(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
2023 年 9 月 28 日 (28.09.2023)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2023/179772 A1

(51) 国际专利分类号:
C12N 5/10 (2006.01) *A61K 35/545* (2015.01)
C12N 15/12 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01) *A61P 25/00* (2006.01)
C12N 15/867 (2006.01) *A61P 9/00* (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2023/083761

(22) 国际申请日: 2023 年 3 月 24 日 (24.03.2023)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202210307870.8 2022年3月25日 (25.03.2022) CN
202210806871.7 2022年7月8日 (08.07.2022) CN

(71) 申请人: 士泽生物医药（苏州）有限公司 (XELLSMART BIOMEDICAL (SUZHOU) CO., LTD) [CN/CN]; 中国江苏省苏州市中国（江苏）自由贸易试验区苏州片区苏州工业园区金谷路99号生物医药产业园三期B区项目3号楼201单元, Jiangsu 210008 (CN)。

(72) 发明人: 李翔 (LI, Xiang); 中国上海市闵行区元江路金领谷科技产业园1号楼601-607室, Shanghai 201100 (CN)。 朱珉喆 (ZHU, Minzhe); 中国上海市闵行区元江路金领谷科技产业园1号楼601-607室, Shanghai 201100 (CN)。

(74) 代理人: 北京知元同创知识产权代理事务所（普通合伙） (BEIJING ORIGINTELLIGENCE IP LAW FIRM); 中国北京市海淀区上地东路35号院1号楼4层3-509, Beijing 100085 (CN)。

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

(84) 指定国 (除另有指明，要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, 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))。

(54) **Title:** UNIVERSAL CELL AND METHOD FOR PREPARING SAME

(54) 发明名称: 一种通用型细胞及其制备方法

(57) **Abstract:** Disclosed is a method for preparing a universal cell. After major histocompatibility complex class I (MHC-I) and class II genes are inactivated in cells, fusion proteins comprising functional domains of CD47 and/or CD24 are overexpressed, such that the obtained human pluripotent stem cells or human cell lines can, on the basis of escaping T cell attack, further escape killing by NK cells, the effect of which is even better than that of the reported stellar target CD47. Meanwhile, the pluripotent stem cells with low immunogenicity retain their stemness and differentiation capacity.

(57) 摘要: 本发明公开了一种通用型细胞的制备方法。通过在细胞中失活主要组织相容性复合体MHC-I和II类基因后，过表达包含CD47和/或CD24的功能结构域的融合蛋白，获得的人多能干细胞或人类细胞系可在逃逸T细胞攻击的基础上，进一步逃逸NK细胞的杀伤，其效果甚至优于已经报道的明星靶点CD47。同时这些低免疫原性的多能干细胞保留了其干性和分化能力。

WO 2023/179772 A1

一种通用型细胞及其制备方法

相关申请的交叉引用

本发明要求 2022 年 03 月 25 日向中国国家知识产权局提交的专利申请号为202210307870.8，发明名称为“一种通用型细胞及其制备方法”和2022年07月08日向中国国家知识产权局提交的专利申请号为 202210806871.7，发明名称为“一种通用型细胞及其制备方法”的在先申请的优先权。该两件在先申请的全文通过引用的方式结合于本发明中。

技术领域

本发明属于基因工程与干细胞技术交叉领域，具体涉及一种通用型细胞及其制备方法。

背景技术

通过细胞的体外培养或干细胞的诱导分化，能够在体外大量的再生健康的功能细胞，能够通过异体功能细胞移植治疗疾病，但是，免疫不相容和移植细胞遭受的免疫排斥仍然是其临床应用的关键障碍。干细胞是一类具备自我更新能力及向特定功能体细胞分化能力的“种子”细胞，依据干细胞特性的程度差异，主要将干细胞分为：全能干细胞（Totipotent stem cells）、多能干细胞（Pluripotent stem cells，PSCs）和成体干细胞（Adult stem cell）。人类胚胎干细胞（hESC）和诱导多能干细胞（iPSC）具有无限增殖、自我更新和分化到各种类型细胞的潜力，在治疗癌症、神经相关、心血管等疾病具有重要应用前景。

移植自体细胞治疗可以回避免疫排斥问题，但是从病人身上制造自体细胞成本高昂且制备流程周期长（Khera et al.， 2013），并且个体来源的细胞产品的质量和有效性不确定。有数据表明病人体内的细胞与正常人的存在差异，治疗效果可能受影响。

可通过免疫抑制药物、HLA 匹配和基因编辑来降低免疫原性，或降低宿主免疫系统对异体移植细胞的排斥反应。免疫抑制药物副作用大，会导致骨髓抑制、肝毒性、脱发和胃肠道不良反应。现在美国、日本、中国都在建立 HLA 匹配的 iPSC 库，但建库和维护都需要高额的成本，因为 HLA 抗原的基因是在人类基因组中观察到的最具多态性

的基因。目前各地的 iPSC 库无法为各自国家的大多数人提供匹配，覆盖的只能是特定人群（Solomon et al.，2015; Turner et al.，2013）。针对大患者群体的异体细胞治疗可能在经济上和建设及运行成本上相对配型库具有非常明显的优势，但异体细胞治疗会受到强烈的免疫排斥。于是，构建同种异体免疫兼容的通用型 PSCs 迫在眉睫。

人类的主要组织相容性复合体（MHC），即人白细胞抗原（HLA），是导致免疫不相容的主要原因。HLA 复合体由一系列基因组成，可分为 I 类、II 类和 III 类。MHC-I 基因在几乎所有的组织细胞类型中表达，表达“非己” MHC-I 类分子的移植细胞将刺激 CD8+ T 细胞的活化而被消除。CD4+辅助 T 细胞识别“非己”细胞的 MHC-II 基因，从而进行免疫排斥，而 III 类分子不参与免疫活动。使用基因编辑的方法改变免疫原性元件，以产生低免疫原性细胞，使得具备免疫豁免性的“off-the-shelf”细胞治疗产品的大规模制造成为可能。

近年已有先驱报道通过敲除 B2M、CIITA 等基因，实现 MHC-I 和 MHC-II 细胞表面或本身基因的缺失表达，进而使细胞具备免疫耐受或逃逸 T/B 细胞特异性免疫应答，产生免疫兼容的通用型 PSCs，为更广泛的通用型 PSCs 源细胞、组织、器官应用奠定了重要的基础。然而，HLA 分子是自然杀伤细胞（NK 细胞）的主要抑制性配体，MHC-I 类阴性细胞易受天然杀伤（NK）细胞裂解。体内外数据均显示宿主 NK 细胞可消除植入的 $B2M^{-/-}$ 供体细胞（Flahou et al.，2021）。因此，需要改善先前的方法以产生可以避免免疫反应的通用供体细胞。已报道在破坏 MHC-I 和 MHC-II 类基因表达的基础上使细胞表达 HLA-E/G 等非经典 HLA-I 类分子，或表达 PD-L1、CTLA4-Ig、CD47、CD24 等免疫抑制检查点蛋白，可有效逃逸 NK 细胞的杀伤（Zhao， W. et al.，2020; Ye， Q. et al.，2020;WO2021041316 A1）。

这些方案存在仅基于领域已知常识明星分子的直接应用，但存在免疫兼容性不彻底、不明确或缺乏持久性、有效剂量窗口窄等技术问题，由此表明需要更创新和更优化的策略来实现更优化的改造干细胞获得更优的免疫豁免性方案。

发明内容

针对现有技术所存在的不足，本发明提供了改造细胞获得低免疫原性的新方法，首次采用了结构域融合的新基因策略，开展了基于 CD47 和 CD24 改造人类干细胞获得低免疫原性的策略实践，通过多轮筛选和序列组合测试，最终鉴定出了代表性的融合新基因。该融合新基因能够显著减少或逃逸免疫系统的识别和攻击，尤其是自然杀伤细胞、

巨噬细胞等的攻击，本发明提出了通过开发结构域融合的新基因实现细胞的免疫豁免性的可行策略。

本发明通过敲除人多能干细胞内质网中β-2-微球蛋白（B2M）和敲除MHC-II基因转录的正调节因子CIITA，成功构建B2M/CIITA双等位基因敲除阳性克隆（DKO细胞）；然后使用慢病毒载体在DKO细胞中过表达本发明鉴定出的融合新基因，由此获得的人多能干细胞可在逃逸T细胞攻击的基础上，进一步逃逸NK细胞的杀伤，从而能够获得相对DKO+CD47（下文简称"CD47现有技术"）的出人意料的优异的免疫逃逸效果。同时这些低免疫原性的多能干细胞保留了其干性和分化能力等多能干细胞的关键生物学功能。

为了实现上述目的，本发明采用如下技术方案：

第一方面，本发明提供一种通用型细胞，其相对于野生型细胞，包含：

1）MHC-I和/或MHC-II人类白细胞抗原的表达降低或不表达；

2）表达包含免疫抑制检查点的融合蛋白；

所述细胞能逃逸T细胞攻击及NK细胞的杀伤。

在某些方面，所述包含免疫抑制检查点的融合蛋白包括PD-L1、CTLA4-Ig、CD47、CD24中的两种及两种以上。优选地，表达包含2种所述免疫抑制检查点的融合蛋白。

根据本发明，表达包含CD47和/或CD24的功能结构域的融合蛋白。

在某些方面，所述细胞包括MHC-I和MHC-II人类白细胞抗原的表达降低或不表达。

在某些方面，所述细胞中使用基因编辑工具（诸如TALEN和/或CRISPR系统）靶向编码MHC-I的一种或多种转录调节因子的一个或多个基因，以及编码MHC-II的一种或多种转录调节因子的一个或多个基因，来实现MHC-I和MHC-II基因的表达降低或不表达。

在某些实施方式中，为实现MHC-I和MHC-II基因的表达降低或不表达，所述MHC-I的转录调节因子可优选自：B2M、TAP1、TAP2、TAP相关糖蛋白（Tapasin）或NLRC5中的一个或多个；所述MHC-II的转录调节因子可优选自：CIITA、RFXANK、RFX5、RFXAP中的一个或多个；

所述转录调节因子优选B2M和CIITA。

在某些实施方式中，所述细胞还包括通过选择性灭活CIITA基因的稀有切割核酸内切酶靶向CIITA基因的遗传修饰。

在某些实施方式中，所述细胞还包括通过选择性灭活B2M基因的稀有切割核酸内

切酶靶向 B2M 基因的遗传修饰。

在某些实施方式中，其中通过稀有切割内切核酸酶靶向 CIITA 基因或 B2M 基因的遗传修饰包括CAS 蛋白或编码CAS 蛋白的多核苷酸,和至少一个用于特异性靶向CIITA 基因或 B2M 基因的导向核糖核酸序列。

在具体的实施方式中，使用 CRISPR/CAS9 系统分别对 B2M 和 CIITA 外显子区段进行两端直接敲除，其中，针对 B2M 基因的 gRNA 的靶序列为 SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:3，针对 CIITA 基因的 gRNA 的靶序列为 SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:5。

在某些方面，所述细胞中通过引入针对编码 MHC-I 的一种或多种转录调节因子的一个或多个基因，或编码 MHC-II 的一种或多种转录调节因子的一个或多个基因的基因表达修饰分子，来实现 MHC-I 和/或 MHC-II 基因的表达降低或不表达，其中所述基因表达修饰分子包括选自 siRNA，shRNA，microRNA，反义 RNA 和另一种 RNA 介导的抑制分子中的一种。

在某些方面，所述包含 CD47 和/或 CD24 的功能结构域的融合蛋白中的 CD47 的功能结构域为 CD47 跨膜结构域；优选地，所述 CD47 跨膜结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO：6-10 任一项所示。

在某些方面，所述包含 CD47 和/或 CD24 的功能结构域的融合蛋白中的 CD24 的功能结构域为 CD24 的信号肽序列、CD24 成熟肽、CD24 胞外肽、CD24 膜锚定序列、CD24 胞外成熟肽；优选地，所述 CD24 的功能结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO：11-16 任一项所示。

在某些实施方式中,所述由 CD47 和 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白是将 CD47 的 SIRPα 结合域和 CD24 的膜锚定序列连接。

在某些实施方式中,所述由 CD47 和 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白是将 CD47 的 SIRPα 结合域插入至 CD24 的胞外序列和膜锚定序列的链接位点。

在某些实施方式中，所述由 CD47 和 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白是将 CD47CD47 的 SIRPα 结合域链接到 CD24 的胞外序列后。

在某些实施方式中,所述由 CD47 和 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白是将 CD24 成熟肽链接到 CD47 的 SIRPα 结合域后。

在某些实施例方式中，所述由 CD47 和 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白是将 CD24 的胞外成熟肽插入到 CD47 的 SIRPα 结合域和跨膜结构域链接点。

在某些实施方式中,所述由 CD47 和 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白是将 CD24

的成熟肽序列和 CD47 跨膜结构域连接；

优选地，所述由 CD47 和 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白的氨基酸序列与如 SEQ ID NO:1 所示的序列具有 70%以上的同源性，例如 80%以上的同源性，再例如 90%以上、95%以上、98%以上的同源性；

进一步优选地，所述由 CD47 和 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示。

在某些方面，所述编码上述由 CD47 和 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白核酸序列可以根据所述融合蛋白的氨基酸序列得到。

在某些方面，所述细胞还包括修饰以增加以下一种或多种多肽的表达：DUX4，CD27，CD35，CD46，CD55，CD59，CD200，HLA-C，HLA-E，HLA-E 重链，HLA-G，PD-L1，IDOl，CTLA4-Ig，Cl-抑制剂，IL-10，IL-35，，CCL21，Mfge8 和 SerpinB9。

在某些方面，所述细胞是胚胎干细胞。

在某些方面，所述细胞是多能干细胞。

在某些实施方案中，所述细胞是低免疫原性干细胞。

在某些实施方案中，所述细胞是人类干细胞或人类体细胞。

第二方面，本发明提供一种第一方面通用型细胞的制备方法，包含如下步骤：

1）敲除细胞的 MHC-I 的一种或多种转录调节因子的一个或多个基因；和/或，

2）敲除细胞的 MHC-II 的一种或多种转录调节因子的一个或多个基因；

3）在细胞中引入编码包含免疫抑制检查点的融合蛋白的核酸序列。

在某些方面，所述免疫抑制检查点的融合蛋白包括 PD-L1、CTLA4-Ig、CD47、CD24 中的多种。优选地，引入编码包含 2 种所述免疫抑制检查点的融合蛋白的核酸序列。

根据本发明，引入包含 CD47 和/或 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白的核酸序列。

在某些方面，所述 MHC-I 的转录调节因子可优选自：B2M、TAP1、TAP2、TAP 相关糖蛋白（Tapasin）或 NLRC5 中的一个或多个；所述 MHC-II 的转录调节因子可优选自：CIITA、RFXANK、RFX5、RFXAP 中的一个或多个。

在某些实施例方式中，所述转录调节因子选自 B2M 和 CIITA。

在某些方面，步骤 1）和 2）所述的敲除为通过选择性灭活 CIITA 基因或 B2M 基因的稀有切割核酸内切酶靶向 CIITA 基因或 B2M 基因的遗传修饰。

优选地，所述稀有切割核酸内切酶选自 CAS 蛋白，TALE-核酸酶，锌指核酸酶，大核酸酶和归巢核酸酶。

进一步优选地，其中通过稀有切割内切核酸酶靶向 CIITA 基因或 B2M 基因的遗传修饰包括 CAS 蛋白或编码 CAS 蛋白的多核苷酸，和至少一个用于特异性靶向 CIITA 基因或 B2M 基因的导向核糖核酸序列。

在某些实施例方式中，步骤 1）和 2）使用 CRISPR 系统分别对 B2M 和 CIITA 外显子区段进行两端直接敲除，其中，针对 B2M 基因的 gRNA 的靶序列为 SEQ ID NO:2、3，针对 CIITA 基因的 gRNA 的靶序列为 SEQ ID NO:4、5。

在某些方面，步骤 1）或 2）所述的敲除为通过引入针对编码 MHC-I 的一种或多种转录调节因子的一个或多个基因，或编码 MHC-II 的一种或多种转录调节因子的一个或多个基因的基因表达修饰分子，来实现 MHC-I 和/或 MHC-II 基因的表达降低或不表达，其中所述基因表达修饰分子包括选自 siRNA，shRNA，microRNA，反义 RNA 和另一种 RNA 介导的抑制分子中的一种。

在某些方面，步骤 3）采用表达载体将编码包含 CD47 和/或 CD24 的功能结构域的融合蛋白的核酸序列引入细胞中。

优选地，所述步骤 3）采用的表达载体为病毒载体。

在某些实施例方式中，步骤 3）采用的病毒载体为慢病毒。

在某些方面，步骤 3）将编码包含 CD47 和/或 CD24 的功能结构域的融合蛋白的核酸序列导入所述细胞的选定位点；优选地，所述细胞的选定位点是安全港基因位点。

在某些方面，所述包含 CD47 和/或 CD24 的功能结构域的融合蛋白中的 CD47 的功能结构域为 CD47 跨膜结构域；优选地，所述 CD47 跨膜结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO：6-10 任一项所示。

