(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119032102 A
(43)申请公布日 2024.11.26

(21)申请号 202380034675.5
(22)申请日 2023.02.17
(30)优先权数据
63/311,143 2022.02.17 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.10.17
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2023/013364 2023.02.17
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/158836 EN 2023.08.24
(71)申请人 萨那生物技术股份有限公司
地址 美国
(72)发明人 A·J·约翰逊 W·道德勒 N·H·基普尼斯
(74)专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所有限公司 11038
专利代理师 傅宇昌
(51)Int.Cl.
C07K 14/47(2006.01)
C07K 14/705(2006.01)
C07K 14/71(2006.01)
C07K 16/18(2006.01)
C12N 5/10(2006.01)
A61K 38/00(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
C07K 19/00(2006.01)

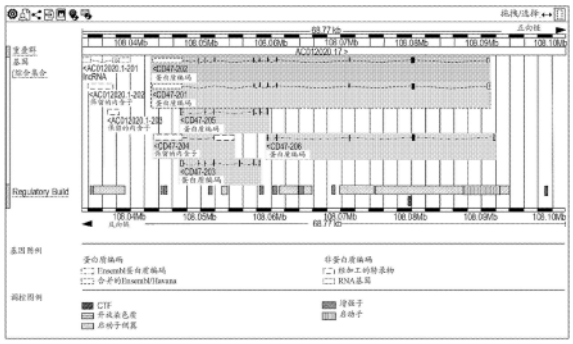
权利要求书49页 说明书444页 附图27页

(54)发明名称

经工程化的CD47蛋白及其用途

(57)摘要

本公开提供了经工程化的CD47蛋白及其用途。还公开了编码所述经工程化的CD47蛋白的多核苷酸、包含所述多核苷酸的载体、包含所述经工程化的蛋白质和/或载体的细胞,以及包含所述经工程化的CD47蛋白的组合物。



CN 119032102 A

1.一种核酸构建体,其包含编码经工程化的蛋白质的一个或多个核酸序列,所述经工程化的蛋白质包含:

(a).一个或多个细胞外结构域;和

(b).一个或多个膜栓系物;

其中所述一个或多个细胞外结构域包含信号调控蛋白α(SIRPα)相互作用基序,并且

其中所述核酸构建体不包含编码一个或多个全长CD47细胞内结构域的核酸序列。

2.如权利要求1所述的核酸构建体,其中所述SIRPα相互作用基序是或者包含CD47细胞外结构域或其部分。

3.如权利要求2所述的核酸构建体,其中所述CD47细胞外结构域是或者包含CD47免疫球蛋白可变(IgV)样结构域。

4.如权利要求1或2所述的核酸构建体,其中所述CD47细胞外结构域是人CD47细胞外结构域。

5.如权利要求2-4中任一项所述的核酸构建体,其中所述CD47细胞外结构域由与SEQ ID NO:52具有至少80%同一性的核酸序列编码。

6.如权利要求2-4中任一项所述的核酸构建体,其中所述CD47细胞外结构域由与SEQ ID NO:53具有至少80%同一性的核酸序列编码。

7.如权利要求2-4中任一项所述的核酸构建体,其中所述CD47细胞外结构域由与SEQ ID NO:57具有至少80%同一性的核酸序列编码。

8.如权利要求2-4中任一项所述的核酸构建体,其中所述CD47细胞外结构域由与SEQ ID NO:59具有至少80%同一性的核酸序列编码。

9.如权利要求1所述的核酸构建体,其中所述SIRPα相互作用基序是或者包含SIRPα抗体或其部分。

10.如权利要求1-9中任一项所述的核酸构建体,其中所述一个或多个膜栓系物是或者包含跨膜结构域。

11.如权利要求10所述的核酸构建体,其中所述跨膜结构域是或者包括CD3ζ、CD8a、CD16a、CD28、CD32a、CD32c、CD40、CD47、CD64、ICOS、Dectin-1、DNGR1、EGFR、GPCR、MyD88、PDGFR、SLAMF7、TRL1、TLR2、TLR3、TRL4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9或VEGFR跨膜结构域。

12.如权利要求10或11所述的核酸构建体,其中所述跨膜结构域是或者包括CD47跨膜结构域。

13.如权利要求10-12中任一项所述的核酸构建体,其中所述跨膜结构域由与SEQ ID NO:54具有至少80%同一性的核酸序列编码。

14.如权利要求10-12中任一项所述的核酸构建体,其中所述跨膜结构域由与SEQ ID NO:56具有至少80%同一性的核酸序列编码。

15.如权利要求10-12中任一项所述的核酸构建体,其中所述跨膜结构域由与SEQ ID NO:58具有至少80%同一性的核酸序列编码。

16.如权利要求10-12中任一项所述的核酸构建体,其中所述跨膜结构域由与SEQ ID NO:60具有至少80%同一性的核酸序列编码。

17.如权利要求10-12中任一项所述的核酸构建体,其中所述跨膜结构域由与SEQ ID NO:62具有至少80%同一性的核酸序列编码。

18.如权利要求10或11所述的核酸构建体,其中所述跨膜结构域是或者包括CD8a跨膜结构域。

19.如权利要求10、11或18所述的核酸构建体,其中所述跨膜结构域由与SEQ ID NO:69具有至少80%同一性的核酸序列编码。

20.如权利要求10或11所述的核酸构建体,其中所述跨膜结构域是或者包括CD28跨膜结构域。

21.如权利要求10、11或20所述的核酸构建体,其中所述跨膜结构域由与SEQ ID NO:71具有至少80%同一性的核酸序列编码。

22.如权利要求10或11所述的核酸构建体,其中所述跨膜结构域是或者包括PDGFR跨膜结构域。

23.如权利要求10、11或22所述的核酸构建体,其中所述跨膜结构域由与SEQ ID NO:73具有至少80%同一性的核酸序列编码。

24.如权利要求1-9中任一项所述的核酸构建体,其中所述一个或多个膜栓系物是或者包括糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚。

25.如权利要求24所述的核酸构建体,其中所述GPI锚是或者包括DAF/CD55 GPI锚、TRAILR3 GPI锚或CD59 GPI锚。

26.如权利要求24或25所述的核酸构建体,其中所述GPI锚是或者包括DAF/CD55 GPI锚。

27.如权利要求24-26中任一项所述的核酸构建体,其中所述DAF/CD55 GPI锚由与SEQ ID NO:65具有至少80%同一性的核酸序列编码。

28.如权利要求24或25所述的核酸构建体,其中所述GPI锚是或者包括TRAILR3 GPI锚。

29.如权利要求24、25或28中任一项所述的核酸构建体,其中所述TRAILR3 GPI锚由与SEQ ID NO:66具有至少80%同一性的核酸序列编码。

30.如权利要求24、25或28中任一项所述的核酸构建体,其中所述TRAILR3 GPI锚由与SEQ ID NO:67具有至少80%同一性的核酸序列编码。

31.如权利要求24或25所述的核酸构建体,其中所述GPI锚是或者包括CD59 GPI锚。

32.如权利要求24、25或31中任一项所述的核酸构建体,其中所述CD59 GPI锚由与SEQ ID NO:68具有至少80%同一性的核酸序列编码。

33.如权利要求1-24中任一项所述的核酸构建体,其进一步包含一个或多个控制序列。

34.如权利要求33所述的核酸构建体,其中所述一个或多个控制序列编码细胞外信号肽。

35.如权利要求33或34所述的核酸构建体,其中所述细胞外信号肽由与SEQ ID NO:51具有至少80%同一性的核酸序列编码。

36.如权利要求33所述的核酸构建体,其中所述一个或多个控制序列包括启动子。

37.如权利要求36所述的核酸构建体,其中所述启动子是组成型启动子或诱导型启动子。

38.如权利要求36或37所述的核酸构建体,其中所述启动子是天然存在的启动子、杂合启动子或合成启动子。

39.如权利要求36-38中任一项所述的核酸构建体,其中所述启动子是或者包括EF1α启

动子、EF1α短启动子、CAG启动子、泛素/S27a启动子、SV40早期启动子、腺病毒主要晚期启动子、小鼠金属硫蛋白-I启动子、RSV启动子、MMTV启动子、莫洛尼鼠白血病病毒长末端重复区、CMV启动子、肌动蛋白启动子、免疫球蛋白启动子、热休克启动子、多瘤病毒启动子、禽痘病毒启动子、牛乳头瘤病毒启动子、禽肉瘤病毒启动子、逆转录病毒启动子、乙型肝炎病毒启动子、PGK启动子、腺病毒晚期启动子、痘苗病毒7.5K启动子、SV40启动子、HSV的tk启动子,小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)启动子、HIV的LTR启动子、莫洛尼病毒启动子、爱泼斯坦巴尔病毒(EBV)启动子、劳斯肉瘤病毒(RSV)启动子、U6启动子或UBC启动子。

40.如权利要求36-39中任一项所述的核酸构建体,其中所述启动子是或者包括CAG启动子。

41.如权利要求36-40中任一项所述的核酸构建体,其中所述启动子包含与SEQ ID NO:49具有至少80%同一性的核酸序列。

42.如权利要求36-39中任一项所述的核酸构建体,其中所述启动子是或者包括EF1α启动子。

43.如权利要求36-40,或42中任一项所述的核酸构建体,其中所述启动子包含与SEQ ID NO:50具有至少80%同一性的核酸序列。

44.如权利要求33所述的核酸构建体,其中所述一个或多个控制序列包括核糖体结合位点、增强子元件、活化子元件、翻译起始序列、翻译终止序列、转录起始序列、转录终止序列、多聚腺苷酸化信号序列、复制元件、RNA加工和输出元件、转座子序列、转座酶序列、绝缘子序列、内部核糖体进入位点(IRES)、5'UTR、3'UTR、mRNA 3'末端加工序列、边界元件、基因座控制区(LCR)、基质结合区(MAR)、重组或盒式交换序列、接头序列、分泌信号、抗性标志物、锚定肽、定位信号、融合标签、亲和标签、伴侣蛋白、蛋白酶或其组合。

45.如权利要求1-44中任一项所述的核酸构建体,其中所述一个或多个细胞外结构域进一步包含细胞外铰链结构域。

46.如权利要求45所述的核酸构建体,其中所述细胞外铰链结构域是或者包括CD47铰链、CD8a铰链、CD28铰链、PDGFR铰链或IgG4铰链。

47.如权利要求45或46所述的核酸构建体,其中所述细胞外铰链结构域是或者包括CD47铰链。

48.如权利要求45-47中任一项所述的核酸构建体,其中所述细胞外铰链结构域由与SEQ ID NO:75具有至少80%同一性的核酸序列编码。

49.如权利要求45或46所述的核酸构建体,其中所述细胞外铰链结构域是或者包括CD8a铰链。

50.如权利要求45、46,或49所述的核酸构建体,其中所述细胞外铰链结构域由与SEQ ID NO:76具有至少80%同一性的核酸序列编码。

51.如权利要求45或46所述的核酸构建体,其中所述细胞外铰链结构域是或者包括CD28铰链。

52.如权利要求45、46,或7f51所述的核酸构建体,其中所述细胞外铰链结构域由与SEQ ID NO:77具有至少80%同一性的核酸序列编码。

53.如权利要求45或46所述的核酸构建体,其中所述细胞外铰链结构域是或者包括PDGFR铰链。

54.如权利要求45、46,或53所述的核酸构建体,其中所述细胞外铰链结构域由与SEQ ID NO:78具有至少80%同一性的核酸序列编码。

55.如权利要求45或46所述的核酸构建体,其中所述细胞外铰链结构域是或者包括IgG4铰链。

56.如权利要求45、46,或55所述的核酸构建体,其中所述细胞外铰链结构域由与SEQ ID NO:79具有至少80%同一性的核酸序列编码。

57.如前述权利要求中任一项所述的核酸构建体,其进一步包含编码细胞内结构域的一个或多个核酸序列。

58.如权利要求57所述的核酸构建体,其中所述细胞内结构域是或者包括CD47细胞内结构域或其部分。

59.如权利要求57或58所述的核酸构建体,其中所述细胞内结构域由与SEQ ID NO:55具有至少80%同一性的核酸序列编码。

60.如权利要求57或58所述的核酸构建体,其中所述细胞内结构域由与SEQ ID NO:59具有至少80%同一性的核酸序列编码。

61.如权利要求57或58所述的核酸构建体,其中所述细胞内结构域由与SEQ ID NO:63具有至少80%同一性的核酸序列编码。

62.如权利要求57或58所述的核酸构建体,其中所述细胞内结构域由与SEQ ID NO:64具有至少80%同一性的核酸序列编码。

63.如权利要求57所述的核酸构建体,其中所述细胞内结构域是或者包括CD8a细胞内结构域或其部分。

64.如权利要求57或63所述的核酸构建体,其中所述细胞内结构域由与SEQ ID NO:70具有至少80%同一性的核酸序列编码。

65.如权利要求57所述的核酸构建体,其中所述细胞内结构域是或者包括CD28细胞内结构域或其部分。

66.如权利要求57或58所述的核酸构建体,其中所述细胞内结构域由与SEQ ID NO:72具有至少80%同一性的核酸序列编码。

67.如权利要求57所述的核酸构建体,其中所述细胞内结构域是或者包括PDGFR细胞内结构域或其部分。

68.如权利要求57或67所述的核酸构建体,其中所述细胞内结构域由与SEQ ID NO:74具有至少80%同一性的核酸序列编码。

69.如权利要求57-68中任一项所述的核酸构建体,其中所述细胞内结构域包含相对于野生型CD47细胞内结构域的一种或多种修饰。

70.如权利要求57-69中任一项所述的核酸构建体,其中所述细胞内结构域包含相对于野生型CD47细胞内结构域的一个或多个缺失。

71.如权利要求57-69中任一项所述的核酸构建体,其中所述细胞内结构域包含相对于野生型CD47细胞内结构域的一个或多个插入。

72.如权利要求57-71中任一项所述的核酸构建体,其中所述细胞内结构域包含相对于野生型CD47细胞内结构域改变的功能。

73.如权利要求57-72中任一项所述的核酸构建体,其中所述细胞内结构域包含相对于

野生型CD47细胞内结构域降低的功能。

74.如权利要求57-73中任一项所述的核酸构建体,其中所述细胞内结构域包含相对于野生型CD47细胞内结构域降低的水平的CD47细胞内信号传导。

75.如权利要求57-74中任一项所述的核酸构建体,其中所述细胞内结构域包括非功能性细胞内结构域。

76.如前述权利要求中任一项所述的核酸构建体,其包含与选自表31的序列具有至少80%同一性的核酸序列。

77.如权利要求1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:13具有至少80%同一性的核酸序列。

78.如权利要求1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:14具有至少80%同一性的核酸序列。

79.如权利要求1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:18具有至少80%同一性的核酸序列。

80.如权利要求1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:133具有至少80%同一性的核苷酸序列。

81.如权利要求1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:134具有至少80%同一性的核苷酸序列。

82.如权利要求1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:135具有至少80%同一性的核苷酸序列。

83.如权利要求1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:136具有至少80%同一性的核苷酸序列。

84.如权利要求1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:137具有至少80%同一性的核苷酸序列。

85.如权利要求1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:138具有至少80%同一性的核苷酸序列。

86.如权利要求1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:139具有至少80%同一性的核苷酸序列。

87.如权利要求1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:140具有至少80%同一性的核苷酸序列。

88.如权利要求1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:141具有至少80%同一性的核苷酸序列。

89.如权利要求1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:142具有至少80%同一性的核苷酸序列。

90.如权利要求1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:143具有至少80%同一性的核苷酸序列。

91.如权利要求1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:144具有至少80%同一性的核苷酸序列。

92.如权利要求1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:145具有至少80%同一性的核苷酸序列。

93.如权利要求1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:146具有至少80%同一性的核苷酸序列。

94.如权利要求1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:147具有至少80%同一性的核苷酸序列。

95.如权利要求1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:148具有至少80%同一性的核苷酸序列。

96.如权利要求1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:149具有至少80%同一性的核苷酸序列。

97.如权利要求1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:150具有至少80%同一性的核苷酸序列。

98.如权利要求1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:151具有至少80%同一性的核苷酸序列。

99.如权利要求1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:152具有至少80%同一性的核苷酸序列。

100.如权利要求1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:153具有至少80%同一性的核苷酸序列。

101.如权利要求1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:154具有至少80%同一性的核苷酸序列。

102.如权利要求1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:155具有至少80%同一性的核苷酸序列。

103.如权利要求1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:156具有至少80%同一性的核苷酸序列。

104.如权利要求1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:157具有至少80%同一性的核苷酸序列。

105.如权利要求1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:158具有至少80%同一性的核苷酸序列。

106.如权利要求1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:159具有至少80%同一性的核苷酸序列。

107.如权利要求1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:160具有至少80%同一性的核苷酸序列。

108.如权利要求1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:161具有至少80%同一性的核苷酸序列。

109.如权利要求1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:162具有至少80%同一性的核苷酸序列。

110.如权利要求1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:163具有至少80%同一性的核苷酸序列。

111.如权利要求1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:164具有至少80%同一性的核苷酸序列。

112.如权利要求1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:165具有至少

80％同一性的核苷酸序列。

113.如权利要求1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:166具有至少80％同一性的核苷酸序列。

114.如权利要求1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:167具有至少80％同一性的核苷酸序列。

115.如权利要求1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:168具有至少80％同一性的核苷酸序列。

116.如权利要求1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:169具有至少80％同一性的核苷酸序列。

117.如权利要求1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:170具有至少80％同一性的核苷酸序列。

118.如权利要求1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:171具有至少80％同一性的核苷酸序列。

119.如权利要求1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:172具有至少80％同一性的核苷酸序列。

120.如权利要求1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:173具有至少80％同一性的核苷酸序列。

121.如权利要求1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:174具有至少80％同一性的核苷酸序列。

122.如权利要求1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:175具有至少80％同一性的核苷酸序列。

123.如权利要求1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:176具有至少80％同一性的核苷酸序列。

124.如权利要求1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:177具有至少80％同一性的核苷酸序列。

125.如权利要求1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:178具有至少80％同一性的核苷酸序列。

126.如权利要求1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:179具有至少80％同一性的核苷酸序列。

127.如权利要求1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:180具有至少80％同一性的核苷酸序列。

128.如权利要求1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:181具有至少80％同一性的核苷酸序列。

129.如权利要求1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:182具有至少80％同一性的核苷酸序列。

130.如权利要求1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:183具有至少80％同一性的核苷酸序列。

131.如权利要求1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:184具有至少80％同一性的核苷酸序列。

132.如权利要求1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:185具有至少80%同一性的核苷酸序列。

133.如权利要求1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:341具有至少80%同一性的核苷酸序列。

134.如权利要求1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:342具有至少80%同一性的核苷酸序列。

135.如权利要求1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与选自表33的一个或多个序列具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

136.如前述权利要求中的任一项所述的核酸构建体,其包含与选自表33和/或表31的一个或多个序列具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

137.如权利要求1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:49和SEQ ID NO:14具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

138.如权利要求1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:14具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

139.如权利要求1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:49和SEQ ID NO:13具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

140.如权利要求1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:13具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

141.如权利要求1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:49和SEQ ID NO:18具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

142.如权利要求1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:18具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

143.如权利要求1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID No:51、52、54、55、56和57具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

144.如权利要求1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID No:51、52、54、55和56具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

145.如权利要求1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID No:51、52、54和55具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

146.如权利要求1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID No:51、52、54、55、56、57、58、59、60、61和62具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

147.如权利要求1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID No:51、52、54、55、56、57、58、59、60和61具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

148.如权利要求1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID No:51、52、54、55、56、57、58、59和60具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

149.如权利要求1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID No:51、52、54、55、56、57、58和59具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

150.如权利要求1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:49、53和65具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

151.如权利要求1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:53和65具有至

少80%同一性的一个或多个核酸序列。

152.如权利要求1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:49、53和66具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

153.如权利要求1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:53和66具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

154.如权利要求1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:49、53和67具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

155.如权利要求1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:53和67具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

156.如权利要求1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:49、53、69和70具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

157.如权利要求1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:53、69和70具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

158.如权利要求1-8k中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:49、53、71和72具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

159.如权利要求1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:53、71和72具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

160.如权利要求1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:49、53、73和74具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

161.如权利要求1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:53、73和74具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

162.如权利要求1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:49、52、78、73和74具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

163.如权利要求1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:52、78、73和74具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

164.如权利要求1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:49、52、79、71和72具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

165.如权利要求1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:52、79、71和72具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

166.如权利要求1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:49、52、79、69和70具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

167.如权利要求1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:52、79、69和70具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

168.如权利要求1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:49、52、77、71和72具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

169.如权利要求1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:52、77、71和72具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

170.如权利要求1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:49、52、77、69和70具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

171.如权利要求1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:52、77、69和70具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

172.如权利要求1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:49、52、76、71和72具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

173.如权利要求1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:52、76、71和72具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

174.如权利要求1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:49、52、76、69和70具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

175.如权利要求1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:52、76、69和70具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

176.如权利要求1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:49和200具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

177.如权利要求1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:50和200具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

178.如权利要求1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:200具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

179.一种载体,其包含权利要求1-178中任一项所述的核酸构建体。

180.如权利要求179所述的载体,其中所述载体是多顺反子载体。

181.如权利要求180所述的载体,其中所述多顺反子载体是双顺反子载体或三顺反子载体。

182.如权利要求179-181中任一项所述的载体,其中所述载体是质粒或病毒载体。

183.如权利要求182所述的载体,其中所述病毒载体是假型化的自失活慢病毒载体。

184.一种由权利要求1-178中任一项所述的核酸构建体编码的经工程化的蛋白质。

185.一种经工程化的蛋白质,其包含:

(a).一个或多个细胞外结构域;和

(b).一个或多个膜栓系物;

其中所述一个或多个细胞外结构域包含信号调控蛋白α(SIRPα)相互作用基序,并且

其中所述经工程化的蛋白质不包含一个或多个全长CD47细胞内结构域。

186.如权利要求185所述的经工程化的蛋白质,其中所述SIRPα相互作用基序是或者包含CD47细胞外结构域或其部分。

187.如权利要求186所述的经工程化的蛋白质,其中所述CD47细胞外结构域是CD47免疫球蛋白可变(IgV)样结构域。

188.如权利要求185或186所述的经工程化的蛋白质,其中所述CD47细胞外结构域是人CD47细胞外结构域。

189.如权利要求186-188中任一项所述的经工程化的蛋白质,其中所述CD47细胞外结构域包含与SEQ ID NO:21具有至少80%同一性的氨基酸序列。

190.如权利要求186-188中任一项所述的经工程化的蛋白质,其中所述CD47细胞外结构域包含与SEQ ID NO:22具有至少80%同一性的氨基酸序列。

191.如权利要求186-188中任一项所述的经工程化的蛋白质,其中所述CD47细胞外结

构域包含与SEQ ID NO:26具有至少80%同一性的氨基酸序列。

192.如权利要求186-188中任一项所述的经工程化的蛋白质,其中所述CD47细胞外结构域包含与SEQ ID NO:30具有至少80%同一性的氨基酸序列。

193.如权利要求185所述的经工程化的蛋白质,其中所述SIRPα相互作用基序是或者包含SIRPα抗体或其部分。

194.如权利要求193所述的经工程化的蛋白质,其中所述SIRPα抗体或其部分包含与SEQ ID NO:186具有至少80%同一性的氨基酸序列。

195.如权利要求193所述的经工程化的蛋白质,其中所述SIRPα抗体或其部分包含与SEQ ID NO:187具有至少80%同一性的氨基酸序列。

196.如权利要求193所述的经工程化的蛋白质,其中所述SIRPα抗体或其部分包含与SEQ ID NO:188具有至少80%同一性的氨基酸序列。

197.如权利要求193所述的经工程化的蛋白质,其中所述SIRPα抗体或其部分包含与SEQ ID NO:189具有至少80%同一性的氨基酸序列。

198.如权利要求193所述的经工程化的蛋白质,其中所述SIRPα抗体或其部分包含与SEQ ID NO:190具有至少80%同一性的氨基酸序列。

199.如权利要求193所述的经工程化的蛋白质,其中所述SIRPα抗体或其部分包含与SEQ ID NO:191具有至少80%同一性的氨基酸序列。

200.如权利要求193所述的经工程化的蛋白质,其中所述SIRPα抗体或其部分包含与SEQ ID NO:192具有至少80%同一性的氨基酸序列。

201.如权利要求193所述的经工程化的蛋白质,其中所述SIRPα抗体或其部分包含与SEQ ID NO:193具有至少80%同一性的氨基酸序列。

202.如权利要求193所述的经工程化的蛋白质,其中所述SIRPα抗体或其部分包含与SEQ ID NO:194具有至少80%同一性的氨基酸序列。

203.如权利要求193所述的经工程化的蛋白质,其中所述SIRPα抗体或其部分包含与SEQ ID NO:195具有至少80%同一性的氨基酸序列。

204.如权利要求193所述的经工程化的蛋白质,其中所述SIRPα抗体或其部分包含与SEQ ID NO:196具有至少80%同一性的氨基酸序列。

205.如权利要求193所述的经工程化的蛋白质,其中所述SIRPα抗体或其部分包含与SEQ ID NO:197具有至少80%同一性的氨基酸序列。

206.如权利要求193所述的经工程化的蛋白质,其中所述SIRPα抗体或其部分包含与SEQ ID NO:198具有至少80%同一性的氨基酸序列。

207.如权利要求185-193中任一项所述的经工程化的蛋白质,其中所述一个或多个膜栓系物是或者包含跨膜结构域。

208.如权利要求207所述的经工程化的蛋白质,其中所述跨膜结构域是或者包括CD3ζ、CD8a、CD16a、CD28、CD32a、CD32c、CD40、CD47、CD64、ICOS、Dectin-1、DNGR1、EGFR、GPCR、MyD88、PDGFR、SLAMF7、TRL1、TLR2、TLR3、TRL4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9或VEGFR跨膜结构域。

209.如权利要求207或208所述的经工程化的蛋白质,其中所述跨膜结构域是或者包括CD47跨膜结构域。

210.如权利要求207-209中任一项所述的经工程化的蛋白质,其中所述跨膜结构域包含与SEQ ID NO:23具有至少80%同一性的氨基酸序列。

211.如权利要求207-209中任一项所述的经工程化的蛋白质,其中所述跨膜结构域包含与SEQ ID NO:25具有至少80%同一性的氨基酸序列。

212.如权利要求207-209中任一项所述的经工程化的蛋白质,其中所述跨膜结构域包含与SEQ ID NO:27具有至少80%同一性的氨基酸序列。

213.如权利要求207-209中任一项所述的经工程化的蛋白质,其中所述跨膜结构域包含与SEQ ID NO:29具有至少80%同一性的氨基酸序列。

214.如权利要求207-209中任一项所述的经工程化的蛋白质,其中所述跨膜结构域包含与SEQ ID NO:31具有至少80%同一性的氨基酸序列。

215.如权利要求207或208所述的经工程化的蛋白质,其中所述跨膜结构域是或者包括CD8a跨膜结构域。

216.如权利要求207、208或215所述的经工程化的蛋白质,其中所述跨膜结构域包含与SEQ ID NO:38具有至少80%同一性的氨基酸序列。

217.如权利要求207或208所述的经工程化的蛋白质,其中所述跨膜结构域是或者包括CD28跨膜结构域。

218.如权利要求207、208或217所述的经工程化的蛋白质,其中所述跨膜结构域包含与SEQ ID NO:40具有至少80%同一性的氨基酸序列。

219.如权利要求207或208所述的经工程化的蛋白质,其中所述跨膜结构域是或者包括PDGFR跨膜结构域。

220.如权利要求207、208或219所述的经工程化的蛋白质,其中所述跨膜结构域包含与SEQ ID NO:42具有至少80%同一性的氨基酸序列。

221.如权利要求85-193中任一项所述的经工程化的蛋白质,其中所述一个或多个膜栓系物是或者包括糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚。

222.如权利要求221所述的经工程化的蛋白质,其中所述GPI锚是或者包括DAF/CD55 GPI锚、TRAILR3 GPI锚或CD59 GPI锚。

223.如权利要求221或222所述的经工程化的蛋白质,其中所述GPI锚是或者包括DAF/CD55 GPI锚。

224.如权利要求221-223中任一项所述的经工程化的蛋白质,其中所述DAF/CD55 GPI锚包含与SEQ ID NO:34具有至少80%同一性的氨基酸序列。

225.如权利要求221或222所述的经工程化的蛋白质,其中所述GPI锚是或者包括TRAILR3 GPI锚。

226.如权利要求221、222或225中任一项所述的经工程化的蛋白质,其中所述TRAILR3 GPI锚包含与SEQ ID NO:35具有至少80%同一性的氨基酸序列。

227.如权利要求221、222或225中任一项所述的经工程化的蛋白质,其中所述TRAILR3 GPI锚包含与SEQ ID NO:36具有至少80%同一性的氨基酸序列。

228.如权利要求221或222所述的经工程化的蛋白质,其中所述GPI锚是或者包括CD59 GPI锚。

229.如权利要求221、222或228中任一项所述的经工程化的蛋白质,其中所述CD59 GPI

锚包含与SEQ ID NO:37具有至少80％同一性的氨基酸序列。

230.如权利要求185-221中任一项所述的经工程化的蛋白质,其进一步包含细胞外信号肽。

231.如权利要求230所述的经工程化的蛋白质,其中所述细胞外信号肽由与SEQ ID NO:20具有至少80％同一性的核酸序列编码。

232.如权利要求185-231中任一项所述的经工程化的蛋白质,其中所述一个或多个细胞外结构域进一步包含细胞外铰链结构域。

233.如权利要求232所述的经工程化的蛋白质,其中所述细胞外铰链结构域是或者包括CD47铰链、CD8a铰链、CD28铰链、PDGFR铰链或IgG4铰链。

234.如权利要求232或17a所述的经工程化的蛋白质,其中所述细胞外铰链结构域是或者包括CD47铰链。

235.如权利要求232-234中任一项所述的经工程化的蛋白质,其中所述细胞外铰链结构域包含与SEQ ID NO:44具有至少80％同一性的氨基酸序列。

236.如权利要求232或233所述的经工程化的蛋白质,其中所述细胞外铰链结构域是或者包括CD8a铰链。

237.如权利要求232、233或236所述的经工程化的蛋白质,其中所述细胞外铰链结构域包含与SEQ ID NO:45具有至少80％同一性的酸序列。

238.如权利要求232或233所述的经工程化的蛋白质,其中所述细胞外铰链结构域是或者包括CD28铰链。

239.如权利要求232、233或238所述的经工程化的蛋白质,其中所述细胞外铰链结构域包含与SEQ ID NO:46具有至少80％同一性的氨基酸序列。

240.如权利要求232或233所述的经工程化的蛋白质,其中所述细胞外铰链结构域是或者包括PDGFR铰链。

241.如权利要求232、233或240所述的经工程化的蛋白质,其中所述细胞外铰链结构域包含与SEQ ID NO:47具有至少80％同一性的氨基酸序列。

242.如权利要求232或233所述的经工程化的蛋白质,其中所述细胞外铰链结构域是或者包括IgG4铰链。

243.如权利要求232、233或242所述的经工程化的蛋白质,其中所述细胞外铰链结构域包含与SEQ ID NO:48具有至少80％同一性的氨基酸序列。

244.如前述权利要求中任一项所述的经工程化的蛋白质,其进一步包含细胞内结构域。

245.如权利要求244所述的经工程化的蛋白质,其中所述细胞内结构域是或者包括CD47细胞内结构域或其部分。

246.如权利要求244或245所述的经工程化的蛋白质,其中所述细胞内结构域包含与SEQ ID NO:24具有至少80％同一性的氨基酸序列。

247.如权利要求244或245所述的经工程化的蛋白质,其中所述细胞内结构域包含与SEQ ID NO:28具有至少80％同一性的氨基酸序列。

248.如权利要求244或245所述的经工程化的蛋白质,其中所述细胞内结构域包含与SEQ ID NO:32具有至少80％同一性的氨基酸序列。

249.如权利要求244或245所述的经工程化的蛋白质,其中所述细胞内结构域包含与SEQ ID NO:33具有至少80%同一性的氨基酸序列。

250.如权利要求244所述的经工程化的蛋白质,其中所述细胞内结构域是或者包括CD8a细胞内结构域或其部分。

251.如权利要求244或250所述的经工程化的蛋白质,其中所述细胞内结构域包含与SEQ ID NO:39具有至少80%同一性的氨基酸序列。

252.如权利要求244所述的经工程化的蛋白质,其中所述细胞内结构域是或者包括CD28细胞内结构域或其部分。

253.如权利要求244或245所述的经工程化的蛋白质构建体,其中所述细胞内结构域包含与SEQ ID NO:41具有至少80%同一性的氨基酸序列。

254.如权利要求244所述的经工程化的蛋白质,其中所述细胞内结构域是或者包括PDGFR细胞内结构域或其部分。

255.如权利要求244或254所述的经工程化的蛋白质,其中所述细胞内结构域包含与SEQ ID NO:43具有至少80%同一性的氨基酸序列。

256.如权利要求244-255中任一项所述的经工程化的蛋白质,其中所述细胞内结构域包含相对于野生型CD47细胞内结构域的一种或多种修饰。

257.如权利要求244-256中任一项所述的经工程化的蛋白质,其中所述细胞内结构域包含相对于野生型CD47细胞内结构域的一个或多个缺失。

258.如权利要求244-256中任一项所述的经工程化的蛋白质,其中所述细胞内结构域包含相对于野生型CD47细胞内结构域的一个或多个插入。

259.如权利要求244-258中任一项所述的经工程化的蛋白质,其中所述细胞内结构域包含相对于野生型CD47细胞内结构域改变的功能。

260.如权利要求244-259中任一项所述的经工程化的蛋白质,其中所述细胞内结构域包含相对于野生型CD47细胞内结构域降低的功能。

261.如权利要求244-260中任一项所述的经工程化的蛋白质,其中所述细胞内结构域包含相对于野生型CD47细胞内结构域降低的水平的CD47细胞内信号传导。

262.如权利要求244-261中任一项所述的经工程化的蛋白质,其中所述细胞内结构域包括非功能性细胞内结构域。

263.如权利要求185-262中任一项所述的经工程化的蛋白质,其包含与选自表30的序列具有至少80%同一性的氨基酸序列。

264.如权利要求185-263中任一项所述的经工程化的蛋白质,其包含与SEQ ID NO:1具有至少80%同一性的氨基酸序列。

265.如权利要求185-263中任一项所述的经工程化的蛋白质,其包含与SEQ ID NO:2具有至少80%同一性的氨基酸序列。

266.如权利要求185-263中任一项所述的经工程化的蛋白质,其包含与SEQ ID NO:6具有至少80%同一性的氨基酸序列。

267.如权利要求185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:80具有至少80%同一性的核苷酸序列。

268.如权利要求185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:81具有至

少80％同一性的核苷酸序列。

269.如权利要求185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:82具有至少80％同一性的核苷酸序列。

270.如权利要求185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:83具有至少80％同一性的核苷酸序列。

271.如权利要求185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:84具有至少80％同一性的核苷酸序列。

272.如权利要求185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:85具有至少80％同一性的核苷酸序列。

273.如权利要求185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:86具有至少80％同一性的核苷酸序列。

274.如权利要求185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:87具有至少80％同一性的核苷酸序列。

275.如权利要求185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:88具有至少80％同一性的核苷酸序列。

276.如权利要求185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:89具有至少80％同一性的核苷酸序列。

277.如权利要求185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:90具有至少80％同一性的核苷酸序列。

278.如权利要求185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:91具有至少80％同一性的核苷酸序列。

279.如权利要求185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:92具有至少80％同一性的核苷酸序列。

280.如权利要求185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:93具有至少80％同一性的核苷酸序列。

281.如权利要求185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:94具有至少80％同一性的核苷酸序列。

282.如权利要求185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:95具有至少80％同一性的核苷酸序列。

283.如权利要求185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:96具有至少80％同一性的核苷酸序列。

284.如权利要求185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:97具有至少80％同一性的核苷酸序列。

285.如权利要求185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:98具有至少80％同一性的核苷酸序列。

286.如权利要求185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:99具有至少80％同一性的核苷酸序列。

287.如权利要求185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:100具有至少80％同一性的核苷酸序列。

288.如权利要求185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:101具有至少80%同一性的核苷酸序列。

289.如权利要求185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:102具有至少80%同一性的核苷酸序列。

290.如权利要求185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:103具有至少80%同一性的核苷酸序列。

291.如权利要求185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:104具有至少80%同一性的核苷酸序列。

292.如权利要求185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:105具有至少80%同一性的核苷酸序列。

293.如权利要求185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:106具有至少80%同一性的核苷酸序列。

294.如权利要求185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:107具有至少80%同一性的核苷酸序列。

295.如权利要求185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:108具有至少80%同一性的核苷酸序列。

296.如权利要求185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:109具有至少80%同一性的核苷酸序列。

297.如权利要求185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:110具有至少80%同一性的核苷酸序列。

298.如权利要求185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:111具有至少80%同一性的核苷酸序列。

299.如权利要求185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:112具有至少80%同一性的核苷酸序列。

300.如权利要求185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:113具有至少80%同一性的核苷酸序列。

301.如权利要求185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:114具有至少80%同一性的核苷酸序列。

302.如权利要求185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:115具有至少80%同一性的核苷酸序列。

303.如权利要求185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:116具有至少80%同一性的核苷酸序列。

304.如权利要求185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:117具有至少80%同一性的核苷酸序列。

305.如权利要求185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:118具有至少80%同一性的核苷酸序列。

306.如权利要求185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:119具有至少80%同一性的核苷酸序列。

307.如权利要求185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:120具有至

少80％同一性的核苷酸序列。

308.如权利要求185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:121具有至少80％同一性的核苷酸序列。

309.如权利要求185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:122具有至少80％同一性的核苷酸序列。

310.如权利要求185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:123具有至少80％同一性的核苷酸序列。

311.如权利要求185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:124具有至少80％同一性的核苷酸序列。

312.如权利要求185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:125具有至少80％同一性的核苷酸序列。

313.如权利要求185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:126具有至少80％同一性的核苷酸序列。

314.如权利要求185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:127具有至少80％同一性的核苷酸序列。

315.如权利要求185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:128具有至少80％同一性的核苷酸序列。

316.如权利要求185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:129具有至少80％同一性的核苷酸序列。

317.如权利要求185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:130具有至少80％同一性的核苷酸序列。

318.如权利要求185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:131具有至少80％同一性的核苷酸序列。

319.如权利要求185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:132具有至少80％同一性的核苷酸序列。

320.如权利要求185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:340具有至少80％同一性的核苷酸序列。

321.如权利要求185-255中任一项所述的经工程化的蛋白质,其包含与选自表32的一个或多个序列具有至少80％同一性的一个或多个氨基酸序列。

322.如前述权利要求中的任一项所述的经工程化的蛋白质,其包含与选自表32和/或表30的一个或多个序列具有至少80％同一性的一个或多个核酸序列。

323.如权利要求185-255中任一项所述的经工程化的蛋白质,其包含与SEQ ID NO:20、21、23、24、25和26具有至少80％同一性的一个或多个氨基酸序列。

324.如权利要求185-255中任一项所述的经工程化的蛋白质,其包含与SEQ ID NO:20、21、23、24和25具有至少80％同一性的一个或多个氨基酸序列。

325.如权利要求185-255中任一项所述的经工程化的蛋白质,其包含与SEQ ID NO:20、21、23和24具有至少80％同一性的一个或多个氨基酸序列。

326.如权利要求185-255中任一项所述的经工程化的蛋白质,其包含与SEQ ID NO:20、21、23、24、25、26、27、28、29、30和31具有至少80％同一性的一个或多个氨基酸序列。

327.如权利要求185-255中任一项所述的经工程化的蛋白质,其包含与SEQ ID NO:20、21、23、24、25、26、27、28、29和30具有至少80%同一性的一个或多个氨基酸序列。

328.如权利要求185-255中任一项所述的经工程化的蛋白质,其包含与SEQ ID NO:20、21、23、24、25、26、27、28和29具有至少80%同一性的一个或多个氨基酸序列。

329.如权利要求185-255中任一项所述的经工程化的蛋白质,其包含与SEQ ID NO:20、21、23、24、25、26、27和28具有至少80%同一性的一个或多个氨基酸序列。

330.如权利要求185-255中任一项所述的经工程化的蛋白质,其包含与SEQ ID NO:22和34具有至少80%同一性的一个或多个氨基酸序列。

331.如权利要求185-255中任一项所述的经工程化的蛋白质,其包含与SEQ ID NO:22和35具有至少80%同一性的一个或多个氨基酸序列。

332.如权利要求185-255中任一项所述的经工程化的蛋白质,其包含与SEQ ID NO:22和36具有至少80%同一性的一个或多个氨基酸序列。

333.如权利要求185-255中任一项所述的经工程化的蛋白质,其包含与SEQ ID NO:22、38和39具有至少80%同一性的一个或多个氨基酸序列。

334.如权利要求185-255中任一项所述的经工程化的蛋白质,其包含与SEQ ID NO:22、40和41具有至少80%同一性的一个或多个氨基酸序列。

335.如权利要求185-255中任一项所述的经工程化的蛋白质,其包含与SEQ ID NO:22、42和43具有至少80%同一性的一个或多个氨基酸序列。

336.如权利要求185-255中任一项所述的经工程化的蛋白质,其包含与SEQ ID NO:21、47、42和43具有至少80%同一性的一个或多个氨基酸序列。

337.如权利要求185-255中任一项所述的经工程化的蛋白质,其包含与SEQ ID NO:21、48、40和41具有至少80%同一性的一个或多个氨基酸序列。

338.如权利要求185-255中任一项所述的经工程化的蛋白质,其包含与SEQ ID NO:21、48、38和39具有至少80%同一性的一个或多个氨基酸序列。

339.如权利要求185-255中任一项所述的经工程化的蛋白质,其包含与SEQ ID NO:21、46、40和41具有至少80%同一性的一个或多个氨基酸序列。

340.如权利要求185-255中任一项所述的经工程化的蛋白质,其包含与SEQ ID NO:21、46、38和39具有至少80%同一性的一个或多个氨基酸序列。

341.如权利要求185-255中任一项所述的经工程化的蛋白质,其包含与SEQ ID NO:21、45、40和41具有至少80%同一性的一个或多个氨基酸序列。

342.如权利要求185-255中任一项所述的经工程化的蛋白质,其包含与SEQ ID NO:21、45、38和39具有至少80%同一性的一个或多个氨基酸序列。

343.如权利要求185-342中任一项所述的经工程化的蛋白质,其包含比野生型人CD47蛋白更少的糖基化修饰位点。

344.如权利要求343所述的经工程化的蛋白质,其中所述经工程化的蛋白质不包含N206糖基化位点。

345.一种包含权利要求185-344中任一项所述的经工程化的蛋白质的经遗传工程化的细胞。

346.一种包含编码经工程化的蛋白质的第一转基因的经遗传工程化的细胞,

其中,所述经工程化的蛋白质包含:

(a)一个或多个细胞外结构域;和

(b)一个或多个膜栓系物;

其中所述一个或多个细胞外结构域包含信号调控蛋白α(SIRPα)相互作用基序,并且

其中所述经工程化的蛋白质不包含一个或多个全长CD47细胞内结构域。

347.如权利要求346所述的经遗传工程化的细胞,其中所述SIRPα相互作用基序是或者包含CD47细胞外结构域或其部分。

348.如权利要求347所述的经遗传工程化的细胞,其中所述CD47细胞外结构域是CD47免疫球蛋白可变(IgV)样结构域。

349.如权利要求23或347所述的经遗传工程化的细胞,其中所述CD47细胞外结构域是人CD47细胞外结构域。

350.如权利要求347-349中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述CD47细胞外结构域由所述第一转基因编码,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:52具有至少80%同一性的核酸序列。

351.如权利要求347-349中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述CD47细胞外结构域由所述第一转基因编码,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:53具有至少80%同一性的核酸序列。

352.如权利要求347-349中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述CD47细胞外结构域由与SEQ ID NO:57具有至少80%同一性的核酸序列编码。

353.如权利要求347-349中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述CD47细胞外结构域由与SEQ ID NO:59具有至少80%同一性的核酸序列编码。

354.如权利要求346所述的经遗传工程化的细胞,其中所述SIRPα相互作用基序是或者包含SIRPα抗体或其部分。

355.如权利要求346-354中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述一个或多个膜栓系物是或者包含跨膜结构域。

356.如权利要求355所述的经遗传工程化的细胞,其中所述跨膜结构域是或者包括CD3ζ、CD8a、CD16a、CD28、CD32a、CD32c、CD40、CD47、CD64、ICOS、Dectin-1、DNGR1、EGFR、GPCR、MyD88、PDGFR、SLAMF7、TRL1、TLR2、TLR3、TRL4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9或VEGFR跨膜结构域。

357.如权利要求355或356所述的经遗传工程化的细胞,其中所述跨膜结构域是或者包括CD47跨膜结构域。

358.如权利要求355-357中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述跨膜结构域由所述第一转基因编码,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:54具有至少80%同一性的核酸序列。

359.如权利要求355-357中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述跨膜结构域由所述第一转基因编码,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:56具有至少80%同一性的核酸序列。

360.如权利要求355-357中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述跨膜结构域由所述第一转基因编码,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:58具有至少80%同一性的

核酸序列。

361.如权利要求355-357中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述跨膜结构域由所述第一转基因编码,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:60具有至少80%同一性的核酸序列。

362.如权利要求355-357中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述跨膜结构域由所述第一转基因编码,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:62具有至少80%同一性的核酸序列。

363.如权利要求355或356所述的经遗传工程化的细胞,其中所述跨膜结构域是或者包括CD8a跨膜结构域。

364.如权利要求355、356或363所述的经遗传工程化的细胞,其中所述跨膜结构域由所述第一转基因编码,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:69具有至少80%同一性的核酸序列。

365.如权利要求355或356所述的经遗传工程化的细胞,其中所述跨膜结构域是或者包括CD28跨膜结构域。

366.如权利要求355、356或365所述的经遗传工程化的细胞,其中所述跨膜结构域由所述第一转基因编码,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:71具有至少80%同一性的核酸序列。

367.如权利要求355或356所述的经遗传工程化的细胞,其中所述跨膜结构域是或者包括PDGFR跨膜结构域。

368.如权利要求355、356或367所述的经遗传工程化的细胞,其中所述跨膜结构域由所述第一转基因编码,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:73具有至少80%同一性的核酸序列。

369.如权利要求346-354中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述一个或多个膜栓系物是或者包括糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚。

370.如权利要求369所述的经遗传工程化的细胞,其中所述GPI锚是或者包括DAF/CD55 GPI锚、TRAILR3 GPI锚或CD59 GPI锚。

371.如权利要求369或370所述的经遗传工程化的细胞,其中所述GPI锚是或者包括DAF/CD55 GPI锚。

372.如权利要求369-371中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述DAF/CD55 GPI锚由所述第一转基因编码,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:65具有至少80%同一性的核酸序列。

373.如权利要求369或370所述的经遗传工程化的细胞,其中所述GPI锚是或者包括TRAILR3 GPI锚。

374.如权利要求369、370或373中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述TRAILR3 GPI锚由所述第一转基因编码,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:66具有至少80%同一性的核酸序列。

375.如权利要求369、370或373中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述TRAILR3 GPI锚由所述第一转基因编码,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:67具有至少80%同一性的核酸序列。

376.如权利要求369或370所述的经遗传工程化的细胞,其中所述GPI锚是或者包括CD59 GPI锚。

377.如权利要求369、370或376中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述CD59 GPI锚由所述第一转基因编码,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:68具有至少80%同一性的核酸序列。

378.如权利要求346-369中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其进一步包含一个或多个控制序列。

379.如权利要求378所述的经遗传工程化的细胞,其中所述一个或多个控制序列编码细胞外信号肽。

380.如权利要求378或379所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细胞外信号肽由所述第一转基因编码,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:51具有至少80%同一性的核酸序列。

381.如权利要求378所述的经遗传工程化的细胞,其中所述一个或多个控制序列包括启动子。

382.如权利要求381所述的经遗传工程化的细胞,其中所述启动子是组成型启动子或诱导型启动子。

383.如权利要求381或382所述的经遗传工程化的细胞,其中所述启动子是天然存在的启动子、杂合启动子或合成启动子。

384.如权利要求381-383中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述启动子是或者包括EF1α启动子、EF1α短启动子、CAG启动子、泛素/S27a启动子、SV40早期启动子、腺病毒主要晚期启动子、小鼠金属硫蛋白-I启动子、RSV启动子、MMTV启动子、莫洛尼鼠白血病病毒长末端重复区、CMV启动子、肌动蛋白启动子、免疫球蛋白启动子、热休克启动子、多瘤病毒启动子、禽痘病毒启动子、牛乳头瘤病毒启动子、禽肉瘤病毒启动子、逆转录病毒启动子、乙型肝炎病毒启动子、PGK启动子、腺病毒晚期启动子、痘苗病毒7.5K启动子、SV40启动子、HSV的tk启动子,小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)启动子、HIV的LTR启动子、莫洛尼病毒启动子、爱泼斯坦巴尔病毒(EBV)启动子、劳斯肉瘤病毒(RSV)启动子,或UBC启动子。

385.如权利要求381-384中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述启动子是或者包括CAG启动子。

386.如权利要求381-385中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含所述启动子,并且其中所述启动子包含与SEQ ID NO:49具有至少80%同一性的核酸序列。

387.如权利要求381-384中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述启动子是或者包括EF1α启动子。

388.如权利要求381-385,或387中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含所述启动子,并且其中所述启动子包含与SEQ ID NO:50具有至少80%同一性的核酸序列。

389.如权利要求378所述的经遗传工程化的细胞,其中所述一个或多个控制序列包括核糖体结合位点、增强子元件、活化子元件、翻译起始序列、翻译终止序列、转录起始序列、转录终止序列、多聚腺苷酸化信号序列、复制元件、RNA加工和输出元件、转座子序列、转座

酶序列、绝缘子序列、内部核糖体进入位点(IRES)、5'UTR、3'UTR、mRNA 3'末端加工序列、边界元件、基因座控制区(LCR)、基质结合区(MAR)、重组或盒式交换序列、接头序列、分泌信号、抗性标志物、锚定肽、定位信号、融合标签、亲和标签、伴侣蛋白、蛋白酶或其组合。

390.如权利要求346-389中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述一个或多个细胞外结构域进一步包含细胞外铰链结构域。

391.如权利要求390所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细胞外铰链结构域是或者包括CD47铰链、CD8a铰链、CD28铰链、PDGFR铰链或IgG4铰链。

392.如权利要求390或391所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细胞外铰链结构域是或者包括CD47铰链。

393.如权利要求390-392中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细胞外铰链结构域由所述第一转基因编码,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:75具有至少80%同一性的核酸序列。

394.如权利要求390或391所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细胞外铰链结构域是或者包括CD8a铰链。

395.如权利要求390、391或394所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细胞外铰链结构域由所述第一转基因编码,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:76具有至少80%同一性的核酸序列。

396.如权利要求390或391所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细胞外铰链结构域是或者包括CD28铰链。

397.如权利要求390、391或396所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细胞外铰链结构域由所述第一转基因编码,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:77具有至少80%同一性的核酸序列。

398.如权利要求390或391所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细胞外铰链结构域是或者包括PDGFR铰链。

399.如权利要求390、391或398所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细胞外铰链结构域由所述第一转基因编码,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:78具有至少80%同一性的核酸序列。

400.如权利要求390或391所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细胞外铰链结构域是或者包括IgG4铰链。

401.如权利要求390、391或400所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细胞外铰链结构域由所述第一转基因编码,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:79具有至少80%同一性的核酸序列。

402.如权利要求346-401中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因进一步包含编码细胞内结构域的一个或多个核酸序列。

403.如权利要求402所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细胞内结构域是或者包括CD47细胞内结构域或其部分。

404.如权利要求402或403所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细胞内结构域由所述第一转基因编码,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:55具有至少80%同一性的核酸序列。

405.如权利要求402或403所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细胞内结构域由所述第一转基因编码,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:59具有至少80%同一性的核酸序列。

406.如权利要求402或403所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细胞内结构域由所述第一转基因编码,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:63具有至少80%同一性的核酸序列。

407.如权利要求402或403所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细胞内结构域由所述第一转基因编码,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:64具有至少80%同一性的核酸序列。

408.如权利要求402所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细胞内结构域是或者包括CD8a细胞内结构域或其部分。

409.如权利要求402或408所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细胞内结构域由所述第一转基因编码,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:70具有至少80%同一性的核酸序列。

410.如权利要求402所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细胞内结构域是或者包括CD28细胞内结构域或其部分。

411.如权利要求402或403所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细胞内结构域由所述第一转基因编码,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:72具有至少80%同一性的核酸序列。

412.如权利要求402所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细胞内结构域是或者包括PDGFR细胞内结构域或其部分。

413.如权利要求402或412所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细胞内结构域由所述第一转基因编码,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:74具有至少80%同一性的核酸序列。

414.如权利要求402-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细胞内结构域包含相对于野生型CD47细胞内结构域的一种或多种修饰。

415.如权利要求402-414中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细胞内结构域包含相对于野生型CD47细胞内结构域的一个或多个缺失。

416.如权利要求402-414中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细胞内结构域包含相对于野生型CD47细胞内结构域的一个或多个插入。

417.如权利要求402-416中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细胞内结构域包含相对于野生型CD47细胞内结构域改变的功能。

418.如权利要求402-417中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细胞内结构域包含相对于野生型CD47细胞内结构域降低的功能。

419.如权利要求402-418中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细胞内结构域包含相对于野生型CD47细胞内结构域降低的水平的CD47细胞内信号传导。

420.如权利要求402-419中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细胞内结构域包括非功能性细胞内结构域。

421.如权利要求346-420中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因

包含与选自表31的序列具有至少80％同一性的核酸序列。

422.如权利要求346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:13具有至少80％同一性的核酸序列。

423.如权利要求346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:14具有至少80％同一性的核酸序列。

424.如权利要求346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:18具有至少80％同一性的核酸序列。

425.如权利要求346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:133具有至少80％同一性的核苷酸序列。

426.如权利要求346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:134具有至少80％同一性的核苷酸序列。

427.如权利要求346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:135具有至少80％同一性的核苷酸序列。

428.如权利要求346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:136具有至少80％同一性的核苷酸序列。

429.如权利要求346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:137具有至少80％同一性的核苷酸序列。

430.如权利要求346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:138具有至少80％同一性的核苷酸序列。

431.如权利要求346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:139具有至少80％同一性的核苷酸序列。

432.如权利要求346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:140具有至少80％同一性的核苷酸序列。

433.如权利要求346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:141具有至少80％同一性的核苷酸序列。

434.如权利要求346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:142具有至少80％同一性的核苷酸序列。

435.如权利要求346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:143具有至少80％同一性的核苷酸序列。

436.如权利要求346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:144具有至少80％同一性的核苷酸序列。

437.如权利要求346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:145具有至少80％同一性的核苷酸序列。

438.如权利要求346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:146具有至少80％同一性的核苷酸序列。

439.如权利要求346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:147具有至少80％同一性的核苷酸序列。

440.如权利要求346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:148具有至少80％同一性的核苷酸序列。

441.如权利要求346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:149具有至少80%同一性的核苷酸序列。

442.如权利要求346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:150具有至少80%同一性的核苷酸序列。

443.如权利要求346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:151具有至少80%同一性的核苷酸序列。

444.如权利要求346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:152具有至少80%同一性的核苷酸序列。

445.如权利要求346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:153具有至少80%同一性的核苷酸序列。

446.如权利要求346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:154具有至少80%同一性的核苷酸序列。

447.如权利要求346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:155具有至少80%同一性的核苷酸序列。

448.如权利要求346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:156具有至少80%同一性的核苷酸序列。

449.如权利要求346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:157具有至少80%同一性的核苷酸序列。

450.如权利要求346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:158具有至少80%同一性的核苷酸序列。

451.如权利要求346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:159具有至少80%同一性的核苷酸序列。

452.如权利要求346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:160具有至少80%同一性的核苷酸序列。

453.如权利要求346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:161具有至少80%同一性的核苷酸序列。

454.如权利要求346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:162具有至少80%同一性的核苷酸序列。

455.如权利要求346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:163具有至少80%同一性的核苷酸序列。

456.如权利要求346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:164具有至少80%同一性的核苷酸序列。

457.如权利要求346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:165具有至少80%同一性的核苷酸序列。

458.如权利要求346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:166具有至少80%同一性的核苷酸序列。

459.如权利要求346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:167具有至少80%同一性的核苷酸序列。

460.如权利要求346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:

168具有至少80%同一性的核苷酸序列。

461.如权利要求346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:169具有至少80%同一性的核苷酸序列。

462.如权利要求346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:170具有至少80%同一性的核苷酸序列。

463.如权利要求346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:171具有至少80%同一性的核苷酸序列。

464.如权利要求346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:172具有至少80%同一性的核苷酸序列。

465.如权利要求346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:173具有至少80%同一性的核苷酸序列。

466.如权利要求346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:174具有至少80%同一性的核苷酸序列。

467.如权利要求346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:175具有至少80%同一性的核苷酸序列。

468.如权利要求346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:176具有至少80%同一性的核苷酸序列。

469.如权利要求346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:177具有至少80%同一性的核苷酸序列。

470.如权利要求346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:178具有至少80%同一性的核苷酸序列。

471.如权利要求346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:179具有至少80%同一性的核苷酸序列。

472.如权利要求346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:180具有至少80%同一性的核苷酸序列。

473.如权利要求346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:181具有至少80%同一性的核苷酸序列。

474.如权利要求346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:182具有至少80%同一性的核苷酸序列。

475.如权利要求346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:183具有至少80%同一性的核苷酸序列。

476.如权利要求346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:184具有至少80%同一性的核苷酸序列。

477.如权利要求346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:185具有至少80%同一性的核苷酸序列。

478.如权利要求346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:341具有至少80%同一性的核苷酸序列。

479.如权利要求346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:342具有至少80%同一性的核苷酸序列。

480.如权利要求346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与选自表33的一个或多个序列具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

481.如权利要求346中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与选自表33和/或表31的一个或多个序列具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

482.如权利要求346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:49和SEQ ID NO:14具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

483.如权利要求346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:14具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

484.如权利要求346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:49和SEQ ID NO:13具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

485.如权利要求346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:13具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

486.如权利要求346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:49和SEQ ID NO:18具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

487.如权利要求346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:18具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

488.如权利要求346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:51、52、54、55、56和57具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

489.如权利要求346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:51、52、54、55和56具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

490.如权利要求346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:51、52、54和55具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

491.如权利要求346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:51、52、54、55、56、57、58、59、60、61和62具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

492.如权利要求346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:51、52、54、55、56、57、58、59、60和61具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

493.如权利要求346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:51、52、54、55、56、57、58、59和60具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

494.如权利要求346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:51、52、54、55、56、57、58和59具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

495.如权利要求346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:49、53和65具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

496.如权利要求346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:53和65具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

497.如权利要求346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因

包含与SEQ ID NO:49、53和66具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

498.如权利要求346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:53和66具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

499.如权利要求346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:49、53和67具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

500.如权利要求346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:53和67具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

501.如权利要求346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:49、53、69和70具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

502.如权利要求346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:53、69和70具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

503.如权利要求346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:49、53、71和72具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

504.如权利要求346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:53、71和72具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

505.如权利要求346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:49、53、73和74具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

506.如权利要求346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:53、73和74具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

507.如权利要求346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:49、52、78、73和74具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

508.如权利要求346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:52、78、73和74具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

509.如权利要求346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:49、52、79、71和72具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

510.如权利要求346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:52、79、71和72具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

511.如权利要求346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:49、52、79、69和70具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

512.如权利要求346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:52、79、69和70具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

513.如权利要求346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:49、52、77、71和72具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

514.如权利要求346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:52、77、71和72具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

515.如权利要求346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:49、52、77、69和70具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

516.如权利要求346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:52、77、69和70具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

517.如权利要求346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:49、52、76、71和72具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

518.如权利要求346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:52、76、71和72具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

519.如权利要求346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:49、52、76、69和70具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

520.如权利要求346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:52、76、69和70具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

521.如权利要求346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:49和200具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

522.如权利要求346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:50和200具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

523.如权利要求346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:200具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

524.如权利要求346-523中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其在其基因组中包含位于第一插入位点处的所述第一转基因。

525.如权利要求524所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一插入位点是T细胞受体(TCR)基因座。

526.如权利要求525所述的经遗传工程化的细胞,其中所述TCR基因座是或者包括:TRAC基因座、TRBC1基因座或TRBC2基因座。

527.如权利要求525所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一插入位点是β2微球蛋白(B2M)基因座。

528.如权利要求525所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一插入位点是II类反式活化因子(CIITA)基因座。

529.如权利要求525所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一插入位点是安全港基因座。

530.如权利要求529所述的经遗传工程化的细胞,其中所述安全港基因座是AAVS1、ABO、CCR5、CLYBL、CXCR4、F3、FUT1、HMGB1、KDM5D、LRP1、MICA、MICB、RHD、ROSA26,或SHS231基因座。

531.如权利要求525-530中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一插入位点是外显子。

532.如权利要求525-530中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一插入位点是内含子。

533.如权利要求525-530中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一插入位点位于内含子和外显子之间。

534.如权利要求525-530中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一插入位点位于调控区中。

535.如权利要求346-534中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述经遗传工程化的细胞具有所述经工程化的蛋白质的细胞表面表达。

536.如权利要求346-535中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述经遗传工程化的细胞具有与未被遗传工程化的相当细胞相比降低的TCR细胞表面表达。

537.如权利要求346-536中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述经遗传工程化的细胞具有与未被遗传工程化的相当细胞相比降低的B2M细胞表面表达。

538.如权利要求346-537中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述经遗传工程化的细胞具有与未被遗传工程化的相当细胞相比降低的CIITA表达。

539.如权利要求346-538中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述经遗传工程化的细胞包含位于TCR基因座、B2M基因座、TAP I基因座、NLRC5基因座、CIITA基因座、HLA-A基因座、HLA-B基因座、HLA-C基因座、HLA-DP基因座、HLA-DM基因座、HLA-DOA基因座、HLA-DOB基因座、HLA-DQ基因座、HLA-DR基因座、RFX5基因座、RFXANK基因座、RFXAP基因座、NFY-A基因座、NFY-B基因座、NFY-C基因座,或其组合处的修饰。

540.如权利要求346-539中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述经遗传工程化的细胞已被遗传工程化以敲除HLA-A基因座、HLA-B基因座、HLA-C基因座,或其组合。

541.如权利要求346-539中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述经遗传工程化的细胞已被遗传工程化以敲除HLA-DM基因座、HLA-DO基因座、HLA-DP基因座、HLA-DQ基因座、HLA-DR基因座,或其组合。

542.如权利要求346-541中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述经遗传工程化的细胞已被遗传工程化以敲除TCR基因座。

543.如权利要求346-542中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述经遗传工程化的细胞已被遗传工程化以敲除B2M基因座。

544.如权利要求346-543中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述经遗传工程化的细胞已被遗传工程化以敲除CIITA基因座。

545.如权利要求346-544中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细胞包含一种或多种修饰,所述一种或多种修饰使以下的一个或多个等位基因失活或破坏:

(a)一种或多种主要组织相容性复合物(MHC)I类分子或调控所述一种或多种MHC I类分子的表达的一种或多种分子,和/或

(b)一种或多种MHC II类分子或调控所述一种或多种MHC II类分子的表达的一种或多种分子。

546.如权利要求346-545中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细胞包含一种或多种修饰,所述一种或多种修饰使一种或多种MHC I类分子或调控所述一种或多种MHC I类分子的表达的一种或多种分子的一个或多个等位基因失活或破坏。

547.如权利要求346-546中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细胞包含一种或多种修饰,所述一种或多种修饰使一种或多种MHC II类分子或调控所述一种或多种MHC II类分子的表达的一种或多种分子的一个或多个等位基因失活或破坏。

548.如权利要求346-547中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细胞包含一种或多种修饰,所述一种或多种修饰使以下的一个或多个等位基因失活或破坏:

(a)一种或多种MHC I类分子或调控所述一种或多种MHC I类分子的表达的一种或多种分子,和

(b)一种或多种MHC II类分子或调控所述一种或多种MHC II类分子的表达的一种或多

种分子。

549.如权利要求346-548中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述一种或多种修饰降低所述一种或多种MHC I类分子的细胞表面蛋白表达。

550.如权利要求346-549中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述一种或多种修饰降低所述一种或多种MHC I类分子的细胞表面运输。

551.如权利要求346-550中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述一种或多种修饰降低所述一种或多种MHC I类分子的功能,任选地其中所述功能是抗原呈递。

552.如权利要求346-551中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述一种或多种MHC I类分子是一种或多种人白细胞抗原(HLA)I类分子。

553.如权利要求552所述的经遗传工程化的细胞,其中所述一种或多种HLA I类分子选自由HLA-A、HLA-B和HLA-C组成的组。

554.如权利要求346-551中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述的调控所述一种或多种MHC I类分子的表达的一种或多种分子选自由B2M、NLRC5和TAP1组成的组。

555.如权利要求346-554中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述一种或多种修饰降低所述一种或多种MHC II类分子的细胞表面蛋白表达。

556.如权利要求346-555中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述一种或多种修饰降低所述一种或多种MHC II类分子的细胞表面运输。

557.如权利要求346-556中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述一种或多种修饰降低所述一种或多种MHC II类分子的功能,任选地其中所述功能是抗原呈递。

558.如权利要求346-557中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述一种或多种MHC II类分子是一种或多种人白细胞抗原(HLA)II类分子。

559.如权利要求558所述的经遗传工程化的细胞,其中所述一种或多种HLA II类分子选自由HLA-DP、HLA-DQ,和/或HLA-DR组成的组。

560.如权利要求346-557中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述的调控所述一种或多种MHC II类分子的表达的一种或多种分子选自由CIITA和CD74组成的组。

561.如权利要求346-547中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其进一步包含编码致耐受因子的第二转基因。

562.如权利要求561所述的经遗传工程化的细胞,其中所述致耐受因子是或者包括A20/TNFAIP3、B2M-HLA-E、CD16、CD16 Fc受体、CD24、CD27、CD35、CD39、CD46、CD47、CD52、CD55、CD59、CD64、CD200、CCL21、CCL22、CTLA4-Ig、C1抑制剂、CR1、DUX4、FASL、HLA-C、HLA-E、HLA-E重链、HLA-F、HLA-G、H2-M3、IDO1、IL-10、IL15-RF、IL-35、IL-39、MANF、Mfge8、PD-L1或Serpinb9。

563.如权利要求561或562所述的经遗传工程化的细胞,其中编码所述致耐受因子的所述第二转基因被插入在位于TCR基因座处的插入位点处。

564.如权利要求561或562所述的经遗传工程化的细胞,其中编码所述致耐受因子的所述第二转基因被插入在位于B2M基因座处的插入位点处。

565.如权利要求561或562所述的经遗传工程化的细胞,其中编码所述致耐受因子的所述第二转基因被插入在位于CIITA基因座处的插入位点处。

566.如权利要求561或562所述的经遗传工程化的细胞,其中编码所述致耐受因子的所

述第二转基因被插入在位于安全港基因座处的插入位点处。

567.如权利要求566所述的经遗传工程化的细胞,其中所述安全港基因座是AAVS1、ABO、CCR5、CLYBL、CXCR4、F3、FUT1、HMGB1、KDM5D、LRP1、MICA、MICB、RHD、ROSA26,或SHS231基因座。

568.如权利要求561-565中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述经遗传工程化的细胞具有所述致耐受因子的细胞表面表达。

569.如权利要求346-568中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其进一步包含编码嵌合抗原受体(CAR)的第三转基因。

570.如权利要求569所述的经遗传工程化的细胞,其中所述CAR是或者包括CD5特异性CAR、CD19特异性CAR、CD20特异性CAR、CD22特异性CAR、CD23特异性CAR、CD30特异性CAR、CD33特异性CAR、CD38特异性CAR、CD70特异性CAR、CD123特异性CAR、CD138特异性CAR、κ,λ,B细胞成熟剂(BCMA)特异性CAR、G蛋白偶联受体家族C组5成员D(GPRC5D)特异性CAR、CD123特异性CAR、LeY特异性CAR、NKG2D配体特异性CAR、WT1特异性CAR、GD2特异性CAR、HER2特异性CAR、EGFR特异性CAR、EGFRvIII特异性CAR、B7H3特异性CAR、PSMA特异性CAR、PSCA特异性CAR、CAIX特异性CAR、CD171特异性CAR、CEA特异性CAR、CSPG4特异性CAR、EPHA2特异性CAR、FAP特异性CAR、FRα特异性CAR、IL-13Rα特异性CAR、间皮素特异性CAR、MUC1特异性CAR、MUC16特异性CAR、ROR1特异性CAR、C-Met特异性CAR、CD133特异性CAR、Ep-CAM特异性CAR、GPC3特异性CAR、HPV16-E6特异性CAR、IL13Ra2特异性CAR、MAGEA3特异性CAR、MAGEA4特异性CAR、MART1特异性CAR、NY-ESO-1特异性CAR、VEGFR2特异性CAR、α-叶酸受体特异性CAR、CD24特异性CAR、CD44v7/8特异性CAR、EGP-2特异性CAR、EGP-40特异性CAR、erb-B2特异性CAR、erb-B 2,3,4特异性CAR、FBP特异性CAR、胎儿乙酰胆碱e受体特异性CAR、GD2特异性CAR、GD3特异性CAR、HMW-MAA特异性CAR、IL-11Rα特异性CAR、KDR特异性CAR、Lewis Y特异性CAR、L1-细胞粘附分子特异性CAR、MAGE-A1特异性CAR、癌胚抗原(h5T4)特异性CAR、TAG-72特异性CAR、或CD19/CD22双特异性CAR。

571.如权利要求569或570所述的经遗传工程化的细胞,其中所述CAR是或者包括CD19特异性CAR、CD20特异性CAR、CD22特异性CAR、CD38特异性CAR、CD123特异性CAR、CD138特异性CAR、BCMA特异性CAR或CD19/CD22双特异性CAR。

572.如权利要求569-571中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述经遗传工程化的细胞具有所述CAR的细胞表面表达。

573.如权利要求346-567中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其进一步包含编码嵌合自身抗原受体(CAAR)的第三转基因。

574.如权利要求573所述的经遗传工程化的细胞,其中所述CAAR包含选自由胰腺β细胞抗原、滑膜关节抗原、髓鞘碱性蛋白、蛋白脂质蛋白、髓鞘少突糖蛋白、MuSK、角质形成细胞粘附蛋白桥粒芯糖蛋白3(Dsg3)、Ro-RNP复合物、La抗原、髓过氧化物酶、蛋白酶3、心磷脂、瓜氨酸化蛋白、氨基甲酰化蛋白和基膜胶原蛋白α3链组成的组的抗原。

575.如权利要求573或574所述的经遗传工程化的细胞,其中所述经遗传工程化的细胞具有所述CAAR的细胞表面表达。

576.如权利要求346-567中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其进一步包含编码B细胞自身抗体受体(BAR)的第三转基因。

577.如权利要求576所述的经遗传工程化的细胞,其中所述经遗传工程化的细胞具有所述BAR的细胞表面表达。

578.如权利要求569-577中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第三转基因被插入在安全港基因座处。

579.如权利要求569-578中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第三转基因被插入在TRAC基因座、TRBC1基因座、TRBC2基因座、B2M基因座、CIITA基因座、MICA基因座、MICB基因座或安全港基因座处。

580.如权利要求569-579中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第三转基因被插入在AAVS1基因座、ABO基因座、CCR5基因座、CLYBL基因座、CXCR4基因座、F3基因座、FUT1基因座、HMGB1基因座、KDM5D基因座、LRP1基因座、RHD基因座、ROSA26基因座或SHS231基因座处。

581.如权利要求346-566中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因和所述第二转基因被插入到相同的插入位点中。

582.如权利要求346-566或576-580中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因和所述第三转基因被插入到相同的插入位点中。

583.如权利要求561-580中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第二转基因和所述第三转基因被插入到相同的插入位点中。

584.如权利要求346-580中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因、所述第二转基因和所述第三转基因被插入到相同的插入位点中。

585.如权利要求346-584中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因、所述第二转基因和所述第三转基因由三个单独的构建体编码。

586.如权利要求346-584中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因、所述第二转基因和所述第三转基因由两个单独的构建体编码。

587.如权利要求346-584中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因、所述第二转基因和所述第三转基因由多顺反子构建体编码。

588.如权利要求346-587中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因和/或所述第二转基因和/或所述第三转基因编码基因组编辑复合物。

589.如588所述的经遗传工程化的细胞,其中所述基因组编辑复合物包含基因组靶向实体和基因组修饰实体。

590.如589所述的经遗传工程化的细胞,其中所述基因组靶向实体是核酸指导的靶向实体。

591.如权利要求589或590所述的经遗传工程化的细胞,其中所述基因组靶向实体选自由以下组成的组:序列特异性核酸酶、核酸可编程DNA结合蛋白、RNA指导的核酸酶、包含Cas核酸酶和指导RNA的RNA指导的核酸酶(CRISPR-Cas组合)、包含gRNA和Cas核酸酶的核糖核蛋白(RNP)复合物、归巢核酸内切酶、锌指核酸酶(ZF)核酸结合实体、转录活化因子样效应物(TALE)核酸结合实体、大范围核酸酶、Cas核酸酶、核心Cas蛋白、归巢核酸内切酶、核酸内切酶缺陷型Cas蛋白、无酶活性的Cas蛋白、CRISPR相关转座酶(CAST)、II型或V型Cas蛋白,或其功能部分。

592.如权利要求589-591中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述基因组靶向

实体选自由以下组成的组:Cas1、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8a、Cas8b、Cas8c、Cas9、Cas10、Cas12、Cas12a(Cpf1)、Cas12b(C2c1)、Cas12c(C2c3)、Cas12d(CasY)、Cas12e(CasX)、Cas12f(C2c10)、Cas12g、Cas12h、Cas12i、Cas12k(C2c5)、Cas13、Cas13a(C2c2)、Cas13b、Cas13c、Cas13d、C2c4、C2c8、C2c9、Cmr1、Cmr2、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csd1、Csd2、Cas5d、Cse1、Cse2、Cse3、Cse4、Cas5e、Csf1、Csm1、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csn1、Csn2、Cst1、Cst2、Cas5t、Csh1、Csh2、Cas5h、Csa1、Csa2、Csa3、Csa4、Csa5、Cas5a、Csx10、Csx11、Csy1、Csy2、Csy3、Csy4、Mad7、SpCas9、SpCas9的eSpCas9、SpCas9-HF1、HypaSpCas9、HeFSpCas9和evoSpCas9高保真变体、SaCas9、NmeCas9、CjCas9、StCas9、TdCas9、LbCas12a、AsCas12a、AacCas12b、BhCas12b v4、TnpB、dCas(D10A)、dCas(H840A)、dCas13a、dCas13b,或其功能部分。

593.如权利要求589-592中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述基因组修饰实体对靶基因座进行切割、脱氨基、切口、聚合、询问、整合、切割、解旋、断裂、改变、甲基化、去甲基化,或以其他方式使靶基因座不稳定。

594.如权利要求589-593中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述基因组修饰实体包含重组酶、整合酶、转座酶、核酸内切酶、核酸外切酶、切口酶、解旋酶、DNA聚合酶、RNA聚合酶、逆转录酶、脱氨酶、翻转酶、甲基化酶、脱甲基酶、乙酰化酶、核酸修饰蛋白、RNA修饰蛋白、DNA修饰蛋白、Argonaute蛋白、表观遗传修饰蛋白、组蛋白修饰蛋白,或其功能部分。

595.如权利要求589-594中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述基因组靶向实体选自由以下组成的组:序列特异性核酸酶、核酸可编程DNA结合蛋白、RNA指导的核酸酶、包含Cas核酸酶和指导RNA的RNA指导的核酸酶(CRISPR-Cas组合)、包含gRNA和Cas核酸酶的核糖核蛋白(RNP)复合物、归巢核酸内切酶、锌指核酸酶(ZFN)、转录活化因子样效应物核酸酶(TALEN)、大范围核酸酶、Cas核酸酶、核心Cas蛋白、TnpB核酸酶、核酸内切酶缺陷型Cas蛋白、无酶活性的Cas蛋白、CRISPR相关转座酶(CAST)、II型或V型Cas蛋白、碱基编辑、先导编辑、经由位点特异性靶向元件的可编程添加(PASTE),或其功能部分。

596.如权利要求589-595中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述基因组修饰实体选自由以下组成的组:Cas1、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8a、Cas8b、Cas8c、Cas9、Cas10、Cas12、Cas12a(Cpf1)、Cas12b(C2c1)、Cas12c(C2c3)、Cas12d(CasY)、Cas12e(CasX)、Cas12f(C2c10)、Cas12g、Cas12h、Cas12i、Cas12k(C2c5)、Cas13、Cas13a(C2c2)、Cas13b、Cas13c、Cas13d、C2c4、C2c8、C2c9、Cmr1、Cmr2、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csd1、Csd2、Cas5d、Cse1、Cse2、Cse3、Cse4、Cas5e、Csf1、Csm1、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csn1、Csn2、Cst1、Cst2、Cas5t、Csh1、Csh2、Cas5h、Csa1、Csa2、Csa3、Csa4、Csa5、Cas5a、Csx10、Csx11、Csy1、Csy2、Csy3、Csy4、Mad7、SpCas9、SpCas9的eSpCas9、SpCas9-HF1、HypaSpCas9、HeFSpCas9和evoSpCas9高保真变体、SaCas9、NmeCas9、CjCas9、StCas9、TdCas9、LbCas12a、AsCas12a、AacCas12b、BhCas12b v4、TnpB、FokI、dCas(D10A)、dCas(H840A)、dCas13a、dCas13b、碱基编辑器、先导编辑器、靶标引发的逆转录(TPRT)编辑器、APOBEC1、胞苷脱氨酶、腺苷脱氨酶、尿嘧啶糖基化酶抑制剂(UGI)、腺嘌呤碱基编辑器(ABE)、胞嘧啶碱基编辑器(CBE)、逆转录酶、丝氨酸整合酶、重组酶、转座酶、聚合酶、腺嘌呤到胸腺嘧啶或“ATBE”(或胸腺嘧啶到腺嘌呤或“TABE”)颠换碱基编辑器、十-十一易位甲基胞嘧啶双加氧酶(TET)、TET1、TET3、TET1CD、

组蛋白乙酰转移酶p300、组蛋白甲基转移酶SMYD3、组蛋白甲基转移酶PRDM9、H3K79甲基转移酶DOT1L、转录阻遏子或其功能部分。

597.如权利要求589-596中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述基因组靶向实体和所述基因组修饰实体是单个多肽的不同结构域。

598.如权利要求589-597中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述基因组靶向实体和基因组修饰实体是可操作地连接在一起的两种不同的多肽。

599.如权利要求589-597中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述基因组靶向实体和基因组修饰实体是未连接在一起的两种不同的多肽。

600.如权利要求589-599中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述基因组编辑复合物包含具有与至少一个靶基因座互补的靶向结构域的指导核酸,任选地其中所述指导核酸是指导RNA(gRNA)。

601.如权利要求588-598中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述基因组编辑复合物包含RNA指导的核酸酶。

602.如权利要求601所述的经遗传工程化的细胞,其中所述RNA指导的核酸酶包括Cas核酸酶。

603.如权利要求602所述的经遗传工程化的细胞,其中所述基因组编辑复合物包括包含所述Cas核酸酶和所述gRNA的核糖核蛋白(RNP)复合物。

604.如权利要求602或603所述的经遗传工程化的细胞,其中所述Cas核酸酶是II型或V型Cas蛋白。

605.如权利要求602-604中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述Cas核酸酶选自由以下组成的组:Cas3、Cas4、Cas5、Cas8a、Cas8b、Cas8c、Cas9、Cas10、Cas12、Cas12a(Cpf1)、Cas12b(C2c1)、Cas12c(C2c3)、Cas12d(CasY)、Cas12e(CasX)、Cas12f(C2c10)、Cas12g、Cas12h、Cas12i、Cas12k(C2c5)、Cas13、Cas13a(C2c2)、Cas13b、Cas13c、Cas13d、C2c4、C2c8、C2c9、Cmr5、Cse1、Cse2、Csf1、Csm2、Csn2、Csx10、Csx11、Csy1、Csy2、Csy3和Mad7。

606.如权利要求346-587中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述经遗传工程化的细胞是人细胞或非人动物细胞。

607.如权利要求606所述的经遗传工程化的细胞,其中所述非人动物细胞是猪、牛或绵羊细胞。

608.如权利要求606所述的经遗传工程化的细胞,其中所述经遗传工程化的细胞是人细胞。

609.如权利要求346-608中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述经遗传工程化的细胞是来源于干细胞或祖细胞的分化的细胞。

610.如权利要求609所述的经遗传工程化的细胞,其中所述干细胞是多能干细胞。

611.如权利要求610所述的经遗传工程化的细胞,其中所述多能干细胞是诱导型多能干细胞(iPSC)。

612.如权利要求610所述的经遗传工程化的细胞,其中所述多能干细胞是胚胎干细胞(ESC)。

613.如权利要求346-612中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细胞是从供

体分离的原代细胞。

614.如权利要求613所述的经遗传工程化的细胞,其中在从所述供体获取所述原代细胞时所述供体是健康的且/或没有被怀疑患有疾病或疾患。

615.如权利要求346-614中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述经遗传工程化的细胞是从多个供体分离的原代细胞群体的一部分。

616.如权利要求346-615中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中在从所述供体获取所述原代细胞时所述多个供体是健康的且/或没有被怀疑患有疾病或疾患。

617.如权利要求346-616中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细胞是胰岛细胞、β胰岛细胞、胰腺胰岛细胞、免疫细胞、B细胞、T细胞、自然杀伤(NK)细胞、自然杀伤T(NKT)细胞、巨噬细胞、内皮细胞、肌肉细胞、心脏肌肉细胞、平滑肌细胞、骨骼肌细胞、多巴胺能神经元、视网膜色素上皮细胞、视细胞、肝细胞、甲状腺细胞、皮肤细胞、胶质祖细胞、神经细胞、心脏细胞、干细胞、造血干细胞、诱导型多能干细胞(iPSC)、间充质干细胞(MSC)、胚胎干细胞(ESC)、多能干细胞(PSC)、血细胞或其组合。

618.如权利要求346-617中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细胞是T细胞。

619.如权利要求618所述的经遗传工程化的细胞,其中所述T细胞是CD3+T细胞、CD4+T细胞、CDS+T细胞、原初T细胞、调节T(Treg)细胞、非调节T细胞、Th1细胞、Th2细胞、Th9细胞、Th17细胞、滤泡辅助T(Tfh)细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、效应T(Teff)细胞、中央记忆T细胞、效应记忆T细胞、表达CD45RA的效应记忆T细胞(TEMRA细胞)、组织驻留记忆(Trm)细胞、虚拟记忆T细胞、先天记忆T细胞、记忆干细胞(Tse)、γδT细胞或其组合。

620.如权利要求618或619所述的经遗传工程化的细胞,其中所述T细胞是细胞毒性T细胞、辅助T细胞、记忆T细胞、调节T细胞、肿瘤浸润淋巴细胞或其组合。

621.如权利要求618-620中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细胞是人T细胞。

622.如权利要求618-621中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细胞是自体T细胞。

623.如权利要求618-621中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细胞是同种异体T细胞。

624.如权利要求623所述的经遗传工程化的细胞,其中所述同种异体T细胞是原代T细胞。

625.如623或624所述的经遗传工程化的细胞,其中所述同种异体T细胞已从胚胎干细胞(ESC)或诱导型多能干细胞(iPSC)分化而来。

626.如权利要求346-625中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述经工程化的蛋白质以是与所述经遗传工程化的细胞相同的细胞类型的对照细胞中的内源性CD47蛋白的至少约1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、25倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、150倍、200倍、300倍、400倍、500倍、600倍、700倍、800倍、900倍、1000倍、1100倍、1200倍、1300倍、1400倍、1500倍、2000倍、2500倍、3000倍、3500倍、4000倍、4500倍或5000倍的水平在所述经遗传工程化的细胞中表达。

627.如权利要求346-625中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述经工程化的

蛋白质以是与所述经遗传工程化的细胞相同的细胞类型的对照细胞中的内源性CD47蛋白的至少约1倍至至少约15倍的水平在所述经遗传工程化的细胞中表达。

628.如权利要求346-625中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述经工程化的蛋白质以是与所述经遗传工程化的细胞相同的细胞类型的对照细胞中的内源性CD47蛋白的至少约1倍至至少约10倍的水平在所述经遗传工程化的细胞中表达。

629.如权利要求346-625中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述经工程化的蛋白质以是与所述经遗传工程化的细胞相同的细胞类型的对照细胞中的内源性CD47蛋白的至少约1倍至至少约5倍的水平在所述经遗传工程化的细胞中表达。

630.如权利要求346-625中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述经工程化的蛋白质以是与所述经遗传工程化的细胞相同的细胞类型的对照细胞中的内源性CD47蛋白的至少约3倍至至少约4倍的水平在所述经遗传工程化的细胞中表达。

631.如权利要求346-625中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述经工程化的蛋白质以是与所述经遗传工程化的细胞相同的细胞类型的对照细胞中的内源性CD47蛋白的至少约3倍至至少约10倍的水平在所述经遗传工程化的细胞中表达。

632.如权利要求346-625中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述经工程化的蛋白质以是与所述经遗传工程化的细胞相同的细胞类型的对照细胞中的内源性CD47蛋白的至少约4倍至至少约10倍的水平在所述经遗传工程化的细胞中表达。

633.如权利要求346-625中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述经工程化的蛋白质以是与所述经遗传工程化的细胞相同的细胞类型的对照细胞中的内源性CD47蛋白的至少约500倍至至少约2000倍的水平在所述经遗传工程化的细胞中表达。

634.如权利要求346-625中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述经工程化的蛋白质以是与所述经遗传工程化的细胞相同的细胞类型的对照细胞中的内源性CD47蛋白的至少约500倍至至少约1500倍的水平在所述经遗传工程化的细胞中表达。

635.如权利要求346-625中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述经工程化的蛋白质以是与所述经遗传工程化的细胞相同的细胞类型的对照细胞中的内源性CD47蛋白的至少约900倍至至少约1000倍的水平在所述经遗传工程化的细胞中表达。

636.如权利要求346-625中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述经工程化的蛋白质以是与所述经遗传工程化的细胞相同的细胞类型的对照细胞中的内源性CD47蛋白的至少约1000倍的水平在所述经遗传工程化的细胞中表达。

637.一种组合物,其包含权利要求345-636中任一项所述的经遗传工程化的细胞。

638.一种药物组合物,其包含(i)权利要求345-636中任一项所述的经遗传工程化的细胞,和(ii)药学上可接受的赋形剂。

639.一种方法,其包括向受试者施用权利要求345-636中任一项所述的经遗传工程化的细胞、权利要求637所述的组合物,或权利要求638所述的药物组合物。

640.如权利要求639所述的方法,其中所述方法是治疗受试者的疾病的方法。

641.一种包含权利要求345-636中任一项所述的经遗传工程化的细胞的细胞群体,其用于治疗受试者的疾病。

642.如权利要求637所述的组合物,其用于治疗受试者的疾病。

643.如权利要求638所述的药物组合物,其用于治疗受试者的疾病。

644.权利要求345-636中任一项所述的经遗传修饰的细胞、权利要求56所述的细胞群体、权利要求54或56a所述的组合物,或权利要求54a或54b所述的药物组合物用于治疗受试者的疾病的用途。

645.权利要求345-636中任一项所述的经遗传修饰的细胞、权利要求56所述的细胞群体、权利要求54或56a所述的组合物,或权利要求54a或54b所述的药物组合物在制造用于治疗疾病的药物中的用途。

646.如前述权利要求中任一项所述的经遗传修饰的细胞、细胞群体、组合物、药物组合物或用途,其中所述疾病是癌症。

647.如前述权利要求中任一项所述的经遗传修饰的细胞、细胞群体、组合物、药物组合物或用途,其中所述癌症与以下相关:CD5、CD19、CD20、CD22、CD23、CD30、CD33、CD70、κ,λ,B细胞成熟剂(BCMA)、G蛋白偶联受体家族C组5成员D(GPRC5D)、CD123、LeY、NKG2D配体、WT1、GD2、HER2、EGFR、EGFRvIII、B7H3、PSMA、PSCA、CAIX、CD171、CEA、CSPG4、EPHA2、FAP、FRα、IL-13Rα、间皮素、MUC1、MUC16、ROR1、C-Met、CD133、Ep-CAM、GPC3、HPV16-E6、IL13Ra2、MAGEA3、MAGEA4、MART1、NY-ESO-1、VEGFR2、α-叶酸受体、CD24、CD44v7/8、EGP-2、EGP-40、erb-B2、erb-B 2,3,4、FBP、胎儿乙酰胆碱e受体、GD2、GD3、HMW-MAA、IL-11Rα、KDR、Lewis Y、L1细胞粘附分子、MAGE-A1、癌胎抗原(h5T4)和/或TAG-72表达。

648.如前述权利要求中任一项所述的经遗传修饰的细胞、细胞群体、组合物、药物组合物或用途,其中所述癌症是血液恶性疾病。

649.如前述权利要求中任一项所述的经遗传修饰的细胞、细胞群体、组合物、药物组合物或用途,其中所述血液恶性疾病选自由以下组成的组:髓系赘生物、骨髓增生异常综合征(MDS)、骨髓增殖/骨髓增生异常综合征、急性淋巴母细胞白血病(ALL)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、急性髓系白血病(AML)、慢性骨髓性白血病(CML)、母细胞危象慢性骨髓性白血病(bcCML)、B细胞急性淋巴系白血病(B-ALL)、T细胞急性淋巴系白血病(T-ALL)、T细胞淋巴瘤和B细胞淋巴瘤。

650.如前述权利要求中任一项所述的经遗传修饰的细胞、细胞群体、组合物、药物组合物或用途,其中所述癌症是实体恶性疾病。

651.如前述权利要求中任一项所述的经遗传修饰的细胞、细胞群体、组合物、药物组合物或用途,其中所述实体恶性疾病选自乳腺癌、卵巢癌、结肠癌、前列腺癌、上皮癌、肾细胞癌、胰腺腺癌、宫颈癌、结直肠癌、胶质母细胞瘤、横纹肌肉瘤、神经母细胞瘤、黑色素瘤、尤文氏肉瘤、骨肉瘤、间皮瘤和腺癌。

652.如前述权利要求中任一项所述的经遗传修饰的细胞、细胞群体、组合物、药物组合物或用途,其中所述疾病是自身免疫性疾病。

653.如前述权利要求中任一项所述的经遗传修饰的细胞、细胞群体、组合物、药物组合物或用途,其中所述自身免疫性疾病选自由以下组成的组:狼疮、全身性红斑狼疮、类风湿性关节炎、银屑病、银屑病关节炎、多发性硬化症、克罗恩氏病、溃疡性结肠炎、阿狄森氏病、格雷夫氏病、舍格伦综合征、桥本氏甲状腺炎和乳糜泻。

654.如前述权利要求中任一项所述的经遗传修饰的细胞、前述权利要求中任一项所述的细胞群体、前述权利要求中任一项所述的组合物、前述权利要求中任一项所述的药物组合物或前述权利要求中任一项所述的用途,其中所述疾病是糖尿病。

655.如前述权利要求中任一项所述的经遗传修饰的细胞、细胞群体、组合物、药物组合物或用途,其中所述糖尿病选自由以下组成的组:I型糖尿病、II型糖尿病、前驱糖尿病和妊娠期糖尿病。

656.如前述权利要求中任一项所述的经遗传修饰的细胞、细胞群体、组合物、药物组合物或用途,其中所述疾病是神经性疾病。

657.如前述权利要求中任一项所述的经遗传修饰的细胞、细胞群体、组合物、药物组合物或用途,其中所述神经性疾病选自由以下组成的组:全身僵硬症、癫痫、脑炎、脑膜炎、偏头痛、亨廷顿病、阿尔茨海默病、帕金森病、佩利扎伊斯-梅茨巴赫氏病和多发性硬化症。

658.一种制造包含核酸构建体的经遗传工程化的细胞的方法,所述方法包括:

将权利要求1-184中任一项所述的核酸构建体递送至细胞,从而制成经遗传工程化的细胞。

659.如权利要求658所述的方法,其中所述核酸构建体包含编码所述经工程化的蛋白质的第一转基因。

660.如权利要求658或659所述的方法,其中所述方法包括将编码所述经工程化的蛋白质的第一转基因插入到所述细胞基因组中的第一插入位点中。

661.如权利要求660所述的方法,其中所述第一插入位点是T细胞受体(TCR)基因座。

662.如权利要求661所述的方法,其中所述TCR基因座是或者包括:TRAC基因座、TRBC1基因座或TRBC2基因座。

663.如权利要求661所述的方法,其中所述第一插入位点是β2微球蛋白(B2M)基因座。

664.如权利要求661所述的方法,其中所述第一插入位点是II类反式活化因子(CIITA)基因座。

665.如权利要求661所述的方法,其中所述第一插入位点是安全港基因座。

666.如权利要求665所述的方法,其中所述安全港基因座是AAVS1、ABO、CCR5、CLYBL、CXCR4、F3、FUT1、HMGB1、KDM5D、LRP1、MICA、MICB、RHD、ROSA26或SHS231基因座。

667.如权利要求660-664中任一项所述的方法,其中所述第一插入位点是外显子。

668.如权利要求660-664中任一项所述的方法,其中所述第一插入位点是内含子。

669.如权利要求660-664中任一项所述的方法,其中所述第一插入位点位于内含子和外显子之间。

670.如权利要求660-664中任一项所述的方法,其中所述第一插入位点位于调控区中。

671.如权利要求660-670中任一项所述的方法,其中插入步骤包括使用基因疗法载体、转座酶、慢病毒载体、逆转录病毒、融合体、PiggyBac转座子、睡美人(SB11)转座子、Mos1转座子或Tol2转座子插入。

672.如权利要求660-671中任一项所述的方法,其中插入步骤包括使用慢病毒载体插入。

673.如权利要求660-670中任一项所述的方法,其中插入步骤包括使用基因组修饰蛋白的同源性定向修复(HDR)介导的插入。

674.如权利要求658-673中任一项所述的方法,其进一步包括向所述细胞中引入基因组编辑复合物。

675.如权利要求674所述的方法,其中所述基因组编辑复合物包含基因组靶向实体和

基因组修饰实体。

676.如权利要求675所述的方法,其中所述基因组靶向实体将所述基因组编辑复合物定位到安全港位点,任选地其中所述基因组靶向实体是核酸指导的靶向实体。

677.如675或676所述的方法,其中所述基因组靶向实体选自由以下组成的组:序列特异性核酸酶、核酸可编程DNA结合蛋白、RNA指导的核酸酶、包含Cas核酸酶和指导RNA的RNA指导的核酸酶(CRISPR-Cas组合)、包含gRNA和Cas核酸酶的核糖核蛋白(RNP)复合物、归巢核酸内切酶、锌指核酸酶(ZF)核酸结合实体、转录活化因子样效应物(TALE)核酸结合实体、大范围核酸酶、Cas核酸酶、核心Cas蛋白、归巢核酸内切酶、核酸内切酶缺陷型Cas蛋白、无酶活性的Cas蛋白、CRISPR相关转座酶(CAST)、II型或V型Cas蛋白,或其功能部分。

678.如权利要求675-677中任一项所述的方法,其中所述基因组靶向实体选自由以下组成的组:Cas1、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8a、Cas8b、Cas8c、Cas9、Cas10、Cas12、Cas12a(Cpf1)、Cas12b(C2c1)、Cas12c(C2c3)、Cas12d(CasY)、Cas12e(CasX)、Cas12f(C2c10)、Cas12g、Cas12h、Cas12i、Cas12k(C2c5)、Cas13、Cas13a(C2c2)、Cas13b、Cas13c、Cas13d、C2c4、C2c8、C2c9、Cmr1、Cmr2、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csd1、Csd2、Cas5d、Cse1、Cse2、Cse3、Cse4、Cas5e、Csf1、Csm1、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csn1、Csn2、Cst1、Cst2、Cas5t、Csh1、Csh2、Cas5h、Csa1、Csa2、Csa3、Csa4、Csa5、Cas5a、Csx10、Csx11、Csy1、Csy2、Csy3、Csy4、Mad7、SpCas9、SpCas9的eSpCas9、SpCas9-HF1、HypaSpCas9、HeFSpCas9和evoSpCas9高保真变体、SaCas9、NmeCas9、CjCas9、StCas9、TdCas9、LbCas12a、AsCas12a、AacCas12b、BhCas12b v4、TnpB、dCas(D10A)、dCas(H840A)、dCas13a、dCas13b,或其功能部分。

679.如权利要求675-678中任一项所述的方法,其中所述基因组修饰实体对所述靶基因座进行切割、脱氨基、切口、聚合、询问、整合、切割、解旋、断裂、改变、甲基化、去甲基化,或以其他方式使所述靶基因座不稳定。

680.如权利要求675-679中任一项所述的方法,其中所述基因组修饰实体包含重组酶、整合酶、转座酶、核酸内切酶、核酸外切酶、切口酶、解旋酶、DNA聚合酶、RNA聚合酶、逆转录酶、脱氨酶、翻转酶、甲基化酶、脱甲基酶、乙酰化酶、核酸修饰蛋白、RNA修饰蛋白、DNA修饰蛋白、Argonaute蛋白、表观遗传修饰蛋白、组蛋白修饰蛋白,或其功能部分。

681.如权利要求675-680中任一项所述的方法,其中所述基因组修饰实体选自由以下组成的组:序列特异性核酸酶、核酸可编程DNA结合蛋白、RNA指导的核酸酶、包含Cas核酸酶和指导RNA的RNA指导的核酸酶(CRISPR-Cas组合)、包含gRNA和Cas核酸酶的核糖核蛋白(RNP)复合物、归巢核酸内切酶、锌指核酸酶(ZFN)、转录活化因子样效应物核酸酶(TALEN)、大范围核酸酶、Cas核酸酶、核心Cas蛋白、TnpB核酸酶、核酸内切酶缺陷型Cas蛋白、无酶活性的Cas蛋白、CRISPR相关转座酶(CAST)、II型或V型Cas蛋白、碱基编辑、先导编辑、经由位点特异性靶向元件的可编程添加(PASTE),或其功能部分。

682.如权利要求675-681中任一项所述的方法,其中所述基因组修饰实体选自由以下组成的组:Cas1、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8a、Cas8b、Cas8c、Cas9、Cas10、Cas12、Cas12a(Cpf1)、Cas12b(C2c1)、Cas12c(C2c3)、Cas12d(CasY)、Cas12e(CasX)、Cas12f(C2c10)、Cas12g、Cas12h、Cas12i、Cas12k(C2c5)、Cas13、Cas13a(C2c2)、Cas13b、Cas13c、Cas13d、C2c4、C2c8、C2c9、Cmr1、Cmr2、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csd1、Csd2、Cas5d、Cse1、Cse2、Cse3、Cse4、Cas5e、Csf1、Csm1、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csn1、Csn2、Cst1、Cst2、Cas5t、

Csh1、Csh2、Cas5h、Csa1、Csa2、Csa3、Csa4、Csa5、Cas5a、Csx10、Csx11、Csy1、Csy2、Csy3、Csy4、Mad7、SpCas9、SpCas9的eSpCas9、SpCas9-HF1、HypaSpCas9、HeFSpCas9和evoSpCas9高保真变体、SaCas9、NmeCas9、CjCas9、StCas9、TdCas9、LbCas12a、AsCas12a、AacCas12b、BhCas12b v4、TnpB、FokI、dCas(D10A)、dCas(H840A)、dCas13a、dCas13b、碱基编辑器、先导编辑器、靶标引发的逆转录(TPRT)编辑器、APOBEC1、胞苷脱氨酶、腺苷脱氨酶、尿嘧啶糖基化酶抑制剂(UGI)、腺嘌呤碱基编辑器(ABE)、胞嘧啶碱基编辑器(CBE)、逆转录酶、丝氨酸整合酶、重组酶、转座酶、聚合酶、腺嘌呤到胸腺嘧啶或“ATBE”(或胸腺嘧啶到腺嘌呤或“TABE”)颠换碱基编辑器、十-十一易位甲基胞嘧啶双加氧酶(TET)、TET1、TET3、TET1CD、组蛋白乙酰转移酶p300、组蛋白甲基转移酶SMYD3、组蛋白甲基转移酶PRDM9、H3K79甲基转移酶DOT1L、转录阻遏子或其功能部分。

683.如权利要求675-682中任一项所述的方法,其中所述基因组靶向实体和所述基因组修饰实体是单个多肽的不同结构域。

684.如权利要求675-683中任一项所述的方法,其中所述基因组靶向实体和基因组修饰实体是可操作地连接在一起的两种不同的多肽。

685.如权利要求675-683中任一项所述的方法,其中所述基因组靶向实体和基因组修饰实体是未连接在一起的两种不同的多肽。

686.如权利要求674-685中任一项所述的方法,其中所述基因组编辑复合物包含具有与基因组安全港位点内的至少一个序列互补的靶向结构域的指导核酸,任选地其中所述指导核酸是指导RNA(gRNA)。

687.如权利要求674-686中任一项所述的方法,其中所述基因组编辑复合物包含RNA指导的核酸酶。

688.如权利要求687所述的方法,其中所述RNA指导的核酸酶包括Cas核酸酶。

689.如权利要求688所述的方法,其中所述基因组编辑复合物包括包含所述Cas核酸酶和所述gRNA的核糖核蛋白(RNP)复合物。

690.如权利要求688或689所述的方法,其中所述Cas核酸酶是II型或V型Cas蛋白。

691.如权利要求688-690中任一项所述的方法,其中所述Cas核酸酶选自由以下组成的组:Cas3、Cas4、Cas5、Cas8a、Cas8b、Cas8c、Cas9、Cas10、Cas12、Cas12a(Cpf1)、Cas12b(C2c1)、Cas12c(C2c3)、Cas12d(CasY)、Cas12e(CasX)、Cas12f(C2c10)、Cas12g、Cas12h、Cas12i、Cas12k(C2c5)、Cas13、Cas13a(C2c2)、Cas13b、Cas13c、Cas13d、C2c4、C2c8、C2c9、Cmr5、Cse1、Cse2、Csf1、Csm2、Csn2、Csx10、Csx11、Csy1、Csy2、Csy3和Mad7。

692.如权利要求678所述的方法,其中所述gRNA包含互补区,其中所述互补区包含与基因座内的靶核酸序列互补的核酸序列,并且其中所述靶核酸序列包含所述插入位点。

693.如权利要求692所述的方法,其中所述基因座是TCR基因座。

694.如权利要求692所述的方法,其中所述基因座是B2M基因座。

695.如权利要求692所述的方法,其中所述基因座是CIITA基因座。

696.如权利要求660-695中任一项所述的方法,其中所述第一插入位点距离原型间隔区相邻基序(PAM)序列25个或更少的核苷酸,其中所述PAM序列为ngg、nag、ngrrt、ngrrn、nnnngatt、nnnnryac、nnagaaw、naaaac、tttv、ttn、attn、tttn、gttn或yttn,并且其中:

(i)r=a或g,

(ii)y＝c或t,

(iii)w＝a或t,

(iv)v＝a或c或g,且

(v)n＝a、c、t或g。

697.如权利要求660-696中任一项所述的方法,其中插入步骤包括使用SpCas9的同源性定向修复(HDR)介导的插入并且所述PAM是ngg或nag,其中n＝a、c、t或g。

698.如权利要求660-696中任一项所述的方法,其中插入步骤包括使用SaCas9的同源性定向修复(HDR)介导的插入并且所述PAM是ngrrt或ngrrn,其中:

(i)r＝a或g,且

(ii)n＝a、c、t或g。

699.如权利要求660-696中任一项所述的方法,其中插入步骤包括使用NmeCas9的同源性定向修复(HDR)介导的插入并且所述PAM是nnnngatt,其中n＝a、c、t或g。

700.如权利要求660-696中任一项所述的方法,其中插入步骤包括使用CjCas9的同源性定向修复(HDR)介导的插入并且所述PAM是nnnnryac,其中:

(i)r＝a或g,

(ii)y＝c或t,且

(iii)n＝a、c、t或g。

701.如权利要求660-696中任一项所述的方法,其中插入步骤包括使用StCas9的同源性定向修复(HDR)介导的插入并且所述PAM是nnagaaw,其中:

(i)w＝a或t,且

(ii)n＝a、c、t或g。

702.如权利要求660-696中任一项所述的方法,其中插入步骤包括使用TdCas9的同源性定向修复(HDR)介导的插入并且所述PAM是naaaac,其中n＝a、c、t或g。

703.如权利要求660-696中任一项所述的方法,其中插入步骤包括使用LbCas12a的同源性定向修复(HDR)介导的插入并且所述PAM是tttv,其中v＝a或c或g。

704.如权利要求660-696中任一项所述的方法,其中插入步骤包括使用AsCas12a的同源性定向修复(HDR)介导的插入并且所述PAM是tttv,其中v＝a或c或g。

705.如权利要求660-696中任一项所述的方法,其中插入步骤包括使用AacCas12b的同源性定向修复(HDR)介导的插入并且所述PAM是ttn,其中n＝a、c、t或g。

706.如权利要求660-696中任一项所述的方法,其中插入步骤包括使用BhCas12b的同源性定向修复(HDR)介导的插入并且所述PAM是attn.、tttn或gttn,其中n＝a、c、t或g。

707.如权利要求660-696中任一项所述的方法,其中插入步骤包括使用MAD7(ErCas12a)的同源性定向修复(HDR)介导的插入并且所述PAM是yttn,其中:

(i)y＝c或t,且

(ii)n＝a、c、t或g。

708.如权利要求660、678或697-707中任一项所述的方法,其中使用定点核酸酶的同源性定向修复(HDR)介导的插入以等于或大于使用慢病毒的HDR插入的HDR效率进行。

709.如权利要求660-673、675、676或677中任一项所述的方法,其中插入步骤包括使用ZFN的同源性定向修复(HDR)介导的插入。

710.如权利要求660-673、675、676、677或709中任一项所述的方法,其中所述第一插入位点距离锌指结合序列25个或更少的核苷酸。

711.如权利要求660-673、675、676或677中任一项所述的方法,其中插入步骤包括使用TALEN的同源性定向修复(HDR)介导的插入。

712.如权利要求660-673、675、676、677或711中任一项所述的方法,其中所述第一插入位点距离转录活化因子样效应物(TALE)结合序列25个或更少的核苷酸。

