

(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
2024 年 12 月 19 日 (19.12.2024)



(10) 国际公布号
WO 2024/254772 A1

(51) 国际专利分类号:

C12N 15/867 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01) *A61P 31/00* (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

(74) 代理人: 成都超凡明远知识产权代理有限公司 (**FOUNDIN INTELLECTUAL PROPERTY**); 中国北京市海淀区北四环西路 68 号左岸工社 1215-1218 室, Beijing 100080 (CN)。

(21) 国际申请号: PCT/CN2023/100058

(22) 国际申请日: 2023 年 6 月 14 日 (14.06.2023)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人: 香港北恒生物科技有限公司 (**HONGKONG BIOHENG BIOTECH LIMITED**) [CN/CN]; 中国香港特别行政区九龙长沙湾道 788 号罗氏商业广场 6 楼 603 室, Hong Kong 999077 (CN)。

(72) 发明人: 苏俊 (**SU, Jun**); 中国香港特别行政区九龙长沙湾道 788 号罗氏商业广场 6 楼 603 室, Hong Kong 999077 (CN)。李陈梅 (**LI, Chenmei**); 中国香港特别行政区九龙长沙湾道 788 号罗氏商业广场 6 楼 603 室, Hong Kong 999077 (CN)。王爽 (**WANG, Shuang**); 中国香港特别行政区九龙长沙湾道 788 号罗氏商业广场 6 楼 603 室, Hong Kong 999077 (CN)。罗涛 (**LUO, Tao**); 中国香港特别行政区九龙长沙湾道 788 号罗氏商业广场 6 楼 603 室, Hong Kong 999077 (CN)。章倩倩 (**ZHANG, Qianqian**); 中国香港特别行政区九龙长沙湾道 788 号罗氏商业广场 6 楼 603 室, Hong Kong 999077 (CN)。任江涛 (**REN, Jiangtao**); 中国香港特别行政区九龙长沙湾道 788 号罗氏商业广场 6 楼 603 室, Hong Kong 999077 (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:** ENGINEERED TROPHOBLAST AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 工程化的滋养细胞及其用途

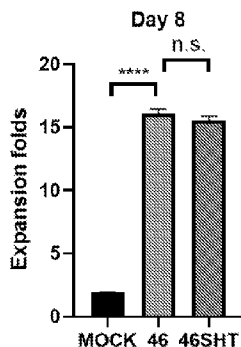


图 2

(57) **Abstract:** An engineered trophoblast, which expresses a cell surface molecule specifically recognizing NKp46, wherein the cell surface molecule at least contains an antibody targeting NKp46 and a transmembrane domain. A cell culture medium and a method for expanding NK cells. Compared with non-engineered trophoblasts, the engineered trophoblast is used for activating NK cells, and can enhance the NK cell expansion capability and the tumor cell killing activity.

(57) **摘要:** 一种工程化滋养细胞, 其表达特异性识别 NKp46 的细胞表面分子, 所述细胞表面分子至少包含靶向 NKp46 的抗体和跨膜结构域。一种细胞培养基及扩增 NK 细胞的方法。与未经工程化的滋养细胞相比, 将该工程化滋养细胞用于激活 NK 细胞, 能够增强 NK 细胞扩增能力和肿瘤细胞杀伤活性。

工程化的滋养细胞及其用途

技术领域

本发明属于细胞治疗领域。更具体地，本发明涉及工程化的滋养细胞及其用途。

背景技术

自然杀伤（NK）细胞是体内重要的淋巴细胞，具有细胞毒性和免疫调节功能，参与体内天然免疫和适应性免疫，被认为是最有潜力的肿瘤杀伤效应细胞之一。NK 细胞表达多种激活受体，其中的 NKp46 被认为是跨物种 NK 细胞的统一特征分子。

NK 细胞在细胞治疗领域有以下优势：1. NK 细胞能自发地杀死肿瘤细胞的能力，无需提前敏化，无需抗原呈递，起效更迅速；2. NK 细胞能通过多种途径杀死肿瘤细胞；3. NK 细胞治疗不会产生严重不良反应，仅有较轻的移植物抗宿主病（GvHD）；4. NK 细胞可以不用改造直接用于异体通用型的免疫细胞治疗等等。但是，由于 NK 细胞只占正常人外周血淋巴细胞的 1%-32.6%，体外扩增难度较大，而且在体内存活寿命有限，NK 细胞免疫治疗一直受限于无法获得足够数量的细胞等问题。

已有研究报道，IL-2、IL-15 等一些细胞因子可以用于扩增 NK 细胞，但作用有限。因此，仍有必要开发一种工程化滋养细胞，用于研究 NK 细胞的功能，并为细胞治疗奠定基础。

发明内容

除非另有说明，否则本文中所使用的所有科学技术术语的含义与本发明所属领域的普通技术人员通常所了解的相同。

本发明的目的在于提供一种工程化滋养细胞，其表达特异性识别 NKp46 的细胞表面分子。与未经工程化的滋养细胞相比，将该工程化滋养细胞用于激活 NK 细胞，能够增强 NK 细胞扩增能力和肿瘤细胞杀伤活性。

工程化滋养细胞

在第一个方面，本发明提供一种工程化滋养细胞，其表达特异性识别 NKp46 的细胞表面分子，所述细胞表面分子至少包含靶向 NKp46 的抗体和跨膜结构域。

如本文所用，术语“滋养细胞”是指添加至靶细胞（例如 NK 细胞）培养物中以支

持其存活和/或生长的细胞。滋养细胞提供完整和功能性的细胞外基质和基质相关的因子，并且将已知和未知的细胞因子分泌至条件培养基中。滋养细胞通常处于生长停滞状态，以防止其在培养物中增殖，但维持其存活。生长停滞可以通过有效剂量的辐照或用有效剂量的化学物质（如丝裂霉素 C）处理来实现。适用于本发明的滋养细胞包括：PBMC、RPMI8866、HFWT、K562、EBV-LCL、721.221 以及 NK92 细胞等。

如本文所用，术语“细胞表面分子”是指在细胞表面表达的能够与 NKp46 特异性结合的分子。此类表面分子一般包含能够与 NKp46 特异性结合的抗体以及将表面分子锚定在细胞表面的跨膜结构域。任选地，表面分子还包含位于抗体和跨膜结构域之间的铰链区、负责信号传递的胞内结构域、外源的细胞活化分子等。

如本文所用，“抗体”是指可以与抗原结合的任何结构或其功能性变体，包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、重组抗体，可以选自人抗体、人源化抗体、鼠源抗体、嵌合抗体及其功能性片段。例如，抗体包括但不限于完整抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fd'、Fv、scFv、sdFv、线性抗体、sdAb、纳米抗体、双体、anticalin、DARPIN 等。在本发明中，抗体可以是单价或二价，且可以是单特异性、双特异性或多特异性的抗体。

本领域已知的靶向 NKp46 的抗体均可用于本发明。在一些实施方案中，所述靶向 NKp46 的抗体选自完整抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fd'、Fv、scFv、sdFv、线性抗体、双体、sdAb 和纳米抗体，优选选自 Fab、scFv、单域抗体和纳米抗体。优选地，所述靶向 NKp46 的抗体包含轻链可变区和重链可变区，其中所述轻链可变区包含的 CDR1-L、CDR2-L 和 CDR3-L 与 SEQ ID NO:7 所包含的 CDR1-L、CDR2-L 和 CDR3-L 相同；其中所述重链可变区包含的 CDR1-H、CDR2-H 和 CDR3-H 与 SEQ ID NO:8 所包含的 CDR1-H、CDR2-H 和 CDR3-H 相同。优选地，所述 CDR1-L 如 SEQ ID NO:1 所示，CDR2-L 如 SEQ ID NO:2 所示，CDR3-L 如 SEQ ID NO:3 所示，CDR1-H 如 SEQ ID NO:4 所示，CDR2-H 如 SEQ ID NO:5 所示，CDR3-H 如 SEQ ID NO:6 所示。