在某些方面，所述包含 CD47 和/或 CD24 的功能结构域的融合蛋白中的 CD24 的功能结构域为 CD24 的信号肽序列、CD24 成熟肽、CD24 胞外肽、CD24 膜锚定序列、CD24 胞外成熟肽；优选地，所述 CD24 的功能结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO：11-16 任一项所示。

在某些实施方式中，所述由 CD47 和 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白是将 CD47 的 SIRPα 结合域和 CD24 的膜锚定序列连接。

在某些实施方式中，所述由 CD47 和 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白是将 CD47 的 SIRPα 结合域插入至 CD24 的胞外序列和膜锚定序列的链接位点。

在某些实施方式中，所述由 CD47 和 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白是将 CD47CD47 的 SIRPα 结合域链接到 CD24 的胞外序列后。

在某些实施方式中，所述由 CD47 和 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白是将 CD24 成熟肽链接到 CD47 的 SIRPα 结合域后。

在某些实施方式中，所述由 CD47 和 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白是将 CD24 的胞外成熟肽插入到 CD47 的 SIRPα 结合域和跨膜结构域链接点。

在某些实施方式中，所述由 CD47 和 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白是将 CD24 的成熟肽序列和 CD47 跨膜结构域连接；

优选地，所述由 CD47 和 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白与如 SEQ ID NO:1 所示的序列具有至少 70%以上的同源性，例如 80%以上的同源性，再例如 90%以上、95%以上、98%以上的同源性；进一步优选地，所述由 CD47 和 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示。

在某些方面，所述通用型细胞还包括第二表达载体，其包含编码选自 CD35，CD27，DUX4，CD26， CD200,HLA-C，HLA-E，HLA-E 重链，HLA-G，PD-L1，IDOl，IDO2，TDO, CTLA4-IgG，Cl-抑制剂，IL-10，CD46，CD55，CD59，CCL21，Mfge8，SerpinB9 和 IL-35 中的一种的多核苷酸序列。

在某些实施方案中，所述第二表达载体是诱导型表达载体；优选地，所述第二表达载体是病毒载体。

第三方面，本发明提供一种制备分化的通用型细胞的方法，包括在分化条件下培养根据第二方面的方法制备的通用型细胞，从而制备分化的低免疫原性细胞。

在某些方面，其中所述分化条件适于将细胞分化为选自心肌细胞，神经细胞，胶质细胞，内皮细胞，T 细胞，NK 细胞，NKT 细胞，巨噬细胞，造血祖细胞，间充质细胞，胰岛细胞，软骨细胞，视网膜色素上皮细胞，肾细胞，肝细胞，甲状腺细胞，皮肤细胞，血细胞和上皮细胞的细胞类型。

第四方面，本发明提供一种治疗需要细胞治疗的患者的方法，包括给予根据第三方面的方法制备的分化的低免疫原性细胞群。

第五方面，本发明提供一种组合物，所述组合物包含第一方面所述的通用型细胞。

在某些方面，所述组合物包含第一方面所述的通用型细胞和一种或多种治疗剂，所述治疗剂包含肽、细胞因子、小分子化合物、大分子、ADC、抗体、纳米粒子、生物类似物、mRNA、中药、蛋白、疫苗、检查点抑制剂、丝裂原、生长因子、小 RNA、双链 RNA(double stranded RNA；dsRNA)、单核血细胞、饲养细胞、饲养细胞组分或其置换因子、包含一种或多种所关注多核酸的载体、抗体等。

第六方面，本发明提供一种融合蛋白，所述融合蛋白包含 CD47 和/或 CD24 的功能结构域。

在某些方面，所述包含 CD47 和/或 CD24 的功能结构域的融合蛋白中的 CD47 的功能结构域为 CD47 跨膜结构域；优选地，所述 CD47 跨膜结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO：6-10 任一项所示。

在某些方面，所述包含 CD47 和/或 CD24 的功能结构域的融合蛋白中的 CD24 的功能结构域为 CD24 的信号肽序列、CD24 成熟肽、CD24 胞外肽、CD24 膜锚定序列、CD24 胞外成熟肽；优选地，所述 CD24 的功能结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO：11-16 任一项所示。

在某些实施方式中，所述由 CD47 和 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白是将 CD47 的 SIRPα 结合域和 CD24 的膜锚定序列连接。

在某些实施方式中，所述由 CD47 和 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白是将 CD47 的 SIRPα 结合域插入至 CD24 的胞外序列和膜锚定序列的链接位点。

在某些实施方式中，所述由 CD47 和 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白是将 CD47 链接到 CD24 的胞外序列后。

在某些实施方式中，所述由 CD47 和 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白是将 CD24 成熟肽链接到 CD47 的 SIRPα 结合域后。

在某些实施方式中，所述由 CD47 和 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白是将 CD24 的胞外成熟肽插入到 CD47 的 SIRPα 结合域和跨膜结构域链接点。

在某些实施方式中，所述由 CD47 和 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白是将 CD24 的成熟肽序列和 CD47 跨膜结构域连接；

优选地，所述由 CD47 和 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白与如 SEQ ID NO:1 所示的序列具有至少 70%以上的同源性，例如 80%以上的同源性，再例如 90%以上、95%以上、98%以上的同源性；进一步优选地，所述由 CD47 和 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示。

第七方面，本发明提供编码第六方面融合蛋白的核酸序列，所述核酸序列可以根据所述融合蛋白的氨基酸序列得到。

第八方面，本发明提供一种表达载体或表达盒，所述表达盒或表达载体包含第七方面的核酸序列。

第九方面，本发明提供一种表达第六方面所述融合蛋白，并具有表达降低或不表达

的 MHC I 类和/或 MHC II 类人白细胞抗原的细胞。

第十方面，本发明提供一种不表达 CIITA，表达第六方面所述融合蛋白，并且具有表达降低或不表达的 MHC I 类和/或 MHC II 类人白细胞抗原的细胞。

第十一方面，本发明提供一种不表达 B2M，表达第六方面所述融合蛋白，并具有表达降低或不表达的 MHC I 类和/或 MHC II 类人白细胞抗原的细胞。

第十二方面，本发明提供一种不表达 CIITA 和 B2M，表达第六方面所述融合蛋白，并具有表达降低或不表达的 MHC I 类和/或 MHC II 类人白细胞抗原的细胞。

第十三方面，本发明提供一种表达第六方面所述融合蛋白和至少一种选自：DUX4，HLA-C，HLA-E，HLA-G，PD-L1，CTLA4，Cl-抑制剂，CD46，CD55，CD59 和 IL-35 的多肽，并具有表达降低或不表达的 MHC I 类和/或 MHC II 类人白细胞抗原的的细胞。

第十四方面，本发明提供一种不表达 CIITA，表达第六方面所述融合蛋白和至少一种选自：CD35，CD27，DUX4，CD26，CD55，CD59，CD200,HLA-C，HLA-E，HLA-E 重链，HLA-G，PD-L1，IDOl，IDO2，TDO，CTLA4-IgG，Cl-抑制剂，IL-10，CD46，CD55，CD59，CCL21，Mfge8，SerpinB9 和 IL-35 中的多肽，并且具有表达降低或不表达的 MHC I 类和/或 MHC II 类人白细胞抗原的细胞。

第十五方面，本发明提供一种不表达 B2M，表达第六方面所述融合蛋白和至少一种选自：DUX4，HLA-C，HLA-E，HLA-G，PD-L1，CTLA4，Cl-抑制剂，CD46，CD55，CD59 和 IL-35 的多肽，并且具有表达降低或不表达的 MHC I 类和/或 MHC II 类人白细胞抗原的细胞。

第十六方面，本发明提供一种不表达 CIITA 和 B2M，表达第六方面所述融合蛋白和至少一种选自：CD35，CD27，DUX4，CD26，CD55，CD59，CD200,HLA-C，HLA-E，HLA-E 重链，HLA-G，PD-L1，IDOl，IDO2，TDO，CTLA4-IgG，Cl-抑制剂，IL-10，CD46，CD55，CD59，CCL21，Mfge8，SerpinB9 和 IL-35 中的多肽，并且具有表达降低或不表达的 MHC I 类和/或 MHC II 类人白细胞抗原的细胞。

第十七方面，本发明提供一种上述第九方面～第十六方面所述的细胞，其中所述细胞选自干细胞，分化细胞，多能干细胞，诱导的多能干细胞，成体干细胞，祖细胞，体细胞，原代 T 细胞和嵌合抗原受体 T 细胞。

第十八方面，本发明提供第一方面所述的通用型细胞、第五方面所述的组合物或第八方面所述的表达载体或表达盒在制备用于细胞治疗的产品中的应用。

第十九方面，本发明提供第一方面所述的通用型细胞、第五方面所述的组合物或第

八方面所述的表达载体或表达盒在制备用于器官移植的产品中的应用。

第二十方面，本发明提供第一方面所述的通用型细胞、第五方面所述的组合物或第八方面所述的表达载体或表达盒在构建通用型 PSCs 细胞库中的应用。

第二十一方面，本发明提供第一方面所述的通用型细胞、第五方面所述的组合物或第八方面所述的表达载体或表达盒作为基因药物载体的应用。

本发明的有益效果：

本发明在干细胞中失活主要组织相容性复合体 MHC-I 和 II 类基因后，过表达由 CD47 和 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白 XSG006，获得的人多能干细胞可在逃逸 T 细胞攻击的基础上，进一步逃逸 NK 细胞的杀伤，其效果甚至优于已经报道的阳性靶点 CD47 和 CD24。同时这些低免疫原性的多能干细胞保留了其干性和分化能力。融合蛋白 XSG006 过表达的 DKO+G6 细胞分化的神经细胞相较于 WT 分化的神经细胞，可在体内有效逃逸免疫系统的攻击。

附图说明

图 1. 人胚胎干细胞系 H1 中 B2M 基因敲除策略及结果图；

图 2. 人胚胎干细胞系 H1 中 CIITA 基因敲除策略及结果图；

图 3. 实施例 1 中使用 RT-qPCR 检测 DKO 细胞中 B2M 和 CIITA 在 RNA 水平的表达图；

图 4. 实施例 1 中使用 Western-blot 检测 B2M 蛋白水平的结果图；

图 5. 实施例 1 中用 INF-gamma 刺激野生型 H1（WT）及 DKO，通过流式细胞计数仪检测各种细胞中 HLA-I/II 的表达图；

其中，T 细胞为检测 HLA-I/II 类分子的阳性对照；

图 6. 实施例 1 中获得的 B2M/CIITA 双等位基因敲除阳性克隆（DKO）核型图；

图 7. 实施例 2 中利用免疫荧光和 RT-qPCR 检测 WT 和 DKO 细胞在 RNA 和蛋白水平干性基因 POU5F1/NANOG/SOX2 的表达图；

其中 MSC 为阴性对照；

图 8. 实施例 2 中利用免疫荧光检测 WT 和 DKO 细胞表面干性基因 SSEA-4 和 Tra1-81 的表达图。

图 9. 使用免疫组化显示 DKO 细胞可形成具有内、中、外三个胚层的畸胎瘤；

图 10. 实施例 2 中采用 RTCA 检测对 DKO 细胞免疫功能进行验证的结果图；

图 11. pGC-EF1a 质粒结构示意图；

图 12. 流式细胞计数仪检测实施例 3 中构建的 DKO + CD47 细胞系 CD47 的表达图；

图 13.实施例 3 中 RTCA 检测 NK 细胞对过表达 CD47 的 DKO+CD47 细胞株、WT、DKO 细胞的杀伤结果图；

图 14. 实施例 4 中 RTCA 检测 NK 细胞对过表达 XSG1-XSG20 融合蛋白的细胞株 DKO+G1-G20、H1WT（阳性对照）、H1 DKO 细胞（阴性对照）的杀伤结果图。

图 15. 实施例 5 中对构建的 DKO+G6 细胞株基因组进行序列 PCR 鉴定。

图 16. 实施例 5 中 RTCA 检测 NK 细胞对过表达 XSG006 蛋白的 DKO+G6 细胞株、WT、DKO 细胞的杀伤结果图。

图 17. 实施例 6 中 RTCA 检测 NK 细胞对过表达 XSG006 蛋白的 DKO+G6 细胞株、WT、DKO、过表达 CD24 或 CD47 蛋白的 DKO+CD24/CD47 细胞的杀伤结果图；

A 为杀伤结果图；B 为多次结果汇总图。

图 18. 实施例 7 中 RTCA 检测 NK 细胞对过表达 XSG006 蛋白的 DKO+G6 细胞株、WT、DKO、过表达 CD24 或 CD47 蛋白的 DKO+CD24/CD47 细胞、过表达 CD24 和 CD47 蛋白的 DKO+ CD47+CD24 细胞的杀伤结果图；

A 为杀伤结果图；B 为多次结果汇总图。

图 19. 实施例 8 中 DKO+G6 分化的神经细胞在人源免疫系统小鼠中的免疫逃逸作用验证结果图；

具体实施方式

下文将结合具体实施例对本发明的技术方案做更进一步的详细说明。应当理解，下列实施例仅为示例性地说明和解释本发明，而不应被解释为对本发明保护范围的限制。凡基于本发明上述内容所实现的技术均涵盖在本发明旨在保护的范围内。

除非另有说明，以下实施例中使用的原料和试剂均为市售商品，或者可以通过已知方法制备。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 Sambrook 等人，分子克隆：实验室手册（New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press， 1989）中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。

除非另外定义或由背景清楚指示，否则在本公开中的全部技术与科学术语具有如本

公开所属领域的普通技术人员通常理解的相同含义。

实施例 1.构建 B2M 及 CIITA 双敲除细胞系（DKO）

1、细胞培养试剂：

试剂名称	公司
mTeSR™ Plus	Stemcell
TrypLE™ Express 酶 （1X），无酚红	ThermoFisher
DPBS，无钙、无镁	ThermoFisher
Matrigel® hESC-Qualified Matrix，*LDEV-Free， 5mL	Corning®
DMEM/F-12，GlutaMAX™ 添加剂	ThermoFisher
Y-27632	Stemcell
TrueCut™ Cas9 Protein v2	ThermoFisher
EasyEdit sgRNA	金斯瑞

2、方法及结果：

本发明选用了人多能干细胞系H1（Wicell，WA01）或H9（Wicell，WA09），使用CRISPR/CAS9敲除内质网中β-2-微球蛋白（B2M），使细胞表面MHC-I不能形成功能性分子，从而逃逸同种异体$CD8^+$ T细胞的杀伤；逃逸$CD4^+$ T细胞的杀伤则是通过敲除MHC-II基因转录的正调节因子CIITA，而降低MHC-II类分子表达。

其中，B2M的CRISPR/CAS9基因敲除策略如图1所示，使用B2M-gRNA1和B2M-gRNA2对B2M 外显子区段进行两端直接敲除，然后分别使用B2M-F1/R1和B2M-F2/R2两对PCR 引物进行基因组序列敲除验证。

gRNA序列:

B2M-gRNA1：CGTGAGTAAACCTGAATCTT

B2M-gRNA2：AGTCACATGGTTCACACGGC

鉴定引物

B2M-F1:TGGGGCCAAATCATGTAGACTC

B2M-R1:TCAGTGGGGGTGAATTCAGTGT

B2M-F2 + B2M-R2=608bp

敲除后：无条带

B2M-F2 : CAGAAGTCCTTGAGAGCCTCC

B2M-R2: TGTGCATCAGTATCTCAGCAGG

B2M-F2 + B2M-R2=812 bp

敲除后：569bp。

另外，CIITA的CRISPR/CAS9基因敲除策略如图2所示，使用CIITA-gRNA1和CIITA-gRNA2对CIITA外显子区段进行两端直接敲除，然后分别使用CIITA-F1/R1和CIITA-F2/R2两对PCR引物进行基因组序列敲除验证。

gRNA序列:

CIITA-gRNA1: GATATTGGCATAAGCCTCCC

CIITA-gRNA2: CATCGCTGTTAAGAAGCTCC

鉴定引物：

CIITA-F1: CTGTGCCTCTACCACTTCTATG

CIITA-R1: CCTTCCATGTCACACAACAGCC

CIITA-F1 + CIITA-R1=368 bp

敲除后：无条带

CIITA-F2: TGGAATCCACACTTTCCAGTTC

CIITA-R2: TGGAGTCTCCGTTCCTCCAG

CIITA-F2 + CIITA-R2=889 bp

敲除后：459bp

具体操作如下：

1）在Matrigel包被的6孔板上正常使用mTeSR1培养人类多能干细胞至80%密度。使用TRYPLE消化后加入DMEM/F12中和，计数。吸取2×10^6细胞于EP管中，离心后弃上清。

2）根据Neon转染系统100μL电转体系，加入15μg TrueCut™ Cas9 Protein+ 3μg gRNA（B2MgRNA1 + B2MgRNA2 + CIITA gRNA1 + CIITA gRNA2 ）组成RNP体系，混匀室温下放置20min。

3）100μL RNP电转体系重悬细胞，Neon 转染系统进行电转，电转参数为1200V，

30ms，1pause。电转后细胞迅速加入提前预热的培养基，均匀接种于1孔包被了Matrigel的6孔板中。

4）每天更换新鲜mTeSR1培养基。待单细胞生长起来，挑取单个克隆于48孔板内，待克隆扩增后，收取基因组样品进行PCR检测基因编辑情况，PCR结果如图1和2所示。PCR阳性克隆送公司做Sanger测序进一步验证。

