



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108472314 A

(43)申请公布日 2018.08.31

(21)申请号 201680059180.8

部部长代表

(22)申请日 2016.07.29

(72)发明人 布兰登·莫里亚提 博·韦伯

(30)优先权数据

62/199,905 2015.07.31 US

62/232,983 2015.09.25 US

62/286,206 2016.01.22 US

62/295,670 2016.02.16 US

62/330,464 2016.05.02 US

62/360,245 2016.07.08 US

斯科特·R·麦基弗

大卫·拉盖斯帕达

莫达希尔·乔杜里

史蒂文·A·罗森堡

道格拉斯·C·帕尔默

尼古拉斯·P·雷斯蒂福

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.03.30

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

代理人 郑霞

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/044858 2016.07.29

(51)Int.Cl.

A61K 35/00(2006.01)

A61K 35/17(2015.01)

A61K 35/28(2015.01)

A61K 38/00(2006.01)

C07H 21/04(2006.01)

C07K 14/725(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/023803 EN 2017.02.09

(71)申请人 明尼苏达大学董事会

地址 美国明尼苏达州

申请人 因提玛生物科学公司

美利坚合众国,由健康及人类服务

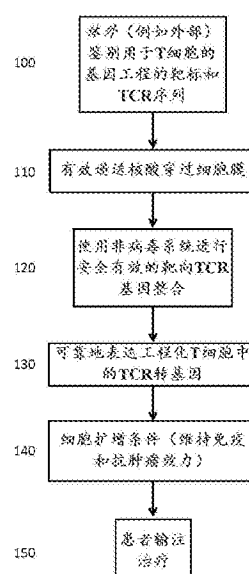
权利要求书5页 说明书121页 附图96页

(54)发明名称

修饰的细胞和治疗方法

(57)摘要

公开了用于治疗癌症的遗传修饰组合物,如非病毒载体和T细胞。还公开了制备和使用该遗传修饰组合物治疗癌症的方法。



1. 一种遗传修饰免疫细胞,其包含:

- a. 淋巴细胞,其中所述淋巴细胞来源于人类受试者;
- b. 靶向多核酸的多核酸,其中所述靶向多核酸的多核酸被工程化以与所述淋巴细胞的基因组中的靶基因的特定区域杂交;
- c. 核酸酶,其中所述核酸酶能够与所述靶向多核酸的多核酸相缔合以形成核蛋白复合体,其中所述核蛋白复合体能够在所述淋巴细胞的基因组中的所述靶基因中产生靶向双链断裂;以及
- d. 靶多核酸,其中所述靶多核酸是在所述靶基因中包含双链断裂的基因组DNA,其中所述靶基因中的所述双链断裂导致所述靶基因功能的破坏,并且其中所述靶基因功能的所述破坏在所述核蛋白复合体与原代淋巴细胞群体接触时以至少60%的效率发生,

其中所述遗传修饰免疫细胞能够扩充以产生具有所述靶基因的改变的功能的淋巴细胞克隆群体,并且其中所述淋巴细胞克隆群体适合施用于有需要的人。

2. 一种工程化原代细胞,其在内源细胞因子诱导的含SH2 (CISH) 基因序列中具有破坏并在内源基因中具有至少一个额外的破坏,其中所述内源基因选自腺苷A2a受体 (ADORA)、CD276、含V-set域的T细胞激活抑制因子1 (VTCN1)、B和T淋巴细胞相关因子 (BTLA)、细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4 (CTLA4)、吡啶胺2,3-双加氧酶1 (IDO1)、杀伤细胞免疫球蛋白样受体三域长细胞质尾1 (KIR3DL1)、淋巴细胞激活基因3 (LAG3)、程序性细胞死亡因子1 (PD-1)、甲型肝炎病毒细胞受体2 (HAVCR2)、V域免疫球蛋白T细胞激活抑制因子 (VISTA)、自然杀伤细胞受体2B4 (CD244)、次黄嘌呤磷酸核糖转移酶1 (HPRT)、腺相关病毒整合位点 (AAVS1) 和趋化因子 (C-C基序) 受体5 (基因/假基因) (CCR5)。

3. 一种工程化细胞,其包含:

- a) 至少一种外源T细胞受体 (TCR);
- b) 程序性死亡配体-1 (PD-1) 的至少一个基因组破坏;以及
- c) TCR α (TCRA) 链基因和TCR β (TCRB) 链基因的至少一个基因组破坏;

其中所述TCR使用慢病毒载体引入,并且所述基因组破坏使用CRISPR内切核酸酶系统进行。

4. 一种细胞,其包含:

- a. 至少一种外源T细胞受体 (TCR) 序列;以及
- b. 至少一种靶向核酸的核酸-核酸酶复合体,所述靶向核酸的核酸-核酸酶复合体包含:
 - i. 含有与至少一种靶基因组序列基本互补的序列的工程化靶向核酸的核酸;和
 - ii. 外源内切核酸酶。

5. 一种工程化细胞,其包含至少一种外源T细胞受体 (TCR) 序列;以及至少一种复合体,该复合体包含:

- a. 具有与至少一种基因组序列互补的序列的至少一种工程化多核酸;和
- b. 至少一种外源内切核酸酶。

6. 一种工程化细胞,其包含:

- a. 至少一种外源T细胞受体 (TCR);
- b. 程序性死亡配体-1 (PD-1) 的至少一个基因组破坏;以及

- c. 至少一种内源基因的至少一个基因组破坏；
其中所述TCR使用慢病毒载体引入，并且所述基因组破坏使用CRISPR系统进行。
7. 一种工程化细胞，其包含至少一个基因破坏和至少一种非病毒整合的T细胞受体(TCR)序列，其中所述基因被所述非病毒整合的TCR序列破坏。
8. 根据前述权利要求中任一项所述的细胞，其中所述细胞使用CRISPR核酸酶进行工程化。
9. 根据前述权利要求中任一项所述的细胞，其中所述细胞使用AAV载体进行工程化。
10. 根据前述权利要求中任一项所述的工程化细胞，其进一步包含外源受体。
11. 根据前述权利要求中任一项所述的工程化细胞，其中外源受体选自：T细胞受体(TCR)、嵌合抗原受体(CAR)或B细胞受体(BCR)。
12. 一种药物组合物，其包含前述权利要求中任一项所述的细胞。
13. 根据前述权利要求中任一项所述的细胞，其中所述细胞能在12天的时间段内扩充超过40x。
14. 根据前述权利要求中任一项所述的细胞，其中所述细胞为TIL。
15. 根据前述权利要求中任一项所述的细胞，其中所述细胞为免疫细胞。
16. 根据前述权利要求中任一项所述的细胞，其中所述细胞为人类细胞。
17. 根据前述权利要求中任一项所述的工程化细胞，其中外源受体选自：T细胞受体(TCR)、嵌合抗原受体(CAR)或B细胞受体(BCR)。
18. 一种用于治疗有需要的患者的方法，该方法包括施用前述权利要求中任一项所述的细胞。
19. 一种组合物，其包含与内源细胞因子诱导的含SH2 (CISH) 基因结合的至少一种指导RNA以及与内源基因结合的次级指导RNA，该内源基因选自腺苷A2a受体(ADORA)、CD276、含V-set域的T细胞激活抑制因子1 (VTCN1)、B和T淋巴细胞相关因子(BTLA)、细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4 (CTLA4)、吡啶胺2,3-双加氧酶1 (IDO1)、杀伤细胞免疫球蛋白样受体三域长细胞质尾1 (KIR3DL1)、淋巴细胞激活基因3 (LAG3)、程序性细胞死亡因子1 (PD-1)、甲型肝炎病毒细胞受体2 (HAVCR2)、V域免疫球蛋白T细胞激活抑制因子(VISTA)、自然杀伤细胞受体2B4 (CD244)、次黄嘌呤磷酸核糖转移酶1 (HPRT)、腺相关病毒整合位点(AAVS SITE (例如AAVS1、AAVS2等))或趋化因子(C-C基序)受体5 (基因/假基因) (CCR5)。
20. 根据前述权利要求中任一项所述的工程化细胞，其中外源受体选自：T细胞受体(TCR)、嵌合抗原受体(CAR)或B细胞受体(BCR)。
21. 一种用于T细胞中有效的检查点抑制因子破坏的方法，该方法包括：
- a. 使T细胞与Cas9核酸酶和指导RNA接触，其中所述指导RNA含有与靶基因中的区域基本互补的17至22个核苷酸的区域；
- b. 切割所述靶基因，其中所述靶基因为PD-1，并且其中当原代T细胞群体与Cas9核酸酶和指导RNA接触时，在至少30%的原代T细胞中发生敲除事件；以及
- c. 破坏所述T细胞中的检查点抑制因子。
22. 一种治疗有需要的受试者的方法，该方法包括：
- a. 从人类收集淋巴细胞；
- b. 通过接触能够经由在淋巴细胞中的基因组DNA的特定靶区域中诱导双链断裂而敲除

PD-1蛋白功能的核糖核酸酶对所述淋巴细胞进行离体遗传修饰,其中所述淋巴细胞中的基因组DNA的所述靶区域在PD-1基因内并且所述双链断裂发生在基因组DNA的靶区域中,该基因组DNA的靶区域在能够与所述核糖核酸酶的至少15个核苷酸杂交的所述靶DNA的区域的3'侧,并且在含有前间区序列邻近基序的所述靶DNA的区域的5'侧;

c. 扩充敲除了PD-1蛋白的遗传修饰淋巴细胞群体以产生PD-1敲除T细胞群体;

d. 向所述受试者施用所述PD-1敲除T细胞群体,其中所述PD-1敲除T细胞适合施用于患者。

23. 根据权利要求21.c所述的方法,其中所述遗传修饰淋巴细胞群体在至少12天的时间段内进行扩充,并且其中所述遗传修饰淋巴细胞群体增加至少40倍。

24. 根据权利要求22.d所述的方法,其中所述遗传修饰淋巴细胞群体增加至少100倍。

25. 一种制备工程化细胞的方法,该方法包括:

a. 向细胞中非病毒性地引入一种或多种多核酸,该多核酸包含侧翼为重组臂的至少一种外源T细胞受体(TCR)序列;以及

b. 使所述至少一种外源TCR序列与包含基因的双链断裂区接触。

26. 根据权利要求24所述的方法,其中所述重组臂与所述基因的一部分互补。

27. 根据权利要求24所述的方法,其中所述基因为腺苷A2a受体(ADORA)、CD276、含V-set域的T细胞激活抑制因子1(VTCN1)、B和T淋巴细胞相关因子(BTLA)、细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(CTLA4)、吡啶胺2,3-双加氧酶1(IDO1)、杀伤细胞免疫球蛋白样受体三域长细胞质尾1(KIR3DL1)、淋巴细胞激活基因3(LAG3)、程序性细胞死亡因子1(PD-1)、甲型肝炎病毒细胞受体2(HAVCR2)、V域免疫球蛋白T细胞激活抑制因子(VISTA)、自然杀伤细胞受体2B4(CD244)、细胞因子诱导的含SH2的蛋白(CISH)、次黄嘌呤磷酸核糖转移酶1(HPRT)、腺相关病毒整合位点(AAVS SITE(例如AAVS1、AAVS2等))或趋化因子(C-C基序)受体5(基因/假基因)(CCR5)。

28. 根据权利要求24中任一项所述的方法,其中所述双链断裂区通过所述至少一种外源TCR序列的插入进行修复。

29. 根据权利要求24中任一项所述的方法,其中所述至少一种外源TCR序列的插入包括所述至少一种基因的破坏。

30. 根据权利要求28中任一项所述的方法,其中所述至少一种外源TCR序列的插入由同源重组(HR)增强子辅助。

31. 根据权利要求24所述的方法,其中所述插入包括同源性指导的修复。

32. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述双链断裂由核酸酶诱导。

33. 根据权利要求31所述的方法,其中所述核酸酶选自:Cas9、Argonaute、Cpf1、CRISPR、TALEN、转座酶、ZEN、大范围核酸酶或Mega-TAL。

34. 根据权利要求36至52中任一项所述的方法,其中所述双链断裂区由CRISPR产生。

35. 根据权利要求32所述的方法,其中所述核酸酶被复用。

36. 根据权利要求34所述的方法,其中所述复用通过添加至少2种指导多核酸进行。

37. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述非病毒性地引入包括电穿孔或核转染。

38. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述多核酸与改变对所述多核酸的

细胞应答的至少一种修饰剂共递送。

39. 一种用于促进同源性指导的修复 (HDR) 的方法, 该方法包括:

- a. 向细胞中非病毒性地引入 mRNA、逆转录酶 (RT)、增强子和引物;
- b. 将所述 mRNA 逆转录成多核酸的一个或多个拷贝; 以及
- c. 促进所述细胞的基因组与所述多核酸的基因组之间的 HDR。

40. 一种用于降低一种或多种外源工程化多核酸对细胞的细胞毒性的方法, 该方法包括通过使所述细胞与所述一种或多种外源工程化多核酸接触而改变对所述多核酸的一种或多种细胞应答, 并且其中所述一种或多种细胞应答包括胞质 DNA 传感途径。

41. 根据权利要求 39.c 所述的方法, 其中所述改变一种或多种细胞应答包括修饰 DNA 依赖性 IFN 调节因子激活因子 (DAI)、IFN 诱导蛋白 16 (IFI16)、DEAD 盒多肽 41 (DDX41)、黑素瘤缺乏因子 2 (AIM2)、DNA 依赖性蛋白激酶、环鸟苷单磷酸-腺苷单磷酸合酶 (cGAS)、IFN 基因刺激因子 (STING)、TANK 结合激酶 (TBK1)、白介素-1 β (IL-1 β)、MRE11、减数分裂重组 11、Trex1、天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 (胱天蛋白酶-1)、三种主要修复外切核酸酶、DNA 依赖性 IRF 激活因子 (DAI)、IFI16、DDX41、DNA 依赖性蛋白激酶 (DNA-PK)、减数分裂重组 11 同源物 A (MRE11) 和/或 IFN 调节因子 (IRF) 3 或 7。

42. 一种用于基因组工程化的方法, 该方法包括:

- a. 使细胞与一种或多种信号传导修饰剂化合物接触; 以及
- b. 使所述细胞与包含至少一种抗原受体序列的多核酸接触, 该抗原受体序列的侧翼为与至少一个基因组区域互补的至少两个重组臂。

43. 根据权利要求 39.c 所述的方法, 其中所述一种或多种信号传导修饰剂化合物改变胞质 DNA 传感途径。

44. 根据权利要求 39.c 所述的方法, 其中所述一种或多种信号传导修饰剂化合物改变 DNA 依赖性 IFN 调节因子激活因子 (DAI)、IFN 诱导蛋白 16 (IFI16)、DEAD 盒多肽 41 (DDX41)、黑素瘤缺乏因子 2 (AIM2)、DNA 依赖性蛋白激酶、环鸟苷单磷酸-腺苷单磷酸合酶 (cGAS)、IFN 基因刺激因子 (STING)、TANK 结合激酶 (TBK1)、白介素-1 β (IL-1 β)、MRE11、减数分裂重组 11、Trex1、天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 (胱天蛋白酶-1)、三种主要修复外切核酸酶、DNA 依赖性 IRF 激活因子 (DAI)、IFI16、DDX41、DNA 依赖性蛋白激酶 (DNA-PK)、减数分裂重组 11 同源物 A (MRE11) 和/或 IFN 调节因子 (IRF) 3 或 7。

45. 一种用于制备工程化细胞的方法, 该方法包括:

- a. 向细胞中引入:
 - i. 包含与所述细胞的基因组区域中的靶核酸互补的间隔区的指导多核苷酸;
 - ii. 由所述指导多核苷酸指导的核酸酶; 和
 - iii. 编码外源 T 细胞受体的多核苷酸;
- b. 通过由所述指导多核苷酸指导的核酸酶对所述细胞内的靶核酸进行位点特异性切割; 以及
- c. 在切割位点处将编码所述外源 T 细胞受体的多核苷酸插入所述细胞的基因组区域中。

46. 根据权利要求 44 所述的方法, 其中所述基因为 PD-1。

47. 根据权利要求 44 中任一项所述的方法, 其中所述外源 TCR 序列在所述切割位点处的

插入导致所述基因的破坏。

48. 根据权利要求44中任一项所述的方法,其进一步包括在所述细胞中表达所述外源T细胞受体。

49. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其进一步包括将所述工程化细胞引入生物体中。

50. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其进一步包括离体扩充所述工程化细胞。

51. 一种制备工程化细胞的方法,该方法包括:

- a. 向所述细胞的至少一个基因组病毒性地引入至少一种外源T细胞受体 (TCR);
- b. 对至少一种内源基因进行基因组破坏;以及
- c. 对至少一种免疫检查点基因进行基因组破坏;
- d. 其中所述基因组破坏与所述细胞的前间区序列邻近基序 (PAM) 序列相邻。

52. 一种制备工程化细胞的方法,该方法包括:

- a. 病毒性地引入编码至少一种外源T细胞受体 (TCR) 序列的至少一种多核酸;以及
- b. 用至少一种内切核酸酶或其功能部分对至少一种基因进行基因组破坏。

53. 一种制备工程化细胞的方法,该方法包括:

- a) 引入编码至少一种外源T细胞受体 (TCR) 序列的至少一种多核酸;
- b) 引入包含至少一种修饰的至少一种指导RNA (gRNA);以及
- c) 引入至少一种内切核酸酶;

其中所述gRNA包含与至少一个内源基因组互补的至少一种序列。

修饰的细胞和治疗方法

交叉引用

[0001] 本申请要求于2015年7月31日提交的美国临时申请号62/199,905;于2015年9月25日提交的美国临时申请号62/232,983;于2016年1月22日提交的美国临时申请号62/286,206;于2016年2月16日提交的美国临时申请号62/295,670;于2016年5月2日提交的美国临时申请号62/330,464;以及于2016年7月8日提交的美国临时申请号62/360,245的权益,所有这些申请均通过引用而整体并入本文。

背景技术

[0002] 尽管在过去的50年中癌症疗法取得了显著进步,但仍存在许多对化学疗法、放射疗法或生物疗法顽抗的肿瘤类型,特别是在通过手术技术无法解决的晚期阶段。近来,在用于体内识别肿瘤上的分子靶标的淋巴细胞基因工程方面取得了显著进步,从而导致了靶向肿瘤缓解的显著病例。然而,这些成功在很大程度上局限于血液肿瘤,并且针对实体瘤的更广泛应用受限于缺乏由特定肿瘤中的细胞表达的可鉴别分子以及缺乏可用于特异性结合肿瘤靶标以便介导肿瘤破坏的分子。一些近期进展关注对在一些情况下触发抗肿瘤T细胞应答的肿瘤特异性突变的鉴别。例如,可使用全外显子组测序方法来鉴别这些内源性突变。Tran E等人,“Cancer immunotherapy based on mutation-specific CD4+T cells in a patient with epithelial cancer,”*Science* 344:641-644 (2014)。

[0003] 本文所公开的组合物和方法可用于对识别患者癌症中的独特免疫原性突变的癌症特异性T细胞受体(TCR)的鉴别,以及治疗患者体内的任何类型的癌症。使用非病毒(例如,CRISPR、TALEN、基于转座子、ZEN、大范围核酸酶或Mega-TAL)方法将这些编码癌症特异性TCR的转基因插入T细胞中是创新的方法,其为将免疫疗法扩展到许多癌症类型创造了新的机会。

援引并入

[0004] 本文中的所有出版物、专利和专利申请均通过引用而并入,其程度犹如特别地且单独地指出每个单独的出版物、专利或专利申请通过引用而并入。在本文中的术语与并入的参考文献中的术语之间存在冲突的情况下,以本文中的术语为准。

发明内容

[0005] 本文公开了包含至少一个基因破坏和至少一种非病毒整合的T细胞受体(TCR)序列的工程化细胞,其中所述基因可被所述非病毒整合的TCR序列破坏。在一些情况下,所述基因可以是检查点基因,例如,所述基因可以是免疫检查点基因。所述基因可以是腺苷A2a受体(ADORA)、CD276、含V-set域的T细胞激活抑制因子1(VTCN1)、B和T淋巴细胞相关因子(B and T lymphocyte associated, BTLA)、细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(CTLA4)、吡咯胺2,3-双加氧酶1(IDO1)、杀伤细胞免疫球蛋白样受体三域长细胞质尾1(KIR3DL1)、淋巴细胞激活基因3(LAG3)、程序性细胞死亡因子1(PD-1)、甲型肝炎病毒细胞受体2(HAVCR2)、V域免疫球蛋白T细胞激活抑制因子(VISTA)、自然杀伤细胞受体2B4(CD244)、细胞因子诱导的含SH2

的蛋白 (CISH)、次黄嘌呤磷酸核糖转移酶1 (HPRT)、腺相关病毒整合位点 (AAVS SITE (例如 AAVS1、AAVS2等)) 或趋化因子 (C-C基序) 受体5 (基因/假基因) (CCR5)。在一些情况下, 所述基因可以是PD-1。

[0006] 所述工程化细胞可包含单个TCR序列。所述TCR序列可包含工程化TCR序列。所述TCR序列可包含两条或更多条链。所述两条或更多条链可包含至少一条 α 链。所述两条或更多条链可包含至少一条 β 链。所述TCR序列可包含细胞外区域、跨膜区域和细胞内区域。所述TCR序列可产生功能性TCR。所述TCR序列可识别抗原。所述TCR序列可识别主要组织相容性复合体 (MHC) 背景下的抗原。所述MHC可以是I类。所述MHC可以是HLA-A02。所述MHC可以是II类。所述TCR可与突变结合。可通过全外显子组测序来鉴别与所述TCR结合的突变。所述TCR可与癌细胞结合。

[0007] 所述工程化细胞可以是原代细胞。所述工程化细胞可以是免疫细胞。所述工程化细胞可以是T细胞、干细胞或祖细胞。所述工程化细胞可以是造血祖细胞。所述工程化细胞可以是人类细胞。可对所述工程化细胞进行选择。所述工程化细胞可离体扩充。所述工程化细胞可在体内扩充。所述工程化细胞可以是CD45RO (-)、CCR7 (+)、CD45RA (+)、CD62L (+)、CD27 (+)、CD28 (+) 或IL-7R α (+)。所述工程化细胞对于有需要的受试者可以是自体的。所述工程化细胞对于有需要的受试者可以是非自体的。所述工程化细胞可以是符合良好生产规范 (GMP) 的物质 (good manufacturing practices (GMP) compatible reagent)。所述工程化细胞可以是用于治疗有需要的受试者的癌症、感染、自身免疫病或移植物抗宿主病 (GVHD) 的联合疗法的一部分。

[0008] 本文还公开了用于制备工程化细胞的方法, 该方法包括: a) 向细胞中非病毒性地引入一种或多种多核酸, 该多核酸包含侧翼为重组臂的至少一种外源T细胞受体 (TCR) 序列; 以及b) 使所述至少一种外源TCR序列与包含基因的双链断裂区接触。所述重组臂可与所述基因的一部分互补。所述基因可以是腺苷A2a受体、CD276、含V-set域的T细胞激活抑制因子1、B和T淋巴细胞相关因子、细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4、吡啶胺2,3-双加氧酶1、杀伤细胞免疫球蛋白样受体三域长细胞质尾1、淋巴细胞激活基因3、程序性细胞死亡因子1 (PD-1)、甲型肝炎病毒细胞受体2、V域免疫球蛋白T细胞激活抑制因子或自然杀伤细胞受体2B4。在一些情况下, 所述基因可以是PD-1。在一些情况下, 所述基因可以是检查点基因。在一些情况下, 所述检查点基因可以是免疫检查点基因。

[0009] 所述双链断裂区可通过所述至少一种外源TCR序列的插入进行修复。所述至少一种外源TCR序列的插入可包括所述至少一种基因的破坏。所述至少一种外源TCR序列的插入可由同源重组 (HR) 增强子辅助。所述增强子可来源于病毒蛋白。所述增强子可以是E1B55K、E4orf6、Scr7或L755507。在一些情况下, 所述增强子可以是化学抑制剂。在一些情况下, 所述增强子抑制连接酶IV。在一些情况下, 所述增强子可促进所述TCR序列的插入。所述插入可包括同源性指导的修复。

[0010] 在一些情况下, 所述双链断裂区可由CRISPR、TALEN、基于转座子、ZEN、大范围核酸酶或Mega-TAL产生。在一些情况下, 所述双链断裂区可由CRISPR产生。在一些情况下, CRISPR可以进行复用 (multiplexed)。在一些情况下, 复用可通过添加至少2种指导RNA进行。所述TCR序列可插入所述双链断裂区附近。

[0011] 在一些情况下, 所述多核酸可以是RNA。在一些情况下, 所述RNA可以是mRNA。在一

些情况下,所述细胞可与逆转录酶(RT)接触。在一些情况下,所述细胞可与引物接触,该引物与所述多核酸互补。在一些情况下,所述RT将mRNA转录成第一ssDNA模板。在一些情况下,所述RT将所述第一ssDNA模板转录成第二dsDNA模板。在一些情况下,转录可在原位进行。所述ssDNA或dsDNA可包含所述至少一种外源TCR序列。在一些情况下,引物序列可用于确定RT的存在。逆转录酶(RT)报告基因正向引物可以是AAC GTG CTG GTT GTT GTG CTG (SEQ ID NO 180)。在其他情况下,可以使用逆转录酶(RT)报告基因反向引物。RT报告基因反向引物可以是AAA GTG GTG GTA GAA TAG GCT C (SEQ ID NO 181)。

[0012] 在一些情况下,非病毒引入可包括电穿孔或核转染。多核酸可与改变对多核酸的细胞应答的至少一种修饰剂共递送。至少一种修饰剂可降低细胞毒性。修饰剂可包括泛胱天蛋白酶抑制剂(abPan Caspase Inhibitor) Z-VAD-FMK或BX795。本发明可包括原代细胞。所述原代细胞可以是免疫细胞。所述免疫细胞可以是T细胞、干细胞或祖细胞。所述方法可包括祖细胞。在一些情况下,祖细胞为造血祖细胞。在一些情况下,所述细胞为人类细胞。所述方法可以是符合良好生产规范(GMP)的。

[0013] 在一些情况下,有需要的受试者接受治疗,该治疗包括向该受试者施用治疗有效量的包含工程化细胞的药物组合物。药物组合物可静脉内施用。药物组合物可局部施用。在一些情况下,方法可进一步包括施用一种或多种其他疗法。所述一种或多种其他疗法可包括移植。所述一种或多种其他疗法可包括免疫疗法。在一些情况下,所述工程化细胞对于所述受试者可以是自体的。在一些情况下,所述工程化细胞对于所述受试者可以是同种异体的。

[0014] 本文还公开了包含侧翼为至少两个重组臂的至少一种外源T细胞受体(TCR)序列的多核酸,该重组臂具有与基因组序列互补的序列,该基因组序列可以是腺苷A2a受体(ADORA)、CD276、含V-set域的T细胞激活抑制因子1(VTCN1)、B和T淋巴细胞相关因子(BTLA)、细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(CTLA4)、吡啶胺2,3-双加氧酶1(IDO1)、杀伤细胞免疫球蛋白样受体三域长细胞质尾1(KIR3DL1)、淋巴细胞激活基因3(LAG3)、程序性细胞死亡因子1(PD-1)、甲型肝炎病毒细胞受体2(HAVCR2)、V域免疫球蛋白T细胞激活抑制因子(VISTA)、自然杀伤细胞受体2B4(CD244)、细胞因子诱导的含SH2的蛋白(CISH)、次黄嘌呤磷酸核糖转移酶1(HPRT)、腺相关病毒整合位点(AAVS SITE(例如AAVS SITE(例如AAVS1、AAVS2等)、AAVS2等))或趋化因子(C-C基序)受体5(基因/假基因)(CCR5)。

[0015] 所述多核酸序列可与可以是部分序列的基因组序列互补。在一些情况下,所述重组臂与所述与基因组序列互补的序列的结合使所述外源TCR序列插入。在一些情况下,所述重组臂与所述与基因组序列互补的序列的结合修复双链断裂。在一些情况下,所述基因组序列包含编码序列。在一些情况下,所述基因组序列包含非编码序列。在一些情况下,所述基因组序列包含一个或多个基因。所述外源TCR序列的插入可破坏一个或多个基因。在一些情况下,所述基因组序列可以是PD-1。

[0016] 在一些情况下,所述多核酸可以是质粒载体。所述质粒载体可包含启动子。在一些情况下,所述启动子可以是组成型的。在一些情况下,所述启动子可以是诱导型的。所述启动子可以是CMV、U6、MND或EF1a。在一些情况下,所述启动子可与所述外源TCR序列相邻。在一些情况下,所述质粒载体进一步包含剪接受体。在一些情况下,所述剪接受体可与所述外源TCR序列相邻。启动子序列可以是PKG或MND启动子。MND启动子可以是含有修饰的MoMuLV

LTR的U3区与骨髓增生性肉瘤病毒增强子的合成启动子。

[0017] 在一些情况下,所述质粒载体进一步包含“ATG”序列。所述“ATG”序列可与所述TCR序列相邻。在一些情况下,所述TCR序列编码融合蛋白。在一些情况下,所述TCR序列可在多顺反子载体内。在一些情况下,所述多核酸包含外源启动子、通过剪接的内源启动子和/或通过框内翻译的内源启动子。

[0018] 在一些情况下,可对所述质粒进行修饰。所述修饰可包括去甲基化、CpG甲基化的添加、细菌甲基化的去除和哺乳动物甲基化的添加。所述TCR序列可以是工程化TCR序列。在一些情况下,所述多核酸可设计成通过非病毒技术递送至细胞。在一些情况下,所述多核酸可以是符合良好生产规范(GMP)的物质。

[0019] 本文还公开了用于促进同源性指导的修复(HDR)的方法,该方法包括:a)向细胞中非病毒性地引入mRNA、逆转录酶(RT)、增强子和引物;b)将所述mRNA逆转录成多核酸的一个或多个拷贝;以及c)促进所述细胞的基因组与所述多核酸的基因组之间的HDR。在一些情况下,所述方法可包括产生双链断裂。在一些情况下,所述双链断裂可通过CRISPR、TALEN、基于转座子、ZEN、大范围核酸酶和Mega-TAL进行。在一些情况下,所述双链断裂可通过CRISPR进行。在一些情况下,c)中的HDR修复双链断裂。在一些情况下,所述CRISPR可与至少两(2)种指导RNA一起复用。在一些情况下,所述多核酸可以是DNA。在一些情况下,所述多核酸可以是cDNA。在一些情况下,所述多核酸可以是单链的。

[0020] 在一些情况下,所述RT将所述mRNA转录成第一ssDNA模板。在一些情况下,所述多核酸可以是双链的。在一些情况下,所述RT将所述mRNA原位转录成第二dsDNA模板。所述mRNA或多核酸可包含至少一种TCR序列。在一些情况下,所述TCR序列包含具有与基因组区域互补的序列的至少两个侧翼重组臂。在一些情况下,所述TCR序列可用于c)中的HDR。在一些情况下,所述TCR序列可用于c)中的HDR,并且进一步包括所述重组臂与所述细胞的基因组的互补部分的结合。在一些情况下,所述TCR序列可用于c)中的HDR,并且进一步包括所述重组臂与所述细胞的基因组的互补部分的结合,并且进一步包括所述TCR序列的插入。在一些情况下,所述细胞的基因组与所述多核酸的基因组之间的HDR破坏一个或多个基因。一个或多个基因可包括免疫检查点基因。在一些情况下,一个或多个基因包括腺苷A2a受体(ADORA)、CD276、含V-set域的T细胞激活抑制因子1(VTCN1)、B和T淋巴细胞相关因子(BTLA)、细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(CTLA4)、吡啶胺2,3-双加氧酶1(IDO1)、杀伤细胞免疫球蛋白样受体三域长细胞质尾1(KIR3DL1)、淋巴细胞激活基因3(LAG3)、程序性细胞死亡因子1(PD-1)、甲型肝炎病毒细胞受体2(HAVCR2)、V域免疫球蛋白T细胞激活抑制因子(VISTA)、自然杀伤细胞受体2B4(CD244)、细胞因子诱导的含SH2的蛋白(CISH)、次黄嘌呤磷酸核糖转移酶1(HPRT)、腺相关病毒整合位点(AAVS SITE(例如AAVS1、AAVS2等))或趋化因子(C-C基序)受体5(基因/假基因)(CCR5)。在一些情况下,一个或多个基因包括PD-1。在一些情况下,一个或多个基因包括TCR。

[0021] 在一些情况下,所述细胞的基因组与所述多核酸的基因组之间的HDR可由一种或多种同源重组(HR)增强子辅助。所述一种或多种增强子可包括病毒蛋白。在一些情况下,一种或多种增强子包括E1B55K、E4orf6、Scr7和/或L755507。在一些情况下,所述增强子包括化学抑制剂。在一些情况下,所述增强子抑制连接酶IV。在一些情况下,所述增强子促进所述多核酸向所述细胞的基因组的插入。所述增强子可防止非同源末端连接(NHEJ)。在一些

情况下,所述多核酸可插入所述双链断裂处或其附近。在一些情况下,所述mRNA、逆转录酶、引物、HR增强子和CRISPR与所述细胞接触。在一些情况下,所述多核酸、CRISPR和HR增强子与所述细胞接触。所述细胞可以是原代细胞。所述细胞可以是免疫细胞。所述细胞可以是T细胞、干细胞或祖细胞。在一些情况下,所述细胞为T细胞。在一些情况下,所述细胞为祖细胞。在一些情况下,所述细胞为造血祖细胞。所述细胞可以是人类细胞。在一些情况下,所述T细胞可以是自体的。在一些情况下,所述T细胞可以是非自体的。在一些情况下,所述方法可以是符合良好生产规范(GMP)的。

[0022] 本文还公开了用于降低外源工程化多核酸的细胞毒性的方法,该方法包括改变对所述多核酸的一种或多种细胞应答。所述一种或多种细胞应答可包括胞质DNA传感途径。在一些情况下,改变一种或多种细胞应答包括修饰DNA依赖性IFN调节因子激活因子(DAI)、IFN诱导蛋白16 (IFI16)、DEAD盒多肽41 (DDX41)、黑素瘤缺乏因子2 (AIM2)、DNA依赖性蛋白激酶、环鸟苷单磷酸-腺苷单磷酸合酶(cGAS)、IFN基因刺激因子(STING)、TANK结合激酶(TBK1)、白介素-1 β (IL-1 β)、MRE11、减数分裂重组11(meiotic recombination11)、Trex1、天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(胱天蛋白酶-1)、三种主要修复外切核酸酶、DNA依赖性IRF激活因子(DAI)、IFI16、DDX41、DNA依赖性蛋白激酶(DNA-PK)、减数分裂重组11同源物A(MRE11)和/或IFN调节因子(IRF)3和7。在一些情况下,一种或多种化合物改变一种或多种细胞应答。一种或多种化合物可包括抑制剂。一种或多种化合物可包括激活剂。在一些情况下,一种或多种化合物包括泛胱天蛋白酶抑制剂,Z-VAD-FMK和/或Z-VAD-FMK。

[0023] 在一些情况下,对一种或多种化合物进行修饰。一种或多种化合物可防止细胞凋亡和细胞焦亡(pyroptosis)。在一些情况下,一种或多种化合物可抑制胱天蛋白酶-1切割proIL-1 β 和proIL-18。在一些情况下,一种或多种化合物可调节含有CARD的凋亡相关斑点样蛋白(ASC)的活性。一种或多种化合物可调节cGAS-STING途径。一种或多种化合物可防止I型干扰素的表达。在一些情况下,一种或多种化合物可包括两种或更多种化合物。在一些情况下,所述化合物可以是符合良好生产规范(GMP)的。

[0024] 在一些情况下,所述化合物可在所述细胞与所述一种或多种外源工程化多核酸接触之前与所述细胞接触。在一些情况下,所述方法可进一步包括使所述细胞与一种或多种同源重组(HR)增强子接触。

[0025] 在一些情况下,所述方法可进一步包括对所述细胞进行选择。在一些情况下,所述方法可进一步包括对所述细胞进行扩充。在一些情况下,所述方法产生符合GMP的细胞疗法。

[0026] 本文公开了用于基因组工程化的方法,该方法包括:a)使细胞与一种或多种信号传导修饰剂化合物接触;以及b)使所述细胞与包含至少一种抗原受体序列的多核酸接触,该抗原受体序列的侧翼为与至少一个基因组区域互补的至少两个重组臂。在一些情况下,所述一种或多种信号传导修饰剂化合物改变胞质DNA传感途径。在一些情况下,所述一种或多种信号传导修饰剂化合物改变DNA依赖性IFN调节因子激活因子(DAI)、IFN诱导蛋白16 (IFI16)、DEAD盒多肽41 (DDX41)、黑素瘤缺乏因子2 (AIM2)、DNA依赖性蛋白激酶、环鸟苷单磷酸-腺苷单磷酸合酶(cGAS)、IFN基因刺激因子(STING)、TANK结合激酶(TBK1)、白介素-1 β (IL-1 β)、MRE11、减数分裂重组11、Trex1、天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(胱天蛋白酶-1)、三种主要修复外切核酸酶、DNA依赖性IRF激活因子(DAI)、IFI16、DDX41、DNA依赖性蛋白

激酶(DNA-PK)、减数分裂重组11同源物A(MRE11)和/或IFN调节因子(IRF)3和7。在一些情况下,所述一种或多种信号传导修饰剂化合物包括抑制剂。在一些情况下,所述一种或多种信号传导修饰剂化合物包括激活剂。所述一种或多种信号传导修饰剂化合物可包括泛胱天蛋白酶抑制剂,Z-VAD-FMK和/或Z-VAD-FMK。

[0027] 在一些情况下,可对所述一种或多种信号传导修饰剂化合物进行修饰。所述一种或多种信号传导修饰剂化合物可防止细胞凋亡和细胞焦亡。在一些情况下,所述一种或多种信号传导修饰剂化合物抑制胱天蛋白酶-1切割proIL-1 β 和proIL-18。所述一种或多种信号传导修饰剂化合物可调节含有CARD的凋亡相关斑点样蛋白(ASC)的活性。在一些情况下,所述一种或多种信号传导修饰剂化合物调节cGAS-STING途径。所述一种或多种信号传导修饰剂化合物可防止I型干扰素的表达。所述一种或多种信号传导修饰剂化合物可包括两种或更多种化合物。在一些情况下,所述一种或多种信号传导修饰剂化合物可在所述细胞与所述一种或多种外源工程化多核酸接触之前与所述细胞接触。在一些情况下,所述方法可进一步包括使所述细胞与一种或多种同源重组(HR)增强子接触。在一些情况下,所述细胞为原代细胞。在一些情况下,所述细胞为免疫细胞。在一些情况下,所述细胞为T细胞、干细胞或祖细胞。本发明可包括祖细胞。所述细胞可以是造血祖细胞。所述细胞可以是人类细胞。

[0028] 本文还公开了包含至少一种工程化抗原受体的未甲基化多核酸,该工程化抗原受体的侧翼为与至少一个基因组区域互补的至少两个重组臂。在一些情况下,可对所述多核酸进行修饰。在一些情况下,所述修饰可以是去甲基化、CpG甲基化的添加、细菌甲基化的去除和/或哺乳动物甲基化的添加。在一些情况下,所述多核酸可以是能够经历同源重组。在一些情况下,所述重组臂结合互补的基因组区域。在一些情况下,所述抗原受体包括TCR或嵌合抗原受体(CAR)。

[0029] 本文还公开了包含至少一种工程化抗原受体的哺乳动物甲基化多核酸。在一些情况下,可进一步对所述多核酸进行修饰。修饰可以是去甲基化、CpG甲基化的添加、细菌甲基化的去除和/或哺乳动物甲基化的添加。在一些情况下,所述多核酸可以是能够经历同源重组。所述哺乳动物甲基化多核酸可进一步包含与至少一个互补基因组区域结合的重组臂。在一些情况下,所述重组臂结合互补的基因组区域。在一些情况下,所述哺乳动物甲基化多核酸可包含抗原受体,该抗原受体包括TCR或嵌合抗原受体(CAR)。

[0030] 本文公开的还可以是用于降低细胞毒性的组合物,该组合物包含胱天蛋白酶调节剂和cGAS-STING途径调节剂。胱天蛋白酶调节剂可改变胞质DNA传感途径。cGAS-STING途径调节剂可改变胞质DNA传感途径。所述胞质DNA传感途径可包括胱天蛋白酶-1。所述胱天蛋白酶调节剂可以是胱天蛋白酶抑制剂。所述胱天蛋白酶调节剂可抑制胱天蛋白酶-1切割proIL-1 β 和proIL-18。

[0031] 所述胞质DNA传感途径可包括DNA依赖性IFN调节因子激活因子(DAI)、IFN诱导蛋白16(IFI16)、DEAD盒多肽41(DDX41)、黑素瘤缺乏因子2(AIM2)、DNA依赖性蛋白激酶、环鸟苷单磷酸-腺苷单磷酸合酶(cGAS)、IFN基因刺激因子(STING)、TANK结合激酶(TBK1)、白介素-1 β (IL-1 β)、MRE11、减数分裂重组11、Trex1、天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(胱天蛋白酶-1)、三种主要修复外切核酸酶、DNA依赖性IRF激活因子(DAI)、IFI16、DDX41、DNA依赖性蛋白激酶(DNA-PK)、减数分裂重组11同源物A(MRE11)和/或IFN调节因子(IRF)3和7。所述

cGAS-STING途径调节剂可以是cGAS-STING途径抑制剂。所述cGAS-STING途径抑制剂可包括泛胱天蛋白酶抑制剂,Z-VAD-FMK和/或Z-VAD-FMK。所述组合物可防止细胞凋亡和细胞焦亡。所述组合物可防止I型干扰素的表达。在一些情况下,所述组合物可降低细胞毒性,其包含修饰的胱天蛋白酶调节剂。在一些情况下,所述组合物可降低细胞毒性,其包含修饰的cGAS-STING途径调节剂。所述修饰可包括氘化、脂化、糖基化、烷基化、聚乙二醇化、氧化、磷酸化、硫酸化、酰胺化、生物素化、瓜氨酸化、异构化、泛素化、质子化、小分子偶联、还原、去磷酸化、亚硝基化和/或蛋白水解。在一些情况下,所述修饰可改善所述修饰的胱天蛋白酶调节剂和所述修饰的cGAS-STING途径调节剂的活性。所述活性与未修饰的胱天蛋白酶调节剂或未修饰的cGAS-STING途径调节剂的活性相比可增加约或增加5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、500%、750%或1000%或更多。所述活性与未修饰的胱天蛋白酶调节剂或未修饰的cGAS-STING途径调节剂的活性相比可增加至少约或增加至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、500%、750%或1000%或更多。所述活性与未修饰的胱天蛋白酶调节剂或未修饰的cGAS-STING途径调节剂的活性相比可增加至少约或增加至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、500%、750%或1000%以及至多100%。在一些情况下,向所述细胞中引入所述组合物。在一些情况下,所述组合物可防止细胞中的毒性。在一些情况下,所述细胞进一步与所述多核酸接触。

[0032] 本文公开了一种用于制备工程化细胞的方法,该方法包括:向细胞中引入包含与所述细胞的基因组区域中的靶核酸互补的间隔区的指导多核苷酸,由所述指导多核苷酸指导的核酸酶,和编码外源T细胞受体的多核苷酸;通过由所述指导多核苷酸指导的核酸酶对所述细胞内的靶核酸进行位点特异性切割;以及在切割位点处将编码所述外源T细胞受体的多核苷酸插入所述细胞的基因组区域中。所述核酸酶可以是Cas9。在一些情况下,所述指导多核苷酸可以是单一指导多核苷酸。所述指导多核苷酸可以是RNA。所述靶核酸可以是DNA。所述间隔区可以为10-30个核苷酸的长度。所述核酸酶可在所述靶核酸中产生双链断裂。

[0033] 在一些情况下,所述指导多核苷酸可通过电穿孔引入细胞中。指导核酸可通过核转染引入细胞中。核酸酶还可通过递送载体引入细胞中。编码外源T细胞受体的多核苷酸可进一步包含启动子序列。外源T细胞受体可通过同源重组插入。指导多核苷酸和核酸酶可形成核蛋白复合物。

[0034] 在本发明中,切割靶核酸可去除被编码外源T细胞受体的多核苷酸取代的基因组核酸序列。编码外源T细胞受体的多核苷酸可进一步包含第一重组臂和第二重组臂。第一重组臂可包含与靶核酸的第一部分相同的第一序列,并且第二重组臂可包含与靶核酸的第二部分相同的第二序列。在一些情况下,第一重组臂可包含与邻近靶核酸的第一部分相同的第一序列,并且第二重组臂可包含与邻近靶核酸的第二部分相同的第二序列。靶核酸可在基因内。基因可选自腺苷A2a受体(ADORA)、CD276、含V-set域的T细胞激活抑制因子1(VTCN1)、B和T淋巴细胞相关因子(BTLA)、细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(CTLA4)、吲哚胺2,3-双加氧酶1(IDO1)、杀伤细胞免疫球蛋白样受体三域长细胞质尾1(KIR3DL1)、淋巴细胞激活基因3(LAG3)、程序性细胞死亡因子1(PD-1)、甲型肝炎病毒细胞受体2(HAVCR2)、V域免疫

球蛋白T细胞激活抑制因子 (VISTA)、自然杀伤细胞受体2B4 (CD244)、细胞因子诱导的含SH2的蛋白 (CISH)、次黄嘌呤磷酸核糖转移酶1 (HPRT)、腺相关病毒整合位点 (AAVS SITE (例如 AAVS1、AAVS2等)) 或趋化因子 (C-C基序) 受体5 (基因/假基因) (CCR5)。基因可以是PD-1。基因可以是检查点基因。检查点基因可以是免疫检查点基因。

[0035] 在一些情况下,外源TCR序列在切割位点处的插入可导致基因的破坏。靶核酸可在基因间位点内。外源T细胞受体可在细胞中表达。工程化细胞可引入生物体中。工程化细胞可离体扩充。

[0036] 在本发明中,可在细胞中抑制非同源末端连接 (NHEJ)。在细胞中抑制NHEJ可包括抑制连接酶IV。在细胞中抑制NHEJ还可包括引入同源重组 (HR) 增强子。增强子可来源于病毒蛋白。增强子可以是E1B55K、E4orf6、Scr7或L755507。在细胞中抑制NHEJ可促进编码外源TCR的多核苷酸通过同源重组在切割位点处的插入。

[0037] 本文公开的可进一步包括向细胞中引入修饰剂以降低细胞毒性。修饰剂可以是泛胱天蛋白酶抑制剂Z-VADFMK和/或BX795。细胞可以是T细胞。细胞可以是哺乳动物细胞。细胞可以是原代细胞。原代细胞可以是免疫细胞。细胞可以是干细胞或祖细胞。在一些情况下,细胞为祖细胞。祖细胞可以是造血祖细胞。细胞可以是人类细胞。

[0038] 本文公开的还可以是包含工程化细胞的组合物。工程化细胞可以以治疗有效量施用于受试者。工程化细胞的施用可在受试者中产生治疗结果,其中治疗结果通过外源TCR进行调节。

[0039] 本文公开的可以是包含可与基因组DNA的前间区序列邻近基序序列相邻的至少一种外源受体序列的工程化细胞。在一些情况下,前间区序列邻近基序序列 (PAM) 可由CRISPR内切核酸酶识别。内切核酸酶可以是Cas蛋白。Cas蛋白可选自Cas1、Cas1B、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、Cas9 (也称为Csn1或Csx12)、Cas10、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1、Cse2、Csc1、Csc2、Csa5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、CsaX、Csx3、Csx1、Csx1S、Csf1、Csf2、Cs0、Csf4、Cpf1、c2c1、c2c3、Cas9HiFi、其同源物或其修饰型。在一些情况下,CRISPR内切核酸酶可以是Cas9。本发明的Cas9可识别PAM序列,该PAM序列可以是5'NGG 3'。

[0040] 本文公开的可以是可破坏至少一个基因的至少一种外源受体。基因可以是检查点基因。检查点基因可选自腺苷A2a受体 (ADORA)、CD276、含V-set域的T细胞激活抑制因子1 (VTCN1)、B和T淋巴细胞相关因子 (BTLA)、细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4 (CTLA4)、吡啶胺2,3-双加氧酶1 (IDO1)、杀伤细胞免疫球蛋白样受体三域长细胞质尾1 (KIR3DL1)、淋巴细胞激活基因3 (LAG3)、程序性细胞死亡因子1 (PD-1)、甲型肝炎病毒细胞受体2 (HAVCR2)、V域免疫球蛋白T细胞激活抑制因子 (VISTA)、自然杀伤细胞受体2B4 (CD244)、细胞因子诱导的含SH2的蛋白 (CISH)、次黄嘌呤磷酸核糖转移酶1 (HPRT)、腺相关病毒整合位点 (AAVS SITE (例如 AAVS1、AAVS2等)) 或趋化因子 (C-C基序) 受体5 (基因/假基因) (CCR5)。

[0041] 在一些情况下,基因可包含前间区序列。可通过插入外源受体序列破坏前间区序列。在一些情况下,至少一种外源受体序列可以是免疫受体序列。免疫受体序列可选自T细胞受体 (TCR) 序列、B细胞受体 (BCR) 序列或嵌合抗原受体 (CAR) 序列。TCR序列可包含两条或更多条链。在本发明中,两条或更多条链可包含至少一条 α 链。两条或更多条链还可包含至少一条 β 链。TCR序列可包含细胞外区域、跨膜区域和细胞内区域。TCR序列可产生功能性

TCR。TCR序列可识别抗原。TCR序列可识别主要组织相容性复合体(MHC)背景下的抗原。在一些情况下,MHC可以是I类。在一些情况下,MHC可以是HLA-A02。在其他情况下,MHC可以是II类。

[0042] 本文公开的可以是可与突变结合的外源受体。可通过全外显子组测序来鉴别突变。外源受体序列可与癌细胞结合。在一些情况下,本发明的细胞可以是原代细胞。原代细胞可以是免疫细胞。细胞可以是T细胞、干细胞或祖细胞。细胞可以是祖细胞。祖细胞可以是造血祖细胞。本发明的细胞可以是人类细胞。可对细胞进行选择。细胞可离体扩充。细胞可在体内扩充。细胞还可以是CD45RO(-)、CCR7(+)、CD45RA(+)、CD62L(+)、CD27(+)、CD28(+)、IL-7R α (+)或其组合。

[0043] 本发明的细胞可以是对于有需要的受试者可以是自体的细胞。细胞对于有需要的受试者还可以是非自体的。细胞可以是符合良好生产规范(GMP)的物质。细胞可以是用于治疗有需要的受试者的癌症、感染、自身免疫病或移植物抗宿主病(GVHD)的联合疗法的一部分。在一些情况下,本发明的细胞可作为单一疗法施用于有需要的受试者。

[0044] 本文公开的可以是一种组合物,其包含与内源细胞因子诱导的含SH2(CISH)基因结合的至少一种指导RNA以及与内源基因结合的次级指导RNA,该内源基因选自腺苷A2a受体(ADORA)、CD276、含V-set域的T细胞激活抑制因子1(VTCN1)、B和T淋巴细胞相关因子(BTLA)、细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(CTLA4)、吡啶胺2,3-双加氧酶1(IDO1)、杀伤细胞免疫球蛋白样受体三域长细胞质尾1(KIR3DL1)、淋巴细胞激活基因3(LAG3)、程序性细胞死亡因子1(PD-1)、甲型肝炎病毒细胞受体2(HAVCR2)、V域免疫球蛋白T细胞激活抑制因子(VISTA)、自然杀伤细胞受体2B4(CD244)、次黄嘌呤磷酸核糖转移酶1(HPRT)、腺相关病毒整合位点(AAVS SITE(例如AAVS1、AAVS2等))和趋化因子(C-C基序)受体5(基因/假基因)(CCR5)。

[0045] 本文公开的可以是一种在内源细胞因子诱导的含SH2(CISH)基因序列中具有破坏并在内源基因中具有至少一种次级破坏的工程化细胞。内源基因可选自腺苷A2a受体(ADORA)、CD276、含V-set域的T细胞激活抑制因子1(VTCN1)、B和T淋巴细胞相关因子(BTLA)、细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(CTLA4)、吡啶胺2,3-双加氧酶1(IDO1)、杀伤细胞免疫球蛋白样受体三域长细胞质尾1(KIR3DL1)、淋巴细胞激活基因3(LAG3)、程序性细胞死亡因子1(PD-1)、甲型肝炎病毒细胞受体2(HAVCR2)、V域免疫球蛋白T细胞激活抑制因子(VISTA)、自然杀伤细胞受体2B4(CD244)、次黄嘌呤磷酸核糖转移酶1(HPRT)、腺相关病毒整合位点(AAVS SITE(例如AAVS1、AAVS2等))和趋化因子(C-C基序)受体5(基因/假基因)(CCR5)。

[0046] 在一些情况下,本发明的细胞可进一步包含外源受体。外源受体可选自T细胞受体(TCR)、嵌合抗原受体(CAR)或B细胞受体(BCR)。外源受体可与突变结合。可通过全外显子组测序来鉴别突变。外源受体可与癌细胞结合。工程化细胞可以是原代细胞。原代细胞可以是免疫细胞。细胞可以是T细胞、干细胞或祖细胞。细胞可以是祖细胞。祖细胞可以是造血祖细胞。本发明的细胞可以是人类细胞。

[0047] 本文公开了一种遗传修饰免疫细胞,其包含:淋巴细胞,其中淋巴细胞来源于人类受试者;靶向多核酸的多核酸,其中靶向多核酸的多核酸被工程化以与淋巴细胞的基因组中的靶基因的特定区域杂交;核酸酶,其中核酸酶能够与靶向多核酸的多核酸相缔合以形

成核蛋白复合体,其中核蛋白复合体可以是能够在淋巴细胞的基因组中的靶基因中产生靶向双链断裂;以及靶多核酸,其中靶多核酸可以是在靶基因中包含双链断裂的基因组DNA,其中靶基因中的双链断裂导致靶基因功能的破坏,并且其中靶基因功能的破坏在核蛋白复合体可与原代淋巴细胞群体接触时以至少60%的效率发生,其中遗传修饰免疫细胞可以是能够扩充以产生具有靶基因的改变的功能的淋巴细胞克隆群体,并且其中淋巴细胞克隆群体适合施用于有需要的人。

[0048] 本文公开了一种用于T细胞中有效的检查点抑制因子破坏的方法,该方法包括:使T细胞与Cas9核酸酶和指导RNA接触,其中指导RNA含有与靶基因中的区域基本互补的17至22个核苷酸的区域;切割靶基因,其中靶基因可以是PD-1,并且其中当原代T细胞群体与Cas9核酸酶和指导RNA接触时,在至少30%的原代T细胞中发生敲除事件;以及破坏T细胞中的检查点抑制因子。

[0049] 本文公开了一种治疗有需要的受试者的方法,该方法包括:从人类收集淋巴细胞;通过接触能够经由在淋巴细胞中的基因组DNA的特定靶区域中诱导双链断裂而敲除PD-1蛋白功能的核糖核酸酶对淋巴细胞进行离体遗传修饰,其中淋巴细胞中的基因组DNA的靶区域在PD-1基因内并且双链断裂发生在基因组DNA的靶区域中,该基因组DNA的靶区域在能够与核糖核酸酶的至少15个核苷酸杂交的靶DNA的区域的3'侧,并且在含有前间区序列邻近基序的靶DNA的区域的5'侧;扩充敲除了PD-1蛋白的遗传修饰淋巴细胞群体以产生PD-1敲除T细胞群体;向受试者施用PD-1敲除T细胞群体,其中PD-1敲除T细胞适合施用于患者。

[0050] 在一些方面,本公开内容提供了制备遗传修饰细胞的方法,该方法包括从受试者获得一个或多个细胞。在一些方面,所述方法包括向所述一个或多个细胞中引入第一核酸。在一些实施方案中,所述方法包括第一核酸,并且该第一核酸包含编码至少一种抗DNA传感蛋白的第一转基因。在一些实施方案中,所述方法包括至少一种DNA传感途径,并且该至少一种DNA传感途径在所述一个或多个细胞内被至少一种抗DNA传感蛋白破坏。在一些方面,所述方法包括向所述一个或多个细胞中引入第二核酸。在一些实施方案中,所述方法包括第二核酸,并且该第二核酸包含编码工程化T细胞受体(TCR)的第二转基因。在一些实施方案中,所述方法包括至少一种内源免疫检查点基因,并且该至少一种内源免疫检查点基因在所述一个或多个细胞内通过所述第二转基因的插入而破坏。在一些实施方案中,所述方法包括所述至少一种DNA传感途径的破坏降低由所述第二转基因诱导的细胞毒性,由此维持或增加所述一个或多个细胞的活力。在一些实施方案中,所述方法包括一个或多个细胞,并且该一个或多个细胞为免疫细胞。在一些实施方案中,所述方法包括一个或多个细胞,并且该一个或多个细胞为T细胞、幼稚T细胞、CD4+细胞、CD8+细胞、干细胞、诱导多能干细胞、祖细胞、造血细胞、原代细胞或其任意组合。在一些实施方案中,所述方法包括第一核酸,并且该第一核酸为DNA、RNA或其杂合体。在一些实施方案中,所述方法包括第一核酸,并且该第一核酸为单链的或双链的。在一些实施方案中,所述方法包括第二核酸,并且该第二核酸为DNA、RNA或其杂合体。在一些实施方案中,所述方法包括第二核酸,并且该第二核酸为单链的或双链的。在一些实施方案中,所述方法包括引入第一核酸,并且引入该第一核酸包括非病毒转染、生物射弹(biolistics)、化学转染、电穿孔、核转染、热休克转染、脂质转染、显微注射或病毒转染。在一些实施方案中,所述方法包括病毒转导,并且该病毒转导包含腺相关病毒。在一些实施方案中,所述方法包括包含至少一种DNA传感蛋白的至少一种DNA传感

途径,并且该至少一种DNA传感蛋白选自三种主要修复外切核酸酶1 (TREX1)、DEAD盒解旋酶41 (DDX41)、DNA依赖性IFN调节因子激活因子 (DAI)、Z-DNA结合蛋白1 (ZBP1)、干扰素 γ 诱导蛋白16 (IFI16)、富含亮氨酸重复序列 (In FLII) 相互作用蛋白1 (LRRFIP1)、DEAH盒解旋酶9 (DHX9)、DEAH盒解旋酶36 (DHX36)、Lupus Ku自身抗原蛋白p70 (Ku70)、中国仓鼠细胞中的X射线修复互补缺陷修复蛋白6 (X-ray repair complementing defective repair in chinese hamster cells 6) (XRCC6)、干扰素基因刺激因子 (STING)、跨膜蛋白173 (TMEM173)、含有三重基序的32 (tripartite motif containing 32, TRIM32)、含有三重基序的56 (tripartite motif containing 56, TRIM56)、 β -连环蛋白 (CTNNB1)、髓性分化原发反应蛋白88 (MyD88)、黑素瘤缺乏因子2 (AIM2)、含有CARD的凋亡相关斑点样蛋白 (ASC)、胱天蛋白酶-1前体 (pro-CASP1)、胱天蛋白酶-1 (CASP1)、白介素1 β 前体 (pro-IL-1 β)、白介素18前体 (pro-IL-18)、白介素1 β (IL-1 β)、白介素18 (IL-18)、干扰素调节因子1 (IRF1)、干扰素调节因子3 (IRF3)、干扰素调节因子7 (IRF7)、干扰素刺激反应元件7 (ISRE7)、干扰素刺激反应元件1/7 (ISRE1/7)、核因子 κ B (NF- κ B)、RNA聚合酶III (RNA Pol III)、黑素瘤分化相关蛋白5 (MDA-5)、遗传和生理学实验室蛋白2 (LGP2)、视黄酸诱导基因1 (RIG-I)、线粒体抗病毒信号传导蛋白 (IPS-1)、TNF受体相关因子3 (TRAF3)、TRAF家族成员相关NFKB激活因子 (TANK)、核小体组装蛋白1 (NAP1)、TANK结合激酶1 (TBK1)、自噬相关蛋白9A (Atg9a)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、干扰素 λ -1 (IFN λ 1)、其蛋白质的磷酸化形式或其任意组合或衍生物。在一些实施方案中,所述方法包括至少一种DNA传感途径的破坏,并且该至少一种DNA传感途径的破坏包括至少一种DNA传感蛋白被所述抗DNA传感蛋白至少部分地抑制。在一些实施方案中,所述方法包括至少一种DNA传感途径的破坏,并且该至少一种DNA传感途径的破坏包括至少一种DNA传感蛋白被所述抗DNA传感蛋白激活。在一些实施方案中,所述方法包括至少一种抗DNA传感蛋白,并且该至少一种抗DNA传感蛋白选自c-FLiP、HCMV pUL83、DENV NS2B-NS3、HPV18E7、hAd5E1A、HSV1ICP0、VACV B13、VACV C16、TREX1、HCoV-NL63、SARS-CoV、HBV Pol、PEDV及其任意组合或衍生物。在一些实施方案中,所述方法包括至少一种内源免疫检查点基因,并且该至少一种内源免疫检查点基因为PD-1。在一些实施方案中,所述方法包括至少一种内源免疫检查点基因,并且该至少一种内源免疫检查点基因选自腺苷A2a受体 (ADORA)、CD276、含V-set域的T细胞激活抑制因子1 (VTCN1)、B和T淋巴细胞相关因子 (BTLA)、吡啶胺2,3-双加氧酶1 (IDO1)、杀伤细胞免疫球蛋白样受体三域长细胞质尾1 (KIR3DL1)、淋巴细胞激活基因3 (LAG3)、甲型肝炎病毒细胞受体2 (HAVCR2)、V域免疫球蛋白T细胞激活抑制因子 (VISTA)、自然杀伤细胞受体2B4 (CD244)、细胞因子诱导的含SH2的蛋白 (CISH)、次黄嘌呤磷酸核糖转移酶1 (HPRT)、腺相关病毒整合位点 (AAVS SITE (例如AAVS1、AAVS2等))或趋化因子 (C-C基序) 受体5 (基因/假基因) (CCR5)、CD160分子 (CD160)、具有Ig和ITIM结构域的T细胞免疫受体 (TIGIT)、CD96分子 (CD96)、细胞毒性和调节性T细胞分子 (CRTAM)、白细胞相关免疫球蛋白样受体1 (LAIR1)、唾液酸结合Ig样凝集素7 (SIGLEC7)、唾液酸结合Ig样凝集素9 (SIGLEC9)、肿瘤坏死因子受体超家族成员10b (TNFRSF10B)、肿瘤坏死因子受体超家族成员10a (TNFRSF10A)、胱天蛋白酶8 (CASP8)、胱天蛋白酶10 (CASP10)、胱天蛋白酶3 (CASP3)、胱天蛋白酶6 (CASP6)、胱天蛋白酶7 (CASP7)、Fas相关死亡结构域蛋白 (Fas associated via death domain) (FADD)、Fas细胞表面死亡受体 (FAS)、转化生长因子 β 受体II (TGFBRII)、转化生长因子 β 受体I (TGFBRI)、SMAD家族成员2 (SMAD2)、SMAD家族成员

3 (SMAD3)、SMAD家族成员4 (SMAD4)、SKI原癌基因 (SKI)、SKI样原癌基因 (SKIL)、TGFB诱导因子同源框1 (TGIF1)、程序性细胞死亡因子1 (PD-1)、细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4 (CTLA4)、白介素10受体亚基 α (IL10RA)、白介素10受体亚基 β (IL10RB)、血红素氧化酶2 (HMOX2)、白介素6受体 (IL6R)、白介素6信号转导蛋白 (IL6ST)、c-src酪氨酸激酶 (CSK)、鞘糖脂微域关联磷蛋白膜锚定物1 (PAG1)、信号阈值调节跨膜衔接因子1 (SIT1)、叉头框蛋白P3 (FOXP3)、PR结构域1 (PRDM1)、碱性亮氨酸拉链转录因子ATF样蛋白 (basic leucine zipper transcription factor, ATF-like, BATF)、可溶性鸟苷酸环化酶1, α 2 (GUCY1A2)、可溶性鸟苷酸环化酶1, α 3 (GUCY1A3)、可溶性鸟苷酸环化酶1, β 2 (GUCY1B2)、脯氨酰羟化酶结构域 (PHD1、PHD2、PHD3) 家族蛋白或可溶性鸟苷酸环化酶1, β 3 (GUCY1B3)、T细胞受体 α 基因座 (TRA)、T细胞受体 β 基因座 (TRB)、egl-9家族缺氧诱导因子1 (EGLN1)、egl-9家族缺氧诱导因子2 (EGLN2)、egl-9家族缺氧诱导因子3 (EGLN3)、蛋白磷酸酶1调节亚基12C (PPP1R12C) 及其任意组合或衍生物。在一些实施方案中,所述方法包括至少一种内源免疫检查点基因,并且该至少一种内源免疫检查点基因包括双链断裂。在一些实施方案中,所述方法包括双链断裂,并且产生该双链断裂包括CRISPR。在一些实施方案中,所述方法包括双链断裂,并且产生该双链断裂包括CRISPR、TALEN、基于转座子、ZEN、大范围核酸酶或Mega-TAL。在一些实施方案中,所述方法包括双链断裂,并且该双链断裂通过插入编码工程化TCR的第二转基因进行修复。在一些实施方案中,所述方法包括第二核酸,并且该第二核酸包含重组臂,并且其中所述编码工程化TCR的第二转基因的侧翼为该重组臂。在一些实施方案中,所述方法包括重组臂,并且该重组臂与所述至少一种内源免疫检查点基因的至少一部分至少部分互补。在本公开内容的方法的一些实施方案中,所述重组臂与所述至少一种内源免疫检查点基因之间同基因性 (isogenicity) 的增加对应于所述第二转基因插入效率的增加。在一些实施方案中,所述方法包括所述第二转基因的插入,并且所述第二转基因的插入效率使用荧光激活细胞分选术进行测量。在一些实施方案中,所述方法包括引入第二核酸,并且引入该第二核酸包括非病毒转染、生物射弹、化学转染、电穿孔、核转染、热休克转染、脂质转染、显微注射或病毒转染。在一些实施方案中,所述方法包括第二转基因的插入,并且编码工程化TCR的第二转基因的插入包括同源性指导的修复 (HDR)。在一些实施方案中,所述方法包括第二转基因的插入,并且该第二转基因的插入由同源重组 (HR) 增强子辅助。在一些实施方案中,所述方法包括增强子,并且该增强子来源于病毒蛋白。在一些实施方案中,所述方法包括HR增强子,并且该HR增强子选自E4orf6、E1b55K、E1b55K-H354、E1b55K-H373A、Scr7、L755507或其任意组合。在一些实施方案中,所述方法包括HR增强子,并且该HR增强子为化学抑制剂。在一些实施方案中,所述方法包括HR增强子,并且该HR增强子抑制连接酶IV。在一些实施方案中,所述方法包括降低细胞毒性,并且该细胞毒性包括DNA切割、细胞死亡、凋亡、核凝聚、细胞裂解、坏死、细胞运动性改变、细胞硬度改变、胞质蛋白表达改变、膜蛋白表达改变、膨胀、膜完整性丧失、代谢活动停止、低活性代谢、高活性代谢、活性氧物质 (reactive oxygen species) 增加、细胞质收缩或其任意组合中的至少一种。在一些实施方案中,所述方法包括测量活力,并且该活力使用荧光激活细胞分选术、台盼蓝拒染法、CD4+细胞表面标志物、CD8+细胞表面标志物、端粒长度或其任意组合中的至少一种进行测量。在一些实施方案中,所述方法包括受试者,并且该受试者为人类受试者。

[0051] 在一些方面,本公开内容提供了制备包含一个或多个细胞的治疗有效的组合物的

方法。在一些方面,所述方法包括测量基因编辑后所述一个或多个细胞的活力。在一些实施方案中,所述方法包括基因编辑,并且该基因编辑包括向所述一个或多个细胞中引入第一核酸。在一些实施方案中,所述方法包括第一核酸,并且该第一核酸包含编码至少一种抗DNA传感蛋白的第一转基因。在一些实施方案中,所述方法包括至少一种DNA传感途径,并且该至少一种DNA传感途径在所述一个或多个细胞内被至少一种抗DNA传感蛋白破坏。在一些实施方案中,所述方法包括基因编辑,并且该基因编辑包括向所述一个或多个细胞中引入第二核酸。在一些实施方案中,所述方法包括第二核酸,并且该第二核酸包含编码工程化T细胞受体(TCR)的第二转基因。在一些实施方案中,所述方法包括至少一种内源免疫检查点基因,并且该至少一种内源免疫检查点基因在所述一个或多个细胞内通过所述第二转基因的插入而破坏。在一些实施方案中,所述方法包括至少一种DNA传感途径的破坏,并且该至少一种DNA传感途径的破坏降低由所述第二转基因诱导的细胞毒性,由此维持或增加所述一个或多个细胞的活力。在一些方面,所述方法包括测量所述一个或多个细胞的基因编辑的效率。在一些方面,所述方法包括计算当施用于受试者时实现治疗反应所必需的所述一个或多个细胞的量。在一些实施方案中,所述方法包括计算实现治疗反应所必需的细胞的量,并且计算该量包括所测量的活力和所测量的效率。在一些方面,所述方法包括使所计算量的所述一个或多个细胞与至少一种赋形剂接触。在一些方面,所述方法包括测量所述活力,并且测量所述活力包括荧光激活细胞分选术、台盼蓝拒染法、CD4+细胞表面标志物、CD8+细胞表面标志物、端粒长度或其任意组合中的至少一种。在一些实施方案中,所述方法包括一个或多个细胞,并且该一个或多个细胞为免疫细胞。在一些实施方案中,所述方法包括一个或多个细胞,并且该一个或多个细胞为T细胞、幼稚T细胞、CD4+细胞、CD8+细胞、干细胞、诱导多能干细胞、祖细胞、造血细胞、原代细胞或其任意组合。在一些实施方案中,所述方法包括第一核酸,并且该第一核酸为DNA、RNA或其杂合体。在一些实施方案中,所述方法包括第一核酸,并且该第一核酸为单链的或双链的。在一些实施方案中,所述方法包括第二核酸,并且该第二核酸为DNA、RNA或其杂合体。在一些实施方案中,所述方法包括第二核酸,并且该第二核酸为单链的或双链的。在一些实施方案中,所述方法包括引入第一核酸,并且引入该第一核酸包括非病毒转染、生物射弹、化学转染、电穿孔、核转染、热休克转染、脂质转染、显微注射或病毒转染。在一些实施方案中,所述方法包括病毒转导,并且该病毒转导包含腺相关病毒。在一些实施方案中,所述方法包括包含至少一种DNA传感蛋白的至少一种DNA传感途径,并且该至少一种DNA传感蛋白选自三种主要修复外切核酸酶1(TREX1)、DEAD盒解旋酶41(DDX41)、DNA依赖性IFN调节因子激活因子(DAI)、Z-DNA结合蛋白1(ZBP1)、干扰素 γ 诱导蛋白16(IFI16)、富含亮氨酸重复序列(In FLII)相互作用蛋白1(LRRFIP1)、DEAH盒解旋酶9(DHX9)、DEAH盒解旋酶36(DHX36)、Lupus Ku自身抗原蛋白p70(Ku70)、中国仓鼠细胞中的X射线修复互补缺陷修复蛋白6(XRCC6)、干扰素基因刺激因子(STING)、跨膜蛋白173(TMEM173)、含有三重基序的32(TRIM32)、含有三重基序的56(TRIM56)、 β -连环蛋白(CTNNB1)、髓性分化原发反应蛋白88(MyD88)、黑素瘤缺乏因子2(AIM2)、含有CARD的凋亡相关斑点样蛋白(ASC)、胱天蛋白酶-1前体(pro-CASP1)、胱天蛋白酶-1(CASP1)、白介素1 β 前体(pro-IL-1 β)、白介素18前体(pro-IL-18)、白介素1 β (IL-1 β)、白介素18(IL-18)、干扰素调节因子1(IRF1)、干扰素调节因子3(IRF3)、干扰素调节因子7(IRF7)、干扰素刺激反应元件7(ISRE7)、干扰素刺激反应元件1/7(ISRE1/7)、核因子 κ B(NF- κ B)、RNA聚合酶III(RNA

Po1 III)、黑素瘤分化相关蛋白5(MDA-5)、遗传和生理学实验室蛋白2(LGP2)、视黄酸诱导基因1(RIG-I)、线粒体抗病毒信号传导蛋白(IPS-1)、TNF受体相关因子3(TRAF3)、TRAF家族成员相关NFKB激活因子(TANK)、核小体组装蛋白1(NAP1)、TANK结合激酶1(TBK1)、自噬相关蛋白9A(Atg9a)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、干扰素 λ -1(IFN λ 1)、其蛋白质的磷酸化形式或其任意组合或衍生物。在一些实施方案中,所述方法包括至少一种DNA传感途径的破坏,并且该至少一种DNA传感途径的破坏包括至少一种DNA传感蛋白被所述抗DNA传感蛋白至少部分地抑制。在一些实施方案中,所述方法包括至少一种DNA传感途径的破坏,并且该至少一种DNA传感途径的破坏包括至少一种DNA传感蛋白被所述抗DNA传感蛋白激活。在一些实施方案中,所述方法包括至少一种抗DNA传感蛋白,并且该至少一种抗DNA传感蛋白选自c-FLiP、HCMV pUL83、DENV NS2B-NS3、HPV18E7、hAd5E1A、HSV1ICP0、VACV B13、VACV C16、TREX1、HCoV-NL63、SARS-CoV、HBV Po1、PEDV及其任意组合或衍生物。在一些实施方案中,所述方法包括至少一种内源免疫检查点基因,并且该至少一种内源免疫检查点基因为PD-1。在一些实施方案中,所述方法包括至少一种内源免疫检查点基因,并且该至少一种内源免疫检查点基因选自腺苷A2a受体(ADORA)、CD276、含V-set域的T细胞激活抑制因子1(VTCN1)、B和T淋巴细胞相关因子(BTLA)、吡啶胺2,3-双加氧酶1(IDO1)、杀伤细胞免疫球蛋白样受体三域长细胞质尾1(KIR3DL1)、淋巴细胞激活基因3(LAG3)、甲型肝炎病毒细胞受体2(HAVCR2)、V域免疫球蛋白T细胞激活抑制因子(VISTA)、自然杀伤细胞受体2B4(CD244)、细胞因子诱导的含SH2的蛋白(CISH)、次黄嘌呤磷酸核糖转移酶1(HPRT)、腺相关病毒整合位点(AAVS SITE(例如AAVS1、AAVS2等))或趋化因子(C-C基序)受体5(基因/假基因)(CCR5)、CD160分子(CD160)、具有Ig和ITIM结构域的T细胞免疫受体(TIGIT)、CD96分子(CD96)、细胞毒性和调节性T细胞分子(CRTAM)、白细胞相关免疫球蛋白样受体1(LAIR1)、唾液酸结合Ig样凝集素7(SIGLEC7)、唾液酸结合Ig样凝集素9(SIGLEC9)、肿瘤坏死因子受体超家族成员10b(TNFRSF10B)、肿瘤坏死因子受体超家族成员10a(TNFRSF10A)、胱天蛋白酶8(CASP8)、胱天蛋白酶10(CASP10)、胱天蛋白酶3(CASP3)、胱天蛋白酶6(CASP6)、胱天蛋白酶7(CASP7)、Fas相关死亡结构域蛋白(FADD)、Fas细胞表面死亡受体(FAS)、转化生长因子 β 受体II(TGFBRII)、转化生长因子 β 受体I(TGFBRI)、SMAD家族成员2(SMAD2)、SMAD家族成员3(SMAD3)、SMAD家族成员4(SMAD4)、SKI原癌基因(SKI)、SKI样原癌基因(SKIL)、TGFB诱导因子同源框1(TGIF1)、程序性细胞死亡因子1(PD-1)、细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(CTLA4)、白介素10受体亚基 α (IL10RA)、白介素10受体亚基 β (IL10RB)、血红素氧化酶2(HMOX2)、白介素6受体(IL6R)、白介素6信号转导蛋白(IL6ST)、c-src酪氨酸激酶(CSK)、鞘糖脂微域关联磷蛋白膜锚定物1(PAG1)、信号阈值调节跨膜衔接因子1(SIT1)、叉头框蛋白P3(FOXP3)、PR结构域1(PRDM1)、碱性亮氨酸拉链转录因子ATF样蛋白(BATF)、可溶性鸟苷酸环化酶1, α 2(GUCY1A2)、可溶性鸟苷酸环化酶1, α 3(GUCY1A3)、可溶性鸟苷酸环化酶1, β 2(GUCY1B2)、脯氨酰羟化酶结构域(PHD1、PHD2、PHD3)家族蛋白或可溶性鸟苷酸环化酶1, β 3(GUCY1B3)、T细胞受体 α 基因座(TRA)、T细胞受体 β 基因座(TRB)、eg1-9家族缺氧诱导因子1(EGLN1)、eg1-9家族缺氧诱导因子2(EGLN2)、eg1-9家族缺氧诱导因子3(EGLN3)、蛋白磷酸酶1调节亚基12C(PPP1R12C)及其任意组合或衍生物。在一些实施方案中,所述方法包括至少一种内源免疫检查点基因,并且该至少一种内源免疫检查点基因包括双链断裂。在一些实施方案中,所述方法包括双链断裂,并且产生该双链断裂包括CRISPR。在一些实施方案中,所述方法包括双

链断裂,并且产生该双链断裂包括CRISPR、TALEN、基于转座子、ZEN、大范围核酸酶或Mega-TAL。在一些实施方案中,所述方法包括双链断裂,并且该双链断裂通过插入编码工程化TCR的第二转基因进行修复。在一些实施方案中,所述方法包括第二核酸,并且该第二核酸包含重组臂,并且其中所述编码工程化TCR的第二转基因的侧翼为该重组臂。在一些实施方案中,所述方法包括重组臂,并且该重组臂与所述至少一种内源免疫检查点基因的至少一部分至少部分互补。在本公开内容的方法的一些实施方案中,所述重组臂与所述至少一种内源免疫检查点基因之间同基因性的增加对应于所述第二转基因插入效率的增加。在一些实施方案中,所述方法包括所述第二转基因的插入,并且所述基因编辑的效率对应于所述第二转基因的插入效率。在一些实施方案中,所述方法包括测量所述基因编辑的效率,并且测量所述基因编辑的效率包括荧光激活细胞分选术、实时PCR或微滴式数字PCR中的至少一种。在一些实施方案中,所述方法包括引入第二核酸,并且引入该第二核酸包括非病毒转染、生物射弹、化学转染、电穿孔、核转染、热休克转染、脂质转染、显微注射或病毒转染。在一些实施方案中,所述方法包括第二转基因的插入,并且编码工程化TCR的第二转基因的插入包括同源性指导的修复(HDR)。在一些实施方案中,所述方法包括第二转基因的插入,并且该第二转基因的插入由同源重组(HR)增强子辅助。在一些实施方案中,所述方法包括增强子,并且该增强子来源于病毒蛋白。在一些实施方案中,所述方法包括HR增强子,并且该HR增强子选自E4orf6、E1b55K、E1b55K-H354、E1b55K-H373A、Scr7、L755507或其任意组合。在一些实施方案中,所述方法包括HR增强子,并且该HR增强子为化学抑制剂。在一些实施方案中,所述方法包括HR增强子,并且该HR增强子抑制连接酶IV。在一些实施方案中,所述方法包括降低细胞毒性,并且该细胞毒性包括DNA切割、细胞死亡、凋亡、核凝聚、细胞裂解、坏死、细胞运动性改变、细胞硬度改变、胞质蛋白表达改变、膜蛋白表达改变、膨胀、膜完整性丧失、代谢活动停止、低活性代谢、高活性代谢、活性氧物质增加、细胞质收缩或其任意组合中的至少一种。在一些实施方案中,所述方法包括实现治疗反应所必需的所述一个或多个细胞的量,并且当施用于受试者时实现治疗反应所必需的所述一个或多个细胞的量包括约 5×10^4 至 10^6 个细胞。在一些实施方案中,所述方法包括实现治疗反应所必需的所述一个或多个细胞的量,并且当施用于受试者时实现治疗反应所必需的所述一个或多个细胞的量包括至少约 5×10^4 至 10^6 个细胞。在一些实施方案中,所述方法包括一个或多个细胞,并且该一个或多个细胞为活细胞。在一些实施方案中,所述方法包括第二转基因,并且该第二转基因插入所述一个或多个细胞中的至少一种内源免疫检查点基因中。在一些实施方案中,所述方法包括受试者,并且该受试者为人类受试者。在一些实施方案中,所述方法包括治疗反应,并且该治疗反应包括预防、减少或消除所述受试者的癌症。在一些实施方案中,所述方法包括癌症,并且该癌症为膀胱癌、骨癌、脑肿瘤、乳腺癌、食管癌、胃肠癌、造血系统恶性肿瘤、白血病、肝癌、肺癌、淋巴瘤、骨髓瘤、卵巢癌、前列腺癌、肉瘤、胃癌或甲状腺癌。在一些实施方案中,所述方法包括至少一种赋形剂,并且该至少一种赋形剂选自乙酸盐、酸、醇、藻酸盐、铵、细胞培养基、纤维素、壳聚糖、胶原、葡聚糖、右旋糖、酯、乙醇、明胶、葡萄糖、甘油、乳糖、甘露糖醇、甘露糖、汞化合物、矿物油、苯酚、磷酸盐、聚丙烯酸、聚乙二醇(PEG)、林格氏溶液、盐水、山梨糖醇、淀粉、蔗糖、植物油、水、白石油或其组合。在一些实施方案中,所述方法包括向受试者施用在受试者中实现治疗反应所必需的量的工程化细胞。

附图说明

[0052] 本发明的新颖特征在随附权利要求中具体阐述。通过参考以下对利用本发明的原理的说明性实施方案加以阐述的详细描述以及附图,将获得对本发明的特征和优点的更好理解,在这些附图中:

[0053] 图1为本文公开的一些方法的概述。

[0054] 图2示出了用于TCR转基因整合和TCR表达的一些示例性转座子构建体。

[0055] 图3显示了mRNA的体外转录及其作为模板在任何类型的细胞(例如,原代细胞、细胞系等)中产生同源重组(HR)底物的应用。在病毒基因组的5' LTR区上游,可以放置T7、T3或其他转录起始序列以用于病毒盒的体外转录。编码病毒载体的有义链和反义链的mRNA可用于提高产量。

[0056] 图4显示了四种质粒的结构,包括Cas9核酸酶质粒、HPRT gRNA质粒、Amaxa EGFPmax质粒和HPRT靶载体。

[0057] 图5示出了具有0.5kb靶向臂的示例性HPRT靶载体。

[0058] 图6显示了靶向示例性基因(例如,HPRT基因)的三种潜在TCR转基因敲入设计。(1) 外源启动子:由外源启动子(“启动子”)转录的TCR转基因(“TCR”);(2) SA框内转录:通过剪接由内源启动子(由箭头指示)转录的TCR转基因;和(3) 融合框内翻译:通过框内翻译由内源启动子转录的TCR转基因。所有三种示例性设计均可敲除基因功能。例如,当通过插入TCR转基因敲除HPRT基因或PD-1基因时,可使用6-硫代鸟嘌呤作为选择测定。

[0059] 图7显示了Cas9+gRNA+靶质粒共转染在大量群体中具有良好的转染效率。

[0060] 图8显示了CD3+T细胞的EGFP FACS分析结果。

[0061] 图9示出了两种类型的T细胞受体。

[0062] 图10示出了使用两种平台的成功的T细胞转染效率。

[0063] 图11示出了随着T细胞数目成比例增加,例如,随着T细胞数目增加的高效转染。

[0064] 图12示出了通过CRISPR gRNA在潜在靶位点发生的基因修饰百分比。

[0065] 图13显示了刺激T细胞中的CRISPR诱导的DSB。

[0066] 图14示出了RNA递送的优化。

[0067] 图15显示了靶位点处的双链断裂。在引入靶向CRISPR-Cas系统之前诱导用抗CD3和抗CD28激活的T细胞中的双链断裂方面,基因靶向是成功的。举例而言,使用免疫检查点基因PD-1、CCR5和CTLA4来验证该系统。

[0068] 图16示出了CCR5处的TCR整合图示。具有CCR5的1kb重组臂的质粒靶向载体的示例性设计。3kb TCR表达转基因可插入与不同基因相似的具有重组臂的载体中,以便使用同源重组靶向其他感兴趣的基因。使用重组臂之外的引物进行的PCR分析可证明在基因处成功的TCR整合。

[0069] 图17描绘了刺激T细胞中CCR5基因处的TCR整合。阳性PCR结果证明转染后72小时在CCR5基因处的成功的同源重组。

[0070] 图18示出了响应质粒DNA转染的T细胞死亡。

[0071] 图19为存在于不同类型细胞(包括但不限于T细胞)中的胞质DNA的先天免疫传感途径的示意图。T细胞表达用于检测外来DNA的两种途径。细胞毒性可由基因组工程化期间

这些途径的激活而引起。

[0072] 图20显示了图19阻断凋亡和细胞焦亡的抑制剂。

[0073] 图21示出了代表性质粒修饰的示意图。标准质粒含有可触发先天免疫传感系统的细菌甲基化。去除细菌甲基化可降低由标准质粒引起的毒性。也可去除细菌甲基化,并添加哺乳动物甲基化,以使载体看起来像“自身DNA”。修饰还可包括合成单链DNA的使用。

[0074] 图22示出了代表性功能性工程化TCR抗原受体。这种工程化TCR对表达MART-1的黑素瘤肿瘤细胞系具有高度反应性。TCR α 和TCR β 链与弗林蛋白酶切割位点连接,然后是2A核糖体跳跃肽。

[0075] 图23A和图23B示出了在用指导RNA转染后第6天PD-1、CTLA-4,PD-1和CTLA-2,或CCR5、PD-1和CTLA-4的表达。代表性指导:PD-1 (P2、P6、P2/6),CTLA-4 (C2、C3、C2/3)或CCR5 (CC2)。A.示出了抑制性受体表达百分比。B.示出了相对于对照指导RNA的归一化抑制性受体表达。

[0076] 图24A和图24B示出了与未染色和无指导物对照相比,用CRISPR和CTLA-4特异性指导RNA(指导#2和指导#3)电穿孔后原代人T细胞中的CTLA-4表达。B.示出了与未染色和无指导物对照相比,用CRISPR和PD-1特异性指导RNA(指导#2和指导#6)电穿孔后原代人T细胞中的PD-1表达。

[0077] 图25示出了在用CRISPR和多重CTLA-4和PD-1指导RNA电穿孔后原代人T细胞中CTLA-4和PD-1表达的FACs结果。

[0078] 图26A和图26B示出了用CRISPR处理后原代人T细胞中的双敲除百分比。A.示出了与仅Zap、仅Cas9以及所有指导RNA对照相比,用CTLA-4指导#2、CTLA-4指导#3、CTLA-4指导#2和#3、PD-1指导#2和CTLA-4指导#2、PD-1指导#6和CTLA-4指导#3处理的T细胞中的CTLA-4敲除百分比。B.示出了与仅Zap、仅Cas9以及所有指导RNA对照相比,用PD-1指导#2、PD-1指导#6、PD-1指导#2和#6、PD-1指导#2和CTLA-4指导#2、PD-1指导#6和CTLA-4指导#3处理的T细胞中的PD-1敲除百分比。

[0079] 图27示出了用CRISPR和对CTLA-4、PD-1或其组合具有特异性的指导RNA电穿孔后的T细胞活力。

[0080] 图28为CEL-I测定的结果,示出了在仅引入PD-1指导RNA,引入PD-1和CTLA-4指导RNA,或引入CCR5、PD-1和CTLA-4指导RNA,仅Zap或仅gRNA作为对照的条件下,由PD-1指导RNA#2、#6、#2和#6进行的切割。

[0081] 图29为CEL-I测定的结果,示出了在仅引入CTLA-4指导RNA,引入PD-1和CTLA-4指导RNA,或引入CCR5、PD-1和CTLA-4指导RNA,仅Zap或仅gRNA作为对照的条件下,由CTLA-4指导RNA#2、#3、#2和#3进行的切割。

[0082] 图30为CEL-I测定的结果,示出了与仅Zap、仅Cas 9或仅指导RNA对照相比,在引入CCR5指导RNA、PD-1指导RNA或CTLA-4指导RNA的条件下,由CCR5指导RNA#2进行的切割。

[0083] 图31示出了利用5微克和10微克具有2'-O-甲基RNA修饰的优化CRISPR指导RNA在原代人T细胞中,如通过CD3FACs表达所测量的TCR α 的敲除。

[0084] 图32描绘了用CRISPR和CTLA-4指导RNA处理后检测T细胞活力和表型的方法。通过对显示正常FSC/SSC谱的处理细胞的频率(相对于单独电穿孔对照的频率进行归一化)进行定量来检测表型。还通过FSC/SSC门控群体内的细胞对活力染料的拒染来测量活力。通过

CD3和CD62L来检测T细胞表型。

[0085] 图33示出了用CRISPR和PD-1指导RNA以及PD-1和CTLA-4指导RNA处理后检测T细胞活力和表型的方法。通过对显示正常FSC/SSC谱的处理细胞的频率(相对于单独电穿孔对照的频率进行归一化)进行定量来检测表型。还通过FSC/SSC门控群体内的细胞对活力染料的拒染来测量活力。通过CD3和CD62L来检测T细胞表型。

[0086] 图34示出了用原代人T细胞和Jurkat对照的PD-1或CTLA-4指导RNA转染后第4天检测CRISPR基因编辑的T7E1测定结果。NN为无T7E1核酸酶对照。

[0087] 图35示出了通过分解追踪插入缺失(TIDE)分析的结果。示出了PD-1和CTLA-4指导RNA的基因编辑效率百分比。

[0088] 图36示出了针对单指导转染的通过分解追踪插入缺失(TIDE)分析的结果。针对用PD-1或CTLA-1指导RNA和CRISPR转染的原代人T细胞示出了具有缺失或插入的序列的百分比。

[0089] 图37示出了具有双靶向的PD-1序列缺失。

[0090] 图38示出了具有双靶向的PD-1序列缺失的PCR产物的测序结果。显示样品6和14具有两个gRNA序列的融合物,其间的135bp被切除。

[0091] 图39示出了CTLA-4的双靶向序列缺失。两个指导RNA序列之间的缺失也存在于双指导靶向CTLA-4(样品9和14)的测序中。T7E1测定通过PCR证实了缺失。

[0092] 图40A和图40B示出了A. CRISPR转染后第6天人T细胞的活力。B. 人T细胞的转染效率的FACs分析(%pos GFP)。

[0093] 图41示出了用抗CTLA-4CRISPR指导RNA转染的染色人T细胞中CTLA-4表达的FACs分析。PE为抗人CD152(CTLA-4)。

[0094] 图42A和图42B示出了用抗CTLA-4指导RNA和CRISPR转染后CTLA-4阳性人T细胞的CTLA-4FACs分析。B. 示出了用抗CTLA-4指导RNA和CRISPR转染后人T细胞中相对于脉冲对照的CTLA-4敲除效率。

[0095] 图43示出了含有工程化TCR的微环DNA。

[0096] 图44描绘了针对CISH、PD-1、CTLA4和AAVS1的修饰的sgRNA。

[0097] 图45描绘了用CRISPR和抗PD-1指导RNA转染后第14天PD-1KO的FACs结果。PerCP-Cy5.5为小鼠抗人CD279(PD-1)。

[0098] 图46A和图46B, A. 示出了用抗PD-1CRISPR系统转染后的PD-1表达百分比。B. 示出了与仅Cas9对照相比的PD-1敲除效率百分比。

[0099] 图47示出了用CRISPR系统与抗PD-1指导#2、抗PD-1指导#6、抗PD1指导#2和#6、或抗PD-1指导#2和#6以及抗CTLA-4指导#2和#3转染的人T细胞的FSC/SSC子集的FACs分析。

[0100] 图48示出了用CRISPR和抗CTLA-4指导RNA转染后第6天人T细胞的FACs分析。PE为小鼠抗人CD152(CTLA-4)。

[0101] 图49示出了用CRISPR和抗PD-1以及抗CTLA-4指导RNA转染后第1天人T细胞和对照Jurkat细胞的FACs分析。示出了与转染的Jurkat细胞相比,人T细胞的活力和转染效率。

[0102] 图50描绘了来自用CRISPR和抗CTLA-4指导RNA转染的CTLA-4染色人T细胞的FACs分析的定量数据。转染后第6天的数据示出了CTLA-4表达百分比和敲除百分比。

[0103] 图51示出了用CRISPR和抗PD-1指导RNA转染的PD-1染色人T细胞的FACs分析。转染

后第14天的数据示出了PD-1表达(抗人CD279PerCP-Cy5.5)。

[0104] 图52示出了与用CRISPR和抗PD-1指导RNA转染的人T细胞的仅Cas9对照相比的PD-1表达百分比和PD-1敲除百分比。

[0105] 图53示出了用CRISPR、抗CTLA-4和抗PD-1指导RNA转染的人T细胞的第14天细胞计数和活力。

[0106] 图54示出了用CRISPR,以及仅抗PD-1指导#2,抗PD-1指导#2和#6,或仅抗CTLA-4指导#3电穿孔后第14天的人T细胞的FACs数据。将工程化T细胞再刺激48小时以评估CTLA-4和PD-1的表达,并与未用指导RNA电穿孔的对照细胞进行比较。

[0107] 图55示出了用CRISPR,以及抗CTLA-4指导#2和#3,抗PD-1指导#2和抗CTLA-4指导#3,或抗PD-1指导#2和#6、抗CTLA-4指导#3和#2电穿孔后第14天的人T细胞的FACs数据。将工程化T细胞再刺激48小时以评估CTLA-4和PD-1的表达,并与未用指导RNA电穿孔的对照细胞进行比较。

[0108] 图56描绘了原代人T细胞中CRISPR介导的CISH基因座的基因修饰的surveyor测定结果。

[0109] 图57A、图57B和图57C, A. 描绘了T细胞受体(TCR)的示意图。B. 示出了嵌合抗原受体的示意图。C. 示出了B细胞受体(BCR)的示意图。

[0110] 图58示出了体细胞突变负荷在各种肿瘤类型之间变化。肿瘤特异性新抗原产生和呈现在理论上与突变负荷成正比。

[0111] 图59示出了可对核酸进行的假尿苷-5'-三磷酸和5-甲基胞苷-5-三磷酸修饰。

[0112] 图60示出了用CRISPR和CISH gRNA 1、3、4、5或6转染的293T细胞的TIDE和密度测定数据比较。

[0113] 图61描绘了用CRISPR和CISH gRNA 1、3、4、5或6转染的293T细胞的密度测定分析的重复实验。

[0114] 图62A和图62B示出了CISH gRNA 1的重复TIDE分析A和B。

[0115] 图63A和图63B示出了CISH gRNA 3的重复TIDE分析A和B。

[0116] 图64A和图64B示出了CISH gRNA 4的重复TIDE分析A和B。

[0117] 图65A和图65B示出了CISH gRNA 5的重复TIDE分析A和B。

[0118] 图66A和图66B示出了CISH gRNA 6的重复TIDE分析A和B。

[0119] 图67示出了显示在原代T细胞中CRISPR敲除后CISH蛋白损失的蛋白质印迹。

[0120] 图68A、图68B和图68C通过用单链或双链DNA转染后A. 1天、B. 2天、C. 3天的细胞计数描绘了DNA活力。M13ss/dsDNA为7.25kb。pUC57为2.7kb。GFP质粒为6.04kb。

[0121] 图69示出了可在工程化细胞制备期间或制备之后进行调节的机制途径。

[0122] 图70A和图70B描绘了在A. 第3天和B. 第7天用CRISPR系统(15μg Cas9, 10μg gRNA)转染后的细胞计数。样品1-未处理的。样品2-仅脉冲的。样品3-GFP mRNA。样品4-仅Cas9脉冲。样品5-仅5微克微环供体脉冲。样品6-仅20微克微环供体脉冲。样品7-质粒供体(5微克)。样品8-质粒供体(20微克)。样品9-+指导PD1-2/+Cas9/-供体。样品10-+指导PD1-6/+Cas9/-供体。样品11-+指导CTLA4-2/+Cas9/-供体。样品12-+指导CTLA4-3/+Cas9/-供体。样品13-PD1-2/5ug供体。样品14-PD1双重/5ug供体。样品15-CTLA4-3/5ug供体。样品16-CTLA4双重/5ug供体。样品17-PD1-2/20ug供体。样品18-PD1双重/20ug供体。样品19-CTLA4-3/

20ug供体。样品20-CTLA4双重/20ug供体。

[0123] 图71A和图71B示出了无供体核酸的PD1A.gRNA 2和B.gRNA6的第4天TIDE分析。

[0124] 图72A和图72B示出了无供体核酸的CTLA4A.gRNA 2和B.gRNA3的第4天TIDE分析。

[0125] 图73示出了对照细胞、用5微克供体DNA(微环)电穿孔的细胞或用20微克供体DNA(微环)电穿孔的细胞的第7天TCR β 检测的FACs分析。

[0126] 图74示出了用CRISPR系统以及无多核酸供体(对照)、5微克多核酸供体(微环)或20微克多核酸供体(微环)电穿孔的第7天T细胞的总结。示出了TCR阳性细胞的FACs分析的总结。

[0127] 图75示出了TCR微环以正向方向整合到PD1gRNA#2切割位点中。

[0128] 图76A和图76B示出了使用以CRISPR和具有5'或3'修饰(或两者)的PD-1或CISH gRNA(增加浓度的双链多核酸供体)进行转染的人T细胞的GUIDE-Seq剂量测试得到的第4天活细胞百分比。B.示出了在用CRISPR和PD-1或CISH特异性gRNA转染的人T细胞的PD-1或CISH基因座处的整合效率。

[0129] 图77示出了在PD-1或CISH基因位点处dsDNA整合的GoTaq和PhusionFlex分析。

[0130] 图78示出了用CRISPR和5微克或20微克编码外源TCR的微环DNA转染的人T细胞的第15天FACs分析。

[0131] 图79示出了用CRISPR系统以及无多核酸供体(对照)、5微克多核酸供体(微环)或20微克多核酸供体(微环)电穿孔的第15天T细胞的总结。示出了TCR阳性细胞的FACs分析的总结。

[0132] 图80描绘了在CRISPR和编码mTCR β 链的微环转染后第4天相对于RNA酶P的数字PCR拷贝数数据。编码mTCR β 链的质粒供体用作对照。

[0133] 图81A和图81B示出了A.随着编码外源TCR的微环的剂量增加的第3天T细胞活力。B.随着编码外源TCR的微环的剂量增加的第7天T细胞活力。

[0134] 图82A和图82B示出了A.用于T细胞双链DNA转染的Lonza核转染的优化条件。细胞数目与编码GFP的质粒的浓度。B.用编码GFP蛋白的双链DNA进行T细胞的Lonza核转染的优化条件。示出了转导百分比与用于转染的GFP质粒的浓度。

[0135] 图83A和图83B,A.描绘了用于AAV TCR递送的pDG6-AAV无辅助包装质粒。B.示出了用于AAV瞬时转染293细胞以产生病毒的方案的示意图。将对病毒进行纯化和储存,以转导至原代人T细胞中。

[0136] 图84示出了编码外源TCR的rAAV供体,该外源TCR的侧翼为内源免疫检查点(CTLA4和PD1作为示例性实例示出)的900bp同源臂。

[0137] 图85示出了编码外源TCR的rAAV同源重组供体的基因组整合示意图,该外源TCR的侧翼为AAVS1基因的同源臂。

[0138] 图86A、图86B、图86C和图86D示出了使用AAVS1系统可发生的可能的重组事件。A.示出了在AAVS1处的双链断裂的同源性指导的修复与转基因的整合。B.示出了AAVS1基因一条链的同源性指导的修复以及AAVS1互补链的非同源末端连接插入缺失。C.示出了转基因向AAVS1基因位点中的非同源末端连接插入以及AAVS1处的非同源末端连接插入缺失。D.示出了在两个AAVS1位置处的非同源插入缺失与转基因向基因组位点中的随机整合。

[0139] 图87示出了将编码外源TCR的转基因引入免疫检查点基因中的组合的CRISPR和

rAAV靶向方法。

[0140] 图88A和图88B示出了第3天数据：A. CRISPR电穿孔实验，其中在7.5微克编码外源TCR的微环供体的电穿孔期间使用胱天蛋白酶和TBK抑制剂。相比于所用抑制剂的浓度对活力进行绘图。B. 示出了电穿孔的效率。示出了阳性TCR百分比与所用抑制剂的浓度。

[0141] 图89示出了用CRISPR和编码外源TCR的微环DNA (7.5微克) 电穿孔的人T细胞的FACs数据。在电穿孔期间添加胱天蛋白酶和TBK抑制剂。

[0142] 图90A和图90B示出了用CRISPR和编码外源TCR的微环DNA (20微克) 电穿孔的人T细胞的FACs数据。A. 显示TCR阳性细胞与所用免疫检查点特异性指导物的电穿孔效率。B. 显示TCR阳性细胞与所用免疫检查点特异性指导物的电穿孔效率的FACs数据。

[0143] 图91示出了用CRISPR和编码外源TCR的微环 (在不同的微环浓度下) 电穿孔后第13天的TCR表达。

[0144] 图92A和图92B示出了细胞死亡抑制剂研究，其中在用CRISPR和编码外源TCR的微环DNA转染之前用布雷菲德菌素A (Brefeldin A) 和ATM抑制剂对人T细胞进行预处理。A. 示出了在电穿孔后第3天T细胞的活力。B. 示出了在电穿孔后第7天T细胞的活力。

[0145] 图93A和图93B示出了细胞死亡抑制剂研究，其中在用CRISPR和编码外源TCR的微环DNA转染之前用布雷菲德菌素A和ATM抑制剂对人T细胞进行预处理。A. 示出了电穿孔后第3天在T细胞上的TCR表达。B. 示出了电穿孔后第7天在T细胞上的TCR表达。

[0146] 图94示出了用来快速检测外源转基因 (例如, TCR) 整合的剪接受体GFP报告基因测定。

[0147] 图95示出了用来快速检测外源转基因 (例如, TCR) 整合的基因座特异性数字PCR测定。

[0148] 图96示出了使用PGK启动子或剪接受体编码外源TCR的重组 (rAAV) 供体构建体。每个构建体的侧翼为AAVS1检查点基因的850个碱基对同源臂 (HA)。