在一些实施方案中，所述轻链可变区与 SEQ ID NO:7 具有至少 70%，优选至少 80%，更优选至少 90%、95%、97% 或 99% 或 100% 的序列同一性；所述重链可变区与 SEQ ID NO:8 具有至少 70%，优选至少 80%，更优选至少 90%、95%、97% 或 99% 或 100% 的序列同一性。优选地，其中所述靶向 NKp4 的抗体与 SEQ ID NO:10 所示的氨基酸序列具有至少 70%，优选至少 80%，更优选至少 90%、95%、97% 或 99%

或 100% 的序列同一性

术语“重链”是指抗体分子中天然存在的构象中存在的两种类型多肽链中较大的一种，并且通常决定抗体所属的类别。术语“轻链”是指抗体分子中天然存在的构象中存在的两种类型多肽链中较小的一种。Kappa(κ)和 lambda(λ)轻链是指两种主要的抗体轻链同种型。

术语“互补决定区”或“CDR”是指赋予抗原特异性和结合亲和力的抗体可变区内的氨基酸序列。例如，一般来说，每个重链可变区中存在三个 CDR（例如 CDR1-H、CDR2-H、和 CDR3-H），并且每个轻链可变区中存在三个 CDR（CDR1-L、CDR2-L、和 CDR3-L）。CDR 的精确氨基酸序列边界可以使用许多熟知的方案中的任一种来确定，包括：Kabat 编号方案、Chothia 编号方案、IMGT 编号方案、AHO 编号方案、AbM 编号方案。给定 CDR 或 FR 的精确氨基酸序列可能由于选择的编号方案不同而不同，应理解，给定抗体或其区域（如其可变区）的“CDR”或“FR”涵盖由任何上述方案或其他已知方案所定义的 CDR 或 FR，在指定的 CDR 或 FR 含有给定氨基酸序列的情况下，应理解，这样的 CDR 或 FR 还可以具有由任何上述方案或其他已知方案所定义的相应 CDR 或 FR 的序列。在本文中用于界定 CDR 和 FR 的边界的编号方案为 Chothia 方案。

术语“单链抗体”或“scFv”是指包含至少一个轻链可变区（VL）和至少一个重链可变区（VH）的融合蛋白，其中所述轻链可变区和重链可变区是邻接的（例如经由接头连接），并且能够以单链多肽形式表达，且其中所述 scFv 保留其来源的完整抗体的特异性。除非另有说明，否则本文中的 scFv 可以以任何顺序（例如相对于多肽的 N-末端和 C 末端）具有所述的 VL 和 VH，scFv 从 N 端到 C 端可以包含 VL-接头-VH，也可以包含 VH-接头-VL。术语“接头”是指连接两个分子或同一分子上的两个序列的分子序列。在一些实施方案中，接头是肽接头。优选地，接头不会不利地影响多肽的表达、分泌或生物活性。此外，接头优选地不是抗原性的并且不引发免疫应答。在一些实施方案中，接头可以是内源氨基酸序列、外源氨基酸序列（例如，富含 GS 的序列）或非肽化学接头。在一种实施方案中，本发明所述的接头与 SEQ ID NO:28 或 29 所示的氨基酸序列具有至少 70%，优选至少 80%，更优选至少 90%、95%、97% 或 99% 或 100% 的序列同一性。

如本文所用，术语“跨膜结构域”是指能够使细胞表面分子在细胞表面上表达的多肽结构。跨膜结构域可以是天然或合成的，也可以源自任何膜结合蛋白或跨膜蛋白。

当抗体与靶抗原结合时，跨膜结构域能够进行信号传导。特别适用于本发明中的跨膜结构域可以源自例如 TCR α 链、TCR β 链、TCR γ 链、TCR δ 链、CD3 ζ 亚基、CD3 ϵ 亚基、CD3 γ 亚基、CD3 δ 亚基、CD45、CD4、CD5、CD8 α 、CD9、CD16、CD22、CD33、CD28、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137 和 CD154。优选地，所述跨膜结构域选自 CD8 α 、CD4、CD28 或 CD278 的跨膜结构域。更为优选地，所述跨膜结构域为 CD8 α 或 CD28 跨膜结构域，与 SEQ ID NO:12-14 任一项所示的氨基酸序列具有至少 70%，优选至少 80%，更优选至少 90%、95%、97% 或 99% 或 100% 的序列同一性。

在一些实施方案中，本发明的工程化滋养细胞还可以表达位于抗体和跨膜结构域之间的铰链区。如本文所用，术语“铰链区”一般是指作用为连接跨膜结构域至抗体的任何寡肽或多肽。具体地，铰链区用来为抗体提供更大的灵活性和可及性。铰链区可以包含最多达 300 个氨基酸，优选 10 至 100 个氨基酸并且最优选 25 至 50 个氨基酸。铰链区可以源自全部或部分的天然分子，如源自全部或部分的 CD8、CD4 或 CD28 的胞外区，或源自全部或部分的抗体恒定区。或者，铰链区可以是对应于天然存在的铰链序列的合成序列，或可以是完全合成的铰链序列。优选地，所述铰链区选自以下蛋白的铰链区：CD8 α 、CD28、Fc γ RIII α 受体、IgG4 和 IgG1，更优选与 SEQ ID NO:21-24 所示的氨基酸序列具有至少 70%，优选至少 80%，更优选至少 90%、95%、97% 或 99% 或 100% 的序列同一性。

在一些实施方案中，本发明的细胞表面分子还包含胞内结构域。优选地，所述胞内结构域包含共刺激结构域和/或初级信号传导结构域。

本发明的初级信号传导结构域可以是 T 细胞受体和共受体的细胞质序列，其在抗原受体结合以后一同起作用以引发信号传导，以及这些序列的任何衍生物或变体和具有相同或相似功能的任何合成序列。初级信号传导结构域包含两种不同类型的细胞质信号序列：引发抗原依赖性初级活化的那些，以及以不依赖抗原的方式起作用以提供次级或共刺激信号的那些。初级细胞质信号序列可以包含许多免疫受体酪氨酸激活基序（ITAM）。本发明的初级信号传导结构域包括但不限于源自 FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 ζ 、CD22、CD79a、CD79b、CD66d 及其任意组合。优选地，所述初级信号传导结构域包含 CD3 ζ 的信号传导结构域。更为优选地，所述初级信号传导结构域与 SEQ ID NO:18-20 任一所示的氨基酸序列具有至少 70%，优选至少 80%，

更优选至少 90%、95%、97%或 99%或 100%的序列同一性。

本发明的共刺激结构域可以是来自共刺激分子的细胞内功能性信号传导结构域，其可以包含所述共刺激分子的整个细胞内部分，或其功能片段。“共刺激分子”是指在 T 细胞上与共刺激配体特异性结合，由此介导 T 细胞的共刺激反应(例如增殖)的同源结合配偶体。共刺激分子包括但不限于 1 类 MHC 分子、BTLA 和 Toll 配体受体。本发明的共刺激结构域的非限制性实施例包括但不限于源自以下蛋白质的共刺激信号传导结构域：LTB、CD94、TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10、CARD11、CD2、CD7、CD8、CD18、CD27、CD28、CD30、CD40、CD54、CD83、CD134、CD137、CD270、CD272、CD276、CD278、CD357、DAP10、DAP12、LAT、NKG2C、SLP76、PD-1、LIGHT、TRIM、ZAP70 及其任意组合。优选地，所述共刺激结构域选自 4-1BB、CD28、CD27、OX40、CD278 或其任意组合。更为优选地，所述共刺激结构域为 4-1BB 或 CD28，与 SEQ ID NO:15-17 任一所示的氨基酸序列具有至少 70%，优选至少 80%，更优选至少 90%、95%、97%或 99%或 100%的序列同一性。

