

(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



(10) 国际公布号
WO 2023/284875 A1

(43) 国际公布日
2023 年 1 月 19 日 (19.01.2023)

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

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)。

(21) 国际申请号: PCT/CN2022/106096

(22) 国际申请日: 2022 年 7 月 15 日 (15.07.2022)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202110807344.3 2021年7月16日 (16.07.2021) CN
202110918700.9 2021年8月11日 (11.08.2021) CN
202210447726.4 2022年4月26日 (26.04.2022) CN

本国际公布:

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

(71) 申请人: 克莱格医学有限公司(CRAGE MEDICAL
CO., LIMITED) [CN/CN]; 中国香港特别行政
区九龙旺角花园街2-16号好景商业中心
20层12室, Hong Kong (CN)。

(72) 发明人: 李宗海(LI, Zonghai); 中国上海市徐汇区
银都路388号12幢, Shanghai 200231 (CN)。 廖
朝晖(LIAO, Zhaohui); 中国上海市徐汇区银都
路388号12幢, Shanghai 200231 (CN)。

(74) 代理人: 北京彩和律师事务所(BEIJING CAI HE
LAW FIRM); 中国北京市海淀区大柳树路17号
富海国际港1602室, Beijing 100081 (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,
CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ,
IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ,
LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK,
MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA,
PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区
保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ,
NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG,

(54) Title: CHIMERIC ANTIGEN RECEPTOR

(54) 发明名称: 嵌合抗原受体

(57) Abstract: Provided are a CAR-T cell and CAR targeting both NKG2A and tumor antigens at the same time. The CAR comprises a bispecific antigen binding domain, and the bispecific antigen binding domain comprises an NKG2A antigen binding domain and a tumor antigen binding domain.

(57) 摘要: 提供了同时靶向NKG2A和肿瘤抗原的CAR-T细胞及CAR, 所述CAR包含双特异性抗原结合域, 所述双特异性抗原结合域包括NKG2A抗原结合域和肿瘤抗原结合域。

WO 2023/284875 A1

嵌合抗原受体

相关申请

本专利申请要求于2021年7月16日递交的申请号为202110807344.3的中国专利申请，
于2021年8月11日递交的申请号为202110918700.9的中国专利申请，以及于2022年4月26日
5 递交的申请号为202210447726.4的中国专利申请的优先权。

同时提交的序列表文件

下列XML文件的全部内容通过整体引用并入本文：计算机可读格式(CRF)的序列
表(名称：FF00640PCT-sequence listing.xml，日期：20220714，大小：55 KB)。

技术领域

10 本申请提供嵌合抗原受体(CAR)和工程化双靶向T细胞及其制备方法。所述工程化双靶向T细胞和含有所述工程化双靶向T细胞的组合物可用于疾病治疗。

背景技术

免疫细胞疗法作为基于细胞的癌症疗法是目前最有前景的治疗方法,免疫细胞具有靶向肿瘤细胞同时保留正常组织的潜力;临床观察指示它们具有主要的抗癌活性。现仍迫切
15 需要通过拓宽免疫细胞适用性和增强其功效用于改善免疫细胞疗法。CAR-T细胞的有效激活均严重依赖识别肿瘤相关抗原的抗体的特异性以及抗原结合的亲和力高低等性质。所以在目前CAR-T细胞胞内信号转导区的设计已经趋于成熟的现状下，抗原结合区的设计成为新型CAR-T技术开发的重点和关键。

发明内容

20 本申请的目的在于提供一种工程化双靶向T细胞和嵌合抗原受体(CAR)，其中分别靶向两个抗原的抗体片段串联表达在一个嵌合抗原受体(CAR)上。在一些实施方式中，所提供的工程化细胞表现出增强的免疫反应，包括对于受试者的癌症、微生物感染和/或病毒感染的治疗。在一些实施例，所提供的工程化细胞既具有抵抗宿主免疫排斥作用，也具有抗肿瘤作用。还提供了通过给予治疗有效量的所提供的工程化T细胞来治疗受
25 试者的方法。

一方面，本申请提供了一种嵌合抗原受体(CAR)，所述CAR包含双特异性抗原结合域，所述双特异性抗原结合域包括NKG2A抗原结合域和肿瘤抗原结合域，所述NKG2A抗原结合域包含第一结合区L、第一结合区H，所述肿瘤抗原结合域包含第二结合区L、第二结合区H,所述第一结合区L、第一结合区H、第二结合区L、第二结合区H以形成loop结构的方式连接。
30

在某些实施方式中，所述loop结构通过如下方式形成：其中一个抗原结合域的结合区H和结合区L连接为抗体，另一个抗原结合域的结合区H、结合区L分别与所述抗体的两端连接。

在某些实施方式中，所述抗体自N端至C端依次包含：

所述结合区H、所述结合区L。

在某些实施方式中，所述另一个抗原结合域的结合区L与所述抗体的N端连接，所述另一个抗原结合域的结合区H与所述抗体的C端连接。

- 5 在某些实施方式中，所述另一个抗原结合域的结合区H与所述抗体的N端连接，所述另一个抗原结合域的结合区L与所述抗体的C端连接。

在某些实施方式中，所述连接为抗体的结合区H为第一结合区H，所述连接为抗体的结合区L为第一结合区L，所述另一个抗原结合域的结合区L为第二结合区L，所述另一个抗原结合域的结合区H为第二结合区H。

- 10 在某些实施方式中，所述连接为抗体的结合区H为第二结合区H，所述连接为抗体的结合区L为第二结合区L。所述另一个抗原结合域的结合区L为第一结合区L，所述另一个抗原结合域的结合区H为第一结合区H。

在某些实施方式中，所述抗体自N端至C端依次包含：

所述结合区L、所述结合区H。

- 15 在某些实施方式中，所述另一个抗原结合域的结合区L与所述抗体的N端连接，所述另一个抗原结合域的结合区H与所述抗体的C端连接。

在某些实施方式中，所述另一个抗原结合域的结合区H与所述抗体的N端连接，所述另一个抗原结合域的结合区L与所述抗体的C端连接。

- 20 在某些实施方式中，所述连接为抗体的结合区H为第一结合区H，所述连接为抗体的结合区L为第一结合区L，所述另一个抗原结合域的结合区L为第二结合区L，所述另一个抗原结合域的结合区H为第二结合区H。

在某些实施方式中，所述连接为抗体的结合区H为第二结合区H，所述连接为抗体的结合区L为第二结合区L。所述另一个抗原结合域的结合区L为第一结合区L，所述另一个抗原结合域的结合区H为第一结合区H。

- 25 在某些实施方式中，所述第一结合区L包含第一轻链或第一轻链可变区（VL），所述第一结合区H包含第一重链或第一重链可变区（VH），所述第二结合区L包含第二轻链或第二轻链可变区（VL），所述第二结合区H包含第二重链或第二重链可变区（VH）。

在某些实施方式中，所述第一结合区L包含第一轻链可变区（VL），所述第一结合区H包含第一重链可变区（VH），所述第二结合区L包含第二轻链可变区（VL），所述第二结合

- 30 区H包含第二重链可变区（VH）。

在某些实施方式中，所述抗体包含scFv。

在某些实施方式中，所述第一轻链包含所述第一轻链可变区（VL），所述第一重链包含

所述第一重链可变区 (VH), 所述第二轻链包含所述第二轻链可变区 (VL), 所述第二重链包含所述第二重链可变区 (VH)。

在某些实施方式中, 所述NKG2A抗原结合域包含单域抗体, 和/或肿瘤抗原结合域包含单域抗体。

- 5 在某些实施方式中, 所述第一轻链可变区 (VL) 包含如SEQ ID NO: 6-8中任一项所示的第一轻链互补决定区 (LCDR) 或其组合。

在某些实施方式中, 所述第一重链可变区 (VH) 包含如SEQ ID NO: 3-5中任一项所示的第一重链互补决定区 (HCDR) 或其组合。

- 在某些实施方式中, 所述第一轻链可变区 (VL) 包含第一轻链互补决定区1 (LCDR1)、
10 第一轻链互补决定区2 (LCDR2)、第一轻链互补决定区3 (LCDR3), 所述第一LCDR1包含如SEQ ID NO: 6所示的氨基酸序列, 所述第一LCDR2包含如SEQ ID NO: 7所示的氨基酸序列, 所述第一LCDR3包含如SEQ ID NO: 8所示的氨基酸序列。

- 在某些实施方式中, 所述第一重链可变区 (VH) 包含第一重链互补决定区1 (HCDR1)、
15 第一重链互补决定区2 (HCDR2)、第一重链互补决定区3 (HCDR3), 所述第一HCDR1包含如SEQ ID NO: 3所示的氨基酸序列, 所述第一HCDR2包含如SEQ ID NO: 4所示的氨基酸序列, 所述第一HCDR3包含如SEQ ID NO: 5所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 所述NKG2A抗原结合域包含如SEQ ID NO: 3-8所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 所述第一重链可变区 (VH) 包含如SEQ ID NO: 1所示的氨基酸序列, 所述第一轻链可变区 (VL) 包含如SEQ ID NO: 2所示的氨基酸序列。

- 20 在某些实施方式中, 所述肿瘤抗原包括CD19、GPC3、Claudin18.2、WT1、HER2、EGFR、BCMA或其组合。

在某些实施方式中, 所述肿瘤抗原包括BCMA。

在某些实施方式中, 所述肿瘤抗原结合域包括BCMA抗原结合域。

- 在某些实施方式中, 所述第二轻链可变区 (VL) 包含如SEQ ID NO: 12-14中任一项所示
25 的第二轻链互补决定区 (LCDR) 或其组合。

在某些实施方式中, 所述第二重链可变区 (VH) 包含如SEQ ID NO: 9-11中任一项所示的第二重链互补决定区 (HCDR) 或其组合。

- 在某些实施方式中, 所述第二轻链可变区 (VL) 包含第二轻链互补决定区1 (LCDR1)、
30 第二轻链互补决定区2 (LCDR2)、第二轻链互补决定区3 (LCDR3), 所述第二LCDR1的包含如SEQ ID NO: 12所示氨基酸序列, 所述第二LCDR2包含如SEQ ID NO: 13所示氨基酸序列, 所述第二LCDR3包含如SEQ ID NO: 14所示氨基酸序列。

在某些实施方式中, 所述第二重链可变区 (VH) 包含第二重链互补决定区1 (HCDR1)、

第二重链互补决定区2 (HCDR2)、第二重链互补决定区3 (HCDR3), 所述第二HCDR1包含如SEQ ID NO: 9所示氨基酸序列, 所述第二HCDR2包含如SEQ ID NO: 10所示氨基酸序列, 所述第二HCDR3包含如SEQ ID NO: 11所示氨基酸序列。

在某些实施方式中, 所述BCMA抗原结合域包含如SEQ ID NO:9-14所示的氨基酸序列。

- 5 在某些实施方式中, 所述NKG2A抗原结合域包含如SEQ ID NO:3-8所示的氨基酸序列, 所述BCMA抗原结合域包含如SEQ ID NO:9-14所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 所述第二重链可变区 (VH) 包含如SEQ ID NO: 15所示的氨基酸序列, 所述第二轻链可变区 (VL) 包含如SEQ ID NO: 16所示的氨基酸序列。

- 10 在某些实施方式中, 所述第二结合区L包含如SEQ ID NO:46-50中任一项所示序列中的轻链可变区, 所述第二结合区H包含如SEQ ID NO:46-50中任一项所示序列中的重链可变区。

在某些实施方式中, 所述NKG2A抗原结合域包含如SEQ ID NO:1所示的第一重链可变区和如SEQ ID NO:2所示的第一轻链可变区, 所述BCMA抗原结合域包含如SEQ ID NO:15所示的第二重链可变区和如SEQ ID NO:16所示的第二轻链可变区。

在某些实施方式中, 所述双特异性抗原结合域自N端至C端包含如下连接方式:

- 15 BCMA VL—NKG2A VH—NKG2A VL—BCMA VH。

在某些实施方式中, 所述双特异性抗原结合域自N端至C端包含如下连接方式:

NKG2A V—BCMA VH—BCMA VL—NKG2A VH。

在某些实施方式中, 所述连接包括通过连接子连接, 所述连接子包含Lin1或(G4S)_n, 其中, n是等于或大于1的整数; 所述Lin1包含如SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列。

- 20 在某些实施方式中, 在所述(G4S)_n中, n为1或3。

在某些实施方式中, 所述双特异性抗原结合域自N端至C端包含如下连接方式:

BCMA VL—G4S—NKG2A VH—(G4S)₃—NKG2A VL—G4S—BCMA VH。

在某些实施方式中, 所述双特异性抗原结合域自N端至C端包含如下连接方式:

NKG2A VL—G4S—BCMA VH—(G4S)₃—BCMA VL—G4S—NKG2A VH。

- 25 在某些实施方式中, 所述双特异性抗原结合域自N端至C端包含如下连接方式:

BCMA VL—G4S—NKG2A VH—Lin1—NKG2A VL—G4S—BCMA VH。

在某些实施方式中, 所述双特异性抗原结合域自N端至C端包含如下连接方式:

NKG2A VL—G4S—BCMA VH—Lin1—BCMA VL—G4S—NKG2A VH。

在某些实施方式中, 所述抗体包含如SEQ ID NO:39-41中任一项所示的氨基酸序列。

- 30 在某些实施方式中, 所述抗体包含如SEQ ID NO:46-50中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 所述双特异性抗原结合域包含如SEQ ID NO:20、23和26中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述CAR包含跨膜域。

在某些实施方式中，所述CAR包含胞内信号传导域。

在某些实施方式中，所述CAR包含跨膜域、胞内信号传导域。

在某些实施方式中，所述跨膜域包含CD28跨膜结构域或CD8跨膜域。

- 5 在某些实施方式中，所述CD8跨膜域包含如SEQ ID NO: 30所示的氨基酸序列，所述CD28跨膜域包含如SEQ ID NO: 31所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述胞内信号传导域包含CD3 ζ 胞内信号传导域。

在某些实施方式中，所述CD3 ζ 胞内信号传导域包含如SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述CAR还包含共刺激信号结构域。

- 10 在某些实施方式中，所述CAR包含2个相同或不同的共刺激信号结构域。

在某些实施方式中，所述共刺激信号结构域包含4-1BB共刺激信号结构域和/或CD28共刺激信号结构域。

在某些实施方式中，所述CAR包含包含4-1BB共刺激信号结构域和CD3 ζ 胞内信号传导域。

在某些实施方式中，所述4-1BB共刺激信号结构域包含如SEQ ID NO:33所示的氨基酸序列，

- 15 所述CD28共刺激信号结构域包含如SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述CAR包含铰链区。

在某些实施方式中，所述铰链区包含CD8铰链区。

在某些实施方式中，所述CD8铰链区包含如SEQ ID NO: 35所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述CAR包含CD8跨膜域和CD8铰链域。

- 20 在某些实施方式中，所述CD8跨膜结构域包含如SEQ ID NO: 30所示的氨基酸序列，所述CD8铰链域包含如SEQ ID NO: 35所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述CAR包含如SEQ ID NO:22、25和28中任一项所示的氨基酸序列。

另一方面本申请还提供了核酸分子，其编码本申请所述的CAR。

在某些实施方式中，所述核酸分子包含如SEQ ID 21、24和27中任一项所述的核苷酸序列。

- 25 另一方面本申请还提供了载体，其包含本申请所述的核酸分子。

另一方面本申请还提供了细胞，其包含本申请所述的CAR、本申请所述的核酸分子和/或本申请所述的载体。

在某些实施方式中，所述细胞包含免疫细胞。

在某些实施方式中，所述细胞选自：T细胞、NK细胞、细胞毒性T细胞、NKT细胞、巨噬细胞、CIK细胞和干细胞衍生的免疫细胞。

- 30 在某些实施方式中，所述细胞为T细胞。

在某些实施方式中，所述T细胞为自体T细胞和/或同种异体T细胞。

在某些实施方式中，所述T细胞为干细胞衍生的自体T细胞和/或干细胞衍生的同种异体T细胞。

在某些实施方式中，所述T细胞为原代自体T细胞和/或原代同种异体T细胞。

在某些实施方式中，所述T细胞包含基因修饰，所述基因修饰包括抑制或消除参与响应自体

5 体和/或异体抗原识别多肽的至少一种内源基因表达、活性。

在某些实施方式中，所述细胞内源性TCR、MHC不表达或低表达。

在某些实施方式中，所述细胞包括：

a)内源性HLA-I分子低表达或不表达，

b)内源性TCR分子低表达或不表达， 和/或

10 c)内源性NKG2A分子低表达或不表达。

在某些实施方式中，

a)所述内源性HLA-I蛋白低表达或不表达包括敲除编码内源性HLA-I的基因，

b)所述内源性TCR蛋白低表达或不表达包括敲除编码内源性TCR的基因， 和/或

c)所述内源性NKG2A分子低表达或不表达包括敲除编码内源性NKG2A的基因。

15 在某些实施方式中，采用基因敲除技术敲除内源性TRAC和/或B2M。

在某些实施方式中，所述基因敲除技术为CRISPR/Cas9技术。

在某些实施方式中，所述细胞包括：

a)采用CRISPR/Cas9技术敲除内源性B2M，

b)采用CRISPR/Cas9技术敲除内源性B2M、TCR， 或

20 c)采用CRISPR/Cas9技术敲除内源性B2M、TCR、NKG2A。

在某些实施方式中，所述CRISPR/Cas9技术使用的gRNA包括如SEQ ID NO：36-38中任一项所示的核苷酸序列或其组合。

另一方面，本申请还提供了药物组合物，其包含本申请所述的CAR、本申请所述的核酸分子、本申请所述的载体和/或本申请所述的细胞，以及药学上可接受的载体。

25 另一方面，本申请还提供了一种试剂盒，其包含本申请所述的CAR、本申请所述的核酸分子、本申请所述的载体、本申请所述的细胞、和/或本申请所述的药物组合物。

另一方面，本申请还提供了提高靶向肿瘤的免疫细胞在有宿主免疫细胞存在时的存活时间和/或扩增能力的方法，包括：

a)提供免疫细胞；

30 b)任选地，修饰所述免疫细胞，所述修饰包括抑制或消除参与响应自体体和/或异体抗原识别多肽的至少一种内源基因表达、活性；

c)编码包含NKG2A抗原结合域和肿瘤抗原结合域的CAR的多核苷酸来修饰所述免疫细

胞。

在某些实施方式中，在所述步骤c)中，所述方法包括向所述免疫细胞中引入本申请所述的核酸分子或本申请所述的载体。

在某些实施方式中，所述方法还包括使所述免疫细胞表达本申请所述的CAR。

- 5 在某些实施方式中，所述方法包括修饰所述免疫细胞，所述修饰包括抑制或消除参与响应自体 and/或 异体抗原识别多肽的至少一种内源基因表达、活性。

在某些实施方式中，所述CAR包括：

a) NKG2A 抗原结合域和肿瘤抗原结合域，CD28 或 CD8 的跨膜域，CD28 的共刺激信号结构域，和 CD3 ζ ；和/或

- 10 b) NKG2A 抗原结合域和肿瘤抗原结合域，CD28 或 CD8 的跨膜域，4-1BB 的共刺激信号结构域，和 CD3 ζ ；和/或

c) NKG2A 抗原结合域和肿瘤抗原结合域，CD28 或 CD8 的跨膜域，CD28 的共刺激信号结构域，4-1BB 的共刺激信号结构域，和 CD3 ζ ；

d) NKG2A 抗原结合域和肿瘤抗原结合域，CD28 或 CD8 的跨膜域，和 CD3 ζ 。

- 15 在某些实施方式中，所述 NKG2A 抗原结合域包含如 SEQ ID NO:3-8 所示的氨基酸序列；或包含如 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列的重链可变区和包含如 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列的轻链可变区。

在某些实施方式中，肿瘤抗原为 BCMA，所述 BCMA 抗原结合域包含如 SEQ ID NO:9-14 所示的氨基酸序列；或包含如 SEQ ID NO:15 所示的氨基酸序列的重链可变区和包含如

- 20 SEQ ID NO:16 所示的氨基酸序列的轻链可变区。

在某些实施方式中，所述抗原结合域包含如 SEQ ID NO:20、23 和 26 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述 CAR 包含如 SEQ ID NO:22、25 和 28 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述步骤 b) 包括：

- 25 i) 采用 CRISPR/Cas9 技术敲除内源性 B2M，
ii) 采用 CRISPR/Cas9 技术敲除内源性 B2M、TCR， 或
iii) 采用 CRISPR/Cas9 技术敲除内源性 B2M、TCR、NKG2A。

在某些实施方式中，所述 CRISPR/Cas9 技术使用的 gRNA 包括如 SEQ ID NO: 36-38 中任一项所示的核苷酸序列或其组合。

- 30 在某些实施方式中，所述免疫细胞选自：T 细胞、NK 细胞、细胞毒性 T 细胞、NKT 细胞、巨噬细胞、CIK 细胞和干细胞衍生的免疫细胞。

在某些实施方式中，所述免疫细胞为自体或同种异体 T 细胞、干细胞衍生的 T 细胞、原代 T

细胞或来源于人的自体T细胞。

在某些实施方式中，所述方法用于治疗 and/or 预防肿瘤。

在某些实施方式中，所述肿瘤包括血液瘤和/or 实体瘤。

在某些实施方式中，所述血液瘤包含多发性骨髓瘤。

5 在某些实施方式中，所述方法在离体条件下进行。

另一方面，本申请还提供了本申请所述的CAR、本申请所述的核酸分子、权本申请所述的载体、本申请所述的细胞、本申请所述的药物组合物在制备药物中的用途，所述药物用于预防、缓解和/or 治疗肿瘤。