713.如权利要求660-675或677中任一项所述的方法,其中插入步骤包括使用指导RNA(gRNA)和TnpB多肽的同源性定向修复(HDR)介导的插入。

714.如权利要求713所述的方法,其中所述gRNA包含互补区,其中所述互补区包含与基因座内的靶核酸序列互补的核酸序列,并且其中所述靶核酸序列包含所述插入位点。

715.如权利要求714所述的方法,其中所述基因座是TCR基因座。

716.如权利要求714所述的方法,其中所述基因座是B2M基因座。

717.如权利要求714所述的方法,其中所述基因座是CIITA基因座。

718.如权利要求714所述的方法,其中所述基因座是安全港基因座。

719.如权利要求718所述的方法,其中所述安全港基因座是AAVS1、ABO、CCR5、CLYBL、CXCR4、F3、FUT1、HMGB1、KDM5D、LRP1、MICA、MICB、RHD、ROSA26或SHS231基因座。

720.如权利要求713-719中任一项所述的方法,其中所述插入位点距离靶标相邻基序(TAM)序列25个核苷酸或更少核苷酸,其中所述TAM序列是tca、tcac、tcag、tcat、tcaa、ttcan、ttcaa、ttcag或ttgat,并且其中:

(i)n=a、c、t或g。

721.如权利要求713-720中任一项所述的方法,其中插入步骤包括使用TnpB多肽的同源性定向修复(HDR)介导的插入并且所述TAM是tca。

722.如权利要求713-720中任一项所述的方法,其中插入步骤包括使用TnpB多肽的同源性定向修复(HDR)介导的插入并且所述TAM是tcac。

723.如权利要求713-720中任一项所述的方法,其中插入步骤包括使用TnpB多肽的同源性定向修复(HDR)介导的插入并且所述TAM是tcag。

724.如权利要求713-720中任一项所述的方法,其中插入步骤包括使用TnpB多肽的同源性定向修复(HDR)介导的插入并且所述TAM是tcat。

725.如权利要求713-720中任一项所述的方法,其中插入步骤包括使用TnpB多肽的同源性定向修复(HDR)介导的插入并且所述TAM是tcaa。

726.如权利要求713-720中任一项所述的方法,其中插入步骤包括使用TnpB多肽的同源性定向修复(HDR)介导的插入并且所述TAM是ttcan,其中n=a、c、t或g。

727.如权利要求713-720中任一项所述的方法,其中插入步骤包括使用TnpB多肽的同源性定向修复(HDR)介导的插入并且所述TAM是ttcaa。

728.如权利要求713-720中任一项所述的方法,其中插入步骤包括使用TnpB多肽的同源性定向修复(HDR)介导的插入并且所述TAM是ttcag。

729.如权利要求713-720中任一项所述的方法,其中插入步骤包括使用TnpB多肽的同源性定向修复(HDR)介导的插入并且所述TAM是ttgat。

730.如权利要求658或659所述的方法,其中将所述核酸构建体递送至所述细胞的步骤

包括利用逆转录病毒或腺相关病毒(AAV)载体进行病毒转导。

731.如权利要求730所述的方法,其中所述逆转录病毒是或者包括莫洛尼鼠白血病病毒(M-MuLV)、莫洛尼鼠肉瘤病毒(MoMSV)、哈维鼠肉瘤病毒(HaMuSV)、鼠乳腺肿瘤病毒(MuMTV)、长臂猿白血病病毒(GaLV)、猫白血病病毒(FLV)、泡沫病毒、弗瑞德鼠白血病病毒、鼠干细胞病毒(MSCV)、劳斯肉瘤病毒(RSV)、慢病毒、γ逆转录病毒、ε逆转录病毒、α逆转录病毒、β逆转录病毒、δ逆转录病毒或泡沫逆转录病毒。

732.如权利要求730所述的方法,其中所述AAV载体是AAV6载体或AAV9载体。

733.如权利要求660、661、662、673-693、696-715或720-732中任一项所述的方法,其中在所述位于TCR基因座处的插入位点处的编码所述经工程化的蛋白质的所述第一转基因降低功能性TCR的表达。

734.如权利要求660、661、662、673-693、696-715或720-733中任一项所述的方法,其中在所述位于TCR基因座处的插入位点处的编码所述经工程化的蛋白质的所述第一转基因破坏功能性TCR的表达。

735.如权利要求660、661、662、673-693、696-715或720-732中任一项所述的方法,其中在所述位于B2M基因座处的插入位点处的编码所述经工程化的蛋白质的所述第一转基因降低功能性B2M的表达。

736.如权利要求660、661、662、673-693、696-715或720-732,或735中任一项所述的方法,其中在所述位于B2M基因座处的插入位点处的编码所述经工程化的蛋白质的所述第一转基因降低功能性MHC I分子的表达。

737.如权利要求660、661、662、673-693、696-715或720-732,或735-736中任一项所述的方法,其中在所述位于B2M基因座的插入位点处的编码所述经工程化的蛋白质的所述第一转基因破坏功能性B2M的表达。

738.如权利要求660、661、662、673-693、696-715或720-732,或735-737中任一项所述的方法,其中在所述位于B2M基因座处的插入位点处的编码所述经工程化的蛋白质的所述第一转基因破坏功能性MHC I分子的表达。

739.如权利要求660、661、662、673-693、696-715或720-732中任一项所述的方法,其中在所述位于CIITA基因座处的插入位点处的编码所述经工程化的蛋白质的所述第一转基因降低功能性CIITA的表达。

740.如权利要求660、661、662、673-693、696-715或720-732,或739中任一项所述的方法,其中在所述位于CIITA基因座处的插入位点处的编码所述经工程化的蛋白质的所述第一转基因降低功能性MHC II分子的表达。

741.如权利要求660、661、662、673-693、696-715或720-732,或739-740中任一项所述的方法,其中在所述位于CIITA基因座处的插入位点处的编码所述经工程化的蛋白质的所述第一转基因破坏功能性CIITA的表达。

742.如权利要求660、661、662、673-693、696-715或720-732,或739-741中任一项所述的方法,其中在所述位于CIITA基因座处的插入位点处的编码所述经工程化的蛋白质的所述第一转基因破坏功能性MHC II分子的表达。

743.如权利要求658-742中任一项所述的方法,其中所述细胞包含一种或多种修饰,所述一种或多种修饰使以下的一个或多个等位基因失活或破坏:

(a)一种或多种主要组织相容性复合物(MHC)I类分子或调控所述一种或多种MHC I类分子的表达的一种或多种分子,和/或

(b)一种或多种MHC II类分子或调控所述一种或多种MHC II类分子的表达的一种或多种分子。

744.如权利要求658-743中任一项所述的方法,其中所述细胞包含一种或多种修饰,所述一种或多种修饰使一种或多种MHC I类分子或调控所述一种或多种MHC I类分子的表达的一种或多种分子的一个或多个等位基因失活或破坏。

745.如权利要求658-744中任一项所述的方法,其中所述细胞包含一种或多种修饰,所述一种或多种修饰使一种或多种MHC II类分子或调控所述一种或多种MHC II类分子的表达的一种或多种分子的一个或多个等位基因失活或破坏。

746.如权利要求658-745中任一项所述的方法,其中所述细胞包含一种或多种修饰,所述一种或多种修饰使以下的一个或多个等位基因失活或破坏:

(a)一种或多种MHC I类分子或调控所述一种或多种MHC I类分子的表达的一种或多种分子,和

(b)一种或多种MHC II类分子或调控所述一种或多种MHC II类分子的表达的一种或多种分子。

747.如权利要求743-746中任一项所述的方法,其中所述一种或多种修饰降低所述一种或多种MHC I类分子的细胞表面蛋白表达。

748.如权利要求743-747中任一项所述的方法,其中所述一种或多种修饰降低所述一种或多种MHC I类分子的细胞表面运输。

749.如权利要求743-748中任一项所述的方法,其中所述一种或多种修饰降低所述一种或多种MHC I类分子的功能,任选地其中所述功能是抗原呈递。

750.如权利要求743-749中任一项所述的v,其中所述一种或多种MHC I类分子是一种或多种人白细胞抗原(HLA)I类分子。

751.如权利要求750所述的方法,其中所述一种或多种HLA I类分子选自由HLA-A、HLA-B和HLA-C组成的组。

752.如权利要求743-751中任一项所述的方法,其中所述的调控所述一种或多种MHC I类分子的表达的一种或多种分子选自由B2M、NLRC5和TAP1组成的组。

753.如权利要求743-752中任一项所述的方法,其中所述一种或多种修饰降低所述一种或多种MHC II类分子的细胞表面蛋白表达。

754.如权利要求743-753中任一项所述的方法,其中所述一种或多种修饰降低所述一种或多种MHC II类分子的细胞表面运输。

755.如权利要求743-754中任一项所述的方法,其中所述一种或多种修饰降低所述一种或多种MHC II类分子的功能,任选地其中所述功能是抗原呈递。

756.如权利要求743-755中任一项所述的方法,其中所述一种或多种MHC II类分子是一种或多种人白细胞抗原(HLA)II类分子。

757.如权利要求756所述的方法,其中所述一种或多种HLA II类分子选自由HLA-DP、HLA-DQ和/或HLA-DR组成的组。

758.如权利要求743-757中任一项所述的方法,其中所述的调控所述一种或多种MHC

II类分子的表达的一种或多种分子选自由CIITA和CD74组成的组。

759.如权利要求660-758中任一项所述的方法,其中在所述位于安全港基因座处的插入位点处的编码所述经工程化的蛋白质的所述第一转基因破坏功能性AAVS1、ABO、CCR5、CLYBL、CXCR4、F3、FUT1、HMGB1、KDM5D、LRP1、MICA、MICB、RHD、ROSA26或SHS231的表达。

760.如权利要求660-758中任一项所述的方法,其中在所述位于安全港基因座处的插入位点处的编码所述经工程化的蛋白质的所述第一转基因破坏功能性AAVS1、ABO、CCR5、CLYBL、CXCR4、F3、FUT1、HMGB1、KDM5D、LRP1、MICA、MICB、RHD、ROSA26或SHS231分子的表达。

761.如权利要求658-760中任一项所述的方法,其中所述经遗传工程化的细胞具有所述经工程化的蛋白质的细胞表面表达。

762.如权利要求658-761中任一项所述的方法,其中所述核酸构建体进一步包含编码致耐受因子的第二转基因。

763.如权利要求762所述的方法,其中所述方法进一步包括将所述第二转基因插入到所述细胞的基因组中的第二插入位点。

764.如权利要求762所述的方法,其中所述致耐受因子是或者包括A20/TNFAIP3、B2M-HLA-E、CD16、CD16 Fc受体、CD24、CD27、CD35、CD39、CD46、CD47、CD52、CD55、CD59、CD64、CD200、CCL21、CCL22、CTLA4-Ig、C1抑制剂、CR1、DUX4、FASL、HLA-C、HLA-E、HLA-E重链、HLA-F、HLA-G、H2-M3、IDO1、IL-10、IL15-RF、IL-35、IL-39、MANF、Mfge8、PD-L1或Serpinb9。

765.如权利要求762-764中任一项所述的方法,其中编码所述致耐受因子的所述第二转基因被插入在位于TCR基因座处的第二插入位点处。

766.如权利要求762-764中任一项所述的方法,其中编码所述致耐受因子的所述第二转基因被插入在位于B2M基因座处的第二插入位点处。

767.如权利要求762-121b764中任一项所述的方法,其中编码所述致耐受因子的所述第二转基因被插入在位于CIITA基因座处的第二插入位点处。

768.如权利要求762-764中任一项所述的方法,其中编码所述致耐受因子的所述第二转基因被插入在位于安全港基因座处的第二插入位点处。

769.如权利要求768所述的方法,其中所述安全港基因座是AAVS1、ABO、CCR5、CLYBL、CXCR4、F3、FUT1、HMGB1、KDM5D、LRP1、MICA、MICB、RHD、ROSA26或SHS231基因座。

770.如权利要求762-769中任一项所述的方法,其中所述经遗传工程化的细胞具有所述致耐受因子的细胞表面表达。

771.如权利要求658-770中任一项所述的方法,其中所述核酸构建体进一步包含编码嵌合抗原受体(CAR)的第三转基因。

772.如权利要求771所述的方法,其中所述方法进一步包括将所述第三转基因插入到所述细胞的基因组中的第三插入位点中。

773.如权利要求771所述的方法,其中所述CAR是或者包括CD5特异性CAR、CD19特异性CAR、CD20特异性CAR、CD22特异性CAR、CD23特异性CAR、CD30特异性CAR、CD33特异性CAR、CD38特异性CAR、CD70特异性CAR、CD123特异性CAR、CD138特异性CAR、κ,λ,B细胞成熟剂(BCMA)特异性CAR、G蛋白偶联受体家族C组5成员D(GPRC5D)特异性CAR、CD123特异性CAR、LeY特异性CAR、NKG2D配体特异性CAR、WT1特异性CAR、GD2特异性CAR、HER2特异性CAR、EGFR特异性CAR、EGFRvIII特异性CAR、B7H3特异性CAR、PSMA特异性CAR、PSCA特异性CAR、CAIX特

异性CAR、CD171特异性CAR、CEA特异性CAR、CSPG4特异性CAR、EPHA2特异性CAR、FAP特异性CAR、FRα特异性CAR、IL-13Rα特异性CAR、间皮素特异性CAR、MUC1特异性CAR、MUC16特异性CAR、ROR1特异性CAR、C-Met特异性CAR、CD133特异性CAR、Ep-CAM特异性CAR、GPC3特异性CAR、HPV16-E6特异性CAR、IL13Ra2特异性CAR、MAGEA3特异性CAR、MAGEA4特异性CAR、MART1特异性CAR、NY-ESO-1特异性CAR、VEGFR2特异性CAR、α-叶酸受体特异性CAR、CD24特异性CAR、CD44v7/8特异性CAR、EGP-2特异性CAR、EGP-40特异性CAR、erb-B2特异性CAR、erb-B 2,3,4特异性CAR、FBP特异性CAR、胎儿乙酰胆碱e受体特异性CAR、GD2特异性CAR、GD3特异性CAR、HMW-MAA特异性CAR、IL-11Rα特异性CAR、KDR特异性CAR、Lewis Y特异性CAR、L1细胞粘附分子特异性CAR、MAGE-A1特异性CAR、癌胚抗原(h5T4)特异性CAR、TAG-72特异性CAR、或CD19/CD22双特异性CAR。

774.如权利要求771-773中任一项所述的方法,其中所述CAR是或者包括CD19特异性CAR、CD20特异性CAR、CD22特异性CAR、CD38特异性CAR、CD123特异性CAR、CD138特异性CAR、BCMA特异性CAR或CD19/CD22双特异性CAR。

775.如权利要求771-774中任一项所述的方法,其中所述经遗传工程化的细胞具有所述CAR的细胞表面表达。

776.如权利要求658-770中任一项所述的方法,其中所述核酸构建体进一步包含编码嵌合自身抗原受体(CAAR)的第三转基因。

777.如权利要求776所述的方法,其中所述方法进一步包括将所述第三转基因插入到所述细胞的基因组中的第三插入位点中。

778.如权利要求776所述的方法,其中所述CAAR包含选自由胰腺β细胞抗原、滑膜关节抗原、髓鞘碱性蛋白、蛋白脂质蛋白、髓鞘少突糖蛋白、MuSK、角质形成细胞粘附蛋白桥粒芯糖蛋白3(Dsg3)、Ro-RNP复合物、La抗原、髓过氧化物酶、蛋白酶3、心磷脂、瓜氨酸化蛋白、氨基甲酰化蛋白和基膜胶原蛋白α3链组成的组的抗原。

779.如权利要求776-778中任一项所述的方法,其中所述经遗传工程化的细胞具有所述CAAR的细胞表面表达。

780.如权利要求658-770中任一项所述的方法,其中所述核酸构建体进一步包含编码B细胞自身抗体受体(BAR)的第三转基因。

781.如权利要求780所述的方法,其中所述方法进一步包括将所述第三转基因插入到所述细胞的基因组中的第三插入位点中。

782.如权利要求780所述的方法,其中所述经遗传工程化的细胞具有所述BAR的细胞表面表达。

783.如权利要求771-782中任一项所述的方法,其中所述第三转基因被插入在安全港基因座处。

784.如权利要求771-783中任一项所述的方法,其中所述第三转基因被插入在TRAC基因座、TRBC1基因座、TRBC2基因座、B2M基因座、CIITA基因座、MICA基因座、MICB基因座或安全港基因座处。

785.如权利要求771-784中任一项所述的方法,其中所述第三转基因被插入在AAVS1基因座、ABO基因座、CCR5基因座、CLYBL基因座、CXCR4基因座、F3基因座、FUT1基因座、HMGB1基因座、KDM5D基因座、LRP1基因座、RHD基因座、ROSA26基因座或SHS231基因座处。

786.如权利要求658-785中任一项所述的方法,其中所述第一转基因和所述第二转基因被插入到相同的插入位点中。

787.如权利要求658-768或780-785中任一项所述的方法,其中所述第一转基因和所述第三转基因被插入到相同的插入位点中。

788.如权利要求762-785中任一项所述的方法,其中所述第二转基因和所述第三转基因被插入到相同的插入位点中。

789.如权利要求658-785中任一项所述的方法,其中所述第一转基因、所述第二转基因和所述第三转基因被插入到相同的插入位点中。

790.如权利要求658-789中任一项所述的方法,其中所述第一转基因、所述第二转基因和所述第三转基因由三个单独的构建体编码。

791.如权利要求658-789中任一项所述的方法,其中所述第一转基因、所述第二转基因和所述第三转基因由两个单独的构建体编码。

792.如权利要求658-789中任一项所述的方法,其中所述第一转基因、所述第二转基因和所述第三转基因由多顺反子构建体编码。

793.如权利要求658-792中任一项所述的方法,其中所述经遗传工程化的细胞是人细胞或非人动物细胞。

794.如权利要求793所述的方法,其中所述非人动物细胞是猪、牛或绵羊细胞。

795.如权利要求793所述的方法,其中所述经遗传工程化的细胞是人细胞。

796.如权利要求658-795中任一项所述的方法,其中所述经遗传工程化的细胞是来源于干细胞或祖细胞的分化的细胞。

797.如权利要求658-796中任一项所述的方法,其中所述细胞是干细胞或祖细胞。

798.如权利要求658-796中任一项所述的方法,其中所述细胞是来源于干细胞或祖细胞的分化的细胞。

799.如权利要求796所述的方法,其中所述干细胞是多能干细胞。

800.如权利要求799所述的方法,其中所述多能干细胞是诱导型多能干细胞(iPSC)。

801.如权利要求799所述的方法,其中所述多能干细胞是胚胎干细胞(ESC)。

802.如权利要求658-801中任一项所述的方法,其中所述细胞是从供体分离的原代细胞。

803.如权利要求802所述的方法,其中在从所述供体获取所述原代细胞时所述供体是健康的且/或没有被怀疑患有疾病或疾患。

804.如权利要求658-803中任一项所述的方法,其中所述细胞是胰岛细胞、β胰岛细胞、胰腺胰岛细胞、免疫细胞、B细胞、T细胞、自然杀伤(NK)细胞、自然杀伤T(NKT)细胞、巨噬细胞、内皮细胞、肌肉细胞、心脏肌肉细胞、平滑肌细胞、骨骼肌细胞、多巴胺能神经元、视网膜色素上皮细胞、视细胞、肝细胞、甲状腺细胞、皮肤细胞、胶质祖细胞、神经细胞、心脏细胞、干细胞、造血干细胞、诱导型多能干细胞(iPSC)、间充质干细胞(MSC)、胚胎干细胞(ESC)、多能干细胞(PSC)、血细胞或其组合。

805.如权利要求658-804中任一项所述的方法,其中所述细胞是T细胞。

806.如权利要求805所述的方法,其中所述T细胞是CD3+T细胞、CD4+T细胞、CDS+T细胞、原初T细胞、调节T(Treg)细胞、非调节T细胞、Th1细胞、Th2细胞、Th9细胞、Th17细胞、滤泡辅

助T(Tfh)细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、效应T(Teff)细胞、中央记忆T细胞、效应记忆T细胞、表达CD45RA的效应记忆T细胞(TEMRA细胞)、组织驻留记忆(Trm)细胞、虚拟记忆T细胞、先天记忆T细胞、记忆干细胞(Tse)、γδT细胞,或其组合。

807.如权利要求805或806所述的方法,其中所述T细胞是细胞毒性T细胞、辅助T细胞、记忆T细胞、调节T细胞、肿瘤浸润淋巴细胞,或其组合。

808.如权利要求805-807中任一项所述的方法,其中所述细胞是人T细胞。

809.如权利要求805-808中任一项所述的方法,其中所述细胞是自体T细胞。

810.如权利要求805-808中任一项所述的方法,其中所述细胞是同种异体T细胞。

811.如权利要求810所述的方法,其中所述同种异体T细胞是原代T细胞。

812.如810或811所述的方法,其中所述同种异体T细胞已从胚胎干细胞(ESC)或诱导型多能干细胞(iPSC)分化而来。

经工程化的CD47蛋白及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2022年2月17日提交的美国临时申请第63/311,143号的优先权,该申请以引用的方式并入本文中。

发明领域

[0003] 本公开总体上涉及经工程化的CD47蛋白及其用途。还公开了编码经工程化的CD47蛋白的多核苷酸、包含该多核苷酸的载体、包含该经工程化的蛋白质和/或载体的细胞,以及包含该经工程化的CD47蛋白的组合物。

[0004] 国际申请PCT/US2021/065157和美国申请63/282,961、63/270,956和63/222,954以引用的方式整体并入。

发明内容

[0005] CD47是人体中由CD47基因(图1)编码的跨膜蛋白。它是免疫球蛋白(Ig)超家族的成员。CD47的分子量为约50kDa。它被糖基化并在人体中几乎所有细胞中普遍表达(图2)。它具有在其N端的单个IgV样结构域、具有五个跨膜区段的高度疏水段,以及在其C端的选择性剪接的胞质尾(图4)。另外,它在邻近的跨膜区段之间具有两个细胞外区域和两个细胞内区域。信号肽当存在于CD47同种型上时,位于IgV样结构域的N端处。人CD47基因具有六种天然存在的转录物,其中五种转录物各自编码CD47的蛋白质同种型(Ensembl,基因:CD47)。因此,人CD47有五种蛋白质同种型,每种同种型均具有跨各种细胞和组织类型的差异表达。

[0006] CD47参与包括凋亡、增殖、粘附和迁移在内的一系列细胞过程。CD47与多种细胞外配体,诸如TSP-1、整联蛋白、其他CD47蛋白和SIRPα相互作用。CD47/SIRPα相互作用调控许多身体系统(诸如免疫系统)中的多种细胞间相互作用,在该系统中CD47/SIRPα相互作用调控淋巴细胞稳态、树突状细胞(DC)的成熟和活化、次级淋巴系器官中某些DC亚组的正确定位以及细胞迁移。细胞(包括移植或细胞疗法应用背景下的供体细胞)上的CD47可以充当“自身标志物”,并通过与循环免疫细胞表面上的SIRPα结合以递送抑制性“不要杀伤我(don't kill me)”信号来调控吞噬作用。CD47-SIRPα结合引起SIRPα上基于免疫受体酪氨酸的抑制基序(ITIM)磷酸化,从而触发SHP1和SHP2 Src同源磷酸酶的募集。这些磷酸酶转而抑制吞噬突触处肌球蛋白II的积聚,从而阻止吞噬作用(Fujioka等人,1996)巨噬细胞对靶细胞的吞噬作用最终受活化信号(例如,Fcγ R、CRT、LRP-1)和抑制性信号(例如,SIRPα-CD47)的平衡调控。CD47表达升高可以帮助细胞逃避免疫监视、随后的破坏和先天免疫细胞杀伤。因此,当正常免疫反应出现病理性或不期望的活化时,CD47可以用作诱导免疫耐受的致耐受因子。例如,当患者在接受同种异体移植或同种异体细胞疗法后对供体抗原发展出免疫反应时,或者当身体对与自身免疫性疾病有牵连的自身抗原做出不适当反应时,就会发生这种情况。然而,本领域需要改进CD47的此类用途。

[0007] 在一个方面,本公开提供了经工程化的CD47蛋白,其具有比野生型全长人CD47蛋白更少的氨基酸。此类经工程化的蛋白质提供了更有效的细胞工程化方法,包括经由整合

基因疗法载体进行递送。

[0008] 在一个方面,本公开提供了一种经工程化的CD47蛋白,该经工程化的CD47蛋白包含人CD47细胞外结构域或其部分、至少一个人CD47跨膜结构域或其部分、和包含至少一个氨基酸缺失的人CD47细胞内结构域的一部分,其中该缺失不是C端18个氨基酸缺失。

[0009] 在一个方面,本公开提供了一种经工程化的CD47蛋白,该经工程化的CD47蛋白包含人CD47细胞外结构域的一部分、至少一个人CD47跨膜结构域或其部分、和包含C端18个氨基酸缺失的人CD47细胞内结构域的一部分。

[0010] 在一个方面,本公开提供了一种经工程化的CD47蛋白,该经工程化的CD47蛋白包含人CD47细胞外结构域或其部分、至少一个且少于五个人CD47跨膜结构域或其部分、和包含C端18个氨基酸缺失的人CD47细胞内结构域的一部分。

[0011] 在一个方面,本公开提供了一种经工程化的CD47蛋白,该经工程化的CD47蛋白包含人CD47细胞外结构域或其部分、至少一个人CD47跨膜结构域或其部分、和信号肽,其中该经工程化的CD47蛋白不包含细胞内结构域。

[0012] 在一个方面,本公开提供了一种经工程化的CD47蛋白,该经工程化的CD47蛋白包含人CD47细胞外结构域,和至少一个人CD47跨膜结构域或其部分,其中该经工程化的CD47蛋白不包含细胞内结构域。

[0013] 在一个方面,本公开提供了一种经工程化的CD47蛋白,该经工程化的CD47蛋白包含人CD47细胞外结构域或其部分,和至少一个且少于五个人CD47跨膜结构域或其部分,其中该经工程化的CD47蛋白不包含细胞内结构域。

[0014] 在一个方面,本公开提供了一种经工程化的CD47蛋白,该经工程化的CD47蛋白包含人CD47细胞外结构域或其部分,和至少一个人CD47跨膜结构域或其部分,不包含细胞内结构域或包含至少一个氨基酸缺失的人CD47细胞内结构域,其中该经工程化的CD47蛋白具有与SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:6具有最多99%同一性的氨基酸序列。

[0015] 在一些实施方案中,本文公开的经工程化的CD47蛋白包含比野生型CD47蛋白更少的糖基化修饰位点。

[0016] 在一些实施方案中,本文公开的经工程化的CD47蛋白包含比野生型人CD47蛋白更少的糖基化修饰。

[0017] 在一些实施方案中,本文公开的经工程化的CD47蛋白包含少于两个硫酸乙酰肝素和/或硫酸软骨素糖胺聚糖修饰位点。

[0018] 在一些实施方案中,本文公开的经工程化的CD47蛋白包含少于两个硫酸乙酰肝素和/或硫酸软骨素糖胺聚糖链。

[0019] 在一些实施方案中,本文公开的经工程化的CD47蛋白包含少于五个N-糖基化修饰位点。

[0020] 在一些实施方案中,本文公开的经工程化的CD47蛋白包含少于四个N-糖基化修饰链。

[0021] 在一些实施方案中,与野生型人CD47蛋白相比,本文公开的经工程化的CD47蛋白中的人CD47细胞外结构域或其部分缺少一个或多个血小板反应蛋白-1结合位点。

[0022] 在一些实施方案中,与野生型人CD47蛋白相比,本文公开的经工程化的CD47蛋白中的人CD47细胞外结构域或其部分缺少一个或多个整联蛋白结合位点。在一些实施方案

中,该整联蛋白选自由由以下组成的组:αvβ3整联蛋白、αIIbβ3整联蛋白、α2β1整联蛋白、α4β1整联蛋白、α6β1整联蛋白和α5整联蛋白。

[0023] 在一些实施方案中,本文公开的经工程化的CD47蛋白中的人CD47细胞外结构域或其部分包含至少一个SIRPα相互作用基序。

[0024] 在一些实施方案中,本文公开的经工程化的CD47蛋白包含介于位于人CD47细胞外结构域或其部分内的半胱氨酸与位于一个或多个人CD47跨膜结构域内或之间的半胱氨酸之间的二硫键。

[0025] 在一些实施方案中,本文公开的经工程化的CD47蛋白是致耐受因子。

[0026] 在一些实施方案中,本文公开的经工程化的CD47蛋白是跨膜蛋白。

[0027] 在一些实施方案中,本文公开的经工程化的CD47蛋白中的人CD47细胞外结构域包含与SEQ ID NO:2的氨基酸19-141具有至少80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0028] 在一些实施方案中,本文公开的经工程化的CD47蛋白中的至少一个人CD47跨膜结构域中的任一个包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:与SEQ ID NO:2的氨基酸142-162具有至少80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列、与SEQ ID NO:2的氨基酸177-197具有至少80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列、与SEQ ID NO:2的氨基酸208-228具有至少80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列、与SEQ ID NO:2的氨基酸236-257具有至少80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列、以及与SEQ ID NO:2的氨基酸269-289具有至少80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0029] 在一些实施方案中,本文公开的经工程化的CD47蛋白中的人CD47细胞内结构域包含与SEQ ID NO:2的氨基酸290-323的序列具有至少80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0030] 在一些实施方案中,本文公开的经工程化的CD47蛋白包含与SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列具有至少80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0031] 在一些实施方案中,本文公开的经工程化的CD47蛋白包含与SEQ ID NO:8中所示的氨基酸序列具有至少80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0032] 在一些实施方案中,本文公开的经工程化的CD47蛋白包含与SEQ ID NO:9中所示的氨基酸序列具有至少80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0033] 在一些实施方案中,本文公开的经工程化的CD47蛋白包含与SEQ ID NO:12中所示的氨基酸序列具有至少80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0034] 在一些实施方案中,本文公开的经工程化的CD47蛋白包含与SEQ ID NO:10中所示的氨基酸序列具有至少80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0035] 在一些实施方案中,本文公开的经工程化的CD47蛋白包含与SEQ ID NO:11中所示

的氨基酸序列具有至少80％、90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一性的氨基酸序列。

[0036] 在一些实施方案中,经工程化的CD47蛋白是经工程化的人CD47蛋白、经工程化的人源化CD47蛋白或经工程化的部分人源化CD47蛋白。

[0037] 在另一个方面,本公开提供了编码本文公开的经工程化的CD47蛋白的多核苷酸。

[0038] 在另一个方面,本公开提供了包含编码本文公开的经工程化的CD47蛋白的多核苷酸的载体。在一些实施方案中,该载体是质粒或病毒载体。在一些实施方案中,该病毒载体是假型化的自失活慢病毒载体。在一些实施方案中,该载体是多顺反子载体。在一些实施方案中,该多顺反子载体是双顺反子载体或三顺反子载体。

[0039] 在另一个方面,本公开提供了包含编码本文公开的经工程化的CD47蛋白的多核苷酸的细胞,和/或包含编码本文公开的经工程化的CD47蛋白的多核苷酸的载体。

[0040] 在另一个方面,本公开提供了包含本文公开的经工程化的CD47蛋白的细胞。

[0041] 在一些实施方案中,本文公开的细胞是干细胞。

[0042] 在一些实施方案中,本文公开的细胞是多能干细胞。在一些实施方案中,多能干细胞是诱导型多能干细胞(iPSC)或胚胎干细胞。

[0043] 在一些实施方案中,本文公开的细胞是胰腺胰岛细胞。

[0044] 在一些实施方案中,本文公开的细胞是原代胰腺胰岛细胞。在一些实施方案中,胰腺胰岛细胞从多能干细胞分化而来。在一些实施方案中,多能干细胞是iPSC或ESC。

[0045] 在一些实施方案中,本文公开的细胞是T细胞。

[0046] 在一些实施方案中,本文公开的细胞是原代T细胞。在一些实施方案中,原代T细胞是包含嵌合抗原受体的T细胞。在一些实施方案中,T细胞是CAR-T细胞。在一些实施方案中,T细胞从多能干细胞分化而来。在一些实施方案中,多能干细胞是iPSC或ESC。

[0047] 在一些实施方案中,本文公开的细胞选自由干细胞、胰腺胰岛细胞、T细胞、CAR-T细胞、心脏细胞、心脏祖细胞、神经细胞、胶质祖细胞、内皮细胞、B细胞、视网膜色素上皮细胞、肝细胞、甲状腺细胞、皮肤细胞、血细胞、浆细胞、血小板、肾细胞、上皮细胞、自然杀伤细胞(NK细胞)和CAR-NK细胞组成的细胞的组。

[0048] 在一些实施方案中,该细胞是呈原代细胞形式。在一些实施方案中,该细胞是分化的细胞。

[0049] 在一些实施方案中,该细胞是低免疫原性细胞。

[0050] 在一些实施方案中,一种或多种主要组织相容性(MHC)I类蛋白和/或一种或多种MHC II类蛋白的表达与野生型或对照细胞相比降低。在一些实施方案中,野生型或对照细胞是起始材料。在一些实施方案中,本文公开的细胞不表达一种或多种主要组织相容性(MHC)I类蛋白和/或一种或多种MHC II类蛋白。在一些实施方案中,MHC蛋白是HLA蛋白。

[0051] 在一些实施方案中,通过敲除或降低本文所述的细胞中B2M的表达来降低MHC I类蛋白的表达。

[0052] 在一些实施方案中,通过敲除或降低本文所述的细胞中CIITA的表达来降低MHC II类蛋白的表达。

[0053] 在一些实施方案中,TRAC和/或TRBC在本文所述的细胞中被敲除或它们在本文所述的细胞中的表达被降低。

[0054] 在另一个方面,本公开提供了包含本文公开的经工程化的CD47蛋白的组合物。

[0055] 在另一个方面,本公开提供了包含本文公开的细胞的组合物。

[0056] 附图简述

[0057] 图1提供了人CD47基因图谱并图示了人CD47基因中进行蛋白质编码的区域。该图谱来自Ensembl基因组数据库。

[0058] 图2A和图2B提供了CD47 ENSG00000196776.14CD47分子(来源:HGNC符号;Acc:HGNC:1682)的同种型表达,并图示了每种同种型在各种人组织和人细胞类型中的表达。此数据来自基因型-组织表达(Genotype-Tissue Expression,GTEx)项目数据库。

[0059] 图3提供了预测的CD47跨膜结构域和人CD47蛋白拓扑学。具体来说,图3提供了人CD47蛋白中各种结构域的预测位置。此预测来自通用蛋白质资源(Universal Protein Resource,UniProt)。

[0060] 图4提供了根据AlphaFold蛋白质结构数据库预测的人CD47三级结构。

[0061] 图5A、图5B、图5C和图5D提供了人CD47蛋白的同种型201、同种型202、同种型203、同种型205和同种型206的序列比对。

[0062] 图6提供了示出包含示例性CD47截短变体的LVV的如经由Ella自动免疫测定系统评估的病毒滴度的示例性图表。

[0063] 图7提供了示出在用经截短的CD47 LVV处理后表达CD47的CD47KO HEK293T细胞的百分比(如通过抗CD47流式细胞术评估)的示例性图表。测试了各种CD47变体,包括几种包含GPI锚的CD47变体。

[0064] 图8提供了示出在用经截短的CD47 LVV处理后表达CD47的CD47KO HEK293T细胞的百分比(如通过抗CD47流式细胞术评估)的示例性图表。测试了各种CD47变体,包括几种包含经截短的细胞内结构域和替代的跨膜结构域的CD47变体。

[0065] 图9提供了示出在用经截短的CD47 LVV处理后表达CD47的CD47KO HEK293T细胞的百分比(如通过抗CD47流式细胞术评估)的示例性图表。测试了各种CD47变体,包括那些包含经截短的细胞内结构域和替代的铰链结构域的CD47变体。

[0066] 图10提供了示出在用经截短的CD47 LVV处理后表达CD47的CD47KO HEK293T细胞的百分比(如通过抗CD47流式细胞术评估)的示例性图表。测试了各种CD47变体,包括那些包含经截短的细胞内结构域和替代的铰链结构域的CD47变体。

[0067] 图11提供了示出在用经截短的CD47 LVV处理后表达CD47的CD47KO HEK293T细胞的百分比(如通过抗CD47流式细胞术评估)的示例性图表。测试了各种CD47变体,包括那些包含经截短的细胞内结构域和替代的铰链结构域的CD47变体。

[0068] 图12A、图12B、图12C、图12D和图12E提供了示出在用经截短的CD47 LVV处理后表达CD47的CD47KO HEK293T细胞的百分比(如通过抗CD47流式细胞术评估)的示例性图表。

[0069] 图13提供了示出在用经截短的CD47 LVV处理后表达CD47的CD47KO HEK293T细胞的百分比(如通过抗CD47流式细胞术评估)的示例性图表。

[0070] 图14提供了示出在用经截短的CD47 LVV处理后表达CD47的CD47KO HEK293T细胞的百分比(如通过抗CD47流式细胞术评估)的示例性图表。

[0071] 图15提供了示出在用经截短的CD47 LVV处理后表达CD47的CD47KO HEK293T细胞的百分比(如通过SIRPα-FC流式细胞术评估)的示例性图表。

[0072] 图16提供了示出在用经截短的CD47 LVV处理后表达CD47的CD47KO HEK293T细胞的百分比(如通过SIRPα-FC流式细胞术评估)的示例性图表。

[0073] 图17提供了示出在用经截短的CD47 LVV处理后表达CD47的CD47KO HEK293T细胞的百分比(如通过SIRPα-FC流式细胞术评估)的示例性图表。

[0074] 图18A提供了示出在用经截短的CD47 LVV处理后表达CD47的CD47KO HEK293T细胞的百分比(如通过抗CD47流式细胞术评估)的示例性图表。

[0075] 图18B提供了示出在用经截短的CD47 LVV处理后表达CD47的CD47KO HEK293T细胞的百分比(如通过SIRPα-FC流式细胞术评估)的示例性图表。

具体实施方式

[0076] I.定义

[0077] 本文引用的所有出版物、专利和专利申请以引用的方式整体并入,引用程度如同每个单个出版物、专利或专利申请具体地且单独地被指示为以引用的方式整体并入。

[0078] 在本公开中,除非另有说明,否则本文中使用的科学技术术语具有本领域技术人员通常理解的含义。尽管与本文所述的方法和材料相似或等效的任何方法和材料都可用于本公开的实践中,但本文描述了优选的方法和材料。因此,本文所定义的术语将通过参考整个说明书进行更全面的描述。

[0079] 除非上下文另有明确指示,否则如本文所用,单数术语“一”、“一个”和“该/所述”包括复数指代物。

[0080] 如本文所用,“和/或”是指并涵盖相关所列项目中的一个或多个项目的任何和所有可能组合,以及在以替代方式(“或/或者”)解释时的组合缺乏。此外,本发明还考虑了,在本发明的一些实施方案中,可以排除或省略本文所阐述的任何特征或特征的组合。

[0081] 如本文在提及可测量值(诸如序列长度等)时所使用的术语“约”意在涵盖指定量的5%、1%、0.5%或甚至0.1%的变化。

[0082] 除非上下文另有要求,否则术语“包括(comprise)”、“包含(comprises)”和“含有(comprising)”或类似术语旨在表示非排他性包含,使得所列举的要素或特征列表不仅仅包括那些陈述或列出的要素,而是可以包括未列出或陈述的其他要素或特征。

[0083] 除非另有指示,否则核酸以5’到3’的取向从左到右书写;并且氨基酸序列以氨基到羧基的取向从左到右书写。

[0084] 应当理解,本公开不限于所描述的特定方法、方案和试剂,因为这些可能会有所不同,这取决于本领域技术人员使用它们的环境。

[0085] 如本文所用,“亲和力”是指分子(例如受体)的单个结合位点与其结合配偶体(例如配体)之间的非共价相互作用的总和的强度。分子对其配偶体的亲和力通常可由平衡解离常数(K_D)(或其反向平衡结合常数,KA)表示。

[0086] 亲和力可通过本领域已知的常用方法(包括本文中描述的那些方法)进行测量。参见例如,Pope M.E.,Soste M.V.,Eyford B.A.,Anderson N.L.,Pearson T.W.,(2009)J.Immunol.Methods.341(1-2):86-96和其中所述的方法。

[0087] 如本文所用,如应用于核酸或多核苷酸序列的术语“同一性百分比”和“同一性%”是指使用标准化算法比对的至少两个核酸或多核苷酸序列之间的残基匹配的百分比。此种

算法可以以标准化和可重复的方式在正在被比较的序列中插入空位以便优化两个序列之间的比对,并从而实现对这两个序列的更有意义的比较。

[0088] 核酸或多核苷酸序列之间的同一性百分比可使用由美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information,NCBI)基本局部比对搜索工具(Basic Local Alignment Search Tool,BLAST)(Altschul,S.F.等人(1990)J.Mol.Biol.215:403-410)提供的一套常用且可免费获得的序列比较算法来确定,该算法可从包括马里兰州贝塞斯达(Bethesda,Md.)的NCBI以及互联网上的http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/在内的多个来源获得。

[0089] 由于遗传密码的简并性,未表现出高度同一性的核酸或多核苷酸序列可能仍然编码相似的氨基酸序列。应当理解,可以利用这种简并性来改变核酸序列,以产生全部编码基本上相同的蛋白质的多个核酸序列。具体而言,可通过生成其中一个或多个选定(或所有)密码子的第三位置被混合碱基和/或脱氧肌苷残基取代的序列来实现简并密码子取代(Batzer等人(1991)Nucleic Acid Res 19:5081;Ohtsuka等人(1985)J Biol Chem 260:2605-2608;Cassol等人(1992);Rossolini等人(1994)Mol Cell Probes 8:91-98)。术语“核酸”是指呈单链或双链形式的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸及其聚合物。除非特别限制,否则该术语涵盖含有天然核苷酸的已知类似物的核酸,这些核酸具有与参考核酸相似的结合特性并以与天然存在的核苷酸类似的方式代谢。术语核酸可与多核苷酸,以及(在适当的背景下)基因、cDNA和由基因编码的mRNA互换使用。

[0090] 如本文所用,关于肽、多肽或蛋白质序列的“氨基酸序列同一性百分比(%)”被定义为在比对序列并引入空位(如果需要)以实现最大序列同一性百分比并且不将任何保守取代视为序列同一性的一部分之后,候选序列中与另一种肽或多肽序列中的氨基酸残基同一的氨基酸残基的百分比。本公开中的氨基酸序列同一性百分比是使用BLAST软件来测量的。本领域技术人员可以确定用于测量比对的适当参数,包括在正在被比较的序列的全长上实现最大比对所需的任何算法。

[0091] 氨基酸取代是指多肽中的一个氨基酸用另一种氨基酸替换。示例性取代显示于表1中。可以将氨基酸取代引入到所关注的蛋白质中,并且筛选产物的期望活性,例如保留/改善的生物活性。

[0092] 表1.示例性氨基酸取代

[0093]

原始残基	示例性取代
Ala (A)	Val; Leu; Ile
Arg (R)	Lys; Gln; Asn
Asn (N)	Gln; His; Asp; Lys; Arg
Asp (D)	Glu; Asn
Cys (C)	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn; Glu
Glu (E)	Asp; Gln

[0094]

Gly (G)	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 正亮氨酸
Leu (L)	正亮氨酸; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Val; Ser
Trp (W)	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正亮氨酸

[0095] 可以根据共同的侧链特性对氨基酸进行分组:

[0096] (1)疏水性:正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile;

[0097] (2)中性亲水性:Cys、Ser、Thr、Asn、Gln;

[0098] (3)酸性:Asp、Glu;

[0099] (4)碱性:His、Lys、Arg;

[0100] (5)影响链取向的残基:Gly、Pro;

[0101] (6)芳香族:Trp、Tyr、Phe。

[0102] 非保守取代将需要将这些类别之一的成员交换成另一类别的。关于诸如序列表中所示的序列的核苷酸或氨基酸位置的术语"对应于",是指基于结构序列比对或使用标准比对算法(诸如GAP算法)在与目标序列比对后鉴定的核苷酸或氨基酸位置。例如,相似序列(例如片段或物种变体)的对应残基可以通过结构比对方法与参考序列比对来确定。通过比对序列,本领域技术人员可以鉴定对应的残基,例如,使用保守的和同一的氨基酸残基作为指导物。

[0103] 如本文所用,人CD47蛋白的同种型是指由人CD47基因翻译并通过选择性剪接加工的蛋白质。

[0104] 如本文所用,野生型人CD47蛋白是指体内天然存在的人CD47蛋白,诸如在人基因组中/由人基因组编码的野生型人CD47蛋白。野生型人CD47蛋白可以是天然存在的人CD47蛋白的同种型中的任何同种型。CD47的五种目前已知的天然存在的同种型(同种型201、202、203、205、206)的氨基酸序列分别示于SEQ ID NO:1、2、4-5中。同种型CD47-202(SEQ ID NO:2)是在被翻译时含有信号序列的全长野生型人CD47蛋白。缺乏信号序列的成熟CD47-202同种型的序列示于SEQ ID NO:3中。野生型人CD47蛋白在其被表达时可能具有或可能不具有信号肽。例如,CD47-206在其被翻译时缺少信号肽。野生型人CD47蛋白可能会或可能不会被糖基化。野生型人CD47蛋白可能是蛋白聚糖。

[0105] 如本文所用,经工程化的CD47蛋白是指在任何物种中不天然存在的CD47蛋白。换句话说,经工程化的CD47蛋白在任何物种中都不是野生型CD47蛋白。在一些实施方案中,经工程化的CD47蛋白是经工程化的人CD47蛋白,这意味着它是通过使用人野生型CD47蛋白作为起始材料并进行本文所述的一种或多种修饰而工程化的。在一些实施方案中,经工程化

的CD47蛋白是经工程化的人源化CD47蛋白,这意味着它是通过使用非人(例如鼠)CD47蛋白作为起始材料并且通过将非人CD47序列人源化并且此外还进行本文所述的一种或多种其他修饰而工程化的。在一些实施方案中,经工程化的CD47蛋白是经工程化的一部分人源化CD47蛋白,这意味着它是通过使用非人(例如鼠)CD47蛋白作为起始材料并且通过将非人CD47序列的一部分人源化并且此外还进行本文所述的一种或多种其他修饰而工程化的。

[0106] 如本文所用,经工程化的CD47蛋白是指不是在原生基因组中/由原生基因组编码的CD47蛋白的蛋白质,例如不是野生型CD47蛋白的蛋白质。经工程化的CD47蛋白的非限制性实例包括具有以下的经工程化的CD47蛋白:(i)人CD47细胞外结构域或其部分、至少一个人CD47跨膜结构域或其部分、和包含至少一个氨基酸缺失的人CD47细胞内结构域的一部分,其中该缺失不是C端18个氨基酸缺失;(ii)人CD47细胞外结构域的一部分、至少一个人CD47跨膜结构域或其部分、和包含C端18个氨基酸缺失的人CD47细胞内结构域的一部分;(iii)人CD47细胞外结构域或其部分、至少一个且少于五个人CD47跨膜结构域或其部分、和包含C端18个氨基酸缺失的人CD47细胞内结构域的一部分;(iv)人CD47细胞外结构域或其部分、至少一个人CD47跨膜结构域或其部分、和信号肽,其中经工程化的CD47蛋白不包含细胞内结构域,(v)人CD47细胞外结构域、和至少一个人CD47跨膜结构域或其部分,其中经工程化的CD47蛋白不包含细胞内结构域,(vi)人CD47细胞外结构域或其部分、和至少一个且少于五个人CD47跨膜结构域或其部分,其中经工程化的CD47蛋白不包含细胞内结构域,(vii)人CD47细胞外结构域或其部分、和至少一个人CD47跨膜结构域或其部分,不包含细胞内结构域或包含至少一个氨基酸缺失的人CD47细胞内结构域,其中经工程化的CD47蛋白具有与SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:6具有最多99%同一性的氨基酸序列。

[0107] 如本文所用,在多核苷酸或多肽被表达的背景下,术语“外源性”旨在意指所提及的分子或所提及的多肽被引入到所关注的细胞中。该多肽可以例如通过将编码核酸引入到细胞的遗传物质中(诸如通过整合到染色体中或作为非染色体遗传物质(诸如质粒或表达载体))来引入。因此,当在提及编码核酸的表达时被使用时,该术语是指将编码核酸以可表达的形式引入到细胞中。可以使用病毒转导(例如使用载体)将外源性多核苷酸插入到细胞的至少一个等位基因中。在一些实施方案中,载体是携带外源性多核苷酸的假型化的自失活慢病毒载体。在一些实施方案中,载体是用水疱性口炎VSV-G包膜假型化并携带外源性多核苷酸的自失活慢病毒载体。在一些实施方案中,使用病毒转导将外源性多核苷酸插入到细胞的至少一个等位基因中。在一些实施方案中,使用基于慢病毒的病毒载体将外源性多核苷酸插入到细胞的至少一个等位基因中。在一些实施方案中,将外源性多核苷酸插入到细胞的至少一个等位基因的靶基因座中。

[0108] “外源性”分子是通常不存在于细胞中但可以通过一种或多种遗传、生化或其他方法引入到细胞中的分子、构建体、因子等。“细胞中通常存在”是相对于细胞的特定发育阶段和环境条件确定的。因此,例如,仅在神经元胚胎发育期间存在的分子相对于成体神经元细胞是外源性分子。外源性分子可以包括例如功能失常的内源性分子的功能型式或功能正常的内源性分子的功能失常型式。

[0109] 外源性分子或因子尤其可以是诸如通过组合化学过程生成的小分子,或者可以是大分子,诸如蛋白质、核酸、碳水化合物、脂质、糖蛋白、脂蛋白、多糖、上述分子的任何修饰的衍生物或包含一种或多种上述分子的任何复合物。核酸包括DNA和RNA;可以是单链或双

链的;可以是直链、支链或环状的;并且可以是任意长度。核酸包括那些能够形成双链体的核酸,以及形成三链体的核酸。参见,例如,美国专利号

[0110] 5,176,996和5,422,251。蛋白质包括但不限于DNA结合蛋白、转录因子、染色质重塑因子、甲基化DNA结合蛋白、聚合酶、甲基化酶、去甲基化酶、乙酰化酶、去乙酰化酶、激酶、磷酸酶、整合酶、重组酶、连接酶、拓扑异构酶、促旋酶和解旋酶。

[0111] 外源性分子或构建体可以是与内源性分子相同类型的分子,例如外源性蛋白或核酸。在此类情况下,将外源性分子以比细胞中内源性分子更高的浓度引入到细胞中。在一些情况下,外源性核酸可以包含引入到细胞中的感染性疾病毒基因组、质粒或附加体或者细胞中通常不存在的染色体。用于将外源性分子引入到细胞中的方法是本领域技术人员已知的并且包括但不限于脂质介导的转移(即,脂质体,包括中性和阳离子脂质)、电穿孔、直接注射、细胞融合、粒子轰击、磷酸钙共沉淀、DEAE-葡聚糖介导的转移和病毒载体介导的转移。

[0112] 如本文所用的术语“遗传修饰”及其语法等同物可以指核酸(例如生物体基因组内的核酸)的一种或多种改变。例如,遗传修饰可以指基因或基因部分或其他核酸序列的改变、添加和/或缺失。经遗传修饰的细胞还可以指具有经添加的、经缺失的和/或经改变的基因或基因部分的细胞。经遗传修饰的细胞还可以指添加了不是基因或基因部分的核酸序列的细胞。遗传修饰包括例如瞬时敲入或敲低机制,以及导致靶基因或基因部分或核酸序列的永久敲入、敲低或敲除的机制。遗传修饰包括例如瞬时敲入和导致核酸序列永久敲入的机制。遗传修饰还包括例如减少或增加转录、减少或增加mRNA稳定性、减少或增加翻译,以及减少或增加蛋白质稳定性。

[0113] 如本文所用,肽的一部分具有比参考肽更少的氨基酸,并且具有来自该肽的至少一个氨基酸。

[0114] 如本文所用,组合物是指两种或更多种产物、物质或化合物(包括细胞)的任何混合物。

[0115] II.CD47蛋白

[0116] CD47蛋白概述

[0117] 本公开涉及经工程化的CD47蛋白及其用途。

[0118] CD47,也称为整联蛋白相关蛋白(IAP)或MER6,是在人中由人CD47基因(SEQ ID NO:19)编码的跨膜蛋白(图1)。CD47是免疫球蛋白(Ig)超家族的成员,并且参与包括凋亡、增殖、粘附和迁移在内的一系列细胞过程。

[0119] 人CD47为约50kDa。它被糖基化并在人体中几乎所有细胞中普遍表达(图2)。历史文献表明同种型202(即CD47-202,SEQ ID NO:2)主要在脑中表达,但最近的GTEx表达数据并不支持这一结论(图2)。如本文实施例1所示,同种型CD47-202(SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:14)和同种型CD47-201(SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:13)在Gibco和Rues2人干细胞系中以相对相等的水平表达。同种型CD47-206(SEQ ID NO:6,SEQ ID NO:18)、205(SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:17)、204(SEQ ID NO:16)也似乎在这些干细胞系中高度表达。在干细胞系中没有检测到同种型CD47-203(SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:15)的证据。

[0120] 人CD47具有在其N端的单个IgV样结构域、具有五个跨膜区段的高度疏水段,以及在其C端的选择性剪接的胞质尾(图4)。另外,它在邻近的跨膜区段之间具有两个细胞外区

域和两个细胞内区域。信号肽当存在于CD47同种型上时,位于IgV样结构域的N端处。

[0121] 如本文所用,人CD47细胞外结构域是指人CD47蛋白的N端处的IgV样结构域。从结构上看,人CD47细胞外结构域是人CD47蛋白的N端部分,当人CD47蛋白锚定在细胞膜中时,该部分位于细胞外部。在一些实施方案中,人CD47细胞外结构域具有对应于SEQ ID NO:2的氨基酸19-141的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:2的氨基酸19-141有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,人CD47细胞外结构域具有对应于SEQ ID NO:2的氨基酸19-141的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:2的氨基酸19-141具有80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0122] 如本文所用,人CD47细胞内结构域是指人CD47蛋白的C端处的胞质尾。从结构上看,人CD47细胞内结构域是人CD47蛋白的C端部分,当人CD47蛋白锚定在细胞膜中时,该部分位于细胞内部。人CD47细胞内结构域在体内被选择性剪接。在一些实施方案中,人CD47细胞内结构域具有对应于SEQ ID NO:2的氨基酸290-323的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:2的氨基酸290-323具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,人CD47细胞内结构域具有对应于SEQ ID NO:2的氨基酸290-323的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:2的氨基酸290-323具有至少约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0123] 如本文所用,人CD47跨膜结构域是指人CD47蛋白的跨膜区段之一。在一些实施方案中,人CD47跨膜结构域具有对应于SEQ ID NO:2的氨基酸142-162、177-197、208-228、236-257或269-289的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:2的氨基酸142-162、177-197、208-228、236-257或269-289具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,人CD47跨膜结构域具有对应于SEQ ID NO:2的氨基酸142-162、177-197、208-228、236-257或269-289的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:2的氨基酸142-162、177-197、208-228、236-257或269-289具有至少约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0124] 如本文所用,信号肽是指在CD47蛋白初始被翻译时其N端处存在的短肽。信号肽通常在插入到细胞膜中期间或在插入到细胞膜中之后立即被信号肽酶从蛋白质上切割下来。信号肽的作用是促使细胞使蛋白质易位,通常是易位到质膜。在一些实施方案中,人CD47蛋白的信号肽具有对应于SEQ ID NO:2的氨基酸1-18的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:2的氨基酸1-18具有至少约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,人CD47蛋白的信号肽具有对应于SEQ ID NO:2的氨基酸1-18的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:2的氨基酸1-18具有至少约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0125] 人CD47基因具有六种转录物,其中的五种转录物编码CD47的蛋白质同种型(Ensembl,基因:CD47)。这六种转录物被命名为CD47-201、CD47-202、CD47-203、CD47-204、CD47-205和CD47-206(Ensembl,基因:CD47,ENSG00000196776)。

[0126] 这六种转录物的编码DNA序列(CDS)分别如SEQ ID NO:13-18所示。这五种蛋白质同种型的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:1、2、4、5、6(表2)所示。

[0127] 转录物CD47-202(SEQ ID NO:14)编码具有323个氨基酸的同种型CD47-202(SEQ

ID NO:2)。CD47-202是人CD47基因的最长转录物。它被指定为Ensembl数据库中的代表性转录物。在鉴定代表性转录物时,Ensembl旨在鉴定总体上具有最高保守外显子覆盖率、最高表达、最长编码序列并在其他关键资源诸如NCBI和UniProt中具有代表性的转录物。CD47-202转录物的所有剪接接点(splice junction)均由至少一种非可疑mRNA支持。

[0128] 转录物CD47-201(SEQ ID NO:13)编码具有305个氨基酸的同种型CD47-201(SEQ ID NO:1)。同种型CD47-201具有由同种型CD47-202的18个氨基酸的C端截短。CD47-201转录物的所有剪接接点均由至少一种非可疑mRNA支持。

[0129] 转录物CD47-203(SEQ ID NO:15)编码具有86个氨基酸的同种型CD47-203(SEQ ID NO:4)。转录物模型的唯一支持来自单个表达序列标签(EST)。

[0130] 转录物CD47-204(SEQ ID NO:16)不编码蛋白质。此转录物的所有剪接接点均由至少一种非可疑mRNA支持。

[0131] 转录物CD47-205(SEQ ID NO:17)编码具有109个氨基酸的同种型CD47-205(SEQ ID NO:5)。同种型205包含来自同种型CD47-202(SEQ ID NO:2)的3个跨膜结构域和经截短的细胞内结构域。转录模型的最佳支持mRNA被标记为可疑或支持来自多个EST。

[0132] 转录物CD47-206(SEQ ID NO:18)编码具有183个氨基酸的同种型CD47-206(SEQ ID NO:6)。同种型206包含来自同种型CD47-202(SEQ ID NO:2)的经截短的细胞外结构域和5个跨膜结构域。

[0133] 该五种同种型的氨基酸序列列于表2中。与人CD47蛋白中各种结构域对应的氨基酸还标识在表2中并描绘在图5中。“细胞内连接部(Intracellular connection)”是指连接相邻跨膜结构域的细胞内区域,该区域位于细胞内部(即不在细胞外部,也不在细胞膜内),但不位于经工程化的CD47蛋白的N端或C端处。“细胞外连接部(Extracellular connection)”是指连接相邻跨膜结构域的细胞外区域,该区域位于细胞外部(即不在细胞内部,也不在细胞膜内)。如本文所用,CD47“细胞内结构域”不包括细胞内连接部。还如本文所用,CD47“细胞外结构域”不包括细胞外连接部。

[0134] 表2.CD47结构域的氨基酸SEQ ID NO

[0135]

	CD47-201 **SEQ ID NO:1**	CD47-202 **SEQ ID NO:2**	CD47-203 **SEQ ID NO:4**	CD47-205 **SEQ ID NO:5**	CD47-206 **SEQ ID NO:6**
信号肽	1-18	1-18	N/A	N/A	N/A
细胞外结构域	19-141	19-141			1-96
跨膜结构域 1	142-162	142-162			97-117
细胞内连接部 1	163-176	163-176			118-131
跨膜结构域 2	177-197	177-197			132-152
细胞外连接部 1	198-207	198-207		1-4	153-162
跨膜结构域 3	208-228	208-228		5-25	163-183
细胞内连接部 2	229-235	229-235		26-32	
跨膜结构域 4	236-256	236-256		33-53	
细胞外连接部 2	257-268	257-268		54-65	
跨膜结构域 5	269-289	269-289		66-86	
细胞内结构域	290-305	290-323		87-109	

[0136] 经工程化的CD47蛋白

[0137] 本公开提供了经工程化的CD47蛋白,其具有比野生型全长人CD47蛋白更少的氨基酸。此类经工程化的蛋白质提供了更有效的细胞工程化方法,包括经由整合基因疗法载体进行递送。

[0138] 如本文所用的野生型全长人CD47蛋白是指截至本专利申请提交之日Ensembl数据库中公开的同种型CD47-202。野生型全长人CD47蛋白具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列,其中氨基酸1-18为信号肽,氨基酸19-141为细胞外结构域,氨基酸142-162、177-197、208-228、236-257、269-289为五个跨膜结构域(图3),并且氨基酸290-323为细胞内结构域。氨基酸163-176和229-235是跨膜结构域之间的两个细胞内连接部,并且氨基酸198-207和257-268是跨膜结构域之间的两个细胞外连接部(图3)。

[0139] 在一些实施方案中,经工程化的CD47蛋白是同种型202(SEQ ID NO:2)的C端被截短的型式。例如,在一些实施方案中,C端截断是连续的,并且长度为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、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160或161个氨基酸。优选地,C端截短的长度为158、123、92、64、31或95个氨基酸,从而产生具有分别如SEQ ID NO:7-12所示的氨基酸序列的经工程化的CD47蛋白。在一些实施方案中,具有SEQ ID NO:2的C端截短的经工程化的CD47蛋白进一步具有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、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139或140个连续氨基酸的N端截短。

[0140] 在一些实施方案中,经工程化的CD47蛋白是同种型201(SEQ ID NO:1)的C端被截短的型式。例如,在一些实施方案中,C端截短是连续的并且长度为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、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142或143个氨基酸。在一些实施方案中,具有SEQ ID NO:1的C端截短的经工程化的CD47蛋白进一步具有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或95个连续氨基酸的N端截短。

[0141] 在一些实施方案中,经工程化的CD47蛋白是同种型206(SEQ ID NO:6)的C端被截短的型式。例如,在一些实施方案中,C端截短是连续的并且长度为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或66个氨基酸。在一些实施方案中,具有SEQ ID NO:6的C端截短的经工程化的CD47蛋白进一步具有1、2、3、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、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139或140个连续氨基酸的N端截短。

[0142] 在一些实施方案中,经工程化的CD47蛋白包含最小细胞内结构域。如本文所用,最小细胞内结构域是指具有维持经工程化的CD47蛋白的SIRPα结合所需的最少氨基酸数目的细胞内结构域。

[0143] 在一些实施方案中,经工程化的CD47蛋白包含最小细胞外结构域。如本文所用,最小细胞外结构域是指具有经工程化的CD47蛋白与SIRPα结合所需的最少氨基酸数目的细胞外结构域。

[0144] 在一个方面,本公开提供了一种经工程化的CD47蛋白,其包含人CD47细胞外结构域或其部分和至少一个人CD47跨膜结构域,其中当存在细胞内结构域时,其为具有至少一个氨基酸缺失的人CD47细胞内结构域。在一些实施方案中,当经工程化的CD47蛋白中存在不止一个跨膜结构域时,这些跨膜结构域中的每个跨膜结构域均与细胞内和/或细胞外连接部相互连接。

[0145] 在一个方面,本公开提供了一种经工程化的CD47蛋白,其实质上由人CD47细胞外结构域或其部分和至少一个人CD47跨膜结构域组成。在一些实施方案中,当经工程化的CD47蛋白中存在不止一个跨膜结构域时,这些跨膜结构域中的每个跨膜结构域均与细胞内和/或细胞外连接部相互连接。如本文所用,术语“实质上由……组成”包括指定的要素和任何不消除经工程化的CD47蛋白的SIRPα结合的另外的要素。

[0146] 在一个方面,本公开提供了一种经工程化的CD47蛋白,其由人CD47细胞外结构域或其部分和至少一个人CD47跨膜结构域组成。在一些实施方案中,当经工程化的CD47蛋白中存在不止一个跨膜结构域时,这些跨膜结构域中的每个跨膜结构域均与细胞内和/或细胞外连接部相互连接。

[0147] 在一些实施方案中,经工程化的CD47蛋白包含人CD47细胞外结构域或其部分、至少一个人CD47跨膜结构域或其部分、和包含至少一个氨基酸缺失的人CD47细胞内结构域的一部分,其中该缺失不是C端18个氨基酸缺失。

[0148] 在一些实施方案中,经工程化的CD47蛋白包含人CD47细胞外结构域的一部分、至少一个人CD47跨膜结构域或其部分、和包含C端18个氨基酸缺失的人CD47细胞内结构域的一部分。

[0149] 在一些实施方案中,经工程化的CD47蛋白包含人CD47细胞外结构域或其部分、至少一个且少于五个人CD47跨膜结构域或其部分、和包含C端18个氨基酸缺失的人CD47细胞内结构域的一部分。

[0150] 在一些实施方案中,经工程化的CD47蛋白包含人CD47细胞外结构域或其部分、至少一个人CD47跨膜结构域或其部分、和信号肽,其中经工程化的CD47蛋白不包含细胞内结构域。

[0151] 在一些实施方案中,经工程化的CD47蛋白包含人CD47细胞外结构域和至少一个人CD47跨膜结构域或其部分,其中经工程化的CD47蛋白不包含细胞内结构域。

[0152] 在一些实施方案中,经工程化的CD47蛋白包含人CD47细胞外结构域或其部分、和至少一个且少于五个人CD47跨膜结构域或其部分,其中经工程化的CD47蛋白不包含细胞内结构域。

[0153] 在一些实施方案中,经工程化的CD47蛋白包含人CD47细胞外结构域、五个人CD47跨膜结构域和具有C端18个氨基酸缺失的人CD47细胞内结构域,其中经工程化的CD47蛋白的氨基酸序列不是SEQ ID NO:1。

[0154] 在一些实施方案中,经工程化的CD47蛋白包含人CD47细胞外结构域和五个人CD47跨膜结构域,其中经工程化的CD47蛋白的氨基酸序列不是SEQ ID NO:6。

[0155] 在一些实施方案中,经工程化的CD47蛋白包含人CD47细胞外结构域或其部分、至少一个人CD47跨膜结构域或其部分,并且不包含细胞内结构域或包含含有至少一个氨基酸缺失的人CD47细胞内结构域,其中经工程化的CD47蛋白的氨基酸序列与SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:6具有最多99%的同一性。换句话说,在一些实施方案中,经工程化的CD47蛋白包含人CD47细胞外结构域或其部分、至少一个人CD47跨膜结构域或其部分,并且不包含细胞内结构域或包含含有至少一个氨基酸缺失的人CD47细胞内结构域,其中经工程化的CD47蛋白的氨基酸序列与SEQ ID NO:1具有99%或更低的同一性并且与SEQ ID NO:6具有99%或更低的同一性。

[0156] 在一些实施方案中,经工程化的CD47蛋白中的人CD47细胞外结构域是野生型人CD47细胞外结构域。在一些实施方案中,野生型结构域具有与SEQ ID NO:1的氨基酸19-141或SEQ ID NO:6的氨基酸1-96对应的氨基酸序列。

[0157] 在一些实施方案中,经工程化的CD47蛋白中的人CD47细胞外结构域具有与SEQ ID NO:1的氨基酸19-141或与SEQ ID NO:6的氨基酸1-96具有至少约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,经工程化的CD47蛋白中的人CD47细胞外结构域具有与SEQ ID NO:1的氨基酸19-141或SEQ ID NO:6的氨基酸1-96具有至少约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0158] 在一些实施方案中,经工程化的CD47蛋白中的人CD47细胞外结构域与野生型人CD47细胞外结构域在结构上等效。

[0159] 如本文所用,“在结构上等效”是指具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的两个氨基酸序列。优选地,序列变异不会改变经工程化的CD47蛋白的生物活性。在一些实施方案中,序列变异不会阻止经工程化的人蛋白质与SIRPα结合。在一些实施方案中,序列变异不会阻止经工程化的人蛋白质成为

致耐受因子。在一些实施方案中,序列变异的至少一部分可以通过一个或多个保守氨基酸取代而发生。

[0160] 在一些实施方案中,本公开的经工程化的蛋白质包含一个或多个膜栓系物(membrane tether)。在一些实施方案中,一个或多个膜栓系物是或者包含跨膜结构域。在一些实施方案中,跨膜结构域包括选自由以下组成的组的GPCR跨膜结构域:5-羟色胺(血清素)受体1A(HTR1A)、5-羟色胺(血清素)受体1B(HTR1B)、5-羟色胺(血清素)受体1D(HTR1D)、5-羟色胺(血清素)受体1E(HTR1E)、5-羟色胺(血清素)受体1F(HTR1F)、5-羟色胺(血清素)受体2A(HTR2A)、5-羟色胺(血清素)受体2B(HTR2B)、5-羟色胺(血清素)受体2C(HTR2C)、5-羟色胺(血清素)受体4(HTR4)、5-羟色胺(血清素)受体5A(HTR5A)、5-羟色胺(血清素)受体5B(HTR5BP)、5-羟色胺(血清素)受体6(HTR6)、5-羟色胺(血清素)受体7、腺苷酸环化酶偶联(HTR7)、胆碱能受体、毒蕈碱1(CHRM1)、胆碱能受体、毒蕈碱2(CHRM2)、胆碱能受体、毒蕈碱3(CHRM3)、胆碱能受体、毒蕈碱4(CHRM4)、胆碱能受体、毒蕈碱5(CHRM5)、腺苷A1受体(ADORA1)、腺苷A2a受体(ADORA2A)、腺苷A2b受体(ADORA2B)、腺苷A3受体(ADORA3)、粘附G蛋白偶联受体A1(ADGRA1)、粘附G蛋白偶联受体A2(ADGRA2)、粘附G蛋白偶联受体A3(ADGRA3)、粘附G蛋白偶联受体B1(ADGRB1)、粘附G蛋白偶联受体B2(ADGRB2)、粘附G蛋白偶联受体B3(ADGRB3)、钙粘蛋白EGF LAG七通G型受体1(CELSR1)、钙粘蛋白EGF LAG七通G型受体2(CELSR2)、钙粘蛋白EGF LAG七通G型受体3(CELSR3)、粘附G蛋白偶联受体D1(ADGRD1)、粘附G蛋白偶联受体D2(ADGRD2)、粘附G蛋白偶联受体E1(ADGRE1)、粘附G蛋白偶联受体E2(ADGRE2)、粘附G蛋白偶联受体E3(ADGRE3)、粘附G蛋白偶联受体E4(ADGRE4P),粘附G蛋白偶联受体E5(ADGRE5)、粘附G蛋白偶联受体F1(ADGRF1)、粘附G蛋白偶联受体F2(ADGRF2)、粘附G蛋白偶联受体F3(ADGRF3)、粘附G蛋白偶联受体F4(ADGRF4)、粘附G蛋白偶联受体F5(ADGRF5)、粘附G蛋白偶联受体G1(ADGRG1),粘附G蛋白偶联受体G2(ADGRG2)、粘附G蛋白偶联受体G3(ADGRG3)、粘附G蛋白偶联受体G4(ADGRG4)、粘附G蛋白偶联受体G5(ADGRG5)、粘附G蛋白偶联受体G6(ADGRG6)、粘附G蛋白偶联受体G7(ADGRG7)、粘附G蛋白偶联受体L1(ADGRL1)、粘附G蛋白偶联受体L2(ADGRL2)、粘附G蛋白偶联受体L3(ADGRL3)、粘附G蛋白偶联受体L4(ADGRL4)、粘附G蛋白偶联受体V1(ADGRV1)、肾上腺素能受体α1A(ADRA1A)、肾上腺素能受体α1B(ADRA1B)、肾上腺素能受体α1D(ADRA1D)、肾上腺素能受体α2A(ADRA2A)、肾上腺素能受体α2B(ADRA2B)、肾上腺素能受体α2C(ADRA2C)、肾上腺素能受体β1(ADRB1)、肾上腺素受体β2(ADRB2)、肾上腺素受体β3(ADRB3)、血管紧张素II受体1型(AGTR1)、血管紧张素II受体2型(AGTR2)、爱帕琳肽(apelin)受体(APLNR)、G蛋白偶联胆汁酸受体1(GPBAR1)、神经调节素B受体(NMBR)、胃泌素释放肽受体(GRPR)、炸弹素样受体3(BRS3)、缓激肽受体B1(BDKRB1)、缓激肽受体B2(BDKRB2)、降钙素受体(CALCR)、降钙素受体样受体(CALCRL)、钙敏感受体(CASR)、G蛋白偶联受体C类(GPRC6A)、大麻素受体1(脑)(CNR1)、大麻素受体2(CNR2)、chemerin趋化因子样受体1(CMKLR1)、趋化因子(C—C基序)受体1(CCR1)、趋化因子(C—C基序)受体2(CCR2)、趋化因子(C—C基序)受体3(CCR3)、趋化因子(C—C基序)受体4(CCR4)、趋化因子(C—C基序)受体5(基因/假基因)(CCR5)、趋化因子(C—C基序)受体6(CCR6)、趋化因子(C—C基序)受体7(CCR7)、趋化因子(C—C基序)受体8(CCR8)、趋化因子(C—C基序)受体9(CCR9)、趋化因子(C—C基序)受体10(CCR10)、趋化因子(C—X—C基序)受体1(CXCR1)、趋化因子(C—X—C基序)受体2(CXCR2)、趋化因子(C—X—C基序)受体3

(CXCR3)、趋化因子(C—X—C基序)受体4(CXCR4)、趋化因子(C—X—C基序)受体5(CXCR5)、趋化因子(C—X—C基序)受体6(CXCR6)、趋化因子(C—X3—C基序)受体1(CX3CR1)、趋化因子(C基序)受体1(XCR1)、非典型趋化因子受体1(Duffy血型)(ACKR1)、非典型趋化因子受体2(ACKR2)、非典型趋化因子受体3(ACKR3)、非典型趋化因子受体4(ACKR4)、趋化因子(C—C基序)受体样2(CCRL2)、胆囊收缩素A受体(CCKAR)、胆囊收缩素B受体(CCKBR)、G蛋白偶联受体1(GPR1)、铃蟾肽样受体3(BRS3)、G蛋白偶联受体3(GPR3)、G蛋白偶联受体4(GPR4)、G蛋白偶联受体6(GPR6)、G蛋白偶联受体12(GPR12)、G蛋白偶联受体15(GPR15)、G蛋白偶联受体17(GPR17)、G蛋白偶联受体18(GPR18)、G蛋白偶联受体19(GPR19)、G蛋白偶联受体20(GPR20)、G蛋白偶联受体21(GPR21)、G蛋白偶联受体22(GPR22)、G蛋白偶联受体25(GPR25)、G蛋白偶联受体26(GPR26)、G蛋白偶联受体27(GPR27)、G蛋白偶联受体31(GPR31)、G蛋白偶联受体32(GPR32)、G蛋白偶联受体33(基因/假基因)(GPR33)、G蛋白偶联受体34(GPR34)、G蛋白偶联受体35(GPR35)、G蛋白偶联受体37(内皮素受体B型样)(GPR37)、G蛋白偶联受体37样1(GPR37L1)、G蛋白偶联受体39(GPR39)、G蛋白偶联受体42(基因/假基因)(GPR42)、G蛋白偶联受体45(GPR45)、G蛋白偶联受体50(GPR50)、G蛋白偶联受体52(GPR52)、G蛋白偶联受体55(GPR55)、G蛋白偶联受体61(GPR61)、G蛋白偶联受体62(GPR62)、G蛋白偶联受体63(GPR63)、G蛋白偶联受体65(GPR65)、G蛋白偶联受体68(GPR68)、G蛋白偶联受体75(GPR75)、G蛋白偶联受体78(GPR78)、G蛋白偶联受体79(GPR79)、G蛋白偶联受体82(GPR82)、G蛋白偶联受体83(GPR83)、G蛋白偶联受体84(GPR84)、G蛋白偶联受体85(GPR85)、G蛋白偶联受体87(GPR87)、G蛋白偶联受体88(GPR88)、G蛋白偶联受体101(GPR101)、G蛋白偶联受体119(GPR119)、G蛋白偶联受体132(GPR132)、G蛋白偶联受体135(GPR135)、G蛋白偶联受体139(GPR139)、G蛋白偶联受体141(GPR141)、G蛋白偶联受体142(GPR142)、G蛋白偶联受体146(GPR146)、G蛋白偶联受体148(GPR148)、G蛋白偶联受体149(GPR149)、G蛋白偶联受体150(GPR150)、G蛋白偶联受体151(GPR151)、G蛋白偶联受体152(GPR152)、G蛋白偶联受体153(GPR153)、G蛋白偶联受体160(GPR160)、G蛋白偶联受体161(GPR161)、G蛋白偶联受体162(GPR162)、G蛋白偶联受体171(GPR171)、G蛋白偶联受体173(GPR173)、G蛋白偶联受体174(GPR174)、G蛋白偶联受体176(GPR176)、G蛋白偶联受体182(GPR182)、G蛋白偶联受体183(GPR183)、含有富含亮氨酸重复序列的G蛋白偶联受体4(LGR4)、含有富含亮氨酸重复序列的G蛋白偶联受体5(LGR5)、含有富含亮氨酸重复序列的G的蛋白质偶联受体6(LGR6)、MAS1原癌基因(MAS1)、MAS1原癌基因样(MAS1L)、MAS相关GPR家族成员D(MRGPRD)、MAS相关GPR家族成员E(MRGPRE)、MAS相关GPR家族成员F(MRGPRF)、MAS相关GPR家族成员G(MRGPRG)、MAS相关GPR家族成员X1(MRGPRX1)、MAS相关GPR家族成员X2(MRGPRX2)、MAS相关GPR家族成员X3(MRGPRX3)、MAS相关GPR家族成员X4(MRGPRX4)、视蛋白3(OPN3)、视蛋白4(OPN4)、视蛋白5(OPN5)、嘌呤能受体P2Y(P2RY8)、嘌呤能受体P2Y(P2RY10)、痕量胺关联受体2(TAAR2)、痕量胺关联受体3(基因/假基因)(TAAR3)、痕量胺关联受体4(TAAR4P)、痕量胺关联受体5(TAAR5)、痕量胺关联受体6(TAAR6)、痕量胺关联受体8(TAAR8)、痕量胺关联受体9(基因/假基因)(TAAR9)、G蛋白偶联受体156(GPR156)、G蛋白偶联受体158(GPR158)、G蛋白偶联受体179(GPR179)、G蛋白偶联受体C类(GPRC5A)、G蛋白偶联受体C类(GPRC5B)、G蛋白偶联受体C类(GPRC5C)、G蛋白偶联受体C类(GPRC5D)、卷曲类受体1(FZD1)、卷曲类受体2(FZD2)、卷曲类受体3(FZD3)、卷曲类受体4(FZD4)、卷曲类受体5(FZD5)、卷曲类受体6(FZD6)、卷曲类受体7(FZD7)、卷曲类受体8

(FZD8)、卷曲类受体9(FZD9)、卷曲类受体10(FZD10)、平滑卷曲类受体(SMO)、补体成分3a受体1(C3AR1)、补体成分5a受体1(C5AR1)、补体成分5a受体2(C5AR2)、促肾上腺皮质激素释放激素受体1(CRHR1)、促肾上腺皮质激素释放激素受体2(CRHR2)、多巴胺受体D1(DRD1)、多巴胺受体D2(DRD2)、多巴胺受体D3(DRD3)、多巴胺受体D4(DRD4)、多巴胺受体D5(DRD5)、内皮素受体A型(EDNRA)、内皮素受体B型(EDNRB)、甲酰肽受体1(FPR1)、甲酰肽受体2(FPR2)、甲酰肽受体3(FPR3)、游离脂肪酸受体1(FFAR1)、游离脂肪酸受体2(FFAR2)、游离脂肪酸受体3(FFAR3)、游离脂肪酸受体4(FFAR4)、G蛋白偶联受体42(基因/假基因)(GPR42)、γ-氨基丁酸(GABA)B受体1(GABBR1)、γ-氨基丁酸(GABA)B受体2(GABBR2)、甘丙肽受体1(GALR1)、甘丙肽受体2(GALR2)、甘丙肽受体3(GALR3)、生长激素促分泌素受体(GHSR)、生长激素释放激素受体(GHRHR)、抑胃多肽受体(GIPR)、胰高血糖素样肽1受体(GLP1R)、胰高血糖素样肽2受体(GLP2R)、胰高血糖素受体(GCGR)、分泌素受体(SCTR)、促卵泡激素受体(FSHR)、黄体生成激素/绒毛膜促性腺激素受体(LHCGR)、促甲状腺激素受体(TSHR)、促性腺激素释放激素受体(GNRHR)、促性腺激素释放激素受体2(假基因)(GNRHR2)、G蛋白偶联受体18(GPR18)、G蛋白偶联受体55(GPR55)、G蛋白偶联受体119(GPR119)、G蛋白偶联雌激素受体1(GPER1)、组胺受体H1(HRH1)、组胺受体H2(HRH2)、组胺受体H3(HRH3)、组胺受体H4(HRH4)、羟基羧酸受体1(HCAR1)、羟基羧酸受体2(HCAR2)、羟基羧酸受体3(HCAR3)、KISS1受体(KISS1R)、白三烯B4受体(LTB4R)、白三烯B4受体2(LTB4R2)、半胱氨酰白三烯受体1(CYSLTR1)、半胱氨酰白三烯受体2(CYSLTR2)、氧桥二十烷类(oxoeicosanoid)(OXE)受体1(OXER1)、甲酰肽受体2(FPR2)、溶血磷脂酸受体1(LPAR1)、溶血磷脂酸受体2(LPAR2)、溶血磷脂酸受体3(LPAR3)、溶血磷脂酸受体4(LPAR4)、溶血磷脂酸受体5(LPAR5)、溶血磷脂酸受体6(LPAR6)、鞘氨醇-1-磷酸受体1(S1PR1)、鞘氨醇-1-磷酸受体2(S1PR2)、鞘氨醇-1-磷酸受体3(S1PR3)、鞘氨醇-1-磷酸受体4(S1PR4)、鞘氨醇-1-磷酸受体5(S1PR5)、黑色素浓集激素受体1(MCHR1)、黑色素浓集激素受体2(MCHR2)、黑皮质素1受体(α促黑素细胞激素受体)(MC1R)、黑皮质素2受体(促肾上腺皮质激素)(MC2R)、黑皮质素3受体(MC3R)、黑皮质素4受体(MC4R)、黑皮质素5受体(MC5R)、褪黑素受体1A(MTNR1A)、褪黑素受体1B(MTNR1B)、代谢型谷氨酸受体1(GRM1)、代谢型谷氨酸受体2(GRM2)、代谢型谷氨酸受体3(GRM3)、代谢型谷氨酸受体4(GRM4)、代谢型谷氨酸受体5(GRM5)、代谢型谷氨酸受体6(GRM6)、代谢型谷氨酸受体7(GRM7)、代谢型谷氨酸受体8(GRM8)、胃动素受体(MLNR)、神经调节肽U受体1(NMUR1)、神经调节肽U受体2(NMUR2)、神经肽FF受体1(NPFFR1)、神经肽FF受体2(NPFFR2)、神经肽S受体1(NPSR1)、神经肽B/W受体1(NPBWR1)、神经肽B/W受体2(NPBWR2)、神经肽Y受体Y1(NPY1R)、神经肽Y受体Y2(NPY2R)、神经肽Y受体Y4(NPY4R)、神经肽Y受体Y5(NPY5R)、神经肽Y受体Y6(假基因)(NPY6R)、神经降压肽受体1(高亲和力)(NTSR1)、神经降压肽受体2(NTSR2)、阿片样物质受体δ1(OPRD1)、阿片样物质受体κ1(OPRK1)、阿片样物质受体μ1(OPRM1)、阿片剂受体样1(OPRL1)、下丘泌素(食欲肽)受体1(HCRTR1)、下丘泌素(食欲肽)受体2(HCRTR2)、G蛋白偶联受体107(GPR107)、G蛋白偶联受体137(GPR137)、嗅觉受体家族51亚家族E成员1(OR51E1)、脂肪细胞相关跨膜蛋白1(TPRA1)、G蛋白偶联受体143(GPR143)、G蛋白偶联受体157(GPR157)、氧化戊二酸(α-酮戊二酸)受体1(OXGR1)、嘌呤能受体P2Y(P2RY1)、嘌呤能受体P2Y(P2RY2)、嘧啶能受体P2Y(P2RY4)、嘧啶能受体P2Y(P2RY6)、嘌呤能受体P2Y(P2RY11)、嘌呤能受体P2Y(P2RY12)、嘌呤能受体P2Y(P2RY13)、嘌呤能受体P2Y(P2RY14)、甲状旁腺激素1

受体(PTH1R)、甲状旁腺激素2受体(PTH2R)、血小板活化因子受体(PTAFR)、前动力蛋白受体1(PROKR1)、前动力蛋白受体2(PROKR2)、催乳素释放激素受体(PRLHR)、前列腺素D2受体(DP)(PTGDR)、前列腺素D2受体2(PTGDR2)、前列腺素E受体1(PTGER1)、前列腺素E受体2(PTGER2)、前列腺素E受体3(PTGER3)、前列腺素E受体4(PTGER4)、前列腺素F受体(PTGFR)、前列腺素12(前列环素)受体(IP)(PTGIR)、血栓烷A2受体(TBXA2R)、凝血因子II凝血酶受体(F2R)、F2R样胰蛋白酶受体1(F2RL1)、凝血因子II凝血酶受体样2(F2RL2)、F2R样凝血酶/胰蛋白酶受体3(F2RL3)、焦谷氨酰化RF酰胺肽受体(QRFPR)、松弛素/胰岛素样家族肽受体1(RXFP1)、松弛素/胰岛素样家族肽受体2(RXFP2)、松弛素/胰岛素样家族肽受体3(RXFP3)、松弛素/胰岛素样家族肽受体4(RXFP4)、促生长素抑制素受体1(SSTR1)、促生长素抑制素受体2(SSTR2)、促生长素抑制素受体3(SSTR3)、促生长素抑制素受体4(SSTR4)、促生长素抑制素受体5(SSTR5)、琥珀酸受体1(SUCNR1)、速激肽受体1(TACR1)、速激肽受体2(TACR2)、速激肽受体3(TACR3)、味觉1受体成员1(TAS1R1)、味觉1受体成员2(TAS1R2)、味觉1受体成员3(TAS1R3)、味觉2受体成员1(TAS2R1)、味觉2受体成员3(TAS2R3)、味觉2受体成员4(TAS2R4)、味觉2受体成员5(TAS2R5)、味觉2受体成员7(TAS2R7)、味觉2受体成员8(TAS2R8)、味觉2受体成员9(TAS2R9)、味觉2受体成员10(TAS2R10)、味觉2受体成员13(TAS2R13)、味觉2受体成员14(TAS2R14)、味觉2受体成员16(TAS2R16)、味觉2受体成员19(TAS2R19)、味觉2受体成员20(TAS2R20)、味觉2受体成员30(TAS2R30)、味觉2受体成员31(TAS2R31)、味觉2受体成员38(TAS2R38)、味觉2受体成员39(TAS2R39)、味觉2受体成员40(TAS2R40)、味觉2受体成员41(TAS2R41)、味觉2受体成员42(TAS2R42)、味觉2受体成员43(TAS2R43)、味觉2受体成员45(TAS2R45)、味觉2受体成员46(TAS2R46)、味觉2受体成员50(TAS2R50)、味觉2受体成员60(TAS2R60)、促甲状腺素释放激素受体(TRHR)、痕量胺关联受体1(TAAR1)、硬骨鱼紧张肽2受体(UTS2R)、精氨酸加压素受体1A(AVPR1A)、精氨酸加压素受体1B(AVPR1B)、精氨酸加压素受体2(AVPR2)、催产素受体(OXTR)、腺苷酸环化酶活化多肽1(垂体)受体I型(ADCYAP1R1)、血管活性肠肽受体1(VIPR1)、血管活性肠肽受体2(VIPR2)以及其任何变体。在一些实施方案中,跨膜结构域是或者包括CD3ζ、CD8a、CD16a、CD28、CD32a、CD32c、CD40、CD47、CD64、ICOS、Dectin-1、DNGR1、EGFR、GPCR、MyD88、PDGFR、SLAMF7、TRL1、TLR2、TLR3、TRL4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9,或VEGFR跨膜结构域。

[0161] 质膜蛋白可以连接到外周膜或可以是整合膜蛋白。参见,例如,Komath SS,Fujita M,Hart GW等人,Glycosylphosphatidylinositol Anchors,见:Varki A,Cummings RD,Esko JD等人编辑,Essentials of Glycobiology.第4版.Cold Spring Harbor(NY):Cold Spring Harbor Laboratory Press;2022.第12章中的综述。GPI锚定是指在翻译后修饰期间糖基磷脂酰肌醇或GPI连接到蛋白质的C端。在一些实施方案中,异源膜连接序列是GPI锚连接序列。经由C端连接到GPI锚的蛋白质通常在外部脂质双层中被发现。GPI锚是I型整合膜蛋白的单一跨膜结构域的替代品。

[0162] 异源GPI锚连接序列可来源于任何已知的GPI锚定蛋白(综述于Ferguson MAJ,Kinoshita T,Hart GW.Glycosylphosphatidylinositol Anchors.见:Varki A,Cummings RD,Esko JD等人编辑,Essentials of Glycobiology.第2版.Cold Spring Harbor(NY):Cold Spring Harbor Laboratory Press;2009.第11章中)。在一些实施方案中,异源GPI锚连接序列是来自CD14、CD16、CD48、DAF/CD55、CD59、CD80、CD87或TRAIL-R3的GPI锚连接序

列。在一些实施方案中,异源GPI锚连接序列来源于DAF/CD55。在一些实施方案中,异源GPI锚连接序列来源于CD59。在一些实施方案中,异源GPI锚连接序列来源于TRAIL-R3。在例示性实施方案中,异源GPI锚连接序列来源于DAF/CD55、CD59或TRAIL-R3。在一些实施方案中,活化元件中的一个或两个活化元件包括异源信号序列,以帮助将活化元件的表达引导到细胞膜。可以使用在包装细胞系中具有活性的任何信号序列。在一些实施方案中,信号序列是DAF/CD55信号序列。在一些实施方案中,信号序列是CD59信号序列。在一些实施方案中,信号序列是TRAIL-R3信号序列。

[0163] 在一些实施方案中,经工程化的CD47蛋白包含一个或多个野生型人CD47跨膜结构域。在一些实施方案中,野生型结构域具有与SEQ ID NO:2的氨基酸142-162、177-197、208-228、236-257或269-289对应的氨基酸序列。

[0164] 在一些实施方案中,经工程化的CD47蛋白包含与野生型人CD47跨膜结构域在结构上等效的一个或多个跨膜结构域。在一些实施方案中,经工程化的CD47蛋白包含具有与SEQ ID NO:2的氨基酸142-162、177-197、208-228、236-257或269-289具有至少80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列的一个或多个跨膜结构域。

[0165] 在一些实施方案中,经工程化的CD47蛋白中的人CD47细胞内结构域是野生型人CD47细胞内结构域。在一些实施方案中,野生型细胞内结构域具有与SEQ ID NO:2的氨基酸290-323对应的氨基酸序列。

[0166] 在一些实施方案中,经工程化的CD47蛋白中的人CD47细胞内结构域与野生型人CD47细胞内结构域在结构上等效。在一些实施方案中,经工程化的CD47蛋白中的人CD47细胞内结构域具有与SEQ ID NO:2的氨基酸290-323具有至少80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0167] 在一些实施方案中,经工程化的CD47蛋白包含与SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列具有至少80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0168] 在一些实施方案中,经工程化的CD47蛋白包含与SEQ ID NO:8中所示的氨基酸序列具有至少80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0169] 在一些实施方案中,经工程化的CD47蛋白包含与SEQ ID NO:9中所示的氨基酸序列具有至少80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0170] 在一些实施方案中,经工程化的CD47蛋白包含与SEQ ID NO:12中所示的氨基酸序列具有至少80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0171] 在一些实施方案中,经工程化的CD47蛋白包含与SEQ ID NO:10中所示的氨基酸序列具有至少80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0172] 在一些实施方案中,经工程化的CD47蛋白包含与SEQ ID NO:11中所示的氨基酸序列具有至少80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0173] 在一些实施方案中,经工程化的CD47蛋白是跨膜蛋白。跨膜蛋白是一种跨越整个细胞膜并具有细胞内和细胞外部分的完整膜蛋白。如本文所用,“细胞内部分”可以包括CD47细胞内结构域和细胞内连接部(当存在于分子中时)。如本文所用,“细胞外部分”可以包括CD47细胞外结构域和细胞外连接部(当存在于分子中时)。

[0174] 如本文所用,野生型人CD47细胞外结构域是指野生型人CD47蛋白同种型中的任一种的细胞外结构域。野生型人CD47跨膜结构域是指野生型人CD47蛋白同种型中的任一种的

跨膜结构域。野生型人CD47细胞内结构域是指野生型人CD47蛋白同种型中的任一种的细胞内结构域。

[0175] 在一些实施方案中,经工程化的CD47蛋白是经工程化的人CD47蛋白、经工程化的人源化CD47蛋白或经工程化的部分人源化CD47蛋白。

[0176] 如本文所用,“人源化的”或“人源化”意指经工程化的CD47蛋白的氨基酸序列被修饰以降低其在人中的免疫原性。如本文所用,“部分人源化的”或“部分人源化”意指经工程化的CD47蛋白的一部分氨基酸序列被修饰,以降低经工程化的CD47蛋白在人中的免疫原性。例如,在一些实施方案中,经工程化的CD47蛋白的细胞外结构域被修饰,以降低经工程化的CD47蛋白在人中的免疫原性。人源化通常是通过修饰来自非人来源的蛋白质序列来增加其与其在人中自然产生的对应蛋白质的相似性来实现的。有两种主要方法用来使蛋白质人源化:合理设计和经验方法。合理设计方法的特点是蛋白质结构建模,生成蛋白质的几个变体以及评估它们的结合或任何其他所关注的特性。与合理设计方法相比,经验方法不需要蛋白质的结构信息。它们依赖于大型组合文库的生成以及通过诸如噬菌体、核糖体或酵母展示的富集技术或通过高通量筛选技术对所需变体的选择。这些方法基于选择,而不是对突变对蛋白质结构的影响做出假设。例如,在一些实施方案中,经工程化的CD47蛋白的人源化包括将经工程化的CD47蛋白中的SIRPα结合区移植到人CD47蛋白上。在其他实施方案中,经工程化的CD47蛋白的人源化包括在经工程化的CD47蛋白中引入一个或多个点突变,使得经工程化的CD47蛋白中的一个或多个残基被人CD47蛋白中的对应残基取代。

[0177] 在一些实施方案中,本公开的经工程化的蛋白质包含含有SIRPα抗体的SIRPα相互作用基序。在一些实施方案中,SIRPα抗体选自表3。

[0178] 表3.SIRPα抗体

[0179]

名称	相关专利	非专利文献	公司/机构
ADU-1805	2020 US20220135671 2018 US20180312587 2018 US10851164	2019 阻断 SIRPα-CD47 先天免疫检查点的选择性泛等位基因抗 SIRPα 抗体 ADU-1805 的功能表征。	Aduro

[0180]

Alector 专利抗 SIRPA	2022 US20220289844 2019 US20210277113 2019 US20190359707 2019 WO2019226973 2019 US11319373 2017 WO2018107058 2017 US20190275150		Alector
ALX Oncology 专利抗 SIRPa	2022 US20220242928 2022 US20220324996 2021 US20210363269 2021 US20220002434 2021 US11242404 2021 US20230018821 2021 WO2021247430 2020 US20200392199 2020 US20210070838 2020 US11208459 2019 US20190352419 2019 US11292850 2017 US20180105600 2017 US11401338		ALX Oncology
Apexigen 专利抗 SIRPA	2021 WO2021174127		Apexigen
Arch Oncology 专利抗 SIRPA	2021 US20220226469 2021 WO2021222746 2019 WO2020102422 2019 US20200297842 2019 US11202828	2021 在保留 T 细胞的同时诱导肿瘤细胞的单药吞噬的新型 SIRPα 抗体。	Arch Oncology
BI 765063	2022 WO2022254379 2022 US20230012273 2022 US20220281991 2019 WO2019175218 2018 WO2019073080 2018 US20210179728 2017 WO2017178653 2017 US20190127477 2017 US11279766	2022 NCT05249426 阶段 1 一项用于测试 BI 765063、埃本利单抗(Ezabenlimab)、化疗、西妥昔单抗和 BI 836880 的不同组合是否有助于治疗患有头颈癌或肝癌的患者的研究 2020 NCT04653142 阶段 1 一项用于在患有不同类型的晚期癌症(实体肿瘤)的日本患者中测试不同剂量的单独的和与 BI 754091 组合的 BI 765063 的研究	Boehringer OSE 免疫治疗剂
Bio-Thera 专利抗 SIRPA	2022 WO2022247933		Bio-Thera Solutions
Bioray Pharma 专利抗 SIRPA	2021 WO2022121980		Bioray Pharma Zheijang Hisun
Byondis	2022		Byondis

[0181]

专利抗 SIRPA	US20220195063 2019 US20210388107 2018 US20210070874 2018 US11274159		
CC-95251	2019 WO2020068752	2022 NCT05168202 阶段 1 一项用于评估 CC-95251 在患有急性髓系白血病和骨髓增生异常综合征的参与者中的效果的研究 2019 NCT03783403 阶段 1 将针对 SIRPα 的单克隆抗体 CC-95251 与西妥昔单抗一起在患有晚期实体癌的受试者中进行的研究 2019 NCT03816254 阶段 1 将针对 SIRPα 的单克隆抗体 CC-95251 与西妥昔单抗一起在患有晚期实体癌的受试者中进行的研究	Celgene
ES004	2020 WO2021032078 2020 US20210347908		Elpiscience
Hospital for Sick Children 专利抗 SIRPA	2012 WO2013056352 2012 US20140242095		Toronto Hospital for Sick Children
Kobe U. 抗 SIRPA	2021 WO2022102634 2019 WO2020013170 2019 US20210155707	2022 使用针对 SIRPα/SIRPβ1 的抗体的单一疗法的由抗肿瘤发生的巨噬细胞的诱导介导的抗癌功效。2018 抗人 SIRPα 抗体是一种用于癌症免疫疗法的新工具。	Daiichi Sankyo Kobe University
L & L Biopharma 专利抗 SIRPalpha	2021 WO2021185273		L&L Biopharma
Lanova 专利抗 SIRPA	2021 US20220169726 2020 WO2021129697		Lanova
Qure 专利抗 SIRPA	2021 WO2022110922		QureBio
Sairopa 专利抗 SIRPA	2022 US20220135677		Sairopa
Sound Biologics 专利抗 SIRPA	2020 WO2020180811 2020 US20220235144		Sound Biologics
Stanford U.专利抗	2021 US20210171654 2020	2017 抗 SIRPα 抗体免疫疗法增强中性粒细胞和巨噬细胞的抗肿瘤	Forty Seven

[0182]

SIRPA	WO2021011912 2020 US20200262918 2018 US10487150 2018 WO2019023347 2018 US20190119396 2018 US10961318 2018 US20180319883 2018 US10781256 2017 US20180037652 2017 US10611842 2016 WO2016205042 2016 US20180171030 2016 US10618976 2015 WO2015138600 2015 US20170073414 2015 US10081680	活性。	Stanford
Synthon 专利抗 SIRPA	2018 WO2018210795 2018 WO2018210793		Synthon
Electra 专利抗 SIRPA/SIRPB	2021 WO2021226576 2021 WO2021226591		Electra
Forty Seven 专利抗 SIRPA / SIGLEC-10	2020 WO2020198353		Fort Seven
IMM2902		2022 NCT05076591 阶段 1 IMM2902，一种 HER2/SIRPα 双特异性 mAb-Trap 抗体-	ImmuneOnco
		受体融合蛋白，用于患有表达 HER2 的晚期实体肿瘤的患者	
Lanova 专利抗 SIRPA/PD-L1	2021 WO2022127901		Lanova
OSE 专利抗 PD-1 / SIRPA	2019 US20220056135		OSE Immunotherapeutics

[0183] 糖基化

[0184] 人CD47蛋白被糖基化。蛋白质糖基化涉及聚糖(也称为碳水化合物、糖类或糖)与蛋白质的共价连接。基于聚糖所连接至的氨基酸侧链原子,大多数蛋白质糖基化落入两类:N-连接糖基化和O-连接糖基化。在N连接糖基化中,聚糖连接至保守共识序列Asn-Xaa-Ser/Thr(Xaa≠Pro)中天冬酰胺残基的侧链氮原子,而在O连接糖基化中,聚糖连接至羟基氨基酸(主要是丝氨酸和苏氨酸残基)的侧链氧原子。

[0185] 野生型人CD47蛋白的IgV结构域被N-糖基化并用O-连接糖胺聚糖修饰。人CD47蛋白可以表达为分子量>250kDa、在Ser^{64}和Ser^{79}处具有硫酸乙酰肝素和硫酸软骨素糖胺聚糖

(GAG)链的蛋白聚糖(Kaur等人,J.Biological Chemistry,2011)。硫酸乙酰肝素(HSGAG)和硫酸软骨素(CSGAG)在高尔基体中合成,在高尔基体中,粗面内质网中制成的蛋白质核心被形成蛋白聚糖的糖基转移酶用O-连接糖基化进行翻译后修饰。此外,已经在人CD47蛋白中的五个潜在修饰位点中的四个(N^{16}、N^{32}、N^{55}和N^{93})处鉴定出N连接糖基化(Hatherley等人,Cell,2008)。本段中的氨基酸编号是基于SEQ ID NO 3(即成熟、全长的野生型CD47)。

[0186] 在一些实施方案中,经工程化的CD47蛋白包含比野生型人CD47蛋白更少的糖基化修饰位点。糖基化修饰位点是指蛋白质中可用作聚糖的连接位点的连续氨基酸序列。糖基化修饰位点也称为序列段(sequons)。在一些实施方案中,野生型人CD47蛋白的糖胺聚糖修饰位点内的一个或多个氨基酸在经工程化的CD47蛋白中被缺失或取代。在一些实施方案中,经工程化的CD47蛋白具有0、1、2、3、4、5或6个糖基化位点。

[0187] 在一些实施方案中,经工程化的CD47蛋白包含比野生型人CD47蛋白更少的糖基化修饰。糖基化修饰包括但不限于N-糖基化、O糖基化、磷酸丝氨酸糖基化和C-糖基化。在一些实施方案中,经工程化的CD47蛋白具有0、1、2、3、4或5个糖基化修饰。

[0188] 在一些实施方案中,经工程化的CD47蛋白包含比野生型人CD47蛋白更少的糖胺聚糖修饰位点。糖胺聚糖修饰位点是指蛋白质中可用作糖胺聚糖的连接位点的连续氨基酸序列。在一些实施方案中,野生型人CD47蛋白的糖胺聚糖修饰位点内的一个或多个氨基酸在经工程化的CD47蛋白中被缺失或取代。在一些实施方案中,经工程化的CD47蛋白具有0或1个糖胺聚糖修饰位点。

[0189] 在一些实施方案中,经工程化的CD47蛋白包含比野生型人CD47蛋白更少的糖胺聚糖链。糖胺聚糖链包括但不限于硫酸乙酰肝素(HSGAG)、硫酸软骨素(CSGAG)、硫酸角质素和透明质酸。在一些实施方案中,经工程化的CD47蛋白具有0或1个糖胺聚糖侧链。

[0190] 在一些实施方案中,经工程化的CD47蛋白包含少于两个硫酸乙酰肝素和/或硫酸软骨素糖胺聚糖修饰位点。在一些实施方案中,野生型人CD47蛋白的糖胺聚糖修饰位点内的一个或多个氨基酸在经工程化的CD47蛋白中被缺失或取代。在一些实施方案中,经工程化的CD47蛋白包含一个硫酸乙酰肝素和/或硫酸软骨素糖胺聚糖修饰位点。在一些实施方案中,经工程化的CD47蛋白不包含硫酸乙酰肝素和/或硫酸软骨素糖胺聚糖修饰位点。

[0191] 在一些实施方案中,经工程化的CD47蛋白包含少于两个硫酸乙酰肝素和/或硫酸软骨素糖胺聚糖链。在一些实施方案中,经工程化的CD47蛋白具有0或1个乙硫酸酰肝素和/或硫酸软骨素糖胺聚糖链。

[0192] 在一些实施方案中,经工程化的CD47蛋白包含比野生型人CD47蛋白更少的N-连接糖基化位点。N-连接糖基化位点是蛋白质中可用作糖(特别是N-聚糖)的连接位点的连续氨基酸序列。在一些实施方案中,经工程化的CD47蛋白具有0、1、2、3或4个N-连接糖基化位点。

[0193] 在一些实施方案中,经工程化的CD47蛋白包含比野生型人CD47蛋白更少的N-连接糖基化修饰。在一些实施方案中,经工程化的CD47蛋白具有0、1、2或3个N-连接糖基化修饰。

[0194] 经工程化的CD47蛋白的生物活性

[0195] 在一些实施方案中,经工程化的CD47蛋白与野生型人CD47蛋白在功能上等效。如本文所用,“在功能上等效”是指具有野生型人CD47蛋白的至少一种类型的生物活性。野生型人CD47蛋白的生物活性类型包括但不限于与TSP-1、整联蛋白、另一种CD47蛋白或SIRPα相互作用的能力。优选地,经工程化的CD47蛋白可以与SIRPα结合。

[0196] 与TSP-1的相互作用

[0197] CD47的主要分泌型配体是血小板反应蛋白-1(TSP-1)。TSP-1是一种同源三聚体型糖蛋白,并且它的C端结构域介导与CD47的结合(Isenberg等人,2009年)。血小板反应蛋白家族中的至少两个另外的成员与CD47结合,尽管亲和力较低。TSP-1是与调控细胞运动、增殖和分化有牵连的细胞外基质糖蛋白的血小板反应蛋白家族的原型成员。CD47的细胞外IgV结构域是TSP-1的C端细胞结合结构域(CBD)的受体。诱变研究证实TSP-1与CD47的高亲和力相互作用需要CD47的硫酸乙酰肝素修饰(Kaur等人,2011)。

[0198] 在一些实施方案中,与野生型人CD47蛋白相比,经工程化的CD47蛋白缺少一个或多个血小板反应蛋白-1结合位点。在一些实施方案中,野生型人CD47蛋白的TSP-1位点内的一个或多个氨基酸在经工程化的CD47蛋白中被缺失或取代。在一些实施方案中,缺少一个或多个TSP-1结合位点的经工程化的CD47蛋白不会被一个或多个硫酸乙酰肝素糖基化。

[0199] 在一些实施方案中,与野生型人CD47蛋白相比,经工程化的CD47蛋白以较低的亲和力与TSP-1结合。在一些实施方案中,经工程化的CD47蛋白以高于约0.1μM、0.2μM、0.3μM、0.4μM、0.5μM、0.6μM、0.7μM、0.8μM、0.9μM、1μM、2μM、3μM、4μM、5μM、6μM、7μM、8μM、9μM、10μM、20μM、30μM、40μM、50μM、60μM、70μM、80μM、90μM、100μM的KD与TSP-1结合。在一些实施方案中,经工程化的CD47蛋白不能与TSP-1结合。