在一些实施方案中，本发明的细胞表面分子还包含信号肽，所述信号肽选自以下蛋白的信号肽：CD8 α 、IgG1、GM-CSFR α 、IgG4 或其任意组合。优选地，所述信号肽包含 CD8 α 或 B2M 的信号肽。更为优选地，所述信号肽与 SEQ ID NO:25-27 任一所示的氨基酸序列具有至少 70%，优选至少 80%，更优选至少 90%、95%、97%或 99%或 100%的序列同一性。

在一些实施方案中，本发明的细胞表面分子还包含接头，其用于隔开任何本文中所述的结构域/区。例如，接头可位于信号肽与抗体之间、抗体的 VH 与 VL 之间、抗体与铰链区之间、铰链区与跨膜结构域之间、侧接共刺激结构域或在共刺激结构域的 N-或 C-区上、和/或在跨膜结构域与初级信号传导结构域之间。接头可以是长度为约 6 至约 40 个氨基酸、或长度为约 6 至约 25 个氨基酸的肽。

如本文所用，术语“同一性”或“同源性”定义为在比对序列及必要时引入空位以实现最大序列同一性百分比后且不考虑任何保守取代作为序列同一性的一部分下，候选序列中与特定肽或多肽序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比。可根据所属领域技能内的多种方式，使用公众可获得的计算器软件，诸如 BLAST、BLAST-2、ALIGN 或 MEGALIGN™(DNASTAR)软件，实现比对，以确定氨基酸序列同一性百

分比。所属领域技术人员可确定用于量测比对的适当参数，包括实现所比较的全长序列上的最大比对所需的任何算法。

如本文所用，术语“变体”是指具有与参考氨基酸序列基本上相同的氨基酸序列，或由基本上相同的核苷酸序列编码的多肽。在一些实施方案中，变体是功能性变体。术语“功能性变体”是指具有与参考氨基酸序列基本上相同的氨基酸序列，或由基本上相同的核苷酸序列编码，并且能够具有参考氨基酸序列的一种或多种活性的多肽。

在一些实施方案中，本发明的工程化滋养细胞还表达至少一种细胞活化分子，所述细胞活化分子选自分泌型或膜结合型细胞因子、共刺激配体、激活性受体激动剂及其他具备细胞活化功能的分子。在一些实施方案中，所述细胞因子选自分泌型或膜结合型的 IL-2、IL-5、IL-7、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21 及其任意组合；所述共刺激配体选自 4-1BBL、OX40L、B7-H6、CD58、CD112、CD155、MIC-A/B、ULBPs 及其任意组合；所述激活性受体激动剂选自 NKG2D 激动剂、NKp44 激动剂、NKp30 激动剂、CD16 激动剂及其任意组合；所述其他具备细胞活化功能的分子包括但不限于 DNER、Jedi、SOM-11、CCN3、MAGP2、MAGP1、TSP2、YB-1、EGFL7、CCR7、DAP12 和 DAP10、Notch 配体等。优选地，所述细胞活化分子选自 IL-21、4-1BBL、IL-15、IL-21 和 4-1BBL、IL-21 和 IL-15、以及 IL-15 和 4-1BBL，所述 IL-21、IL-15 或 IL-21 以分泌型或膜结合型的形式存在，更优选 IL-21 和 4-1BBL。

培养基

在第二个方面，本发明提供一种细胞培养基，其包含如上所述的工程化滋养细胞。

在一些实施方案中，所述 NK 细胞可以是 CD56^{dim} NK 细胞和/或 CD56^{bright} NK 细胞。在一些实施方案中，所述 NK 细胞可以来源于原代 NK 细胞、干细胞衍生的 NK 细胞、NK 细胞系等。其中，所述原代 NK 细胞可以来源于受试者（如人、小鼠或者大鼠、猫、狗、奶牛、马、绵羊、山羊或其他牲畜等），选自外周血 NK 细胞、脐带血 NK 细胞、脾脏 NK 细胞等；所述干细胞衍生的 NK 细胞可以选自多能干细胞（iPSC）衍生的 NK 细胞、胚胎干细胞（ESC）衍生的 NK 细胞、造血干细胞（HSPC）衍生的 NK 细胞等；所述 NK 细胞系选自 NK92、NK92.26.5、NK92.M1、NK92Ci、NK92Fc、NK3.3、NKL、NKG、NK-YT、NK-YTS、KHYG-1、HATAK 细胞等。在一些实施方案中，所述 NK 细胞为 NK92 细胞。

在一些实施方案中，所述细胞选自天然 NK 细胞或工程化的 NK 细胞。

在一些实施方案中，所述工程化的 NK 细胞选自表达嵌合抗原受体（CAR）、T 细胞受体（TCR）、T 细胞受体融合蛋白（TFP）、T 细胞抗原耦合器（TAC）、免疫动员单克隆 T 细胞受体（ImmTAC）的 NK 细胞。

术语“嵌合抗原受体”或“CAR”是指人工构建的杂合多肽，该杂合多肽一般包括抗原（例如肿瘤抗原）结合结构域（例如抗体或抗原的配体）、跨膜结构域、任选的共刺激结构域和初级信号传导结构域，各个结构域之间通过接头连接。CAR 能够以非 MHC 限制性的方式将 T 细胞和其它免疫细胞的特异性和反应性重定向至所选择的靶标。在一些实施方案中，本发明的功能性外源受体是嵌合抗原受体，其包含抗原结合结构域、跨膜结构域、一个或多个共刺激结构域和初级信号传导结构域。任选地，所述嵌合抗原受体还包含以下结构中的一个或多个：信号肽、铰链区、自杀基因、开关结构等。适用于本发明中的“跨膜结构域”、“共刺激结构域”、“初级信号传导结构域”、“铰链区”、“信号肽”等已在上文中定义。

如本文所用，术语“T 细胞受体”或“TCR”是指响应于抗原呈递并参与 T 细胞活化的膜蛋白复合体。TCR 的刺激由抗原呈递细胞上的主要组织相容性复合体分子（MHC）触发，所述抗原呈递细胞将抗原肽呈递至 T 细胞并且结合至 TCR 复合体以诱发一系列胞内信号传导。TCR 由分别形成异二聚体的六条肽链组成，其一般分为 $\alpha\beta$ 型和 $\gamma\delta$ 型。每条肽链包括恒定区和可变区，其中可变区负责结合特异性的特定的抗原和 MHC 分子。TCR 的可变区可以包含抗原结合结构域或与抗原结合结构域可操作连接。

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

术语“T 细胞受体融合蛋白”或“TFP”是指由 TCR 各组衍生重组多肽，通常由 TCR 亚基和与其连接的抗原结合区组成并在细胞表面表达。其中，TCR 亚基包括至少部分 TCR 胞外结构域、跨膜结构域、TCR 胞内信号结构域。

术语“免疫动员单克隆 T 细胞受体”或“ImmTAC”是由工程化改造的 T 细胞受体（TCR）以及抗 CD3 的 scFv 组成，其中：改造后的 TCR 能以显著提高的亲和力特异

性识别并结合肿瘤细胞表面的 HLA-肽复合物,并通过 scFv 抗体片段与 CD3 的相互作用促进 T 细胞介导的效应器功能。

方法

在第三个方面,本发明还提供一种扩增 NK 细胞的方法,其包括:将 NK 细胞与如上所述的工程化滋养细胞共培养。共培养的时间及条件可以根据需要以及本领域内常见的培养方法进行选择。

在一些实施方案中,在所述共培养前还包括将所述工程化滋养细胞进行辐照处理或丝裂霉素处理。

下面结合具体实施例和附图,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例和附图仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,或按照制造厂商所建议的条件。