10 另一方面，本申请还提供了预防、缓解和/or 治疗肿瘤的方法，其包括向有需要的受试者施用本申请所述的细胞、本申请所述的药物组合物。

另一方面，本申请还提供了本申请所述的CAR、本申请所述的核酸分子、本申请所述的载体、本申请所述的细胞、本申请所述的药物组合物，其用于预防、缓解和/or 治疗肿瘤。

在某些实施方式中，所述肿瘤包括血液瘤和/or 实体瘤。

在某些实施方式中，所述血液瘤包含多发性骨髓瘤。

15 应理解，在本申请范围内中，本申请的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合，从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅，在此不再一一累述。

附图说明

20 图1显示的是本申请中的串联CAR-T细胞体外对NK细胞的杀伤效果。

图2显示的是本申请中的串联CAR-T细胞体外杀伤肿瘤细胞的效果。

图3显示的是本申请中的串联CAR-T细胞的体内抗肿瘤作用。

图4显示的是本申请中的串联CAR-T细胞与肿瘤细胞共孵育后细胞因子分泌情况。

图5显示的是本申请中的串联UCAR-T细胞体外抵抗NK细胞杀伤的。

25 图6显示的是本申请中的串联UCAR-T细胞与肿瘤细胞共孵育后后细胞因子分泌情况。

图7显示的是本申请中的串联UCAR-T细胞体内抑制肿瘤生长的效果。

图8显示的是本申请中的串联UCAR-T细胞体外对抗NK细胞杀伤并杀伤肿瘤细胞的效果。

30 图9A显示的是本申请中的串联UCAR-T细胞在NK细胞条件下的原位肿瘤模型中抑制肿瘤生长的效果。

图9B显示的是本申请中的串联UCAR-T细胞在NK细胞条件下的原位肿瘤模型中对

小鼠生存期的影响。

图10显示的是本申请中的串联UCAR-T细胞特异性浸润肿瘤组织。

图11显示的是本申请中的串联UCAR-T细胞不引起移植物抗宿主反应。

5 具体实施方式

本申请提供了一种靶向BCMA抗原和NKG2A抗原的双抗原特异性嵌合抗原受体(CAR)，该CAR包含BCMA抗原结合域、NKG2A抗原结合域。本申请进一步提供与本申请的CAR相关的核酸、重组表达载体、宿主细胞、细胞群和药物组合物。本申请还提供了检测哺乳动物中是否存在癌症的方法以及治疗或预防哺乳动物中癌症的方法。表达本申请所述CAR的T细胞具有很强的抵抗NK细胞的能力，从而具有更好存活和/或增殖能力，增强抗肿瘤能力。此外，将抗NKG2A和抗肿瘤抗原的CAR串联，可以只用一个载体就能实现抵抗宿主免疫排斥（如NK细胞攻击）和抗肿瘤的双重目的，有利于简化工艺的制备以及质检、质控流程。

除非专门定义，否则本文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相同含义。类似或等效于本文中描述的那些所有方法和材料都可以在本申请的实践或测试中使用，其中，本文描述的是合适的方法和材料。本文提及的所有出版物、专利申请、专利和其他参考文献都以其全部内容通过引用并入本文。在冲突的情况下，以本说明书，包括定义为准。此外，除非另有规定，否则本申请的材料、方法和实施例仅是说明性的，而并非旨在进行限制。根据本申请内容，本领域技术人员应了解在所公开的具体实施方案中可以作出许多变化或改变，并且仍获得相同或相似结果，而不背离本申请的精神和范围。本申请在范围上并不受限于本文描述的具体实施方案(其仅预期作为本申请的各方面的举例说明)，并且功能等价的方法和组分在本申请的范围内。本申请包括对本申请的主题进行变型和修改来用于各种用途和条件。

除非另有说明，否则本申请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，这都属于本领域的技术范围。这些技术充分解释于文献中。参见，例如，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)。

在本申请中, 范围形式的描述仅仅为方便和简洁起见, 而不应当被看作是对本申请的范围不可改变的限制。因此, 范围的描述应当被认为特别地公开了所有可能的子范围以及该范围内的单独数值。

本文使用的术语“约”是指本技术领域技术人员容易知晓的各值的通常误差范围。本文中述及“约”值或参数, 包括指向该值或参数本身的实施方式。例如, 关于“约X”的描述包括“X”的描述。在本文中, “约”可以是在所述技术领域内可以接受的误差范围; 例如, 可以是指“约”值或参数的 $\pm 10\%$ 范围内的值或参数, 例如, 约5 μM 可包括在4.5 μM 与5.5 μM 之间的任何数目。

术语

术语“包含”或“包括”通常是指包括明确指定的特征, 但不排除其他要素。

在本申请中, 术语“嵌合抗原受体”(Chimeric Antigen Receptor, CAR)通常是指包含能够结合抗原的胞外结构域和至少一个胞内结构域的融合蛋白。其可以包括抗原(例如, 肿瘤相关抗原(tumor-associated antigen, TAA))结合区、跨膜结构域、共刺激结构域和胞内信号结构域。经基因修饰表达CAR的T细胞可以特异地识别和消除表达靶抗原的恶性细胞。

在本申请中, 术语“抗原结合域”是指特异性结合抗原决定簇的分子, 包括免疫球蛋白分子和免疫分子的免疫活性部分, 即含有与抗原特异性结合(“免疫反应”)的抗原结合位点的分子。

在本申请中, 术语“抗体”通常是指包括免疫球蛋白分子或免疫分子的免疫活性部分, 即含有与抗原特异性结合(“免疫反应”)的抗原结合位点的分子。其可以包括完整的抗体分子(也称作免疫球蛋白), 也可以是保留抗原结合能力的抗体分子的片段。在一些情况下, 术语“抗体”与术语“免疫球蛋白”“抗原结合域”可互换使用。抗体通常包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、天然抗体、双特异性抗体、嵌合抗体、Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、

线性抗体、单链抗体分子(例如scFv)、单域抗体。在某些实施方式中,“抗体”可以是包含轻链或轻链可变区、重链或重链可变区的单链多肽。例如,是由轻链、重链组成的单链多肽;例如,是由轻链可变区、重链可变区组成的单链多肽;例如,是由轻链可变区、重链组成的单链多肽;例如,是由轻链、重链可变区组成的单链多肽;例如,是由重链可变区(VH)和重链恒定区(CH)组成的多肽。例如,CH包含三个结构域CH1、CH2、CH3。每条轻链包含轻链可变区(VL)和轻链恒定区(CL)。CL由一个结构域组成。例如,VH和VL可进一步分为高变区,称为互补决定区(CDR),和散布其间的更保守的区域,称为框架区(FR)。每个VH和VL可由三个CDR和四个FR组成,从氨基端到羧基端按以下顺序排列:FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4。

在本申请中,术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”可互换使用,是指由通过肽键共价连接的氨基酸残基组成的化合物。

在本申请中,术语“双特异性”,通常是指具有与两个不同位点识别和/或结合的特性。所述位点可以是一定数目的氨基酸或其组成的肽段或肽段组,例如表达在细胞表面的蛋白。例如,本申请中的双特异性抗原结合域可以包含 NKG2A 抗原结合域、肿瘤抗原结合域两个不同的靶向结合域。通常情况下“双特异性”可与“双靶点”互换使用。在一些实例中,“双特异性 CAR”、“串联 CAR”可互换使用,均为本申请提供的 CAR。

在本申请中,术语“loop 结构”,通常是指一段弯曲的、非闭合的肽段,其可以是经合适的连接方式由 NKG2A 抗原结合域、肿瘤抗原结合域形成的 loop 结构;例如,其中一个结合域的结合区 H 和结合区 L 连接为抗体,另一个结合域的结合区 H (例如重链或重链可变区)、结合区 L (例如轻链或轻链可变区)分别与所述抗体的两端连接。

在本申请中,术语“结合区 L”,通常是指包含轻链功能片段(例如轻链、轻链可变区)的多肽。例如,结合区 L 为轻链,例如结合区 L 为轻链可变区。例如,第一结合区 L 为识别 NKG2A 的抗体的轻链,例如,第一结合区 L 为识别 NKG2A 的抗体的轻链可变区,例如,第二结合区 L 为识别 BCMA 的抗体的轻链,例如,第二结合区 L 为识别 BCMA 的抗体的轻链可变区。

在本申请中,术语“结合区 H”,通常是指包含重链功能片段(例如重链、重链可变区)的多肽。例如,结合区 H 为重链,例如结合区 H 为重链可变区。例如,第一结合区 H 为识别 NKG2A 的抗体的重链,例如,第一结合区 H 为识别 NKG2A 的抗体的重链可变区,例如,第二结合区 H 为识别 BCMA 的抗体的重链,例如,第二结合区 H 为识别 BCMA 的抗体的重链可变区。

在本申请中，术语“C 端”通常是指多肽链的两个末端之一，此末端的氨基酸残基携带游离的 α 羧基($-\text{COOH}$)。在某些实施方式中，所述游离的 α 羧基在某些肽链中也可被酰胺化。

在本申请中，术语“N 端”通常是指多肽链的两个末端之一，此末端的氨基酸残基携带游离的 α 氨基($-\text{NH}_2$)。在某些实施方式中，所述游离的 α 氨基也可被酰胺化或环化。

在本申请中，术语“轻链”通常是指免疫球蛋白中分子量较小的肽链，可包含轻链可变区(VL)和轻链恒定区(CL)。根据其结构和恒定区抗原性的差异可分为“ κ 轻链(kappa light chain)”和“ λ 轻链(lambda light chain)”两种类别。

在本申请中，术语“重链”通常是指免疫球蛋白中分子量较大的肽链，可包含重链可变区(VL)和重链恒定区(CL)。根据其恒定区抗原性的不同可分为 μ 、 γ 、 α 、 δ 和 ϵ 五类。

在本申请中，术语“轻链可变区”通常指抗体轻链的氨基末端结构域。轻链可变区可以称为“VL”。这些结构域通常是抗体轻链中变化最大的部分(相对于相同类型的其它抗体)，可以包括互补决定区(CDR)或高变区(HVR)和框架区(FR)。

在本申请中，术语“重链可变区”通常指抗体重链的氨基末端结构域。重链可变区可以称为“VH”。这些结构域通常是抗体重链中变化最大的部分(相对于相同类型的其它抗体)，可以包括互补决定区(CDR)或高变区(HVR)和框架区(FR)。

在本申请中，术语“连接子”、“连接片段”可互换使用，通常是指一段具备柔性特征的氨基酸序列。例如，所述连接子可以用于在嵌合多肽(或融合蛋白、嵌合蛋白)连接不同的功能模块，其功能可以包括提高嵌合多肽的折叠和稳定性等。例如，连接肽的长度可以有较大的变化范围，例如长度约为1至约100、约为3至约20、约为5至约30、约为5至约18或约为3至约8个氨基酸的甘氨酸/丝氨酸连接片段。例如，所述连接肽可以是 $(\text{GGGGS})_n/(\text{G4S})_n$ ，G为甘氨酸，S为丝氨酸，n为大于等于1的整数；例如n可以是1、2、3、4或5。本申请中的各结合区H或结合区L之间可通过合适的连接子连接以实现本申请的目的。

在本申请中，术语“跨膜域”通常是指蛋白质序列中跨越细胞膜的区域。在某些实施方式中，蛋白质序列中跨越细胞膜的区域通常为 α -螺旋结构，包含大部分为疏水性的氨基酸。在某些实施方式中，所述跨膜域可获取自天然蛋白质(例如来自于CD8的跨膜域或其功能性衍生序列)，或者，跨膜域可以是合成的非天然存在的蛋白质区段，例如在细胞膜中热力学稳定的疏水性蛋白质区段。

在本申请中，术语“共刺激结构域”通常是指可以提供免疫共刺激信号的共刺激分

子的胞内结构域,所述共刺激分子为淋巴细胞对抗原的有效应答所需要的细胞表面分子。所述共刺激结构域可包括CD28的共刺激结构域,还可包括TNF受体家族的共刺激结构域,例如OX40和4-1BB的共刺激结构域。

在本申请中,术语“胞内信号传导域”也称作“初级信号传导结构域”,通常是指含有称作基于免疫受体酪氨酸的活化基序或ITAM的信号转导序列。例如,衍生自CD3 ζ 、FcR γ (FCER1G)、Fc γ RIIa、FcR β (Fc ϵ R1b)、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD79a、CD79b、DAP10和DAP12的初级信号传导结构域。在某些实施方式中,胞内信号传导域转导效应功能信号并指导细胞进行特化功能。虽然可以使用整个胞内信号传导域,但在许多情况下,不必使用整个链。就使用胞内信号传导域的截短部分而言,此类截短部分可用于代替完整链,只要其能够转导效应子功能信号即可。因此,初胞内信号传导域意在包括足以转导效应子功能信号的胞内信号传导结构域的任一截短部分。胞内信号传导域。

在本申请中,术语“铰链域”通常是指在蛋白质的两个域之间的氨基酸区段,其能够允许蛋白质的柔性和/或一个或两个以上的域相对于彼此的运动。例如来源于IgG家族(例如IgG1和IgG4)、IgD以及其他蛋白分子的铰链域,例如来自于CD28、HLA家族的铰链域。

术语“宿主抗移植反应(HVGR)”通常是指:由于供体和受体(或称为宿主)之间的免疫遗传学差异,在进行外源供体移植时,作为外源移植物的供体会受到宿主体内的免疫细胞(例如NK细胞)识别和攻击,进而抑制或者清除供体。

术语“移植抗宿主病(GVHD)”通常是指:由于外源移植供体T淋巴细胞的TCR的多样性,以及与宿主HLA分子的不兼容性,供体T淋巴细胞会识别宿主正常组织上的抗原,经扩增并释放一系列细胞因子,攻击宿主细胞。

在本申请中,术语“药物组合物”通常指涉及适合施用于患者、例如人患者的组合物。例如,本申请所述的药物组合物,其可以包含本申请所述的核酸分子、本申请所述的载体和/或本申请所述的细胞,以及任选地药学上可接受的佐剂。

在本申请中,术语“载体”通常指可将编码某蛋白的多聚核苷酸插入其中并使蛋白获得表达的一种核酸运载工具。载体可通过转化、转导或转染宿主细胞,使其携带的遗传物质元件在宿主细胞内表达得以表达。举例来说,载体包括:质粒、脂质体、噬菌体如 λ 噬菌体或M13噬菌体及病毒载体等。一种载体可能含有多种控制表达的元件,包括启动子序列、转录起始序列、增强子序列、选择元件及报告基因。另外,载体还可含有复制起始位点。载体还有可能包括有协助其进入细胞的成分,如病毒颗粒、脂质体或蛋白外壳,但不仅仅只有这些物质。

在本申请中,术语“肿瘤”和“癌症”通常是指在正常生长和/或发育中呈现出至少部分失去控制的细胞。例如,常见的肿瘤或癌细胞通常已经失去了接触抑制并可能是入侵性的和/或具有转移的能力。

术语“核酸分子”或“多核苷酸”是指单链或双链形式的脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)及其聚合物,包括编码目的多肽或其片段的任何核苷酸序列。

在本申请中,术语“内源”,是指核酸分子或多肽等来自生物体自身。

术语“外源”,是指核酸分子或多肽不是内源性存在细胞中的,或表达水平不足以实现过表达时具有的功能;涵盖在细胞中表达的任何重组核酸分子或多肽,例如外源、异源和过表达的核酸分子和多肽。

术语“个体”和“受试者”可互换,包括人或来自其他种属的动物,其包括但不限于人、小鼠、大鼠、仓鼠和豚鼠、兔子、狗、猫、绵羊、猪、山羊、牛、马、猿、猴子。

术语“移植免疫排斥”是指宿主进行同种异体的组织、器官、或细胞等移植物移植后,外源的移植物作为一种“异己成分”被宿主的免疫系统识别,并发起针对移植物的攻击、破坏和清除的免疫学反应。

术语“治疗有效量”、“治疗有效的”、“有效量”或“以有效的量”在本文中可互换地使用,是指如本文中所述有效地实现特定生物学结果的化合物、制剂、物质或组合物、药物组合物的量,例如但不限于足以促进T细胞应答的量或剂量。有效量的免疫细胞,是指但不限于:能使抗肿瘤活性增加、增强或延长的免疫细胞的数量;抗肿瘤免疫细胞数目或活化免疫细胞数目的增加;促进IFN- γ 分泌、肿瘤消退、肿瘤缩小、肿瘤坏死的免疫细胞的数量。

术语“MHC”为组织相容性复合物,是所有编码生物相容复合体抗原的基因群一种统称。在人类细胞中MHC称为HLA抗原,在移植反应中发挥重要作用,由对所植入的组织的表面上的组织相容性抗原产生反应的T细胞介导排异。

术语“人类白细胞抗原”(Human leukocyte antigen, HLA)是人类的主要组织相容性复合体的编码基因,与人类的免疫系统功能密切相关。HLA包括有I类、II类和III类基因部分。HLA I类是一个异二聚体,由重链(α 链)与轻链 β 2微球蛋白(B2M)组成。HLA-II类基因包括HLA-D家族,主要有HLA-DP、HLA-DQ和HLA-DR等,主要分布于B淋巴细胞、巨噬细胞和树突状细胞等专职抗原提呈细胞表面。

发明详述

本申请提供了一种嵌合抗原受体(CAR),所述CAR包含双特异性抗原结合域,所述双特异性抗原结合域包括NKG2A抗原结合域和肿瘤抗原结合域,所述NKG2A抗原结合域包含第一结合区L、第一结合区H,所述肿瘤抗原结合域包含第二结合区L、第二结合区H。

抗原

“NKG2A 抗原”或“NKG2A”通常是指 NKG2A 多肽，是 NKG2 转录物组的成员，NKG2A 与 CD94 形成的异源二聚体抑制性受体 CD94/NKG2A，表达于 NK 细胞、 $\alpha\beta$ T 细胞、 $\gamma\delta$ T 细胞和 NKT 细胞的亚群的表面上。如本文所使用的，“NKG2A”是指 NKG2A 基因或编码的蛋白的任何变体、衍生物或同种型。NKG2A 多肽具有与由 NCBI GenBank Gene ID: 3821 的基因表达的转录物编码的氨基酸序列具有至少约 80%、至少约 85%、至少约 90%、至少约 95%、至少约 96%、至少约 97%、至少约 98%、至少约 99% 或 100% 同源性或同一性的氨基酸序列或其片段，和/或可任选地包括至多一个或至多两个或至多三个保守氨基酸取代。在一实例中，人 NKG2A 多肽具有 SEQ ID NO: 42 所示序列。

在一实例中，所述 NKG2A 多肽为人 NKG2A 多肽，包括与 SEQ ID No: 42 所示的氨基酸序列具有至少约 80%、至少约 85%、至少约 90%、至少约 95%、至少约 96%、至少约 97%、至少约 98%、至少约 99% 或 100% 同源性或同一性的氨基酸序列或其片段，和/或可任选地包括至多一个或至多两个或至多三个保守氨基酸取代。

“BCMA 抗原”或“BCMA”通常是指 BCMA 多肽，是 B 细胞成熟抗原(B-cell maturation antigen)，属 TNF 受体超家族。BCMA 与其配体结合后，可激活 B 细胞的增殖和存活。BCMA 特异地高表达于浆细胞和多发性骨髓瘤细胞，而在造血干细胞和其他正常组织细胞中均不表达。“BCMA”是指 BCMA 基因或编码的蛋白的任何变体、衍生物或同种型。BCMA 多肽具有与由 NCBI GenBank Gene ID: NP_001183.2 的基因表达的转录物编码的氨基酸序列具有至少约 80%、至少约 85%、至少约 90%、至少约 95%、至少约 96%、至少约 97%、至少约 98%、至少约 99% 或 100% 同源性或同一性的氨基酸序列或其片段，和/或可任选地包括至多一个或至多两个或至多三个保守氨基酸取代。在一实例中，人 BCMA 多肽具有 SEQ ID NO: 43 所示序列。

在一实例中，所述 BCMA 多肽为人 BCMA 多肽，包括与 SEQ ID No: 43 所示的氨基酸序列具有至少约 80%、至少约 85%、至少约 90%、至少约 95%、至少约 96%、至少约 97%、至少约 98%、至少约 99% 或 100% 同源性或同一性的氨基酸序列或其片段，和/或可任选地包括至多一个或至多两个或至多三个保守氨基酸取代。

任何肿瘤抗原均可用于本申请所述的肿瘤相关的实施例(本文中“实例”与“实施例”可互换使用)中。抗原表达为多肽或完整蛋白或其部分。本申请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
 5 (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(aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-4)bDGlc(1-1)Cer; 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,
 10 Claudin18.2、Claudin18.1; ASGPR1; CDH16; 5T4; 8H9; $\alpha\text{v}\beta 6$ 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 (GPCR5D); X染色体开放阅读框61
 15 (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 $\beta 3$ (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
 20 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
 25 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
 30 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)。

在一实例中, 嵌合抗原受体(CAR)识别病原体抗原, 例如用于治疗 and/或预防病原体感染或其他感染性疾病, 例如在免疫受损的受试者中。病原体抗原包括但不限于:

- 5 病毒、细菌、真菌、原生动物, 或寄生虫的抗原; 病毒抗原包括但不限于: 巨细胞病毒(CMV)抗原、爱泼斯坦-巴尔病毒(EBV)抗原、人类免疫缺陷病毒(HIV)抗原或流感病毒抗原。

