(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2020 年 7 月 16 日 (16.07.2020)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2020/143042 A1

(51) 国际专利分类号:
C12N 5/0783 (2010.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2019/071416

(22) 国际申请日: 2019 年 1 月 11 日 (11.01.2019)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人: 深圳市双科生物科技有限公司 (SHENZHEN SHUANGKE BIOTECHNOLOGY CO., LTD) [CN/CN]; 中国广东省深圳市龙华区民治街道民泰社区星河盛世A5栋1单元2101, Guangdong 518000 (CN)。

(72) 发明人: 周双念(ZHOU, Shuangnian); 中国广东省深圳市龙华区民治街道民泰社区星河盛世A5栋1单元2101, Guangdong 518000 (CN)。

(74) 代理人: 广州市越秀区哲力专利商标事务所（普通合伙）(GUANGZHOU YUEXIU JILY PATENT & TRADEMARK LAW OFFICE); 中国广东省广州市越秀区中山五路70号13层34号房（简称：L1334房）周炽权, Guangdong 510000 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

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

本国际公布:
— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

(54) **Title:** METHOD FOR RESTORING CELL FUNCTION

(54) 发明名称: 一种恢复细胞性能的方法

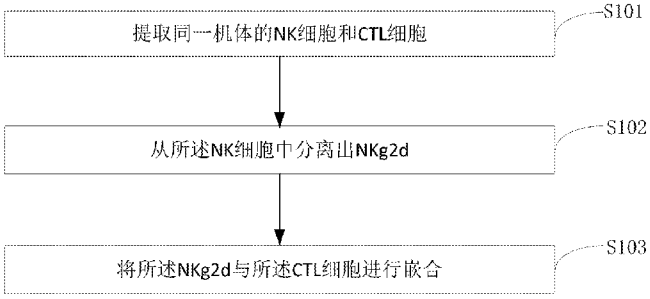


图 1

S101 Collect NK cells and CTL cells of the same organism

S102 Separate NKg2d from the NK cells

S103 Perform chimerization of NKg2d and the CTL cells

(57) **Abstract:** Provided is a method for restoring cell function, comprising: collecting NK cells and CTL cells of the same organism; separating NKg2d from the NK cells; and performing chimerization of NKg2d and the CTL cells, thereby restoring the ability of the CTL cells to recognize and kill abnormal cells.

(57) 摘要: 提供一种恢复细胞性能的方法，包括：提取同一机体的NK细胞和CTL细胞；从NK细胞中分离出NKg2d；将NKg2d与CTL细胞进行嵌合，从而恢复CTL细胞对异常细胞的识别和杀伤能力。

WO 2020/143042 A1

一种恢复细胞性能的方法

技术领域

本发明涉及细胞分离和结合领域，尤其涉及一种恢复细胞性能的方法。

背景技术

CTL 细胞（细胞毒性 T 淋巴细胞）表面的 NKg2d 脱落，会影响 CTL 细胞的性能，导致 CTL 细胞丧失对感染性病毒细胞、癌细胞和细菌的识别和杀伤能力。

