51 纯合子,HLA-B*58 纯合子,HLA-B*07 纯合子,HLA-B*35 纯合子,HLA-B*44 纯合子,HLA-B*52 纯合子,HLA-B*57 纯合子,HLA-B*54 纯合子,HLA-B*55 纯合子。
- 104.根据权利要求 75-103 中任一项所述的方法,其中所述细胞为 HLA-A 纯合子或杂合子细胞。

胞。

- 105.根据权利要求 104 所述的方法,其中所述 HLA-A 纯合子或杂合子包括 HLA-A*02 纯合子,HLA-A*11 纯合子,HLA-A*02/A*11 杂合子或 HLA-A*24 纯合子。
- 106.权利要求 1-74 中任一项所述经修饰的免疫效应细胞在制备 CAR-T 细胞中的应用。
- 107.药物组合物,其包含权利要求 1-74 中任一项所述经修饰的免疫效应细胞,以及任选地药学上可接受的载剂。
- 108.权利要求 1-74 中任一项所述经修饰的免疫效应细胞和/或权利要求 107 所述的药物组合物,其用于治疗与 GD2 的表达相关的疾病或病症。
- 109.根据权利要求 108 所述的用途,其中所述与 GD2 的表达相关的疾病或病症包括与 GD2 的表达上调相关的疾病或病症。
- 110.根据权利要求 108-109 中任一项所述的用途,其中所述与 GD2 的表达相关的疾病或病症包括癌症。
- 111.根据权利要求 110 所述的用途,其中所述癌症包括 GD2 阳性肿瘤。
- 112.根据权利要求 110-111 中任一项所述的用途,其中所述癌症包括:神经母细胞瘤,黑色素瘤,视网膜母细胞瘤,小细胞肺癌,尤文肉瘤,成神经管细胞瘤,软组织肉瘤,骨肉瘤或胶质瘤。
- 113.权利要求 1-74 中任一项所述经修饰的免疫效应细胞和/或权利要求 107 所述的药物组合物在制备药物中的用途,所述药物用于治疗与 GD2 的表达相关的疾病或病症。
- 114.根据权利要求 113 所述的用途,所述与 GD2 的表达相关的疾病或病症包括与 GD2 的表达上调相关的疾病或病症。
- 115.根据权利要求 113 所述的用途,其中所述与 GD2 的表达相关的疾病或病症包括癌症。
- 116.根据权利要求 115 所述的用途,其中所述癌症包括 GD2 阳性肿瘤。
- 117.根据权利要求 115-116 中任一项所述的用途,其中所述癌症包括:神经母细胞瘤,黑色素瘤,视网膜母细胞瘤,小细胞肺癌,尤文肉瘤,成神经管细胞瘤,软组织肉瘤,骨肉瘤或胶质瘤。
- 118.预防或治疗与 GD2 的表达相关的疾病或病症的方法,其包括向有需要的受试者施用有效量的权利要求 1-74 中任一项所述经修饰的免疫效应细胞和/或权利要求 107 所述的药物组合物。
- 119.根据权利要求 118 所述的用途,其中所述与 GD2 的表达相关的疾病或病症包括与 GD2 的表达上调相关的疾病或病症。

120.根据权利要求 119 所述的方法，其中所述与 GD2 的表达相关的疾病或病症包括癌症。

121.根据权利要求 119 中任一项所述的方法，其中所述癌症包括 GD2 阳性肿瘤。

122.根据权利要求 120-121 中任一项所述的方法，其中所述癌症包括：神经母细胞瘤，黑色瘤，视网膜母细胞瘤，小细胞肺癌，尤文肉瘤，成神经管细胞瘤，软组织肉瘤，骨肉瘤或胶质瘤。

