(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
2021 年 12 月 16 日 (16.12.2021)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2021/249549 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 14/725 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 35/17 (2015.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2021/099797

(22) 国际申请日: 2021 年 6 月 11 日 (11.06.2021)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202010535848.X 2020年6月12日 (12.06.2020) CN

(71) 申请人: 中国科学院分子细胞科学卓越创新中心(CENTER FOR EXCELLENCE IN MOLECULAR CELL SCIENCE, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) [CN/CN]; 中国上海市徐汇区岳阳路320号35号楼, Shanghai 200031 (CN)。

(72) 发明人: 许琛琦(XU, Chenqi); 中国上海市徐汇区岳阳路320号35号楼, Shanghai 200031 (CN)。 周秋萍(ZHOU, Qiuping); 中国上海市徐汇区岳阳路320号35号楼, Shanghai 200031 (CN)。 吴微(WU, Wei); 中国上海市徐汇区岳阳路320号35号楼, Shanghai 200031 (CN)。 何星(HE, Xing); 中国上海市徐汇区岳阳路320号35号楼, Shanghai 200031 (CN)。 孙赫(SUN, He); 中国上海市徐汇区岳阳路320号35号楼, Shanghai 200031 (CN)。

(74) 代理人: 上海光华专利事务所 (普通合伙) (J.Z.M.C. PATENT AND TRADEMARK LAW OFFICE); 中国上海市杨浦区国定路335号5022室余明伟, Shanghai 200433 (CN)。

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

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

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

(54) **Title:** CHIMERIC ANTIGEN RECEPTOR AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 一种嵌合抗原受体及其用途

(57) **Abstract:** Provided is a chimeric antigen receptor, comprising an extracellular domain, a transmembrane domain and an intracellular domain, which are connected in sequence, wherein the extracellular domain comprises an antigen recognition region and a hinge region; and one end of the intracellular domain which is connected to the transmembrane domain is connected to a CD3ε intracellular region. The chimeric antigen receptor can further improve the treatment effect of B-cell leukemia lymphoma in B-cell leukemia lymphoma treatment, and reduces inflammatory cytokines generated by means of macrophage monocyte activation by down-regulating cytokines of the chimeric antigen receptor, so that a cytokine storm can be prevented in an early stage, and the risk of neurotoxicity can be reduced. The treatment effect of solid tumors with high mesothelin expression is further improved in mesothelin-positive tumor treatment, and also, a cytokine storm can be prevented in an early stage and the risk of neurotoxicity can be reduced.

(57) 摘要: 提供一种嵌合抗原受体, 包括: 依次连接的胞外结构域、跨膜结构域和胞内结构域; 所述胞外结构域包括抗原识别区和铰链区; 所述胞内结构域与跨膜结构域相连的一端连接有CD3ε胞内区。该嵌合抗原受体在B细胞白血病淋巴瘤治疗中可进一步提高B细胞白血病淋巴瘤的治疗效果, 同时因其下调自身细胞因子来降低巨噬细胞单核细胞活化产生炎性细胞因子, 从而可早期预防细胞因子风暴及降低神经毒性的风险。在mesothelin阳性的肿瘤治疗中进一步提高mesothelin高表达的实体瘤治疗效果, 同时可早期预防细胞因子风暴及降低神经毒性的风险。

WO 2021/249549 A1

一种嵌合抗原受体及其用途

技术领域

本发明涉及 嵌合抗原受体领域，具体涉及一种嵌合抗原受体及其用途 。

背景技术

嵌合抗原受体简称 CAR（chimeric antigen receptor），搭载针对特定肿瘤抗原 CAR 的 T 细胞称为 CAR-T 细胞。CAR-T 疗法在肿瘤的治疗中应用广泛，但仍然存在诸多局限，例如在临床上治疗白血病和实体瘤所遇到的细胞因子风暴、神经毒性安全性问题和疗效有待提高的问题，尤其是实体瘤免疫治疗的应用。

目前解决细胞因子风暴（CRS）和神经毒性（NT）的方法均存在局限性：临床上目前主要是 FDA 批准的用罗氏的 Actemra(tocilizumab，IL-6R 单抗)管理 CRS，tocilizumab 首次被美国 FDA 批准用于治疗类风湿性关节炎治疗，可阻断这些细胞因子所介导的炎症反应。缺点是会使病人体内血液中的 IL-6 水平升高，高浓度 IL-6 可通过血脑屏障可以诱发神经毒性；②IL-1 抑制剂：2018 年 5 月，来自意大利圣拉菲尔医院-圣拉菲尔科学研究所和 MSKCC(Memorial Sloan Kettering 癌症中心)的两个研究团队的两项独立试验均证明了：CRS 是由炎性分子 IL-1 引发的，在治疗方案中加入 IL-1 受体拮抗剂 Kineret (anakinra，类风湿性关节炎药物)通过竞争抑制 IL-1，能够有效控制 CRS，因其具有血脑屏障穿透能力，也可控制神经毒性；局限性：tocilizumab 和 anakinra 都不是从早期干预预防细胞 CRS/NS, 而是属于应急措施，发现补救不及时会存在致命的风险。而目前还不清楚早期干预发生副作用的最佳方案是什么。

设计一款针对 CAR 结构本身的改造是更优化的方案。

发明内容

鉴于以上所述现有技术的缺点，本发明的目的在于提供 一种嵌合抗原受体及其用途 。

为实现上述目的及其他相关目的，本发明第一方面提供一种 嵌合抗原受体。包括：

依次连接的胞外结构域、跨膜结构域和胞内结构域；

所述胞外结构域包括抗原识别区和铰链区；

所述胞内结构域与跨膜结构域相连的一端连接有 CD3ε 胞内区。

本发明第二方面提供一种多核苷酸序列，该多核苷酸序列选自：

（1）编码权利要求前述的嵌合抗原受体的多核苷酸序列；和

（2）（1）所述多核苷酸序列的互补序列；

本发明第三方面提供一种核酸构建物，所述核酸构建物含有前述多核苷酸序列；

优选的，所述核酸构建物为载体；

更优选的，所述核酸构建物为慢病毒载体含有复制起始位点、3’LTR、5’LTR 前述的多核苷酸序列。

本发明第四方面提供慢病毒载体系统，所述慢病毒载体系统含有前述的核酸构建物及慢病毒载体辅助成分。

本发明第五方面提供一种基因修饰的 T 细胞或含该基因修饰的 T 细胞的药物组合物，其特征在于，所述细胞含有前述多核苷酸序列，或含有前述核酸构建物，或感染了前述慢病毒载体系统。

本发明第六方面提供前述嵌合抗原受体、前述多核苷酸序列、前述核酸构建物或前述慢病毒载体系统在制备以下任一种或多种用途产品中的应用：（1）制备 T 细胞；（2）抑制 T 细胞的细胞因子 IFN-γ、IL-2、TNF 分泌；（3）抑制 T 细胞凋亡；（5）增强 T 细胞增殖能力；（6）提高 T 细胞杀伤力；（7）促进 GrzB 产生；（8）促进脱颗粒。

本发明第七方面提供前述嵌合抗原受体、前述多核苷酸序列、前述核酸构建物、前述慢病毒载体系统或前述基因修饰的 T 细胞在制备以下任一种或多种用途产品中的应用：（1）治疗肿瘤；（3）抑制肿瘤治疗时产生的细胞因子风暴；（4）抑制肿瘤治疗时产生的神经毒性；

优选的，所述肿瘤选自白血病或实体瘤中的一种或多种。

如上所述，本发明 的嵌合抗原受体及其用途 ，具有以下有益效果：

本发明的嵌合抗原受体在 B 细胞白血病淋巴瘤治疗中可进一步提高 B 细胞白血病淋巴瘤的治疗效果，同时因其下调自身细胞因子来降低巨噬细胞单核细胞活化产生炎性细胞因子，从而可早期预防细胞因子风暴及降低神经毒性的风险。在 mesothelin 阳性的肿瘤治疗中进一步提高 mesothelin 高表达的实体瘤治疗效果，同时可早期预防细胞因子风暴及降低神经毒性的风险。

附图说明

图 1:a.靶向 CD19 28Z CAR 和 E28Z CAR 的结构示意图。

图 1:b. anti-CD19 CAR 在 28Z 和 E28Z CAR-T 细胞膜表面水平流式图。

图 1:c. 28Z和E28Z CAR-T 中$CD4^+$和$CD8^+$细胞比例的流式图。

图 1: d. anti-CD19 28Z 和 E28Z CAR 经 CD19 抗原刺激后的 CD3ζ 磷酸化水平比较。

图 1: e. anti-CD19 28Z 和 E28Z CAR 经 CD19 抗原刺激后的 CAR 膜表面水平变化。

图 1: f-h. anti-CD19 28Z 和 E28Z CAR-T 细胞经 CD19 抗原刺激后的细胞因子水平比较。

图 1: i. anti-CD19 28Z 和 E28Z CAR-T 细胞经 CD19 抗原刺激后的脱颗粒反应。

图 1: j. anti-CD19 28Z 和 E28Z CAR-T 细胞经 CD19 抗原刺激后的颗粒酶释放反应。

图 1: k. anti-CD19 28Z和E28Z CAR-T对$CD19^+$肿瘤细胞毒性反应。

图 1: l. anti-CD19 28Z 和 E28Z CAR-T 细胞经 CD19 抗原刺激后增殖情况。

图 1: m. anti-CD19 28Z 和 E28Z CAR-T 细胞经 CD19 抗原刺激后凋亡情况。

图 1: n. anti-CD19 28Z 和 E28Z CAR-T 细胞经 CD19 抗原刺激后的存活能力。

图 1: o-p. anti-CD19 28Z 和 E28Z CAR-T 细胞经 CD19 抗原刺激后的 exhaustion 衰竭状态。

图 1: q. CAR-T 细胞治疗 Raji 异种皮下移植瘤模型流程图。

图 1: r. CAR-T 细胞治疗后 Raji 异种皮下移植瘤生长情况。

图 2: a.靶向 mesothelin 28Z CAR 和 E28Z CAR 的结构示意图。

图 2: b. anti-mesothelin CAR 在 28Z 和 E28Z CAR-T 细胞膜表面水平流式图。

图 2: c. anti-mesothelin 28Z和E28Z CAR-T 中$CD4^+$和$CD8^+$细胞比例的流式图。

图 2: d-f. anti-mesothelin 28Z 和 E28Z CAR-T 细胞经 mesothelin 抗原刺激后的细胞因子水平比较。

图 2: g. anti-mesothelin 28Z 和 E28Z CAR-T 细胞经 mesothelin 抗原刺激后凋亡情况。

图 2: h. anti-mesothelin 28Z 和 E28Z CAR-T 细胞经 mesothelin 抗原刺激后的存活能力。

图 2: i. anti-mesothelin 28Z和E28Z CAR-T对$mesothelin^+$肿瘤细胞毒性反应。

图 2: j. anti-mesothelin CAR-T 细胞治疗人源 PANC-1 胰腺癌细胞系（高表达 mesothelin）异种皮下移植瘤模型流程图。

图 2: k. anti-mesothelin CAR-T 细胞治疗后 Raji 异种皮下移植瘤生长情况。

具体实施方式

本发明所述的嵌合抗原受体，包括：

依次连接的胞外结构域、跨膜结构域和胞内结构域；

所述胞外结构域包括抗原识别区和铰链区；

所述胞内结构域与跨膜结构域相连的一端连接有 CD3ε 胞内区。

进一步的，所述 CD3ε 胞内区的氨基酸序列如 SEQ ID NO：1 所示；具体的：KNRKAKAKPVTRGAGAGGRQRGQNKERPPPVPNPDYEPIRKGQRDLYSGLNQRRI。

所述胞内结构域包括依次连接的 CD3ε 胞内区、共刺激信号传导区胞内区和 CD3ζ 胞内区。

在一种实施方式中，所述共刺激信号传导区选自 CD27、CD28、CD134，4-1BB 或 ICOS 的胞内区中的一种或多种。

在进一步优选的实施方式中，所述共刺激信号传导区选自 CD28。杀伤能力更强。

CD28 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：2 所示，具体的，RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS。

在一种实施方式中，所述 CD3ζ 胞内区的氨基酸序列如 SEQ ID NO：3 所示。具体为：RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR。

在一种实施方式中，所述抗原识别区选自针对肿瘤表面抗原的单链抗体，所述肿瘤表面抗原选自 CD19、间皮素（mesothelin）、CD20、CD22、CD123、CD30、CD33、CD38、CD138、BCMA、Fibroblast activation protein(FAP)、Glypican-3、CEA、EGFRvIII、PSMA、Her2、IL13Rα2、CD171 和 GD2 中的一种或多种。

优选的，选自 CD19 或间皮素。靶向特异性好。

所述跨膜结构域选自 CD28TM、CD4、CD8α、OX40 或 H2-Kb。

优选的，所述跨膜结构域选自 CD28TM。具体的，所述 CD28TM 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：4 所示。具体的，FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV。

在一种实施方式中，所述单链抗体含有轻链可变区和重链可变区。

在一种实施方式中，所述轻链可变区与所述重链可变区通过接头序列相连。

在一种实施方式中，所述单链抗体选自 FMC63 或 SS1。

FMC63 可采用市售产品。

在一种实施方式中，所述单链抗体含有单克隆抗体 FMC63 的轻链可变区和重链可变区，所述轻链可变区和重链可变区任选地通过接头相连。

在一种实施方式中，所述单链抗体含有单克隆抗体 SS1 的轻链可变区和重链可变区，所述轻链可变区和重链可变区任选地通过接头相连。

SS1 的 scFv 核苷酸序列如 SEQ ID NO：9 所示。具体为：

CAGGTACAACTGCAGCAGTCTGGGCCTGAGCTGGAGAAGCCTGGCGCTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTCACTGGCTACACCATGAACTGGGTGAAGCAGAGCCATGGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGACTTATTACTCCTTACAATGGTGCTTCTAGCTACAACCAGAAGTTCAGGGGCAAGGCCACATTAACTGTAGACAAGTCATCCAGC

ACAGCCTACATGGACCTCCTCAGTCTGACATCTGAAGACTCTGCAGTCTATTTCTGTGC
AAGGGGGGGTTACGACGGGAGGGGTTTTGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCAC
CGTCTCCTCAGGTGGAGGCGGTTCAGGCGGCGGTGGCTCTAGCGGTGGTGGATCGGAC
ATCGAGCTCACTCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCA
TGACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGTCAGG
CACCTCCCCCAAAAGATGGATTTATGACACATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCAGGTC
GCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGAAACTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGCGTGGAGGCT
GAAGATGATGCAACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAAGCACCCTCTCACGTACGGTG
CTGGGACAAAGTTGGAAATCAAA

SS1 的 scFv 氨基酸序列如 SEQ ID NO：10 所示。具体为：

QVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYTMNWVKQSHGKSLEWIGLITPYNGA
SSYNQKFRGKATLTVDKSSSTAYMDLLSLTSEDSAVYFCARGGYDGRGFDYWGQGTTVT
VSSGGGGSGGGGSSGGGSDIELTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSGTSP
KRWIYDTSKLASGVPGRFSGSGSGNSYSLTISSVEAEDDATYYCQQWSKHPLTYGAGTKLE
IK

进一步的，所述胞外结构域还包括信号肽，形成依次连接的信号肽-抗原识别区-铰链区。

在一种实施方式中，所述嵌合抗原受体的氨基酸序列如 SEQ ID NO：5（Anti-CD19 E28Z CAR）或 SEQ ID NO：6（Anti-mesothelin E28Z CAR）所示。

具体的，

SEQ ID NO：5（Anti-CD19 E28Z CAR）：

MVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKLPVPW
PTLVTTLTYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGD
TLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQL
ADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMVLLEFVTAAGITLGMDELYK
GSGEGRGSLLTCGDVEENPGPMLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPYPYDVPDYADIQMTQTTSS
LSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYS
LTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGP
GLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIK
DNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSAAAIEVMYPP
PYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVKNR
KAKAKPVTRGAGAGGRQRGQNKERPPPVPNPDYEPIRKGQRDLYSGLNQRRIRSKRSRLL
HSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNL
GRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK
GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR*

SEQ ID NO：5（Anti-CD19 E28Z CAR）对应的核苷酸序列为 SEQ ID NO：7（Anti-CD19 E28Z CAR），SEQ ID NO：7 如下：

ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGC
TGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATG
CCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCC
CTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCG
ACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGA
GCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTC
GAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGAC
GGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCA
TGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCG
AGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACG
GCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGA
CCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATC
ACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGGGAAGCGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTGCTA
ACATGCGGTGACGTCGAGGAGAATCCTGGACCTatgcttctcctggtgacaagccttctgctctgtgagttaccac
acccagcattcctcctgatcccaTACCCCTACGACGTGCCCGACTACGCCgacatccagatgacacagactacatcctc
cctgtctgcctctctgggagacagagtcaccatcagttgcagggcaagtcaggacattagtaaatatttaaattggtatcagcagaaaccagatgg
aactgttaaactcctgatctaccatacatcaagattacactcaggagtcccatcaaggttcagtggcagtgggtctggaacagattattctctcacc
attagcaacctggagcaagaagatattgccacttacttttgccaacagggtaatacgcttccgtacacgttcggaggggggactaagttggaaat
aacaggctccacctctggatccggcaagcccggatctggcgagggatccaccaagggcgaggtgaaactgcaggagtcaggacctggcctg
gtggcgccctcacagagcctgtccgtcacatgcactgtctcaggggtctcattacccgactatggtgtaagctggattcgccagcctccacgaaa
gggtctggagtggctgggagtaatatggggtagtgaaaccacatactataattcagctctcaaatccagactgaccatcatcaaggacaactcca
agagccaagttttcttaaaaatgaacagtctgcaaactgatgacacagccatttactactgtgccaaacattattactacggtggtagctatgctatg
gactactggggtcaaggaacctcagtcaccgtctcctcagcggccgcaattgaagttatgtatcctcctccttacctagacaatgagaagagcaat
ggaaccattatccatgtgaaagggaaacacctttgtccaagtcccctatttcccggaccttctaagccctttgggtgctggtggtggttgggggag
tcctggcttgctatagcttgctagtaacagtggcctttattattttctgggtgaagaatagaaaggccaaggccaagcctgtgacacgaggagcgg
gtgctggcggcaggcaaaggggacaaaacaaggagaggccaccacctgttcccaacccagactatgagcccatccggaaaggccagcgg
gacctgtattctggcctgaatcagagacgcatcaggagtaagaggagcaggctcctgcacagtgactacatgaacatgactccccgccgcccc
gggcccacccgcaagcattaccagccctatgccccaccacgcgacttcgcagcctatcgctccagagtgaagttcagcaggagcgcagacgc
ccccgcgtaccagcagggccagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgttttggacaagagacgtggcc
gggaccctgagatgggggaaagccgagaaggaagaaccctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcct
acagtgagattgggatgaaaggcgagcgccggaggggcaaggggcacgatggcctttaccagggtctcagtacagccaccaaggacacct
acgacgcccttcacatgcaggccctgcccccctcgctaa

SEQ ID NO：6（Anti-mesothelin E28Z CAR）：

MVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKLPVPW
PTLVTTLTYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGD
TLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQL
ADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMVLLEFVTAAGITLGMDELYK
GSGEGRGSLLTCGDVEENPGPMLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPYPYDVPDYAQVQLQQSGPE
LEKPGASVKISCKASGYSFTGYTMNWVKQSHGKSLEWIGLITPYNGASSYNQKFRGKATL
TVDKSSSTAYMDLLSLTSEDSAVYFCARGGYDGRGFDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGS
SGGGSDIELTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASG
VPGRFSGSGSGNSYSLTISSVEAEDDATYYCQQWSKHPLTYGAGTKLEIKAAAIEVMYPPP
YLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVKNR
KAKAKPVTRGAGAGGRQRGQNKERPPPVPNPDYEPIRKGQRDLYSGLNQRRIRSKRSRLL
HSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNL
GRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK
GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR*

SEQ ID NO：6（Anti-mesothelin E28Z CAR）对应的核苷酸序列为 SEQ ID NO：8（Anti-mesothelin E28Z CAR，SEQ ID NO：8 如下：

ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGC
TGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATG
CCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCC
CTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCG
ACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGA
GCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTC
GAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGAC
GGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCA
TGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCG
AGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACG
GCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGA
CCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATC
ACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGGGAAGCGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTGCTA
ACATGCGGTGACGTCGAGGAGAATCCTGGACCTatgcttctcctggtgacaagccttctgctctgtgagttaccac
acccagcattcctcctgatcccaTACCCCTACGACGTGCCCGACTACGCCCAGGTACAACTGCAGCA
GTCTGGGCCTGAGCTGGAGAAGCCTGGCGCTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCTTCT
GGTTACTCATTCACTGGCTACACCATGAACTGGGTGAAGCAGAGCCATGGAAAGAGCC

TTGAGTGGATTGGACTTATTACTCCTTACAATGGTGCTTCTAGCTACAACCAGAAGTTC
AGGGGCAAGGCCACATTAACTGTAGACAAGTCATCCAGCACAGCCTACATGGACCTCC
TCAGTCTGACATCTGAAGACTCTGCAGTCTATTTCTGTGCAAGGGGGGGTTACGACGG
GAGGGGTTTTGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGAGGC
GGTTCAGGCGGCGGTGGCTCTAGCGGTGGTGGATCGGACATCGAGCTCACTCAGTCTC
CAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGCAGTGCCAGCTC
AAGTGTAAGTTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCCCAAAAGATGG
ATTTATGACACATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCAGGTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTC
TGGAAACTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGCGTGGAGGCTGAAGATGATGCAACTTATT
ACTGCCAGCAGTGGAGTAAGCACCCTCTCACGTACGGTGCTGGGACAAAGTTGGAAAT
CAAAgcggccgcaattgaagttatgtatcctcctccttacctagacaatgagaagagcaatggaaccattatccatgtgaaagggaaacacct
ttgtccaagtcccctatttcccggaccttctaagccctttgggtgctggtggtggttgggggagtcctggcttgctatagcttgctagtaacagtgg
cctttattattttctgggtgaagaatagaaaggccaaggccaagcctgtgacacgaggagcgggtgctggcggcaggcaaaggggacaaaac
aaggagaggccaccacctgttcccaacccagactatgagcccatccggaaaggccagcgggacctgtattctggcctgaatcagagacgcat
caggagtaagaggagcaggctcctgcacagtgactacatgaacatgactccccgccgccccgggcccacccgcaagcattaccagccctatg
ccccaccacgcgacttcgcagcctatcgctccagagtgaagttcagcaggagcgcagacgcccccgcgtaccagcagggccagaaccagct
ctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgttttggacaagagacgtggccgggaccctgagatgggggggaaagccgaga
aggaagaaccctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctacagtgagattgggatgaaaggcgagcgcc
ggaggggcaaggggcacgatggcctttaccagggtctcagtacagccaccaaggacacctacgacgcccttcacatgcaggccctgccccct
cgctaa

形成本发明的嵌合抗原受体的上述各个部分，相互之间可直接连接，或者可通过接头序列连接。接头序列可以是本领域周知的适用于抗体的接头序列，例如含 G 和 S 的接头序列。通常，接头含有一个或多个前后重复的基序。例如，该基序可以是 GGGS、GGGGS、SSSSG、GSGSA 和 GGSGG。优选地，该基序在接头序列中是相邻的，在重复之间没有插入氨基酸残基。接头序列可以包含 1、2、3、4 或 5 个重复基序组成。接头的长度可以是 3～25 个氨基酸残基，例如 3～15、5～15、10～20 个氨基酸残基。在某些实施方案中，接头序列是多甘氨酸接头序列。接头序列中甘氨酸的数量无特别限制，通常为 2～20 个，例如 2～15、2～10、2～8 个。除甘氨酸和丝氨酸来，接头中还可含有其它已知的氨基酸残基，例如丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、苏氨酸(T)、谷氨酸(E)、苯丙氨酸(F)、精氨酸(R)、谷氨酰胺(Q)等。

应理解，在基因克隆操作中，常常需要设计合适的酶切位点，这势必在所表达的氨基酸序列末端引入了一个或多个不相干的残基，而这并不影响目的序列的活性。为了构建融合蛋白、促进重组蛋白的表达、获得自动分泌到宿主细胞外的重组蛋白、或利于重组蛋白的纯化，常常需要将一些氨基酸添加至重组蛋白的 N-末端、C-末端或该蛋白内的其它合适区域内，例

如，包括但不限于，适合的接头肽、信号肽、前导肽、末端延伸等。因此，本发明的融合蛋白(即所述 CAR)的氨基端或羧基端还可含有一个或多个多肽片段，作为蛋白标签。任何合适的标签都可以用于本文。例如，所述的标签可以是 FLAG，HA，HA1，c-Myc，Poly-His，Poly-Arg，Strep-TagII，AU1，EE，T7，4A6，ε，B，gE 以及 Ty1。这些标签可用于对蛋白进行纯化。

本发明提供的多核苷酸序列，该多核苷酸序列选自：

（1）编码权利前述的嵌合抗原受体的多核苷酸序列；和

（2）（1）所述多核苷酸序列的互补序列。

本发明的多核苷酸序列可以是 DNA 形式或 RNA 形式。DNA 形式包括 cDNA、基因组 DNA 或人工合成的 DNA。DNA 可以是单链的或是双链的。DNA 可以是编码链或非编码链。本发明也包括编码融合蛋白的多核苷酸序列的简并变异体，即编码相同的氨基酸序列但核苷酸序列有所不同的核苷酸序列。

本文所述的多核苷酸序列通常可以用 PCR 扩增法获得。具体而言，可根据本文所公开的核苷酸序列，尤其是开放阅读框序列来设计引物，并用市售的 cDNA 库或按本领域技术人员已知的常规方法所制备的 cDNA 库作为模板，扩增而得有关序列。当序列较长时，常常需要进行两次或多次 PCR 扩增，然后再将各次扩增出的片段按正确次序拼接在一起。

本发明提供的核酸构建物，含有前述的多核苷酸序列。

所述核酸构建物还包括与前述的多核苷酸序列操作性连接的一个或多个调控序列。本发明所述的 CAR 的编码序列可以多种方式被操作以保证所述蛋白的表达。在将核酸构建物插入载体之前可根据表达载体的不同或要求而对核酸构建物进行操作。利用重组 DNA 方法来改变多核苷酸序列的技术是本领域已知的。

调控序列可以是合适的启动子序列。启动子序列通常与待表达蛋白的编码序列操作性连接。启动子可以是在所选择的宿主细胞中显示转录活性的任何核苷酸序列，包括突变的、截短的和杂合启动子，并且可以从编码与该宿主细胞同源或异源的胞外或胞内多肽的基因获得。

调控序列也可以是合适的转录终止子序列，由宿主细胞识别以终止转录的序列。终止子序列与编码该多肽的核苷酸序列的 3’末端操作性连接。在选择的宿主细胞中有功能的任何终止子都可用于本发明。

调控序列也可以是合适的前导序列，对宿主细胞翻译重要的 mRNA 的非翻译区。前导序列与编码该多肽的核苷酸序列的 5′末端可操作连接。在选择的宿主细胞中有功能的任何终止子都可用于本发明。

优选的，所述核酸构建物为载体。

通常通过可操作地连接编码 CAR 的多核苷酸序列至启动子，并将构建体并入表达载体，实现编码 CAR 的多核苷酸序列的表达。该载体对于复制和整合真核细胞可为合适的。典型的克隆载体包含可用于调节期望核酸序列表达的转录和翻译终止子、起始序列和启动子。

编码本发明 CAR 的多核苷酸序列可被克隆入许多类型的载体。例如，可被克隆入质粒、噬菌粒、噬菌体衍生物、动物病毒和粘粒。进一步地，载体是表达载体。表达载体可以以病毒载体形式提供给细胞。病毒载体技术在本领域中是公知的。可用作载体的病毒包括但不限于逆转录病毒、腺病毒、腺伴随病毒、疱疹病毒和慢病毒。通常，合适的载体包含在至少一种有机体中起作用的复制起点、启动子序列、方便的限制酶位点和一个或多个可选择的标记。

更优选的，所述核酸构建物为慢病毒载体含有复制起始位点、3’LTR、5’LTR 以及前述多核苷酸序列。

合适的启动子的一个例子为即时早期巨细胞病毒(CMV)启动子序列。该启动子序列是能够驱动可操作地连接至其上的任何多核苷酸序列高水平表达的强组成型启动子序列。合适的启动子的另一个例子为延伸生长因子-1α(EF-1α)。然而，也可使用其他组成型启动子序列，包括但不限于类人猿病毒 40(SV40)早期启动子、小鼠乳癌病毒(MMTV)、人免疫缺陷病毒(HIV)长末端重复(LTR)启动子、MoMuLV 启动子、鸟类白血病病毒启动子、EB 病毒即时早期启动子、鲁斯氏肉瘤病毒启动子、以及人基因启动子，诸如但不限于肌动蛋白启动子、肌球蛋白启动子、血红素启动子和肌酸激酶启动子。进一步地，也可考虑使用诱导型启动子。诱导型启动子的使用提供了分子开关，其能够在期限表达时打开可操作地连接诱导型启动子的多核苷酸序列的表达，而在当表达是不期望的时关闭表达。诱导型启动子的例子包括但不限于金属硫蛋白启动子、糖皮质激素启动子、孕酮启动子和四环素启动子。

为了评估 CAR 多肽或其部分的表达，被引入细胞的表达载体也可包含可选择的标记基因或报道基因中的任一个或两个，以便于从通过病毒载体寻求被转染或感染的细胞群中鉴定和选择表达细胞。在其他方面，可选择的标记可被携带在单独一段 DNA 上并用于共转染程序。可选择的标记和报道基因两者的侧翼都可具有适当的调节序列，以便能够在宿主细胞中表达。有用的可选择标记包括例如抗生素抗性基因，诸如 neo 等等。

报道基因用于鉴定潜在转染的细胞并用于评价调节序列的功能性。在 DNA 已经被引入受体细胞后，报道基因的表达在合适的时间下进行测定。合适的报道基因可包括编码荧光素酶、β-半乳糖苷酶、氯霉素乙酰转移酶、分泌型碱性磷酸酶或绿色荧光蛋白基因的基因。合适的表达系统是公知的并可利用已知技术制备或从商业上获得。

将基因引入细胞和将基因表达入细胞的方法在本领域中是已知的。载体可通过在本领域

中的任何方法容易地引入宿主细胞，例如，哺乳动物、细菌、酵母或昆虫细胞。例如，表达载体可通过物理、化学或生物学手段转移入宿主细胞。

将多核苷酸引入宿主细胞的物理方法包括磷酸钙沉淀、脂质转染法、粒子轰击、微注射、电穿孔等等。将感兴趣的多核苷酸引入宿主细胞的生物学方法包括使用 DNA 和 RNA 载体。将多核苷酸引入宿主细胞的化学手段包括胶体分散系统，诸如大分子复合物、纳米胶囊、微球、珠；和基于脂质的系统，包括水包油乳剂、胶束、混合胶束和脂质体。

将多核苷酸引入宿主细胞的生物学方法包括使用病毒载体，特别是慢病毒载体，这已经成为最广泛使用的将基因插入哺乳动物例如人细胞的方法。其他病毒载体可源自慢病毒、痘病毒、单纯疱疹病毒 I、腺病毒和腺伴随病毒等等。已经开发了许多基于病毒的系统，用于将基因转移入哺乳动物细胞。例如，慢病毒提供了用于基因传递系统的方便的平台。可利用本领域中已知的技术将选择的基因插入载体并包装入慢病毒颗粒。该重组病毒可随后被分离和传递至体内或离体的对象细胞。许多反转录病毒系统在本领域中是已知的。在一些实施方案中，使用腺病毒载体。许多腺病毒载体在本领域中是已知的。在一个实施方案中，使用慢病毒载体。

本发明提供的慢病毒载体系统，所述慢病毒载体系统含有前述的核酸构建物及慢病毒载体辅助成分。

所述慢病毒辅助成分包括慢病毒包装质粒和细胞系。

所述慢病毒载体系统是前述核酸构建物在慢病毒包装质粒、细胞系的辅助下，经过病毒包装而成。所述慢病毒载体系统构建方法为本领域常用方法。

本发明提供的一种离体活化 T 细胞的方法，所述方法包括使用前述慢病毒感染所述 T 细胞的步骤。

本发明的CAR-T细胞可经历稳固的体内T细胞扩展并在血液和骨髓中以高水平持续延长的时间量，并形成特异性记忆 T 细胞。在遇到并随后消除表达替代抗原的靶细胞后，本发明的 CAR-T 细胞可体内分化成中心记忆样状态。

本发明还包括一类细胞疗法，其中 T 细胞被基因修饰以表达本文所述的 CAR，和 CAR-T 细胞被注入需要其的接受者中。注入的细胞能够杀死接受者的肿瘤细胞。不像抗体疗法，CAR-T 细胞能够体内复制，产生可导致持续肿瘤控制的长期持久性。

由 CAR-T 细胞引起的抗肿瘤免疫应答可为主动或被动免疫应答。另外，CAR 介导的免疫应答可为过继免疫疗法步骤的一部分，其中 CAR-T 细胞诱导对 CAR 中的抗原结合部分特异性的免疫应答。

可治疗的癌症可以是非实体瘤，如血液肿瘤，例如白血病和淋巴瘤。尤其是，可采用本发明的 CAR、其编码序列、核酸构建物、表达载体、病毒以及 CAR-T 细胞治疗的疾病优选为 CD19 介导的疾病，尤其是 CD19 介导的血液肿瘤。

具体而言，本文中，“CD19 介导的疾病”包括但不限于白血病和淋巴瘤，例如 B 细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、急性淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、多毛细胞白血病、和急性髓性白血病。