发明内容

为了克服现有技术的不足，本发明的目的在于提供一种恢复细胞性能的方法，以恢复 CTL 细胞的性能。

本发明的目的之一采用如下技术方案实现：

一种恢复细胞性能的方法，包括：

提取同一机体的 NK 细胞和 CTL 细胞；

从所述 NK 细胞中分离出 NKg2d；

将所述 NKg2d 与所述 CTL 细胞进行嵌合。

进一步地，将所述 NKg2d 与所述 CTL 细胞进行嵌合包括：

将所述 NKg2d 嵌合于所述 CTL 细胞的表面。

进一步地，提取同一机体的 NK 细胞和 CTL 细胞之前还包括：

检测所述样本的 CTL 细胞中的 NKg2d 是否低于阈值；

检测样本中的 CTL 细胞的 MHC-1 的表达值是否在预设范围内；

若所述 CTL 细胞中的 NKg2d 低于阈值，且所述 MHC-1 的表达值在预设范

围内，则提取 NK 细胞和 CTL 细胞。

进一步地，提取同一机体的 NK 细胞和 CTL 细胞之后还包括：

将所述 NK 细胞和所述 CTL 细胞进行分离、培育和扩增。

相比现有技术，本发明的有益效果在于：从 NK 细胞（自然杀伤细胞）中分离出 NKg2d，将 NKg2d 与 CTL 细胞进行嵌合，从而恢复 CTL 细胞对异常细胞的识别和杀伤能力。

附图说明

图 1 为本发明实施例提供的恢复细胞性能的方法流程图。

具体实施方式

下面，结合附图以及具体实施方式，对本发明做进一步描述，需要说明的是，在不相冲突的前提下，以下描述的各实施例之间或各技术特征之间可以任意组合形成新的实施例。

如图 1 所示，本发明实施例提供的恢复细胞性能的方法，包括：

步骤 S101：提取同一机体的 NK 细胞和 CTL 细胞。

较佳的，NK 细胞和 CTL 细胞来自同一机体，以确保 NKg2d 与 CTL 细胞嵌合的成功率。提取 NK 细胞和 CTL 细胞之前还包括：检测所述样本的 CTL 细胞中的 NKg2d 是否低于阈值；检测样本中的 CTL 细胞的 MHC-1 的表达值是否在预设范围内；若所述 CTL 细胞中的 NKg2d 低于阈值或 NKg2d 脱落，且所述 MHC-1 的表达值在预设范围内，则提取 NK 细胞和 CTL 细胞，则提取 NK 细胞和 CTL 细胞。样本一般是含有肿瘤、病毒细胞的样本，NK 细胞处于正常表达 NKg2d 的状态或较少表达 NKg2d，NK 细胞可以分离出 NKg2d，若 CTL 细胞表面的 NKg2d 脱落达到预设值，就会影响 CTL 细胞对肿瘤、病毒细胞的识别和杀

伤。首先检测样本中的CTL细胞中的NKg2d是否低于阈值，若低于阈值或NKg2d脱落，则需要对 CTL 细胞进行修复，提取样本中的 NK 细胞和 CTL 细胞。

步骤 S102：从所述 NK 细胞中分离出 NKg2d。

较佳的，提取 NK 细胞和 CTL 细胞后，需要对细胞进行培养，将 NK 细胞和 CTL 细胞静置预设时间以对细胞进行分离、培育和扩增，以便提取出所需的 NKg2d。

步骤 S103：将所述 NKg2d 与所述 CTL 细胞进行嵌合。

将 NKg2d 与 CTL 细胞进行嵌合包括：将 NKg2d 嵌合于所述 CTL 细胞的表面，使得 NKg2d 在 CTL 细胞表面不脱靶，以恢复 CTL 细胞的性能，恢复对异常细胞的识别和杀伤力。

本发明实施例提供的恢复细胞性能的方法，从 NK 细胞（自然杀伤细胞）中分离出 NKg2d，将 NKg2d 与 CTL 细胞进行嵌合，从而恢复 CTL 细胞的性能。

上述实施方式仅为本发明的优选实施方式，不能以此来限定本发明保护的范围，本领域的技术人员在本发明的基础上所做的任何非实质性的变化及替换均属于本发明所要求保护的范围。

