

(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
2019 年 4 月 25 日 (25.04.2019)



(10) 国际公布号
WO 2019/076149 A1

(51) 国际专利分类号:
C12N 5/10 (2006.01) *A61P 31/00* (2006.01)
C12N 15/867 (2006.01) *A61P 37/06* (2006.01)
A61K 35/17 (2015.01) *A61P 37/08* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *A61P 37/02* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2018/103714

(22) 国际申请日: 2018 年 9 月 2 日 (02.09.2018)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201710983276.X 2017 年 10 月 20 日 (20.10.2017) CN

(71) 申请人: 重庆精准生物技术有限公司 (CHONGQING PRECISION BIOTECH COMPANY LIMITED) [CN/CN]; 中国重庆市

九龙坡区含谷镇含兴路 38 号, Chongqing 400038 (CN)。

(72) 发明人: 张巍(ZHANG, Wei); 中国重庆市九龙坡区含谷镇含兴路 38 号, Chongqing 400038 (CN)。李戊玲(LI, Wuling); 中国重庆市九龙坡区含谷镇含兴路 38 号, Chongqing 400038 (CN)。张茜真(ZHANG, Xizhen); 中国重庆市九龙坡区含谷镇含兴路 38 号, Chongqing 400038 (CN)。单娟娟(SHAN, Juanjuan); 中国重庆市九龙坡区含谷镇含兴路 38 号, Chongqing 400038 (CN)。

(74) 代理人: 北京元本知识产权代理事务所 (BEIJING YUANBEN INTELLECTUAL PROPERTY LAW OFFICE); 中国北京市海淀区学清路 9 号汇智大厦 3 层 2 单元 312, 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,

(54) Title: UNIVERSAL CAR-T CELL, PREPARATION METHOD THEREFOR AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 通用型 CAR-T 细胞及其制备方法和应用

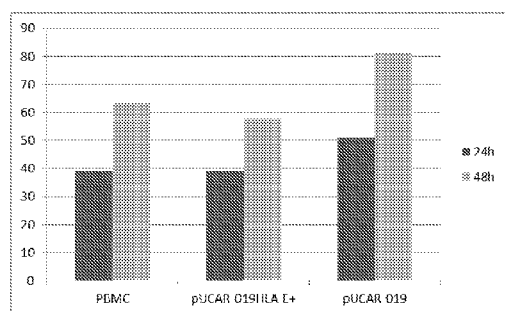


图 11

(57) Abstract: Provided are a universal CAR-T cell, a preparation method therefor and an application thereof. In the universal CAR-T cell, the functions of a T cell antigen receptor (TCR) and major histocompatibility complexes (MHC I and MHC II) in the T cell are inhibited while multi-gene knockout is performed. A gene encoding the TCR comprises TRAC and/or TRBC. Genes encoding the major histocompatibility complexes comprise HLA-A, B2MH and CIITA. The universal CAR-T cell can target relevant markers of specific tumors and inactivate the functions of the TCR and the MHC on the cell surface, can reduce immunological rejection caused by allogeneic cell therapy and safely and effectively remove tumor cells in the diseased human body, and is not affected by the disease or a treatment mode of a patient in use.

(57) 摘要: 提供了一种通用型 CAR-T 细胞及其制备方法和应用。所述通用型 CAR-T 细胞中经过多基因敲除同时抑制了 T 细胞抗原受体(TCR)和主要组织相容性复合体(MHC I, MHC II)在 T 细胞中的功能。编码所述 TCR 的基因包括 TRAC 和/或 TRBC。编码所述主要组织相容性复合体的基因包括 HLA-A、B2MH 和 CIITA。所述通用型 CAR-T 细胞能够靶向特异的肿瘤相关标志并且细胞表面 TCR 和 MHC 功能失活, 可以降低同种异体细胞治疗引起的免疫排斥反应并且清除病人体内的肿瘤细胞, 且在使用中不受病人自身病情或治疗方式影响。

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))。
- 包括说明书序列表部分 (细则5.2(a))。

通用型 CAR-T 细胞及其制备方法和应用

技术领域

本发明属于免疫治疗领域，涉及通用型 CAR-T 细胞及其制备方法和应用，具体涉及一种通用型 T 细胞和通用型 CAR-T 细胞及其制备方法和在药物中的应用。

背景技术

过继细胞治疗(adoptive cell therapy, ACT)是生物治疗技术的一种，对自体免疫细胞(主要是 T 细胞)进行体外扩增，然后将其回输给肿瘤患者以达到治疗目的的方法，被认为是继手术、放、化疗后的第 4 种治疗方式，在临床治疗中受到广泛应用。

嵌合抗原受体又称 CAR，是模拟 TCR 功能的人工受体。肿瘤细胞表面的抗原（受体）与嵌合抗原受体的抗体（配体）结合时，通过铰链区和跨膜区将信号传递至胞内，胞内信号域再将信号转化为活化信号，激活效应细胞，效应细胞通过分泌穿孔素或者产生细胞因子杀伤肿瘤细胞，同时效应细胞本身也发生扩增，进一步扩大免疫杀伤作用。

近年来随着嵌合抗原受体（CAR）修饰的 T 细胞在血液病肿瘤治疗上的显著效果，过继细胞治疗的需求不断升高。但是目前过继细胞治疗还是基于自体细胞的回输治疗方式，这种方式在步骤上需要抽取病人一定量的外周血，之后再进行外周血单个核细胞分离，T 淋巴细胞分离，进一步对分离的 T 淋巴细胞进行修饰改造以及体外增殖，修饰的 T 细胞增殖到一定数目再回输回病人体内才能起到一定的治疗效果。但是大部分病人尤其是肿瘤病人在进行 CAR-T 细胞过继治疗前均进行过其他方式的治疗，例如：化疗，放射性治疗，这就导致获得的 T 淋巴细胞较少，甚至由于药物的作用很多病人的 T 细胞在体外扩增困难并且病人自身来源的 T 细胞还可能出现功能衰减或缺失，并且对于 T 细胞基因改造的难度加大并且治疗效果和安全性不易控制，这些障碍均影响着 CAT-T 细胞治疗和肿瘤临床治疗的应用推广和发展。

同种异体细胞是指属于相同物种但在遗传上有所差异个体的细胞；虽然能够利用健康人外周血分离的 T 淋巴细胞较多，CAR 感染阳性率高并且活力和功能优于病人来源 T 淋巴细胞的优势进行同种异体细胞治疗，但是同种异体细胞治疗仍然面临诸多障碍：由于供受体之间存在免疫遗传学差异，一方面，具有免疫活性的供体的 T 淋巴细胞在进入受体病人体内并增殖到一定程度后，将受体病人的正常细胞或组织误认为靶标进行攻击从而产生移植物抗宿主反应（GVHD），另一方面，作为异体细胞受体体内的正常免疫系统也可能会对其进行清

除产生宿主抗移植反应（HVGR）从而影响治疗效果。针对 HVGR 临床上主要在治疗前应用免疫抑制类药物抑制受体免疫系统活性，但是在过继细胞治疗时免疫抑制类药物会影响回输细胞的疗效；针对 GVHD 医学上主要通过 HLA 配型来进行预防，但是 HLA 配型成功概率低耗时长而且费用高昂。

因此需要开发一种可以降低同种异体细胞治疗引起的免疫排斥反应并安全有效的通用型 CAR-T 细胞。

发明内容

有鉴于此，本发明的目的在于提供一种通用型CAR-T细胞，本发明的通用型CAR-T细胞能够靶向特异的肿瘤相关标志并且细胞表面TCR和MHC功能失活，可以降低同种异体细胞治疗引起的免疫排斥反应并且安全有效的清除病人体内的肿瘤细胞。

为实现上述目的，本发明的技术方案为：

通用型CAR-T细胞，所述通用型CAR-T细胞中经过多基因敲除同时抑制了T细胞抗原受体（TCR）和主要组织相容性复合体（MHC I，MHC II）在T细胞中的功能；编码所述TCR的基因包括TRAC和/或TRBC；编码所述主要组织相容性复合体的基因包括HLA-A，B2M和CIITA。

自体细胞的 CAR-T 治疗需要抽取血液分离病人自身 T 淋巴细胞制备，一方面由于病人自身病情以及 T 淋巴细胞状态不同 CAR-T 生产过程影响因素较多不能标准化生产影响安全性，另一方面有些病人自体 T 淋巴细胞经过化疗后活性和数量不足，或受到肿瘤环境影响导致 T 淋巴细胞活性和增殖能力受限，这样的细胞在制备 CAR-T 时往往难度较大，治疗的安全性和有效性受到影响；或者在 CAR-T 细胞制备过程中若出现突发状况已准备细胞不能及时回输给病人也会影响治疗效果，甚至于受到自体 T 淋巴细胞状态影响有些肿瘤患者不能接受自体的 CAR-T 细胞过继治疗；可用于同种异体治疗的通用型 CAR-T 或通用型 T 淋巴细胞治疗的研究技术就显得迫在眉睫。

我们同时敲除基因 TRAC，B2M 和 CIITA 或 TRAC、HLA-A 和 CIITA 基因，TCR 和 MHC 一、二类分子（主要组织相容性复合体）功能全部失活，获得的通用型 CAR-T 安全性高，另一方面考虑到体内 NK 细胞通过 MHCI 来识别“自体和非自体”并对识别的“非自体”进行攻击，导致病人的 NK 细胞会识别通用型 CAR-T 并对其清除，这样该通用型 CAR-T 在病人体内存活时间短效果差，所以我们进行了改进：同时表达 HLA-E 或 HLA-F 可以与 NK 细胞表面的分子识别，让 NK 细胞认为该细胞为“自体”细胞不进行攻击。

