

(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
2020 年 6 月 18 日 (18.06.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/119048 A1

(51) 国际专利分类号:
C12N 5/10 (2006.01) *A61K 35/17* (2015.01)
C12N 15/867 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)

PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(21) 国际申请号: PCT/CN2019/090998

(22) 国际申请日: 2019 年 6 月 12 日 (12.06.2019)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201811527903.X 2018 年 12 月 13 日 (13.12.2018) CN

(71) 申请人: 苏州康聚生物科技有限公司 (SUZHOU
KANGJU BIOTECHNOLOGY CO., LTD) [CN/CN];
中国江苏省苏州市苏州工业园区星湖街218号生
物纳米园C13楼301A室, Jiangsu 215123 (CN)。

(72) 发明人: 王征(WANG, Zheng); 中国江苏省苏州市
苏州工业园区星湖街218号生物纳米园C13楼301A
室, Jiangsu 215123 (CN)。 徐云霞(XU, Yunxia);
中国江苏省苏州市苏州工业园区星湖街218号生
物纳米园C13楼301A室, Jiangsu 215123 (CN)。

(74) 代理人: 上海弼兴律师事务所 (SHANGHAI
BESHINING LAW OFFICE); 中国上海市小木桥路
681号外经大厦21楼, Shanghai 200032 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家
保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,
BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,
GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS,
JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK,
LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,
MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL,

(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:

- 关于申请人有权申请并被授予专利(细则
4.17(ii))
- 发明人资格(细则4.17(iv))

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括经修改的权利要求及声明(条约第19条
(1))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

(54) Title: IMMUNE CELL CONTAINING TUMOR ANTIGEN RECOGNITION RECEPTOR AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 一种包含肿瘤抗原识别受体的免疫细胞及其应用

(57) Abstract: An immune cell containing a tumor antigen recognition receptor and an application thereof. The immune cell containing the tumor antigen recognition receptor expresses hyaluronidase, and the hyaluronidase is: a) a full-length protein anchored to the immune cell; or b) a soluble protein secreted to the outside of the immune cell. An application of the immune cell in preparation of drugs for treating tumors. By means of the described immune cell containing the tumor antigen recognition receptor, the extracellular matrix structure of a microenvironment may be changed to normalize a tumor immune microenvironment, so that the immune cell may effectively approach and kill tumor cells. With the help of the soluble PH20 protein, the immune cell containing the tumor antigen recognition receptor may also improve a tumor microenvironment and effectively kill tumor cells.

(57) 摘要: 一种包含肿瘤抗原识别受体的免疫细胞及其应用, 所述包含肿瘤抗原识别受体的免疫细胞表达透
明质酸酶, 所述透明质酸酶为: a) 锚定于所述免疫细胞上的全长蛋白; 或b) 分泌至所述免疫细胞外的可溶性
蛋白。所述的免疫细胞在制备治疗肿瘤药物中的应用。所述包含肿瘤抗原识别受体的免疫细胞, 可以改变微
环境的细胞外基质结构正常化肿瘤免疫微环境的效果, 从而使得其可以有效接近并杀死肿瘤细胞。在可溶性
PH20蛋白的帮助下, 包含肿瘤抗原识别受体的免疫细胞也能改善肿瘤微环境, 有效杀死肿瘤细胞。

WO 2020/119048 A1

一种包含肿瘤抗原识别受体的免疫细胞及其应用

本申请要求申请日为 2018/12/13 的中国专利申请 201811527903X 的优先权。本申请引用上述中国专利申请的全文。

技术领域

本发明属于细胞免疫治疗领域，具体涉及一种包含肿瘤抗原识别受体的免疫细胞及其应用。

背景技术

癌症，又称恶性肿瘤，它是严重危害人类健康、导致现代人类死亡的第一大恶疾和顽症。据联合国统计数据显示，目前全球平均每 8 个死亡病例中就有 1 人死于癌症，这比艾滋病、结核病和疟疾导致的死亡人数还要高。而且每年全球还有 1000 多万人被确诊患上癌症（世界卫生组织发布的《2014 年世界癌症报告》）。

一直以来，肿瘤治疗的基础都是手术、化疗以及放疗。然而传统的治疗方式仅能延长恶性肿瘤患者的生存期，治愈的可能性很低，恶性肿瘤依然是“绝症”。在过去 20 年中，通过特异性识别肿瘤细胞表面特异性蛋白、从而杀死肿瘤细胞的靶向疗法比如西妥昔单抗（Erbix[®]）和曲妥珠单抗（Herceptin[®]）治疗方法，使得它们成为很多癌症的标准治疗方法，然而上述方法并不能够有效治疗实体瘤。但在过去几年中，免疫疗法，一种通过招募并加强病人的免疫系统以攻击肿瘤的方法，已经成为肿瘤治疗方法的第 5 大支柱。其中，最热门且目前最接近 FDA 获批的治疗方法为 CAR-T 细胞治疗方法。然而，直到最近，CAR-T 细胞疗法一直局限于小规模临床试验，并且大部分是用于晚期血液癌症的治疗，而除淋巴瘤以外的恶性实体肿瘤效果不佳。

CAR-T 细胞用于实体瘤治疗的最大障碍在于肿瘤免疫抑制微环境，是肿瘤发生发展过程中形成的内环境。恶性实体肿瘤主要由癌/瘤细胞和基质细胞（例如成纤维细胞和炎症细胞）细胞外基质及血管/淋巴管构成。与正常组织相比，肿瘤组织中的基质细胞、细胞外基质和血管/淋巴管系统一般是异常的，具有增加数目的成纤维细胞，并且血管系统呈现出高度分支或卷曲的结构。肿瘤和基质细胞产生并装配细胞外基质组分（胶原蛋白、蛋白聚糖、透明质酸）形成致密团块（Clin Oncol 31:2205-2218, 2013）。以上因素造成了肿瘤组织结构致密、营养缺乏、pH 偏低、缺氧，抑制了 CAR-T 细胞有效发挥肿瘤杀伤作用。

想要有效治疗肿瘤，CAR-T 细胞必须能够克服上述微环境，进入到肿瘤组织、在肿瘤组织中存活并对肿瘤细胞进行杀伤。

尽管可能已经产生了针对肿瘤微环境的 CAR-T 细胞，即表达透明质酸酶 PH20 的 CAR-T 细胞（专利 CN107400664A），但是这种细胞产生的技术手段存在问题，发挥杀伤作用的原理及技术效果未得到揭示。首先，在透明质酸酶的设计上，CN107400664A 认为：在自然状态下，透明质酸酶是以分泌蛋白质形式（即游离透明质酸酶）而不是以跨膜蛋白质的形式表达，这种分泌型透明质酸酶或者透明质酸酶跨膜融合蛋白质基因序列中的透明质酸酶编码序列可以是全部蛋白质编码序列，也可以是含有编码透明质酸酶活性的部分序列。但未公布制备分泌透明质酸酶 PH20 CAR-T 细胞的技术手段，且指出了与游离型扩散的透明质酸酶相比较，跨膜型透明质酸酶疗效更好。

其次，在具体实施例中公开的表达透明质酸酶跨膜融合蛋白的 CAR-T 细胞制备方法，即采用透明质酸酶 PH20 跨膜融合蛋白慢病毒感染 CAR-T 细胞，通过透明质酸酶抗体磁珠分离得到表达跨膜透明质酸酶的 CAR-T 细胞。该 PH20 跨膜融合蛋白的编码序列由 PH20-人 IgG4 铰链区-CD8 跨膜区-CD28 胞内区-4-1BB 胞内区-CD3 ζ 胞内序列依次组成。但其未公布该 CAR-T 细胞的透明质酸降解活性，CAR-T 细胞的肿瘤细胞杀伤活性，CAR-T 细胞的体内肿瘤抑制活性。本发明人通过实验发现，采用 CN107400664A 公开的表达透明质酸酶跨膜融合蛋白的制备方法很难获得具有透明质酸酶活性的 CAR 的阳性细胞；另一方面，采用两个慢病毒分别感染 T 细胞后，T 细胞状态差，CAR 阳性细胞几乎无法检测到透明质酸酶活性。

鉴于以上缺陷，现有技术中亟待需要一种有效的包含肿瘤抗原识别受体的免疫细胞。

发明内容

本发明所要解决的技术问题是为了克服目前现有技术当中无法得到具有透明质酸降解活性的 CAR-T 细胞、同时 CAR 的阳性率也很低或者含有透明质酸酶的 CAR-T 细胞难以分泌透明质酸酶，因而无法得到有效的包含肿瘤抗原识别受体的免疫细胞的缺陷，提供一种包含肿瘤抗原识别受体的免疫细胞及其应用。所述免疫细胞可以进入实体瘤内部杀死肿瘤细胞；在可溶型 PH20 蛋白的帮助下，包含肿瘤抗原识别受体的免疫细胞也能进入实体瘤内部，杀死肿瘤细胞。

本发明提供一种包含肿瘤抗原识别受体的免疫细胞，其表达透明质酸酶，所述透明质酸酶为：

- a) 锚定于所述免疫细胞上的全长蛋白；或

b) 分泌至所述免疫细胞外的可溶型蛋白。

透明质酸酶是降解透明质酸的酶家族。在人类中，存在编码具有不同性质和位置的透明质酸酶的 6 个基因，HYAL1、HYAL2、HYAL3、HYAL4、HYAL5（又被称为 SPAM1 或者 PH-20）、HYAL6（又被称为 HYALP1）。同工型 HYAL1 和 HYAL2 存在于大多数组织中。HYAL2 为 GPI 膜锚定蛋白，主要负责剪切高分子透明质酸，得到的小片段透明质酸被细胞内吞至内溶酶体（Endolysosome）后，被 HYAL1 进一步降解。在肿瘤组织中，透明质酸由透明质酸合成酶合成（HAS1、HAS2 以及 HAS3）。HYAL3 存在于骨髓和睾丸中，但是其功能还没有被良好地表征。透明质酸酶 PH20 在睾丸中高表达，并参与卵母细胞被精子受精的过程。

本发明中，所述的透明质酸酶较佳地为哺乳动物睾丸透明质酸酶；更佳地为人类睾丸透明质酸酶，也被称为 SPAM1（精子黏附分子 1）、HYAL1、HYAL2、或者 PH20。

编码所述 PH20 的基因产生两种转录变体，分别对应两种形式的酶序列：

一种形式为包含膜锚定序列的 PH20 序列，该所述 PH20 序列可以锚定在包含肿瘤抗原识别受体的免疫细胞的表面，即如上所述的透明质酸酶 a)。因此，获得了表达细胞膜锚定 PH20 的包含肿瘤抗原识别受体的免疫细胞；本发明中所述透明质酸酶的氨基酸序列较佳地如序列表中 SEQ ID NO. 1 所示，或者对该氨基酸序列进行过氨基酸修饰且保持其原有功能的透明质酸酶，如：与如 SEQ ID NO. 1 所示的氨基酸序列具有 80% 以上的序列同一性，例如具有 85%、90%、95%、98% 或 99% 的序列同一性，且保持透明质酸酶原有功能的氨基酸序列；编码该所述 PH20 的核苷酸序列较佳地如序列表中 SEQ ID NO. 2 或者 3 所示，或者与如 SEQ ID NO. 2 或者 3 所示的核苷酸序列具有 80% 以上的序列同一性，例如具有 85%、90%、95%、98% 或 99% 的序列同一性的核苷酸序列。

另一种形式为缺失了对应于羧基端膜结合结构域的序列，所述缺失后的序列的最后一位氨基酸通常位于全长序列的第 430~454 位，以产生可溶型 PH20，该羧基端结构域的缺失导致透明质酸酶分泌到细胞外介质。因此，获得了表达在中性及偏酸性 pH 条件下具有酶活性的分泌性透明质酸酶的包含 CAR 或者 TCR 的 T 细胞或者 NK 细胞，所述的 NK 细胞为 NK-92 细胞；该种形式的透明质酸酶的氨基酸序列为如序列表中 SEQ ID NO. 1 所示的氨基酸序列的第 1~447 位，或者为与如序列表中 SEQ ID NO. 1 所示的氨基酸序列的第 1~447 位的氨基酸序列具有 80% 以上的序列同一性，例如具有 85%、90%、95%、98% 或 99% 的序列同一性，且保持透明质酸酶原有功能的氨基酸序列；较佳地，其核苷酸序列为如序列表中 SEQ ID NO. 2 或者 SEQ ID NO. 3 所示的核苷酸序列的第 1~1341 位，或者与如序列表中 SEQ ID NO. 2 或者 SEQ ID NO. 3 所示的核苷酸序列的第 1~1341

位具有 80% 以上的序列同一性，例如具有 85%、90%、95%、98% 或 99% 的序列同一性的核苷酸序列。

所述的肿瘤抗原识别受体优选嵌合抗原受体 (CAR) 或者 T 细胞受体 (TCR)，其中：

所述的 TCR 包含，如 TCR 的 α 链、TCR 的 β 链、TCR 的 γ 链、TCR 的 δ 链或它们中的一种或多种的组合，所述 α 链包含可变区和恒定区，较佳地，所述可变区为人 TCR α 链的可变区，所述恒定区为鼠 α 链的恒定区，较佳地，所述 β 链包含可变区和恒定区，所述可变区为人 TCR β 链的可变区，所述恒定区为鼠 β 链的恒定区；其中，所述 TCR 的 α 链和所述 TCR 的 β 链之间可以通过接头序列连接，所述接头序列可以为 P2A、T2A、E2A、F2A 或者 IRES；更佳地为 E6 TCR。

所述的 CAR 包括胞内区、铰链区和跨膜区，所述胞内区、所述铰链区以及所述跨膜区均可为本领域常规，所述的 CAR 的胞内区优选包括人的 4-1BB 胞内区和/或人的 CD28 胞内区，以及人的 CD3 ζ 胞内区，更优选包括人的 4-1BB 胞内区、人的 CD28 胞内区，以及人的 CD3 ζ 胞内区。

所述的 CAR 的铰链区优选人的 CD8 α 铰链区、所述的跨膜区优选人的 CD8 α 跨膜区

所述抗原识别区、所述铰链区、所述跨膜区以及所述胞内区之间可以通过接头序列连接，所述接头序列包含 n 个前后重复的基序，所述基序为 GGGs、GGGGs、SSSSG、GSGSA 或者 GGSgG，所述 n 可为 1~5 的整数。

较佳地，所述肿瘤抗原识别受体的肿瘤抗原识别区识别的抗原可以为 EpCAM、Mesothelin、CEA、IL13、PDPN、VEGF、EGFR、EGFRvIII、PSMA、FAP、CD171、GD2、Glypican $\square$ 2、Glypican $\square$ 3、HER2、HPV 抗原、cyclin D1、p53、MMP-7、IL13R α 2、MMP-2、MUC-1、G250、L1CAM、ROR1、GPC3 或者 MSLN；较佳地为 ROR1、GPC3、MSLN 或者 EpCAM。其中，所述 Mesothelin、所述 IL13R、所述 Podoplanin (PDPN)、所述 EGFRvIII 以及所述 EGFR 在胶质母细胞瘤中均有过量表达；所述 EpCAM 在上皮细胞癌中有过量表达。

所述肿瘤抗原识别区为能够结合以上肿瘤抗原的区域例如抗体，目前常用的为 scFv (单链抗体)。

较佳地，识别所述 ROR1 的 scFv 的核苷酸序列如序列表中 SEQ ID NO. 4 所示，或者与序列表中 SEQ ID NO. 4 所示的核苷酸序列具有 80% 以上的序列同一性；

或者，识别所述 GPC3 的 scFv 的核苷酸序列如序列表中 SEQ ID NO. 5 所示，或者与序列表中 SEQ ID NO. 5 所示的核苷酸序列具有 80% 以上的序列同一性；

或者，识别所述 EpCAM 的 scFv 的核苷酸序列如序列表中 SEQ ID NO. 6 所示，或者

与序列表中 SEQ ID NO. 6 所示的核苷酸序列具有 80% 以上的序列同一性。

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、化学或生物学方法转移入宿主细胞。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；化学方法包括胶体分散系统，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；其中生物方法包括使用 DNA 和 RNA 载体。在一种实施方式中，所述的载体被递送（例如，通过转染或电穿孔）到细胞，例如，T 细胞或 NK 细胞，其中所述的载体包含编码如本发明中描述的透明质酸酶的核酸分子，该核酸分子被转录为 mRNA 分子，并且从所述的 RNA 分子翻译为所述的透明质酸酶并表达在所述细胞的表面上。

表达所述透明质酸酶的基因可以与表达上述免疫细胞中的肿瘤抗原识别受体的基因位于不同或者同一个载体上。在所述 CAR 与所述的透明质酸酶位于同一个表达载体上的情况下，所述的表达载体包括以下表达单元：信号肽+scFv+人 CD8 α 铰链区+人 CD8 α 跨膜区+人 4-1BB 胞内区+人 CD3 ζ 胞内区+连接元件+透明质酸酶，其中，所述信号肽位于 5' 端，所述透明质酸酶位于 3' 端；或者，所述 TCR 与所述的透明质酸酶位于同一个表达载体的情况下，所述的表达载体包括以下单元：E6 TCR+连接元件+透明质酸酶，其中，所述 E6 TCR 位于 5' 端，所述透明质酸酶位于 3' 端；

在所述 CAR 或者所述的 TCR 与所述的透明质酸酶分别位于不同的表达载体上的情况下，其中一个所述表达载体包括以下表达单元：信号肽+scFv+人 CD8 α 铰链区+人 CD8 α 跨膜区+人 4-1BB 胞内区+人 CD3 ζ 胞内区，或者包括以下表达单元：E6 TCR+IRES，另一个所述表达载体包括以下表达单元：透明质酸酶+连接元件+标签蛋白，其中，所述的透明质酸酶位于 5' 端，所述的标签蛋白位于 3' 端；

所述的连接元件优选 T2A 连接肽、P2A 连接肽、E2A 连接肽、F2A 连接肽或者 IRES 元件；

所述的标签蛋白优选 tEGFR。

较佳地表达所述透明质酸酶的基因位于上述免疫细胞中的肿瘤抗原识别受体表达载体上。本发明中所述的表达载体可为本领域内常规的、用于在哺乳动物中过表达外源基因的载体，其被用于目的基因的表达，所述表达载体对于复制和整合真核细胞为合适的。典型的克隆载体包含可用于调节目的基因表达的转录和翻译终止子、起始序列和启动子。较佳地为质粒、噬菌体、噬菌体衍生物、动物病毒或者粘粒；其中使用病毒载体已经成为

最广泛使用的将基因插入哺乳动物细胞（例如人类细胞）的方法。例如，逆转录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逆转录病毒颗粒。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。许多逆转录病毒系统在本领域中是已知的。当本发明所述表达载体选用动物病毒作为表达载体时，优选逆转录病毒、腺病毒、腺伴随病毒、疱疹病毒或者慢病毒，更优选逆转录病毒或者慢病毒。

不论表达所述的透明质酸酶的基因与表达所述的肿瘤抗原识别受体的基因位于同一个表达载体上或者不同的表达载体上，两者在包含肿瘤抗原识别受体的免疫细胞中的表达均可为本领域常规；为保证目的基因可以高效地表达，本发明所述的核苷酸序列可以通过多种方式被操作，例如：所述透明质酸酶或者肿瘤抗原识别受体的表达可以受到一个或者多个调控序列的调控。所述的调控序列可以是：（1）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，在选择的主细胞中有功能的任何终止子都可用于本发明；（2）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，在选择的主细胞中有功能的任何前导序列都可用于本发明；（3）合适的启动子序列，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。另一个例子为延伸生长因子-1 α (EF-1 α)。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，其能够在期望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，而在不期望表达时关闭表达。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。

本发明中的启动子较佳地为巨细胞病毒启动子、腺病毒主要晚期启动子、SV40 启动子、单纯性疱疹病毒胸苷激酶启动子、CMV 启动子、EF1 α 启动子、泛素 C 启动子、PGK 启动子、IRES 启动子、MMTV、HIV LTR 启动子、MoMuLV 启动子、ALV 启动子、EBV 启动子、RSV 启动子或者人类基因的启动子，所述人类基因启动子为肌凝蛋白启动子、血红蛋白启动子、肌酸激酶启动子、 β -肌动蛋白启动子、人类 IL-2 启动子、人类 IL-4 启

动子、IFN 启动子、E2F 启动子或者人类 GM-CSF 启动子；更优选 EF1 α 启动子。

上述免疫细胞可为本领域内常规的免疫细胞，例如 T 细胞或 NK 细胞或巨噬细胞；较佳地所述 T 细胞为 CD3 抗体刺激活化后的 T 细胞；更佳地，所述 T 细胞来源于肿瘤患者的外周血单个核细胞（PBMC）。

本发明还提供一种表达构建物，其包括肿瘤抗原识别受体的表达盒 1 和透明质酸酶的表达盒 2；

较佳地，所述的表达盒 1 和所述的表达盒 2 之间通过连接元件顺序连接，所述的连接元件优选 T2A 连接肽、P2A 连接肽、E2A 连接肽、F2A 连接肽或者 IRES 元件；

更佳地，所述的肿瘤抗原识别受体为嵌合抗原受体（CAR）或者 T 细胞受体（TCR）；和/或，所述的透明质酸酶为透明质酸酶全长蛋白或透明质酸酶可溶性蛋白。

其中，当所述的肿瘤抗原识别受体为嵌合抗原受体（CAR）时，所述的表达盒 1 包括以下表达单元：信号肽+scFv+人 CD8 α 铰链区+人 CD8 α 跨膜区+人 4-1BB 胞内区+人 CD3 ζ 胞内区，或者当所述的肿瘤抗原识别受体为 TCR 时，所述的表达盒 1 包括以下表达单元：E6 TCR；

较佳地，所述的 scFv 为识别 ROR1、GPC3 或者 EpCAM 的 scFv；所述识别 ROR1 的 scFv 的核苷酸序列优选如序列表中 SEQ ID NO. 4 所示，或者与序列表中 SEQ ID NO. 4 所示的核苷酸序列具有 80%以上的序列同一性；所述识别 GPC3 的 scFv 的核苷酸序列优选如序列表中 SEQ ID NO. 5 所示，或者与序列表中 SEQ ID NO. 5 所示的核苷酸序列具有 80%以上的序列同一性；所述识别 EpCAM 的 scFv 的核苷酸序列优选如序列表中 SEQ ID NO. 6 所示，或者与序列表中 SEQ ID NO. 6 所示的核苷酸序列具有 80%以上的序列同一性

和/或，所述的信号肽的氨基酸序列如序列表中 SEQ ID NO. 7 所示，或者与序列表中 SEQ ID NO. 7 所示的氨基酸序列具有 80%以上的序列同一性；

和/或，所述的人 CD8 α 铰链区的氨基酸序列如序列表中 SEQ ID NO. 11 所示，或者与序列表中 SEQ ID NO. 11 所示的氨基酸序列具有 80%以上的序列同一性；

和/或，所述的人 CD8 α 跨膜区的氨基酸序列如序列表中 SEQ ID NO. 12 所示，或者与序列表中 SEQ ID NO. 12 所示的氨基酸序列具有 80%以上的序列同一性；

和/或，所述的人 4-1BB 胞内区的氨基酸序列如序列表中 SEQ ID NO. 13 所示，或者与序列表中 SEQ ID NO. 13 所示的氨基酸序列具有 80%以上的序列同一性；

和/或，所述的人 CD3 ζ 胞内区的氨基酸序列如序列表中 SEQ ID NO. 14 所示，或者与序列表中 SEQ ID NO. 14 所示的氨基酸序列具有 80%以上的序列同一性；

和/或，所述的 E6 TCR 的氨基酸序列如序列表中 SEQ ID NO. 18 所示，或者与序列表中 SEQ ID NO. 18 所示的氨基酸序列具有 80% 以上的序列同一性。