[0149] 图97示出了rAAV AAVS1-TCR基因靶向载体。用于将转基因TCR表达盒插入PPP1R12C基因内区域内的AAVS1“安全港”基因座中的rAAV靶向载体的示意性图示。示出了主要特征及其核苷酸数目的大小 (bp)。ITR：内部串联重复序列；PGK：磷酸甘油酸激酶；mTCR：鼠T细胞受体 β ；SV40PolyA：猿猴病毒40聚腺苷酸化信号。

[0150] 图98示出了用修饰的gRNA刺激后48小时用GFP+转基因电穿孔的T细胞。用假尿苷、5' moC、5' meC、5' moU、5' hmC+5' moU、m6A或5' moC+5' meC对gRNA进行修饰。

[0151] 图99A和图99B描绘了用修饰的gRNA刺激后48小时用GFP+转基因电穿孔的T细胞中表达GFP的细胞的A. 活力和B. MFI。用假尿苷、5' moC、5' meC、5' moU、5' hmC+5' moU、m6A或5' moC+5' meC对gRNA进行修饰。

[0152] 图100A和图100B示出了A. 修饰的洁净帽 (clean cap) Cas9蛋白或B. 未修饰的Cas9蛋白的TIDE结果。在用未修饰的Cas9或洁净帽Cas9 (15微克Cas9和10微克化学修饰的gRNA) 电穿孔的T细胞的CCR5基因座处检测基因组整合。

[0153] 图101A和图101B示出了表达逆转录酶 (RT) 报告RNA的Jurkat细胞的A. 活力和B. 逆转录酶活性，该Jurkat细胞使用Neon转染系统采用编码RT的质粒和引物进行转染 (浓度参见表格) 并测定转染后第3天的细胞活力和GFP表达。GFP阳性细胞表示具有RT活性的细胞。

[0154] 图102A和图102B示出了人TIL刺激前后的绝对细胞计数。

A. 示出了在RPMI培养基或离体培养基中培养的刺激前后的第一供体细胞计数。B. 示出了在RPMI培养基中培养的刺激前后的第二供体细胞计数。

[0155] 图103A和图103B示出了用靶向PD-1基因座的CRISPR系统进行电穿孔的人肿瘤浸润性淋巴细胞 (TIL) 或对照细胞的细胞扩充, 其中A. 添加了自体饲养细胞或B. 未添加自体饲养细胞。

[0156] 图104A和图104B示出了用单独CRISPR系统 (对照); 单独的GFP质粒 (供体) (对照); 供体和CRISPR系统; 供体、CRISPR和cFLP蛋白; 供体、CRISPR和hAd5E1A (E1A) 蛋白; 或供体、CRISPR和HPV18E7蛋白进行电穿孔的人T细胞。在电穿孔后A. 48小时或B. 8天测量GFP的FACs分析。

具体实施方式

[0157] 以下描述和实施例详细阐明了本发明的实施方案。应当理解, 本发明不限于本文所述的特定实施方案, 并且因此可以变化。本领域技术人员将认识到, 本发明存在许多变化和修改, 其包含在本发明的范围内。

定义

[0158] 如本文所用的涉及参考数值及其语法等同项的术语“约”及其语法等同项可包括从该值加上或减去10%的数值范围。例如, “约10”的量包括9至11的量。涉及参考数值的术语“约”还可包括从该值加上或减去10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%的数值范围。

[0159] 如本文所用的术语“激活 (活化)”及其语法等同项可指使细胞从休眠状态转变成活跃状态的过程。该过程可包括对抗原的应答、迁移和/或向功能激活状态的表型或遗传改变。例如, 术语“激活 (活化)”可指T细胞激活的逐步过程。例如, T细胞可能需要至少两个信号, 以变得完全激活。第一信号可在TCR被抗原-MHC复合体接合之后发生, 而第二信号可通过共刺激分子接合而发生。在体外, 抗CD3可模拟第一信号, 而抗CD28可模拟第二信号。

[0160] 如本文所用的术语“邻近 (相邻)”及其语法等同项可指正好在参考对象旁边。例如, 在核苷酸序列的语境下术语邻近 (相邻) 可意指其间没有任何核苷酸。例如, 多核苷酸A与多核苷酸B相邻 (邻近) 可意指A和B之间没有任何核苷酸的AB。

[0161] 如本文所用的术语“抗原”及其语法等同项可指含有能够被一个或多个受体结合的一个或多个表位的分子。例如, 抗原可在被呈递时刺激宿主的免疫系统产生细胞抗原特异性免疫应答, 或可产生体液抗体应答。抗原还可具有通过自身或在与另一分子结合存在时引发细胞和/或体液应答的能力。例如, 肿瘤细胞抗原可被TCR识别。

[0162] 如本文所用的术语“表位”及其语法等同项可指可以被抗体、B细胞、T细胞或工程化细胞识别的抗原的一部分。例如, 表位可以是被TCR识别的癌症表位。抗原内的多个表位也可被识别。表位也可是突变的。

[0163] 如本文所用的术语“自体”及其语法等同项可指来源于相同的生物体。例如, 可将样品 (例如, 细胞) 去除、处理, 并在随后的时间返还至相同的受试者 (例如, 患者)。自体过程不同于同种异体过程, 在同种异体过程中, 供体和接受者是不同的受试者。

[0164] 术语“条码化成”是指分子之间的关系, 其中第一分子含有可用于鉴别第二分子的条码。

[0165] 如本文所用的术语“癌症”及其语法等同项可指其独特特性(丧失正常控制)导致不受调节的生长、缺乏分化、局部组织入侵和转移的细胞过度增殖。对于本发明的方法,癌症可以是任何癌症,包括以下的任一种:急性淋巴细胞癌、急性髓性白血病、腺泡状横纹肌肉瘤、膀胱癌、骨癌、脑癌、乳腺癌、肛门癌、肛管癌、直肠癌、眼癌、肝内胆管癌、关节癌、颈癌、胆囊癌或胸膜癌、鼻癌、鼻腔癌或中耳癌、口腔癌、外阴癌、慢性淋巴细胞白血病、慢性骨髓癌、结肠癌、食管癌、宫颈癌、纤维肉瘤、胃肠类癌瘤、霍奇金淋巴瘤、下咽癌、肾癌、喉癌、白血病、液体肿瘤、肝癌、肺癌、淋巴瘤、恶性间皮瘤、肥大细胞瘤、黑素瘤、多发性骨髓瘤、鼻咽癌、非霍奇金淋巴瘤、卵巢癌、胰腺癌、腹膜癌、网膜癌和肠系膜癌、咽癌、前列腺癌、直肠癌、肾癌、皮肤癌、小肠癌、软组织癌、实体瘤、胃癌、睾丸癌、甲状腺癌、输尿管癌和/或尿膀胱癌(acute lymphocytic cancer, acute myeloid leukemia, alveolar rhabdomyosarcoma, bladder cancer, bone cancer, brain cancer, breast cancer, cancer of the anus, anal canal, rectum, cancer of the eye, cancer of the intrahepatic bile duct, cancer of the joints, cancer of the neck, gallbladder, or pleura, cancer of the nose, nasal cavity, or middle ear, cancer of the oral cavity, cancer of the vulva, chronic lymphocytic leukemia, chronic myeloid cancer, colon cancer, esophageal cancer, cervical cancer, fibrosarcoma, gastrointestinal carcinoid tumor, Hodgkin lymphoma, hypopharynx cancer, kidney cancer, larynx cancer, leukemia, liquid tumors, liver cancer, lung cancer, lymphoma, malignant mesothelioma, mastocytoma, melanoma, multiple myeloma, nasopharynx cancer, non-Hodgkin lymphoma, ovarian cancer, pancreatic cancer, peritoneum, omentum, and mesentery cancer, pharynx cancer, prostate cancer, rectal cancer, renal cancer, skin cancer, small intestine cancer, soft tissue cancer, solid tumors, stomach cancer, testicular cancer, thyroid cancer, ureter cancer, and/or urinary bladder cancer)。如本文所用的,术语“肿瘤”是指,例如,恶性类型或良性类型的细胞或组织的异常生长。

[0166] 如本文所用的术语“癌症新抗原”或“新抗原”或“新表位”及其语法等同项可指不在正常未突变的宿主基因组中编码的抗原。在一些情况下,“新抗原”可代表由于体细胞突变而产生的致癌病毒蛋白或异常蛋白。例如,新抗原可通过经由病毒蛋白活性的细胞机制破坏而产生。另一实例可以是致癌化合物的暴露,该致癌化合物在一些情况下可导致体细胞突变。这种体细胞突变最终可导致肿瘤/癌症的形成。

[0167] 如本说明书中所用的术语“细胞毒性”是指细胞的正常状态下非预期或不期望的改变。细胞的正常状态可指在细胞暴露于细胞毒性组合物、药剂和/或条件之前呈现或存在的状态。通常,处于正常状态的细胞是处于稳态中的细胞。细胞正常状态的非预期或不期望改变可以例如细胞死亡(例如,程序性细胞死亡)、复制潜能的降低、细胞完整性如膜完整性的降低、代谢活性的降低、发育能力的降低或本申请中公开的任何细胞毒性作用的形式呈现。

[0168] 短语“减少细胞毒性”或“降低细胞毒性”是指细胞暴露于细胞毒性组合物、药剂和/或条件后,细胞正常状态的非预期或不期望改变的程度或频率的降低。该短语可指降低暴露于细胞毒性组合物、药剂和/或条件的单个细胞中的细胞毒性程度,或者指降低当细胞

群体暴露于细胞毒性组合物、药剂和/或条件时群体中呈现细胞毒性的细胞数目。

[0169] 如本文所用的术语“工程化”及其语法等同项可指核酸,例如,生物体基因组内的核酸的一个或多个改变。术语“工程化”可指基因的改变、添加和/或缺失。工程化细胞也可指具有添加、缺失和/或改变的基因的细胞。

[0170] 如本文所用的术语“细胞”或“工程化细胞”及其语法等同项可指人或非人动物来源的细胞。

[0171] 如本文所用的术语“检查点基因”及其语法等同项可指参与抑制过程(例如,反馈环)的任何基因,该基因起到调节免疫应答(例如,减少有害应答的不受控传播的免疫抑制性反馈环)幅度的作用。这些应答可包括有助于分子屏(molecular shield),该分子屏防止可能在针对感染的免疫应答和/或维持外周自身耐受性期间出现的附带组织损伤(collateral tissue damage)。检查点基因的非限制性实例可包括延伸的CD28受体家族成员及其配体以及参与共抑制途径的基因(例如,CTLA-4和PD-1)。术语“检查点基因”也可指免疫检查点基因。

[0172] “CRISPR”、“CRISPR系统”或“CRISPR核酸酶系统”及其语法等同项可包括与DNA以及具有核酸酶功能(例如,两个核酸酶结构域)的Cas蛋白(例如,Cas9)结合的非编码RNA分子(例如,指导RNA)。参见例如,Sander,J.D.等人,“CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes,”*Nature Biotechnology*,32:347-355(2014);还参见例如,Hsu,P.D.等人,“Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering,”*Cell* 157(6):1262-1278(2014)。

[0173] 如本文所用的术语“破坏”及其语法等同项可指例如通过缺失、插入、突变、重排或其任意组合而改变基因的过程。例如,基因可通过敲除而被破坏。破坏基因可部分降低或完全抑制该基因的表达。破坏基因还可引起不同基因,例如,下游基因的激活。

[0174] 如本文所用的术语“功能”及其语法等同项可指执行、具有或服务于预期目的的能力。功能可包括从基线到正常功能的100%的任何百分比。例如,功能可包括或包括约正常功能的5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%和/或100%。在一些情况下,术语功能可意指超过或超过约正常功能的100%,例如,正常功能的125%、150%、175%、200%、250%、300%和/或以上。

[0175] 如本文所用的术语“基因编辑”及其语法等同项可指插入、取代或从基因组去除一个或多个核苷酸的基因工程。可使用核酸酶(例如,天然存在的核酸酶或人工改造的核酸酶)进行基因编辑。

[0176] 如本文所用的术语“突变”及其语法等同项可包括多核苷酸中一个或多个核苷酸的置换、缺失和插入。例如,多核苷酸(cDNA,基因)或多肽序列中的至多1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、40、50个或更多个核苷酸/氨基酸可被置换、删除和/或插入。突变可影响基因或其调控序列的编码序列。突变还可影响基因组序列的结构或所编码的mRNA的结构/稳定性。

[0177] 如本文所用的术语“非人动物”及其语法等同项可包括除人之外的所有动物物种,包括非人哺乳动物,其可以是天然动物或遗传修饰非人动物。术语“核酸”、“多核苷酸”、“多核苷酸”和“寡核苷酸”及其语法等同项可互换使用,并且可指线性或环状构象且为单链或双链形式的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸聚合物。出于本公开内容的目的,这些术语不应被

解释为关于长度的限制。这些术语还可涵盖天然核苷酸以及在碱基、糖和/或磷酸部分(例如,硫代磷酸骨架)中进行修饰的核苷酸的类似物。这些术语的修饰还可涵盖去甲基化、CpG甲基化的添加、细菌甲基化的去除和/或哺乳动物甲基化的添加。通常,特定核苷酸的类似物可具有相同的碱基配对特异性,即,A的类似物可与T进行碱基配对。

[0178] 如本文所用的术语“外周血淋巴细胞”(PBL)及其语法等同项可指在血液(例如,外周血)中循环的淋巴细胞。外周血淋巴细胞可指不定位于器官的淋巴细胞。外周血淋巴细胞可包括T细胞、NK细胞、B细胞或其任意组合。

[0179] 如本文所用的术语“表型”及其语法等同项可指生物体的可观察特征或特性,如其形态、发育、生化或生理特性、物候、行为和行为产物的组合。根据语境,术语“表型”有时可指群体的可观察特征或特性的组合。

[0180] 如本文所用的术语“前间区序列”及其语法等同项可指能够与指导RNA的一部分如间隔序列或指导RNA的工程化靶向部分杂交的PAM邻近核酸序列。前间区序列可以是被指导RNA靶向的基因、基因组或染色体内的核苷酸序列。在天然状态下,前间区序列与PAM(前间区序列邻近基序)相邻。由RNA指导的核酸酶切割的位点在前间区序列内。例如,当指导RNA靶向特定的前间区序列时,Cas蛋白将在前间区序列内产生双链断裂,从而切割前间区序列。在切割之后,前间区序列的破坏可导致非同源末端连接(NHEJ)或同源性指导的修复(HDR)。前间区序列的破坏可导致前间区序列的缺失。另外或备选地,前间区序列的破坏可导致外源核酸序列插入到前间区序列中或取代前间区序列。

[0181] 如本文所用的术语“接受者”及其语法等同项可指人或非人动物。接受者也可以是有需要的接受者。

[0182] 如本文所用的术语“重组”及其语法等同项可指两个多核酸之间遗传信息交换的过程。出于本公开内容的目的,“同源重组”或“HR”可指例如在双链断裂修复期间可以发生的此类遗传交换的特定形式。该过程可能需要核苷酸序列同源性,例如,使用供体分子进行靶分子(例如,经历双链断裂的分子)的模板修复,并且有时被称为非交叉基因转换或短程基因转换(short tract gene conversion)。此类转移还可涉及在破坏的靶标与供体之间形成的异源双链体DNA的错配校正和/或依赖合成的链退火(其中供体可用于重新合成可成为靶标的一部分的遗传信息),和/或相关过程。这样的特定的HR通常可导致靶分子序列的改变,使得供体多核苷酸的部分或全部序列可整合到靶多核苷酸中。在一些情况下,术语“重组臂”和“同源臂”可互换使用。

[0183] 术语“靶载体”和“靶向载体”在本文中可互换使用。

[0184] 如本文所用的术语“转基因”及其语法等同项可指被转移到生物体中的基因或遗传物质。例如,转基因可以是含有被引入生物体中的基因的DNA的片段或区段。当转基因被转移到生物体中时,该生物体随后被称为转基因生物体。转基因可保留其在转基因生物体中产生RNA或多肽(例如,蛋白质)的能力。转基因可由不同的核酸例如RNA或DNA组成。转基因可编码工程化T细胞受体,例如TCR转基因。转基因可包含TCR序列。转基因可包含重组臂。转基因可包含工程化位点。

[0185] 如本文所用的术语“T细胞”及其语法等同项可指来自任何来源的T细胞。例如,T细胞可以是原代T细胞,例如,自体T细胞、细胞系等。T细胞也可以是人类或非人类T细胞。

[0186] 如本文所用的术语“TIL”或肿瘤浸润性淋巴细胞及其语法等同项可指从肿瘤分离

的细胞。例如，TIL可以是迁移到肿瘤的细胞。TIL也可以是已浸润肿瘤的细胞。TIL可以是在肿瘤内发现的任何细胞。例如，TIL可以是T细胞、B细胞、单核细胞、自然杀伤细胞或其任意组合。TIL可以是混合的细胞群体。TIL群体可包含不同表型的细胞、不同分化程度的细胞、不同谱系的细胞或其任意组合。

[0187] 如果所治疗的病况发生变化，则可能出现“治疗效果”。该变化可以是积极的或消极的。例如，“积极效果”可对应于受试者中激活的T细胞数目的增加。在另一个实例中，“消极效果”可对应于受试者中肿瘤的量或大小的减小。如果改善至少10%，优选至少25%，更优选至少50%，甚至更优选至少75%，以及最优选100%，则存在所治疗的病况的“变化”。该变化可基于个体的所治疗病况的严重程度的改善，或基于采用和未采用治疗性组合物（该治疗性组合物与本发明的组合物联合施用）进行治疗的个体群体中改善的病况的频率差异。类似地，本公开内容的方法可包括向受试者施用“治疗有效”的量的细胞。术语“治疗有效的”应当理解成具有对应于“具有治疗效果”的定义。

[0188] 如本文所用的术语“安全港 (safe harbor)”和“免疫安全港 (immune safe harbor)”及其语法等同项可指可用于整合外源核酸的基因组内的位置，其中该整合不会通过仅添加核酸对宿主细胞的生长造成任何显著的影响。安全港的非限制性实例可包括HPRT、AAVS SITE（例如，AAVS1、AAVS2等）、CCR5或Rosa26。

[0189] 如本文所用的术语“序列”及其语法等同项可指核苷酸序列，该核苷酸序列可以是DNA或RNA；可以是线性的、环状的或分支的；并且可以是单链的或双链的。序列可以突变。序列可以是任何长度，例如，2至1,000,000个或更多个核苷酸的长度（或在其之间或其以上的任何整数值），例如，约100至约10,000个核苷酸，或约200至约500个核苷酸。

概述

[0190] 本文公开了用于进行细胞内基因组移植的组合物和方法。细胞内基因组移植可包括对细胞和核酸进行遗传修饰用于治疗应用。全文描述的组合物和方法可使用核酸介导的基因工程过程，用于以改善工程化细胞的生理和免疫学抗肿瘤效力的方式递送肿瘤特异性TCR。有效的基于过继细胞转移的免疫疗法 (ACT) 可用于治疗癌症（例如，转移癌）患者。例如，自体外周血淋巴细胞 (PBL) 可使用非病毒方法进行修饰以表达识别癌细胞上的独特突变即新抗原的T细胞受体 (TCR)，并且可用于所公开的细胞内基因组移植的组合物和方法。新抗原可能与高突变负荷的肿瘤相关，图58。

[0191] 图1描绘了可使用体外测定（例如全外显子组测序）从获自癌症患者的样品鉴别癌症相关靶序列（在一些情况下为新抗原）的方法的示例。该方法可进一步从识别靶序列的第一T细胞鉴别TCR转基因。癌症相关靶序列和TCR转基因可从同一患者或不同患者的样品获得。该方法可有效且高效地递送包含TCR转基因的核酸穿过第二T细胞的膜。在一些情况下，第一和第二T细胞可从同一患者获得。在其他情况下，第一和第二T细胞可从不同患者获得。在其他情况下，第一和第二T细胞可从不同患者获得。该方法可使用非病毒整合系统（例如，CRISPR、TALEN、基于转座子、ZEN、大范围核酸酶或Mega-TAL）安全高效地将TCR转基因整合到T细胞的基因组中以产生工程化T细胞，从而可在该工程化T细胞中可靠地表达TCR转基因。工程化T细胞可在维持其免疫学和抗肿瘤效力的条件下生长和扩充，并且可进一步施用于患者以用于癌症治疗。

[0192] 工程化细胞还可在一旦施用于患者即可改善其性能的条件下生长和扩充。可对工

程化细胞进行选择。例如,在细胞的扩充和工程化之前,可通过多种非限制性方法从受试者获得细胞来源。可从许多非限制性来源获得细胞,该非限制性来源包括外周血单核细胞、骨髓、淋巴结组织、脐带血、胸腺组织、来自感染部位的组织、腹水、胸腔积液、脾脏组织和肿瘤。例如,可使用任何T细胞系。或者,细胞可来源于健康供体、被诊断患有癌症的患者或被诊断患有感染的患者。在另一个实施方案中,细胞可以是呈现不同表型特征的混合细胞群体的一部分。还可根据先前描述的方法从转化的T细胞获得细胞系。还可从细胞治疗储库(bank)获得细胞。可以获得对免疫抑制治疗具有抗性的修饰细胞。还可在修饰之前对期望的细胞群体进行选择。还可在修饰之后对工程化细胞群体进行选择。

[0193] 在一些情况下,工程化细胞可用于自体移植。或者,工程化细胞可用于同种异体移植。在一些情况下,工程化细胞可施用于同一患者,该患者的样品用于鉴别癌症相关靶序列和/或TCR转基因。在其他情况下,工程化细胞可施用于不同于其样品用于鉴别癌症相关靶序列和/或TCR转基因的患者的患者。一种或多种同源重组增强子可与本发明的细胞一起引入。增强子可促进双链断裂的同源性指导的修复。增强子可促进TCR整合到本发明的细胞中。增强子可阻断非同源末端连接(NHEJ),使得优先发生双链断裂的同源性指导的修复。

[0194] 修饰化合物也可用来降低本发明的外源多核酸的毒性。例如,修饰剂化合物可作用于胱天蛋白酶-1、TBK1、IRF3、STING、DDX41、DNA-PK、DAI、IFI16、MRE11、cGAS、2' 3' - cGAMP、TREX1、AIM2、ASC或其任意组合。修饰剂可以是TBK1修饰剂。修饰剂可以是胱天蛋白酶-1修饰剂。修饰剂化合物还可作用于先天信号传导系统,因此,其可以是先天信号传导修饰剂。在一些情况下,外源核酸可以是对细胞有毒的。抑制细胞的先天性免疫传感应答的方法可改善工程化细胞产物的细胞活力。修饰化合物可以是布雷菲德菌素A和或ATM途径的抑制剂(图92A、图92B、图93A和图93B)。

[0195] 可在添加多核酸之前将修饰化合物引入细胞。修饰化合物可与多核酸同时引入。修饰化合物可包含在多核酸内。这些组合物和方法可提供高效且低毒性的方法,通过该方法可产生细胞疗法,例如,癌症特异性细胞疗法。

[0196] 一种或多种细胞因子可与本发明的细胞一起引入。细胞因子可用来促进细胞毒性T淋巴细胞(包括过继转移的肿瘤特异性细胞毒性T淋巴细胞)在肿瘤微环境内扩充。在一些情况下,IL-2可用于促进本文所述细胞的扩充。还可使用细胞因子如IL-15。还可使用免疫疗法领域中的其他相关细胞因子,如IL-2、IL-7、IL-12、IL-15、IL-21或其任意组合。在一些情况下,使用IL-2、IL-7和IL-15来培养本发明的细胞。

[0197] 细胞毒性通常可指对细胞具有毒性的组合物、药剂和/或条件(例如,外源DNA)的性质。在一些方面,本公开内容的方法通常涉及降低在遗传修饰期间引入到一个或多个细胞中的外源DNA的细胞毒性作用。在一些实施方案中,细胞毒性或对细胞具有细胞毒性的物质的作用可包括DNA切割、细胞死亡、自噬、凋亡、核凝聚、细胞裂解、坏死、细胞运动性改变、细胞硬度改变、胞质蛋白表达改变、膜蛋白表达改变、不期望的细胞分化、膨胀、膜完整性丧失、代谢活动停止、低活性代谢、高活性代谢、活性氧物质增加、细胞质收缩、促炎细胞因子的产生(例如,作为DNA传感途径的产物)或其任意组合。促炎细胞因子的非限制性实例包括白介素6(IL-6)、干扰素 α (IFN α)、干扰素 β (IFN β)、C-C基序配体4(CCL4)、C-C基序配体5(CCL5)、C-X-C基序配体10(CXCL10)、白介素1 β (IL-1 β)、IL-18和IL-33。在一些情况下,细胞毒性可受到多核酸如转基因或TCR引入的影响。外源TCR并入细胞中可

[0198] 可以以本领域已知的许多方法中的任一种测量细胞毒性的变化。在一个实施方案中,可基于细胞毒性相关作用如细胞死亡或不期望的细胞分化发生的程度和/或频率来评估细胞毒性的变化。在另一个实施方案中,通过使用本领域已知的测定法测量细胞毒性的量来评估细胞毒性的降低,该测定法包括标准实验室技术,如染料排斥,与细胞活力、损伤和/或死亡相关的形态学特征的检测,以及与感兴趣的细胞类型相关的酶和/或代谢活性的测量。

[0199] 通常,本发明的T细胞可通过与连接有物质和配体的表面接触而进行扩充,其中该物质可刺激CD3TCR复合体相关信号,该配体可刺激T细胞表面上的共刺激分子。特别地,可诸如通过与抗CD3抗体或其抗原结合片段或固定在表面上的抗CD2抗体接触,或通过与蛋白激酶C激活剂(例如,苔藓抑制素)(有时与钙离子载体结合)接触对T细胞群体进行体外刺激。为了共刺激T细胞表面上的辅助分子,可使用结合该辅助分子的配体。例如,T细胞群体可在可刺激T细胞增殖的条件下与抗CD3抗体和抗CD28抗体接触。在一些情况下,4-1BB可用于刺激细胞。例如,可用4-1BB和IL-21或另一种细胞因子刺激细胞。

[0200] 为了刺激CD4T细胞或CD8T细胞的增殖,可使用抗CD3抗体和抗CD28抗体。例如,提供信号的药剂可以在溶液中或与表面偶联。颗粒与细胞的比例可取决于相对于靶细胞的颗粒大小。在进一步的实施方案中,细胞如T细胞可与药剂包被的珠子组合,其中该珠子和细胞可随后进行分离,并任选地进行培养。每个珠子可用抗CD3抗体或抗CD28抗体进行包被,或者在一些情况下,可用两者的组合进行包被。在备选的实施方案中,在培养之前,药剂包被的珠子和细胞不分离,而是一起培养。可通过使可附接至抗CD3和抗CD28的顺磁珠(3x28个珠子)接触T细胞来连接细胞表面蛋白。在一个实施方案中,在缓冲液中,例如,磷酸盐缓冲盐水(PBS)(例如,不含二价阳离子如钙和镁)中组合细胞和珠子(例如,比例为1:1的DYNABEADS[®]M-450CD3/CD28T顺磁珠)。可使用任何细胞浓度。该混合物可培养或培养约几个小时(例如,约3小时)至或至约14天,或其间的任何小时整数值。在另一个实施方案中,该混合物可培养或培养约21天或者至多21天或至多约21天。适用于T细胞培养的条件可包括可以含有增殖和活力所必需的因子的适当培养基(例如,最小必需培养基或RPMI培养基1640或X-vivo 5(Lonza)),该因子包括血清(例如,胎牛或人血清)、白介素-2(IL-2)、胰岛素、IFN- γ 、IL-4、IL-7、GM-CSF、IL-10、IL-21、IL-15、TGF β 和TNF α 或用于细胞生长的任何其他添加剂。用于细胞生长的其他添加剂包括但不限于表面活性剂、人血浆蛋白粉(plasmanate)以及还原剂如N-乙酰半胱氨酸和2-巯基乙醇。培养基可包括RPMI 1640、A1M-V、DMEM、MEM、 α -MEM、F-12、X-Vivo 1和X-Vivo 20、Optimizer,其具有添加的氨基酸、丙酮酸钠和维生素,无血清或补充有适量的血清(或血浆)或限定的一组激素,和/或足够用于T细胞生长和扩充的量的细胞因子。抗生素例如青霉素和链霉素仅可包含在实验培养物中,可能不包含在将要输注到受试者中的细胞培养物中。靶细胞可维持在支持生长所必需条件下;例如,适当的温度(例如,37 $^{\circ}$ C)和气氛(例如,空气加5%CO₂)。在一些情况下,已暴露于不同刺激时间的T细胞可表现出不同的特征。在一些情况下,可使用针对人CD3、CD28、CD2或其任意组合的可溶单特异性四聚体抗体。

[0201] 在一些情况下,经历基因组移植的细胞可通过与组织或细胞共培养而被激活或扩充。细胞可以是抗原呈递细胞。人工抗原呈递细胞(aAPC)可表达T细胞受体的配体和共刺激分子,并且可激活并扩充T细胞以用于转移,同时在一些情况下改善其效力和功能。aAPC可

被工程化为表达用于T细胞激活的任何基因。aAPC可被工程化为表达用于T细胞扩充的任何基因。aAPC可以是珠子、细胞、蛋白质、抗体、细胞因子或任意组合。aAPC可将信号递送至可经历基因组移植的细胞群体。例如，aAPC可递送信号1、信号2、信号3或任意组合。信号1可以是抗原识别信号。例如，信号1可以是TCR被肽-MHC复合体连接或是可导致CD3信号转导复合体激活的针对CD3的激动性抗体的结合。信号2可以是共刺激信号。例如，共刺激信号可以是分别与ICOS-L、CD70和4-1BBL结合的抗CD28、诱导型共刺激物 (ICOS)、CD27和4-1BB (CD137)。信号3可以是细胞因子信号。细胞因子可以是任何细胞因子。细胞因子可以是IL-2、IL-7、IL-12、IL-15、IL-21或其任意组合。

[0202] 在一些情况下，人工抗原呈递细胞 (aAPC) 可用于激活和/或扩充细胞群体。在一些情况下，人工的可以不诱导同种异型特异性 (allospecificity)。在一些情况下，aAPC可以不表达HLA。可对aAPC进行遗传修饰以稳定表达可用于激活和/或刺激的基因。在一些情况下，K562细胞可用于激活。K562细胞还可用于扩充。K562细胞可以是人红白血病细胞系。K562细胞可被工程化以表达感兴趣的基因。K562细胞可以不内源性表达HLA I类、II类或CD1d分子，但可表达ICAM-1 (CD54) 和LFA-3 (CD58)。K562可被工程化以向T细胞传递信号1。例如，K562细胞可被工程化以表达HLA I类。在一些情况下，K562细胞可被工程化以表达另外的分子，如B7、CD80、CD83、CD86、CD32、CD64、4-1BBL、抗CD3、抗CD3mAb、抗CD28、抗CD28mAb、CD1d、抗CD2、膜结合的IL-15、膜结合的IL-17、膜结合的IL-21、膜结合的IL-2、截短的CD19或任意组合。在一些情况下，除CD80和CD83之外，工程化K562细胞还可表达膜形式的抗CD3mAb、克隆OKT3。在一些情况下，除CD80和CD83之外，工程化K562细胞还可表达膜形式的抗CD3mAb、克隆OKT3、膜形式的抗CD28mAb。

[0203] aAPC可以是珠子。球形聚苯乙烯珠子可用针对CD3和CD28的抗体进行包被并用于T细胞激活。珠子可以是任何大小。在一些情况下，珠子可以为或可以为约3微米和6微米。珠子可以为或可以为约4.5微米的大小。珠子可以以任何细胞与珠子的比例使用。例如，可使用每毫升100万个细胞3:1的珠子与细胞的比例。aAPC还可以是刚性球形颗粒、聚苯乙烯乳胶微珠、磁性纳米或微米颗粒、纳米级量子点、(乳酸-乙醇酸) 共聚物 (PLGA) 微球 (4)、非球形颗粒、碳纳米管束 (5)、椭圆体PLGA微粒 (6)、纳米虫 (nanoworm) (7)、含流体脂双层的系统、2D-支持的脂双层 (2D-SLB) (8)、脂质体 (9)、RAFT体 (RAFTsome) /微域脂质体 (10)、SLB颗粒 (11) 或其任意组合。

[0204] 在一些情况下，aAPC可扩充CD4T细胞。例如，aAPC可被工程化以模拟HLA II类限制性CD4T细胞的抗原加工和呈递途径。K562可被工程化以表达HLA-D、DP α 链、DP β 链、Ii、DM α 、DM β 、CD80、CD83或其任意组合。例如，可用HLA限制性肽对工程化K562细胞进行脉冲，以便扩充HLA限制性抗原特异性CD4T细胞。

[0205] 在一些情况下，可将aAPC的使用与外源引入的细胞因子组合，以用于T细胞激活、扩充或任意组合。还可在体内扩充细胞，例如在将基因组移植细胞施用于受试者之后，在受试者的血液中扩充细胞。

[0206] 这些用于细胞内基因组移植的组合物和方法可提供具有许多优点的癌症疗法。例如，它们可提供高效率的基因转移、表达，增加的细胞存活率，重组双链断裂的有效引入，以及相比于非同源末端连接 (NHEJ) 机制有利于同源性指导的修复 (HDR) 的过程，以及同源重组体的有效回收和扩充。

核糖核酸系统

[0207] 一种通过使用核糖核酸(RNA)系统,例如,用于细胞内基因组移植的全部或部分RNA系统生成工程化细胞的示例性方法。可用RNA或修饰的RNA而非DNA对将要工程化的细胞进行遗传修饰,以防止有时在使用DNA时观察到的DNA(例如,双链或单链DNA)诱导的毒性和免疫原性。在一些情况下,RNA/DNA融合多核酸还可用于基因组工程。

[0208] 在一些情况下,可以使用用于原代人T细胞的基因编辑的所有RNA多核酸系统,参见例如,图5。该示意图显示,可将体外转录的核糖核酸递送并逆转录成靶细胞内的dsDNA。然后可使用DNA模板进行细胞内的同源重组(HR)反应。

[0209] 在一些情况下,可通过增加编码转基因的多核酸的量来实现强效的基因组工程。在一些情况下,引入增加量的DNA可导致细胞毒性(图2和图3);因此可能需要将RNA引入细胞用于基因组工程。

[0210] 在一些情况下,可将包含外源受体序列的转基因引入细胞中用于通过RNA,例如,信使RNA(mRNA)进行基因组工程。RNA,例如,mRNA可原位转变成DNA。一种示例性方法利用多核酸的体外转录来产生mRNA多核酸。然后可用逆转录酶(RT)(蛋白质形式或编码RT的多核酸)将mRNA多核酸转染到细胞中。编码逆转录酶(RT)的多核酸。在其他情况下,将RT蛋白引入细胞中。RT可以是或可来源于禽成髓细胞瘤病毒逆转录酶(AMV RT)、莫洛尼鼠白血病病毒(M-MLV RT)、人类免疫缺陷病毒(HIV)逆转录酶(RT)、其衍生物或其组合。一旦转染,逆转录酶即可将工程化mRNA多核酸转录成双链DNA(dsDNA)。逆转录酶(RT)可以是用于从RNA模板生成互补DNA(cDNA)的酶。在一些情况下,RT酶可使用RNA(cDNA合成)或单链DNA作为模板从引物起始合成互补DNA链。在一些情况下,RT可在37摄氏度的温度下起作用。在其他情况下,RT可在低于37摄氏度的温度下起作用。在其他情况下,RT可在高于37摄氏度的温度下起作用。

[0211] RT可以是用于从RNA模板生成互补DNA(cDNA)的任何酶。RT可来源于逆转录病毒、乙型肝炎病毒、嗜肝DNA病毒科(hepadnaviridae)或者任何双链或单链病毒。RT可具有任何数目的生化活性。例如,RT可具有RNA依赖性DNA聚合酶活性。RT可具有核糖核酸酶H活性。RT可具有DNA依赖性DNA聚合酶活性。在一些情况下,RT可用于将单链RNA转变成双链cDNA。随后可将cDNA引入细胞基因组中。图101A和图101B示出了电穿孔的mRNA的体内逆转录。

[0212] RT可以是来自1型人类免疫缺陷病毒的HIV-1RT。HIV-1RT可具有亚基。例如,HIV-1RT可具有两个亚基。RT还可来自莫洛尼(Maloney)鼠白血病病毒(M-MLV)。M-MLV病毒可具有或不具有亚基。在一些情况下,M-MLV病毒是单个单体。RT还可以是禽成髓细胞瘤病毒RT(AMV RT)。AMV RT可具有亚基。在一些情况下,AMV RT具有两个亚基。在一些情况下,还使用端粒酶RT。

[0213] 在一些情况下,ds DNA可用于随后的同源重组步骤。随后的同源重组步骤可将外源受体序列引入细胞的基因组中。

将逆转录酶靶向工程化多核酸的方法

a) 独特序列

[0214] 在一些情况下,引入的RT可能需要被靶向至引入的多核酸。引入的多核酸可以是RNA或DNA。在一些情况下,引入的多核酸可以是RNA和DNA的组合。靶向引入的RT可通过将独特序列并入编码工程化受体(图22)的多核酸来进行。这些独特序列可帮助将RT靶向至特定

的多核酸。在一些情况下,独特序列可提高反应的效率。表1描述了用来将RT靶向至工程化多核酸的可能的独特序列。独特序列可以是可能不会在任何人类mRNA转录物中发现的序列。在一些情况下,可从已知的mRNA转录物修饰独特序列,使得其不再是内源序列。可使用生物信息学鉴别独特序列。在一些情况下,可使用可公开获得的数据库鉴别独特序列。

表1:独特序列

SEQ ID	独特序列5' 至3'
1	TAG TCG GTA CGC GAC TAA GCC G
2	TAG TCG TCG TAA CGT ACG TCG G
3	CGG CTA TAA CGC GTC GCG TAG
4	TAG AGC GTA CGC GAC TAA CGA C

[0215] 独特序列可以是任何碱基对长度的大小。独特序列可以是或可以在1-20个碱基对、1-30个碱基对、1-40个碱基对、1-50个碱基对、1-60个碱基对、1-70个碱基对、1-80个碱基对、1-90个碱基对、1-100个碱基对之间,或超过100个碱基对的任何长度。在一些情况下,独特序列为1-20个碱基对或在1-20个碱基对之间。在一些情况下,独特序列为超过20个碱基对。在一些情况下,独特序列为恰好20个碱基对的长度。独特序列可以是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21个或更多个碱基对。在一些情况下,将多个独特序列引入多核酸中。

[0216] 在一些情况下,独特序列可包含在工程化多核酸中。独特序列可用于将RT靶向至工程化多核酸。在一些情况下,寡核苷酸可与工程化多核酸预退火。预退火的寡核苷酸可包含工程化多核酸中任何长度的互补独特序列。预退火的寡核苷酸可以是与工程化多核酸中的独特序列的互补独特序列完全相同的长度或短于工程化多核酸中的独特序列的互补序列的全长。

b) 工程化结构

[0217] 在一些情况下,可通过将多核酸工程化为具有二级结构而使逆转录酶靶向至工程化多核酸。二级结构可以是任何结构。在一些情况下,可使用多种二级结构。

[0218] 例如,二级结构可以是双螺旋。双螺旋可由许多连续碱基对的区域形成。在一些情况下,双螺旋为三级结构。双螺旋可以是螺旋聚合物。在一些情况下,双螺旋可以是右旋的。双螺旋也可以是左旋的。在一些情况下,双螺旋可以是右旋结构,该右旋结构可含有可在一起碱基配对的两条核苷酸链。在一些情况下,双螺旋的单圈可以为或可以为约10个核苷酸。在其他情况下,双螺旋的单圈可以为或可以为约超过10个核苷酸或少于10个核苷酸。双螺旋的单圈可以为或可以为约1-5个核苷酸、1-10个核苷酸、1-20个核苷酸或超过20个核苷酸的长度。

[0219] 二级结构也可以是茎环或发夹结构。当分子折叠或折皱后单个RNA分子中的两个互补序列相遇并结合在一起时,可形成RNA发夹。在一些情况下,RNA发夹可由双链RNA(dsRNA)茎和末端环组成。在结构上,RNA发夹可出现在不同类型RNA内的不同位置。RNA发夹可出现在核糖核酸的5'端、3'端,或5'端与3'端之间的任何地方。RNA发夹在茎的长度、环的大小、凸起的数目和大小以及核苷酸序列方面可以不同。RNA发夹可以是任何茎长。RNA发夹可具有任何大小的环。例如,发夹环可为或可为约4至8个碱基长度。在一些情况下,发夹环超过或超过约8个碱基长度。在某些情况下,超过或超过约8个碱基长度的发夹环可具有二

级结构。RNA发夹可具有任何数目和大小的凸起。RNA发夹可以是任何碱基对长度。例如，RNA发夹可以为或可以为约1-100个碱基对、1-200个碱基对、1-300个碱基对或超过300个碱基对。RNA发夹可具有二级结构，例如凸起。

[0220] 在功能上，RNA发夹可顺式或反式调节基因表达，例如，RNA分子内的RNA发夹可以仅调节该分子（顺式），或者该RNA发夹可诱导对其他RNA或途径的作用（反式）。发夹可充当多种蛋白质的结合位点，作为酶促反应的底物，以及显示内在的酶活性。在一些情况下，发夹可用于将RT靶向至工程化多核酸以供转录。发夹结构可位于核糖体结合位点。发夹结构可促进翻译。

[0221] 发夹结构可具有内部核糖体进入位点（IRES）。IRES序列可允许含有发夹的mRNA的靶向转录。在一些情况下，发夹结构可将工程化多核酸引导至细胞位置。例如，发夹可以是或可含有核定位信号。

[0222] 在一些情况下，RT可靶向工程化多核酸的RNA发夹。工程化多核酸可含有一个或多个发夹区域。发夹可在工程化多核酸的任何位置形成。

[0223] 二级结构也可以是假结。假结可以是可含有至少两个茎环或发夹结构的核酸二级结构，其中一个茎的一半嵌入另一个茎的两个半部之间。可以使用假结的几种明显的折叠拓扑结构。在一些情况下，可以使用H型假结。在H型折叠中，发夹环中的碱基可与茎外部的碱基形成分子内配对。这可引起第二茎和环的形成，从而产生具有两个茎和两个环的假结。两个茎能够在彼此的顶部堆叠，以形成具有一条连续链和一条不连续链的准连续螺旋。

[0224] 在一些情况下，假结可用于启动工程化多核酸的转录。假结可诱导核糖体滑入替代阅读框中。在一些情况下，假结可引起移码。将工程化多核酸靶向至核

[0225] 在一些情况下，工程化多核酸可能需要定位至细胞核。工程化多核酸可编码可能需要引入到细胞基因组中的外源或工程化受体序列。在一些情况下，向细胞基因组引入受体序列可通过将工程化多核酸定位至用于转录的细胞核酸酶来进行。

[0226] 工程化RNA多核酸可定位至细胞核酸酶。定位可包括任何数目的技术。在一些情况下，核定位信号可用于将编码工程化受体的工程化多核酸定位至核。核定位信号可以是任何内源或工程化序列。

[0227] 在一些情况下，核定位信号或序列可来源于可严格为核的蛋白质。为核的蛋白可具有可不受细胞状态或其基因组表达基因座影响的核定位信号。在一些情况下，核定位可来源于成熟的剪接蛋白转录物内的序列或结构。

[0228] 在一些情况下，核定位信号可以是BMP2-OP1应答基因（“BORG”）序列。在一些情况下，多核酸中包含多个BORG NLS序列。在一些情况下可包含1-5个BORG序列。在其他情况下，包含5-10个BORG序列。1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个BORG序列可作为核定位信号包含在多核酸中。在一些情况下，采用可在多核酸内编码的许多BORG序列。核定位信号可以由五聚体AGCCC组成的短RNA基序，其在相对于五聚体起点的位置-8和-3处具有两个序列限制。BORG序列可用于工程化多核酸以将该工程化多核酸定位至细胞核。

[0229] 在一些情况下，核定位可由SF1与类似于内在分支位点共有序列的短序列的串联重复序列的相互作用来介导，从而导致RNA多核酸定位至离散的核子域。BORG序列可通过与丰富的核限制性蛋白或蛋白复合体如转录复合体相互作用而起作用。在其他情况下，核定位序列可与可将含有核定位基序的多核酸锚定在核内的核定位RNA或染色质相关RNA-蛋白

复合体相互作用。在其他情况下,核定位序列可与可干扰输出复合体形成的因子相互作用,从而导致多核酸滞留在核内。

[0230] 核定位信号可以是序列、结构或其任意组合。在一些情况下,核酸的核定位可能不需要运输,而仅锚定至细胞骨架(肌动蛋白或中间丝)。在其他情况下,工程化多核酸可在微管上运输至核。运输可以以大型核糖核蛋白(RNP)复合体或RNP运输颗粒的形式进行。在一些情况下,多核酸可与将其定位至核的次级蛋白复合。在一些情况下,运输的多核酸可锚定在其最终目的地。一些反式作用因子可穿梭回核内。

[0231] 在一些情况下,多核酸可直接引入核中。在其他情况下,多核酸可在核内合成。多核酸可被工程化以编码至少一个BORG序列。多核酸可被工程化以编码多个BORG序列。多核酸可被工程化以编码四个BORG序列。在一些情况下,用含有BORG序列的多核酸转染细胞。含有BORG序列的多核酸可定位至细胞核中,在细胞核中,该多核酸可参与同源重组。在一些情况下,定位至核的多核酸可编码受体序列。可通过BORG介导的核定位将受体序列引入细胞基因组中。多核酸修饰

[0232] 可对如本文所述的多核酸进行修饰。修饰可在多核酸的任何位置进行。可对单个多核酸进行多于一种修饰。多核酸可在修饰后经历质量控制。在一些情况下,质量控制可包括PAGE、HPLC、MS或其任意组合。

[0233] 修饰可以是置换、插入、缺失、化学修饰、物理修饰、稳定化、纯化或其任意组合。

[0234] 还可通过以下部分对多核酸进行修饰:5' 腺苷酸、5' 鸟苷-三磷酸帽、5' N⁷-甲基鸟苷-三磷酸帽、5' 三磷酸帽、3' 磷酸、3' 硫代磷酸、5' 磷酸、5' 硫代磷酸、Cis-Syn型胸苷二聚体、三聚体、C12间隔区、C3间隔区、C6间隔区、d间隔区、PC间隔区、r间隔区、间隔区18、间隔区9、3' -3' 修饰、5' -5' 修饰、脱碱基、吡啶、偶氮苯、生物素、生物素BB、生物素TEG、胆固醇TEG、脱硫生物素TEG、DNP TEG、DNP-X、DOTA、dT-生物素、双生物素、PC生物素、补骨脂素C2、补骨脂素C6、TINA、3' DABCYL、黑洞猝灭剂(black hole quencher)1、黑洞猝灭剂2、DABCYL SE、dT-DABCYL、IRDye QC-1、QSY-21、QSY-35、QSY-7、QSY-9、羧基接头、硫醇接头、2' 脱氧核糖核苷类似物嘌呤、2' 脱氧核糖核苷类似物嘧啶、核糖核苷类似物、2' -O-甲基核糖核苷类似物、糖修饰的类似物、摆动性/通用碱基、荧光染料标记、2' 氟代RNA、2' O-甲基RNA、甲基磷酸酯、磷酸二酯DNA、磷酸二酯RNA、硫代磷酸酯DNA、硫代磷酸酯RNA、UNA、假尿苷-5' -三磷酸、5-甲基胞苷-5' -三磷酸或其任意组合。代表性2' O-甲基RNA修饰的gRNA在图31中示出。

[0235] 在一些情况下,修饰可以是永久性的。在其他情况下,修饰是暂时的。在一些情况下,对多核酸进行多种修饰。多核酸修饰可改变核苷酸的物理化学性质,如其构象、极性、疏水性、化学反应性、碱基配对相互作用或其任意组合。

[0236] 修饰也可以是硫代磷酸酯置换。在一些情况下,天然磷酸二酯键可易于被细胞核酸酶迅速降解;并且使用硫代磷酸酯(PS)键置换进行的核苷酸间连键的修饰可以对由细胞降解导致的水解更稳定。修饰可增加多核酸的稳定性。修饰还可增强生物学活性。在一些情况下,硫代磷酸酯增强的RNA多核酸可抑制RNA酶A、RNA酶T1、小牛血清核酸酶或其任意组合。这些性质可允许将PS-RNA多核酸用于在体内或体外高概率暴露于核酸酶的应用中。例如,可在多核酸5'端或3'端的最后3-5个核苷酸之间引入硫代磷酸酯(PS)键,这可抑制外切核酸酶降解。在一些情况下,可将硫代磷酸酯键添加至整个多核酸以减少内切核酸酶的攻击。

[0237] 在一些情况下,可对修饰进行筛选。筛选可包括但不限于测试免疫原性、测试毒性、测试转录效率、测试翻译效率或其任意组合。在一些情况下,修饰可以不是免疫原性的。修饰可以不是毒性的。在一些情况下,候选修饰在并入多核酸之前进行筛选。在其他情况下,对具有不同修饰的多核酸进行筛选,以确定所添加修饰的免疫原性、毒性、功效的水平或任意组合。在一些情况下,针对修饰支持多核酸逆转录的能力进行筛选。在一些情况下,修饰为假尿苷-5'-三磷酸(参见例如,图59)。在其他情况下,修饰为5-甲基胞苷-5'-三磷酸(参见例如,图59)。修饰还可包括手性的改变。

[0238] 可通过多种方法,例如,通过自动化固相合成来组装多核酸。可以使用标准固相DNA/RNA合成来构建多核酸。还可使用合成程序构建多核酸。还可手动或以全自动方式合成多核酸。在一些情况下,合成程序可包括可首先将5'-羟基寡核苷酸转化成相应的5'-H-磷酸酯单酯,随后在咪唑存在的情况下氧化成活化的5'-磷酸咪唑烷酸酯(phosphorimidazolidate),以及最后在固体支持体上与焦磷酸酯反应。该程序可包括合成后的纯化步骤,如PAGE、HPLC、MS或其任意组合。

[0239] 在一些情况下,可对多核酸进行修饰,以使其具有较低的免疫原性并更稳定地转染到细胞中。修饰的多核酸可编码任何数目的基因。在一些情况下,多核酸可编码转基因。转基因可编码工程化受体。受体可以是T细胞受体(TCR)、B细胞受体(BCR)、嵌合抗原受体(CAR)或其任意组合,参见例如,图57。在一些情况下,受体可以是TCR。

[0240] 在一些情况下,修饰的多核酸可用于后续步骤中。例如,修饰的多核酸可用于同源重组反应中。同源重组反应可包括将编码外源受体的转基因引入细胞基因组中。引入可包括将转基因序列引入细胞基因组中所必需的任何机制。在一些情况下,在向细胞基因组中引入受体序列的步骤中使用CRISPR。

细胞内基因组移植

[0241] 细胞内基因组移植可以是对细胞和核酸进行遗传修饰用于治疗应用的方法。全文描述的组合物和方法可使用核酸介导的基因工程过程,以用于以使T细胞的生理和免疫学抗肿瘤效力不受干扰的方式进行肿瘤特异性TCR表达。有效的基于过继细胞转移的免疫疗法(ACT)可用于治疗癌症(例如,转移癌)患者。例如,自体外周血淋巴细胞(PBL)可使用非病毒方法进行修饰以表达识别癌细胞上的独特突变即新抗原的T细胞受体(TCR),并且可用于所公开的细胞内基因组移植的组合物和方法。

[0242] PCT/US14/58796中描述了一种对识别患者癌症上的独特免疫原性突变的癌症特异性TCR序列进行鉴别的示例性方法。例如,可以使用随机或特异性插入将癌症特异性TCR转基因插入细胞(例如,T细胞)的基因组中。

[0243] 在一些方面,本文所公开的方法包括向细胞中引入一种或多种核酸(例如,第一核酸或第二核酸)。本领域技术人员将会理解,核酸通常可指其分子由在长链中连接的许多核苷酸组成的物质。核酸的非限制性实例包括人工核酸类似物(例如,肽核酸、吗啉代寡聚物、锁核酸、二醇核酸或苏糖核酸)、环状核酸、DNA、单链DNA、双链DNA、基因组DNA、质粒、质粒DNA、病毒DNA、病毒载体、 γ -逆转录病毒载体、慢病毒载体、腺相关病毒载体、RNA、短发夹RNA、psiRNA和/或其杂合体或组合。在一些实施方案中,方法可包括核酸,并且该核酸是合成的。在一些实施方案中,样品可包含核酸,并且该核酸可被片段化。在一些情况下,核酸为微环。

[0244] 在一些实施方案中,核酸可包含启动子区域、条码、限制性位点、切割位点、内切核酸酶识别位点、引物结合位点、可选标志物、独特识别序列、抗性基因、接头序列或其任意组合。在一些方面,这些位点可用于酶消化、扩增、测序、靶向结合、纯化、提供抗性特性(例如,抗生素抗性)或其任意组合。在一些实施方案中,核酸可包含一个或多个限制性位点。限制性位点通常可指特定的肽或核苷酸序列,在该序列处,位点特异性分子(例如,蛋白酶、内切核酸酶或酶)可切割核酸。在一个实例中,核酸可包含一个或多个限制性位点,其中在限制性位点处切割核酸使该核酸片段化。在一些实施方案中,核酸可包含至少一个内切核酸酶识别位点。在一些实施方案中,内切核酸酶识别位点可包括I型内切核酸酶识别位点、II型内切核酸酶识别位点、III型内切核酸酶识别位点、IV型内切核酸酶识别位点或V型内切核酸酶识别位点。内切核酸酶识别位点的非限制性实例包括AatII识别位点、Acc65I识别位点、AccI识别位点、AcII识别位点、AatII识别位点、Acc65I识别位点、AccI识别位点、AcII识别位点、AfeI识别位点、AflIII识别位点、AgeI识别位点、ApaI识别位点、ApaLI识别位点、ApoI识别位点、AscI识别位点、AseI识别位点、AsiSI识别位点、AvrII识别位点、BamHI识别位点、BclI识别位点、BglIII识别位点、Bme1580I识别位点、BmtI识别位点、BsaI识别位点、BsaHI识别位点、BsiEI识别位点、BsiWI识别位点、BspEI识别位点、BspHI识别位点、BsrGI识别位点、BssHII识别位点、BstBI识别位点、BstZ17I识别位点、BtgI识别位点、ClaI识别位点、DraI识别位点、EaeI识别位点、EagI识别位点、EcoRI识别位点、EcoRV识别位点、FseI识别位点、FspI识别位点、HaeII识别位点、HincII识别位点、HindIII识别位点、HpaI识别位点、KasI识别位点、KpnI识别位点、MfeI识别位点、MluI识别位点、MscI识别位点、MspAII识别位点、MfeI识别位点、MluI识别位点、MscI识别位点、MspAII识别位点、NaeI识别位点、NarI识别位点、NcoI识别位点、NdeI识别位点、NgoMIV识别位点、NheI识别位点、NotI识别位点、NruI识别位点、NsiI识别位点、NspI识别位点、PacI识别位点、PciI识别位点、PmeI识别位点、PmlI识别位点、PsiI识别位点、PspOMI识别位点、PstI识别位点、PvuI识别位点、PvuII识别位点、SacI识别位点、SacII识别位点、SalI识别位点、SbfI识别位点、ScaI识别位点、SfcI识别位点、SfoI识别位点、SgrAI识别位点、SmaI识别位点、SmlI识别位点、SnaBI识别位点、SpeI识别位点、SphI识别位点、SspI识别位点、StuI识别位点、SwaI识别位点、XbaI识别位点、XhoI识别位点和XmaI识别位点。在特定的实例中,限制性位点可包括NotI内切核酸酶识别位点。

[0245] 在一些情况下,核酸可容易地与另一核酸(例如,该核酸包含粘性末端或核苷酸突出端)结合。例如,核酸可包含在该核酸的第一末端处的突出端。通常,粘性末端或突出端可指在核酸末端处的一系列未配对的核苷酸。在一些情况下,核酸可包含在该核酸的一个或多个末端处的单链突出端。在一些情况下,突出端可出现在核酸的3'端。在一些情况下,突出端可出现在核酸的5'端。突出端可包含任何数目的核苷酸。例如,突出端可包含1个核苷酸、2个核苷酸、3个核苷酸、4个核苷酸或者5个或更多个核苷酸。在一些情况下,核酸在与另一核酸结合之前可能需要修饰(例如,核酸可能需要用内切核酸酶进行消化)。在一些情况下,核酸的修饰可产生核苷酸突出端,并且该突出端可包含任何数目的核苷酸。例如,突出端可包含1个核苷酸、2个核苷酸、3个核苷酸、4个核苷酸或者5个或更多个核苷酸。在一个实例中,核酸可包含限制性位点,其中用限制酶(例如,NotI)在限制性位点处消化核酸产生了4个核苷酸的突出端。在一些情况下,修饰包括在核酸的一个或多个末端处产生平末端。通

常,平末端可指双链核酸,其中两条链均以碱基对终止。在一个实例中,核酸可包含限制性位点,其中用限制酶(例如,BsaI)在限制性位点处消化核酸产生了平末端。

[0246] 启动子是控制RNA聚合酶与转录因子结合的核酸序列,并且可对基因转录的效率、基因可在细胞中表达的位置和/或基因可在其中表达的细胞类型具有重大影响。启动子的非限制性实例包括巨细胞病毒(CMV)启动子、延伸因子1 α (EF1 α)启动子、猿猴空泡病毒(SV40)启动子、磷酸甘油酸激酶(PGK1)启动子、泛素C(Ubc)启动子、人 β 肌动蛋白启动子、CAG启动子、四环素应答元件(TRE)启动子、UAS启动子、肌动蛋白5c(Ac5)启动子、多角体启动子、Ca²⁺/钙调蛋白依赖性蛋白激酶II(CaMKII α)启动子、GAL1启动子、GAL 10启动子、TEF1启动子、甘油醛3-磷酸脱氢酶(GDS)启动子、ADH1启动子、CaMV35S启动子、Ubi启动子、人聚合酶III RNA(H1)启动子、U6启动子或其组合。

[0247] 在一些情况下,核酸可以是病毒载体,并且该病毒载体可包含:编码长末端重复序列(LTR)的序列;在逆转录病毒原病毒任一侧发现的U3-R-U5区。在一些情况下,核酸可以是病毒载体,并且该病毒载体可包含编码U3的序列,U3是在病毒基因组RNA的3'端的独特区域,含有激活病毒基因组RNA转录所必需的序列。在一些情况下,核酸可以是病毒载体,并且该病毒载体可包含编码R的序列,R是在逆转录病毒/慢病毒载体的5'和3'LTR内均发现的重复区域。在一些情况下,核酸可以是病毒载体,并且该病毒载体可包含编码U5的序列,U5是在病毒基因组RNA的5'端的独特区域。在一些情况下,核酸可以是病毒载体,并且该病毒载体可包含编码5'LTR的序列,5'LTR可充当RNA pol II启动子。在一些情况下,核酸可以是病毒载体,并且该病毒载体可包含编码杂合5'LTR的序列,该杂合5'LTR具有组成型启动子如CMV或RSV。在一些情况下,核酸可以是病毒载体,并且该病毒载体可包含编码TAR的序列,TAR是可位于LTR的R区中并充当Tat的结合位点的反式激活应答元件。在一些情况下,核酸可以是病毒载体,并且该病毒载体可包含编码3'LTR的序列,3'LTR可用于通过在R序列之后添加多聚A段(poly A tract)来终止由5'LTR启动的转录。在一些情况下,核酸可以是病毒载体,并且该病毒载体可包含编码中心多嘌呤段(central polypurine tract,cPPT)的序列,cPPT为原病毒DNA合成的识别位点。cPPT的存在可影响转导效率和转基因表达。在一些情况下,核酸可以是病毒载体,并且该病毒载体可包含编码Psi的序列,Psi是用于通过核衣壳进行包装的RNA靶位点。在一些情况下,核酸可以是病毒载体,并且该病毒载体可包含编码rev应答元件(RRE)的序列,RRE是与Rev蛋白结合的序列。在一些情况下,核酸可以是病毒载体,并且该病毒载体可包含编码土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件的序列,该调控元件是通过增加核输出来刺激转基因的表达的序列。在一些情况下,核酸可以是病毒载体,并且该病毒载体可包含编码GAG的序列,GAG是含有基质、衣壳和核衣壳组分的慢病毒颗粒的前体结构蛋白。在一些情况下,核酸可以是病毒载体,并且该病毒载体可包含编码Pol的序列,Pol是含有逆转录酶和整合酶组分的前体蛋白。在一些情况下,核酸可以是病毒载体,并且该病毒载体可包含编码Rev的序列,Rev可与未剪接和部分剪接的转录物内的RRE结合以促进核输出。在一些情况下,核酸可以是病毒载体,并且该病毒载体可包含编码反式激活因子(Tat)的序列,Tat可与TAR结合以激活从LTR启动子开始的转录。在一些情况下,核酸可以是病毒载体,并且该病毒载体可包含编码水泡性口炎病毒G糖蛋白(VSVG)的序列,VSVG是可用于假型(psuedotype)慢病毒载体的广向性包膜蛋白。在一些情况下,核酸可以是病毒载体,并且该病毒载体可包含编码反向末端重复序列(ITR)的序列,ITR形成可充当病毒DNA复制

起点的T形发夹。ITR对称性可影响AAV基因组的有效增殖。在一些情况下,核酸可以是病毒载体,并且该病毒载体可包含编码Rep(例如,Rep78、Rep68、Rep52和Rep40)的序列,Rep是基因组复制所需要的以及整合所必需的包装蛋白。在一些情况下,核酸可以是病毒载体,并且该病毒载体可包含编码结构衣壳蛋白(例如,VP1、VP2和VP3)的序列,结构衣壳蛋白可用于从晚期体内释放AAV颗粒和/或确保正确的病毒体组装。

[0248] 在一些情况下,核酸可包含条码或条码序列。条码或条码序列涉及由多核苷酸构成的天然或合成的核酸序列(其允许明确鉴别该多核苷酸)和具有所述条码序列的由多核苷酸构成的其他序列。例如,包含条码的核酸可允许鉴别编码的转基因。条码序列可包括至少3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、40、45或50个或更多个连续核苷酸的序列。核酸可包含两个或更多个条码序列或其互补序列。条码序列可包括随机组装的核苷酸序列。条码序列可以是简并序列。条码序列可以是已知序列。条码序列可以是预定义的序列。

[0249] 在一些情况下,本文所公开的方法可包括核酸(例如,第一核酸和/或第二核酸)。在一些情况下,该核酸可编码转基因。通常,转基因可指包含多个核苷酸亚基的线性聚合物。转基因可包含任何数目的核苷酸。在一些情况下,转基因可包含少于约100个核苷酸。在一些情况下,转基因可包含至少约100个核苷酸。在一些情况下,转基因可包含至少约200个核苷酸。在一些情况下,转基因可包含至少约300个核苷酸。在一些情况下,转基因可包含至少约400个核苷酸。在一些情况下,转基因可包含至少约500个核苷酸。在一些情况下,转基因可包含至少约1000个核苷酸。在一些情况下,转基因可包含至少约5000个核苷酸。在一些情况下,转基因可包含至少约10,000个核苷酸。在一些情况下,转基因可包含至少约20,000个核苷酸。在一些情况下,转基因可包含至少约30,000个核苷酸。在一些情况下,转基因可包含至少约40,000个核苷酸。在一些情况下,转基因可包含至少约50,000个核苷酸。在一些情况下,转基因可包含约500至约5000个核苷酸。在一些情况下,转基因可包含约5000至约10,000个核苷酸。在本文公开的任何情况下,转基因可包括DNA、RNA或DNA和RNA的杂合体。在一些情况下,转基因可以是单链的。在一些情况下,转基因可以是双链的。

a. 随机插入

[0250] 本文所述方法的一种或多种转基因可随机插入细胞的基因组中。当插入到基因组中的任何位置时,这些转基因均可以是功能性的。例如,转基因可编码其自身的启动子,或者可插入处于内源启动子控制下的位置中。或者,转基因可插入基因中,如基因的内含子、基因的外显子、启动子或非编码区中。

[0251] 编码转基因序列的核酸例如RNA可随机插入细胞的染色体中。随机整合可由将核酸例如RNA引入细胞中的任何方法产生。例如,该方法可以是但不限于电穿孔,声致穿孔,基因枪的使用,脂质体转染(lipotransfection),磷酸钙转染,树枝状分子的使用,显微注射,以及包括腺病毒、AAV和逆转录病毒载体在内的病毒载体的使用,和/或II族核酶。

[0252] 编码转基因的RNA还可设计成包含报告基因,以便可经由报告基因的激活来检测转基因或其表达产物的存在。可以使用任何报告基因,如上文公开的那些。通过在细胞培养物中选择报告基因被激活的那些细胞,可选择含有转基因的细胞。

[0253] 待插入的转基因的侧翼可以是与基因组中的靶向双链断裂位点类似的工程化位点,以从多核酸切除转基因,从而可将该转基因插入双链断裂区。在一些情况下,可通过病

毒引入转基因。例如,AAV病毒可用于采用转基因感染细胞。在一些情况下,可使用修饰的或工程化AAV病毒将转基因引入细胞(图83A和图83B)。修饰的或野生型AAV可在至少一个基因组位置包含同源臂(图84至图86D)。

[0254] 可经由电穿孔将编码转基因的RNA引入细胞中。还可经由脂质转染、感染或转化将RNA引入细胞中。电穿孔和/或脂质转染可用于转染原代细胞。电穿孔和/或脂质转染可用于转染原代造血细胞。在一些情况下,RNA可在细胞内逆转录为DNA。然后可在同源重组反应中使用DNA底物。还可以在不使用同源重组的情况下将DNA引入细胞基因组中。在一些情况下,DNA的侧翼可以是与基因组中的靶向双链断裂区互补的工程化位点。在一些情况下,可从多核酸切除DNA,以便可在不进行同源重组的情况下将该DNA插入双链断裂区。

[0255] 可通过表达测定例如qPCR,或通过测量RNA水平来验证转基因的表达。表达水平还可指示拷贝数。例如,如果表达水平非常高,则这可指示转基因的多于一个拷贝整合到基因组中。或者,高表达可指示转基因整合到高转录区域中,例如,高度表达的启动子附近。还可通过测量蛋白质水平,如通过蛋白质印迹法来验证表达。在一些情况下,剪接受体测定可与报告系统一起使用以检测转基因整合(图94)。

b. 位点特异性插入

[0256] 以本文公开的任何方法插入一种或多种转基因可以是位点特异性的。例如,一种或多种转基因可插入到启动子附近或周围。在另一个实例中,一种或多种转基因可插入到基因的外显子(例如,PD-1基因)附近、周围或内部。这样的插入可用于敲入转基因(例如,癌症特异性TCR转基因),同时破坏另一基因(例如,PD-1基因)。在另一个实例中,一种或多种转基因可插入到基因的内含子附近、周围或内部。可通过AAV病毒载体引入转基因并将其整合到靶向基因组位置中(图87)。

[0257] 可通过将DNA引入细胞中而产生细胞的靶向基因座的修饰,其中该DNA与该靶基因座具有同源性。DNA可包含标志基因,从而允许对包含整合的构建体的细胞进行选择。靶载体中的互补DNA可与靶基因座上的染色体DNA进行重组。标志基因的侧翼可以是互补DNA序列、3'重组臂和5'重组臂。可靶向细胞内的多个基因座。例如,可一次引入具有对1个或多个靶基因座具有特异性的重组臂的转基因,使得在单个步骤中发生多个基因组修饰。

[0258] 多种酶可催化外来DNA向宿主基因组中的插入。例如,位点特异性重组酶可簇集成具有不同生物化学性质的两个蛋白家族,即酪氨酸重组酶(其中DNA与酪氨酸残基共价连接)和丝氨酸重组酶(其中共价连接发生在丝氨酸残基处)。在一些情况下,重组酶可包括Cre,fC31整合酶(衍生自链霉菌噬菌体fC31的丝氨酸重组酶)或细菌噬菌体衍生的位点特异性重组酶(包括Flp λ 整合酶、细菌噬菌体HK022重组酶、细菌噬菌体R4整合酶和噬菌体TP901-1整合酶)。

[0259] 也可在构建体中使用表达控制序列。例如,表达控制序列可包含在很多种细胞类型中表达的组成型启动子。也可使用组织特异性启动子并且其可用于引导向特定细胞谱系的表达。

[0260] 可以使用非病毒基因编辑如CRISPR、TALEN(参见美国专利号14/193,037)、基于转座子、ZEN、大范围核酸酶或Mega-TAL或基于转座子的系统来实现位点特异性基因编辑。例如,可以使用PiggyBac(参见Moriarty,B.S.等人,“Modular assembly of transposon integratable multigene vectors using RecWay assembly,”Nucleic Acids Research

(8):e92(2013))或睡美人(sleeping beauty)(参见Aronovich,E.L等人,“The Sleeping Beauty transposon system:a non-viral vector for gene therapy,”Hum.Mol.Genet., 20(R1):R14-R20.(2011))转座子系统。

[0261] 还可在不进行同源重组的情况下实现位点特异性基因编辑。可在使用同源重组的情况下将外源多核酸引入细胞基因组中。在一些情况下,转基因的侧翼可以是与基因组中的靶向双链断裂区互补的工程化位点。可从多核酸切除转基因,以便可在使用同源重组的情况下将该转基因插入双链断裂区。

c. 转基因

[0262] 转基因可用于以比没有转基因的情况下更高的水平表达,例如,过表达内源基因。此外,转基因可用于以高于背景(即未用转基因进行转染的细胞)的水平表达外源基因。转基因还可包括其他类型的基因,例如,显性失活基因。

[0263] 可以以产生转基因产物的方式将转基因置于生物体、细胞、组织或器官中。多核酸可包含转基因。多核酸可编码外源受体(图57A、图57B和图57C)。例如,本文公开了包含至少一种侧翼为至少两个重组臂的外源T细胞受体(TCR)序列的多核酸,该重组臂具有与基因组序列内的多核苷酸互补的序列,该基因组序列为腺苷A2a受体、CD276、含V-set域的T细胞激活抑制因子1、B和T淋巴细胞相关因子、细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4、吡啶胺2,3-双加氧酶1、杀伤细胞免疫球蛋白样受体三域长细胞质尾1、淋巴细胞激活基因3、程序性细胞死亡因子1、甲型肝炎病毒细胞受体2、V域免疫球蛋白T细胞激活抑制因子或自然杀伤细胞受体2B4。一种或多种转基因可与一种或多种破坏相组合。

T细胞受体(TCR)

[0264] T细胞可包含一种或多种转基因。一种或多种转基因可表达识别并结合抗原上的至少一个表位(例如,癌症表位)的TCR α 、 β 、 γ 和/或 δ 链蛋白,或结合抗原上的突变表位。TCR可与癌症新抗原结合。TCR可以是如图22和图26中所示的功能性TCR。TCR可以仅包含如本文所定义的 α 链或 β 链序列的其中之一(例如,分别与另外的 α 链或 β 链组合),或者可包含两条链。TCR可以仅包含如本文所定义的 γ 链或 δ 链序列的其中之一(例如,分别与另外的 γ 链或 δ 链组合),或者可包含两条链。功能性TCR至少维持融合蛋白中的大部分生物学活性。在TCR的 α 和/或 β 链的情况下,这可能意味着两条链仍然能够形成T细胞受体(具有未修饰的 α 和/或 β 链或具有另一融合蛋白 α 和/或 β 链),该T细胞受体发挥其生物学功能,特别是与TCR的特定的肽-MHC复合体结合,和/或肽活化后的功能性信号转导。在TCR的 γ 和/或 δ 链的情况下,这可能意味着两条链仍然能够形成T细胞受体(具有未修饰的 γ 和/或 δ 链或具有另一融合蛋白 γ 和/或 δ 链),该T细胞受体发挥其生物学功能,特别是与TCR的特定的肽-MHC复合体结合,和/或肽活化后的功能性信号转导。T细胞还可包含一种或多种TCR。T细胞还可包含对多于一种靶标具有特异性的单个TCR。

[0265] 可以使用多种方法鉴别TCR。在一些情况下,可以使用全外显子组测序来鉴别TCR。例如,TCR可靶向含有通过全外显子组测序鉴别的E805G突变的ErbB2相互作用蛋白(ERBB2IP)抗原。或者,可从自体、同种异体或异种组库鉴别TCR。自体 and 同种异体鉴别可能需要多步骤的过程。在自体 and 同种异体鉴别中,树突细胞(DC)可从CD14选择的单核细胞产生,并在成熟后,用特定肽进行脉冲或转染。肽脉冲的DC可用于刺激自体或同种异体T细胞。可通过有限稀释从这些肽脉冲的T细胞系分离单细胞肽特异性T细胞克隆。可对感兴趣的

TCR进行鉴别和分离。可对感兴趣的TCR的 α 和 β 链进行克隆、密码子优化并将其编码到载体或转基因中。TCR的部分可被替换。例如,人TCR的恒定区可被相应的鼠区替换。可以进行采用相应的鼠区对人恒定区的替换以增加TCR稳定性。还可以以高亲合力或超生理学亲合力对TCR进行离体鉴别。

[0266] 为了产生成功的肿瘤特异性TCR,应当鉴别合适的靶序列。可通过分离罕见的肿瘤反应性T细胞来找到该序列,或者在这种方法不可行的情况下,可以采用替代技术来产生高活性的抗肿瘤T细胞抗原。一种方法可能需要用人肿瘤蛋白对表达人白细胞抗原(HLA)系统的转基因小鼠进行免疫,以产生表达抗人抗原的TCR的T细胞(参见例如,Stanislowski等人,Circumventing tolerance to a human MDM2-derived tumor antigen by TCR gene transfer,Nature Immunology 2,962-970(2001))。替代方法可以是同种异体TCR基因转移,其中从经历肿瘤缓解的患者分离肿瘤特异性T细胞,并且可将反应性TCR序列转移到来自另一患有该疾病但可能无应答的患者的T细胞中(de Witte,M.A.等人,Targeting self-antigens through allogeneic TCR gene transfer,Blood 108,870-877(2006))。最后,可以采用体外技术来改变TCR的序列,从而通过增加弱反应性肿瘤特异性TCR与靶抗原相互作用的强度(亲合力)来增强其杀肿瘤活性(Schmid,D.A.等人,Evidence for a TCR affinity threshold delimiting maximal CD8T cell function.J.Immunol.184,4936-4946(2010))。或者,可以使用全外显子组测序来鉴别TCR。

[0267] 本发明的功能性TCR融合蛋白可导向MHC呈递的表位。MHC可以是I类分子,例如HLA-A。MHC可以是II类分子。本发明的功能性TCR融合蛋白还可具有基于肽或肽指导的功能,以便靶向抗原。本发明的功能性TCR可以连接,例如,本发明的功能性TCR可与2A序列连接。如图26中所示,本发明的功能性TCR还可与弗林蛋白酶-V5-SGSGF2A连接。本发明的功能性TCR还可含有哺乳动物组分。例如,本发明的功能性TCR可含有小鼠恒定区。本发明的功能性TCR在一些情况下还可含有人恒定区。原则上可通过将肽序列引入TCR中并通过用这些肽序列靶向肿瘤来实现肽指导的功能。这些肽可来源于噬菌体展示或合成的肽文库(参见例如,Arap,W.等人,“Cancer Treatment by Targeted Drug Delivery to Tumor Vasculature in a Mouse Model,”Science,279,377-380(1998);Scott,C.P.等人,“Structural requirements for the biosynthesis of backbone cyclic peptide libraries,”8:801-815(2001))。其中,对乳腺癌、前列腺癌和结肠癌特异的肽以及对新血管系统特异的肽已成功分离并且可用于本发明(Samoylova,T.I.等人,“Peptide Phage Display:Opportunities for Development of Personalized Anti-Cancer Strategies,”Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry,6(1):9-17(9)(2006))。本发明的功能性TCR融合蛋白可导向突变的癌症表位或突变的癌症抗原。

[0268] 可以使用和特别考虑的转基因可包括那些表现出与本文公开的基因例如TCR基因的一定的同一性和/或同源性的基因。因此,考虑,如果基因表现出至少或至少约50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的同源性(在核酸或蛋白质水平),则该基因可用作转基因。还考虑,表现出至少或至少约50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的同一性(在核酸或蛋白质水平)的基因可

用作转基因。在一些情况下,转基因可以是功能性的。

[0269] 转基因可并入细胞中。例如,转基因可并入生物体的生殖细胞系中。当插入细胞中时,转基因可以是互补DNA (cDNA) 区段(其为信使RNA (mRNA) 的拷贝),或位于其基因组DNA原始区域(含有或不含有内含子)的基因本身。蛋白质X的转基因可指包含编码蛋白质X的核苷酸序列的转基因。如本文所用的,在一些情况下,编码蛋白质X的转基因可以是编码蛋白质X的100%或约100%的氨基酸序列的转基因。在其他情况下,编码蛋白质X的转基因可以是编码蛋白质X的至少或至少约99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、40%、30%、20%、10%、5%或1%的氨基酸序列的转基因。转基因的表达可最终产生功能性蛋白质,例如,部分、完全或过度功能性蛋白质。如上文所讨论的,如果部分序列被表达,则最终的结果可以为非功能性蛋白质或显性失活蛋白质。非功能性蛋白质或显性失活蛋白质还可与功能性(内源或外源)蛋白质竞争。转基因还可编码RNA(例如,mRNA、shRNA、siRNA或微小RNA)。在一些情况下,当转基因编码mRNA时,该mRNA转而可被翻译成多肽(例如蛋白质)。因此,考虑转基因可编码蛋白质。在一些情况下,转基因可编码蛋白质或蛋白质的一部分。此外,与野生型多肽相比,蛋白质可具有一种或多种突变(例如,缺失、插入、氨基酸置换或重排)。蛋白质可以是天然多肽或人工多肽(例如,重组多肽)。转基因可编码由两种或更多种多肽形成的融合蛋白。T细胞可包含或可包含约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20种或更多种转基因。例如,T细胞可包含一种或多种含有TCR基因的转基因。

[0270] 转基因(例如,TCR基因)可插入安全港基因座中。安全港可包含其中转基因可整合和发挥作用而不扰乱内源活性的基因组位置。例如,一种或多种转基因可插入HPRT、AAVS SITE(例如,AAVS1、AAVS2等)、CCR5、hROSA26和/或其任意组合中的任一种中。转基因(例如,TCR基因)也可插入内源免疫检查点基因中。内源免疫检查点基因可以是刺激性检查点基因或抑制性检查点基因。转基因(例如,TCR基因)也可插入刺激性检查点基因如CD27、CD40、CD122、OX40、GITR、CD137、CD28或ICOS中。使用基因组参照序列联盟人类基因组序列第38版第2次补充版(Genome Reference Consortium Human Build 38patch release 2, GRCh38.p2)程序集提供免疫检查点基因位置。转基因(例如,TCR基因)也可插入内源抑制性检查点基因如A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、CTLA-4、IDO、KIR、LAG3、PD-1、TIM-3、VISTA或CISH中。例如,一种或多种转基因可插入CD27、CD40、CD122、OX40、GITR、CD137、CD28、ICOS、A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、CTLA-4、IDO、KIR、LAG3、PD-1、TIM-3、VISTA、HPRT、AAVS SITE(例如AAVS1、AAVS2等)、PHD1、PHD2、PHD3、CCR5、CISH、PPP1R12C和/或其任意组合中的任一种中。转基因可插入内源TCR基因中。转基因可插入编码基因组区域内。转基因也可插入非编码基因组区域内。转基因可在不进行同源重组的情况下插入基因组中。转基因的插入可包括细胞内基因组移植的步骤。转基因可插入PD-1基因处(图46A和图46B)。在一些情况下,多于一种指导物可靶向免疫检查点(图47)。在其他情况下,转基因可整合到CTLA-4基因处(图48和图50)。在其他情况下,转基因可整合到CTLA-4基因和PD-1基因处(图49)。转基因也可整合到安全港如AAVS1中(图96和图97)。转基因可插入AAV整合位点中。在一些情况下,AAV整合位点可以是安全港。可以存在替代AAV整合位点,如5号染色体上的AAVS2或3号染色体上的AAVS3。另外的AAV整合位点如AAVS2、AAVS3、AAVS4、AAVS5、AAVS6、AAVS7、AAVS8等也被认为是外源受体如TCR的可能的整合位点。如本文所用的,AAVS可指AAVS1以及相关的腺相关病

毒(AAVS)整合位点。

[0271] 嵌合抗原受体可由胞外抗原识别域、跨膜域和控制T细胞激活的信号传导区构成。胞外抗原识别域可来源于鼠、人源化或完全人源单克隆抗体。具体而言,胞外抗原识别域由单克隆抗体的重链和轻链的可变区构成,该单克隆抗体以单链可变片段(scFv)的形式进行克隆并通过铰链和跨膜域与T细胞受体(TCR)复合体的胞内信号传导分子以及至少一种共刺激分子连接。在一些情况下,不使用共刺激域。

[0272] 本公开内容的CAR可存在于真核细胞例如哺乳动物细胞的质膜中,其中合适的哺乳动物细胞包括但不限于细胞毒性细胞、T淋巴细胞、干细胞、干细胞的子代、祖细胞、祖细胞的子代和NK细胞。当存在于真核细胞的质膜中时,CAR在其结合靶标存在的情况下可以是活性的。靶标可在膜上表达。靶标还可以是可溶的(例如,不与细胞结合)。靶标可存在于细胞如靶细胞的表面上。靶标可存在于固体表面(如脂双层等)上。靶标可以是可溶的,如可溶性抗原。靶标可以是抗原。抗原可存在于细胞如靶细胞的表面上。抗原可存在于固体表面(如脂双层等)上。在一些情况下,靶标可以是抗原的表位。在一些情况下,靶标可以是癌症新抗原。

一些近期进展关注于鉴别在一些情况下触发抗肿瘤T细胞应答的肿瘤特异性突变。例如,可使用全外显子组测序方法来鉴别这些内源突变。Tran E等人,“Cancer immunotherapy based on mutation-specific CD4+T cells in a patient with epithelial cancer,”*Science* 344:641-644 (2014)。因此,CAR可由靶向肿瘤特异性新抗原的scFv组成。

[0273] 一种方法可使用体外测定(例如全外显子组测序)从获自癌症患者的样品鉴别癌症相关靶序列。一种方法可进一步鉴别来自识别靶序列的第一T细胞的TCR转基因。癌症相关靶序列和TCR转基因可从同一患者或不同患者的样品获得。可在CAR转基因上编码癌症相关靶序列,以使CAR对靶序列具有特异性。一种方法可有效递送包含CAR转基因的核酸穿过T细胞的膜。在一些情况下,第一和第二T细胞可从同一患者获得。在其他情况下,第一和第二T细胞可从不同患者获得。在其他情况下,第一和第二T细胞可从不同患者获得。该方法可使用非病毒整合或病毒整合系统安全高效地将CAR转基因整合到T细胞的基因组中以产生工程化T细胞,从而可在该工程化T细胞中可靠地表达CAR转基因。

[0274] T细胞可包含一种或多种被破坏的基因和一种或多种转基因。例如,一种或多种表达被破坏的基因可包括CD27、CD40、CD122、OX40、GITR、CD137、CD28、ICOS、A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、CTLA-4、IDO、KIR、LAG3、PD-1、TIM-3、PHD1、PHD2、PHD3、VISTA、CISH、PPP1R12C和/或其任意组合中的任一种。例如,仅为了说明各种组合,一种或多种表达被破坏的基因可包括PD-1,并且一种或多种转基因包括TCR。在另一个实例中,一种或多种表达被破坏的基因还可包括CTLA-4,并且一种或多种转基因包括TCR。

[0275] T细胞可包含一种或多种被抑制的基因和一种或多种转基因。例如,一种或多种表达被抑制的基因可包括CD27、CD40、CD122、OX40、GITR、CD137、CD28、ICOS、A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、CTLA-4、IDO、KIR、LAG3、PD-1、TIM-3、PHD1、PHD2、PHD3、VISTA、CISH、PPP1R12C和/或其任意组合中的任一种。例如,仅为了说明各种组合,一种或多种表达被抑制的基因可包括PD-1,并且一种或多种转基因包括TCR。在另一个实例中,一种或多种表达被抑制的基因还可包括CTLA-4,并且一种或多种转基因包括TCR。

[0276] T细胞还可包含或可包含约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20种或更多种显性失活转基因。显性失活转基因的表达可抑制显性失活转基因的野生型对应物的表达和/或功能。因此,例如,包含显性失活转基因X的T细胞可具有与包含表达被抑制的X基因的不同T细胞相似的表型。一种或多种显性失活转基因可以是显性失活CD27、显性失活CD40、显性失活CD122、显性失活OX40、显性失活GITR、显性失活CD137、显性失活CD28、显性失活ICOS、显性失活A2AR、显性失活B7-H3、显性失活B7-H4、显性失活BTLA、显性失活CTLA-4、显性失活IDO、显性失活KIR、显性失活LAG3、显性失活PD-1、显性失活TIM-3、显性失活VISTA、显性失活PHD1、显性失活PHD2、显性失活PHD3、显性失活CISH、显性失活CCR5、显性失活HPRT、显性失活AAVS SITE (例如AAVS1、AAVS2等)、显性失活PPP1R12C或其任意组合。

[0277] 还提供了包含一种或多种转基因的T细胞,该转基因编码一种或多种可抑制基因表达例如可敲低基因的核酸。抑制基因表达的RNA可包括但不限于shRNA、siRNA、RNAi和微小RNA。例如,可将siRNA、RNAi和/或微小RNA递送至T细胞以抑制基因表达。此外,T细胞可包含编码shRNA的一种或多种转基因。shRNA可对特定基因具有特异性。例如,shRNA可对本申请中所述的任何基因具有特异性,该基因包括但不限于CD27、CD40、CD122、OX40、GITR、CD137、CD28、ICOS、A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、CTLA-4、IDO、KIR、LAG3、PD-1、TIM-3、VISTA、HPRT、AAVS SITE (例如AAVS1、AAVS2等)、PHD1、PHD2、PHD3、CCR5、CISH、PPP1R12C和/或其任意组合。

[0278] 一种或多种转基因可来自不同的物种。例如,一种或多种转基因可包括人基因、小鼠基因、大鼠基因、猪基因、牛基因、狗基因、猫基因、猴基因、黑猩猩基因或其任意组合。例如,转基因可来自人类,从而具有人基因序列。一种或多种转基因可包括人基因。在一些情况下,一种或多种转基因不是腺病毒基因。

[0279] 如上所述,转基因可以以随机或位点特异性方式插入T细胞的基因组中。例如,转基因可插入T细胞基因组中的随机基因座中。这些转基因在插入基因组中的任何位置时,可以是功能性的,例如,完全功能性的。例如,转基因可编码其自身的启动子,或者可插入处于内源启动子控制下的位置中。或者,转基因可插入基因中,如基因的内含子或基因的外显子、启动子或非编码区中。可以插入转基因以使该插入破坏基因,例如,内源检查点。转基因插入可包括内源检查点区域。可通过可位于转基因侧翼的重组臂来引导转基因插入。

[0280] 有时,转基因的多于一个拷贝可插入基因组中的多于一个随机基因座中。例如,多个拷贝可插入基因组中的随机基因座中。与转基因随机插入一次时相比,这可导致整体表达增加。或者,转基因的一个拷贝可插入基因中,而转基因的另一个拷贝可插入不同的基因中。转基因可被靶向,使得其可插入T细胞基因组中的特定基因座中。

[0281] 转基因的表达可受一种或多种启动子控制。启动子可以是普遍存在的组成型(允许连续转录相关基因的不受调控的启动子)组织特异性启动子或诱导型启动子。可对被插入到启动子附近或周围的转基因的表达进行调控。例如,转基因可插入到普遍存在的启动子附近或旁边。一些普遍存在的启动子可以是CAGGS启动子、hCMV启动子、PGK启动子、SV40启动子或ROSA26启动子。

[0282] 启动子可以是内源的或外源的。例如,一种或多种转基因可插入到内源或外源ROSA26启动子附近或周围。此外,启动子可对T细胞具有特异性。例如,一种或多种转基因可

插入到猪ROSA26启动子附近或周围。

[0283] 组织特异性启动子或细胞特异性启动子可用来控制表达的位置。例如,一种或多种转基因可插入到组织特异性启动子附近或周围。组织特异性启动子可以是FABP启动子、Lck启动子、CamKII启动子、CD19启动子、角蛋白启动子、白蛋白启动子、aP2启动子、胰岛素启动子、MCK启动子、MyHC启动子、WAP启动子或Col2A启动子。

[0284] 组织特异性启动子或细胞特异性启动子可用来控制表达的位置。例如,一种或多种转基因可插入到组织特异性启动子附近或周围。组织特异性启动子可以是FABP启动子、Lck启动子、CamKII启动子、CD19启动子、角蛋白启动子、白蛋白启动子、aP2启动子、胰岛素启动子、MCK启动子、MyHC启动子、WAP启动子或Col2A启动子。

[0285] 还可使用诱导型启动子。可通过添加或去除诱导剂,在需要时开启和关闭这些诱导型启动子。考虑,诱导型启动子可以是但不限于Lac、tac、trc、trp、araBAD、phoA、recA、proU、cst-1、tetA、cadA、nar、PL、cspA、T7、VHB、Mx和/或Trex。

[0286] 细胞可被工程化以敲除内源基因。可被敲除的内源基因可包括免疫检查点基因。免疫检查点基因可以是刺激性检查点基因或抑制性检查点基因。可以使用基因组参照序列联盟人类基因组序列第38版第2次补充版(GRCh38.p2)程序集提供免疫检查点基因位置。

[0287] 可以使用数据库选择将要敲除的基因。在一些情况下,某些内源基因对基因组工程而言是更适合的(more amendable)。数据库可包含表观遗传学上许可的靶位点。在一些情况下,数据库可以是ENCODE(DNA元素的百科全书(encyclopedia of DNA Elements))(<http://www.genome.gov/10005107>)。数据库可鉴别具有可以更容许进行基因组工程的开放染色质的区域。

[0288] T细胞可包含一种或多种被破坏的基因。例如,一种或多种表达被破坏的基因可包括以下的任一种:腺苷A2a受体(ADORA)、CD276、含V-set域的T细胞激活抑制因子1(VTCN1)、B和T淋巴细胞相关因子(BTLA)、细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(CTLA4)、吡啶胺2,3-双加氧酶1(IDO1)、杀伤细胞免疫球蛋白样受体三域长细胞质尾1(KIR3DL1)、淋巴细胞激活基因3(LAG3)、程序性细胞死亡因子1(PD-1)、甲型肝炎病毒细胞受体2(HAVCR2)、V域免疫球蛋白T细胞激活抑制因子(VISTA)、自然杀伤细胞受体2B4(CD244)、细胞因子诱导的含SH2的蛋白(CISH)、次黄嘌呤磷酸核糖转移酶1(HPRT)、腺相关病毒整合位点(AAVS SITE(例如AAVS1、AAVS2等))或趋化因子(C-C基序)受体5(基因/假基因)(CCR5)、CD160分子(CD160)、具有Ig和ITIM结构域的T细胞免疫受体(TIGIT)、CD96分子(CD96)、细胞毒性和调节性T细胞分子(CRTAM)、白细胞相关免疫球蛋白样受体1(LAIR1)、唾液酸结合Ig样凝集素7(SIGLEC7)、唾液酸结合Ig样凝集素9(SIGLEC9)、肿瘤坏死因子受体超家族成员10b(TNFRSF10B)、肿瘤坏死因子受体超家族成员10a(TNFRSF10A)、胱天蛋白酶8(CASP8)、胱天蛋白酶10(CASP10)、胱天蛋白酶3(CASP3)、胱天蛋白酶6(CASP6)、胱天蛋白酶7(CASP7)、Fas相关死亡结构域蛋白(FADD)、Fas细胞表面死亡受体(FAS)、转化生长因子β受体II(TGFBRII)、转化生长因子β受体I(TGFBR1)、SMAD家族成员2(SMAD2)、SMAD家族成员3(SMAD3)、SMAD家族成员4(SMAD4)、SKI原癌基因(SKI)、SKI样原癌基因(SKIL)、TGFB诱导因子同源框1(TGIF1)、白介素10受体亚基α(IL10RA)、白介素10受体亚基β(IL10RB)、血红素氧化酶2(HMOX2)、白介素6受体(IL6R)、白介素6信号转导蛋白(IL6ST)、c-src酪氨酸激酶(CSK)、鞘脂微域关联磷蛋白膜锚定物1(PAG1)、信号阈值调节跨膜衔接因子1(SIT1)、叉头框蛋白P3(FOXP3)、PR结构域1

(PRDM1)、碱性亮氨酸拉链转录因子ATF样蛋白(BATF)、可溶性鸟苷酸环化酶1, α 2(GUCY1A2)、可溶性鸟苷酸环化酶1, α 3(GUCY1A3)、可溶性鸟苷酸环化酶1, β 2(GUCY1B2)、可溶性鸟苷酸环化酶1, β 3(GUCY1B3)、细胞因子诱导的含SH2的蛋白(CISH)、脯氨酰羟化酶结构域(PHD1、PHD2、PHD3)家族蛋白或其任意组合。在一些情况下,还可敲除内源TCR。例如,仅为了说明各种组合,一种或多种表达被破坏的基因可包括PD-1、CLTA-4和CISH。

[0289] T细胞可包含一种或多种被抑制的基因。例如,一种或多种表达被抑制的基因可包括以下的任一种:腺苷A2a受体(ADORA)、CD276、含V-set域的T细胞激活抑制因子1(VTCN1)、B和T淋巴细胞相关因子(BTLA)、细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(CTLA4)、吡啶胺2,3-双加氧酶1(IDO1)、杀伤细胞免疫球蛋白样受体三域长细胞质尾1(KIR3DL1)、淋巴细胞激活基因3(LAG3)、程序性细胞死亡因子1(PD-1)、甲型肝炎病毒细胞受体2(HAVCR2)、V域免疫球蛋白T细胞激活抑制因子(VISTA)、自然杀伤细胞受体2B4(CD244)、细胞因子诱导的含SH2的蛋白(CISH)、次黄嘌呤磷酸核糖转移酶1(HPRT)、腺相关病毒整合位点(AAVS1)或趋化因子(C-C基序)受体5(基因/假基因)(CCR5)、CD160分子(CD160)、具有Ig和ITIM结构域的T细胞免疫受体(TIGIT)、CD96分子(CD96)、细胞毒性和调节性T细胞分子(CRTAM)、白细胞相关免疫球蛋白样受体1(LAIR1)、唾液酸结合Ig样凝集素7(SIGLEC7)、唾液酸结合Ig样凝集素9(SIGLEC9)、肿瘤坏死因子受体超家族成员10b(TNFRSF10B)、肿瘤坏死因子受体超家族成员10a(TNFRSF10A)、胱天蛋白酶8(CASP8)、胱天蛋白酶10(CASP10)、胱天蛋白酶3(CASP3)、胱天蛋白酶6(CASP6)、胱天蛋白酶7(CASP7)、Fas相关死亡结构域蛋白(FADD)、Fas细胞表面死亡受体(FAS)、转化生长因子 β 受体II(TGFBRII)、转化生长因子 β 受体I(TGFBRI)、SMAD家族成员2(SMAD2)、SMAD家族成员3(SMAD3)、SMAD家族成员4(SMAD4)、SKI原癌基因(SKI)、SKI样原癌基因(SKIL)、TGFB诱导因子同源框1(TGIF1)、白介素10受体亚基 α (IL10RA)、白介素10受体亚基 β (IL10RB)、血红素氧化酶2(HMOX2)、白介素6受体(IL6R)、白介素6信号转导蛋白(IL6ST)、c-src酪氨酸激酶(CSK)、鞘脂微域关联磷蛋白膜锚定物1(PAG1)、信号阈值调节跨膜衔接因子1(SIT1)、叉头框蛋白P3(FOXP3)、PR结构域1(PRDM1)、碱性亮氨酸拉链转录因子ATF样蛋白(BATF)、可溶性鸟苷酸环化酶1, α 2(GUCY1A2)、可溶性鸟苷酸环化酶1, α 3(GUCY1A3)、可溶性鸟苷酸环化酶1, β 2(GUCY1B2)、可溶性鸟苷酸环化酶1, β 3(GUCY1B3)、脯氨酰羟化酶结构域(PHD1、PHD2、PHD3)家族蛋白、细胞因子诱导的含SH2的蛋白(CISH)或其任意组合。例如,仅为了说明各种组合,一种或多种表达被抑制的基因可包括PD-1、CLTA-4和CISH。

d. 癌症靶标

[0290] 工程化细胞可靶向抗原。工程化细胞也可靶向表位。抗原可以是肿瘤细胞抗原。表位可以是肿瘤细胞表位。这样的肿瘤细胞表位可衍生自很多种肿瘤抗原,如来自突变引起的肿瘤的抗原(新抗原或新表位)、共享的肿瘤特异性抗原、分化抗原和在肿瘤中过表达的抗原。仅列举一些例子,这些抗原例如可衍生自 α -辅肌动蛋白-4、ARTC1、BCR-ABL融合蛋白(b3a2)、B-Raf、CASP-5、CASP-8、 β -连环蛋白、Cdc27、CDK4、CDKN2A、COA-1、dek-can融合蛋白、EFTUD2、延伸因子2、ETV6-AML1融合蛋白、FLT3-ITD、FN1、GPNMB、LDLR-岩藻糖基转移酶融合蛋白、HLA-A2d、HLA-A1 1d、hsp70-2、KIAA0205、MART2、ME1、MUM-1f、MUM-2、MUM-3、neo-PAP、肌球蛋白I类、NFYC、OGT、OS-9、p53、pm1-RAR α 融合蛋白、PRDX5、PTPRK、K-ras、N-ras、RBAF600、SIRT2、SNRPD1、SYT-SSX1融合蛋白或SYT-SSX2融合蛋白、TGF- β RII、丙糖磷酸异构

酶、BAGE-1、GAGE-1,2,8、Gage 3,4,5,6,7、GnTVf、HERV-K-MEL、KK-LC-1、KM-HN-1、LAGE-1、MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A6、MAGE-A9、MAGE-A10、MAGE-A12、MAGE-C2、mucink、NA-88、NY-ESO-1/LAGE-2、SAGE、Sp17、SSX-2、SSX-4、TAG-1、TAG-2、TRAG-3、TRP2-INT2g、XAGE-1b、CEA、gp100/Pmel17、激肽释放酶4、乳腺珠蛋白-A、Melan-A/MART-1、NY-BR-1、0A1、PSA、RAB38/NY-MEL-1、TRP-1/gp75、TRP-2、酪氨酸酶、脂肪分化相关蛋白(adipophilin)、AIM-2、ALDH1A1、BCLX(L)、BCMA、BING-4、CPSF、细胞周期蛋白D1、DKK1、ENAH(hMena)、EP-CAM、EphA3、EZH2、FGF5、G250/MN/CAIX、HER-2/neu、IL13Ra2、肠羧基酯酶、α胎蛋白、M-CSFT、MCSP、mdm-2、MMP-2、MUC1、p53、PBF、PRAME、PSMA、RAGE-1、RGS5、RNF43、RU2AS、分离蛋白1、SOX10、STEAP1、存活蛋白、端粒酶、VEGF和/或WT1。肿瘤相关抗原可以由宿主非正常表达的抗原；肿瘤相关抗原可以由宿主正常表达的分子的突变、截短、错误折叠或其他方式的异常显示；肿瘤相关抗原可与正常表达但以异常高水平表达的分子相同；或者肿瘤相关抗原可在异常的情形或环境中表达。肿瘤相关抗原可以是，例如，蛋白质或蛋白质片段、复合碳水化合物、神经节苷脂、半抗原、核酸、其他生物分子或其任意组合。

[0291] 在一些情况下，靶标为新抗原或新表位。例如，新抗原可以是ERBB2IP中的E805G突变。在一些情况下，可以通过全外显子组测序来鉴别新抗原和新表位。在一些情况下，新抗原和新表位靶标可由胃肠癌细胞表达。新抗原和新表位可在上皮癌上表达。

e. 其他靶标

[0292] 表位可以是基质表位。这样的表位可以在肿瘤微环境的基质上。抗原可以是基质抗原。这样的抗原可以在肿瘤微环境的基质上。仅列举一些例子，这些抗原和这些表位例如可存在于肿瘤内皮细胞、肿瘤血管系统、肿瘤成纤维细胞、肿瘤周细胞、肿瘤基质和/或肿瘤间质细胞上。这些抗原例如可包括CD34、MCSP、FAP、CD31、PCNA、CD117、CD40、MMP4和/或腱生蛋白。

f. 基因的破坏

[0293] 转基因的插入可在有或没有基因破坏的情况下进行。转基因可插入基因如CD27、CD40、CD122、OX40、GITR、CD137、CD28、ICOS、A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、CTLA-4、IDO、KIR、LAG3、PD-1、TIM-3、VISTA、HPRT、AAVS SITE (例如AAVS1、AAVS2等)、CCR5、PPP1R12C或CISH的附近、周围或内部，以降低或消除基因的活性或表达。例如，癌症特异性TCR转基因可插入基因(例如，PD-1)的附近、周围或内部，以降低或消除基因的活性或表达。转基因的插入可在内源TCR基因处进行。

[0294] 基因的破坏可以是任何特定的基因。考虑，涵盖了本申请内的基因的遗传同源物(例如，基因的任何哺乳动物形式)。例如，被破坏的基因可表现出与本文公开的基因，例如，CD27、CD40、CD122、OX40、GITR、CD137、CD28、ICOS、A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、CTLA-4、IDO、KIR、LAG3、PD-1、TIM-3、VISTA、HPRT、CCR5、AAVS SITE (例如AAVS1、AAVS2等)、PPP1R12C或CISH的一定的同一性和/或同源性。因此，考虑，可以破坏表现出或表现出约50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的同源性(在核酸或蛋白质水平)的基因。还考虑，可以破坏表现出或表现出约50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的同一性(在核酸或蛋白质水平)的基因。一些遗传同源物是

本领域已知的,但在一些情况下,同源物是未知的。然而,可以通过使用可公开获得的数据库如NCBI BLAST对核酸(DNA或RNA)序列或蛋白质序列进行比较来找到哺乳动物之间的同源基因。