5）鉴定阳性的B2M/ CIITA双等位基因敲除克隆DKO扩增培养及冻存。

使用qPCR检测B2M/ CIITA双等位基因敲除克隆DKO的B2M和CIITA在RNA水平的表达情况，如图3所示，确定敲除。

B2M-F:AAGATGAGTATGCCTGCCGT

B2M-R: ATGCGGCATCTTCAAACCTC

CIITA-F: CCTGGAGCTTCTTAACAGCGA

CIITA-R: TGTGTCGGGTTCTGAGTAGAG

使用Western-Blot检测B2M/CIITA双等位基因敲除克隆DKO的B2M蛋白水平的表达情况，如图4所示，确定敲除。

使用INF-gamma刺激WT及DKO：细胞铺板，第二天换液时将含有INF-gamma的培养基加入到细胞中，作用48h后将细胞消化后使用流式检测HLA-I/II的表达情况。结果如图5显示B2M/CIITA双等位基因敲除的干细胞阳性克隆（DKO）不能响应INF-gamma的刺激而表达HLA-I/II类分子。T细胞为检测HLA-I/II类分子的阳性对照。

对获得的B2M/CIITA双等位基因敲除阳性克隆（DKO）进行核型检测：用胰蛋白酶处理固定于载玻片上的染色体标本，再用Giemsa染液染色。将分裂中期染色体进行染色体数目、形态结构分析，确定其核型是否与正常核型一致。结果如图6所示，DKO核型正常。

实施例2. 验证实施例1中DKO细胞系的干性和免疫功能

1、WT和DKO细胞中干性基因的表达

免疫荧光检测显示WT和DKO细胞在蛋白水平表达干性基因POU5F1和NANOG：将细胞铺板在12孔板中，待细胞长到60-80%的密度后吸去培养基，加入4%多聚甲醛进行固定。细胞破膜后使用POU5F1和NANOG的一抗在4℃过夜孵育，洗去一抗后室温孵育带有荧光标记的二抗，随后使用荧光显微镜进行拍照。结果如图7A所示。RT-qPCR检测显示WT和DKO细胞在RNA水平表达干性基因POU5F1、NANOG和SOX2：结果如图7B

所示。（MSC为干性基因表达的阴性对照）

流式结果检测显示WT和DKO细胞表面均高表达干性基因SSEA-4和Tra1-81占比分别为100%，99.98%和96.75%，99.13%。结果如图8所示。

2、获得的B2M/CIITA双等位基因敲除阳性克隆（DKO）的分化能力

在免疫缺陷小鼠（SCID Beige）皮下注射100μL含5E+5 DKO细胞的悬液，待畸胎瘤体积大于1.5cm^{3}后取出，并进行切片染色。

获得的B2M/CIITA双等位基因敲除阳性克隆（DKO）可以在体内形成畸胎瘤并分化出内中外三胚层的细胞。如图9所示。

3、DKO细胞免疫功能验证

T细胞及NK细胞的杀伤性实验使用xCELLigence RTCA Instrument。将相同数量WT和DKO细胞系使用含有IL-2的Essential 8培养基重悬，并接种于用基质胶包被的96-well E-plates，加入活化的T细胞或NK细胞进行杀伤检测。RTCA检测数据使用xCELLigence软件进行分析，计算杀伤率和逃逸功能。

名称	货号（Cat No.）	规格	厂家
PE anti-human CD4	980804	500 μL/管	Biolegend
APC anti-human CD8	980904	500 μL/管	Biolegend
FITC anti-human CD3	300440	500 tests	Biolegend
APC anti-human CD16	301012	100 tests	Biolegend
PE anti-human CD56（NCAM）	318306	100 tests	Biolegend
human IL-2	202-1L-050/CF	50 μg	R&D
Y-27632 2HCl	S1049	5 mg	Selleck
基质胶	354277	5 ml	Gibco
Essential 8™ 培养基	A1517001	500 ml	Gibco
E-Plate VIEW 96 PET	300601030	6 块/盒	Agilent

如图10的RTCA数据显示，WT细胞因为有HLA-I的表达而逃逸NK细胞的杀伤，但会被T细胞杀伤。DKO细胞能逃逸T细胞杀伤，同时对NK细胞的杀伤更为敏感。

实施例3. DKO + CD47细胞系的构建及免疫功能验证

在实施例1获得的DKO细胞中使用慢病毒载体过表达CD47（NM_198793），所述CD47的氨基酸序列如SEQ ID NO.29，将过表达序列的cDNA（SEQ ID NO.30）构建在由EF1a启动，且带puromycin筛选标记的慢病毒质粒中（pGC-EF1a），pGC-EF1a质粒的结构如图11所示。质粒用*BamH*I / *Nhe*I 酶切，连接成功后采用Sanger测序验证插入序列正确性并进行病毒包装。对实施例2构建的 DKO人类多能干细胞进行转染，24h换液，48h后换成带puromycin的培养基进行筛选。构建的稳转株细胞DKO+CD47的结果如图12所示，确认表达无误后进行细胞扩增和后续功能性检测。

参照实施例2，使用RTCA检测过表达的DKO+CD47细胞株是否可以在逃逸T细胞杀伤的同时成功逃逸NK细胞的杀伤，如图13所示，NK细胞可有效杀伤DKO细胞，WT和DKO+CD47过表达细胞可逃逸NK杀伤。

实施例4. 表达包含CD47和CD24的功能结构域的融合蛋白的通用型细胞的筛选

本发明融合蛋白的构建策略及筛选：

CD24 是一种前体蛋白，包含一个信号肽区域和糖基磷脂酰肌醇(GPI)膜锚定序列，通过切割后成为成熟有功能的CD24蛋白(Chen et al., 2014; Pirruccello and LeBien, 1986)。CD24有多个潜在O-和N-糖基化位点的糖蛋白，其可以被唾液酸化，从而与唾液酸识别受体Siglec 10（唾液酸结合 Ig 样凝集素 10）结合，与巨噬细胞相互作用以抑制吞噬作用(Barkal et al., 2019)。

CD47是一个具有胞外N-末端IgV结构域、5个跨膜结构域和胞内C-末端的跨膜蛋白(Logtenberg et al., 2020)。N-末端IgV结构域可与免疫抑制剂受体SIRPA(信号调节蛋白α)相互作用，抑制免疫反应(Jaiswal et al., 2009)。

本发明的策略是组合已知的CD24及CD47功能结构域形成多种融合蛋白。每种融合蛋白必须包含至少一个膜锚定或跨膜序列，所述膜锚定或跨膜序列选自CD24或CD47；同时，每种融合蛋白必须包含至少一个Siglec 10或SIRPα受体识别序列，所述受体识别序列选自CD24或CD47。各结构域均通过柔性蛋白进行链接最终形成融合蛋白XSG01-XSG20，依照实施例3的方式，在实施例2制备的H1 DKO细胞中通过慢病毒感染的方式进行过表达融合蛋白XSG001-XSG020，形成所有融合蛋白稳转细胞株DKO+G1-G20。

以下列举6种融合蛋白的构建策略和具体序列：

1、融合蛋白XSG006，所述由CD47和CD24的功能结构域构建的融合蛋白是将CD24的成熟肽序列和CD47跨膜结构域连接，其氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示。

2、融合蛋白XSG007，所述由CD47和CD24的功能结构域构建的融合蛋白是将CD47的SIRPα结合域和CD24的膜锚定序列连接，其氨基酸序列如SEQ ID NO.35所示。

3、融合蛋白XSG009，所述由CD47和CD24的功能结构域构建的融合蛋白是将CD47的SIRPα结合域插入至CD24的胞外序列和膜锚定序列的链接位点，其氨基酸序列如SEQ ID NO.36所示。

4、融合蛋白XSG010，所述由CD47和CD24的功能结构域构建的融合蛋白是将CD47链接到CD24的胞外序列后，其氨基酸序列如SEQ ID NO.37所示。

5、融合蛋白XSG011，所述由CD47和CD24的功能结构域构建的融合蛋白是将CD24成熟肽链接到CD47的SIRPα结合域后，其氨基酸序列如SEQ ID NO.38所示。

6、融合蛋白XSG012，所述由CD47和CD24的功能结构域构建的融合蛋白是将CD24的胞外成熟肽插入到CD47的SIRPα结合域和跨膜结构域链接点其氨基酸序列如SEQ ID NO.39所示。

表1.部分融合蛋白的氨基酸序列

序列号	氨基酸序列	融合蛋白名称
SEQ ID NO.1	MGRAMVARLGLGLLLLALLLPTQIYSSETTTGTSSNSSQSTSNSGLAPNPTNATTKAAG**GGGGSGGGGSGGGGS**NILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIVTSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFV	XSG006
SEQ ID NO.35	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETIIELKYRVVSWFSPNE**GGGGSGGGGSGGGGS**TNATTKAAGGALQSTASLFVVSLSLLHLYS	XSG007
SEQ ID NO.36	MGRAMVARLGLGLLLLALLLPTQIYSSETTTGTSSNSSQSTSNSGLAPNP**GGGGSGGGGSGGGGSQ**LLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETIIELKYRVVSWFSPNE**GGGGSGGGGSGGGGS**TNATTKAAGGALQSTASLFVVSLSLLHLYS	XSG009

SEQ ID NO.37	MGRAMVARLGLGLLLLALLLPTQIYSSETTTGTSSNSSQSTSNS GLAPNPGGGGSGGGGSGGGGSQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIP CFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDFSS AKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETII ELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGGM DEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIVTST GILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVVGLSLCIAACIP MHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFV	XSG010
SEQ ID NO.38	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFV TNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDFSSAKI EVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETIIELK YRVVSWFSPNE**GGGGSGGGGSGGGGS**SETTTGTSSNSSQSTS NSGLAPNPTNATTKAAGGALQSTASLFVVSLSLLHLYS	XSG011
SEQ ID NO.39	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFV TNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDFSSAKI EVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETIIELK YRVVSWFSPNE**GGGGSGGGGSGGGGS**SETTTGTSSNSSQSTS NSGLAPNP**GGGGSGGGGSGGGGSS**NILIVIFPIFAILLFWGQFGI KTLKYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKN ATGLGLIVTSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAV VGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFV	XSG012

对细胞株DKO+G1-G20分别进行如实施例2所示的NK细胞杀伤功能检测，拟筛选出对NK细胞的逃逸程度最优的的融合蛋白。结果如图14所示，有且只有DKO+G6多次杀伤均小于阳性对照H1 WT的平均杀伤率，为逃逸NK杀伤的最优细胞。

实施例5. DKO + G6 细胞系的构建及免疫功能验证

直接合成编码XSG006（XSG006的氨基酸序列如SEQ ID NO：1所示）的核酸序列并构建在由EF1a启动，且带puromycin筛选标记的慢病毒质粒中（pGC-EF1a），pGC-EF1a质粒的结构如图11所示。质粒用*BamH*I / *Nhe*I 酶切，连接成功后采用Sanger测序验证插入序列正确性并进行病毒包装。对实施例2获得的DKO人类多能干细胞进行转染后换成带puromycin的培养基进行筛选。XSG006为完全外源序列，构建的DKO+G6细胞使用PCR检测序列在基因组中的插入情况，DKO细胞为阴性对照，结果如图15所示，确认表达无误后进行细胞扩增和后续功能性检测。

XSG006 F1：CCAGATCTACAGCAGCGAGA

XSG006 R1：GTTCTTCAGGCTGTACTCGC

XSG006 F+XSG006 R=352bp

XSG006 F2：CCAGATCTACAGCAGCGAGA

XSG006 R2：CCAGGATGTAGGCGATCACC

XSG006 F+XSG006 R=488bp

参照实施例 2，在 RTCA 检测的 NK 细胞杀伤性实验中，实施例 2 构建的 DKO 细胞被 NK 细胞完全杀伤，H1WT、DKO+G6 成功逃逸。逃逸程度为 DKO+G6 略优于 H1 WT。如图 16 所示。

实施例6. NK细胞杀伤性实验比较几种细胞系NK逃逸程度

本实施例涉及细胞系：实施例3中的DKO+CD47、DKO+CD24、现有技术(WO2020018615A2)中的DKO+CD47（以下简称“CD47现有技术”），其中现有技术中的DKO+CD47细胞系中的CD47的氨基酸序列如SEQ ID NO.40所示，通过与免疫细胞表面的信号调节蛋白α(SIRPα)相互作用来促进免疫逃逸，“CD47现有技术”细胞系的构建按照WO2020018615A2中的记载完成。在B2M和CIITA双敲的细胞（DKO）中过表达CD47可以成功逃逸T及NK细胞的杀伤。（PMID: 32433947/PMID: 30778232）。

CD24通过与免疫细胞表面的抑制性受体唾液酸结合Ig样凝集素 10 (Siglec-10) 相互作用来促进免疫逃（PMID: 31367043）。本实施例中的细胞系DKO+CD24中的CD24的氨基酸序列如SEQ ID NO.41所示，其构建方法参照实施例3。

同时将多次重复实验归一至每次 DKO 杀伤，杀伤结果汇总后显示 DKO+G6 杀伤比例最小，且与 WT、DKO+CD24、“CD47 现有技术”相比具有显著性差异。如图 17 所示。

实施例 7. NK 细胞杀伤性实验比较 DKO+G6 和 DKO+CD47+CD24 细胞系 NK 逃逸程度

DKO+CD47+CD24 细胞系为实施例 3 的基础上通过慢病毒转染的方式进一步过表达 CD24，慢病毒构建及过表达操作参考实施例 3，CD24 的氨基酸序列为 MGRAMVARLGLGLLLLALLLPTQIYSSETTTGTSSNSSQSTSNSGLAPNPTNATTKAA GGALQSTASLFVVSLSLLHLYS。通过 NK 细胞杀伤性实验比较 DKO+G6 与 DKO+CD47+CD24，DKO+G6 细胞杀伤比例小，逃逸效果更佳。如图 18 所示。

实施例 8. DKO+G6 分化的神经细胞在人源免疫系统小鼠中的免疫逃逸作用验证

将 WT 及 DKO+G6 细胞传代后铺至已预包被 Matrigel 的培养瓶中，培养 24h 后换至预分化培养基，诱导细胞向中脑细胞分化

（ Nolbrant S, Heuer A, Parmar M, Kirkeby A. Generation of high-purity human ventral midbrain dopaminergic progenitors for in vitro maturation a nd intracerebral transplantation. Nat Protoc. 2017 Sep;12(9):1962-1979. doi: 1 0.1038/nprot.2017.078. Epub 2017 Aμg 31. PMID: 28858290）；在分化 9d 后，可获得高纯度的中脑细胞。其后，通过加入神经祖细胞培养基对获得的中脑细胞进行扩增，可获得大量的高纯度的神经祖细胞；最后，再通过加入神经前体细胞培养基，神经祖细胞进一步分化成为神经细胞。将携带荧光素酶(luc)的慢病毒感染分化的 WT 和 DKO+G6 细胞，然后将表达 luc 的细胞移植到 $CD34^{+}$HSC 重建的人源免疫系统小鼠上。通过腹腔注射 luc 的发光底物 D-荧光素(A025011，上海翊圣生物科技有限公司)，并使用活体成像仪(iVIS spectrum, PerkinElmer)检测细胞的荧光强度，可指示细胞在小鼠体内的存活情况。持续检测移植部位荧光 51 天，WT 分化的神经细胞荧光值趋于背景值，而 DKO+G6 分化的神经细胞移植后可以检测到持续上升的荧光值，说明 DKO+G6 分化的神经细胞相较于 WT 分化的神经细胞，可在体内有效逃逸免疫系统的攻击。如图 19 所示。

以上，对本发明的实施方式进行了说明。但是，本发明不限定于上述实施方式。凡在本发明的精神和原则之内，所做的任何修改、等同替换、改进等，均应包含在本发明的保护范围之内。

权 利 要 求

1. 一种通用型细胞，其特征在于，相对于野生型细胞，包含：

1）MHC-I 和/或 MHC-II 人类白细胞抗原的表达降低或不表达；

2）表达包含免疫抑制检查点的融合蛋白；

所述细胞能逃逸 T 细胞攻击及 NK 细胞的杀伤；

优选地，所述包含免疫抑制检查点的融合蛋白包括 PD-L1、CTLA4-Ig、CD47、CD24 中的两种及两种以上；优选地，表达包含 2 种所述免疫抑制检查点的融合蛋白；更优选，表达包含 CD47 和/或 CD24 的功能结构域的融合蛋白。

2. 根据权利要求 1 所述的通用型细胞，其特征在于，所述细胞包括 MHC-I 和 MHC-II 人类白细胞抗原的表达降低或不表达。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的通用型细胞，其特征在于，所述细胞中使用基因编辑工具靶向编码 MHC-I 的一种或多种转录调节因子的一个或多个基因，或编码 MHC-II 的一种或多种转录调节因子的一个或多个基因，来实现 MHC-I 和/或 MHC-II 基因的表达降低或不表达；