权 利 要 求 书

1.一种恢复细胞性能的方法，其特征在于，包括：

提取同一机体的 NK 细胞和 CTL 细胞；

从所述 NK 细胞中分离出 NKg2d；

将所述 NKg2d 与所述 CTL 细胞进行嵌合。

2.根据权利要求 1 所述的恢复细胞性能的方法，其特征在于，将所述 NKg2d 与所述 CTL 细胞进行嵌合包括：

将所述 NKg2d 嵌合于所述 CTL 细胞的表面。

3.根据权利要求 2 所述的恢复细胞性能的方法，其特征在于，提取同一机体的 NK 细胞和 CTL 细胞之前还包括：

检测所述样本的 CTL 细胞中的 NKg2d 是否低于阈值；

检测样本中的 CTL 细胞的 MHC-1 的表达值是否在预设范围内；

若所述 CTL 细胞中的 NKg2d 低于阈值，且所述 MHC-1 的表达值在预设范围内，则提取 NK 细胞和 CTL 细胞。

4.根据权利要求 1 所述的恢复细胞性能的方法，其特征在于，提取同一机体的 NK 细胞和 CTL 细胞之后还包括：

将所述 NK 细胞和所述 CTL 细胞进行分离、培育和扩增。

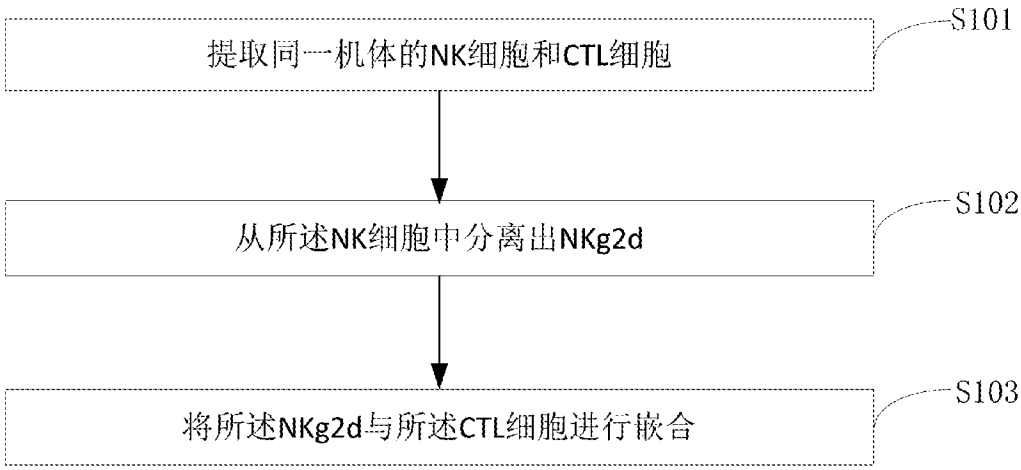

提取同一机体的NK细胞和CTL细胞
S101
从所述NK细胞中分离出NKg2d
S102
将所述NKg2d与所述CTL细胞进行嵌合
S103

图 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2019/071416

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/0783(2010.01)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

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, DWPI, CNTXT, WOTXT, USTXT, EPTXT, JPTXT, CNKI, Web of Science, Google Scholar, Patentics, incoPat: applicant/inventor, NKg2d, NK 族2D 组2D 成员D, NK细胞, 自然杀伤细胞, NK cell, 细胞毒性T淋巴细胞, 细胞毒性T细胞, CTL, Cytotoxic T lymphocyte

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MARKIEWICZ, M.A. et al. "Costimulation through NKG2D Enhances Murine CD8+ CTL Function: Similarities and Differences between NKG2D and CD28 Costimulation." *Journal of Immunology,* Vol. 175, 31 December 2005 (2005-12-31), pp. 2825-2833	1-4
Y	ROBERTS, A.I. et al. "Cutting Edge: NKG2D Receptors Induced by IL-15 Costimulate CD28-negative Effector CTL in the Tissue Microenvironment." *Journal of Immunology,* Vol. 167, 31 December 2001 (2001-12-31), pp. 5527-5530	1-4
Y	MERESSE, B et al. "Coordinated Induction by IL15 of a TCR-independent NKG2D Signaling Pathway Converts CTL into Lymphokine-activated Killer Cells in Celiac Disease." *Immunity.,* Vol. 21, 30 September 2004 (2004-09-30), pp. 357-366	1-4
Y	CN 104293815 A (YANGZHOU UNIVERSITY) 21 January 2015 (2015-01-21) the abstract	1-4

