基因工程化的细胞及应用

本申请要求申请日为2018年5月15日的中国专利申请CN201810463564.7、2018年9月18日的中国专利申请CN201811088090.9、2018年12月19日的中国专利申请CN201811552806.6、2019年2月28日的中国专利申请CN201910151930.X的优先权。本申请引用上述中国专利申请的全文。

技术领域

本发明属于细胞治疗领域，涉及基因工程化的细胞及应用。更具体地，本发明涉及特异性结合靶抗原的外源性受体和外源性CCL21的细胞。

背景技术

CAR-T细胞能够以MHC非限制性的方式进行肿瘤特异性地杀伤，在肿瘤免疫治疗中显示出较好的的应用前景，但其仍有较多局限性，如对实体瘤的疗效不佳、在体外表现出优良效果的候选药物，在体内往往无法表现出相应的效果。

Adachi等尝试采用表达IL7和CCL19的CAR-T细胞（IL-7 and CCL19 expression in CAR-T cells improves immune cell infiltration and CAR-T cell survival in the tumor. Nature Biotechnology, 2018, 36(4), 346–351），以提高CAR-T细胞的抗肿瘤能力。

发明内容

本发明的目的在于提供一种基因工程改造的细胞。

在本发明的第一方面，提供了一种基因工程化的细胞，所述细胞包含特异性结合靶抗原的外源性受体和外源性CCL21。

在具体实施方式中，所述细胞表达特异性结合靶抗原的外源性受体、外源性CCL21以及促进所述细胞增殖的蛋白。优选地，所述促进所述细胞增殖的蛋白为IL-7R结合蛋白或外源性IL-7。

在具体实施方式中，所述IL-7R结合蛋白为外源性IL-7R结合蛋白，即所述细胞包含特异性结合靶抗原的外源性受体、外源性CCL21以及外源性IL-7R结合蛋白。

在具体实施方式中，所述外源性IL-7R结合蛋白能特异性结合IL-7R且增强IL-7R活性。

在具体实施方式中，所述外源性IL-7R结合蛋白选自IL-7R的抗体。优选地，所

述外源性IL-7R的氨基酸序列如SEQ ID NO: 19所示。

在具体实施方式中，所述外源性CCL21为天然CCL21、或与天然CCL21具有相同功能的天然CCL21的截短片段或天然CCL21的突变体。

在一具体实施方式中，所述天然CCL21与SEQ ID NO: 21所示的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%的序列同一性、或是SEQ ID NO: 21所示的氨基酸序列的截短片段；或者与由SEQ ID NO: 14或15所示的核苷酸编码的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%的序列同一性、或是由SEQ ID NO: 14或15所示的核苷酸编码的氨基酸序列的截短片段。在一优选例中，所述天然CCL21为人的CCL21，其氨基酸序列如SEQ ID NO: 21所示；或者其氨基酸序列由SEQ ID NO: 14或15所示的核苷酸编码。

在具体实施方式中，所述外源性CCL21是组成型表达。

在具体实施方式中，所述外源性CCL21是诱导型表达。在一优选例中，所述诱导型表达通过免疫细胞诱导型启动子启动。在一较佳优选例中，所述的免疫细胞诱导型启动子是NFAT启动子。

在具体实施方式中，所述外源性IL-7为天然IL-7、或与天然IL-7具有相同功能的天然IL-7的截短片段或天然IL-7的突变体。

在具体实施方式中，所述的天然IL-7的氨基酸序列与SEQ ID NO: 18所示的序列具有至少90%的同一性、或是SEQ ID NO: 18所示的氨基酸序列的截短片段；或者与由SEQ ID NO: 13所示的核苷酸编码的氨基酸序列具有至少90%同一性、或是由SEQ ID NO: 13所示的核苷酸编码的氨基酸序列的截短片段。

在具体实施方式中，所述外源性IL-7R结合蛋白或外源性IL-7是组成型表达。

在优选的实施方式中，所述外源性IL-7R结合蛋白或外源性IL-7是诱导性表达。

在优选的实施例中，所述诱导型表达通过免疫细胞诱导型启动子启动。在一较佳优选例中，所述的免疫细胞诱导型启动子是NFAT启动子。

在具体实施方式中，所述的细胞为免疫效应细胞。在具体实施例中，所述的免疫效应细胞选自T细胞、B细胞、自然杀伤(NK)细胞、自然杀伤T(NKT)细胞、肥大细胞或骨髓源性吞噬细胞或其组合；优选地，所述免疫效应细胞选自T细胞、NK细胞；更优选地，所述免疫效应细胞为T细胞。

在具体实施方式中，所述的细胞来自自体细胞；优选地，为自体T细胞、自体NK细胞；更优选地，为自体T细胞。

在具体实施方式中，所述的细胞来自同种异体细胞；优选地，为同种异体的T

细胞或同种异体NK细胞（也包含NK细胞的细胞系，如NK92细胞）。

在具体实施方式中，所述靶抗原为肿瘤抗原或病原体抗原。

在具体实施方式中，所述靶抗原为肿瘤抗原。在优选的实施方式中，所述肿瘤抗原选自：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-13Rα)；白介素11受体α(IL-11Rα)；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；路易斯(Y)抗原；CD24；血小板衍生生长因子受体β(PDGFR-β)；阶段特异性胚胎抗原-4(SSEA-4)；细胞表面相关的粘蛋白1(MUC1)，MUC6；表皮生长20 因子受体家族及其突变体(EGFR，EGFR2，ERBB3，ERBB4，EGFRvIII)；神经细胞粘附分子(NCAM)；碳酸酐酶IX(CAIX)；LMP2；肝配蛋白A型受体2(EphA2)；岩藻糖基GM1；唾液酸基路易斯粘附分子(sLe)；神经节苷脂GM3；TGS5；高分子量黑素瘤相关抗原(HMWMAA)；邻乙酰基GD2神经节苷脂(OAcGD2)；叶酸受体；肿瘤血管内皮标记25 1(TEM1/CD248)；肿瘤血管内皮标记7相关的(TEM7R)；Claudin 6，Claudin18.2(CLD18A2)、Claudin18.1；ASGPR1；CDH16；5T4；8H9；αvβ6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(GPRC5D)；X染色体开放阅读框61(CXORF61)；CD97；CD179a；间变性淋巴瘤激酶(ALK)；聚唾液酸；胎盘特异性1(PLAC1)；globoH glycoceramide 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5 体β3 (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)；TCRγ交替阅读框蛋白(TARP)；肾母细胞瘤蛋白(WT1)；ETS 易位变异基因6 (ETV6-AML)；精子蛋白17(SPA17)；X抗原家族成员1A (XAGE1)；血管生成素结合细胞表面受体2(Tie2)；黑素瘤癌睾丸抗原-1(MAD-CT-1)；黑素瘤癌睾丸抗原-2(MAD-CT-2)；Fos相关抗原1；p53突变体；人端粒酶逆转录酶(hTERT)；肉瘤易位断点；细胞凋亡的黑素瘤抑制剂(ML-IAP)；ERG(跨膜蛋白酶丝氨酸2(TMPRSS2)ETS融合基因)；N-乙酰葡糖胺基

转移酶V(NA17)；配对盒蛋白Pax-3(PAX3)；雄激素受体；细胞周期蛋白B1；V-myc鸟髓细胞瘤病病毒癌基因神经母细胞瘤衍生的同源物(MYCN)；Ras同源物家族成员C(RhoC)；细胞色素P450 1B1(CYP1B1)；CCCTC结合因子(锌指蛋白)样(BORIS)；由T细胞识别的鳞状细胞癌抗原3(SART3)；配对盒蛋白Pax-5(PAX5)；proacrosin结合蛋白sp32(OYTES1)；淋巴细胞特异性蛋白酪氨酸激酶(LCK)；A激酶锚定蛋白4(AKAP-4)；滑膜肉瘤X断点2(SSX2)；CD79a；CD79b；CD72；白细胞相关免疫球蛋白样受体1(LAIR1)；IgA受体的Fc片段(FCAR)；白细胞免疫球蛋白样受体亚家族成员2(LILRA2)；CD300分子样家族成员f (CD300LF)；C型凝集素结构域家族12成员A(CLEC12A)；骨髓基质细胞抗原2(BST2)；含有EGF样模块粘蛋白样激素受体样2(EMR2)；淋巴细胞抗原75(LY75)；磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3(GPC3)；Fc受体样5(FCRL5)；免疫球蛋白λ样多肽1(IGLL1)。

在一优选例中，所述肿瘤抗原为GPC3、EGFR、EGFRvIII或Claudin18.2。

在具体实施方式中，所述靶抗原为病原体抗原。在优选的实施方式中，所述病原体抗原选自：病毒、细菌、真菌、原生动物，或寄生虫的抗原。在一具体实施例中，所述病毒抗原选自：巨细胞病毒抗原、爱泼斯坦-巴尔病毒抗原、人类免疫缺陷病毒抗原或流感病毒抗原。

在具体实施方式中，所述外源性受体为嵌合受体，所述的嵌合受体包含抗原结合结构域，跨膜结构域和细胞内结构域。

在具体实施方式中，所述外源性受体为嵌合受体，该嵌合受体选自：嵌合抗原受体(CAR)、修饰的T细胞(抗原)受体(TCR)、T细胞融合蛋白(TFP)、T细胞抗原耦合器(TAC)或其组合。

在优选的实施方式中，所述外源性受体为嵌合抗原受体，该嵌合抗原受体的抗原结合结构域包含：抗体，抗体片段，scFv，Fv，Fab，(Fab')2，单结构域抗体(SDAB)，VH或VL结构域，或骆驼科VHH结构域，或相应抗原的天然配体，或其组合。

在优选的实施方式中，所述外源性受体为嵌合抗原受体，该嵌合抗原受体的跨膜结构域包含选自以下组成的蛋白质的跨膜结构域：T细胞受体的α、β或ζ链，CD28，CD3ε，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)，SLAMF7，NKp80(KLRF1)，CD160，CD19，IL2Rβ，IL2Rγ，IL7Rα，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，CD100(SEMA4D)，SLAMF6(NTB-A，Ly108)，SLAM(SLAMF1，CD150，IPO-3)，BLAME(SLAMF8)，SELPLG(CD162)，LTBR，PAG/Cbp，NKp44，NKp30，NKp46，NKG2D，和NKG2C。

在优选的实施方式中，所述外源性受体为嵌合抗原受体，该嵌合抗原受体的细胞内结构域包括：一级信号传导结构域和/或共刺激信号传导结构域，其中：（1）所述一级信号传导结构域包含选自：CD3ζ，CD3γ，CD3δ，CD3ε，常见FcRγ(FCER1G)，FcRβ(FcεR1b)，CD79a，CD79b，FcγRIIa，DAP10，和DAP12的蛋白质的功能信号传导结构域，或其组合；和/或（2）所述共刺激信号传导结构域包含选自如下的蛋白质的功能信号传导结构域：CD27，CD28，4-1BB(CD137)，OX40，CD30，CD40，PD-1，ICOS，淋巴细胞功能相关的抗原-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，CD8α，CD8β，IL2Rβ，IL2Rγ，IL7Rα，ITGA4，VLA1，CD49a，ITGA4，IA4，CD49D，ITGA6，VLA-6，CD49f，ITGAD，CD11d，ITGAE，CD103，ITGAL，CD11a，LFA-1，ITGAM，CD11b，ITGAX，CD11c，ITGB1，CD29，ITGB2，CD18，LFA-1，ITGB7，TNFR2，TRANCE/RANKL，DNAM1(CD226)，SLAMF4(CD244，2B4)，CD84，CD96(Tactile)，CEACAM1，CRTAM，Ly9(CD229)，CD160(BY55)，PSGL1，CD100(SEMA4D)，CD69，SLAMF6(NTB-A，Ly108)，SLAM(SLAMF1，CD150，IPO-3)，BLAME(SLAMF8)，SELPLG(CD162)，LTBR，LAT，GADS，SLP-76，PAG/Cbp，NKp44，NKp30，NKp46，和NKG2D，或其组合。

在具体实施方式中，所述的嵌合抗原受体包括：(i) 特异性结合靶抗原的抗体或其片段、CD28或CD8的跨膜域、CD28的共刺激信号结构域和CD3ζ；或(ii) 特异性结合靶抗原的抗体或其片段、CD28或CD8的跨膜域、4-1BB的共刺激信号结构域和CD3ζ；或(iii)特异性结合靶抗原的抗体或其片段、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CD3ζ。