优选地，所述 MHC-I 的转录调节因子选自：B2M、TAP1、TAP2、TAP 相关糖蛋白（Tapasin）或 NLRC5 中的一个或多个；所述 MHC-II 的转录调节因子选自：CIITA、RFXANK、RFX5、RFXAP 中的一个或多个；

进一步优选地，所述转录调节因子为 B2M 和 CIITA。

4. 根据权利要求 3 所述的通用型细胞，其特征在于，所述细胞还包括通过选择性灭活 CIITA 基因的稀有切割核酸内切酶靶向 CIITA 基因的遗传修饰。

5. 根据权利要求 1-4 任一项所述的通用型细胞，其特征在于，所述细胞还包括通过选择性灭活 B2M 基因的稀有切割核酸内切酶靶向 B2M 基因的遗传修饰。

6. 根据权利要求 4 或 5 所述的通用型细胞，其特征在于，所述稀有切割核酸内切酶选自 CAS 蛋白，TALE-核酸酶，锌指核酸酶，大核酸酶和归巢核酸酶。

7. 根据权利要求 6 所述的通用型细胞，其特征在于，其中通过稀有切割内切核酸酶靶向 CIITA 基因或 B2M 基因的遗传修饰包括 CAS 蛋白或编码 CAS 蛋白的多核苷酸，和至少一个用于特异性靶向 CIITA 基因或 B2M 基因的导向核糖核酸序列。

8. 根据权利要求 7 所述的通用型细胞，其特征在于，使用 CRISPR/CAS9 系统分别

对 B2M 和 CIITA 外显子区段进行两端直接敲除，其中，针对 B2M 基因的导向核糖核酸序列 gRNA 的靶序列为 SEQ ID NO:2 和 3，针对 CIITA 基因的导向核糖核酸序列 gRNA 的靶序列为 SEQ ID NO:4 和 5。

9. 根据权利要求 1 或 2 所述的通用型细胞，其特征在于，所述细胞中通过引入针对编码 MHC-I 的一种或多种转录调节因子的一个或多个基因的基因表达修饰分子，或编码 MHC-II 的一种或多种转录调节因子的一个或多个基因的基因表达修饰分子，来实现 MHC-I 和/或 MHC-II 基因的表达降低或不表达，其中所述基因表达修饰分子包括选自 siRNA，shRNA，microRNA，反义 RNA 和另一种 RNA 介导的抑制分子中的一种。

10. 根据权利要求 1-9 任一项所述的通用型细胞，其特征在于，所述包含 CD47 和/或 CD24 的功能结构域的融合蛋白中的 CD47 的功能结构域为 CD47 跨膜结构域；优选地，所述 CD47 跨膜结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO：6-10 任一项所示。

11. 根据权利要求 1-10 任一项所述的通用型细胞，其特征在于，所述包含 CD47 和/或 CD24 的功能结构域的融合蛋白中的 CD24 的功能结构域为 CD24 的信号肽序列、CD24 成熟肽、CD24 胞外肽、CD24 膜锚定序列、CD24 胞外成熟肽，优选地，所述 CD24 的功能结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO：11-16 任一项所示。

12. 根据权利要求 11 所述的通用型细胞，其特征在于，所述由 CD47 和 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白是将 CD47 的 SIRPα 结合域和 CD24 的膜锚定序列连接。

13. 根据权利要求 11 所述的通用型细胞，其特征在于，所述由 CD47 和 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白是将 CD47 的 SIRPα 结合域插入至 CD24 的胞外序列和膜锚定序列的链接位点。

14. 根据权利要求 11 所述的通用型细胞，其特征在于，所述由 CD47 和 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白是将 CD47 的 SIRPα 结合域链接到 CD24 的胞外序列后。

15. 根据权利要求 11 所述的通用型细胞，其特征在于，所述由 CD47 和 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白是将 CD24 成熟肽链接到 CD47 的 SIRPα 结合域后。

16. 根据权利要求 11 所述的通用型细胞，其特征在于，所述由 CD47 和 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白是将 CD24 的胞外成熟肽插入到 CD47 的 SIRPα 结合域和跨膜结构域链接点。

17. 根据权利要求 11 所述的通用型细胞，其特征在于，所述由 CD47 和 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白是将 CD24 的成熟肽序列和 CD47 跨膜结构域连接；

优选地，所述由 CD47 和 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白的氨基酸序列与如

SEQ ID NO:1 所示的序列具有 70%以上的同源性，例如 80%以上的同源性，再例如 90%以上、95%以上、98%以上的同源性；

进一步优选地，所述由 CD47 和 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示。

18. 根据权利要求 1-17 任一项所述的通用型细胞，其特征在于，所述细胞还包括修饰以增加以下一种或多种多肽的表达：CD35，CD27，DUX4，CD26，CD55，CD59，CD200,HLA-C，HLA-E，HLA-E 重链，HLA-G，PD-L1，IDOl，IDO2，TDO，CTLA4-IgG ，Cl-抑制剂，IL-10，CD46，CD55，CD59，CCL21，Mfge8，SerpinB9 和 IL-35。

19. 根据权利要求 1-18 任一项所述的通用型细胞，其特征在于，所述细胞是胚胎干细胞或多能干细胞；优选为低免疫原性干细胞；进一步优选为人类干细胞或人类体细胞。

20. 一种权利要求 1-19 任一项所述的通用型细胞的制备方法，其特征在于，包含如下步骤：

1）敲除干细胞的 MHC-I 的一种或多种转录调节因子的一个或多个基因；和/或，

2）敲除干细胞的 MHC-II 的一种或多种转录调节因子的一个或多个基因；

3）在干细胞中引入编码包含免疫抑制检查点蛋白的核酸序列；

优选地，所述免疫抑制检查点蛋白包括 PD-L1、CTLA4-Ig、CD47、CD24 中的一种或多种；优选地，引入编码包含 2 种所述免疫抑制检查点的融合蛋白的核酸序列；更优选地，引入包含 CD47 和/或 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白的核酸序列。

21. 根据权利要求 20 所述的通用型细胞的制备方法，其特征在于，所述 MHC-I 的转录调节因子选自：B2M、TAP1、TAP2、TAP 相关糖蛋白（Tapasin）或 NLRC5 中的一个或多个；所述 MHC-II 的转录调节因子选自：CIITA、RFXANK、RFX5、RFXAP 中的一个或多个；优选地，所述转录调节因子选自 B2M 和 CIITA。

22. 根据权利要求 20 或 21 所述的制备方法，其特征在于，步骤 1）或 2）所述的敲除为通过选择性灭活 CIITA 基因或 B2M 基因的稀有切割核酸内切酶靶向 CIITA 基因或 B2M 基因的遗传修饰；

优选地，所述稀有切割核酸内切酶选自 CAS 蛋白，TALE-核酸酶，锌指核酸酶，大核酸酶和归巢核酸酶；

进一步优选地，其中通过稀有切割内切核酸酶靶向 CIITA 基因或 B2M 基因的遗传修饰包括 CAS 蛋白或编码 CAS 蛋白的多核苷酸，和至少一个用于特异性靶向 CIITA 基因或 B2M 基因的导向核糖核酸序列；

更进一步优选地，步骤 1）和 2）使用 CRISPR 系统分别对 B2M 和 CIITA 外显子区段进行两端直接敲除，其中，针对 B2M 基因的 gRNA 的靶序列为 SEQ ID NO:2 和 3，针对 CIITA 基因的 gRNA 的靶序列为 SEQ ID NO:4 和 5。

23. 根据权利要求 20 或 21 所述的制备方法，其特征在于，步骤 1）或 2）所述的敲除为通过引入针对编码 MHC-I 的一种或多种转录调节因子的一个或多个基因，或编码 MHC-II 的一种或多种转录调节因子的一个或多个基因的基因表达修饰分子，来实现 MHC-I 和/或 MHC-II 基因的表达降低或不表达，其中所述基因表达修饰分子包括选自 siRNA，shRNA，microRNA，反义 RNA 和另一种 RNA 介导的抑制分子中的一种。

24. 根据权利要求 20-23 任一项所述的制备方法，其特征在于，所述步骤 3）采用表达载体将编码包含 CD47 和/或 CD24 的功能结构域的融合蛋白的核酸序列引入干细胞中；

优选地，所述步骤 3）采用的表达载体为病毒载体；

进一步优选地，所述病毒载体为慢病毒。

25. 根据权利要求 20-24 任一项所述的制备方法，其特征在于，所述步骤 3）将编码包含 CD47 和/或 CD24 的功能结构域的融合蛋白的核酸序列导入所述干细胞的选定位点；优选地，所述干细胞的选定位点是安全港基因位点。

26. 根据权利要求 20-25 任一项所述的制备方法，其特征在于，所述包含 CD47 和/或 CD24 的功能结构域的融合蛋白中的 CD47 的功能结构域为 CD47 跨膜结构域；优选地，所述 CD47 跨膜结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO：6-10 任一项所示。

27. 根据权利要求 20-26 任一项所述的制备方法，其特征在于，所述包含 CD47 和/或 CD24 的功能结构域的融合蛋白中的 CD24 的功能结构域为 CD24 的信号肽序列、CD24 成熟肽、CD24 胞外肽、CD24 膜锚定序列、CD24 胞外成熟肽，优选地，所述 CD24 的功能结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO：11-16 任一项所示。

28. 根据权利要求 27 所述的制备方法，其特征在于，所述由 CD47 和 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白是将 CD47 的 SIRPα 结合域和 CD24 的膜锚定序列连接。

29. 根据权利要求 27 所述的制备方法，其特征在于，所述由 CD47 和 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白是将 CD47 的 SIRPα 结合域插入至 CD24 的胞外序列和膜锚定序列的链接位点。

30. 根据权利要求 27 所述的制备方法，其特征在于，所述由 CD47 和 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白是将 CD47 的 SIRPα 结合域链接到 CD24 的胞外序列后。

31. 根据权利要求 27 所述的制备方法，其特征在于，所述由 CD47 和 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白是将 CD24 成熟肽链接到 CD47 的 SIRPα 结合域后。

32. 根据权利要求 27 所述的制备方法，其特征在于，所述由 CD47 和 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白是将 CD24 的胞外成熟肽插入到 CD47 的 SIRPα 结合域和跨膜结构域链接点。

33. 根据权利要求 27 所述的制备方法，其特征在于，所述由 CD47 和 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白是将 CD47 跨膜结构域和 CD24 的成熟肽序列连接；优选地，所述由 CD47 和 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白与如 SEQ ID NO:1 所示的序列具有至少 70%以上的同源性，例如 80%以上的同源性，再例如 90%以上、95%以上、98%以上的同源性；进一步优选地，所述由 CD47 和 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示。

34. 根据权利要求 20-33 任一项所述的制备方法，其特征在于，所述通用型干细胞还包括第二表达载体，其包含编码选自 CD35，CD27，DUX4，CD26，CD55，CD59，CD200,HLA-C，HLA-E，HLA-E 重链，HLA-G，PD-L1，IDOl，IDO2，TDO，CTLA4-IgG ，Cl-抑制剂，IL-10，CD46，CD55，CD59，CCL21，Mfge8，SerpinB9 和 IL-35 中的一种的多核苷酸序列。

35. 根据权利要求 34 所述的制备方法，其特征在于，所述第二表达载体是诱导型表达载体；优选地，所述第二表达载体是病毒载体。

36. 一种制备分化的通用型细胞的方法，包括在分化条件下培养根据权利要求 20-35 中任一项的方法制备的通用型细胞，从而制备分化的低免疫原性细胞。

37. 如权利要求 36 所述的方法， 其中所述分化条件适于将细胞分化为选自心肌细胞，神经细胞，胶质细胞，内皮细胞，T 细胞，NK 细胞，NKT 细胞，巨噬细胞，造血祖细胞，间充质细胞，胰岛细胞，软骨细胞，视网膜色素上皮细胞，肾细胞，肝细胞，甲状腺细胞，皮肤细胞，血细胞和上皮细胞的细胞类型。

38. 一种治疗需要细胞治疗的患者的方法，包括给予根据权利要求 36 或 37 的方法制备的分化的低免疫原性细胞群。

39. 一种组合物，其特征在于，所述组合物包含权利要求 1-29 任一项所述的通用型细胞；优选地，所述组合物还包含一种或多种治疗剂；优选地，所述治疗剂包含肽、细胞因子、检查点抑制剂、丝裂原、生长因子、小 RNA、双链 RNA(double stranded RNA；dsRNA)、单核血细胞、饲养细胞、饲养细胞组分或其置换因子、包含一种或多种所关

注多核酸的载体、抗体等。

40. 一种融合蛋白，其特征在于，所述融合蛋白包含 CD47 和/或 CD24 的功能结构域。

41. 根据权利要求 40 所述的融合蛋白，其特征在于，所述包含 CD47 和/或 CD24 的功能结构域的融合蛋白中的 CD47 的功能结构域为 CD47 跨膜结构域；优选地，所述 CD47 跨膜结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO：6-10 任一项所示。

42. 根据权利要求 40 所述的融合蛋白，其特征在于，所述包含 CD47 和/或 CD24 的功能结构域的融合蛋白中的 CD24 的功能结构域为 CD24 的信号肽序列、CD24 成熟肽、CD24 胞外肽、CD24 膜锚定序列、CD24 胞外成熟肽；优选地，所述 CD24 的功能结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO：11-16 任一项所示。

43. 根据权利要求 42 所述的融合蛋白，其特征在于，所述由 CD47 和 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白是将 CD47 的 SIRPα 结合域和 CD24 的膜锚定序列连接。

44. 根据权利要求 42 所述的融合蛋白，其特征在于，所述由 CD47 和 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白是将 CD47 的 SIRPα 结合域插入至 CD24 的胞外序列和膜锚定序列的链接位点。

45. 根据权利要求 42 所述的融合蛋白，其特征在于，所述由 CD47 和 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白是将 CD47 的 SIRPα 结合域链接到 CD24 的胞外序列后。

46. 根据权利要求 42 所述的融合蛋白，其特征在于，所述由 CD47 和 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白是将 CD24 成熟肽链接到 CD47 的 SIRPα 结合域后。

47. 根据权利要求 42 所述的融合蛋白，其特征在于，所述由 CD47 和 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白是将 CD24 的胞外成熟肽插入到 CD47 SIRPα 结合域和跨膜结构域链接点。

48. 根据权利要求 42 所述的融合蛋白，其特征在于，所述由 CD47 和 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白是将 CD47 跨膜结构域插入到 CD24 的信号肽序列和前体蛋白序列链接位点而获得；或者，将 CD47 跨膜结构域和 CD24 的信号肽序列和成熟肽序列连接；优选地，所述融合蛋白的氨基酸序列与如 SEQ ID NO:1 所示的序列具有 70%以上的同源性，例如 80%以上的同源性，再例如 90%以上、95%以上、98%以上的同源性；进一步优选地，所述由 CD47 和 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示。

49. 一种编码权利要求 40-48 任一项所述融合蛋白的核酸序列，其特征在于，所述

核酸序列可以根据权利要求 40-48 任一项所述融合蛋白的氨基酸序列得到。

50. 一种表达载体或表达盒，其特征在于，所述表达盒或表达载体包含权利要求 49 所述的核酸序列。

51. 一种表达权利要求 40-48 任一项所述融合蛋白，并具有表达降低或不表达的 MHC I 类和/或 MHC II 类人白细胞抗原的细胞。

52. 一种不表达 CIITA，表达权利要求 40-48 任一项所述融合蛋白，并且具有表达降低或不表达的 MHC I 类和/或 MHC II 类人白细胞抗原的细胞。

53. 一种不表达 B2M，表达权利要求 40-48 任一项所述融合蛋白，并具有表达降低或不表达的 MHC I 类和/或 MHC II 类人白细胞抗原的细胞。

54. 一种不表达 CIITA 和 B2M，表达权利要求 40-48 任一项所述融合蛋白，并具有表达降低或不表达的 MHC I 类和/或 MHC II 类人白细胞抗原的细胞。

55. 表达权利要求 40-48 任一项所述融合蛋白和至少一种选自：CD35, CD27, DUX4, CD26，CD55，CD59，CD200,HLA-C，HLA-E，HLA-E 重链，HLA-G，PD-L1，IDOl, IDO2, TDO, CTLA4-IgG ，Cl-抑制剂，IL-10，CD46，CD55，CD59，CCL21，Mfge8, SerpinB9 和 IL-35 的多肽，并具有表达降低或不表达的 MHC I 类和/或 MHC II 类人白细胞抗原的的细胞。

56. 一种不表达 CIITA，表达权利要求 40-48 任一项所述融合蛋白和至少一种选自：DUX4，HLA-C，HLA-E，HLA-G，PD-L1，CTLA4，Cl-抑制剂，CD46，CD55，CD59 和 IL-35 的多肽，并且具有表达降低或不表达的 MHC I 类和/或 MHC II 类人白细胞抗原的细胞。

57. 一种不表达 B2M，表达权利要求 40-48 任一项所述融合蛋白和至少一种选自：DUX4，HLA-C，HLA-E，HLA-G，PD-L1，CTLA4，Cl-抑制剂，CD46，CD55，CD59 和 IL-35 的多肽，并且具有表达降低或不表达的 MHC I 类和/或 MHC II 类人白细胞抗原的细胞。

