(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2021 年 7 月 1 日 (01.07.2021)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2021/129015 A1

(51) 国际专利分类号:
*C12N 5/0783* (2010.01) *A61K 35/17* (2015.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2020/118265

(22) 国际申请日: 2020 年 9 月 28 日 (28.09.2020)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201911382947.2 2019年12月27日 (27.12.2019) CN

(71) 申请人: 昭泰英基生物医药（香港）有限公司 (**ZHAOTAI IMMUGENE BIOMEDICINE (HONG KONG) LIMITED**) [CN/CN]; 中国香港特别行政区九龙九龙湾宏光道8号创豪坊8楼805室, Hong Kong 999077 (CN)。

(72) 发明人: **李鹏 (LI, Peng)**; 中国香港特别行政区九龙九龙湾宏光道8号创豪坊8楼805室, Hong Kong 999077 (CN)。 **蒋治武 (JIANG, Zhiwu)**; 中国香港特别行政区九龙九龙湾宏光道8号创豪坊8楼805室, Hong Kong 999077 (CN)。 **汤朝阳 (TANG, Chaoyang)**; 中国香港特别行政区九龙九龙湾宏光道8号创豪坊8楼805室, Hong Kong 999077 (CN)。 **秦乐 (QIN, Le)**; 中国香港特别行政区九龙九龙湾宏光道8号创豪坊8楼805室, Hong Kong 999077 (CN)。 **廖芮 (LIAO, Rui)**; 中国香港特别行政区九龙九龙湾宏光道8号创豪坊8楼805室, Hong Kong 999077 (CN)。 **郑迪威 (ZHENG, Diwei)**; 中国香港特别行政区九龙九龙湾宏光道8号创豪坊8楼805室, Hong Kong 999077 (CN)。 **崔元彬 (CUI, Yuanbin)**; 中国香港特别行政区九龙九龙湾宏光道8号创豪坊8楼805室, Hong Kong 999077 (CN)。 **姚瑶 (YAO, Yao)**; 中国香港特别行政区九龙九龙湾宏光道8号创豪坊8楼805室, Hong Kong 999077 (CN)。 **林思妙 (LIN, Simiao)**; 中国香港特别行政区九龙九龙湾宏光道8号创豪坊8楼805室, Hong Kong 999077 (CN)。

(74) 代理人: **北京品源专利代理有限公司 (BEYOND ATTORNEYS AT LAW)**; 中国北京市海淀区莲花池东路39号西金大厦6层, Beijing 100036 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,

(54) **Title:** ENGINEERED IMMUNE KILLER CELL, PREPARATION METHOD THEREFOR AND USE THEREOF

(54) **发明名称**: 工程化免疫杀伤细胞、其制备方法和应用

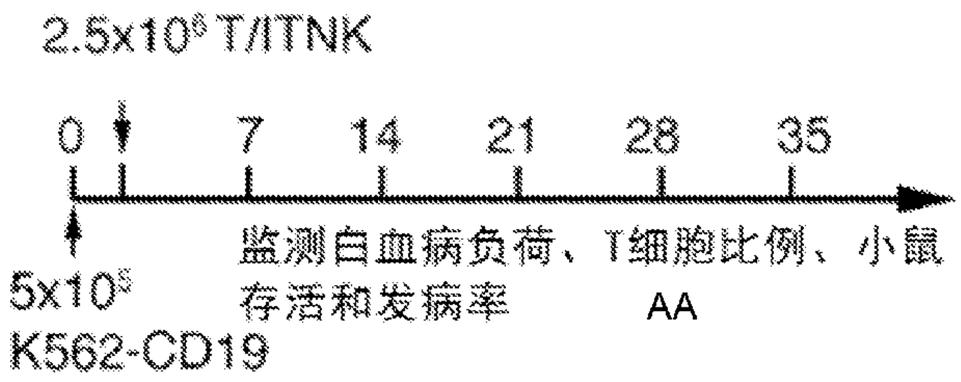



图 36（A）

AA MONITORING LEUKEMIA BURDEN, T CELL PROPORTION, MICE SURVIVAL AND INCIDENCE RATE

(57) **Abstract:** Disclosed are an engineered immune killer cell, and a preparation method therefor and the use thereof. The engineered immune killer cell is prepared by inducing reprogrammed human T cell, retains the marker and function of the human T cell from which the engineered immune killer cell is derived, has the marker and function of an NK cell, and transfects and expresses, in an obtained immune killer lymphocyte, a CAR molecule which recognizes tumor and virus-associated antigens or a TCR molecule which specifically recognizes a tumor.

(57) **摘要**: 公开了一种工程化免疫杀伤细胞及其制备方法和应用。所述工程化免疫杀伤细胞是通过重编程人T细胞诱导而成，保留衍生其的人T细胞的标志物和功能，并具有NK细胞的标志物和功能，并在所得免疫杀伤淋巴细胞中转染并表达识别肿瘤、病毒相关抗原的CAR分子或特异性识别肿瘤的TCR分子。

[见续页]

WO 2021/129015 A1

MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

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

**本国际公布：**

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

— 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

# 工程化免疫杀伤细胞、其制备方法和应用

## 技术领域

本申请涉及生物医药技术领域，具体涉及一种工程化免疫杀伤细胞、其制备方法及应用。

## 背景技术

目前，免疫疗法已成为癌症治疗领域中最受关注和最有希望的“新”想法。2013 年《科学》杂志评出的年度十大科学突破排行榜中，肿瘤免疫治疗高居榜首。诺华和凯特公司的嵌合抗原受体（CAR, Chimeric Antigen Receptor）T 细胞被美国 FDA 批准上市，肿瘤免疫细胞治疗在血液恶性癌症治疗领域取得了里程碑式进展。然而，肿瘤免疫细胞治疗仍然存在临床治疗的技术瓶颈，如基因修饰免疫细胞的靶点单一等原因导致肿瘤免疫逃逸，肿瘤复发；如实体肿瘤缺乏高效、低副作用的特异性标志物，目前的基因修饰免疫细胞治疗对实体肿瘤均未见高效、安全的临床疗效。

T 细胞根据其表面标志和功能的差异，可分为不同的亚群；如根据 TCR 类型差异可分为 γδT 细胞和 αβT 细胞。αβT 细胞占 T 细胞 95%以上，是体内具有 T 细胞分化标记、执行 T 细胞功能主要的细胞群，代表了 T 细胞的多样性。而 γδT 细胞是一群高度异质性细胞，其表面 T 细胞受体由 γ 链和 δ 链组成，其亚类种类多、表型多变、功能丰富，γδT 细胞各亚类间生物学特性各异，在机体肿瘤、感染及自身免疫性疾病等的发生、发展中均有重要作用，被认为是机体连接天然免疫与适应性免疫功能的桥梁。

像 T 细胞一样，自然杀伤（NK）细胞是人体免疫系统中不可或缺的一部分。NK 细胞被认为是占外周血淋巴细胞约 10-15%且在天然免疫响应中起关键作用的淋巴样细胞。与 T 细胞不同的是，NK 细胞以 MHC 非限制性方式识别其靶标。NK 细胞可呈现抗病毒作用、抗 GvH 作用和抗癌作用，具体地，NK 细胞直接杀伤恶性肿瘤，包括肉瘤、骨髓瘤、癌、淋巴瘤和白血病，或有助于通过诱导树突状细胞（DC）活性或肿瘤特异性细胞毒性 T 淋巴细胞（CTL）的适应性免疫活化，由此消除异常细胞，所述异常细胞为肿瘤细胞或正发展成为肿瘤细胞的细胞。尽管 NK 细胞具有作为对抗癌症或感染性疾病的治疗剂的潜力，但是正常人体内大多的 NK 细胞以休眠状态存在，且癌症患者内的 NK 细胞由于癌细胞的免疫逃逸机制缺少其功能。为将自然杀伤细胞实际应用为治疗剂，需要能够识别并破坏肿瘤细胞的活化的自然杀伤细胞，且由于体内的自然杀伤细胞数目有限，因此，获得足够数量的活化的自然杀伤细胞是非常重要的。

细胞重编程（cell reprogramming）指的是分化的细胞在特定的条件下被逆转后恢复到全能性状态，或者形成胚胎干细胞系，或者进一步发育成一个新的个体的过程。在疾病的免疫治疗领域，已有通过细胞重编程来实现免疫细胞的类型转化的相关报道。例如，美国格拉斯通研究所（Gladstone Institutes）的丁胜博士曾报道，通过特定的重编程方法，将促炎的效应 T 细胞重编程为抗炎的调节性 T 细胞；这种重编程对于自身免疫性疾病的治疗意义重大，具体地，在自身免疫性疾病中，被过度激发的效应 T 细胞会对机体造成损害，将这些细胞转化为调节性 T 细胞有助于减少免疫系统的过度活跃，使其恢复平衡，从而根本上治疗疾病。目前，尚未见细胞重编程技术在人类肿瘤免疫治疗中的应用。

嵌合抗原受体（CAR, Chimeric Antigen Receptor）分子通常包括胞外段、跨膜区和胞内段：胞外段是由抗体重链和轻链可变区通过一条肽段相连接而形成的单链可变区（ScFv）；胞内段是各种信号传导分子的胞内段嵌合体，包括 CD3zeta、CD28、OX-40、4-1BB 等；跨膜区则来自其他分子（如 CD8，CD4，CD28 和 CD3zeta）的跨膜区。单链可变片段部分的基因分离自例如产生识别靶抗原的单克隆抗体的杂交瘤。

CAR 分子的结构设计经历多代的研究发展。第一代 CAR 分子的结构包含识别肿瘤细胞表面抗原的单链可变片段(scFv)、跨膜结构域和激活 T 细胞的 TCR 复合物 CD3ζ 的胞内结构

域。由于第一代 CAR 的胞内段只有 CD3ζ 信号传递区域，没有共刺激信号，因而第一代 CAR T 细胞的功能存在很大缺陷，其在病人体内的扩增、持久性和效应功能等方面都表现出低水平。为了增强第一代 CAR 激活 T 细胞的能力的目的，已经开发出第二代 CAR，第二代 CAR 在胞内加入了共刺激分子（如 CD28、CD134(OX-40)、CD137(4-1BB)等）来源的胞内分子信号传递域。临床试验表明，第二代 CAR T 细胞在病人体内表现出较好的增殖、持久性和效应功能。第二代 CAR T 细胞的临床试验，大部分是抗 CD19 CAR T 对 B 细胞白血病的治疗。虽然 CAR T 细胞临床试验获得了疗效，但还存在进一步改善的空间。第三代 CAR 是为了进一步提高 CAR T 细胞疗法的疗效而开发的。第三代 CAR 的胞内段引入了两个共刺激分子的信号传递区域。通常情况下，一个共刺激信号是 CD28 胞内区域，另一个则是 CD134、CD137 或 ICOS 等的胞内信号传递区域。共刺激信号的不同组合可能影响 CAR T 细胞的功能和疗效，研究表明，并不是所有的第三代 CAR 都比第二代好。

表达 CAR 分子的免疫细胞可在抗肿瘤中发挥重要作用，例如，CAR T 细胞独立于肿瘤细胞上的主要组织相容性抗原 I 型的表达而直接识别肿瘤细胞表面抗原，并且在同时激活 T 细胞，并因此表达 CAR 的 T 细胞可以有效杀伤肿瘤细胞。简言之，CAR T 细胞通过抗原-抗体识别模式对肿瘤细胞表面的特异分子进行识别，然后通过其胞内的信号传导进行激活、增殖并发挥细胞杀伤功能。

## 发明内容

针对现有技术的不足及实际的需求，本申请提供了一种工程化免疫杀伤细胞、其制备方法及应用。本申请的工程化免疫杀伤细胞兼具 T 细胞和 NK 细胞的部分标志物和功能，同时表达 NK 细胞和 T 细胞的抗原识别杀伤受体，因而，比 NK 细胞和 T 细胞本身具有更广谱的肿瘤抗原识别杀伤功能；相较于衍生其的人成熟 T 细胞，本申请的工程化人体免疫细胞扩增能力增强，抗肿瘤效果更好；同时，由于其表达肿瘤相关抗原的 CAR 分子或肿瘤特异性 TCR 分子，因此其还具有增强的肿瘤特异性识别杀伤功能。

在第一方面，本申请提过了一种工程化免疫杀伤细胞（下文也称为 CAR ITNK 细胞），其通过以下制备而成：在人 T 细胞中转染靶向肿瘤或病毒相关抗原的 CAR 分子或 TCR 分子，同时或其后，进行涉及 BCL11B 基因的缺失或抑制的重编程。

优选地，所述免疫杀伤细胞表达靶向肿瘤或病毒相关抗原的 CAR 分子或 TCR 分子，保留衍生其的人 T 细胞的标志物和功能并具有 NK 细胞的标志物和功能。

优选地，所述人 T 细胞为成熟的人 T 细胞或含有成熟人 T 细胞的细胞群；进一步优选地，所述成熟人 T 细胞或含有成熟人 T 细胞的细胞群来源于人体脐带血或外周血；进一步优选地，所述成熟人 T 细胞或含有成熟人 T 细胞的细胞群来源于多能干细胞、胚胎干细胞或脐带血干细胞分化获得的成熟 T 细胞或细胞群。

优选地，所述重编程的免疫杀伤淋巴细胞表达功能性的 TCR、CD3 和 NKp30。

优选地，所述重编程的免疫杀伤淋巴细胞表达选自以下的 NK 细胞的标志物：CD11c、NKG2D 和 CD161。

优选地，所述重编程的免疫杀伤淋巴细胞低表达或不表达 PD-1、CTLA-4 或 FOXP3 免疫抑制检查点。

优选地，所述重编程的免疫杀伤淋巴细胞低表达或不表达 NK 相关标志物： CD127、CD16 、KIRDL2、KIRDL3、NKG2A。

优选地，相较于衍生其的 T 细胞，所述重编程的免疫杀伤淋巴细胞的 NOTCH 表达上调。

优选地，相较于衍生其的 T 细胞，所述重编程的免疫杀伤淋巴细胞中，LEF1 和 TCF7 转录因子表达下降，NOTCH、AP1、mTOR、ID2、TBX21 和 NFIL3 表达上升。

优选地，所述重编程的免疫杀伤淋巴细胞的 TCR 介导的信号转导增强；

优选地，相较于衍生其的 T 细胞，所述重编程的免疫杀伤淋巴细胞的与 TCR 介导的信号

转导相关的基因 CSF2、FOS、MAPK12、MAP3K8、IFNγ、NFKBIA、MAPK11、IL-10 和 TEC 的表达上调。

优选地，相对于 NK 细胞，所述重编程的免疫杀伤淋巴细胞的 T 细胞识别和 TCR 信号转导增强，优选地，CD3、CD4、CD8、CD40LG 的表达上调。

优选地，相较于衍生其的 T 细胞，所述重编程的免疫杀伤淋巴细胞的 NK 杀伤毒性相关信号转导增强；

优选地，相较于衍生其的 T 细胞，所述重编程的免疫杀伤淋巴细胞的与 NK 杀伤毒性相关信号转导相关的基因 PRF1、CSF2、ICAM1、CD244、PLCG2、IFNG、FCER1G、GZMB、NCR2、NCR1、KIR2DL4 和 SYK 的表达上调。

在一个优选的具体实施方案中，所述重编程的免疫杀伤淋巴细胞包括 CD8+NKp46$^{hi}$NKp44+NKp30+、CD4+NKp30+和 γδTCR+NKp46$^{hi}$NKp44+ NKp30+T 细胞亚群。

在一个优选的具体实施方案中，所述人 T 细胞为成熟人 T 细胞，并且重编程所述人成熟 T 细胞包括：

1’）激活成熟人 T 细胞；

2’）对步骤 1’）所得激活的成熟人 T 细胞实施 BCL11B 基因敲除；

3’）将步骤 2’）所得细胞用 T 细胞培养基进行培养。

其中，步骤 1’）中，使用抗人 CD3 抗体、抗人 CD28 抗体和抗人 CD2 抗体进行激活；

优选地，使用抗人 CD3 抗体、抗人 CD28 抗体和抗人 CD2 抗体的磁珠与人成熟 T 细胞以 1:2 混合孵育激活 T 细胞。

其中，步骤 2’）中，使用 CRISPR/CAS9 技术进行 BCL11B 基因敲除；

优选地，所述基因敲除的靶点在 BCL11B 基因的第二外显子处。

优选地，所述基因敲除的靶点在 BCL11B 基因的第三外显子处。

其中，步骤 3’）中，所述 T 细胞培养基包含 IL-2；优选地，不与 OP9-DL1 进行共培养。

其中，所述 CAR 分子包含以下结构域：信号肽、胞外抗原识别结构域、跨膜区、胞内共刺激结构域；在一个优选的具体实施方案中，所述 CAR 分子从 N 端到 C 端依次包含以下结构域：信号肽、胞外抗原识别结构域、跨膜区、胞内共刺激结构域。

其中，所述肿瘤相关抗原为肿瘤表面抗原、肿瘤分泌的细胞因子、肿瘤微环境免疫抑制作用相关的细胞的表面抗原及其分泌的细胞因子、肿瘤相关的微生物抗原，优选为 CD19、GPC3、Mesothelin、PSCA、MUC1。

第二方面，本申请提供了一种制备上述第一方面所述的细胞的方法，其包括：

1’’）激活人 T 细胞；

2’’)将表达肿瘤相关抗原的 CAR 分子或肿瘤特异性 TCR 分子载体转染激活的人 T 细胞，与此同时或其后，实施 BCL11B 基因敲除；

3’’）将步骤 2’’）所得细胞用 T 细胞培养基进行培养。

上述方法中，优选地，步骤 1’’）中，所述人 T 细胞为成熟人 T 细胞或含有成熟人 T 细胞的细胞群；进一步优选地，所述成熟人 T 细胞或含有成熟人 T 细胞的细胞群来源于人体脐带血或外周血；进一步优选地，所述成熟人 T 细胞或含有成熟人 T 细胞的细胞群来源于多能干细胞、胚胎干细胞或脐带血干细胞分化获得的成熟 T 细胞或细胞群。

上述方法中，优选地，步骤 1’’）中，使用抗人 CD3 抗体、抗人 CD28 抗体和抗人 CD2 抗体进行激活；在一个优选的具体实施方案中，使用抗人 CD3 抗体、抗人 CD28 抗体和抗人 CD2 抗体的磁珠与人成熟 T 细胞以 1:2 混合孵育激活 T 细胞。

优选地，步骤 2’’）中，所述 CAR 分子包含以下结构域：信号肽、胞外抗原识别结构域、跨膜区、胞内共刺激结构域；在一个优选的具体实施方案中，所述 CAR 分子从 N 端到 C 端依次包含以下结构域：信号肽、胞外抗原识别结构域、跨膜区、胞内共刺激结构域；优选地，所述抗原为肿瘤相关抗原和/或病毒、细菌等微生物相关抗原；进一步优选地，所述肿瘤相关

抗原为肿瘤表面抗原、肿瘤分泌的细胞因子、肿瘤微环境免疫抑制作用相关的细胞的表面抗原及其分泌的细胞因子、肿瘤相关的微生物抗原，更优选为肿瘤表面抗原，甚至更优选为CD19、GPC3、Mesothelin、PSCA、MUC1。

优选地，步骤2’’）中，使用CRISPR/CAS9技术进行BCL11B基因敲除；进一步优选地，在BCL11B基因的第二外显子处进行基因敲除；或者，在BCL11B基因的第三外显子处进行基因敲除。

优选地，步骤3’’）中，所述T细胞培养基包含IL-2；优选地，不与OP9-DL1进行共培养。

第三方面，本申请还提供了如上述第一方面所述的细胞在制备治疗选自以下的疾病的药物中的用途：肿瘤、艾滋病和感染性疾病；优选地，所述感染性疾病为病毒感染性疾病。

优选地，所述药物还包含药学上可接受的赋形剂。

本申请通过将人T细胞重编程为免疫杀伤淋巴细胞，并在所得免疫杀伤淋巴细胞中转染并表达肿瘤相关抗原的CAR分子或肿瘤特异性TCR分子，实现了更强的肿瘤杀伤效应，其原因在于：重编程后的细胞同时表达NK细胞和T细胞的抗原识别杀伤受体，特别是功能性TCR，同时具备T细胞和NK细胞功能；由于其同时表达NK细胞和T细胞的抗原识别杀伤受体，所以可识别这些受体敏感的抗原，相对于T细胞和NK细胞，不仅具有更广谱的肿瘤抗原识别杀伤功能，而且还具有更广谱的病毒、细菌等微生物识别清除功能；同时，由于其表达肿瘤相关抗原的CAR分子或肿瘤特异性TCR分子，因此其还具有增强的肿瘤特异性识别杀伤功能。

此外，本申请的工程化免疫杀伤细胞具有高效的体外扩增能力。在过继细胞转移（ACT）治疗中，T细胞和NK细胞都被用于治疗癌症。本申请的工程化免疫杀伤细胞兼具T细胞和NK细胞的功能，相较于NK细胞应用于过继性免疫治疗（ACT）时的可用性和扩增能力限制，使用者可从患者的外周血中获得大量的T细胞来产生本申请的重编程的免疫杀伤淋巴细胞，并在2 ~ 3周内，即可从实体瘤患者约$100\times10^6$个外周血单核细胞中制备获取200-$1248\times10^6$个重编程的免疫杀伤淋巴细胞，达到患者回输细胞的需求量。

## 附图说明

图1是本申请实施例1中所构建的PX458-gBCL11B载体的示意图。

图2是基因测序检测并验证转导了PX458-gBCL11B的T细胞的BCL11B外显子是否被敲除的图示，对照组为转导了PX458空载体（Mock）的T细胞。

图3是Western Blotting检测并验证转导了PX458-gBCL11B的T细胞中BCL11B蛋白表达水平，以进一步确认BCL11B蛋白是否缺失的图示，对照组为转导了PX458空载体（Mock）的T细胞。

图4为流式细胞结果散点图，其显示相对于Mock T细胞和NK细胞，本申请的ITNK细胞（即，PX458-gBCL11B转导的T细胞，图中以PAX458指示）同时高表达T细胞标志物CD3和NK细胞标志物CD56和NKp46。所有样本来源于同一PBMC样本，Mock T为PBMC通过Pan-T分选，所以存在7.2-7.8%的CD3-CD56+NKp46+的NK细胞杂群；PX458为Mock T经过PX458-gBCL11B转染获得，与Mock-T存在相同的7.6-7.8%的NK细胞亚群；NK细胞为PBMC通过NK细胞培养基培养纯化获得，所以存在少量10.4%的CD3+CD56+的NKT或γδT细胞杂群。

图5为流式细胞结果散点图（A）其显示脐带血来源的ITNK细胞（即，PX458-gBCL11B转导的T细胞，图中以PAX458指示）相对于Mock T细胞同时高表达T细胞标志物CD3和NK细胞标志物NKp46、CD56、NKp30和NKp44，以及相应的细胞百分比统计图（B）。

图6为流式细胞结果散点图（A）其显示外周血来源的ITNK细胞（即，PX458-gBCL11B转导的T细胞，图中以PAX458指示）相对于Mock T细胞同时高表达T细胞标志物CD3和

NK 细胞标志物 NKp46、CD56、NKp30 和 NKp44，以及相应的细胞百分比统计图（B）。

图 7 是 Mock T 细胞、NK 细胞和 ITNK 细胞（即，PX458-gBCL11B 转导的 T 细胞，图中以 PAX458 指示）的透射电镜图，其显示：与 T 细胞相比，ITNK 细胞的核质比较低；其中，1 指示核；2 指示线粒体；3 指示内质网；4 指示粒；标尺，左图为 2 μm，右图为 500 nm。

图 8 显示 PX458-gBCL11B 转导的脐带血、外周血来源的 T 细胞（即，ITNK 细胞）的 CD4+、CD8+、CD3+CD4-CD8- T 细胞亚群中 NK 受体表达，其中，NKp46 在 CD8+ T 细胞中表达明显高于 CD4+ T 细胞；n = 6，表示试验为 6 个独立健康供体的重复；***P≤0.001，配对 t 检验。

图 9 显示 PX458-gBCL11 转导的 T 细胞的流式细胞术分析，并将 CD4+、CD8+和 CD4-CD8-亚群中的 CD56+细胞分选并进行 DNA 测序分析，进一步证实了 ITNK 细胞中的 BCL11B 位点被敲除。

图 10 显示 TCRβ 多样性测序，所有 TCRβ 链序列轨迹变量在同一来源的 T 细胞和 ITNK 细胞中具有相同的多样性。

图 11 显示 TCRα 多样性测序，所有 TCRα 链序列轨迹变量在同一来源的 T 细胞和 ITNK 细胞中具有相同的多样性。

图 12 是质谱流式聚类分析 t-SEN 点密度图，（A）显示分别来源于脐带血和外周血的 CD45+单核细胞，分为进行转导 PX458 空载体（Mock-T）、转导 PX458-gBCL11B（PX458-T）和转导了 PX458-gBCL11B 后经过 K562 细胞 24 小时活化（激活的 PX458-T）三个实验组的 t-SEN 点密度；（B-C） 分别展示脐带血（CB）、成体外周血（PBMC）来源的 Mock-T 和敲除 BCL11B 的 T 细胞（BCL11B-KO T）、是否经过激活的敲除 BCL11B 的 T 细胞（BCL11B-KO T）和（Activated BCL11B-KO T）之间的分群差异和过度转变情况（箭头）。

图 13 是脐带血和外周血 CD45+细胞融合的 t-SEN 彩色富集簇图；ITNK 细胞按指示标记。t-SEN 图上标记物 CD3、CD4、CD8、γδ TCR、CD56、NKp46、NKp30、NKp44 和 CD11c 的标准化表达使细胞着色。

图 14 是本申请 ITNK 细胞的免疫表型分析-脐带血和外周血 CD45+细胞融合的 t-SEN 彩色富集簇图；其中，（A）显示 NKG2D 和 CD161 标记物表达量，（B）显示 CD25、CD127、CD16、KIRDL2、KIRDL 3 和 NKG2A 标志物表达量，以及（C）显示免疫检查点标记物 PD-1、CTLA-4、FOXP3 和 TIM-3 的表达量。

图 15 是根据脐带血 T 细胞的免疫细胞亚群分组的频率，ITNK 细胞可由 CD4+、CD8+和 γδTCR+ T 细胞分化而来，所有 ITNK 亚型均可被 HLA 阴性细胞(K562)激活。

图 16 是根据外周血 T 细胞的免疫细胞亚群分组的频率，ITNK 细胞可由 CD4+、CD8+和 γδTCR+ T 细胞分化而来，所有 ITNK 亚型均可被 HLA 阴性细胞(K562)激活。

图 17 显示质谱流式热图分析结果，其显示了每个免疫细胞亚群的标志物表达情况。

图 18 显示用于 RNA-Seq 的 ITNK 细胞分选。分选脐带血或成体外周血中 CD3+ T、CD3-NKp46+ NK、CD3+NKp46+ CB-ITNK 和 PBMC-ITNK 用于 RNA 测序和 atac 测序。Mock-T(n=6)、ITNK(n=6)和 NK 细胞(n=4)的分选细胞纯度分别为 95.3±3.61%、92.41±2.6%和 92.88±2.06%。

图 19 是 RNA 测序-细胞亚群基因表达数据的主成分分析。

图 20 是 RNA 测序-KEGG 富集途径分析 ITNK 细胞相对于 T 细胞的基因上调情况（截止:绝对对数 2 倍，变化≥1；调整 P 值≤0.05）。

图 21 是 RNA 测序-KEGG 富集途径分析 ITNK 细胞相对于 NK 细胞的基因上调情况（截止:绝对对数 2 倍，变化≥1;调整 P 值≤0.05）。

图 22 是 RNA-Seq 分层聚类热图，其中，左图显示 T、ITNK、NK 细胞基因转录表达的差异 (log2 绝对倍数变化≥1；调整后 P 值≤0.05)，右图是通过 RNA-seq 分析筛选出的基因在 T 细胞、ITNK 细胞和 NK 细胞中差异表达的热点图；与 T 细胞相比，ITNK 细胞中 NK 信号基

因表达上调，TCF1 和 LEF1 基因表达下调 (log2 绝对倍数变化≥1；调整后 P 值≤0.05)。

图 23 是 ITNK 细胞的免疫表型动态流式分析图；通过流式细胞技术，分析在人 T 细胞中敲除 BCL11B 后的第 0、5、10、15、20 天，检测 CD3+CD4+、CD3+CD8+亚群中 NKp30 和 NKp46 阳性亚群的比例变化；数据代表了三个实验；BCL11B 敲除后的第 5 天开始检测到 NKp46，第 10-15 天稳定。

图 24（A）是 Sc-RNA seq 分析结果的 t-SNE 点图，上图表示 D0-D20 的细胞分布图，下图表示 PX458-gBCL11B 基因转导 T 细胞敲除 BCL11B 后 D0(2263)、D5(1565)、D10(498)、D15(204)、D20(418)天的 4948 个细胞聚类分布图。4948 个细胞通过聚类为 11 个细胞亚群，ITNK 细胞主要富集在（红色）圆圈标记的亚群；（B）通过 t-SNE 点图表示检测的 4948 个细胞（11 个亚群）中 NK 细胞标志物表达的情况；（C）通过 t-SNE 点图表示检测的 4948 个细胞（11 个亚群）中 T 细胞标志物、NK 细胞标志物、免疫检查点、转录因子、凋亡基因相关基因的表达情况。

图 25（A）KEGG 信号通路分析，其显示 NK 细胞毒性基因在 ITNK 细胞中高表达；（B）小提琴图显示了不同亚群中 NK 细胞相关的 KAR 和 KIR 基因的表达谱；（C）小提琴图显示了与 T 细胞和 NK 细胞发育相关基因的表达谱。NK 信号基因（ID2, TBX21）、NOTCH 相关基因（MXI1, ZMIZ1, RBPJ）、AP-1 相关基因（FOS, JUN, JUNB, JUND）在 ITNK 细胞中表达上调。

图 26（A）为从亚群 5(CD8+ T)、亚群 0(早期 CD8+ ITNK)和亚群 1(晚期 CD8+ ITNK)的单个细胞的无监督轨迹分析显示 CD8+ T 细胞向 CD8+ ITNK 细胞的逐步过渡；（B）从亚群 4(CD4+ T)、亚群 5(早期 CD4+ ITNK)和亚群 7(晚期 CD4+ ITNK)的单个细胞的无监督轨迹分析显示 CD4+ T 细胞向 CD4+ ITNK 细胞的逐步过渡。