所述的表达盒 2 表达哺乳动物睾丸透明质酸酶，较佳地为人透明质酸酶 HYAL1、HYAL2、SPAM1 或者 PH20；更佳地：所述的透明质酸酶全长蛋白的氨基酸序列如序列表中 SEQ ID NO. 1 所示，或者与如 SEQ ID NO. 1 所示的氨基酸序列具有 80% 以上的序列同一性，例如具有 85%、90%、95%、98% 或 99% 的序列同一性，且保持透明质酸酶原有功能的氨基酸序列；编码所述的透明质酸酶全长蛋白的核苷酸序列优选如序列表中 SEQ ID NO. 2 或 3 所示，或者为与如 SEQ ID NO. 2 或者 3 所示的核苷酸序列具有 80% 以上的序列同一性，例如具有 85%、90%、95%、98% 或 99% 的序列同一性的核苷酸序列；或者所述的透明质酸酶可溶性蛋白的氨基酸序列如序列表中 SEQ ID NO. 1 所示的氨基酸序列的第 1~447 位所示，或者为与如序列表中 SEQ ID NO. 1 所示的氨基酸序列的第 1~447 位的氨基酸序列具有 80% 以上的序列同一性，例如具有 85%、90%、95%、98% 或 99% 的序列同一性，且保持透明质酸酶原有功能的氨基酸序列，编码所述的透明质酸酶可溶性蛋白的核苷酸序列如序列表中 SEQ ID NO. 2 或者 SEQ ID NO. 3 所示的核苷酸序列的第 1~1341 位所示，或者与如序列表中 SEQ ID NO. 2 或者 SEQ ID NO. 3 所示的核苷酸序列的第 1~1341 位具有 80% 以上的序列同一性，例如具有 85%、90%、95%、98% 或 99% 的序列同一性的核苷酸序列。

本发明还提供一种表达载体，其包含如上所述的表达构建物。

较佳地，所述的表达载体还含有启动子；所述的启动子优选 EF1 α 启动子。

本发明还提供一种病毒，其包含如上所述的表达载体；较佳地，所述的病毒为慢病毒。

本发明还提供一种药物组合物，其包含如上所述的免疫细胞；

较佳地，所述的药物组合物还包含药学上可接受的载体或赋形剂。

本发明还提供一种药物组合物，其活性成分包括透明质酸酶和包含肿瘤抗原识别受体的免疫细胞；较佳地：

所述的透明质酸酶在所述的药物组合物中的浓度为 0.1 μ g/ml-15mg/ml，和/或，所述的透明质酸酶的比活性 $\geq$ 10,000 单位/mg。

本发明还包括一种药盒，其包括药盒 A 和药盒 B，所述的药盒 A 包括包含肿瘤抗原识别受体的免疫细胞；所述的药盒 B 包括透明质酸酶；

较佳地，所述的药盒 A 和所述的药盒 B 的施用不分先后。

对于如上所述的药物组合物或者如上所述的药盒中的所述肿瘤抗原识别受体、所述

透明质酸酶等的限定亦如上所述。

本发明还提供一种上述免疫细胞、上述药物组合物或者上述药盒在制备治疗肿瘤药物中的应用；所述肿瘤较佳地为实体肿瘤。

所述实体肿瘤为本领域内常规的实体肿瘤，优选表达透明质酸的实体肿瘤，例如乳腺癌、胃癌、黑色素瘤、胰腺癌、肝癌、胶质母细胞瘤或者肺癌。

在符合本领域常识的基础上，上述各优选条件，可任意组合，即得本发明各较佳实例。

本发明所用试剂和原料均市售可得。

本发明的积极进步效果在于：本发明的包含肿瘤抗原识别受体的免疫细胞，可以改变微环境的细胞外基质结构正常化肿瘤免疫微环境的效果，从而使得其可以有效接近并杀死肿瘤细胞。在可溶性 PH20 蛋白的帮助下，包含肿瘤抗原识别受体的免疫细胞也能改善肿瘤微环境，有效杀死肿瘤细胞。

附图说明

图 1 为 pPWT 质粒。

图 2 为胰腺癌 PDX 选定样本免疫组化图；a. HE 染色；b. MSLN 染色；c. HA 染色；d. 经 PH20 处理后进行 HA 染色；图中比例尺为 100 μ m。

图 3 为胃癌 PDX 选定样本免疫组化图；a. HE 染色；b. EpCAM 染色；c. HA 染色；d. 经 PH20 处理后进行 HA 染色；图中比例尺为 100 μ m。

图 4 为表达 PH20 的免疫细胞对人胰腺癌 PDX 模型小鼠移植瘤的抑制作用。

图 5 为表达 PH20 的免疫细胞对人胃癌 PDX 模型小鼠移植瘤的抑制作用。

具体实施方式

下面通过实施例的方式进一步说明本发明，但并不因此将本发明限制在所述的实施例范围之中。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，按照常规方法和条件，或按照商品说明书选择。

除非专门定义，本发明所用的所有技术和科学术语具有在基因治疗，生物化学、遗传学和分子生物学领域内的技术人员通常理解的含义。类似或等效于本发明中描述的所有方法和材料都可以在本发明所述的实践或测试中使用。这些技术如方法和材料充分记载于文献中，参见，例如，除非另有说明，本发明的实践将采用细胞生物学、细胞培养、分子生物学、转基因生物学、微生物学、重组 DNA 和免疫学的传统技术，这都属于本领域

域的技术范围 Current Protocols in Molecular Biology (Frederick M. Ausubel, 2000, Wiley and son Inc, Library of Congress, USA); Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition, (Sambrook et al, 2001, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gaited., 1984); Mullis et al. U.S. Pat. No. 4,683,195; Nucleic Acid Hybridization (B. D. Harries & S. J. Higgins eds. 1984); Transcription And Translation (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Culture Of Animal Cells (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); the series, Methods In ENZYMOLOGY (J. Abelson 和 M. Simon, eds.-in-chief, Academic Press, Inc., New York), 尤其是 Vols.154 和 155 (Wu et al. eds.) 和 Vol.185, "Gene Expression Technology" (D. Goeddel, ed.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller 和 M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer 和 Walker, eds., Academic Press, London, 1987); Hand book Of Experimental Immunology, 卷 I-IV (D. M. Weir 和 C. C. Blackwell, eds., 1986); 和 Manipulating the Mouse Embryo (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986)。

本发明提及的所有出版物、专利申请、专利和其他参考文献都以其全部内容结合于本发明中作为参考。在冲突的情况下，以本说明书为准。此外，除非另有规定，本说明书中所列举的材料、方法和实施例仅是说明性的，而并非旨在进行限制。

术语“免疫细胞”，是指参与免疫应答，产生免疫效应的细胞，如 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。在一些实施方案中，所述的免疫效应细胞为 T 细胞、NK 细胞、NKT 细胞。在一些实施方案中，所述 T 细胞可以是自体 T 细胞、异种 T 细胞、同种异体 T 细胞。在一些实施方案中，所述的 NK 细胞可以是同种异体 NK 细胞。

术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”可互换地使用，并且是指由肽键共价连接的氨基酸残基组成的化合物。蛋白质或肽必须含有至少两个氨基酸，并且对于可以包括蛋白质或肽的序列的氨基酸的最大数量没有限制。多肽包括含有彼此通过肽键结合的两个或多个氨基酸的任何肽或蛋白质。正如本发明中使用的那样，该术语是指短链(其在本领域通常也称为例如肽、寡肽和寡聚物)以及较长链(其在本领域通常也称为蛋白质，其存在多种类型)。

“多肽”包括例如生物学活性片段、基本上同源的多肽、寡肽、同型二聚体、异二聚体、多肽的变体、修饰的多肽、衍生物、类似物、融合蛋白等。多肽包括天然肽、重组肽或其组合。

术语“氨基酸修饰”包括氨基酸取代、添加和/或缺失，“氨基酸取代”意指用另一种氨基酸替换亲本多肽序列中特定位置上的氨基酸。本发明中使用的“氨基酸插入”意指在亲本多肽序列中的特定位置添加氨基酸。本发明中使用的“氨基酸缺失”或“缺失”意指去除亲本多肽序列中特定位置上的氨基酸。本发明中使用的术语“保守修饰”意指不显着影响或改变含有所述氨基酸序列的抗体的结合特征的氨基酸修饰。此类保守修饰包括氨基酸取代、插入和缺失。可通过本领域已知的标准技术将修饰导入本发明的抗体中，例如定点诱变和 PCR 介导的诱变。保守的氨基酸取代是用具有相似侧链的氨基酸残基替换氨基酸残基的取代。本领域已经定义了具有相似侧链的氨基酸残基家族。这些家族包括含碱性侧链的氨基酸(例如，赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如，天冬氨酸、谷氨酸)、不带电的急性侧链(例如，甘氨酸、天冬酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸)、非极性侧链(例如，丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸)、 β 分支侧链(例如，苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳香族侧链(例如，酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。

本发明使用的术语“启动子”为由启动多核苷酸序列的特异性转录所需的细胞的合成机制或引入的合成机制识别的 DNA 序列。

典型的真核生物启动子由最小启动子和其他顺式元件组成。最小启动子实质上是一个 TATA 框区，RNA 聚合酶 II (polII)、TATA 结合蛋白 (TBP) 和 TBP 相关因子(TAF)可在此结合而启动转录。已发现这类序列元件(例如增强子)提高临近的基因的总表达水平，且往往是以不依赖位置和/或取向的方式。

在一些实施方案中，本发明所述的肿瘤抗原识别受体是指嵌合受体，是指用基因重组技术将不同来源的 DNA 片段或蛋白质相应的 cDNA 连接而成的融合分子。嵌合受体通常包括胞外域、跨膜域和胞内域。可用于本发明的嵌合受体包括但不限于：嵌合抗原受体(CAR)、修饰的 T 细胞(抗原)受体(TCR)、T 细胞融合蛋白(TFP)、T 细胞抗原耦合器(TAC)。

本文所用的“嵌合抗原受体”或“CAR”是指一组多肽，当其在免疫效应细胞中时，给所述的细胞提供针对靶细胞(通常是癌细胞)的特异性，并且具有细胞内信号产生。CAR 通常包括至少一个细胞外抗原结合结构域(也称为胞外区)、跨膜结构域(也称为跨膜区)和细胞质信号传导结构域(本文中也称为“胞内信号传导结构域”或“胞内区”)，其包括来源于如下定义的刺激分子和/或共刺激分子的功能信号传导结构域。在某些方面，多肽组彼此邻接。多肽组包括在存在二聚化分子时可以使多肽彼此偶联的二聚化开关，例如，可以使抗原结合结构域偶联至胞内信号传导结构域。在一个方面，刺激性分子为

与 T 细胞受体复合体结合的 ζ 链。在一个方面，细胞质信号传导结构域进一步包括一种或多种来源于至少一个如下定义的共刺激性分子的功能性信号传导结构域。在一个方面，共刺激性分子选自本文所述共刺激性分子，例如 4-1BB(即，CD137)、CD27 和/或 CD28。在一个方面，CAR 包括嵌合融合蛋白，该融合蛋白包含细胞外抗原结合结构域、跨膜结构域和包含来源于刺激性分子的功能性信号传导结构域的胞内信号传导结构域。在一个方面，CAR 包含嵌合融合蛋白，该融合蛋白包含细胞外抗原结合结构域、跨膜结构域和包含来源于共刺激性分子的功能性信号传导结构域和来源于刺激性分子的功能性信号传导结构域的胞内信号传导结构域。在一个方面中，CAR 包含嵌合融合蛋白，该融合蛋白包含细胞外抗原结合结构域、跨膜结构域和包含来源于一个或更多个共刺激性分子的两个功能性信号传导。

在一个方面，本发明设想产生功能等同分子的起始抗体或片段(例如 scFv)氨基酸序列的修饰。例如，本文所述的癌症相关抗原的抗原结合结构域的 VH 或 VL，例如 CAR 中包含的 scFv，可以被修饰以保留本文所述的癌症相关抗原的抗原结合结构域的起始 VH 或 VL 构架区(例如 scFv)的至少约 70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性。本发明设想整个 CAR 构建体的修饰，例如 CAR 构建体的多个结构域的一个或更多个氨基酸序列的修饰，以产生功能等同分子。CAR 构建体可以被修饰以保留起始 CAR 构建体的至少约 70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性。

术语“刺激性分子”是指由免疫细胞(例如，T 细胞、NK 细胞、B 细胞)表达的提供细胞质信号传导序列的分子，该信号传导序列以刺激性方式调节用于免疫细胞信号传导途径的至少一些方面的免疫细胞的活化。在一个方面，信号是通过例如 TCR/CD3 复合体与负载有肽的 MHC 分子的结合启动的初级信号，并且其导致介导 T 细胞应答，包括，但不限于增殖、活化、分化等。以刺激方式起作用的一级细胞质信号传导序列(也称为“一级信号传导结构域”)可以含有被称为基于免疫受体酪氨酸的活化基序(Immunoreceptor tyrosine-based activation motif, ITAM)的信号传导基序。特别地用于本发明的含有 ITAM 的细胞质信号传导序列的实例包括，但不限于来源于下述的那些：CD3 ζ 、常见的 FcR γ (FCER1G)、Fc γ RIIa、FcR β (FcEpsilon R1b)、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD79a、CD79b、DAP10 和 DAP12。在本发明的特异性 CAR 中，在本发明的任一个或更多个 CAR 中的胞内信号传导结构域包括细胞内信号传导序列，例如 CD3- ζ 的初级信号传导序列。在本发明的特异性

CAR中, CD3- ζ 的初级信号传导序列是来自人或非人类种类例如小鼠、啮齿类动物、猴、猿等的等同残基。

术语“共刺激性分子”是指T细胞上的同源结合配偶体, 其特异性地结合共刺激配体, 从而介导T细胞的共刺激反应, 比如但不限于增殖。共刺激性分子为除了抗原受体或其配体之外的细胞表面分子, 其促进有效的免疫应答。共刺激性分子包括但不限于MHC I类分子, BTLA和Toll配体受体, 以及OX40、CD27、CD28、CDS、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)、ICOS (CD278)和4-1BB (CD137)。这样的共刺激性分子的进一步实例包括CDS、ICAM-1、GITR、BAFFR、HVEM (LIGHTR)、SLAMF7、NKp80 (KLRF1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD160、CD19、CD4、CD8 α 、CD8 β 、IL2R β 、IL2R γ 、IL7R α 、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、NKG2C、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1 (CD226)、SLAMF4 (CD244、2B4)、CD84、CD96 (Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9 (CD229)、CD160 (BY55)、PSGL1、CD100 (SEMA4D)、CD69、SLAMF6 (NTB-A、Ly108)、SLAM (SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME (SLAMF8)、SELPLG (CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19a以及特异性地结合CD83的配体。

共刺激性胞内信号传导结构域可以为共刺激性分子的细胞内部分。共刺激性分子可以以下述蛋白质家族代表: TNF受体蛋白、免疫球蛋白样蛋白质、细胞因子受体、整联蛋白、信号传导淋巴细胞性活化分子 (SLAM蛋白质)、和NK细胞受体。这样的分子的实例包括CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX40、GITR、CD30、CD40、ICOS、BAFFR、HVEM、ICAM-1、与淋巴细胞功能相关的抗原-1 (LFA-1)、CD2、CDS、CD7、CD287、LIGHT、NKG2C、NKG2D、SLAMF7、NKp80、NKp30、NKp44、NKp46、CD160、B7-H3以及特异性地结合CD83的配体等。

胞内信号传导结构域可以包括分子的全部细胞内部分或全部天然胞内信号传导结构域、或其功能片段或衍生物。

术语“4-1BB”是指具有如GenBank Accession No.AAA62478.2提供的氨基酸序列的TNFR超家族的成员, 或来自非人类物种例如小鼠、啮齿类动物、猴子、猿等的等同残基; 并且“4-1BB共刺激结构域”被定义为GenBank Accession No.AAA62478.2的氨基酸残基214~255, 或来自非人类物种例如小鼠、啮齿类动物、猴子、猿等的等同残基。在一个方面, “4-1BB共刺激结构域”为来自人或者来自非人类物种例如小鼠、啮齿类动物、猴子、猿等的等同残基。

术语“T细胞(抗原)受体(T cell receptor, TCR)”，为所有T细胞表面的特征性标志，以非共价键与CD3结合，形成TCR-CD3复合物。TCR负责识别与主要组织相容性复合体分子结合的抗原。TCR是由两条不同肽链构成的异二聚体，由 α 、 β 两条肽链组成，每条肽链又可分为可变区(V区)，恒定区(C区)，跨膜区和胞质区等几部分；其特点是胞质区很短。TCR分子属于免疫球蛋白超家族，其抗原特异性存在于V区；V区(V α 、V β)又各有三个高变区CDR1、CDR2、CDR3，其中以CDR3变异最大，直接决定了TCR的抗原结合特异性。在TCR识别MHC-抗原肽复合物时，CDR1，CDR2识别和结合MHC分子抗原结合槽的侧壁，而CDR3直接与抗原肽相结合。TCR分为两类：TCR1和TCR2；TCR1由 γ 和 δ 两条链组成，TCR2由 α 和 β 两条链组成。

术语“T细胞融合蛋白 (T cell fusion protein, TFP)”，包括构成TCR的各种多肽衍生的重组多肽，其能够结合到靶细胞上的表面抗原，和与完整的TCR复合物的其他多肽相互作用，通常同定位在T细胞表面。TFP由一个TCR亚基与人或人源化抗体结构域组成的一个抗原结合结构域组成，其中，TCR亚基包括至少部分TCR胞外结构域、跨膜结构域、TCR胞内结构域的胞内信号结构域的刺激结构域；该TCR亚基和该抗体结构域有效连接，其中，TCR亚基的胞外、跨膜、胞内信号结构域来源于CD3 ϵ 或CD3 γ ，并且，该TFP整合进T细胞上表达的TCR。

术语“T细胞抗原耦合器 (T cell antigen coupler, TAC)”，包括三个功能结构域：1、肿瘤靶向结构域，包括单链抗体、设计的锚蛋白重复蛋白 (designed ankyrin repeat protein, DARPIn)或其他靶向基团；2、胞外区结构域，与CD3结合的单链抗体，从而使得TAC受体与TCR受体靠近；3、跨膜区和CD4共受体的胞内区，其中，胞内区连接蛋白激酶LCK，催化TCR复合物的免疫受体酪氨酸活化基序(ITAMs)磷酸化作为T细胞活化的初始步骤。

术语“抗体”是指源于特异性地结合抗原的免疫球蛋白分子的蛋白质或多肽序列。抗体可以为多克隆的或单克隆的、多链或单链、或完整的免疫球蛋白，并且可以来源于天然来源或重组来源。抗体可以为免疫球蛋白分子的四聚体。

术语“scFv”是指包含至少一个包括轻链的可变区抗体片段和至少一个包括重链的可变区的抗体片段的融合蛋白，其中所述轻链和重链可变区是邻接的 (例如经由合成接头例如短的柔性多肽接头)，并且能够以单链多肽形式表达，且其中所述scFv保留其所来源的完整抗体的特异性。除非指定，否则如正如本文中使用的的那样，scFv可以以任何顺序 (例如相对于多肽的N-末端和C末端)具有所述的VL和VH可变区，scFv可以包括VL-接头-VH或可以包括VH-接头-VL。

术语“重链”是指以其天然存在的构型存在于抗体分子中且通常决定抗体所属类

型的两种多肽链中较大者。

术语“轻链”是指以其天然存在构型存在于抗体分子中的两种多肽链的较小者。 $\kappa(k)$ 和 $\lambda(l)$ 轻链是指两种主要的抗体轻链的同种型。

术语“抗原”是指引起免疫应答的分子。该免疫应答可以涉及抗体产生或有特异性免疫能力的细胞的活化或两者。本领域技术人员应当理解包括实际上所有蛋白质或肽的任何大分子都可以充当抗原。此外，抗原可以来源于重组或基因组DNA。当在本文中使用该术语时，本领域技术人员应当理解包括编码引起免疫应答的蛋白质的核苷酸序列或部分核苷酸序列的任何DNA，所编码的蛋白质或肽。此外，本领域技术人员应当理解抗原无需仅通过基因的全长核苷酸序列编码。显而易见的是，本发明包括但不限于使用超过一个基因的部分核苷酸序列，并且这些核苷酸序列以不同组合排列以编码引发期望免疫应答的多肽。而且，本领域技术人员应当理解抗原根本无需由“基因”编码。显而易见的是，抗原可以合成产生，或者可以来源于生物样品，或者可以是除了多肽之外的大分子。这样的生物样品可以包括，但不限于组织样品、肿瘤样品、具有其它生物组分的细胞或液体。

“肿瘤抗原”指的是过度增生性疾病发生、发展过程中新出现的或过度表达的抗原。在某些方面，本发明的过度增生性病症是指癌症。

本发明所述的肿瘤抗原可以是实体瘤抗原，也可以是血液瘤抗原。

本发明的肿瘤抗原包括但不限于：促甲状腺激素受体 (TSHR)；CD171；CS-1；C型凝集素样分子-1；神经节苷脂GD3；Tn抗原；CD19；CD20；CD 22；CD 30；CD 70；CD 123；CD 138；CD33；CD44；CD44v7/8；CD38；CD44v6；B7H3 (CD276)，B7H6；KIT (CD117)；白介素13受体亚单位 α (IL-13R α)；白介素11受体 α (IL-11R α)；前列腺干细胞抗原 (PSCA)；前列腺特异性膜抗原(PSMA)；癌胚抗原 (CEA)；NY-ESO-1；HIV-1 Gag；MART-1；gp100；酪氨酸酶；间皮素；EpCAM；蛋白酶丝氨酸21 (PRSS21)；血管内皮生长因子受体，血管内皮生长因子受体2 (VEGFR2)；路易斯(Y)抗原；CD24；血小板衍生生长因子受体 β (PDGFR- β)；阶段特异性胚胎抗原-4 (SSEA-4)；细胞表面相关的粘蛋白1 (MUC1)，MUC6；表皮生长因子受体家族及其突变体 (EGFR，EGFR2，ERBB3，ERBB4，EGFRvIII)；神经细胞粘附分子 (NCAM)；碳酸酐酶IX (CAIX)；LMP2；肝配蛋白A型受体2 (EphA2)；岩藻糖基GM1；唾液酸基路易斯粘附分子 (sLe)；神经节苷脂GM3；TGS5；高分子量黑素瘤相关抗原 (HMWMAA)；邻乙酰基GD2神经节苷脂 (OAcGD2)；叶酸受体；肿瘤血管内皮标记1 (TEM1/CD248)；肿瘤血管内皮标记7相关的 (TEM7R)；Claudin 6，Claudin18.2、Claudin18.1；ASGPR1；CDH16；5T4；8H9； $\alpha\beta$ 6整合素；B细胞成熟

抗原(BCMA); CA9; κ 轻链(kappa light chain); CSPG4; EGP2, EGP40; FAP; FAR; FBP; 胚胎型AChR; HLA-A1, HLA-A2; MAGEA1, MAGE3; KDR; MCSP; NKG2D配体; PSC1; ROR1; Sp17; SURVIVIN; TAG72; TEM1; 纤连蛋白; 腱生蛋白; 肿瘤坏死区的癌胚变体; G蛋白偶联受体C类5组-成员D (GPC5D); X染色体开放阅读框61 (CXORF61); CD97; CD179a; 间变性淋巴瘤激酶 (ALK); 聚唾液酸; 胎盘特异性1 (PLAC1); globoH glycosphingolipid的己糖部分 (GloboH); 乳腺分化抗原 (NY-BR-1); uroplakin 2 (UPK2); 甲型肝炎病毒细胞受体1 (HAVCR1); 肾上腺素受体 β 3 (ADRB3); pannexin 3 (PANX3); G蛋白偶联受体20 (GPR20); 淋巴细胞抗原6复合物基因座K9 (LY6K); 嗅觉受体51E2 (OR51E2); TCR γ 交替阅读框蛋白 (TARP); 肾母细胞瘤蛋白 (WT1); ETS 易位变异基因6 (ETV6-AML); 精子蛋白17 (SPA17); X抗原家族成员1A (XAGE1); 血管生成素结合细胞表面受体2 (Tie2); 黑素瘤癌睾丸抗原-1 (MAD-CT-1); 黑素瘤癌睾丸抗原-2 (MAD-CT-2); Fos相关抗原1; p53突变体; 人端粒酶逆转录酶 (hTERT); 肉瘤易位断点; 细胞凋亡的黑素瘤抑制剂 (ML-IAP); ERG(跨膜蛋白酶丝氨酸2 (TMPRSS2)ETS融合基因); N-乙酰葡萄糖胺基转移酶V (NA17); 配对盒蛋白Pax-3 (PAX3); 雄激素受体; 细胞周期蛋白B1; V-myc鸟髓细胞瘤病毒癌基因神经母细胞瘤衍生的同源物 (MYCN); Ras同源物家族成员C (RhoC); 细胞色素P450 1B1 (CYP1B1); CCCTC结合因子(锌指蛋白)样 (BORIS); 由T细胞识别的鳞状细胞癌抗原3 (SART3); 配对盒蛋白Pax-5 (PAX5); proacrosin结合蛋白sp32 (OYTES1); 淋巴细胞特异性蛋白酪氨酸激酶 (LCK); A激酶锚定蛋白4 (AKAP-4); 滑膜肉瘤X断点2 (SSX2); CD79a; CD79b; CD72; 白细胞相关免疫球蛋白样受体1 (LAIR1); IgA受体的Fc片段 (FCAR); 白细胞免疫球蛋白样受体亚家族成员2 (LILRA2); CD300分子样家族成员f (CD300LF); C型凝集素结构域家族12成员A (CLEC12A); 骨髓基质细胞抗原2 (BST2); 含有EGF样模块粘蛋白样激素受体样2 (EMR2); 淋巴细胞抗原75 (LY75); 磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 (GPC3); Fc受体样5 (FCRL5); 免疫球蛋白 λ 样多肽1 (IGLL1)。