本发明提供的基因修饰的 T 细胞或含该基因修饰的 T 细胞的药物组合物，所述细胞含有前述多核苷酸序列，或含有前述核酸构建物，或感染了前述慢病毒载体系统。

本发明的 CAR-修饰的 T 细胞可被单独施用或作为药物组合物与稀释剂和/或与其他组分诸如相关的细胞因子或细胞群结合施用。简单地说，本发明的药物组合物可包括如本文所述的 CAR-T 细胞，与一种或多种药学或生理学上可接受载体、稀释剂或赋形剂结合。这样的组合物可包括缓冲液诸如中性缓冲盐水、硫酸盐缓冲盐水等等；碳水化合物诸如葡萄糖、甘露糖、蔗糖或葡聚糖、甘露醇；蛋白质；多肽或氨基酸诸如甘氨酸；抗氧化剂；螯合剂诸如 EDTA 或谷胱甘肽；佐剂(例如，氢氧化铝)；和防腐剂。

本发明的药物组合物可以以适于待治疗(或预防)的疾病的方式施用。施用的数量和频率将由这样的因素确定，如患者的病症、和患者疾病的类型和严重度。

当指出“ 免疫学上有效量”、“ 抗肿瘤有效量”、“ 肿瘤-抑制有效量”或“ 治疗量”时，待施用的本发明组合物的精确量可由医师确定，其考虑患者(对象)的年龄、重量、肿瘤大小、感染或转移程度和病症的个体差异。可通常指出：包括本文描述的T细胞的药物组合物可以以 10^4至 10^9个细胞/kg体重的剂量，优选 10^5至 10^6个细胞/kg体重的剂量。T细胞组合物也可以以这些剂量多次施用。细胞可通过使用免疫疗法中公知的注入技术施用。对于具体患者的最佳剂量和治疗 方案可通过监测患者的疾病迹象并因此调节治疗由医学领域技术人员容易地确定 。

对象组合物的施用可以以任何方便的方式进行，包括通过喷雾法、注射、吞咽、输液、植入或移植。本文描述的组合物可被皮下、皮内、瘤内、结内、脊髓内、肌肉内、通过静脉内注射或腹膜内施用给患者。在一个实施方案中，本发明的 T 细胞组合物通过皮内或皮下注射被施用给患者。在另一个实施方案中，本发明的 T 细胞组合物优选通过静脉注射施用。T 细胞的组合物可被直接注入肿瘤、淋巴结或感染位置。

在本发明的一些实施方案中，本发明的 CAR-T 细胞或其组合物可与本领域已知的其它疗法结合。所述疗法包括但不限于化疗、放疗和免疫抑制剂。例如，可结合各种放疗制剂进行

治疗，这些放疗制剂包括：环孢菌素、硫唑嘌呤、甲氨喋呤、麦考酚酯、FK506、氟达拉滨、雷帕霉素和麦考酚酸等。在进一步的实施方案中，本发明的细胞组合物与骨髓移植、利用化疗剂诸如氟达拉滨、外部光束放射疗法(XRT)、环磷酰胺或抗体诸如 OKT3 或 CAMPATH 的 T 细胞烧蚀疗法结合(例如，之前、同时或之后)而施用给患者。

本文中，“ 抗肿瘤效应”指一种生物学效应，其可由肿瘤体积的减少、肿瘤细胞数的减少、转移数的减少、预期寿命的增加或与癌相关的各种生理症状的改善表示。

“患者”、“ 对象”、“ 个体”等等在本文中可交换使用，指可引起免疫应答的活有机体，如哺乳动物。例子包括但不限于人、狗、猫、小鼠、大鼠和其转基因物种。

前述嵌合抗原受体、前述多核苷酸序列、前述核酸构建物、前述慢病毒载体系统在制备以下任一种或多种用途产品中的应用：（1）制备 T 细胞；（2）抑制 T 细胞的细胞因子 IFN-γ、IL-2、TNF 分泌；（3）抑制 T 细胞凋亡；（5）增强 T 细胞增殖能力；（6）提高 T 细胞杀伤力；（7）促进 GrzB 产生；（8）促进脱颗粒。

前述嵌合抗原受体、前述多核苷酸序列、前述核酸构建物、前述慢病毒载体系统或前述基因修饰的 T 细胞在制备以下任一种或多种用途产品中的应用：（1）治疗肿瘤；（3）抑制肿瘤治疗时产生的细胞因子风暴；（4）抑制肿瘤治疗时产生的神经毒性。

优选的， 所述肿瘤选自白血病或实体瘤中的一种或多种。

更优选的，所述肿瘤选自 B 细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、急性淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、多毛细胞白血病、和急性髓性白血病。

以下通过特定的具体实例说明本发明的实施方式，本领域技术人员可由本说明书所揭露的内容轻易地了解本发明的其他优点与功效。本发明还可以通过另外不同的具体实施方式加以实施或应用，本说明书中的各项细节也可以基于不同观点与应用，在没有背离本发明的精神下进行各种修饰或改变。

在进一步描述本发明具体实施方式之前，应理解，本发明的保护范围不局限于下述特定的具体实施方案；还应当理解，本发明实施例中使用的术语是为了描述特定的具体实施方案，而不是为了限制本发明的保护范围；在本发明说明书和权利要求书中，除非文中另外明确指出，单数形式“一个”、“一”和“这个”包括复数形式。

当实施例给出数值范围时，应理解，除非本发明另有说明，每个数值范围的两个端点以及两个端点之间任何一个数值均可选用。除非另外定义，本发明中使用的所有技术和科学术语与本技术领域技术人员通常理解的意义相同。除实施例中使用的具体方法、设备、材料外，根据本技术领域的技术人员对现有技术的掌握及本发明的记载，还可以使用与本发明实施例

中所述的方法、设备、材料相似或等同的现有技术的任何方法、设备和材料来实现本发明。

除非另外说明，本发明中所公开的实验方法、检测方法、制备方法均采用本技术领域常规的分子生物学、生物化学、染色质结构和分析、分析化学、细胞培养、重组DNA技术及相关领域的常规技术。

实施例 1

anti-CD19 28Z CAR 序列参考 Rosenberg,S.A.实验室于 NCBI 共享的序列，我们在此基础上，利用基因合成技术，CD3ε 全长胞内段插在 CD28TM 跨膜区后面，构建出来新型 CAR 命名为 E28Z。

anti-CD19 E28Z CAR 的序列如 SEQ ID NO：7 所示。具体为：

ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGAC
GTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACC
CTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCT
ACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCAT
GCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCC
GAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAG
GACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCG
ACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGC
AGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCA
CTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTG
GAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGGGAAGCGGAGAGGGC
AGAGGAAGTCTGCTAACATGCGGTGACGTCGAGGAGAATCCTGGACCTatgcttctcctggtgacaagccttctgctctgt
gagttaccacacccagcattcctcctgatcccaTACCCCTACGACGTGCCCGACTACGCCgacatccagatgacacagactacatcctccctg
tctgcctctctgggagacagagtcaccatcagttgcagggcaagtcaggacattagtaaatatttaaattggtatcagcagaaaccagatggaactgttaaactcctgat
ctaccatacatcaagattacactcaggagtcccatcaaggttcagtggcagtgggtctggaacagattattctctcaccattagcaacctggagcaagaagatattgcca
cttacttttgccaacagggtaatacgcttccgtacacgttcggaggggggactaagttggaaataacaggctccacctctggatccggcaagcccggatctggcgag
ggatccaccaagggcgaggtgaaactgcaggagtcaggacctggcctggtggcgccctcacagagcctgtccgtcacatgcactgtctcaggggtctcattacccg
actatggtgtaagctggattcgccagcctccacgaaagggtctggagtggctgggagtaatatggggtagtgaaaccacatactataattcagctctcaaatccagact
gaccatcatcaaggacaactccaagagccaagttttcttaaaaatgaacagtctgcaaactgatgacacagccatttactactgtgccaaacattattactacggtggtag
ctatgctatggactactggggtcaaggaacctcagtcaccgtctcctcagcggccgcaattgaagttatgtatcctcctccttacctagacaatgagaagagcaatgga
accattatccatgtgaaagggaaacacctttgtccaagtcccctatttcccggaccttctaagccctttgggtgctggtggtggttgggggagtcctggcttgctatagct

tgctagtaacagtggcctttattattttctgggtgaagaatagaaaggccaaggccaagcctgtgacacgaggagcgggtgctggcggcaggcaaaggggacaaaa caaggagaggccaccacctgttcccaacccagactatgagcccatccggaaaggccagcgggacctgtattctggcctgaatcagagacgcatcaggagtaagag gagcaggctcctgcacagtgactacatgaacatgactccccgccgccccgggcccacccgcaagcattaccagccctatgccccaccacgcgacttcgcagcctat cgctccagagtgaagttcagcaggagcgcagacgcccccgcgtaccagcagggccagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacg atgttttggacaagagacgtggccgggaccctgagatgggggggaaagccgagaaggaagaaccctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatg gcggaggcctacagtgagattgggatgaaaggcgagcgccggaggggcaaggggcacgatggcctttaccagggtctcagtacagccaccaaggacacctacg acgcccttcacatgcaggccctgcccccctcgctaa。

将 CAR 亚克隆至慢病毒表达质粒 pHAGE 载体，将 CAR 表达质粒与包装质粒 pSPAX2 和 pMD2G 分别按照 10：7.5：3.5 的比例混合后用磷酸钙转染的方法转入 293FT 细胞以生产慢病毒颗粒。用超高速离心方法分别表达 28Z CAR 或 E28Z CAR 慢病毒经浓缩为小体积高滴度病毒（~10^8/ml），然后分别转染经 α CD3/ α CD28 Ab-beads 活化一天的原代 T 细胞(MOI=10)。原代 T 细胞用 T 细胞完全培养基(XIVO-15+1%P.S.+10ng/ml human IL-7+10ng/ml human IL-15+10mM+5% Human AB serum, 10 mM neutralized NAC)培养期间，病毒转染一天后则除去，抗体刺激四天后也除去，抗体刺激后的第 5 天分选出 CAR 表达量相同的 CAR-T 细胞。经过一段时间扩增后，对 CAR-T 进行一系列的指标鉴定，如 CAR 上膜水平，CD4 和 CD8 亚群比例，体外细胞因子分泌，体外杀伤能力、体外增殖能力，体外凋亡水平，体外持续生存能力，以及体内抗肿瘤效果等。

靶向 CD19 28Z CAR 和 E28Z CAR 的结构如图 1：a 所示。

用 anti-mouse FM63 scFv 偶联 Alexa Fluor647 抗体流式检测 28Z CAR-T 和 E28Z CAR-T 细胞膜表面的 CAR 水平，流式图结果如图 1：b 所示，显示两者 CAR 阳性率和表达量（MFI）没差异。

用anti-human CD4-APC 和anti-human CD8-PE-Cy7 抗体流式检测 28Z CAR-T和E28Z CAR-T细胞，流式图结果如图 1：c所示，显示两者的$CD4^+$ CAR-T细胞和$CD8^+$ CAR-T细胞的比例相近。

CAR-T 细胞与 CD19+淋巴瘤细胞系 Raji 按照 1：1 比例混合，4° C 离心促细胞间接触，37° C 水浴计时，在一系列时间点用 LDS sample buffer 终止反应，然后用 anti-pCD3 ζ (p142) 抗体 western blotting 检测。结果如图 1：d 所示，图片 pCD3 ζ 条带显示 E28Z 在 0min （即未遇到 CD19 抗原）时本底的 pCD3 ζ 磷酸化水平明显高于 28Z CAR-T 细胞，而经过 CD19 抗原特异刺激之后，pCD3 ζ 磷酸化先升后降，pCD3 ζ 磷酸化后面的下降速度明显快于 28Z CAR-T 细胞。

10 万 CAR-T 细胞与 CD19+淋巴瘤细胞系 Raji 按照 1：1 比例在 1.5ml EP 管混合后，室温离心（400g,1min）促细胞间接触，用完全培养基于 37° C 培养箱中培养，在一系列时间点用冷 PBS 终止 CAR 内吞反应，收样品置冰，冷 PBS 洗一次，然后用 anti-mouse FM63 scFv 偶联 Alexa Fluor647 抗体染色（4° C，30min），后流式检测 28Z CAR-T 和 E28Z CAR-T 细胞膜上 CAR 的水平。结果如图 1：e 所示，表明，28Z 和 E28Z CAR 上膜水平是先急剧下降，而后慢慢回复上升，其中 28Z CAR 膜 水平比 E28Z CAR 下降的快，后面回复上升也是明显快于 E28Z CAR。

10 万 CAR-T细胞与$CD19^+$淋巴瘤细胞系Raji按照 1：1 比例接种于圆底 96 孔板中，混匀，室温离心（400g,1min）促细胞间接触，用完全培养基于 37° C培养箱中培养一天即收样。收样前 6 小时加 1x BFA抑制细胞因子外排，收样后将样品PBS洗一次，然后 4%PFA室温固定 5min，0.1%TritonX-100 室温打孔 5min, 接着按照常规操作胞内染色检测IL-2、IFN-γ、TNF-α。结果如图 1：f-h所示，表明E28Z CAR-T细胞经$CD19^+$细胞特异刺激后产生的细胞因子IL-2、IFN-γ、TNF-α都明显少于 28Z CAR-T细胞。

结合图 1d 和图 1e，说明 E28Z CAR pCD3ζ磷酸化水平下降较快不是由于 CAR 膜水平下调引起的，因为 CD19 特异刺激后 28Z CAR 膜水平反而比 E28Z CAR 下降的快。

10 万 CAR-T 细胞与 CD19+淋巴瘤细胞系 Raji 按照 1：1 比例接种于圆底 96 孔板中，混匀，室温离心（400g,1min）促细胞间接触，用完全培养基于 37° C 培养箱中培养 2h、4h，其中完全培养基中还加有 anti-human CD107a-eFluor660 抗体和 1x Monensin（防止 anti-human CD107a 抗体内吞降解），收样时用冷 PBS 终止反应，PBS 洗一次后流式检测。结果如图 1：i 所示，表明 E28Z CAR-T 细胞经 CD19 抗原特异刺激后的脱颗粒反应速率明显快于 28Z CAR-T 细胞。

10 万 CAR-T细胞与$CD19^+$淋巴瘤细胞系Raji按照 1：1 比例接种于圆底 96 孔板中，混匀，室温离心（400g,1min）促细胞间接触，用完全培养基于 37° C培养箱中培养一天即收样。收样前 6 小时加 1x BFA抑制颗粒酶外排，收样后将样品PBS洗一次，然后 4%PFA室温固定 5min，0.1%TritonX-100 室温打孔 5min, 接着按照常规操作胞内染色检测颗粒酶Granzyme B。结果 如图 1：j所示，表明E28Z CAR-T细胞经$CD19^+$细胞特异刺激后产生的颗粒酶Granzyme B都明显多于 28Z CAR-T细胞。

anti-CD19 28Z和E28Z CAR-T对$CD19^+$肿瘤细胞毒性反应。将$CD19^-$K562 细胞重悬于 1640 无血清培养基，然后预染 1x CellTraker deep red dye(37° 水浴，30min)，接着 1640 无血清培养基洗一次，用T细胞完全培养基重悬后与$CD19^+$K562_CD19(IRES mCherry)细胞按照 1：1

混合为靶细胞。 CAR-T细胞再与该混合型靶细胞按照 3：1，1：1，1：3 比例混合铺板于圆底 96 孔板，混匀，室温离心（400g,1min）促细胞间接触，用完全培养基于 37° C培养箱中培养一天即收样，置冰，流式检测$CD19^-$K562 细胞(APC^+, $mCherry^-$)百分比与$CD19^+$K562_CD19 细胞(APC^-, $mCherry^+$)百分比变化，实验组的“$CD19^-$K562 细胞(APC^+, $mCherry^-$)百分比/$CD19^+$K562_CD19 细胞(APC^-, $mCherry^+$)百分比”记为N。N值以未加CAR-T细胞的混合型靶细胞样品孔的“N_0=$CD19^-$K562 细胞(APC^+, $mCherry^-$)百分比/$CD19^+$K562_CD19 细胞(APC^-, $mCherry^+$)百分比”标准化后，计得存活比率N/N_0，则杀伤率公式为“$Lysis(\%)=1-N/N_0$”。结果如图 1：k所示，显示，anti-CD19 E28Z CAR-T对$CD19^+$肿瘤细胞毒性比 28Z CAR-T 细胞较大。

10 万 CAR-T细胞与CD19+淋巴瘤细胞系Raji按照 1：1 比例接种于圆底 96 孔板中，混匀，室温离心（400g,1min）促细胞间接触，用完全培养基于 37° C培养箱中培养一段时间。于不同时间点收样后将样品PBS洗一次，按照Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set 试剂盒说明书操作，用anti-human Ki67-APC抗体染色后流式检测Ki67 的表达量。结果如图 1：l表示，anti-CD19 E28Z CAR-T经$CD19^+$Raji细胞刺激后持续一段时间一直比 28Z CAR-T增殖快。