进一步，所述通用型 CAR-T 细胞中敲除包括 TRAC，B2M 和 CIITA 基因的同时还表达

HLA-E 或 HLA-F。

宿主抗移植反应 (host versus graft reaction, HVGR) 与移植抗宿主反应 (graft versus host reaction, GVHR) 是除细胞因子释放综合征 (Cytokine release syndrome, CRS) 等以外 CAR-T 治疗存在的最大难题之一, HVGR 与 GVHR 相关基因包含 TCR、MHC 一、二类分子 (主要组织相容性复合体 MHC I、MHC II) 相关基因, 单个 TRAC 基因是编码 TCR α 链的基因与编码 TCR β 的两个 TRBC 基因形成完整的有功能的 TCR 复合物, 敲除 TRAC 是可以达到致使 TCR 失活的最优方案, B2M 和 CIITA 分别为 MHC I、MHC II 相关基因, 以上三个基因同时敲除的 T 淋巴细胞在回输入同种异体病人时不会引起移植抗宿主病 (GVHD)。

但是利用上述构建的通用型 CAR-T 细胞进行试验时发明人发现: 该通用型 CAR-T 细胞会很快被异体的 NK 细胞清除, 存活时间短。可能是因为 B2M 干扰后会引起 MHCI 类家族所有基因的完全失活, 虽然这样能够更完全消除 GVHD 但是 MHCI 类分子的表达又是 NK 细胞识别“自体细胞”的关键分子, MHCI 类分子完全失活会导致 NK 细胞将回输细胞认为“异体”对回输细胞进行清除, 影响通用型 CAR-T 细胞针对肿瘤的有效性。

在感染 CAR 的同时共表达 MHCI 类亚型中在人类基因组中保守的基因如 HLA-E 或 HLA-F, 再利用 CRISPR/Cas9 敲除 TRAC、B2M 和 CIITA 基因, 让通用型 CAR-T 细胞重新“贴上自体标签”, 以达到在减弱 GVHD 的同时又不引起 NK 细胞的攻击的目的。

作为一种优选, 所述通用型 CAR-T 细胞中敲除 TRAC, B2M 和 CIITA 基因的同时还表达 HLA-E 或 HLA-F。

作为一种优选, 所述通用型 CAR-T 细胞中敲除 TRAC, B2M 和 CIITA 基因的同时还表达 HLA-E。

申请人团队之前进行过不同健康供者的血液的 HLA 分型检测, HLA 是具有高度多态性的同种异体抗原, 受控于人类主要组织相容性复合体 (MHC) 的基因簇, HLA 等同于前述 MHC 分子; 发现所检测样本中 HLA-A 主要集中在 8 种分型中, 8 种分型分别为 A*02, A*11, A*24, A*30, A*33, A*03, A*01 和 A*26, 对这 8 种分型进行 PCR 扩增获得 PCR 片段进行 gRNA 设计时又发现其中 7 种分型可在同一区域设计 gRNA, 进一步发明人团队利用生物信息技术通过大数据分析不同 HLA-A 转录本比例发现该 8 种基因分型在包含 90% 以上中国人中频率最高。8 种频率最高的分型 gRNA 设计区域基因序列如 SEQ ID NO:4, gRNA 序列如 SEQ ID NO:8-12。

HLA-A 基因敲除可以引起 HLA 功能失活但是对于人类保守的 HLA-E, HLA-F 功能并不影响 (人类保守的 HLA 分子在所有人类中表型均一致), 选择 HLA-A 基因替换 B2M 基因, 敲除

TRAC、HLA-A和CIITA从而达到既不引起GVHD又不会引起NK特异识别的通用型CAR-T细胞。

进一步，所述通用型CAR-T细胞中敲除TRAC、HLA-A或B2M、CIITA基因。

本发明的目的之二在于提供一种所述通用型CAR-T细胞的制备方法，包括以下步骤：

1) 得到活化的T细胞；

2) 用编码靶向不同肿瘤相关分子的CAR或CAR与HLA-E或HLA-F共表达的慢病毒载体来转染步骤1)的T细胞，获得靶向不同肿瘤相关分子的CAR-T细胞；

3) 将步骤2)获得的CAR-T细胞通过TALEN或锌指方法或CRISPR/Cas9系统的方法进行包括TRAC、HLA-A和CIITA或者TRAC、B2M和CIITA的多基因敲除获得通用型CAR-T细胞。

所述的通用型CAR-T细胞能够靶向特异的肿瘤相关标志并且细胞表面TCR和MHC功能失活，制备方法需要逾越两个技术障碍，一是在T淋巴细胞内同时实现多基因敲除与多基因表达的可行性；二是获得的通用型CAR-T或T淋巴细胞是否能够安全有效的针对特异靶点的肿瘤细胞。

多基因敲除的研究，基本是在T淋巴细胞上完成的，在CAR-T上进行多基因敲除既要完成基因敲除又要实现CAR-T的表达在技术上实现较为困难；一般的基因敲除方法是，利用病毒载体多次感染带有要敲除的目的基因的sgRNA的CRISPR/Cas9载体和CAR载体，并且因多次病毒感染细胞活性降低，而多基因敲除导致载体过大利用病毒或者转染试剂转染效率极低，只能用电转才能实现转染载体的目的，但是申请人发现经过电转的细胞状态较差需要经过一定的恢复期而T淋巴细胞不能在体外长期增值存活（即便使用活化试剂刺激在体外生存时间一般也是最多在2-3周）电转之后再进行CAR的感染效率低并且细胞活性差；

因此，申请人优化感染条件在T细胞活化24小时后先进行CAR感染制备CAR-T细胞，24小时培养后再进行电转，转染带有要敲除的目的基因的sgRNA的CRISPR/Cas9载体，构建通用型CAR-T细胞。该方法敲除效率高，获得的通用型CAR-T细胞异体回输安全性高，感染CAR阳性率稳定具有很好的杀伤活性和特异性。

为了达到治疗的目的，过继转输或者同种异体回输所用的CAR-T或T淋巴细胞（T细胞）均为外周血分离的T细胞制备，但是外周血分离的T细胞是已经成熟的T细胞在体外保持增殖和有效功能时间有限，所以经过基因修饰的通用型细胞需要在体外快速扩增到病人治疗所需数目后回输给病人，发明人通过大量实验摸索，结合病毒感染和电转的方式获得了最优的构建通用型CAR-T或T细胞的方法：1) 利用病毒感染的方式进行多基因表达；2) 利用CRISPR/Cas9技术进行多基因干扰。但是目前普遍采用的病毒感染表达基因对于单基因感染技术较为成熟，多基因感染往往感染效率不高，并且同时涉及到多基因敲除，

CRISPR/Cas9 技术虽然可以实现目标基因的稳态敲除,但是多基因干扰采用病毒感染的方式敲除效率低,利用电转的方式对细胞活性影响大并且最佳的电转条件需要大量摸索实验。

步骤2)中先利用含有编码针对特异性肿瘤靶点的CAR和共表达HLA-E或HLA-F的病毒感染T淋巴细胞获得CAR-T细胞,再进一步进行多基因敲除。

进一步,步骤2)中所述CAR识别的靶标分子包括CD19, PSCA, CD123, CD20, CEA (癌胚抗原), FAP, CD133, EGFR, EGFRVIII, BCMA, PSMA, Her2, CA125, EphA2, C-met, L1CAM, VEGFR, CS1, ROR1, EC, NY-ESO-1, MUC1, MUC16, mesothelin, LewisY, GPC3, GD2, EPG, DLL3, CD99, 5T4, CD22, CD30, CD33, CD138, CD171 中的一种。

进一步,步骤3)中多基因敲除的方法为CRISPR/Cas9系统的方法。

进一步,所述CRISPR/Cas9系统由gRNA和Cas9核酸酶或内切酶组成。

进一步,通过CRISPR/Cas9系统进行多基因敲除优选电转转染方式,将要敲除的多基因的gRNA构建在同一载体,利用电转的方式转染进行基因敲除。

进一步,靶向B2M, HLA-A, CIITA和TRAC基因的gRNA序列如SEQ ID NO:5-19所示。

进一步,靶向TRAC、B2M和CIITA或者HLA-A, CIITA和TRAC基因的gRNA序列构建在载体PX330A。

表达的HLA-E基因序列为SEQ ID NO:33,蛋白序列为SEQ ID NO:34;表达的HLA-F基因序列为SEQ ID NO:32。

如何选择敲除方式达到转染效率高细胞存活率高这是一个难题。申请人通过多次试验发现多次转染以达到多基因敲除的方法会严重影响细胞活性,申请人设计靶向B2M, CIITA和TRAC或者HLA-A, CIITA和TRAC三种基因的gRNA构建在同一载体,利用电转的方式转染进行基因敲除。在未有更有效的提示技术下,申请人通过大量实验摸索电转条件的优化:在进行电转时所用电转Buffer、电压、脉冲大小以及电击次数的不同都会影响着细胞存活率和电转效率。

作为一种优选,293T细胞进行GFP的转染,电转条件为PBMC或T细胞活化48小时后电压1000V,脉宽为35ms电击次数两次进行电转,细胞总量 2×10^5 ,电转后用新鲜含IL-2的培养基培养。

本发明的目的之三在于提供一种上述制备方法中所得的CRISPR/Cas9基因敲除的表达载体,所述表达载体包含如SEQ ID NO:26-31所示的基因序列。

本发明的目的还在于提供一种所述通用型CAR-T细胞在异体治疗的药物中的应用。

在所述的方法下得到所述的通用型细胞,可以获得靶向特异性肿瘤并且细胞表面TCR和

MHC一、二类分子同时失活的通用型CAR-T细胞，或者细胞表面TCR和MHC一、二类分子同时失活的通用型T淋巴细胞，应用于肿瘤治疗可以提高CAR-T细胞清除肿瘤的安全性和有效性。