术语“肿瘤”指在体外(例如经转化的细胞)或体内的过度增殖性细胞生长的广泛病症类别。可以通过本发明的方法治疗或预防的病况包括例如各种赘生物, 包括良性或恶性肿瘤, 各种增生等等。癌症的具体例子包括但不限于: 乳腺癌, 前列腺癌, 白血病, 淋巴瘤, 鼻咽癌, 脑胶质瘤, 结肠癌, 直肠癌, 肾细胞癌, 肝癌, 非小细胞肺癌, 小肠癌, 食道癌, 黑色素瘤, 骨癌, 胰腺癌, 皮肤癌, 头颈癌, 子宫癌, 卵巢癌, 胃癌, 睾丸癌, 输卵管癌, 子宫内膜癌, 宫颈癌, 阴道癌, 甲状腺癌, 甲状旁腺癌, 肾上腺癌, 软组织肉瘤, 尿道癌, 阴茎癌, 膀胱癌, 输尿管癌, 肾盂癌, 中枢神经系统(CNS)瘤, 血管瘤, 脊椎肿瘤, 胶质瘤, 星形细胞瘤, 垂体腺瘤所述癌症的组合和所述癌症的转移性病灶。

术语“转染的”或“转化的”是指外源性核酸通过其转移或引入到宿主细胞中的过程。“转染的”或“转化的”细胞是已经用外源性核酸转染或转化细胞。所述细胞包括原发性受试者细胞及其后代。

实施例 1. CAR/TCR 序列的设计

本发明涉及的蛋白包括 PH20、CD8 α 铰链区、人的 CD8 α 跨膜区、人的 4-1BB 胞内区和人的 CD3 ζ 胞内区、MSLN、HAS2（透明质酸酶合成基因）以及靶向各靶点的 scFv 序列、TCR 序列。其中 PH20 氨基酸序列的 NCBI 收录号为 NP_694859.1（cDNA 为 NM_153189.2）；HAS2 的 NCBI 收录号为 NP_005319.1（cDNA 为 NM_005328.3）；MSLN 的 NCBI 收录号为 NP_037536.2（cDNA 为 NM_013404.4）；tEGFR 为 EGFR 的第 III 和 IV 结构域，EGFR 的 NCBI 收录号为 NP_005219.2（cDNA 为 NM_005228.4）。MSLN scFv（SS1）的氨基酸序列及编码碱基序列来源于专利 US7977457（SEQ ID NO. 12）；GPC3 scFv 的氨基酸序列来源于专利 CN104140974A（SEQ ID NO. 22），碱基序列为针对人进行密码子优化得到；ROR1 scFv 的氨基酸序列及编码碱基序列来源于专利 US20170283497A1（SEQ ID NO. 93），碱基序列为针对人进行密码子优化得到；EpCAM scFv（MOC31）的氨基酸序列来源于专利 US7858088（SEQ ID NO. 2），碱基序列为针对人进行密码子优化得到；HER2 scFv（FRP5）的氨基酸序列及编码碱基序列来源于专利 US7887801（SEQ ID NO. 2）；E6 TCR 的氨基酸序列及编码碱基序列来源于专利 CN105452288A（SEQ ID NO. 30）。

用于本发明各种细胞制备涉及蛋白的氨基酸序列信息如表 1 所示，相关表达区域的结构如表 2 所示，编码氨基酸的碱基序列如表 3 所示。

表 1. 氨基酸序列表

名称	氨基酸序列
全长 PH20 (mPH20, 野生型)	MGVLKFKHIFFRSEVKSSGVSQIVFTFLIPCCCLTLNFRAPPVIPNPFLWAWNAPSEFCLGKFDEP LDMSLFSFIGSPRINATGQVTFIFYVDRLGYPYIDSITGVTVNGGIPQKISLQDHLDAKAKDITFY MPVDNLGMAVIDWEEWRPTWARNWPKDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLV ETIKLGKLLRPNHLWGYYLFPDCYNHHYKPGYNGSCFNVEIKRNDLWSLWNESTALYPSIYLNTQ QSPVAATLYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPVPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVALGASG IVIWGTLSIMRSMKSCLLLDNYMETILNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQQVCIRKNWNSSDYHLNLP DNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDLEQFSEKFCYSCYSTLSCKEKADVKTDAVDVCIADGVCIDAFV KPPMETEEPQIFYNASPSTLSATMFIVSILFLIISVASL（下划线没有标注的序列为 SEQ ID NO. 1）
可溶型 PH20 (sPH20, 野生型)	MGVLKFKHIFFRSEVKSSGVSQIVFTFLIPCCCLTLNFRAPPVIPNPFLWAWNAPSEFCLGKFDEP LDMSLFSFIGSPRINATGQVTFIFYVDRLGYPYIDSITGVTVNGGIPQKISLQDHLDAKAKDITFY MPVDNLGMAVIDWEEWRPTWARNWPKDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLV ETIKLGKLLRPNHLWGYYLFPDCYNHHYKPGYNGSCFNVEIKRNDLWSLWNESTALYPSIYLNTQ QSPVAATLYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPVPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVALGASG IVIWGTLSIMRSMKSCLLLDNYMETILNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQQVCIRKNWNSSDYHLNLP DNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDLEQFSEKFCYSCYSTLSCKEKADVKTDAVDVCIADGVCIDAFV KPPMETEEPQIFY（下划线没有标注的为如 SEQ ID NO. 1 所示的氨基酸序列的第 1~447

	位, 见 SEQ ID NO. 22)
HAS2	MHCERFLCILRIIGTTLFGVSLLLGITAAYIVGYQFIQTDNYYFSFGLYGAFSLASHLI IQSLFAFLE HRKMKKSLETP IKLNKTVALCIAAYQEDPDYLRKCLQSVKRLTYPGIKVVMVIDGNSEDDLYMMDIF SEVMGRDKSATYIWKNNFHEKGPGETDESHKESQHVTVLVLNKSICIMQKWGGKREVMYTAFRAL GRSVDYVQVCDSDTMDLPASSVEMVKVLEEDPMVGGVGGDVQILNKYDSWISFLSSVRYWMAFNIER ACQSYFGCVQCISGPLGMYRNSLLHEFVEDWYNQEFMGNQCSFGDDRHLNTRVLSLGYATKYTARSK CLTETPIEYLRWLNQQTRWSKSYFREWLYNAMWFHKHHLWMTYEAIITGFFPFFLIATVIQLFYRGK IWNILLFLLTVQLVGLIKSSFASCLRGNI VMVMSLYSVLYMSSLLPAKFMAIATINKAGWGTSGRK TIVVNFILIPVSVWFTILLGGVIFTIYKESKRPFSESKQTVLIVGTLLYACYWVMLLTLYVVLINK CGRKKGQQYDMVLDV (SEQ ID NO. 8)
MSLN	MALPTARPLLGSCGTPALGSLFLFLSLGWVQPSRTLAGETGQEAAPLDGVLANPPNISLSRQQLL GFPCAESVGLSTERVRELAVALAQKNVKLSTEQLRCLAHRLSEPPEDLDALPLDLLLFLNPDADFSGP QACTRFFSRITKANVDLLPRGAPERQRLLPAAALACWGVRSLLSEADVRLGGLACDLPGRFVAESA EVLPLRLVSCPGPLDQDQQAARAALQGGGPPYPGPPSTWSVSTMDALRGLLPVLGQPIIRSIPOGIV AAWRQRSSRDP SWRQPERTILRPRFRREVEKTACPSGKKAREIDESLIFYKKWELEACVDAALLATQ MDRVNAIPFTYEQLDVLKHKLDLDELYPQGYPESVIQHLGYFLKMSPEDIRKWNVTSLCTLKALLEVN KGHEMSPQAPRRPLPQVATLIDRFVKGRGQLDKD TLDTLTAFYPGYLCSLSPHEELSSVPPSSIWA VR PQDLDTCDPRQLDVLYPKARLAFQNMNGSEYFVKIQSFLGGAPTEDLKALSQQNVSMDLATFMKLRT DAVLPLTVAEVQKLLGPHVEGLKAEERHRPVRDWILRQRQDDLDTLGLGLQGGIPNGYLVLDLSMQE ALSGTPCLLGGPVLTVLALLLASTLA (SEQ ID NO. 9)
tEGFR	MWLQSLLLLTGTVACSSIRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFNCTSSISGLHILPVAFRGDSFTH TPPLDPQELDILKTVEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIRGRKQHGQFSLAVVSLNITSLGL RSLKEISDGDV IISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATQOVCHALCSPGECWG PEPRDCVSCRNVSRGRCVDKCNLLEGEPREFVENSEC IQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAH YIDGPHCVKTCAPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCP TNGPKIPSIATGMV GALLLLLVVALGIGLFM (SEQ ID NO. 10)
CD8α 铰链区	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD (SEQ ID NO. 11)
CD8α 跨膜区	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC (SEQ ID NO. 12)
4-1BB 胞内区	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL (SEQ ID NO. 13)
CD3ζ 胞内区	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKM AEAYSEIGMKGERRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO. 14)
T2A 连接肽	EGRGSLTTCGDVEENPGP (SEQ ID NO. 15)
信号肽	MALPVTALLPLALLLHARPGRS (SEQ ID NO. 7)
MSLN scFv (SS1)	QVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSTGYTMNWVKQSHGKSLEWIGLITPYNGASSYNQKFRGK ATLTVDKSSSTAYMDLLSLTSEDSAVYFCARGGYDGRGFDYWGQGTITVTVSSGGGGSGGGSGGGGS DIELTQSPAIMSASPGKEKVTMTCSASSSVSYMHWWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPRFSGSGSG NSYSLTISSVEAEDDATYQCQWQSKHPLTFGAGTKLEI (SEQ ID NO. 16)
GPC3 scFv	DVVMTQSPSLPVPVTPGEPASISCRSSQSLVHSNANTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPRDF SGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVIYCSQNTHTVPTFGQGTGKLEIKRGGGSGGGGSGGGSGVQLVQ SGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDYEMHWVRQAPGQGLEWMGALDPKIGTAYSQKFKGRVILTAD ESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRFYSYTYWGQGTLLTVVSS (SEQ ID NO. 19)
ROR1 scFv	QVQLKESGPGVLVAPSQTLSITCTVSGFSLTSYGVHWVRQPPGKLEWLGVIWAGGFTNYNSALKSRL SISKDNSKSVLLKMTSLQTDITAMYYCARRGSSYSMDYWGQGTITVTVSSGGGGSGGGSGGGSGSEI VLSQSPAITAASLGQKVTITCSASSNVSYIHWYQQRSSTSPRPWIYEISKLASGVPRFSGSGSGTS YSLTISSMEAEDAAIYYCQWNYPLITFGSGTKLEI (SEQ ID NO. 20)
EpCAM scFv (MOC31)	DIVMTQSAFSPVTLTGTSASISCRSTKSLHSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVPRDF SSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVIYCAQNLIEIPRTFGGKLEIKRGGGSGGGGSGGGSGVQLVQ SGPELKKPGETVKISKASGYTFTNYGMNWVKQAPGRGLKWMGWINTYTGSTYADDFKGRFAFSLE TSASAAYLQINNLKNEATATYFCARFAIKGDYWGQGTLLTVVSS (SEQ ID NO. 21)
HER2 scFv (FRP5)	QVQLQQSGPELKKPGETVKISKASGYPTFTNYGMNWVKQAPGQGLKWMGWINTSTGESTFADDFKGR FDFSLET SANTAYLQINNLKSEDMATYFCARWEVYHGYVPYWGQGTITVTVSSGGGGSGGGSGGGGS DIQLTQSHKFLSTSVGDRVSITCKASQDVYNAVAWYQQKPGQSPKLLIYSSASRYTGVPSTRFTGSGS GPDFTFTISSVQAEDLAVYFCQGHFRTPFTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO. 17)
E6 TCR	MALEHLIIILWMQLTIWVSGQQLNQSPQSMFIQEGEDVSMNCTSSSIFNTWLWYKQDPGEGPVLLIAL YKAGELTNGRLTAQFGITRKDSFLNISASIPSDVGIYFCAGHPSSNSGYALNFGKGTSLIVTPDIQ NPEPAVYQLKDPQRSQDSTLCFLTDFDSQINVPKTMESGFTITDKTVLDMKAMDSKNGAIAWSNQTS

	FTCQDIFKETNATYPSSDVPDCATLLEKSEFETDMNLFQNLVSMGLRIILLKLVAGFNLLMTLRWSS RAKRSKSGATNFSLLKQAGDVEENPGMGTSLLCWVVLGFLGTDHTGAGVSQSPRYKVKTRGQDVAL RCDPI SGHVS LYWYRQALGQGPEFLTYFNIEAQDDKSGLPNDRF SAERPEGSISLTIQRTEQRDSA MYRCASSQTGARTDTQYFGPGTRLTVLEDLRNVTPPKVSLFEP SKAEIANKQKATLVCLARGFFPD HVELS W W V N G K E V H S G V S T D P Q A Y K E S N Y S Y C L S S R L R V S A T F W H N P R N H F R C Q V Q F H G L S E E D K W P EGSPKPVTONISAEAWGRADC GITSASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVVMAMVVRKNS (SEQ ID NO. 18)
--	---

表 2. 碱基序列表

名称	碱基序列
全长 PH20wt (mPH20wt, 野生型)	ATGGGAGTGCTAAAATTCAAGCACATCTTTTTCAGAAGCTTTGTTAAATCAAGTGGAGTATCCCAGAT AGTTTTACCTTCTTCTGATTCCATGTTGCTTGACTCTGAATTTTCAGAGCACCTCTGTATTCCAA ATGTGCCTTTCTCTCTGGGCTGGAATGCCCAAGTGAAATTTGTCTTGGAATTTGATGAGCCACTA GATATGAGCCTCTTCTCTTTTCATAGGAAGCCCCGAATAAACGCCACCGGGCAAGGTGTTACAATATT TTATGTTGATAGACTTGGCTACTATCCTTACATAGATTCAATCACAGGAGTAACGTGTAATGGAGGAA TCCCCAGAAGATTTCTTACAAGACCATCTGGACAAAGCTAAGAAAGACATTACATTTTATATGCCA GTAGACAATTTGGGAATGGCTGTTATTGACTGGGAAGAATGGAGACCCACTTGGGCAAGAACTGGAA ACCTAAAGATGTTTACAAGAATAGGTCTATTGAATTGGTTGAGCAACAAAATGTACAACCTAGTCTCA CAGAGCCACTGAGAAAGCAAAACAAGAAATTTGAAAGGCAGGGAAGGATTTCTGTGATAGACTATA AAATTGGGAAAATTACTTCGGCCAAATCACTTGTGGGGTATTATCTTTTCCGGATTGTACAACCA TCACTATAAGAAACCCGGTTACAATGGGAAGTTGCTTCAATGTAGAAATAAAAGAAATGATGATCTCA GCTGGTTGTGGAATGAAAGCACTGCTCTTTACCCATCCATTTATTTGAACACTCAGCAGTCTCCTGTA GCTGCTACACTCTATGTGCGCAATCGAGTTTCGGGAAGCCATCAGAGTTTCCAAAATACCTGATGCAAA AAGTCCACTTCCGGTTTTTGCATATACCCGCATAGTTTTTACTGATCAAGTTTTGAAATTCCTTTCTC AAGATGAACCTGTGTATACATTTGGCGAACTGTTGCTCTGGGTGCTTCTGGAATTGTAATATGGGGA ACCCTCAGTATAATGCGAAGTATGAAATCTTGCTTGCTCTAGACAATTACATGGAGACTATACTGAA TCCTTACATAATCAACGTCACACTAGCAGCCAAAATGTGTAGCCAAGTGCTTTGCCAGGAGCAAGGAG TGTGTATAAGGAAAACTGGAACTCAAGTGACTATCTTCACTCAACCCAGATAATTTTGCTATTCAA CTTGAGAAAGGTGGAAAGTTTACAGTACGTGGAAACCGACACTTGAAGACCTGAGCAATTTTCTGA AAAATTTTATTGCAGCTGTTATAGCACCTTGAGTTGTAAAGGAGAAAGCTGATGTAAAAGACACTGATG CTGTTGATGTGTGTTATTGCTGATGGTGTCTGTATAGATGCTTTTCTAAAACCTCCCATGGAGACAGAA GAACCTCAAATTTTCTACAATGCTTACCCTCCACACTATCTGCCACAATGTTTCAATTGTTAGTATTTT GTTTCTTATCATTTCTTCTGTAGCGAGTTTGTA (下划线没有标注的序列为 SEQ ID NO. 2)
全长 PH20 (密码子优化)	ATGGGCGTGCTGAAGTTTAAAGCACATCTTCTTTAGATCCTTCGTGAAGAGCTCCGGCGTGCTCAGAT CGTGTTCACCTTTCTGCTGATCCCATGCTGTCTGACCTGAACTTCAGAGCCCCCTGTGATCCCCA ACGTGCCTTTCTGTGGGCTGGAATGCCCAAGCGAGTTCTGCCTGGGCAAGTTTGACGAGCCCCCTG GATATGTCTCTGTTTCTGCTTTATCGGCTCCCCAGAATCAATGCCACCGGCCAGGGCGTGACAATCTT TTACGTGGACAGGCTGGGCTACTATCCTTATATCGATTCCATCACCGGCGTGACAGTGAACGGCGGCA TCCCACAGAAGATCAGCCTGCAGGACCACCTGGATAAGGCCAAGAAGGATATCACCTTCTACATGCCC GTGGACAATCTGGCATGGCCGTGATCGATTGGGAGGAGTGGCGCCCAACATGGGCCAGAACTGGAA GCCCAAGGACGTGTATAAGAATCGCTCTATCGAGCTGGTGACGACGACGAGCTGACAGCTGAGCCTGA CCGAGGCCACAGAGAAGGCCAAGCAGGAGTTCGAGAAGGCCGGAAGGACTTTCTGGTGGAGACCATC AAGCTGGGCAAGCTGCTGAGACCCAAACCTGTGGGCTACTATCTGTTTCTGATTGCTACAATCA CCACTATAAGAAGCCAGGCTACAACGGCTCTTGTTTCAATGTGGAGATCAAGAGGAACGACGATCTGA GCTGGCTGTGGAATGAGTCCACAGCCCTGTACCCCTCTATCTATCTGAACCCAGCAGTCCCCTGTG GCCGCCACACTGTATGTGCGGAATAGAGTGAGGGAGGCCATCCGCGTGAGCAAGATCCCTGACGCCAA GTCCCCCTGTGCCAGTGTTCGCCTACACCGGATCGTGTTCACAGACAGGTGCTGAAGTTCTTGAGCC AGGATGAGCTGGTGTATACCTTCGGCGAGACAGTGGCCCTGGGCGCCAGCGGAATCGTGATCTGGGGC ACCTGTCCATCATGCGGTCCATGAAGTCTTGCTGTCTGCTGGATAACTACATGGAGACCATCCTGAA CCCCATATCATCAATGTGACACTGGCCGCCAAGATGTGCAGCCAGGTGCTGTGCCAGGAGCAGGGCG TGTGCATCCGCAAGAACTGGAACAGCAGCGATTACCTGCACCTGAACCCCGACAATTTTGCCATCCAG CTGGAGAAGGGCGGCAAGTTACCGTGCAGGGGCAAGCTTACACTGGAGGACCTGGAGCAGTTCTCCGA GAAGTTTACTGCAGCTGTTATTCCACCCTGTCTTGTAAAGGAGAAGGCCGATGTGAAGGACACAGATG CCGTGACGTGTGCTATGCCGATGGCGTGTGATCGACGCTTTCTGAAGCACCCTGAGGAGACCGGAG GAGCCTCAGATTTTCTACAATGCCAGCCATCCACCCTGTCTGCCACAATGTTTCAATCGTGAGCATCCT GTTTCTGATCATCTCCTCTGTGGCCAGCCTGTAA (SEQ ID NO. 3)
可溶型 PH20wt (sPH20wt, 含信号肽)	ATGGGAGTGCTAAAATTCAAGCACATCTTTTTCAGAAGCTTTGTTAAATCAAGTGGAGTATCCCAGAT AGTTTTACCTTCTTCTGATTCCATGTTGCTTGACTCTGAATTTTCAGAGCACCTCTGTATTCCAA ATGTGCCTTTCTCTCTGGGCTGGAATGCCCAAGTGAAATTTGTCTTGGAATTTGATGAGCCACTA GATATGAGCCTCTTCTCTTTTCATAGGAAGCCCCGAATAAACGCCACCGGGCAAGGTGTTACAATATT TTATGTTGATAGACTTGGCTACTATCCTTACATAGATTCAATCACAGGAGTAACGTGTAATGGAGGAA TCCCCAGAAGATTTCTTACAAGACCATCTGGACAAAGCTAAGAAAGACATTACATTTTATATGCCA GTAGACAATTTGGGAATGGCTGTTATTGACTGGGAAGAATGGAGACCCACTTGGGCAAGAACTGGAA

