

(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
2016 年 7 月 28 日 (28.07.2016)



(10) 国际公布号
WO 2016/116035 A1

- (51) 国际专利分类号:
C07K 19/00 (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01) *A61K 35/17* (2015.01)
C12N 15/867 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2016/071371
- (22) 国际申请日: 2016 年 1 月 19 日 (19.01.2016)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201510024857.1 2015 年 1 月 19 日 (19.01.2015) CN
- (71) 申请人: 西比曼生物科技(上海)有限公司
(CELLULAR BIOMEDICINE GROUP(SHANGHAI)
LTD.) [CN/CN]; 中国上海市徐汇区桂平路 333 号 1
号楼 5 楼, Shanghai 200233 (CN)。 西比曼生物科技
(无锡)有限公司 (CELLULAR BIOMEDICINE
GROUP (WUXI)LTD.) [CN/CN]; 中国江苏省无锡市
惠山区惠山大道 1619 号 2 号楼 301 室, Jiangsu
214174 (CN)。
- (72) 发明人: 伍志强 (WU, Zhiqiang); 中国上海市徐汇
区桂平路 333 号 1 号楼 5 楼, Shanghai 200233 (CN)。
韩为东 (HAN, Weidong); 中国上海市徐汇区桂平路
333 号 1 号楼 5 楼, Shanghai 200233 (CN)。 王瑶
(WANG, Yao); 中国上海市徐汇区桂平路 333 号 1 号
楼 5 楼, Shanghai 200233 (CN)。 郭业磊 (GUO,
Yelei); 中国上海市徐汇区桂平路 333 号 1 号楼 5 楼,
Shanghai 200233 (CN)。 代汉仁 (DAI, Hanren); 中国
上海市徐汇区桂平路 333 号 1 号楼 5 楼, Shanghai
200233 (CN)。 王晓慧 (WANG, Xiaohui); 中国上海
市徐汇区桂平路 333 号 1 号楼 5 楼, Shanghai 200233
(CN)。 王春萌 (WANG, Chunmeng); 中国上海市徐

汇区桂平路 333 号 1 号楼 5 楼, Shanghai 200233
(CN)。

- (74) 代理人: 上海一平知识产权代理有限公司 (XU &
PARTNERS,LLC.); 中国上海市普陀区真北路 958
号天地科技广场 1 号楼 106 室, Shanghai 200333
(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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,
GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS,
JP, KE, KG, KN, KP, KR, 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, SM, ST,
SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, ZA, ZM, ZW。
- (84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保
护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA,
RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ,
BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH,
CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE,
IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO,
RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则 4.17 的声明:

- 关于申请人有权要求在先申请的优先权(细则
4.17(iii))

本国际公布:

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

(54) Title: CD30-TARGETED CHIMERIC ANTIGEN RECEPTOR AND NKT CELL AND PREPARATION METHOD THERE-
FOR AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: CD30 靶向性的嵌合抗原受体和 NKT 细胞及其制法和应用

(57) Abstract: A chimeric antigen receptor and a gene and a recombinant expression vector thereof, and an engineered CD30-tar-
geted NKT cell and an application thereof. The chimeric antigen receptor is CD30-ScFv-CD8-CD137-CD3 ζ , which is formed by
connecting CD30ScFv, a hinge region and a transmembrane region of CD8, an intracellular signal structural domain of CD137, and
an intracellular signal structural domain of CD3 ζ in series. When the NKT cell modified by the chimeric antigen receptor CD30-
ScFv-CD8-CD137-CD3 ζ treats CD30 positive hodgkin lymphoma and non-hodgkin lymphoma, very good specific cytotoxicity for
lymphoma cells is achieved, and some curative effects are achieved for a CD30 positive hodgkin lymphoma patient who has been
treated multiple times without achieving a significant curative effect.

(57) 摘要: 一种嵌合抗原受体及其基因和重组表达载体、工程化 CD30 靶向性的 NKT 细胞及其应用, 所述嵌合抗
原受体为 CD30-ScFv-CD8-CD137-CD3 ζ , 由 CD30ScFv、CD8 的铰链区和跨膜区、CD137 的胞内信号结构域和 CD3 ζ
的胞内信号结构域串联构成。嵌合抗原受体 CD30-ScFv-CD8-CD137-CD3 ζ 修饰的 NKT 细胞治疗 CD30 阳性的霍奇
金淋巴瘤及非霍奇金淋巴瘤时, 对淋巴瘤细胞具有很好的特异杀伤活性, 且对已经过多次治疗但均无明显疗效
的 CD30 阳性的霍奇金淋巴瘤患者有一定的治疗效果。

WO 2016/116035 A1

CD30 靶向性的嵌合抗原受体和 NKT 细胞及其制法和应用

技术领域

本发明属于用于肿瘤治疗的生物制品领域，具体地，涉及 CD30 靶向性的嵌合抗原受体和 NKT 细胞及其制法和应用。更具体地，涉及过继免疫治疗中的一种嵌合抗原受体 CD30ScFv-CD8-CD137-CD3 ζ 及其基因和重组表达载体、工程化 CD30 靶向性的 NKT 细胞（CAR30-NKT 细胞）及其应用。

背景技术

CD30 抗原是一个 120kDa 糖蛋白，属于 TNF/nerve 生长因子受体家族成员，几乎表达于所有的霍奇金淋巴瘤、部分非霍奇金淋巴瘤及被病毒感染的淋巴细胞表面。由于以上特性，CD30 抗原成为抗体为基础治疗

的理想靶点。目前，在治疗复发难治性霍奇金淋巴瘤患者过程中，临床研究通常采用 CD30 单克隆抗体结合细胞毒素药物或者放射性同位素的方案，这种方案在产生一定临床效应的基础上，同时也存在一定的缺陷，如：CD30 单克隆抗体靶向效应的短暂性及 CD30 单克隆抗体在肿瘤部位分布的不足等。

因此，本领域技术人员致力于开发新的更有效的针对 CD30 阳性肿瘤的治疗方案。

发明内容

本发明的目的是为了克服现有技术中 NKT 细胞对肿瘤的杀伤作用比较弱、特异杀伤活性有待提高以及现有临床研究中 CD30 单克隆抗体存在的上述缺陷，提供一种嵌合抗原受体 CD30ScFv-CD8-CD137-CD3 ζ 及其基因和重组表达载体、工程化 CD30 靶向性的 NKT 细胞（CAR30-NKT 细胞）及其应用。

本发明的第一方面，提供了一种嵌合抗原受体(CAR)，所述嵌合抗原受体以 CD8 的铰链区和跨膜区及 CD137 和 CD3 ζ 的胞内信号结构域串联而成的结构为信号传导结构域。

在另一优选例中，所述嵌合抗原受体为 CD30ScFv-CD8-CD137-CD3 ζ ，由 CD30ScFv、CD8 的铰链区和跨膜区、CD137 的胞内信号结构域和 CD3 ζ 的胞内信号结构域串联构成。

在另一优选例中，所述嵌合抗原受体的胞外结构域为抗 CD30 的单链抗体。

在另一优选例中，所述嵌合抗原受体的氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示。

在另一优选例中，所述 CD8 的铰链区和跨膜区选自下组：

(A)具有 SEQ ID NO:17 所示氨基酸序列的多肽；

(B)具有与 SEQ ID NO: 17 所示氨基酸序列 $\geq 80\%$ 同源性(优选地， $\geq 90\%$)

的同源性；等优选地 $\geq 95\%$ 的同源性；最优选地， $\geq 97\%$ 的同源性)的多肽；(C)将 SEQ ID NO:17 中任一所示氨基酸序列经过 1-5 个氨基酸残基的取代、缺失或添加而形成的衍生多肽。

在另一优选例中，所述 CD137 的胞内信号结构域选自下组：

- 5 (A)具有 SEQ ID NO:18 所示氨基酸序列的多肽；
(B)具有与 SEQ ID NO: 18 所示氨基酸序列 $\geq 80\%$ 同源性(优选地， $\geq 90\%$ 的同源性；优选地 $\geq 95\%$ 的同源性；最优选地， $\geq 97\%$ 的同源性)，并且能够转导效应子功能信号的多肽；
(C)将 SEQ ID NO:18 中任一所示氨基酸序列经过 1-5 个氨基酸残基的取代、
10 缺失或添加而形成的衍生多肽。

在另一优选例中，所述 CD3 ζ 的胞内信号结构域选自下组：

- (A)具有 SEQ ID NO:19 所示氨基酸序列的多肽；
(B)具有与 SEQ ID NO: 19 所示氨基酸序列 $\geq 80\%$ 同源性(优选地， $\geq 90\%$ 的同源性；等优选地 $\geq 95\%$ 的同源性；最优选地， $\geq 97\%$ 的同源性)，并且能够
15 转导效应子功能信号的多肽；
(C)将 SEQ ID NO:19 中任一所示氨基酸序列经过 1-5 个氨基酸残基的取代、缺失或添加而形成的衍生多肽。

在另一优选例中，所述 CAR 包括 SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列。

在另一优选例中，所述嵌合抗原受体(CAR)为分离的。

- 20 在另一优选例中，所述嵌合抗原受体(CAR)的氨基酸序列如 SEQ ID NO.:1 所示。

本发明的第二方面，提供了一种核酸分子，所述核酸分子编码本发明第一方面所述的嵌合抗原受体(CAR)。

- 25 在另一优选例中，所述核酸分子包含选自下组的编码所述 CD8 的铰链区和跨膜区的核酸序列：

- (a) 编码如 SEQ ID NO.:17 所示多肽的多核苷酸；
(b) 序列如 SEQ ID NO.:3 所示的多核苷酸；
(c) 核苷酸序列与 SEQ ID NO.:3 所示序列的同源性 $\geq 90\%$ (较佳地 $\geq 95\%$)，并
30 且编码 SEQ ID NO.:17 所示氨基酸序列的多核苷酸；
(d) 与(a)-(c)任一所述的多核苷酸互补的多核苷酸。

在另一优选例中，所述核酸分子包含选自下组的编码所述 CD137 的胞内信号结构域的核酸序列：

- (a) 编码如 SEQ ID NO.:18 所示多肽的多核苷酸；
35 (b) 序列如 SEQ ID NO.:4 所示的多核苷酸；
(c) 核苷酸序列与 SEQ ID NO.:4 所示序列的同源性 $\geq 90\%$ (较佳地 $\geq 95\%$)，并且编码 SEQ ID NO.:18 所示氨基酸序列的多核苷酸；
(d) 与(a)-(c)任一所述的多核苷酸互补的多核苷酸。

- 40 在另一优选例中，所述核酸分子包含选自下组的编码所述 CD3 ζ 的胞内信号结构域的核酸序列：

(a) 编码如 SEQ ID NO. :19 所示多肽的多核苷酸;
(b) 序列如 SEQ ID NO. :5 所示的多核苷酸;
(c) 核苷酸序列与 SEQ ID NO. :5 所示序列的同源性 $\geq 90\%$ (较佳地 $\geq 95\%$), 并且编码 SEQ ID NO. :19 所示氨基酸序列的多核苷酸;

5 (d) 与(a)-(c)任一所述的多核苷酸互补的多核苷酸。
在另一优选例中, 所述核酸分子包含选自下组的核酸序列:

(a) 编码如 SEQ ID NO. :9 所示多肽的多核苷酸;
(b) 序列如 SEQ ID NO. :10 所示的多核苷酸;
(c) 核苷酸序列与 SEQ ID NO. :10 所示序列的同源性 $\geq 95\%$ (较佳地 $\geq 98\%$),
10 并且编码 SEQ ID NO. :9 所示氨基酸序列的多核苷酸;
(d) 与(a)-(c)任一所述的多核苷酸互补的多核苷酸。

在另一优选例中, 所述核酸分子为分离的。

在另一优选例中, 所述核酸分子还包括编码前导序列(信号肽)的多核苷酸, 所述前导序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO. : 21 所示;

15 在另一优选例中, 所述核酸分子的序列如 SEQ ID NO. :2 所示。

本发明的第三方面, 提供了一种载体, 所述的载体含有本发明第二方面所述的核酸分子。

在另一优选例中, 所述载体为慢病毒载体。

20

本发明的第四方面, 提供了一种细胞, 所述的细胞中含有本发明第三方面所述的载体或染色体中整合有外源的本发明第二方面所述的核酸分子。

在另一优选例中, 所述细胞为分离的细胞, 和/或所述细胞为基因工程化的细胞。

25 在另一优选例中, 所述细胞为哺乳动物细胞。

在另一优选例中, 所述细胞为 NKT 细胞、或 T 细胞。

在另一优选例中, 所述 T 细胞为 NKT 细胞。

30 本发明的第五方面, 提供了一种药物组合物, 所述组合物含有药学上可接受的载体以及本发明第一方面所述的嵌合抗原受体、本发明第二方面所述的核酸分子、本发明第三方面所述的载体、或本发明第四方面所述的细胞。

35 本发明的第六方面, 提供了本发明第一方面所述的嵌合抗原受体、本发明第二方面所述的核酸分子、本发明第三方面所述的载体、或本发明第四方面所述的细胞的用途, 用于制备治疗肿瘤的药物或制剂。

在另一优选例中, 所述的肿瘤包括 CD30 阳性的淋巴瘤。

在另一优选例中, 所述淋巴瘤为霍奇金淋巴瘤。

40 本发明的第七方面, 提供了一种治疗疾病的方法, 包括给需要治疗的对象施用适量的本发明第一方面所述的嵌合抗原受体、本发明第二方面所述的核酸分子、

本发明第三方面所述的载体、本发明第四方面所述的细胞、或本发明第五方面所述的药物组合物。

在另一优选例中，所述疾病为肿瘤。

5 本发明的第八方面，提供了一种嵌合抗原受体，所述嵌合抗原受体以 CD8 的 hinge 区和跨膜区及 CD137 和 CD3 ζ 的胞内信号结构域串联而成的结构为信号传导结构域，所述信号传导结构域氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 所示。