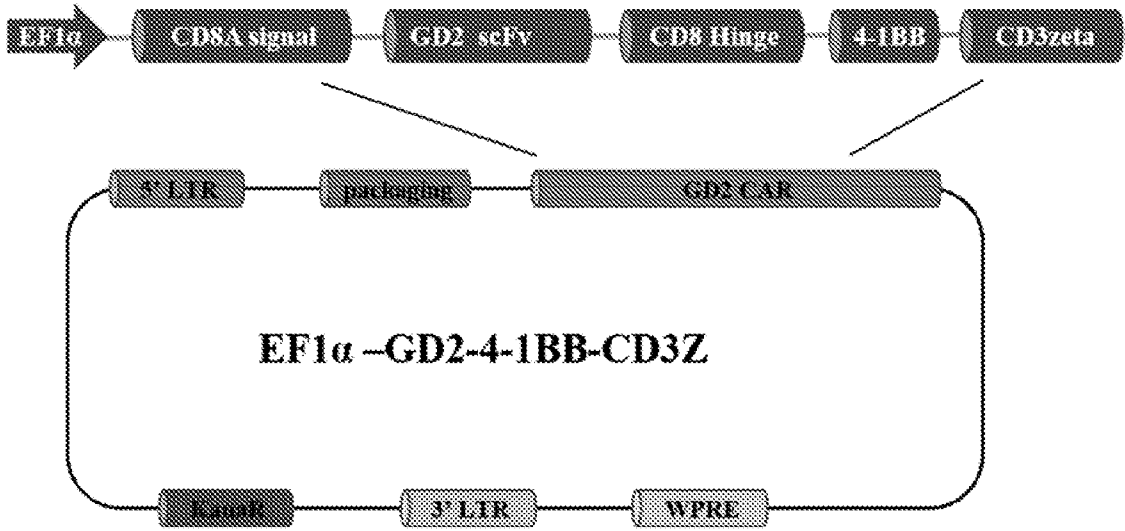


图 1

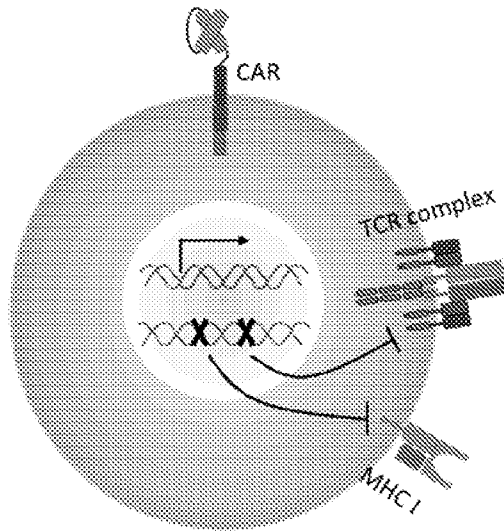


图 2

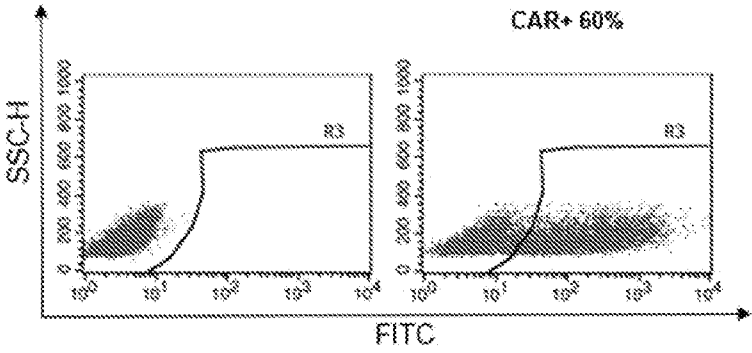


图 3A

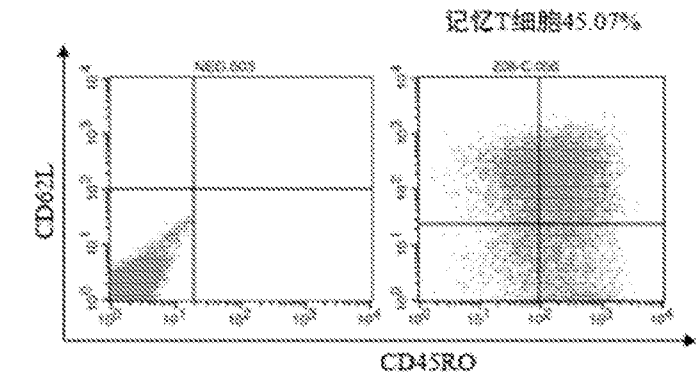


图 3B

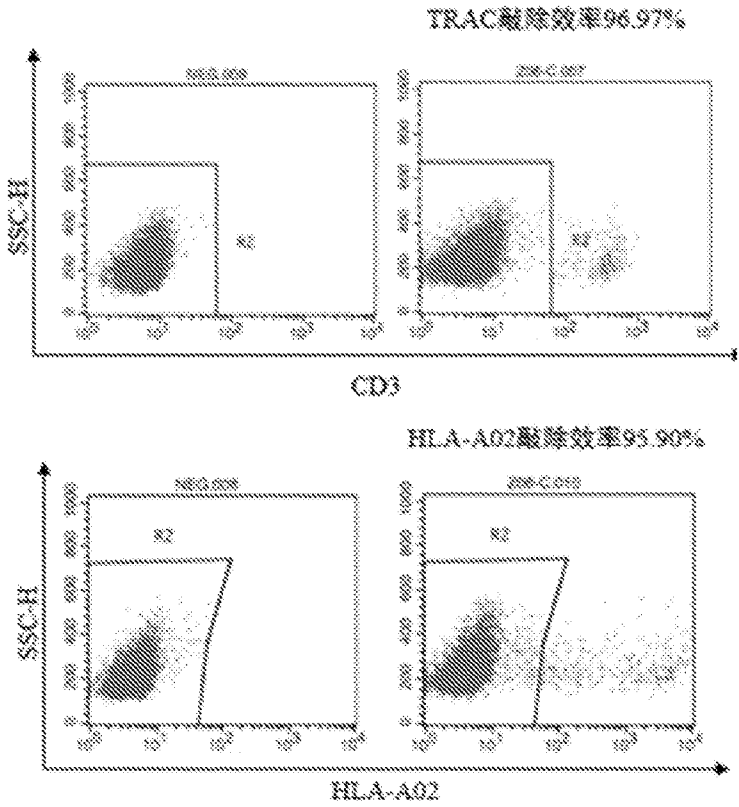


图 3C

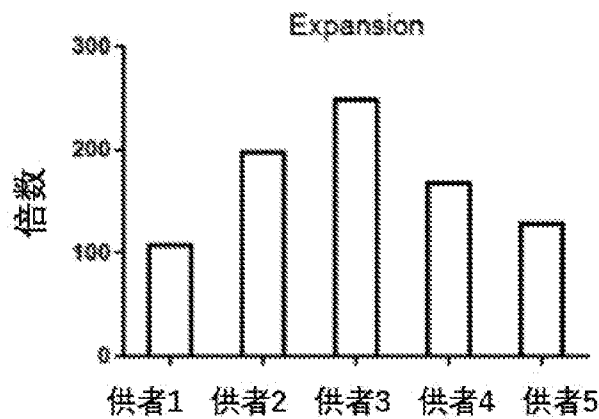


图 3D

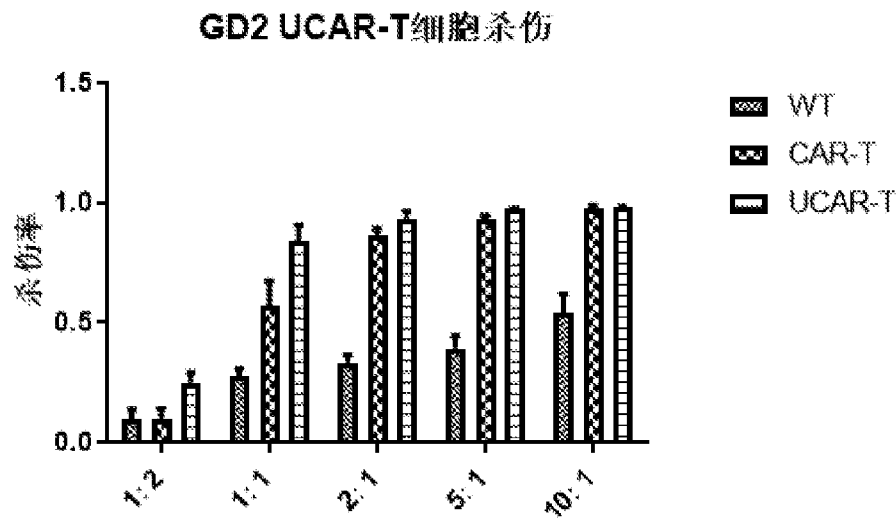


图 4

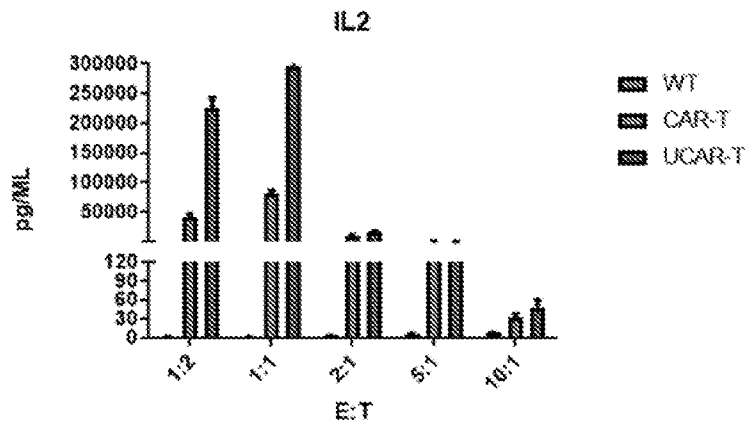


图 5A

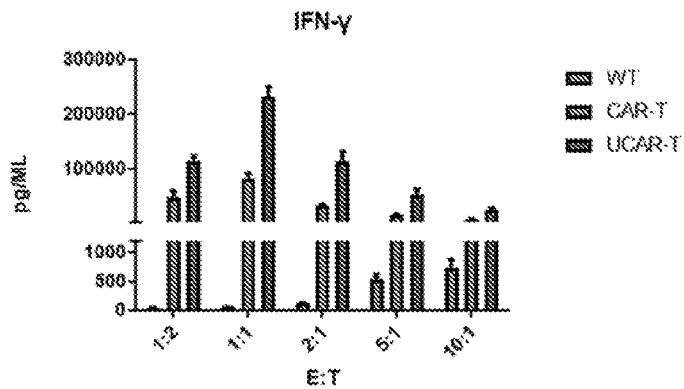


图 5B

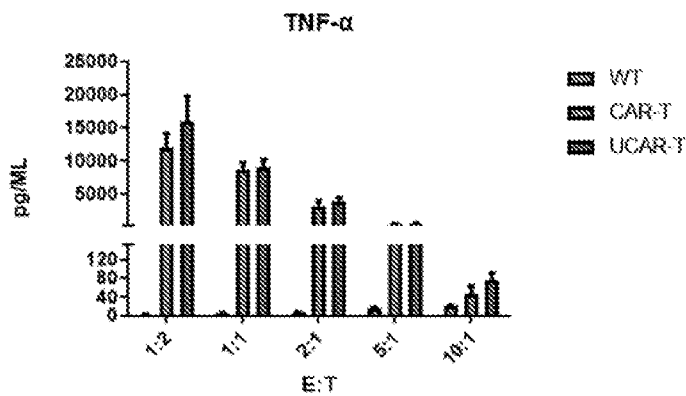


图 5C

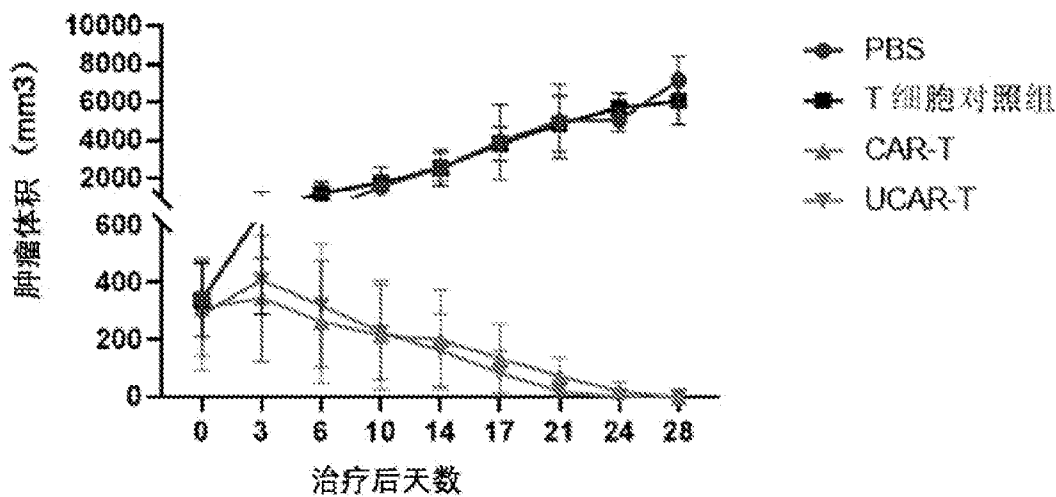


图 6

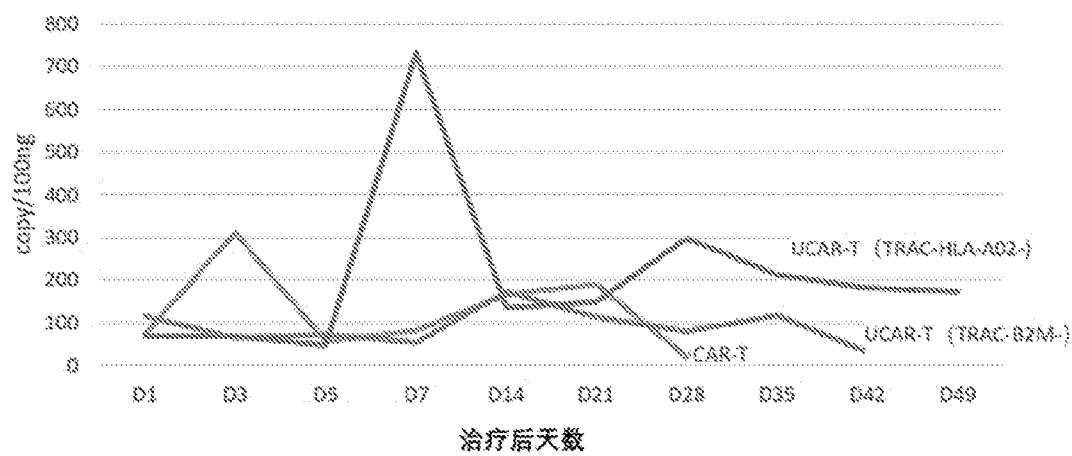


图 7

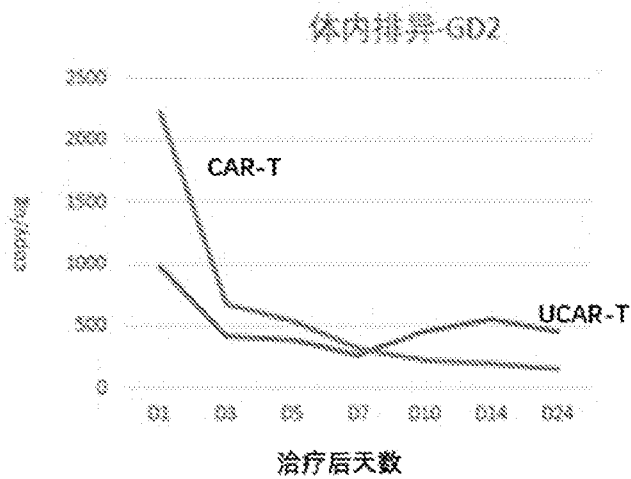


图 8A

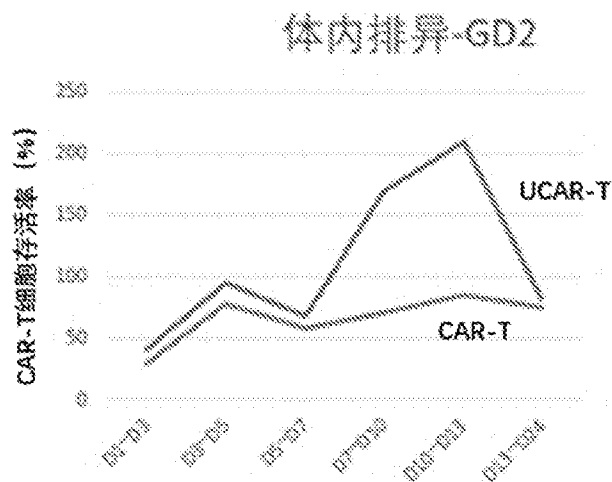
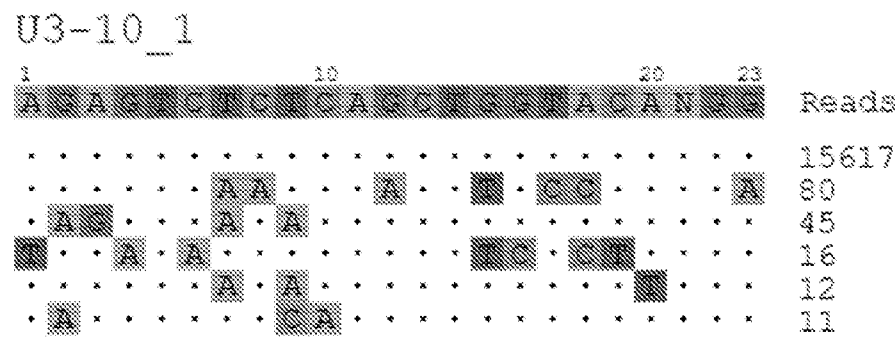