附图说明

图 1: 经过工程化 K562 细胞处理后, NK92 细胞的激活与扩增效果。

图 2: 经过工程化 K562 细胞处理后, 分选后的 PBNK 细胞的激活与扩增效果。

图 3: 经过工程化 K562 细胞处理后, 未分选的 PBNK 细胞的激活与扩增效果。

图 4: 工程化 K562 细胞激活的 NK92 细胞对 K562 细胞的杀伤作用。

图 5: 工程化 K562 细胞激活的 NK92 细胞的 CD107a 阳性率。

具体实施方式

实施例 1 工程化 K562 细胞的构建

合成编码 4-1BBL (氨基酸序列如 SEQ ID NO:10 所示) 的 DNA, 将其克隆至慢病毒载体 pLv-EF1a (即启动子替换为 EF1a 的 pLVX 载体(PPL, Cat No.:PPL00157-4a)) 中, 构建得到 pLv-EF1a-4-1BBL 质粒。

合成编码 mbIL21 (氨基酸序列如 SEQ ID NO:11 所示) 的 DNA, 将其克隆至慢病毒载体 pLv-CMV (即启动子替换为 CMV 的 pLVX 载体(PPL, Cat No.:PPL00157-4a)) 中, 构建得到 pLv-CMV-mbIL21 质粒。

分别合成编码抗 NKp46 scFv (氨基酸序列如 SEQ ID NO:9 所示)、CD8 α 铰链区 (氨基酸序列如 SEQ ID NO:22 所示)、CD8 α 跨膜结构域 (氨基酸序列如 SEQ ID NO:13

所示)、4-1BB 共刺激结构域(氨基酸序列如 SEQ ID NO:16 所示)、CD3 ζ 初级信号传导结构域(氨基酸序列如 SEQ ID NO:19 所示)的 DNA, 将其克隆至慢病毒载体 pLv-EF1a 中, 构建得到 pLv-EF1a-NKp46 CAR 质粒。

分别合成编码抗 NKp46 scFv(氨基酸序列如 SEQ ID NO:9 所示)、CD8 α 铰链区(氨基酸序列如 SEQ ID NO:22 所示)、CD8 α 跨膜结构域(氨基酸序列如 SEQ ID NO:13 所示)的 DNA, 将其克隆至慢病毒载体 pLv-EF1a 中, 构建得到 pLv-EF1a-NKp46 CAR-SHT 质粒。

分别合成编码 4-1BBL(氨基酸序列如 SEQ ID NO:10 所示)、T2A(氨基酸序列如 SEQ ID NO:30 所示)、抗 NKp46 scFv(氨基酸序列如 SEQ ID NO:9 所示)、CD8 α 铰链区(氨基酸序列如 SEQ ID NO:22 所示)、CD8 α 跨膜结构域(氨基酸序列如 SEQ ID NO:13 所示)、4-1BB 共刺激结构域(氨基酸序列如 SEQ ID NO:16 所示)、CD3 ζ 初级信号传导结构域(氨基酸序列如 SEQ ID NO:19 所示)的 DNA, 将其克隆至慢病毒载体 pLv-EF1a 中, 构建得到 pLv-EF1a-4-1BBL-T2A-NKp46 CAR 质粒。

将上述质粒包装入慢病毒, 并进一步转染 K562 细胞, 获得相应的工程化 K562 细胞, 质粒及包含其的工程化 K562 细胞如表 1 所示。流式检测阳性细胞比例, 确定各个慢病毒有效转染至 K562 细胞。

表 1 构建的各工程化 K562 细胞及所需要的病毒

工程化 K562 细胞	质粒 1	质粒 2
Mock K562	pLVX	
NKp46 CAR K562	pLv-EF1a-NKp46 CAR	
NKp46 CAR-SHT K562	PLV-EF1a-NKp46 CAR-SHT	
4-1BBL+mbIL21 K562	pLV-EF1a-4-1BBL	pLv-CMV-mbIL21
4-1BBL+NKp46 CAR K562	pLV-EF1a-4-1BBL-T2A-NKp46 CAR	
NKp46 CAR+mbIL21 K562	pLV-EF1a-NKp46 CAR	pLv-CMV-mbIL21
4-1BBL+NKp46 CAR+mbL21 K562	pLV-EF1a-4-1BBL-T2A-NKp46 CAR	pLv-CMV-mbIL21

实施例 2 NK92 细胞的激活与扩增

2.1 丝裂霉素处理工程化 K562 细胞

细胞激活当天 (Day0), 分别转移实施例 1 中制备的 Mock K562 (Mock)、NKp46 CAR K562 (46)、NKp46 CAR-SHT K562 (46SHT) 细胞至离心管中, 室温下 300g 离心 5 分钟, 弃上清。加入 25 μ g/ml 丝裂霉素 (PBS 稀释), 37 $^{\circ}$ C 处理 45 分钟。处理后, 用 PBS 重悬细胞, 室温下 300g 离心 5 分钟, 弃上清。按此步骤重复洗细胞 4 次,

得到丝裂霉素处理后的工程化 K562 细胞。

2.2 激活 NK92 细胞

对 NK92 细胞和丝裂霉素处理后的工程化 K562 细胞进行计数。以 NK92 细胞：K562 细胞=1：0.65 的数量比，取出 NK92 细胞和 K562 细胞，分别转移至离心管中，室温下 300g 离心 5 分钟，弃上清。向 NK92 细胞和 K562 细胞分别加入 NK92 培养基（XVIVO-15+12% FBS+900IU/ml IL2）重悬，将两者混合一起加入细胞培养板中至 NK92 细胞密度为 2.5×10^5 个/ml。将细胞放置于细胞培养箱，37℃培养。每隔 2~3 天，用 NK92 培养基半换液。培养至第 4 天、第 8 天、第 12 天进行细胞计数。结果如图 1 所示。

可以看出，相比于 Mock K562，用 NKp46 CAR K562 和 NKp46 CAR-SHT K562 细胞激活 NK92 细胞，均能够显著促进 NK92 细胞增殖，而且两者没有明显差异，表明 NKp46 CAR K562 和 NKp46 CAR-SHT K562 对 NK 细胞扩增均有显著的促进作用，这种作用不依赖于胞内结构域。

实施例 3 PBNK 细胞（经过分选）的激活与扩增

细胞激活前一天（Day-1），复苏 PBMC 细胞，加入 10ml PBMC 培养基（XVIVO-15+5% FBS）。室温下 300g 离心 5 分钟，弃上清。加入 PBMC 培养基，使细胞密度调整至 1×10^6 个/ml。放置于细胞培养箱，37℃过夜培养。Day0，激活当天，将过夜培养 PBMC 中的悬浮细胞转移至离心管里，室温下 400g 离心 5 分钟，弃上清，加入磁珠分选缓冲液。使用 NK 细胞分选试剂盒（美天旋，130-092-657）分出 PBNK。

对 PBNK 细胞和实施例 2.1 中经过丝裂霉素处理后的工程化 K562 细胞进行计数。以 PBNK 细胞：K562 细胞=1：4 的数量比取出相应的细胞，分别转移至离心管中，室温下 300g 离心 5 分钟，弃上清。加入 PBNK 培养基（XVIVO-15+10% FBS+900IU/ml IL2），调整 PBNK 密度至 2.5×10^5 个/ml，转移到细胞培养板。放置于细胞培养箱，37℃培养。每隔 2~3 天，用 PBNK 培养基半换液。培养至第 8 天进行细胞计数。结果如图 2 所示。

可以看出，相比于 Mock K562，用 NKp46 CAR K562 和 NKp46 CAR-SHT K562 细胞激活分选过的 PBNK 细胞，其细胞增殖倍数均有明显增加，而且两者之间没有明显差异，表明 NKp46 CAR K562 和 NKp46 CAR-SHT K562 对分选过的 PBNK 细胞扩