	ACCTAAAGATGTTTACAAGAATAGGTCTATTGAATTGGTTCAGCAACAAAATGTACAACCTAGTCTCA CAGAGGCCACTGAGAAAGCAAAACAAGATTTGAAAAGGCAGGGAAGGATTTCTTGGTAGAGACTATA AAATTGGGAAAATTACTTCGGCCAAATCACTTGTGGGGTTATTATCTTTTTCCGGATTGTTACAACCA TCACTATAAGAAACCCGGTTACAATGGAAGTTGCTTCAATGTAGAAATAAAAAGAAATGATGATCTCA GCTGGTTGTGGAATGAAAGCACTGCTCTTACCCATCCATTTATTTGAACACTCAGCAGTCTCCTGTA GCTGTACACTCTATGTGCGCAATCGAGTTCCGGAAGCCATCAGAGTTTCCAAAATACCTGATGCAAA AAGTCCACTTCCGGTTTTTGCATATACCCGCATAGTTTTTACTGATCAAGTTTTGAAATTCCTTTCTC AAGATGAACCTTGTGTATACATTTGGCGAAACTGTTGCTCTGGGTGCTTCTGGAATTGTAAATGAGGGA ACCCTCAGTATAATGCGAAGTATGAAATCTTGCTTGCTCCTAGACAATTACATGGAGACTATACTGAA TCCTTACATAATCAACGTCACACTAGCAGCCAAAATGTGTAGCCAAGTGCTTTGCCAGGAGCAAGGAG TGTGTATAAGGAAAACTGGAACTCAAGTGACTATCTTCACTCAACCCAGATAATTTTGTATTCAA CTTGAGAAAGGTGGAAAGTTACAGTACGTGGAAAACCGACACTTGAAGACCTGGAGCAATTTTCTGA AAAATTTTATTGCAGCTGTTATAGCACCTTGAGTTGTAAAGGAGAAAGCTGATGTAAAAGACACTGATG CTGTTGATGTGTATTGCTGATGGTGTCTGTATAGATGCTTTTCTAAACCTCCATGGAGACAGAA GAACCTCAAATTTTCTACTAA (下划线没有标注的为如 SEQ ID NO. 2 所示的核苷酸序列的第 1~1341 位, 见 SEQ ID NO. 23)
可溶型 PH20 (密码子优化)	ATGGGCGTGCTGAAGTTTAAGCACATCTTCTTTAGATCCTTCGTGAAGAGCTCCGGCGTGCTCAGAT CGTGTTACCTTTCTGCTGATCCCATGCTGTCTGACCTTGAACCTCAGAGCCCCCTGTGATCCCCA ACGTGCCCTTCTGTGGGCTTGAATGCCCAAGCGAGTTCTGCCTGGGCAAGTTTGACGAGCCCCCTG GATATGTCTCTGTTTACGCTTTATCGGCTCCCCCAGAATCAATGCCACCCAGGCGGTGACAACTCTT TTACGTGGACAGGCTGGGCTACTATCCTTATATCGATTCCATCACCAGCGTGACAGTGAACGGCGGCA TCCCACAGAAGATCAGCCTGCAGGACCACCTGGATAAGGCCAAGAAGGATATCACCTTCTACATGCCC GTGGACAATCTGGGCATGGCCGTGATCGATTGGGAGGAGTGGCGCCCAACATGGGCCAGAACTGGAA GCCCCAAGGACGTGTATAAGAATCGCTCTATCGAGCTGGTGACAGCAGCAACGTGCAGCTGAGCCTGA CCGAGGCCACAGAGAAGGCCAAGCAGGAGTTCGAGAAGGCCGGAAGGACTTTCTGGTGGAGACCATC AAGCTGGGCAAGCTGCTGAGACCCAACCACCTGTGGGGCTACTATCTGTTTCTGATTGCTACAATCA CCACTATAAGAAGCCAGGCTACAACGGCTCTTGTTCATATGTGGAGATCAAGAGGAACGACGATCTGA GCTGGCTGTGGAATGAGTCCACAGCCCTGTACCCCTCTATCTATCTGAACCCAGCAGTCCCCTGTG GCCGCCACACTGTATGTGCGGAATAGAGTGAGGGAGGCCATCCGCGTGAGCAAGATCCCTGACGCCAA GTCCCTCTGCCAGTGTTCGCCTACACCCGGATCGTGTACAGACCAGGTGCTGAAGTTCTTGAGCC AGGATGAGCTGGTGTATACCTTCGGCGAGACAGTGGCCCTGGGCGCCAGCGGAATCGTGATCTGGGGC ACCTGTCCATCATGCGGTCCATGAAGTCTTGCTGCTGCTGGATAACTACATGGAGACCATCCTGAA CCCCATATCATCAATGTGACACTGGCCGCAAGATGTGCAGCCAGGTGCTGTGCCAGGACGAGGCGC TGTGCATCCGCAAGAAGTGGAAACAGCAGCGATTACCTGCACCTGAACCCCGACAATTTTGCCATCCAG CTGGAGAAGGGCGGCAAGTTCACCGTGCAGGGGCAAGCCTACACTGGAGGACCTGGAGCAGTTCTCCGA GAAGTTTACTGCAGCTGTTATTCCACCTGTCTTGTAAGGAGAAGGCCGATGTGAAGGACACAGATG CCGTGGACGTGTGCATCGCCGATGGCGTGTGCATCGACGCTTTCTGAAGCCACCCATGGAGACCGAG GAGCCTCAGATTTTCTACTAA (下划线没有标注的为如 SEQ ID NO. 3 所示的核苷酸序列的第 1~1341 位; 见 SEQ ID NO. 24)
HAS2	ATGCATTGTGAGAGGTTTCTATGTATCCTGAGAATAATTGGAACCACACTCTTTGGAGTCTCTCTCCT CCTTGGAATCACAGCTGCTTATATTGTTGGCTACCAGTTTATCCAACGGATAATTACTATTCTCTT TTGGACTGTATGGTGCCTTTTTGGCATCACACCTCATATCCAAAGCCTGTTTGCCTTTTTGGAGCAC CGAAAAATGAAAAATCCCTAGAAACCCCATAAAGTTGAACAAAACAGTTGCCCTTTGCATCGCTGC CTATCAAGAAGATCCAGACTACTTAAGGAAATGTTTGAATCTGTGAAAAGGCTAACCTACCCTGGGA TTAAAGTTGTATGGTCATAGATGGGAAGTCAAGAGATGACCTTTACATGTGCTGACGATCTCAGTGAA GTCATGGGCAGAGACAAATCAGCCACTTATATCTGGAAGAACAACCTCCACGAAAAGGGTCCCGGTGA GACAGATGAGTCACATAAAGAAAGCTCGCAACACGTAACGCAATTGGTCTTGTCCAACAAAAGTATCT GCATCATGCAAAAATGGGTGGAAAAGAGAAGTCATGTACACAGCCTTCAGAGCACTGGGACGAAGT GTGGATTATGTACAGGTTTGTGATTACAGACATATGCTTGACCCAGCCTCATCTGTGGAGATGGTAAA AGTTTTAGAAGAAGATCCCATGGTTGGAGGTGTTGGGGGAGATGTCCAGATTTTAAACAAGTACGATT CCTGGATCTCATTCTCAGCAGTGTAAAGATATTGGATGGCTTTTAAATATAGAAAGGCCGTGTCAGTCT TATTTGGGTGTGTTTCAAGTGCATTAGTGACCTCTGGGAATGTACAGAACTCCTTGTGTGATGAGTT TGTGGAAGATTGGTACAATCAAGAATTTATGGGCAACCAATGTAGCTTTGGTGATGACAGGCATCTCA CGAACCGGTGCTGAGCCTGGGCTATGCAACAAAATACACAGCTCGATCTAAGTGCCTTACTGAAACA CCTATAGAATATCTCAGATGGCTAAACCAGCAGACCCGTTGGAGCAAGTCTACTTCCGAGAATGGCT GTACAATGCAATGTGGTTTCAACAAATCACTTGTGGATGACCTACGAAGCGATTATCACTGGATTCT TTCCTTTCTTTCTCATTGCCACAGTAATCCAGCTCTTCTACCGGGGTAAAAATTTGGAACATTCTCCTC TTCCTTGAACCTGCTAGTGTAGTGTCTATAGGTCATATCTTTTGGCAGCTGCCTTAGAGGAAATAT CGTCATGGTCTTTCATGTCTCTTACTCAGTGTATATACATGTGAGTTTACTTCCCGCCAAGATGTTTG CAATTGCAACAATAAACAAGCTGGGTGGGGCACATCAGGAAGGAAAACCATTTGTTGTTAATTTTATA GGACTCATTCCAGTATCAGTTTGGTTTACAATCCTCCTGGGTGGTGTGATTTTACCATTATAAGGA GTCTAAAAGGCCATTTTCAAGATCCAAACAGACAGTCTAATTGTTGGAACGTTGCTCTATGCATGCT ATTGGGTGATGCTTTTACGCTGTATGTAGTTCTCATCAATAAGTGTGGCAGGCGGAAGAAGGGACAA CAATATGACATGGTGTGCTGATGTATGA (SEQ ID NO. 25)

MSLN	ATGGCCTTGCCAACGGCTCGACCCCTGTGGGGTCTGTGGGACCCCGCCCTCGGCAGCCTCCTGTT CCTGCTCTTCAGCCTCGATGGGTGCAGCCCTCGAGGACCCTGGCTGGAGAGACAGGGCAGGAGCTG CGCCCTTGACGGAGTCTTGCCAACCCACCTAACATTTCAGCCTCTCCCTCGCCAACCTCTGGC TTCCCGTGTGCGGAGGTGTCCGGCCTGAGCACGGAGCGTGTCCGGGAGCTGGCTGTGGCCTTGGCACA GAAGAAATGTCAAGCTCTCAACAGAGCAGCTGCGCTGTCTGGCTCACCGGCTCTCTGAGCCCCCGAGG ACCTGGACGCCCTCCCATTTGGACCTGCTGCTATTCTCAACCCAGATGCGTTCTCGGGGGCCAGGCC TGCACCCGTTTCTTCTCCCGCATCACGAAGGCCAATGTGGACCTGCTCCCGAGGGGGGCTCCCGAGCG ACAGCGGCTGCTGCTGCGGCTCTGGCTGTGGGGTGTGCGGGGGTCTGTGCTGAGCGAGGCTGATG TGCGGGCTCTGGGAGGCTGGCTTGCACCTGCTGGCGCTTTGTGGCCGAGTCGGCCGAAGTGTGTG CTACCCCGGCTGGTGAGCTGCCCGGGACCCCTGGACCAGGACCAGCAGGAGGCAGCCAGGGCGGCTCT GCAGGGCGGGGACCCCTTACGGCCCCCGTCGACATGGTCTGTCTCCACGATGGACGCTCTGCGGG GCCTGTGCCCCGTGTGGGCCAGCCCATCATCCGCAGCATCCCGCAGGGCATCGTGGCCCGTGGCGG CAACGCTCCTCTCGGGACCCATCTTGGCGGCAGCCTGAACGGACCATCTCCGGCCGCGGTTCCGGCG GGAAGTGGAGAAGACAGCCTGTCTTCAGGCAAGAAGGCCCGCAGATAGACGAGAGCCTCATCTTCT ACAAGAAGTGGGAGCTGGAAGCCTGCGTGGATGCGGCCCTGCTGGCCACCCAGATGGACCGCGCTGAAC GCCATCCCCCTTACCTACGAGCAGCTGGACGCTCTAAAGCATAAACTGGATGAGCTCTACCCACAAGG TTACCCGAGTCTGTGATCCAGCACCTGGGCTACCTCTTCTCAAGATGAGCCCTGAGGACATTCGCA AGTGGAAATGTGACGTCCTTGAGACCTGAAGGCTTTGCTTGAAGTCAACAAAGGGCACGAAATGAGT CCTCAGGCTCCTCGGCGGCCCTCCACAGGTGGCCACCCTGATCGACCGCTTTGTGAAGGGAAGGGG CCAGCTAGACAAAGACACCCTAGACACCCTGACCGCTTCTACCTGGGTACCTGTGCTCCCTCAGCC CCGAGGAGCTGAGCTCCGTGCCCCCAGCAGCATCTGGCGGGTCAGGCCCAGGACCTGGACACGTGT GACCCAAGGCAGCTGGACGCTCTCTATCCCAAGGCCCGCTTGTCTTCCAGAACATGAACGGGTCCGA ATACTTCGTGAAGATCCAGTCTTCTGGGTGGGGCCCCCAGGAGGATTTGAAGGCGCTCAGTCAGC AGAATGTGAGCATGGACTTGGCCACGTTTATGAAGCTGCGGACGGATGCGGTGCTGCCGTGACTGTG GCTGAGGTGCAGAACTTCTGGGACCCACGTGGAGGGCTGAAGGCGGAGGAGCGGCACCGCCCGGT GCGGGACTGGATCCTACGGCAGCGGCAGGACGACCTGGACACGCTGGGGCTGGGGCTACAGGGCGGCA TCCCCAACGGCTACCTGGTCTTAGACCTCAGCATGCAAGAGGCCCTCTCGGGGACGCCCTGCCTCCTA GGACCTGGACCTGTTCTACCGTCTGGCACTGCTCCTAGCCTCCACCTGGCCTGA (SEQ ID NO. 26)
tEGFR	ATGTGGCTGCAGAGCCTGCTGCTCTTGGGCACTGTGGCCTGCAGCATCTCTCGCAAAGTGTGTAACGG AATAGGTATTGGTGAATTTAAAGACTCACTCTCCATAAAATGCTACGAATATTAACACTTCAAAAAT GCACCTCCATCAGTGGCGATCTCCACATCCTGCCGGTGGCATTAGGGGTGACTCCTTCACACATACT CCTCCTCTGGATCCACAGGAAGTGGATATTCTGAAAACCGTAAAGGAAATCACAGGGTTTTTGTGAT TCAGGCTTGGCCTGAAAACAGGACGGACCTCCATGCCTTTGAGAACCTAGAAATCATACGCGGCAGGA CCAAGCAACATGGTCAGTTTTCTCTTGCACTGCTCAGCCTGAACATAACATCCTTGGGATACGCTCC CTCAAGGAGATAAGTGATGGAGATGTGATAATTTAGGAAACAAAATTTGTGCTATGCAAAATACAAT AACTGGAAAAAATGTTTGGGACCTCCGGTCAGAAAACAAAATTTATAAGCAACAGAGGTGAAAACA GCTGCAAGGCCACAGGCCAGGTCTGCCATGCCTTGTGCTCCCCGAGGGCTGTGGGGCCCGGAGCCC AGGGACTGCGTCTCTTGGCGGAATGTGAGCCGAGGCAGGGAATGCGTGGACAAGTGAACCTTCTGGA GGGTGAGCCAAGGGAGTTTGTGGAGAACTCTGAGTGCATACAGTGCCACCCAGAGTGCCTGCCTCAGG CCATGAACATCACCTGCACAGGACGGGGACCAGACAACGTATCCAGTGTGCCACTACATTGACGGC CCCCACTGCGTCAAGACCTGCCCGGCAGGAGTATGGGAGAAAACAACACCCTGGTCTGGAAGTACGC AGACGCCGGCCATGTGTGCCACCTGTGCCATCCAACTGCACCTACGGATGCATGGGCCAGGTCTTG AAGGCTGTCCAACGAATGGGCCTAAGATCCCGTCCATGCCACTGGGATGGTGGGGCCCTCCTCTTG CTGCTGGTGGTGGCCCTGGGGATCGGCCTCTTCATGTGA (SEQ ID NO. 27)
CD8α 铰链区	ACCACTACCCAGCACCAGGACCACCCACCCCGGCTCCTACCATCGCTCCAGCCTCTGTCCCTGCG TCCGGAGGCATGTAGACCCGAGCTGGTGGGGCCGTGCATACCCGGGGTCTTGACTTCGCTGCGAT (SEQ ID NO. 28)
CD8α 跨膜区	ATCTACATTTGGGCCCCCTCTGGCTGGTACTTGCGGGGTCTGCTGCTTTCACTCGTGATCACTCTTTA CTGT (SEQ ID NO. 29)
4-1BB 胞内区	AAGCGGGTCGGAAGAAGCTGCTGTACATCTTTAAGCAACCTTCATGAGGCTGTGCAGACTACTCA AGAGGAGGACGGCTGTTTCATGCCGTTCCAGAGGAGGAGGAAGGCGGCTGCGAACTG (SEQ ID NO. 30)
CD3ζ 胞内区	CGCGTGAAATTCAGCCGACGCGAGATGCTCCAGCCTACAAGCAGGGGCAGAACAGCTCTACAACGA ACTCAATCTTGGTCGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAATGG GCGGGAAGCCGCGCAGAAAGAATCCCCAAGAGGGCCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCA GAAGCCTATAGCGAGATTGGTATGAAAGGGGAACGCAGAAAGAGGCAAAGGCCACGACGGAAGTACCA GGGACTCAGCACCGCCACCAAGGACACCTATGACGCTCTTCACATGCAGGCCCTGCCGCTCGG (SEQ ID NO. 31)
T2A 连接肽	GAGGGCAGAGGCAGCCTGCTGACATGTGGCGACGTGGAAGAGAACCTGGCCCC (SEQ ID NO. 32)
信号肽	ATGGCCTTACCAGTGACCGCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTGTGCTGCTCCACGCCGACGCGGGGATC

	C (SEQ ID NO. 33)
MSLN scFv (SS1)	CAGGTACAACTGCAGCAGTCTGGGCGCTGAGCTGGAGAAGCCTGGCGCTTCAGTGAAGATATCCTGCAA GGCTTCTGGTTACTCATTCACTGGCTACACCATGAAGTGGGTGAAGCAGAGCCATGGAAGAGCCTTG AGTGGATTGGACTTATTACTCCTTACAATGGTGCTTCTAGCTACAACCAGAAGTTCAGGGGCAAGGCC ACATTAACTGTAGACAAGTCATCCAGCACAGCCTACATGGACCTCCTCAGTCTGACATCTGAAGACTC TGCAGTCTATTTCTGTGCAAGGGGGGGTTACGACGGGAGGGGTTTTGACTACTGGGGCCAAGGGACCA CGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGAGGCGGTTTACGGCGGCGGTGGCTCTAGCGGTGGTGGATCGGACATC GAGCTCACTCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTACCATGACCTGCAGTGC CAGCTCAAGTGTAAGTTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCCCAAAGATGGATTT ATGACACATCCAACTGGCTTCTGGAGTCCCAGGTTCGTTTCACTGGCAGTGGGTCTGGAACTCTTAC TCTCTCAAACTCAGCAGCGTGGAGGCTGAAGATGATGCAACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAAGCA CCCTCTCACGTACGGTGTCTGGGACAAAGTTGGAATCAAAAGCAGC (SEQ ID NO. 34)
GPC3 scFv	GACGTGGTGATGACCCAGAGCCCACTGTCTCTGCCCCTGACCCCCGAGAGCCCGCCAGCATCTCCTG TAGGAGTAGTCAGAGCCTTGATACACAGCAACGCCAACCTACCTGCATTGGTATCTGCAAAAGCCCG GTCAAAGCCCAAGCTCCTGATCTACAAGGTGAGCAACAGGTTTTTCAGGCGTGCCGATCTGAGTTCAGT GGGTCTGGGAGCGGCACCGACTTACCCCTGAAGATCAGCAGGGTCGAGGCCGAGGACGTGGGCGTGTA CTATTGCTCTCAGAACACCCACGTGCCCCCACCTTCGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGAGGG GGGGAGGAGGTAGCGGGGGTGGAGGCAGCGGCGGTGGCGGTAGCCAGGTGCAACTGGTCCAGTCCGGC GCAGAGGTGAAGAAACAGGCGCCAGCGTGAAGGTGAGTGCAGGCAAGCGGCTACACCTTTACCGA TTACGAGATGCACTGGGTGAGGCAGGCACCGGGACAGGGCCTGGAGTGGATGGGAGCCCTTGATCCCA AGACCGGGGACACGGCATACAGCCAGAAGTTCAAAGGTGAGTGAACCTGACCGCCAGCAGAGACACC AGCAGCGCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGGAGCGAGGACACCGCGTATTACTGACAGAGGTT CTATAGCTACACTTACTGGGGGAGGGTACTCTGGTGACAGTGTCTAGC (SEQ ID NO. 5)
ROR1 scFv	CAGGTACAGCTGAAGGAGAGCGGTCCCGGCTGGTGGCCCCCTCTCAGACCCTGAGCATAAAGTGCAC CGTGAGCGGATTACAGCTGACAGCTACGGGGTGCAGTGGGTGAGGCAGCTCCCGGCAAGGGCCTGG AGTGGCTGGGCGTGATCTGGGCGGTGGCTTACCAACTACAACAGCGCCTGAAGTCTCGACTGTCA ATCTCAAAGGACAATTCTAAGAGCCAGGTGCTGCTCAAAATGACATCATTGCAGACCGACGACACCGC CATGTACTACTGCGCCAGGAGGGGAGCTCCTACAGCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACAAGCGTGA CGGTGTCTCAGGAGGCGGTGGGAGTGGGGGAGGAGGAGCGGTGGCGGAGGCAGTGAGATCGTGCTG TCTCAGAGCCCCGCAATTACTGCCGCCAGCCTGGGCCAAAAAGTGACCATAACATGCAGCGCCAGTAG CAACGTAAGCTACATCCACTGGTATCAACAAAGGAGCGGAACAGCCCTAGGCCCTGGATCTACGAGA TCAGCAAGCTGGCCTCTGGCGTGCCGTGAGGTTTTAGCGGCTCAGGCAGCGGCACTTCTTACAGCTTG ACAATCAGCAGTATGGAGGCCGAGGACGCCGCCATCTATTATTGCCAGCAGTGGAACTACCCCCGTAT CACCTTCGGCTCTGGGACCAAGTTGGAGATC (SEQ ID NO. 4)
EpCAM (MOC31) scFv	GACATCGTGATGACCCAGAGCGCCTTCAGCAACCCCGTGACCCTGGGCACACAGCGCCAGCATCAGCTG CAGGAGCACCAGAGCCTGCTGCACAGCAACCGCATCACTTACCTGTACTGGTACCTGCAAAAGCCGG GTCAGAGCCCCAGCTCCTGATTTACCAATGAGCAATTTGGCCAGCGGTGTGCCGACAGGTTTCAGC TCTAGCGGCAGCGGCACCGACTTTACCTGAGGATCAGCAGGGTGGAGGCCAGGACGTGGGCGTGTA CTACTGCGCTCAAAATCTGGAGATACCCAGGACCTTTGGCGGTGGCAGCAAGCTGGAAATCAAGAGGG GGGGTGGCGGTTTCAAGTGGGGGAGGGAGCGGAGGAGGCGGGAGCCAGGTGCAGCTCCAGCAGAGCGGC CCAGAAGTTAAGAAGCCAGGGGAAACCGTGAAGATTAGCTGCAAGGCCCTCTGGCTACACCTTCACCAA CTACGGCATGAAGTGGTTAAGCAAGCACCCGGAAGGGGCTGAAGTGGATGGGCTGGATCAATCAAGCC ACACCGCGAGAGCACCTACGCCGACGACTTCAAAGGCAGGTTTCGCTTTCTCTCTGGAACGCTCTGCC AGCGCAGCCTACTTGCAGATCAACAAGTTGAAGAAGCAGGACACCGCAACCTACTTCTGCGCCAGGTT TGCTATCAAGGGGGACTACTGGGGCAAGGAACCACTCTCACAGTTTCAAGC (SEQ ID NO. 6)
HER2 scFv (FRP5)	CAGGTACAACTGCAGCAGTCAGGACCTGAAGTGAAGAAGCCTGGAGAGACAGTCAAGATCTCCTGCAA GGCCTCTGGGTATCCTTTACAAACTATGGAATGAAGTGGGTGAAGCAGGCTCCAGGACAGGGTTTTAA AGTGGATGGGCTGGATTAAACACCTCCACTGGAGAGTCAACATTTGCTGTGACTTCAAGGGACGGTTT GACTTCTCTTTGGAACCTCTGCCAACCTGCCTATTTGCAGATCAACAACCTCAAAGTGAAGACAT GGCTACATATTTCTGTGCAAGATGGGAGGTTTACCACGGCTACGTTCTTACTGGGGCCAAGGGACCA CGGTCACCGTTTCTCTGGCGGTGGCGGTTCTGGTGGCGGTGGCTCCGGCGGTGGCGGTTCTGACATC CAGCTGACCCAGTCTCAAAATCTGTCCACTTTCAGTAGGAGACAGGGTCAGCATCACTTCAAGGC CAGTCAGGATGTGTATAATGCTGTGTGCTGGTATCAACAGAAACAGGACATCTCTTAACTTCTGA TTTACTCGGCATCCTCCCGGTACACTGGAGTCCCTTCTCGCTTCACTGGCAGTGGCTCTGGGCGGAT TTCACTTTACCATCAGCAGTGTGAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTTATTCTGTGCAACATTTTCG TACTCCATTACGTTTCGGCTCGGGGACAAATTTGAGATCAAA (SEQ ID NO. 35)
E6 TCR	ATGGCCCTTGAACATCTGTGTGATAATACTGTGGATGCAACTTACCTGGGTATCTGGTCAGCAATTGAA CCAGTCTCCACAGTCCATGTTTATCCAAGAAGGGGAGGACGTGTCCATGAATTGTACAAGCTCCAGTA TCTTCAACACGTGGCTGTGGTACAAACAGGATCCTGGGGAAGGACCAGTACTGTTGATAGCCCTCTAT AAGGCGGGCGAACTGACATCCAATGGAAGACTCACAGCCAATTTCGGAATTACCGGAAGGATTCTTT CCTCAACATCTCCGCGAGTATTCATCTGATGTAGGAATATACTTCTGTGACAGGGCATCCGTCTAGCA ACAGTGGATATGCCCTCAATTTTGGAAAGGGCACCTCCCTGCTGGTTACCCAGACATTGAGAACCC GAACCAGCCGTATATCAGTTGAAGGACCAAGATCTCAGGATAGTACACTCTGTTTGTTCACGGACTT