在具体实施方式中，所述外源性受体的抗原结合结构域的氨基酸序列与SEQ ID NO:2所示的序列具有至少90%的同一性。

在具体实施方式中，所述外源性受体的氨基酸序列与SEQ ID NO: 26、27或35所

示的序列具有至少90%的同一性。

在具体实施方式中，所述外源性受体、和/或外源性IL-7R结合蛋白、和/或外源性CCL21利用病毒载体表达。较佳地，所述的病毒载体包括：慢病毒载体，逆转录病毒载体或腺病毒载体。

在本发明的第二方面，提供了一种表达构建物，该表达构建物包括顺序连接的：特异性结合靶抗原的外源性受体的表达盒1，外源性IL-7R结合蛋白或外源性IL-7的表达盒2，外源性CCL21的表达盒3；优选地，所述表达盒之间由串联片段连接，选自F2A、PA2、T2A、和/或E2A。其中，所述F2A和P2A的核酸序列分别如SEQ ID NO: 11和SEQ ID NO: 16所示。

在本发明的第三方面，提供了一种表达载体，其包含本发明第二方面所述的表达构建物。

在本发明的第四方面，提供了一种病毒，所述的病毒包含本发明的第三方面所述的表达载体。

在本发明的第五方面，提供了一种提高免疫应答细胞活力的方法，所述方法包括在免疫应答细胞中共表达：包括本发明的第一方面所述的特异性结合靶抗原的嵌合抗原受体、外源性IL-7R结合蛋白或外源性IL-7、外源性CCL21。

在本发明的第六方面，提供了本发明的第一方面所述的细胞，或本发明的第二方面所述的表达构建物，或本发明的第三方面所述的表达载体，或本发明的第四方面所述的病毒的用途，用于制备抑制肿瘤、抑制病原体或加强受试者免疫耐受能力的药物。在具体的实施方式中，用于制备抑制肿瘤的药物。在优选的实施方式中，所述制备抑制肿瘤的药物与化疗药物联用。

在具体实施方式中，所述的肿瘤为血液肿瘤。

在具体实施方式中，所述的肿瘤为实体肿瘤。

在具体实施方式中，所述的肿瘤选自结肠癌，直肠癌，肾细胞癌，肝癌，肺的非小细胞癌，小肠癌，食道癌，黑素瘤，骨癌，胰腺癌，皮肤癌，头颈癌，皮肤或眼内恶性黑素瘤，子宫癌，卵巢癌，直肠癌，肛区癌，胃癌，睾丸癌，子宫癌，输卵管癌，子宫内膜癌，宫颈癌，阴道癌，阴户癌，霍奇金氏病，非霍奇金淋巴瘤，内分泌系统癌，甲状腺癌，甲状旁腺癌，肾上腺癌，软组织肉瘤，尿道癌，阴茎癌，儿童实体瘤，膀胱癌，肾或输尿管癌，肾盂癌，中枢神经系统(CNS)瘤，原发性CNS淋巴瘤，肿瘤血管发生，脊椎肿瘤，脑干神经胶质瘤，垂体腺瘤，卡波西肉瘤，表皮样癌，鳞状细胞癌，T细胞淋巴瘤，环境诱发的癌症，所述癌症的组合和所述癌症

的转移性病灶。

在一优选例中，所述的实体肿瘤选自结肠癌，直肠癌，肾细胞癌，肝癌，非小细胞肺癌，小肠癌，食道癌，黑素瘤，骨癌，胰腺癌，皮肤癌，头颈癌，皮肤或眼内恶性黑素瘤，子宫癌，卵巢癌，直肠癌，肛区癌，胃癌，睾丸癌，子宫癌，输卵管癌，子宫内膜癌，宫颈癌，阴道癌，阴户癌，内分泌系统癌，甲状腺癌，甲状旁腺癌，肾上腺癌，软组织肉瘤，尿道癌，阴茎癌，膀胱癌，肾或输尿管癌，肾盂癌，中枢神经系统(CNS)瘤，原发性CNS淋巴瘤，肿瘤血管发生，脊椎肿瘤，脑干神经胶质瘤，垂体腺瘤，卡波西肉瘤，表皮样癌，鳞状细胞癌。

更优选的，所述的实体肿瘤选自结肠癌，直肠癌，肝癌，非小细胞肺癌，小肠癌，食道癌，胰腺癌，头颈癌，皮肤或眼内恶性黑素瘤，子宫癌，卵巢癌，直肠癌，肛区癌，胃癌。更优选的，所述的实体肿瘤为胃癌、胰腺癌、或食道癌。

在本发明的第七方面，提供了一种药物组合物，所述的药物组合物包括本发明的第一方面所述的细胞和药学上可接受的载体或赋形剂。

在本发明的第八方面，提供了一种药盒，其包括药盒A和药盒B，所述药盒A包括基因工程化的细胞，所述细胞包括本发明的第一方面所述的表达特异性结合靶抗原的外源性受体；所述药盒B包括CCL21，和/或，促进所述细胞增殖的蛋白。优选地，所述促进细胞增殖的蛋白包括本发明的第一方面所述的IL-7R结合蛋白或IL-7。更优选地，所述药盒A和药盒B的施用不分先后。

在一优选例中，所述药盒A包括嵌合受体修饰的免疫效应细胞。优选地，所述嵌合受体为嵌合抗原受体。

在一优选例中，所述免疫效应细胞为T细胞、NK细胞或NKT细胞。

在本发明的第九方面，提供了一种抑制肿瘤或抑制病原体或加强受试者免疫耐受能力的方法，其包括施用本发明的第一方面所述的细胞，或本发明的第七方面所述的药物组合物，或本发明的第八方面所述的药盒。优选地，还包括施用化疗药物。

本发明的有益效果：

1、本发明所提供的细胞，由于共表达特异性结合靶抗原的外源性受体，外源性IL-7R结合蛋白或外源性IL-7、和外源性CCL21，能够提高细胞的存活能力、积蓄能力。

2、采用本发明的技方案制备得到的免疫效应细胞具有优异的肿瘤细胞杀伤能力。

3、采用本发明的技方案制备得到的细胞在治疗癌症中，能够对抗癌症微环境中的免疫抑制，从而对于实体瘤的作用显著增强。对于难治性和进行性的癌症也具有较好的效果。

附图说明

图1A为MSCV- hu8E5 (2I) -m28Z的质粒图谱；

图1B为MSCV- hu8E5 (2I) -m28Z-F2A-mIL-7-P2A-mCCL21a质粒图谱；

图1C为MSCV- hu8E5 (2I) -m28Z-F2A-mIL7-P2A-mCCL21b质粒图谱；

图1D为MSCV- hu8E5 (2I) -mBBZ质粒图谱；

图1E为MSCV- hu8E5 (2I) -mBBZ-F2A-mIL-7-P2A-mCCL21a质粒图谱；

图1F为MSCV- hu8E5 (2I) -m28Z-F2A-mIL7-P2A-mCCL21b质粒图谱；

图2显示了体外细胞因子IL7、CCL21检测的结果；

图3A和3B显示了不同组的细胞分泌PD-1的情况；图3C和3D显示了不同组的细胞分泌LAG-3的情况；图3E和3F显示了不同组的细胞分泌TIM-3的情况；

图4A显示了28Z的体外杀伤结果；4B显示了BBZ的体外杀伤结果；

图5显示了体外增殖检测的结果；

图6显示了小鼠体内肿瘤治疗实验的结果；

图7为mBBZ-7*19的质粒图；

图8A显示了表达IL7和CCL21的CAR-T细胞与表达IL7和CCL19的CAR-T细胞的体内杀伤对比结果；图8B显示了小鼠体重的变化；图8C显示了肿瘤重量比较结果；图8D显示了小鼠的胰腺癌PANC02-A2治疗后的CAR-T细胞拷贝数；图8E显示了小鼠胰腺癌CD8+细胞的免疫组化检测结果；

图9A显示了小鼠乳腺癌E0771-A2原位移植瘤经CAR-T细胞治疗后的肿瘤体积变化情况；

图9B显示了了小鼠乳腺癌E0771-A2原位移植瘤治疗后的肿瘤重量；

图9C显示了小鼠的乳腺癌治疗后的CAR-T细胞拷贝数；

图9D显示了小鼠乳腺癌CD8+细胞的免疫组化检测结果；

图10A显示了小鼠肝癌Hepal-6-A2移植瘤治疗后的肿瘤体积变化情况；

图10B显示了小鼠肝癌Hepa1-6-A2移植瘤治疗后的肿瘤重量；

图10C显示了小鼠的肝癌治疗后的CAR-T细胞拷贝数；

图10D显示了小鼠肝癌CD8+细胞的免疫组化检测结果；

图11显示了体外IFN-γ的检测结果；

图12A显示了小鼠胰腺癌皮下瘤清淋模型经CAR-T细胞治疗后的肿瘤体积变化情况；图12B显示了了小鼠胰腺癌皮下瘤清淋模型治疗后的肿瘤重量；图12C显示了

小鼠胰腺癌皮下瘤清淋模型治疗后的CAR-T细胞拷贝数；图12D显示了小鼠胰腺癌皮下瘤清淋模型CD8+细胞的免疫组化检测结果。

图13A显示了小鼠胰腺癌PANC02-A2皮下瘤模型CAR-T治疗d10天脾脏中Tcm的检测情况；图13B显示了d20天脾脏中Tcm的检测情况；

图14A显示了小鼠胰腺癌PANC02-A2皮下瘤模型CAR-T治疗d10天骨髓中Tcm的含量情况；图14B显示了d20天脾脏中Tcm的检测情况；

图15显示了小鼠胰腺癌PANC02-A2皮下瘤模型CAR-T治疗d10天小鼠肿瘤组织中有更多的DC细胞浸润情况；

图16显示了小鼠胰腺癌PANC02-A2皮下瘤模型CAR-T治疗d10天小鼠的肿瘤组织中MDSC的含量情况。

具体实施方式

本发明发现，表达有靶向肿瘤抗原的外源性受体和CCL21的免疫效应细胞不仅对肿瘤具有更优异的杀伤效果，并且也提高了免疫效应细胞在肿瘤组织中的存活，即使对于难治的实体瘤，也显示出更为优异的抗肿瘤能力。

根据本公开内容，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，而不背离本文所述的精神和范围。本发明在范围上并不受限于本文描述的具体实施方案(其仅预期作为本文所述的各方面的举例说明)，并且应当认为，在功能上等价的方法和组分仍包括在本文所述的范围内。

除非专门定义，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含义。类似或等效于本文中描述的所有方法和材料都可以在本文所述的实践或测试中使用。这些技术如方法和材料充分记载于文献中，参见，例如，除非另有说明，本发明的实践将采用细胞生物学、细胞培养、分子生物学、转基因生物学、微生物学、重组DNA和免疫学的传统技术，这都属于本领域的技术范围 Current Protocols in Molecular Biology (FrederickM.AUSUBEL，2000，Wileyand sonInc，Library of Congress，USA)；Molecular Cloning: A Laboratory Manual，Third Edition，(Sambrooketal，2001，Cold Spring Harbor，NewYork: 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. Higginseds. 1984)； Transcription And Translation (B. D. Hames & S. J. Higginseds. 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 (Wuetal. eds.)和Vol.185，“Gene Expression Technology” (D. Goeddel，ed.)；Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller和M. P. Caloseds.，1987，Cold Spring Harbor Laboratory)；Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer和Walker，eds.，Academic Press，London，1987)；Hand book Of Experimental Immunology，卷I-IV (D. M. Weir和C. C. Blackwell，eds.，1986)；和Manipulating the Mouse Embryo (Cold Spring Harbor Laboratory Press，Cold Spring Harbor，N.Y.，1986)。

本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结合于本文中作为参考。在冲突的情况下，以本说明书为准。此外，除非另有规定，本说明书中所列举的材料、方法和实施例仅是说明性的，而并非旨在进行限制。

本文所用的术语“工程化”及其语法上的其他形式可以指核酸的一个或多个改变，例如生物体基因组内的核酸。术语“工程化”可以指基因的改变、添加和/或缺失。工程细胞还可以指具有加入、缺失和/或改变的基因的细胞。

本文所用的术语“基因工程化的细胞”是指通过基因工程的手段改造的细胞。在一些实施方案中，所述的细胞是免疫效应细胞。在一些实施方案中，所述的细胞是T细胞。在一些实施方案中，本文所述的基因工程化的细胞是指表达特异性结合靶抗原的外源性受体的细胞。在一些实施方案中，本文所述的基因工程化的细胞是指表达特异性结合靶抗原的外源性受体并且表达外源性的CLL21的细胞。在一些实施方案中，本文所述的基因工程化的细胞还可以是共表达特异性结合肿瘤抗原的嵌合抗原受体、CLL21、及促进T细胞增殖的蛋白的T细胞。在一些实施方案中，本文所述的基因工程化的细胞还可以是共表达特异性结合肿瘤抗原的嵌合抗原受体、CLL21、及IL-7R结合蛋白或外源性的IL-7的T细胞。