本发明还提供了一种嵌合抗原受体，所述嵌合抗原受体为
10 CD30ScFv-CD8-CD137-CD3 ζ ，由 CD30 单链抗体 CD30ScFv、CD8 的铰链区（hinge 区）和跨膜区、CD137 的胞内信号结构域和 CD3 ζ 的胞内信号结构域串联构成。

本发明还提供了编码上述嵌合抗原受体的基因。

本发明还提供了含有上述基因的重组表达载体。

本发明还提供了一种工程化 CD30 靶向性的 NKT 细胞，所述 NKT 细胞是上
15 述嵌合抗原受体 CD30ScFv-CD8-CD137-CD3 ζ 修饰的 NKT 细胞。

本发明还提供了上述工程化 CD30 靶向性的 NKT 细胞在制备用于治疗肿瘤的制剂中的应用。

在治疗 CD30 阳性的霍奇金淋巴瘤及非霍奇金淋巴瘤时，本发明的嵌合抗原受体 CD30ScFv-CD8-CD137-CD3 ζ 修饰的 NKT 细胞，即工程化 CD30 靶向性的
20 NKT 细胞能够特异性结合 CD30 抗原，明显延长免疫细胞在患者体内的存活时间，增强免疫细胞靶向识别霍奇金淋巴瘤细胞及非霍奇金淋巴瘤细胞 CD30 抗原的能力，加强对霍奇金淋巴瘤细胞及非霍奇金淋巴瘤细胞的特异杀伤活性，而且对已经过多次治疗（如采用 CD30 单克隆抗体结合细胞毒素药物或者放射性同位素治疗等）但均无明显疗效的 CD30 阳性的霍奇金淋巴瘤患者有一定的治疗效果。本
25 发明的工程化 CD30 靶向性的 NKT 细胞为治疗 CD30 阳性的霍奇金淋巴瘤及非霍奇金淋巴瘤提供了一种新的选择，具有良好的产业应用前景。

本发明的其它特征和优点将在随后的具体实施方式部分予以详细说明。

应理解，在本发明范围内中，本发明的上述各技术特征和在下文（如实施例）
30 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

图 1 为流式细胞术对分离培养的 NKT 细胞表型分析的结果。

35 图 2 为本发明的慢病毒表达载体 pWPT-CD8-CD137-CD3 ζ 的限制性内切酶 *MluI*/*SaI* 双酶切片段的电泳鉴定图。

图 3 为本发明的慢病毒表达载体 pWPT-CD30ScFv-CD8-CD137-CD3 ζ 的限制性内切酶 *BamHI*/*SaI* 双酶切片段的电泳鉴定图。

40 图 4 为本发明的慢病毒表达载体 pWPT-CD30ScFv-CD8-CD137-CD3 ζ 的结构示意图，其中，逆时针序列为正向基因片段，顺时针为反向基因片段。

图 5 为流式细胞术检测含有嵌合抗原受体 CD30ScFv-CD8-CD137-CD3 ζ 的病毒浓缩液对 NKT 细胞的感染效率。

图 6 为流式细胞术检测嵌合抗原受体 CD30ScFv-CD8-CD137-CD3 ζ 修饰的 NKT 细胞 (CAR30-NKT 细胞) 表型鉴定的结果。

图 7 为本发明的 CAR30-NKT 细胞对 CD30 阳性的人霍奇金淋巴瘤细胞的杀伤作用的细胞毒性分析图。

图 8 为本发明的 CAR30-NKT 细胞对 CD30 阳性的霍奇金淋巴瘤患者治疗过程中, 患者白细胞总数、淋巴细胞总数、患者体温水平及白介素 6 水平的变化趋势图。

图 9 为本发明的 CAR30-NKT 细胞对 CD30 阳性的霍奇金淋巴瘤患者 (肝转移) 治疗前后, 患者肝转移病灶的影像图变化。

具体实施方式

以下对本发明的具体实施方式进行详细说明。应当理解的是, 此处所描述的具体实施方式仅用于说明和解释本发明, 并不用于限制本发明。

本发明的发明人在研究中意外发现, 采用嵌合抗原受体 CD30ScFv-CD8-CD137-CD3 ζ 修饰的 NKT 细胞治疗 CD30 阳性的霍奇金淋巴瘤及非霍奇金淋巴瘤时, 对淋巴瘤细胞具有很好的特异杀伤活性, 且对已经过多次治疗 (如采用 CD30 单克隆抗体结合细胞毒素药物或者放射性同位素治疗等) 但均无明显疗效的 CD30 阳性的霍奇金淋巴瘤患者有一定的治疗效果。在此基础上完成了本发明。

本发明提供了一种嵌合抗原受体, 所述嵌合抗原受体为 CD30ScFv-CD8-CD137-CD3 ζ , 由 CD30 单链抗体 CD30ScFv、CD8 的铰链区和跨膜区、CD137 的胞内信号结构域和 CD3 ζ 的胞内信号结构域串联构成。优选情况下, 嵌合抗原受体的氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示。

本发明提供了编码上述嵌合抗原受体的基因。优选情况下, 编码上述嵌合抗原受体的基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO.2 所示。

本发明提供了含有上述基因的重组表达载体。优选情况下, 重组表达载体为慢病毒表达载体。对于慢病毒表达载体没有特别的限定, 只要能够与辅助载体共转染包装细胞如 293T 包装细胞, 获得病毒浓缩液及嵌合抗原受体 CD30ScFv-CD8-CD137-CD3 ζ 修饰的 NTK 细胞即可, 优选情况下, 慢病毒表达载体为 pWPT-CD30ScFv-CD8-CD137-CD3 ζ 。

对于慢病毒表达载体 pWPT-CD30ScFv-CD8-CD137-CD3 ζ 的制备方法没有特别的限定, 可以为本领域技术人员能够想到的各种方法, 优选情况下, 慢病毒表达载体 pWPT-CD30ScFv-CD8-CD137-CD3 ζ 的制备方法包括以下步骤:

(1) 从 NKT 细胞 cDNA 中分别扩增 CD8 的 hinge 区和跨膜区、CD137 的胞内信号结构域和 CD3 ζ 的胞内信号结构域, 并克隆至载体 pWPT-GFP 中, 构建得到 pWPT-CD8-CD137-CD3 ζ ;

(2) 合成编码大鼠生长激素信号肽和 CD30ScFv 的核苷酸序列, 并克隆至

pWPT-CD8-CD137-CD3 ζ 中，经测序验证后得到序列正确的 pWPT-CD30ScFv-CD8-CD137-CD3 ζ 。

步骤(1)中，对于从 NKT 细胞 cDNA 中分别扩增 CD8 的 hinge 区和跨膜区、CD137 的胞内信号结构域和 CD3 ζ 的胞内信号结构域的方法没有特别的限定，可以为本领域常用的各种方法，例如可以为 RT-PCR 法。其中，NKT 细胞可以通过分离人静脉血中的单个核细胞，然后进行培养获得。

具体地，得到 pWPT-CD8-CD137-CD3 ζ 的方法可以包括：提取 NKT 细胞的总 RNA，逆转录获得 NKT 细胞 cDNA，以得到的 NKT 细胞 cDNA 为模板，利用引物 P1 (SEQID NO.11) 和 P2 (SEQID NO.12) 进行 PCR 扩增获得 CD8 基因的 hinge 区和跨膜区 (SEQID NO.3)；利用引物 P3 (SEQID NO.13) 和 P4 (SEQID NO.14) 进行 PCR 扩增获得 CD137 基因的胞内信号结构域 (SEQID NO.4)；利用引物 P5 (SEQID NO.15) 和 P6 (SEQID NO.16) 进行 PCR 扩增获得 CD3 ζ 基因的胞内信号结构域 (SEQID NO.5)，将获得的 PCR 产物分别进行双酶切，然后与 *MluI/SalI* 双酶切后的慢病毒表达载体 pWPT-GFP 连接。

步骤(2)中，对于合成编码大鼠生长激素信号肽和 CD30ScFv 的核苷酸序列的方法没有特别的限定，可以为本领域常用的各种方法，例如可以通过全基因合成技术合成。

具体地，得到序列正确的 pWPT-CD30ScFv-CD8-CD137-CD3 ζ 的方法可以包括：通过全基因合成技术合成编码大鼠生长激素信号肽和 CD30ScFv 融合基因的核苷酸序列 (SEQID NO.8)，克隆至载体 pGSI 中，得到 pGSI-CD30ScFv；然后将 pGSI-CD30ScFv 进行 *BamHI/MluI* 双酶切，与 *BamHI/MluI* 双酶切后的步骤(1)得到的重组质粒 pWPT-CD8-CD137-CD3 ζ 连接，经测序鉴定，得到序列正确的 pWPT-CD30ScFv-CD8-CD137-CD3 ζ 。其中，大鼠生长激素信号肽的核苷酸序列如 SEQID NO.6 所示，CD30ScFv 核苷酸序列如 SEQID NO.7 所示。

本发明还提供了一种工程化 CD30 靶向性的 NKT 细胞，所述 NKT 细胞是由上述嵌合抗原受体 CD30ScFv-CD8-CD137-CD3 ζ 修饰的 NKT 细胞(即 CAR30-NKT 细胞)。

对于工程化 CD30 靶向性的 NKT 细胞的制备方法没有特别的限定，可以为本领域技术人员能够想到的任何方法，优选情况下，该方法包括：包装携带 pWPT-CD30ScFv-CD8-CD137-CD3 ζ 编码基因的慢病毒；利用得到的慢病毒感染 NKT 细胞，使 NKT 细胞表达嵌合抗原受体 CD30ScFv-CD8-CD137-CD3 ζ 。

对于包装携带 pWPT-CD30ScFv-CD8-CD137-CD3 ζ 编码基因的慢病毒的方法没有特别的限定，可以为本领域技术人员常用的各种方法，优选情况下，将慢病毒表达载体 pWPT-CD30ScFv-CD8-CD137-CD3 ζ 与辅助质粒(如 psPAX2、pMD2.G)共转染 293T 包装细胞，转染 48-72 h 时收集病毒上清，离心、过滤，在滤液中添加 5 $\times$ PEG6000-NaCl 进行混匀，离心后弃上清，沉淀用 0-4 $^{\circ}$ C 预冷的无菌 PBS 溶解，获得病毒浓缩液。

对于慢病毒感染 NKT 细胞的方法没有特别限定，可以为本领域常用的各种方法，优选情况下，该方法包括：取 1×10^7 - 5×10^7 个 NKT 细胞，弃掉旧的培养液，加入 2-4 mL 新鲜 GT-T551 培养液，再加入 200-400 μ L 病毒浓缩液、2-4 μ L

1×10⁻⁶mg/mL 鱼精蛋白和终浓度为 800-1200 U/mL 的 IL-2, 置于 30-37℃、饱和湿度为 3-6%的 CO₂ 培养箱中感染 12-16 h 后, 弃培养液, 将细胞转至未包被的培养瓶中, 加入 20-50 mL 的 GT-T551 培养基, 再加入终浓度为 800-1200 U/mL 的 IL-2, 于 30-37℃、饱和湿度为 3-6%的 CO₂ 培养箱中培养 12-18 h, 获得嵌合抗原受体 CD30ScFv-CD8 -CD137-CD3ζ 修饰的 NKT 细胞。

进一步优选地, 慢病毒感染 NKT 细胞的方法还包括: 将上述培养后获得的慢病毒感染的 NKT 细胞用 IL-2 的终浓度为 800-1200 U/mL 的 GT-T551 培养液进行体外诱导, 待细胞的密度为 80-90%时将细胞转入细胞培养袋中, 隔 1.5-2.5 天加入 IL-2 的终浓度为 800-1200 U/mL 的新鲜 GT-T551 培养液进行扩增培养并将细胞扩增至总量为 1×10⁹-2×10⁹ 个细胞。

嵌合抗原受体 CD30ScFv-CD8-CD137-CD3ζ 修饰的 NKT 细胞表达的嵌合抗原受体的成熟蛋白氨基酸序列如 SEQID NO.1 所示。其中, 本领域技术人员应该理解的是, 嵌合抗原受体前体蛋白包括串联的信号肽、CD30ScFv、CD8 的 hinge 区和跨膜区、CD137 的胞内信号结构域和 CD3ζ 的胞内信号结构域, 蛋白质翻译后在细胞内粗面型内质网切除信号肽后成为成熟嵌合抗原受体蛋白, 分泌输出后并定位于 NKT 细胞的细胞膜上。该嵌合抗原受体的成熟蛋白氨基酸序列对应的基因编码序列如 SEQID NO.2 所示。该嵌合抗原受体以基因 CD8 的 hinge 区和跨膜区及 CD137 和 CD3ζ 的胞内信号结构域串联而成的结构为信号传导结构域, 其氨基酸序列如 SEQID NO.9 所示, 对应的基因编码序列如 SEQID NO.10 所示。

本发明还提供了上述方法制备得到的工程化 CD30 靶向性的 NKT 细胞。

本发明还提供了工程化 CD30 靶向性的 NKT 细胞在制备用于治疗肿瘤的制剂中的应用。优选情况下, 肿瘤是 CD30 阳性的淋巴瘤。所述淋巴瘤可以为霍奇金淋巴瘤或非霍奇金淋巴瘤, 进一步优选地, 所述淋巴瘤为霍奇金淋巴瘤。