10 万 CAR-T细胞与CD19+淋巴瘤细胞系Raji按照 1：1 比例接种于圆底 96 孔板中，混匀，室温离心（400g,1min）促细胞间接触，用完全培养基于 37° C培养箱中培养一段时间。于不同时间点收样后将样品PBS洗一次，按照Annexin V Apoptosis Detection Kit APC试剂盒说明书染色好后流式检测CAR-T细胞Annexin V的表达水平。结果如图 1：m，表示，anti-CD19 E28Z CAR-T经$CD19^+$Raji细胞刺激后的凋亡水平持续一段时间一直比 28Z CAR-T明显低。

10 万 CAR-T细胞与CD19+淋巴瘤细胞系Raji按照 1：1 比例接种于圆底 96 孔板中，混匀，室温离心（400g,1min）促细胞间接触，用完全培养基于 37° C培养箱中培养一段时间。于不同时间点收样后将样品PBS洗一次，用anti-human CD4-APC 和anti-human CD8-PE-Cy7 抗体染色检测CAR^+T细胞存活数量。结果如图 1：n，表示，anti-CD19 E28Z CAR-T经$CD19^+$Raji细胞刺激后的存活数量比 28Z CAR-T显著增多。

10 万 CAR-T细胞与CD19+淋巴瘤细胞系Raji按照 1：1 比例接种于圆底 96 孔板中，混匀，室温离心（400g,1min）促细胞间接触，用完全培养基于 37° C培养箱中培养一段时间。于不同时间点收样后将样品PBS洗一次，用anti-human PD-1-APC 和anti-human TIM3-PE抗体染色检测CAR^+T细胞的PD-1 和TIM3 表达情况。结果图 1: o-p，表示，anti-CD19 E28Z CAR-T经$CD19^+$Raji细胞刺激后的PD-1 和TIM3 表达情况于第 7 天后比 28Z CAR-T低，说明E28Z CAR不会引起T细胞的exhaustion状态，即使有本底较强的pCD3ζ磷酸化水平（图 1d）。

无菌操作准备 3x10^7/ml Raji 细胞-PBS 重悬液，在每只 6 周龄 B-NDG 雌鼠的左侧背部皮下接种 100ul Raji 细胞 3 百万，时间点记为 day0。6 天后，Raji 皮下瘤长至直径 7-8mm 时，将小鼠随机分组，然后对每只小鼠尾静脉注射 100ul 8 百万 CAR-T 细胞，模型见图 1：q，之后定期用游标卡尺测量肿瘤的大小，记录数据，肿瘤面积=长 x 宽。结果如图 1: r.，结果表明，vector 对照组的小鼠的肿瘤生长最快，其次是 28Z 组，治疗效果最好的是 E28Z 组，E28Z 组治疗效果明显高于 28Z 组。

实施例 2

如图 2：a 所示，将靶向 CD19 28Z CAR 和 E28Z CAR 中的 FMC63 scFv (anti-CD19) 序列依次换成 SS1 scFv (anti-mesothelin)即分别为靶向 mesothelin 28Z CAR 和 E28Z CAR。

用一抗 Rat anti-HA 和二抗 goat anti-Rat IgG-Alexa Fluor647 抗体流式检测 28Z 和 E28Z CAR-T 细胞膜表面 CAR 水平，流式图结果如图 2: b.所示，显示两者 CAR 阳性率和表达量（MFI）没差异。

用anti-human CD4-APC 和anti-human CD8-PE-Cy7 抗体流式检测anti-mesothelin 28Z CAR-T和E28Z CAR-T细胞，流式图结果如图 2: c，显示两者的$CD4^+$ CAR-T细胞和$CD8^+$ CAR-T细胞的比例相近。

10 万 anti-mesothelin CAR-T 细胞与过表达 mesothelin 的 K562-Mesothelin 细胞系按照 1：1 比例接种于圆底 96 孔板中，混匀，室温离心（400g,1min）促细胞间接触，用完全培养基于 37° C 培养箱中培养一天即收样。收样前 6 小时加 1x BFA 抑制细胞因子外排，收样后将样品 PBS 洗一次，然后 4%PFA 室温固定 5min，0.1%TritonX-100 室温打孔 5min, 接着按照常规操作胞内染色检测 IL-2、IFN-γ、TNF-α。结果图 2: d-f.所示，表明 anti-mesothelin E28Z CAR-T 细胞经 K562-Mesothelin 细胞特异刺激后产生的细胞因子 IL-2、IFN-γ、TNF-α 都明显少于 anti-mesothelin 28Z CAR-T 细胞。

10 万 CAR-T 细胞与过表达 mesothelin 的 K562-Mesothelin 细胞系按照 1：1 比例接种于圆底 96 孔板中，混匀，室温离心（400g,1min）促细胞间接触，用完全培养基于 37° C 培养箱中培养一段时间。于不同时间点收样后将样品 PBS 洗一次，按照 Annexin V Apoptosis Detection Kit APC 试剂盒说明书染色好后流式检测 CAR-T 细胞 Annexin V 的表达水平。结果如图 2: g，表示，anti-mesothelin E28Z CAR-T 经 K562-Mesothelin 细胞系刺激后的凋亡水平持续一段时间一直比 anti-mesothelin 28Z CAR-T 明显低。

10 万 CAR-T细胞与过表达mesothelin 的K562-Mesothelin细胞系按照 1：1 比例接种于圆底 96 孔板中，混匀，室温离心（400g,1min）促细胞间接触，用完全培养基于 37° C培养箱

中培养一段时间。于不同时间点收样后将样品PBS洗一次，用anti-human CD4-APC 和anti-human CD8-PE-Cy7 抗体染色检测CAR$^+$T细胞存活数量。结果如图 2: h，表示，anti-mesothelin E28Z CAR-T经K562-Mesothelin细胞系刺激后的存活数量比 28Z CAR-T明显增多。

将mesothelin$^-$K562 细胞重悬于 1640 无血清培养基，然后预染 1x CellTraker deep red dye(37° 水浴，30min)，接着 1640 无血清培养基洗一次，用T细胞完全培养基重悬后与mesothelin$^+$K562_ mesothelin (IRES mCherry)细胞按照 1：1 混合为靶细胞。 CAR-T细胞再与该混合型靶细胞按照 3：1，1：1，1：3 比例混合铺板于圆底 96 孔板，混匀，室温离心（400g,1min）促细胞间接触，用完全培养基于 37° C培养箱中培养一天即收样，置冰，流式检测mesothelin$^-$K562 细胞(APC$^+$, mCherry$^-$)百分比与mesothelin$^+$K562_ mesothelin细胞(APC$^-$, mCherry$^+$)百分比变化，实验组的“mesothelin$^-$K562 细胞(APC$^+$, mCherry$^-$)百分比/mesothelin$^+$K562_ mesothelin细胞(APC$^-$, mCherry$^+$)百分比”记为N。N值以未加CAR-T细胞的混合型靶细胞样品孔的“N_0= mesothelin$^-$K562 细胞(APC$^+$, mCherry$^-$)百分比/mesothelin$^+$K562_mesothelin细胞(APC$^-$, mCherry$^+$)百分比”标准化后，计得存活比率N/N_0，则杀伤率公式为“$Lysis(\%)=1-N/N_0$”。结果如图 2: i，显示，anti-mesothelin E28Z CAR-T对mesothelin$^+$肿瘤细胞毒性比 28Z CAR-T 细胞较大。

无菌操作准备 2x10^7/ml PANC-1 细胞-PBS 重悬液，在每只 6 周龄 B-NDG 雌鼠的左侧背部皮下接种 100ul PANC-1 细胞 2 百万，时间点记为 day0。7 天后，PANC-1 皮下瘤长至直径 7-8mm 时，将小鼠随机分组，然后对每只小鼠尾静脉注射 100ul 6 百万 anti-mesothelin CAR-T 细胞，模型如图 2: j 所示，之后定期用游标卡尺测量肿瘤的大小，记录数据，肿瘤面积=长 x 宽。 结果如图 2: k.表明，vector 对照组与实验组 28Z 组的小鼠的肿瘤生长最快，两者没有差异，而 E28Z 组治疗效果比较好，统计有差异。

实验结果：

（1）、E28Z 与 28Z CAR-T 细胞的上膜水平以及 CD4 和 CD8 比例相当；

（2）、CAR-T 细胞经过 Raji 细胞体外特异性刺激后，E28Z 分泌的细胞因子（IFN-γ、IL-2、TNF）明显比 28Z 低，而产生的 GrzB 明显比 28Z 高；

（3）、CAR-T 细胞经过 Raji 细胞体外特异性刺激后，起初短时间内 28Z 的表面 CAR（%）下降速率比 E28Z 快，然后表面 CAR（%）回复速率也明显比 E28Z 快。

（4）、CAR-T 细胞经过 Raji 细胞体外特异性刺激扩增一段时间后，于不同时间点采样检测凋亡水平，E28Z 与 28Z 相比，先是两者相当，而后是 E28Z 凋亡水平明显低于 28Z；

（5）、CAR-T 细胞经过 Raji 细胞体外特异性刺激扩增一段时间后， 于不同时间点采样检测增殖能力（即 Ki67 表达水平），E28Z 增殖能力明显高于 28Z；

（7）、CAR-T 细胞经过 Raji 细胞特异性刺激扩增一段时间后，于不同时间点采样检测扩增的 CAR+T 细胞数目，随着时间的推移，E28Z 数量越明显高于 28Z；

（8）、CAR-T 细胞与 CD19+K562:CD19-K562 共孵育的体外杀伤实验中，较高剂量的 E28Z 的杀伤能力可明显高于 28Z。

（9）、小鼠体内抗肿瘤实验中，E28Z 的疗效可明显高于 28Z。

以上所述，仅为本发明的较佳实施例，并非对本发明任何形式上和实质上的限制，应当指出，对于本技术领域的普通技术人员，在不脱离本发明方法的前提下，还将可以做出若干改进和补充，这些改进和补充也应视为本发明的保护范围。凡熟悉本专业的技术人员，在不脱离本发明的精神和范围的情况下，当可利用以上所揭示的技术内容而做出的些许更动、修饰与演变的等同变化，均为本发明的等效实施例；同时，凡依据本发明的实质技术对上述实施例所作的任何等同变化的更动、修饰与演变，均仍属于本发明的技术方案的范围内。

1、 一种嵌合抗原受体，包括：

依次连接的胞外结构域、跨膜结构域和胞内结构域；

所述胞外结构域包括抗原识别区和铰链区；

所述胞内结构域与跨膜结构域相连的一端连接有 CD3ε 胞内区。

2、 如权利要求 1 所述的嵌合抗原受体，其特征在于，还包括以下特征中的一项或多项：

（1） 所述 CD3ε 胞内区的氨基酸序列如 SEQ ID NO：1 所示；

（2） 所述胞内结构域包括依次连接的CD3ε胞内区、共刺激信号传导区和CD3ζ胞内区。

3、 如权利要求 2 所述的嵌合抗原受体，其特征在于，所述共刺激信号传导区选自 CD27、CD28、CD134、4-1BB 和 ICOS 的胞内区中的一种或多种。

4、 如权利要求 3 所述的嵌合抗原受体，其特征在于，还包括以下特征中的一项或多项：

（1） 所述 CD28 胞内区的氨基酸序列如 SEQ ID NO：2 所示；

（2） 所述 CD3ζ 胞内区的氨基酸序列如 SEQ ID NO：3 所示。

5、 如权利要求 1 所述的嵌合抗原受体，其特征在于，还包括以下特征中的一项或多项：

a. 所述抗原识别区选自针对肿瘤表面抗原的单链抗体，所述肿瘤表面抗原选自 CD19、间皮素、CD20、CD22、CD123、CD30、CD33、CD38、CD138、BCMA、Fibroblast activation protein、Glypican-3、CEA、EGFRvIII、PSMA、Her2、IL13Rα2、CD171 和 GD2 中的一种或多种；

b. 所述跨膜结构域选自 CD28TM、CD4、CD8α、OX40 或 H2-Kb。

6、 如权利要求 5 所述的嵌合抗原受体，其特征在于，还包括以下特征中的一项或多项：

c. 所述单链抗体选自 FMC63 或 SS1；

d. 所述 CD28 TM 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：4 所示。

7、 如权利要求 1-6 任一所述的嵌合抗原受体，其特征在于，所述嵌合抗原受体的氨基酸序列如 SEQ ID NO：5 或 SEQ ID NO：6 所示。

8、 一种多核苷酸序列，该多核苷酸序列选自：

（1）编码权利要求 1-7 任一所述的嵌合抗原受体的多核苷酸序列；和

（2）（1）所述多核苷酸序列的互补序列。

9、 如权利要求 8 所述的多核苷酸序列，其特征在于，所述多核苷酸序列如 SEQ ID NO：7 或 SEQ ID NO：8 所示。

10、 一种核酸构建物，所述核酸构建物含有权利要求 8-9 任一所述的多核苷酸序列；

优选的，所述核酸构建物为载体；

更优选的，所述核酸构建物为慢病毒载体，含有复制起始位点、3’LTR、5’LTR 以及权利要求 8-9 任一所述的多核苷酸序列。

11、 一种慢病毒载体系统，所述慢病毒载体系统含有权利要求 10 所述的核酸构建物及慢病毒载体辅助成分。

12、 一种基因修饰的 T 细胞，其特征在于，所述细胞含有权利要求 8-9 任一所述的多核苷酸序列，或含有权利要求 10 所述的核酸构建物，或感染了权利要求 11 所述的慢病毒载体系统。

13、 权利要求 1—7 中任一项所述的嵌合抗原受体、权利要求 8-9 任一所述的多核苷酸序列，或含有权利要求 10 所述的核酸构建物，或权利要求 11 所述的慢病毒载体系统在制备以下任一种或多种用途产品中的应用：（1）制备 T 细胞；（2）抑制 T 细胞的细胞因子 IFN-γ、IL-2、TNF 分泌；（3）抑制 T 细胞凋亡；（5）增强 T 细胞增殖能力；（6）提高 T 细胞杀伤力；（7）促进 GrzB 产生；（8）促进脱颗粒。

14、 权利要求 1—7 中任一项所述的嵌合抗原受体、权利要求 8-9 任一所述的多核苷酸序列，或含有权利要求 10 所述的核酸构建物，或权利要求 11 所述的慢病毒载体系统在或权利要求 12 所述的基因修饰的 T 细胞在制备以下任一种或多种用途产品中的应用：（1）治疗肿瘤；（3）抑制肿瘤治疗时产生的细胞因子风暴；（4）抑制肿瘤治疗时产生的神经毒性；

优选的，所述肿瘤选自白血病或实体瘤中的一种或多种。


28Z
eGFP
T2A
SP
HA
FMC63 scFv
CD28α hinge TM
CD28
CD3ζ
E28Z
eGFP
T2A
SP
HA
FMC63 scFv
CD28α hinge TM
CD3ε
CD28
CD3ζ

图 1：a

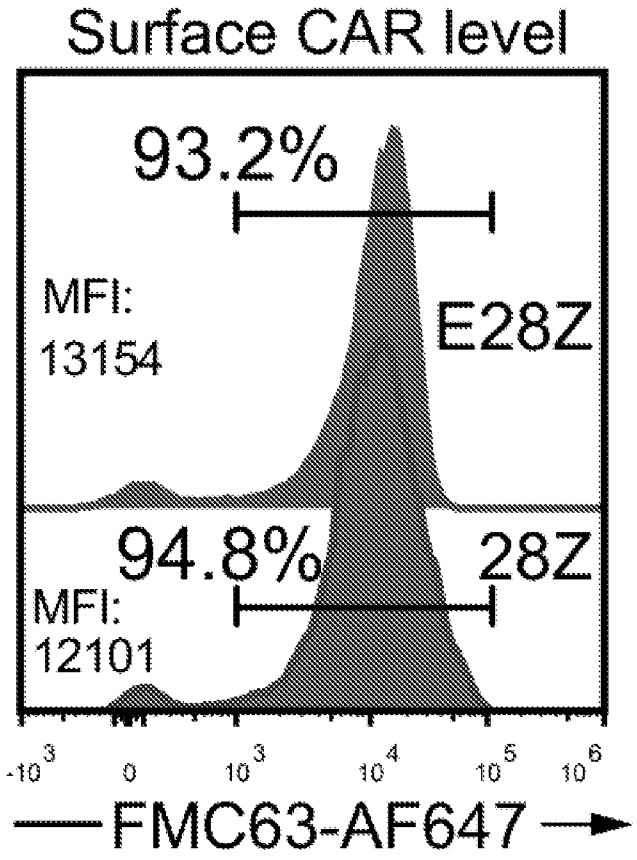

Surface CAR level
93.2%
MFI:
13154
E28Z
94.8%
28Z
MFI:
12101
-10^3
0
10^3
10^4
10^5
10^6
FMC63-AF647