本发明的目的还在于提供一种所述通用型CAR-T细胞在用于制备针对恶性肿瘤或感染性疾病的药物中的应用。

进一步，所述恶性肿瘤或感染性疾病的细胞或组织能够表达包括CD19, PSCA, CD123, CD20, CEA (癌胚抗原), FAP, CD133, EGFR, EGFRVIII, BCMA, PSMA, Her2, CA125, EphA2, C-met, L1CAM, VEGFR, CS1, ROR1, EC, NY-ESO-1, MUC1, MUC16, mesothelin, LewisY, GPC3, GD2, EPG, DLL3, CD99, 5T4, CD22, CD30, CD33, CD138, CD171中的一种。所述通用型CAR-T包含UCAR-19和UCAR-PSCA。

进一步，所述恶性肿瘤或感染性疾病包括：血液系统肿瘤、实体瘤、异体移植所引起的免疫排斥反应以及自身免疫性疾病如过敏反应或者系统性红斑狼疮。

本发明的目的还在于提供一种用于同种异体治疗药物中的通用型T细胞，所述通用型T细胞中同时抑制了T细胞抗原受体(TCR)和主要组织相容性复合体(MHC I, MHC II)在T细胞中的功能并且表达识别恶性肿瘤或者感染细胞的嵌合抗原受体。

进一步，编码所述TCR的基因包括TRAC和/或TRBC；编码所述主要组织相容性复合体的基因包括HLA, B2MH和CIITA。

进一步，所述通用型CAR-T细胞中同时敲除了TRAC、HLA-A和CIITA基因或同时敲除TRAC, B2M和CIITA基因还表达HLA-E或HLA-F。

该通用型T细胞可以用于同种异体治疗。

本发明的目的还在于提供一种上述的通用型T细胞在用于制备针对恶性肿瘤或感染性疾病的药物中的应用。

进一步，所述恶性肿瘤或感染性疾病包括：血液系统肿瘤、实体瘤、异体移植所引起的免疫排斥反应以及自身免疫性疾病如过敏反应或者系统性红斑狼疮。

申请人在与HVGR和GVHR相关的基因中，通过基因编辑技术设计不同的研究方案对健康供着的T淋巴细胞进行基因编辑改造，最终获得排斥反应低在病人体内长期存活并且安全性高的同种异体通用T细胞，通用型T细胞的获得使得同种异体细胞治疗获得更广泛的应用空间促进细胞治疗的标准化生产；申请人进一步利用通用型的T淋巴细胞成功进行CAR-T改造获得同种异体通用型CAR-T细胞，让CAR-T治疗的安全性和有效性进一步提升。

总的来说，本发明所述的通用型T细胞和通用型CAR-T细胞可以通过同种异体回输的方式应用于恶性肿瘤或感染性疾病的治疗，并且排斥反应低在病人体内可以长期存活安全性

高,促进了大部分病人尤其是肿瘤病人经过化疗,放射性治疗导致自体 T 细胞较少甚至由于病情 T 胞功能衰减或缺失进而影响细胞治疗的治疗效果和安全性问题的解决,为 CAR-T 细胞治疗的推广和发展提供帮助。

本发明的有益效果在于:

1) 本发明提供的制备通用型 CAR-T 细胞的方法能够获得 CAR 表达率高 TCR 和 MHC 同时失活的通用型 CAR-T 细胞,所述通用型 CAR-T 细胞应用于恶性肿瘤或感染性疾病的治

疗排斥反应低并且在病人体内有效性安全性高。

2) 本发明提供的通用型 CAR-T 细胞应用于异体的过继细胞治疗不受病人自身病情或治疗方式影响通用型 CAR-T 细胞的制备,可以随时制备所需通用型 CAR-T,在最佳的时机给予病人进行治疗,确保治疗的有效性。

3) 本发明提供的通用型 T 细胞能够应用于同种异体回输的免疫治疗的 T 细胞,所述通用型 T 细胞便于程序化制备异体回输后排斥反应小。

附图说明

图 1 为中国人 HLA-A 分型频率检测结果。

图 2 为利用 CRISPR/Cas9 系统敲除 TCR 和 MHC 一、二类分子相关基因载体设计。

图 3 为设计的 gRNA 靶向位点检测。

图 4 为 CRISPR/Cas9 系统敲除后 CAR-T 细胞表面 B2M, CIITA 和 TRAC 表达检测。

图 5 为 CAR 表达检测。

图 6 为 CRISPR/Cas9 系统敲除后 CAR-T 细胞 TCR 和 MHC 一、二类分子同时失活效率以及分选后获得三阴性 CAR-T 表型检测。

图 7 为 CRISPR/Cas9 脱靶检测。

图 8 为三阴性 CAR-T 细胞对异体 NK 细胞反应性检测。

图 9 为通用型 CAR-T HLA-E 表达检测。

图 10 为通用型 CAR-T 杀伤肿瘤细胞能力检测。

图 11 为通用型 CAR-T 细胞异体 NK 反应性检测。

具体实施方式

以下将参照附图,对本发明的优选实施例进行详细描述。优选实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,例如分子克隆实验指南(第三版, J.萨姆布鲁克等著)中所

述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。所举实施例是为了更好地对本发明的内容进行说明，但并不是本发明的内容仅限于所举实施例。所以熟悉本领域的技术人员根据上述发明内容对实施方案进行非本质的改进和调整，仍属于本发明的保护范围。

实施例 1、中国人群 HLA-A 分型频率检测

1.SBT（Sequenced Based Typing）检测：

该方法属于 HLA 高分辨率分型技术。

EDTA 抗凝管（血常规管）抽取受检者静脉血 4ml，4°冷藏暂存，-20°长期冻存。然后送华大进行 HLA 分型检测。

2.生物信息学方法：参考 Boegel, Sebastian,Valesca et al. (2013)

利用 seq2HLA 软件，直接从 RNA-Seq 测序的原始数据（fastq 格式）中计算该样本的 HLA 高分辨率分型（MHC-I 和 MHC-II，4 位）及相应的表达值和 p 值。

实验结果如图 1 所示获得 8 种中国人频率最高的 8 种 HLA-A 分型，分别为 A*02，A*11 A*24，A*30，A*33，A*03，A*01 和 A*26，分别针对这 8 种亚型设计 gRNA 分子，gRNA 序列如 SEQ ID NO:8-12。

实施例 2、敲除 TCR 和 MHC 一、二类分子相关基因载体构建

1.sgRNA 分子设计：

确认与 TCR 和 MHC 一、二类分子相关的基因：B2M、CIITA 以及 TRAC 基因与 TCR 和 MHC 一、二类分子相关的基因功能密切相关确认敲除 B2M、CIITA 以及 TRAC 基因。在 NCBI 分别获得 B2M、CIITA 以及 TRAC 基因序列号获得 CDS 序列，B2M 序列号 AH002619.2，CIITA 在 NCBI 基因 ID：4261，TRAC 在 NCBI 基因 ID：28755，如 SEQ ID NO：1-3 所示。分别针对 CDS 区的确定靶向的 SEQ ID NO：1-3 区域设计 gRNA，gRNA 序列如表 1。

表 1：gRNA 序列

基因名称	序列名称	序列
HLA-A	sg-B2M-1	CGCGAGCACAGCTAAGGCCA
	sg-B2M-2	GAGTAGCGCGAGCACAGCTA
	sg-B2M-3	GGCCGAGATGTCCTCGCTCCG
	sg-HLA-A1	TGACGGCCATCCTCGGCGTC
	sg-HLA-A2	GACGCCGAGGATGGCCGTCA
	sg-HLA-A3	GACGGCCATCCTCGGCGTCT
	sg-HLA-A11-1	CGCCATGACGGCCATCCTCG
	sg-HLA-A11-2	GCGCCATGACGGCCATCCTC
CIITA（HLAII 类分子转录因子）	sg-CIITA-1	GCTGAACTGGTCGCAGTTGA
	sg-CIITA-2	GATATTGGCATAAGCCTCCC
	sg-CIITA-3	GTCAACTGCGACCAGTTCAGC
	sg-CIITA-C1	TTCTTACACAATGCGTTGCC

	sg-CIITA-C2	AGCCAGGCAACGCATTGTGT
TCR	sg-TRAC-1	AGAGTCTCTCAGCTGGTACA
	sg-TRAC-2	TGTGCTAGACATGAGGTCTA
	sg-TRBC	TCTCCGAGAGCCCGTAGAAC
	sg-TCR	GAGAATCAAAATCGGTGAAT

2. 构建 CRISPR/Cas9 基因敲除的表达载体

设计如下引物，并将其由南京金斯瑞生物科技有限公司合成，具体引物如下：

引物 sg-B2M-3-up: 5'-CACCGGCCGAGATGTCTCGCTCCG-3'; SEQ ID NO:20;

引物 sg-B2M-3-down: 5'-AAACCGGAGCGAGACATCTCGGCC-3'; SEQ ID NO:21;

引物 sg-CIITA2-up: 5'-CACCGATATTGGCATAAGCCTCCC-3'; SEQ ID NO:22;

引物 sg-CIITA2-down: 5'-AAACGGGAGGCTTATGCCAATATC-3'; SEQ ID NO:23;

引物 sg-TRAC-1-up: 5'-CACCGAGTCTCTCAGCTGGTACA-3'; SEQ ID NO:24;