图 8B

U3-10_1: TRAC

去除对照背景后的脱靶展示



U3-10_2: HLA-A02

去除对照背景后的脱靶展示

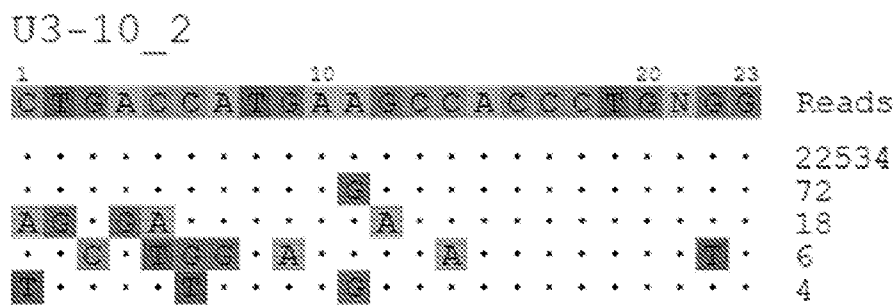


图 9

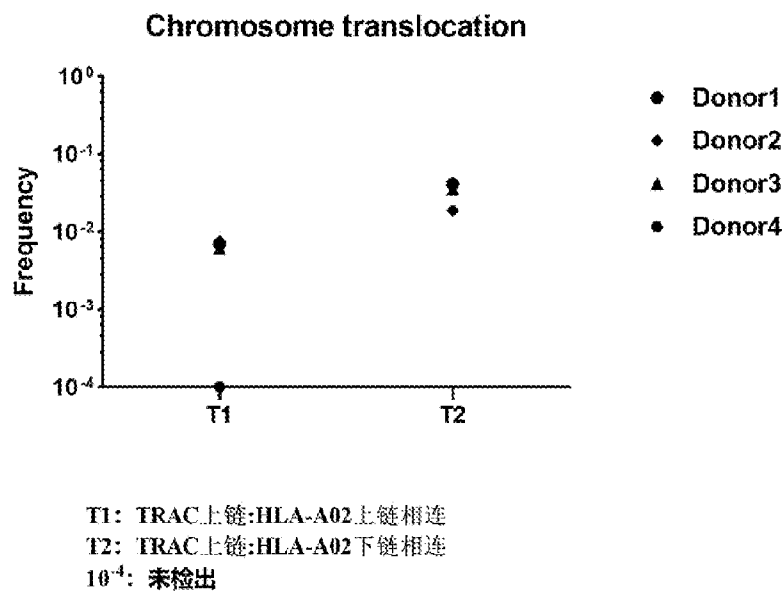
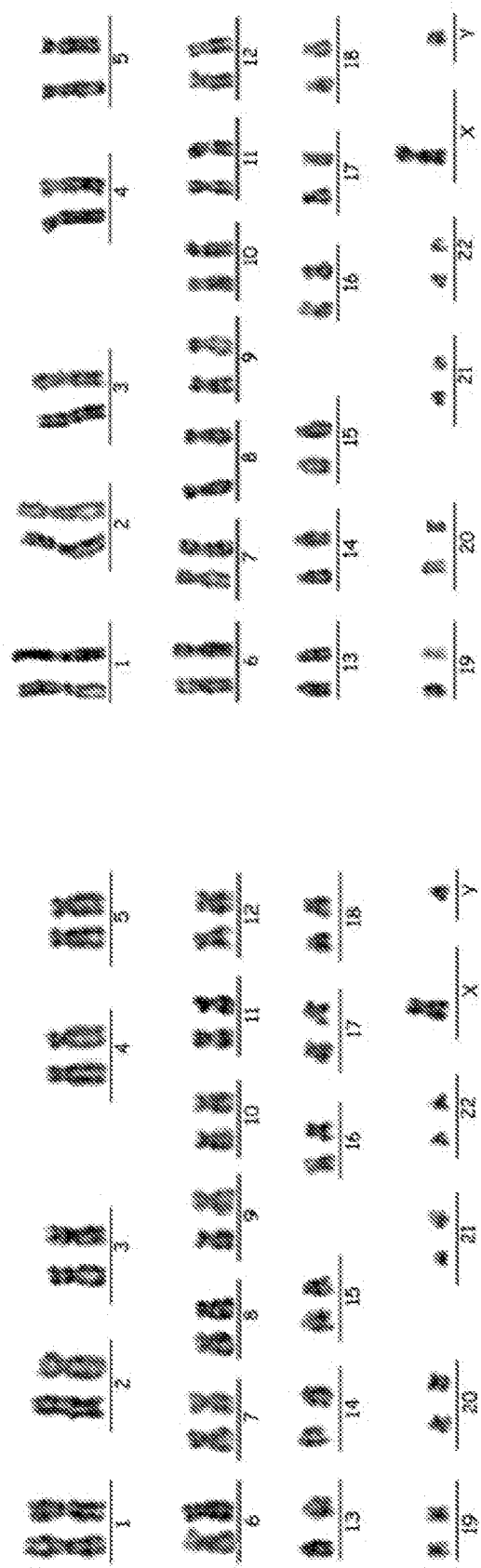