术语“免疫效应细胞”，是指参与免疫应答，产生免疫效应的细胞，如T细胞，、B细胞、自然杀伤(NK)细胞、自然杀伤T(NKT)细胞、肥大细胞和骨髓源性吞噬细胞。在一些实施方案中，所述的免疫效应细胞为T细胞、NK细胞、NKT细胞。在一些实施方案中，所述T细胞可以是自体T细胞、异种T细胞、同种异体T细胞。在一些实施方案中，所述的NK细胞可以是同种异体NK细胞。

术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”可互换地使用，并且是指由肽键共价连接的氨基酸残基组成的化合物。蛋白质或肽必须含有至少两个氨基酸，并且对于可以包括蛋白

质或肽的序列的氨基酸的最大数量没限制。多肽包括含有彼此通过肽键结合的两个或多个氨基酸的任何肽或蛋白质。正如本文中使用的那样，该术语是指短链(其在本领域通常也称为例如肽、寡肽和寡聚物)以及较长链(其在本领域通常也称为蛋白质，其存在多种类型)。“多肽”包括例如生物学活性片段、基本上同源的多肽、寡肽、同型二聚体、异二聚体、多肽的变体、修饰的多肽、衍生物、类似物、融合蛋白等。多肽包括天然肽、重组肽或其组合。

本术语“IL-7(Interleukin7，白细胞介素7或IL7)”是指能够与IL-7R (优选来自哺乳动物，例如鼠或人IL-7R)相互作用(例如结合)的蛋白质(优选来自哺乳动物，例如鼠或人)，并且具有以下特征之一：(i)为天然存在的哺乳动物IL-7的氨基酸序列或其片段，例如SEQIDNO：18(人)所示的氨基酸序列或其片段；(ii)基本上与SEQIDNO：18(人)所示氨基酸序列或其片段具有例如至少85％、90％、95％、96%、97%、98％、99％同源性的氨基酸序列；(iii) 由天然存在的哺乳动物IL-7核苷酸序列或其片段(例如SEQ ID NO：17(人)或其片段所编码的氨基酸序列；(iv)由与SEQ ID NO：17(人)所示核苷酸序列或其片段具有例如至少85％、90％、95％、96%、97%、98％、99％ 同源性的核苷酸序列所编码的氨基酸序列；(v)由与天然存在的IL-7核苷酸序列或其片段简并的核苷酸序列(例如SEQIDNO：17(人)或其片段)所编码的氨基酸序列；或(vi)在严格性条件与前述核苷酸序列之一杂交的核苷酸序列。

“外源性IL-7R结合蛋白”是指能特异性结合IL-7R且增强IL-7R活性的所有蛋白质。“增强IL-7R活性”应理解为意指IL-7R结合蛋白能够增强天然存在的IL-7R的任何一种或多种活性，包括但不限于刺激NK细胞的增殖、细胞毒性或成熟；刺激B细胞和T细胞的增殖或分化；刺激B细胞中的抗体产生和亲和力成熟；刺激CD8+T细胞的细胞毒性；刺激T细胞和NK细胞中干扰素γ产生；抑制树突状细胞(DC)活化和成熟；抑制炎性介质从肥大细胞释放；增强巨噬细胞的吞噬作用；抑制TReg细胞的产生或存活；和刺激骨髓祖细胞的增殖。

“CCL21(Chemokine (C-C motif) ligand 21)”是主要的免疫趋化因子之一，在脾脏和淋巴结的二级淋巴组织的T细胞区表达，负责抗原激活的(成熟的)树突细胞(DC)、非成熟的DC和幼稚T细胞的招募。本发明中CCL21具有以下特征之一：(i)为天然存在的哺乳动物CCL21的氨基酸序列或其片段，例如SEQ ID NO：21(人)所示的氨基酸序列或其片段；(ii)为与SEQ ID NO：21(人)所示氨基酸序列或其片段具有例如至少85％、90％、95％、96%、97%、98％、99％同源性的氨基酸序列；(iii)由天然存在的哺乳动物CCL21核苷酸序列或其片段(例如SEQ ID NO：20(人)或其片段所编码的氨

基酸序列；(iv)由与SEQ ID NO：20(人)所示核苷酸序列或其片段具有例如至少85％、90％、95％、96%、97%、98％、99％同源性的核苷酸序列所编码的氨基酸序列；(v)由与天然存在的CCL21核苷酸序列或其片段简并的核苷酸序列(例如SEQ ID NO：20(人)或其片段)所编码的氨基酸序列；或(vi)在严格性条件下与前述核苷酸序列之一杂交的核苷酸序列。

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

本文使用的术语“野生型”、“亲本”、“天然”在涉及蛋白质和DNA时，代表相同的意思。术语“突变”、“变体”或“突变体”具有与天然蛋白质或天然DNA具有相同或更优的生物活性，其在天然蛋白质的氨基酸序列上发生了一个或多个氨基酸的取代、添加或缺失；或在天然DNA的核酸序列上发生了一个或多个核苷酸的取代、添加或缺失。在具体的实施方式中，本文中的突变体的序列具有与天然蛋白质的氨基酸序列或天然DNA的核酸序列具有至少约80%、优选至少约90%、更优选至少约95%、更优选至少约97%、更优选至少约98%、最优选至少约99%的同一性。如“IL-7的变体”通常指将野生型的IL-7进行氨基酸修饰后得到的与IL-7具有类似生物活性或者更优的生物活性的多肽。术语“截短片段”指天然蛋白质或天然DNA的非全长形式，其在天然氨基酸序列或核酸序列上有连续或非连续的多个氨基酸残基或核苷酸的缺失，该缺失发生于序列的任何位置，例如头部、中部、尾部或他们的结合。在本发明中，蛋白质的截短片段仍然保留其来源的天然蛋白质相同的功能。

“组成型表达”（constitutive expression）又称持续表达，是指在几乎所有的生

理条件下，基因都能够在细胞中持续的表达。“诱导型表达（inducible expression）”是指在一定条件下的表达，所述的条件例如T细胞与抗原发生结合的时候。

术语 “有效量”是指有效地实现特定生物学结果的化合物、制剂、物质或组合物的量，例如但不限于足以促进T细胞应答的量或剂量。当指示“免疫学上有效量”、“抗肿瘤有效量”、“抑制肿瘤有效量”或“治疗有效量”时，本发明的免疫效应细胞、或治疗剂的精确给药剂量可以由医师在考虑个体在年龄、体重、肿瘤大小、或转移的程度以及患者(受试者)的状况的情况下确定。有效量的免疫效应细胞是指但不限于能使免疫效应细胞抗肿瘤活性增加、增强或延长；抗肿瘤免疫效应细胞或活化免疫效应细胞数目的增加；促进IFN-γ分泌；肿瘤消退、肿瘤缩小、肿瘤坏死的免疫效应细胞的数量。

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

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

NFAT”(Nuclear factor of activated T cells，) 是活化T细胞核因子。在一些具体实施方案中，NFAT在T细胞活化过程中细胞因子的转录表达起着重要的作用。在一些实施方案中，RUNX3是采用诱导性启动子的诱导性表达。在一些实施方案中，所述诱导性启动子为NFAT启动子。在一些实施方案中，将RUNX3的编码序列置于与含NFAT结合基序的最小启动子的调控之下。在一些具体实施方案中，含6个NFAT结合基序的IL2最小启动子是利用6个NFAT的结合位子与IL2的最小启动子 (minimal promoter)串联在一起组成的启动子。

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

术语“开放阅读框(Open Reading Frame, ORF)”是结构基因的正常核苷酸序列，从起始密码子到终止密码子的阅读框可编码完整的多肽链，其间不存在使翻译中断的终止密码子。

本文所用的“嵌合抗原受体”或“CAR”是指一组多肽，当其在免疫效应细胞中时，

给所述的细胞提供针对靶细胞(通常是癌细胞)的特异性，并且具有细胞内信号产生。CAR通常包括至少一个细胞外抗原结合结构域（也称为胞外区）、跨膜结构域（也称为跨膜区）和细胞质信号传导结构域(本文中也称为“胞内信号传导结构域”或“胞内区”)，其包括来源于如下定义的刺激性分子和/或共刺激性分子的功能信号传导结构域。在某些方面，多肽组彼此邻接。多肽组包括在存在二聚化分子时可以使多肽彼此偶联的二聚化开关，例如，可以使抗原结合结构域偶联至胞内信号传导结构域。在一个方面，刺激性分子为与T细胞受体复合体结合的ζ链。在一个方面，细胞质信号传导结构域进一步包括一种或多种来源于至少一个如下定义的共刺激性分子的功能性信号传导结构域。在一个方面，共刺激性分子选自本文所述共刺激性分子，例如4-1BB(即，CD137)、CD27和/或CD28。在一个方面，CAR包括嵌合融合蛋白，该融合蛋白包含细胞外抗原结合结构域、跨膜结构域和包含来源于刺激性分子的功能性信号传导结构域的胞内信号传导结构域。在一个方面，CAR包含嵌合融合蛋白，该融合蛋白包含细胞外抗原结合结构域、跨膜结构域和包含来源于共刺激性分子的功能性信号传导结构域和来源于刺激性分子的功能性信号传导结构域的胞内信号传导结构域。在一个方面中，CAR包含嵌合融合蛋白，该融合蛋白包含细胞外抗原结合结构域、跨膜结构域和包含来源于一个或更多个共刺激性分子的两个功能性信号传导。

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

本文所用的“跨膜结构域”（也称为跨膜区），可以包括一个或更多个邻接跨膜区域的另外氨基酸，例如一个或更多个与所述跨膜蛋白所源自的蛋白质的胞外区域相关联的氨基酸 (例如，胞外区域的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10直至15个氨基酸)和/或与所述跨膜蛋白所源自的蛋白质的胞外区域相关联的一个或更多个另外的氨基酸 (例如，胞

内区域的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10直至15个氨基酸)。在一个方面，跨膜结构域是与嵌合受体的其它结构域中的一个有关的结构域，例如，在一种实施方式中，所述跨膜结构域可以来自信号传导结构域、共刺激结构域或铰链结构域所源自的相同蛋白质。在某些情况下，跨膜结构域可以被选择或通过氨基酸取代以避免这样的结构域与相同或不同表面膜蛋白的跨膜结构域结合，例如以使与受体复合体的其它成员的相互作用最小化。在一个方面，跨膜结构域能够与表达嵌合受体的细胞的细胞表面上的另一个嵌合受体同型二聚化。在一个不同的方面，跨膜结构域的氨基酸序列可以被修饰或取代，以便使与存在于表达相同嵌合受体的细胞中的天然结合配偶体的结合结构域的相互作用最小化。跨膜结构域可以来源于天然或重组来源。当所述来源是天然的时，所述结构域可以来源于任何膜结合的蛋白质或跨膜蛋白质。在一个方面，只要所述嵌合受体与所述靶抗原结合时，跨膜结构域能够向胞内结构域传导信号。在本发明中特别使用的跨膜结构域可以包括至少以下的跨膜结构域：例如，T-细胞受体的α、β或ζ链、CD28、CD27、CD3ε、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154。在某些实施方式中，跨膜结构域可以包括至少下述跨膜区域：例如KIRDS2、OX40、CD2、CD27、LFA-1(CD11a、CD18)、ICOS(CD278)、4-1BB(CD137)、GITR、CD40、BAFFR、HVEM(LIGHTR)、SLAMF7、NKp80(KLRF1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD160、CD19、IL2Rβ、IL2Rγ、IL7Rα、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、CD100(SEMA4D)、SLAMF6(NTB-A、Ly108)、SLAM(SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME(SLAMF8)、SELPLG(CD162)、LTBR、PAG/Cbp、NKG2D、NKG2C。

在某些情况下，跨膜结构域可以经由铰链(例如，来自人蛋白质的铰链)连接至CAR的胞外区域，例如CAR的抗原结合结构域。例如，在一种实施方式中，铰链可以是人Ig(免疫球蛋白)铰链(例如，IgG4铰链、IgD铰链)、GS接头(例如，本文所述的GS接头)、KIR2DS2铰链或CD8a铰链。在一个方面，跨膜结构域可以是重组的，在这样情况下，其将会主要包含疏水性残基，比如亮氨酸和缬氨酸。在一个方面，在重组跨膜结构域的每个末端可以发现苯丙氨酸、色氨酸和缬氨酸的三联体。任选地，长度在2至10个氨基酸之间的短的寡肽或多肽接头可以在CAR的跨膜结构域与细胞质区之间形成键。甘氨酸-丝氨酸二联体提供一种特别合适的接头。