引物 sg-TRAC-1-down: 5'-AAACTGTACCAGCTGAGAGACTCT-3'; SEQ ID NO:25。

然后以上述所示序列为引物，将两条上下游引物退火成三条双链的 gRNA 序列，反应体系按 Annealing Buffer for DNA Oligos (5X)(购自碧云天公司)说明书加样。

用限制性内切酶 BbsI(购自 NEB 公司)分别酶切 PX330A-1X3, PX330S-2, PX330S-3(均购自 Addgene Plasmid)，酶切反应按说明书进行。酶切产物经琼脂糖凝胶电泳分离后进行 DNA 片段回收，然后分别将对应退火后的引物片段和纯化后载体片段通过 T4 连接酶(购自 Promega 公司)进行连接，获得只带一个 gRNA 的表达载体。大肠杆菌表达后用质粒抽提试剂盒(Invitrogen 公司)抽提质粒，具体方法见说明书。

3. 参照 Golden gate cloning 技术，用限制性内切酶 BsaI(购自 NEB 公司)分别酶切上述构建的只带一个 gRNA 的表达载体。利用快速连接酶 Quick Ligation™ Kit (购自 NEB) 进行连接反应，按照说明书加样。用 X-gal 和 IPTG (均购自生工生物工程股份有限公司) 进行蓝白斑筛选得到六个包含三个不同 gRNA 表达框的组合载体：

PX330A-1X3-B2M-3-CIITA2-TRAC-1, PX330-A-1X3-B2M-3-TRAC-1-CIITA2,

PX330A-1X3-CIITA2-B2M-3-TRAC-1, PX330A-1X3-CIITA2-TRAC-1-B2M-3,

PX330A-1X3-TRAC-1-B2M-3-CIITA2, PX330A-1X3-TRAC-1-CIITA2-B2M-3; 大肠杆菌表达后用质粒抽提试剂盒(Invitrogen 公司)抽提质粒，具体方法见说明书。载体图谱及 PCR 结果如图 2 所示。

4. 检测构建的载体是否正确

将步骤 3 中获得的载体分别转染感受态利用小抽质粒 PCR 验证序列正确性，具体步骤

见分子克隆实验指南(第三版, J.萨姆布鲁克等著), 实验结果见图 2 可见有三条带并且进行测序结果正确。

实施例 3、通用型 CAR-T 细胞构建以及表型检测

1. 电转条件确认

在不同的条件下利用 293T 细胞进行 GFP 的转染进行电转条件的优化确认较好的电转条件后进一步进行 PBMC 转染, 实验结果见表 2, 表 3, 优选的电转条件为 PBMC 或 T 细胞活化 48 小时后电压 1000V, 脉宽为 35ms 电击次数两次进行电转, 细胞总量 2×10^5 , 电转后用新鲜含 IL-2 的培养基培养。

表 2: 不同电转条件下转染 293T 细胞转染效率以及细胞活性比较

序号	效率%	存活率%	电压/V	脉宽/ms	电击次数
1	0	100	0	1	1
2	83.1	35.7	1400	20	1
3	89.8	27.9	1500	20	1
4	91.8	21.2	1600	20	1
5	85.4	11.8	1700	20	1
6	60.6	23.2	1100	30	1
7	80.3	27.8	1200	30	1
8	83.9	23.9	1300	30	1
9	90	14.7	1400	30	1
10	48.2	34.8	1000	40	1
11	73.7	22.4	1100	40	1
12	87.4	15.6	1200	40	1
13	65.3	28.6	1100	20	2
14	83.6	22.8	1200	20	2
15	82.6	20.8	1300	20	2
16	94	12.8	1400	20	2
17	20.3	42.1	850	30	2
18	47.3	42.8	950	30	2
19	77.3	32.7	1050	30	2
20	90.6	23.6	1000	30	2
21	78.2	26.3	1300	10	3
22	87.8	23.8	1400	10	3
23	92.3	14.6	1500	10	3
24	89.7	8.9	1600	10	3

表 3: PBMC 和 T 淋巴细胞电转条件优化结果

细胞类型	电压 (v)	脉宽 (ms)	电击次数	细胞数目 (个)	存活率/%	电转效率/%
JURKAT E6-1	1300	10	3	2×10^5	—	25
	1500	20	1	2×10^5	10.1	22.5

	1400	10	3	2×10^5	17.6	23.5
	1000	30	2	2×10^5	18.1	20.3
	1000	35	2	2×10^5	23.9	28.1
PBMC 未活化	1000	30	2	2×10^5	47.6	0.5
PBMC 活化	1400	10	3	2×10^5	26.1	4.6
	1000	35	2	2×10^5	28.8	26.5
	1000	30	2	2×10^5	22.7	13.8
	1000	40	1	2×10^5	19.6	7.8

2. 包含 CAR 载体的慢病毒感染 T 淋巴细胞进行 CAR-T 细胞制备

1) 人外周血单核细胞的分离

用加有抗凝剂的采血管采集外周血约 60ml，分装于 50ml 离心管各 30ml，加入 7.5ml 羟乙基淀粉稀释；室温(18~25℃)自然沉降约 30min，收集上层血浆，离心 15min；然后用生理盐水重悬沉淀，按体积比为 1:1 加到淋巴细胞分离液上，梯度离心，离心 20min；离心后，取第二层白色淋巴细胞层，并用生理盐水洗涤 2 次，生理盐水重悬细胞，加入含有 10%FBS 的 RPMI 1640 完全培养基培养，得人外周血单核细胞。

2) 慢病毒载体感染 T 淋巴细胞

用含 10% FBS 的 RPMI 1640 完全培养基培养新制备的单个核细胞 PBMC，抗 CD3 单克隆抗体活化后进行慢病毒感染；分别加入含有靶向 CD19 或 PSCA 的 CAR 基因和/或编码 HLA-E 表达基因的慢病毒载体，未感染的外周血淋巴细胞 (PBMC) 作为空白对照；24 小时后收集细胞计数制备通用型 CAR-T 细胞，24 孔板铺板每孔 2×10^5 细胞，电转条件电压 1000V，电脉冲 35ms，电击两次完成电转。具体步骤采用 Neon® Transfection System 详见 Neon® Transfection System 操作说明书。

3. CAR-T 细胞表型检测：

以靶向 CD19 和 PSCA 为例，利用优选的电转条件：电压 1000V，脉宽为 35ms 电击次数两次进行电转，将含有靶向 B2M、CIITA 以及 TRAC 基因的 gRNA 的 CRISPR/Cas9 表达载体电转进(2)中靶向 CD19 或 PSCA 的 CAR-T 细胞获得通用型 pUCAR-19 和 pUCAR-PSCA 细胞，对培养至 10 天的已感染包含 CAR 病毒并通过电转利用 CRISPR/Cas9 系统敲除 TCR 和 MHC 一、二类分子相关基因的 T 细胞，300g/min，离心 5min，弃尽上清以收集细胞；将细胞调整密度为 1×10^6 个/ml；将收集的细胞分别分装利用流式细胞术检测 Protein-L 阳性率以检测通用型 CAR-T 细胞 CAR 表达阳性率，PBS 清洗 2 次洗去多余未结合 Protein-L 抗体后标记 HLA-DR，B2M，CIITA，HLA-E 以及 CD3 抗体检测 TCR 和 MHC 一、二类分子的表达。检测结果如图 4 所示，经过修饰的 T 淋巴细胞存在有 30%左右比例的表面 B2M，CIITA

以及 TRAC 分子均不表达, 如图 5 所示有 43.6% 的 CAR 表达, 发明所采用的方法同时敲除 3 个基因效率高并且不影响 CAR 表达。

分选 B2M, CIITA 以及 TRAC 分子三阴性并且 CAR 阳性表达的 pUCAR-CD19 或 pUCAR-PSCA 细胞, 如图 6 所示为获得的 pUCAR-CD19 细胞。

分选 B2M, CIITA 以及 TRAC 分子三阴性并且 CAR 和 HLA-E 阳性表达的 pUCAR-CD19 细胞, 三阴性并共表达 CAR 和 HLA-E 的细胞为改进的通用型 CAR-T 细胞用 pUCAR-019^{HLA-E+} 表示, 如图 7 所示为 HLA-E 的表达。

4. gRNA 靶向性检测

进一步将步骤 3 中获得的通用型 CAR-T 细胞用 QIAamp DNA Blood Mini Kit 购于 Qiagen 公司(货号 511004) 基因组抽提试剂盒抽提基因组。按试剂盒说明书操作, RT-PCR 并测序方式验证设计的 gRNA 靶向的区域, 结果见图 3, 字体加粗或者缺码的区域即为研发人员所设计 gRNA 所靶向区域, 结果显示研究人员所设计的 gRNA 可以对应的靶向 B2M、CIITA 以及 TRAC 基因的目标区域致使 B2M、CIITA 以及 TRAC 基因失活, 其中—为缺失; +为插入; M 为突变。

实施例 4、CRISPR/cas9 敲除 B2M、CIITA 以及 TRAC 脱靶检测

1. 将 gRNA 在设计网站比对, 找出预测人全基因组上的脱靶位点, 具体基因位点如表 4。
(<http://crispr.mit.edu>)
2. 在 NCBI 网站找出脱靶位点所在基因位置。 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>)
3. 设计相应基因位点 PCR 引物, 进行 PCR, 连接 T 载体并测序。
4. 根据测序结果分析是否发生脱靶。