增有显著的促进作用，这种作用不依赖于胞内结构域。

实施例 4 PBNK 细胞（未经分选）的激活与扩增

细胞激活前一天（Day-1），复苏 PBMC 细胞，加入 10ml PBMC 培养基（XVIVO-15+5% FBS）。室温下 300g 离心 5 分钟，弃上清。加入 PBMC 培养基，使细胞密度调整至 1×10^6 个/ml。放置于细胞培养箱，37℃过夜培养。细胞激活当天（Day0），将过夜培养 PBMC 中的悬浮细胞转移至离心管里，室温下 400g 离心 5 分钟，弃上清。取一部分进行流式分析，对 PBNK 细胞进行绝对计数，计数的结果作为 PBNK 扩增的起始值。

对 PBMC 细胞和按照实施例 2.1 中的丝裂霉素处理方法处理后的 Mock K562（Mock），4-1BBL+NKp46 CAR K562（bbl46）、NKp46 CAR +mbIL21 K562（4621）、4-1BBL+NKp46 CAR+mbIL21 K562（bbl4621）进行计数。以未分选的 PBMC 细胞：K562 细胞=1：0.8 的数量比取出相应细胞，转移至离心管中，室温下 300g 离心 5 分钟，弃上清。加入 PBNK 培养基（XVIVO-15+10% FBS+900IU/ml IL2），调整 PBMC 密度至 6×10^5 个/ml，转移到细胞培养板。放置于细胞培养箱，37℃培养。每隔 2~3 天，用 PBNK 培养基半换液。培养至第 6 天进行细胞计数。结果如图 3 所示。

可以看出，相比于 Mock K562，4-1BBL+NKp46 CAR K562、NKp46 CAR +mbIL21 K562、4-1BBL+NKp46 CAR+mbIL21 K562 细胞对 PBNK 细胞的激活效果均显著增强。值得注意的是，相比于表达 anti-NKp46 CAR 和 mbIL21、以及 anti-NKp46 CAR 和 4-1BBL 的 K562 细胞，同时表达 anti-NKp46 CAR、mbIL21 和 4-1BBL 的 K562 细胞进一步提高了 PBNK 细胞的扩增倍数。

实施例 5 不同工程化 K562 细胞激活的 NK92 细胞对 K562 细胞的杀伤

5.1 利用工程化 K562 细胞激活 NK92 细胞

在实验前 4 天（Day-4），按照实施例 2.1 中的丝裂霉素处理方法处理工程化 K562 细胞。将细胞分为两组：

第一组：未转染 K562 细胞（NT）、NKp46 CAR K562（46）、NKp46 CAR-SHT K562（46SHT）；

第二组：Mock K562（Mock）、NKp46 CAR K562（46）、NKp46 CAR+mbIL21 K562

(4621)、4-1BBL+NKp46 CAR K562 (bbl46)、4-1BBL+NKp46 CAR+mbIL21 K562 (bbl4621)。

按照实施例 2.2 中的激活方式，用这些丝裂霉素处理过的工程化 K562 分别激活 NK92。加入 NK92 培养基 (XVIVO-15+12% FBS+900IU/ml IL2)，将细胞放置于细胞培养箱，37℃培养。每隔 2~3 天，用 NK92 培养基半换液。

5.2 利用激活后的 NK92 细胞杀伤 K562 细胞

实验当天 (Day0)，配置 R10 培养基 50ml (45ml RPMI 1640+5ml FBS)。对各 NK92 细胞以及稳定表达荧光素酶的 K562 细胞进行计数。

取稳定表达荧光素酶的 K562 细胞转移至离心管中，室温下 300g 离心 5 分钟，弃上清。加入 R10 培养基调整细胞密度至 1×10^5 个/ml。取各组 NK92 细胞分别转移至离心管中，室温下 300 g 离心 5 分钟，弃上清。加入 R10 培养基调整细胞密度至 5×10^5 个/ml。将 NK92 细胞与稳定表达荧光素酶的 K562 细胞分别按 100μl/孔吸取细胞悬液，转移至同一块 96 孔板对应的孔中。37℃孵育 4 小时。4 小时后，每孔取 100μl 转移到全白 96 孔板中。加入荧光素酶底物。使用酶标仪读取荧光值。结果如图 4 所示。

可以看出，相比于 NT 细胞，NKp46 CAR K562 和 NKp46 CAR-SHT K562 细胞激活的 NK92 细胞对 K562 细胞的杀伤作用均显著增强，而且它们之间没有明显差异，表明利用 NKp46 CAR K562 和 NKp46 CAR-SHT K562 细胞激活 NK 细胞均可以增强 NK 细胞对肿瘤细胞的杀伤作用，此作用不依赖于胞内结构域。另外，相比于 Mock K562 细胞，各工程化 K562 细胞激活的 NK92 细胞的杀伤作用均显著增强；相比于仅表达 anti-NKp46 CAR 的 K562 细胞，额外表达 mbIL21、或 4-1BBL 和 mbIL21 能够进一步增强 NK92 细胞对 K562 的杀伤作用，表明在 anti-NKp46 CAR 的基础上额外表达一些外源细胞活化分子，如 mbIL21、或 4-1BBL 和 mbIL21，可进一步增强对 NK 细胞的激活作用，增强 NK 细胞的肿瘤细胞杀伤活性。

实施例 6 不同工程化 K562 细胞激活的 NK92 细胞与 K562 细胞共孵育后的 CD107a 阳性率检测

6.1 利用工程化 K562 细胞激活 NK92 细胞

在实验前 4 天 (Day-4)，按照实施例 2.1 中的丝裂霉素处理方法处理工程化 K562 细胞。将细胞分为两组：

第一组：未转染 K562 细胞（NT）、NKp46 CAR K562（46）、NKp46 CAR-SHT K562（46SHT）；

第二组：Mock K562（Mock）、NKp46 CAR K562（46）、NKp46 CAR+mbIL21 K562（4621）、4-1BBL+mbIL21 K562（bbl21）、4-1BBL+NKp46 CAR K562（bbl46）、4-1BBL+NKp46 CAR+mbIL21 K562（bbl4621）。

按照实施例 2.2 中的激活方式，用这些丝裂霉素处理过的工程化 K562 分别激活 NK92。加入 NK92 培养基（XVIVO-15+12% FBS+900IU/ml IL2），将细胞放置于细胞培养箱，37℃培养。每隔 2~3 天，用 NK92 培养基半换液。

6.2 检测激活后的 NK92 细胞与 K562 细胞共孵育后的 CD107a 阳性率

提前一天（Day-1）将所有 NK92 细胞的培养基换成低浓度 IL-2 培养基（90 IU/ml IL2）。实验当天（Day0），配置 X10 培养基 50 ml（45 ml X-VIVO 15+5 ml FBS）；配置 Golgi Stop 稀释液：2μl Golgi Stop 加入 3 ml X10 培养液中。对各 NK92 细胞以及野生型 K562 细胞进行计数。

向 96 孔板中每孔加入 1×10^5 个 NK92 细胞和 1×10^5 个野生型 K562 细胞，以及 CD107a 荧光抗体，每孔细胞悬液总体积为 170μl，37℃孵育 1 小时。每孔加入 20μl Golgi Stop 稀释液，37℃孵育 2.5 小时。最后加入 5μl CD56 荧光抗体，37℃孵育 30 分钟。用 FACS 缓冲液洗涤样品。用流式细胞仪对样品的 CD56+细胞群进行分析，计算 CD107+细胞占比。结果如图 5 所示。

可以看出，与 Mock K562 和 4-1BBL+mbIL21 K562 相比，本发明中制备的各工程化 K562 细胞激活的 NK 细胞在与野生型 K562 共孵育后，CD107a 阳性率均显著提高，且各工程化 K562 细胞激活的 NK 细胞之间相差不大，表明用本发明制备的表达包含靶向 NKp46 的抗体和跨膜结构域的细胞表面分子各工程化 K562 细胞激活的 NK 细胞，细胞毒性均显著增强。