本文所用的“细胞内结构域”（也称为胞内域）,包括胞内信号传导结构域。胞内信号传导结构域通常负责其中已经引入嵌合受体的免疫细胞的正常效应子功能中至少一个的活化。术语“效应子功能”是指细胞的特化功能。T细胞的效应子功能例如可以是细胞溶解活性或辅助活性，包括分泌细胞因子。因此，术语“胞内信号传导结构域”是指转导效应子功能信号且引导细胞执行特定功能的蛋白质的部分。虽然通常可以应用全部胞内信号传导结构域，但是在许多情况下不必使用整个链。就使用胞内信号传导结构域的截短部分来说，可以使用这样的截短部分代替完整的链，只要其转导效应子功能信号。因此，术语胞内信号传导结构域意味着包括足以转导效应子功能信号的胞内信号传导结构域的截短部分。

众所周知，通过单独的TCR产生的信号不足以完全活化T细胞，并且也需要二级和/或共刺激信号。因此，T细胞活化可以被称为是由两个不同种类的细胞质信号传导序列介导的:通过TCR引发抗原依赖性一级活化的那些(一级胞内信号传导结构域)以及以抗原独立方式起作用以提供二级或共刺激信号的那些(二级细胞质结构域，例如共刺激结构域)。

术语“刺激”是指由刺激性分子 (例如，TCR/CD3复合体或CAR)与其同源配体(或在CAR的情况下为肿瘤抗原)的结合，由此介导信号转导事件 (比如但不限于经由TCR/CD3复合体的信号转导或经由适合的NK受体或CAR的信号传导结构域的信号转导)而诱导的初次应答。刺激可以介导某些分子的改变的表达。

术语“刺激性分子”是指由免疫细胞 (例如，T细胞、NK细胞、B细胞)表达的提供细胞质信号传导序列的分子，该信号传导序列以刺激性方式调节用于免疫细胞信号传导途径的至少一些方面的免疫细胞的活化。在一个方面，信号是通过例如TCR/CD3复合体与负载有肽的MHC分子的结合启动的初级信号，并且其导致介导T细胞应答，包括，但不限于增殖、活化、分化等。以刺激方式起作用的一级细胞质信号传导序列 (也称为“一级信号传导结构域”)可以含有被称为基于免疫受体酪氨酸的活化基序（Immunoreceptor tyrosine-based activation motif，ITAM）的信号传导基序。特别地用于本发明的含有ITAM的细胞质信号传导序列的实例包括，但不限于来源于下述的那些：CD3ζ、常见的 FcRγ (FCER1G)、FcγRIIa、FcRβ (FcEpsilon R1b)、CD3γ、CD3δ、CD3ε、CD79a、CD79b、DAP10和DAP12。在本发明的特异性CAR中，在本发明的任一个或更多个CAR中的胞内信号传导结构域包括细胞内信号传导序列，例如CD3-ζ的初级信号传导序列。在本发明的特异性CAR中，CD3-ζ的初级信号传导序列是来自人或非人类种类例如小鼠、啮齿类动物、猴、猿等的等同残基。

术语“共刺激性分子”是指T细胞上的同源结合配偶体，其特异性地结合共刺激配

体，从而介导T细胞的共刺激反应，比如但不限于增殖。共刺激性分子为除了抗原受体或其 配体之外的细胞表面分子，其促进有效的免疫应答。共刺激性分子包括但不限于MHC I类分子，BTLA和Toll配体受体，以及OX40、CD27、CD28、CDS、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)、ICOS (CD278)和4-1BB (CD137)。这样的共刺激性分子的进一步实例包括CDS、ICAM-1、GITR、BAFFR、HVEM (LIGHTR)、SLAMF7、NKp80 (KLRF1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD160、CD19、CD4、CD8α、CD8β、IL2Rβ、IL2Rγ、IL7Rα、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、 ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、NKG2C、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1 (CD226)、SLAMF4 (CD244、2B4)、CD84、CD96 (Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9 (CD229)、CD160 (BY55)、PSGL1、CD100(SEMA4D)、CD69、SLAMF6(NTB-A、Ly108)、SLAM (SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME (SLAMF8)、SELPLG (CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19a以及特异性地结合CD83的配体。

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

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

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

术语“T细胞(抗原)受体 (T cell receptor，TCR)”，为所有T细胞表面的特征性标志，以非共价键与CD3结合，形成TCR-CD3复合物。TCR负责识别与主要组织相容性复合体分子结合的抗原。TCR是由两条不同肽链构成的异二聚体，由α、β两条肽链

组成，每条肽链又可分为可变区(V区)，恒定区(C区)，跨膜区和胞质区等几部分；其特点是胞质区很短。TCR分子属于免疫球蛋白超家族，其抗原特异性存在于V区；V区(Vα、Vβ)又各有三个高变区CDR1、CDR2、CDR3，其中以CDR3变异最大，直接决定了TCR的抗原结合特异性。在TCR识别MHC-抗原肽复合体时，CDR1，CDR2识别和结合MHC分子抗原结合槽的侧壁，而CDR3直接与抗原肽相结合。TCR分为两类：TCR1和TCR2；TCR1由γ和δ两条链组成，TCR2由α和β两条链组成。

术语“T细胞融合蛋白 (T cell fusion protein，TFP)”，包括构成TCR的各种多肽衍生的重组多肽，其能够结合到靶细胞上的表面抗原，和与完整的TCR复合物的其他多肽相互作用，通常同定位在T细胞表面。TFP由一个TCR亚基与人或人源化抗体结构域组成的一个抗原结合结构域组成，其中，TCR亚基包括至少部分TCR胞外结构域、跨膜结构域、TCR胞内结构域的胞内信号结构域的刺激结构域；该TCR亚基和该抗体结构域有效连接，其中，TCR亚基的胞外、跨膜、胞内信号结构域来源于CD3 ε或CD3γ，并且，该TFP整合进T细胞上表达的TCR。

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

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

术语“抗体片段”是指保留与抗原的表位特异性地相互作用 (例如，通过结合、空间位阻、稳定化/去稳定化、空间分布)的能力的抗体的至少一部分。抗体片段的实例包括，但不限于Fab，Fab'、$F(ab')_2$、Fv片段、scFv、二硫键-连接的Fvs (sdFv)、由VH和CH1结构域组成的Fd片段、线性抗体、单域抗体（如sdAb）、由抗体片段 (例如包括在铰链区通过二硫键连接的两个Fab片段的二价片段)形成的多特异性抗体和抗体的分离的CDR或其它表位结合片段。

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

(例如相对于多肽的N-末端和C末端)具有所述的VL和VH可变区，scFv可以包括VL-接头-VH或可以包括VH-接头-VL。

术语“抗体重链”是指以其天然存在的构型存在于抗体分子中且通常决定抗体所属类型的两种多肽链中较大者。

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

术语“重组抗体”是指使用重组DNA技术产生的抗体，比如例如由噬菌体或酵母菌表达系统表达的抗体。该术语也应当解释为指已经通过合成编码抗体的DNA分子 (且其中DNA分子表达抗体蛋白质)或指定抗体的氨基酸序列产生的抗体，其中所述DNA或氨基酸序列已经使用重组DNA或本领域可获得且熟知的氨基酸序列技术获得。

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

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

本发明所述的肿瘤抗原可以是实体瘤抗原，也可以是血液瘤抗原。

本发明的肿瘤抗原包括但不限于：促甲状腺激素受体 (TSHR)；CD171；CS-1；C型凝集素样分子-1；神经节苷脂GD3；Tn抗原；CD19；CD20；CD 22；CD 30；CD 70；CD 123；CD 138；CD33；CD44；CD44v7/8；CD38；CD44v6；B7H3 (CD276)，B7H6；KIT (CD117)；白介素13受体亚单位α (IL-13Rα)；白介素11受体α (IL-11Rα)；前列腺干细胞抗原 (PSCA)；前列腺特异性膜抗原(PSMA)；癌胚抗原 (CEA)；NY-ESO-1；HIV-1 Gag；MART-1；gp100；酪氨酸酶；间皮素；EpCAM；蛋白酶丝氨酸21 (PRSS21)；血管内皮生长因子受体，血管内皮生长因子受体2 (VEGFR2)；路易斯(Y)抗原；CD24；血小板衍生生

长因子受体β (PDGFR-β)；阶段特异性胚胎抗原-4 (SSEA-4)；细胞表面相关的粘蛋白1 (MUC1)，MUC6；表皮生长因子受体家族及其突变体 (EGFR，EGFR2，ERBB3，ERBB4，EGFRvIII)；神经细胞粘附分子 (NCAM)；碳酸酐酶IX (CAIX)；LMP2；肝配蛋白A型受体2 (EphA2)；岩藻糖基GM1；唾液酸基路易斯粘附分子 (sLe)；神经节苷脂GM3；TGS5；高分子量黑素瘤相关抗原 (HMWMAA)；邻乙酰基GD2神经节苷脂 (OAcGD2)；叶酸受体；肿瘤血管内皮标记1 (TEM1/CD248)；肿瘤血管内皮标记7相关的 (TEM7R)；Claudin 6，Claudin18.2、Claudin18.1；ASGPR1；CDH16；5T4；8H9；αvβ6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 (GPRC5D)；X染色体开放阅读框61 (CXORF61)；CD97；CD179a；间变性淋巴瘤激酶 (ALK)；聚唾液酸；胎盘特异性1 (PLAC1)；globoH glycoceramide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β3 (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)；TCRγ交替阅读框蛋白 (TARP)；肾母细胞瘤蛋白 (WT1)；ETS 易位变异基因6 (ETV6-AML)；精子蛋白17 (SPA17)；X抗原家族成员1A (XAGE1)；血管生成素结合细胞表面受体2 (Tie2)；黑素瘤癌睾丸抗原-1 (MAD-CT-1)；黑素瘤癌睾丸抗原-2 (MAD-CT-2)；Fos相关抗原1；p53突变体；人端粒酶逆转录酶 (hTERT)；肉瘤易位断点；细胞凋亡的黑素瘤抑制剂 (ML-IAP)；ERG(跨膜蛋白酶丝氨酸2 (TMPRSS2)ETS融合基因)；N-乙酰葡糖胺基转移酶V (NA17)；配对盒蛋白Pax-3 (PAX3)；雄激素受体；细胞周期蛋白B1；V-myc鸟髓细胞瘤病病毒癌基因神经母细胞瘤衍生的同源物 (MYCN)；Ras同源物家族成员C (RhoC)；细胞色素P450 1B1 (CYP1B1)；CCCTC结合因子(锌指蛋白)样 (BORIS)；由T细胞识别的鳞状细胞癌抗原3 (SART3)；配对盒蛋白Pax-5 (PAX5)；proacrosin结合蛋白sp32 (OYTES1)；淋巴细胞特异性蛋白酪氨酸激酶 (LCK)；A激酶锚定蛋白4 (AKAP-4)；滑膜肉瘤X断点2 (SSX2)；CD79a；CD79b；CD72；白细胞相关免疫球蛋白样受体1 (LAIR1)；IgA受体的Fc片段 (FCAR)；白细胞免疫球蛋白样受体业家族成员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)。

病原体抗原选自：病毒、细菌、真菌、原生动物，或寄生虫的抗原；病毒抗原选自：

巨细胞病毒抗原、爱泼斯坦-巴尔病毒抗原、人类免疫缺陷病毒抗原,或流感病毒抗原。

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

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

术语“特异性地结合”是指抗体或配体结合存在于样品中的结合配偶体(例如肿瘤抗原)，但基本上不识别或结合样品中的其它分子。

这里使用的“难治”指的是一种疾病，例如，肿瘤，其不应答治疗。在实施方案中，难治性肿瘤可以是对治疗开始前或开始时的治疗有抗性。在其他实施方案中，难治性肿瘤可以成为治疗期间抗性的。在本发明中，难治性肿瘤包括但不限于放疗不敏感、放疗后复发、化疗不敏感、化疗后复发、对CAR-T治疗不敏感或治疗后复发的肿瘤。难治性或复发性恶性肿瘤可以使用本文中描述的治疗方案。

如本文所用“复发的”是指在一段改进期，例如在先有效肿瘤治疗后，患者又再出现该有效治疗之前的体征和症状。

术语“个体”和“受试者”在本文中具有同等含义，可以是人和来自其他种属的动物。

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，增强的应答可以包含应答性中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效应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。