表 4: 预测人全基因组上的脱靶位点

B2M-3	sequence	score	mismatches	UCSC gene	locus
1	GGCCGGCATCTCTCGCTCCACGG	0.2	4MMs [6:7:10:20]	AOC1	NM_001091 chr7:-150553540
2	GGCCAAGATGTCTCACACCCTAG	0.1	4MMs [5:15:17:20]	ZSWIM8	NM_015037 chr10:+75561425
3	GGCCCAGAAGTCTGGCTCAGGAG	0	4MMs [5:9:14:19]	ULK4	NM_017886 chr3:-41497060
CIITA2					
4	GAAAGTTGCATCAGCCTCCCGAG	0.5	4MMs [3:5:7:12]	SLC6A9	NR_048549 chr1:+44497045
5	CATCTTGGCACAAGCCTCCTGGG	0.4	4MMs [1:4:11:20]	RAB3D	NM_004283 chr19:+11448071
6	AATTTTGGCCTAAGACTCCCAAG	0.4	4MMs [1:4:10:15]	QSOX1	NM_001004128 chr1:-180163582
7	GATTTTGGCTGAAGCCGCCCCAG	0.3	4MMs [4:10:11:17]	27113	NM_001127242 chr19:-47724303
TRAC-1					

8	TGCCTCCCTCAGCTGGTACAAGG	0.9	4MMs [1:3:4:7]	HMCN1	NM_031935	chr1:+186039857
9	AGTCTCTCTCAGCTGGTGCAGGG	0.6	3MMs [3:4:18]	HPCAL4	NM_016257	chr1:+40145300
10	AGAGTCCAGCTGCTGGTACATGG	0.3	4MMs [7:8:9:11]	KIR3DL3	NM_153443	chr19:-55247683
11	AGAGACTTTCATCTGGCACAGAG	0.3	4MMs [5:8:12:17]	SLC26A5	NM_198999	chr7:-103017342
12	AGAGTATGGCGGCTGGTACAAAG	0.3	4MMs [6:8:9:11]	3831	NM_005552	chr14:+104142053

脱靶检测结果如图 8 所示，off-target-analysis 结果均为 0/6 或 0/5，表明分别针对 B2M、CIITA 以及 TRAC 设计的 gRNA 经过多次重复试验均未出现脱靶现象，申请所提及的 gRNA 序列特异性高稳定性好，在体内更安全。

实施例 5、通用型 CAR-T 细胞抗肿瘤效果验证

1.以 PSCA 高表达 Hela 细胞和 PSCA 不表达的 T24 细胞作为靶细胞检测构建的通用型 CAR-T 细胞针对 PSCA 靶点的有效性和特异性，pUCAR-PSCA 作为效应细胞按照 1:1 效靶比铺板效应细胞，验证 pUCAR-PSCA 的杀伤效果。杀伤实验通过 ACEA xCELLigence RTCA MP 仪器完成，实验步骤依据仪器说明书进行；第一天将靶细胞（表达 PSCA 的肿瘤细胞）以 2.5×10^4 每孔铺板于仪器配备的 96 孔板中，附着于孔底的肿瘤细胞以电阻指数为数据每 15 分钟记录一次，24 小时后依据预先设计的效靶比每孔铺入相应的 CAR-T 细胞，CAR-T 细胞铺入后每隔 15 分钟记录一次电阻指数，通过电阻指数判断贴壁的靶细胞的增殖或者死亡情况，见图 9，细胞基数为 1 当 Y 轴数字大于 1 是证明肿瘤细胞增殖了，当 Y 轴数字小于 1 时表明肿瘤细胞被杀伤，X 轴 T-B-C、B-T-C、T-C-B 分别表示在 PSCA-CAR-T 细胞分别转染 PX330A-1X3-TRAC-1-B2M-3-CIITA2、PX330A-1X3-B2M-3-TRAC-1-CIITA2、以及 PX330A-1X3-TRAC-1-CIITA2-B2M-3 载体的通用型 pUCAR-PSCA 细胞，PSCA 组为未转染敲除系统只感染了 CAR 的自体 CAR-T 细胞，Medium 为正常培养的肿瘤细胞，PBMC 组为未感染 CAR 也未转染敲除载体的 T 淋巴细胞，杀伤结果如图 9 所示：在 24 小时通用型 CAR-T 展现了显著的杀伤作用，尤其是 B-T-C（PX330-A-1X3-B2M-3-TRAC-1-CIITA2）组展现了高的杀伤活性和特异性。

2.以稳定表达萤火虫荧光素酶的 CD19 阳性 Raji 细胞（简称为 Raji-luc）作为靶细胞，UCAR-19 作为效应细胞按照 1:1 效靶比铺效应细胞，验证 pUCAR-019 的杀伤结果。其中 1 表示 CAR-019 细胞感染 PX330-A-1X3-B2M-3-TRAC-1-CIITA2 的 pUCAR-019-1 细胞，2 表示 CAR-019 细胞感染 PX330A-1X3-TRAC-1-CIITA2-B2M-3 的 pUCAR-019-2 细胞；使用 Steady-Glo® Luciferase Assay System（Promega Cat. #E2520）试剂盒提供的标准方法检测杀伤效果，杀伤率用下列公式计算：

$$\text{细胞杀伤率} = (1 - \text{效应细胞靶细胞共培养孔荧光强度} / \text{单独靶细胞孔荧光强度}) \times 100\%$$

杀伤结果如图 10 所示，1 即 pUCAR-019-1 组的细胞展现了高的杀伤活性。

实施例 6、通用型 CAR-T 细胞对异体 NK 细胞反应性检测

1. 根据细胞的大小和生长速度将适量同种异体 T 淋巴细胞或者 pUCAR-19 细胞接种到 96 孔细胞培养板中，使待检测时细胞密度不超过 80-90% 满。

2. 吸去培养液，用 PBS 液洗涤一次。换新鲜培养液。将 NK-92 细胞依据效靶比 1:1 比例分别与 PBMC 或 pUCAR-19 混合继续按常规培养。共培养 24 小时前 1 小时从细胞培养箱里取出细胞培养板，在“样品最大酶活性对照孔”中加入试剂盒提供的 LDH 释放试剂，加入量为原有培养液体积的 10%。加入 LDH 释放试剂后，反复吹打数次混匀，然后继续在细胞培养箱中孵育。

3. 共培养 24 小时后，将细胞培养板用多孔板离心机 400g 离心 5min。分别取各孔的上清液 120 μ l，加入到一新的 96 孔板相应孔中，随即进行样品测定。

其中 pUCAR-019 表示敲除 B2M、CIITA 和 TRAC 并靶向 CD19 的三阴性 CAR 细胞，pUCAR-019^{HLA-E+} 表示敲除 B2M、CIITA 和 TRAC 的 CAR-T 细胞共表达 HLA-E。

具体测定方式参考：碧云天的乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒(LDH Cytotoxicity Assay Kit)，产品编号 C0017。

实验结果如图 11 所示：LDH 细胞毒性检测中 B2M 被敲除后 NK 细胞对其有明显杀伤，敲除 B2M(HLA-I 类分子通用亚基)后，保守型 HLA-I 类分子无法表达，即无法保护其免受 NK 细胞介导的细胞毒性。未敲除组 (PBMC) 与表达 HLA-E 的通用型 CAR-T 细胞组杀伤基本一致，HLA-E 的表达可以弥补保守型 HLA-I 类分子的功能，抑制 NK 细胞活化降低对通用型 CAR-T 细胞的杀伤。表 5 中列出了细胞毒性检测各细胞的裂解率。

表 5：NK 细胞介导的细胞毒性裂解异体免疫细胞裂解率

细胞类型	细胞裂解率 24h (%)	细胞裂解率 48h (%)	重复次数
PBMC	38.95873525	63.3938706	2
pUCAR-019 ^{HLA-E+}	39.08128334	57.8858351	2
pUCAR-019	51.00717304	81.0123622	2

最后说明的是，以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非限制，尽管参照较佳实施例对本发明进行了详细说明，本领域的普通技术人员应当理解，可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换，而不脱离本发明技术方案的宗旨和范围，其均应涵盖在本发明的权利要求范围当中。

权 利 要 求 书

1. 通用型 CAR-T 细胞, 其特征在于, 所述通用型 CAR-T 细胞中经过多基因敲除同时抑制了 T 细胞抗原受体 (TCR) 和主要组织相容性复合体 (MHC I, MHC II) 在 T 细胞中的功能; 编码所述 TCR 的基因包括 TRAC 和/或 TRBC; 编码所述主要组织相容性复合体的基因包括 HLA-A, B2MH 和 CIITA。
2. 根据权利要求 1 所述的通用型 CAR-T 细胞, 其特征在于, 所述通用型 CAR-T 细胞中敲除包括 TRAC, B2M 和 CIITA 基因的同时还表达 HLA-E 或 HLA-F。
3. 根据权利要求 1 所述的通用型 CAR-T 细胞, 其特征在于, 所述通用型 CAR-T 细胞中敲除包括 TRAC、HLA-A 或 B2M、CIITA 基因。
4. 权利要求 1-3 任一项所述通用型 CAR-T 细胞的制备方法, 其特征在于, 包括以下步骤:
 - 1) 得到活化的 T 细胞;
 - 2) 用编码靶向不同肿瘤相关分子的 CAR 或 CAR 与 HLA-E 或 HLA-F 共表达的慢病毒载体来转染步骤 1) 的 T 细胞, 获得靶向不同肿瘤相关分子的 CAR-T 细胞;
 - 3) 将步骤 2) 获得的 CAR-T 细胞通过 TALEN 或锌指方法或 CRISPR/Cas9 系统的方法进行包括 TRAC、HLA-A 和 CIITA 或者 TRAC、B2M 和 CIITA 的多基因敲除获得通用型 CAR-T 细胞。
5. 根据权利要求 4 所述的制备方法, 其特征在于, 步骤 2) 中所述 CAR 识别的靶标分子包括 CD19, PSCA, CD123, CD20, CEA (癌胚抗原), FAP, CD133, EGFR, EGFRVIII, BCMA, PSMA, Her2, CA125, EphA2, C-met, L1CAM, VEGFR, CS1, ROR1, EC, NY-ESO-1, MUC1, MUC16, mesothelin, LewisY, GPC3, GD2, EPG, DLL3, CD99, 5T4, CD22, CD30, CD33, CD138, CD171 中的一种。
6. 根据权利要求 4 所述的制备方法, 其特征在于, 步骤 3) 中多基因敲除的方法为 CRISPR/Cas9 系统的方法。
7. 根据权利要求 6 所述的制备方法, 其特征在于, 所述 CRISPR/Cas9 系统由 gRNA 和 Cas9 核酸酶或内切酶组成。
8. 根据权利要求 7 所述的制备方法, 其特征在于, 通过 CRISPR/Cas9 系统进行多基因敲除优选电转转染方式, 将要敲除的多基因的 gRNA 构建在同一载体, 利用电转的方式转染进行基因敲除。
9. 根据权利要求 8 所述的制备方法, 其特征在于, 靶向 B2M, HLA-A, CIITA 和 TRAC 基因的 gRNA 序列如 SEQ ID NO:5-19 所示。
10. 根据权利要求 9 所述的制备方法, 其特征在于, 靶向 TRAC、B2M 和 CIITA 或者 HLA-A,