[0295] 可被破坏的基因可以是基因家族的成员。例如,可被破坏的基因可提高癌症免疫疗法的治疗潜力。在一些情况下,基因可以是CISH。CISH基因可以是细胞因子诱导的STAT抑制因子(CIS)(也称为细胞因子信号传导抑制因子(SOCS)或STAT诱导的STAT抑制因子(SS1))蛋白家族的成员,(参见例如,Palmer等人,Cish actively silences TCR signaling in CD8+T cells to maintain tumor tolerance,The Journal of Experimental Medicine 202(12),2095-2113(2015))。基因可以是SOCS蛋白家族的一部分,SOCS蛋白家族可形成可调节细胞因子信号转导的经典负反馈系统的一部分。待破坏的基因可以是CISH。CISH可参与通过JAK-STAT5途径传导信号的细胞因子如促红细胞生成素、催乳素或白介素3(IL-3)受体的负调控。基因可通过抑制STAT5的酪氨酸磷酸化来抑制STAT5反式激活。已知CISH家族成员是细胞因子诱导的细胞因子信号传导负调节物。基因的表达可由造血细胞中的IL2、IL3、GM-CSF或EPO诱导。蛋白酶体介导的基因蛋白降解可参与促红细胞生成素受体的失活。在一些情况下,待靶向的基因可在肿瘤特异性T细胞中表达。待靶向的基因可在被破坏时增加工程化细胞向抗原相关肿瘤的浸润。在一些情况下,待靶向的基因可以是CISH。

[0296] 可被破坏的基因可参与减弱TCR信号传导、功能性亲合力或对癌症的免疫力。在一些情况下,当刺激TCR时,待破坏的基因上调。基因可参与抑制细胞扩充、功能性亲合力或细胞因子多功能性。基因可参与负调控细胞因子产生。例如,基因可参与抑制效应细胞因子,例如,IFN- γ 和/或TNF的产生。基因还可参与抑制TCR刺激后的支持性细胞因子如IL-2的表达。这样的基因可以是CISH。

[0297] 还可通过多种方式进行基因抑制。例如,可通过敲除、改变基因的启动子和/或通过施用干扰RNA来抑制基因表达。这可在生物体水平或在组织、器官和/或细胞水平进行。如果在细胞、组织和/或器官中敲低一个或多个基因,则可通过施用RNA干扰试剂,例如,siRNA、shRNA或微小RNA来抑制该一个或多个基因。例如,可将可表达shRNA的核酸稳定转染到细胞中以敲低表达。此外,可将可表达shRNA的核酸插入T细胞的基因组中,从而敲低T细胞内的基因。

[0298] 破坏方法还可包括过表达显性失活蛋白。该方法可导致功能性野生型基因的整体功能下降。此外,表达显性失活基因可产生与敲除和/或敲低的表型类似的表型。

[0299] 有时,可在一个或多个基因中插入或产生终止密码子(例如,通过核苷酸取代),这可产生无功能的转录物或蛋白质(有时称为敲除)。例如,如果在一个或多个基因的中间部分内产生终止密码子,则所得到的转录物和/或蛋白质可被截短,并且可以是无功能的。然而,在一些情况下,截短可产生活跃的(部分或过度活跃的)蛋白质。如果蛋白质过度活跃,这可产生显性失活蛋白。

[0300] 这种显性失活蛋白可在处于任何启动子控制内的核酸中表达。例如,启动子可以是普遍存在的启动子。启动子也可以是诱导型启动子、组织特异性启动子、细胞特异性启动子和/或发育特异性启动子。

[0301] 编码显性失活蛋白的核酸随后可插入细胞中。任何方法均可使用。例如,可以使用

稳定转染。此外,编码显性失活蛋白的核酸可插入T细胞的基因组中。

[0302] 可用任何方法敲除或破坏T细胞中的一个或多个基因。例如,敲除一个或多个基因可包括从T细胞的基因组删除一个或多个基因。敲除还可包括从T细胞去除全部或部分基因序列。还考虑,敲除可包括用一个或多个核苷酸取代T细胞基因组中的全部或部分基因。敲除一个或多个基因还可包括在一个或多个基因中插入序列,从而破坏该一个或多个基因的表达。例如,插入序列可在一个或多个基因的中间产生终止密码子。插入序列还可使一个或多个基因的开放阅读框移动。

[0303] 敲除可在任何细胞、器官和/或组织中进行,例如,在T细胞、造血干细胞、骨髓和/或胸腺中进行。例如,敲除可以是全身敲除,例如,一个或多个基因的表达在人的所有细胞中均被抑制。敲除还可以是特定于人的一种或多种细胞、组织和/或器官。这可通过条件敲除来实现,在条件敲除中一个或多个基因的表达在一种或多种器官、组织或细胞类型中被选择性抑制。可通过Cre-lox系统进行条件敲除,其中cre在细胞、组织和/或器官特异性启动子的控制下进行表达。例如,可在一种或多种组织或器官中敲除一个或多个基因(或可对表达进行抑制),其中该一种或多种组织或器官可包括脑、肺、肝、心脏、脾、胰腺、小肠、大肠、骨骼肌、平滑肌、皮肤、骨骼、脂肪组织、毛发、甲状腺、气管、胆囊、肾、输尿管、膀胱、主动脉、静脉、食道、隔膜、胃、直肠、肾上腺、支气管、耳、眼、视网膜、生殖器、下丘脑、喉、鼻、舌、脊髓或输尿管、子宫、卵巢、睾丸和/或其任意组合。还可可在一种或多种类型的细胞中敲除一个或多个基因(或可对表达进行抑制),其中一种或多种类型的细胞包括毛细胞(trichocyte)、角质形成细胞、促性腺激素细胞、促肾上腺皮质激素细胞、促甲状腺素细胞、促生长激素细胞、泌乳细胞、嗜铬细胞、滤泡旁细胞、球细胞、黑素细胞、痣细胞、梅克尔细胞、成牙本质细胞、成牙骨质细胞、角膜细胞、视网膜muller细胞、视网膜色素上皮细胞、神经元、神经胶质细胞(例如,少突胶质细胞、星形胶质细胞)、室管膜细胞、松果体细胞、肺细胞(例如,I型肺细胞和II型肺细胞)、克拉拉细胞、杯形细胞、G细胞、D细胞、肠嗜铬样细胞、胃主细胞、壁细胞、小凹细胞、K细胞、D细胞、I细胞、杯形细胞、帕内特细胞、肠上皮细胞、微皱褶细胞、肝细胞、肝星状细胞(例如,来自中胚层的枯否细胞)、胆囊细胞、泡心细胞、胰腺星状细胞、胰腺 α 细胞、胰腺 β 细胞、胰腺 δ 细胞、胰腺F细胞、胰腺 ϵ 细胞、甲状腺(例如,滤泡细胞)、甲状旁腺(例如,甲状旁腺主细胞)、嗜酸细胞、尿道上皮细胞、成骨细胞、骨细胞、成软骨细胞、软骨细胞、成纤维细胞、纤维细胞、成肌细胞、肌细胞、肌卫星细胞、腱细胞、心肌细胞、成脂肪细胞、脂肪细胞、cajal间质细胞、成血管细胞、内皮细胞、系膜细胞(例如,肾小球内系膜细胞和肾小球外系膜细胞)、近肾小球细胞、致密斑细胞、基质细胞、间质细胞、特络细胞(telocytes)简单上皮细胞、足细胞、肾近端小管刷状缘细胞、支持细胞、leydig细胞、颗粒细胞、栓细胞、生殖细胞、精子、卵子、淋巴细胞、骨髓细胞、内皮祖细胞、内皮干细胞、成血管细胞、中胚层成血管细胞(mesoangioblast)、周细胞壁细胞(pericyte mural cells)和/或其任意组合。

[0304] 在一些实施方案中,本公开内容的方法可包括从受试者获得一个或多个细胞。细胞通常可指包含细胞质、蛋白质、核酸和/或封闭在膜内的细胞器的任何生物学结构。在一些实施方案中,细胞可以是哺乳动物细胞。在一些实施方案中,细胞可指免疫细胞。细胞的非限制性实例可包括B细胞、嗜碱性粒细胞、树突细胞、嗜酸性粒细胞、 $\gamma\delta$ T细胞、粒细胞、辅助T细胞、朗格汉斯细胞、淋巴样细胞、先天淋巴样细胞(ILC)、巨噬细胞、肥大细胞、巨核细

胞、记忆T细胞、单核细胞、骨髓细胞、自然杀伤T细胞、嗜中性粒细胞、前体细胞、浆细胞、祖细胞、调节性T细胞、T细胞、胸腺细胞、其任何分化或去分化的细胞或其任何混合物或细胞的组合。

[0305] 在一些实施方案中,细胞可以是ILC,并且ILC是1型ILC、2型ILC或3型ILC。1型ILC通常可描述为受T-bet转录因子控制从而响应细胞内病原体分泌1型细胞因子如IFN- γ 和TNF- α 的细胞。2型ILC通常可描述为依赖于GATA-3和ROR- α 转录因子从而响应细胞外寄生虫感染产生2型细胞因子的细胞。3型ILC通常可描述为受ROR- γ t转录因子控制并产生IL-17和/或IL-22的细胞。

[0306] 在一些实施方案中,细胞可以是针对给定因子呈阳性或阴性的细胞。在一些实施方案中,细胞可以是CD3+细胞、CD3-细胞、CD5+细胞、CD5-细胞、CD7+细胞、CD7-细胞、CD14+细胞、CD14-细胞、CD8+细胞、CD8-细胞、CD103+细胞、CD103-细胞、CD11b+细胞、CD11b-细胞、BDCA1+细胞、BDCA1-细胞、L-选择蛋白+细胞、L-选择蛋白-细胞、CD25+、CD25-细胞、CD27+、CD27-细胞、CD28+细胞、CD28-细胞、CD44+细胞、CD44-细胞、CD56+细胞、CD56-细胞、CD57+细胞、CD57-细胞、CD62L+细胞、CD62L-细胞、CD69+细胞、CD69-细胞、CD45RO+细胞、CD45RO-细胞、CD127+细胞、CD127-细胞、CD132+细胞、CD132-细胞、IL-7+细胞、IL-7-细胞、IL-15+细胞、IL-15-细胞、凝集素样受体G1阳性细胞、凝集素样受体G1阴性细胞或其分化或去分化细胞。由细胞表达的因子的实例并非意在限制,并且本领域技术人员将理解,细胞对于本领域已知的任何因子可以是阳性的或阴性的。在一些实施方案中,细胞对于两种或更多种因子可以是阳性的。例如,细胞可以是CD4+和CD8+。在一些实施方案中,细胞对于两种或更多种因子可以是阴性的。例如,细胞可以是CD25-、CD44-和CD69-。在一些实施方案中,细胞对于一种或多种因子可以是阳性的,并且对于一种或多种因子可以是阴性的。例如,细胞可以是CD4+和CD8-。然后可将所选择的细胞输注到受试者中。在一些实施方案中,可对具有或不具有一种或多种给定因子的细胞进行选择(例如,可基于一种或多种因子的存在或不存在来分离细胞)。分离效率可影响细胞的活力以及转基因可整合到细胞基因组中和/或可被表达的效率。在一些实施方案中,所选择的细胞也可在体外扩充。所选择的细胞可在输注前进行体外扩充。应当理解,在本文公开的任何方法中使用的细胞可以是本文公开的任何细胞的混合物(例如,两个或更多个不同的细胞)。例如,本公开内容的方法可包括细胞,并且该细胞是CD4+细胞和CD8+细胞的混合物。在另一个实例中,本公开内容的方法可包括细胞,并且该细胞是CD4+细胞和幼稚细胞的混合物。

[0307] 幼稚细胞保留了对本文公开的方法可能特别有用的几种特性。例如,幼稚细胞能够容易地在体外扩充并进行T细胞受体转基因表达,幼稚细胞呈现出较少的终末分化标志物(一种可能与细胞输注后更高的功效相关的特性),并保留较长的端粒(暗示着更大的增殖潜能)(Hinrichs,C.S.等人,“Human effector CD8+T cells derived from naive rather than memory subsets possess superior traits for adoptive immunotherapy,”Blood,117(3):808-14(2011))。本文公开的方法可包括对幼稚细胞具有特异性的标志物的选择或阴性选择。在一些实施方案中,细胞可以是幼稚细胞。幼稚细胞通常可指未暴露于抗原的任何细胞。本公开内容中的任何细胞可以是幼稚细胞。在一个实例中,细胞可以是幼稚T细胞。幼稚T细胞通常可被描述为已在骨髓中分化并且成功经历了胸腺中的中心选择(central selection)的阳性和阴性过程,并且/或者可通过特定标志物的

表达或缺乏(例如,L-选择蛋白的表面表达,活化标志物CD25、CD44或CD69的缺乏以及记忆CD45RO同种型的缺乏)进行表征的细胞。

[0308] 在一些实施方案中,细胞可包括细胞系(例如,永生化细胞系)。细胞系的非限制性实例包括人BC-1细胞、人BJAB细胞、人IM-9细胞、人Jiyoye细胞、人K-562细胞、人LCL细胞、小鼠MPC-11细胞、人Raji细胞、人Ramos细胞、小鼠Ramos细胞、人RPMI8226细胞、人RS4-11细胞、人SKW6.4细胞、人树突细胞、小鼠P815细胞、小鼠RBL-2H3细胞、人HL-60细胞、人NAMALWA细胞、人巨噬细胞、小鼠RAW 264.7细胞、人KG-1细胞、小鼠M1细胞、人PBMC细胞、小鼠BW5147 (T200-A) 5.2细胞、人CCRF-CEM细胞、小鼠EL4细胞、人Jurkat细胞、人SCID.adh细胞、人U-937细胞或这些细胞的任意组合。

[0309] 干细胞可产生多种体细胞,并因此在原则上具有充当几乎任何类型治疗细胞的无限供应源的潜力。干细胞的可重编程性也允许进行额外的工程化,以增加重编程细胞的治疗价值。在本公开内容的任何方法中,一个或多个细胞可来源于干细胞。干细胞的非限制性实例包括胚胎干细胞、成体干细胞、组织特异性干细胞、神经干细胞、同种异体干细胞、全能干细胞、多能干细胞、多潜能干细胞、诱导多潜能干细胞、造血干细胞、表皮干细胞、脐带干细胞、上皮干细胞或脂肪来源的干细胞。在一个实例中,细胞可以是造血干细胞衍生的淋巴祖细胞。在另一个实例中,细胞可以是胚胎干细胞衍生的T细胞。在又一个实例中,细胞可以是诱导多潜能干细胞(iPSC)衍生的T细胞。

[0310] 条件敲除可以是可诱导的,例如通过使用四环素诱导型启动子、发育特异性启动子。这可允许在任何时间或在特定时间消除或抑制基因/蛋白质的表达。例如,在四环素诱导型启动子的情况下,可在出生后的任何时间将四环素给予T细胞。cre/lox系统也可受发育特异性启动子的控制。例如,一些启动子在出生后或者甚至在青春期开始后开启。这些启动子可用于控制cre表达,并因此可用于发育特异性敲除。

[0311] 还考虑,可以将敲除技术的任意组合进行组合。例如,组织特异性敲除或细胞特异性敲除可与诱导型技术相组合,从而产生组织特异性或细胞特异性诱导型敲除。此外,其他系统如发育特异性启动子可与组织特异性启动子和/或诱导型敲除组合使用。

[0312] 敲除技术还可包括基因编辑。例如,可以使用核酸酶(包括CRISPR相关蛋白(Cas蛋白,例如Cas9)、锌指核酸酶(ZFN)、转录激活因子样效应物核酸酶(TALEN)和大范围核酸酶)进行基因编辑。核酸酶可以是天然存在的核酸酶、遗传修饰和/或重组的核酸酶。还可使用基于转座子的系统(例如,PiggyBac、睡美人(Sleeping beauty))进行基因编辑。例如,可以使用转座酶进行基因编辑。

CRISPR系统

[0313] 本文所述的方法可利用CRISPR系统。存在至少五种类型的均合并RNA和Cas蛋白的CRISPR系统。I型、III型和IV型组装能够切割与crRNA互补的核酸的多Cas蛋白复合体。I型和III型均需要在将经加工的crRNA组装成多Cas蛋白复合体之前进行pre-crRNA加工。II型和V型CRISPR系统包含与至少一种指导RNA复合的单一Cas蛋白。

[0314] 在以下文献中讨论了CRISPR系统的一般机制和最新进展: Cong, L. 等人, "Multiplex genome engineering using CRISPR systems," Science, 339(6121): 819-823 (2013); Fu, Y. 等人, "High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells," Nature Biotechnology, 31, 822-826 (2013); Chu, VT 等人,

“Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells,”*Nature Biotechnology* 33,543-548 (2015); Shmakov, S. 等人, “Discovery and functional characterization of diverse Class 2 CRISPR-Cas systems,”*Molecular Cell*, 60, 1-13 (2015); Makarova, KS 等人, “An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems,”*Nature Reviews Microbiology*, 13, 1-15 (2015)。靶DNA的位点特异性切割发生在由以下两者决定的位置: 1) 指导RNA与靶DNA (也称为前间区序列) 之间的碱基配对互补性, 和2) 靶DNA中的短基序 (被称为前间区序列邻近基序) (PAM)。例如, 可使用CRISPR系统, 例如, II型CRISPR系统, 产生工程化细胞。本文公开的方法中所使用的Cas酶可以是催化DNA切割的Cas9。通过衍生自酿脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) 的Cas9或任何密切相关的Cas9进行的酶促作用可在靶位点序列处产生双链断裂, 该靶位点序列与指导序列的20个核苷酸杂交, 并且具有位于该靶序列的20个核苷酸之后的前间区序列邻近基序 (PAM)。

a. Cas蛋白

[0315] 载体可与编码CRISPR酶如Cas蛋白 (CRISPR相关蛋白) 的酶编码序列可操作地连接。Cas蛋白的非限制性实例可包括Cas1、Cas1B、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、Cas9 (也被称为Csn1或Csx12)、Cas10、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1、Cse2、Csc1、Csc2、Csa5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、CsaX、Csx3、Csx1、Csx1S、Csf1、Csf2、Cs0、Csf4、Cpf1、c2c1、c2c3、Cas9HiFi、其同源物或其修饰型。未修饰的CRISPR酶可具有DNA切割活性, 如Cas9。CRISPR酶可引导靶序列处, 如靶序列内和/或靶序列的互补序列内一条链或两条链的切割。例如, CRISPR酶可引导在距离靶序列的第一个或最后一个核苷酸1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、50、100、200、500个或更多个碱基对或者约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、50、100、200、500个或更多个碱基对内一条链或两条链的切割。可以使用编码CRISPR酶的载体, 该CRISPR酶相对于相应的野生型酶发生突变, 使得突变的CRISPR酶缺乏切割含有靶序列的靶多核苷酸的一条链或两条链的能力。Cas蛋白可以是高保真Cas蛋白, 如Cas9HiFi。

[0316] 可以使用编码包含一个或多个核定位序列 (NLS) (诸如多于或约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个NLS) 的CRISPR酶的载体。例如, CRISPR酶可包含在氨基末端或其附近的多于或多于约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个NLS, 在羧基末端或其附近的多于或多于约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个NLS, 或这些的任何组合 (例如, 在氨基末端的一个或多个NLS和在羧基末端的一个或多个NLS)。当存在多于一个NLS时, 每一个可独立于其他NLS而被选择, 使得单个NLS可存在于多于一个拷贝中并且/或者与一个或多个其他NLS组合存在于一个或多个拷贝中。

[0317] Cas9可指与野生型示例性Cas9多肽 (例如, 来自酿脓链球菌的Cas9) 具有至少或至少约50%、60%、70%、80%、90%、100%的序列同一性和/或序列相似性的多肽。Cas9可指与野生型示例性Cas9多肽 (例如, 来自酿脓链球菌) 具有至多或至多约50%、60%、70%、80%、90%、100%的序列同一性和/或序列相似性的多肽。Cas9可指可包含氨基酸改变如缺失、插入、置换、变体、突变、融合、嵌合或其任意组合的野生型或修饰形式的Cas9蛋白。

[0318] 可对编码内切核酸酶 (例如, Cas蛋白如Cas9) 的多核苷酸进行密码子优化以用于在特定细胞如真核细胞中的表达。这种类型的优化可能需要外部来源 (例如, 重组) DNA的突变, 以在编码相同蛋白质的同时模拟预期宿主生物体或细胞的密码子偏好。

[0319] 所述方法中使用的CRISPR酶可包含NLS。NLS可位于多肽链内的任何位置,例如,靠近N末端或C末端。例如,NLS可处于沿多肽链从N末端或C末端开始的1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、40、50个氨基酸或约1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、40、50个氨基酸内。有时,NLS可处于从N末端或C末端开始的50个氨基酸或更多个氨基酸或者约50个氨基酸或更多个氨基酸,例如,100、200、300、400、500、600、700、800、900或1000个氨基酸内。

[0320] 内切核酸酶可包含与野生型示例性位点定向多肽(例如,来自酿脓链球菌的Cas9)的核酸酶结构域具有至少或至少约50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或100%的氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0321] 虽然酿脓链球菌Cas9 (SpCas9) (表11) 通常用作CRISPR内切核酸酶以用于基因组工程,但它可能不是每个靶切除位点的最佳内切核酸酶。例如,SpCas9 (5'NGG 3') 的PAM序列在整个人类基因组中大量存在,但NGG序列可能无法正确定位以靶向所需基因用于修饰。在一些情况下,不同的内切核酸酶可用于靶向某些基因组靶标。在一些情况下,可以使用具有非NGG PAM序列的合成的SpCas9衍生变体。此外,已经鉴别了来自各种物种的其他Cas9直系同源物,并且这些“非SpCas9”结合也可用于本发明的多种PAM序列。例如,尺寸相对较大的SpCas9 (大约4kb编码序列) 意味着携带SpCas9cDNA的质粒可能无法在细胞中有效表达。相反,金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) Cas9 (SaCas9) 的编码序列比SpCas9短大约1千碱基,从而可能允许其在细胞中有效表达。与SpCas9类似,SaCas9内切核酸酶能够在体外修饰哺乳动物细胞中的靶基因以及在体内修饰小鼠中的靶基因。

[0322] 酿脓链球菌Cas9的替代物可包括在哺乳动物细胞中显示出切割活性的来自Cpf1家族的RNA指导的内切核酸酶。与Cas9核酸酶不同,Cpf1介导的DNA切割的结果为具有短3'突出端的双链断裂。Cpf1的交错切割模式可开启定向基因转移的可能性,类似于传统的限制酶克隆,这可提高基因编辑的效率。与上述Cas9变体和直系同源物一样,Cpf1也可扩大可由CRISPR靶向至富含AT的区域或富含AT的基因组(其缺乏SpCas9所偏好的NGG PAM位点)的位点数目。

[0323] 可将任何功能性浓度的Cas蛋白引入细胞中。例如,可将15微克的Cas mRNA引入细胞中。在其他情况下,可以引入0.5微克至100微克的Cas mRNA。可以引入0.5、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或100微克的Cas mRNA。

b. 指导RNA

[0324] 如本文所用的术语“指导RNA (gRNA)”及其语法等同项可指可对靶DNA具有特异性并且可与Cas蛋白形成复合体的RNA。指导RNA可包含指导序列或间隔序列,该序列指定靶位点并将RNA/Cas复合体引导至指定的靶DNA以供切割。例如,图15显示指导RNA可将CRISPR复合体靶向至三种基因并进行靶向双链断裂。靶DNA的位点特异性切割发生在由以下两者决定的位置:1) 指导RNA与靶DNA (也称为前间区序列) 之间的碱基配对互补性,和2) 靶DNA中的短基序(被称为前间区序列邻近基序) (PAM))。

[0325] 本文公开的方法还可包括向细胞或胚胎中引入至少一种指导RNA或核酸,例如,编码至少一种指导RNA的DNA。指导RNA可与RNA指导的内切核酸酶相互作用以将该内切核酸酶引导至特定的靶位点,在该位点处,指导RNA的5'端与染色体序列中的特异性前间区序列进行碱基配对。

[0326] 指导RNA可包括两种RNA,例如,CRISPR RNA (crRNA) 和反式激活crRNA (tracrRNA)。

指导RNA有时可包括通过crRNA和tracrRNA的一部分(例如,功能部分)融合而形成的单指导RNA(sgRNA)。指导RNA还可以是包含crRNA和tracrRNA的双重RNA。指导RNA可包含crRNA而缺乏tracrRNA。此外,crRNA可与靶DNA或前间区序列杂交。

[0327] 如上文所讨论的,指导RNA可以是表达产物。例如,编码指导RNA的DNA可以是包含编码指导RNA的序列的载体。可通过用分离的指导RNA或质粒DNA(其包含编码指导RNA的序列和启动子)转染细胞或生物体,将指导RNA转移到细胞或生物体中。还可以以其他方式,如使用病毒介导的基因递送将指导RNA转移到细胞或生物体中。

[0328] 可以分离指导RNA。例如,可以以分离的RNA的形式将指导RNA转染到细胞或生物体中。可通过使用任何体外转录系统的体外转录来制备指导RNA。可以以分离的RNA的形式而不是以包含指导RNA的编码序列的质粒形式将指导RNA转移到细胞中。

[0329] 指导RNA可包含DNA靶向区段和蛋白结合区段。DNA靶向区段(或DNA靶向序列或间隔序列)包含可与靶DNA内的特定序列(例如,前间区序列)互补的核苷酸序列。蛋白结合区段(或蛋白结合序列)可与位点定向修饰多肽,例如,RNA指导的内切核酸酶如Cas蛋白相互作用。“区段”意指分子的区段/部分/区域,例如,RNA中的连续核苷酸片段。区段也可意指复合体的区域/部分,使得区段可包含多于一种分子的区域。例如,在一些情况下,靶向DNA的RNA的蛋白结合区段是一种RNA分子,因此该蛋白结合区段包含该RNA分子的区域。在其他情况下,靶向DNA的RNA的蛋白结合区段包含沿互补区域杂交的两个独立的分子。

[0330] 指导RNA可包含两个独立的RNA分子或单个RNA分子。示例性单分子指导RNA包含DNA靶向区段和蛋白结合区段两者。

[0331] 示例性的靶向两分子DNA的RNA可包含crRNA样(“CRISPR RNA”或“靶向物-RNA”或“crRNA”或“crRNA重复序列”)分子和相应的tracrRNA样(“反式作用CRISPR RNA”或“激活因子-RNA”或“tracrRNA”)分子。第一RNA分子可以是可包含DNA靶向区段(例如,间隔区)和一段核苷酸的crRNA样分子(靶向物-RNA),该段核苷酸可形成包含指导RNA的蛋白结合区段的双链RNA(dsRNA)双链体的一半。第二RNA分子可以是可包含一段核苷酸的相应的tracrRNA样分子(激活因子-RNA),该段核苷酸可形成指导RNA的蛋白结合区段的dsRNA双链体的另一半。换言之,crRNA样分子的一段核苷酸可与tracrRNA样分子的一段核苷酸互补并杂交,以形成指导RNA的蛋白结合域的dsRNA双链体。如此,可以说每个crRNA样分子都具有相应的tracrRNA样分子。crRNA样分子可额外提供单链DNA靶向区段或间隔序列。因此,crRNA样分子和tracrRNA样分子(作为相应的配对)可杂交形成指导RNA。主题两分子指导RNA可包含任何相应的crRNA和tracrRNA对。

[0332] 指导RNA的DNA靶向区段或间隔序列可与染色体序列中靶位点处的序列(例如,前间区序列)互补,使得指导RNA的DNA靶向区段可与该靶位点或前间区序列进行碱基配对。在一些情况下,指导RNA的DNA靶向区段可包含或包含约10个核苷酸至或至约25个核苷酸或更多个核苷酸。例如,指导RNA的第一区域与染色体序列中的靶位点之间的碱基配对区域可以为或可以为约10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、22、23、24、25个或多于25个核苷酸的长度。有时,指导RNA的第一区域可以为或可以为约19、20或21个核苷酸的长度。

[0333] 指导RNA可靶向20个核苷酸或约20个核苷酸的核酸序列。靶核酸可少于或少于约20个核苷酸。靶核酸可以是至少或至少约5、10、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30个或更多个核苷酸。靶核酸可以是至多或至多约5、10、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、

30个或更多个核苷酸。靶核酸序列可以是紧邻PAM的第一个核苷酸的5'的20个碱基或约20个碱基。指导RNA可靶向核酸序列。

[0334] 指导核酸,例如,指导RNA可指可与另一核酸(例如,细胞基因组中的靶核酸或前间区序列)杂交的核酸。指导核酸可以是RNA。指导核酸可以是DNA。指导核酸可被编程为或设计成以位点特异性方式与核酸序列结合。指导核酸可包含一条多核苷酸链,并且可被称为单指导核酸。指导核酸可包含两条多核苷酸链,并且可被称为双指导核酸。

[0335] 指导核酸可包含一种或多种修饰,从而为核酸提供新的或增强的特征。指导核酸可包含核酸亲和标签。指导核酸可包含合成的核苷酸、合成的核苷酸类似物、核苷酸衍生物和/或修饰的核苷酸。

[0336] 指导核酸可包含可与靶核酸中的序列(例如,前间区序列)杂交、例如位于5'端或3'端或其附近的核苷酸序列(例如,间隔区)。指导核酸的间隔区可通过杂交(即碱基配对)以序列特异性方式与靶核酸相互作用。间隔序列可与位于前间区序列邻近基序(PAM)的5'或3'侧的靶核酸杂交。间隔序列的长度可以是至少或至少约5、10、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30个或更多个核苷酸。间隔序列的长度可以是至多或至多约5、10、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30个或更多个核苷酸。

[0337] 指导RNA还可包含形成二级结构的dsRNA双链体区域。例如,由指导RNA形成的二级结构可包括茎(或发夹)和环。环和茎的长度可以变化。例如,环可以在约3至约10个核苷酸长度的范围内,而茎可以在约6至约20个碱基对长度的范围内。茎可包含一个或多个1至约10个核苷酸的凸起。第二区域的总长度可以在约16至约60个核苷酸长度的范围内。例如,环可以为或可以为约4个核苷酸的长度,而茎可以为或可以为约12个碱基对。dsRNA双链体区域可包含可与RNA结合蛋白如RNA指导的内切核酸酶,例如Cas蛋白形成复合体的蛋白结合区段。

[0338] 指导RNA还可包含可以是基本上单链、位于5'或3'端的尾区。例如,尾区有时不与感兴趣的细胞中的任何染色体序列互补,并且有时不与指导RNA的其余部分互补。此外,尾区的长度可以变化。尾区可以为多于或多于约4个核苷酸的长度。例如,尾区的长度可以在或在约5至或至约60个核苷酸长度的范围内。

[0339] 指导RNA可作为RNA分子而引入细胞或胚胎中。例如,RNA分子可在体外转录并且/或者可以化学合成。然后指导RNA可作为RNA分子引入细胞或胚胎中。指导RNA也可以以非RNA核酸分子,例如DNA分子的形式引入细胞或胚胎中。例如,编码指导RNA的DNA可以与启动子控制序列可操作地连接,以用于在感兴趣的细胞或胚胎中表达指导RNA。RNA编码序列可以与被RNA聚合酶III(Pol III)识别的启动子序列可操作地连接。

[0340] 编码指导RNA的DNA分子还可以是线性的。编码指导RNA的DNA分子还可以是环形的。

[0341] 编码指导RNA的DNA序列也可以是载体的一部分。载体的一些实例可包括质粒载体、噬菌粒、粘粒、人工/微型染色体、转座子和病毒载体。例如,编码RNA指导的内切核酸酶的DNA存在于质粒载体中。合适的质粒载体的其他非限制性实例包括pUC、pBR322、pET、pBluescript及其变体。此外,载体可包含另外的表达控制序列(例如,增强子序列、Kozak序列、聚腺苷酸化序列、转录终止序列等)、选择性标记序列(例如,抗生素抗性基因)、复制起点等。

[0342] 当RNA指导的内切核酸酶和指导RNA两者均作为DNA分子被引入细胞中时,每一种可以是不同分子的一部分(例如,含有融合蛋白编码序列的一个载体和含有指导RNA编码序列的第二载体),或两者可以是相同分子的一部分(例如,含有融合蛋白和指导RNA两者的编码(和调控)序列的一个载体)。

[0343] Cas蛋白如Cas9蛋白或其任何衍生物可与指导RNA预先复合,以形成核糖核蛋白(RNP)复合体。RNP复合体可引入原代免疫细胞中。可以定时引入RNP复合体。可在细胞周期的G1、S和/或M期使细胞与其他细胞同步。可在细胞阶段递送RNP复合体,使HDR得以增强。RNP复合体可促进同源性指导的修复。

[0344] 还可对指导RNA进行修饰。该修饰可包括化学改变、合成修饰、核苷酸添加和/或核苷酸减少。该修饰还可增强CRISPR基因组工程。修饰可改变gRNA的手性。在一些情况下,手性在修饰后可以是一致的或立体纯的(stereopure)。可以合成指导RNA。合成的指导RNA可增强CRISPR基因组工程。还可将指导RNA截短。截短可用于减少不期望的脱靶(off-target)诱变。截短可包含任何数目的核苷酸缺失。例如,截短可包括1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、40、50个或更多个核苷酸。指导RNA可包含任何长度的靶互补性区域。例如,靶互补性区域可以为少于20个核苷酸的长度。靶互补性区域可以为多于20个核苷酸的长度。

[0345] 在一些情况下,双切口酶方法可用于引入双链断裂。Cas蛋白可在核酸酶结构域内的已知氨基酸处突变,从而删除一个核酸酶结构域的活性并生成能够产生单链断裂的切口酶Cas蛋白。切口酶连同靶向相反链的两种不同的指导RNA可用于在靶位点内产生DSB(通常称为“双切口”或“双切口酶”CRISPR系统)。这种方法可显著增加靶标特异性,因为不太可能会在接近到足以引起DSB的距离内产生两个脱靶切口。

[0346] 在一些情况下,可以进行GUIDE-Seq分析以确定工程化指导RNA的特异性。在Tsai, S.等人,“GUIDE-Seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR system nucleases,”Nature,33:187-197(2015)中讨论了通过CRISPR系统核酸酶进行的脱靶切割的GUIDE-Seq谱分析的一般机制和方案。

[0347] 可以以任何功能性浓度引入gRNA。例如,可以向细胞引入10微克gRNA。在其他情况下,可以引入0.5微克至100微克的gRNA。可以引入0.5、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或100微克的gRNA。

[0348] 在一些情况下,方法可包括选自Cas1、Cas1B、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、Cas9、Cas10、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1、Cse2、Cse1、Cse2、Csa5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、CsaX、Csx3、Csx1、Csx1S、Csf1、Csf2、Cs0、Csf4、Cpf1、c2c1、c2c3、Cas9HiFi、其同源物或其修饰型的内切核酸酶。Cas蛋白可以是Cas9。在一些情况下,方法可进一步包括至少一种指导RNA(gRNA)。gRNA可包含至少一种修饰。外源TCR可结合癌症新抗原。

[0349] 本文公开了一种制备工程化细胞的方法,该方法包括:引入编码至少一种外源T细胞受体(TCR)序列的至少一种多核酸;引入包含至少一种修饰的至少一种指导RNA(gRNA);以及引入至少一种内切核酸酶;其中所述gRNA包含与至少一个内源基因组互补的至少一种序列。在一些情况下,修饰在5'端、3'端、5'端至3'端,为单碱基修饰、2'-核糖修饰或其任意组合。修饰可选自碱基置换、插入、缺失、化学修饰、物理修饰、稳定化、纯化及其任意组合。

[0350] 在一些情况下,修饰为化学修饰。修饰可选自5'腺苷酸、5'鸟苷-三磷酸帽、5'N7-

甲基鸟苷-三磷酸帽、5' 三磷酸帽、3' 磷酸、3' 硫代磷酸、5' 磷酸、5' 硫代磷酸、Cis-Syn型胸苷二聚体、三聚体、C12间隔区、C3间隔区、C6间隔区、d间隔区、PC间隔区、r间隔区、间隔区18、间隔区9、3' -3' 修饰、5' -5' 修饰、脱碱基、吡啶、偶氮苯、生物素、生物素BB、生物素TEG、胆固醇TEG、脱硫生物素TEG、DNP TEG、DNP-X、DOTA、dT-生物素、双生物素、PC生物素、补骨脂素C2、补骨脂素C6、TINA、3' DABCYL、黑洞猝灭剂1、黑洞猝灭剂2、DABCYL SE、dT-DABCYL、IRDye QC-1、QSY-21、QSY-35、QSY-7、QSY-9、羧基接头、硫醇接头、2' 脱氧核糖核苷类似物嘌呤、2' 脱氧核糖核苷类似物嘧啶、核糖核苷类似物、2' -O-甲基核糖核苷类似物、糖修饰的类似物、摆动性/通用碱基、荧光染料标记、2' 氟代RNA、2' O-甲基RNA、甲基磷酸酯、磷酸二酯DNA、磷酸二酯RNA、硫代磷酸酯DNA、硫代磷酸酯RNA、UNA、假尿苷-5' -三磷酸、5-甲基胞苷-5' -三磷酸、3硫代磷酸2-O-甲酯或其任意组合。修饰可以是如图98中所示的假尿苷(pseudouride)修饰。在一些情况下,修饰可以不影响活力(图99A和图99B)。

[0351] 在一些情况下,修饰为3硫代磷酸2-O-甲酯添加。可对1个碱基至150个碱基进行3硫代磷酸2-O-甲酯添加。可对1个碱基至4个碱基进行3硫代磷酸2-O-甲酯添加。可对2个碱基进行3硫代磷酸2-O-甲酯添加。可对4个碱基进行3硫代磷酸2-O-甲酯添加。修饰也可以是截短。截短可以是5个碱基的截短。

[0352] 在一些情况下,5个碱基的截短可防止Cas蛋白进行切割。内切核酸酶可选自CRISPR系统、TALEN、锌指、基于转座子、ZEN、大范围核酸酶、Mega-TAL和任意组合。内切核酸酶可以是Cas内切核酸酶。Cas内切核酸酶可选自Cas1、Cas1B、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、Cas9、Cas10、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1、Cse2、Csc1、Csc2、Csa5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、CsaX、Csx3、Csx1、Csx1S、Csf1、Csf2、Cs0、Csf4、Cpf1、c2c1、c2c3、Cas9HiFi、其同源物或其修饰型。如图100A和图100B中所示,Cas的修饰型可以是洁净的cas(clean cas)。Cas蛋白可以是Cas9。Cas9可在所述至少一种内源基因组中产生双链断裂。在一些情况下,内源基因组包含至少一个基因。基因可以是CISH、PD-1、TRA、TRB或其组合。在一些情况下,可以使用同源性指导的修复(HR)、非同源末端连接(NHEJ)、微同源性介导的末端连接(MMEJ)或其任意组合或衍生方法来修复双链断裂。TCR可整合到双链断裂中。

c. 转基因

[0353] 转基因(例如,外源序列)的插入可用于例如多肽的表达、突变基因的校正或用于增加野生型基因的表达。转基因通常与其所在的基因组序列不同。供体转基因可含有侧翼为两个同源区域的非同源序列,以允许在感兴趣的位置处进行有效的HDR。此外,转基因序列可包含载体分子,该载体分子含有与细胞染色质中的感兴趣区域不同源的序列。转基因可含有与细胞染色质同源的数个不连续区域。例如,对于通常不存在于感兴趣区域中的序列的靶向插入,序列可存在于供体核酸分子中并且侧翼为与感兴趣区域中的序列同源的区域。

[0354] 转基因多核酸可以是单链或双链的DNA或RNA,并且可以以线性或环状形式引入细胞中。转基因序列可包含在DNA微环内,其可以以环状或线性形式引入细胞中。如果以线性形式引入,则可通过任何方法来保护转基因序列的末端(例如,保护免受核酸外切降解)。例如,可将一个或多个双脱氧核苷酸残基添加至线性分子的3'末端,和/或可将自身互补的寡核苷酸连接至一个或两个末端。用于保护外源多核苷酸免受降解的其他方法包括但不限于

添加末端氨基基团和使用修饰的核苷酸间连键,例如,硫代磷酸酯、氨基磷酸酯和O-甲基核糖或脱氧核糖残基。

[0355] 转基因的侧翼可以是重组臂。在一些情况下,重组臂可包含将转基因靶向至期望整合位点的互补区域。转基因也可整合到基因组区域中,使得插入破坏内源基因。可通过任何方法,例如,非重组末端连接和/或重组定向修复来整合转基因。还可在修复双链断裂的重组事件期间整合转基因。还可使用同源重组增强子整合转基因。例如,增强子可阻断非同源末端连接,使得进行同源性指导的修复以修复双链断裂。

[0356] 转基因的侧翼可以是重组臂,其中臂与其互补序列之间的同源性程度足以允许两者之间的同源重组。例如,臂与其互补序列之间的同源性程度可以为50%或更高。两个同源的不相同序列可以是任何长度,并且其非同源性程度可小到单个核苷酸(例如,用于通过靶向同源重组来校正基因组点突变)或大到10个或更多个千碱基(例如,用于在染色体中的预定异常位点处插入基因)。包含同源不相同序列的两个多核苷酸无需为相同的长度。例如,具有CCR5的重组臂的代表性转基因在图16中示出。任何其他基因,例如,本文所述的基因可用于产生重组臂。

[0357] 转基因的侧翼可以是与基因组中的靶向双链断裂区互补的工程化位点。在一些情况下,工程化位点不是重组臂。工程化位点可与双链断裂区具有同源性。工程化位点可与基因具有同源性。工程化位点可与编码基因组区域具有同源性。工程化位点可与非编码基因组区域具有同源性。在一些情况下,可从多核酸切除转基因,以便可在不进行同源重组的情况下将该转基因插入双链断裂区。转基因可在不进行同源重组的情况下整合到双链断裂中。

[0358] 多核苷酸可引入细胞中,作为具有附加序列例如复制起点、启动子和编码抗生素抗性的基因的载体分子的一部分。此外,转基因多核苷酸可作为裸核酸、作为与药剂如脂质体或泊洛沙姆复合的核酸引入,或者可通过病毒(例如,腺病毒、AAV、疱疹病毒、逆转录病毒、慢病毒和整合酶缺陷型慢病毒(IDLV))进行递送。可递送转基因的病毒可以是AAV病毒。

[0359] 通常插入转基因以使其表达由整合位点处的内源启动子,即驱动插入转基因的内源基因(例如,AAVS SITE(例如,AAVS1、AAVS2等)、CCR5、HPRT))的表达的启动子所驱动。转基因可包含启动子和/或增强子,例如组成型启动子或诱导型或组织/细胞特异性启动子。微环载体可编码转基因。

[0360] 还可实现非编码核酸序列的靶向插入。编码反义RNA、RNAi、shRNA和微小RNA(miRNA)的序列也可用于靶向插入。

[0361] 转基因可插入内源基因中,使得全部、部分或无内源基因得以表达。例如,如本文所述的转基因可插入内源基因座中,使得部分内源序列(转基因的N末端和/或C末端)或无内源序列例如作为与转基因的融合物得以表达。在其他情况下,转基因(例如,具有或不具有诸如内源基因的其他编码序列)整合到任何内源基因座,例如安全港基因座中。例如,TCR转基因可插入内源TCR基因中。例如,图17显示,转基因可插入内源CCR5基因中。转基因可插入任何基因,例如,如本文所述的基因中。

[0362] 当内源序列(内源或部分转基因)与转基因一起表达时,该内源序列可以是全长序列(野生型或突变型)或部分序列。内源序列可以是功能性的。这些全长或部分序列的功能的非限制性实例包括增加由转基因(例如,治疗性基因)表达的多肽的血清半衰期和/或充

当载体。

[0363] 此外,虽然不要求表达,但外源序列还可包括转录或翻译调控序列,例如,启动子、增强子、绝缘子、内部核糖体进入位点、编码2A肽的序列和/或聚腺苷酸化信号序列。

[0364] 在一些情况下,外源序列(例如,转基因)包含感兴趣的蛋白质和作为其融合配偶体的膜蛋白胞外结构域的融合物,从而导致融合蛋白位于细胞的表面。在一些情况下,转基因编码TCR,其中TCR编码序列插入安全港中,使得TCR得以表达。在一些情况下,TCR编码序列插入PD1和/或CTLA-4基因座中。在其他情况下,TCR以慢病毒的形式递送至细胞用于随机插入,而PD1或CTLA-4特异性核酸酶可以以mRNA的形式提供。在一些情况下,通过病毒载体系统如逆转录病毒、AAV或腺病毒连同编码安全港(例如AAVS SITE(例如,AAVS1、AAVS2等)、CCR5、白蛋白或HPRT)特异性核酸酶的mRNA来递送TCR。还可使用编码PD1和/或CTLA-4特异性核酸酶的mRNA处理细胞。在一些情况下,通过病毒递送系统与编码HPRT特异性核酸酶和PD1或CTLA-4特异性核酸酶的mRNA一起来提供编码TCR的多核苷酸。可以使用6-硫代鸟嘌呤(即可导致细胞停滞和/或在具有完整HPRT基因的细胞中引发凋亡的鸟嘌呤类似物)选择在HPRT基因座处包含整合的编码TCR的核苷酸的细胞。可与本发明的方法和组合物一起使用的TCR包括这些嵌合蛋白的所有类型,包括第一代、第二代和第三代设计。包含衍生自抗体的特异性结构域的TCR可能是特别有用的,但本发明也可设想衍生自受体、配体和工程化多肽的特异性结构域。细胞间信号传导结构域可衍生自TCR链如 ζ 链以及CD3复合体的其他成员如 γ 和E链。在一些情况下,TCR可包含额外的共刺激结构域,如来自CD28、CD137(也称为4-1BB)或CD134的细胞间结构域。在又一些情况下,可同时使用两种类型的共刺激结构域(例如,CD3 ζ 与CD28+CD137一起使用)。

[0365] 在一些情况下,工程化细胞可以是由CD45RO(-)、CCR7(+)、CD45RA(+)、CD62L+(L-选择蛋白)、CD27+、CD28+和IL-7R α +组成的干细胞样记忆(stem memory) T_{SCM}细胞,干细胞样记忆细胞还可表达CD95、IL-2R β 、CXCR3和LFA-1,并显示出许多与干细胞样记忆细胞不同的功能属性。工程化细胞还可以是包含L-选择蛋白和CCR7的中央记忆T_{CM}细胞,其中该中央记忆细胞可分泌例如IL-2但不分泌IFN γ 或IL-4。工程化细胞还可以是包含L-选择蛋白或CCR7的效应记忆T_{EM}细胞,并产生例如效应细胞因子如IFN γ 和IL-4。在一些情况下,细胞群体可引入受试者中。例如,细胞群体可以是T细胞和NK细胞的组合。在其他情况下,群体可以是幼稚细胞和效应细胞的组合。

同源重组HR增强子的递送

[0366] 在一些情况下,同源重组HR增强子可用于抑制非同源末端连接(NHEJ)。非同源末端连接可导致双链断裂末端处的核苷酸的丢失;非同源末端连接还可导致移码。因此,同源性指导的修复可以是在敲入基因时使用的更具吸引力的机制。为了抑制非同源末端连接,可递送HR增强子。在一些情况下,可递送多于一种HR增强子。HR增强子可抑制参与非同源末端连接的蛋白质,例如,KU70、KU80和/或DNA连接酶IV。在一些情况下,可递送连接酶IV抑制剂,如Scr7。在一些情况下,HR增强子可以是L755507。在一些情况下,可以使用不同的连接酶IV抑制剂。在一些情况下,HR增强子可以是腺病毒4蛋白,例如,E1B55K和/或E4orf6。在一些情况下,可以使用化学抑制剂。

[0367] 可通过使用多种方法来抑制非同源末端连接分子,如KU70、KU80和/或DNA连接酶IV。例如,可通过基因沉默来抑制非同源末端连接分子,如KU70、KU80和/或DNA连接酶IV。例

如,可在因子的转录或翻译期间通过基因沉默来抑制非同源末端连接分子KU70、KU80和/或DNA连接酶IV。还可通过因子的降解来抑制非同源末端连接分子KU70、KU80和/或DNA连接酶IV。还可抑制非同源末端连接分子KU70、KU80和/或DNA连接酶IV。KU70、KU80和/或DNA连接酶IV的抑制剂可包括E1B55K和/或E4orf6。还可通过隔离来抑制非同源末端连接分子KU70、KU80和/或DNA连接酶IV。可通过敲除、改变基因的启动子,和/或通过施用针对该因子的干扰RNA来抑制基因表达。

[0368] 抑制非同源末端连接的HR增强子可与质粒DNA一起递送。有时,质粒可以是双链DNA分子。质粒分子还可以是单链DNA。质粒还可携带至少一种基因。质粒还可携带多于一种基因。还可使用至少一种质粒。还可使用多于一种质粒。抑制非同源末端连接的HR增强子可与质粒DNA,连同CRISPR-Cas、引物和/或修饰剂化合物一起递送。修饰剂化合物可降低质粒DNA的细胞毒性并改善细胞活力。可在基因组工程之前将HR增强子和修饰剂化合物引入细胞中。HR增强子可以是小分子。在一些情况下,HR增强子可递送至T细胞悬浮液。HR增强子可改善转染有双链DNA的细胞的活力。在一些情况下,双链DNA的引入可以是有毒的(图81A和图81B)。

[0369] 抑制非同源末端连接的HR增强子可与待整合的HR底物一起递送。底物可以是多核酸。多核酸可包含TCR转基因。多核酸可作为mRNA进行递送(参见图10和图14)。多核酸可包含基因组内源区域的重组臂,用于TCR转基因的整合。多核酸可以是载体。载体可以以有义或反义方向插入另一载体(例如,病毒载体)中。在病毒基因组的5' LTR区上游,可以放置T7、T3或其他转录起始序列以用于病毒盒的体外转录(参见图3)。该载体盒随后可用作mRNA体外转录的模板。例如,当该mRNA被递送至具有其同源逆转录酶(也作为mRNA或蛋白质进行递送)的任何细胞时,则单链mRNA盒可用作模板以产生双链DNA(dsDNA)形式的数百至数千个拷贝,该dsDNA可用作期望的同源重组事件的HR底物,以在基因组中的预期靶位点处整合转基因盒。该方法可规避递送用于CRISPR介导的同源重组的毒性质粒DNA的需求。此外,由于每个mRNA模板可制成数百或数千个dsDNA拷贝,因此细胞内可获得的同源重组模板的量可以非常高。大量的同源重组模板可驱动期望的同源重组事件。此外,mRNA还可产生单链DNA。单链DNA也可例如利用重组AAV(rAAV)基因靶向而用作同源重组的模板。mRNA可在原位逆转录成DNA同源重组HR增强子。该策略可避免质粒DNA的毒性递送。此外,mRNA可将同源重组底物扩增至比质粒DNA更高的水平和/或可提高同源重组的效率。

[0370] 抑制非同源末端连接的HR增强子可作为化学抑制剂进行递送。例如,HR增强子可通过干扰连接酶IV-DNA结合而起作用。HR增强子还可激活内在的凋亡途径。HR增强子还可以是连接酶IV抑制剂的肽模拟物。HR增强子还可与Cas9系统共表达。HR增强子还可与病毒蛋白如E1B55K和/或E4orf6共表达。HR增强子还可以是SCR7、L755507或其任何衍生物。HR增强子可与降低外源DNA插入的毒性的化合物一起递送。

[0371] 如果在细胞中仅发生单链DNA的强效逆转录,则可引入编码病毒载体的有义链和反义链两者的mRNA(参见图3)。在这种情况下,两条mRNA链均可在细胞内逆转录和/或天然退火以产生dsDNA。

[0372] HR增强子可递送至原代细胞。可通过任何合适的方式递送同源重组HR增强子。同源重组HR增强子还可作为mRNA进行递送。同源重组HR增强子还可作为质粒DNA进行递送。同源重组HR增强子还可连同CRISPR-Cas一起递送至免疫细胞。同源重组HR增强子还可连同

CRISPR-Cas、包含TCR序列的多核酸和/或降低外源DNA插入的毒性的化合物一起递送至免疫细胞。

[0373] 同源重组HR增强子可递送至任何细胞,例如,免疫细胞。例如,同源重组HR增强子可递送至原代免疫细胞。同源重组HR增强子还可递送至T细胞,包括但不限于T细胞系和原代T细胞。同源重组HR增强子还可递送至CD4⁺细胞、CD8⁺细胞和/或肿瘤浸润性细胞(TIL)。同源重组HR增强子还可连同CRISPR-Cas一起递送至免疫细胞。

[0374] 在一些情况下,同源重组HR增强子可用于抑制非同源末端连接。在一些情况下,同源重组HR增强子可用于促进同源性指导的修复。在一些情况下,同源重组HR增强子可用于促进CRISPR-Cas双链断裂后的同源性指导的修复。在一些情况下,同源重组HR增强子可用于促进CRISPR-Cas双链断裂后的同源性指导的修复以及多种基因中的一种的敲入和敲除。敲入的基因可以是TCR。敲除的基因也可以是任何数目的内源检查点基因。例如,内源检查点基因可选自A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、CTLA-4、IDO、KIR、LAG3、PD-1、TIM-3、VISTA、AAVS SITE (例如AAVS1、AAVS2等)、CCR5、HPRT、PPP1R12C或CISH。在一些情况下,该基因可以是PD-1。在一些情况下,该基因可以是内源TCT。在一些情况下,该基因可包含编码区。在一些情况下,该基因可包含非编码区。

[0375] 采用HR增强子获得的HR效率的增加可以为或可以为约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。

[0376] 采用HR增强子获得的NHEJ的降低可以为或可以为约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。

细胞的低毒性工程化

[0377] 可以减轻对外源多核酸的细胞毒性以改善包括T细胞在内的细胞的工程化。例如,可通过改变对多核酸的细胞应答来降低细胞毒性。

[0378] 多核酸可接触细胞。然后可将多核酸引入细胞中。在一些情况下,多核酸用来改变细胞的基因组。多核酸插入后,细胞可死亡。例如,多核酸的插入可引起如图18中所示的细胞凋亡。可通过使用修饰剂化合物来降低由多核酸诱导的毒性。例如,修饰剂化合物可破坏细胞的免疫传感应答。修饰剂化合物还可减少细胞凋亡和细胞焦亡。视情况而定,修饰剂化合物可以是激活剂或抑制剂。修饰剂化合物可作用于图19中所示的途径的任何组分。例如,修饰剂化合物可作用于胱天蛋白酶-1、TBK1、IRF3、STING、DDX41、DNA-PK、DAI、IFI16、MRE11、cGAS、2' 3' -cGAMP、TREX1、AIM2、ASC或其任意组合。修饰剂化合物还可作用于先天信号传导系统,因此,其可以是先天信号传导修饰剂。

[0379] 可通过使化合物与细胞接触来降低对外源多核酸的毒性。在一些情况下,可在与多核酸接触之前用化合物对细胞进行预处理。在一些情况下,化合物和多核酸同时引入细胞中。在一些情况下,化合物可作为包含多核酸、HR增强子和/或CRISPR-Cas的混合物而被引入。

[0380] 可在本文所述的方法和组合物中使用的化合物可具有以下特征中的一种或多种并且可具有本文所述的一种或多种功能。尽管其具有一种或多种功能,但本文所述的化合物可降低外源多核苷酸的毒性。例如,化合物可调节由外源引入的多核酸而导致毒性的途径。在一些情况下,多核酸可以是DNA。多核酸还可以是RNA。多核酸可以是单链。多核酸还可以是双链。多核酸可以是载体。多核酸还可以是裸多核酸。多核酸可编码蛋白质。多核酸还

可具有任何数目的修饰。多核酸修饰可以是去甲基化、CpG甲基化的添加、细菌甲基化的去除和/或哺乳动物甲基化的添加。多核酸还可作为包含额外的多核酸、任何数目的HR增强子和/或CRISPR-Cas的试剂混合物而引入细胞中。多核酸还可包含转基因。多核酸可包含作为TCR序列的转基因。

[0381] 化合物还可调节参与启动对外源DNA的毒性的途径。途径可含有任何数目的因子。例如,因子可包括DNA依赖性IFN调节因子激活因子(DAI)、IFN诱导蛋白16(IFI16)、DEAD盒多肽41(DDX41)、黑素瘤缺乏因子2(AIM2)、DNA依赖性蛋白激酶、环鸟苷单磷酸-腺苷单磷酸合酶(cGAS)、IFN基因刺激因子(STING)、TANK结合激酶(TBK1)、白介素-1 β (IL-1 β)、MRE11、减数分裂重组11、Trex1、天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(胱天蛋白酶-1)、三种主要修复外切核酸酶、DNA依赖性IRF激活因子(DAI)、IFI16、DDX41、DNA依赖性蛋白激酶(DNA-PK)、减数分裂重组11同源物A(MRE11)和IFN调节因子(IRF)3和7和/或其任何衍生物。

[0382] 在一些情况下,DNA传感途径通常可指任何细胞信号传导途径,其包含参与细胞内核酸和一些情况下的外源核酸的检测的一种或多种蛋白质(例如,DNA传感蛋白)。在一些情况下,DNA传感途径可包含干扰素刺激因子(STING)。在一些情况下,DNA传感途径可包含DNA依赖性IFN调节因子激活因子(DAI)。DNA传感蛋白的非限制性实例包括三种主要修复外切核酸酶1(TREX1)、DEAD盒解旋酶41(DDX41)、DNA依赖性IFN调节因子激活因子(DAI)、Z-DNA结合蛋白1(ZBP1)、干扰素 γ 诱导蛋白16(IFI16)、富含亮氨酸重复序列(In FLII)相互作用蛋白1(LRRFIP1)、DEAH盒解旋酶9(DHX9)、DEAH盒解旋酶36(DHX36)、Lupus Ku自身抗原蛋白p70(Ku70)、中国仓鼠细胞中的X射线修复互补缺陷修复蛋白6(XRCC6)、干扰素基因刺激因子(STING)、跨膜蛋白173(TMEM173)、含有三重基序的32(TRIM32)、含有三重基序的56(TRIM56)、 β -连环蛋白(CTNNB1)、髓性分化原发反应蛋白88(MyD88)、黑素瘤缺乏因子2(AIM2)、含有CARD的凋亡相关斑点样蛋白(ASC)、胱天蛋白酶-1前体(pro-CASP1)、胱天蛋白酶-1(CASP1)、白介素1 β 前体(pro-IL-1 β)、白介素18前体(pro-IL-18)、白介素1 β (IL-1 β)、白介素18(IL-18)、干扰素调节因子1(IRF1)、干扰素调节因子3(IRF3)、干扰素调节因子7(IRF7)、干扰素刺激反应元件7(ISRE7)、干扰素刺激反应元件1/7(ISRE1/7)、核因子 κ B(NF- κ B)、RNA聚合酶III(RNA Pol III)、黑素瘤分化相关蛋白5(MDA-5)、遗传和生理学实验室蛋白2(LGP2)、视黄酸诱导基因1(RIG-I)、线粒体抗病毒信号传导蛋白(IPS-1)、TNF受体相关因子3(TRAF3)、TRAF家族成员相关NFKB激活因子(TANK)、核小体组装蛋白1(NAP1)、TANK结合激酶1(TBK1)、自噬相关蛋白9A(Atg9a)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、干扰素 λ -1(IFN λ 1)、环状GMP-AMP合酶(cGAS)、AMP、GMP、环状GMP-AMP(cGAMP)、其蛋白质的磷酸化形式或其任意组合或衍生物。在DNA传感途径的一个实例中,DAI激活IRF和NF- κ B转录因子,从而导致产生I型干扰素和其他细胞因子。在DNA传感途径的另一个实例中,一旦感应到外源细胞内DNA,AIM2即触发炎性体的组装,最终导致白介素成熟和细胞焦亡。在DNA传感途径的又一个实例中,RNA Pol III可将外源DNA转变为RNA以便由RNA传感器RIG-I识别。

[0383] 在一些方面,本公开内容的方法包括向一个或多个细胞中引入包含编码至少一种抗DNA传感蛋白的第一转基因的核酸。

[0384] 抗DNA传感蛋白通常可指改变对应于DNA传感途径的蛋白质(例如,DNA传感蛋白)的活性或表达水平的任何蛋白质。在一些情况下,抗DNA传感蛋白可降解(例如,降低总蛋白水平)一种或多种DNA传感蛋白。在一些情况下,抗DNA传感蛋白可完全抑制一种或多种DNA

传感蛋白。在一些情况下,抗DNA传感蛋白可部分抑制一种或多种DNA传感蛋白。在一些情况下,抗DNA传感蛋白可将至少一种DNA传感蛋白的活性抑制至少约95%、至少约90%、至少约85%、至少约80%、至少约75%、至少约70%、至少约65%、至少约60%、至少约55%、至少约50%、至少约45%、至少约40%、至少约35%、至少约30%、至少约25%、至少约20%、至少约15%、至少约10%或至少约5%。在一些情况下,抗DNA传感蛋白可将至少一种DNA传感蛋白的量减少至少约95%、至少约90%、至少约85%、至少约80%、至少约75%、至少约70%、至少约65%、至少约60%、至少约55%、至少约50%、至少约45%、至少约40%、至少约35%、至少约30%、至少约25%、至少约20%、至少约15%、至少约10%或至少约5%。

[0385] 可通过在基因组工程化程序期间引入病毒蛋白来增加细胞活力,这可抑制细胞检测外源DNA的能力。在一些情况下,抗DNA传感蛋白可促进一种或多种DNA传感蛋白的翻译(例如,增加总蛋白水平)。在一些情况下,抗DNA传感蛋白可保护或增加一种或多种DNA传感蛋白的活性。在一些情况下,抗DNA传感蛋白可将至少一种DNA传感蛋白的活性增加至少约95%、至少约90%、至少约85%、至少约80%、至少约75%、至少约70%、至少约65%、至少约60%、至少约55%、至少约50%、至少约45%、至少约40%、至少约35%、至少约30%、至少约25%、至少约20%、至少约15%、至少约10%或至少约5%。在一些情况下,抗DNA传感蛋白可将至少一种DNA传感蛋白的量增加至少约95%、至少约90%、至少约85%、至少约80%、至少约75%、至少约70%、至少约65%、至少约60%、至少约55%、至少约50%、至少约45%、至少约40%、至少约35%、至少约30%、至少约25%、至少约20%、至少约15%、至少约10%或至少约5%。在一些情况下,抗DNA传感抑制剂可以是一种或多种DNA传感蛋白的竞争性抑制剂或激活剂。在一些情况下,抗DNA传感蛋白可以是DNA传感蛋白的非竞争性抑制剂或激活剂。

[0386] 在本公开内容的一些情况下,抗DNA传感蛋白还可以是DNA传感蛋白(例如,TREX1)。抗DNA传感蛋白的非限制性实例包括细胞FLICE抑制蛋白(c-FLiP)、人巨细胞病毒被膜蛋白(HCMV pUL83)、登革病毒特异性NS2B-NS3(DENV NS2B-NS3)、人乳头瘤病毒18型E7蛋白(HPV18 E7)、hAd5E1A、单纯疱疹病毒立即早期蛋白ICP0(HSV1 ICP0)、痘苗病毒B13(VACV B13)、痘苗病毒C16(VACV C16)、三种主要修复外切核酸酶1(TREX1)、人冠状病毒NL63(HCoV-NL63)、严重急性呼吸综合征冠状病毒(SARS-CoV)、乙型肝炎病毒DNA聚合酶(HBV Po1)、猪流行性腹泻病毒(PEDV)、腺苷脱氨酶(ADAR1)、E3L、p202、这些蛋白的磷酸化形式及其任意组合或衍生物。在一些情况下,HCMV pUL83可通过与IFI16(例如,核IFI16)上的热蛋白结构域相互作用并阻断其寡聚化和随后的下游活化而抑制STING-TBK1-IRF3途径的活化,来破坏DNA传感途径。在一些情况下,DENV NS2B-NS3可通过降解STING来破坏DNA传感途径。在一些情况下,HPV18E7可通过与STING结合而阻断cGAS/STING途径信号传导来破坏DNA传感途径。在一些情况下,hAd5E1A可通过与STING结合而阻断cGAS/STING途径信号传导来破坏DNA传感途径。例如,图104A和图104B示出了用CRISPR系统、外源多核酸和hAd5E1A或HPV18E7蛋白转染的细胞。在一些情况下,HSV1ICP0可通过降解IFI16和/或延迟IFI16向病毒基因组的募集来破坏DNA传感途径。在一些情况下,VACV B13可通过阻断胱天蛋白酶1依赖性炎性体(inflammasome)活化和胱天蛋白酶8依赖性外在凋亡来破坏DNA传感途径。在一些情况下,VACV C16可通过阻断对DNA的先天免疫应答而导致细胞因子表达下降来破坏DNA传感途径。

[0387] 化合物可以是抑制剂。化合物还可以是激活剂。化合物可与第二化合物组合。化合

物还可与至少一种化合物组合。在一些情况下,一种或多种化合物可协同起作用。例如,一种或多种化合物可如图20中所示在被引入细胞时立即降低细胞毒性。

[0388] 化合物可以是泛胱天蛋白酶抑制剂Z-VAD-FMK和/或Z-VAD-FMK。化合物可以是任何数目的已知化合物的衍生物,该已知化合物调节参与启动对外源DNA的毒性的途径。还可对化合物进行修饰。可通过任何数目的方式对化合物进行修饰,例如,对化合物的修饰可包括氘化、脂化、糖基化、烷基化、聚乙二醇化、氧化、磷酸化、硫酸化、酰胺化、生物素化、瓜氨酸化、异构化、泛素化、质子化、小分子偶联、还原、去磷酸化、亚硝基化和/或蛋白水解。修饰还可以是翻译后的。修饰可以是翻译前的。修饰可在不同的氨基酸侧链或肽键处发生,并且可通过酶活性来介导。

[0389] 修饰可在化合物合成的任何步骤中发生。例如,在蛋白质中,许多化合物在翻译进行或完成后不久被修饰,以介导正确的化合物折叠或稳定性或将新化合物引导至不同的细胞区室。其他修饰在折叠和定位完成后发生,以激活催化活性或使催化活性失活或者以其他方式影响化合物的生物学活性。化合物还可与靶向化合物以供降解的标签共价连接。除单一修饰外,化合物通常还通过翻译后切割和添加官能团(经由化合物成熟或活化的逐步机制)的组合进行修饰。

[0390] 化合物可减少I型干扰素(IFN),例如,IFN- α 和/或IFN- β 的产生。化合物还可减少促炎细胞因子如肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和/或白介素-1 β (IL-1 β)的产生。化合物还可通过调节Janus激酶(JAK)-信号转导物和转录激活因子(STAT)途径来调节抗病毒基因的诱导。化合物还可调节转录因子即活化B细胞的核因子 κ 轻链增强子(NF- κ B)和IFN调节因子IRF3和IRF7。化合物还可例如通过经由I κ B激酶(IKK)复合体修饰I κ B的磷酸化来调节NF- κ B的活化。化合物还可调节I κ B的磷酸化或防止I κ B的磷酸化。化合物还可调节IRF3和/或IRF7的活化。例如,化合物可调节IRF3和/或IRF7的活化。化合物可激活TBK1和/或IKK ϵ 。化合物还可抑制TBK1和/或IKK ϵ 。化合物可防止形成由IRF3、IRF7、NF- κ B和其他转录因子组成的增强体复合物,从而防止开启I型IFN基因的转录。修饰化合物可以是TBK1化合物和至少一种额外的化合物(图88A和图88B)。在一些情况下,TBK1化合物和胱天蛋白酶抑制剂化合物可用于降低双链DNA的毒性(图89)。

[0391] 化合物可防止细胞凋亡和/或细胞焦亡。化合物还可防止炎性体的活化。炎性体可以是细胞内的多蛋白复合体,其介导蛋白水解酶胱天蛋白酶-1的活化和IL-1 β 的成熟。化合物还可调节AIM2(黑素瘤缺乏因子2)。例如,化合物可防止AIM2与衔接蛋白ASC(含有CARD的凋亡相关斑点样蛋白)相缔合。化合物还可调节同型PYD:PYD相互作用。化合物还可调节同型CARD:CARD相互作用。化合物可调节胱天蛋白酶-1。例如,化合物可抑制胱天蛋白酶-1将IL-1 β 和IL-18的无活性前体转变为成熟的细胞因子的过程。

[0392] 化合物可以是用来产生与GMP兼容的细胞疗法的平台的组分。化合物可用于改善细胞疗法。化合物可用作药剂。化合物可以组合为联合疗法。化合物可离体使用。化合物可用于免疫疗法。化合物可以是产生用于有需要的患者的T细胞疗法的过程的一部分。

[0393] 在一些情况下,化合物不用于降低毒性。在一些情况下,可对多核酸进行修饰以另外降低毒性。例如,可对多核酸进行修饰以减少多核酸,例如,外源多核酸的检测。还可对多核酸进行修饰以降低细胞毒性。例如,可通过图21中描绘的一种或多种方法修饰多核酸。还可在体外或体内对多核酸进行修饰。

[0394] 化合物或修饰剂化合物可将质粒DNA的细胞毒性降低或降低约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。修饰剂化合物可将细胞活力提高或提高约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。

[0395] 未甲基化的多核酸也可降低毒性。例如,包含至少一种工程化抗原受体的未甲基化的多核酸可用于降低细胞毒性,该工程化抗原受体的侧翼为与至少一个基因组区域互补的至少两个重组臂。多核酸还可以是裸多核酸。多核酸还可具有哺乳动物甲基化,这在一些情况下也会降低毒性。在一些情况下,还可对多核酸进行修饰,以便去除细菌甲基化并引入哺乳动物甲基化。本文所述的任何修饰均可适用于如本文所述的任何多核酸。

[0396] 多核酸修饰可包括去甲基化、CpG甲基化的添加、细菌甲基化的去除和/或哺乳动物甲基化的添加。修饰可以是将双链多核酸转变成单链多核酸。单链多核酸也可转变成双链多核酸。

[0397] 多核酸可被甲基化(例如人甲基化)以降低细胞毒性。修饰的多核酸可包含TCR序列或嵌合抗原受体(CAR)。多核酸还可包含工程化胞外受体。

[0398] 包含至少一种工程化抗原受体的哺乳动物甲基化多核酸可用于降低细胞毒性。可对多核酸进行修饰以包含哺乳动物甲基化。可用哺乳动物甲基化将多核酸甲基化,以使多核酸不被细胞识别为外来的。

[0399] 多核酸修饰也可作为培养过程的一部分进行。可用不引入细菌甲基化的基因组修饰的细菌培养物产生去甲基化的多核酸。这些多核酸随后可被修饰以含有哺乳动物甲基化,例如,人甲基化。

[0400] 还可通过在基因组工程化程序期间引入病毒蛋白来降低毒性。例如,病毒蛋白可用于阻断DNA传感并降低编码外源TCR或CRISPR系统的供体核酸的毒性。由病毒采用的用来阻断DNA传感的逃避策略可以是隔离或修饰病毒核酸;干扰PRR或其衔接蛋白的特定翻译后修饰;降解或切割模式识别受体(PRR)或其衔接蛋白;隔离或重新定位PRR或其任意组合。在一些情况下,可以引入病毒蛋白,该病毒蛋白可通过由病毒采用的任何逃避策略来阻断DNA传感。

[0401] 在一些情况下,病毒蛋白可以是或可衍生自病毒,如人巨细胞病毒(HCMV)、登革病毒(DENV)、人乳头瘤病毒(HPV)、单纯疱疹病毒1型(HSV1)、痘苗病毒(VACV)、人冠状病毒(HCoV)、严重急性呼吸综合征(SARS)冠状病毒(SARS-CoV)、乙型肝炎病毒、猪流行性腹泻病毒或其任意组合。

[0402] 引入的病毒蛋白可通过诱导形成可由细胞膜限制的特定复制区室来防止RIG-I样受体(RLR)进入病毒RNA,或者在其他情况下在细胞器如内质网、高尔基体、线粒体或其任意组合上复制。例如,本发明的病毒可具有防止检测或阻碍RLR活化的修饰。在其他情况下,可以抑制RLR信号传导途径。例如,可以抑制或阻断RIG-I的Lys63连接的泛素化,以防止RIG-I信号传导的活化。在其他情况下,病毒蛋白可靶向可负责RIG-I泛素化的细胞E3泛素连接酶。病毒蛋白还可去除RIG-I的泛素化。此外,病毒可通过调节细胞微小RNA的丰度或通过RNA-蛋白相互作用,在不依赖蛋白-蛋白相互作用的情况下抑制RIG-I的泛素化(例如Lys63连接的泛素化)。

[0403] 在一些情况下,为了防止RIG-I的活化,病毒蛋白可对病毒RNA中的5'-三磷酸部分进行加工,或者病毒核酸酶可消化游离的双链RNA(dsRNA)。此外,病毒蛋白可与病毒RNA结

合,以抑制RIG-I对病原体相关分子模式(PAMP)的识别。一些病毒蛋白可操控RIG-I和/或MDA5的特定翻译后修饰,从而阻断它们的信号传导能力。例如,病毒可通过编码病毒去泛素化酶(DUB)来防止RIG-I的Lys63-连接的泛素化。在其他情况下,病毒蛋白可拮抗细胞E3泛素连接酶、三重基序蛋白25(TRIM25)和/或Riplet,从而还抑制RIG-I泛素化,并因此抑制其活化。此外,在其他情况下,病毒蛋白可与TRIM25结合,以阻断持续的RIG-I信号传导。为了抑制MDA5的活化,病毒蛋白可阻止PP1 α 介导的或PP1 γ 介导的MDA5去磷酸化,从而使其保持在其磷酸化失活状态。例如,中东呼吸综合征冠状病毒(MERS-CoV)可靶向蛋白激酶R激活剂(PACT),以拮抗RIG-I。来自DENV病毒的NS3蛋白可靶向运输因子14-3-3 ϵ ,以防止RIG-I在线粒体处向MAVS易位。在一些情况下,病毒蛋白可切割RIG-I、MDA5和/或MAVS。可以引入其他病毒蛋白以破坏细胞降解途径,从而抑制RLR-MAVS依赖性信号传导。例如,来自乙型肝炎病毒(HBV)的X蛋白和来自严重急性呼吸综合征(SARS)相关冠状病毒(SARS-CoV)的9b蛋白可促进MAVS的泛素化和降解。

[0404] 在一些情况下,引入的病毒蛋白可允许cGAS、IFI16、STING或其任意组合的免疫逃避。例如,为了防止环状GMP-AMP合酶(cGAS)的活化,病毒蛋白可使用细胞3'-修复外切核酸酶1(TREX1)来降解过量的逆转录病毒DNA。此外,病毒衣壳可募集宿主编码的因子,如亲环蛋白A(CYPA),该因子可防止cGAS对逆转录DNA的传感。此外,引入的病毒蛋白可与病毒DNA以及cGAS结合,以抑制cGAS的活性。在其他情况下,为了拮抗干扰素(IFN)基因刺激因子(STING)的活化,乙型肝炎病毒(HBV)的聚合酶(Po1)和人冠状病毒NL63(HCoV-NL63),例如严重急性呼吸综合征(SARS)相关冠状病毒(SARS-CoV)的木瓜蛋白酶样蛋白酶(PLP)可防止或去除STING的Lys63连接的泛素化。引入的病毒蛋白还可与STING结合并抑制其活化或切割STING以使其失活。在一些情况下,可使IFI16失活。例如,病毒蛋白可靶向IFI16用于蛋白酶体降解,或与IFI16结合以防止其寡聚化并因此防止其活化。

[0405] 例如,待引入的病毒蛋白可以是或可衍生自:HCMV pUL83、DENV NS2B-NS3、HPV18E7、hAd5E1A、HSV1ICP0、VACV B13、VACV C16、TREX1、HCoV-NL63、SARS-CoV、HBV Po1 PEDV或其任意组合。病毒蛋白可以是腺病毒蛋白。腺病毒蛋白可以是腺病毒4E1B55K、E4orf6蛋白。病毒蛋白可以是B13疫苗病毒蛋白。引入的病毒蛋白可抑制胞质DNA识别、传感或其组合。

[0406] 在一些情况下,可以抑制RIP途径。在其他情况下,可将细胞FLICE(FADD样IL-1 β 转化酶)抑制蛋白(c-FLIP)途径引入细胞中。c-FLIP可在人类细胞中表达为长(c-FLIPL)、短(c-FLIPS)和c-FLIPR剪接变体。c-FLIP可表达为剪接变体。c-FLIP也可被称为Casper、iFLICE、FLAME-1、CASH、CLARP、MRIT或usurpin。c-FLIP可与FADD和/或胱天蛋白酶-8或胱天蛋白酶-10以及TRAIL受体5(DR5)结合。这种相互作用转而阻止死亡诱导信号传导复合体(DISC)形成和随后的胱天蛋白酶级联活化。还已知c-FLIPL和c-FLIPS在各种信号传导途径中以及在激活和/或上调包括Akt、ERK和NF- κ B在内的数种细胞保护和促存活信号传导蛋白方面具有多功能作用。在一些情况下,可将c-FLIP引入细胞中以增加活力。

[0407] 在其他情况下,可以抑制STING。在一些情况下,抑制胱天蛋白酶途径。DNA传感途径可以是基于细胞因子的炎性途径和/或干扰素 α 表达途径。在一些情况下,当至少一种DNA传感途径抑制剂被引入细胞时采取多模式方法。在一些情况下,DNA传感抑制剂可减少细胞死亡并允许改善外源TCR转基因的整合。多模式方法可以是STING和胱天蛋白酶抑制剂与

TBK抑制剂的组合。

[0408] 为了增强HDR从而使精确的遗传修饰能够插入,我们通过基因沉默、连接酶IV抑制剂SCR7或腺病毒4E1B55K和E4orf6蛋白的共表达来抑制NHEJ关键分子KU70、KU80或DNA连接酶IV。

[0409] 引入的病毒蛋白可将质粒DNA的细胞毒性降低或降低约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。病毒蛋白可将细胞活力提高或提高约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。

[0410] 在一些情况下,gRNA可用于降低毒性。例如,gRNA可被工程化以在载体的填充区内结合。载体可以是微环DNA载体。在一些情况下,微环载体可与病毒蛋白联合使用。在其他情况下,微环载体可与病毒蛋白以及至少一种其他毒性降低剂联合使用。在一些情况下,通过降低与外源DNA如双链DNA相关的毒性,可以更有效地进行基因组破坏。

[0411] 在一些情况下,可以使用酶来降低DNA毒性。例如,可以使用酶如DpnI来去除DNA载体或转基因上的甲基化靶标。可在电穿孔之前用DpnI对载体或转基因进行预处理。IIM型限制性内切核酸酶如DpnI能够识别并切割甲基化DNA。在一些情况下,用DpnI处理微环DNA。天然存在的限制性内切核酸酶分为四类(I型、II型、III型和IV型)。在一些情况下,使用限制性内切核酸酶如DpnI或CRISPR系统内切核酸酶来制备工程化细胞。

[0412] 本文公开了一种制备工程化细胞的方法,该方法包括:引入至少一种工程化腺病毒蛋白或其功能部分;引入编码至少一种外源受体序列的至少一种多核酸;以及用至少一种内切核酸酶或其部分对至少一种基因组进行基因组破坏。在一些情况下,腺病毒蛋白或其功能部分为E1B55K、E4orf6、Scr7、L755507、NS2B3、HPV18E7、hAd5E1A或其组合。腺病毒蛋白可选自血清型1至57。在一些情况下,腺病毒蛋白血清型为血清型5。

[0413] 在一些情况下,工程化腺病毒蛋白或其部分具有至少一种修饰。修饰可以是置换、插入、缺失或所述腺病毒蛋白序列的修饰。修饰可以是插入。插入可以是AGIPA插入。在一些情况下,修饰为置换。置换可以是在蛋白序列的氨基酸位置373处将H置换成A。多核酸可以是DNA或RNA。多核酸可以是DNA。DNA可以是微环DNA。在一些情况下,外源受体序列可选自T细胞受体(TCR)、B细胞受体(BCR)、嵌合抗原受体(CAR)的序列及其任何部分或衍生物。外源受体序列可以是TCR序列。内切核酸酶可选自CRISPR、TALEN、基于转座子、ZEN、大范围核酸酶、Mega-TAL及其任何部分或衍生物。内切核酸酶可以是CRISPR。CRISPR可包含至少一种Cas蛋白。Cas蛋白可选自Cas1、Cas1B、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、Cas9、Cas10、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1、Cse2、Cse1、Cse2、Csa5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、CsaX、Csx3、Csx1、Csx1S、Csf1、Csf2、Cs0、Csf4、Cpf1、c2c1、c2c3、Cas9HiFi、其同源物或其修饰型。Cas蛋白可以是Cas9。

[0414] 在一些情况下,CRISPR在基因组中产生双链断裂。基因组可包含至少一种基因。在一些情况下,将外源受体序列引入至少一种基因中。引入可破坏至少一种基因。基因可以是CISH、PD-1、TRA、TRB或其组合。细胞可以是人类细胞。人类细胞可以是免疫细胞。免疫细胞可以是CD3+、CD4+、CD8+或其任意组合。方法可进一步包括对细胞进行扩充。

[0415] 本文公开了一种制备工程化细胞的方法,该方法包括:病毒性地引入编码至少一种外源T细胞受体(TCR)序列的至少一种多核酸;以及用至少一种内切核酸酶或其功能部分

对至少一种基因进行基因组破坏。在一些情况下,病毒可选自逆转录病毒、慢病毒、腺病毒、腺相关病毒或其任何衍生物。病毒可以是腺相关病毒(AAV)。AAV可以是血清型5。AAV可包含至少一种修饰。修饰可以是化学修饰。多核酸可以是DNA、RNA或其任何修饰物。多核酸可以是DNA。在一些情况下,DNA为微环DNA。在一些情况下,多核酸可进一步包含至少一个侧翼为TCR序列的同源臂。同源臂可包含至少一种基因的互补序列。基因可以是内源基因。内源基因可以是检查点基因。

[0416] 在一些情况下,方法可进一步包括至少一种毒性降低剂。毒性降低剂可以是病毒蛋白或胞质DNA传感途径的抑制剂。病毒蛋白可以是E1B55K、E4orf6、Scr7、L755507、NS2B3、HPV18E7、hAd5E1A或其组合。方法可进一步包括细胞的扩充。在一些情况下,可以使用胞质DNA传感途径的抑制剂。胞质DNA传感途径的抑制剂可以是细胞FLICE (FADD样IL-1 β 转化酶)抑制蛋白(c-FLIP)。

[0417] 可以使用本领域已知的任何方法测量细胞活力和/或转基因整合到一个或多个细胞的基因组中的效率。在一些情况下,可以使用台盼蓝拒染法、末端脱氧核苷酸转移酶dUTP切口端标记(TUNEL)、给定的细胞表面标志物(例如,CD4或CD8)的存在或缺乏、端粒长度、荧光激活细胞分选术(FACS)、实时PCR或微滴式数字PCR来测量细胞活力和/或整合效率。例如,可以使用FACS来检测电穿孔后转基因的整合效率。在另一个实例中,可以使用TUNEL测量凋亡。

非病毒载体向细胞膜中的递送

[0418] 可通过任何合适的方式将核酸酶和转录因子、编码它们的多核苷酸和/或任何转基因多核苷酸以及包含本文所述的蛋白质和/或多核苷酸的组合物递送至靶细胞。

[0419] 合适的细胞可包括但不限于真核和原核细胞和/或细胞系。由此类细胞产生的这些细胞或细胞系的非限制性实例包括COS、CHO(例如,CHO-S、CHO-K1、CHO-DG44、CHO-DUXB11、CHO-DUKX、CHO-K1SV)、VERO、MDCK、WI38、V79、B14AF28-G3、BHK、HaK、NSO、SP2/0-Ag14、HeLa、HEK293(例如,HEK293-F、HEK293-H、HEK293-T)和perC6细胞以及昆虫细胞如草地夜蛾(*Spodoptera frugiperda*, Sf)或真菌细胞如酵母属(*Saccharomyces*)、毕赤酵母属(*Pichia*)和裂殖酵母属(*Schizosaccharomyces*)。在一些情况下,细胞系为CHO-K1、MDCK或HEK293细胞系。在一些情况下,合适的原代细胞包括外周血单核细胞(PBMC)、外周血淋巴细胞(PBL)和其他血细胞亚群,诸如但不限于T细胞、自然杀伤细胞、单核细胞、自然杀伤T细胞、单核细胞前体细胞、造血干细胞或非多潜能干细胞。在一些情况下,细胞可以是任何免疫细胞,包括任何T细胞如肿瘤浸润性细胞(TIL),如CD3+T细胞、CD4+T细胞、CD8+T细胞或任何其他类型的T细胞。T细胞还可包括记忆T细胞、记忆性干细胞样T细胞(memory stem T cells)或效应T细胞。还可从整体群体中选择T细胞,例如从全血中选择T细胞。还可从整体群体中扩充T细胞。T细胞也可偏向特定的群体和表型。例如,T细胞可在表型上有所偏向,包括CD45RO(-)、CCR7(+)、CD45RA(+)、CD62L(+)、CD27(+)、CD28(+)和/或IL-7R α (+)。可以选择包含选自列表的一种或多种标志物的合适的细胞,该列表包括:CD45RO(-)、CCR7(+)、CD45RA(+)、CD62L(+)、CD27(+)、CD28(+)和/或IL-7R α (+)。合适的细胞还包括干细胞,如举例而言,胚胎干细胞、诱导多潜能干细胞、造血干细胞、神经元干细胞和间质干细胞。合适的细胞可包括任何数目的原代细胞,如人类细胞、非人细胞和/或小鼠细胞。合适的细胞可以是祖细胞。合适的细胞可来源于待治疗的受试者(例如,患者)。合适的细胞可来源于人类供

体。合适的细胞可以是由CD45RO(-)、CCR7(+)、CD45RA(+)、CD62L+(L-选择蛋白)、CD27+、CD28+和IL-7R α +组成的干细胞样记忆T_{SCM}细胞(stem memory T_{SCM} cell),记忆干细胞还可表达CD95、IL-2R β 、CXCR3和LFA-1,并显示出记忆干细胞所特有的许多功能属性。合适的细胞可以是包含L-选择蛋白和CCR7的中央记忆T_{CM}细胞,中央记忆细胞可分泌例如IL-2但不分泌IFN γ 或IL-4。合适的细胞还可以是包含L-选择蛋白或CCR7的效应记忆T_{EM}细胞,并可产生例如效应细胞因子如IFN γ 和IL-4。

[0420] 获得合适的细胞的方法可包括选择细胞。在一些情况下,细胞可包含可用于细胞的选择的标志物。例如,这样的标志物可包括GFP、抗性基因、细胞表面标志物、内源标签。可以使用任何内源标志物选择细胞。可以使用任何技术选择合适的细胞。这样的技术可包括流式细胞术和/或磁性柱。然后可将所选择的细胞输注到受试者中。还可将所选择的细胞扩充到较大的数目。可在输注前扩充所选择的细胞。

[0421] 可以使用例如含有编码一种或多种蛋白质的序列的载体递送如本文所述的转录因子和核酸酶。可类似地递送编码多核苷酸的转基因。可以使用任何载体系统,包括但不限于质粒载体、逆转录病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体、痘病毒载体、疱疹病毒载体和腺相关病毒载体等。此外,这些载体中的任何一种均可包含一种或多种转录因子、核酸酶和/或转基因。因此,当将一种或多种CRISPR、TALEN、基于转座子、ZEN、大范围核酸酶或Mega-TAL分子和/或转基因引入细胞中时,CRISPR、TALEN、基于转座子、ZEN、大范围核酸酶或Mega-TAL分子和/或转基因可携带于相同的载体或不同的载体上。当使用多种载体时,每种载体可包含一种或多种编码CRISPR、TALEN、基于转座子、ZEN、大范围核酸酶或Mega-TAL分子和/或转基因的序列。

[0422] 常规的基于病毒和非病毒的基因转移方法可用于在细胞(例如,哺乳动物细胞)和靶组织中引入编码工程化CRISPR、TALEN、基于转座子、ZEN、大范围核酸酶或Mega-TAL分子和/或转基因的核酸。这样的方法还可用于在体外将编码CRISPR、TALEN、基于转座子、ZEN、大范围核酸酶或Mega-TAL分子和/或转基因的核酸施用于细胞。在一些实例中,可以施用编码CRISPR、TALEN、基于转座子、ZEN、大范围核酸酶或Mega-TAL分子和/或转基因的核酸用于体内或离体免疫疗法应用。非病毒载体递送系统可包括DNA质粒、裸核酸以及与递送媒介物如脂质体或泊洛沙姆复合的核酸。病毒载体递送系统可包括DNA和RNA病毒,该DNA和RNA病毒在递送至细胞后具有附加型或整合型基因组。

[0423] 核酸的非病毒递送方法包括电穿孔、脂质转染、核转染、金纳米颗粒递送、显微注射、生物弹射、病毒体(virosome)、脂质体、免疫脂质体、聚阳离子或脂质-核酸偶联物、裸DNA、mRNA、人工病毒体和试剂增强的DNA摄入(agent-enhanced uptake of DNA)。使用例如Sonitron 2000系统(Rich-Mar)进行的声致穿孔也可用于核酸的递送。

[0424] 其他的示例性核酸递送系统包括由AMAXA[®]Biosystems(Cologne,德国)、Life Technologies(Frederick,Md.)、MAXCYTE,Inc.(Rockville,Md.)、BTX分子递送系统(Holliston,Mass.)和Copernicus Therapeutics Inc.提供的核酸递送系统(参见例如美国专利号6,008,336)。脂质转染试剂在商业上出售(例如TRANSFECTAM[®]和LIPOFECTIN[®])。可以递送至细胞(离体施用)或靶组织(体内施用)。其他递送方法包括将待递送的核酸包装到EnGeneIC递送媒介物(EDV)中的应用。使用双特异性抗体将这些EDV

特异性递送至靶组织,其中抗体的一个臂对靶组织具有特异性,而另一个臂对EDV具有特异性。抗体将EDV带至靶细胞表面,然后通过内吞作用将EDV带入细胞中。

[0425] 载体(包括含有编码工程化CRISPR、TALEN、基于转座子、ZEN、大范围核酸酶或Mega-TAL分子、转座子和/或转基因的核酸的病毒和非病毒载体)也可直接施用于生物体以在体内转导细胞。或者,可以施用裸DNA或mRNA。通过通常用于引入分子以便与血液或组织细胞最终接触的任何途径进行施用,该途径包括但不限于注射、输注、局部施用和电穿孔。可以使用多于一种途径来施用特定的组合物。药学上可接受的载体部分地由所施用的特定组合物以及用来施用组合物的特定方法确定。

[0426] 在一些情况下,编码外源TCR的载体可穿梭至细胞核酸酶。例如,载体可含有核定位序列(NLS)。载体也可通过蛋白质或蛋白复合体穿梭。在一些情况下,Cas9可用作穿梭微环载体的手段。Cas可包含NLS。在一些情况下,可在电穿孔之前将载体与Cas蛋白预先复合。可用于穿梭的Cas蛋白可以是核酸酶缺陷型Cas9(dCas9)蛋白。可用于穿梭的Cas蛋白可以是有核酸酶活性的Cas9。在一些情况下,Cas蛋白可与指导RNA以及编码外源TCR的质粒预先混合。

[0427] 本文公开的某些方面可以利用载体。例如,可以使用的载体包括但不限于细菌载体:pBs、pQE-9(Qiagen)、phagescript、PsiX174、pBluescript SK、pBsKS、pNH8a、pNH16a、pNH18a、pNH46a(Stratagene);pTrec99A、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5(Pharmacia);真核载体:pWL-neo、pSv2cat、pOG44、pXT1、pSG(Stratagene)pSVK3、pBPv、pMSG、pSVL(Pharmacia)。此外,可以使用任何其他质粒和载体,只要它们在选择的主细胞中是可复制的并具有活力。任何载体和可商购的载体(及其变体或衍生物)可被工程化以包含用于该方法的一个或多个重组位点。这样的载体可获自,例如,Vector Laboratories Inc.、Invitrogen、Promega、Novagen、NEB、Clontech、Boehringer Mannheim、Pharmacia、EpiCenter、OriGenes Technologies Inc.、Stratagene、PerkinElmer、Pharmlingen和Research Genetics。感兴趣的其他载体包括真核表达载体,如pFastBac、pFastBacHT、pFastBacDUAL、pSFV、和pTet-Splice(Invitrogen)、pEUK-C1、pPUR、pMAM、pMAMneo、pBI101、pBI121、pDR2、pCMVEBNA、和pYACneo(Clontech)、pSVK3、pSVL、pMSG、pCH110、和pKK232-8(Pharmacia, Inc.)、p3'SS、pXT1、pSG5、pPbac、pMbac、pMClneo、和pOG44(Stratagene, Inc.)、和pYES2、pAC360、pBlueBa-chis A、B和C、pVL1392、pBlueBac111、pCDM8、pcDNA1、pZeoSV、pcDNA3、pREP4、pCEP4和pEBVHis(Invitrogen, Corp.)及其变体或衍生物。其他载体包括pUC18、pUC19、pBlueScript、pSPORT、粘粒、噬菌粒、YAC(酵母人工染色体)、BAC(细菌人工染色体)、P1(大肠杆菌噬菌体)、pQE70、pQE60、pQE9(quagen)、pBS载体、PhageScript载体、BlueScript载体、pNH8A、pNH16A、pNH18A、pNH46A(Stratagene)、pcDNA3(Invitrogen)、pGEX、pTrsfus、pTrec99A、pET-5、pET-9、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5(Pharmacia)、pSPORT1、pSPORT2、pCMVSPORT2.0和pSYSPORT1(Invitrogen)及其变体或衍生物。感兴趣的其他载体还可包括来自Invitrogen的pTrxFus、pThioHis、pLEX、pTrcHis、pTrcHis2、pRSET、pBlueBa-chis2、pcDNA3.1/His、pcDNA3.1(-)/Myc-His、pSecTag、pEBVHis、pPIC9K、pPIC3.5K、pA081S、pPICZ、pPICZA、pPICZB、pPICZC、pGAPZA、pGAPZB、pGAPZC、pBlue-Bac4.5、pBlueBacHis2、pMelBac、pSinRep5、pSinHis、pIND、pIND(SP1)、pVgRXR、pcDNA2.1、pYES2、pZer01.1、pZer0-2.1、pCR-Blunt、pSE280、pSE380、pSE420、pVL1392、pVL1393、pCDM8、

pCDNA1.1、pCDNA1.1/Amp、pCDNA3.1、pCDNA3.1/Zeo、pSe、SV2、pRc/CMV2、pRc/RSV、pREP4、pREP7、pREP8、pREP9、pREP 10、pCEP4、pEBVHis、pCR3.1、pCR2.1、pCR3.1-Uni和pCRBac；来自Pharmacia的X ExCell、X gt11、pTrc99A、pKK223-3、pGEX-1X T、pGEX-2T、pGEX-2TK、pGEX-4T-1、pGEX-4T-2、pGEX-4T-3、pGEX-3X、pGEX-5X-1、pGEX-5X-2、pGEX-5X-3、pEZZ18、pRIT2T、pMC1871、pSVK3、pSVL、pMSG、pCH110、pKK232-8、pSL1180、pNEO和pUC4K；来自Novagen的pSCREEN-1b(+)、pT7Blue(R)、pT7Blue-2、pCITE-4-abc(+)、pOCUS-2、pTAg、pET-32LIC、pET-30LIC、pBAC-2cp LIC、pBACgus-2cp LIC、pT7Blue-2LIC、pT7Blue-2、X SCREEN-1、X BlueSTAR、pET-3abcd、pET-7abc、pET9abcd、pET11abcd、pET12abc、pET-14b、pET-15b、pET-16b、pET-17b-pET-17xb、pET-19b、pET-20b(+)、pET-21abcd(+)、pET-22b(+)、pET-23abcd(+)、pET-24abcd(+)、pET-25b(+)、pET-26b(+)、pET-27b(+)、pET-28abc(+)、pET-29abc(+)、pET-30abc(+)、pET-31b(+)、pET-32abc(+)、pET-33b(+)、pBAC-1、pBACgus-1、pBAC4x-1、pBACgus4x-1、pBAC-3cp、pBACgus-2cp、pBACsurf-1、plg、Signal plg、pYX、Selecta Vecta-Neo、Selecta Vecta-Hyg和Selecta Vecta-Gpt；来自Clontech的pLexA、pB42AD、pGBT9、pAS2-1、pGAD424、pACT2、pGAD GL、pGAD GH、pGAD10、pGilda、pEZM3、pEGFP、pEGFP-1、pEGFPN、pEGFP-C、pEBFP、pGFPuv、pGFP、p6xHis-GFP、pSEAP2-Basic、pSEAP2-Contral、pSEAP2-启动子、pSEAP2-增强子、p I3gal-Basic、pI3gal-Control、pI3gal-启动子、pI3gal-增强子、pCMV、pTet-Off、pTet-On、pTK-Hyg、pRetro-Off、pRetro-On、pIRES1neo、pIRES1hyg、pLXSN、pLNCX、pLAPSN、pMAMneo、pMAMneo-CAT、pMAMneo-LUC、pPUR、pSV2neo、pYEX4T-1/2/3、pYEX-S1、pBacPAK-His、pBacPAK8/9、pAcUW31、BacPAK6、pTriplEx、2Xgt10、Xgt11、pWE15和X TriplEx；Lambda ZAP II、pBK-CMV、pBK-RSV、pBluescript II KS+/-、pBluescript II SK+/-、pAD-GAL4、pBD-GAL4Cam、pSurfscrip、Lambda FIX II、Lambda DASH、Lambda EMBL3、Lambda EMBL4、SuperCos、pCR-Script Amp、pCR-Script Cam、pCR-Script Direct、pBS+/-、pBC KS+/-、pBC SK+/-、Phag-escript、pCAL-n-EK、pCAL-n、pCAL-c、pCAL-ke、pET-3abcd、pET-11abcd、pSPUTK、pESP-1、pCMVLacI、pOPRSVI/MCS、pOPI3CAT、pXT1、pSG5、pPbac、pMbac、pMC1neo、pMC1neo Poly A、pOG44、pOG45、pFRTI3GAL、pNEOI3GAL、pRS403、pRS404、pRS405、pRS406、pRS413、pRS414、pRS415和pRS416(来自Stratagene)；pPC86、pDBLeu、pDBTrp、pPC97、p2.5、pGAD1-3、pGAD10、pAct、pACT2、pGADGL、pGADGH、pAS2-1、pGAD424、pGBT8、pGBT9、pGAD-GAL4、pLexA、pBD-GAL4、pHISi、pHISi-1、placZi、pB42AD、pDG202、pJK202、pJG4-5、pNLexA、pYESTrp及其变体或衍生物。

[0428] 这些载体可用于表达基因，例如转基因，或感兴趣的基因的一部分。可通过使用任何方法插入基因的一部分或基因，例如方法可以是基于限制酶的技术。

[0429] 如下所述，可通过向个体患者施用，典型地通过全身施用(例如，静脉内、腹膜内、肌内、皮下或颅内输注)或局部施用在体内递送载体。或者，可将载体离体递送至细胞，如从个体患者移植出的细胞(例如，淋巴细胞、T细胞、骨髓抽吸物、组织活检物)，然后通常在已并入载体的细胞进行选择后将细胞重新植入患者中。在选择之前或之后，可以扩充细胞。载体可以是微环载体(图43)。

[0430] 可用微环载体和CRISPR系统转染细胞。微环载体浓度可以为0.5纳克至50微克。在一些情况下，可通过电穿孔引入细胞中的核酸(例如，ssDNA、dsDNA、RNA)的量可以变化以优化转染效率和/或细胞活力。在一些情况下，可将少于约100皮克的核酸添加至每个细胞样

品(例如,一个或多个电穿孔细胞)中。在一些情况下,可将至少约100皮克、至少约200皮克、至少约300皮克、至少约400皮克、至少约500皮克、至少约600皮克、至少约700皮克、至少约800皮克、至少约900皮克、至少约1微克、至少约1.5微克、至少约2微克、至少约2.5微克、至少约3微克、至少约3.5微克、至少约4微克、至少约4.5微克、至少约5微克、至少约5.5微克、至少约6微克、至少约6.5微克、至少约7微克、至少约7.5微克、至少约8微克、至少约8.5微克、至少约9微克、至少约9.5微克、至少约10微克、至少约11微克、至少约12微克、至少约13微克、至少约14微克、至少约15微克、至少约20微克、至少约25微克、至少约30微克、至少约35微克、至少约40微克、至少约45微克或至少约50微克的核酸添加至每个细胞样品(例如,一个或多个电穿孔细胞)中。例如,可将1微克dsDNA添加至每个用于电穿孔的细胞样品中。在一些情况下,最佳转染效率和/或细胞活力所需的核酸(例如,dsDNA)的量可以是对细胞类型特定的。在一些情况下,用于每个样品的核酸(例如,dsDNA)的量可直接对应于转染效率和/或细胞活力。例如,微环转染的浓度范围在图70A、图70B和图73中示出。示出了5微克和20微克浓度下转染的微环载体的整合效率的总结的代表性流式细胞术实验在图74、图78和图79中示出。由微环载体编码的转基因可整合到细胞基因组中。在一些情况下,由微环载体编码的转基因的整合为正向方向(图75)。在其他情况下,由微环载体编码的转基因的整合为反向方向。

[0431] 采用本文所述的任何核酸递送平台例如核转染或电穿孔的细胞的转染效率可以为或可以为约20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.9%或大于99.9%。

[0432] 使用例如Neon®转染系统(ThermoFisher Scientific)或AMAXA®Nucleofector(AMAXA®Biosystems)进行的电穿孔也可用于核酸向细胞中的递送。可以调整电穿孔参数以优化转染效率和/或细胞活力。电穿孔设备可具有多种电波形式的脉冲设置,如指数衰减、时间常数和方波。每种细胞类型具有独特的最佳场强(E),该最佳场强取决于施加的脉冲参数(例如,电压、电容和电阻)。最佳场强的施加通过诱导跨膜电压引起电渗透,从而使核酸穿过细胞膜。在一些情况下,可以调整电穿孔脉冲电压、电穿孔脉冲宽度、脉冲数目、细胞密度和尖端类型以优化转染效率和/或细胞活力。