在一个方面，治疗由临床结果；通过T细胞的抗肿瘤活性增加、增强或延长；与治疗

前的数目相比较，抗肿瘤T细胞或活化T细胞数目的增加，促进IFN-γ分泌，或其组合决定。在另一个方面，临床结果是肿瘤消退；肿瘤缩小；肿瘤坏死；通过免疫系统的抗肿瘤应答；肿瘤扩大，复发或扩散或其组合。在一个另外方面，治疗效应通过T细胞的存在、指示T细胞炎症的基因标记的存在，促进IFN-γ分泌，或其组合预测。

如本文公开的免疫效应细胞可以通过各种途径施用于个体，包括例如经口或肠胃外，例如静脉内、肌内、皮下、眶内、囊内、腹膜内、直肠内、脑池内、瘤内、鼻内(intravasally)、皮内或者分别使用例如皮肤贴片或透皮离子电渗疗法通过皮肤的被动或促进吸收。

在实践本发明的方法中待施用的试剂总量可以作为单一剂量以推注或通过在相对短时间段的输注，施用于受试者，或可以使用分级治疗方案进行施用，其中在延长时间段施用多个剂量。本领域技术人员将知道治疗受试者中的病理状况的组合物的量取决于许多因素，包括受试者的年龄和一般健康、以及施用途径和待施用的治疗次数。考虑到这些因素，技术人员将根据需要调整具体剂量。一般而言，最初，使用I期和II期临床试验测定组合物的配制以及施用途径和频率。

范围：在整个公开中，本发明的各个方面都可以以范围形式存在。应当理解，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发明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。例如，范围的描述比如从1至6就应当被认为具体地公开了子范围比如1至3、1至4、1至5、2至4、2至6、3至6等，以及该范围内的单独数值，例如1、2、2.7、3、4、5、5.3和6。作为另一个实例，范围比如95-99％的同一性包括具有95％、96％、97％、98％或99％同一性的范围，并且包括子范围比如96~99％、96~98％、96~97％、97~99％、97~98％和98~99％的同一性。不考虑范围的宽度，这均适用。

根据本公开内容，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，而不背离本发明的精神和范围。本发明在范围上并不受限于本文描述的具体实施方案(其仅预期作为本发明的各方面的举例说明)，并且功能等价的方法和组分在本发明的范围内。事实上，本发明的各种修饰加上本文显示且描述的那些，根据前述描述对于本领域技术人员将变得明显。

当采用的共表达IL7和CCL21的CAR-T细胞用于受试者时，可以选择相应种属，如当用于鼠时，采用鼠源的IL7和CCL21，构建CAR的元件如跨膜域、胞内域等也可以选择鼠源的。当受试者为人时，优选人源的IL7和CCL21及人源的CAR的元件。在一些实施方式中，使用的CAR的序列可以如SEQ ID NO：26、27、或34所示。

在一些实施方案中，本发明的细胞在用于肿瘤治疗时可以与化疗药物联合应用。

术语“CLD18(claudin 18)”指密蛋白-18，并包括细胞天然表达的或转染了CLD18基因的细胞所表达的任何CLD18的变体(包括CLD18A1(claudin 18.1)和CLD18A2(claudin 18.2))、构象、同工型(isoform)和种间同源物(specieshomologs)。优选地，“CLD18”指人CLD18，特别是CLD18A2 (SEQ ID NO:22) 和/或CLD18A1 (SEQ ID NO:23)，更优选CLD18A2。

术语“CLD18A1”包括细胞天然表达的或转染了CLD18A1基因的细胞所表达的任何人CLD18A1的翻译后修饰变体、同工型和种间同源物。

术语“CLD18A2”包括细胞天然表达的或转染了CLD18A2基因的细胞所表达的任何人CLD18A2的翻译后修饰变体、同工型和种间同源物。

术语“CLD18变体”应包括(i) CLD18剪接变体，(ii) CLD18 翻译后修饰变体，特别是包括N糖基化状态不同的变体，(iii) CLD18构象变体，特别是包括CLD18-构象-1、CLD18-构象-2和CLD18-构象-3，(iv) 位于胞间紧密连接处的游离CLD18和同型/异型相关联变体，(v) CLD18癌症相关变体和CLD18非癌症相关变体。

本发明的嵌合抗原受体多肽可以选自按如下方式顺序连接：

胞外抗原结合区-CD8跨膜区-4-1BB-CD3ζ，

胞外抗原结合区-CD8跨膜区-CD28b-CD3ζ，

胞外抗原结合区-CD28a-CD28b-CD3ζ，

胞外抗原结合区-CD28a-CD28b-4-1BB-CD3ζ，

及其组合，其中相关嵌合抗原受体蛋白中CD28a代表CD28分子的跨膜区，CD28b代表CD28分子的胞内信号区。本发明也包括编码所述嵌合抗原受体的核酸。本发明还涉及上述多核苷酸的变异体，其编码与本发明有相同的氨基酸序列的多肽或多肽的片段、类似物和衍生物。

本发明还提供了包含上述嵌合抗原受体的核酸的载体。本发明还包括包含上述载体的病毒。本发明的病毒包括包装后的具有感染力的病毒，也包括包含包装为具有感染力的病毒所必需成分的待包装的病毒。本领域内已知的其它可用于将外源基因转导入免疫效应细胞的病毒及其对应的质粒载体也可用于本发明。

本发明还提供了嵌合抗原修饰的免疫效应细胞，其被转导有编码所述的嵌合抗原受体的核酸或被转导有上述包含所述含有该核酸的重组质粒，或包含该质粒的病毒。本领域常规的核酸转导方法，包括非病毒和病毒的转导方法都可以用于本发明。基于非病毒的转导方法包括电穿孔法和转座子法。近期Amaxa公司研发的Nucleofector核转染仪能够直接将外源基因导入细胞核获得目的基因的高效转导。另外，基于睡美人转座子(Sleeping

Beauty system)或PiggyBac转座子等转座子系统的转导效率较普通电穿孔有较大提高，将nucleofector转染仪与睡美人转座子系统联合应用已有报道[Davies JK.，et al. Combining CD19 redirection and alloanergization to generate tumor-specific human T cells for allogeneic cell therapy of B-cell malignancies. Cancer Res，2010，70(10): OF1-10.]，该方法既具有较高的转导效率又能够实现目的基因的定点整合。在本发明的一个实施方案中，实现嵌合抗原受体基因修饰的免疫效应细胞的转导方法是基于病毒如逆转录病毒或慢病毒的转导方法。该方法具有转导效率高，外源基因能够稳定表达，且可以缩短体外培养免疫效应细胞到达临床级数量的时间等优点。在该转基因免疫效应细胞表面，转导的核酸通过转录、翻译表达在其表面。通过对各种不同的培养的肿瘤细胞进行体外细胞毒实验证明，本发明的嵌合抗原修饰的免疫效应细胞具有高度特异性的肿瘤细胞杀伤效果(亦称细胞毒性)，且能够在肿瘤组织中有效存活。因此本发明的编码嵌合抗原受体的核酸，包含该核酸的质粒，包含该质粒的病毒和转导有上述核酸，质粒或病毒的转基因免疫效应细胞可以有效地用于肿瘤的免疫治疗。

本发明所述的嵌合抗原修饰的免疫效应细胞还可以表达除了上述嵌合受体以外的另一种嵌合受体，该受体不含有CD3ζ，但含有CD28的胞内信号结构域、CD137的胞内信号结构域或者这两者的组合。

本发明的嵌合抗原受体修饰的免疫效应细胞可以应用于制备药物组合物或诊断试剂。所述的组合物除了包括有效量的所述免疫细胞，还可包含药学上可接受的载体。术语“药学上可接受的”是指当分子本体和组合物适当地给予动物或人时，它们不会产生不利的、过敏的或其它不良反应。

可作为药学上可接受的载体或其组分的一些物质的具体例子是糖类，如乳糖、葡萄糖和蔗糖；淀粉，如玉米淀粉和土豆淀粉；纤维素及其衍生物，如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和甲基纤维素；西黄蓍胶粉末；麦芽；明胶；滑石；固体润滑剂，如硬脂酸和硬脂酸镁；硫酸钙；植物油，如花生油、棉籽油、芝麻油、橄榄油、玉米油和可可油；多元醇，如丙二醇、甘油、山梨糖醇、甘露糖醇和聚乙二醇；海藻酸；乳化剂，如Tween®；润湿剂，如月桂基硫酸钠；着色剂；调味剂；压片剂、稳定剂；抗氧化剂；防腐剂；无热原水；等渗盐溶液和磷酸盐缓冲液等。

本发明的组合物可根据需要制成各种剂型，并可由医师根据患者种类、年龄、体重和大致疾病状况、给药方式等因素确定对病人有益的剂量进行施用。给药方式可以采用注射或其它治疗方式。

本发明的优点：

1.本文所提供的免疫效应细胞可有效地增加所述免疫效应细胞在肿瘤内的增殖、存活及功能；降低抑制性免疫检查点的表达，从而缓解T细胞的耗竭。

2. 本文所提供的免疫效应细胞对实体瘤细胞具备更优异的杀伤效果以及体外扩增性能。

下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不用于限制本发明的范围。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。

本发明的示例性的抗原受体，包括CAR，以及用于工程改造和将受体导入细胞中的方法，参考例如中国专利申请公开号CN107058354A、CN107460201A、CN105194661A、CN105315375A、CN105713881A、CN106146666A、CN106519037A、CN106554414A、CN105331585A、CN106397593A、CN106467573A、CN104140974A、国际专利申请公开号WO2017186121A1 、WO2018006882A1、WO2015172339A8、WO2018/018958A1中公开的那些。

实施例1. 表达嵌合抗原受体的T细胞的构建

本实施例选择Claudin18.2作为CAR-T细胞的靶点，为了更准确的验证在小鼠体内的抗肿瘤效果，因此，选择的信号肽、跨膜区、胞内区等为鼠源的。制备的方法按照本领域常规的CAR-T细胞制备方法操作。

1、质粒构建

采用本领域常规分子生物学方法，本实施例采用的scFv为靶向人Claudin18.2抗体，核酸序列如SEQ ID NO：1所示，所采用的嵌合抗原受体为二代的嵌合抗原受体，具有mCD8的跨膜域、mCD28的胞内域和/或m4-1BB胞内域、及mCD3ζ。

1. 以MSCV.pBABE 5（购自addgene公司）为载体，构建了表达二代嵌合抗原受体的逆转录病毒质粒MSCV-hu8E5(2I)-28Z。hu8E5(2I)-28Z的核酸序列包含了CD8α信号肽(SEQ ID NO：3)、scFv(SEQ ID NO：1)、mCD8铰链区和跨膜区(SEQ ID NO：5)和mCD28胞内信号传导结构域(SEQ ID NO：7)以及mCD3的胞内段mCD3ζ(SEQ ID NO：9)组成。hu8E5(2I)-28Z的质粒构建图如图1A所示。

在MSCV-hu8E5(2I)-m28Z质粒的基础上插入F2A-mIL7-P2A-mCCL21a或F2A-

mIL7-P2A-mCCL21b的基因，构建表达CAR、IL7及CCL21的逆转录病毒质粒MSCV-hu8E5(2I)-m28Z-F2A-mIL7-P2A-mCCL21a (质粒图如图1B所示)和MSCV-hu8E5(2I)-m28Z-F2A-mIL7-P2A-mCCL21b（质粒图如图1C所示）。

F2A-mIL7-P2A-mCCL21a由F2A(SEQ ID NO : 11)、mouse IL7(SEQ ID NO : 13)组成、P2A(SEQ ID NO : 16)、mouse CCL21a(SEQ ID NO : 14)组成；F2A-mIL7-P2A-mCCL21b由F2A(SEQ ID NO : 11)、mouse IL7(SEQ ID NO : 13)组成、P2A(SEQ ID NO : 16)、mouse CCL21b(SEQ ID NO : 15)组成。

以MSCV.pBABE 5为载体，构建了表达二代嵌合抗原受体的逆转录病毒质粒MSCV-hu8E5(2I)- mBBZ。hu8E5(2I)- mBBZ序列由CD8α信号肽(SEQ ID NO : 3)、scFv(SEQ ID NO : 1)、mCD8 hinge和跨膜区(SEQ ID NO : 5)和m4-1BB胞内信号传导结构域(SEQ ID NO : 24)以及mCD3的胞内段CD3ζ(SEQ ID NO : 9)组成。质粒图如图1D所示。

在MSCV- hu8E5(2I)-mBBZ质粒的基础上分别插入了F2A-mIL-7-P2A-mCCL21a、F2A-mIL7-P2A-mCCL21b，构建了表达CAR、IL7及CCL21的逆转录病毒质粒MSCV-hu8E5(2I)-mBBZ-F2A-mIL-7-P2A-mCCL21a(质粒图如图1E所示) 、MSCV-hu8E5(2I)-mBBZ-F2A-mIL7-P2A-mCCL21b(质粒图如图1F所示)。