在一实例中, 本申请的CAR特异性结合BCMA多肽和NKG2A多肽。在一实例中, CAR结合至NKG2A多肽和BCMA多肽的胞外结构域。

双特异性抗原结合域

- 10 在本申请提供的CAR中, 肿瘤抗原结合域(例如BCMA抗体)、肿瘤抗原结合域(例如NKG2A抗体)的重链/重链可变区(VH)和/或轻链/轻链可变区(VL)可定位在任何合适的位置上。

在本申请中, NKG2A抗原结合域包含第一结合区L、第一结合区H, 肿瘤抗原结合域包含第二结合区L、第二结合区H, 所述第一结合区L、所述第一结合区H、所述第二结合区L、所述第二结合区H以如下方式连接:

- 15 a) 自N端至C端: 所述第一结合区L或所述第一结合区H—所述第一结合区H或所述第一结合区L—所述第二结合区H或所述第二结合区L—所述第二结合区L或所述第二结合区H,
- 20 b). 自N端至C端: 所述第二结合区H—所述第二结合区L—所述第一结合区L—所述第一结合区H, 或
- c) 所述第一结合区L与所述第二结合区H连接为第一多肽, 所述第二结合区L与所述第一结合区H连接为第二多肽, 所述第一多肽与所述第二多肽连接, 其中, 所述第一结合区L不与所述第一结合区H连接, 且所述第二结合区L不与所述第二结合区H连接。

在一实例中, 所述第一结合区L包含第一轻链或第一轻链可变区(VL)。

25 在一实例中, 所述第一结合区H包含第一重链或第一重链可变区(VH)。

在一实例中, 所述第二结合区L包含第二轻链或第二轻链可变区(VL)。

在一实例中, 所述第二结合区H包含第二重链或第二重链可变区(VH)。

在一实例中, 在所述方式a中, 所述第一结合区L与所述第一结合区H连接, 所述第二结合区L与所述第二结合区H连接。

- 30 在一实例中, 在所述方式a中, 所述第一轻链与所述第一重链连接, 所述第二轻链与所述第二重链连接。

在一实例中, 在所述方式a中, 所述第一轻链可变区(VL)与所述第一重链可变

区 (VH) 连接, 所述第二轻链可变区 (VL) 与所述第二重链可变区 (VH) 连接。

在一实例中, 在所述方式a中, 以如下方式连接: NKG2A VL—NKG2A VH—BCMA VH—BCMAVL。

5 在一实例中, 在所述方式a中, 以如下方式连接: NKG2A VL—(G4S)3—NKG2A VH—(G4S)3—BCMA VH—(G4S)3—BCMA VL。

在一实例中, 在所述方式b中, 以如下方式连接: BCMA VH—BCMA VL—NKG2A VL—NKG2A VH。

在一实例中, 在所述方式b中, 以如下方式连接: BCMA VH—(G4S)3—BCMA VL—(G4S)3—NKG2A VL—(G4S)3—NKG2A VH。

10 在一实例中, 在所述方式c中, 自N端至C端以如下方式连接:

c1. 所述第二结合区H—所述第一结合区L—所述第二结合区H—所述第一结合区L;

c2. 所述第一结合区H—所述第二结合区L—所述第一结合区H—所述第二结合区L;

15 c3. 所述第二结合区L—所述第一结合区H—所述第二结合区H—所述第一结合区L;

c4. 所述第一结合区L—所述第二结合区H—所述第一结合区H—所述第二结合区L;

20 c5. 所述第二结合区H—所述第一结合区L—所述第一结合区L—所述第二结合区H;或

c6. 所述第一结合区H—所述第二结合区L—所述第二结合区L—所述第一结合区H。

在一实例中, 在所述方式c1中, 以如下方式连接:

所述第二VH—所述第一VL—所述第二VH—所述第一VL。

25 在一实例中, 在所述方式c2中, 以如下方式连接:

所述第一VH—所述第二VL—所述第一VH—所述第二VL。

在一实例中, 在所述方式c3中, 以如下方式连接:

所述第二VL—所述第一VH—所述第二VH—所述第一VL。

在一实例中, 在所述方式c4中, 以如下方式连接:

30 所述第一VL—所述第二VH—所述第一VH—所述第二VL。

在一实例中, 在所述方式c5中, 以如下方式连接:

所述第二VH—所述第一VL—所述第一VL—所述第二VH。

在一实例中，在所述方式c6中，以如下方式连接：

所述第一VH—所述第二VL—所述第二VL—所述第一VH。

在本申请中，NKG2A抗原结合域包含第一结合区L、第一结合区H,肿瘤抗原结合域包含第二结合区L、第二结合区H,所述第一结合区L、所述第一结合区H、所述第二结合区L、所述第二结合区H以形成loop结构的方式连接。

在一实例中，所述loop结构通过如下方式形成：其中一个抗原结合域的结合区H和结合区L连接为抗体，另一个抗原结合域的结合区H、结合区L分别与所述抗体的两端连接。

在一实例中，所述抗体自N端至C端依次包含：所述结合区H、所述结合区L。

在一实例中，所述抗体自N端至C端依次包含：所述结合区H、所述结合区L;所述另一个抗原结合域的结合区L与所述抗体的N端连接，所述另一个抗原结合域的结合区H与所述抗体的C端连接。

在一实例中，所述连接为抗体的结合区H为第一结合区H，所述连接为抗体的结合区L为第一结合区L，所述另一个抗原结合域的结合区L为第二结合区L，所述另一个抗原结合域的结合区H为第二结合区H。

在一实例中，所述连接为抗体的结合区H为第二结合区H，所述连接为抗体的结合区L为第二结合区L。所述另一个抗原结合域的结合区L为第一结合区L，所述另一个抗原结合域的结合区H为第一结合区H。

在一实例中，所述抗体自N端至C端依次包含：所述结合区H、所述结合区L;所述另一个抗原结合域的结合区H与所述抗体的N端连接，所述另一个抗原结合域的结合区L与所述抗体的C端连接。

在一实例中，所述连接为抗体的结合区H为第一结合区H，所述连接为抗体的结合区L为第一结合区L，所述另一个抗原结合域的结合区L为第二结合区L，所述另一个抗原结合域的结合区H为第二结合区H。

在一实例中，所述连接为抗体的结合区H为第二结合区H，所述连接为抗体的结合区L为第二结合区L。所述另一个抗原结合域的结合区L为第一结合区L，所述另一个抗原结合域的结合区H为第一结合区H。

在一实例中，所述抗体自N端至C端依次包含：所述结合区L、所述结合区H。

在一实例中，所述抗体自N端至C端依次包含：所述结合区L、所述结合区H;所述另一个抗原结合域的结合区L与所述抗体的N端连接，所述另一个抗原结合域的结合区H与所述抗体的C端连接。

在一实例中，所述抗体自N端至C端依次包含：所述结合区L、所述结合区H;所述

另一个抗原结合域的结合区H与所述抗体的N端连接，所述另一个抗原结合域的结合区L与所述抗体的C端连接。

在一实例中，所述连接为抗体的结合区H为第一结合区H，所述连接为抗体的结合区L为第一结合区L，所述另一个抗原结合域的结合区L为第二结合区L，所述另一个抗原结合域的结合区H为第二结合区H。

在一实例中，所述连接为抗体的结合区H为第二结合区H，所述连接为抗体的结合区L为第二结合区L。所述另一个抗原结合域的结合区L为第一结合区L，所述另一个抗原结合域的结合区H为第一结合区H。

在某一实例中，所述第一结合区L、所述第一结合区H、所述第二结合区L、所述第二结合区H以如下方式连接：

所述第二结合区L—所述第一结合区H—所述第一结合区L—所述第二结合区H。

在某一实例中，所述第一结合区L、所述第一结合区H、所述第二结合区L、所述第二结合区H以如下方式连接：

所述第一结合区L—所述第二结合区H—所述第二结合区L—所述第一结合区H。

在一实例中，所述第一结合区L包含第一轻链或第一轻链可变区（VL）。

在一实例中，所述第一结合区H包含第一重链或第一重链可变区（VH）。

在一实例中，所述第二结合区L包含第二轻链或第二轻链可变区（VL）。

在一实例中，所述第二结合区H包含第二重链或第二重链可变区（VH）。

在一实例中，所述第一结合区L包含第一轻链，所述第一结合区H包含第一重链，所述第二结合区L包含第二轻链，所述第二结合区H包含第二重链。

在一实例中，所述第一结合区L包含第一VL，所述第一结合区H包含第一VH，所述第二结合区L包含第二轻链，所述第二结合区H包含第二重链。

在一实例中，所述第一结合区L包含第一轻链，所述第一结合区H包含第一重链，所述第二结合区L包含第二VL，所述第二结合区H包含第二VH。

在一实例中，所述第一结合区L包含第一VL，所述第一结合区H包含第一VH，所述第二结合区L包含第二VL，所述第二结合区H包含第二VH。

在本申请中，所述第一VL为所述NKG2A抗体的VL，所述第一轻链为所述NKG2A抗体的轻链，所述第一VH为所述NKG2A抗体的VH，所述第一重链为所述NKG2A抗体的重链，所述第二VL为识别所述肿瘤抗原的抗体的VL，所述第二轻链为识别所述肿瘤抗原的抗体的轻链，所述第二VH为识别所述肿瘤抗原的抗体的VH，所述第二重链为识别所述肿瘤抗原的抗体的重链。

在一实例中，在所述双特异性抗原结合域中，自N端至C端包含如下连接方式：

BCMA VL—NKG2A VH—NKG2A VL—BCMA VH,
 BCMA VH—NKG2A VH—NKG2A VL—BCMA VL,
 NKG2A VL—BCMA VH—BCMA VL—NKG2A VH, 或
 NKG2A VH—BCMA VH—BCMA VL—NKG2A VL,

5 在一实例中, 在所述双特异性抗原结合域中, 自N端至C端包含如下连接方式:

BCMA VL—NKG2A VL—NKG2A VH—BCMA VH,
 NKG2A VL—BCMA VL—BCMA VH—NKG2A VH,
 NKG2A VH—BCMA VL—BCMA VH—NKG2A VL, 或
 BCMA VH—NKG2A VL—NKG2A VH—BCMA VL,

10 在一实例中, CAR中的各轻链/VL、重链/VH可通过连接子连接。连接子可包含任何合适的氨基酸序列, 用于向细胞外抗原结合区提供柔性的CAR的一部分, 其组成和长度都是可调的。

在一实例中, 一个抗原结合域的结合区H和结合区L通过连接子连接为抗体, 另一个抗原结合域的结合区H、结合区L分别通过连接子与所述抗体的两端连接。

15 在一实例中, 所述连接子包含Lin1或(G4S)_n, 其中, n是等于或大于1的整数, 所述Lin1包含如SEQ ID NO: 18所示的氨基酸序列。例如, 所述 (G4S)_n中n为1或3。

在一实例中, 一个抗原结合域的结合区H和结合区L通过Lin1或(G4S)₃连接为抗体, 另一个抗原结合域的结合区H、结合区L分别通过连接子与所述抗体的两端连接。

20 在一实例中, 一个抗原结合域的结合区H和结合区L通过Lin1或(G4S)₃连接为抗体, 另一个抗原结合域的结合区H、结合区L分别通过G4S与所述抗体的两端连接。

在一实例中, 所述抗体包含所述第一结合区H、第一结合区L, 所述抗体的N端通过G4S与所述第二结合区H或第二结合区L连接, 所述抗体的N端通过G4S与所述第二结合区L或第二结合区H连接。

25 在一实例中, 所述抗体包含所述第二结合区H、第二结合区L, 所述抗体的N端通过G4S与所述第一结合区H或第一结合区L连接, 所述抗体的N端通过G4S与所述第一结合区L或第一结合区H连接。

在一实例中, 在所述双特异性抗原结合域中, 自N端至C端包含如下连接方式:

BCMA VL—G4S—NKG2A VH—(G4S)₃—NKG2A VL—G4S—BCMA VH;
 BCMA VH—G4S—NKG2A VH—(G4S)₃—NKG2A VL—G4S—BCMA VL;
 30 NKG2A VL—G4S—BCMA VH—(G4S)₃—BCMA VL—G4S—NKG2A VH;
 NKG2A VH—G4S—BCMA VH—(G4S)₃—BCMA VL—G4S—NKG2A VL;
 BCMA VH—G4S—NKG2A VL—(G4S)₃—NKG2A VH—G4S—BCMA VL;

BCMA VL—G4S—NKG2A VL—(G4S)₃—NKG2A VH—G4S—BCMA VH;
 NKG2A VL—G4S—BCMA VL—(G4S)₃—BCMA VH—G4S—NKG2A VH; 或
 NKG2A VH—G4S—BCMA VL—(G4S)₃—BCMA VH—G4S—NKG2A VL。

在一实例中, 在所述方式a)中, 自N端至C端包含如下连接方式:

- 5 BCMA VL—G4S—NKG2A VH—Lin1—NKG2A VL—G4S—BCMA VH;
 BCMA VH—G4S—NKG2A VH—Lin1—NKG2A VL—G4S—BCMA VL;
 NKG2A VL—G4S—BCMA VH—Lin1—BCMA VL—G4S—NKG2A VH;
 NKG2A VH—G4S—BCMA VH—Lin1—BCMA VL—G4S—NKG2A VL;
 BCMA VH—G4S—NKG2A VL—Lin1—NKG2A VH—G4S—BCMA VL;
 10 BCMA VL—G4S—NKG2A VL—Lin1—NKG2A VH—G4S—BCMA VH;
 NKG2A VL—G4S—BCMA VL—Lin1—BCMA VH—G4S—NKG2A VH; 或
 NKG2A VH—G4S—BCMA VL—Lin1—BCMA VH—G4S—NKG2A VL。

在一实例中, 所述CAR包含如SEQ ID NO: 22、25和28中任一项所述的氨基酸序列。

- 15 在一实例中, 所述第二VL为BCMA抗体的VL, 所述第二轻链为BCMA抗体的轻链, 所述第二VH为BCMA抗体的VH, 所述第二重链为BCMA抗体的重链。

在一实例中, CAR中的抗体各轻链/VL、重链/VH可通过连接子连接。连接子可包含任何合适的氨基酸序列。

- 20 在一实例中, 所述连接子包含Lin1或(G4S)_n, 其中, n是等于或大于1的整数; 所述Lin1包含如SEQ ID NO: 18所示的氨基酸序列。

在一实例中, 连接子是长度约为1至约100、约为3至约20、约为5至约30、约为5至约18或约为3至约8个氨基酸的甘氨酸/丝氨酸连接片段, 并且在序列中由甘氨酸和/或丝氨酸残基组成。

- 25 在一实例中, 所述甘氨酸/丝氨酸连接体是式[GGGGS]_n ((G4S)_n) 的肽, 其中n是1到10、2到8或3到5的整数。例如, n是1、2、3或4。

在一实例中, NKG2A抗体VL和VH可通过连接片段连接。在一实例中, NKG2A抗体VL和VH通过包含具有如SEQ ID NO: 18所示序列的连接片段连接, 或者通过(G4S)₃连接。

- 30 在一实例中, BCMA抗体VL和VH可通过连接片段连接。在一实例中, BCMA抗体包括如SEQ ID NO: 9-14所示的序列, 还包括如SEQ ID NO: 18所示的序列或(G4S)₃; 或包括如SEQ ID NO: 15和16所示的序列, 还包括如SEQ ID NO: 18所示的序列或(G4S)₃; 或包括如SEQ ID NO: 39或40所示的序列。

在一实例中，NKG2A抗体包含VH、VL和连接片段。在一实例中，NKG2A抗体包含如SEQ ID NO: 3-8所示的序列，还包括如SEQ ID NO:18所示的序列或(G4S)₃；或包括如SEQ ID NO: 1和2所示的序列，还包括如SEQ ID NO:18所示的序列或(G4S)₃；或包括如SEQ ID NO:41所示的序列。

5 在一实例中，BCMA抗体和NKG2A抗体通过连接片段连接。连接片段可包含任何合适的氨基酸序列。优选地，将所述BCMA抗体和所述NKG2A抗体连接的连接片段包括甘氨酸/丝氨酸连接片段，所述甘氨酸/丝氨酸连接体是式(G4S)_n的肽，其中n是1到10、2到8或3到5的整数。优选地，n是1、2、3、4。优选地，将BCMA抗体和NKG2A抗体连接的连接片段包含(G4S)₃序列（包含由连接片段连接的BCMA抗体
10 重链和轻链和NKG2A抗体重链和轻链，(G4S)₃位于BCMA抗体和NKG2A抗体之间）。

在一实例中，CAR包括(i)位于BCMA抗体重链的氨基末端附近的NKG2A抗体轻链，其中连接片段位于它们之间，(ii)位于NKG2A抗体轻链的氨基末端附近的NKG2A抗体重链，其中连接片段位于它们之间，以及(iii)定位在NKG2A抗体重链的氨基末端附近的BCMA抗体轻链，其中连接片段位于它们之间；所述连接片段任
15 选地包括，如SEQ ID NO: 18所示的序列、G4S或(G4S)₃。在一实例中，CAR包括(i)位于NKG2A抗体重链的氨基末端附近的BCMA抗体轻链，其中连接片段位于它们之间，(ii)位于BCMA抗体轻链的氨基末端附近的BCMA抗体重链，其中连接片段位于它们之间，以及(iii)位于BCMA抗体重链的氨基末端附近的NKG2A抗体轻链，其中连接片段位于它们之间；所述连接片段任
20 选地包括，如SEQ ID NO: 18所示的序列、G4S或(G4S)₃。

在一实例中，BCMA抗体可定位在与NKG2A抗体的氨基末端相邻的位置（其中连接片段位于它们之间）。在一实施例中，NKG2A抗体位于BCMA抗体的氨基末端附近（其中连接片段位于它们之间）。

在一实例中，表达本申请提供的CAR的car-t细胞相对于仅靶向肿瘤抗原的car-t
25 细胞具有更好的体外杀伤NK细胞的效果。

在一实例中，表达本申请提供的CAR的ucar-t细胞相对于仅靶向肿瘤抗原的ucar-t细胞具有更好的体外杀伤NK细胞的效果。

在一实例中，表达本申请提供的CAR的ucar-t细胞相对于仅靶向肿瘤抗原ucar-t细胞具有更好的体内抑制肿瘤生长的效果。

30 在一实例中，表达本申请提供的CAR的ucar-t细胞与仅靶向肿瘤抗原的ucar-t细胞相比，具有更长存活时间和/或扩增能力。

在一实例中，表达本申请提供的CAR的ucar-t细胞与仅靶向肿瘤抗原的ucar-t细胞

相比，在体外NK细胞环境下具有更好的抗NK细胞和杀伤肿瘤细胞的效果。

在一实例中，表达本申请提供的CAR的ucar-t细胞与仅靶向肿瘤抗原的ucar-t细胞相比，在体内NK细胞环境下具有更好的抗NK细胞和抑制肿瘤生长的效果。

在一实例中，表达本申请提供的CAR的ucar-t细胞与仅靶向肿瘤抗原的ucar-t细胞
5 相比，具有更好的特异性向肿瘤组织浸润的效果。

在一实例中，表达本申请提供的CAR的ucar-t细胞不会引起移植物抗宿主（GVHD）反应。

在一实例中，NKG2A 抗原结合域包含识别 NKG2A 多肽的抗体(也称 NKG2A 抗体)的 scFv。

10 在一实例中，NKG2A 抗原结合域包含 NKG2A 抗体的轻链可变区（VL）和/或重链可变区（VH）。在一实例中，NKG2A 抗原结合域包含 NKG2A 抗体的轻链和/或重链。在一实例中，NKG2A 的抗体重链或 VH 包含一个或多个重链 CDR(HCDR)：如 SEQ ID NO:3 序列所示的 HCDR1、如 SEQ ID NO:4 所示序列的 HCDR2、如 SEQ ID NO:5 所示序列的 HCDR3。在一实例中，NKG2A 抗体重链或 VH 包含如 SEQ ID NO: 15 3-5 所示序列。在一实例中，NKG2A 抗体轻链或 VL 包含一个或多个轻链 CDR(LCDR)：如 SEQ ID NO:6 所示序列的 LCDR1、如 SEQ ID NO:7 所示序列的 LCDR2、如 SEQ ID NO:8 所示序列的 LCDR3。在一实例中，NKG2A 抗体轻链或 VL 包含如 SEQ ID NO: 6-8 所示序列。在一实例中，NKG2A 抗体重链或 VH 包含如 SEQ ID NO:1 所示的序列。在一实例中，NKG2A 抗体轻链或 VL 包含如 SEQ ID NO:2 所示的序列。在一实例中，
20 NKG2A 抗体或 NKG2A 抗原结合域包含如 SEQ ID NO:1 所示序列的 VH 和/或如 SEQ ID NO:2 所示序列的 VL。在一实例中，NKG2A 抗体或 NKG2A 抗原结合域包含如 SEQ ID NO:1 和 2 所示序列。