图 10

样本编号: A21-006-U



样本编号: A23-006-WT



分析日期: 2022-04-18

分析结果: 46, XY

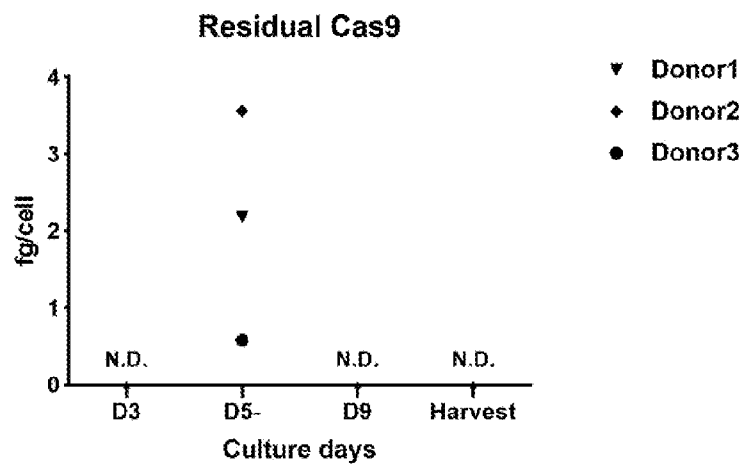
备注: 未见染色体异常

分析日期: 2022-04-18

分析结果: 46, XY

备注: 未见染色体异常

图 11



D3: 第3天电转前
D5-: 第5天电转后换液前
N.D.: 未检出

图 12

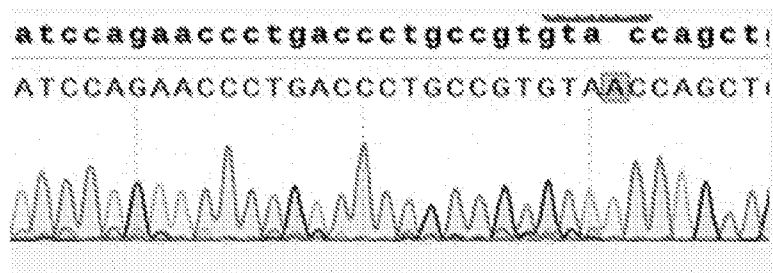


图 13

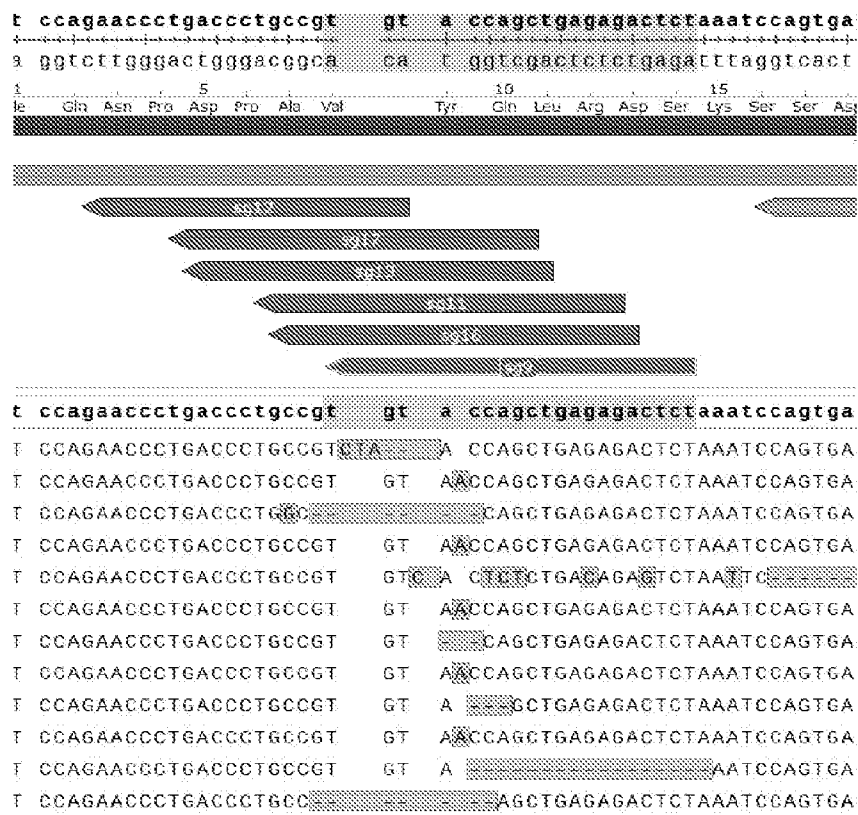


图 14

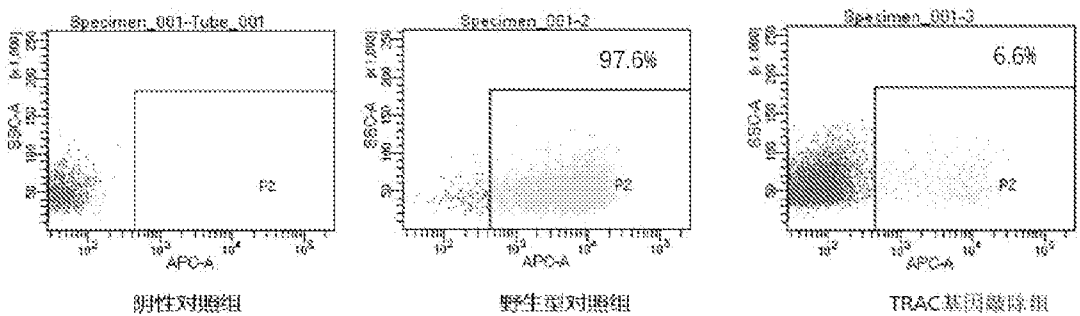


图 15

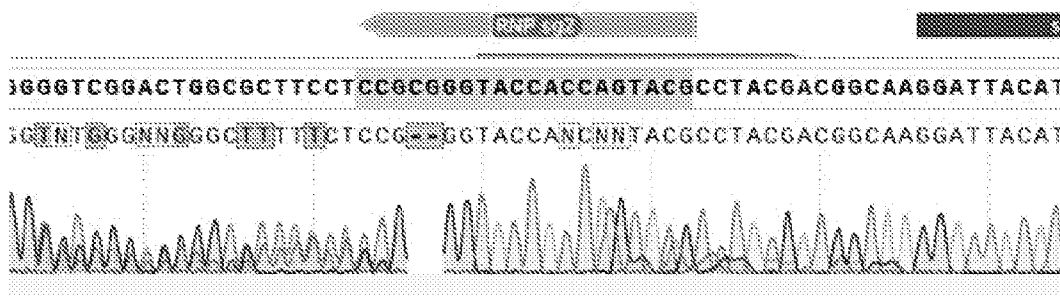


图 16

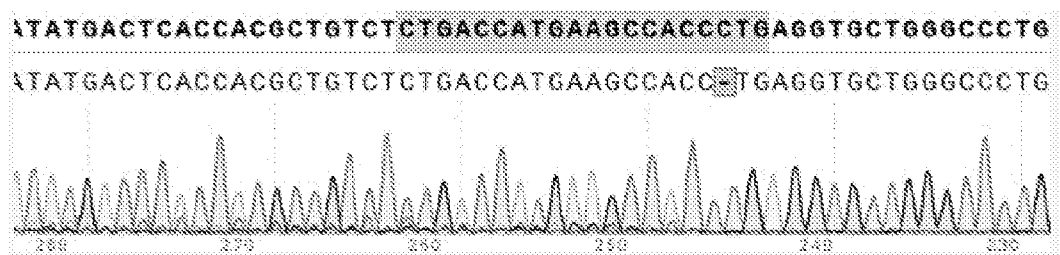


图 17

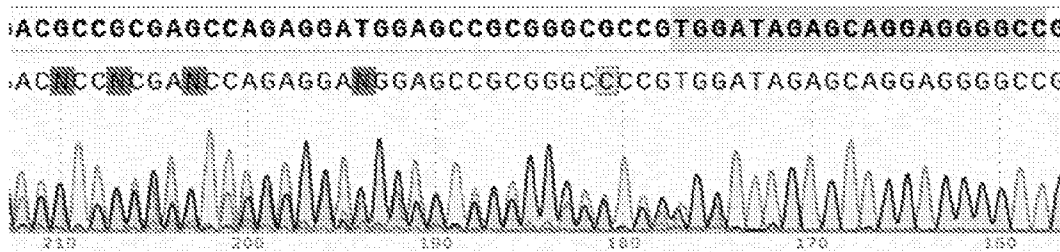


图 18

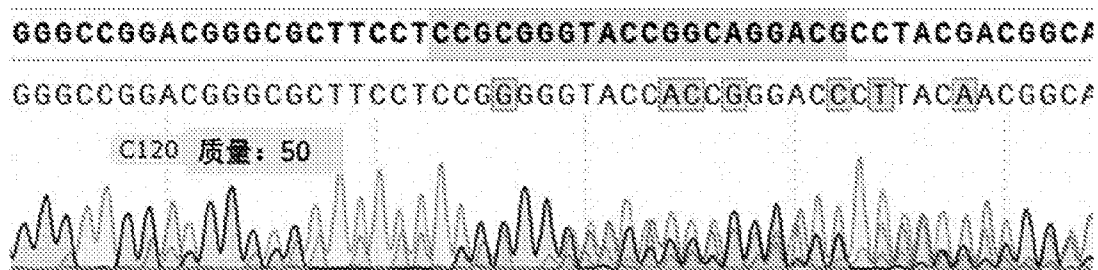


图 19

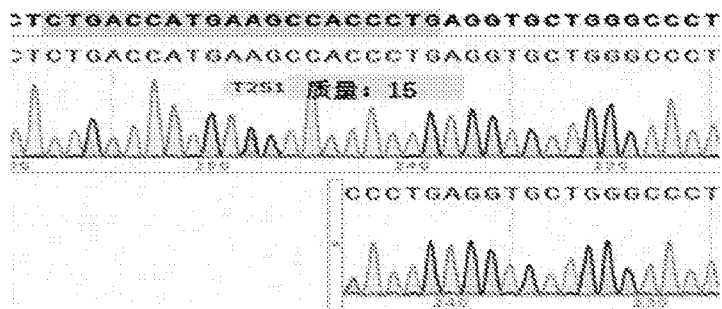


图 20A

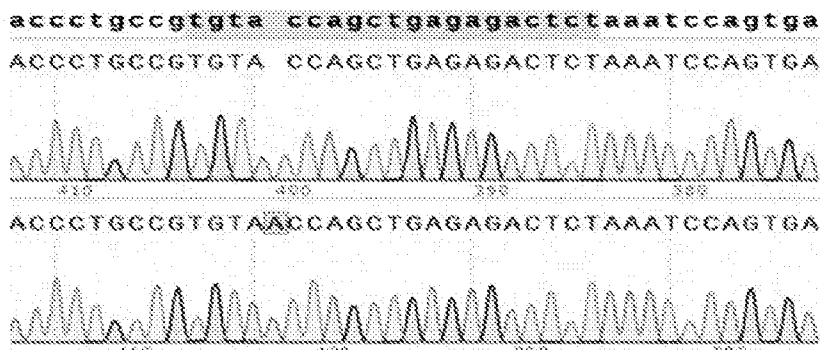


图 20B

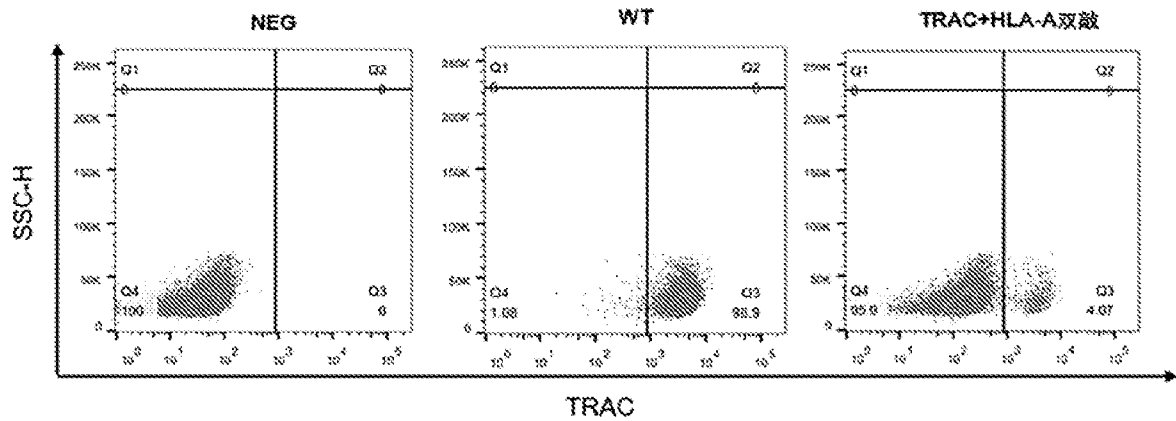


图 21A

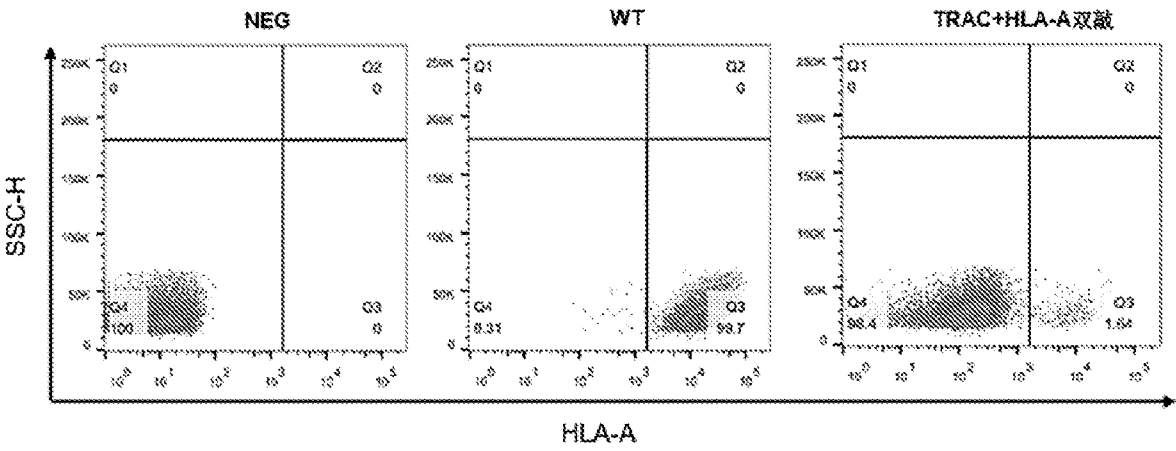


图 21B

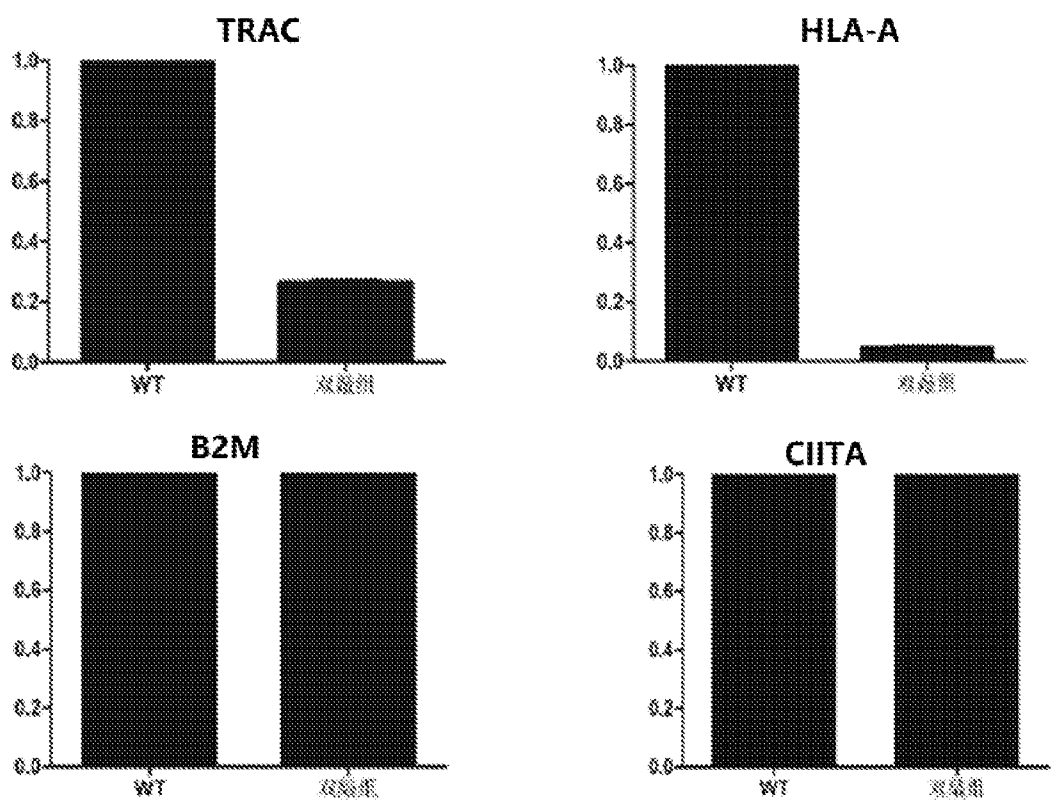


图 22