CIITA 和 TRAC 基因的 gRNA 序列构建在载体 PX330A。

11. 权利要求 4 的制备方法中所得的 CRISPR/Cas9 基因敲除的表达载体, 其特征在于, 所述表达载体包含如 SEQ ID NO:26-31 所示基因序列。
12. 所述通用型 CAR-T 细胞在异体治疗的药物中的应用。
13. 所述通用型 CAR-T 细胞在用于制备针对恶性肿瘤或感染性疾病的药物中的应用。
14. 根据权利要求 13 所述的应用, 其特征在于, 所述恶性肿瘤或感染性疾病的细胞或组织能够表达包括 CD19, PSCA, CD123, CD20, CEA (癌胚抗原), FAP, CD133, EGFR, EGFRVIII, BCMA, PSMA, Her2, CA125, EphA2, C-met, L1CAM, VEGFR, CS1, ROR1, EC, NY-ESO-1, MUC1, MUC16, mesothelin, LewisY, GPC3, GD2, EPG, DLL3, CD99, 5T4, CD22, CD30, CD33, CD138, CD171 中的一种。
15. 根据权利要求 13 所述的应用, 其特征在于, 所述恶性肿瘤或感染性疾病包括: 血液系统肿瘤、实体瘤、异体移植所引起的免疫排斥反应以及自身免疫性疾病如过敏反应或者系统性红斑狼疮。
16. 用于同种异体治疗药物中的通用型 T 细胞, 其特征在于, 所述通用型 T 细胞中同时抑制了 T 细胞抗原受体 (TCR) 和主要组织相容性复合体 (MHC I, MHC II) 在 T 细胞中的功能。
17. 根据权利要求 16 所述的通用型 T 细胞, 其特征在于, 编码所述 TCR 的基因包括 TRAC 和/或 TRBC; 编码所述主要组织相容性复合体的基因包括 HLA, B2MH 和 CIITA。
18. 根据权利要求 16 所述的通用型 T 细胞, 其特征在于, 所述通用型 T 细胞中同时敲除了 TRAC、HLA-A 和 CIITA 基因或 TRAC, B2M 和 CIITA 基因的同时还表达 HLA-E 或 HLA-F。
19. 权利要求 16-18 任一项所述的通用型 T 细胞在用于制备针对恶性肿瘤或感染性疾病的药物中的应用。
20. 根据权利要求 19 所述的应用, 其特征在于, 所述恶性肿瘤或感染性疾病包括: 血液系统肿瘤、实体瘤、异体移植所引起的免疫排斥反应以及自身免疫性疾病如过敏反应或者系统性红斑狼疮。

采样编号	客户编号	HLA-A*	HLA-B*	HLA-C*
R-XNYY160449	HD-01	A*01:01:01:01 A*02:01:01:01	B*37:01:01 B*52:01:01	C*06:02:01 C*12:02:02
R-XNYY160450	HD-002	A*02:01:01:01 A*24:02	B*40:01 B*54:01:01	C*01:02:01 C*07:02:01
R-XNYY160451	HD-03	A*02:01:01:01 A*02:05:01	B*13:02:01 B*50:01:01	C*06:02:01 C*06:02:01
R-XNYY160452	HD-04	A*03:01:01:01 A*30:01:01	B*13:02(NEW) B*35:01(NEW)	C*04:01:01G C*06:02:01
R-XNYY160453	HD-05	A*02:01:01:01 A*11:01:01:01	B*39:01 B*54:01:01	C*01:02:01 C*07:02:01
R-XNYY160454	HD-06	A*11:01:01:01 A*33:03:01	B*40:01 B*58:01:01:01	C*03:02:01 C*07:02:01
R-XNYY160455	HD-07	A*02:01:01:01/A*02:06:01:01 A*02:10/A*02:242	B*40:06:01:01 B*46:01:01	C*01:02:01 C*08:01:01G
R-XNYY160456	HD-08	A*02:07:01 A*11:01:01:01	B*15:02:01 B*15:02:01	C*08:01:01G C*08:01:01G
R-XNYY160457	HD-09	A*02:07:01 A*11:01:01:01	B*15:01:01:01 B*40:06:01:01	C*03:04:01 C*04:01:01:01
R-XNYY160458	HD-11	A*02:01:01:01 A*24:02	B*15:01:01:01 B*46:01:01	C*01:02:01 C*04:01:01:01
R-XNYY160459	HD-12	A*11:01:01:01 A*30:01:01	B*13:02:01 B*38:02:01	C*06:02:01 C*07:02:01
R-XNYY160460	HD-14	A*02:03:01 A*11:01:01:01	B*15:02:01 B*40:01	C*07:02:01 C*08:01:01G
R-XNYY160461	HD-15	A*11:01:01:01 A*24:02	B*39:01 B*55:02:01:01	C*01:02:01 C*07:02:01

结果说明：R-XNYY160452，HD-04的B*13:02 或B*35:01 在exon2的294bp位置上存在一个C→A的突变。

图 1

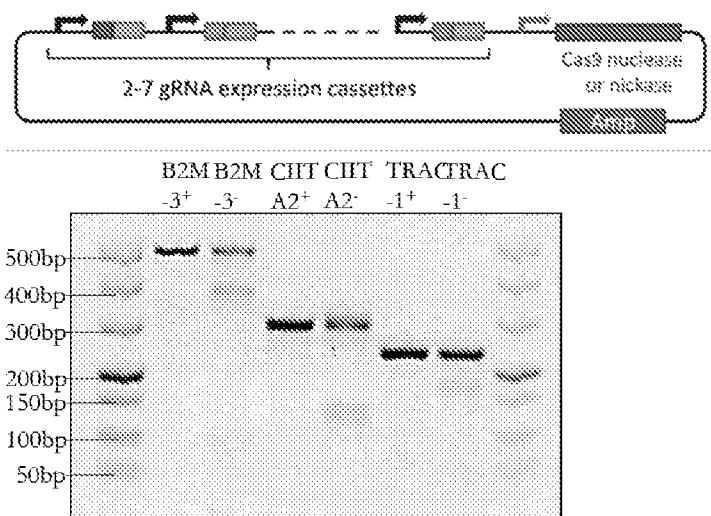


图 2

B2M-3	TGACAGCATTCGGGCCGAGATGTCCTCGCTCCGTGGCCTTAGCTGTGCT	download
WT	TGACAGCATTCGGGCCGAGATGTCCTCGCTCCGTGGCCTTAGCTGTGCT	
16. 17. 19. 1. 2. 3. 5. 8. 9. 10. 13	TGACAGCATTCGGGCCGAGATGTCCTCGCTCCGTGGCCTTAGCTGTGCT	+1
20	TGACAGCATTCGGGCCGAGATGTCCTCGCTCCGTGGCCTTAGCTGTGCT	-1
4	TGACAGCATTCGGGCCCGCCCGTGCGGCTAGGCTTAGCTGTGCT	M9+8
7	-----CCTTAGCTGTGCT	-46
11	TGACAGCATTCGGGCCGAGATGTCCTCGCTCCGTGGCCTTAGCTGTGCT	-1
12	TGACAGCATTCGGGCCGAGATGT-----GGCCCTTAGCTGTGCT	-10
CHITA2	GGAAGGTGATGAAGAGACCAGGAGGCTTATGCCAATATCGGTGAGGAAG	download
WT	GGAAGGTGATGAAGAGACCAGGAGGCTTATGCCAATATCGGTGAGGAAG	
7	GGAAGGTGATGAAGAGACCAGGA-----TTATGCCAATATCGGTGAGGAAG	-3
8	GGAAGGTGATGAAGAGACCAGGCTATAAGCCTTATGCCAATATCGGTGAGGAAG	+5
14	GGAAGGTGATGAAGAGACCAGG-----CCAATATCGGTGAGGAAG	-9
28	GGAAGGTGCTT-----CC-----T	-36
34	GGAAG-----	-45
1	GGAAGGTGATGAAGAGACCAG-----AGGAAG	-23
TRAC	CCTGACCCGTGCGGTGTACAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTG	download
WT	CCTGACCCGTGCGGTGTACAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTG	
21. 15	CCTGACCCGTGCGGTGTACAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTG	+1
22. 23. 24. 26. 27. 28. 6. 7. 9. 10. 13. 14. 18	CCTGACCCGTGCGGTGTACAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTG	+1
25	CCTGACCCGTGCGGTG-----ACAAG-----TCTAAATCCAGTG	-10/M1
1	CCTGACCCGTG-----ACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTG	-6
2	CCTGACCCGTGCGC-----GCTGAGAGACTCTAAATCCAGTG	M1-7
11	CCTGACCCGTG-----AGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTG	-8
17	CCTGACCCGTGCGGTGTA-----GAGAGACTCTAAATCCAGTG	-6