58. 一种不表达 CIITA 和 B2M，表达权利要求 40-489 任一项所述融合蛋白和至少一种选自：DUX4，HLA-C，HLA-E，HLA-G，PD-L1，CTLA4，Cl-抑制剂，CD46，CD55，CD59 和 IL-35 的多肽，并且具有表达降低或不表达的 MHC I 类和/或 MHC II 类人白细胞抗原的细胞。

59. 权利要求 52-58 任一项所述的细胞，其中所述细胞选自干细胞，分化细胞，多能干细胞，诱导的多能干细胞，成体干细胞，祖细胞，体细胞，原代 T 细胞和嵌合抗原

受体 T 细胞。

60. 权利要求 1-19 任一项所述的通用型细胞、权利要求 39 所述的组合物、权利要求 40-48 任一项所述融合蛋白或权利要求 50 所述的表达载体或表达盒、权利要求 52-58 所述的细胞在制备用于细胞治疗的产品中的应用。

61. 权利要求 1-19 任一项所述的通用型细胞、权利要求 39 所述的组合物、权利要求 40-48 任一项所述融合蛋白或权利要求 50 所述的表达载体或表达盒、权利要求 52-58 所述的细胞在制备用于器官移植的产品中的应用。

62. 权利要求 1-19 任一项所述的通用型干细胞、权利要求 39 所述的组合物、权利要求 40-48 任一项所述融合蛋白或权利要求 50 所述的表达载体或表达盒、权利要求 52-58 所述的细胞在构建通用型 PSCs 细胞库中的应用。

63. 权利要求 1-19 任一项所述的通用型干细胞、权利要求 39 所述的组合物、权利要求 40-48 任一项所述融合蛋白或权利要求 50 所述的表达载体或表达盒、权利要求 52-58 所述的细胞作为基因药物载体的应用。

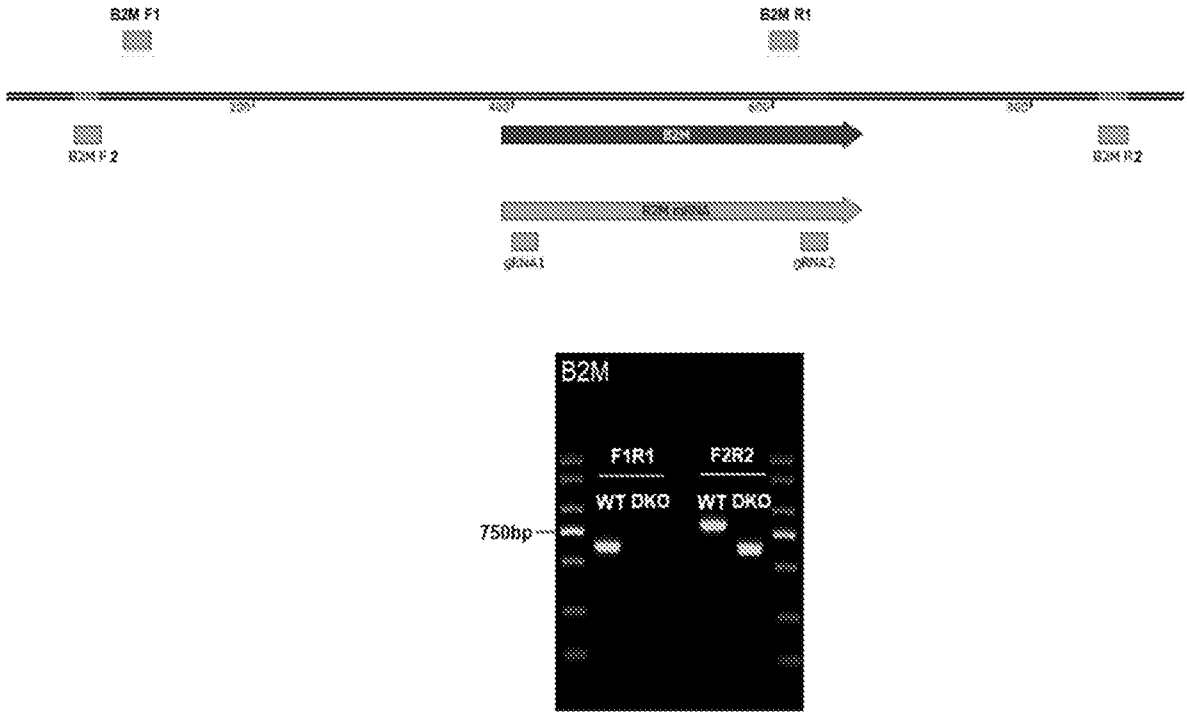

B2M F1
B2M R1
B2M F2
B2M R2
gRNA1
gRNA2
B2M
F1R1
F2R2
WT DKO
WT DKO
750bp

图 1

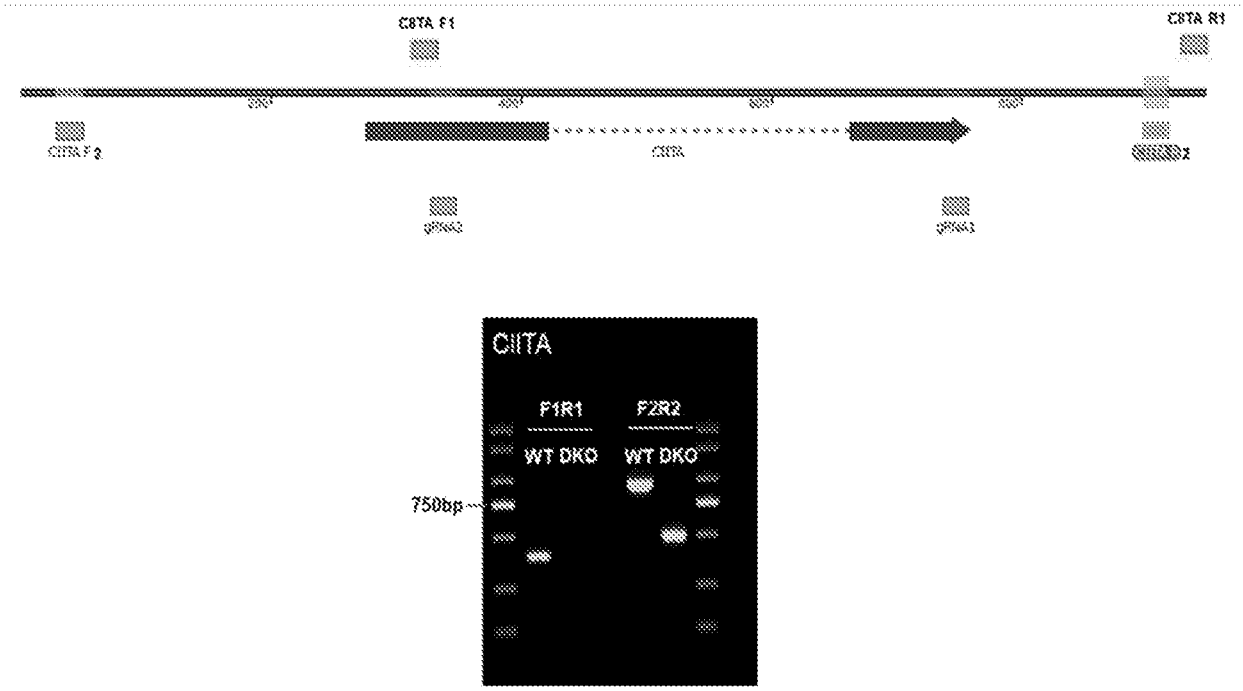

CIITA F1
CIITA R1
CIITA F2
CIITA
gRNA2
gRNA3
CIITA
F1R1
F2R2
WT DKO
WT DKO
750bp

图 2

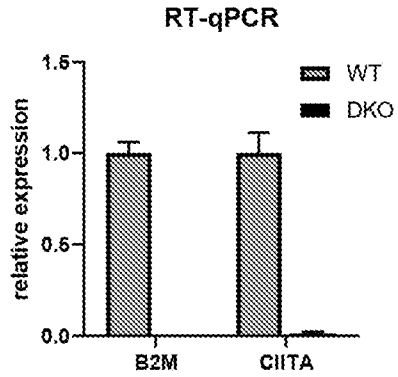

RT-qPCR
relative expression
1.5
1.0
0.5
0.0
WT
DKO
B2M
CIITA

图 3

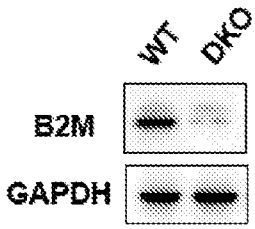

WT
DKO
B2M
GAPDH

图 4

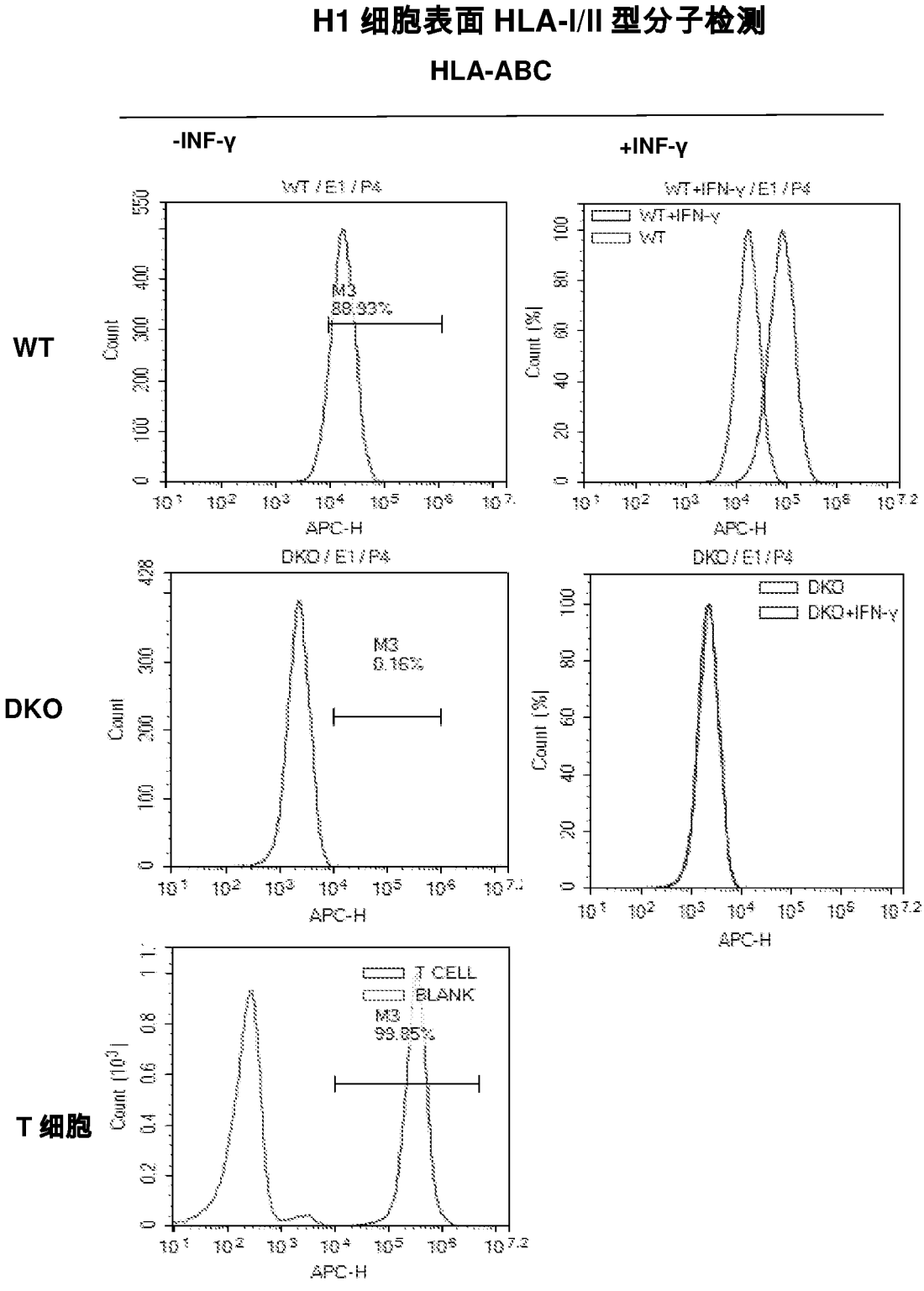

H1 细胞表面 HLA-I/II 型分子检测
HLA-ABC
-INF-γ
+INF-γ
WT
DKO
T 细胞
WT / E1 / P4
M3
89.93%
Count
APC-H
WT+IFN-γ / E1 / P4
WT+IFN-γ
WT
Count [%]
DKO / E1 / P4
M3
9.16%
DKO
DKO+IFN-γ
T CELL
BLANK
M3
99.85%
Count [10³]

图 5

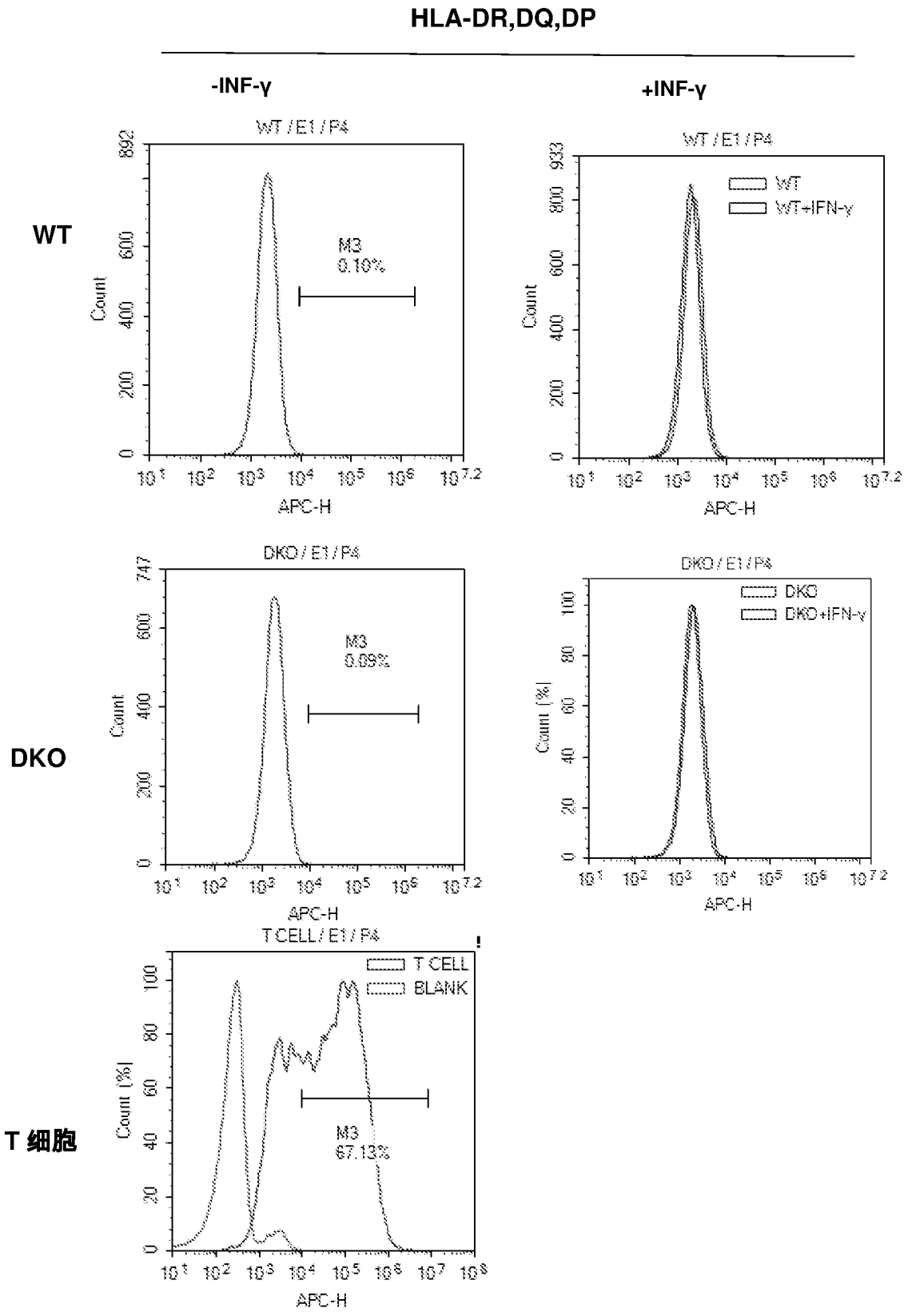

HLA-DR,DQ,DP
-INF-γ
+INF-γ
WT
DKO
T 细胞
WT / E1 / P4
M3
0.10%
WT
WT+IFN-γ
DKO / E1 / P4
M3
0.09%
DKO
DKO+IFN-γ
T CELL / E1 / P4
T CELL
BLANK
M3
67.13%
Count
Count [%]
APC-H