图 1：b

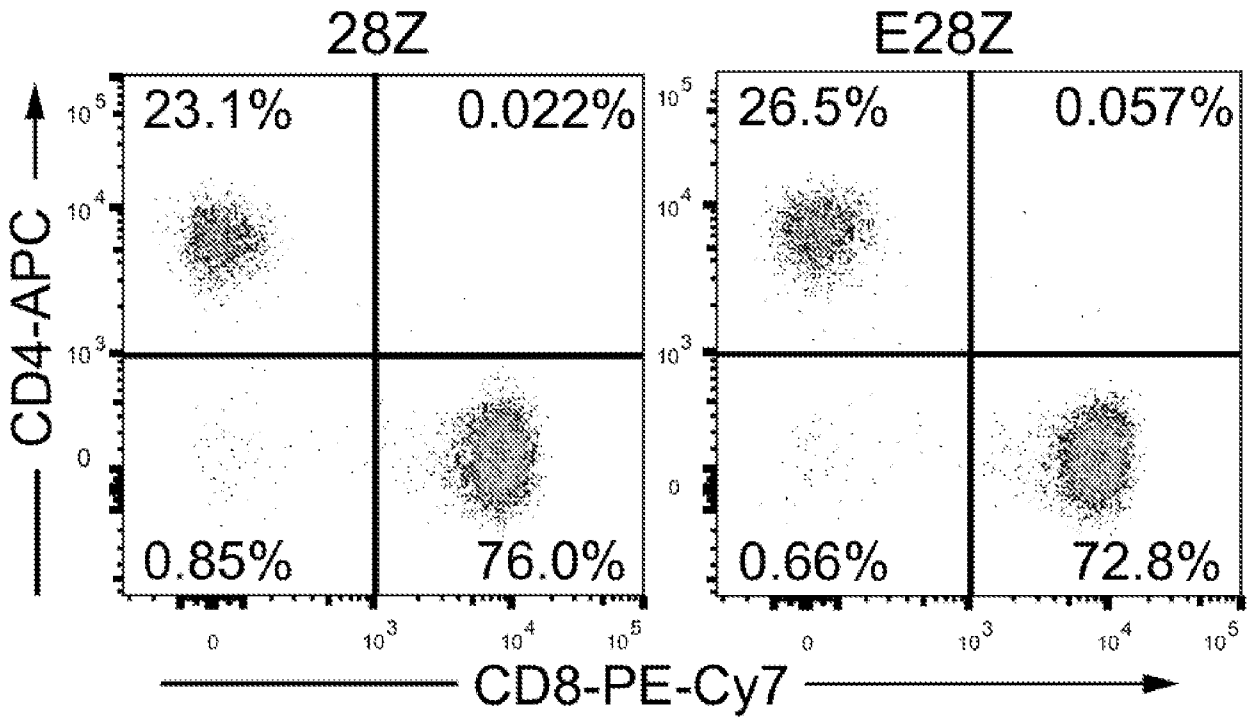

28Z
E28Z
23.1%
0.022%
26.5%
0.057%
0.85%
76.0%
0.66%
72.8%
CD4-APC
CD8-PE-Cy7

图 1：c

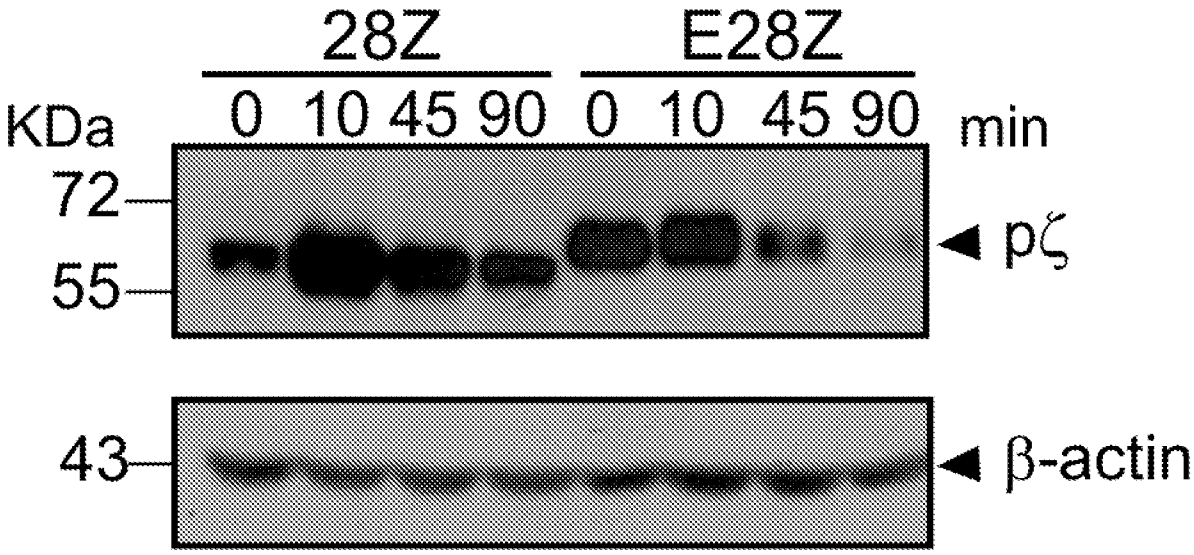

28Z
E28Z
KDa
0 10 45 90 0 10 45 90 min
72
55
pζ
43
β-actin

图 1：d

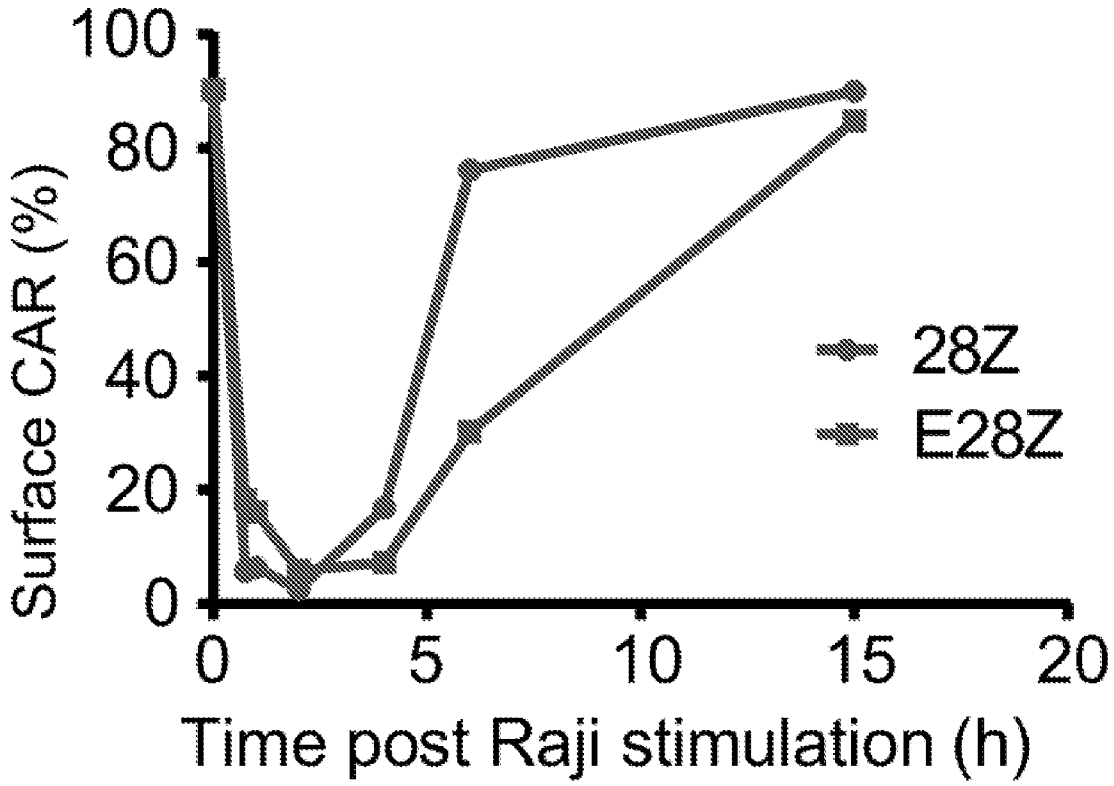

Surface CAR (%)
100
80
60
40
20
0
0
5
10
15
20
Time post Raji stimulation (h)
28Z
E28Z

图 1：e

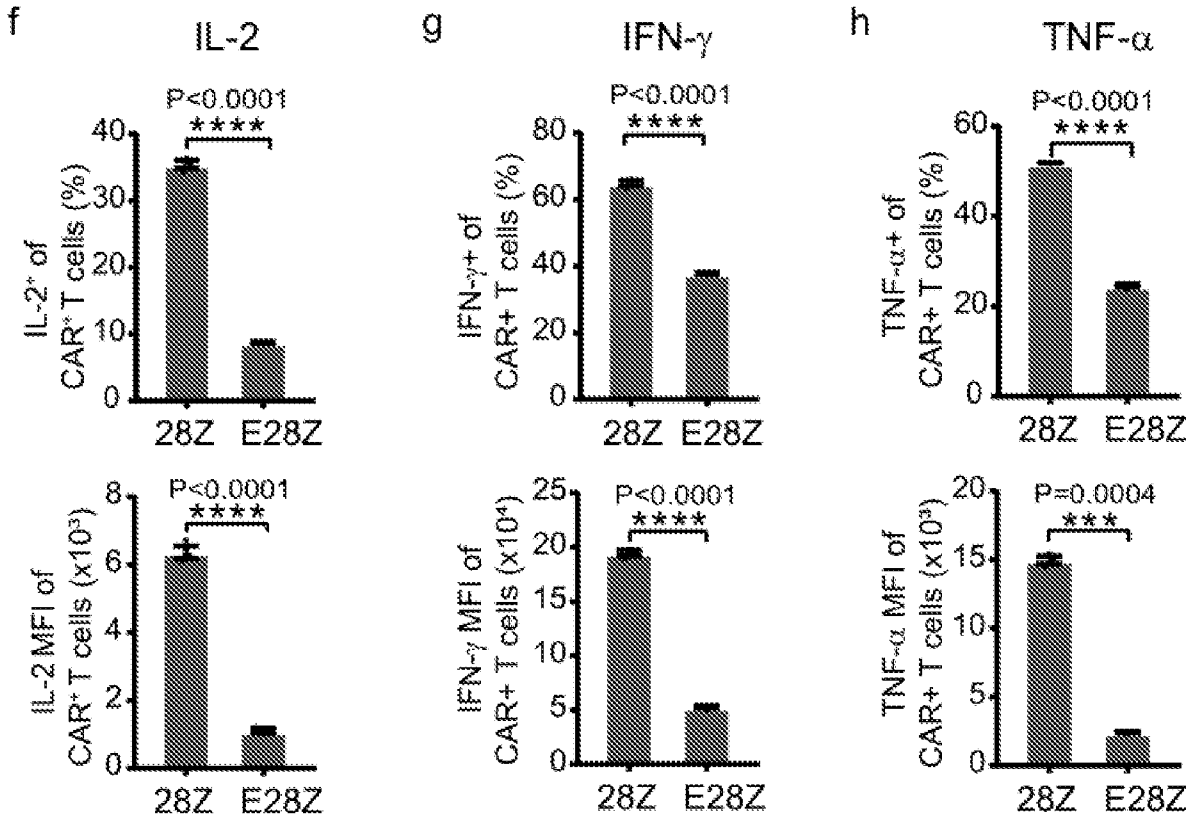

f
IL-2
P<0.0001
****
IL-2+ of CAR+ T cells (%)
40
30
20
10
0
28Z E28Z
IL-2 MFI of CAR+ T cells (x10³)
8
6
4
2
0
P<0.0001
****
28Z E28Z
g
IFN-γ
P<0.0001
****
IFN-γ+ of CAR+ T cells (%)
80
60
40
20
0
28Z E28Z
IFN-γ MFI of CAR+ T cells (x10⁴)
25
20
15
10
5
0
P<0.0001
****
28Z E28Z
h
TNF-α
P<0.0001
****
TNF-α+ of CAR+ T cells (%)
60
40
20
0
28Z E28Z
TNF-α MFI of CAR+ T cells (x10³)
20
15
10
5
0
P=0.0004
***
28Z E28Z

图 1：f-h

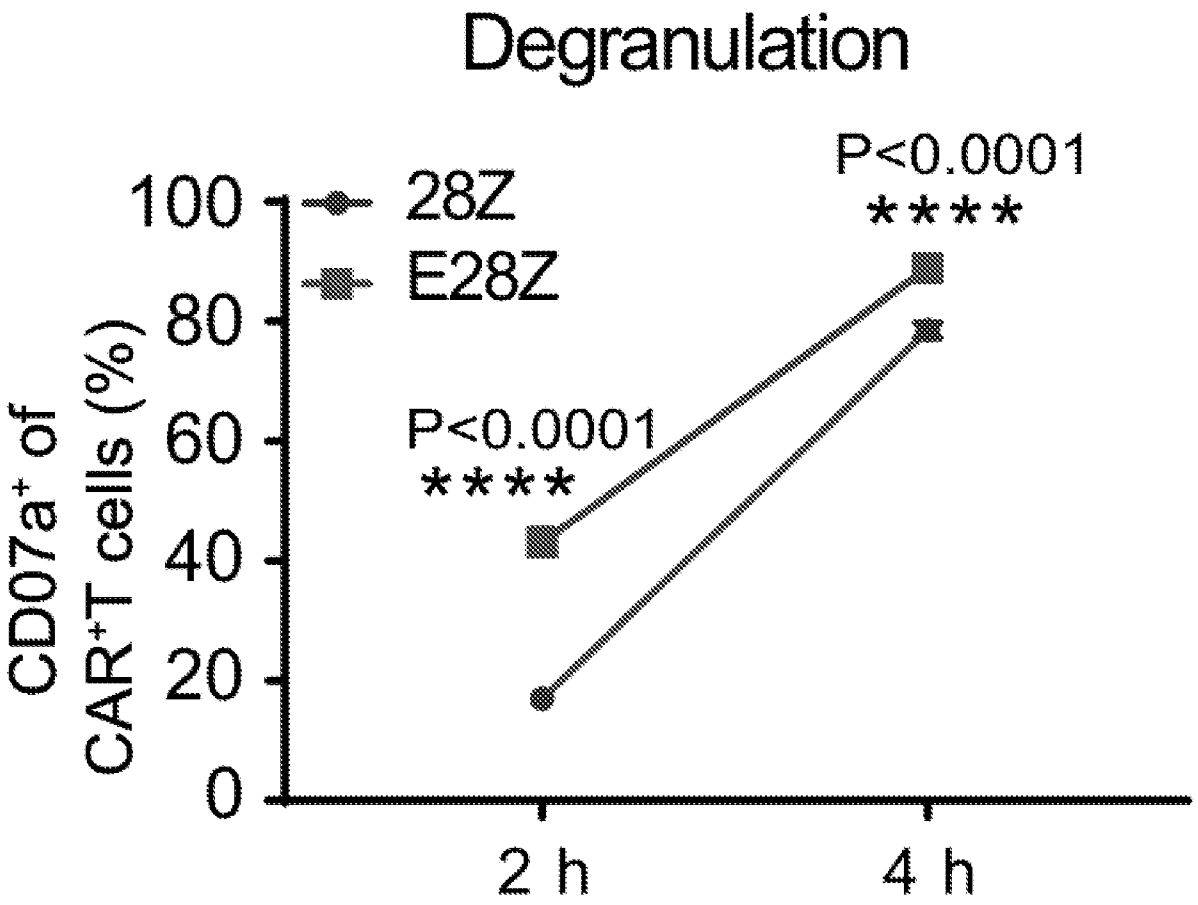

Degranulation
P<0.0001
****
28Z
E28Z
P<0.0001
****
CD07a+ of
CAR+T cells (%)
100
80
60
40
20
0
2 h
4 h

图 1：i

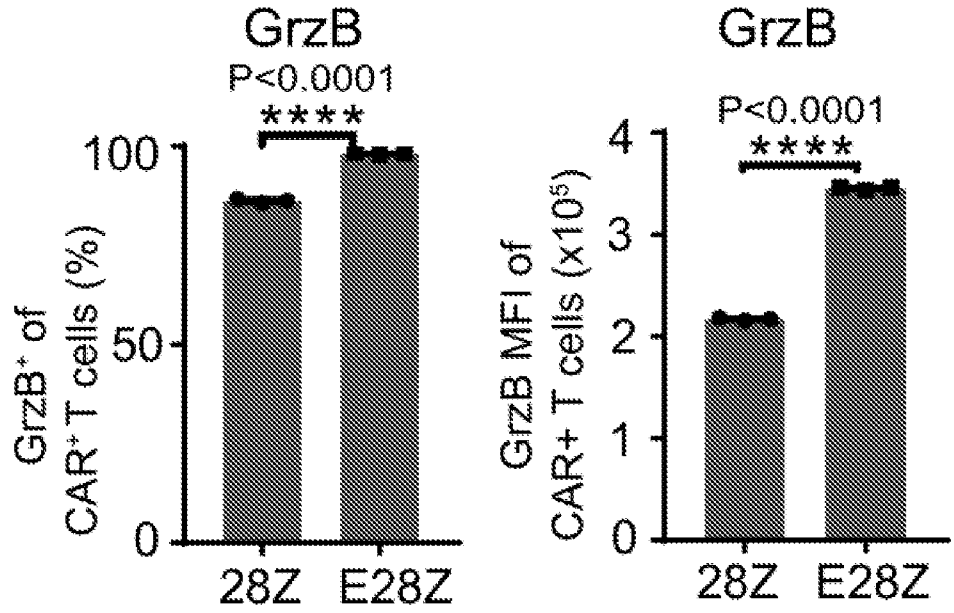

GrzB
P<0.0001
****
GrzB+ of
CAR+ T cells (%)
100
50
0
28Z
E28Z
GrzB
P<0.0001
****
GrzB MFI of
CAR+ T cells (x10^5)
4
3
2
1
0
28Z
E28Z