[0200] 与整联蛋白的相互作用

[0201] CD47的早期研究是基于使用针对从胎盘中纯化的CD47蛋白产生的单克隆抗体(mAb)。这些研究表明,在存在含RGD的配体(诸如纤连蛋白、纤维蛋白原、玻连蛋白或IV型胶原蛋白)的情况下,CD47具有增强IgG介导的吞噬响应的作用。还发现相同的mAb可以阻断由白细胞介素8(IL-8)或细菌肽N-甲酰甲硫氨酰亮氨酰苯丙氨酸(f-Met-Leu-Phe)刺激的中性粒细胞跨内皮迁移,并抑制中性粒细胞迁移跨过肿瘤坏死因子α(TNFα)刺激的内皮细胞。这些研究表明中性粒细胞和内皮细胞上的CD47都很重要。针对上皮膜制备物产生的其他抗CD47mAb的产生表明,CD47存在于上皮细胞单层的基底外侧膜处,阻断中性粒细胞或上皮细胞上的CD47的mAb会延迟中性粒细胞跨上皮迁移,并且有效的中性粒细胞趋化性与中性粒细胞表面的CD47表达的增加相关。还发现含有RGD序列的基膜蛋白巢蛋白(entactin)在体外以CD47依赖的方式刺激中性粒细胞粘附和趋化性。通过表现出由细菌性腹膜炎中中性粒细胞积聚延迟引起的增加的对细菌感染的敏感性,CD47缺陷小鼠的产生进一步证明了这种蛋白质在调控中性粒细胞炎性反应方面的重要性。CD47缺陷的中性粒细胞也表现出RGD刺激的中性粒细胞粘附、吞噬作用和呼吸爆发的严重受损。对于$\alpha_v\beta_3$整联蛋白介导的细胞对细胞外基质蛋白玻连蛋白的反应,发现CD47是$\alpha_v\beta_3$介导的与玻连蛋白包被的珠粒的结合所必需的,但不是$\alpha_v\beta_3$介导的与玻连蛋白包被的表面的粘附所必需的。除了与$\alpha_v\beta_3$整联蛋白的原始关联之外,CD47还被证明能与以下蛋白相互作用并且调控以下蛋白:血小板上的整联蛋白$\alpha_2\beta_1$和$\alpha IIb\beta_3$、平滑肌细胞上的$\alpha_2\beta_1$整联蛋白、镰状红血细胞和B淋巴细胞上的$\alpha_4\beta_1$整联蛋白、小胶质细胞中的$\alpha_6\beta_1$整联蛋白以及软骨细胞中的α_5整联蛋白。

[0202] 在一些实施方案中,与野生型人CD47蛋白相比,经工程化的CD47蛋白缺少一个或多个整联蛋白结合位点。在一些实施方案中,野生型人CD47蛋白的整联蛋白结合位点内的一个或多个氨基酸在经工程化的CD47蛋白中被缺失或取代。

[0203] 在一些实施方案中,与野生型人CD47蛋白相比,经工程化的CD47蛋白以较低的亲

和力与整联蛋白结合。在一些实施方案中,经工程化的CD47蛋白以高于约0.1μM、0.2μM、0.3μM、0.4μM、0.5μM、0.6μM、0.7μM、0.8μM、0.9μM、1μM、2μM、3μM、4μM、5μM、6μM、7μM、8μM、9μM、10μM、20μM、30μM、40μM、50μM、60μM、70μM、80μM、90μM、100μM的KD与整联蛋白结合。在一些实施方案中,经工程化的CD47蛋白不能与整联蛋白结合。

[0204] 在一些实施方案中,整联蛋白选自由以下组成的组:$\alpha_v\beta_3$整联蛋白、$\alpha II_b\beta_3$整联蛋白、$\alpha_2\beta_1$整联蛋白、$\alpha_4\beta_1$整联蛋白、$\alpha_6\beta_1$整联蛋白和α_5整联蛋白。

[0205] 与SIRP蛋白的相互作用

[0206] 信号调控蛋白(SIRP)家族含有三个成员,其中SIRPα和SIRPγ是已知的CD47受体。SIRP蛋白属于细胞表面糖蛋白的Ig家族,并且第一个被鉴定的成员是SIRPα(也称为SHPS-1、CD172a、BIT、MFR或P84)。SIRPα在髓系细胞和神经元中高度表达,但也在内皮细胞和纤维母细胞中高度表达,并且具有三个细胞外Ig样结构域、一个远端IgV样结构域和两个膜近端IgC样结构域。此外,还报道了仅具有一个IgV结构域的经选择性剪接的形式。SIRPα在其细胞内尾部中具有两个基于免疫受体酪氨酸的抑制性基序(ITIM),这两个基序在被磷酸化时可以结合含有Src同源性2(SH2)结构域的蛋白质酪氨酸磷酸酶SHP-1和SHP-2。SIRPα的另外的细胞质结合配偶体是55kDa的衔接子分子Src激酶相关蛋白同源物/SKAP2(SKAP55hom/R)、130kDa的Fyn结合蛋白/SLP-76相关磷蛋白(FYB/SLAP-130)和酪氨酸激酶PYK2。SIRPα也是胰岛素、EGF和bPDGF受体的激酶活性的底物。纤维母细胞中SIRPα的过度表达会降低响应于胰岛素、EGF和bPDGF的增殖和其他下游事件。由于SIRPα也与M-CSF受体c-fms组成型相关,因此SIRPα过表达会部分逆转v-fms表型。

[0207] CD47是SIRPα的配体。CD47或SIRPα的糖基化似乎不是它们的相互作用所必需的,但SIRPα的N-糖基化水平对该相互作用有影响,使得过度糖基化会降低CD47的结合。CD47 IgV结构域中的Cys^{33}与CD47跨膜结构域中的Cys^{263}之间的长距离二硫键(long-range disulfide)对于确定CD47 IgV结构域的增强其与SIRPα的结合的取向也很重要。本段中的氨基酸编号是基于SEQ ID NO:3(即成熟的、野生型的全长CD47蛋白)。

[0208] CD47和CD47/SIRPα复合物的结构已被揭示(Hatherley等人,2008)。对应于SEQ ID NO:3的氨基酸92-100和103-113的两条β链被鉴定为位于CD47/SIRPα相互作用的核心处。SEQ ID NO:3的氨基酸97(Glu)、99(Thr)、100(Glu)、103(Arg)、104(Glu)和106(Glu)被鉴定为CD47/SIRPα相互作用中的接触残基,并且在CD47对SIRPα的结合亲和力方面发挥作用(Hatherley等人,2008)。在优选的实施方案中,该两条β链及其内的六个接触残基被保留在本文公开的经工程化的CD47蛋白中,以维持SIRPα结合能力。

[0209] 在一些实施方案中,经工程化的CD47蛋白在其细胞外结构域中包含至少一个SIRPα相互作用基序。在一些实施方案中,对应于SEQ ID NO:3的氨基酸97、99、100、103、104、106的氨基酸被保留在经工程化的CD47蛋白中。在一些实施方案中,该两条β链被保留在经工程化的CD47蛋白中。

[0210] 在一些实施方案中,经工程化的CD47蛋白包含介于位于人CD47细胞外结构域或其部分内的半胱氨酸与位于一个或多个人CD47跨膜结构域内或之间的半胱氨酸之间的二硫键。在一些实施方案中,该两个半胱氨酸是细胞外结构域中的Cys^{33}和跨膜结构域中的Cys^{263},其中编号是基于SEQ ID NO:3。

[0211] 在一些实施方案中,经工程化的CD47蛋白可以与SIRPα结合。在一些实施方案中,

经工程化的CD47蛋白可以以类似于野生型人CD47蛋白的结合亲和力与SIRPα结合。在一些实施方案中,经工程化的CD47蛋白以低于约0.01μM、0.02μM、0.03μM、0.04μM、0.05μM、0.06μM、0.07μM、0.08μM、0.09μM、0.1μM、0.2μM、0.3μM、0.4μM、0.5μM、0.6μM、0.7μM、0.8μM、0.9μM、1μM、2μM、3μM、4μM、5μM的KD与SIRPα结合。在一些实施方案中,经工程化的CD47蛋白可以以比野生型人CD47蛋白更高的结合亲和力与SIRPα结合。

[0212] 直接结合研究表明,TSP-1抑制SIRPα与表达CD47的细胞结合(Isenberg等人,2009)。此数据与TSP-1和SIRPα与CD47上单个位点的竞争性结合、与不同的但处于近端的位点的结合的空间抑制,或变构抑制一致。Ser^{64}处的用硫酸乙酰肝素链进行的糖基化是TSP-1结合所必需的,但不是SIRPα结合所必需的(Soto-Pantoja等人,2015)。因此,在一些实施方案中,缺乏Ser^{64}处的糖基化的经工程化的CD47蛋白具有增强的SIRPα结合能力,因为TSP-1结合受到阻碍。

[0213] CD47/SIRPα相互作用调控许多身体系统(诸如免疫系统)中的多种细胞间相互作用,在该系统中CD47/SIRPα相互作用调控淋巴细胞稳态、树突状细胞(DC)的成熟和活化、次级淋巴系器官中某些DC亚组的正确定位以及细胞迁移。CD47/SIRPα相互作用也调控神经系统细胞。这两种蛋白质之间的相互作用在骨重建中也发挥着重要作用。由CD47/SIRPα相互作用调控的细胞反应通常依赖于通过两种受体的双向信号传导。

[0214] 宿主细胞上的CD47可以充当“自身标志物”,并通过与循环免疫细胞表面上的SIRPα结合以递送抑制性“不要杀伤我(don't kill me)”信号来调控吞噬作用。如上所公开,SIRPα编码表达在巨噬细胞和树突状细胞表面上的Ig超家族受体,其细胞质区域含有基于免疫受体酪氨酸的抑制基序(ITIM),该抑制基序可以触发级联反应来抑制吞噬作用。CD47-SIRPα结合导致SIRPα上ITIM的磷酸化,从而触发SHP1和SHP2-Src同源磷酸酶的募集。这些磷酸酶转而抑制吞噬突触处肌球蛋白II的积聚,从而阻止吞噬作用(Fujioka等人,1996)巨噬细胞对靶细胞的吞噬作用最终受活化信号(Fcγ R、CRT、LRP-1)和抑制性信号(SIRPα-CD47)的平衡调控。CD47表达升高可以帮助细胞逃避免疫监视和随后的破坏。CD47表达升高可以帮助细胞逃避先天免疫细胞杀伤。

[0215] 在一些实施方案中,经工程化的CD47蛋白是致耐受因子。如本文所用,致耐受因子是一种在正常免疫反应出现病理性或不希望的活化时诱导免疫耐受的因子。例如,当患者在接受同种异体移植或同种异体细胞疗法后对供体抗原发展出免疫反应时,或者当身体对与自身免疫性疾病有牵连的自身抗原做出不适当响应时,就会发生这种情况。在一些实施方案中,“致耐受因子”包括低免疫因子(hypoimmunity factor)、补体抑制剂,以及其他调节或影响细胞在施用、移植或植入后被宿主或接受者受试者的免疫系统识别的能力的因子。在一些实施方案中,对致耐受因子进行遗传修饰以实现另外的功能。

[0216] 在一些实施方案中,经工程化的CD47蛋白可以抑制吞噬作用、细胞毒性剂的释放和/或其他细胞介导的杀伤机制。

[0217] CD47分子之间的相互作用

[0218] 研究还表明,在不存在任何已知CD47配体的情况下,CD47介导细胞粘附相互作用。这种细胞-细胞粘附需要CD47,但不需要其任何已知的配体,这表明同型结合也可以发生在对立细胞上的CD47的IgV结构域之间(Rebres等人,2005年)。这种相互作用可能需要一种未鉴定的胰蛋白酶敏感蛋白质(X)来介导细胞-细胞粘附,但应该考虑到这种细胞-细胞相互

作用以及蛋白质水解脱落的CD47 IgV结构域(Maile等人,2010)或外泌体中的CD47(Kaur等人,2014)与细胞表面CD47的同型结合可引发CD47信号转导的潜力。然而,缺乏CD47-CD47结合和由同型CD47结合引起的信号传导的直接证据。在一些实施方案中,经工程化的CD47蛋白不能与另一个CD47分子相互作用。

[0219] III.多核苷酸

[0220] 在另一个方面,本公开提供了编码本文公开的经工程化的CD47蛋白的多核苷酸。

[0221] 编码本文公开的经工程化的CD47蛋白的多核苷酸可以通过本领域已知的方法获得。例如,该多核苷酸可以从经克隆的DNA(例如,来自DNA文库)、通过化学合成、通过cDNA克隆,或通过从所需细胞纯化的基因组DNA或其片段的克隆获得。当通过重组手段产生该多核苷酸时,可以使用本领域技术人员已知的任何用于鉴定编码所需基因的核酸的方法。本领域中可获得的任何方法都可用于诸如从细胞或组织来源获得编码所需人CD47蛋白的全长(即,涵盖整个编码区域)的cDNA或基因组DNA。可以使用标准重组DNA方法从野生型多核苷酸工程化出包括CD47的经截短的形式(诸如本文提供的)在内的经修饰的或变异的多核苷酸。可以使用本领域已知的用于克隆和分离核酸分子的任何可获得的方法来克隆或分离多核苷酸。此类方法包括核酸的PCR扩增和文库筛选,包括核酸杂交筛选、基于抗体的筛选和基于活性的筛选。

[0222] 用于扩增多核苷酸的方法可被用来分离编码所需蛋白质的多核苷酸,包括例如聚合酶链式反应(PCR)方法。PCR可以使用本领域中任何已知的方法或程序进行。示例性方法包括使用Perkin-Elmer Cetus热循环仪和Taq聚合酶(Gene Amp)。含有所关注的基因的核酸可用作源材料,可从该源材料中扩增所需的编码多肽的核酸分子。例如,DNA和mRNA制备物、细胞提取物、来自适当来源(例如睾丸、前列腺、乳腺)的组织提取物、流体样本(例如血液、血清、唾液)、来自健康和/或患病受试者的样本可用于扩增方法。该来源可以是任何真核物种,包括但不限于脊椎动物、哺乳动物、人、猪科动物、牛科动物、猫科动物、鸟类、马科动物、犬科动物和其他灵长类动物来源。也可使用核酸文库作为源材料。可设计引物来扩增所需的多核苷酸。例如,可以基于从中生成所需的多核苷酸的表达序列来设计引物。可以基于多肽氨基酸序列的反向翻译来设计引物。如果需要,可以使用简并引物进行扩增。可使用与位于所需序列3'和5'末端处的序列杂交的寡核苷酸引物作为引物,以通过PCR从核酸样本中进行扩增。可使用引物扩增整个全长多核苷酸或其经截短的序列。可以对通过扩增生成的核酸分子进行测序并确认其编码所需的多肽。

[0223] IV.载体

[0224] 在另一个方面,本公开提供了包含编码本文公开的经工程化的CD47蛋白的多核苷酸的载体。

[0225] 本领域技术人员已知的用于将DNA片段插入到载体中的任何方法都可用于构建包含本文公开的多核苷酸的表达载体。这些方法可包括体外重组DNA和合成技术以及体内(基因)重组。在一个或多个表达载体中本文公开的多核苷酸可以可操作地连接到控制序列,以确保经工程化的CD47蛋白的表达。此类控制序列可包括但不限于前导序列或信号序列、启动子(如天然相关或异源启动子)、核糖体结合位点、增强子或活化子元件、翻译起始和终止序列以及转录起始和终止序列,并且被选择为与选择用于表达经工程化的CD47蛋白的宿主细胞相容。还考虑了本领域已知的组成型或诱导型启动子。启动子可以是天然存在的启动

子、组合了不止一个启动子的元件的杂合启动子,或合成启动子。表达构建体可存在于细胞中的附加体(诸如质粒)上,或者表达构建体可被插入到染色体中,诸如基因座中。在一些实施方案中,表达载体包括可选择标志物基因以允许选择经转化的宿主细胞。一些实施方案包括这样的表达载体,该表达载体包含编码变异多肽的核苷酸序列,该核苷酸序列与至少一个调控控制序列可操作地连接。本文使用的调控控制序列包括启动子、增强子和其他表达控制元件。在一些实施方案中,表达载体被设计用于选择待转化的宿主细胞、期望表达的特定变异多肽、载体的拷贝数、控制该拷贝数的能力,和/或载体编码的任何其他蛋白质(诸如抗生素标志物)的表达。

[0226] 合适的哺乳动物启动子的实例包括例如来自以下基因的启动子:延伸因子1α(EF1α)启动子、CAG启动子、仓鼠的泛素/S27a启动子(WO 97/15664)、猿猴空泡病毒40(SV40)早期启动子、腺病毒主要晚期启动子、小鼠金属硫蛋白-I启动子、劳斯肉瘤病毒(RSV)的长末端重复区、小鼠乳腺肿瘤病毒启动子(MMTV)、莫洛尼氏鼠白血病病毒长末端重复区和人巨细胞病毒(CMV)早期启动子。其他异源哺乳动物启动子的实例是肌动蛋白、免疫球蛋白或一种或多种热休克启动子。在另外的实施方案中,用于哺乳动物宿主细胞的启动子可以从病毒的基因组获得,该病毒诸如多瘤病毒、禽痘病毒(1989年7月5日公开的UK 2,211,504)、牛乳头瘤病毒、禽肉瘤病毒、巨细胞病毒、逆转录病毒、乙型肝炎病毒和猿猴病毒40(SV40)。在进一步的实施方案中,使用异源哺乳动物启动子。实例包括肌动蛋白启动子、免疫球蛋白启动子和热休克启动子。SV40的早期和晚期启动子作为同样含有SV40病毒复制起点的SV40限制性片段方便地获得(Fiers等人,Nature 273:113-120(1978))。人巨细胞病毒的即刻早期启动子作为HindIII限制酶片段方便地获得(Greenaway等人,Gene 18:355-360(1982))。前述参考文献以引用的方式整体并入。

[0227] 在一些实施方案中,载体是携带外源性多核苷酸的假型化的自失活慢病毒载体。在一些实施方案中,载体是用水疱性口炎VSV-G包膜假型化并携带外源性多核苷酸的自失活慢病毒载体。

[0228] 该载体可以包括,但不限于,病毒载体和质粒DNA。病毒载体可以包括但不限于腺病毒载体、慢病毒载体、逆转录病毒载体和腺相关病毒载体。通常,表达载体含有选择

[0229] 标志物,诸如氨苄青霉素抗性、潮霉素抗性、四环素抗性、卡那霉素抗性或新霉素抗性,以允许检测用所需DNA序列转化的那些细胞。合适的载体、启动子和增强子元件是本领域已知的;许多是可商购获得的,用于生成主题重组构建体。在一些实施方案中,该载体是多顺反子载体。在一些实施方案中,该载体是双顺反子或多顺反子表达载体。双顺反子或多顺反子表达载体可包括(1)与每个开放阅读框融合的多个启动子;(2)基因之间的剪接信号的插入;(3)表达受单一启动子驱动的基因的融合;和(4)基因之间的蛋白水解切割位点(自切割肽)的插入或基因之间的内部核糖体进入位点(IRES)的插入。

[0230] 多顺反子载体用于在同一细胞中共表达多种基因。两种策略最常用于构建多顺反子载体。首先,内部核糖体进入位点(IRES)元件通常用于双顺反子载体。IRES元件用作另一个核糖体募集位点,允许从mRNA的内部区域启动翻译。因此,从一个mRNA翻译出两种蛋白质。IRES元件相当大(通常为500-600bp)(Pelletier等人,1988;Jang等人,1988)。本文公开的经工程化的CD47蛋白与野生型全长人CD47相比具有较小的尺寸,并且因此可与IRES元件一起用于包装能力有限的多顺反子载体中。

[0231] 第二种策略依赖于“自切割的”2A肽。这些肽最早是在小核糖核酸病毒中发现的，它们很短(约20个氨基酸)，并且可以从相同的mRNA产生等摩尔水平的多种基因。“自切割”这一术语并不完全准确，因为这些肽被认为是通过使核糖体跳过2A元件C端处的肽键合成，从而导致2A序列的末端与下游下一个肽之间的分离来发挥作用的(Kim等人，2011)。“切割”发生在于C端发现的甘氨酸和脯氨酸残基之间。因此，上游顺反子将具有添加到该末端的几个另外的残基，而下游顺反子将从脯氨酸开始。

[0232] 在一些实施方案中，在本公开的背景下使用的多顺反子载体是美国申请63/270,956和63/222,954中描述的多顺反子载体。

[0233] 在一些实施方案中，本文的载体是能够转移或转运另一核酸分子(包括转移或转运到细胞或细胞基因组中)的核酸分子。被转移的核酸通常与载体核酸分子连接，例如被插入到载体核酸分子中。载体可包括在细胞中引导自主复制的序列，或者可包括足以允许整合到宿主细胞DNA中的序列。有用的载体包括例如质粒(例如，DNA质粒或RNA质粒)、转座子、粘粒、细菌人工染色体和病毒载体。有用的病毒载体包括例如复制缺陷逆转录病毒和慢病毒。非病毒载体可能需要递送媒介物以促进核酸分子进入到细胞中。

[0234] 病毒载体可包含核酸分子，该核酸分子包含通常促进核酸分子转移或整合到细胞的基因组中或者转移或整合到介导核酸转移的病毒颗粒中的病毒来源的核酸元件。除了一种或多种核酸外，病毒颗粒通常将包含各种病毒组分并且有时还包含宿主细胞组分。病毒载体可以包含例如能够将核酸转移到细胞中或转移到被转移的核酸中的病毒或病毒颗粒(例如，作为裸DNA)。病毒载体和转移质粒可以包含主要来源于病毒的结构和/或功能遗传元件。逆转录病毒载体可包含含有主要来源于逆转录病毒的结构和功能遗传元件或其部分的病毒载体或质粒。

[0235] 在本文所述的一些载体中，与对应的野生型病毒相比，有助于复制或为复制所必需的一个或多个蛋白质编码区域的至少一部分可能不存在。这使得病毒载体复制有缺陷。在一些实施方案中，该载体能够转导靶非分裂宿主细胞和/或将其基因组整合到宿主基因组中。

[0236] 在一些实施方案中，逆转录病毒核酸包含以下中的一种或多种(例如，全部)：5’启动子(例如，用于控制整个包装的RNA的表达)、5’LTR(例如，其包括R(聚腺苷酸化尾信号)和/或包括引物活化信号的U5)、引物结合位点、psi包装信号、用于核输出的RRE元件、直接位于转基因上游以控制转基因表达的启动子、转基因(或其他外源性剂元件)、多嘌呤区和3’LTR(例如，其包括突变的U3、R和U5)。在一些实施方案中，逆转录病毒核酸进一步包含cPPT、WPRE和/或绝缘子元件(例如，如Browning等人，“Insulators to Improve the Safety of Retroviral Vectors for HIV Gene Therapy”，Biomedicines，4(1)：4(2016)所述)中的一个或多个。

[0237] 逆转录病毒通常通过将其基因组RNA逆转录成线性双链DNA拷贝来复制并随后将其基因组DNA共价整合到宿主基因组中。野生型逆转录病毒基因组的结构通常包含5’长末端重复序列(LTR)和3’LTR，在该5’长末端重复序列(LTR)和3’LTR之间或之内有使基因组能够被包装的包装信号、引物结合位点、实现整合到宿主细胞基因组中的整合位点以及编码促进病毒颗粒组装的包装组分的gag、pol和env基因。更复杂的逆转录病毒具有另外的特征，诸如HIV中的rev和RRE序列，其使得经整合的原病毒的RNA转录物能够从受感染的靶细

胞的细胞核有效输出到细胞质。在原病毒中,病毒基因在两个末端处侧接有称为长末端重复序列(LTR)的区域。LTR参与原病毒整合和转录。LTR也充当增强子-启动子序列,并且可以控制病毒基因的表达。逆转录病毒RNA的衣壳化是通过位于病毒基因组的5'末端处的psi序列发生的。

[0238] LTR本身通常是相似的(例如同一的)序列,其可以分成三个元件,称为U3、R和U5。U3来源于RNA的3'末端特有的序列。R来源于在RNA两端重复的序列,并且U5来源于RNA的5'末端特有的序列。这三种元件的尺寸在不同的逆转录病毒中可以有相当大的变化。

[0239] 对于病毒基因组,转录起始位点通常在一个LTR中的U3与R之间的边界处,而poly(A)添加(终止)位点在另一个LTR中的R与U5之间的边界处。U3含有原病毒的大部分转录控制元件,其包括对细胞和在一些情况下病毒转录活化因子蛋白作出响应的启动子和多个增强子序列。一些逆转录病毒包含编码参与调控基因表达的蛋白质的以下基因中的任何一种或多种基因:tot、rev、tax和rex。

[0240] 关于结构基因gag、pol和env本身,gag编码病毒的内部结构蛋白质。Gag蛋白被蛋白水解地加工成成熟的蛋白质MA(基质)、CA(衣壳)和NC(核衣壳)。pol基因编码逆转录酶(RT),该逆转录酶含有介导基因组复制的DNA聚合酶、相关RNA酶H和整合酶(IN)。env基因编码病毒体的表面(SU)糖蛋白和跨膜(TM)蛋白,它们形成与细胞受体蛋白特异性相互作用的复合物。这种相互作用例如通过病毒膜与细胞膜的融合来促进感染。

[0241] 在复制缺陷逆转录病毒载体基因组中,gag、pol和env可能不存在或没有功能。RNA的两末端处的R区域通常是重复序列。U5和U3分别代表RNA基因组的5'和3'端处的独特序列。逆转录病毒还可以含有编码除gag、pol和env以外的蛋白质的另外的基因。另外的基因的实例包括(在HIV中)vif、vpr、vpx、vpu、tat、rev和nef中的一种或多种。EIAV具有(尤其)另外的基因S2。

[0242] 适用于具体实施方案的例示性逆转录病毒包括但不限于:莫洛尼鼠白血病病毒(M-MuLV)、莫洛尼鼠肉瘤病毒(MoMSV)、哈维鼠肉瘤病毒(HaMuSV)、鼠乳腺肿瘤病毒(MuMTV)、长臂猿白血病病毒(GaLV)、猫白血病病毒(FLV)、泡沫病毒(spumavirus)、弗瑞德鼠(Friend murine)白血病病毒、鼠干细胞病毒(MSCV)和劳斯肉瘤病毒(RSV)和人免疫缺陷病毒(HIV)。

[0243] 在一些实施方案中,逆转录病毒是γ逆转录病毒。在一些实施方案中,逆转录病毒是ε逆转录病毒。在一些实施方案中,逆转录病毒是α逆转录病毒。在一些实施方案中,逆转录病毒是β逆转录病毒。在一些实施方案中,逆转录病毒是δ逆转录病毒。在一些实施方案中,逆转录病毒是泡沫逆转录病毒(Spumaretrovirus)。在一些实施方案中,逆转录病毒是内源性逆转录病毒。在一些实施方案中,逆转录病毒是慢病毒。

[0244] 在一些实施方案中,逆转录病毒或慢病毒载体进一步包含一个或多个绝缘子元件,例如,Browning等人,"Insulators to Improve the Safety of Retroviral Vectors for HIV Gene Therapy,"Biomedicines,4(1):4(2016)中描述的绝缘子元件。在各种实施方案中,该载体包含与编码外源性剂的多核苷酸可操作地连接的启动子。该载体可以具有一个或多个LTR,其中任一个LTR均包含一种或多种修饰,诸如一个或多个核苷酸取代、添加或缺失。该载体可进一步包含一个或多个用于增加转导效率的辅助元件(例如,cPPT/FLAP)、病毒包装(例如,Psi(Y)包装信号,RRE)和/或其他增加外源性基因表达的元件(例

如,poly(A)序列),并且可任选地包含WPRE或HPRE。在一些实施方案中,慢病毒核酸例如从5'至3'包含以下中的一种或多种(诸如全部):启动子(例如CMV)、R序列(例如包含TAR)、U5序列(例如用于整合)、PBS序列(例如用于逆转录)、DIS序列(例如用于基因组二聚化)、psi包装信号、部分gag序列、RRE序列(例如用于核输出)、cPPT序列(例如用于核输入)、驱动外源性剂表达的启动子、编码外源性剂的基因、WPRE序列(例如,用于有效的转基因表达)、PPT序列(例如,用于逆转录)、R序列(例如,用于聚腺苷酸化和终止)和U5信号(例如,用于整合)。

[0245] 例示性慢病毒包括但不限于:HIV(人免疫缺陷病毒;包括HIV 1型和HIV 2型);维士那-梅地病毒(visna-maedi virus,VMV)病毒;山羊关节炎-脑炎病毒(CAEV);马传染性贫血病毒(EIAV);猫免疫缺陷病毒(FIV);牛免疫缺陷病毒(BIV);和猿猴免疫缺陷病毒(SIV)。在一些实施方案中,使用基于HIV的载体骨架(即HIV顺式作用序列元件)。慢病毒载体可包含含有结构和功能遗传元件或其部分的病毒载体或质粒,包括主要来源于慢病毒的LTR。

[0246] 在实施方案中,慢病毒载体(例如,慢病毒表达载体)可包含慢病毒转移质粒(例如,作为裸DNA)或感染性慢病毒颗粒。关于诸如克隆位点、启动子、调控元件、异源核酸等元件,应理解这些元件的序列可以在慢病毒颗粒中以RNA形式存在,并且可以在DNA质粒中以DNA形式存在。

[0247] 在实施方案中,慢病毒载体是具有足够的逆转录病毒遗传信息以允许在包装组分的存在下将RNA基因组包装到能够感染靶细胞的病毒颗粒中的载体。靶细胞的感染可以包括逆转录和整合到靶细胞基因组中。重组慢病毒载体(RLV)通常携带要被载体递送至靶细胞的非病毒编码序列。在实施方案中,RLV不能在靶细胞内独立复制来产生感染性逆转录病毒颗粒。通常,RLV缺乏功能性gag-pol和/或env基因和/或参与复制的其他基因。该载体可以被配置为分裂式内含子载体,例如,如PCT专利申请WO 99/15683中所述,该申请以引用的方式整体并入本文中。

[0248] 在一些实施方案中,慢病毒载体包含最小的病毒基因组,例如,病毒载体已被操纵以去除非必需元件并保留必需元件,以便提供感染、转导和递送所关注的核苷酸序列至靶宿主细胞所需的功能,例如,如以引用的方式整体并入本文中的WO 98/17815中所述。

[0249] 最小的慢病毒基因组可以包含例如(5')R-U5-一个或多个第一核苷酸序列-U3-R(3')。然而,用于在源细胞内产生慢病毒基因组的质粒载体也可以包含可操作地连接到慢病毒基因组以引导该基因组在源细胞中的转录的转录调控控制序列。这些调控序列可以包含与转录的逆转录病毒序列缔合的天然序列,例如5'U3区,或者这些调控序列可以包含异源启动子,例如另一种病毒启动子,例如CMV启动子。一些慢病毒基因组包含促进有效病毒产生的另外的序列。例如,在HIV的情况下,rev和RRE序列可被包括在内。

[0250] V.细胞

[0251] 在另一个方面,本公开提供了包含编码本文公开的经工程化的CD47蛋白的多核苷酸的细胞,和/或包含编码本文公开的经工程化的CD47蛋白的多核苷酸的载体。

[0252] 在一些实施方案中,经工程化的CD47蛋白以编码经工程化的CD47蛋白的核酸分子的形式被引入到细胞中。将核酸分子引入到细胞中的过程可以通过任何合适的技术来实现。合适的技术包括磷酸钙或脂质介导的转染、电穿孔和使用病毒载体进行的转导或感染。在一些实施方案中,核酸分子包含DNA。在一些实施方案中,核酸分子包含经修饰的DNA。在

一些实施方案中,核酸分子包含mRNA。在一些实施方案中,核酸分子包含经修饰的mRNA。

[0253] 在一些实施方案中,使用病毒转导(例如使用载体)递送经工程化的CD47蛋白。在一些实施方案中,该载体是携带外源性多核苷酸的假型自失活慢病毒载体。在一些实施方案中,载体是用水疱性口炎VSV-G包膜假型化并携带外源性多核苷酸的自失活慢病毒载体。

[0254] 在一些实施方案中,使用一种或多种基因编辑系统递送经工程化的CD47蛋白。在一些实施方案中,该基因编辑系统是CRISPR/Cas。在一些实施方案中,该基因编辑系统是本文所述的CRISPR/Cas系统中的一种或多种。在一些实施方案中,使用转录活化因子样效应物核酸酶(TALEN)方法递送经工程化的CD47蛋白。在一些实施方案中,该基因编辑系统是本文所述的TALEN方法中的一种或多种。

[0255] 在一些实施方案中,经工程化的CD47蛋白使用锌指核酸酶(ZFN)递送。在一些实施方案中,该基因编辑系统是本文所述的ZFN方法中的一种或多种。

[0256] 在一些实施方案中,经工程化的CD47蛋白使用大范围核酸酶递送。在一些实施方案中,该基因编辑系统是本文所述的大范围核酸酶方法中的一种或多种。

[0257] 在一些实施方案中,细胞是干细胞。

[0258] 在一些实施方案中,细胞是多能干细胞。多能干细胞是具有通过分裂进行自我更新,并且发育成早期胚胎的三个原代生殖细胞层的能力并从而发育成成年身体的所有细胞,但不能发育成诸如胎盘的胚胎外组织的细胞。胚胎干细胞和诱导型多能干细胞都是多能干细胞。

[0259] 在一些实施方案中,细胞是胚胎干细胞(ESC)。胚胎干细胞是来源于胚泡(早期植入前胚胎)的内细胞团的多能干细胞。

[0260] 在一些实施方案中,细胞是诱导型多能干细胞(iPSC)。iPSC来源于成体体细胞,这些体细胞已被遗传重编程回到胚胎样多能状态,该胚胎样多能状态使得能够开发出治疗目的所需的任何类型的细胞的无限来源。

[0261] 如本文所用的“多能干细胞”具有分化为以下三个胚层中的任一个的潜力:内胚层(例如,胃内衬、胃肠道、肺等)、中胚层(例如,肌肉、骨骼、血液、泌尿生殖组织等)或外胚层(例如表皮组织和神经系统组织)。如本文所用的术语“多能干细胞”还涵盖诱导型多能干细胞(iPSC或iPS细胞),或一类来源于非多能细胞的多能干细胞。在一些实施方案中,多能干细胞由不是多能细胞的细胞产生或生成。换句话说,多能干细胞可以是非多能细胞的直接或间接后代。亲本细胞的实例包括已被重编程以通过各种手段诱导多能未分化的表型的体细胞。此类“iPS”或“iPSC”细胞可以通过诱导某些调控基因的表达或通过某些蛋白质的外源性应用来产生。用于诱导iPS细胞的方法是本领域已知的并且在下文进一步描述。(参见,例如Zhou等人,Stem Cells27(11):2667-74(2009);Huangfu等人,Nature Biotechnol.26(7):795(2008);Woltjen等人,Nature 458(7239):766-770(2009);以及Zhou等人,Cell Stem Cell 8:381-384(2009);这些文献中的每一篇均以引用的方式整体并入本文中。)如本文所用,“hiPSC”是人诱导型多能干细胞。在一些实施方案中,如本文所用的“多能干细胞”还涵盖间充质干细胞(MSC)和/或胚胎干细胞(ESC)。

[0262] 在一些实施方案中,细胞是胰腺胰岛细胞。在一些实施方案中,细胞是原代胰腺胰岛细胞。

[0263] 在一些实施方案中,细胞从多能干细胞分化而来。在一些实施方案中,多能干细胞

是iPSC或ESC。

[0264] 在一些实施方案中,细胞是T细胞。在一些实施方案中,细胞是原代T细胞。在一些实施方案中,细胞是包含嵌合抗原受体(CAR),诸如包含编码CAR的多核苷酸和/或包含CAR,或者以其他方式从多核苷酸表达CAR的T细胞。在一些实施方案中,细胞是CAR-T细胞。在一些实施方案中,T细胞从多能干细胞分化而来。在一些实施方案中,多能干细胞是iPSC或ESC。

[0265] T细胞是一种类型的淋巴细胞。T细胞是免疫系统的白血细胞(white blood cell)之一,并且在适应性免疫反应中发挥着核心作用。CAR-T细胞是已被遗传工程化为产生人工T细胞受体的T细胞。嵌合抗原受体(CAR,也称为嵌合免疫受体、嵌合T细胞受体或人工T细胞受体)是已被工程化为赋予T细胞靶向特定蛋白质的能力的受体蛋白。这些受体是嵌合的,因为它们将抗原结合和T细胞活化功能组合在单个受体中。CAR-T细胞可以是两种细胞类型的比率为1:1的CD4+和CD8+两者,从而提供协同抗肿瘤作用。CAR-T细胞可以来源于患者自身血液中的T细胞(自体),或来源于另一个健康供体的T细胞(同种异体)。T细胞可以从许多种来源获得,该来源包括但不限于外周血单核细胞、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、脾组织和肿瘤。在某些实施方案中,可以使用技术人员已知的许多技术从自受试者收集的单位血液中获得T细胞,该技术诸如沉降法(例如FICOLL™分离法)、基于抗体缀合的珠的方法(诸如MACS™分离法(Miltenyi))。

[0266] 在一些实施方案中,该细胞选自但不限于心脏细胞、心脏祖细胞、神经细胞、胶质祖细胞、内皮细胞、T细胞、B细胞、胰腺胰岛细胞、视网膜色素上皮细胞、肝细胞、甲状腺细胞、皮肤细胞、血细胞、浆细胞、血小板、肾细胞、上皮细胞、CAR-T细胞、NK细胞和CAR-NK细胞。

[0267] 在一些实施方案中,该细胞是原代细胞。使用酶方法或机械方法直接从人体或动物组织分离原代细胞。一旦被分离,它们就会被放置在塑料或玻璃容器中的人工环境中,容器内装有含有必需营养素和生长因子的专门培养基以支持增殖。原代细胞可属于两种类型:贴壁细胞或悬浮细胞。贴壁细胞需要附着才能生长,并且被称为锚定依赖性细胞。贴壁细胞通常来源于器官组织。悬浮细胞不需要附着来生长,并且被称为不依赖于锚定的细胞。大多数悬浮细胞是从血液系统中分离出来的,但一些组织来源的细胞也可以以悬浮形式使用,诸如肝细胞或肠细胞。尽管原代细胞的寿命通常有限,但它们与细胞系相比具有许多优势。原代细胞培养使研究人员能够研究供体而不仅仅是细胞。在建立实验模型时,可以考虑诸如年龄、病史、种族和性别的多种因素。随着个性化医疗趋势的日益增长,此种供体的可变性和组织的复杂性可以通过使用原代细胞来实现,但很难用本质上更系统和统一的细胞系来复现,并且无法捕捉到活组织的真正多样性。

[0268] 在一些实施方案中,该细胞是分化的细胞。分化的细胞是已经经历分化的细胞。它们是执行专门功能的成熟细胞。分化的细胞的一些实例是上皮细胞、皮肤纤维母细胞、内衬于血管中的内皮细胞、平滑肌细胞、肝脏细胞、神经细胞、人心脏肌肉细胞等。通常,这些细胞具有独特的形态、代谢活性、膜电位和对促进它们在身体组织或器官中的功能的信号的响应性。

[0269] 低免疫原性细胞

[0270] 在一些实施方案中,本文所述的细胞是低免疫原性细胞。如本文用于表征细胞,术

语“低免疫原性”通常意指这种细胞不太容易受到移植了此类细胞的受试者的先天或适应性免疫排斥,例如,该细胞不太容易受到移植了此类细胞的受试者的同种异体排斥。例如,在一些实施方案中,相对于不包含修饰的相同细胞类型的细胞,此种低免疫原性细胞可能约2.5%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、97.5%、99%、100%,或其间的任何量不太容易受到移植了此类细胞的受试者的先天或适应性免疫排斥。在一些实施方案中,使用基因组编辑技术来调节MHC I和MHC II基因的表达,从而促进低免疫原性细胞的生成。在一些实施方案中,低免疫原性细胞在MHC错配的同种异体接受者中逃避免疫排斥。在一些实施方案中,当向MHC错配的同种异体接受者施用(例如,移植或植入)时,由本文概述的低免疫原性干细胞产生的分化的细胞逃避免疫排斥。在一些实施方案中,低免疫原性细胞受到保护而免于T细胞介导的适应性免疫排斥和/或先天免疫细胞排斥。低免疫原性细胞、产生此类细胞的方法以及使用此类细胞的方法的详细描述参见2015年5月9日提交的WO2016183041;2018年1月14日提交的WO2018132783;2018年3月20日提交的WO2018176390;2019年7月17日提交的WO2020018615;2020年7月17日提交的WO2020018620;2020年7月31日提交的PCT/US2020/44635;2019年8月1日提交的US62/881,840;2019年8月23日提交的US62/891,180;2020年4月27日提交的US63/016,190;以及2020年7月15日提交的US63/052,360,它们的包括实施例、序列表和附图在内的公开内容以引用的方式整体并入本文中。

[0271] 细胞的低免疫原性可以通过评价细胞的免疫原性(诸如细胞引发适应性和先天免疫反应或避免引发此类适应性和先天免疫反应的能力)来确定。此种免疫反应可以使用本领域技术人员认可的测定来测量。在一些实施方案中,免疫反应测定测量低免疫原性细胞对T细胞增殖、T细胞活化、T细胞杀伤、供体特异性抗体生成、NK细胞增殖、NK细胞活化和巨噬细胞活性的影响。在一些情况下,低免疫原性细胞及其衍生物在向受试者施用后经历降低的T细胞和/或NK细胞杀伤。在一些情况下,该细胞及其衍生物显示出与未经修饰或野生型的细胞相比降低的巨噬细胞吞噬。在一些实施方案中,与对应的未经修饰的野生型细胞相比,低免疫原性细胞在接受者受试者中引发降低或减弱的免疫反应。在一些实施方案中,低免疫原性细胞是非免疫原性的或不能在接受者受试者中引发免疫反应。

[0272] 在一些实施方案中,主要组织相容性(MHC)I类和MHC II类蛋白的表达在该细胞中被破坏。MHC I类和II类蛋白在免疫系统的适应性分支中发挥作用。这两类蛋白质的共同任务是将肽呈递到细胞表面上,以供T细胞识别。免疫原性肽-MHC I类(pMHCI)复合物被呈递在有核细胞上,并被细胞毒性CD8+T细胞识别。另一方面,抗原呈递细胞(例如树突状细胞(DC)、巨噬细胞或B细胞)对肽-MHC II类(pMHCII)的呈递可活化CD4+T细胞,从而导致效应细胞的协调和调控。在所有情况下,它都是与给定的pMHC复合物相互作用,从而潜在地导致持续的细胞-细胞接触形成和T细胞活化的克隆型T细胞受体。

[0273] 在一些实施方案中,本文所述的细胞表达相对于野生型或对照细胞降低的水平的MHC I类蛋白。在一些实施方案中,该细胞表达相对于野生型或对照细胞降低的水平的MHC II类蛋白。在一些实施方案中,该细胞表达相对于野生型或对照细胞降低的水平的MHC I类和MHC II类蛋白两者。

[0274] 在一些实施方案中,该细胞不表达任何MHC I类蛋白。在一些实施方案中,该细胞不表达任何MHC II类蛋白。在一些实施方案中,该细胞不表达任何MHC I类蛋白,并且不表

达任何MHC II类蛋白。

[0275] 在一些实施方案中,本文讨论的MHC蛋白是HLA蛋白。

[0276] "HLA"或"人白细胞抗原"复合物是在人中编码MHC蛋白的基因复合物。构成HLA复合物的细胞表面蛋白负责调控对抗原的免疫反应。在人中,有两种MHC,即I类和II类,或"HLA-I"和"HLA-II"。HLA-I包括三种蛋白质,即HLA-A、HLA-B和HLA-C,这三种蛋白质呈递来自细胞内的肽,并且由HLA-I复合物呈递的抗原吸引杀伤T细胞(也称为CD8+T细胞或细胞毒性T细胞)。HLA-I蛋白与β-2微球蛋白(B2M)相关。HLA-II包括五种蛋白质,即HLA-DP、HLA-DM、HLA-DOB、HLA-DQ和HLA-DR,这五种蛋白质将来自细胞外的抗原呈递到T淋巴细胞。HLA-II蛋白质与II类反式活化因子(CIITA)相关。这会刺激CD4+细胞(也称为辅助T细胞)。应当理解,"MHC"或"HLA"的使用并不意味着限制,尽管术语"HLA"通常指示基因来自人。因此,当它涉及哺乳动物细胞时,这些术语在本文中可互换使用。

[0277] 在一些实施方案中,通过敲除或降低CIITA的表达来降低MHC II类蛋白的表达。在一些实施方案中,通过靶向和调节(例如,降低或消除)II类反式活化因子(CIITA)的表达来调节(例如降低或消除)MHC II类基因的表达。在一些实施方案中,使用CRISPR/Cas系统进行调节。CIITA是LR或核苷酸结合结构域(NBD)富亮氨酸重复序列(LRR)蛋白质家族的成员,并且通过与MHC增强体缔合来调控MHC II的转录。在一些实施方案中,被靶向用于调节的多核苷酸序列是CIITA的变体、CIITA的同源物,或CIITA的直系同源物。

[0278] 在一些实施方案中,CIITA的表达的降低或消除会降低或消除以下MHC II类分子中的一种或多种的表达:HLA-DP、HLA-DM、HLA-DOA、HLA-DOB、HLA-DQ和HLA-DR。

[0279] 在一些实施方案中,本文所述的细胞包含在编码CIITA蛋白的基因座处的基因修饰。换句话说,该细胞包含在CIITA基因座处的遗传修饰。在一些情况下,编码CIITA蛋白的核苷酸序列示于RefSeq.编号NM_000246.4和NCBI Genbank编号U18259中。在一些情况下,CIITA基因座描述在NCBI Gene ID编号4261中。在某些情况下,CIITA的氨基酸序列被描绘为NCBI GenBank编号AAA88861.1。CIITA蛋白和基因座的另外的描述可见于Uniprot编号P33076、HGNC参考编号7067和OMIM参考编号600005。

[0280] 在一些实施方案中,本文概述的低免疫原性细胞包含靶向CIITA基因的遗传修饰。在一些实施方案中,靶向CIITA基因的遗传修饰通过罕见切割核酸内切酶来生成,该罕见切割核酸内切酶包含Cas蛋白或编码Cas蛋白的多核苷酸,以及至少一个用于特异性地靶向CIITA基因的指导核糖核酸序列。在一些实施方案中,该至少一个用于特异性地靶向CIITA基因的指导核糖核酸序列选自由WO2016183041(其以引用的方式并入本文中)的表12的SEQ ID NO:5184-36352组成的组。在一些实施方案中,该细胞在接受者受试者中诱导先天和/或适应性免疫反应的能力降低。在一些实施方案中,将编码如本文所公开的多肽(例如,嵌合抗原受体、CD47或本文公开的另一种致耐受因子)的外源性核酸插入在CIITA基因处。

[0281] 测试CIITA基因是否已失活的测定是已知的并且在本文中有描述。在一些实施方案中,可以通过PCR来确认产生的CIITA基因的遗传修饰,并且可以通过FACS分析来确认HLA-II表达的减少。在另一个实施方案中,使用用针对CIITA蛋白的抗体探测的细胞裂解物的蛋白质印迹来检测CIITA蛋白表达。在另一个实施方案中,使用逆转录酶聚合酶链式反应(RT-PCR)确认失活遗传修饰的存在。在一些实施方案中,通过病毒转导(例如使用载体)将外源性多核苷酸插入到细胞的至少一个等位基因中。在一些实施方案中,载体是携带外源

性多核苷酸的假型化的自失活慢病毒载体。在一些实施方案中,载体是用水疱性口炎VSV-G包膜假型化并携带外源性多核苷酸的自失活慢病毒载体。在一些实施方案中,使用病毒转导将外源性多核苷酸插入到细胞的至少一个等位基因中。在一些实施方案中,使用基于慢病毒的病毒载体将外源性多核苷酸插入到细胞的至少一个等位基因中。

[0282] 在一些实施方案中,通过敲除或降低B2M的表达来降低MHC I类蛋白的表达。在一些实施方案中,通过靶向和调节(例如降低或消除)辅助链B2M的表达来调节(例如降低或消除)MHC-I基因的表达。在一些实施方案中,使用CRISPR/Cas系统进行调节。通过调节(例如,降低或缺失)B2M的表达,MHC-I分子的表面运输被阻断并且细胞呈现低免疫原性。在一些实施方案中,该细胞在接受者受试者中诱导先天和/或适应性免疫反应的能力降低。

[0283] 在一些实施方案中,被靶向用于调节的多核苷酸序列是B2M的变体、B2M的同源物或B2M的直系同源物。

[0284] 在一些实施方案中,B2M的表达的降低或消除会降低或消除以下MHC I分子中的一种或多种的表达:HLA-A、HLA-B和HLA-C。

[0285] 在一些实施方案中,本文所述的细胞包含在编码B2M蛋白的基因座处的基因修饰。换句话说,该细胞包含在B2M基因座处的遗传修饰。在一些情况下,编码B2M蛋白的核苷酸序列示于RefSeq.编号NM_004048.4和Genbank编号AB021288.1中。在某些情况下,B2M基因座描述于NCBI Gene ID编号567中。在某些情况下,B2M的氨基酸序列示于NCBI GenBank编号BAA35182.1中。B2M蛋白和基因座的另外的描述可见于Uniprot编号P61769、HGNC参考编号914和OMIM参考编号109700。

[0286] 在一些实施方案中,本文概述的低免疫原性细胞包含靶向B2M基因的遗传修饰。在一些实施方案中,靶向B2M基因的遗传修饰通过罕见切割核酸内切酶来生成,该罕见切割核酸内切酶包含Cas蛋白或编码Cas蛋白的多核苷酸,以及至少一个用于特异性地靶向B2M基因的指导核糖核酸序列。在一些实施方案中,该至少一个用于特异性地靶向B2M基因的指导核糖核酸序列选自由WO2016183041(其以引用的方式并入本文中)的表15的SEQ ID NO:81240-85644组成的组。在一些实施方案中,将编码如本文所公开的多肽(例如,嵌合抗原受体、CD47或本文公开的另一种致耐受因子)的外源性核酸插入在B2M基因处。在一些实施方案中,使用病毒转导(例如使用载体)将外源性多核苷酸插入到细胞的至少一个等位基因中。在一些实施方案中,载体是携带外源性多核苷酸的假型化的自失活慢病毒载体。在一些实施方案中,载体是用水疱性口炎VSV-G包膜假型化并携带外源性多核苷酸的自失活慢病毒载体。在一些实施方案中,使用病毒转导将外源性多核苷酸插入到细胞的至少一个等位基因中。在一些实施方案中,使用基于慢病毒的病毒载体将外源性多核苷酸插入到细胞的至少一个等位基因中。

[0287] 测试B2M基因是否已失活的测定是已知的并且在本文中有描述。在一些实施方案中,可通过PCR确认所产生的B2M基因的遗传修饰,并且可通过FACS分析确认HLA-I表达的减少。在另一个实施方案中,使用用针对B2M蛋白的抗体探测的细胞裂解物的蛋白质印迹来检测B2M蛋白表达。在另一个实施方案中,使用逆转录酶聚合酶链式反应(RT-PCR)确认失活遗传修饰的存在。

[0288] 在本文所述的T细胞、iPSC或ESC的一些实施方案中,T细胞受体α链(TRAC)和/或T细胞受体β链(TRBC)基因被敲除,或它们在该细胞中的表达被降低。

[0289] T细胞受体(TCR)是在T细胞的表面上发现的一种蛋白质复合物,该蛋白质复合物负责识别与MHC分子结合的呈肽形式的抗原片段。TCR是一种通常由高度可变的alpha(α)和beta(β)链(分别由TRAC和TRBC基因编码)组成、作为与不变的CD3链分子的复合物的一部分表达的二硫键连接的膜锚定异二聚体型蛋白质。表达这种受体的T细胞被称为α:β(或αβ)T细胞,但少数T细胞表达由可变的gamma(γ)和delta(δ)链形成的替代受体,被称为γδT细胞。每条链由以下两个细胞外结构域构成:可变区和恒定区,这两个免疫球蛋白超家族(IgSF)结构域均形成反向平行的β折叠。恒定区靠近细胞膜,后面跟着跨膜区和短的细胞质尾,而可变区与肽/MHC复合物结合。据报道,内源性TRAC和/或TRBC基因的敲除可以增加表达转基因T细胞受体的T细胞的表达和功能。在一些实施方案中,本文所述的细胞表达相对于野生型或对照细胞降低的水平的MHC I类蛋白和/或MHC II类蛋白。

[0290] 在一些实施方案中,该细胞包含相对于野生型细胞或相同细胞类型的对照细胞增加的野生型和/或经工程化的CD47蛋白的表达。在一些实施方案中,野生型细胞或对照细胞是起始材料。如本文所用,起始材料是指对其作出本文所述的修饰中的一种或多种修饰,以产生如本文所述的经工程化的CD47蛋白、编码如本文所述的经工程化的CD47蛋白的多核苷酸、如本文所述的载体、包含如本文所述的经工程化的CD47蛋白的细胞,或包含如本文所述的经工程化的CD47蛋白或细胞的组合物的原材料。

[0291] 如本文所用,“野生型细胞”或“wt细胞”意指自然界中发现的任何细胞。在一些实施方案中,野生型细胞包括自然界中发现的原代细胞和T细胞。如本文所用,“对照细胞”是其CD47基因未被改变但可对其进行其他修饰的细胞。在一些实施方案中,对照细胞是可含有导致MHC I蛋白和/或MHC II蛋白和/或T细胞受体的表达降低的核酸变化的经工程化的细胞。在一些实施方案中,对照细胞是B2M被敲除或包含降低的B2M表达的经工程化的细胞。在一些实施方案中,对照细胞是CIITA被敲除或包含降低的CIITA表达的经工程化的细胞在一些实施方案中,对照细胞是TRAC和/或TRBC被敲除或包含降低的TRAC和/或TRBC表达的经工程化的细胞。

[0292] 在一些实施方案中,对照细胞是含有导致多能性的核酸变化的iPSC、ESC或后代。在一些实施方案中,对照细胞是B2M被敲除或包含降低的B2M表达的iPSC、ESC或后代。在一些实施方案中,对照细胞是CIITA被敲除或包含降低的CIITA表达的iPSC、ESC或后代。在一些实施方案中,对照细胞是TRAC和/或TRBC被敲除或包含降低的TRAC和/或TRBC表达的iPSC、ESC或后代。

[0293] 在一些实施方案中,对照细胞是含有导致MHC I蛋白和/或MHC II蛋白和/或T细胞受体的表达降低的核酸变化的原代T细胞或后代。在一些实施方案中,对照细胞是B2M被敲除或包含降低的B2M表达的原代T细胞或后代。在一些实施方案中,对照细胞是CIITA被敲除或包含降低的CIITA表达的原代T细胞或后代。在一些实施方案中,对照细胞是TRAC和/或TRBC被敲除或包含降低的TRAC和/或TRBC表达的原代T细胞或后代。

[0294] 在一些实施方案中,起始材料是从供体收集的原代细胞。在一些实施方案中,起始材料是例如经由leukopak从供体收集的原代血细胞。例如,在一些实施方案中,起始材料是从供体获得的未经修饰的T细胞。在一些实施方案中,起始材料是iPSC细胞系。在一些实施方案中,起始材料以其他方式被修饰或工程化为具有改变的除人CD47基因以外的一种或多种基因的表达。

[0295] 在一些实施方案中,所描述的经工程化和低免疫原性的细胞来源于iPSC或其后代。如本文所用,术语“来源于iPSC或其后代”涵盖生成的初始iPSC及其任何后续后代。如本文所用,术语“后代”涵盖例如第一代后代,即通过例如传统繁殖方法直接源自、获得自、可获得自或可源自初始iPSC的后代。术语“后代”还涵盖进一步的世代,例如第二代、第三代、第四代、第五代、第六代、第七代或更多代,即通过例如传统繁殖方法源自、获得自、可获得自或可源自先前世代的细胞世代。术语“后代”还涵盖由于初始iPSC或其后代的修饰或改变而产生的经修饰的细胞。

[0296] 在一些实施方案中,敲低(例如,降低、消除或抑制)基因表达可以通过RNA沉默或RNA干扰(RNAi)实现。有用的RNAi方法包括利用合成RNAi分子、短干扰RNA(siRNA)、PIWI相互作用NRA(piRNA)、短发夹RNA(shRNA)、微小RNA(miRNA)的方法,以及本领域技术人员认可的其他瞬时敲低方法。包括序列特异性shRNA、siRNA、miRNA等的用于RNAi的试剂是可商购获得的。

[0297] 如本文所用的术语“经工程化的细胞”是指已经通过人为干预以至少一些方式改变的细胞,该人为干预包括例如通过遗传改变或修饰,使得经工程化的细胞不同于野生型细胞。

[0298] 术语“减少(decrease)”、“降低(reduced)”、“降低(reduction)”和“减少(decreased)”在本文中均通常用于意指下降了统计上显著的量。然而,为避免疑问,“减少(decrease)”、“降低(reduced)”、“降低(reduction)”、“减少(decreased)”意指与参考水平相比下降了至少10%,例如与参考水平相比下降了至少约20%,或至少约30%,或至少约40%,或至少约50%,或至少约60%,或至少约70%,或至少约80%,或至少约90%或至多且包括100%下降(即,与参考样本相比不存在的水平)或在10-100%之间的任何下降。在一些实施方案中,细胞被工程化为具有相对于未改变或未经修饰的野生型细胞降低的一个或多个靶标的表达。

[0299] 在一些实施方案中,提供的经修饰的细胞被修饰为使得它们在被施用于患者(例如,接受者受试者)时能够逃避免疫识别和反应。该细胞可以逃避免疫细胞在体外和体内的杀伤。在一些实施方案中,该细胞逃避巨噬细胞和NK细胞的杀伤。在一些实施方案中,该细胞被免疫细胞或受试者的免疫系统忽略。换句话说,按照本文所述的方法施用的细胞不能被免疫系统的免疫细胞检测到。在一些实施方案中,该细胞被掩蔽并因此避免免疫排斥。

[0300] 确定本文提供的经修饰的细胞是否逃避免疫识别的方法包括但不限于IFN-γ Elispot测定、小胶质细胞杀伤测定、细胞植入动物模型、细胞因子释放测定、ELISA、使用生物发光成像的杀伤测定或铬释放测定或Xcelligence分析、混合淋巴细胞反应、免疫荧光分析等。

[0301] 在一些实施方案中,在补体依赖性细胞毒性(CDC)测定中评价细胞的免疫原性。可以通过在含有补体的血清存在下将细胞与针对细胞表面上表达的HLA非依赖性抗原的IgG或IgM抗体一起孵育并分析细胞杀伤来体外测定CDC。在一些实施方案中,可以通过将细胞与ABO血型不相容血清一起孵育来测定CDC,其中该细胞包含A抗原或B抗原,并且该血清包含针对该细胞的A抗原和/或B抗原的抗体。

[0302] 在一些实施方案中,一旦如本文所述修饰或生成经修饰的细胞,就可以测定它们的低免疫原性。可以使用多种测定中的任一种来评估细胞是否具有低免疫原性或是否可以

逃避免疫系统。示例性测定包括如WO2016183041和WO2018132783中描述的任何测定。

[0303] 在一些实施方案中,本文所述的经修饰的细胞在不刺激宿主免疫反应的情况下在宿主中存活一周或更长时间(例如,一周、两周、一个月、两个月、三个月、六个月、一年、两年、三年、四年、五年或更长时间,例如,细胞和/或其后代的一生)。只要该细胞在宿主中存活,该细胞就会维持转基因的表达且/或该细胞中靶基因的表达就会被缺失或降低。在一些方面,如果转基因不再被表达且/或如果靶基因被表达,则经修饰的细胞可以被宿主的免疫系统去除。在一些实施方案中,在经修饰的细胞施用于接受者之后,经修饰的细胞的持续存在(persistence)或存活可以通过进一步表达编码允许该细胞在体内被检测到的蛋白质(例如,荧光蛋白(诸如GFP)、经截短的受体或其他替代标志物或其他可检测标志物)的转基因来监测。

[0304] 低免疫原性细胞以允许它们植入到预期组织部位并重建功能缺陷区域或使功能缺陷区域再生的方式施用。在一些实施方案中,测定低免疫原性细胞的植入(例如,成功植入)。在一些实施方案中,在预选的时间量后评价低免疫原性细胞的植入。在一些实施方案中,监测植入的细胞的细胞存活。例如,可以经由生物发光成像(BLI)监测细胞存活,其中用荧光素酶表达构建体转导细胞以监测细胞存活。在一些实施方案中,通过本领域已知的免疫染色和成像方法使植入的细胞可视化。在一些实施方案中,植入的细胞表达已知的生物标志物,可以检测该生物标志物以确定成功植入。例如,流式细胞术可以用于确定特定生物标志物的表面表达。在一些实施方案中,低免疫原性细胞按预期被植入到期望组织部位(例如,低免疫原性细胞的成功植入)。在一些实施方案中,将低免疫原性细胞按需要植入到预期的组织部位,诸如植入在细胞缺陷部位处。在一些实施方案中,将低免疫原性细胞以与不包含修饰的相同类型的细胞相同的方式植入到预期组织部位。

[0305] 在一些实施方案中,施用经修饰的细胞群体(例如,包含包括降低的CD142表达的修饰的经修饰的β胰岛细胞)或组合(例如,施用经修饰的细胞群体与抗凝血剂的组合)通过允许细胞避免或降低因移植期间细胞暴露于血液而发生的IBMIR来改善存活和植入。在一些实施方案中,IBMIR的降低降低了移植期间发生的细胞损失(例如,移植的胰岛的损失)的量。

[0306] 在一些实施方案中,测定低免疫原性细胞的功能。在一些实施方案中,在将低免疫原性细胞植入到预期的组织部位之前,测定它们的功能。在一些实施方案中,在将低免疫原性细胞植入到预期的组织部位之后,测定它们的功能。在一些实施方案中,在预选量之后评价低免疫原性细胞的功能。在一些实施方案中,植入的细胞的功能通过该细胞产生可检测表型的能力来评价。例如,植入的β胰岛细胞功能可基于糖尿病导致的葡萄糖失去控制的恢复来评价。在一些实施方案中,低免疫原性细胞的功能如预期一样(例如,低免疫原性细胞成功发挥作用,同时避免抗体介导的排斥)。在一些实施方案中,低免疫原性细胞的功能如需要的一样,诸如在细胞缺陷位点具有足够的功能,同时避免抗体介导的排斥。在一些实施方案中,经修饰的细胞以与相同类型的非经修饰的细胞相同的方式发挥作用。

[0307] 即刻血液介导的炎性反应

[0308] 在一些实施方案中,本文提供的经修饰的细胞逃避即刻血液介导的炎性反应。临床胰岛移植结局不佳的一个主要原因是破坏性即刻血液介导的炎性反应(IBMIR)的发生,该破坏性即刻血液介导的炎性反应在胰岛遇到门静脉中的血液时导致移植的组织的损失

(Bennet等人,(1995)Diabetes 48:1907-1914;Moberg等人,(2002)Lancet360:2039-2045)。此反应由胰岛的内分泌细胞的组织因子(TF)表达与一系列其他促炎性事件(诸如MCP-1(Piemonti等人,(2002)Diabetes51:55-65)、IL-8和MIF(Waeber等人,(1997)Proc Natl Acad Sci USA 94:4782-4787;Johansson等人,(2006)Am J Transplantation 6(2):305)的表达)的组合触发。

[0309] 即刻血液介导的炎性反应(IBMIR)是一种可以在表达CD142的细胞与血液接触时发生的非特异性炎性和血栓性反应。IBMIR由暴露于门静脉中的人血液迅速启动。其特征是补体、血小板和凝血途径的活化,这进而导致中性粒细胞的募集。IBMIR导致移植的胰岛的显著损失。在一些实施方案中,本文提供了组合物(例如,包含降低的CD142的表达与本文所述的一种或多种其他修饰的组合的经修饰的细胞)、组合(例如,包括本文所述的经修饰的细胞群体中的任何经修饰的细胞群体和降低凝血的抗凝血剂的组合),以及降低与细胞移植或细胞暴露于血液相关的IBMIR的方法(例如,治疗患者的方法,该方法包括施用本文所述的经修饰的细胞群体中的任何经修饰的细胞群体和降低凝血的抗凝血剂)。

[0310] 在一些实施方案中,可以体外,例如在IBMIR的体外管循环模型(in vitro tubing loop model)中测定IBMIR,该模型先前在美国专利号7,045,502中已有描述,该专利以引用的方式整体并入本文中。

[0311] 在一些实施方案中,可以通过在围移植期期间抽取血样并评价以下的血浆水平来体内(例如,在哺乳动物或在人患者中)测定IBMIR:凝血酶-抗凝血酶III复合物(TAT)、C肽、XIa因子-抗凝血酶(FXIa-AT)、XIIa因子-抗凝血酶(FXIIa-AT)、凝血酶-抗凝血酶(TAT)纤溶酶-α2抗纤溶酶(PAP)和/或补体C3a。在一些实施方案中,IBMIR与在输注移植的细胞期间和/或在移植后的时间段(例如,移植后长达3、5、10或多于10小时)内TAT、C肽、FXIa-AT、FXIIa-AT、PAP和/或补体C3a的水平的增加相关。在一些实施方案中,可以通过监测游离循环血小板的计数来测定IBMIR,其中移植期间或移植后血小板计数的减少与IBMIR相关(例如,与IBMIR导致的血小板消耗相关)。

[0312] 补体依赖性细胞毒性

[0313] 在一些实施方案中,本文提供的经修饰的细胞(例如,β胰岛)逃避补体依赖性细胞毒性(CDC)。在一些实施方案中,CDC继发于IBMIR的血栓性反应。在一些实施方案中,CDC独立于IBMIR发生。

[0314] 在一些实施方案中,可以根据本领域普通技术人员理解的标准方案分析细胞对CDC的敏感性。在一些实施方案中,可以通过将包含补体系统组分的血清(例如人血清)与抗体(例如IgG或IgM抗体)结合的靶细胞混合,然后确定细胞死亡来体外分析CDC。在一些实施方案中,可以通过在ABO不相容或Rh因子不相容血清存在下孵育细胞来体外分析细胞对CDC的敏感性,该血清包含补体系统的组分和针对细胞的ABO A型、ABO B型和/或Rh因子抗原的抗体。

[0315] 常见的CDC测定经由给靶细胞预装载放射性化合物来确定细胞死亡。当细胞死亡时,放射性化合物就会从其中释放出来。因此,通过放射性水平确定抗体介导细胞死亡的功效。与放射性CDC测定不同,非放射性CDC测定通常通过荧光或发光测定来确定大量细胞组分(诸如GAPDH)的释放。在一些实施方案中,可以使用无标记平台(诸如xCELLigence™ (Agilent))来分析CDC的细胞杀伤。

[0316] VI.组合物

[0317] 在另一个方面,本公开提供了组合物,该组合物包含本文公开的经工程化的CD47蛋白。

[0318] 在另一个方面,本公开提供了组合物,该组合物包含含有编码本文公开的经工程化的CD47蛋白的多核苷酸的细胞,和/或包含该多核苷酸的载体。

[0319] 如本文所用,术语“组合物”包括但不限于药物组合物。“药物组合物”是指用于单独或与一种或多种其他疗法方式组合施用于细胞或动物的配制成药学上可接受或生理学上可接受的溶液的活性药剂。还应当理解,如果需要,本发明的组合物可以与其他剂(诸如例如细胞因子、生长因子、激素、小分子、化学治疗剂、前体药物、药物、抗体或其他各种药物活性剂)组合施用。对于还可以包含在组合物中的其他组分几乎没有限制,只要这些另外的剂不会对组合物递送预期疗法的能力产生不利影响即可。词语“药学上可接受的”在本文中用于指在合理的医学判断范围内适合用于与人和动物的组织接触,而没有过度的毒性、刺激性、过敏响应或其他问题或并发症且具有合理的效益/风险比的那些化合物、材料、组合物和/或剂型。

[0320] 该组合物可以还包含药学上可接受的载剂、稀释剂、或赋形剂。如本文所用,“药学上可接受的载剂、稀释剂或赋形剂”包括但不限于已被美国食品和药物管理局(United States Food and Drug Administration)批准可用于人或家畜的任何佐剂、载剂、赋形剂、助流剂、甜味剂、稀释剂、防腐剂、染料/着色剂、增味剂、表面活性剂、润湿剂、分散剂、悬浮剂、稳定剂、等渗剂、溶剂、表面活性剂或乳化剂。示例性药学上可接受的载剂包括但不限于糖类,诸如乳糖、葡萄糖和蔗糖;淀粉类,诸如玉米淀粉和马铃薯淀粉;纤维素及其衍生物,诸如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和醋酸纤维素;黄蓍胶;麦芽;明胶;滑石粉;可可脂;蜡;动物和植物脂肪;石蜡;硅酮;膨润土;硅酸;氧化锌;油类,诸如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油;二醇类,诸如丙二醇;多元醇类,诸如甘油、山梨醇、甘露醇和聚乙二醇;酯类,诸如油酸乙酯和月桂酸乙酯;琼脂;缓冲剂,诸如氢氧化镁和氢氧化铝;藻酸;无热原水;等渗盐水;林格氏溶液;乙醇;磷酸盐缓冲溶液;以及药物制剂中使用的任何其他相容的物质。

[0321] 液体药物组合物,无论是溶液、悬浮液还是其他类似形式,可以包含以下中的一种或多种:无菌稀释剂,诸如注射用水、盐水溶液,优选生理盐水;林格氏溶液;等渗氯化钠;不挥发性油,诸如可用作溶剂或悬浮介质的合成单甘油酯或双甘油酯;聚乙二醇;甘油;丙二醇或其他溶剂;抗菌剂,诸如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂,诸如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂,诸如乙二胺四乙酸;缓冲剂,诸如醋酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐;以及用于调节张力的剂,诸如氯化钠或右旋糖。肠胃外制备物可以封装在由玻璃或塑料制成的安瓿、一次性注射器或多剂量小瓶中。可注射的药物组合物优选是无菌的。

[0322] 该组合物可以被适当地开发用于静脉内、瘤内、经口、直肠、阴道、肠胃外、外用、肺部、鼻内、颊部、眼部或其他施用途径。

[0323] VII.基因编辑方法

[0324] 在一些实施方案中,用于遗传修饰细胞以敲除、敲低或以其他方式修饰一种或多种基因的方法包括使用定点核酸酶,包括例如锌指核酸酶(ZFN)、转录活化因子样效应物核酸酶(TALEN)、大范围核酸酶、转座酶和成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)/Cas系统,

以及切口酶系统、碱基编辑系统、先导编辑系统和本领域已知的任何其他基因编辑系统。

[0325] ZFN是包含一系列位点特异性DNA结合结构域的融合蛋白,该结构域改造自连接至细菌FokI限制酶的核酸内切酶结构域的含锌指转录因子。ZFN可具有一个或多个(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个)DNA结合结构域或锌指结构域。参见,例如,Carroll等人,Genetics Society of America(2011)188:773-782;Kim等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA(1996)93:1156-1160。单个DNA结合结构域通常被称为"指"或"锌指"。每个锌指结构域均是被一个或多个锌离子稳定的小蛋白质结构基序,并且通常识别3至4bp的DNA序列。因此,串联结构域可以潜在地与细胞基因组内独特的延伸的核苷酸序列结合。每个指结合两个至四个DNA碱基对,通常是三个或四个DNA碱基对。DNA结合结构域与被称为靶位点或靶区段的核酸序列结合。每个指通常包含一个约30个氨基酸的锌螯合DNA结合子结构域。研究表明,这类单个锌指由含有与锌配位的两个不变组氨酸残基的α螺旋以及单个β转角的两个半胱氨酸残基组成(参见,例如,Berg和Shi,Science 271:1081-1085(1996))。

[0326] 可以组合特异性已知的各种锌指以产生识别约6、9、12、15或18bp序列的多指多肽。各种选择和模块化组装技术可用于生成识别特定序列的锌指(及其组合),此类技术包括噬菌体展示、酵母单杂交系统、细菌单杂交和双杂交系统以及哺乳动物细胞。可以将锌指工程化为结合预定的核酸序列。用于将锌指工程化为结合至预定核酸序列的标准是本领域已知的。参见,例如,Sera等人,Biochemistry(2002)41:7074-7081;Liu等人,Bioinformatics(2008)24:1850-1857。

[0327] 含有FokI核酸酶结构域或其他二聚核酸酶结构域的ZFN作为二聚体发挥作用。因此,需要一对ZFN来靶向非回文DNA位点。两个单独的ZFN必须以它们的适当间隔开的核酸酶结合DNA的相对链。参见Bitinaite等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA(1998)95:10570-10575。为了切割基因组中的特定位点,设计了一对ZFN以识别侧接该位点的两个序列,一个在正向链上,而另一个在反向链上。在ZFN在该位点的任一侧结合后,核酸酶结构域二聚化并且切割所述位点处的DNA,从而生成具有5'突出端的DSB。然后可以借助含有侧接有同源臂的期望突变的修复模板,利用HDR来引入特定突变。修复模板通常是引入到细胞中的外源性双链DNA载体。参见Miller等人,Nat.Biotechnol.(2011)29:143-148;Hockemeyer等人,Nat.Biotechnol.(2011)29:731-734。

[0328] TALEN是可以用于编辑靶基因的人工核酸酶的另一个实例。"TALE核酸酶"(TALEN)是由通常来源于转录活化因子样效应物(TALE)的核酸结合结构域和一个用于切割核酸靶序列的核酸酶催化结构域组成的融合蛋白。催化结构域优选地是核酸酶结构域,并且更优选地是具有核酸内切酶活性的结构域,例如I-TevI、ColE7、NucA和Fok-I。在多个实施方案中,可以使TALE结构域与大范围核酸酶融合,例如I-CreI和I-Onul或其功能变体。在更优选的实施方案中,所述核酸酶是单体TALE核酸酶。单体TALE核酸酶是不需要二聚化来进行特异性识别和切割的TALE核酸酶,诸如WO2012138927中描述的经工程化的TAL重复序列与I-TevI的催化结构域的融合体。

[0329] 转录活化因子样效应物(TALE)是来自细菌种黄单胞菌的蛋白质并且包含多个重复的序列。每个重复序列的长度为33至35个氨基酸,其中位置12和13中有两个相邻的氨基酸(称为重复可变的二残基或RVD),这两个相邻的氨基酸对核酸靶向的序列的每个核苷酸碱基都有特异性。具有相似模块化逐碱基核酸结合性质(MBBBD)的结合结构域也可以来源

于最近在不同细菌种中发现的新模块化蛋白质。该新模块化蛋白质具有展现出比TAL重复序列更多的序列可变性的优势。优选地,与不同核苷酸的识别相关的RVD是用于识别C的HD;用于识别T的NG;用于识别A的NI;用于识别G或A的NN;用于识别A、C、G或T的NS;用于识别T的HG;用于识别T的IG;用于识别G的NK;用于识别C的HA;用于识别C的ND;用于识别C的HI;用于识别G的HN;用于识别G的NA;用于识别G或A的SN;和用于识别T的YG;用于识别A的TL;用于识别A或G的VT;以及用于识别A的SW。在另一个实施方案中,可以使关键氨基酸12和13向其他氨基酸残基突变,以便调节它们对核苷酸A、T、C和G的特异性,并且特别是增强这种特异性。TALEN试剂盒在商业上出售。

[0330] 通过使一个或多个TALE DNA结合结构域(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个)与核酸酶结构域(例如FokI核酸内切酶结构域)融合来人工产生TALEN。参见Zhang,Nature Biotech.(2011)29:149-153。为了在TALEN中使用FokI,已经对FokI进行了若干种突变;例如,这些突变改善了切割特异性或活性。参见Cermak等人,Nucl.Acids Res.(2011)39:e82;Miller等人,Nature Biotech.(2011)29:143-148;Hockemeyer等人,Nature Biotech.(2011)29:731-734;Wood等人,Science(2011)333:307;Doyon等人,Nature Methods(2010)8:74-79;Szczepek等人,Nature Biotech(2007)25:786-793;Guo等人,J.Mol.Biol.(2010)200:96。FokI结构域作为二聚体发挥作用,对于靶基因组中的具有正确的取向和间距的位点需要具有独特的DNA结合结构域的两个构建体。TALE DNA结合结构域与FokI核酸酶结构域之间的氨基酸残基数量以及两个单独的TALEN结合位点之间的碱基数量似乎都是实现高水平活性的重要参数。Miller等人,Nature Biotech.(2011)29:143-148。

[0331] 通过将经工程化的TALE重复序列与核酸酶结构域相组合,可以产生对任何期望的DNA序列具有特异性的位点特异性核酸酶。与ZFN类似,TALEN可以被引入到细胞中以在基因组中的期望靶位点处生成DSB,并且因此可以被用于以类似的HDR介导的途径敲除基因或敲入突变。参见Boch,Nature Biotech.(2011)29:135-136;Boch等人,Science(2009)326:1509-1512;Moscou等人,Science(2009)326:3501。

[0332] 大范围核酸酶是核酸内切酶家族中的序列特异性酶,其特征在于它们识别并切割大DNA序列(14至40个碱基对)的能力。(Chevalier,B.S.和B.L.Stoddard,Nucleic Acids Res.,2001,29,3757-3774)。它们可以切割活细胞中的独特位点,从而将切割位点附近的基因靶向增强1000倍或更多(Puchta等人,Nucleic Acids Res.,1993,21,5034-5040;Rouet等人,Mol.Cell.Biol.,1994,14,8096-8106;Choulika等人,Mol.Cell.Biol.,1995,15,1968-1973;Puchta等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,1996,93,5055-5060;Sargent等人,Mol.Cell.Biol.,1997,17,267-77;Donoho等人,Mol.Cell.Biol,1998,18,4070-4078;Elliott等人,Mol.Cell.Biol.,1998,18,93-101;Cohen-Tannoudji等人,Mol.Cell.Biol.,1998,18,1444-1448)。

[0333] 基于大范围核酸酶的影响核酸酶活性和/或DNA识别的结构基序,将大范围核酸酶分为多个家族。最广泛和最有名的大范围核酸酶是LAGLIDADG家族中的蛋白质,其名称来源于保守的氨基酸序列。参见Chevalier等人,Nucleic Acids Res.(2001)29(18):3757-3774。另一方面,GIY-YIG家族成员具有GIY-YIG模块,其长度为70-100个残基,并且包括具有四个不变残基的四个或五个保守序列基序,其中两个是活性所需的。参见Van Roey等

人.,Nature Struct.Biol.(2002)9:806-811。His-Cys家族大范围核酸酶的特征在于在涵盖数百个氨基酸残基的区域中的一系列高度保守的组氨酸和半胱氨酸。参见Chevalier等人,Nucleic Acids Res.(2001)29(18):3757-3774。NHN家族的成员由含有被天冬酰胺残基包围的两对保守组氨酸的基序定义。参见Chevalier等人,Nucleic Acids Res.(2001)29(18):3757-3774。

[0334] 由于高特异性要求,鉴定特定靶DNA序列的天然大范围核酸酶的机会较低,因此已使用各种方法(包括诱变和高通量筛选方法)来产生识别独特序列的大范围核酸酶变体。用于对具有改变的DNA结合特异性的大范围核酸酶进行工程化(例如,以结合至预定核酸序列)的策略是本领域已知的。参见,例如,Chevalier等人,Mol.Cell.(2002)10:895-905;Epinat等人,Nucleic Acids Res(2003)31:2952-2962;Silva等人,J Mol.Biol.(2006)361:744-754;Seligman等人,Nucleic Acids Res(2002)30:3870-3879;Sussman等人,J Mol Biol(2004)342:31-41;Doyon等人,J Am Chem Soc(2006)128:2477-2484;Chen等人,Protein Eng Des Sel(2009)22:249-256;Arnould等人,J Mol Biol.(2006)355:443-458;Smith等人,Nucleic Acids Res.(2006)363(2):283-294。

[0335] 与ZFN和TALEN一样,大范围核酸酶可以在基因组DNA中产生DSB,如果修复不当(例如,经由NHEJ),它可以产生移码突变,从而导致靶基因在细胞中的表达降低。可替代地,可以将外来DNA与大范围核酸酶一起引入到细胞中。根据外来DNA的序列和染色体序列,此过程可用于修饰靶基因。参见Silva等人,Current Gene Therapy(2011)11:11-27。

[0336] 转座酶是结合至转座子的末端并且通过剪切和粘贴机制或复制性转座机制催化该转座子移动到基因组的另一部分的酶。通过将转座酶连接至其他系统(诸如CRISPER/Cas系统),可以开发新的基因编辑工具以实现基因组DNA的位点特异性插入或操作。有两种已知的使用转座子的DNA整合方法,其使用无催化活性的Cas效应蛋白和Tn7样转座子。转座酶依赖性DNA整合不在基因组中引发DSB,这可以保证更安全和更具特异性的DNA整合。

[0337] CRISPR系统作为提供一种形式的获得性免疫的参与防御入侵噬菌体和质粒的系统最初在原核生物体(例如,细菌和古细菌)中被发现。现在它已被改造并用作研究和临床应用中流行的基因编辑工具。

[0338] CRISPR/Cas系统通常包含至少两种组分:一种或多种指导RNA(gRNA)和Cas蛋白。Cas蛋白是一种将DSB引入到靶位点中的核酸酶。CRISPR-Cas系统有两大类:1类系统使用多种Cas蛋白的复合物来降解核酸;2类系统使用单一大Cas蛋白来达到相同目的。1类分为I、III和IV型;2类分为II、V和VI型。适用于基因编辑应用的不同Cas蛋白包括但不限于Cas3、Cas4、Cas5、Cas8a、Cas8b、Cas8c、Cas9、Cas10、Cas12、Cas12a(Cpf1)、Cas12b(C2c1)、Cas12c(C2c3)、Cas12d(CasY)、Cas12e(CasX)、Cas12f(C2c10)、Cas12g、Cas12h、Cas12i、Cas12k(C2c5)、Cas13、Cas13a(C2c2)、Cas13b、Cas13c、Cas13d、C2c4、C2c8、C2c9、Cmr5、Cse1、Cse2、Csf1、Csm2、Csn2、Csx10、Csx11、Csy1、Csy2、Csy3和Mad7。最广泛使用的Cas9在本文中被描述为例示性的。这些Cas蛋白可来源于不同的来源物种。例如,Cas9可以来源于化脓性链球菌(S.pyogenes)或金黄色葡萄球菌(S.aureus)。

[0339] 在原始微生物基因组中,II型CRISPR系统将来自入侵DNA的序列并入到宿主基因组内编码为阵列的CRISPR重复序列之间。来自CRISPR重复序列阵列的转录物被加工成CRISPR RNA(crRNA),每个CRISPR RNA均携带有从入侵DNA转录的可变序列(称为“原型间隔

区”序列),以及CRISPR重复序列的一部分。每个crRNA与第二反式活化CRISPR RNA(tracrRNA)杂交,并且这两个RNA与Cas9核酸酶形成复合物。crRNA的原型间隔区编码部分引导Cas9复合物切割互补的靶DNA序列,前提条件是该序列与被称为“原型间隔区相邻基序”(PAM)的短序列相邻。

[0340] 自发现以来,CRISPR系统已被改造用于在从细菌到真核细胞(包括人细胞)的广泛细胞和生物体中诱导序列特异性DSB和靶向基因组编辑。在它在基因编辑应用中的使用中,人工设计的合成gRNA已经替换了原始的crRNA:tracrRNA复合物。例如,gRNA可以是由crRNA、四环和tracrRNA构成的单一指导RNA(sgRNA)。crRNA通常包含被用户设计为识别所关注的靶DNA的互补区域(也称为间隔区,长度通常为约20个核苷酸)。tracrRNA序列包含用于Cas核酸酶结合的支架区域。crRNA序列和tracrRNA序列通过四环连接,并且各自具有用于彼此杂交的短重复序列,因此生成嵌合sgRNA。可以通过简单地改变gRNA中存在的间隔区或互补区域序列来改变Cas核酸酶的基因组靶标。互补区域将通过标准的RNA-DNA互补碱基配对规则将Cas核酸酶引导至靶DNA位点。

[0341] 为了使Cas核酸酶发挥作用,紧邻基因组DNA中的靶序列的下游必须存在PAM。Cas蛋白对PAM的识别被认为会使相邻基因组序列不稳定,从而允许gRNA对所述序列进行询问,并且在存在匹配序列时导致gRNA-DNA配对。PAM的特定序列根据Cas基因的种类而变化。例如,最常用的来源于化脓性链球菌的Cas9核酸酶识别5’-NGG-3’的PAM序列,或者以较低的效率识别5’-NAG-3’的PAM序列,其中“N”可以是任何核苷酸。具有替代的PAM的其他Cas核酸酶变体也已经被表征并成功用于基因组编辑,该Cas核酸酶变体总结在下表4中。

[0342] 表4.示例性Cas核酸酶变体及其PAM序列

[0343]

CRISPR核酸酶	来源生物体	PAM序列(5’→3’)
SpCas9	化脓性链球菌	NGG或NAG
SaCas9	金黄色葡萄球菌	NGRRT或NGRRN
NmeCas9	脑膜炎奈瑟氏菌(Neisseria meningitidis)	NNNNGATT
CjCas9	空肠弯曲杆菌(Campylobacter jejuni)	NNNNRYAC
StCas9	嗜热链球菌(Streptococcus thermophilus)	NNAGAAW
TdCas9	齿垢密螺旋体(Treponema denticola)	NAAAAC
LbCas12a(Cpf1)	毛螺菌科细菌(Lachnospiraceae bacterium)	TTTV
AsCas12a(Cpf1)	氨基酸球菌属某种(Acidaminococcus sp.)	TTTV
AacCas12b	嗜热脂环酸芽胞杆菌(Alicyclobacillus acidiphilus)	TTN
BhCas12b v4	外村尚芽孢杆菌(Bacillus hisashii)	ATTN、TTTN或GTTN

[0344] R=A或G;Y=C或T;W=A或T;V=A或C或G;N=任何碱基

[0345] 在一些实施方案中,Cas核酸酶可包含一个或多个突变以改变它们的活性、特异性、识别和/或其他特征。例如,Cas核酸酶可具有改变其保真度以减轻脱靶效应的一个或多个突变(例如,SpCas9的eSpCas9、SpCas9-HF1、HypaSpCas9、HeFSpCas9和evoSpCas9高保真度变体)。再例如,Cas核酸酶可具有改变其PAM特异性的一个或多个突变。

[0346] 可以独立地使Cas(特别是Cas9)核酸酶的核酸酶结构域突变以生成被称为DNA“切口酶”的酶。切口酶能够以与常规CRISPR/Cas核酸酶系统(包括例如CRISPR/Cas9)相同的特异性引入单链切割。切口酶可被用于生成可用于基因编辑系统的双链断裂(Mali等人,Nat Biotech,31(9):833-838(2013);Mali等人,Nature Methods,10:957-963(2013);Mali等

人,Science,339(6121):823-826(2013))。在一些情况下,当使用两种Cas切口酶时,在每个被切割端上会产生长突出端而不是平端,这允许对精确基因整合和插入进行另外的控制(Mali等人,Nat Biotech,31(9):833-838(2013);Mali等人,Nature Methods,10:957-963(2013);Mali等人,Science,339(6121):823-826(2013))。由于两种切口Cas酶必须有效地切割其靶DNA,因此与基于双链切割Cas的系统相比,配对的切口酶可以具有更低的脱靶效应(Ran等人,Cell,155(2):479-480(2013);Mali等人,Nat Biotech,31(9):833-838(2013);Mali等人Nature Methods,10:957-963(2013);Mali等人,Science,339(6121):823-826(2013))。

[0347] 此类Cas蛋白的允许CRISPR/Cas系统改变细胞中的靶多核苷酸序列的分子机制包括RNA结合蛋白、核酸内切酶和核酸外切酶、解旋酶和聚合酶。在一些实施方案中,CRISPR/Cas系统包括Cas蛋白和能够将Cas蛋白引导到靶多核苷酸序列的靶基序并与其杂交的至少一种至两种核糖核酸。如本文所用,“蛋白质”和“多肽”可以被互换地用来指通过肽键连接的一系列氨基酸残基(即,氨基酸的聚合物),并且包括经修饰的氨基酸(例如,磷酸化、糖化、糖基化等)和氨基酸类似物。示例性多肽或蛋白质包括基因产物,天然存在的蛋白质、上述项的同源物、旁系同源物、片段以及其他等效物、变体和类似物。

[0348] 在一些实施方案中,Cas蛋白包含一个或多个氨基酸取代或修饰。在一些实施方案中,该一个或多个氨基酸取代包括保守氨基酸取代。在一些情况下,取代和/或修饰可以防止或减少蛋白水解降解和/或延长多肽在细胞中的半衰期。在一些实施方案中,Cas蛋白可以包含肽键替换(例如,脲、硫脲、氨基甲酸酯、磺酰脲等)。在一些实施方案中,Cas蛋白可以包含天然存在的氨基酸。在一些实施方案中,Cas蛋白可以包含替代氨基酸(例如,D-氨基酸、β-氨基酸、同型半胱氨酸、磷酸丝氨酸等)。在一些实施方案中,Cas蛋白可以包含纳入一个部分(moiety)的修饰(例如,聚乙二醇化、糖基化、脂化、乙酰化、封端等)。

[0349] 在一些实施方案中,Cas蛋白包含核心Cas蛋白、其同种型或具有任何Cas蛋白或其同种型的类似功能或活性的任何Cas样蛋白。在一些实施方案中,Cas蛋白包含核心Cas蛋白。示例性Cas核心蛋白包括但不限于Cas1、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8和Cas9。在一些实施方案中,Cas蛋白包含V型Cas蛋白。在一些实施方案中,Cas蛋白包含大肠杆菌(E.coli)亚型的Cas蛋白(也称为CASS2)。大肠杆菌亚型的示例性Cas蛋白包括但不限于Cse1、Cse2、Cse3、Cse4和Cas5e。在一些实施方案中,Cas蛋白包含Ypest亚型的Cas蛋白(也称为CASS3)。Ypest亚型的示例性Cas蛋白包括但不限于Csy1、Csy2、Csy3和Csy4。在一些实施方案中,Cas蛋白包含Nmeni亚型的Cas蛋白(也称为CASS4)。Nmeni亚型的示例性Cas蛋白包括但不限于Csn1和Csn2。在一些实施方案中,Cas蛋白包含Dvulg亚型的Cas蛋白(也称为CASS1)。Dvulg亚型的示例性Cas蛋白包括Csd1、Csd2和Cas5d。在一些实施方案中,Cas蛋白包含Tneap亚型的Cas蛋白(也称为CASS7)。Tneap亚型的示例性Cas蛋白包括但不限于Cst1、Cst2、Cas5t。在一些实施方案中,Cas蛋白包含Hmari亚型的Cas蛋白。Hmari亚型的示例性Cas蛋白包括但不限于Csh1、Csh2和Cas5h。在一些实施方案中,Cas蛋白包含Apern亚型的Cas蛋白(也称为CASS5)。Apern亚型的示例性Cas蛋白包括但不限于Csa1、Csa2、Csa3、Csa4、Csa5和Cas5a。在一些实施方案中,Cas蛋白包含Mtube亚型的Cas蛋白(也称为CASS6)。Mtube亚型的示例性Cas蛋白包括但不限于Csm1、Csm2、Csm3、Csm4和Csm5。在一些实施方案中,Cas蛋白包括RAMP模块Cas蛋白。示例性RAMP模块Cas蛋白包括但不限于Cmr1、Cmr2、

Cmr3、Cmr4、Cmr5和Cmr6。参见,例如,Klompe等人,Nature 571,219-225(2019);Strecker等人,Science365,48-53(2019)。Cas蛋白的实例包括但不限于:Cas3、Cas8a、Cas5、Cas8b、Cas8c、Cas10d、Cse1、Cse2、Csy1、Csy2、Csy3和/或GSU0054。在一些实施方案中,Cas蛋白包括Cas3、Cas8a、Cas5、Cas8b、Cas8c、Cas10d、Cse1、Cse2、Csy1、Csy2、Csy3和/或GSU0054。Cas蛋白的实例包括但不限于:Cas9、Csn2和/或Cas4。在一些实施方案中,Cas蛋白包括Cas9、Csn2和/或Cas4。在一些实施方案中,Cas蛋白的实例包括但不限于:Cas10、Csm2、Cmr5、Cas10、Csx11和/或Csx10。在一些实施方案中,Cas蛋白包括Cas10、Csm2、Cmr5、Cas10、Csx11和/或Csx10。在一些实施方案中,Cas蛋白的实例包括但不限于:Csf1。在一些实施方案中,Cas蛋白包括Csf1。在一些实施方案中,Cas蛋白的实例包括但不限于:Cas12a、Cas12b、Cas12c、C2c4、C2c8、C2c5、C2c10和C2c9;以及CasX(Cas12e)和CasY(Cas12d)。另见,例如,Koonin等人,Curr Opin Microbiol.2017;37:67-78:“Diversity,classification and evolution of CRISPR-Cas systems”。在一些实施方案中,Cas蛋白包括Cas12a、Cas12b、Cas12c、Cas12d、Cas12e、Cas12d和/或Cas12e。在一些实施方案中,Cas蛋白包括Cas13、Cas13a、C2c2、Cas13b、Cas13c和/或Cas13d。在一些实施方案中,CRISPR/Cas系统包括选自由以下组成的组的Cas效应物蛋白:a)Cas3、Cas8a、Cas5、Cas8b、Cas8c、Cas10d、Cse1、Cse2、Csy1、Csy2、Csy3和GSU0054;b)Cas9、Csn2和Cas4;c)Cas10、Csm2、Cmr5、Cas10、Csx11和Csx10;d)Csf1;e)Cas12a、Cas12b、Cas12c、C2c4、C2c8、C2c5、C2c10、C2c9、CasX(Cas12e)和CasY(Cas12d);以及f)Cas13、Cas13a、C2c2、Cas13b、Cas13c和Cas13d。

[0350] 在一些实施方案中,Cas蛋白包括本文所述的Cas蛋白中的任何一种或其功能部分。如本文所用,“功能部分”是指肽的保留其与至少一种核糖核酸(例如,指导RNA(gRNA))复合并且切割靶多核苷酸序列的能力的部分。在一些实施方案中,功能部分包含可操作地连接的Cas9蛋白功能结构域的组合,该Cas9蛋白功能结构域选自由DNA结合结构域、至少一个RNA结合结构域、解旋酶结构域和核酸内切酶结构域组成的组。在一些实施方案中,功能部分包含可操作地连接的Cas12a(也称为Cpf1)蛋白功能结构域的组合,该Cas12a蛋白功能结构域选自由DNA结合结构域、至少一个RNA结合结构域、解旋酶结构域和核酸内切酶结构域组成的组。在一些实施方案中,功能结构域形成复合物。在一些实施方案中,Cas9蛋白的功能部分包含RuvC样结构域的功能部分。在一些实施方案中,Cas9蛋白的功能部分包含HNH核酸酶结构域的功能部分。在一些实施方案中,Cas12a蛋白的功能部分包含RuvC样结构域的功能部分。

[0351] 在一些实施方案中,可以将外源性Cas蛋白以多肽形式引入到细胞中。在某些实施方案中,可以使Cas蛋白与细胞穿透多肽或细胞穿透肽缀合或融合。如本文所用,“细胞穿透多肽”和“细胞穿透肽”分别指促进分子摄取到细胞中的多肽或肽。细胞穿透多肽可以含有可检测标记。

[0352] 在许多实施方案中,可以使Cas蛋白与带电蛋白质(例如,其携带正电荷、负电荷或整体中性电荷)缀合或融合。此种键联可以是共价的。在一些实施方案中,可以使Cas蛋白与超正电荷(superpositively charged)GFP融合以显著增加Cas蛋白穿透细胞的能力(Cronican等人ACS Chem Biol.2010;5(8):747-52)。在某些实施方案中,可以使Cas蛋白与蛋白质转导结构域(PTD)融合以促进Cas蛋白进入细胞。示例性PTD包括Tat、寡精氨酸和穿透肽(penetratin)。在一些实施方案中,Cas9蛋白包含与细胞穿透肽融合的Cas9多肽。在一

些实施方案中,Cas9蛋白包含与PTD融合的Cas9多肽。在一些实施方案中,Cas9蛋白包含与tat结构域融合的Cas9多肽。在一些实施方案中,Cas9蛋白包含与寡精氨酸结构域融合的Cas9多肽。在一些实施方案中,Cas9蛋白包含与穿透肽结构域融合的Cas9多肽。在一些实施方案中,Cas9蛋白包含与超正电荷GFP融合的Cas9多肽。在一些实施方案中,Cas12a蛋白包含与细胞穿透肽融合的Cas12a多肽。在一些实施方案中,Cas12a蛋白包含与PTD融合的Cas12a多肽。在一些实施方案中,Cas12a蛋白包含与tat结构域融合的Cas12a多肽。在一些实施方案中,Cas12a蛋白包含与寡精氨酸结构域融合的Cas12a多肽。在一些实施方案中,Cas12a蛋白包含与穿透肽结构域融合的Cas12a多肽。在一些实施方案中,Cas12a蛋白包含与超正电荷GFP融合的Cas12a多肽。

[0353] 一些实施方案中,可以将Cas蛋白以编码Cas蛋白的核酸的形式引入到含有靶多核苷酸序列的细胞中。将核酸引入到细胞中的过程可以通过任何合适的技术来实现。合适的技术包括本文所述的那些。

[0354] 在一些实施方案中,使Cas蛋白与一种至两种核糖核酸复合。在一些实施方案中,使Cas蛋白与两种核糖核酸复合。在一些实施方案中,使Cas蛋白与一种核糖核酸复合。在一些实施方案中,Cas蛋白由如本文所述的经修饰的核酸(例如,合成的经修饰的mRNA)编码。

[0355] 本公开的方法考虑了使用能够将Cas蛋白引导到靶多核苷酸序列的靶基序并与其杂交的任何核糖核酸。在一些实施方案中,该核糖核酸中的至少一种包含tracrRNA。在一些实施方案中,该核糖核酸中的至少一种包含CRISPR RNA(crRNA)。在一些实施方案中,单个核糖核酸包含将Cas蛋白引导到细胞中的靶多核苷酸序列的靶基序并与其杂交的指导RNA。在一些实施方案中,该核糖核酸中的至少一种包含将Cas蛋白引导到细胞中的靶多核苷酸序列的靶基序并与其杂交的指导RNA。在一些实施方案中,该一种至两种核糖核酸都包含将Cas蛋白引导到细胞中的靶多核苷酸序列的靶基序并与其杂交的指导RNA。如本领域技术人员将理解的,本公开的核糖核酸可以被选择为与多种不同的靶基序杂交,这取决于采用的特定CRISPR/Cas系统和靶多核苷酸的序列。该一种至两种核糖核酸还可以被选择为以最大程度地减少与除靶多核苷酸序列之外的核酸序列的杂交。在一些实施方案中,当与细胞中的所有其他基因组核苷酸序列相比时,该一种至两种核糖核酸与含有至少两个错配的靶基序杂交。在一些实施方案中,当与细胞中的所有其他基因组核苷酸序列相比时,该一种至两种核糖核酸与含有至少一个错配的靶基序杂交。在一些实施方案中,该一种至两种核糖核酸被设计成与紧邻被Cas蛋白识别的脱氧核糖核酸基序的靶基序杂交。在一些实施方案中,该一种至两种核糖核酸中的每一种被设计为与紧邻由Cas蛋白识别的脱氧核糖核酸基序的靶基序杂交,该脱氧核糖核酸基序侧接位于靶基序之间的突变等位基因。

[0356] 在一些实施方案中,该一种至两种核糖核酸中的每一种包含将Cas蛋白引导到细胞中的靶多核苷酸序列的靶基序并与其杂交的指导RNA。

[0357] 在一些实施方案中,一种或两种核糖核酸(例如,指导RNA)与靶多核苷酸序列的同一链上的序列互补和/或杂交。在一些实施方案中,一种或两种核糖核酸(例如,指导RNA)与靶多核苷酸序列的相对链上的序列互补和/或杂交。在一些实施方案中,该一种或两种核糖核酸(例如,指导RNA)不与靶多核苷酸序列的相对链上的序列互补和/或杂交。在一些实施方案中,该一种或两种核糖核酸(例如,指导RNA)与靶多核苷酸序列的重叠靶基序互补和/或杂交。在一些实施方案中,该一种或两种核糖核酸(例如,指导RNA)与靶多核苷酸序列的

补偿靶基序互补和/或杂交。

[0358] VIII.表达经工程化的CD47蛋白的方法

[0359] 本文提供的经工程化的CD47蛋白可以通过本领域技术人员已知的任何方法(包括体内和体外方法)产生。所需蛋白质可在任何适合于产生所需数量和形式的蛋白质的生物体中表达。表达宿主包括原核生物和真核生物,诸如大肠杆菌、酵母、植物、昆虫细胞、哺乳动物细胞,包括人细胞系和转基因动物。表达宿主在它们的蛋白质产生水平以及所表达的蛋白质上存在的翻译后修饰的类型上可能有所不同。表达宿主的选择可以基于这些因素和其他因素,诸如监管和安全考虑、生产成本以及纯化的需要和方法来作出。

[0360] 在一些实施方案中,可以通过任何合适的技术将编码本文所述的经工程化的CD47蛋白的多核苷酸引入到细胞中。合适的技术包括磷酸钙、脂质介导的转染、电穿孔、促融剂(fusogen)和使用病毒载体进行的转导或感染,如本文所讨论。在一些实施方案中,将多核苷酸经由病毒转导(例如,AAV转导、慢病毒转导)引入到细胞中或者以其他方式在病毒载体上递送(例如,促融剂介导的递送)。在一些实施方案中,经由促融剂介导的递送或选自由以下组成的组的转座酶系统将多核苷酸引入到细胞中:条件性或诱导型转座酶、条件性或诱导型PiggyBac转座子、条件性或诱导型睡美人(SB11)转座子、条件性或诱导型Mos1转座子和条件性或诱导型Tol2转座子。

[0361] 许多表达载体是可用的并且为本领域技术人员所知,并且可用于表达蛋白质。表达载体的选择会受到宿主表达系统的选择的影响。一般来说,表达载体可以包括转录启动子和任选的增强子、翻译信号以及转录和翻译终止信号。用于稳定转化的表达载体通常具有允许选择和维持经转化的细胞的可选择标志物。在一些情况下,可以利用复制起点来扩增载体的拷贝数。

[0362] 可以将表达载体经由例如转化、转染、转导、感染、电穿孔和声孔效应引入到宿主细胞中。本领域技术人员能够选择适合于将表达载体引入到宿主细胞中的方法和条件。

[0363] 在一些实施方案中,使用病毒转导(例如使用载体)递送经工程化的CD47蛋白。在一些实施方案中,该载体是携带外源性多核苷酸的假型自失活慢病毒载体。在一些实施方案中,载体是用水疱性口炎VSV-G包膜假型化并携带外源性多核苷酸的自失活慢病毒载体。

[0364] 在一些实施方案中,使用一种或多种基因编辑系统递送经工程化的CD47蛋白。在一些实施方案中,该基因编辑系统是CRISPR/Cas。在一些实施方案中,该基因编辑系统包括TALEN。在一些实施方案中,该基因编辑系统包括锌指核酸酶。在一些实施方案中,该基因编辑系统包括大范围核酸酶。

[0365] 在引入包含可选择标志物的载体后,可使细胞在经富集的培养基中生长1-2天,然后将它们转换到选择性培养基中。可选择标志物的目的是赋予选择抗性,并且它的存在允许成功地表达所引入的序列的细胞的生长和回收。可以使用适合于细胞类型的组织培养技术来使经稳定转化的细胞的抗性细胞增殖。在一些实施方案中,使经工程化的CD47蛋白在哺乳动物表达系统中表达。可以将表达构建体通过病毒感染(诸如通过腺病毒构建体)或通过直接DNA转移(诸如脂质体、磷酸钙、DEAE-葡聚糖)以及通过物理手段(诸如电穿孔和显微注射)转移到哺乳动物细胞中。在一些实施方案中,使用病毒转导(例如使用载体)递送经工程化的CD47蛋白。在一些实施方案中,该载体是携带外源性多核苷酸的假型自失活慢病毒载体。在一些实施方案中,载体是用水疱性口炎VSV-G包膜假型化并携带外源性多核苷酸的

自失活慢病毒载体。在一些实施方案中,使用一种或多种基因编辑系统递送经工程化的CD47蛋白。在一些实施方案中,该基因编辑系统是CRISPR/Cas。在一些实施方案中,该基因编辑系统包括TALEN。在一些实施方案中,该基因编辑系统包括锌指核酸酶。在一些实施方案中,该基因编辑系统包括大范围核酸酶。

[0366] 在一些实施方案中,在本公开的背景下使用的表达系统公开在美国申请63/270,454中。

[0367] 用于哺乳动物细胞的表达载体通常包括mRNA帽位点、TATA盒、翻译启动序列(Kozak共识序列)和聚腺苷酸化元件。还可以添加IRES元件,以允许与另一种基因(诸如可选择标志物)进行双顺反子表达。此类载体通常包括用于高水平表达的转录启动子增强子,例如SV40启动子增强子、人巨细胞病毒(CMV)启动子和Rous肉瘤病毒(RSV)的长末端重复序列。这些启动子增强子在许多细胞类型中都具有活性。组织和细胞类型启动子和增强子区也可用于表达。示例性的启动子/增强子区域包括但不限于来自诸如弹性蛋白酶I、胰岛素、免疫球蛋白、小鼠乳腺肿瘤病毒、白蛋白、甲胎蛋白、α1抗胰蛋白酶、β珠蛋白、髓鞘碱性蛋白、肌球蛋白轻链2和促性腺激素释放激素基因控制的基因的启动子/增强子区域。可使用可选择标志物来选择和维持具有表达构建体的细胞。可选择标志物基因的实例包括但不限于潮霉素B磷酸转移酶、腺苷脱氨酶、黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶、氨基糖苷磷酸转移酶、二氢叶酸还原酶(DHFR)和胸苷激酶。例如,可以在甲氨蝶呤存在下进行表达,以选择仅表达DHFR基因的那些细胞。

[0368] 一旦载体已被并入到合适的宿主细胞中,就将宿主细胞维持在适于表达由并入的多核苷酸编码的经工程化的CD47蛋白的条件下。技术人员能够选择适合于表达经工程化的CD47蛋白的条件。

[0369] IX.其他特性

[0370] 应当理解,在制造细胞疗法的过程中,可以向细胞中引入被认为对于细胞疗法产品是需要的某些修饰。经受针对供体能力(donor capability)的分析的细胞可以是经编辑的细胞或未经编辑的细胞。对细胞进行特性分析(Profiling)可以发生在细胞编辑之前或之后。经编辑的细胞包含一种或多种修饰,诸如HIP修饰(能够实现免疫逃避的低免疫基因修饰)。当在没有免疫抑制的情况下体内移植时,经HIP修饰的细胞具有降低的MHC I类和/或MHC II类分子中的一种或多种分子的表达,并且因此可能不存在全身免疫反应的证据,诸如没有T细胞活化、抗体产生或NK细胞活性。本文提供了与经编辑的细胞相关的公开内容。此类公开内容适用于本文所述的方法、用途和细胞。本文公开的用于对细胞群体进行针对供体能力的特性分析的方法对于如本文所述的许多细胞类型都是有利的。在一些实施方案中,细胞是T细胞(例如,CAR-T细胞)。经工程化的细胞和对细胞进行工程化的方法