图 27（A）为显示 NK 相关转录因子 ID2 和 TBX21 在 ITNK 细胞中表达水平上调的条形图；（B）为免疫细胞裂解液中 TBX21 和 ID2 的免疫印迹（Western Blot）分析，其中，左泳道为 NK 细胞，中泳道为 ITNK 细胞，右泳道为 T 细胞，并且 β-Tublin 作为内部参考。

图 28 为显示通过 Elisa 实验，检测 T 细胞和 ITNK 细胞分别经过 anti-NKp30、anti-NKp46 和 anti-CD3/CD28 抗体（5 ug /ml）刺激后的 IFNγ 分泌量的柱状图；其中，数据来自三个独立供体的样本；数据以平均值±SD 表示；**P≤0.01，***P≤0.001；配对 t 测试。

图 29 显示经过 K562 细胞刺激后，T 细胞、ITNK 细胞和 NK 细胞的细胞因子分泌情况；具体地，将 T、ITNK 和 NK 细胞分别以 E（效应子）: T（靶标）比 1:1 和 K562 细胞，在 37℃下孵育 18 小时；取上清液，用多重免疫法（multiplex immunoassay）测定细胞因子（CSF2、CCL4、IFNγ、CCL3、IL13、IL2、TNF、CX3CL1、IL8、IL10、IL23、IL7、IL4、IL5、CXCL11、CCL20、IL6、IL17A、IL21、IL12、IL1β）浓度；值表示为 3 个不同供体的平均值±SD。

图 30 显示 ITNK 细胞对 HLA 阴性 K562 细胞（A）、HLA 阳性 Hela 细胞（B）、HLA 阳性 A549 细胞（C）和 HLA 阳性的 NALM-6 细胞（D）的特异性细胞毒性百分比，其中，数据以均数±标准差表示；* * P≤0.01；非配对 t 检验。

图 31 显示免疫印迹法测定 K562 细胞刺激 6 小时后，免疫细胞裂解液中 Fyn、PLC-g2、Syk、Erk1/2 和 mTOR 的蛋白和磷酸化水平，其中，左边三泳道为 NK 细胞，中间三泳道为 ITNK 细胞，右边三泳道为 T 细胞，以 BCL11B 作为基因编辑对照，以 GAPDH 作为上样对照。

图 32（A）为检测 ITNK 细胞体内杀伤肿瘤细胞试验的示意图；（B-C）显示利用体内生物荧光成像技术，对特定时间点的实验小鼠荧光素酶活性的总通量进行定量分析(每组 5 只小鼠)，结果为平均值±SD，* * P≤0.01，未配对 t 检验；（D）为 PBS (n=10)、Mock T(n=15)、ITNK(n=15)、NK 细胞(n=5)处理 K562 荷瘤小鼠的生存时间统计图；（E）显示第 7 天和第 10 天对 Hela 荷瘤小鼠分别进行 PBS、Mock T、ITNK 和 NK 细胞治疗，并于指定的时间点检测肿瘤大小(每组 5 只小鼠)，数据以均数±标准差表示；* * * P≤0.001；非配对 t 检验。

图 33 显示 ITNK 细胞移植到缺失 T、B、NK 细胞的免疫缺陷小鼠 NSI 品系后其在小鼠体内的分布和维持情况；其中，（A 上）为向 NSI 小鼠注射 ITNK 细胞和检测实验示意图，其显示 ITNK 在第 1 天、第 7 天、第 14 天、第 21 天和第 6 个月分别进行短期和长期的分析（每组 n=3）;（A 下）显示了代表性的流式细胞术分析的 CD3+ T 细胞中 ITNK 细胞的百分比;（B）为小鼠外周血(PB)、骨髓(BM)、脾脏、肝脏和肺中 ITNK 细胞的动态分布图，其显示在注射 ITNK 细胞 6 个月后检测不到 T 细胞和 ITNK 细胞。

图 34 显示通过流式细胞术检测转导后的细胞的 PI 标记和 GFP 表达情况以确定转导后细胞的存活和转导效率（如图 34A 所示），以及显示 ITNK 细胞的重编程情况（B）。

图 35 显示各效应细胞组（T、ITNK、19t2、19t2/ITNK）分别与靶细胞（A）K562-CD19 细胞和（B）NALM6 细胞以不同的效应细胞与靶细胞数量比（E:T 比例）下混合共培养时的靶点肿瘤细胞裂解率，其显示为平均值±SD。* * P≤0.01;未配对 t 检验。

图 36（A）为显示 NSI 小鼠静脉注射 CD19 + K562-GL 细胞(5x105)的实验示意图，根据该图，第 2 天向小鼠注入 T 细胞、ITNK 细胞和 NK 细胞($2.5x10^6$)，并分别于第 2、7、14、21、28 天进行生物发光成像；每组 5 只小鼠。（B-C）为荧光素酶活性的体内生物荧光成像定量分析总通量统计图（B）和活体成像图（C），每组 5 只小鼠。结果显示为平均值±标准差。* P≤0.05，未配对学生的 t 检验，用于指定的时间点。

## 具体实施方式

为更进一步阐述本申请所采取的技术手段及其效果，以下结合附图并通过具体实施方式来进一步说明本申请的技术方案，但本申请并非局限在实施例范围内。

除非另有说明，否则在这些实施例中阐述的部件和步骤的相对布置、数字表达式和数值不构成对本申请的限制。对于本领域普通技术人员已知的技术、方法和设备可能不作详细讨论，但在适当情况下，技术、方法和设备应当被视为本说明的一部分。

**实施例 1　本申请的重编程的自然杀伤（ITNK）细胞的制备**

基因敲除质粒载体构建

根据 CRISP/CAS9 靶位点的选择规则：GN19NGG，GN19 是靶位点，N 最好仍是 G ，靶位点可以在反义链上（即，在正义链上的序列顺序为：CCN N19C），选择了以下靶点序列并分别设计了正向（F）、反向（R）引物作为 guideRNA（gRNA），将 gRNA 退火、连接入酶切好的 PX458 载体，构建了 PX458-gBCL11B 载体（如图 1）。在 293 T 细胞系中转染 PX458-gBCL11B，并挑取单克隆，通过基因测序检测其中 BCL11B 敲除靶点的碱基缺失、错位等敲除情况（见图 2），并统计计算敲除效率，如下表 1。

表 1、BCL11B 靶点序列及其对应的 gRNA 列表

| 位置 | 靶点序列 | 正反引物 | 特异性 | 敲除效率 |
|---|---|---|---|---|
| 第二外显子 | GACCCTGACCTGCTCACCTG（SEQ ID NO:1） | F: caccGACCCTGACCTGCTCACCTG（SEQ ID NO:2）<br>R: aaacCAGGTGAGCAGGTCAGGGTC（SEQ ID NO:3） | 58 | 39 |
| 第二外显子 | GAAGCAGTGTGGCGGCAGCT（SEQ ID NO:4） | F: caccGAAGCAGTGTGGCGGCAGCT（SEQ ID NO:5）<br>R: aaacAGCTGCCGCCACACTGCTTC（SEQ ID NO:6） | 67 | 48 |
| 第二外显子 | CAGGTGGTCATCTTCGTCGG（SEQ ID NO:7） | F：caccCAGGTGGTCATCTTCGTCGG（SEQ ID NO:8）<br>R：aaacCCGACGAAGATGACCACCTG（SEQ ID NO:9） | 97 | 90 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 第二外显子 | GCAGGTGGTCATCTTCGTC（SEQ ID NO:10） | F：caccGCAGGTGGTCATCTTCGTC（SEQ ID NO:11）<br>R：aaacCGACGAAGATGACCACCTG（SEQ ID NO:12） | 95 | 60 |
| 第二外显子 | GCTCAGGAAAGTGTCCGAGC（SEQ ID NO:13） | F：caccGCTCAGGAAAGTGTCCGAGC（SEQ ID NO:14）<br>R：aaacGCTCGGACACTTTCCTGAG（SEQ ID NO:15） | 86 | 59 |
| 第三外显子 | GAGTCCCGTCACCCGAGACC（SEQ ID NO:16） | F：caccGAGTCCCGTCACCCGAGACC（SEQ ID NO:17）<br>R：aaacGGTCTCGGGTGACGGGACT（SEQ ID NO:18） | 93 | 49 |
| 第三外显子 | GAAGTGATCACGGATGAGTG（SEQ ID NO:19） | F：caccGAAGTGATCACGGATGAGTG（SEQ ID NO:20）<br>R：aaacCACTCATCCGTGATCACTT（SEQ ID NO:21） | 81 | 55 |
| 第三外显子 | GGTGACGGGACTCAGGGTGA（SEQ ID NO:22） | F：caccGGTGACGGGACTCAGGGTGA（SEQ ID NO:23）<br>R：aaacTCACCCTGAGTCCCGTCAC（SEQ ID NO:24） | 62 | 69 |
| 第三外显子 | TGCAGCGCGCGCCCGGTCTC（SEQ ID NO:25） | F：caccTGCAGCGCGCGCCCGGTCTC（SEQ ID NO:26）<br>R：aaacGAGACCGGGCGCGCGCTGCA（SEQ ID NO:27） | 87 | 63 |
| 第四外显子 | CACGAGAGCGACCCGTCGCT（SEQ ID NO:28） | F：caccCACGAGAGCGACCCGTCGCT（SEQ ID NO:29）<br>R：aaacAGCGACGGGTCGCTCTCGTG（SEQ ID NO:30） | 99 | 49 |
| 第四外显子 | GCGACGGGTCGCTCTCGTGG（SEQ ID NO:31） | F：caccGCGACGGGTCGCTCTCGTGG（SEQ ID NO:32）<br>R：aaacCCACGAGAGCGACCCGTCG（SEQ ID NO:33） | 97 | 69 |
| 第四外显子 | TCCATGCTGAAGCTCGACTC（SEQ ID NO:34） | F：caccTCCATGCTGAAGCTCGACTC（SEQ ID NO:35）<br>R：aaacGAGTCGAGCTTCAGCATGGA（SEQ ID NO:36） | 91 | 60 |
| 第四外显子 | ACGGGTCGCTCTCGTGGTGG（SEQ ID NO:37） | F：caccACGGGTCGCTCTCGTGGTGG（SEQ ID NO:38）<br>R：aaacCCACCACGAGAGCGACCCGT（SEQ ID NO:39） | 90 | 92 |
| 第四外显子 | AGCCGCAACCGCGAGAACGG（SEQ ID NO:40） | F：caccAGCCGCAACCGCGAGAACGG（SEQ ID NO:41）<br>R：aaacCCGTTCTCGCGGTTGCGGCT（SEQ ID NO:42） | 98 | 55 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 第四外显子 | GCAACTTGACGGTGCACCGG（SEQ ID NO:43） | F：caccGCAACTTGACGGTGCACCGG（SEQ ID NO:44）<br>R：aaacCCGGTGCACCGTCAAGTTG（SEQ ID NO:45） | 97 | 73 |
| 第四外显子 | GAGCTGGGCCGCCCGGGGCC（SEQ ID NO:46） | F：caccGAGCTGGGCCGCCCGGGGCC（SEQ ID NO:47）<br>R：aaacGGCCCCGGGCGGCCCAGCT（SEQ ID NO:48） | 39 | 76 |
| 第三外显子 | GGTCAGACGGAGGCTCCCTT（SEQ ID NO:49） | F：caccGGTCAGACGGAGGCTCCCTT（SEQ ID NO:50）<br>R：aaacAAGGGAGCCTCCGTCTGACC（SEQ ID NO:51） | 61 | 65 |

根据上述表 1 的敲除效率情况，选择敲除第二、第三外显子的 gRNA 基因敲除质粒载体，用于下一步实验。本申请优选在第二外显子、第三外显子中进行 BCL11B 基因敲除，利用第二外显子敲除效率最低的第一对 gRNA 和第二对 gRNA 的混合物，敲除效率最高的第三对 gRNA，第三外显子敲除效率最低的第三对 gRNA 对应的基因敲除质粒以及它们的混合物均能将 T 细胞重编程获得了本申请的免疫杀伤淋巴细胞。在本实施例中，采用 SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:50 和 SEQ ID NO:51 的 gRNA 分别构建 BCL11B 基因敲除质粒并将其混合，用于下一步实验。

T 细胞的分选和激活

采用以下方法进行 T 细胞的分选和激活：

（1）分别将包含人成熟 T 细胞的外周血和脐带血血液以 300×g 离心 10 分钟，收集血浆，在 56℃下热灭活 30 分钟；

（2）将沉淀的颗粒状血细胞用 0.9%NaCl 悬浮，通过 Ficoll 密度梯度离心分离外周血单核细胞（PBMC）；

（3）通过 MACS Pan T 分离试剂盒（Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany）阴性分选，从血液如外周血、脐带血等富集全部 T 细胞（Pan T）

以上（1）-（3）为从外周血和脐带血血液中分离人成熟 T 细胞的步骤，需要说明的是，其它 T 细胞来源亦可，如多能干细胞、造血干细胞定向诱导分化等。所有来源的 T 细胞均利用 T 细胞活化试剂盒（T cell activation kit (Miltenyi Biotec)），使用涂有抗人 CD3、抗人 CD28 抗体和抗人 CD2 的磁珠与 T 细胞以 1：2 混合孵育激活（细胞密度：$2.5\times10^6$ 个细胞/ml，培养基：T551-H3 (Takara, Japan)培养基，含有 5%自体血浆，hIL2（100IU / ml），硫酸庆大霉素（20μg/ ml），10mm HEPES，2mm 谷氨酰胺和 1%青霉素/链霉素），活化 24-48 小时后，将 T 细胞从抗生物素 MACS iBead TM 颗粒中洗脱，备用。

诱导重编程

（1）通过电转(T-023, LONZA Amaxa Nucleofector, Lonza)，将 CRISP/CAS9 敲除载体 PX458-gBCL11B 转导入上述激活后的 T 细胞；

（2）12 小时后，将 PX458-gBCL11B 转导的 T 细胞（简称 PX458-T）离心，并用 T551-H3 (Takara, Japan)培养基（含有 5%自体血浆或胎牛血清（FBS），500IU / ml hIL2 和硫酸庆大霉素（20μg/ ml））培养；

（3）随后每 3 天更换新鲜培养基，保持细胞密度在 0.5-$1\times10^6$ 个细胞/ml 范围内，直至电转后第 14 天。

（4）通过基因测序，检测并验证转导了 PX458-gBCL11B 的 T 细胞的 BCL11B 的第二外显子、第三外显子是否被敲除，如位点诱导插入或缺失等，对照组为转导了 PX458 空载体（Mock）的 T 细胞；

（5）通过 Western Blotting，检测并验证转导了 PX458-gBCL11B 的 T 细胞中 BCL11B 蛋白表达水平，以进一步确认 BCL11B 蛋白的缺失，对照组为转导了 PX458 空载体（Mock）的 T 细胞，Western Blotting 结果见图 3。

重编程细胞的表型鉴定

如上，电转 T 细胞 14 天后，所得细胞中有 19.5-68.7%既表达 T 细胞标志物如 CD3，也表达 NK 细胞标志物如 NKp46、CD56、NKp30 和 NKp44，则确定获得了本申请的人 ITNK 细胞。NK 细胞只表达 NK 细胞标志物如 NKp46、CD56，但不表达 T 细胞标志物如 CD3。电转空载体的 T 细胞表达 T 细胞标志物如 CD3，但不表达 NK 细胞标志物。T 细胞、NK 细胞和 ITNK 细胞的各细胞标志物的表达情况如图 4-6 所示，它们的表型差异也归纳于以下表 2。

表 2、ITNK 细胞与 T 细胞、NK 细胞的表型差异

| -- | T 细胞 | NK 细胞 | ITNK 细胞 |
|---|---|---|---|
| T 细胞标志物 | CD3 等 | - | CD3 等 |
| NK 细胞标志物 | - | 高表达 NKp46、CD56、NKp30 和 NKp44 等 | 高表达 NKp46（CD4 阳性 ITNK 细胞不/低表达）、CD56、NKp30 和 NKp44 等 |
| BCL11B 表达 | 高表达 | 低表达 | 缺失 |

此外，通过共聚焦显微镜观察显示， 由 T 细胞重编程而来的 ITNK 细胞具有区别于 T 细胞的细胞形态，其形态与 NK 细胞类似，细胞核（相对于 T 细胞细胞核占据细胞整体体积）较小，细胞内基质较多，颗粒增大，内质网丰富，高蛋白合成活性，表明重编程后的 ITNK 细胞为免疫杀伤淋巴细胞。T 细胞、NK 细胞和 ITNK 细胞的透射电镜图如图 7 所示。

此外， 发明人还比较了脐带血来源和外周血来源的 BCL11B 缺失的 T 细胞亚群中这些 NK 标志物的表达谱，发现 CD8 + NKp46 +和 CD8 + CD56 +细胞的百分比显着高于 CD4 + NKp46 +和 CD4 + CD56 +细胞，表明 NKp46 + CD3 + ITNK 主要来源于 CD8 + T 细胞（见图 8）。与 CD8 + T 细胞不同，CD4 + T 细胞在失去 BCL11B 后表达 NKp30 但不表达 NKp46（见图 8B）。

CD4-CD8-NKp46 +亚群表达了“TCRγδ”，为 γδTCR+ ITNK 细胞（见图 9）。通过 DNA 测序进一步验证 CD4 +、CD8 +和 γδTCR+ T 细胞中的 BCL11B 缺失（见图 9）。

**实施例 2 本申请 ITNK 细胞的来源鉴定**

TCRαβ 测序：通过人 TCRαβ 分析试剂盒，将同一供者来源的 T 细胞和实施例 1 所得 ITNK 细胞进行 RNA 提取和 CDR3 区域靶向扩增，获得 TCR RNA。利用 Hiseq4000 平台，对 TCR RNA 进行测序，获得 TCR 文库。使用 MiXCR(ref)进行聚类组合分析。通过 MiXCR 克隆导出指令，以“—链”参数导出 TCRαβ 克隆类型。通过 TCR 测序，比较同一供者来源的 T 细胞和 ITNK 细胞的 TCR 克隆的多样性，发现 TCR 克隆多样性一致（见图 10 和 11），由此确定所得 ITNK 细胞是 T 细胞缺失 BCL11B 后重编程而来，并保持了 T 细胞的 TCR 多样性，而不是人 T 细胞中的特殊、未知小亚群扩增而来的。

**实施例 3 本申请 ITNK 细胞的单细胞免疫表型鉴定**

通过质谱流式细胞技术（Mass Cytometry， CyTOF），分别对实施例 1 所得 ITNK 细胞进行单细胞免疫表型分析，对照组为转导了空载体的 T 细胞。

质谱仪样品的制备和预处理：将来自培养悬浮液的细胞离心，用含有 0.5%BSA 和 0.02% NaN 3 的 PBS 重悬，并在室温下用抗人 CD16 / 32 的单克隆抗体孵育 10 分钟以阻断 Fc 受体。随后，加入针对细胞表面分子的金属标记的抗体混合物，并在冰上进一步孵育 20 分钟。抗体为预耦合的抗体（Fluidigm）或使用质谱流式耦合试剂盒（Fluidigm）并根据说明书进行内部耦合。向细胞中加入 5mM 顺铂（cisplatin），在 FBS（Fluidigm）中在冰上孵育染色 1 分钟。在用固定/透化缓冲液（Thermo Fisher）处理后，将细胞与金属标记抗体混合孵育以标记细胞内蛋白质。清洗细胞后，用 1mL 的 1：4000 稀释的 191/193Ir DNA 嵌入剂（Fluidigm）（嵌

入剂用含有 1.6%多聚甲醛（EMS）的 PBS 稀释）染色，并储存在 4℃。检测前，将细胞用含有 0.5%BSA 和 0.02%NaN 3 的 PBS 洗涤一次，用 $ddH_2O$ 洗涤一次，然后用超纯水（$ddH_2O$）将细胞重悬和稀释至约 $10^6$ 个细胞/ 毫升。随后，利用 CyTOF2 设备（Fluidigm）以<400 事件/秒的事件速率检测和收集细胞样品数据。

通过 PhenoGraph 聚类算法，根据 40 个标记物的细胞免疫表型差异进行聚类分析，将脐带血来源的 ITNK 细胞（下文也称 CB-ITNK）、外周血来源的 ITNK 细胞（下文也称为 PBMC-ITNK）和 Mock-T 细胞整合并分类为 39 个亚群，如图 12、13、14、15、16 和 17。由图 12 可知，K562 细胞刺激前后的 PX458 T 与 Mock-T 之间分离，几乎不存在重叠，表明 PX458 T 与 Mock-T 之间差异显著；而经过 K562 细胞刺激前后的 PX458 T 细胞之间存在明显的重叠，且激活后的 PX458-T 细胞衍生了更多新的亚群。

根据质谱流式细胞标记物表达异质性分析结果，本申请的 ITNK 细胞包括 NO.33 的 CD3 阴性细胞亚群、 NO.5-10 的 CD4+细胞亚群、NO.20-22 和 26-28 的 CD8+细胞亚群以及 NO.23-24 的 TCRγδ+细胞亚群，且均表达 NK 相关标志物如 CD56、NKp30、NKp44、NKp46 或 CD11C 等，TCRγδ+ ITNK 相对于 γδT 细胞，NKp46、NKp30 和 NKp44 三个标志物均为高表达，即（$NKp46^{high}$ $NKp30^{high}$ $NKp44^{high}$）（如图 13 和 14A）。本申请的 ITNK 细胞区别于常规的 NK 细胞，因为本申请的 ITNK 细胞不表达 CD127、 CD16、NKG2A 和 KIR2DL2（如图 14B）。而且，本申请的 ITNK 细胞低表达免疫抑制检查点 PD-1、CTLA-4、FOXP3（如图 14C），免疫抑制检查点的高表达会诱导免疫细胞形成低功能、衰竭等免疫抑制状态，由此提示本申请的 ITNK 细胞具有强免疫效应，且不容易被肿瘤等免疫抑制微环境所抑制。

此外，在脐带血来源的 ITNK 细胞中，如图 15 的柱状图清晰地显示了各种 ITNK 细胞在 CD45+造血细胞中所占的百分比，以及刺激后从静止 ITNK 细胞向效应细胞的动态转变。如图 16 所示，成年人外周血来源的 ITNK 细胞经刺激后从静息状态向效应状态的动态转变也与脐带血来源的 ITNK 相同。如图 17 的质谱流式热图（heatmap）显示了激活前后 ITNK 细胞的免疫表型动态变化，激活后 CD25 表达升高。综上所述，ITNK 激活后，仍然保留 NK 细胞激活受体和 T 细胞标志物的表达。

**实施例 4　本申请 ITNK 细胞的 RNA-Seq 转录谱分析**

为了研究 ITNK 细胞的全部基因表达谱，发明人对来自于 4 个脐带血样品和 3 个成体外周血样品的 T 和 ITNK 细胞，以及来自于 2 个脐带血样品和 2 个成体外周血样品的 NK 细胞进行了 RNA 测序分析。分选操作如下：通过流式细胞仪 Canto、FACS Fortessa (BD)、FACSAriaII 等进行流式细胞分析或分选。细胞表面受体标记，将细胞与抗体用 50 μl 流式缓冲液 (含 2% FBS 的 PBS 溶液) 混合，4 度避光孵育 30 分钟；细胞胞内标记，细胞利用 Foxp3/转录因子染色缓冲液 (eBioscience)进行通透性处理，洗脱缓冲液后，用鼠或兔血清阻断，与抗体 4 度避光孵育 30 分钟，利用流式缓冲液冲洗一遍后重悬，备用进行流式细胞分析或分选。细胞分选策略和分选纯度验证（如图 18）。

采用主成分分析(PCA)对 18 个样本的 RNA 测序结果进行相似性评价，发现从转录组分析，ITNK 不同于 T 细胞和 NK 细胞（如图 19）。与 T 细胞相比，增加 776 个基因（数据未显示），包括 NK 特异性转录因子(如 ID2、TBX21、NFIL3、IRF8)、激活和抑制 NK 细胞受体/蛋白(如 IL2RB、IFNG、PRF1、GZMB、TNFRSF4、NCR1、NCR2、PLCG2)、组蛋白基因(HIST1H1D、HIST1H2AC/D/E/G/M、HIST2H2A3/4)（如图 22 和 20）；相反，与 T 细胞相比，ITNK 细胞中有 592 个基因如 TCF-1/TCF-7、LEF-1、IL-7R、MYC、PD-L1、FOXP3 等被下调（如表 3）。与 NK 细胞相比，ITNK 中 666 个基因表达增加（数据未显示），其中大多数基因在 T 细胞识别和 TCR 信号转导(CD3、CD4、CD8、CD40LG)中富集（图 21）。有趣的是，与 NK 细胞相比，ITNK 中 KIR 基因 KIR2DL1、KIR2DL3、KIR3DL1 和 KIR3DL2 表达下调（如表 4），而 KIR2DL1、KIR2DL3、KIR3DL1 和 KIR3DL2 为 NK 细胞抑制性受体，介导免疫细胞的抑制作用，而其低表达则表示 ITNK 细胞具有对免疫抑制微环境的抵抗作用。全转

录组测序分析结果显示，NK 细胞标志性基因 IL2RB、ID2、NFIL3 等在 ITNK 细胞中上调表达（图 22 右）。

表 3、ITNK 细胞相对于 NK 细胞的相关基因表达

| ENTREZ ID | 标志 | 基值 | log2 倍数变化 | lfcSE | stat | P 值 | padj |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 6932 | TCF7 | 6118.39588 | -1.7050171 | 0.20634066 | -8.2631176 | 1.4192E-16 | 3.4959E-14 |
| 51176 | LEF1 | 4011.12315 | -1.1451791 | 0.15917866 | -7.1943003 | 6.2782E-13 | 6.9436E-11 |
| 3575 | IL7R | 1810.03157 | -3.9931208 | 0.40305169 | -9.9072177 | 3.8728E-23 | 6.2964E-20 |
| 4609 | MYC | 1160.22897 | -2.6861929 | 0.28569782 | -9.4022167 | 5.3425E-21 | 4.1361E-18 |
| 50943 | FOXP3 | 769.302246 | -2.0215289 | 0.58426298 | -3.459964 | 0.00054025 | 0.00415092 |

表 4、ITNK 细胞相对于 NK 细胞的相关基因表达

| ENTREZ ID | 标志 | 基值 | log2 倍数变化 | lfcSE | stat | P 值 | padj |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 3811 | KIR3DL1 | 365.099198 | -7.1254794 | 0.75146844 | -9.482074 | 2.4928E-21 | 3.971E-18 |
| 3804 | KIR2DL3 | 473.412488 | -4.8525337 | 0.89072948 | -5.4478198 | 5.0991E-08 | 2.9645E-06 |
| 3812 | KIR3DL2 | 373.96061 | -3.0917182 | 0.86143947 | -3.5890139 | 0.00033193 | 0.00378501 |
| 3802 | KIR2DL1 | 282.000446 | -4.7696308 | 0.99147586 | -4.8106373 | 1.5045E-06 | 5.0993E-05 |

**实施例 5　本申请 ITNK 细胞的单细胞转录组测序分析**

流式细胞术显示 CD8+CD3+NKp46+ ITNK 和 CD4+CD3+NKp30+ ITNK 在敲除 BCL11B 后 5 天即出现（如图 23）。为了进一步解释 T 细胞向 ITNK 重编程过程中的细胞命运转变，我们使用基于微孔的单细胞转录组测序（scRNA-seq）技术，研究了敲除 BCL11B 后不同时间点 CD3+脐带血样品中 T 和 ITNK 细胞在单细胞水平上的基因表达谱。

所有实验组共计检测分析约 5000 个细胞。scRNA-seq 检测不同时间点组细胞样本，平均每个细胞检测 2000-4000 个基因，在所有细胞中共检测到 20000 个人类基因。在转录谱的 t-SNE（t-distributed random neighbor- embedded）分析中，将细胞投射到二维上，为 ITNK 细胞重编程过程中的细胞命运转变提供了可视化的表现方式。无偏 t-SEN 分析结果显示，从敲除后第 0 天到第 20 天的细胞可聚类为 11 个亚群（如图 24）。根据 T 细胞和 NK 细胞的标志性基因表达情况，确定 ITNK 细胞主要集中在亚群 6 (CD4+ ITNK)、亚群 1 (CD8+ ITNK) 和 亚群 10 (γδTCR+ ITNK)（如图 24），而这些亚群与 BCL11B 缺失表达亚群完全重合，进一步说明 ITNK 细胞是由 T 细胞中敲除 BCL11B 重编程而来。KEGG 富集分析表明，ITNK 细胞特异性高表达 NK 标记基因及其相关基因（如图 25）。由图 24C、图 25C 可知，人 ITNK 细胞中 NOTCH1、NOTCH2、ZMIZ1（NOTCH1 辅助因子）、RBPJ（NOTCH 下游转录因子）均上调，提示 NOTCH 信号通路在 ITNK 细胞重编程中的发挥作用。FOS、JUN、 JUNB ，三个 AP-1 转录因子的亚基在 ITNK 重编程早期低表达，而重编程晚期逐渐上调表达（如图 25C）。可知 NOTCH 信号和 AP-1 信号在 ITNK 重编后上调。T 细胞和 ITNK 细胞在 t-SNE 点图中紧密聚集，说明 T 细胞向 NK 细胞的转变几乎是同步的。通过对 CD8+ T (亚群 5)、早期 CD8+ ITNK (亚群 0)和晚期 CD8+ ITNK (亚群 1)的 NK 标志性基因的轨迹分析，可以看出 CD8+ T 细胞向 CD8+ ITNK 的逐步过渡（如图 26A）。同样，CD4+ T 细胞和 ITNK 细胞 NK 标志性基因的轨迹分析也显

示了 T 细胞向 ITNK 细胞的逐步过渡(图 26B)。与（图 23）ITNK 细胞的免疫表型动态流式分析结果一致，T 细胞敲除 BCL11B 后第五天开始重编程为 ITNK 细胞。我们发现转录因子基因(TBX2、ID2 等)在 T 细胞向 ITNK 细胞重编程过程中表达明显上调，并通过免疫印迹进一步进行了验证（如图 27）。