图 1：j

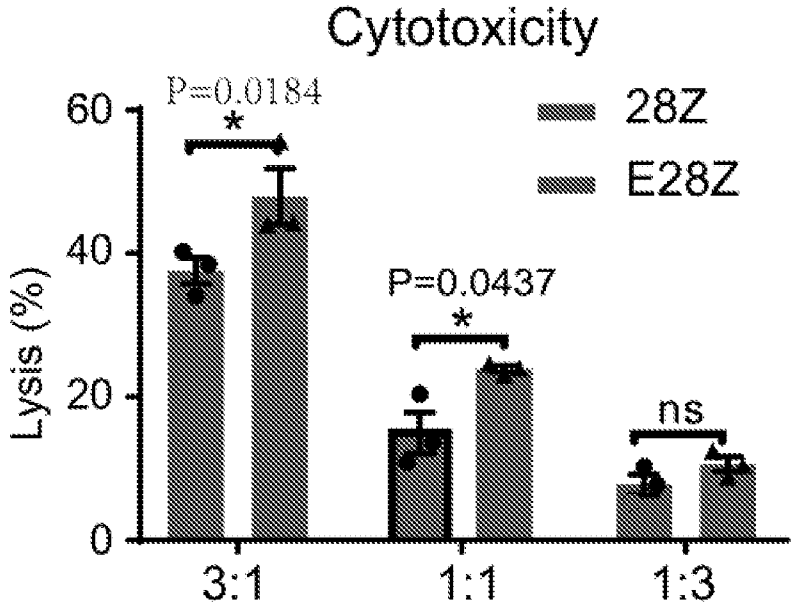

Cytotoxicity
P=0.0184
*
28Z
E28Z
60
40
20
0
Lysis (%)
P=0.0437
*
ns
3:1
1:1
1:3

图 1：k

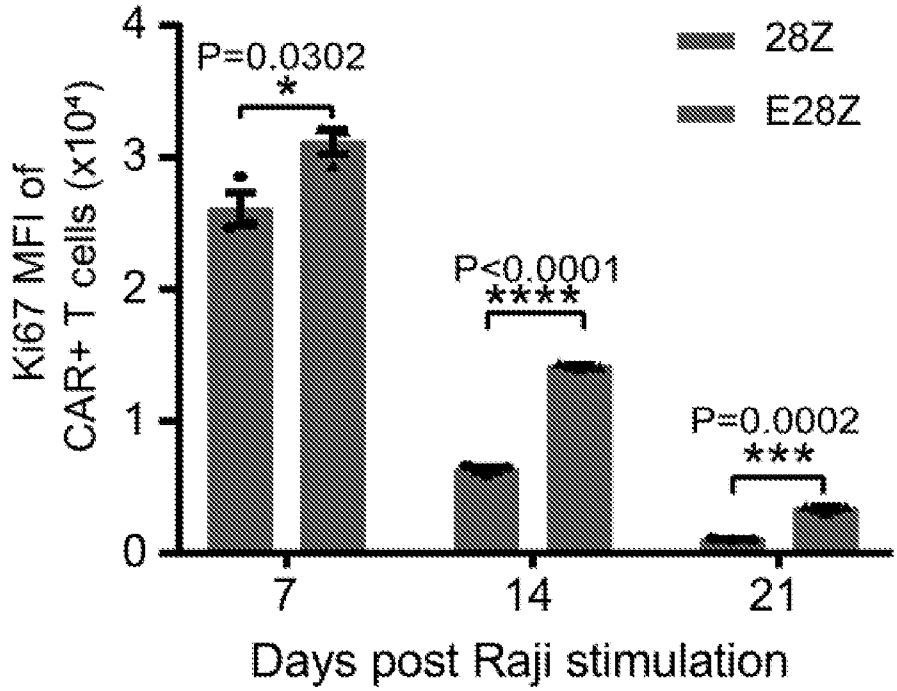

4
3
2
1
0
Ki67 MFI of
CAR+ T cells (x10⁴)
P=0.0302
*
28Z
E28Z
P<0.0001
****
P=0.0002
***
7
14
21
Days post Raji stimulation

图 1：1

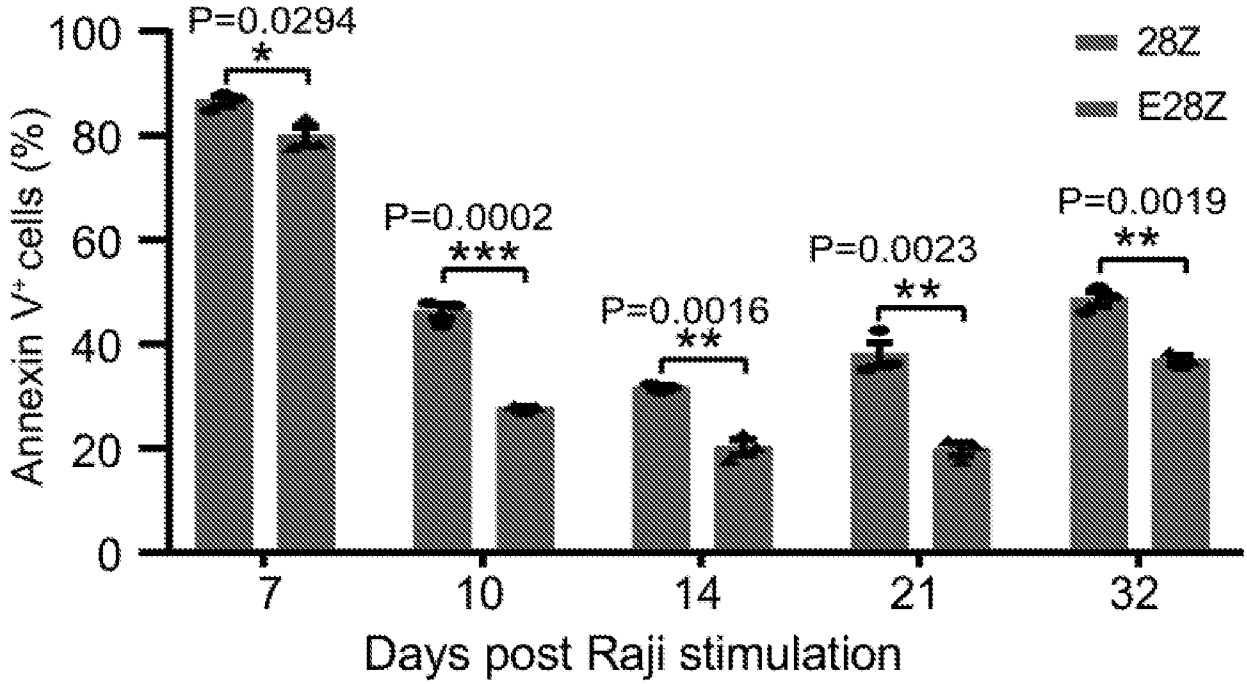

P=0.0294
*
P=0.0002
***
P=0.0016
**
P=0.0023
**
P=0.0019
**
28Z
E28Z
Annexin V+ cells (%)
100
80
60
40
20
0
7
10
14
21
32
Days post Raji stimulation

图 1：m

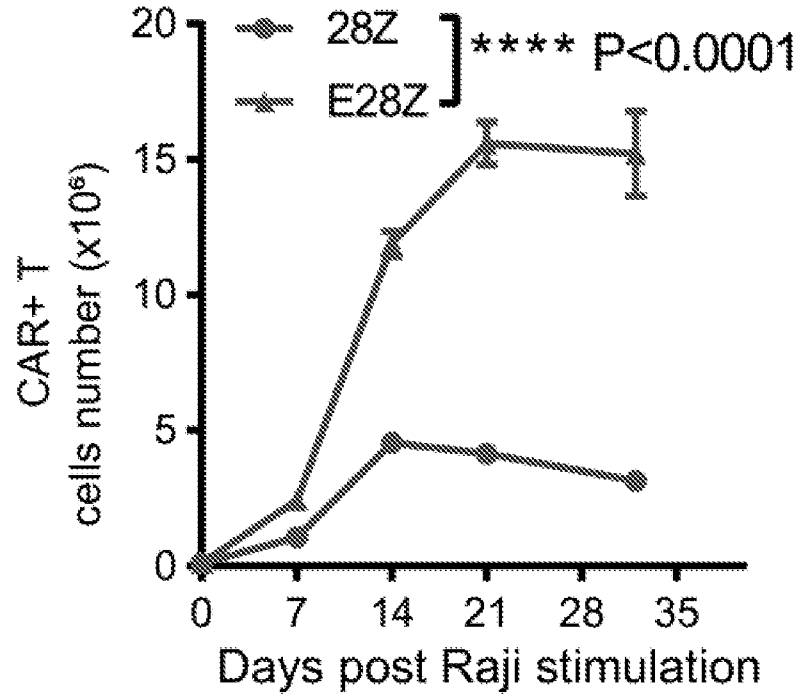

28Z
E28Z
**** P<0.0001
CAR+ T cells number (x10⁶)
20
15
10
5
0
0
7
14
21
28
35
Days post Raji stimulation

图 1：n

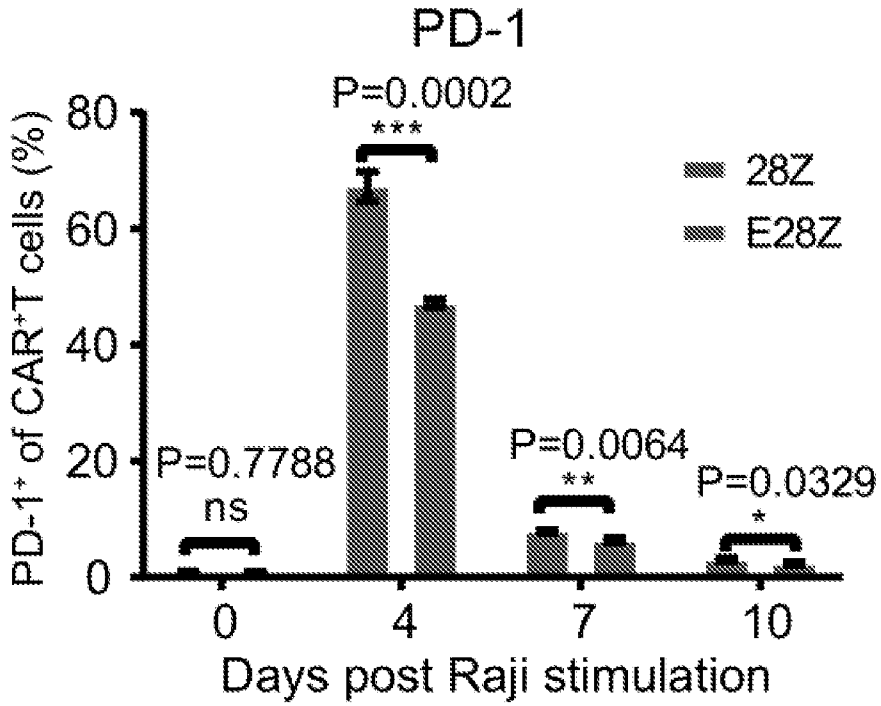

PD-1
P=0.0002
***
28Z
E28Z
PD-1+ of CAR+T cells (%)
80
60
40
20
0
P=0.7788
ns
P=0.0064
**
P=0.0329
*
0
4
7
10
Days post Raji stimulation

图 1：o

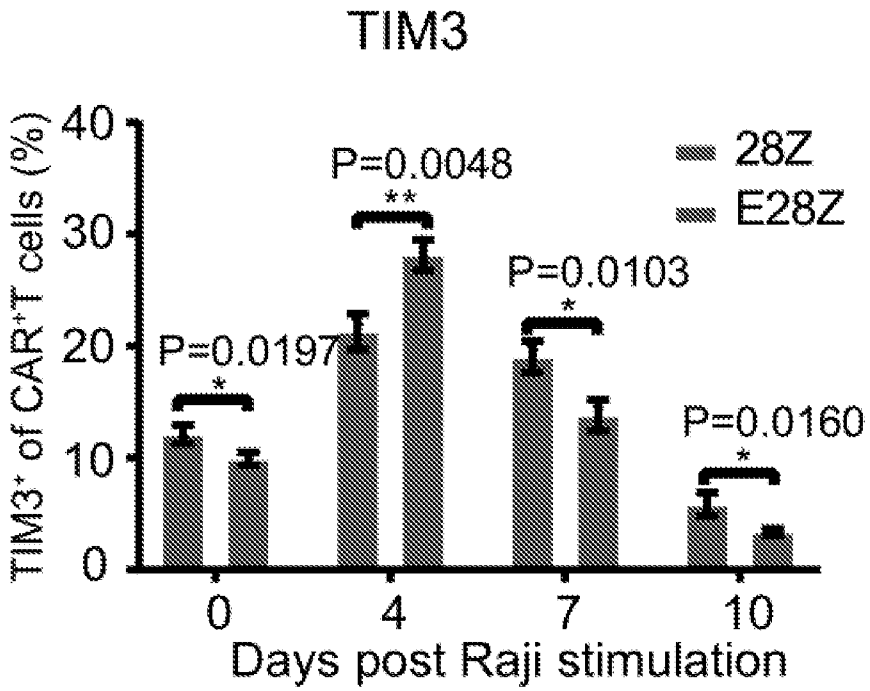

TIM3
P=0.0048
**
28Z
E28Z
TIM3+ of CAR+T cells (%)
40
30
20
10
0
P=0.0197
*
P=0.0103
*
P=0.0160
*
0
4
7
10
Days post Raji stimulation

图 1：p

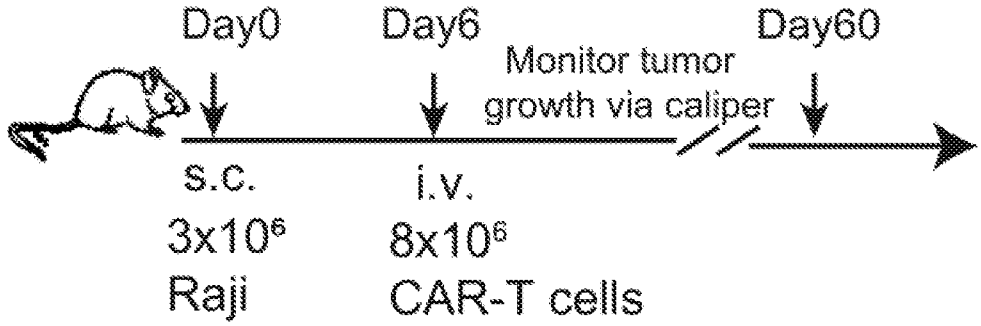

Day0
Day6
Day60
Monitor tumor growth via caliper
s.c.
3x10⁶
Raji
i.v.
8x10⁶
CAR-T cells

图 1：q

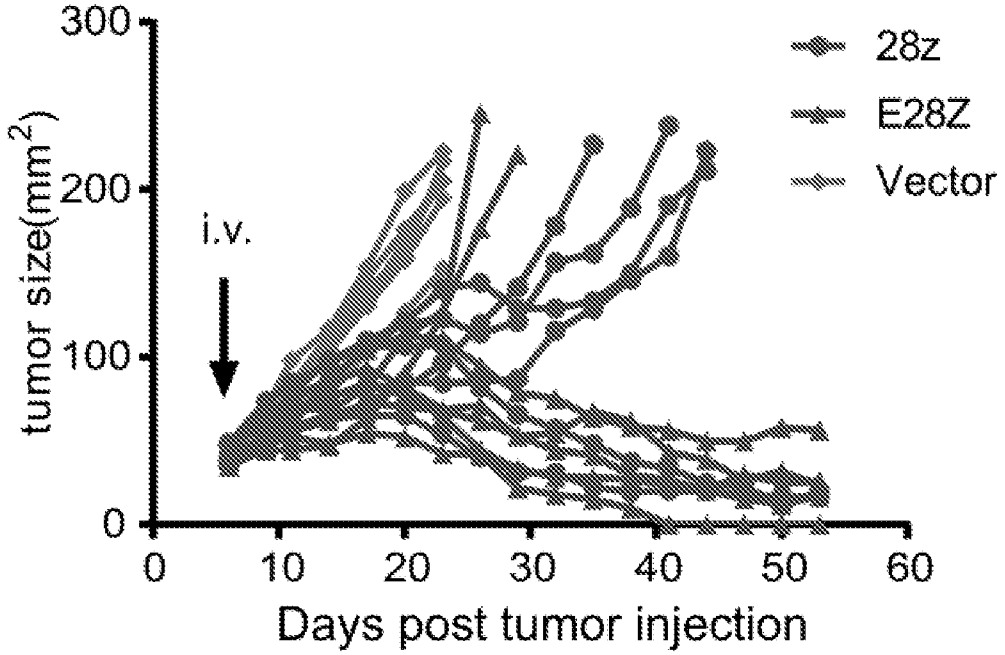

300
200
100
0
tumor size(mm²)
i.v.
28z
E28Z
Vector
0
10
20
30
40
50
60
Days post tumor injection