☑ 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
20 September 2019	**09 October 2019**
Name and mailing address of the ISA/CN **China National Intellectual Property Administration (ISA/CN)** **No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088** **China** Facsimile No. **(86-10)62019451**	Authorized officer Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CHAMPSAUR, M et al. "Effect of NKG2D Ligand Expression on Host Immune Responses." *Immunological Reviews,* Vol. 235, 31 December 2010 (2010-12-31), pp. 267-285	1-4
A	WO 2010141093 A2 (THE UNIVERSITY OF MARYLAND, BALTIMORE) 09 December 2010 (2010-12-09) entire document	1-4
A	US 2015299252 A1 (SUSAVION BIOSCIENCES, INC.) 22 October 2015 (2015-10-22) entire document	1-4
A	CN 108048404 A (XINXIANG MEDICAL UNIVERSITY) 18 May 2018 (2018-05-18) entire document	1-4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2019/071416

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN 104293815 A	21 January 2015	None	
WO 2010141093 A2	09 December 2010	WO 2010141093 A3	21 April 2011
US 2015299252 A1	22 October 2015	None	
CN 108048404 A	18 May 2018	None	

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2019/071416

A. 主题的分类

C12N 5/0783(2010.01)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

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, DWPI, CNTXT, WOTXT, USTXT, EPTXT, JPTXT, CNKI, Web of Science, Google Scholar, Patentics, incoPat: 申请人/发明人, NKg2d, NK 族2D 组2D 成员D, NK细胞, 自然杀伤细胞, NK cell, 细胞毒性T淋巴细胞, 细胞毒性T细胞, CTL, Cytotoxic T lymphocyte

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
Y	MARKIEWICZ, M.A.等. "Costimulation through NKG2D enhances murine CD8+ CTL function: Similarities and differences between NKG2D and CD28 costimulation." JOURNAL OF IMMUNOLOGY., 第175卷, 2005年 12月 31日 (2005-12-31), 第2825-2833页	1-4
Y	ROBERTS, A.I.等. "Cutting edge: NKG2D receptors induced by IL-15 costimulate CD28-negative effector CTL in the tissue microenvironment." JOURNAL OF IMMUNOLOGY., 第167卷, 2001年 12月 31日 (2001-12-31), 第5527-5530页	1-4
Y	MERESSE, B等. "Coordinated induction by IL15 of a TCR-independent NKG2D signaling pathway converts CTL into lymphokine-activated killer cells in celiac disease." IMMUNITY., 第21卷, 2004年 9月 30日 (2004-09-30), 第357-366页	1-4
Y	CN 104293815 A (扬州大学) 2015年 1月 21日 (2015-01-21) 摘要	1-4

☑ 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
2019年 9月 20日	2019年 10月 9日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451	受权官员 冯晓亮 电话号码 86-(10)-53961927

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	CHAMPSAUR, M等. "Effect of NKG2D ligand expression on host immune responses." IMMUNOLOGICAL REVIEWS., 第235卷, 2010年 12月 31日 (2010-12-31), 第267-285页	1-4
A	WO 2010141093 A2 (THE UNIVERSITY OF MARYLAND, BALTIMORE) 2010年 12月 9日 (2010-12-09) 全文	1-4
A	US 2015299252 A1 (SUSAVION BIOSCIENCES, INC.) 2015年 10月 22日 (2015-10-22) 全文	1-4
A	CN 108048404 A (新乡医学院) 2018年 5月 18日 (2018-05-18) 全文	1-4

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2019/071416

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN 104293815 A	2015年 1月 21日	无	
WO 2010141093 A2	2010年 12月 9日	WO 2010141093 A3	2011年 4月 21日
US 2015299252 A1	2015年 10月 22日	无	
CN 108048404 A	2018年 5月 18日	无	