[0433] 在一些情况下,可以改变电穿孔脉冲电压以优化转染效率和/或细胞活力。在一些情况下,电穿孔电压可小于约500伏。在一些情况下,电穿孔电压可以为至少约500伏、至少约600伏、至少约700伏、至少约800伏、至少约900伏、至少约1000伏、至少约1100伏、至少约1200伏、至少约1300伏、至少约1400伏、至少约1500伏、至少约1600伏、至少约1700伏、至少约1800伏、至少约1900伏、至少约2000伏、至少约2100伏、至少约2200伏、至少约2300伏、至少约2400伏、至少约2500伏、至少约2600伏、至少约2700伏、至少约2800伏、至少约2900伏或至少约3000伏。在一些情况下,最佳转染效率和/或细胞活力所需的电穿孔脉冲电压可以是对细胞类型特异的。例如,1900伏的电穿孔电压对于巨噬细胞可能是最佳的(例如,提供最高的活力和/或转染效率)。在另一个实例中,约1350伏的电穿孔电压对于Jurkat细胞或原代人类细胞如T细胞可能是最佳的(例如,提供最高的活力和/或转染效率)。在一些情况下,一定范围的电穿孔电压对于给定的细胞类型可能是最佳的。例如,约1000伏至约1300伏的电穿孔电压对于人578T细胞可能是最佳的(例如,提供最高的活力和/或转染效率)。

[0434] 在一些情况下,可以改变电穿孔脉冲宽度以优化转染效率和/或细胞活力。在一些情况下,电穿孔脉冲宽度可小于约5毫秒。在一些情况下,电穿孔宽度可以为至少约5毫秒、至少约6毫秒、至少约7毫秒、至少约8毫秒、至少约9毫秒、至少约10毫秒、至少约11毫秒、至少约12毫秒、至少约13毫秒、至少约14毫秒、至少约15毫秒、至少约16毫秒、至少约17毫秒、至少约18毫秒、至少约19毫秒、至少约20毫秒、至少约21毫秒、至少约22毫秒、至少约23毫秒、至少约24毫秒、至少约25毫秒、至少约26毫秒、至少约27毫秒、至少约28毫秒、至少约29毫秒、至少约30毫秒、至少约31毫秒、至少约32毫秒、至少约33毫秒、至少约34毫秒、至少约35毫秒、至少约36毫秒、至少约37毫秒、至少约38毫秒、至少约39毫秒、至少约40毫秒、至少约41毫秒、至少约42毫秒、至少约43毫秒、至少约44毫秒、至少约45毫秒、至少约46毫秒、至少约47毫秒、至少约48毫秒、至少约49毫秒或至少约50毫秒。在一些情况下,最佳转染效率和/或细胞活力所需的电穿孔脉冲宽度可以是对细胞类型特异的。例如,30毫秒的电穿孔脉冲宽度对于巨噬细胞可能是最佳的(例如,提供最高的活力和/或转染效率)。在另一个实例中,约10毫秒的电穿孔宽度对于Jurkat细胞可能是最佳的(例如,提供最高的活力和/或转染效率)。在一些情况下,一定范围的电穿孔宽度对于给定的细胞类型可能是最佳的。例如,约20毫秒至约30毫秒的电穿孔宽度对于人578T细胞可能是最佳的(例如,提供最高的活力和/或转染效率)。

[0435] 在一些情况下,可以改变电穿孔脉冲的数目以优化转染效率和/或细胞活力。在一些情况下,电穿孔可包括单个脉冲。在一些情况下,电穿孔可包括多于一个脉冲。在一些情况下,电穿孔可包括2个脉冲、3个脉冲、4个脉冲、5个脉冲、6个脉冲、7个脉冲、8个脉冲、9个脉冲或10个或更多个脉冲。在一些情况下,最佳转染效率和/或细胞活力所需的电穿孔脉冲的数目可以是对细胞类型特异的。例如,具有单个脉冲的电穿孔对于巨噬细胞可能是最佳的(例如,提供最高的活力和/或转染效率)。在另一个实例中,具有3个脉冲的电穿孔对于原代细胞可能是最佳的(例如,提供最高的活力和/或转染效率)。在一些情况下,一定范围的电穿孔宽度对于给定的细胞类型可能是最佳的。例如,具有约1个至约3个脉冲的电穿孔对于人类细胞可能是最佳的(例如,提供最高的活力和/或转染效率)。

[0436] 在一些情况下,可以改变电穿孔的起始细胞密度以优化转染效率和/或细胞活力。在一些情况下,电穿孔的起始细胞密度可小于约 1×10^5 个细胞。在一些情况下,电穿孔的起始细胞密度可以为至少约 1×10^5 个细胞、至少约 2×10^5 个细胞、至少约 3×10^5 个细胞、至少约 4×10^5 个细胞、至少约 5×10^5 个细胞、至少约 6×10^5 个细胞、至少约 7×10^5 个细胞、至少约 8×10^5 个细胞、至少约 9×10^5 个细胞、至少约 1×10^6 个细胞、至少约 1.5×10^6 个细胞、至少约 2×10^6 个细胞、至少约 2.5×10^6 个细胞、至少约 3×10^6 个细胞、至少约 3.5×10^6 个细胞、至少约 4×10^6 个细胞、至少约 4.5×10^6 个细胞、至少约 5×10^6 个细胞、至少约 5.5×10^6 个细胞、至少约 6×10^6 个细胞、至少约 6.5×10^6 个细胞、至少约 7×10^6 个细胞、至少约 7.5×10^6 个细胞、至少约 8×10^6 个细胞、至少约 8.5×10^6 个细胞、至少约 9×10^6 个细胞、至少约 9.5×10^6 个细胞、至少约 1×10^7 个细胞、至少约 1.2×10^7 个细胞、至少约 1.4×10^7 个细胞、至少约 1.6×10^7 个细胞、至少约 1.8×10^7 个细胞、至少约 2×10^7 个细胞、至少约 2.2×10^7 个细胞、至少约 2.4×10^7 个细胞、至少约 2.6×10^7 个细胞、至少约 2.8×10^7 个细胞、至少约 3×10^7 个细胞、至少约 3.2×10^7 个细胞、至少约 3.4×10^7 个细胞、至少约 3.6×10^7 个细胞、至少约 3.8×10^7 个细胞、至少约 4×10^7 个细胞、至少约 4.2×10^7 个细胞、至少约 4.4×10^7 个细胞、至少约 4.6×10^7 个细胞、至少约 4.8×10^7 个细胞或至少约 5×10^7 个细胞。

个细胞。在一些情况下,最佳转染效率和/或细胞活力所需的电穿孔的起始细胞密度可以是对细胞类型特异的。例如, 1.5×10^6 个细胞的电穿孔起始细胞密度对于巨噬细胞可能是最佳的(例如,提供最高的活力和/或转染效率)。在另一个实例中, 5×10^6 个细胞的电穿孔起始细胞密度对于人类细胞可能是最佳的(例如,提供最高的活力和/或转染效率)。在一些情况下,一定范围的电穿孔起始细胞密度对于给定的细胞类型可能是最佳的。例如, 5.6×10^6 至 5×10^7 个细胞的电穿孔起始细胞密度对于人类细胞如T细胞可能是最佳的(例如,提供最高的活力和/或转染效率)。

[0437] 采用例如CRISPR系统将编码外源TCR的核酸序列整合到细胞基因组中的效率可以为或可以为约20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.9%或大于99.9%。

[0438] 可以使用任何技术来检测外源多核酸如TCR的整合。例如,可通过流式细胞术、surveyor核酸酶测定(图56)、通过分解追踪插入缺失(TIDE)(图71和图72)、旁侧PCR(junction PCR)或其任意组合来检测整合。示出了代表性TIDE分析的针对PD-1和CTLA-4指导RNA所显示的基因编辑效率百分比(图35和图36)。CISH指导RNA的代表性TIDE分析在图62至图67A和图67B中示出。在其他情况下,可通过PCR检测转基因整合(图77、图80和图95)。

[0439] 离体细胞转染也可用于诊断、研究或基因疗法(例如,通过将转染的细胞重新输注到宿主生物体中)。在一些情况下,从受试者生物体中分离细胞,将该细胞用核酸(例如,基因或cDNA)进行转染,并重新输注到受试者生物体(例如,患者)中。

[0440] 在患者中达到治疗有效所必需的细胞的量可根据细胞的活力和细胞被遗传修饰的效率(例如,转基因被整合到一个或多个细胞中的效率)而变化。在一些情况下,遗传修饰后细胞活力与转基因整合效率的乘积(例如,乘法)可对应于可用于施用于受试者的细胞的治疗性等分试样。在一些情况下,遗传修饰后细胞活力的增加可对应于在患者中施用达到治疗有效所必需的细胞量的减少。在一些情况下,转基因被整合到一个或多个细胞中的效率的增加可对应于在患者中施用达到治疗有效所必需的细胞量的减少。在一些情况下,确定达到治疗有效所必需的细胞的量可包括确定与随时间推移细胞活力的变化相对应的函数。在一些情况下,确定达到治疗有效所必需的细胞的量可包括确定与转基因可被整合到一个或多个细胞中的效率关于时间相关变量(例如,细胞培养时间、电穿孔时间、细胞刺激时间)的变化相对应的函数。

a. 功能性移植

[0441] 移植之前、之后和/或期间的细胞(例如,工程化细胞或工程化原代T细胞)可以是功能性的。例如,移植的细胞可以在移植后至少或至少约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、6、27、28、29、30、40、50、60、70、80、90或100天是功能性的。移植的细胞可以在移植后至少或至少约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个月是功能性的。移植的细胞可以在移植后至少或至少约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25或30年是功能性的。在一些情况下,移植的细胞可在接受者的终生是功能性的。

[0442] 此外,移植的细胞可发挥其正常预期操作的100%的功能。移植的细胞也可发挥其正常预期操作的1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、

30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的功能。

[0443] 移植的细胞也可发挥其正常预期操作的大于100%的功能。例如,移植的细胞可发挥其正常预期操作的110%、120%、130%、140%、150%、160%、170%、180%、190%、200%、250%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%、1000%或更大百分比的功能。

药物组合物和制剂

[0444] 全文所述的组合物可配制成药物并用于治疗诊断患有疾病例如癌症的有需要的人或哺乳动物。这些药物可与一种或多种T细胞(例如,工程化T细胞)连同一种或多种化疗剂或化疗化合物一起共施用于人或哺乳动物。

[0445] 如本文所用的“化疗剂”或“化疗化合物”及其语法等同项可以是用于治疗癌症的化学化合物。可与所公开的T细胞组合使用的化疗癌症药剂包括但不限于有丝分裂抑制剂(长春花生物碱)。这些抑制剂包括长春新碱、长春花碱、长春地辛和Navelbine™(长春瑞滨, 5'-去甲脱水长春碱(5'-noranhydroblastine))。在其他情况下,化疗癌症药剂包括拓扑异构酶I抑制剂,如喜树碱化合物。如本文所用的,“喜树碱化合物”包括Camptosar™(盐酸伊立替康)、Hycamtin™(盐酸拓扑替康)和其他衍生自喜树碱及其类似物的化合物。可用于本文公开的方法和组合物的另一类化疗癌症药剂是鬼臼毒素衍生物,如依托泊苷、替尼泊苷和米托鬼臼肼。本公开内容进一步涵盖称为烷化剂的其他化疗癌症药剂,该药剂使肿瘤细胞中的遗传物质烷基化。这些癌症药剂包括但不限于顺铂、环磷酰胺、氮芥、三亚甲基硫代磷酰胺、卡莫司汀、白消安、苯丁酸氮芥、洛莫司汀(beusterine)、乌拉莫司汀、chlomaphazin和达卡巴嗪。本公开内容涵盖作为化疗剂的抗代谢物。这些类型的药剂的实例包括阿糖胞苷、氟尿嘧啶、甲氨蝶呤、巯基嘌呤、硫唑嘌呤和丙卡巴肼(procarbazine)。可用于本文公开的方法和组合物的另一类化疗癌症药剂包括抗生素。实例包括但不限于多柔比星、博来霉素、放线菌素D、柔红霉素(daunorubicin)、光神霉素、丝裂霉素、丝裂霉素C和道诺霉素。存在这些化合物的许多可商购脂质体制剂。本公开内容进一步涵盖其他化疗癌症药剂,包括但不限于抗肿瘤抗体、达卡巴嗪、氮杂胞苷、安吡啶、美法仑、异环磷酰胺和米托蒽醌。

[0446] 本文公开的T细胞可与其他抗肿瘤剂,包括细胞毒性剂/抗肿瘤药和抗血管生成剂联合施用。细胞毒性剂/抗肿瘤药可定义为攻击并杀死癌细胞的药剂。一些细胞毒性剂/抗肿瘤药可以是烷化剂,其使肿瘤细胞中的遗传物质烷基化,例如,顺铂、环磷酰胺、氮芥、三亚甲基硫代磷酰胺、卡莫司汀、白消安、苯丁酸氮芥、洛莫司汀、乌拉莫司汀、chlomaphazin和达卡巴嗪。其他细胞毒性剂/抗肿瘤药可以是肿瘤细胞的抗代谢物,例如,阿糖胞苷、氟尿嘧啶、甲氨蝶呤、巯基嘌呤、硫唑嘌呤和丙卡巴肼。其他细胞毒性剂/抗肿瘤药可以是抗生素,例如多柔比星、博来霉素、放线菌素D、柔红霉素、光神霉素、丝裂霉素、丝裂霉素C和道诺霉素。存在这些化合物的许多可商购脂质体制剂。另一些细胞毒性剂/抗肿瘤药可以是有丝分裂抑制剂(长春花生物碱)。这些抑制剂包括长春新碱、长春花碱和依托泊苷。其他细胞毒性剂/抗肿瘤药包括紫杉醇及其衍生物、L-天冬酰胺酶、抗肿瘤抗体、达卡巴嗪、氮杂胞苷、

安吡啶、美法仑、VM-26、异环磷酰胺、米托蒽醌和长春地辛。

[0447] 还可使用抗血管生成剂。用于所公开的方法和组合物的合适的抗血管生成剂包括抗VEGF抗体,包括人源化和嵌合抗体、抗VEGF适体和反义寡核苷酸。其他的血管生成抑制剂包括血管抑素、内皮抑素、干扰素、白介素1(包括 α 和 β)、白介素12、视黄酸以及金属蛋白酶-1和-2的组织抑制剂(TIMP-1和TIMP-2)。还可使用小分子,包括拓扑异构酶如雷佐生、具有抗血管生成活性的拓扑异构酶II抑制剂。

[0448] 可与所公开的T细胞组合使用的其他抗癌剂包括但不限于:阿西维辛;阿柔比星;盐酸阿可达佐;阿克罗宁;阿多来新;阿地白介素;六甲蜜胺;安波霉素;醋酸阿美蒽醌;氨鲁米特;安吡啶;阿那曲唑;安曲霉素;天冬酰胺酶;曲林菌素;阿瓦斯汀;阿扎胞苷;阿扎替派;阿佐霉素;巴马司他;苄替哌;比卡鲁胺;盐酸比生群;双奈法德;比折来新;硫酸博来霉素;布喹那钠;溴匹立明;白消安;放线菌素C;卡鲁唑酮;卡醋胺;卡贝替姆;卡铂;卡莫司汀;盐酸卡米诺霉素;卡折来新;西地芬戈;苯丁酸氮芥;西罗霉素;顺铂;克拉屈滨;甲磺酸克里斯奈托(crisnatol mesylate);环磷酰胺;阿糖胞苷;达卡巴嗪;放线菌素D;盐酸柔红霉素;地西他滨;右奥马铂;地扎胍宁;甲磺酸地扎胍宁;地吡酮;多西他赛;多柔比星;盐酸多柔比星;屈洛昔芬;柠檬酸屈洛昔芬;丙酸屈他雄酮;达佐霉素;依达曲沙;盐酸依氟鸟氨酸;依沙芦星;恩洛铂;恩普氨酯;依匹哌啶;盐酸表柔比星;厄布洛唑;盐酸依索比星;雌莫司汀;雌莫司汀磷酸钠;依他硝唑;依托泊苷;磷酸依托泊苷;艾托卜宁;盐酸法曲唑;法扎拉滨;芬维A胺;氟尿苷;磷酸氟达拉滨;氟尿嘧啶;氟西他滨;磷喹酮;福司曲星钠;吉西他滨;盐酸吉西他滨;羟基脲;盐酸依达比星;异环磷酰胺;伊莫福新;白介素II(包括重组白介素II或rIL2);干扰素 α -2a;干扰素 α -2b;干扰素 α -n1;干扰素 α -n3;干扰素 β -1a;干扰素 γ -1b;异丙铂;盐酸伊立替康;醋酸兰瑞肽;来曲唑;醋酸亮丙瑞林;盐酸利阿唑;洛美曲索钠;洛莫司汀;盐酸洛索蒽醌;马索罗酚;美登素;盐酸氮芥;醋酸甲地孕酮;醋酸美伦孕酮;美法仑;美诺立尔;巯基嘌呤;甲氨蝶呤;甲氨蝶呤钠;氯苯氨啶;美妥替哌;米丁度胺;米托卡星(mitocarcin);丝裂红素(mitocromin);米托洁林;丝裂马菌素;丝裂霉素;米托司培;米托坦;盐酸米托蒽醌;霉酚酸;诺考达唑;诺加霉素;奥马铂;奥昔舒仑;紫杉醇;培门冬酶;培利霉素;戊氮芥;硫酸培洛霉素;培磷酰胺;哌泊溴烷;哌泊舒凡;盐酸吡罗蒽醌;普卡霉素;普洛美坦;吡吩姆钠;泊非霉素;泼尼莫司汀;盐酸丙卡巴肼;嘌呤霉素;盐酸嘌呤霉素;吡唑呋喃菌素;利波腺苷;罗谷亚胺;沙芬戈;盐酸沙芬戈;司莫司汀;辛曲秦;磷乙酰天冬氨酸钠(sparfosate sodium);司帕霉素;盐酸螺旋锗;螺莫司汀;螺铂;链黑菌素;链脲霉素;磺氯苯脲;他利霉素;替可加兰钠;替加氟;盐酸替洛蒽醌;替莫吡吩;替尼泊苷;替罗昔隆;鞣内酯;硫咪嘌呤;硫代鸟嘌呤;噻替哌;噻唑羧胺核苷;替拉扎明;柠檬酸托瑞米芬;醋酸曲托龙;磷酸曲西瑞宾;三甲曲沙;葡萄糖醛酸三甲曲沙;曲普瑞林;盐酸妥布氯唑;乌拉莫司汀;乌瑞替哌;伐普肽;维替泊芬;硫酸长春花碱;硫酸长春新碱;长春地辛;硫酸长春地辛;硫酸长春匹定;硫酸长春甘酯;硫酸长春罗新;酒石酸长春瑞滨;硫酸长春罗定;硫酸长春利定;伏氯唑;折尼铂;净司他丁;盐酸佐柔比星。其他抗癌药包括但不限于:20-表-1,25二羟基维生素D3;5-乙炔基尿嘧啶;阿比特龙;阿柔比星;酰基富烯;腺环戊醇;阿多来新;阿地白介素;ALL-TK拮抗剂;六甲蜜胺;氨莫司汀;amidox;氨磷汀;氨基乙酰丙酸;氨柔比星;安吡啶;阿那格雷;阿那曲唑;穿心莲内酯;血管生成抑制剂;拮抗剂D;拮抗剂G;安雷利克斯;抗背侧化形态发生蛋白-1(anti-dorsalizing morphogenetic protein-1);抗雄激素(前列腺

癌);抗雌激素;抗瘤酮;反义寡核苷酸;甘氨酸阿非迪霉素;凋亡基因调节剂;凋亡调节剂;无嘌呤酸;ara-CDP-DL-PTBA;精氨酸脱氢酶;asulacrine;阿他美坦;阿莫司汀;axinastatin 1;axinastatin 2;axinastatin 3;阿扎司琼;阿扎毒素;重氮酪氨酸;浆果赤霉素III衍生物;balanol;巴马司他;BCR/ABL拮抗剂;苯并二氢卟吩;苯甲酰基星状孢菌素; β -内酰胺衍生物; β -alethine; β clamycin B;桦木酸;bFGF抑制剂;比卡鲁胺;比生群;双吡丙啶基精胺;双奈法德;比曲亭A(bistratene A);比折来新;breflate;溴匹立明;布朵替坦;丁硫氨酸亚砷亚胺;卡泊三醇;钙磷酸蛋白C;喜树碱衍生物;金丝雀痘IL-2;卡培他滨;甲酰胺-氨基-三唑;羧胺三唑;CaRest M3;CARN 700;软骨源抑制剂;卡折来新;酪蛋白激酶抑制剂(ICOS);栗树精胺;天蚕抗菌肽B;西曲瑞克;二氢卟吩;氯喹啉磺酰胺;西卡前列素;顺式卟啉;克拉屈滨;氯米芬类似物;克霉唑;碰撞霉素A(collismycin A);碰撞霉素B(collismycin B);康普瑞汀A4;康普瑞汀类似物;conagenin;crambescidin 816;克雷斯托;念珠藻素8;念珠藻素A衍生物;curacin A;环戊萜醌;环铂(cycloplatin);塞匹霉素(cypemycin);阿糖胞苷烷磷酸酯(cytarabine ocfosphate);溶细胞因子;磷酸己烷雌酚(cytostatin);达昔单抗;地西他滨;脱氢膜海鞘素B;德舍瑞林;地塞米松;右异环磷酰胺;右丙亚胺;右维拉帕米;地吡醌;膜海鞘素B;didox;二乙基去甲精胺;二氢-5-氮杂胞苷;9-二氢紫杉醇;二氧杂霉菌素(dioxamycin);二苯基螺莫司汀;多西他赛;廿二醇;多拉司琼;去氧氟尿苷;屈洛昔芬;屈大麻酚;度卡霉素SA(duocarmycin SA);依布硒啉;依考莫司汀;依地福新;依决洛单抗(edrecolomab);依氟鸟氨酸;榄香烯;乙噻替氟;表柔比星;爱普列特;雌莫司汀类似物;雌激素激动剂;雌激素拮抗剂;依他硝唑;磷酸依托泊苷;依西美坦;法曲唑;法扎拉滨;芬维A胺;非格司亭;非那雄胺;夫拉平度;氟卓斯汀;fluasterone;氟达拉滨;盐酸氟道诺霉素(fluorodaunorubicin hydrochloride);福酚美克;福美司坦;福司曲星;福莫司汀;德卟啉钆(gadolinium texaphyrin);硝酸镓;加洛他滨;加尼瑞克;明胶酶抑制剂;吉西他滨;谷胱甘肽抑制剂;hepsulfam;调蛋白;六亚甲基双乙酰胺;金丝桃素;伊班膦酸;伊达比星;艾多昔芬;伊决孟酮;伊莫福新;伊洛马司他;咪唑并吡啶酮(imidazoacridone);咪唑莫特;免疫刺激肽;胰岛素样生长因子-1受体抑制剂;干扰素激动剂;干扰素;白介素;碘苄胍;碘代多柔比星;4-甘薯苦醇;伊罗普拉;伊索拉定;异邦格唑(isobengazole);异高软海绵素B(isohomohalicondrin B);伊他司琼;加斯普拉诺利得(jasplakinolide);卡哈拉里德F(kahalalide F);三乙酸片螺素-N(lamellarin-N-triacetate);兰瑞肽;雷那霉素;来格司亭;硫酸香菇多糖;雷波斯他汀(leptolstatin);来曲唑;白血病抑制因子;白细胞 α 干扰素;亮丙瑞林+雌激素+黄体酮;亮丙瑞林;左旋咪唑;利阿唑;线性多胺类似物;亲脂性二糖肽;亲脂性铂化合物;lissoclinamide7;洛铂;蚯蚓磷脂;洛美曲索;氯尼达明;洛索萜醌;洛伐他汀;洛索立宾;勒托替康;德卟啉钆(lutetium texaphyrin);lysofylline;裂解肽;美坦辛;曼诺他汀A;马立马司他;马索罗酚;乳腺丝抑蛋白;基质溶解因子抑制剂;基质金属蛋白酶抑制剂;美诺立尔;美巴龙(merbarone);meterelin;蛋氨酸酶(methioninase);胃复安;MIF抑制剂;米非司酮;米替福新;米立司亭;错配的双链RNA;米托胍脲;二溴卫矛醇;丝裂霉素类似物;米托蒽胺;迈托毒素成纤维细胞生长因子-皂草素;米托萜醌;莫法罗汀;莫拉司亭;人绒毛膜促性腺激素单克隆抗体;单磷酸脂质A+分枝杆菌细胞壁sk;莫哌达醇;多重耐药基因抑制剂;基于多肿瘤抑制基因1的治疗;芥末抗癌剂(mustard anticancer agent);印度洋海绵B(mycaperoxide B);分枝杆菌

细胞壁提取物;myriaporone;N-乙酰地那林;N-取代苯甲酰胺;那法瑞林;nagrestip;纳洛酮+喷他佐辛;napavin;naphterpin;那托司亭;奈达铂;奈莫柔比星;奈立膦酸;中性内肽酶;尼鲁米特;尼萨霉素;一氧化氮调节剂;硝基氧抗氧化剂;nitrullyn;06-苄基鸟嘌呤;奥曲肽;okicenone;寡核苷酸;奥那司酮;昂丹司琼;昂丹司琼;oracin;口服细胞因子诱导剂;奥马铂;奥沙特隆;奥沙利铂;oxaunomycin;紫杉醇;紫杉醇类似物;紫杉醇衍生物;palauamine;palmitoylrhizoxin;帕米膦酸;人参炔三醇;帕诺米芬;parabactin;泊泽尼普定;培门冬酶;培得星(peldesine);戊糖多硫酸钠;喷司他丁;喷曲唑(pentrozole);全氟溴烷;培磷酰胺;紫苏醇;吩嗪霉素(phenazinomycin);苯乙酸盐;磷酸酶抑制剂;溶链菌制剂(picibanil);盐酸毛果芸香碱;吡柔比星;吡曲克辛;placetin A;placetin B;纤溶酶原激活物抑制剂;铂络合物;铂化合物;铂-三胺络合物;吡吩姆钠;紫菜霉素;强的松;丙基双吡啶酮;前列腺素J2;蛋白酶体抑制剂;基于蛋白A的免疫调节剂;蛋白激酶C抑制剂;微藻蛋白激酶C抑制剂;蛋白酪氨酸磷酸酶抑制剂;嘌呤核苷磷酸化酶抑制剂;红紫素;甲氧基吡唑啉吡啶;吡哆酸化血红蛋白聚氧乙烯缀合物(pyridoxylated hemoglobin polyoxyethylene conjugate);raf拮抗剂;雷替曲塞;雷莫司琼;ras法尼基蛋白转移酶抑制剂;ras抑制剂;ras-GAP抑制剂;去甲基化瑞替普汀;依替膦酸铼Re 186;根霉素;核酶;RII维甲酰胺(RII retinamide);罗谷亚胺;罗希吐碱;罗莫肽;罗喹美克;rubiginone B1;ruboxyl;沙芬戈;saintopin;SarCNU;sarcophytol A;沙格司亭;Sdi 1模拟物;司莫司汀;衰老衍生的抑制剂1;有义寡核苷酸;信号转导抑制剂;信号转导调节剂;单链抗原结合蛋白;西佐喃;索布佐生;硼卡钠;苯乙酸钠;solverol;生长调节素结合蛋白;索纳明;斯帕磷酸;穗霉素D(spicamycin D);螺莫司汀;斯耐潘定;海绵抑素1(spongistatin 1);角鲨胺;干细胞抑制剂;干细胞分裂抑制剂;stipiamide;基质溶素抑制剂(stromelysin inhibitor);sulfinosine;强效血管活性肠肽拮抗剂;suradista;苏拉明;苦马豆素;合成的糖胺聚糖;他莫司汀;它莫西芬甲碘化物;牛磺莫司汀;他扎罗汀;替可加兰钠;替加氟;tellurapyrylium;端粒酶抑制剂;替莫唑胺;替尼泊苷;四氯十氧化物(tetrachlorodecaoxide);四氮脉(tetrazomine);菌体胚素(thaliblastine);噻可拉林(thiocoraline);血小板生成素;血小板生成素模拟物;胸腺法新;胸腺生成素受体激动剂;胸腺曲南;促甲状腺激素;乙基锡初紫红素(tin ethyl etiopurpurin);替拉扎明;二氯二茂钛(titanocene bichloride);topsentin;托瑞米芬;全能干细胞因子;翻译抑制剂;维甲酸;三乙酰尿苷;曲西瑞宾;三甲曲沙;曲普瑞林;托烷司琼;妥罗雄脲;酪氨酸激酶抑制剂;酪氨酸磷酸化抑制剂(tyrphostin);UBC抑制剂;乌苯美司;泌尿生殖窦源性生长抑制因子(urogenital sinus-derived growth inhibitory factor);尿激酶受体拮抗剂;伐普肽;variolin B;红细胞基因治疗载体系统;维拉雷琐;藜芦胺;verdins;维替泊芬;长春瑞滨;维萨汀(vinxaltine);vitaxin;伏罗唑;扎诺特隆;折尼铂;亚苄维C(zilasorb);和净司他丁斯酯。在一个实施方案中,抗癌药物是5-氟尿嘧啶、紫杉酚或甲酰四氢叶酸。

[0449] 在一些情况下,例如,在治疗癌症的组合物、制剂和方法中,所施用的组合物或制剂的单位剂量可以为5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或100mg。在一些情况下,所施用的组合物或制剂的总量可以为0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、40、50、60、70、80、90或100g。

[0450] 在一些情况下,本发明提供了包含可通过任何途径单独或与药学上可接受的载体或赋形剂一起施用的T细胞的药物组合物,并且可以以单剂量和多剂量进行这样的施用。更具体地,药物组合物可与各种药学上可接受的惰性载体以片剂、胶囊、锭剂、糖锭、手糖(hand candies)、粉末、喷雾剂、水性悬浮液、可注射溶液、酏剂、糖浆等形式进行组合。这样的载体包括固体稀释剂或填充剂、无菌水性介质和各种无毒有机溶剂等。此外,可借助通常用于此类目的的各种类型的试剂将这样的口服药物制剂适当地变甜和/或调味。

[0451] 例如,细胞可与任何数目的相关治疗方式(包括但不限于采用药剂如抗病毒疗法、西多福韦和白介素-2或阿糖胞苷(也称为ARA-C)进行的治疗)联合(例如,在该相关治疗方式之前、同时或之后)施用于患者。在一些情况下,工程化细胞可与化疗、放疗、免疫抑制剂如环孢菌素、硫唑嘌呤、甲氨蝶呤、霉酚酸酯和FK506、抗体或其他免疫消融剂(immunoablative agent)如CAMPATH、抗CD3抗体或其他抗体疗法、细胞毒素、氟达拉滨、环孢菌素、FK506、雷帕霉素、霉酚酸、类固醇、FR901228、细胞因子和辐射组合使用。工程化细胞组合物还可与骨髓移植,使用化疗剂如氟达拉滨、外线束放疗(XRT)、环磷酰胺或抗体如OKT3或CAMPATH进行的T细胞消融疗法联合(例如,在该疗法之前、同时或之后)施用于患者。在一些情况下,可在B细胞消融疗法如与CD20反应的药剂,例如,Rituxan之后施用本发明的工程化细胞组合物。例如,受试者可经历采用高剂量化疗的标准治疗,然后进行外周血干细胞移植。在某些情况下,在移植之后,受试者可接受本发明的工程化细胞例如扩充的工程化细胞的输注。此外,可在手术前或手术后施用扩充的工程化细胞。通过本文所述的任何一种方法获得的工程化细胞可用于本发明的特定方面,以用于治疗有需要的患者的宿主抗移植物(HvG)排斥和移植物抗宿主病(GvHD)。因此,考虑治疗有需要的患者的宿主抗移植物(HvG)排斥和移植物抗宿主病(GvHD)的方法,该方法包括通过向患者施用有效量的包含失活的TCR α 和/或TCR β 基因的工程化细胞来治疗患者。

使用方法

[0452] 如本文所述,可从人提取细胞。细胞可经离体遗传改变并相应地被使用。这些细胞可用于基于细胞的疗法。这些细胞可用于治疗接受者(例如,人)的疾病。例如,这些细胞可用于治疗癌症。

[0453] 本文描述了治疗接受者的疾病(例如,癌症)的方法,该方法包括向该接受者移植包括工程化细胞的一个或多个细胞(包括器官和/或组织)。通过细胞内基因组移植制备的细胞可用于治疗癌症。

[0454] 本文描述了治疗接受者的疾病(例如,癌症)的方法,该方法包括向该接受者移植包括工程化细胞的一个或多个细胞(包括器官和/或组织)。在一些情况下,将向患者施用 5×10^{10} 个细胞。在其他情况下,将向患者施用 5×10^{11} 个细胞。

[0455] 在一些实施方案中,向受试者施用约 5×10^{10} 个细胞。在一些实施方案中,约 5×10^{10} 个细胞代表施用于受试者的细胞的中值量。在一些实施方案中,约 5×10^{10} 个细胞是在受试者中实现治疗反应所必需的。在一些实施方案中,至少约 1×10^7 个细胞、至少约 2×10^7 个细胞、至少约 3×10^7 个细胞、至少约 4×10^7 个细胞、至少约 5×10^7 个细胞、至少约 6×10^7 个细胞、至少约 6×10^7 个细胞、至少约 8×10^7 个细胞、至少约 9×10^7 个细胞、至少约 1×10^8 个细胞、至少约 2×10^8 个细胞、至少约 3×10^8 个细胞、至少约 4×10^8 个细胞、至少约 5×10^8 个细胞、至少约 6×10^8 个细胞、至少约 6×10^8 个细胞、至少约 8×10^8 个细胞、至少约 9×10^8 个细胞、至少约 1×10^9 个细胞、至少约

2x10⁹个细胞、至少约3x10⁹个细胞、至少约4x10⁹个细胞、至少约5x10⁹个细胞、至少约6x10⁹个细胞、至少约6x10⁹个细胞、至少约8x10⁹个细胞、至少约9x10⁹个细胞、至少约1x10¹⁰个细胞、至少约2x10¹⁰个细胞、至少约3x10¹⁰个细胞、至少约4x10¹⁰个细胞、至少约5x10¹⁰个细胞、至少约6x10¹⁰个细胞、至少约6x10¹⁰个细胞、至少约8x10¹⁰个细胞、至少约9x10¹⁰个细胞、至少约1x10¹¹个细胞、至少约2x10¹¹个细胞、至少约3x10¹¹个细胞、至少约4x10¹¹个细胞、至少约5x10¹¹个细胞、至少约6x10¹¹个细胞、至少约6x10¹¹个细胞、至少约8x10¹¹个细胞、至少约9x10¹¹个细胞或至少约1x10¹²个细胞。例如,可向受试者施用约5x10¹⁰个细胞。在另一个实例中,以3x10⁶个细胞开始,这些细胞可扩充至约5x10¹⁰个细胞并施用于受试者。在一些情况下,将细胞扩充至足够的数目以供治疗。例如,5x10⁷个细胞可经历快速扩充以生成足够的数目用于治疗用途。在一些情况下,用于治疗用途的足够数目可以是5x10¹⁰个。任何数目的细胞均可被输注用于治疗用途。例如,可向患者输注1x10⁶至5x10¹² (包括两端值) 数目的细胞。可向患者输注可针对这些细胞生成的尽可能多的细胞。在一些情况下,输注到患者中的细胞并不全是工程化的。例如,至少90%的输注到患者中的细胞可以是工程化的。在其他情况下,至少40%的输注到患者中的细胞可以是工程化的。

[0456] 在一些实施方案中,本公开内容的方法包括计算在受试者中实现治疗反应所必需的工程化细胞的量和/或向受试者施用所述量的工程化细胞。在一些实施方案中,计算实现治疗反应所必需的工程化细胞的量包括细胞的活力和/或转基因整合到细胞基因组中的效率。在一些实施方案中,为了在受试者中实现治疗反应,施用于受试者的细胞可以是活细胞。在一些实施方案中,为了在受试者中实现治疗反应,至少约95%、至少约90%、至少约85%、至少约80%、至少约75%、至少约70%、至少约65%、至少约60%、至少约55%、至少约50%、至少约45%、至少约40%、至少约35%、至少约30%、至少约25%、至少约20%、至少约15%、至少约10%的细胞是活细胞。在一些实施方案中,为了在受试者中实现治疗反应,施用于受试者的细胞可以是已经具有成功整合到细胞基因组中的一种或多种转基因的细胞。在一些实施方案中,为了在受试者中实现治疗反应,至少约95%、至少约90%、至少约85%、至少约80%、至少约75%、至少约70%、至少约65%、至少约60%、至少约55%、至少约50%、至少约45%、至少约40%、至少约35%、至少约30%、至少约25%、至少约20%、至少约15%、至少约10%的细胞已经具有成功整合到细胞基因组中的一种或多种转基因。

[0457] 本文公开的方法可用于治疗或预防疾病,包括但不限于癌症、心血管疾病、肺疾病、肝脏疾病、皮肤疾病或神经疾病。

[0458] 移植可以是任何类型的移植。部位可包括但不限于肝包膜下空间、脾包膜下空间、肾包膜下空间、网膜、胃或肠粘膜下层、小肠血管节段、静脉囊、睾丸、脑、脾或角膜。例如,移植可以是包膜下移植。移植还可以是肌内移植。移植可以是门静脉内移植。

[0459] 移植可以是来自人的一个或多个细胞的移植。例如,该一个或多个细胞可来自器官,该器官可以是脑、心脏、肺、眼、胃、胰腺、肾、肝、肠、子宫、膀胱、皮肤、毛发、指甲、耳、腺体、鼻、嘴、嘴唇、脾、牙龈、牙齿、舌头、唾液腺、扁桃体、咽、食管、大肠、小肠、直肠、肛门、甲状腺、胸腺、骨骼、软骨、肌腱、韧带、肾上腺囊、骨骼肌、平滑肌、血管、血液、脊髓、气管、输尿管、尿道、下丘脑、垂体、幽门、肾上腺、卵巢、输卵管、子宫、阴道、乳腺、睾丸、精囊、阴茎、淋巴、淋巴结或淋巴管。该一个或多个细胞还可来自脑、心脏、肝、皮肤、肠、肺、肾、眼、小肠或胰腺。该一个或多个细胞可来自胰腺、肾、眼、肝、小肠、肺或心脏。该一个或多个细胞可来自

胰腺。该一个或多个细胞可以是胰岛细胞,例如,胰腺 β 细胞。该一个或多个细胞可以是任何血细胞,如外周血单核细胞(PBMC)、淋巴细胞、单核细胞或巨噬细胞。该一个或多个细胞可以是任何免疫细胞,如淋巴细胞、B细胞或T细胞。

[0460] 本文公开的方法还可包括移植一个或多个细胞,其中该一个或多个细胞可以是任何类型的细胞。例如,该一个或多个细胞可以是上皮细胞、成纤维细胞、神经细胞、角质形成细胞、造血细胞、黑素细胞、软骨细胞、淋巴细胞(B和T)、巨噬细胞、单核细胞、单个核细胞、心肌细胞、其他肌细胞、颗粒细胞、丘细胞、表皮细胞、内皮细胞、胰岛细胞、血细胞、血液前体细胞、骨细胞、骨前体细胞、神经元干细胞、原始干细胞、肝细胞、角质形成细胞、脐静脉内皮细胞、主动脉内皮细胞、微血管内皮细胞、成纤维细胞、肝星状细胞、主动脉平滑肌细胞、心肌细胞、神经元、枯否细胞(Kupffer cell)、平滑肌细胞、施万细胞(Schwann cell)和上皮细胞、红细胞、血小板、嗜中性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、脂肪细胞、软骨细胞、胰岛细胞、甲状腺细胞、甲状旁腺细胞、腮腺细胞、肿瘤细胞、神经胶质细胞、星形胶质细胞、红细胞、白细胞、巨噬细胞、上皮细胞、体细胞、垂体细胞、肾上腺细胞、毛细胞、膀胱细胞、肾细胞、视网膜细胞、视杆细胞、视锥细胞、心脏细胞、起搏细胞、脾细胞、抗原呈递细胞、记忆细胞、T细胞、B细胞、浆细胞、肌肉细胞、卵巢细胞、子宫细胞、前列腺细胞、阴道上皮细胞、精细胞、睾丸细胞、生殖细胞、卵细胞、莱迪希细胞(leydig cell)、管周细胞、支持细胞(sertoli cell)、黄体细胞、子宫颈细胞、子宫内膜细胞、乳房细胞、滤泡细胞、粘液细胞、纤毛细胞、非角化上皮细胞、角化上皮细胞、肺细胞、杯形细胞、柱状上皮细胞、多巴胺能细胞(dopamiergic cell)、鳞状上皮细胞、骨细胞、成骨细胞、破骨细胞、多巴胺能细胞、胚胎干细胞、成纤维细胞和胎儿成纤维细胞。此外,所述一个或多个细胞可以是胰岛细胞和/或细胞簇等,包括但不限于胰腺 α 细胞、胰腺 β 细胞、胰腺 δ 细胞、胰腺F细胞(例如,PP细胞)或胰腺 ϵ 细胞。在一种情况下,所述一个或多个细胞可以是胰腺 α 细胞。在另一种情况下,所述一个或多个细胞可以是胰腺 β 细胞。

[0461] 供体可处于任何发育阶段,包括但不限于胎儿期、新生儿期、幼年期和成年期。例如,可从成年人分离供体T细胞。供体人类T细胞可以为10、9、8、7、6、5、4、3、2或1岁以下的年龄。例如,可从6岁以下年龄的人分离T细胞。还可从3岁以下年龄的人分离T细胞。供体可大于10岁。

a. 移植

[0462] 本文公开的方法可包括移植。移植可以是自体移植、异体移植、异种移植或任何其他移植。例如,移植可以是异种移植。移植还可以是异体移植。

[0463] 如本文所用的“异种移植”及其语法等同项可包括涉及将细胞、组织或器官移植、植入或输注到接受者中的任何程序,其中接受者和供体是不同的物种。本文所述的细胞、器官和/或组织的移植可用于向人类中的异种移植。异种移植包括但不限于血管化异种移植、部分血管化异种移植、非血管化异种移植、异种敷料(xenodressings)、异种绷带(xenobandages)和异种结构。

[0464] 如本文所用的“异体移植”及其语法等同项(例如,同种异体移植)可包括涉及将细胞、组织或器官移植、植入或输注到接受者中的任何程序,其中接受者和供体是相同的物种但为不同的个体。本文所述的细胞、器官和/或组织的移植可用于向人类中的异体移植。异体移植包括但不限于血管化异体移植、部分血管化异体移植、非血管化异体移植、异体敷料

(alldressings)、异体绷带(allobandages)和异体结构。

[0465] 如本文所用的“自体移植(Autotransplantation)”及其语法等同项(例如,自体移植(autologous transplantation))可包括涉及将细胞、组织或器官移植、植入或输注到接受者中的任何程序,其中接受者和供体是同一个体。本文所述的细胞、器官和/或组织的移植可用于向人类中的自体移植。自体移植包括但不限于血管化自体移植、部分血管化自体移植、非血管化自体移植、自体敷料(alldressings)、自体绷带(autobandages)和自体结构。

[0466] 治疗(例如,如本文所公开的任何治疗)后,移植排斥反应与将一种或多种野生型细胞移植到接受者中相比可得到改善。例如,移植排斥反应可以是超急性排斥反应。移植排斥反应还可以是急性排斥反应。其他类型的排斥反应可包括慢性排斥反应。移植排斥反应还可以是细胞介导的排斥反应或T细胞介导的排斥反应。移植排斥反应还可以是自然杀伤细胞介导的排斥反应。

[0467] 如本文所用的“改善”及其语法等同项可意指本领域技术人员所认识到的任何改善。例如,改善移植可意指减轻超急性排斥反应,其可包括不良作用或症状的减少、减轻或削弱。

[0468] 移植之后,移植的细胞在接受者中可以是功能性的。在一些情况下,功能性可确定移植是否成功。例如,移植的细胞可在至少或至少约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10天或更多天是功能性的。这可指示移植是成功的。这还可指示移植的细胞、组织和/或器官没有排斥反应。

[0469] 在某些情况下,移植的细胞可在至少1天是功能性的。移植的细胞还可在至少7天是功能性的。移植的细胞可在至少14天是功能性的。移植的细胞可在至少21天是功能性的。移植的细胞可在至少28天是功能性的。移植的细胞可在至少60天是功能性的。

[0470] 成功移植的另一指示可以是接受者不需要免疫抑制治疗的天数。例如,在本文提供的治疗(例如,移植)之后,接受者可在至少或至少约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10天或更多天不需要免疫抑制治疗。这可指示移植是成功的。这还可指示移植的细胞、组织和/或器官没有排斥反应。

[0471] 在一些情况下,接受者可在至少1天不需要免疫抑制治疗。接受者还可在至少7天不需要免疫抑制治疗。接受者可在至少14天不需要免疫抑制治疗。接受者可在至少21天不需要免疫抑制治疗。接受者可在至少28天不需要免疫抑制治疗。接受者可在至少60天不需要免疫抑制治疗。此外,接受者可在至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10年或更多年不需要免疫抑制治疗。

[0472] 成功移植的另一指示可以是接受者需要减少的免疫抑制治疗的天数。例如,在本文提供的治疗之后,接受者可在至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10天或更多天需要减少的免疫抑制治疗。这可指示移植是成功的。这还可指示移植的细胞、组织和/或器官没有排斥反应或仅有最小的排斥反应。

[0473] 在一些情况下,接受者可在至少1天不需要免疫抑制治疗。接受者还可在至少或至少约7天不需要免疫抑制治疗。接受者可在至少或至少约14天不需要免疫抑制治疗。接受者可在至少或至少约21天不需要免疫抑制治疗。接受者可在至少或至少约28天不需要免疫抑制治疗。接受者可在至少或至少约60天不需要免疫抑制治疗。此外,接受者可在至少或至少约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10年或更多年不需要免疫抑制治疗。

[0474] 成功移植的另一指示可以是接受者需要减少的免疫抑制治疗的天数。例如,在本文提供的治疗之后,接受者可在至少或至少约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10天或更多天需要减少的免疫抑制治疗。这可指示移植是成功的。这还可指示移植的细胞、组织和/或器官没有排斥反应或仅有最小的排斥反应。

[0475] 如本文所用的“减少的”及其语法等同项可指与将一种或多种野生型细胞移植到接受者中时所需的免疫抑制治疗相比更少的免疫抑制治疗。

[0476] 免疫抑制治疗可包括抑制免疫系统的任何治疗。免疫抑制治疗可帮助缓解、最小化或消除接受者的移植排斥反应。例如,免疫抑制治疗可包括免疫抑制药物。可在移植之前、期间和/或之后使用的免疫抑制药物包括但不限于MMF(霉酚酸酯(Cellcept))、ATG(抗胸腺细胞球蛋白)、抗CD154(CD40L)、抗CD40(2C10、ASKP1240、CCFZ533X2201)、阿仑单抗(Campath)、抗CD20(利妥昔单抗)、抗IL-6R抗体(托珠单抗,Actemra)、抗IL-6抗体(sarilumab、奥鲁凯珠单抗(olokizumab))、CTLA4-Ig(阿巴西普/Orencia)、贝拉西普(LEA29Y)、西罗莫司(Rapimune)、依维莫司、他克莫司(Prograf)、达利珠单抗(Zenapax)、巴利昔单抗(Simulect)、英夫利昔单抗(Remicade)、环孢菌素、脱氧精肌菌素、可溶性补体受体1、眼镜蛇毒因子、compstatin、抗C5抗体(依库珠单抗/Soliris)、甲基强的松龙、FTY720、依维莫司、来氟米特、抗IL-2R-Ab、雷帕霉素、抗CXCR3抗体、抗ICOS抗体、抗OX40抗体和抗CD122抗体。此外,一种或多于一种免疫抑制剂/药物可一起使用或依次使用。一种或多于一种免疫抑制剂/药物可用于诱导治疗或用于维持治疗。可在诱导和维持阶段使用相同或不同的药物。在一些情况下,达利珠单抗(Zenapax)可用于诱导治疗,而他克莫司(Prograf)和西罗莫司(Rapimune)可用于维持治疗。达利珠单抗(Zenapax)还可用于诱导治疗,而低剂量的他克莫司(Prograf)和低剂量的西罗莫司(Rapimune)可用于维持治疗。还可使用非药物方案来实现免疫抑制,该非药物方案包括但不限于全身照射、胸腺照射和全部和/或部分脾切除术。这些技术还可与一种或多种免疫抑制药物组合使用。

实施例

实施例1:确定各种核酸递送平台的转染效率

从LeukoPak分离外周血单核细胞(PBMC)

[0477] 本文使用从正常外周血收集的leukopak。用冷冻的1X PBS以3比1稀释血细胞。在50mL锥形瓶中的15mL LYMPHOPREP(stem cell Technologies)上逐滴(例如,非常缓慢地)添加稀释的血液。在400x G下并且在无制动情况下将细胞旋转25分钟。缓慢取出血沉棕黄层并将其置于无菌锥形瓶中。用冷冻的1X PBS洗涤细胞并将细胞在400x G下旋转10分钟。去除上清液,将细胞重悬于培养基中,计数并在冷冻培养基(45mL热灭活的FBS和5mL DMSO)中进行有活力的冷冻。

CD3+T细胞的分离

[0478] 将PBMC解冻并在培养基(RPMI-1640(不含酚红),20%FBS(热灭活)和1X Gluta-MAX)中铺板1-2小时。收集细胞并计数;将细胞密度调整至 5×10^7 个细胞/mL并转移至无菌14mL聚苯乙烯圆底管中。使用EasySep人CD3细胞分离试剂盒(EasySep Human CD3 cell Isolation Kit,stem cell Technologies),将50 μ L/mL的分离混合物添加至细胞中。通过用吸移管吸移将混合物混合并在室温下温育5分钟。温育后,将RapidSpheres涡旋30秒并以50 μ L/mL添加至样品中;通过用吸移管吸移进行混合。对于少于4mL的样品,将混合物加满至

5mL,或对于超过4mL的样品,将混合物加满至10mL。将无菌聚苯乙烯管添加至“Big Easy”磁体中;在室温下温育3分钟。以一次连续运动将磁体和管倒置,从而将所富集的细胞悬浮液倒入新的无菌管中。

CD3+T细胞的活化和刺激

[0479] 对分离的CD3+T细胞进行计数,并在24孔板中以 2×10^6 个细胞/mL的密度进行铺板。在用含有0.2%BSA的1X PBS洗涤Dynabeads人T-活化剂CD3/CD28珠(Gibco,Life Technologies)后,使用dynamagnet以3:1(珠子:细胞)将该珠添加至细胞中。以300IU/mL的浓度添加IL-2(Peprotech)。将细胞温育48小时,然后使用dynamagnet去除珠子。细胞在电穿孔或核转染前再培养6-12小时。

CD3+T细胞的Amaxa转染

[0480] 使用Amaxa Human T Cell Nucleofector Kit(Lonza,Switzerland)对未刺激或刺激的T细胞进行核转染(图82A和图82B)。对细胞进行计数,并将细胞以100 μ L室温Amaxa缓冲液中 $1-8 \times 10^6$ 个细胞的密度进行重悬。将1-15 μ g的mRNA或质粒添加至细胞混合物中。使用U-014程序对细胞进行核转染。核转染后,将细胞铺在6孔板中的2mL培养基中。

CD3+T细胞的Neon转染

[0481] 使用Neon转染系统(10 μ L试剂盒,Invitrogen,Life Technologies)对未刺激或刺激的T细胞进行电穿孔。对细胞进行计数,并将细胞以10 μ L T缓冲液中 2×10^5 个细胞的密度进行重悬。将1 μ g的GFP质粒或mRNA或1 μ g Cas9和1 μ g的gRNA质粒添加至细胞混合物中。以1400V、10ms、3个脉冲对细胞进行电穿孔。转染后,将细胞铺在48孔板中的200 μ L培养基中。

RNA的脂质转染和CD3+T细胞的质粒DNA转染

[0482] 以 5×10^5 个细胞/mL的密度将未刺激的T细胞铺在24孔板中。对于RNA转染,根据制造商的方案,使用TransIT-mRNA转染试剂盒(TransIT-mRNA Transfection Kit,Mirus Bio),用500ng的mRNA对T细胞进行转染。对于质粒DNA转染,根据制造商的方案,使用TransIT-X2动态递送系统(TransIT-X2 Dynamic Delivery System,Mirus Bio),用500ng的质粒DNA对T细胞进行转染。将细胞在37 $^{\circ}$ C下温育48小时,然后通过流式细胞术进行分析。

金纳米颗粒SmartFlares的CD3+T细胞摄入

[0483] 将未刺激或刺激的T细胞以 $1-2 \times 10^5$ 个细胞/孔的密度铺在在200 μ L培养基中的48孔板中。在添加至细胞之前,将与Cy5或Cy3复合的金纳米颗粒SmartFlared(Millipore,德国)涡旋30秒。将1 μ L的金纳米颗粒SmartFlares添加至每个孔的细胞中。在通过流式细胞术分析Cy5或Cy3表达之前,将板摇晃1分钟并在37 $^{\circ}$ C下温育24小时。

流式细胞术

[0484] 在转染后24-48小时通过流式细胞术分析电穿孔和核转染的T细胞的GFP表达。通过用冷冻的含有0.5%FBS的1X PBS洗涤并用APC抗人CD3 ϵ (eBiosciences, San Diego)和可固定活力染料(Fixable Viability Dye)eFlour 780(eBiosciences, San Diego)进行染色来制备细胞。使用LSR II(BD Biosciences, San Jose)和FlowJo v.9分析细胞。

结果

[0485] 如表2中所示,使用四种示例性转染平台测试总计六种细胞和DNA/RNA组合。六种细胞和DNA/RNA组合为:将EGFP质粒DNA添加至未刺激的PBMC中;将EGFP质粒DNA添加至未刺激的T细胞中;将EGFP质粒DNA添加至刺激的T细胞中;将EGFP mRNA添加至未刺激的PBMC中;

将EGFP mRNA添加至未刺激的T细胞中;以及将EGFP mRNA添加至刺激的T细胞中。四种示例性转染平台为:AMAXA核转染、NEON电穿孔、基于脂质的转染和金纳米颗粒递送。表1中列出了各种条件下的转染效率(转染细胞的百分比)结果,并且使用AMAXA平台将mRNA添加至刺激的T细胞提供了最高的效率。

表2. 各种核酸递送平台的转染效率

核酸递送平台						
细胞类型	DNA 或 RNA	Amaya	NEON	基于脂质的		金纳米颗粒
PBMC 加载 (未刺激的)	EGFP 质粒	8.1% (CD3 T 细胞)				
T 细胞加载(未刺激的)	EGFP 质粒	28.70%	>0.1%	>0.1% (DNA)	>0.1% (RNA)	54.8% Cy5 阳性
T 细胞加载(刺激的, CD3/CD28)	EGFP 质粒		32.10%	>0.1% (DNA)	>0.1% (RNA)	
PBMC 加载 (未刺激的)	EGFP mRNA	28.1% (CD3 T 细胞)				
T 细胞加载(未刺激的)	EGFP mRNA	29.80%				
T 细胞加载(刺激的, CD3/CD28)	EGFP mRNA	90.30%	81.40%			29.1% Cy5 阳性

[0486] 将在未来使用类似的方法测试包括外来体介导的转染在内的其他转染条件。此外,还将使用类似的方法测试其他递送组合,包括DNA Cas9/DNA gRNA、mRNA Cas9/DNA gRNA、蛋白Cas9/DNA gRNA、DNA Cas9/gRNA的PCR产物、DNA Cas9/gRNA的PCR产物、mRNA Cas9/gRNA的PCR产物、蛋白Cas9/gRNA的PCR产物、DNA Cas9/修饰的gRNA、mRNA Cas9/修饰的gRNA和蛋白Cas9/修饰的gRNA。具有高递送效率的组合可用于本文公开的方法中。

实施例2:确定GFP质粒在T细胞中的转染效率

[0487] 使用GFP质粒采用Amaya核转染的原代T细胞的转染效率。图4示出了为该实验所制备的四种质粒的结构:Cas9核酸酶质粒、HPRT gRNA质粒(靶向人HPRT基因的CRISPR gRNA)、Amaya EGFPmax质粒和HPRT靶载体。HPRT靶载体具有0.5kb的靶向臂(图5)。样品制备、流式细胞术和其他方法与实验1类似。使用无内毒素试剂盒(Qiagen)制备质粒。测试不同的条件(在表3中示出),包括细胞数目和质粒组合。

表3. 实验中使用的不同条件

样品ID	#PBMC	质粒	GFP' (ug)	Cas9' (ug)	gRNA' (ug)	靶标' (ug)
1	5×10^6	GFP	5	0	0	0
2	2×10^7	Cas9	0.1	20	0	0
3	2×10^7	Cas9+gRNA	0.1	10	10	0
4	2×10^7	Cas9+gRNA+靶标	0.1	5	5	10

5	2×10^7	Cas9+gRNA+靶标	0.1	2.5	2.5	15
6	2×10^7	GFP	5	0	0	0

结果

[0488] 图7显示Cas9+gRNA+靶质粒共转染在整体群体(bulk population)中具有良好的转染效率。图8示出了CD3+T细胞的EGFP FACS分析结果。使用上述条件证明了不同的转染效率。图40A和图40B示出了用供体转基因进行CRISPR转染后第6天的活力和转染效率(%GFP+)。

实施例3:鉴别每个基因位点处具有最高双链断裂(DSB)诱导的gRNA

指导RNA的设计和构建:

[0489] 使用CRISPR设计程序(Zhang Lab, MIT 2015)将指导RNA(gRNA)设计成期望的基因区域。基于由脱靶位置所确定的最高排名值来选择用于生成gRNA的多种引物(在表4中示出)。gRNA以寡核苷酸对进行排序:5'-CACCG-gRNA序列-3'和5'-AAAC-反向互补gRNA序列-C-3'(寡核苷酸对的序列在表4中列出)。

表4. 用于生成gRNA的引物(出于克隆的目的,将CACCG序列添加至有义链并将AAAC添加至反义链)。

SEQ ID	引物名称	序列 5'-3'
5	HPRT gRNA 1 有义	CACCGCACGTGTGAACCAACCCGCC
6	HPRT gRNA 1 反义	AAACGGCGGGTTGGTTCACACGTGC
7	HPRT gRNA 2 有义	CACCGAAACAACAGGCCGGGCGGGT
8	HPRT gRNA 2 反义	AAACACCCGCCCCGGCCTGTTGTTTC

9	HPRT gRNA 3 有义	CACCGACAAAAAATTAGCCGGGTG
10	HPRT gRNA 3 反义	AAACCACCCGGCTAATTTTTTTGT
11	HPRT gRNA 4 有义	CACCGTAAATTTCTCTGATAGACTA
12	HPRT gRNA 4 反义	AAACTAGTCTATCAGAGAAATTTAC
13	HPRT gRNA 5 有义	CACCGTGTTTCAATGAGAGCATTAC
14	HPRT gRNA 5 反义	AAACGTAATGCTCTCATTGAAACAC
15	HPRT gRNA 6 有义	CACCGGTCTCGAACTCCTGAGCTC
16	HPRT gRNA 6 反义	AAACGAGCTCAGGAGTTCGAGACC
17	HPRT Cell 正向	AGTGAAGTGGCGCATTCTTG
18	HPRT Cell 反向	CACCCTTTCCAAATCCTCAGC
19	AAVS1 gRNA 1 有义	CACCGTGGGGGTTAGACCCAATATC
20	AAVS1 gRNA 1 反义	AAACGATATTGGGTCTAACCCCCAC
21	AAVS1 gRNA 2 有义	CACCGACCCCACAGTGGGGCCACTA
22	AAVS1 gRNA 2 反义	AAACTAGTGGCCCCACTGTGGGGTC
23	AAVS1 gRNA 3 有义	CACCGAGGGCCGGTTAATGTGGCTC
24	AAVS1 gRNA 3 反义	AAACGAGCCACATTAACCGGCCCTC
25	AAVS1 gRNA 4 有义	CACCGTCACCAATCCTGTCCCTAG
26	AAVS1 gRNA 4 反义	AAACCTAGGGACAGGATTGGTGAC
27	AAVS1 gRNA 5 有义	CACCGCCGGCCCTGGGAATATAAGG
28	AAVS1 gRNA 5 反义	AAACCCTTATATTCCCAGGGCCGGC
29	AAVS1 gRNA 6 有义	CACCGCGGGCCCCTATGTCCACTTC
30	AAVS1 gRNA 6 反义	AAACGAAGTGGACATAGGGGCCCGC
31	AAVS1 Cell 正向	ACTCCTTTCATTIGGGCAGC
32	AAVS1 Cell 反向	GGTTCTGGCAAGGAGAGAGA
33	PD-1 gRNA 1 有义	CACCGCGGAGAGCTTCGTGCTAAAC
34	PD-1 gRNA 1 反义	AAACGTTTAGCACGAAGCTCTCCGC
35	PD-1 gRNA 2 有义	CACCGCCTGCTCGTGGTGACCGAAG
36	PD-1 gRNA 2 反义	AAACCTTCGGTCACCACGAGCAGGC
37	PD-1 gRNA 3 有义	CACCGCAGCAACCAGACGGACAAGC
38	PD-1 gRNA 3 反义	AAACGCTTGTCCTGCTGGTTGCTGC
39	PD-1 gRNA 4 有义	CACCGAGGCGGCCAGCTTGTCCTGC
40	PD-1 gRNA 4 反义	AAACGACGGACAAGCTGGCCGCCTC
41	PD-1 gRNA 5 有义	CACCGCGTTGGGCAGTTGTGTGACA
42	PD-1 gRNA 5 反义	AAACTGTCACACAACCTGCCCAACGC
43	PD-1 gRNA 6 有义	CACCGACGGAAGCGGCAGTCCTGGC
44	PD-1 gRNA 6 反义	AAACGCCAGGACTGCCGCTTCCGTC
45	PD-1 Cell 正向	AGAAGGAAGAGGCTCTGCAG
46	PD-1 Cell 反向	CTCTTTGATCTGCGCCTTGG
47	CTLA4 gRNA 1 有义	CACCGCCGGGTGACAGTGCTTCGGC
48	CTLA4 gRNA 1 反义	AAACGCCGAAGCACTGTCACCCGGC
49	CTLA4 gRNA 2 有义	CACCGTGCGGCAACCTACATGATG
50	CTLA4 gRNA 2 反义	AAACCATCATGTAGGTTGCCGCAC
51	CTLA4 gRNA 3 有义	CACCGCTAGATGATTCCATCTGCAC

52	CTLA4 gRNA 3 反义	AAACGTGCAGATGGAATCATCTAGC
53	CTLA4 gRNA 4 有义	CACCGAGGTTCACTTGATTTCAC
54	CTLA4 gRNA 4 反义	AAACGTGGAAATCAAGTGAACCTC
55	CTLA4 gRNA 5 有义	CACCGCCGCACAGACTTCAGTCACC
56	CTLA4 gRNA 5 反义	AAACGGTGACTGAAGTCTGTGCGGC
57	CTLA4 gRNA 6 有义	CACCGCTGGCGATGCCTCGGCTGC
58	CTLA4 gRNA 6 反义	AAACGCAGCCGAGGCATCGCCAGC
59	CTLA4 CclI 正向	TGGGGATGAAGCTAGAAGGC
60	CTLA4 CclI 反向	AATCTGGGTTCCGTTGCCTA
61	CCR5 gRNA 1 有义	CACCGACAATGTGTCAACTCTTGAC
62	CCR5 gRNA 1 反义	AAACGTCAAGAGTTGACACATTGTC
63	CCR5 gRNA 2 有义	CACCGTCATCCTCCTGACAATCGAT
64	CCR5 gRNA 2 反义	AAACATCGATTGTGACGAGGATGAC
65	CCR5 gRNA 3 有义	CACCGGTGACAAGTGTGATCACTT
66	CCR5 gRNA 3 反义	AAACAAGTGATCACACTTGTGACC
67	CCR5 gRNA 4 有义	CACCGACACAGCATGGACGACAGCC
68	CCR5 gRNA 4 反义	AAACGGCTGTCTGTCATGCTGTGTC
69	CCR5 gRNA 5 有义	CACCGATCTGGTAAAGATGATTCC
70	CCR5 gRNA 5 反义	AAACGGAATCATCTTTACCAGATC
71	CCR5 gRNA 6 有义	CACCGTTGTATTTCCTAAAGTCCCAC
72	CCR5 gRNA 6 反义	AAACGTGGGACTTTGGAAATACAAC
73	CCR5 CclI 正向	CTCAACCTGGCCATCTCTGA
74	CCR5 CclI 反向	CCCGAGTAGCAGATGACCAT

[0490] 使用靶序列克隆方案 (Zhang Lab, MIT) 将gRNA克隆在一起。简言之,使用T4PNK (NEB) 和10X T4连接缓冲液 (T4Ligation Buffer, NEB), 在热循环仪中采用以下方案将寡核苷酸对磷酸化并一起退火: 37℃ 30分钟, 95℃ 5分钟, 然后以5℃/分钟逐渐降至25℃。用FastDigest BbsI (Fermentas) 消化pENTR1-U6-Stuffer-gRNA载体 (自制), FastAP (Fermentas) 和10X Fast消化缓冲液 (Fast Digest Buffer) 用于连接反应。使用T4DNA连接酶和缓冲液 (T4DNA Ligase and Buffer, NEB) 将所消化的pENTR1载体与来自先前步骤的磷酸化并退火的寡核苷酸双链体 (稀释度1:200) 连接在一起。将连接物在室温下温育1小时, 然后转化, 并随后使用GeneJET质粒小量制备试剂盒 (GeneJET Plasmid Miniprep Kit) (Thermo Scientific) 进行小量制备。对质粒进行测序以确认正确的插入。

表5工程化CISH指导RNA (gRNA) 靶序列

SEQ ID	gRNA No.	外显子	靶标5' -3'
75	1	2	TTGCTGGCTGTGGAGCGGAC
76	2	2	GACTGGCTTGGGCGAGTTCCA
77	3	2	TGCTGGGGCCTTCCTCGAGG
78	4	2	CCGAAGGTAGGAGAAGGTCT
79	5	2	ATGCACAGCAGATCCTCCTC
80	6	2	AGAGAGTGAGCCAAAGGTGC
81	1	3	GGCATACTCAATGCGTACAT
82	2	3	GGGTCCATTACGGCCAGCG

83	3	3	AAGGCTGACCACATCCGGAA
84	4	3	TGCCGACTCCAGCTTCCGTC
85	5	3	CTGTCAGTGAAAACCACTCG
86	6	3	CGTACTAAGAACGTGCCTTC

[0491] 被工程化gRNA靶向的基因组序列在表5和表6中示出。图44A和图44B示出了靶向CISH基因的修饰的gRNA。

表6 AAVS1gRNA靶序列

SEQ ID	基因	gRNA序列(5'至3')
87	AAVS1	GTCACCAATCCTGTCCCTAG-

gRNA的验证

[0492] 以 1×10^5 个细胞/孔的密度将HEK293T细胞铺在24孔板中。将150uL的Opti-MEM培养基与1.5ug的gRNA质粒、1.5ug的Cas9质粒合并。将另外150uL的Opti-MEM培养基与5μl的Lipofectamine2000转染试剂(Invitrogen)合并。将这些溶液合并在一起并在室温下温育15分钟。将DNA-脂质复合物逐滴添加至24孔板的孔中。将细胞在37℃下温育3天,并使用GeneJET基因组DNA纯化试剂盒(GeneJET Genomic DNA Purification Kit,Thermo Scientific)收集基因组DNA。通过Surveyor消化、凝胶电泳和密度测定对gRNA的活性进行定量(图60和图61)(Guschin,D.Y.,等人,“A Rapid and General Assay for Monitoring Endogenous Gene Modification,”Methods in Molecular Biology,649:247-256(2010))。

质粒靶向载体构建

[0493] 从整个数据库获得靶整合位点的序列。使用Primer3软件基于这些序列设计PCR引物,以生成承载长度为1kb、2kb和4kb大小的靶向载体。然后按照制造商的说明书,使用Accuprime Taq HiFi(Invitrogen)对靶向载体臂进行PCR扩增。然后使用TOPO-PCR-Blunt II克隆试剂盒(Invitrogen)对所得到的PCR产物进行亚克隆并进行序列验证。代表性靶向载体构建体在图16中示出。

结果

[0494] Cas9在不同gRNA序列的协助下产生双链断裂(DSB)的效率在表7中列出。表7中的百分数指示样品中基因修饰的百分比。

表7.Cas9/gRNA对在各个靶基因位点处产生双链断裂(DSB)的效率

	HPRT	AAVS1	CCR5	PD1	CTLA4
gRNA#1	27.85%	32.99%	21.47%	10.83%	40.96%
gRNA#2	30.04%	27.10%	>60%	>60%	56.10%
gRNA#3	<1%	39.82%	55.98%	37.42%	39.33%
gRNA#4	<5%	25.93%	45.99%	20.87%	40.13%
gRNA#5	<1%	27.55%	36.07%	30.60%	15.90%
gRNA#6	<5%	39.62%	33.17%	25.91%	36.93%

[0495] 在所有五个测试的靶基因位点处均产生DSB。在这些位点中,CCR5、PD1和CTLA4提供了最高的DSB效率。将使用本文所述的相同方法测试其他靶基因位点,包括hRosa26。

[0496] Cas9联合不同的gRNA序列产生双链断裂的比率在图15中示出。列出了与供体对照

和仅Cas9对照相比的双链断裂百分比。对三个代表性靶基因位点(即CCR5、PD1和CTLA4)进行测试。

实施例4:生成包含工程化TCR并且也破坏免疫检查点基因的T细胞

[0497] 为了生成表达工程化TCR并且也破坏免疫检查点基因的T细胞群体,使用CRISPR、TALEN、基于转座子、ZEN、大范围核酸酶或Mega-TAL基因编辑方法。PD-1和其他内源检查点的总结在表9中示出。细胞(例如,PBMC,T细胞如TIL、CD4+或CD8+细胞)从癌症患者(例如,转移性黑色素瘤)进行纯化并根据标准程序进行培养和/或扩充。(例如,使用抗CD3和抗CD28珠)刺激细胞或不刺激细胞。用携带TCR转基因的靶载体转染细胞。例如,通过IDT获得并合成MBVb22的TCR转基因序列作为gBLOCK。gBLOCK被设计成具有侧翼attB序列,并按照制造商的说明书通过LR克隆酶(Clonase)反应(Invitrogen)将gBLOCK克隆到pENTR1中,并进行序列验证。对以三种不同方式表达TCR转基因的三种转基因构型(参见图6)进行测试:1)外源启动子:TCR转基因由外源启动子转录;2)SA框内转录:TCR转基因通过剪接由内源启动子转录;和3)框内翻译融合:TCR转基因通过框内翻译由内源启动子转录。

[0498] 当使用CRISPR基因编辑方法时,还采用具有携带TCR转基因的靶载体的DNA质粒转染Cas9核酸酶质粒和gRNA质粒(与图4中所示的质粒类似)。可以采用10微克的gRNA和15微克的Cas9mRNA。该gRNA将Cas9核酸酶引导至整合位点,例如,内源检查点基因如PD-1。或者,使用gRNA或修饰RNA的PCR产物(如在Hendel,Nature biotechnology,2015中所述的)。还测试具有Cas9核酸酶基因和gRNA两者的另一质粒。这些质粒被一起转染或分别转染。或者,使用Cas9核酸酶或编码Cas9核酸酶的mRNA来替代Cas9核酸酶质粒。

[0499] 为了优化同源重组的比率以使用CRISPR基因编辑方法整合TCR转基因,测试不同长度的靶载体臂,包括0.5kbp、1kbp和2kbp。例如,具有0.5kbp臂长度的靶载体在图5中示出。此外,还测试几种CRISPR增强剂如SCR7药物和DNA连接酶IV抑制剂(例如,腺病毒蛋白)的影响。

[0500] 除了使用质粒递送携带转基因的同源重组HR增强子之外,还测试mRNA的使用。鉴别能够在原位将mRNA同源重组HR增强子高效转变成DNA的最佳逆转录平台。还优化并实施用于造血干细胞和原代T细胞的工程化的逆转录平台。

[0501] 当使用基于转座子的基因编辑方法(例如,PiggyBac、睡美人(Sleeping Beauty))时,还用具有携带TCR转基因的靶载体的DNA质粒转染转座酶质粒。图2示出了用于TCR转基因整合和表达的一些基于转座子的构建体。

[0502] 然后用编码PD1特异性核酸酶的mRNA处理工程化细胞,并通过Ce1-I测定来分析该群体(图28至图30)以验证PD1破坏和TCR转基因插入。验证之后,使工程化细胞在体外生长并扩充。T7内切核酸酶I(T7E1)测定可用来检测培养细胞中的中靶(on-target)CRISPR事件(图34和图39)。双测序删除在图37和图38中示出。

[0503] 一些工程化细胞用于自体移植(例如,回输给其细胞用于生成工程化细胞的癌症患者)。一些工程化细胞用于同种异体移植(例如,回输给不同的癌症患者)。确定T细胞在治疗患者方面的功效和特异性。可用抗原或抗CD3和抗CD28对已被基因工程化的细胞进行再刺激,以驱动内源检查点基因的表达(图90A和图90B)。

结果

生成具有工程化TCR和免疫检查点基因破坏的T细胞的代表性示例在图17中示出。阳性

PCR结果证明了CCR5基因处的成功重组。免疫检查点敲除的效率在图23A、图23B、图24A和图24B中的代表性实验中示出。示出了图25中的代表性实验的流式细胞术数据。图26A和图26B示出了用CRISPR处理后原代人T细胞中的双敲除百分比。用CRISPR和抗PD-1指导RNA转染后第14天的流式细胞术结果的代表性示例在图45、图51和图52中示出。对于用CRISPR系统和靶向CTLA-4和PD-1的gRNA转染的细胞,转染后14天的细胞活力和基因编辑效率在图53、图54和图55中示出。

实施例5:检测T细胞中的同源重组

[0504] 为了生成表达工程化TCR并且也破坏基因的工程化T细胞群体,使用CRISPR、TALEN、基于转座子、ZEN、大范围核酸酶或Mega-TAL基因编辑方法。为了确定使用同源重组增强子是否促进同源重组,以下实例体现代表性实验。使用NEON转染系统(Invitrogen)对刺激的CD3+T细胞进行电穿孔。对细胞进行计数,并以100 μ L T缓冲液中 $1.0-3.0 \times 10^6$ 个细胞的密度进行重悬。使用15 μ g mRNA Cas9(TriLink BioTechnologies)、10 μ g mRNA gRNA(TriLink BioTechnologies)和10 μ g的同源重组(HR)靶向载体来检测HR。单独的10 μ g HR靶向载体或15 μ g Cas9与10 μ g mRNA gRNA用作对照。电穿孔后,将细胞分成四种条件以测试提示促进HR的两种药物:1) 仅DMSO(媒介物对照),2) SCR7(1 μ M),3) L755507(5 μ M)和4) SCR7和L755507。使用Countess II自动细胞计数器(Countess II Automated Cell Counter, Thermo Fisher)每三天对细胞进行一次计数,以监测在这些不同条件下的生长。为了监测HR,通过流式细胞术分析细胞并通过PCR对细胞进行测试。对于流式细胞术,每周分析一次细胞,持续三周。用APC抗小鼠TCRB(eBiosciences)和可固定活力染料eFluor 780(ixable Viability Dye eFluor 780,eBiosciences)对T细胞进行染色。使用LSR II(BD Biosciences)和FlowJo v.9分析细胞。为了通过PCR测试HR,从T细胞分离gDNA并使用accuprime taq DNA聚合酶(高保真度)(Thermo Fisher)通过PCR进行扩增。将引物设计成针对CCR5基因和HR靶向载体的两端,以寻找位于5'和3'两端的正确的同源重组。

实施例6:预防由外源质粒DNA诱导的毒性

[0505] 外源质粒DNA诱导T细胞中的毒性。图19和图69的先天免疫传感途径描述了毒性发生的机制。为了确定是否可通过添加修饰对外源多核酸的应答的化合物来降低细胞毒性,完成了以下代表性实验。使用NEON转染系统(Invitrogen),采用增加量的质粒DNA(0.1 μ g至40 μ g)对CD3+T细胞进行电穿孔(图91)。电穿孔后,将细胞分成四种条件以测试能够阻断由双链DNA诱导的凋亡的两种药物:1) 仅DMSO(媒介物对照),2) BX795(1 μ M,Invivogen),3) Z-VAD-FMK(50 μ M,R&D Systems),和4) BX795和Z-VAD-FMK。在流动48小时后分析细胞。用可固定活力染料eFluor 780(eBiosciences)对T细胞进行染色,并使用LSR II(BD Biosciences)和FlowJo v.9对T细胞进行分析。

结果

[0506] 图18、图27、图32和图33中示出了用质粒DNA转染的T细胞所经受的毒性的代表性示例。图86中示出了由细胞计数得到的活力。在添加先天免疫途径抑制剂后,经历死亡的T细胞的百分比降低。举例而言,图20示出了用两种不同抑制剂处理的T细胞培养物的凋亡减少的图示。

实施例7:具有基因组区域的重组臂、包含至少一种工程化抗原受体的未甲基化多核酸

[0507] 可以如图21中所示对多核酸进行修饰。为了确定未甲基化的多核酸是否可降低由

外源质粒DNA诱导的毒性并改善基因组工程化,可以采用以下实验实例。为了开始大量制备,挑取含有同源重组靶向载体的细菌菌落并将该菌落接种在含有卡那霉素(1:1000)的5mL LB肉汤中,并使其在37℃下生长4-6小时。然后将起子培养物(starter culture)添加至含有卡那霉素的250mL LB肉汤的较大培养物中,并在37℃下在SssI酶的存在下生长12-16小时。按照制造商方案,使用Hi Speed Plasmid Maxi Kit试剂盒(Qiagen)进行大量制备,但有一个例外。在裂解和中和制备物后,将2.5mL的内毒素毒素去除缓冲液添加至制备物中并在冰上温育45分钟。在层流罩超净台中完成该制备以保持无菌性。使用纳米微滴(Nanodrop)确定制备物的浓度。

实施例8:GUIDE-Seq文库制备

[0508] 从转染的、对照未转染的和CRISPR转染的具有携带外源TCR的微环DNA的细胞分离基因组DNA(表10)。将使用固相可逆固定化磁珠(Agencourt DNAdvance)分离的人T细胞用Covaris S200仪器剪切至平均长度500bp,进行末端修复,进行A加尾,并与合并了8-nt随机分子指标物的半功能性衔接子连接。使用两轮巢式锚定PCR(其中引物与寡核苷酸标签互补)进行靶标富集。末端修复热循环仪程序:12℃15min;37℃15min;72℃15min;保持在4℃。

[0509] 映射回基因组的GUIDE-Seq读取的起始位点能够使DSB定位在几个碱基对内。根据制造商说明书,使用Illumina Library Quantification试剂盒的Kapa Biosystems试剂盒对文库进行定量。使用对每个样品运行qPCR所给出的每uL分子数目的平均数量估计值,继续将总文库集合相对于 1.2×10^{10} 个分子进行归一化,除以待汇集在一起用于测序的文库的数目。这会给出每个样品的按分子输入,并且还给出每个样品的按体积输入。示出了通过GUIDE-Seq评估的由截短的gRNA引导的三种RGN的中靶和脱靶位点的映射读取。在所有的情况下,靶位点序列显示,在x轴上的左边具有前间区序列并且在x轴上的右边具有PAM序列。根据Illumina的标准方案将文库变性并加载到Miseq上,以便采用Illumina Miseq试剂盒V2-300循环(Illumina Miseq Reagent Kit V2-300cycle) (2x 150bp配对端)进行测序。图76A和图76B示出了代表性GUIDE-Seq实验的数据。

实施例9:AAVS1突变蛋白生成

[0510] 对突变cDNA(表8)进行密码子优化并通过整合DNA技术(IDT)将其合成为gBlock片段。将合成的片段亚克隆至mRNA生产载体中用于体外mRNA合成。

表8:腺病毒蛋白的突变cDNA序列

SEQ ID	突变	名称	序列 (5'至3')
88	无	腺病毒血清型5 <i>E4orf6</i>	atgacaacaagtggcgtgccattcgccatgactttgcgcc cacgagatcacgactgtctcgccgaactccctacag ccgggatcgactccctcccttgagactgaaacacg ggccacgatactcgaggaccaccacttctgccgga gtgtaacaccttgacgatgcataacgttagctatgtga gaggtctccctgttctgtcggtttaccctattcaag agtgggtcgtgccgtgggacatggtctcacgagag

			aggagctcgttatectgagaaaatgtatgcacgtttgt ctttgctgtgcaaatatagatataatgacttctatgatga licalggglacgaatctgggacctgcaactgccallgt agcagtcctggctccctccaatgcacgcgggaggc caagttctcgcttctggttagaatggctgtggacgg agcaatgttcaaccagegctttatctggtatcgcgag gtagtcaactataatatgccgaaggagggttatgtttat gtctagtgtgttcacgcgaggagacatttgatttact tagactgtggtatgatggccatgtggaagcgtagt ccggcgatgiccttcggllaciccgcattgcaattggg gattttgaataacatcgttgtactttgtttcactactgcg ccgatctgtcagaaataagggtacgatgctgcgcac ggcgaaccggaggctcatgctgagagccgttcga ataatcgctgaagaacgacagcaatgttgtattcatg ccgaactgaaaggcgacggcaacagtttatacgcg cactctgcagcaccacaggccgatcctgatgcacg actacgatagcactccgatgtag
89	氨基酸 373 处 H->A	腺病毒血清型 5 H373A 突变 体	atggagagaaggaatccatgtagaggggagtgcccgcc gggttttctggtcacgcctccgtggaatccggatgtg agactcaggagtcctccgccaccgtggtgttccgcc caccaggagacaacactgacgggtggcgccggcg tctgcagggtggaagccaagccgccgtgctgggg ccgagccgatggaaccgaatccagaccgggtccc tctggcatgaacgttgtgcaggctgcagaactctacc ccgaactcgcaggatcttgacaatcacggaggac ggccagggcctcaaggaggatgaagagagagagag gggcttgtgaggccactgaggagctcgcaatctgg cgttttcattgatgacaaggcacaggccgggaatgcat tacatccaacagatlaaggacaactgcgcaaacga gctcgatctctggcccagagtagcatcgagca gctgacaacctattggctgcagcccggcgacgattt gaagaggccatccgcgtgtacgcaagggtggccct gcgacctgactgcaaatataagatttccaaactggta acatccggaattgtgttatattagtgaatggcgca gaagtggagattgacacagaggatcgagtcgttctc cggtgclclatgalcaacatgtggccgggtgtgtc gcatggatggcgtagtcattatgaatgtgaggtcac cggacctaattttagcgggaaccgtcttctggcaaac actaatctgatcctgcatggagtttcttctatggattta ataacacctgtgtgaagcttgaccgacgtgcgggt tagagggtgtgcttttattgtgctggaaggcgctc tgtgtagacccaaaagtagagcttctatcaagaaatg cctgttcgagaggtgtactctgggcattctcagtga ggtaatagcagggtcaggcataacgtggccctcagat tgcggatgtttatgttggttaaatccgtggctgtgatc aagcacaacatgggtgtgtgcaattgtgaggaccgg gcatctcaaatgctgacatgtccgatggcaactgtca cctgctcaaaacaattgccgttcgagccattctcgg aaggcctggccagtttctgagcataacatcctgacgc gctgtagtctccacctgggtaacagacggggcgttt cctgccataatcagtgaacctgtcacataaceaagatac

			tcttgaaccagaatctatgagtaaagtgaacctgaa tgggtattcgaatgacatgaagatatgaaagtcc tccgctatgacgaaactaggactaggtgtaggccct gcgagtggtggcggaagcatalccgcaaccaacc gtgalgctggacgtgaccgaggagctgcgcccgga tcacctggtgctggcctgcaccagagcagaattcgg gagctcagacgaagacactgattaa
90	氨基酸插入 (AGIPA)	腺病毒血清型5 H354 突变 体	alggagagaaggaalectaglgagaggggagtgcccgcc ggggtttctggtcacgcctccgtggaaatccggtgtg agactcaggagtcccccgccaccgtggtgttccgcc caccaggagacaacactgacggtggcgcgccggc tctgcaggtggaagccaagccgccgctgctgggg ccgagccgatggaacccgaatccagaaccgggtccc tctggcatgaacgttgtgcaggtcgcagaactctacc ccgaactccgcaggatctgacaatcacggaggac ggccagggccctcaaggagtgaaagagagagagag gggcttgtgagggcactgaggaagctcgcaatctgg cgtttcattgatgacaaggcacagccgggaatgcat tacattcaacagattaaggacaactcgcgaacga gctcgatctctggcccagaagtatagcatcgagca gctgacaacctatfggctgcagcccgccgacgatf gaagaggccatccgcgtgtacgcaaagggtggccct gcgacctgactgcaaatataagatttccaaactggfta acatccggaattgtgttatattagtggaatggcgca gaagtggagattgacacagaggatcgagtcgcttcc cgggtgctctatgatcaacatgtggcccggtgtgctcg gcatggatggcgtagtcattatgaatgtgaggttcac cggacctaatittagcggaaaccgtcttctggaac actaatcgtatcctgcatggagttcttctatggattta ataacacctgtgtgaagcttggaccgacgtgcgggt tagagggtgtgcttttatgtgctggaaggcgctcg tgtgtagacccaaaagtagagcttctatcaagaaatg cctgttcgagaggtgtactctgggcattctcagtga gglaatagcaggggtcaggcataacgtggccctcagat tgcggatgtttatgttggttaaalcctggcgtgtatc aagcacaacatggtgtgtggcaattgtgaggaccgg gctggaattccagcatctcaaatgctgacatgttccga tggcaactgtcacctgctcaaaacaattcacgttgcg agccattctcggaggccctggccagtttccgagcata acatcctgacgcgctgtagctccacctgggtaacag acggggcggttcttgcataatcagttaacctgtcac ataccaagatactcctggaaccagaatctatgagtaa agtgaacctgaatggtgtattcgatatgacctgaag atatggaaagtccctcgctatgacgaaactaggacta ggtgtaggccctgcgagtggtggcggaagcatatcc gcaaccaaccgtgatgctggacgtgaccgaggag ctgcgccccgatcactggtgctggcctgcaccaga gcagaattcgggagctcagacgaagacactgattaa

实施例10. 对TIL进行基因组工程化以敲除PD-1、CTLA-4和CISH

[0511] 将来自符合条件的IIIc-IV期癌症患者的合适肿瘤切除并切成小的3-5mm²碎片，并置于含有生长培养基和高剂量 (HD) IL-2的培养板或小培养瓶中。在此“预快速扩充方案 (pre-rapid expansion protocol)” (pre-REP) 阶段，初始将TIL扩充3-5周，达到至少50×

10^6 个细胞。使用Neon Transfection System(100uL或10ul试剂盒,Invitrogen,Life Technologies)对TIL进行电穿孔。使TIL沉淀并用T缓冲液洗涤一次。针对10ul尖端,以在10 μ L T缓冲液中 2×10^5 个细胞的密度将TIL进行重悬,而针对100ul尖端以在100ul T缓冲液中 3×10^6 个细胞的密度将TIL进行重悬。然后使用15ug Cas9mRNA和10-50ug PD-1、CTLA-4和CISH gRNA-RNA(100mc1尖端)以1400V、10ms、3个脉冲对TIL进行电穿孔。转染后,以1000个细胞/ μ l将TIL铺在不含抗生素的培养基中,并在30℃、5%CO₂下温育24hr。24hr恢复后,可将TIL转移至含抗生素的培养基中,并在37℃、5%CO₂下进行培养。

[0512] 然后通过PBMC饲养细胞和IL-2存在的情况下使用抗CD3刺激TIL,使细胞在两周内经受快速扩充方案(REP)。对扩充的TIL(当前的数十亿个细胞)进行洗涤、汇集并输注到患者中,然后进行一或两个周期的HD IL-2治疗。在TIL转移之前,可采用使用环磷酰胺(Cy)和氟达拉滨(Flu)的预备方案治疗患者,该预备方案短暂地消耗宿主淋巴细胞从而为输注的TIL“腾出空间(making room)”并去除细胞因子阱(sink)和调节性T细胞以便促进TIL存续。受试者在30分钟内接受其自身的修饰的TIL细胞的输注,并留在医院中以监测不良事件,直到他们从治疗中恢复。图102A和图102B示出了两个不同受试者的TIL的细胞扩充。图103A和图103B示出了用CRISPR系统和抗PD-1指导物进行电穿孔并在添加饲养细胞(A)或不添加饲养细胞(B)下进行培养的TIL的细胞扩充。表9.内源检查点总结

SEQ ID	基因符号	缩写	名称	NCBI 编号 (GRCh38.p2) *AC010327.8 ** GRCh38.p7	原始起点	原始终点	基因组中的位置
91	ADORA2A	A2aR; RDC8; ADORA2	腺苷 A2a 受体	135	24423597	24442360	22q11.2 3
92	CD276	B7H3; B7-H3; B7RP-2; 4Ig-B7-H3	CD276 分子	80381	73684281	73714518	15q23-q 24
93	VTCN1	B7X; B7H4; B7S1; B7-H4; B7h.5; VCTN1; PRO1291	含 V-set 域的 T 细胞激活抑制因子 1	79679	11714358 7	117270368	1p13.1
94	BTLA	BTLA1; CD272	B 和 T 淋巴细胞相关因子	151888	11246396 6	112499702	3q13.2
95	CTLA4	GSE; GRD4; ALPS5; CD152; CTLA-4; IDDM12; CELIAC3	细胞毒性 T 淋巴细胞相关蛋白 4	1493	20386778 8	203873960	2q33
96	IDO1	IDO; INDO; IDO-1	吲哚胺 2,3-双加氧酶 1	3620	39913809	39928790	8p12-p1 1
97	KIR3DL1	KIR; NKB1; NKAT3; NKB1B; NKAT-3; CD158E1; KIR3DL2; KIR3DL1/ S1	杀伤细胞免疫球蛋白样受体三域长细胞质尾 1	3811	54816438	54830778	19q13.4
98	LAG3	LAG3; CD223	淋巴细胞激活因子 3	3902	6772483	6778455	12p13.3 2
99	PDCD1	PD1; PD-1; CD279; SLEB2;	程序性细胞死亡因子 1	5133	24184988 1	241858908	2q37.3

		hPD-1; hPD-1; hSLE1					
100	HAVCR2	TIM3; CD366; KIM-3; TIMD3; Tim-3; TIMD-3; HAVcr-2	甲型肝炎 病毒细 胞受体 2	84868	15708583 2	157109237	5q33.3
101	VISTA	C10orf54, ESC 的分 化因子-1 (Dies1); 血小板受 体 Gi24 前 体; PD1 同 源物 (PD1H) B7H5; GI24; B7-H5; SISP1; PP2135	V 域免疫 球蛋白 T 细胞 激活抑 制因子	64115	71747556	71773580	10q22.1
102	CD244	2B4; 2B4; NAIL; Nmrk; NKR2B4; SLAMF4	CD244 分 子, 即自 然杀伤 细胞受 体 2B4	51744	16083015 8	160862902	1q23.3
103	CISH	CIS; G18; SOCS; CIS-1; BACTS2	细胞因子 诱导的 含 SH2 的蛋白	1154	50606454	50611831	3p21.3
104	HPRT1	HPRT; HGPRT	次黄嘌呤 磷酸核 糖转移 酶 1	3251	13445284 2	134500668	Xq26.1
105	AAV*S1	AAV	腺相关病 毒整合 位点 1	14	7774	11429	19q13
106	CCR5	CKR5; CCR-5; CD195; CKR-5; CCCKR5;	趋化因子 (C-C 基序) 受 体 5 (基 因/假基	1234	46370142	46376206	3p21.31

		CMKBR5; IDDM2; CC-CKR-5	因)				
107	CD160	NK1; BY55; NK28	CD160 分子	11126	14571943 3	145739288	1q21.1
108	TIGIT	VSIG9; VSTM3; WUCAM	具有 Ig 和 ITIM 结 构域的 T 细胞 免疫受 体	201633	11429398 6	114310288	3q13.31
109	CD96	TACTILE	CD96 分子	10225	11154207 9	111665996	3q13.13- q13. 2
110	CRTAM	CD355	细胞毒性 和调节 性 T 细 胞分子	56253	12283843 1	122872643	11q24.1
111	LAIR1	CD305; LAIR-1	白细胞相 关免疫 球蛋白 样受体 1	3903	54353624	54370556	19q13.4
112	SIGLEC7	p75; QA79; AIRM1; CD328; CDw328; D-siglec; SIGLEC-7; SIGLECP2 ; SIGLEC19 P; p75/AIRM 1	唾液酸结 合 Ig 样 凝集素 7	27036	51142294	51153526	19q13.3
113	SIGLEC9	CD329; CDw329; FOAP-9; siglec-9; OBBP-LIK E	唾液酸结 合 Ig 样 凝集素 9	27180	51124880	51141020	19q13.4 1
114	TNFRSF1 0B	DR5; CD262; KILLER; TRICK2; TRICKB; ZTNFR9;	肿瘤坏死 因子受 体超家 族成员 10b	8795	23006383	23069187	8p22-p2 1

		TRAILR2; TRICK2A; TRICK2B; TRAIL-R2 ; KILLER/D R5					
115	TNFRSF10A	DR4; APO2; CD261; TRAILR1; TRAILR-1	肿瘤坏死 因子受 体超家 族成员 10a	8797	23191457	23225167	8p21
116	CASP8	CAP4; MACH; MCH5; FLICE; ALPS2B; Casp-8	胱天蛋白 酶 8	841	20123344 3	201287711	2q33-q3 4
117	CASP10	MCH4; ALPS2; FLICE2	胱天蛋白 酶 10	843	20118289 8	201229406	2q33-q3 4
118	CASP3	CPP32; SCA-1; CPP32B	胱天蛋白 酶 3	836	18462769 6	184649475	4q34
119	CASP6	MCH2	胱天蛋白 酶 6	839	10968862 8	109713904	4q25
120	CASP7	MCH3; CMH-1; LICE2; CASP-7; ICE-LAP3	胱天蛋白 酶 7	840	11367916 2	113730909	10q25
121	FADD	GIG3; MORT1	Fas 相关 死亡结 构域蛋 白	8772	70203163	70207402	11q13.3
122	FAS	APT1; CD95; FAS1; APO-1; FASTM; ALPS1A; TNFRSF6	Fas 细胞 表面死 亡受体	355	88969801	89017059	10q24.1
123	TGFBRII	AAT3; FAA3; LDS2; MFS2;	转化生长 因子 β 受体 II	7048	30606493	30694142	3p22

		RIIC; LDS1B; LDS2B; TAAD2; TGFR-2; TGFβ-RII					
124	TGFR1	AAT5; ALK5; ESS1; LDS1; MSSE; SKR4; ALK-5; LDS1A; LDS2A; TGFR-1; ACVRLK4 ; tbetaR-I	转化生长 因子β 受体1	7046	99104038	99154192	9q22
125	SMAD2	JV18; MADH2; MADR2; JV18-1; hMAD-2; hSMAD2	SMAD 家 族成员 2	4087	47833095	47931193	18q21.1
126	SMAD3	LDS3; LDS1C; MADH3; JV15-2; HSPC193; HsT17436	SMAD 家 族成员 3	4088	67065627	67195195	15q22.3 3
127	SMAD4	JIP; DPC4; MADH4; MYHRS	SMAD 家 族成员 4	4089	51030213	51085042	18q21.1
128	SKI	SGS; SKV	SKI 原癌 基因	6497	2228695	2310213	1p36.33
129	SKIL	SNO; SnoA; SnoI; SnoN	SKI 样原 癌基因	6498	17035767 8	170396849	3q26
130	TGIF1	HPE4; TGIF	TGFB 诱 导因子 同源框1	7050	3411927	3458411	18p11.3
131	IL10RA	CD210; IL10R; CD210a; CDW210A ; HIL-10R; IL-10R1	白介素 10 受体亚 基 α	3587	11798639 1	118001483	11q23

132	IL10RB	CRFB4; CRF2-4; D21S58; D21S66; CDW210B; IL-10R2	白介素 10 受体亚 基 β	3588	33266360	33297234	21q22.1 1
133	HMOX2	HO-2	血红素氧 化酶 2	3163	4474703	4510347	16p13.3
134	IL6R	IL6Q: gp80; CD126; IL6RA; IL6RQ; IL-6RA; IL-6R-1	白介素 6 受体	3570	15440519 3	154469450	1q21
135	IL6ST	CD130; GP130; CDW130; IL-6RB	白介素 6 信号转 导蛋白	3572	55935095	55994993	5q11.2
136	CSK	CSK	c-src 酪氨 酸激酶	1445	74782084	74803198	15q24.1
137	PAG1	CBP; PAG	鞘糖脂微 域关联 磷蛋白 膜锚定 物 1	55824	80967810	81112068	8q21.13
138	SIT1	SIT1	信号阈值 调节跨 膜衔接 因子 1	27240	35649298	35650950	9p13-p1 2
139	FOXP3	JM2; AHID; IPEX; PIDX; XPID; DIETER	叉头框蛋 白 P3	50943	49250436	49269727	Xp11.23
140	PRDM1	BLIMP1; PRDI-BF1	PR 结构域 1	639	10608632 0	106109939	6q21
141	BATF	SFA2; B-ATF; BATF1; SFA-2	碱性亮氨 酸拉链 转录因 子 ATF 样蛋白	10538	75522441	75546992	14q24.3
142	GUCY1A 2	GC-SA2; GUC1A2	可溶性鸟 苷酸环 化酶 1, α 2	2977	10667401 2	107018445	11q21-q 22

143	GUCY1A 3	GUCA3; MYMY6; GC-SA3; GUC1A3; GUCSA3; GUCY1A1	可溶性鸟 苷酸环 化酶 1, α 3	2982	15566656 8	155737062	4q32.1
144	GUCY1B 2	GUCY1B2	可溶性鸟 苷酸环 化酶 1, β 2 (假 基因)	2974	50994511	51066157	13q14.3
145	GUCY1B 3	GUCB3; GC-SB3; GUC1B3; GUCSB3; GUCY1B1 ; GC-S- β -1	可溶性鸟 苷酸环 化酶 1, β 3	2983	15575897 3	155807642	4q31.3-q 33
146	TRA	IMD7; TCRA; TCRD; TRA α ; TRAC	T 细胞受 体 α 基 因座	6955	21621904	22552132	14q11.2
147	TRB	TCRB; TRB β	T 细胞受 体 β 基 因座	6957	14229901 1	142813287	7q34
148	EGLN1	HPH2; PHD2; SM20; ECYT3; HALAH; HPH-2; HIFPH2; ZMYND6; C1orf12; HIF-PH2	egl-9 家族 缺氧诱 导因子 1	54583	23136375 1	231425044	1q42.1
149	EGLN2	EIT6; PHD1; HPH-1; HPH-3; HIFPH1; HIF-PH1	egl-9 家族 缺氧诱 导因子 2	112398	40799143	40808441	19q13.2
150	EGLN3	PHD3; HIFPH3; HIFP4H3	egl-9 家族 缺氧诱 导因子 3	112399	33924215	33951083	14q13.1
151	PPP1R12 C**	p84; p85; LENG3; MBS85	蛋白磷酸 酶 1 调	54776	55090913	55117600	19q13.4 2
			节亚基 12C				

表10工程化T细胞受体 (TCR)

SEQ ID	序列 5'-3'
152	atggccttggtaacctctataactgtgctgctcagtcctgggatcatgggagatgctaagactactcagcctaatagtatgga aagtaatgaggaggagcctgtccacctgcccttgtaatcactctaccataagcgggacagattacatacattggtatcg gcagctcccttcacaagggtccagagtatgtgattcatggcctcacatcaaatgtgaacaatcggaatggcttctctggc attgcagaggatcggaaaagctcaacactcactcgcatagggcgacactcagagatcggccgtttatta

表11 酿脓链球菌Cas9 (SpCas9)

SEQ ID	序列 5'至 3'
153	atggactataaggaccacgacggagactacaaggatcatgataattgattacaaagacgatgacgataagatggcccaaagaa gaagcgggaaggctggatccacggagtcacgagccgacaagaagtacagcatcggcctggacatcggcaccaact ctgtgggctgggccgtgatcccgacg

实施例11: gRNA修饰

修饰的指导RNA的设计和构建:

[0513] 使用CRISPR设计程序 (Zhang Lab, MIT 2015) 将指导RNA (gRNA) 设计成期望的基因区域。基于由脱靶位置所确定的最高排名值来选择多种gRNA (在表12中示出)。将靶向PD-1、CTLA-4和CISH基因序列的gRNA修饰成含有3硫代磷酸2'-O-甲酯添加 (图44和图59)。

表12. 靶向PD-1、CTLA-4、AAVS1或CISH基因的修饰gRNA的序列表

SEQ ID	gRNA	序列 5'-3'
154	PD-1 gRNA #2	gcctgctcgtggtgaccgaagguuuuagagcuagaaaauagca aguuaaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaa guggcaccgagucggugcuuuu
155	PD-1 gRNA #6	gacggaagcggcagtcctggcguuuuagagcuagaaaauagc aaguuaaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaa aguggcaccgagucggugcuuuu
156	CTLA4 gRNA #3	gctagatgattccatctgcacguuuuagagcuagaaaauagcaa guuaaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaag uggcaccgagucggugcuuuu
157	CTLA4 gRNA #2	gtgcggcaacctacatgatgguuuuagagcuagaaaauagcaa guuaaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaag uggcaccgagucggugcuuuu
158	CISH gRNA #2	gggttcattacggccagcgguuuuagagcuagaaaauagcaa guuaaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaag uggcaccgagucggugcuuuu
159	AAVS1	gtcaccaatcctgtccctagguuuuagagcuagaaaauagcaag uuuaaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaag ggcaccgagucggugcuuuu

表13.