图 1：r

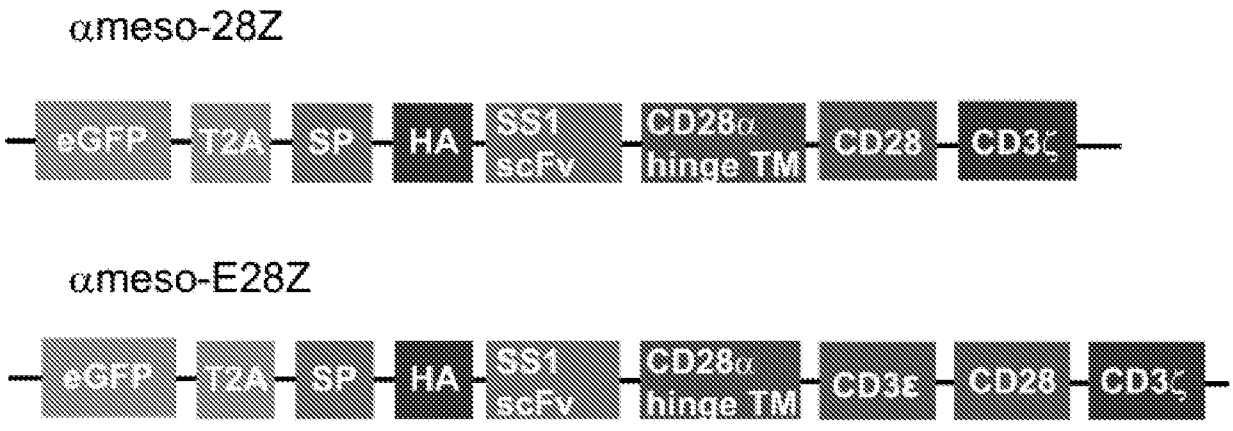

αmeso-28Z
eGFP
T2A
SP
HA
SS1 scFv
CD28 hinge TM
CD28
CD3ζ
αmeso-E28Z
eGFP
T2A
SP
HA
SS1 scFv
CD28 hinge TM
CD3ε
CD28
CD3ζ

图 2:a

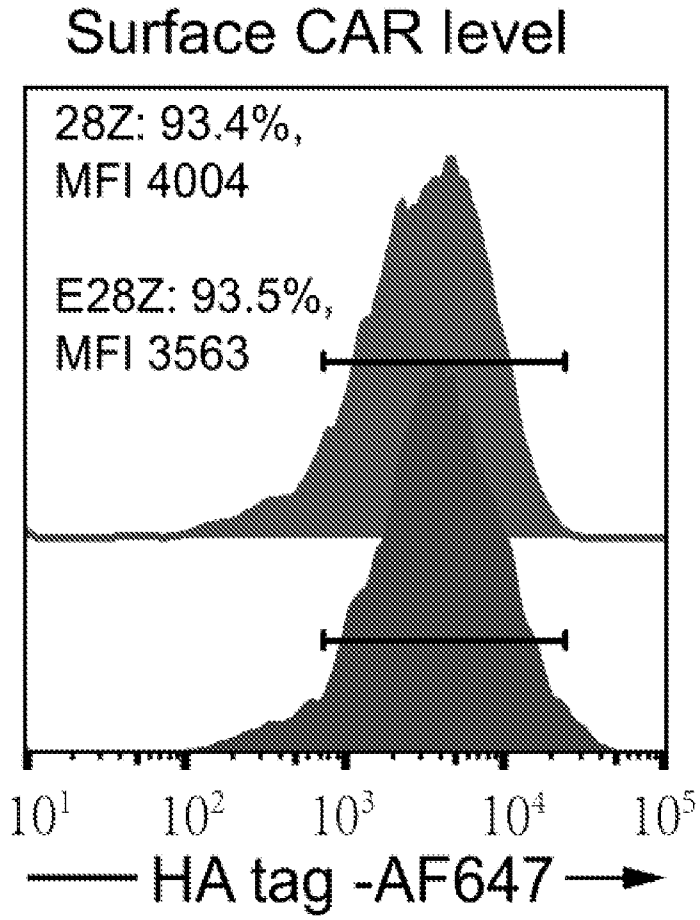

Surface CAR level
28Z: 93.4%,
MFI 4004
E28Z: 93.5%,
MFI 3563
10^1 10^2 10^3 10^4 10^5
HA tag -AF647

图 2：b

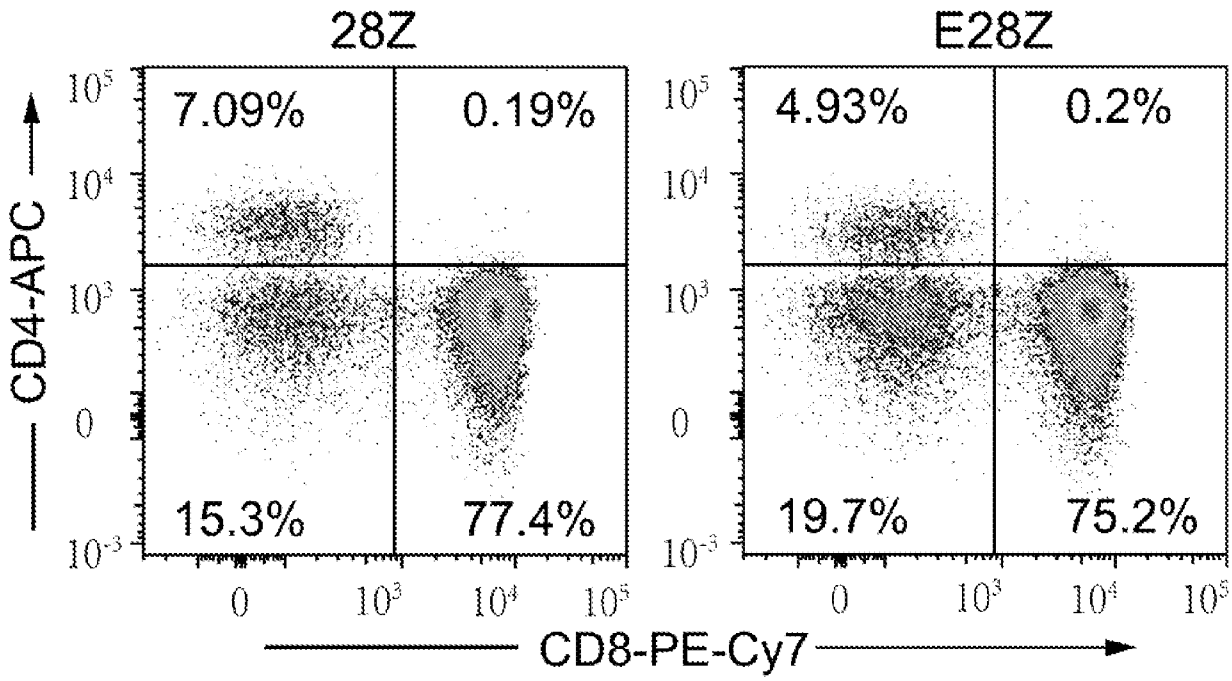

28Z
E28Z
7.09%
0.19%
15.3%
77.4%
4.93%
0.2%
19.7%
75.2%
CD4-APC
CD8-PE-Cy7

图 2：c

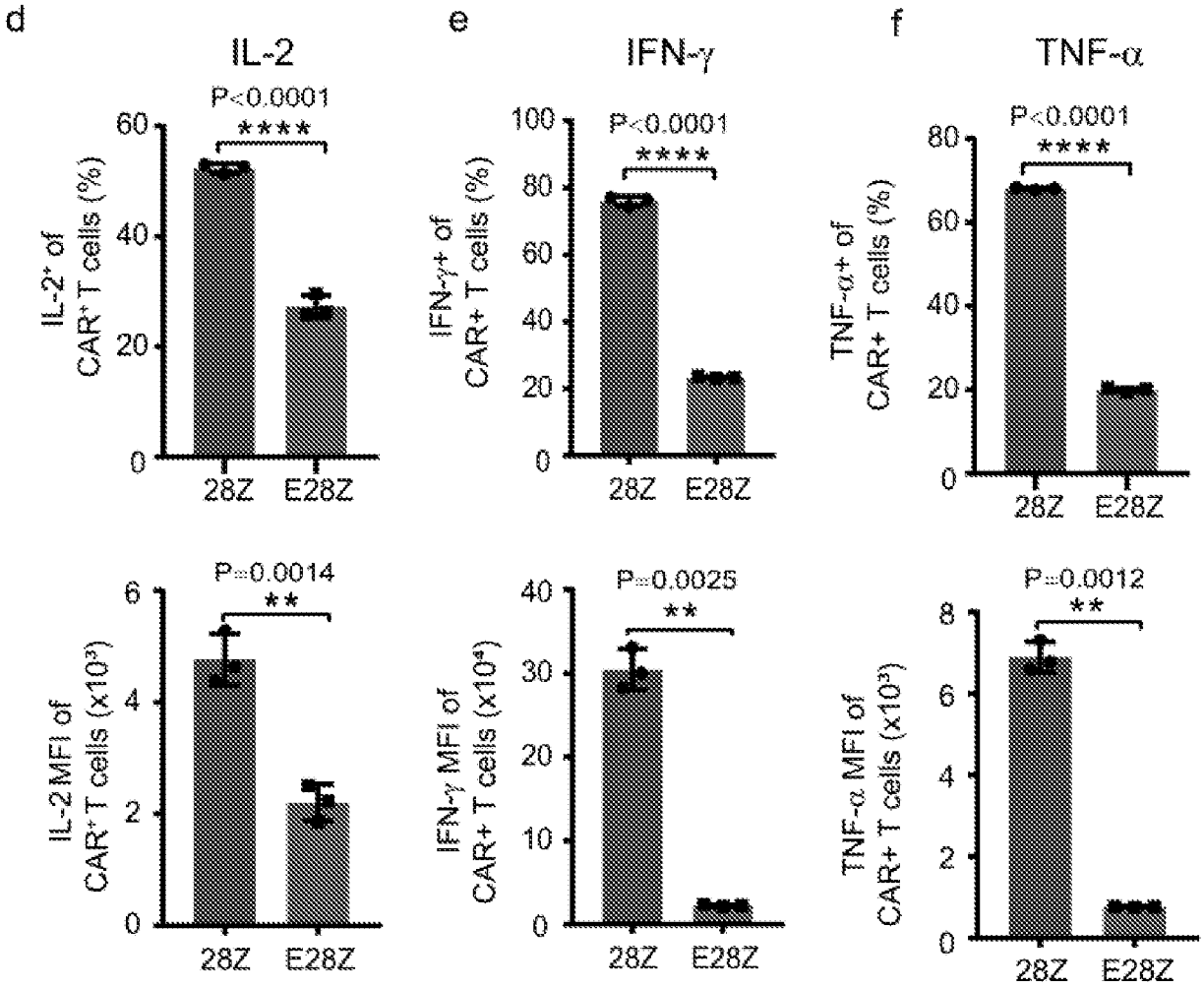

d
IL-2
P<0.0001
****
IL-2+ of CAR+ T cells (%)
28Z
E28Z
e
IFN-γ
P<0.0001
****
IFN-γ+ of CAR+ T cells (%)
f
TNF-α
P<0.0001
****
TNF-α+ of CAR+ T cells (%)
P=0.0014
**
IL-2 MFI of CAR+ T cells (x10³)
P=0.0025
**
IFN-γ MFI of CAR+ T cells (x10⁴)
P=0.0012
**
TNF-α MFI of CAR+ T cells (x10³)

图 2：d-f

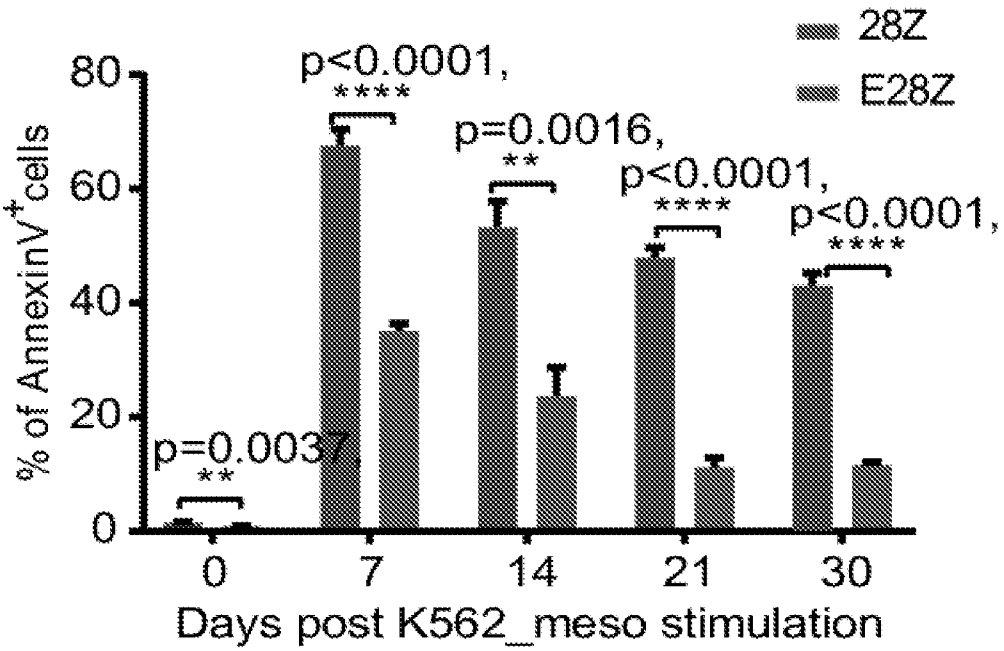

28Z
E28Z
% of AnnexinV+cells
p=0.0037
**
p<0.0001,
****
p=0.0016,
**
p<0.0001,
****
p<0.0001,
****
Days post K562_meso stimulation

图 2：g

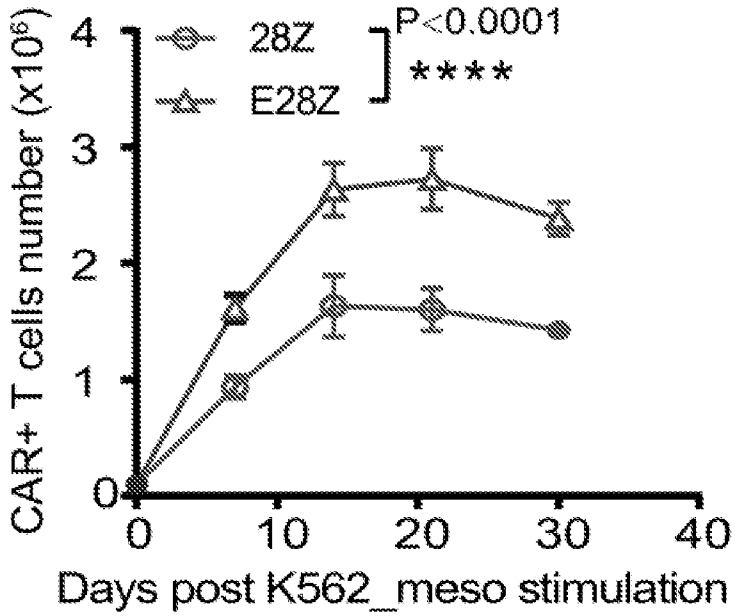

CAR+ T cells number (x10^6)
4
3
2
1
0
28Z
E28Z
P<0.0001
****
0
10
20
30
40
Days post K562_meso stimulation