**实施例 6 本申请 ITNK 细胞可体外识别和杀伤 MHCI 阳性/阴性的肿瘤细胞**

为了确定本申请的 ITNK 细胞上表达的 NK 细胞受体（NCR）和 T 细胞受体（TCR）是否有功能，我们分别利用抗 NKp30、 抗 NKp46 和抗 CD3/CD28 的单克隆抗体刺激 ITNK 细胞，发现：抗 NKp30、抗 NKp46 抗体刺激后，ITNK 细胞的干扰素（IFN）分泌增加，而对照组 T 细胞的不增加（如图 28）；用抗 CD3/CD28 抗体刺激后，ITNK 细胞的干扰素分泌增加，而对照组 T 细胞的不增加（如图 28）。这表明，ITNK 细胞中的 NCR 和 TCR 是功能性的。

与 NK 细胞类似，本申请的 ITNK 细胞可分泌各种细胞因子，包括 GM-CSF、IFN 和 TNF（如图 29），且可识别杀伤 MHC-I 阴性的 K562 细胞（如图 30A）。此外，ITNK 细胞能有效杀死 Hela 和 A549 细胞（如图 30B-C），这两种细胞都是高表达 NK 激活型受体的配体且 MHC I 为阳性；如表 2，由于 ITNK 细胞低表达介导免疫抑制作用的 NK 细胞 KIR 受体（KIR2DL1、KIR2DL3、KIR3DL1 和 KIR3DL2），所以 ITNK 细胞对肿瘤的杀伤效果比 NK 细胞更好。但是，NALM-6 不表达 NCR 配体，且高表达 MHC-I 分子，ITNK 细胞与 NK 细胞对 NALM-6 无显著杀伤（如图 30D）。然后，发明人利用 K562 细胞分别刺激 ITNK、NK 和 T 细胞，发现：ITNK 和 NK 细胞中的磷酸化 Fyn、PLC-γ2、Syk、Erk 和 m-TOR 表达水平相似，但高于 T 细胞（如图 31）。这些结果表明，ITNK 细胞在 NCR 活化、细胞因子分泌、细胞毒性和信号通路等方面具有相似的 NK 细胞功能。

**实施例 7 本申请的 ITNK 细胞可体内抑制肿瘤生长**

发明人还评估了本申请的 ITNK 细胞是否能够抑制异种移植瘤的生长。具体地，将标记有荧光素酶的 K562 细胞植入 NSI 小鼠，构建 K562 荷瘤小鼠模型，然后单次注入 ITNK、NK 或 T 细胞(图 32A)。于特定时间点，通过活体成像设备检测 K562 在小鼠体内的存活状况。与注射 T 细胞（阴性对照）、PBS（空白对照）组相比，ITNK 细胞和 NK 细胞处理的实验小鼠在输注 28 天后 K562 肿瘤负荷显著减少(图 32B 和 32C)，存活时间更长(图 32D)。此外，发明人还用 Hela 细胞移植入 NSI 小鼠，并分别用 ITNK、NK 或 T 细胞治疗 Hela 异种移植小鼠，结果显示，用 ITNK 细胞治疗的荷瘤小鼠的 Hela 肿瘤生长速度显著慢于 NK、T 细胞或 PBS 处理组（图 32E）。由此可见，本申请的 ITNK 细胞是体内肿瘤细胞的有效杀手，可以阻止肿瘤进展。

**实施例 8 本申请的 ITNK 细胞体内安全性评估**

为了验证 ITNK 细胞在体内的分布和维持能力。我们将 ITNK 细胞移植到缺失 T、B、NK 细胞的免疫缺陷小鼠 NSI 品系体内，并检测移植 1、7、14、21 和 180 后，外周血测量外周血与（PB）、脾脏（SP）、骨髓（BM）、肝脏（liver）和肺（lung）中 ITNK 细胞的百分比 (图 33A-B)。ITNK 细胞比例在移植后 21 天达到最高点，其后逐渐减少，6 个月后无法检测到(图 33B)。由图 33B 可知，ITNK 细胞体内维持能力相对于 T 细胞更好。我们始终没有观察到 ITNK 细胞攻击宿主或无限制扩增的情况。

为了评估 PX458-gBCL11B 可能引起的靶外突变，我们对 PX458-gBCL11B 电穿孔 T 细胞进行了高覆盖率的全基因组测序。与野生型 T 细胞相比，我们从两个独立的实验中发现，PX458-gBCL11B 编辑的 T 细胞中，由核酸酶引起的脱靶突变非常少。

**实施例 9 本申请的 CAR ITNK 细胞的构建**

虽然上述 ITNK 细胞具有 TCR（T 细胞受体）和 NCR（NK 细胞受体）功能，但它们不能识别特定的肿瘤抗原。为此，发明人将 PB-CAR 分子载体（CAR 分子结构：胞外结构域为 CD19、GPC3、MUC1 或 Mesothelin 等抗原的受体胞外段或对应抗体 scFv 序列，跨膜区为 CD28、NKG2D、NKp44 或 NKp46 等受体跨膜区的一种或两种，胞内共刺激结构域为 CD28、

TLR2、2B4、DAP10 或 DAP12 等胞内共刺激结构域，以及 CD3ζ）和 BCL11B 敲除载体 PX458-gBCL11B 先后或同时转导至人 T 细胞中，获得了表达抗 CD19 的嵌合抗原受体（CAR）分子的 ITNK 细胞。通过流式细胞技术检测转导后的细胞的 PI 标记和 GFP 表达情况，以确定转导后细胞的存活和转导效率（如图 34A 所示）以及 ITNK 细胞的重编程情况（如图 34B 所示）。具体地，在第 10～14 天检测了 CAR19-ITNK 细胞（如图 34 中所显示的 19T2/ITNK）的百分率，其表现为 GFP+CD4+NKp30+、CD4-CD8-γδITNK 亚群和 GFP+CD8+NKp46+亚群。

**实施例 10 本申请的 CAR ITNK 细胞的体外杀伤 CD19+CML 和 BALL**

为了评价 CAR19（FMC63 scFv 段-CD28 跨膜区-CD28 和 TLR2 的胞内结构域-CD3ζ 信号域）-ITNKs 的抗肿瘤效果，构建了表达人 CD19 和荧光素酶的人慢性髓系白血病细胞系 K562 细胞(K562-CD19)、表达荧光素酶的急性 B 淋巴细胞白血病 NALM-6 细胞，将 CAR19-ITNK 细胞、CAR19-T 细胞、NK 细胞、T 细胞分别与两种白血病细胞系以不同 E:T 效应细胞和靶细胞比混合 24 小时，加入荧光素酶底物，通过酶标仪检测肿瘤细胞被杀伤情况。

上述对 K562-CD19 细胞的体外杀伤实验显示，本申请的 CAR19-ITNK 细胞比 CAR19 T 细胞和 ITNK 细胞更有效地识别和杀伤 K562-CD19 细胞（如图 35A 所示）。然而，在清除 NALM-6 细胞时，CAR19-ITNK 细胞和 CAR19 T 细胞的杀伤能力相似（如图 35B 所示），这可能是由于 HLA-I 阳性或 NCR 配体在 NALM-6 中缺乏所致。ITNK 细胞始终没有裂解 NALM-6（如图 35B 所示）。这些结果表明，CAR 信号和 NCR 信号是兼容的，可以协同工作。

**实施例 11 本申请的 CAR19 ITNK 细胞的体内杀伤 CD19+CML**

为了检测本申请 CAR19-ITNK 细胞的体内抗肿瘤活性，申请人将实施例 10 所构建的 K562-CD19 细胞通过静脉注射到 NSI 小鼠体内（每只小鼠注射剂量为 $5\times10^5$ 个细胞），然后注射 CAR19-ITNK 细胞、ITNK 细胞、CAR19-T 或 T 细胞（每只小鼠注射剂量为 $2.5\times10^5$ 个细胞），分别称为 CAR19-ITNK 组、ITNK 组、CAR19-T 组或 T 细胞组，其实验过程如图 36A 所示，并于 K562-CD19 移植后的第 2、7、14、21、28 天，对白血病小鼠进行荧光素酶底物（可与表达荧光素酶发生作用，表达荧光素酶的细胞可被活体成像仪检测到）处理，通过活体成像技术检测白血病小鼠体内荧光素酶标记的 K562 -CD19 细胞存活或被杀伤的情况，活体成像仪可检测荧光素酶标记的细胞的分布，并通过荧光强度来判断标记细胞的数量。

实验结果显示，CAR19-ITNK 组小鼠的肿瘤负荷较其他组轻，如图 36B-C 所示；实验结果还显示，CAR19-ITNK 细胞抑制 NALM-6 生长的作用较其他细胞如 CAR19-T 细胞和 ITNK 细胞更明显，同样如图 36B-C 所示。值得注意的是，尽管 CAR19-ITNK 和 CAR19 T 细胞在体外对 NALM-6 表现出类似的杀伤能力（如图 35B），但在体内清除 NALM-6 方面，CAR19-ITNK 细胞表现优于 CAR19 T 细胞。综上所述，这些结果表明 CAR 增强了 ITNK 细胞对肿瘤的细胞毒性，特别是体内细胞毒性。

**实施例 12 本申请的抗 GPC3 的 CAR-ITNK 细胞的杀伤肝癌细胞**

本申请构建了识别磷脂酰肌醇 GPC3 的 CAR-ITNK 细胞，CAR 分子结构为抗 GPC3 的 scFv 胞外段、NKG2D 跨膜区、2B4 胞内共刺激结构域和 CD3ζ。在 96 孔板中设置四个实验组，包括 CAR-ITNK 细胞、CAR-T、ITNK 细胞、T 细胞，每组复孔 3 个，每孔加入 10000 个肿瘤细胞（GPC3 阳性肿瘤细胞系 Huh7-GL 和 HepG2-GL，GL 为荧光素酶基因标记）作为靶细胞，效应细胞按照 E:T 分别为 4：1，2:1，1:1，1:2，1:4 加入孔板中，效应细胞与肿瘤细胞共孵育 24h 后，加入荧光素酶底物，通过定量分光光度计，检测肿瘤细胞的杀伤比例。试验结果分析发现，CAR-ITNK 细胞的肿瘤杀伤效果比 ITNK、CAR T 和 T 细胞都更好（数据未显示）。

**实施例 13 本申请的抗 TGFβ 的 CAR-ITNK 细胞的细胞扩增和杀伤实体肿瘤细胞**

本申请构建了识别细胞因子 TGFβ 的 CAR-ITNK 细胞，CAR 分子结构为抗 TGFβ 的 scFv 胞外段、CD28 胞内共刺激结构域、TLR2 胞内共刺激结构域和 CD3ζ。在 96 孔板中设置四个实验组，包括 CAR-ITNK 细胞、CAR-ITNK+TGFβ、ITNK 细胞、ITNK 细胞+TGFβ，每组复孔 5 个，每孔 105 个细胞，于加入 TGFβ (3 ng/ml) 细胞因子后 6、24、48、72、96 小时，通

过细胞计数，记录每孔细胞绝对数值，同时通过 ELISA 检测方法检测不同实验组的相关免疫效应细胞因子的分泌情况。统计结果对比数据分析会发现，TGFβ 对 ITNK 细胞的扩增和免疫效应细胞因子分泌具有抑制作用，而抗 TGFβ 的 CAR-ITNK 细胞在 TGFβ 存在的条件下，细胞扩增和免疫效应细胞因子分泌都相对增强。

评估抗 TGFβ 的 CAR-ITNK 细胞对肿瘤细胞的杀伤作用，设置在 24 孔板中设置四个实验组，包括 CAR-ITNK 细胞、CAR-ITNK+ TGFβ、ITNK 细胞、ITNK 细胞+ TGFβ，每组复孔 3 个，每孔 2 X 105 个效应细胞，加入 105 个肿瘤细胞（肿瘤细胞系 HepG2，荧光素酶基因标记）作为靶细胞，于加入 TGFβ 细胞因子后 24 小时，加入荧光素酶底物，通过荧光照度计，检测肿瘤细胞的杀伤比例。试验结果分析发现，TGFβ 会抑制 ITNK 细胞的肿瘤杀伤效果，而 TGFβ 的存在会相对促进抗 TGFβ 的 CAR ITNK 细胞对肿瘤细胞的杀伤效果(数据未显示)。

**实施例 14 本申请的抗 Mesothelin 的 CAR-ITNK 细胞的杀伤实体肿瘤细胞**

本申请构建了识别间皮素 Mesothelin 的 CAR-ITNK 细胞，CAR 分子结构为抗 Mesothelin 的 scFv 胞外段、CD28 跨膜区、DAP10 或 DAP12 序列和 CD3ζ。在 96 孔板中设置四个实验组，包括 CAR-ITNK 细胞、CAR-T、ITNK 细胞、T 细胞，每组复孔 3 个，每孔加入 10000 个肿瘤细胞（Mesothelin 阳性肿瘤细胞系 BGC-823-GL 和 MKN-28-GL，GL 为荧光素酶基因标记）作为靶细胞, 效应细胞按照 E:T 分别为 4：1，2:1，1:1，1:2，1:4 加入孔板中，效应细胞与肿瘤细胞共孵育 24h 后，，加入荧光素酶底物，通过定量分光光度计，检测肿瘤细胞的杀伤比例。这些实验结果与上述实施例结果类似，都显示 CAR-ITNK 细胞的肿瘤杀伤效果比 ITNK、CAR T 和 T 细胞都更好（数据未显示）。

本申请的 CAR ITNK 细胞中的各个肿瘤和病毒识别和杀伤激活途径不存在相互干扰，具有相互协同作用。本申请的 CAR ITNK 不仅可通过 CAR 分子激活和识别肿瘤或病毒相关抗原，而且可以通过 ITNK 细胞中的 NK 细胞受体和 TCR 受体途径识别肿瘤或病毒相关抗原，不仅对特定肿瘤和病毒具有特异性高效杀伤作用，从而迅速控制肿瘤进展和病毒恶化，而且具有广谱的抗肿瘤和病毒效应，从而防止肿瘤和病毒的逃逸复发。本申请 CAR-ITNK 技术，解决了现有技术中 CAR T 和 CAR NK 治疗中的肿瘤抗原逃逸、治疗复发和效率低等问题。

申请人声明，本申请通过上述实施例来说明本申请的详细方法，但本申请并不局限于上述详细方法，即不意味着本申请必须依赖上述详细方法才能实施。所属技术领域的技术人员应该明了，对本申请的任何改进，对本申请产品各原料的等效替换及辅助成分的添加、具体方式的选择等，均落在本申请的保护范围和公开范围之内。

# 权 利 要 求 书

1、一种工程化免疫杀伤细胞，其通过以下制备而成：在人 T 细胞中转染靶向肿瘤或病毒相关抗原的 CAR 分子或 TCR 分子，同时或其后，进行涉及 BCL11B 基因的缺失或抑制的重编程。

2、根据权利要求 1 所述的细胞，其中，所述免疫杀伤细胞表达靶向肿瘤或病毒相关抗原的 CAR 分子或 TCR 分子，保留衍生其的人 T 细胞的标志物和功能并具有 NK 细胞的标志物和功能。

3、根据权利要求 1 所述的细胞，其中，所述人 T 细胞为成熟人 T 细胞或含有成熟人 T 细胞的细胞群；

优选地，所述成熟人 T 细胞或含有成熟人 T 细胞的细胞群来源于人体脐带血或外周血；

优选地，所述成熟人 T 细胞或含有成熟人 T 细胞的细胞群来源于多能干细胞、胚胎干细胞或脐带血干细胞分化获得的成熟 T 细胞或细胞群。

4、根据权利要求 1-3 任一项所述的细胞，其表达功能性的 TCR、CD3 和 NKp30。

5、根据权利要求 1-4 任一项所述的细胞，其表达选自以下的 NK 细胞的标志物：CD11c、NKG2D 和 CD161；

优选地，其低表达或不表达 PD-1、CTLA-4 或 FOXP3 免疫抑制检查点；

优选地，其低表达或不表达 NK 相关标志物：CD127、CD16 、KIRDL2、KIRDL3、NKG2A。

6、根据权利要求 1-5 任一项所述的新型免疫杀伤淋巴细胞，其中，相较于衍生其的 T 细胞，NOTCH 表达上调。

7、根据权利要求 1-6 任一项所述的细胞，其中，相较于衍生其的 T 细胞，LEF1 和 TCF7 转录因子表达下降，NOTCH、AP1、ID2、TBX21 和 NFIL3 表达上升。

8、根据权利要求 1-7 任一项所述的细胞，其中，其 TCR 介导的信号转导增强；

优选地，相较于衍生其的 T 细胞，其与 TCR 介导的信号转导相关的基因 CSF2、FOS、MAPK12、MAP3K8、IFNγ、NFKBIA、MAPK11、IL-10 和 TEC 的表达上调；

优选地，相对于 NK 细胞，其 T 细胞识别和 TCR 信号转导增强；优选地，CD3、CD4、CD8、CD40LG 的表达上调。

9、根据权利要求 1-8 任一项所述的细胞，其中，相较于衍生其的 T 细胞，其 NK 杀伤毒性相关信号转导增强；

优选地，相较于衍生其的 T 细胞，其与 NK 杀伤毒性相关信号转导相关的基因 PRF1、CSF2、ICAM1、CD244、PLCG2、IFNG、FCER1G、GZMB、NCR2、NCR1、KIR2DL4 和 SYK 的表达上调。

10、根据权利要求 1-9 任一项所述的细胞，其包括 CD8+NKp46+ NKp44+ NKp30+、CD4+NKp30+和 γδTCR+NKp46+ NKp44+ NKp30+T 细胞亚群。

11、根据权利要求 1-10 任一项所述的细胞，其中，所述人 T 细胞为成熟人 T 细胞，并且重编程所述人成熟 T 细胞包括：

1’）激活成熟人 T 细胞；

2’）对步骤 1’）所得激活的成熟人 T 细胞实施 BCL11B 基因敲除；

3’）将步骤 2’）所得细胞用 T 细胞培养基进行培养。

12、根据权利要求 11 所述的细胞，其中，步骤 1’）中，使用抗人 CD3 抗体、抗人 CD28 抗体和抗人 CD2 抗体进行激活；

优选地，使用抗人 CD3 抗体、抗人 CD28 抗体和抗人 CD2 抗体的磁珠与人成熟 T 细胞以 1:2 混合孵育激活 T 细胞。

13、根据权利要求 11 或 12 所述的细胞，其中，步骤 2’）中，使用 CRISPR/CAS9 技术进行 BCL11B 基因敲除；

优选地，所述基因敲除的靶点在 BCL11B 基因的第二外显子处；

优选地，所述基因敲除的靶点在 BCL11B 基因的第三外显子处。

14、根据权利要求 11-13 任一项所述的细胞，其中，步骤 3’）中，所述 T 细胞培养基包含 IL-2；优选地，不与 OP9-DL1 进行共培养。

15、根据权利要求 1-14 任一项所述的细胞，其中， 所述 CAR 分子包含以下结构域：信号肽、胞外抗原识别结构域、跨膜区、胞内共刺激结构域；

优选地，所述 CAR 分子从 N 端到 C 端依次包含以下结构域：信号肽、胞外抗原识别结构域、跨膜区、胞内共刺激结构域。

16、根据权利要求 1-14 任一项所述的细胞，其中，所述肿瘤相关抗原为肿瘤表面抗原、肿瘤分泌的细胞因子、肿瘤微环境免疫抑制作用相关的细胞的表面抗原及其分泌的细胞因子、肿瘤相关的微生物抗原，优选为肿瘤表面抗原，更优选为 CD19、GPC3、Mesothelin、PSCA、MUC1。

17、一种制备权利要求 1-16 任一项所述的细胞的方法，其包括：

1’’）激活人 T 细胞；

2’’)将表达肿瘤相关抗原的 CAR 分子或肿瘤特异性 TCR 分子载体转染激活的人 T 细胞，与此同时或其后，实施 BCL11B 基因敲除；

3’’）将步骤 2’’）所得细胞用 T 细胞培养基进行培养。

18、根据权利要求 17 所述的方法，其中，步骤 1’’）中，所述人 T 细胞为成熟人 T 细胞或含有成熟人 T 细胞的细胞群；

优选地，所述成熟人 T 细胞或含有成熟人 T 细胞的细胞群来源于人体脐带血或外周血；

优选地，所述成熟人 T 细胞或含有成熟人 T 细胞的细胞群来源于多能干细胞、胚胎干细胞或脐带血干细胞分化获得的成熟 T 细胞或细胞群。

19、根据权利要求 17 或 18 所述的方法，其中，步骤 1’ ’）中，使用抗人 CD3 抗体、抗人 CD28 抗体和抗人 CD2 抗体进行激活；

优选地，使用抗人 CD3 抗体、抗人 CD28 抗体和抗人 CD2 抗体的磁珠与人成熟 T 细胞以 1:2 混合孵育激活 T 细胞。

20、根据权利要求 17-19 任一项所述的方法，其中，步骤 2’ ’）中，所述 CAR 分子包含以下结构域：信号肽、胞外抗原识别结构域、跨膜区、胞内共刺激结构域；优选地，所述 CAR 分子从 N 端到 C 端依次包含以下结构域：信号肽、胞外抗原识别结构域、跨膜区、胞内共刺激结构域；

优选地，所述抗原为肿瘤相关抗原和/或病毒、细菌等微生物相关抗原；

优选地，所述肿瘤相关抗原为肿瘤表面抗原、肿瘤分泌的细胞因子、肿瘤微环境免疫抑制作用相关的细胞的表面抗原及其分泌的细胞因子、肿瘤相关的微生物抗原，优选为肿瘤表面抗原，更优选为 CD19、GPC3、Mesothelin、PSCA、MUC1。

21、根据权利要求 17-20 任一项所述的方法，其中，步骤 2’ ’）中，使用 CRISPR/CAS9 技术进行 BCL11B 基因敲除；

优选地，在 BCL11B 基因的第二外显子处进行基因敲除；

优选地，在 BCL11B 基因的第三外显子处进行基因敲除。

22、根据权利要求 17-21 任一项所述的方法，其中，步骤 3’ ’）中，所述 T 细胞培养基包含 IL-2；优选地，不与 OP9-DL1 进行共培养。

23、权利要求 1-16 任一项所述的细胞在制备治疗选自以下的疾病的药物中的用途：肿瘤、艾滋病和感染性疾病；优选地，所述感染性疾病为病毒感染性疾病。

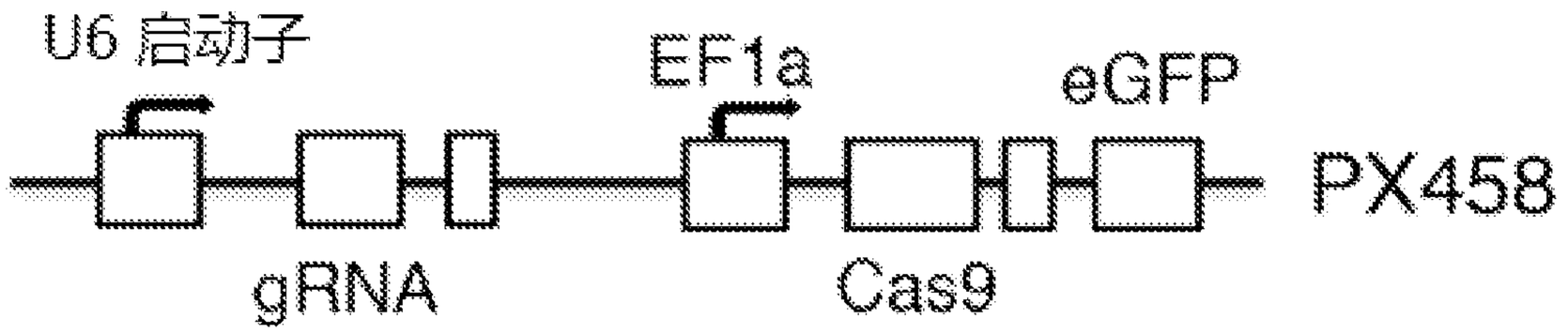

U6 启动子
EF1a
eGFP
PX458
gRNA
Cas9

图 1

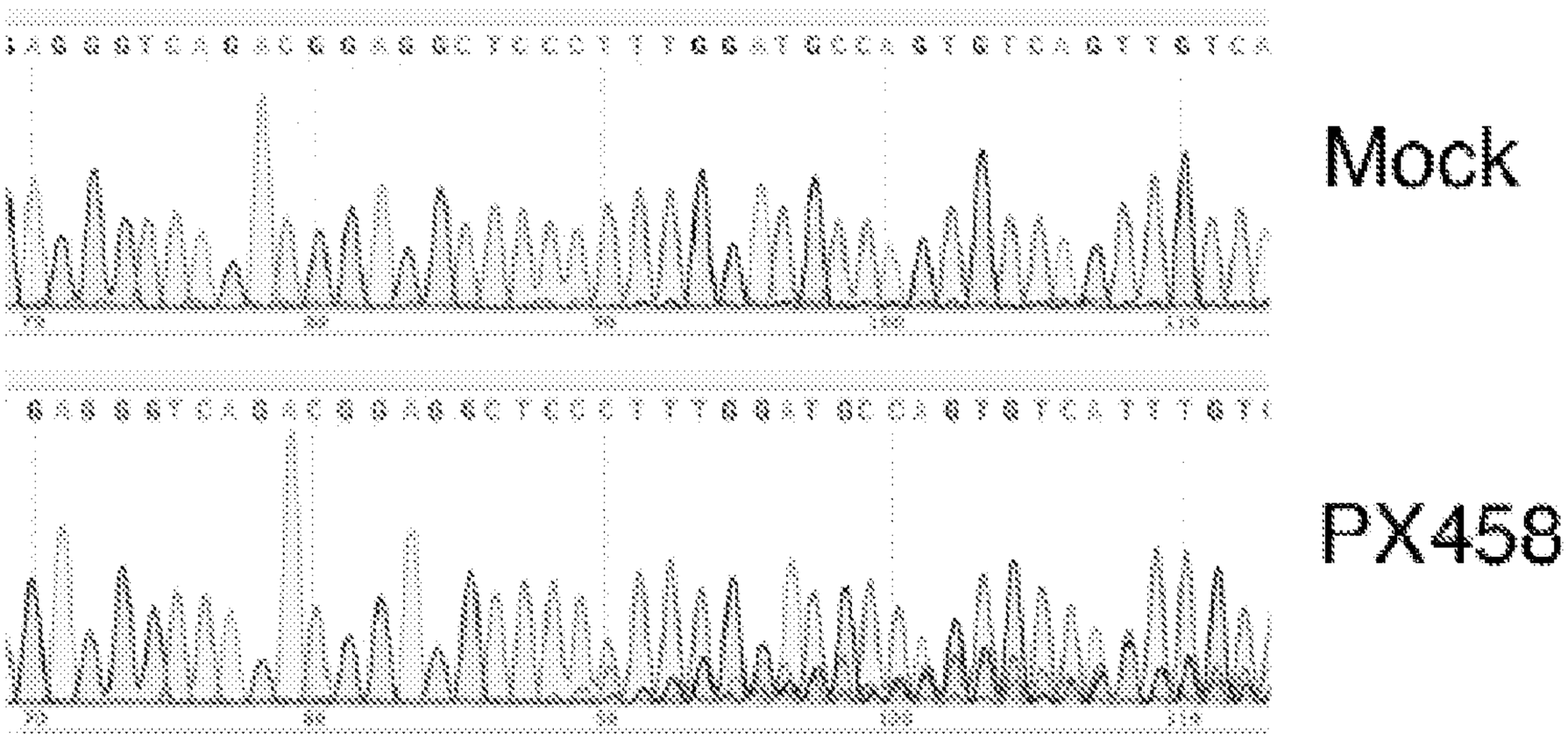

Mock
PX458

图 2

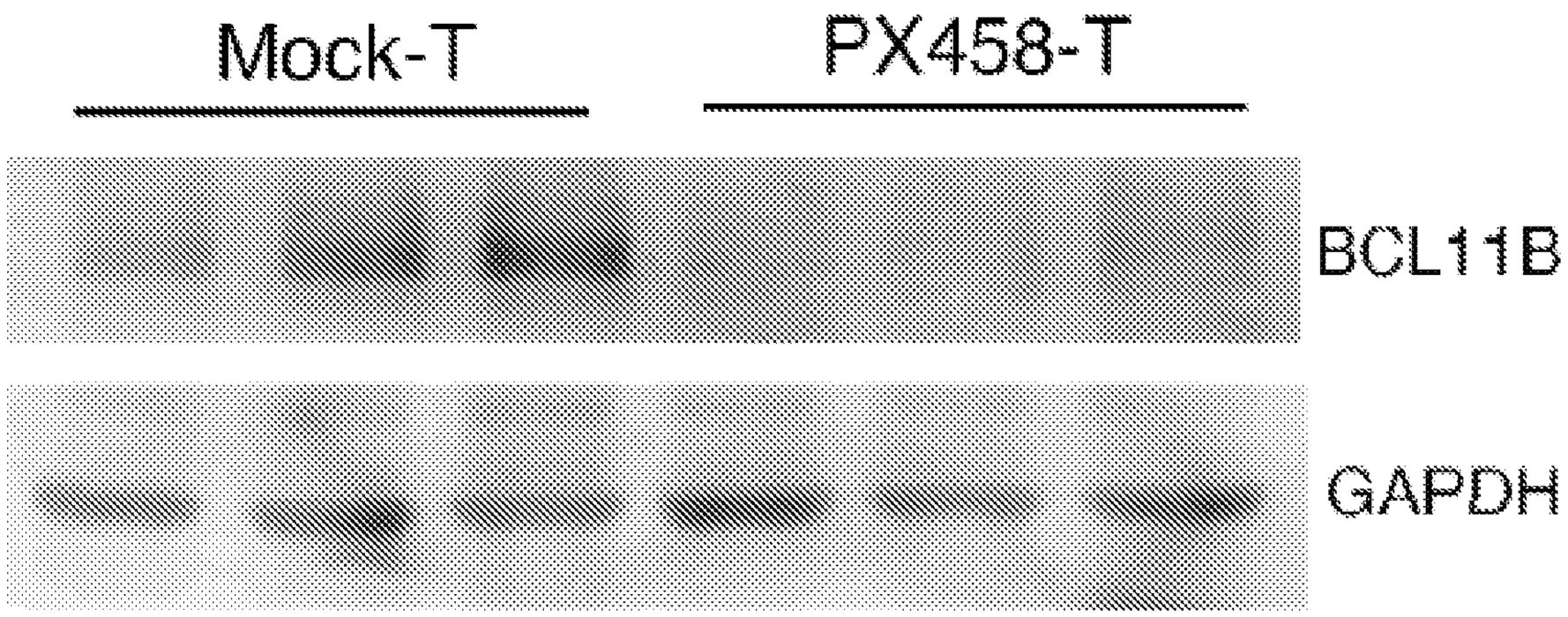

Mock-T
PX458-T
BCL11B
GAPDH

图 3

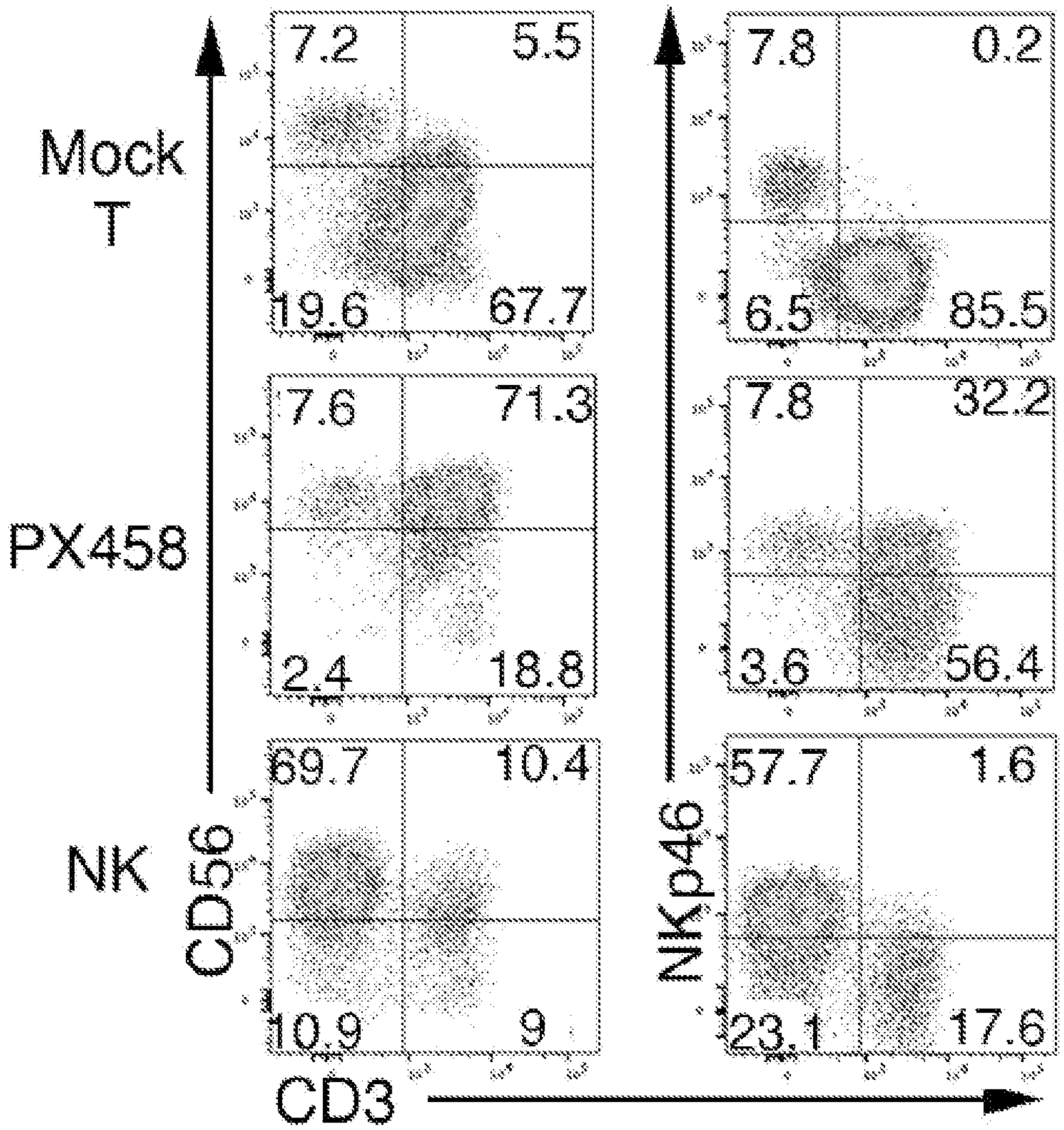

Mock T
PX458
NK
CD56
CD3
7.2
5.5
19.6
67.7
7.6
71.3
2.4
18.8
69.7
10.4
10.9
9
7.8
0.2
6.5
85.5
7.8
32.2
3.6
56.4
57.7
1.6
23.1
17.6
NKp46