本发明提供了治疗癌症等疾病的组合物和方法。该癌症可为实体瘤、原发性肿瘤或转移性肿瘤或血液学恶性肿瘤。利用本发明的组合物和方法可治疗的其他疾病包括病毒、细菌和寄生虫感染以及自身免疫疾病。

NKT 细胞

自然杀伤细胞(NKT)是一种特殊类型的 T 淋巴细胞亚群, 具有 T 细胞和 NK 细胞两重性质。NKT 细胞能表达 T 细胞的 TCR 与 NK 细胞的 NKR-P1 两种受体, 在 TCR 和 NKR 介导下, NKT 细胞能够产生大量的 IL-4 及 INFγ, 对肿瘤细胞发挥细胞杀伤作用。NKT 细胞通过自身表面的 CD16 与特异性抗体的 Fc 段结合, 发挥 ADCC (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity)作用。

NKT 细胞的功能主要包括免疫调节和细胞毒作用, NKT 细胞受到刺激后, 可以分泌大量的 IL-4, IFN-γ, GM-CSF, IL-13 和其它细胞因子和趋化因子, 发挥免疫调节作用, NKT 细胞是联系固有免疫和获得性免疫的桥梁之一。NKT 细胞活化后具有 NK 细胞样细胞毒活性, 可溶解 NK 细胞敏感的靶细胞, 主要效应分子为穿孔素, Fas 配体以及 IFN-γ。

但在抗体依赖的细胞介导的杀伤作用过程中, 由于抗体能与靶细胞上的相应

抗原表位特异性结合，NKT 细胞可杀伤任何已与抗体结合的靶细胞，因此抗体与靶细胞上的抗原结合是特异性的，但NKT细胞对靶细胞的杀伤作用是非特异性的。

NKT 细胞的制备方法

本领域中已存在已知的 NKT 细胞、T 细胞的制备方法，以及活化和扩增方法，例如可以分别参考文献：Motohashi, S., Nagato, K., Kuniti, N., Yamamoto, H., Yamasaki, K., Okita, K., Hanaoka, H., Shimizu, N., Suzuki, M., Yoshino, I., Taniguchi, M., Fujisawa, T. and Nakayama, T., A phase I-II study of alpha-galactosylceramide-pulsed IL-2/GM-CSF-cultured peripheral blood mononuclear cells in patients with advanced and recurrent non-small cell lung cancer. J Immunol 2009. 182: 2492-2501; D.L. Porter, B.L. Levine, M. Kalos, A. Bagg, C.H. June, Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia, The New England journal of medicine, 2011.365:725-733.

在本发明的一个较佳的实施方式中，改良的制备 NKT 细胞的方法如下。

(1)取人静脉血于含肝素的真空管中。采用淋巴细胞分离液，通过密度梯度离心方法分离获得单个核细胞(PBMCs)。

(2)PBMCs 洗三次后，采用含有 0.6 体积%的人自体血清的 NKT 细胞培养基 GT-T551 调整细胞终浓度为 2×10^6 个细胞/mL；将细胞接种于预先经过终浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 的 retronectin 包被的 75 cm^2 细胞培养瓶中。然后在培养基里加入终浓度为 500 U/mL 的重组人白介素 2，50 ng/ml CD3 单克隆抗体，50 ng/mL 的重组人白介素-15，在 37℃、饱和湿度为 5% 的 CO_2 培养箱中培养。

(3)培养第 4 天，将细胞转移至未包被的培养瓶中，并每 2-3 天按照细胞生长状况加入培养液，及人重组 IL-2 浓度为 500 U/ml；第 12-16 天，得到 NKT 细胞，流式细胞术对 NKT 细胞表型进行分析。

采用本发明方法制得的 NKT 细胞群中，CD3+CD8+NKT 细胞/CD3+CD4+NKT 细胞的比率为 10/1 ~ 4/1(优选为 9/1 ~ 6/1)；并且 CD3+CD56+ NKT 细胞/CD3+CD8+ NKT 细胞的比率为 1/18 ~ 10/18(优选为 5/18 ~ 10/18)。

并且 NKT 细胞群中，CD3+细胞比率 $\geq 95\%$ ；CD3⁺CD8⁺细胞比率 $\geq 90.99\%$ ；CD3⁺CD56⁺细胞比率 $\geq 15\%$ (优选地， $\geq 18\%$ ；更优选地 $\geq 20\%$ ；最优选地 $\geq 22\%$ ，如 $\geq 24\%$ 、 $\geq 26\%$ 、 $\geq 28\%$ 、 $\geq 30\%$)；CD8⁺CD56⁺细胞比率 $\geq 15\%$ (优选地， $\geq 18\%$ ；更优选地 $\geq 20\%$ ；最优选地 $\geq 22\%$ ，如 $\geq 24\%$ 、 $\geq 26\%$ 、 $\geq 28\%$ 、 $\geq 30\%$)。。

NKT 细胞的细胞表型为 CD3+和 CD56+，表达 T 细胞受体(TCR)的可变区基因和天然杀伤(NK)细胞表面标记 NK1.1(NKR-P1C)，兼具有 T 淋巴细胞强大的抗瘤活性和 NK 细胞的非 MHC 限制性杀瘤优点。在杀伤发面，弥补了 T 细胞 MHC 限制性的局限性，杀瘤谱、杀伤能力都大大优于 T 细胞。

与传统 T 细胞不同，NKT 细胞是一群兼具 NK 功能和 T 细胞特点的特殊免疫细胞。NKT 细胞具有高度保守的 TCR 表型(TCRV α 24/V β 11-人),同时共表达 NK 细胞特有标志 CD161,它不识别由经典的 MHC- I 或 II 类分子递呈的肽类抗原，而是识别由非经典的 MHC- I 类分子呈递的糖脂类分子抗原。NKT 细胞识别由 CD1d 分子提呈的特异糖脂分子,并能够分泌大量细胞因子,参与机体的先天性免疫和获得性免疫反应。目前，多项研究证实 NKT 细胞在抗肿瘤免疫、抗感染免疫、自身

免疫病、免疫调节中发挥了重要作用，许多生理病理过程均有 NKT 细胞的参与。

传统的 T 细胞在体外存活时间比较短暂，而根据本发明的 NKT 细胞在体外存活时间较长，能够贴壁感染，感染率高。而 T 细胞感染效率低，而且感染后的 T 细胞死亡率也高。

5

嵌合抗原受体

本发明提供了包括细胞外结构域、跨膜结构域、和细胞内结构域的嵌合抗原受体(CAR)。胞外结构域包括靶-特异性结合元件(也称为抗原结合结构域)。细胞内结构域包括共刺激信号传导区和 ζ 链部分。共刺激信号传导区指包括共刺激分子的细胞内结构域的一部分。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，而不是抗原受体或它们的配体。

在 CAR 的胞外结构域和跨膜结构域之间，或在 CAR 的胞浆结构域和跨膜结构域之间，可并入接头。如本文所用的，术语“接头”通常指起到将跨膜结构域连接至多肽链的胞外结构域或胞浆结构域作用的任何寡肽或多肽。接头可包括 0-300 个氨基酸，优选地 2 至 100 个氨基酸和最优选地 3 至 50 个氨基酸。

在本发明的一个较佳的实施方式中，本发明提供了经过基因工程改造以表达 CAR 的细胞(例如，T 细胞、NKT 细胞)，其显示显著的抗肿瘤性质。本发明的 CAR 还可以包括胞外结构域，所述胞外结构域具有融合至 T 细胞抗原受体复合物 ζ 链(例如，CD3 ζ)的细胞内信号传导结构域的抗原结合结构域。本发明的 CAR 当在 NKT 细胞中表达时，能够基于抗原结合特异性改变抗原识别。示例性抗原为 CD30，因为该抗原在肺癌细胞上表达。

在一个实施方式中，本发明的 CAR 包括包含本发明特定信号传导结构域(CD8 的 hinge 区和跨膜区、CD137 和 CD3 ζ 的胞内信号结构域串联而成)，与其他方式的 CAR 相比，本发明的信号传导结构域显著增加了抗肿瘤活性和 CART 细胞的体内持久性。

抗原结合结构域

在一个实施方式中，本发明的 CAR 包括被称为抗原结合结构域的靶-特异性结合元件。抗原结合结构域的选择取决于限定靶细胞表面的配体的类型和数目。例如，可选择抗原结合结构域，以识别用作与具体疾病状态相关的靶细胞上的细胞表面标记的配体。因此，细胞表面标记的例子包括与病毒、细菌和寄生虫感染，自身免疫疾病和癌细胞相关的那些标记。

在本发明的内容中，“肿瘤抗原”指由引起免疫应答特别是 T-细胞介导的免疫应答的肿瘤细胞产生的蛋白质。本发明的 CAR 的抗原结合结构域靶向 CD30。优选地，本发明的 CAR 中的抗原结合结构域为抗-CD30scFv (single-chain antibody fragment, scFv)，其中抗-CD30scFv 的核酸序列包括 SEQ ID NO:7 中提出的序列。在一个实施方式中，抗-CD30scFv 包括编码 SEQ ID NO:20 的氨基酸序列的核酸序列。在另一个实施方式中，本发明的 CAR 的抗-CD30scFv 如 SEQ ID NO:20 所示。

40 LLHESGAEEVA KPGASVKMSC KASGYTFTTY WMHWIKQRPG QGLEWIGYIN PSTGYTDYNQ 60
NFKDKATLTA DKSSRTAYMQ LSSLTSEDST VYYCTRRGPS YGNHGAWFPY WGQGTLTVTS 120

AVSSGGGGSG GGGSGGGGST NIVMTQSPRS MSMSVGERVT LSCKASENVD TYVSWYQQKP 180
EQSPKLLIYG ASNRYTGVPD RFTGSGSATD FTLTISSVQA EDLADYHCGQ SYRYPPTFGG 240
GTKLEI 246

(SEQ ID NO.:20)。

5

绞链区和跨膜区

对于绞链区和跨膜区(跨膜结构域), CAR 可被设计以包括融合至 CAR 的胞外结构域的跨膜结构域。在一个实施方式中, 使用天然与 CAR 中的结构域之一相关联的跨膜结构域。在一些例子中, 可选择跨膜结构域, 或通过氨基酸置换进行修饰, 以避免将这样的结构域结合至相同或不同的表面膜蛋白的跨膜结构域, 从而最小化与受体复合物的其他成员的相互作用。

10

跨膜结构域可源于天然来源或合成来源。在天然来源中, 该结构域可源于任何膜结合蛋白或跨膜蛋白。具体用于本发明的跨膜区可源于 T-细胞受体的 α 、 β 或 ζ 链、CD28、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、
15 CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154(即至少包括上述中的跨膜区(一个或多个))。

优选地, 本发明的 CAR 中的绞链区和跨膜区为 CD8 的绞链区和跨膜区。在一个实施方式中, 编码 CD8 的绞链区和跨膜区的核苷酸序列包括 SEQ ID NO:3 的核酸序列。在本发明的一个优选的实施方式中, CD8 的绞链区和跨膜区包括以下
20 氨基酸序列:

LSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGG
AVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC (SEQ ID NO.:17)

胞内结构域

25

本发明的 CAR 的胞内结构域或另外的细胞内信号传导结构域是造成其中已放置 CAR 的免疫细胞的至少一种正常效应子功能的活化的原因。术语“效应子功能”指的是细胞的专有功能。例如, T 细胞的效应子功能可为包括细胞因子分泌的细胞溶解活性或辅助活性。因此术语“细胞内信号传导结构域”指的是转导效应子功能信号并指导细胞实施专有功能的蛋白部分。尽管通常可使用整个细胞内信号
30 传导结构域, 但在很多例子中, 不必使用整个链。就使用细胞内信号传导结构域的截短部分而言, 这种截短部分可用于代替完整的链, 只要它转导效应子功能信号。术语细胞内信号传导结构域因此指包括足以转导效应子功能信号的细胞内信号传导结构域的任何截短部分。

用于本发明的 CAR 的细胞内信号传导结构域的优选例子包括 T 细胞受体
35 (TCR)的胞浆序列和协同行动以在抗原受体结合后开始信号转导的共受体, 以及这些序列的任何衍生物或变体和具有相同的功能能力的任何合成序列。

已知通过 TCR 单独产生的信号不足以完全活化 T 细胞, 并且也需要次级或共刺激信号。因此, T 细胞活化可被认为由两个不同类的胞浆信号传导序列介导: 通过 TCR(初级胞浆信号传导序列)开始抗原-依赖性初级活化的那些和以抗原-非
40 依赖性方式起作用以提供次级或共刺激信号(次级胞浆信号传导序列)的那些。

初级胞浆信号传导序列以刺激方式或以抑制方式调节 TCR 复合物的初级活

化。以刺激方式起作用的初级胞浆信号传导序列可包含信号传导基序，其已知为基于免疫受体酪氨酸的活化基序或 ITAM。

包含在本发明中具有具体用途的初级胞浆信号传导序列的 ITAM 的例子包括源于 TCR ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b 和 CD66d 的那些。特别优选地，本发明的 CAR 中的胞浆信号传导分子包括源于 CD3 ζ 的胞浆信号传导序列。

在优选的实施方式中，CAR 的胞浆结构域可被设计以本身包括 CD3- ζ 信号传导结构域，或可与在本发明的 CAR 的内容中有用的任何其他期望的胞浆结构域(一个或多个)联合。例如，CAR 的胞浆结构域可包括 CD3 ζ 链部分和共刺激信号传导区。共刺激信号传导区指的是包括共刺激分子的细胞内结构域的一部分 CAR。共刺激分子是淋巴细胞对抗原的有效应答所需的细胞表面分子，而不是抗原受体或它们的配体。这种分子的例子包括 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 和与 CD83 特异性结合的配体等等。因此，尽管本发明主要以 4-1BB 作为共刺激信号传导元件的例子，但其他共刺激元件也位于本发明的范围内。