以上结果表明，利用表达包含靶向 NKp46 的抗体、跨膜结构域以及任选的胞内结构域的细胞表面分子，以及任选的外源细胞活化分子（如 4-1BBL 和/或 mbIL21 等）的工程化滋养细胞激活 NK 细胞，能够显著增强 NK 细胞扩增能力和肿瘤细胞杀伤活性。

需要说明的是，以上仅为本发明的优选实施例而已，并不用于限制本发明，对于

本领域的技术人员来说，本发明可以有各种更改和变化。本领域技术人员理解的是，凡在本发明的精神和原则之内，所作的任何修改、等同替换、改进等，均应包含在本发明的保护范围之内。

权利要求书

1.一种工程化滋养细胞，其表达特异性识别 NKp46 的细胞表面分子，所述细胞表面分子至少包含靶向 NKp46 的抗体和跨膜结构域。

2.根据权利要求 1 所述的工程化滋养细胞，其中所述抗体选自完整抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fd'、Fv、scFv、sdFv、线性抗体、双体、sdAb 和纳米抗体。

3.根据权利要求 2 所述的工程化滋养细胞，其中所述靶向 NKp46 的抗体包含轻链可变区和重链可变区，其中所述轻链可变区包含的 CDR1-L、CDR2-L 和 CDR3-L 与 SEQ ID NO:7 所包含的 CDR1-L、CDR2-L 和 CDR3-L 相同；其中所述重链可变区包含的 CDR1-H、CDR2-H 和 CDR3-H 与 SEQ ID NO:8 所包含的 CDR1-H、CDR2-H 和 CDR3-H 相同。

4.根据权利要求 3 所述的工程化滋养细胞，其中所述轻链可变区与 SEQ ID NO:7 所示的氨基酸序列具有至少 90%同一性，其中所述重链可变区与 SEQ ID NO:8 所示的氨基酸序列具有至少 90%同一性；优选地，所述靶向 NKp46 的抗体与 SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列具有至少 90%同一性。

5.根据权利要求 1-4 任一项所述的工程化滋养细胞，其中所述跨膜结构域选自以下蛋白的跨膜结构域：TCR α 链、TCR β 链、TCR γ 链、TCR δ 链、CD3 ζ 亚基、CD3 ϵ 亚基、CD3 γ 亚基、CD3 δ 亚基、CD45、CD4、CD5、CD8 α 、CD9、CD16、CD22、CD33、CD28、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137 和 CD154。

6.根据权利要求 1-5 任一项所述的工程化滋养细胞，其中所述细胞表面分子还包含位于抗体和跨膜结构域之间的铰链区。

7.根据权利要求 6 所述的工程化滋养细胞，其中所述铰链区选自以下蛋白的铰链区：CD8 α 、CD28、Fc γ RIII α 受体、IgG4 和 IgG1。

8.根据权利要求 1-7 任一项所述的工程化滋养细胞，其中所述细胞表面分子还包含胞内结构域。

9.根据权利要求 8 所述的工程化滋养细胞，其中所述胞内结构域包含共刺激结构域和/或初级信号传导结构域。

10.根据权利要求 9 所述的工程化滋养细胞，其中所述初级信号传导结构域选自以下蛋白的信号传导结构域：FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 ζ 、CD22、CD79a、CD79b、CD66d 及其任意组合。

11.根据权利要求 9 或 10 所述的工程化滋养细胞，其中所述共刺激结构域选自以下蛋白质的共刺激信号传导结构域：LTB、CD94、TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10、CARD11、CD2、CD7、CD8、CD18、CD27、CD28、CD30、CD40、CD54、CD83、CD134、CD137、CD270、CD272、CD276、CD278、CD357、DAP10、DAP12、LAT、NKG2C、SLP76、PD-1、LIGHT、TRIM、ZAP70 及其任意组合。

12.根据权利要求 1-11 任一项所述的工程化滋养细胞，其还表达至少一种细胞活化分子，所述细胞活化分子选自分泌型或膜结合型细胞因子、共刺激配体、激活性受体激动剂及其他具备细胞活化功能的分子。

13.根据权利要求 12 所述的工程化滋养细胞，其中所述细胞因子选自分泌型或膜结合型的 IL-2、IL-5、IL-7、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21 及其任意组合；所述共刺激配体选自 4-1BBL、OX40L、B7-H6、CD58、CD112、CD155、MIC-A/B、ULBPs 及其任意组合；所述激活性受体激动剂选自 NKG2D 激动剂、NKp44 激动剂、NKp30 激动剂、CD16 激动剂及其任意组合。

14.根据权利要求 12 所述的工程化滋养细胞，其中所述细胞活化分子选自 IL-21、4-1BBL、IL-15、IL-21 和 4-1BBL、IL-21 和 IL-15、以及 IL-15 和 4-1BBL，所述 IL-21、IL-15 或 IL-21 以分泌型或膜结合型的形式存在。

15.根据权利要求 1-14 任一项所述的工程化滋养细胞，其中所述滋养细胞选自 PBMC、RPMI8866、HFWT、K562、EBV-LCL、721.221 和 NK92 细胞。

16.一种细胞培养基，其中包含权利要求 1-15 任一项所述的工程化滋养细胞。

17.根据权利要求 16 所述的细胞培养基，其中所述细胞选自天然的 NK 细胞或工程化的 NK 细胞。

18.根据权利要求 17 所述的细胞培养基，所述工程化的 NK 细胞表达嵌合抗原受体、T 细胞受体、T 细胞受体融合蛋白、T 细胞抗原耦合器、免疫动员单克隆 T 细胞受体或其组合。