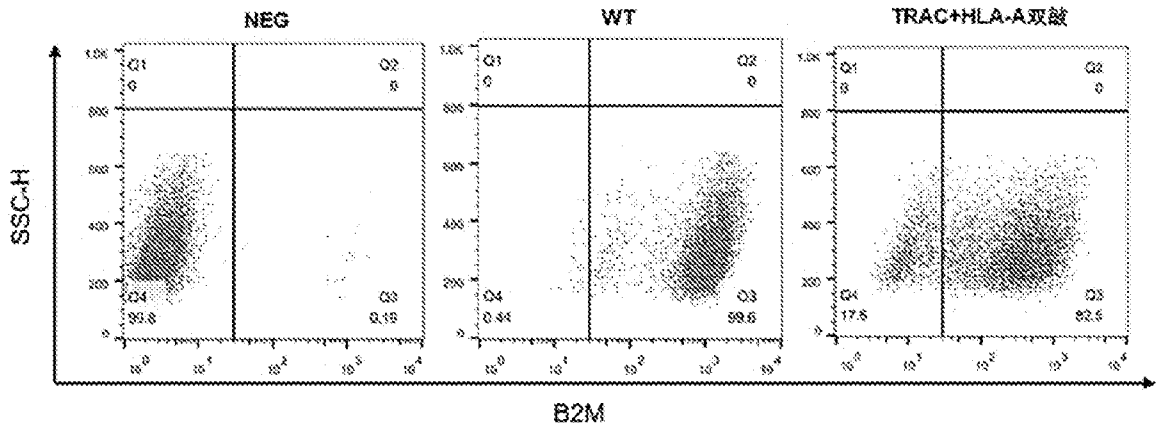


图 23A

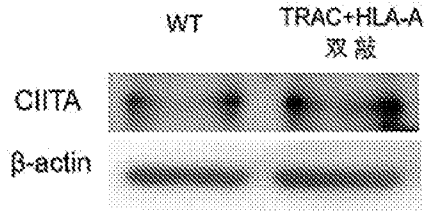


图 23B

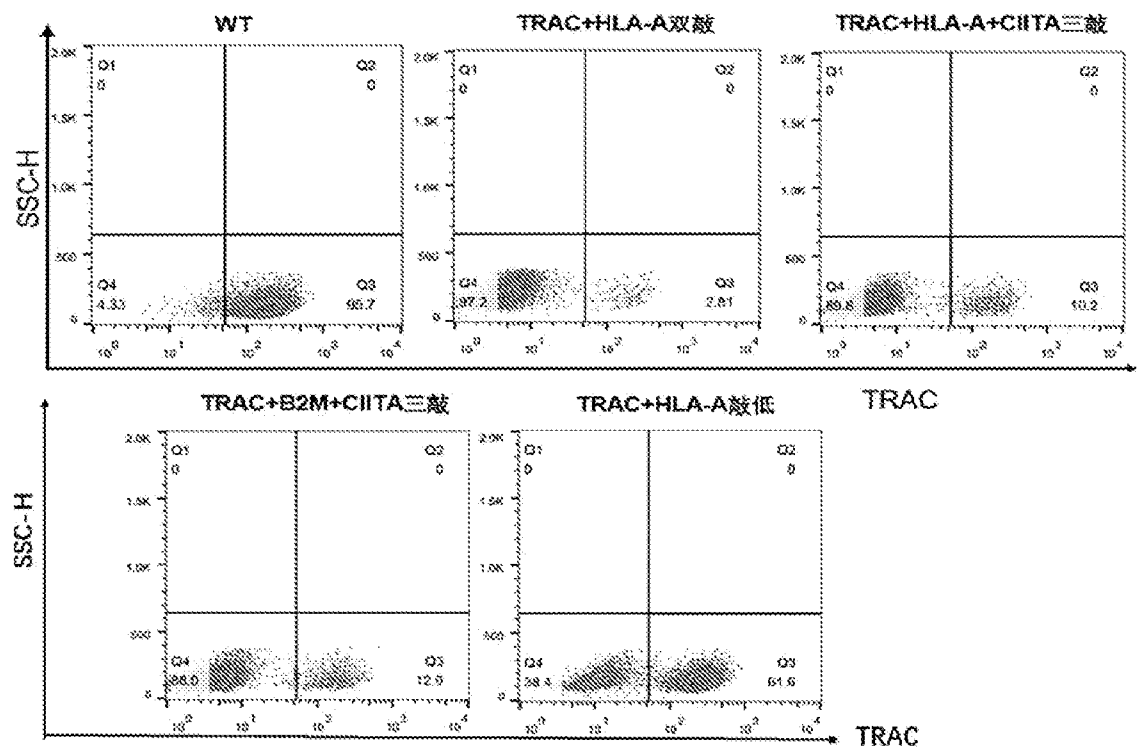


图 24A

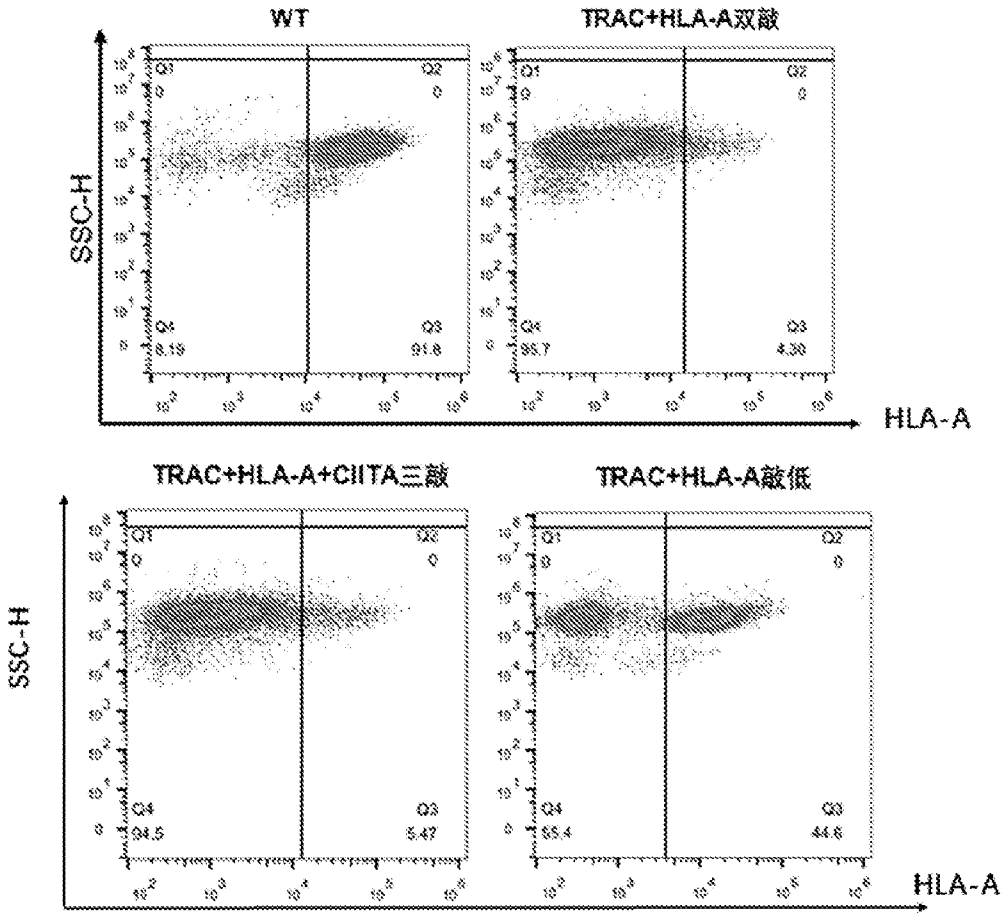


图 24B

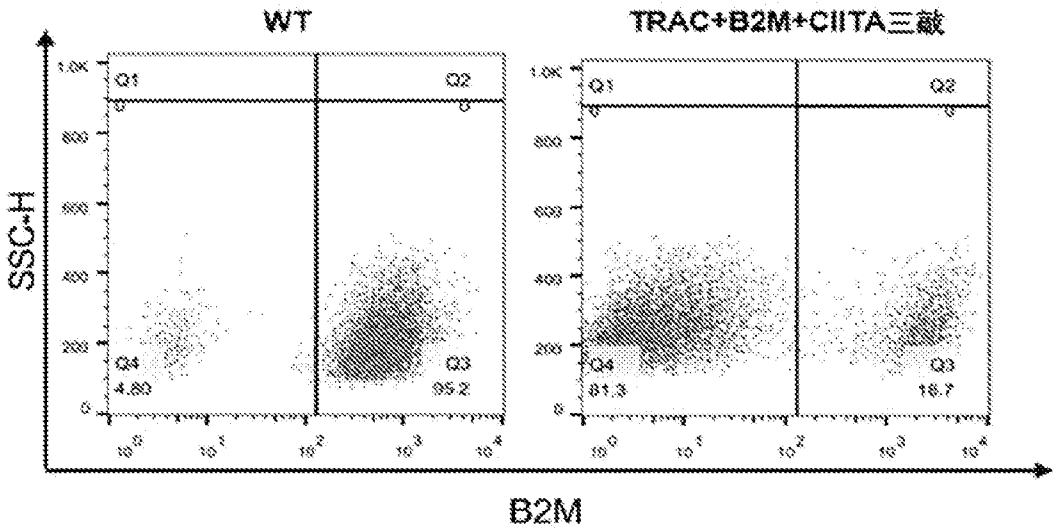


图 24C

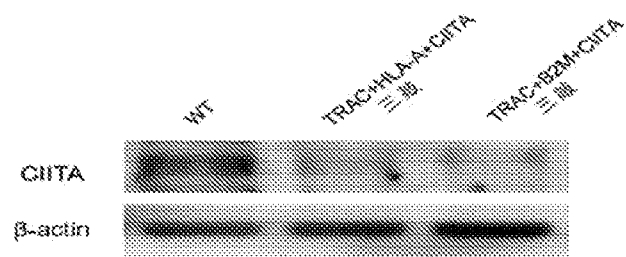


图 24D

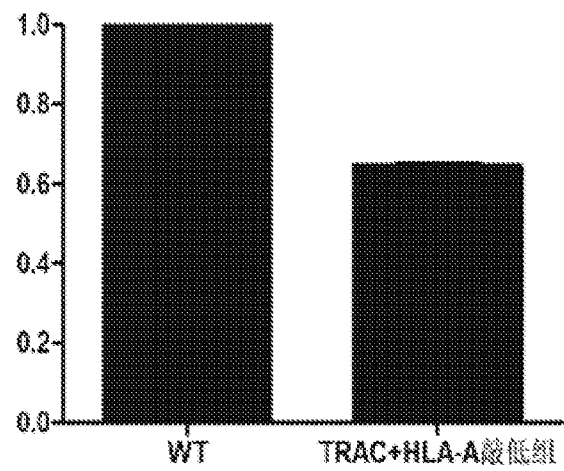


图 25A

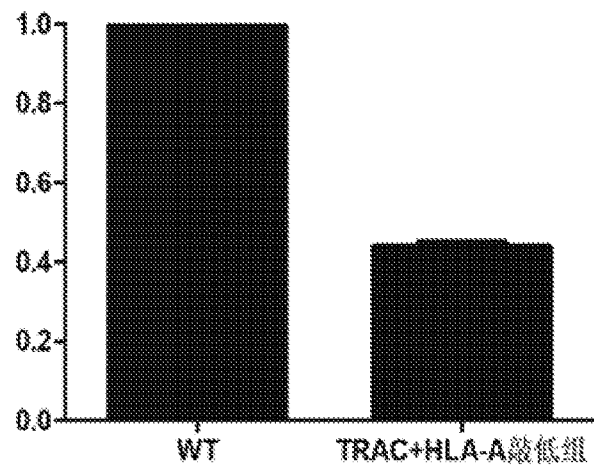


图 25B

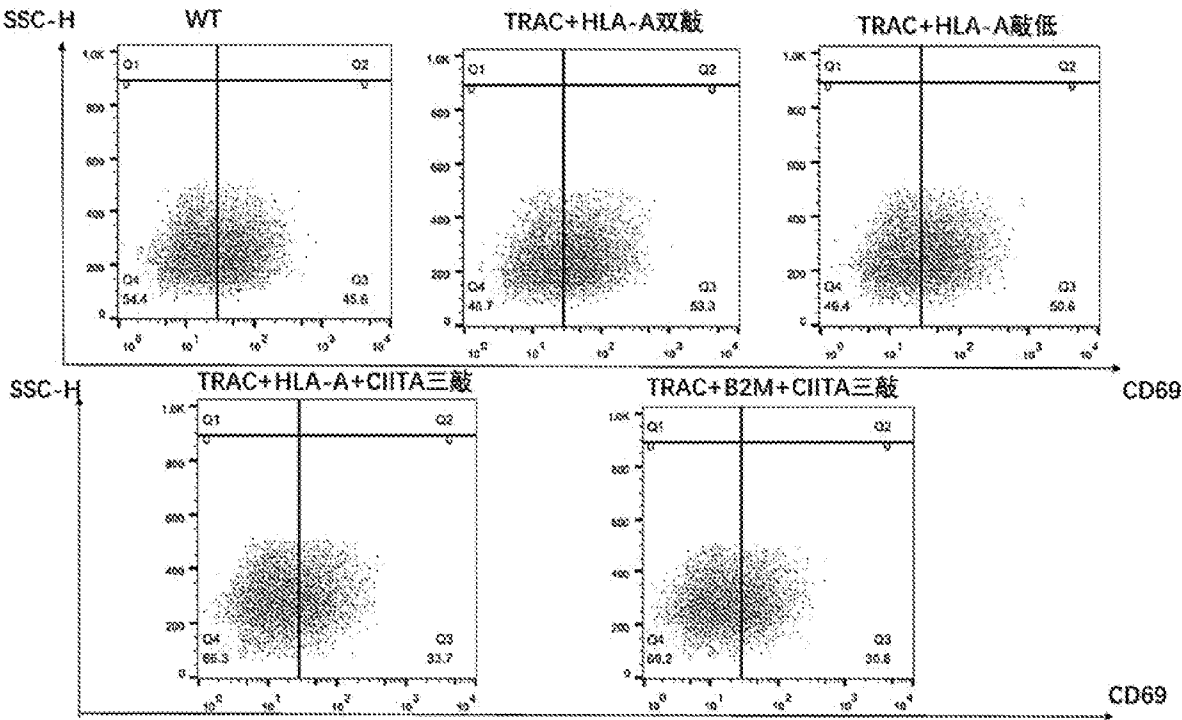


图 26A

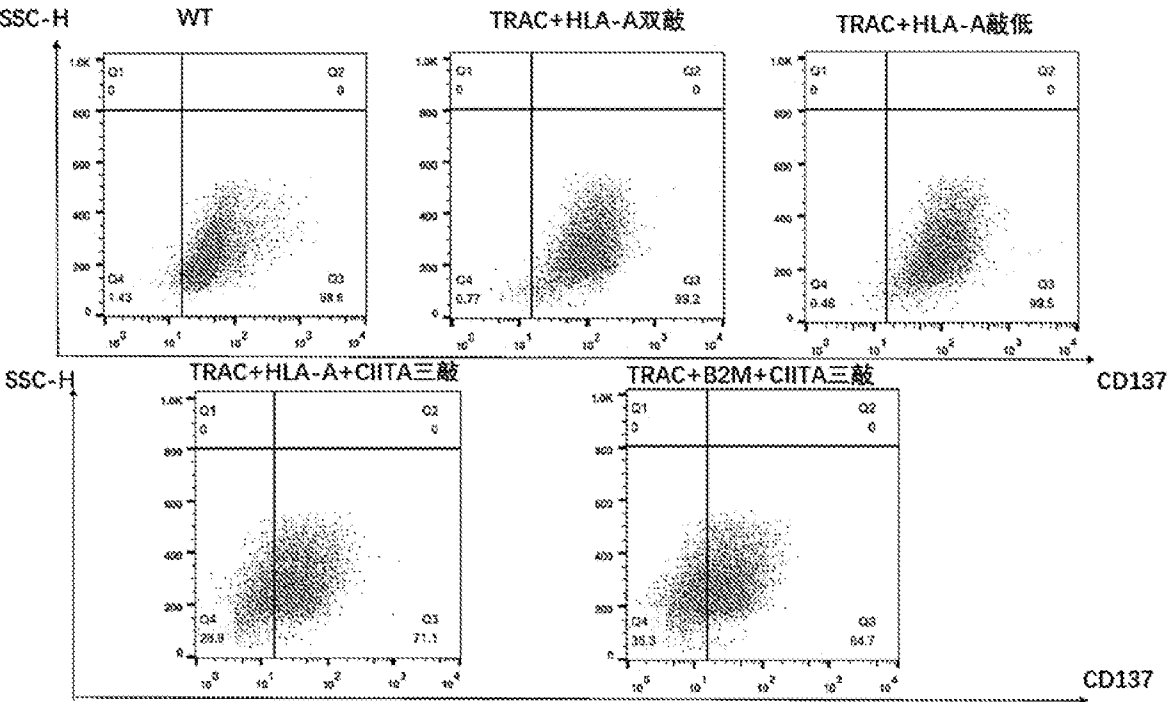


图 26B

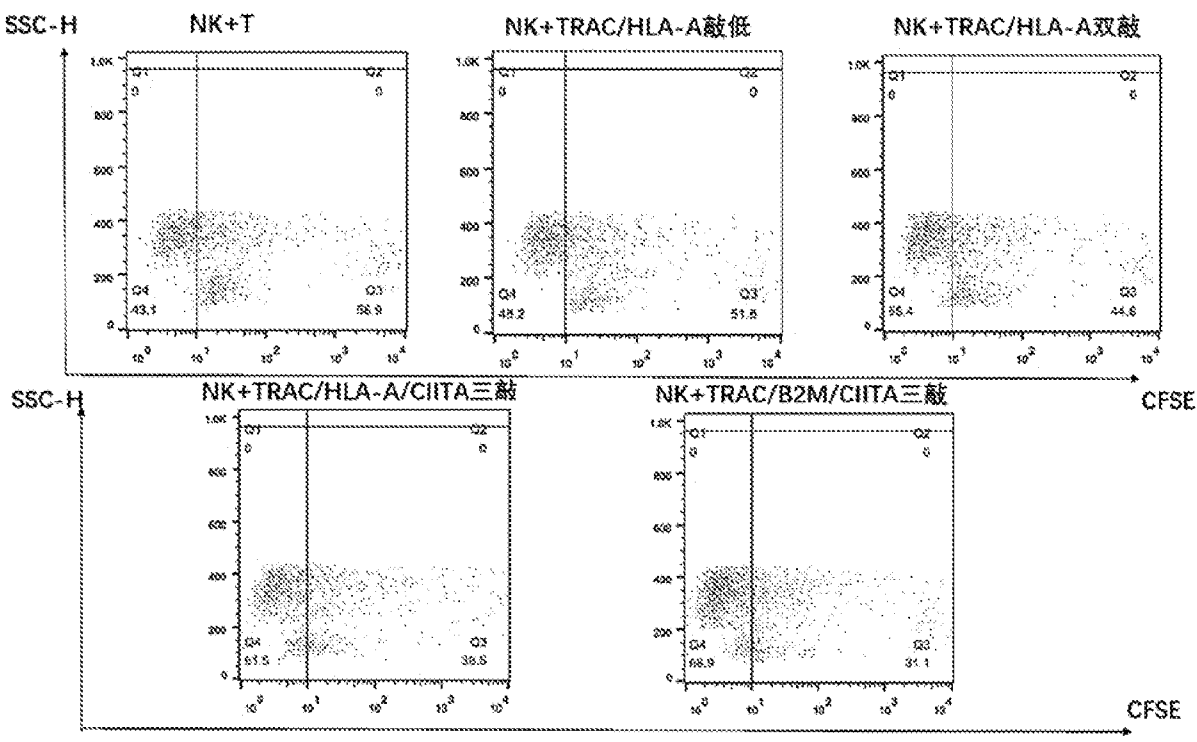


图 27

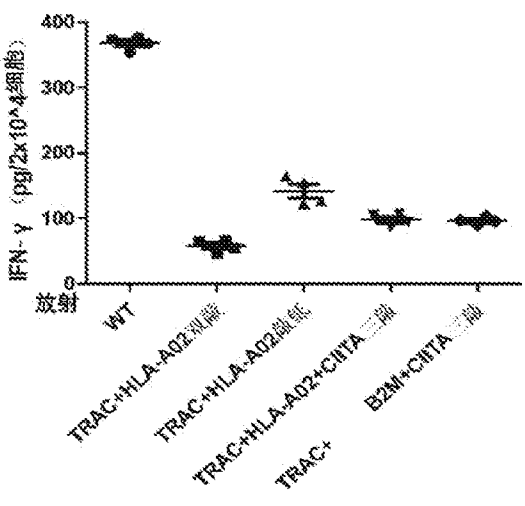


图 28

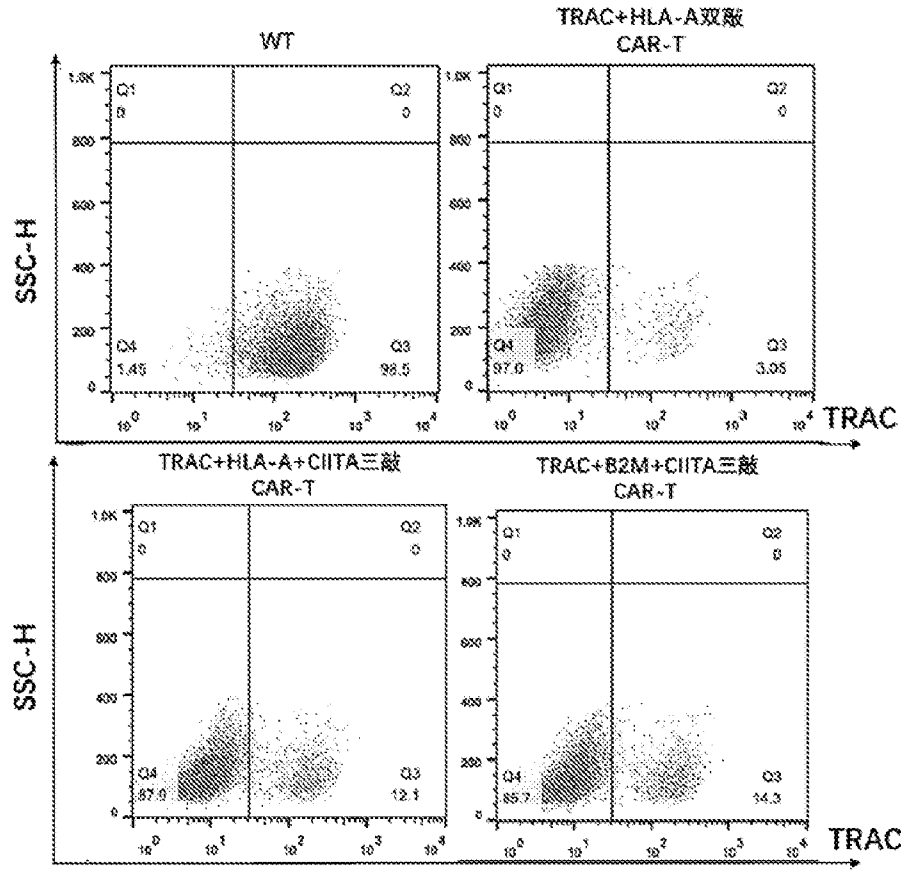


图 29A

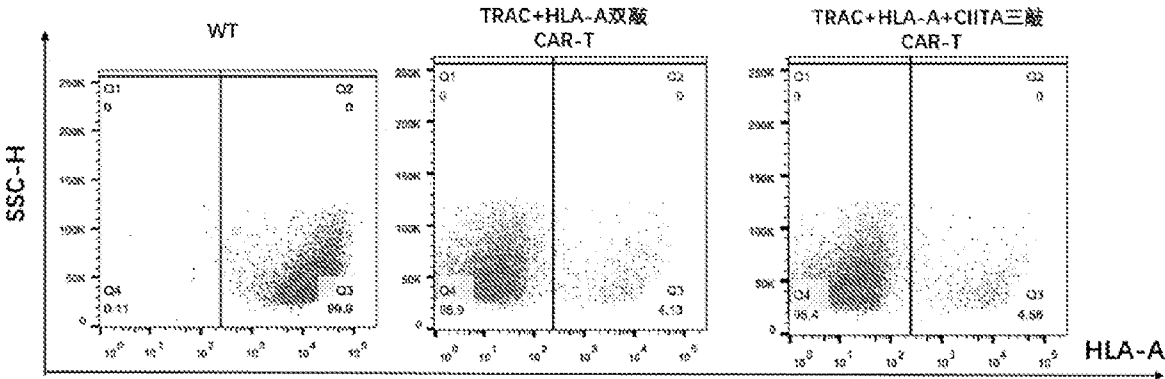


图 29B

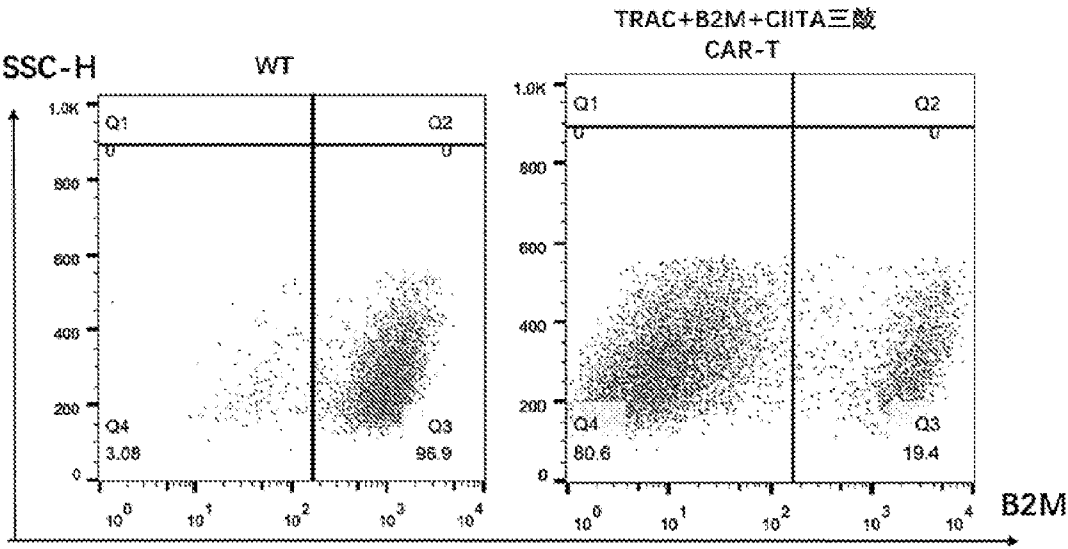


图 29C

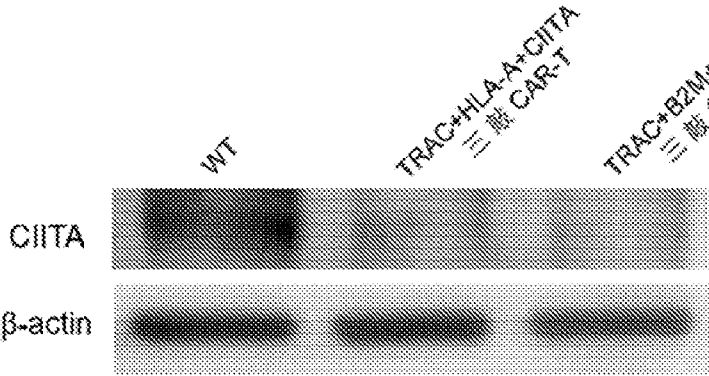


图 29D

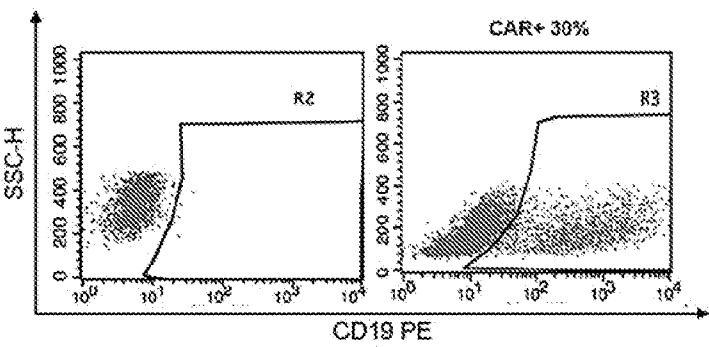