2. 将MSCV-hu8E5(2I)-m28Z、MSCV-hu8E5(2I)-m28Z-F2A-mIL-7-P2A-mCCL21a、MSCV-hu8E5(2I)-m28Z-F2A-mIL7-P2A-mCCL21b、MSCV- hu8E5 (2I) -mBBZ、MSCV-hu8E5(2I)-mBBZ-F2A-mIL-7-P2A-mCCL21a、MSCV-hu8E5(2I)-mBBZ-F2A-mIL7-P2A-mCCL21b分别转染293T细胞，得到逆转录病毒hu8E5(2I)-28Z、IL7-CCL21a-28Z、IL7-CCL21b-28Z、hu8E5(2I)-BBZ、IL7-CCL21a-BBZ、IL7-CCL21b-BBZ。

3. 小鼠T细胞提取以及活化：剥离C57BL/6小鼠脾脏提取小鼠T细胞，经培养和活化后，将所得的逆转录病毒hu8E5(2I)-28Z、IL7-CCL21a-28Z、IL7-CCL21b-28Z、hu8E5(2I)-BBZ、IL7-CCL21a-BBZ、IL7-CCL21b-BBZ分别感染T细胞，得到m28Z CAR-T细胞、m28Z-7*21A CAR-T细胞、m28Z-7*21B CAR-T细胞、mBBZ CAR-T细胞、mBBZ-7*21A CAR-T细胞、及mBBZ-7*21B CAR-T细胞。

实施例2. 体外细胞因子检测

首先利用丝裂霉素C对小鼠胰腺癌细胞PANC02（claudin18.2表达阴性，购自ATCC）与PANC02-A2（claudin18.2表达阳性）进行预处理（40μg/ml，37℃，2-3h）。

按2×10^5细胞/ 400ul接种于24孔板，并按照效靶比1:1分别接种Untransduced T细

胞(UTD)、mBBZ CAR-T细胞、mBBZ- 7*21A CAR-T细胞、mBBZ-7*21B CAR-T细胞于24孔板。其中设置不加靶细胞的对照组，第3天后收集细胞上清，利用ELISA试剂盒检测各细胞因子IL7和CCL21的分泌情况，结果如图2所示。

其中，PANC02-A2细胞时利用pwpt-mclaudin18.2慢病毒感染PANC02细胞构建。pWPT-mclaudin18.2质粒构建过程为：体外合成鼠claudin18.2基因（GeneBank参考序列号为：NM_001194921），通过酶切、连接的方法将其装入慢病毒表达载体pWPT，构建成pwpt-mclaudin18.2质粒。

实施例3.体外CAR-T细胞表型检测

取的UTD、mBBZ CAR-T细胞、mBBZ-7*21A CAR-T细胞、mBBZ- 7*21B CAR-T细胞检测细胞表面免疫检查点：PD-1、LAG-3、TIM-3。首先分别收集不同CAR-T细胞于EP管中，每种细胞分别分为3管，用预冰浴的流式洗涤液（1%NCS加PBS配制）洗涤2次，不同检测管分别按1:50比例稀释加入BV421标记的anti-PD-1抗体、APC标记的anti-LAG-3抗体、APC标记的anti-TIM-3抗体，冰上孵育45min，洗涤3次后转至流式管检测。结果如图3A~3F所示。

图3A显示了不同组的细胞表达PD-1的情况，结果显示，mBBZ组的PD-1的分泌达到30.2%，mBBZ-7*21A组PD-1的分泌仅有11.7%，mBBZ-7*21B组PD-1的分泌仅有9.4%，图3B显示了PD-1的表达强度，从图3B看，mBBZ组PD-1的表达高于mBBZ-7*21A组和mBBZ-7*21B组。

图3C显示了不同组的细胞表达LAG-3的情况，结果显示，mBBZ组的LAG-3的分泌达到80.7%，mBBZ-7*21A组LAG-3的分泌为53.4%，mBBZ-7*21B的分泌为13.7%。图3D显示了LAG-3的表达强度，从图3D看，mBBZ组LAG-3的表达高于mBBZ-7*21A组和mBBZ-7*21B组。

图3E显示了不同组的细胞表达TIM-3的情况，结果显示，mBBZ组的TIM-3的分泌达到41.3%，mBBZ-7*21A组TIM-3的分泌为16.2%，mBBZ-7*21B的分泌为13.2%。图3F显示了TIM-3的表达强度，从图3F看，mBBZ组TIM-3的表达高于mBBZ-7*21A组和mBBZ-7*21B。

综上所述，mBBZ-7*21A CAR-T细胞和mBBZ- 7*21B CAR-T细胞的PD-1、LAG-3和TIM-3的表达均比mBBZ-CAR-T细胞低，说明过表达细胞因子IL7和CCL21后能够降低这些抑制性免疫检查点的表达，从而缓解T细胞的耗竭。

实施例4. 体外杀伤毒性检测

采用CytoTox 96非放射性细胞毒性检测试剂盒(Promega公司)进行。具体方法参照CytoTox 96非放射性细胞毒性检测试剂盒说明书。

效应细胞：按效靶比3:1、1:1或1:3分别接种UTD细胞、m28Z CAR-T细胞、28Z-7*21A CAR-T细胞、m28Z-7*21B CAR-T、mBBZ CAR-T细胞、mBBZ- 7*21A CAR-T细胞、mBBZ-7*21B CAR-T细胞于96孔板。

靶细胞：分别接种50μL 2×10^5/mL的小鼠胰腺癌细胞系PANC02-A2与PANC02细胞到相应的96孔板。

每组均设置5个复孔。将培养板置于细胞培养箱中孵育18h。

其中各实验组及各对照组设置如下：实验组：各靶细胞+不同的CAR-T 细胞；对照组1：靶细胞最大释放LDH；对照组2：靶细胞自发释放LDH；对照组3：效应细胞自发释放LDH。计算公式为：%细胞毒性=[(实验组-效应细胞自发组-靶细胞自发组)/(靶细胞最大-靶细胞自发)]*100。实验结果如图4A和4B所示。

图4A可见，m28Z CAR-T细胞、m28Z-7*21A CAR-T细胞、或m28Z-7*21B CAR-T与对照组UTD相比，对PANC02-A2在效靶比为3:1和1:1都有显著的毒性杀伤作用，对PANC02细胞没有杀伤作用。

图4B可见，mBBZ CAR-T细胞、mBBZ- 7*21A CAR-T细胞、mBBZ-7*21B CAR-T与对照组UTD相比，对PANC02-A2在效靶比为3:1和1:1都有显著的毒性杀伤作用，对PANC02细胞没有杀伤作用。

实施例5. 体外增殖检测

采用丝裂霉素C处理靶细胞PANC02-A2细胞（40 μg/ml，37度，2-3h），对效应细胞UTD细胞、mBBZ CAR-T细胞、mBBZ-7*21A CAR-T细胞、mBBZ- 7*21B CAR-T细胞分别进行CFSE染色，然后按照效靶比（1×10^6细胞/ml）1 : 1共孵2天，

流式检测CAR-T细胞增殖情况，结果如图5所示，mBBZ-7*21A CAR-T细胞和mBBZ- 7*21B CAR-T细胞相较于mBBZ CAR-T细胞均能够更快的增殖。

实施例6. PANC02-A2胰腺癌皮下移植瘤模型**肿瘤治疗**

1) 实验分组：C57BL/6小鼠（购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司）6-8周龄随机分组，每组5-6只，分别为UTD细胞、mBBZ CAR-T细胞、mBBZ-7*21A CAR-T细胞、mBBZ- 7*21B CAR-T细胞治疗组。

2) 皮下移植瘤的接种：胰酶消化法收集处于对数生长期且生长状态良好的PANC02-A2细胞，用PBS洗涤1次后，调整细胞密度为6×10^6/mL，在C57BL/6小鼠右侧腹部皮下注射200μL细胞悬液，即每只小鼠接种1.2×10^6的肿瘤细胞，接种日记为第0天。

3) CAR-T细胞回输：皮下接种肿瘤细胞后D11天，肿瘤平均体积约60mm^3。注射未处理T细胞或CAR-T细胞，注射剂量：2.5×10^6/只。

结果如图6所示，CAR-T注射后20天，肿瘤抑制率分别为：mBBZ CAR-T组：35.5%，mBBZ-7*21A CAR-T组：63%，mBBZ-7*21B CAR-T组：62.4%，说明mBBZ-7*21A CAR-T细胞和mBBZ-7*21B CAR-T细胞治疗组的抗肿瘤效果好于mBBZ CAR-T细胞($P<0.05$）。

实施例7. 表达不同趋化因子的肿瘤杀伤比较

本实施例选择表达IL7和CCL19的CAR-T 细胞（mBBZ-7*19 CAR-T细胞）作为对照。mBBZ-7*19 CAR-T细胞的制备参照实施例1进行，在MSCV- hu8E5(2I)-mBBZ质粒的基础上插入F2A-mIL7-P2A-mCCL19，构建了表达CAR、IL7及CCL19的逆转录病毒质粒，质粒图如图7所示，mCCL19的核酸序列如SEQ ID NO : 34所示。质粒感染小鼠的T细胞，得到mBBZ-7*19 CAR-T细胞。

1）、参照实施例6的操作制作小鼠的胰腺癌皮下移植瘤模型，在肿瘤平均体积约65mm^3时，分别注射mBBZ CAR-T细胞、mBBZ-7*19 CAR-T细胞、mBBZ- 7*21B CAR-T细胞治疗组，注射剂量：2.5×10^6细胞/只，肿瘤杀伤结果如图8A所示，肿瘤抑制率分别是： mBBZ CAR-T组：22.8%， mBBZ-7*19 CAR-T组：32.7%，mBBZ-7*21B CAR-T组：76.6%，mBBZ-7*21B CAR-T细胞治疗组的抗肿瘤效果好于mBBZ CAR-T细胞和mBBZ-7*19 CAR-T细胞组。

同时，检测到各组小鼠体重变化（如图8B所示），结果显示各组小鼠之间体重没有显著性差异（ns），提示细胞因子的分泌对小鼠没有毒性作用。

2）、在肿瘤接种后的第31天，将小鼠实施安乐死，剥离小鼠肿瘤并称量瘤重，具体统计结果如图8C所示。结果显示mBBZ-7*21B CAR-T治疗组肿瘤重量明显小于mBBZ组（$P<0.05$），说明嵌合抗原受体修饰的T细胞共表达IL7、CCL21能显著增加T细胞对体内肿瘤的抑制。

3）、回输CAR-T细胞后，在d31天结束实验的时候剥离肿瘤组织，检测肿瘤组织CAR-T拷贝数。

取1mg肿瘤组织块进行机械研磨，然后利用QIAamp® genomic DNA kits提取肿瘤中的DNA，分别测量每个样品浓度。利用实时定量PCR(qPCR)检测CAR拷贝数。根据模板质粒进行标准曲线制作，最后算出每个样品中CAR的拷贝数。

结果如图8D所示，显示mBBZ-7*21B CAR-T的CAR-T拷贝数较高

4）、免疫组化检测$CD8^+$细胞的肿瘤浸润

取步骤2）安乐死后小鼠的肿瘤组织，制备石蜡组织切片，常规脱蜡后，对标本进行水化；水化完成后将切片置于摇床上PBS清洗3次，将盛有柠檬酸缓冲液煮沸后将组织切片放入柠檬酸缓冲液中，进行抗原热修复；修复完成后采用1% BSA封闭。

将封闭好的切片加入相应的CD8a的抗体（anti-mouse CD8αantibody，购自：Cell Signaling）或空白对照试剂，4℃孵育过夜；用0.5% PBST缓冲液洗涤；然后用PBS缓冲液洗涤。

将洗涤好的切片加入二抗羊抗兔-HRP，37℃孵育1h。用0.5% PBST缓冲液洗涤2次后，用PBS缓冲液洗涤1次，DAB (Dako REAL™ EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB+, 1: 50稀释)显色。

苏木紫复染至细胞核染至深红色，将复染后的组织切片置于1% 盐酸乙醇分化液分化3～5秒钟；自来水冲洗20 min后脱水透明；90%乙醇浸泡1 min；100%乙醇I浸泡1 min；100%乙醇II浸泡1 min；二甲苯浸泡3 min；中性树胶封片，风干。

显微镜下观察，结果如图8E所示，虽然mBBZ-7*19组和mBBZ-7*21B组肿瘤组织中都有明显的$CD8^+$ T细胞的浸润，但其中mBBZ-7*21B CAR-T组$CD8^+$ T细胞浸润较多。