图 5 续

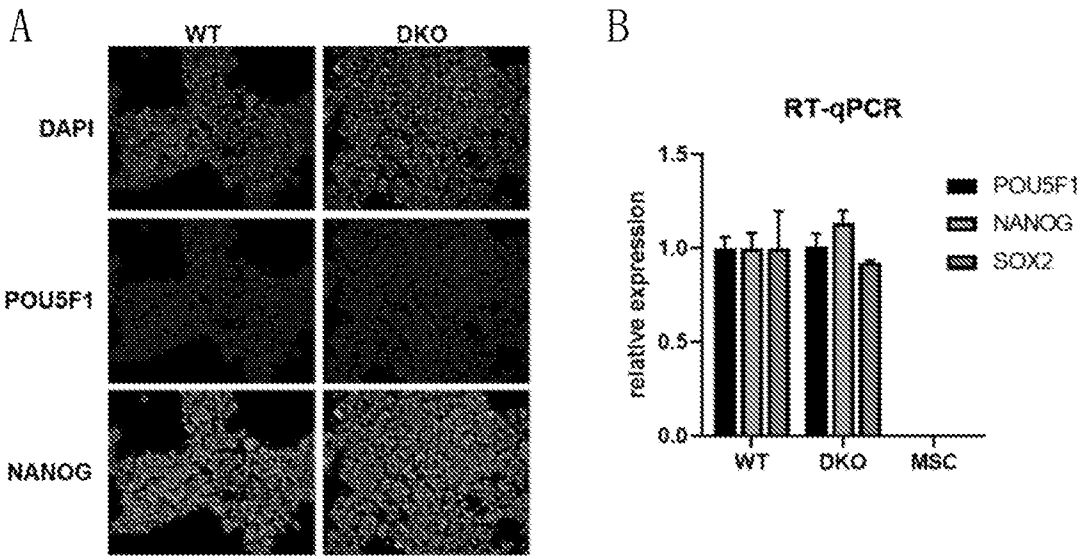

A
WT
DKO
DAPI
POU5F1
NANOG
B
RT-qPCR
relative expression
1.5
1.0
0.5
0.0
POU5F1
NANOG
SOX2
WT
DKO
MSC

图 7

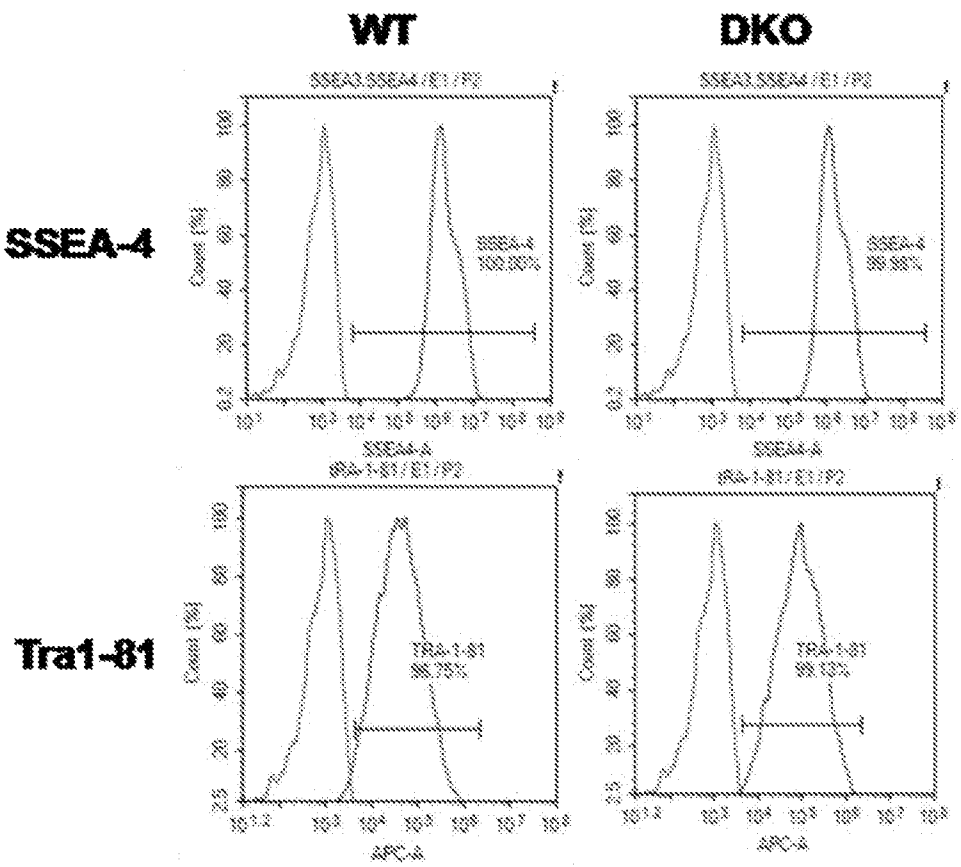

WT
DKO
SSEA-4
Tra1-81

图 8

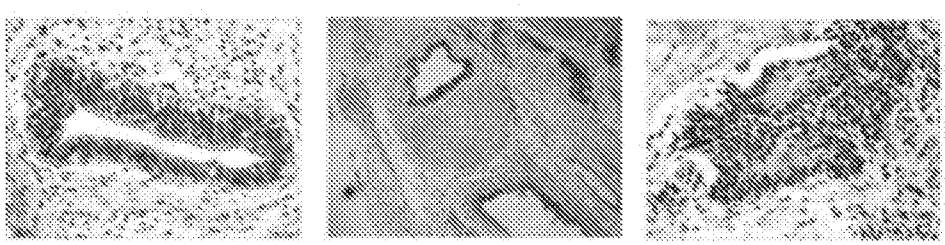


图 9

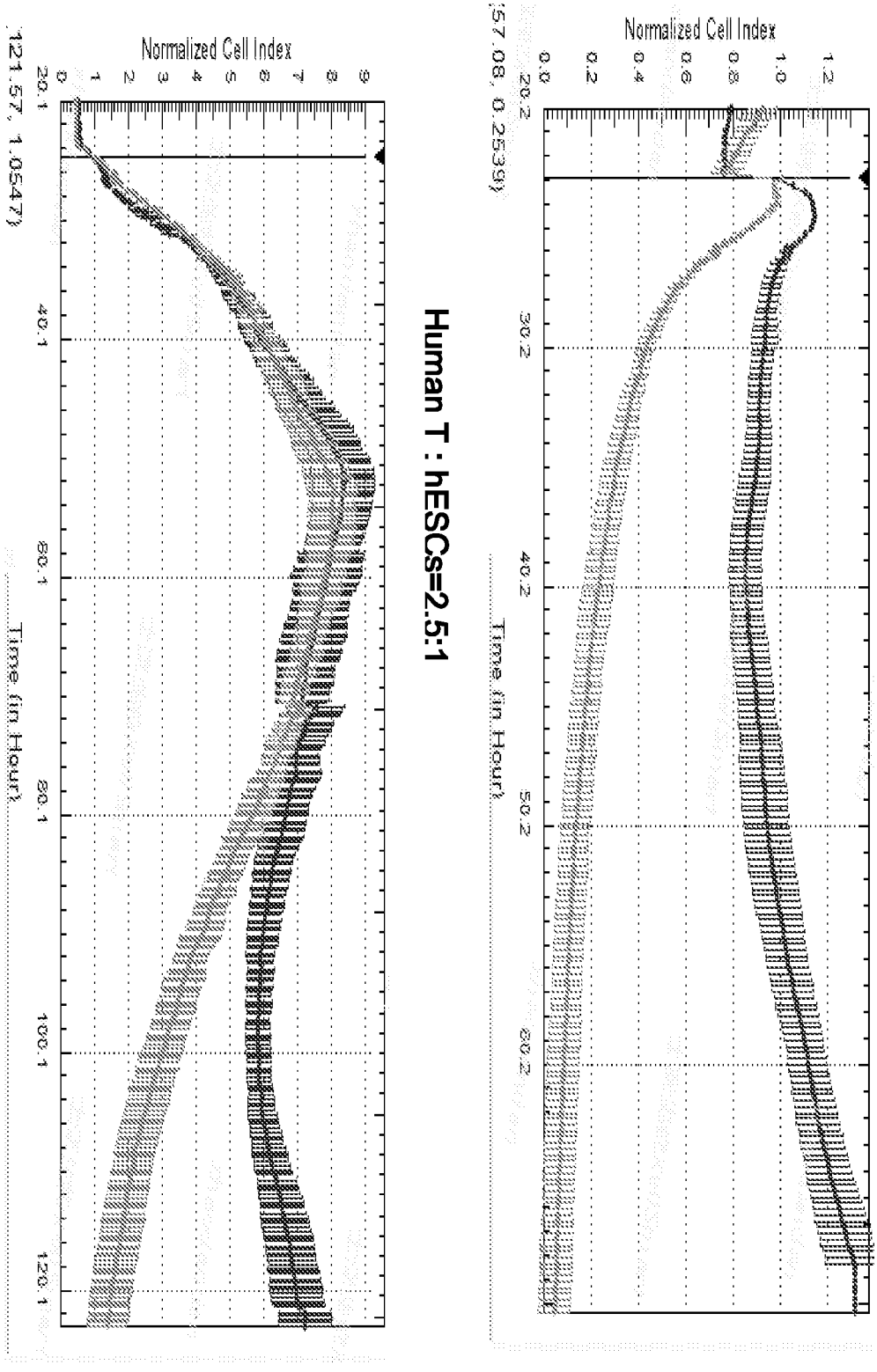

Normalized Cell Index
Time (in Hour)
(57.08, 0.2539)
Human NK:hESCs 2:1
Normalized Cell Index
Time (in Hour)
(121.57, 1.0547)
Human T : hESCs=2.5:1