SED ID	构建体	序列 5'-3'
174	pPBSB-Cagg-RTreporter (Puro)()	gtggcacttttcggggaaatgtgcgcggaaacccctatttgtttattttctaaatacattcaaatatgtatccgc tcatgagacaataaccctgataaatgcttcaataatallgaaaaggaagagatgatgatttcaacatttccg tgcgcccttattcccttttttgcggcattttgccttctgttttgcacaccagaaacgctggtaaaagtaaaa gatgctgaagatcagttgggtgcacgagtggttacatcgaactggatcacaacagcggtgaagatccttg agagttttcgccccgaagaacgtttccaatgatgagcacttttaaagtctgctatgtggcgcggtattatcc cgtattgacgccgggcaagagcaactcggcgcgcacatactattctcagaatgacttgggttgagtactc accagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgtgcataaccatg agtgataacactcggccaacttactctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaaccgctttttgca caacalgggggatcalgtaactcgccttgatcgtlgggaaccggagctgaatgaagccataccaaacga cgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaaaactattaactggcgaactactt actctagcttccggcaacaattaatagactggatggaggcggataaagtgcaggaccacttctgcgctc ggcccttccggctggctggtttattgtgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgc agcactggggccagatggtgaagccctccgctatcgtatgtatctacacgacggggagtcaggcaactatg gatgaacgaatagacagatcgtgagataggtgcctcactgattaagcattgtaactgtcagaccaagt ttaactafatatacttttagattgatttaaaactcatttttaatttaaaaggatctaggtgaagatccttttgataat ctcalgaccaaatacccttaacgtgagtttctgctcactgagcgtcagaccccgtagaaaaagatcaaaagg atcttcttgagatccttttttctgcgcgtaatctgctgcttgcacacaaaaaaaccaccgctaccagcgggtg gtttgtttgccggatcaagagctaccaactcttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagatacca aatactgtccttctagtgtagccgtagtaggcccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctacatactc gctctgctaatcctgttaccagtggctgctgccagtggcgataagtcgtgtcttaccgggttgactcaaga cgatagttaccggataaggcgcagcggctcgggctgaacgggggggtcgtgcacacagcccagcttggga gcgaacgacctacaccgaactgagatactacagcgtgagctatgagaaagcggcacgcttccggaag ggagaaaggcggacaggtatccggttaagcggcagggtcggaaacaggagagcgcacgaggagctt ccaggggggaaacgcctgggtatctttatagtcctgtcgggttcgccacctctgacttgagcgtcgtttttgt gatgtcgtcagggggggcggagccatggaaaaacgccagcaacgcggcctttttacgggttcttggcctt ttgctggccttttgcctacatgttcttctcgtttatccctgattctgtggataaccgtattaccgcctttgagt gagctgataccgctcggcgagccgaacgaccgagcgcagcagtcagtgagcgagggaagcgggaag agcgcccaatacgcaaaccgcctctccccgcggttgccgattcattaatgcagctggcacgacaggtt tcccgactggaaaagcgggcagtgagcgcgaacgcaattaatgtgagttagctcactcattaggcacccca

	ggctttacactttatgcttccggctcgtatgtgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacacaggaac agctatgaccatgattacgccaagcgcgcgcgggtaactacgggtatccatgctcatittctcggg catccagccaggataccgctctcgtgacgtaatatccagcgcgcgaccgctgtcattaatctgcacac cggcacggcagttccggctgtcgcgcgtattgttcgggtgctgatgcgttcgggctgacctccggaa ctgtgtccggaaaagccgcgcgacgaactggatccaggtggcctgaacgaacagttaccggttaaaggc gtgcatggccacaccttcccgaatcatcatggtaaacgtgcgttttcgtcaacgtcaatgcagcagcagt catctcggcaaaccttccatgccgttcaacctcgcgggaaaaggcacgggcttcttctccccgatg cccagatagcgcagcttggcgatgactgagccggaaaaagaccgcgataatgatcctgatgcag ctagattaacctagaaagatagctgcgtaaaattgacgcatgcattctgaatatgtctctctttctaaa tagcgcgaatccgtcgtgtgcattaggacatctcagtcgccgttggagctcccgtagggcgtgctgt caatgcggtgaagtgtcactgatttgaactataacgaccgcgtgagtaaaatgacgcatgattatctttac gtgacttttaagatttaactatagataatfatattgttattcatgttctacttacgtgataacttattatata tttcttgttatagataaatggfaccagatccctatacagttgaagtcggaagttacatacaccttagccaaat acattfaaactcacttttccaaattctgacattfaatcctagtaaaaattccctgtctttaggcagttaggatc accactttatttaagaatgtgaaatatcagaataatagtagagagaatgattcattcagctttatttcttcat cacattcccagtgggtcagaagttacatacactcaattagtttggtagcattgcctttaaattgtttaacttg gtctccctttatgtgagggtaattgatacgaattcagatctgctagtatttaataagtaataacacggggc ttagttcatagcccatatatggagtccggttacataacttacggtaaatggcccgcctggctgaccgcc aacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacgccaatagggacttccattga cgtcaatgggtggactatttacggtaaacgtccacttggcaglacatcaagtgtatcatatgccagtagc ccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccgcctggcattatgccagtagatgacctatgggactt cctacttggcagtagatctacgtattatgtatcgtctattaccatgggtcaggtgagccccacgttctgttc actetccccatctcccccccccccccccccaattttgtatttttttttttttttttttttttttttttt ggcgggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggg gagggcgagagggtggcgggcagccaatcagagcggcgcgctccgaaagtctcttttatggcgagggc ggcggcgggcggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggg cccgtgccccgctccgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc gtgagcgggggggggacggcccttctctccgggctglaattagcgttgggttlaalacggcgtcttcttct tgtggctgcgtgaaagcctfaaagggtccgggagggccctttgtgcggggggggagcggctcggggg gtgcgtgcgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt ggggggcgggcggggggggttgtgcgtccgcgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt ccccgcggtgcgggggggggtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt gagcaggggggtgtggcgcgggcggtcgggtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt agcacggggcggtcgggtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt gggggtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt gggagggggcgggcggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggg cttttatggtaatcgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt agggcgccggcgacccccctcagggggcgggggcgaaagggtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt ggcggggagggcctcgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt
--	---

111

	tgaagcgacggctgaggacggaaaggcccttttctttgtgtgggtgactcaccgcccgtctccgag cgccgcgtctccattttgagctccctgcagcaggggccgggaaagcgccatctttccgctcacgcaactg gtgccgaccgggcccagccttgcgcccaggggcggggcgatcacggcggcgagggccaggcacc agagcaggccggccagcttgagactacccccgtccgattctcgggtggccgcgtcgcagggccccgcct cgccgaacatgtgcgtgggacgcacgggccccgtcggcccccggcccccacaaaccgaaatacc agtgtgcagatcttggcccgcatttacaagactatcttgcagaaaaaagccttgcagaaaaaagcgt cgagcaggtcatcaaaaattttaaattggctagagacttatcgaaagcagcgagacaggcggaagggtg ccaccagattccgcacgcggcgggcccccagcgcccaggccaggcctcaactcaagcacgaggcgaag gggctccttaagcgcaaggcctcgaactctccaccacacttccaaccggaagctcgggatcaagaatca cgtactgcagccaggggcggtggaagtaattcaaggcacgcaaggggccataaccgtaagaggccag ggccgcgggaaccacacacggcacttacctgtgttctggcgcaaaccggtgcgaaaaagaacgttca cggcgactactgcacitatacgggttctccccaccctcgggaaaaaggcgaggccagtlacacgacat cacitcccagtttaccggcgccaccttctctaggcaccgggttcaattgccgacccctcccccaacttctc ggggactgtgggcgatgtgcgtctgcccactgacgggcaccggagccacacgcatgtcttctccacc tcagtatgacgagagcggggcggtgagggggcggaagcagcgatctctgggttctacgttagtgg gagtttaacgacggctccctgggattcccaaggcaggggcgagtcctttgtatgaattactctcagctcc ggtcggggcggggtgggggggggtgtgacggggaggccgcctgggaaggagcgtgcagaatcttccct ctaccattgctggcttagctccaaagggtgtattgagattaggggtaccttcgctctcaatcagctccct cctcagccttgcacatctcgtagtcgggacaaatccctagagcgcttctctcgggtctcagcccagc ccgggggttggctcctctccgcccggcttccgcccctcccggtgtggcaaggagtaccaggcccgg ggaccccaggggcttggggcggaagggtcgggactgggggcctcctaaccggtcacggacttgcga gaggttcggctcgtatggcgtgaaagcgacgaatccgctcctgtgtgcttcttggctccttccattcaa agccagctgctttatggaagcccgtaacacgcatctccccctggtaactccagatgtccaggcttcagttt agaalagactcagctcclacagtlagctttagatclaattclaglttltglaagccaaaaagttccgaggtgt gtgtgtgtgctcctatggtactttttaaataaaagggtgtacagttatttattgcaaacataaggaaactaaat gcttccagatttccacatgaltcatglagaggctaaagatclacagcatcagcaagttatccaccagtttc ctaaccceaacttgcctatgaagtcacagcttctcctattttaaataagtgccctattatattttaaataagtgctgt cglttctgtcatcctatcagatgtaactgcatlltagcataaactlagggcaagattggatgagcttggccttlt tggatggctatcaaggcaggccttgggaaatgtcctctgaggaaagaagaacgtttatttttaatgagcta attactagatcattatgttcttctccagctgtagaataatcattgccagcttctcgaacaaacttattttaaac aagtatttgagaacctactatgtggccaacgctaagtgaactgcaggcatgcaagctgagcctatttctacc accacttltgacaagaaagctgggttgalctagaggcccgcggttcgaagglaagcctatccctaaccct ctctcggctcgtattctacgcgtcaggtgcaggctgcctatcagaagggtggtggctggtgtggccaatgc cctggctcacaataaccactgagatcttltccctctgccaaaaattatggggacatcatgaacgcagtgaa aaaaatgctttatttggaaatttgtgctatttgccttatttgaaccattataagctgcaataaacaagttctc gagaagttcctattctcagaaagtalaggaaacttctggctgcaggtcgtcgaattctaccgggtagggg aggcgcttttccaaggcagcttggagcatgcgttttagcagccccgctgggcacttggcgctacacaag tggcctctggcctcgcacacatccacatccaccggtagggccaaccggctccgttcttltgggtggccct tcgcgccaccttctactctccctagtcaggaaagttccccccgccccgcagctcgcgtcgtgcaggac
--	---

gtgacaaatggaagtagcacgtctactagctcgtgcagatggacagcaccgctgagcaatggaagcg
 ggtaggcctttggggcagcggccaatagcagctttggctcttcgctttctgggctcagaggtgggaag
 ggggtgggtccggggcgggctcagggcgggctcagggcgggcgggcgcccgaaggtctcc
 ggaggcccggtctctcacgcttcaaaagcgacgtctgccgctgttctctctctctctccggg
 cctttcgacctgcatcatctagatctcagcagctgaagcttaccatgaccgagtacaagccacgggtgc
 gcctcgccacccgcgacgacgtcccgaggccgtacgacccctcgccgcccgttcgcccactaccc
 cggcacgcccacaccgtcgatccagaccgccacatcgagcgggtcaccgagctgcaagaactcttc
 tcacgcgcgtcgggctcgacatcggaaggtgtgggtcgcggacgacggcgagcagtggtgtg
 gaccacgccggagagcgtcgaagcggggcggtgttcgccgagatcgcccgccgcatggccgagtt
 gagcgggtcccggctggccgcgcaacagatggaaggcctcctggcgccgaccggcccaagga
 gcccgcgtggtcctggccaccgtcggcgctctgcccgaaccaggggcaagggtctgggcagcgcc
 gtgtgtctccccggagtgaggcgggcgagcgcggcggtgtcccgcttctggagacctccgcgc
 cccgcaacctccccctctacgagcggctcggttcaccgtcaccggcgacgtcgaggtgcccgaagga
 ccgcgcacttgggtgcatgacccgcaagcccggtgcctgacgcccgccacaagacccgcagcgccc
 accgaaaggagcgcacgaccccatgcacgatgatctagagctcgctgatcagcctcgactgtgcctct
 agttgccagccatctgttgtttgccccccccgtgccttcttgacctgggaagggtccactccactgtcc
 ttcttaataaaatgaggaaattgcatcgcatgtctgagtaggtgtcattctatctgggggggtggg
 gcaggacagcaagggggaggttgggaagacaatagcaggcatgtgggatgcggtgggtctatg
 gcttctgagcggaagtctctattctctagaaagtataaggaactctcaggtctagaagatggcgggagt
 ctctgggcaggttaaaagctaacctggtgtgtggcggtgtctcgcaggggaattgaacaggtgattac
 cctgttatccctagtaatccgggatctaatacgactactataggagaccatcatcttctggaattttcaa
 gctgtttaaggcacagtaacttagtgtatgtaaaactctgacccactggaattgtgatacagtgattataa
 gtgaataatctgtctgtaacaattgtggaaaaatgacttgtgtcatgcacaaagtagatgtcctaactga
 ctggccaaaactatltgttgaacaagaattgtggagtagtgaaaaacgagtlitaaatgactccaactlaa
 gtgtatgtaaaactccgacttcaactgtataggatccccgggctgcagggaattcgataaaagtittgttac
 ttatagaagaaattltgagttttgtttttttaaataaataaataacataaataaattgtttgtgaattatatta
 gtatgtaaagttaataataaataaacttaatatctattcaattaataaataaactcgatatacagaccgataa
 aacacatgcgtcaattttacgcatgattatcttlaacgtacgacacaatatgattatctttclagggtlaatctag
 ctgcgtgttctgcagcgtgtcagcatctcatctgtccatcacgctgtaaaacacatttgaccgcgagt
 ctgcccgtcctccacgggttcaaaaacgtgaatgaacgagggcgcgctcactggccgctgtttacaacgt
 cgtgactgggaaaacctggcggtacccaaactaatgccttgacgacatcccccttccgacgtggcg
 taatagcgaagaggcccgaccgatcgcccttccaacagltgcgcagcclgaatggcgaaagggacg
 cggcctgtagcggcgcatgaagcggcggggtgtgtgtgtgtacgcgcagcgtgaccgctacacttggca
 gcgcccclagcggcgctccttctgcttcttcccttcttctcgcacgttcgcccgttcccccgcgaagt
 ctaaatcgggggtccctttaggggtccgatttagtctttacggcacctcgacccccaaaaaacttgattag
 ggtgatgttcacgtatgggccatcgccctgalagacggttttgcgcccgttgacgttgaggtccaggttct
 ttaatagtgactcttgttccaaactggaacaacactaaccttatctcggctattctttgattataaggat
 ttgcccgaattcggcctattgttlaaaaaalgagctgattlaacaaaaatlaacgcgaattlaacaaaatatt
 aacgcttacaatttag

175	AMVlargc pcDNA Dest40	gacggatcgggagatctcccgatcccctatgggtgactctcagtacaatctgctctgatccgcatagttaa gccagtatctgctccctgcttgtgtgtggaggtcgtgagtagtgcgcgagcaaaatlaagctacaaca aggcaaggcttgaccgacaattgcatgaagaatctgcttagggtaggcgttttgcgtgcttcgcgatgta cgggccagatatacgcgttgacattgattatgactagttattaatagtaataaattacggggcattagttcat agcccatatatggagttccgcgttacataacttacggtaaatggcccgcctggctgaccgccaacgacc cccgccattgacgtcaataatgacgtatgtcccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaat gggtggagtatttacggtaaaactgcccacttggcagtagatcaagtgatcatatgccaaagtacgccccta ttgacgtcaatgacggtaaatggcccgcctggcattatgccagtagatgaccttatgggactttctacttg gcagtagatctactgattagtcacgctattaccatgggtgatgcggttttggcagtagatcaatgggcgtgga tagcgggttgactcaggggatttccaagtctccacccttgacgtcaatgggagttgttttggcaccacaa aatcaacgggactttccaaatgtcgtacaacacccgcccattgacgcaaatgggggtaggcgtgtac gggtggaggtctatataagcagagctctctggctaaactagagaacccactgcttactggttatcgaaatta atacgactactatagggaacccaagctggctagttaagctatcaacaagttgtacaaaaaagctgaac gagaaacgtaaaatgatataaatatcaatataatlaaattagattttgcataaaaaacagactacataactgt aaaacacacatatccagtcactatggctgccaccatggactacaaagcagtagacgacaagagcagg gctgacccaagaagaagaggaaggtagctgtcgtctgcacctggcaataacctcttaaatggaaccta atcacactccagtttggatcgaatgcccacttccctgaggggcaagtgtgtggcattgactcagttggtag agaaagaactccaacttgggcacatgaaccgtccctgtctgttggacaccccagttatcgtcataagg aaagcctccggaagtaccgcttgcttcatgacctgagggcggtgaatgcaaaagctgtaccttttggcgc cgtccagcaggagctccagttgagtgccctgccacggggatggccgcttatggttctcgatttgaagg actgcttttcagcattccgttgcggaacaggatcgagaggcttgcctttacgtgcccagcgtcaaca accaggccccggctagacgttccaatggaaagtcctccctcagggtatgacctgttcaacctacaattgt caactattgttggtaaatcctggaaccgcttagattgaagcatccgtcccttagaatgctgcattataggga cgacctgttctcgcagcgagttctcagacgagggttggaggctgccggagaagaagttatlagcacctt gaacgagcagggttaccatttaccggataaggtagcgggaacccggcgtagacttgggttac aagctcggltcaacalacgtggccccgtaggactgggtgccgagccaaggattgcaaccttltgggatgt acaaaaactgttggttcacttcagttggtgaggccgcctcggcattccgccgagacttatgggcccctt ctatgagcagcttagaggatctgacctgaacgaagcagagaalggaaactggacatgaaaatggcctg gcgagagatcgtacagcttcaacacggctgtcttgaacgggtgggacccgcccttcccctcgaagg ggctgtggcacgctgtgaacaaggagctatagggttccctcggtcagggaacttccacccaaccccgcc atgtcttggctttttcaactcaaccaccaaagcatttacagcgtggctggaggtacttacccttctcattac caaatgtagcagctccgcgggtccgaactttcgggaaagaagtagatalattgttgcgtccagcctgttttag agaagatttccccctccagaagggttcttcttgccttgagagggttgcaggttaagattagaagtagcga cacaccgtccatctcagacatgcgcgcgcctccacgtgagcctgaagggttagagtcaccgacctccc gttccgggtcccacagttttaccgatgcatttagtagtaccacaaaggagtagtagctggcgcgaggg acctcgtatgggaaataaaggagatcgagatttgggggctagtgttcagcagttggaagcacgcgccgt ggcgtatggctcttctctgtggcccacgacaccaactaatgttgaaccgactcagcttctgtactaaat gtccttgaataaggccagggaagggtcccaactcagcgtgcalttatccttgaagacgcactcagc caaaggtagcaatggctgcggtgtccatgtgcgggtccattccgaagtacctgttctttacagaggg
-----	-----------------------	--

	gaatgatgtcggcactctcaagcaaccttccaggcgatcctcttagggaagctaaagacctccatacag ctctcatataggtccgagagctctgagcaaggcgtgtaattattagcatgcagcaagctaggaggtcgtc cagacatgtccacactgtaactccgcacctgccctcgaggcaggggtaaatccgcgagggttggggcc gtccagatctggcaaaactgatttcacgttggaaaccaaggatggctccgcggagtggctggcagtaacc gtagacacagcgtcttctgcaattgttgaactcagcatggccgcgtgactagcgtggccgcgcagcatc actgggcaacggctatagcggctcctcgacgacctaaagcaataaagacggacaatggcagttgtttac ttcaaatcaaccagagagtggctcgctagggtgggcatagcacacacgactggatccccggtaatag ccaaggcgaggtatggtagagagagcaaatcgactgctcaagataagatccgggtccttgcgaagg ggacggcttatgaagcggataccaactagtaaacagggaagaacttctgcaaggccatgtacgcgtc aatcatttgaacgaggggaaaaactaaaaacccgacccaacacactggcgacctaccgtgtgacgg agggacctccagtaaaaatcaggattgagacggcgagtgaggaaaaagggtggacgtgctggtctgg ggcgaggggtatgctgcagtaaaaaacagagacactgacaagtaatatgggttccalcgcgaaggta aaccggacatcgctcaaaaggatgaagtgaacaaaaagacgaagcgtcaccactcttgcataatgaa cccatagtgactggatatgttgtgtttacagtattatgtagctgtttttatgcaaaactaatttaatafatg attatactatttacgttctcgttcagcttctgtacaaagtgttgatctagagggcccgcggttcgaagg taagcctatccctaacctctcctcggtctcgattctacgcgtaccggctcatcaccatcaccattgagttt aaaccgcgtgatcagcctcgactgtgcctctagttgccagccatctgtgttgcctcccccggtgcctc cttgacctggaagggtgccactcccactgtccttcttaataaaatgaggaaattgcatcgattgtctgagt agggtgctattctattctgggggtgggggtggggcaggacagcaagggggaggattgggaagacaatag caggcatgctggggatgcgggtgggtctatggctctgaggcggaaagaaccaagctggggctctagg ggatccccacgcgccctgtagcggcgcaataagcgcggcggtgtggtgttacgcgcagcgtgacc gctacacttgccagcgccctagcggccgctccttctgcttcttcccttcttctgcccacgttgcgggtt tccccgtcaagctctaaatcgggggtcccttaggggtccgatttagtgetttacggcacctcgacccaa aaaacttgallagggtgaggttcacgtagtgggccalcgccctgatacgggttllcgccttltgacgttg gagtcacgttcttaatagtggaactctgttccaaactggaacaacactcaacctatctcggtctattttt gallataagggalitccgatttcggcclattggtaaaaaatgagctgalltaacaaaaatlaacgcgaa ttaattctgtggaatgtgtcagtaggggtgtggaagtcgccaggctccccagcaggcagaagtatgca aagcatgcatctcaaliagtcagcaaccagggtgtggaagtcgccaggctccccagcaggcagaaglat gcaaagcatgcatctcaattagtcagcaaccatagtcgccccctaactccgcccatcccgccctaactc cgcccagltccgcccaltccgcccaltgctgactaaftttttatllatgagaggccgaggccgctc tgctctgagctattcagaaagttagtgaggaggctttttggaggcctaggcttttgcacaaagctccggg agctgtatatccalltccggtatgacaaagacaggatgaggatcgttgcgaltgattgaacaagatgg attgcacgcagggttctccggcgttgggtggagaggctattcgctatgactgggcacacagacaatc gggtgctctgaltccggtgttccgggtgtcagcgcaggggcgcccggttcllttgcagaccgacct gtccggtgccctgaatgaactgcaggacgaggcagcgcggctatcgtggtggccacgacggcggtc cttggcagctgtgtcaggtgtcactgaagcgggaagggtggtgctattggcggaagtgcggg ggcaggatctcctgtcatctacctgtcctgccgagaaagtatccatcatgctgatgcaatgcggcg ctgcatacgttgalccggclacctgccaltcgaccaccaagcgaacalcgcalcgagcagcagcgl ctcggatggaagccggtctgtcgtatcaggatgatctggacgaagacatcaggggtcgcgccagcc
--	---

	gaactgttcgccaggtcaaggcgcgcgcacccgacggcgaggatctcgtcgtgacccatggcgatgc ctgcttgccgaataatcatggtggaaaatggcgctttctggattcatcgaactgtgcccggctgggtgtggc ggaccgctatcaggacatagcgttggctacccgtgatattgctgaagagcttggcgccgaatgggctga ccgcttcctcgtgctttacgggtatcgccgctcccgaattcgagcgcgcgcgccttctatcgcttcttgacgag ttcttctgagcgggactctgggggttcgcgaatgaccgaccaagcgacgcccaacctgccatcacgaga tttcgattccaccggcgcttctatgaagggttgggcttcggaatcgtttccgggacggcggttgatgat cctccagcggcggtatctcatgctggagtcttcgccaccccaactgtttattgcagcttataatggttac aaataaagcaatagcatcacaaattcacaaataaagcatttttcaactgcattctagtgtgtgttgcctaaa ctcatcaatglatctatcatgctgtataccgtcgacctctagctagagcttggcgtaatcatggctatagct gtttcctgtgtgaaattgtatccgctcacaaatccacacacatacagcgggaagcataaagtgtaaagc ctgggggtgctaatgagtgagctaaactacattaatgctgtcgcctcactgccgctttccagtcgggaaa cctgtcgtgccagctgcattaatgaatcgccaacgcgcggggagaggcggtttgcgtatggcgctct tccgcttctcgtcactgactcgtcgcgcggcgttcggctgcggcgagcgggtatcagctcactcaaa ggcggttaatacgggtatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagc aaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgcttgcgtggcggttttccataggctccgccccctgacgagc atcacaaaaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaaccgcagaggactataaagataccaggcggttc ccccgggaagctccctcgtgcgcctcctgttccgacctgccgcttaccggalatctgtcgccttctcc cttcgggaagcgtggcgcttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcgggtgtaggtcgtcgtcca agctgggctgtgtgcacgaacccccgtcagccgaccgctgcgccttatccggtaactatcgtcttgag tccaaccgggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgag gtatgtaggcgggtgctacagagttcttgaagtggtggcctaactacggctacactagaagaacagtattg gtatctgcgctctgctgaagccagttacctcggaagaaagagttggtagctcttgatccggcaaaacacc accgctggtagcgggtgtttttgtttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaagatctcaagaaga tcccttgalcttllctacggggctlgacgctcagtggaacgaaaacacgflaagggtatttggcaltgaga ttatcaaaaaggatctacctagatccttttaaatataaatgaagtttataatcaatcaagatatatgagt aaacttggctlgacagttaccaatgctlaalcagtgaggcacctatctcagcgaltctctatllctgttcatcc atagttgcctgactccccgtcgtgtagataactacgatacgggagggccttaccatctggccccagtgctgc aatgataccggagaccacgctcaccggcaccagalltalagcaataaacagccagccgggaaggg ccgagcgcagaagtggtcctgcaacttatccgctccatccagctctattaattgttggccgggaagctaga gtaagtagtgcgagllaatagtttgcgcaacgttgttgccttgcacagggacgttgggtgcacgctcgt cgtttggtatggcttcaatcagctccgggtcccaacgatcaaggcgagttacatgatccccatgttgtgcaa aaaagcgggttagctccttcgggtccctccgaltcgttgcagaaglaagttggccgcagtgltacactcatggtt atggcagcactgcataattcttactgtcatgccatccgtaagatgcttttctgtactggtgagtactcaac caagtcattctgagaalagtgatcgggcgaccgagttgctcttggccggcgtcaatccgggataataccg cgccacatagcagaactttaaaagtgtcatcattggaaaacgttctcggggcgaaaaactctcaaggatc tlaccgctgtlgatccagtlcgatglaaccacgtgcacccaactgaltctcagcatcttllactllcacc agcgtttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgccgcaaaaagggaataaggcgacacgga aatgttgaatactcalactctccttllcaatattatgaagcatttatcagggttattgtctcatgagcggatc atatgtgaatgtatttagaaaaataacaatatagggttccgcgcacattccccgaaaagtgccacctgac
--	---

		gtc
176	AMVsma II pcDNA Dest40	gacggatcgggagatctccgatccctatggcgactctcagtlacaatctgctctgatgccgcatagttaa gccagtatctgctccctgcttgtgtgttgaggctgctgagtagtgcgcgagcaaatttaagctacaaca aggcaaggcttgaccgacaattgcatgaagaatctgcttagggtaggcgtttgctgcttgcgcgatgta cgggccagatafacgcgttgacattgattattgactagtattataagtaataatcaattacggggctcattgctat agcccataatggagttccgcgttacataacttacggtaaatggcccgcctggctgaccgccaacgacc cccgccattgacgtcaataatgacgtatgtcccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaat gggtggagtatttacggtaactgccacttggcagtacatcaagtgtatcatatgccaaagtagccccccta ttgacgtcaatgacggtaaatggcccgcctggcattatgccagtagatgacctatgggactttctactctg gcagtagatctacgtattagtcacgctattaccatggtagtgcggttttggcagtagatcaatggcgtgga tagcgggttgactcacggggatttccaagtctccaccattgacgtcaatgggagttgttttggcaccaa aatcaacgggactttccaaaatgtcgtlaacaactccgcccattgacgcaaatggcggttaggcgtgtac gggtgggaggtctatataagcagagctctctggctaactagagaacccactgcttactgcttactcgaatta atacgactactatagggagacccaagctggctagtttaagctatcaacaagttgtacaaaaaagctgaac gagaaacgtaaaatgatataaatatcaatataataattagattttgcataaaaaacagactacataactgt aaaacacaacataaccagtcacatggctgccaccatggacacaaagacgatgacgacaagagcagg gctgaccccaagaagaagaggaaggtagctgttgcctccatcttgcgalaccgttgaaagggaaccg aatcacactcctgtgtgacgaccagtgccacacccagaagggaactggtagcgttgacacaacttg tcgaaaaggagcttcaacttggccatatagaacctagttgtcctgttggaaactcctgtgttgcacag gaaggcctccgggagttatgcctgttgacgaccttcgagctgtaatgcaaaactcgtaccttttggcg cgggtgcaacaagggtctccagttttgagtgacttgcctcgggggtggccgcttatggcttggatctgaag gattgcttttttagtatacctctggcagagcaggatagagaggcctttgccttcacgcttccctcagtgaaca accaggctccggccaggcggtttcaatggaaagggtttgccccaaaggatgacttgcctcccgacgatafg tcaactgatcgtggccagatactggaaccactccgattgaagcacccttcttgcgatgctccattacat ggatgacctctgttggcggccagctcccatgacggctctggaggcggcggtgaagaagtataagca ccctggaacgagcgggattcacaatcagccggacaaagtgcaaaagagagcccgagtgcaatatctg ggctacaagttgggtccacatacgtcgcctctgtaggcctggtagcggaaaccggcattgccacgttgt gggatgtgcaaaaactcgttggatctctcaatggttgcgccggcactgggtatccaccagactgat gggtccattctatgaacaactgaggggctctgaccgaatgaggcgcgggaatggaatttgacatgaa gatggcgtggcgcgaaatagtccaacttcaacaacggcggtcttgaacgctgggacgtcgtccttgcg cttgaaggcgcagtagccaggtgcgagcagggggcgataggagtgttgggacaaggctcagcacac acccgaggccgtgcctgtgttgttcaagtactcaacctacgaaggctttacagcatggctggaagtcctc acctgttgattacaaaaactcagagcatctgccgtcaggaccttcggcaaggaaagtagataccttcttctgc ccgctgcttccgcgaagaccttccactgccagagggaatactgcttgcattgaggggtttgccggttaag atccgggtccagcgatactccgagcatatttgacatcgctagacctcttcacgttcaactcaagggttcgctg actgaccacccagttccgggacccaccgtattaccgatgccagtagtagcactcataaagggttagtcg tctggcggggaaggacctcgtgggagataaaggaaatagcagacttgggtgccagcgtgcaacaactg gaggcccgggcggtcgcgatggcactccttttggccaaccaccccgacgaacgtagttacagattca gcttctgtagccaaaalgttggaaaalgggtcagggaagggtgtcccttccactgccgcagcatcatattg

gaggatgccctgagtc aaagaagt gcaatggccgcagttcttcacgtgcgatcccatagcgaagtacctg
gcttttttactgagggcaatgatgtggctgactcacaggctacatticaggttataatgaacccatagtg
ctggatatgttgtgttttacagtattatgtagctgtttttatgcaaaatctaatttaatatattgataattatcatt
ttacgtttctcgttcagctttctgtacaaagtgggtgatctagagggcccgccggttcgaaggtaagccctate
cctaaccctctcctcggtctcgattctacgcgtaccggctcatcatcaccatcaccattgagtttaaacccgct
gatcagcctcgactgtgccttctagttgccagccatctgtttgttgccttccccgtgccttcttgacctg
gaagggtgccactcccactgtcctttcctaataaaatgaggaaattgcatcgcatgtctgagtaggtgtcatt
ctattctgggggggtgggggggggcaggacagcaaggggggaggattgggaagacaatagcaggcatgc
tgggggatgcgggtgggctctatggcttctgaggcggaagaaccagctggggctctaggggglatcccca
cgcgccctglagcgggcgcatlaagcgcggcggtgtggtgggttacgcgcagcgtgacctgctacattg
ccagcgccctagcggccgctcttctgctttcttcccttcttctcgcacgttcgccggctttccccgtcaa
gctctaaatcgggggctcccttaggggtccgatttagtgccttacggcacctcgaccccaaaaaacttgatt
agggtgatgggtcacgtagtggggccatcggcctgatagacggttttgccctttgacgttggagtcacgt
tctttaatagtggaactctgttccaaactggaacaacactcaaccctatctcggcttattcttttgattataagg
gattttgccgatttcggcctattggttaaaaatgagctgatttaacaaaatttaacgcgaattattctgtgg
aatgtgtgtcagtttaggggtgtggaaagtccccaggctccccagcaggcagaagtatgcaaagcatgcac
tcaattagtcgaaccagggtgtggaaagtccccaggctccccagcaggcagaagtatgcaaagcatgc
atctcaattagtcgaaccatagtcgccgccctaactccgcccatcccgccctaactccgccagttcc
gcccattctccgcccagtggtgactaatttttttatttatgcagaggccgaggccgctctgctctgagct
attccagaagttagtgaggaggctttttggaggccctaggcttttgcaaaaagctccgggagcttgtatctc
cattttcggatctgatcaagagacaggatgaggatcgttcgcatgattgaacaagatggattgcacgcag
gttctccggccgcttgggtggagaggctatcggctatgactgggcacaacagacaatcggctgctctga
tgccgccgtgttcggctgtcagcgcaggggcgcccggttcttttgtaagaccgacctgtccgggtgcc
ctgaatgaacgcaggacgaggcagcgcggctalcgtggctggccacgacggcggttcttgcgcagc
tgtgtctgacgttgcactgaagcgggaaaggactggctgctattggcggaagtccggggcaggatct
cctgtcalctcaccitgctcctgccgagaaaglatccatcatggctgatgcaatgcggcggtctgcatacgt
tgatccggctacctgcccaltcgaccaccaagcgaaacatcgcatcgagcgagcacgtactcggatgga
agccggctctgtcgalcaggatgatctggacgaagagcatcaggggctcgcgccagccgaactgttcgc
caggctcaaggcgcgcgatccccgacggcgaggatctcgtcgtgacctatggcgatgcctgcttgccga
atatcatgggtggaaaaatggccgctttctlggaltcalcgaclgtlgccggctgggtgtggcggaccgclat
caggacatagcgttggctaccctgatattgctgaagagcttggcgccgaatgggctgaccttctctcg
tgtttlacgggtalcgccgctcccgalcgcagcgcacgccttctatcgcttcttgacagagttcttctgagc
gggactctgggggtcgcgaaatgaccgaccaagcgacgccccacctgccatcacgagatttcgattcca
ccgccgcttctatgaaagggtgggctcggaaatcgtttccgggacgcggcgctggatgatctccagcg
cggggatctcatgctggagtcttcgccacccccactgtttattgcagcttataatggttacaataaagc
aalagcatcacaaatttcacaaalaaagcatttttctactgcattctagttgtgtgttgcctaaactcatcaatg
tatcttcatctgtctgtataccgtcgacctctagctagagcttggcgtaatcatggctcatagctgttctctgt
gaaattgtatccgctcacaatccacacaacatacagccggaagcataaagtlaaagcctgggggtgc
ctaatagtgagctaaactcacattaaftgcgttcgctcactgccccgttccagtcgggaaacctgtctgt

		ccagctgcattaatgaatcgccaacgcgcggggagagggcggttgcgtattgggcgctcttccgcttcc tcgctcactgactcgcgcgcctggctgttcggctgcggcgagcgggtatcagctcactcaaaaggcggtaa tacggttatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggcc aggaaccgtaaaaaaggccgcgttgcgcgttlllccalaggctccgccccclgacgagcatcacaaaa atcgacgctcaagtcagaggtggcgaaaccgcagaggactataaagataccaggcggttcccccctggaa gtlccctcgtgcgcctcctgtlccgacctgcccgtlaccggalacctgcccgttllccctcgggaa gcgtggcgcttctcatagctcacgctgtaggatctcagttcgggtgtaggtcgttcgctccaagctgggt gtlgtcacgaacccccgllcagcccagccgtgcgccttaccgglaactatgctltgagtcgaacccg gtaagacacgacttaccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggc gggtgtacagagttctgaagtggggcctaactacggctacactagaagaacagttttggtatctgcgt ctgctgaagccagttaccttggaaaaagagttggtagctctgatccggcaacaaaccaccgctgta gcggtgggtttttgttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaggatctcaagaagatcttctgatt ttctacggggctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggtatttgggtcatgagattatcaaaag gatcttcacctagatccttttaattaaaaatgaagttttaaataatcaataagtatatatgagtaaaacttggct gacagttaccaatgcttaacagtgaggcacctatctcagcgatctgtctatitctgtcatccatagttgctg actccccgtcgtgtagataactacgatacgggagggcttaccatctggccccagtgctgcaatgataccg cgagacccacgctcaccggcctccagattatcagcaataaacagccagccggaagggccgagcgca gaagtggctcgtcaactttatccgctccatccagcttattaattgttccgggaagctagagtaagtagttc gccagttaatagtttgcgcaacgttgttgcattgctacaggcatcgtggtgtcacgctcgtcgttggatg gcttcattcagctccggttcccaacgatcaaggcgagttacatgatccccatgttgtgcaaaaaagcggtt agctccttggctcctccgactgttgcagaagtaagtggccgagtggtatcactcatggtatggcagca ctgcataattctcttactgtcatgccatccgtaagatgcttttctgtgactggtgagtactcaaccaagtcattc tgagaatagtgatgcggcgaccgagttgctcttggccggcgtaatacgggataataccgcggccacata gcagaactttaaagtgcctcatcattggaaaacgttcttggggcgaaaactcgaaggatcttaccgctgt lgagatccagtlcgalgaacccacacgtgcacccaactgatctcagcatcttllactllcaccagcglltcl gggtgagcaaaaacagggaaggcaaaatgccgcaaaaaagggaataaggcgacacggaaatgttga atactcatactcttcttllcaalattatgaagcattatcaggggtattgtlcatgagcggatacalatttga atgtatttagaaaaataaacaataagggttccggcgacatttccccgaaaagtggccacctgacgtc
177	HIVp51 pcDNA Dest40	gacggatcgggagatcctccgatccctatggtgcactctcagtacaatctgctctgatgccgcatagttaa gccagtatctgctccctgcttgtgtgttggaggctcgtgagtagtgcgcgagcaaaattaaagctacaaca aggcaaggcttgaccgacaattgcatgaagaatctgcttagggtaggcgttttgcgtgcttcgcgatgta cgggccagatatacgcgttgacattgattattgactagtattataatagtaatcaattacggggctattagttcat agccccatataggagttccggttacataacttacggtaaatggcccgcctggctgaccgcccacgacc ccccccattgacgtcaataatgacgtatgttccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaat gggtggagtatttacgglaaactgccactlggcagtlacalcaagtgtatcatatgccaagtlacgcccccta ttgacgtcaatgacggtaaatggccgcctggcattatgccagtlacatgaccttatgggactttctacttg gcagtlacatctacgtlaltagtcacgttaccatgggtgagtggtlgtggcagtlacatcaatggcggtgga tagcgggttgactcacggggatttccaagctccacccattgacgtcaatgggagttgttttggcaccaa aalcaacgggactllccaaaalgctgtaacaactccgcccattgacgcaaalggcggttaggcgtgtac

	gggtgggaggctatataagcagagctctctggctaactagagaacccactgcttactggcttatcgaaatta atacgactcactatagggagacccaagctggctagttaagctatcaacaagttgtacaaaaagctgaac gagaaacgtaaaatgataataatcaatataaataagattttgcataaaaaacagactacataaactgt aaaacacaacataatccagtcactatggctgccaccatggactacaaagacgalgacgacaagagcagg gctgaccccaagaagaagaggaagggtgccaatctcaccatcgaaacagtcgccgtgaaactcaagcc gggtatggatgggcccgaaggftaagcaatggcccttgactgaggaaaaataaaggcgctcgtagagat atgcacggaaatggagaaggagggaagataagcaagattggcccagagaatccctataatacccccg tttcgcgataaagaagaaggactcaaccaaatggcggaaacttgtagattttcggaacttaataagcga acccaagacttctggagggtccaacttggcattccgcaccccccgtttgaaaaagaagaatcagttac gggtgcttgacgttggcgacgcctattttagcgctccttgacgaggactttagaaaatacacagccctcac ataccaagtattacaacgagacacccggatccggatcaataaacgtgctccccaaggatggaaa gggtctccagcaattttcagcttagcatgaccaaaatcttgaacctttccgcaagcagaacccggatatt gttattatcagtatatggatgacctttatgtcggctcagatcttgaattggcagcaccgaacgaagataga ggaacttcgacagcacttgttgcgtggggtcttacaacccagacaaaaaacaccagaagggaaccacc tttcttggatgggttatgaacttcaccagataaagtggaccgtgcagcccattgtcttgcggaaaagga ctcctggacagtaaatgatattcagaagctcgtaggaaaactgaattgggcaaggcagatataccaggt attaaagttaggcaattgtgcaaacctttcgggggcacgaaggcacttactgaggttataccactgactgaa gagcgaggacttgaactcgcagagaatagagaataactcaaggaaaccgggtacatggcgatactatgat ccaagtaaggatttgaattgcggagattcagaacagggtcagggacaatggacgtaccaaatftaccaag aacctttcaaaaatcttaagacgggaaagtatgcacgaatgcgcggcgacatacgaatgatgtcaagca gttgactgaagcagtacagaagattacaacccaatctatcgttatatggggaaagactcccaaatftaagct cccaatacaaaaagaacttgggagacctgggtggaccgaatattggcaggcgacatggataccggagt gggaatttgttaacacaccgccgtggttaaagtgtggtatcagctcgaagaaagccaatttggggagc agagacgttctaatgaaccatagtgactggatattgtgtgtttacagtattatgtagctgtttttatgcaaa atctaattataatattgatattatatactttacgtttctcgttcagctttctgtacaaagtgtgtgactagagg gcccgcgggtcgaaggtaagcctatccctaaccctcctcgggtcgcattctacgcgtaccgggcatc accatcaccattgagttaaaccgcgtgatcagccctcagctgtgcccttctagtggcagccatctgtgtttgc ccccecccgctgcccttccgtgacctggaagggtgccactccactgtccttccctaataaaalgaggaaatt gcatcgcatgtctgagtaggtgtcattctattctgggggtgggggtggggcaggacagcaagggggag gattgggaagacaatagcaggcatgctggggaigcgggtgggctctatggcttctgaggcggaaagaac cagctggggcttaggggggtatccccacgcgccctgtagcggcgcatgaagcgcggcgggtgtgtgg llacgcgcagcgtgaccgtacacttgcagcgcgccclagcggccgtccttccgttcttcccttcttctc gccacgttcggcggttcccgctcaagctctaaatcgggggtccctttaggggtccgatttagtgccttac ggcacctcgacccccaaaaacttgallagggtgatgttccacgtatgggccatcgccctgalagacggt tttcgccccttgacgttggagtccacgttcttaatagtgactctgttccaaactggaacaacactcaacc ctatctcggctattctttgattataagggaatttgcgalltcggcctattggtaaaaaatgagctgatllaa caaaaattaacgcgaattaattctgtggaatgtgtgcagttaggggtggaaagtccccaggctccag caggeagaaglatgcaagcatgcaltcaalltagcagcaaccagggtggaaagtccccaggctccc cagcaggcagaagtatgcaagcatgcaltcaalltagcagcaaccagggtggaaagtccccaggctccc
--	---

catcccgccctaactccgccagttccgcccaattccgcccaatggctgactaattttttattatgcag
 aggccgagggccctctgctctgagctatccagaagtagtgaggaggtttttggagggcctaggttt
 tgcaaaaagctccgggagcttgatatccatttccggaictgatcaagagacaggatgaggatcgttccg
 atgattgaacaagatggattgcacgcagggttccggccgttgggtggagaggctattcggctatgactg
 ggcacaacagacaatcggctgctctgatccgccgtgttccggctgtcagcgcaggggcgcccggttct
 tttgtcaagaccgacctgtccggtgccctgaatgaactgcaggacgaggcagcgcggctatcgtggctg
 gccacgacggcggttccctgcgcagctgtgctcgcaggtgtcactgaagcgggaaggaggtggtgcta
 ttggcggaagtgcggggcaggatctcctgtcatctcaccttgcctcgcgagaaaagtatccatcatggc
 tgatgcaatgcggcggtgcatacgcctgatccggctacctgccattcgaccaccaagcgaaacatcgc
 atcgaagcagcagctactcggatggaagccggcttctgtcagcaggatgactggacgaagagcatcag
 gggctcgcgccagccgaactgttccgcaaggctcaaggcgcgatcccgacggcgaggatctcgtcgt
 gaeccatggcgatgccgttgcgaatatcatggtggaaaatggccgcttttctgattcatcgactgtgg
 ccggctgggtgtggcgaccgctatcaggacatagcgttggctaccggtgatattgctgaagagcttggc
 ggcgaatgggtgaccgcttctcgtgctttacggatcgcgcctccgattcgacgcagcagcgttctat
 cgccttctgacagttctctgagcgggactctgggggtcgcgaatgaccgaccaagcagcggcccaac
 ctgccatcacgagattcgattccaccgccgcttctatgaaagggttgggttcggaatcgtttccgggac
 gccggctggatgatcctccagcgcggggatctcatgctggagtcttccgccaccccaacttggttattgca
 gcttataatggttacaataaagcaatagcatcacaatttcacaataaagcatttttctactgcattctagt
 gtggttgcctaaactcatcaatgtatcttatcatgtctgtataccgtcgaccttagctagagcttggcgtat
 catggtcatagctgttctctgtgtgaaattgtatccgctcacaatttcacacacatacagaccggaagcat
 aaaagtgtaaagcctgggggtgcctaatagtgtagctaaactcacattaatfgcgttgcgctactgcccgctt
 ccagtcgggaaacctgtcgtccagctgcattaatgaatcgccaacgcgcggggagaggcggttgc
 gtattggcgctcttccgcttctcgtcactgactcgtcgtcggctgttcggctcggcgagcggta
 tcagctcactcaaaaggcglaalacggltatccacagaatcaggggalaacgcaggaaagaacatgtga
 gcaaaaggccagcaaaaaggccaggaaccgtaaaaaggcccggttgcgtggcgttttccataggtctccg
 cccctgacgagcatcacaataatcgacgtcgaagtcagaggtggcgaaaccgcagaggacataaag
 ataccaggcggttccccctggaagctccctcgtgcgctcctctgttccgacctgcccgttaccggatacct
 gtccgcttctccctcgggaagcgtggcgcttctcatalagctcagcgtgtaggtatctcagttcgggtgag
 gtcgttcgtccaagctgggctgtgtgcacgaacccccgttcagcccagccgtcgccttatccggta
 actatcgtctgagtcacccggtaagacacgactatcggcactggcagcagccactggtaacaggatt
 agcagagcgaggtatgtaggcggtgtacagagttcttgaagtgttggcctaactacggctacactagaa
 gaacaglatlgtglatctgcgtctgctgaagccagttaccltcggaaaaaggttggtagctcttgalccg
 gcaaaacaccaccgctggtagcgggtgtttttgttgcagcagcagattacggcgagaaaaaagg
 atctcaagaagatccttgalcttctacgggtctgacgtcagtggaacgaaaactcacgtlaagggtt
 ttggtcatgagattatcaaaaaagatcttcacctagatcctttaaattaaaaatgaagtttaaatcaatctaa
 gtatatatgagtaaacctggctgacagtlaccaatgcclaatcagtgaggcacctatcagcgaletgtcta
 ttctgtcatccatagttgctgactccccgtcgttagataactacgatacgggaggggttaccatctggcc
 ccagtgctgcaatgataccgcgagaccacgcacccggtccagallatcagcaalaaccagccag
 ccggaaggccgagcgcagaagtgtcctgcaacttatccgctccatccagcttattaattgttccgg

		gaagctagagtaagtagtgcgcagttaatagttgcgcaacgttgtgccattgctacaggcatcgtgggtg tcacgctcgtcgttggatgggttcattcagctccgggtcccaacgatcaaggcgagttacatgatcccc atgttgtcaaaaaagcggtagctcctcggtcctccgatcgtgtcagaagtaagttggccgcagtggtat cactcalggllatggcagcactgcalaattctcttactgtcatgccatccglaagatgcttctgtgactgggtg agtactcaaccaagtcattctgagaatagtgtatgcggcgaccgagttgctctgcccggcgtaatacgg gataataccgcgccacatagcagaacttlaaaagtgctcatcatlggaaaacgttctcggggcgaaaact ctcaaggatcttaccgctgttgagatccagttcgaatgaacccactcgtgcacccaactgatcttcagcatct tllactllcaccagcgtllctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgccgcaaaaaagggaalaagg gcgacacggaaaagtgtgaatactcactcttcttllcaatatttgaagcatttatcagggttattgtctcat gagcggatacatattgaatgtatttagaaaaataaacaataagggttccgcgcacatttccccgaaaagt gccacctgacgtc
178	HIVp66 pcDNA Dest40	gacggatcgggagatcctccgatccctatgggtgactctcagtacaatctgctctgatgccgcatagttaa gccagtatctgctccctgcttgtgtgtggaggctcgtgagtagtgcgcgagcaaaatttaagctacaaca aggcaaggcttgaccgacaattgcatgaagaatctgcttaggggttagggcgtttgctgctcgcgatgta cgggccagatatacgcgttgacattgatttactagttaitaatagtaatcaattacggggctcattgctcat agcccatafatggagttccgcgttacataacttacgglaaatggcccgcctggctgaccgcccacgacc cccgccattgacgtcaataatgacgtatgttccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaat gggtggagtattlacggtaaaactgccactlggcagtlacatcaagtgtaicatatgccaaagtacgccccta ttgacgtcaatgacggtaaatggcccgcctggcattatgccagtcacatgaccttatgggactttctacttg gcagtacatctacgtatttagtcacgtctattaccatggtagtcgggttttggcagtcacatcaatggcggtgga tagcgggttgactcacggggatttccaagctccacccattgacgtcaatgggagttgttttggcaccaa aatcaacgggactttccaaaatgtcgtacaacacccgcccattgacgcaaatggcggttaggcgtgtac gggtggaggctctatataagcagagctctctggctaactagagaacccactgcttactggcttatcgaaatta atacgactcactataggagacccaagctggctagttaagctatcaacaagttgtacaaaaaagctgaac gagaaaactgaaaatgatataaatatcaatataataattagatttgcataaaaaacagactacataatactgt aaaacacaacataatccagtcactatggctctatctccaatcgaaacagtcctccgtcaaatgaaaccg ggaatggacgggtccaaaagtcaacaatggcctctcaccgaggagaagattaaaggcattggctgaaatc tgactgagatggagaaaagggggaaaattagcaaaatcgggccagagaacccctacaatacacccgt atttgcacataaaaaaaagatagcactaagtggcgaaagctcgtggacttccgcgaactcaataaaaga accaggatttttgggaggtacagcttggcattccgcacccggcaggacttaagaagaaaaatccgtaa ccgtgctggatgtggcgatgcatactttagcgtaccactggatgaggattttaggaaagtatactgcatfca caataccttcaattaacaacgaaacgccagggataaggtaaccaataaacgtctcccccaaggctggaa gggtctccagcgatcttccagcttcaatgactaagatacttgagccgttcagggaagcaaaaccccgaca tcgtaatttaccagtcacatggatgactgtacgtcggtagtgtatcgaattggccagcatcgaacaaaa tcgaggaattgaggcaacacctctgcgggtgggttgcgacgcccgaacaaaagcatcaaaaagagc cgccgttctgtggatgggttatgagctccatccggacaaatggacagtcagcccatcgtcttccagaa aaagatagttggactgtaaatgacatlcacaaaatgggtcgggaaattgaactgggcgtlccagatctatcca ggaattaaagtcggcagcttgcgaagcttctccgggaacgaaggcacttacagaggtcataccctta cggaaagaagcgggaattggagcttgcggagaaccgcgagatactcaagagccgggtccacgggtctta

ctacgatccatccaaagatcttattgcagagattcagaaacaagggcagggtcaatggacatatcagatct
 accaagagccgttcaagaatttgaagacaggaaagtacgcgaggatgagggcgccacatactaacgat
 gttaacaactcactgaggctgtacaaaagattactacggagtcaatagtaatatggggcaaaacaccta
 gttaagctccgatccaaaaggagacttgggaaccctgggtggaccgaglatitggcaagctacgtggatt
 cctgagtgagggaatttgaacacacctccctcgtgaagctgtgtatcaacttgaaggagccaatagt
 cggcgccggagaccttctatgtggacggcgccgcgaaccgagagacaaagctcggcaaggcgggttat
 gtaacgaaccgaggtaggcaaaaggctgtaacgcttactgatacgaccaacaaaaaacggaactgca
 ggctatttactcgcattgcaagactcaggactggaagtcaatatcgtgacggacagtcaatatgcaactgg
 ggattattcaggcgcaaccggatcagagtgaaagcgagctggtaaaccaattattgagcagttgataaa
 aaaggagaaagtgtatcttgccttgggtaccagcccataaggggatcgagggtaatgaacaggttgataaa
 ctgtgaagcgctggaattcggaaagtacttaccatagtgactggatatgttgtgtttacagtattatgtatc
 tgtttttatgcaaaatctaatttaatatattgatatttatcaatttactgttctcgttcagcttcttgcataaagt
 gttgatctagagggcccgcttgaaggtaagcctatccctaaccctctcctcggctcgtgattctacgcgt
 accggctcatcaccatcaccattgagttaaaccgctgacagcctcgaactgtgaccttctagttgccag
 ccatctgttgttccccccccctgaccttctgaacctggaagggtgccaactccactgtccttcttaata
 aaatgaggaaattgcatcgcattgtctgagtaggtgtcattctattctgggggggtgggtggggcaggaca
 gcaagggggaggattgggaagacaatagcaggcatgctggggatgcgggtgggctctatggcttctgag
 gcggaaagaaccagctggggctctaggggtatcccacgcgccctgtagcggcgcaattaagcgcgg
 cgggtgtgtgttacgcgcagcgtgaccgtacacttgccagcgccctagcgcccgctccttctcgtttc
 tcccttcttctcgcacgttgcgggcttcccgtaagctctaaatcgggggctccctttaggggttccg
 attagtgtttacggcactcgacccccaaaaacttgattagggtgatggttcacgtagtgggccatgcc
 ctgatagacgggttttgcaccttgacgttggagtccacttcttaatagtggactcttgttccaaactggaa
 caaactcaacctatctcggctattctttgattataagggttttgcgatttcggcctattggttaaaaa
 tgagctgattlaacaaaaaattlaacgcgaalttaattctgttgaatgtgtgicagttagggtgtggaagtc
 caggctccccagcaggcagaagatgcaagcatgcatctcaatagtcagcaaccaggtgtggaagt
 cccaggtccccagcaggcagaagatgcaagcatgcatctcaatagtcagcaaccatagtcgcc
 cctaactccgccatcccccccccttaactccgccagttccgccatctccgcccatggctgactaatt
 tttttttatgcagaggccgaggccgctctgcccctgagctatccagaagtagtgaggaggcttttgg
 aggcctaggcttttcaaaaagctccgggagcttgtatatccatttccgatctgataagagacaggatg
 aggatcgttctgcatgattgaacaagatggattgcacgcagggttccggccgcttgggtggagaggctat
 tcggctatgactgggcacaacagacaatcggctgctctgatccgccgtgttccggctgtcagcgcagg
 ggccggcggttcttttgaagaccgacctgtccggtgccctgaatgaactgcaggacgaggcagcgc
 ggctatcgtggctggccacgacggcgcttcttgcgcagctgtgtcgaactgtcactgaagcgggaa
 gggactggctgclattggcggaagtgcggggcaggatctcctgtcatctcacttgcctcctgcagaa
 agtatccatcatggctgatgcaatcgccgggctgcatacgttgcacggctacctgccattcgaccacc
 aagcgaacatcgcacgagcgcacgtactcggatggaagccggcttcttgcacaggaatgactgg
 acgaagagcatcaggggctcgcgccagccgaactgttcgccaggctcaaggcgcgcatgccgacgg
 cgaggatcgtcgtgacctggcgatgcctgcttgcgaataatggtggaaalggccgctttctg
 gattcatcgactgtggccggctgggtgtggcgaccgctatcaggacatagcgttggctaccctgatatt

		gctgaagagcttggcggcgaatgggctgaccgcttctcgtgctttacggtatcgccgctcccgaattcgc agcgcacgccttctatcgcttcttgacgagttcttctgagcgggactctggggctcgcgaaatgaccga ccaagcgacgcccacctgccatcacgagattcgaattccaccgccccttctatgaaagggtgggcttcg gaalcgtttccgggacgcccgtggatgatcctccagcgcggggaatcctgctggagttcttcgcca ccccaaactgtttattgacgttataatggttacaataaagcaatagcatcacaatttcacaaataaagcat tttttcaclgcattctagttggtgttgcctaaactcatcaatglatcttcatgctglataccgctcgacctta gctagagcttggcgtaatcatggcatagctgtttcctgtgtgaaattgttatccgctcacaattccacacaac atacgagccggaagcataaagtgtaaaggctgggggtgcctaalgaglgagctaacctacallaattgcgtt gcgctcactgcccgtttccagtcgggaaacctgtcgtgccagctgcattaatgaatcgcccaacgcgcg gggagaggcggttgcgtattggcgctcttccgcttctcgtcactgactcgtcgcgtcggctgttcg gctgcggcgagcggatcagctcacicaaaggcggtatatacgggtatccacagaatcaggggataacgc aggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccagggaaccgtaaaaaggccgctgtctggc gttttccataggctccgccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtcagagggtggcgaaac ccgacaggactataaagataccaggcggtttcccccgtgaagctcctcgtgcgtctcctgttccgacctt gccgcttaccggatacctgtccgcttctccttccgggaagcgtggcgcttctcagatcctacgtgtag gtatctcagttcgggtgtaggtcgttcgtccaagctgggctgtgtgcacgaacccccgttcagcccacc gctgcgccttaccggtaactatcgtcttgatccaacccgglaagacacgacttaccgactggcagca gccactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtagggcggtctacagagttcttgaagtgggtgccta actacggctacactagaagaacaglattttggtatctgcgctctgctgaagccagttaccttcggaaaaaga gttggtagctcttgatccggcaaaaccaccgctggtagcgggtgtttttgttgcaagcagcagatta cgcgcagaaaaaaggatcicaagaagatccttgatctttctacggggctgacgctcagtggaacgaa aactcacgttaagggttttggatcagattatcaaaaaggatctcacctagatccttttaattaaaaatg aagttttaaatcaatctaaagtatatatgagtaaaacttggtctgacagttaccaatgcttaatcagtgaggcac ctatctcagcgatctgtctatttcttcatcattagttgcctgactccccgtcgtgtagataactacgatacgg gagggcttaccatctggccccagtgctgcaatgalaccgcgagaccacgctcaccggctccagattat cagcaataaaccagccagccggaaggggccgagcgagaagtggtcctgcaactttatccgctccatcc agctatlaaflgttggcgggaagctagaglaagtagtgcagllaatagtttgcgcaacgltgttgcatt gctacaggcatcgtggtgtcacgctcgtgttggtaggttcaatcagctccgggtcccaacgatcaagg cgagttacatgatccccatgttgcgcaaaaagcggttagctccttcgglectccgacgttgcagaagt aagttggccgagtggtatcacatcaggtatggcagcactgcataattctcttactgtatgccatccgtaag atgctttctgtgactggtgagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgatgcggcgaccgagttgctct tgcccggtcaatacgggataataccgcgccacatagcagaactttaaaagtgtcatcattggaaaac gttctcggggcgaaaactctcaaggatcttaccgctgttgagatccagttcagatgaaccactcgtgcac ccaactgatcttcagcatctttactttaccagcgtttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaatgccg caaaaaagggaataaggcgacacggaaatgttgaatactcactcttcttttcaataattattgaagcatt tatcagggttattgtctcatgagcggatacatattgaatgtatttagaaaaataacaaatagggttccgc gcacattccccgaaaagtgccacctgacgtc
179	MMLV pcDNA	gacggatcgggagatctcccgaatccctatgggtgactctcagttacaatctgctctgatccgcatagttaa gccagtatctgctccctgctgtgtgttgaggctcgtgagtagtgcgcgagcaaaatttaagctacaaca

Dest40	aggcaaggcttgaccgacaattgcatgaagaatctgcttagggftaggcgltttgctgcttctcgcatgta cgggccagatatacgcgttgacattgatttgaactagtattataatagtaataaattacggggctcattagtcat agcccataataggagtccgcgttacataacttacggtaaatggcccgcctggctgaccgccaacgacc cccgcccattgacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacgccaatagggaactttccattgacgtcaat ggggtggagtatttacggtaaacgtcccacttggcagtacatcaagtgtatcatatgccaaagtacgccccta ttgacgtcaatgacggtaaatggcccgcctggcattatgccagtacatgacctatgggaactttctacttg gcagtacatctacgtattagtcacgtctattaccatgggtatgcgggtttggcaglacatcaatggcggtga tagcgggttgactcacggggatttccaagtctccacccattgacgtcaatgggagttgtttggcaccaa aatcaacgggactttccaaaatgtcgtacaactccgcccattgacgcaaatggcggttaggcgtglac ggtgggaggtctatataagcagagctcttggctaactagagaacccactgttactggttactcgaatta atacgactcactafagggagacccaagctggctagttaagctatcaacaagttgtacaaaaagctgaac gagaaacgtaaaatgatataaataatataatataatagattttgcataaaaaacagactacataaactgt aaaacacaacatatccagtcactatggctgccaccatggactacaaagacgatgacgacaagagcagg gctgaccccaagaagaagagggaaggtgggtatgtcacatgacatggctgtctgactttctcaggcatgg gcggaaactggaggtatgggttggcagtagcggaaggctccacttattatccctttaaagcaacgtcaac gccggtttctatcaagcaatatcaatgagtcagaagctcgcctgggaattaagcctcacatacaacgt tgttggatcaaggtattcttgtgccgtgccaatctccttgaatacaccaccccttctgtcaaaaaacccgg aacaaatgactaccgcccgtgcaagacctcgggaagtcaataagagggtagaagatattaccggac cgltccaaatccgtataatctgtgtcaggactgccaccgtcccatcagtggtatactgtccctgacttgaag gatgcgttttttgcctgcgcctccaccctacgtcacagccctgttcgcgttcgaatggagagacccgtgaa atgggtatatcagggcagttgacttggaccagactccacaagggttcaaaaatagccctactcttttgatg aagccctccacagggacctcgcagatttcaggatccagcaccggaccttatcttctgctgacgtacgtaga cgatctcttgcggcggcacaagcgaactggattgccagcagggcacgcgagctctctccagacact gggtaacctggggtlacaggcgicagctaaagggcacaataatgccaaaaacaagtgaaatgacctgg ggtatctctgaaagaggggcaacgggtggtcacagaagcccgaaggagacgggtgatgggacaacc gacgcctaaaaacgccacgacaactgcgagaalittgggcaccgcccgggtttgccgctttggatccctg gctttgcggagatggctgctcattgtatcccttgactaaaacagggtacgttgttaattggggcccagatca gcaaaaggcttaccagaagaalaaacaagcgcttcttactgtctccggcacctcggccttccggalltgactaa gccctttgagttgtttgtagacgagaagcaggatcgcgaagggtgtttgacgcaaaagctcggccctt ggcgacgacccglagcgtattgtctaaaaagctcgaccagtagcgggccgggttggccaccatgtctctg gatggctcgtgccatagcgggttcttaccagacgcggggaactgacaatgggacagcctcttgaata aaggcggcgcatgctgttgaagcactgggtgaagcagccaccagatcgatggctgagcaacgcaaggat gacacactatcaggccctgcttctcgatacagatagatccaattcggccctgttgttgccttgaacccagc tacgttttgccttcccagaagagggtttgcaacacaattgcttggatalcttggcagaagcccacggcac gcggccggatttgacggaccagccgttgcctgatgccaccatacctggtatactgacgggtcctcattg ctgcaggaggggccagcgcaaaagctggggcgagtaactlacggagaccgaagtcalltgggcaaaag cactgccagcagggacctctgccagcggcgagcttattgcgttacacaggcattgaagatggcag aaggaaagaagctcaatgtctatcggallcccggtatgcalltgcacggcgacacalacggcgagat ctataggcgaagaggactgcttactccagggtaaggagataaagaataaggatgaatcctcgcctt
--------	--

	ctcaaagcccttttttgcgaaacgcctgagcataatccattgccctgggtacccaaaaggggcattctgca gaggcgcgaggcaacaggatggcagatcaggetgctaggaaagccgccattacggagacgccgata cgagtacgttgcttaataaaccatagtgactggatatgttggttttacagtattatgtagctgttttatgc aaaatctaatttaataatattgataattatattacgtttctcgttcagctttctgtacaaaagtggtgatctag agggcccgcggttcgaaggtaagcctatccctaaccctctcctcgggtctcgattctacgcgtaccggctat catcaccatcaccattgagtttaaacccgctgatcagcctcagctgtgccttctagtggccagccatctgtgt ttgccctccccgtgccttcttgaccctggaaagtgccactccactgtccttcttaataaaatgagga aattgcatcgcatgtgctgagtaggtgtcattctattctggggggtgggggtggggcaggacagcaagggg gaggattgggaagacaatagcaggcatgctggggatgcggtgggctctatggcttctgaggcggaaag aaccagctggggctctaggggtatccccacgcgcctgtagcggcgcatlaagcggcggggtgtgg tggttacgcgcagcgtgaccgctacactgccagcgccttagcggccgctccttctgcttcttctcctt tctcgccacgttcggcggtttccccgtcaagctctaaatcgggggtcctttaggggttcgatttagtgc ttacggcacctcgacccccaaaaacttgattaggggtgatggttcacgtagtggccatcgccctgatagac ggtttttgcctttgacgttgagtcacgttctttaaagtggactctgttccaaactggaacaacactca accctatctcggctattctttgattataagggaatttgcgatttcggcctattggttaaaaaatgagctgatt taacaaaaatfaacgcgaatfaattctgtggaatgtgtcagttagggtgtggaagtccccaggctccc cagcaggcagaagatgcaaaagcatgcatctcaatagtcagcaaccagggtgtggaagtccccaggct ccccagcaggcagaagatgcaaaagcatgcatctcaatagtcagcaaccatagtcggccctaaactcc gcccacccgcccctaactcggccagttccggccattctcggcccatggctgactaattttttattatg cagaggccgagccgctctgctctgagctattccagaagtagtgaggaggctttttggaggcctagg cttttcaaaaagctcccgaggctgtatatccatttccgatctgatcaagagacaggatgaggatcgttt cgcatgattgaacaagatggatgacgcaggttctccggcgcttgggtggagaggctattcggctatg actgggcacaacagacaatcgctgctctgatgcccgctgttccggctgtcagcgcaagggcgcccg gttcttttgaagaccgacctgtccgggtccclgaalgaactgcaggacgagggcagcgcggtatcgt ggctggccacgacggcggttcttgcgcagctgtgctcgacgttgcactgaagcgggaaggagactgg ctgctattggcggaagtgccggggcaggatctcctgtcctcaccctgtcctgcccagaaaatgtaacat catggctgatgcaatgcggcggtgcatacgcttgatccggctacctgcccattcgaccaccaagcgaaa catcgcatcgagcgagcacgtactcggatggaagccggcttgtcgtacaggatgactggcagaagag catcaggggctcgcgcagccgaactgttcgccaggctcaaggcgcgatgccgacggcgaggatc tcgtcgtgacctgagcgtatgcttgcctgcccgaatatcatgggtgaaaatggccgcttttctggatcactg actgtggccggctgggtgtggcgggaccgctatcaggacatagcgttggctaccgtgatattgctgaaga gcttggcgggcgaatgggtgaccgcttctcgtgctttacgggtatcggcgtcccgtatcgcagcgatc gccttctatcgcttcttgacgagttcttctgagcgggactctgggttcgcgaaatgaccgaccaagcga cgcccaacctgccatcacgagattcgaatccaccgcccgttctatgaaaggttgggttcgggaatcgtt tccgggacgcccgtggatgatcctcagcgcgggagatctatgctggagttctcggccaccccaactt gttattgcagcttataatggtacaaaalaaagcaatagcatcacaatttcacaaataaagcatttttactg cattctagtgtgtgttgcctaaactcaatgtatcttctatctgtctgtataccgtcgacctctagtagagct tggcgtatcatggctatagctgttctgtgtgaaatgttatccgtcacaatttcacacacacacagagc cggaagcataaagtgtaaagcctgggggtgcctaatagtgagctaaactcacatttaattgcgttgcgtcac
--	---

	tgcccgctttccagtcgggaaacctgtcgtgccagctgcattaatgaatcggccaaacgcgcggggagag gcggtttgctattggggcgtcttccgcttcctcgtcactgactcgtcgcctcggcgttcggctgcggc gagcggatcagctcactcaaaggcggtaatacggttatccacagaatcaggggataacgcaggaaaga acatgtgagcaaaaaggccagcaaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgcgttgcctggcgttttccata ggctccgccccctgacgagcatcacaaaaatcagcgtcaagtcagagggtggcgaacccgacagg actataaagataaccaggcgtttccccctggaaagctccctcgtgcgtctcctgttccgacctgcgccttac cggatacctgtccgctttctccctcgggaagcgtggcgtttctcatagctcacgctgtaggtatctcagt tcgggtgtaggtcgttcgtccaagctgggctgtgtgcacgaacccccgttcagcccagccgctgcgcct tatccggtaactatcgtctgagtcacaacccggtaagacacgacttatgccactggcagcagccactggt aacaggattagcagagcgagggtatgtaggcgggtgctacagagtcttgaagtgggtgacctaacacggct acactagaagaacagtatgtgtatctgcgtctgctgaagccagttaccttcgaaaaagagtgtgtagct cttgatccggcaacaaaccaccgctggtagcgggtgtttttgtttgcaagcagcagattacgcgcaga aaaaaaggatctcaagaagatcctttgatctttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgt taagggaatttggtcatgagattatcaaaaaggatcttcacctagatccttttaattaaaaatgaagtttaaat caatctaaagtatatagtaaaacttggtctgacagttaccaatgcttaacagtgaggcacctatctcagc gatctgtctatttcgttcacatagttgcctgactccccgtcgtgtagataactacgatacgggagggtta ccatctggccccagtgctgcaatgataccgcgagaccacgctcaccggctccagatttatcagcaataa accagccagccggaaggggccgagcgcagaagtggctctgaactttatccgctccatccagctatttaa ttgttccgggaaagctagagtaagtagttcggcagttaatagtttgcgcaacggtgttgccatfgctacagg catcgtggtgtcacgctcgtctgttggtaggttcattcagctccggttcccaacgatcaaggcgagttac atgatccccatgtgtgcaaaaagcggtagctccttcggctctccgatcgtgtgcagaagtaagtggc cgcagtggtatcactcatggttatggcagcactgcataattctcttactgtcatgccatccgtaagatgctttc tgtgactggtgagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgtagcggcgaccgagttgctcttccccg cgtaaatcgggataataccgcgccacatagcagaactttaaaagtgtcatcattggaaaacgtttctcg ggcgaaaactctcaaggatcttaccgctgttgagatccagttcagtgtaaccacactgtgcaaccaactg atcttcagcatctttactttaccagcgtttctgggtgagcaaaaacaggaaaggcaaaatgccgaaaaaa gggaataaggcgacacggaaatgtgaatactcatactcttcttttcaattattgaagcatttatcagg gttattgtctcatgagcggatacatattgaatgtatttagaaaaataaacaatatgggggtccgcgcacatti ccccgaaaagtccacctgacgtc
--	--

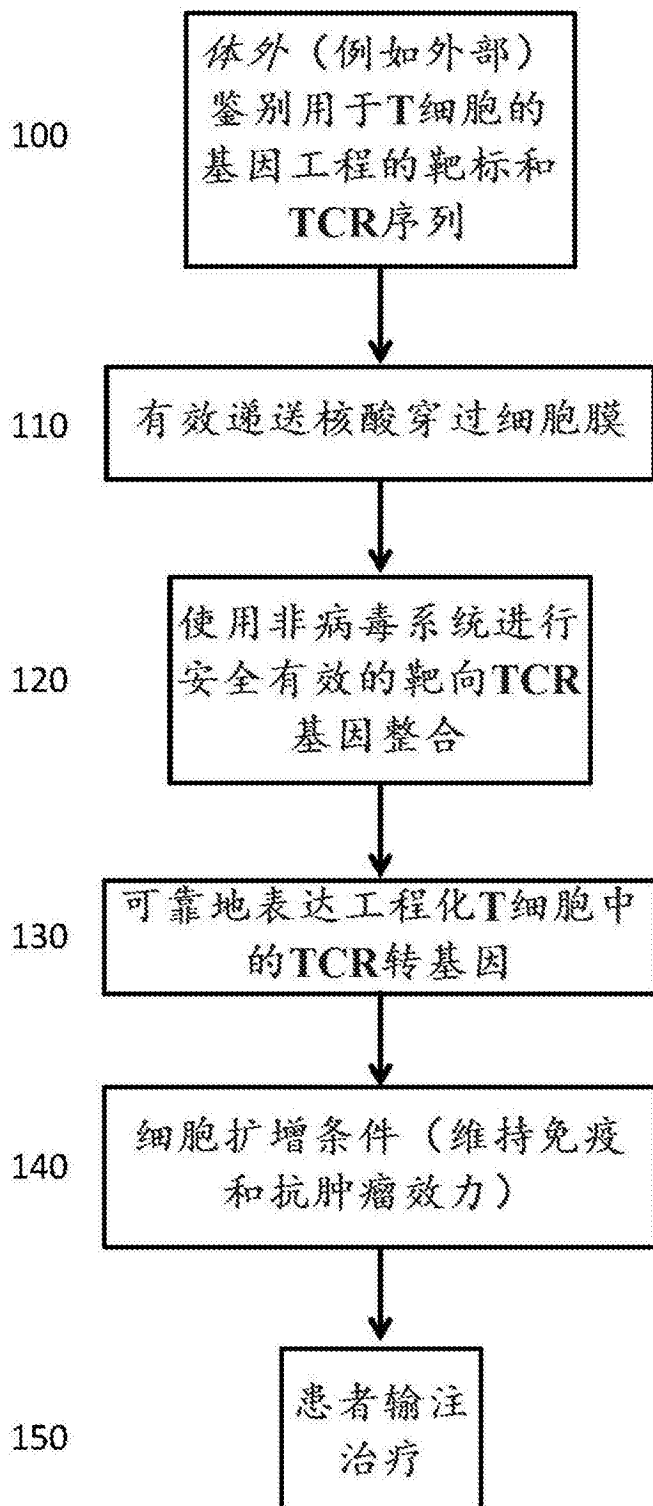


图1

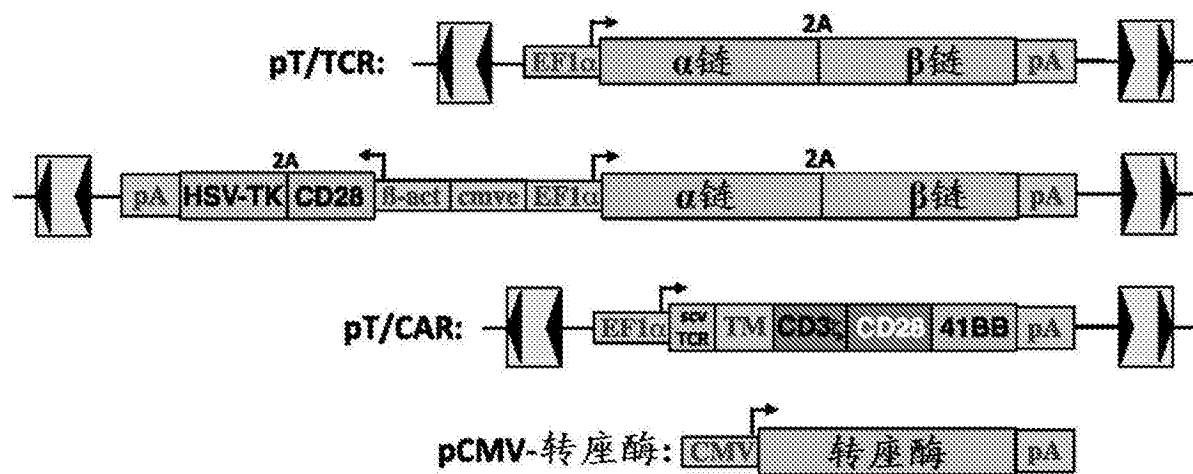


图2

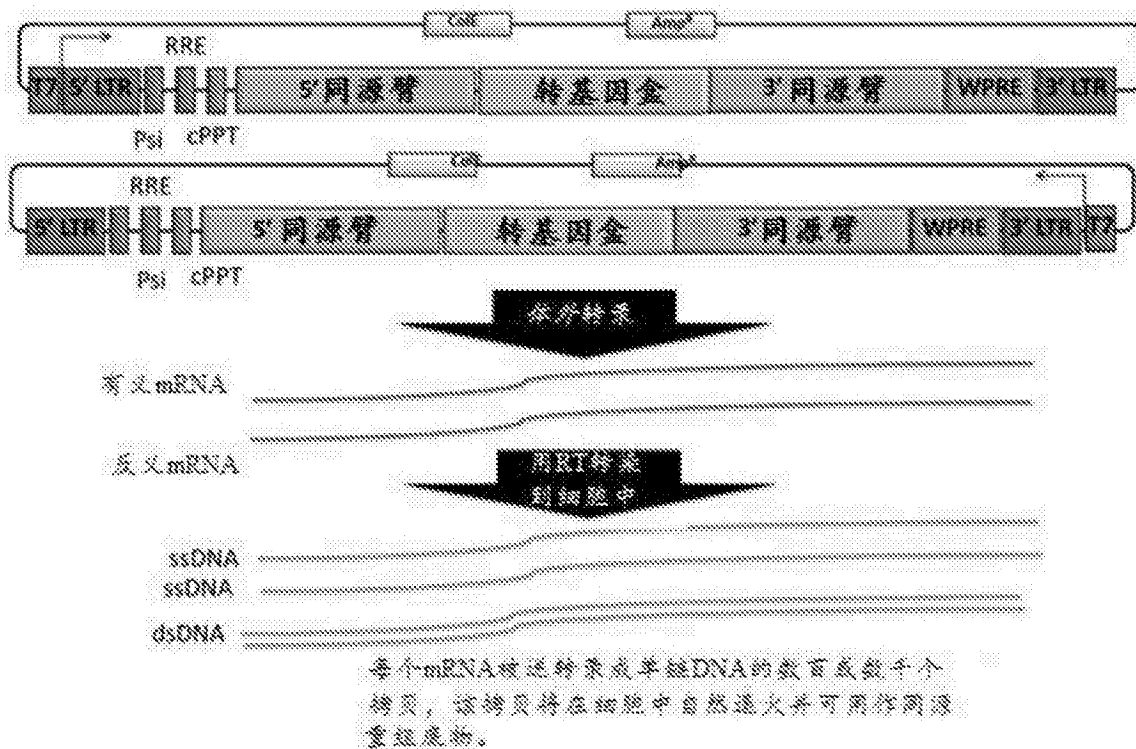
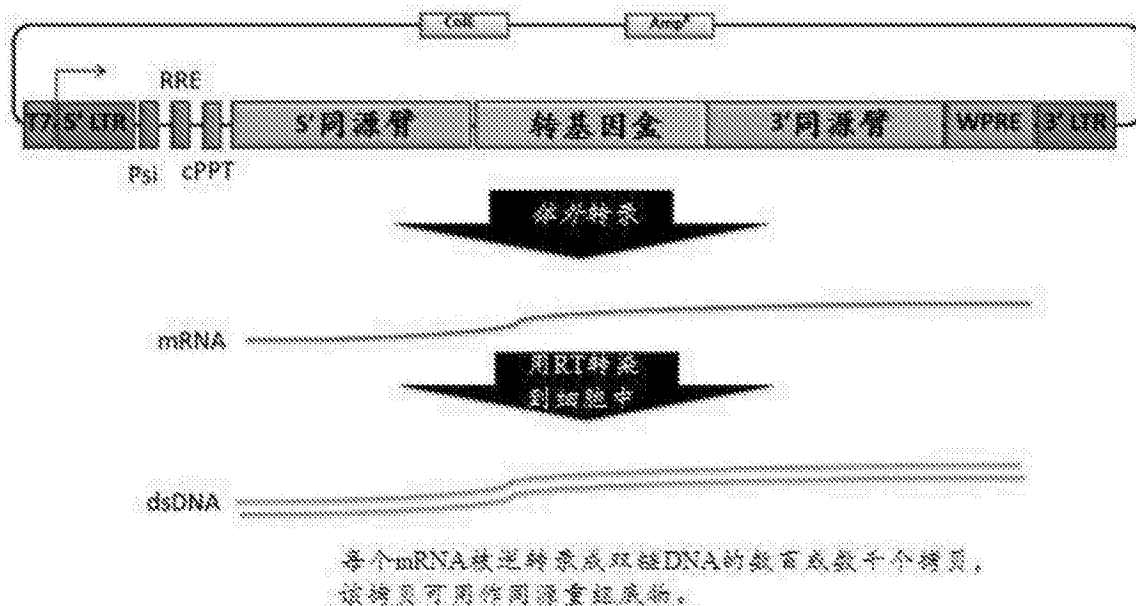


图3

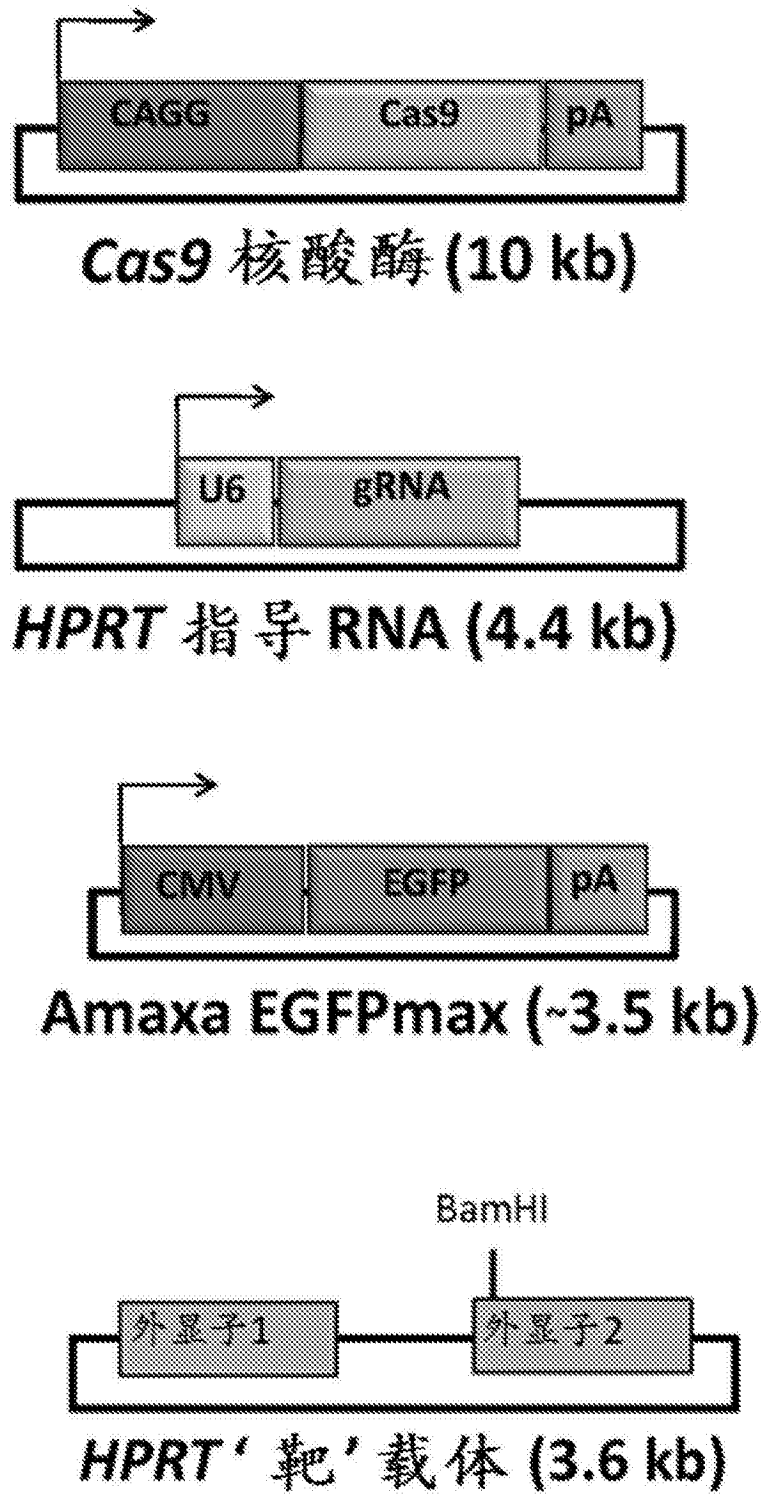
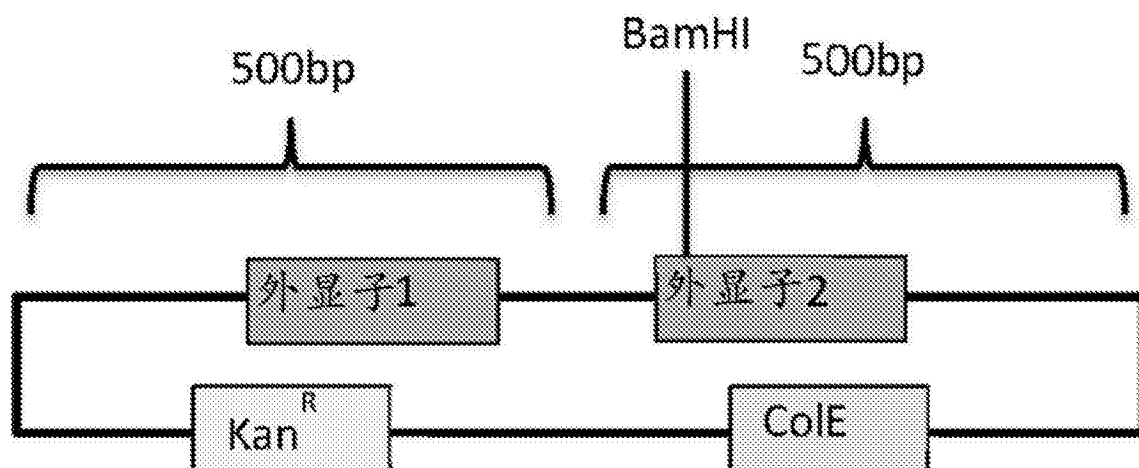
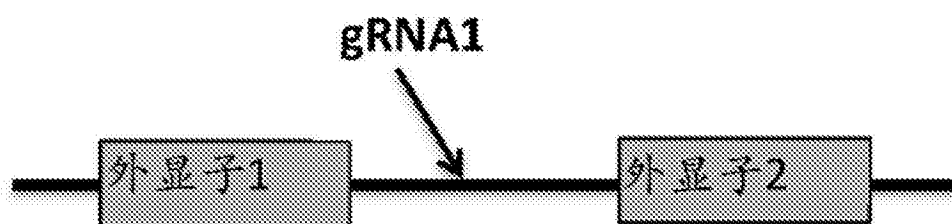


图4

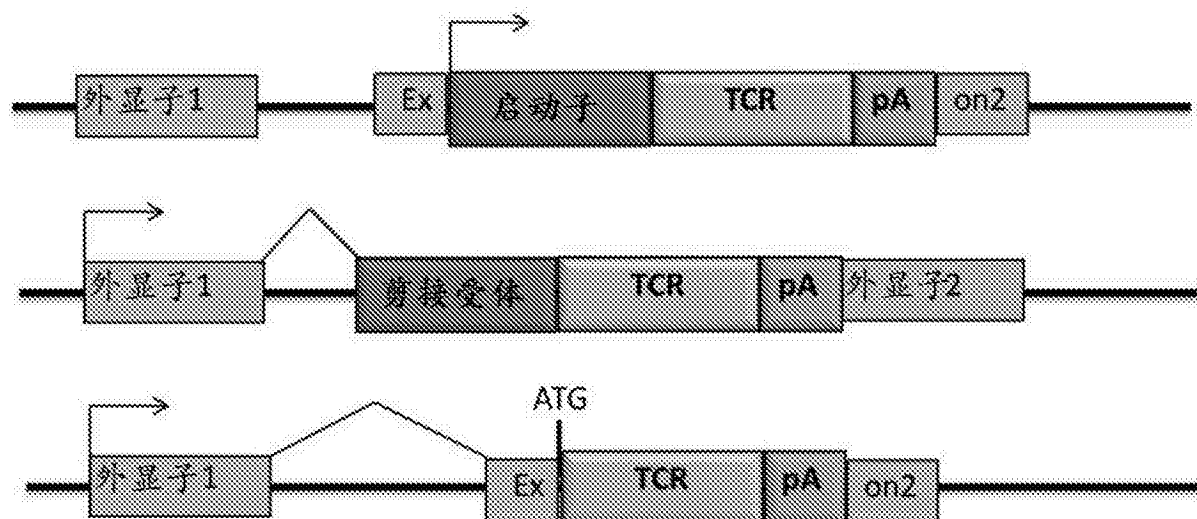


靶向载体



HPRT 基因组区域

图5



- (1) 由外源启动子转录的TCR转基因
- (2) 通过剪接由内源启动子转录的TCR转基因
- (3) 通过框内翻译由内源启动子转录的TCR转基因

图6

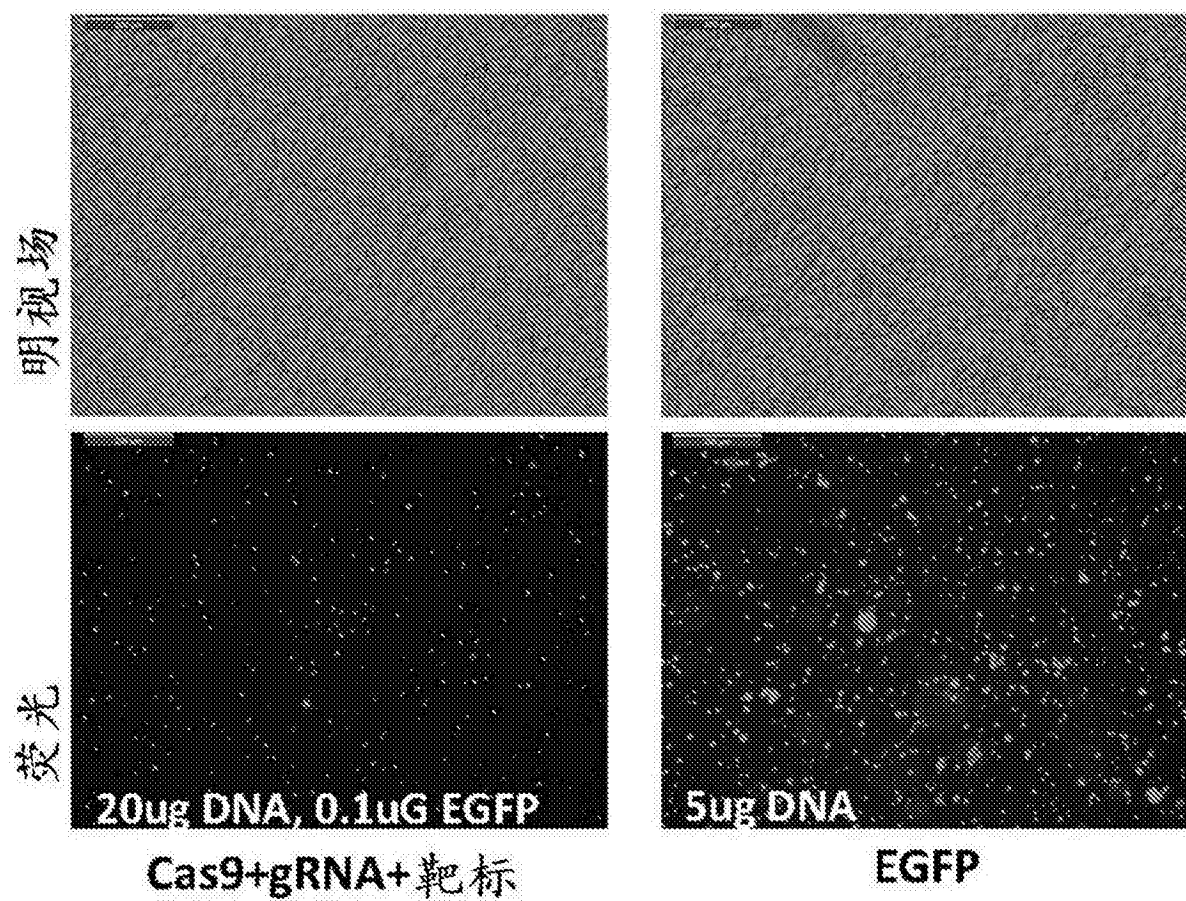


图7

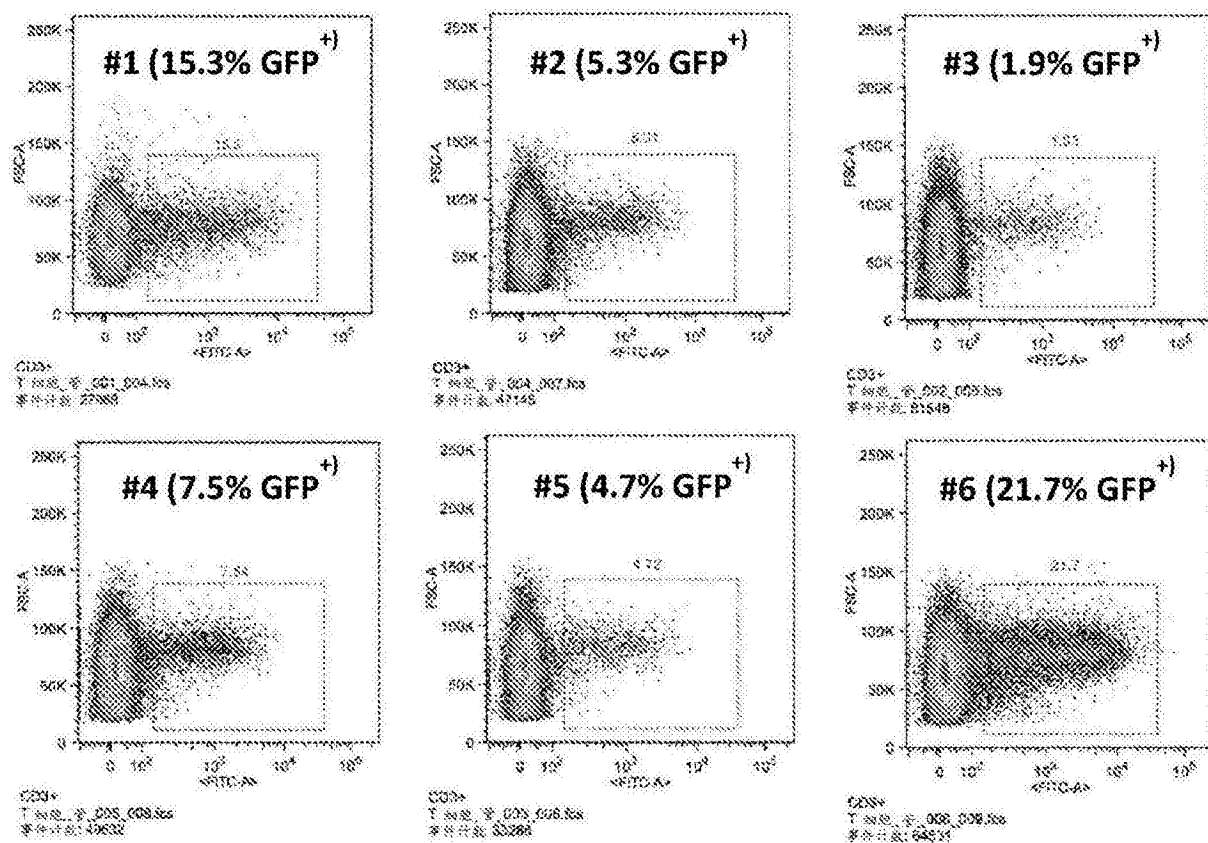


图8

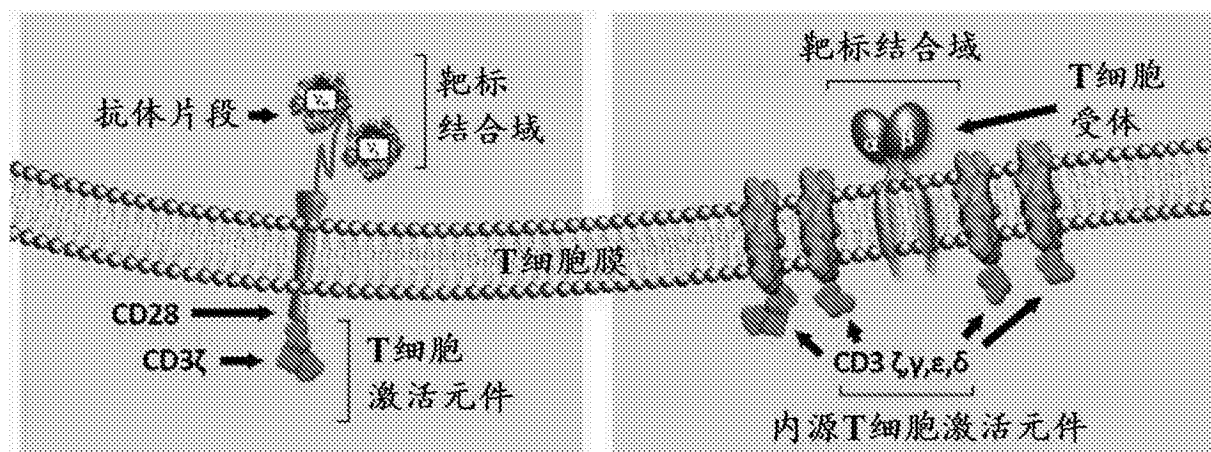


图9

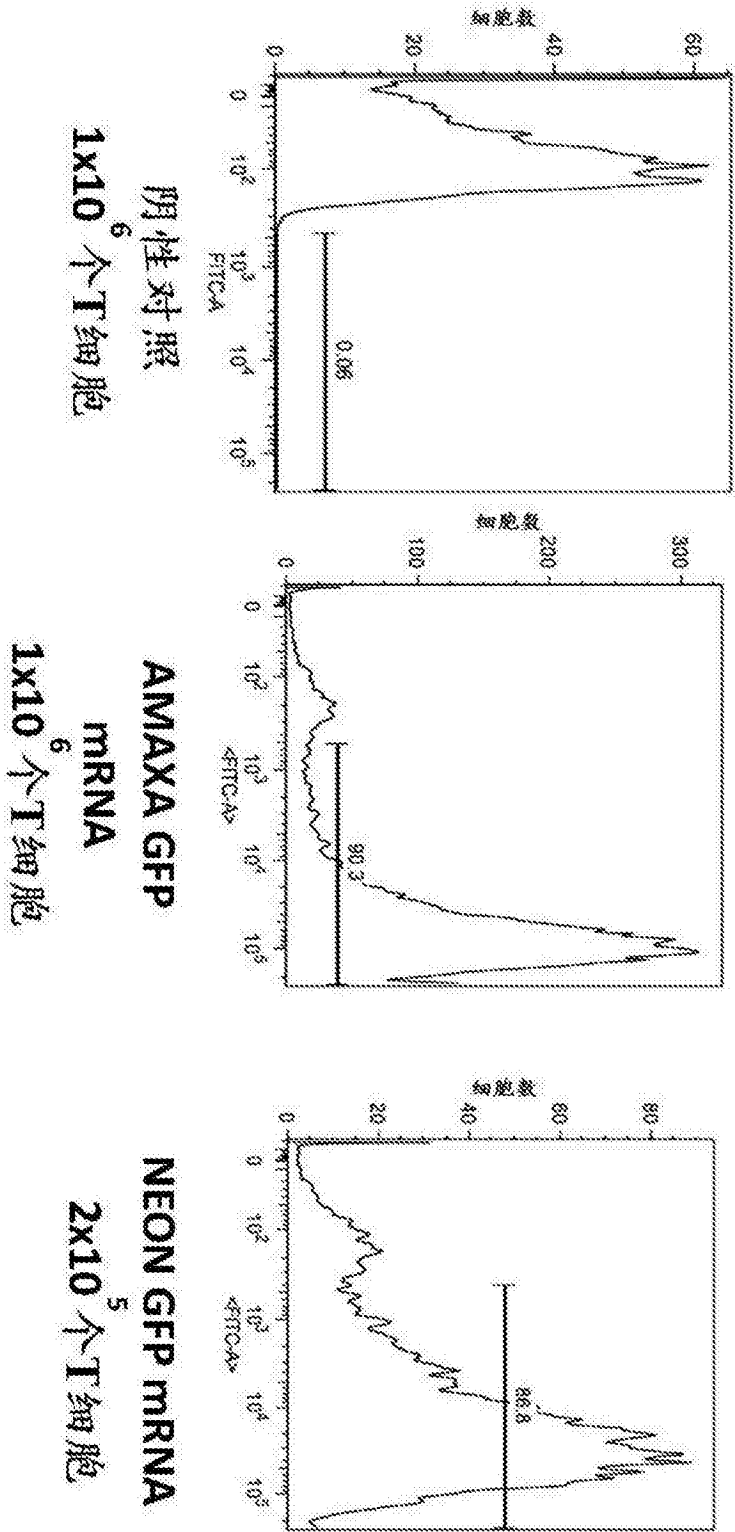


图10

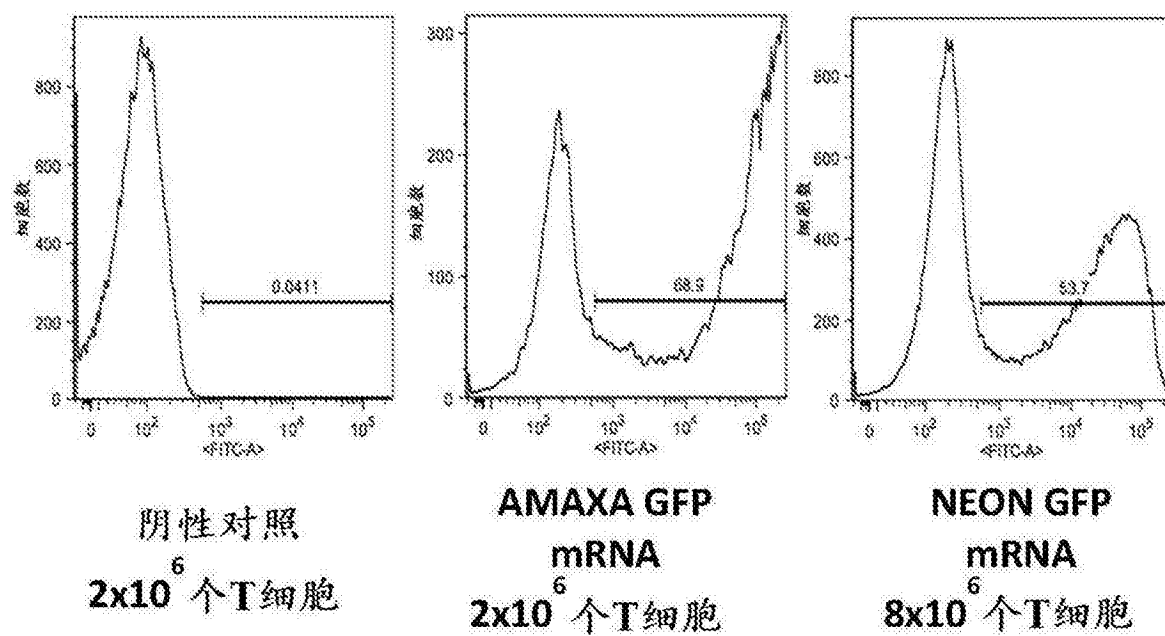
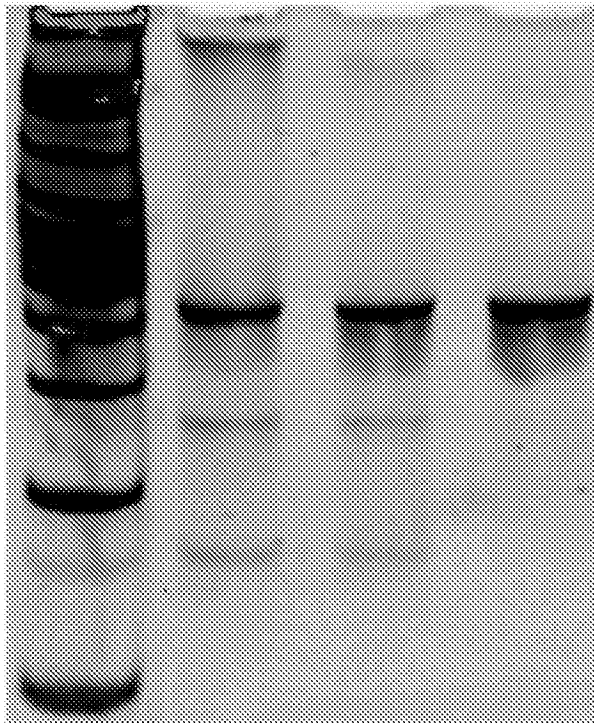