19.根据权利要求 17 或 18 所述的细胞培养基，所述 NK 细胞选自原代 NK 细胞、NK 细胞株和 NKT 细胞。

20.一种扩增 NK 细胞的方法，其包括将 NK 细胞与权利要求 1-15 任一项中所述的工程化滋养细胞共培养。

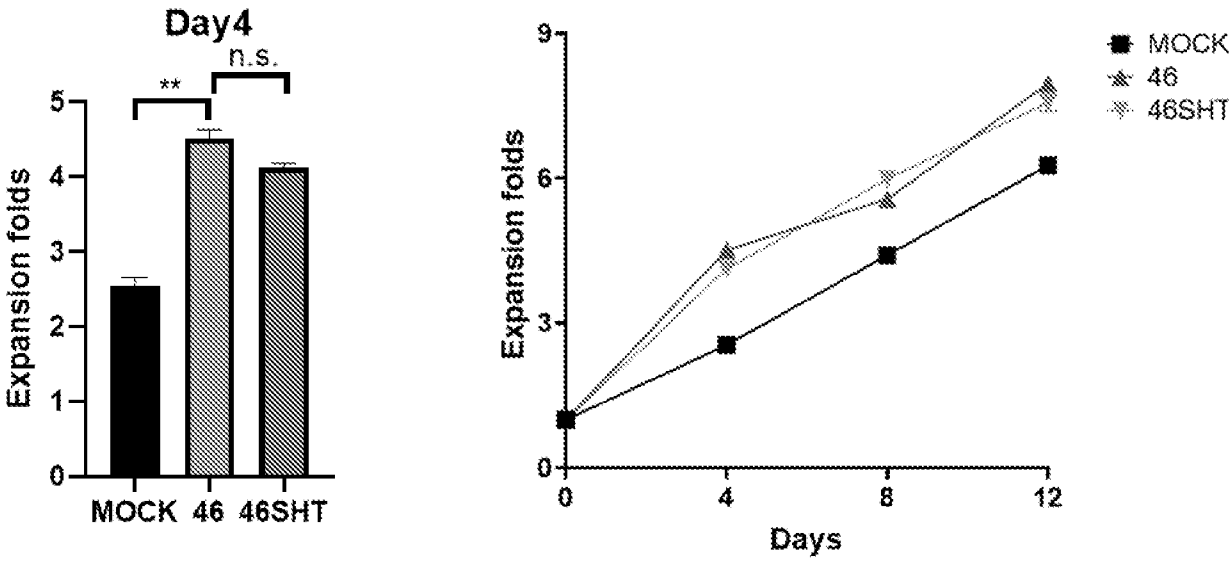


图 1

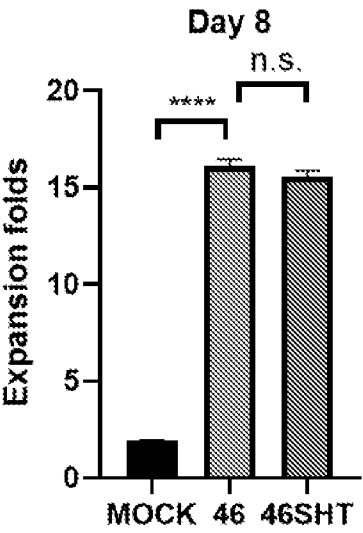


图 2

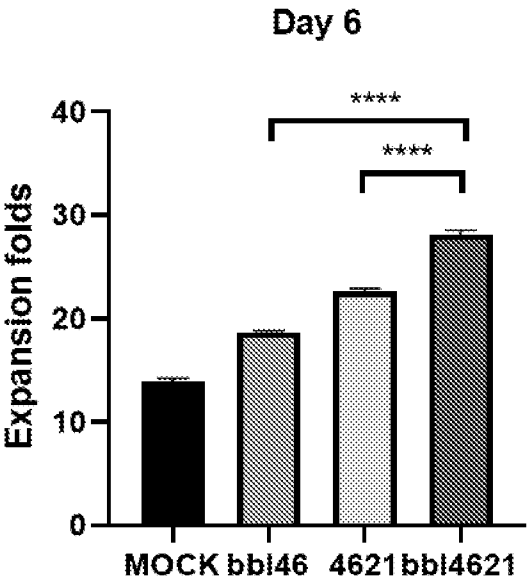


图 3

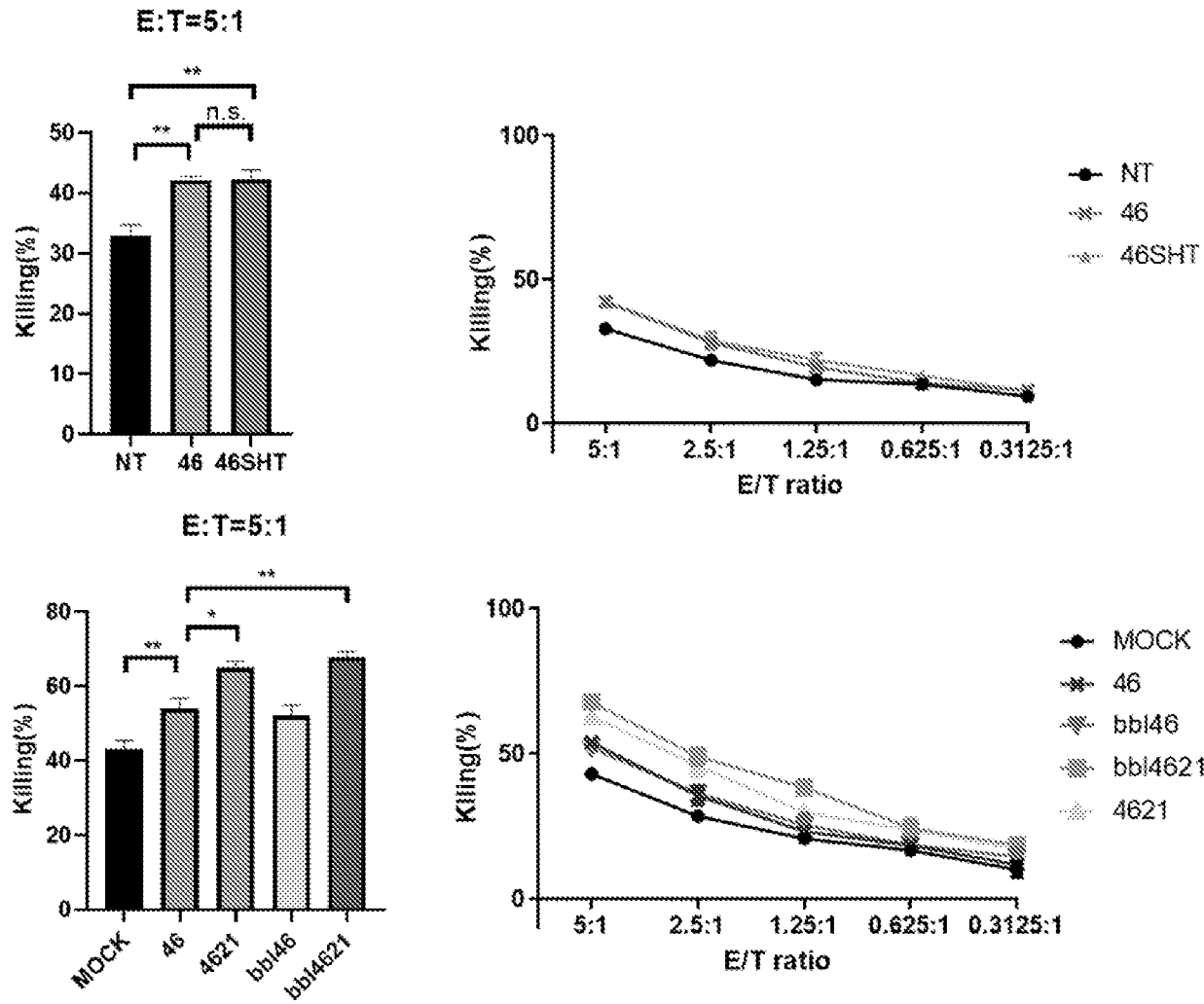


图 4

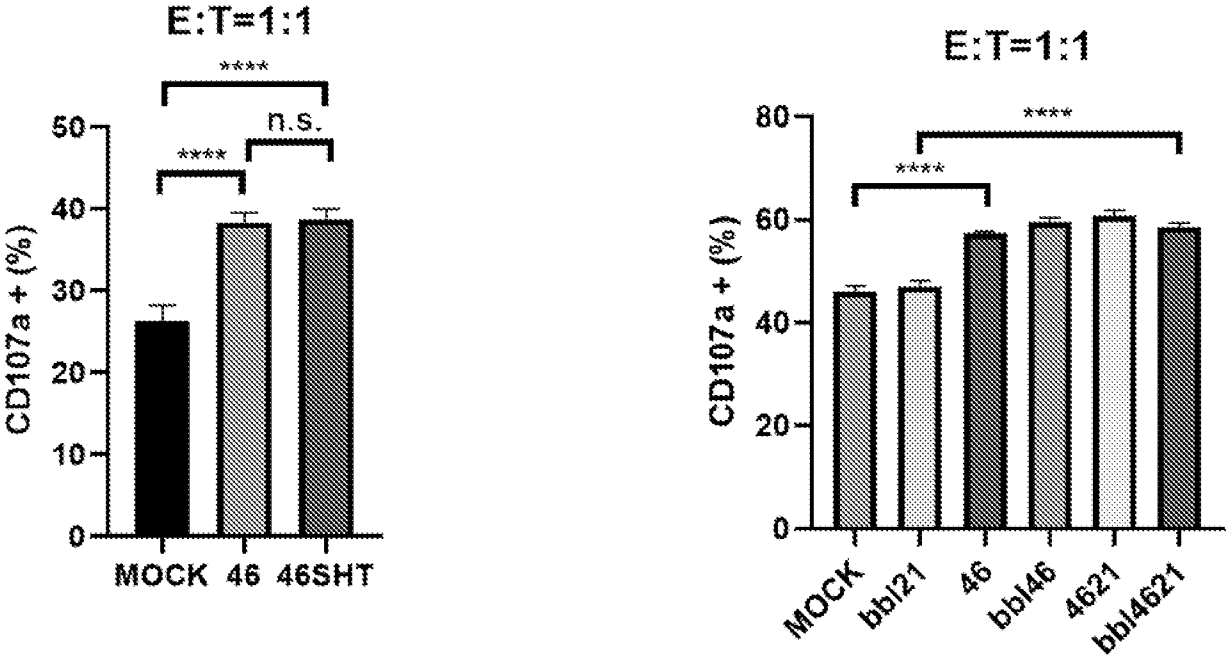


图 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/100058

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/867(2006.01)i; C12N5/10(2006.01)i; C07K19/00(2006.01)i; A61K39/00(2006.01)i; A61P31/00(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:C12N,C07K,A61K,A61P