[0371] 被认为对于细胞疗法产品是理想的一种修饰是,经工程化的细胞及其群体表现出降低的MHC I类和/或MHC II类分子中的一种或多种分子的表达。被认为对于细胞疗法产品是理想的进一步的修饰是,经工程化的细胞及其群体表现出增加的至少一种致耐受因子(诸如本文所述的致耐受因子)的表达。

[0372] 本文提供了用于缓和和/或逃避针对同种异体移植物的免疫系统反应的影响的方法和组合物。为了克服细胞来源的移植物和/或组织移植物的免疫排斥问题,本文公开了一种经工程化免疫逃避细胞(例如,经工程化的原代低免疫原性细胞)或其群体或药物组合

物,其代表了任何可移植细胞类型的可行来源。本文公开的经工程化的细胞实现降低接受者受试者免疫系统的识别,而不管受试者的基因组成,或受试者体内对一种或多种先前同种异体移植物的任何现有响应、先前自体嵌合抗原受体(CAR)T排斥,和/或其中表达转基因的其他自体或同种异体疗法。经工程化的细胞可以包括但不限于β胰岛细胞、B细胞、T细胞、NK细胞、视网膜色素上皮细胞、胶质祖细胞、内皮细胞、肝细胞、甲状腺细胞、皮肤细胞和血细胞(例如,浆细胞或血小板)。

[0373] 在一些实施方案中,本文所述的经工程化的细胞进一步包含增加的一种或多种补体抑制剂的表达和/或过表达。在一些实施方案中,该一种或多种补体抑制剂选自CD46、CD59和DAF/CD55。在一些实施方案中,经工程化的细胞包含增加的呈组合形式的两种或更多种补体抑制剂的表达,诸如增加的CD46和CD59的表达或增加的CD46、CD59和CD55的表达。

[0374] 本文提供的经工程化的细胞利用致耐受因子的表达,并且还可以调节(例如,降低或消除)一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子表达(例如,表面表达)。在一些实施方案中,利用罕见切割核酸内切酶(例如,CRISPR/Cas、TALEN、锌指核酸酶、大范围核酸酶和归巢核酸内切酶系统)的基因组编辑技术也被用于降低或消除人细胞中关键免疫基因的表达(例如,通过缺失关键免疫基因的基因组DNA)。在某些实施方案中,基因组编辑技术或其他基因调节技术被用于在人细胞中插入耐受诱导(致耐受)因子(例如,CD47),从而产生在植入接受者受试者后可以逃避免疫识别的经工程化的细胞。因此,本文提供的经工程化的细胞表现出受到调节的影响一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子的一种或多种基因和因子的表达(例如,降低或消除的该一种或多种基因和因子的表达),受到调节的致耐受因子(如CD47)的表达(例如,降低或/和受到调节的该致耐受因子的表达(例如,该致耐受因子的过表达),并且实现了降低的接受者受试者的免疫系统的识别。在一些实施方案中,本文提供的经工程化的细胞表现出受到调节的CD142的表达(例如,降低的CD142的表达)。在一些实施方案中,本文提供的经工程化的细胞表现出受到调节的选自CD46、CD59和DAF/CD55的一种或多种补体抑制剂的表达(例如,增加的该一种或多种补体抑制剂的表达)。

[0375] 在一些方面,本文提供的经工程化的细胞表现出降低的先天免疫细胞排斥和/或适应性免疫细胞排斥(例如,低免疫原性细胞)。例如,在一些实施方案中,经工程化的细胞表现出降低的对NK细胞介导的裂解和/或巨噬细胞吞噬的敏感性。在一些实施方案中,经工程化的细胞可用作普遍相容的细胞或组织(例如,通用供体细胞或组织)的来源,该细胞或组织被移植到接受者受试者中而几乎不需要至不需要免疫抑制剂。此类低免疫原性细胞在移植后保留细胞特异性特征和特性。

[0376] 本文还提供了用于治疗病症的方法,该方法包括施用在MHC错配的同种异体接受者中逃避免疫排斥的经工程化的细胞(例如,经工程化的原代细胞)。在一些实施方案中,当被重复施用(例如,移植或植入)于MHC错配的同种异体接受者时,由本文所述的方法中的任一种产生的经工程化的细胞逃避免疫排斥。

[0377] 除非有明确相反的指示,否则本文所述的实施方案的实践将采用化学、生物化学、有机化学、分子生物学、微生物学、重组DNA技术、遗传学、免疫学和细胞生物学的常规方法,此类方法在本领域的技术范围内,其中许多方法出于说明目的在下文中描述。此类技术在文献中有充分解释。参见例如,Sambrook等人,Molecular Cloning:ALaboratory Manual

(第3版,2001);Sambrook等人,Molecular Cloning:ALaboratory Manual(第2版,1989);Maniatis等人,Molecular Cloning:ALaboratory Manual(1982);Ausubel等人,Current Protocols in Molecular Biology(John Wiley and Sons,2008年7月更新);Short Protocols in Molecular Biology:A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology,Greene Pub.Associates and Wiley-Interscience;Glover,DNA Cloning:A Practical Approach,第I卷和第II卷(IRL Press,Oxford,1985);Anand,Techniques for the Analysis of Complex Genomes,(Academic Press,New York,1992);Transcription and Translation(B.Hames和S.Higgins编,1984);Perbal,A Practical Guide to Molecular Cloning(1984);Harlow和Lane,Antibodies,(Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.,1998)Current Protocols in Immunology Q.E.Coligan,A M.Kruisbeek,D.H.Margulies,E.M.Shevach和W.Strober编,1991);Annual Review of Immunology;以及诸如Advances in Immunology的期刊上的专题论文。

[0378] 本申请中提及的所有出版物(包括专利文献、科学文章和数据库)出于所有目的以引用的方式整体并入,引用程度如同每篇单独的出版物单独地以引用的方式并入一样。如果本文阐述的定义与以引用的方式并入本文中的专利、申请、公开的申请和其他出版物中阐述的定义相反或以其他方式不一致,则本文阐述的定义优先于以引用的方式并入本文中的定义。

[0379] 本文使用的小节标题仅出于组织性目的并且不解读为限制描述的主题。本领域技术人员将认识到,在本公开的范围和精神内,若干实施方案是可能的。以下描述说明了本公开并且当然不应被解读为以任何方式限制本文所述的所考虑的实施方案的范围。

[0380] 本文描述了包含一种或多种修饰的经工程化的细胞。在一些实施方案中,提供的经工程化的细胞还含有一种或多种靶多核苷酸序列的修饰,该修饰调控一种或多种MHC I类分子、一种或多种MHC II类分子,或一种或多种MHC I类分子和一种或多种MHC II类分子的表达。

[0381] 在一些实施方案中,提供的经工程化的细胞还包含用于增加一种或多种致耐受因子的表达的修饰。在一些实施方案中,致耐受因子是以下中的一种或多种:A20/TNFAIP3、B2M-HLA-E、CD16、CD16 Fc受体、CD24、CD27、CD35、CD39、CD46、CD47、CD52、CD55、CD59、CD64、CD200、CCL21、CCL22、CTLA4-Ig、C1抑制剂、CR1、DUX4、FASL、HLA-C、HLA-E、HLA-E重链、HLA-F、HLA-G、H2-M3、IDO1、IL-10、IL15-RF、IL-35、IL-39、MANF、Mfge8、PD-L1、Serpinb9或其任何组合。在一些实施方案中,该用于增加一种或多种致耐受因子表达的修饰是或者包括增加的CD47的表达。在一些实施方案中,该用于增加一种或多种致耐受因子表达的修饰是或者包括增加的PD-L1的表达。在一些实施方案中,该用于增加一种或多种致耐受因子表达的修饰是或者包括增加的HLA-E的表达。在一些实施方案中,该用于增加一种或多种致耐受因子表达的修饰是或者包括增加的HLA-G的表达。在一些实施方案中,该用于增加一种或多种致耐受因子表达的修饰是或者包括增加的CCL21、PD-L1、FasL、Serpinb9、H2-M3(HLA-G)、CD47、CD200和Mfge8的表达。

[0382] 在一些实施方案中,该细胞包含降低一种或多种MHC I类分子的表达的一种或多种基因组修饰和增加CD47的表达的修饰。换句话说,经工程化的细胞包含外源性CD47蛋白

并表现出降低或沉默的一种或多种MHC I类分子的表面表达。在一些实施方案中,该细胞包含降低一种或多种MHC II类分子的表达的一种或多种基因组修饰和增加CD47的表达的修饰。在一些情况下,经工程化的细胞包含外源性CD47核酸和蛋白质并表现出降低或沉默的一种或多种MHC I类分子的表面表达。在一些实施方案中,该细胞包含降低或消除一种或多种MHC II类分子的表达的一种或多种基因组修饰、降低或消除一种或多种MHC II类分子的表达的一种或多种基因组修饰,以及增加CD47的表达的修饰。在一些实施方案中,经工程化的细胞包含外源性CD47蛋白,表现出降低或沉默的一种或多种MHC I类分子的表面表达,并表现出降低的一种或多种MHC II类分子的表面表达或缺乏该表面表达。在许多实施方案中,该细胞是$B2M^{插入缺失/插入缺失}$、$CIITA^{插入缺失/插入缺失}$、CD47tg细胞。

[0383] 在一些实施方案中,任何基因编辑技术都可以用于降低如所描述的一种或多种靶多核苷酸或靶蛋白的表达。在一些实施方案中,基因编辑技术可以包括涉及核酸酶、整合酶、转座酶、重组酶的系统。在一些实施方案中,基因编辑技术可以用于基因的敲除或敲低。在一些实施方案中,基因编辑技术可以用于将DNA敲入或整合到基因组的区域中。在一些实施方案中,基因编辑技术介导单链断裂(SSB)。在一些实施方案中,基因编辑技术介导双链断裂(DSB),包括与非同源末端连接(NHEJ)或同源定向修复(HDR)有关的双链断裂。在一些实施方案中,基因编辑技术可以包括基于DNA的编辑或先导编辑。在一些实施方案中,基因编辑技术可以包括经由位点特异性靶向元件进行的可编程添加(PASTE)。

[0384] 在一些实施方案中,基因编辑技术与碱基编辑相关。碱基编辑器(BE)通常是Cas(“CRISPR相关”)结构域和核碱基修饰结构域(例如,天然或进化的脱氨酶,诸如胞苷脱氨酶,其包括APOBEC1(“载脂蛋白BmRNA编辑酶,催化多肽1”)、CDA(“胞苷脱氨酶”)和AID(“活化诱导胞苷脱氨酶”)结构域)的融合体。在一些情况下,碱基编辑器还可以包含改变细胞DNA修复过程的蛋白质或结构域,以提高所得单核苷酸变化的效率和/或稳定性。

[0385] 在一些方面,当前可用的碱基编辑器包括将靶C·G转化为T·A的胞苷碱基编辑器(例如,BE4)和将A·T转化为G·C的腺嘌呤碱基编辑器(例如,ABE7.10)。在一些方面,首次证实Cas9靶向脱氨与被设计成在不引入双链DNA断裂的情况下诱导碱基变化的碱基编辑器(BE)系统有关。进一步地,与失活的Cas9(dCas9)融合的大鼠脱氨酶APOBEC1(rAPOBEC1)被用于成功地将sgRNA的PAM上游的胞苷转化为胸苷。在一些方面,通过将dCas9改变为“切口酶”Cas9 D10A来优化此第一BE系统,该切口酶在与脱氨基胞苷相对的链上切口。不受理论的束缚,这预计将启动长补丁碱基切除修复(BER),其中脱氨基链优先被用于将修复模板化以产生U:A碱基对,该U:A碱基然后在DNA复制期间被转换为T:A。

[0386] 在一些实施方案中,碱基编辑器是核碱基编辑器,其含有催化失活的第一DNA结合蛋白结构域、具有碱基编辑活性的结构域和具有切口酶活性的第二DNA结合蛋白结构域,其中DNA结合蛋白结构域在单一融合蛋白上表达或单独表达(例如,在单独的表达载体上)。在一些实施方案中,碱基编辑器是融合蛋白,其包含具有碱基编辑活性的结构域(例如,胞苷脱氨酶或腺苷脱氨酶)和两个核酸可编程DNA结合蛋白结构域(napDNAbp),第一个具有切口酶活性,并且第二个napDNAbp是催化失活的,其中至少两个napDNAbp通过接头连接。在一些实施方案中,碱基编辑器是融合蛋白,其包含具有切口酶活性的CRISPR-Cas(例如Cas9)(nCas;nCas9)的DNA结构域、具有核酸可编程DNA结合活性的CRISPR-Cas蛋白(例如Cas9)(dCas;例如dCas9)的催化失活结构域,以及脱氨酶结构域,其中dCas通过接头连接至nCas,

并且dCas紧邻脱氨酶结构域。在一些实施方案中,碱基编辑器是腺嘌呤到胸腺嘧啶或“ATBE”(或胸腺嘧啶到腺嘌呤或“TABE”)颠换碱基编辑器。示例性碱基编辑器和碱基编辑器系统包括如专利公布号US20220127622、US20210079366、US20200248169、US20210093667、US20210071163、WO2020181202、WO2021158921、WO2019126709、WO2020181178、WO2020181195、WO2020214842、WO2020181193中所述的任何碱基编辑器和碱基编辑器系统,这些专利据此整体并入。

[0387] 在一些实施方案中,基因编辑技术是靶标引发的逆转录(TPRT)或“先导编辑”。在一些实施方案中,先导编辑介导人细胞中的靶向插入、缺失、所有12种可能的碱基到碱基转换及其组合,而不需要DSB或供体DNA模板。

[0388] 先导编辑是一种基因组编辑方法,其使用与聚合酶联合工作(即,以与napDNAbp反式提供的融合蛋白形式或其他方式)的核酸可编程DNA结合蛋白(“napDNAbp”)将新的遗传信息直接写入指定的DNA位点中,其中用先导编辑(PE)指导RNA(“PEgRNA”)对先导编辑系统进行编程,该先导编辑(PE)指导RNA既指定靶位点,又以替换DNA链的形式通过工程化到指导RNA上(例如,在5′或3′端,或在指导RNA的内部部分处)的延伸(extension)(DNA或RNA)来将所需编辑的合成模板化。含有所需编辑(例如,单个核碱基取代)的替换链与待编辑的靶位点的内源性链共享相同的序列(除了其包含所需编辑)。通过DNA修复和/或复制机制,靶位点的内源性链被新合成的含有所需编辑的替换链替换。在一些情况下,先导编辑可以被认为是一种“搜索和替换”基因组编辑技术,因为先导编辑器搜索并定位待编辑的期望靶位点,并编码含有期望编辑的替换链,该替换链同时被安装以替代对应靶位点内源性DNA链。例如,先导编辑可以适用于进行精确的基于CRISPR/Cas的基因组编辑,以避开双链断裂。在一些实施方案中,同源蛋白是Cas蛋白-逆转录酶融合体或相关系统,或编码Cas蛋白-逆转录酶融合体或相关系统,以用指导RNA靶向特定DNA序列,在靶位点处生成单链切口,并使用带切口DNA作为引物用于与指导RNA整合的经工程化的逆转录酶模板的逆转录。在一些实施方案中,先导编辑器蛋白与两个先导编辑指导RNA(pegRNA)配对,该两个先导编辑指导RNA(pegRNA)将基因组DNA的相对链上的互补DNA瓣的合成模板化,从而导致PE诱导的切口位点之间的内源性DNA序列被替换为pegRNA编码的序列。

[0389] 在一些实施方案中,基因编辑技术与先导编辑器相关,该先导编辑器是逆转录酶或本领域已知的任何DNA聚合酶。因此,在一个方面,先导编辑器可以包含Cas9(或等效的napDNAbp),其被编程为通过将DNA序列与含有与靶DNA中的互补原型间隔区退火的间隔区序列的专门指导RNA(即,PEgRNA)缔合来靶向该DNA序列。此类方法包括Anzalone等人(doi.org/10.1038/s41586-019-1711-4)或PCT公布号WO2020191248、WO2021226558或WO2022067130中公开的任何方法,这些文献据此整体并入。

[0390] 在一些实施方案中,基因编辑技术是经由位点特异性靶向元件的可编程添加(PASTE)。在一些方面,PASTE是其中经由与逆转录酶和丝氨酸整合酶两者融合的CRISPR-Cas9切口酶引导基因组插入的平台。如Ioannidi等人(doi.org/10.1101/2021.11.01.466786)所述,PASTE不产生双链断裂,但允许整合大至约36kb的序列。在一些实施方案中,丝氨酸整合酶可以是本领域已知的任何丝氨酸整合酶。在一些实施方案中,丝氨酸整合酶具有足够的正交性,使得PASTE可以用于多重基因整合,在至少两个基因组基因座处同时整合至少两个不同的基因。在一些实施方案中,PASTE具有与基于同源定向修复或

非同源末端连接的整合相当或比其更优的编辑效率,具有在非分裂细胞中的活性和更少的可检测脱靶事件。

[0391] 在一些实施方案中,本公开的CRISPR系统包括TnpB多肽。在一些实施方案中,TnpB多肽可以包含Ruv-C样结构域。RuvC结构域可以是包含RuvC-I、RuvC-II和RuvC-III子结构域的分裂式RuvC结构域。在一些实施方案中,TnpB可以进一步包含HTH结构域、桥螺旋结构域和锌指结构域中的一个或多个。TnpB多肽不包含HNH结构域。在一些实施方案中,TnpB蛋白从N端开始包含:HTH结构域、RuvC-I子结构域、桥螺旋结构域、RuvC-II子结构域、zinger指结构域和RuvC-III子结构域。在一些实施方案中,RuvC-III亚结构域形成TnpB多肽的C端。在一些实施方案中,TnpB多肽来自ε变形菌(Epsilonproteobacteria)细菌、小叶游动放线菌(Actinoplanes lobatus)菌株DSM 43150、纤维素性马杜拉放线菌(Actinomadura celluolosilytica)菌株DSM 45823、纳米比亚马杜拉放线菌(Actinomadura namibiensis)菌株DSM 44197、巨大肠脂环酸芽孢杆菌(Alicyclobacillus macrosprangiidus)菌株DSM 17980、嗜盐李平张氏菌(Lipingzhangella halophila)菌株DSM 102030,或总状花序纤线杆菌(Ktedonobacter recemifer)。在一些实施方案中,TnpB多肽来自总状花序纤线杆菌,或包含与总状花序纤线杆菌TnpB基因座的5'ITR具有相似性的保守的RNA区域。在一些实施方案中,TnpB可包含Fanzor蛋白,即在真核生物基因组中发现的TnpB同源物。在一些实施方案中,包含TnpB多肽的CRISPR系统结合靶多核苷酸的5'处的靶标相邻基序(TAM)序列。在一些实施方案中,TAM是转座子相关基序。在一些实施方案中,TAM序列包含TCA。在一些实施方案中,TAM序列包含TTCAN。在一些实施方案中,TAM序列包含TTGAT。在一些实施方案中,TAM序列包含ATAAA。

[0392] 在一些实施方案中,所描述的经工程化的细胞群体在施用于接受者受试者后引发降低水平的免疫活化或不引发免疫活化。在一些实施方案中,该细胞在接受者受试者中引发降低水平的全身性TH1活化或不引发全身性TH1活化。在一些实施方案中,该细胞在接受者受试者中引发降低水平的外周血单核细胞(PBMC)的免疫活化或不引发PBMC的免疫活化。在一些实施方案中,该细胞在施用于接受者受试者后引发降低水平的针对该细胞的供体特异性IgG抗体或不引发该供体特异性IgG抗体。在一些实施方案中,该细胞在接受者受试者中引发降低水平的针对该细胞的IgM和IgG抗体产生或不引发该IgM和IgG抗体产生。在一些实施方案中,该细胞在施用于接受者受试者后引发降低水平的细胞毒性T细胞对该细胞的杀伤。

[0393] 在一些实施方案中,本文提供的经工程化的细胞包含"自杀基因"或"自杀开关"。可以并入自杀基因或自杀开关来充当"安全开关",诸如在将经工程化的细胞施用于受试者后和当细胞以不期望的方式生长和分裂时,该安全开关可以导致经工程化的细胞(例如,原代经工程化的细胞或从经工程化多能干细胞分化而来的细胞)死亡。"自杀基因"消融方法包括基因转移载体中的自杀基因,该自杀基因编码仅在被指定化合物活化时才会导致细胞杀伤的蛋白质。自杀基因可以编码选择性地将无毒化合物转化成高毒性代谢物的酶。结果是特异性消除表达该酶的细胞。在一些实施方案中,自杀基因是单纯疱疹病毒胸苷激酶(HSV-tk)基因并且触发子是更昔洛韦(ganciclovir)。在其他实施方案中,自杀基因是大肠杆菌胞嘧啶脱氨酶(EC-CD)基因并且触发子是5-氟胞嘧啶(5-FC)(Barese等人,Mol.Therap.20(10):1932-1943(2012),Xu等人,Cell Res.8:73-8(1998),两者均以引用的

方式整体并入本文中)。

[0394] 在其他实施方案中,自杀基因是诱导型半胱天冬酶蛋白。诱导型半胱天冬酶蛋白包括能够诱导细胞凋亡的半胱天冬酶蛋白的至少一部分。在一些实施方案中,诱导型半胱天冬酶蛋白是iCasp9。其包含具有F36V突变的人FK506结合蛋白FKBP12的序列,该序列通过一系列氨基酸连接到编码人半胱天冬酶9的基因。FKBP12-F36V以高亲和力与小分子二聚剂API 903结合。因此,iCasp9的自杀功能是通过二聚化化学诱导剂(CID)的施用触发的。在一些实施方案中,CID是小分子药物API 903。二聚化引起细胞凋亡的快速诱导。(参见WO2011146862;Stasi等人,N.Engl.J.Med 365;18(2011);Tey等人Biol.Blood Marrow Transplant.13:913-924(2007),这些文献中的每一个都以引用的方式整体并入本文中。)

[0395] 安全开关或自杀基因的纳入允许在对接受者产生细胞毒性或其他负面后果的情况下对细胞进行受控杀伤,从而增加基于细胞的疗法(包括使用致耐受因子的疗法)的安全性。

[0396] 在一些实施方案中,可以将安全开关并入到(诸如引入到)本文提供的经工程化的细胞中,以提供例如在含有安全开关的经工程化的细胞以不期望的方式生长和分裂或者对宿主造成过度毒性时诱导该细胞死亡或凋亡的能力。因此,安全开关的使用使得人们能够有条件地消除体内异常细胞,并且可能是细胞疗法在临床应用中的关键步骤。安全开关及其用途描述于例如Duzgune§,Origins of Suicide Gene Therapy(2019);Duzgune§(编),Suicide Gene Therapy.Methods in Molecular Biology,vol.1895(Humana Press,New York,NY)(对于HSV-tk、胞嘧啶脱氨酶、硝基还原酶、嘌呤核苷磷酸化酶和辣根过氧化物酶);Zhou和Brenner,Exp Hematol 44(11):1013-1019(2016)(对于iCaspase9);Wang等人,Blood 18(5):1255-1263(2001)(对于huEGFR);美国专利申请公布号20180002397(对于HER1);以及Philip等人,Blood124(8):1277-1287(2014)(对于RQR8)。

[0397] 在一些实施方案中,安全开关可以以受控方式,例如在药物或前药存在下或在被选择性外源性化合物活化后引起细胞死亡。在一些实施方案中,安全开关选自由以下组成的组:单纯疱疹病毒胸苷激酶(HSV-tk)、胞嘧啶脱氨酶(CyD)、硝基还原酶(NTR)、嘌呤核苷磷酸化酶(PNP)、辣根过氧化物酶、诱导型半胱天冬酶9(iCasp9)、雷帕霉素活化的半胱天冬酶9(rapaCasp9)、CCR4、CD16、CD19、CD20、CD30、EGFR、GD2、HER1、HER2、MUC1、PSMA和RQR8。

[0398] 在一些实施方案中,安全开关可以是编码当被药物或前药活化(例如通过将无毒前药在细胞内转变成毒性代谢物)时具有细胞杀伤能力的产物的转基因。在这些实施方案中,通过使经工程化的细胞与药物或前药接触来活化细胞杀伤。在一些情况下,安全开关是HSV-tk,其将更昔洛韦(GCV)转化为GCV-三磷酸,从而干扰DNA合成并杀伤分裂细胞。在一些情况下,安全开关是CyD或其变体,其通过催化胞嘧啶水解脱氨为尿嘧啶来将抗真菌药物5-氟胞嘧啶(5-FC)转化为细胞毒性5-氟尿嘧啶(5-FU)。5-FU进一步被细胞酶转化为强效抗代谢物(5-FdUMP、5-FdUTP、5-FUTP)。这些化合物抑制胸苷酸合成酶以及RNA和DNA的产生,从而导致细胞死亡。在一些情况下,安全开关是NTR或其变体,其可以通过将硝基还原为在增殖中的(proliferating)和非增殖中的(nonproliferating)细胞中有毒性的反应性N-羟胺中间体来作用于前药CB 1954。在一些情况下,安全开关是PNP或其变体,其可以将前药6-甲基嘌呤脱氧核苷或氟达拉滨转变为对增殖中的和非增殖中的细胞均有毒性的代谢物。在一些情况下,安全开关是辣根过氧化物酶或其变体,其可以催化吲哚-3-乙酸(IAA)为强效的

细胞毒素,从而实现细胞杀伤。

[0399] 在一些实施方案中,安全开关可以是iCasp9。半胱天冬酶9是内在线粒体凋亡途径的组分,该组分在生理条件下因细胞色素C从受损线粒体释放而被活化。经活化的半胱天冬酶9然后活化半胱天冬酶3,该半胱天冬酶3触发末端效应物分子导致细胞凋亡。可以通过经由肽接头将经截短的半胱天冬酶9(没有其生理二聚化结构域或半胱天冬酶活化结构域)融合到FK506结合蛋白(FKBP)FKBP12-F36V来生成iCasp9。iCasp9具有低二聚体依赖性基础活性,并且可以在宿主细胞(例如,人T细胞)中稳定表达而不损害宿主细胞的表型、功能或抗原特异性。然而,在化学二聚化诱导剂(CID)诸如利米杜西(rimiducid)(AP1903)、AP20187和雷帕霉素存在下,iCasp9可以经历诱导型二聚化并活化下游半胱天冬酶分子,从而导致表达iCasp9的细胞凋亡。参见例如,PCT申请公布号WO2011/146862;Stasi等人,N.Engl.J.Med.365;18(2011);Tey等人,Biol.Blood Marrow Transplant 13:913-924(2007)。例如,雷帕霉素诱导型半胱天冬酶9变体被称为rapaCasp9。参见Stavrou等人,Mal.Ther.26(5):1266-1276(2018)。因此,iCasp9可以用作用于实现宿主细胞的受控杀伤的安全开关。

[0400] 在一些实施方案中,安全开关可以是膜表达的蛋白质,该蛋白质允许在施用针对此蛋白质的特异性抗体之后细胞耗竭。这种类别的安全开关可以包括例如编码用于其表面表达的CCR4、CD16、CD19、CD20、CD30、EGFR、GD2、HER1、HER2、MUC1、PSMA或RQR8的一种或多种转基因。这些蛋白质可能具有可以被特定抗体靶向的表面表位。在一些实施方案中,安全开关包含CCR4,其可以被抗CCR4抗体识别。合适的抗CCR4抗体的非限制性实例包括莫格利珠单抗及其生物类似物。在一些实施方案中,安全开关包含CD16或CD30,其可以被抗CD16或抗CD30抗体识别。此类抗CD16或抗CD30抗体的非限制性实例包括AFM13及其生物类似物。在一些实施方案中,安全开关包含可以被抗CD19抗体识别的CD19。此类抗CD19抗体的非限制性实例包括MOR208及其生物类似物。在一些实施方案中,安全开关包含可以被抗CD20抗体识别的CD20。此类抗CD20抗体的非限制性实例包括奥妥珠单抗、乌妥昔单抗、奥卡妥珠单抗、利妥昔单抗、利妥昔单抗-RIIb及其生物类似物。因此,表达安全开关的细胞是CD20阳性的,并且可以通过施用如上所述的抗CD20抗体来靶向以进行杀伤。在一些实施方案中,安全开关包含可以被抗EGFR抗体识别的EGFR。此类抗EGFR抗体的非限制性实例包括托木妥昔单抗(tomuzotuximab)、RO5083945(GA201)、西妥昔单抗(cetuximab)及其生物类似物。在一些实施方案中,安全开关包含可以被抗GD2抗体识别的GD2。此类抗GD2抗体的非限制性实例包括Hu14.18K322A、Hu14.18-IL2、Hu3F8、地妥昔单抗、c.60C3-R11c及其生物类似物。

[0401] 在一些实施方案中,安全开关可以是识别经工程化的细胞的表面上的一种或多种致耐受因子的外源性施用的剂。在一些实施方案中,该外源性施用的剂是针对致耐受剂或对致耐受剂具有特异性的抗体,例如抗CD47抗体。通过识别和阻断经工程化的细胞上的致耐受因子,外源性施用的抗体可阻断致耐受因子的免疫抑制性功能,从而使免疫系统对经工程化的细胞重新敏感。例如,对于过表达CD47的经工程化的细胞,可以将外源性施用的抗CD47抗体施用于受试者,从而导致经工程化的细胞上CD47的掩蔽以及对经工程化的细胞的免疫反应的触发。

[0402] 在一些实施方案中,本文提供了一种生成经工程化的细胞的方法,该方法包括:(a)降低或消除该细胞中一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子的表达;

(b)增加该细胞中致耐受因子的表达。在一些实施方案中,该一种或多种致耐受因子选自A20/TNFAIP3、B2M-HLA-E、CD16、CD16 Fc受体、CD24、CD27、CD35、CD39、CD46、CD47、CD52、CD55、CD59、CD64、CD200、CCL21、CCL22、CTLA4-Ig、C1抑制剂、CR1、DUX4、FASL、HLA-C、HLA-E、HLA-E重链、HLA-F、HLA-G、H2-M3、IDO1、IL-10、IL15-RF、IL-35、IL-39、MANF、Mfge8、PD-L1和Serpinb9。在一些实施方案中,该一种或多种致耐受因子是CD47。在一些实施方案中,该方法包括降低或消除一种或多种MHC I类分子和一种或多种MHC II类分子的表达。在一些实施方案中,降低或增加表达包括使用指导核酸酶(例如,CRISPR/Cas系统)对细胞进行一种或多种修饰。在一些实施方案中,该方法进一步包括将包含诱导型自杀开关的表达载体引入到细胞中。

[0403] 在一些实施方案中,降低或增加表达包括使用指导核酸酶(例如,CRISPR/Cas系统)对细胞进行一种或多种修饰。在一些实施方案中,该方法进一步包括将包含诱导型自杀开关的表达载体引入到细胞中。在一些实施方案中,该方法进一步包括增加所述细胞中DAF/CD55的表达。

[0404] 在一些实施方案中,致耐受因子是CD47,并且细胞包含编码CD47蛋白的外源性多核苷酸。在一些实施方案中,细胞表达外源性CD47多肽。

[0405] 在一些实施方案中,本文公开的方法包括向有需要的受试者施用CD47-SIRPα阻断剂,其中先前向受试者施用被工程化为表达外源性CD47多肽的细胞群体。在一些实施方案中,CD47-SIRPα阻断剂包含CD47结合结构域。在一些实施方案中,CD47结合结构域包含信号调控蛋白α(SIRPα)或其片段。在一些实施方案中,CD47-SIRPα阻断剂包含免疫球蛋白G(IgG)Fc结构域。在一些实施方案中,IgG Fc结构域包含IgG1 Fc结构域。在一些实施方案中,IgG1 Fc结构域包含人抗体的片段。在一些实施方案中,CD47-SIRPα阻断剂选自由TTI-621、TTI-622和ALX148组成的组。在一些实施方案中,CD47-SIRPα阻断剂是TTI-621、TTI-622和ALX148。在一些实施方案中,CD47-SIRPα阻断剂是TTI-622。在一些实施方案中,CD47-SIRPα阻断剂是ALX148。在一些实施方案中,IgG Fc结构域包含IgG4 Fc结构域。在一些实施方案中,CD47-SIRPα阻断剂是抗体。在一些实施方案中,该抗体选自由以下组成的组:MIAP410、B6H12和莫洛利单抗。在一些实施方案中,该抗体是MIAP410。在一些实施方案中,该抗体是B6H12。在一些实施方案中,该抗体是莫洛利单抗。在一些实施方案中,该抗体选自由AO-176、IBI188(信迪利单抗(letaplimab))、STI-6643和ZL-1201组成的组。在一些实施方案中,该抗体是AO-176(Arch)。在一些实施方案中,该抗体是IBI188(信迪利单抗)(Innovent)。在一些实施方案中,该抗体是STI-6643(Sorrento)。在一些实施方案中,该抗体是ZL-1201(Zai)。

[0406] 在一些实施方案中,结合CD47的可用抗体或其片段可以选自包括以下的组:莫洛利单抗((Hu5F9-G4))(Forty Seven,Inc.;Gilead Sciences,Inc.)、乌拉利单抗(urabrelimab)、CC-90002(Celgene;Bristol-Myers Squibb)、IBI-188(Innovent Biologics)、IBI-322(Innovent Biologics)、TG-1801(TG Therapeutics;也称为NI-1701,Novimmune SA)、ALX148(ALX Oncology)、TJ011133(也称为TJC4,I-Mab Biopharma)、FA3M3、ZL-1201(Zai Lab Co.,Ltd)、AK117(Akesbio Australia Pty,Ltd.)、AO-176(Arch Oncology)、SRF231(Surface Oncology)、GenSci-059(GeneScience)、C47B157(Janssen Research and Development)、C47B161(Janssen Research and Development)、C47B167

(Janssen Research and Development)、C47B222(Janssen Research and Development)、C47B227(Janssen Research and Development)、Vx-1004(Corvus Pharmaceuticals)、HMBD004(Hummingbird Bioscience Pte Ltd)、SHR-1603(Hengrui)、AMMS4-G4(Beijing Institute of Biotechnology)、RTX-CD47(University of Groningen)和IMC-002。(Samsung Biologics;ImmuneOnciaTherapeutics)。在一些实施方案中,该抗体或其片段不与选自包括以下的组的抗体竞争CD47结合:莫洛利单抗、乌拉利单抗、CC-90002、IBI-188、IBI-322、TG-1801(NI-1701)、ALX148、TJ011133、FA3M3、ZL1201、AK117、AO-176、SRF231、GenSci-059、C47B157、C47B161、C47B167、C47B222、C47B227、Vx-1004、HMBD004、SHR-1603、AMMS4-G4、RTX-CD47和IMC-002。在一些实施方案中,该抗体或其片段与选自以下的抗体竞争CD47结合:莫洛利单抗、乌拉利单抗、CC-90002、IBI-188、IBI-322、TG-1801(NI-1701)、ALX148、TJ011133、FA3M3、ZL1201、AK117、AO-176、SRF231、GenSci-059、C47B157、C47B161、C47B167、C47B222、C47B227、Vx-1004、HMBD004、SHR-1603、AMMS4-G4、RTX-CD47和IMC-002。在一些实施方案中,结合CD47的抗体或其片段选自包括以下的组:针对CD47的单链Fv片段(scFv)、针对CD47的Fab、针对CD47的VHH纳米抗体、针对CD47的DARPin及其变体。在一些实施方案中,针对CD47的scFv、针对CD47的Fab及其变体是基于选自包括以下的组的抗体中的任何抗体的抗原结合结构域:莫洛利单抗、乌拉利单抗、CC-90002、IBI-188、IBI-322、TG-1801(NI-1701)、ALX148、TJ011133、FA3M3、ZL1201、AK117、AO-176、SRF231、GenSci-059、C47B157、C47B161、C47B167、C47B222、C47B227、Vx-1004、HMBD004、SHR-1603、AMMS4-G4、RTX-CD47和IMC-002。

[0407] 在一些实施方案中,CD47拮抗剂提供CD47阻断。用于CD47阻断的方法和剂描述于PCT/US2021/054326中,该专利以引用的方式整体并入本文中。

[0408] 一旦被改变,本文所描述的分子中的任何分子的表达的存在可以使用已知技术,诸如蛋白质印迹、ELISA测定、FACS测定等来测定。

[0409] 在一些实施方案中,与特定细胞类型相关的特征,例如细胞标志物特征、生物标志物、细胞内标志物、细胞外标志物、细胞细胞因子产生、抗体产生也可用作细胞质量的读出。在一些实施方案中,细胞内标志物可以是细胞内蛋白质水平的变化。在一些实施方案中,细胞内标志物可以是细胞内RNA水平的变化。在一些实施方案中,细胞内标志物可以是细胞内DNA水平的变化。在一些实施方案中,细胞外标志物可以是细胞外肽水平的变化(例如,一种或多种细胞因子、一种或多种激素、一种或多种抗体等)。在一些实施方案中,细胞外标志物可以是细胞外信号传导分子水平的变化(例如,一种或多种信号肽、一种或多种代谢物、一种或多种配体、一种或多种有机化合物、一种或多种离子等)。

[0410] A.降低的靶基因的表达

[0411] 1.靶基因

[0412] a.MHC I类分子和/或MHC II类分子

[0413] 在一些实施方案中,提供的经工程化的细胞包含一种或多种靶多核苷酸或蛋白质序列(也可互换地称为靶基因)的修饰(例如,遗传修饰),该修饰调控(例如,降低或消除)一种或多种MHC I类分子、一种或多种MHC II类分子,或一种或多种MHC I类分子和一种或多种MHC II类分子的表达。在一些实施方案中,待被修饰或工程化的细胞是先前未被引入一种或多种修饰的未经修饰的细胞或非经工程化的细胞。在一些实施方案中,基因编辑系统

被用于修饰一种或多种靶多核苷酸序列,从而调控(例如,降低或消除)一种或多种MHC I类分子、一种或多种MHC II类分子,或一种或多种MHC I类分子和MHC II类分子的表达。在某些实施方案中,细胞的基因组已被改变以减少或缺失促进HLA表达(诸如细胞表面上一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子的表达)所需或涉及的组分。例如,在一些实施方案中,细胞中MHC I类分子的组分β-2-微球蛋白(B2M)的表达被降低或消除,从而降低或消除经工程化的细胞的一种或多种MHC I类分子的蛋白质表达(例如,细胞表面表达)。

[0414] 在一些实施方案中,经工程化的细胞中调控(例如,降低或消除)经工程化的细胞中一种或多种靶多核苷酸或蛋白质的表达的所描述的修饰中的任何修饰都可以与第II.B节中所描述的用于使多核苷酸(例如致耐受因子,诸如CD47)过表达的一种或多种修饰组合在一起。

[0415] 在一些实施方案中,降低一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子表达可以例如通过以下方式中的一者或多者来实现:(1)直接靶向多态HLA等位基因(HLA-A、HLA-B、HLA-C)和MHC II类基因;(2)去除B2M,这将降低所有MHC I类分子的表面运输;以及/或者(3)缺失对HLA表达至关重要的MHC增强体的一种或多种组分,诸如LRC5、RFX-5、RFXANK、RFXAP、IRF1、NF-Y(包括NFY-A、NFY-B、NFY-C)和CIITA。

[0416] 在某些实施方案中,对HLA表达进行干扰。在一些实施方案中,通过以下方式来干扰HLA表达:靶向单个的HLA(,敲除HLA-A、HLA-B和/或HLA-C的表达)、靶向HLA表达的转录调控子(例如,敲除NLRC5、CIITA、RFX5、RFXAP、RFXANK、NFY-A、NFY-B、NFY-C和/或IRF-1的表达)、阻断MHC I类分子的表面运输(例如,敲除B2M和/或TAP1的表达)以及/或者用HLA-Razor靶向(参见,例如,WO2016183041)。

[0417] 人白细胞抗原(HLA)复合物与人MHC同义。在一些实施方案中,本文公开的经工程化的细胞是人细胞。在某些方面,本文公开的经工程化的细胞不表达对应于一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子的一种或多种人白细胞抗原(例如,HLA-A、HLA-B和/或HLA-C),并且因此被表征为低免疫原性的。例如,在某些方面,本文公开的经工程化的细胞已经被修饰为使得细胞(包括任何干细胞或从其制备的分化的干细胞)不表达以下MHC I类分子中的一种或多种,或者表现出降低的以下MHC I类分子中的一种或多种的表达:HLA-A、HLA-B和HLA-C。在一些实施方案中,HLA-A、HLA-B和HLA-C中的一种或多种可以从细胞被“敲除”。具有经敲除的HLA-A基因、HLA-B基因和/或HLA-C基因的细胞可表现出降低或消除的每个经敲除的基因的表达。

[0418] 在某些实施方案中,通过靶向和缺失一段连续基因组DNA来调节一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子的表达,从而降低或消除选自由B2M、CIITA和NLRC5组成的组的靶基因的表达。

[0419] 在一些实施方案中,提供的经工程化的细胞包含调控一种或多种MHC I类分子的一种或多种靶多核苷酸序列的修饰。用于降低一种或多种MHC I类分子的表达的示例性方法在以下小节中描述。在一些实施方案中,被靶向的多核苷酸序列是B2M和NLRC5中的一者或两者。在一些实施方案中,该细胞包含对B2M基因的遗传编辑修饰(例如,插入缺失)。在一些实施方案中,该细胞包含对NLRC5基因的遗传编辑修饰(例如,插入缺失)。在一些实施方案中,该细胞包含对B2M和CIITA基因的遗传编辑修饰(例如,插入缺失)。

[0420] 在一些实施方案中,降低一种或多种MHC I类分子表达的修饰是降低B2M表达的修

饰。在一些实施方案中,降低B2M表达的修饰降低B2M mRNA表达。在一些实施方案中,B2M的mRNA表达的降低是相对于不包含修饰的相同细胞类型的未经修饰或野生型的细胞而言的。在一些实施方案中,B2M的mRNA表达被降低了超过约5%,诸如降低超过约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多中的任一个。在一些实施方案中,B2M的mRNA表达被降低了高达约100%,诸如降低了高达约90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%或更少中的任一个。在一些实施方案中,B2M的mRNA表达被降低了约5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%中的任一个。在一些实施方案中,B2M的mRNA表达被消除(例如,B2M mRNA的0%表达)。在一些实施方案中,降低B2M mRNA表达的修饰消除了B2M基因活性。

[0421] 在一些实施方案中,降低B2M表达的修饰降低B2M蛋白表达。在一些实施方案中,B2M的蛋白质表达的降低是相对于不包含修饰的相同细胞类型的未经修饰或野生型的细胞而言的。在一些实施方案中,B2M的蛋白质表达被降低了超过约5%,诸如被降低了超过约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多中的任一个。在一些实施方案中,B2M的蛋白质表达被降低了高达约100%,诸如被降低了高达约90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%或更少中的任一个。在一些实施方案中,B2M的蛋白质表达被降低了约5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%中的任一个。在一些实施方案中,B2M的蛋白质表达被消除(例如,B2M蛋白的0%表达)。在一些实施方案中,降低B2M蛋白表达的修饰消除了B2M基因活性。

[0422] 在一些实施方案中,降低B2M表达的修饰包括B2M基因的失活或破坏。在一些实施方案中,降低B2M表达的修饰包括B2M基因的一个等位基因的失活或破坏。在一些实施方案中,降低B2M表达的修饰包括B2M基因的两个等位基因的失活或破坏。

[0423] 在一些实施方案中,该修饰包括细胞中一个或多个B2M编码序列的失活或破坏。在一些实施方案中,该修饰包括细胞中所有B2M编码序列的失活或破坏。在一些实施方案中,该修饰包括失活或破坏包括B2M基因中的插入缺失。在一些实施方案中,该修饰是B2M基因的基因组DNA的移码突变。在一些实施方案中,该修饰是B2M基因的基因组DNA的缺失。在一些实施方案中,该修饰是B2M基因的一段连续基因组DNA的缺失。在一些实施方案中,B2M基因被敲除。

[0424] 在一些实施方案中,提供的经工程化的细胞包含调控一种或多种MHC II类分子的一种或多种靶多核苷酸序列的修饰。用于降低一种或多种MHC II类分子的表达的示例性方法在以下小节中描述。在一些实施方案中,该细胞包含对CIITA基因的遗传编辑修饰。

[0425] 在一些实施方案中,降低一种或多种MHC II类分子表达的修饰是降低CIITA表达的修饰。在一些实施方案中,降低CIITA表达的修饰降低CIITA mRNA表达。在一些实施方案中,CIITA的mRNA表达的降低是相对于不包含修饰的相同细胞类型的未经修饰或野生型的细胞而言的。在一些实施方案中,CIITA的mRNA表达被降低了超过约5%,诸如被降低了超过约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多中的任一个。在一些实施方案中,CIITA的mRNA表达被降低了高达约100%,诸如被降低了高达约90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%或更少中的任一个。在一些实施方案中,CIITA的mRNA表达被降低了约5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%中的任一个。在一些实施方案中,CIITA的mRNA表达被消除(例如,CIITA mRNA的0%表达)。在一些实施方

案中,降低CIITA mRNA表达的修饰消除了CIITA基因活性。

[0426] 在一些实施方案中,降低CIITA表达的修饰降低CIITA蛋白表达。在一些实施方案中,CIITA的蛋白质表达的降低是相对于不包含修饰的相同细胞类型的未经修饰或野生型的细胞而言的。在一些实施方案中,CIITA的蛋白质表达被降低了超过约5%,诸如被降低了超过约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多中的任一个。在一些实施方案中,CIITA的蛋白质表达被降低了高达约100%,诸如被降低了高达约90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%或更少中的任一个。在一些实施方案中,CIITA的蛋白质表达被降低了约5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%中的任一个。在一些实施方案中,CIITA的蛋白质表达被消除(例如,CIITA蛋白的0%表达)。在一些实施方案中,降低CIITA蛋白表达的修饰消除了CIITA基因活性。

[0427] 在一些实施方案中,降低CIITA表达的修饰包括CIITA基因的失活或破坏。在一些实施方案中,降低CIITA表达的修饰包括CIITA基因的一个等位基因的失活或破坏。在一些实施方案中,降低CIITA表达的修饰包括CIITA基因的两个等位基因的失活或破坏。

[0428] 在一些实施方案中,该修饰包括细胞中一个或多个B2M编码序列的失活或破坏。在一些实施方案中,该修饰包括细胞中所有B2M编码序列的失活或破坏。在一些实施方案中,该修饰包括失活或破坏包括B2M基因中的插入缺失。在一些实施方案中,该修饰是B2M基因的基因组DNA的移码突变。在一些实施方案中,该修饰是B2M基因的基因组DNA的缺失。在一些实施方案中,该修饰是B2M基因的一段连续基因组DNA的缺失。在一些实施方案中,CIITA基因被敲除。

[0429] 在一些实施方案中,提供的经工程化的细胞包含调控一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子的一种或多种靶多核苷酸序列的修饰。用于降低一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子的表达的示例性方法在以下小节中描述。在一些实施方案中,该细胞包含对B2M和NLRC5基因的遗传编辑修饰。在一些实施方案中,该细胞包含对CIITA和NLRC5基因的遗传编辑修饰。在多个实施方案中,该细胞包含对B2M、CIITA和NLRC5基因的遗传编辑修饰。

[0430] 2.降低表达的方法

[0431] 在一些实施方案中,本文提供的细胞被修饰(例如,遗传修饰)以降低如所描述的一种或多种靶多核苷酸或蛋白质的表达。在一些实施方案中,被工程化为具有用于降低(例如,消除)多核苷酸或蛋白质的表达的一种或多种修饰的细胞是如本文所述的任何源细胞。在一些实施方案中,源细胞是第II.C节中描述的任何细胞。在某些实施方案中,本文公开的细胞(例如,干细胞、诱导型多能干细胞、分化的细胞诸如β胰岛细胞或肝细胞,或原代细胞)包含用于降低一种或多种靶多核苷酸的表达的一种或多种修饰。该一种或多种靶多核苷酸的非限制性实例包括如上所述的任何一种,诸如CIITA、B2M、NLRC5、HLA-A、HLA-B、HLA-C、LRC5、RFX-ANK、RFX5、RFX-AP、NFY-A、NFY-B、NFY-C、IRF1和TAP1中的一种或多种。在一些实施方案中,该用于降低一种或多种靶多核苷酸的表达的修饰与用于增加所需转基因(诸如第II.B节中描述的任何转基因)的表达的一种或多种修饰组合在一起。在一些实施方案中,该修饰产生了作为免疫豁免细胞或低免疫原性细胞的经工程化的细胞。通过调节(例如,降低或缺失)一种或多种靶多核苷酸的表达,此类细胞在植入到接受者受试者中时表现出减少的免疫活化。在一些实施方案中,该细胞被认为是低免疫原性的,例如,在施用后在接受

者受试者或患者中是低免疫原性的。

[0432] 可以使用用于降低靶多核苷酸表达的任何方法。在一些实施方案中,该修饰导致靶多核苷酸的表达永久消除或降低。例如,在一些实施方案中,通过在靶多核苷酸中引入DNA断裂(诸如通过使用靶向核酸内切酶)来破坏靶多核苷酸或基因。在其他实施方案中,该修饰导致靶多核苷酸的表达瞬时降低。例如,在一些实施方案中,通过使用与靶多核苷酸互补的抑制性核酸选择性地抑制或阻遏基因的表达(例如使用反义技术,诸如通过RNA干扰(RNAi)、短干扰RNA(siRNA)、短发夹(shRNA)和/或核酶)来实现基因阻遏。

[0433] 在一些实施方案中,靶多核苷酸序列是基因组序列。在一些实施方案中,靶多核苷酸序列是人基因组序列。在一些实施方案中,靶多核苷酸序列是哺乳动物基因组序列。在一些实施方案中,靶多核苷酸序列是脊椎动物基因组序列。

[0434] 在一些实施方案中,通过通常以靶向方式诱导基因中的一个或多个双链断裂和/或一个或多个单链断裂来进行基因破坏。在一些实施方案中,双链或单链断裂由核酸酶(例如核酸内切酶,诸如基因靶向核酸酶)产生。在一些实施方案中,靶向核酸酶选自专门设计用于被靶向于基因或其一部分的序列的锌指核酸酶(ZFN)、转录活化因子样效应物核酸酶(TALEN)和RNA指导的核酸酶诸如CRISPR相关核酸酶(Cas)。在一些实施方案中,靶向核酸酶生成双链或单链断裂,该双链或单链断裂然后经受通过易错非同源末端连接(NHEJ)进行的修复,或者在一些情况下,通过使用模板的精确同源定向修复(HDR)进行的修复。在一些实施方案中,靶向核酸酶生成DNA双链断裂(DSB)。在一些实施方案中,产生和修复断裂的过程通常容易出错并导致来自NHEJ修复的DNA碱基的插入和缺失(插入缺失)。在一些实施方案中,该修饰可以诱导靶基因的核苷酸序列的缺失、插入或突变。在一些情况下,该修饰可导致移码突变,该移码突变可以导致提前终止密码子。在核酸酶介导的基因编辑的实例中,靶向编辑发生在基因的两个等位基因上,从而导致该基因的双等位基因破坏或编辑。在一些实施方案中,基因编辑靶向基因的所有等位基因。在一些实施方案中,使用靶向核酸酶(诸如使用CRISPR/Cas系统)的修饰导致基因的完全敲除。

[0435] 在一些实施方案中,将核酸酶(诸如罕见切割核酸内切酶)引入到含有靶多核苷酸序列的细胞中。核酸酶可以以编码核酸酶的核酸的形式被引入到细胞中。将核酸引入到细胞中的过程可以通过任何合适的技术来实现。合适的技术包括磷酸钙或脂质介导的转染、电穿孔和使用病毒载体进行的转导或感染。在一些实施方案中,引入到细胞中的核酸是DNA。在一些实施方案中,核酸酶以蛋白质的形式被引入到细胞中。例如,在CRISPR/Cas系统的情况下,可以将核糖核蛋白(RNP)引入到细胞中。

[0436] 在一些实施方案中,使用CRISPR/Cas系统进行修饰。可以使用能够改变细胞中的靶多核苷酸序列的任何CRISPR/Cas系统。此类CRISPR-Cas系统可以采用多种Cas蛋白(Haft等人,PLoS Comput Biol.2005;1(6)e60)。此类Cas蛋白的允许CRISPR/Cas系统改变细胞中的靶多核苷酸序列的分子机制包括RNA结合蛋白、核酸内切酶和外切酶、解旋酶和聚合酶。在一些实施方案中,CRISPR/Cas系统是I型CRISPR系统。在一些实施方案中,CRISPR/Cas系统是II型CRISPR系统。在一些实施方案中,CRISPR/Cas系统是V型CRISPR系统。

[0437] CRISPR/Cas系统包括可以用于改变细胞中的任何靶多核苷酸序列的靶向系统。在一些实施方案中,本文提供的CRISPR/Cas系统包括Cas蛋白和能够将Cas蛋白引导到靶多核苷酸序列的靶基序并与其杂交的一种或多种(诸如至少一种至两种)核糖核酸(例如,指导

RNA(gRNA))。

[0438] 在一些实施方案中,Cas蛋白包含一个或多个氨基酸取代或修饰。在一些实施方案中,该一个或多个氨基酸取代包括保守氨基酸取代。在一些情况下,取代和/或修饰可以防止或减少蛋白水解降解和/或延长多肽在细胞中的半衰期。在一些实施方案中,Cas蛋白可以包含肽键替换(例如,脲、硫脲、氨基甲酸酯、磺酰脲等)。在一些实施方案中,Cas蛋白可以包含天然存在的氨基酸。在一些实施方案中,Cas蛋白可以包含替代氨基酸(例如,D-氨基酸、β-氨基酸、同型半胱氨酸、磷酸丝氨酸等)。在一些实施方案中,Cas蛋白可以包含纳入一个部分的修饰(例如,聚乙二醇化、糖基化、脂化、乙酰化、封端等)。

[0439] 在一些实施方案中,Cas蛋白包含核心Cas蛋白。示例性Cas核心蛋白包括但不限于Cas1、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8和Cas9。在一些实施方案中,Cas蛋白包含大肠杆菌亚型的Cas蛋白(也称为CASS2)。大肠杆菌亚型的示例性Cas蛋白包括但不限于Cse1、Cse2、Cse3、Cse4和Cas5e。在一些实施方案中,Cas蛋白包含Ypest亚型的Cas蛋白(也称为CASS3)。Ypest亚型的示例性Cas蛋白包括但不限于Csy1、Csy2、Csy3和Csy4。在一些实施方案中,Cas蛋白包含Nmeni亚型的Cas蛋白(也称为CASS4)。Nmeni亚型的示例性Cas蛋白包括但不限于Csn1和Csn2。在一些实施方案中,Cas蛋白包含Dvulg亚型的Cas蛋白(也称为CASS1)。Dvulg亚型的示例性Cas蛋白包括Csd1、Csd2和Cas5d。在一些实施方案中,Cas蛋白包含Tneap亚型的Cas蛋白(也称为CASS7)。Tneap亚型的示例性Cas蛋白包括但不限于Cst1、Cst2、Cas5t。在一些实施方案中,Cas蛋白包含Hmari亚型的Cas蛋白。Hmari亚型的示例性Cas蛋白包括但不限于Csh1、Csh2和Cas5h。在一些实施方案中,Cas蛋白包含Apern亚型的Cas蛋白(也称为CASS5)。Apern亚型的示例性Cas蛋白包括但不限于Csa1、Csa2、Csa3、Csa4、Csa5和Cas5a。在一些实施方案中,Cas蛋白包含Mtube亚型的Cas蛋白(也称为CASS6)。Mtube亚型的示例性Cas蛋白包括但不限于Csm1、Csm2、Csm3、Csm4和Csm5。在一些实施方案中,Cas蛋白包括RAMP模块Cas蛋白。示例性RAMP模块Cas蛋白包括但不限于Cmr1、Cmr2、Cmr3、Cmr4、Cmr5和Cmr6。参见,例如,Klompe等人,Nature 571,219-225(2019);Strecker等人,Science 365,48-53(2019)。

[0440] 在一些实施方案中,本公开的CRISPR系统包含TnpB多肽。在一些实施方案中,TnpB多肽可以包含Ruv-C样结构域。RuvC结构域可以是包含RuvC-I、RuvC-II和RuvC-III子结构域的分裂式RuvC结构域。在一些实施方案中,TnpB可以进一步包含HTH结构域、桥螺旋结构域和锌指结构域中的一个或多个。TnpB多肽不包含HNH结构域。在一些实施方案中,TnpB蛋白从N端开始包含:HTH结构域、RuvC-I子结构域、桥螺旋结构域、RuvC-II子结构域、zinger指结构域和RuvC-III子结构域。在一些实施方案中,RuvC-III亚结构域形成TnpB多肽的C端。在一些实施方案中,TnpB多肽来自ε变形菌细菌、小叶游动放线菌菌株DSM 43150、纤维素性马杜拉放线菌菌株DSM 45823、纳米比亚马杜拉放线菌菌株DSM 44197、巨大肠脂环酸芽孢杆菌菌株DSM 17980、嗜盐李平张氏菌菌株DSM 102030,或总状花序纤线杆菌。在一些实施方案中,TnpB多肽来自总状花序纤线杆菌,或包含与总状花序纤线杆菌TnpB基因座的5'ITR具有相似性的保守的RNA区域。在一些实施方案中,TnpB可包含Fanzor蛋白,即在真核生物基因组中发现的TnpB同源物。在一些实施方案中,包含TnpB多肽的CRISPR系统结合靶多核苷酸的5'处的靶标相邻基序(TAM)序列。在一些实施方案中,TAM是转座子相关基序。在一些实施方案中,TAM序列包含TCA。在一些实施方案中,TAM序列包含TTCAN。在一些实施方

案中,TAM序列包含TTGAT。在一些实施方案中,TAM序列包含ATAAA。

[0441] 在一些实施方案中,用于遗传修饰细胞以敲除、敲低或以其他方式修饰一种或多种基因的方法包括使用定点核酸酶,包括例如锌指核酸酶(ZFN)、转录活化因子样效应物核酸酶(TALEN)、大范围核酸酶、转座酶和成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)/Cas系统。

[0442] ZFN是包含一系列位点特异性DNA结合结构域的融合蛋白,该结构域改造自连接至细菌FokI限制酶的核酸内切酶结构域的含锌指转录因子。ZFN可以具有一个或多个(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个)DNA结合结构域或锌指结构域。参见,例如,Carroll等人,Genetics Society of America(2011)188:773-782;Kim等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA(1996)93:1156-1160。每个锌指结构域均是被一个或多个锌离子稳定的小蛋白质结构基序,并且通常识别3至4bp的DNA序列。因此,串联结构域可以潜在地结合至细胞基因组内独特的延伸的核苷酸序列。

[0443] 可以将已知特异性的各种锌指组合以产生识别约6、9、12、15或18-bp序列的多指多肽。各种选择和模块化组装技术可用于生成识别特定序列的锌指(及其组合),该技术包括噬菌体展示、酵母单杂交系统、细菌单杂交和双杂交系统以及哺乳动物细胞。可以将锌指工程化为结合预定的核酸序列。用于将锌指工程化为结合至预定核酸序列的标准是本领域已知的。参见,例如,Sera等人,Biochemistry(2002)41:7074-7081;Liu等人,Bioinformatics(2008)24:1850-1857。

[0444] 含有FokI核酸酶结构域或其他二聚核酸酶结构域的ZFN作为二聚体发挥作用。因此,需要一对ZFN来靶向非回文DNA位点。两个单独的ZFN必须以它们的适当间隔开的核酸酶结合DNA的相对链。参见Bitinaite等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA(1998)95:10570-10575。为了切割基因组中的特定位点,设计了一对ZFN以识别侧接该位点的两个序列,一个在正向链上,而另一个在反向链上。在ZFN在该位点的任一侧结合后,核酸酶结构域二聚化并且切割该位点处的DNA,从而生成具有5'突出端的DSB。然后可以借助含有侧接有同源臂的期望突变的修复模板,利用HDR来引入特定突变。修复模板通常是引入到细胞中的外源性双链DNA载体。参见Miller等人,Nat.Biotechnol.(2011)29:143-148;Hockemeyer等人,Nat.Biotechnol.(2011)29:731-734。

[0445] TALEN是可以用于编辑靶基因的人工核酸酶的另一个实例。TALEN来源于被称为TALE重复序列的DNA结合结构域,该DNA结合结构域通常包含具有10至30个重复序列的串联阵列,该重复序列结合并识别延伸的DNA序列。每个重复序列长度为33至35个氨基酸,两个相邻的氨基酸(称为重复可变双残基或RVD)赋予四个DNA碱基对之一的特异性。因此,重复序列与靶DNA序列中的碱基对之间存在一一对应关系。

[0446] 通过使一个或多个TALE DNA结合结构域(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个)与核酸酶结构域(例如FokI核酸内切酶结构域)融合而人工产生TALEN。参见Zhang,Nature Biotech.(2011)29:149-153。为了在TALEN中使用FokI,已经对FokI进行了若干种突变;例如,这些突变改善了切割特异性或活性。参见Cermak等人,Nucl.Acids Res.(2011)39:e82;Miller等人,Nature Biotech.(2011)29:143-148;Hockemeyer等人,Nature Biotech.(2011)29:731-734;Wood等人,Science(2011)333:307;Doyon等人,Nature Methods(2010)8:74-79;Szczepek等人,Nature Biotech(2007)25:786-793;Guo等人,J.Mol.Biol.(2010)200:96。、FokI结构域作为二聚体发挥作用,对于靶基因组中的具有正

确的取向和间距的位点需要具有独特的DNA结合结构域的两个构建体。TALE DNA结合结构域与FokI核酸酶结构域之间的氨基酸残基数量以及两个单独的TALEN结合位点之间的碱基数量似乎都是实现高水平活性的重要参数。Miller等人,Nature Biotech.(2011)29:143-148。

[0447] 通过将经工程化TALE重复序列与核酸酶结构域相组合,可以产生对任何期望的DNA序列具有特异性的位点特异性核酸酶。与ZFN类似,TALEN可以被引入到细胞中以在基因组中的期望靶位点处生成DSB,并且因此可以被用于以类似的HDR介导的途径敲除基因或敲入突变。参见Boch,Nature Biotech.(2011)29:135-136;Boch等人,Science(2009)326:1509-1512;Moscou等人,Science(2009)326:3501。

[0448] 大范围核酸酶是核酸内切酶家族中的酶,该酶的特征在于它们识别并切割大DNA序列(14至40个碱基对)的能力。基于大范围核酸酶的影响核酸酶活性和/或DNA识别的结构基序,将大范围核酸酶分为多个家族。最广泛和最有名的大范围核酸酶是LAGLIDADG家族中的蛋白质,其名称来源于保守的氨基酸序列。参见Chevalier等人,Nucleic Acids Res.(2001)29(18):3757-3774。另一方面,GIY-YIG家族成员具有GIY-YIG模块,其长度为70-100个残基,并且包括具有四个不变残基的四个或五个保守序列基序,其中两个是活性所需的。参见Van Roey等人,Nature Struct.Biol.(2002)9:806-811。His-Cys家族大范围核酸酶的特征在于在涵盖数百个氨基酸残基的区域中的一系列高度保守的组氨酸和半胱氨酸。参见Chevalier等人,Nucleic Acids Res.(2001)29(18):3757-3774。NHN家族的成员由含有被天冬酰胺残基包围的两对保守组氨酸的基序定义。参见Chevalier等人,Nucleic Acids Res.(2001)29(18):3757-3774。

[0449] 由于高特异性要求,鉴定特定靶DNA序列的天然大范围核酸酶的机会较低,因此已使用各种方法(包括诱变和高通量筛选方法)来产生识别独特序列的大范围核酸酶变体。用于对具有改变的DNA结合特异性的大范围核酸酶进行工程化(例如,以结合至预定核酸序列)的策略是本领域已知的。参见,例如,Chevalier等人,Mol.Cell.(2002)10:895-905;Epinat等人,Nucleic Acids Res(2003)31:2952-2962;Silva等人,J Mol.Biol.(2006)361:744-754;Seligman等人,Nucleic Acids Res(2002)30:3870-3879;Sussman等人,J Mol Biol(2004)342:31-41;Doyon等人,J Am Chem Soc(2006)128:2477-2484;Chen等人,Protein Eng Des Sel(2009)22:249-256;Arnould等人,J Mol Biol.(2006)355:443-458;Smith等人,Nucleic Acids Res.(2006)363(2):283-294。

[0450] 与ZFN和TALEN一样,大范围核酸酶可以在基因组DNA中产生DSB,如果修复不当(例如,经由NHEJ),它可以产生移码突变,从而导致靶基因在细胞中的表达降低。可替代地,可以将外来DNA与大范围核酸酶一起引入到细胞中。根据外来DNA的序列和染色体序列,此过程可用于修饰靶基因。参见Silva等人,Current Gene Therapy(2011)11:11-27。

[0451] 转座酶是结合至转座子的末端并且通过剪切和粘贴机制或复制性转座机制催化该转座子移动到基因组的另一部分的酶。通过将转座酶连接至其他系统(诸如CRISPER/Cas系统),可以开发新的基因编辑工具以实现基因组DNA的位点特异性插入或操作。有两种已知的使用转座子的DNA整合方法,其使用无催化活性的Cas效应蛋白和Tn7样转座子。转座酶依赖性DNA整合不在基因组中引发DSB,这可以保证更安全和更具特异性的DNA整合。

[0452] CRISPR系统作为提供一种形式的获得性免疫的参与防御入侵噬菌体和质粒的系

统最初在原核生物(例如,细菌和古细菌)中被发现。现在它已被改造并用作研究和临床应用中流行的基因编辑工具。

[0453] CRISPR/Cas系统通常包含至少两种组分:一种或多种指导RNA(gRNA)和Cas蛋白。Cas蛋白是一种将DSB引入到靶位点中的核酸酶。CRISPR-Cas系统有两大类:1类系统使用多种Cas蛋白的复合物来降解核酸;2类系统使用单一大Cas蛋白来达到相同目的。1类分为I、III和IV型;2类分为II、V和VI型。适用于基因编辑应用的不同Cas蛋白包括但不限于Cas3、Cas4、Cas5、Cas8a、Cas8b、Cas8c、Cas9、Cas10、Cas12、Cas12a(Cpf1)、Cas12b(C2c1)、Cas12c(C2c3)、Cas12d(CasY)、Cas12e(CasX)、Cas12f(C2c10)、Cas12g、Cas12h、Cas12i、Cas12k(C2c5)、Cas13、Cas13a(C2c2)、Cas13b、Cas13c、Cas13d、C2c4、C2c8、C2c9、Cmr5、Cse1、Cse2、Csf1、Csm2、Csn2、Csx10、Csx11、Csy1、Csy2、Csy3和Mad7。最广泛使用的Cas9是II型Cas蛋白并且在本文中被描述为例示性的。这些Cas蛋白可来源于不同的来源物种。例如,Cas9可以来源于化脓性链球菌(S.pyogenes)或金黄色葡萄球菌(S.aureus)。

[0454] 在原始微生物基因组中,II型CRISPR系统将来自入侵DNA的序列并入到宿主基因组内编码为阵列的CRISPR重复序列之间。来自CRISPR重复序列阵列的转录物被加工成CRISPR RNA(crRNA),每个CRISPR RNA均携带有从入侵DNA转录的可变序列(称为“原型间隔区”序列),以及CRISPR重复序列的一部分。每个crRNA与第二反式活化CRISPR RNA(tracrRNA)杂交,并且这两个RNA与Cas9核酸酶形成复合物。crRNA的原型间隔区编码部分引导Cas9复合物切割互补的靶DNA序列,前提条件是该序列与被称为“原型间隔区相邻基序”(PAM)的短序列相邻。

[0455] 自发现以来,CRISPR系统已被改造用于在从细菌到真核细胞(包括人细胞)的广泛细胞和生物体中诱导序列特异性DSB和靶向基因组编辑。在它在基因编辑应用中的使用中,人工设计的合成gRNA已经替换了原始的crRNA:tracrRNA复合物。例如,gRNA可以是由crRNA、四环和tracrRNA构成的单一指导RNA(sgRNA)。crRNA通常包含被用户设计为识别所关注的靶DNA的互补区域(也称为间隔区,长度通常为约20个核苷酸)。tracrRNA序列包含用于Cas核酸酶结合的支架区域。crRNA序列和tracrRNA序列通过四环连接,并且各自具有用于彼此杂交的短重复序列,因此生成嵌合sgRNA。可以通过简单地改变gRNA中存在的间隔区或互补区域序列来改变Cas核酸酶的基因组靶标。互补区域将通过标准的RNA-DNA互补碱基配对规则将Cas核酸酶引导至靶DNA位点。

[0456] 为了使Cas核酸酶发挥作用,紧邻基因组DNA中的靶序列的下游必须存在PAM。Cas蛋白对PAM的识别被认为会使相邻基因组序列不稳定,从而允许gRNA对所述序列进行询问,并且在存在匹配序列时导致gRNA-DNA配对。PAM的特定序列根据Cas基因的种类而变化。例如,最常用的来源于化脓性链球菌的Cas9核酸酶识别5’-NGG-3’的PAM序列,或者以较低的效率识别5’-NAG-3’的PAM序列,其中“N”可以是任何核苷酸。具有替代PAM的其他Cas核酸酶变体也已经被表征并成功地被用于基因组编辑,该Cas核酸酶变体总结在下表1a中。

[0457] 表5.示例性Cas核酸酶变体及其PAM序列

[0458]

CRISPR 核酸酶	来源生物体	PAM 序列(5'→3')
SpCas9	*化脓性链球菌*	NGG 或 NAG
SaCas9	*金黄色葡萄球菌*	NGRRT 或 NGRRN
NmeCas9	*脑膜炎奈瑟氏菌(Neisseria meningitidis)*	NNNNGATT
CjCas9	*空肠弯曲杆菌(Campylobacter jejuni)*	NNNNRYAC
StCas9	*嗜热链球菌(Streptococcus thermophilus)*	NNAGAAW
TdCas9	*齿垢密螺旋体(Treponema denticola)*	NAAAAC
LbCas12a (Cpf1)	*毛螺菌科细菌(Lachnospiraceae bacterium)*	TTTV
AsCas12a (Cpf1)	*氨基酸球菌属某种(Acidaminococcus sp.)*	TTTV
AacCas12b	*嗜热脂环酸芽胞杆菌(Alicyclobacillus acidiphilus)*	TTN
BhCas12b v4	*外村尚芽孢杆菌(Bacillus hisashii)*	ATTN、TTTN 或 GTTN

[0459] R＝A或G;Y＝C或T;W＝A或T;V＝A或C或G;N＝任何碱基

[0460] 在一些实施方案中,Cas核酸酶可包含一个或多个突变以改变它们的活性、特异性、识别和/或其他特征。例如,Cas核酸酶可具有改变其保真度以减轻脱靶效应的一个或多个突变(例如,SpCas9的eSpCas9、SpCas9-HF1、HypaSpCas9、HeFSpCas9和evoSpCas9高保真度变体)。再例如,Cas核酸酶可具有改变其PAM特异性的一个或多个突变。

[0461] 在一些实施方案中,Cas蛋白包括本文所述的Cas蛋白中的任何一种或其功能部分。如本文所用,“功能部分”是指肽的保留其与至少一种核糖核酸(例如,指导RNA(gRNA))复合并且切割靶多核苷酸序列的能力的部分。在一些实施方案中,功能部分包含可操作地连接的Cas9蛋白功能结构域的组合,该Cas9蛋白功能结构域选自由DNA结合结构域、至少一个RNA结合结构域、解旋酶结构域和核酸内切酶结构域组成的组。在一些实施方案中,功能部分包含可操作地连接的Cas12a(也称为Cpf1)蛋白功能结构域的组合,该Cas12a蛋白功能结构域选自由DNA结合结构域、至少一个RNA结合结构域、解旋酶结构域和核酸内切酶结构域组成的组。在一些实施方案中,功能结构域形成复合物。在一些实施方案中,Cas9蛋白的功能部分包含RuvC样结构域的功能部分。在一些实施方案中,Cas9蛋白的功能部分包含HNH核酸酶结构域的功能部分。在一些实施方案中,Cas12a蛋白的功能部分包含RuvC样结构域的功能部分。

[0462] 在一些实施方案中,合适的Cas蛋白包括但不限于Cas0、Cas12a(即Cpf1)、Cas12b、Cas12i、CasX和Mad7。

[0463] 在一些实施方案中,可以将外源性Cas蛋白以多肽形式引入到细胞中。在某些实施方案中,可以使Cas蛋白与细胞穿透多肽或细胞穿透肽缀合或融合。如本文所用,“细胞穿透多肽”和“细胞穿透肽”分别指促进分子摄取到细胞中的多肽或肽。细胞穿透多肽可以含有可检测的标记。

[0464] 在某些实施方案中,可以使Cas蛋白与带电蛋白质(例如,其携带正电荷、负电荷或整体中性电荷)缀合或融合。此种键联可以是共价的。在一些实施方案中,可以使Cas蛋白与超正电荷GFP融合以显著增加Cas蛋白穿透细胞的能力(Cronican等人ACS Chem Biol.2010;5(8):747-52)。在某些实施方案中,可以使Cas蛋白与蛋白质转导结构域(PTD)融合以促进Cas蛋白进入细胞。示例性PTD包括Tat、寡精氨酸和穿透肽。在一些实施方案中,Cas9蛋白包含与细胞穿透肽融合的Cas9多肽。在一些实施方案中,Cas9蛋白包含与PTD融合

的Cas9多肽。在一些实施方案中,Cas9蛋白包含与tat结构域融合的Cas9多肽。在一些实施方案中,Cas9蛋白包含与寡精氨酸结构域融合的Cas9多肽。在一些实施方案中,Cas9蛋白包含与穿透肽结构域融合的Cas9多肽。在一些实施方案中,Cas9蛋白包含与超正电荷GFP融合的Cas9多肽。在一些实施方案中,Cas12a蛋白包含与细胞穿透肽融合的Cas12a多肽。在一些实施方案中,Cas12a蛋白包含与PTD融合的Cas12a多肽。在一些实施方案中,Cas12a蛋白包含与tat结构域融合的Cas12a多肽。在一些实施方案中,Cas12a蛋白包含与寡精氨酸结构域融合的Cas12a多肽。在一些实施方案中,Cas12a蛋白包含与穿透肽结构域融合的Cas12a多肽。在一些实施方案中,Cas12a蛋白包含与超正电荷GFP融合的Cas12a多肽。

[0465] 一些实施方案中,可以将Cas蛋白以编码Cas蛋白的核酸的形式引入到含有靶多核苷酸序列的细胞中。将核酸引入到细胞中的过程可以通过任何合适的技术来实现。合适的技术包括磷酸钙或脂质介导的转染、电穿孔和使用病毒载体进行的转导或感染。在一些实施方案中,核酸包含DNA。在一些实施方案中,核酸包含如本文所述的修饰DNA。在一些实施方案中,核酸包含mRNA。在一些实施方案中,核酸包含如本文所述的经修饰的mRNA(例如,合成的经修饰的mRNA)。

[0466] 在提供的实施方案中,CRISPR/Cas系统通常包括两种组分:一种或多种指导RNA(gRNA)和Cas蛋白。在一些实施方案中,使Cas蛋白与一种或多种(诸如一种至两种)核糖核酸(例如,指导RNA(gRNA))复合。在一些实施方案中,使Cas蛋白与两种核糖核酸复合。在一些实施方案中,使Cas蛋白与一种核糖核酸复合。在一些实施方案中,Cas蛋白由如本文所述的经修饰的核酸(例如,合成的经修饰的mRNA)编码。

[0467] 在一些实施方案中,gRNA是由用于Cas结合的支架序列和用户设计的间隔区或指定为crRNA的互补部分组成的短合成RNA。cRNA由限定待修饰的基因组靶标的crRNA靶向序列(下文也称为gRNA靶向序列;长度通常约为20个核苷酸)和crRNA重复区域(例如GUUUUAGAGCUA;SEQ ID NO:19)组成。可以通过简单地改变gRNA中存在的互补部分序列(例如,gRNA靶向序列)来改变Cas蛋白的基因组靶标。在一些实施方案中,用于Cas结合的支架序列由通过其抗重复序列与crRNA杂交的tracrRNA序列(例如,UAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAA AGUGGCACCGAGUCGGUGCUUU;SEQ ID NO:20)组成。crRNA:tracrRNA之间的复合物募集Cas核酸酶(例如Cas9)并切割原型间隔区相邻基序(PAM)的上游。为了使Cas蛋白发挥作用,紧邻基因组DNA中的靶序列的下游必须存在PAM。Cas蛋白对PAM的识别被认为会使相邻基因组序列不稳定,从而允许gRNA对所述序列进行询问,并且在存在匹配序列时导致gRNA-DNA配对。PAM的特定序列根据Cas基因的种类而变化。例如,最常用的来源于化脓性链球菌的Cas9核酸酶识别NGG的PAM序列。具有替代PAM的其他Cas9变体和其他核酸酶也已经被表征并成功用于基因组编辑。因此,CRISPR/Cas系统可以用于在指定的基因组基因座处产生靶向DSB,其与为靶基因座设计的gRNA互补。crRNA和tracrRNA可以用环序列(例如,四环;GAAA)连接在一起用于生成作为嵌合单指导RNA(sgRNA;Hsu等人2013)的gRNA。可以生成sgRNA用于基于DNA的表达或通过化学合成来生成sgRNA。

[0468] 在一些实施方案中,gRNA的互补部分序列(例如gRNA靶向序列)将根据所关注的靶位点而变化。在一些实施方案中,gRNA包含对表1a中所示的基因序列具有特异性的互补部分。在一些实施方案中,由gRNA靶向的基因组基因座位于如所描述的基因座中的任何基因座的4000bp内、3500bp内、3000bp内、2500bp内、2000bp内、1500bp内、1000bp内或500bp内。

[0469] 本文公开的方法考虑使用能够将Cas蛋白引导到靶多核苷酸序列的靶基序并与其杂交的任何核糖核酸。在一些实施方案中,该核糖核酸中的至少一种包含

[0470] 在一些实施方案中,使Cas蛋白与一种至两种核糖核酸(例如,指导RNA(gRNA))复合。在一些实施方案中,使Cas蛋白与两种核糖核酸复合。在一些实施方案中,使Cas蛋白与一种核糖核酸复合。在一些实施方案中,Cas蛋白由如本文所述的经修饰的核酸(例如,合成的经修饰的mRNA)编码。

[0471] 本文公开的方法考虑使用能够将Cas蛋白引导到靶多核苷酸序列的靶基序并与其杂交的任何核糖核酸。在一些实施方案中,该核糖核酸中的至少一种包含tracrRNA。在一些实施方案中,该核糖核酸中的至少一种包含CRISPR RNA(crRNA)。在一些实施方案中,单个核糖核酸包含将Cas蛋白引导到细胞中的靶多核苷酸序列的靶基序并与其杂交的指导RNA。在一些实施方案中,该核糖核酸中的至少一种包含将Cas蛋白引导到细胞中的靶多核苷酸序列的靶基序并与其杂交的指导RNA。在一些实施方案中,该一种至两种核糖核酸都包含将Cas蛋白引导到细胞中的靶多核苷酸序列的靶基序并与其杂交的指导RNA。如本领域技术人员将理解的,本文提供的核糖核酸可以被选择为与多种不同的靶基序杂交,这取决于采用的特定CRISPR/Cas系统和靶多核苷酸的序列。该一种至两种核糖核酸还可以被选择为以最大程度地减少与除靶多核苷酸序列之外的核酸序列的杂交。在一些实施方案中,当与细胞中的所有其他基因组核苷酸序列相比时,该一种至两种核糖核酸与含有至少两个错配的靶基序杂交。在一些实施方案中,当与细胞中的所有其他基因组核苷酸序列相比时,该一种至两种核糖核酸与含有至少一个错配的靶基序杂交。在一些实施方案中,该一种至两种核糖核酸被设计成与紧邻被Cas蛋白识别的脱氧核糖核酸基序的靶基序杂交。在一些实施方案中,该一种至两种核糖核酸中的每一种被设计为与紧邻由Cas蛋白识别的脱氧核糖核酸基序的靶基序杂交,该脱氧核糖核酸基序侧接位于靶基序之间的突变等位基因。

[0472] 在一些实施方案中,该一种至两种核糖核酸中的每一种包含将Cas蛋白引导到细胞中的靶多核苷酸序列的靶基序并与其杂交的指导RNA。

[0473] 在一些实施方案中,一种或两种核糖核酸(例如,指导RNA)与靶多核苷酸序列的同一链上的序列互补和/或杂交。在一些实施方案中,一种或两种核糖核酸(例如,指导RNA)与靶多核苷酸序列的相对链上的序列互补和/或杂交。在一些实施方案中,该一种或两种核糖核酸(例如,指导RNA)不与靶多核苷酸序列的相对链上的序列互补和/或杂交。在一些实施方案中,该一种或两种核糖核酸(例如,指导RNA)与靶多核苷酸序列的重叠靶基序互补和/或杂交。在一些实施方案中,该一种或两种核糖核酸(例如,指导RNA)与靶多核苷酸序列的补偿靶基序互补和/或杂交。

[0474] 在一些实施方案中,将编码Cas蛋白的核酸和编码至少一种至两种核糖核酸的核酸经由病毒转导(例如,慢病毒转导)引入到细胞中。在一些实施方案中,使Cas蛋白与1-2种核糖核酸复合。在一些实施方案中,使Cas蛋白与两种核糖核酸复合。在一些实施方案中,使Cas蛋白与一种核糖核酸复合。在一些实施方案中,Cas蛋白由如本文所述的经修饰的核酸(例如,合成的经修饰的mRNA)编码。

[0475] 可用于本文所述的基于CRISPR/Cas的基因靶向的示例性gRNA靶向序列在表6中提供。该序列可见于2016年5月9日提交的WO2016183041,其包括表、附录和序列表的公开内容以引用的方式整体并入本文中。

[0476] 表6.可用于靶向基因的示例性gRNA靶向序列

[0477]

基因名称	WO2016183041 中的 SEQ ID NO:	WO2016183041
HLA-A	SEQ ID NO: 2-1418	表 8，附录 1
HLA-B	SEQ ID NO: 1419-3277	表 9，附录 2
HLA-C	SEQ ID NO:3278-5183	表 10，附录 3
RFX-ANK	SEQ ID NO: 95636-102318	表 11，附录 4
NFY-A	SEQ ID NO: 102319-121796	表 13，附录 6
RFX5	SEQ ID NO: 85645-90115	表 16，附录 9
RFX-AP	SEQ ID NO: 90116-95635	表 17，附录 10
NFY-B	SEQ ID NO: 121797-135112	表 20，附录 13
NFY-C	SEQ ID NO: 135113-176601	表 22，附录 15

[0478]

IRF1	SEQ ID NO: 176602-182813	表 23，附录 16
TAP1	SEQ ID NO: 182814-188371	表 24，附录 17
CIITA	SEQ ID NO:5184-36352	表 12，附录 5
B2M	SEQ ID NO:81240-85644	表 15，附录 8
NLRC5	SEQ ID NO:36353-81239	表 14，附录 7

[0479] 可用于本文所述的基于CRISPR/Cas的基因靶向的另外的示例性Cas9指导RNA序列在表7中提供。

[0480] 表7.可用于靶向基因的另外的示例性Cas9指导RNA序列

[0481]

基因	指导序列	PAM	靶位点	gRNA 切割位置	SEQ ID NO
ABO	UCUCUCCAUGUGCAGUAGGA	AGG	外显子 7	chr9:133,257,541	201
FUT1	CUGGAUGUCGGAGGAGUACG	CGG	外显子 4	chr19:48,750,822	202
RHD	GUCUCCGGAAACUCGAGGUG	AGG	外显子 2	chr1:25,284,622	203
F3 (CD142)	ACAGUGUAGACUUGAUUGAC	GGG	外显子 2	chr1:94,540,281	204
B2M	CGUGAGUAAACCUGAAUCUU	TGG	外显子 2	chr15:44,715,434	205
CIITA	GAUAUUGGCAUAAGCCUCCC	TGG	外显子 3	chr16:10,895,747	206
TRAC	AGAGUCUCUCAGCUGGUACA	CGG	外显子 1	chr14:22,5547,533	207

[0482] 在一些实施方案中,鉴定用于遗传破坏方法以降低或消除如所描述的基因表达的新基因座和/或gRNA靶向序列在技术人员的水平之内。例如,对于CRISPR/Cas系统,当已知

针对特定基因座(例如,在靶基因(例如表1中所示)内)的现有gRNA靶向序列时,可以使用“英寸蠕动”(inch worming)方法通过扫描PAM序列的基因座的任一侧上的侧接区来鉴定用于靶向插入转基因的另外的基因座,其通常在整个基因组中约每100个碱基对(bp)出现一次。PAM序列将取决于使用的特定Cas核酸酶,因为不同的核酸酶通常具有不同的对应PAM序列。基因座任一侧上的侧接区域可以是约500至4000bp长,例如约500bp、约1000bp、约1500bp、约2000bp、约2500bp、约3000bp、约3500bp或约4000bp长。当在搜索范围内鉴定出PAM序列时,可以根据此基因座的序列设计新的指导物以用于遗传破坏方法。尽管CRISPR/Cas系统被描述为例示性的,但如所描述的任何基因编辑方法都可以用于这种鉴定新基因座的方法,包括使用ZFN、TALEN、大范围核酸酶和转座酶的那些方法。

[0483] 在一些实施方案中,本文使用转录活化因子样效应物核酸酶(TALEN)方法制备文所述的细胞。“TALE-核酸酶”(TALEN)意指由通常来源于转录活化因子样效应物(TALE)的核酸结合结构域和一个用于切割核酸靶序列的核酸酶催化结构域组成的融合蛋白。催化结构域可以是核酸酶结构域,并且在实施方案中更可以为,具有核酸内切酶(例如I-TevI、ColE7、NucA和Fok-I)活性的结构域。在实施方案中,可以使TALE结构域与大范围核酸酶融合,例如I-CreI和I-Onul或其功能变体。在一些实施方案中,所述核酸酶是单体TALE-核酸酶。单体TALE-核酸酶是不需要二聚化来进行特异性识别和切割的TALE-核酸酶,诸如在WO2012138927中描述的经工程化的TAL重复与I-TevI的催化结构域的融合。转录活化因子样效应物(TALE)是来自细菌种黄单胞菌属(Xanthomonas)的蛋白质,包含多个重复序列,每个重复包含位置12和13中对核酸靶向序列的每个核苷酸碱基具有特异性的二残基(RVD)。具有相似模块化逐碱基核酸结合性质(MBBBD)的结合结构域也可以来源于申请人最近在不同细菌种中发现的新模块化蛋白质。该新模块化蛋白质具有展现出比TAL重复序列更多的序列可变性的优势。在实施方案中,与识别不同核苷酸相关的RVD是用于识别C的HD;用于识别T的NG;用于识别A的NI;用于识别G或A的NN;用于识别A、C、G或T的NS;用于识别T的HG;用于识别T的IG;用于识别G的NK;用于识别C的HA;用于识别C的ND;用于识别C的HI;用于识别G的HN;用于识别G的NA;用于识别G或A的SN;和用于识别T的YG;用于识别A的TL;用于识别A或G的VT;以及用于识别A的SW。在一些实施方案中,可以使关键氨基酸12和13向其他氨基酸残基突变,以便调节它们对核苷酸A、T、C和G的特异性,并且增强这种特异性。TALEN试剂盒在商业上出售。

[0484] 在一些实施方案中,使用锌指核酸酶(ZFN)对细胞进行操作。“锌指结合蛋白”是一种由于通过锌离子的配位稳定蛋白质结构而例如以序列特异性方式结合DNA、RNA和/或蛋白质的蛋白质或多肽。术语锌指结合蛋白通常缩写为锌指蛋白或ZFP。单个DNA结合结构域通常被称为“指”。ZFP具有至少一个指,通常具有两个指、三个指或六个指。每个指结合两个至四个DNA碱基对,通常是三个或四个DNA碱基对。ZFP与被称为靶位点或靶区段的核酸序列结合。每个指通常包含一个约30个氨基酸的锌螯合DNA结合子结构域。研究表明,这类单个锌指由含有与锌配位的两个不变组氨酸残基的α螺旋以及单个β转角的两个半胱氨酸残基组成(参见,例如,Berg和Shi,Science 271:1081-1085(1996))。

[0485] 在一些实施方案中,使用归巢核酸内切酶来制备本文所述的细胞。此类归巢核酸内切酶是本领域众所周知的(Stoddard 2005)。归巢核酸内切酶识别DNA靶序列并生成单链或双链断裂。归巢核酸内切酶具有高度特异性,识别长度范围为12至45个碱基对(bp)的DNA

靶位点,通常长度范围为14bp至40bp。归巢核酸内切酶可以例如对应于LAGLIDADG核酸内切酶、HNH核酸内切酶或GIY-YIG核酸内切酶。在一些实施方案中,归巢核酸内切酶可以是I-CreI变体。

[0486] 在一些实施方案中,使用大范围核酸酶制备本文所述的细胞。按照定义,大范围核酸酶是识别大序列的序列特异性核酸内切酶(Chevalier,B.S.和B.L.Stoddard,Nucleic Acids Res.,2001,29,3757-3774)。它们可以切割活细胞中的独特位点,从而将切割位点附近的基因靶向增强1000倍或更多(Puchta等人,Nucleic Acids Res.,1993,21,5034-5040;Rouet等人,Mol.Cell.Biol.,1994,14,8096-8106;Choulika等人,Mol.Cell.Biol.,1995,15,1968-1973;Puchta等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,1996,93,5055-5060;Sargent等人,Mol.Cell.Biol.,1997,17,267-77;Donoho等人,Mol.Cell.Biol,1998,18,4070-4078;Elliott等人,Mol.Cell.Biol.,1998,18,93-101;Cohen-Tannoudji等人,Mol.Cell.Biol.,1998,18,1444-1448)。

[0487] 在一些实施方案中,通过使用RNA沉默或RNA干扰(RNAi)敲低(例如,降低、消除或抑制)多肽的表达来制备本文提供的细胞。有用的RNAi方法包括利用合成RNAi分子、短干扰RNA(siRNA)、PIWI相互作用NRA(piRNA)、短发夹RNA(shRNA)、微小RNA(miRNA)的方法以及本领域技术人员认可的其他瞬时敲低方法。包括序列特异性shRNA、siRNA、miRNA等的用于RNAi的试剂是可商购获得的。例如,可以通过RNA干扰敲低细胞中的靶多核苷酸(诸如上述的任一种,例如CIITA、B2M或NLRC5),该RNA干扰通过引入与靶多核苷酸的靶基序互补的抑制性核酸(诸如siRNA)到细胞中来进行。在一些实施方案中,可以通过将shRNA表达病毒转导到细胞中来敲低细胞中的靶多核苷酸(诸如上述的任一种,例如CIITA、B2M或NLRC5)。在一些实施方案中,采用RNA干扰来降低或抑制选自由CIITA、B2M和NLRC5组成的组的至少一种的表达。

[0488] 3.示例性靶多核苷酸和用于降低表达的方法

[0489] a.MHC I类分子

[0490] 在某些实施方案中,修饰通过靶向辅助链B2M来降低或消除(诸如敲除)一种或多种MHC I类分子(例如,编码一种或多种MHC I类分子的一种或多种MHC I类基因)的表达。在一些实施方案中,使用CRISPR/Cas系统进行修饰。通过降低或消除(诸如敲除)B2M的表达,阻断了一种或多种MHC I类分子的表面运输,并且此类细胞在植入到接受者受试者体内时表现出免疫耐受性。在一些实施方案中,该细胞被认为是低免疫原性的,例如,在施用后在接受者受试者或患者中是低免疫原性的。

[0491] 在一些实施方案中,本文提供的靶多核苷酸序列是B2M的变体。在一些实施方案中,靶多核苷酸序列是B2M的同源物。在一些实施方案中,靶多核苷酸序列是B2M的直向同源物。

[0492] 在一些实施方案中,B2M的表达的降低或消除会降低或消除以下MHC I类分子中的一种或多种的表达:HLA-A、HLA-B和HLA-C。

[0493] 在一些实施方案中,经工程化的细胞包含靶向B2M基因的修饰。在一些实施方案中,通过使用靶向核酸酶系统进行靶向B2M基因的修饰,该靶向核酸酶系统包括Cas蛋白或编码Cas蛋白的多核苷酸,以及至少一个用于特异性地靶向B2M基因的指导核糖核酸序列。在一些实施方案中,该至少一个用于特异性地靶向B2M基因的指导核糖核酸序列(例如,

gRNA靶向序列)选自由WO2016/183041(其公开内容以引用的方式整体并入本文中)的附录2或表15的SEQ ID NO:81240-85644组成的组。

[0494] 在一些实施方案中,将编码如本文所公开的多肽(例如,嵌合抗原受体、CD47或本文公开的另一种致耐受因子)的外源性核酸或转基因插入在B2M基因处。用于在B2M基因座处靶向插入的示例性转基因包括如第II.B节中所述的任何转基因。

[0495] 测试B2M基因是否已失活的测定是已知的并且在本文中有描述。在一些实施方案中,通过PCR得到的B2M基因的修饰和HLA-I表达的降低可以通过流式细胞术(诸如通过FACS分析)进行测定。在一些实施方案中,使用用针对B2M蛋白的抗体探测的细胞裂解物的蛋白质印迹来检测B2M蛋白表达。在一些实施方案中,使用逆转录酶聚合酶链式反应(RT-PCR)确认失活修饰的存在。

[0496] 在一些实施方案中,可以使用本领域已知的技术(例如,使用结合HLA复合物的经标记的抗体(例如,使用与人主要组织相容性HLA I类抗原的α链结合的可商购获得的HLA-A、B、C抗体)的FACS技术)测量经工程化的细胞中一种或多种MHC I类分子表达或功能(当细胞来源于人细胞时为HLA)的降低。另外,可以对细胞进行测试,以确认HLA I复合物不在细胞表面上表达。这可以通过使用如上文所讨论的针对一种或多种HLA细胞表面组分的抗体的FACS分析来测定。除了降低HLA I(或MHC I类)之外,本文提供的经工程化的细胞对巨噬细胞吞噬和NK细胞杀伤的敏感性也降低。下文进一步描述了测定经工程化的细胞的低免疫原性表型的方法。

[0497] b.MHC I类分子

[0498] 在某些方面,修饰通过靶向II类反式活化因子(CIITA)表达来降低或消除(诸如敲除)一种或多种MHC II类分子的表达。在一些实施方案中,使用CRISPR/Cas系统进行修饰。CIITA是LR或核苷酸结合结构域(NBD)富亮氨酸重复序列(LRR)蛋白家族的成员,并且通过与MHC增强体缔合来调控一种或多种MHC II类基因的转录。通过降低或消除(诸如敲除)CIITA的表达,一种或多种MHC II类分子的表达降低,从而也降低表面表达。在一些情况下,此类细胞在被植入到接受者受试者中时表现出免疫耐受性。在一些实施方案中,该细胞被认为是低免疫原性的,例如,在施用后在接受者受试者或患者中是低免疫原性的。

[0499] 在一些实施方案中,靶多核苷酸序列是CIITA的变体。在一些实施方案中,靶多核苷酸序列是CIITA的同源物。在一些实施方案中,靶多核苷酸序列是CIITA的直向同源物。

[0500] 在一些实施方案中,CIITA的表达的降低或消除会降低或消除以下MHC II类分子中的一种或多种的表达:HLA-DP、HLA-DM、HLA-DOA、HLA-DOB、HLA-DQ和HLA-DR。

[0501] 在一些实施方案中,经工程化的细胞包含靶向CIITA基因的修饰。在一些实施方案中,通过靶向核酸酶系统进行靶向CIITA基因的修饰,该靶向核酸酶系统包含Cas蛋白或编码Cas蛋白的多核苷酸,以及至少一个用于特异性地靶向CIITA基因的指导核糖核酸序列。在一些实施方案中,该至少一个用于特异性地靶向CIITA基因的指导核糖核酸序列(例如,gRNA靶向序列)选自由WO2016183041(其公开内容以引用的方式整体并入本文中)的附录1或表12的SEQ ID NO:5184-36352组成的组。

[0502] 在一些实施方案中,将编码如本文所公开的多肽(例如,嵌合抗原受体、CD47或本文公开的另一种致耐受因子)的外源性核酸或转基因插入在CIITA基因处。用于在B2M基因座处靶向插入的示例性转基因包括如第II.B节中所述的任何转基因。

[0503] 测试CIITA基因是否已失活的测定是已知的并且在本文中有描述。在一些实施方案中,通过PCR得到的CIITA基因的修饰和HLA-II表达的降低可以通过流式细胞术(诸如通过FACS分析)进行测定。在一些实施方案中,使用用针对CIITA蛋白的抗体探测的细胞裂解物的蛋白质印迹来检测CIITA蛋白表达。在一些实施方案中,使用逆转录酶聚合酶链式反应(RT-PCR)确认失活修饰的存在。

[0504] 在一些实施方案中,可以使用本领域已知的技术(诸如使用针对蛋白质的抗体的蛋白质印迹、FACS技术、RT-PCR技术等)来测量经工程化的细胞中一种或多种MHC II类分子表达或功能(当细胞来源于人细胞时,为HLA II)的降低。在一些实施方案中,可以测试经工程化的细胞以确认HLA II复合物不在细胞表面上表达。评估表面表达的方法包括本领域已知的方法(例如参见WO2018132783的图21)并且通常使用基于与人HLA II类HLA-DR、DP和大多数DQ抗原结合的商业抗体的蛋白质印迹或FACS分析进行。除了降低HLA II(或MHC II类)以外,本文提供的经工程化的细胞对巨噬细胞吞噬作用和NK细胞杀伤的易感性也降低。下文进一步描述了测定经工程化的细胞的低免疫原性表型的方法。

[0505] B.多核苷酸的过表达

[0506] 在一些实施方案中,本文提供的经工程化的细胞是经遗传修饰的或经工程化的,诸如通过将一种或多种修饰引入到细胞中以使期望多核苷酸在细胞中过表达。在一些实施方案中,待被修饰或工程化的细胞是先前未被引入一种或多种修饰的未经修饰的细胞或非经工程化的细胞。在一些实施方案中,本文提供的经工程化的细胞被遗传修饰为包含编码外源性蛋白的一种或多种外源性多核苷酸(也可与术语“转基因”互换使用)。如所描述的,在一些实施方案中,对细胞进行修饰以增加作为影响接受者中的免疫识别和致耐受的致耐受(例如,免疫)因子的某些基因的表达。在一些实施方案中,提供的经工程化的细胞(诸如T细胞或NK细胞)也表达嵌合抗原受体(CAR)。一种或多种多核苷酸,例如外源性多核苷酸,可与一种或多种遗传修饰一起在经工程化的细胞中表达(例如过表达),以降低上文第I.A节中描述的靶多核苷酸(诸如MHC I类和/或MHC II类分子)的表达。在一些实施方案中,提供的经工程化的细胞在施用于接受者受试者后不会触发或活化免疫反应。

[0507] 在一些实施方案中,经工程化的细胞包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个不同的过表达的多核苷酸。在一些实施方案中,经工程化的细胞包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个不同的过表达的多核苷酸。在一些实施方案中,过表达的多核苷酸是外源性多核苷酸。在一些实施方案中,经工程化的细胞包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个不同的外源性多核苷酸。在一些实施方案中,经工程化的细胞包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个不同的外源性多核苷酸。在一些实施方案中,该过表达的多核苷酸是在细胞中游离型地(episomally)表达的外源性多核苷酸。在一些实施方案中,该过表达的多核苷酸是插入或整合到经工程化的细胞的一个或多个基因组基因座中的外源性多核苷酸。

[0508] 在一些实施方案中,使用含有DNA靶向结构域和转录活化因子的融合蛋白来增加多核苷酸的表达,即使多核苷酸过表达。使用反式活化因子结构域增加表达的靶向方法是技术人员已知的。

[0509] 在一些实施方案中,经工程化的细胞含有一种或多种外源性多核苷酸,其中该一种或多种外源性多核苷酸通过非靶向插入方法(诸如通过使用慢病毒载体的转导)被插入或整合到细胞的基因组基因座中。在一些实施方案中,通过靶向插入方法(诸如通过使用同

源定向修复(HDR))将该一种或多种外源性多核苷酸插入或整合到细胞的基因组中。可以使用任何合适的方法通过HDR将外源性多核苷酸插入到经工程化的细胞的基因组基因座中,该方法包括本文所述的基因编辑方法(例如,CRISPR/Cas系统)。在一些实施方案中,将该一种或多种外源性多核苷酸插入到一个或多个基因组基因座,诸如本文所述的任何基因组基因座(例如表2)中。在一些实施方案中,将外源性多核苷酸插入到相同的基因组基因座中。在一些实施方案中,将外源性多核苷酸插入到不同的基因组基因座中。在一些实施方案中,将两种或更多种外源性多核苷酸插入到相同的基因组基因座,诸如本文所述的任何基因组基因座(例如表2)中。在一些实施方案中,将两种或更多种外源性多核苷酸插入到不同的基因组基因座,诸如本文所述的两种或更多种基因组基因座(例如,表2)中。

[0510] 在一些实施方案中,任何基因编辑技术都可以用于增加如所描述的一种或多种靶多核苷酸或靶蛋白的表达。在一些实施方案中,基因编辑技术可以包括涉及核酸酶、整合酶、转座酶、重组酶的系统。在一些实施方案中,基因编辑技术可以用于修饰以增加内源性基因活性(例如,通过修饰或活化可操作地连接至基因的启动子或增强子)。在一些实施方案中,基因编辑技术可以用于将DNA敲入或整合到基因组的区域中(例如,以引入编码靶多核苷酸或靶蛋白的构建体,诸如编码致耐受因子,或本文所述的用于增加经工程化的细胞中的表达的任何其他分子中的任一种的构建体)。在一些实施方案中,基因编辑技术介导单链断裂(SSB)。在一些实施方案中,基因编辑技术介导双链断裂(DSB),包括与非同源末端连接(NHEJ)或同源定向修复(HDR)有关的双链断裂。在一些实施方案中,基因编辑技术可以包括基于DNA的编辑或先导编辑。在一些实施方案中,基因编辑技术可以包括经由位点特异性靶向元件进行的可编程添加(PASTE)。示例性多核苷酸或过表达以及用于使其过表达的方法在以下小节中描述。

[0511] 1.致耐受因子

[0512] 在一些实施方案中,致耐受因子的表达在细胞中过表达或增加。应当理解,关于相对于致耐受因子的表达被修饰的细胞的实施方案可容易地应用于如本文所述的任何细胞类型,以及如本文所述的HIP细胞、CAR细胞、安全开关和其他经修饰的/经基因编辑的细胞。

[0513] 在一些实施方案中,经工程化的细胞包含至少一种致耐受因子的增加的表达,即过表达。在一些实施方案中,致耐受因子是促进或有助于促进或诱导免疫系统(例如,先天或适应性免疫系统)对经工程化的细胞的致耐受的任何因子。在一些实施方案中,致耐受因子是A20/TNFAIP3、B2M-HLA-E、CD16、CD16 Fc受体、CD24、CD27、CD35、CD39、CD46、CD47、CD52、CD55、CD59、CD64、CD200、CCL21、CCL22、CTLA4-Ig、C1抑制剂、CR1、DUX4、FASL、HLA-C、HLA-E、HLA-E重链、HLA-F、HLA-G、H2-M3、IDO1、IL-10、IL15-RF、IL-35、IL-39、MANF、Mfge8、PD-L1或Serpinb9。在一些实施方案中,致耐受因子是CD47、PD-L1、HLA-E或HLA-G、CCL21、FasL、Serpinb9、CD200或Mfge8,或其任何组合。在一些实施方案中,细胞包含至少一种外源性多核苷酸,该外源性多核苷酸包括编码致耐受因子的多核苷酸。例如,在一些实施方案中,该外源性多核苷酸中的至少一种是编码CD47的多核苷酸。本文提供了在施用于接受者受试者后不会触发或活化免疫反应的细胞。如上所述,在一些实施方案中,对细胞进行修饰以增加影响接受者中的免疫识别和致耐受的基因和致耐受(例如,免疫)因子的表达。

[0514] 在一些实施方案中,本公开提供了一种细胞或其群体,其已经被修饰为表达致耐受因子(例如,免疫调节多肽),诸如CD47。在一些实施方案中,本公开提供了一种用于改变

细胞基因组以表达致耐受因子(例如,免疫调节多肽)诸如CD47的方法。在一些实施方案中,经工程化的细胞表达外源性致耐受因子(例如免疫调节多肽),诸如外源性CD47。在一些情况下,外源性多核苷酸的过表达或增加外源性多核苷酸的表达是通过将包含编码人CD47多肽的核苷酸序列的表达载体引入到细胞中(例如,用包含编码人CD47多肽的核苷酸序列的表达载体转导细胞)来实现的。在一些实施方案中,表达载体可以是病毒载体(诸如慢病毒载体),或者可以是非病毒载体。在一些实施方案中,细胞被工程化为含有一种或多种外源性多核苷酸,其中该外源性多核苷酸中的至少一种包括编码致耐受因子的多核苷酸。在任何实施方案的一些中,致耐受因子是A20/TNFAIP3、B2M-HLA-E、CD16、CD16 Fc受体、CD24、CD27、CD35、CD39、CD46、CD47、CD52、CD55、CD59、CD64、CD200、CCL21、CCL22、CTLA4-Ig、C1抑制剂、CR1、DUX4、FASL、HLA-C、HLA-E、HLA-E重链、HLA-F、HLA-G、H2-M3、IDO1、IL-10、IL15-RF、IL-35、IL-39、MANF、Mfge8、PD-L1或Serpinb9。在一些实施方案中,致耐受因子选自CD47、PD-L1、HLA-E或HLA-G、CCL21、FasL、Serpinb9、CD200或Mfge8,或其任何组合。例如,在一些实施方案中,该外源性多核苷酸中的至少一种是编码CD47的多核苷酸。

[0515] 在一些实施方案中,致耐受因子是CD47。在一些实施方案中,经工程化的细胞含有编码CD47(诸如人CD47)的外源性多核苷酸。在一些实施方案中,CD47在该细胞中过表达。在一些实施方案中,与未用修饰工程化的相同细胞类型的类似细胞(诸如参考或未经修饰的细胞,例如未用编码CD47的外源性多核苷酸工程化的细胞)相比,CD47的表达在经工程化的细胞中过表达或增加。CD47是白细胞表面抗原,并且在细胞粘附和整联蛋白调节中发挥作用。它通常在细胞表面上表达,并且向循环巨噬细胞发出不要吃掉该细胞的信号。关于人CD47的有用基因组、多核苷酸和多肽信息提供于例如NP_001768.1、NP_942088.1、NM_001777.3和NM_198793.2中。