图 10

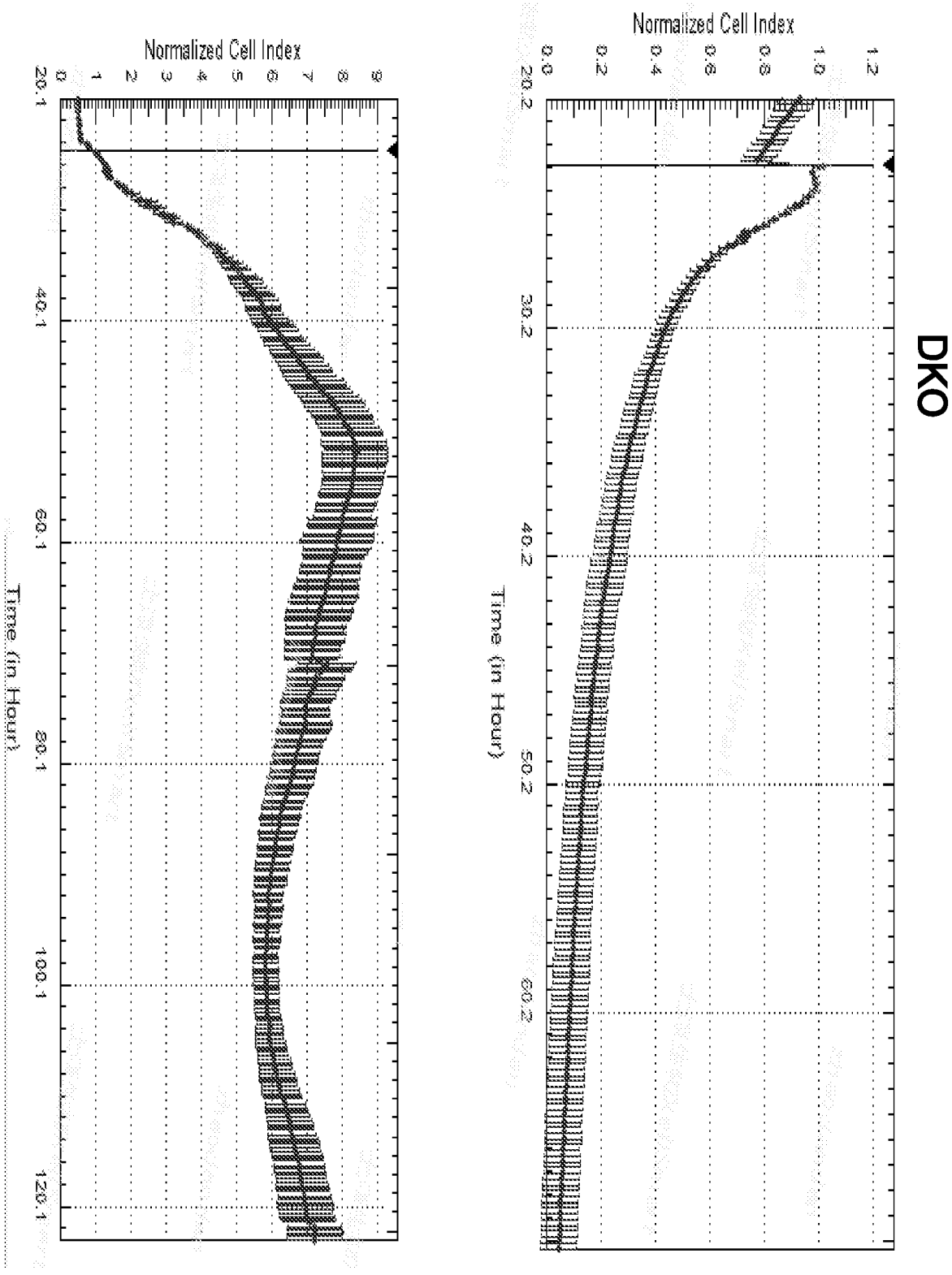


图 10 续

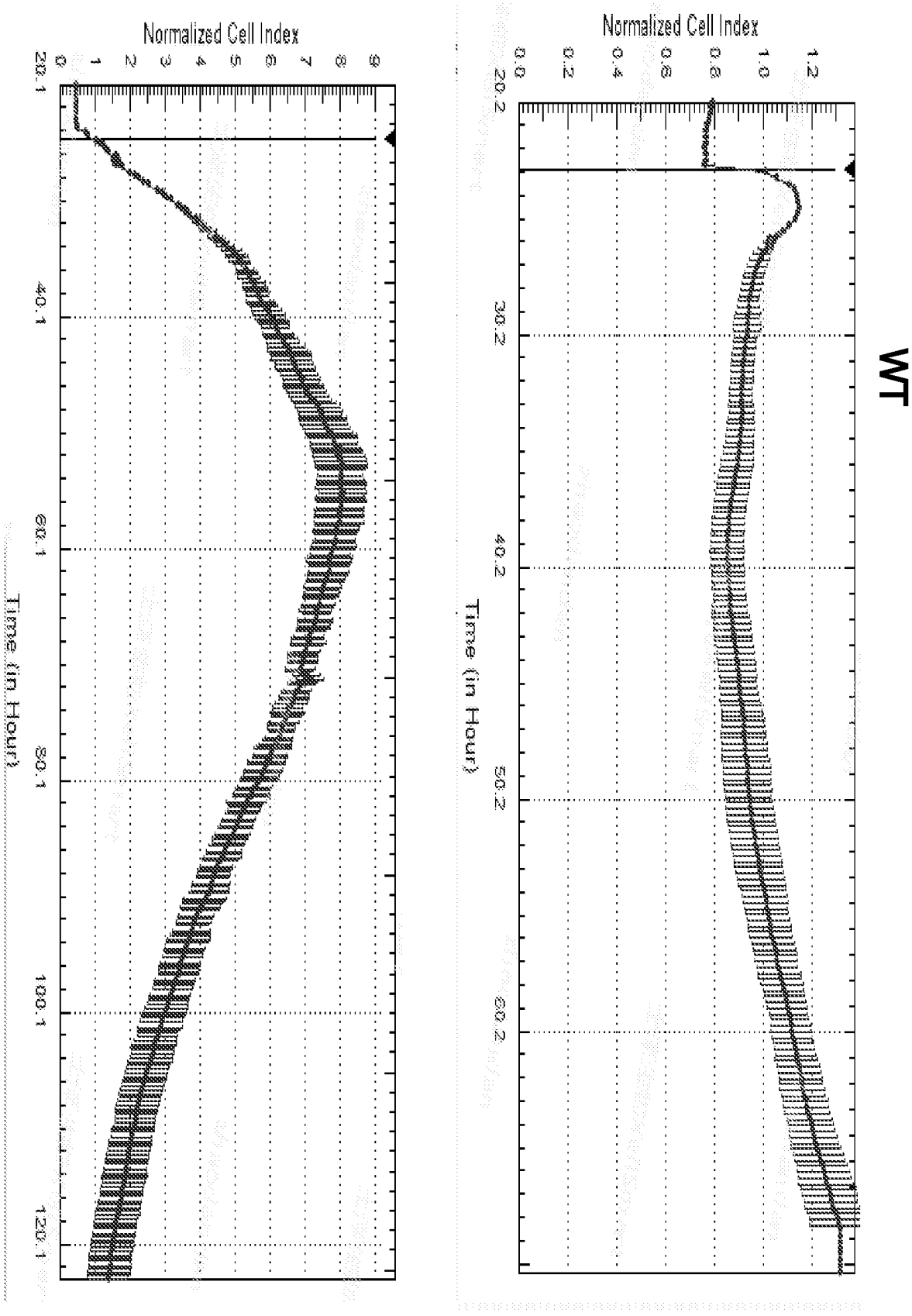


图 10 续

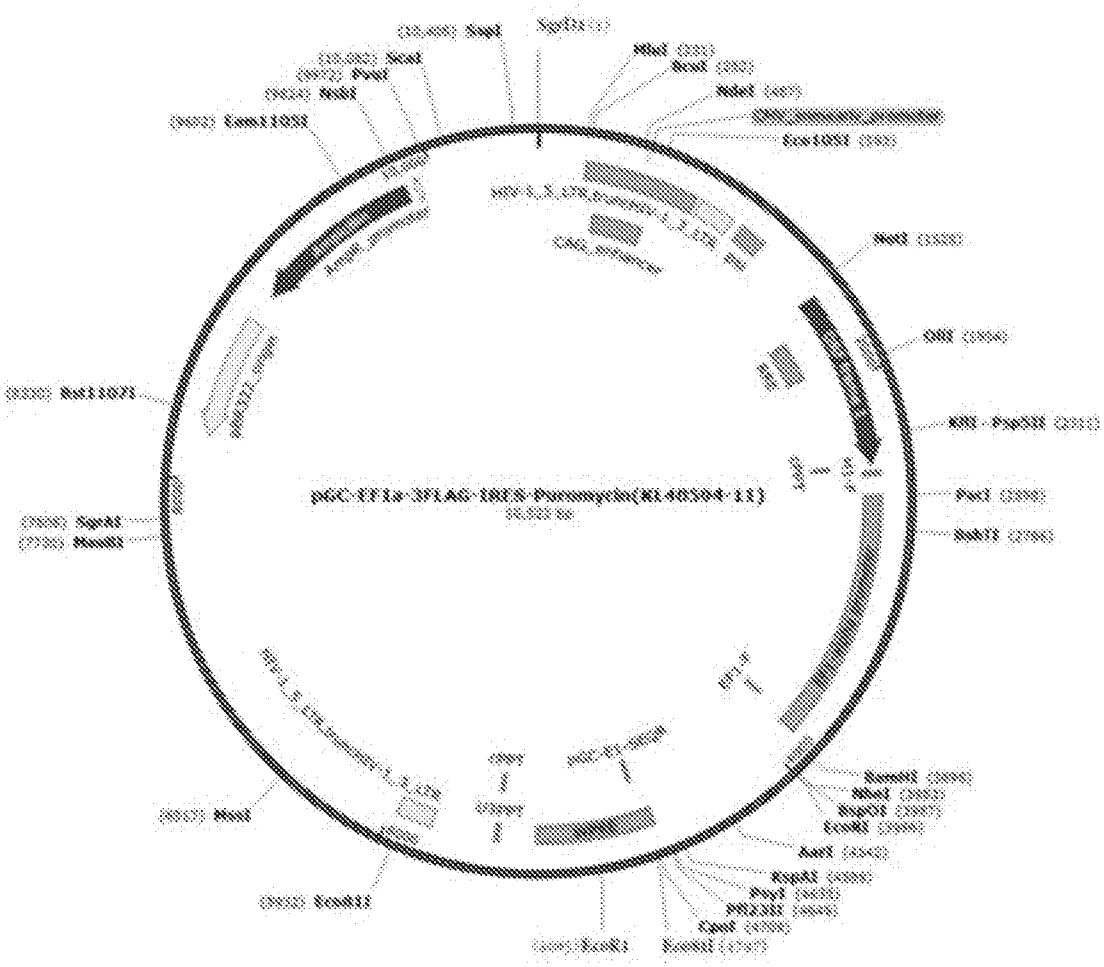


图 11

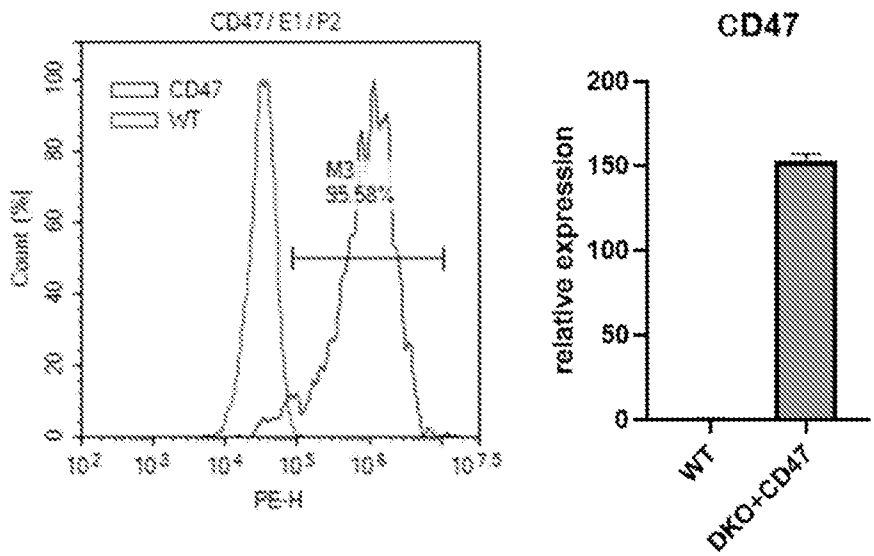

CD47/E1/P2
CD47
WT
M3
95.58%
Count (%)
PE-H
CD47
relative expression
WT
DKO+CD47

图 12

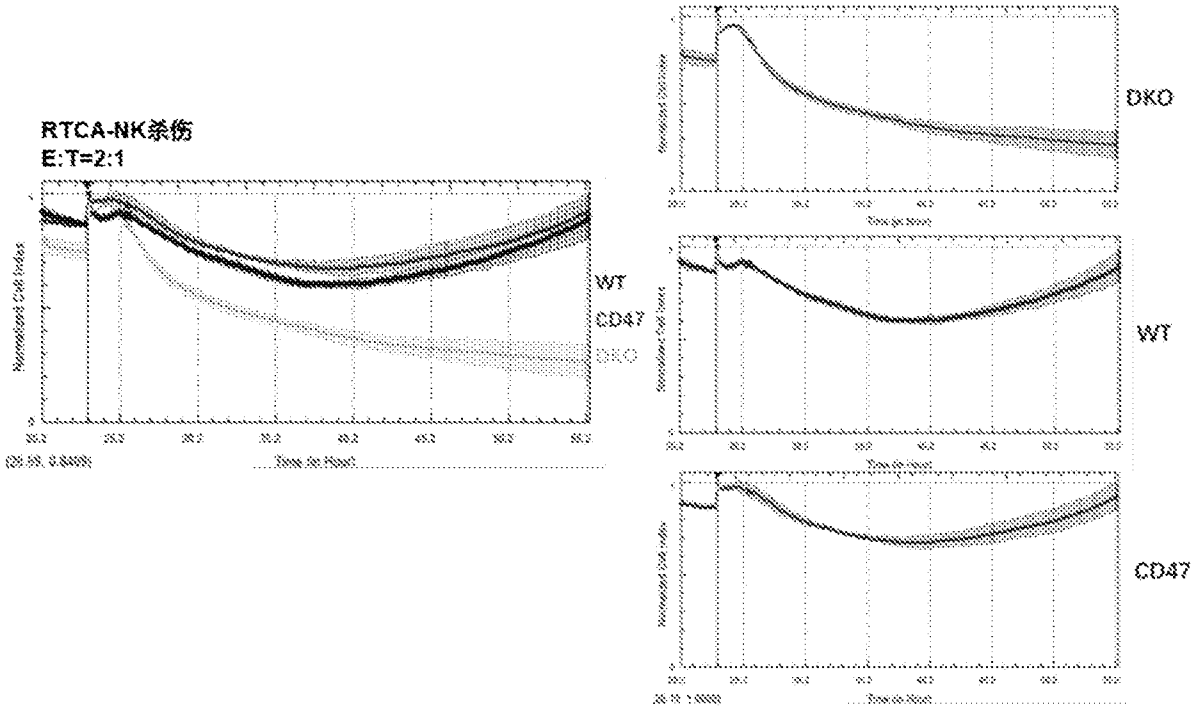

RTCA-NK杀伤
E:T=2:1
WT
CD47
DKO
DKO
WT
CD47

图 13

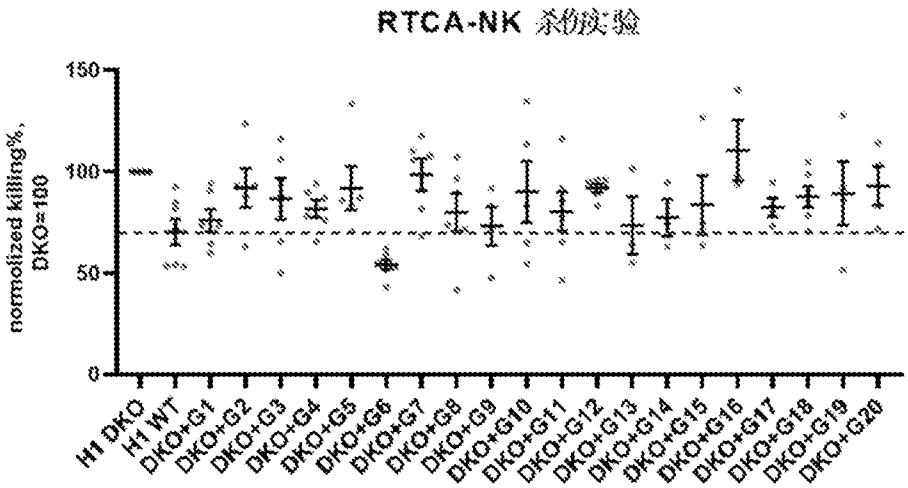

RTCA-NK 杀伤实验
normolized killing%,
DKO=100
150
100
50
0
H1 DKO
H1 WT
DKO+G1
DKO+G2
DKO+G3
DKO+G4
DKO+G5
DKO+G6
DKO+G7
DKO+G8
DKO+G9
DKO+G10
DKO+G11
DKO+G12
DKO+G13
DKO+G14
DKO+G15
DKO+G16
DKO+G17
DKO+G18
DKO+G19
DKO+G20

图 14

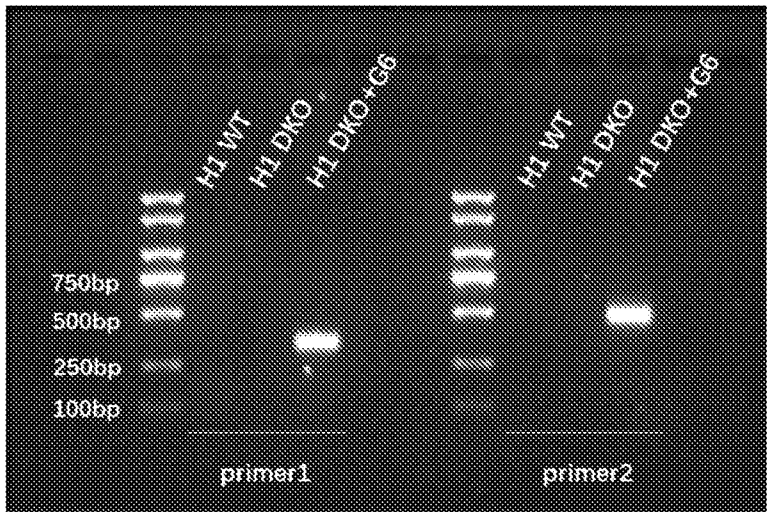
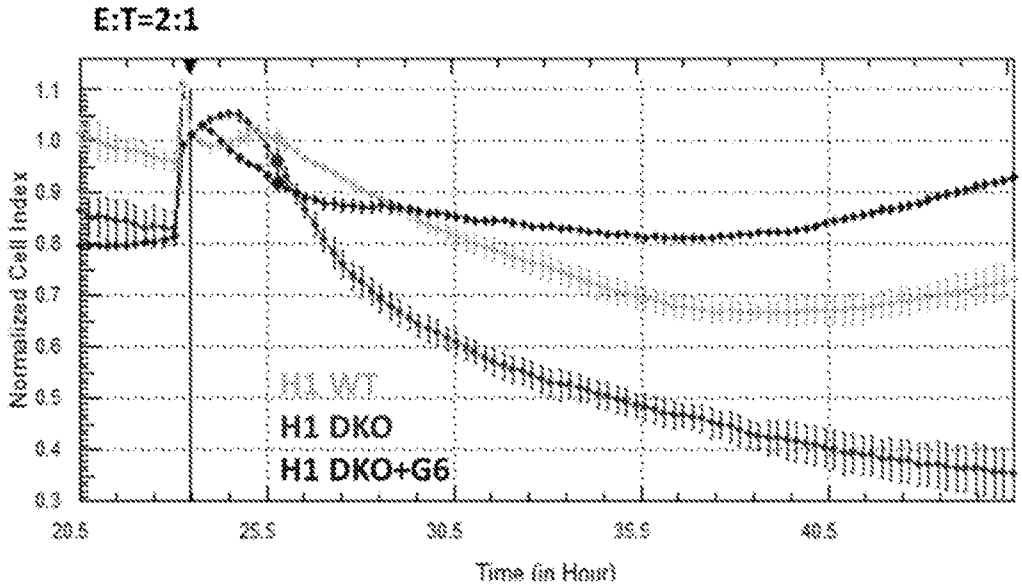


图 15



细胞	H1 WT	H1 DKO	H1 DKO+G6
CI 值(-NK)	1.67	1.81	1.81
CI 值(+NK)	0.72	0.35	0.92
相对杀伤率	56.75%	80.45%	49.21%

图 16

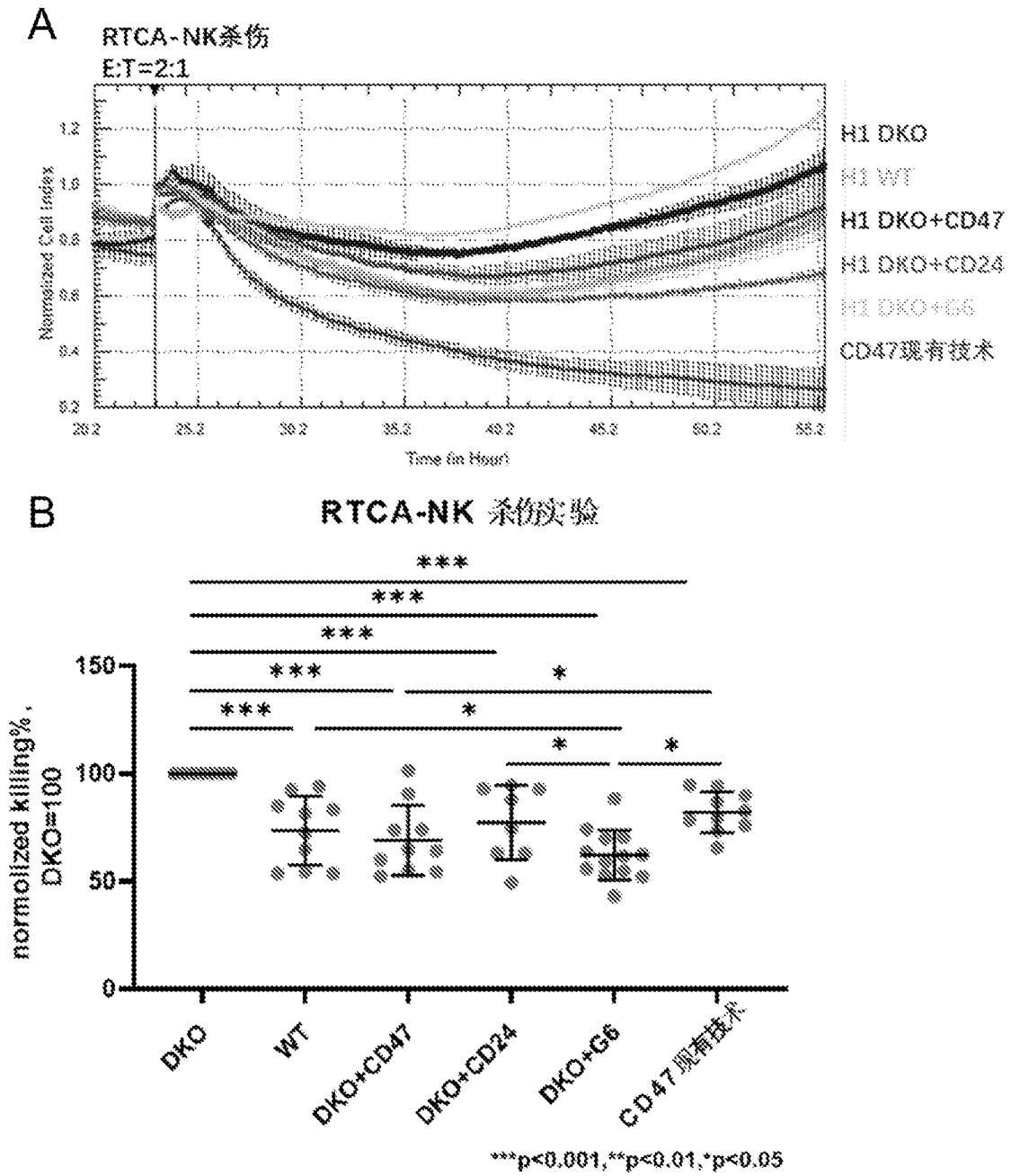

A
RTCA-NK杀伤
E:T=2:1
Normalized Cell Index
Time (in Hour)
H1 DKO
H1 WT
H1 DKO+CD47
H1 DKO+CD24
H1 DKO+G6
CD47现有技术
B
RTCA-NK 杀伤实验
normolized killing%, DKO=100
DKO
WT
DKO+CD47
DKO+CD24
DKO+G6
CD47现有技术
***p<0.001,**p<0.01,*p<0.05