图 30

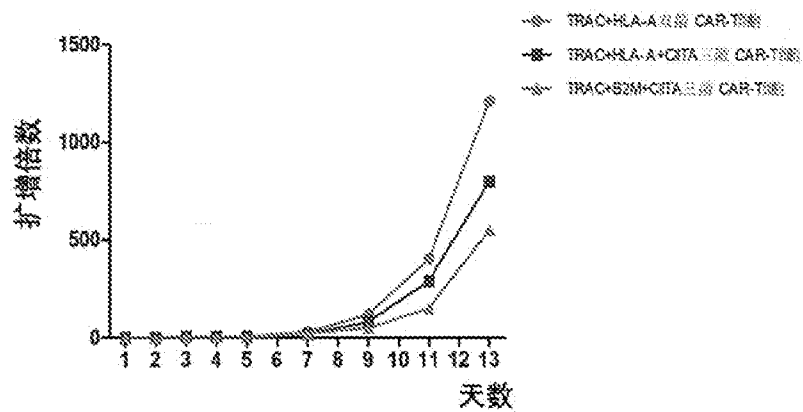


图 31

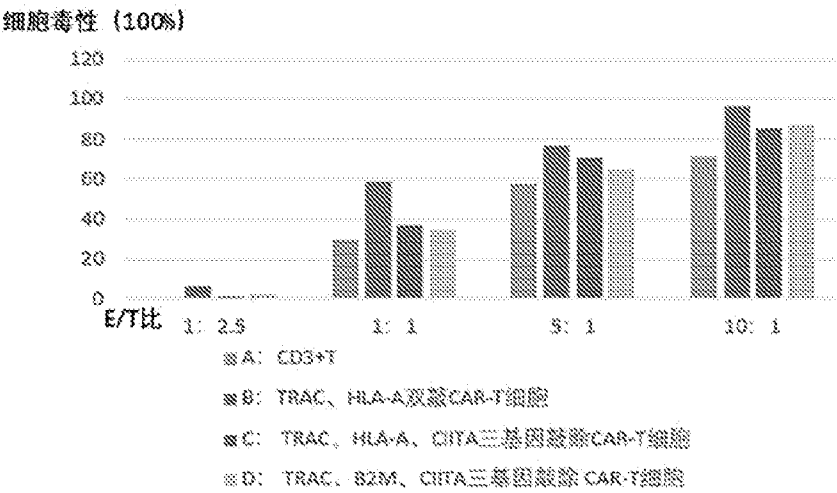


图 32

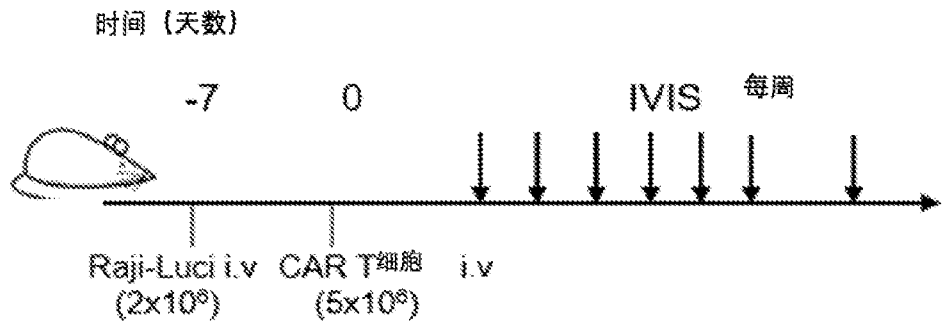


图 33



图 34

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/103102

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61P 35/00(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; A61P 37/06(2006.01)i; A61P 31/00(2006.01)i; C07K 16/28(2006.01)i;
A61P 37/02(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)

A61P; C07K; C12N

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)

CNXTX; ENTXT; ENTXTC; STN; PUBMED; SpringerLink; ISI Web of Knowledge; Elsevier Science Direct; Wiley InterScience; Nature; Science; CNKI; 万方, WANFANG; NCBI: 神经节苷脂, gd2, CAR, TRC, HLA, SEQ ID NOs: 1-20, 144-199.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 113061580 A (JIANGSU MAOXING TECH CO., LTD.) 02 July 2021 (2021-07-02) claims 1-10, and abstract	1, 28-44, 46-64, 66, 68-69, 71-92, 94, 96-97, 99-122
X	US 2014349402 A1 (UNIV. TEXAS.) 27 November 2014 (2014-11-27) claims 1-8 and 17-31, and description, paragraph 107	1, 28-44, 46-64, 66, 68-69, 71-92, 94, 96-97, 99-122
X	CN 107723275 A (CHONGQING PRECISION BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 23 February 2018 (2018-02-23) abstract, and claims 1-20	1, 28-44, 46-64, 66, 68-69, 71-92, 94, 96-97, 99-122
X	CN 107630006 A (SHANDONG BELLASTEM BIOTECHNOLOGY LIMITED) 26 January 2018 (2018-01-26) description, paragraphs 8-24	1, 28-44, 46-64, 66, 68-69, 71-92, 94, 96-97, 99-122
Y	US 2014349402 A1 (UNIV. TEXAS.) 27 November 2014 (2014-11-27) claims 1-8 and 17-31, and description, paragraph 107	2-122