[0516] 在一些实施方案中,经工程化的细胞包含至少一种致耐受因子的增加的表达,即过表达。在一些实施方案中,该细胞包含至少一种外源性多核苷酸,该外源性多核苷酸包括编码致耐受因子的多核苷酸。在一些实施方案中,致耐受因子包括A20/TNFAIP3、B2M-HLA-E、CD16、CD16 Fc受体、CD24、CD27、CD35、CD39、CD46、CD47、CD52、CD55、CD59、CD64、CD200、CCL21、CCL22、CTLA4-Ig、C1抑制剂、CR1、DUX4、FASL、HLA-C、HLA-E、HLA-E重链、HLA-F、HLA-G、H2-M3、IDO1、IL-10、IL15-RF、IL-35、IL-39、MANF、Mfge8、PD-L1、Serpinb9,或其任何组合。例如,在一些实施方案中,过表达(例如,外源性)的多核苷酸中的至少一种是编码CD47的多核苷酸。

[0517] 在一些实施方案中,本公开提供了一种细胞或其群体,其已经被修饰为表达致耐受因子(例如,免疫调节多肽),诸如CD47。在一些实施方案中,本公开提供了一种用于改变细胞基因组以表达致耐受因子(例如,免疫调节多肽)诸如CD47的方法。在一些实施方案中,经工程化的细胞表达外源性致耐受因子(例如免疫调节多肽),诸如外源性CD47。在一些情况下,细胞表达表达载体,该表达载体包含编码人CD47多肽的核苷酸序列。

[0518] 在一些实施方案中,经工程化的细胞含有编码CD47(诸如人CD47)的过表达的多核苷酸。在一些实施方案中,经工程化的细胞含有编码CD47(诸如人CD47)的外源性多核苷酸。在一些实施方案中,CD47在该细胞中过表达。在一些实施方案中,与类似的参考或未经修饰的细胞(包括具有任何其他修饰的细胞)(只不过该参考或未经修饰的细胞不包含编码CD47的外源性多核苷酸)相比,经工程化的细胞中CD47的表达增加。CD47是白细胞表面抗原,并

且在细胞粘附和整联蛋白调节中发挥作用。它通常在细胞表面上表达,并且向循环巨噬细胞发出不要吃掉该细胞的信号。关于人CD47的有用基因组、多核苷酸和多肽信息提供于例如NP_001768.1、NP_942088.1、NM_001777.3和NM_198793.2中。

[0519] 在一些实施方案中,本文概述的细胞包含编码与如NCBI参考序列编号NP_001768.1和NP_942088.1中所示的氨基酸序列具有至少95%序列同一性(例如,95%、96%、97%、98%、99%或更多)的CD47多肽的外源性核苷酸序列。在一些实施方案中,本文概述的细胞包含编码具有如NCBI参考序列编号NP_001768.1和NP_942088.1中所示的氨基酸序列的CD47多肽的外源性核苷酸序列。在一些实施方案中,该细胞包含与NCBI参考编号NNM_001777.3和NM_198793.2中所示的序列具有至少85%序列同一性(例如,85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性)的CD47的外源性核苷酸序列。在一些实施方案中,该细胞包含如NCBI参考序列编号NM_001777.3和NM_198793.2中所示的CD47的外源性核苷酸序列。

[0520] 在一些实施方案中,本文概述的细胞包含编码与如NCBI参考序列编号NP_001768.1和NP_942088.1中所示的氨基酸序列具有至少95%序列同一性(例如,95%、96%、97%、98%、99%或更多)的CD47多肽的外源性核苷酸序列。在一些实施方案中,本文概述的细胞包含编码具有如NCBI参考序列编号NP_001768.1和NP_942088.1中所示的氨基酸序列的CD47多肽的外源性核苷酸序列。在一些实施方案中,该细胞包含与NCBI参考编号NNM_001777.3和NM_198793.2中所示的序列具有至少85%序列同一性(例如,85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性)的CD47的外源性核苷酸序列。在一些实施方案中,该细胞包含如NCBI参考序列编号NM_001777.3和NM_198793.2中所示的CD47的外源性核苷酸序列。

[0521] 在一些实施方案中,该细胞包含与如NCBI参考序列编号NP_001768.1和NP_942088.1中所示的氨基酸序列具有至少95%序列同一性(例如,95%、96%、97%、98%、99%或更多)的外源性CD47多肽。在一些实施方案中,本文概述的细胞包含具有如NCBI参考序列编号NP_001768.1和NP_942088.1中所示的氨基酸序列的外源性CD47多肽。

[0522] 在一些实施方案中,该细胞包含编码与如SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列具有至少95%序列同一性(例如,95%、96%、97%、98%、99%或更高)的CD47多肽的过表达的多核苷酸。在一些实施方案中,该细胞包含编码与如SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列具有至少95%序列同一性(例如,95%、96%、97%、98%、99%或更高)的CD47多肽的外源性多核苷酸。在一些实施方案中,该细胞包含编码具有如SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列的CD47多肽的过表达的多核苷酸。在一些实施方案中,该细胞包含编码具有如SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列的CD47多肽的外源性多核苷酸。

[0523] 在一些实施方案中,该细胞包含与如SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列具有至少95%序列同一性(例如,95%、96%、97%、98%、99%或更多)的过表达的CD47多肽。在一些实施方案中,该细胞包含与如SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列具有至少95%序列同一性(例如,95%、96%、97%、98%、99%或更多)的外源性CD47多肽。在一些实施方案中,该细胞包含具有如SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列的过表达的CD47多肽。在一些实施方案中,该细胞包含具有如SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列的外源性CD47多肽。在一些实施方案中,编码CD47的外源性多核苷酸通过靶向或非靶向插入方法整合到细胞的基因组中,如下面进

一步描述的。在一些实施方案中,靶向插入是通过同源依赖性插入到靶基因座中,诸如通过插入到表2中描绘的基因座中的任何一个基因座(例如B2M基因、CIITA基因、TRAC基因、TRBC基因)中进行的。在一些实施方案中,靶向插入是通过同源非依赖性插入,诸如通过插入到安全港基因座中进行的。在一些情况下,将编码CD47的多核苷酸插入到安全港基因座(诸如但不限于选自AAVS1、CCR5、CLYBL、ROSA26和SHS231的基因座)中。在实施方案中,将编码CD47的多核苷酸插入到CCR5基因座、PPP1R12C(也称为AAVS1)基因座或CLYBL基因座中。

[0524] 在一些实施方案中,CD47的全部或功能部分可以连接至其他组分,诸如信号肽、前导序列、分泌信号、标记(例如,报告基因)或其任何组合。在一些实施方案中,编码CD47的信号肽的核酸序列被编码来自异源蛋白质的信号肽的核酸序列替换。异源蛋白质可以是例如CD8α、CD28、组织纤溶酶原活化子(tPA)、生长激素、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、GM-CSF受体(GM-CSFRa)或免疫球蛋白(例如,IgE或IgK)。在一些实施方案中,信号肽是来自免疫球蛋白(诸如IgG重链或IgG-κ轻链)、细胞因子(诸如白细胞介素-2(IL-2)或CD33)、血清白蛋白(例如HSA或白蛋白)、人天青素前蛋白信号序列、荧光素酶、胰蛋白酶原(例如胰凝乳蛋白酶原或胰蛋白酶原)的信号肽或能够通过细胞或在细胞上有效表达蛋白质的其他信号肽。

[0525] 在某些实施方案中,编码CD47的外源性多核苷酸可操作地连接至启动子。

[0526] 在一些实施方案中,将编码CD47的外源性多核苷酸插入到表2中所描绘的基因座中的任一个基因座中。在一些情况下,将编码CD47的外源性多核苷酸插入到安全港基因座(诸如但不限于选自AAVS1、CCR5、CLYBL、ROSA26和SHS231的基因座中)。在实施方案中,将编码CD47的外源性多核苷酸插入到CCR5基因座、PPP1R12C(也称为AAVS1)基因座或CLYBL基因座中。在一些实施方案中,将编码CD47的外源性多核苷酸插入到B2M基因座或CIITA基因座中。在一些实施方案中,经工程化的细胞是T细胞,并且将编码CD47的外源性多核苷酸插入到TRAC基因座或TRBC基因座中。在一些实施方案中,使用合适的基因编辑系统(例如,CRISPR/Cas系统或本文所述的基因编辑系统中的任何基因编辑系统)来促进将编码CD47的多核苷酸插入到细胞的基因组基因座中。

[0527] 在一些实施方案中,使用用针对CD47蛋白的抗体探测的细胞裂解物的蛋白质印迹检测CD47蛋白表达。在一些实施方案中,使用逆转录酶聚合酶链式反应(RT-PCR)确认外源性CD47 mRNA的存在。

[0528] 在一些实施方案中,经工程化的细胞含有编码CD200(诸如人CD200)的外源性多核苷酸。在一些实施方案中,CD200在该细胞中过表达。在一些实施方案中,与类似的参考或未经修饰的细胞(包括具有任何其他修饰的细胞)(只不过该参考或未经修饰的细胞不包含编码CD200的外源性多核苷酸)相比,经工程化的细胞中CD200的表达增加。关于人CD200的有用基因组、多核苷酸和多肽信息提供于例如GeneCard标识符GC03P112332、HGNC编号7203、NCBI Gene ID 4345、Uniprot编号P41217以及NCBI RefSeq编号NP_001004196.2、NM_001004196.3、NP_001305757.1、NM_001318828.1、NP_005935.4、NM_005944.6、XP_005247539.1和XM_005247482.2中。在某些实施方案中,编码CD200的多核苷酸可操作地连接至启动子。

[0529] 在一些实施方案中,将编码CD200的多核苷酸插入到表2中所描绘的基因座中的任一个基因座中。在一些情况下,将编码CD200的多核苷酸插入到安全港基因座(诸如但不限

于选自AAVS1(也称为PPP1R12C)、ABO、CCR5、CLYBL、CXCR4、F3(也称为CD142)、FUT1、HMGB1、KDM5D、LRP1(也称为CD91)、MICA、MICB、RHD、ROSA26和SHS231基因座的基因座)中。在实施方案中,将编码CD200的多核苷酸插入到CCR5基因座、PPP1R12C(也称为AAVS1)基因座或CLYBL基因座中。在一些实施方案中,将编码CD200的多核苷酸插入到B2M基因座或CIITA基因座中。在一些实施方案中,经工程化的细胞是T细胞,并且将编码CD200的多核苷酸插入到TRAC基因座或TRBC基因座中。在一些实施方案中,使用合适的基因编辑系统(例如,CRISPR/Cas系统或本文所述的基因编辑系统中的任何基因编辑系统)来促进将编码CD200的多核苷酸插入到细胞的基因组基因座中。

[0530] 在一些实施方案中,使用用针对CD200蛋白的抗体探测的细胞裂解物的蛋白质印迹检测CD200蛋白表达。在一些实施方案中,使用逆转录酶聚合酶链式反应(RT-PCR)确认外源性CD200 mRNA的存在。

[0531] 在一些实施方案中,经工程化的细胞含有编码HLA-E(诸如人HLA-E)的外源性多核苷酸。在一些实施方案中,HLA-E在该细胞中过表达。在一些实施方案中,与类似的参考或未经修饰的细胞(包括具有任何其他修饰的细胞)(只不过该参考或未经修饰的细胞不包含编码HLA-E的外源性多核苷酸)相比,经工程化的细胞中HLA-E的表达增加。关于人HLA-E的有用基因组、多核苷酸和多肽信息提供于例如GeneCard标识符GC06P047281、HGNC No.4962、NCBI Gene ID 3133、Uniprot No.P13747以及NCBI RefSeq No.NP_005507.3和NM_005516.5中。在某些实施方案中,编码HLA-E的多核苷酸可操作地连接至启动子。

[0532] 在一些实施方案中,编码HLA-E的多核苷酸被插入到表2中所描绘的基因座中的任一个基因座中。在一些情况下,将编码HLA-E的多核苷酸插入到安全港基因座(诸如但不限于选自AAVS1(也称为PPP1R12C)、ABO、CCR5、CLYBL、CXCR4、F3(也称为CD142)、FUT1、HMGB1、KDM5D、LRP1(也称为CD91)、MICA、MICB、RHD、ROSA26和SHS231基因座的基因座)中。在实施方案中,将编码HLA-E的多核苷酸插入到CCR5基因座、PPP1R12C(也称为AAVS1)基因座或CLYBL基因座中。在一些实施方案中,将编码HLA-E的多核苷酸插入到B2M基因座或CIITA基因座中。在一些实施方案中,经工程化的细胞是T细胞,并且将编码HLA-E的多核苷酸插入TRAC基因座或TRBC基因座中。在一些实施方案中,使用合适的基因编辑系统(例如,CRISPR/Cas系统或本文所述的基因编辑系统中的任何基因编辑系统)来促进将编码HLA-E的多核苷酸插入到细胞的基因组基因座中。

[0533] 在一些实施方案中,使用用针对HLA-E蛋白的抗体探测的细胞裂解物的蛋白质印迹检测HLA-E蛋白表达。在一些实施方案中,使用逆转录酶聚合酶链式反应(RT-PCR)确认外源性HLA-E mRNA的存在。

[0534] 在一些实施方案中,经工程化的细胞含有编码HLA-G(诸如人HLA-G)的外源性多核苷酸。在一些实施方案中,HLA-G在该细胞中过表达。在一些实施方案中,与类似的参考或未经修饰的细胞(包括具有任何其他修饰的细胞)(只不过该参考或未经修饰的细胞不包含编码HLA-G的外源性多核苷酸)相比,经工程化的细胞中HLA-G的表达增加。关于人HLA-G的有用基因组、多核苷酸和多肽信息提供于例如GeneCard标识符GC06P047256、HGNC编号4964、NCBI Gene ID 3135、Uniprot编号P17693以及NCBI RefSeq编号NP_002118.1和NM_002127.5中。在某些实施方案中,编码HLA-G的多核苷酸可操作地连接至启动子。

[0535] 在一些实施方案中,将编码HLA-G的多核苷酸插入到表2中所描绘的基因座中的任

一个基因座中。在一些情况下,将编码HLA-G的多核苷酸插入到安全港基因座(诸如但不限于选自AAVS1(也称为PPP1R12C)、ABO、CCR5、CLYBL、CXCR4、F3(也称为CD142)、FUT1、HMGB1、KDM5D、LRP1(也称为CD91)、MICA、MICB、RHD、ROSA26和SHS231基因座的基因座)中。在实施方案中,将编码HLA-G的多核苷酸插入到CCR5基因座、PPP1R12C(也称为AAVS1)基因座或CLYBL基因座中。在一些实施方案中,将编码HLA-G的多核苷酸插入到B2M基因座或CIITA基因座中。在一些实施方案中,经工程化的细胞是T细胞,并且将编码HLA-G的多核苷酸插入到TRAC基因座或TRBC基因座中。在一些实施方案中,使用合适的基因编辑系统(例如,CRISPR/Cas系统或本文所述的基因编辑系统中的任何基因编辑系统)来促进将编码HLA-G的多核苷酸插入到细胞的基因组基因座中。

[0536] 在一些实施方案中,使用用针对HLA-G蛋白的抗体探测的细胞裂解物的蛋白质印迹检测HLA-G蛋白表达。在一些实施方案中,使用逆转录酶聚合酶链式反应(RT-PCR)确认外源性HLA-G mRNA的存在。

[0537] 在一些实施方案中,经工程化的细胞含有编码PD-L1(诸如人PD-L1)的外源性多核苷酸。在一些实施方案中,PD-L1在该细胞中过表达。在一些实施方案中,与类似的参考或未经修饰的细胞(包括具有任何其他修饰的细胞)(只不过该参考或未经修饰的细胞不包含编码PD-L1的外源性多核苷酸)相比,经工程化的细胞中PD-L1的表达增加。关于人PD-L1或CD274的有用基因组、多核苷酸和多肽信息提供于例如GeneCard标识符GC09P005450、HGNC编号17635、NCBI Gene ID 29126、Uniprot编号Q9NZQ7以及NCBI RefSeq编号NP_001254635.1、NM_001267706.1、NP_054862.1和NM_014143.3中。在某些实施方案中,编码PD-L1的多核苷酸可操作地连接至启动子。

[0538] 在一些实施方案中,将编码PD-L1的多核苷酸插入到表2中所描绘的基因座中的任一个基因座中。在一些情况下,将编码PD-L1的多核苷酸插入到安全港基因座(诸如但不限于选自AAVS1(也称为PPP1R12C)、ABO、CCR5、CLYBL、CXCR4、F3(也称为CD142)、FUT1、HMGB1、KDM5D、LRP1(也称为CD91)、MICA、MICB、RHD、ROSA26和SHS231基因座的基因座)中。在实施方案中,将编码PD-L1的多核苷酸插入到CCR5基因座、PPP1R12C(也称为AAVS1)基因座或CLYBL基因座中。在一些实施方案中,将编码PD-L1的多核苷酸插入到B2M基因座或CIITA基因座中。在一些实施方案中,经工程化的细胞是T细胞,并且将编码PD-L1的多核苷酸插入到TRAC基因座或TRBC基因座中。在一些实施方案中,使用合适的基因编辑系统(例如,CRISPR/Cas系统或本文所述的基因编辑系统中的任何基因编辑系统)来促进将编码PD-L1的多核苷酸插入到细胞的基因组基因座中。

[0539] 在一些实施方案中,使用用针对PD-L1蛋白的抗体探测的细胞裂解物的蛋白质印迹检测PD-L1蛋白表达。在一些实施方案中,使用逆转录酶聚合酶链式反应(RT-PCR)确认外源性PD-L1 mRNA的存在。

[0540] 在一些实施方案中,经工程化的细胞含有编码FasL(诸如人FasL)的外源性多核苷酸。在一些实施方案中,FasL在该细胞中过表达。在一些实施方案中,与类似的参考或未经修饰的细胞(包括具有任何其他修饰的细胞)(只不过该参考或未经修饰的细胞不包含编码FasL的外源性多核苷酸)相比,经工程化的细胞中FasL的表达增加。关于人Fas配体(其也被称为FasL、FASLG、CD178、TNFSF6等)的有用基因组、多核苷酸和多肽信息提供于例如GeneCard标识符GC01P172628、HGNC编号11936、NCBI Gene ID 356、Uniprot编号P48023以

及NCBI RefSeq编号NP_000630.1、NM_000639.2、NP_001289675.1和NM_001302746.1中。在某些实施方案中,编码Fas-L的多核苷酸可操作地连接至启动子。

[0541] 在一些实施方案中,将编码Fas-L的多核苷酸插入到表2中所描绘的基因座中的任一个基因座中。在一些情况下,将编码Fas-L的多核苷酸插入到安全港基因座(诸如但不限于选自AAVS1(也称为PPP1R12C)、ABO、CCR5、CLYBL、CXCR4、F3(也称为CD142)、FUT1、HMGB1、KDM5D、LRP1(也称为CD91)、MICA、MICB、RHD、ROSA26和SHS231基因座的基因座)中。在实施方案中,将编码Fas-L的多核苷酸插入到CCR5基因座、PPP1R12C(也称为AAVS1)基因座或CLYBL基因座中。在一些实施方案中,将编码Fas-L的多核苷酸插入到B2M基因座或CIITA基因座中。在一些实施方案中,经工程化的细胞是T细胞,并且将编码Fas-L的多核苷酸插入到TRAC基因座或TRBC基因座中。在一些实施方案中,使用合适的基因编辑系统(例如,CRISPR/Cas系统或本文所述的基因编辑系统中的任何基因编辑系统)来促进将编码Fas-L的多核苷酸插入到细胞的基因组基因座中。

[0542] 在一些实施方案中,使用用针对Fas-L蛋白的抗体探测的细胞裂解物的蛋白质印迹检测Fas-L蛋白表达。在一些实施方案中,使用逆转录酶聚合酶链式反应(RT-PCR)确认外源性Fas-L mRNA的存在。

[0543] 在一些实施方案中,经工程化的细胞含有编码CCL21(诸如人CCL21)的外源性多核苷酸。在一些实施方案中,CCL21在该细胞中过表达。在一些实施方案中,与类似的参考或未经修饰的细胞(包括具有任何其他修饰的细胞)(只不过该参考或未经修饰的细胞不包含编码CCL21的外源性多核苷酸)相比,经工程化的细胞中CCL21的表达增加。关于人CCL21的有用基因组、多核苷酸和多肽信息提供于例如GeneCard标识符GC09M034709、HGNC编号10620、NCBI Gene ID 6366、Uniprot编号O00585以及NCBI RefSeq编号NP_002980.1和NM_002989.3中。在某些实施方案中,编码CCL21的多核苷酸可操作地连接至启动子。

[0544] 在一些实施方案中,编码CCL21的多核苷酸被插入到表2中所描绘的基因座中的任一个基因座中。在一些情况下,将编码CCL21的多核苷酸插入到安全港基因座(诸如但不限于选自AAVS1(也称为PPP1R12C)、ABO、CCR5、CLYBL、CXCR4、F3(也称为CD142)、FUT1、HMGB1、KDM5D、LRP1(也称为CD91)、MICA、MICB、RHD、ROSA26和SHS231基因座的基因座)中。在实施方案中,将编码CCL21的多核苷酸插入到CCR5基因座、PPP1R12C(也称为AAVS1)基因座或CLYBL基因座中。在一些实施方案中,将编码CCL21的多核苷酸插入到B2M基因座或CIITA基因座中。在一些实施方案中,经工程化的细胞是T细胞,并且将编码CCL21的多核苷酸插入到TRAC基因座或TRBC基因座中。在一些实施方案中,使用合适的基因编辑系统(例如,CRISPR/Cas系统或本文所述的基因编辑系统中的任何基因编辑系统)来促进将编码CCL21的多核苷酸插入到细胞的基因组基因座中。

[0545] 在一些实施方案中,使用用针对CCL21蛋白的抗体探测的细胞裂解物的蛋白质印迹检测CCL21蛋白表达。在一些实施方案中,使用逆转录酶聚合酶链式反应(RT-PCR)确认外源性CCL21 mRNA的存在。

[0546] 在一些实施方案中,经工程化的细胞含有编码CCL22(诸如人CCL22)的外源性多核苷酸。在一些实施方案中,CCL22在该细胞中过表达。在一些实施方案中,与类似的参考或未经修饰的细胞(包括具有任何其他修饰的细胞)(只不过该参考或未经修饰的细胞不包含编码CCL22的外源性多核苷酸)相比,经工程化的细胞中CCL22的表达增加。关于人CCL22的有

用基因组、多核苷酸和多肽信息提供于例如GeneCard标识符GC16P057359、HGNC编号10621、NCBI Gene ID 6367、Uniprot编号O00626以及NCBI RefSeq编号NP_002981.2、NM_002990.4、XP_016879020.1和XM_017023531.1中。在某些实施方案中,编码CCL22的多核苷酸可操作地连接至启动子。

[0547] 在一些实施方案中,将编码CCL22的多核苷酸插入到表2中所描绘的基因座中的任一个基因座中。在一些情况下,将编码CCL22的多核苷酸插入到安全港基因座(诸如但不限于选自AAVS1(也称为PPP1R12C)、ABO、CCR5、CLYBL、CXCR4、F3(也称为CD142)、FUT1、HMGB1、KDM5D、LRP1(也称为CD91)、MICA、MICB、RHD、ROSA26和SHS231基因座的基因座)中。在实施方案中,将编码CCL22的多核苷酸插入到CCR5基因座、PPP1R12C(也称为AAVS1)基因座或CLYBL基因座中。在一些实施方案中,将编码CCL22的多核苷酸插入到B2M基因座或CIITA基因座中。在一些实施方案中,经工程化的细胞是T细胞,并且将编码CCL22的多核苷酸插入到TRAC基因座或TRBC基因座中。在一些实施方案中,使用合适的基因编辑系统(例如,CRISPR/Cas系统或本文所述的基因编辑系统中的任何基因编辑系统)来促进将编码CCL22的多核苷酸插入到细胞的基因组基因座中。

[0548] 在一些实施方案中,使用用针对CCL22蛋白的抗体探测的细胞裂解物的蛋白质印迹检测CCL22蛋白表达。在一些实施方案中,使用逆转录酶聚合酶链式反应(RT-PCR)确认外源性CCL22 mRNA的存在。

[0549] 在一些实施方案中,经工程化的细胞含有编码Mfge8(诸如人Mfg e8)的外源性多核苷酸。在一些实施方案中,Mfge8在该细胞中过表达。在一些实施方案中,与类似的参考或未经修饰的细胞(包括具有任何其他修饰的细胞)(只不过该参考或未经修饰的细胞不包含编码Mfge8的外源性多核苷酸)相比,经工程化的细胞中Mfge8的表达增加。关于人Mfge8的有用基因组、多核苷酸和多肽信息提供于例如GeneCard标识符GC15M088898、HGNC编号7036、NCBI基因ID 4240、Uniprot编号Q08431,以及NCBI RefSeq编号NP_001108086.1、NM_001114614.2、NP_001297248.1、NM_001310319.1、NP_001297249.1、NM_001310320.1、NP_001297250.1、NM_001310321.1、NP_005919.2和NM_005928.3中。在某些实施方案中,编码Mfge8的多核苷酸可操作地连接至启动子。

[0550] 在一些实施方案中,将编码Mfge8的多核苷酸插入到表2中所描绘的基因座中的任一个基因座中。在一些情况下,将编码Mfge8的多核苷酸插入到安全港基因座(诸如但不限于选自AAVS1(也称为PPP1R12C)、ABO、CCR5、CLYBL、CXCR4、F3(也称为CD142)、FUT1、HMGB1、KDM5D、LRP1(也称为CD91)、MICA、MICB、RHD、ROSA26和SHS231基因座的基因座)中。在实施方案中,将编码Mfge8的多核苷酸插入到CCR5基因座、PPP1R12C(也称为AAVS1)基因座或CLYBL基因座中。在一些实施方案中,将编码Mfge8的多核苷酸插入到B2M基因座或CIITA基因座中。在一些实施方案中,经工程化的细胞是T细胞,并且将编码Mfge8的多核苷酸插入到TRAC基因座或TRBC基因座中。在一些实施方案中,使用合适的基因编辑系统(例如,CRISPR/Cas系统或本文所述的基因编辑系统中的任何基因编辑系统)来促进将编码Mfge8的多核苷酸插入到细胞的基因组基因座中。

[0551] 在一些实施方案中,使用用针对Mfge8蛋白的抗体探测的细胞裂解物的蛋白质印迹检测Mfge8蛋白表达。在一些实施方案中,使用逆转录酶聚合酶链式反应(RT-PCR)确认外源性Mfge8 mRNA的存在。

[0552] 在一些实施方案中,经工程化的细胞含有编码SerpinB9(诸如人SerpinB9)的外源性多核苷酸。在一些实施方案中,SerpinB9在该细胞中过表达。在一些实施方案中,与类似的参考或未经修饰的细胞(包括具有任何其他修饰的细胞)(只不过该参考或未经修饰的细胞不包含编码SerpinB9的外源性多核苷酸)相比,经工程化的细胞中SerpinB9的表达增加。关于人SerpinB9的有用基因组、多核苷酸和多肽信息提供于例如GeneCard标识符GC06M002887、HGNC编号8955、NCBI Gene ID 5272、Uniprot编号P50453以及NCBI RefSeq编号NP_004146.1、NM_004155.5、XP_005249241.1和XM_005249184.4中。在某些实施方案中,编码SerpinB9的多核苷酸可操作地连接至启动子。

[0553] 在一些实施方案中,将编码SerpinB9的多核苷酸插入到表2中所描绘的基因座中的任一个基因座中。在一些情况下,将编码SerpinB9的多核苷酸插入到安全港基因座(诸如但不限于选自AAVS1(也称为PPP1R12C)、ABO、CCR5、CLYBL、CXCR4、F3(也称为CD142)、FUT1、HMGB1、KDM5D、LRP1(也称为CD91)、MICA、MICB、RHD、ROSA26和SHS231基因座的基因座)中。在实施方案中,将编码SerpinB9的多核苷酸插入到CCR5基因座、PPP1R12C(也称为AAVS1)基因座或CLYBL基因座中。在一些实施方案中,将编码SerpinB9的多核苷酸插入到B2M基因座或CIITA基因座中。在一些实施方案中,经工程化的细胞是T细胞,并且将编码SerpinB9的多核苷酸插入到TRAC基因座或TRBC基因座中。在一些实施方案中,使用合适的基因编辑系统(例如,CRISPR/Cas系统或本文所述的基因编辑系统中的任何基因编辑系统)来促进将编码SerpinB9的多核苷酸插入到细胞的基因组基因座中。

[0554] 在一些实施方案中,使用用针对SerpinB9蛋白的抗体探测的细胞裂解物的蛋白质印迹检测SerpinB9蛋白表达。在一些实施方案中,使用逆转录酶聚合酶链式反应(RT-PCR)确认外源性SerpinB9 mRNA的存在。

[0555] 2.嵌合抗原受体

[0556] 在一些实施方案中,提供的经工程化的细胞被进一步修饰为表达嵌合抗原受体(CAR)。应当理解,关于CAR修饰的细胞的实施方案可容易地应用于如本文所述的任何合适的细胞类型,以及如本文所述的HIP细胞、安全开关和其他经修饰的/经基因编辑的细胞。

[0557] 在一些实施方案中,所提供的细胞含有一种或多种靶多核苷酸序列的调控一种或多种MHC I类分子、一种或多种MHC II类分子,或一种或多种MHC I类分子和一种或多种MHC II类分子的表达的遗传修饰,过表达如本文所述的致耐受因子(例如CD47),并表达CAR。在一些实施方案中,该细胞是这样一种细胞,其中:B2M被降低或消除(例如敲除),CIITA被降低或消除(例如敲除),CD47被过表达,并且CAR被表达。在一些实施方案中,该细胞为$B2M^{-/-}$、$CIITA^{-/-}$、CD47tg、CAR+。在一些实施方案中,该细胞(例如T细胞)另外可以是其中TRAC被降低或被消除(例如敲除)的细胞。在一些实施方案中,细胞为$B2^{-/-}$、CIITA、CD47tg、$TRAC^{-/-}$CAR+。

[0558] 在一些实施方案中,将编码CAR的多核苷酸引入到细胞中。在一些实施方案中,该细胞是T细胞,诸如原代T细胞或从多能细胞(例如iPSC)分化而来的T细胞。在一些实施方案中,该细胞是自然杀伤(NK)细胞,诸如原代NK细胞或从多能细胞(例如iPSC)分化而来的NK细胞。

[0559] 在一些实施方案中,CAR选自由第一代CAR、第二代CAR、第三代CAR和第四代CAR组成的组。在一些实施方案中,CAR是或者包括包含抗原结合结构域、跨膜结构域和至少一个

信号传导结构域(例如,一个、两个或三个信号传导结构域)的第一代CAR。在一些实施方案中,CAR包括包含抗原结合结构域、跨膜结构域和至少两个信号传导结构域的第二代CAR。在一些实施方案中,CAR包括包含抗原结合结构域、跨膜结构域和至少三个信号传导结构域的第三代CAR。在一些实施方案中,第四代CAR包含抗原结合结构域、跨膜结构域、三个或四个信号传导结构域和在CAR成功信号传导后诱导细胞因子基因表达的结构域。在一些实施方案中,抗原结合结构域是或者包含抗体、抗体片段、scFv或Fab。

[0560] 在一些实施方案中,本文所述的细胞中的任一种细胞包含编码CAR或第一代CAR的核酸。在一些实施方案中,第一代CAR包含一个抗原结合结构域、一个跨膜结构域和信号传导结构域。在一些实施方案中,信号传导结构域在T细胞活化过程中介导下游信号传导。

[0561] 在一些实施方案中,本文所述的细胞中的任一种细胞包含编码CAR或第二代CAR的核酸。在一些实施方案中,第二代CAR包含一个抗原结合结构域、一个跨膜结构域和两个信号传导结构域。在一些实施方案中,信号传导结构域在T细胞活化过程中介导下游信号传导。在一些实施方案中,信号传导结构域是共刺激结构域。在一些实施方案中,共刺激结构域增强T细胞活化过程中的细胞因子产生、CAR-T细胞增殖和/或CAR-T细胞持续存在。

[0562] 在一些实施方案中,本文所述的细胞中的任一种细胞包含编码CAR或第三代CAR的核酸。在一些实施方案中,第三代CAR包含一个抗原结合结构域、一个跨膜结构域和至少三个信号传导结构域。在一些实施方案中,信号传导结构域在T细胞活化过程中介导下游信号传导。在一些实施方案中,信号传导结构域是共刺激结构域。在一些实施方案中,共刺激结构域增强T细胞活化过程中的细胞因子产生、CAR-T细胞增殖和或CAR-T细胞持续存在。在一些实施方案中,第三代CAR包含至少两个共刺激结构域。在一些实施方案中,该至少两个共刺激结构域不同。

[0563] 在一些实施方案中,本文所述的细胞中的任一种细胞包含编码CAR或第四代CAR的核酸。在一些实施方案中,第四代CAR包含一个抗原结合结构域、一个跨膜结构域和至少两个、三个或四个信号传导结构域。在一些实施方案中,信号传导结构域在T细胞活化过程中介导下游信号传导。在一些实施方案中,信号传导结构域是共刺激结构域。在一些实施方案中,共刺激结构域增强T细胞活化过程中的细胞因子产生、CAR-T细胞增殖和或CAR-T细胞持续存在。

[0564] 在一些实施方案中,本文提供的经工程化的细胞(例如原代或iPSC来源的T细胞或原代或iPSC来源的NK细胞)包含编码CAR的多核苷酸,其中将该多核苷酸插入到基因组基因座中。在一些实施方案中,将多核苷酸插入到安全港基因座(诸如但不限于AAVS1、CCR5、CLYBL、ROSA26、SHS231、F3(也称为CD142)、MICA、MICB、LRP1(也称为CD91)、HMGB1、ABO、RHD、FUT1或KDM5D基因座)中。在一些实施方案中,将多核苷酸插入到B2M、CIITA、TRAC、TRB、PD1或CTLA4基因中。可以使用任何合适的方法将CAR插入到低免疫原性细胞的基因组基因座中,该方法包括本文所述的基因编辑方法(例如,CRISPR/Cas系统)。

[0565] 在一些实施方案中,第一、第二、第三或第四代CAR进一步包含在CAR成功信号传导后诱导细胞因子基因表达的结构域。在一些实施方案中,细胞因子基因对于包含CAR的靶细胞来说是内源性或外源性的,该CAR包含在CAR成功信号传导后诱导细胞因子基因表达的结构域。在一些实施方案中,细胞因子基因编码促炎细胞因子。在一些实施方案中,细胞因子基因编码IL-1、IL-2、IL-9、IL-12、IL-18、TNF或IFN-γ或其功能片段。在一些实施方案中,

在CAR成功信号传导后诱导细胞因子基因表达的结构域是或者包含转录因子或其功能结构域或片段。在一些实施方案中,在CAR成功信号传导后诱导细胞因子基因表达的结构域是或者包含转录因子或其功能结构域或片段。在一些实施方案中,转录因子或其功能结构域或片段是或者包含活化T细胞的核因子(NFAT)、NF-kB或其功能结构域或片段。参见例如Zhang.C.等人,Engineering CAR-T cells.Biomarker Research.5:22(2017);WO2016126608;Sha,H.等人Chimaeric antigen receptor T-cell therapy for tumour immunotherapy.Bioscience Reports 2017年1月27日,37(1)。

[0566] 技术人员熟悉CAR以及CAR的不同组分和配置。任何已知的CAR都可以与提供的实施方案结合应用。除了本文所述的CAR之外,各种CAR和编码其的核苷酸序列是本领域已知的,并且将适用于对如本文所述的细胞进行工程化。参见,例如,WO2013040557;WO2012079000;WO2016030414;Smith T等人,Nature Nanotechnology.2017.DOI:10.1038/NNANO.2017.57,其公开内容以引用的方式并入本文中。CAR的示例性特性和组分在以下小节中描述。

[0567] a.抗原结合结构域

[0568] 在一些实施方案中,CAR抗原结合结构域(ABD)是或者包含抗体或其抗原结合部分。在一些实施方案中,CAR抗原结合结构域是或者包含scFv或Fab。

[0569] 在一些实施方案中,抗原结合结构域结合至细胞的细胞表面抗原。在一些实施方案中,细胞表面抗原是具体或特定细胞类型的特征(例如,由具体或特定细胞类型表达)。在一些实施方案中,细胞表面抗原是不止一个类型的细胞的特征。

[0570] 在一些实施方案中,该抗原可以是仅在肿瘤细胞上或优先在肿瘤细胞上表达的抗原,或是自身免疫或炎性疾病的特征性抗原。在一些实施方案中,抗原结合结构域(ABD)靶向赘生性细胞特征性抗原。例如,抗原结合结构域靶向赘生性细胞或癌细胞表达的抗原。在一些实施方案中,ABD结合肿瘤相关抗原。在一些实施方案中,赘生性细胞特征性抗原(例如与赘生性细胞或癌细胞相关的抗原)或肿瘤相关抗原选自细胞表面受体、离子通道连接的受体、酶连接的受体、G蛋白偶联受体、受体酪氨酸激酶、酪氨酸激酶相关受体、受体样酪氨酸磷酸酶、受体丝氨酸/苏氨酸激酶、受体鸟苷酸环化酶、组氨酸激酶相关受体。

[0571] 在一些实施方案中,靶抗原是包括但不限于以下的抗原:表皮生长因子受体(EGFR)(包括ErbB1/EGFR、ErbB2/HER2、ErbB3/HER3和ErbB4/HER4)、纤维母细胞生长因子受体(FGFR)(包括FGF1、FGF2、FGF3、FGF4、FGF5、FGF6、FGF7、FGF18和FGF21)、血管内皮生长因子受体(VEGFR)(包括VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D和PIGF)、RET受体和Eph受体家族(包括EphA1、EphA2、EphA3、EphA4、EphA5、EphA6、EphA7、EphA8、EphA9、EphA10、EphB1、EphB2、EphB3、EphB4和EphB6)、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR6、CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR8、CFTR、CIC-1、CIC-2、CIC-4、CIC-5、CIC-7、CIC-Ka、CIC-Kb、Bestrophins、TMEM16A、GABA受体、甘氨酸受体、ABC转运蛋白、NAV1.1、NAV1.2、NAV1.3、NAV1.4、NAV1.5、NAV1.6、NAV1.7、NAV1.8、NAV1.9、鞘氨醇-1-磷酸受体(S1P1R)、NMDA通道、跨膜蛋白、多跨跨膜蛋白、T细胞受体基序、T细胞α链、T细胞β链、T细胞γ链、T细胞δ链、CCR7、CD3、CD4、CD5、CD7、CD8、CD11b、CD11c、CD16、CD19、CD20、CD21、CD22、CD25、CD28、CD34、CD35、CD40、CD45RA、CD45RO、CD52、CD56、CD62L、CD68、CD80、CD95、CD117、CD127、CD133、CD137(4-1BB)、CD163、F4/80、IL-4Ra、Sca-1、CTLA-4、GITR、GARP、LAP、颗粒酶B、LFA-1、转铁蛋白受体、NKp46、穿孔

素、CD4+、Th1、Th2、Th17、Th40、Th22、Th9、Tfh、典型Treg、FoxP3+、Tr1、Th3、Treg17、TREG、CDCP、NT5E、EpCAM、CEA、gpA33、粘蛋白、TAG-72、碳酸酐酶IX、PSMA、叶酸结合蛋白、神经节苷脂(例如CD2、CD3、GM2)、Lewis-γ^2、VEGF、VEGFR 1/2/3、αVβ3、α5β1、ErbB1/EGFR、ErbB1/HER2、ErB3、c-MET、IGF1R、EphA3、TRAIL-R1、TRAIL-R2、RANKL、FAP、腱糖蛋白、PDL-1、BAFF、HDAC、ABL、FLT3、KIT、MET、RET、IL-1β、ALK、RANKL、mTOR、CTLA-4、IL-6、IL-6R、JAK3、BRAF、PTCH、Smoothened、PIGF、ANPEP、TIMP1、PLAUR、PTPRJ、LTBR或ANTXR1、叶酸受体α(FRa)、ERBB2(Her2/neu)、EphA2、IL-13Ra2、表皮生长因子受体(EGFR)、间皮素、TSHR、CD19、CD123、CD22、CD30、CD171、CS-1、CLL-1、CD33、EGFRvIII、GD2、GD3、BCMA、MUC16(CA125)、L1CAM、LeY、MSLN、IL13Rα1、L1-CAM、Tn Ag、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、ROR1、FLT3、FAP、TAG72、CD38、CD44v6、CEA、EPCAM、B7H3、KIT、白细胞介素-11受体a(IL-11Ra)、PSCA、PRSS21、VEGFR2、LewisY、CD24、血小板衍生的生长因子受体-β(PDGFR-β)、SSEA-4、CD20、MUC1、NCAM、Prostase、PAP、ELF2M、Ephrin B2、IGF-1受体、CAIX、LMP2、gp100、bcr-abl、酪氨酸酶、岩藻糖基GM1、sLe、GM3、TGS5、HMWMAA、o-乙酰基-GD2、叶酸受体β、TEM1/CD248、TEM7R、CLDN6、GPRC5D、CXORF61、CD97、CD179a、ALK、聚唾液酸、PLAC1、GloboH、NY-BR-1、UPK2、HAVCR1、ADRB3、PANX3、GPR20、LY6K、OR51E2、TARP、WT1、NY-ESO-1、LAGE-1a、MAGE-A1、豆荚蛋白(legumain)、HPV E6、E7、ETV6-AML、精子蛋白17、XAGE1、Tie 2、MAD-CT-1、MAD-CT-2、主要组织相容性复合物I类相关基因蛋白(MR1)、尿激酶型纤溶酶原活化子受体(uPAR)、Fos相关抗原1、p53、p53突变体、prostein、存活素、端粒酶、PCTA-1/Galectin 8、MelanA/MART1、Ras突变体、hTERT、肉瘤易位断点、ML-IAP、ERG(TMPRSS2 ETS融合基因)、NA17、PAX3、雄激素受体、细胞周期蛋白B1、MYCN、RhoC、TRP-2、CYPIB I、BORIS、SART3、PAX5、OY-TES1、LCK、AKAP-4、SSX2、RAGE-1、人端粒酶逆转录酶、RU1、RU2、肠道羧基酯酶、mut hsp70-2、CD79a、CD79b、CD72、LAIR1、FCAR、LILRA2、CD300LF、CLEC12A、BST2、EMR2、LY75、GPC3、FCRL5、IGLL1、新抗原、CD133、CD15、CD184、CD24、CD56、CD26、CD29、CD44、HLA-A、HLA-B、HLA-C、(HLA-A、B、C)CD49f、CD151 CD340、CD200、tkrA、trkB或trkC,或其抗原片段或抗原部分。

[0572] 在一些实施方案中,示例性靶抗原包括但不限于CDS,CD19,CD20,CD22,CD23,CD30,CD70,κ、λ和B细胞成熟剂(BCMA)(与白血病相关);CS1/SLAMF7、CD38、CD138、GPRC5D、TACI和BCMA(与骨髓瘤相关);GD2、HER2、EGFR、EGFRvlll、B7H3、PSMA、PSCA、CAIX、CD171、CEA、CSPG4、EPHA2、FAP、FRα、IL-13Rα、间皮素、MUC1、MUC16和ROR1(与实体肿瘤相关)。

[0573] 在一些实施方案中,CAR是CD19 CAR。在一些实施方案中,CD19CAR的细胞外结合结构域包含特异性结合至CD19(例如,人CD19)的抗体。在一些实施方案中,CD19 CAR的细胞外结合结构域包含来源于FMC63单克隆抗体(FMC63)的scFv抗体片段,其包含通过接头肽连接的FMC63的重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)。在一些实施方案中,接头肽是“Whitlow”接头肽。FMC63和获得的scFv已在Nicholson等人,Mal.lmmun.34(16-17):1157-1165(1997)和PCT申请公布号WO2018/213337A 1中进行了描述,这些文献中每一篇的全部内容都以引用的方式并入本文中。

[0574] 在一些实施方案中,CD19 CAR的细胞外结合结构域包含来源于CD19特异性抗体之一的抗体,所述CD19特异性抗体包括例如SJ25C1(Bejcek等人,Cancer Res.55:2346-2351(1995))、HD37(Pezutto等人,J.lmmunol.138(9):2793-2799(1987))、4G7(Meeker等人,Hybridoma 3:305-320(1984))、B43(Bejcek(1995))、BLY3(Bejcek(1995))、B4(Freedman等

人,70:418-427(1987))、B4 HB12b(Kansas和Tedder,J.lmmunol.147:4094-4102(1991);Yazawa等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 102:15178-15183(2005);Herbst等人,J.Pharmacol.Exp.Ther.335:213-222(2010))、BU12(Gallard等人J.Immunology,148(10):2983-2987(1992)),以及CLB-CD19(De Rie Cell.lmmunol.118:368-381(1989))。

[0575] 在一些实施方案中,CAR是CD22 CAR。CD22是一种跨膜蛋白,其主要存在于成熟B细胞的表面,充当B细胞受体(BCR)信号传导的抑制性受体。CD22在60-70%的B细胞淋巴瘤和白血病(例如,B慢性淋巴细胞白血病、毛细胞白血病、急性淋巴细胞白血病(ALL)和伯基特氏淋巴瘤(Burkitt's lymphoma))中表达,并且在B细胞发育早期阶段的细胞表面或干细胞上不存在。在一些实施方案中,CD22 CAR包含特异性结合CD22的细胞外结合结构域、跨膜结构域、细胞内信号传导结构域和/或细胞内共刺激结构域。在一些实施方案中,CD22 CAR的细胞外结合结构域包含来源于m971单克隆抗体(m971)的scFv抗体片段,其包含通过接头连接的m971的重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)。在一些实施方案中,CD22 CAR的细胞外结合结构域包含来源于m971-L7的scFv抗体片段,其是与亲本抗体m971相比CD22结合亲和力显著提高(从约2nM提高至小于50pM)的m971的亲和力成熟变体。在一些实施方案中,来源于m971-L7的scFv抗体片段包含通过3xG4S接头连接的m971-L7的VH和VL。在一些实施方案中,CD22 CAR的细胞外结合结构域包含免疫毒素HA22或BL22。免疫毒素BL22和HA22是包含对与细菌毒素融合的CD22具有特异性的scFv的治疗剂,因此可以结合至表达CD22的癌细胞的表面并杀伤该癌细胞。BL22包含抗CD22抗体RFB4的dsFv,其与38-kDa经截短的形式的假单胞菌外毒素A融合(Bang等人,Clin.Cancer Res.,11:1545-50(2005))。HA22(CAT8015,莫塞妥莫单抗(moxetumomab pasudotox))是BL22的突变的较高亲和力型式(Ho等人,J.Biol.Chem.,280(1):607-17(2005))。对CD22具有特异性的HA22和BL22的抗原结合结构域的合适序列公开于例如美国专利号7,541,034;7,355,012;和7,982,011中,这些专利据此整体以引用的方式并入。

[0576] 在一些实施方案中,CAR是BCMACAR。BCMA是在B细胞谱系的细胞上表达的肿瘤坏死家族受体(TNFR)成员,在终末分化的B细胞或成熟的B淋巴细胞上表达最高。BCMA参与介导浆细胞的存活以维持长期体液免疫。最近发现,BCMA的表达与多种癌症,诸如多发性骨髓瘤、霍奇金和非霍奇金淋巴瘤、各种白血病和胶质母细胞瘤有关。在一些实施方案中,BCMACAR包含特异性结合BCMA的细胞外结合结构域、跨膜结构域、细胞内信号传导结构域和/或细胞内共刺激结构域。在一些实施方案中,BCMACAR的细胞外结合结构域包含特异性结合至BCMA(例如,人BCMA)的抗体。针对BCMA的CAR已在PCT申请公布号WO2016/014789、WO2016/014565、WO2013/154760和WO 2015/128653中描述。PCT申请公布号WO2015/166073和WO2014/068079中还公开了BCMA结合抗体。在一些实施方案中,BCMACAR的细胞外结合结构域包含来源于鼠单克隆抗体的scFv抗体片段,如Carpenter等人,Clin.Cancer Res.19(8):2048-2060(2013)中所述。在一些实施方案中,scFv抗体片段是鼠单克隆抗体的人源化型式(Sommermeyer等人,Leukemia 31:2191-2199(2017))。在一些实施方案中,BCMACAR的细胞外结合结构域包含两条重链(VHH)的单个可变片段,其可以结合BCMA的两个表位,如Zhao等人,J.Hematol.Oneal.11(1):141(2018)中所述。在一些实施方案中,BCMACAR的细胞外结合结构域包含完全人重链可变结构域(FHVH),如Lam等人,Nat.Commun.11(1):283(2020)中所述。

[0577] 在一些实施方案中,抗原结合结构域靶向自身免疫或炎性病症特征性抗原。在一些实施方案中,ABD结合与自身免疫或炎性病症相关的抗原。在一些情况下,该抗原由与自身免疫或炎性病症相关的细胞表达。在一些实施方案中,自身免疫或炎性病症选自慢性移植物抗宿主病(GVHD)、狼疮、关节炎、免疫复合物肾小球肾炎、古德帕斯丘病(goodpasture)、葡萄膜炎、肝炎、全身性硬化症或硬皮病、I型糖尿病、多发性硬化、冷凝集素病、寻常型天疱疮、格雷夫氏病、自身免疫性溶血性贫血、A型血友病、原发性斯耶格伦氏综合征(Primary Sjogren'sSyndrome)、血栓性血小板减少性紫癜、视神经脊髓炎、埃文氏综合征(Evan's syndrome)、IgM介导的神经病、冷球蛋白血症、皮肌炎、特发性血小板减少症、强直性脊柱炎、大疱性类天疱疮、获得性血管性水肿、慢性荨麻疹、抗磷脂脱髓鞘性多发性神经病和自身免疫性血小板减少症或中性粒细胞减少症或纯红细胞再生障碍,虽然同种免疫疾病的示例性非限制性实例包括同种异体致敏(参见例如Blazar等人,2015,Am.J.Transplant,15(4):931-41)或来自造血或实体器官移植、输血、妊娠与胎儿的异种致敏、新生儿同种免疫血小板减少症、新生儿溶血性疾病、对外来抗原的致敏,诸如用酶或蛋白质替换疗法治疗的遗传性或获得性缺陷病症的替换、血液制品和基因疗法可发生。在一些情况下,同种异体致敏是指针对接受者受试者或怀孕受试者的免疫系统认为是非自身抗原的人白细胞抗原产生免疫反应(诸如循环抗体)。在一些实施方案中,自身免疫或炎性病症特征性抗原选自细胞表面受体、离子通道连接的受体、酶连接的受体、G蛋白偶联受体、受体酪氨酸激酶、酪氨酸激酶相关受体、受体样酪氨酸磷酸酶、受体丝氨酸/苏氨酸激酶、受体鸟苷酸环化酶或组氨酸激酶相关受体。

[0578] 在一些实施方案中,CAR的抗原结合结构域结合至B细胞、浆细胞或成浆细胞上表达的配体。在一些实施方案中,CAR的抗原结合结构域结合至CD10、CD19、CD20、CD22、CD24、CD27、CD38、CD45R、CD138、CD319、BCMA、CD28、TNF、干扰素受体、GM-CSF、ZAP-70、LFA-1、CD3γ、CD5或CD2。参见US2003/0077249;WO 2017/058753;WO 2017/058850,其内容以引用的方式并入本文中。在一些实施方案中,CAR是抗CD19 CAR。在一些实施方案中,CAR是抗BCMACAR。

[0579] 在一些实施方案中,抗原结合结构域靶向衰老细胞特征性抗原,例如尿激酶型纤溶酶原活化子受体(uPAR)。在一些实施方案中,ABD结合与衰老细胞相关的抗原。在一些情况下,该抗原由衰老细胞表达。在一些实施方案中,CAR可用于治疗或预防以衰老细胞的异常积累为特征的病症,例如肝脏和肺纤维化、动脉粥样硬化、糖尿病和骨关节炎。

[0580] 在一些实施方案中,抗原结合结构域靶向感染性疾病特征性抗原。在一些实施方案中,ABD结合与感染性疾病相关的抗原。在一些情况下,该抗原由受感染性疾病影响的细胞表达。在一些实施方案中,其中感染性疾病选自HIV、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、人疱疹病毒、人疱疹病毒8型(HHV-8、卡波西肉瘤相关疱疹病毒(KSHV))、人T-淋巴细胞病毒-1(HTLV-1)、默克尔细胞多瘤病毒(MCV)、猿猴病毒40(SV40)、爱泼斯坦-巴尔病毒(Epstein-Barr virus)、CMV、人乳头瘤病毒。在一些实施方案中,感染性疾病特征性抗原选自细胞表面受体、离子通道连接的受体、酶连接的受体、G蛋白偶联受体、受体酪氨酸激酶、酪氨酸激酶相关受体、受体样酪氨酸磷酸酶、受体丝氨酸/苏氨酸激酶、受体鸟苷酸环化酶、组氨酸激酶相关受体、HIV Env、gp120或HIV-1Env上的CD4诱导的表位。

[0581] 在这些实施方案中的任一个中,CAR的细胞外结合结构域可以针对在宿主细胞中

的表达而被密码子优化,或具有变异序列以增加细胞外结合结构域的功能。

[0582] 在一些实施方案中,CAR对两种靶抗原具有双特异性。在一些实施方案中,靶抗原是不同的靶抗原。在任何此类实施方案中的一些中,该两种不同的靶抗原是上述的任何两种不同的抗原。在一些实施方案中,细胞外结合结构域不同并且结合来自以下的两种不同的抗原:(i)CD19和CD20,(ii)CD20和L1-CAM,(iii)L1-CAM和GD2,(iv)EGFR和L1-CAM,(v)CD19和CD22,(vi)EGFR和C-MET,(vii)EGFR和HER2,(viii)C-MET和HER2,或(ix)EGFR和ROR1。在一些实施方案中,该两种不同的抗原结合结构域中的每一种是scFv。在一些实施方案中,第一scFv的一个可变结构域(VH或VL)的C端经由多肽接头连接至第二scFv(分别为VL或VH)的N端。在一些实施方案中,该接头将VH的N端与VL的C端连接或者将VH的C端与VL的N端连接。这些scFv缺乏原生抗体的重链和轻链中存在的恒定区(Fc)。对至少两种不同抗原具有特异性的scFv串联排列并经由跨膜结构域连接到共刺激结构域和细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,细胞外间隔区结构域可以连接在抗原特异性结合区和跨膜结构域之间。

[0583] 在一些实施方案中,CAR的每个抗原特异性靶向区域包含二价(或双价)单链可变片段(di-scFv、bi-scFv)。在包含di-scFV的CAR中,通过产生具有两个VH和两个VL区的单肽链,将对每种抗原具有特异性的两种scFv连接在一起,从而产生串联scFv。(Xiong,Cheng-Yi;Natarajan,A;Shi,X B;Denardo,G L;Denardo,S J(2006).“Development of tumor targeting anti-MUC-1multimer:effects of di-scFv unpaired cysteine location on PEGylation and tumor binding”.Protein Engineering Design and Selection 19(8):359-367;Kufer,Peter;Lutterbüse,Ralf;Baeuerle,Patrick A.(2004).“A revival of bispecific antibodies”.Trends in Biotechnology 22(5):238-244)。包含至少两种抗原特异性靶向区的CAR将表达对两种抗原中的每一种具有特异性的两种scFv。对至少两种不同的抗原具有特异性的所得抗原特异性靶向区经由跨膜结构域与共刺激结构域和细胞内信号传导结构域连接。在一些实施方案中,细胞外间隔区结构域可以连接在抗原特异性结合结构域和跨膜结构域之间。

[0584] 在一些实施方案中,CAR的每个抗原特异性靶向区域包含双抗体。在双抗体中,scFv是用接头肽产生的,该接头肽太短,使得两个可变区不能折叠在一起,从而驱动scFv二聚化。更短的接头(一个或两个氨基酸)导致三聚体的形成,即所谓的三链抗体(triabody)或三体(tribody)。也可以使用四链抗体(Tetrabody)。

[0585] 在一些实施方案中,细胞被工程化为表达不止一个CAR,诸如两种不同的CAR,其中每种CAR具有针对不同靶抗原的抗原结合结构域。在任何此类实施方案中的一些中,该两种不同的靶抗原是上述的任何两种不同的抗原。在一些实施方案中,细胞外结合结构域是不同的并且结合来自以下的两种不同的抗原:(i)CD19和CD20,(ii)CD20和L1-CAM,(iii)L1-CAM和GD2,(iv)EGFR和L1-CAM,(v)CD19和CD22,(vi)EGFR和C-MET,(vii)EGFR和HER2,(viii)C-MET和HER2,或(ix)EGFR和ROR1。

[0586] 在一些实施方案中,制备含有所提供的修饰并且每种用不同的CAR工程化的两种不同的经工程化的细胞。在一些实施方案中,该两种不同的CAR中的每一种均具有针对不同靶抗原的抗原结合结构域。在任何此类实施方案中的一些中,该两种不同的靶抗原是上述的任何两种不同的抗原。在一些实施方案中,细胞外结合结构域是不同的并且结合来自以

下的两种不同的抗原:(i)CD19和CD20,(ii)CD20和L1-CAM,(iii)L1-CAM和GD2,(iv)EGFR和L1-CAM,(v)CD19和CD22,(vi)EGFR和C-MET,(vii)EGFR和HER2,(viii)C-MET和HER2,或(ix)EGFR和ROR1。在一些实施方案中,将表达针对第一靶抗原的第一CAR的经工程化的细胞(例如,低免疫原性的细胞)的群体和表达针对第二靶抗原的第二CAR的经工程化的细胞(例如,低免疫原性的细胞)的群体单独地施用于受试者。在一些实施方案中,将第一和第二细胞群体以任何顺序依序施用。例如,在施用表达第一CAR的细胞群体后施用表达第二CAR的细胞群体。

[0587] b.间隔区

[0588] 在一些实施方案中,CAR进一步包含一个或多个间隔区,例如,其中该间隔区是抗原结合结构域与跨膜结构域之间的第一间隔区。在一些实施方案中,第一间隔区包括免疫球蛋白恒定区或其变体或经修饰型式的至少一部分。在一些实施方案中,间隔区是跨膜结构域与信号传导结构域之间的第二间隔区。在一些实施方案中,第二间隔区是寡肽,例如,其中寡肽包含甘氨酸和丝氨酸残基,诸如但不限于甘氨酸-丝氨酸双联体。在一些实施方案中,CAR包含两个或更多个间隔区,例如,抗原结合结构域与跨膜结构域之间的间隔区以及跨膜结构域与信号传导结构域之间的间隔区。

[0589] c.跨膜结构域

[0590] 在一些实施方案中,CAR跨膜结构域至少包含以下的跨膜区:T细胞受体的α、β或ζ链、CD28、CD3ε、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD28、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154或其功能变体。在一些实施方案中,跨膜结构域至少包含以下的跨膜区:CD8α、CD8β、4-1BB/CD137、CD28、CD34、CD4、FcεRIγ、CD16、OX40/CD134、CD3ζ、CD3ε、CD3γ、CD3δ、TCRα、TCRβ、TCRζ、CD32、CD64、CD64、CD45、CD5、CD9、CD22、CD37、CD80、CD86、CD40、CD40L/CD154、VEGFR2、FAS和FGFR2B或其功能变体。

[0591] d.信号传导结构域

[0592] 在一些实施方案中,本文所述的CAR包含一个或至少一个信号传导结构域,该信号传导结构域选自以下中的一种或多种:B7-1/CD80;B7-2/CD86;B7-H1/PD-L1;B7-H2;B7-H3;B7-H4;B7-H6;B7-H7;BTLA/CD272;CD28;CTLA-4;Gi24/VISTA/B7-H5;ICOS/CD278;PD-1;PD-L2/B7-DC;PDCD6);4-1BB/TNFSF9/CD137;4-1BB配体/TNFSF9;BAFF/BLyS/TNFSF13B;BAFFR/TNFRSF13C;CD27/TNFRSF7;CD27配体/TNFSF7;CD30/TNFRSF8;CD30配体/TNFSF8;CD40/TNFRSF5;CD40/TNFSF5;CD40配体/TNFSF5;DR3/TNFRSF25;GITR/TNFRSF18;GITR配体/TNFSF18;HVEM/TNFRSF14;LIGHT/TNFSF14;淋巴毒素-α/TNF-β;OX40/TNFRSF4;OX40配体/TNFSF4;RELT/TNFRSF19L;TACI/TNFRSF13B;TL1A/TNFSF15;TNF-α;TNF RII/TNFRSF1B);2B4/CD244/SLAMF4;BLAME/SLAMF8;CD2;CD2F-10/SLAMF9;CD48/SLAMF2;CD58/LFA-3;CD84/SLAMF5;CD229/SLAMF3;CRACC/SLAMF7;NTB-A/SLAMF6;SLAM/CD150);CD2;CD7;CD53;CD82/Kai-1;CD90/Thy1;CD96;CD160;CD200;CD300a/LMIR1;HLA I类;HLA-DR;Ikaros;整联蛋白α4/CD49d;整联蛋白α4β1;整联蛋白α4β7/LPAM-1;LAG-3;TCL1A;TCL1B;CRTAM;DAP12;Dectin-1/CLEC7A;DPPIV/CD26;EphB6;TIM-1/KIM-1/HAVCR;TIM-4;TSLP;TSLP R;淋巴细胞功能相关抗原1(LFA-1);NKG2C、CD3ζ结构域、基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM)、CD27、CD28、4-1BB、CD134/OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、与CD83特异性结合的配体,或其功能片段。

[0593] 在一些实施方案中,该至少一个信号传导结构域包含CD3ζ结构域或基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM)或其功能变体。

[0594] 在一些实施方案中,CAR包含作为共刺激结构域的信号传导结构域。在一些实施方案中,CAR包含第二共刺激结构域。在一些实施方案中,CAR包含至少两个共刺激结构域。在一些实施方案中,CAR包含至少三个共刺激结构域。在一些实施方案中,CAR包含共刺激结构域,该共刺激结构域选自CD27、CD28、4-1BB、CD134/OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、与CD83特异性结合的配体中的一种或多种。在一些实施方案中,如果CAR包含两个或更多个共刺激结构域,则两个共刺激结构域是不同的。在一些实施方案中,如果CAR包含两个或更多个共刺激结构域,则两个共刺激结构域是相同的。

[0595] 在其他实施方案中,该至少一个信号传导结构域包含(i)CD3ζ结构域,或基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM),或其功能变体;以及(ii)CD28结构域,或4-1BB结构域,或其功能变体。在又其他实施方案中,该至少一个信号传导结构域包含(i)CD3ζ结构域,或基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM),或其功能变体;(ii)CD28结构域或其功能变体;以及(iii)4-1BB结构域,或CD134结构域,或其功能变体。在一些实施方案中,该至少一个信号传导结构域包含(i)CD3ζ结构域,或基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM),或其功能变体;(ii)CD28结构域或其功能变体;(iii)4-1BB结构域,或CD134结构域,或其功能变体;以及(iv)细胞因子或共刺激配体转基因。

[0596] 在一些实施方案中,该至少两个信号传导结构域包含CD3ζ结构域或基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM),或其功能变体。在其他实施方案中,该至少两个信号传导结构域包含(i)CD3ζ结构域或基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM),或其功能变体;和(ii)CD28结构域,或4-1BB结构域,或其功能变体。在又其他实施方案中,该至少一个信号传导结构域包含(i)CD3ζ结构域,或基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM),或其功能变体;(ii)CD28结构域或其功能变体;以及(iii)4-1BB结构域,或CD134结构域,或其功能变体。在一些实施方案中,该至少两个信号传导结构域包含(i)CD3ζ结构域,或基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM),或其功能变体;(ii)CD28结构域或其功能变体;(iii)4-1BB结构域,或CD134结构域,或其功能变体;以及(iv)细胞因子或共刺激配体转基因。

[0597] 在一些实施方案中,该至少三个信号传导结构域包含CD3ζ结构域或基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM),或其功能变体。在其他实施方案中,该至少三个信号传导结构域包含(i)CD3ζ结构域,或基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM),或其功能变体;以及(ii)CD28结构域,或4-1BB结构域,或其功能变体。在又其他实施方案中,该至少三个信号传导结构域包含(i)CD3ζ结构域,或基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM),或其功能变体;(ii)CD28结构域或其功能变体;以及(iii)4-1BB结构域,或CD134结构域,或其功能变体。在一些实施方案中,该至少三个信号传导结构域包含(i)CD3ζ结构域,或基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM),或其功能变体;(ii)CD28结构域或其功能变体;(iii)4-1BB结构域,或CD134结构域,或其功能变体;以及(iv)细胞因子或共刺激配体转基因。

[0598] 在一些实施方案中,该CAR包含CD3ζ结构域或基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM),或其功能变体。在一些实施方案中,CAR包含(i)CD3ζ结构域或基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM)或其功能变体;和(ii)CD28结构域,或4-1BB结构域,或其功能变体。

[0599] 在一些实施方案中,CAR包含(i)CD3ζ结构域或基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM)或其功能变体;(ii)CD28结构域或其功能变体;和(iii)4-1BB结构域或CD134结构域或其功能变体。

[0600] 在一些实施方案中,CAR包含(i)CD3ζ结构域或基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM)或其功能变体;(ii)CD28结构域或4-1BB结构域或其功能变体,和/或(iii)4-1BB结构域,或CD134结构域,或其功能变体。

[0601] 在一些实施方案中,CAR包含(i)CD3ζ结构域或基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM)或其功能变体;(ii)CD28结构域或其功能变体;(iii)4-1BB结构域,或CD134结构域,或其功能变体;和(iv)细胞因子或共刺激配体转基因。

[0602] e.示例性CAR

[0603] 在一些实施方案中,CAR包含与抗原(例如,肿瘤抗原)结合的细胞外抗原结合结构域(例如抗体或抗体片段,诸如scFv)、间隔区(例如,含有铰链结构域,诸如本文所述的任何一种)、跨膜结构域(例如本文所述的任何一种)和细胞内信号传导结构域(例如,任何细胞内信号传导结构域,诸如本文所述的初级信号传导结构域或共刺激信号传导结构域)。在一些实施方案中,细胞内信号传导结构域是或者包括初级细胞质信号传导结构域。在一些实施方案中,细胞内信号传导结构域另外包括共刺激分子的细胞内信号传导结构域(例如,共刺激结构域)。任何此类组分可以是如上所述的任何组分。

[0604] CAR的示例性组分的实例描述于表8中。在所提供的方面,CAR中的每个组分的序列可以包括表8中列出的任何组合。

[0605] 表8.CAR组分和示例性序列

[0606]

组分 细胞外结合结构域	序列	SEQ ID NO
抗 CD19 scFv (FMC63)	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLN WYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGS GTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGG TKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPG LVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKG LEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQV FLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDY WGQGTSVTVSS	208
抗 CD19 scFv (FMC63)	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLN WYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGS GTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGG TKLEITGGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLV APSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLE WLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFL KMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWG QGTSVTVSS	209
间隔区(例如，铰链)		
IgG4 铰链	ESKYGPPCPPCP	210
CD8 铰链	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPE	211
CD28	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPG PSKP	212
跨膜		
CD8	ACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCG VLLLSLVITLYC	213
CD28	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	214
CD28	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	215
共刺激结构域		
CD28	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPP RDFAAYRS	216
4-1BB	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFP EEEEGGCEL	217

[0607]

初级信号传导结构域		
CD3ζ	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQK DKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTA TKDTYDALHMQALPPR	217
CD3ζ	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEY DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQK DKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTA TKDTYDALHMQALPPR	218

[0608] CAR(也称为嵌合免疫受体、嵌合T细胞受体或人工T细胞受体)是已被工程化为赋予宿主细胞(例如,T细胞)靶向特定蛋白质的新能力的受体蛋白。该受体是嵌合的,因为它们将抗原结合和T细胞活化功能组合到单个受体中。CAR可以包含特异性结合靶抗原的细胞

外结合结构域(也称为“结合剂”)、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域。在某些实施方案中,CAR可以进一步包含一种或多种另外的元件,包括一种或多种信号肽、一种或多种细胞外铰链结构域和/或一种或多种细胞内共刺激结构域。结构域可以彼此直接相邻,或者可以有连接结构域的一个或多个氨基酸。编码CAR的核苷酸序列可以来源于哺乳动物序列,例如小鼠序列、灵长类动物序列、人序列或其组合。在编码CAR的核苷酸序列是非人的情况下,CAR的序列可以是人源化的。编码CAR的核苷酸序列还可以针对在哺乳动物细胞例如人细胞中的表达而被密码子优化。在这些实施方案中的任一个中,编码CAR的核苷酸序列可以与本文公开的核苷酸序列中的任何核苷酸序列具有至少80%同一性(例如,至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性)。序列变异可能是由于密码子优化、人源化、基于限制酶的克隆疤痕,和/或连接功能结构域的另外的氨基酸残基等。

[0609] 在某些实施方案中,CAR可以包含在N端处的信号肽。信号肽的非限制性实例包括CD8α信号肽、IgK信号肽和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子受体亚基α(GMCSFR-α,也称为集落刺激因子2受体亚基α(CSF2RA))信号肽以及它们的变体,其氨基酸序列提供于下表9中。

[0610] 表9.信号肽的示例性序列

[0611]

SEQ ID NO:	序列	描述
219	MALPVTALLLPLALLLH AARP	CD8α 信号肽
220	METDTLLLWVLLLWVP GSTG	IgK 信号肽
221	MLLLVTSLLLCELPHPAF LLIP	GMCSFR-α (CSF2RA)信号肽

[0612] 在某些实施方案中,CAR的细胞外结合结构域可以包含对一种靶抗原或多种靶抗原具有特异性的一种或多种抗体。该抗体可以是抗体片段(例如scFv),或单结构域抗体片段(例如VHH)。在某些实施方案中,scFv可以包含通过接头连接的抗体的重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)。VH和VL可以以任一顺序连接,即VH-接头-VL或VL-接头-VH。接头的非限制性实例包括Whitlow接头、(G4S)n(n可以是正整数,例如,1、2、3、4、5、6等)接头以及其变体。在某些实施方案中,该抗原可以是仅在肿瘤细胞上或优先在肿瘤细胞上表达的抗原,或是自身免疫或炎性疾病的特征性抗原。示例性靶抗原包括但不限于CD5、CD19、CD20、CD22、CD23、CD30、CD33、CD70、κ,λ,B细胞成熟剂(BCMA)和G蛋白偶联受体家族C组5成员D(GPRC5D)(与白血病相关);CS1/SLAMF7、CD38、CD138、GPRC5D、TACI和BCMA(与骨髓瘤相关);CD123、LeY、NKG2D配体和WT1(与其他血液性癌症相关);GD2、HER2、EGFR、EGFRvIII、B7H3、PSMA、PSCA、CAIX、CD171、CEA、CSPG4、EPHA2、FAP、FRα、IL-13Rα、间皮素(Mesothelin)、MUC1、MUC16、ROR1、C-Met、CD133、Ep-CAM、GPC3、HPV16-E6、IL13Ra2、MAGEA3、MAGEA4、MART1、NY-ESO-1、VEGFR2、α-叶酸受体、CD24、CD44v7/8、EGP-2、EGP-40、erb-B2、erb-B 2,3,4、FBP、胎儿乙酰胆碱e受体、GD2、GD3、HMW-MAA、IL-11Rα、KDR、Lewis Y、L1细胞粘附分子、MAGE-A1、癌胚抗原(h5T4)和TAG-72(与实体肿瘤相关);A*02(与器官移植相关);纤维母细胞活化蛋白(FAP)(与纤维化相关);尿激酶型纤溶酶原活化子受体(uPAR)(与衰老相关)。在某些实施方

案中,CAR可以被重工程化为用于选择性地耗竭自身反应性免疫细胞的嵌合自身抗体受体(CAAR)。在某些实施方案中,CAAR被工程化为靶向免疫细胞上存在的自身抗体。CAAR的示例性靶抗原包括但不限于DSG3(与寻常性天疱疮(pemphigus volgaris)相关);因子VIII(FVIII)(与血友病相关)。在这些实施方案中的任一个中,CAR的细胞外结合结构域可以针对在宿主细胞中的表达而被密码子优化,或具有变异序列以增加细胞外结合结构域的功能。

[0613] 在某些实施方案中,CAR可以包含铰链结构域,也称为间隔区。术语"铰链"和"间隔区"在本公开中可以互换使用。铰链结构域的非限制性实例包括CD8α铰链结构域、CD28铰链结构域、IgG4铰链结构域、IgG4铰链-CH2-CH3结构域以及其变体,其氨基酸序列提供于下表10中。

[0614] 表10.铰链结构域的示例性序列

[0615]

SEQ ID NO:	序列	描述
222	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD	CD8α 铰链结构域
223	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKP	CD28 铰链结构域
224	AAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKP	CD28 铰链结构域
225	ESKYGPPCPPCP	IgG4 铰链结构域
226	ESKYGPPCPSCP	IgG4 铰链结构域
227	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	IgG4 铰链-CH2-CH3 结构域

[0616] 在某些实施方案中,CAR的跨膜结构域可以包含以下的跨膜区:T细胞受体的α、β或ζ链、CD28、CD3ε、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154,或其功能性变体,包括这些序列中的每一个序列的人型式。在其他实施方案中,跨膜结构域可以包含以下的跨膜区:CD8α、CD8β、4-1BB/CD137、CD28、CD34、CD4、FcεRIγ、CD16、OX40/CD134、CD3ζ、CD3ε、CD3γ、CD3δ、TCRα、TCRβ、TCRζ、CD32、CD64、CD64、CD45、CD5、CD9、CD22、CD37、CD80、CD86、CD40、CD40L/CD154、VEGFR2、FAS和FGFR2B,或其功能变体,包括这些序列中的每一个序列的人型式。表11提供了几个示例性跨膜结构域的氨基酸序列。

[0617] 表11.跨膜结构域的示例性序列

[0618]

SEQ ID NO:	序列	描述
228	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC	CD8α跨膜结构域

229	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28跨膜结构域
230	MFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28跨膜结构域

[0619] 在某些实施方案中,CAR的细胞内信号传导结构域和/或细胞内共刺激结构域可以包含选自以下的一个或多个信号传导结构域:B7-1/CD80、B7-2/CD86、B7-H1/PD-L1、B7-H2、B7-H3、B7-H4、B7-H6、B7-H7、BTLA/CD272、CD28、CTLA-4、Gi24/VISTA/B7-H5、ICOS/CD278、PD-1、PD-L2/B7-DC、PDCD6、4-1BB/TNFSF9/CD137、4-1BB配体/TNFSF9、BAFF/BLyS/TNFSF13B、BAFF R/TNFRSF13C、CD27/TNFRSF7、CD27配体/TNFSF7、CD30/TNFRSF8、CD30配体/TNFSF8、CD40/TNFRSF5、CD40/TNFSF5、CD40配体/TNFSF5、DR3/TNFRSF25、GITR/TNFRSF18、GITR配体/TNFSF18、HVEM/TNFRSF14、LIGHT/TNFSF14、淋巴毒素-α/TNFβ、OX40/TNFRSF4、OX40配体/TNFSF4、RELT/TNFRSF19L、TACI/TNFRSF13B、TL1A/TNFSF15、TNFα、TNF RII/TNFRSF1B、2B4/CD244/SLAMF4、BLAME/SLAMF8、CD2、CD2F-10/SLAMF9、CD48/SLAMF2、CD58/LFA-3、CD84/SLAMF5、CD229/SLAMF3、CRACC/SLAMF7、NTB-A/SLAMF6、SLAM/CD150、CD2、CD7、CD53、CD82/Kai-1、CD90/Thy1、CD96、CD160、CD200、CD300a/LMIR1、HLA I类、HLA-DR、Ikaros、整联蛋白α4/CD49d、整联蛋白α4β1、整联蛋白α4β7/LPAM-1、LAG-3、TCL1A、TCL1B、CRTAM、DAP12、Dectin-1/CLEC7A、DPPIV/CD26、EphB6、TIM-1/KIM-1/HAVCR、TIM-4、TSLP、TSLP R、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、NKG2C、CD3ζ、基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM)、CD27、CD28、4-1BB、CD134/OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、与CD83特异性结合的配体,以及其功能变体,包括这些序列中的每个序列的人型式。在一些实施方案中,细胞内信号传导结构域和/或细胞内共刺激结构域包含选自CD3ζ结构域、ITAM、CD28结构域、4-1BB结构域或其功能性变体的一个或多个信号传导结构域。表12提供了几个示例性细胞内共刺激和/或信号传导结构域的氨基酸序列。在某些实施方案中,如在如下所述的替沙仑赛的情况下,SEQ ID NO:233的CD3ζ信号传导结构域可以具有在氨基酸位置14处的突变,例如谷氨酰胺(Q)至赖氨酸(K)突变(参见SEQ ID NO:234)。

[0620] 表12.细胞内共刺激和/或信号传导结构域的示例性序列

[0621]

SEQ ID NO:	序列	描述
231	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	4-1BB 共刺激结构域
232	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS	CD28 共刺激结构域
233	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CD3ζ 信号传导结构域
234	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CD3ζ 信号传导结构域(在位置 14 处具有 Q 至 K 突变)

[0622] f.CD19 CAR

[0623] 在一些实施方案中,CAR是CD19 CAR,并且在这些实施方案中,第二转基因包含编码CD19 CAR的核苷酸序列。在一些实施方案中,CD19 CAR可以包含串联的信号肽、特异性结合CD19的细胞外结合结构域、铰链结构域、跨膜结构域、细胞内共刺激结构域和/或细胞内信号传导结构域。

[0624] 在一些实施方案中,CD19 CAR的信号肽包含CD8α信号肽。在一些实施方案中,CD8α信号肽包含SEQ ID NO:219中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:219中所示的氨基酸序列具有至少80%同一性(例如,至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性)的氨基酸序列,或者由SEQ ID NO:219中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:219中所示的氨基酸序列具有至少80%同一性(例如,至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性)的氨基酸序列组成。在一些实施方案中,该信号肽包含IgK信号肽。在一些实施方案中,IgK信号肽包含SEQ ID NO:220中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:220中所示的氨基酸序列具有至少80%同一性(例如,至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性)的氨基酸序列,或者由SEQ ID NO:220中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:220中所示的氨基酸序列具有至少80%同一性(例如,至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性)的氨基酸序列组成。在一些实施方案中,该信号肽包含GMCSFR-α或CSF2RA信号肽。在一些实施方案中,GMCSFR-α或CSF2RA信号肽包含SEQ ID NO:221中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:221中所示的氨基酸序列具有至少80%同一性(例如,至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性)的氨基酸序列,或者由SEQ ID NO:221中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:221中所示的氨基酸序列具有至少80%同一性(例如,至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性)的氨基酸序列组成。

[0625] 在一些实施方案中,CD19 CAR的细胞外结合结构域对CD19(例如,人CD19)具有特异性。CD19 CAR的细胞外结合结构域可以针对在宿主细胞中的表达而被密码子优化,或具有变异序列以增加细胞外结合结构域的功能。在一些实施方案中,细胞外结合结构域包含免疫球蛋白分子的免疫原性活性部分,例如scFv。

[0626] 在一些实施方案中,CD19 CAR的细胞外结合结构域包含来源于FMC63单克隆抗体(FMC63)的scFv,其包含通过接头连接的FMC63的重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)。FMC63和获得的scFv已在Nicholson等人,Mol.Immun.34(16-17):1157-1165(1997)和PCT申请公布号WO2018/213337中进行了描述,这些文献中每一篇的全部内容以引用方式并入本文中。在一些实施方案中,完整FMC63来源的scFv(也称为FMC63 scFv)及其不同部分的氨基酸序列提供于下表13中。在一些实施方案中,CD19特异性scFv包含SEQ ID NO:235、236或241中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:235、236或241中所示的氨基酸序列具有至少80%同一性(例如,至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性)的氨基酸序列,或者由SEQ ID NO:235、236或241中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:235、236或241中所示的氨基酸序列具有至少80%同一性(例如,至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性)

的氨基酸序列组成。在一些实施方案中,CD19特异性scFv可包含具有SEQ ID NO:237、238、239和241、243、244中所示的氨基酸序列的一个或多个CDR。在一些实施方案中,CD19特异性scFv可以包含具有一个或多个CDR的轻链,该一个或多个CDR具有SEQ ID NO:237、238、239中所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,CD19特异性scFv可以包含具有一个或多个CDR的重链,该一个或多个CDR具有SEQ IDNO:242、243、244中所示的氨基酸序列。在这些实施方案中的任一个中,CD19特异性scFv可以包含一个或多个CDR,该一个或多个CDR包含一个或多个氨基酸取代,或包含与所标识的序列中的任何序列具有至少80%同一性(例如,至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性)的序列。在一些实施方案中,CD19 CAR的细胞外结合结构域包含如本文所述的一个或多个CDR或由其组成。

[0627] 在一些实施方案中,连接scFv的VH和VL部分的接头是具有SEQ ID NO:240中所示的氨基酸序列的Whitlow接头。在一些实施方案中,Whitlow接头可以被不同的接头替换,该不同的接头为例如具有SEQ ID NO:246中所示的氨基酸序列的3xG 4S接头,其产生具有SEQ ID NO:245中所示的氨基酸序列的不同的FMC63来源的scFv。在这些实施方案中的某些中,CD19特异性scFv包含SEQ ID NO:245中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:245中所示的氨基酸序列具有至少80%同一性(例如,至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性)的氨基酸序列,或者由SEQ ID NO:245中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:245中所示的氨基酸序列具有至少80%同一性(例如,至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性)的氨基酸序列组成。

[0628] 表13.抗CD19 scFv和组分的示例性序列

[0629]

SEQ ID NO:	氨基酸序列	描述
235	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDIS KYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGV PSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFC QQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPG SGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVT CTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLG VIWGSETTYYNSALKSR	抗 CD19 FMC63 scFv 完整序列,具有 Whitlow 接头
	LTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYC AKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS	

[0630]

236	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDIS KYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGV PSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFC QQGNTLPYTFGGGTKLEIT	抗 CD19 FMC63 scFv 轻链可变区
237	QDISKY	抗 CD19 FMC63 scFv 轻链 CDR1
238	HTS	抗 CD19 FMC63 scFv 轻链 CDR2
239	QQGNTLPYT	抗 CD19 FMC63 scFv 轻链 CDR3
240	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	Whitlow 接头
241	EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSL PDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETT YYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQ TDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQ GTSVTVSS	抗 CD19 FMC63 scFv 重链可变区
242	GVSLPDYG	抗 CD19 FMC63 scFv 重链 CDR1
243	IWGSETT	抗 CD19 FMC63 scFv 重链 CDR2
244	AKHYYYGGSYAMDY	抗 CD19 FMC63 scFv 重链 CDR3
245	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDIS KYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGV PSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFC QQGNTLPYTFGGGTKLEITGGGGSGGGG SGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCT VSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVI WGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFL KMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAM DYWGQGTSVTVSS	抗 CD19 FMC63 scFv 完整序列,具有 3xG4S 接头
246	GGGGSGGGGSGGGGS	3xG4S 接头

[0631] 在一些实施方案中,CD19 CAR的细胞外结合结构域来源于对CD19具有特异性的抗体,包括例如SJ25C1(Bejcek等人,Cancer Res.55:2346-2351(1995))、HD37(Pezutto等人,J.Immunol.138(9):2793-2799(1987))、4G7(Meeker等人,Hybridoma 3:305-320(1984)),B43(Bejcek(1995)),BLY3(Bejcek(1995)),B4(Freedman等人,70:418-427(1987)),B4 HB12b(Kansas&Tedder,J.Immunol.147:4094-4102(1991);Yazawa等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 102:15178-15183(2005);Herbst等人,J.Pharmacol.Exp.Ther.335:213-222(2010))、BU12(Callard等人,J.Immunology,148(10):2983-2987(1992))和CLB-CD19(De Rie Cell.Immunol.118:368-381(1989))。在这些实施方案中的任一个中,CD19 CAR的细胞外结合结构域可以包含这些抗体中的任何抗体的V_H、V_L和/或一个或多个CDR,或者由这些抗体中的任何抗体的V_H、V_L和/或一个或多个CDR组成。

[0632] 在一些实施方案中,CD19 CAR的铰链结构域包含CD8α铰链结构域,例如人CD8α铰链结构域。在一些实施方案中,CD8α铰链结构域包含SEQ ID NO:222中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:222中所示的氨基酸序列具有至少80%同一性(例如,至少80%、至少85%、至

少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性)的氨基酸序列,或者由SEQ ID NO:222中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:222中所示的氨基酸序列具有至少80％同一性(例如,至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性)的氨基酸序列组成。在一些实施方案中,铰链结构域包含CD28铰链结构域,例如人CD28铰链结构域。在一些实施方案中,CD28铰链结构域包含SEQ ID NO:223中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:223中所示的氨基酸序列具有至少80％同一性(例如,至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性)的氨基酸序列,或者由SEQ ID NO:223中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:223中所示的氨基酸序列具有至少80％同一性(例如,至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性)的氨基酸序列组成。在一些实施方案中,铰链结构域包含IgG4铰链结构域,例如人IgG4铰链结构域。在一些实施方案中,IgG4铰链结构域包含SEQ ID NO:12A或SEQ ID NO:13A中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:12A或SEQ ID NO:13A中所示的氨基酸序列具有至少80％同一性(例如,至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性)的氨基酸序列,或者由SEQ ID NO:12A或SEQ ID NO:13A中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:12A或SEQ ID NO:13A中所示的氨基酸序列具有至少80％同一性(例如,至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性)的氨基酸序列组成。在一些实施方案中,铰链结构域包含IgG4铰链-Ch2-Ch3结构域,例如人IgG4铰链-Ch2-Ch3结构域。在一些实施方案中,IgG4铰链-Ch2-Ch3结构域包含SEQ ID NO:227中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:227中所示的氨基酸序列具有至少80％同一性(例如,至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性)的氨基酸序列,或者由SEQ ID NO:227中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:227中所示的氨基酸序列具有至少80％同一性(例如,至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性)的氨基酸序列组成。

[0633] 在一些实施方案中,CD19 CAR的跨膜结构域包含CD8α跨膜结构域,例如人CD8α跨膜结构域。在一些实施方案中,CD8α跨膜结构域包含SEQ ID NO:15A中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:15A中所示的氨基酸序列具有至少80％同一性(例如,至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性)的氨基酸序列,或者由SEQ ID NO:15A中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:15A中所示的氨基酸序列具有至少80％同一性(例如,至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性)的氨基酸序列组成。在一些实施方案中,该跨膜结构域包括CD28跨膜结构域,例如人CD28跨膜结构域。在一些实施方案中,CD28跨膜结构域包含SEQ ID NO:229中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:229中所示的氨基酸序列具有至少80％同一性(例如,至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性)的氨基酸序列,或者由SEQ ID NO:229中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:229中所示的氨基酸序列具有至少80％同一性(例如,至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性)的氨基酸序列组成。

[0634] 在一些实施方案中,CD19 CAR的细胞内共刺激结构域包含4-1BB共刺激结构域。4-

1BB(也称为CD137)向T细胞传递强效的共刺激信号,从而促进分化并增强T淋巴细胞的长期存活。在一些实施方案中,4-1BB共刺激结构域是人的。在一些实施方案中,4-1BB共刺激结构域包含SEQ ID NO:231中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:231中所示的氨基酸序列具有至少80%同一性(例如,至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性)的氨基酸序列,或者由SEQ ID NO:231中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:231中所示的氨基酸序列具有至少80%同一性(例如,至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性)的氨基酸序列组成。在一些实施方案中,细胞内共刺激结构域包含CD28共刺激结构域。CD28是T细胞上的另一种共刺激分子。在一些实施方案中,CD28共刺激结构域是人的。在一些实施方案中,CD28共刺激结构域包含SEQ ID NO:232中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:232中所示的氨基酸序列具有至少80%同一性(例如,至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性)的氨基酸序列,或者由SEQ ID NO:232中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:232中所示的氨基酸序列具有至少80%同一性(例如,至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性)的氨基酸序列组成。在一些实施方案中,CD19 CAR的细胞内共刺激结构域包含如所描述的4-1BB共刺激结构域和CD28共刺激结构域。

[0635] 在一些实施方案中,CD19 CAR的细胞内信号传导结构域包含CD3 zeta(ζ)信号传导结构域。CD3ζ与T细胞受体(TCR)缔合产生信号并含有基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM)。CD3ζ信号传导结构域是指来自ζ链的细胞质结构域的氨基酸残基,其足以功能性地传递T细胞活化所必需的初始信号。在一些实施方案中,CD3ζ信号传导结构域是人的。在一些实施方案中,CD3ζ信号传导结构域包含SEQ ID NO:233中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:233中所示的氨基酸序列具有至少80%同一性(例如,至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性)的氨基酸序列,或者由SEQ ID NO:233中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:233中所示的氨基酸序列具有至少80%同一性(例如,至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性)的氨基酸序列组成。

[0636] 在一些实施方案中,第二转基因包含编码CD19 CAR的核苷酸序列,该CD19 CAR包括例如包含以下的CD19 CAR:具有SEQ ID NO:235或SEQ ID NO:245中所示的序列的CD19特异性scFv、SEQ ID NO:222的CD8α铰链结构域、SEQ ID NO:15A的CD8α跨膜结构域、SEQ ID NO:231的4-1BB共刺激结构域、SEQ ID NO:233的CD3ζ信号传导结构域和/或其变体(即,具有与所公开的序列具有至少80%同一性,例如至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99同一性的序列)。在这些实施方案中的任一个中,CD19 CAR可以另外包含如所描述的信号肽(例如,CD8α信号肽)。

[0637] 在一些实施方案中,第二转基因包含编码CD19 CAR的核苷酸序列,该CD19 CAR包括例如包含以下的CD19 CAR:具有SEQ ID NO:235或SEQ ID NO:245中所示的序列的CD19特异性scFv、SEQ ID NO:12A或SEQ ID NO:13A的IgG4铰链结构域、SEQ ID NO:229的CD28跨膜结构域、SEQ ID NO:231的4-1BB共刺激结构域、SEQ ID NO:233的CD3ζ信号传导结构域和/或其变体(即,具有与所公开的序列具有至少80%同一性,例如至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99同一性的序列)。在这些实施方案

中的任一个中,CD19 CAR可以另外包含如所描述的信号肽(例如,CD8α信号肽)。

[0638] 在一些实施方案中,第二转基因包含编码CD19 CAR的核苷酸序列,该CD19 CAR包括例如包含以下的CD19 CAR:具有SEQ ID NO:235或SEQ ID NO:245中所示的序列的CD19特异性scFv、SEQ ID NO:223的CD28铰链结构域、SEQ ID NO:229的CD28跨膜结构域、SEQ ID NO:232的CD28共刺激结构域、SEQ ID NO:233的CD3ζ信号传导结构域和/或其变体(即,具有与所公开的序列具有至少80%同一性,例如至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99同一的序列)。在这些实施方案中的任一个中,CD19 CAR可以另外包含如所描述的信号肽(例如,CD8α信号肽)。

[0639] 在一些实施方案中,第二转基因包含如SEQ ID NO:247中所示的编码CD19 CAR的核苷酸序列,或者与SEQ ID NO:247中所示的核苷酸序列具有至少80%同一性(例如,至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性)(参见表14)。所编码的CD19 CAR具有SEQ ID NO:248中所示的对应氨基酸序列,或者与SEQ ID NO:248中所示的氨基酸序列具有至少80%同一性(例如,至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性),具有以下组分:CD8α信号肽、FMC63 scFv(VL-Whitlow接头-VH)、CD8α铰链结构域、CD8α跨膜结构域、4-1BB共刺激结构域和CD3ζ信号传导结构域。

[0640] 在一些实施方案中,第二转基因包含编码CD19 CAR的可商购获得的实施方案的核苷酸序列。由T细胞表达和/或编码的CD19 CAR的可商购获得的实施方案的非限制性实例包括替沙仑赛(tisagenlecleucel)、利基迈仑赛(lisocabtagene maraleucel)、阿基仑赛(axicabtagene ciloleucel)和布瑞基奥仑赛(brexucabtagene autoleucel)。

[0641] 在一些实施方案中,第二转基因包含编码替沙仑赛或其部分的核苷酸序列。替沙仑赛包含具有以下组分的CD19 CAR:CD8α信号肽、FMC63 scFv(VL-3xG4S接头-VH)、CD8α铰链结构域、CD8α跨膜结构域、4-1BB共刺激结构域和CD3ζ信号传导结构域。替沙仑赛中的CD19 CAR的核苷酸和氨基酸序列提供于表14中,该序列的注释提供于表15中。

[0642] 在一些实施方案中,第二转基因包含编码利基迈仑赛或其部分的核苷酸序列。利基迈仑赛包含具有以下组分的CD19 CAR:GMCSFR-α或CSF2RA信号肽、FMC63 scFv(VL-Whitlow接头-VH)、IgG4铰链结构域、CD28跨膜结构域、4-1BB共刺激结构域和CD3ζ信号传导结构域。利基迈仑赛中的CD19 CAR的核苷酸和氨基酸序列提供于表14中,该序列的注释提供于表16中。

[0643] 在一些实施方案中,第二转基因包含编码阿基仑赛或其部分的核苷酸序列。阿基仑赛包含具有以下组分的CD19 CAR:GMCSFR-α或CSF2RA信号肽、FMC63 scFv(VL-Whitlow接头-VH)、CD28铰链结构域、CD28跨膜结构域、CD28共刺激结构域和CD3ζ信号传导结构域。阿基仑赛中的CD19 CAR的核苷酸和氨基酸序列提供于表14中,该序列的注释提供于表17中。

[0644] 在一些实施方案中,第二转基因包含编码布瑞基奥仑赛或其部分的核苷酸序列。布瑞基奥仑赛包含具有以下组分的CD19 CAR:GMCSFR-α信号肽、FMC63 scFv、CD28铰链结构域、CD28跨膜结构域、CD28共刺激结构域和CD3ζ信号传导结构域。

[0645] 在一些实施方案中,第二转基因包含如SEQ ID NO:249、251或253中所示的编码CD19 CAR的核苷酸序列,或者与SEQ ID NO:249、251或253中所示的核苷酸序列具有至少80%同一性(例如,至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少

98％、至少99％或100％同一性)。所编码的CD19 CAR具有SEQ ID NO:250、252或254中分别所示的对应氨基酸序列,或者与SEQ ID 250、252或254中分别所示的氨基酸序列具有至少80％同一性(例如,至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性)。

[0646] 表14.CD19 CAR的示例性序列

SEQ ID NO:	序列	描述
247	atggccttaccagtgaccgccttgctcctgccgctggccttgctgctccacgccgccaggccggacatccagat gacacagactacatcctccctgtctgcctctctgggagacagagtcaccatcagttgcagggcaagtcaggacat tagtaaatatttaaattggtatcagcagaaaccagatggaactgttaaactcctgatctaccatacatcaagattaca ctcaggagtcccatcaaggttcagtggcagtgggtctggaacagattattctctcaccattagcaacctggagcaa gaagatattgccacttacttttgccaacagggtaatacgcttccgtacacgttcggaggggggaccaagctggag atcacaggctccacctctggatccggcaagcccggatctggcgagggatccaccaagggcgaggtgaaactg caggagtcaggacctggcctggtggcgccctcacagagcctgtccgtcacatgcactgtctcaggggtctcatt acccgactatggtgtaagctggattcgccagcctccacgaaagggtctggagtggctgggagtaatatggggta gtgaaaccacatactataattcagctctcaaatccagactgaccatcatcaaggacaactccaagagccaagtttt cttaaaaatgaacagtctgcaaactgatgacacagccatttactactgtgccaaacattattactacggtggtagcta tgctatggactactggggccaaggaacctcagtcaccgtctcctcaaccacgacgccagcgccgcgaccacca acaccggcgcccaccatcgcgtcgcagcccctgtccctgcgcccagaggcgtgccggccagcggcgggggg gcgcagtgcacacgagggggctggacttcgcctgtgatatctacatctgggcgcccttggccgggacttgtggg gtccttctcctgtcactggttatcacccttactgcaaacggggcagaaagaaactcctgtatatattcaaacaacca tttatgagaccagtacaaactactcaagaggaagatggctgtagctgccgatttccagaagaagaagaaggagg atgtgaactgagagtgaagttcagcaggagcgcagacgcccccgcgtaccagcagggccagaaccagctcta taacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgttttggacaagagacgtggccgggaccctgagatg gggggaaagccgagaaggaagaaccctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcgga ggcctacagtgagattgggatgaaaggcgagcgccggaggggcaaggggcacgatggccttaccagggtc tcagtacagccaccaaggacacctacgacgcccttcacatgcaggccctgcccccctcgc	示例性CD19 CAR核苷酸序列
248	MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQD ISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISN LEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGE VKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLG VIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAK HYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPE ACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGR KKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADA PAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQE GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYD ALHMQALPPR	示例性CD19 CAR氨基酸序列
249	atggccttaccagtgaccgccttgctcctgccgctggccttgctgctccacgccgccaggccggacatccagat gacacagactacatcctccctgtctgcctctctgggagacagagtcaccatcagttgcagggcaagtcaggacat tagtaaatatttaaattggtatcagcagaaaccagatggaactgttaaactcctgatctaccatacatcaagattaca ctcaggagtcccatcaaggttcagtggcagtgggtctggaacagattattctctcaccattagcaacctggagcaa gaagatattgccacttacttttgccaacagggtaatacgcttccgtacacgttcggaggggggaccaagctggag atcacaggtggcggtggctcgggcggtggtgggtcgggtggcggcggatctgaggtgaaactgcaggagtca ggacctggcctggtggcgccctcacagagcctgtccgtcacatgcactgtctcaggggtctcattacccgactat ggtgtaagctggattcgccagcctccacgaaagggtctggagtggctgggagtaatatggggtagtgaaacca catactataattcagctctcaaatccagactgaccatcatcaaggacaactccaagagccaagttttcttaaaaatg aacagtctgcaaactgatgacacagccatttactactgtgccaaacattattactacggtggtagctatgctatgga ctactggggccaaggaacctcagtcaccgtctcctcaaccacgacgccagcgccgcgaccaccaacaccggc gcccaccatcgcgtcgcagcccctgtccctgcgcccagaggcgtgccggccagcggcgggggcgcagtg cacacgagggggctggacttcgcctgtgatatctacatctgggcgcccttggccgggacttgtggggtccttctc ctgtcactggttatcacccttactgcaaacggggcagaaagaaactcctgtatatattcaaacaaccatttatgaga ccagtacaaactactcaagaggaagatggctgtagctgccgatttccagaagaagaagaaggaggatgtgaac tgagagtgaagttcagcaggagcgcagacgcccccgcgtacaagcagggccagaaccagctctataacgag ctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgttttggacaagagacgtggccgggaccctgagatgggggga aagccgagaaggaagaaccctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcta	替沙仑赛CD19 CAR核苷酸序列

[0647]

[0648]

	cagtgagattgggatgaaaggcgagcgccggaggggcaaggggcacgatggcctttaccagggtctcagtac agccaccaaggacacctacgacgcccttcacatgcaggccctgcccccctcgc	
250	MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQD ISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISN LEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGGGGSGGGGSGGGGSEVK LQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVI WGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHY YYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEAC RPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKK LLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPA YKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGL YNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDAL HMQALPPR	替沙仑赛 CD19 CAR 氨基酸序列
251	atgctgctgctggtgaccagcctgctgctgtgcgagctgccccaccccgcctttctgctgatccccgacatccag atgacccagaccacctccagcctgagcgccagcctgggcgaccgggtgaccatcagctgccgggccagcca ggacatcagcaagtacctgaactggtatcagcagaagcccgacggcaccgtcaagctgctgatctaccacacc agccggctgcacagcggcgtgcccagccggtttagcggcagcggctccggcaccgactacagcctgaccatc tccaacctggaacaggaagatatcgccacctacttttgccagcagggcaacacactgccctacacctttggcgg cggaacaaagctggaaatcaccggcagcacctccggcagcggcaagcctggcagcggcgagggcagcacc aagggcgaggtgaagctgcaggaaagcggccctggcctggtggcccccagccagagcctgagcgtgacctg caccgtgagcggcgtgagcctgcccgactacggcgtgagctggatccggcagccccccaggaagggcctgg aatggctgggcgtgatctggggcagcgagaccacctactacaacagcgccctgaagagccggctgaccatcat caaggacaacagcaagagccaggtgttcctgaagatgaacagcctgcagaccgacgacaccgccatctacta ctgcgccaagcactactactacggcggcagctacgccatggactactggggccagggcaccagcgtgaccgt gagcagcgaatctaagtacggaccgccctgcccccctttgccctatgttctgggtgctggtggtggtcggaggcg tgctggcctgctacagcctgctggtcaccgtggccttcatcatcttttgggtgaaacggggcagaaagaaactcct gtatatattcaaacaaccatttatgagaccagtacaaactactcaagaggaagatggctgtagctgccgatttcca gaagaagaagaaggaggatgtgaactgcgggtgaagttcagcagaagcgccgacgcccctgcctaccagca gggccagaatcagctgtacaacgagctgaacctgggcagaagggaagagtacgacgtcctggataagcgga gaggccgggaccctgagatgggcggcaagcctcggcggaagaacccccaggaaggcctgtataacgaact gcagaaagacaagatggccgaggcctacagcgagatcggcatgaagggcgagcggaggcggggcaaggg ccacgacggcctgtatcagggcctgtccaccgccaccaaggatacctacgacgccctgcacatgcaggccctg cccccaagg	利基迈仑赛 CD19 CAR 核苷酸序列
252	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQD ISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISN LEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGE VKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLG VIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAK HYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSESKYGPPCPPCPMFWVLVVVGG VLACYSLLVTVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSC RFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERR RGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	利基迈仑赛 CD19 CAR 氨基酸序列
253	atgcttctcctggtgacaagccttctgctctgtgagttaccacacccagcattcctcctgatcccagacatccagat gacacagactacatcctccctgtctgcctctctgggagacagagtcaccatcagttgcagggcaagtcaggacat tagtaaatatttaaattggtatcagcagaaaccagatggaactgttaaactcctgatctaccatacatcaagattaca ctcaggagtcccatcaaggttcagtggcagtgggtctggaacagattattctctcaccattagcaacctggagcaa gaagatattgccacttacttttgccaacagggtaatacgcttccgtacacgttcggaggggggactaagttggaaa taacaggctccacctctggatccggcaagcccggatctggcgagggatccaccaagggcgaggtgaaactgc aggagtcaggacctggcctggtggcgccctcacagagcctgtccgtcacatgcactgtctcaggggtctcatta cccgactatggtgtaagctggattcgccagcctccacgaaagggtctggagtggctgggagtaatatggggtag tgaaaccacatactataattcagctctcaaatccagactgaccatcatcaaggacaactccaagagccaagttttct taaaaatgaacagtctgcaaactgatgacacagccatttactactgtgccaaacattattactacggtggtagctat gctatggactactggggtcaaggaacctcagtcaccgtctcctcagcggccgcaattgaagttatgtatcctcctc cttacctagacaatgagaagagcaatggaaccattatccatgtgaaagggaaacacctttgtccaagtcccctattt cccggaccttctaagccctttgggtgctggtggtggttgggggagtcctggcttgctatagcttgctagtaacagt ggcctttattattttctgggtgaggagtaagaggagcaggctcctgcacagtgactacatgaacatgactccccgc cgccccgggcccacccgcaagcattaccagccctatgccccaccacgcgacttcgcagcctatcgctccagag tgaagttcagcaggagcgcagacgcccccgcgtaccagcagggccagaaccagctctataacgagctcaatct aggacgaagagaggagtacgatgttttggacaagagacgtggccgggaccctgagatgggggggaaagccga	阿基仑赛 CD19 CAR 核苷酸序列

[0649]

	gaaggaagaaccctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctacagtgagattgggatgaaaggcgagcgccggaggggcaaggggcacgatggcctttaccagggtctcagtacagccaccaaggacacctacgacgcccttcacatgcaggccctgccccctcgc	
254	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	阿基仑赛CD19CAR氨基酸序列

[0650] 表15.替沙仑赛CD19 CAR序列的注释

[0651]

特性	核苷酸序列位置	氨基酸序列位置
CD8α 信号肽	1-63	1-21
FMC63 scFv (V_L-3xG_4S 接头-V_H)	64-789	22-263
CD8α 铰链结构域	790-924	264-308
CD8α 跨膜结构域	925-996	309-332
4-1BB 共刺激结构域	997-1122	333-374
CD3ζ 信号传导结构域	1123-1458	375-486

[0652] 表16.利基迈仑赛CD19 CAR序列的注释

[0653]

特性	核苷酸序列位置	氨基酸序列位置
GMCSFR-α 信号肽	1-66	1-22
FMC63 scFv (V_L-Whitlow 接头-V_H)	67-801	23-267
IgG4 铰链结构域	802-837	268-279
CD28 跨膜结构域	838-921	280-307
4-1BB 共刺激结构域	922-1047	308-349
CD3ζ 信号传导结构域	1048-1383	350-461

[0654] 表17.阿基仑赛CD19 CAR序列的注释

[0655]

特性	核苷酸序列位置	氨基酸序列位置
CSF2RA 信号肽	1-66	1-22
FMC63 scFv (VL-Whitlow 接头-VH)	67-801	23-267
CD28 铰链结构域	802-927	268-309
CD28 跨膜结构域	928-1008	310-336
CD28 共刺激结构域	1009-1131	337-377

[0656]

CD3ζ 信号传导结构域	1132-1467	378-489

[0657] 在一些实施方案中,第二转基因包含如SEQ ID NO:244、246或248中所示的编码CD19 CAR的核苷酸序列,或者与SEQ ID NO:244、246或248中所示的核苷酸序列具有至少

80％同一性(例如,至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性)。所编码的CD19 CAR具有SEQ ID NO:245、247或249中分别所示的对应氨基酸序列,与SEQ ID NO:245、247或249中分别所示的氨基酸序列具有至少80％同一性(例如具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性)。

[0658] g.CD20 CAR

[0659] 在一些实施方案中,CAR是CD20 CAR,并且在这些实施方案中,第二转基因包含编码CD20 CAR的核苷酸序列。CD20是这样的抗原,其早在前-B期就在B细胞表面上被发现,并且水平逐渐增加直到B细胞成熟,也在大多数B细胞赘生物的细胞上被发现。CD20阳性细胞有时也在霍奇金病、骨髓瘤和胸腺瘤的病例中被发现。在一些实施方案中,CD20 CAR可以包含串联的信号肽、特异性地结合CD20的细胞外结合结构域、铰链结构域、跨膜结构域、细胞内共刺激结构域和/或细胞内信号传导结构域。

[0660] 在一些实施方案中,CD20 CAR的信号肽包含CD8α信号肽。在一些实施方案中,CD8α信号肽包含SEQ ID NO:6A中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:6A中所示的氨基酸序列具有至少80％同一性(例如,至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性)的氨基酸序列,或者由SEQ ID NO:6A中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:6A中所示的氨基酸序列具有至少80％同一性(例如,至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性)的氨基酸序列组成。在一些实施方案中,该信号肽包含IgK信号肽。在一些实施方案中,IgK信号肽包含SEQ ID NO:7A中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:7A中所示的氨基酸序列具有至少80％同一性(例如,至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性)的氨基酸序列,或者由SEQ ID NO:7A中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:7A中所示的氨基酸序列具有至少80％同一性(例如,至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性)的氨基酸序列组成。在一些实施方案中,该信号肽包含GMCSFR-α或CSF2RA信号肽。在一些实施方案中,GMCSFR-α或CSF2RA信号肽包含SEQ ID NO:8A中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:8A中所示的氨基酸序列具有至少80％同一性(例如,至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性)的氨基酸序列,或者由SEQ ID NO:8A中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:8A中所示的氨基酸序列具有至少80％同一性(例如,至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性)的氨基酸序列组成。