本发明的 CAR 的胞浆信号传导部分内的胞浆信号传导序列可以随机或以规定的顺序相互连接。任选地，短的寡肽或多肽连接体，优选长度在 2 和 10 个氨基酸，可形成该连接。甘氨酸-丝氨酸双联体提供了特别合适的连接体。

在一个实施方式中，胞浆结构域被设计以包括 CD3 ζ 的信号传导结构域和 CD28 的信号传导结构域。在另一个实施方式中，胞浆结构域被设计以包括 CD3 ζ 的信号传导结构域和 CD137 的信号传导结构域。

在一个实施方式中，本发明的 CAR 中的胞浆结构域被设计以包括 CD137 的信号传导结构域和 CD3 ζ 的信号传导结构域，其中 CD137 的信号传导结构域包括 SEQ ID NO:4 中提出的核酸序列和 CD3- ζ 的信号传导结构域包括 SEQ ID NO:5 中提出的核酸序列。

在一个实施方式中，本发明的 CAR 中的胞浆结构域被设计以包括 CD137 的信号传导结构域和 CD3 ζ 的信号传导结构域，其中 CD137 的信号传导结构域包括编码 SEQ ID NO:18 的氨基酸序列的核酸序列，和 CD3 ζ 的信号传导结构域包括编码 SEQ ID NO:19 的氨基酸序列的核酸序列。

在一个实施方式中，本发明的 CAR 中的胞浆结构域被设计以包括 CD137 的信号传导结构域和 CD3 ζ 的信号传导结构域，其中 CD137 的信号传导结构域包括 SEQ ID NO:18 中提出的氨基酸序列，和 CD3 ζ 的信号传导结构域包括 SEQ ID NO:19 中提出的氨基酸序列。

优选地，CD137 的胞内信号结构域包含如下氨基酸序列：

KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL (SEQ ID NO.:18)

优选地，CD3 ζ 的胞内信号结构域包含如下氨基酸序列：

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGKP
RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTY
DALHMQALPPR (SEQ ID NO.:19)

载体

本发明包括包含 CAR 序列的 DNA 构建体，其中该序列包括可操作地连接至信号传导结构域的核酸序列的抗原结合结构域的核酸序列。可用于本发明的 CAR 的示例性的信号传导结构域包括抗-CD30scFv、CD8 铰链和跨膜区、和 CD137 和 CD3 ζ 胞内信号传导结构域。在一个实施方式中，本发明的 CAR 包括 SEQ ID NO:10 中提出的核酸序列。在另一个实施方式中，本发明的 CAR 包括编码 SEQ ID NO:9 的氨基酸序列的核酸序列。在另一个实施方式中，本发明的 CAR 包括 SEQ ID NO:9 中提出的氨基酸序列。

编码期望分子的核酸序列可利用在本领域中已知的重组方法获得，诸如例如通过从表达基因的细胞中筛选文库，通过从已知包括该基因的载体中得到该基因，或通过利用标准的技术，从包含该基因的细胞和组织中直接分离。可选地，感兴趣的基因可被合成生产。

本发明也提供了其中插入本发明的 DNA 的载体。源于逆转录病毒诸如慢病毒的载体是实现长期基因转移的合适工具，因为它们允许转基因长期、稳定的整合并且其在子细胞中增殖。慢病毒载体具有超过源自致癌逆转录病毒诸如鼠科白血病病毒的载体的优点，因为它们可转导非增殖的细胞，诸如肝细胞。它们也具有低免疫原性的优点。

简单概括，通常通过可操作地连接编码 CAR 多肽或其部分的核酸至启动子，并将构建体并入表达载体，实现编码 CAR 的天然或合成核酸的表达。该载体适合于复制和整合真核细胞。典型的克隆载体包含可用于调节期望核酸序列表达的转录和翻译终止子、初始序列和启动子。

本发明的表达构建体也可利用标准的基因传递方案，用于核酸免疫和基因疗法。基因传递的方法在本领域中是已知的。见例如美国专利号 5,399,346、5,580,859、5,589,466，在此通过引用全文并入。在另一个实施方式中，本发明提供了基因疗法载体。

该核酸可被克隆入许多类型的载体。例如，该核酸可被克隆入如此载体，其包括但不限于质粒、噬菌粒、噬菌体衍生物、动物病毒和粘粒。特定的感兴趣载体包括表达载体、复制载体、探针产生载体和测序载体。

进一步地，表达载体可以以病毒载体形式提供给细胞。病毒载体技术在本领域中是公知的并在例如 Sambrook 等 (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York) 和其他病毒学和分子生物学手册中进行了描述。可用作载体的病毒包括但不限于逆转录病毒、腺病毒、腺伴随病毒、疱疹病毒和慢病毒。通常，合适的载体包含在至少一种有机体中起作用的复制起点、启动子序列、方便的限制酶位点和一个或多个可选择的标记(例如，WO01/96584；WO01/29058；和美国专利号 6,326,193)。

已经开发许多基于病毒的系统，用于将基因转移入哺乳动物细胞。例如，逆转录病毒提供了用于基因传递系统的方便的平台。可利用在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。在一些

实施方式中，使用腺病毒载体。许多腺病毒载体在本领域中是已知的。在一个实施方式中，使用慢病毒载体。

额外的启动子元件，例如增强子，可以调节转录开始的频率。通常地，这些位于起始位点上游的 30-110bp 区域中，尽管最近已经显示许多启动子也包含起始位点下游的功能元件。启动子元件之间的间隔经常是柔性的，以便当元件相对于另一个被倒置或移动时，保持启动子功能。在胸苷激酶(tk)启动子中，启动子元件之间的间隔可被增加隔开 50bp，活性才开始下降。取决于启动子，表现出单个元件可合作或独立地起作用，以启动转录。

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。该启动子序列为能够驱动可操作地连接至其上的任何多核苷酸序列高水平表达的强组成型启动子序列。合适的启动子的另一个例子为延伸生长因子-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、艾伯斯坦-巴尔(Epstein-Barr)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，本发明不应被限于组成型启动子的应用。诱导型启动子也被考虑为本发明的一部分。诱导型启动子的使用提供了分子开关，其能够当这样的表达是期望的时，打开可操作地连接诱导型启动子的多核苷酸序列的表达，或当表达是不期望的时关闭表达。诱导型启动子的例子包括但不限于金属硫蛋白启动子、糖皮质激素启动子、孕酮启动子和四环素启动子。

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

报道基因用于鉴定潜在转染的细胞并用于评价调节序列的功能性。通常地，报道基因为以下基因：其不存在于受体有机体或组织或由受体有机体或组织进行表达，并且其编码多肽，该多肽的表达由一些可容易检测的性质例如酶活性清楚表示。在 DNA 已经被引入受体细胞后，报道基因的表达在合适的时间下进行测定。合适的报道基因可包括编码荧光素酶、 β -半乳糖苷酶、氯霉素乙酰转移酶、分泌型碱性磷酸酶或绿色荧光蛋白基因的基因(例如，Ui-Tei 等，2000FEBS Letters479:79-82)。合适的表达系统是公知的并可利用已知技术制备或从商业上获得。通常，显示最高水平的报道基因表达的具有最少 5 个侧翼区的构建体被鉴定为启动子。这样的启动子区可被连接至报道基因并用于评价试剂调节启动子-驱动转录的能力。

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。在表达载体的内容中，载体可通过在本领域中的任何方法容易地引入宿主细胞，例如，哺乳动物、细菌、酵母或昆虫细胞。例如，表达载体可通过物理、化学或生物学手

段转移入宿主细胞。

将多核苷酸引入宿主细胞的物理方法包括磷酸钙沉淀、脂质转染法、粒子轰击、微注射、电穿孔等等。生产包括载体和/或外源核酸的细胞的方法在本领域中是公知的。见例如 Sambrook 等(2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)。将多核苷酸引入宿主细胞的优选方法为磷酸钙转染。

将感兴趣的多核苷酸引入宿主细胞的生物学方法包括使用 DNA 和 RNA 载体。病毒载体,特别是逆转录病毒载体,已经成为最广泛使用的将基因插入哺乳动物例如人细胞的方法。其他病毒载体可源自慢病毒、痘病毒、单纯疱疹病毒 I、腺病毒和腺伴随病毒等等。见例如美国专利号 5,350,674 和 5,585,362。

将多核苷酸引入宿主细胞的化学手段包括胶体分散系统,诸如大分子复合物、纳米胶囊、微球、珠;和基于脂质的系统,包括水包油乳剂、胶束、混合胶束和脂质体。用作体外和体内传递工具(delivery vehicle)的示例性胶体系统为脂质体(例如,人造膜囊)。

在使用非病毒传递系统的情况下,示例性传递工具为脂质体。考虑使用脂质制剂,以将核酸引入宿主细胞(体外、离体(ex vivo)或体内)。在另一方面,该核酸可与脂质相关联。与脂质相关联的核酸可被封装入脂质体的水性内部中,散布在脂质体的脂双层内,经与脂质体和寡核苷酸两者都相关联的连接分子附接至脂质体,陷入脂质体,与脂质体复合,分散在包含脂质的溶液中,与脂质混合,与脂质联合,作为悬浮液包含在脂质中,包含在胶束中或与胶束复合,或以其他方式与脂质相关联。与组合物相关联的脂质、脂质/DNA 或脂质/表达载体不限于溶液中的任何具体结构。例如,它们可存在于双分子层结构中,作为胶束或具有“坍塌的(collapsed)”结构。它们也可简单地散布在溶液中,可能形成大小或形状不均一的聚集体。脂质为脂肪物质,其可为天然发生或合成的脂质。例如,脂质包括脂肪小滴,其天然发生在细胞质以及包含长链脂肪族烃和它们的衍生物诸如脂肪酸、醇类、胺类、氨基醇类和醛类的该类化合物中。

在本发明的一个优选地实施方式中,所述载体为慢病毒载体,更优选地为 pWPT-GFP 慢病毒载体。本发明人研究证实,使用该慢病毒载体构建本发明 CAR,对 NKT 细胞的转染效率较高,且具有高度的可重复性。

在本发明的一个优选地实施方式中,所述载体中还包括信号肽序列。优选地,所述信号肽序列连接在所述抗原结合结构域核酸序列的上游。

优选地,所述信号肽为大鼠生长激素信号肽;更优选的,所述大鼠生长激素信号肽的核酸序列如 SEQ ID NO.:6 所示。本发明人在研究中,意外地发现,在本发明的载体为慢病毒载体时,使用大鼠生长激素信号肽能够显著提高包含本发明 CAR 的慢病毒载体对 NKT 细胞的转染效率。

治疗性应用

本发明包括用慢病毒载体(LV)转导的细胞(例如, NKT 细胞、T 细胞)。例如, LV 编码将特异性抗体的抗原结合结构域与 CD3- ζ 、CD137 组合的细胞内结构域联

合的 CAR。因此，在一些例子中，转导的 NKT 细胞可引起 CAR-介导的 NKT-细胞应答。

因此，本发明也提供了刺激对哺乳动物的靶细胞群或组织的 NKT 细胞-介导的免疫应答的方法，其包括以下步骤：施用给哺乳动物表达 CAR 的 NKT 细胞，其中 CAR 包括特异性地与预定靶靶相互作用的结合部分，包括例如人 CD3 ζ 的细胞内结构域的 ζ 链部分，和共刺激信号传导区。

在一个实施方式中，本发明包括一类细胞疗法，其中 NKT 细胞被基因修饰以表达 CAR，和 CAR-NKT 细胞被注入需要其的接受者中。注入的细胞能够杀死接受者的肿瘤细胞。不像抗体疗法，CAR-NKT 细胞能够体内复制，产生可导致持续肿瘤控制的长期持久性。

在一个实施方式中，本发明的 CAR-NKT 细胞可经历稳固的体内 NKT 细胞扩展并可持续延长的时间量。另外，CAR 介导的免疫应答可为过继免疫疗法步骤的一部分，其中 CAR-修饰 NKT 细胞诱导对 CAR 中的抗原结合结构域特异性的免疫应答。例如，抗 CD30CAR-NKT 细胞引起抗表达 CD30 的细胞的特异性免疫应答。

尽管本文公开的数据具体公开了包括抗- CD30scFv、CD8 铰链和跨膜区、和 CD137 和 CD3 ζ 信号传导结构域的慢病毒载体，但本发明应被解释为包括对构建体组成部分中的每一个的任何数量的变化。

可治疗的癌症包括没有被血管化或基本上还没有被血管化的肿瘤，以及血管化的肿瘤。癌症可包括非实体瘤(诸如血液学肿瘤，例如白血病和淋巴瘤)或可包括实体瘤。用本发明的 CAR 治疗的癌症类型包括但不限于癌、胚细胞瘤和肉瘤，和某些白血病或淋巴恶性肿瘤、良性和恶性肿瘤、和恶性瘤，例如肉瘤、癌和黑素瘤。也包括成人肿瘤/癌症和儿童肿瘤/癌症。

血液学癌症为血液或骨髓的癌症。血液学(或血原性)癌症的例子包括白血病，包括急性白血病(诸如急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞白血病、急性骨髓性白血病和成髓细胞性、前髓细胞性、粒-单核细胞型、单核细胞性和红白血病)、慢性白血病(诸如慢性髓细胞(粒细胞性)白血病、慢性骨髓性白血病和慢性淋巴细胞白血病)、真性红细胞增多症、淋巴瘤、霍奇金氏疾病、非霍奇金氏淋巴瘤(无痛和高等级形式)、多发性骨髓瘤、瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症、重链疾病、骨髓增生异常综合征、多毛细胞白血病和脊髓发育不良。