	TGACTCACAAATCAACGTCCCGAAGACTATGAAAGTGGTACGTTTCATCACAGATAAGACGGTTCCTGG ACATGAAGGCTATGGACTCAAAGAGCAACGGGGCAATTGCTTGGTCCAACCAGACAAGCTTTACCTGT CAGGACATTTTTAAGGAGACTAATGCTACTTATCCCTCCAGCGACGTTCCGTGTGATGCGACTCTTAC CGAGAAGTCTTTTGGACCGATATGAATCTCAACTTCCAGAATCTGTCAGTGATGGGTCTGCGGATCC TGCTTCTGAAGGTTGCAGGATTCAATCTTCTTATGACTCTCCGGCTCTGGTCTTCAAGAGCCAAAAGA AGTGGTTCTGGCGCGACGAATTTTAGTTTGTCTTAAGCAAGCCGGAGATGTGGAGGAAAATCCTGGACC GATGGGCACAAGTTTGTGTGTGGTGTGTGGGCTTCTGGGTACAGATCATACTGGGGCGGGAG TCTCTCAAAGCCCCGATACAAAGTCACTAAAAGAGGGCAGGATGTGCGCTTCGCTGTGATCCCAT AGCGGGCATGTCTCCCTTTATTGGTACCGGCAGGCTTGGGACAAGGACCGGAGTTCTCTCACTTACTT CAACTACGAAGCGCAGCAGGACAAGTCCGGTCTGCCTAATGATAGATTAGCGCCGAGAGACCGGAGG GCAGTATCTCTACTCTTACGATACAAAGAACGGAGCAGCGAGACTCTGCTATGTATAGATGTGCAAGT TCTAGCCAGACGGGTGCTCGCACGGACACTCAATATTTCCGGTCTGGTACAAGATTGACCGTCTTGGA GGATCTCCGGAACGTACCCCAACAAAGGTCAGTTTGTGGTGGCCATCAAAGGCGGAGATCGCCAACA AACAGAAAGCTACGCTCGTGTGTGGTCTGGGGCTTCTCCAGACCAGTAGAAGTTTCTGGTGG GTCAATGGAAAGGAGGTTCAATCCGGAGTGTCCTCACTGATCCCCAAGCGTACAAGGAATCCAACATAG CTACTGTCTCTCATCTCGGCTCCGGGTGAGTGCGACATCTGGCATAATCTCGGAACCACTTTTCGAT GCCAAGTGCAGTTTCATGGGTTGAGCGAGGAAGACAAGTGGCCCCGAGGGCAGTCTTAACCAAGTCACT CAAAACATAAGCGCCGAGGCATGGGGTAGAGCCGATTGTGGGATTACTAGCGCTTCATACCAACAAGG GGTATTGAGCGCTACAATCTTTACGAAATCTCTCGGCAAGGCGACGCTCTACGCCGTACTGGTGT CTACTCTCGTGGTTATGGCAATGGTGAACCGGAAAAACAGCTAA (SEQ ID NO. 36)
--	---

表 3. 慢病毒 GOI 载体表达蛋白的连接顺序

类型	连接顺序
mPH20wt	mPH20wt -T2A 连接肽-tEGFR-IRES-潮霉素筛选标记
sPH20wt	sPH20wt -T2A 连接肽-tEGFR-IRES-潮霉素筛选标记
CAR-G418	信号肽-scFv-人 CD8 α 铰链区-人 CD8 α 跨膜区-人 4-1BB 胞内区-人 CD3 ζ 胞内区-T2A 连接肽-G418 筛选标记
CAR	信号肽-scFv-人 CD8 α 铰链区-人 CD8 α 跨膜区-人 4-1BB 胞内区-人 CD3 ζ 胞内区-T2A 连接肽-G418 筛选标记
CAR-sPH20	信号肽-scFv-人 CD8 α 铰链区-人 CD8 α 跨膜区-人 4-1BB 胞内区-人 CD3 ζ 胞内区-T2A 连接肽-sPH20
CAR-mPH20	信号肽-scFv-人 CD8 α 铰链区-人 CD8 α 跨膜区-人 4-1BB 胞内区-人 CD3 ζ 胞内区-T2A 连接肽-mPH20
TCR	E6 TCR-IRES
TCR-sPH20	E6 TCR-IRES-sPH20
TCR-mPH20	E6 TCR-IRES-mPH20

按照表 2 的碱基序列以及表 3 的顺序委托 Genewiz 公司进行 CAR 或者 TCR 序列的全基因合成。

实施例 2. 载体构建

实施例 1 中合成得到的 PH20、CAR/TCR 碱基序列通过 EcoRI 和 XbaI 酶切、经 DNA Ligation Kit (Takara) 连接插入慢病毒载体 pCDH-EF1a (SBI) 的对应位点 (图 1), 得到目的基因表达载体 Lenti-GOI。MSLN 碱基序列通过 BamHI 和 EcoRI 酶切、经 DNA Ligation Kit (Takara) 连接插入 pcDNA3.1 载体 (Invitrogen) 的对应位点; HAS2 碱基序列通过 NheI 和 BamHI 酶切、经 DNA Ligation Kit 连接插入 pcDNA3.1-Hyg 载体 (Invitrogen) 的

对应位点。连接产物分别转化至感受态大肠杆菌 (Top10)。转化后第二天,挑取克隆至含 100 μ g/mL 氨苄西林 (生工生物) LB 液体培养基中进行培养,并测序鉴定。选择测序结果正确的克隆,接种至 50ml 规模含 100 μ g/mL 氨苄西林的 LB 液体培养基中培养约 16 小时。收集菌体,使用质粒抽提试剂盒 (Qiagen) 提取并纯化质粒。

得到的 MSLN-pcDNA3.1 质粒采用 PvuI 进行线性化酶切, HAS2-pcDNA3.1-Hyg 质粒采用 FspI 进行线性化酶切。酶切产物采用酚氯仿进行抽提,得到初步的线性化质粒。质粒制备所用限制性内切酶均购自 Thermo 公司。

质粒除菌处理:在得到的质粒中分别加入 1/14 体积的 3M NaCl 溶液,使盐离子浓度达到 200 mM。后加入 2.5 倍体积-20 $^{\circ}$ C 预冷的无水乙醇,反复颠倒混匀,于-20 $^{\circ}$ C 保留 30min。将该得到的溶液 12,000rpm, 4 $^{\circ}$ C 离心 20min,小心地弃去上清,收集沉淀。用 1ml 70%乙醇洗涤沉淀, 12,000rpm, 离心 5min 后弃去上清。无菌风干沉淀,加入 100~200 μ l 无菌水溶解 DNA。无菌取 5 μ l 用 TE Buffer 稀释 50 倍,紫外测 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀。最终得到浓度确定可用于转染的质粒。

实施例 3. 慢病毒包装

准备 10cm 细胞培养皿,接种 5×10^6 个 293 细胞/皿,加入完全培养基 DMEM 高糖 (GIBCO) + 10%FBS (GIBCO),置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱,过夜培养。

取出 1mg/ml 的聚醚酰亚胺 (PEI, Polyscience) 转染试剂及慢病毒包装质粒 (Lenti-GOI、pMD2.G、psPAX2),室温解冻。取出 HBSS 缓冲液,温热至室温。取 2mL PBS 至 6 孔板的一个孔,分别加入 10 μ g Lenti-GOI、7 μ g psPAX2、4 μ g pMD2.G 混匀,加入 63 μ L PEI 转染试剂并用移液器混匀,室温静置 10 分钟。将 DNA/PEI 复合物逐滴加入到 10cm 培养皿中,轻轻晃动培养皿,充分混匀。将培养皿置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱,培养 6~8 小时后,将含有转染试剂的培养基去掉,更换为新鲜的完全培养基并放回培养箱中继续培养。

培养 48 小时后,收集培养皿中含有病毒的培养上清,用 0.45 μ m 滤膜过滤,滤液转至无菌离心管中,加入 5mL 20%蔗糖,然后沿着离心管内壁轻轻加入含有病毒的培养基上清。50000 $\times$ g 于 4 $^{\circ}$ C 离心 2 小时,离心结束后,在生物安全柜中,小心将离心管中的液体吸去,加入 400 μ L PBS 缓冲液将沉淀重悬,将病毒置于-80 $^{\circ}$ C 保存。

复苏 HT1080 细胞并将细胞状态调整至对数生长期。按照每孔 8×10^5 个细胞接种 HT1080 至 6 孔板,培养体积为 3mL,将 6 孔板置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中过夜培养。将浓缩后的慢病毒按照 0.1、1、10 μ L 的量加入至上述 6 孔板中,同时添加终浓度为 6 μ g/mL 的聚凝胺 (Polybrene, Sigma)。将 6 孔板重新放回 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中,连续培养 96

小时。培养结束后，使用 PBS 洗涤每孔的细胞，然后使用基因组 DNA 提取试剂盒（TIANGEN）提取基因组 DNA，并使用 NanoDrop2000 测定所提取的基因组 DNA 的浓度。

采用荧光定量 PCR 的方法测定慢病毒拷贝数。按照 SYBR Premix Ex Taq II（Takara）说明书配制 qPCR 的反应体系，制备 PCR 反应预混液，使用 Roche Light cycler 480 进行 PCR 反应。计算拷贝数，根据计算结果将病毒滴度调整至约为 1×10^8 TU/mL。

实施例 4. 表达 PH20 的 T 细胞、CAR-T 以及 TCR-T 细胞的制备

调整 T 细胞密度至 1×10^6 细胞/mL，加入终浓度为 100IU/mL 的白介素 2（Novatis）及终浓度为 100ng/mL 的 Anti-CD3-OKT3 抗体（Thermo），培养约 48hr。

核转染方式制备

采用 LONZA T 细胞转染试剂盒（VPA-1002）进行 T 细胞的转染。对 T 细胞转染程序进行优化，首先选择试剂盒推荐优选方案，V-024/U-014，这两种方式转染后得到细胞活力特别低，因此优化方案至 U-010/T-010 再进行实验。取出转染所需的质粒至室温融化，打开核转仪，选定不同程序进行转染：V-024/U-014/U-010/T-010（转染强度依次降低）。准备核转染试剂，取 $20 \times 4 \mu\text{l}$ supplement 加入至 $90 \times 4 \mu\text{l}$ Nucleofector Solution 中，即 1:4.5 的比例，轻轻混匀后平衡此混合溶液至室温。取 X VIVO 培养基于 6 孔板，2.5ml/孔，共 8 个孔，按 5.3.4 的规则编号，将 6 孔板放入 37℃ 培养箱预热。从细胞培养箱拿出 SS1-CAR-T 细胞，计数并再次确认，取相应体积细胞液 $200 \times \text{g}$ 离心 5min，弃净上清，离心过程中取出预热的 6 孔板。取 100 μl 中平衡至室温的混合溶液重悬细胞，再依次加入质粒，混匀后用试剂盒中配套的吸管将细胞液轻轻转至电转杯中。将电转杯放入核转仪，按下“X”键开始电转。电转结束后，取出电转杯，立即吸取 500 μl 预热的培养基稀释电转的细胞悬液，轻柔的混匀后均匀的加至 2 个含预热培养基的 6 孔板孔中。转染后 2 ± 0.5 hr，去掉培养基上清，用新鲜培养基 X-Vivo 15（LONZA）（含 100IU/mL 白介素 2）重悬细胞沉淀，将细胞转移至新的方瓶中。继续培养 3 天，得到 CAR-T 细胞。

慢病毒感染方式制备

从 -80℃ 冰箱取出含有慢病毒的重悬溶液后，迅速在 37℃ 水浴锅中融化。在方瓶中加入含有慢病毒的重悬溶液，添加终浓度为 5 $\mu\text{g/mL}$ 的 Polybrene，充分混匀后， $800 \times \text{g}$ 离心 1.5 小时。离心结束后，将方瓶置于 37℃ 5% CO₂ 培养箱中继续培养 24 小时。 $250 \times \text{g}$ 离心 10 分钟，去掉含有病毒的培养基上清，用新鲜培养基 X-Vivo 15（LONZA）（含 100IU/mL 白介素 2）重悬细胞沉淀，将细胞转移至新的方瓶中。继续培养 3 天，得到 CAR/TCR-T 细胞。

阳性率检测

取 1×10^6 个细胞使用 FACS 检测 T 细胞表面 CAR/TCR 分子的表达情况。通过 Protein L 抗体 (Thermo) 检测 CAR 阳性率, 对应的二抗为 Streptavidin PE 和 Streptavidin FITC (BD Bioscience)。通过 Erbitux 抗体(BMS)及对应二抗 PE 山羊抗人 IgG Fc 抗体(Thermo)检测 mPH20-T 及 sPH20-T 细胞阳性率。通过 FITC Hamster Anti-Mouse TCR β Chain (BD Bioscience) 抗体检测 TCR 阳性率。阳性率检测结果见表 4。

表 4. 表达 PH20 的 T 细胞、CAR-T 以及 TCR-T 细胞的阳性率

免疫细胞	体外实验 (%)	体内实验 (%)
mPH20-Twt	27.5	/
sPH20-Twt	24.9	/
mPH20-T	25.6	/
sPH20-T	30.2	/
MSLN-CAR-T 核转染*	2.8	/
MSLN-mPH20-CAR-T 核转染*	1.7	/
MSLN-sPH20-CAR-T 核转染*	2.1	/
MSLN-CAR-T	22.1	33.6
MSLN-mPH20-CAR-T	19.7	29.7
MSLN-sPH20-CAR-T	18.7	30.4
GPC3-CAR-T	26.4	/
GPC3-mPH20-CAR-T	16.7	/
GPC3-sPH20-CAR-T	20.3	/
ROR1-CAR-T	35.4	/
ROR1-mPH20-CAR-T	23.5	/
ROR1-sPH20-CAR-T	25.2	/
EpCAM-CAR-T	25.9	/
EpCAM-mPH20-CAR-T	31.2	/
EpCAM-sPH20-CAR-T	28.7	/
E6 TCR-T	/	45.7
mPH20-E6 TCR-T	/	46.1
sPH20-E6 TCR-T	/	39.8

*注: 采用 4 种核转染程序 (V-024/U-014/U-010/T-010) 得到的细胞, 其状态均不好, T 细胞转染前活力为 93%, 转染 MSLN-CAR 后, 活力依次为 26%、22%、37%、66%; 转染 MSLN-mPH20-CAR 后, 活力依次为 23%、31%、35%、71%; 转染 MSLN-sPH20-CAR 后, 活力依次为 10%、19%、22%、60%。选用活力最高的组别进行 CAR 阳性的检测。

每隔 2 天对细胞进行传代处理, 观察细胞状态, 进行细胞计数, 并更换至新鲜培养基进行培养。采用核转染方式进行 CAR 的瞬时转染实验发现, 转染后细胞状态及活力均较差, 扩增缓慢, 因此未再使用该方式制备 CAR-T 或者其他类型细胞。慢病毒方式制备的细胞培养约 8~14 天后, 收集细胞备用。培养过程中发现, 同时表达 PH20 没有影响 T 细胞的增值及阳性率。

实施例 5. 表达 PH20 的 NK 细胞、CAR-NK 细胞的制备

采用 NK-92 细胞(ATCC CRL-2407)进行 CAR-NK 细胞的制备。NK-92 采用 RPMI1640 (GIBCO) 培养基进行培养, 添加 10%胎牛血清 (GIBCO), 加入终浓度为 500IU/mL 的白介素 2 (Novatis)。

NK 细胞感染慢病毒的方法

从-80℃冰箱取出含有慢病毒的重悬溶液后, 迅速在 37℃水浴锅中融化。在方瓶中加入含有慢病毒的重悬溶液, 添加终浓度为 8μg/mL 的 Polybrene, 充分混匀后, 800×g 离心 1.5 小时。离心结束后, 将方瓶置于 37℃ 5% CO₂ 培养箱中继续培养 24 小时。250×g 离心 10 分钟, 去掉含有病毒的培养基上清, 用新鲜培养基(RPMI1640 + 10%FBS + 500IU/mL)重悬细胞沉淀, 将细胞转移至新的方瓶中。继续培养 2 天后, 加入抗生素进行加压筛选, 每隔 2-3 天换液。培养约 10 天后, 对细胞进行有限稀释, 接种至 96 孔板, 0.5 细胞/孔。37℃ 5% CO₂ 培养 15~25 天。

表达 PH20 的 NK-92 细胞制备

通过慢病毒感染并进行有限稀释的方式, 分别用 sPH20 慢病毒和 mPH20 慢病毒感染 NK-92 细胞。采用 400μg/mL 终浓度的潮霉素进行加压筛选。待有限稀释的克隆形成后, 检测克隆的透明质酸酶活性。其中 sPH20-NK92 的克隆, 检测上清中的酶活性; 而 mPH20-NK-92 则检测细胞的酶活性。选择有活性的克隆用于后续实验。

表达 CAR 的 NK-92 细胞制备

通过慢病毒感染并进行有限稀释的方式, 用 FRP5-CAR 慢病毒分别感染 NK-92 细胞、sPH20-NK92 细胞、mPH20-NK92 细胞。采用 600μg/mL 终浓度的 G418 进行加压筛选。待有限稀释的克隆形成后, 分别检测克隆的透明质酸酶活性以及 CAR 阳性。通过 Protein L 抗体 (Thermo) 检测 CAR 阳性率, 对应的二抗为 Streptavidin PE 和 Streptavidin FITC (BD)。保留 CAR 阳性的 FRP5-CAR-NK92 克隆、具有酶活性的 CAR 阳性 FRP5-sPH20-NK92 克隆、具有酶活性的 CAR 阳性 FRP5-mPH20-NK92 克隆用于后续实验。

实施例 6. 靶细胞的制备

MSLN 阳性靶细胞制备

准备 24 孔板, 接种 1×10^5 个 BxPC3 细胞/孔, 加入完全培养基 (DMEM、10%FBS), 置于 37°C 、5% CO_2 培养箱, 过夜培养。

取出 1mg/ml 的聚醚酰亚胺 (PEI, Polyscience) 转染试剂及 MSLN-pcDNA3.1 质粒, 室温解冻。取质粒 DNA (3.3 μg) 加入至 165 μl opti-MEM 培养基中, 混合均匀。取 PEI (10.5 μg) 加入 165 μl opti-MEM 培养基 (GIBCO) 中, 混合均匀。按 1:1 比例混合以上两种溶液, 室温孵育 20mins 以形成 DNA/PEI 复合物。按 100 μl /well 将 DNA/PEI 溶液加入种板细胞, 前后左右摇晃混匀培养板, 置于 37°C 、5% CO_2 培养箱孵育 24hr。

消化各转染孔中的细胞, 混合均匀后计数, 按照 100000 个细胞/皿的比例将转染细胞接种于 10cm 培养皿, 10ml/孔。接种后 24hr, 更换培养基为 DMEM + 10%FBS + 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ G418。培养皿置于 37°C 、5% CO_2 培养箱继续培养。后续每 2~4 天更换培养基, 至克隆长出, 长出后的克隆混合后进行有限稀释, 0.5 个细胞/孔接种至 96 孔板。培养 15~25 天待克隆长出后, 扩增克隆。扩增后的克隆取 1×10^6 个细胞使用 FACS 检测表面 MSLN 分子的表达情况。通过抗人 MSLN PE 抗体 (R&D) 检测 CAR 阳性率, 对应的二抗为 Streptavidin PE 和 Streptavidin FITC (BD Bioscience)。得到表达 MSLN 的 BxPC3 靶细胞。

表 5. 靶细胞及培养方法

No.	细胞名称	细胞类型	ATCC	细胞培养基
1	BxPC3	胰腺癌细胞	CRL-1687	RPMI1640 + 10%FBS
2	BxPC3-MSLN	胰腺癌细胞	/	RPMI1640 + 10%FBS + 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ G418
3	MDA-MB-231	乳腺癌细胞	HTB-26	DMEM + 10%FBS
4	SCC152	头颈鳞状细胞癌细胞	CRL-3240	DMEM + 10%FBS
5	Hep3B	肝癌细胞	HB-8064	DMEM + 10%FBS

HAS2 过高表达靶细胞制备

通过 HAS2 的稳定转染及筛选得到 HA 高表达靶细胞, 作为体外细胞模型, 评价 PH20 对于免疫细胞杀伤靶细胞效果的影响。各靶细胞按照表 5 列出的培养基进行培养, 其中培养试剂均购自 GIBCO。取出 1mg/ml 的聚醚酰亚胺 (PEI, Polyscience) 转染试剂及 HAS2-pcDNA3.1-Hyg 质粒, 室温解冻。取质粒 DNA (3.3 μg) 加入至 165 μl opti-MEM 培养基中, 混合均匀。取 PEI (10.5 μg) 加入 165 μl opti-MEM 培养基中, 混合均匀。按 1:1 比例混合以上两种溶液, 室温孵育 20mins 以形成 DNA/PEI 复合物。按 100 μl /well 将 DNA/PEI 溶液加入种板细胞, 前后左右摇晃混匀培养板, 置于 37°C 、5% CO_2 培养箱孵育 24hr。

消化各转染孔中的细胞, 混合均匀后计数, 按照 100000 个细胞/皿的比例将转染细胞接种于 10cm 培养皿, 10ml/孔。接种后 24hr, 更换培养基为细胞培养基 + 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 潮

霉素 (GIBCO)。培养皿置于 37℃、5%CO₂ 培养箱继续培养。后续每 2~4 天更换培养基，至克隆长出，长出后的克隆混合后进行有限稀释，0.5 个细胞/孔接种至 96 孔板。培养 15~25 天待克隆长出后，对克隆进行换液处理。换液后 24hr，采用透明质酸 ELISA 定量试剂盒 (R&D) 检测培养上清中的透明质酸含量。选择透明质酸分泌量高、生长良好的克隆扩增至 24 孔板。待满层后，按照 1×10^5 个细胞每孔接种至 24 孔板，每孔培养体积 1ml。培养 24hr 后，取培养上清，依据试剂盒提供的检测方法、采用试剂盒中的稀释液稀释培养上清以检测其中的透明质酸含量，选择透明质酸分泌量高、生长良好的克隆各一株用于后续实验 (表 6)。

表 6. 靶细胞透明质酸表达量

细胞名称	培养上清中的 HA 含量 (ng/ml)	
	HAS2-	HAS2+
BxPC3-MSLN	1314	19491
MDA-MB-231	851	6236
SCC152	301	8936
Hep3B	353	12501

实施例 7 表达 PH20 的 CAR-T 细胞具有透明质酶活性以及细胞杀伤活性

慢病毒感染后第 7 天，取细胞检测透明质酶活性。针对分泌透明质酸酶的免疫细胞，取 1×10^6 个细胞接种至 24 孔板，培养体积 1ml。培养 24hr 后，取上清用于酶活性检测。针对表达膜结合透明质酸酶的免疫细胞，取 1×10^6 个目的蛋白表达阳性细胞，酶活性检测缓冲液重悬细胞沉淀至 1×10^6 个细胞/ml，取细胞液用于酶活性检测。按照《中国药典》2015 年版 四部中的通则《1207 玻璃酸酶测定法》进行 CAR-T 细胞的透明质酶活性检测。

慢病毒感染后第 7 天，进行体外细胞杀伤实验。取靶细胞按照 1×10^5 细胞/ml 的密度、1ml/孔接种至 24 孔板。CAR-T 细胞按照 1×10^6 、 3×10^5 分别接种至含靶细胞的 24 孔板中。将 24 孔板放置于 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养 16~24hr。培养结束后，取培养上清，按照 CytoTox 96[®] 非放射性细胞毒性检测试剂盒 (Promega) 说明书的方法检测培养上清中的 LDH 以确认杀伤效果。

表 7. 表达不同密码子 PH20 的 T 细胞及培养上清中的透明质酶活性检测

PH20 表达 T 细胞 ($\times 10^6$ cells/ml)	不同样品的 OD _{640nm} 值			
	mPH20-T	mPH20-Twt	PBS	10 单位/ml 透明质酸酶
0.04	0.38	0.39	0.39	0.09
0.2	0.31	0.37		
1	0.09	0.27		

5	0.10	0.10		
25	0.09	0.15		

注：OD_{640nm} 值越高，酶活性越小；值越低，酶活性越高。

对比不同核苷酸序列的 PH20 表达情况。针对表达膜结合透明质酸酶的免疫细胞，采用酶活性检测缓冲液将细胞密度调正未如表 7 所示，取细胞液用于酶活性检测。结果显示细胞密度达到 1×10^6 时，mPH20-T 细胞的透明质酸酶表达量高于 mPH20-Twt（野生型密码子）。针对分泌透明质酸酶的免疫细胞，取 1×10^6 个细胞接种至 24 孔板，培养体积 1ml。培养 24hr 后，取上清用于酶活性检测，以玻璃酸酶国家标准品作为标准品进行酶活性的计算。sPH20-T 的分泌酶活性为 67 ± 25 单位/ml，sPH20-Twt 的分泌酶活性为 58 ± 23 单位/ml。以上结果显示，经优化的密码子其表达量高于野生型密码子。