[0661] 在一些实施方案中,CD20 CAR的细胞外结合结构域对CD20(例如,人CD20)具有特异性。CD20 CAR的细胞外结合结构域可以针对在宿主细胞中的表达而被密码子优化,或具有变异序列以增加细胞外结合结构域的功能。在一些实施方案中,细胞外结合结构域包含免疫球蛋白分子的免疫原性活性部分,例如scFv。

[0662] 在一些实施方案中,CD20 CAR的细胞外结合结构域来源于CD20特异性抗体,包括例如Leu16、IF5、1.5.3、利妥昔单抗、奥妥珠单抗、替伊莫单抗、奥法妥木单抗、托西莫单抗、奥尼妥单抗、维妥珠单抗、乌妥昔单抗和奥瑞利珠单抗。在这些实施方案中的任一个中,CD20CAR的细胞外结合结构域可以包含这些抗体中的任何抗体的V_H、V_L和/或一个或多个

CDR,或者由这些抗体中的任何抗体的V_H、V_L和/或一个或多个CDR组成。

[0663] 在一些实施方案中,CD20 CAR的细胞外结合结构域包含来源于Leu16单克隆抗体的scFv,其包含通过接头连接的Leu16的重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)。参见Wu等人,Protein Engineering.14(12):1025-1033(2001)。在一些实施方案中,接头是3xG4S接头。在其他实施方案中,接头是如本文所描述的Whitlow接头。在一些实施方案中,完整Leu16来源的scFv(也称为Leu16 scFv)的不同部分及其不同部分的氨基酸序列提供于下表18中。在一些实施方案中,CD20特异性scFv包含SEQ ID NO:255、256或260中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:255、256或260中所示的氨基酸序列具有至少80%同一性(例如,至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性)的氨基酸序列,或者由SEQ ID NO:255、256或260中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:255、256或260中所示的氨基酸序列具有至少80%同一性(例如,至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性)的氨基酸序列组成。在一些实施方案中,CD20特异性scFv可以包含具有SEQ ID NO:257、258、259、261和262中所示的氨基酸序列的一个或多个CDR。在一些实施方案中,CD20特异性scFv可以包含具有一个或多个CDR的轻链,该一个或多个CDR具有SEQ ID NO:257、258、259中所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,CD20特异性scFv可包含具有一个或多个CDR的重链,该一个或多个CDR具有SEQ ID NO:261、262中所示的氨基酸序列。在这些实施方案中的任一个中,CD20特异性scFv可以包含一个或多个CDR,该一个或多个CDR包含一个或多个氨基酸取代,或包含与所标识的序列中的任何序列具有至少80%同一性(例如,至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性)的序列。在一些实施方案中,CD20 CAR的细胞外结合结构域包含如本文所述的一个或多个CDR或由其组成。

[0664] 表18.抗CD20 scFv和组分的示例性序列

[0665]

SEQ ID NO:	氨基酸序列	描述
255	DIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRA SSSVNYM DWYQKKPGSSPKPWIY ATSNLASGVPARFSGS GSGTSYSL TISRVEAEDAATYYCQQWSFNPPT FGGGTKLEIKGSTSGSGKPGSGEGS TKGEVQL QQSGAELVKPGASVKM SCKASGYTFTSYNMH WVKQTPG QGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKG KATLTADKSSSTAYMQLSSLTSED SADYYCAR SNYYGSSYWFFDVW GAGTTVTVSS	抗 CD20 Leu16 scFv 完整序列，具有 Whitlow 接头
256	DIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRA SSSVNYM DWYQKKPGSSPKPWIY ATSNLASGVPARFSGS GSGTSYSL TISRVEAEDAATYYCQQWSFNPPT FGGGTKLEIK	抗 CD20 Leu16 scFv 轻链可变区
257	RASSSVNYMD	抗 CD20 Leu16 scFv 轻链 CDR1
258	ATSNLAS	抗 CD20 Leu16 scFv 轻链 CDR2
259	QQWSFNPPT	抗 CD20 Leu16 scFv 轻链 CDR3
260	EVQLQQSGAELVKPGASVKMSCK ASGYTFTS YNMHWVKQTPGQGL EWIGAIYPGNGDTSYN	抗 CD20 Leu16 scFv 重链
	QKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSS LTSEDSAD YYCARSNYYGSSYWF FDVWGAGTTVTVSS	
261	SYNMH	抗 CD20 Leu16 scFv 重链 CDR1
262	AIYPGNGDTSYNQKFKG	抗 CD20 Leu16 scFv 重链 CDR2

[0666] 在一些实施方案中,CD20 CAR的铰链结构域包含CD8α铰链结构域,例如人CD8α铰链结构域。在一些实施方案中,CD8α铰链结构域包含SEQ ID NO:9A中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:9A中所示的氨基酸序列具有至少80%同一性(例如,至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性)的氨基酸序列,或者由SEQ ID NO:9A中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:9A中所示的氨基酸序列具有至少80%同一性(例如,至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至

少98％、至少99％或100％同一性)的氨基酸序列组成。在一些实施方案中,铰链结构域包含CD28铰链结构域,例如人CD28铰链结构域。在一些实施方案中,CD28铰链结构域包含SEQ ID NO:223中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:223中所示的氨基酸序列具有至少80％同一性(例如,至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性)的氨基酸序列,或者由SEQ ID NO:223中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:223中所示的氨基酸序列具有至少80％同一性(例如,至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性)的氨基酸序列组成。在一些实施方案中,铰链结构域包含IgG4铰链结构域,例如人IgG4铰链结构域。在一些实施方案中,IgG4铰链结构域包含SEQ ID NO:12A或SEQ ID NO:13A中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:12A或SEQ ID NO:13A中所示的氨基酸序列具有至少80％同一性(例如,至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性)的氨基酸序列,或者由SEQ ID NO:12A或SEQ ID NO:13A中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:12A或SEQ ID NO:13A中所示的氨基酸序列具有至少80％同一性(例如,至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性)的氨基酸序列组成。在一些实施方案中,铰链结构域包含IgG4铰链-Ch2-Ch3结构域,例如人IgG4铰链-Ch2-Ch3结构域。在一些实施方案中,IgG4铰链-Ch2-Ch3结构域包含SEQ ID NO:227中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:227中所示的氨基酸序列具有至少80％同一性(例如,至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性)的氨基酸序列,或者由SEQ ID NO:227中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:227中所示的氨基酸序列具有至少80％同一性(例如,至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性)的氨基酸序列组成。

[0667] 在一些实施方案中,CD20 CAR的跨膜结构域包含CD8α跨膜结构域,例如人CD8α跨膜结构域。在一些实施方案中,CD8α跨膜结构域包含SEQ ID NO:15A中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:15A中所示的氨基酸序列具有至少80％同一性(例如,至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性)的氨基酸序列,或者由SEQ ID NO:15A中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:15A中所示的氨基酸序列具有至少80％同一性(例如,至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性)的氨基酸序列组成。在一些实施方案中,跨膜结构域包含CD28跨膜结构域,例如人CD28跨膜结构域。在一些实施方案中,CD28跨膜结构域包含SEQ ID NO:229中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:229中所示的氨基酸序列具有至少80％同一性(例如,至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性)的氨基酸序列,或者由SEQ ID NO:229中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:229中所示的氨基酸序列具有至少80％同一性(例如,至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性)的氨基酸序列组成。

[0668] 在一些实施方案中,CD20 CAR的细胞内共刺激结构域包含4-1BB共刺激结构域,例如人4-1BB共刺激结构域。在一些实施方案中,4-1BB共刺激结构域包含SEQ ID NO:231中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:231中所示的氨基酸序列具有至少80％同一性(例如,至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同

一性)的氨基酸序列,或者由SEQ ID NO:231中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:231中所示的氨基酸序列具有至少80%同一性(例如,至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性)的氨基酸序列组成。在一些实施方案中,细胞内共刺激结构域包含CD28共刺激结构域,例如人CD28共刺激结构域。在一些实施方案中,CD28共刺激结构域包含SEQ ID NO:232中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:232中所示的氨基酸序列具有至少80%同一性(例如,至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性)的氨基酸序列,或者由SEQ ID NO:232中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:232中所示的氨基酸序列具有至少80%同一性(例如,至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性)的氨基酸序列组成。

[0669] 在一些实施方案中,CD20 CAR的细胞内信号传导结构域包含CD3 zeta(ζ)信号传导结构域,例如人CD3ζ信号传导结构域。在一些实施方案中,CD3ζ信号传导结构域包含SEQ ID NO:233中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:233中所示的氨基酸序列具有至少80%同一性(例如,至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性)的氨基酸序列,或者由SEQ ID NO:233中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:233中所示的氨基酸序列具有至少80%同一性(例如,至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性)的氨基酸序列组成。

[0670] 在一些实施方案中,第二转基因包含编码CD20 CAR的核苷酸序列,该CD20 CAR包括例如包含以下的CD20 CAR:具有SEQ ID NO:255中所示的序列的CD20特异性scFv、SEQ ID NO:9A的CD8α铰链结构域、SEQ ID NO:15A的CD8α跨膜结构域、SEQ ID NO:231的4-1BB共刺激结构域、SEQ ID NO:233的CD3ζ信号传导结构域和/或其变体(即,具有与所公开的序列具有至少80%同一性,例如至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99同一性的序列)。

[0671] 在一些实施方案中,第二转基因包含编码CD20 CAR的核苷酸序列,该CD20 CAR包括例如包含以下的CD20 CAR:具有SEQ ID NO:255中所示的序列的CD20特异性scFv、SEQ ID NO:223的CD28铰链结构域、SEQ ID NO:15A的CD8α跨膜结构域、SEQ ID NO:231的4-1BB共刺激结构域、SEQ ID NO:233的CD3ζ信号传导结构域和/或其变体(即,具有与所公开的序列具有至少80%同一性的序列,例如具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的序列)。

[0672] 在一些实施方案中,第二转基因包含编码CD20 CAR的核苷酸序列,该CD20 CAR包括例如包含以下的CD20 CAR:具有SEQ ID NO:255中所示的序列的CD20特异性scFv、SEQ ID NO:12A或SEQ ID NO:13A的IgG4铰链结构域、SEQ ID NO:15A的CD8α跨膜结构域、SEQ ID NO:231的4-1BB共刺激结构域、SEQ ID NO:233的CD3ζ信号传导结构域和/或其变体(即,具有与所公开的序列具有至少80%同一性,例如具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的序列)。

[0673] 在一些实施方案中,第二转基因包含编码CD20 CAR的核苷酸序列,该CD20 CAR包括例如包含以下的CD20 CAR:具有SEQ ID NO:255中所示的序列的CD20特异性scFv、SEQ ID NO:9A的CD8α铰链结构域、SEQ ID NO:229的CD28跨膜结构域、SEQ ID NO:231的4-1BB共刺

激结构域、SEQ ID NO:233的CD3ζ信号传导结构域和/或其变体(即,具有与所公开的序列具有至少80%同一性,例如具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的序列)。

[0674] 在一些实施方案中,第二转基因包含编码CD20 CAR的核苷酸序列,该CD20 CAR包括例如包含以下的CD20 CAR:具有SEQ ID NO:255中所示的序列的CD20特异性scFv、SEQ ID NO:223的CD28铰链结构域、SEQ ID NO:229的CD28跨膜结构域、SEQ ID NO:231的4-1BB共刺激结构域、SEQ ID NO:233的CD3ζ信号传导结构域和/或其变体(即,具有与所公开的序列具有至少80%同一性的序列,例如具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的序列)。

[0675] 在一些实施方案中,第二转基因包含编码CD20 CAR的核苷酸序列,该CD20 CAR包括例如包含以下的CD20 CAR:具有SEQ ID NO:255中所示的序列的CD20特异性scFv、SEQ ID NO:12A或SEQ ID NO:13A的IgG4铰链结构域、SEQ ID NO:229的CD28跨膜结构域、SEQ ID NO:231的4-1BB共刺激结构域、SEQ ID NO:233的CD3ζ信号传导结构域和/或其变体(即,具有与所公开的序列具有至少80%同一性,例如至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99同一性的序列)。

[0676] h.CD22 CAR

[0677] 在一些实施方案中,CAR是CD22 CAR,并且在这些实施方案中,第二转基因包含编码CD22 CAR的核苷酸序列。CD22是一种跨膜蛋白,其主要存在于成熟B细胞的表面,充当B细胞受体(BCR)信号传导的抑制性受体。CD22在60-70%的B细胞淋巴瘤和白血病(例如,B慢性淋巴细胞白血病、毛细胞白血病、急性淋巴细胞白血病(ALL)和伯基特氏淋巴瘤(Burkitt's lymphoma))中表达,并且在B细胞发育早期阶段的细胞表面或干细胞上不存在。在一些实施方案中,CD22CAR可以包含串联的信号肽、特异性地结合CD22的细胞外结合结构域、铰链结构域、跨膜结构域、细胞内共刺激结构域和/或细胞内信号传导结构域。

[0678] 在一些实施方案中,CD22 CAR的信号肽包含CD8α信号肽。在一些实施方案中,CD8α信号肽包含SEQ ID NO:6A中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:6A中所示的氨基酸序列具有至少80%同一性(例如,至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性)的氨基酸序列,或者由SEQ ID NO:6A中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:6A中所示的氨基酸序列具有至少80%同一性(例如,至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性)的氨基酸序列组成。在一些实施方案中,该信号肽包含IgK信号肽。在一些实施方案中,IgK信号肽包含SEQ ID NO:7A中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:7A中所示的氨基酸序列具有至少80%同一性(例如,至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性)的氨基酸序列,或者由SEQ ID NO:7A中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:7A中所示的氨基酸序列具有至少80%同一性(例如,至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性)的氨基酸序列组成。在一些实施方案中,该信号肽包含GMCSFR-α或CSF2RA信号肽。在一些实施方案中,GMCSFR-α或CSF2RA信号肽包含SEQ ID NO:8A中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:8A中所示的氨基酸序列具有至少80%同一性(例如,至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性)的氨基酸序列,或者由SEQ ID NO:

8A中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:8A中所示的氨基酸序列具有至少80％同一性(例如,至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性)的氨基酸序列组成。

[0679] 在一些实施方案中,CD22 CAR的细胞外结合结构域对CD22(例如,人CD22)具有特异性。CD22 CAR的细胞外结合结构域可以针对在宿主细胞中的表达而被密码子优化,或具有变异序列以增加细胞外结合结构域的功能。在一些实施方案中,细胞外结合结构域包含免疫球蛋白分子的免疫原性活性部分,例如scFv。

[0680] 在一些实施方案中,CD22 CAR的细胞外结合结构域来源于对CD22具有特异性的抗体,包括例如SM03、伊珠单抗、依帕珠单抗、莫塞妥莫单抗和匹那妥珠单抗。在这些实施方案中的任一个中,CD22CAR的细胞外结合结构域可以包含这些抗体中的任何抗体的V_H、V_L和/或一个或多个CDR,或者由这些抗体中的任何抗体的V_H、V_L和/或一个或多个CDR组成。

[0681] 在一些实施方案中,CD22 CAR的细胞外结合结构域包含来源于m971单克隆抗体(m971)的scFv,其包含通过接头连接的m971的重链可变区(V_H)和轻链可变区(V_L)。在一些实施方案中,接头是3xG_4S接头。在其他实施方案中,可以替代地使用Whitlow接头。在一些实施方案中,完整m971来源的scFv(也称为m971 scFv)及其不同部分的氨基酸序列提供于下表19中。在一些实施方案中,CD22特异性scFv包含SEQ ID NO:263、264或268中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:263、264或268中所示的氨基酸序列具有至少80％同一性(例如,至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性)的氨基酸序列,或者由SEQ ID NO:263、264或268中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:263、264或268中所示的氨基酸序列具有至少80％同一性(例如,至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性)的氨基酸序列组成。在一些实施方案中,CD22特异性scFv可以包含具有SEQ ID NO:265、266、267和269、270、271中所示的氨基酸序列的一个或多个CDR。在一些实施方案中,CD22特异性scFv可以包含具有一个或多个CDR的重链,该一个或多个CDR具有SEQ ID NO:265、266、267中所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,CD22特异性scFv可以包含具有一个或多个CDR的轻链,该一个或多个CDR具有SEQ ID NO:269、270、271中所示的氨基酸序列。在这些实施方案中的任一个中,CD22特异性scFv可以包含一个或多个CDR,该一个或多个CDR包含一个或多个氨基酸取代,或包含与所标识的序列中的任何序列具有至少80％同一性(例如,至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性)的序列。在一些实施方案中,CD22 CAR的细胞外结合结构域包含如本文所述的一个或多个CDR或由其组成。

[0682] 在一些实施方案中,CD22 CAR的细胞外结合结构域包含来源于m971-L7的scFv,其是具有与亲本抗体m971相比显著提高的CD22结合亲和力(从约2nM提高至小于50pM)的m971的亲和力成熟变体。在一些实施方案中,来源于m971-L7的scFv包含通过3xG_4S接头连接的m971-L7的V_H和V_L。在其他实施方案中,可以替代地使用Whitlow接头。在一些实施方案中,完整m971-L7来源的scFv(也称为m971-L7 scFv)及其不同部分的氨基酸序列提供于下表19中。在一些实施方案中,CD22特异性scFv包含SEQ ID NO:272、273或277中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:272、273或277中所示的氨基酸序列具有至少80％同一性(例如,至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同

一性)的氨基酸序列,或者由SEQ ID NO:272、273或277中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:272、273或277中所示的氨基酸序列具有至少80%同一性(例如,至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性)的氨基酸序列组成。在一些实施方案中,CD22特异性scFv可以包含具有SEQ ID NO:274、275、276和278、279、280中所示的氨基酸序列的一个或多个CDR。在一些实施方案中,CD22特异性scFv可以包含具有一个或多个CDR的重链,该一个或多个CDR具有SEQ ID NO:274、275、276中所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,CD22特异性scFv可以包含具有一个或多个CDR的轻链,该一个或多个CDR具有SEQ ID NO:278、279、280中所示的氨基酸序列。在这些实施方案中的任一个中,CD22特异性scFv可以包含一个或多个CDR,该一个或多个CDR包含一个或多个氨基酸取代,或包含与所标识的序列中的任何序列具有至少80%同一性(例如,至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性)的序列。在一些实施方案中,CD22 CAR的细胞外结合结构域包含如本文所述的一个或多个CDR或由其组成。

[0683] 表19.抗CD22 scFv和组分的示例性序列

[0684]

SEQ ID NO:	氨基酸序列	描述
263	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNSA AW NWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYNDYAV SVKSRI TINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYC AREVTGDL EDAFDIWGQGTMVTVSSGGGGSGG GGSGGGGSDI QMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS QTIWSYLNWYQ QRPGKAPNLLIYAASSLQSGVP SRFSGRGSGTDFTLTISSLQAEDFATYYCQQSYS IPQ TFGQGTKLEIK	抗CD22 m971 scFv完整序列，具有 3xG4 S接头
264	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNSA AW NWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYNDYAV SVKSRI TINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYC AREVTGDL EDAFDIWGQGTMVTVSS	抗CD22 m971 scFv重链可变区
265	GDSVSSNSAA	抗CD22 m971 scFv重链 CDR1
266	TYYRSKWYN	抗CD22 m971 scFv重链 CDR2
267	AREVTGDLEDAFDI	抗CD22 m971 scFv重链 CDR3
268	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQTIWSYLN WY QQRPGKAPNLLIYAASSLQSGVPSRFSGRGS GTDFTLTISSLQAEDFATYYCQQSYSIPQTFGQG TKL EIK	抗CD22 m971 scFv轻链
269	QTIWSY	抗CD22 m971 scFv轻链 CDR1
270	AAS	抗CD22 m971 scFv轻链 CDR2
271	QQSYSIPQT	抗CD22 m971 scFv轻链 CDR3
272	QVQLQQSGPGMVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNS VA WNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSTWYNDYA VSMKS RITINPDTNKNQFSLQLNSVTPEDTAVY YCAREVTG DLEDAFDIWGQGTMVTVSSGGGGS GGGGSGGGGS DIQMIQSPSSLSASVGDRVTITCR ASQTIWSYLNWY RQRPGEAPNLLIYAASSLQSG VPSRFSGRGSGTDFT LTISSLQAEDFATYYCQQS YSIPQTFGQGTKLEIK	抗 CD22 m971-L7 scFv 完整序列，具有 3xG_4S 接头
273	QVQLQQSGPGMVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNS VA WNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSTWYNDYA VSMKS RITINPDTNKNQFSLQLNSVTPEDTAVY YCAREVTG DLEDAFDIWGQGTMVTVSS	抗 CD22 m971-L7 scFv 重链可变区
274	GDSVSSNSVA	抗 CD22 m971-L7 scFv 重链 CDR1
275	TYYRSTWYN	抗 CD22 m971-L7 scFv 重链 CDR2

[0685]

276	AREVTGDLEDAFDI	抗 CD22 m971-L7 scFv 重链 CDR3
277	DIQMIQSPSSLSASVGDRVTITCRASQTIWSYLN WY RQRPGEAPNLLIYAASSLQSGVPSRFSGRGS GTDFT LTISSLQAEDFATYYCQQSYSIPQTFGQG TKLEIK	抗 CD22 m971-L7 scFv 轻链可变区
278	QTIWSY	抗 CD22 m971-L7 scFv 轻链 CDR1
279	AAS	抗 CD22 m971-L7 scFv 轻链 CDR2
280	QQSYSIPQT	抗 CD22 m971-L7 scFv 轻链 CDR3

[0686] 在一些实施方案中,CD22 CAR的细胞外结合结构域包含免疫毒素HA22或BL22。免疫毒素BL22和HA22是包含对与细菌毒素融合的CD22具有特异性的scFv的治疗剂,因此可以结合至表达CD22的癌细胞的表面并杀伤该癌细胞。BL22包含抗CD22抗体RFB4的dsFv,其与38-kDa经截短的形式的假单胞菌外毒素A融合(Bang等人,Clin.Cancer Res.,11:1545-50(2005))。HA22(CAT8015,莫塞妥莫单抗(moxetumomab pasudotox))是BL22的突变的较高亲和力型式(Ho等人,J.Biol.Chem.,280(1):607-17(2005))。对CD22具有特异性的HA22和BL22的抗原结合结构域的合适序列公开于例如美国专利号7,541,034;7,355,012;和7,982,011中,这些专利据此整体以引用的方式并入。

[0687] 在一些实施方案中,CD22 CAR的铰链结构域包含CD8α铰链结构域,例如人CD8α铰链结构域。在一些实施方案中,CD8α铰链结构域包含SEQ ID NO:9A中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:9A中所示的氨基酸序列具有至少80%同一性(例如,至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性)的氨基酸序列,或者由SEQ ID NO:9A中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:9A中所示的氨基酸序列具有至少80%同一性(例如,至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性)的氨基酸序列组成。在一些实施方案中,铰链结构域包含CD28铰链结构域,例如人CD28铰链结构域。在一些实施方案中,CD28铰链结构域包含SEQ ID NO:223中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:223中所示的氨基酸序列具有至少80%同一性(例如,至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性)的氨基酸序列,或者由SEQ ID NO:223中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:223中所示的氨基酸序列具有至少80%同一性(例如,至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性)的氨基酸序列组成。在一些实施方案中,铰链结构域包含IgG4铰链结构域,例如人IgG4铰链结构域。在一些实施方案中,IgG4铰链结构域包含SEQ ID NO:12A或SEQ ID NO:13A中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:12A或SEQ ID NO:13A中所示的氨基酸序列具有至少80%同一性(例如,至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性)的氨基酸序列,或者由SEQ ID NO:12A或SEQ ID NO:13A中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:12A或SEQ ID NO:13A中所示的氨基酸序列具有至少80%同一性(例如,至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性)的氨

基酸序列组成。在一些实施方案中,铰链结构域包含IgG4铰链-Ch2-Ch3结构域,例如人IgG4铰链-Ch2-Ch3结构域。在一些实施方案中,IgG4铰链-Ch2-Ch3结构域包含SEQ ID NO:227中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:227中所示的氨基酸序列具有至少80%同一性(例如,至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性)的氨基酸序列,或者由SEQ ID NO:227中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:227中所示的氨基酸序列具有至少80%同一性(例如,至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性)的氨基酸序列组成。

[0688] 在一些实施方案中,CD22 CAR的跨膜结构域包含CD8α跨膜结构域,例如人CD8α跨膜结构域。在一些实施方案中,CD8α跨膜结构域包含SEQ ID NO:228中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:228中所示的氨基酸序列具有至少80%同一性(例如,至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性)的氨基酸序列,或者由SEQ ID NO:228中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:228中所示的氨基酸序列具有至少80%同一性(例如,至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性)的氨基酸序列组成。在一些实施方案中,跨膜结构域包含CD28跨膜结构域,例如人CD28跨膜结构域。在一些实施方案中,CD28跨膜结构域包含SEQ ID NO:229中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:229中所示的氨基酸序列具有至少80%同一性(例如,至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性)的氨基酸序列,或者由SEQ ID NO:229中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:229中所示的氨基酸序列具有至少80%同一性(例如,至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性)的氨基酸序列组成。

[0689] 在一些实施方案中,CD22 CAR的细胞内共刺激结构域包含4-1BB共刺激结构域,例如人4-1BB共刺激结构域。在一些实施方案中,4-1BB共刺激结构域包含SEQ ID NO:231中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:231中所示的氨基酸序列具有至少80%同一性(例如,至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性)的氨基酸序列,或者由SEQ ID NO:231中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:231中所示的氨基酸序列具有至少80%同一性(例如,至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性)的氨基酸序列组成。在一些实施方案中,细胞内共刺激结构域包含CD28共刺激结构域,例如人CD28共刺激结构域。在一些实施方案中,CD28共刺激结构域包含SEQ ID NO:232中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:232中所示的氨基酸序列具有至少80%同一性(例如,至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性)的氨基酸序列,或者由SEQ ID NO:232中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:232中所示的氨基酸序列具有至少80%同一性(例如,至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性)的氨基酸序列组成。

[0690] 在一些实施方案中,CD22 CAR的细胞内信号传导结构域包含CD3 zeta(ζ)信号传导结构域,例如人CD3ζ信号传导结构域。在一些实施方案中,CD3ζ信号传导结构域包含SEQ ID NO:233中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:233中所示的氨基酸序列具有至少80%同一性(例如,至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少

99％或100％同一性)的氨基酸序列,或者由SEQ ID NO:233中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:233中所示的氨基酸序列具有至少80％同一性(例如,至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性)的氨基酸序列组成。

[0691] 在一些实施方案中,第二转基因包含编码CD22 CAR的核苷酸序列,该CD22 CAR包括例如包含以下的CD22 CAR:具有SEQ ID NO:263或SEQ ID NO:272中所示的序列的CD22特异性scFv、SEQ ID NO:9A的CD8α铰链结构域、SEQ ID NO:228的CD8α跨膜结构域、SEQ ID NO:231的4-1BB共刺激结构域、SEQ ID NO:233的CD3ζ信号传导结构域和/或其变体(即,具有与所公开的序列具有至少80％同一性,例如至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99同一性的序列)。

[0692] 在一些实施方案中,第二转基因包含编码CD22 CAR的核苷酸序列,该CD22 CAR包括例如包含以下的CD22 CAR:具有SEQ ID NO:263或SEQ ID NO:272中所示的序列的CD22特异性scFv、SEQ ID NO:223的CD28铰链结构域、SEQ ID NO:228的CD8α跨膜结构域、SEQ ID NO:231的4-1BB共刺激结构域、SEQ ID NO:233的CD3ζ信号传导结构域和/或其变体(即,具有与所公开的序列具有至少80％同一性,例如至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99同一性的序列)。

[0693] 在一些实施方案中,第二转基因包含编码CD22 CAR的核苷酸序列,该CD22 CAR包括例如包含以下的CD22 CAR:具有SEQ ID NO:263或SEQ ID NO:272中所示的序列的CD22特异性scFv、SEQ ID NO:12A或SEQ ID NO:13A的IgG4铰链结构域、SEQ ID NO:228的CD8α跨膜结构域、SEQ ID NO:231的4-1BB共刺激结构域、SEQ ID NO:233的CD3ζ信号传导结构域和/或其变体(即,具有与所公开的序列具有至少80％同一性,例如至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99同一性的序列)。

[0694] 在一些实施方案中,第二转基因包含编码CD22 CAR的核苷酸序列,该CD22 CAR包括例如包含以下的CD22 CAR:具有SEQ ID NO:263或SEQ ID NO:272中所示的序列的CD22特异性scFv、SEQ ID NO:9A的CD8α铰链结构域、SEQ ID NO:229的CD28跨膜结构域、SEQ ID NO:231的4-1BB共刺激结构域、SEQ ID NO:233的CD3ζ信号传导结构域和/或其变体(即,具有与所公开的序列具有至少80％同一性,例如至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99同一性的序列)。

[0695] 在一些实施方案中,第二转基因包含编码CD22 CAR的核苷酸序列,该CD22 CAR包括例如包含以下的CD22 CAR:具有SEQ ID NO:263或SEQ ID NO:272中所示的序列的CD22特异性scFv、SEQ ID NO:223的CD28铰链结构域、SEQ ID NO:229的CD28跨膜结构域、SEQ ID NO:231的4-1BB共刺激结构域、SEQ ID NO:233的CD3ζ信号传导结构域和/或其变体(即,具有与所公开的序列具有至少80％同一性,例如至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99同一性的序列)。

[0696] 在一些实施方案中,第二转基因包含编码CD22 CAR的核苷酸序列,该CD22 CAR包括例如包含以下的CD22 CAR:具有SEQ ID NO:263或SEQ ID NO:272中所示的序列的CD22特异性scFv、SEQ ID NO:12A或SEQ ID NO:13A的IgG4铰链结构域、SEQ ID NO:229的CD28跨膜结构域、SEQ ID NO:231的4-1BB共刺激结构域、SEQ ID NO:233的CD3ζ信号传导结构域和/或其变体(即,具有与所公开的序列具有至少80％同一性,例如至少80％、至少85％、至少

90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99同一性的序列)。

[0697] i.BCMACAR

[0698] 在一些实施方案中,CAR是BCMACAR,并且在这些实施方案中,第二转基因包含编码BCMACAR的核苷酸序列。BCMA是在B细胞谱系的细胞上表达的肿瘤坏死家族受体(TNFR)成员,在终末分化的B细胞或成熟的B淋巴细胞上表达最高。BCMA参与介导浆细胞的存活以维持长期体液免疫。最近发现,BCMA的表达与多种癌症,诸如多发性骨髓瘤、霍奇金和非霍奇金淋巴瘤、各种白血病和胶质母细胞瘤有关。在一些实施方案中,BCMACAR可以包含串联的信号肽、特异性地结合BCMA的细胞外结合结构域、铰链结构域、跨膜结构域、细胞内共刺激结构域和/或细胞内信号传导结构域。

[0699] 在一些实施方案中,BCMACAR的信号肽包含CD8α信号肽。在一些实施方案中,CD8α信号肽包含SEQ ID NO:6A中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:6A中所示的氨基酸序列具有至少80％同一性(例如,至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性)的氨基酸序列,或者由SEQ ID NO:6A中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:6A中所示的氨基酸序列具有至少80％同一性(例如,至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性)的氨基酸序列组成。在一些实施方案中,该信号肽包含IgK信号肽。在一些实施方案中,IgK信号肽包含SEQ ID NO:7A中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:7A中所示的氨基酸序列具有至少80％同一性(例如,至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性)的氨基酸序列,或者由SEQ ID NO:7A中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:7A中所示的氨基酸序列具有至少80％同一性(例如,至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性)的氨基酸序列组成。在一些实施方案中,该信号肽包含GMCSFR-α或CSF2RA信号肽。在一些实施方案中,GMCSFR-α或CSF2RA信号肽包含SEQ ID NO:8A中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:8A中所示的氨基酸序列具有至少80％同一性(例如,至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性)的氨基酸序列,或者由SEQ ID NO:8A中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:8A中所示的氨基酸序列具有至少80％同一性(例如,至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性)的氨基酸序列组成。

[0700] 在一些实施方案中,BCMACAR的细胞外结合结构域对BCMA(例如,人BCMA)具有特异性。BCMACAR的细胞外结合结构域可以针对在宿主细胞中的表达而被密码子优化,或具有变异序列以增加细胞外结合结构域的功能。

[0701] 在一些实施方案中,细胞外结合结构域包含免疫球蛋白分子的免疫原性活性部分,例如scFv。在一些实施方案中,BCMACAR的细胞外结合结构域来源于BCMA特异性抗体,包括例如贝兰他单抗、埃拉那他单抗、特利司他单抗、LCAR-B38M和西达基(ciltacabtagene)。在这些实施方案中的任一个中,BCMACAR的细胞外结合结构域可以包含这些抗体中的任何抗体的V_H、V_L和/或一个或多个CDR,或者由这些抗体中的任何抗体的V_H、V_L和/或一个或多个CDR组成。

[0702] 在一些实施方案中,BCMACAR的细胞外结合结构域包含来源于C11D5.3的scFv,其是如Carpenter等人,Clin.Cancer Res.19(8):2048-2060(2013)中所述的鼠单克隆抗体。

还参见PCT申请公布号WO2010/104949。C11D5.3来源的scFv可以包含通过Whitlow接头连接的C11D5.3的重链可变区(V_H)和轻链可变区(V_L),其氨基酸序列提供于下表20中。在一些实施方案中,BCMA特异性细胞外结合结构域包含SEQ ID NO:281、282或286中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:281、282或286中所示的氨基酸序列具有至少80%同一性(例如,至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性)的氨基酸序列,或者由SEQ ID NO:281、282或286中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:281、282或286中所示的氨基酸序列具有至少80%同一性(例如,至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性)的氨基酸序列组成。在一些实施方案中,BCMA特异性细胞外结合结构域可包含具有SEQ ID NO:283、284、285和287、288、289中所示的氨基酸序列的一个或多个CDR。在一些实施方案中,BCMA特异性细胞外结合结构域可以包含具有一个或多个CDR的轻链,该一个或多个CDR具有SEQ ID NO:283、284、285中所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,BCMA特异性细胞外结合结构域可包含具有一个或多个CDR的重链,该一个或多个CDR具有SEQ ID NO:287、288、289中所示的氨基酸序列。在这些实施方案中的任一个中,BCMA特异性scFv可以包含一个或多个CDR,该一个或多个CDR包含一个或多个氨基酸取代,或包含与所标识的序列中的任何序列具有至少80%同一性(例如,至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性)的序列。在一些实施方案中,BCMACAR的细胞外结合结构域包含如本文所述的一个或多个CDR或由其组成。

[0703] 在一些实施方案中,BCMACAR的细胞外结合结构域包含来源于另一种鼠单克隆抗体C12A3.2的scFv(如Carpenter等人,Clin.Cancer Res.19(8):2048-2060(2013)和PCT申请公布号WO2010/104949中所描述的),其氨基酸序列也提供于下表20中。在一些实施方案中,BCMA特异性细胞外结合结构域包含SEQ ID NO:290、291或295中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:290、291或295中所示的氨基酸序列具有至少80%同一性(例如,至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性)的氨基酸序列,或者由SEQ ID NO:290、291或295中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:290、291或295中所示的氨基酸序列具有至少80%同一性(例如,至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性)的氨基酸序列组成。在一些实施方案中,BCMA特异性细胞外结合结构域可包含具有SEQ ID NO:292、293、294和296、297、298中所示的氨基酸序列的一个或多个CDR。在一些实施方案中,BCMA特异性细胞外结合结构域可以包含具有一个或多个CDR的轻链,该一个或多个CDR具有SEQ ID NO:292、293、294中所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,BCMA特异性细胞外结合结构域可以包含具有一个或多个CDR的重链,该一个或多个CDR具有SEQ ID NO:296、297、298中所示的氨基酸序列。在这些实施方案中的任一个中,BCMA特异性scFv可以包含一个或多个CDR,该一个或多个CDR包含一个或多个氨基酸取代,或包含与所标识的序列中的任何序列具有至少80%同一性(例如,至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性)的序列。在一些实施方案中,BCMACAR的细胞外结合结构域包含如本文所述的一个或多个CDR或由其组成。

[0704] 在一些实施方案中,BCMACAR的细胞外结合结构域包含对人BCMA具有高特异性的鼠单克隆抗体,其在Friedman等人,Hum.Gene Ther.29(5):585-601(2018)中称为BB2121。

还参见PCT申请公布号WO2012163805。

[0705] 在一些实施方案中,BCMACAR的细胞外结合结构域包含如Zhao等人,J.Hematol.Oncol.11(1):141(2018)中所描述的可结合至BCMA的两个表位的两条重链(VHH)的单个可变片段,其也称为LCAR-B38M。还参见PCT申请公布号WO2018/028647。

[0706] 在一些实施方案中,BCMACAR的细胞外结合结构域包含如Lam等人,Nat.Commun.11(1):283(2020)中所描述的完全人重链可变结构域(FHVH),其也称为FHVH33。还参见PCT申请公布号WO2019/006072。FHVH33及其CDR的氨基酸序列在下表20中提供。在一些实施方案中,BCMA特异性细胞外结合结构域包含SEQ ID NO:299中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:299中所示的氨基酸序列具有至少80%同一性(例如,至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性)的氨基酸序列,或者由SEQ ID NO:299中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:299中所示的氨基酸序列具有至少80%同一性(例如,至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性)的氨基酸序列组成。在一些实施方案中,BCMA特异性细胞外结合结构域可包含具有SEQ ID NO:300、301、302中所示的氨基酸序列的一个或多个CDR。在这些实施方案中的任一个中,BCMA特异性细胞外结合结构域可以包含一个或多个CDR,该一个或多个CDR包含一个或多个氨基酸取代,或包含与所标识的序列中的任何序列具有至少80%同一性(例如,至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性)的序列。在一些实施方案中,BCMACAR的细胞外结合结构域包含如本文所述的一个或多个CDR或由其组成。

[0707] 在一些实施方案中,BCMACAR的细胞外结合结构域包含来源于CT103A(或CAR0085)的scFv(如美国专利号11,026,975B2中所描述的),其氨基酸序列提供于下表20中。在一些实施方案中,BCMA特异性细胞外结合结构域包含SEQ ID NO:303、304或308中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:303、304或308中所示的氨基酸序列具有至少80%同一性(例如,至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性)的氨基酸序列,或者由SEQ ID NO:303、304或308中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:303、304或308中所示的氨基酸序列具有至少80%同一性(例如,至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性)的氨基酸序列组成。在一些实施方案中,BCMA特异性细胞外结合结构域可包含具有SEQ ID NO:305、306、307和309、310、311中所示的氨基酸序列的一个或多个CDR。在一些实施方案中,BCMA特异性细胞外结合结构域可包含具有一个或多个CDR的轻链,该一个或多个CDR具有SEQ ID NO:305、306、307中所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,BCMA特异性细胞外结合结构域可以包含具有一个或多个CDR的重链,该一个或多个CDR具有SEQ ID NO:309、310、311中所示的氨基酸序列。在这些实施方案中的任一个中,BCMA特异性scFv可以包含一个或多个CDR,该一个或多个CDR包含一个或多个氨基酸取代,或包含与所标识的序列中的任何序列具有至少80%同一性(例如,至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性)的序列。在一些实施方案中,BCMACAR的细胞外结合结构域包含如本文所述的一个或多个CDR或由其组成。

[0708] 另外,针对BCMA的CAR和结合剂已在美国申请公布号2020/0246381A1和2020/0339699A1中进行了描述,这些申请中的每一个的全部内容以引用的方式并入本文中。

[0709] 表20.抗BCMA结合剂和组分的示例性序列

[0710]

SEQ ID NO:	氨基酸序列	描述
281	DIVLTQSPASLAMSLGKRATISCRASESVSVIG AHLIHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLETGVPAR FSGSGSGTDFTLTIDPVEEDDVAIYSCLQSRIFP RTFGGGTKLEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQIQ LVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTDYSIN WVKRAPGKGLKWMGWINTETREPAYAYDFR GRFAFSLETSASTAYLQINNLKYEDTATYFCA LDYSYAMDYWGQGTSVTVSS	抗 BCMA C11D5.3scFv 完整序列，具有 Whitlow 接头
282	DIVLTQSPASLAMSLGKRATISCRASESVSVIG AHLIHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLETGVPAR FSGSGSGTDFTLTIDPVEEDDVAIYSCLQSRIFP RTFGGGTKLEIK	抗 BCMA C11D5.3 scFv 轻链可变区

[0711]

283	RASESVSVIGAHLIH	抗 BCMA C11D5.3 scFv 轻链 CDR1
284	LASNLET	抗 BCMA C11D5.3 scFv 轻链 CDR2
285	LQSRIFPRT	抗 BCMA C11D5.3 scFv 轻链 CDR3
286	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTDYS INWVKRAPGKGLKWMGWINTETREPAYAYD FRGRFAFSLETSASTAYLQINNLKYEDTATYFC ALDYSYAMDYWGQGTSVTVSS	抗 BCMA C11D5.3 scFv 重链可变区
287	DYSIN	抗 BCMA C11D5.3 scFv 重链 CDR1
288	WINTETREPAYAYDFRG	抗 BCMA C11D5.3 scFv 重链 CDR2
289	DYSYAMDY	抗 BCMA C11D5.3 scFv 重链 CDR3
290	DIVLTQSPPSLAMSLGKRATISCRASESVTILGS HLIYWYQQKPGQPPTLLIQLASNVQTGVPARF SGSGSRTDFTLTIDPVEEDDVAVYYCLQSRTIP RTFGGGTKLEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQIQ LVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFRHYSMN WVKQAPGKGLKWMGRINTESGVPIYADDFK GRFAFSVETSASTAYLVINNLKDEDTASYFCS NDYLYSLDFWGQGTALTVSS	抗 BCMA C12A3.2 scFv 完整序列，具有 Whitlow 接头
291	DIVLTQSPPSLAMSLGKRATISCRASESVTILGS HLIYWYQQKPGQPPTLLIQLASNVQTGVPARF SGSGSRTDFTLTIDPVEEDDVAVYYCLQSRTIP RTFGGGTKLEIK	抗 BCMA C12A3.2 scFv 轻链可变区
292	RASESVTILGSHLIY	抗 BCMA C12A3.2 scFv 轻链 CDR1
293	LASNVQT	抗 BCMA C12A3.2 scFv 轻链 CDR2
294	LQSRTIPRT	抗 BCMA C12A3.2 scFv 轻链 CDR3
295	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFRHYS MNWVKQAPGKGLKWMGRINTESGVPIYADD FKGRFAFSVETSASTAYLVINNLKDEDTASYF CSNDYLYSLDFWGQGTALTVSS	抗 BCMA C12A3.2 scFv 重链可变区
296	HYSMN	抗 BCMA C12A3.2 scFv 重链 CDR1
297	RINTESGVPIYADDFKG	抗 BCMA C12A3.2 scFv 重链 CDR2
298	DYLYSLDF	抗 BCMA C12A3.2 scFv 重链 CDR3

[0712]

299	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY AMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGDYIYYADS VKGRFTISRDISKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CAKEGTGANSSLADYRGQGTLVTVSS	抗 BCMA FHVH33 完整序列
300	GFTFSSYA	抗 BCMA FHVH33 CDR1
301	ISGSGDYI	抗 BCMA FHVH33 CDR2
302	AKEGTGANSSLADY	抗 BCMA FHVH33 CDR3
303	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYL NWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQKYDLLTFG GG	抗 BCMA CT103A scFv 完整序列，具有 Whitlow 接头
	TKVEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQLQLQESG PGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWIRQ PPGKGLEWIGSISYSGSTYYNPSLKSRVTISVD TSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDRGDTIL DVWGQGTMVTVSS	
304	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYL NWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGS GS GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQKYDLLTFGG GTKVEIK	抗 BCMA CT103A scFv 轻链可变区
305	QSISSY	抗 BCMA CT103A scFv 轻链 CDR1
306	AAS	抗 BCMA CT103A scFv 轻链 CDR2
307	QQKYDLLT	抗 BCMA CT103A scFv 轻链 CDR3
308	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSS YYWGWIRQPPGKGLEWIGSISYSGSTYYNPSL KSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC ARDRGDTILDVWGQGTMVTVSS	抗 BCMA CT103A scFv 重链可变区
309	GGSISSSSYY	抗 BCMA CT103A scFv 重链 CDR1
310	ISYSGST	抗 BCMA CT103A scFv 重链 CDR2
311	ARDRGDTILDV	抗 BCMA CT103A scFv 重链 CDR3

[0713] 在一些实施方案中,BCMACAR的铰链结构域包含CD8α铰链结构域,例如人CD8α铰链结构域。在一些实施方案中,CD8α铰链结构域包含SEQ ID NO:9A中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:9A中所示的氨基酸序列具有至少80%同一性(例如,至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性)的氨基酸序列,或者由SEQ ID NO:9A中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:9A中所示的氨基酸序列具有至少80%同一性(例如,至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少

98％、至少99％或100％同一性)的氨基酸序列组成。在一些实施方案中,铰链结构域包含CD28铰链结构域,例如人CD28铰链结构域。在一些实施方案中,CD28铰链结构域包含SEQ ID NO:223中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:223中所示的氨基酸序列具有至少80％同一性(例如,至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性)的氨基酸序列,或者由SEQ ID NO:223中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:223中所示的氨基酸序列具有至少80％同一性(例如,至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性)的氨基酸序列组成。在一些实施方案中,铰链结构域包含IgG4铰链结构域,例如,人IgG4铰链结构域。在一些实施方案中,IgG4铰链结构域包含SEQ ID NO:225或SEQ ID NO:226中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:225或SEQ ID NO:226中所示的氨基酸序列具有至少80％同一性(例如,至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性)的氨基酸序列,或者由SEQ ID NO:225或SEQ ID NO:226中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:225或SEQ ID NO:226中所示的氨基酸序列具有至少80％同一性(例如,至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性)的氨基酸序列组成。在一些实施方案中,铰链结构域包含IgG4铰链-Ch2-Ch3结构域,例如人IgG4铰链-Ch2-Ch3结构域。在一些实施方案中,IgG4铰链-Ch2-Ch3结构域包含SEQ ID NO:227中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:227中所示的氨基酸序列具有至少80％同一性(例如,至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性)的氨基酸序列,或者由SEQ ID NO:227中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:227中所示的氨基酸序列具有至少80％同一性(例如,至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性)的氨基酸序列组成。

[0714] 在一些实施方案中,BCMACAR的跨膜结构域包含CD8α跨膜结构域,例如人CD8α跨膜结构域。在一些实施方案中,CD8α跨膜结构域包含SEQ ID NO:228中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:228中所示的氨基酸序列具有至少80％同一性(例如,至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性)的氨基酸序列,或者由SEQ ID NO:228中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:228中所示的氨基酸序列具有至少80％同一性(例如,至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性)的氨基酸序列组成。在一些实施方案中,跨膜结构域包含CD28跨膜结构域,例如人CD28跨膜结构域。在一些实施方案中,CD28跨膜结构域包含SEQ ID NO:229中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:229中所示的氨基酸序列具有至少80％同一性(例如,至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性)的氨基酸序列,或者由SEQ ID NO:229中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:229中所示的氨基酸序列具有至少80％同一性(例如,至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性)的氨基酸序列组成。

[0715] 在一些实施方案中,BCMACAR的细胞内共刺激结构域包含4-1BB共刺激结构域,例如人4-1BB共刺激结构域。在一些实施方案中,4-1BB共刺激结构域包含SEQ ID NO:231中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:231中所示的氨基酸序列具有至少80％同一性(例如,至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性)的氨基酸序列,或者由SEQ ID NO:231中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:231中所

示的氨基酸序列具有至少80％同一性(例如,至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性)的氨基酸序列组成。在一些实施方案中,细胞内共刺激结构域包含CD28共刺激结构域,例如人CD28共刺激结构域。在一些实施方案中,CD28共刺激结构域包含SEQ ID NO:232中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:232中所示的氨基酸序列具有至少80％同一性(例如,至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性)的氨基酸序列,或者由SEQ ID NO:232中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:232中所示的氨基酸序列具有至少80％同一性(例如,至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性)的氨基酸序列组成。

[0716] 在一些实施方案中,BCMACAR的细胞内信号传导结构域包含CD3 zeta(ζ)信号传导结构域,例如人CD3ζ信号传导结构域。在一些实施方案中,CD3ζ信号传导结构域包含SEQ ID NO:233中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:233中所示的氨基酸序列具有至少80％同一性(例如,至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性)的氨基酸序列,或者由SEQ ID NO:233中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:233中所示的氨基酸序列具有至少80％同一性(例如,至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性)的氨基酸序列组成。

[0717] 在一些实施方案中,第二转基因包含编码BCMACAR的核苷酸序列,该BCMACAR包括例如包含以下的BCMACAR:如所描述的BCMA特异性细胞外结合结构域中的任一种、SEQ ID NO:9A的CD8α铰链结构域、SEQ ID NO:228的CD8α跨膜结构域、SEQ ID NO:231的4-1BB共刺激结构域、SEQ ID NO:233的CD3ζ信号传导结构域和/或其变体(即,具有与所公开的序列具有至少80％同一性,例如,至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99同一性的序列)。在这些实施方案中的任一个中,BCMACAR可以另外包含如所描述的信号肽(例如,CD8α信号肽)。

[0718] 在一些实施方案中,第二转基因包含编码BCMACAR的核苷酸序列,该BCMACAR包括例如包含以下的BCMACAR:如所描述的BCMA特异性细胞外结合结构域中的任一种、SEQ ID NO:9A的CD8α铰链结构域、SEQ ID NO:228的CD8α跨膜结构域、SEQ ID NO:232的CD28共刺激结构域、SEQ ID NO:233的CD3ζ信号传导结构域和/或其变体(即,具有与所公开的序列具有至少80％同一性,例如,至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99同一性的序列)。在这些实施方案中的任一个中,BCMA CAR可以另外包含如所描述的信号肽。

[0719] 在一些实施方案中,第二转基因包含如SEQ ID NO:312中所示的编码BCMACAR的核苷酸序列,或者与SEQ ID NO:312中所示的核苷酸序列具有至少80％同一性(例如,至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、或100％同一性)(参见表21)。所编码的BCMACAR具有SEQ ID NO:313中所示的对应氨基酸序列或与SEQ ID NO:313中所示的氨基酸序列具有至少80％同一性(例如,至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％同一性),具有以下组分:CD8α信号肽、CT103A scFv(VL-Whitlow接头-VH)、CD8α铰链结构域、CD8α跨膜结构域、4-1BB共刺激结构域和CD3ζ信号传导结构域。

[0720] 在一些实施方案中,第二转基因包含编码可商购获得的BCMA CAR实施方案(包括

例如艾基维仑赛(idecabtagene vicleucel)(ide-cel,也称为bb2121))的核苷酸序列。在一些实施方案中,第二转基因包含编码艾基维仑赛或其部分的核苷酸序列。艾基维仑赛包含具有以下组分的BCMACAR:BB2121结合剂、CD8α铰链结构域、CD8α跨膜结构域、4-1BB共刺激结构域和CD3ζ信号传导结构域。

[0721] 表21.BCMACAR的示例性序列

[0722]

SEQ ID NO:	序列	描述

[0723]

312	atggccttaccagtgaccgccttgctcctgccgctggccttgctgctcc acgccgccaggccggacatccagatgacccagtctccatcctccctg tctgcatctgtaggagacagagtcaccatcacttgccgggcaagtcag agcattagcagctatttaaattggtatcagcagaaaccagggaaagcc cctaagctcctgatctatgctgcatccagtttgcaaagtggggtcccatc aaggttcagtggcagtggatctgggacagatttcactctcaccatcagc agtctgcaacctgaagattttgcaacttactactgtcagcaaaaatacga cctcctcacttttggcggagggaccaaggttgagatcaaaggcagca ccagcggctccggcaagcctggctctggcgagggcagcacaaagg gacagctgcagctgcaggagtcgggcccaggactggtgaagccttc ggagaccctgtccctcacctgcactgtctctggtggctccatcagcagt agtagttactactggggctggatccgccagccccccagggaaggggct ggagtggattgggagtatctcctatagtgggagcacctactacaaccc gtccctcaagagtcgagtcaccatatccgtagacacgtccaagaacca gttctccctgaagctgagttctgtgaccgccgcagacacggcggtgta ctactgcgccagagatcgtggagacaccatactagacgtatggggtc agggtacaatggtcaccgtcagctcattcgtgcccgtgttcctgcccgc caaacctaccaccaccccctgcccctagacctcccaccccagccccaa caatcgccagccagcctctgtctctgcggcccgaagcctgtagacctg ctgccggcggagccgtgcacaccagaggcctggacttcgcctgcga catctacatctgggcccctctggccggcacctgtggcgtgctgctgct gagcctggtgatcaccctgtactgcaaccaccggaacaaacggggc agaaagaaactcctgtatatattcaaacaaccatttatgagaccagtac aaactactcaagaggaagatggctgtagctgccgatttccagaagaa gaagaaggaggatgtgaactgagagtgaagttcagcagatccgccg acgcccctgcctaccagcagggacagaaccagctgtacaacgagct gaacctgggcagacgggaagagtacgacgtgctggacaagcggag aggccgggaccccgagatgggcggaaagcccagacggaagaacc cccaggaaggcctgtataacgaactgcagaaagacaagatggccga ggcctacagcgagatcggcatgaagggcgagcggaggcgcggca agggccacgatggcctgtaccagggcctgagcaccgccaccaagg acacctacgacgcccctgcacatgcaggccctgcccccaga	示例性 BCMA CAR 核苷酸序列
313	MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQSPSS LSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPG KAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQKYDLLTFGGGTKVE IKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQLQLQESGPGL VKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWIRQPP GKGLEWIGSISYSGSTYYNPSLKSRVTISVDT SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDRGDTIL DVWGQGTMVTVSSFVPVFLPAKPTTTPAPR PPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRG LDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCN HRNKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDG CSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQG QNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM GGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG MKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDAL HMQALPPR	示例性 BCMA CAR 氨基酸序列

[0724] j.多个CAR

[0725] 在一些实施方案中,第二转基因包含两个或更多个核苷酸序列,每个核苷酸序列

编码靶向特定靶抗原的CAR。在这些实施方案中,第二转基因编码对不同靶抗原具有特异性的两个或更多个不同CAR(例如,CD19 CAR和CD22 CAR)。该两个或更多个CAR可以各自包含对特定靶抗原具有特异性的细胞外结合结构域,并且可以包含相同的,或一个或多个不同的非抗原结合结构域。例如,该两个或更多个CAR可以包含不同的信号肽、铰链结构域、跨膜结构域、共刺激结构域和/或细胞内信号传导结构域,以最大程度地减少由于序列相似性导致的重组风险。或者,可替代地,该两个或更多个CAR可以包含相同的非抗原结合结构域。在使用相同的一个或多个非抗原结合结构域和/或主链的情况下,任选在核苷酸序列水平上引入密码子差异以最大程度地减少重组的风险。作为一个非限制性实例,第二转基因可以包含编码CD19 CAR的核苷酸序列和编码CD22 CAR的核苷酸序列。CD19 CAR可以包含一个跨膜结构域(例如,CD28跨膜结构域),而CD22 CAR包含不同的跨膜结构域(例如,CD8α跨膜结构域),或者反之亦然。作为另一个非限制性实例,CD19 CAR可以包含一个共刺激结构域(例如,4-1BB共刺激结构域),而CD22 CAR包含不同的共刺激结构域(例如,CD28共刺激结构域),或者反之亦然。或者,可替代地,CD22 CAR和CD19 CAR可包含相同的非抗原结合结构域,但在核苷酸序列水平上引入密码子分歧以最大程度地减少重组风险。在这些实施方案中的任一个中,第二转基因的两个或更多个核苷酸序列可以通过一个或多个如所描述的切割位点(例如,2A位点和/或弗林蛋白酶位点)以如本文所述的多顺反子构建体的形式连接。

[0726] 3.调控元件

[0727] 在一些实施方案中,编码CAR的第二转基因可以包含可操作地连接到如所描述的CAR编码序列的另外的调控元件,包括例如启动子、绝缘子、增强子、聚腺苷酸化(poly(A))尾和/或普遍存在的染色质开放元件。

[0728] 4.基因组插入

[0729] 在一些实施方案中,编码CAR的第二转基因可以以载体的形式递送到宿主细胞中以用于插入到宿主基因组中。该插入可以是使用本文所述的随机或定点插入方法中的任何一种的随机插入(即插入到宿主细胞的随机基因组基因座中)或靶向插入(即插入到宿主细胞的特定基因组基因座中)。

[0730] 在一些实施方案中,可以将编码致耐受因子的第一转基因和编码CAR的第二转基因单独地引入到宿主中以进行基因组插入。在一些实施方案中,可以将编码致耐受因子的第一转基因和编码CAR的第二转基因经由单个载体或多个载体同时引入到宿主中以进行基因组插入。在第一和第二转基因在单个载体中一起被递送到宿主细胞中的情况下,第一和第二转基因可被设计为如下所述的多顺反子构建体。

[0731] 5.多顺反子构建体

[0732] 在一些实施方案中,编码致耐受因子的第一转基因和编码CAR的第二转基因,和/或第二转基因的多个CAR编码序列可以呈多顺反子构建体的形式。多顺反子构建体具有用于在宿主细胞中共表达两种或更多种所关注的蛋白质的两个或更多个表达盒。在一些实施方案中,多顺反子构建体包含两个表达盒,即,是双顺反子的。在一些实施方案中,多顺反子构建体包含三个表达盒,即,是三顺反子的。在一些实施方案中,多顺反子构建体包含四个表达盒,即,是四顺反子的。在一些实施方案中,多顺反子构建体包含多于四个表达盒。在这些实施方案中的任一个中,该表达盒中的每个表达盒包含编码所关注的蛋白质(例如,致耐受或CAR)的核苷酸序列。在某些实施方案中,所表达的两种或更多种基因处于单个启动子

的控制下,并且被一个或多个切割位点彼此分隔开,以实现所关注的蛋白质从一种转录物的共表达。在其他实施方案中,该两种或更多种基因可以处于单独的启动子的控制下。

[0733] 在一些实施方案中,多顺反子构建体的该两个或更多个表达盒可以被一个或多个切割位点分隔开。顾名思义,多顺反子构建体允许在宿主细胞中从一种mRNA转录物同时表达两种或更多种单独的蛋白质。切割位点可用于多顺反子构建体的设计中以实现多种基因的此种共表达。

[0734] 在一些实施方案中,该一个或多个切割位点包括一个或多个自切割位点。在一些实施方案中,自切割位点包含2A位点。2A肽是首先在小核糖核酸病毒中发现的一类18-22个氨基酸长的肽并且可以在蛋白质翻译期间诱导核糖体跳跃,从而从相同的mRNA转录物产生等量的多种基因。2A肽的功能是通过使核糖体跳过甘氨酸(G)和脯氨酸(P)残基之间C端处的肽键的合成来"切割"mRNA转录物,从而导致2A序列末端和下游下一个肽之间的分隔。分子生物学中常用的2A肽有四种,即T2A、P2A、E2A和F2A,其序列汇总于表22中。甘氨酸-丝氨酸-甘氨酸(GSG)接头任选地被添加到2A肽的N端以提高切割效率。在本公开中,在序列周围使用"()"意指所包围的序列是任选的。

[0735] 表22.2A肽的序列

[0736]

SEQ ID NO:	氨基酸序列	2A肽
314	(GSG)EGRGSLLTCGDVEENPGP	T2A
315	(GSG)ATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
316	(GSG)QCTNYALLKLAGDVESNPGP	E2A
317	(GSG)VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP	F2A

[0737] 在一些实施方案中,该一个或多个切割位点另外包括一个或多个蛋白酶位点。该一个或多个蛋白酶位点可以按5'至3'顺序位于自切割位点(例如,2A位点)之前或之后。蛋白酶位点可以在完整转录物翻译后或在每个表达盒翻译后被蛋白酶切割,使得第一表达产物在下一个表达盒翻译之前释放。在这些实施方案中,特别是按5'至3'顺序位于2A位点之前除了2A位点之外还具有蛋白酶位点可以减少连接至所表达的所关注的蛋白质的额外氨基酸残基的数量。在一些实施方案中,蛋白酶位点包括弗林蛋白酶位点,也称为配对碱性氨基酸切割酶(PACE)位点。至少存在三个弗林蛋白酶切割序列,即FC1、FC2和FC3,其氨基酸序列汇总于表23中。与2A位点类似,可以包含一个或多个任选的甘氨酸-丝氨酸-甘氨酸(GSG)序列以提高切割效率。

[0738] 表23.弗林蛋白酶位点的序列

[0739]

SEQ ID NO:	氨基酸序列	弗林蛋白酶位点
318	RRRR(GSG)	FC1
319	RKRR(GSG)	FC2
320	RKRR(GSG)TPDPW(GSG)	FC3

[0740] 在一些实施方案中,该一个或多个切割位点包括一个或多个自切割位点、一个或多个蛋白酶位点和/或其任何组合。例如,切割位点可以仅包括2A位点。又如,切割位点可包括FC2或FC3位点,随后是2A位点。在这些实施方案中,该一个或多个自切割位点可以相同或不同。类似地,该一个或多个蛋白酶位点可以相同或不同。

[0741] 在一些实施方案中,多顺反子构建体可以呈载体的形式。可以使用适于将核苷酸

序列引入到宿主细胞中的任何类型的载体,包括例如质粒、腺病毒载体、腺相关载体、逆转录病毒载体、慢病毒载体、噬菌体和基于同源定向修复(HDR)的供体载体。

[0742] 6.增加多核苷酸表达(例如,过表达)的方法

[0743] 在一些实施方案中,多核苷酸的表达增加可以通过多种技术中的任一种来进行。例如,用于调节基因和因子(蛋白质)表达的方法包括基因组编辑技术和RNA或蛋白质表达技术等。对于所有这些技术,使用众所周知的重组技术来生成如本文所概述的重组核酸。在一些实施方案中,被工程化为具有用于使多核苷酸过表达或增加多核苷酸的表达的一种或多种修饰的细胞是如本文所述的任何源细胞。在一些实施方案中,源细胞是第II.C节中描述的任何细胞。

[0744] 在一些实施方案中,通过增加内源性基因活性(例如,增加外源性基因的转录)来增加基因的表达。在一些情况下,通过增加可操作地连接至内源性基因的启动子或增强子的活性来增加内源性基因活性。在一些实施方案中,增加启动子或增强子的活性包括对内源性启动子或增强子进行增加内源性启动子或增强子的活性的一种或多种修饰。在一些情况下,增加内源性基因的基因活性包括修饰该基因的内源性启动子。在一些实施方案中,增加内源性基因的基因活性包括引入异源启动子。在一些实施方案中,异源启动子选自由以下组成的组:CAG启动子、巨细胞病毒(CMV)启动子、EF1a启动子、PGK启动子、腺病毒晚期启动子、牛痘病毒7.5K启动子、SV40启动子、HSV的tk启动子、小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)启动子、HIV的LTR启动子、莫洛尼病毒的启动子、爱泼斯坦巴尔病毒(EBV)启动子、劳斯肉瘤病毒(RSV)启动子和UBC启动子。在一些实施方案中,通过表达含有以下的融合蛋白或蛋白质复合物来增加靶基因(例如,CD47或另一种致耐受因子)的表达:(1)对内源性CD47或其他基因具有特异性的位点特异性结合结构域和(2)转录活化因子。

[0745] 在一些实施方案中,调控因子由位点特异性DNA结合核酸分子(诸如指导RNA(gRNA))组成。在一些实施方案中,该方法是通过位点特异性DNA结合靶蛋白来实现,诸如通过锌指蛋白(ZFP)或含有ZFP的融合蛋白(其也被称为锌指核酸酶(ZFN))来实现的。

[0746] 在一些实施方案中,调控因子包含位点特异性结合结构域,诸如使用与靶向区域的基因特异性地结合或杂交的DNA结合蛋白或DNA结合核酸。在一些实施方案中,提供的多核苷酸或多肽与位点特异性核酸酶(诸如经修饰的核酸酶)偶联或复合。例如,在一些实施方案中,使用包含经修饰的核酸酶的DNA靶向蛋白质的融合体来实现施用,该核酸酶诸如大范围核酸酶或RNA指导的核酸酶,诸如成簇规律间隔短回文核酸(CRISPR)-Cas系统,诸如CRISPR-Cas9系统。在一些实施方案中,核酸酶被修饰为缺乏核酸酶活性。在一些实施方案中,经修饰的核酸酶是催化死亡的dCas9。

[0747] 在一些实施方案中,位点特异性结合结构域可来源于核酸酶。例如,归巢核酸内切酶和大范围核酸酶的识别序列,诸如I-SceI、I-CeuI、PI-PspI、PI-Sce、I-SceIV、I-CsmI、I-PanI、I-SceII、I-PpoI、I-SceIII、I-CreI、I-TevI、I-TevII和I-TevIII。另见美国专利号5,420,032;美国专利号6,833,252;Belfort等人,(1997)Nucleic Acids Res.25:3379-3388;Dujon等人,(1989)Gene 82:115-118;Perler等人,(1994)Nucleic Acids Res.22,1125-1127;Jasin(1996)Trends Genet.12:224-228;Gimble等人,(1996)J.Mol.Biol.263:163-180;Argast等人,(1998)J.Mol.Biol.280:345-353和新英格兰生物实验室(New England Biolabs)目录。此外,可以对归巢核酸内切酶和大范围核酸酶的DNA结合特异性进行工程化

以结合非天然靶位点。参见例如,Chevalier等人,(2002)Molec.Cell 10:895-905;Epinat等人,(2003)Nucleic Acids Res.31:2952-2962;Ashworth等人,(2006)Nature441:656-659;Paques等人,(2007)Current Gene Therapy 7:49-66;美国专利公布号2007/0117128。

[0748] 锌指、TALE和CRISPR系统结合结构域可以被“工程化”成结合至预定的核苷酸序列,例如通过工程化天然存在的锌指或TALE蛋白的识别螺旋区域(改变天然存在的锌指或TALE蛋白的识别螺旋区域的一个或多个氨基酸)。经工程化的DNA结合蛋白(锌指或TALE)是非天然存在的蛋白质。合理的设计标准包括应用取代规则和计算机化算法来加工存储现有ZFP和/或TALE设计和结合数据的信息的数据库中的信息。参见例如美国专利号6,140,081;6,453,242;和6,534,261;另见WO 98/53058;WO 98/53059;WO 98/53060;WO 02/016536和WO 03/016496和美国公布号20110301073。

[0749] 在一些实施方案中,位点特异性结合结构域包含一种或多种以序列特异性方式结合DNA的锌指蛋白(ZFP)或其结构域。ZFP或其结构域是通过一种或多种锌指以序列特异性方式结合DNA的较大蛋白质内的蛋白质或结构域,该一种或多种锌指是其结构通过锌离子配位而稳定的结合结构域内的氨基酸序列区域。

[0750] 在ZFP中,有长度通常为9-18个核苷酸、由单个指组装生成的靶向特定DNA序列的人工ZFP结构域。ZFP包括其中单一指结构域在长度上为约30个氨基酸并且含有α螺旋的ZFP,该α螺旋含有通过锌与单个β转角的两个半胱氨酸配位的两个不变的组氨酸残基,并且具有两个、三个、四个、五个或六个指。通常,ZFP的序列特异性可以通过在锌指识别螺旋上的四个螺旋位置(-1、2、3和6)处进行氨基酸取代来改变。因此,在一些实施方案中,ZFP或含有ZFP的分子是非天然存在的,例如,被工程化为与选择的靶位点结合。参见例如,Beerli等人(2002)Nature Biotechnol.20:135-141;Pabo等人(2001)Ann.Rev.Biochem.70:313-340;Isalan等人(2001)Nature Biotechnol.19:656-660;Segal等人(2001)Curr.Opin.Biotechnol.12:632-637;Choo等人(2000)Curr.Opin.Struct.Biol.10:411-416;美国专利号6,453,242;6,534,261;6,599,692;6,503,717;6,689,558;7,030,215;6,794,136;7,067,317;7,262,054;7,070,934;7,361,635;7,253,273;以及美国专利公布号2005/0064474;2007/0218528;2005/0267061,所有这些文献都以引用的方式整体并入本文中。

[0751] 许多基因特异性经工程化锌指是可商购获得的。例如,Sangamo Biosciences(Richmond,CA,USA)已与Sigma-Aldrich(St.Louis,MO,USA)合作开发了针对锌指构建的平台(CompoZr),其允许研究人员完全绕过锌指构建和验证,并且为数千种蛋白质提供了特异性靶向的锌指(Gaj等人,Trends in Biotechnology,2013,31(7),397-405)。在一些实施方案中,使用或定制设计可商购获得的锌指。

[0752] 在一些实施方案中,位点特异性结合结构域包含天然存在的或经工程化的(非天然存在的)转录活化因子样蛋白(TAL)DNA结合结构域,诸如转录活化因子样蛋白效应物(TALE)蛋白中的所述结构域,参见例如美国专利公布号20110301073,其通过引用整体并入本文中。

[0753] 在一些实施方案中,位点特异性结合结构域来源于CRISPR/Cas系统。一般来说,“CRISPR系统”统指参与表达CRISPR相关(“Cas”)基因或引导该基因的活性的转录物和其他元件,包括编码Cas基因的序列、tracr(反式活化CRISPR)序列(例如,tracrRNA或活性部分

tracrRNA)、tracr伴侣序列(在内源性CRISPR系统的上下文中涵盖“直接重复序列”和tracrRNA加工的部分直接重复序列)、指导序列(在内源性CRISPR系统的上下文中也被称为“间隔区”,或“靶向序列”)和/或来自CRISPR基因座的其他序列和转录物。

[0754] 一般来说,指导序列包括靶向结构域,该靶向结构域包含与靶多核苷酸序列具有足够互补性以与靶序列杂交并且引导CRISPR复合物与靶序列的序列特异性结合的多核苷酸序列。在一些实施方案中,当使用合适的比对算法进行最佳比对时,指导序列与其对应靶序列之间的互补程度为约或大于约50%、60%、75%、80%、85%、90%、95%、97.5%、99%或更多。在一些实例中,gRNA的靶向结构域(例如,靶向序列)与靶核酸上的靶序列互补,例如至少80%、85%、90%、95%、98%或99%互补,例如完全互补。

[0755] 在一些实施方案中,gRNA可以是如本文所述的任何gRNA。在实施方案中,gRNA具有与以下的靶位点互补的靶向序列:CD47,诸如SEQ ID NO:200784-231885(WO2016183041的表29,附录22)中任一个所示;HLA-E,诸如SEQ ID NO:189859-193183(WO2016183041的表19,附录12)中任一个所示;HLA-F,诸如SEQ ID NO:688808-699754(WO2016183041的表45,附录38)中任一个所示;HLA-G,诸如SEQ ID NO:188372-189858(WO2016183041的表18,附录11)中任一个所示;或PD-L1,诸如SEQ ID NO:193184-200783(WO2016183041的表21,附录14)中任一个所示。

[0756] 在一些实施方案中,靶位点在靶基因的转录起始位点的上游。在一些实施方案中,靶位点与基因的转录起始位点相邻。在一些实施方案中,靶位点与基因转录起始位点下游的RNA聚合酶暂停位点相邻。

[0757] 在一些实施方案中,靶向结构域被配置为靶向靶基因的启动子区域以促进转录起始、一种或多种转录增强子或活化子和/或RNA聚合酶的结合。一种或多种gRNA可用于靶向基因的启动子区域。在一些实施方案中,可以靶向基因的一个或多个区域。在某些方面,靶位点位于基因的转录起始位点(TSS)任一侧的600个碱基对内。

[0758] 设计或鉴定作为或包含靶向基因的序列(包括外显子序列和调控区(包括启动子和活化子)的序列)的gRNA序列(即gRNA靶向序列)在技术人员的水平内。用于CRISPR基因组编辑的全基因组gRNA数据库是公开可用的,其含有人基因组或小鼠基因组中的基因的组成型外显子中的示例性单一指导RNA(sgRNA)靶序列(参见,例如,genescript.com/gRNA-database.html;另外参见Sanjana等人(2014)Nat.Methods,11:783-4;www.e-crisp.org/E-CRISP/;crispr.mit.edu/)。在一些实施方案中,gRNA序列是或者包含与非靶基因具有最小脱靶结合的靶向序列。

[0759] 在一些实施方案中,调控因子进一步包含功能结构域,例如转录活化因子。

[0760] 在一些实施方案中,转录活化因子是或含有一种或多种调控元件,诸如靶基因的一种或多种转录控制元件,由此识别如上文所提供的位点特异性结构域以驱动这种基因的表达。在一些实施方案中,转录活化因子驱动靶基因的表达。在一些情况下,转录活化因子可以是或含有异源反式活化结构域的全部或一部分。例如,在一些实施方案中,转录活化因子选自单纯疱疹来源的反式活化结构域、Dnmt3a甲基转移酶结构域、p65、VP16和VP64。

[0761] 在一些实施方案中,调控因子是锌指转录因子(ZF-TF)。在一些实施方案中,调控因子是VP64-p65-Rta(VPR)。

[0762] 在某些实施方案中,调控因子进一步包含转录调控结构域。常见结构域包括,例

如,转录因子结构域(活化子、阻遏子、共活化子、共阻遏子)、沉默子、癌基因(例如,myc、jun、fos、myb、max、mad、rel、ets、bcl、myb、mos家族成员等);DNA修复酶及其相关因子和修饰因子;DNA重排酶及其相关因子和修饰因子;染色质相关蛋白及其修饰因子(例如,激酶、乙酰化酶和去乙酰化酶);和DNA修饰酶(例如,甲基转移酶,诸如DNMT家族成员(例如,DNMT1、DNMT3A、DNMT3B、DNMT3L等、拓扑异构酶、解旋酶、连接酶、激酶、磷酸酶、聚合酶、核酸内切酶)及其相关因子和修饰因子。例如,参见美国公布号2013/0253040,其以引用的方式整体并入本文中。

[0763] 用于实现活化的合适结构域包括HSV VP 16活化结构域(参见,例如,Hagmann等人,J.Virol.71,5952-5962(1 97))核激素受体(参见,例如,Torchia等人,Curr.Opin.Cell.Biol.10:373-383(1998));核因子κB的p65亚基(Bitko和Bank,J.Virol.72:5610-5618(1998)和Doyle和Hunt,Neuroreport 8:2937-2942(1997));Liu等人,Cancer Gene Ther.5:3-28(1998))或人工嵌合功能结构域,诸如VP64(Beerli等人,(1998)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 95:14623-33)、和降解决定子(Molinari等人,(1999)EMBO J.18,6439-6447)。另外的示例性活化结构域包括Oct 1、Oct-2A、Spl、AP-2和CTF1(Seipel等人,EMBOJ.11,4961-4968(1992)以及p300、CBP、PCAF、SRC1 PvALF、AtHD2A和ERF-2。参见,例如,Robyr等人,(2000)Mol.Endocrinol.14:329-347;Collingwood等人,(1999)J.Mol.Endocrinol 23:255-275;Leo等人,(2000)Gene 245:1-11;Manteuffel-Cymborowska(1999)Acta Biochim.Pol.46:77-89;McKenna等人,(1999)J.Steroid Biochem.Mol.Biol.69:3-12;Malik等人,(2000)Trends Biochem.Sci.25:277-283;和Lemon等人,(1999)Curr.Opin.Genet.Dev.9:499-504。另外的示例性活化结构域包括但不限于OsGAI、HALF-1、Cl、AP1、ARF-5、ARF-6、ARF-1和ARF-8、CPRF1、CPRF4、MYC-RP/GP和TRAB1,参见,例如,Ogawa等人,(2000)Gene245:21-29;Okanami等人,(1996)Genes Cells 1:87-99;Goff等人,(1991)Genes Dev.5:298-309;Cho等人,(1999)Plant Mol Biol 40:419-429;Ulmason等人,(1999)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 96:5844-5849;Sprenger-Haussels等人,(2000)Plant J.22:1-8;Gong等人,(1999)Plant Mol.Biol.41:33-44;和Hobo等人,(1999)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 96:15,348-15,353。

[0764] 可用于制备遗传阻遏子的示例性阻遏结构域包括但不限于KRAB A/B、KOX、TGF-β-诱导型早期基因(TIEG)、v-erbA、SID、MBD2、MBD3、DNMT家族成员(,DNMT1、DNMT3A、DNMT3B、DNMT3L等)、Rb和MeCP2。参见,例如,Bird等人,(1999)Cell 99:451-454;Tyler等人,(1999)Cell 99:443-446;Knoepfler等人,(1999)Cell99:447-450;和Robertson等人,(2000)Nature Genet.25:338-342。另外的示例性阻遏结构域包括但不限于ROM2和AtHD2A。参见,例如,Chem等人,(1996)Plant Cell 8:305-321;和Wu等人,(2000)Plant J.22:19-27。

[0765] 在一些情况下,该结构域参与染色体的表观遗传调控。在一些实施方案中,该结构域是组蛋白乙酰转移酶(HAT),例如A型、核定位的,诸如MYST家族成员MOZ、Ybf2/Sas3、MOF和Tip60、GNAT家族成员Gcn5或pCAF、p300家族成员CBP、p300或Rttl09(Bemdsen和Denu(2008)Curr Opin Struct Biol 18(6):682-689)。在其他情况下,该结构域是组蛋白去乙酰化酶(HD AC),诸如I类(HDAC-1、2、3和8)、II类(HDAC IIA(HDAC-4、5、7和9)、HD AC IIB(HDAC 6和10))、IV类(HDAC-1 1)、III类(也称为sirtuin(SIRT);SIRT1-7)(参见Mottamal等人,(2015)Molecules 20(3):3898-3941)。在一些实施方案中使用的另一个结构域是组

蛋白磷酸化酶或激酶,其中实例包括MSK1、MSK2、ATR、ATM、DNA-PK、Bubl、VprBP、IKK-a、PKCpi、Dik/Zip、JAK2、PKC5、WSTF和CK2。在一些实施方案中,使用甲基化结构域并且其可以选自诸如Ezh2、PRMT1/6、PRMT5/7、PRMT 2/6、CARM1、set7/9、MLL、ALL-1、Suv 39h、G9a、SETDB1、Ezh2、Set2、Dotl、PRMT 1/6、PRMT 5/7、PR-Set7和Suv4-20h的组。参与苏木化和生物素化的结构域(Lys9、13、4、18和12)也可用于一些实施方案中(综述参见Kousarides(2007)Cell 128:693-705)。

[0766] 融合分子通过本领域技术人员众所周知的克隆和生化缀合方法构建。融合分子包含DNA结合结构域和功能结构域(例如,转录活化或阻遏结构域)。融合分子还任选地包含核定位信号(例如,来自SV40培养基T抗原的信号)和表位标签(诸如,例如,FLAG和血凝素)。设计融合蛋白(和编码它们的核酸),使得翻译阅读框保留在融合组分中。

[0767] 一个方面的功能结构域(或其功能片段)的多肽组分与另一方面的非蛋白质DNA结合结构域(例如,抗生素、嵌入剂、小沟结合剂、核酸)之间的融合体通过本领域技术人员已知的生化缀合方法来构建。参见,例如Pierce Chemical Company(Rockford,IL)目录。已经描述了用于进行小沟结合剂与多肽之间的融合的方法和组合物。Mapp等人,(2000)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 97:3930-3935。同样,CRISPR/Cas TF和包含与多肽组分功能结构域缔合的sgRNA核酸组分的核酸酶也是本领域技术人员已知的并在本文中详细描述。

[0768] a.外源性多肽

[0769] 在一些实施方案中,通过将编码待过表达的多核苷酸的外源性多核苷酸引入到细胞中来介导多核苷酸的表达增加(即过表达)。在一些实施方案中,外源性多核苷酸是重组核酸。可以使用众所周知的重组技术来生成如本文所概述的重组核酸。在一些实施方案中,编码本文的外源性多肽的外源性多核苷酸包含密码子优化的核酸序列。

[0770] 在某些实施方案中,编码外源性多肽(诸如致耐受因子或嵌合抗原受体)的重组核酸可以可操作地连接至表达构建体中的一个或多个调控核苷酸序列。调控核苷酸序列通常适用于待治疗的宿主细胞和接受者受试者。对于多种宿主细胞,多种类型的适当的表达载体和合适的调控序列是本领域已知的。通常,该一种或多种调控核苷酸序列可包括但不限于启动子序列、前导或信号序列、核糖体结合位点、转录起始和终止序列、翻译起始和终止序列以及增强子或活化子序列。还考虑了本领域已知的组成型或诱导型启动子。启动子可以是天然存在的启动子或组合不止一个启动子的元件的杂合启动子。表达构建体可以存在于细胞中的附加体(诸如质粒)上,或者表达构建体可以被插入到染色体中。在一些实施方案中,表达载体包括可选择标志物基因以允许选择转化的宿主细胞。某些实施方案包括包含编码变异多肽的核苷酸序列的表达载体,该核苷酸序列可操作地连接至至少一个调控序列。用于本文使用的调控序列包括启动子、增强子和其他表达控制元件。在某些实施方案中,表达载体被设计用于选择待转化的宿主细胞、待表达的特定变异多肽、载体的拷贝数、控制该拷贝数的能力和/或载体编码的任何其他蛋白质(诸如抗生素标志物)的表达。

[0771] 在一些实施方案中,外源性多核苷酸可操作地连接至用于在经工程化的细胞中表达外源性多核苷酸的启动子。合适的哺乳动物启动子的实例包括例如来自以下基因的启动子:延伸因子1α(EF1α)启动子、仓鼠的泛素/S27a启动子(WO 97/15664)、猿猴空泡病毒40(SV40)早期启动子、腺病毒主要晚期启动子、小鼠金属硫蛋白-I启动子、劳斯肉瘤病毒(RSV)的长末端重复区、小鼠乳腺肿瘤病毒启动子(MMTV)、莫洛尼鼠白血病病毒长末端重复

区和人巨细胞病毒(CMV)的早期启动子。其他异源哺乳动物启动子的实例是肌动蛋白、免疫球蛋白或一种或多种热休克启动子。在另外的实施方案中,用于哺乳动物宿主细胞的启动子可以从病毒的基因组获得,该病毒诸如多瘤病毒、禽痘病毒(1989年7月5日公开的UK 2,211,504)、牛乳头瘤病毒、禽肉瘤病毒、巨细胞病毒、逆转录病毒、乙型肝炎病毒和猿猴病毒40(SV40)。在进一步的实施方案中,使用异源哺乳动物启动子。实例包括肌动蛋白启动子、免疫球蛋白启动子和热休克启动子。SV40的早期和晚期启动子以SV40限制性片段方便地获得,该限制性片段还含有SV40病毒复制起点(Fiers等人,Nature 273:113-120(1978))。人巨细胞病毒的即刻早期启动子以HindIII限制酶片段方便地获得(Greenaway等人,Gene 18:355-360(1982))。前述参考文献以引用的方式整体并入。

[0772] 在一些实施方案中,表达载体是双顺反子或多顺反子表达载体。双顺反子或多顺反子表达载体可以包括(1)与每个开放阅读框融合的多个启动子;(2)基因之间的剪接信号的插入;(3)表达受单一启动子驱动的基因的融合;和/或(4)基因之间的蛋白质水解切割位点(自切割肽)的插入或基因之间的内部核糖体进入位点(IRES)的插入。

[0773] 在一些实施方案中,本文的表达载体或构建体是多顺反子构建体。术语“多顺反子构建体”和“多顺反子载体”在本文中可互换使用,并且指待转录成单个mRNA分子的重组DNA构建体,其中该单个mRNA分子编码两种或更多种基因(例如,两种或更多种转基因)。如果多顺反子构建体编码两种基因,则该多顺反子构建体被称为双顺反子构建体;如果多顺反子构建体编码三种基因,则该多顺反子构建体被称为三顺反子构建体;如果多顺反子构建体编码四种基因,则该多顺反子构建体被称为四顺反子构建体,以此类推。

[0774] 在一些实施方案中,载体或构建体包含的两种或更多种外源性多核苷酸(例如,转基因)各自被多顺反子分离元件分离。在一些实施方案中,多顺反子分离元件是IRES或编码可切割肽或核糖体跳跃元件的序列。在一些实施方案中,多顺反子分离元件是IRES,诸如脑心肌炎(EMCV)病毒IRES。在一些实施方案中,多顺反子分离元件是可切割肽,诸如2A肽。示例性2A肽包括P2A肽、T2A肽、E2A肽和F2A肽。在一些实施方案中,可切割肽是T2A。在一些实施方案中,该两种或更多种外源性多核苷酸(例如第一外源性多核苷酸和第二外源性多核苷酸)可操作地连接至启动子。在一些实施方案中,第一外源性多核苷酸和第二外源性多核苷酸各自可操作地连接至启动子。在一些实施方案中,启动子是相同的启动子。在一些实施方案中,启动子是EF1启动子。

[0775] 在一些情况下,编码外源性多肽的外源性多核苷酸(例如,编码本文所述的致耐受因子或补体抑制剂的外源性多核苷酸)编码可切割肽或核糖体跳跃元件(诸如在由多顺反子载体编码的外源性多肽的N端或C端处的T2A)。在一些实施方案中,包含可切割肽或核糖体跳跃元件允许从单个翻译起始位点表达两个或更多个多肽。在一些实施方案中,可切割肽是T2A。在一些实施方案中,T2A是或者包含SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,T2A是或者包含SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,T2A是或者包含SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,T2A是或者包含SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列。

[0776] 在一些实施方案中,载体或构建体包含驱动外源性多核苷酸的一个或多个转录单位的表达的单个启动子。在一些实施方案中,此类载体或构建体可以是多顺反子的(双顺反子或三顺反子的,参见例如美国专利号6,060,273)。例如,在一些实施方案中,转录单位可

以被工程化为含有IRES(内部核糖体进入位点)的双顺反子单位,其允许来自从单个启动子转录的RNA的基因产物(例如,一种或多种致耐受因子诸如CD47和/或一种或多种补体抑制剂诸如CD46、CD59和DAF/CD55)的共表达。在一些实施方案中,本文提供的载体或构建体是双顺反子的,从而允许载体或构建体表达两种单独的多肽。在一些情况下,由载体或构建体编码的两种单独的多肽是致耐受因子(例如,选自A20/TNFAIP3、B2M-HLA-e、CD16、CD16-Fc受体、CD24、CD27、CD35、CD39、CD46、CD47、CD52、CD55、CD59、CD64、CD200、CCL21、CCL22、CTLA4-Ig、C1抑制剂、CR1、DUX4、FASL、HLA-C、HLA-e、HLA-e重链、HLA-F、HLA-g、H2-M3、IDO1、IL-10、IL15-RF、IL-35、IL-39、MANF、Mfge8、PD-L1和Serpinb9的两种因子)。在一些情况下,由载体或构建体编码的两种单独的多肽是CD46和CD59。在一些实施方案中,由载体或构建体编码的两种单独的多肽是致耐受因子(例如,CD47)和选自CD46、CD59和DAF/CD55的补体抑制剂。在一些实施方案中,本文提供的载体或构建体是三顺反子的,允许载体或构建体表达三种单独的多肽。在一些情况下,三顺反子载体或构建体的三种核酸序列是致耐受因子诸如CD47、CD46和CD59。在一些情况下,三顺反子载体或构建体的三种核酸序列是CD46、CD59和DAF/CD55。在一些情况下,三顺反子载体或构建体的三种核酸序列是选自以下的三种致耐受因子:A20/TNFAIP3、B2M-HLA-E、CD16、CD16 Fc受体、CD24、CD27、CD35、CD39、CD46、CD47、CD52、CD55、CD59、CD64、CD200、CCL21、CCL22、CTLA4-Ig、C1抑制剂、CR1、DUX4、FASL、HLA-C、HLA-E、HLA-E重链、HLA-F、HLA-G、H2-M3、IDO1、IL-10、IL15-RF、IL-35、IL-39、MANF、Mfge8、PD-L1和Serpinb9。在一些实施方案中,本文提供的载体或构建体是四顺反子的,从而允许载体或构建体表达四种单独的多肽。在一些情况下,四顺反子载体或构建体的四种单独的多肽是CD47、CD46、CD59和DAF/CD55。在一些情况下,四顺反子载体或构建体的四种单独的多肽是选自以下的四种致耐受因子:A20/TNFAIP3、B2M-HLA-E、CD16、CD16Fc受体、CD24、CD27、CD35、CD39、CD46、CD47、CD52、CD55、CD59、CD64、CD200、CCL21、CCL22、CTLA4-Ig、C1抑制剂、CR1、DUX4、FASL、HLA-C、HLA-E、HLA-E重链、HLA-F、HLA-G、H2-M3、IDO1、IL-10、IL15-RF、IL-35、IL-39、MANF、Mfge8、PD-L1和Serpinb9。

[0777] 在一些实施方案中,细胞包含一种或多种载体或构建体,其中每种载体或构建体是如上所述的单顺反子或多顺反子构建体,并且单顺反子或多顺反子构建体以任何组合或顺序编码一种或多种致耐受因子、补体抑制剂。

[0778] 在一些实施方案中,单个启动子引导RNA的表达,该RNA在单个开放阅读框(ORF)中含有通过编码自切割肽(例如,2A序列)或蛋白酶识别位点(例如,弗林蛋白酶)的序列彼此分离的两种、三种或四种基因(例如,编码致耐受因子(例如,CD47)和/或选自CD46、CD59和DAF/CD55的一种或多种补体抑制剂)。因此,ORF编码单个多肽,该多肽在翻译期间(在2A的情况下)或翻译后被加工成单独的蛋白质。在一些情况下,肽(诸如T2A)可以导致核糖体跳过(核糖体跳跃)合成2A元件C端处的肽键,导致2A序列末端与下游下一个肽之间的分离(例如,参见de Felipe.Genetic Vaccines and Ther.2:13(2004)和deFelipe等人Traffic 5:616-626(2004))。本领域已知许多2A元件。可用于本文公开的方法和核酸中的2A序列的实例包括但不限于如美国专利公布号20070116690中所述的口蹄疫病毒(F2A,例如SEQ ID NO:16)、马鼻炎A病毒(E2A,例如SEQ ID NO:15)、明脉扁刺蛾(thosea asigna)病毒(T2A,例如,SEQ ID NO:11、12、17或18)和猪捷申病毒-1(P2A,例如序列ID NO:13或14)的2A序列。

[0779] 在载体或构建体(例如转基因)包含不止一种编码蛋白质的核酸序列(例如编码

CD46的第一外源性多核苷酸和编码CD59的第二外源性多核苷酸,或编码CD47的第一外源性多核苷酸、编码CD56的第二外源性多核苷酸和编码CD59的第三外源性多核苷酸)的情况下,该载体或构建体(例如,转基因)可以进一步包含编码第一和第二外源性多核苷酸序列之间的肽的核酸序列。在一些情况下,位于第一和第二外源性多核苷酸之间的核酸序列编码在翻译过程中或翻译后分离第一和第二外源性多核苷酸的翻译产物的肽。在一些实施方案中,肽含有自切割肽或引起核糖体跳跃的肽(核糖体跳跃元件),诸如T2A肽。在一些实施方案中,包含可切割肽或核糖体跳跃元件允许从单个翻译起始位点表达两个或更多个多肽。在一些实施方案中,肽是自切割肽,其是T2A肽。在一些实施方案中,T2A是或者包含SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,T2A是或者包含SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,T2A是或者包含SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,T2A是或者包含SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列。

[0780] 将本文所述的多核苷酸引入到细胞中的过程可以通过任何合适的技术来实现。合适的技术包括磷酸钙或脂质介导的转染、电穿孔、促融剂和使用病毒载体进行的转导或感染。在一些实施方案中,将多核苷酸经由病毒转导(例如,慢病毒转导)引入到细胞中或以其他方式在病毒载体上递送(例如,促融剂介导的递送)。合适的技术包括磷酸钙或脂质介导的转染、电穿孔、转座酶介导的递送和使用病毒载体的转导或感染。在一些实施方案中,将多核苷酸经由病毒转导(例如,慢病毒转导)引入到细胞中或以其他方式在病毒载体上递送(例如,促融剂介导的递送)。在一些实施方案中,包装编码外源性多核苷酸的多核苷酸的载体可以用于将包装的多核苷酸递送至细胞或细胞群体。这些载体可以是任何类型,包括DNA载体、RNA载体、质粒、病毒载体和颗粒。在一些实施方案中,脂质纳米颗粒可以用于将外源性多核苷酸递送至细胞。在一些实施方案中,病毒载体可以用于将外源性多核苷酸递送至细胞。病毒载体技术是众所周知的并且在Sambrook等人(2001,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,New York)中描述。可用作载体的病毒包括但不限于慢病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒(AAV)载体、单纯疱疹病毒载体、逆转录病毒载体、溶瘤病毒等。在一些实施方案中,将外源性多核苷酸引入到细胞中可以是特异性的(靶向的)或非特异性的(例如非靶向的)。在一些实施方案中,将外源性多核苷酸引入到细胞中可以导致整合或插入到细胞的基因组中。在其他实施方案中,引入的外源性多核苷酸在细胞中可以是非整合的或游离型的。技术人员熟悉将核酸转基因引入细胞的方法,包括本文所述的示例性方法中的任何示例性方法,并且可以选择合适的方法。

[0781] 1)非靶向递送

[0782] 在一些实施方案中,通过多种非靶向方法中的任一种将外源性多核苷酸引入到细胞(例如源细胞)中。在一些实施方案中,将外源性多核苷酸插入到宿主细胞的随机基因组基因座中。如本领域技术人员已知的,病毒载体(包括例如逆转录病毒载体和慢病毒载体)通常用于将遗传物质递送至宿主细胞中并将外来或外源性基因随机插入宿主细胞基因组中以促进基因的稳定表达和复制。在一些实施方案中,将外源性多核苷酸非靶向引入到细胞中是在外源性多核苷酸在细胞中稳定表达的条件下进行的。在一些实施方案中,用于引入用于在细胞中稳定表达的核酸的方法涉及任何这样的方法,该方法导致核酸稳定整合到细胞的基因组中,从而使得如果核酸所整合到的细胞分裂,则核酸可以繁殖。

[0783] 在一些实施方案中,病毒载体是慢病毒载体。慢病毒载体是成功病毒转导的有用

的手段,因为它们允许递送的核酸转录物内所含的基因稳定表达。慢病毒载体表达逆转录酶和整合酶,这是递送的核酸转录物内所含的基因稳定表达所需的两种酶。逆转录酶将RNA转录物转化为DNA,而整合酶则将DNA插入并整合到靶细胞的基因组中。一旦DNA已被稳定整合到基因组中,DNA就会与宿主一起分裂。经整合的DNA内所含的所关注的基因可以被组成型表达,或者它可以是诱导型的。作为宿主细胞基因组的一部分,它可以经历包括活化或阻遏在内的细胞调控,这取决于靶细胞中的许多因素。

[0784] 慢病毒是因在整合到宿主基因组中之前需要将病毒RNA基因组逆转录为DNA而得名的逆转录病毒科病毒的亚群。因此,慢病毒媒介物/颗粒最重要的特性是其遗传物质整合到靶/宿主细胞的基因组中。慢病毒的一些实例包括人免疫缺陷病毒:HIV-1和HIV-2、猿猴免疫缺陷病毒(SIV)、猫免疫缺陷病毒(FIV)、牛免疫缺陷病毒(BIV)、杰姆布拉纳病毒(Jembrana Disease Virus)(JDV)、马传染性贫血病毒(EIAV)、马传染性贫血病毒、维士那-梅地病毒和山羊关节炎脑炎病毒(CAEV)。

[0785] 通常,构成基因递送媒介物的慢病毒颗粒本身存在复制缺陷(也称为“自失活”)。慢病毒能够凭借通过完整宿主核被膜的进入机制来感染分裂细胞和非分裂细胞(Naldini L等人,Curr.Opin.Bioiecknol,1998,9:457-463)。重组慢病毒媒介物/颗粒是通过多重减弱HIV毒力基因生成的,例如基因Env、Vif、Vpr、Vpu、Nef和Tat被缺失,从而使载体具有生物安全性。对应地,慢病毒媒介物(例如来源于HIV-1/HIV-2的慢病毒媒介物)可介导转基因向非分裂细胞中的有效递送、整合和长期表达。

[0786] 慢病毒颗粒可通过在生产细胞(诸如人HEK293T细胞)中共表达病毒包装元件和载体基因组本身来生成。这些元件通常以三个(在第二代慢病毒系统中)或四个单独的质粒(在第三代慢病毒系统中)提供。生产细胞与编码慢病毒组分的质粒共转染,该慢病毒组分包括病毒的核心(即结构蛋白质)和酶组分,和一种或多种包膜蛋白(称为包装系统),以及待转移到靶细胞中的编码包含外来转基因的基因组的质粒、媒介物本身(也称为转移载体)。一般来说,质粒或载体包含在生产细胞系中。经由转染、转导或感染将质粒/载体引入生产细胞系中。用于转染、转导或感染的方法是本领域技术人员众所周知的。作为非限制性实例,可以通过磷酸钙转染、脂转染或电穿孔将包装和转移构建体通常与显性可选择标志物(诸如新霉素(neo)、二氢叶酸还原酶(DHFR)、谷氨酰胺合成酶或腺苷脱氨酶(ADA))一起引入到生产细胞系中,随后在适当的药物存在下进行选择并分离克隆。

[0787] 生产细胞产生含有外来基因的重组病毒颗粒,例如编码外源性多核苷酸的多核苷酸。从培养基中回收重组病毒颗粒,并通过本领域技术人员所用的标准方法对重组病毒颗粒进行滴定。重组慢病毒媒介物可以用于感染靶细胞,此类源细胞包括第II.C节中描述的任何细胞。

[0788] 可以用于产生高滴度慢病毒颗粒的细胞可以包括但不限于HEK293T细胞、293G细胞、STAR细胞(Relander等人,Mol Ther.2005,11:452-459)、FreeStyle™293表达系统(ThermoFisher,Waltham,MA)和其他基于HEK293T的生产细胞系(例如Stewart等人,Hum Gene Ther._2011,2,2.(3):357～369;Lee等人,Biotechnol Bioeng,2012,10996):1551-1560;Throm等人Blood.2009,113(21):5104-5110)。

[0789] 慢病毒颗粒中提供的另外的元件可以包括5’或3’末端的逆转录病毒LTR(长末端重复)、逆转录病毒输出元件、任选的慢病毒反向响应元件(RRE)、启动子或其活性部分,以

及基因座控制区(LCR)或其活性部分。其他元件包括提高非分裂细胞中的转导效率的中央多嘌呤束(central polypurine tract,cPPT)序列、增强转基因的表达并增加滴度的土拨鼠肝炎病毒(WHP)转录后调控元件(WPRE)。

[0790] 用于生成重组慢病毒颗粒的方法是技术人员已知的,例如,美国专利号:8,846,385;7,745,179;7,629,153;7,575,924;7,179,903;和6,808,905。使用的慢病毒载体可以选自但不限于pLVX、pLenti、pLenti6、pLJM1、FUGW、pWPXL、pWPI、pLenti CMV puro DEST、pLJM1-EGFP、pULTRA、pInducer2Q、pHIV-EGFP、pCW57.1、pTRPE、pELPS、pRRL和pLionII,也可以使用任何已知的慢病毒媒介物(参见美国专利号9,260,725;9,068,199;9,023,646;8,900,858;8,748,169;8,709,799;8,420,104;8,329,462;8,076,106;6,013,516;和5,994,136;国际专利公布号:WO2012079000)。

[0791] 在一些实施方案中,在用于细胞瞬时表达的条件下将外源性多核苷酸引入到细胞中,诸如通过导致外源性多核苷酸的游离型递送的方法。

[0792] 在一些实施方案中,可以将编码外源性多核苷酸的多核苷酸包装到重组腺相关病毒(rAAV)载体中。此类载体或病毒颗粒可以被设计为利用任何已知的血清型衣壳或血清型衣壳的组合。血清型衣壳可以包括来自任何已鉴定的AAV血清型及其变体的衣壳,例如AAV1、AAV2、AAV2G9、AAV3、AAV4、AAV4-4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12和AAVrh10。在一些实施方案中,AAV血清型可以是或具有如以下中所述的序列:美国公布号US20030138772;Pulicherla等人Molecular Therapy,2011,19(6):1070-1078;美国专利号:6,156,303;7,198,951;美国专利公布号:US2015/0159173和US2014/0359799;以及国际专利公布号:WO1998/011244、WO2005/033321和WO2014/14422。

[0793] AAV载体不仅包括单链载体,还包括自互补AAV载体(scAAV)。scAAV载体含有共同退火从而形成双链载体基因组的DNA。通过跳过第二链合成,scAAV可以在细胞中快速表达。rAAV载体可以通过本领域的标准方法制备,诸如在sf9昆虫细胞中或在人细胞(诸如HEK293细胞)的悬浮细胞培养物中通过三重转染制备。

[0794] 在一些实施方案中,可以使用基于非病毒的方法。例如,在一些方面,包含多核苷酸的载体可以通过非病毒方法(通过物理方法诸如针、电穿孔、声穿孔(sonoporation)、水穿孔(hyrdoporation);化学载剂诸如无机颗粒(例如磷酸钙、二氧化硅、金)和/或化学方法)转移至细胞。在其他方面,合成或天然可生物降解剂可用于递送,诸如阳离子脂质、脂质纳米乳液、纳米颗粒、基于肽的载体或基于聚合物的载体。

[0795] 在一些实施方案中,可以使用基于mRNA的方法。

[0796] 2)非靶向递送

[0797] 可以将外源性多核苷酸插入到细胞的任何合适靶基因组基因座中。在一些实施方案中,通过靶向整合到靶基因座中将外源性多核苷酸引入到细胞中。在一些实施方案中,可以通过在涉及同源依赖性或同源非依赖性重组的过程中使用一种或多种核酸酶和/或切口酶以及供体模板进行基因编辑来实现靶向整合。

[0798] 许多基因编辑方法可以用于将外源性多核苷酸插入所选的特定基因组基因座中,该方法包括例如同源定向修复(HOR)、同源介导的末端连接(HMEJ)、同源非依赖性靶向整合(HITI)、专性连结门控重组(ObliGaRe)或精确整合到靶染色体(PITCh)。

[0799] 在一些实施方案中,核酸酶在基因组中的期望位置(例如靶位点)处产生特异性双

链断裂(DSB),并利用细胞的内源性机制来修复诱导的断裂。切口酶在基因组中的期望位置产生特异性单链断裂。在一个非限制性实例中,两个切口酶可以用于在靶DNA的相对链上产生两个单链断裂,从而生成平端或粘端。可以将任何合适的核酸酶引入到细胞中以诱导靶DNA序列的基因组编辑,该核酸酶包括但不限于CRISPR相关蛋白(Cas)核酸酶、锌指核酸酶(ZFN)、转录活化因子样效应物核酸酶(TALEN)、大范围核酸酶、其他核酸内切酶或核酸外切酶、其变体、其片段以及它们的组合。在一些实施方案中,当核酸酶或切口酶与含有侧接有同源序列(例如同源臂)的外源性多核苷酸序列(也称为转基因)的供体模板一起引入时,DNA损伤修复途径可以导致转基因序列整合在细胞中的靶位点,该同源序列与内源性基因组靶基因座(例如安全港基因座)处或附近的序列同源。这可以通过同源依赖性过程发生。在一些实施方案中,供体模板是环状双链质粒DNA、单链供体寡核苷酸(ssODN)、线性双链聚合酶链式反应(PCR)片段或完整姐妹染色单体的同源序列。根据供体模板的形式,同源介导的基因插入和替换可以经由特定的DNA修复途径进行,诸如同源定向修复(HDR)、合成依赖性链退火(SDSA)、微同源介导的末端连接(MMEJ)和同源介导的末端连接(HMEJ)途径。

[0800] 例如,DNA修复机制可以在以下项后由核酸酶诱导:(i)两个SSB,其中每条链上都有一个SSB,从而诱导单链突出端;(ii)出现在两条链上的相同切割位点处的DSB,从而诱导平端断裂。在被这些剂中的一种切割后,具有SSB或DSB的靶基因座经历DNA损伤修复的两种主要途径之一:(1)易错非同源末端连接(NHEJ),或(2)高保真同源定向修复(HDR)途径。在一些实施方案中,引入到其中存在SSB或DSB的细胞中的供体模板(例如环状质粒DNA或线性DNA片段,诸如ssODN)可以导致HDR和将供体模板整合到靶基因座中。一般来说,在不存在供体模板的情况下,NHEJ过程重新连结经切割的DNA链的末端,这通常会导致切割位点处的核苷酸缺失和插入。

[0801] 在一些实施方案中,将外源性多核苷酸定点插入到细胞中可以通过基于HDR的方法实现。HDR是细胞修复DNA中双链断裂(DSB)的机制,并且可以被用于使用各种基因编辑系统(包括成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)/Cas系统、锌指核酸酶(ZFN)、转录活化因子样效应物核酸酶(TALEN)、大范围核酸酶和转座酶)修饰许多生物体中的基因组。

[0802] 在一些实施方案中,通过引入一种或多种序列特异性或靶向核酸酶来进行靶向整合,该靶向核酸酶包括DNA结合靶向核酸酶和基因编辑核酸酶,诸如专门设计用于被靶向于靶基因的至少一个靶位点序列的锌指核酸酶(ZFN)和转录活化因子样效应物核酸酶(TALEN)以及RNA指导的核酸酶诸如CRISPR相关核酸酶(Cas)系统。示例性的ZFN、TALE和TALEN描述于例如Lloyd等人,Frontiers in Immunology,4(221):1-7(2013)中。在实施方案中,使用成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)和CRISPR相关(Cas)蛋白在靶位点处或靶位点附近进行靶向遗传破坏。参见Sander和Joung,(2014)Nature Biotechnology,32(4):347-355。

[0803] 第II.A.1节中描述的任何用于基因破坏的系统都可以使用,并且当还与具有外源性多核苷酸(例如,转基因序列)的适当供体模板一起被引入时,可以导致外源性多核苷酸在遗传破坏的靶位点处或附近的靶向整合。在实施方案中,使用含有一种或多种指导RNA(gRNA)和Cas蛋白的CRISPR/Cas系统介导遗传破坏。示例性Cas蛋白和gRNA描述于上文第II.A节,其中任何一种都可以用于HDR介导的外源性多核苷酸整合到Crispr/Cas系统特异的靶基因座中。选择适当的Cas核酸酶和gRNA(诸如根据用于通过HDR切割和整合外源性多