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date
 “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 “&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 September 2022

Date of mailing of the international search report

29 September 2022

Name and mailing address of the ISA/CN

**China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing
100088, China**

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/103102

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 107723275 A (CHONGQING PRECISION BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 23 February 2018 (2018-02-23) abstract, and claims 1-20	2-122
Y	CN 107630006 A (SHANDONG BELLASTEM BIOTECHNOLOGY LIMITED) 26 January 2018 (2018-01-26) description, paragraphs 8-24	2-122
Y	CN 108884164 A (CELL MEDICA SWITZERLAND AG) 23 November 2018 (2018-11-23) description, paragraphs 84 and 238-257	2-122
Y	CN 108728460 A (SHANGHAI HENGRUN DASHENG BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 02 November 2018 (2018-11-02) claims 1-10, and sequence table	2-122
Y	CN 109456943 A (GRACELL BIOTECHNOLOGY (SHANGHAI) CO., LTD.) 12 March 2019 (2019-03-12) claims 1-10	2-122
Y	WO 2019097305 A2 (CRISPR THERAPEUTICS AG) 23 May 2019 (2019-05-23) description, page 4, paragraph 4, and page 7, paragraph 4, and sequence table	65-122

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/103102

Box No. I **Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/103102

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.: **118-122**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
[1] Claims 118-122 relates to a disease treatment method, which belongs to a disease treatment method as defined in PCT Rule 39.1(iv). However, a search was still made on the basis of a pharmaceutical use.
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/CN2022/103102

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	113061580	A	02 July 2021	WO	2021136263	A1	08 July 2021
				AU	2020418199	A1	21 July 2022
				US	2022193135	A1	23 June 2022
US	2014349402	A1	27 November 2014	WO	2013074916	A1	23 May 2013
				US	2019388472	A1	26 December 2019
CN	107723275	A	23 February 2018	EP	3699268	A1	26 August 2020
				WO	2019076149	A1	25 April 2019
CN	107630006	A	26 January 2018	None			
CN	108884164	A	23 November 2018	WO	2017144681	A1	31 August 2017
				CA	3014001	A1	31 August 2017
				RU	2018128464	A	25 March 2020
				RU	2018128462	A	25 March 2020
				SG	11201807187 X	A	27 September 2018
				WO	2017147383	A1	31 August 2017
				CN	108699153	A	23 October 2018
				AU	2017224843	A1	23 August 2018
				US	2019048085	A1	14 February 2019
				BR	112018067696	A2	08 January 2019
				BR	112018067698	A2	08 January 2019
				KR	20180111870	A	11 October 2018
				AU	2017223846	A1	23 August 2018
				US	2019055312	A1	21 February 2019
				EP	3420000	A1	02 January 2019
				CA	3014067	A1	31 August 2017
				KR	20190003938	A	10 January 2019
				ES	2903408	T3	01 April 2022
				JP	2022116230	A	09 August 2022
				JP	2019515646	A	13 June 2019
				EP	3420001	A1	02 January 2019
				SG	11201807188V	A	27 September 2018
				JP	2019513009	A	23 May 2019
CN	108728460	A	02 November 2018	None			
CN	109456943	A	12 March 2019	CN	111051502	A	21 April 2020
				WO	2019047899	A1	14 March 2019
				EP	3680328	A1	15 July 2020
WO	2019097305	A2	23 May 2019	US	2018325955	A1	15 November 2018
				US	2021252060	A1	19 August 2021
				ZA	201906923	B	27 January 2021
				US	2021085718	A1	25 March 2021
				ZA	202006500	B	26 January 2022
				MX	2019013514	A	20 January 2020
				KR	20200005596	A	15 January 2020
				CA	3062506	A1	23 May 2019
				PH	12019502529	A1	13 July 2020
				JP	2020519277	A	02 July 2020
				CN	110914289	A	24 March 2020
				US	11071755	B1	27 July 2021
				US	2021236552	A1	05 August 2021
				US	2021236551	A1	05 August 2021

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/103102

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		BR 112019023608 A2	26 May 2020
		US 2019314414 A1	17 October 2019
		US 2021108174 A1	15 April 2021
		US 2019365809 A1	05 December 2019
		US 2019365808 A1	05 December 2019
		AU 2018367896 A1	31 October 2019
		US 2020405764 A1	31 December 2020
		CO 2019013821 A2	31 January 2020
		US 2019314413 A1	17 October 2019
		EP 3621981 A2	18 March 2020
		US 2020330518 A1	22 October 2020

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2022/103102

A. 主题的分类

A61P 35/00(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; A61P 37/06(2006.01)i; A61P 31/00(2006.01)i; C07K 16/28(2006.01)i; A61P 37/02(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. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

A61P; C07K; C12N

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))

CNXTX;ENTXT;ENTXTC;STN;PUBMED;SpringerLink;ISI Web of Knowledge;Elsevier Science Direct;Wiley InterScience;Nature;Science;CNKI;万方;NCBI;神经节苷脂, gd2, CAR, TRC, HLA, SEQ ID NO:1-20、144-199.

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
PX	CN 113061580 A (江苏茂行科技有限公司) 2021年7月2日 (2021 - 07 - 02) 权利要求1-10、摘要	1、28-44、46-64、 66、68-69、71-92、 94、96-97、99-122
X	US 2014349402 A1 (UNIV. TEXAS.) 2014年11月27日 (2014 - 11 - 27) 权利要求1-8、17-31、说明书第107段	1、28-44、46-64、 66、68-69、71-92、 94、96-97、99-122
X	CN 107723275 A (重庆精准生物技术有限公司) 2018年2月23日 (2018 - 02 - 23) 摘要, 权利要求1-20	1、28-44、46-64、 66、68-69、71-92、 94、96-97、99-122
X	CN 107630006 A (山东兴瑞生物科技有限公司) 2018年1月26日 (2018 - 01 - 26) 说明书第8-24段	1、28-44、46-64、 66、68-69、71-92、 94、96-97、99-122
Y	US 2014349402 A1 (UNIV. TEXAS.) 2014年11月27日 (2014 - 11 - 27) 权利要求1-8、17-31、说明书第107段	2-122
Y	CN 107723275 A (重庆精准生物技术有限公司) 2018年2月23日 (2018 - 02 - 23) 摘要, 权利要求1-20	2-122

☒ 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

2022年9月17日

国际检索报告邮寄日期

2022年9月29日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局(ISA/CN)

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

授权官员

张丽玮

电话号码 86-(10)-53962036

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
Y	CN 107630006 A (山东兴瑞生物科技有限公司) 2018年1月26日 (2018 - 01 - 26) 说明书第8-24段	2-122
Y	CN 108884164 A (细胞医学瑞士公司等) 2018年11月23日 (2018 - 11 - 23) 说明书第84、238-257段	2-122
Y	CN 108728460 A (上海恒润达生生物科技有限公司) 2018年11月2日 (2018 - 11 - 02) 权利要求1-10、序列表	2-122
Y	CN 109456943 A (亘喜生物科技上海有限公司) 2019年3月12日 (2019 - 03 - 12) 权利要求1-10	2-122
Y	WO 2019097305 A2 (CRISPR THERAPEUTICS AG) 2019年5月23日 (2019 - 05 - 23) 说明书第4页第4段，第7页第4段，序列表	65-122

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列 (续第1页第1. c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列表进行的:

a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:

☒ 附件C/ST. 25文本文件形式

☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:

☐ 附件C/ST. 25文本文件形式 (细则13之三. 1(a))

☐ 纸件或图形文件形式 (细则13之三. 1(b) 和行政规程第713段)

2. ☐ 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围 (如适用) 的所需声明。

3. 补充意见:

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： 118-122
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118-122涉及治疗疾病的方法，属于PCT细则39.1 (iv) 规定的疾病的治疗方法，但仍然基于其制药用途进行了检索。
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/CN2022/103102

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	113061580	A	2021年7月2日	WO	2021136263	A1	2021年7月8日
				AU	2020418199	A1	2022年7月21日
				US	2022193135	A1	2022年6月23日
US	2014349402	A1	2014年11月27日	WO	2013074916	A1	2013年5月23日
				US	2019388472	A1	2019年12月26日
CN	107723275	A	2018年2月23日	EP	3699268	A1	2020年8月26日
				WO	2019076149	A1	2019年4月25日
CN	107630006	A	2018年1月26日	无			
CN	108884164	A	2018年11月23日	WO	2017144681	A1	2017年8月31日
				CA	3014001	A1	2017年8月31日
				RU	2018128464	A	2020年3月25日
				RU	2018128462	A	2020年3月25日
				SG	11201807187X	A	2018年9月27日
				WO	2017147383	A1	2017年8月31日
				CN	108699153	A	2018年10月23日
				AU	2017224843	A1	2018年8月23日
				US	2019048085	A1	2019年2月14日
				BR	112018067696	A2	2019年1月8日
				BR	112018067698	A2	2019年1月8日
				KR	20180111870	A	2018年10月11日
				AU	2017223846	A1	2018年8月23日
				US	2019055312	A1	2019年2月21日
				EP	3420000	A1	2019年1月2日
				CA	3014067	A1	2017年8月31日
				KR	20190003938	A	2019年1月10日
				ES	2903408	T3	2022年4月1日
				JP	2022116230	A	2022年8月9日
				JP	2019515646	A	2019年6月13日
CN	109456943	A	2019年3月12日	EP	3420001	A1	2019年1月2日
				SG	11201807188V	A	2018年9月27日
				JP	2019513009	A	2019年5月23日
				无			
				CN	111051502	A	2020年4月21日
				WO	2019047899	A1	2019年3月14日
				EP	3680328	A1	2020年7月15日
WO	2019097305	A2	2019年5月23日	US	2018325955	A1	2018年11月15日
				US	2021252060	A1	2021年8月19日
				ZA	201906923	B	2021年1月27日
				US	2021085718	A1	2021年3月25日
				ZA	202006500	B	2022年1月26日
				MX	2019013514	A	2020年1月20日
				KR	20200005596	A	2020年1月15日
				CA	3062506	A1	2019年5月23日
				PH	12019502529	A1	2020年7月13日
				JP	2020519277	A	2020年7月2日
				CN	110914289	A	2020年3月24日
				US	11071755	B1	2021年7月27日
				US	2021236552	A1	2021年8月5日
				US	2021236551	A1	2021年8月5日

国际申请号
PCT/CN2022/103102

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)
	BR	112019023608 A2	2020年5月26日
	US	2019314414 A1	2019年10月17日
	US	2021108174 A1	2021年4月15日
	US	2019365809 A1	2019年12月5日
	US	2019365808 A1	2019年12月5日
	AU	2018367896 A1	2019年10月31日
	US	2020405764 A1	2020年12月31日
	CO	2019013821 A2	2020年1月31日
	US	2019314413 A1	2019年10月17日
	EP	3621981 A2	2020年3月18日
	US	2020330518 A1	2020年10月22日