在一实例中，BCMA抗原结合域包含识别BCMA多肽的抗体(也称BCMA抗体)的 scFv。在一实例中，BCMA抗原结合域包含BCMA抗体VL和/或VH。在一实例中，BCMA
25 抗原结合域包含BCMA抗体的轻链和/或重链。在一实例中，BCMA抗体重链或VH包含一个或多个重链CDR（HCDR）：如SEQ ID NO:9所示序列的HCDR1、如SEQ ID NO:10所示序列的HCDR2、如SEQ ID NO:11所示序列的HCDR3。在一实例中，BCMA抗体重链或VH包含如SEQ ID NO:9-11所示序列。在一实例中，BCMA抗体轻链或VL包含一个或多个轻链CDR（LCDR）：如SEQ ID NO:12所示序列的LCDR1、如SEQ ID NO:13所示序列的LCDR2、如SEQ ID NO:14所示序列的LCDR3。在一实例中，BCMA
30 抗体轻链或VL包含如SEQ ID NO:12-14所示序列。在一实例中，BCMA抗体重链或VH包含如SEQ ID NO:15所示的序列。在一实例中，BCMA抗体轻链或VL包含如SEQ ID

NO:16所示的序列。在一实例中,BCMA抗体或BCMA抗原结合域包含如SEQ ID NO:15所示序列的VH和/或如SEQ ID NO:16所示序列的VL。在一实例中, BCMA抗体或BCMA抗原结合域包含如SEQ ID NO:16和17所示序列。在一实例中, BCMA抗体或BCMA抗原结合域包含如SEQ ID NO:46-50所示序列。

5 在一实例中, CAR包含NKG2A抗体和BCMA抗体全部CDR区域。在一实例中, CAR包括如SEQ ID NO:3-14所示的序列。在一实例中, CAR包括识别NKG2A多肽的抗体和识别BCMA多肽的抗体的轻链可变区和重链可变区。在一实例中, CAR包括如SEQ ID NO: 1、2、15和16所示的序列。

10 在一个方面, 本申请考虑到产生功能上等同的分子的起始抗体或片段(例如, VH或VL)氨基酸序列的修饰。例如, 可修饰CAR中包括的NKG2A抗体或BCMA抗体的VH或VL, 保留NKG2A或BCMA抗体如VH或VL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。

15 本申请考虑到整个CAR分子的修饰, 例如, CAR分子的各个结构域的一个或多个氨基酸序列的修饰, 以便产生功能上等同的分子。可修饰CAR分子保留起始CAR分子的至少约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%或99%的同一性。

20 本领域普通技术人员将会理解, 可进一步修饰本申请的抗体或抗体片段, 使得它们在氨基酸序列上(例如, 相对于野生型或本申请提供的序列)有所变化, 但在所需活性上没有变化。例如, 可对蛋白质进行另外的核苷酸置换, 导致“非必需”氨基酸残基处的氨基酸置换。例如, 分子中的非必需氨基酸残基可被来自相同侧链家族的另一个氨基酸残基取代。在另一个实施方案中, 氨基酸片段可被结构相似但在顺序和/或组成上与侧链家族成员不同的氨基酸片段取代, 例如, 可进行保守置换, 其中氨基酸残基被具有相似侧链的氨基酸残基所取代。

前导序列和铰链域

本申请提供的CAR还可以包括前导序列和/或铰链域。在一实例中, 抗原结合域与跨膜域直接连接或通过铰链连接。在一实例中, 所述铰链包括CD8铰链, 例如, CD8铰链包含SEQ ID NO: 35或与SEQ ID NO: 35具有95-99%同一性的的序列。

30 在一实例中, 抗原结合域包含前导序列。在一实例中, 前导序列可定位于BCMA抗体VH的氨基末端(例如, 在BCMA抗体重链的氨基末端)。在一实例中, 前导序列位于BCMA抗体VL的氨基末端(例如, 位于BCMA抗体轻链的氨基末端)。在一实

例中, 前导序列位于NKG2A抗体VL的氨基末端(例如, 位于NKG2A抗体轻链的氨基末端)。前导序列可以包括任何合适的前导序列。在一实例中, 前导序列包含如SEQ ID NO:29的氨基酸序列。在一实例中, CAR缺少前导序列。

跨膜域

5 本申请提供的CAR还可以包括跨膜域。跨膜域可以将CAR锚定在细胞膜上。本申请CAR的跨膜域可以包括选自以下蛋白的跨膜结构域:T细胞受体的 α 、 β 、或 ζ 的跨膜结构域、CD28、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、KIRDS2、OX40、CD2、CD27、LFA-1(CD11a、CD18)、ICOS(CD278)、4-1BB(CD137)、GITR、CD40、BAFFR、HVEM(LIGHTR)、
10 SLAMF7、Nkp80(KLRF1)、CD160、CD19、IL2R β 、IL2R γ 、IL7R α 、ITGA1、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、TNFR2、DNAM1(CD226)、SLAMF4(CD244、2B4)、CD84、CD96(Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9(CD229)、CD160(BY55)、PSGL1、
15 CD100(SEMA4D)、SLAMF6(NTB-A、Ly108)、SLAM(SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME(SLAMF8)、SELPLG(CD162)、LTBR、PAG/Cbp、Nkp44、Nkp30、Nkp46、NKG2D和/或NKG2C的跨膜结构域。

在一实例中, CAR包括CD8跨膜结构域, 其具有如SEQ ID NO:30所示序列的至少一个、两个或三个修饰, 但不超过20, 10或5个修饰, 或与SEQ ID NO:30的氨基酸序列具有
20 95-99%同一性的序列。在一个实例中, CD8跨膜结构域包括如SEQ ID NO:30所示的序列。

在一实例中, CAR包括CD28跨膜结构域, 其具有如SEQ ID NO:31所示的至少一个、两个或三个修饰, 但不超过20, 10或5个修饰, 或与SEQ ID NO:31所示的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。在一个实例中, CD28跨膜结构域包括如SEQ ID NO:31所示的序列。

25 胞内信号传导域

本发明提供的CAR还可以包括胞内信号传导域。在一实例中, 胞内信号传导域(也称作一级信号结构域)包括选自如下蛋白分子的信号传导域: CD3 ζ 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、FcR γ (FCER1G)、FcR β (Fc ϵ R1b)、CD79a、CD79b、Fc γ RIIa。

在一实例中, 胞内信号传导域包括CD3 ζ 的胞内信号传导域。CD3 ζ 胞内信号传导域可
30 包括如SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列的至少1、2、或3个修饰但不超过20、10或5个修饰的氨基酸序列, 或与SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列有95-99%同一性的序列。在一实例中, CD3 ζ 信号结构域包括如SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列。

在一实例中，本发明提供的CAR的胞内信号结构域包括人CD3 ζ 信号结构域。在一实例中，CAR的胞内信号结构域包括人CD3 ζ 信号结构域和CD28共刺激信号结构域。

共刺激信号结构域

5 本申请提供的CAR还可以包括共刺激信号结构域。在一实例中，共刺激信号结构域包括选自如下蛋白功能信号结构域：CD27、CD28、4-1BB(CD137)、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、特异性结合CD83的配体、CDS、ICAM-1、GITR、BAFFR、HVEM(LIGHTR)、SLAMF7、NKp80(KLRF1)、CD160、CD19、CD4、CD8 α 、CD8 β 、IL2R β 、IL2R γ 、IL7R α 、ITGA4、
10 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、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)、
15 SLAM(SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME(SLAMF8)、SELPLG(CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、NKp44、NKp30、NKp46、NKG2D。

在一实例中，共刺激信号结构域4-1BB包括如SEQ ID NO:33所示氨基酸序列的至少1、2、或3个修饰但不超过20、10或5个修饰的氨基酸序列，或与SEQ ID NO:33所示的氨基酸序列有95-99%同一性的序列。在一实例中，共刺激信号结构域包括如SEQ ID NO:33所示
20 的序列。

在一实例中，共刺激信号结构域CD28包括如SEQ ID NO: 32所示的氨基酸序列的至少1、2、或3个修饰但不超过20、10或5个修饰的氨基酸序列，或与SEQ ID NO: 32所示的氨基酸序列有95-99%同一性的序列。在一实例中，共刺激信号结构域包括如SEQ ID NO:32所示的序列。

25 在一实例中，本发明提供的CAR的胞内信号结构域包括人CD3 ζ 信号结构域。在一实例中，CAR的胞内信号结构域包括人CD3 ζ 信号结构域和CD28共刺激信号结构域。在一实例中，CAR的胞内信号结构域包括人CD3 ζ 信号结构域和4-1BB共刺激信号结构域。在一实例中，CAR的胞内信号结构域包括CD3 ζ 信号结构域、CD28和4-1BB共刺激信号结构域。

30 示例性，本申请的CAR包括如SEQ ID NO: 17、22、25或28所示的序列。

示例性，本申请的CAR包括如SEQ ID NO: 17、22、25或28所示序列中的任一项与如SEQ ID NO: 19、44或45所示序列中的任一项顺序连接的序列。

细胞

本申请提供了包括本申请提供的CAR的细胞。所述细胞包括衍生自干细胞或淋巴谱系的免疫细胞。CAR与靶抗原结合后能激活所述免疫细胞；本申请所提供的CAR（也称作串联CAR），其包含双特异性抗原结合域，该双特异性抗原结合域包含NKG2A抗原结合域和肿瘤抗原结合域。本申请提供的CAR已在前文描述本申请提供的细胞包含其全部技术方案。

在一实例中，本申请的细胞包括识别NKG2A多肽和肿瘤抗原的免疫细胞（例如T、NKT细胞）。在一实例中，本申请的细胞包括识别NKG2A多肽和病原体抗原的免疫细胞。

在一实例中，在有宿主免疫细胞（例如NK细胞）存在时，本申请的免疫细胞具有更长存活时间和/或扩增能力。

在一实例中，与包括仅识别肿瘤抗原的CAR的免疫细胞相比，本申请的免疫细胞对携带靶肿瘤抗原的细胞表现出更强的体内外的细胞杀伤作用。

包括B、T和自然杀伤(NK)细胞的淋巴谱系可以提供抗体的产生、细胞免疫系统的调节、血液中外源试剂的检测、宿主外源细胞的检测等。淋巴谱系的免疫细胞的非限制性实例包括T细胞、自然杀伤T(NKT)细胞及其前体，包括胚胎干细胞和多能干细胞（例如，分化成淋巴样细胞的干细胞或多能干细胞）。T细胞可以是在胸腺中成熟的淋巴细胞，主要负责细胞介导的免疫。T细胞参与适应性免疫系统。T细胞可以是任何类型的T细胞，包括但不限于辅助T细胞、细胞毒性T细胞、记忆T细胞（包括中央记忆T细胞、干细胞样记忆T细胞（或干样记忆T细胞）和两种效应记忆T细胞：例如TEM细胞和TEMRA细胞）、调节性T细胞（也称为抑制性T细胞）、自然杀伤T细胞、粘膜相关性不变T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞或 $\alpha\beta$ T细胞。细胞毒性T细胞(CTL或杀伤性T细胞)是能够诱导被感染的体细胞或肿瘤细胞死亡的T淋巴细胞。

免疫细胞（例如，T细胞）可以是自体的、非自体的（例如，同种异体的）、或者是体外从工程化的祖细胞或干细胞衍生而来。可从许多来源获得，包括外周血单个核细胞(PBMC)、骨髓、淋巴结组织、脐带血、胸腺组织、来自感染部位的组织、腹水、胸腔积液、脾组织和肿瘤。

在某一实例中，受试者自身的免疫细胞可以被工程化改造以表达本申请的CAR。在某一实例中，来自于受试者之外的其他供体（同种异体）的免疫细胞可以被工程化改造以表达本申请的CAR。在一实例中，免疫细胞是T细胞。在一实例中，T细胞可以是CD4+T细胞和/或CD8+T细胞。在一实例中，免疫细胞是CD3+T细胞。在一实例中，本申请的细胞包括由PBMC细胞经CD3磁珠刺激后收集的细胞群。

在本申请的某些方面，可使用本领域技术人员已知的任意数量的技术如Ficoll™分离

技术从收集自受试者的血液样品中获得T细胞。在一个优选的方面，通过单采血液成分术获得来自个体的循环血液的细胞。单采血液成分术产物通常含有淋巴细胞，包括T细胞、单核细胞、粒细胞、B细胞、其他有核白细胞、红细胞和血小板。在一个方面，可洗涤通过单采血液成分术收集的细胞以去除血浆部分并将细胞置于适当的缓冲液或培养基中以供后续处理步骤。在本申请的背景下还可使用多轮选择。在某些方面，可能需要进行选择程序并在激活和扩充过程中使用“未选择的”细胞。“未选择的”细胞也可以经受其他轮选择。

本申请的细胞能够调节肿瘤微环境。

未纯化的CTL来源可以是本领域已知的任何来源，例如骨髓、胎儿、新生儿或成年或其它造血细胞来源，例如胎儿肝、外周血或脐带血。可以采用各种技术来分离细胞。例如，阴性选择法可以最初去除非CTL。mAb对于鉴定与特定细胞谱系和/或阳性和阴性选择的分化阶段相关的标志物特别有用。

最初可以通过相对粗略的分离除去大部分末端分化的细胞。例如，最初可以使用磁珠分离来去除大量不相关的细胞。在某些实施方式中，在分离细胞之前将去除总造血细胞的至少约80%，通常至少约70%。

分离的程序包括但不限于密度梯度离心；重沉(resetting)；偶联至改变细胞密度的颗粒；用抗体包被的磁珠进行磁分离；亲和色谱；与mAb结合或结合使用的细胞毒性剂，包括但不限于补体和细胞毒素；并用附着在固体基质(例如板、芯片、淘析)上的抗体淘选或任何其它方便的技术。

分离和分析的技术包括但不限于流式细胞术，其可以具有不同的复杂程度，例如多个颜色通道、低角度和钝角光散射检测通道、阻抗通道。

通过使用与死细胞相关的染料，例如碘化丙啶(PI)，可以针对死细胞选择细胞。在某些实施方式中，将细胞收集在包括2%胎牛血清(FCS)或0.2%牛血清白蛋白(BSA)的培养基或任何其它合适的例如无菌等渗培养基中。

在一实例中，表达串联 CAR 的细胞还包括 HLA-I 类分子、TCR 分子、NKG2A 分子或其组合低表达或不表达的免疫细胞。TCR、B2M 或 NKG2A 低表达或不表达分别是指细胞中 TCR、B2M 或 NKG2A 的表达减少至少 1%、至少 5%、至少 10%、至少 20%、至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 95%、至少 99% 或 100%。更具体而言，TCR、B2M 或 NKG2A 低表达或不表达分别是指细胞中 TCR、B2M 或 NKG2A 的含量降低至少 1%、至少 5%、至少 10%、至少 20%、至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 95%、至少 99% 或 100%。可以通过本领域内已知的任何合适

的方法,如ELISA、免疫组织化学、免疫印迹(Western Blotting)或流式细胞术使用 TCR、B2M 或 NKG2A 的特异性抗体测定细胞中蛋白的表达或含量。

HLA-I 类分子低表达或不表达

在异体细胞(例如表达串联 CAR 的免疫细胞)移植中,当异体细胞的 HLA-I 类分子的缺失,可以降低宿主 CD8⁺介导的细胞免疫排斥作用。

在一实例中,本申请提供识别NKG2A多肽和肿瘤抗原的串联CAR、且内源性B2M低表达或不表达的免疫细胞。在一实例中,本申请提供识别NKG2A多肽和病原体抗原的串联CAR、且内源性B2M低表达或不表达的免疫细胞。在一实例中,在有宿主免疫细胞(例如NK细胞)存在时,表达串联CAR的免疫细胞具有更长存活时间和/或扩增能力。在一实例中,与表达仅识别肿瘤抗原的CAR的免疫细胞相比,表达串联CAR的免疫细胞表现出更强的体内外的细胞杀伤作用。

TCR低表达或不表达

在一实例中,本申请提供包括识别NKG2A多肽和肿瘤抗原、且内源性TCR低表达或不表达的免疫细胞;任选地,所述免疫细胞内源性B2M低表达或不表达。

在一实例中,本申请提供识别NKG2A多肽和肿瘤抗原的串联CAR、且内源性TCR低表达或不表达的免疫细胞;任选地,所述免疫细胞内源性B2M低表达或不表达。在一实例中,本申请提供识别NKG2A多肽和BCMA多肽的串联CAR、且内源性TCR/B2M低表达或不表达的免疫细胞。在一实例中,在有宿主免疫细胞(例如NK细胞)存在时,上述表达串联CAR的免疫细胞具有更长存活时间和/或扩增能力。在一实例中,与表达仅识别肿瘤抗原的CAR的免疫细胞相比,上述表达串联CAR的免疫细胞表现出更强的体内外的细胞杀伤作用。

NKG2A低表达或不表达

在一实例中,本申请提供识别NKG2A多肽和肿瘤抗原的串联CAR、且内源性NKG2A低表达或不表达的免疫细胞;任选地,所述免疫细胞内源性B2M低表达或不表达、内源性TCR低表达或不表达、内源性B2M/TCR低表达或不表达。在一实例中,本申请提供识别NKG2A多肽和BCMA多肽的串联CAR、且内源性TCR/B2M/NKG2A低表达或不表达的免疫细胞。在一实例中,在有宿主免疫细胞(例如NK细胞)存在时,上述表达串联CAR的免疫细胞具有更长存活时间和/或扩增能力。在一实例中,与表达仅识别肿瘤抗原的CAR的免疫细胞相比,上述表达串联CAR的免疫细胞表现出更强的体内外的细胞杀伤作用。

基因敲除

采用基因敲除技术和/或基因沉默技术来制备内源性 TCR、B2M 或 NKG2A 低表达或不表达的免疫细胞。在一实例中,采用基因敲除技术和/或基因沉默技术来制备内源性

NKG2A 低表达或不表达的免疫细胞。在一实例中,采用基因敲除技术和/或基因沉默技术来制备内源性 TCR/B2M 低表达或不表达的免疫细胞。在一实例中,采用基因敲除技术和/或基因沉默技术来制备内源性 TCR/B2M 低表达或不表达的免疫细胞。在一实例中,采用基因敲除技术和/或基因沉默技术来制备内源性 TCR/B2M/NKG2A 低表达或不表达的免疫细胞。

基因敲除技术包括 Argonaute、CRISPR/Cas9 技术、ZFN 技术、TALE 技术、TALE-CRISPR/Cas9 技术、Base Editor 技术、引导编辑技术和/或归巢核酸内切酶技术。基因沉默技术包括但不限于:反义 RNA、RNA 干扰、微小 RNA 介导的翻译抑制等。

成簇的规律间隔的短回文重复序列(CRISPR)系统用于基因组编辑。该系统包括 Cas(一种能够使用 crRNA 作为其向导来修饰 DNA 的蛋白质), CRISPR RNA(crRNA, 包含 Cas 用来引导其到达宿主 DNA 正确片段的 RNA, 以及与 tracrRNA 结合的区域(通常以发夹环形式), 与 Cas 形成活性复合物), 反式激活 crRNA(tracrRNA, 与 crRNA 结合, 与 Cas 形成活性复合物), 以及 DNA 修复模板的可选片段(可指导细胞修复过程允许插入特定的 DNA 序列的 DNA)。

在一实例中, CRISPR/Cas9 通常采用质粒、或电转方式传递核酸片段到靶细胞。在一实例中, CRISPR/Cas9 通常采用质粒、或电转方式传递包含核酸片段和重组蛋白的复合物到靶细胞, 例如 gRNA 和 Cas9 的核糖核蛋白复合物(RNP)。crRNA 需要针对每种应用进行设计, 因为这是 Cas9 用来识别并直接结合细胞中靶 DNA 的序列。crRNA 和 tracrRNA 可以组合在一起以形成指导 RNA(gRNA)。本申请 gRNA 序列可以用 gRNA 靶向结构域序列来表示。在一实例中, gRNA 序列为靶向 DNA 序列。在一实例中, gRNA 序列为与 gRNA 靶向 DNA 序列完全或部分互补的核酸序列。在一实例中, gRNA 分子包括 gRNA 序列与 crRNA/TracrRNA 形成的完整 Cas9 引导序列的分子。

在一实例中, 本文提供的方法包括向细胞递送一种或多种 gRNA 构建体和一种或多种 Cas9 多肽或编码 Cas9 多肽的核酸序列。在一实例中, 通过载体(例如 AAV、腺病毒、慢病毒)、和/或粒子和/或纳米粒子、和/或电转来递送一种或多种 gRNA 构建体、一种或多种 Cas9 多肽或编码 Cas9 多肽的核酸序列)。在一实例中, 包括 gRNA 靶向结构域的 crRNA 和 tracrRNA 单纯施用, 也可以施用一条完整 RNA。CRISPR/Cas9 转基因可以通过载体(例如 AAV、腺病毒、慢病毒)、和/或粒子和/或纳米粒子、和/或电转来递送。在本申请中, 采用 CRISPR/Cas9 技术敲除免疫细胞的 TCR/B2M 基因后, 均进行了分选得到 TCR/B2M 低表达或不表达的免疫细胞。

本申请还提供了编码本文所述的一种或多种外源受体(例如 CAR)的核酸分子, 和靶向内源性 TCR、B2M 或 NKG2A 的核酸抑制分子或 gRNA 的核酸分子。

示例性的,靶向 NKG2A 的 gRNA 包括如 SEQ ID NO:38 所示的序列;靶向 TRAC 的 gRNA 包括 SEQ ID NO: 36 所示的序列;靶向 B2M 的 gRNA 包括如 SEQ ID NO: 37 所示的序列。

在一实例中,将编码识别靶抗原(示例性,NKG2A和 BCMA肿瘤抗原)的串联CAR引入T细胞中以产生本申请提供的免疫细胞,任选地,将靶向内源性TCR、B2M和/或 NKG2A的核酸抑制分子或gRNA的核酸分子引入T细胞。在一个实例中,体外转录的串联CAR的核酸分子、靶向内源性TCR、B2M或NKG2A的核酸抑制分子或gRNA可作为瞬时转染的形式引入细胞中。示例性人工DNA序列是包括连接在一起以形成编码融合蛋白的开放阅读框的基因部分的序列。连接在一起的DNA部分可来自单个生物体或来自多个生物体。