图 3

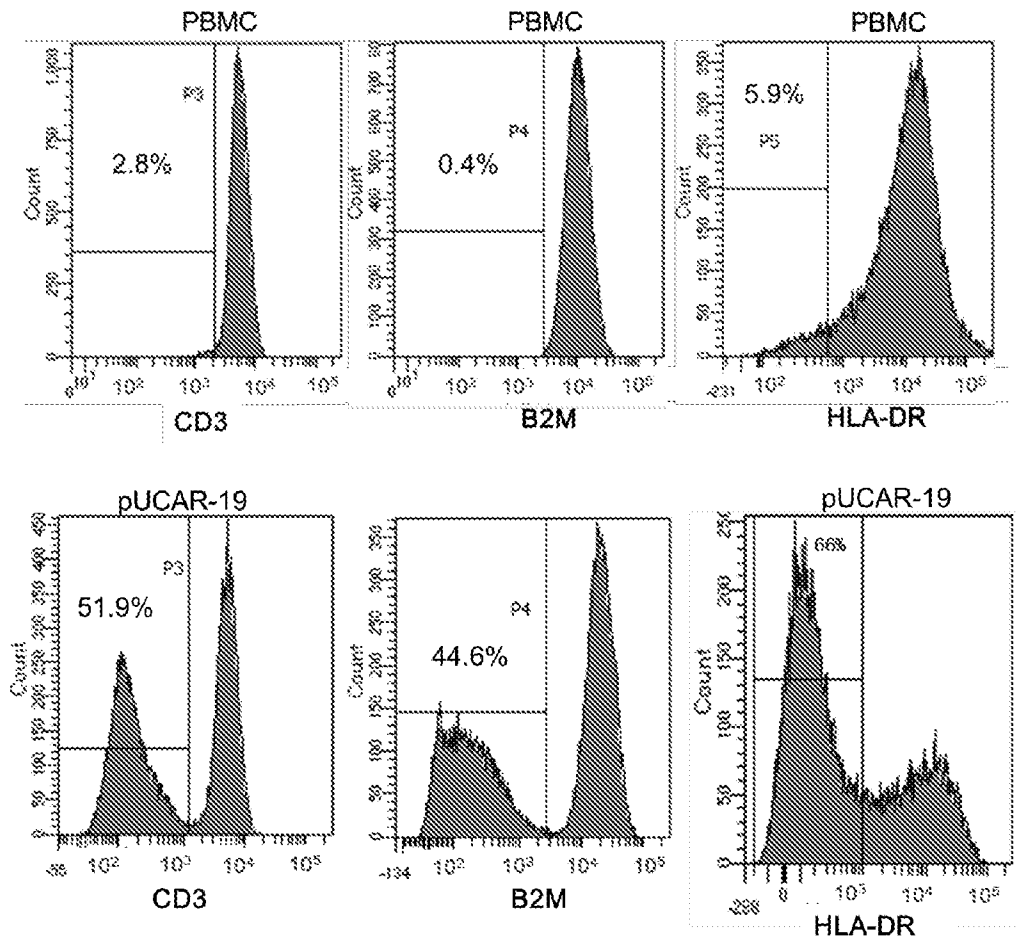


图 4

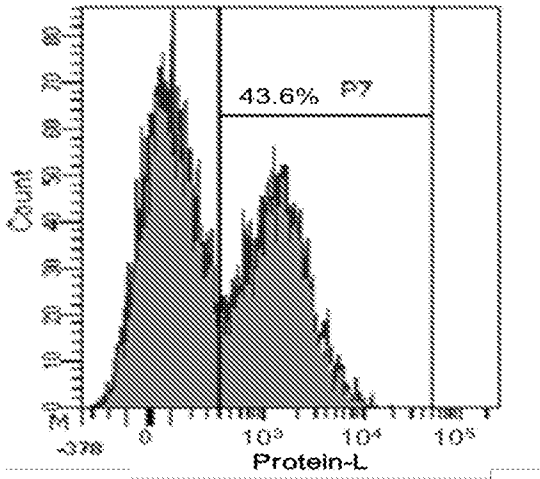


图 5

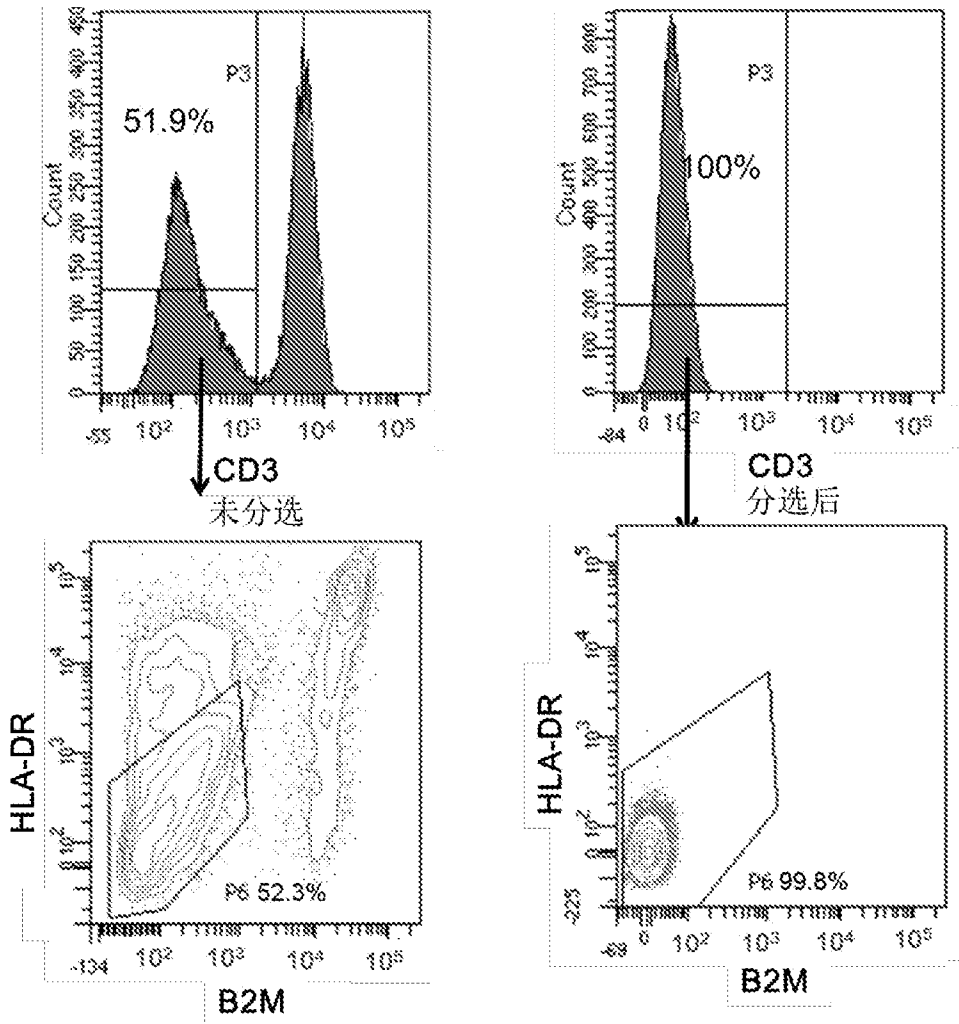


图 6

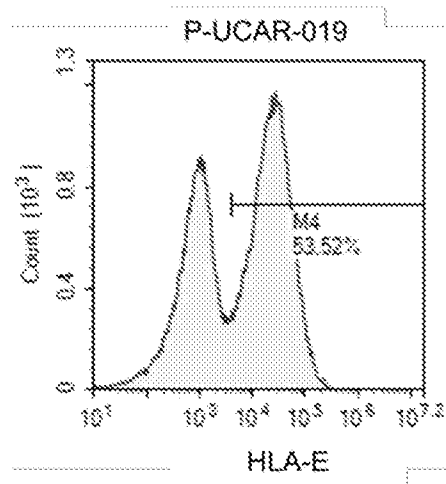


图 7

Target site	gRNA motif (mismatches in red)	PAM	Gene	Off-target analysis
sgB2M-3	GGCCGAGATGTCTCGCTCCG	TGG	B2M	
Off-target1	GGCCGGCATCTCTCGCTCCA	CGG	AOC1	0/6
Off-target2	GGCCAAGATGTCTCACACCC	TAG	ZSWIM8	0/6
Off-target3	GGCCCAGAAAGTCTGGCTCAG	GAG	ULK4	0/5

Target site	gRNA motif (mismatches in red)	PAM	Gene	Off-target analysis
sgCHTA2	GATATTGGCATAAGCCTCCC	TGG	CHTA	
Off-target5	CATCTTGGCACAAAGCCTCCT	GGG	RAB3D	0/6
Off-target6	AATTTTGGCCTAAGACTCCC	AAG	QSOX1	0/5
Off-target7	GATTTTGGCTGAAGCCGCC	CAG	27113	0/5