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, WOTXT, JPTXT, USTXT, EPTXT, 万方, CNKI, PubMed, GenBank, 中国专利序列数据库, China Patents Sequence Database, ISI web of knowledge: 滋养细胞, 表达, NKp46抗体, 跨膜结构域, NK细胞, 激活, 共刺激结构域, 信号传导结构域, 铰链区, Trophoblast, expression, NKp46 antibody, transmembrane domain, NK cell, activation, co-stimulatory domain, signaling domain, hinge region

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 111206052 A (QINHUANGDAO ZHONGBANG STEM CELL MEDICAL TECHNOLOGY CO., LTD.) 29 May 2020 (2020-05-29) abstract, claims 1-12, and description, paragraph 60	1-20
Y	CN 112029001 A (NANJING BIOHENG BIOTECH CO., LTD.) 04 December 2020 (2020-12-04) abstract, claims 1-23, and sequences 43 and 105-110	1-20
Y	CN 110300765 A (INNATE PHARMA S.A.) 01 October 2019 (2019-10-01) abstract, claims 1-3, and sequences 22 and 63	1-20
Y	CN 108779175 A (INNATE PHARMA S.A.) 09 November 2018 (2018-11-09) abstract, claim 1, and sequences 11 and 78	1-20
A	CN 109666640 A (IREGENE THERAPEUTICS CO., LTD.) 23 April 2019 (2019-04-23) entire document	1-20
A	WO 2011110657 A1 (UNIVERSITE PARIS DESCARTES) 15 September 2011 (2011-09-15) entire document	1-20



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

01 September 2023

Date of mailing of the international search report

12 September 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/CN2023/100058**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 115595310 A (HEMATOLOGY HOSPITAL OF CHINESE ACADEMY OF MEDICAL SCIENCES (INSTITUTE OF HEMATOLOGY, CHINESE ACADEMY OF MEDICAL SCIENCES)) 13 January 2023 (2023-01-13) entire document	1-20
A	CA 3007898 A1 (INNATE PHARMA S.A.) 06 July 2017 (2017-07-06) entire document	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/100058

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 13ter.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
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2023/100058

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	111206052	A	29 May 2020	None			
CN	112029001	A	04 December 2020	None			
CN	110300765	A	01 October 2019	JP	2020506720	A	05 March 2020
				JP	7246321	B2	27 March 2023
				AU	2018213823	A1	27 June 2019
				US	2022340661	A1	27 October 2022
				CA	3046548	A1	02 August 2018
				US	2019367609	A1	05 December 2019
				US	11377492	B2	05 July 2022
				WO	2018138032	A2	02 August 2018
				WO	2018138032	A3	04 October 2018
				EP	3574016	A2	04 December 2019
CN	108779175	A	09 November 2018	None			
CN	109666640	A	23 April 2019	None			
WO	2011110657	A1	15 September 2011	EP	2545383	A1	16 January 2013
				US	2013203084	A1	08 August 2013
CN	115595310	A	13 January 2023	None			
CA	3007898	A1	06 July 2017	JP	2019503713	A	14 February 2019
				JP	7091250	B2	27 June 2022
				EP	3397645	A1	07 November 2018
				JP	2022137054	A	21 September 2022
				US	2018355036	A1	13 December 2018
				US	11001629	B2	11 May 2021
				WO	2017114694	A1	06 July 2017
				US	2021269523	A1	02 September 2021
				AU	2016383475	A1	28 June 2018

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2023/100058

A. 主题的分类

C12N15/867(2006.01)i; C12N5/10(2006.01)i; C07K19/00(2006.01)i; A61K39/00(2006.01)i;
A61P31/00(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:C12N, C07K, A61K, A61P

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, WOTXT, JPTXT, USTXT, EPTXT, 万方, CNKI, PubMed, GenBank, 中国专利序列数据库, ISI web of knowledge: 滋养细胞, 表达, Nkp46抗体, 跨膜结构域, NK细胞, 激活, 共刺激结构域, 信号传导结构域, 铰链区, Trophoblast, expression, Nkp46 antibody, transmembrane domain, NK cell, activation, co-stimulatory domain, signaling domain, hinge region

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	CN 111206052 A (秦皇岛中邦干细胞医学科技有限公司) 2020年5月29日 (2020 - 05 - 29) 摘要, 权利要求1-12, 说明书第60段	1-20
Y	CN 112029001 A (南京北恒生物科技有限公司) 2020年12月4日 (2020 - 12 - 04) 摘要, 权利要求1-23, 序列43, 105-110	1-20
Y	CN 110300765 A (依奈特制药公司) 2019年10月1日 (2019 - 10 - 01) 摘要, 权利要求1-3, 序列22, 63	1-20
Y	CN 108779175 A (依奈特制药公司) 2018年11月9日 (2018 - 11 - 09) 摘要, 权利要求1, 序列11, 78	1-20
A	CN 109666640 A (武汉睿健医药科技有限公司) 2019年4月23日 (2019 - 04 - 23) 全文	1-20
A	WO 2011110657 A1 (UNIVERSITY PARIS DESCARTES) 2011年9月15日 (2011 - 09 - 15) 全文	1-20

☒ 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

2023年9月1日

国际检索报告邮寄日期

2023年9月12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

授权官员

吕健

电话号码 (+86) 010-53962098

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	CN 115595310 A (中国医学科学院血液病医院 (中国医学科学院血液学研究所)) 2023年1月13日 (2023 - 01 - 13) 全文	1-20
A	CA 3007898 A1 (INNATE PHARMA) 2017年7月6日 (2017 - 07 - 06) 全文	1-20

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
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2023/100058

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	111206052	A	2020年5月29日	无			
CN	112029001	A	2020年12月4日	无			
CN	110300765	A	2019年10月1日	JP	2020506720	A	2020年3月5日
				JP	7246321	B2	2023年3月27日
				AU	2018213823	A1	2019年6月27日
				US	2022340661	A1	2022年10月27日
				CA	3046548	A1	2018年8月2日
				US	2019367609	A1	2019年12月5日
				US	11377492	B2	2022年7月5日
				WO	2018138032	A2	2018年8月2日
				WO	2018138032	A3	2018年10月4日
				EP	3574016	A2	2019年12月4日
CN	108779175	A	2018年11月9日	无			
CN	109666640	A	2019年4月23日	无			
WO	2011110657	A1	2011年9月15日	EP	2545383	A1	2013年1月16日
				US	2013203084	A1	2013年8月8日
CN	115595310	A	2023年1月13日	无			
CA	3007898	A1	2017年7月6日	JP	2019503713	A	2019年2月14日
				JP	7091250	B2	2022年6月27日
				EP	3397645	A1	2018年11月7日
				JP	2022137054	A	2022年9月21日
				US	2018355036	A1	2018年12月13日
				US	11001629	B2	2021年5月11日
				WO	2017114694	A1	2017年7月6日
				US	2021269523	A1	2021年9月2日
				AU	2016383475	A1	2018年6月28日