实体瘤为通常不包含囊肿或液体区的组织的异常肿块。实体瘤可为良性或恶性的。不同类型的实体瘤以形成它们的细胞类型命名(诸如肉瘤、癌和淋巴瘤)。实体瘤诸如肉瘤和癌的例子包括纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤间皮瘤、淋巴恶性肿瘤、胰腺癌卵巢癌、。

在一个实施方式中，本发明的 CAR 的抗原结合结构域被设计以治疗具体的癌症。例如，被设计以靶向 CD30 的 CAR 可用于治疗癌症和紊乱，包括但不限于肺癌等。

在一个实施方式中，针对癌症和紊乱可利用靶向 CD19、CD20、CD22 和 ROR1 的 CAR 的组合进行治疗。

本发明的 CAR-修饰 T 细胞也可用作对哺乳动物离体免疫和/或体内疗法的疫苗类型。优选地，哺乳动物为人。

对于离体免疫,以下中的至少一项在将细胞施用进入哺乳动物前在体外发生:
i)扩展细胞, ii)将编码 CAR 的核酸引入细胞, 和/或 iii)冷冻保存细胞。

离体程序在本领域中是公知的,并在以下更完全地进行讨论。简单地说,细胞从哺乳动物(优选人)中分离并用表达本文公开的 CAR 的载体进行基因修饰(即,体外转导或转染)。CAR-修饰的细胞可被施用给哺乳动物接受者,以提供治疗益处。哺乳动物接受者可为人,和 CAR-修饰的细胞可相对于接受者为自体的。可选地,细胞可相对于接受者为同种异基因的、同基因的(syngeneic)或异种的。

在此通过引用并入的在美国专利号 5,199,942 中描述的造血干细胞和祖细胞的离体扩展程序,可被应用至本发明的细胞。其他合适的方法在本领域中是已知的,因此本发明不限于细胞离体扩展的任何具体方法。简单地说, T 细胞的离体培养和扩展包括:(1)从外周血收获物或骨髓外植体收集来自哺乳动物的 CD34+造血干细胞和祖细胞;和(2)离体扩展这样的细胞。除了美国专利号 5,199,942 中描述的细胞生长因子,其他因子诸如 flt3-L、IL-1、IL-3 和 c-kit 配体,也可用于培养和扩展细胞。

除了就离体免疫而言使用基于细胞的疫苗之外,本发明也提供了体内免疫以引起针对患者中抗原的免疫应答的组合物和方法。

通常地,如本文所述活化和扩展的细胞可用于治疗和预防无免疫应答的个体中产生的疾病。特别地,本发明的 CAR-修饰的 T 细胞用于治疗 CCL。在某些实施方式中,本发明的细胞用于治疗处于形成 CCL 风险中的患者。因此,本发明提供了治疗或预防 CCL 的方法,其包括施用给需要其的对象治疗有效量的本发明的 CAR-修饰的 T 细胞。

本发明的 CAR-修饰的 T 细胞可被单独施用或作为药物组合物与稀释剂和/或与其他组分诸如 IL-2 或其他细胞因子或细胞群结合施用。简单地说,本发明的药物组合物可包括如本文所述的靶细胞群,与一种或多种药学或生理学上可接受载体、稀释剂或赋形剂结合。这样的组合物可包括缓冲液诸如中性缓冲盐水、硫酸盐缓冲盐水等等;碳水化合物诸如葡萄糖、甘露糖、蔗糖或葡聚糖、甘露醇;蛋白质;多肽或氨基酸诸如甘氨酸;抗氧化剂;螯合剂诸如 EDTA 或谷胱甘肽;佐剂(例如,氢氧化铝);和防腐剂。本发明的组合物优选配制用于静脉内施用。

本发明的药物组合物可以以适于待治疗(或预防)的疾病的方式施用。施用的数量和频率将由这样的因素确定,如患者的病症、和患者疾病的类型和严重程度——尽管适当的剂量可由临床试验确定。

当指出“免疫学上有效量”、“抗肿瘤有效量”、“肿瘤-抑制有效量”或“治疗量”时,待施用的本发明组合物的精确量可由医师确定,其考虑患者(对象)的年龄、重量、肿瘤大小、感染或转移程度和病症的个体差异。可通常指出:包括本文描述的 T 细胞的药物组合物可以以 10^4 至 10^9 个细胞/kg 体重的剂量,优选 10^5 至 10^6 个细胞/kg 体重的剂量(包括那些范围内的所有整数值)施用。T 细胞组合物也可以以这些剂量多次施用。细胞可通过使用免疫疗法中公知的注入技术(见例如 Rosenberg 等, NewEng.J. of Med.319:1676, 1988)施用。对于具体患者的最佳剂量和治疗方案可通过监测患者的疾病迹象并因此调节治疗由医学领域技术人员容易地确定。

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

在本发明的某些实施方式中，利用本文描述的方法或本领域已知的其他将NKT细胞扩展至治疗性水平的方法活化和扩展的细胞，与任何数量的有关治疗形式结合(例如，之前、同时或之后)施用给患者，所述治疗形式包括但不限于用以下试剂进行治疗：所述试剂诸如抗病毒疗法、西多福韦和白细胞介素-2、阿糖胞苷(也已知为ARA-C)或对MS患者的那他珠单抗治疗或对牛皮癣患者的厄法珠单抗治疗或对PML患者的其他治疗。在进一步的实施方式中，本发明的NKT细胞可与以下结合使用：化疗、辐射、免疫抑制剂，诸如，环孢菌素、硫唑嘌呤、甲氨喋呤、麦考酚酯和FK506，抗体或其他免疫治疗剂。在进一步的实施方式中，本发明的细胞组合物与骨髓移植、利用化疗剂诸如氟达拉滨、外部光束放射疗法(XRT)、环磷酸胺结合(例如，之前、同时或之后)而施用给患者。例如，在一个实施方式中，对象可经历高剂量化疗的标准治疗，之后进行外周血干细胞移植。在一些实施方式中，在移植后，对象接受本发明的扩展的免疫细胞的注入。在一个额外的实施方式中，扩展的细胞在外科手术前或外科手术后施用。

施用给患者的以上治疗的剂量将随着治疗病症的精确属性和治疗的接受者而变化。人施用的剂量比例可根据本领域接受的实践实施。通常，每次治疗或每个疗程，可将 1×10^6 个至 1×10^{10} 个本发明经修饰的NKT细胞(如，CARCD30-NKT细胞)，通过例如静脉回输的方式，施用于患者。

本发明的优点包括：

1、采用本发明的嵌合抗原受体CD30ScFv-CD8-CD137-CD3 ζ 修饰的NKT细胞治疗CD30阳性的霍奇金淋巴瘤及非霍奇金淋巴瘤时，对淋巴瘤细胞具有很好的特异杀伤活性，且对已经过多次治疗(如采用CD30单克隆抗体结合细胞毒素药物或者放射性同位素治疗等)但均无明显疗效的CD30阳性的霍奇金淋巴瘤患者有显著地治疗效果；

2、本发明首次构建了一种对CD30阳性肿瘤具有显著杀伤效果的表达嵌合抗原受体的NKT细胞，并且该NKT细胞具有调节Car-T细胞群内的免疫平衡状态的功能；

3、传统的表达嵌合抗原受体的T细胞在体外存活时间比较短暂，而本发明的表达嵌合抗原受体的NKT细胞在体外存活时间较长，而且能够贴壁感染，感染效率高。而T细胞感染效率低，而且感染后的T细胞死亡率也高。

4、本发明的嵌合抗原受体，以CD8的绞链区和跨膜区及CD137和CD3 ζ 的胞内信号结构域串联而成的结构为信号传导结构域，能够保持对NKT细胞的高效转染，并且在NKT细胞内能够高效表达；

5、与传统的表达嵌合抗原受体的T细胞相比，本发明的表达嵌合抗原受体的

NKT 细胞具有显著更高的体外溶瘤活性；

6、本发明的表达嵌合抗原受体的 NKT 细胞回输至患者体内，在外周血和骨髓中可以大量扩增，并且可以不依赖于白介素 2 而持续长久的存在。

5 实施例

以下的实施例将对本发明作进一步的说明，但并不因此限制本发明。

以下实施例中的实验方法，如无特殊说明，均为本领域常规方法。下述实施例中所用的实验材料，如无特殊说明，均为自常规生化试剂商店购买得到，其中：NKT 细胞培养基 GT-T551 购自 TaKaRa 公司。

10 淋巴细胞分离液购自 TBD 公司。

CD3 单克隆抗体、重组纤维连接蛋白 (retronectin) 均购自 TaKaRa 公司。

重组人蛋白干扰素- γ 、重组人白介素 2 购自 protech 公司。

总 RNA 提取试剂盒 RNAiso Reagent、高保真 DNA 聚合酶 (PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase)、T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司。

15 RevertAid[™] First Strand cDNA Synthesis Kit 购自 Fermentas 公司。

Bgl II、EcoRI、MluI、BamHI、SalI 购自 Fermentas 公司。

琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、普通 DNA 产物纯化试剂盒、质粒小提试剂盒均购自天根生化科技有限公司。

pWPT-GFP、psPAX2、pMD2.G 均购自 Addgene 公司。

20 pGSI 购自北京天一辉远生物科技有限公司。

Trans1-T1 Phage Resistant 化学感受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司。

Lipofectamine[™] 2000 Transfection Reagent 转染试剂购自 Invitrogen 公司。

293T 包装细胞购自美国 ATCC。

25 PEG6000-NaCl 中 PEG6000 终浓度为 25.5 质量%，NaCl 终浓度为 1.2M，PEG6000 和 NaCl 均购自上海索莱宝生物科技有限公司。

胎牛血清购自德国 PAA 公司。

CD30 阳性的淋巴瘤细胞系 karpas299 及 L428 由南方医科大学提供。

5-羧基荧光素琥珀酰亚胺酯购自上海谱振生物科技有限公司。

30 膜联蛋白 V-RPE 试剂盒购自美国 BD 公司。

所有引物均由北京天一辉远生物科技有限公司合成。

实施例 1 NKT 细胞的制备

(1) 取人静脉血于含肝素的真空管中。采用淋巴细胞分离液，通过密度梯度离心方法分离获得单个核细胞 (PBMCs)。

(2) PBMCs 洗三次后，采用含有 0.6 体积%的胎牛血清的 NKT 细胞培养基 GT-T551 调整细胞终浓度为 2×10^6 个细胞/mL；将细胞接种于预先经过终浓度为 5 $\mu\text{g/mL}$ CD3 单克隆抗体及终浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 的 retronectin 包被的 75 cm^2 细胞培养瓶中。然后在培养基里加入终浓度为 1000 U/mL 的重组人蛋白干扰素- γ 和 1000 U/mL 的重组人白介素 2，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、饱和湿度为 5% 的 CO_2 培养箱中培养。

(3) 第四天, 向培养瓶中补加 100 mL 含有 0.6 体积%的胎牛血清的 NKT 细胞培养基 GT-T551, 并加入终浓度为 1000 U/mL 的重组人白介素 2。于 37°C、饱和湿度为 5%的 CO₂ 培养箱中培养 4 天, 得到 NKT 细胞, 流式细胞术对 NKT 细胞表型进行分析。结果见图 1, 其中 CD3⁺:49.64%; CD3⁺CD4⁺: 27.71%; CD3⁺CD8⁺: 21.93%; CD3⁺CD56⁺:2.95%; CD8⁺CD56⁺: 2.86%。

实施例 2 慢病毒表达载体 pWPT-CD30ScFv-CD8-CD137-CD3 ζ 的构建

(1) NKT 细胞 cDNA 的制备

离心沉淀实施例 1 培养得到的 NKT 细胞, 用总 RNA 提取试剂盒 RNAiso Reagent 提取细胞的总 RNA, -80°C 保存备用。提取的总 RNA 用逆转录试剂盒 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 逆转录得 NKT 细胞 cDNA, -20°C 保存备用。

(2) 慢病毒质粒 pWPT-CD8-CD137-CD3 ζ 的制备

设计并合成如下引物序列(其中, 下划线标记为保护碱基, 方框为酶切位点):
P1 (SEQID NO.11): GATCACGCGTCTGAGCAACTCCATCATGTACTTC

MluI

P2 (SEQID NO.12): GATCAGATCTGCAGTAAAGGGTGATAACCAGTGA

BglII

P3 (SEQID NO.13): GATCAGATCTAAACGGGGCAGAAAGAACTCC

BglII

P4 (SEQID NO.14): GATCGAATTCCAGTTCACATCCTCCTTCTTCTTCT

EcoRI

P5 (SEQID NO.15): GATCGAATTCAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCG

EcoRI

P6 (SEQID NO.16): GATCGTCGACTTAGCGAGGGGGGCAGGGC

以步骤(1)中 NKT 细胞 cDNA 为模板, 用引物 P1 和 P2 进行 PCR 扩增, 得到长 287bp 的 CD8 的 hinge 区和跨膜区, 核苷酸序列如 SEQID NO.3 所示, 两端分别含有 *MluI* 和 *BglII* 酶切位点和保护碱基; 用引物 P3 和 P4 进行 PCR 扩增, 得到长 146bp 的 CD137 胞内信号结构域, 核苷酸序列如 SEQID NO.4 所示, 两端分别含有 *BglII* 和 *EcoRI* 酶切位点及保护碱基; 用引物 P5 和 P6 进行 PCR 扩增, 得到长 359bp 的 CD3 ζ 的胞内信号结构域, 核苷酸序列如 SEQID NO.5 所示, 两端分别含有 *EcoRI* 和 *SalI* 酶切位点及保护碱基。各步 PCR 扩增反应体系相同, 以扩增 CD137 胞内信号结构域为例, 进行 PCR 扩增, PCR 反应条件参照 PrimeSTAR® HS DNA Polymerase 的说明书, 反应体系 (50 μ L) 如下:

双蒸水: 32.5 μ L

5 $\times$ 反应 buffer: 10 μ L

dNTP 混合物 (每种 2.5 mM): 4 μ L

P3 (10mM): 1 μ L

P4 (10mM): 1 μ L

NKT 细胞 cDNA (200ng/ul): 1 μ L

PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase: 0.5 μ L

将上述 PCR 产物用 1%的琼脂糖凝胶进行分离,用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒进行 DNA 片段回收。得到片段后分别进行双酶切反应,酶切产物用普通 DNA 产物纯化试剂盒回收备用。

慢病毒表达载体 pWPT-GFP 用 *MluI*/*SalI* 双酶切,酶切产物经 1%的琼脂糖凝胶进行分离,用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收大的载体片段,然后与之前回收的 CD8、CD137、CD3 ζ 片段通过 T4 DNA 连接酶连接,连接产物转化 Trans1-T1 Phage Resistant 化学感受态细胞,37 $^{\circ}$ C 培养 16 h 后挑取单克隆,37 $^{\circ}$ C, 250 rpm 培养 12 h 后用质粒小提试剂盒提取质粒。提取的质粒经限制性内切酶 *MluI* 和 *SalI* 双酶切鉴定,鉴定电泳图见图 2,其中,1 泳道: DNA 分子量标记 D2000; 2 泳道: 质粒 pWPT-GFP 的酶切片段 (835bp); 3 泳道: 质粒 pWPT-CD8-CD137-CD3 ζ 的酶切片段 (756bp)。将鉴定正确的质粒送北京天一辉远生物科技有限公司对插入的融合基因片段进行测序。将测序结果正确的重组质粒命名为 pWPT-CD8-CD137-CD3 ζ 。

(3) 慢病毒质粒 pWPT-CD30ScFv-CD8-CD137-CD3 ζ 的制备

全基因合成编码大鼠生长激素信号肽和 CD30ScFv 融合基因的核苷酸序列,序列如 SEQID NO.8 所示,由北京天一辉远生物科技有限公司合成,其 5'端含有 *BamHI*、kozak 序列,3'端含有 *MluI* 酶切位点,将前述融合基因克隆在质粒 pGSI 中,命名为 pGSI-CD30ScFv。质粒经 *BamHI*/*MluI* 双酶切,酶切产物经 1% 琼脂糖凝胶进行分离,用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收目的片段备用。

pWPT-CD8-CD137-CD3 ζ 质粒经限制性内切酶 *BamHI*/*MluI* 酶切,酶切产物经 1% 琼脂糖凝胶进行分离,用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收载体片段备用。然后与回收的含有大鼠生长激素信号肽和 CD30 ScFv 的 DNA 片段通过 T4 DNA 连接酶进行连接,具体方法见说明书。将连接产物转化 Trans1-T1 Phage Resistant 化学感受态细胞,37 $^{\circ}$ C 培养 16 h 后挑取单克隆,37 $^{\circ}$ C, 250 rpm 培养 12 h 后,用质粒小提试剂盒提取质粒。提取的质粒经限制性内切酶 *BamHI*/*SalI* 双酶切鉴定,鉴定结果如图 3 所示,其中, M1: DNA 分子量标记 D2000; 1 泳道: 质粒 pWPT-CD30ScFv-CD8-CD137-CD3 ζ 未酶切片段 (10232bp); 2 泳道: 质粒 pWPT-CD30ScFv-CD8- CD137-CD3 ζ 的酶切片段; M2: DNA 分子量标记 D15000。将鉴定正确的质粒送北京天一辉远生物科技有限公司对插入的融合基因片段进行测序。将测序结果正确的重组质粒命名为 pWPT-CD30ScFv-CD8-CD137-CD3 ζ ,其结构示意图如图 4 所示,其中包括大鼠生长激素信号肽(核苷酸序列如 SEQID NO.6 所示)、抗 CD30 单链抗体(核苷酸序列如 SEQID NO.7 所示)、CD8 的 hinge 区和跨膜区及 CD137 的胞内信号结构域和 CD3 ζ 的胞内信号结构域,其中,该嵌合抗原受体以基因 CD8 的 hinge 区和跨膜区及 CD137 和 CD3 ζ 的胞内信号结构域串联而成的结构为信号传导结构域,其氨基酸序列如 SEQID NO.9 所示,对应的基因编码序列如 SEQID NO.10 所示。

实施例 3 嵌合抗原受体 CD30ScFv-CD8-CD137-CD3 ζ 修饰的 NKT 细胞的制备

(1) 慢病毒的包装和浓缩

用分光光度计分别测定慢病毒表达质粒 pWPT-CD30ScFv-CD8-CD137-CD3 ζ 和辅助质粒 psPAX2、pMD2.G 的浓度，三种质粒以 4:2:1 的质量比用 Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent 转染试剂共转染 293T 包装细胞。分别在转染 48 h、72 h 时收集病毒上清于 50mL EP 管中，4℃，2000 g 离心 10 min，转移两次得到的上清至新 EP 管中，用 4.5 μ m 滤器过滤病毒上清；过滤的病毒上清与 5 $\times$ PEG6000-NaCl 按照 4:1 的体积比混匀，4℃静置 2 h，然后 4℃，10000 g 离心 20 min，弃上清，沉淀用 1 mL 的 4℃预冷的无菌 PBS 溶解，即得嵌合抗原受体的病毒浓缩液，按每管 100 μ L 进行分装，-80℃保存备用。

按照上述方法，利用慢病毒表达质粒 pWPT-GFP 和辅助质粒 psPAX2、pMD2.G 共转染 293T 包装细胞，收集病毒上清，浓缩，获得表达 GFP 绿色荧光蛋白的慢病毒浓缩液。

(2) 慢病毒感染 NKT 细胞及感染后细胞的扩增培养

取实施例 1 的在 75 cm² 培养瓶中培养的 1×10^7 个 NKT 细胞，弃掉旧的培养液，加入 2 mL 新鲜 NKT 细胞培养基 GT-T551、200 μ L 步骤 (1) 得到的病毒浓缩液、2 μ L 1×10^{-6} mg/mL 鱼精蛋白，终浓度为 1000 U/mL 的重组人白介素 2，置于 37℃、饱和湿度为 5% 的 CO₂ 培养箱中感染 12 小时后，弃培养液，得到的 NKT 细胞称为 CAR30-NKT 细胞。同时用表达 GFP 绿色荧光蛋白的慢病毒浓缩液对 NKT 细胞进行同步感染（得到的 NKT 细胞称为 CART-GFP 细胞），用于计算该病毒的感染效率。将感染后的细胞转至未经 CD3 和 retronectin 包被的 75 cm² 培养瓶中，加入 20 mL 的 NKT 细胞培养基 GT-T551，再加入终浓度为 1000 U/mL 的重组人白介素 2，于 37℃、饱和湿度为 5% 的 CO₂ 培养箱中培养 18 h。用流式细胞术检测该病毒的感染效率，结果如图 5 所示，感染效率为 36.38%。

(3) 体外诱导扩增 CAR30-NKT 细胞群

将上述培养后的 NKT 细胞用重组人白介素 2 的终浓度为 1000 U/mL 的 NKT 细胞培养基 GT-T551 进行体外诱导，待细胞的密度为 85% 时将细胞转入细胞培养袋中，隔 2 天加入重组人白介素 2 的终浓度为 1000 U/mL 的新鲜 NKT 细胞培养基 GT-T551 进行扩增培养，待细胞扩增到总量为 1.5×10^9 个细胞左右后，采用流式细胞仪对感染的细胞群体进行鉴定，结果见图 6，CD3⁺: 89.99%；CD3⁺CD4⁺: 58.18%；CD3⁺CD8⁺: 31.81%；CD3⁺CD56⁺: 6.38%；CD8⁺CD56⁺: 5.37%。

实施例 4 CAR30-NKT 细胞对人霍奇金淋巴瘤细胞杀伤作用的细胞毒性分析

分别取实施例 3 中制备的 CAR30-NKT 细胞、CART-GFP 细胞和实施例 1 中培养的 NKT 细胞接种于 96 孔板，用 5-羧基荧光素琥珀酰亚胺酯 (CFSE) 进行染色，与 CD30 阳性的淋巴瘤细胞系 karpas299 及 L428 以效靶比（杀伤细

胞：靶细胞）1:1，5:1，10:1，20:1，40:1 比率进行共培养，经过 24 小时的共培养后，将细胞用膜联蛋白 V-RPE 试剂盒染色，同时设置对照组分别为未加入免疫细胞杀伤处理的淋巴瘤细胞系 karpas299 及 L428，并将细胞用膜联蛋白 V-RPE 试剂盒染色。流式细胞术对细胞凋亡进行检测，细胞凋亡的量根据下面的公式计算：凋亡率=（对照-样品）/对照×100%，对照为未加免疫细胞杀伤处理的细胞存活数目；样品为加入相对应的效靶比（杀伤细胞：靶细胞）的免疫细胞杀伤处理的细胞存活数目，见图 7。嵌合抗原受体 CD30ScFv-CD8-CD137-CD3ζ 修饰的 NKT 细胞对 CD30 阳性淋巴瘤细胞具有特异杀伤活性，且 CAR30-NKT 细胞的特异杀伤活性明显优于 NKT 细胞。

实施例 5 CAR30-NKT 细胞对 CD30 阳性的霍奇金淋巴瘤患者的治疗效果

取 5×10^8 个 CD30ScFv-CD8-CD137-CD3ζ 修饰的 NKT 细胞（即 CAR30-NKT 细胞），经过 100 ml 生理盐水稀释后，连续三天静脉回输到下述 CD30 阳性的霍奇金淋巴瘤患者（在利用本发明的 CAR30-NKT 细胞进行靶向免疫治疗前，已经过多次治疗（包括采用 CD30 单克隆抗体结合细胞毒素药物或者放射性同位素治疗等），但均无明显疗效）体内，回输后对患者的治疗状况进行评估。

图 8 为血象分析 CAR30-NKT 细胞治疗 CD30 阳性的霍奇金淋巴瘤患者过程中白细胞总数、淋巴细胞总数、体温变化及白介素 6 水平的趋势图（FC 为患者治疗前采取的清髓预处理方案）。结果显示，霍奇金淋巴瘤患者治疗前表现为高热、炎症及骨痛症状（根据 VAS 疼痛评分标准为 7 级骨痛），经 CAR30-NKT 细胞治疗后患者白细胞数目逐渐减少并趋于正常状态，淋巴细胞数目逐渐增加（表明在 CD30 阳性的霍奇金淋巴瘤患者体内 CAR30-NKT 细胞能够逐渐扩增），同时患者体温及白介素 6 水平逐渐恢复至正常并能够维持在正常水平，患者骨痛症状得到缓解（根据 VAS 疼痛评分标准为 1 级骨痛）。说明 CAR30-NKT 细胞治疗 CD30 阳性的淋巴瘤患者是安全、可耐受的，而且 CAR30-NKT 细胞对 CD30 阳性的霍奇金淋巴瘤患者（经已有的多种治疗手段治疗后均无明显疗效）治疗后，对患者的疾病有一定的治疗效果。

图 9 为 CT 分析 CD30 阳性的霍奇金淋巴瘤肝转移患者，经 CAR30-NKT 细胞治疗（一个月）后，患者肝部位病灶变化。结果显示，霍奇金淋巴瘤患者治疗后肝病灶（参见箭头）明显减少，进一步说明 CAR30-NKT 细胞对 CD30 阳性的霍奇金淋巴瘤患者（经已有的多种治疗手段治疗后均无明显疗效）治疗后，对患者的疾病有明显的治疗效果。

取实施例 3 中制备的 CAR30-NKT 细胞接种于 25 厘米的细胞培养瓶进行培养，并持续收集细胞上清，采用 ELISA 试剂盒分析细胞分泌白介素 2 的水平。结果显示本发明的 CAR30-NKT 细胞在体外能持续分泌白介素 2 细胞因子，具有独特的非依赖 IL-2 性的扩增能力，避免了临床使用时体外补充 IL-2。

以上详细描述了本发明的优选实施方式，但是，本发明并不限于上述实施方式中的具体细节，在本发明的技术构思范围内，可以对本发明的技术方案进行多种简单变型，这些简单变型均属于本发明的保护范围。

另外需要说明的是，在上述具体实施方式中所描述的各个具体技术特征，在不矛盾的情况下，可以通过任何合适的方式进行组合，为了避免不必要的重复，本发明对各种可能的组合方式不再另行说明。

此外，本发明的各种不同的实施方式之间也可以进行任意组合，只要其不违背本发明的思想，其同样应当视为本发明所公开的内容。

5

权 利 要 求 书

1、一种嵌合抗原受体(CAR)，其特征在于，所述嵌合抗原受体以 CD8 的绞链区和跨膜区及 CD137 和 CD3 ζ 的胞内信号结构域串联而成的结构为信号传导结构域；并且所述嵌合抗原受体的胞外结构域为抗 CD30 的单链抗体。