图 4

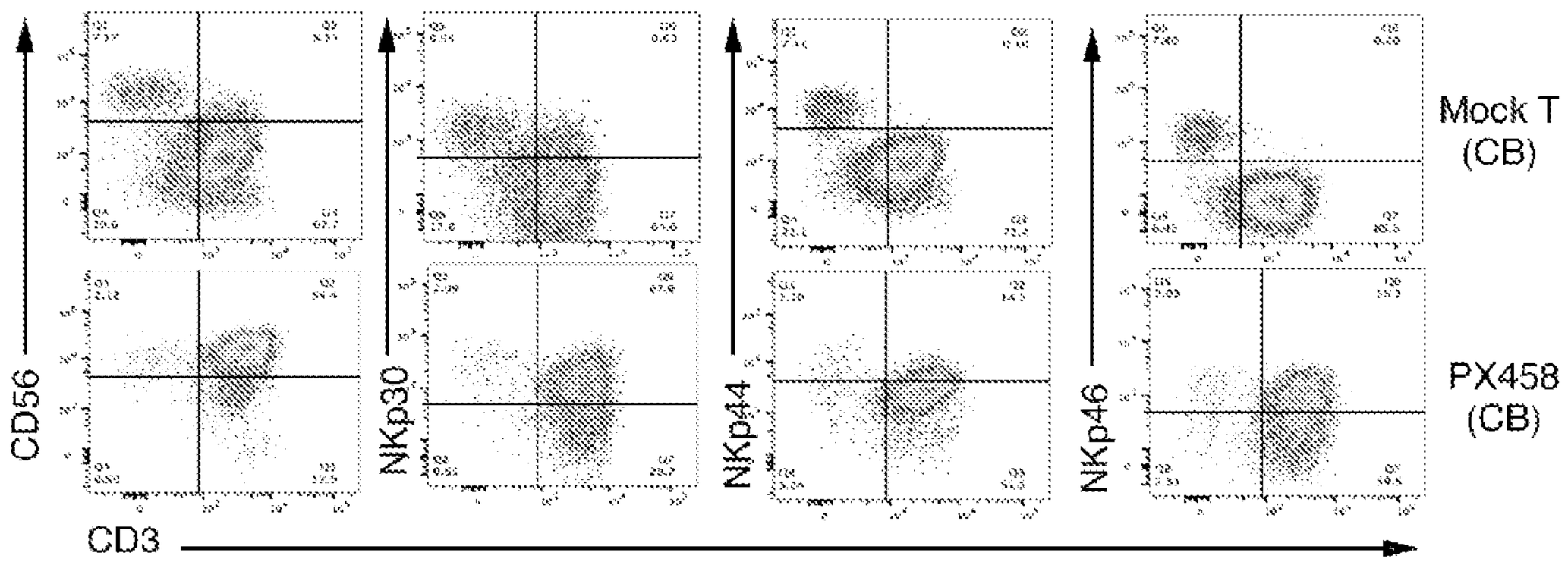

CD56
NKp30
NKp44
NKp46
Mock T (CB)
PX458 (CB)
CD3

图 5（A）

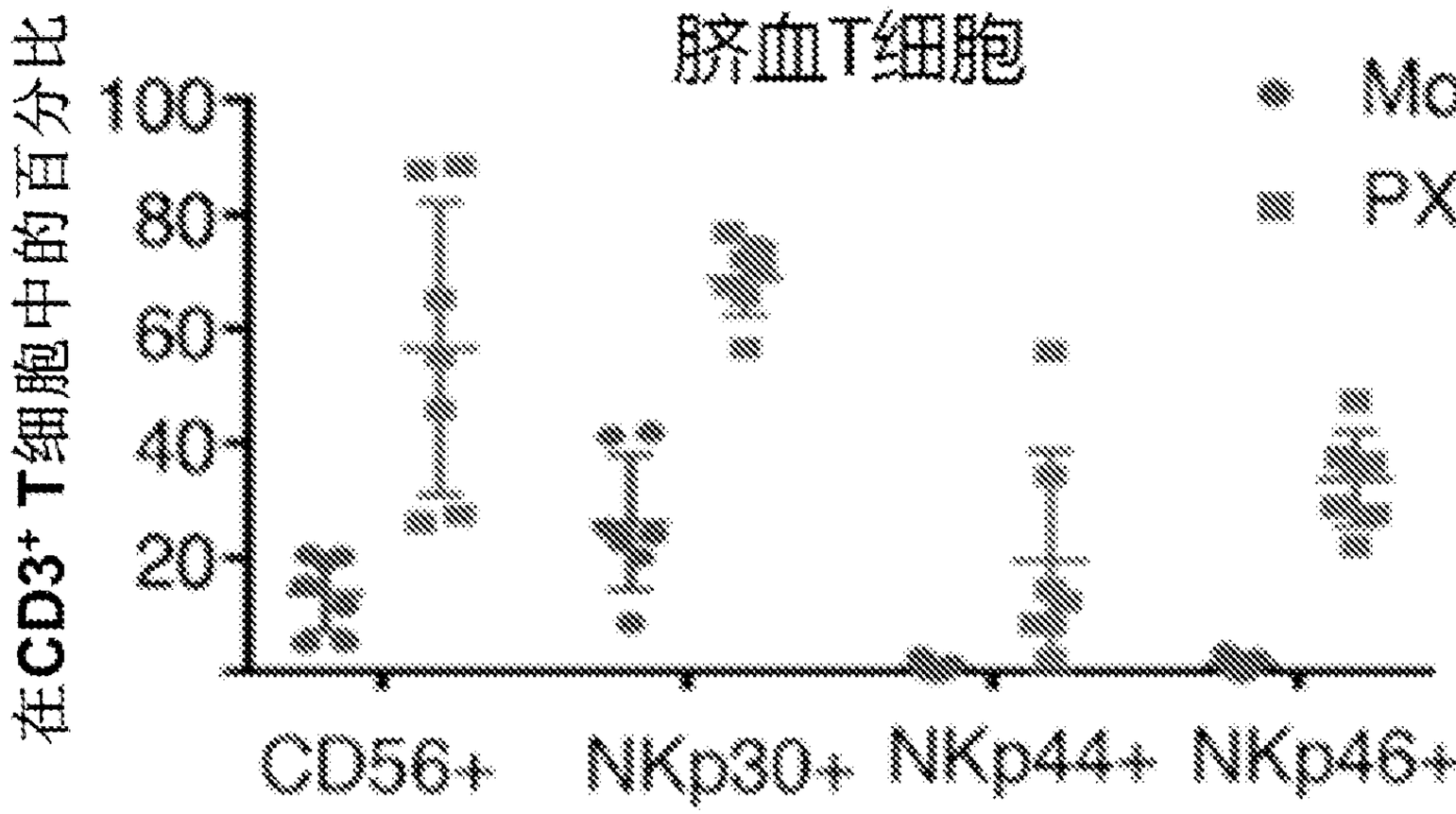

脐血T细胞
Mock
PX458
在CD3+ T细胞中的百分比
100
80
60
40
20
CD56+
NKp30+
NKp44+
NKp46+

图 5（B）

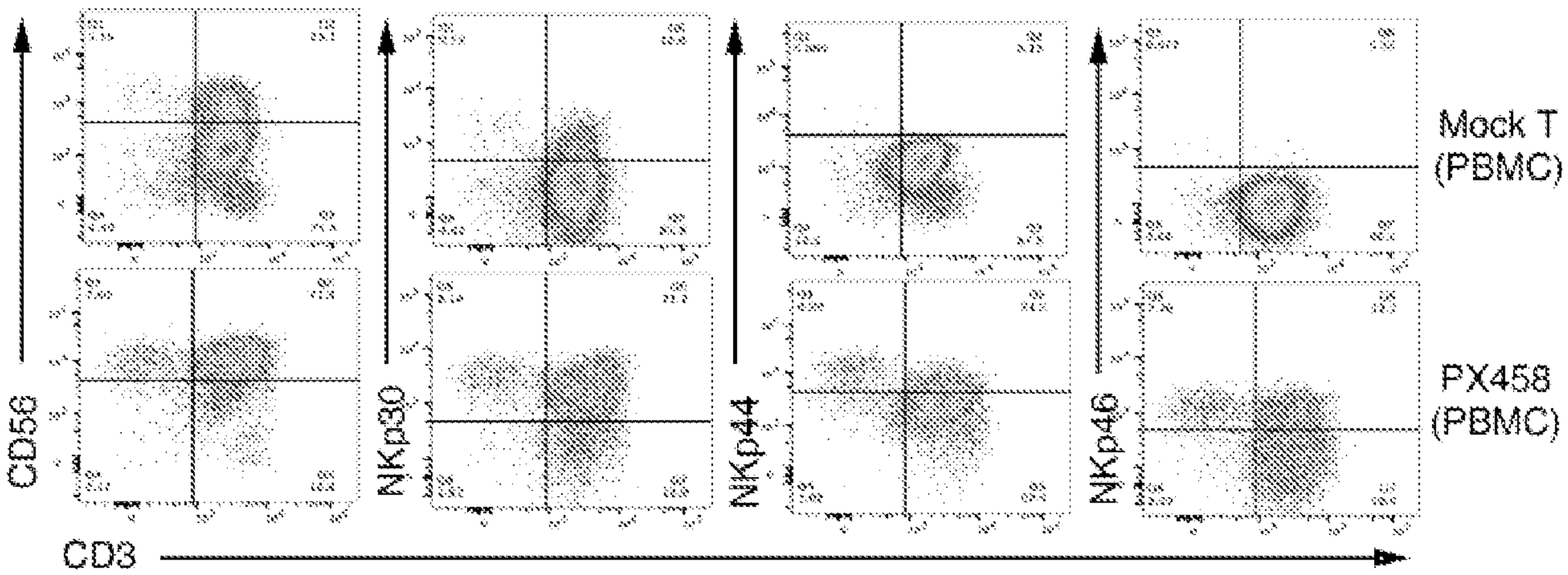

CD56
NKp30
NKp44
NKp46
Mock T (PBMC)
PX458 (PBMC)
CD3

图 6（A）

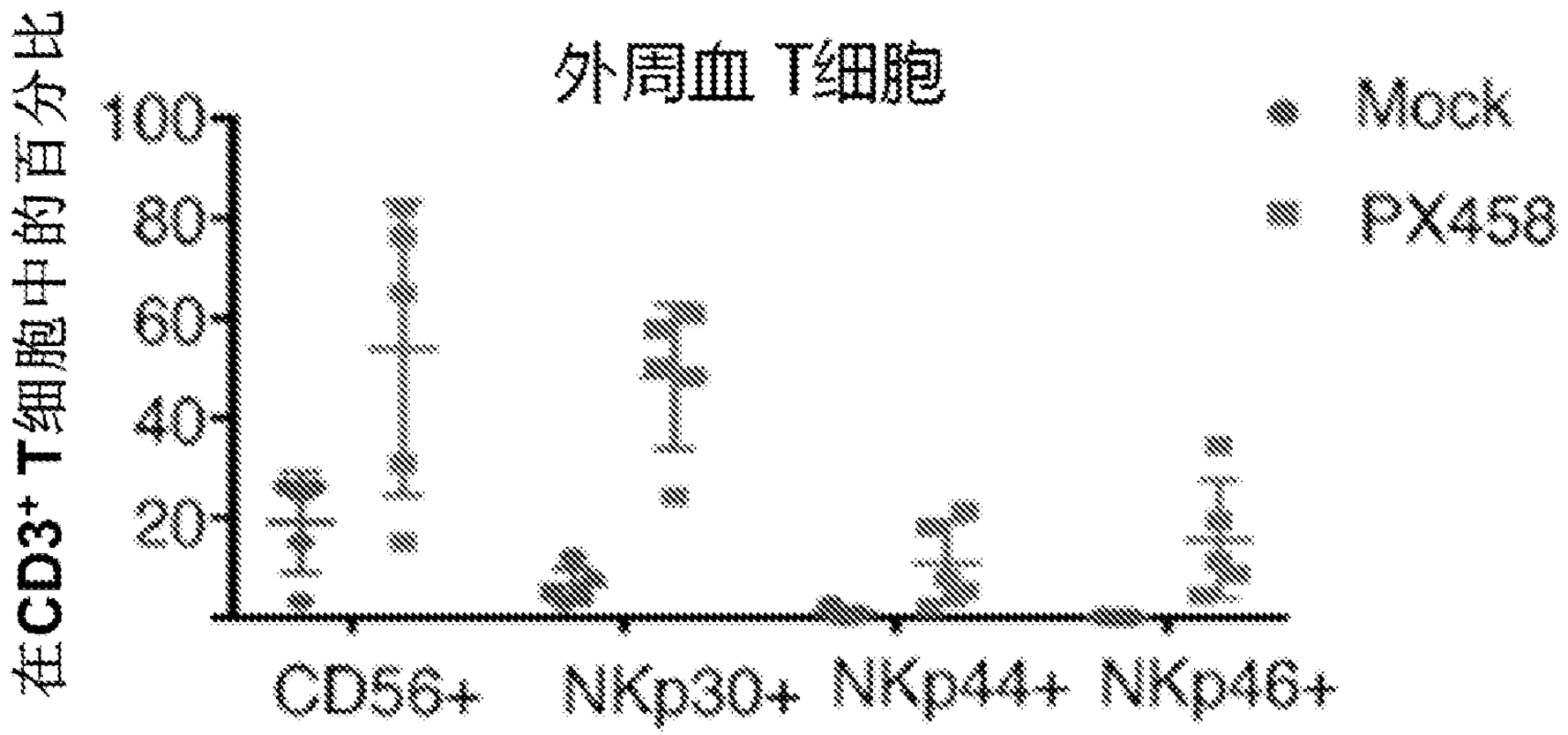

外周血 T细胞
Mock
PX458
在CD3+ T细胞中的百分比
100
80
60
40
20
CD56+
NKp30+
NKp44+
NKp46+

图 6（B）

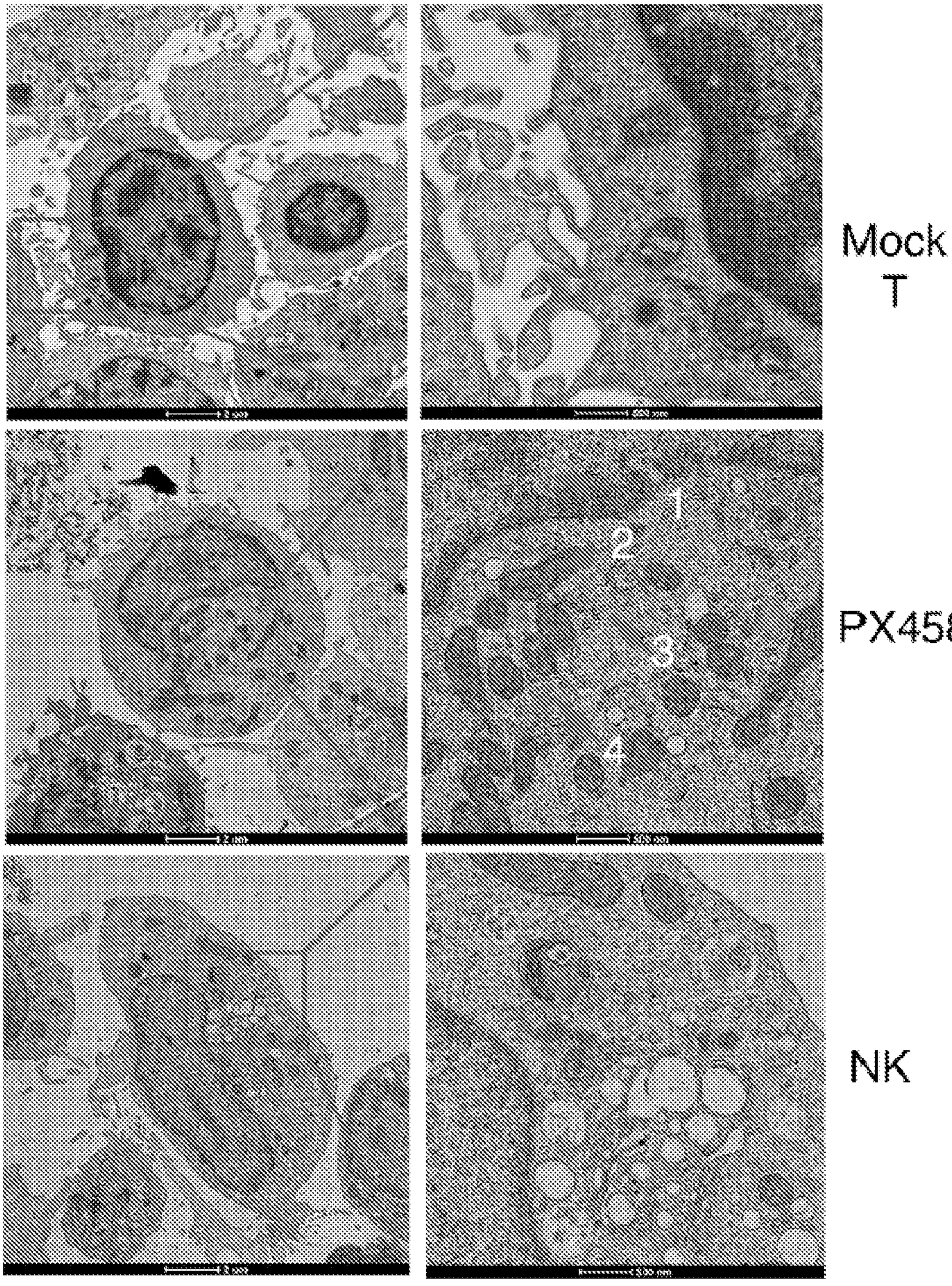



图 7

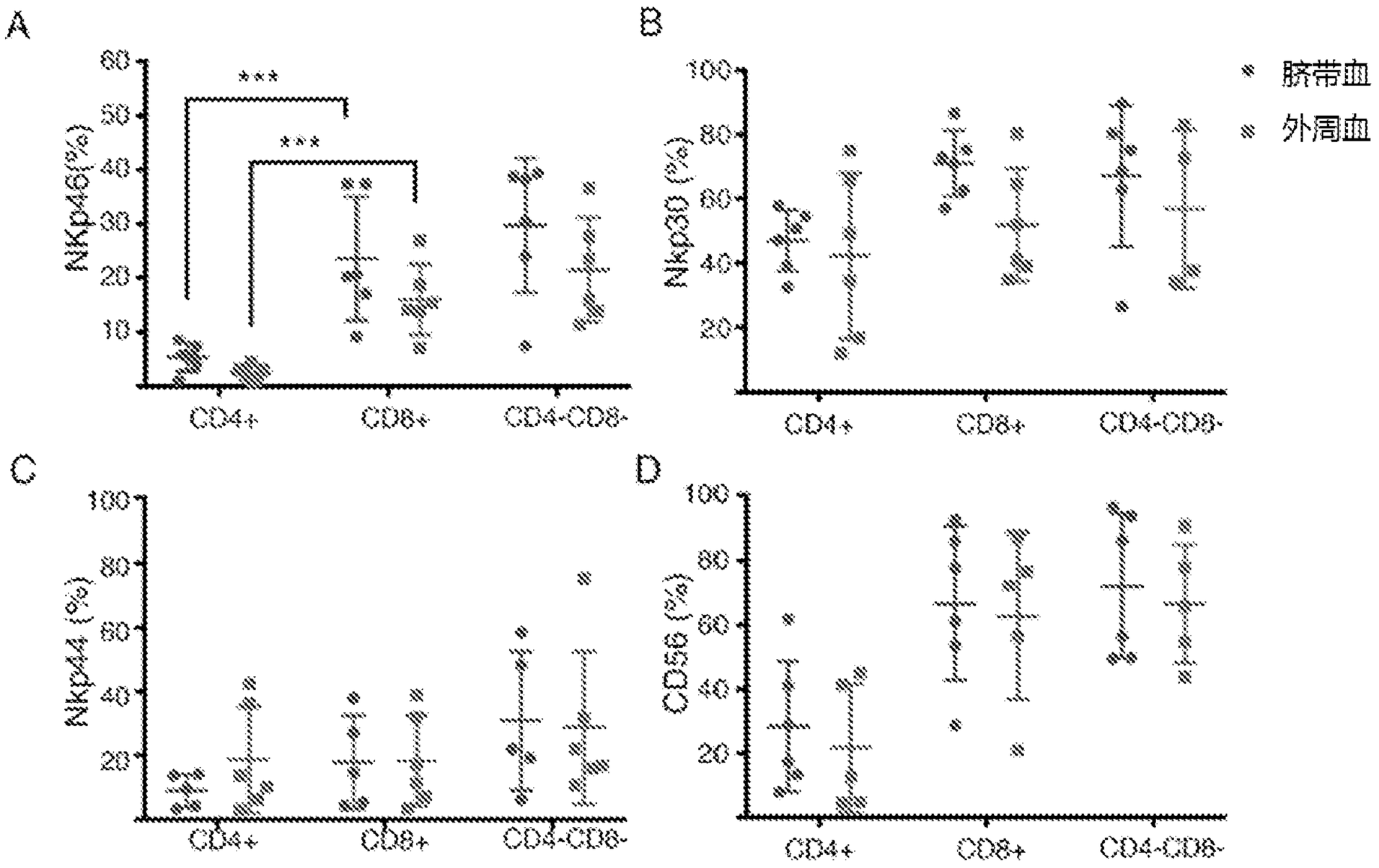

A
NKp46(%)
60
50
40
30
20
10
***
***
CD4+
CD8+
CD4-CD8-
B
NKp30 (%)
100
80
60
40
20
脐带血
外周血
C
NKp44 (%)
D
CD56 (%)

图 8

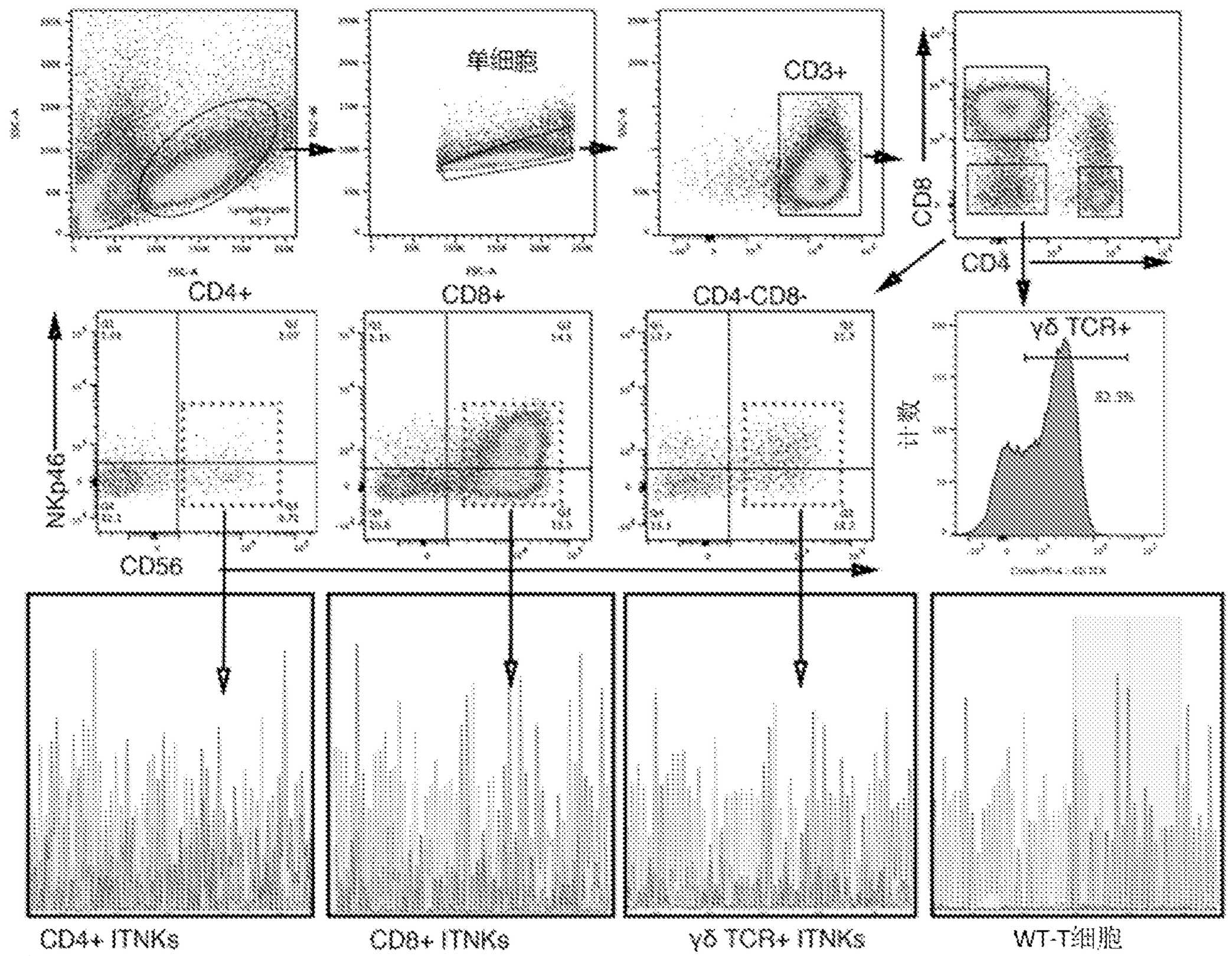

单细胞
CD3+
CD8
CD4
CD4+
CD8+
CD4-CD8-
γδ TCR+
数目
NKp46
CD56
CD4+ ITNKs
CD8+ ITNKs
γδ TCR+ ITNKs
WT-T细胞