图 2：h

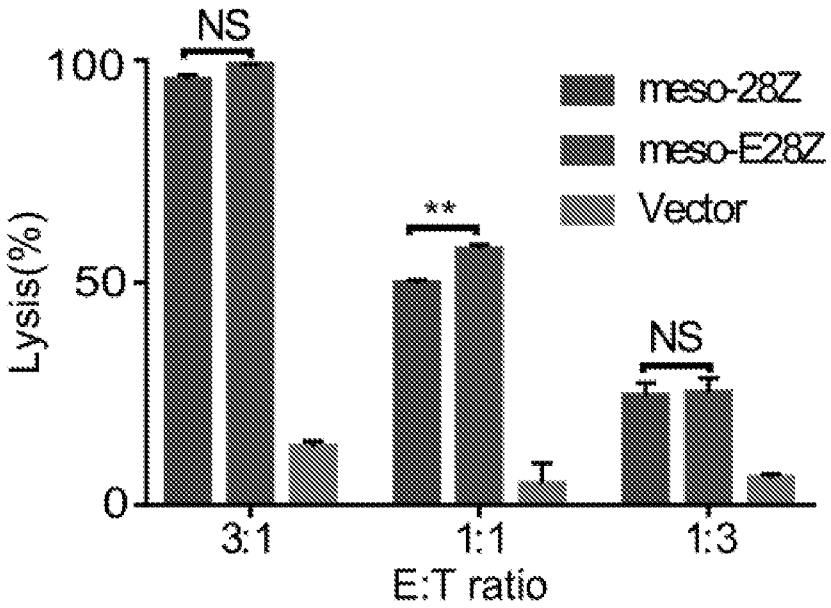

NS
100
50
0
Lysis(%)
meso-28Z
meso-E28Z
Vector
**
NS
3:1
1:1
1:3
E:T ratio

图 2：i

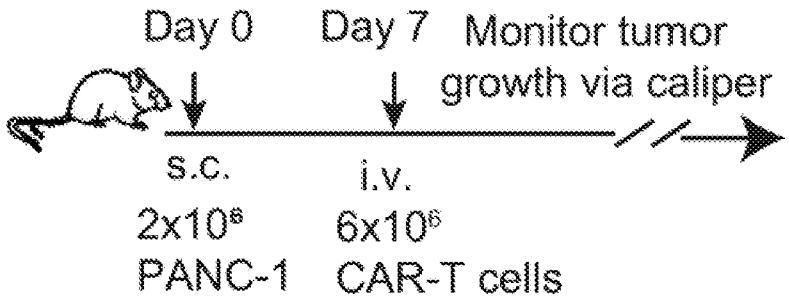

Day 0
Day 7
Monitor tumor growth via caliper
s.c.
i.v.
2x10⁶
PANC-1
6x10⁶
CAR-T cells

图 2：j

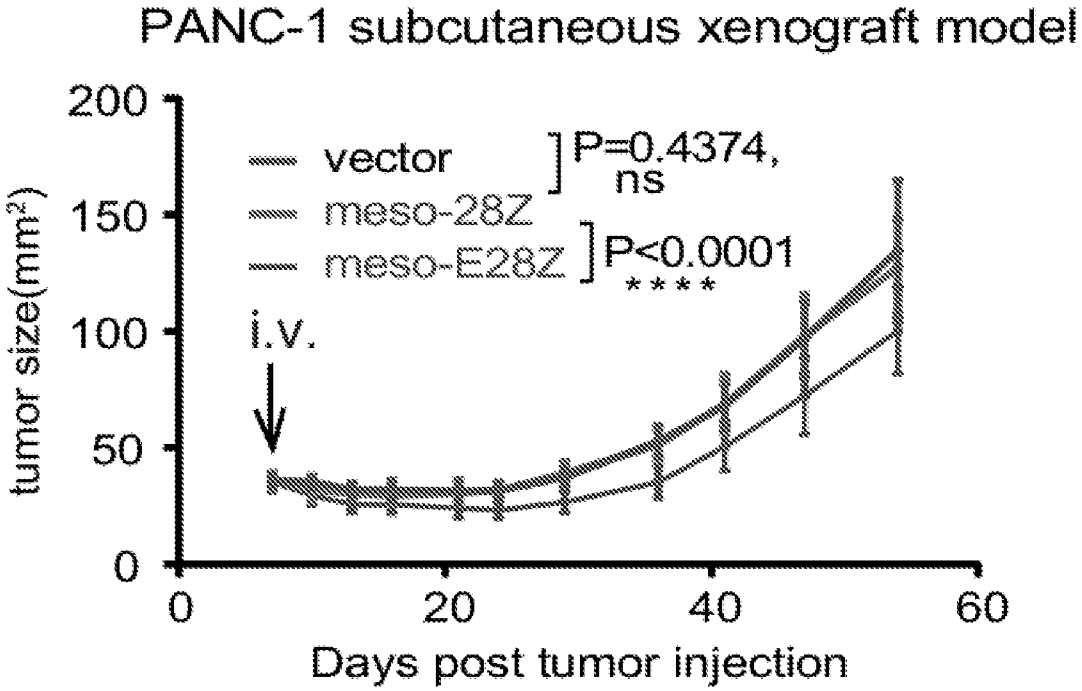

PANC-1 subcutaneous xenograft model
tumor size(mm²)
200
150
100
50
0
vector
meso-28Z
meso-E28Z
P=0.4374, ns
P<0.0001
****
i.v.
0
20
40
60
Days post tumor injection

图 2：k

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2021/099797

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 14/725(2006.01)i; A61K 35/17(2015.01)i; A61P 35/00(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K; A61K; A61P

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

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

CNABS, CNTXT, OETXT, WPABSC, CNKI, Web of Science, 百度学术, incoPat, China Patents Biological Sequence Search System, NCBI, EBI, STN: 申请人, 发明人, CAR, 嵌合抗原受体, chimeric antigen receptor, 胞外域, ECD, ectodomain, 跨膜, transmembrane, 胞内域, intracellular domain, CD3ε, CD27, CD28, CD134, 4-1BB, ICOS, CD3ζ, 铰链, hinge, 序列1-10

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 112500492 A (CAS CENTER FOR EXCELLENCE IN MOLECULAR CELL SCIENCE) 16 March 2021 (2021-03-16) claims 1-14	1-14
X	WO 2020068702 A1 (FRED HUTCHINSON CANCER RESEARCH CENTER) 02 April 2020 (2020-04-02) description page 6 paragraph 2 to page 10 paragraph 3, page 28 paragraph 2 to page 33 paragraph 3, page 35 paragraph 4 to page 39 paragraph 2, page 44 paragraph 2 to page 52 paragraph 1, page 58 paragraph 3 to page 62 paragraph 2	1-6, 8-14
Y	WO 2020068702 A1 (FRED HUTCHINSON CANCER RESEARCH CENTER) 02 April 2020 (2020-04-02) description page 6 paragraph 2 to page 10 paragraph 3, page 28 paragraph 2 to page 33 paragraph 3, page 35 paragraph 4 to page 39 paragraph 2, page 44 paragraph 2 to page 52 paragraph 1, page 58 paragraph 3 to page 62 paragraph 2	7-14
Y	CN 110724698 A (SHANGHAI HENGRUN DASHENG BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 24 January 2020 (2020-01-24) description paragraphs 15-16, 69	7-14

☑ 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	Date of mailing of the international search report
29 August 2021	**09 September 2021**

Name and mailing address of the ISA/CN	Authorized officer
China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) **No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088** **China**	
Facsimile No. **(86-10)62019451**	Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 110177808 A (F1 ONCOLOGY, INC.) 27 August 2019 (2019-08-27) entire document	1-14
A	WO 2018161064 A1 (F1 ONCOLOGY, INC.) 07 September 2018 (2018-09-07) entire document	1-14
A	CN 109715668 A (TCR2 THERAPEUTICS INC.) 03 May 2019 (2019-05-03) entire document	1-14
A	CN 109689686 A (TCR2 THERAPEUTICS INC.) 26 April 2019 (2019-04-26) entire document	1-14
A	CN 110177803 A (TCR2 THERAPEUTICS INC.) 27 August 2019 (2019-08-27) entire document	1-14
A	STROHL, W.R. et al. "Bispecific T-Cell Redirection versus Chimeric Antigen Receptor (CAR)-T Cells as Approaches to Kill Cancer Cells." *ANTIBODIES.*, Vol. 8, 03 July 2019 (2019-07-03), Article No. 41, pages 1-68	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2021/099797

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed:
      ☑ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
      ☐ on paper or in the form of an image file.
   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2021/099797

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	112500492	A	16 March 2021	None			
WO	2020068702	A1	02 April 2020	None			
CN	110724698	A	24 January 2020	None			
CN	110177808	A	27 August 2019	AU	2018211081	A1	18 July 2019
				MX	2019008503	A	13 September 2019
				WO	2018136570	A9	04 October 2018
				IL	267902	D0	26 September 2019
				TW	201831505	A	01 September 2018
				SG	11201906468 T	A	27 August 2019
				JP	2020503885	A	06 February 2020
				BR	112019014615	A2	02 June 2020
				US	2019367621	A1	05 December 2019
				KR	20190130559	A	22 November 2019
				WO	2018136570	A1	26 July 2018
				EP	3571229	A1	27 November 2019
				CA	3049674	A1	26 July 2018
WO	2018161064	A1	07 September 2018	SG	11201907814 S	A	27 September 2019
				CN	110892070	A	17 March 2020
				CA	3054064	A1	07 September 2018
				EP	3589733	A1	08 January 2020
				BR	112019018288	A2	31 March 2020
				KR	20200003370	A	09 January 2020
				IL	268739	D0	31 October 2019
				CU	20190075	A7	02 April 2020
				WO	2018161064	A9	18 July 2019
				TW	201839127	A	01 November 2018
				MX	2019010445	A	24 October 2019
				AU	2018226884	A1	10 October 2019
CN	109715668	A	03 May 2019	AU	2017306432	A1	21 March 2019
				JP	2019531056	A	31 October 2019
				WO	2018026953	A1	08 February 2018
				US	2019256571	A1	22 August 2019
				EP	3494138	A1	12 June 2019
				CA	3032498	A1	08 February 2018
CN	109689686	A	26 April 2019	DK	3445787	T3	01 March 2021
				JP	2019532625	A	14 November 2019
				AU	2017341048	A1	23 May 2019
				GB	2564823	A8	30 January 2019
				GB	2564823	A	23 January 2019
				US	2019177694	A1	13 June 2019
				EP	3445787	B1	02 December 2020
				TW	201827459	A	01 August 2018
				BR	112019007100	A2	25 June 2019
				CN	112280796	A	29 January 2021
				US	2020362306	A1	19 November 2020
				PT	3445787	T	15 March 2021
				EP	3445787	A1	27 February 2019
				KR	20190058509	A	29 May 2019
				GB	201818962	D0	09 January 2019

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2021/099797

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		CA 3036745 A1	12 April 2018
		US 2018230429 A1	16 August 2018
		MX 2019003899 A	14 August 2019
		WO 2018067993 A1	12 April 2018
		IL 265766 D0	30 June 2019
		CN 109689686 B	25 August 2020
		US 10208285 B2	19 February 2019
		GB 2564823 B	29 January 2020
CN 110177803 A	27 August 2019	CA 3044593 A1	31 May 2018
		AU 2017363311 A1	13 June 2019
		EP 3544996 A2	02 October 2019
		WO 2018098365 A3	12 July 2018
		WO 2018098365 A2	31 May 2018
		US 2019276540 A1	12 September 2019
		JP 2019536452 A	19 December 2019

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2021/099797

A. 主题的分类

C07K 14/725(2006.01)i; A61K 35/17(2015.01)i; A61P 35/00(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C07K; A61K; A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用））

CNABS, CNTXT, OETXT, WPABSC, CNKI, Web of Science, 百度学术, incoPat, 中国生物序列检索系统, NCBI, EBI, STN: 申请人, 发明人, CAR, 嵌合抗原受体, chimeric antigen receptor, 胞外域, ECD, ectodomain, 跨膜, transmembrane, 胞内域, intracellular domain, CD3ε, CD27, CD28, CD134, 4-1BB, ICOS, CD3ζ, 铰链, hinge, 序列1-10

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 112500492 A (中国科学院分子细胞科学卓越创新中心) 2021年 3月 16日 (2021-03-16) 权利要求1-14	1-14
X	WO 2020068702 A1 (FRED HUTCHINSON CANCER RESEARCH CENTER) 2020年 4月 2日 (2020-04-02) 说明书第6页第2段至第10页第3段、第28页第2段至第33页第3段、第35页第4段至第39页第2段、第44页第2段至第52页第1段、第58页第3段至第62页第2段	1-6、8-14
Y	WO 2020068702 A1 (FRED HUTCHINSON CANCER RESEARCH CENTER) 2020年 4月 2日 (2020-04-02) 说明书第6页第2段至第10页第3段、第28页第2段至第33页第3段、第35页第4段至第39页第2段、第44页第2段至第52页第1段、第58页第3段至第62页第2段	7-14
Y	CN 110724698 A (上海恒润达生生物科技有限公司) 2020年 1月 24日 (2020-01-24) 说明书第15-16、69段	7-14
A	CN 110177808 A (F1肿瘤医学公司) 2019年 8月 27日 (2019-08-27) 全文	1-14

☑ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

"T" 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件

"X" 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

"Y" 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性

"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2021年 8月 29日	2021年 9月 9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	受权官员 冯晓亮 电话号码 86-(10)-53961927

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2021/099797

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	WO 2018161064 A1 (F1 ONCOLOGY, INC.) 2018年 9月 7日 (2018-09-07) 全文	1-14
A	CN 109715668 A (T细胞受体治疗公司) 2019年 5月 3日 (2019-05-03) 全文	1-14
A	CN 109689686 A (T细胞受体治疗公司) 2019年 4月 26日 (2019-04-26) 全文	1-14
A	CN 110177803 A (T细胞受体治疗公司) 2019年 8月 27日 (2019-08-27) 全文	1-14
A	STROHL, W.R.等. "Bispecific T-Cell Redirection versus Chimeric Antigen Receptor (CAR)-T Cells as Approaches to Kill Cancer Cells." ANTIBODIES., 第8卷, 2019年 7月 3日 (2019-07-03), 文章号41、1-68页	1-14

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2021/099797

第I栏　核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

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

a. ☑ 作为国际申请的一部分提交的：
   - ☑ 附件C/ST.25文本文件形式
   - ☐ 纸件或图形文件形式

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

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的：
   - ☐ 附件C/ST.25文本文件形式（细则13之三.1(a)）
   - ☐ 纸件或图形文件形式（细则13之三.1(b)和行政规程第713段）

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

3. 补充意见：

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2021/099797

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	112500492	A	2021年 3月 16日	无			
WO	2020068702	A1	2020年 4月 2日	无			
CN	110724698	A	2020年 1月 24日	无			
CN	110177808	A	2019年 8月 27日	AU	2018211081	A1	2019年 7月 18日
				MX	2019008503	A	2019年 9月 13日
				WO	2018136570	A9	2018年 10月 4日
				IL	267902	D0	2019年 9月 26日
				TW	201831505	A	2018年 9月 1日
				SG	11201906468T	A	2019年 8月 27日
				JP	2020503885	A	2020年 2月 6日
				BR	112019014615	A2	2020年 6月 2日
				US	2019367621	A1	2019年 12月 5日
				KR	20190130559	A	2019年 11月 22日
				WO	2018136570	A1	2018年 7月 26日
				EP	3571229	A1	2019年 11月 27日
				CA	3049674	A1	2018年 7月 26日
WO	2018161064	A1	2018年 9月 7日	SG	11201907814S	A	2019年 9月 27日
				CN	110892070	A	2020年 3月 17日
				CA	3054064	A1	2018年 9月 7日
				EP	3589733	A1	2020年 1月 8日
				BR	112019018288	A2	2020年 3月 31日
				KR	20200003370	A	2020年 1月 9日
				IL	268739	D0	2019年 10月 31日
				CU	20190075	A7	2020年 4月 2日
				WO	2018161064	A9	2019年 7月 18日
				TW	201839127	A	2018年 11月 1日
				MX	2019010445	A	2019年 10月 24日
				AU	2018226884	A1	2019年 10月 10日
CN	109715668	A	2019年 5月 3日	AU	2017306432	A1	2019年 3月 21日
				JP	2019531056	A	2019年 10月 31日
				WO	2018026953	A1	2018年 2月 8日
				US	2019256571	A1	2019年 8月 22日
				EP	3494138	A1	2019年 6月 12日
				CA	3032498	A1	2018年 2月 8日
CN	109689686	A	2019年 4月 26日	DK	3445787	T3	2021年 3月 1日
				JP	2019532625	A	2019年 11月 14日
				AU	2017341048	A1	2019年 5月 23日
				GB	2564823	A8	2019年 1月 30日
				GB	2564823	A	2019年 1月 23日
				US	2019177694	A1	2019年 6月 13日
				EP	3445787	B1	2020年 12月 2日
				TW	201827459	A	2018年 8月 1日
				BR	112019007100	A2	2019年 6月 25日
				CN	112280796	A	2021年 1月 29日
				US	2020362306	A1	2020年 11月 19日
				PT	3445787	T	2021年 3月 15日
				EP	3445787	A1	2019年 2月 27日
				KR	20190058509	A	2019年 5月 29日
				GB	201818962	D0	2019年 1月 9日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2021/099797

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)
				CA	3036745	A1	2018年 4月 12日
				US	2018230429	A1	2018年 8月 16日
				MX	2019003899	A	2019年 8月 14日
				WO	2018067993	A1	2018年 4月 12日
				IL	265766	D0	2019年 6月 30日
				CN	109689686	B	2020年 8月 25日
				US	10208285	B2	2019年 2月 19日
				GB	2564823	B	2020年 1月 29日
CN	110177803	A	2019年 8月 27日	CA	3044593	A1	2018年 5月 31日
				AU	2017363311	A1	2019年 6月 13日
				EP	3544996	A2	2019年 10月 2日
				WO	2018098365	A3	2018年 7月 12日
				WO	2018098365	A2	2018年 5月 31日
				US	2019276540	A1	2019年 9月 12日
				JP	2019536452	A	2019年 12月 19日