2. 如权利要求 1 嵌合抗原受体(CAR)，其特征在于，所述嵌合抗原受体为 CD30ScFv-CD8-CD137-CD3 ζ ，由 CD30ScFv、CD8 的绞链区和跨膜区、CD137 的胞内信号结构域和 CD3 ζ 的胞内信号结构域串联构成。

3. 如权利要求 1 嵌合抗原受体(CAR)，其特征在于，所述嵌合抗原受体的氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示。

4. 如权利要求 1 嵌合抗原受体(CAR)，其特征在于，所述 CD8 的绞链区和跨膜区选自下组：

(A)具有 SEQ ID NO:17 所示氨基酸序列的多肽；

(B)具有与 SEQ ID NO: 17 所示氨基酸序列 $\geq 80\%$ 同源性(优选地， $\geq 90\%$ 的同源性；等优选地 $\geq 95\%$ 的同源性；最优选地， $\geq 97\%$ 的同源性)的多肽；(C)将 SEQ ID NO:17 中任一所示氨基酸序列经过 1-5 个氨基酸残基的取代、缺失或添加而形成的衍生多肽；和/或

所述 CD137 的胞内信号结构域选自下组：

(A)具有 SEQ ID NO:18 所示氨基酸序列的多肽；

(B)具有与 SEQ ID NO: 18 所示氨基酸序列 $\geq 80\%$ 同源性(优选地， $\geq 90\%$ 的同源性；优选地 $\geq 95\%$ 的同源性；最优选地， $\geq 97\%$ 的同源性)，并且能够转导效应子功能信号的多肽；

(C)将 SEQ ID NO:18 中任一所示氨基酸序列经过 1-5 个氨基酸残基的取代、缺失或添加而形成的衍生多肽；和/或

所述 CD3 ζ 的胞内信号结构域选自下组：

(A)具有 SEQ ID NO:19 所示氨基酸序列的多肽；

(B)具有与 SEQ ID NO: 19 所示氨基酸序列 $\geq 80\%$ 同源性(优选地， $\geq 90\%$ 的同源性；等优选地 $\geq 95\%$ 的同源性；最优选地， $\geq 97\%$ 的同源性)，并且能够转导效应子功能信号的多肽；

(C)将 SEQ ID NO:19 中任一所示氨基酸序列经过 1-5 个氨基酸残基的取代、缺失或添加而形成的衍生多肽。

5. 一种核酸分子，其特征在于，所述核酸分子编码权利要求 1 所述的嵌合抗原受体(CAR)。

6. 一种载体，其特征在于，所述的载体含有权利要求 2 中所述的核酸分子；优选地，所述载体为慢病毒载体。

7. 一种细胞，其特征在于，所述的细胞中含有权利要求 6 中所述的载体或染色体中整合有外源的权利要求 5 中所述的核酸分子。

8. 一种药物组合物，其特征在于，所述组合物含有药学上可接受的载体以及权利要求 1 中所述的嵌合抗原受体、权利要求 5 中所述的核酸分子、权利要求 6 中所述的载体、或权利要求 7 中所述的宿主细胞。

9. 权利要求 1 中所述的嵌合抗原受体、权利要求 5 中所述的核酸分子、权利

要求 6 中所述的载体、或权利要求 7 中所述的宿主细胞的用途，其特征在于，用于制备治疗肿瘤的药物或制剂。

10. 如权利要求 9 所述的用途，其特征在于，所述的肿瘤包括 CD30 阳性的淋巴瘤。

11. 如权利要求 10 所述的用途，其特征在于，所述淋巴瘤为霍奇金淋巴瘤。

12. 一种治疗疾病的方法，其特征在于，包括给需要治疗的对象施用适量的权利要求 1 中所述的嵌合抗原受体、权利要求 5 中所述的核酸分子、权利要求 6 中所述的载体、权利要求 7 中所述的细胞、或权利要求 8 中所述的药物组合物。