表 8. 表达 PH20 的 CAR-T 细胞及培养上清中的透明质酸酶活性检测

免疫细胞	细胞酶活性 /OD _{640nm}	培养上清酶活性 /OD _{640nm}	靶细胞	HAS2-		HAS2+	
				不同效靶比细胞裂解百分比 (%)		不同效靶比细胞裂解百分比 (%)	
				10:1	3:1	10:1	3:1
MSLN-CAR-T 核转染#	0.68	0.39	/	/	/	/	/
MSLN-mPH20-CAR-T 核转染#	0.56	0.42		/	/	/	/
10 单位/ml 透明质酸酶	/	0.18		/	/	/	/
PBS 溶液	/	0.37		/	/	/	/
mPH20-T	0.28	0.39	BxPC3-MSLN	6.3	7.1	8.7	8.8
sPH20-T	0.23	0.22		7.5	6.4	10.8	11.2
MSLN-CAR-T	0.41	0.4		85.2	38.6	80.9	37.9
MSLN-mPH20-CAR-T	0.26	0.41		88.3*	57.1***	85.4	43.6*
MSLN-sPH20-CAR-T	0.28	0.36		84.1*	51.4**	82.1	41.5*
MSLN-CAR-T, 10μg/mL 重组人 PH20	/	/		91.3*	53.5***	87.7	42.9*
10 单位/ml 透明质酸酶	/	0.25		/	/	/	/
PBS 溶液	/	0.42		/	/	/	/
mPH20-T	0.24	0.41		4.2	3.5	1.5	2.1
sPH20-T	0.25	0.26		5.5	4	2.5	1.9
GPC3-CAR-T	0.39	0.39	Hep3B	74.9	60.3	55.3	53.5
GPC3-mPH20-CAR-T	0.24	0.39		95.7**	85.3**	88.5***	85.2***
GPC3-sPH20-CAR-T	0.26	0.37		93.2**	89.6**	93.1***	88.9***
GPC3-CAR-T, 10μg/mL 重组人 PH20	/	/		92.8**	90.1**	87.6***	90.2***
10 单位/ml 透明质酸酶	/	0.23		/	/	/	/
PBS 溶液	/	0.42		/	/	/	/
mPH20-T	0.18	0.37		1.2	1.3	0.9	1
sPH20-T	0.19	0.19		2.1	2.3	0.5	0.3
ROR1-CAR-T	0.36	0.39	MDA-MB-231	40.5	42.1	15.6	16.9
ROR1-mPH20-CAR-T	0.2	0.36		63.8***	59.3**	48.7***	50.2***
ROR1-sPH20-CAR-T	0.17	0.38		70.1***	66.5**	56.5***	62.4***
ROR1-CAR-T, 10μg/mL 重组人 PH20	/	/		67.8***	73.1***	49.9***	55.3***

10 单位/ml 透明质酸酶	/	0.17		/	/	/	/
PBS 溶液	/	0.37		/	/	/	/

注 1: OD_{640nm} 值越高, 酶活性越小; 值越低, 酶活性越高。

注 2: #核转染的细胞, 由于阳性率过低, 1×10^6 个细胞/ml 的阳性细胞实际密度约为 1×10^8 个细胞/ml, 这个密度的细胞对于活性检测存在干扰, 结果显示偏高。

注 3: *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.005。

实验结果表明, 在 HAS2 过表达型 MDA-MB-231 细胞中, 携带 PH20 的 ROR1-CAR-T 细胞及加入 PH20 共培养的 ROR1-CAR-T 细胞, 其对靶细胞的杀伤效果显著好于对照 ROR1-CAR-T 细胞。

实施例 8 表达 PH20 的 CAR-NK 细胞具有透明质酸酶活性以及细胞杀伤活性

取细胞检测透明质酸酶活性。针对分泌透明质酸酶的免疫细胞, 取 1×10^6 个细胞接种至 24 孔板, 培养体积 1ml。培养 24hr 后, 取上清用于酶活性检测。针对表达膜结合透明质酸酶的免疫细胞, 取 1×10^6 个细胞, 酶活性检测缓冲液重悬细胞沉淀至 1×10^6 个细胞/ml, 取细胞液用于酶活性检测。按照《中国药典》2015 年版 四部中的通则《1207 玻璃酸酶测定法》进行 CAR-NK 细胞的透明质酸酶活性检测。

取靶细胞按照 1×10^5 细胞/ml 的密度、1ml/孔接种至 24 孔板。CAR-NK 细胞按照 1×10^6 、 3×10^5 分别接种至含靶细胞的 24 孔板中。将 24 孔板放置于 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养 16~24hr。培养结束后, 取培养上清, 按照 CytoTox 96® 非放射性细胞毒性检测试剂盒 (Promega) 说明书的方法检测培养上清中的 LDH 以确认杀伤效果。

表 9. 表达 PH20 的 CAR-NK 细胞及培养上清中的透明质酸酶活性检测

免疫细胞	细胞酶活性 /OD _{640nm}	培养上清酶 活性/OD _{640nm}	HAS2-		HAS2+	
			不同效靶比细胞裂解 百分比 (%)		不同效靶比细胞裂解 百分比 (%)	
			10:1	3:1	10:1	3:1
mPH20-NK	0.23	0.36	5.6	7.1	5	2.3
sPH20-NK	0.22	0.19	7.2	8.3	5.3	3.7
FRP5-CAR-NK	0.41	0.31	21.5	19	15.5	10.4
FRP5-mPH20-CAR-NK	0.2	0.39	39.9**	28.9*	30.6***	25.8***
FRP5-sPH20-CAR-NK	0.23	0.26	35.2*	25.2	33.8***	23.7**
FRP5-CAR-NK, 10μg/mL 重组人 PH20	/	/	41.7**	30.3*	38.2***	27.5***
10 单位/ml 透明质酸酶	/	0.21	/	/	/	/
PBS 溶液	/	0.44	/	/	/	/

注 1: OD_{640nm} 值越高, 酶活性越小; 值越低, 酶活性越高。

注 2: *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.005。

实验结果表明, 表达 PH20 蛋白的免疫细胞在体外细胞杀伤实验中, 针对野生型

MDA-MB-231 和 HAS2 过表达的 MDA-MB-231 细胞, 携带 PH20 的 FRP5-CAR-NK 细胞及加入 PH20 共培养的 FRP5-CAR-NK 细胞杀伤效果均更好。

实施例 9 表达 PH20 的 TCR-T 细胞具有透明质酶活性以及细胞杀伤活性

取细胞检测透明质酸酶活性。针对分泌透明质酸酶的免疫细胞, 取 1×10^6 个细胞接种至 24 孔板, 培养体积 1ml。培养 24hr 后, 取上清用于酶活性检测。针对表达膜结合透明质酸酶的免疫细胞, 取 1×10^6 个细胞, 酶活性检测缓冲液重悬细胞沉淀至 1×10^6 个细胞/ml, 取细胞液用于酶活性检测。按照《中国药典》2015 年版 四部中的通则《1207 玻璃酸酶测定法》进行 TCR-T 细胞的透明质酸酶活性检测。

慢病毒感染后第 7 天, 进行体外细胞杀伤实验。取靶细胞按照 1×10^5 细胞/ml 的密度、1ml/孔接种至 24 孔板。CAR-T 细胞按照 1×10^6 、 3×10^5 分别接种至含靶细胞的 24 孔板中。将 24 孔板放置于 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 培养箱中培养 16~24hr。培养结束后, 取培养上清, 按照 CytoTox 96® 非放射性细胞毒性检测试剂盒 (Promega) 说明书的方法检测培养上清中的 LDH 以确认杀伤效果。

表 10. 表达 PH20 的 TCR-T 细胞及培养上清中的透明质酸酶活性检测

免疫细胞	细胞酶活性 /OD _{640nm}	培养上清酶活性 /OD _{640nm}	HAS2-		HAS2+	
			不同效靶比细胞裂解 百分比 (%)		不同效靶比细胞裂解 百分比 (%)	
			10:1	3:1	10:1	3:1
mPH20-T	0.21	0.33	0.2	0.1	0.1	0.1
sPH20-T	0.18	0.19	0.1	0.2	0.2	0.1
E6 TCR-T	0.38	0.35	32.4	28.7	16.5	10.6
mPH20-E6 TCR-T	0.19	0.3	33.1	30.4	25.5*	21.8*
sPH20-E6 TCR-T	0.22	0.31	35.2	29.3	30.2**	23.7**
E6 TCR-T, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 重组人 PH20	/	/	26.7	25.1	28.6**	26.3**
10 单位/ml 透明质酸酶	/	0.17	/	/	/	/
PBS 溶液	/	0.37	/	/	/	/

注 1: OD_{640nm} 值越高, 酶活性越小; 值越低, 酶活性越高。

注 2: *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.005。

实验结果表明, 表达 PH20 蛋白的免疫细胞在体外细胞杀伤实验中, 针对野生型 SCC152 细胞, 表现与未表达 PH20 的免疫细胞类似。HAS2 过表达细胞的杀伤实验中, 携带 PH20 的 E6 TCR-T 细胞及加入 PH20 共培养的 FRP5-CAR-NK 细胞杀伤效果均更好。

实施例 10 PDX 模型的筛选

为了评价表达 PH20 的 CAR-T 细胞对高水平 HA 肿瘤组织的作用, 建立 HA 高表达小鼠异种移植物肿瘤模型。采用免疫组化的方法检测 PDX 组织中的 HA 表达。小鼠的

PDX 组织生长至约 500mm³ 时, 取肿瘤组织, 4%福尔马林固定, 保存于 2~8℃。常规脱水, 石蜡包埋切片, 片厚 3μm。对切片进行脱蜡复水, 依次采用二甲苯处理 10 分钟共两次、无水乙醇处理 5 分钟共两次、95%乙醇处理 2 分钟、85%乙醇处理 2 分钟、75%乙醇处理 2 分钟、蒸馏水洗 2 分钟。将切片至于柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液中高温热修复 30 分钟, 自然冷却至室温。PBS 冲洗三次, 每次 3 分钟。使用 3% H₂O₂ 孵育 15 分钟, 封闭内源性过氧化物酶, 随后采用 PBS 冲洗三次, 每次 3 分钟。

每个候选 PDX 组织选择 4 片切片, 其中 2 片加入至含 100 单位/mL 重组人 PH20 (Rhinobio) 的溶液中, 在 37℃ 环境下孵育 2 小时, 得到的切片作为阴性对照。2 片用 PH20 缓冲液 (25mM 哌嗪-1,4-二乙磺酸, 70mM 氯化钠, 0.1%牛血清白蛋白, pH5.5) 在 37℃ 环境下孵育 2 小时。孵育完成后, 使用 2%山羊血清白 (博士德) 孵育 30 分钟进行封闭。将两种处理后的切片分别取一片用 1μg/ml biotin-HABP (AMSBIO) 进行孵育, 4℃ 孵育过夜。PBS 冲洗三次, 每次 5 分钟。采用 Streptavidin-HRP (BD Bioscience) 溶液孵育 30 分钟。PBS 冲洗三次, 每次 5 分钟。随后采用 DAB 显色液 (Thermo) 进行显色。显色完成的切片进行拍照。

每个候选 PDX 组织选择 2 片切片, 进行抗原的染色。Mesothelin 蛋白采用抗人 MSLN 蛋白兔单抗 (abcam) 作为一抗。EpCAM 采用抗人 EpCAM 蛋白兔单抗 (abcam) 作为一抗。山羊抗兔 IgG-HRP 抗体 (abcam) 作为二抗。

通过以上免疫组化的方法对胰腺癌病人来源的 PDX 样本进行 MSLN 以及 HA 表达水平的筛选, 选择强 MSLN 以及 HA 染色级别的 PDX 样本进行小鼠的接种, 最终选择的组织免疫组化结果见图 2。通过以上免疫组化的方法对胃癌病人来源的 PDX 样本进行 EpCAM 以及 HA 表达水平的筛选, 选择强 EpCAM 以及 HA 染色级别的 PDX 样本进行小鼠的接种, 最终选择的组织免疫组化结果见图 3。

实施例 11 表达 PH20 的免疫细胞在胰腺癌 PDX 模型小鼠的体内活性

复苏 MSLN/HA 高表达的胰腺癌 PDX 样本, 接种于 2~4 只 NCG 小鼠皮下, 当单个瘤体积超过 500 mm³ 时, 根据实验方案进行肿瘤的大规模传代。取生长旺盛期的瘤组织剪切成 1.5mm³ 左右, 在无菌条件下, 接种于裸小鼠右侧腋窝皮下。每天观察小鼠的生长情况, 每周称重, 确认小鼠荷瘤后, 对肿瘤大小进行监测, 监测频率根据实际情况确定。

选择 6~7 周龄的 NCG 小鼠用 PDX 荷瘤接种至小鼠右侧腋窝皮下。通过测径器测量实体瘤团块的长度 (L) 和宽度 (W), 肿瘤体积 (TV) 计算为: $(L \times W^2) / 2$ 。当肿瘤的体积达到直径大约 150~250mm³ 时, 将小鼠分级成 5 个处理组: 1) T 细胞对照; 2) MSLN-CAR-T 细胞; 3) MSLN-mPH20-CAR-T 细胞; 4) MSLN-sPH20-CAR-T 细胞; 5) MSLN-

CAR-T 细胞, PH20 蛋白溶液。

给药当日对小鼠的体重和肿瘤大小进行检测。对 CAR-T 细胞进行细胞计数, 并根据 CAR 的阳性率计算需要给药的总细胞数量。取相应细胞数量体积的细胞进行离心, 得到的细胞沉淀采用 PBS (pH7.2) 清洗两次。清洗后, 使用 PBS 重悬 CAR-T 细胞, 终体积为 100 μ l, 每只小鼠给药 5×10^6 阳性 CAR-T 细胞。CAR-T 细胞采用瘤内注射方式给药一次, 一周后采用相同方式再给药一次。PH20 蛋白溶液 (1.4mg/ml; 以下简称溶液 B) 的给药量为 1000 单位/只老鼠, 对应的蛋白含量约为 0.01mg/10 μ g 每只老鼠。组别 5 给药方式为, CAR-T 阳性细胞和溶液 B 一同给药。细胞给药当天 (D0) 取 10 μ l 溶液 B 加入至含细胞的 PBS 中, 混匀后, 用于小鼠给药。后 D1、D3、D5、D7、D8、D10、D12、D14、D16, 进行给药, 用量为取 10 μ l 加入至 90 μ l PBS 后进行给药。肿瘤大小的检测频率为每周两次, 药效观察周期为第二次细胞注射后第 21 天, 实行实验终点处理。

人胰腺癌 PDX 模型小鼠移植瘤各实验组的不同时间的肿瘤体积如图 4 所示, CAR-T 细胞/媒介对照给药 28 天后, 组 2-5 均具有显著的抑瘤作用。MSLN-CAR-T 细胞给药 T/C 值为 50.4%, MSLN-mbPH20-CAR-T 细胞给药 T/C 值为 7.4%, MSLN-sPH20-CAR-T 细胞给药 T/C 值为 2.5%, MSLN-CAR-T 细胞+PH20 给药 T/C 值为 8.9%。其中表达 PH20 或者和 PH20 共给药的 CAR-T 细胞给药效果均明显好于 MSLN-CAR-T 细胞。给药期间, 各实验组对荷瘤鼠的体重变化无影响。各实验组小鼠状态较好, 无体重下降。

实施例 12 表达 PH20 的免疫细胞在胃癌 PDX 模型小鼠的体内活性

复苏 EpCAM/HA 高表达的胃癌 PDX 样本, 接种于 2~4 只 NCG 小鼠皮下, 当单个瘤体积超过 500 mm³ 时, 根据实验方案进行肿瘤的大规模传代。取生长旺盛期的瘤组织剪切成 1.5mm³ 左右, 在无菌条件下, 接种于裸小鼠右侧腋窝皮下。每天观察小鼠的生长情况, 每周称重, 确认小鼠荷瘤后, 对肿瘤大小进行监测, 监测频率根据实际情况确定。

选择 6~7 周龄的 NCG 小鼠用 PDX 荷瘤接种至小鼠右侧腋窝皮下。通过测径器测量实体瘤团块的长度 (L) 和宽度 (W), 肿瘤体积 (TV) 计算为: $(L \times W^2) / 2$ 。当肿瘤的体积达到直径大约 150~250mm³ 时, 将小鼠分级成 5 个处理组: 1) T 细胞对照; 2) EpCAM-CAR-T 细胞; 3) EpCAM-mPH20-CAR-T 细胞; 4) EpCAM-sPH20-CAR-T 细胞; 5) EpCAM-CAR-T 细胞, PH20 蛋白溶液 (溶液 B)。

给药当日对小鼠的体重和肿瘤大小进行检测。对 CAR-T 细胞进行细胞计数, 并根据 CAR 的阳性率计算需要给药的总细胞数量。取相应细胞数量体积的细胞进行离心, 得到的细胞沉淀采用 PBS (pH7.2) 清洗两次。清洗后, 使用 PBS 重悬 CAR-T 细胞, 终体积为 100 μ l, 每只小鼠给药 5×10^6 阳性 CAR-T 细胞。CAR-T 细胞采用瘤内注射方式给药一

次，一周后采用相同方式再给药一次。溶液 B 的给药量为 1000 单位/只老鼠，对应的蛋白含量约为 0.01mg/10 μ g 每只老鼠。组别 5 给药方式为，CAR-T 阳性细胞和溶液 B 一同给药。细胞给药当天（D0）取 10 μ l 溶液 B 加入至含细胞的 PBS 中，混匀后，用于小鼠给药。后 D1、D3、D5、D7、D8、D10、D12、D14、D16 取 10 μ l 加入至 90 μ l PBS 后进行给药。肿瘤大小的检测频率为每周两次，药效观察周期为第二次细胞注射后第 21 天，实行实验终点处理。

人胃癌 PDX 模型小鼠移植瘤各实验组的不同时间的肿瘤体积如图 5 所示，CAR-T 细胞/媒介对照给药 28 天后，组 2-5 均具有显著的抑瘤作用。EpCAM-CAR-T 细胞给药 T/C 值为 68.7%，EpCAM-mPH20-CAR-T 细胞给药 T/C 值为 0.7%，EpCAM-sPH20-CAR-T 细胞给药 T/C 值为 12.0%，EpCAM-CAR-T 细胞+PH20 给药 T/C 值为 11.9%。其中表达 PH20 或者和 PH20 共给药的 CAR-T 细胞给药效果均明显好于 EpCAM-CAR-T 细胞。给药期间，各实验组对荷瘤鼠的体重变化无影响。各实验组小鼠状态较好，无体重下降。

权利要求

1. 一种包含肿瘤抗原识别受体的免疫细胞,其表达透明质酸酶,所述透明质酸酶为:

- a) 锚定于所述免疫细胞上的全长蛋白; 或
- b) 分泌至所述免疫细胞外的可溶型蛋白。

2. 如权利要求 1 所述的免疫细胞,其特征在于,所述的 b) 为所述的 a) 缺失了羧基端膜结构后获得; 较佳地,所述的透明质酸酶为哺乳动物睾丸透明质酸酶,更佳地为人透明质酸酶 HYAL1、HYAL2、SPAM1 或者 PH20; 进一步更佳地:

所述 a) 的氨基酸序列如序列表中 SEQ ID NO. 1 所示,或者为与如 SEQ ID NO. 1 所示的氨基酸序列具有 80% 以上的序列同一性的氨基酸序列; 编码所述 a) 的核苷酸序列优选如序列表中 SEQ ID NO. 2 或者 SEQ ID NO. 3 所示,或者为与如序列表中 SEQ ID NO. 2 或者 SEQ ID NO. 3 所示的核苷酸序列具有 80% 以上的序列同一性的核苷酸序列;

所述 b) 的氨基酸序列为如序列表中 SEQ ID NO. 1 所示的氨基酸序列的第 1~447 位,或者为与如序列表中 SEQ ID NO. 1 所示的氨基酸序列的第 1~447 位的具有 80% 以上的序列同一性的氨基酸序列; 编码所述 b) 的核苷酸序列优选为如序列表中 SEQ ID NO. 2 或者 SEQ ID NO. 3 所示的核苷酸序列的第 1~1341 位,或者为与如序列表中 SEQ ID NO. 2 或者 SEQ ID NO. 3 所示的核苷酸序列的第 1~1341 位具有 80% 以上的序列同一性的核苷酸序列。

3. 如权利要求 1 所述的免疫细胞,其特征在于,所述的肿瘤抗原识别受体为嵌合抗原受体 (CAR) 或者 T 细胞受体 (TCR), 较佳地:

所述的 TCR 包含 TCR 的 α 链、TCR 的 β 链、TCR 的 γ 链和 TCR 的 δ 链中的一种或多种,所述 α 链包含可变区和恒定区; 较佳地,所述可变区为人 TCR α 链的可变区,所述恒定区为鼠 α 链的恒定区; 所述 β 链包含可变区和恒定区,所述可变区为人 TCR β 链的可变区,所述恒定区为鼠 β 链的恒定区; 更佳地,所述的 TCR 为 E6 TCR;

和/或,所述的 CAR 包括胞内区、铰链区和跨膜区,其中胞内区包括人的 4-1BB 胞内区和/或人的 CD28 胞内区,以及人的 CD3 ζ 胞内区,优选为人的 4-1BB 胞内区、人的 CD28 胞内区,以及人的 CD3 ζ 胞内区;

和/或,所述的 CAR 的铰链区为人的 CD8 α 铰链区、跨膜区为人的 CD8 α 跨膜区。

4. 如权利要求 3 所述的免疫细胞,其特征在于,所述 CAR 或者所述 TCR 识别的抗原为 ROR1、GPC3、MSLN 或者 EpCAM; 所述 CAR 或者所述 TCR 的肿瘤抗原识别区为能够结合以上肿瘤抗原的区域,优选 scFv; 较佳地:

识别所述 ROR1 的 scFv 的核苷酸序列如序列表中 SEQ ID NO. 4 所示, 或者与如序列表中 SEQ ID NO. 4 所示的核苷酸序列具有 80% 以上序列同一性; 或者, 识别所述 GPC3 的 scFv 的核苷酸序列如序列表中 SEQ ID NO. 5 所示, 或者与如序列表中 SEQ ID NO. 5 所示的核苷酸序列具有 80% 以上序列同一性; 或者, 识别所述 EpCAM 的 scFv 的核苷酸序列如序列表中 SEQ ID NO. 6 所示, 或者与如序列表中 SEQ ID NO. 6 所示的核苷酸序列具有 80% 以上序列同一性;

和/或, 所述的信号肽的氨基酸序列如序列表中 SEQ ID NO. 7 所示, 或者与如序列表中 SEQ ID NO. 7 所示的氨基酸序列具有 80% 以上的序列同一性;

和/或, 所述的人 CD8 α 铰链区的氨基酸序列如序列表中 SEQ ID NO. 11 所示, 或者与如序列表中 SEQ ID NO. 11 所示的氨基酸序列具有 80% 以上的序列同一性;

和/或, 所述的人 CD8 α 跨膜区的氨基酸序列如序列表中 SEQ ID NO. 12 所示, 或者与如序列表中 SEQ ID NO. 12 所示的氨基酸序列具有 80% 以上的序列同一性;

和/或, 所述的人 4-1BB 胞内区的氨基酸序列如序列表中 SEQ ID NO. 13 所示, 或者与如序列表中 SEQ ID NO. 13 所示的氨基酸序列具有 80% 以上的序列同一性;

和/或, 所述的人 CD3 ζ 胞内区的氨基酸序列如序列表中 SEQ ID NO. 14 所示, 或者与如序列表中 SEQ ID NO. 14 所示的氨基酸序列具有 80% 以上的序列同一性。

5. 如权利要求 1~4 任一项所述的免疫细胞, 其特征在于, 表达所述透明质酸酶的基因与所述 CAR 或者所述 TCR 与所述的透明质酸酶位于同一个表达载体上, 或者分别位于不同的表达载体上; 较佳地:

所述 TCR 或者所述 CAR 通过 DNA 或者 mRNA 形式导入至细胞;

所述表达载体为动物病毒, 优选慢病毒;

和/或, 所述透明质酸酶、所述 CAR 以及所述 TCR 中的一种或多种的表达受到有活性的启动子的控制, 所述的启动子优选 EF1 α 启动子。

6. 如权利要求 5 所述的免疫细胞, 其特征在于,

在所述 CAR 与所述的透明质酸酶位于同一个表达载体上的情况下, 所述的表达载体包括以下表达单元: 信号肽+scFv+人 CD8 α 铰链区+人 CD8 α 跨膜区+人 4-1BB 胞内区+人 CD3 ζ 胞内区+连接元件+透明质酸酶, 其中, 所述信号肽位于 5'端, 所述透明质酸酶位于 3'端; 或者, 所述 TCR 与所述的透明质酸酶位于同一个表达载体上的情况下, 所述的表达载体包括以下表达单元: E6 TCR+连接元件+透明质酸酶, 其中, 所述 E6 TCR 位于 5'端, 所述透明质酸酶位于 3'端;

在所述 CAR 或所述 TCR 与所述的透明质酸酶分别位于不同的表达载体上的情况下,

其中一个所述表达载体包括以下表达单元：信号肽+scFv+人 CD8 α 铰链区+人 CD8 α 跨膜区+人 4-1BB 胞内区+人 CD3 ζ 胞内区，或者包括以下表达单元：E6 TCR+IRES；另一个所述表达载体包括以下表达单元：透明质酸酶+连接元件+标签蛋白，其中，所述的透明质酸酶位于 5'端，所述的标签蛋白位于 3'端；