核酸分子、载体及其用途

在本申请中,所述核酸分子可以编码本申请所述的嵌合多肽。例如,所述核酸分子可以为任何长度的分离形式的核苷酸,脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸,或从天然环境分离的或人工合成的类似物,但可以编码本申请所述的嵌合多肽。例如,所述的核酸分子可以包含SEQ ID NO:21、24和27中任一项所示的核酸序列。

对免疫细胞(例如,T细胞或NKT细胞)的基因修饰可以通过用所述核酸分子或包含所述核酸分子的载体转导基本上均质的细胞群来完成。在一实例中,逆转录病毒载体(γ -逆转录病毒或慢病毒)用于将核酸分子引入细胞。例如,可以将编码串联CAR的多核苷酸克隆到逆转录病毒载体。也可以使用非病毒载体。转导可以使用任何合适的病毒载体或非病毒递送系统。可以在单个多顺反子表达盒、单个载体的多个表达盒或多个载体中用辅助分子(例如细胞因子)构建串联CAR。产生多顺反子表达盒的元件的实例包括但不限于各种病毒和非病毒内部核糖体进入位点(IRES,例如,FGF-1IRES、FGF-2IRES、VEGF IRES、IGF-II IRES、NF- κ B IRES、RUNX1 IRES、p53IRES、甲型肝炎IRES、丙型肝炎IRES、痘病毒IRES、无杆状病毒IRES、小核糖核酸病毒IRES、脊髓灰质炎病毒IRES和脑心肌炎病毒IRES)和可切割的接头(例如2A肽,例如P2A、T2A、E2A和F2A肽)。

可以使用的其它病毒载体包括,例如,腺病毒、慢病毒和与腺相关的病毒载体、牛痘病毒、牛乳头瘤病毒或疱疹病毒,例如爱泼斯坦-巴尔病毒。

非病毒方法也可以用于免疫细胞的修饰。例如,可以通过在脂质转染,脱唾液酸血清类粘蛋白-聚赖氨酸偶联,或手术条件下的微注射将核酸分子引入免疫细胞中。其它非病毒的基因转移方法包括使用脂质体、磷酸钙、DEAE葡聚糖、电穿孔和原生质体融合的体外转染。也可以先将核酸分子转移到可离体培养的细胞类型(例如,自体或同种异体原代细胞或其后代)中,再将经所述核酸分子修饰后的细胞(或其后代)注射到受试者目标组织中

或全身注射。

药物组合物

本申请还提供了药物组合物，其包含本申请所述的CAR、本申请所述的核酸分子、本申请所述的载体和/或本申请所述的细胞，以及药学上可接受的载体。

5 本申请的药物组合物可以方便地以无菌液体制剂的形式提供，例如等渗水溶液剂、悬浮液、乳剂、分散剂或粘性组合物，其可以缓冲至选定的pH。液体制剂通常比凝胶、其它粘性组合物和固体组合物更容易制备。另外，液体组合物在某种程度上更方便施用，尤其是通过注射。另一方面，可以在适当的粘度范围内配制粘性组合物以提供与特定组织的更长的接触时间。液体或粘性组合物可以包括载体，所述载体可以是溶剂或分散介质，其
10 包括例如水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、多元醇(例如甘油、丙二醇、液体聚乙二醇等)及其合适的混合物。

可以通过将本申请的免疫细胞掺入所需量的适当溶剂中，并根据需要掺入不同量的其它成分来制备无菌注射溶液。这样的组合物可以与合适的载体、稀释剂或赋形剂例如无菌水、生理盐水、葡萄糖、右旋糖等混合。组合物也可以冻干。所述组合物可包括辅助物质，
15 例如润湿剂、分散剂或乳化剂(例如，甲基纤维素)、pH缓冲剂、胶凝剂或增粘剂、防腐剂、矫味剂、颜料等，这取决于给药途径和所需制剂。

可以添加增强组合物的稳定性和无菌性的各种添加剂，包括抗微生物防腐剂、抗氧化剂、螯合剂和缓冲剂。可以通过各种抗细菌和抗真菌剂，例如对羟基苯甲酸酯、三氯叔丁醇、苯酚、山梨酸等来确保防止微生物的作用。可通过使用延迟吸收的试剂例如单硬脂酸
20 铝和明胶来延长可注射药物形式的吸收。然而，所使用的任何媒介物、稀释剂或添加剂将必须与遗传修饰的免疫细胞或其祖细胞相容。

该组合物可以是等渗的，即它们可以具有与血液和/或泪液相同的渗透压。组合物的所需等渗性可以使用氯化钠或其它药学上可接受的试剂例如葡萄糖、硼酸、酒石酸钠、丙二醇或其它无机或有机溶质来实现。氯化钠可以特别适用于含有钠离子的缓冲剂。

25 如果需要，可使用药学上可接受的增稠剂将组合物的粘度保持在选定水平。例如，甲基纤维素容易且经济地获得并且易于使用。其它合适的增稠剂包括，例如，黄原胶、羧甲基纤维素、羟丙基纤维素、卡波姆等。增稠剂的浓度可以取决于选择的试剂。重要的是要使用能够达到所选粘度的用量。显然，合适载体和其它添加剂的选择将取决于确切的给药途径和特定剂型的性质，例如液体剂型(例如，是否将组合物配制成溶液剂、悬浮液、凝
30 胶剂或其它液体形式，例如定时释放形式或液体填充形式)。

对于所治疗的受试者，要施用的组合物中的细胞数量将有所不同。可以更少的数量施用更有效的细胞。可以根据每个受试者的个体因素，包括其大小、年龄、性别、体重和受

试者的状况,来确定有效剂量的精确确定。本领域技术人员从本申请和本领域知识中可以容易地确定剂量。

本领域技术人员可以容易地确定组合物中和在方法中施用的细胞和任选的添加剂、媒介物和/或载体的量。通常,任何添加剂(除一种或多种活性细胞和/或一种或多种试剂外)在磷酸盐缓冲盐水中的存在量为0.001%至50%(重量)溶液,并且活性成分按微克至毫克的顺序存在,例如约0.0001wt%至约5wt%、约0.0001wt%至约1wt%、约0.0001wt%至约0.05wt%或约0.001wt%至约20wt%、约0.01wt%至约10wt%或约0.05wt%至约5wt%。对于要施用于动物或人的任何组合物,可以确定以下结果:毒性,例如通过在合适的动物模型例如啮齿类动物如小鼠中确定致死剂量(LD)和LD50;组合物的剂量,其中的组分浓度和施用组合物的时间,引起合适的反应。

可以将包括本申请的药物组合物系统地或直接提供给受试者,以诱导和/或增强对抗原的免疫应答和/或治疗和/或预防肿瘤、病原体感染或感染性疾病。在一实例中,将本发明的组合物直接注射到目的器官(例如,受肿瘤影响的器官)中。或者,例如通过向循环系统(例如,静脉、肿瘤脉管系统)给药,将本发明的组合物间接地提供给目的器官。可以在施用组合物之前、同时或之后提供扩增和分化剂,以增加体外或体内T细胞、NKT细胞或CTL细胞的产生。

本申请的细胞可以包括纯化的细胞群。本领域技术人员可以使用各种众所周知的方法,例如荧光激活细胞分选(FACS),容易地确定群体中本发明的免疫细胞的百分比。在包括本申请的免疫细胞的群体中,纯度的合适范围是约50%至约55%、约5%至约60%、以及约65%至约70%。在某些实施方式中,纯度为约70%至约75%、约75%至约80%或约80%至约85%。在某些实施方式中,纯度为约85%至约90%,约90%至约95%以及约95%至约100%。剂量可以由本领域技术人员容易地调节(例如,纯度降低可能需要增加剂量)。可以通过注射、导管等引入细胞。

本申请的组合物可以是包括本申请的免疫细胞或其祖细胞和药学上可接受的载体的药物组合物。给药可以是自体的或异体的。例如,可以从一个受试者获得免疫细胞或祖细胞,并将其施用于相同受试者或不同的相容受试者。外周血来源的免疫细胞或其后代(例如,体内、离体或体外来源)可通过局部注射施用,包括导管给药、全身注射、局部注射、静脉内注射或肠胃外给药。当施用本申请的组合物时,可以将其配制成单位剂量可注射形式(溶液剂、悬浮剂、乳剂等)。

8. 用途或方法

本申请提供了本申请所述的CAR、本申请所述的核酸分子、权本申请所述的载体、本申请所述的细胞、本申请所述的药物组合物在制备药物中的用途,所述药物用于预防、缓解

和/或治疗肿瘤。

本申请提供了预防、缓解和/或治疗肿瘤的方法，其包括向有需要的受试者施用本申请所述的细胞、本申请所述的药物组合物。

本申请提供了用于在需要本申请的细胞或药物组合物的受试者中诱导和/或增加免疫应答的方法。

本申请的细胞或药物组合物可以用于治疗和/或预防受试者的肿瘤。本申请细胞或药物组合物可以用于延长患有肿瘤的受试者的存活。本申请的细胞或药物组合物也可以用于治疗和/或预防诸如免疫功能低下的人受试者的病原体感染或其它感染性疾病。这种方法包括施用有效量的本申请的细胞或药物组合物以达到期望的效果，无论是减轻现有病症还是预防复发。为了治疗，施用的量是有效产生所需效果的量。可以一次或多次给药来提供有效量。可以大剂量或通过连续灌注来提供有效量。

在一实例中，包括本申请的细胞或药物组合物可以用于治疗具有表面抗原表达水平低的肿瘤细胞的受试者，例如由于疾病的复发，其中受试者接受过导致残留肿瘤细胞的治疗。在某些实施方式中，肿瘤细胞在肿瘤细胞表面上具有低密度的靶分子。

在一实例中，包括本申请的细胞或药物组合物可用于治疗患有疾病复发的受试者，其中该受试者接受过包括单独施用CAR的免疫细胞(例如，T细胞)，该CAR包括细胞内信号结构域，其包括含有共刺激性信号结构域(例如4-1BBz CAR)。在一实例中，肿瘤细胞在肿瘤细胞表面上具有低密度的肿瘤特异性抗原。在一实例中，该疾病是BCMA阳性肿瘤。在一实例中，肿瘤细胞在肿瘤细胞上具有低密度的BCMA。这种方法包括施用有效量的本申请的细胞或药物组合物以达到期望的效果，缓解现有病症或预防复发。

“有效量”(或“治疗有效量”)是足以在治疗后产生有益或期望的临床结果的量。可以以一剂或多剂剂量将有效量施用于受试者。就治疗而言，有效量是足以缓解、改善、稳定、逆转或减慢疾病进展或以其它方式减少疾病病理后果的量。有效量通常由医师根据具体情况确定，并且在本领域技术人员的能力范围内。当确定合适的剂量以达到有效量时，通常要考虑几个因素。这些因素包括受试者的年龄、性别和体重、所治疗的疾病、疾病的严重程度以及所施用的本申请的细胞或药物组合物的形式和有效浓度。

对于使用抗原特异性T细胞的过继免疫疗法，通常输注约 10^6 - 10^{10} 范围内的细胞剂量。在将本申请的免疫细胞施用于宿主并随后分化后，诱导特异性针对特定抗原的T细胞。本申请的细胞或药物组合物可以通过本领域已知的任何方法施用，包括但不限于静脉内、皮下、结内、肿瘤内、鞘内、胸膜内、腹膜内和直接向胸腺施用。

肿瘤的非限制性实例包括血液瘤(例如白血病、淋巴瘤和骨髓瘤)、实体瘤；实体瘤包括：卵巢癌、乳腺癌、膀胱癌、脑癌、结肠癌、肠癌、肝癌、肺癌、胰腺癌、前列腺癌、

皮肤癌、胃癌、胶质母细胞瘤、喉癌、黑素瘤、神经母细胞瘤、腺癌、神经胶质瘤、软组织肉瘤和各种癌(包括前列腺癌和小细胞肺癌)。肿瘤的非限制性实例包括但不限于星形细胞瘤、纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、少突胶质细胞瘤、室管膜瘤、髓母细胞瘤、原始神经外胚层肿瘤(PNET)、软骨肉瘤、成骨肉瘤、胰腺导管腺癌、小细胞和大细胞肺腺癌、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、鳞状细胞癌、支气管肺泡癌、上皮腺癌及其肝转移灶、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、肝癌、胆管癌、滑膜瘤、间皮瘤、尤文氏瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、基底细胞癌、汗腺癌、乳头状癌、皮脂腺癌、状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、胆总管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎癌、Wilms'肿瘤、睾丸肿瘤、髓母细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、血管母细胞瘤、听神经瘤、少突胶质细胞瘤、脑膜瘤、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤、白血病、多发性骨髓瘤、Waldenstrom's巨球蛋白血症和重链疾病、诸如导管和小叶腺癌的乳腺肿瘤、子宫颈的鳞状和腺癌、子宫和卵巢上皮癌、前列腺腺癌、膀胱移行鳞状细胞癌、B和T细胞淋巴瘤(结节性和弥漫性)浆细胞瘤、急慢性白血病、恶性黑色素瘤、软组织肉瘤和平滑肌肉瘤。在某些实施方式中,肿瘤选自血液癌症(例如白血病、淋巴瘤和骨髓瘤)、卵巢癌、前列腺癌、乳腺癌、膀胱癌、脑癌、结肠癌、肠癌、肝癌、肺癌、胰腺癌、前列腺癌、皮肤癌、胃癌、胶质母细胞瘤和喉癌。在一实例中,本申请的细胞或药物组合物可以用于治疗和/或预防常规治疗措施不适合或复发难治性实体瘤,例如肝癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、肾癌、甲状腺癌、胃癌、结直肠癌。在一实例中,肿瘤是血液肿瘤。

本申请的治疗目标可以包括缓解或逆转疾病进展和/或减轻副作用、或治疗目标包括降低或延迟复发风险。

本申请提供用于在例如免疫受损的受试者中治疗和/或预防病原体感染(例如病毒感染、细菌感染、真菌感染、寄生虫感染或原生动物感染)的方法。该方法可以包括向患有病原体感染的受试者施用有效量的本申请的细胞或药物组合物。易于治疗的示例性病毒感染包括但不限于巨细胞病毒、爱泼斯坦-巴尔病毒、人免疫缺陷病毒和流感病毒感染。

术语“增强”指允许受试者或肿瘤细胞改善其响应本文公开的治疗的能力。例如,增强的应答可以包括应答性中5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或98%或更多的增加。如本文使用的,“增强”还可以指增加响应治疗例如免疫细胞疗法的受试者数目。例如,增强的应答可以指响应治疗的受试者总百分比,其中百分比是5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或98%更多。

在一实例中,表达本申请提供的CAR的细胞在小鼠皮下肿瘤模型中具有更长存活时

间和/或扩增能力、特异性的向肿瘤组织浸润、以及良好的抗NK细胞攻击和抑制肿瘤生长的效果，显示出治疗实体瘤的良好功能。

在一实例中，表达本申请提供的CAR的细胞在小鼠原位血液肿瘤模型中具有更长存活时间和/或扩增能力、以及良好的抗NK细胞攻击和抑制肿瘤生长的效果，显示出治疗血液瘤的良好功能。

在一实例中，表达本申请提供的CAR的细胞靶向BCMA表达阳性的肿瘤。在一实例中，表达本申请提供的CAR的细胞靶向多发性骨髓瘤。

9. 试剂盒

本申请提供一种试剂盒，其包含本申请提供的CAR、本申请提供的核酸分子、本申请提供的载体、本申请提供的细胞、和/或本申请提供的药物组合物。本申请提供的试剂盒用于在受试者中诱导和/或增强免疫应答和/或治疗和/或预防肿瘤或病原体感染。在一实例中，试剂盒包括有效量的本申请的细胞和药物组合物。在一实例中，试剂盒包括无菌容器；这样的容器可以是盒子、安瓿、瓶、小瓶、管、袋、小袋、泡罩包装或本领域已知的其它合适的容器形式。这样的容器可以由塑料、玻璃、层压纸、金属箔或其它适合于容纳药物的材料制成。在一实例中，试剂盒包括编码本申请的CAR的核酸分子，其以可表达的形式识别目的抗原，可以任选地包括在一种或多种载体中。

在一实例中，还包括说明书。说明书通常包括有关细胞或药物组合物用于治疗和/或预防肿瘤或病原体感染的信息。在一实例中，说明书包括以下至少一项：治疗剂的描述；用于治疗或预防肿瘤、病原体感染或免疫疾病或其症状的剂量表和给药；注意事项；警告；适应症；不适应症；用药信息；不良反应；动物药理学；临床研究；和/或参考。这些说明书可以直接打印在容器上，或者作为粘贴在容器上的标签，或者作为单独的纸页、小册子、卡片或文件夹提供在容器内或与容器一起。

本申请包括，例如中国专利申请公开号CN107058354A、CN107460201A、CN105194661A、CN105315375A、CN105713881A、CN106146666A、CN106519037A、CN106554414A、CN105331585A、CN106397593A、CN106467573A、CN104140974A、CN108884459A、CN107893052A、CN108866003A、CN108853144A、CN109385403A、CN109385400A、CN109468279A、CN109503715A、CN109908176A、CN109880803A、CN110055275A、CN110123837A、CN110438082A、CN110468105A以及例如国际专利申请公开号WO2017186121A1、WO2018006882A1、WO2015172339A8、WO2018/018958A1、WO2014180306A1、WO2015197016A1、WO2016008405A1、WO2016086813A1、WO2016150400A1、WO2017032293A1、WO2017080377A1、WO2017186121A1、WO2018045811A1、WO2018108106A1、WO 2018/219299、WO2018/210279、

WO2019/024933、WO2019/114751、WO2019/114762、WO2019/141270、WO2019/149279、WO2019/170147A1、WO 2019/210863、WO2019/219029中公开的那些CAR-T细胞及其制备方法、抗体。

下面结合具体实施例，进一步阐述本申请。应理解，这些实施例仅用于说明本申请而不适用于限制本申请的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件如J.萨姆布鲁克等编著，分子克隆实验指南，第三版，科学出版社，2002中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。本说明书中提到的所有出版物、专利和专利申请均通过引用并入本文，其程度如同特别地且单独地指出每一个单独的出版物、专利或专利申请均通过引用而并入本文。

本申请实施例中所用生物材料如表1所示。

表1

名称	来源
T细胞	分离自健康供体原代PBMC
NK细胞	分离自健康供体原代PBMC
单核细胞	分离自健康供体原代PBMC
细胞系RPMI-8226	购自ATCC
MM.1S肿瘤细胞	购自ATCC
NPG免疫缺陷的小鼠	购自北京维通达生物技术有限公司

实施例1 靶向BCMA和NKG2A的串联CAR以及CAR-T细胞的制备。

采用本领域常规分子生物学方法，以BCMA和NKG2A为靶点，使用载体PRRLsin，分别构建表达CAR3多肽(SEQ ID NO: 22)、CAR4多肽(SEQ ID NO: 25)、CAR5多肽(SEQ ID NO: 28)、BCMA-CAR(SEQ ID NO: 17)多肽的CAR-T3细胞、CAR-T4细胞、CAR-T5细胞、BCMA-CAR-T细胞。其中抗原结合域的串联片段如表2所示，其氨基酸序列分别如SEQ ID NO: 20、23和26中任一项所示。

表2.