图 9

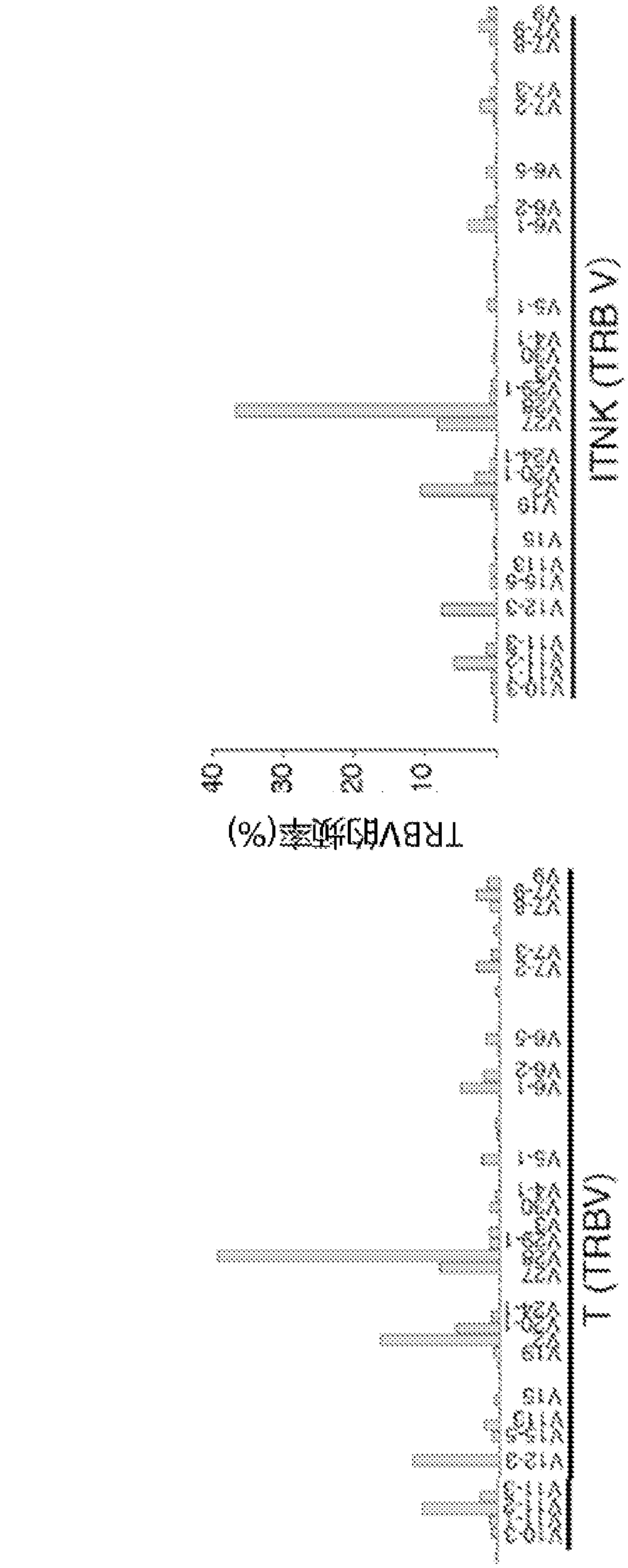



图 10

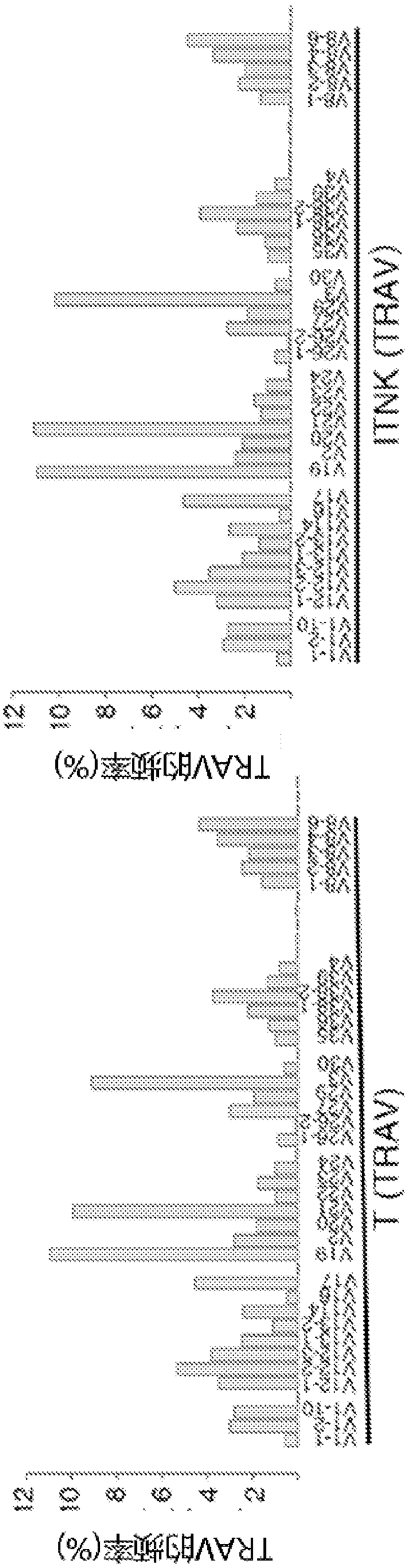



图 11

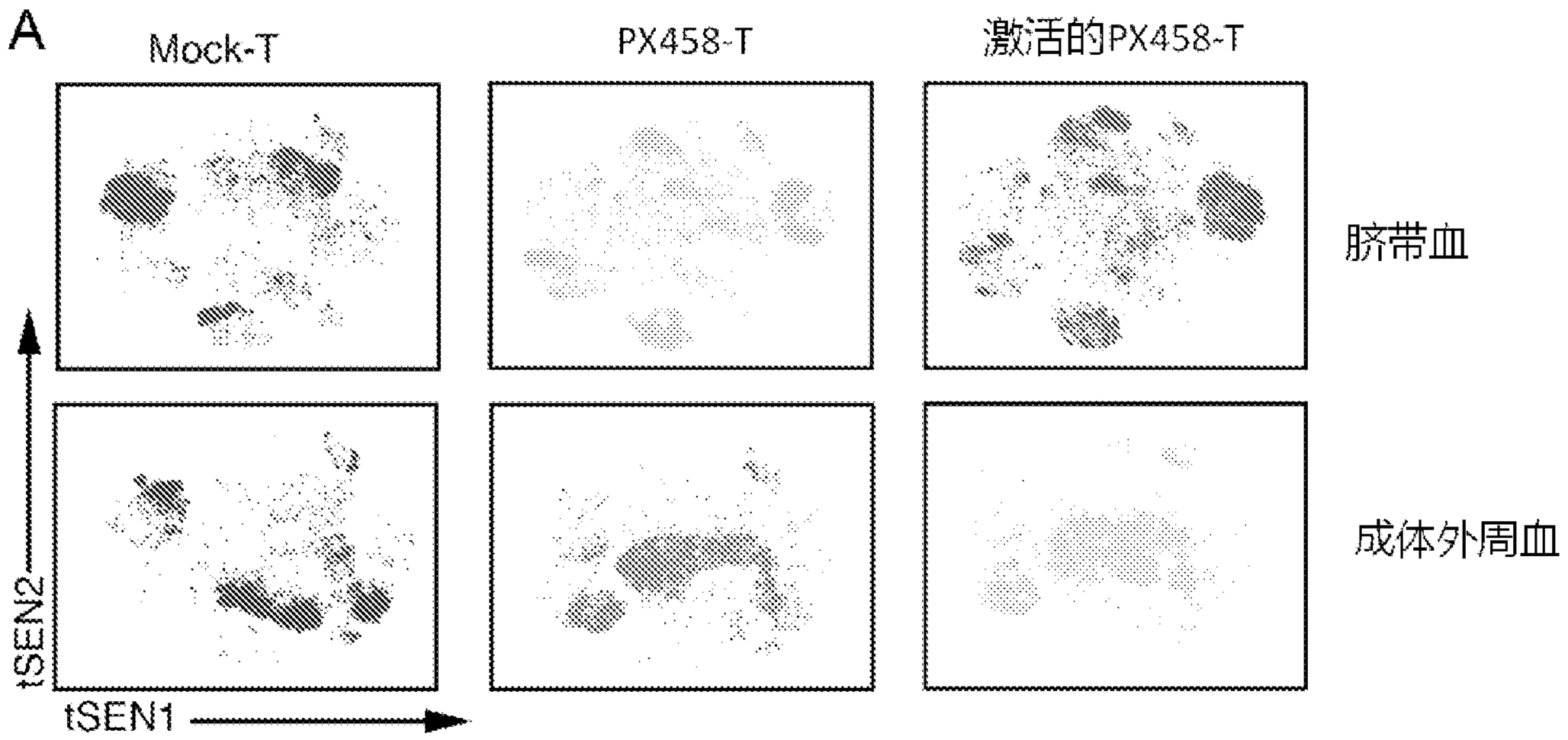

A
Mock-T
PX458-T
激活的PX458-T
脐带血
成体外周血
tSEN2
tSEN1
B
Mock-T
BCL11B-KO T
CD8+ ITNK
CD4+ ITNK
tSEN2
tSEN1
BCL11B-KO T
激活 BCL11B-KO T
CB
激活的ITNK
tSEN2
tSEN1
C
Mock-T
BCL11B-KO T
CD8+ ITNK
CD4+ ITNK
tSEN2
tSEN1
BCL11B-KO T
激活 BCL11B-KO T
PBMC
激活的ITNK
tSEN2
tSEN1

图 12

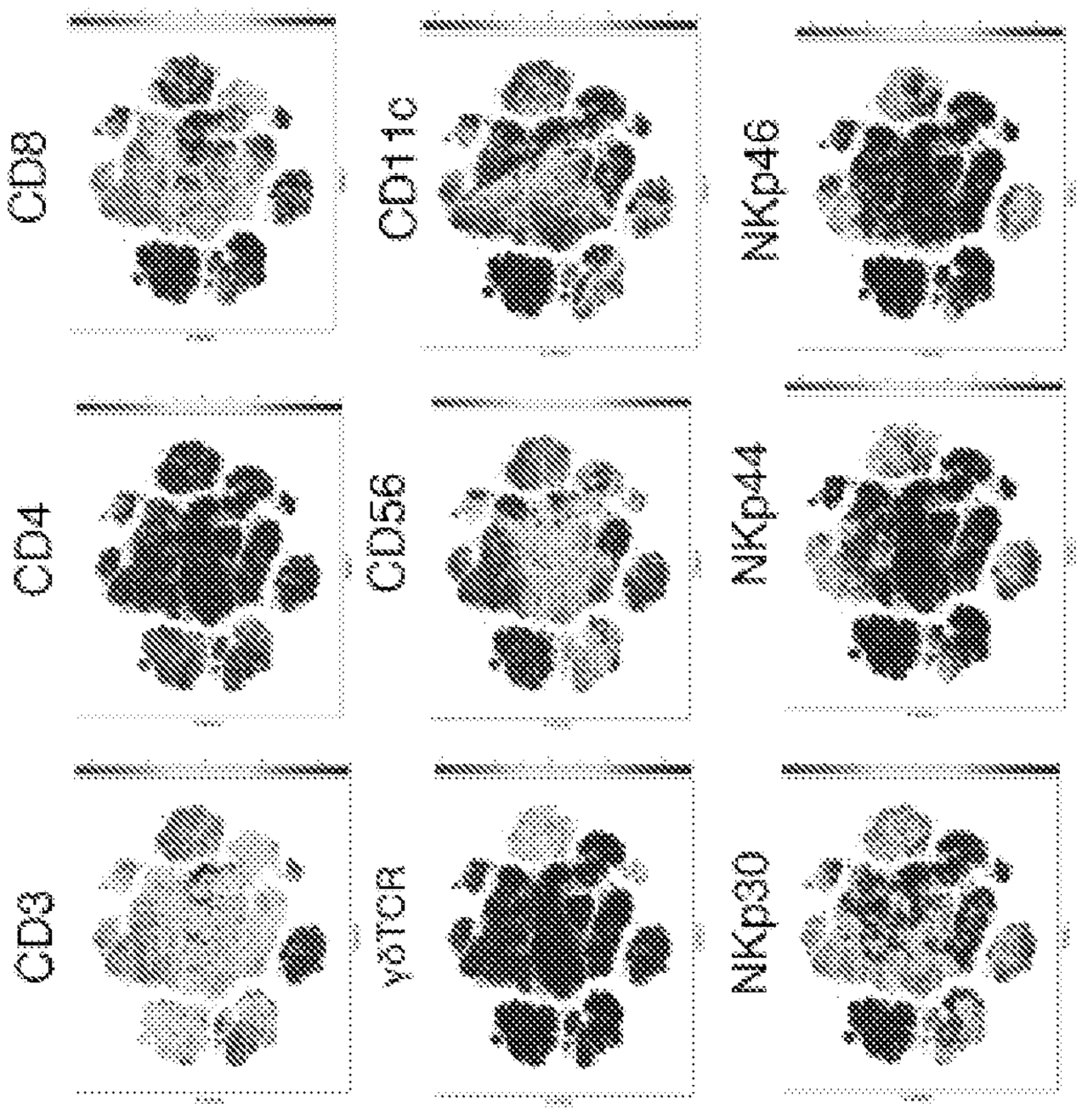

CD8
CD11c
NKp46
CD4
CD56
NKp44
CD3
γδTCR
NKp30
CD3+ γδTCR+ ITNK
CD3+ γδTCR- ITNK
CD3- ITNK
CD8+ ITNK
CD4+ ITNK
tSEN2
tSEN1

图 13

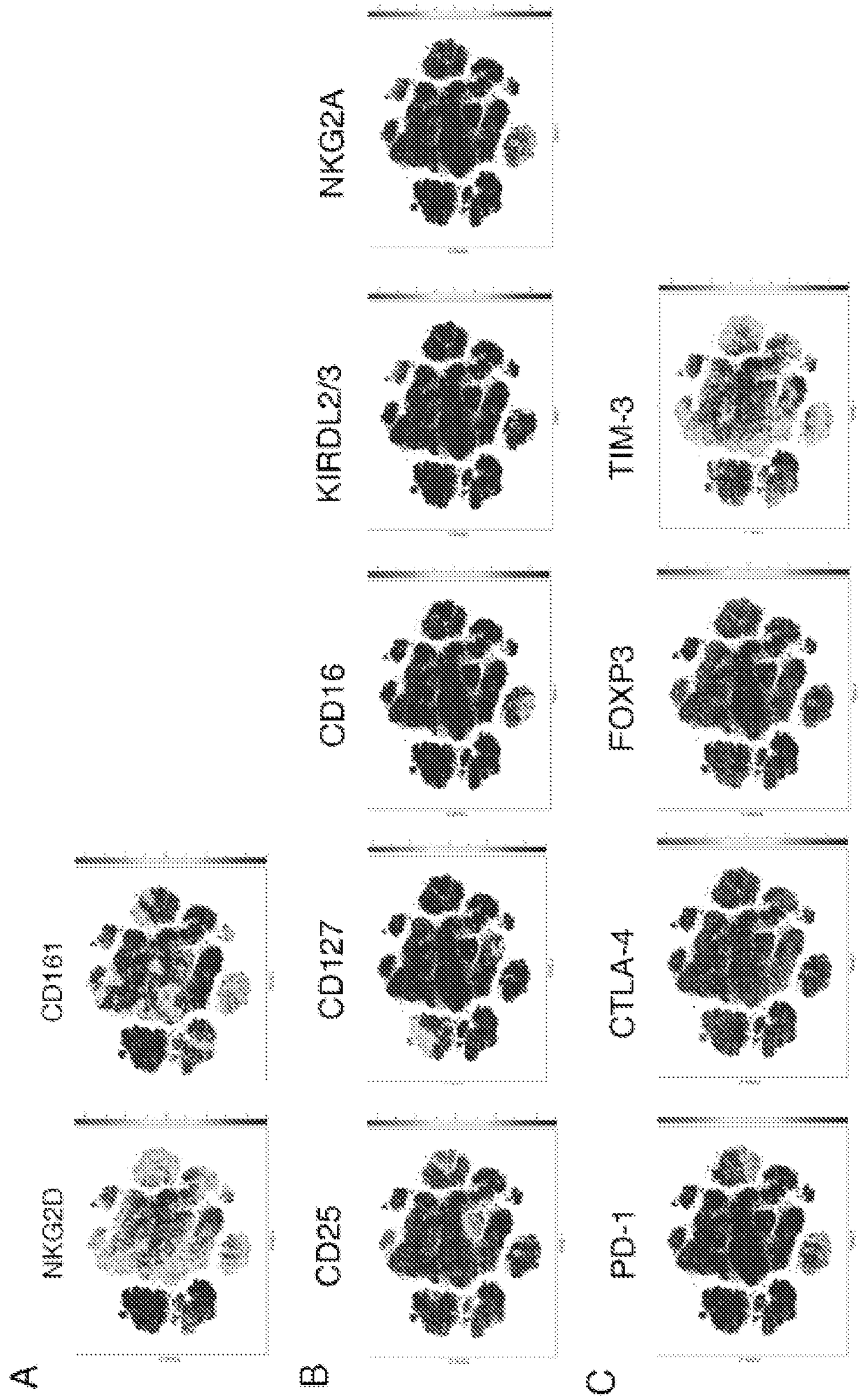

NKG2A
KIRDL2/3
TIM-3
CD16
FOXP3
CD161
CD127
CTLA-4
NKG2D
CD25
PD-1
A
B
C

图 14

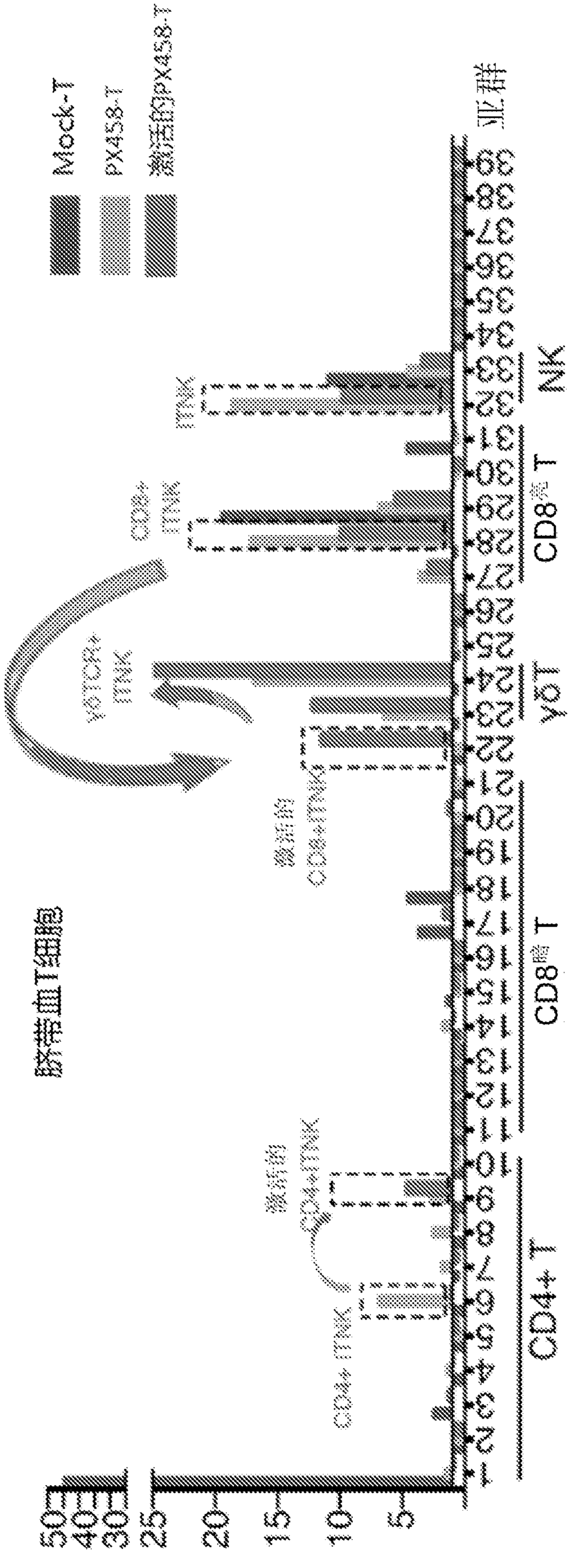

Mock-T
PX458-T
激活的pX458-T
亚群
CD8+ T
γδT
NK
γδTCR+
iNKT
CD8+
MAIT
CD4+ T
CD8- T
CD4+CD8+
CD4+iNKT
激活的
CD45+细胞比例
50
45
40
35
25
20
15
10
5

图 15

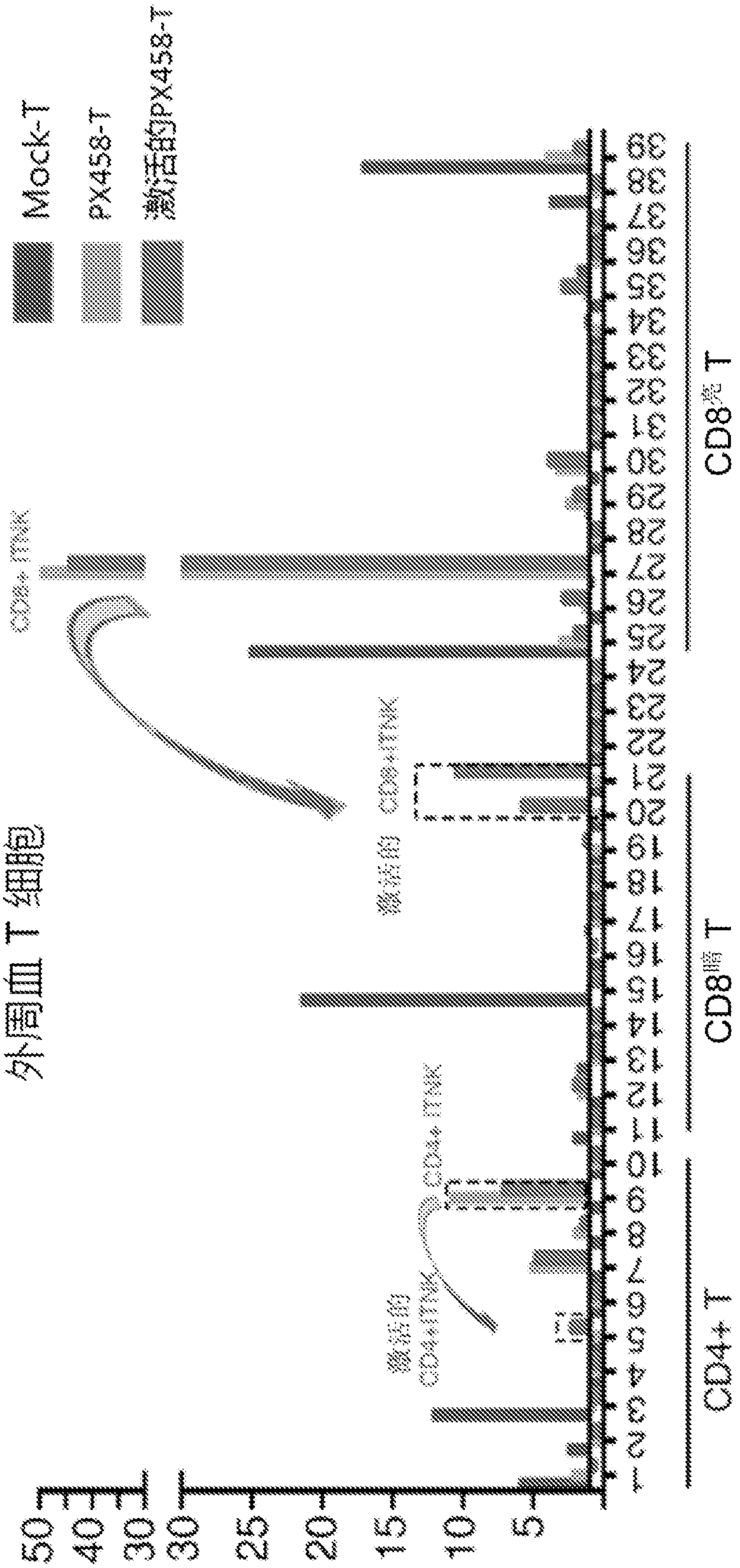

Mock-T
PX458-T
激活的PX458-T
CD8+ TMK
激活的 CD8+TMK
CD4+TMK
激活的 CD4+ TMK
CD8脾 T
CD4+ T
外周血 T 细胞
CD45+细胞比例（%）
50
40
30
25
20
15
10
5

图 16

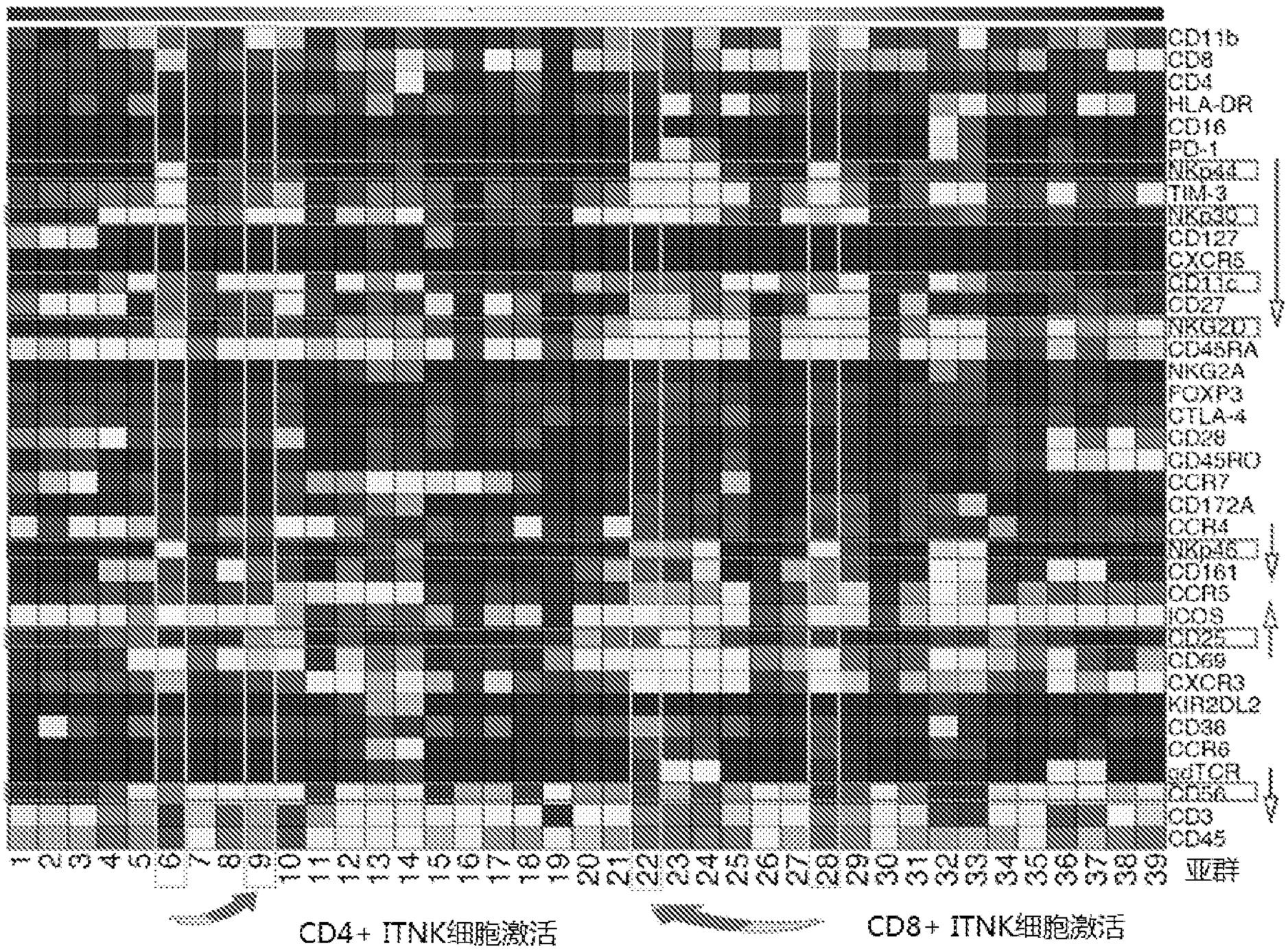

1 表达标准化 0
CD11b
CD8
CD4
HLA-DR
CD16
PD-1
NKp44
TIM-3
NKG30
CD127
CXCR5
CD11c
CD27
NKG2D
CD45RA
NKG2A
FOXP3
CTLA-4
CD28
CD45RO
CCR7
CD172A
CCR4
NKp46
CD161
CCR5
ICOS
CD25
CD69
CXCR3
KIR2DL2
CD38
CCR6
gdTCR
CD56
CD3
CD45
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 亚群
CD4+ ITNK细胞激活
CD8+ ITNK细胞激活