所述的连接元件优选 T2A 连接肽、P2A 连接肽、E2A 连接肽、F2A 连接肽或者 IRES 元件；

所述的标签蛋白优选 tEGFR。

7. 如权利要求 1~6 任一项所述的免疫细胞，其特征在于，所述免疫细胞为 T 细胞、NK 细胞或巨噬细胞；较佳地，所述 T 细胞为 CD3 抗体刺激活化后的 T 细胞，所述的 NK 细胞为 NK-92 细胞系；更佳地，所述 T 细胞来源于肿瘤患者的外周血单个核细胞。

8. 一种表达构建物，其特征在于，其包括肿瘤抗原识别受体的表达盒 1 和透明质酸酶的表达盒 2；

较佳地，所述的表达盒 1 和所述的表达盒 2 之间通过连接元件顺序连接，所述的连接元件优选 T2A 连接肽、P2A 连接肽、E2A 连接肽、F2A 连接肽或者 IRES 元件；

更佳地，所述的肿瘤抗原识别受体为嵌合抗原受体 (CAR) 或者 T 细胞受体 (TCR)；和/或，所述的透明质酸酶为透明质酸酶全长蛋白或透明质酸酶可溶性蛋白。

9. 如权利要求 8 所述的表达构建物，其特征在于，当所述的肿瘤抗原识别受体为嵌合抗原受体 (CAR) 时，所述的表达盒 1 包括以下表达单元：信号肽+scFv+人 CD8 α 铰链区+人 CD8 α 跨膜区+人 4-1BB 胞内区+人 CD3 ζ 胞内区，或者当所述的肿瘤抗原识别受体为 TCR 时，所述的表达盒 1 包括以下表达单元：E6 TCR；

较佳地，所述的 scFv 为识别 ROR1、GPC3 或者 EpCAM 的 scFv；所述识别 ROR1 的 scFv 的核苷酸序列优选如序列表中 SEQ ID NO. 4 所示，或者与序列表中 SEQ ID NO. 4 所示的核苷酸序列具有 80%以上的序列同一性；所述识别 GPC3 的 scFv 的核苷酸序列优选如序列表中 SEQ ID NO. 5 所示，或者与序列表中 SEQ ID NO. 5 所示的核苷酸序列具有 80%以上的序列同一性；所述识别 EpCAM 的 scFv 的核苷酸序列优选如序列表中 SEQ ID NO. 6 所示，或者与序列表中 SEQ ID NO. 6 所示的核苷酸序列具有 80%以上的序列同一性；

和/或，所述的信号肽的氨基酸序列如序列表中 SEQ ID NO. 7 所示，或者与序列表中 SEQ ID NO. 7 所示的氨基酸序列具有 80%以上的序列同一性；

和/或，所述的人 CD8 α 铰链区的氨基酸序列如序列表中 SEQ ID NO. 11 所示，或者与序列表中 SEQ ID NO. 11 所示的氨基酸序列具有 80%以上的序列同一性；

和/或,所述的人 CD8 α 跨膜区的氨基酸序列如序列表中 SEQ ID NO. 12 所示,或者与序列表中 SEQ ID NO. 12 所示的氨基酸序列具有 80%以上的序列同一性;

和/或,所述的人 4-1BB 胞内区的氨基酸序列如序列表中 SEQ ID NO. 13 所示,或者与序列表中 SEQ ID NO. 13 所示的氨基酸序列具有 80%以上的序列同一性;

和/或,所述的人 CD3 ζ 胞内区的氨基酸序列如序列表中 SEQ ID NO. 14 所示,或者与序列表中 SEQ ID NO. 14 所示的氨基酸序列具有 80%以上的序列同一性;

和/或,所述的 E6 TCR 的氨基酸序列如序列表中 SEQ ID NO. 18 所示,或者与序列表中 SEQ ID NO. 18 所示的氨基酸序列具有 80%以上的序列同一性。

10. 如权利要求 8 或 9 所述的表达构建物,其特征在于,所述的表达盒 2 表达哺乳动物睾丸透明质酸酶,较佳地为人透明质酸酶 HYAL1、HYAL2、SPAM1 或者 PH20;更佳地:

所述的透明质酸酶全长蛋白的氨基酸序列如序列表中 SEQ ID NO. 1 所示,或者与如 SEQ ID NO. 1 所示的氨基酸序列具有 80%以上的序列同一性;编码所述的透明质酸酶全长蛋白的核苷酸序列优选如序列表中 SEQ ID NO. 2 或 3 所示,或者与如 SEQ ID NO. 2 或者 3 所示的核苷酸序列具有 80%以上的序列同一性;

或者所述的透明质酸酶可溶性蛋白的氨基酸序列如序列表中 SEQ ID NO. 1 所示的氨基酸序列的第 1~447 位所示,或者与如序列表中 SEQ ID NO. 1 所示的氨基酸序列的第 1~447 位的氨基酸序列具有 80%以上的序列同一性;编码所述的透明质酸酶可溶性蛋白的核苷酸序列优选如序列表中 SEQ ID NO. 2 或者 SEQ ID NO. 3 所示的核苷酸序列的第 1~1341 位所示,或者与如序列表中 SEQ ID NO. 2 或者 SEQ ID NO. 3 所示的核苷酸序列的第 1~1341 位具有 80%以上的序列同一性。

11. 一种表达载体,其包含如权利要求 8~10 任一项所述的表达构建物;

较佳地,所述的表达载体还含有启动子;所述的启动子优选 EF1 α 启动子。

12. 一种病毒,其包含如权利要求 11 所述的表达载体;较佳地,所述的病毒为慢病毒。

13. 一种药物组合物,其特征在于,其包含如权利要求 1~7 任一项所述的免疫细胞;

较佳地,所述的药物组合物还包含药学上可接受的载体或赋形剂。

14 一种药物组合物,其特征在于,其活性成分包括透明质酸酶和包含肿瘤抗原识别受体的免疫细胞;较佳地:

所述的透明质酸酶在所述的药物组合物中的浓度为 0.1 μ g/ml-15mg/ml,和/或,所述的透明质酸酶的比活性 $\geq$ 10,000 单位/mg。

15. 一种药盒，其包括药盒 A 和药盒 B，所述的药盒 A 包括包含肿瘤抗原识别受体的免疫细胞；所述的药盒 B 包括透明质酸酶；

较佳地，所述的药盒 A 和所述的药盒 B 的施用不分先后。

16. 如权利要求 14 所述的药物组合物或者如权利要求 15 所述的药盒，其特征在于，所述的肿瘤抗原识别受体为嵌合抗原受体（CAR）或者 T 细胞受体（TCR）；所述 CAR 或者所述 TCR 识别的抗原优选 ROR1、GPC3、MSLN 或者 EpCAM，所述 CAR 或者所述 TCR 的肿瘤抗原识别区为能够结合以上肿瘤抗原的区域，优选 scFv；其中，识别所述 ROR1 的 scFv 的核苷酸序列优选如序列表中 SEQ ID NO. 4 所示，或者与序列表中 SEQ ID NO. 4 所示的核苷酸序列具有 80% 以上的序列同一性；识别所述 GPC3 的 scFv 的核苷酸序列优选如序列表中 SEQ ID NO. 5 所示，或者与序列表中 SEQ ID NO. 5 所示的核苷酸序列具有 80% 以上的序列同一性；识别所述 EpCAM 的 scFv 的核苷酸序列优选如序列表中 SEQ ID NO. 6 所示，或者与序列表中 SEQ ID NO. 6 所示的核苷酸序列具有 80% 以上的序列同一性。

和/或，所述的透明质酸酶为全长蛋白或可溶性蛋白，较佳地为哺乳动物睾丸透明质酸酶；进一步较佳地为人透明质酸酶 HYAL1、HYAL2、SPAM1 或者 PH20；更佳地：所述的透明质酸酶全长蛋白的氨基酸序列如序列表中 SEQ ID NO. 1 所示，或者与如 SEQ ID NO. 1 所示的氨基酸序列具有 80% 以上的序列同一性；编码所述的透明质酸酶全长蛋白的核苷酸序列优选如序列表中 SEQ ID NO. 2 或 3 所示，或者与如 SEQ ID NO. 2 或 3 所示的氨基酸序列具有 80% 以上的序列同一性；或者所述的透明质酸酶可溶性蛋白的氨基酸序列如序列表中 SEQ ID NO. 1 所示的氨基酸序列的第 1~447 位所示，或者与如序列表中 SEQ ID NO. 1 所示的氨基酸序列的第 1~447 位具有 80% 以上的序列同一性；编码所述的透明质酸酶可溶性蛋白的核苷酸序列优选如序列表中 SEQ ID NO. 2 或者 SEQ ID NO. 3 所示的核苷酸序列的第 1~1341 位所示，或者与如序列表中 SEQ ID NO. 2 或者 SEQ ID NO. 3 所示的核苷酸序列的第 1~1341 位具有 80% 以上的序列同一性。

17. 如权利要求 1~7 任一项所述的免疫细胞、如权利要求 13、14 或者 16 所述的药物组合物、或者如权利要求 15 或 16 所述的药盒在制备治疗肿瘤药物中的应用，所述的肿瘤为实体肿瘤；所述的实体肿瘤优选表达透明质酸的实体肿瘤，例如黑色素瘤、胰腺癌、肝癌、胶质母细胞瘤、乳腺癌或者肺癌。

经修改的权利要求

国际局收到日：08 Nov. 2019 (08.11.2019)

1. 一种包含肿瘤抗原识别受体的免疫细胞，其表达透明质酸酶，所述透明质酸酶为：
a) 锚定于所述免疫细胞上的全长蛋白；或 b) 分泌至所述免疫细胞外的可溶型蛋白；
所述 a) 的氨基酸序列如序列表中 SEQ ID NO. 1 所示，或者为与如 SEQ ID NO. 1 所示的氨基酸序列具有 80% 以上的序列同一性的氨基酸序列；编码所述 a) 的核苷酸序列优选如序列表中 SEQ ID NO. 2 或者 SEQ ID NO. 3 所示，或者为与如序列表中 SEQ ID NO. 2 或者 SEQ ID NO. 3 所示的核苷酸序列具有 80% 以上的序列同一性的核苷酸序列；
所述 b) 的氨基酸序列为如序列表中 SEQ ID NO. 1 所示的氨基酸序列的第 1~447 位，或者为与如序列表中 SEQ ID NO. 1 所示的氨基酸序列的第 1~447 位的具有 80% 以上的序列同一性的氨基酸序列；编码所述 b) 的核苷酸序列优选为如序列表中 SEQ ID NO. 2 或者 SEQ ID NO. 3 所示的核苷酸序列的第 1~1341 位，或者为与如序列表中 SEQ ID NO. 2 或者 SEQ ID NO. 3 所示的核苷酸序列的第 1~1341 位具有 80% 以上的序列同一性的核苷酸序列。

2. 如权利要求 1 所述的免疫细胞，其特征在于，所述的肿瘤抗原识别受体为嵌合抗原受体（CAR）或者 T 细胞受体（TCR），较佳地：

所述的 TCR 包含 TCR 的 α 链、TCR 的 β 链、TCR 的 γ 链和 TCR 的 δ 链中的一种或多种，所述 α 链包含可变区和恒定区；较佳地，所述可变区为人 TCR α 链的可变区，所述恒定区为鼠 α 链的恒定区；所述 β 链包含可变区和恒定区，所述可变区为人 TCR β 链的可变区，所述恒定区为鼠 β 链的恒定区；更佳地，所述的 TCR 为 E6 TCR；

和/或，所述的 CAR 包括胞内区、铰链区和跨膜区，其中胞内区包括人的 4-1BB 胞内区和/或人的 CD28 胞内区，以及人的 CD3 ζ 胞内区，优选为人的 4-1BB 胞内区、人的 CD28 胞内区，以及人的 CD3 ζ 胞内区；

和/或，所述的 CAR 的铰链区为人的 CD8 α 铰链区、跨膜区为人的 CD8 α 跨膜区。

3. 如权利要求 2 所述的免疫细胞，其特征在于，所述 CAR 或者所述 TCR 识别的抗原为 ROR1、GPC3、MSLN 或者 EpCAM；所述 CAR 或者所述 TCR 的肿瘤抗原识别区为能够结合以上肿瘤抗原的区域，优选 scFv；较佳地：

识别所述 ROR1 的 scFv 的核苷酸序列如序列表中 SEQ ID NO. 4 所示，或者与如序列表中 SEQ ID NO. 4 所示的核苷酸序列具有 80% 以上序列同一性；或者，识别所述 GPC3 的 scFv 的核苷酸序列如序列表中 SEQ ID NO. 5 所示，或者与如序列表中 SEQ ID NO. 5 所示的核苷酸序列具有 80% 以上序列同一性；或者，识别所述 EpCAM 的 scFv 的核苷酸

序列如序列表中 SEQ ID NO. 6 所示，或者与如序列表中 SEQ ID NO. 6 所示的核苷酸序列具有 80%以上序列同一性；

和/或，所述的信号肽的氨基酸序列如序列表中 SEQ ID NO. 7 所示，或者与如序列表中 SEQ ID NO. 7 所示的氨基酸序列具有 80%以上的序列同一性；

和/或，所述的人 CD8 α 铰链区的氨基酸序列如序列表中 SEQ ID NO. 11 所示，或者与如序列表中 SEQ ID NO. 11 所示的氨基酸序列具有 80%以上的序列同一性；

和/或，所述的人 CD8 α 跨膜区的氨基酸序列如序列表中 SEQ ID NO. 12 所示，或者与如序列表中 SEQ ID NO. 12 所示的氨基酸序列具有 80%以上的序列同一性；

和/或，所述的人 4-1BB 胞内区的氨基酸序列如序列表中 SEQ ID NO. 13 所示，或者与如序列表中 SEQ ID NO. 13 所示的氨基酸序列具有 80%以上的序列同一性；

和/或，所述的人 CD3 ζ 胞内区的氨基酸序列如序列表中 SEQ ID NO. 14 所示，或者与如序列表中 SEQ ID NO. 14 所示的氨基酸序列具有 80%以上的序列同一性。

4. 如权利要求 1~3 任一项所述的免疫细胞，其特征在于，表达所述透明质酸酶的基因与所述 CAR 或者所述 TCR 与所述的透明质酸酶位于同一个表达载体上，或者分别位于不同的表达载体上；较佳地：

所述 TCR 或者所述 CAR 通过 DNA 或者 mRNA 形式导入至细胞；

所述表达载体为动物病毒，优选慢病毒；

和/或，所述透明质酸酶、所述 CAR 以及所述 TCR 中的一种或多种的表达受到有活性的启动子的控制，所述的启动子优选 EF1 α 启动子。

5. 如权利要求 4 所述的免疫细胞，其特征在于，

在所述 CAR 与所述的透明质酸酶位于同一个表达载体上的情况下，所述的表达载体包括以下表达单元：信号肽+scFv+人 CD8 α 铰链区+人 CD8 α 跨膜区+人 4-1BB 胞内区+人 CD3 ζ 胞内区+连接元件+透明质酸酶，其中，所述信号肽位于 5'端，所述透明质酸酶位于 3'端；或者，所述 TCR 与所述的透明质酸酶位于同一个表达载体上的情况下，所述的表达载体包括以下表达单元：E6 TCR+连接元件+透明质酸酶，其中，所述 E6 TCR 位于 5'端，所述透明质酸酶位于 3'端；

在所述 CAR 或所述 TCR 与所述的透明质酸酶分别位于不同的表达载体上的情况下，其中一个所述表达载体包括以下表达单元：信号肽+scFv+人 CD8 α 铰链区+人 CD8 α 跨膜区+人 4-1BB 胞内区+人 CD3 ζ 胞内区，或者包括以下表达单元：E6 TCR+IRES；另一个所述表达载体包括以下表达单元：透明质酸酶+连接元件+标签蛋白，其中，所述的透明质酸酶位于 5'端，所述的标签蛋白位于 3'端；

所述的连接元件优选 T2A 连接肽、P2A 连接肽、E2A 连接肽、F2A 连接肽或者 IRES 元件；

所述的标签蛋白优选 tEGFR。

6. 如权利要求 1~5 任一项所述的免疫细胞，其特征在于，所述免疫细胞为 T 细胞、NK 细胞或巨噬细胞；较佳地，所述 T 细胞为 CD3 抗体刺激活化后的 T 细胞，所述的 NK 细胞为 NK-92 细胞系；更佳地，所述 T 细胞来源于肿瘤患者的外周血单个核细胞。

7. 一种表达构建物，其特征在于，其包括肿瘤抗原识别受体的表达盒 1 和如权利要求 1 中所述的透明质酸酶的表达盒 2；

较佳地，所述的表达盒 1 和所述的表达盒 2 之间通过连接元件顺序连接，所述的连接元件优选 T2A 连接肽、P2A 连接肽、E2A 连接肽、F2A 连接肽或者 IRES 元件；

更佳地，所述的肿瘤抗原识别受体为嵌合抗原受体 (CAR) 或者 T 细胞受体 (TCR)；和/或，所述的透明质酸酶为透明质酸酶全长蛋白或透明质酸酶可溶性蛋白。

8. 如权利要求 7 所述的表达构建物，其特征在于，当所述的肿瘤抗原识别受体为嵌合抗原受体 (CAR) 时，所述的表达盒 1 包括以下表达单元：信号肽+scFv+人 CD8 α 铰链区+人 CD8 α 跨膜区+人 4-1BB 胞内区+人 CD3 ζ 胞内区，或者当所述的肿瘤抗原识别受体为 TCR 时，所述的表达盒 1 包括以下表达单元：E6 TCR；

较佳地，所述的 scFv 为识别 ROR1、GPC3 或者 EpCAM 的 scFv；所述识别 ROR1 的 scFv 的核苷酸序列优选如序列表中 SEQ ID NO. 4 所示，或者与序列表中 SEQ ID NO. 4 所示的核苷酸序列具有 80% 以上的序列同一性；所述识别 GPC3 的 scFv 的核苷酸序列优选如序列表中 SEQ ID NO. 5 所示，或者与序列表中 SEQ ID NO. 5 所示的核苷酸序列具有 80% 以上的序列同一性；所述识别 EpCAM 的 scFv 的核苷酸序列优选如序列表中 SEQ ID NO. 6 所示，或者与序列表中 SEQ ID NO. 6 所示的核苷酸序列具有 80% 以上的序列同一性；

和/或，所述的信号肽的氨基酸序列如序列表中 SEQ ID NO. 7 所示，或者与序列表中 SEQ ID NO. 7 所示的氨基酸序列具有 80% 以上的序列同一性；

和/或，所述的人 CD8 α 铰链区的氨基酸序列如序列表中 SEQ ID NO. 11 所示，或者与序列表中 SEQ ID NO. 11 所示的氨基酸序列具有 80% 以上的序列同一性；

和/或，所述的人 CD8 α 跨膜区的氨基酸序列如序列表中 SEQ ID NO. 12 所示，或者与序列表中 SEQ ID NO. 12 所示的氨基酸序列具有 80% 以上的序列同一性；

和/或，所述的人 4-1BB 胞内区的氨基酸序列如序列表中 SEQ ID NO. 13 所示，或者与序列表中 SEQ ID NO. 13 所示的氨基酸序列具有 80% 以上的序列同一性；

和/或，所述的人 CD3 ζ 胞内区的氨基酸序列如序列表中 SEQ ID NO. 14 所示，或者与序列表中 SEQ ID NO. 14 所示的氨基酸序列具有 80% 以上的序列同一性；

和/或，所述的 E6 TCR 的氨基酸序列如序列表中 SEQ ID NO. 18 所示，或者与序列表中 SEQ ID NO. 18 所示的氨基酸序列具有 80% 以上的序列同一性。

9. 如权利要求 7 或 8 所述的表达构建物，其特征在于，所述的表达盒 2 表达哺乳动物睾丸透明质酸酶，较佳地为人透明质酸酶 HYAL1、HYAL2、SPAM1 或者 PH20；更佳地：

所述的透明质酸酶全长蛋白的氨基酸序列如序列表中 SEQ ID NO. 1 所示，或者与如 SEQ ID NO. 1 所示的氨基酸序列具有 80% 以上的序列同一性；编码所述的透明质酸酶全长蛋白的核苷酸序列优选如序列表中 SEQ ID NO. 2 或 3 所示，或者与如 SEQ ID NO. 2 或者 3 所示的核苷酸序列具有 80% 以上的序列同一性；

或者所述的透明质酸酶可溶性蛋白的氨基酸序列如序列表中 SEQ ID NO. 1 所示的氨基酸序列的第 1~447 位所示，或者与如序列表中 SEQ ID NO. 1 所示的氨基酸序列的第 1~447 位的氨基酸序列具有 80% 以上的序列同一性；编码所述的透明质酸酶可溶性蛋白的核苷酸序列优选如序列表中 SEQ ID NO. 2 或者 SEQ ID NO. 3 所示的核苷酸序列的第 1~1341 位所示，或者与如序列表中 SEQ ID NO. 2 或者 SEQ ID NO. 3 所示的核苷酸序列的第 1~1341 位具有 80% 以上的序列同一性。

10. 一种表达载体，其包含如权利要求 7~9 任一项所述的表达构建物；

较佳地，所述的表达载体还含有启动子；所述的启动子优选 EF1 α 启动子。

11. 一种病毒，其包含如权利要求 10 所述的表达载体；较佳地，所述的病毒为慢病毒。

12. 一种药物组合物，其特征在于，其包含如权利要求 1~6 任一项所述的免疫细胞；较佳地，所述的药物组合物还包含药学上可接受的载体或赋形剂。

13. 一种药物组合物，其特征在于，其活性成分包括透明质酸酶和包含肿瘤抗原识别受体的免疫细胞；较佳地：

所述的透明质酸酶在所述的药物组合物中的浓度为 0.1 μ g/ml-15mg/ml，和/或，所述的透明质酸酶的比活性 $\geq$ 10,000 单位/mg。

14. 一种药盒，其包括药盒 A 和药盒 B，所述的药盒 A 包括包含肿瘤抗原识别受体的免疫细胞；所述的药盒 B 包括透明质酸酶；

较佳地，所述的药盒 A 和所述的药盒 B 的施用不分先后。

15. 如权利要求 13 所述的药物组合物或者如权利要求 14 所述的药盒，其特征在于，

所述的肿瘤抗原识别受体为嵌合抗原受体 (CAR) 或者 T 细胞受体 (TCR); 所述 CAR 或者所述 TCR 识别的抗原优选 ROR1、GPC3、MSLN 或者 EpCAM, 所述 CAR 或者所述 TCR 的肿瘤抗原识别区为能够结合以上肿瘤抗原的区域, 优选 scFv; 其中, 识别所述 ROR1 的 scFv 的核苷酸序列优选如序列表中 SEQ ID NO. 4 所示, 或者与序列表中 SEQ ID NO. 4 所示的核苷酸序列具有 80% 以上的序列同一性; 识别所述 GPC3 的 scFv 的核苷酸序列优选如序列表中 SEQ ID NO. 5 所示, 或者与序列表中 SEQ ID NO. 5 所示的核苷酸序列具有 80% 以上的序列同一性; 识别所述 EpCAM 的 scFv 的核苷酸序列优选如序列表中 SEQ ID NO. 6 所示, 或者与序列表中 SEQ ID NO. 6 所示的核苷酸序列具有 80% 以上的序列同一性。

16. 如权利要求 1~6 任一项所述的免疫细胞、如权利要求 12、13 或者 15 所述的药物组合物、或者如权利要求 14 或 15 所述的药盒在制备治疗肿瘤药物中的应用, 所述的肿瘤为实体肿瘤; 所述的实体肿瘤优选表达透明质酸的实体肿瘤, 例如黑色素瘤、胰腺癌、肝癌、胶质母细胞瘤、乳腺癌或者肺癌。