图 17

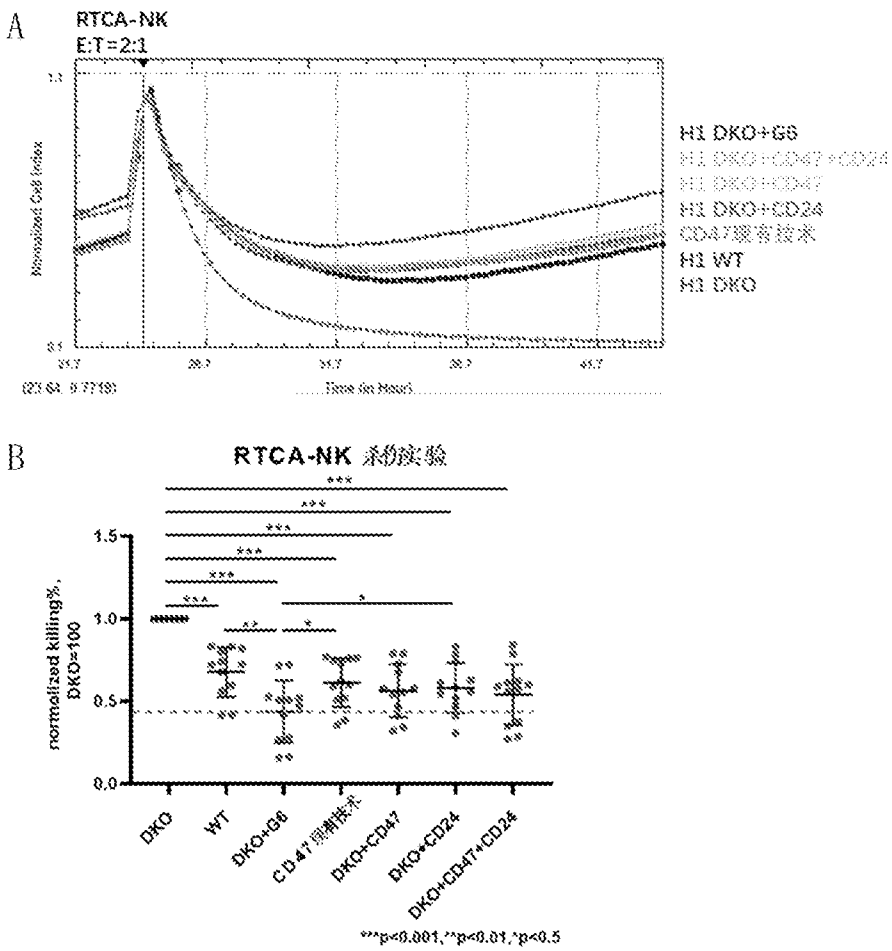

A
RTCA-NK
E:T=2:1
H1 DKO+G6
H1 DKO+CD47+CD24
H1 DKO+CD47
H1 DKO+CD24
CD47阻断技术
H1 WT
H1 DKO
B
RTCA-NK 杀伤实验
normalized killing%, DKO=100
1.5
1.0
0.5
0.0
DKO
WT
DKO+G6
CD47阻断技术
DKO+CD47
DKO+CD24
DKO+CD47+CD24
***p<0.001,**p<0.01,*p<0.5

图 18

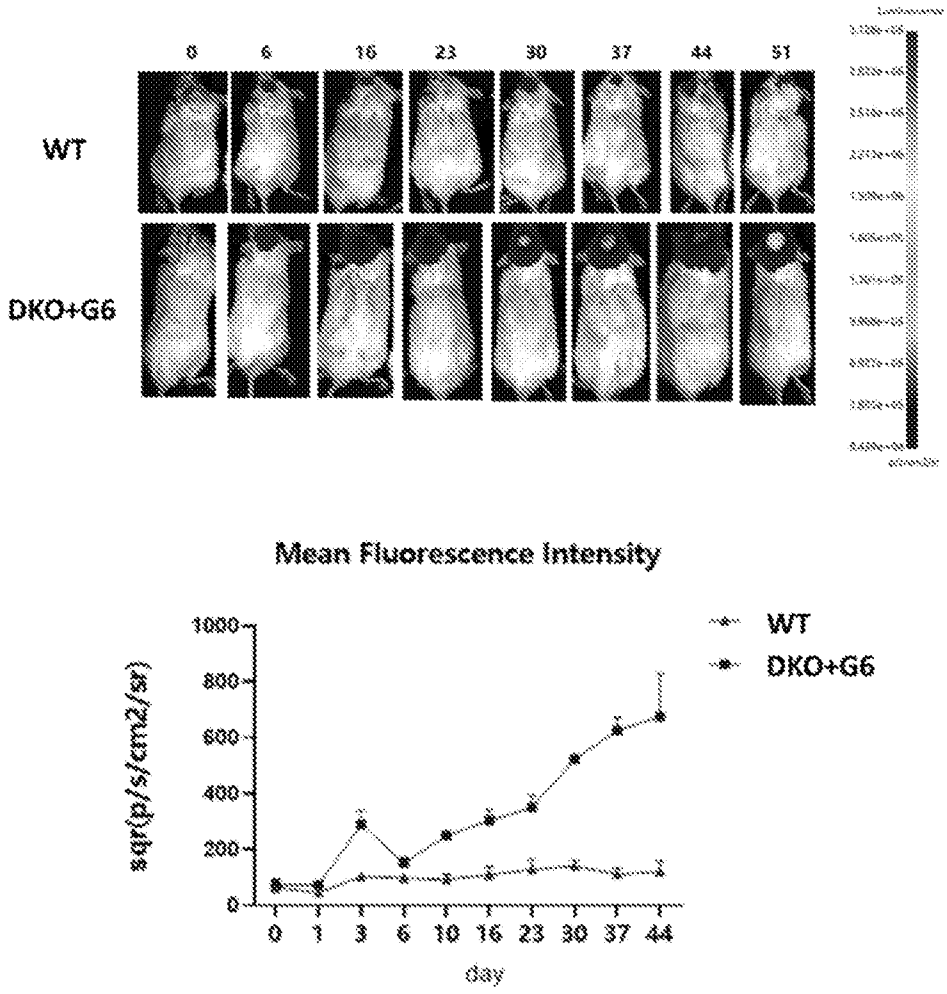

0
6
16
23
30
37
44
51
WT
DKO+G6
Mean Fluorescence Intensity
sqr(p/s/cm2/sr)
1000
800
600
400
200
0
0 1 3 6 10 16 23 30 37 44
day
WT
DKO+G6

图 19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2023/083761

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/10(2006.01)i; C12N 15/12(2006.01)i; C12N15/62(2006.01)i; C12N 15/867(2006.01)i; C07K 19/00(2006.01)i; A61K 35/545(2015.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61P 25/00(2006.01)i; A61P 9/00(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: C12N5, C12N15, A61K35, C07K19

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, SIPOABS, CNTXT, EPTXT, USTXT, WOTXT, PubMed, Web of knowledge, CNKI, 万方, WANFANG, 百度, BAIDU, 百度学术, BAIDU SCHOLAR: 融合, fusion, NK?, 自然杀伤, CD24+, CD47+, B2M, CIITA, 细胞, Cell?, MHC+, TAP+, RFX+, NLRC5, PD-1, PD-L1, CTLA+, CD26, HLA+, stem, SIRP+, 跨膜, 慢病毒, CAS+, gRNA; Genbank, 中国专利生物序列数据库, NATIONAL BIO-SEQUENCE DATABASE OF CHINESE PATENT, EMBL-EBI, Uniprot: 序列1-41, Uniprot: sequence 1-41.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2021041316 A1 (SANA BIOTECHNOLOGY INC.) 04 March 2021 (2021-03-04) description paragraphs 26, 57, 59-61, 64-65, 127, 200, 213, 227, 238	1-37, 39-62
X	CN 109554433 A (HANGZHOU KEXING BIOCHEM CO., LTD.) 02 April 2019 (2019-04-02) claim 5	40, 41
X	CN 113801238 A (NANJING BIOHENG BIOTECH CO., LTD.) 17 December 2021 (2021-12-17) description, paragraphs 20-25	1-37, 39-62
X	CN 111954715 A (FATE THERAPEUTICS INC.) 17 November 2020 (2020-11-17) claims 1-21	1-10, 18-26, 34-37, 39
X	WO 2021146627 A1 (SANA BIOTECHNOLOGY INC.) 22 July 2021 (2021-07-22) claims 1-320	1-37, 39-62

☑ 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
"D" document cited by the applicant in the international application
"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
05 June 2023	**28 June 2023**
Name and mailing address of the ISA/CN **China National Intellectual Property Administration (ISA/CN)** **China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088**	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2023/083761

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KALNINE, N. et al. "Homo Sapiens CD24 Antigen (Small Cell Lung Carcinoma Cluster 4 Antigen), Partial [Synthetic construct]" *GenBank: AAP36467.1,* 25 July 2016 (2016-07-25), feature, origin section	40, 42

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2023/083761

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.
   b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)),
      ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2023/083761

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

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

1. ☑ Claims Nos.: **38, 63**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 38 sets forth a method for treating a patient in need of cell therapy, and claim 63 sets forth the use of the universal stem cell of any one of claims 1-19, the composition of claim 39, the fusion protein of any one of claims 40-48 or the expression vector or expression cassette of claim 50, and the cell of claims 52-58 as a gene drug carrier. Claim 38 or 63 takes the living human body or animal as an implementation object, is directly used for treating diseases, and belongs to subject matter for which an international search is not required (PCT Rule 39.1(iv)).

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2023/083761

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2021041316	A1	04 March 2021	CA	3148370	A1	04 March 2021
				AU	2020336302	A1	03 March 2022
				KR	20220068222	A	25 May 2022
				EP	4017508	A1	29 June 2022
				JP	2022546317	W	04 November 2022
				US	2023025289	A1	26 January 2023
CN	109554433	A	02 April 2019	CN	109554433	B	29 April 2022
CN	113801238	A	17 December 2021	WO	2021249462	A1	16 December 2021
				JP	2023514386	A	05 April 2023
				AU	2021286676	A1	08 September 2022
				EP	4112721	A1	04 January 2023
				KR	20220166837	A	19 December 2022
				CA	3171344	A1	16 December 2021
CN	111954715	A	17 November 2020	WO	2019191495	A1	03 October 2019
				IL	277611	A	30 November 2020
				EP	3775228	A1	17 February 2021
				EP	3775228	A4	23 February 2022
				US	2021024959	A1	28 January 2021
				JP	2021519061	A	10 August 2021
				BR	112020019205	A2	05 January 2021
				SG	11202008977	UA	29 October 2020
				KR	20200127250	A	10 November 2020
				AU	2019243315	A1	24 September 2020
				MX	2020009896	A	12 October 2020
				CA	3093020	A1	03 October 2019
				IN	202017043284	A	22 January 2021
				HK	40033113	A0	01 April 2021
				JP	2021519061	W	10 August 2021
				HK	40046590	A0	05 November 2021
WO	2021146627	A1	22 July 2021	CA	3165076	A1	22 July 2021
				TW	202140784	A	01 November 2021
				AU	2021207993	A1	11 August 2021
				IL	294820	A	01 September 2022
				BR	112022014118	A2	27 September 2022
				KR	20220142433	A	21 October 2022
				CN	115298314	A	04 November 2022
				EP	4090747	A1	23 November 2022
				US	2023062612	A1	02 March 2023
				JP	2023510916	W	15 March 2023

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2023/083761

A. 主题的分类

C12N 5/10(2006.01)i；C12N 15/12(2006.01)i；C12N15/62(2006.01)i；C12N 15/867(2006.01)i；C07K 19/00(2006.01)i；A61K 35/545(2015.01)i；A61P 35/00(2006.01)i；A61P 25/00(2006.01)i； A61P 9/00(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC：C12N5，C12N15，A61K35，C07K19

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，SIPOABS，CNTXT，EPTXT，USTXT，WOTXT,PubMed，Web of knowledge，CNKI，万方，百度，百度学术：融合，fusion，NK?，自然杀伤，CD24+，CD47+，B2M，CIITA，细胞，Cell?，MHC+，TAP+，RFX+，NLRC5，PD-1，PD-L1，CTLA+，CD26，HLA+，stem，SIRP+，跨膜，慢病毒，CAS+，gRNA； Genbank，中国专利生物序列数据库，EMBL-EBI，Uniprot：序列1-41。

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
X	WO 2021041316 A1 (SANA BIOTECHNOLOGY INC) 2021年3月4日 (2021-03-04) 说明书第26、57、59-61、64-65、127、200、213、227、238段	1-37、39-62
X	CN 109554433 A (杭州科兴生物科技有限公司) 2019年4月2日 (2019-04-02) 权利要求5	40、41
X	CN 113801238 A (南京北恒生物科技有限公司) 2021年12月17日 (2021-12-17) 说明书第20-25段	1-37、39-62
X	CN 111954715 A (菲特治疗公司) 2020年11月17日 (2020-11-17) 权利要求1-21	1-10、18-26、34-37、39
X	WO 2021146627 A1 (SANA BIOTECHNOLOGY INC) 2021年7月22日 (2021-07-22) 权利要求1-320	1-37、39-62

☑ 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

“D” 申请人在国际申请中引证的文件

“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
2023年6月5日	2023年6月28日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088	受权官员 于淼 电话号码 (+86) 020-28957144

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
X	N. Kalnine 等. "Homo sapiens CD24 antigen (small cell lung carcinoma cluster 4 antigen), partial [synthetic construct]" GenBank: AAP36467.1, 2016年7月25日 (2016-07-25), feature、origin部分	40、42

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2023/083761

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：

b. ☐ 为国际检索的目的在国际申请日之后提交（细则13之三.1(a)），

☐ 附有说明序列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。

2. ☐ 本报告是在没有收到符合WIPO ST.26标准的序列表的情况下，考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列，在可进行有意义检索的范围内做出的。

3. 补充意见：

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2023/083761

第II栏　某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下:

1. ☑ 权利要求： 38、63
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：

权利要求38请求保护一种治疗需要细胞治疗的患者的方法，权利要求63请求保护权利要求1-19任一项所述的通用型干细胞、权利要求39所述的组合物、权利要求40-48任一项所述融合蛋白或权利要求50所述的表达载体或表达盒、权利要求52-58所述的细胞作为基因药物载体的应用，权利要求38或63,是以有生命的人体或动物为实施对象，直接用于疾病的治疗，属于PCT实施细则39.1（iv）规定的无需进行国际检索的主题。

2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：

3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2023/083761

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
WO	2021041316	A1	2021年3月4日	CA	3148370	A1	2021年3月4日
				AU	2020336302	A1	2022年3月3日
				KR	20220068222	A	2022年5月25日
				EP	4017508	A1	2022年6月29日
				JP	2022546317	W	2022年11月4日
				US	2023025289	A1	2023年1月26日
CN	109554433	A	2019年4月2日	CN	109554433	B	2022年4月29日
CN	113801238	A	2021年12月17日	WO	2021249462	A1	2021年12月16日
				JP	2023514386	A	2023年4月5日
				AU	2021286676	A1	2022年9月8日
				EP	4112721	A1	2023年1月4日
				KR	20220166837	A	2022年12月19日
				CA	3171344	A1	2021年12月16日
CN	111954715	A	2020年11月17日	WO	2019191495	A1	2019年10月3日
				IL	277611	A	2020年11月30日
				EP	3775228	A1	2021年2月17日
				EP	3775228	A4	2022年2月23日
				US	2021024959	A1	2021年1月28日
				JP	2021519061	A	2021年8月10日
				BR	112020019205	A2	2021年1月5日
				SG	11202008977	UA	2020年10月29日
				KR	20200127250	A	2020年11月10日
				AU	2019243315	A1	2020年9月24日
				MX	2020009896	A	2020年10月12日
				CA	3093020	A1	2019年10月3日
				IN	202017043284	A	2021年1月22日
				HK	40033113	A0	2021年4月1日
				JP	2021519061	W	2021年8月10日
				HK	40046590	A0	2021年11月5日
WO	2021146627	A1	2021年7月22日	CA	3165076	A1	2021年7月22日
				TW	202140784	A	2021年11月1日
				AU	2021207993	A1	2021年8月11日
				IL	294820	A	2022年9月1日
				BR	112022014118	A2	2022年9月27日
				KR	20220142433	A	2022年10月21日
				CN	115298314	A	2022年11月4日
				EP	4090747	A1	2022年11月23日
				US	2023062612	A1	2023年3月2日
				JP	2023510916	W	2023年3月15日