片段	组成
串联片段3	BCMAVL-G4S-NKG2AVH-(G4S)3-NKG2AVL-G4S-BCMAVH
串联片段4	NKG2AVL-G4S-BCMAVH-(G4S)3-BCMAVL-G4S-NKG2AVH
串联片段5	NKG2AVL-G4S-BCMAVH-linker1-BCMAVL-G4S-NKG2AVH

实施例2 串联CAR-T体外杀伤NK细胞

取 5×10^4 个UTD细胞（即没有进行病毒载体转染的T细胞组），以及由实施例1制备的BCMA-CAR-T、CAR-T3、CAR-T4、CAR-T5细胞，体外与活化扩增的NK细胞

(aNK)分别按效靶比E: T=1: 3、1: 1、3: 1进行共孵育18hr, 按试剂盒说明书 (CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay, promega公司), 取上清进行乳酸脱氢酶 (LDH) 含量测定, 并计算各组中aNK的裂解效率。如图1所示, 各组串联CAR-T细胞均能杀伤NK细胞。

5 实施例3 串联CAR-T体外杀伤肿瘤细胞

将效应细胞 (UTD、BCMA-CAR-T、CAR-T3、CAR-T4、CAR-T5) 与靶细胞 (多发性骨髓瘤细胞系RPMI-8226), 分别按效靶比1: 3、1: 1、3: 1共孵育18小时, 检测体外肿瘤细胞杀伤。按试剂盒说明书 (CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay, promega公司), 取上清进行乳酸脱氢酶 (LDH) 含量测定, 并
10 计算各组靶细胞裂解效率。结果如图2所示, 各组串联CAR-T细胞均能杀伤肿瘤细胞。

实施例4 串联CAR-T体内抗肿瘤作用

皮下接种 5×10^6 个RPMI-8226细胞于NPG免疫缺陷小鼠 (购买自北京维通达生物技术有限公司) 中 (接种日记为D0), 接种11天后瘤平均体积为约 190 mm^3 , 分为5组: UTD细胞组、BCMA-CAR-T细胞组、CAR-T3细胞组、CAR-T4细胞组、CAR-T5
15 细胞组, 每组5只。尾静脉分别注射 1×10^6 个上述UTD、BCMA-CAR-T、CAR-T3、CAR-T4、CAR-T5细胞, 注射后, 每周2次测量体重 (包括分组给药及安乐死当天), 并用游标卡尺测量并记录肿瘤长径、短径, 计算肿瘤体积, 根据肿瘤体积绘制肿瘤生长曲线, 并比较各组间肿瘤生长曲线的差异 (肿瘤体积: $V = 1/2 \times \text{长径} \times \text{短径}^2$)。如图3所示, 各组串联CAR-T细胞均能抑制体内肿瘤生长。

20 实施例5 串联CAR-T细胞体外细胞因子分泌

取UTD、BCMA-CAR-T、CAR-T3、CAR-T5细胞, 以RPMI-8226细胞作为靶细胞, 按T细胞: 靶细胞=1: 1或按T细胞: 靶细胞: 自体来源的单核细胞=1: 1: 1进行共孵育, 24hr后取上清进行细胞因子微球检测技术 (CBA) 监测 (如图4所示)。

实施例6 串联UCAR-T细胞制备

按照试剂说明书 (GeneArt™ Precision gRNA Synthesis Kit, Thermo Fisher) 体外合成靶向TCR、B2M、NKG2A的gRNA序列 (SEQ ID NO: 36、37、38), 采用常规CRISPR/Cas9技术, 即将Cas 9酶和gRNA按1: 4比例进行混合形成RNP, 室温孵育, 将各组细胞与RNP进行混合, 利用maxcyte电转仪将RNP复合物导入到CAR-T细胞, 敲除UTD、BCMA-CAR-T、CAR-T3、CAR-T4、CAR-T5细胞内源性TRAC/B2M分别得
30 到UTD-DKO、BCMA-UCAR-T、UCAR-T3、UCAR-T4、UCAR-T5细胞, 敲除CAR-T3细胞内源性TRAC/B2M/NKG2A得到UCAR-T3-NKG2A KO细胞。未转染病毒的且内源性TCR/B2M敲除的T细胞命名为UTD-DKO。

实施例7：串联UCAR-T细胞体外对NK细胞的抵抗功能

取 5×10^4 个由实施例6制备的UTD-DKO、BCMA UCAR-T、UCAR-T3、UCAR-T4、UCAR-T5细胞，体外与活化扩增的NK细胞(aNK)分别按1: 1、2: 1的比例进行共孵育，在0hr, 4hr, 24hr和48hr进行流式染色，检测共培养体系中UCAR-T细胞和NK细胞的比例。如图5所示，串联UCAR-T均能抵抗NK细胞的杀伤。

实施例8. 串联UCAR-T细胞体外细胞因子分泌

按照实施例5所述方法检测串联UCAR-T细胞体外细胞因子分泌，结果如图6所示。

实施例9. 串联UCAR-T细胞的体内抗肿瘤功能

皮下接种 5×10^6 个RPMI-8226细胞于NPG小鼠，接种12-14天后瘤平均体积为约 350 mm^3 ，分4组：UTD-DKO细胞组，BCMA UCAR-T细胞组、UCAR-T3细胞组、UCAR-T5细胞组，每组5只。尾静脉分别注射 1.5×10^6 个UTD-DKO、BCMA UCAR-T、UCAR-T3或UCAR-T5细胞。参照实施例4所记载的方法绘制肿瘤生长曲线。结果如图7所示，各组串联UCAR-T细胞均能抑制体内肿瘤生长。

实施例10： 串联UCAR-T细胞在NK细胞存在下体外抗肿瘤活性以及抗NK活性

取 2×10^5 个经CFSE染色和标记后的RPMI-8226细胞，按肿瘤细胞：T细胞：aNK细胞=1: 2: 1的比例，接种到96孔板，培养5天，进行细胞计数和流式染色（图8）。取 2×10^5 个经CFSE染色和标记后的多发性骨髓瘤细胞系MM.1S-GFP，按肿瘤细胞：T细胞：aNK细胞=2: 2: 0、2: 2: 1、2: 2: 2的比例，接种到96孔板培养5天，进行细胞计数和流式染色（图8）。如图8所示，串联UCAR-T细胞具有更长存活时间和/或扩增能力，既能靶向杀伤肿瘤细胞、又能杀伤NK细胞。

实施例11. 串联UCAR-T细胞在NK细胞存在下体内抗原位肿瘤活性

尾静脉接种 2×10^6 个多发性骨髓瘤细胞系MM.1S-luciferase细胞（MM.1S-luc）于NPG小鼠中，接种9天后荧光成像检测肿瘤负荷在约 $2-5 \times 10^4$ Radiance (p/s/cm²/sr)，分7组（UTD-DKO, BCMA UCAR-T、BCMA UCAR-T +NK-1、BCMA UCAR-T +NK-2、UCAR-T3-NKG2A KO 和 UCAR-T3-NKG2A KO+NK-1 、 UCAR-T3-NKG2A KO+NK-2），每组5只。在D10,尾静脉分别注射 1×10^6 个NK细胞（如上标记为NK-1）或者 2×10^6 个NK细胞（如上标记为NK-2），后续每隔两天注射1次NK细胞，一共注射5次，用于模拟NK细胞的存在；第1次NK细胞注射完后，再尾静脉注射 1×10^6 个UCAR-T细胞，注射后，每周1次进行荧光成像，监测肿瘤负荷，每周2次测量体重（包括分组给药及安乐死当天），根据肿瘤负荷绘制肿瘤生长曲线，比较各组间肿瘤生长曲线的差异，并记录小鼠的生存期。结果如图9A-B所示，NK细胞明显减弱了BCMA UCAR-T细胞的抗肿瘤活性，降低了BCMA UCAR-T细胞组的小鼠生存期；而低剂量

以及高剂量的NK细胞存在下，UCAR-T3的抗肿瘤活性和小鼠的生存期均未受到明显改变。表明串联UCAR-T细胞在体内可以抵抗NK细胞杀伤，并抑制肿瘤生长。

实施例12. 串联UCAR-T细胞的特异性向肿瘤组织浸润

取UCAR-T细胞治疗RPMI-8226皮下荷瘤模型小鼠（如实施例9中记载），包括
5 UTD-DKO，BCMA UCAR-T，UCAR-T3-NKG2A KO三组小鼠的肿瘤组织，以及心
肝脾肺肾正常组织。经多聚甲醛固定后进行切片和抗CD3e免疫组化染色。如图10所
示，在UCAR组中，尤其是串联UCAR-T组的肿瘤组织中T细胞浸润多于BCMA
UCAR-T组；正常组织内（包括心肝脾肺肾组织），均未检测到明显的T细胞浸润。
这表明串联UCAR-T细胞不仅具有更长存活时间、扩增能力，并且特异性向肿瘤组织
10 浸润，安全性好。

实施例13. 串联UCAR-T细胞不引起移植物抗宿主反应

分别取 1×10^7 个UTD、BCMA UCAR-T、UCAR-T3-NKG2A KO细胞注射到NPG
小鼠中，PBS组作为阴性对照，每周2次测量体重，观察小鼠的毛发及基础情况。

如图11所示，UTD组小鼠从D25开始发生明显的体重下降，从D30开始出现明显
15 的脱毛、活动性降低，表现出明显的GVHD症状。串联UCAR-T组与PBS类似，小鼠
正常生长，且体重逐渐增加。这表明UCAR-T3细胞不会引起移植物抗宿主（GVHD）
反应。

本申请所述实施例包括将该实施例作为任何单一实施例或与任何其他实施例或其部
分相结合。此外应理解，在阅读了本申请的上述讲授内容之后，本领域技术人员可以对本
20 申请作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

序列信息

SEQ ID NO	名称	序列
1	抗 NKG2A 抗体 -VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQ GLEWMGRIDPYDSETHYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRS DDTAVYYCARGGYDFDVGTLYWFFDVWGQGTTVTVSS
2	抗 NKG2A 抗体 -VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASENIYSYLAWYQQKPGKAPKL LIYNAKTLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHHYG TPRTFGGGTKVEIK
3	抗 NKG2A 抗体 -HCDR1	SYWMN
4	抗 NKG2A 抗体 -HCDR2	RIDPYDSETHYAQKLQG
5	抗 NKG2A 抗体 -HCDR3	GGYDFDVGTLYWFFDV
6	抗 NKG2A 抗体 -LCDR1	RASENIYSYLA

7	抗 NKG2A 抗体 -LCDR2	NAKTLAE
8	抗 NKG2A 抗体 -LCDR3	QHHYGTPRT
9	抗 BCMA 抗体 -HCDR1	GNAMS
10	抗 BCMA 抗体 -HCDR2	AISGNNGGSTFYADSVKG
11	抗 BCMA 抗体 -HCDR3	VRPFWGTFDY
12	抗 BCMA 抗体 -LCDR1	RASQSVSSSYLA
13	抗 BCMA 抗体 -LCDR2	GASSRAT
14	抗 BCMA 抗体 -LCDR3	QQYFNPPEYT
15	抗 BCMA 抗体 -VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGGNAMSWVRQAPGKGL EWVSAISGNNGGSTFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAKVRPFWGTFDYWGQGTLVTVSS
16	抗 BCMA 抗体 -VL	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRL LIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYFNP PEYTFGQGTKVEIKR
17	BCMA-CAR-1	evqllesggglvqp ggsrlrlscaasgftfggnamswvrqapgglewvsaisnggstfyadsvkgrft isrdnskntlylqmnsraedtavyyca kvrpfwgtdywgqgtlv tvssgggsgggsgggsgggseiv ltqspgtls l pgeratls crasqsvssylawyqqkpgqaprliygassratgipdrfsgsgsgtdftltisr lepedfavyyccqyfnppeytf ggtkveikrttpprptpaptiasqplsrpeacrpaa ggvahtrg ldfacdiy iwaplagtcgvllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvqtqeedgcscr fpeeeeggcel rvkfsrsadapayqqgnqlynelnlgrreedyldkrrgrdpemggkpprrknpqeglynelqkdk maeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr
18	linker1 氨基酸序 列	gstsgskpgsggstkg
19	BBZ 氨基酸序列	IYIWAPLAGTCGVL LLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQ EEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNL GRREEYDVLDRRGRDP EMGGKPQRRKNPQEGLYNELQKDKMAE AYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
20	串联片段 3 氨基 酸	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRL LIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYFNP PEYTFGQGTKVEIKRGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKAS GYTFTSYWMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYAQKLQGRV TMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGGYDFDVGTLYWFF DVWGQGT TVTVSSGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASENIYSYLAWYQQKPGKAPKLLIYNAKTLAEGVPSRFS GSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHHYGTPRTFGGGTKVEIKG GGSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGGNAMSWVRQAPG KGLEWVSAISGNNGGSTFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAKVRPFWGTFDYWGQGTLVTVSS
21	串联片段 3 核苷 酸	gaaatcgtgttaacgcagtcctcaggcaccctgtcttctcctcaggggaaagagccacctctcttcagg gccagtcagagtgtagcagcagctacttagcctggtaccagcagaaacctggccaggtccaggctcc tcactatgtagcagcagcaggccactggcagcagacaggtcagtgagtgatcgggacag acttactctcaccatcagcagactggagcctgaagatttgcagtgattactgtcagcagctactcaacca ccagaatacacgttcggccaggggaccaaagtggaaatcaaacgtgtgaggcggttcacaggtgca gctggtgagagcgccgaggtgaagaagcccgccgagcgtgaagtgagctgcaaggccag cggtacacctcaccagctactgagtaactgggtgcggcaggccccggccaggcgctggagtgat gggcccgatcgaccctacgacagcagaccactaccccagaagctgcagggccgggtgaccatg accaccgacaccagcaccagcaccgctacatggagctgcgggagcctgcggagcgacgacaccgccc gtactactgcggccggggcggtacgacttcagctgggcaccctgtactggttcttcgacgtgtgggc

		cagggcaccacgtgaccgtgagcagcgggtggaggcgggttcaggcggaggtggttctggcgggtggcg gatcggacatccagatgaccagagccccagcagcctgagcgccagcgtggcgaccgggtgaccatc acctgccgggcccagcgaacatctacagctacctggcctgtgtaccagcagaagccccggaagggccc caagctgctgatacaacgccaagacctggcggaggcggtgcccagccggttcagcggcagcggca gcggcaccgactcacctgaccatcagcagcctgcagcccaggacttcgccactactactgcccagca ccactacggcaccggggacgttcggcgggcgccaccaaggtggagatcaaggcggtggcggtggtcgc gaggtgcaattgctggagctggggaggcctgtgtacagcctgggggtgccctgagactctcctgtgcag cctccggattcaccttggcggtaatgcatgtcctgggtccgcccaggtccagggaaggggctggagtg ggctcagcaattagtggaatggtgtagtacattctacgcagactccgtgaaggcgccgttcaccatctc cagagacaattccaagaacacgctgtatctgcagatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtatat tactgtgcgaagttcgtccattctgggttacttgcactactggggccaaggaaacctgtgaccgtctcg agt
22	串联片段 3-CAR 氨基酸	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRL LIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYFNP PEYTFGQGTKVEIKRGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCAS GYTFTSYWMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYAQKLQGRV TMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGGYDFDVGTLYWFF DVWGQGTITVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASENIYSYLAWYQQKPGKAPKLLIYNAKTLAEGVPSRFS GSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHHYGTPTFGGGTKVEIKGG GGSEVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFTFGGNAMSWVRQAPG KGLEWVSAISGNGGSTFYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAKVRPFWGTFDYWGQGLTVTVSSTTPAPRPPTPPTI ASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLL SLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGG CELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGR DPEMGGKPKRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
23	串联片段 4 氨基 酸	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASENIYSYLAWYQQKPGKAPKL LIYNAKTLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHHYG TPRTFGGGTKVEIKGGGGSEVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGF TFGNAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGNGGSTFYADSVKGRFTISR DNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVRPFWGTFDYWGQGLTVT VSSGGGGSGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSV SSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLT ISRLEPEDFAVYYCQQYFNPPEYTFGQGTKVEIKRGGGGSQVQLVQS GAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYWMNWVRQAPGQGLEWMGR IDPYDSETHYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYY CARGGYDFDVGTLYWFFDVWGQGTITVTVSS
24	串联片段 4 核苷 酸	gacatccagatgaccagagccccagcagcctgagcgccagcgtggcgaccgggtgaccatcacctg ccgggcccagcgaacatctacagctacctggcctgtgtaccagcagaagccccgcaaggcccccaagc tgctgatacaacgccaagacctggcggaggcggtgcccagccggttcagcggcagcggcagcggc accgacttcacctgaccatcagcagcctgcagcccaggacttcgccactactactgcccagcaccact acggcaccggggacgttcggcgggcgccaccaaggtggagatcaagggtggaggcggttcagaggt gcaattgctggagtgctggggaggcctgtgtacagcctgggggtgccctgagactctcctgtgcagcctc ggattcaccttggcggtaatgcatgtcctgggtccgcccaggtccagggaaggggctggagtggtgct cagcaattagtggaatggtgtagtacattctacgcagactccgtgaaggcgccgttcaccatctccagag acaattccaagaacacgctgtatctgcagatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtatattactgt gcgaaggtcgtccattctgggttacttgcactactggggccaaggaaacctgtgaccgtctcagtggt ggaggcggttcaggcgagggtggttctggcggtggcggtatcggaatcgtgttaacgcagtcctccaggc acctgtcttgtctccaggggaaagagccacctctcttcaggggccagtcagagtgtagcagcagcta cttagcctgtgtaccagcagaacctggccagggtcccagggtcctcatctatggagcatccagcaggggc actggcatcccagacaggttcagtgagtgatccgggacagacttcactctcaccatcagcagactgg agcctgaagatttgcagtgattactgtcagcagcttcaaccaccagaatacagttcggccaggggga ccaaagtggaaatcaacgtggcggtggcggtatcgaggtgcagctgtgtgcagagcgggcgccagggt gaagaagccccggcgccagcgtgaagggtgagctgaaggccagcggttacaccttcaccagctactgga tgactgggtgcggcaggccccggccagggtggtgagtgatggcggtatcgaccttacgacag cgagaccactacgcccagaagctgcaggggcggtgacatgaccaccgacaccagcaccagcacc gcctacatggagctggaggcctgcggagcgacgacaccgcccgtgtactactgcgccccggggcggtc

		cgacttcgacgtgggcaccctgtactggttcttcgacgtgtggggccagggcaccaccgtgaccgtgagcagc
25	串联片段 4-CAR 氨基酸	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASENIYSYLAWYQQKPGKAPKL LIYNAKTLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHHYG TPRTFGGGTKVEIKGGGGSEVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGF TFGGNAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGNGGSTFYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVRPFWGTFDYWGQGLVT VSSGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSV SSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLT SRLEPEDFAVYYCQQYFNPPEYTFGQGTKVEIKRGGGGSQVQLVQS GAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQGLEWMGR IDPYDSETHYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYY CARGGYDFDVGTLVWFFDVWGQGTITVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIA SQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLS LVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGC ELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRRGRDP EMGGKQRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
26	串联片段 5 氨基 酸	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASENIYSYLAWYQQKPGKAPKL LIYNAKTLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHHYG TPRTFGGGTKVEIKGGGGSEVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGF TFGGNAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGNGGSTFYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVRPFWGTFDYWGQGLVT VSSGSTSGSGKPGSGEGSTKGEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQ SVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTL TISRLEPEDFAVYYCQQYFNPPEYTFGQGTKVEIKRGGGGSQVQLV QSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQGLEWM GRIDPYDSETHYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAV YYCARGGYDFDVGTLVWFFDVWGQGTITVTVSS
27	串联片段 5 核苷 酸	gacatccagatgaccagagccccagcagcctgagcgccagcgtggggcaccgggtgaccatcacctg ccgggccagcgagaaatctacagctacctggcctgtaccagcagaagcccggaaggcccccaagc tgctgatctacaacccaagaccctggcggaggcggtgcccagccgggtcagcgccagcgccagcgcc accgacttcaccctgaccatcagcagcctgcagcccaggacttcgccactactactgcccagcaccact acggcaccccccggaccttcggcgccggcaccaggtggagatcaaggggtggaggcggttcagagggt gcaattgtcggagtctggggaggcctgtgtacagcctgggggttcctgagactctcctgtgcagcctcc ggatfcaccttggcggtaatgccatgtcctgggtccgccaggctccagggaaggggctggagtgggtct cagcaattagtggaatgggtgtgtacattctacgcagactccgtgaaggggccgggtccaccatctccagag acaattccaagaacacgctgtatctgcagatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtatattactgt gcgaaagttcgtccattctgggttacttctgactactggggccaaggaaacctgtgaccgtctcagtggt agtactctgttctggaaccgggttcaggcgaaaggaagtaaaaggggaaatcgtgttaacgcagt ctccaggcaccctgtcttctcaggggaagagccaccctctctgaggggccagtcagagtgtagc agcagctacttagcctgtaccagcagaacctggccaggctcccaggctcctcatctatggagcatcca gcaggggccactggcatccagacagggtcagtggcagtggtatccgggacagacttactctaccatcag cagactggagcctgaagatttgcagtgattactgtcagcagacttcaaccaccagaatacacgttcgg ccaggggaccaaagtggaaatcaaacgtggcggtggcgatcgaggtgcagctggtgcagagcggc gccgagggtgaagaagccggcgccagcgtgaagggtgagctgaaggccagcggtacacctcaccag gctactggatgaactgggtgcggcaggccccggccagggcctggagtggatggcgccggtatgaccc tacgacagcgagaccactacgccagaaagctgcaggggcggtgacctgaccaccgacaccagca ccagcaccgcctacatggagctgcggagcctgcggagcgacgacaccgctgtactactgcggccgg ggcggtacgacttcgacgtgggcaccctgtactggttcttcgacgtgtggggccaggggcaccaccgtga ccgtgagcagc
28	串联片段 5-CAR 氨基酸	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASENIYSYLAWYQQKPGKAPKL LIYNAKTLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHHYG TPRTFGGGTKVEIKGGGGSEVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGF TFGGNAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGNGGSTFYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVRPFWGTFDYWGQGLVT VSSGSTSGSGKPGSGEGSTKGEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQ SVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTL TISRLEPEDFAVYYCQQYFNPPEYTFGQGTKVEIKRGGGGSQVQLV

		QSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYWMNWVRQAPGQGLEWM GRIDPYDSETHYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAV YYCARGGYDFDVGTLYWFFDVWGQGTITVTSSTTPAPRPPTPAP TASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVL LLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE GGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRR GRDPEMGGKPKRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR GKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
29	CD8 α 信号肽序 列	MALPVTALLPLALLLHAARP
30	CD8 跨膜区序列	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC
31	CD28 跨膜区序 列	FWVLVVVGGVLACYSLVTVAFIIFWV
32	CD28 胞内区序 列	RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS
33	4-1BB 共刺激因 子序列	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL
34	T 细胞激活因子 CD3 ζ	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPE MGGKPKRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
35	CD8 铰链区	TTTPAPRPPTPAPTASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD
36	TRAC-gRNA	AGAGTCTCTCAGCTGGTACA
37	B2M-gRNA	GAGTAGCGCGAGCACAGCTA
38	NKG2A-gRNA	GGTCTGAGTAGATTACTCCT
39	BCMAVH-(G4S) 3-BCMAVL 氨基 酸	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGGNAMSWVRQAPGKGL EWVSAISNGGSTFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAKVRPFWGTFDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSE IVLTQSPGTL SLSPGERATL SCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLL IYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYFNP EYTFGQGTKVEIKR
40	BCMAVH-linker 1-BCMAVL 氨基 酸	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGGNAMSWVRQAPGKGL EWVSAISNGGSTFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAKVRPFWGTFDYWGQGLTVTVSSGSTSGSGKPGSGEGSTK GEIVLTQSPGTL SLSPGERATL SCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPR LLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYFN PPEYTFGQGTKVEIKR
41	NKG2AVH-(G4S) 3-NKG2AVL 氨 基酸	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYWMNWVRQAPGQ GLEWMGRIDPYDSETHYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRS DDTAVYYCARGGYDFDVGTLYWFFDVWGQGTITVTVSSGGGGSG GGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASENIYSYLA WYQ QKPGKAPKLLIYNAKTLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFA TYYCQHHYGTPTFTFGGGTKVEIK
42	NKG2A 多肽	MDNQGVISDLNLPNPKRQQRKPKGNKNSILATEQEITYAELNLQ KASQDFQGN DKTYHCKDLPSAPEKLIVGILGHIILMASVVTIVVIP STLIQRHNSSLNTRTQKARHCGHCPEEWITYSNSCYIIGKERRTW EESLLACTSKNSSLLSIDNEEEMKFLSIISPSSWIGVFRNSSHHPWVT MNGLA FKHEIKDSDNAELNCAVLQVNRLKSAQCGSSIIYHCKHKL
43	BCMA 多肽	MLQMAGQCSQNEYFDSLLHACIPCQLRCSSNTPPLTCQRYCNAS VTNSVKGTNAILWTCLGLSLIISLAVFVLMFLLRKINSEPLKDEF KNTGSGLLGMANIDLEKSRTGDEIILPRGLEYTVEECTCEDCIKS KPKVDS DHCFPLPAMEEGATILVTTKTNDYCKSLPAALSATEIEK SISAR

44	28Z	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMT PRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQN QLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPQRRKNPQEGLY NELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTY DALHMQALPPR
45	28BBZ	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMT PRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSKRGRKKLLYIFKQPFMRPV QTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQL YNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPQRRKNPQEGLYNE LQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDA LHMQALPPR
46	抗 BCMA 抗体 1- scFv	evqllesggglvqpqgsrlscaasgftfgnamswvrqapgkglewvsaisgnggstfyadsv kgrftisrdnsksntlylqmnsraedtavyycaavrpfgtfdywgqgtltvssgggsgggg sggggseivltqspgtlslspgeratlsrasqsvssylawyqqkpgqaprlliygassratgipdr fsgsgsgtdftltisrlepedfavyyccqyfnppeytfqggtkveikr
47	抗 BCMA 抗体 2- scFv	Evqllesggglvqpqgsrlscaasgftfssyamswvrqapgkglewvsaisgsggstyyadsv kgrftisrdnsksntlylqmnsraedtavyycaavrpfgtfdywgqgtltvssgggsggggsg gggseivltqspgtlslspgeratlsrasqsvssylawyqqkpgqaprlliygassratgipdrfs gsgsgtdftltisrlepedfavyyccqygypptytfqggtkveikr
48	抗 BCMA 抗体 3- scFv	Evqllesggglvqpqgsrlscaasgftfssyamswvrqapgkglewvsaisgsggstyyadsv kgrftisrdnsksntlylqmnsraedtavyycaavrpfgtfdywgqgtltvssgggsggggsg sggggseivltqspgtlslspgeratlsrasqsvssylawyqqkpgqaprlliygassratgipdr fsgsgsgtdftltisrlepedfavyyccqygypptytfqggtkveikr
49	抗 BCMA 抗体 4-scFv	Evqllesggglvqpqgsrlscaasgftfssyamswvrqapgkglewvsaisgsggstyyadsv kgrftisrdnsksntlylqmnsraedtavyycaavrpfgtfdywgqgtltvssgggsggggsg sggggseivltqspgtlslspgeratlsrasqsvssylawyqqkpgqaprlliygassratgipdr fsgsgsgtdftltisrlepedfavyyccqyfnppeytfqggtkveikr
50	抗 BCMA 抗体 5- scFv	evqllesggglvqpqgsrlscaasgftfrsyamswvrqapgkglewvsaisgggntfyadsv kgrftisrdnsksntlylqmnsraedtavyycaavrpfgtfdywgqgtltvssgggsggggsg sggggseivltqspgtlslspgeratlsrasqsvssylawyqqkpgqaprlliygassratgipdr fsgsgsgtdftltisrlepedfavyyccqyfnppeytfqggtkveikr

权 利 要 求

1. 嵌合抗原受体 (CAR)，其特征在于，所述CAR包含双特异性抗原结合域，所述双特异性抗原结合域包括NKG2A抗原结合域和肿瘤抗原结合域，所述NKG2A抗原结合域包含第一结合区L、第一结合区H，所述肿瘤抗原结合域包含第二结合区L、第二结合区H，所述第一结合区L、所述第一结合区H、所述第二结合区L、所述第二结合区H以形成loop结构的方式连接。
2. 如权利要求1中所述的CAR，其特征在于，所述loop结构通过如下方式形成：其中一个抗原结合域的结合区H和结合区L连接为抗体，另一个抗原结合域的结合区H、结合区L分别与所述抗体的两端连接。
3. 如权利要求2中所述的CAR，其特征在于，所述抗体自N端至C端依次包含：所述结合区H、所述结合区L。
4. 如权利要求3中所述的CAR，其特征在于，所述另一个抗原结合域的结合区L与所述抗体的N端连接，所述另一个抗原结合域的结合区H与所述抗体的C端连接。
5. 如权利要求4中所述的CAR，其特征在于，所述连接为抗体的结合区H为第一结合区H，所述连接为抗体的结合区L为第一结合区L，所述另一个抗原结合域的结合区L为第二结合区L，所述另一个抗原结合域的结合区H为第二结合区H。
6. 如权利要求4中所述的CAR，其特征在于，所述连接为抗体的结合区H为第二结合区H，所述连接为抗体的结合区L为第二结合区L。所述另一个抗原结合域的结合区L为第一结合区L，所述另一个抗原结合域的结合区H为第一结合区H。
7. 如权利要求5或6中所述的CAR，其特征在于，所述第一结合区L包含第一轻链可变区 (VL)，所述第一结合区H包含第一重链可变区 (VH)，所述第二结合区L包含第二轻链可变区 (VL)，所述第二结合区H包含第二重链可变区 (VH)。
8. 如权利要求7所述的CAR，其特征在于，所述第一轻链可变区 (VL) 包含如SEQ ID NO: 6-8中任一项所示的第一轻链互补决定区 (LCDR) 或其组合。
9. 如权利要求7或8所述的CAR，其特征在于，所述第一重链可变区 (VH) 包含如SEQ ID NO: 3-5中任一项所示的第一重链互补决定区 (HCDR) 或其组合。
10. 如权利要求7-9中任一项所述的CAR，其特征在于，所述第一轻链可变区 (VL) 包含第一轻链互补决定区1 (LCDR1)、第一轻链互补决定区2 (LCDR2)、第一轻链互补决定区3 (LCDR3)，所述第一LCDR1包含如SEQ ID NO: 6所示的氨基酸序列，所述第一LCDR2包含如SEQ ID NO: 7所示的氨基酸序列，所述第一LCDR3包含如SEQ ID NO: 8所示的氨基酸序列。

11. 如权利要求7-10中任一项所述的CAR,其特征在于,所述第一重链可变区(VH)包含第一重链互补决定区1(HCDR1)、第一重链互补决定区2(HCDR2)、第一重链互补决定区3(HCDR3),所述第一HCDR1包含如SEQ ID NO: 3所示的氨基酸序列,所述第一HCDR2包含如SEQ ID NO: 4所示的氨基酸序列,所述第一HCDR3包含如SEQ ID NO: 5所示的氨基酸序列。
12. 如权利要求1-11中任一项所述的CAR,其特征在于,所述肿瘤抗原选自CD19、GPC3、Claudin18.2、WT1、HER2、EGFR、BCMA或它们的组合。
13. 如权利要求7-12中任一项所述的CAR,其特征在于,所述第二轻链可变区(VL)包含如SEQ ID NO: 12-14中任一项所示的第二轻链互补决定区(LCDR)或其组合。
14. 如权利要求7-13中任一项所述的CAR,其特征在于,所述第二重链可变区(VH)包含如SEQ ID NO: 9-11中任一项所示的第二重链互补决定区(HCDR)或其组合。
15. 如权利要求7-14中任一项所述的CAR,其特征在于,所述第二轻链可变区(VL)包含第二轻链互补决定区1(LCDR1)、第二轻链互补决定区2(LCDR2)、第二轻链互补决定区3(LCDR3),所述第二LCDR1包含如SEQ ID NO: 12所示的氨基酸序列,所述第二LCDR2包含如SEQ ID NO: 13所示的氨基酸序列,所述第二LCDR3包含如SEQ ID NO: 14所示的氨基酸序列。
16. 如权利要求7-15中任一项所述的CAR,其特征在于,所述第二重链可变区(VH)包含第二重链互补决定区1(HCDR1)、第二重链互补决定区2(HCDR2)、第二重链互补决定区3(HCDR3),所述第二HCDR1包含如SEQ ID NO: 9所示的氨基酸序列,所述第二HCDR2包含如SEQ ID NO: 10所示的氨基酸序列,所述第二HCDR3包含如SEQ ID NO: 11所示的氨基酸序列。
17. 如权利要求1-16中任一项所述的CAR,其特征在于,所述连接包括通过连接子连接,所述连接子选自Lin1或(G4S)_n,其中,n是1或3;所述Lin1包含如SEQ ID NO: 18所示的氨基酸序列。
18. 核酸分子,其编码权利要求1-18中任一项所述的CAR。
19. 载体,其包含权利要求19所述的核酸分子。
20. 细胞,其包含权利要求1-18中任一项所述的CAR、权利要求19所述的核酸分子和/或权利要求20所述的载体。
21. 如权利要求20所述的细胞,其特征在于,所述细胞选自:T细胞、NK细胞、NKT细胞、巨噬细胞、CIK细胞和干细胞衍生的免疫细胞。
22. 如权利要求20-21中任一项所述的细胞,其特征在于,所述细胞包括:
 - a)内源性HLA-I分子低表达或不表达,

b)内源性TCR分子低表达或不表达， 和/或

c)内源性NKG2A分子低表达或不表达。

23. 如权利要求22所述的细胞，其特征在于，

a)所述内源性HLA-I蛋白低表达或不表达包括编码内源性HLA-I的基因的敲除，

b)所述内源性TCR蛋白低表达或不表达包括编码内源性TCR的基因的敲除， 和/或

c)所述内源性NKG2A分子低表达或不表达包括编码内源性NKG2A的基因的敲除。

24. 药物组合物，其包含如权利要求1-17中任一项所述的CAR、权利要求18中所述的核酸分子、权利要求19中所述的载体和/或权利要求20-23中任一项所述的细胞，以及药学上可接受的载体。

25. 一种试剂盒，其包含如权利要求1-17中任一项所述的CAR、权利要求18中所述的核酸分子、权利要求19中所述的载体、权利要求20-23中任一项所述的细胞、和/或权利要求24所述的药物组合物。

26. 提高靶向肿瘤的免疫细胞在有宿主免疫细胞存在时的存活时间和/或扩增能力的方法，其包括向所述免疫细胞中引入如权利要求18中所述的核酸分子或权利要求19中所述的载体。

27. 如权利要求27所述的方法，其还包括使所述免疫细胞表达如权利要求1-17中任一项所述的CAR。

28. 如权利要求26-27中任一项所述的方法，其还包括对所述免疫细胞进行修饰，所述修饰包括抑制或消除参与响应自体和/或异体抗原识别多肽的至少一种内源基因表达、活性。

29. 如权利要求1-17中任一项所述的CAR、权利要求18中所述的核酸分子、权利要求19中所述的载体、权利要求20-23中任一项所述的细胞、权利要求24所述的药物组合物在制备药物中的用途，所述药物用于预防、缓解和/或治疗肿瘤。

30. 预防、缓解和/或治疗肿瘤的方法，其包括向有需要的受试者施用如权利要求20-23中任一项所述的细胞、权利要求24所述的药物组合物。

31. 权利要求1-17中任一项所述的CAR、权利要求18中所述的核酸分子、权利要求19中所述的载体、权利要求20-23中任一项所述的细胞、权利要求24所述的药物组合物，其用于预防、缓解和/或治疗肿瘤。

32. 如权利要求29所述的用途、权利要求30所述的方法、权利要求31所述的CAR、核酸分子、载体、细胞、药物组合物，其中所述肿瘤包括血液瘤和/或实体瘤。

33. 如权利要求29所述的用途、权利要求30所述的方法、权利要求31所述的CAR、核酸分子、载体、细胞、药物组合物，其中所述血液瘤包括多发性骨髓瘤。

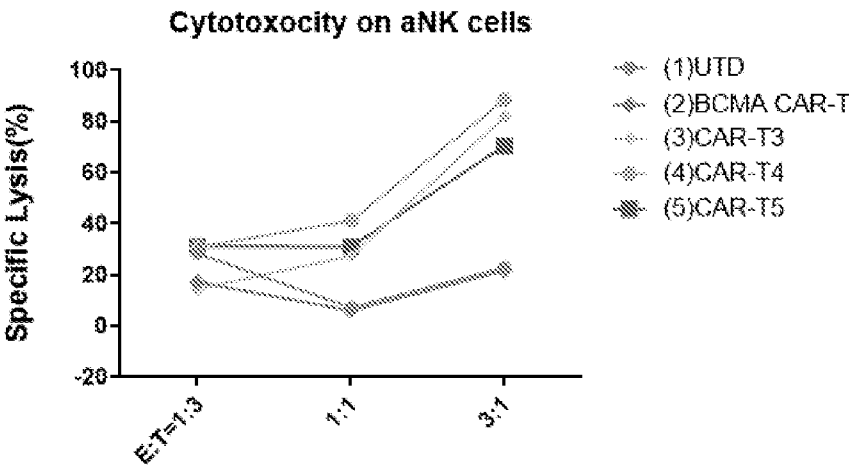


图 1.