图 17

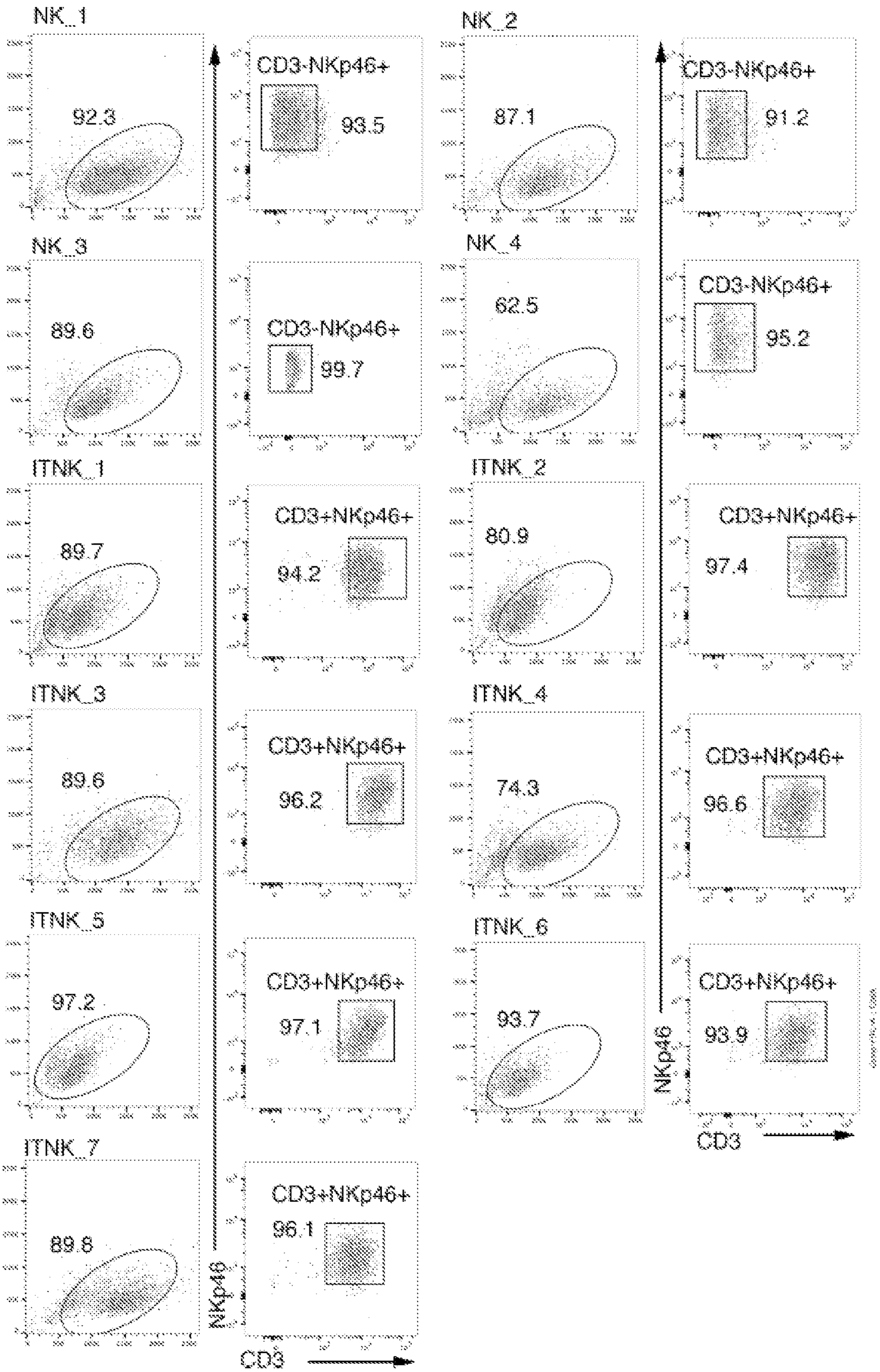

NK_1
92.3
CD3-NKp46+
93.5
NK_2
87.1
CD3-NKp46+
91.2
NK_3
89.6
CD3-NKp46+
99.7
NK_4
62.5
CD3-NKp46+
95.2
ITNK_1
89.7
CD3+NKp46+
94.2
ITNK_2
80.9
CD3+NKp46+
97.4
ITNK_3
89.6
CD3+NKp46+
96.2
ITNK_4
74.3
CD3+NKp46+
96.6
ITNK_5
97.2
CD3+NKp46+
97.1
ITNK_6
93.7
CD3+NKp46+
93.9
ITNK_7
89.8
CD3+NKp46+
96.1
NKp46
CD3

图 18

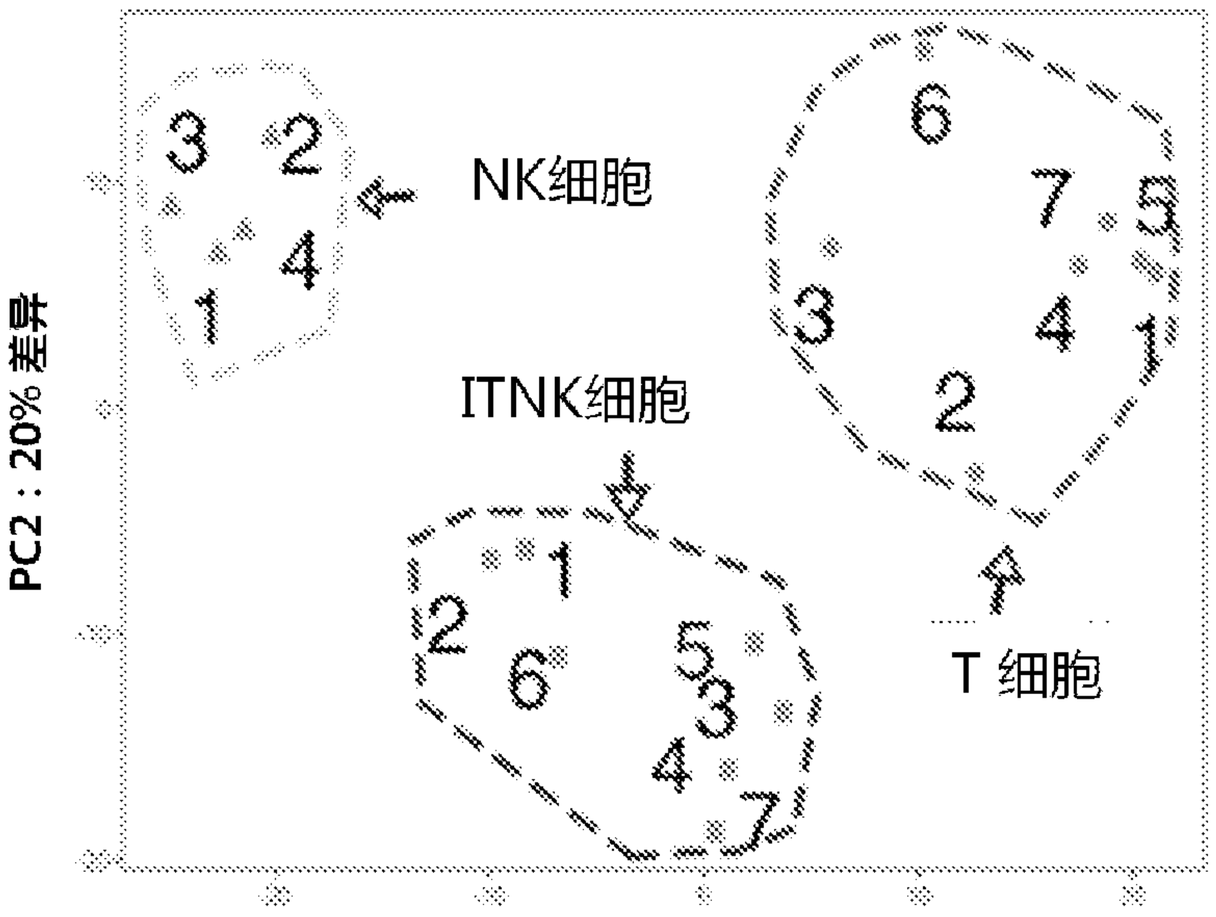
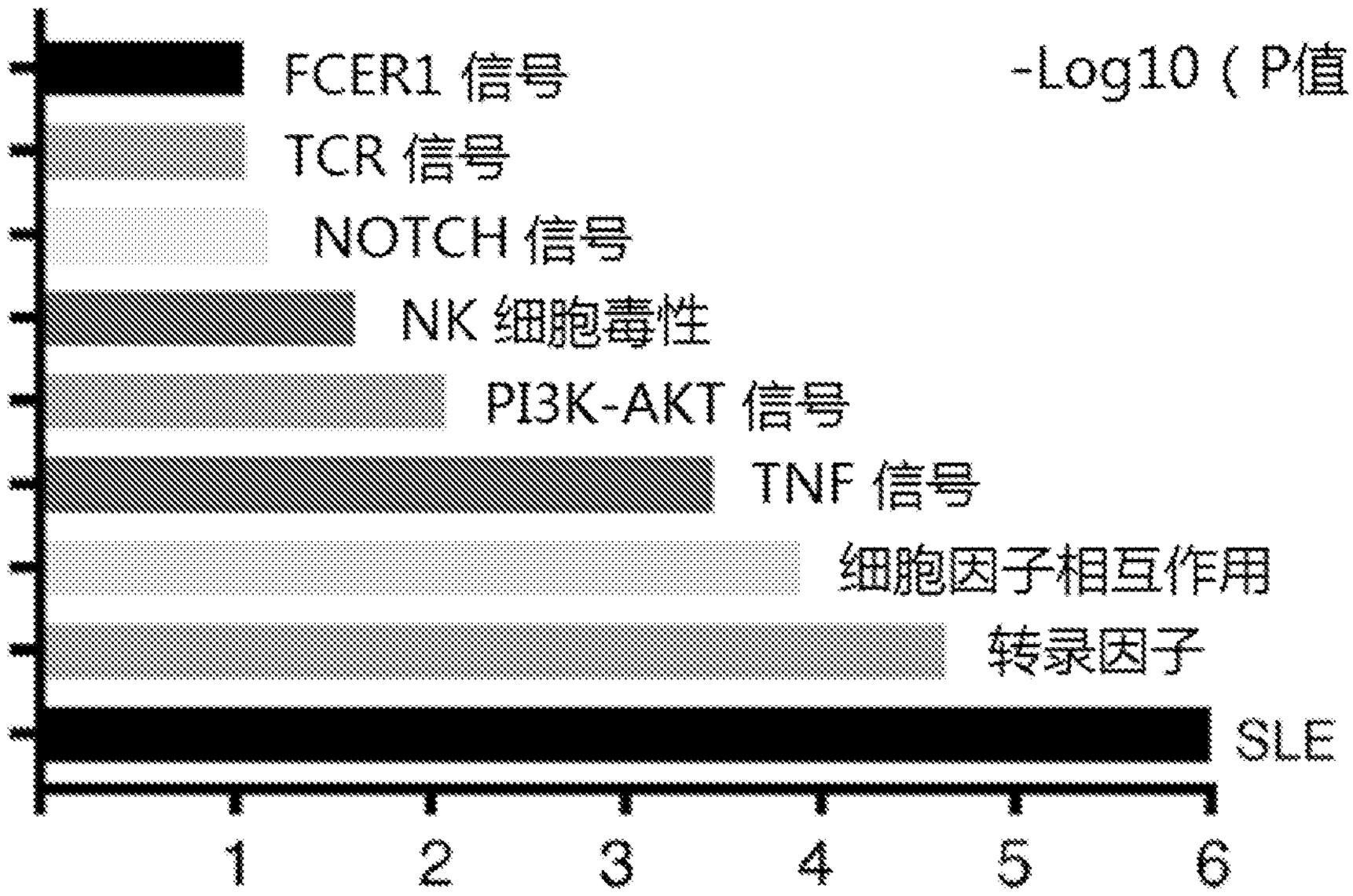
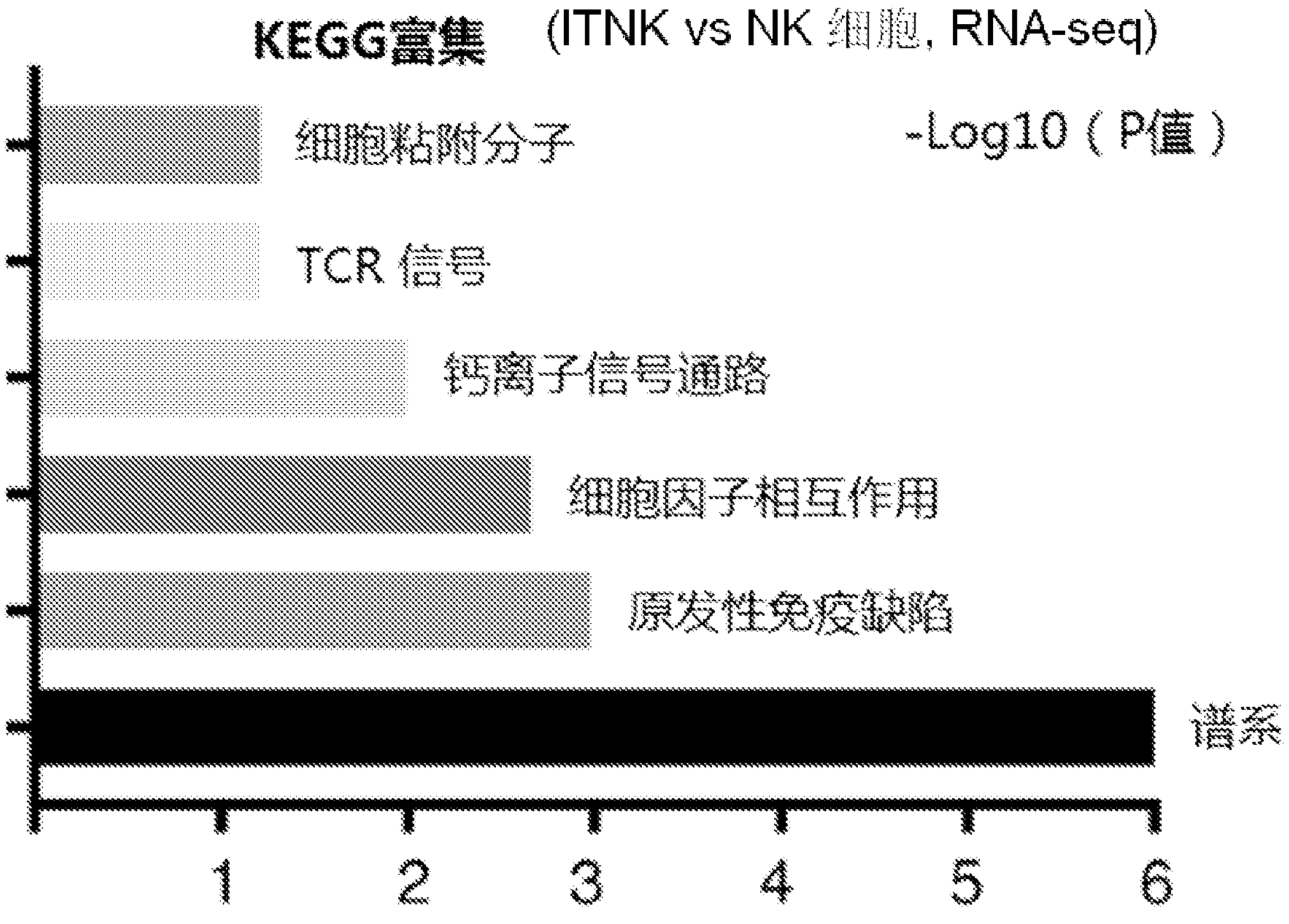



图 19




| 信号通路 | 基因 | P值 |
|---|---|---|
| 细胞因子和细胞因子受体相互作用 | CCL1, IL18R1, CSF2, CCL3, IL2RB, TNFSF4, IL18RAP, TNFRSF12A, CCR1, CCL4L1, TNFRSF8, CCL4L2, CCL4, TNFRSF4, IL10, LIF, OSM, INHBA, CCL23, CCR6, CCL3L1, IFNG, TNFRSF18, CSF2RB, XCL1, XCL2 | 1.18E-04 |
| TNF信号通路 | ICAM1, IL18R1, CSF2, CEBPB, PTGS2, SOCS3, MMP9, NFKBIA, MAPK11, JAG1, JUNB, LIF, FOS, MAPK12, MAP3K8 | 3.53E-04 |
| PI3K-AKT信号通路 | PDGFA, FGF17, ITGA11, GNG11, LPAR1, KIT, LAMB3, PIK3AP1, THBS1, PPP2R2C, SYK, FN1, COL4A4, COL4A3, SGK1, IL2RB, RXRA, ITGA1, NR4A1, ITGA2, BCL2L11, DDIT4, OSM, LAMA2, VWF, CDKN1A, LAMA5 | 0.006399746 |
| NK细胞介导的细胞毒性 | PRF1, CSF2, ICAM1, CD244, PLCG2, IFNG, FCER1G, GZMB, NCR2, NCR1, KIR2DL4, SYK | 0.024097852 |
| NOTCH信号通路 | NOTCH1, DTX1, PSEN2, JAG2, DLL1, JAG1 | 0.067748673 |
| T细胞受体信号通路 | CSF2, FOS, MAPK12, MAP3K8, IFNG, NFKBIA, MAPK11, IL10, TEC | 0.088058365 |
| Fc ε RI信号通路 | CSF2, MAPK12, LYN, PLCG2, FCER1G, MAPK11, SYK | 0.091032458 |

图 20




| 信号通路 | 基因 | P值 |
|---|---|---|
| 造血细胞谱系 | CR1, IL9R, CR2, CD3G, CD8A, CD3D, CD8B, CD3E, CD1A, IL6R, FLT3LG, CD36, ITGA6, GP1BB, CD33, CD4, CD5, CD7 | 6.06E-09 |
| 原发性免疫 | CD3D, CD8A, CD3E, CD40LG, CD8B, AIRE, CD4 | 0.001046336 |
| 细胞因子和细胞因子受体相互作用 | IL9R, EDA2R, IL6R, TNFSF8, TNFRSF10A, LEP, INHBB, CCR8, IFNL1, TNFRSF10C, TNFRSF11A, TNFRSF10D, CD40LG, CLCF1, CCR4, CCR10, CSF2RB, IFNGR2, CD27 | 0.002173353 |
| 钙离子信号通路 | ADCY4, ADCY1, ERBB3, TACR2, HRH1, PLCB4, P2RX6, CHRM3, CAMK4, HRH2, GRIN2C, RYR3, RYR1, ADRA1A | 0.010226092 |
| T细胞受体信号通路 | CD3G, CD3D, MAPK12, CD8A, CD3E, CD40LG, CD8B, CD4 | 0.061814193 |
| 细胞粘附分子CAM | CLDN9, ITGA6, CD8A, NRXN3, CD40LG, CD8B, LRRC4B, NECTIN2, CD4, CD6 | 0.062300543 |

图 21

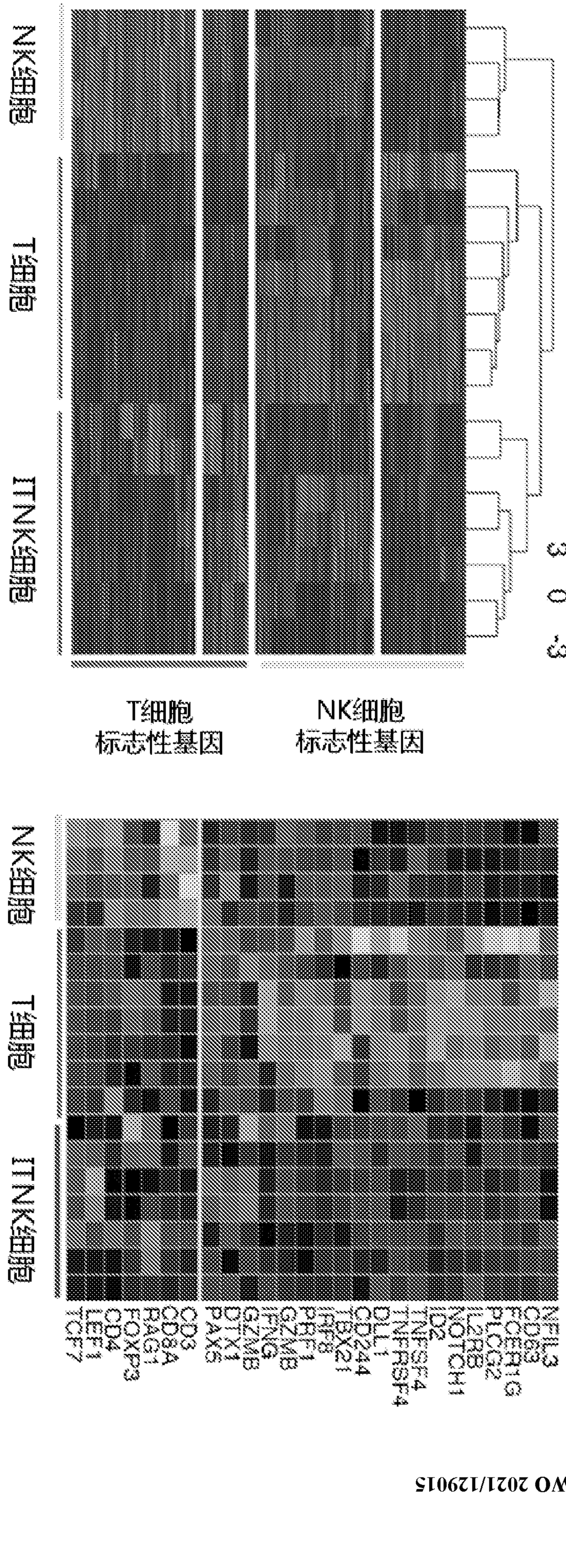

NK细胞
T细胞
ITNK细胞
3
0
-3
T细胞
标志性基因
NK细胞
标志性基因
NK细胞
T细胞
ITNK细胞
NFIL3
CD63
FCER1G
PLCG2
IL2RB
NOTCH1
ID2
TNFSF4
TNFRSF4
DUSP1
CD244
TBX21
RPS6
PRF1
GZMB
IFNG
GZMB
PTX1
PAX5
CD3
CD8A
BAG1
FOXP3
CD4
TCF7

图 22

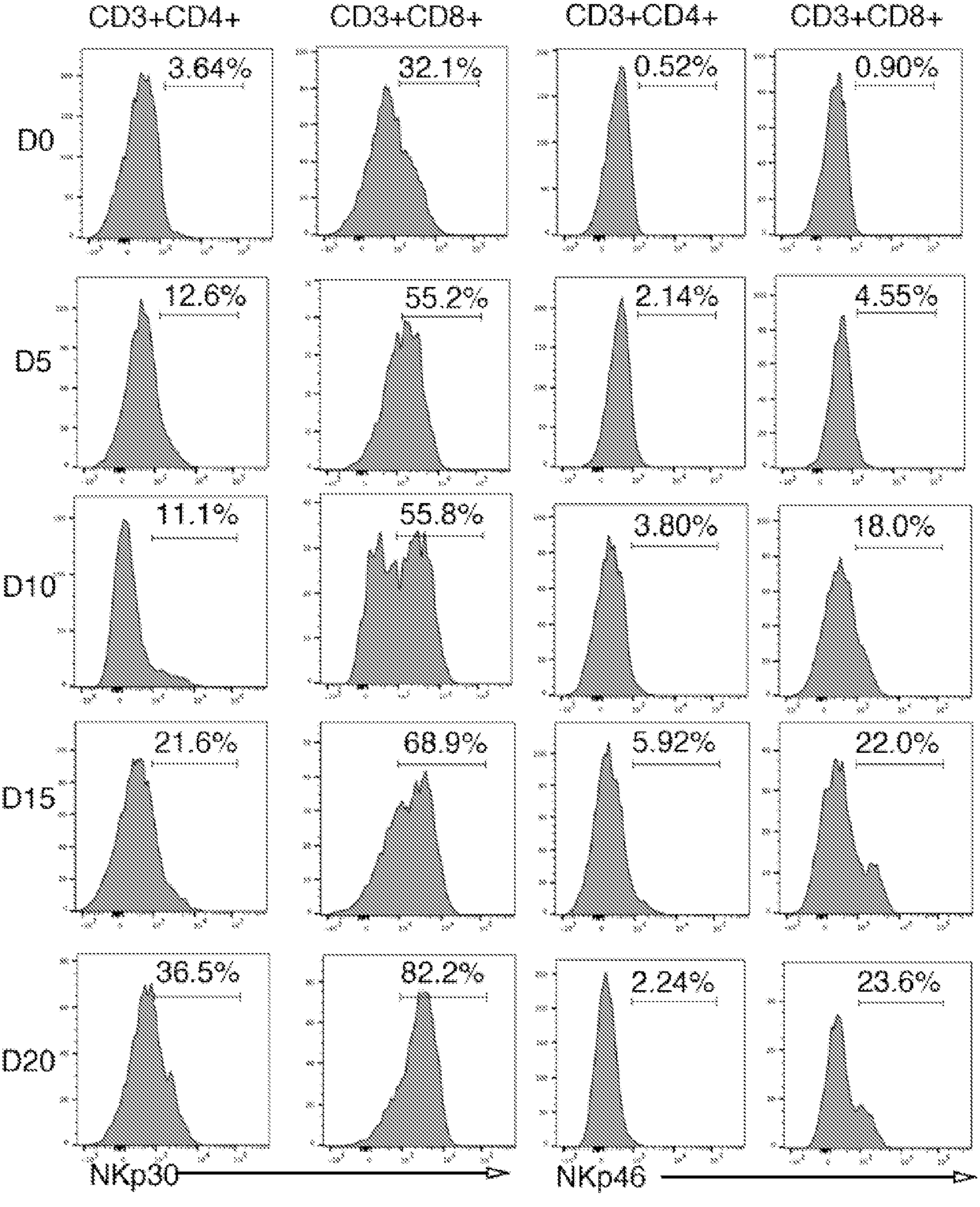

CD3+CD4+
CD3+CD8+
CD3+CD4+
CD3+CD8+
D0
3.64%
32.1%
0.52%
0.90%
D5
12.6%
55.2%
2.14%
4.55%
D10
11.1%
55.8%
3.80%
18.0%
D15
21.6%
68.9%
5.92%
22.0%
D20
36.5%
82.2%
2.24%
23.6%
NKp30
NKp46

图 23

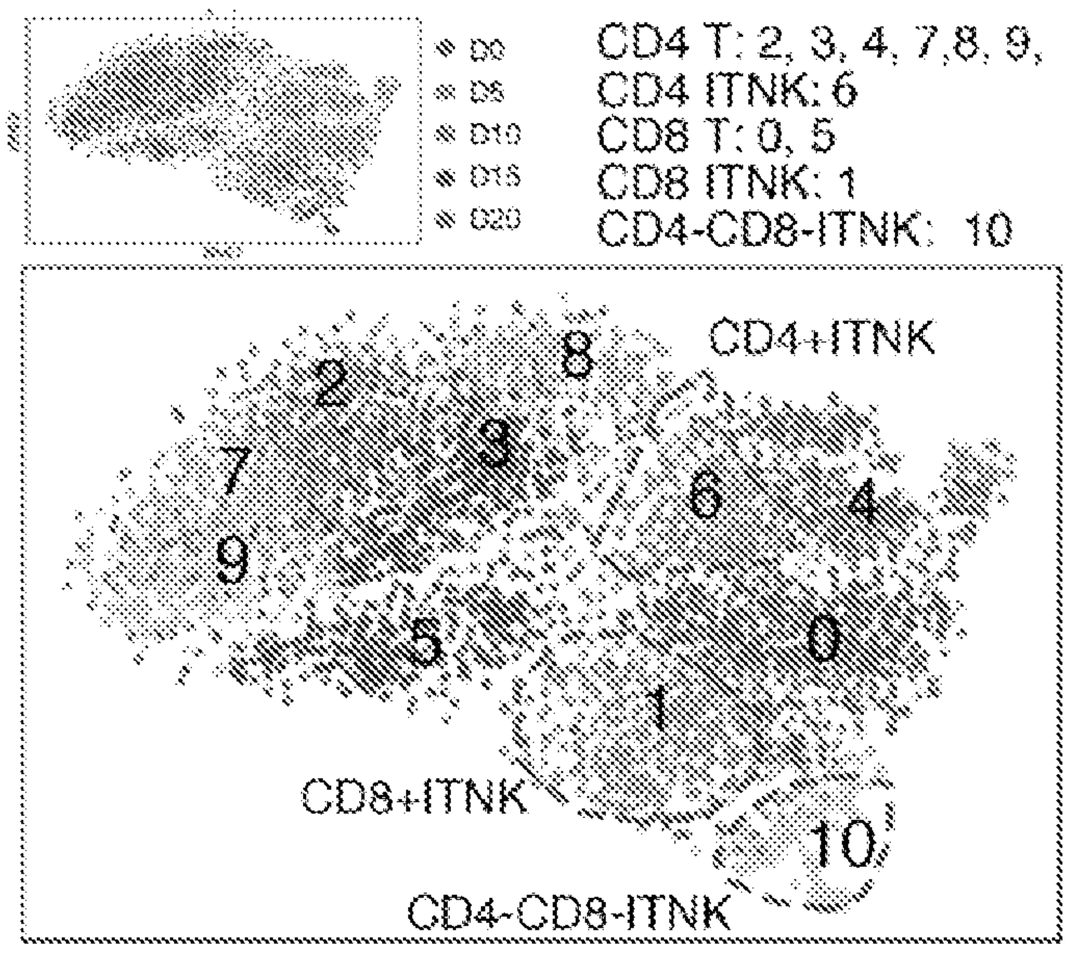

A
D0
D5
D10
D15
D20
CD4 T: 2, 3, 4, 7,8, 9,
CD4 ITNK: 6
CD8 T: 0, 5
CD8 ITNK: 1
CD4-CD8-ITNK: 10
CD4+ITNK
CD8+ITNK
CD4-CD8-ITNK
B
CD3
CD56
CD4
CD8
NKp46
NKp44
NKp30
CD11C
C
CD3
CD4
CD8
PTPRC
CD19
T细胞
标志物
NCAM1
NCR3
NCR2
NCR1
ITAGX
NK细胞
标志物
CD226
CD122
CD161
KLRC1
TNFRSF1
PDCD1
CTLA4
LAG3
FOXP3
HAVCR2
免疫检查点
BCL11B
TBX21
NFIL3
GATA3
ID2
转录因子
TCF7
LEF1
RBPJ
NOTCH1
NOTCH2
FASLG
TNFSF10
BCL2
BAX
MCL1
凋亡

图 24

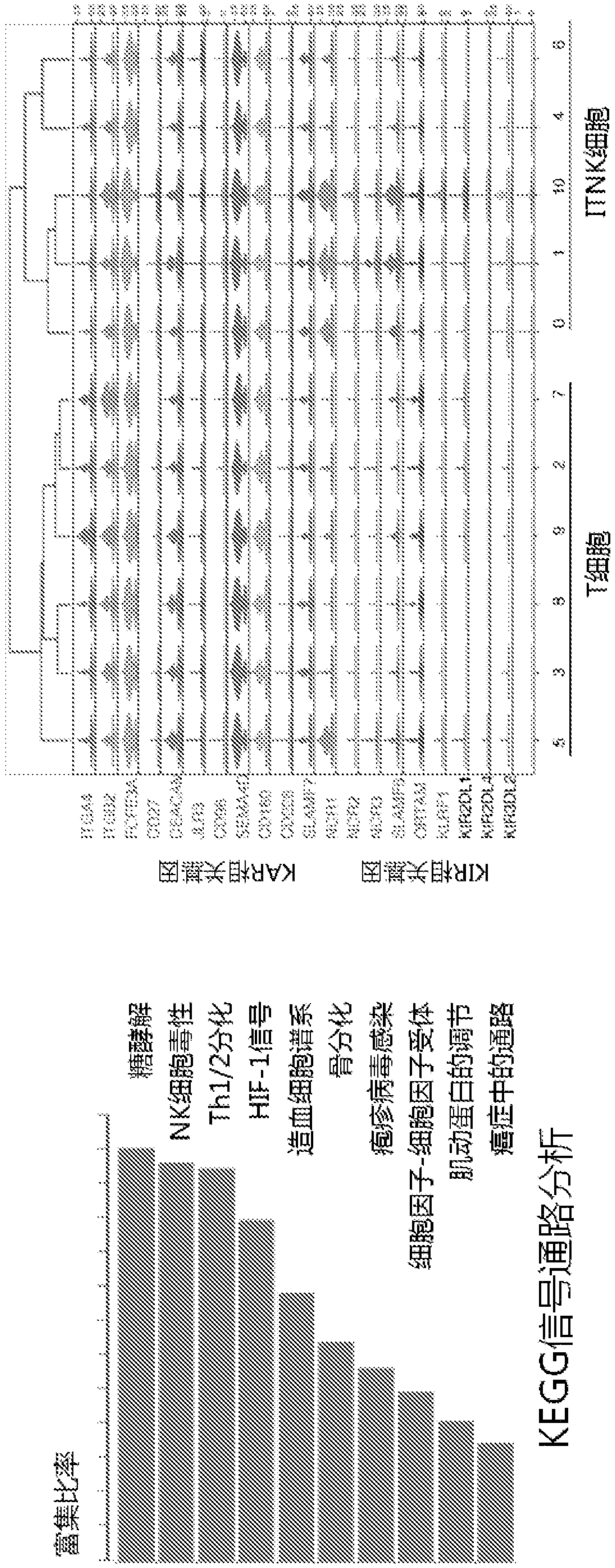

ITNK细胞
T细胞
KIR相关基因
KAR相关基因

图 25（B）


糖酵解
NK细胞毒性
Th1/2分化
HIF-1信号
造血细胞谱系
骨分化
痘疹病毒感染
细胞因子-细胞因子受体
肌动蛋白的调节
癌症中的通路
KEGG信号通路分析
富集比率