图11

	HPRT	AAVS1	CCRS5	PDI	CTLA4
gRNA#1	27.85%	32.99%	21.47%	10.83%	40.96%
gRNA#2	30.04%	27.10%	>60%	>60%	56.10%
gRNA#3	<1%	39.82%	55.98%	37.42%	39.33%
gRNA#4	<5%	25.93%	45.99%	20.87%	40.13%
gRNA#5	<1%	27.55%	36.07%	30.60%	15.90%
gRNA#6	<5%	39.62%	33.17%	25.91%	36.93%

%基因 修饰	
0/10%	
10/20%	
20/30%	
30/40%	
40/50%	
50/60%	
>60%	

图12



泳道1: 梯
泳道2: Cas9+gRNA
泳道3: Cas9+gRNA
泳道4: 仅Cas9的对照

图13

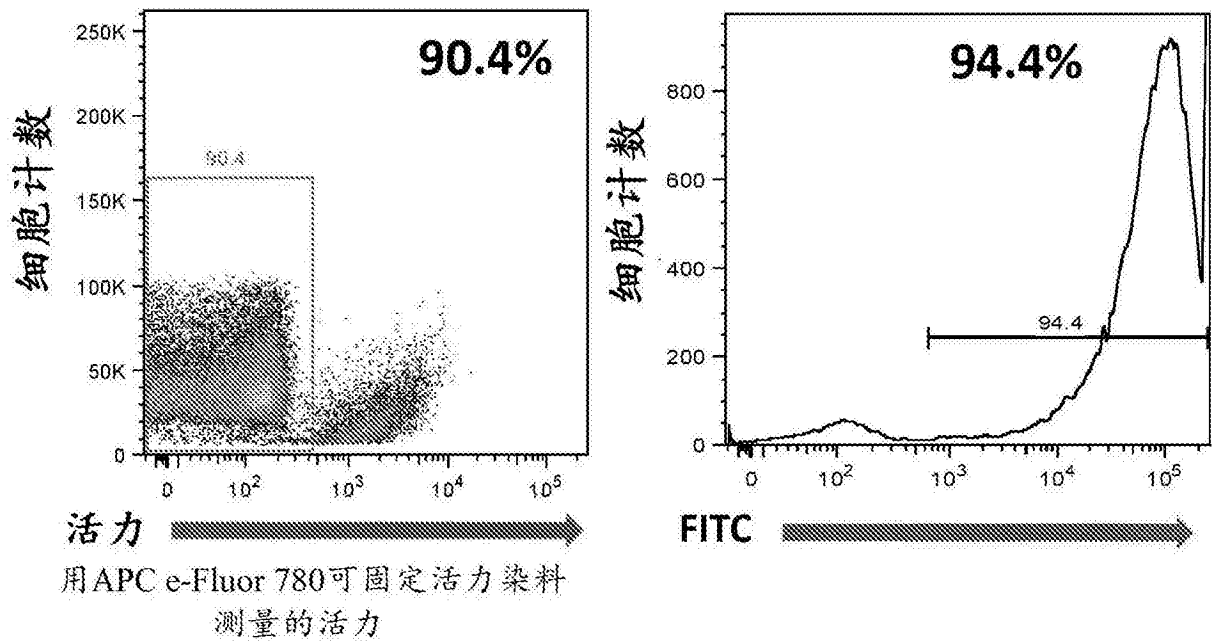


图14

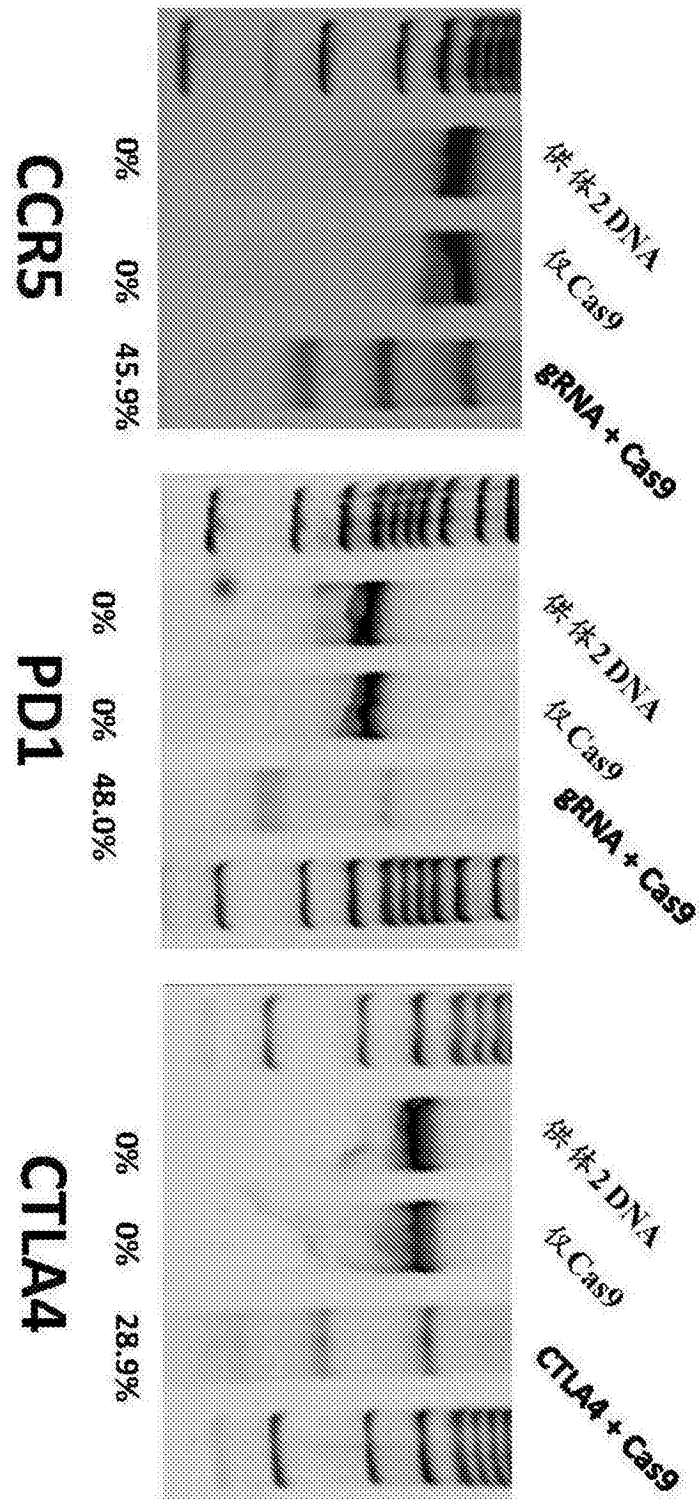


图15

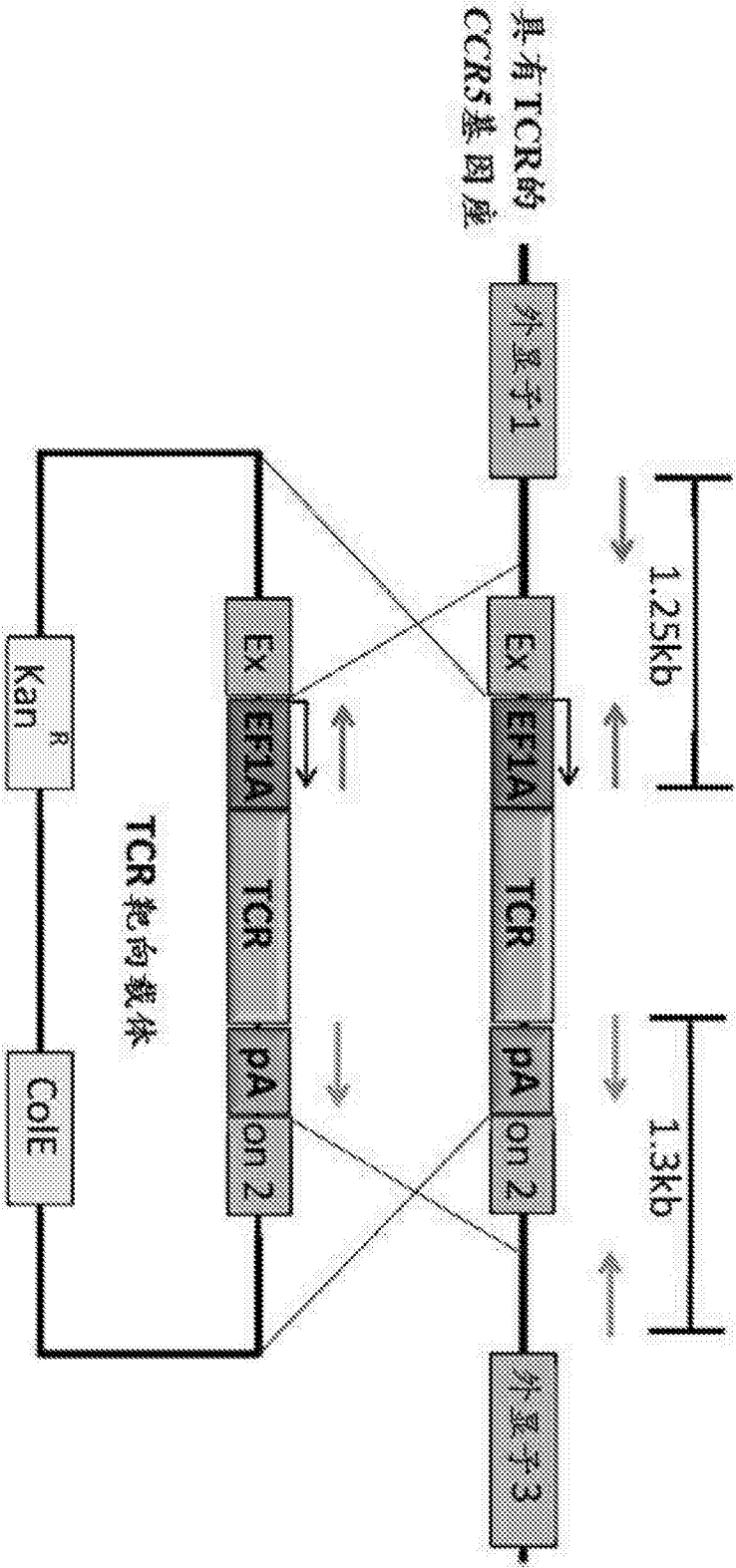


图16

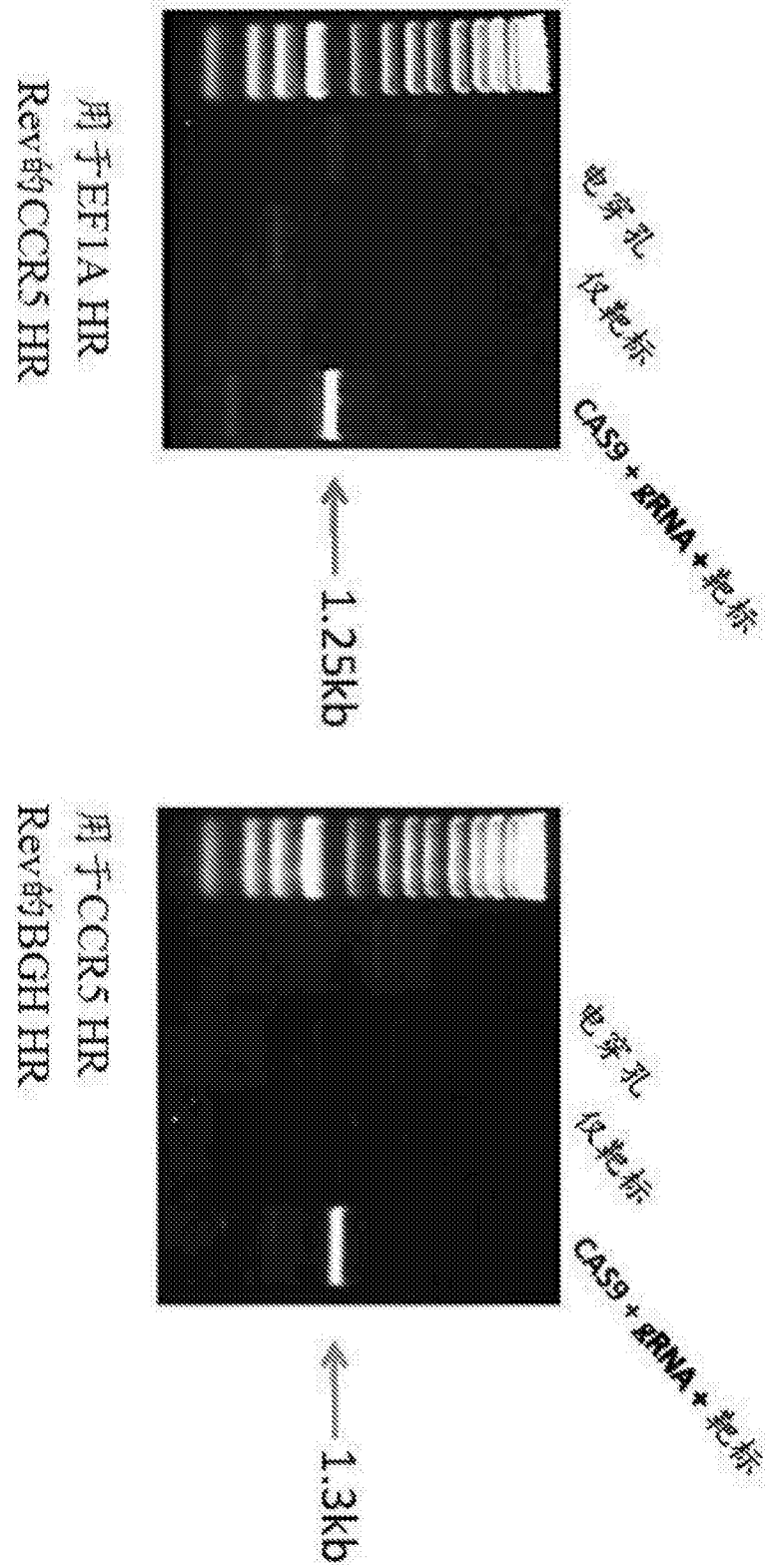


图17

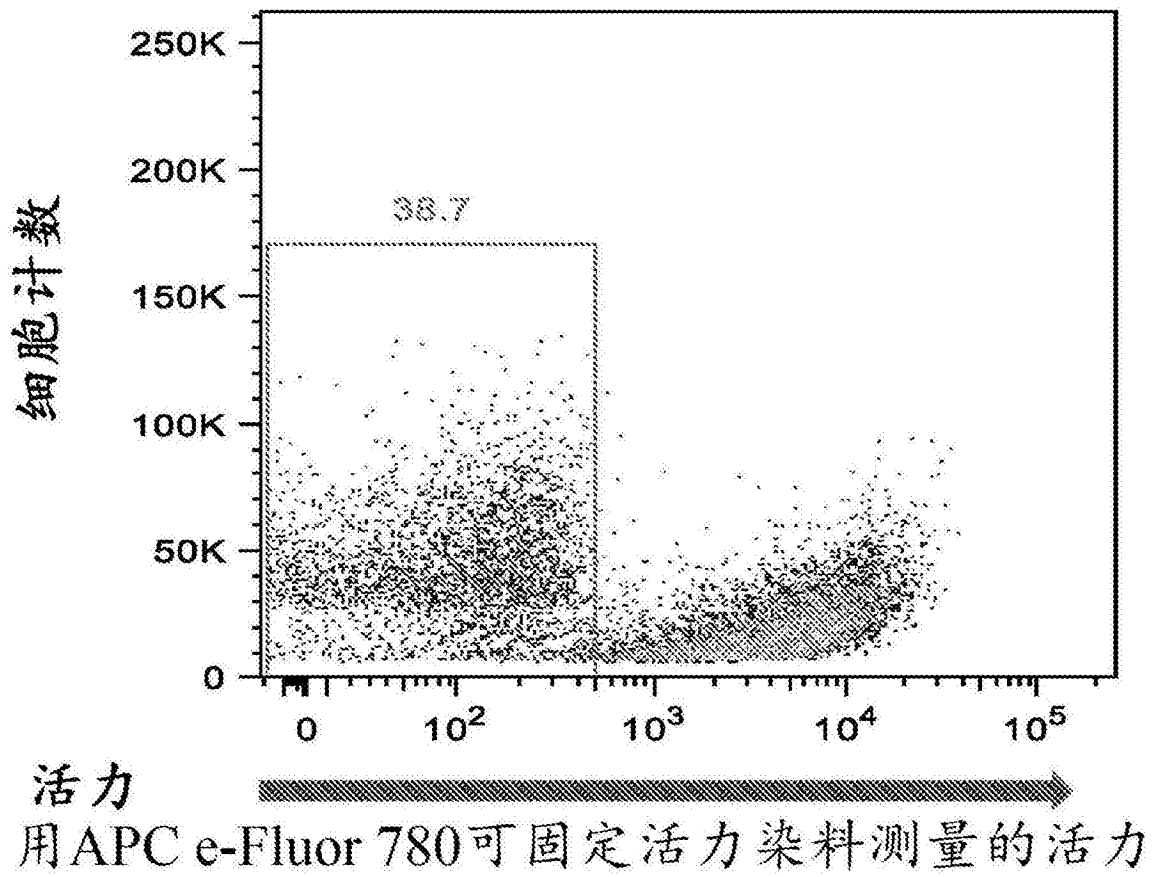


图18

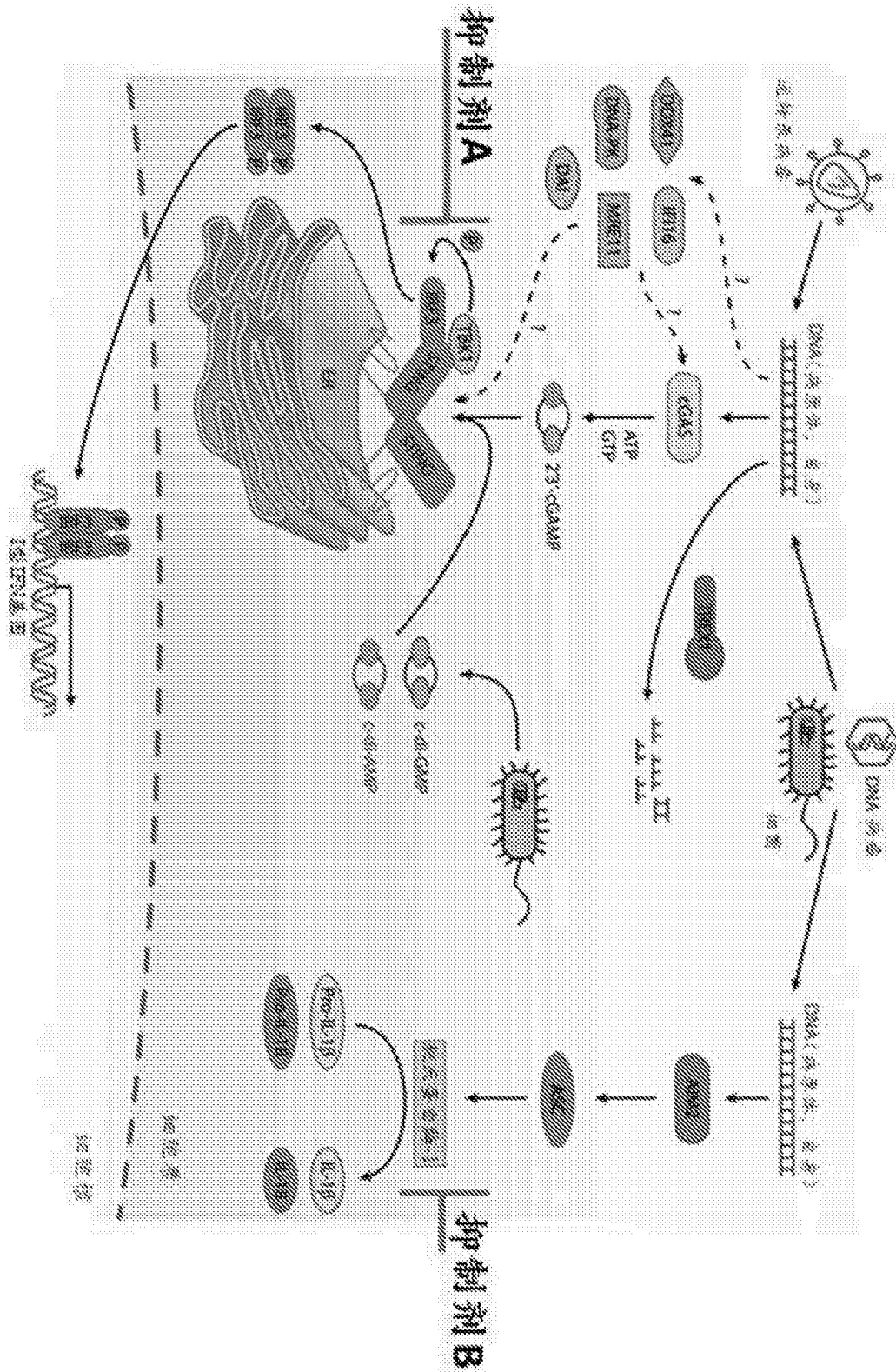


图19

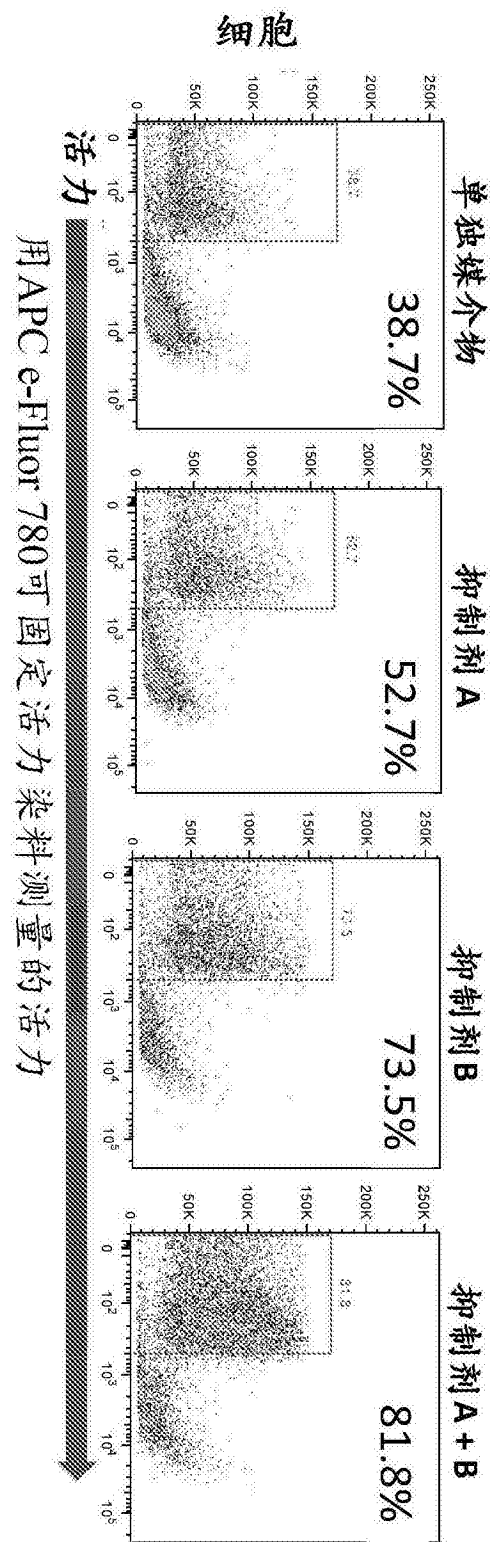


图20



图21

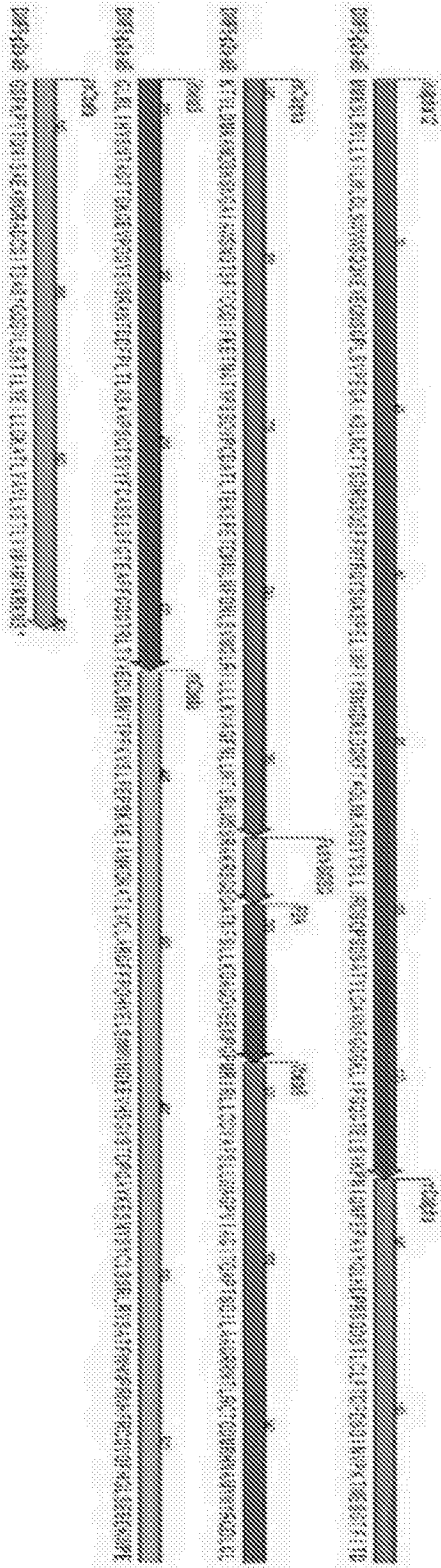


图22

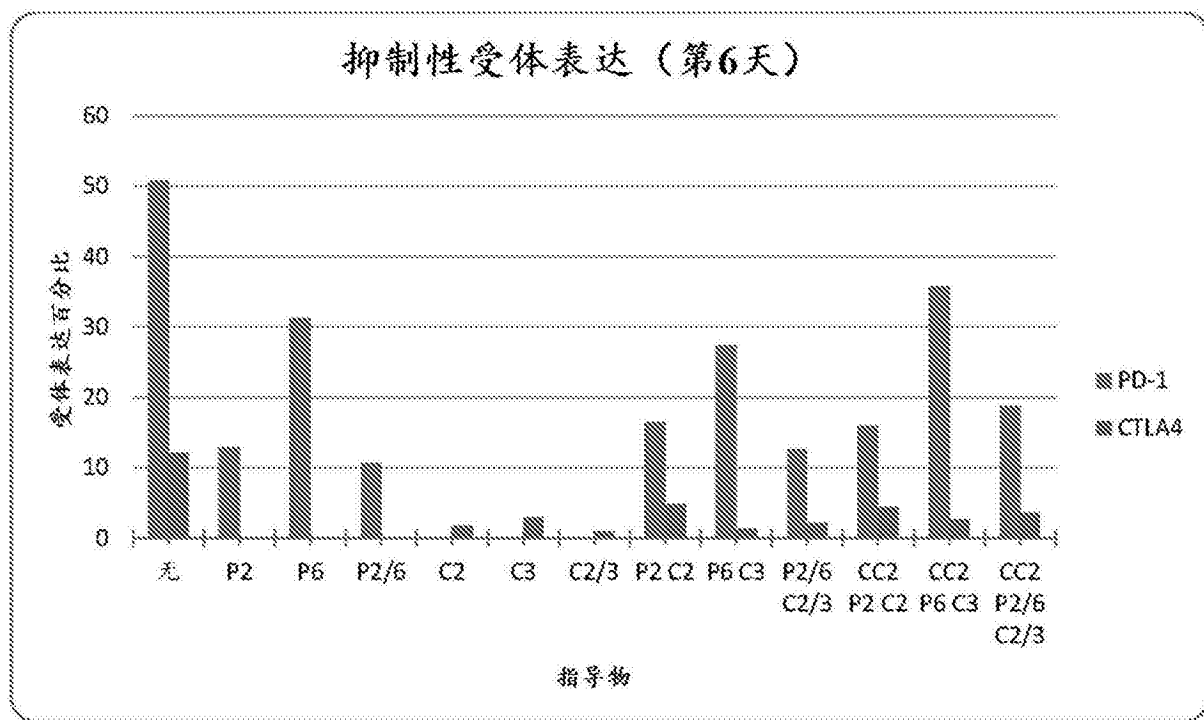


图23A

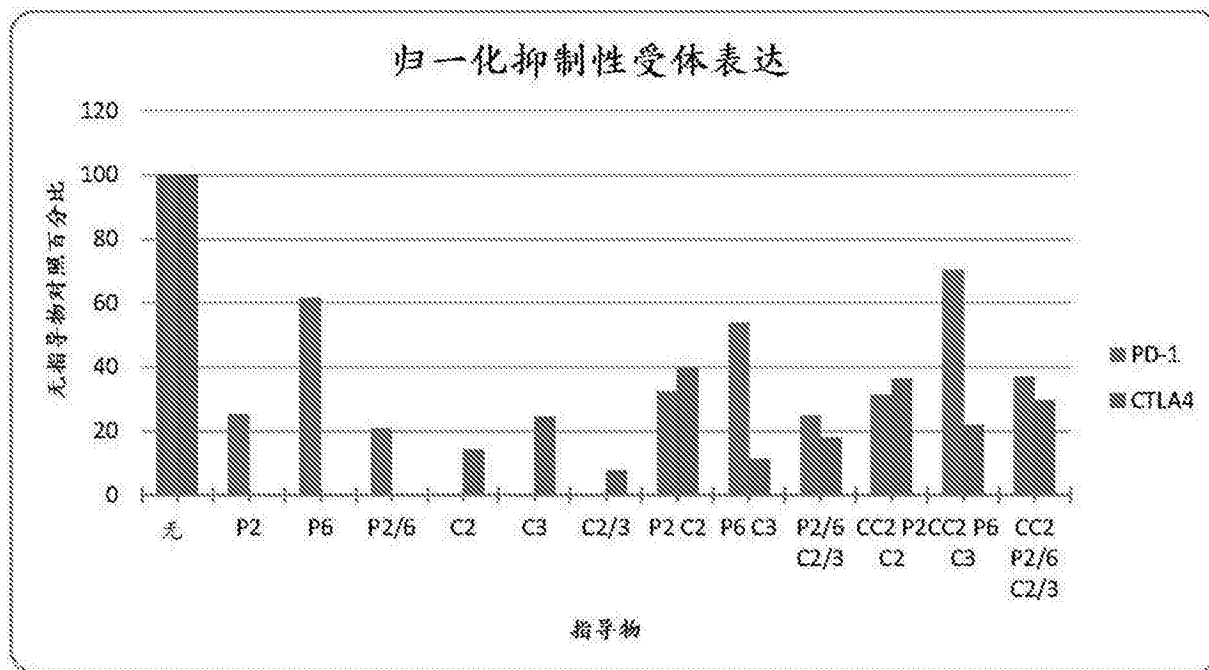


图23B

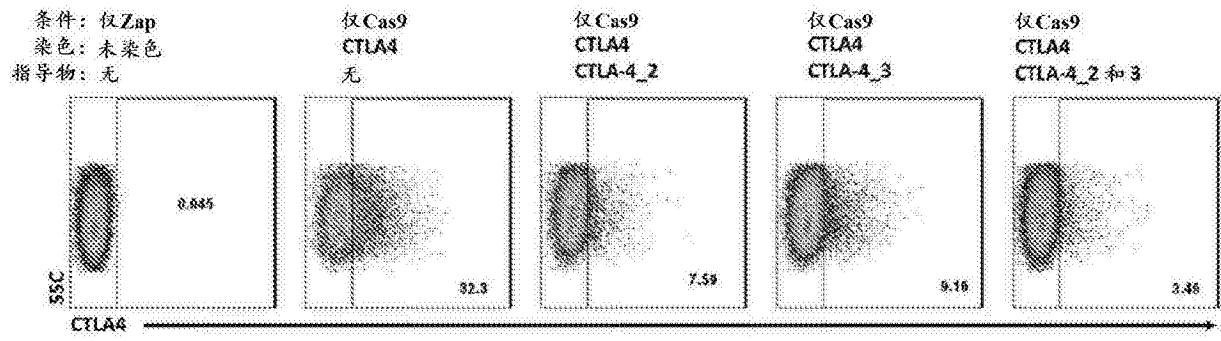


图24A

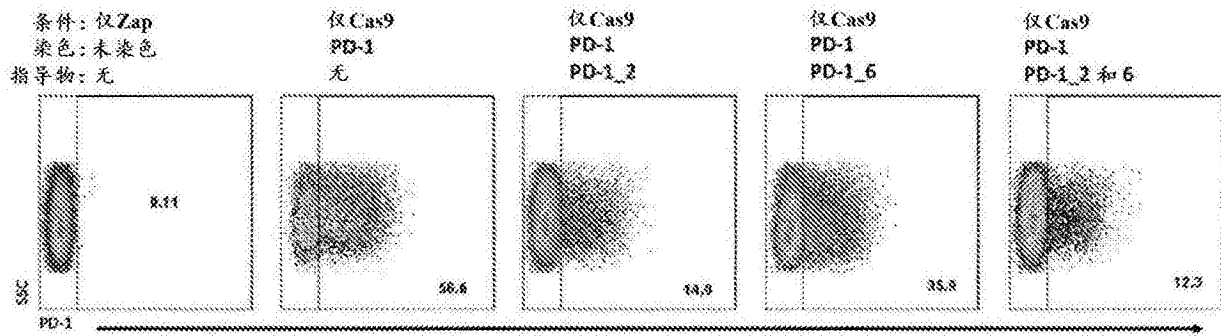


图24B

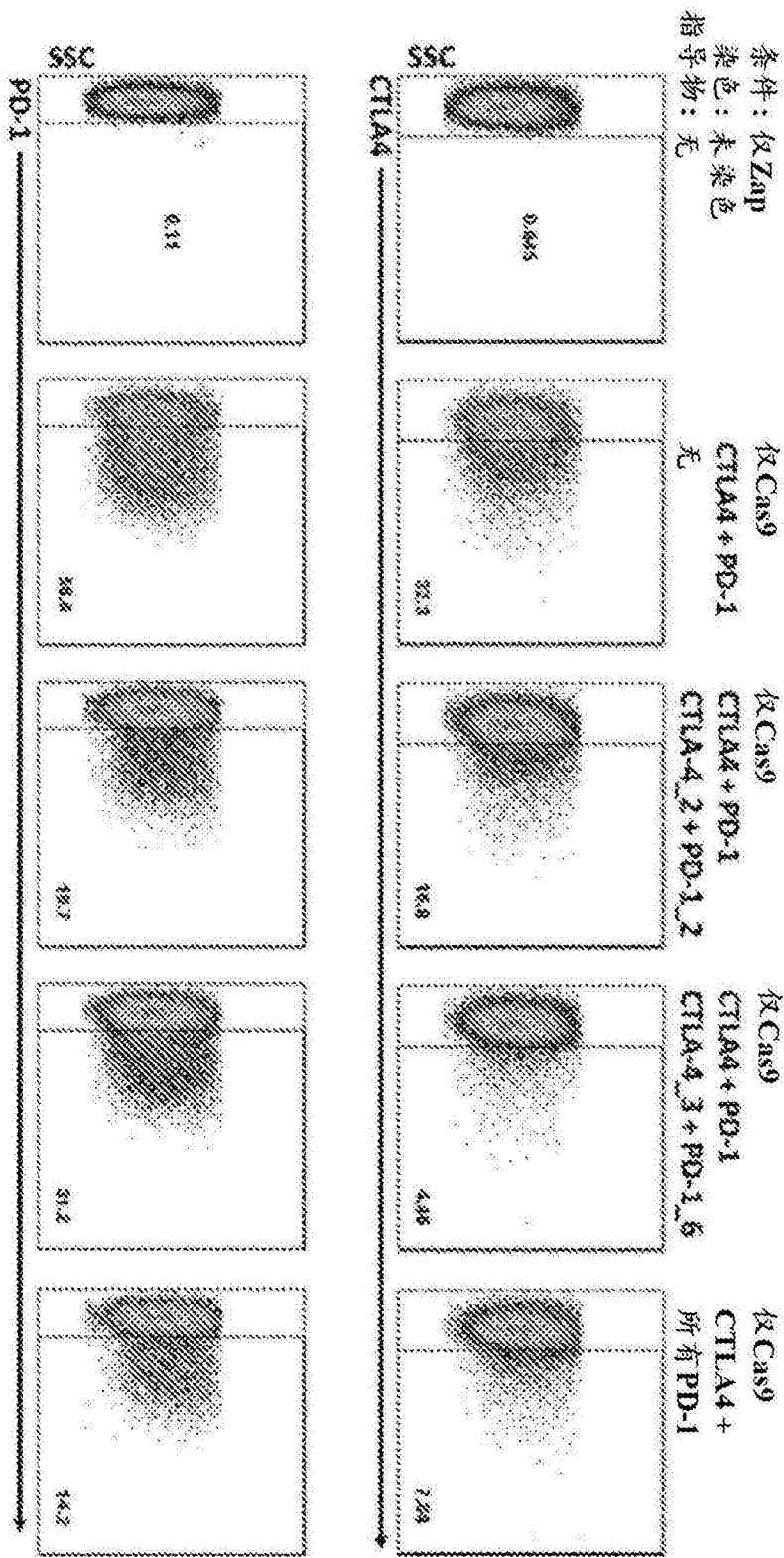


图25

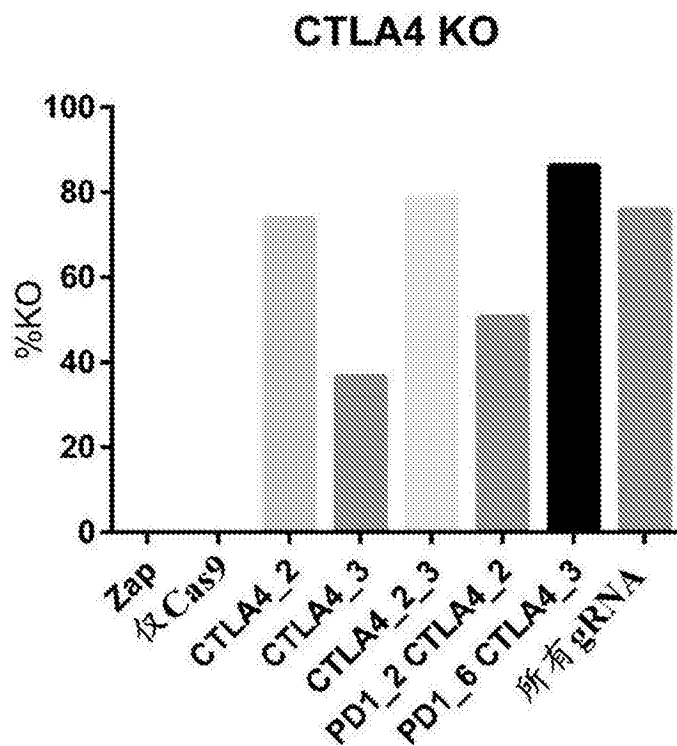


图26A

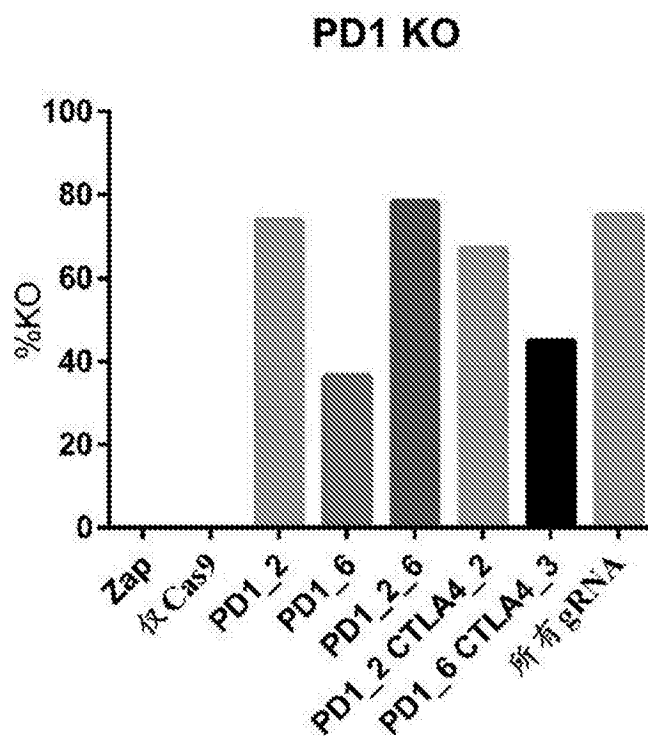


图26B

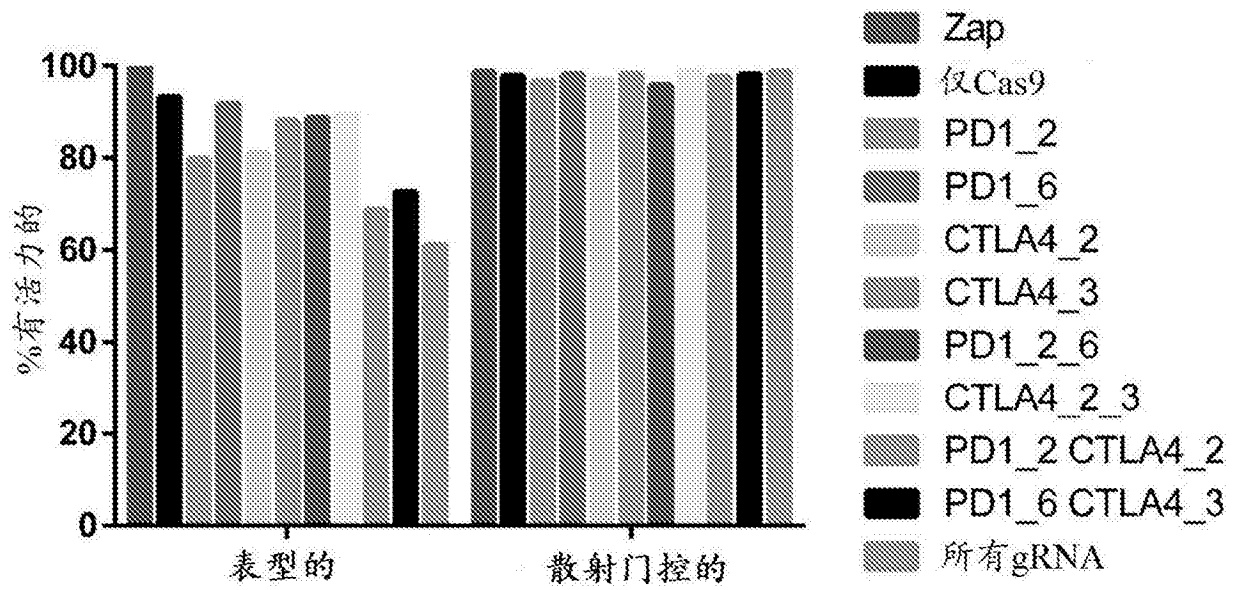


图27

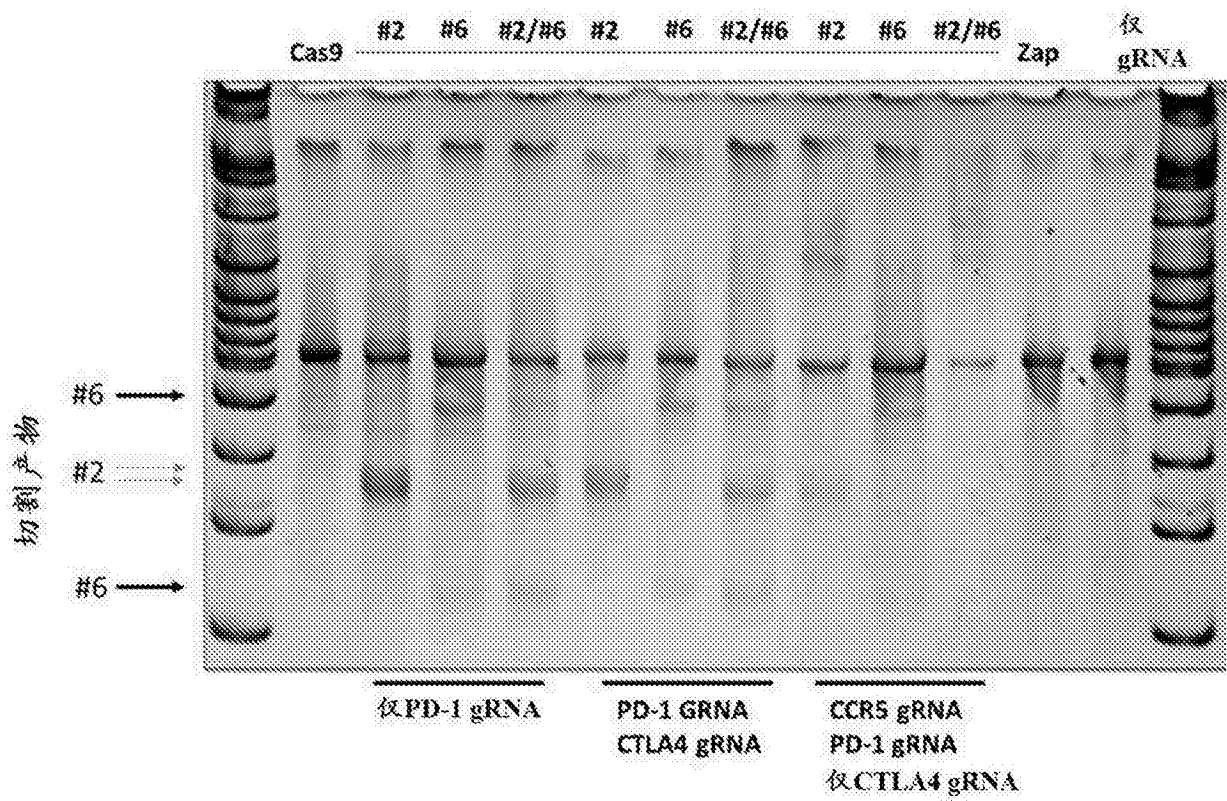


图28

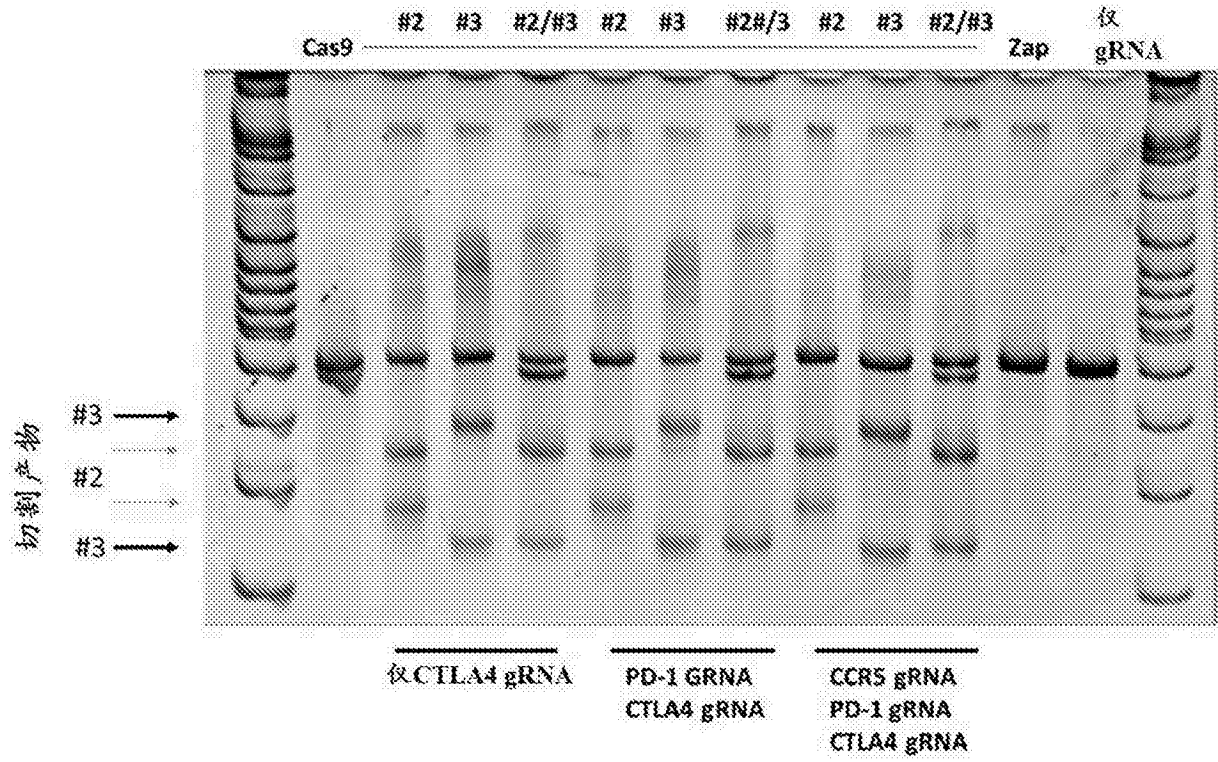


图29

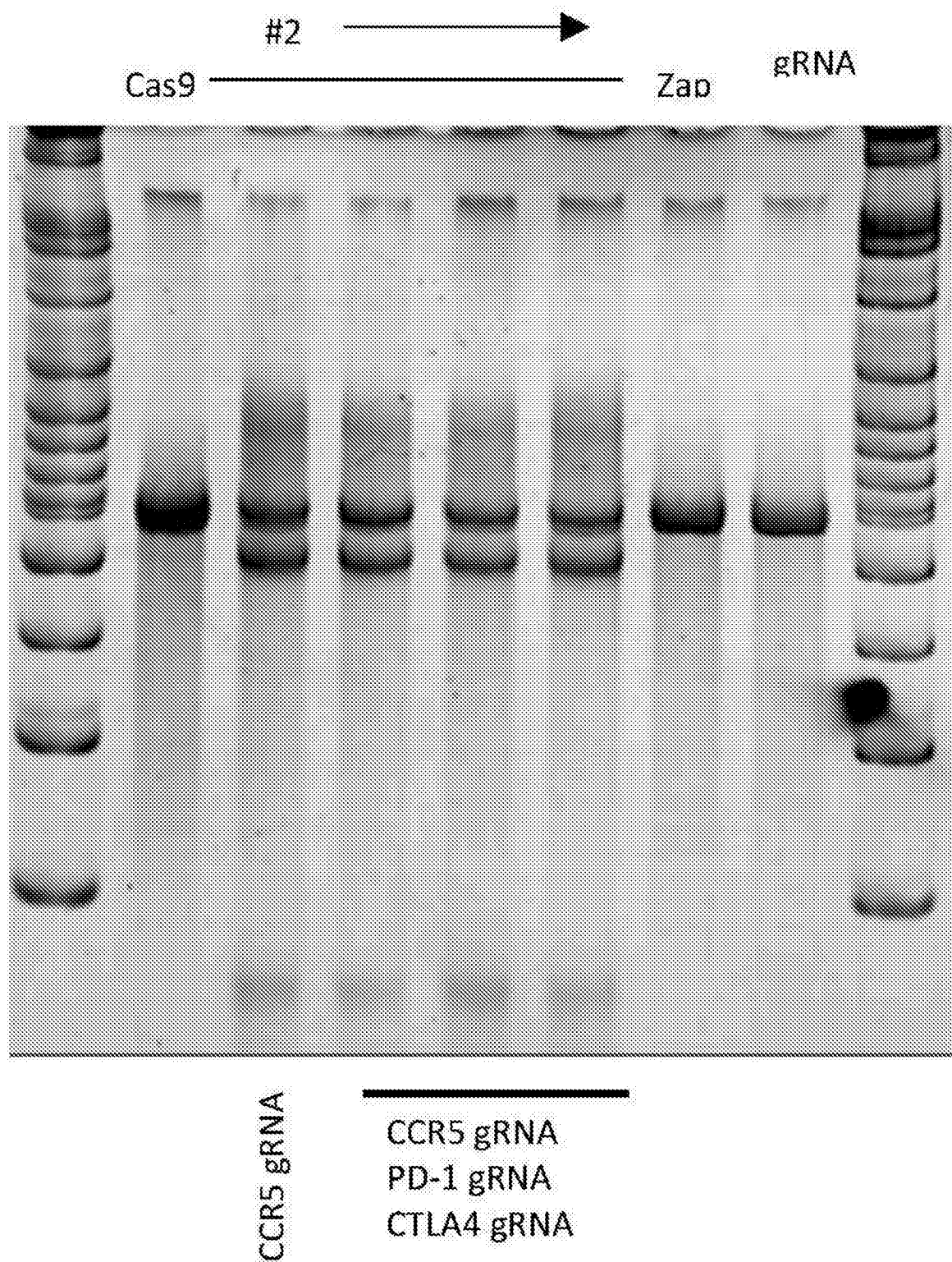


图30

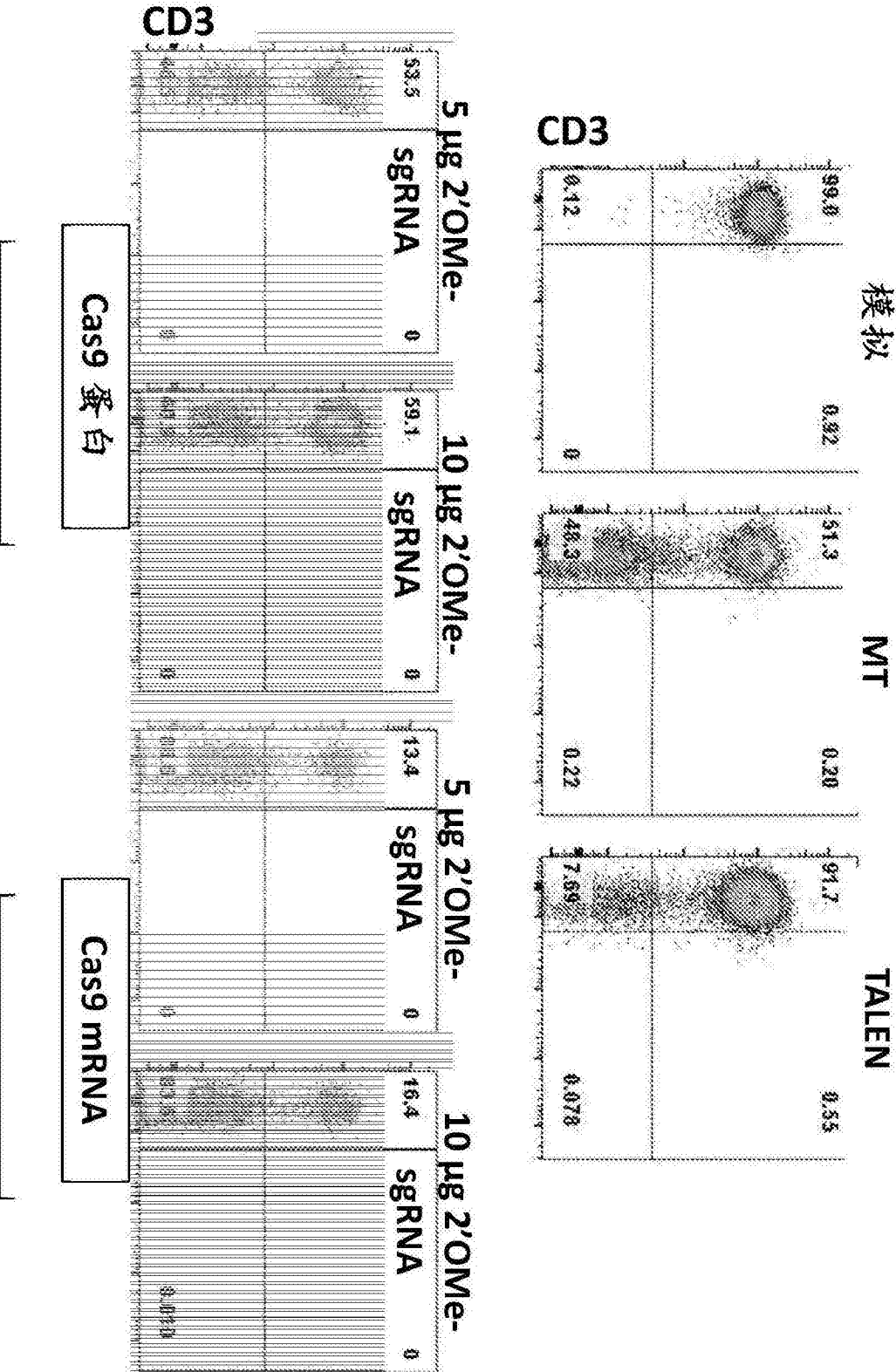


图31

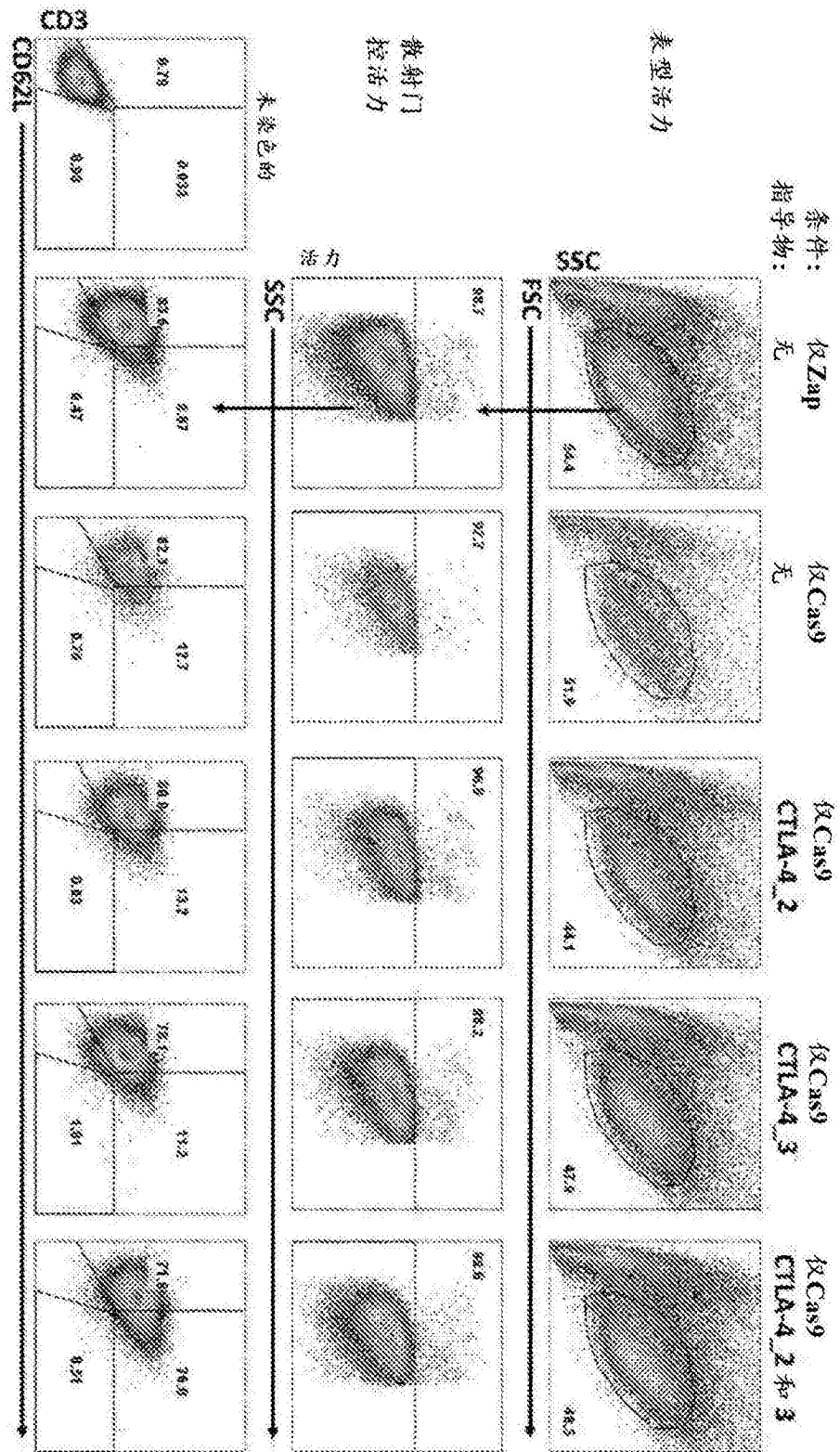


图32

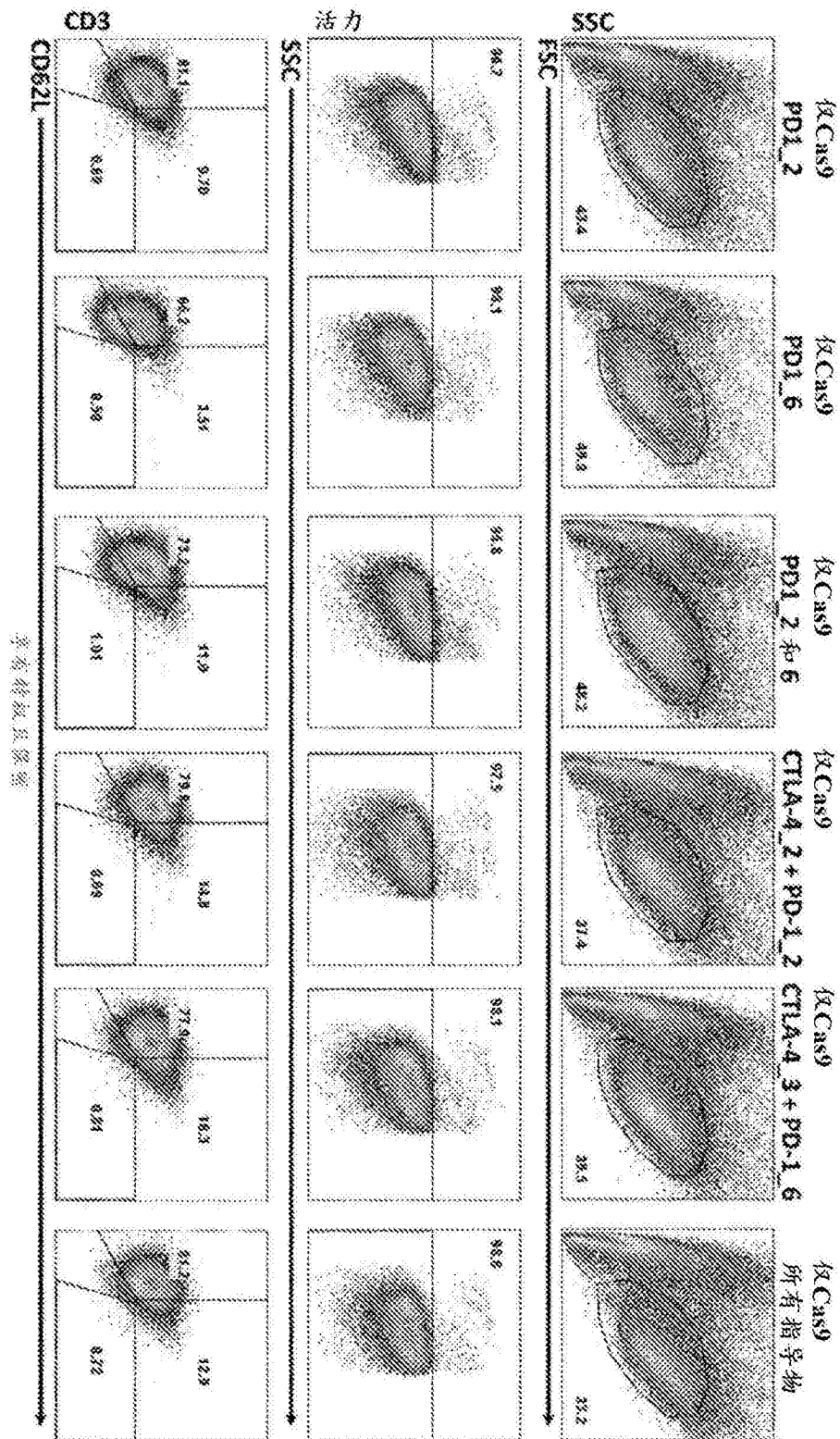


图33

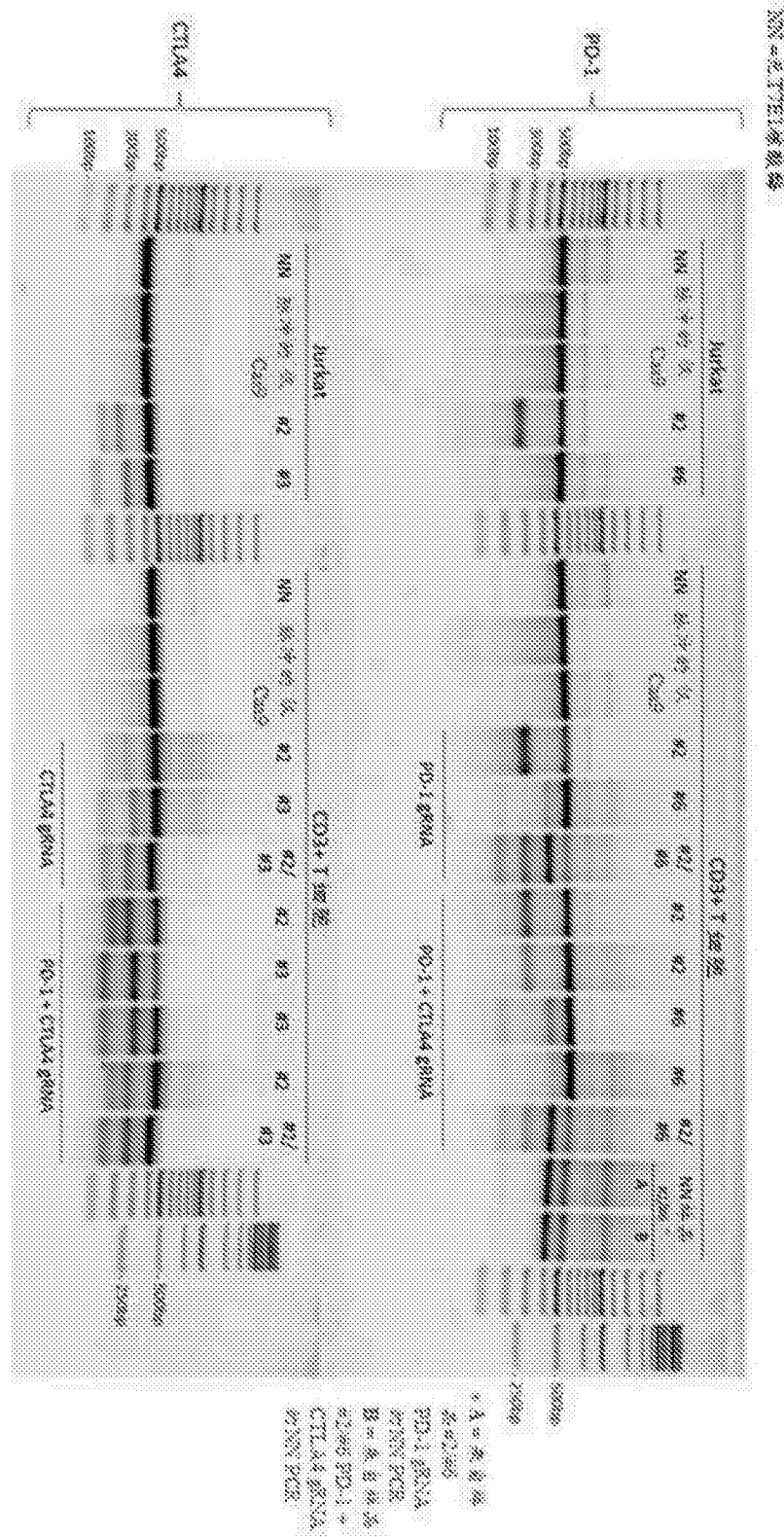
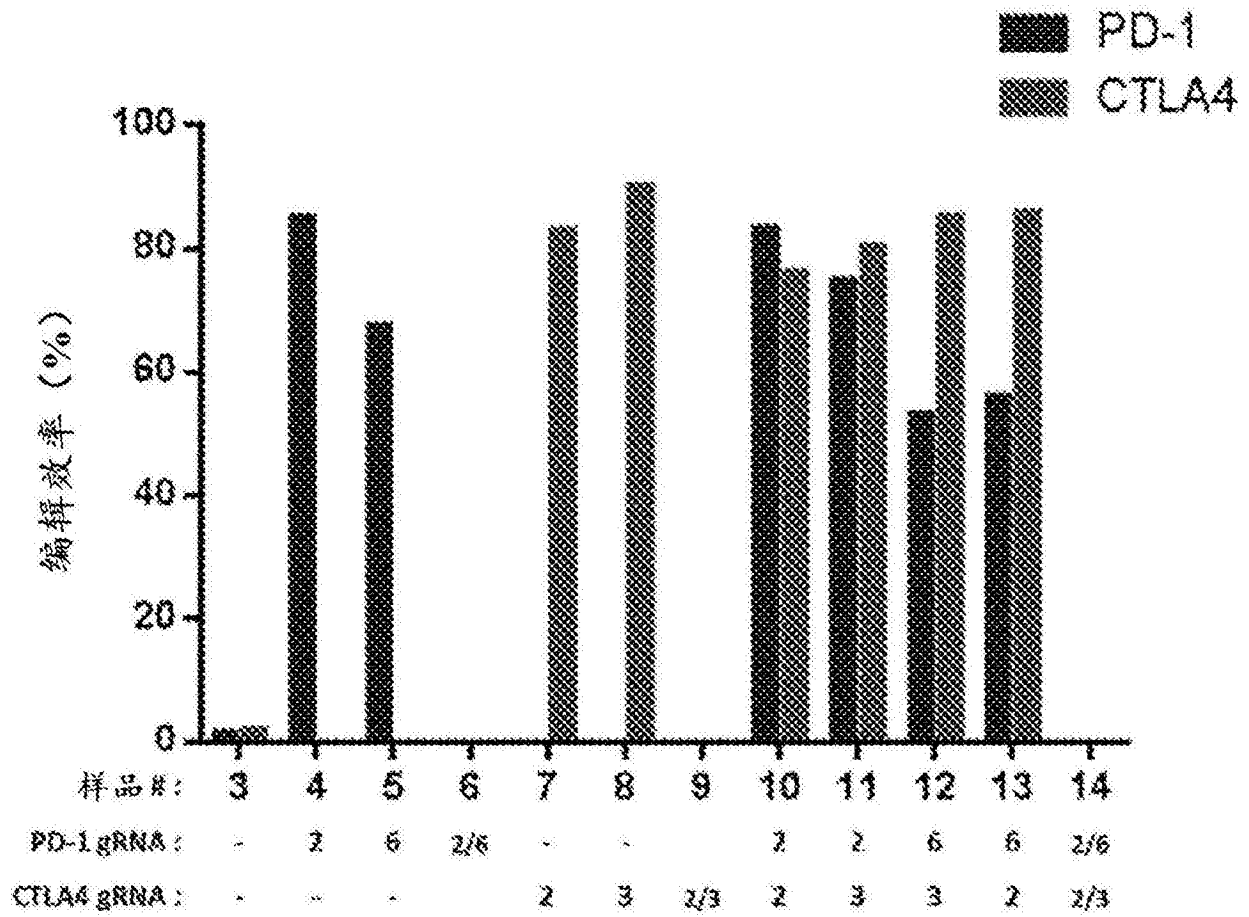


图34



* 每个基因2个指导物的样品与TIDE分析不兼容。

图35

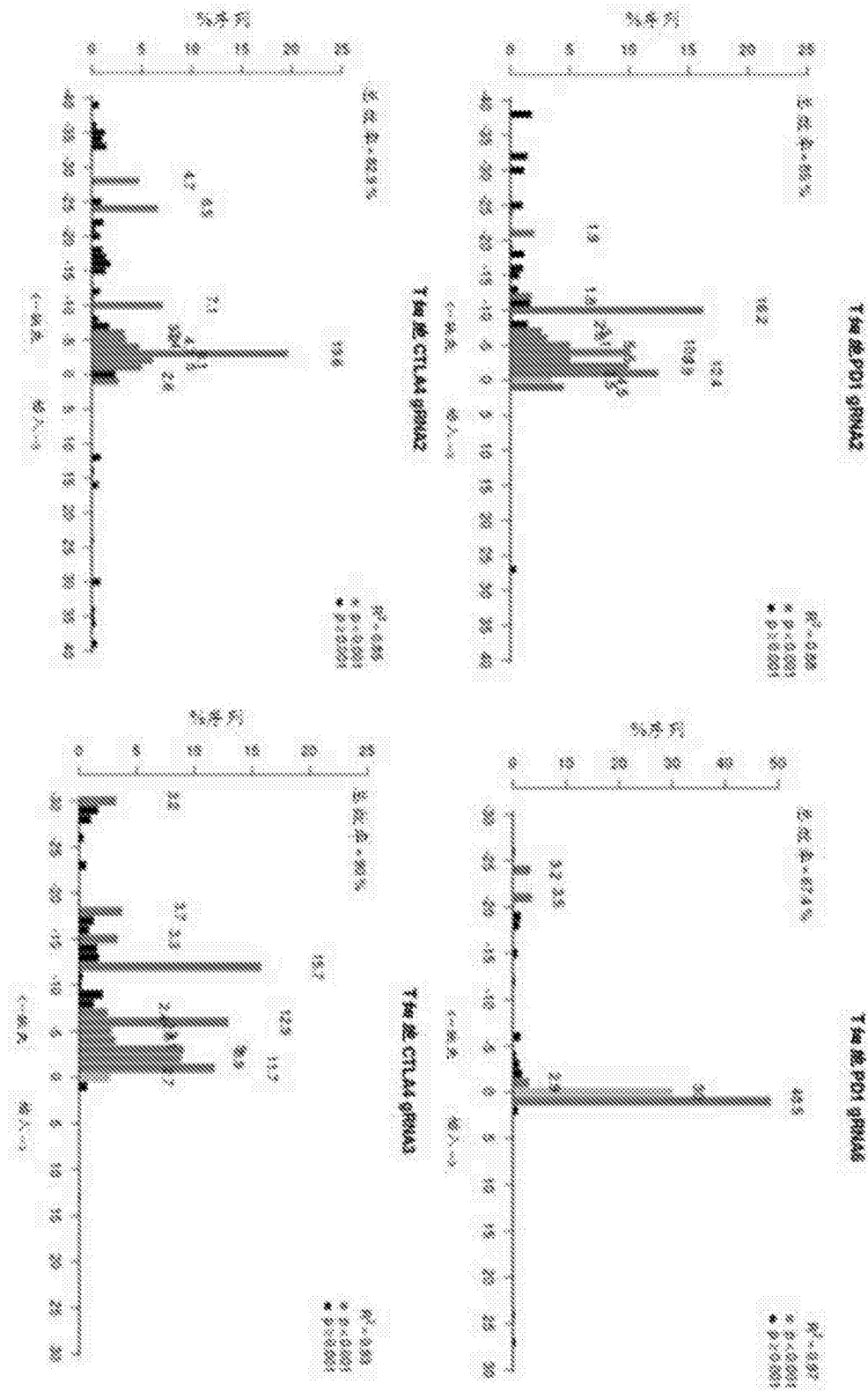


图36

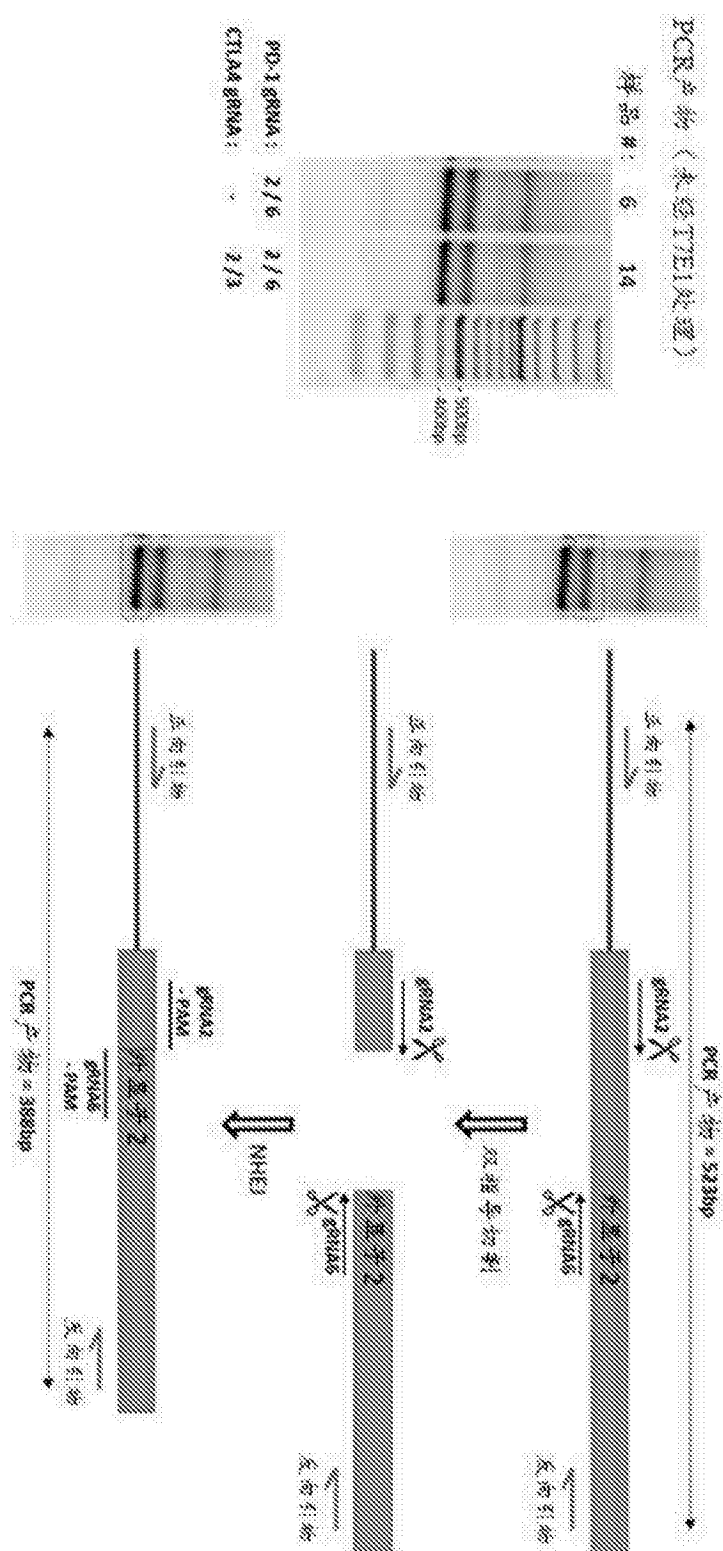


图37

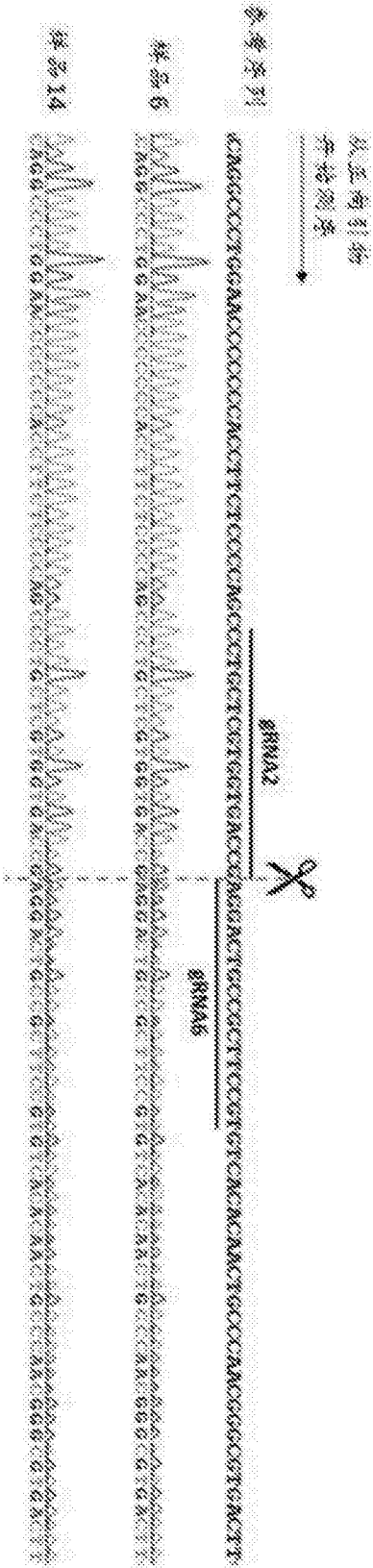


图38

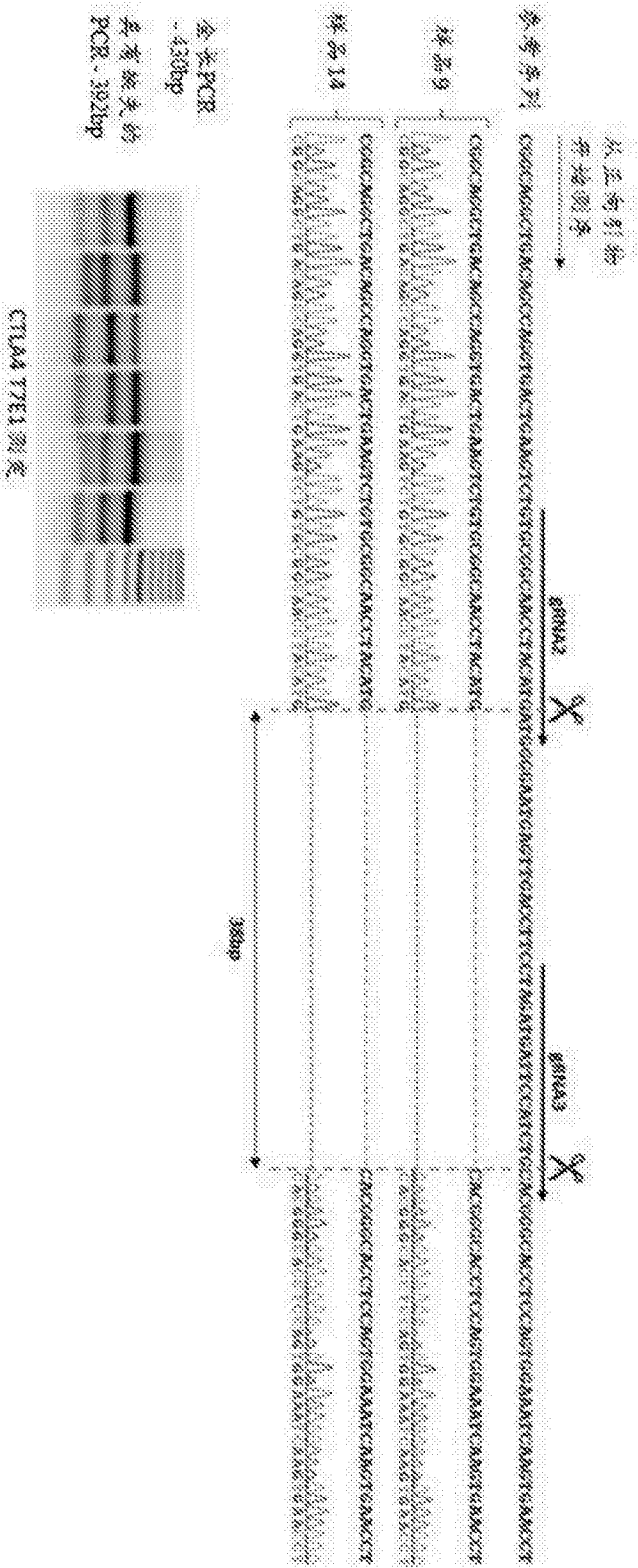


图39

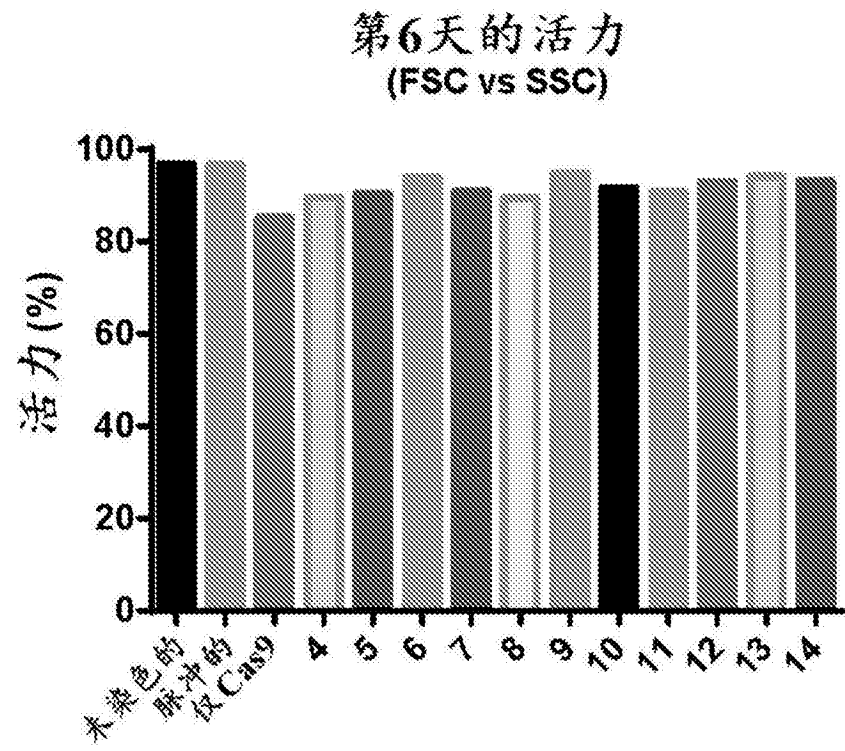


图40A

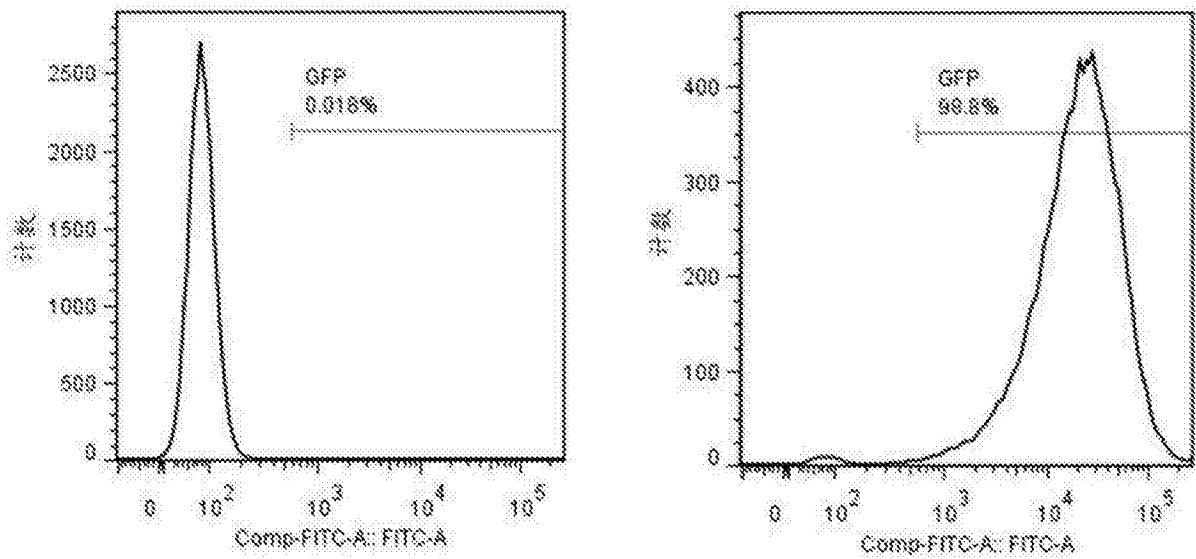


图40B

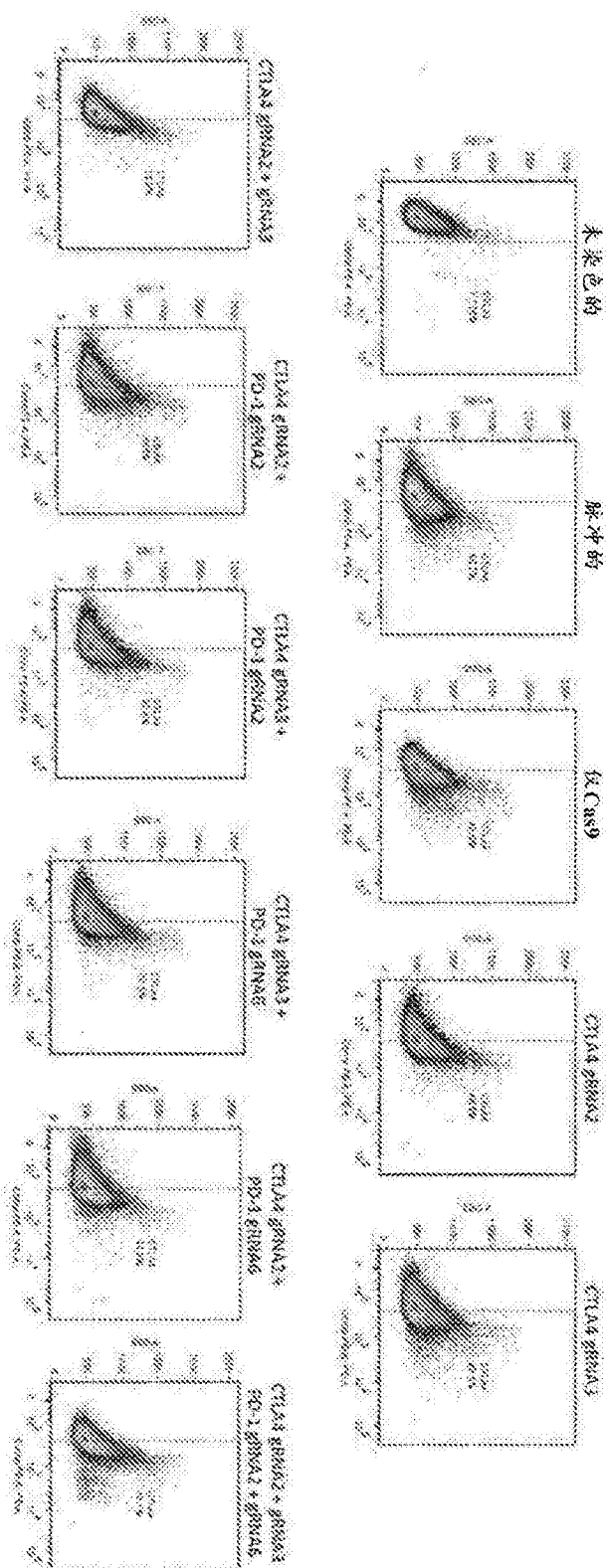


图41

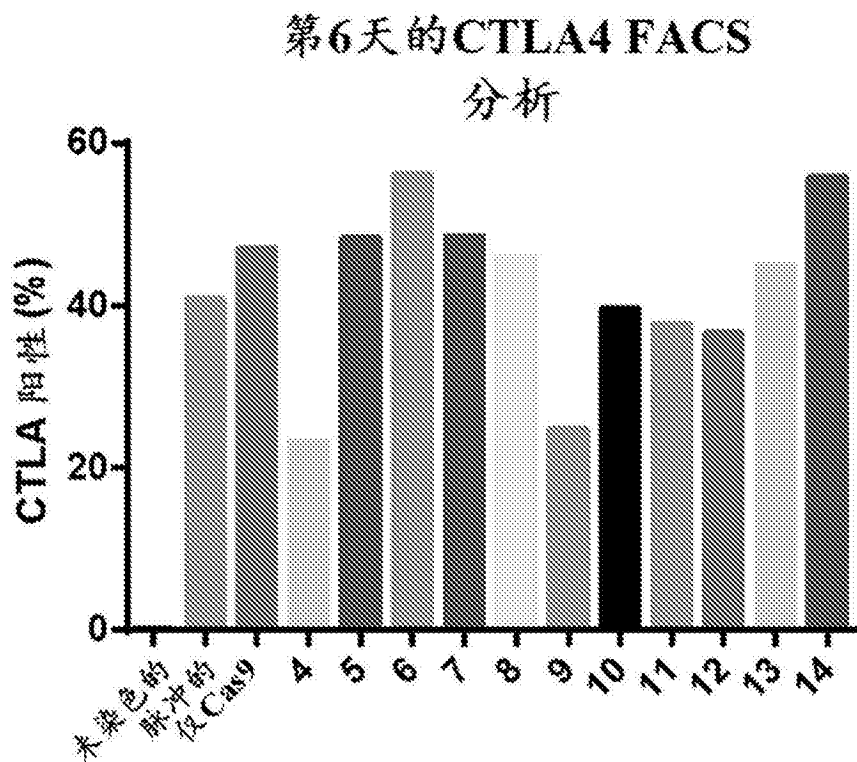


图42A

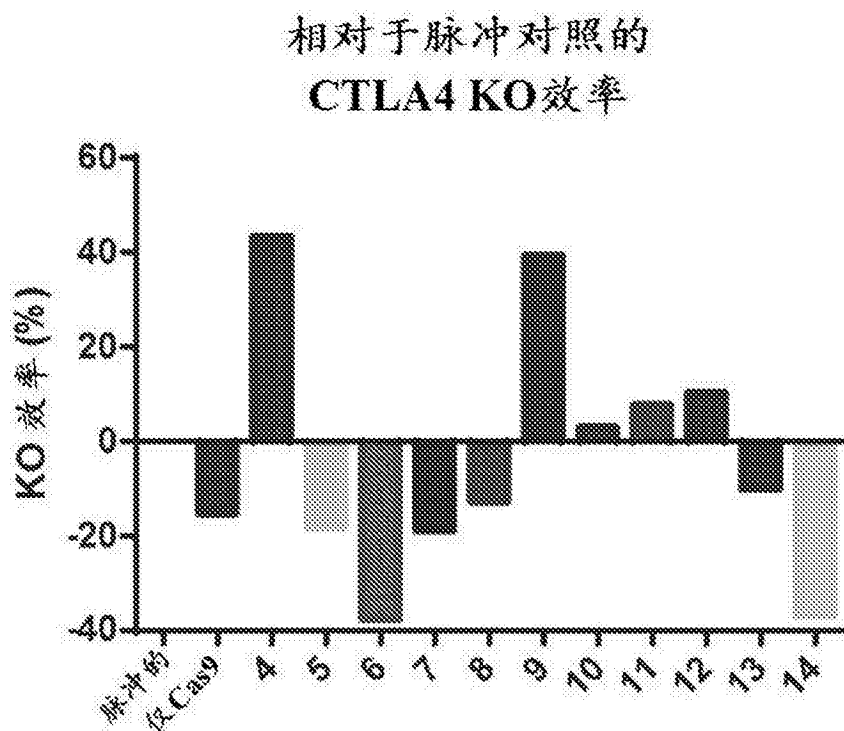


图42B

[illegible]

图43

PD-1 gRNA #2修饰的RNA寡核苷酸

GGCTGCTCGTGGTGACCGAAGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAG
UGGCACCGAGUCGGUGCUUUU

CTLA4 gRNA #3修饰的RNA寡核苷酸

GCTAGATGATTCCATCTGCACGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAG
UGGCACCGAGUCGGUGCUUUU

CISH gRNA #2修饰的RNA寡核苷酸

GGGTTCCATTACGGCCAGCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGU
GGCACCGAGUCGGUGCUUUU

AAVS1 gRNA修饰的寡核苷酸

GTCACCAATCCTGTCCCTAGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGU
GGCACCGAGUCGGUGCUUUU

PD-1 gRNA #2修饰的RNA寡核苷酸

GGCTGCTCGTGGTGACCGAAGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAG
UGGCACCGAGUCGGUGCUUUU

CTLA4 gRNA #3修饰的RNA寡核苷酸

GCTAGATGATTCCATCTGCACGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAG
UGGCACCGAGUCGGUGCUUUU

CISH gRNA #2修饰的RNA寡核苷酸

GGGTTCCATTACGGCCAGCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGU
GGCACCGAGUCGGUGCUUUU

AAVS1 gRNA修饰的寡核苷酸

GTCACCAATCCTGTCCCTAGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGU
GGCACCGAGUCGGUGCUUUU

PD-1 gRNA #2修饰的RNA寡核苷酸

GGCTGCTCGTGGTGACCGAAGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAG
UGGCACCGAGUCGGUGCUUUU

CTLA4 gRNA #3修饰的RNA寡核苷酸

GCTAGATGATTCCATCTGCACGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAG
UGGCACCGAGUCGGUGCUUUU

CISH gRNA #2修饰的RNA寡核苷酸

GGGTTCCATTACGGCCAGCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGU
GGCACCGAGUCGGUGCUUUU

AAVS1 gRNA修饰的寡核苷酸

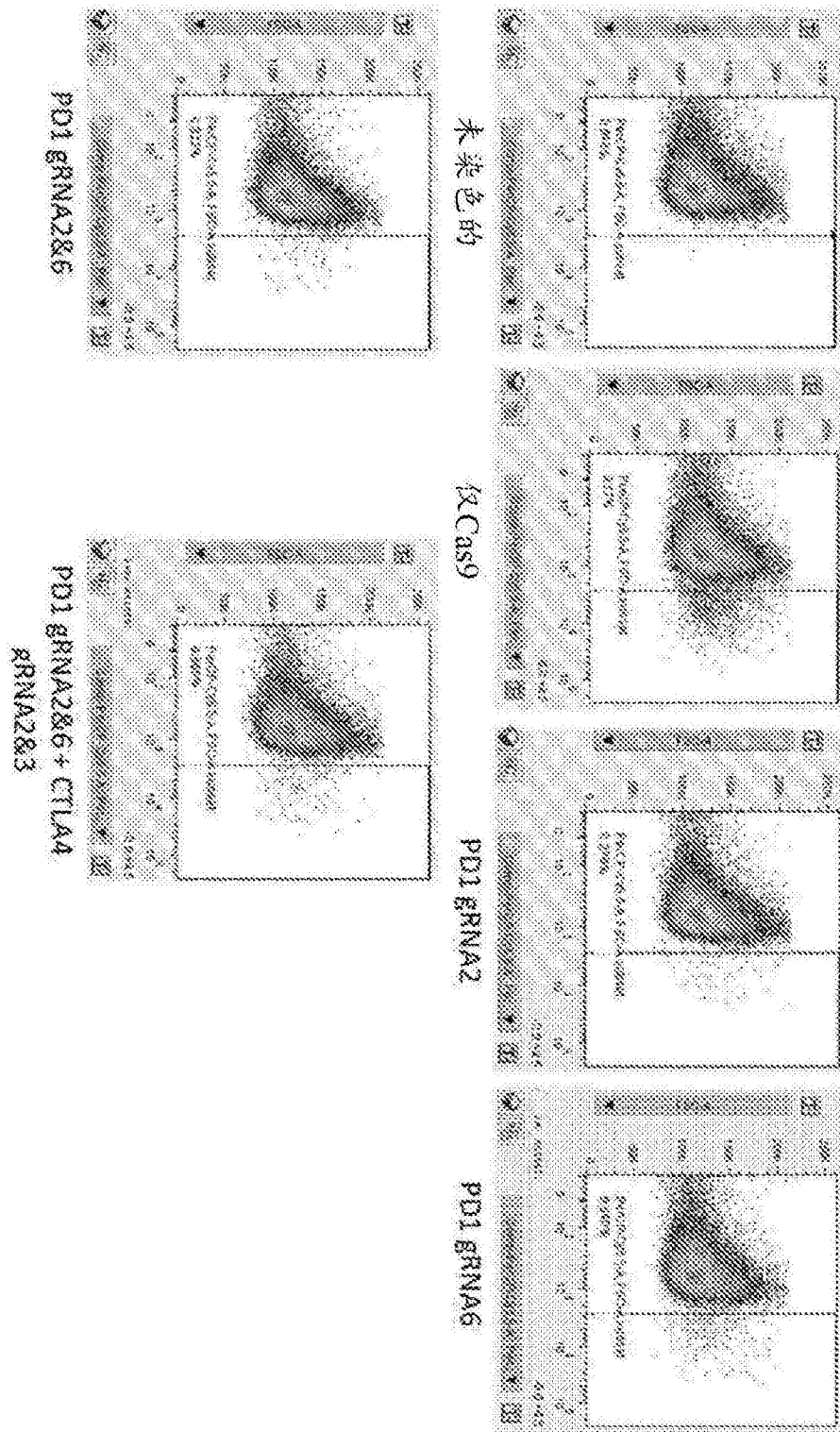
GTCACCAATCCTGTCCCTAGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGU
GGCACCGAGUCGGUGCUUUU