实施例8. 小鼠的乳腺癌原位移植瘤模型

制作小鼠的乳腺癌皮下移植瘤模型，胰酶消化法收集处于对数生长期且生长状态良好的E0771-A2细胞（制备方法：利用pwpt-mclaudin18.2质粒包装慢病毒感染E0771细胞），用PBS洗涤1次后，调整细胞密度为2×10^7/mL，在C57BL/6小鼠右侧腹部第四对乳房皮下注射50μL细胞悬液，即每只小鼠接种1×10^6的E0771-A2细胞，接种日记为第0天。

CAR-T细胞回输：皮下接种肿瘤细胞后D12天，肿瘤平均体积约150mm^3。注射未处理T细胞或CAR-T细胞，注射剂量：2.5×10^6 /只。

每隔3-4天测量E0771-A2移植瘤体积的大小，记录每组小鼠瘤体积变化，结果如图9A所示，相比mBBZ-7*19 CAR-T组，mBBZ-7*21B CAR-T治疗组的肿瘤杀伤能力显

著增强。

在肿瘤接种后的第31天，将小鼠实施安乐死，剥离小鼠肿瘤并称量瘤重，具体统计结果如图9B所示。结果显示mBBZ-7*21B CAR-T治疗组肿瘤重量明显小于mBBZ-7*19 CAR-T组（P<0.05）和mBBZ CAR-T组（P<0.001），说明嵌合抗原受体修饰的T细胞共表达IL7、CCL21能显著增加T细胞对体内肿瘤的抑制。

参照实施例7步骤3）的操作，检测乳腺癌皮下移植瘤模型的CAR-T的细胞拷贝，结果如图9C所示，mBBZ-7*19 CAR-T和mBBZ-7*21B CAR-T组的CAR-T拷贝数高于UTD和BBZ组。

参照实施例7步骤4）的操作，检测$CD8^+$细胞的肿瘤浸润情况，结果如图9D所示，mBBZ-7*19 CAR-T组和mBBZ-7*21B CAR-T组肿瘤组织中有明显的CD8 T细胞的浸润，其中mBBZ-7*21B CAR-T组$CD8^+$ T细胞浸润较多。

实施例9. 小鼠的肝癌皮下移植瘤模型

制作小鼠的肝癌移植瘤模型，胰酶消化法收集处于对数生长期且生长状态良好的Hepa1-6-A2细胞（利用pwpt-mclaudin18.2质粒包装慢病毒感染Hepa1-6细胞），用PBS洗涤1次后，调整细胞密度为5×10^7/mL，在C57BL/6小鼠右侧腹部皮下注射200μL细胞悬液，即每只小鼠接种1×10^7的Hepa1-6-A2肝癌细胞，接种日记为第0天。

CAR-T细胞回输：皮下接种肿瘤细胞后D7天，肿瘤平均体积约300mm^3。注射未处理T细胞或CAR-T细胞，注射剂量：1×10^6/只。

每隔3-4天测量Hepa1-6-A2移植瘤体积的大小，记录每组小鼠瘤体积变化，结果如图10A所示，相比mBBZ-7*19 CAR-T组，mBBZ-7*21B CAR-T治疗组的肿瘤杀伤能力显著增强。

在肿瘤接种后的第31天，将小鼠实施安乐死，剥离小鼠肿瘤并称量瘤重，具体统计结果如图10B所示。结果显示mBBZ-7*21B CAR-T治疗组肿瘤重量明显小于mBBZ-7*19 CAR-T组（p<0.01）和8E5-2I-mBBZ CAR-T组（p<0.05），说明嵌合抗原受体修饰的T细胞共表达IL7、CCL21能显著增加T细胞对体内肿瘤的抑制。

参照实施例7步骤3）的操作，检测CAR-T细胞拷贝数，结果如图10C所示，mBBZ-7*21B CAR-T组的CAR-T拷贝数较高。

参照实施例7步骤4）的操作，检测$CD8^+$细胞的肿瘤浸润情况，结果如图10D所示，mBBZ-7*19 CAR-T组和mBBZ-7*21B CAR-T组肿瘤组织中有明显的$CD8^+$ T细胞的浸润，其中mBBZ-7*21B CAR-T组$CD8^+$ T细胞浸润较多。

实施例10. 体外IFN-γ检测

将UTD、8E5-2I-mBBZ-CAR、mBBZ-7*21B CAR-T、及mBBZ-7*19 CAR-T分别与靶细胞PANC02-A2，按照1: 1共孵24h后收上清后ELISA检测上清中IFN-γ的分泌水平。采用的ELISA试剂盒为联科生物mouse IFN-γ检测试剂盒。

结果如图11所示，mBBZ-7*21B CAR-T细胞与claudin18.2阳性的肿瘤细胞共孵育后有较多的IFN-γ分泌。

实施例11. 小鼠PANC02-A2胰腺癌皮下瘤清淋模型的治疗

参照实施例6的操作，制备C57BL/6小鼠的PANC02-A2皮下移植瘤模型，接种日记为第0天，肿瘤接种后第14天，肿瘤平均体积约60mm^3，按照100mg/kg，尾静脉注射环磷酰胺，肿瘤接种后第15天，注射未处理T细胞或CAR-T细胞，注射剂量：2.5×10^6/只。

每隔3-4天测量PANC02-A2移植瘤体积的大小，记录每组小鼠瘤体积变化，结果如图12A所示，在肿瘤接种后的第38天，将小鼠实施安乐死，剥离小鼠肿瘤并称量瘤重，具体统计结果如图12B所示。

参照实施例7步骤3）的操作，检测CAR-T细胞拷贝数，结果如图12C所示，mBBZ-7*19 CAR-T和mBBZ-7*21B CAR-T组的CAR-T拷贝数高于UTD和BBZ组。

参照实施例7步骤4）的操作，检测CD8$^+$细胞的肿瘤浸润情况，结果如图12D所示。mBBZ-7*19 CAR-T组和mBBZ-7*21B CAR-T组肿瘤组织中有明显的CD8 T细胞的浸润，其中mBBZ-7*21B CAR-T组CD8 T细胞浸润较多。

实施例12. 小鼠PANC02-A2胰腺癌皮下瘤模型的CAR-T细胞检测分析

参照实施例 6 的操作，制备小鼠胰腺癌皮下移植瘤模型，在 C57BL/6 小鼠右侧腹部皮下注射 2×10^6 的 PANC02-A2 胰腺癌细胞，皮下接种肿瘤细胞后 D14 天，肿瘤平均体积约 60mm^3，分别注射未处理 T 细胞或 CAR-T 细胞（mBBZ CAR-T 细胞、mBBZ-7*21A CAR-T 细胞、及 mBBZ-7*19 CAR-T 细胞），注射剂量：4×10^6 /只。

1、分别提取 CAR-T 细胞治疗后第 10 天（d10）、第 20 天（d20）小鼠的脾脏、骨髓检测 Tcm（中心记忆性 T 细胞）的含量（各治疗组取 2 只小鼠）。实验方法如下：

1）脾脏细胞提取：通过颈椎脱臼的方法处死小鼠，取脾脏，置于干净的 2mL EP

管内，用 PBS 清洗掉血污。利用 40um 滤膜进行研磨取脾细胞。将脾细胞混合液 400g 5min 离心，去掉上清，加入 400μL 小鼠红细胞裂解液（1×），静置 5min，加入 1.5mL PBS 中和反应，离心，加入 PBS 重悬，分管进行抗体孵育，抗体标记为 CD8（PerCP）、CD44（BV510）、CD62L（APC）。

2）骨髓细胞提取：通过颈椎脱臼的方法处死小鼠，取小鼠股骨和胫骨，剔除肌肉，置于干净的 2mL EP 管内，用 PBS 清洗掉血污。取 2mL 注射器，抽吸 2mL 的 PBS，将针头沿着股骨或胫骨一端穿刺进去，用小镊子固定住，挤压活塞，冲洗取骨髓细胞。将细胞混合液 400g 5min 离心，去掉上清，加入 400μL 小鼠红细胞裂解液（1×），静置 5min，加入 400μL 小鼠红细胞裂解液（1×），静置 5min，加入 1.5mL PBS 中和反应，离心，加入 PBS 重悬，分管进行抗体孵育，抗体标记为 CD8（PerCP）、CD44（BV510）、CD62L（APC）。

d10 天脾脏中 Tcm 的检测情况如图 13A 所示，d20 天脾脏中 Tcm 的检测情况如图 13B 所示，相较于常规的 CAR-T，表达 IL7 和 CCL21 的 mBBZ-CAR-T 细胞组 Tcm 的含量显著增多。

d10 天骨髓中 Tcm 的含量情况如图 14A 所示，d20 天脾脏中 Tcm 的检测情况如图 14B 所示，相较于常规的 CAR-T，mBBZ-7*21BCAR-T 治疗后，骨髓中 Tcm 的含量显著增多。

2、DC 浸润检测

CAR-T 细胞治疗后第 10 天（d10）小鼠的肿瘤组织进行冰冻切片制作检测 DC 的浸润，结果如图 15 所示，相较于 mBBZ 细胞组，mBBZ-7*21B 细胞组小鼠肿瘤组织中有更多的 DC 细胞浸润。

3、MDSC（骨髓来源的抑制性细胞）的含量检测

分别提取 CAR-T 细胞治疗后第 10 天（d10）的 UTD 组、mBBZ 组、mBBZ-7*21B 组、和 mBBZ-7*19 CAR-T 组的小鼠的肿瘤组织，去除肿瘤表面脂肪、血管、包膜及内部坏死组织，PBS 冲洗，转入 5 mL 离心管加入 2 mL 培养液，将肿瘤剪碎至 1×1 mm 左右，补培养液至 4.7 mL 按比例加入消化酶（组织分离所使用的消化酶：collagenase type I（0.05mg/ml）、collagenase type IV（0.05mg/ml、hyaluronidase（0.025mg/ml）、DNase I（0.01mg/ml）37℃摇床 30 min 左右（中间取出观察消化情况）；消化后悬液过 70 um 细胞筛至 50 mL 管（冰上操作），用注射器推棒轻撵未消化完的组织，用大量（至 20 mL）培养液冲洗筛网并收集，同时终止消化，400g 离心 8 min，4℃，去上清 PBS 洗涤后分管进行抗体孵育，检测 $CD45^+$、$CD11b^+$（FITC）和 $Gr\text{-}1^+$（PE）的细胞的含量，即 MDSC

的含量。实验结果如图 16 所示：相较于 mBBZ 组，mBBZ-7*21B CAR-T 治疗后，肿瘤组织中 MDSC 的含量较少。

作为示例性的，上述实施例选择靶向CLD18A2的CAR-T细胞，应理解，选择作用于其他靶点的CAR-T细胞也具有相同的效果，如GPC3、EGFR、EGFRvIII、CD19、BCMA等。所采用的抗体可以是鼠抗也可以是人源化的，采用的跨膜域、胞内域也可以根据目的不同采用不同种属的，如采用人的。

作为示例性的，上述实施例虽然采用的是CAR-T细胞，但该T细胞还可以表达有其他增强CAR-T细胞功能的细胞因子，如CAR和I型干扰素共表达的CAR-T细胞、CAR和PD-1共表达的CAR-T细胞等。作为示例性的，上述实施例虽然采用的是CAR-T细胞，但还可以选择其他免疫细胞，如NK细胞、NK-T细胞，还可以具体选择免疫细胞的特定亚型，如γ/δT细胞等。

本发明所用的序列总结于下表：

SEQ ID NO.	名称	序列
1	Hu8E5-2I scFv 核酸序列	caggtgcagctgcaggagagcggccccggcctgatcaagcccagccagaccctgagcctgacctgcaccgtgagcggcggcagcatcagcagcggctacaactggcactggatccggcagccccccggcaagggcctggagtggatcggctacatccactacaccggcagcaccaactacaaccccgccctgcggagccgggtgaccatcagcgtggacaccagcaagaaccagttcagcctgaagctgagcagcgtgaccgccgccgacaccgccatctactactgcgcccggatctacaacggcaacagcttcccctactggggccagggcaccaccgtgaccgtgagcagcggtggaggcggttcaggcggaggtggttctggcggtggcggatcggacatcgtgatgacccagagccccgacagcctggccgtgagcctgggcgagcgggccaccatcaactgcaagagcagccagagcctgttcaacagcggcaaccagaagaactacctgacctggtaccagcagaagcccggccagccccccaagctgctgatctactgggccagcacccgggagagcggcgtgcccgaccggttcagcggcagcggcagcggcaccgacttcaccctgaccatcagcagcctgcaggccgaggacgtggccgtgtactactgccagaacgcctacagcttcccctacaccttcggcggcggcaccaagctggagatcaagcgg
2	Hu8E5-2I scFv 氨基酸序列	qvqlqesgpglikpsqtlsltctvsggsissgynwhwirqppgkglewigyihytgstnynpalrsrvtisvdtsknqfslklssvtaadtaiyycariyngnsfpywgqgttvtvssggggsggggsggggsdivmtqspdslavslgeratinckssqslfnsgnqknyltwyqqkpgqppklliywastresgvpdrfsgsgsgtdftltisslqaedvavyycqnaysfpytfgggtkleikr
3	mouse CD8α 信号肽核酸序列	atggcctcaccgttgacccgctttctgtcgctgaacctgctgctgctgggtgagtcgattatcctggggagtggagaagct