核苷酸的特定靶基因座和靶位点)在技术人员的水平之内。此外,根据靶基因座,技术人员可以容易地制备适当的供体模板,诸如下面进一步描述的。

[0804] 在一些实施方案中,DNA编辑系统是RNA指导的CRISPR/Cas系统(诸如基于RNA的CRISPR/Cas系统),其中CRISPR/Cas系统能够在靶基因座(例如,安全港基因座)中产生双链断裂以诱导转基因插入到靶基因座中。在一些实施方案中,核酸酶系统是CRISPR/Cas9系统。在一些实施方案中,CRISPR/Cas9系统包含基于质粒的Cas9。在一些实施方案中,CRISPR/Cas9系统包含基于RNA的Cas9。在一些实施方案中,CRISPR/Cas9系统包含Cas9 mRNA和gRNA。在一些实施方案中,CRISPR/Cas9系统包含蛋白质/RNA复合物,或质粒/RNA复合物,或蛋白质/质粒复合物。在一些实施方案中,提供了用于生成经工程化的细胞的方法,该方法包括将含有转基因或外源性多核苷酸序列的供体模板和包括DNA核酸酶系统(例如,Cas9)的DNA核酸酶系统以及基因座特异性gRNA引入到源细胞(例如,原代细胞或多能干细胞,例如,iPSC)中。在一些实施方案中,Cas9作为mRNA引入。在一些实施方案中,Cas9作为与gRNA的核糖核蛋白复合物引入。

[0805] 通常,待插入的供体模板将至少包含含有所关注的外源性多核苷酸(例如,致耐受因子或CAR)的转基因盒,并且将任选地还包含启动子。在这些实施方案的某些中,含有待插入的外源性多核苷酸和/或启动子的转基因盒将在供体模板中侧接有具有与紧邻靶切割位点上游和下游的序列同源的序列的同源臂,即左同源臂(LHA)和右同源臂(RHA)。通常,供体模板的同源臂是专门为靶基因组基因座设计的,以用作HDR的模板。每个同源臂的长度通常取决于所引入的插入物的大小,较大的插入物需要较长的同源臂。

[0806] 在一些实施方案中,供体模板(例如,重组供体修复模板)包含:(i)包含外源性多核苷酸序列的转基因盒(例如,可操作地连接到启动子(例如,异源启动子)的转基因);和(ii)侧接转基因盒并与DNA核酸酶(例如,Cas核酸酶,如Cas9或Cas12)切割位点的任一侧处的靶基因座(例如,安全港基因座)的一部分同源的两个同源臂。供体模板可以进一步包含可选择标志物、可检测标志物和/或纯化标志物。

[0807] 在一些实施方案中,同源臂长度相同。在其他实施方案中,同源臂长度不同。同源臂可为至少约10个碱基对(bp),例如,至少约10bp、15bp、20bp、25bp、30bp、35bp、45bp、55bp、65bp、75bp、85bp、95bp、100bp、150bp、200bp、250bp、300bp、350bp、400bp、450bp、500bp、550bp、600bp、650bp、700bp、750bp、800bp、850bp、900bp、950bp、1000bp、1.1千碱基(kb)、1.2kb、1.3kb、1.4kb、1.5kb、1.6kb、1.7kb、1.8kb、1.9kb、2.0kb、2,1kb、2.2kb、2.3kb、2,4kb、2,5kb、2,6kb、2.7kb、2.8kb、2.9kb、3.0kb、3.1kb、3.2kb、3.3kb、3.4kb、3.5kb、3.6kb、3.7kb、3.8kb、3.9kb、4.0kb或更长。同源臂可以是约10bp至约4kb,例如约10bp至约20bp、约10bp至约50bp、约10bp至约100bp、约10bp至约200bp、约10bp至约500bp、约10bp至约I kb、约10bp至约2kb、约10bp至约4kb、约100bp至约200bp、约100bp至约500bp、约100bp至约1kb、约100bp至约2kb、约100bp至约4kb、约500bp至约I kb、约500bp至约2kb、约500bp至约4kb、约1kb至约2kb、约1kb至约2kb、约1kb至约4kb或约2kb至约4kb。

[0808] 在一些实施方案中,供体模板可以被克隆到表达载体中。可以使用本领域普通技术人员已知的基于常规病毒和非病毒的表达载体。

[0809] 在一些实施方案中,靶向整合的靶基因座可以是任何基因座,其中靶向整合外源性多核苷酸或转基因是可接受或期望的。靶基因座的非限制性实例包括但不限于CXCR4基

因、白蛋白基因、SHS231基因座、F3基因(也称为CD142)、MICA基因、MICB基因、LRP1基因(也称为CD91)、HMGB1基因、ABO基因、RHD基因、FUT1基因、KDM5D基因(也称为HY)、B2M基因、CIITA基因、TRAC基因、TRBC基因、CCR5基因、F3(即,CD142)基因、MICA基因、MICB基因、LRP1基因、HMGB1基因、ABO基因、RHD基因、FUT1基因、KDM5D(即,HY)基因、PDGFRa基因、OLIG2基因和/或GFAP基因。在一些实施方案中,外源性多核苷酸可以被插入在靶基因座(例如,安全港基因座)的合适区域中,该区域包括例如内含子、外显子和/或基因编码区(也称为编码序列,或"CDS")。在一些实施方案中,该插入发生在靶基因组基因座的一个等位基因中。在一些实施方案中,该插入发生在靶基因组基因座的两个等位基因中。在这些实施方案的任一个中,插入到靶基因组基因座中的转基因的取向可以与此基因座中的基因的方向相同或相反。

[0810] 在一些实施方案中,将外源性多核苷酸插入到安全港基因座的内含子、外显子或编码序列区域中。在一些实施方案中,将外源性多核苷酸插入到内源性基因中,其中该插入导致内源性基因的沉默或内源性基因的表达降低。用于插入外源性多核苷酸的示例性基因组基因座描述于表24中。

[0811] 表24.用于插入外源性多核苷酸的示例性基因组基因座

[0812]

编号	物种	名称	Ensembl ID	用于切割的靶区域	也被称为
1	人	B2M	ENSG00000166710	CDS	

[0813]

2	人	CIITA	ENSG00000179583	CDS	
3	人	TRAC	ENSG00000277734	CDS	
4	人	PPP1R12C	ENSG00000125503	内含子 1 和 2	AAVS1
5	人	CLYBL	ENSG00000125246	内含子 2	
6	人	CCR5	ENSG00000160791	外显子 1-3、内含子 1-2 和 CDS	
7	人	THUMPD3- AS1	ENSG00000206573	内含子 1	ROSA26
8	人	Ch- 4:58,976,613		500 bp 窗口	SHS231
9	人	F3	ENSG00000117525	CDS	CD142
10	人	MICA	ENSG00000204520	CDS	
11	人	MICB	ENSG00000204516	CDS	
12	人	LRP1	ENSG00000123384	CDS	
13	人	HMGB1	ENSG00000189403	CDS	
14	人	ABO	ENSG00000175164	CDS	
15	人	RHD	ENSG00000187010	CDS	
16	人	FUT1	ENSG00000174951	CDS	
17	人	KDM5D	ENSG00000012817	CDS	HY

[0814] 在一些实施方案中,靶基因座是安全港基因座。在一些实施方案中,安全港基因座是允许经整合的DNA稳定表达而对附近或邻近的内源性基因、调控元件等影响最小的基因组位置。在一些情况下,安全港基因能够实现可持续的基因表达,并且可以在各种细胞类型中被经工程化的核酸酶靶向以进行基因修饰,该细胞类型包括原代细胞和多能干细胞(包括其衍生物)以及其分化的细胞。安全港基因座的非限制性实例包括但不限于CCR5基因座、

PPP1R12C(也称为AAVS1)基因座、CLYBL基因座和/或Rosa基因座(例如,ROSA26基因座)。在一些实施方案中,安全港基因座选自由AAVS1基因座、CCR5基因座和CLYBL基因座组成的组。在一些情况下,SHS231可以作为许多细胞类型中的安全港基因座被靶向。在一些情况下,某些基因座在某些细胞类型中可以作为安全港基因座发挥作用。例如,PDGFRa是胶质祖细胞(GPC)的安全港,OLIG2是少突胶质细胞的安全港基因座,并且GFAP是星形胶质细胞的安全港基因座。根据特定的经工程化的细胞类型选择适当的安全港基因座在技术人员的水平之内。在一些情况下,可以靶向不止一种安全港基因,从而将不止一种转基因引入到经遗传修饰的细胞中。

[0815] 在一些实施方案中,提供了用于生成经工程化的细胞的方法,该方法包括将含有转基因或外源性多核苷酸序列的供体模板和包括DNA核酸酶系统(例如Cas9)的DNA核酸酶系统以及基因座特异性gRNA引入到源细胞(例如原代细胞或多能干细胞,例如iPSC)中,该基因座特异性gRNA包含对CCR5基因座、PPP1R12C(也称为AAVS1)基因座、CLYBL基因座和/或Rosa基因座(例如,ROSA26基因座)具有特异性的互补部分(例如,gRNA靶向序列)。在一些实施方案中,由gRNA靶向的基因组基因座位于如所描述的基因座中的任何基因座的4000bp内、3500bp内、3000bp内、2500bp内、2000bp内、1500bp内、1000bp内或500bp内。

[0816] 在一些实施方案中,本文用于HDR介导的转基因插入的gRNA包含识别AAVS1中的靶序列的互补部分(例如gRNA靶向序列)。在这些实施方案的某些中,靶序列位于AAVS1的内含子1中。AAVS1位于染色体19:55,090,918-55,117,637反向链,并且AAVS1内含子1(基于转录物ENSG00000125503)位于染色体19:55,117,222-55,112,796反向链。在某些实施方案中,gRNA靶向染色体19:55,117,222-55,112,796的4000bp内、3500bp内、3000bp内、2500bp内、2000bp内、1500bp内、1000bp内或500bp内的基因组基因座。在某些实施方案中,gRNA靶向染色体19:55,115,674的4000bp内、3500bp内、3000bp内、2500bp内、2000bp内、1500bp内、1000bp内或500bp内的基因组基因座。在某些实施方案中,gRNA被配置成在染色体19:55,115,674处或在染色体19:55,115,674的5、10、15、20、30、40或50个核苷酸内的位置处产生切割位点。在某些实施方案中,gRNA是GET000046,也称为“sgAAVS1-1”,描述于Li等人,Nat.Methods 16:866-869(2019)中。此gRNA包含具有SEQ ID NO:36中所示的核酸序列的互补部分(例如,gRNA靶向序列)(如表25所示)并且靶向AAVS1的内含子1(也称为PPP1R12C)。

[0817] 在一些实施方案中,本文用于HDR介导的转基因插入的gRNA包含识别CLYBL中的靶序列的互补部分(例如,gRNA靶向序列)。在这些实施方案的某些中,靶序列位于CL YBL的内含子2中。CLYBL位于染色体13:99,606,669-99,897,134正向链,并且CLYBL内含子2(基于转录物ENST00000376355.7)位于染色体13:99,773,011-99,858,860正向链。在某些实施方案中,gRNA靶向染色体13:99,773,011-99,858,860的4000bp内、3500bp内、3000bp内、2500bp内、2000bp内、1500bp内、1000bp内或500bp内的基因组基因座。在某些实施方案中,gRNA靶向染色体13:99,822,980的4000bp内、3500bp内、3000bp内、2500bp内、2000bp内、1500bp内、1000bp内或500bp内的基因组基因座。在某些实施方案中,gRNA被配置成在染色体13:99,822,980处或在染色体13:99,822,980的5、0、15、20、30、40或50个核苷酸内的位置处产生切割位点。在某些实施方案中,gRNA是GET000047,其包含具有SEQ ID NO:36(示于表25)中所示的核酸序列的互补部分(例如gRNA靶向序列)并且靶向CLYBL的内含子2。靶位点与如Cerbini等人,PLoS One,10(1):e0116032(2015)中所述的TALEN的靶位点类似。

[0818] 在一些实施方案中,本文用于HDR介导的转基因插入的gRNA包含识别CCR5中的靶序列的互补部分(例如gRNA靶向序列)。在这些实施方案的某些中,靶序列位于CCR5的外显子3中。CCR5位于染色体3:46,370,854-46,376,206正向链,并且CCR5外显子3(基于转录物ENST00000292303.4)位于染色体3:46,372,892-46,376,206正向链。在某些实施方案中,gRNA靶向染色体3:46,372,892-46,376,206的4000bp内、3500bp内、3000bp内、2500bp内、2000bp内、1500bp内、1000bp内或500bp内的基因组基因座。在某些实施方案中,gRNA靶向染色体3:46,373,180的4000bp内、3500bp内、3000bp内、2500bp内、2000bp内、1500bp内、1000bp内或500bp内的基因组基因座。在某些实施方案中,gRNA被配置成在染色体3:46,373,180处或在染色体3:46,373,180的5、10、15、20、30、40或50个核苷酸内的位置处产生切割位点。在某些实施方案中,gRNA是GET000048,也称为“crCCR5_D”,描述于Mandal等人,Cell Stem Cell 15:643-652(2014)。此gRNA包含具有SEQ ID NO:37(示于表17)中所示的核酸序列的互补部分并且靶向CCR5的外显子3(在Ensembl基因组数据库中替代地被注解为外显子2)。参见Gomez-Ospina等人,Nat.Comm.10(1):4045(2019)。

[0819] 表25示出了示例性gRNA靶向序列。在一些实施方案中,gRNA靶向序列可以含有表17中所示的互补部分序列中的一个或多个胸腺嘧啶,其被尿嘧啶取代。本领域普通技术人员应当理解,尿嘧啶和胸腺嘧啶均可以用“t”表示,而不是尿嘧啶用“u”表示且胸腺嘧啶用“t”表示;在核糖核酸的上下文中,应当理解除非另有说明,否则“t”用于表示尿嘧啶。

[0820] 表25.CCR5的示例性gRNA靶向序列

[0821]

描述	核酸序列	SEQ ID NO:
GET000046指导物	(5’→3’)accccacagtggggccacta	321
GET000047指导物	(5’→3’)tgttggaaggatgaggaaat	322
GET000048指导物	(5’→3’)tcactatgctgccgcccagt	323

[0822] 在一些实施方案中,靶基因座是细胞中需要被敲除的基因座。在此类实施方案中,此种靶基因座是细胞中需要其破坏或消除(诸如以调节细胞的表型或功能)的任何靶基因座。例如,第II.A节中描述的用于降低靶基因的表达的基因修饰中的任何基因修饰可以是用于靶向整合外源性多核苷酸的所需靶基因座,其中靶基因的遗传破坏或敲除以及通过靶向插入外源性多核苷酸的过表达可以在细胞中的相同靶位点或基因座处实现。例如,HDR过程可以被用于导致遗传破坏,以消除或降低(例如,敲除)表1中所示的任何靶基因的表达,同时也通过使用具有侧接同源臂的供体模板将外源性多核苷酸整合(例如,敲入)到靶基因中,该同源臂与遗传破坏的靶位点处或附近的核酸序列同源。

[0823] 在一些实施方案中,提供了用于生成经工程化的细胞的方法,该方法包括将含有转基因或外源性多核苷酸序列的供体模板和包括DNA核酸酶系统(例如Cas9)的DNA核酸酶系统以及基因座特异性gRNA引入到源细胞(例如原代细胞或多能干细胞,例如iPSC)中,该基因座特异性gRNA包含对B2M基因座、CIITA基因座、TRAC基因座、TRBC基因座具有特异性的互补部分。在一些实施方案中,由gRNA靶向的基因组基因座位于如所描述的基因座中的任何基因座的4000bp内、3500bp内、3000bp内、2500bp内、2000bp内、1500bp内、1000bp内或500bp内。

[0824] 在实施方案中,靶基因座是B2M。在一些实施方案中,经工程化的细胞包含靶向B2M基因的遗传修饰。在一些实施方案中,通过使用靶向核酸酶系统进行靶向B2M基因的遗传修

饰,该靶向核酸酶系统包含Cas蛋白或编码Cas蛋白的多核苷酸,以及至少一个用于特异性地靶向B2M基因的指导核糖核酸序列。在一些实施方案中,该至少一个用于特异性地靶向B2M基因的指导核糖核酸(gRNA)序列选自由WO2016/183041(其公开内容以引用的方式整体并入本文中)的附录2或表15的SEQ ID NO:81240-85644组成的组。在一些实施方案中,通过引入含有外源性多核苷酸序列的供体模板由HDR将外源性多核苷酸整合到被破坏的B2M基因座中,该外源性多核苷酸序列具有与邻近gRNA靶向的靶位点的序列同源的侧接同源臂。

[0825] 在实施方案中,靶基因座是CIITA。在一些实施方案中,经工程化的细胞包含靶向CIITA基因的遗传修饰。在一些实施方案中,通过靶向核酸酶系统进行靶向CIITA基因的遗传修饰,该靶向核酸酶系统包含Cas蛋白或编码Cas蛋白的多核苷酸,以及至少一个用于特异性地靶向CIITA基因的指导核糖核酸序列。在一些实施方案中,该至少一个用于特异性地靶向CIITA基因的指导核糖核酸序列选自由WO2016183041(其公开内容以引用的方式整体并入本文中)的附录1或表12的SEQ ID NO:5184-36352组成的组。在一些实施方案中,通过引入含有外源性多核苷酸序列的供体模板由HDR将外源性多核苷酸整合到被破坏的CIITA基因座中,该外源性多核苷酸序列具有与邻近gRNA靶向的靶位点的序列同源的侧接同源臂。

[0826] 在一些实施方案中,细胞是T细胞并且通过基因编辑方法降低或消除细胞中内源性TRAC或TRBC基因座的表达。例如,HDR过程可以被用于导致遗传破坏,以消除或降低(例如,敲除)TRAC或TRBC基因的表达,同时还通过使用具有侧接同源臂的供体模板将外源性多核苷酸整合(例如,敲入)到相同基因座中,该同源臂与遗传破坏的靶位点处或附近的核酸序列同源。可用于本文所述的基于CRISPR/Cas的基因靶向的示例性gRNA序列在表26中提供。该序列可见于US20160348073,包括序列表的公开内容以引用的方式整体并入本文中。

[0827] 表26.可用于靶向基因的示例性gRNA靶向序列

[0828]

基因名称	US20160348073中的SEQ ID NO
TRAC	SEQ ID NO:532-609和9102-9797
TRB(也称为TCRB和TRBC)	SEQ ID NO:610-765和9798-10532

[0829] 在一些实施方案中,经工程化的细胞包含靶向TRAC基因的遗传修饰。在一些实施方案中,通过靶向核酸酶系统进行靶向TRAC基因的遗传修饰,该靶向核酸酶系统包含Cas蛋白或编码Cas蛋白的多核苷酸,以及至少一个用于特异性地靶向TRAC基因的指导核糖核酸序列。在一些实施方案中,该至少一个用于特异性地靶向TRAC基因的指导核糖核酸序列(例如gRNA靶向序列)选自由US20160348073(其公开内容以引用的方式整体并入本文中)的SEQ ID NO:532-609和9102-9797组成的组。在一些实施方案中,通过引入含有外源性多核苷酸序列的供体模板由HDR将外源性多核苷酸整合到被破坏的TRAC基因座中,该外源性多核苷酸序列具有与邻近gRNA靶向的靶位点的序列同源的侧接同源臂。

[0830] 在一些实施方案中,经工程化的细胞包含靶向TRBC基因的遗传修饰。在一些实施方案中,通过靶向核酸酶系统进行靶向TRBC基因的遗传修饰,该靶向核酸酶系统包含Cas蛋白或编码Cas蛋白的多核苷酸,以及至少一个用于特异性地靶向TRBC基因的指导核糖核酸序列。在一些实施方案中,该至少一个用于特异性地靶向TRBC基因的指导核糖核酸序列(例如gRNA靶向序列)选自由US20160348073(其公开内容以引用的方式整体并入本文中)的SEQ ID NO:610-765和9798-10532组成的组。在一些实施方案中,通过引入含有外源性多核苷酸

序列的供体模板由HDR将外源性多核苷酸整合到被破坏的TRBC基因座中,该外源性多核苷酸序列具有与邻近gRNA靶向的靶位点的序列同源的侧接同源臂。

[0831] 在一些实施方案中,鉴定用于如所描述的HDR介导的整合方法的新基因座和/或gRNA序列在技术人员的水平之内。例如,对于CRISPR/Cas系统,当已知针对特定基因座(例如,在靶基因(例如表1中所示)内)的现有gRNA时,可以使用"英寸蠕动"方法通过扫描PAM序列的基因座的任一侧上的侧接区来鉴定用于靶向插入转基因的另外的基因座,其通常在整个基因组中约每100个碱基对(bp)出现一次。PAM序列将取决于使用的特定Cas核酸酶,因为不同的核酸酶通常具有不同的对应PAM序列。基因座任一侧上的侧接区域可以是约500至4000bp长,例如约500bp、约1000bp、约1500bp、约2000bp、约2500bp、约3000bp、约3500bp或约4000bp长。当在搜索范围内鉴定出PAM序列时,可以根据此基因座的序列设计新的指导物,用于遗传破坏方法。尽管CRISPR/Cas系统被描述为例示性的,但如所描述的任何HDR介导的方法都可以用于这种鉴定新基因座的方法,包括使用ZFN、TALEN、大范围核酸酶和转座酶的那些方法。

[0832] 在一些实施方案中,外源性多核苷酸编码外源性CD47多肽(例如,人CD47多肽),并且将外源性多肽插入到如本文所公开的安全港基因座或安全港位点中,或插入到导致内源性基因的沉默或内源性基因的表达降低的基因组基因座中。在一些实施方案中,将编码CD47的外源性多核苷酸插入到CCR5基因座、PPP1R12C(也称为AAVS1)基因座、CLYBL基因座和/或Rosa基因座(例如,ROSA26基因座)中。在一些实施方案中,将多核苷酸插入到B2M、CIITA、TRAC、TRBC、PD1或CTLA4基因座中。

[0833] C.细胞

[0834] 在一些实施方案中,本公开提供了已经被工程化(或修饰)的细胞(例如,干细胞、诱导型多能干细胞、由此种干细胞获得或产生的分化的细胞、造血干细胞或原代细胞)或其群体,其中该细胞的基因组已被修饰为使得如本文所述的一种或多种基因的表达被降低或缺失(例如调控一种或多种MHC I类分子或一种或多种MHC II类分子的表达的基因),或者其中基因或多核苷酸过表达或表达增加(例如编码诸如CD47的致耐受因子的多核苷酸)。

[0835] 本文公开的涉及干细胞的实施方案还可被认为公开了其中细胞是来源于此类干细胞的细胞的对应实施方案。

[0836] 在一些实施方案中,包含外源性多核苷酸的经工程化的细胞是β胰岛细胞并且包含编码CD47多肽的第一外源性多核苷酸。在一些实施方案中,经工程化的β胰岛细胞进一步包含编码本文所述的一种或多种补体抑制剂或其他致耐受多肽的一种或多种另外的外源性多核苷酸。在一些实施方案中,将第一外源性多核苷酸和该一种或多种另外的外源性多核苷酸插入到相同的基因组基因座中。在一些实施方案中,将第一外源性多核苷酸和该一种或多种另外的外源性多核苷酸插入到不同的基因组基因座中。在示例性实施方案中,经工程化的(例如,低免疫原性的)细胞是原代β胰岛细胞或来源于经工程化的(例如,低免疫原性的)多能细胞(例如,iPSC)的β胰岛细胞。

[0837] 在一些实施方案中,包含外源性多核苷酸的经工程化的细胞是肝细胞并且包含编码CD47多肽的第一外源性多核苷酸。在一些实施方案中,经工程化的肝细胞进一步包含编码本文所述的一种或多种补体抑制剂或其他致耐受多肽的一种或多种另外的外源性多核苷酸。在一些实施方案中,将第一外源性多核苷酸和该一种或多种另外的外源性多核苷酸

插入到相同的基因组基因座中。在一些实施方案中,将第一外源性多核苷酸和该一种或多种另外的外源性多核苷酸插入到不同的基因组基因座中。在示例性实施方案中,经工程化的(例如,低免疫原性的)细胞是原代肝细胞或来源于经工程化的(例如,低免疫原性的)多能细胞(例如,iPSC)的肝细胞。

[0838] 在一些实施方案中,如本文所提供的那样被工程化或修饰的细胞是多能干细胞或者是从多能干细胞分化而来的细胞。在一些实施方案中,如本文所提供的那样被工程化或修饰的细胞是原代细胞。

[0839] 该细胞可以是脊椎动物细胞,例如哺乳动物细胞,诸如人细胞或小鼠细胞。细胞也可以是脊椎动物干细胞,例如哺乳动物干细胞,诸如人干细胞(或来源于此种干细胞的细胞),或小鼠干细胞(或者来源于此种干细胞的细胞)。在实施方案中,细胞或干细胞或来源于此种干细胞的细胞易于进行修饰。

[0840] 在实施方案中,细胞或干细胞或来源于此种干细胞的细胞具有或被认为具有治疗价值,使得细胞或干细胞或来源于此种干细胞或从此种干细胞分化而来的细胞可以用于治疗需要治疗的受试者的疾病、病症、缺陷或损伤。

[0841] 在一些实施方案中,细胞是干细胞或祖细胞(例如,iPSC、胚胎干细胞、造血干细胞、间充质干细胞、内皮干细胞、上皮干细胞、脂肪干细胞或祖细胞、生殖干细胞、肺干细胞或祖细胞、乳腺干细胞、嗅觉成体干细胞、毛囊干细胞、多潜能干细胞、羊膜干细胞、脐带血干细胞或神经干细胞或祖细胞)。在一些实施方案中,干细胞是成体干细胞(例如,体干细胞或组织特异性干细胞)。在一些实施方案中,干细胞或祖细胞能够分化(例如,干细胞是全能的、多能的或多潜能的)。在一些实施方案中,细胞分离自胚胎或新生儿组织。在一些实施方案中,细胞是单核前体纤维母细胞、B细胞、外分泌细胞、胰腺祖细胞、内分泌祖细胞、成肝细胞、成肌细胞、前脂肪细胞、祖细胞、肝细胞、软骨细胞、平滑肌细胞、K562人红系白血病细胞系、骨细胞、滑膜细胞、肌腱细胞、韧带细胞、半月板细胞、脂肪细胞、树突状细胞,或自然杀伤细胞。在一些实施方案中,细胞被操纵(例如,转化或分化)为肌肉细胞、红系巨核细胞、嗜酸性粒细胞、iPS细胞、巨噬细胞、T细胞、胰岛β细胞、神经元、心肌细胞、血细胞、内分泌祖细胞、外分泌祖细胞、导管细胞、腺泡细胞、α细胞、β细胞、δ细胞、PP细胞、肝细胞、胆管细胞或棕色脂肪细胞。在一些实施方案中,细胞是肌肉细胞(例如,骨骼肌细胞、平滑肌细胞或心脏肌肉细胞)、红系巨核细胞、嗜酸性粒细胞、iPS细胞、巨噬细胞、T细胞、胰岛β细胞、神经元、心肌细胞、血细胞(例如,红血细胞(red blood cell)、白血细胞或血小板)、内分泌祖细胞、外分泌祖细胞、导管细胞、腺泡细胞、α细胞、β细胞、δ细胞、PP细胞、肝细胞、胆管细胞或白色或棕色脂肪细胞。在一些实施方案中,细胞是激素分泌细胞(例如,分泌胰岛素、催产素、内啡肽、加压素、血清素、生长抑素、胃泌素、分泌素、胰高血糖素、甲状腺激素、铃蟾肽、胆囊收缩素、睾酮、雌激素或黄体酮、肾素、生长激素释放肽、胰淀素或胰多肽的细胞)、表皮角质形成细胞、上皮细胞(例如,外分泌分泌上皮细胞、甲状腺上皮细胞、角化上皮细胞、胆囊上皮细胞,或角膜、舌头、口腔、食道、肛管、远端尿道或阴道的表面上皮细胞)、肾细胞、生殖细胞、骨关节滑膜细胞、骨膜细胞、骨细胞(例如,破骨细胞或成骨细胞)、软骨膜细胞(例如,成软骨细胞或软骨细胞(chondrocyte))、软骨细胞(cartilage cell)(例如,软骨细胞(chondrocyte))、纤维母细胞、内皮细胞、心包细胞、脑膜细胞、角质形成细胞前体细胞、角质形成细胞干细胞、周细胞、胶质细胞、室管膜细胞、从羊膜或胎盘膜分离的细胞,或浆膜细

胞(例如,内衬于体腔中的浆膜细胞)。

[0842] 在一些实施方案中,细胞是体细胞。在一些实施方案中,细胞来源于皮肤或其他器官,例如心脏、脑或脊髓、肝脏、肺、肾、胰腺、膀胱、骨髓、脾、肠或胃。细胞可以来自人或其他哺乳动物(例如,啮齿动物、非人灵长类动物、牛或猪细胞)。

[0843] 在一些实施方案中,细胞是T细胞、NK细胞、β胰岛细胞、内皮细胞、上皮细胞诸如RPE、甲状腺细胞、皮肤细胞或肝细胞。在一些实施方案中,细胞是已从经工程化的iPSC分化而来的iPSC来源的细胞。在一些实施方案中,细胞是已从原代细胞修饰的经工程化的细胞。在一些实施方案中,细胞包含增加的一种或多种致耐受因子的表达。在一些实施方案中,该一种或多种致耐受因子是CD47。

[0844] 在一些实施方案中,细胞包含编码CD47的外源性多核苷酸。在一些实施方案中,细胞包含一种或多种补体抑制剂的过表达或增加的表达。

[0845] 在一些实施方案中,细胞是被工程化为含有本文所述的修饰(例如,遗传修饰)的iPSC来源的T细胞。在一些实施方案中,细胞是被工程化为含有本文所述的修饰(例如,遗传修饰)的原代T细胞。在一些实施方案中,细胞包含一种或多种补体抑制剂的过表达或增加的表达。在一些实施方案中,T细胞可以用嵌合抗原受体(CAR)(包括如本文所述的任何嵌合抗原受体)工程化。在一些实施方案中,经工程化的(例如,低免疫原性的)T细胞可以被用于使用同种异体细胞疗法治疗多种适应症,包括如本文(例如,第IV节)所述的任何适应症。在一些实施方案中,经工程化的(例如,低免疫原性的)T细胞可被用于治疗癌症。

[0846] 在一些实施方案中,细胞是被工程化为含有本文所述的修饰(例如,遗传修饰)的iPSC来源的NK细胞。在一些实施方案中,细胞是被工程化为含有本文所述的修饰(例如,遗传修饰)的原代NK细胞。在一些实施方案中,细胞包含一种或多种补体抑制剂的过表达或增加的表达。在一些实施方案中,NK细胞可以用嵌合抗原受体(CAR)(包括如本文所述的任何嵌合抗原受体)工程化。在一些实施方案中,经工程化的(例如,低免疫原性的)NK细胞可以被用于使用同种异体细胞疗法治疗多种适应症,包括如本文(例如,第V节)所述的任何适应症。在一些实施方案中,经工程化的(例如,低免疫原性的)NK细胞可被用于治疗癌症。

[0847] 在一些实施方案中,细胞是被工程化为含有本文所述的修饰(例如,遗传修饰)的iPSC来源的β胰岛细胞。在一些实施方案中,细胞是被工程化为含有本文所述的修饰(例如,遗传修饰)的原代β胰岛细胞。在一些实施方案中,细胞包含一种或多种补体抑制剂的过表达或增加的表达。在一些实施方案中,经工程化的(例如,低免疫原性的)β胰岛细胞可以被用于使用同种异体细胞疗法治疗多种适应症,包括如本文(例如,第V节)所述的任何适应症。在一些实施方案中,经工程化的(例如,低免疫原性的)β胰岛细胞可以被用于治疗糖尿病,诸如I型糖尿病。

[0848] 在一些实施方案中,细胞是被工程化为含有本文所述的修饰(例如遗传修饰)的iPSC来源的内皮细胞。在一些实施方案中,细胞是被工程化为含有本文所述的修饰(例如,遗传修饰)的原代内皮细胞。在一些实施方案中,经工程化的细胞(例如低免疫原性)内皮细胞可以被用于使用同种异体细胞疗法治疗多种适应症,包括如本文(例如,第V节)所述的任何适应症。在一些实施方案中,经工程化的(例如,低免疫原性的)内皮细胞可被用于治疗血管形成或眼部疾病。

[0849] 在一些实施方案中,细胞是被工程化为含有本文所述的修饰(例如,遗传修饰)的

iPSC来源的上皮细胞。在一些实施方案中,细胞是被工程化为含有本文所述的修饰(例如,遗传修饰)的原代上皮细胞。在一些实施方案中,上皮细胞是RPE。在一些实施方案中,上皮细胞是甲状腺细胞。在一些实施方案中,上皮细胞是皮肤细胞。在一些实施方案中,经工程化的(例如,低免疫原性的)上皮细胞可以被用于使用同种异体细胞疗法治疗多种适应症,包括如本文(例如,第V节)所述的任何适应症。在一些实施方案中,经工程化的(例如,低免疫原性的)上皮细胞可以被用于治疗甲状腺疾病或皮肤疾病。

[0850] 在一些实施方案中,细胞是被工程化为含有本文所述的修饰(例如遗传修饰)的iPSC来源的肝细胞。在一些实施方案中,细胞是被工程化为含有本文所述的修饰(例如,遗传修饰)的原代肝细胞。在一些实施方案中,经工程化的(例如,低免疫原性的)上皮细胞可以被用于使用同种异体细胞疗法治疗多种适应症,包括如本文(例如,第V节)所述的任何适应症。在一些实施方案中,经工程化的(例如,低免疫原性的)肝细胞可以被用于治疗肝脏疾病。

[0851] 在一些实施方案中,如本文所提供的那样被工程化或修饰的细胞是来自健康受试者(诸如未知或未被怀疑患有待治疗的特定疾病或疾患的受试者)的细胞。例如,如果β胰岛细胞分离或获得自供体受试者,诸如用于治疗糖尿病,那么如果受试者未知或未被怀疑患有糖尿病或另一种疾病或疾患,则供体受试者是健康受试者。

[0852] 1.原代细胞

[0853] 在一些实施方案中,如本文所提供的那样被工程化的细胞包含来源于从一个或多个个体受试者或供体获得或分离的原代细胞的细胞。在一些实施方案中,该细胞来源于分离的原代细胞的集合(pool),该分离的原代细胞获得自一个或多个(例如,两个或更多个、三个或更多个、四个或更多个、五个或更多个、十个或更多个、二十个或更多个、五十个或更多个或一百个或更多个)不同的供体受试者。在一些实施方案中,将分离或获得自多个不同的供体受试者(例如两个或更多个、三个或更多个、四个或更多个、五个或更多个、十个或更多个、二十个或更多个、五十个或更多个或一百个或更多个)的原代细胞汇集为一批,并根据所提供的方法进行工程化。

[0854] 在一些实施方案中,原代细胞来自一个或多个供体受试者的原代细胞集合,该供体受试者不同于接受者受试者(例如,被施用细胞的患者)。原代细胞可以获得自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、50、100个或更多个供体受试者并被汇集在一起。可以从1个或多个、2个或更多个、3个或更多个、4个或更多个、5个或更多个、6个或更多个、7个或更多个、8个或更多个、9个或更多个、10个或更多个、20个或更多个、50个或更多或100个或更多个供体受试者获得原代细胞并将它们汇集在一起。在一些实施方案中,从一个或多个个体收获原代细胞,并且在一些情况下,将原代细胞或原代T细胞集合在体外培养。在一些实施方案中,根据本文提供的方法对原代细胞或原代T细胞集合进行工程化或修饰。

[0855] 在一些实施方案中,该方法包括从个体供体受试者获得或分离所需类型的原代细胞(例如T细胞、NK细胞、NKT细胞、内皮细胞、胰岛细胞、β胰岛细胞、肝细胞或如本文所述的其他原代细胞),汇集细胞以获得一批原代细胞类型,以及通过本文提供的方法对细胞进行工程化。在一些实施方案中,该方法包括获得或分离所需类型的原代细胞(例如T细胞、NK细胞、内皮细胞、β胰岛细胞、肝细胞或如本文所述的其他原代细胞)、通过本文提供的方法对每个个体供体的细胞进行工程化,以及汇集至少两个个体样本的经工程化(经修饰的)细胞

以获得一批原代细胞类型的经工程化的细胞。

[0856] 在一些实施方案中,原代细胞是从个体或者从分离或获得自不止一个个体供体的原代细胞的集合分离或获得的。原代细胞可以是本文所述的任何类型的原代细胞,包括第II.C.3节中描述的任何类型。在一些实施方案中,原代细胞选自T细胞、NK细胞、β胰岛细胞、内皮细胞、上皮细胞诸如RPE、甲状腺细胞、皮肤细胞或肝细胞。在一些实施方案中,来自个体供体或个体供体集合的原代细胞被工程化为含有本文所述的修饰(例如遗传修饰)。

[0857] 2.诱导型多能干细胞的生成

[0858] 在一些实施方案中,如本文所提供的那样被工程化的细胞是诱导型多能干细胞或者是来源于诱导型多能干细胞或从诱导型多能干细胞分化而来的经工程化的细胞。小鼠和人多能干细胞(通常称为iPSC;对于鼠细胞为miPSC或对于人细胞为hiPSC)的生成在本领域中通常是已知的。如本领域技术人员将理解的,有多种不同的方法用于生成iPSC。最初的诱导是使用四种转录因子Oct3/4、Sox2、c-Myc和Klf4的病毒引入在小鼠胚胎或成体纤维母细胞中进行的;参见Takahashi和Yamanaka Cell 126:663-676(2006),该文献特此以引用的方式整体并入,特别是其中概述的技术。从那时起,已经开发了许多方法;参见Seki等人,World J.Stem Cells 7(1):116-125(2015)进行回顾,以及Lakshmipathy和Vermuri编辑,Methods in Molecular Biology:Pluripotent Stem Cells,Methods and Protocols,Springer 2013,这两篇文献均以引用的方式整体据此明确并入,特别是用于生成hiPSC的方法(参见例如后一篇参考文献的第3章)。

[0859] 通常,iPSC是通过在宿主细胞中瞬时表达通常使用游离型载体引入的一种或多种重新编程因子生成的。在这些条件下,少量的细胞被诱导成为iPSC(一般来说,这一步的效率很低,因为没有使用选择标志物)。一旦细胞被“重新编程”,并成为多能细胞,它们就会失去一个或多个游离型载体,并使用内源性基因产生该因子。

[0860] 如本领域技术人员还应理解的,可使用的或使用的重新编程因子的数目可以变化。通常,当使用较少的重编程因子时,细胞转化为多能状态的效率下降,“多能性”也下降,例如,较少的重编程因子可能导致细胞不是完全多能的,而是可能只能够分化为较少的细胞类型。

[0861] 在一些实施方案中,使用单个重编程因子OCT4。在其他实施方案中,使用两个重编程因子OCT4和KLF4。在其他实施方案中,使用三个重编程因子OCT4、KLF4和SOX2。在其他实施方案中,使用四个重编程因子OCT4、KLF4、SOX2和c-Myc。在其他实施方案中,可以使用选自SOKMNLT;SOX2、OCT4(POU5F1)、KLF4、MYC、NANOG、LIN28和SV40L T抗原的5、6或7个重编程因子。一般来说,这些重编程因子基因是在游离型载体(诸如本领域已知的和可商购获得的)上提供的。

[0862] 在一些实施方案中,用于转染一种或多种重编程因子的宿主细胞是非多能干细胞。一般来说,如本领域已知的,iPSC是通过瞬时表达如本文所述的重编程因子由非多能细胞(诸如但不限于血细胞、纤维母细胞等)制成的。在一些实施方案中,非多能细胞(诸如纤维母细胞)是在重编程该细胞之前从一个或多个个体受试者或供体获得或分离的。在一些实施方案中,iPSC是由获自一个或多个(例如,两个或更多个、三个或更多个、四个或更多个、五个或更多个、十个或更多个、二十个或更多个、五十个或更多个或一百个或更多个)不同的供体受试者的分离的非多能干细胞(例如纤维母细胞)的集合制成的。在一些实施方案

中,非多能细胞(诸如纤维母细胞)分离或获得自多个不同的供体受试者(例如两个或更多个、三个或更多个、四个或更多个、五个或更多个、十个或更多个、二十个或更多个、五十个或更多个或一百个或更多个),被汇集为一批,被重编程为iPSC并根据提供的方法进行工程化。

[0863] 在一些实施方案中,iPSC是诸如通过将一种或多种重编程因子瞬时转染到来自一个或多个不同于接受者受试者(例如,施用细胞的患者)的供体受试者的非多能细胞(例如,纤维母细胞)的集合中的细胞中而来源于该细胞。可以从1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、50、100个或更多个供体受试者获得待被诱导为iPSC的非多能细胞(例如纤维母细胞)并将它们汇集在一起。可以从1个或多个、2个或更多个、3个或更多个、4个或更多个、5个或更多个、6个或更多个、7个或更多个、8个或更多个、9个或更多个、10个或更多个、20个或更多个、50个或更多或100个或更多个供体受试者获得非多能细胞(例如纤维母细胞)并将它们汇集在一起。在一些实施方案中,从一个或多个个体收获非多能细胞(例如纤维母细胞),并且在一些情况下,将非多能细胞(例如纤维母细胞)或非多能细胞(例如纤维母细胞)集合在体外培养,并用一种或多种重编程因子转染以诱导iPSC的生成。在一些实施方案中,根据本文提供的方法对非多能细胞(例如纤维母细胞)或非多能细胞(例如纤维母细胞)集合进行工程化或修饰。在一些实施方案中,然后使经工程化的iPSC或经工程化的iPSC集合经受分化过程以分化为生物体和组织的任何细胞。

[0864] 一旦已经生成经工程化iPSC细胞,就可如WO2016183041和WO2018132783中所述的那样测定它们的低免疫原性和/或多能性保留。在一些实施方案中,使用如WO2018132783的图13和图15中例示的多种技术测定低免疫原性。这些技术包括移植到同种异体宿主中和监测逃脱宿主免疫系统的低免疫原性多能细胞生长(例如畸胎瘤)。在一些情况下,低免疫原性多能细胞衍生物被转导为表达荧光素酶,然后可以使用生物发光成像进行跟踪。类似地,测试宿主动物对此类细胞的T细胞和/或B细胞反应,以确认这些细胞不会引起宿主动物的免疫反应。可以通过Elispot、ELISA、FACS、PCR或质谱流式细胞术(CYTOF)来评估T细胞反应。使用FACS或Luminex来评估B细胞反应或抗体反应。另外或替代地,可以如WO2018132783的图14和15中一般性地示出的那样测定细胞避免先天免疫反应(例如NK细胞杀伤)的能力。

[0865] 在一些实施方案中,使用本领域技术人员认可的T细胞免疫测定,诸如T细胞增殖测定、T细胞活化测定和T细胞杀伤测定来评价细胞的免疫原性。在一些情况下,T细胞增殖测定包括用干扰素-γ预处理细胞以及将细胞与经标记的T细胞共培养以及在预选的时间量后测定T细胞群体(或增殖中的T细胞群体)的存在。在一些情况下,T细胞活化测定包括将T细胞与本文概述的细胞共培养,以及确定T细胞中T细胞活化标志物的表达水平。

[0866] 可以进行体内测定以评估本文概述的细胞的免疫原性。在一些实施方案中,使用同种异体人源化免疫缺陷小鼠模型来确定经工程化或经修饰的iPSC细胞的存活率和免疫原性。在一些情况下,将经工程化或经修饰的iPSC移植到同种异体人源化NSG-SGM3小鼠中并测定细胞排斥、细胞存活和畸胎瘤形成。在一些情况下,植入的经工程化的iPSC或其分化的细胞在小鼠模型中展现出长期存活。

[0867] 用于确定免疫原性(包括细胞的低免疫原性)的另外的技术描述于例如Deuse等人,Nature Biotechnology,2019,37,252-258和Han等人,Proc Natl Acad Sci USA,2019,116(21),10441-10446,包括附图、附图说明和方法描述的公开内容以引用的方式整体并入

本文中。

[0868] 类似地,以多种方式测试多能性保留。在一些实施方案中,如本文一般性地描述和WO2018132783的图29中所示出的那样通过某些多能性特异性因子的表达来测定多能性。另外或替代地,使多能细胞分化为作为多能性的指示的一种或多种细胞类型。

[0869] 一旦已经生成经工程化的多能干细胞(经工程化的iPSC),就可以如对于维持iPSC已知的那样将它们维持在未分化状态。例如,可以使用防止分化和维持多能性的培养基在基质胶上培养细胞。另外,该细胞可以在培养基中处于维持多能性的条件下。

[0870] 本文所述的多能干细胞中的任何多能干细胞都可以分化为生物体和组织的任何细胞。在一个方面,本文提供了从iPSC分化为不同细胞类型的经工程化的细胞,用于随后移植到接受者受试者中。可以如本领域已知的那样,通常通过评价细胞特异性标志物的存在来测定分化。如本领域技术人员将理解的,可以使用本领域已知的技术移植分化的经工程化的(例如,低免疫原性的)多能细胞衍生物,这取决于细胞类型和这些细胞的最终用途。下文描述了分化的细胞的示例性类型和用于产生其的方法。在一些实施方案中,iPSC可以被分化为本文所述的任何类型的细胞(包括第II.C.3节中描述的任何类型)。在一些实施方案中,iPSC被分化为选自T细胞、NK细胞、β胰岛细胞、内皮细胞、上皮细胞诸如RPE、甲状腺细胞、皮肤细胞或肝细胞的细胞类型。在一些实施方案中,宿主细胞(诸如来自个体供体或个体供体集合的非多能细胞(例如纤维母细胞))被分离或获得,被生成为iPSC,其中该iPSC随后被工程化为含有本文所述的修饰(例如遗传修饰),并然后被分化为所需的细胞类型。

[0871] 3.细胞类型

[0872] 从本文的公开内容可以理解,本公开的实施方案可应用于许多种不同的细胞类型。应当理解,本文所述的关于任何细胞类型的实施方案可以容易且适当地与描述安全开关的实施方案以及描述HIP细胞、CAR细胞和如本文所述的其他经修饰的/经基因编辑的细胞的实施方案相组合。

[0873] 如本文任何地方所描述的用于对细胞群体进行针对供体能力的特性分析的方法可以使用原代(例如,经基因组编辑的)细胞进行。当所制造的细胞疗法产品由干细胞来源的细胞组成时,如本文任何地方所描述的用于对细胞群体进行针对供体能力的特性分析的方法也可以使用(例如,经基因组编辑的)干细胞(即,分化前)和/或使用干细胞来源的细胞(即,分化后)来进行。

[0874] a.β胰岛细胞

[0875] 胰腺含有产生激素的细胞簇,其称为胰岛。胰岛内有几种不同类型的细胞。例如,α细胞产生胰高血糖素;δ细胞产生生长抑素;并且β细胞产生胰岛素。原代胰腺胰岛细胞样本可至少包含α细胞、δ细胞和β细胞。

[0876] 待用于细胞疗法产品中的如本文所述的β-胰岛细胞可以与α细胞和δ细胞一起存在于细胞疗法产品中。可以在细胞疗法产品制造过程的任何阶段对待用于细胞疗法产品中的胰岛细胞进行针对供体能力的特性分析。在一些实施方案中,细胞疗法产品包含至多5%、10%、15%、20%、25%、35%或40%的α细胞。在一些实施方案中,细胞疗法产品包含至多10%、15%、20%、25%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%或80%的β细胞。在一些实施方案中,细胞疗法产品包含至多1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%或25%的δ细胞。

[0877] 可以在细胞疗法产品制造过程的任何阶段对待用于细胞疗法产品中的β-胰岛细胞进行针对供体能力的特性分析。

[0878] 细胞疗法产品中使用的β胰岛细胞可以是原代的(例如,经基因组编辑的)胰腺胰岛细胞。如本文任何地方所描述的用于对细胞群体进行针对供体能力的特性分析的方法可以对原代(例如,经基因组编辑的)胰腺胰岛细胞进行。

[0879] 如本文其他地方所述,细胞疗法产品中使用的β-胰岛细胞可以是多能干细胞(iPSC)来源的β-胰岛细胞。如本文任何地方所描述的用于对细胞群体进行针对供体能力的特性分析的方法也可以对在能够分化形成β胰岛细胞的干细胞进行。如本文任何地方所描述的用于对细胞群体进行针对供体能力的特性分析的方法也可以对干细胞来源的(例如,经基因组编辑的)β-胰岛细胞进行。

[0880] 如本公开的上下文中提及的有关β-胰岛细胞的相关信息(包括关于β-胰岛细胞在被用于细胞疗法时的所需特征的某些信息)在本领域中是已知的。应当理解,本文所述的关于β-胰岛细胞的实施方案可以容易且适当地与描述HIP细胞(例如,表现出降低的MHC I类和/或MHC II类分子中的一种或多种分子的表达以及增加的至少一种致耐受因子的表达)的实施方案以及描述安全开关和如本文所述的其他经修饰的/经基因编辑的细胞的实施方案相组合。可在细胞疗法产品制造期间的编辑过程的任何阶段对待用于细胞疗法产品中的β-胰岛细胞进行针对供体能力的特性分析。

[0881] 本文所述的β-胰岛细胞可用于治疗或预防受试者的疾病。

[0882] 在一些实施方案中,如本文所提供的那样被工程化或修饰的细胞是原代β胰岛细胞(也称为胰腺胰岛细胞或胰腺β细胞)。在一些实施方案中,原代β胰岛细胞分离或获得自一个或多个个体供体受试者,诸如一个或多个个体健康供体(例如,未知或未被怀疑患有疾病或感染(例如,未表现出疾病或感染的临床体征)的受试者)。如本领域技术人员将理解的,从个体分离或获得β胰岛细胞的方法可以使用已知技术来实现。本文提供了含有本文所述的修饰(例如遗传修饰)的经工程化的原代β胰岛细胞,用于随后移植或植入到受试者(例如,接受者)中。

[0883] 在一些实施方案中,从受试者或个体获得(例如,收获、提取、移除或取出)β胰岛细胞。在一些实施方案中,由β胰岛细胞集合产生原代β胰岛细胞,使得该β胰岛细胞来自一个或多个受试者(例如,一个或多个人,包括一个或多个健康人)。在一些实施方案中,原代β胰岛细胞集合来自1-100个、1-50个、1-20个、1-10个、1个或多个、2个或更多个、3个或更多个、4个或更多个、5个或更多个、10个或更多个、20个或更多个、30个或更多个、40个或更多个、50个或更多个,或100个或更多个受试者。在一些实施方案中,供体受试者与患者(例如,施用治疗性细胞的接受者)不同。在一些实施方案中,β胰岛细胞集合不包括来自患者的细胞。在一些实施方案中,从中获得β胰岛细胞集合的供体受试者中的一个或多个供体受试者与患者不同。

[0884] 在一些实施方案中,如本文所提供的细胞是来源于经工程化的iPSC的β胰岛细胞,该经工程化的iPSC含有本文所述的修饰(例如遗传修饰)并且被分化为β胰岛细胞。如本领域技术人员将理解的,用于分化的方法取决于使用已知技术的所需细胞类型。在一些实施方案中,分化为各种β胰岛细胞的细胞可以用于随后移植或植入到受试者(例如,接受者)中。在一些实施方案中,胰腺胰岛细胞来源于本文所述的经工程化的多能细胞。用于使多能

干细胞分化为β胰岛细胞的有用方法描述于例如美国专利号9,683,215;美国专利号9,157,062;美国专利号8,927,280;美国专利公布号2021/0207099;Hogrebe等人,“Targeting the cytoskeleton to direct pancreatic differentiation of human pluripotent stem cells,”Nat.Biotechnol.,2020,38:460-470;以及Hogrebe等人,“Generation of insulin-producing pancreatic beta cells from multiple human stem cell lines,”Nat.Protoc.,2021中,这些文献的内容以引用的方式整体并入本文中。

[0885] 在一些实施方案中,本文所述的经工程化的多能细胞被分化为β样细胞或胰岛类器官,以用于移植以解决I型糖尿病(T1DM)。细胞系统是解决T1DM的有前景的方法,参见例如Ellis等人,Nat Rev Gastroenterol Hepatol.2017年10月;14(10):612-628,其以引用的方式并入本文中。此外,Pagliuca等人(Cell,2014,159(2):428-39)报告了从hiPSC中成功分化β细胞,其内容以引用的方式整体并入本文中,特别是其中概述的用于从人多能干细胞大规模产生功能性人β细胞的方法和试剂。此外,Vegas等人示出了从人多能干细胞产生人β细胞,然后进行封装以避免宿主的免疫排斥;Vegas等人,Nat Med,2016,22(3):306-11,其以引用的方式整体并入本文中,特别是其中概述的用于从人多能干细胞大规模产生功能性人β细胞的方法和试剂。

[0886] 在一些实施方案中,通过体外分化从经工程化的多能细胞群体产生经工程化的胰腺胰岛细胞群体的方法包括:(a)在第一培养基中培养经工程化的iPSC群体以产生未成熟的胰腺胰岛细胞群体,该培养基包含选自由以下组成的组的一种或多种因子:胰岛素样生长因子、转化生长因子、FGF、EGF、HGF、SHH、VEGF、转化生长因子-b超家族、BMP2、BMP7、GSK抑制剂、ALK抑制剂、BMP 1型受体抑制剂和视黄酸;以及(b)在与第一培养基不同的第二培养基中培养未成熟的胰腺胰岛细胞群体,以产生经工程化的胰腺胰岛细胞群体。在一些实施方案中,GSK抑制剂是CHIR-99021、其衍生物或其变体。在一些情况下,GSK抑制剂的浓度范围为约2mM至约10mM。在一些实施方案中,ALK抑制剂是SB-431542、其衍生物或其变体。在一些情况下,ALK抑制剂的浓度范围为约1pM至约10pM。在一些实施方案中,第一培养基和/或第二培养基不含动物血清。

[0887] 如本领域已知的那样,通常通过评价β细胞相关或特异性标志物(包括但不限于胰岛素)的存在来测定分化。也可以在功能上测量分化,诸如测量葡萄糖代谢,通常参见Muraro等人,Cell Syst.2016年10月26日;3(4):385-394.e3,其特此以引用的方式整体并入,特别是其中概述的生物标志物。一旦生成β细胞,就可以将其移植(作为细胞悬浮液或在如本文所讨论的凝胶基质内)到门静脉/肝脏、网膜、胃肠粘膜、骨髓、肌肉或皮下囊中。

[0888] 包括用于本技术的胰腺胰岛细胞的另外的描述可见于WO2020/018615,其公开内容以引用的方式整体并入本文中。

[0889] 在一些实施方案中,经工程化的β胰岛细胞(诸如从一个或多个个体供体(例如健康供体)分离的原代β胰岛细胞或从来源于一个或多个个体供体(例如健康供体)的iPSC分化而来的内皮细胞)的群体被维持在培养基中,在一些情况下在施用之前被扩增。在某些实施方案中,经工程化的β胰岛细胞群体在施用前被冷冻保存。

[0890] 示例性胰腺胰岛细胞类型包括但不限于胰腺胰岛祖细胞、未成熟胰腺胰岛细胞、成熟胰腺胰岛细胞等。在一些实施方案中,将本文所述的胰腺细胞施用于受试者以治疗糖尿病。

[0891] 在一些实施方案中,如本文所公开的那样被工程化的胰腺胰岛细胞(诸如从一个或多个个体供体(例如健康供体)分离的原代β胰岛细胞或从来源于一个或多个个体供体(例如健康供体)的iPSC分化而来的β胰岛细胞)分泌胰岛素。在一些实施方案中,胰腺胰岛细胞表现出内源性胰腺胰岛细胞的至少两个特征,例如但不限于响应于葡萄糖而分泌胰岛素和表达β细胞标志物。

[0892] 示例性β细胞标志物或β细胞祖细胞标志物包括但不限于c肽、Pdx1、葡萄糖转运蛋白2(Glut2)、HNF6、VEGF、葡萄糖激酶(GCK)、激素原转换酶(PC 1/3)、Cdcp1、NeuroD、Ngn3、Nkx2.2、Nkx6.1、Nkx6.2、Pax4、Pax6、Ptf1a、Isl1、Sox9、Sox17和FoxA2。

[0893] 在一些实施方案中,胰腺胰岛细胞(诸如从一个或多个个体供体(例如健康供体)分离的原代β胰岛细胞或从来源于一个或多个个体供体(例如健康供体)的iPSC分化而来的β胰岛细胞)响应于葡萄糖增加而产生胰岛素。在各种实施方案中,胰腺胰岛细胞响应于葡萄糖增加而分泌胰岛素。在一些实施方案中,细胞具有独特的形态,诸如鹅卵石细胞形态和/或约17pm至约25pm的直径。

[0894] 在一些实施方案中,本技术涉及经工程化的β胰岛细胞(诸如从一个或多个个体供体(例如健康供体)分离的原代β胰岛细胞或从来源于一个或多个个体供体(例如健康供体)的iPSC分化而来的β胰岛细胞),其过表达致耐受因子(例如CD47),具有降低的一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子(例如,一种或多种MHC I类人白细胞抗原和/或一种或多种MHC II类人白细胞抗原)的表达或缺乏该表达。在一些实施方案中,β胰岛细胞进一步表达一种或多种补体抑制剂。在某些实施方案中,经工程化的β胰岛细胞过表达致耐受因子(例如CD47),并且在B2M基因中携有基因组修饰。在一些实施方案中,β胰岛细胞进一步表达一种或多种补体抑制剂。在一些实施方案中,经工程化的β胰岛细胞过表达致耐受因子(例如CD47),并且在CIITA基因中携有基因组修饰。在一些实施方案中,β胰岛细胞过表达致耐受因子(例如CD47),并且携有破坏B2M和CIITA基因中的一者或多者的基因组修饰。

[0895] 在一些实施方案中,提供的经工程化的β胰岛细胞逃避免疫识别。在一些实施方案中,本文所述的经工程化的β胰岛细胞(诸如从一个或多个个体供体(例如健康供体)分离的原代β胰岛细胞或从来源于一个或多个个体供体(例如健康供体)的iPSC分化而来的β胰岛细胞)不会活化患者(例如,施用后的接受者)的免疫反应。提供了通过向有需要的受试者(例如,接受者)或患者施用本文所述的经工程化的β胰岛细胞群体来治疗疾病的方法。

[0896] 在一些实施方案中,所施用细胞的数目的剂量低于免疫原性细胞(例如相同或相似细胞类型或表型但不含有经工程化的细胞的修饰(例如遗传修饰)的细胞群体,例如具有内源性水平的一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子的表达的细胞群体)所需的剂量。

[0897] b.肝细胞

[0898] 可以在细胞疗法产品制造过程的任何阶段对待用于细胞疗法产品中的肝细胞进行针对供体能力的特性分析。

[0899] 细胞疗法产品中使用的肝细胞可以是原代肝细胞。如本文任何地方所描述的用于对细胞群体进行针对供体能力的特性分析的方法可以使用原代(例如,经基因组编辑的)肝细胞进行。

[0900] 如本文其他地方所述,细胞疗法产品中使用的肝细胞可以是多能干细胞(iPSC)来

源的肝细胞。如本文任何地方所描述的用于对细胞群体进行针对供体能力的特性分析的方法也可对能够分化形成肝细胞的干细胞进行。如本文任何地方所描述的用于对细胞群体进行针对供体能力的特性分析的方法也可以对干细胞来源的(例如,经基因组编辑的)肝细胞进行。

[0901] 如本公开的上下文中提及的有关肝细胞的相关信息(包括关于肝细胞在被用于细胞疗法时的所需特征的某些信息)在本领域中是已知的,并且例如可从WO2022081760、WO2022164807A2、WO2016200340A1中找到,其内容以引用的方式并入本文中。应当理解,本文所述的关于肝细胞的实施方案可以容易且适当地与描述HIP细胞(例如,表现出降低的MHC I类和/或MHC II类分子中的一种或多种分子的表达以及增加的至少一种致耐受因子的表达)的实施方案以及描述安全开关和如本文所述的其他经修饰的/经基因编辑的细胞的实施方案相组合。可以在细胞疗法产品制造期间的编辑过程的任何阶段对待用于细胞疗法产品中的肝细胞进行针对供体能力的特性分析。

[0902] 本文所述的肝细胞可用于治疗或预防受试者的疾病。

[0903] 在一些实施方案中,如本文所提供的那样被工程化或修饰的细胞是原代肝细胞。在一些实施方案中,原代肝细胞分离或获得自一个或多个个体供体受试者,诸如一个或多个个体健康供体(例如,未知或未被怀疑患有疾病或感染(例如,未表现出疾病或感染的临床体征)的受试者)。如本领域技术人员将理解的,从个体分离或获得肝细胞的方法可以使用已知技术来实现。本文提供了含有本文所述的修饰(例如,遗传修饰)的经工程化的原代肝细胞,用于随后移植或植入到受试者(例如,接受者)中。在一些实施方案中,经工程化的原代肝细胞可以作为细胞疗法施用以解决肝细胞功能丧失或肝脏硬化。

[0904] 在一些实施方案中,从受试者或个体获得(例如,收获、提取、移除或取出)原代肝细胞。在一些实施方案中,由肝细胞集合产生原代肝细胞,使得该肝细胞来自一个或多个受试者(例如,一个或多个人,包括一个或多个健康人)。在一些实施方案中,原代肝细胞集合来自1-100个、1-50个、1-20个、1-10个、1个或多个、2个或更多个、3个或更多个、4个或更多个、5个或更多个、10个或更多个、20个或更多个、30个或更多个、40个或更多个、50个或更多个,或100个或更多个受试者。在一些实施方案中,供体受试者与患者(例如,施用治疗性细胞的接受者)不同。在一些实施方案中,肝细胞集合不包括来自患者的细胞。在一些实施方案中,从中获得肝细胞集合的供体受试者中的一个或多个供体受试者与患者不同。

[0905] 在一些实施方案中,如本文所提供的细胞是从经工程化的iPSC分化而来的肝细胞,该经工程化的iPSC含有本文所述的修饰(例如遗传修饰)并且被分化为肝细胞。如本领域技术人员将理解的,用于分化的方法取决于使用已知技术的所需细胞类型。在一些实施方案中,分化为肝细胞的细胞可以用于随后移植或植入到受试者(例如,接受者)中。在一些实施方案中,从多能干细胞分化而来的经工程化的肝细胞可以作为细胞疗法施用以解决肝细胞功能丧失或肝脏硬化。

[0906] 在一些实施方案中,含有本文所述的修饰的经工程化的多能细胞被分化为肝细胞。有许多技术可以用于使经工程化的多能细胞分化为肝细胞;参见例如Pettinato等人,doi:10.1038/spre32888、Snykers等人,Methods Mol Biol,2011 698:305-314、Si-Tayeb等人,Hepatology,2010,51:297-305和Asgari等人,Stem Cell Rev,2013,9(4):493-504,所有这些文献都以引用的方式整体并入本文中,特别是用于分化的方法和试剂。可以如本

领域已知的那样,通常通过评价肝细胞相关和/或特异性标志物的存在来测定分化,该标志物包括但不限于白蛋白、甲胎蛋白和纤维蛋白原。还可以在功能上(诸如氨的代谢、LDL储存和摄取、ICG摄取和释放以及糖原储存)测量分化。

[0907] 在一些实施方案中,经工程化的肝细胞(诸如从一个或多个个体供体(例如健康供体)分离的原代肝细胞或从来源于一个或多个个体供体(例如健康供体)的iPSC分化而来的肝细胞)的群体被维持在培养基中,在一些情况下在施用之前被扩增。在某些实施方案中,肝细胞群体在施用前被冷冻保存。

[0908] 在一些实施方案中,本技术涉及经工程化的肝细胞(诸如从一个或多个个体供体(例如健康供体)分离的原代肝细胞或从来源于一个或多个个体供体(例如健康供体)的iPSC分化而来的肝细胞),其过表达致耐受因子(例如CD47),并且具有降低的一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子(例如,一种或多种MHC I类人白细胞抗原和/或一种或多种MHC II类人白细胞抗原)的表达或缺乏该表达。

[0909] 在一些实施方案中,提供的经工程化的肝细胞逃避免疫识别。在一些实施方案中,本文所述的经工程化的肝细胞(诸如从一个或多个个体供体(例如健康供体)分离的原代肝细胞或从来源于一个或多个个体供体(例如健康供体)的iPSC分化而来的肝细胞)不会活化患者(例如,施用后的接受者)的免疫反应。提供了通过向有需要的受试者(例如,接受者)或患者施用本文所述的经工程化的肝细胞群体来治疗疾病的方法。

[0910] 本文公开的实施方案中使用的细胞可以是肝细胞,例如肝细胞群体。应当理解,下文中对“细胞”,例如“肝细胞”的任何提及也适用于如本申请中所描述的“细胞群体”,例如“肝细胞群体”。

[0911] 肝细胞是肝脏的主要功能细胞。肝细胞在中心静脉周围紧密排列,并且小叶边缘可见门脉三合体(由胆道、肝静脉和肝动脉组成)。虽然肝细胞构成了小叶中的大部分细胞,但其他几种细胞类型对于形成导管和血管网络以及器官的免疫监视至关重要。肝脏中的其他主要细胞类型包括胆道细胞(胆管细胞)、肝脏窦内皮细胞、血管内皮细胞、免疫细胞(包括隐窝细胞、库普弗细胞和肝星状细胞)。在肝脏小叶内,肝细胞分布到3个不同的区带,这由肝细胞与位于小叶末端处的中央静脉或门脉三合体的接近程度决定。不同区带中的肝细胞暴露于不同的生态环境并在肝脏中发挥特定的功能作用。它们可以通过不同标志物、葡萄糖和脂质代谢功能的表达来区分。

[0912] 肝细胞执行惊人数量的代谢、内分泌和分泌功能。约80%的肝脏质量是由肝细胞贡献的。肝细胞功能可通过葡萄糖储存、离子摄取、胆汁盐分泌、氨基酸代谢功能、尿素合成及药物代谢功能测试来评估。

[0913] 术语“肝细胞”是指通常占肝脏细胞质质量70-80%的一类细胞。肝细胞参与蛋白质的合成,蛋白质贮存和碳水化合物转化,胆固醇、胆汁盐和磷脂的合成,以及外源性物质和内源性物质的解毒、修饰和排泄。肝细胞还启动胆汁的形成和分泌。肝细胞制造血清白蛋白、纤维蛋白原和凝血因子的凝血酶原组,并且是用于合成脂蛋白、铜蓝蛋白、转铁蛋白、补体和糖蛋白的主要部位。此外,肝细胞还具有使外源性化合物(如药物和杀虫剂)和内源性化合物(诸如类固醇)代谢、解毒和失活的能力。

[0914] 肝细胞的药物代谢功能由细胞色素P450(CYP)介导。CYP是能够催化大多数药物氧化生物转化的主要酶家族。90%的药物由六种主要CYP(CYP3A4/5、CYP2C9、CYP2C19、

CYP1A2、CYP2B6和CYP2D6)代谢。通过用特定药物诱导可以增强CYP功能。CYP功能和药物诱导响应是用于评估实验室制造的肝细胞的功能成熟度的主要关键标准。虽然已经使用各种方法从胚胎和胎儿组织中获得肝细胞,但这些肝细胞的成熟度和功能(如由6种主要CYP的活性及其对药物诱导的响应决定)表明它们在功能上未成熟。因此,肝细胞获得领域中目前已知的方法无法解决为工业和临床应用获取大量功能成熟肝细胞的问题。

[0915] 本文公开的细胞群体可以包含肝细胞和/或肝细胞祖细胞。在一些情况下,细胞群体可能高度富集肝细胞和/或肝细胞祖细胞。"高度富集"意指一种或多种所关注的细胞将为细胞组合物的70%或更多、75%或更多、80%或更多、85%或更多、90%或更多,例如细胞组合物的约95%或更多或98%或更多。换句话说,该群体可能是基本上纯的一种或多种所关注的细胞类型的组合物。在一些情况下,所关注的细胞群体可包含粗制备物。在一些情况下,可以从经解离的组织(经过过滤或未过滤)中制备细胞群体。含有肝细胞和/或肝细胞祖细胞的细胞群体可以例如根据分离和/或制备方法包括或排除各种非肝细胞细胞类型,包括但不限于例如肝非实质细胞(NPC)、非肝细胞肝脏相关细胞(例如星状细胞、库普弗细胞、内皮细胞、胆管细胞等)、免疫细胞(例如WBC)、RBC等。在某些情况下,细胞群体可以是纯的或实质上纯的肝细胞和/或肝细胞祖细胞制备物。

[0916] 如本文公开的肝细胞可以从肝脏中的再生细胞来源获得。

[0917] 在体内,肝脏是人身体的最具再生能力的器官之一。人肝脏可失去其高达2/3的质量,但仍能维持其关键功能并在8至15天内恢复到原来的质量。研究表明,在部分肝脏切除术的恢复过程中,来自肝脏的所有区域的肝细胞都会增殖,包括胆道细胞。最近的谱系追踪实验已鉴定出了在正常肝脏稳态和肝脏损伤期间在肝脏的不同区域、靠近中心静脉或门脉三合体的增殖的肝细胞。除肝细胞外,在胆道区域中还鉴定出了潜在的增殖细胞,其可以在损伤期间补充受损的肝细胞。因此,本文公开的肝细胞可以通过从成年人肝脏中分离成体肝脏干细胞来获得。

[0918] 肝脏干细胞的多细胞起源表明可以使用不同的方法从肝脏中分离和获得干细胞。成功分离和扩增肝脏干细胞并进一步使其分化为功能性肝细胞以便在受损肝脏中进行有意义的重新填充从而递送临床益处的能力已成为肝脏干细胞生物学家的首要任务。迄今为止,两组研究人员已经报道了从成年肝脏组织中分离出干细胞,这些干细胞可以在体外长期稳定扩增。然而,来源于些干细胞的肝细胞在功能上未成熟,并且不适合用于临床和工业应用。

[0919] 在一些实施方案中,分化的肝细胞从分离自健康人的肝脏干细胞或从iPSC分化而来。

[0920] 可以从健康患者获得肝脏干细胞或iPSC。

[0921] 在一些实施方案中,可以从一个或多个哺乳动物肝脏(例如人肝脏)制备肝细胞或肝细胞细胞群体。在一些情况下,一个细胞群体或多个细胞群体,或经工程化的细胞(包括多个细胞群体中的群体的所有经工程化的细胞)都可源自或制备自单个人肝脏,诸如单个尸体供体肝脏。细胞群体的细胞可能全部属于一个物种(例如,人、小鼠、大鼠、猪、NHP等),也可能是两个或多个物种的混合物(即,异种混合物)。肝脏的来源将会有所不同,并且可包括但不限于例如切除的肝脏组织、尸体人肝脏、嵌合(例如人源化)肝脏、生物反应器肝脏等。可以根据和/或包括任何方便的方法(诸如但不限于例如解离、灌注、过滤、分选等),从

肝脏(包括整个肝脏和肝脏部分)制备细胞群体。在一些情况下,细胞群体中的全部或实质上全部的肝细胞或人肝细胞可来源于单个供体肝脏或单个供体肝脏的一部分。在一些情况下,细胞群体中的全部或实质上全部的肝细胞或人肝细胞可来源于多个不同的供体肝脏或多个不同供体肝脏的一部分。在一些情况下,多个细胞群体可来源于单个供体肝脏,包括例如,从单个人供体肝脏中收集的原代人肝细胞被扩增许多倍(包括2倍或更多倍、5倍或更多倍、10倍或更多倍、20倍或更多倍、50倍或更多倍、100倍或更多倍等)以生成多个细胞群体(例如可用于治疗多个受试者的多个细胞群体)的情况。

[0922] 在一些情况下,可以从经培养的肝细胞和/或经培养的肝细胞祖细胞制备肝细胞或肝细胞细胞群体。在一些情况下,可以从原代肝细胞制备物制备细胞群体,包括例如从人肝脏制备的包含原代人肝细胞(PHH)的细胞群体。在某些实施方案中,细胞群体可以包含使用针对任何来源的标准技术(例如从人供体)分离的肝细胞。在某些实施方案中,肝细胞是从筛选的尸体供体分离的PHH,包括新鲜PHH或冷冻保存的PHH。在一些情况下,细胞群体的PHH自从肝脏分离以来没有经历细胞周期/分裂或者只经历了极少数量的细胞周期/分裂,包括但不限于例如1个或更少、2个或更少、3个或更少、4个或更少、5个或更少、6个或更少、7个或更少、8个或更少、9个或更少、10个或更少的周期/分裂。

[0923] 在一些情况下,含有肝细胞和/或肝细胞祖细胞的细胞群体可以从不是永生化细胞系的细胞或不是以其他方式实质上永久繁殖的细胞系的细胞制备。例如,细胞群体的肝细胞和/或肝细胞祖细胞可以来源于原代肝脏细胞和原代肝脏细胞的后代(包括例如原代肝脏细胞的非永生化后代)。

[0924] 在一些情况下,细胞群体可以包含或可以明确排除肝细胞祖细胞。如本文所用,术语“肝细胞祖细胞”和“肝细胞的祖细胞”等通常是指肝细胞所源自的细胞和/或分化为肝细胞的细胞。在一些情况下,肝细胞祖细胞可能是定向祖细胞,这意味着祖细胞将实质上只会分化为肝细胞。在一些情况下,肝细胞祖细胞可能具有不同的潜能,并且可以是例如多能、多能或全能祖细胞。肝细胞祖细胞可以包括或来源于干细胞、诱导型多能干细胞(iPSC)、胚胎干(ES)细胞、肝细胞样细胞(HLC)等。在一些情况下,肝细胞祖细胞可来源于成熟肝细胞和/或其他非肝细胞的细胞,例如通过肝细胞的去分化和/或其他肝细胞或非肝细胞类型的转分化。

[0925] 本文公开的肝细胞或肝细胞细胞群体或亚群(包括经扩增的肝细胞细胞群体)可源自或传衍(descended)自多个单个细胞(包括例如从单个供体获得的多个单个肝细胞或从多个供体获得的多个单个肝细胞)。在原代细胞群体来源于单个供体的情况下,此类多个单个细胞实质上共享相同的供体基因组,但是它们不是克隆来源的、不是单克隆的,并且在一些情况下可能彼此存在某些差异,包括例如不同的遗传变异、不同的表观遗传变异、供体肝脏中的不同分区、基因表达的差异等。因此,与克隆来源的细胞群体相反,从多个单个原代肝细胞(包括来自单个供体或多个供体的原代肝细胞)扩增的细胞群体可称为非单克隆的,或者在一些情况下,此类经扩增的细胞可称为多克隆的或非克隆扩增的。在一些情况下,可以对个体原代肝细胞(或其后代)群体进行本公开的遗传修饰,以生成非单克隆的经工程化的肝细胞群体,并且可以扩增此类细胞以生成经扩增的非单克隆的经工程化的肝细胞群体。在一些情况下,可以扩增肝细胞群体以生成实质上多克隆的群体,随后对其进行遗传修饰以生成经扩增的非单克隆的经工程化的肝细胞群体。

[0926] 本文描述了肝细胞在被用于细胞疗法时的一些所需特征。

[0927] 在一些实施方案中,肝细胞和/或肝细胞祖细胞、和/或此类肝细胞和/或肝细胞祖细胞所来源自的肝脏、受试者、和/或细胞培养物可以是健康肝细胞和/或肝细胞祖细胞。如本文所用的“健康肝细胞和/或肝细胞祖细胞”意指该细胞展现出正常的肝细胞表型和/或基因型,实质上没有功能和/或遗传缺陷或者正常肝脏和/或肝细胞相关功能方面的缺陷或将影响正常肝脏和/或肝细胞相关功能的缺陷,如WO22164807A2(其内容以引用的方式整体并入本文中)中所述。肝细胞相关功能包括主要或仅由肝脏中的肝细胞执行的功能,例如肝脏代谢(例如肝细胞代谢)、氨代谢、氨基酸代谢(包括生物合成和/或分解代谢)、解毒、肝脏蛋白质(例如白蛋白、纤维蛋白原、凝血酶原、凝血因子(例如因子V、VII、IX、X、XI和XII)、蛋白C、蛋白S、抗凝血酶、脂蛋白、铜蓝蛋白、转铁蛋白、补体蛋白)合成。肝细胞和/或肝细胞祖细胞在一种或多种如本文所述的遗传修饰之前、期间和/或之后可能是健康的。例如,在一些情况下,肝细胞和/或肝细胞祖细胞在遗传修饰(例如以功能性地整合异源转基因和/或修饰该细胞的一个或多个内源性基因座)之前和之后可能是健康细胞。在一些情况下,肝细胞和/或肝细胞祖细胞在纠正有缺陷的疾病相关等位基因或基因座之后是健康的。

[0928] 健康的肝细胞和/或肝细胞祖细胞通常将排除那些携有与肝脏相关单基因疾病相关的遗传畸变的细胞,该肝脏相关单基因疾病包括但不限于例如遗传性胆汁淤积性病症、威尔逊氏病、遗传性血色素沉着症、酪氨酸血症、α1抗胰蛋白酶缺乏症、尿素循环障碍、克里格勒-纳贾尔综合征、家族性淀粉样多发性神经病、原发性高草酸尿症1型、非典型溶血性尿毒症综合征-1等。因此,健康的肝细胞和/或肝细胞祖细胞可在与肝脏相关单基因疾病相对应的基因座和/或基因(诸如但不限于例如ABCB11(BSEP)、AGXT、ARG、ASL、ASS、ATP7B、ATP8B1(又名FIC1)、CFH、CPS、FAH、HAMP、HFE、JAG1、JH、MDR3(ABCB4)、NAGS、OTC、PI、SLC40A1、TFR2、TTR、UGT1A1等)处含有正常基因/等位基因(即非疾病相关基因/等位基因,即不含疾病相关基因/等位基因)。与肝脏相关单基因疾病相对应的基因的此外的实例和描述可以在Fagiuoli等人,J Hepatol(2013)59(3):595-612中找到;其公开内容以引用的方式整体并入本文中。携有与肝脏相关单基因疾病相关的一种或多种遗传畸变的细胞在本文中可能被称为“疾病”、“患病”、“疾病相关”、“功能障碍”或“缺陷”细胞等。

[0929] 在一些实施方案中,本文所用的细胞是具有增强的尿素生成能力的肝细胞样细胞。尿素生成是指细胞利用尿素循环转化氨从而产生尿素的过程。在特定实施方案中,肝细胞样细胞在体外发育并表现出增强的尿素生成。与先前的依靠可变的体内过程来开发具有改善的尿素生成的肝细胞样细胞的方法相比,本文提供的细胞由于在一种或多种尿素生成增强剂的存在下进行体外分化过程而表现出增强的体外尿素生成。本领域技术人员可以在移植之前评估受试者肝细胞样细胞的增强的尿素生成,从而利用现有方法有利地降低与肝细胞样细胞相关的潜在的批次间的可变性。

[0930] 如本文所用,术语“增强的尿素生成能力”是指与参照物相比,通过尿素循环将氨转化为尿素的能力有所提高。尿素生成可以用本领域已知的任何合适的测定,例如比色尿素测定(例如,BiosAssay Systems的QuantiChrom测定试剂盒)来测量。在一些实施方案中,增强的尿素生成能力是与参考细胞进行比较。在特定实施方案中,参考细胞是在不存在本文提供的尿素生成增强剂中的一种或多种的情况下分化的成熟肝细胞样细胞。在一些实施方案中,在特定尿素生成增强剂的存在下分化的成熟肝细胞样细胞的增强的尿素生成能力

为与在没有尿素生成增强剂的情况下分化的参考成熟肝细胞样细胞相比高出至少10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、85％、90％、95％或99％的尿素生成。在示例性实施方案中,本文提供的主题成熟肝细胞样细胞表现出与野生型成熟肝细胞相当的水平的尿素生成。在示例性实施方案中,本文提供的主题成熟肝细胞样细胞表现出与参考野生型成熟肝细胞相比为至少50％、55％、60％、65％、70％、75％、85％、90％、95％或99％的尿素生成。

[0931] 在一些实施方案中,肝细胞样细胞在用氨刺激时表现出对尿素生成活性的刺激。例如,肝细胞样细胞在用5mM或10mM氨刺激后表现出至少3、4、5、6、8、10、12、15、20或25nmol/min/10^6细胞的尿素生成速率。在一些实施方案中,肝细胞样细胞在用5mM或10mM氨刺激后表现出以下的尿素生成速率:3与50nmol/min/10^6细胞之间、3与40nmol/min/10^6细胞之间、3与30nmol/min/10^6细胞之间、4与50nmol/min/10^6细胞之间、4与40nmol/min/10^6细胞之间、4与30nmol/min/10^6细胞之间、5与50nmol/min/10^6细胞之间、5与40nmol/min/10^6细胞之间、5与30nmol/min/10^6细胞之间、6与50nmol/min/10^6细胞之间、6与40nmol/min/10^6细胞之间、6与30nmol/min/10^6细胞、8与50nmol/min/10^6细胞之间、8与40nmol/min/10^6细胞之间、8与30nmol/min/10^6细胞之间、10与50nmol/min/10^6细胞之间、10与40nmol/min/10^6细胞之间、10与30nmol/min/10^6细胞之间、12与50nmol/min/10^6细胞之间、12与40nmol/min/10^6细胞之间、12与30nmol/min/10^6细胞之间、15与50nmol/min/10^6细胞之间、15与40nmol/min/10^6细胞之间、15与30nmol/min/10^6细胞之间、20与50nmol/min/10^6细胞之间、20与40nmol/min/10^6细胞之间,或20与30nmol/min/10^6细胞之间。

[0932] 在一些实施方案中,具有增强的尿素生成能力的肝细胞样细胞表现出增加的一种或多种尿素循环途径酶的表达。示例性的尿素循环途径酶包括但不限于氨基甲酰磷酸合成酶I(CPS1)、鸟氨酸转氨基甲酰酶(OTC)、精氨琥珀酸合成酶(ASS1)、精氨琥珀酸裂解酶(ASL)、精氨酸酶(ARG1)、N-乙酰谷氨酸合成酶(NAGS)、鸟氨酸转位酶(ORNT1)和柠檬素(citrin)。在特定实施方案中,肝细胞样细胞表现出以下尿素循环酶之一的表达:CPS1、NAGS、ARG1、ASL、ASS1或OTC。在一些实施方案中,肝细胞样细胞表现出增加的一种或多种尿素循环途径酶的RNA转录表达。在示例性实施方案中,肝细胞样细胞表现出增加的一种或多种尿素循环途径酶的蛋白质表达。在一些实施方案中,成熟肝细胞样细胞表现出增加的一种或多种尿素循环途径酶的蛋白质表达,其量比在没有尿素生成增强剂的情况下分化的参考成熟肝细胞样细胞高出至少10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、85％、90％、95％或99％。在一些实施方案中,与参考野生型成熟肝细胞相比,受试者成熟肝细胞样细胞表现出相似的一种或多种尿素循环途径酶表达水平。在示例性实施方案中,与参考野生型成熟肝细胞相比,主题成熟肝细胞样细胞表现出至少50％、55％、60％、65％、70％、75％、85％、90％、95％或99％的一种或多种尿素途径酶表达水平。

[0933] 如本文所用,“成熟肝细胞样细胞”是指表现出成熟肝细胞的一种或多种特征的细胞,该特征包括但不限于:白蛋白分泌、α-1抗胰蛋白酶(A1AT)分泌、细胞色素p450活性、糖原合成能力和/或储存能力、脂质(例如低密度脂蛋白(LDL))摄取和/或储存能力、吲哚菁绿(ICG)摄取和/或清除能力,以及γ-谷氨酰转肽活性。在示例性实施方案中,本文提供的成熟肝细胞样细胞表现出增强的尿素生成能力和本文公开的成熟肝细胞的其他特征中的至

少一个或多个。在示例性实施方案中,主题成熟肝细胞样细胞表现出增强的尿素生成能力以及本文公开的成熟肝细胞的2、3、4、5、6、7、8、9或10个另外的特征。

[0934] 在一些实施方案中,成熟肝细胞样细胞表现出白蛋白分泌。在一些实施方案中,成熟肝细胞样细胞分泌的白蛋白的量比在没有尿素生成增强剂的情况下分化的参考成熟肝细胞样细胞高出至少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、85%、90%、95%或99%。在示例性实施方案中,成熟肝细胞样细胞表现出至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、85%、90%、95%或99%的参考野生型成熟肝细胞(例如,原代人肝细胞)的白蛋白分泌水平。可以使用任何合适的技术来评估白蛋白分泌,该技术包括例如酶联免疫吸附(ELISA)测定和免疫组织化学技术(参见例如Wu等人,Cell Stem Cell 14:394-403(2014),其以引用的方式并入本文中,特别是与白蛋白分泌评估相关的部分)。在某些实施方案中,成熟肝细胞样细胞表现出增加的白蛋白基因(ALB)表达。

[0935] 在一些实施方案中,成熟肝细胞样细胞表现出α-1抗胰蛋白酶(A1AT)分泌。在一些实施方案中,成熟肝细胞样细胞分泌的A1AT的量比在没有尿素生成增强剂的情况下分化的参考成熟肝细胞样细胞高出至少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、85%、90%、95%或99%。在示例性实施方案中,成熟肝细胞样细胞表现出至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、85%、90%、95%或99%的参考野生型成熟肝细胞(例如,原代人肝细胞)的A1AT分泌水平。可以使用任何合适的技术来评估A1AT分泌,该技术包括例如酶联免疫吸附(ELISA)测定和免疫组织化学技术(参见,例如Wu等人,Cell Stem Cell 14:394-403(2014),其以引用的方式并入本文中,特别是与A1AT分泌评估相关的部分)。在某些实施方案中,成熟肝细胞样细胞表现出增加的α-1抗胰蛋白酶基因(SERPINA1)表达。在一些实施方案中,成熟肝细胞样细胞表达的SERPINA1基因的量比在没有尿素生成增强剂的情况下分化的参考成熟肝细胞样细胞高出至少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、85%、90%、95%或99%。在示例性实施方案中,成熟肝细胞样细胞以至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、85%、90%、95%或99%的参考野生型成熟肝细胞(例如,原代人肝细胞)的A1AT分泌水平表达SERPINA1基因。

[0936] 在一些实施方案中,成熟肝细胞样细胞表现出凝血因子V分泌。在一些实施方案中,成熟肝细胞样细胞分泌的因子V的量比在没有尿素生成增强剂的情况下分化的参考成熟肝细胞样细胞高出至少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、85%、90%、95%或99%。在示例性实施方案中,成熟肝细胞样细胞表现出至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、85%、90%、95%或99%的参考野生型成熟肝细胞(例如,原代人肝细胞)的因子V分泌水平。可以使用任何合适的技术来评估因子V的分泌,该技术包括例如酶联免疫吸附(ELISA)测定和免疫组织化学技术。在某些实施方案中,成熟肝细胞样细胞表现出增加的凝血因子V基因(F5)表达。

[0937] 在一些实施方案中,成熟肝细胞样细胞表现出糖原合成能力和/或储存能力。在一些实施方案中,成熟肝细胞样细胞表现出比在没有尿素生成增强剂的情况下分化的参考成熟肝细胞样细胞高出至少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、85%、90%、95%或99%的糖原合成能力和/或储存能力。在示例性实施方案中,成熟肝细胞样细胞表现出至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、85%、90%、95%或

99％的参考野生型成熟肝细胞(例如,原代人肝细胞)的糖原合成能力和/或储存能力的水平。糖原合成能力和/或储存能力可以例如使用免疫组织化学技术(参见,例如,Du等人,Cell Stem Cell 14:394-403(2014),其以引用的方式并入本文中,特别是与糖原合成能力和/或储存能力评估相关的部分)来评估。

[0938] 在一些实施方案中,成熟肝细胞样细胞表现出脂质(例如,VLDL、LDL和HDL)摄取和/或储存能力。在特定实施方案中,成熟肝细胞样细胞表现出低密度脂蛋白(LDL)摄取和/或储存能力。在一些实施方案中,成熟肝细胞样细胞表现出比在没有尿素生成增强剂的情况下分化的参考成熟肝细胞样细胞高出至少10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、85％、90％、95％或99％的脂质摄取和/或储存。在示例性实施方案中,成熟肝细胞样细胞表现出参考野生型成熟肝细胞(例如,原代人肝细胞)的脂质摄取和/或储存水平的至少50％、55％、60％、65％、70％、75％、85％、90％、95％或99％。

[0939] 在一些实施方案中,成熟肝细胞样细胞表现出ICG摄取和/或清除能力。在一些实施方案中,成熟肝细胞样细胞表现出比在没有尿素生成增强剂的情况下分化的参考成熟肝细胞样细胞高出至少10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、85％、90％、95％或99％的ICG摄取和/或清除。在示例性实施方案中,成熟肝细胞样细胞表现出参考野生型成熟肝细胞(例如,原代人肝细胞)的脂质摄取和/或储存水平的至少50％、55％、60％、65％、70％、75％、85％、90％、95％或99％。脂质摄取/储存能力和ICG摄取和/或清除能力可使用如例如以下文献中所述的免疫组织化学技术评估:Huang等人,Cell Stem Cell 14:370-384(2014);和Wang等人,Cell Stem Cell 19:449-461(2016),其以引用的方式并入本文中,特别是与ICG活性评估相关的部分。

[0940] 在一些实施方案中,成熟肝细胞样细胞表现出细胞色素p450活性。此类细胞可表现出一种或多种细胞色素p450家族成员的活性,该家族成员包括CYP1A1、CYP1A2、CYP2C9、CYP2C19、CYP2B6、CYP2D6、CYP3A4和/或CYP3A7。在某些实施方案中,成熟肝细胞样细胞表现出一个或多个细胞色素p450家族成员的基因或蛋白质表达。在一些实施方案中,成熟肝细胞样细胞表现出至少50％、55％、60％、65％、70％、75％、85％、90％、95％或99％的参考野生型成熟肝细胞(例如,原代人肝细胞)的细胞色素p450活性水平。细胞色素p450活性可以使用核酸定量分析技术(例如,qPCR)、发光测定(参见,例如,Kim等人,Biomol Ther:23(5):486-492(2015);和P450-Glo测定试剂盒,Promega)或液相色谱/质谱技术(参见,例如,Du等人,Cell Stem Cell 14:394-403(2014);和Lahoz等人,Methods in Molecular Biology 806:97-97(2012))来测量,所有这些文献均以引用的方式并入本文中,特别是与细胞色素p450活性评估相关的部分。

[0941] 在一些实施方案中,成熟肝细胞样细胞表现出去唾液酸糖蛋白受体表达(例如ASGR1和/或ASGR2表达)。在示例性实施方案中,成熟肝细胞样细胞表现出至少50％、55％、60％、65％、70％、75％、85％、90％、95％或99％的参考野生型成熟肝细胞(例如,原代人肝细胞)的去唾液酸糖蛋白受体表达水平。

[0942] 在一些实施方案中,成熟肝细胞样细胞表现出甲胎蛋白(AFP)表达。在示例性实施方案中,成熟肝细胞样细胞表现出参考野生型成熟肝细胞(例如,原代人肝细胞)的甲胎蛋白表达水平的至少50％、55％、60％、65％、70％、75％、85％、90％、95％或99％。

[0943] 在一些实施方案中,成熟肝细胞样细胞表现出γ-谷氨酰转肽酶活性。在示例性实施方案中,成熟肝细胞样细胞表现出至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、85%、90%、95%或99%的参考野生型成熟肝细胞(例如,原代人肝细胞)的γ-谷氨酰转肽酶活性水平。γ-谷氨酰转肽酶活性可以例如使用免疫组织化学技术(参见例如Woo等人,Gastroenterology 42:602-611(2012),其以引用的方式并入本文中,特别是与γ-谷氨酰转肽酶活性评估相关的部分)来评估。

[0944] 在一些实施方案中,成熟肝细胞样细胞表现出SOX9表达。在示例性实施方案中,成熟肝细胞样细胞表现出至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、85%、90%、95%或99%的参考野生型成熟肝细胞(例如,原代人肝细胞)的SOX9表达水平。在一些实施方案中,与参考野生型成熟肝细胞相比,成熟肝细胞样细胞表现出增加的SOX9表达。

[0945] 在一些实施方案中,成熟肝细胞样细胞表现出角蛋白、I型细胞骨架18(KRT18)表达。在一些实施方案中,成熟肝细胞样细胞表现出至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、85%、90%、95%或99%的参考野生型成熟肝细胞(例如,原代人肝细胞)的KRT18表达水平。在一些实施方案中,与参考野生型成熟肝细胞相比,成熟肝细胞样细胞表现出增加的KRT18表达。

[0946] 在一些实施方案中,成熟肝细胞样细胞表现出HNF4A(例如,HNF4a和HNF4α)表达。在一些实施方案中,成熟肝细胞样细胞表现出至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、85%、90%、95%或99%的参考野生型成熟肝细胞(例如,原代人肝细胞)的HNF4A表达水平。在一些实施方案中,与参考野生型成熟肝细胞相比,成熟肝细胞样细胞表现出增加的HNF4A表达。

[0947] 在一些实施方案中,成熟肝细胞样细胞表现出G6PC表达。在一些实施方案中,成熟肝细胞样细胞表现出至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、85%、90%、95%或99%的参考野生型成熟肝细胞(例如,原代人肝细胞)的G6PC表达水平。在一些实施方案中,与参考野生型成熟肝细胞相比,成熟肝细胞样细胞表现出增加的G6PC表达。

[0948] 在一些实施方案中,本文所述的分化的肝细胞以表达肝细胞标志物HNF4a、ALB、CYP2C9为特征,并且还可表达终末分化标志物PEPCK1。紧密连接(tight junction)标志物ZO1可以在分化的细胞之间表达。在一些实施方案中,分化的肝细胞还可以表达功能性CYP酶,包括CYP3A4、CYP2C9、CYP2B6、CYP1A2、CYP1A1、CYP2D6、CYP3A7和CYP2E1。分化的肝细胞可能表现出成熟肝细胞的其他特征,包括功能性葡萄糖代谢(通过针对糖原合成和储存的PAS染色确定)、功能性脂质代谢(通过低密度脂蛋白(LDL)摄取测定确定)、吲哚菁绿(ICG)摄取和白蛋白分泌。ICG摄取是一种用于诊断肝功能的医学诊断测试,并且被用于证明肝细胞具有将离子转运进和转运出肝细胞的功能性转运蛋白功能。

[0949] 本文公开的肝细胞可表现出主要CYP,CYP1A2、CYP3A4、CYP2B6和CYP2C9的代谢功能,其占肝脏的化合物代谢活动的大部分。更重要的是,肝细胞可能对已知的CYP诱导药物(诸如利福平)有响应。

[0950] 在一些实施方案中,分化的肝细胞包含以下特征中的至少一个:(i)表达标志物HNF4a和ALB;

[0951] (ii)表达选自CYP3A4、CYP2C9、CYP2B6、CYP1A2、CYP1A1、CYP2D6、CYP3A7和CYP2E1的至少1、2、3、4、5、6、7或8种CYP酶;

[0952] (iii)具有以下功能中的至少1、2或3种功能:a)功能性葡萄糖代谢;b)功能性脂质代谢;c)功能性白蛋白分泌;

[0953] (vi)吲哚菁绿(ICG)摄取;以及

[0954] (vii)当与其他分化的肝细胞一起在足以形成上皮的条件下被培养时,形成紧密连接。

[0955] 分化的肝细胞还可表达终末分化标志物PEPCK1或TAT中的至少一种。分化的肝细胞具有针对选自CYP3A4、CYP2C9、CYP2B6、CYP1A2、CYP1A1、CYP2D6、CYP3A7和CYP2E1的至少2、3或4种CYP的诱导型CYP功能。分化后的肝细胞还可以储存糖原并摄取低密度脂蛋白。此类肝细胞的特性在WO2016200340A1中有所描述,其内容以引用的方式整体并入本文中。

[0956] 人肝脏干细胞的分离和长期培养可以根据如WO2016200340A1(其内容以引用的方式整体并入本文中)中所述的以下方法进行。

[0957] 如WO2016200340A1中的“材料和方法”所述:

[0958] 胶原蛋白酶消化溶液:含10mM Hepes、5% FBS(Clonetech)、2mg/ml胶原蛋白酶(Sigma,C-5138)的DEME/F12(Gibco)。将胶原蛋白酶溶液加热至37摄氏度,在胶原蛋白酶通过0.2微米过滤器进入溶液中后进行过滤除菌。使此培养基保持新鲜(胶原蛋白酶在高温和长时间段下会失活)。

[0959] 洗涤溶液:具有10mM HEPES(Gibco)、100U/ml Pen/Strep(Gibco)、100μg/ml庆大霉素(Gibco)的DEME/F12培养基,通过0.2微米过滤器对溶液进行过滤除菌。

[0960] 包被培养基:生长因子减少的基质胶(Corning)10%、稀释的高级F12/DMEM减少的血清培养基(Gibco)。

[0961] 肝脏干细胞培养基:高级F12/DMEM减少的血清培养基(1:1)(Gibco.12643)、10mM HEPES(Gibco)、100U/ml Pen/Strep(Gibco)、2mM L-谷氨酰胺(Gibco)、1% N2(Gibco)、2% B27(Gibco)、50ng/ml EGF(Millipore)、250ng/ml R-Spondin1(R&D)、2μMSB431542(Tocris))、IμMJagged-1(188-204)(Anaspec)、2μMT3(3,3',5-三碘-L-甲状腺原氨酸)(Sigma)、0.1μM霍乱内毒素(Sigma)、10mM烟酰胺(Sigma)、1.25μMN-乙酰半胱氨酸(NAC)(Sigma)。

[0962] 如WO2016200340A1中所述的饲养层细胞的制备:1.可将板用10%基质胶包被。可将基质胶用高级F12/DMEM基础培养基稀释。包被板后,可将板储存在37℃孵育器中30分钟。2.可将含有7X 106个细胞的小瓶解冻放入3个六孔板中,每孔2mL培养基。可以将该细胞在水浴中快速解冻,并用70%酒精擦拭,然后将它们放入层流罩中。将细胞加入50mL管中,并逐滴加入温热培养基以稀释细胞。3.可在孵育器中摇动板(左右各2次以及前后各2次)以使细胞均匀分布。4.该饲养层可在第二天使用。

[0963] 可以从新鲜的人肝脏组织分离肝脏干细胞。为科学目的而使用人肝脏样本制备肝细胞已获得机构审查委员会(Institutional Review Boards,IRB)和人类研究伦理委员会(Human Research Ethics committee)的批准。可以从用于移植的捐赠肝脏中获取正常肝脏样本。肝硬化肝脏样本可从用于移植的接受者肝脏获取。可以将组织切割并切碎成小块,并然后在胶原蛋白酶溶液中消化。可将经消化的细胞悬浮在肝脏干细胞培养基中。可以将该细胞汇集并铺板在具有饲养层细胞的组织培养板上并让该细胞附着。7-10天后,可以收获细胞并将其作为单细胞重新悬浮并铺板到饲养层上。3天后,肝干细胞群落可能开始出

现。为了长期培养,可以每7至10天对细胞进行继代培养。可以每两天更换培养基。

[0964] 可通过在饲养层上拾取单个集落进行持续培养来生成单细胞来源的细胞系。可以将早期传代的肝脏干细胞消化成单细胞并通过流式细胞术收回。可将分选出的单细胞在96孔板中培养,并进一步分入48孔板、24孔板和6孔板中进行扩增。

[0965] 在某些实施方案中,可将经消化的早期传代细胞通过40μm粗滤器(strainer)过滤并以低密度铺板在培养皿上。10至14天后,单细胞应生长从而形成集落,而不会与其他集落融合。可以挑选单细胞来源的集落以在24孔板上继续培养。将这些细胞的1%、10%、20%、30%、40%和50%重新填充在下一次传代中。

[0966] 可每7至14天连续传代单细胞来源的肝干细胞系,并且可对早期传代和晚期传代进行核型分析。可以看出处于这两种传代下的细胞均具有正常核型。这表明干细胞基因组在长期培养期间是稳定的。

[0967] 根据WO2016200340A1所描述的结果:该肝干细胞可表达成体干细胞标志物SOX9以及肝细胞标志物HNF4a和HNF3P。胆道标志物KRT19可能低表达,并且胆道标志物KRT7可能在细胞中检测不到(蛋白质水平)。肝脏干细胞也可以表达其他肝脏干细胞标志物EPCAM、CD24、PROM1、FOXA3和FOXQ 1。在干细胞维持期间,可以观察到分化的细胞的集落(占总集落数的约1-2%)。分化的肝脏细胞可以表现出强的ECAD、KRT19、KRT7表达水平和降低的SOX9表达水平,这与分化的细胞的导管性质一致。从形态上看,未分化的细胞可能很小、呈圆形且紧密簇聚在一起。肝干细胞可能未极化。零星分化的细胞可能更大且形状更扁平。培养中的几乎所有细胞都可能正在增殖,因为所有细胞都可能在细胞核中表达KI67。从形态上看,它们可能都是小圆形状。未分化的细胞表达低水平的KRT19,但可能不会表达可检测水平的KRT7。

[0968] 肝脏干细胞向肝细胞的分化可以通过如WO2016200340A1(其内容以引用的方式整体并入本文中)中所述的以下方法进行:

[0969] 如WO2016200340A1中所述,肝脏干细胞可能能够以接近100%的效率分化为肝细胞和胆道细胞。肝细胞分化可以以二维、三维和气液界面(ALI)格式进行。胆道分化可采用3D格式。

[0970] 肝细胞分化培养基可以由Clonetics™HCM™肝细胞培养基(Lonza)组成,该培养基补充有0.5μM A83-01(Tocris)、30μM地塞米松(Dex)(Sigma)、20ng/ml制瘤素M(OSM)(Prospecbio)、0.1μMγ-分泌酶抑制剂XXI(也称为化合物E)(Santa cruz)、25ng/ml Bmp7和25ng/ml Fgf19。

[0971] 在一些实施方案中,Clonetics™HCM™肝细胞培养基(Lonza)可以用具有B27、N2的高级DMEM/F12(1:1)培养基或具有10%FBS的DMEM/F12(1:1)培养基替换。

[0972] 在一些实施方案中,γ-分泌酶抑制剂XXI可以用Notch途径抑制剂DAPT、DBZ替换。

[0973] 在一些实施方案中,BMP7、FGF19和制瘤素M(OSM)是任选的。可以去除其中任一个,并且细胞仍然能够以较低的效率分化为肝细胞。

[0974] 2D肝细胞分化

[0975] 可以将肝干细胞在饲养层上培养7至10天。在干细胞达到50%至70%汇合度后,可在细胞培养基中添加BMP420 50ng/ml、100ng/ml和Fgf2 10ng/ml、20ng/ml、50ng/ml、100ng/ml并保持3~5天,然后将该细胞培养基更换成用于启动肝细胞分化的肝细胞分化培

养基。可每2-3天更换培养基,持续14天。在肝细胞分化培养基中长期培养可增加肝细胞成熟。可将分化的细胞在Clonetics™HMM™肝细胞维持培养基(HMM)中继续培养超过30天。

[0976] 在一些实施方案中,可以将肝脏干细胞在干细胞培养基中以1X10 5细胞/cm 2的高密度接种在饲养层上。当肝脏干细胞达到汇合时,可以将培养基用分化培养基替换。成熟的肝细胞将在14至21天后形成。

[0977] 3D肝细胞分化

[0978] 可将肝脏干细胞在饲养层上培养6至10天。随后可收回细胞并将其作为单细胞在人肝脏干细胞培养基中以1X105个细胞/cm的密度接种于超低附着细胞培养皿中。

[0979] 在某些实施方案中,可以将细胞以2-5X104/孔接种在低附着96孔板上。

[0980] 第二天,可以将干细胞在具有BMP4 20ng/m、50ng/m、100ng/m和Fgf2 10ng/ml、20ng/ml、50ng/ml、100ng/ml的肝脏干细胞培养基中再培养3-5天以形成球体结构。可使用肝细胞分化培养基在低附着板中培养球体结构以启动肝细胞分化。可每2-3天更换培养基。可在分化的第8至14天获得成熟肝细胞。在肝细胞分化培养基中长期培养可增加3D肝细胞的成熟。可在每2-3天更换培养基的情况下将3D肝细胞在分化培养基中培养长达30天。3D肝细胞可在Clonetics™HMM™肝细胞维持培养基(HMM)中被维持2-3个月。肝细胞气液界面(ALI)分化

[0981] 可将肝脏干细胞以3x10 4细胞/cm 2的密度铺板在跨孔(transwell)(Corning,0.4μm孔隙尺寸,聚酯膜)中的3T3J2饲养层上。可将跨孔中的细胞在肝脏干细胞培养基中培养7至10天。可以去除插入物内的培养基,并将插入物外部的培养基更换成肝细胞分化培养基。可以在每2-3天更换培养基的情况下将气液界面上的细胞再培养14天。在第10至14天,可获得成熟肝细胞。在肝细胞分化培养基中长期培养可增加肝细胞成熟。可将分化的细胞继续培养超过30天。

[0982] 所有描述的肝细胞分化方法都应当产生没有胎儿和未成熟的肝细胞标志物表达(诸如AFP)的功能性人肝细胞(来源于来自肝癌患者的LSC的肝细胞除外,其确实表达AFP)。

[0983] 如WO2016200340A1中所述,分化的肝细胞应具有细胞色素p450药物代谢功能、糖原储存和LDL摄取功能。2D和3D分化的效率可能在80%到90%左右。3D在某些单个3D肝细胞球体中的最高分化效率可达到100%。3D分化的肝细胞可表达肝细胞终末分化标志物PEPCK和TAT。如WO2016200340A1中所述,六种主要CYP p450家族成员可具有增加的RNA表达。

[0984] CYP1A2、2C9、2B6和3A4/5功能可通过代谢测定来确定。该肝细胞也可表现出药物诱导的对CYP3A4和CYP2C9活性的响应。

[0985] 尽管如WO2016200340A1中所述的肝干细胞分化的肝细胞展现出原代成体肝细胞的许多特征,但它们在几个方面可能有所不同。肝脏干细胞分化的肝细胞(dHep)的细胞尺寸可能比成体原代肝细胞(aHep)小。aHep的尺寸可能比dHep大2-10倍。大多数的dHep可能为具有单核的二倍体,但也有相当大的数目的aHep可能为多倍体,并且也可能为具双核的。aHep CYP功能在体外在细胞培养中可能只能被维持24-48小时,但是dHep CYP功能可被维持超过30天。

[0986] 如WO2016200340A1中所述,肝脏干细胞向胆管细胞的分化可以通过以下方法进行:

[0987] 胆道分化培养基可以由高级F12/DMEM减少的血清培养基(1:1)(Gibco.12643)、

10mM HEPES(Gibco)、100U/ml Pen/Strep(Gibco)、2mM L-谷氨酰胺(Gibco)、1% N2(Gibco)、2% B27(Gibco)、10ng/ml EGF(Millipore)、100ng/ml Fgf10(R&D)组成。

[0988] 该培养基中可能不存在Tgfp抑制剂和Notch抑制剂。该胆道分化培养基可能不含Tgfp3抑制剂和Notch抑制剂。

[0989] 在某些实施方案中,在分化培养基中添加Tgfp3和Notch配体jagged-1以帮助胆道形成。它们中的任一者均是任选的。

[0990] 可以将生长因子减少的基质胶提前一天在4℃下解冻。将50ul基质胶放入8腔室载玻片的一个孔中。将具有基质胶的腔室载玻片在37℃下孵育。半小时后,如WO2016200340A1中所述,基质胶可能会凝固并在每个孔上形成圆顶形状的果冻样结构。可以将肝脏干细胞用0.05%胰蛋白酶消化30至60秒。可以将该肝脏干细胞以3-5x104的密度接种在生长因子减少的基质胶悬浮液中