图 25（A）

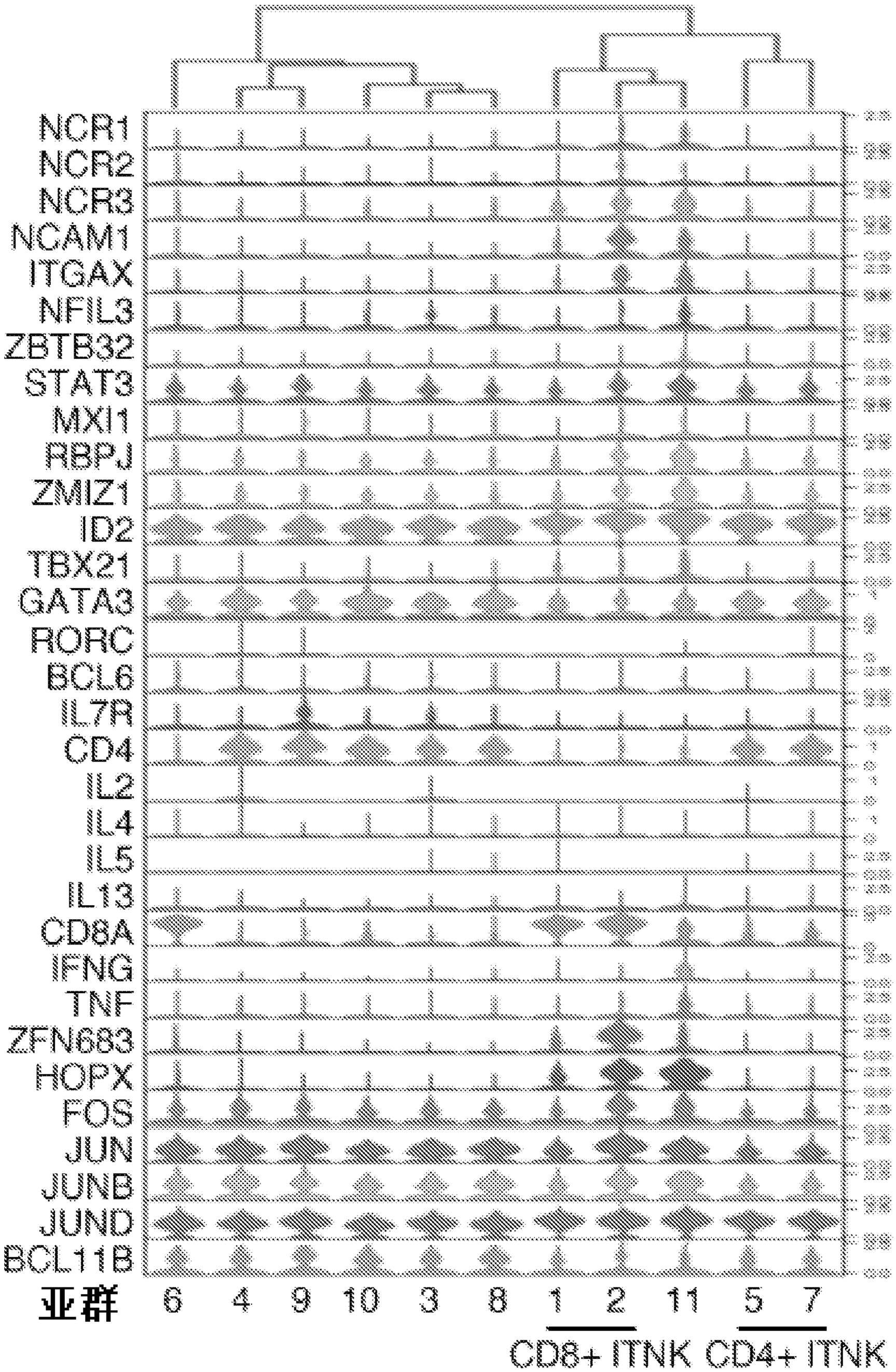
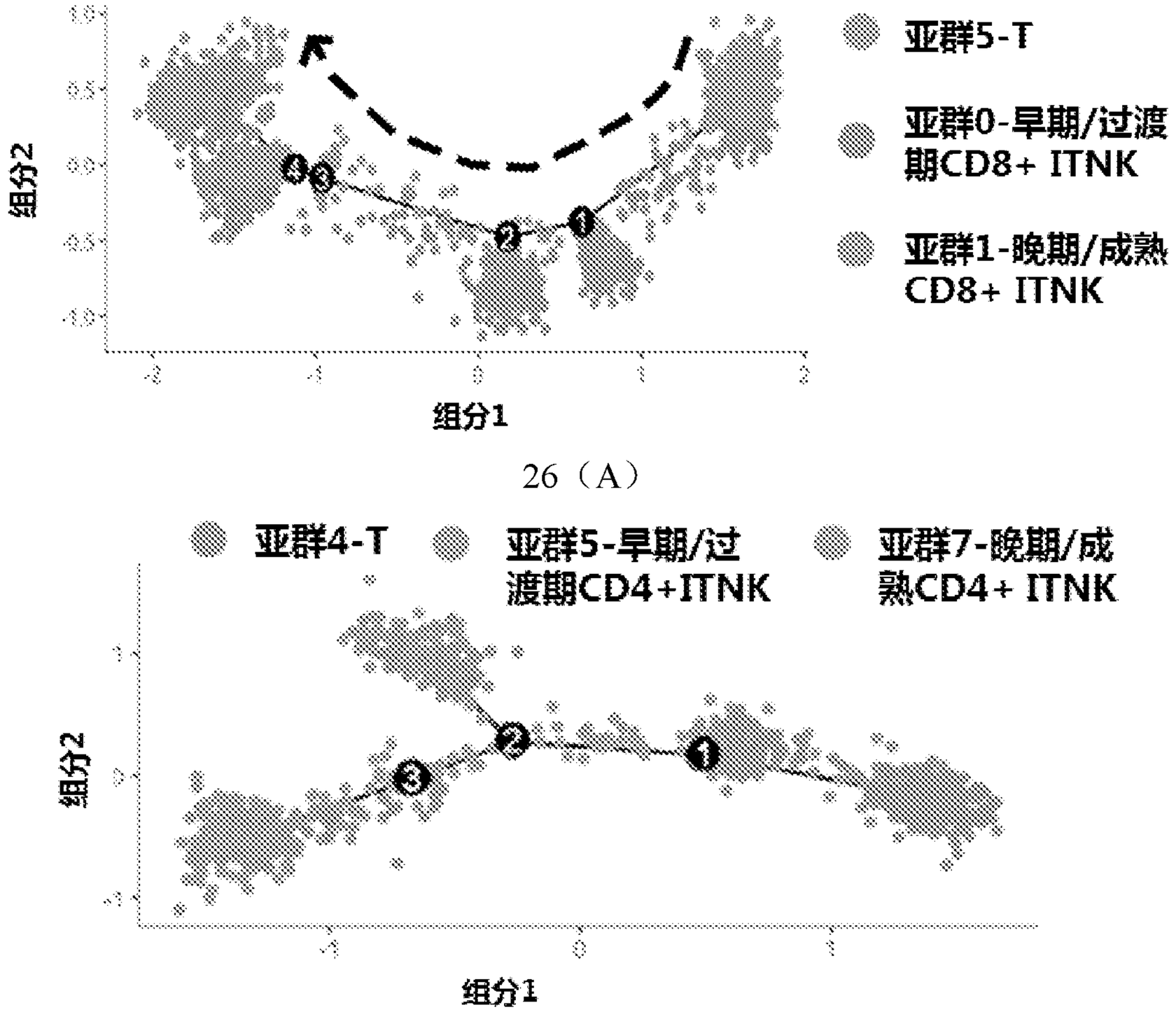

NCR1
NCR2
NCR3
NCAM1
ITGAX
NFIL3
ZBTB32
STAT3
MXI1
RBPJ
ZMIZ1
ID2
TBX21
GATA3
RORC
BCL6
IL7R
CD4
IL2
IL4
IL5
IL13
CD8A
IFNG
TNF
ZFN683
HOPX
FOS
JUN
JUNB
JUND
BCL11B
亚群 6 4 9 10 3 8 1 2 11 5 7
CD8+ ITNK
CD4+ ITNK

图 25（C）


组分2
组分1
亚群5-T
亚群0-早期/过渡期CD8+ ITNK
亚群1-晚期/成熟CD8+ ITNK

26（A）


亚群4-T
亚群5-早期/过渡期CD4+ITNK
亚群7-晚期/成熟CD4+ ITNK
组分2
组分1

图 26（B）

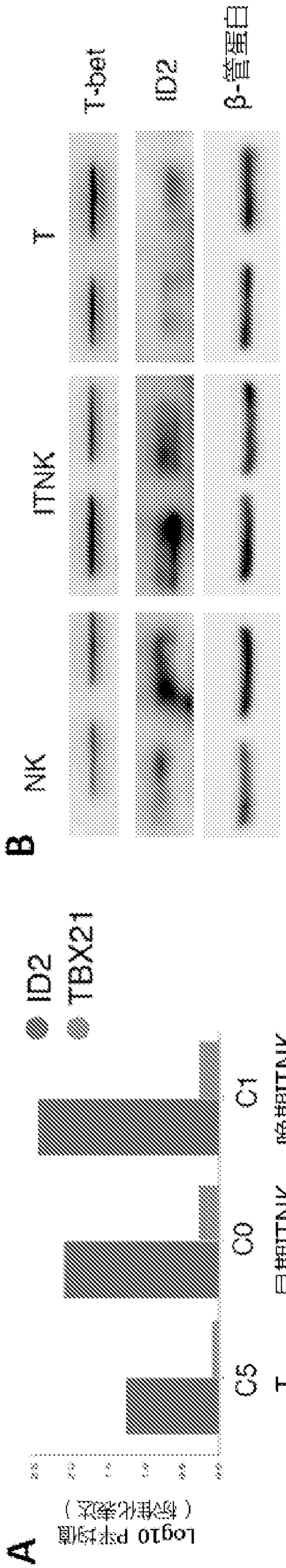

T
T-bet
ID2
β-管蛋白
B
NK
ITNK
ID2
TBX21
C0
C1
早期ITNK
晚期ITNK
A
log10 P平均值
（标准化表达）

图27

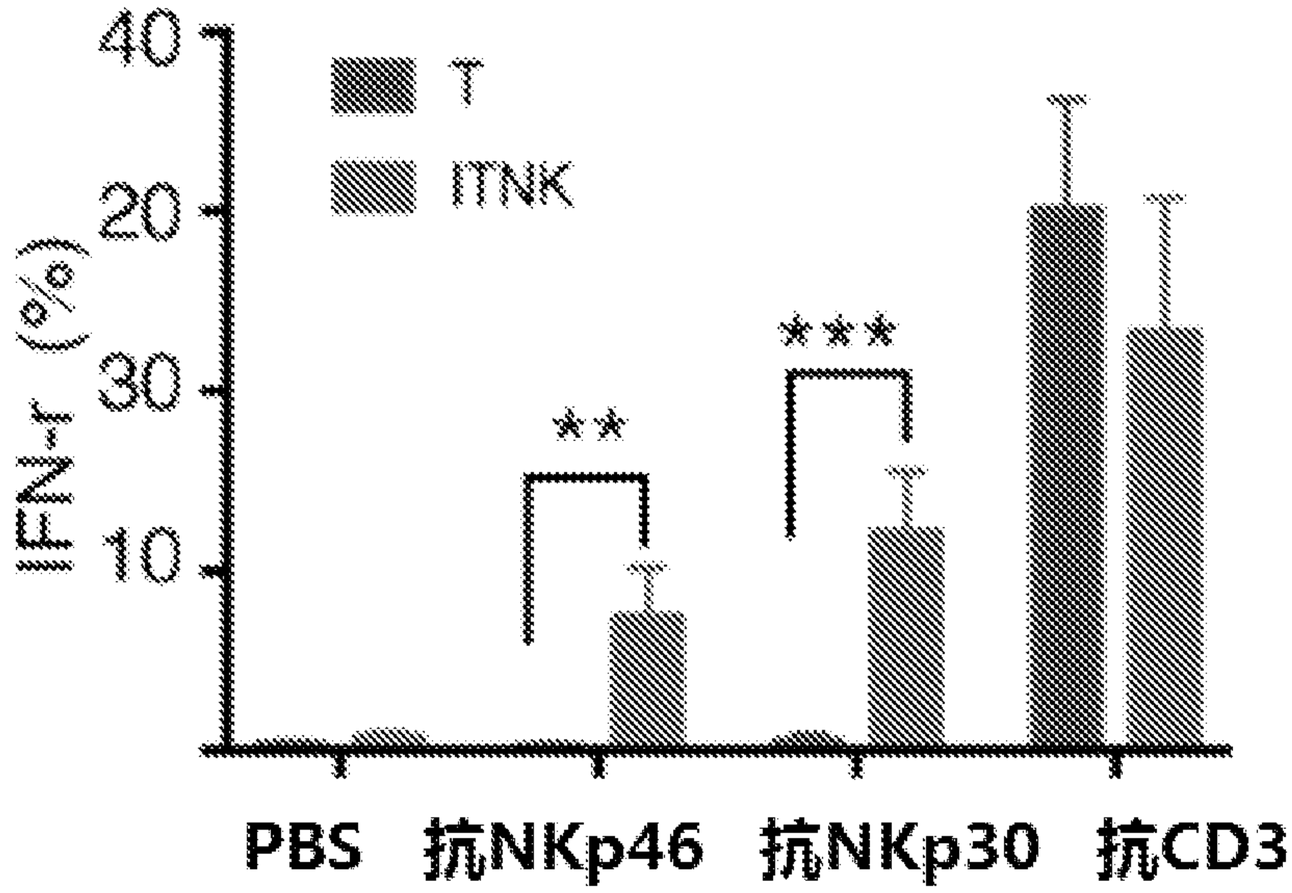

IFN-γ（%）
40
30
20
10
T
ITNK
**
***
PBS
抗NKp46
抗NKp30
抗CD3

图 28

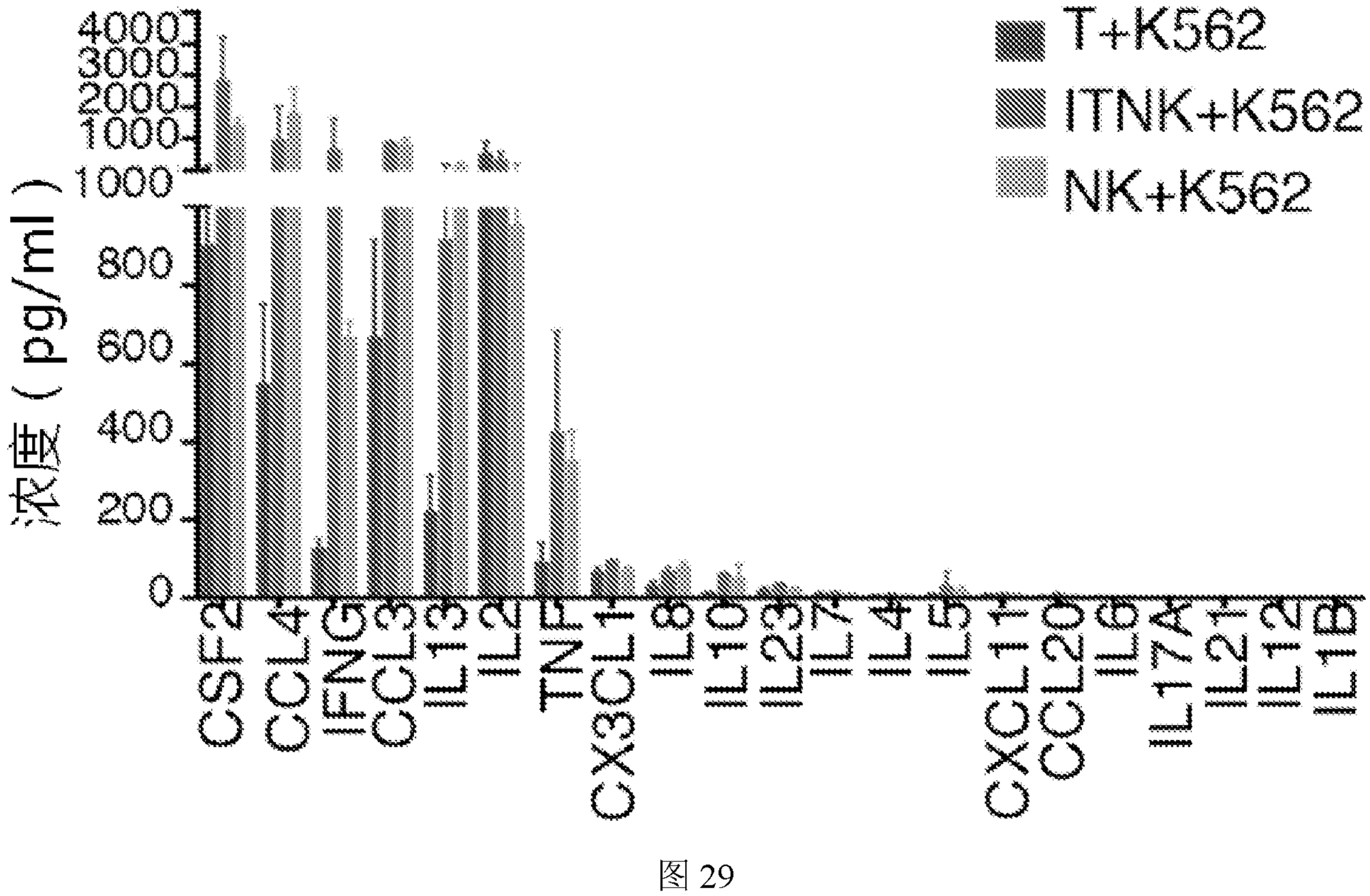

浓度（pg/ml）
4000
3000
2000
1000
800
600
400
200
0
T+K562
ITNK+K562
NK+K562
CSF2
CCL4
IFNG
CCL3
IL13
IL4
TNF
CX3CL1
IL8
IL10
IL23
IL17
IL4
IL5
CXCL11
CCL20
IL6
IL17A
IL21
IL12
IL1B

图 29

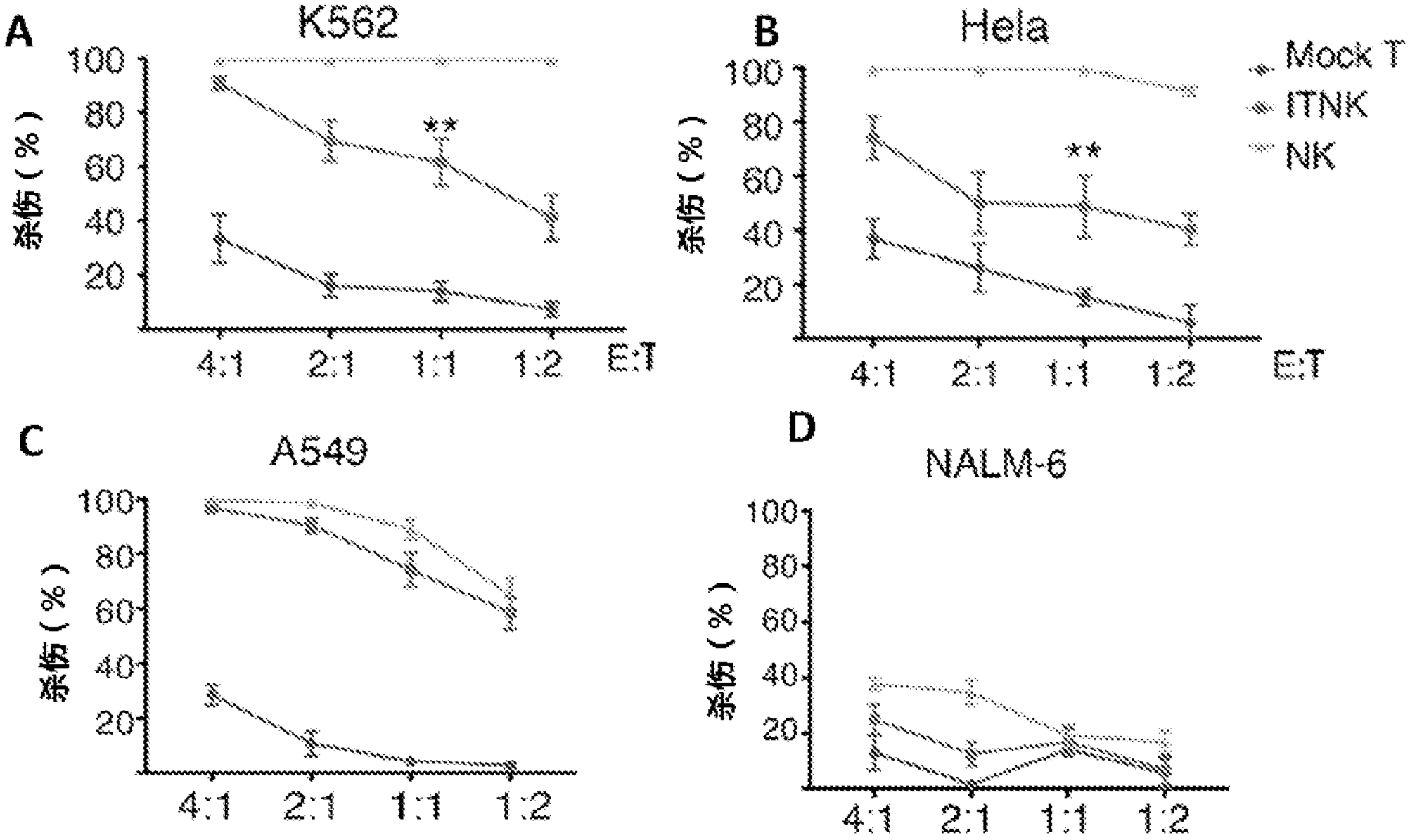

A
K562
杀伤(%)
100
80
60
40
20
**
4:1
2:1
1:1
1:2
E:T
B
Hela
Mock T
ITNK
NK
C
A549
D
NALM-6

图 30

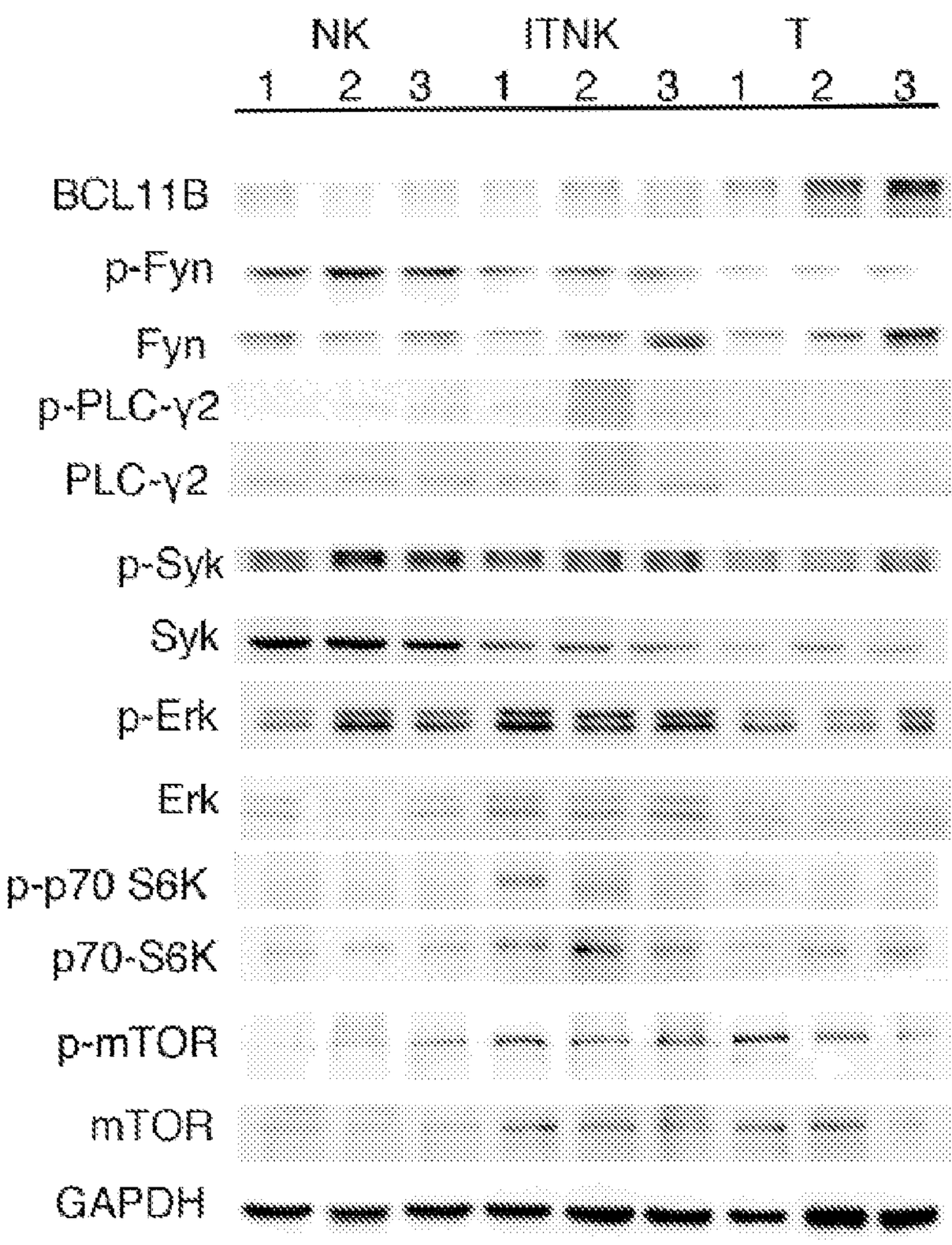

NK
ITNK
T
1 2 3 1 2 3 1 2 3
BCL11B
p-Fyn
Fyn
p-PLC-γ2
PLC-γ2
p-Syk
Syk
p-Erk
Erk
p-p70 S6K
p70-S6K
p-mTOR
mTOR
GAPDH

图 31

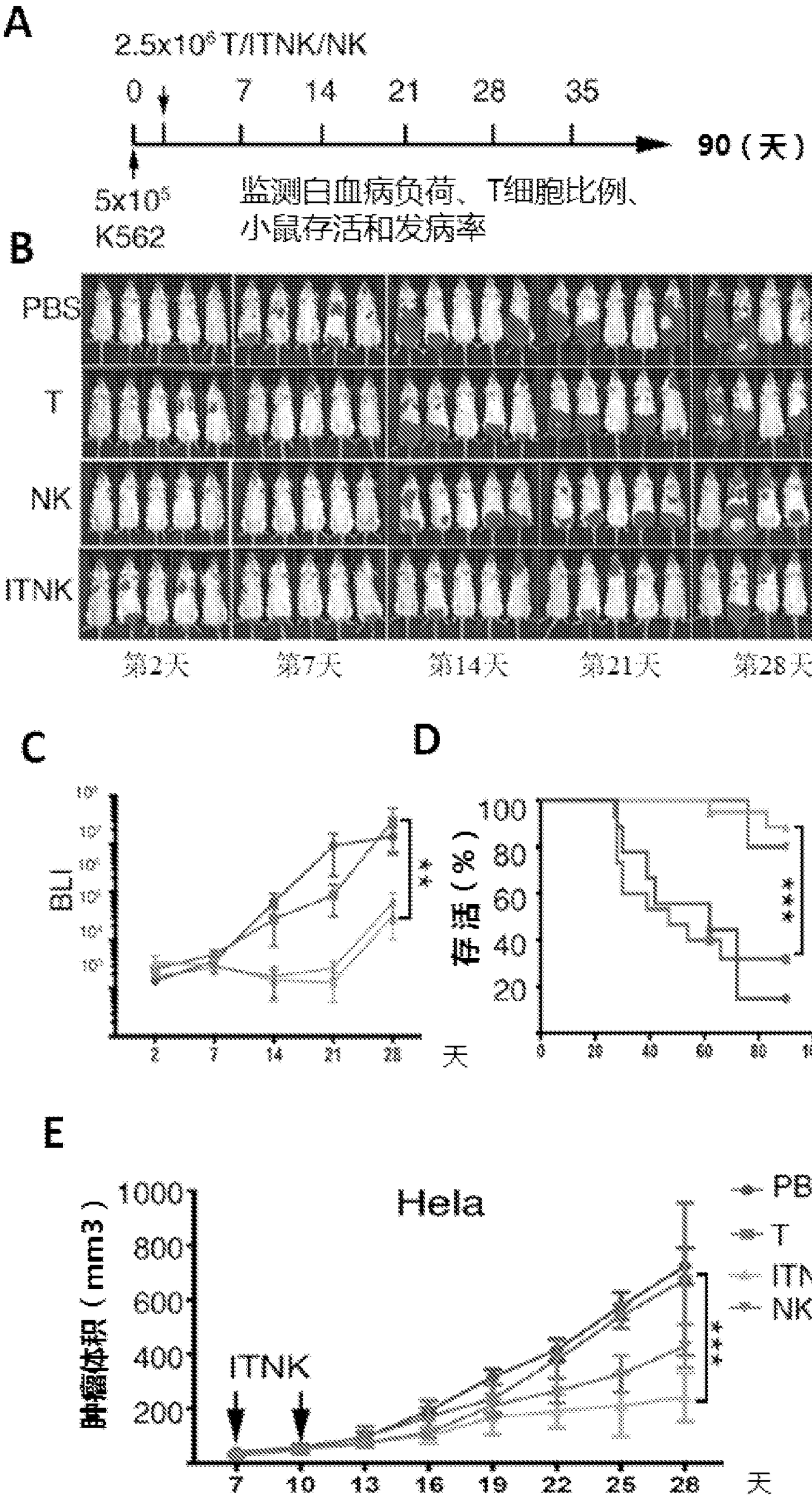

A
2.5x10⁶ T/ITNK/NK
0
7
14
21
28
35
90（天）
5x10⁶
K562
监测白血病负荷、T细胞比例、
小鼠存活和发病率
B
PBS
T
NK
ITNK
第2天
第7天
第14天
第21天
第28天
C
BLI
天
D
存活（%）
PBS
T
ITNK
NK
天
E
肿瘤体积（mm3）
Hela
ITNK
PBS
T
ITNK
NK
天