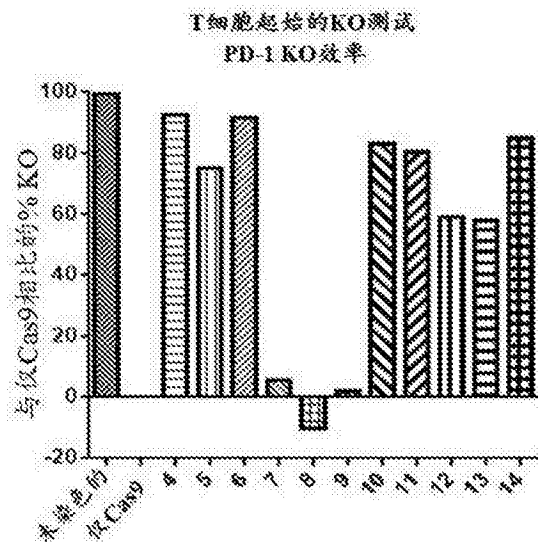
靶位点

骨架

3-硫代磷酸2'-O-甲酯 (MS)

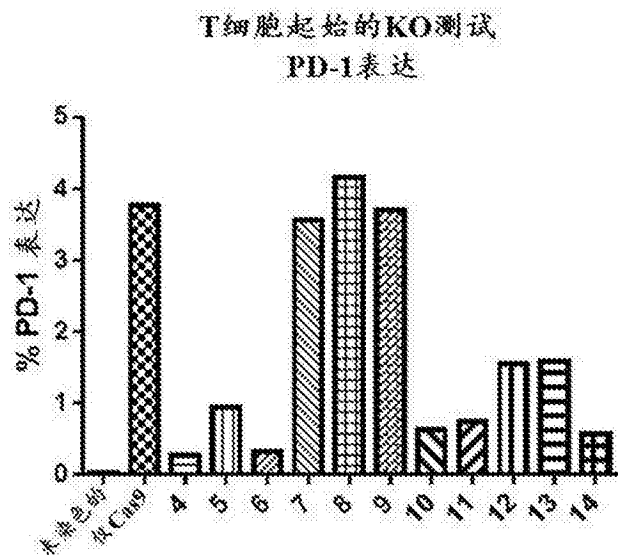
图44





样品	% PD1 +ve	与仅Cas9相比的%表达	与仅Cas9相比的% KO
未染色的	0.018	0.5	99.5
3	3.77	100.0	0.0
4	0.278	7.4	92.6
5	0.94	24.9	75.1
6	0.322	8.5	91.5
7	3.56	94.4	5.6
8	4.16	110.3	-10.3
9	3.7	98.1	1.9
10	0.637	16.9	83.1
11	0.744	19.7	80.3
12	1.55	41.1	58.9
13	1.59	42.2	57.6
14	0.568	15.1	84.9

图46A



	Cas9 mRNA	PD-1 gRNA2	PD-1 gRNA6	CTLA4 gRNA2	CTLA4 gRNA3
1 脉冲的					
2 GFP mRNA					
3 仅 Cas9	Y				
4 PD-1	Y	P2			
5	Y		P6		
6	Y	P2	P6		
7 CTLA4	Y			C2	
8	Y				C3
9	Y			C2	C3
10 PD-1 + CTLA4	Y	P2		C2	
11	Y	P2			C3
12	Y		P6		C3
13	Y		P6	C2	
14	Y	P2	P6	C2	C3

图46B

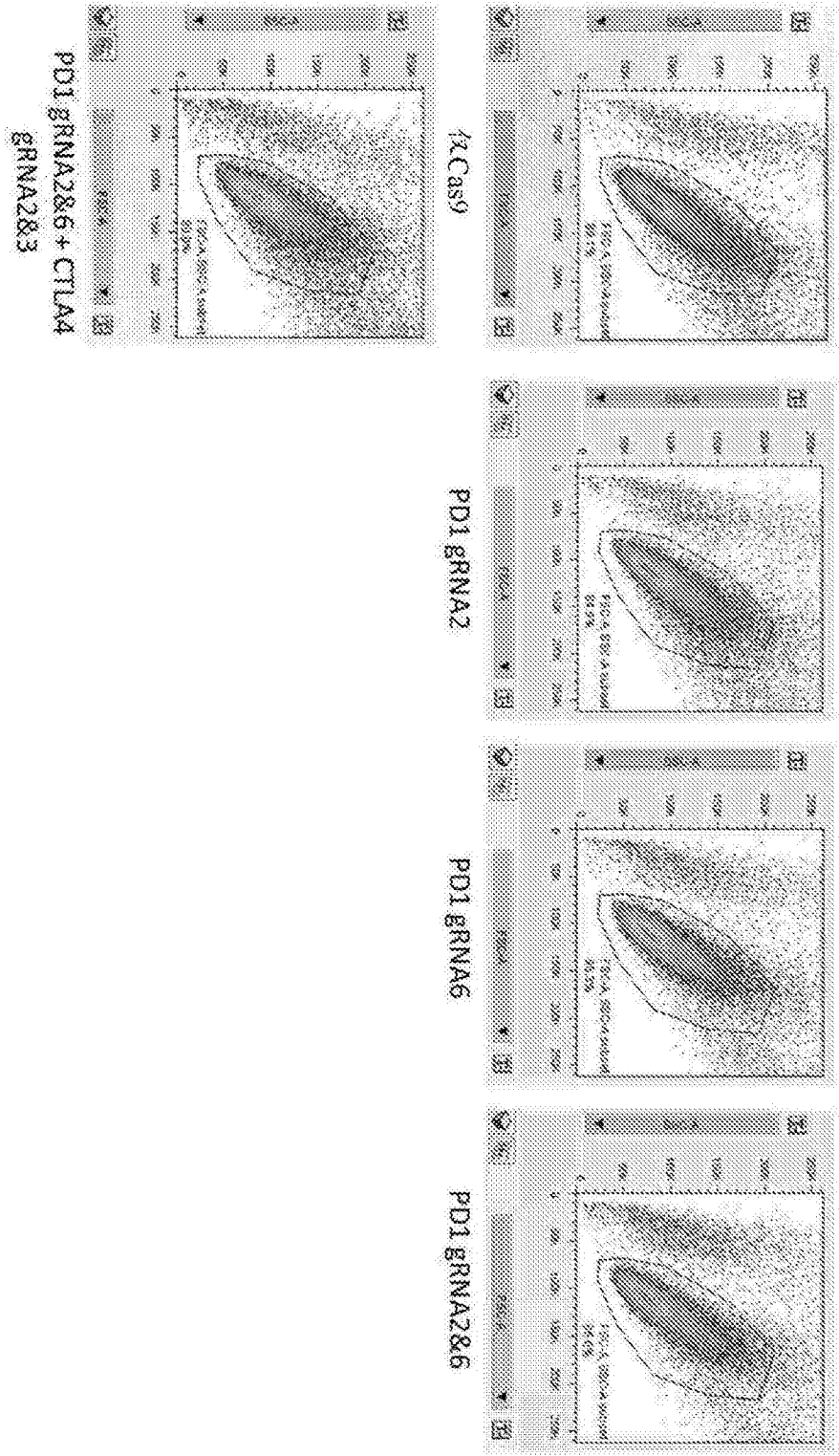


图47

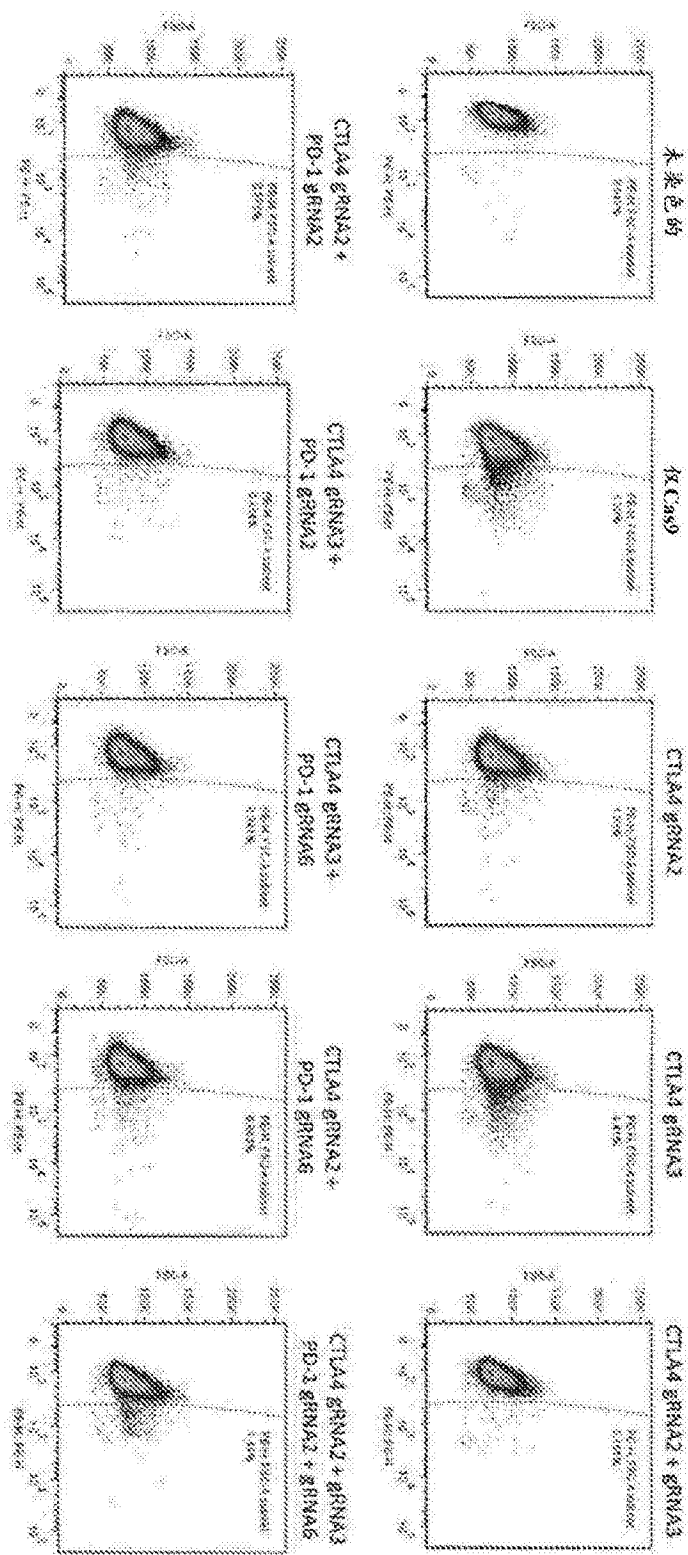


图48

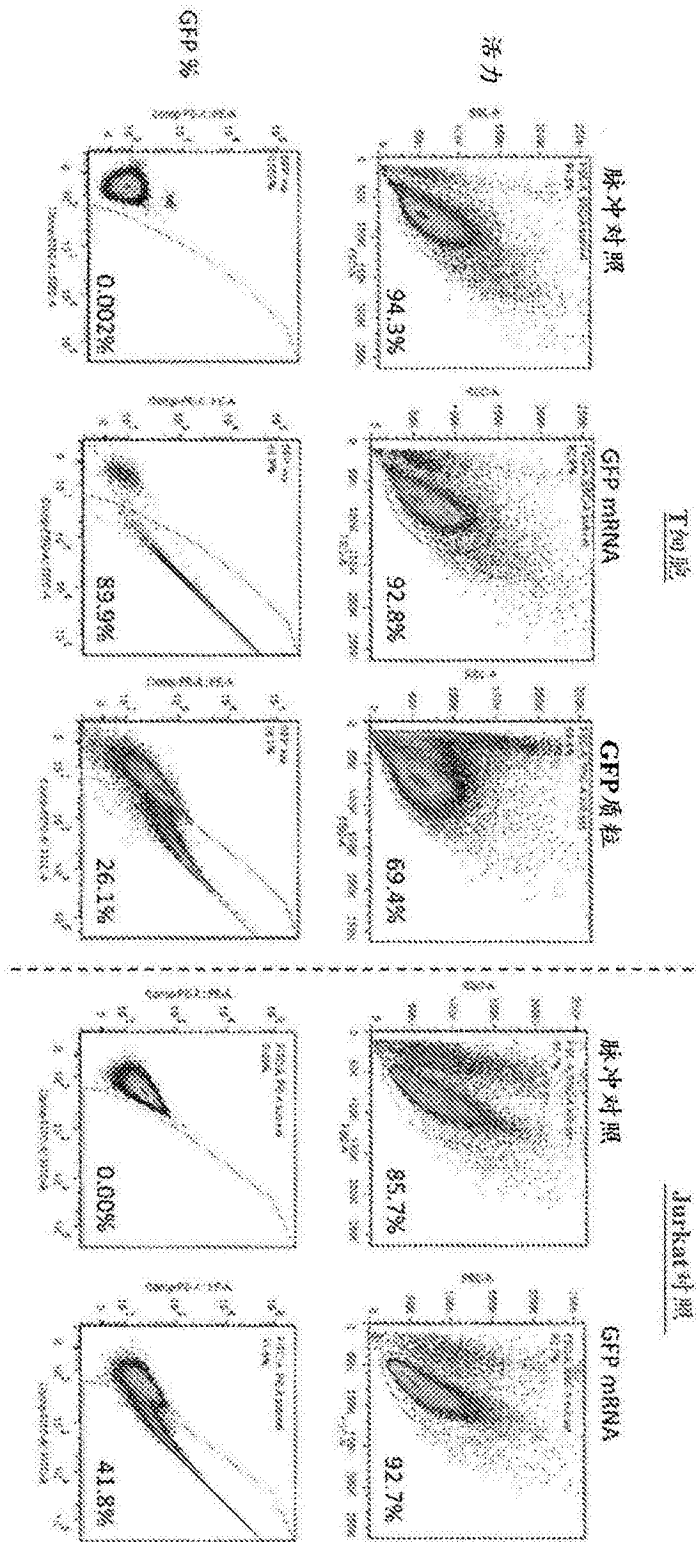


图49

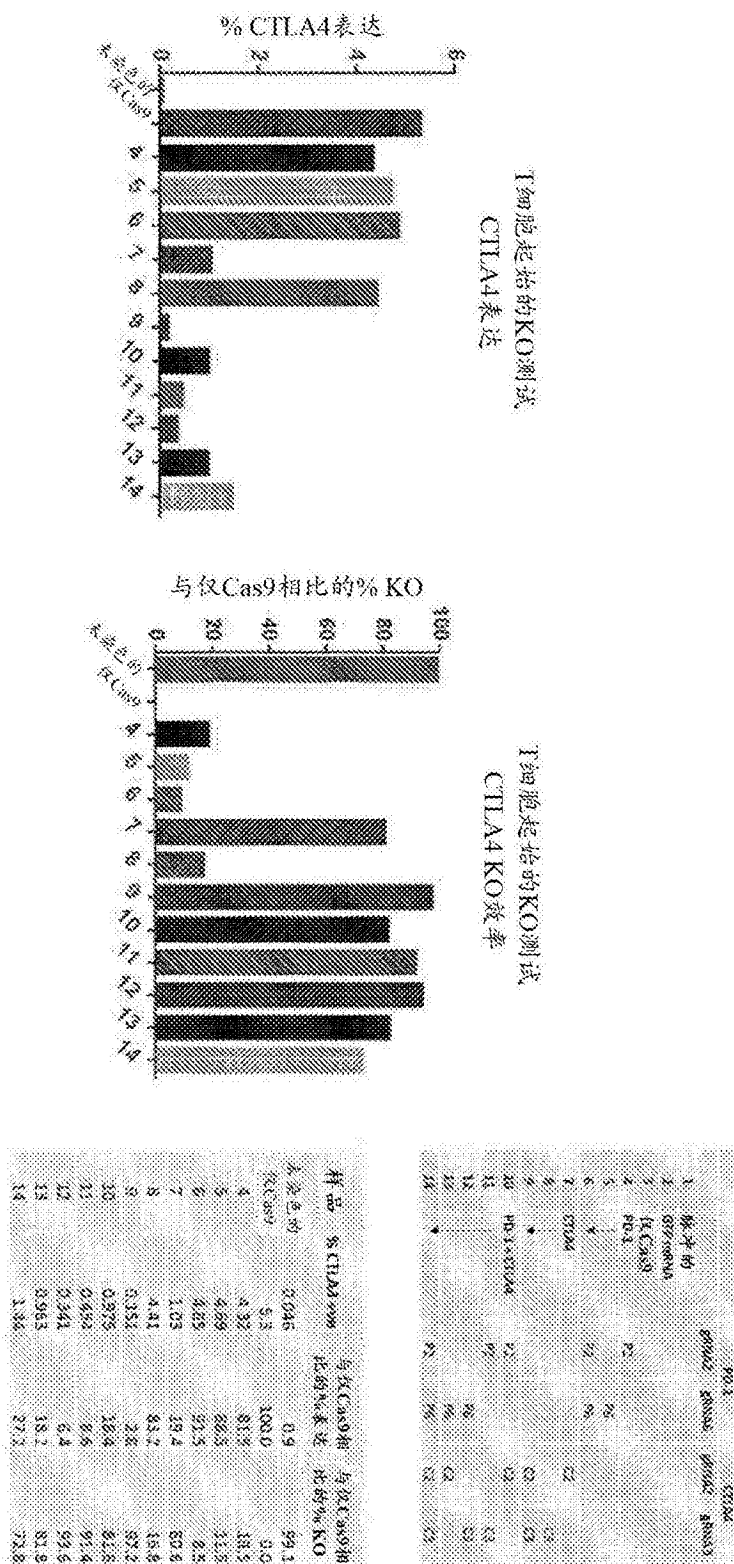


图50

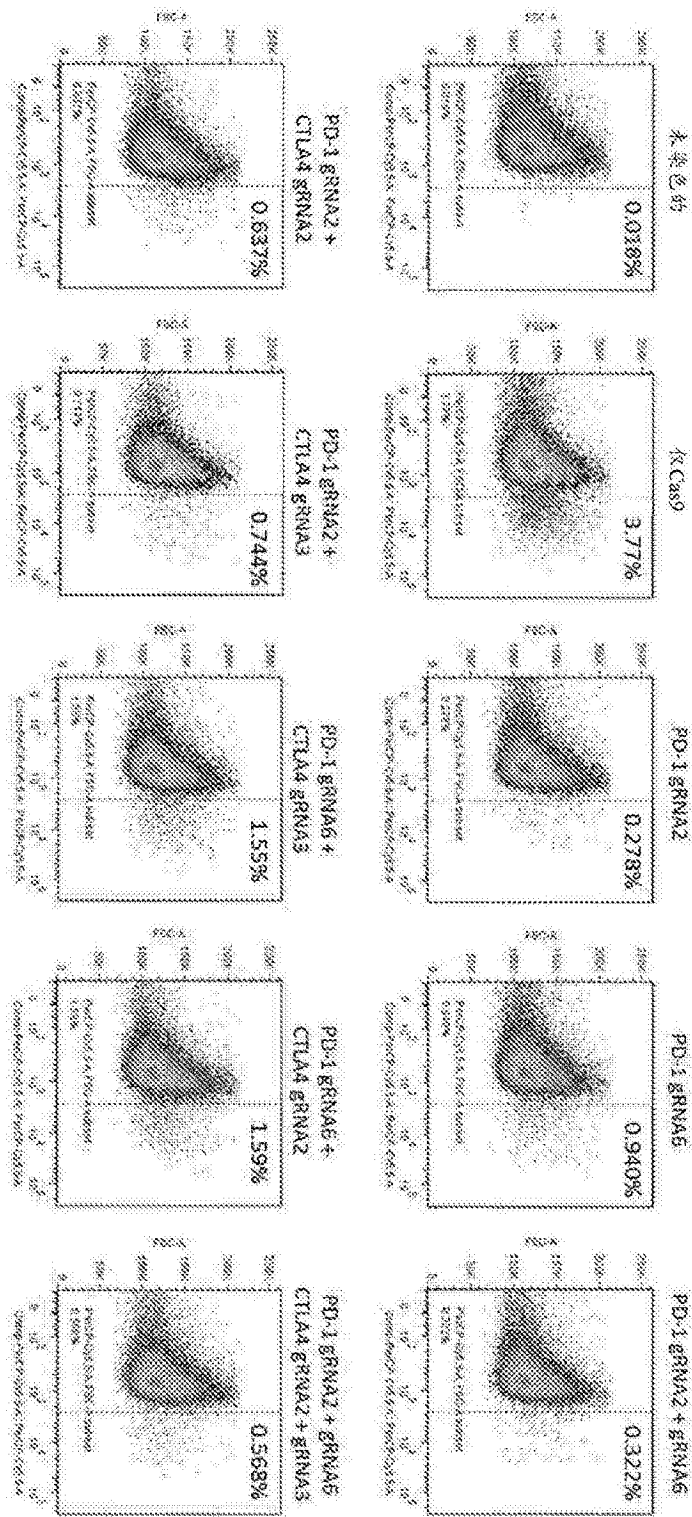


图51

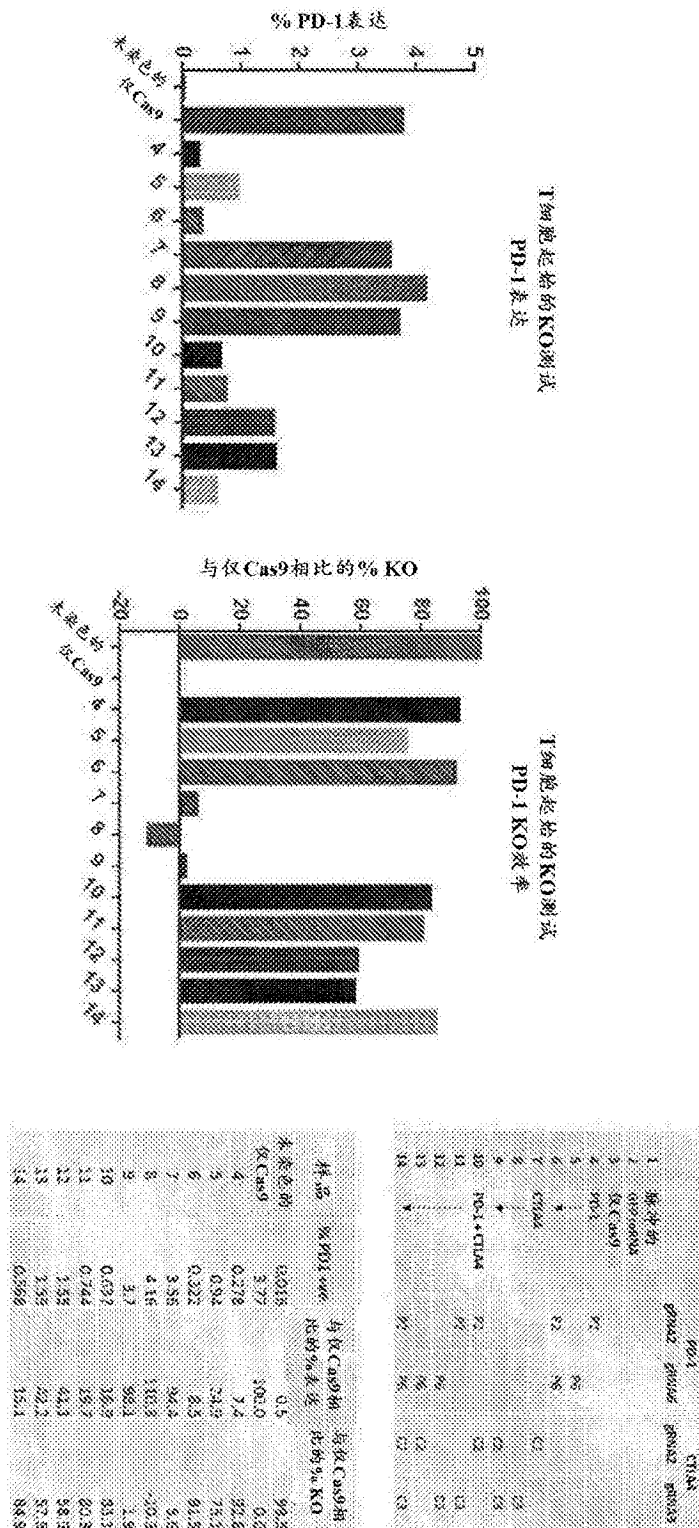


图52

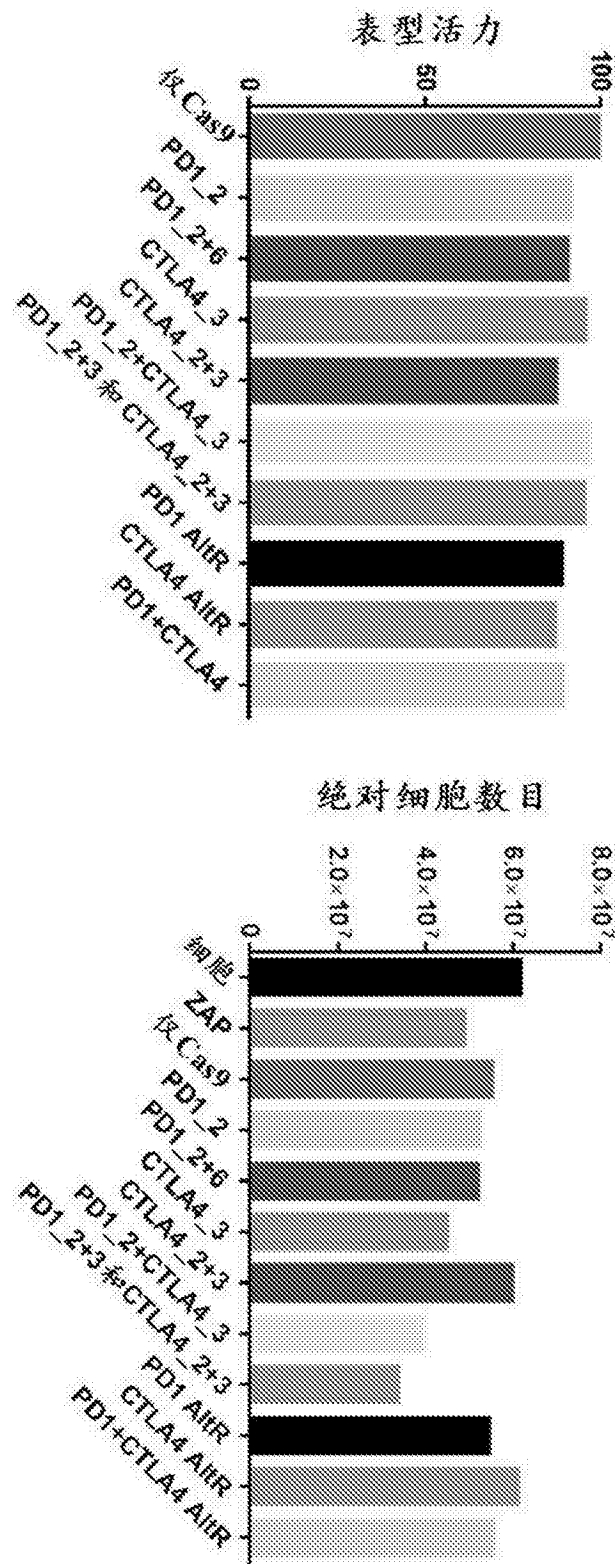


图53

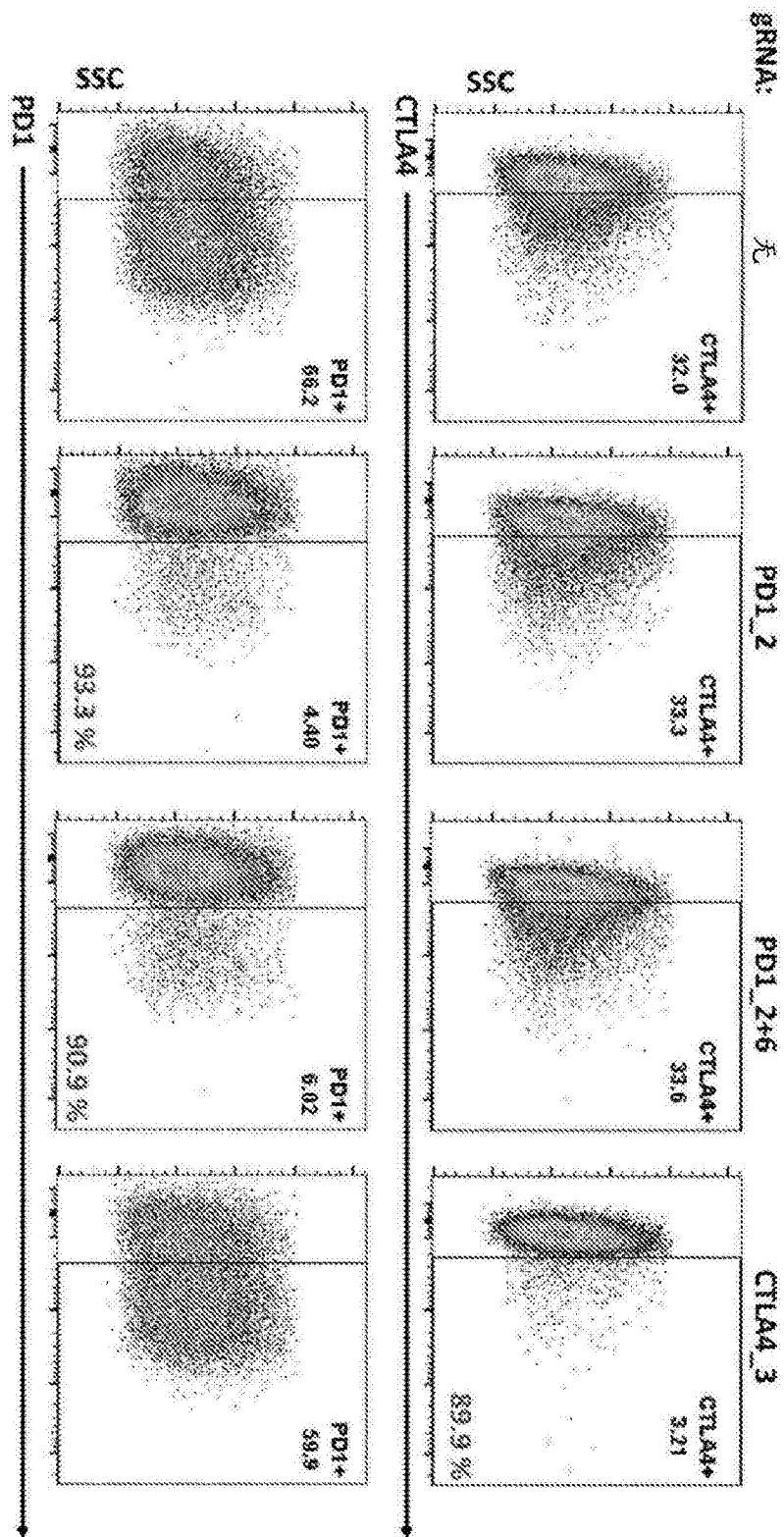


图54

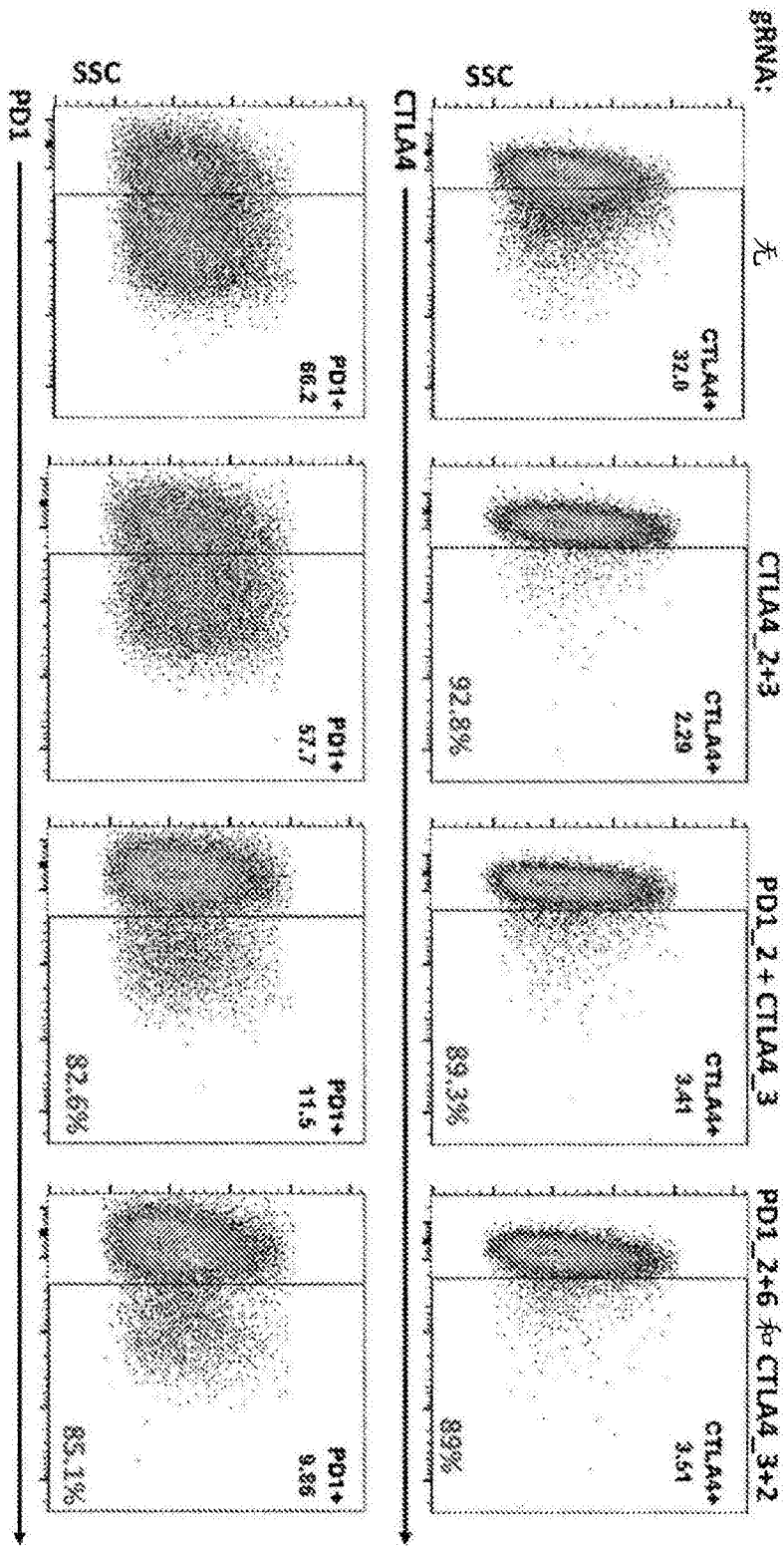


图55

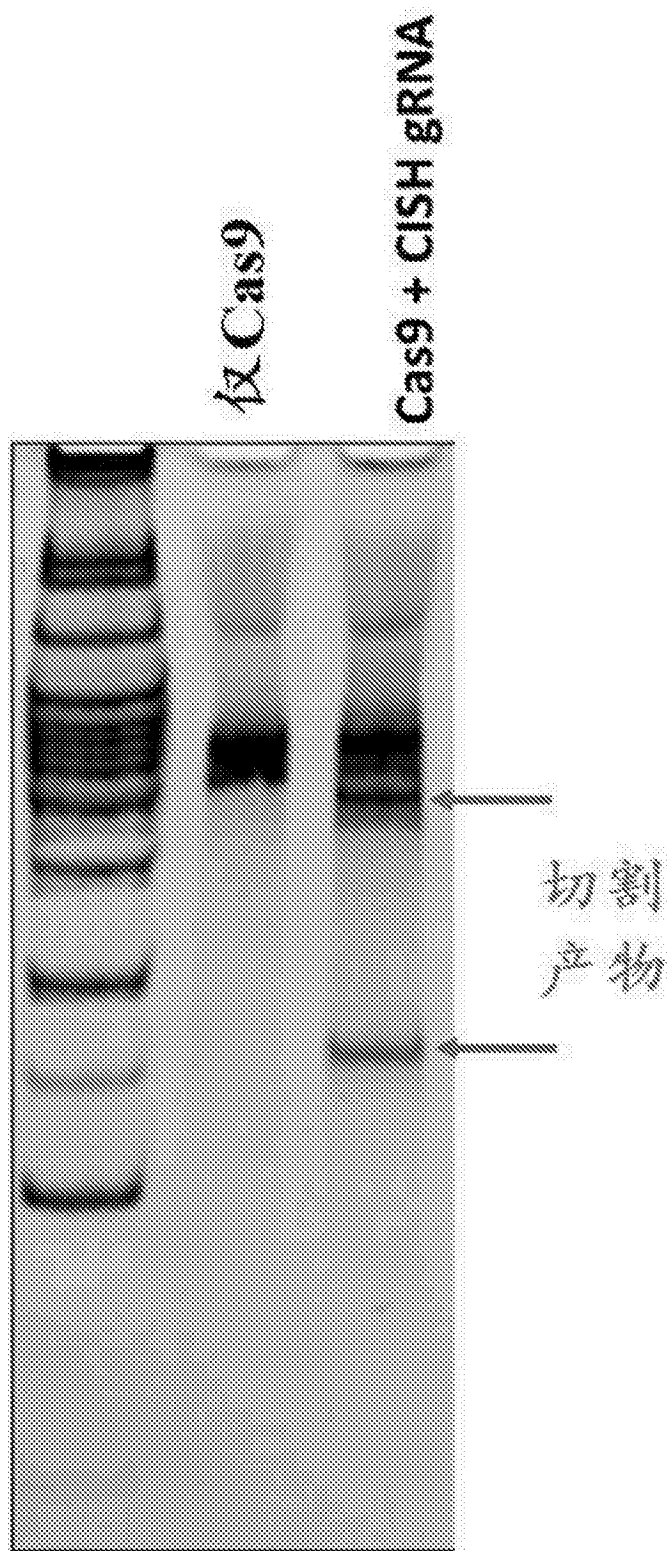


图56

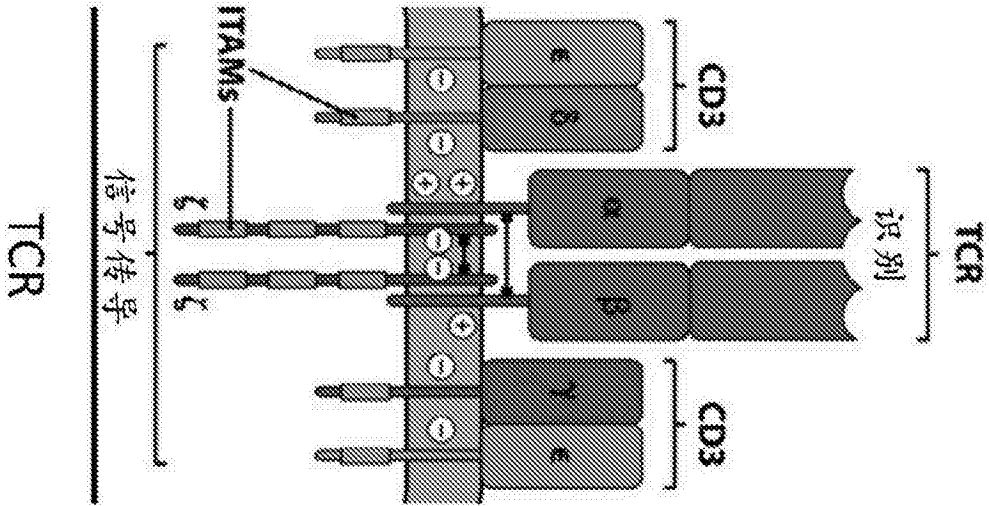


图57A

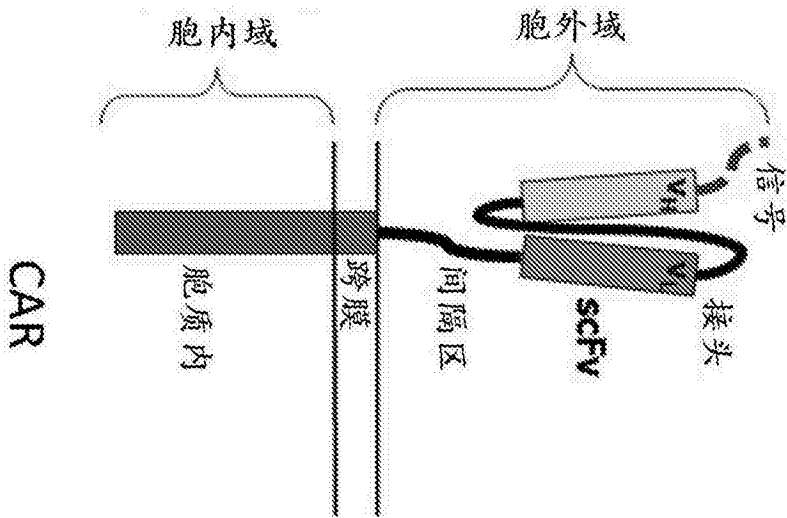


图57B

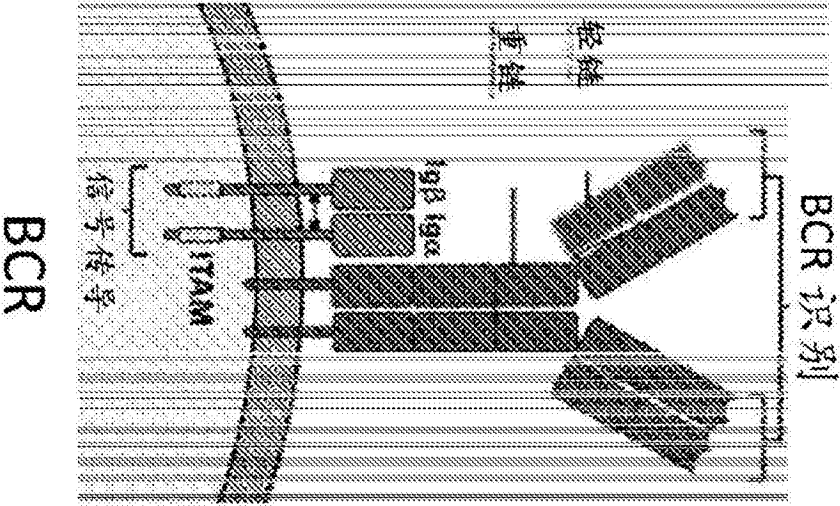


图57C

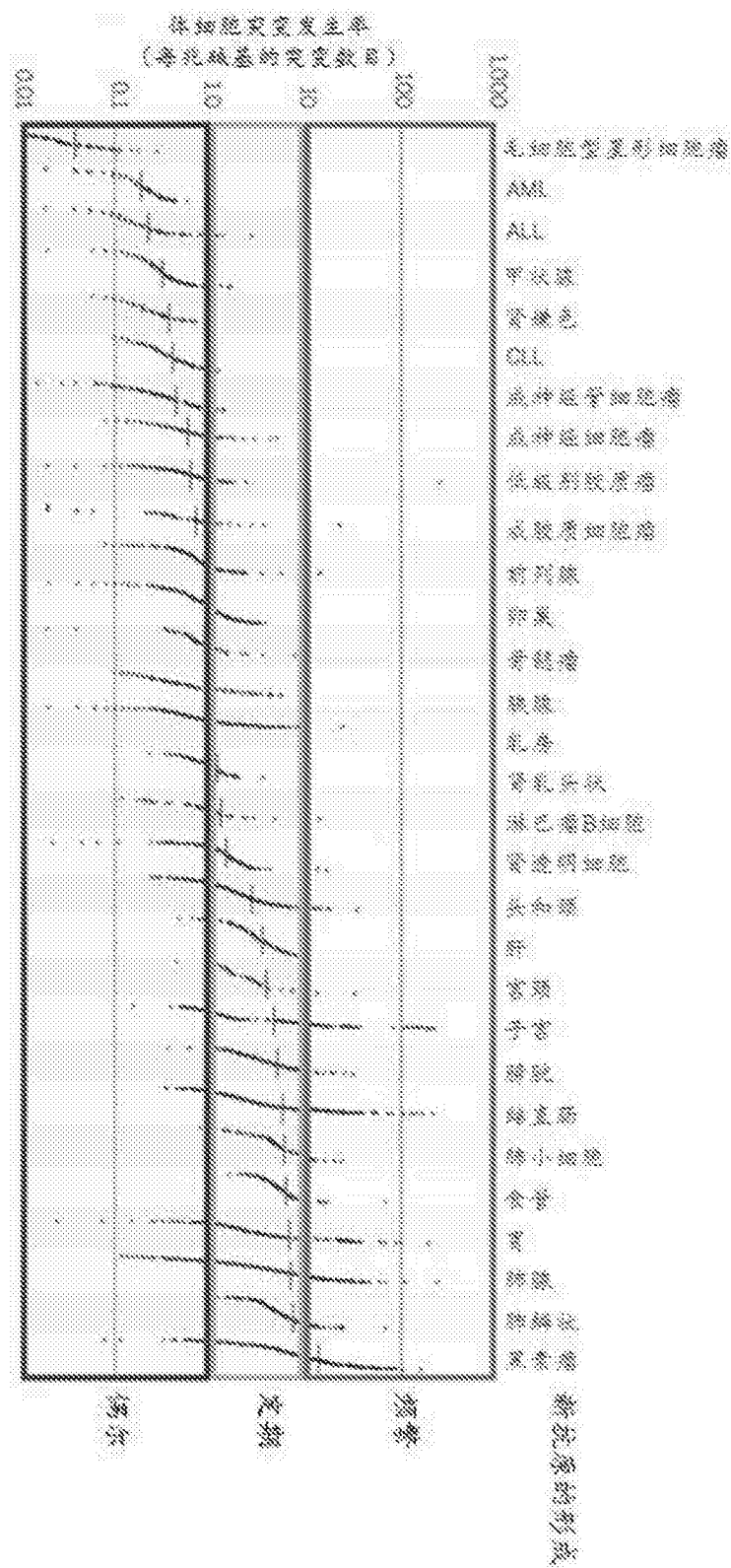


图58

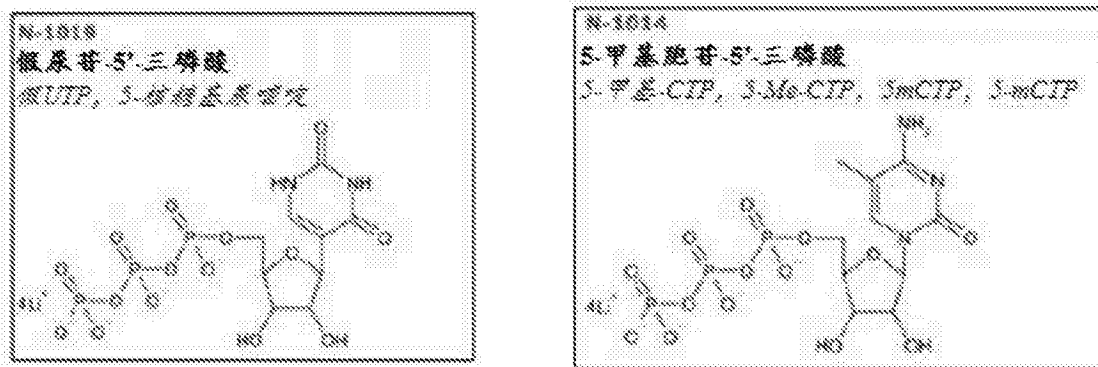


图59

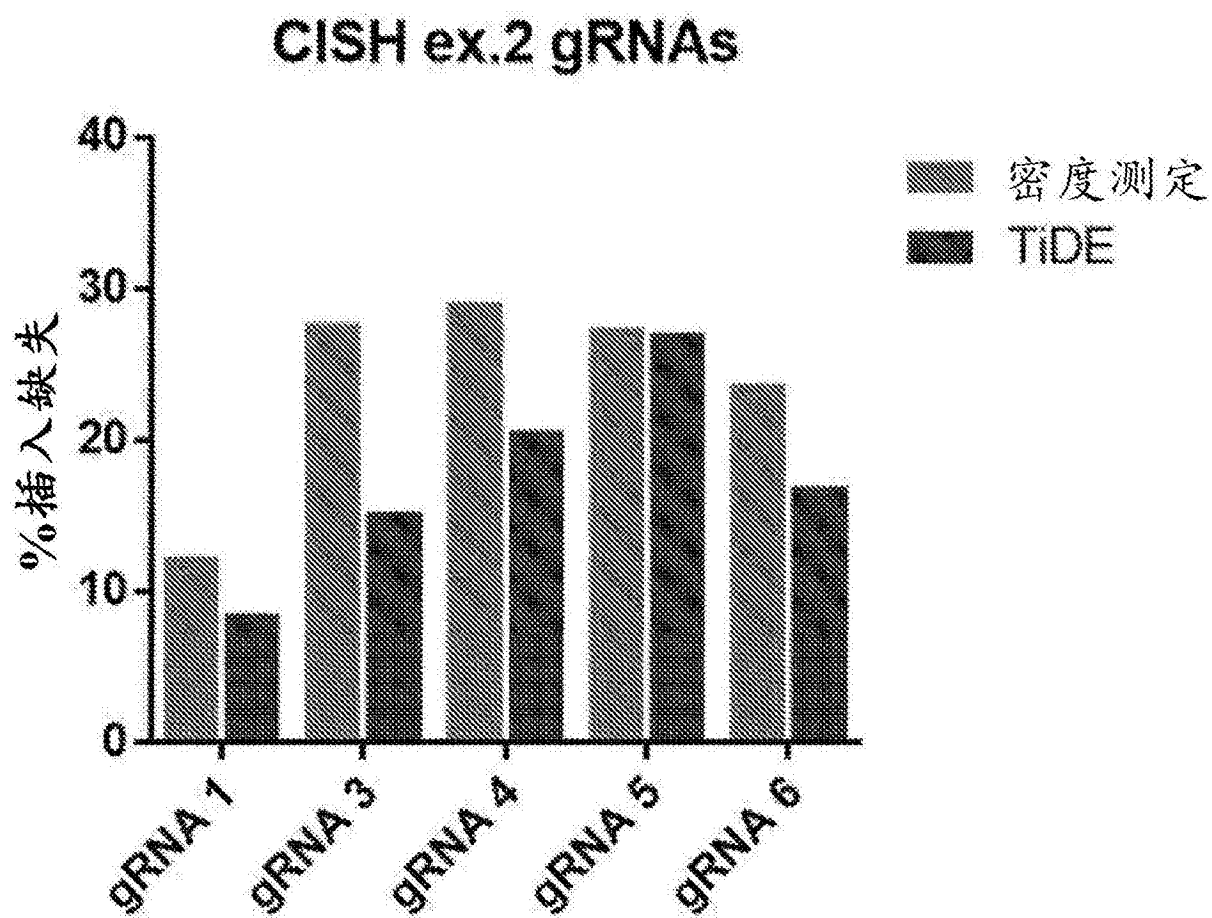


图60

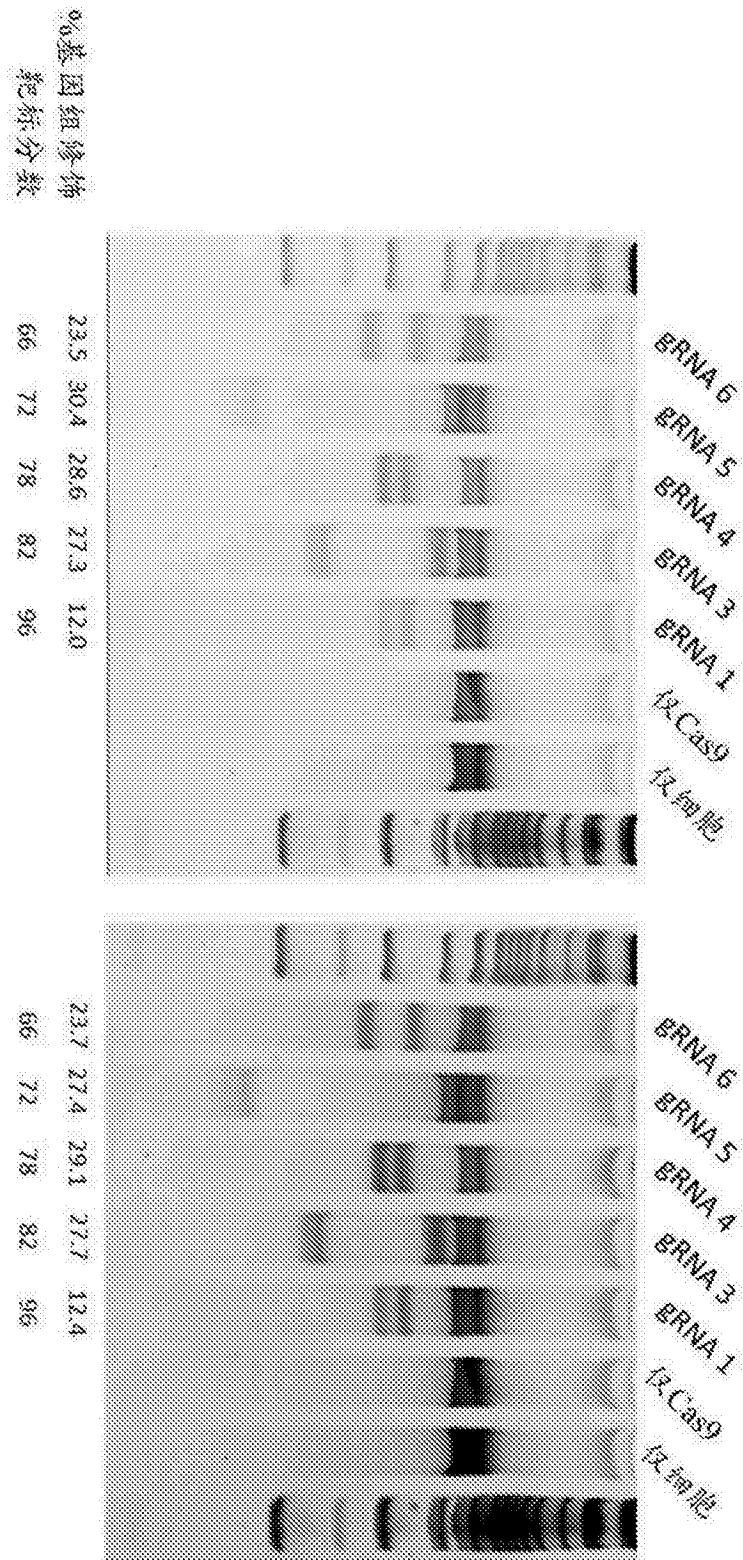


图61

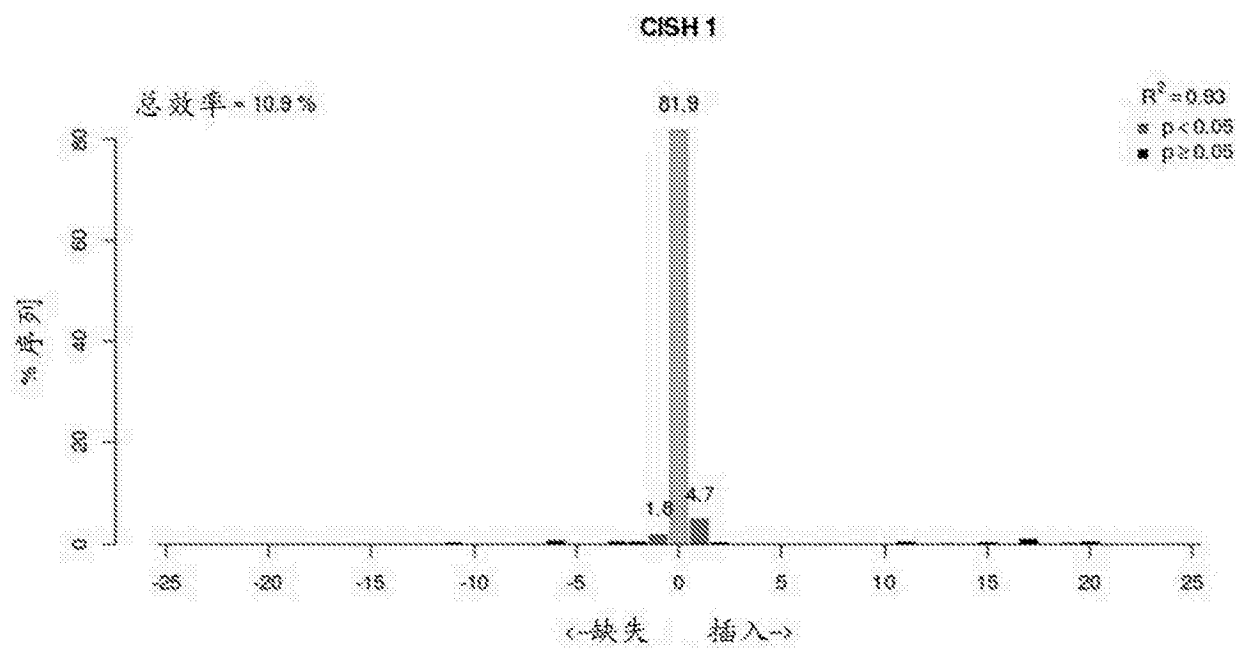


图62A

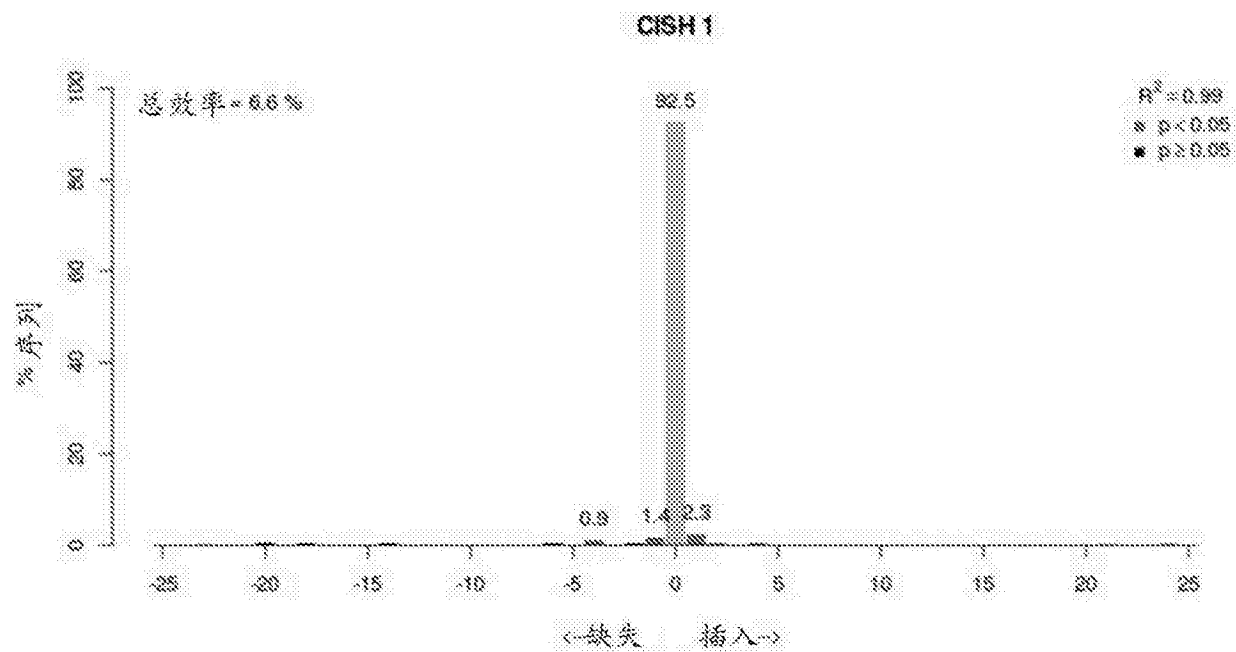


图62B

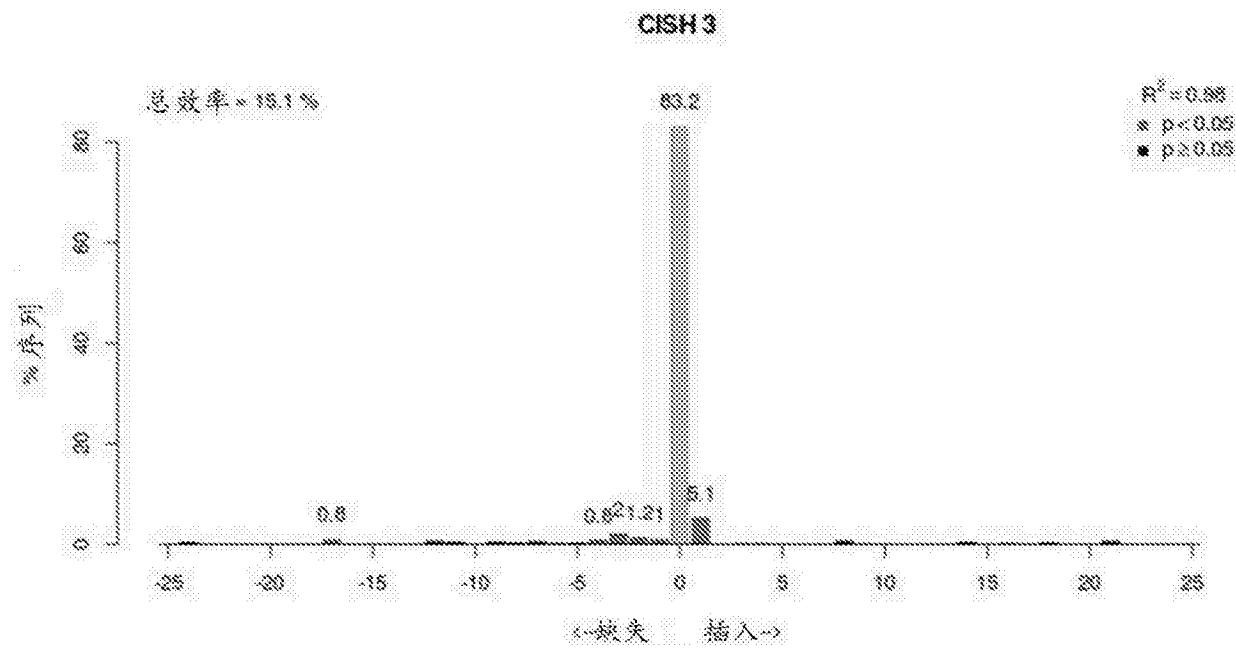


图63A

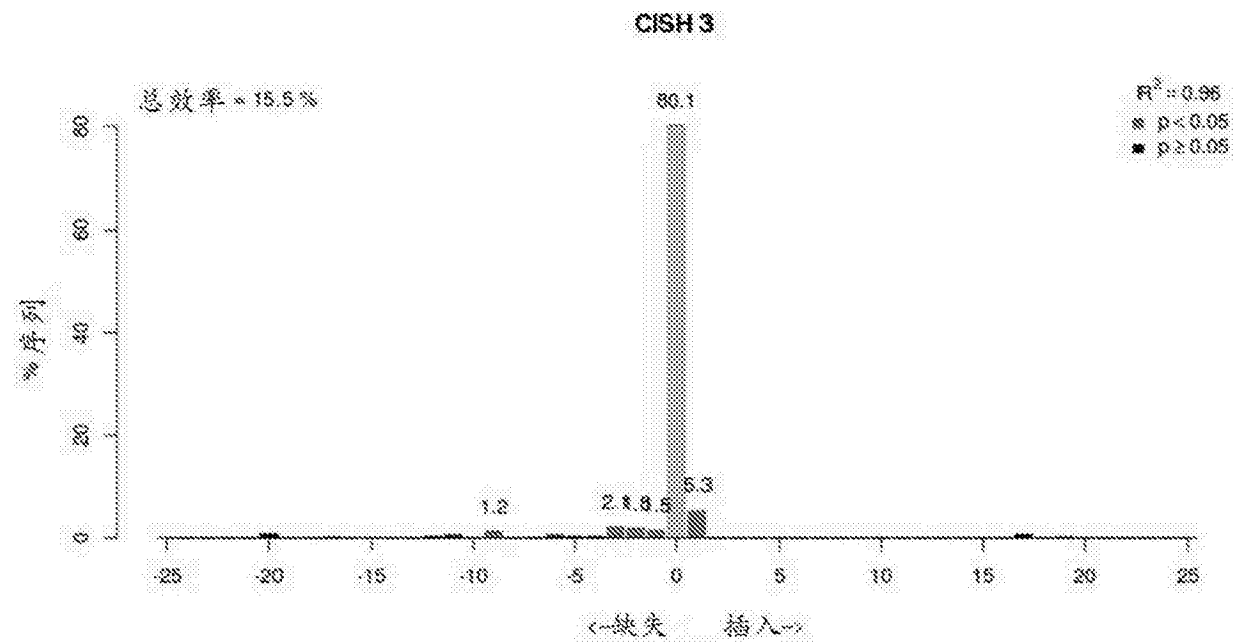


图63B

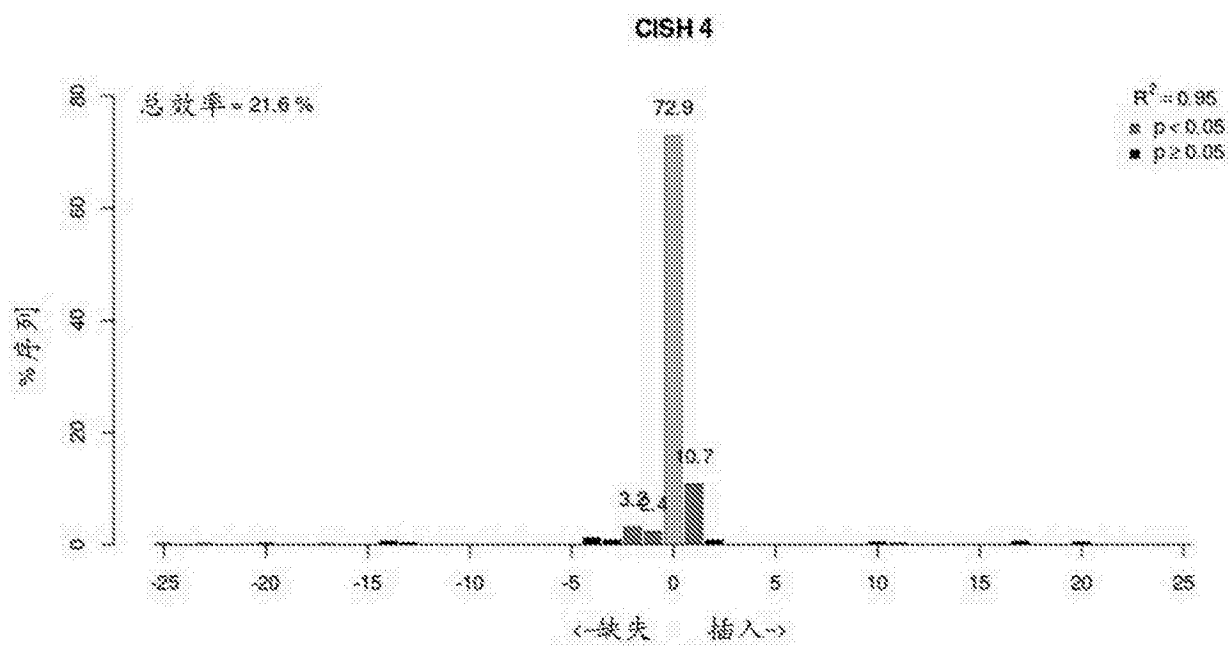


图64A

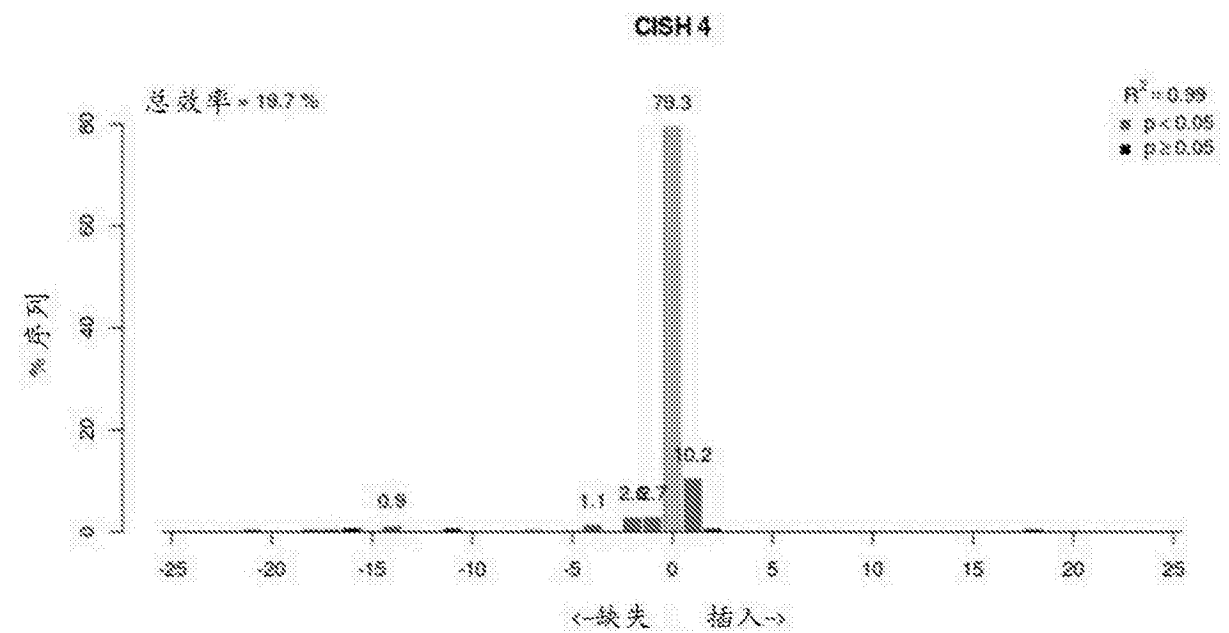


图64B

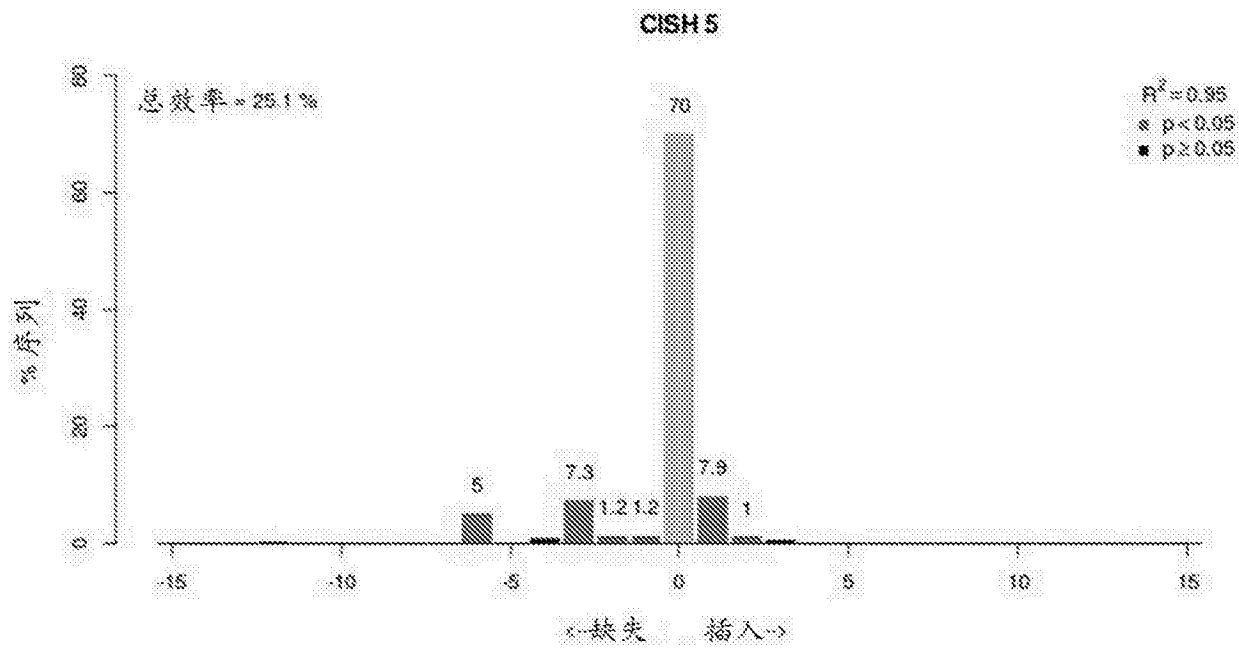


图65A

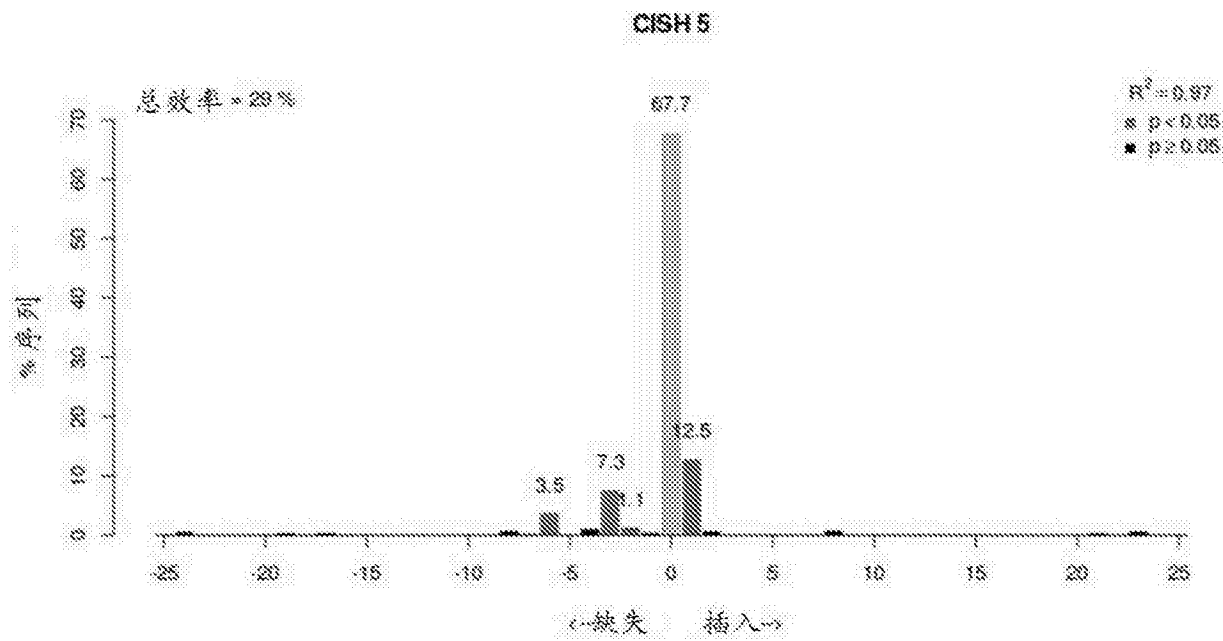


图65B

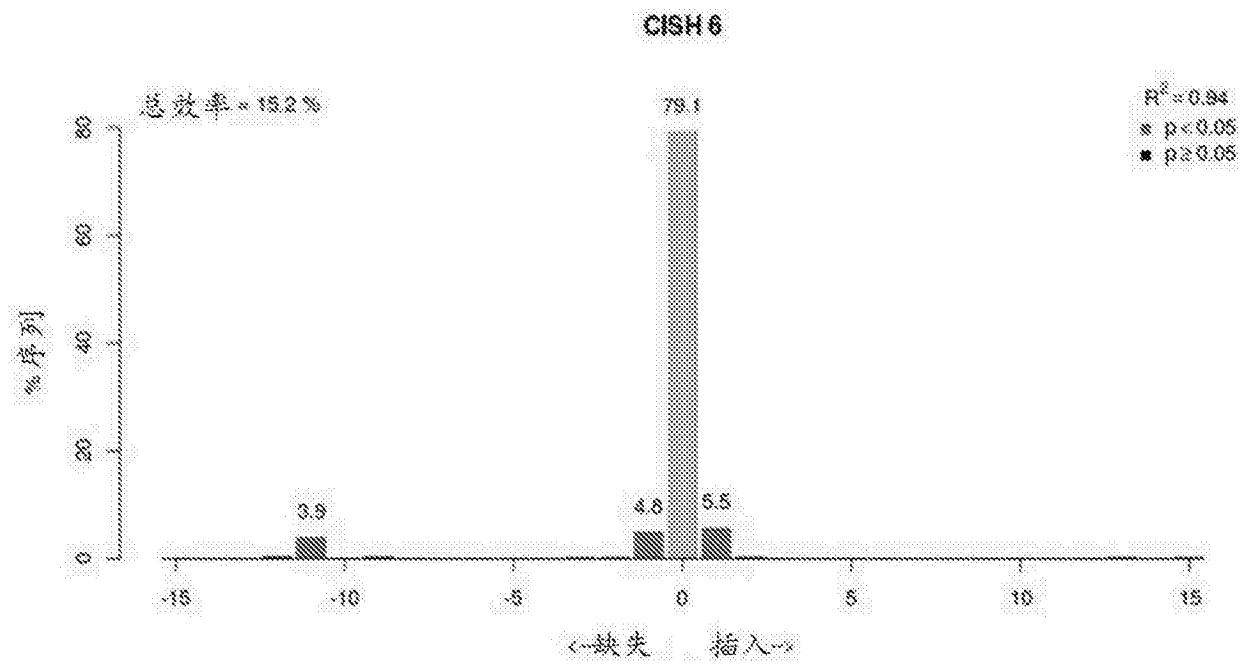


图66A

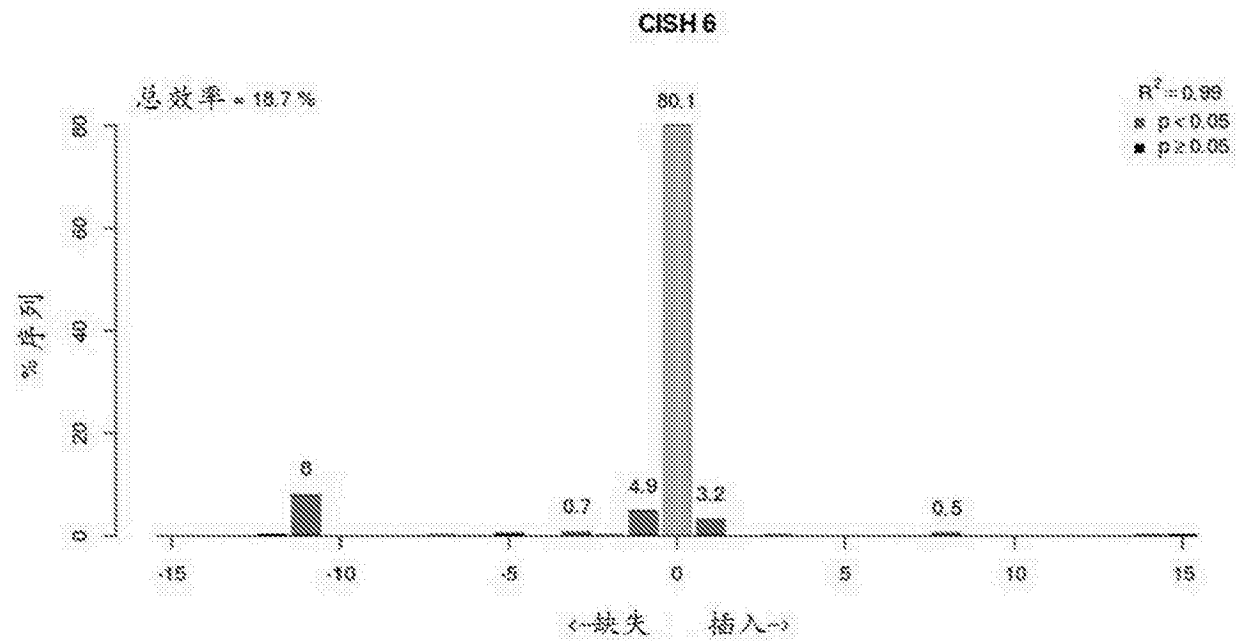
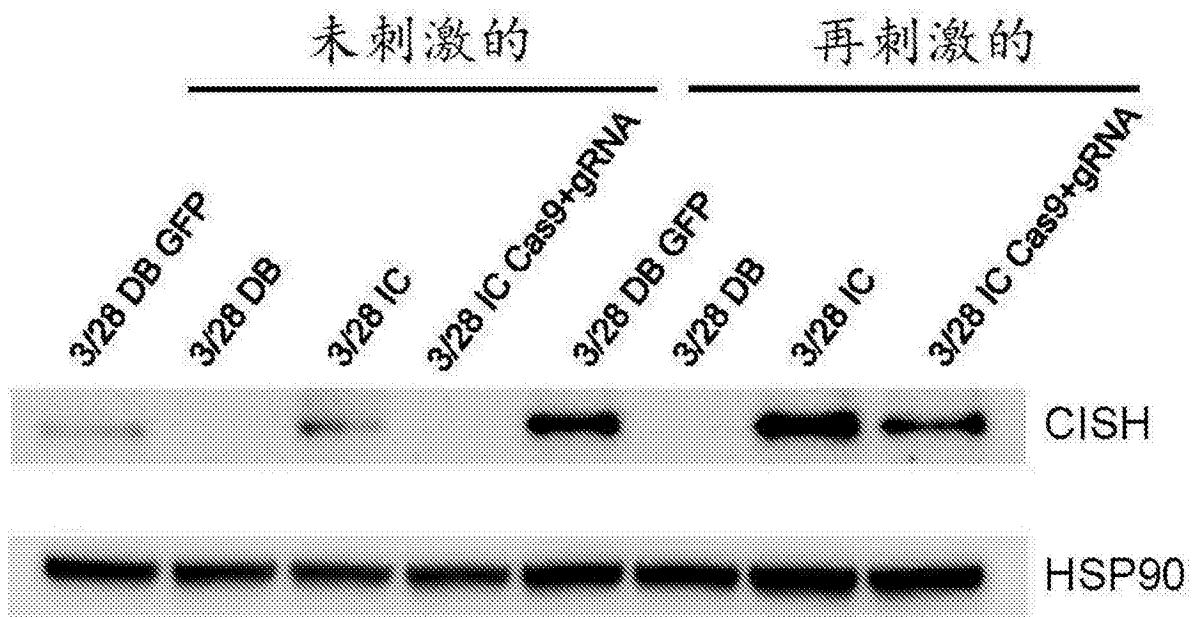


图66B



IC = Immunocult (Stem Cell Technologies)