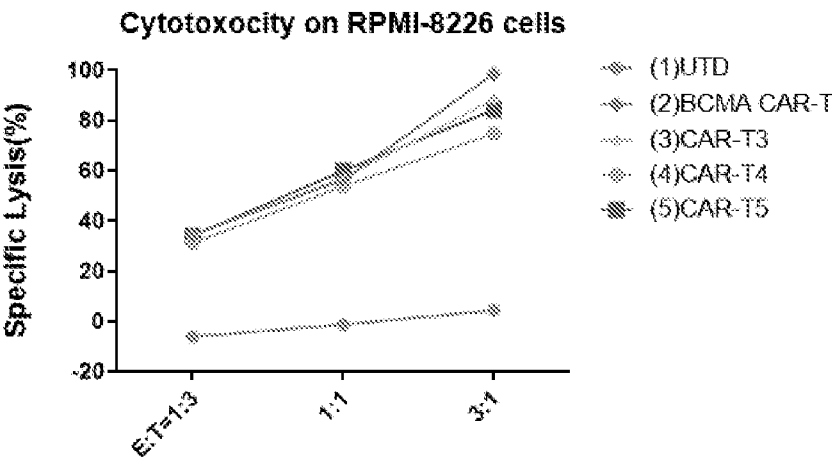


图 2

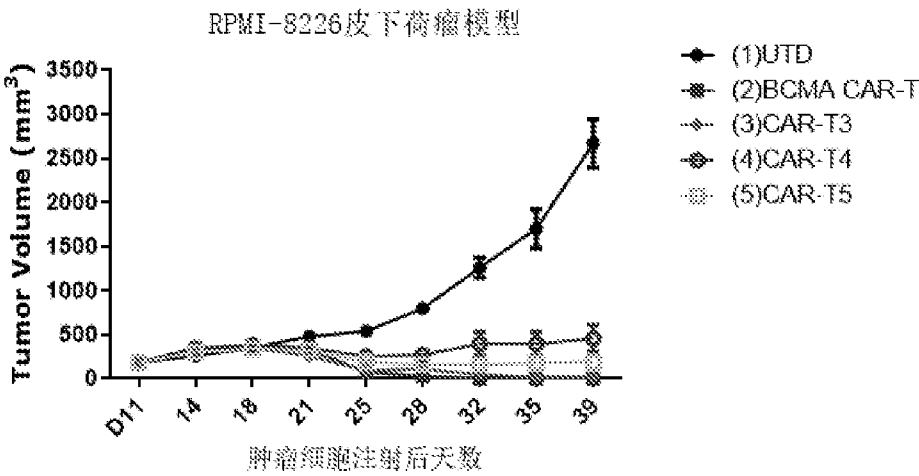


图 3

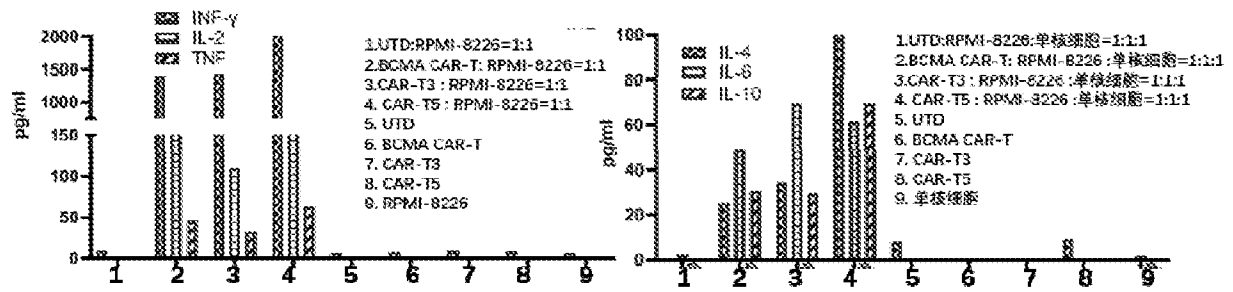


图4

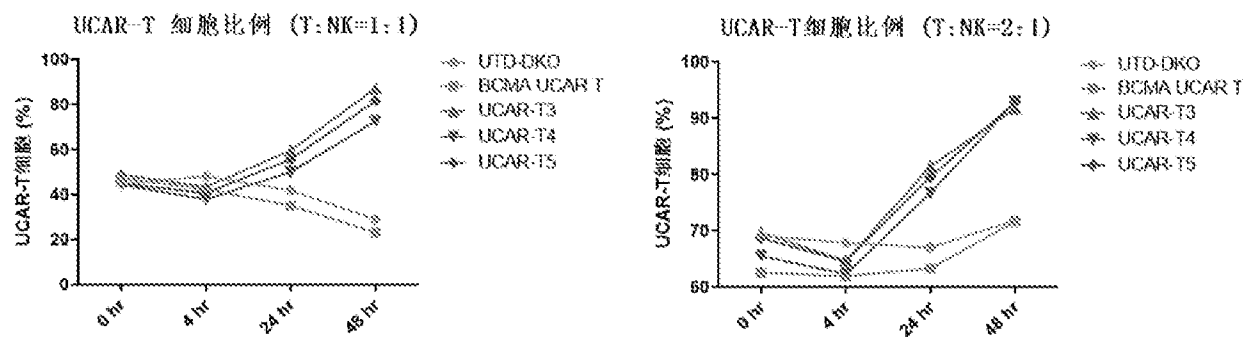


图5

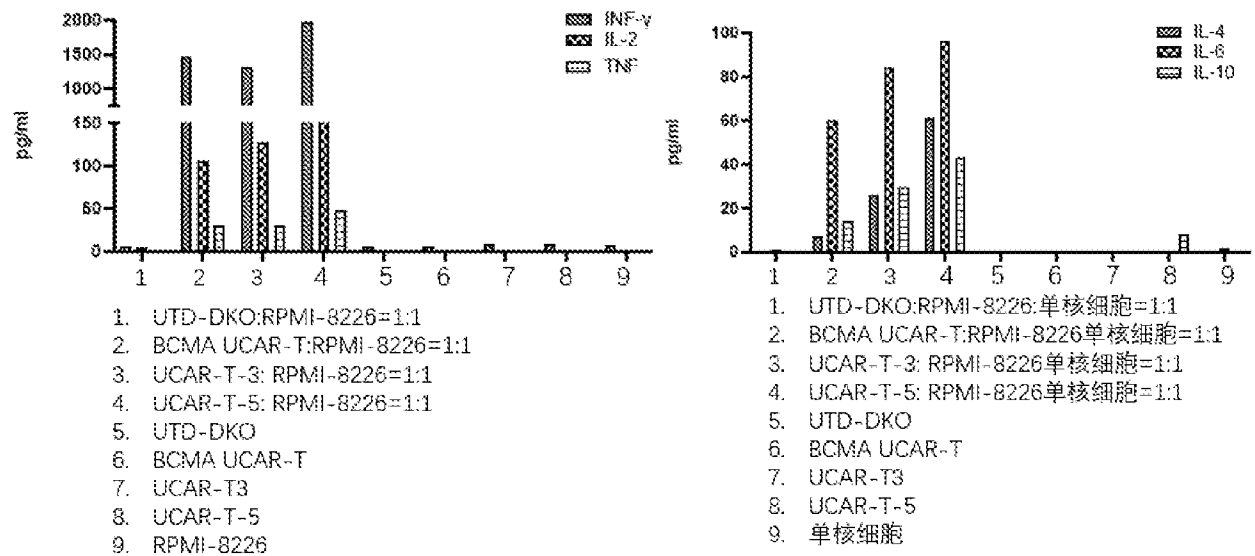


图6

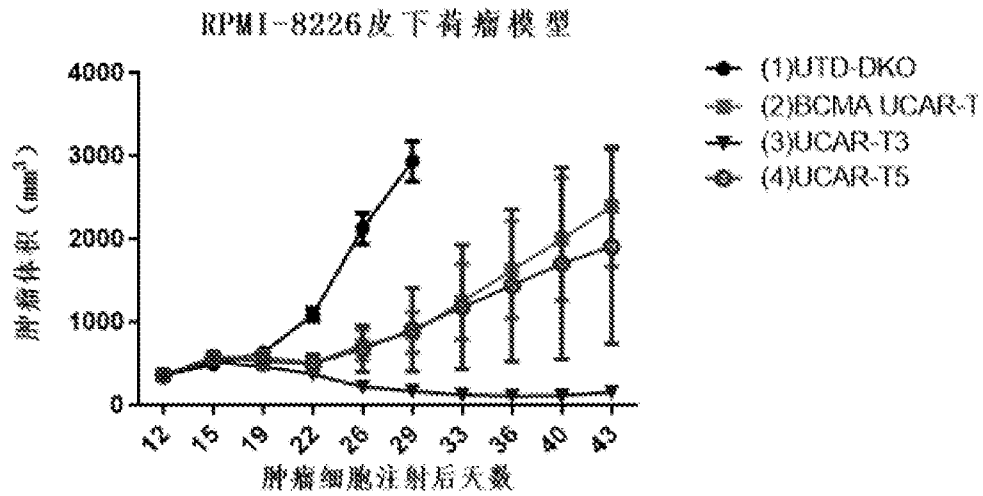


图7

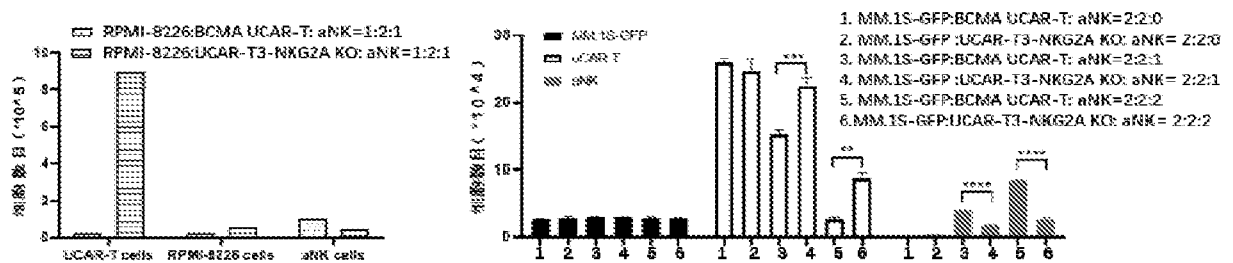


图8

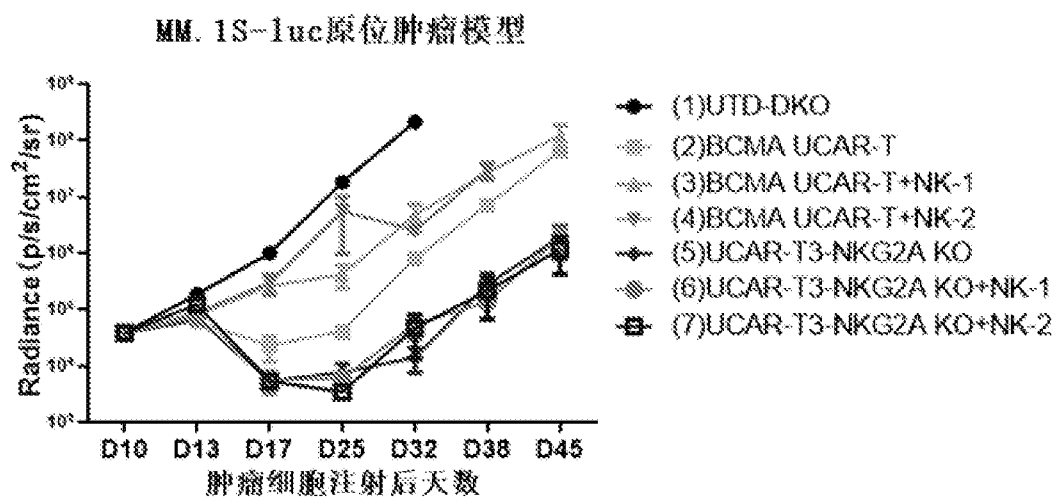


图9A

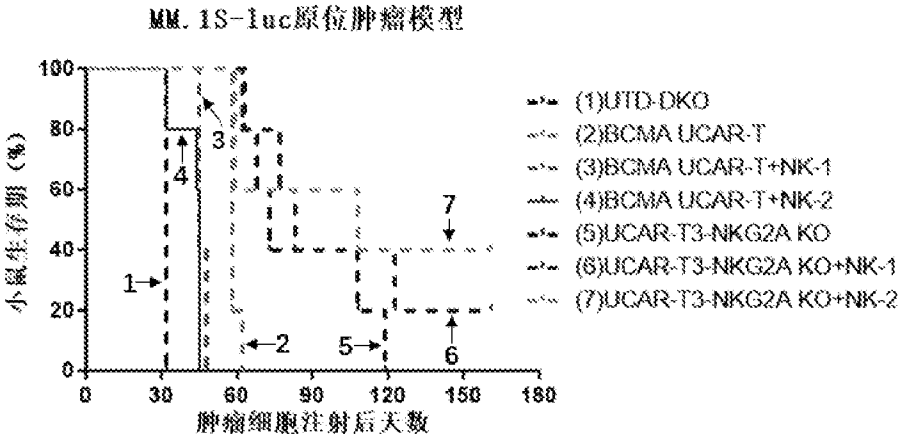


图9B

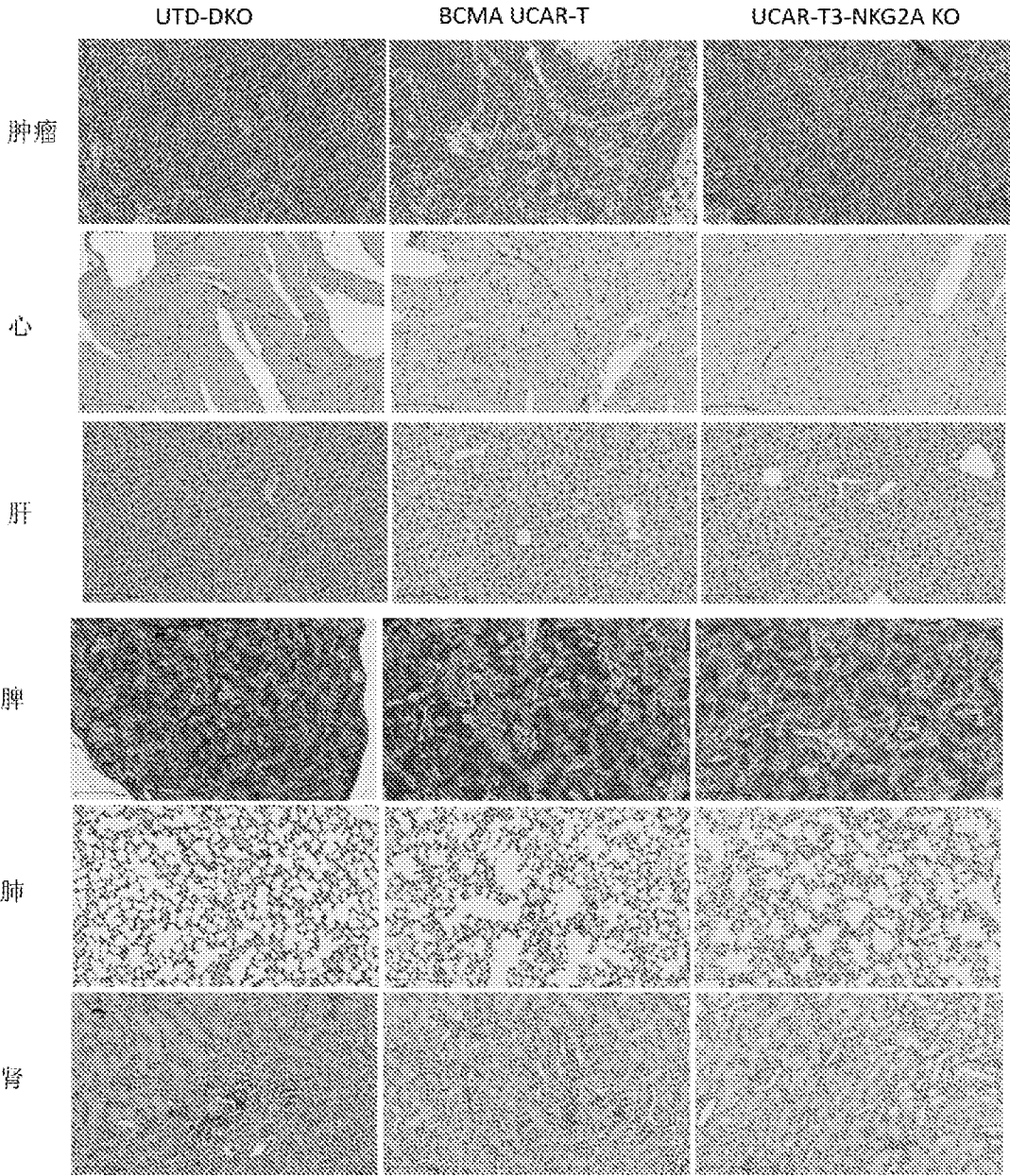


图10

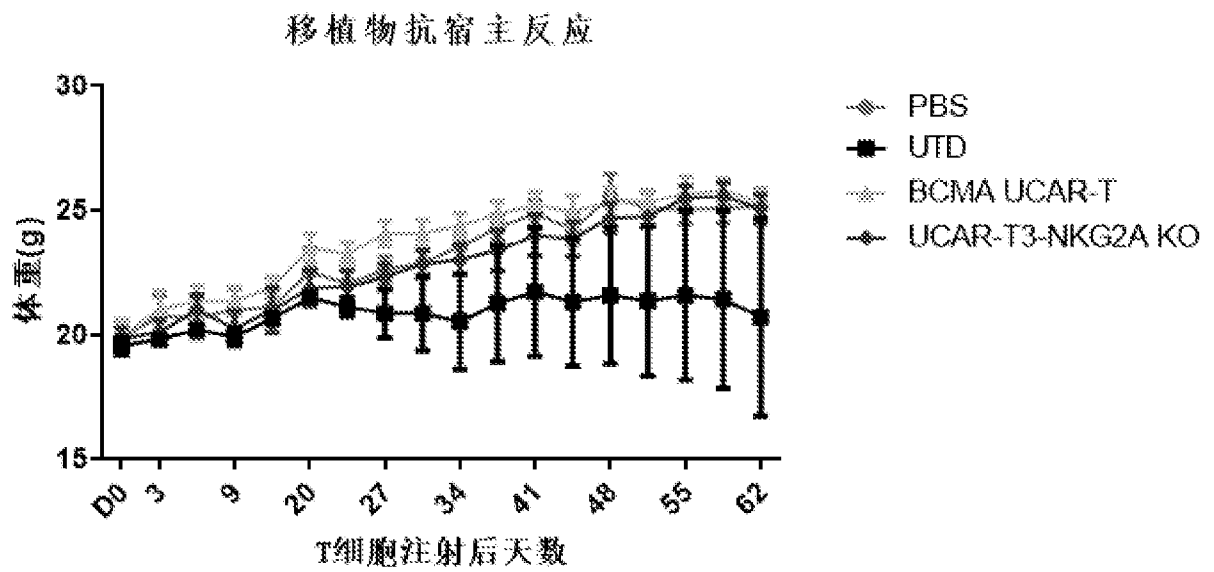


图 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/106096

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/10(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)

VEN; CNABS; CNTXT; ENTXTC; CNKI; 万方; 百度学术; ISI WEB OF KNOWLEDGE; PUBMED; NCBI; STN; 申请人, 发明人, NKG2A, 肿瘤抗原, tumor antigen, 嵌合抗原受体, CAR, chimeric antigen receptor, CD19, GPC3, Claudin18.2, WT1, HER2, EGFR, BCMA, 癌症, 肿瘤, SEQ ID NOS: 1-14, 18

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2020259707 A1 (CARSGEN THERAPEUTICS (SHANGHAI) CO., LTD.) 30 December 2020 (2020-12-30) claims 1-38, embodiments 6-9, figure 12, and sequence table	1-33
X	CN 109694854 A (GRACELL BIOTECHNOLOGY (SHANGHAI) CO., LTD.) 30 April 2019 (2019-04-30) claims 1-10, embodiments 1 and 11, and figure 12	1-12, 17-33
Y	CN 109694854 A (GRACELL BIOTECHNOLOGY (SHANGHAI) CO., LTD.) 30 April 2019 (2019-04-30) claims 1-10, embodiments 1 and 11, and figure 12	13-16
Y	CN 112739817 A (CARSGEN THERAPEUTICS CO., LTD.) 30 April 2021 (2021-04-30) claim 15, and sequence table	13-16
A	CN 110575537 A (LIU HUINING) 17 December 2019 (2019-12-17) entire document	1-33
A	US 2020023010 A1 (REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.) 23 January 2020 (2020-01-23) entire document	1-33



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

26 September 2022

Date of mailing of the international search report

27 December 2022

Name and mailing address of the ISA/CN

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

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/106096**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2021087275 A1 (CYTOIMMUNE THERAPEUTICS, INC.) 25 March 2021 (2021-03-25) entire document	1-33
A	CN 109641012 A (MAX DELBRUCK CT FUR MOLEKULARE MEDIZIN) 16 April 2019 (2019-04-16) entire document	1-33
A	ZHUANG, Xiaoxuan et al. "Inhibition-Resistant CARs for NK Cell Cancer Immunotherapy" <i>Trends in Immunology</i> , Vol. 40, No. 12, 31 December 2019 (2019-12-31), pp. 1078-1081	1-33

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/106096

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:
 - [1] The actually submitted sequence table is an XML file of the standard ST.26.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/106096

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **30**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

[1] Claim 30 relates to a method for preventing, alleviating, and/or treating tumors, belonging to a method for treating diseases defined in PCT Rule 39.1(iv). Therefore, an international search was conducted on the basis of a corresponding pharmaceutical use of a cell or pharmaceutical composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/106096

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2020259707	A1	30 December 2020	CA	3144549	A1	30 December 2020
				IL	289353	A	01 February 2022
				KR	20220028090	A	08 March 2022
				AU	2020304139	A1	24 February 2022
				BR	112021026416	A2	08 February 2022
				EP	3992204	A1	04 May 2022
CN	109694854	A	30 April 2019	None			
CN	112739817	A	30 April 2021	None			
CN	110575537	A	17 December 2019	None			
US	2020023010	A1	23 January 2020	WO	2020018825	A1	23 January 2020
				IL	279979	A	01 March 2021
				SG	11202100221V	A	25 February 2021
				CN	112437671	A	02 March 2021
				AU	2019308290	A1	18 February 2021
				KR	20210035832	A	01 April 2021
				CA	3106612	A1	23 January 2020
				CL	2021000142	A1	02 July 2021
				CO	2021000334	A2	29 January 2021
				EP	3823665	A1	26 May 2021
				BR	112021000919	A2	27 April 2021
				PH	12021550036	A1	20 September 2021
				EA	202190315	A1	16 April 2021
				JP	2021531004	A	18 November 2021
US	2021087275	A1	25 March 2021	IL	276975	A	29 October 2020
				RU	2020133311	A	11 April 2022
				BR	112020018301	A2	22 December 2020
				CO	2020012504	A2	30 October 2020
				JP	2021524731	A	16 September 2021
				WO	2019178576	A1	19 September 2019
				CA	3092355	A1	19 September 2019
				AU	2019233917	A1	17 September 2020
				CN	112118850	A	22 December 2020
				EP	3765042	A1	20 January 2021
				KR	20200131844	A	24 November 2020
				SG	11202008129 Y	A	29 September 2020
CN	109641012	A	16 April 2019	SG	11201810697 Q	A	28 December 2018
				EP	3463396	A1	10 April 2019
				JP	2019527537	A	03 October 2019
				US	2019307797	A1	10 October 2019
				KR	20190015733	A	14 February 2019
				CA	3026778	A1	14 December 2017
				WO	2017211900	A1	14 December 2017
				AU	2017276706	A1	03 January 2019

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2022/106096

A. 主题的分类

C12N 5/10(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))

VEN;CNABS;CNTXT;ENTXTC;CNKI; 万方; 百度学术; ISI WEB OF KNOWLEDGE; PUBMED;NCBI;STN: 申请人, 发明人, NKG2A, 肿瘤抗原, tumor antigen, 嵌合抗原受体, CAR, chimeric antigen receptor, CD19, GPC3, Claudin18.2, WT1, HER2, EGFR, BCMA, 癌症, 肿瘤, SEQ ID NOs: 1-14, 18

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 2020259707 A1 (科济生物医药上海有限公司) 2020年12月30日 (2020 - 12 - 30) 权利要求1-38, 实施例6-9, 图12, 序列表	1-33
X	CN 109694854 A (亘喜生物科技上海有限公司) 2019年4月30日 (2019 - 04 - 30) 权利要求1-10, 实施例1、11, 图12	1-12, 17-33
Y	CN 109694854 A (亘喜生物科技上海有限公司) 2019年4月30日 (2019 - 04 - 30) 权利要求1-10, 实施例1、11, 图12	13-16
Y	CN 112739817 A (佶玛药业有限公司) 2021年4月30日 (2021 - 04 - 30) 权利要求15, 序列表	13-16
A	CN 110575537 A (刘慧宁) 2019年12月17日 (2019 - 12 - 17) 全文	1-33
A	US 2020023010 A1 (REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.) 2020年1月23日 (2020 - 01 - 23) 全文	1-33
A	US 2021087275 A1 (CYTOIMMUNE THERAPEUTICS, INC.) 2021年3月25日 (2021 - 03 - 25) 全文	1-33

☒ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

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

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

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

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

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

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2022年9月26日

国际检索报告邮寄日期

2022年12月27日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局(ISA/CN)

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

授权官员

张丽颖

电话号码 86-(10)-53961978

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 109641012 A (马克思-德布鲁克-分子医学中心亥姆霍兹联合会) 2019年4月16日 (2019 - 04 - 16) 全文	1-33
A	ZHUANG, X. X. 等. "Inhibition-Resistant CARs for NK Cell Cancer Immunotherapy" Trends in Immunology, 第40卷, 第12期, 2019年12月31日 (2019 - 12 - 31), 第1078-1081页	1-33

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1. c项)

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

a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:

☒ 附件C/ST. 25文本文件形式

☐ 纸件或图形文件形式

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

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:

☐ 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))

☐ 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b)和行政规程第713段)

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

3. 补充意见:

[1] 实际提交的序列表是ST. 26标准的XML文件。

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☒ 权利要求： 30
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] 权利要求30涉及预防、缓解和/或治疗肿瘤的方法，属于PCT细则39.1(iv)规定的疾病的治疗方法，因此国际检索基于细胞或药物组合物相应的制药用途作出。
2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说：
3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/106096

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	2020259707	A1	2020年12月30日	CA	3144549	A1	2020年12月30日
				IL	289353	A	2022年2月1日
				KR	20220028090	A	2022年3月8日
				AU	2020304139	A1	2022年2月24日
				BR	112021026416	A2	2022年2月8日
				EP	3992204	A1	2022年5月4日
CN	109694854	A	2019年4月30日	无			
CN	112739817	A	2021年4月30日	无			
CN	110575537	A	2019年12月17日	无			
US	2020023010	A1	2020年1月23日	WO	2020018825	A1	2020年1月23日
				IL	279979	A	2021年3月1日
				SG	11202100221V	A	2021年2月25日
				CN	112437671	A	2021年3月2日
				AU	2019308290	A1	2021年2月18日
				KR	20210035832	A	2021年4月1日
				CA	3106612	A1	2020年1月23日
				CL	2021000142	A1	2021年7月2日
				CO	2021000334	A2	2021年1月29日
				EP	3823665	A1	2021年5月26日
				BR	112021000919	A2	2021年4月27日
				PH	12021550036	A1	2021年9月20日
				EA	202190315	A1	2021年4月16日
				JP	2021531004	A	2021年11月18日
US	2021087275	A1	2021年3月25日	IL	276975	A	2020年10月29日
				RU	2020133311	A	2022年4月11日
				BR	112020018301	A2	2020年12月22日
				CO	2020012504	A2	2020年10月30日
				JP	2021524731	A	2021年9月16日
				WO	2019178576	A1	2019年9月19日
				CA	3092355	A1	2019年9月19日
				AU	2019233917	A1	2020年9月17日
				CN	112118850	A	2020年12月22日
				EP	3765042	A1	2021年1月20日
				KR	20200131844	A	2020年11月24日
				SG	11202008129Y	A	2020年9月29日
CN	109641012	A	2019年4月16日	SG	11201810697Q	A	2018年12月28日
				EP	3463396	A1	2019年4月10日
				JP	2019527537	A	2019年10月3日
				US	2019307797	A1	2019年10月10日
				KR	20190015733	A	2019年2月14日
				CA	3026778	A1	2017年12月14日
				WO	2017211900	A1	2017年12月14日
				AU	2017276706	A1	2019年1月3日