图 32

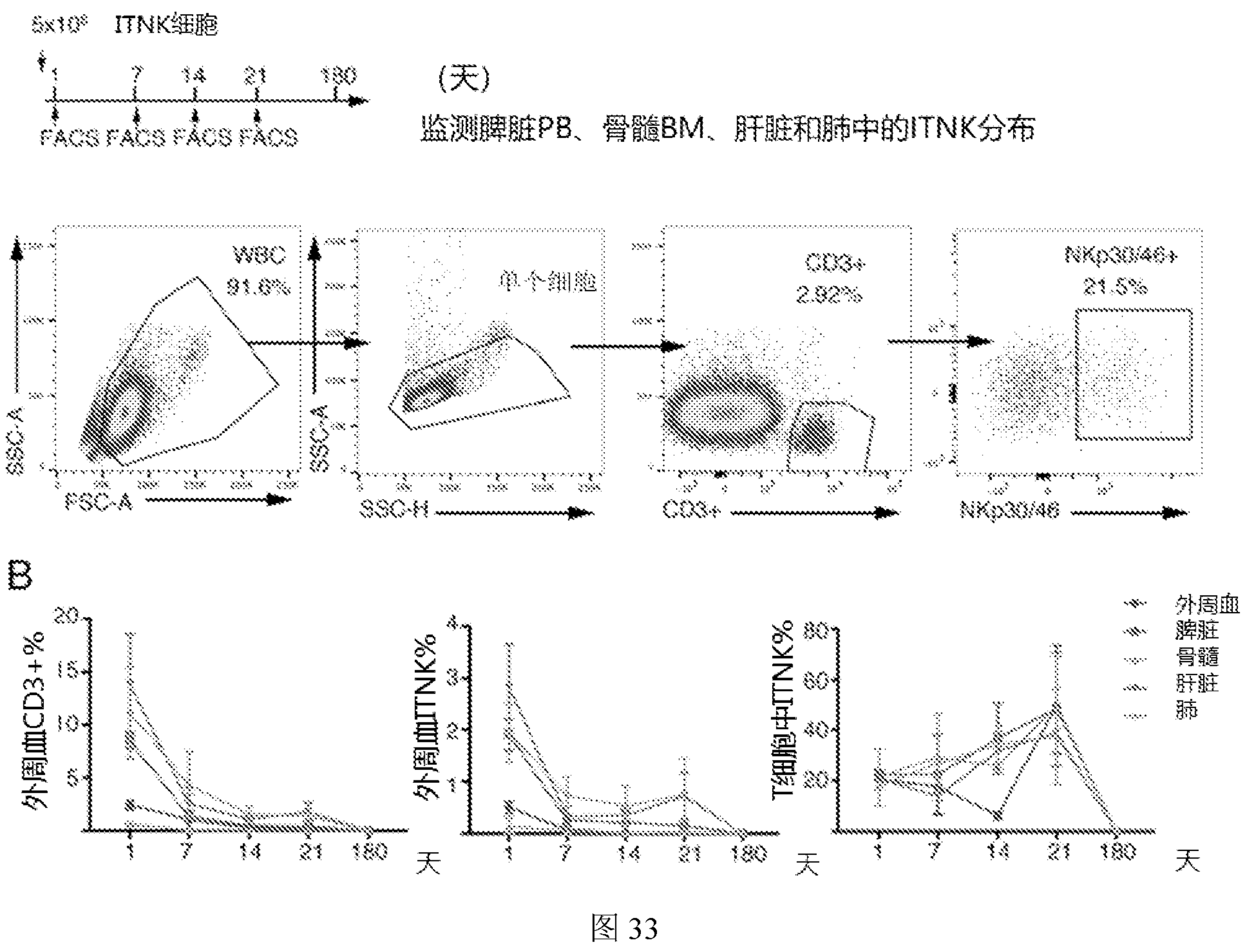
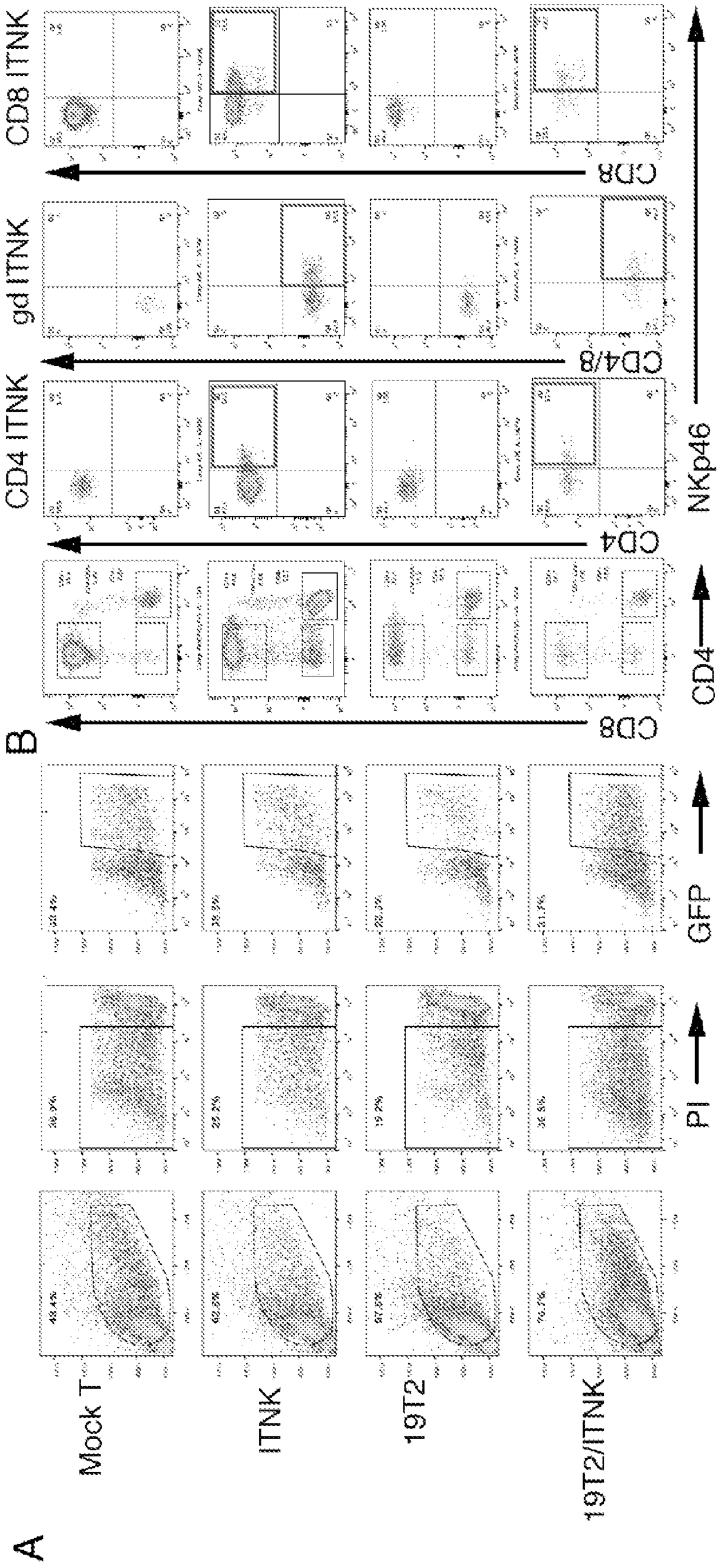

A
5x10⁶ ITNK细胞
1
7
14
21
180
(天)
FACS FACS FACS FACS
监测脾脏PB、骨髓BM、肝脏和肺中的ITNK分布
WBC
91.6%
SSC-A
FSC-A
单个细胞
SSC-A
SSC-H
CD3+
2.92%
CD3+
NKp30/46+
21.5%
NKp30/46
B
外周血CD3+%
外周血ITNK%
T细胞中ITNK%
天
外周血
脾脏
骨髓
肝脏
肺

图 33


A
B
Mock T
ITNK
19T2
19T2/ITNK
PI
GFP
CD4
CD8
CD4/8
NKp46
gd ITNK
CD8 ITNK
CD4 ITNK
48.4%
62.6%
97.5%
76.7%
30.9%
27.2%
19.2%
26.6%
38.4%
38.2%
28.3%
31.5%

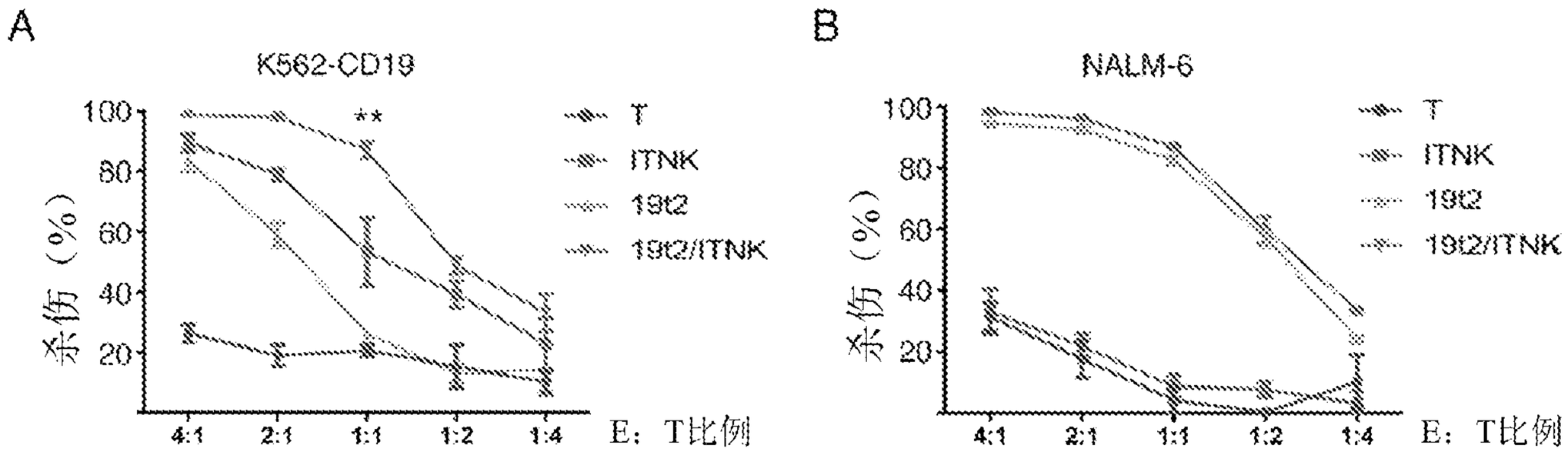



图 35

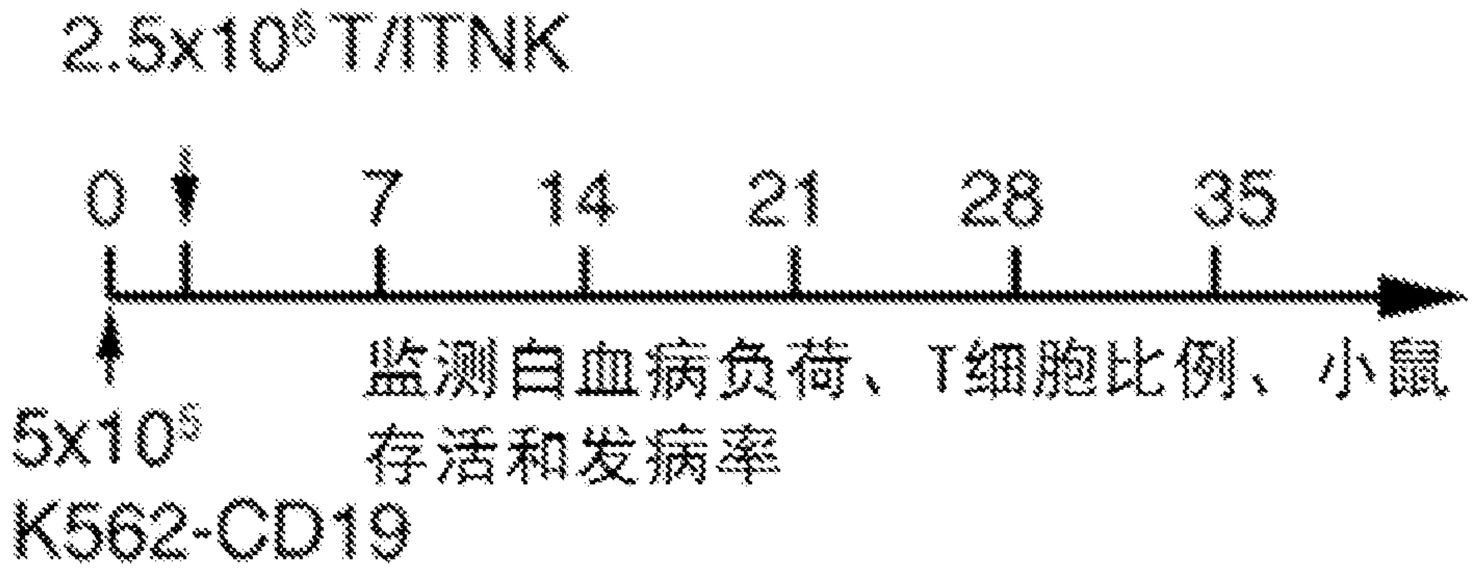



图 36（A）

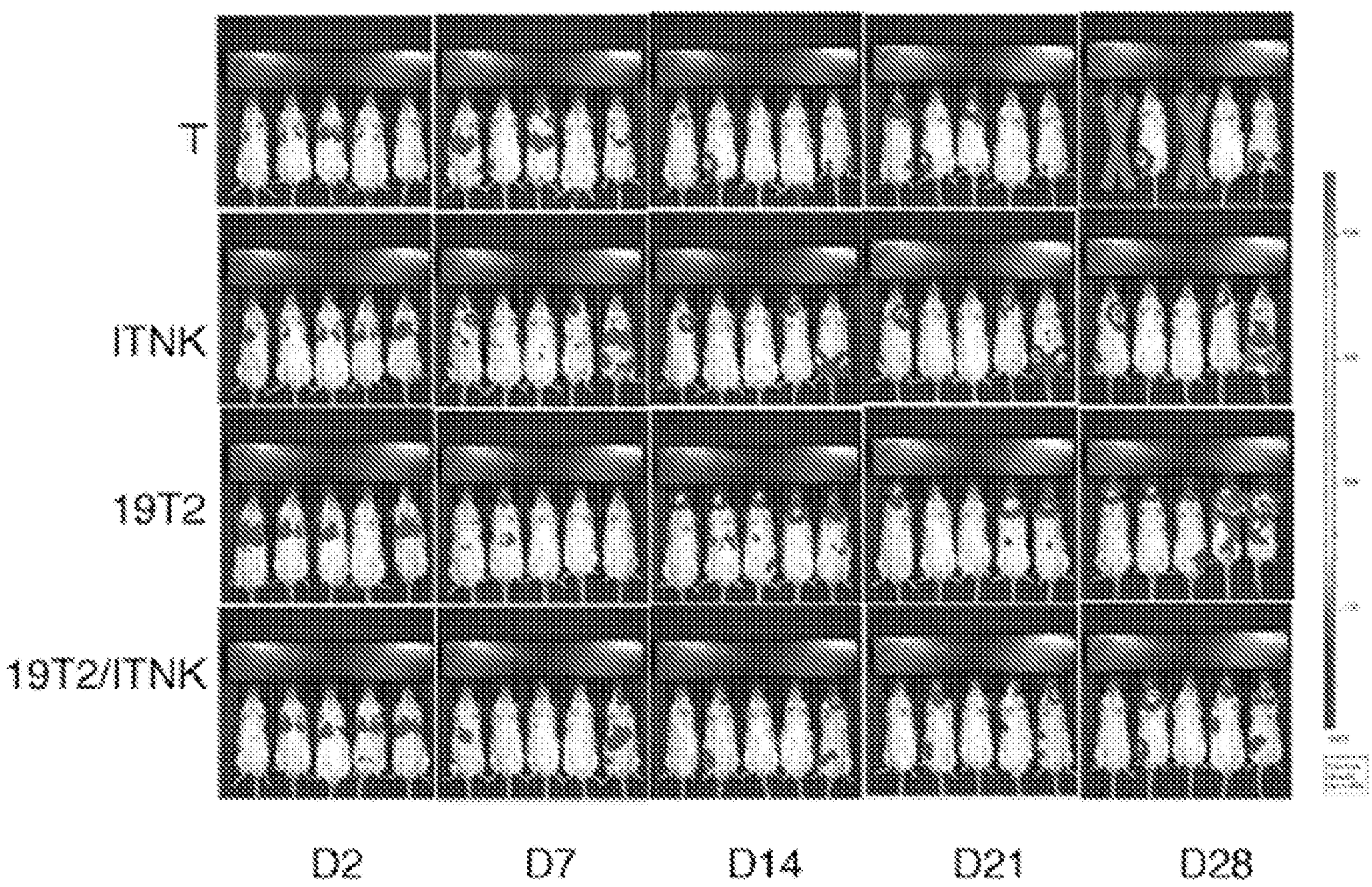



图 36（B）

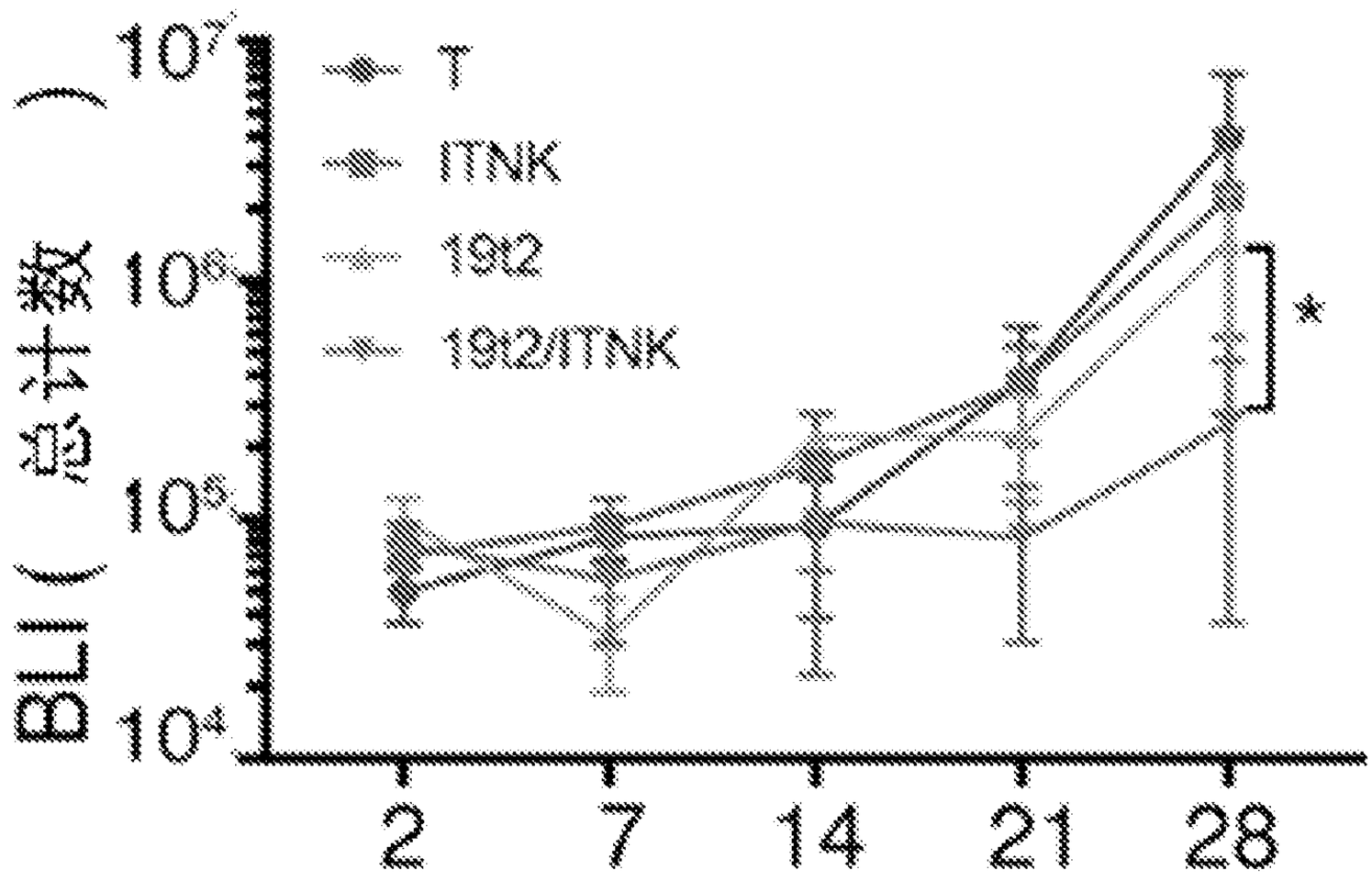



图 36（C）

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
**PCT/CN2020/118265**

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/0783(2010.01)i; A61K 35/17(2015.01)i

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

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N,A61K

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

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

CNABS; CNTXT; GBTXT; SGTXT; DWPI; EPTXT; USTXT; VEN; CHTXT; WOTXT; CATXT; ATTXT; KRTXT; LEXTXT; SIPOABS; JPTXT; TWTXT; CNKI, NCBI, ISI-WEB OF SCIENCE; ELSEVIER: 重编程, BCL11B, 抑制, 缺失, CAR, TCR, 敲除, ITNK, knock+, B cell lymphoma/leukemia 11B, reprogramm+, NK, BCL, inhibit+, delet+, CAR-T, 激活, 单抗, cell, NK, like, muc1, mesothelin, psca, gpc3, CD2, CD3, CD28

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| A | US 2012288484 A1 (LIU PENTAO et al.) 15 November 2012 (2012-11-15)<br>see claims 46-51, description paragraphs 100-102 | 1-23 |
| A | CN 104884095 A (THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA) 02 September 2015 (2015-09-02)<br>see claim 1, description paragraph 33 | 1-23 |
| A | Su, Dongming et al. "Reprogramming of T Cells to Natural Killer–Like Cells upon Bcl11b Deletion"<br>*Science,* Vol. 329, No. 5987, 02 July 2010 (2010-07-02),<br>pp. 85-89, see abstract | 1-23 |
| A | Marcel Maluski et al. "Chimeric antigen receptor–induced BCL11B suppression propagates NK-like cell development"<br>*The Journal of Clinical Investigation,* Vol. 129, No. 12, 02 December 2019 (2019-12-02),<br>pp. 5108-5122, see abstract | 1-23 |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

| Date of the actual completion of the international search | Date of mailing of the international search report |
|---|---|
| **22 December 2020** | **07 January 2021** |
| Name and mailing address of the ISA/CN<br>**China National Intellectual Property Administration (ISA/CN)**<br>**No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088**<br>**China**<br>Facsimile No. **(86-10)62019451** | Authorized officer<br><br>Telephone No. |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
**PCT/CN2020/118265**

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

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

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

3. Additional comments:

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT
**Information on patent family members**

International application No.
**PCT/CN2020/118265**

| Patent document cited in search report | Publication date (day/month/year) | Patent family member(s) | Publication date (day/month/year) |
|---|---|---|---|
| US 2012288484 A1 | 15 November 2012 | EP 2454361 A1 | 23 May 2012 |
| | | JP 2012532624 A | 20 December 2012 |
| | | WO 2011007176 A1 | 20 January 2011 |
| CN 104884095 A | 02 September 2015 | AU 2018203756 B2 | 24 October 2019 |
| | | EP 2872184 A4 | 30 March 2016 |
| | | EP 2872184 A2 | 20 May 2015 |
| | | AU 2013289984 B2 | 08 March 2018 |
| | | JP 2015523386 A | 13 August 2015 |
| | | BR 112015000657 A2 | 27 June 2017 |
| | | IN 139DEN2015 A | 12 June 2015 |
| | | MX 2015000433 A | 28 April 2016 |
| | | WO 2014012001 A3 | 23 April 2015 |
| | | AU 2020200315 A1 | 06 February 2020 |
| | | EA 201590209 A1 | 31 August 2015 |
| | | WO 2014012001 A2 | 16 January 2014 |
| | | US 2015290244 A1 | 15 October 2015 |
| | | EP 2872184 B1 | 16 September 2020 |
| | | EA 034644 B1 | 02 March 2020 |
| | | AU 2018203756 A1 | 21 June 2018 |
| | | KR 20150030750 A | 20 March 2015 |
| | | BR 112015000657 A8 | 16 January 2018 |
| | | US 2018271907 A1 | 27 September 2018 |
| | | CA 2876734 A1 | 16 January 2014 |
| | | AU 2013289984 A1 | 22 January 2015 |
| | | JP 2018135363 A | 30 August 2018 |

# 国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2020/118265

A. 主题的分类

C12N 5/0783(2010.01)i; A61K 35/17(2015.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C12N, A61K

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用））

CNABS;CNTXT;GBTXT;SGTXT;DWPI;EPTXT;USTXT;VEN;CHTXT;WOTXT;CATXT;ATTXT;KRTXT;LEXTXT;SIPOABS;JPTXT;TWTXT; CNKI, NCBI, ISI-WEB OF SCIENCE;ELSEVIER:重编程，BCL11B，抑制，缺失，CAR，TCR，敲除，ITNK，knock+，B cell lymphoma/leukemia 11B，reprogramm+，NK，BCL，inhibit+，delet+，CAR-T，激活，单抗，cell，NK，like，muc1，mesothelin，psca，gpc3，CD2，CD3，CD28

C. 相关文件

| 类 型* | 引用文件，必要时，指明相关段落 | 相关的权利要求 |
|---|---|---|
| A | US 2012288484 A1 (LIU PENTA0等) 2012年 11月 15日 (2012-11-15)<br>参见权利要求46-51，说明书第100-102段 | 1-23 |
| A | CN 104884095 A (宾夕法尼亚大学董事会) 2015年 9月 2日 (2015-09-02)<br>参见权利要求1，说明书第33段 | 1-23 |
| A | Su , Dongming 等. "Reprogramming of T Cells to Natural Killer-Like Cells upon Bcl11b Deletion"<br>Science, 第329卷，第5987期，2010年 7月 2日 (2010-07-02),<br>第85-89页 参见摘要 | 1-23 |
| A | Marcel Maluski等. "Chimeric antigen receptor-induced BCL11B suppression propagates NK-like cell development"<br>The Journal of Clinical Investigation, 第129卷，第12期，2019年 12月 2日 (2019-12-02),<br>第5108-5122页 参见摘要 | 1-23 |

☐ 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 |
|---|---|
| 2020年 12月 22日 | 2021年 1月 7日 |
| ISA/CN的名称和邮寄地址<br>中国国家知识产权局(ISA/CN)<br>中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088<br>传真号 (86-10)62019451 | 受权官员<br>田园<br>电话号码 62411047 |

# 国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2020/118265

## 第I栏　核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

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

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

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

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

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

3. 补充意见：

# 国际检索报告
## 关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2020/118265

| 检索报告引用的专利文件 | | | 公布日<br>(年/月/日) | 同族专利 | | | 公布日<br>(年/月/日) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| US | 2012288484 | A1 | 2012年 11月 15日 | EP | 2454361 | A1 | 2012年 5月 23日 |
| | | | | JP | 2012532624 | A | 2012年 12月 20日 |
| | | | | WO | 2011007176 | A1 | 2011年 1月 20日 |
| CN | 104884095 | A | 2015年 9月 2日 | AU | 2018203756 | B2 | 2019年 10月 24日 |
| | | | | EP | 2872184 | A4 | 2016年 3月 30日 |
| | | | | EP | 2872184 | A2 | 2015年 5月 20日 |
| | | | | AU | 2013289984 | B2 | 2018年 3月 8日 |
| | | | | JP | 2015523386 | A | 2015年 8月 13日 |
| | | | | BR | 112015000657 | A2 | 2017年 6月 27日 |
| | | | | IN | 139DEN2015 | A | 2015年 6月 12日 |
| | | | | MX | 2015000433 | A | 2016年 4月 28日 |
| | | | | WO | 2014012001 | A3 | 2015年 4月 23日 |
| | | | | AU | 2020200315 | A1 | 2020年 2月 6日 |
| | | | | EA | 201590209 | A1 | 2015年 8月 31日 |
| | | | | WO | 2014012001 | A2 | 2014年 1月 16日 |
| | | | | US | 2015290244 | A1 | 2015年 10月 15日 |
| | | | | EP | 2872184 | B1 | 2020年 9月 16日 |
| | | | | EA | 034644 | B1 | 2020年 3月 2日 |
| | | | | AU | 2018203756 | A1 | 2018年 6月 21日 |
| | | | | KR | 20150030750 | A | 2015年 3月 20日 |
| | | | | BR | 112015000657 | A8 | 2018年 1月 16日 |
| | | | | US | 2018271907 | A1 | 2018年 9月 27日 |
| | | | | CA | 2876734 | A1 | 2014年 1月 16日 |
| | | | | AU | 2013289984 | A1 | 2015年 1月 22日 |
| | | | | JP | 2018135363 | A | 2018年 8月 30日 |