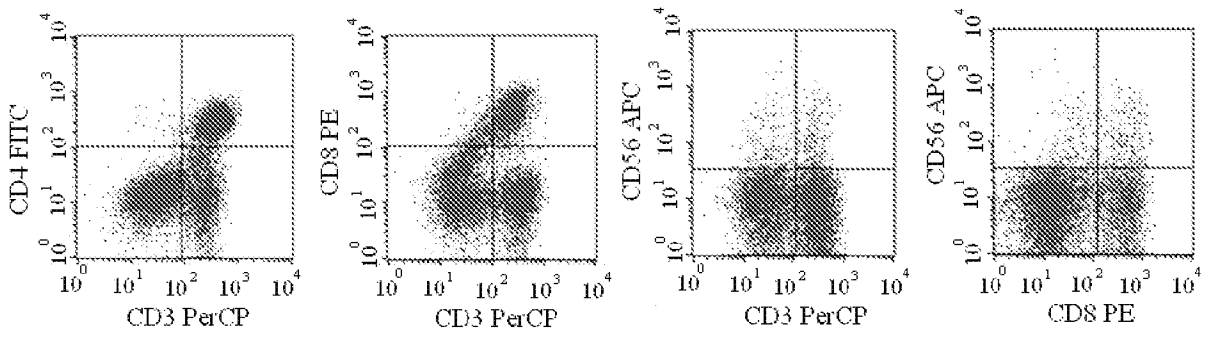


图 1

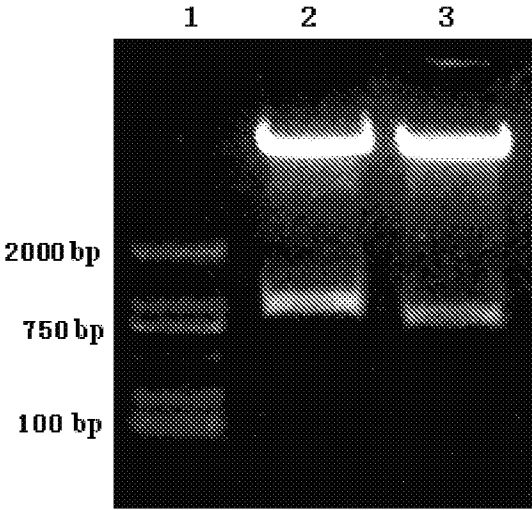


图 2

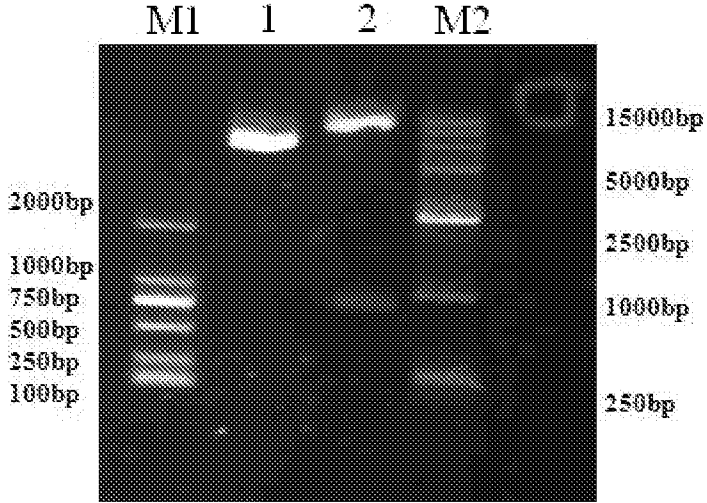


图 3

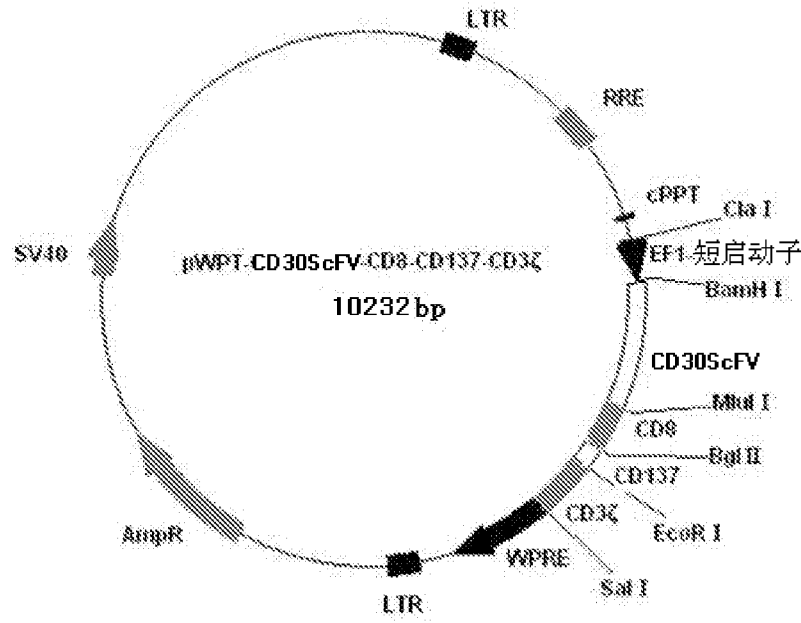


图 4

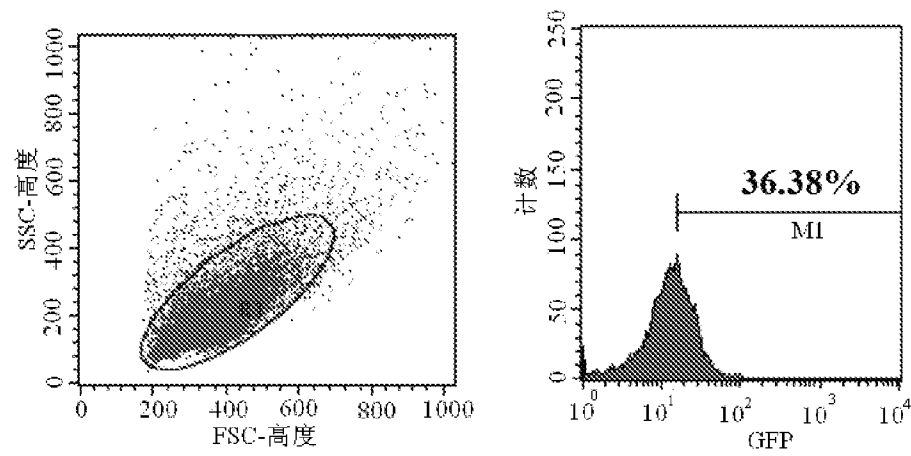


图 5

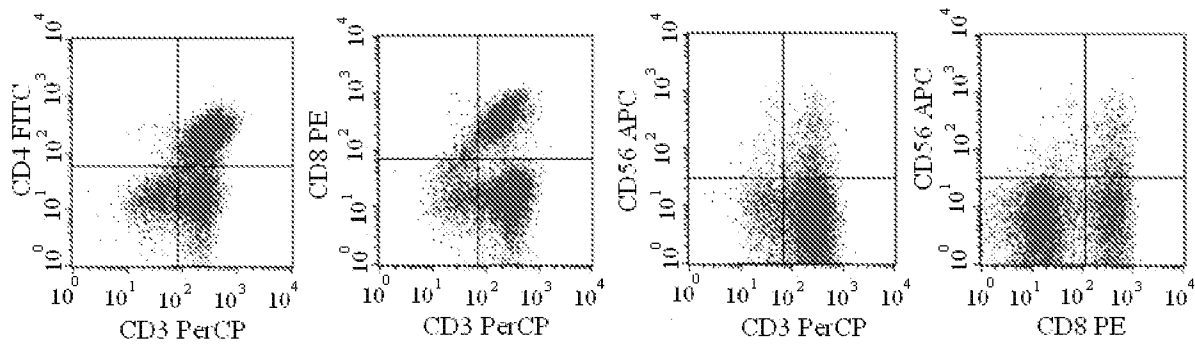


图 6

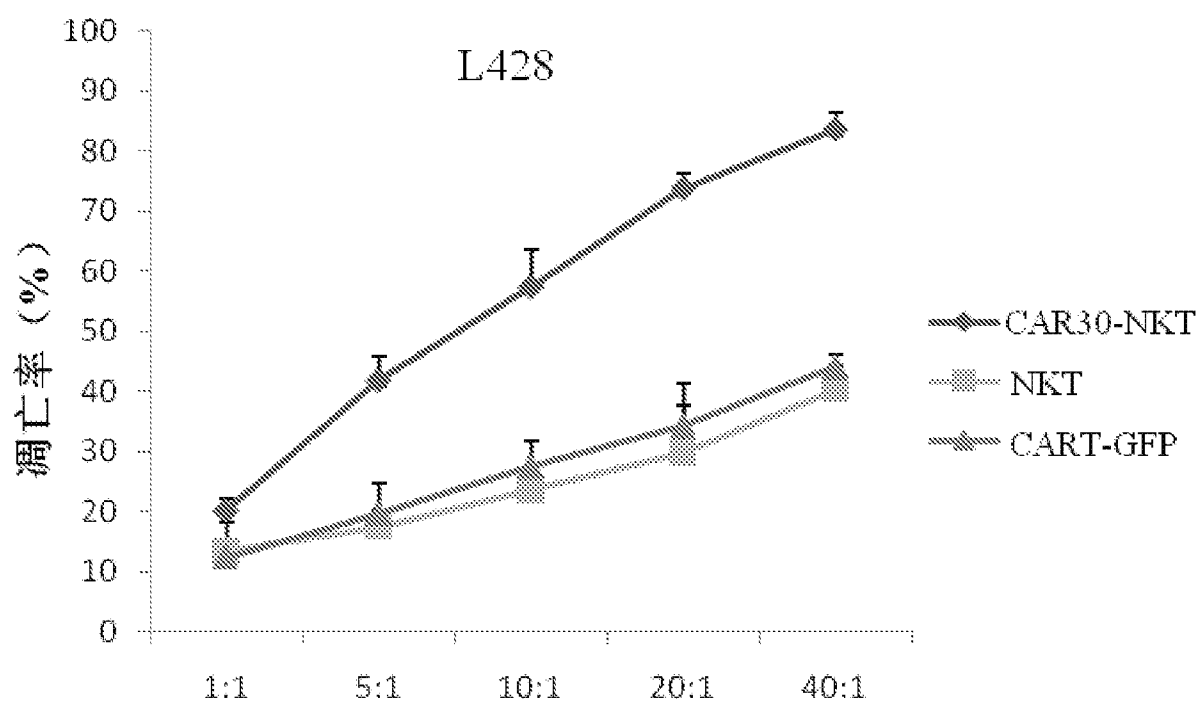
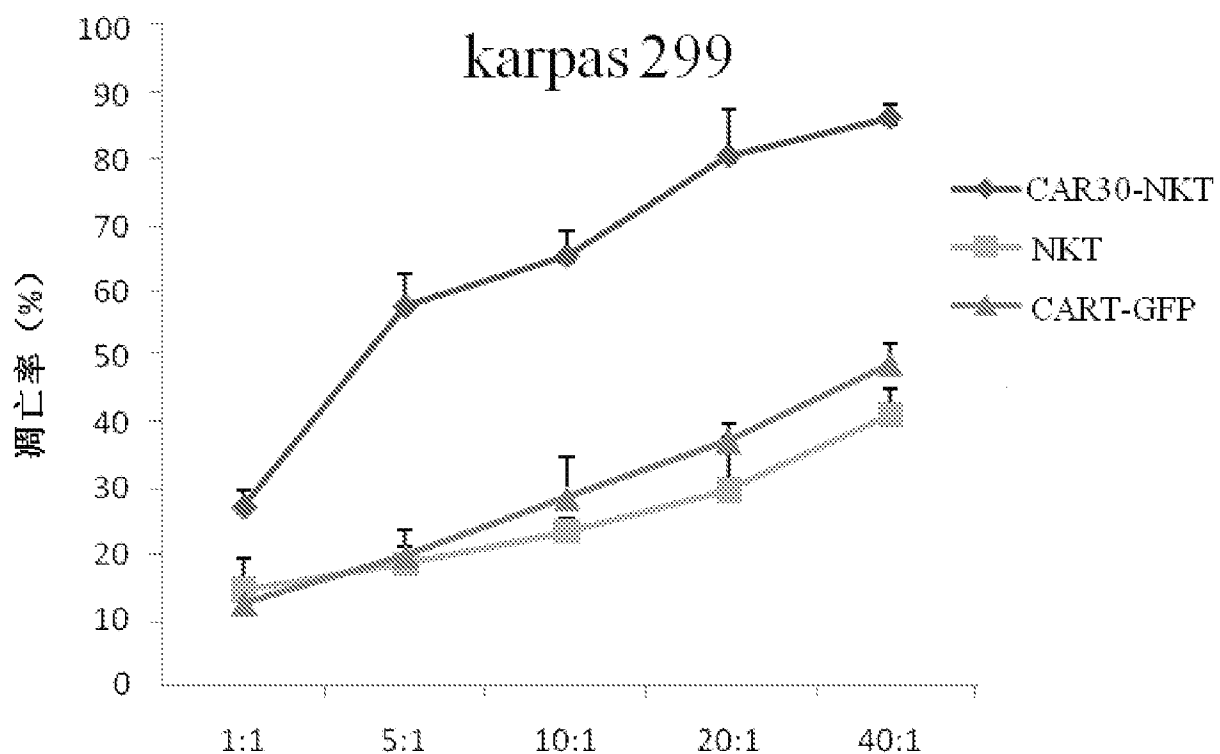


图 7

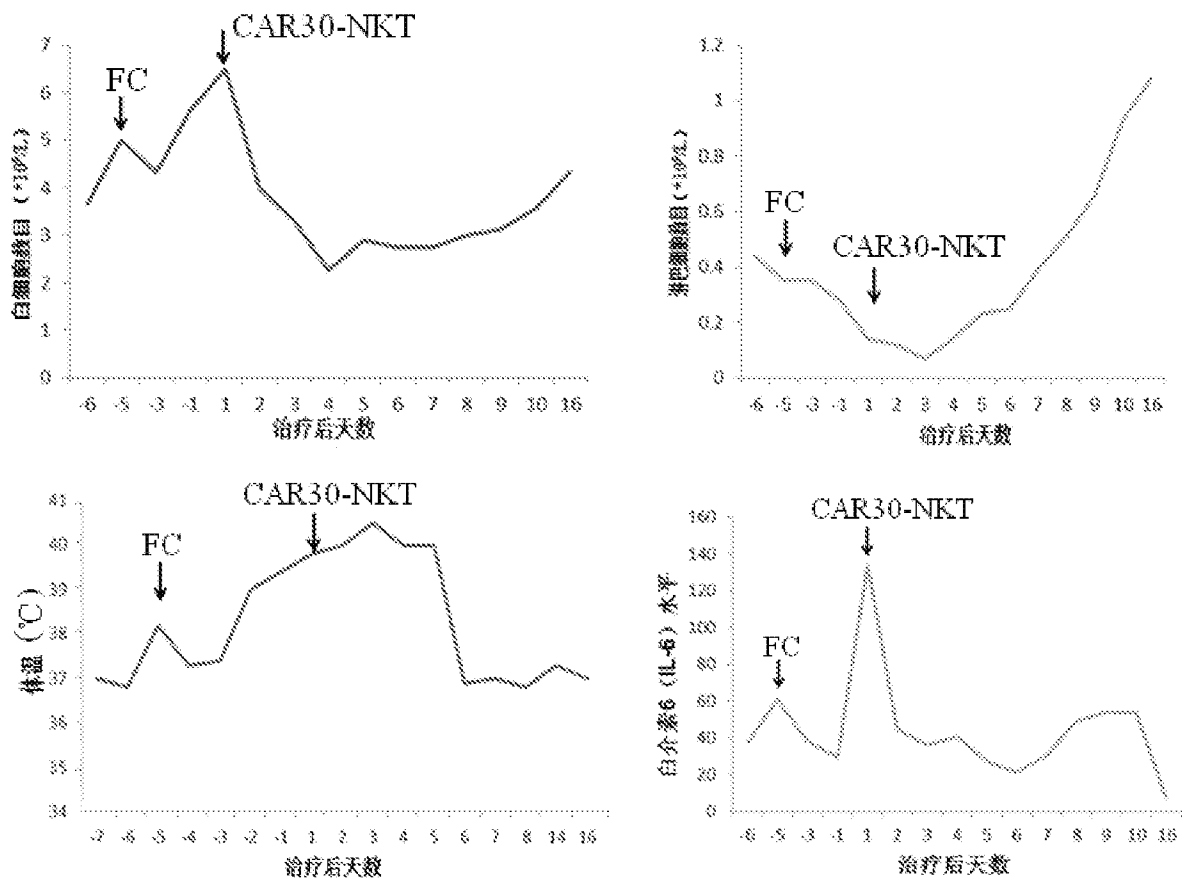


图 8

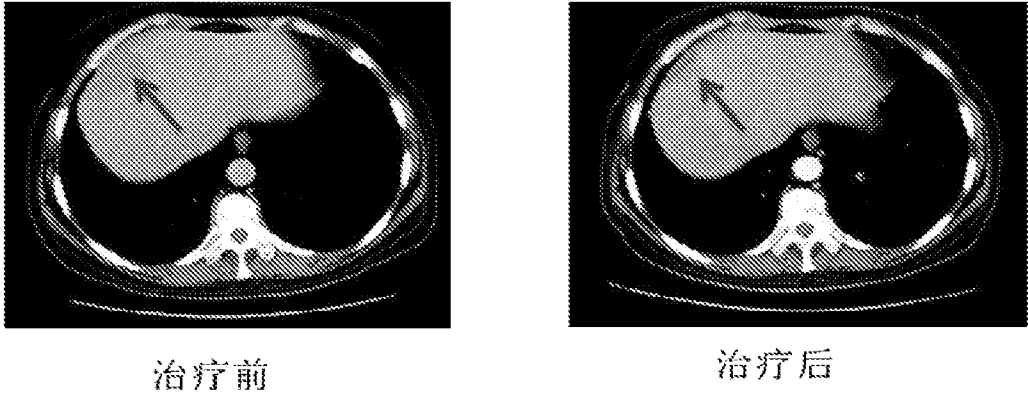


图 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2016/071371

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 19/00 (2006.01) i; C12N 15/62 (2006.01) i; C12N 15/867 (2006.01) i; 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)

C07K 19/-; C12N 15/-; C12N 5/-; A61K 35/-; A61P 35/-

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)

WPI, EPODOC, CNPAT, CNKI, NCBI, PubMed, Google: CELLULAR BIOMEDICINE GROUP, THE GENERAL HOSPITAL OF LIBERATION ARMY, chimeric antigen receptor, CD30-ScFv-CD8-CD137-CD3ζ, CD30, ScFv, CD8, CD137, CD3ζ, CD3, CAR30-NKT, Hodgkin Lymphomas, cAC10, MMAE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	LIU, T.B.; "Realizing the Potential of Cell-based Therapy Technology", JEFFERIES 2015 GLOBAL HEALTHCARE CONFERENCE, 01 June 2015 (01.06.2015), pages 6, 10-11, 13 and 16	1-12
PY	CN 104877028 A (BIOMICS BIOTECHNOLOGIES CO., LTD.), 02 September 2015 (02.09.2015), claims 1-6	1-12
Y	CN 103820393 A (THE GENERAL HOSPITAL OF CHINESE PEOPLE'S LIBERATION ARMY), 28 May 2014 (28.05.2014), abstract, claims 1-8, SEQ ID Nos: 1-16	1-12
Y	LIU, Mingying et al., "Brentuximab Vedotin: a New Therapeutic Agent for Hodgkin Lymphoma", CHINESE JOURNAL OF NEW DRUGS, vol. 21, no. 23, 31 December 2012 (31.12.2012), pages 2709-2715	1-12
A	CN 102775500 A (ZHENG, Junnian), 14 November 2012 (14.11.2012), claims 1-6	1-12
A	CN 104177499 A (ZHANG, Hongsheng), 03 December 2014 (03.12.2014), claims 1-9	1-12

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 11 March 2016 (11.03.2016)	Date of mailing of the international search report 08 April 2016 (08.04.2016)
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer YAO, Jinxiao Telephone No.: (86-10) 62414292

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2016/071371

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.: 12
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
[1] claim 12 sets forth a method for treating a disease, which falls within the subject matter requiring no search by the International Searching Authority defined in Rule 39.1. The search report is prepared on the following basis: claim 12 sets forth the chimeric antigen receptor as described in claim 1, the nucleic acid molecule as described in claim 5, the carrier as described in claim 6, the cell as described in claim 7, or the use of the pharmaceutical composition as described in claim 8 for preparing drugs or preparations for treating tumours.
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 application No.
PCT/CN2016/071371

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 2009)

A. 主题的分类		
C07K 19/00(2006.01)i; C12N 15/62(2006.01)i; C12N 15/867(2006.01)i; 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)		
C07K 19/-;C12N 15/-;C12N 5/-;A61K 35/-;A61P 35/-		
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))		
WPI, EPODOC, CNPAT, CNKI, NCBI, PubMed, Google; 西比曼生物科技, 解放军总医院, 嵌合抗原受体, 霍奇金淋巴瘤, CD30-ScFv-CD8-CD137-CD3 ζ, CD30, ScFv, CD8, CD137, CD3 ζ, CD3, CAR30-NKT, Hodgkin Lymphomas, cAC10, MMAE		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
PX	Tony B.Liu. "Realizing the potential of cell-based therapy technology" Jefferies 2015 global healthcare conference, 2015年 6月1日 (2015 - 06 - 01), 第6、10-11、13、16页	1-12
PY	CN 104877028 A (百奥迈科生物技术有限公司) 2015年 9月 2日 (2015 - 09 - 02) 权利要求1-6	1-12
Y	CN 103820393 A (中国人民解放军总医院) 2014年 5月 28日 (2014 - 05 - 28) 摘要, 权利要求1-8, SEQ ID Nos: 1-16	1-12
Y	刘明颖等. "抗霍奇金淋巴瘤新药贝伦妥单抗-维多汀" 中国新药杂志, 第21卷, 第23期, 2012年 12月 31日 (2012 - 12 - 31), 第2709-2715页	1-12
A	CN 102775500 A (郑骏年) 2012年 11月 14日 (2012 - 11 - 14) 权利要求1-6	1-12
A	CN 104177499 A (张鸿声) 2014年 12月 3日 (2014 - 12 - 03) 权利要求1-9	1-12
☐ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 "T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期		国际检索报告邮寄日期
2016年 3月 11日		2016年 4月 8日
ISA/CN的名称和邮寄地址		受权官员
中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088		姚进孝
传真号 (86-10)62019451		电话号码 (86-10)62414292

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： 12
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12请求保护一种治疗疾病的方法，属于PCT细则39（1）定义的不要求国际检索单位检索的主题。本检索报告是基于权利要求12请求保护权利要求1中所述的嵌合抗原受体、权利要求5中所述的核酸分子、权利要求6中所述的载体、权利要求7中所述的细胞、或权利要求8中所述的药物组合物在制备治疗肿瘤的药物或制剂中的应用做出的。
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/CN2016/071371

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	104877028	A	2015年 9月 2日	无	
CN	103820393	A	2014年 5月 28日	无	
CN	102775500	A	2012年 11月 14日	无	
CN	104177499	A	2014年 12月 3日	无	