DB = Dynabeads

图67

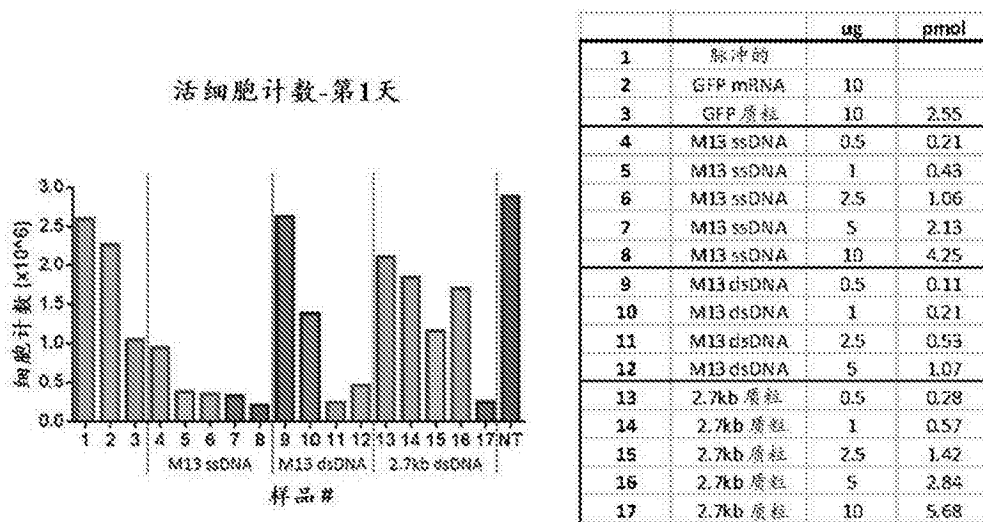


图68A

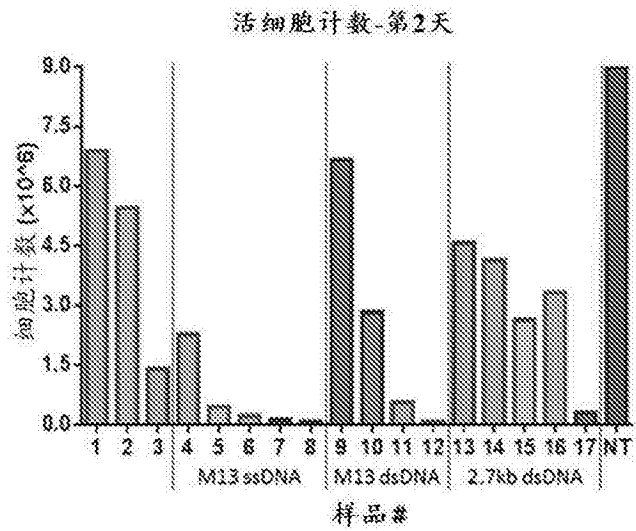


图68B

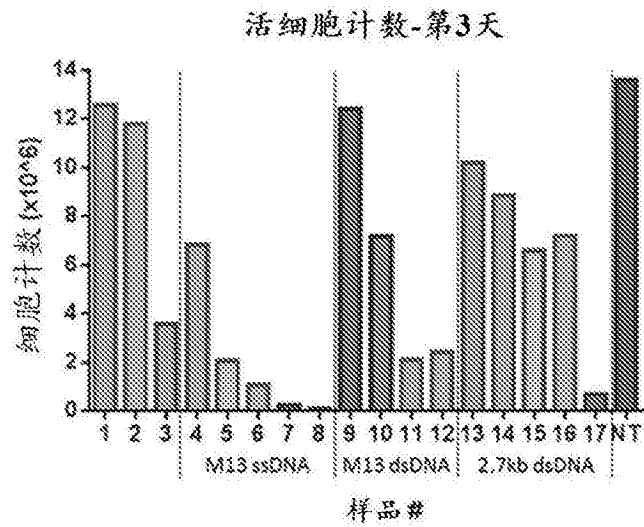


图68C

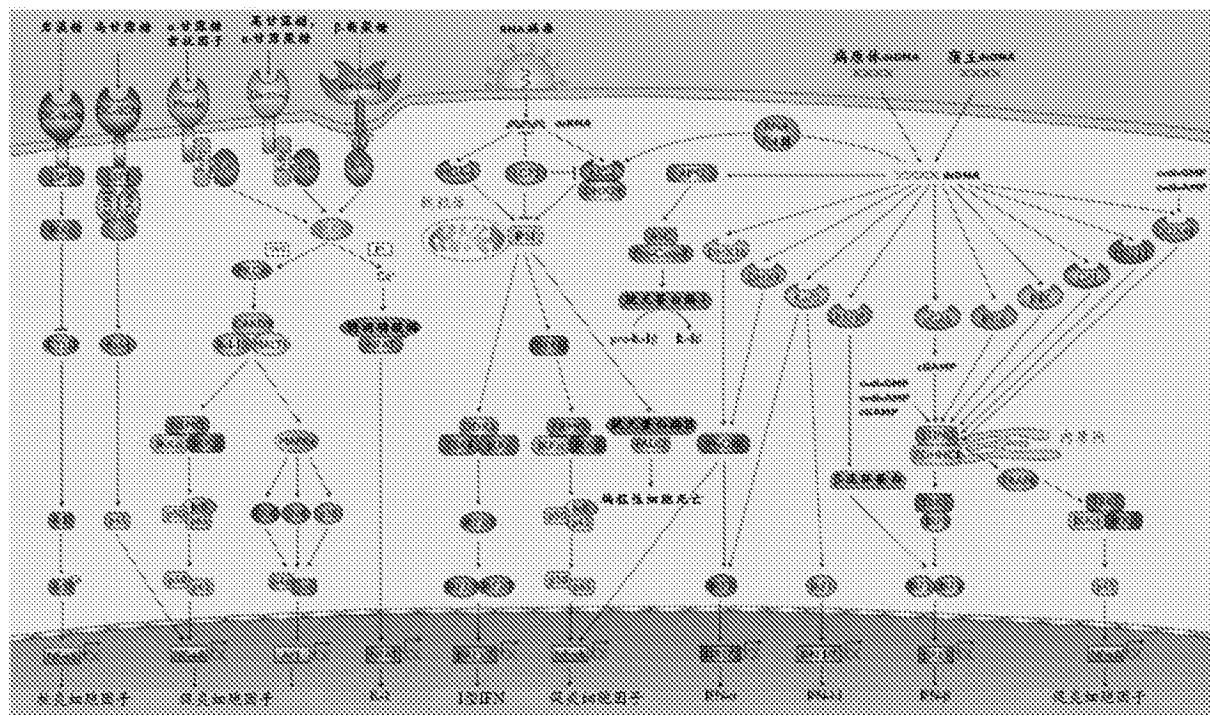


图69

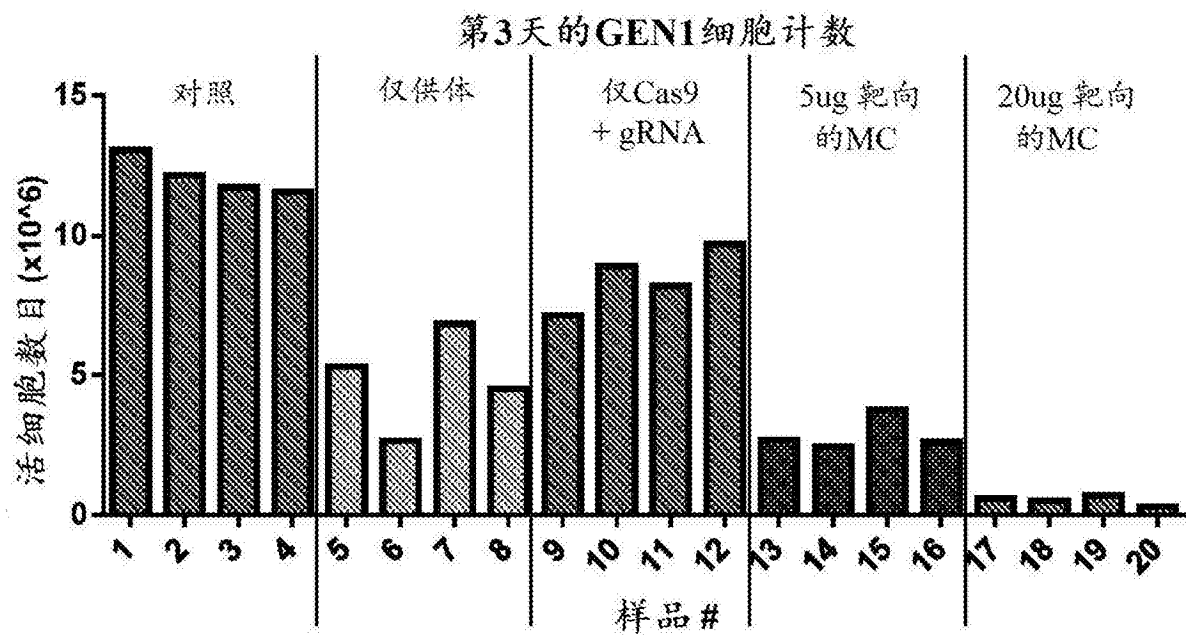


图70A

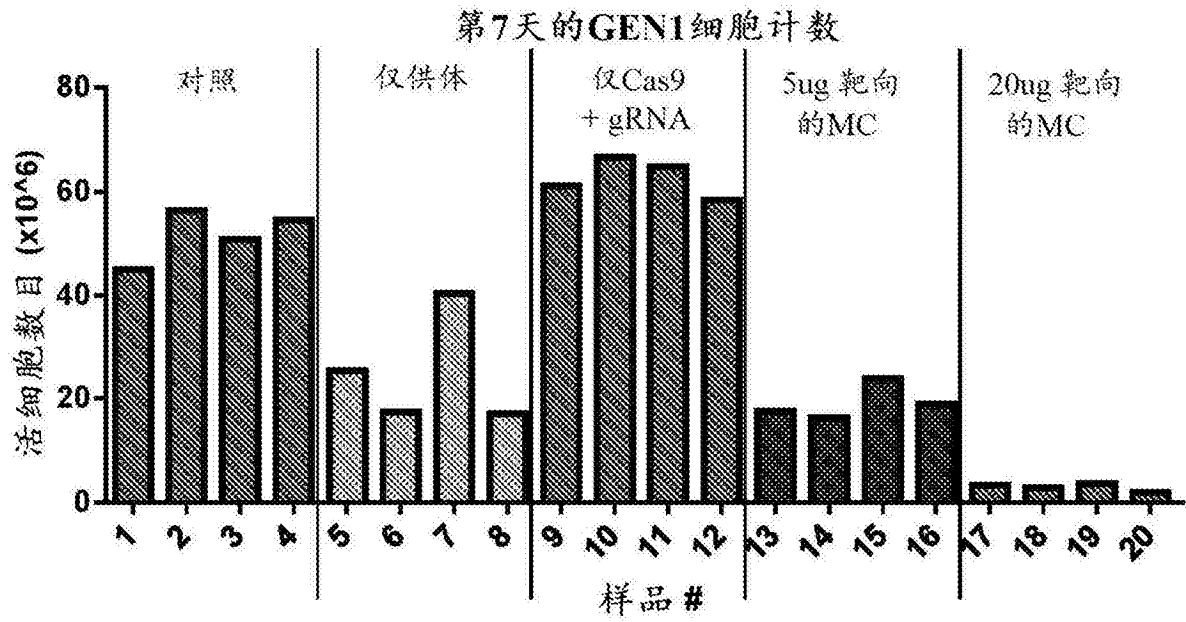


图70B

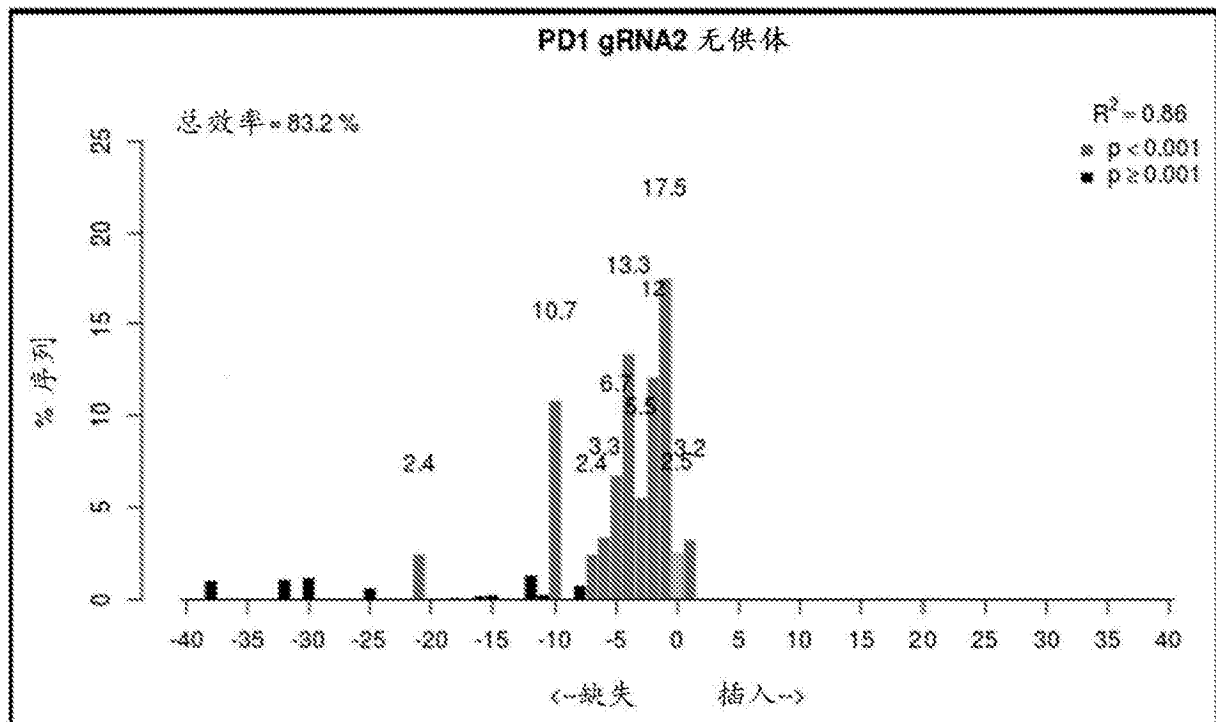


图71A

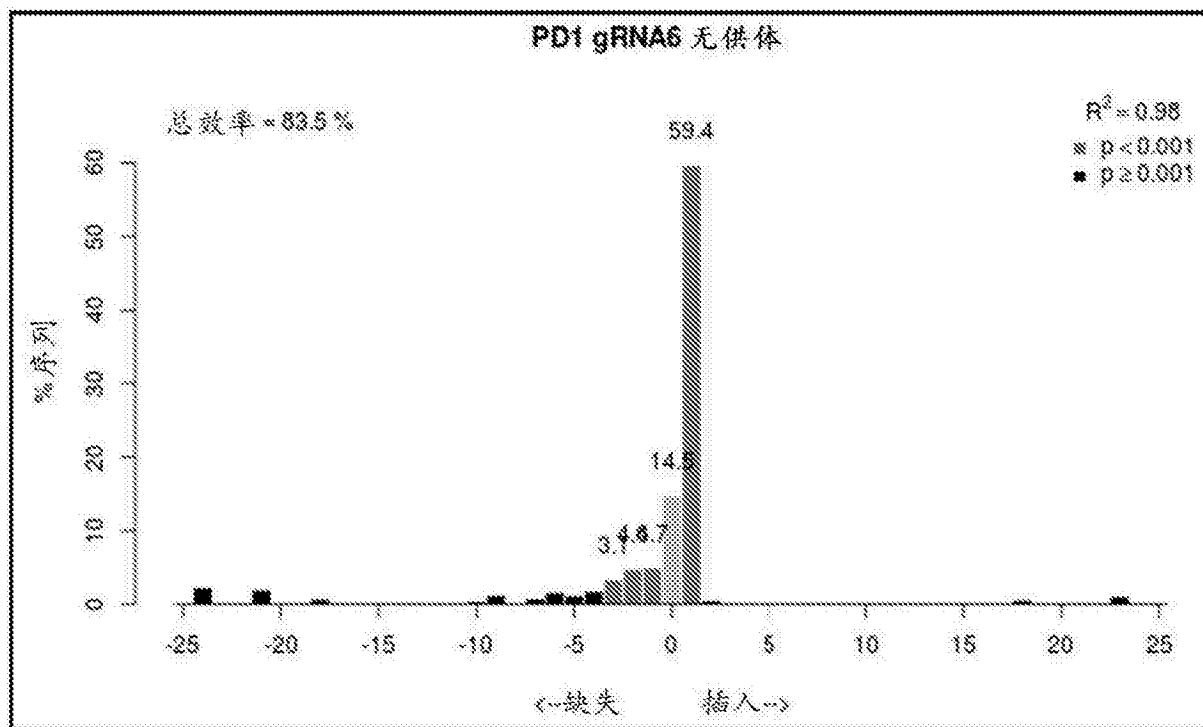


图71B

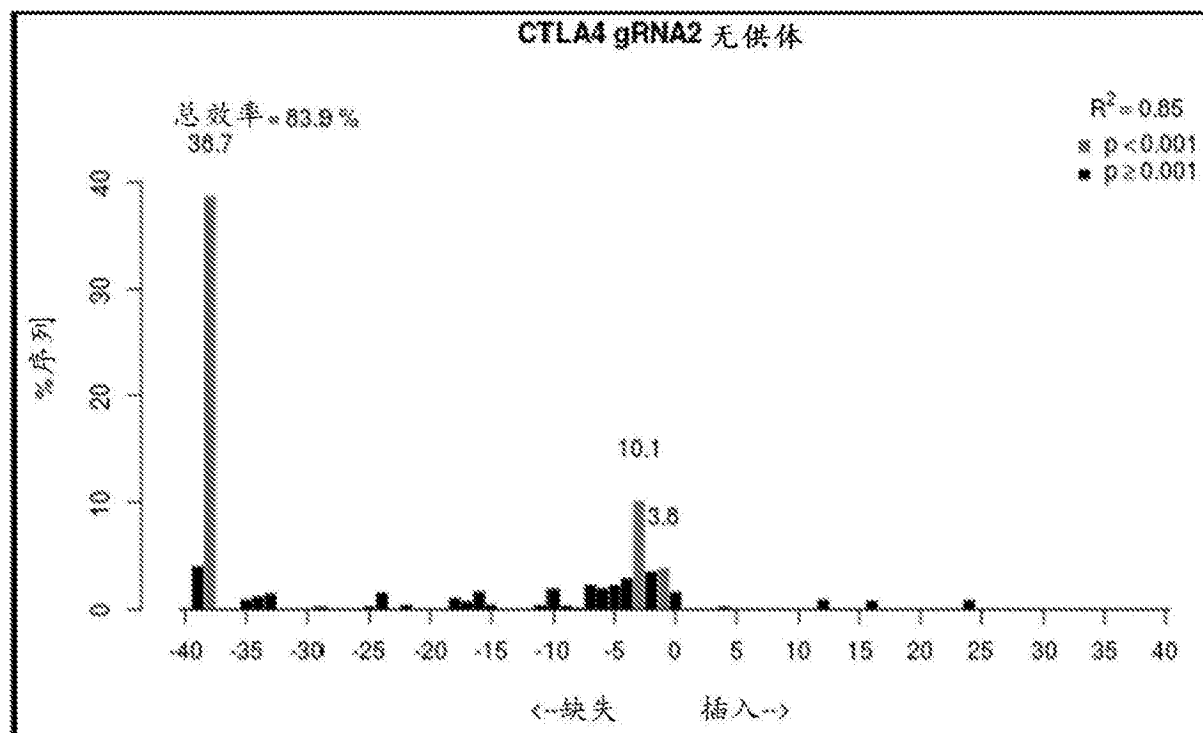


图72A

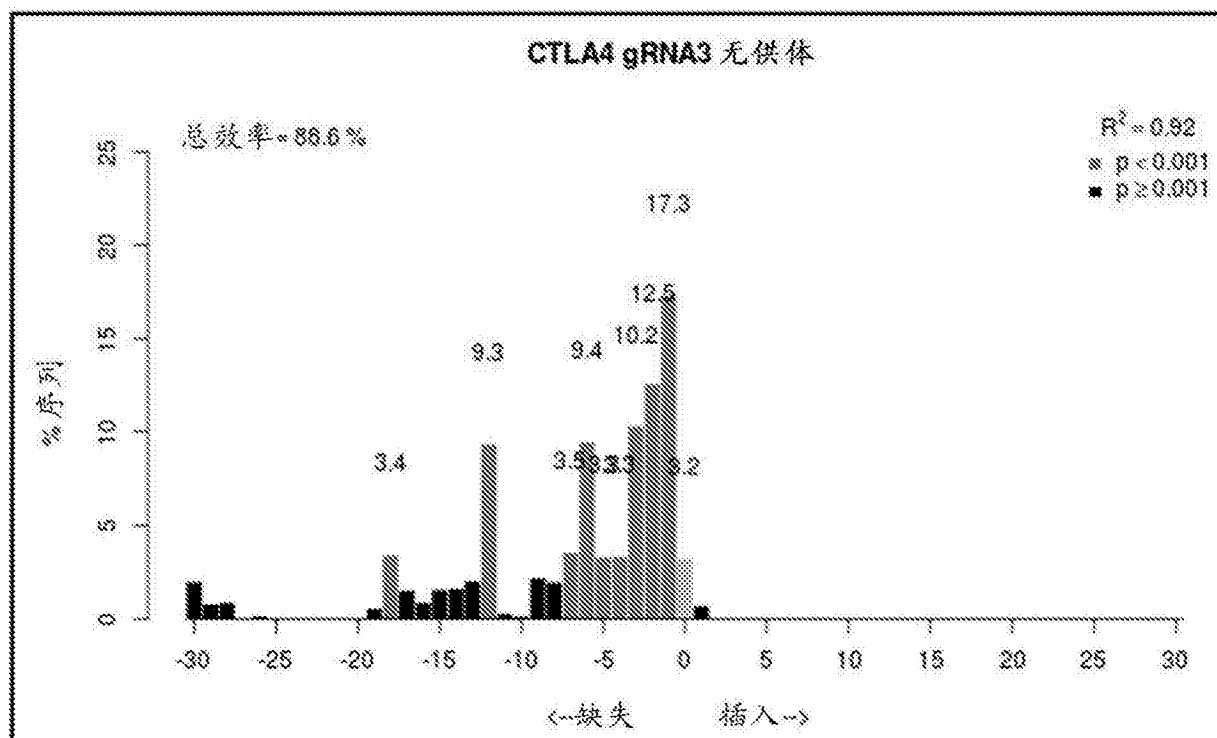


图72B

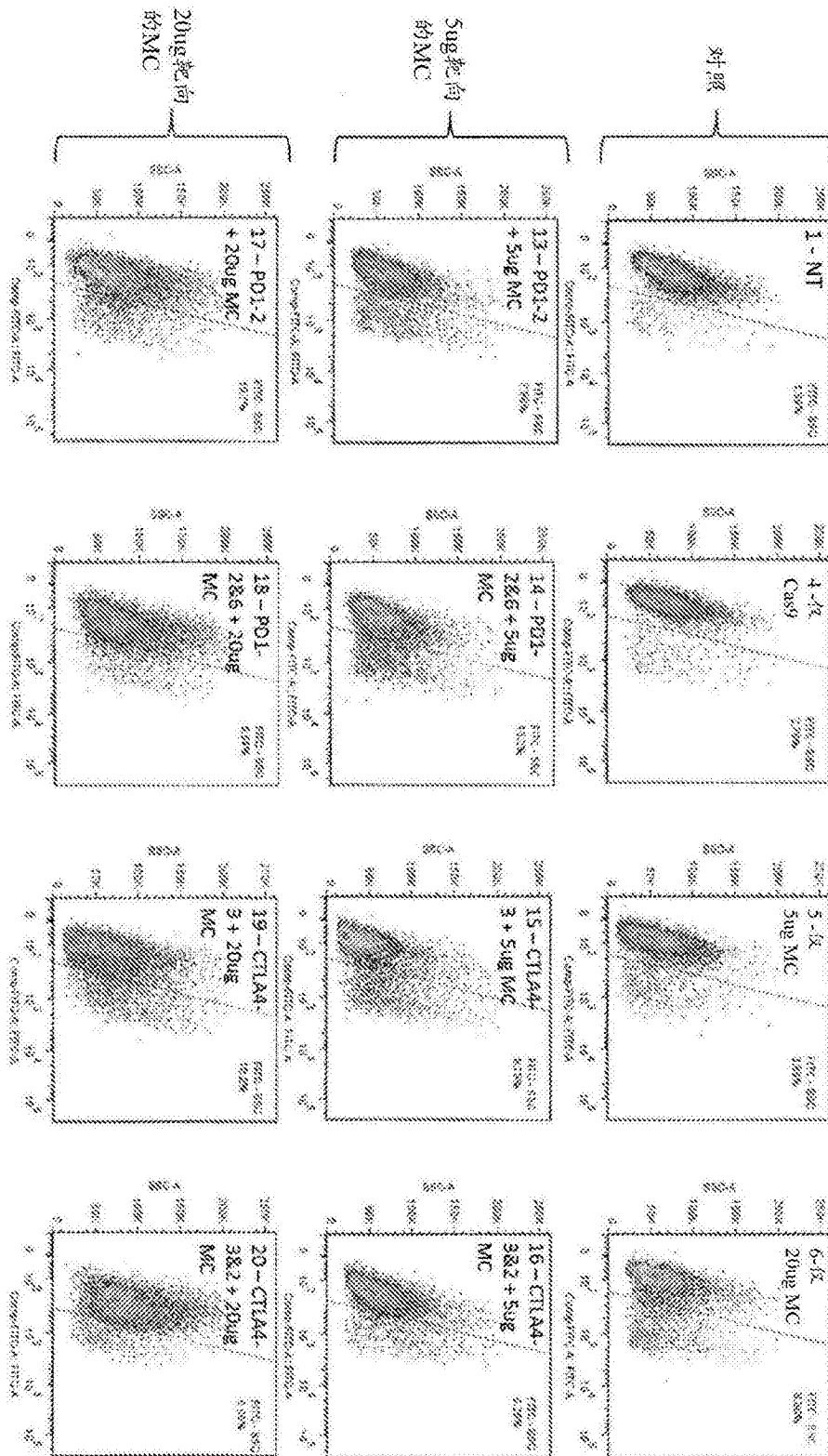


图73

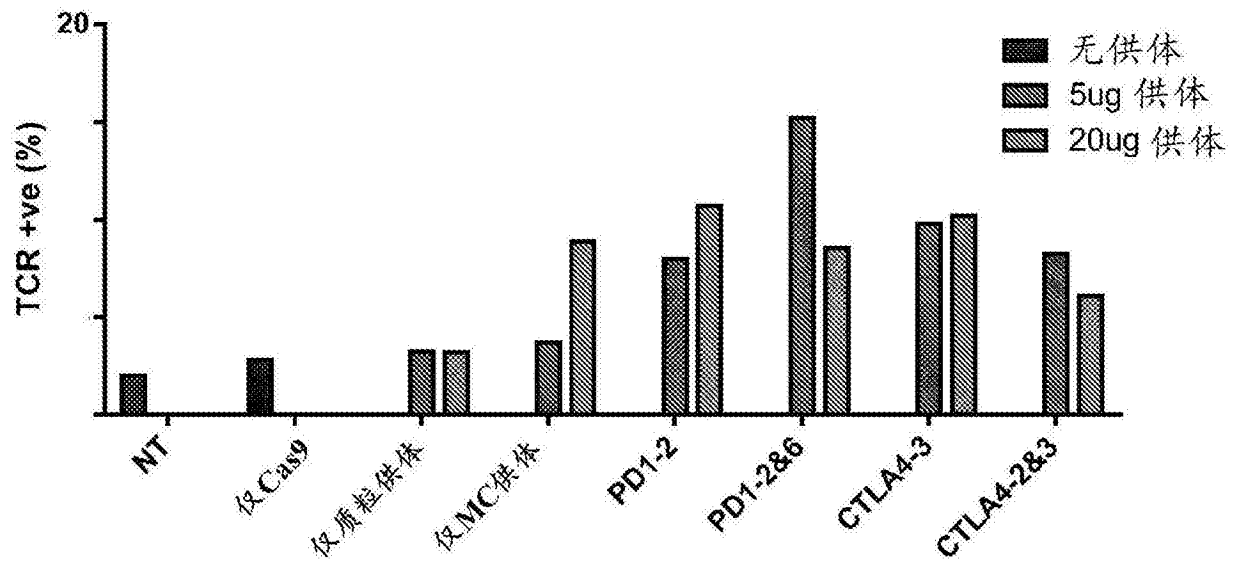


图74

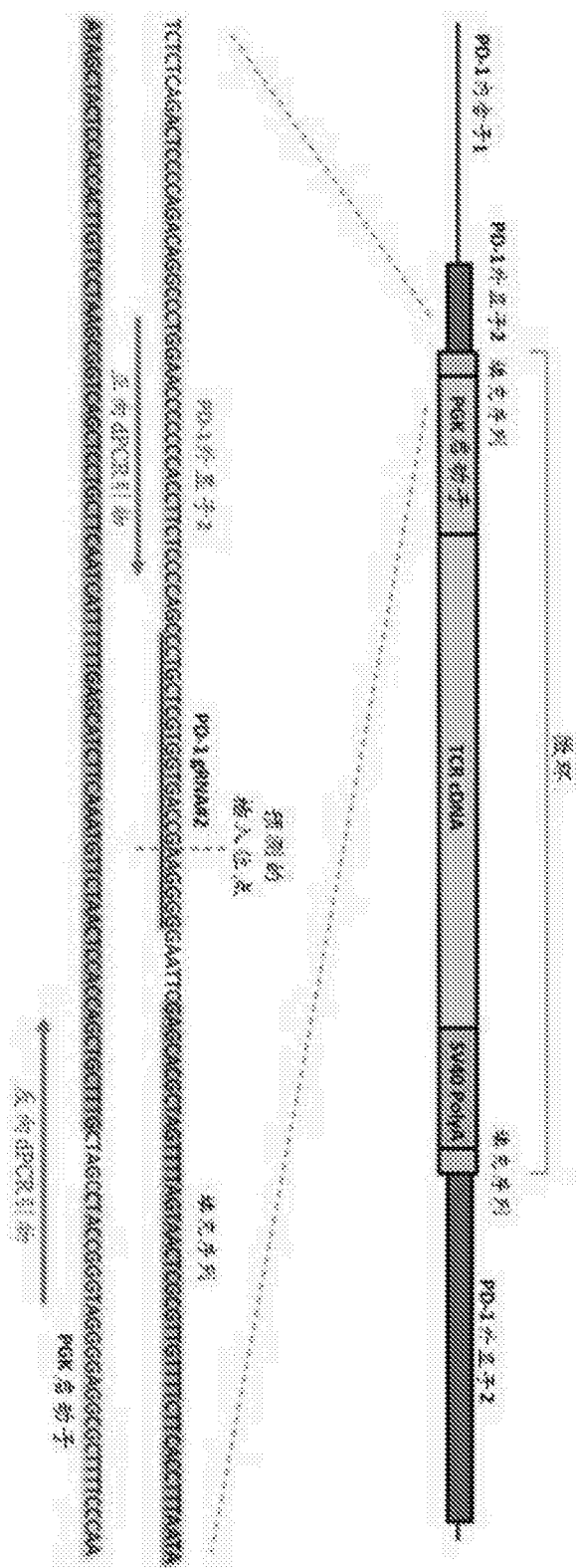


图75

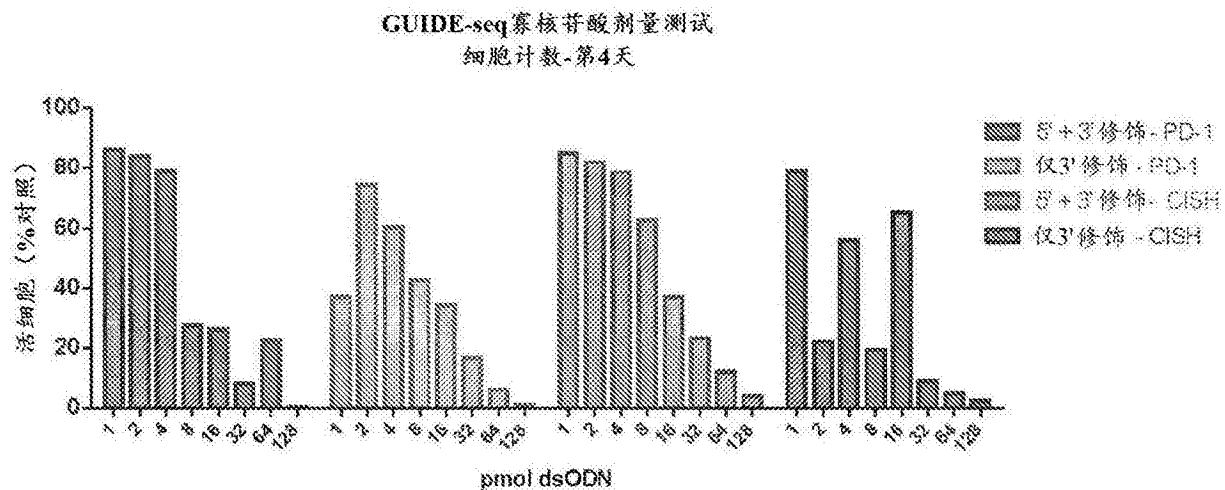
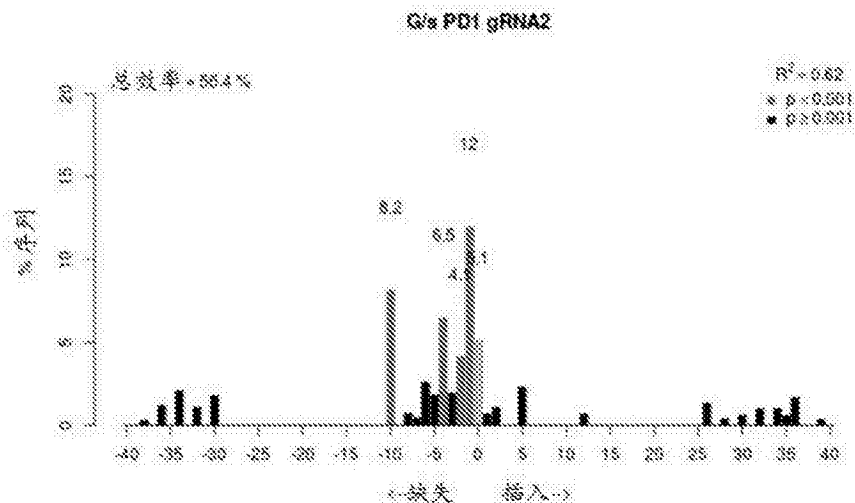


图76A

PD-1 gRNA#2
总效率 =
58.4%



CISH gRNA#2
总效率 =
85.1%

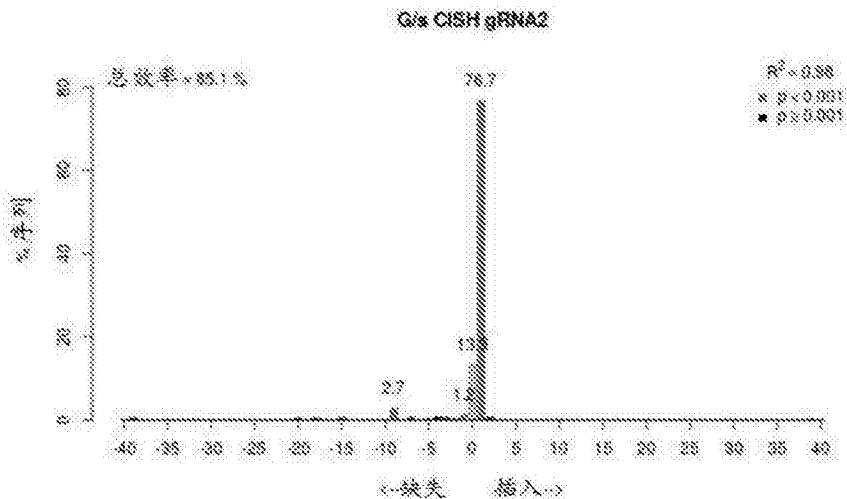


图76B

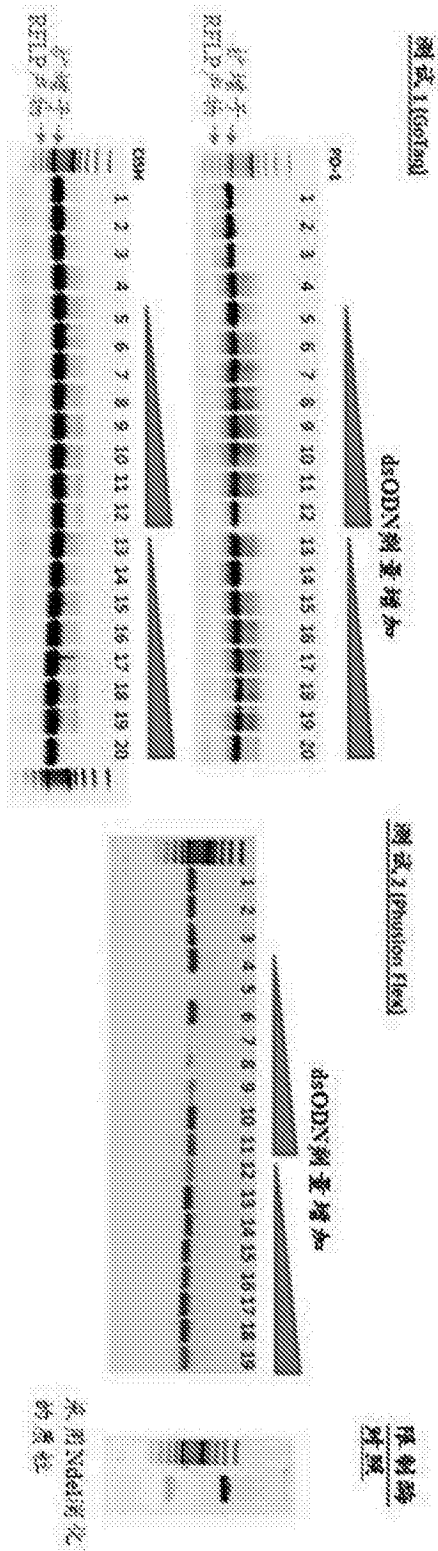


图77

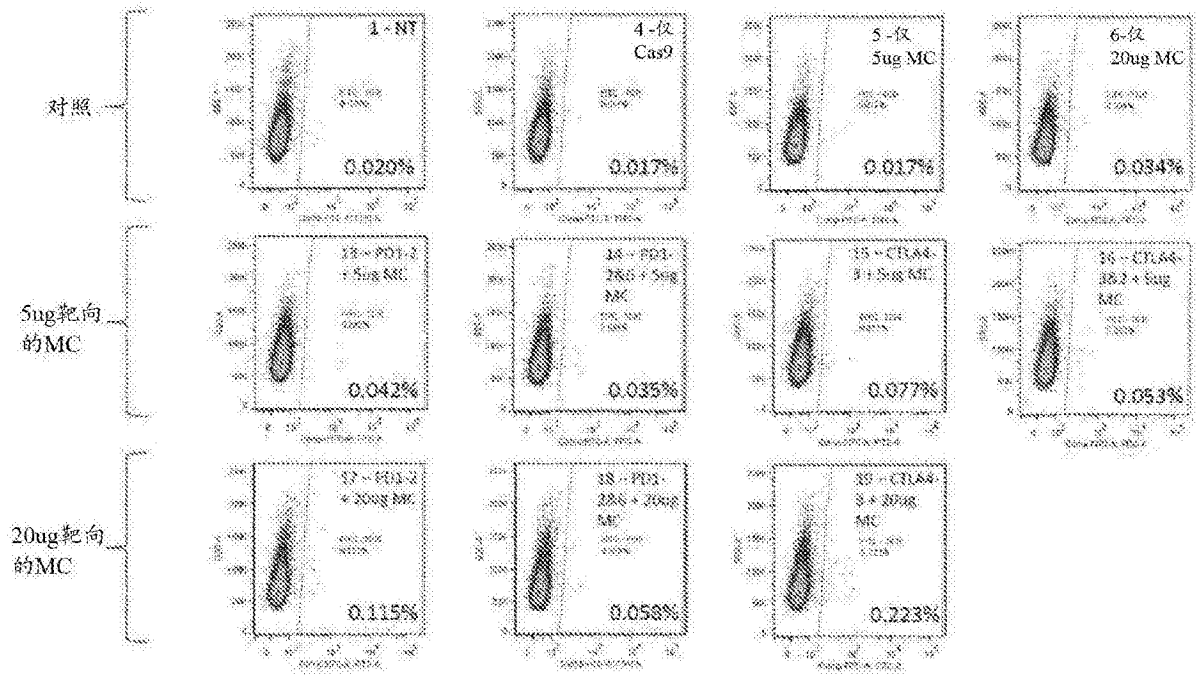


图78

GEN1 TCR 染色-第15天

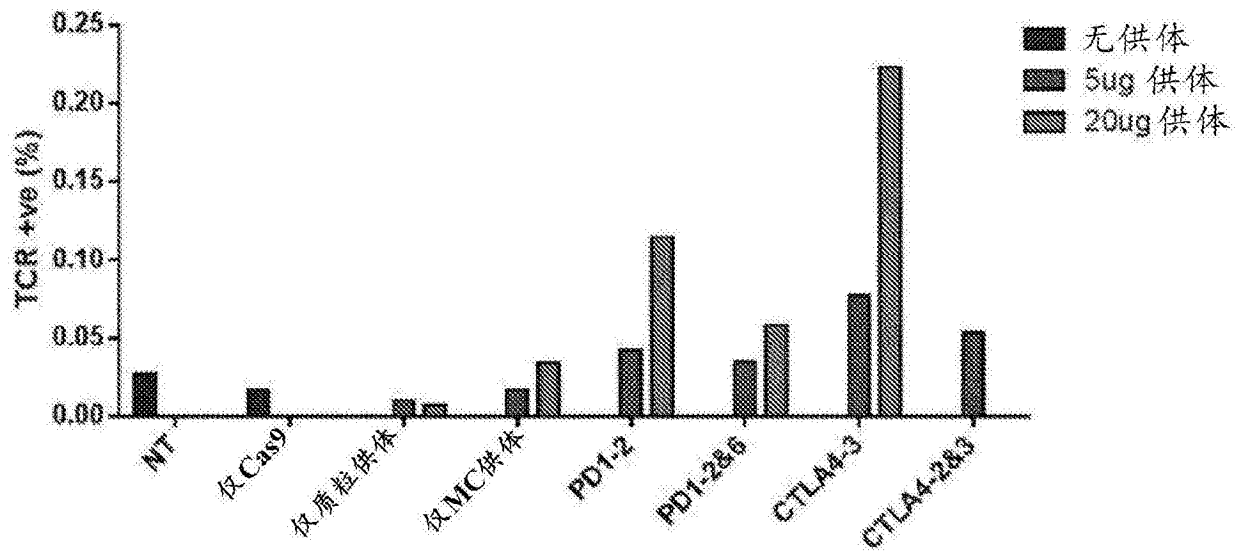


图79

mTCRb ddPCR - 第4天

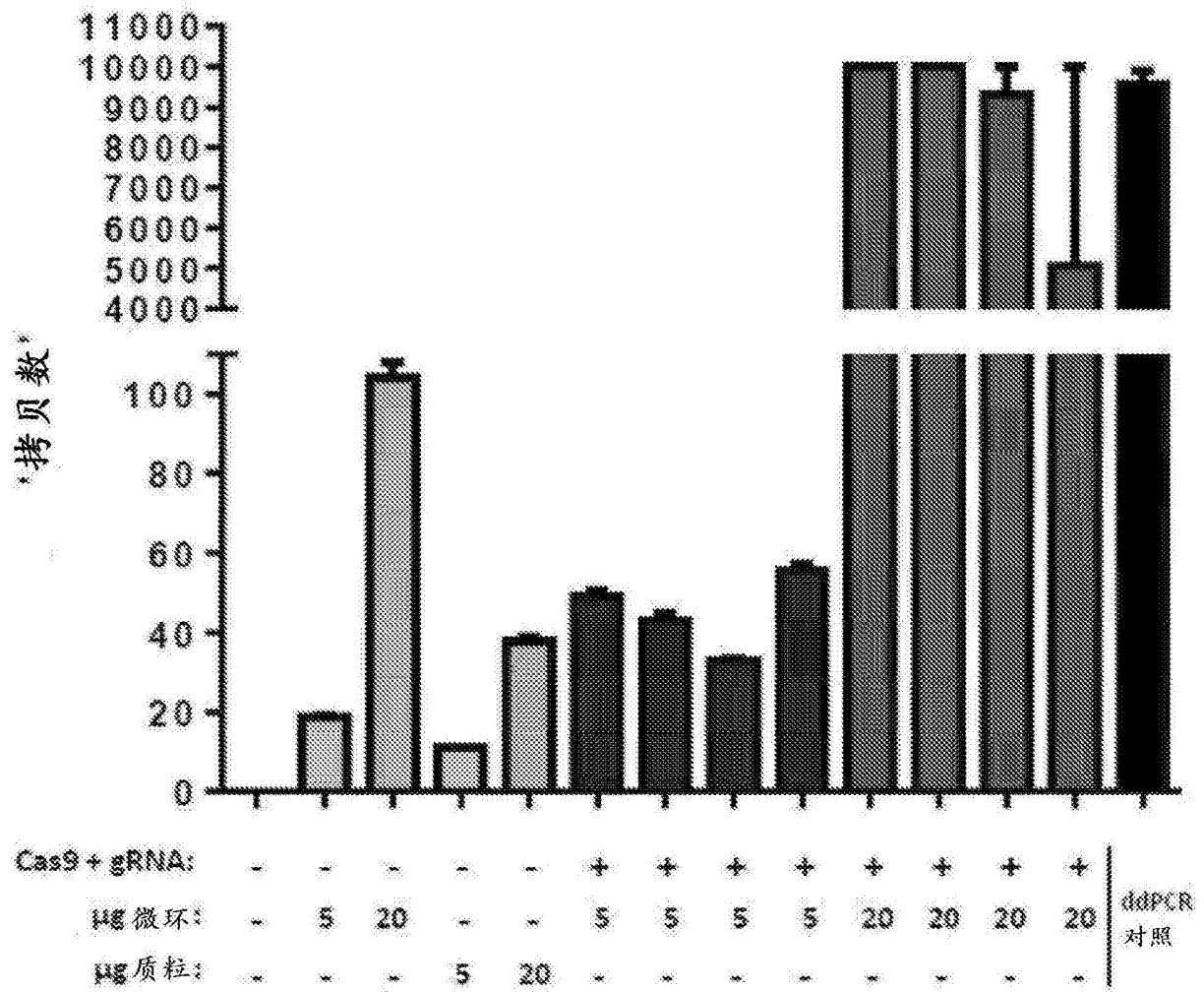


图80

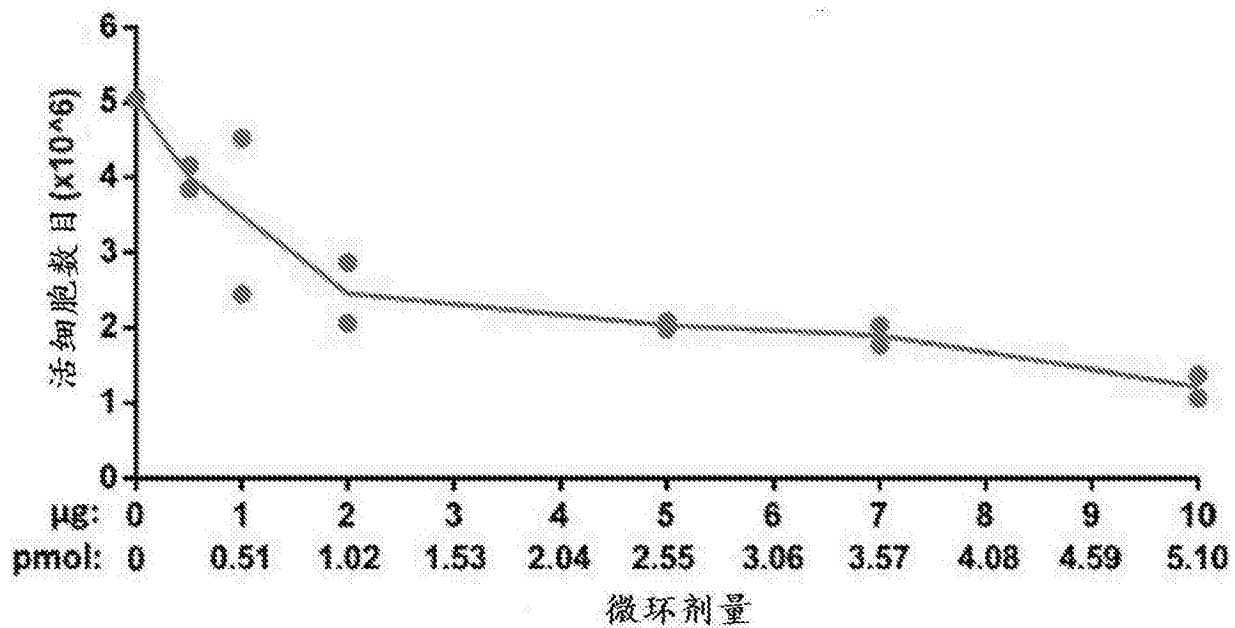


图81A

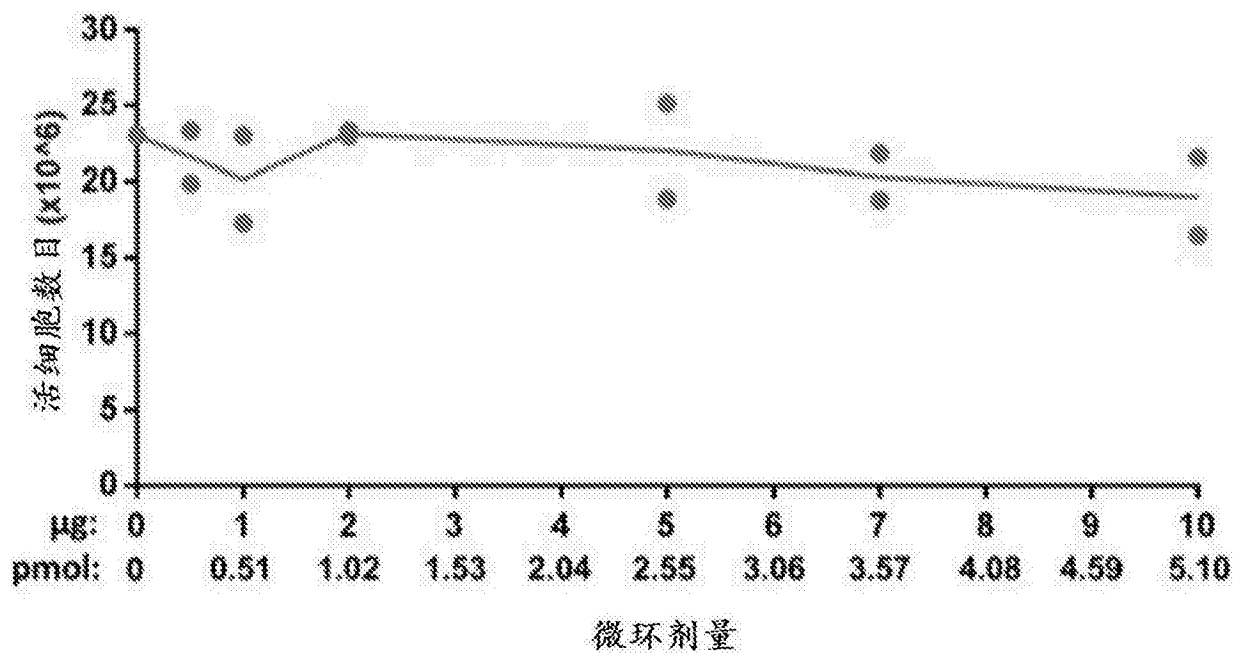


图81B

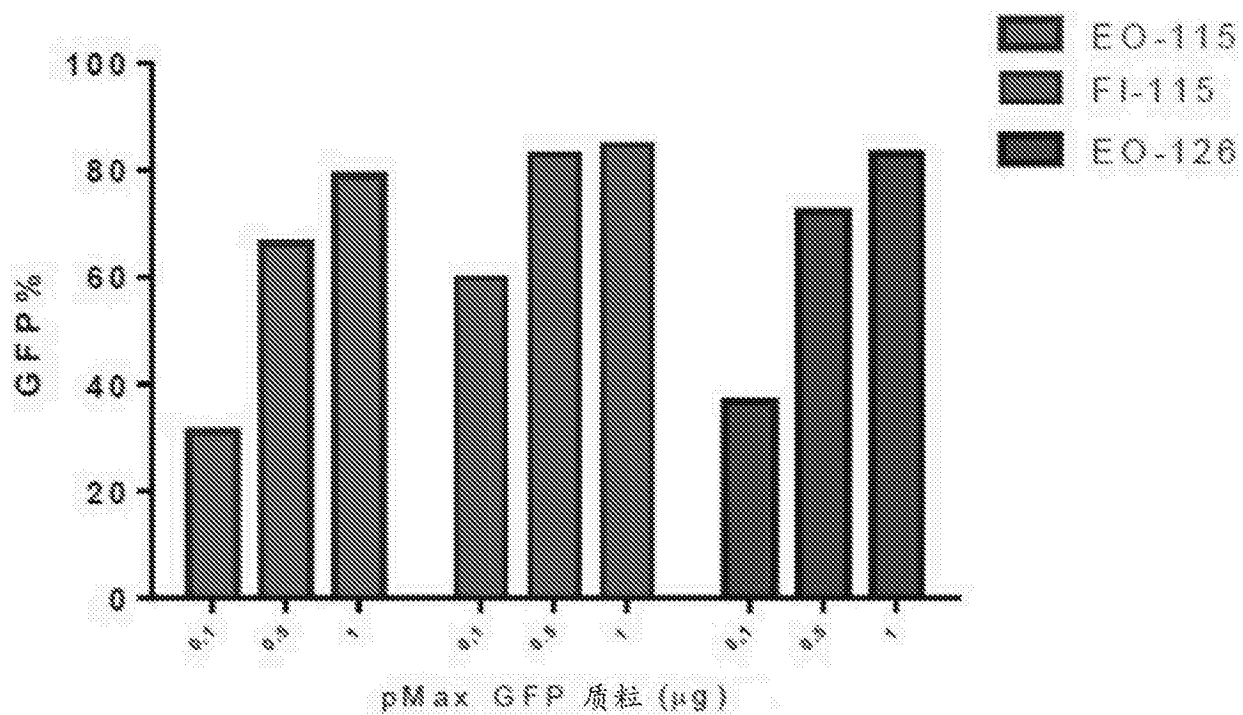


图82A

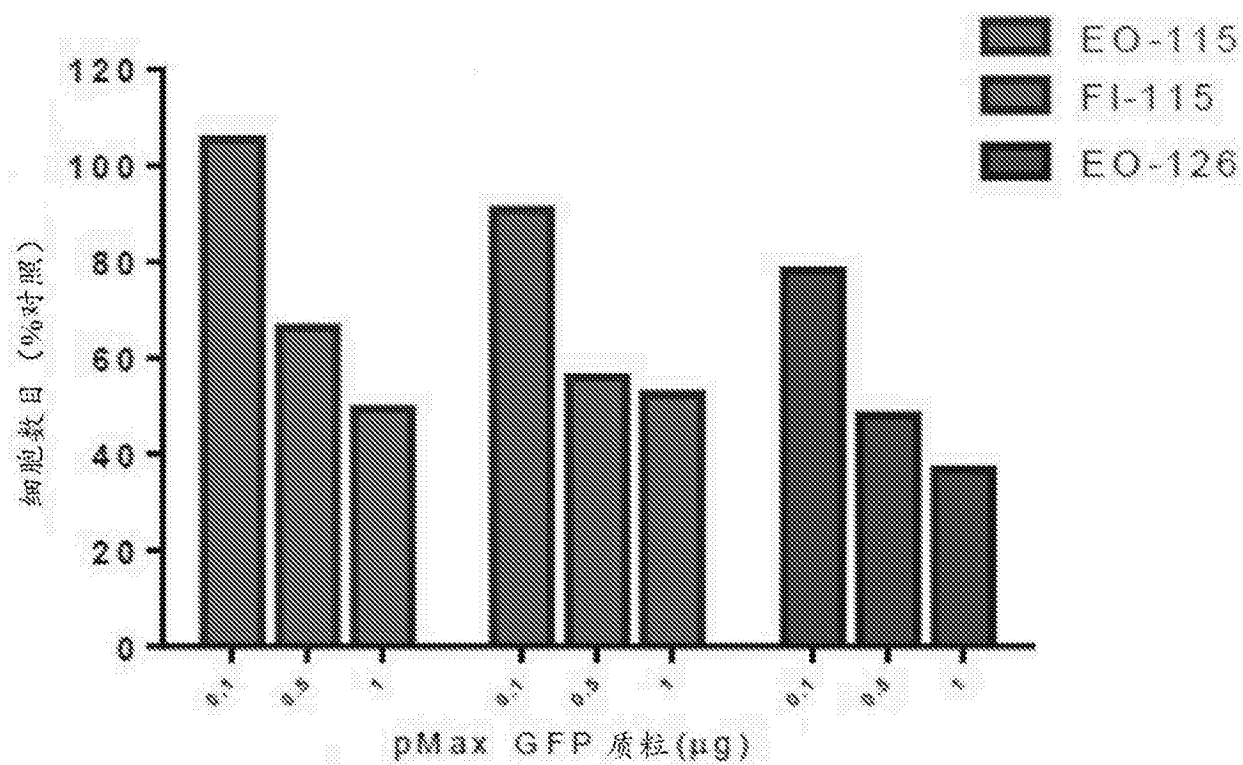


图82B

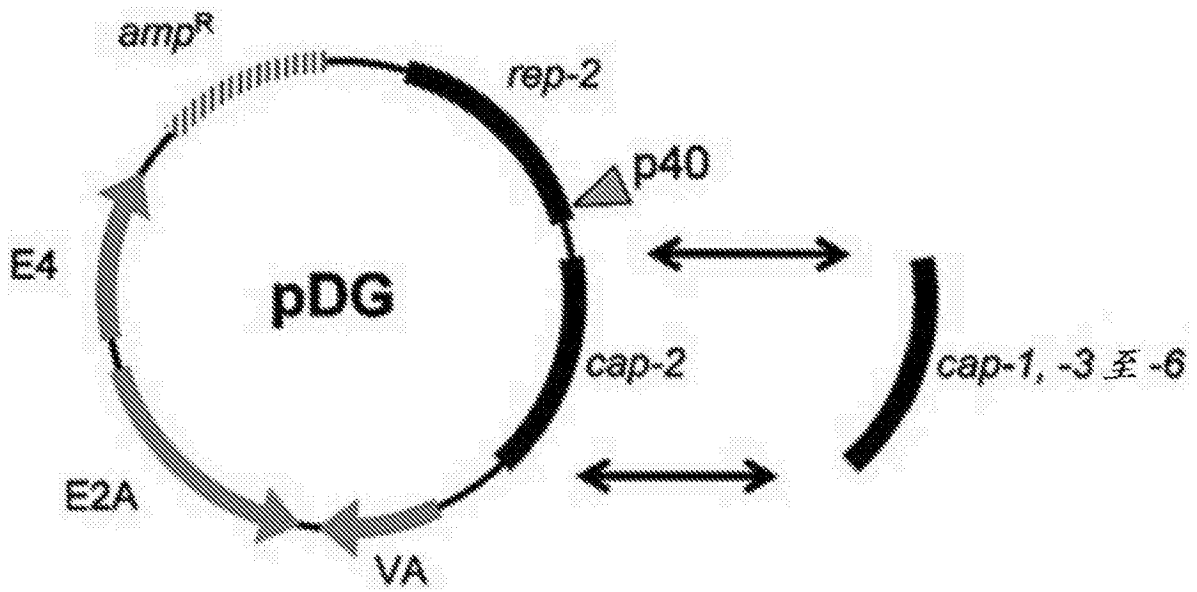


图83A

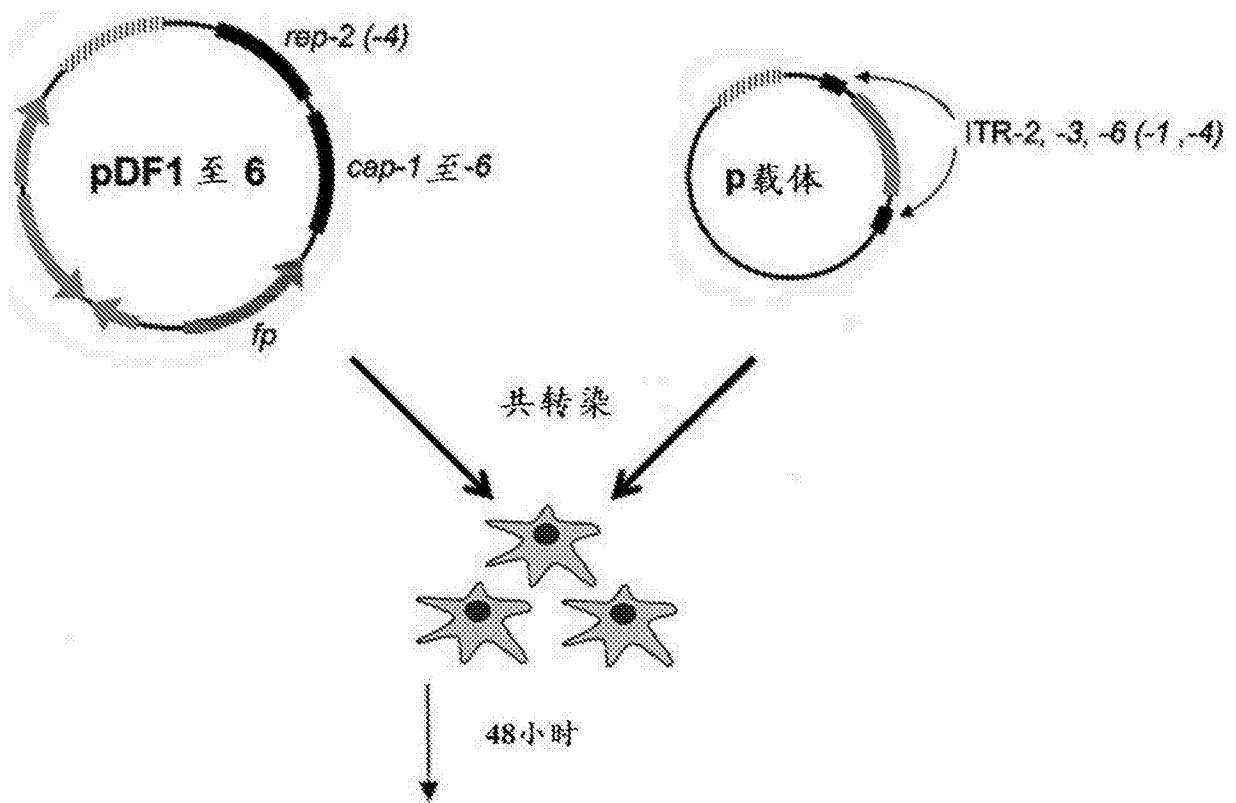


图83B

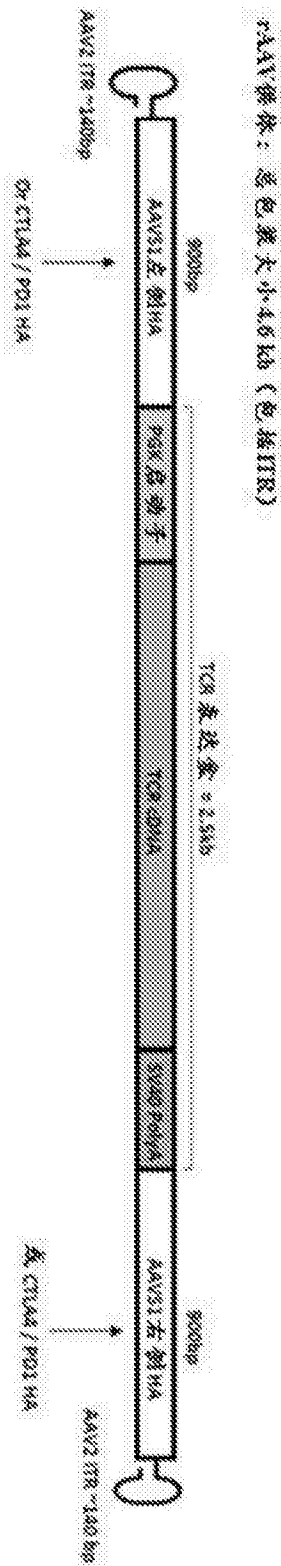


图84

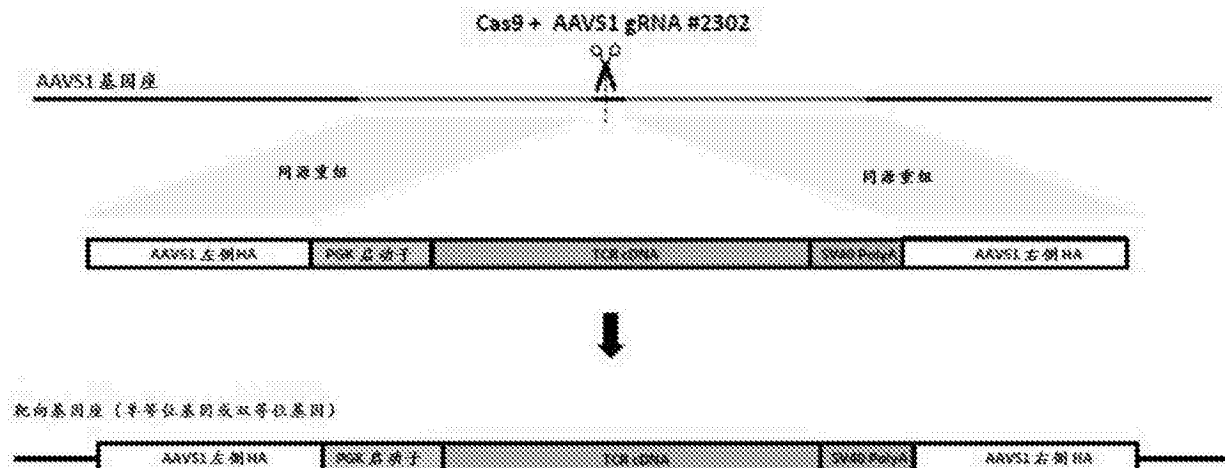


图85

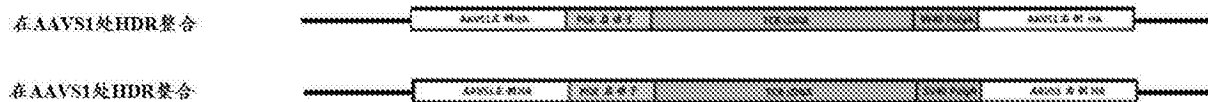


图86A

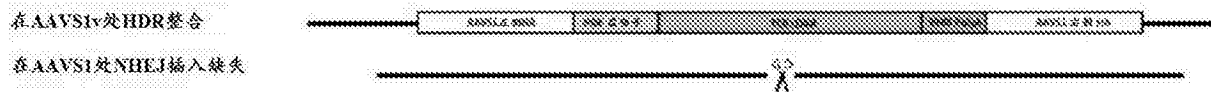


图86B



图86C

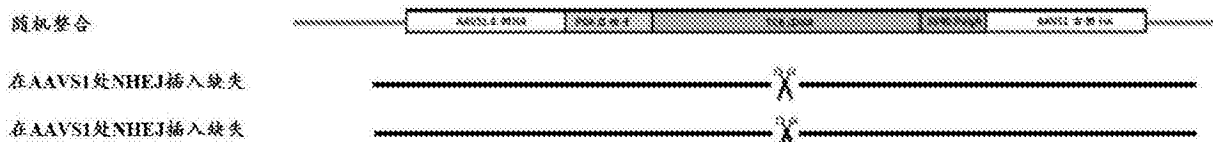


图86D

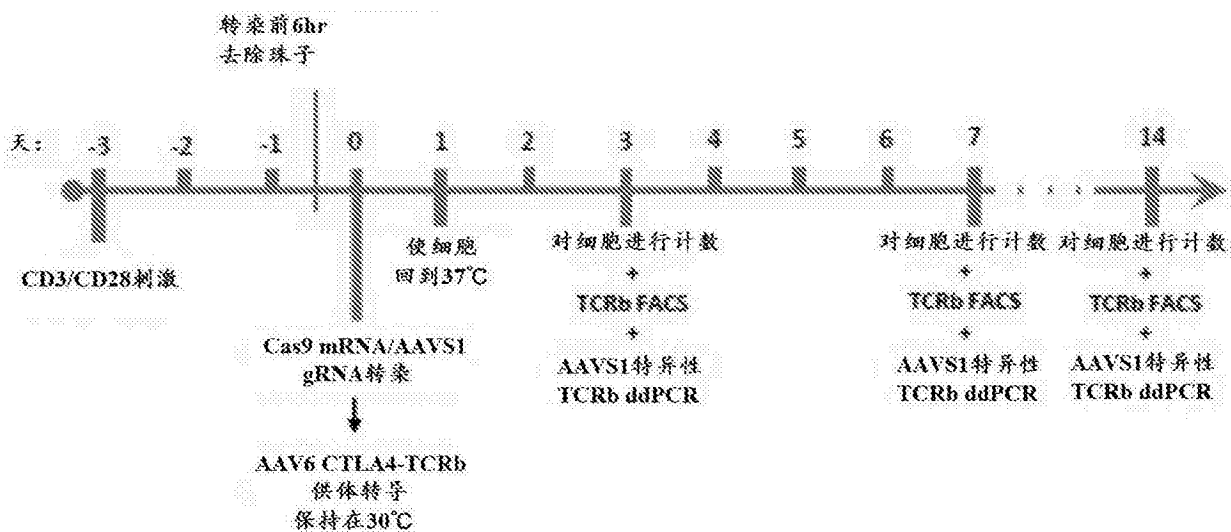


图87

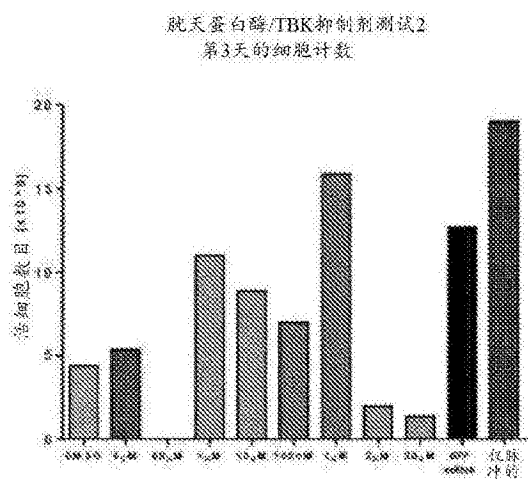


图 88A

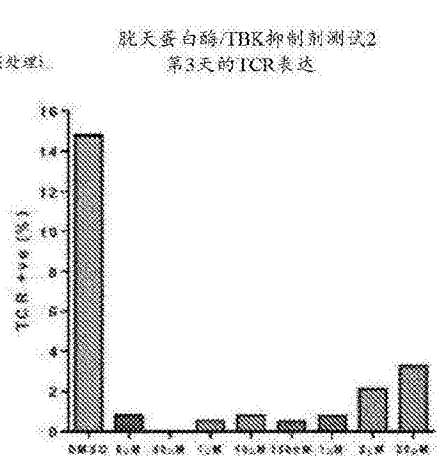


图 88B

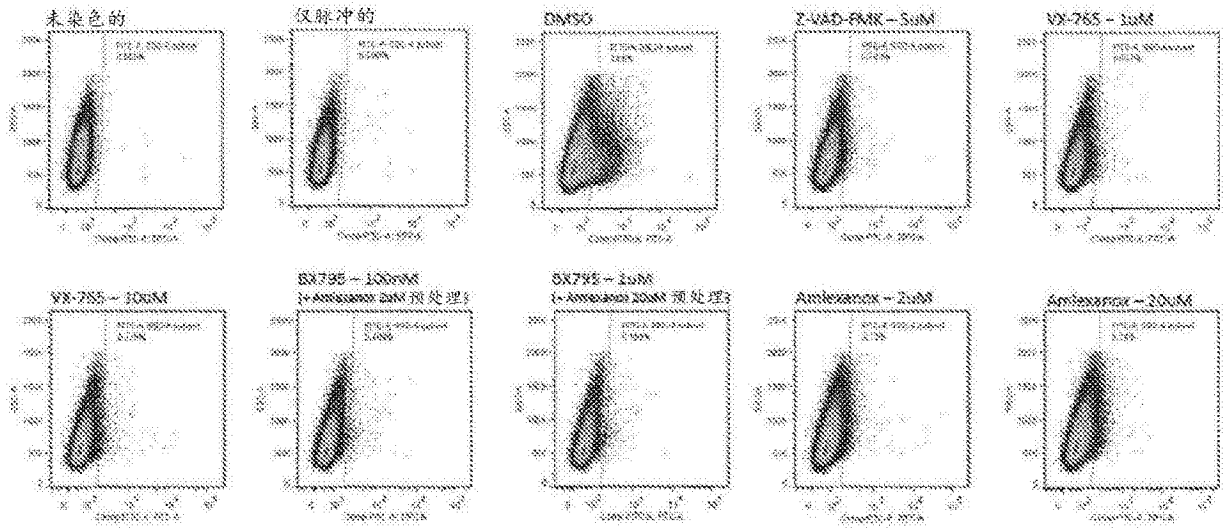


图89

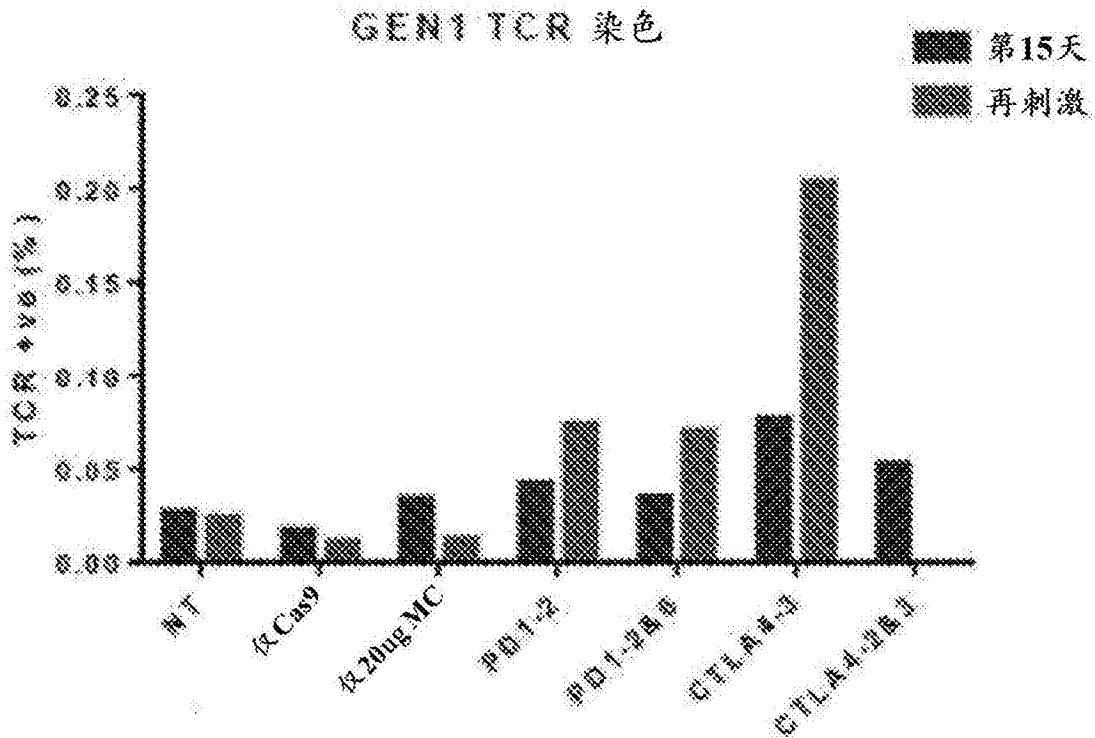


图90A

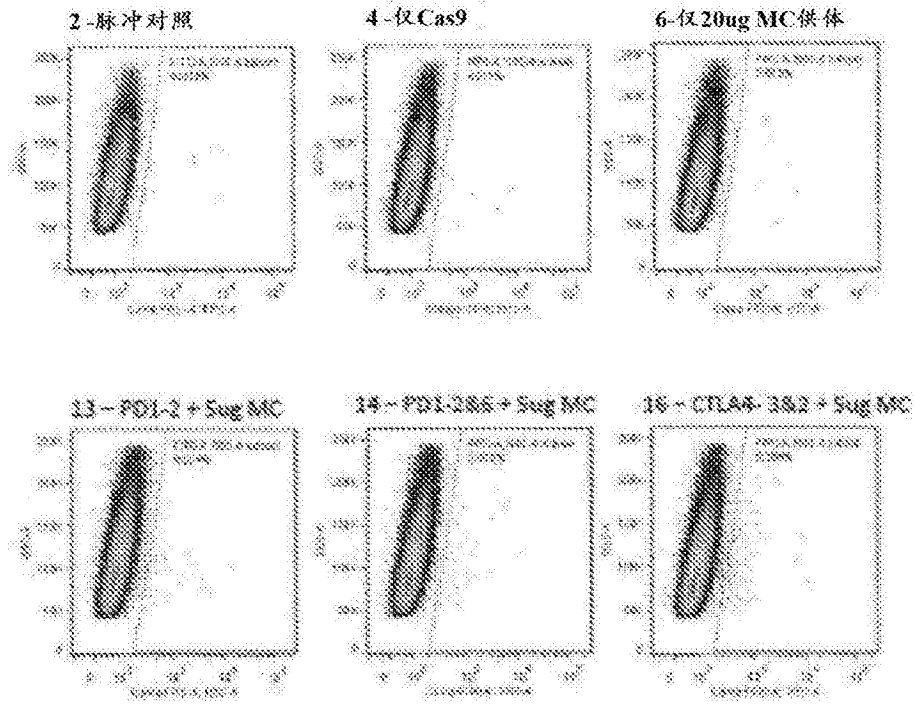


图90B

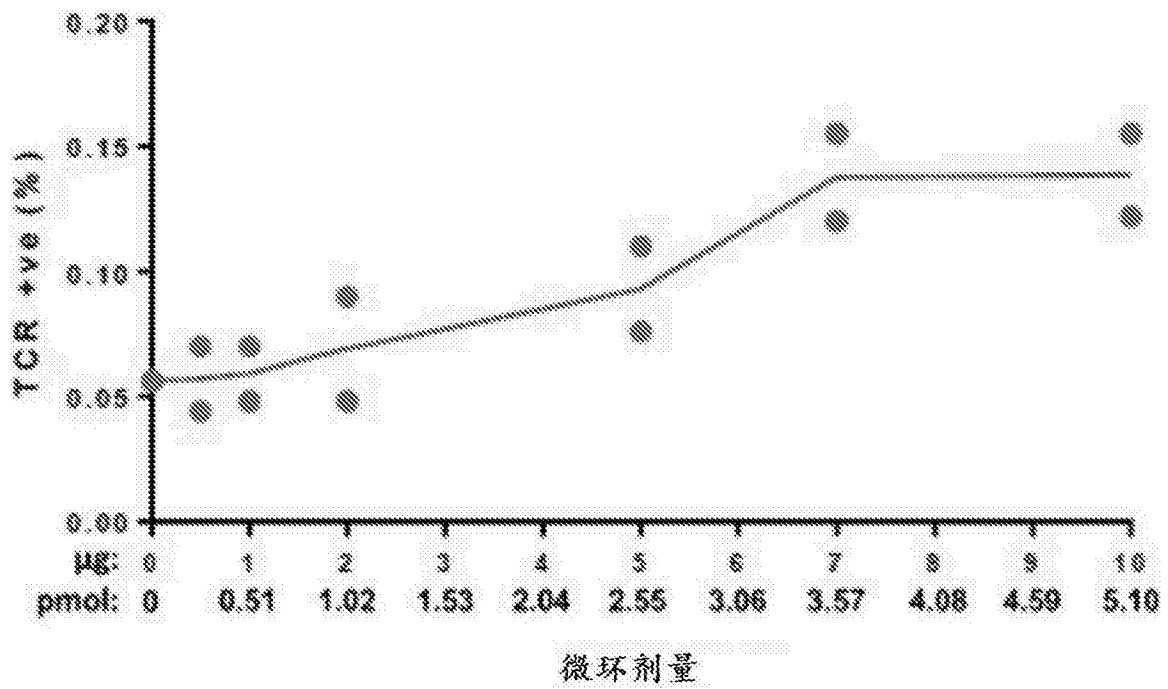


图91

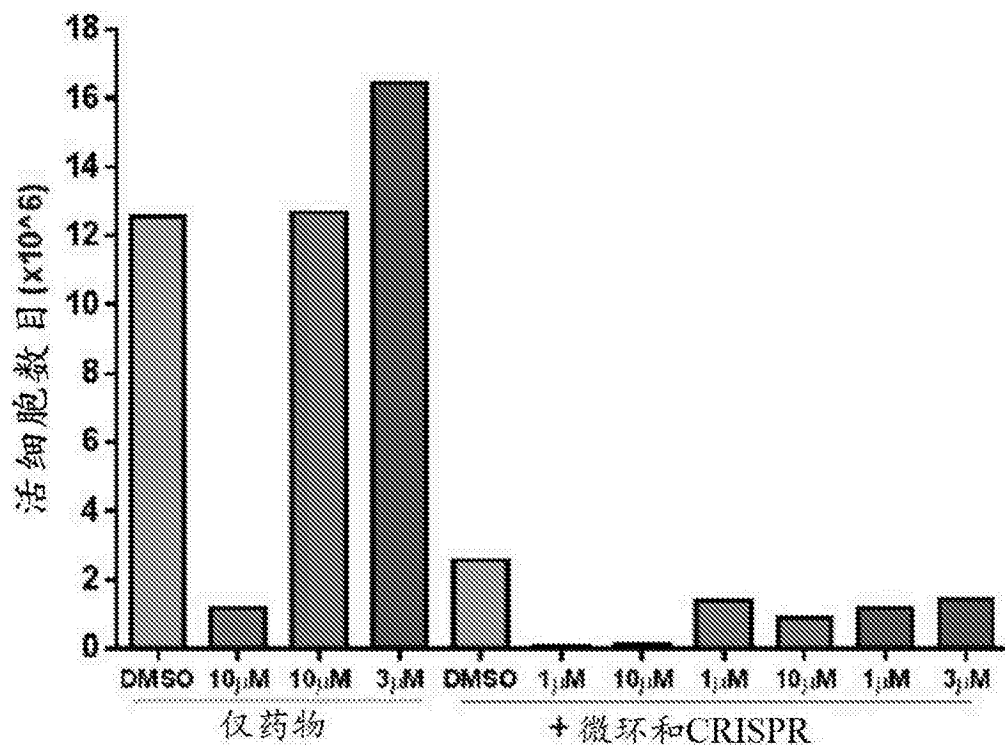


图92A

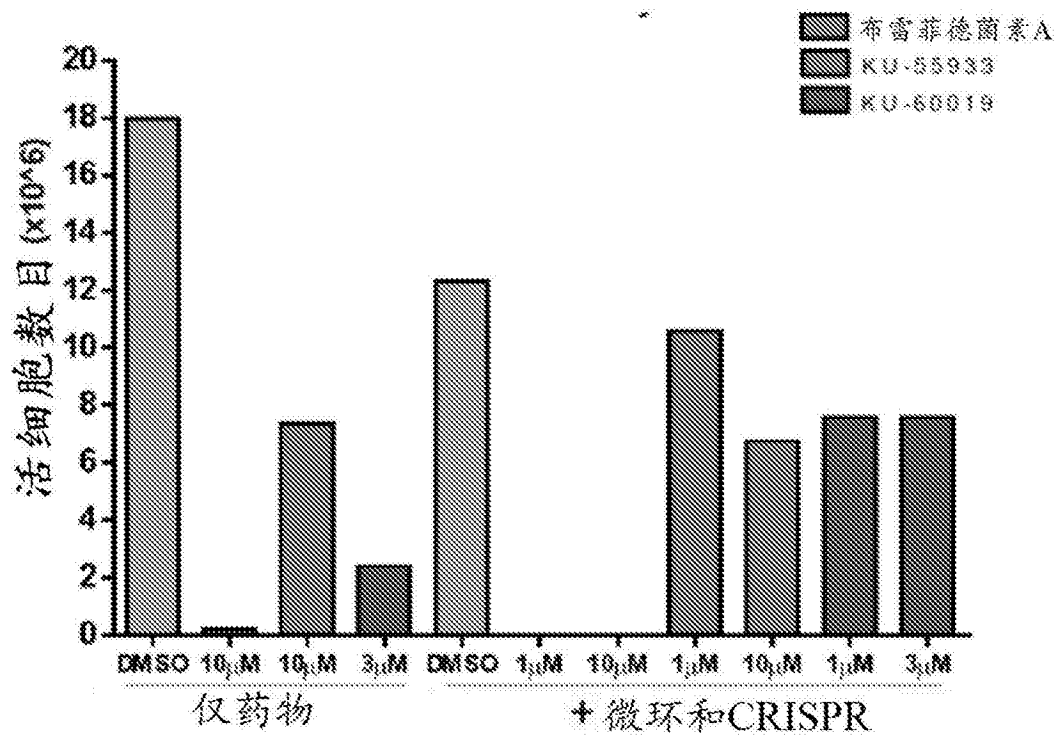


图92B

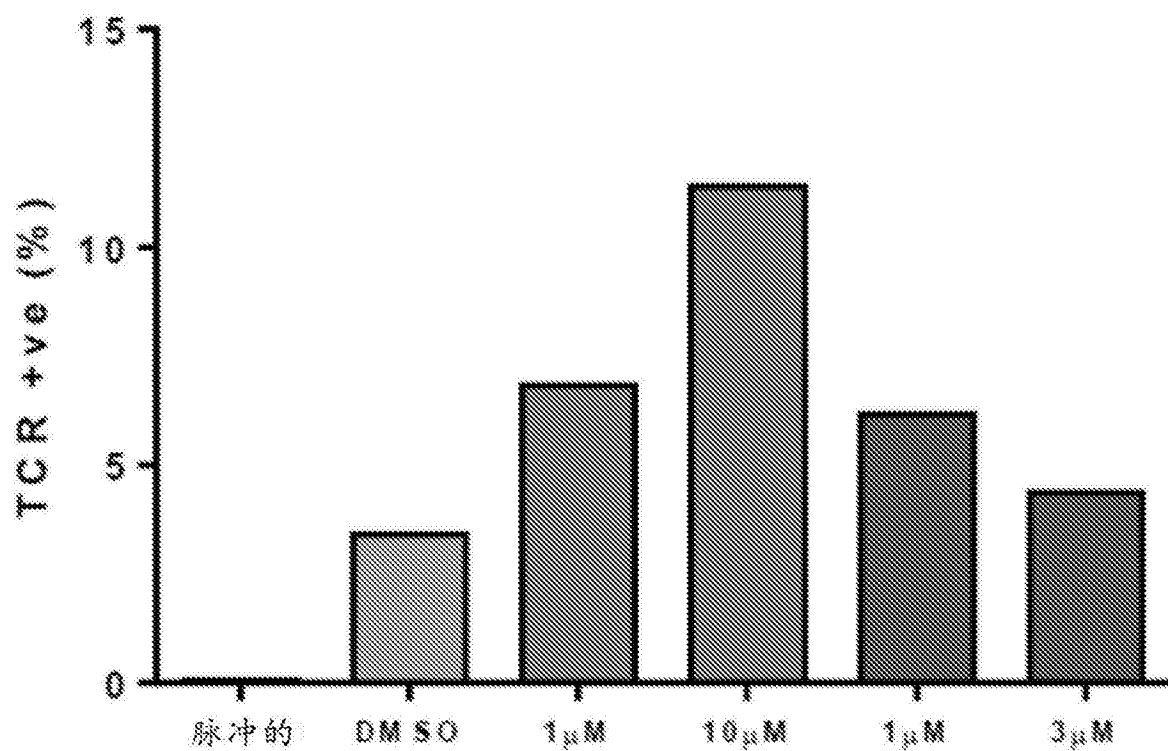


图93A

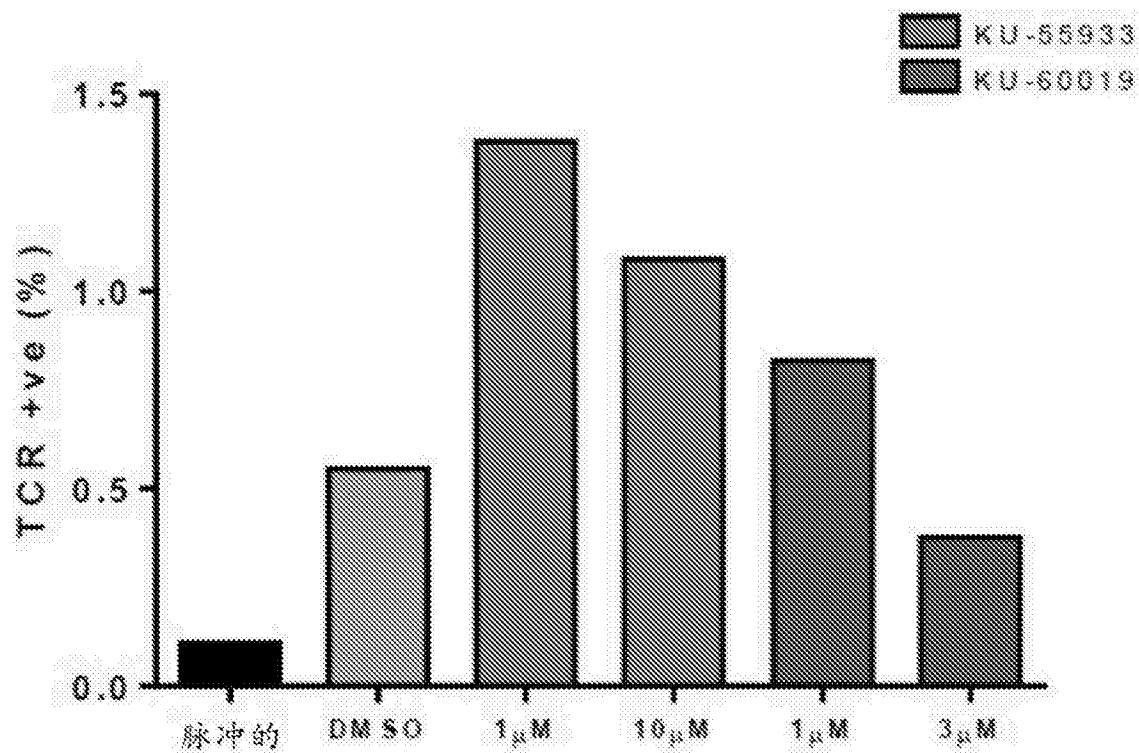


图93B

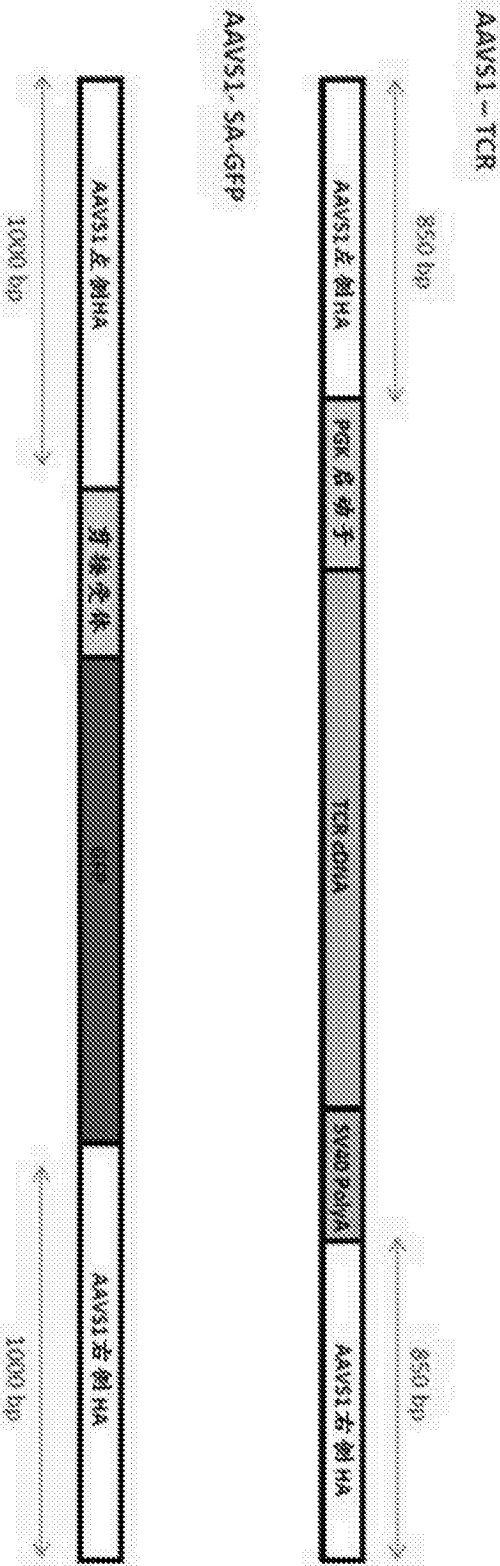


图96

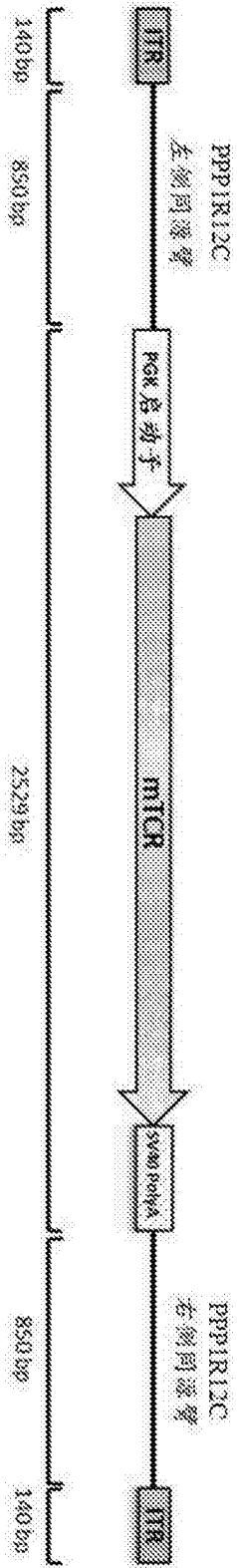


图97

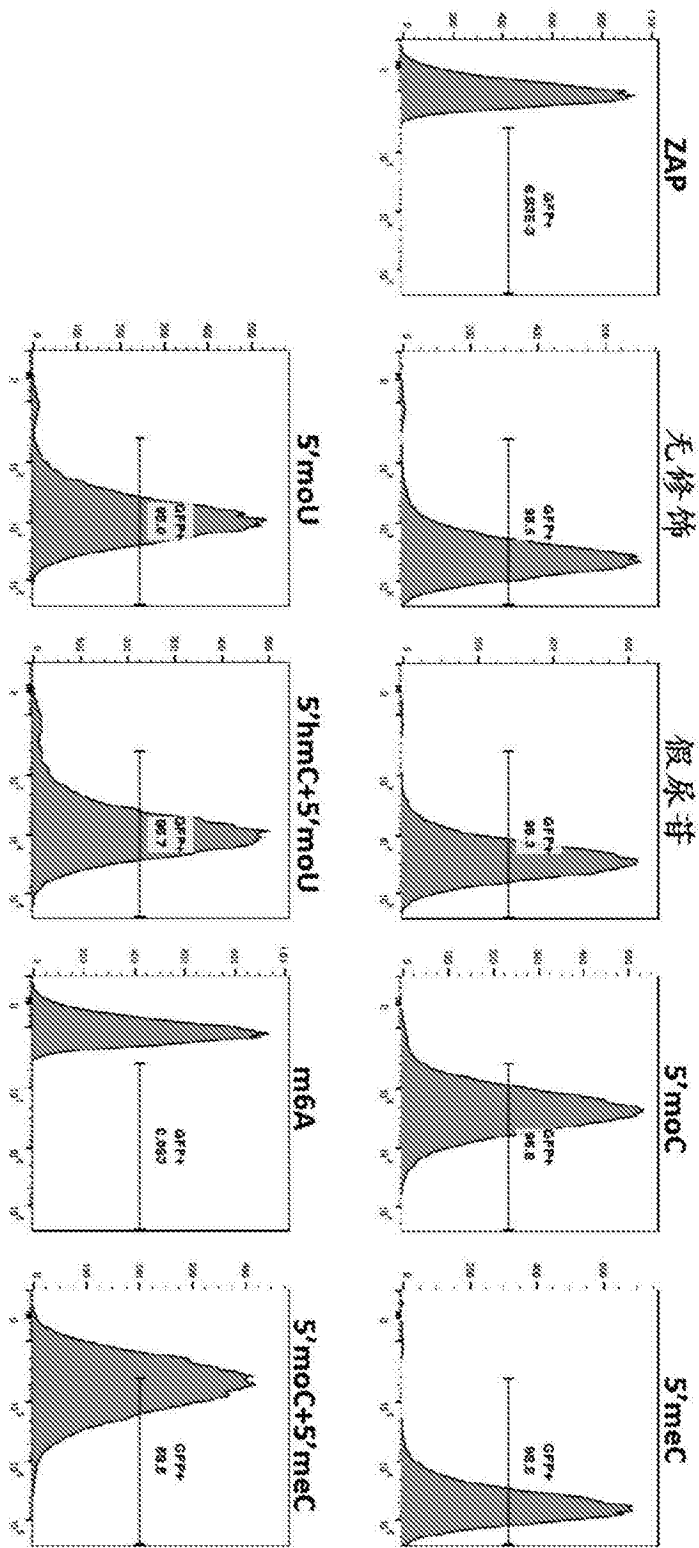


图98

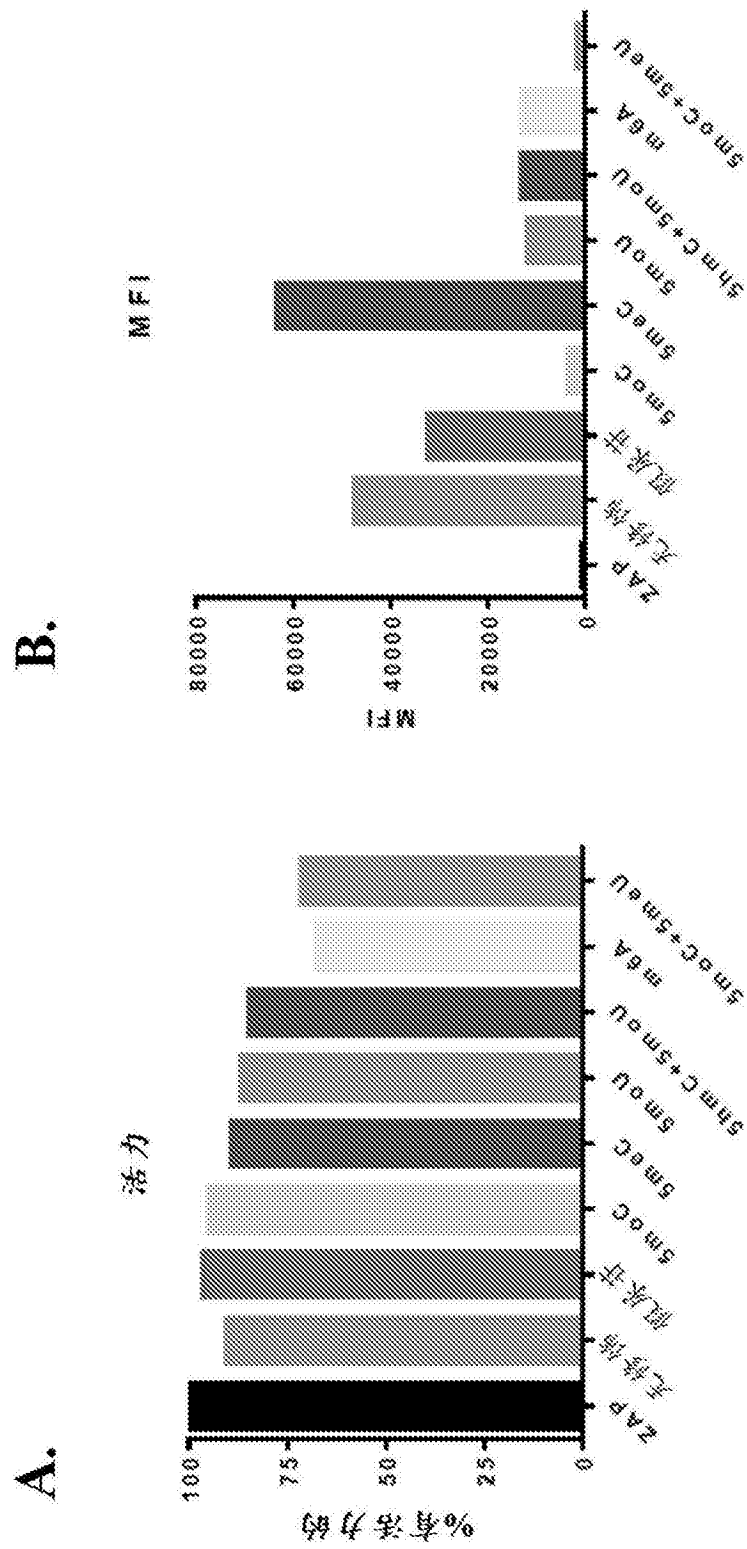


图99

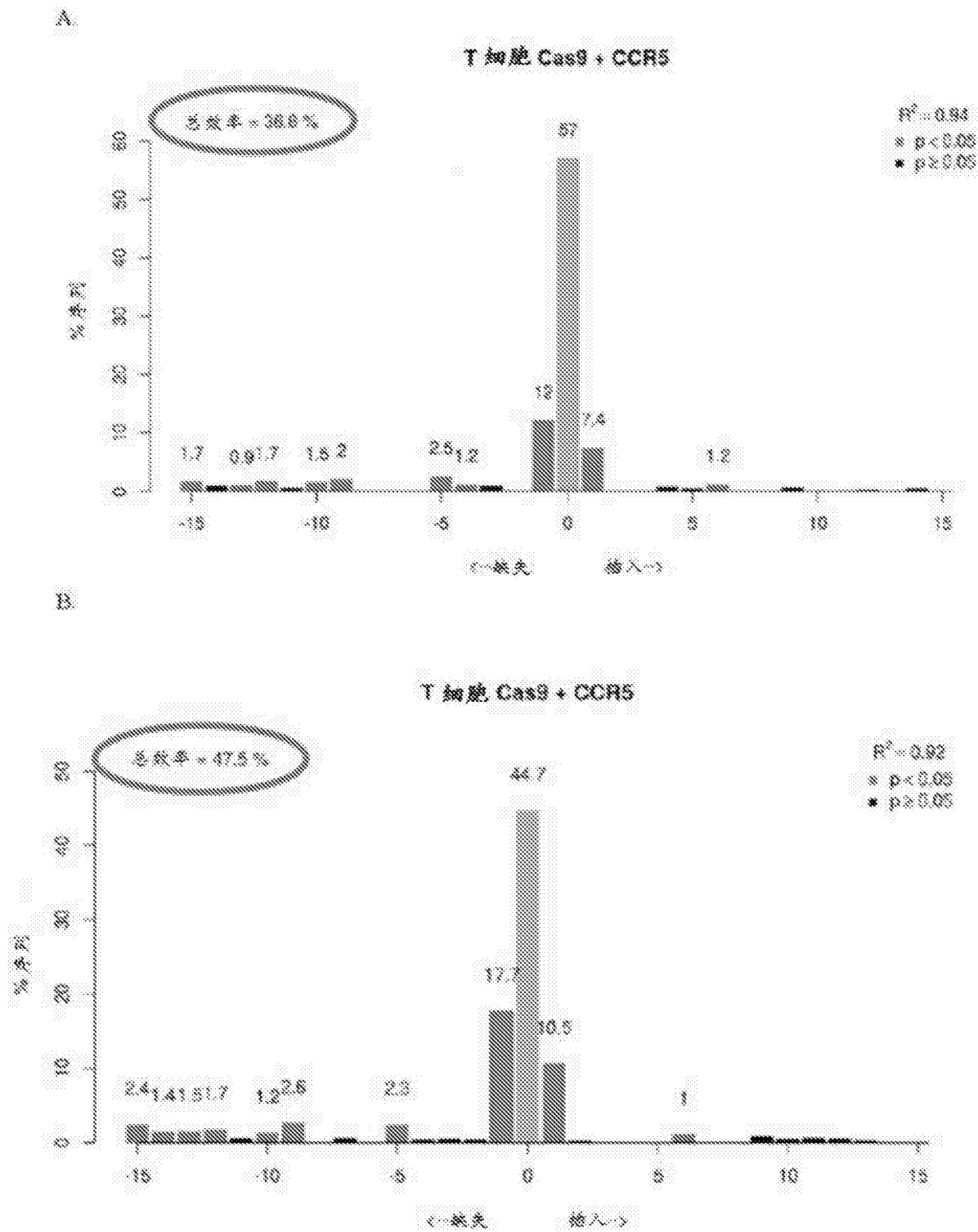
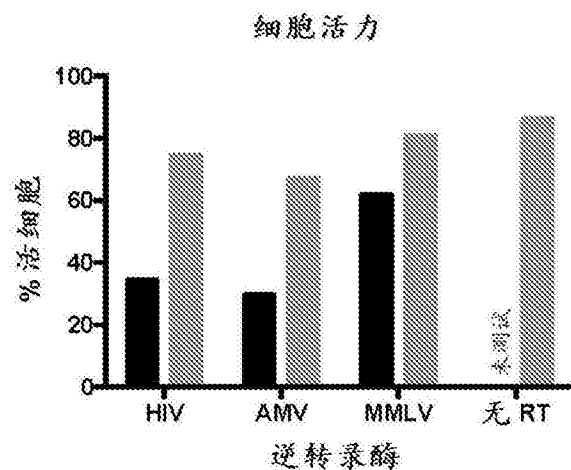
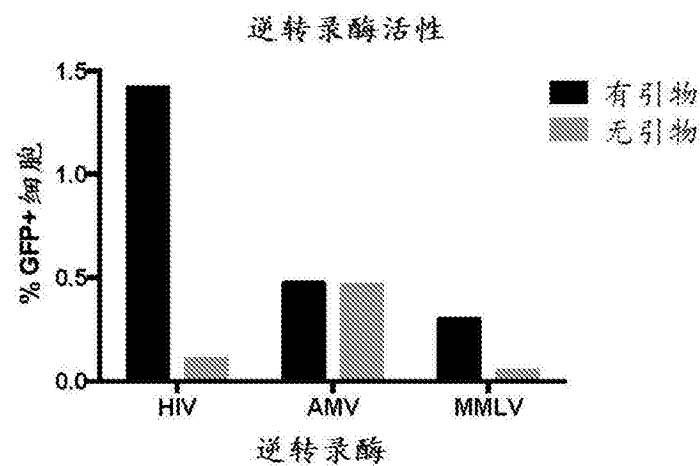


图100

A.



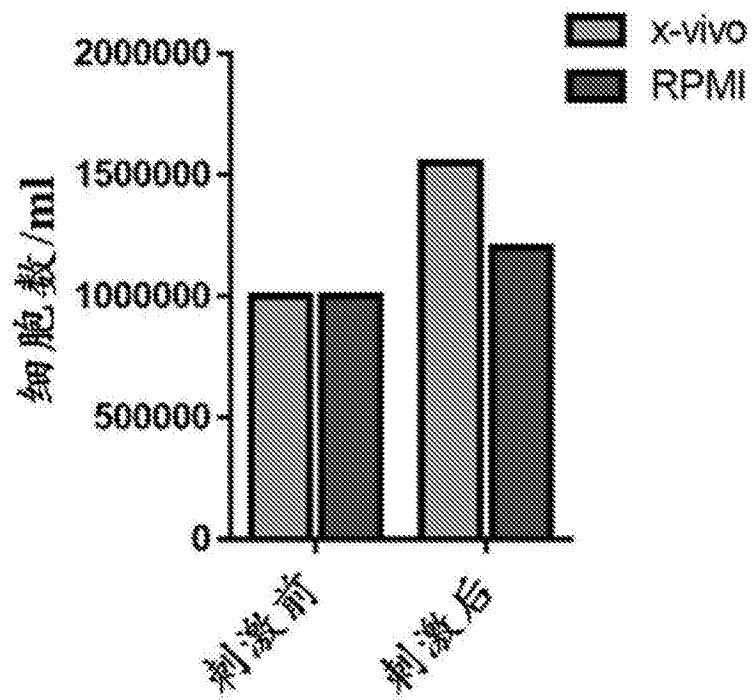
B.



有引物			无引物		
HIV	AMV	MMLV	HIV	AMV	MMLV
100万个细胞	100万个细胞	100万个细胞	100万个细胞	100万个细胞	100万个细胞
2ug HIV RTp66酶	2ug AMV RTlarge酶	2ug MMLV RT酶	2ug HIV RTp66酶	2ug AMV RTlarge酶	2ug MMLV RT酶
2ug HIV RTp51酶	2ug AMV RTsmall酶		2ug HIV RTp51酶	2ug AMV RTsmall酶	
125 pmol正向引物	125 pmol正向引物	125 pmol正向引物			
125 pmol反向引物	125 pmol反向引物	125 pmol反向引物			

图101

A.



B.

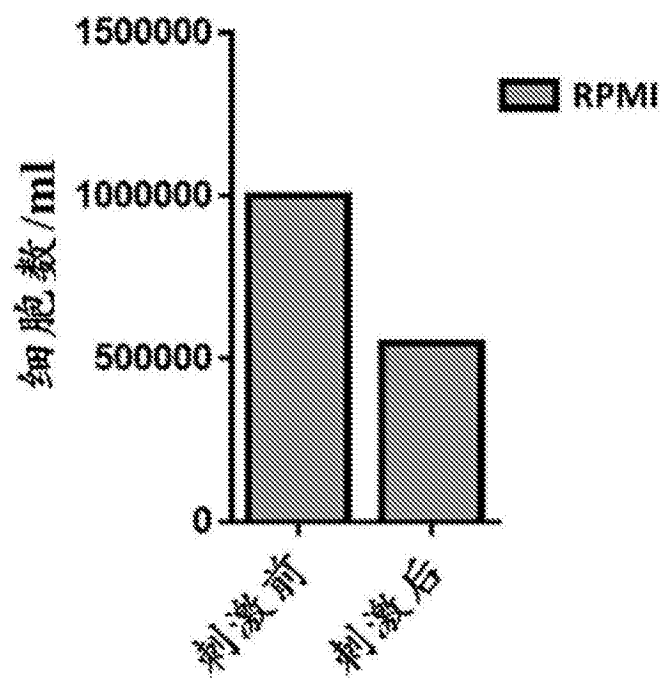
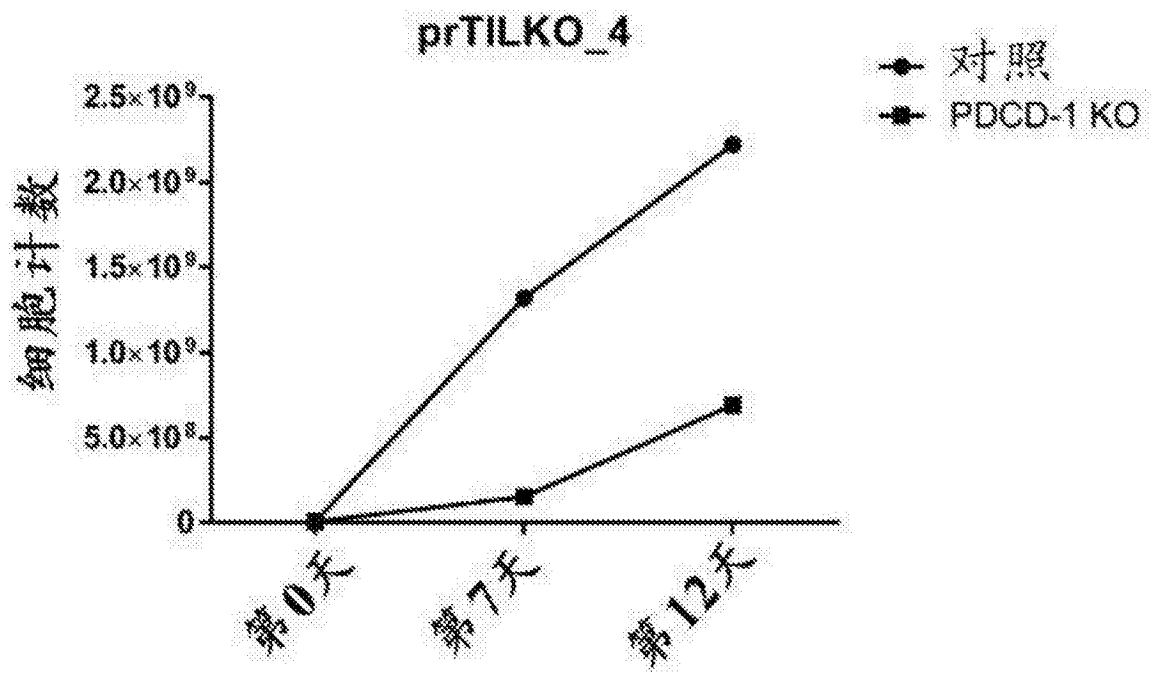


图102

A.



B.

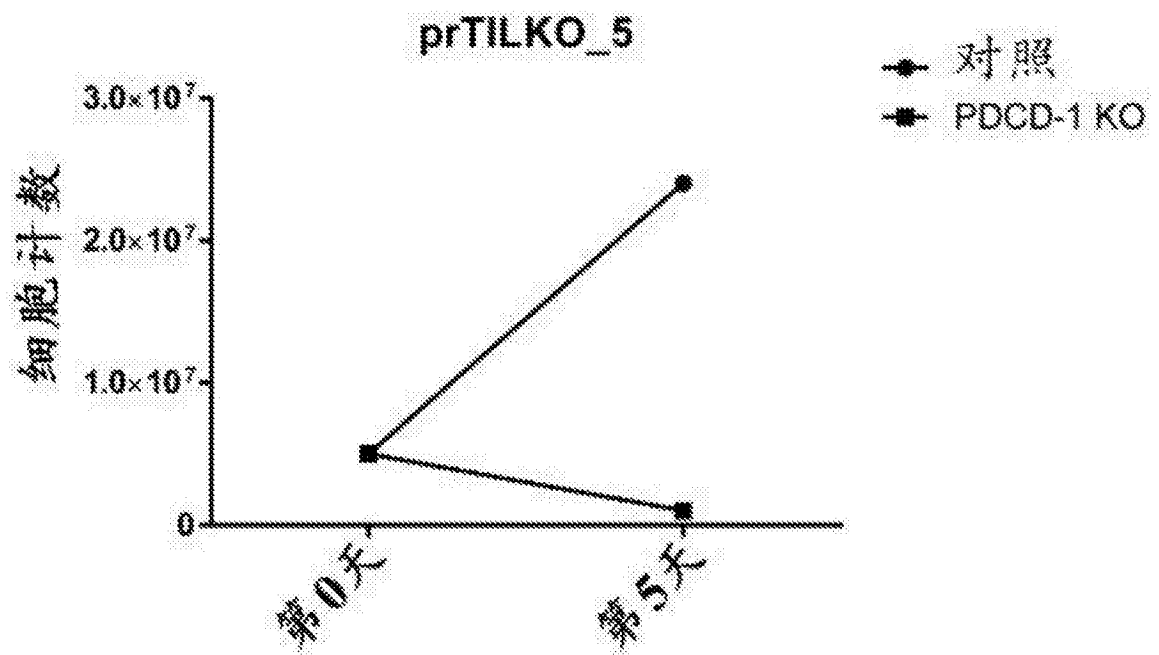
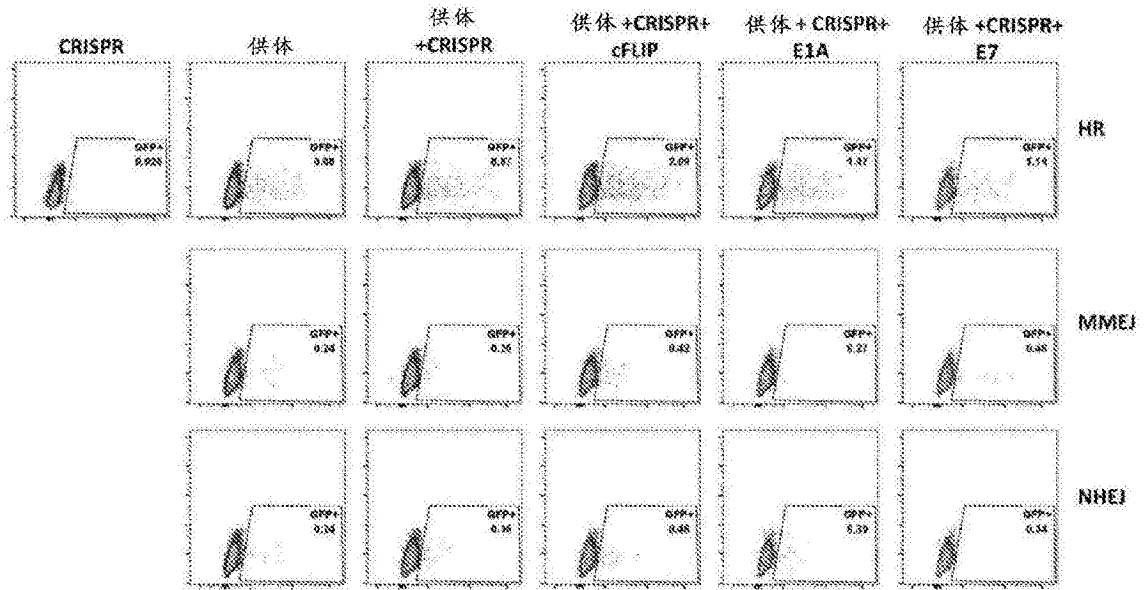


图103

A.



B.

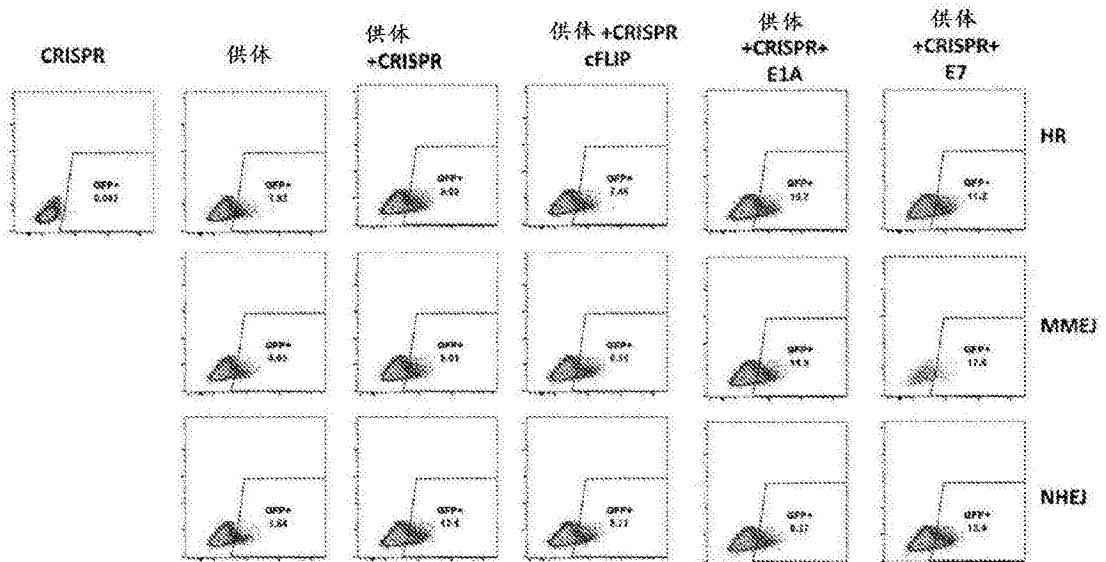


图104