条约第19条第(1)款的声明

1. 将原权利要求 2 中“进一步更佳地”之后的附加技术特征限定到原权利要求 1 中，形成新的权利要求 1。

2. 删除原权利要求 2。

3. 将原权利要求 16 中“和/或”之后的技术方案删除，形成新的权利要求 15。

4. 根据上述修改相应修改其他权利要求及其引用的权利要求的编号。

综上，本次修改涉及权利要求 1~17，形成的新权利要求（第 1~16 项）的替换页见附件。上述修改均未超出原说明书和权利要求书记载的范围。

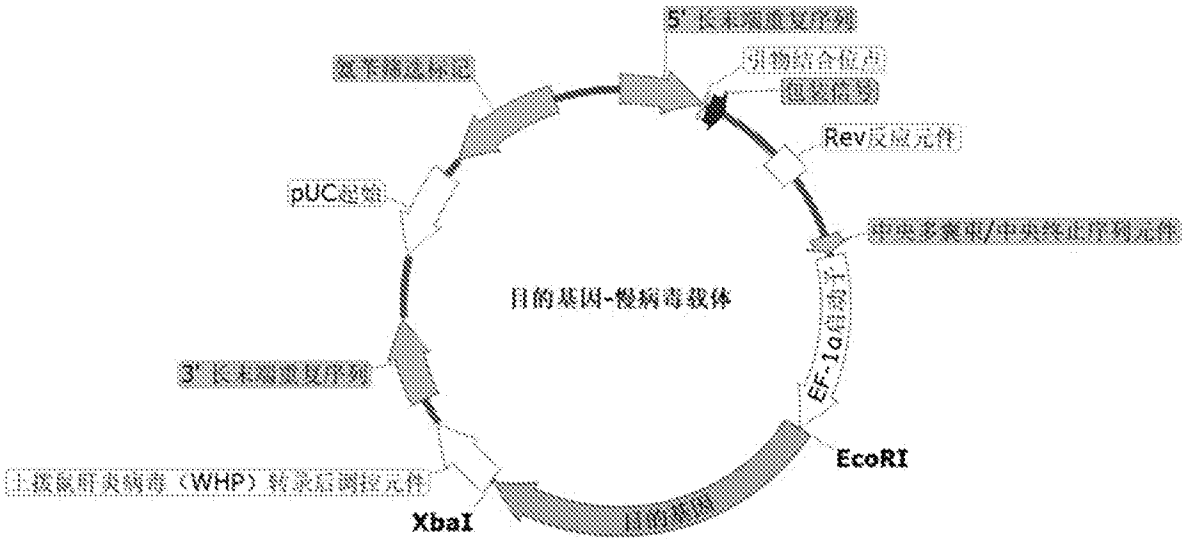


图 1

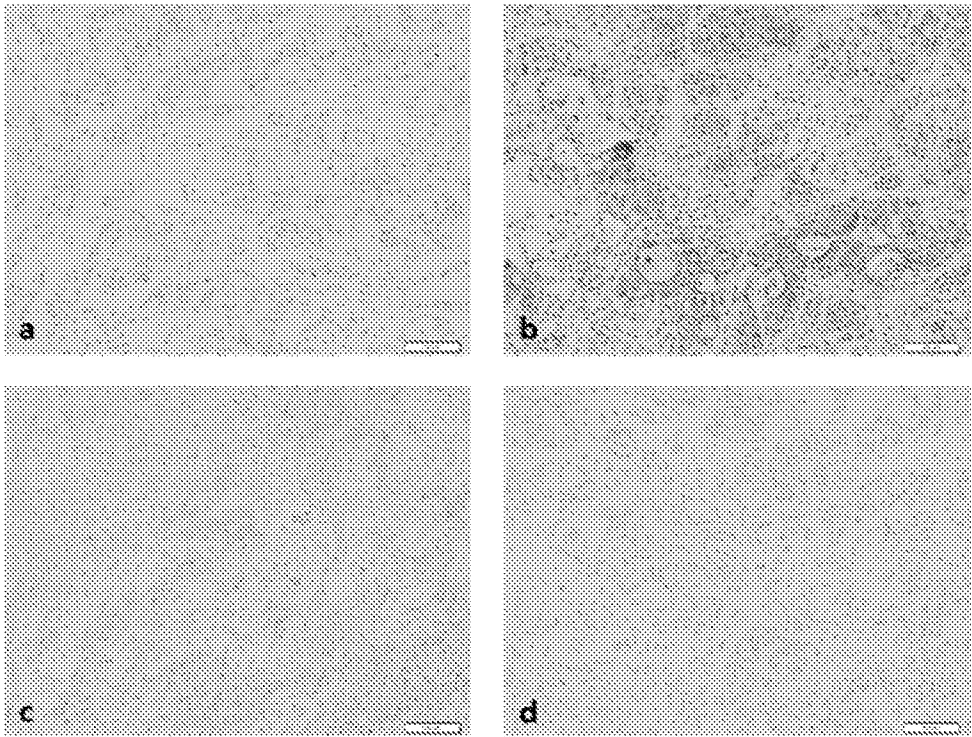


图 2

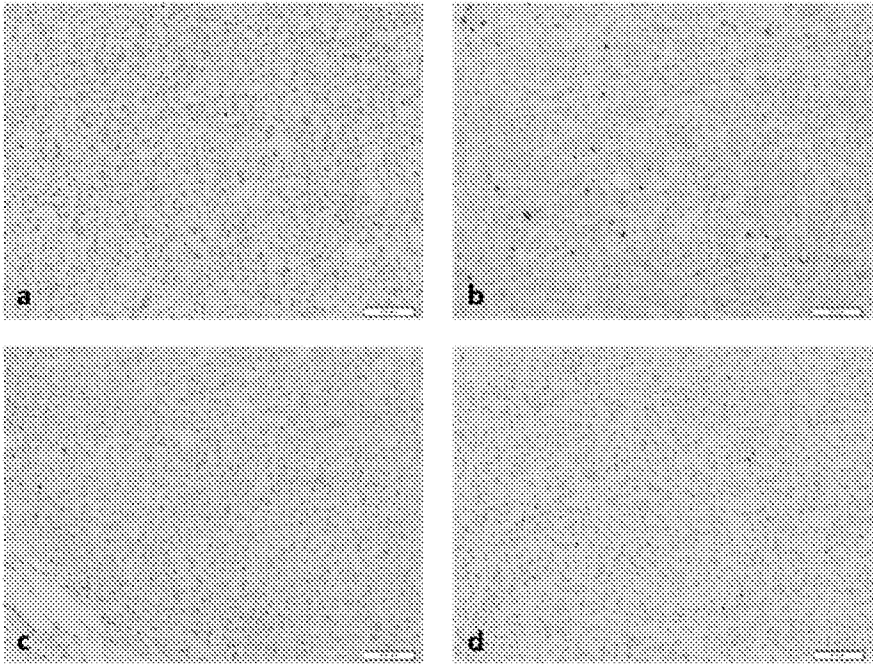


图 3

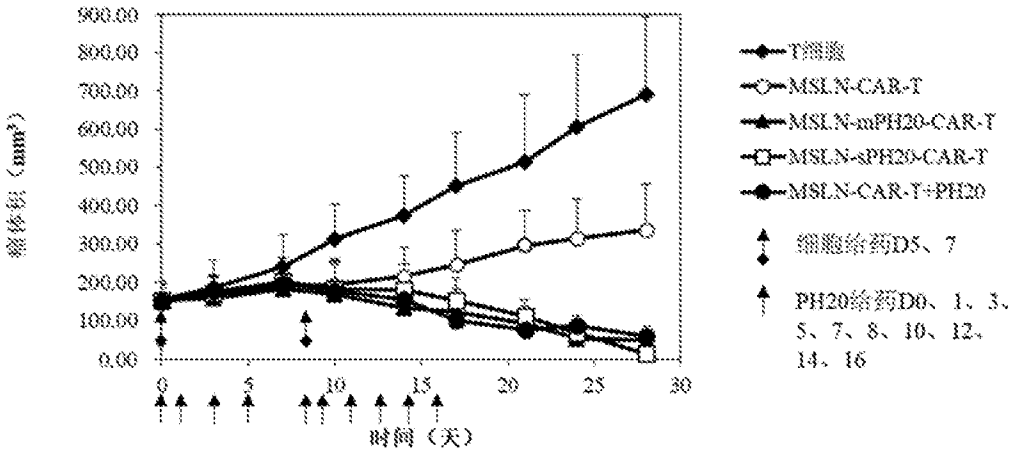


图 4

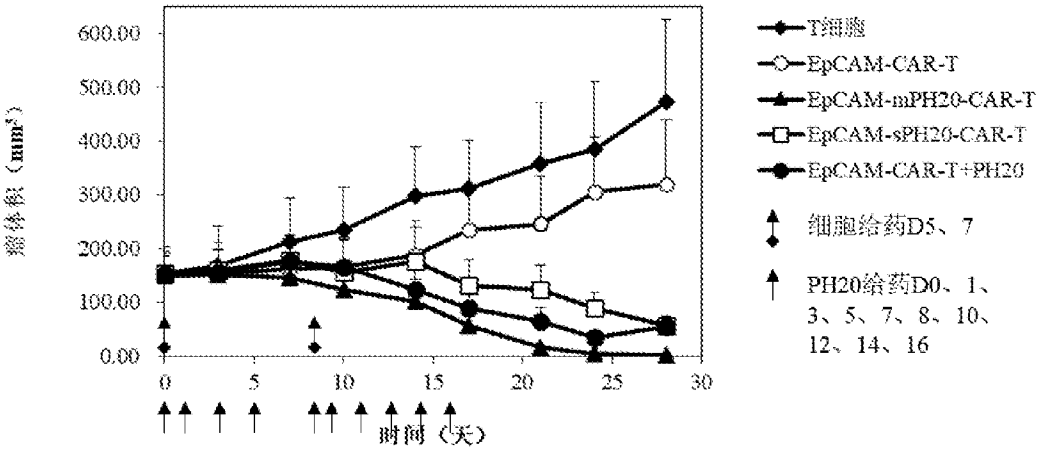


图 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/090998

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/10(2006.01)i; C12N 15/867(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)

C12N; A61K; A61P

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

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

CNABS, SIPOABS, DWPI, CNTXT, EPTXT, USTXT, WOTXT, CNKI, 万方, WANFANG, EBI, NCBI, GOOGLE, 百度, BAIDU, ISI WEB OF KNOWLEDGE, PUBMED: 苏州康聚生物科技有限公司, 王征, 徐云霞, 免疫细胞, 肿瘤抗原识别受体, 透明质酸酶, 锚定, 分泌, 嵌合抗原受体, CAR, T细胞受体, TCR, hyaluronidase, hydase, HAase, hyal+, PH-20, PH20, CAR-T, TCR-T, cell, chimeric antigen receptor, T-cell receptor, T cell, tumor antigen recognition receptor

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2017201635 A1 (CAI, Shenghe) 30 November 2017 (2017-11-30) abstract, claims 1-10, description, page 4, paragraph 1, and embodiment 1	1-17
X	CN 107400664 A (CAI, Shenghe) 28 November 2017 (2017-11-28) abstract, claims 1-10, and description, paragraphs [0040-0044]	1-17
A	CN 102548584 A (FUNDACIO PRIVADA INSTITUTE D INVESTIGACIO BIOMEDICA DE BELLVITGE et al.) 04 July 2012 (2012-07-04) entire document	1-17
A	CN 104244968 A (HALOZYME, INC.) 24 December 2014 (2014-12-24) entire document	1-17
A	CN 101679508 A (BAYLOR RESEARCH INSTITUTE) 24 March 2010 (2010-03-24) entire document	1-17
A	WO 2018057755 A1 (THORNE, S.H.) 29 March 2018 (2018-03-29) entire document	1-17
A	CN 101668777 A (BAYLOR RESEARCH INSTITUTE) 10 March 2010 (2010-03-10) entire document	1-17

☐ 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

19 August 2019

Date of mailing of the international search report

11 September 2019

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing
100088
China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2019/090998

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2017201635	A1	30 November 2017	None			
CN	107400664	A	28 November 2017	None			
CN	102548584	A	04 July 2012	KR	101878274	B1	13 July 2018
				US	10316065	B2	11 June 2019
				RU	2011149458	A	27 June 2013
				EP	2428229	B1	03 August 2016
				KR	20120049185	A	16 May 2012
				AU	2010244348	B2	11 August 2016
				WO	2010128182	A1	11 November 2010
				HK	1167818	A1	12 May 2017
				ES	2385251	B1	06 May 2013
				EP	2428229	A1	14 March 2012
				CN	107252438	A	17 October 2017
				CA	2761183	A1	11 November 2010
				JP	2012525833	A	25 October 2012
				PL	2428229	T3	28 February 2017
				RU	2536931	C2	27 December 2014
				ES	2385251	A1	20 July 2012
				ES	2600955	T3	13 February 2017
				AU	2010244348	A1	01 December 2011
				MX	2011011818	A	19 June 2012
				CA	2761183	C	26 March 2019
				US	2012148535	A1	14 June 2012
CN	104244968	A	24 December 2014	WO	2013102144	A3	06 February 2014
				MX	361727	B	14 December 2018
				CN	104244968	B	25 July 2017
				ES	2609582	T3	21 April 2017
				SG	11201403714T	A	30 July 2014
				CA	2861919	A1	04 July 2013
				AU	2017245352	B2	01 August 2019
				CA	2861919	C	02 April 2019
				US	2016362670	A1	15 December 2016
				EA	201400772	A1	30 July 2015
				US	9447401	B2	20 September 2016
				SG	10201604470T	A	28 July 2016
				HK	1202814	A1	09 October 2015
				DK	2797622	T3	16 January 2017
				EP	2797622	B1	12 October 2016
				WO	2013102144	A8	29 August 2013
				BR	112014016195	A2	13 June 2017
				AU	2012362141	A1	10 July 2014
				EP	3130347	A1	15 February 2017
				JP	2017112999	A	29 June 2017
				JP	6067746	B2	25 January 2017
				JP	2015504666	A	16 February 2015
				JP	6422933	B2	14 November 2018
				MX	2014007966	A	17 October 2014
				IL	233192	D0	31 July 2014
				US	2014178330	A9	26 June 2014
				AU	2012362141	B2	21 September 2017

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2019/090998

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)
				NZ	626126 A	24 June 2016
				EA	030252 B1	31 July 2018
				AU	2017245352 A1	02 November 2017
				US	2013302275 A1	14 November 2013
				EP	2797622 A2	05 November 2014
				WO	2013102144 A2	04 July 2013
CN	101679508	A	24 March 2010	BR	PI0807160 A2	25 September 2018
				US	9234040 B2	12 January 2016
				US	2014134168 A1	15 May 2014
				AU	2008214032 B2	28 June 2012
				EP	2115002 B1	20 August 2014
				NZ	593450 A	31 August 2012
				KR	20090114430 A	03 November 2009
				TW	200902061 A	16 January 2009
				CN	101679508 B	05 November 2014
				US	2013295120 A1	07 November 2013
				NZ	578696 A	12 January 2012
				EP	2115002 A4	01 September 2010
				IL	200088 D0	15 April 2010
				ZA	200905347 B	28 April 2010
				MX	2009008140 A	26 October 2009
				US	2012004643 A1	05 January 2012
				TW	I446921 B	01 August 2014
				ZA	200905347 A	28 April 2010
				US	2008241170 A1	02 October 2008
				EP	2115002 A2	11 November 2009
				JP	2010517538 A	27 May 2010
				CA	2715044 A1	14 August 2008
				AU	2008214032 A1	14 August 2008
				US	9102730 B2	11 August 2015
				JP	5377330 B2	25 December 2013
				US	8586052 B2	19 November 2013
				US	8449888 B2	28 May 2013
				US	2012237513 A1	20 September 2012
				US	8057798 B2	15 November 2011
				WO	2008097866 A3	24 December 2008
				HK	1141812 A1	12 June 2015
				WO	2008097866 A2	14 August 2008
				EP	2527363 A1	28 November 2012
WO	2018057755	A1	29 March 2018	KR	20190059297 A	30 May 2019
				CN	110022867 A	16 July 2019
				EP	3515419 A1	31 July 2019
				US	2019209629 A1	11 July 2019
				AU	2017332367 A1	11 April 2019
CN	101668777	A	10 March 2010	IL	216778 D0	31 January 2012
				US	2008254047 A1	16 October 2008
				TW	200900078 A	01 January 2009
				CA	2717656 A1	28 August 2008
				IL	200526 D0	29 April 2010
				AU	2008218184 A1	28 August 2008

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2019/090998

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		CN 102586186 A	18 July 2012
		ZA 200906618 B	30 June 2010
		WO 2008103947 A2	28 August 2008
		BR PI0807613 A2	10 June 2014
		ZA 200906618 A	30 June 2010
		WO 2008103947 A3	27 November 2008
		JP 2010519313 A	03 June 2010
		AU 2008218184 B2	10 January 2013
		MX 2009008918 A	14 September 2009
		NZ 595319 A	28 September 2012
		EP 2129692 A2	09 December 2009
		EP 2129692 A4	15 December 2010
		NZ 579238 A	27 April 2012
		KR 20090118981 A	18 November 2009

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2019/090998

A. 主题的分类

C12N 5/10(2006.01)i; C12N 15/867(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)

C12N; A61K; A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNABS, SIPOABS, DWPI, CNTXT, EPTXT, USTXT, WOTXT, CNKI, 万方, EBI, NCBI, GOOGLE, 百度, ISI Web of Knowledge, PUBMED:苏州康聚生物科技有限公司, 王征, 徐云霞, 免疫细胞, 肿瘤抗原识别受体, 透明质酸酶, 锚定, 分泌, 嵌合抗原受体, CAR, T细胞受体, TCR, hyaluronidase, hydase, HAase, hyal+, PH-20, PH20, CAR-T, TCR-T, cell, chimeric antigen receptor, T-cell receptor, T cell, tumor antigen recognition receptor

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
X	WO 2017201635 A1 (蔡胜和) 2017年 11月 30日 (2017 - 11 - 30) 摘要, 权利要求1-10, 第4页最后1段, 具体实施方式1	1-17
X	CN 107400664 A (蔡胜和) 2017年 11月 28日 (2017 - 11 - 28) 摘要, 权利要求1-10, 第【0040-0044】段	1-17
A	CN 102548584 A (贝尔韦什生物医学研究学会 等) 2012年 7月 4日 (2012 - 07 - 04) 全文	1-17
A	CN 104244968 A (哈洛齐梅公司) 2014年 12月 24日 (2014 - 12 - 24) 全文	1-17
A	CN 101679508 A (贝勒研究院) 2010年 3月 24日 (2010 - 03 - 24) 全文	1-17
A	WO 2018057755 A1 (THORNE, STEPHEN H.) 2018年 3月 29日 (2018 - 03 - 29) 全文	1-17
A	CN 101668777 A (贝勒研究院) 2010年 3月 10日 (2010 - 03 - 10) 全文	1-17

☐ 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

2019年 8月 19日

国际检索报告邮寄日期

2019年 9月 11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

李娟娟

电话号码 86-(10)-53962095

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2019/090998

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
WO	2017201635	A1	2017年 11月 30日	无			
CN	107400664	A	2017年 11月 28日	无			
CN	102548584	A	2012年 7月 4日	KR	101878274	B1	2018年 7月 13日
				US	10316065	B2	2019年 6月 11日
				RU	2011149458	A	2013年 6月 27日
				EP	2428229	B1	2016年 8月 3日
				KR	20120049185	A	2012年 5月 16日
				AU	2010244348	B2	2016年 8月 11日
				WO	2010128182	A1	2010年 11月 11日
				HK	1167818	A1	2017年 5月 12日
				ES	2385251	B1	2013年 5月 6日
				EP	2428229	A1	2012年 3月 14日
				CN	107252438	A	2017年 10月 17日
				CA	2761183	A1	2010年 11月 11日
				JP	2012525833	A	2012年 10月 25日
				PL	2428229	T3	2017年 2月 28日
				RU	2536931	C2	2014年 12月 27日
				ES	2385251	A1	2012年 7月 20日
				ES	2600955	T3	2017年 2月 13日
				AU	2010244348	A1	2011年 12月 1日
				MX	2011011818	A	2012年 6月 19日
				CA	2761183	C	2019年 3月 26日
				US	2012148535	A1	2012年 6月 14日
CN	104244968	A	2014年 12月 24日	WO	2013102144	A3	2014年 2月 6日
				MX	361727	B	2018年 12月 14日
				CN	104244968	B	2017年 7月 25日
				ES	2609582	T3	2017年 4月 21日
				SG	11201403714T	A	2014年 7月 30日
				CA	2861919	A1	2013年 7月 4日
				AU	2017245352	B2	2019年 8月 1日
				CA	2861919	C	2019年 4月 2日
				US	2016362670	A1	2016年 12月 15日
				EA	201400772	A1	2015年 7月 30日
				US	9447401	B2	2016年 9月 20日
				SG	10201604470T	A	2016年 7月 28日
				HK	1202814	A1	2015年 10月 9日
				DK	2797622	T3	2017年 1月 16日
				EP	2797622	B1	2016年 10月 12日
				WO	2013102144	A8	2013年 8月 29日
				BR	112014016195	A2	2017年 6月 13日
				AU	2012362141	A1	2014年 7月 10日
				EP	3130347	A1	2017年 2月 15日
				JP	2017112999	A	2017年 6月 29日
				JP	6067746	B2	2017年 1月 25日
				JP	2015504666	A	2015年 2月 16日
				JP	6422933	B2	2018年 11月 14日
				MX	2014007966	A	2014年 10月 17日
				IL	233192	D0	2014年 7月 31日
				US	2014178330	A9	2014年 6月 26日
				AU	2012362141	B2	2017年 9月 21日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2015年1月)

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2019/090998

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)
						NZ 626126 A	2016年 6月 24日
						EA 030252 B1	2018年 7月 31日
						AU 2017245352 A1	2017年 11月 2日
						US 2013302275 A1	2013年 11月 14日
						EP 2797622 A2	2014年 11月 5日
						WO 2013102144 A2	2013年 7月 4日
CN	101679508	A	2010年 3月 24日			BR PI0807160 A2	2018年 9月 25日
						US 9234040 B2	2016年 1月 12日
						US 2014134168 A1	2014年 5月 15日
						AU 2008214032 B2	2012年 6月 28日
						EP 2115002 B1	2014年 8月 20日
						NZ 593450 A	2012年 8月 31日
						KR 20090114430 A	2009年 11月 3日
						TW 200902061 A	2009年 1月 16日
						CN 101679508 B	2014年 11月 5日
						US 2013295120 A1	2013年 11月 7日
						NZ 578696 A	2012年 1月 12日
						EP 2115002 A4	2010年 9月 1日
						IL 200088 D0	2010年 4月 15日
						ZA 200905347 B	2010年 4月 28日
						MX 2009008140 A	2009年 10月 26日
						US 2012004643 A1	2012年 1月 5日
						TW I446921 B	2014年 8月 1日
						ZA 200905347 A	2010年 4月 28日
						US 2008241170 A1	2008年 10月 2日
						EP 2115002 A2	2009年 11月 11日
						JP 2010517538 A	2010年 5月 27日
						CA 2715044 A1	2008年 8月 14日
						AU 2008214032 A1	2008年 8月 14日
						US 9102730 B2	2015年 8月 11日
						JP 5377330 B2	2013年 12月 25日
						US 8586052 B2	2013年 11月 19日
						US 8449888 B2	2013年 5月 28日
						US 2012237513 A1	2012年 9月 20日
						US 8057798 B2	2011年 11月 15日
						WO 2008097866 A3	2008年 12月 24日
						HK 1141812 A1	2015年 6月 12日
						WO 2008097866 A2	2008年 8月 14日
						EP 2527363 A1	2012年 11月 28日
WO	2018057755	A1	2018年 3月 29日			KR 20190059297 A	2019年 5月 30日
						CN 110022867 A	2019年 7月 16日
						EP 3515419 A1	2019年 7月 31日
						US 2019209629 A1	2019年 7月 11日
						AU 2017332367 A1	2019年 4月 11日
CN	101668777	A	2010年 3月 10日			IL 216778 D0	2012年 1月 31日
						US 2008254047 A1	2008年 10月 16日
						TW 200900078 A	2009年 1月 1日
						CA 2717656 A1	2008年 8月 28日
						IL 200526 D0	2010年 4月 29日
						AU 2008218184 A1	2008年 8月 28日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2015年1月)

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2019/090998

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 102586186 A	2012年 7月 18日
		ZA 200906618 B	2010年 6月 30日
		WO 2008103947 A2	2008年 8月 28日
		BR PI0807613 A2	2014年 6月 10日
		ZA 200906618 A	2010年 6月 30日
		WO 2008103947 A3	2008年 11月 27日
		JP 2010519313 A	2010年 6月 3日
		AU 2008218184 B2	2013年 1月 10日
		MX 2009008918 A	2009年 9月 14日
		NZ 595319 A	2012年 9月 28日
		EP 2129692 A2	2009年 12月 9日
		EP 2129692 A4	2010年 12月 15日
		NZ 579238 A	2012年 4月 27日
		KR 20090118981 A	2009年 11月 18日