4	mouse CD8α信号肽氨基酸序列	maspltrflslnllllgesiilgsgea
5	mouse CD8铰链区+跨膜域核酸序列	actactaccaagccagtgctgcgaactccctcacctgtgcaccctaccgggg acatctcagccccagagaccagaagattgtcggccccgtggctcagtgaag gggaccggattggacttcgcctgtgatatttacatctgggcacccttggccg gaatctgcgtggcccttctgctgtccttgatcatcactctcatctgctaccaca ggagccga
6	mouse CD8铰链区+跨膜域氨基酸序列	tttkpvlrtpspvhptgtsqpqrpedcrprgsvkgtgldfacdiyiwaplag icvalllsliitlicyhrsr
7	mouse CD28胞内域核酸序列	aatagtagaaggaacagactccttcaaagtgactacatgaacatgactcccc ggaggcctgggctcactcgaaagccttaccagccctacgcccctgccaga gactttgcagcgtaccgcccc
8	mouse CD28胞内域氨基酸序列	nsrrnrllqsdymnmtprrpgltrkpyqpyapardfaayrp
9	mouse CD3的胞内段CD3ξ核酸序列	agcaggagtgcagagactgctgccaacctgcaggaccccaaccagctcta caatgagctcaatctagggcgaagagaggaatatgacgtcttggagaagaag gcgggctcgggatccagagatgggaggcaaacagcagaggaggaggaa cccccaggaaggcgtatacaatgcactgcagaaagacaagatggcagaa gcctacagtgagatcggcacaaaaggcgagaggcggagaggcaaggggg cacgatggcctttaccagggtctcagcactgccaccaaggacacctatgat gccctgcatatgcagaccctggcc
10	mouse CD3的胞内段CD3ξ氨基酸序列	srsaetaanlqdpnqlynelnlgrreeydvlekkrardpemggkqqrrrn pqegvynalqkdkmaeayseigtkgerrrgkghdglyqglstatkdtyd alhmqtla
11	F2A核酸序列	gtgaaacagactttgaattttgaccttctgaagttggcaggagacgttgagtc caaccctgggccc
12	F2A氨基酸序列	vkqtlnfdllklagdvesnpgp
13	mouse IL7核酸序列	atgttccatgtttcttttagatatatctttggaattcctccactgatccttgttctgc tgcctgtcacatcatctgagtgccacattaaagacaaagaaggtaaagcata tgagagtgtactgatgatcagcatcgatgaattggacaaaatgacaggaact gatagtaattgcccgaataatgaaccaaacttttttagaaaacatgtatgtgat gatacaaaggaagctgcttttctaaatcgtgctgctcgcaagttgaagcaattt cttaaaatgaatatcagtgaagaattcaatgtccacttactaacagtatcacaa ggcacacaaacactggtgaactgcacaagtaaggaagaaaaaaacgtaaa ggaacagaaaaagaatgatgcatgtttcctaaagagactactgagagaaat aaaaacttgttggaataaaattttgaagggcagtata

14	mouse CCL21a 核酸序列	atggctcagatgatgactctgagcctccttagcctggtcctggctctctgcat ccctggacccaaggcagtgatggagggggtcaggactgctgccttaagt acagccagaagaaaattccctacagtattgtccgaggctataggaagcaag aaccaagtttaggctgtcccatcccggcaatcctgttctcaccccggaagca ctctaagcctgagctatgtgcaaaccctgaggaaggctgggtgcagaacct gatgcgccgcctggaccagcctccagccccagggaaacaaagccccggc tgcaggaagaaccggggaacctctaagtctggaaagaaaggaaagggct ccaagggctgcaagagaactgaacagacacagccctcaagagga
15	mouse CCL21b 核酸序列	atggctcagatgatgactctgagcctccttagcctggtcctggctctctgcat ccctggacccaaggcagtgatggaggggacaggactgctgccttaagt acagccagaagaaaattccctacagtattgtccgaggctataggaagcaag aaccaagtttaggctgtcccatcccggcaatcctgttcttaccccggaagca ctctaagcctgagctatgtgcaaaccctgaggaaggctgggtgcagaacct gatgcgccgcctggaccagcctccagccccagggaaacaaagccccggc tgcaggaagaaccggggaacctctaagtctggaaagaaaggaaagggct ccaagggctgcaagagaactgaacagacacagccctcaagagga
16	P2A核酸序列	gctactaacttcagcctgctgaagcaggctggagacgtggaggagaaccct ggacct
17	人 IL7 核酸序列	atgttccatgtttcttttaggtatatctttggacttcctcccctgatccttgttctgtt gccagtagcatcatctgattgtgatattgaaggtaaagatggcaaacaatatg agagtgttctaatggtcagcatcgatcaattattggacagcatgaaagaaatt ggtagcaattgcctgaataatgaatttaacttttttaaaagacatatctgtgatg ctaataaggaaggtatgtttttattccgtgctgctcgcaagttgaggcaatttct taaaatgaatagcactggtgattttgatctccacttattaaaagtttcagaaggc acaacaatactgttgaactgcactggccaggttaaaggaagaaaaccagct gccctgggtgaagcccaaccaacaaagagtttggaagaaaataaatctttaa aggaacagaaaaaactgaatgacttgtgtttcctaaagagactattacaaga gataaaaacttgttggaataaaattttgatgggcactaaagaacactga
18	人 IL7 氨基酸序列	mfhvsfryifglpplilvllpvassdcdiegkdgkqyesvlmvsidqllds mkeigsnclnnefnffkrhicdankegmflfraarklrqflkmnstgdfdl hllkvsegttillnctgqvkgrkpaalgeaqptksleenkslkeqkklndlc flkrllqeiktcwnkilmgtkeh
19	人IL7R氨基酸序列	mtilgttfgmvfsllqvvsgesgyaqngdledaelddysfscysqlevng sqhsltcafedpdvnitnlefeicgalvevkclnfrklqeiyfietkkflligk snicvkvgeksltckkidlttivkpeapfdlsvvyregandfvvtfntshlq kkyvkvlmhdvayrqekdenkwthvnlsstkltllqrklqpaamyeikv rsipdhyfkgfwsewspsyyfrtpeinnssgemdpilltisilsffsvallvi lacvlwkkrikpivwpslpdhkktlehlckkprknlnvsfnpesfldcqi hrvddiqardevegflqdtfpqqleesekqrlggdvqspncpsedvvitp esfgrdssltclagnvsacdapilsssrsldcresgkngphvyqdlllslgtt nstlpppfslqsgiltlnpvaqgqpiltslgsnqeeayvtmssfyqnq

20	人CCL21核酸序列	atggctcagtcactggctctgagcctccttatcctggttctggcctttggcatc cccaggacccaaggcagtgatggaggggctcaggactgttgcctcaagta cagccaaaggaagattcccgccaaggttgtccgcagctaccggaagcagg aaccaagcttaggctgctccatcccagctatcctgttcttgccccgcaagcg ctctcaggcagagctatgtgcagacccaaaggagctctgggtgcagcagct gatgcagcatctggacaagacaccatccccacagaaaccagcccagggct gcaggaaggacaggggggcctccaagactggcaagaaaggaaagggct ccaaaggctgcaagaggactgagcggtcacagacccctaaagggccata g
21	人CCL21氨基酸序列	maqslalsllilvlafgiprtqgsdggaqdcclkysqrkipakvvrsyrkqe pslgcsipailflprkrsqaelcadpkelwvqqlmqhldktpspqkpaqg crkdrgasktgkkgkgskgckrtersqtpkgp
22	Claudin18.2氨基酸序列	mavtacqglgfvvsligiagiiaatcmdqwstqdlynnpvtavfnyqgl wrscvressgftecrgyftllglpamlqavralmivgivlgaigllvsifalk cirigsmedsakanmtltsgimfivsglcaiagvsvfanmlvtnfwmsta nmytgmggmvqtvqtrytfgaalfvgwvaggltliggvmmciacrgla peetnykavsyhasghsvaykpggfkastgfgsntknkkiydggarted evqsypskhdyv
23	Claudin18.1氨基酸序列	mstttcqvvafllsilglagciaatgmdmwstqdlydnpvtsvfqyeglw rscvrqssgftecrpyftilglpamlqavralmivgivlgaigllvsifalkci rigsmedsakanmtltsgimfivsglcaiagvsvfanmlvtnfwmstan mytgmggmvqtvqtrytfgaalfvgwvaggltliggvmmciacrglap eetnykavsyhasghsvaykpggfkastgfgsntknkkiydggartede vqsypskhdyv
24	mouse4-1BB胞内域核酸序列	aaatggatcaggaaaaaattcccccacatattcaagcaaccatttaagaaga ccactggagcagctcaagaggaagatgcttgtagctgccgatgtccacagg aagaagaaggaggaggaggaggctatgagctg
25	mouse4-1BB胞内域氨基酸序列	kwirkkfphifkqpfkkttgaaqeedacscrcpqeeeggggggyel
26	Hu8E5-28ZCAR氨基酸序列（human）	QVQLQESGPGLIKPSQTLSLTCTVSGGSISSGYNW HWIRQPPGKGLEWIGYIHYTGSTNYNPALRSRVTI SVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAIYYCARIYNGNSF PYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMT QSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLFNSGNQKNYLT WYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSG TDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNAYSFPYTFGGGTK LEIKRTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAG GAVHTRGLDFACDFWVLVVVGGVLACYSLLVTV AFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHY QPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQL YNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPQRRK NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKG HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

27	Hu8E5-BBZCAR氨基酸序列（human）	QVQLQESGPGLIKPSQTLSLTCTVSGGSISSGYNW HWIRQPPGKGLEWIGYIHYTGSTNYNPALRSRVTI SVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAIYYCARIYNGNSF PYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMT QSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLFNSGNQKNYLT WYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSG TDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNAYSFPYTFGGGTK LEIKRTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAG GAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITL YCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRF PEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNEL NLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPQRRKNPQE GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGL YQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
28	humanCD8α信号肽氨基酸序列	malpvtalllplalllhaarp
29	humanCD8 铰链区氨基酸序列	tttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacd
30	humanCD28跨膜区氨基酸序列	fwvlvvvggvlacysllvtvafiifwv
31	humanCD28胞内域氨基酸序列	rskrsrllhsdymnmtprrpgptrkhyqpyapprdfaayrs
32	human4-1BB胞内域氨基酸序列	krgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcel
33	humanCD3 的胞内段CD3ξ氨基酸序列	rvkfsrsadapayqqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkp qrrknpqeglynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstat kdtydalhmqalppr
34	mouse CCL19核酸序列	atggccccccgtgtgaccccactcctggccttcagcctgctggttctctgga ccttcccagccccaactctgggggggtgctaatgatgcggaagactgctgcc tgtctgtgacccagcgccccatccctgggaacatcgtgaaagccttccgcta ccttcttaatgaagatggctgcagggtgcctgctgttgtgttcaccacactaa ggggctatcagctctgtgcacctccagaccagccctgggtggatcgcatca tccgaagactgaagaagtcttctgccaagaacaaaggcaacagcaccaga aggagccctgtgtct
35	28BBZ氨基酸序列	QVQLQESGPGLIKPSQTLSLTCTVSGGSISSGYNW HWIRQPPGKGLEWIGYIHYTGSTNYNPALRSRVTI SVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAIYYCARIYNGNSF PYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMT QSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLFNSGNQKNYLT WYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSG TDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNAYSFPYTFGGGT KLEIKRTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPA

		AGGAVHTRGLDFACDFWVLVVVGGVLACYSLL VTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTR KHYQPYAPPRDFAAYRSKRGRKKLLYIFKQPFMR PVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSAD APAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGR DPEMGGKPQRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYS EIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALH MQALPPR

本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考，就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解，在阅读了本发明的上述讲授内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，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。