Target site	gRNA motif (mismatches in red)	PAM	Gene	Off-target analysis
sgTRAC-1	AGAGTCTCTCAGCTGGTACA	CGG	TRAC	
Off-target8	TGCCTCCCTCAGCTGGTACA	AGG	HMCN1	0/6
Off-target9	AGTCTCTCTCAGCTGGTACA	GGG	HPCAL4	0/6
Off-target10	AGAGTCCAOCCTGCTGGTACA	TGG	KIR3DL3	0/6
Off-target11	AGAGACTTTCATCTGGCACA	AGG	SLC26A5	0/6
Off-target12	AGAGTATGGCGGCTGGTACA	AAG	3831	0/6

图 8

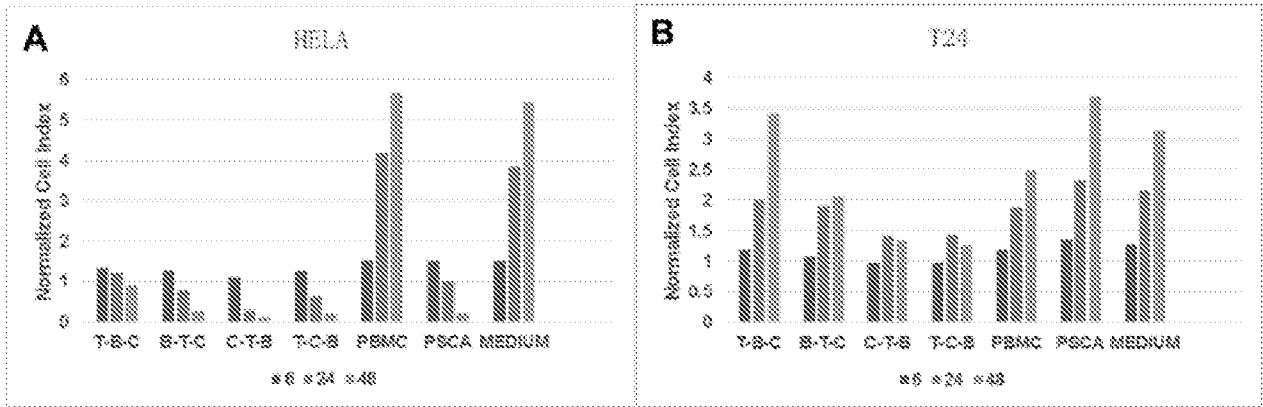


图 9

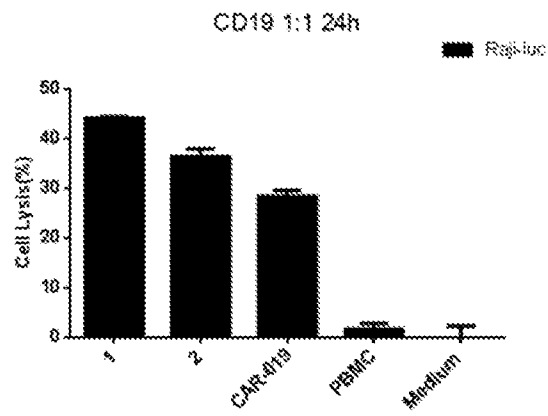


图 10

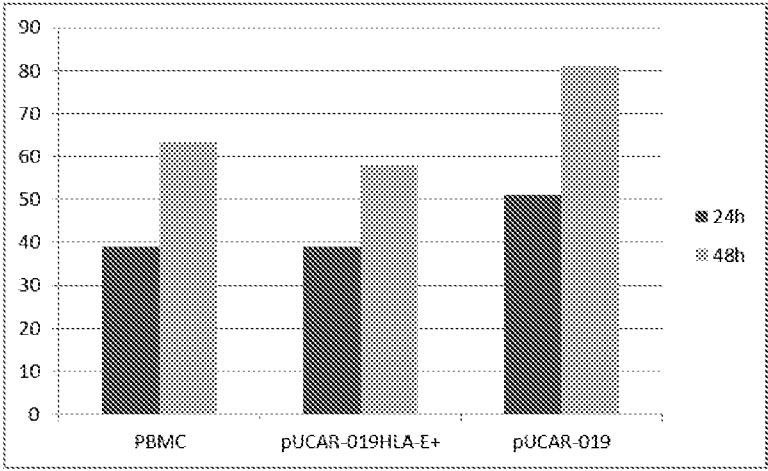


图 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/103714

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/10(2006.01)i; C12N 15/867(2006.01)i; A61K 35/17(2015.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61P 31/00(2006.01)i;
A61P 37/06(2006.01)i; A61P 37/08(2006.01)i; A61P 37/02(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)

C12N; 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, VEN (DWPI-SIPOABS), CNTXT, EPTXT, USTXT, WOTXT, CNKI, 百度学术, Baidu, ISI-WEB OF SCIENCE, Genbank+EMBL, 中国专利生物序列检索系统, China Patents Biological Sequence Search System: T细胞, 抑制, T细胞抗原受体, 主要组织相容?复合?, 敲除, T cell?, T lymphocyte, inhibit+, T cell antigen receptor, TCR, main histocompatibility complex, MHC, TRAC, TRBC, HLA-A, B2M, β 2M, CIITA, HLA-E, HLA-F, 对序列SEQ ID NO:5-19和26-31的检索, search for SEQ ID NOs: 5-19 and 26-31

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 107723275 A (CHONGQING PRECISION BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 23 February 2018 (2018-02-23) see claims 1-20, and description, paragraphs [0007]-[0057]	1-20
X	WO 2017093969 A1 (NOVARTIS AG ET AL.) 08 June 2017 (2017-06-08) see abstract, and description, p. 1, line 23 to p. 65, line 10 and p. 690, line 34 to p. 691, line 5	1-20
A	XU, Jing et al. "T细胞介导的精准肿瘤免疫治疗 (T cell-mediated precision cancer immunotherapy)" <i>中国肿瘤生物治疗杂志 (Chinese Journal of Cancer Biotherapy)</i> , Vol. 23, No. 5, 20 October 2016 (2016-10-20), ISSN: 1007-385X, see pp. 714-719	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

"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

14 November 2018

Date of mailing of the international search report

30 November 2018

Name and mailing address of the ISA/CN

State Intellectual Property Office of the P. R. China (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing
100088
China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/103714

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Poirot, L. et al. "Multiplex Genome-Edited T-cell Manufacturing Platform for "Off-the-Shelf" Adoptive T-cell Immunotherapies" <i>CANCER RESEARCH</i> , Vol. 75, No. 18, 15 September 2015 (2015-09-15), ISSN: 0008-5472, see pp. 3853-3864	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/103714

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2018/103714

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	107723275	A	23 February 2018	None			
WO	2017093969	A1	08 June 2017	IL	259576	D0	31 July 2018
				CA	3006432	A1	08 June 2017
				AU	2016362129	A1	14 June 2018
				SG	11201804373V	A	28 June 2018
				EP	3384027	A1	10 October 2018

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2018/103714

A. 主题的分类

C12N 5/10(2006.01)i; C12N 15/867(2006.01)i; A61K 35/17(2015.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61P 31/00(2006.01)i; A61P 37/06(2006.01)i; A61P 37/08(2006.01)i; A61P 37/02(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)

C12N; 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, VEN(DWPI+SIPOABS), CNTXT, EPTXT, USTXT, WOTXT, CNKI, 百度学术, ISI-WEB OF SCIENCE, Genbank+EMBL, 中国专利生物序列检索系统:T细胞, 抑制, T细胞抗原受体, 主要组织相容?复合?, 敲除, T cell?, T lymphocyte, inhibit+, T cell antigen receptor, TCR, main histocompatibility complex, MHC, TRAC, TRBC, HLA-A, B2M, β 2M, CIITA, HLA-E, HLA-F, 对序列SEQ ID NO:5-19和26-31的检索

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
PX	CN 107723275 A (重庆精准生物技术有限公司) 2018年 2月 23日 (2018 - 02 - 23) 参见权利要求1-20、说明书第[0007]-[0057]段	1-20
X	WO 2017093969 A1 (NOVARTIS AG等) 2017年 6月 8日 (2017 - 06 - 08) 参见说明书摘要、说明书第1页第23行至第65页第10行、第690页第34行至第691页第5行	1-20
A	许晶等. "T细胞介导的精准肿瘤免疫治疗" 中国肿瘤生物治疗杂志, 第23卷, 第5期, 2016年 10月 20日 (2016 - 10 - 20), ISSN: 1007-385X, 参见第714-719页	1-20
A	Poirot, L等. "Multiplex Genome-Edited T-cell Manufacturing Platform for "Off-the-Shelf" Adoptive T-cell Immunotherapies" CANCER RESEARCH, 第75卷, 第18期, 2015年 9月 15日 (2015 - 09 - 15), ISSN: 0008-5472, 参见第3853-3864页	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

"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

2018年 11月 14日

国际检索报告邮寄日期

2018年 11月 30日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中华人民共和国国家知识产权局 (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

徐益君

电话号码 86-(010)-62411083

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列表进行的:

a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:

☒ 附件C/ST. 25文本文件形式

☐ 纸件或图形文件形式

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

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:

☐ 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))

☐ 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b)和行政规程第713段)

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

3. 补充意见:

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2018/103714

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	107723275	A	2018年 2月 23日	无			
WO	2017093969	A1	2017年 6月 8日	IL	259576	D0	2018年 7月 31日
				CA	3006432	A1	2017年 6月 8日
				AU	2016362129	A1	2018年 6月 14日
				SG	11201804373V	A	2018年 6月 28日
				EP	3384027	A1	2018年 10月 10日