[0991] 3至5天后,当球体结构可形成时,可将肝脏干细胞培养基更换成胆道分化培养基。可以每2天更换分化培养基。胆管细胞可在14天后形成。

[0992] 如WO2016200340A1中所述,胆道分化方法可以产生胆道样3D结构。此结构模拟了闭合的管道,其中的细胞被布置成球体结构或管状结构,该球体结构或管状结构具有被胆管细胞包围的封闭的管腔或空间,该胆管细胞之间具有紧密连接。在胆道样结构中的一些中,可以观察到粘液分泌到管腔中。所有细胞对胆道标志物KRT19和KRT7染色呈阳性,这表明分化效率接近100%。细胞可能已被完全极化,该结构的管腔顶端部分具有微绒毛。细胞中的细胞核可能位于基膜附近。紧密连接标志物ZO-1可在细胞之间表达。胆道类器官可能会展现出模仿体内胆道结构的组织。

[0993] 胆道3D分化过程可以包括以下步骤:将细胞外基质放入合适的容器(诸如8孔腔室载玻片的一个孔中50-60μl的基质胶)中;使细胞外基质(诸如基质胶)凝固以在合适的容器(诸如细胞培养腔室)中形成圆顶形状的果冻样结构;将肝脏干细胞(任选地与合适的消化酶如胰蛋白酶一起)放在细胞外基质上(诸如将肝脏干细胞接种在基质胶的顶部);孵育细胞外基质和肝脏干细胞以及让聚集的细胞在细胞外基质(诸如基质胶)的顶部形成球体结构。不希望受理论的束缚,人们认为细胞外基质(诸如基质胶)可以支持细胞聚集并形成3D结构,这有助于启动胆道分化。此外,人们认为TGF-β和细胞外基质(诸如基质胶)中的其他细胞因子可能促进球体结构进一步分化为胆道样结构。细胞外基质(诸如基质胶)可以支持球体结构的形成,并辅助球体结构极化从而进一步分化为胆道样结构。虽然肝干细胞分化的胆管细胞可能展现出原代成体胆管细胞的许多特征,但它们可能在某些方面存在差异。LSC来源的胆管细胞可能缺乏具有增殖潜能的立方形胆管细胞。可能未观察到LSC胆管细胞的增殖。尽管ECAD在成体原代胆管细胞中的表达有所不同,但培养中的所有胆管细胞都可能表达ECAD。

[0994] 可获取肝脏(诸如人肝脏)或其部分,并任选地例如如WO22164807A2(其内容以引用的方式整体并入本文中)中所述的那样对其进行手术加工(例如,以分离肝脏的一个或多个部分或者一个或多个叶)。然后通过任何方便且适当的手段将肝脏或其部分脱细胞,该手段包括例如机械细胞损伤、冷冻/解冻、插管和逆行灌注一种或多种脱细胞试剂(例如一种或多种蛋白酶(例如胰蛋白酶)、一种或多种核酸酶(例如DNase)、一种或多种表面活性剂(例如十二烷基硫酸钠、Triton X-100等)、一种或多种低渗试剂、一种或多种高渗试剂、其

组合等)。可以将经脱细胞的肝脏或其部分储存和/或预浸泡在肝细胞相容的培养基中。然后可以通过任何方便的机制(诸如例如注射、灌注、外用施加(例如,逐滴)或其组合),将含有如本文所述的经离体操纵的生成肝细胞的细胞的细胞悬浮液施加到经脱细胞的肝脏或其部分。在一些情况下,经离体操纵的生成肝细胞的细胞可存在于细胞悬浮液中,以用于以任何方便且适当的浓度接种到所制备的支架中,该浓度包括例如每50pL Ix105或更少至Ix107个或更多细胞的浓度,包括但不限于例如每50pL 1-2x106个细胞。可将接种的经脱细胞的肝脏、其部分和/或其他脱细胞的支架维持在用于所引入细胞的植入/附着和/或扩增的合适条件下,其中此类条件可包括合适的湿度、温度、气体交换、营养物等。在一些情况下,可将接种的肝脏、其部分和/或其他脱细胞的支架在具有5% CO2的37℃或约37℃的潮湿环境中维持在合适的培养基中。在接种的和/或所生成的肝细胞附着且/或扩增到脱细胞的肝脏、其部分或其他脱细胞的支架或者在脱细胞的肝脏、其部分或其他脱细胞的支架内附着且/或扩增后,该材料可用于各种用途,包括例如移植到有需要的受试者(诸如肝功能下降和/或患有肝脏疾病的人受试者)中。与肝脏(包括人肝脏)的脱细胞以及肝细胞接受性(hepatocyte-receptive)无细胞支架的产生有关的方法和试剂描述于例如Mazza等人Sci Rep 5,13079(2015);Mango等人,Adv.Funct.Mater.2000097(2020);Shimoda等人,Sci Rep 9,1543(2019);Croce等人,Biomolecules.2019,9(12):813;以及美国专利号10,688,221中,这些文献的公开内容以引用的方式整体并入本文中。

[0995] 收集的通过如本文所述的方法产生的细胞群体及其治疗或药物组合物可以存在于任何合适的容器(例如,培养器皿、管、烧瓶、小瓶、冷冻管、冷冻袋等)中,并且可以使用任何合适的递送方法和/或装置来使用(例如,施用于受试者)。此类肝细胞群体和药物组合物可以新鲜制备和/或使用或者可以被冷冻保存。在一些情况下,肝细胞群体及其药物组合物可以以“即用型”格式制备,包括例如,该细胞存在于合适的稀释剂中和/或处于所需的递送浓度(例如,呈单位剂型)或者可容易地稀释(例如,用合适的稀释剂或培养基稀释)至所需递送浓度的浓度下的情况。可以在递送装置或者与所需递送机制或所需递送途径相容的装置(诸如但不限于注射器、输液袋等)中制备肝细胞群体及其药物组合物。

[0996] 在一些情况下,本公开包括多次细胞疗法剂量(例如,每次剂量均包含在合适的容器中),包括例如,该多次剂量中的经遗传修饰的肝细胞全部源自(包括扩增自)由单个人供体肝脏产生的肝细胞群体(例如,主细胞库)的情况。在一些情况下,本公开包括多次细胞疗法剂量(例如,每次剂量均包含在合适的容器中),包括例如,该多次剂量中的经遗传修饰的肝细胞全部源自(包括扩增自)由多个(例如,2个、2个或更多、3个或更少、3个、3个或更多、4个或更少、4个、4个或更多、5个或更少、5个、5个或更多、6个或更少、6个、6个或更多、7个或更少、7个、7个或更多、8个或更少、8个、8个或更多、9个或更少、9个、9个或更多、10个或更少、10个或更多等)人供体肝脏创建的肝细胞群体(例如,主细胞库)的情况。

[0997] 通过本文所述的方法产生的肝细胞样细胞中的任何肝细胞样细胞都可用于治疗受试者。在一个方面,本文提供了包含具有增强的体外尿素生成能力的主题成熟肝细胞样细胞的药物组合物。在一些实施方案中,在用于药物组合物中之前评估成熟肝细胞样细胞的尿素生成能力。尿素生成可以用本领域已知的任何合适的测定,例如比色尿素测定(例如,BiosAssay Systems的QuantiCrom测定试剂盒)来测量。在示例性实施方案中,药物组合物包含表现出与参考野生型成熟肝细胞相比为至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、

85％、90％、95％或99％的尿素生成的成熟肝细胞样细胞。

[0998] 细胞分化

[0999] 本文所述的主题成熟肝细胞样细胞可以通过在体外在分化期间的离散时间点在尿素生成增强剂的存在下使源细胞分化来产生。

[1000] 在示例性实施方案中,源细胞分化为肝细胞样祖细胞中间体,并且该肝细胞样祖细胞在包含一种或多种尿素生成增强剂的培养基中分化为成熟样肝细胞。如本文所用,“肝细胞样祖细胞”是指能够分化为成熟肝细胞样细胞并具有肝细胞祖细胞的一个或多个特征的细胞。肝细胞祖细胞的特征包括但不限于:EpCAM表达、细胞角蛋白19表达,去唾液酸糖蛋白受体1(ASGPR1)表达,以及增加的AFP、ALB、HNF4A、HNF6、SERPINA1、ALB和/或CYP3A7的基因表达。在特定实施方案中,增加的AFP、ALB、HNF4A、HNF6、SERPINA1、ALB和/或CYP3A7的基因表达是与参考源细胞(例如,干细胞、纤维母细胞或本文所述的任何源细胞)进行比较。在某些实施方案中,基因表达的增加是基因表达与参考源细胞相比增加至少10倍、100倍、$1x10^3$倍、$1x\ 10^4$倍、$1x\ 10^5$倍,或$1x\ 10^6$倍。在示例性实施方案中,肝细胞样祖细胞表现出1)EpCAM和/或细胞角蛋白-19的表达;和2)增加的AFP、ALB、HNF4A、HNF6、SERPINA1、ALB和/或CYP3A7的基因表达。在一些实施方案中,肝细胞样祖细胞表现出1)EpCam和细胞角蛋白19的表达;和2)增加的ALB和CYP3A7的表达。肝细胞样祖细胞还包括肝母细胞样细胞,其是能够分化为肝细胞或胆管细胞的双潜能祖细胞。在一些实施方案中,使该一种或多种尿素生成增强剂与成熟肝细胞样细胞接触。

[1001] 在一些实施方案中,使一种或多种尿素生成增强剂从分化的特定日开始与分化中的细胞(differentiating cell)接触。在一些实施方案中,使一种或多种尿素生成增强剂从分化的第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或40天开始与分化中的细胞接触。在一些实施方案中,使一种或多种尿素生成增强剂与分化中的细胞在分化为成熟肝细胞样细胞前接触1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20天。在一些实施方案中,使一种或多种尿素生成增强剂与表现出如本文公开的成熟肝细胞的一种或多种特征的成熟肝细胞样细胞接触。在一些实施方案中,使尿素生成增强剂与分化中的细胞(例如,肝细胞样祖细胞)接触至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、24或36小时。在一些实施方案中,使尿素生成增强剂与分化中的细胞接触至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天。在几个实施方案中,使尿素生成增强剂与分化中的细胞接触至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10周。

[1002] 源细胞

[1003] 任何合适的源细胞都可用于产生主题肝细胞样细胞,该源细胞包括但不限于干细胞(例如诱导型多能干细胞和胚胎干细胞)、纤维母细胞、胃上皮细胞、肝细胞和导管细胞。

[1004] 在一些实施方案中,源细胞是干细胞。在一些实施方案中,源细胞是人干细胞。在一些实施方案中,干细胞是多能干细胞。如本文所用的“多能干细胞”具有分化为以下三个胚层中的任一个的潜力:内胚层(例如,胃内衬、胃肠道、肺等)、中胚层(例如,肌肉、骨骼、血液、泌尿生殖组织等)或外胚层(例如,表皮组织和神经系统组织)。如本文所用的术语“多能干细胞”还涵盖“诱导型多能干细胞”或“iPSC”,其是一种来源于非多能细胞的多能干细胞。亲本细胞的实例包括已被重编程以通过各种手段诱导多能未分化的表型的体细胞。此类“iPS”或“iPSC”细胞可以通过诱导某些调控基因的表达或通过某些蛋白质的外源性应用来

产生。用于诱导iPS细胞的方法是本领域已知的。(参见,例如Zhou等人,Stem Cells 27(11):2667-74(2009);Huangfu等人,Nature Biotechnol.26(7):795(2008);Woltjen等人,Nature 458(7239):766-770(2009);及Zhou等人,Cell Stem Cell 8:381-384(2009))。在某些实施方案中,干细胞是胚胎干细胞。使用干细胞分化肝细胞的方法是本领域已知的。参见例如Blackford等人,Stem Cells Transl Med.8(2):124-137(2019);Hannan等人,Nature Prot.8(2):430-437(2013);Liu等人,Sci Transl Med.3(82):82ra39(2011);Woo等人,Gastroenterology42:602-611(2012);以及Carpentier等人,J Clin Invest.124(11):4953-4964(2014),这些文献以引用的方式并入本文中,特别是与肝细胞样细胞分化方法相关的部分。

[1005] 在其中源细胞是诱导型多能干细胞的一些实施方案中,使诱导型多能干细胞首先分化为表达以下基因中的一种或多种基因的定形内胚层(DE):CXCR4、SOX17、CER和/或FOXA2。随后,使DE分化为表达甲胎蛋白(AFP)的肝细胞样祖细胞。随后,使肝细胞样祖细胞分化为成熟肝细胞样细胞。参见,例如Liu等人,Sci Transl Med.3(82):82ra39(2011),其以引用的方式并入本文中,特别是与肝细胞样细胞分化相关的部分。在一些实施方案中,使肝细胞样祖细胞在本文所述的尿素生成增强剂中的一种或多种的存在下分化以产生具有增强的尿素生成能力的成熟肝细胞样细胞。在一些实施方案中,使肝细胞样祖细胞在包含一种或多种尿素生成增强剂和制瘤素-M(OSM)的培养基中分化为成熟肝细胞样细胞。在一些实施方案中,该培养基进一步包含肝细胞生长因子(HGF)。在一些实施方案中,使成熟肝细胞样细胞经受该一种或多种尿素生成增强剂。

[1006] 在其中源细胞是人胚胎干细胞或人诱导型多能干细胞的一些实施方案中,使该源细胞首先分化为表达SOX17和/或FOXA2的定形内胚层。使定形内胚层分化为表达AFP和/或HNF4A的肝母细胞样细胞。然后使肝母细胞样细胞分化为表达以下基因中的一种基因或以下基因的组合的成熟肝细胞样细胞:AFP、AAT、ALB和HNF3B。参见,例如Carpentier等人,J Clin Invest.124(11):4953-4964(2014),其以引用的方式并入本文中,特别是与肝细胞样细胞分化相关的部分。在一些实施方案中,使肝母细胞样细胞在本文所述的尿素生成增强剂中的一种或多种的存在下分化以产生具有增强的尿素生成能力的成熟肝细胞样细胞。在一些实施方案中,使肝母细胞样细胞在包含一种或多种尿素生成增强剂、DMSO和HGF的培养基中分化。在一些实施方案中,使成熟肝细胞样细胞经受该一种或多种尿素生成增强剂。

[1007] 在其中源细胞是人多能干细胞的一些实施方案中,使该源细胞首先分化为表达SOX17和/或CXCR4的定形内胚层。使定形内胚层分化为表达EpCAM、细胞角蛋白19,以及以下基因中的一种基因或以下基因的组合的肝内胚层:AFP、SERPINA2和HNF4A。然后使肝内胚层分化为表达以下基因中的一种基因或以下基因的组合的成熟肝细胞样细胞:AFP、ASGR2、SERPINA2、CYP3A7和ALB。参见,例如Blackford等人,Stem Cells Transl Med.8(2):124-137(2019),其以引用的方式并入本文中,特别是与肝细胞样细胞分化相关的部分。在一些实施方案中,使肝内胚层在本文所述的尿素生成增强剂中的一种或多种的存在下分化以产生具有增强的尿素生成能力的成熟肝细胞样细胞。在一些实施方案中,使肝内胚层在包含一种或多种尿素生成增强剂和制瘤素-M(OSM)的细胞培养基中分化。在一些实施方案中,该培养基进一步包含肝细胞生长因子(HGF)。在一些实施方案中,使成熟肝细胞样细胞经受该一种或多种尿素生成增强剂。

[1008] 在一些实施方案中,成熟肝细胞样细胞是从源细胞转分化而来的。转分化是指一种分化的细胞类型无需经过中间的多能阶段而直接转化为另一种分化的细胞类型。能够转分化为成熟肝细胞样细胞的示例性细胞包括但不限于纤维母细胞、胃上皮细胞、肝细胞和导管细胞。

[1009] 在一些实施方案中,成熟肝细胞样细胞是由纤维母细胞转分化而来的。参见,例如Zhu等人,Nature 508(7494):93-7(2014);Du等人,Cell Stem Cell 14(3):394-403(2014);以及Huang等人,Cell Stem Cell4(3):370-84,其以引用的方式并入本文中,特别是与转分化方法相关的部分。在此类方法中,通过逆转录病毒转导递送技术将可用于纤维母细胞到肝细胞重编程的一种或多种基因转移到纤维母细胞中,并且将经转导的纤维母细胞在含有有利于肝细胞样祖细胞形成的因子的培养基中培养,该肝细胞样祖细胞随后分化为成熟肝细胞样细胞。可用于纤维母细胞到肝细胞重编程的基因包括但不限于OCT4、SOX2、KLF4、HNF6、HNF1α、FOXA3、HNF1β和/或HNF4α。在一些实施方案中,使肝细胞样祖细胞在本文所述的尿素生成增强剂中的一种或多种的存在下分化以产生具有增强的尿素生成能力的成熟肝细胞样细胞。

[1010] 在一些实施方案中,成熟肝细胞样细胞是由成熟肝细胞转分化而来的。在一些实施方案中,成熟肝细胞被转化为可扩增的肝细胞样祖细胞,该肝细胞样祖细胞随后分化为成熟肝细胞样细胞。在一些实施方案中,成熟肝细胞向肝细胞样祖细胞的转化是在包含以下中的一种或以下的组合的培养基中进行的:Wnt信号传导激动剂(例如,CHIR99021)、TGFβ信号传导抑制剂(例如,A82-01和A83-01)和ROCK激酶抑制剂(例如,Y27632、A82-01)。参见,例如Kim等人,J.Hepatol.70(1):97-107(2019);和Fu等人,Cell Res.29(1):8-22(2019),其以引用的方式并入本文中,特别是与转分化方法相关的部分。在一些实施方案中,使肝细胞样祖细胞在本文所述的尿素生成增强剂中的一种或多种的存在下分化以产生具有增强的尿素生成能力的成熟肝细胞样细胞。

[1011] 在一些实施方案中,主题成熟肝细胞样细胞是从胃上皮细胞(例如,Wang等人,Cell Stem Cell 19(4):449-61(2016))或导管细胞(参见,例如,Huch等人,Cell 160(1-2):299-312(2015),这些文献以引用的方式并入本文中,特别是与转分化方法相关的部分)转分化而来的。在一些实施方案中,使源细胞在本文所述的尿素生成增强剂中的一种或多种的存在下转分化以产生具有增强的尿素生成能力的成熟肝细胞样细胞。

[1012] 尿素生成增强剂

[1013] 本文提供的主题成熟肝细胞样细胞是通过在体外在一种或多种促进增强的体外尿素生成能力的条件下使源细胞分化而产生的。小分子增强剂

[1014] 在一些实施方案中,分化发生在至少一种包含一种或多种小分子尿素生成增强剂的培养基中。在示例性实施方案中,此种分化步骤发生在源细胞已分化为中间肝细胞样祖细胞之后。在某些实施方案中,将小分子增强剂添加到表现出如本文公开的成熟肝细胞的一个或多个特征的成熟肝细胞样细胞中。在一些实施方案中,在该一种或多种小分子尿素生成增强剂的存在下的分化发生在成熟肝细胞样细胞形成前1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20天。在一些实施方案中,使小分子尿素生成增强剂与分化中的细胞接触至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天。在一些实施方案中,使小分子尿素生成增强剂与分化中的细胞接触2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天。在一些实施方案

中,使小分子尿素生成增强剂与分化中的细胞接触至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10周。

[1015] 在一些实施方案中,本文公开的小分子增强剂以至少1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、100、250、500或750μM的浓度包含在培养基中。在一些实施方案中,本文公开的小分子增强剂以以下的浓度包含在培养基中:1与800μM之间、1与750μM之间、1与700μM之间、1与650μM之间、1与600μM之间、1与550μM之间、1与500μM之间、1与500μM之间、1与450μM之间、1与400μM之间、1与350μM之间、1与300μM之间、1与250μM之间、1与200μM之间、1与150μM之间、1与100μM之间、1与50μM之间、50与800μM之间、50与750μM之间、50与700μM之间、50与650μM之间、50与600μM之间、50与550μM之间、50与500μM之间、50与500μM之间、50与450μM之间、50与400μM之间、50与350μM之间、50与300μM之间、50与250μM之间、50与200μM之间、50与150μM之间、50与100μM之间、100与800μM之间、100与750μM之间、100与700μM之间、100与650μM之间、100与600μM之间、100与550μM之间、100与500μM之间、100与500μM之间、100与450μM之间、100与400μM之间、100与350μM之间、100与300μM之间、100与250μM之间、100与200μM之间、100与150μM之间、200与800μM之间、200与750μM之间、200与700μM之间、200与650μM之间、200与600μM之间、200与550μM之间、200与500μM之间、200与500μM之间、200与450μM之间、200与400μM之间、200与350μM之间、200与300μM之间、200与250μM之间、300与800μM之间、300与750μM之间、300与700μM之间、300与650μM之间、300与600μM之间、300与550μM之间、300与500μM之间、300与500μM之间、300与450μM之间、300与400μM之间、300与350μM之间、400与800μM之间、400与750μM之间、400与700μM之间、400与650μM之间、400与600μM之间、400与550μM之间、400与500μM之间、400与500μM之间、400与450μM之间、500与800μM之间、500与750μM之间、500与700μM之间、500与650μM之间、500与600μM之间、500与550μM之间、600与800μM之间、600与750μM之间、600与700μM之间、600与650μM之间、700与800μM之间、700与750μM之间,或750与800μM之间。

[1016] 在一些实施方案中,本文公开的小分子增强剂以至少1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、100、250、500或750mM的浓度包含在培养基中。在一些实施方案中,本文公开的小分子增强剂以以下的浓度包含在培养基中:1与800mM之间、1与750mM之间、1与700mM之间、1与650mM之间、1与600mM之间、1与550mM之间、1与500mM之间、1与500mM之间、1与450mM之间、1与400mM之间、1与350mM之间、1与300mM之间、1与250mM之间、1与200mM之间、1与150mM之间、1与100mM之间、1与50mM之间、50与800mM之间、50与750mM之间、50与700mM之间、50与650mM之间、50与600mM之间、50与550mM之间、50与500mM之间、50与500mM之间、50与450mM之间、50与400mM之间、50与350mM之间、50与300mM之间、50与250mM之间、50与200mM之间、50与150mM之间、50与100mM之间、100与800mM之间、100与750mM之间、100与700mM之间、100与650mM之间、100与600mM之间、100与550mM之间、100与500mM之间、100与500mM之间、100与450mM之间、100与400mM之间、100与350mM之间、100与300mM之间、100与250mM之间、100与200mM之间、100与150mM之间、200与800mM之间、200与750mM之间、200与700mM之间、200与650mM之间、200与600mM之间、200与550mM之间、200与500mM之间、200与500mM之间、200与450mM之间、200与400mM之间、200与350mM之间、200与300mM之间、200与250mM之间、300与800mM之间、300与750mM之间、300与700mM之间、300与650mM之间、300与600mM之间、300与550mM之间、300与500mM之间、300与500mM之间、300与450mM之间、300与400mM之间、300与350mM之间、400与800mM之间、400与750mM之间、400与700mM之间、

400与650mM之间、400与600mM之间、400与550mM之间、400与500mM之间、400与500mM之间、400与450mM之间、500与800mM之间、500与750mM之间、500与700mM之间、500与650mM之间、500与600mM之间、500与550mM之间、600与800mM之间、600与750mM之间、600与700mM之间、600与650mM之间、700与800mM之间、700与750mM之间,或750与800mM之间。

[1017] 在一些实施方案中,小分子增强剂增加一种或多种尿素循环途径酶的表达。示例性的尿素循环途径酶包括但不限于氨基甲酰磷酸合成酶I(CPS1)、鸟氨酸转氨基甲酰酶(OTC)、精氨琥珀酸合成酶(ASS1)、精氨琥珀酸裂解酶(ASL)、精氨酸酶(ARG1)、N-乙酰谷氨酸合成酶(NAGS)、鸟氨酸转位酶(ORNT1)和柠檬素。在一些实施方案中,小分子增强剂增加以下尿素循环酶之一的表达:CPS1、NAGS、ARG1 ASL、ASS1或OTC。在一些实施方案中,小分子增强剂增加一种或多种尿素循环途径酶的RNA转录表达。在一些实施方案中,肝细胞样细胞表现出增加的一种或多种尿素循环途径酶的蛋白质表达。在一些实施方案中,小分子增强剂增加一种或多种尿素循环途径酶的蛋白质表达,其量比在没有增强子的情况下分化的参考成熟肝细胞样细胞高出至少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、85%、90%、95%或或99%。

[1018] 在一些实施方案中,小分子增强剂是增加细胞内环AMP的剂。不受任何特定操作理论的约束并且如本文提供的实例中所公开的,增加细胞内环AMP的剂会增加尿素循环酶的转录和翻译,从而增加成熟肝细胞样细胞的体外尿素生成能力。增加细胞内环AMP的剂包括但不限于福斯高林、胰高血糖素、胰高血糖素样肽-1(GLP-1)、葡萄糖依赖性促胰岛素肽(GIP)、磷酸二酯酶抑制剂和前述中的任一个的类似物。示例性的磷酸二酯酶抑制剂包括IBMX(3-异丁基-1-甲基黄嘌呤)、茶碱、V11294A、咯利普兰、米力农、CDP-840、罂粟碱、西地那非、他达拉非、罗氟司特、氨力农、西洛他唑和双嘧达莫。

[1019] 在示例性实施方案中,增强剂是福斯高林。在一些实施方案中,使分化中的肝细胞样祖细胞在包含福斯高林的细胞培养基中分化。在一些实施方案中,使表现出如本文所述的成熟肝细胞的一个或多个特征的肝细胞样细胞在包含福斯高林的细胞培养基中分化。在一些实施方案中,福斯高林以至少1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、75或100μM的浓度包含在培养基中。在一些实施方案中,福斯高林以至少1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、75或100mM的浓度包含在培养基中。在一些实施方案中,福斯高林以以下的浓度包含在培养基中:0.5与800μM之间、0.5与750μM之间、0.5与700μM之间、0.5与650μM之间、0.5与600μM之间、0.5与550μM之间、0.5与500μM之间、0.5与500μM之间、0.5与450μM之间、0.5与400μM之间、0.5与350μM之间、0.5与300μM之间、0.5与250μM之间、0.5与200μM之间、0.5与150μM之间、0.5与100μM之间、0.5与95μM之间、0.5与90μM之间、0.5与85μM之间、0.5与80μM之间、0.5与75μM之间、0.5与70μM之间、0.5与65μM之间、0.5与60μM之间、0.5与55μM之间、0.5与50μM之间、0.5与45μM之间、0.5与40μM之间、0.5与35μM之间、0.5与30μM之间、0.5与25μM之间、0.5与20μM之间、0.5与15μM之间、0.5与10μM之间、0.5与9μM之间、0.5与8μM之间、0.5与7μM之间、0.5与6μM之间、0.5与5μM之间、0.5与2μM之间、0.5与1μM之间、1与30μM之间、5与30μM之间、10与30μM之间、1与20μM之间、5与20μM之间,或10与20μM之间。在一些实施方案中,福斯高林以5-20μM的浓度包含在培养基中。在一些实施方案中,使细胞(例如,分化中的肝细胞样祖细胞)经受福斯高林至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23或24小时。在一些实施方案中,使分化中的细胞经受福斯高林至少8小时。在一

些实施方案中,细胞培养基进一步包含制瘤素-M(OSM)和/或肝细胞生长因子(HGF)。

[1020] 在一些实施方案中,小分子增强剂是维生素K1。在一些实施方案中,维生素K是维生素K1。在一些实施方案中,分化发生在基本上不含维生素K2和/或维生素K3的培养基中。不受任何特定操作理论的约束并且如本文提供的实例中所公开的,维生素K可以增加成熟肝细胞样细胞中的体外尿素生成。在一些实施方案中,使分化中的肝细胞样祖细胞在包含维生素K1的细胞培养基中分化。在一些实施方案中,使表现出如本文所述的成熟肝细胞的一个或多个特征的肝细胞样细胞在包含维生素K1的细胞培养基中分化。在一些实施方案中,维生素K1以至少0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.75、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、100、250、500或750μM的浓度包含在培养基中。在一些实施方案中,维生素K以以下的浓度包含在培养基中:0.05与800μM之间、0.05与750μM之间、0.05与700μM之间、0.05与650μM之间、0.05与600μM之间、0.05与550μM之间、0.05与500μM之间、0.05与500μM之间、0.05与450μM之间、0.05与400μM之间、0.05与350μM之间、0.05与300μM之间、0.05与250μM之间、0.05与200μM之间、0.05与150μM之间、0.05与100μM之间、0.05与95μM之间、0.05与90μM之间、0.05与85μM之间、0.05与80μM之间、0.05与75μM之间、0.05与70μM之间、0.05与65μM之间、0.05与60μM之间、0.05与55μM之间、0.05与50μM之间、0.05与45μM之间、0.05与40μM之间、0.05与35μM之间、0.05与30μM之间、

[1021] 0.05与25μM之间、0.05与20μM之间、0.05与15μM之间、0.05与10μM之间、0.05与9μM之间、0.05与8μM之间、0.05与7μM之间、0.05与6μM之间、0.05与5μM之间、0.05与2μM之间、0.05与1μM之间、0.05与0.5μM之间、0.05与0.1μM之间、0.1与5μM之间、0.5与5μM之间,或1与5μM之间。在一些实施方案中,使细胞(例如分化中的肝细胞样祖细胞)经受维生素K1至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23或24小时。在一些实施方案中,使分化中的细胞经受维生素至少8小时。在一些实施方案中,将精氨酸与维生素K1一起添加到培养基中。在一些实施方案中,以750μM-10mM的浓度添加精氨酸。在一些实施方案中,将精氨酸以与维生素K1相似的浓度添加到培养基中。在一些实施方案中,细胞培养基进一步包含制瘤素-M(OSM)和/或肝细胞生长因子(HGF)。

[1022] 在一些实施方案中,小分子增强剂是维生素K2。在示例性实施方案中,维生素K是维生素K2。在一些实施方案中,分化发生在基本上不含维生素K1和/或维生素K3的培养基中。

[1023] 在一些实施方案中,使分化中的肝细胞样祖细胞在包含维生素K2的细胞培养基中分化。在实施方案中,使表现出如本文所述的成熟肝细胞的一个或多个特征的肝细胞样细胞在包含维生素K2的细胞培养基中分化。在一些实施方案中,维生素K2以至少0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.75、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、100、250、500或750μM的浓度包含在培养基中。在一些实施方案中,维生素K以以下的浓度包含在培养基中:0.05与800μM之间、0.05与750μM之间、0.05与700μM之间、0.05与650μM之间、0.05与600μM之间、0.05与550μM之间、0.05与500μM之间、0.05与500μM之间、0.05与450μM之间、0.05与400μM之间、0.05与350μM之间、0.05与300μM之间、0.05与250μM之间、0.05与200μM之间、0.05与150μM之间、0.05与100μM之间、0.05与95μM之间、0.05与90μM之间、0.05与85μM之间、0.05与80μM之间、0.05与75μM之间、0.05与70μM之间、0.05与65μM之间、0.05与60μM之间、0.05与55μM之间、0.05与50μM之间、0.05与45μM之间、0.05与40μM之

间、0.05与35μM之间、0.05与30μM之间、0.05与25μM之间、0.05与20μM之间、0.05与15μM之间、0.05与10μM之间、0.05与9μM之间、0.05与8μM之间、0.05与7μM之间、0.05与6μM之间、0.05与5μM之间、0.05与2μM之间、0.05与1μM之间、0.05与0.5μM之间、0.05与0.1μM之间、0.1与5μM之间、0.5与5μM之间,或1与5μM之间。在一些实施方案中,使细胞(例如,分化中的肝细胞样祖细胞)经受维生素K2至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23或24小时。在一些实施方案中,使分化中的细胞经受维生素至少8小时。在一些实施方案中,将精氨酸与维生素K2一起添加到培养基中。在一些实施方案中,以750μM-10mM的浓度添加精氨酸。在一些实施方案中,将精氨酸以与维生素K2相似的浓度添加到培养基中。在一些实施方案中,细胞培养基进一步包含制瘤素-M(OSM)和/或肝细胞生长因子(HGF)。

[1024] 培养基

[1025] 向成熟肝细胞样细胞的分化可以在包含一种或多种生长因子的培养基的存在下发生。在一些实施方案中,该分化发生在包含肝细胞生长因子(HGF)和制瘤素-M(OSM)的培养基中。在其中分化通过中间肝细胞样祖细胞发生的一些实施方案中,向成熟肝细胞样细胞的分化是在不存在HGF的情况下进行的。在一些实施方案中,培养基包含OSM,但不含HGF。在其中分化通过中间肝细胞样祖细胞发生的一些实施方案中,从中间肝细胞样祖细胞向成熟肝细胞样细胞的分化初始在HGF的存在下进行,并且在分化开始后1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、21、22、23或24小时从培养基中除去HGF。在一些实施方案中,在从肝细胞样祖细胞开始分化为成熟肝细胞样细胞起2、3、4、5、6、7、8、9或10天从培养基中除去HGF。

[1026] 增高的氧气条件

[1027] 不受任何特定操作理论的约束并且如本文提供的实例中所示,在升高的氧气条件下培养的肝细胞样细胞表现出增加的体外尿素生成。因此,在一些实施方案中,根据本文提供的方法向成熟肝细胞样细胞的分化是在促进增强的体外尿素生成的升高的氧气水平下发生的。在一些实施方案中,该分化在正常氧(常氧)条件(约20%的O_2分压)下发生。在一些实施方案中,该分化在高氧条件下(>20%分压)发生。在一些实施方案中,向成熟肝细胞样细胞的分化是在高于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%、35%或40%的O_2分压下进行的。在一些实施方案中,向成熟肝细胞样细胞的分化是在5-30%、6-30%、7-30%、8-30%、9-30%、10-30%、11-30%、12-30%、13-30%、14-30%、15-30%、16-30%、17-30%、18-30%、19-30%、20-30%、21-30%、22-30%、23-30%、24-30%、25-30%、26-30%、27-30%、28-30%、29-30%、15-25%、15-35%、15-40%或20-25%的O_2分压下进行的。

[1028] 在一些实施方案中,根据本文提供的方法向成熟肝细胞样细胞的分化是在至少两种氧气条件下发生的。在一些情况下,其中一种氧气条件是低氧条件,另一种氧气条件是常氧条件。在一些实施方案中,低氧条件包括约0%至约5%氧气的氧气含量,例如约0%-5%、约0%-4%、约0%-3%、约0%-2%、约0%-3%、约0%-4%、约1%-5%、约1%-4%、约1%-3%、约1%-2%、约2%-3%、约3%-4%、约4%-5%、约2%-5%和约3%-5%的氧气含量。在一些实施方案中,常氧条件包括约20%至约22%氧气的氧气含量,例如,约20%-22%、约

20％-21％、约21％-22％、约20％、约21％和约22％的氧气含量。在一些实施方案中,将分化中的细胞暴露于低氧条件至少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或更多天。在一些实施方案中,将分化中的细胞暴露于常氧条件下至少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或更多天。

[1029] 培养系统

[1030] 本文所述的分化方法可以用悬浮的细胞或附着于2D或3D固体支持物的细胞进行。固体支持物包括但不限于玻璃或塑料培养皿、多孔皿、烧瓶、板、微载体、聚偏氟乙烯、聚合物膜(诸如金属膜)和3D支架。在某些实施方案中,分化发生在2D培养系统中。在一些实施方案中,分化发生在由合成或天然水凝胶构成的3D支架中。在示例性实施方案中,3D支架是聚乙二醇(PEG)支架。在特定实施方案中,3D支架是倒置胶体晶体PEG支架。参见,例如Shirahama等人,J Vis Exp.114:54331(2016),其以引用的方式并入本文中,特别是与倒置胶体晶体PEG支架相关的部分。

[1031] 在一些实施方案中,向成熟肝细胞样细胞的分化是在包含一种或多种细胞外基质组分的2D或3D固体支持物上进行的。细胞外基质组分包括但不限于I型、II型和IV型胶原蛋白、刀豆球蛋白A、硫酸软骨素、纤连蛋白、“超纤连蛋白”和/或纤连蛋白样聚合物、明胶、层粘连蛋白、聚-D和聚-L-赖氨酸、基质胶™、血小板反应蛋白和/或玻连蛋白。在示例性实施方案中,固体支持物包被有重组层粘连蛋白(例如,层粘连蛋白521、BioLamina)。在一些实施方案中,固体支持物不含胎牛血清(FBS)。在其中分化经由肝细胞样祖细胞中间体发生的一些实施方案中,将肝细胞样祖细胞中间体转移到包被有促进向成熟肝细胞样细胞的分化的ECM组分的固体基底。在一些实施方案中,该分化初始发生在不含胎牛血清的第一基底中,然后将分化中的细胞转移到包含用于促进向成熟肝细胞样细胞的分化的层粘连蛋白和/或胶原蛋白的第二基底。在一些实施方案中,将分化中的细胞在分化的约第10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23或24天转移至第二基底。在一些实施方案中,第一基底包括明胶。在一些实施方案中,第二基底进一步包括胎牛血清。促进向成熟肝细胞样细胞分化的示例性ECM组分包括,例如,重组层粘连蛋白411(BioLamina)。

[1032] 在一些实施方案中,使用水凝胶基底进行分化。水凝胶基底可与作为2D或3D培养系统的一部分提供的分化方法一起使用。在一些实施方案中,水凝胶基质具有小于2kPa、1kPa、0.5kPa或0.1kPa的弹性模量。在一些实施方案中,水凝胶基质具有以下的弹性模量:10Pa与5kPa之间、10Pa与1kPa之间、8Pa与1kPa之间、50Pa与5kPa之间、100Pa与5kPa之间、200Pa与5kPa之间、250Pa与5kPa之间、500Pa与5kPa之间、750Pa与5kPa之间、1kPa与5kPa之间、10Pa与5kPa之间、10Pa与1kPa之间、10Pa与900Pa之间、10Pa与800Pa之间、10Pa与700Pa之间、10Pa与600Pa之间、10Pa与500Pa之间、10Pa与400Pa之间、10Pa与300Pa之间、10Pa与200Pa之间、10Pa与100Pa之间、10Pa与50Pa之间,或10Pa与25Pa之间。在一些实施方案中,水凝胶基质具有至少1kPa、2kPa、3kPa、4kPa、5kPa、10kPa、15kPa、20kPa、25kPa、30kPa、35kPa、40kPa、45kPa、50kPa的弹性模量。在一些实施方案中,水凝胶基质具有以下的弹性模量:1与100kPa之间、5与100kPa之间、10与100kPa之间、25与100kPa之间、50与100kPa之间、1与100kPa之间、1与50kPa之间、1与40kPa之间、1与30kPa之间、1与25kPa之间、1与20kPa之间、1与15kPa之间、1与10kPa之间、10与50kPa之间、10与40kPa之间、10与35kPa之间、10与30kPa

之间、10与25kPa之间、10与20kPa之间、10与15kPa之间、1与10kPa之间、20与50kPa之间、20与40kPa之间、20与35kPa之间、20与30kPa之间、20与25kPa之间、30与50kPa之间、30与40kPa之间、30与35kPa之间,或40与50kPa之间。在某些实施方案中,水凝胶基质具有防止Yes相关蛋白1(YAP1)干扰向成熟肝细胞样细胞的分化的弹性模量。人们认为,刚性基质导致细胞经由核YAP1在肝细胞样祖细胞中扩散。此种细胞扩散导致肝细胞样祖细胞分化为胆管细胞并阻碍肝细胞分化。因此,在一些实施方案中,弹性水凝胶基底(小于2kPa)有利地促进向成熟肝细胞样细胞的分化。在一些实施方案中,水凝胶基底连接于一种或多种ECM组分。在一些实施方案中,ECM组分以至少50、75、100、150、200、250、300、400、450、500、600、700、800、900或1,000μM ECM的密度连接于水凝胶基质。在一些实施方案中,ECM组分以少于50μM、75μM、100μM、150μM、200μM、250μM、300μM、400μM、450μM、500μM、600μM、700μM、800μM、900或1,000μM ECM的密度连接于水凝胶基质。在一些实施方案中,ECM组分以以下的密度连接于水凝胶基质:至少在50μM与5,000μM之间、50μM与4,000μM之间、50μM与3,000μM之间、50μM与2,000μM之间、50μM与1,000μM之间、50μM与500μM之间、50μM与400μM之间、1μM与300μM之间、50μM与200μM之间、50μM与100μM之间、50μM与75μM之间、50μM与50μM之间、50μM与25μM之间、50μM与10μM之间、100μM与5,000μM之间、100μM与4,000μM之间、100μM与3,000μM之间、100μM与2,000μM之间、100μM与1,000μM之间、100μM与1000μM之间、100μM与400μM之间、1μM与300μM之间、100μM与200μM之间、250μM与5,000μM之间、500μM与5,000μM之间、750μM与5,000μM之间、1,000μM与5,000μM之间、2,000μM与5,000μM之间、3,000μM与5,000μM之间、4,000μM与5,000μM之间、250μM与5,000μM之间、500μM与5,000μM之间、750μM与5,000μM之间、1,000μM与5,000μM之间、2,000μM与5,000μM之间、3,000μM与5,000μM之间、4,000μM与5,000μM之间、100μM与1,000μM之间、200μM与900μM之间、300μM与800μM之间、400μM与700μM之间,或500μM与600μM之间的ECM。在一些实施方案中,向成熟肝细胞样细胞的分化在具有高密度ECM组分的弹性水凝胶存在下发生。包含低密度ECM组分的刚性水凝胶和包含低密度ECM组分的弹性水凝胶可促进成熟为成熟肝细胞样细胞。在一些实施方案中,向成熟肝细胞样细胞的分化在包含高密度ECM组分的刚性水凝胶的存在下发生。在一些实施方案中,向成熟肝细胞样细胞的分化在包含低密度ECM组分的刚性水凝胶的存在下发生。

[1033] 在一些实施方案中,将分化中的细胞在人脐静脉内皮细胞(HUVEC)存在下共培养。已经证明,向成熟肝细胞样细胞的分化增强体外尿素生成能力。在其中分化通过肝细胞样祖细胞中间体发生的一些实施方案中,肝细胞样祖细胞在HUVEC存在下培养。在一些实施方案中,肝细胞样祖细胞与培养中的HUVEC直接接触。在其他实施方案中,肝细胞样祖细胞和HUVEC在由多孔膜分隔的两个不同隔室(例如,跨孔(transwell)培养系统)中培养。

[1034] 2D贴壁培养中的肝细胞分化方案

[1035] 可以利用使用二维贴壁培养系统的方法来生成多能干细胞来源的肝细胞样细胞。该方法包括单细胞传代和无异种组分。在一些实施方案中,将多能干细胞维持在标准细胞培养基中以维持分化之前的多能性。

[1036] 在一些实施方案中,在第0天将多能干细胞在包含一种或多种因子(包括但不限于活化素A、bFGF、BMP4、LY294002、CHIR99021)的培养基中培养。在一些实施方案中,在第0天将多能干细胞在包含活化素A、bFGF、BMP4、LY294002、CHIR99021的第一培养基中培养。在一些情况下,将多能干细胞在ECM的一种或多种组分(包括本文所述的组分)上培养。在一些实

施方案中,在第1天将分化中的细胞在包含一种或多种因子(包括但不限于活化素A、bFGF、BMP4和LY294002)的培养基中培养。在一些实施方案中,在第1天将分化中的细胞在包含活化素A、bFGF、BMP4和LY294002的第二培养基中培养。在一些实施方案中,第1天的经培养的细胞形成细胞网络。

[1037] 在一些实施方案中,在第2天将分化中的细胞在包含一种或多种因子(包括但不限于活化素A和bFGF)的培养基中培养。在一些实施方案中,在第2天将分化中的细胞在包含活化素A和bFGF的第三培养基中培养。在一些情况下,该培养基进一步包含B27补充剂。在一些实施方案中,第2天的经培养的细胞表现出定形内胚层样细胞形态和/或活性。

[1038] 在一些实施方案中,在第3-7天将分化中的细胞在包含一种或多种因子(包括但不限于活化素A)的培养基中培养。在一些实施方案中,在第3天至第7天将分化中的细胞在包含活化素A的第四培养基中培养。在一些实施方案中,第2-4天的经培养的细胞表现出中内胚层样细胞形态和/或活性。在一些实施方案中,第5-7的经培养的细胞表现出定形内胚层样细胞形态和/或活性。在一些实施方案中,第约6-7天的经培养的细胞包含肝母细胞样细胞。在一些实施方案中,第6-7天的经培养的细胞表现出肝母细胞样细胞形态和/或活性。

[1039] 在一些实施方案中,在第8-27天将分化中的细胞在包含一种或多种因子(包括但不限于制瘤素-M和HGF)的培养基中培养。在一些实施方案中,在第8-27天将分化中的细胞在包含制瘤素-M和HGF的第五培养基中培养。在一些实施方案中,该培养基进一步包含B27补充剂。在一些实施方案中,第8-10天的经培养的细胞表现出明确的立方形形态。在一些实施方案中,第13-15天的经培养的细胞表现出多面体形态。在一些实施方案中,在分化方法的第13-15天,细胞表现出肝内胚层细胞形态和/或活性。

[1040] 在一些实施方案中,在第28-35天将分化中的细胞在包含一种或多种因子(包括但不限于制瘤素-M、HGF和福斯高林)的培养基中培养。在一些实施方案中,在第28-35天将分化中的细胞在包含制瘤素-M、HGF和福斯高林的第六培养基中培养。在一些实施方案中,该培养基进一步包含化学成分明确的脂质以及胰岛素、转铁蛋白和硒的混合物。

[1041] 在一些实施方案中,在第20-28天,细胞表现出肝细胞样细胞(未成熟肝细胞样细胞)形态和/或活性。在一些实施方案中,在第25-35天,细胞表现出肝细胞样细胞(成熟肝细胞样细胞)形态和/或活性。在一些实施方案中,在第20-35天,细胞包含肝细胞样细胞,该肝细胞样细胞包含未成熟肝细胞样细胞、成熟肝细胞样细胞或两者。在一些实施方案中,根据本技术方法分化的细胞包含至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多的未成熟肝细胞样细胞。在一些实施方案中,根据本技术方法分化的细胞包含至少80%、81、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多的成熟肝细胞样细胞。

[1042] 在一些实施方案中,将成熟肝细胞样细胞在用于维持和/或扩增诸如但不限于原代肝细胞的肝细胞的标准培养基中培养。本文所述的培养基组合物中的任何培养基组合物还可含有维持健康细胞所必需的组分,包括但不限于非必需氨基酸、谷氨酰胺及其类似物。

[1043] 在一些实施方案中,在第0天将多能干细胞在包含活化素A、bFGF、BMP4、LY294002、CHIR99021的第一培养基中培养。之后,在一些实施方案中,在第1天将细胞在包含活化素A、bFGF、BMP4和LY294002的第二培养基中培养。之后在一些实施方案中,在第2天将分化中的

细胞在包含活化素A和bFGF的第三种培养基中培养。之后在一些实施方案中,在第3-7天将分化中的细胞在包含活化素A的第四培养基中培养。之后,在一些实施方案中,在第8-27天将分化中的细胞在包含制瘤素-M和HGF的第五培养基中培养。之后,在一些实施方案中,在第28-35天将分化中的细胞在包含制瘤素-M、HGF和福斯高林的第六培养基中培养。

[1044] 在一些实施方案中,LY294002以以下的浓度存在:约1-20μM、约1-15μM、约1-10μM、约1-8μM、约1-5μM、约2-15μM、约2-10μM、约2-8μM、约1-5μM、约1μM、约2μM、约3μM、约4μM、约5μM、约6μM、约7μM、约8μM、约9μM、约10μM、约11μM、约12μM、约13μM、约14μM、约15μM、约16μM、约17μM、约18μM、约19μM或约20μM。在许多实施方案中,培养基包含浓度为10μM的LY294002。

[1045] 在一些实施方案中,CHIR-99021以以下的浓度存在:约1-15μM、约1-10μM、约1-8μM、约1-5μM、约2-15μM、约2-10μM、约2-8μM、约1-5μM、约1μM、约2μM、约3μM、约4μM、约5μM、约6μM、约7μM、约8μM、约9μM、约10μM、约11μM、约12μM、约13μM、约14μM,或约15μM。在许多实施方案中,培养基包含浓度为3μM的CHIR-99021。

[1046] 在一些实施方案中,活化素A以以下的浓度存在:约20ng/ml-200ng/ml、约25ng/ml-200ng/ml、约30ng/ml-200ng/ml、约40ng/ml-200ng/ml、约50ng/ml-200ng/ml、约60ng/ml-200ng/ml、约70ng/ml-200ng/ml、约80ng/ml-200ng/ml、约90ng/ml-200ng/ml、约100ng/ml-200ng/ml、约20ng/ml-100ng/ml、约30ng/ml-100ng/ml、约40ng/ml-100ng/ml、约50ng/ml-100ng/ml、约60ng/ml-100ng/ml、约70ng/ml-100ng/ml、约20ng/ml、约25ng/ml、约30ng/ml、约35ng/ml、约40ng/ml、约45ng/ml、约50ng/ml、约55ng/ml、约60ng/ml、约65ng/ml、约70ng/ml、约75ng/ml、约80ng/ml、约85ng/ml、约90ng/ml、约95ng/ml、约100ng/ml、约105ng/ml、约110ng/ml、约115ng/ml、约120ng/ml、约125ng/ml、约130ng/ml、约135ng/ml、约140ng/ml、约145ng/ml、约150ng/ml、约155ng/ml、约160ng/ml、约165ng/ml、约170ng/ml、约175ng/ml、约180ng/ml、约185ng/ml、约190ng/ml、约195ng/ml,或约200ng/ml。在许多实施方案中,培养基包含浓度为50ng/ml或100ng/ml的活化素A。

[1047] 在一些实施方案中,bFGF以以下的浓度存在:约5ng/ml、约7ng/ml、约8ng/ml、约10ng/ml、约13ng/ml、约15ng/ml、约17ng/ml、约18ng/ml、约20ng/ml、约23ng/ml、约25ng/ml、约27ng/ml、约28ng/ml、约30ng/ml、约35ng/ml、约37ng/ml、约38ng/ml、约40ng/ml、约43ng/ml、约45ng/ml、约47ng/ml、约48ng/ml、约50ng/ml、约51ng/ml、约52ng/ml、约53ng/ml、约55ng/ml、约58ng/ml、约5ng/ml-40ng/ml、约5ng/ml-30ng/ml、约10ng/ml-40ng/ml、约5ng/ml-20ng/ml,或约10ng/ml-50ng/ml。在一些实施方案中,培养基包含浓度为80ng/ml的bFGF。

[1048] 在一些实施方案中,BMP4以以下的浓度存在:约5ng/ml、约7ng/ml、约8ng/ml、约10ng/ml、约13ng/ml、约15ng/ml、约17ng/ml、约18ng/ml、约20ng/ml、约23ng/ml、约25ng/ml、约27ng/ml、约28ng/ml、约30ng/ml、约35ng/ml、约37ng/ml、约38ng/ml、约40ng/ml、约43ng/ml、约45ng/ml、约47ng/ml、约48ng/ml、约50ng/ml、约51ng/ml、约52ng/ml、约53ng/ml、约55ng/ml、约58ng/ml、约5ng/ml-40ng/ml、约5ng/ml-30ng/ml、约10ng/ml-40ng/ml、约5ng/ml-20ng/ml,或约10ng/ml-50ng/ml。在一些实施方案中,培养基包含浓度为10ng/ml的BMP4。

[1049] 在一些实施方案中,OSM以以下的浓度存在:约5ng/ml、约7ng/ml、约8ng/ml、约10ng/ml、约13ng/ml、约15ng/ml、约17ng/ml、约18ng/ml、约20ng/ml、约23ng/ml、约25ng/

ml、约27ng/ml、约28ng/ml、约30ng/ml、约35ng/ml、约37ng/ml、约38ng/ml、约40ng/ml、约43ng/ml、约45ng/ml、约47ng/ml、约48ng/ml、约50ng/ml、约51ng/ml、约52ng/ml、约53ng/ml、约55ng/ml、约58ng/ml、约5ng/ml-50ng/ml、约5ng/ml-40ng/ml、约5ng/ml-30ng/ml、约30ng/ml-40ng/ml、约5ng/ml-20ng/ml,或约30ng/ml-50ng/ml。在一些实施方案中,培养基包含浓度为10ng/ml的OSM。

[1050] 在一些实施方案中,HGF以以下的浓度存在:约25ng/ml-200ng/ml、约30ng/ml-200ng/ml、约40ng/ml-200ng/ml、约50ng/ml-200ng/ml、约60ng/ml-200ng/ml、约70ng/ml-200ng/ml、约80ng/ml-200ng/ml、约90ng/ml-200ng/ml、约100ng/ml-200ng/ml、约30ng/ml-100ng/ml、约40ng/ml-100ng/ml、约50ng/ml-100ng/ml、约60ng/ml-100ng/ml、约70ng/ml-100ng/ml、约25ng/ml、约30ng/ml、约35ng/ml、约40ng/ml、约45ng/ml、约50ng/ml、约55ng/ml、约60ng/ml、约65ng/ml、约70ng/ml、约75ng/ml、约80ng/ml、约85ng/ml、约90ng/ml、约95ng/ml、约100ng/ml、约105ng/ml、约110ng/ml、约115ng/ml、约120ng/ml、约125ng/ml、约130ng/ml、约135ng/ml、约140ng/ml、约145ng/ml、约150ng/ml、约155ng/ml、约160ng/ml、约165ng/ml、约170ng/ml、约175ng/ml、约180ng/ml、约185ng/ml、约190ng/ml、约195ng/ml,或约200ng/ml。在一些实施方案中,培养基包含浓度为50ng/ml的HGF。

[1051] 在一些实施方案中,福斯高林以以下的浓度存在:约1-20μM、约1-15μM、约1-10μM、约1-8μM、约1-5μM、约2-15μM、约2-10μM、约2-8μM、约1-5μM、约1μM、约2μM、约3μM、约4μM、约5μM、约6μM、约7μM、约8μM、约9μM、约10μM、约11μM、约12μM、约13μM、约14μM、约15μM、约16μM、约17μM、约18μM、约19μM或约20μM。在一些实施方案中,培养基包含浓度为10μM的福斯高林。

[1052] 3D悬浮培养中的肝细胞分化方案

[1053] 可以利用使用3D悬浮培养系统的方法来生成多能干细胞来源的肝细胞样细胞。在一些实施方案中,将多能干细胞维持在标准细胞培养基中以维持分化之前的多能性。

[1054] 在一些实施方案中,在第0天将细胞在包含一种或多种因子(包括但不限于胰岛素、PIK-90、活化素A、bFGF、BMP4和CHIR99021)的培养基中培养。在一些实施方案中,在第0天将多能干细胞在包含胰岛素、PIK-90、活化素A、bFGF、BMP4和CHIR99021的第一培养基中培养。在一些实施方案中,将多能干细胞在有利于低附着或不附着于支持表面的固体支持物(包括本文所述的那些)上培养。在一些实施方案中,该培养基进一步包含以下组分中的一种或多种:人血清白蛋白、化学成分明确的脂质、非必需氨基酸、抗坏血酸-2-磷酸酯、全转铁蛋白、亚硒酸钠和任何促进肝细胞分化和/或细胞健康的另外的试剂。

[1055] 在一些实施方案中,以以下的细胞浓度(细胞密度)培养细胞:约500,000至约5,000,000个细胞/mL,例如,约500,000-5,000,000个细胞/mL;约500,000-4,500,000个细胞/mL;约500,000-4,000,000个细胞/mL;约500,000-3,500,000个细胞/mL;约500,000-3,000,000个细胞/mL;约500,000-2,500,000个细胞/mL;约500,000-2,000,000个细胞/mL;约500,000-2,500,000个细胞/mL;约500,000-1,500,000个细胞/mL;约500,000-1,000,000个细胞/mL;约1,000,000-5,000,000个细胞/mL;约1,000,000-4,500,000个细胞/mL;约1,000,000-4,000,000个细胞/mL;约1,000,000-3,500,000个细胞/mL;约1,000,000-3,000,000个细胞/mL;约1,000,000-2,500,000个细胞/mL;约1,000,000-2,000,000个细胞/mL;约1,000,000-1,500,000个细胞/mL。

[1056] 在一些实施方案中,在低氧条件下培养细胞。在一些实施方案中,低氧条件包括约

0％至约5％氧气的氧气含量,例如约0％-5％、约0％-4％、约0％-3％、约0％-2％、约0％-3％、约0％-4％、约1％-5％、约1％-4％、约1％-3％、约1％-2％、约2％-3％、约3％-4％、约4％-5％、约2％-5％和约3％-5％的氧气含量。在一些实施方案中,细胞形成为聚集体。

[1057] 在一些实施方案中,细胞聚集体的直径在约100-250μm之间,例如直径为约100-250μm、约100-240μm、约100-230μm、约100-220μm、约100-210μm、约100-200μm、约110-250μm、约120-250μm、约130-250μm、约140-250μm、约150-250μm、约160-250μm、约100-200μm、约100-190μm、约100-180μm、约100-170μm、约140-250μm、约140-250μm、约140-240μm、约140-230μm、约140-220μm、约140-210μm、约140-200μm、约140-190μm。

[1058] 在一些实施方案中,在第1天将分化中的细胞聚集体在包含一种或多种因子(包括但不限于胰岛素、PIK-90、活化素A、bFGF和BMP4)的培养基中培养。在一些实施方案中,在第1天将细胞聚集体在包含胰岛素、PIK-90、活化素A、bFGF和BMP4的第二培养基中培养。在一些实施方案中,该培养基进一步包含以下组分中的一种或多种:人血清白蛋白、化学成分明确的脂质、非必需氨基酸、抗坏血酸-2-磷酸酯、全转铁蛋白、亚硒酸钠和任何促进肝细胞分化和/或细胞健康的另外的试剂。在一些实施方案中,从第0-21天将概述的细胞在低氧条件下培养。

[1059] 在一些实施方案中,在第2天将分化中的细胞聚集体在包含一种或多种因子(包括但不限于胰岛素、PIK-90、活化素A和bFGF)的培养基中培养。在一些实施方案中,在第2天将细胞聚集体在包含胰岛素、PIK-90、活化素A和bFGF的第三培养基中培养。在一些实施方案中,该培养基进一步包含以下组分中的一种或多种:人血清白蛋白、化学成分明确的脂质、非必需氨基酸、抗坏血酸-2-磷酸酯、全转铁蛋白、亚硒酸钠和任何促进肝细胞分化和/或细胞健康的另外的试剂。

[1060] 在一些实施方案中,在第3-5天将分化中的细胞聚集体在包含一种或多种因子(包括但不限于B27补充剂和活化素A)的培养基中培养。在一些实施方案中,在第3-5天将细胞聚集体在包含B27补充剂和活化素A的第四培养基中培养。在一些实施方案中,该培养基进一步包括一些实施方案,该培养基还包含以下组分中的一个或多个组分:人血清白蛋白、化学成分明确的脂质、非必需氨基酸、抗坏血酸-2-磷酸酯、全转铁蛋白、亚硒酸钠和任何促进肝细胞分化和/或细胞健康的另外的试剂。可以每天、每隔一天或根据需要更新、更换或替换培养基。

[1061] 在一些实施方案中,在第6-9天将分化中的细胞聚集体在包含一种或多种因子(包括但不限于B27补充剂、BMP4和FGF10)的培养基中培养。在一些实施方案中,在第6-9天将细胞聚集体在包含B27补充剂、BMP4和FGF10的第五培养基中培养。在一些实施方案中,该培养基进一步包含以下组分中的一种或多种:人血清白蛋白、化学成分明确的脂质、非必需氨基酸、抗坏血酸-2-磷酸酯、全转铁蛋白、亚硒酸钠和任何促进肝细胞分化和/或细胞健康的另外的试剂。可以每天、每隔一天或根据需要更新、更换或替换培养基。

[1062] 在一些实施方案中,在第10-14天将分化中的细胞聚集体在包含一种或多种因子(包括但不限于HGF)的培养基中培养。在一些实施方案中,在第10-14天将细胞聚集体在包含HGF的第六培养基中培养。在一些实施方案中,该培养基进一步包含化学成分明确的脂质以及胰岛素、转铁蛋白和硒的混合物。可以每天、每隔一天或根据需要更新、更换或替换培养基。

[1063] 在一些实施方案中,在第15-27天将分化中的细胞在包含一种或多种因子(包括但不限于制瘤素-M)的培养基中培养。在一些实施方案中,在第15-27天将细胞聚集体在包含制瘤素-M的第七培养基中培养。在一些实施方案中,处于此分化阶段的培养基不含HGF。在一些实施方案中,该培养基进一步包含化学成分明确的脂质以及胰岛素、转铁蛋白和硒的混合物。可以每天、每隔一天或根据需要更新、更换或替换培养基。

[1064] 在一些实施方案中,在第28-35天将分化中的细胞在包含一种或多种因子(包括但不限于制瘤素-M和福斯高林)的培养基中培养。在许多实施方案中,在第28-35天将细胞聚集体在包含制瘤素-M和福斯高林的第八培养基中培养。在一些实施方案中,处于此分化阶段的培养基不含HGF。在一些实施方案中,该培养基进一步包含化学成分明确的脂质以及胰岛素、转铁蛋白和硒的混合物。可以每天、每隔一天或根据需要更新、更换或替换培养基。

[1065] 在一些实施方案中,在第15-35天,细胞包含肝细胞样细胞,该肝细胞样细胞包含未成熟肝细胞样细胞、成熟肝细胞样细胞或两者。在一些实施方案中,根据本技术的方法分化的细胞包含至少80%、81、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多的未成熟肝细胞样细胞。在一些实施方案中,根据本技术方法分化的细胞包含至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的成熟肝细胞样细胞。

[1066] 在一些实施方案中,将细胞聚集体在常氧(正常氧)条件下培养。在一些实施方案中,常氧条件包括约20%至约22%氧气的氧气含量,例如,约20%-22%、约20%-21%、约21%-22%、约20%、约21%和约22%的氧气含量。换句话说,常氧条件包括环境中的O2水平。在一些实施方案中,在至少第15-27天、第21-27天、第20-28天、第20-35天、第27-35天、第28-35天、第29-35天或第30-35天将细胞聚集体在常氧条件下培养。

[1067] 在一些实施方案中,在第0天将多能干细胞在包含胰岛素、PIK-90、活化素A、bFGF、BMP4和CHIR99021的第一培养基中培养。在第0天,细胞形成聚集体(也称为球体)。之后,在一些实施方案中,在第1天将细胞聚集体在包含胰岛素、PIK-90、活化素A、bFGF和BMP4的第二培养基中培养。之后,在一些实施方案中,在第2天将细胞聚集体在包含胰岛素、PIK-90、活化素A和bFGF的第三培养基中培养。之后,在一些实施方案中,在第3-5天将细胞聚集体在包含B27补充剂和活化素A的第四培养基中培养。之后,在一些实施方案中,在第6-9天将细胞聚集体在包含B27补充剂、BMP4和FGF10的第五培养基中培养。之后,在一些实施方案中,在第10-14天将细胞聚集体在包含HGF的第六培养基中培养。之后,在一些实施方案中,在第15-27天将细胞聚集体在包含制瘤素-M的第七培养基中培养。之后,在一些实施方案中,在第28-35天将细胞聚集体在包含制瘤素-M和福斯高林的第八培养基中培养。

[1068] 在一些实施方案中,分化中的细胞在第0-2天表现出定形内胚层细胞特征。在一些实施方案中,分化中的细胞在第3-5天表现出前层定形内胚层细胞特征。在一些实施方案中,分化中的细胞在第6-9天表现出前肠内胚层细胞特征。在一些实施方案中,分化中的细胞在第10-14天表现出肝内胚层细胞特征。在一些实施方案中,分化中的细胞在第15-35天表现出未成熟肝细胞样细胞特征。

[1069] 在一些实施方案中,胰岛素以以下的浓度存在:约0.1μg/ml、约0.2μg/ml、约0.3μg/ml、约0.4μg/ml、约0.5μg/ml、约0.6μg/ml、约0.1μg/ml-约0.6μg/ml、约0.1μg/ml-约0.5μ

g/ml、约0.1μg/ml-约0.4μg/ml、约0.2μg/ml-约0.6μg/ml、约0.2μg/ml-约0.5μg/ml,或约0.2μg/ml-约0.4μg/ml。在一些实施方案中,培养基包含浓度为0.2μg/ml的胰岛素。

[1070] 在一些实施方案中,PIK-90以以下的浓度存在:约0.1μM、约0.2μM、约0.3μM、约0.4μM、约0.5μM、约0.6μM、约0.1μM-约0.6μM、约0.1μM-约0.5μM、约0.1μM-约0.4μM、约0.2μM-约0.6μM、约0.2μM-约0.5μM,或约0.2μM约0.4μM。在一些实施方案中,培养基包含浓度为0.1μM的PIK-90。

[1071] 在一些实施方案中,CHIR-99021以以下的浓度存在:约1-15μM、约1-10μM、约1-8μM、约1-5μM、约2-15μM、约2-10μM、约2-8μM、约1-5μM、约1μM、约2μM、约3μM、约4μM、约5μM、约6μM、约7μM、约8μM、约9μM、约10μM、约11μM、约12μM、约13μM、约14μM,或约15μM。在一些实施方案中,培养基包含浓度为3μM的CHIR-99021。

[1072] 在一些实施方案中,活化素A以以下的浓度存在:约20ng/ml-200ng/ml、约25ng/ml-200ng/ml、约30ng/ml-200ng/ml、约40ng/ml-200ng/ml、约50ng/ml-200ng/ml、约60ng/ml-200ng/ml、约70ng/ml-200ng/ml、约80ng/ml-200ng/ml、约90ng/ml-200ng/ml、约100ng/ml-200ng/ml、约20ng/ml-100ng/ml、约30ng/ml-100ng/ml、约40ng/ml-100ng/ml、约50ng/ml-100ng/ml、约60ng/ml-100ng/ml、约70ng/ml-100ng/ml、约20ng/ml、约25ng/ml、约30ng/ml、约35ng/ml、约40ng/ml、约45ng/ml、约50ng/ml、约55ng/ml、约60ng/ml、约65ng/ml、约70ng/ml、约75ng/ml、约80ng/ml、约85ng/ml、约90ng/ml、约95ng/ml、约100ng/ml、约105ng/ml、约110ng/ml、约115ng/ml、约120ng/ml、约125ng/ml、约130ng/ml、约135ng/ml、约140ng/ml、约145ng/ml、约150ng/ml、约155ng/ml、约160ng/ml、约165ng/ml、约170ng/ml、约175ng/ml、约180ng/ml、约185ng/ml、约190ng/ml、约195ng/ml或约200ng/ml。在一些实施方案中,培养基包含浓度为50ng/ml或100ng/ml的活化素A。

[1073] 在一些实施方案中,bFGF以以下的浓度存在:约5ng/ml、约7ng/ml、约8ng/ml、约10ng/ml、约13ng/ml、约15ng/ml、约17ng/ml、约18ng/ml、约20ng/ml、约23ng/ml、约25ng/ml、约27ng/ml、约28ng/ml、约30ng/ml、约35ng/ml、约37ng/ml、约38ng/ml、约40ng/ml、约43ng/ml、约45ng/ml、约47ng/ml、约48ng/ml、约50ng/ml、约51ng/ml、约52ng/ml、约53ng/ml、约55ng/ml、约58ng/ml、约5ng/ml-40ng/ml、约5ng/ml-30ng/ml、约10ng/ml-40ng/ml、约5ng/ml-20ng/ml,或约10ng/ml-50ng/ml。在一些实施方案中,培养基包含浓度为10ng/ml或40ng/ml的bFGF。

[1074] 在一些实施方案中,BMP4以以下的浓度存在:约5ng/ml、约7ng/ml、约8ng/ml、约10ng/ml、约13ng/ml、约15ng/ml、约17ng/ml、约18ng/ml、约20ng/ml、约23ng/ml、约25ng/ml、约27ng/ml、约28ng/ml、约30ng/ml、约35ng/ml、约37ng/ml、约38ng/ml、约40ng/ml、约43ng/ml、约45ng/ml、约47ng/ml、约48ng/ml、约50ng/ml、约51ng/ml、约52ng/ml、约53ng/ml、约55ng/ml、约58ng/ml、约5ng/ml-40ng/ml、约5ng/ml-30ng/ml、约10ng/ml-40ng/ml、约5ng/ml-20ng/ml,或约10ng/ml-50ng/ml。在一些实施方案中,培养基包含浓度为10ng/ml或20ng/ml的BMP4。

[1075] 在一些实施方案中,OSM以以下的浓度存在:约5ng/ml、约7ng/ml、约8ng/ml、约10ng/ml、约13ng/ml、约15ng/ml、约17ng/ml、约18ng/ml、约20ng/ml、约23ng/ml、约25ng/ml、约27ng/ml、约28ng/ml、约30ng/ml、约35ng/ml、约37ng/ml、约38ng/ml、约40ng/ml、约43ng/ml、约45ng/ml、约47ng/ml、约48ng/ml、约50ng/ml、约51ng/ml、约52ng/ml、约53ng/

ml、约55ng/ml、约58ng/ml、约5ng/ml-50ng/ml、约5ng/ml-40ng/ml、约5ng/ml-30ng/ml、约30ng/ml-40ng/ml、约5ng/ml-20ng/ml,或约30ng/ml-50ng/ml。在一些实施方案中,培养基包含浓度为30ng/ml的OSM。

[1076] 在一些实施方案中,HGF以以下的浓度存在:约25ng/ml-200ng/ml、约30ng/ml-200ng/ml、约40ng/ml-200ng/ml、约50ng/ml-200ng/ml、约60ng/ml-200ng/ml、约70ng/ml-200ng/ml、约80ng/ml-200ng/ml、约90ng/ml-200ng/ml、约100ng/ml-200ng/ml、约30ng/ml-100ng/ml、约40ng/ml-100ng/ml、约50ng/ml-100ng/ml、约60ng/ml-100ng/ml、约70ng/ml-100ng/ml、约25ng/ml、约30ng/ml、约35ng/ml、约40ng/ml、约45ng/ml、约50ng/ml、约55ng/ml、约60ng/ml、约65ng/ml、约70ng/ml、约75ng/ml、约80ng/ml、约85ng/ml、约90ng/ml、约95ng/ml、约100ng/ml、约105ng/ml、约110ng/ml、约115ng/ml、约120ng/ml、约125ng/ml、约130ng/ml、约135ng/ml、约140ng/ml、约145ng/ml、约150ng/ml、约155ng/ml、约160ng/ml、约165ng/ml、约170ng/ml、约175ng/ml、约180ng/ml、约185ng/ml、约190ng/ml、约195ng/ml,或约200ng/ml。在一些实施方案中,培养基包含浓度为50ng/ml的HGF。

[1077] 在一些实施方案中,福斯高林以以下的浓度存在:约1-20μM、约1-15μM、约1-10μM、约1-8μM、约1-5μM、约2-15μM、约2-10μM、约2-8μM、约1-5μM、约1μM、约2μM、约3μM、约4μM、约5μM、约6μM、约7μM、约8μM、约9μM、约10μM、约11μM、约12μM、约13μM、约14μM、约15μM、约16μM、约17μM、约18μM、约19μM或约20μM。在一些实施方案中,培养基包含浓度为10μM的福斯高林。

[1078] 如本文所述的肝细胞可用于治疗与肝功能障碍相关的疾病或病症。

[1079] 描述了治疗患有肝脏疾病的受试者的方法。在一些实施方案中,该方法包括诸如通过以下方式向受试者施用本文所述的肝脏干细胞:使该肝脏干细胞与受试者的肝脏在体内接触或者将该肝脏干细胞移植到受试者的肝脏中,其中施用或移植的细胞整合到受试者的肝脏中并重新填充受试者的肝脏,从而治疗肝脏疾病。在一些实施方案中,该方法包括诸如通过以下方式向受试者施用本文所述的分化的肝脏干细胞或干细胞来源的细胞:使该分化的肝脏干细胞或干细胞来源的细胞与受试者的肝脏在体内接触或者将肝脏干细胞或干细胞来源的细胞移植到受试者的肝脏中,其中施用或移植的细胞整合到受试者的肝脏中并重新填充受试者的肝脏,从而治疗肝脏疾病。在一些实施方案中,肝脏疾病选自代谢疾病、自身免疫性疾病、感染性疾病、药物诱导的急性和慢性肝脏衰竭、肝硬化和肝癌的组。

[1080] 例如,本文所述的肝细胞可用于治疗肝脏硬化。因此,此类肝细胞可用于肝脏硬化患者的肝脏再生。

[1081] 肝脏干细胞(LSC)及其分化的肝细胞(dHep)和胆道细胞具有治疗由不同肝脏疾病引起的肝脏硬化的潜力。可以将体外来源的自体LSC、dHep和胆道细胞递送到同一患者中,以挽救肝脏衰竭并减轻肝脏硬化。LSC可来源于同一患者,并在体外被培养以进行扩增。dHep和胆道细胞从LSC体外分化而来。这些干细胞和分化的细胞是自体的,并且不会在患者中诱导移植排斥。

[1082] 肝脏干细胞(LSC)及其分化的肝细胞(dHep)和胆道细胞具有治疗由不同肝脏疾病引起的肝脏硬化的潜力。可以将体外来源的同种异体LSC、dHep和胆道细胞递送到患者中,以挽救肝脏衰竭并减轻肝脏硬化。LSC可来自供体,并在体外被培养以进行扩增。dHep和胆道细胞可以从LSC体外分化而来。这些干细胞和分化的细胞是同种异体的,并且在经受本文所述的低免疫修饰中的一些或全部低免疫修饰的情况下,不会在患者中诱导移植排斥。

[1083] WO2016200340A1证明,肝脏干细胞和分化的肝脏干细胞(dHep)在被移植到用用于诱导肝脏硬化小鼠的硫代乙酰胺处理的小鼠中时都挽救了肝脏硬化表型。持续用硫代乙酰胺处理2-3个月后,该小鼠出现肝脏硬化。如WO2016200340A1所述,可以通过脾内注射将肝脏干细胞或肝脏干细胞分化的dHep细胞移植到小鼠中。移植后,小鼠可再继续接受3个月的药物治疗。可在第三个月检测小鼠的肝脏功能。经移植的小鼠组的血清白蛋白可比未经移植的对照组高。它们的肝功能因此可能得到部分挽救。接受移植的dHEP细胞的小鼠的肝脏的纤维化和炎症可比对照组少。dHep可被重新填充在经移植的小鼠肝脏中。肝脏干细胞和dHEP细胞都可以整合到小鼠肝脏组织中并表达人特异性白蛋白。

[1084] 可使用本文所述的肝细胞治疗的疾病和病症包括但不限于克里格勒-纳贾尔综合征1型(Crigler-Najjar syndrome type 1);家族性高胆固醇血症;因子VII缺乏症;糖原累积病I型;婴儿雷夫苏姆病(infantile Refsum's disease);进行性家族性肝内胆汁淤积症2型;遗传性酪氨酸血症1型;以及各种尿素循环缺陷;急性肝脏衰竭,包括药物诱导的急性肝脏衰竭的青少年和成年患者;病毒诱导的急性肝脏衰竭;特发性急性肝脏衰竭;蘑菇中毒诱导的急性肝脏衰竭;术后急性肝脏衰竭;妊娠急性脂肪肝诱导的急性肝脏衰竭;慢性肝脏疾病,包括肝硬化和/或纤维化;由以下急性事件之一诱导的慢加急性肝脏疾病:饮酒、服药和/或乙型肝炎发作。因此,患者可能患有这些或其他肝脏疾患中的一种或多种。

[1085] 可使用本文所述的肝细胞治疗的疾病和病症包括肝细胞特异性的(肝细胞内在的)功能障碍。例如,该疾病和/或病症的功能障碍和病因可能是由于或主要归因于受试者内存在的内源性肝细胞的功能障碍。在一些实施方案中,肝细胞特异性功能障碍可能是遗传的或者可能被受试者遗传。在一些实施方案中,该疾病或病症的病因基本上不涉及除肝细胞以外的细胞类型。在一些实施方案中,该疾病或病症导致肝脏功能下降、肝脏疾病(急性或慢性),或来源于内源性肝细胞的其他不良状况。因此,在一些实施方案中,例如在该疾病是内源性肝细胞群体内在的情况下,有效的治疗可以包括用如本文所述的肝细胞替换、补充、移植或重新填充。不受理论的束缚,在肝细胞内在的疾病/病症中,内源性肝细胞的替换和/或补充可导致显著的临床改善,而该疾病/病症不会对移植的肝细胞产生负面影响。例如,在受试者患有影响肝细胞功能(例如,肝细胞内的氨基酸代谢,诸如高酪氨酸血症)的遗传性病症的情况下,同种异体移植的肝细胞可能实质上不受受试者体内的疾病/病症的存在的影响。因此,移植的肝细胞可在受试者体内大量植入、存活、扩增和/或重新填充,从而产生显著的积极临床结局。

[1086] 以肝细胞特异性的(肝细胞内在的)功能障碍为特征的疾病和病症可与具有非肝细胞特异性的病因且涉及肝细胞外在因素的疾病和病症形成对比。具有肝细胞外在的因素和/或病因的疾病的实例包括但不限于例如酒精性脂肪性肝炎、酒精性肝脏疾病(ALD)、肝脂肪变性/非酒精性脂肪性肝脏疾病(NAFLD)等。肝细胞外在的疾病涉及外部的或来源于内源性肝细胞之外的肝损伤,诸如酒精、饮食、感染等。在一些实施方案中,根据本文所述的方法治疗的疾病和病症可以包括非肝细胞特异性的(肝细胞内在的)功能障碍的疾病和病症。

[1087] 肝细胞内在的和肝细胞相关的疾病的实例包括肝脏相关酶缺乏症、肝细胞相关转运疾病等。此类肝脏相关缺乏症可能是获得性或遗传性疾病,并且可包括代谢疾病(例如,基于肝脏的代谢病症)。遗传性的基于肝脏的代谢病症可以称为“肝脏的遗传性代谢疾病”,诸如但不限于,Ishak,Clin Liver Dis(2002)6:455-479中描述的那些疾病。在一些情况

下,肝脏相关的缺乏症可能会导致急性和/或慢性肝脏疾病,包含例如,急性和/或慢性肝脏疾病是该缺乏症在尚未得到治疗或治疗不足时的结果的情况。遗传性肝脏相关酶缺乏症、肝细胞相关转运疾病等的非限制性实例包含克里格勒-纳贾尔综合征(Crigler-Najjar syndrome)1型;家族性高胆固醇血症、因子VII缺乏症、糖原贮积病I型、小儿雷弗素姆氏病(infantile Refsum's disease)、进行性家族性肝内胆汁淤积症2型、遗传性酪氨酸血症(例如,遗传性酪氨酸血症1型)、遗传性尿素循环缺陷、苯丙酮尿症(PKU)、遗传性血色素沉着症、α-I抗胰蛋白酶缺乏症(AATD)、威尔逊病等。肝脏的遗传代谢疾病(包含具有至少一些肝脏表型、病理学和/或肝脏相关症状)的代谢疾病的非限制性实例包含5-β还原酶缺乏症、AACT缺乏症、阿斯科格综合征(Aarskog syndrome)、无β脂蛋白血症、肾上腺脑白质营养不良、阿尔珀斯病(Alpers disease)、阿尔珀斯综合征、α-1-抗胰蛋白酶缺乏症、抗凝血酶III缺乏症、精氨酸酶缺乏症、精氨琥珀酸尿症、肝动脉发育不良症、自身免疫性淋巴增殖综合征、良性复发性胆汁淤积、β-地中海贫血、布卢姆综合征(Bloom syndrome)、巴德-吉亚利综合征(Budd-Chiari syndrome)、碳水化合物缺乏的糖蛋白综合征、神经酰胺酶缺乏症、蜡样脂褐质沉积症、胆固醇脂贮积病、胆固醇酯贮积病、慢性肉芽肿、慢性丙型肝炎、克里格勒—纳贾二氏综合征(Crigler-Najjar syndrome)、囊性纤维化、胱氨酸病、糖尿病、杜宾-约翰逊综合征(Dubin-Johnson syndrome)、地方性蒂罗尔肝硬化(endemic Tyrolean cirrhosis)、红细胞生成性原卟啉症、法布里病(Fabry disease)、家族性高胆固醇血症、家族性脂肪性肝炎、纤维蛋白原贮积病、半乳糖血症、神经节苷脂沉积症、高雪氏(Gaucher disease)、遗传性血色素沉着症、糖原病1a型、糖原病2型、糖原病3型、糖原病4型、肉芽肿病、肝家族性淀粉样变性、遗传性果糖不耐受症、遗传性球形红细胞症、赫曼斯基-普德拉克综合征(Hermansky-Pudlak syndrome)、高胱氨酸尿症、高草酸尿症、低β脂蛋白血症、低纤维蛋白原血症、妊娠期肝内胆汁淤积症、拉福拉病(Lafora disease)、脂酰胺脱氢酶缺乏症、脂蛋白病症、莫里阿克综合征(Mauriac syndrome)、异染性脑白质营养不良、线粒体细胞病、纳瓦霍神经肝病(Navajo neurohepatopathy)、尼曼-匹克病(Niemann-Pick disease)、无综合征性胆道缺乏症、北美印第安印度儿童肝硬化(North American Indian childhood cirrhosis)、鸟氨酸氨甲酰基转移酶缺乏症、部分脂肪营养不良、皮尔森综合征(Pearson syndrome)、迟发性皮肤卟啉症、进行性家族性肝内胆汁淤积症、进行性家族性肝内胆汁淤积症1型、进行性家族性肝内胆汁淤积症2型、蛋白C缺乏症、舒氏综合征(Shwachman syndrome)、丹吉尔病(Tangier disease)、血小板减少性紫癜、总脂肪营养不良、1型糖原病、蒂罗尔肝硬化(Tyrolean cirrhosis)、酪氨酸血症、尿素循环障碍、静脉闭塞病、威尔逊病(Wilson disease)、沃尔曼病(Wolman disease)、X-连锁高IgM综合征和齐薇格综合征(Zellweger syndrome)。

[1088] 根据本文所述的方法对受试者的治疗可以产生各种临床益处和/或可测量的结局,包括但不限于例如存活期延长、疾病进展延迟(例如,肝脏衰竭延迟)、肝脏衰竭得到预防、肝脏功能得到改善和/或正常化、氨基酸水平得到改善和/或正常化、氨水平得到改善和/或正常化、白蛋白水平得到改善和/或正常化、胆红素得到改善和/或正常化、从无法茁壮成长的表型中恢复、嗜睡减少、迟钝减少、癫痫减少、黄疸减少、血清葡萄糖得到改善和/或正常化、INR得到改善和/或正常化、尿液测试结果得到改善和/或正常化等。

[1089] 例如,在一些情况下,相比于例如根据护理标准治疗和/或施用了尚未如本文所述

进行遗传修饰的肝细胞和/或肝细胞祖细胞的受试者,如本文所述的经遗传修饰的肝细胞和/或肝细胞祖细胞的施用使患有肝脏疾病和/或导致肝脏衰竭的疾患的受试者的存活期增加了至少5%。此种受试者中的观察到的增强的存活水平可以变化并且范围可以为增加至少5%到60%或更多,包含但不限于例如存活期增加至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%或更多。在一些实施方案中,施用了如本文所述的经遗传修饰的肝细胞和/或其祖细胞的受试者可能经历疾病进展和/或一种或多种疾病症状(诸如但不限于例如肝脏衰竭和/或可归因于肝脏衰竭的任何一种或多种症状)的发作的延迟。此种疾病进展和/或症状发作的延迟可以持续数天、数周、数月或数年,包含但不限于例如至少一周、至少一个月、至少2个月、至少3个月、至少4个月、至少5个月、至少6个月、至少一年或更长时间。施用于患者的如本文所述的肝细胞随着时间的推移在患者中产生有益的治疗响应。

[1090] 可被治疗的肝脏疾患的非限制性实例包括急性间歇性卟啉症、急性肝脏衰竭、阿拉吉欧综合征、酒精性脂肪性肝脏疾病、酒精性肝炎、酒精性肝脏硬化、酒精性肝脏疾病、α1-抗胰蛋白酶缺乏症、阿米巴肝脏脓肿、自身免疫性肝炎、胆汁性肝脏硬化、布-加综合征(budd-chiari syndrome)、化学和药物诱导的肝脏损伤、胆汁淤积、慢性肝炎、慢性乙型肝炎、慢性丙型肝炎、慢性丁型肝炎、终末期肝脏疾病、红细胞生成性原卟啉症、片形吸虫病、脂肪性肝脏疾病、局灶性结节性增生、肝包虫病、肝性脑病、肝梗塞、肝功能不全、肝卟啉症、肝结核、肝静脉闭塞性疾病、肝炎、肝细胞癌、肝红细胞生成性卟啉症、肝豆状核变性、肝肿大、肝肺综合征、肝肾综合征、遗传性粪卟啉症、肝脏脓肿、肝脏细胞腺瘤、肝脏硬化、肝脏衰竭、肝脏赘生物、大面积肝坏死、非酒精性脂肪性肝脏疾病、寄生虫性肝脏疾病、肝紫癜、迟发性皮肤卟啉症、门脉高压症、化脓性肝脏脓肿、雷氏综合征、多样化卟啉症、病毒性肝炎、病毒性甲型肝炎、病毒性乙型肝炎、病毒性丙型肝炎、病毒性丁型肝炎、病毒性戊型肝炎和泽尔韦格综合征(zellweger syndrome)等。在一些情况下,可以治疗受试者的纤维化或纤维化疾患。在一些情况下,可以治疗受试者的肝硬化或肝硬化疾患。

[1091] 本文所述的治疗可以慢性(即连续)或非慢性(即非连续)进行,并且可以包括慢性(即连续)或非慢性(即非连续)施用一种或多种剂。根据本文所述的方法对一种或多种剂的慢性施用可用于各种情况,包括例如受试者患有慢性疾患的情况,该慢性疾患包括例如慢性肝脏疾患(例如慢性肝脏疾病、肝硬化、酒精性肝脏疾病、非酒精性脂肪肝脏疾病(NAFLD/NASH)、慢性病毒性肝炎等)、慢性遗传性肝脏疾患(α-1抗胰蛋白酶缺乏症、遗传性血色素沉着症、威尔逊病等)、慢性肝脏相关自身免疫性疾患(例如原发性胆汁性肝硬化(PBC)、原发性硬化性胆管炎(PSC)、自身免疫性肝炎(AIH)等)等。针对慢性疾患的一种或多种剂的施用可包括但不限于施用该剂数月、一年或更长时间、数年等。此种慢性施用可以以任何方便和适当的时给药时间表进行,该给药时间表包括但不限于例如每日、每日两次、每周、每周两次、每月、每月两次等。在一些情况下,例如在遗传疾患纠正或其他持续性基因疗法的情况下,慢性疾患可以通过单次或几次(例如2、3、4或5次)治疗来治疗。一种或多种剂的非慢性施用可以包括但不限于例如施用一个月或更短时间(包括例如几周的时段、一周、几天的时段)、有限次数的剂量(例如少于10次剂量,例如9次剂量或更少、8次剂量或更少、7次剂量或更少等,包括单次剂量)。

[1092] 在一些实施方案中,施用于受试者的经遗传修饰的肝细胞的量可以包括例如至少

1000万、至少2500万、至少5000万、至少7500万、至少1亿、至少2.5亿、至少5亿、至少7.5亿、至少10亿、至少20亿、至少30亿、至少40亿、至少50亿、至少60亿、至少70亿、至少80亿、至少90亿、至少100亿、至少150亿、至少200亿、至少300亿、至少400亿、至少500亿、至少600亿、至少700亿、至少800亿、至少900亿或至少1000亿个肝细胞。可以将经遗传修饰的肝细胞以单次剂量或多次剂量递送给有需要的受试者。

[1093] 用于任何特定受试者的具体剂量水平和给药频率可能有所不同,并且取决于多种因素,包括一种或多种组合物中的细胞的活性,组合物中的细胞的稳定性和作用时长,受试者的年龄、体重、总体健康状况、性别和饮食,施用方式和时间,共同施用的一种或多种药物组合,以及经受疗法的宿主的疾患的严重程度。

[1094] 上面列出的疗法的实例不应被解读为限制性的,在如所描述的那样鉴定的受试者中产生所需治疗结局的实质上任何适当的疗法都可以采用。

[1095] 本文提供的肝细胞样细胞可用于任何需要恢复或补充肝功能的受试者的疗法中。可适合于此种疗法的人疾患包括但不限于任何原因引起的暴发性肝衰竭、病毒性肝炎、药物诱导的肝脏损伤、肝硬化、遗传性肝功能不全(如威尔逊氏病(Wilson's disease)、吉尔伯特综合征(Gilbert's syndrome)或α1-抗胰蛋白酶缺乏症)、肝胆癌、自身免疫性肝脏疾病(诸如自身免疫性慢性肝炎或原发性胆汁性肝硬化)以及导致肝功能受损的任何其他疾患。

[1096] 在一些实施方案中,本文提供的肝细胞样细胞被封装或成为生物人工肝脏装置的一部分。用于临床使用的生物人工器官被设计用于支持肝功能受损的个体-作为长期疗法的一部分,或作为爆发性肝衰竭与肝重建或肝脏移植之间的过渡期。例如,美国专利号5,290,684、5,624,840、5,837,234、5,853,717和5,935,849中公开了生物人工肝脏装置。悬浮型生物人工肝脏包含悬浮在板透析器中、微胶囊化在合适的基底中,或附着于包被有细胞外基质的微载体珠的细胞。可替代地,可以将肝细胞放置在填充床中、多板平板床中、微通道筛网上或中空纤维毛细管周围的固体支持物上。该装置具有受试者的血液从中通过的入口和出口,并且有时还具有一组单独的端口用于为细胞提供营养

[1097] 根据本文所述的方法制备肝细胞,然后将其铺板到该装置中的适合的基底(诸如Matrigel®或胶原蛋白基质)上。通过比较传入通道中的血液成分和传出通道中的血液成分(即就传入血流中去除的代谢物和传出血流中新合成的蛋白质而言),可以评估该装置的功效。

[1098] 这种类型的装置可用于对诸如血液的流体进行解毒,其中该流体与本技术某些方面中提供的肝细胞在允许该细胞去除或改变该流体中的毒素的条件下接触。该解毒将涉及去除或改变至少一种通常由肝脏加工的配体、代谢物或其他化合物(天然的和合成的)。此类化合物包括但不限于胆红素、胆汁酸、尿素、血红素、脂蛋白、碳水化合物、转铁蛋白、血红素结合蛋白、去唾液酸糖蛋白、像胰岛素和胰高血糖素之类的激素,以及各种小分子药物。该装置还可用于将传出流体富集为具有合成的蛋白质(诸如白蛋白、急性期反应物和未经负载的运载蛋白质)。该装置可以被优化成使得执行这些功能中的多种功能,从而恢复所需的尽可能多的肝功能。在治疗护理的背景下,该装置对从肝细胞衰竭患者流出的血液进行加工,然后将血液返回给患者。

[1099] c.T细胞

[1100] 可以在细胞疗法产品制造过程的任何阶段对待用于细胞疗法产品中的T细胞进行针对供体能力的特性分析。

[1101] 细胞疗法产品中使用的T细胞可以是原代T细胞。如本文任何地方所描述的用于对细胞群体进行针对供体能力的特性分析的方法可以对原代(例如,经基因组编辑的)T细胞进行。

[1102] 如本文其他地方所述,细胞疗法产品中使用的T细胞可以是多能干细胞(iPSC)来源的T细胞。如本文任何地方所描述的用于对细胞群体进行针对供体能力的特性分析的方法也可以对能够分化形成T细胞的干细胞进行。如本文任何地方所描述的用于对细胞群体进行针对供体能力的特性分析的方法也可以对干细胞来源的(例如,经基因组编辑的)T细胞进行。

[1103] 如本公开的上下文中提及的有关T细胞的相关信息(包括关于T细胞在被用于细胞疗法时的所需特征的某些信息)在本领域中是已知的。应当理解,本文所述的关于T细胞的实施方案可以容易且适当地,应当理解,本文所述的关于T细胞的实施方案可以容易且适当地与描述HIP细胞(例如,表现出降低的MHC I类和/或MHC II类分子中的一种或多种分子的表达以及增加的至少一种致耐受因子的表达)的实施方案以及描述安全开关和如本文所述的其他经修饰的/经基因(例如CAR转基因)编辑的细胞的实施方案相组合。可以在细胞疗法产品制造过程的任何阶段对待用于细胞疗法产品中的T细胞进行针对供体能力的特性分析。可以在细胞疗法产品制造期间的编辑过程的任何阶段对待用于细胞疗法产品中的T细胞进行针对供体能力的特性分析。

[1104] 本文所述的T细胞可用于治疗或预防受试者的疾病。

[1105] 在一些实施方案中,如本文所提供的那样被工程化或修饰的细胞是原代T淋巴细胞(也称为T细胞)。在一些实施方案中,原代T淋巴细胞分离或获得自一个或多个个体供体受试者,诸如一个或多个个体健康供体(例如,未知或未被怀疑患有疾病或感染(例如,未表现出疾病或感染的临床体征)的受试者)。在一些情况下,T细胞是来自一个或多个个体的原代T细胞群体。在一些情况下,T细胞是来自一个或多个个体的原代T细胞的亚群或亚型或亚组。本文下文进一步详细描述了原代T细胞的亚群和亚型和亚组。如本领域技术人员将理解的,从个体分离或获得T淋巴细胞的方法可以使用已知技术来实现。本文提供了含有本文所述的修饰(例如遗传修饰)的经工程化的原代T淋巴细胞,用于随后移植或植入到受试者(例如,接受者)中。

[1106] 在一些实施方案中,从受试者或个体获得(例如,收获、提取、移除或取出)原代T细胞。在一些实施方案中,由T细胞集合产生原代T细胞,使得该T细胞来自一个或多个受试者(例如,一个或多个人,包括一个或多个健康的人)。在一些实施方案中,原代T细胞的集合来自1-100个、1-50个、1-20个、1-10个、1个或多个、2个或更多个、3个或更多个、4个或更多个、5个或更多个、10个或更多个、20个或更多个、30个或更多个、40个或更多个、50个或更多个,或100个或更多个受试者。在一些实施方案中,供体受试者与患者(例如,施用治疗性细胞的接受者)不同。在一些实施方案中,T细胞集合不包括来自患者的细胞。在一些实施方案中,从中获得T细胞集合的供体受试者中的一个或多个供体受试者与患者不同。

[1107] 在一些实施方案中,如本文所提供的细胞是从经工程化的多能细胞分化而来的T淋巴细胞,该经工程化的多能细胞含有本文所述的修饰(例如遗传修饰)并且被分化为T淋

巴细胞。如本领域技术人员将理解的,用于分化的方法取决于使用已知技术的所需细胞类型。在一些实施方案中,分化为T淋巴细胞的细胞可以用于随后移植或植入到受试者(例如,接受者)中。

[1108] 用于从多能干细胞(例如,iPSC)生成T细胞的方法描述于例如Iriguchi等人,Nature Communications 12,430(2021);Themeli等人16(4):357-366(2015);Themeli等人,Nature Biotechnology 31:928-933(2013)。

[1109] 原代T细胞的非限制性实例包括CD3+T细胞、CD4+T细胞、CD8+T细胞、原初T细胞、调节T(Treg)细胞、非调节T细胞、Th1细胞、Th2细胞、Th9细胞、Th17细胞、T滤泡辅助(Tfh)细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、效应T(Teff)细胞、中央记忆T(Tcm)细胞、效应记忆T(Tem)细胞、表达CD45RA的效应记忆T细胞(TEMRA细胞)、组织驻留记忆(Trm)细胞、虚拟记忆T细胞、先天记忆T细胞、记忆干细胞(Tsc)、γδT细胞,以及T细胞的任何其他亚型。在一些实施方案中,原代T细胞选自包括以下的组:细胞毒性T细胞、辅助T细胞、记忆T细胞、调控性T细胞、肿瘤浸润淋巴细胞及其组合。

[1110] 在一些实施方案中,原代T细胞是T细胞亚组或亚型或亚群的原代T细胞。此类T细胞亚组可在US2018/0319862A1和/或WO2016/090190A1中找到,其全部内容据此以引用的方式并入。因此,在一些实施方案中,在施用经遗传工程化的细胞后在受试者中增加的T细胞亚组(诸如CD62L+T细胞亚组)是或者包括记忆T细胞或其特定亚组(诸如长寿命记忆T细胞),或者与之具有相同的表型特征。在一些实施方案中,此类记忆T细胞是中央记忆T细胞(Tcm)或T记忆干细胞(Tsc)细胞。在一些实施方案中,该记忆T细胞是Tsc细胞。Tsc细胞可被描述为与其他记忆T细胞亚组相比或与原初T细胞相比具有一个或多个表型差异或功能特征,如分化程度更低或更原初(参见,例如,Ahlers和Belyakov(2010)Blood,115:1678);Cieri等人(2015)Blood,125:2865;Flynn等人(2014)Clinical&Translational Immunology,3,e20;Gattinoni等人(2012)Nat.Med.,17:1290-1297;Gattinoni等人(2012)Nat.Reviews,12:671;Li等人(2013)PLOS ONE,8:e67401;以及已发表的PCT Appl.专利号WO2014/039044)。在一些情况下,Tsc细胞被认为是唯一能够生成效应T细胞和所有三种记忆T细胞亚组(Tsc、Tcm和Tem)的记忆T细胞。在一些方面,在所有记忆T细胞亚组中,Tsc细胞对抗原或稳态刺激具有最高的存活和增殖反应,并且在缺乏同源抗原的情况下具有最少的损耗。在一些实施方案中,分化程度较低的Tsc细胞在过继转移后可能比其他记忆T细胞表现出更大的扩增、长期存活力和靶细胞破坏,并且因此可能能够以比Tcm或Tem细胞更少的转移细胞介导更有效的治疗。

[1111] 在T细胞和/或CD4+和/或CD8+T细胞的亚型和亚群中,有原初T(Tn)细胞、效应T细胞(Teff)、记忆T细胞及其亚型(诸如干细胞记忆T(Tsc)、中枢记忆T(Tcm)、效应记忆T(Tem)或终末分化效应记忆T细胞)、肿瘤浸润淋巴细胞(Til)、未成熟T细胞、成熟T细胞、辅助T细胞、细胞毒性T细胞、粘膜相关不变T(MAIT)细胞、天然存在和适应性的调节T(Treg)细胞、辅助T细胞,诸如TH1细胞、TH2细胞、TH3细胞、TH17细胞、TH9细胞、TH22细胞、滤泡辅助T细胞、α/βT细胞和δ/γT细胞。

[1112] 在一些实施方案中,进一步诸如通过基于与相应亚群相关的表面抗原的阳性或阴性选择来富集或耗竭CD8+细胞中的原初、中央记忆、效应记忆和/或中央记忆干细胞。在一些实施方案中,对中央记忆T(Tcm)细胞进行富集以提高功效,诸如以改善施用后的长期存

活、扩增和/或植入,其在一些方面在此类亚群中是稳健的。参见Terakura等人(2012)Blood.1:72-82;Wang等人(2012)J Immunother.35(9):689-701。在一些实施方案中,将Tcm富集的CD8+T细胞和CD4+T细胞组合能进一步增强功效。

[1113] 本公开涉及过继细胞疗法,该过继细胞疗法涉及例如经由多个施用步骤和/或通过向已接受过先前施用的受试者施用来施用多次剂量的表达经遗传工程化的(重组的)受体的细胞。下文将进一步详细描述治疗方法和细胞疗法。在一些实施方案中,所注意到的差异是第一次剂量或施用的细胞中的重组分子(例如受体)与第二次剂量或施用相比的唯一差异或者基本上或实质上唯一的差异。在一些实施方案中,除了受体的差异和/或其他注意到的差异外,在先前和后续施用中施用的细胞和/或细胞群体是同一的或实质上同一的或基本上同一的。在一些实施方案中,一次施用中表达可检测到的表面水平的一种或多种标志物的细胞的比率与后续施用相同或相似。在一些实施方案中,不同剂次或施用中的细胞群体和/或细胞亚群的百分比是相同的或基本上相同的或实质上相同的。不同剂次可能含有相同百分比的T细胞、CD8+和/或CD4+T细胞、特定谱系或活化状态或经历的T细胞,诸如相对百分比的效应T细胞、初始T细胞和/或记忆T细胞和/或其亚群(诸如Tcm、Tem、Tsc细胞),和/或这些细胞可能来源于同一受试者、样本、组织和/或流体或隔室。在一些实施方案中,用于对第一次剂量的细胞进行工程化(例如通过用编码重组受体的载体转导)的相同细胞组合物的另一部分被用于对第二次施用的细胞进行工程化。在一些实施方案中,在第二次施用之前,通过例如冷冻保存来保存该组合物。

[1114] 在T细胞和/或CD4+和/或CD8+T细胞的亚型和亚群中,有原初T(Tn)细胞、效应T细胞(Teff)、记忆T细胞及其亚型(诸如干细胞记忆T(Tsc)、中枢记忆T(Tcm)、效应记忆T(Tem)或终末分化效应记忆T细胞)、肿瘤浸润淋巴细胞(Til)、未成熟T细胞、成熟T细胞、辅助T细胞、细胞毒性T细胞、粘膜相关不变T(MAIT)细胞、天然存在和适应性的调节T(Treg)细胞、辅助T细胞,诸如TH1细胞、TH2细胞、TH3细胞、TH17细胞、TH9细胞、TH22细胞、滤泡辅助T细胞、α/βT细胞和δ/γT细胞。

[1115] 本公开的示例性T细胞选自由以下组成的组:细胞毒性T细胞、辅助T细胞、记忆T细胞、中央记忆T细胞、效应记忆T细胞、效应记忆RA T细胞、调节T细胞、组织浸润淋巴细胞及其组合。在许多实施方案中,T细胞表达CCR7、CD27、CD28和CD45RA。在一些实施方案中,中央T细胞表达CCR7、CD27、CD28和CD45RO。在其他实施方案中,效应记忆T细胞表达PD-1、CD27、CD28和CD45RO。在其他实施方案中,效应记忆RA T细胞表达PD-1、CD57和CD45RA。

[1116] 在一些实施方案中,本文所述的经工程化的T细胞(诸如从一个或多个个体供体(例如健康供体)分离的原代T细胞或从来源于一个或多个个体供体(例如健康供体)的iPSC分化而来的T细胞)包含被工程化(例如,修饰)为表达嵌合抗原受体的T细胞,该嵌合抗原受体包括但不限于本文所述的嵌合抗原受体。任何合适的CAR都可以被包含在T细胞中,包括本文所述的CAR。在一些实施方案中,经工程化T细胞表达至少一种嵌合抗原受体,该嵌合抗原受体与以下细胞中的至少一种的表面上表达的所关注的抗原或表位结合:受损细胞、发育异常细胞、受感染的细胞、免疫原性细胞、发炎细胞、恶性细胞、化生细胞、突变细胞及其组合。在其他情况下,经工程化的T细胞包含引起细胞表达至少一种蛋白质的修饰,当该细胞接近相邻细胞、组织或器官时,该蛋白质在该相邻细胞、组织或器官中调节所关注的生物学效应。对T细胞(包括原代T细胞)有用的修饰在US2016/0348073和WO2020/018620中有详

细描述,该文献的公开内容整体并入本文中。

[1117] 在一些实施方案中,T细胞包含编码CAR的多核苷酸,其中将该多核苷酸插入在基因组基因座中。可以使用任何合适的方法将CAR插入到T细胞的基因组基因座中,该方法包括基于慢病毒的转导方法或本文所述的基因编辑方法(例如,CRISPR/Cas系统)。在一些实施方案中,将多核苷酸插入到安全港基因座(诸如但不限于AAVS1、CCR5、CLYBL、ROSA26、SHS231、F3(也称为CD142)、MICA、MICB、LRP1(也称为CD91)、HMGB1、ABO、RHD、FUT1或KDM5D基因座)中。在一些实施方案中,将多核苷酸插入在B2M、CIITA、TRAC、TRBC、PD1或CTLA4基因中。

[1118] 在一些实施方案中,本文所述的T细胞(诸如经工程化或经修饰的T细胞)包含降低的内源性T细胞受体的表达。在一些实施方案中,TRAC或TRBC基因座在细胞中被破坏或消除,诸如通过本文所述的基因编辑方法(例如,CRISPR/Cas系统)被破坏或消除。在一些实施方案中,将外源性多核苷酸或转基因(诸如编码CAR的多核苷酸或如所描述的其他多核苷酸)插入到被破坏的TRAC或TRBC基因座中。

[1119] 在一些实施方案中,本文所述的T细胞(诸如经工程化或修饰的T细胞)包含降低的细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(CTLA4)的表达。在一些实施方案中,CTLA-4基因座在细胞中被破坏或消除,诸如通过本文所述的基因编辑方法(例如,CRISPR/Cas系统)被破坏或消除。在一些实施方案中,将外源性多核苷酸或转基因(诸如编码CAR的多核苷酸或如所描述的其他外源性多核苷酸)插入到被破坏的CTLA-4基因座中。

[1120] 在其他实施方案中,本文所述的T细胞(诸如经工程化或经修饰的T细胞)包含降低的程序性细胞死亡(PD1)的表达。在一些实施方案中,PD1基因座在细胞中被破坏或消除,诸如通过本文所述的基因编辑方法(例如,CRISPR/Cas系统)被破坏或消除。在一些实施方案中,将外源性多核苷酸或转基因(诸如编码CAR的多核苷酸或如所描述的其他外源性多核苷酸)插入到被破坏的PD1基因座中。在某些实施方案中,本文所述的T细胞(诸如经工程化或修饰的T细胞)包含降低的CTLA4和PD1的表达。

[1121] 在某些实施方案中,本文所述的T细胞(诸如经工程化或经修饰的T细胞)包含增强的PD-L1的表达。在一些实施方案中,PD-L1基因座在细胞中被破坏或消除,诸如通过本文所述的基因编辑方法(例如,CRISPR/Cas系统)被破坏或消除。在一些实施方案中,将外源性多核苷酸或转基因(诸如编码CAR的多核苷酸或如所描述的其他外源性多核苷酸)插入到被破坏的PD-L1基因座中。

[1122] 在一些实施方案中,本技术涉及经工程化的T细胞,诸如从一个或多个个体供体(例如健康供体)分离的原代T细胞或从来源于一个或多个个体供体(例如健康供体)的iPSC分化而来的T细胞,其过表达致耐受因子(例如CD47),具有降低的一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子(例如,一种或多种MHC I类人白细胞抗原和/或一种或多种MHC II类人白细胞抗原)的表达或缺乏该表达。在一些实施方案中,经工程化的T细胞进一步表达一种或多种补体抑制剂。在一些实施方案中,经工程化的T细胞还被工程化为表达CAR。在一些实施方案中,经工程化T细胞具有降低的TCR复合物分子的表达或缺乏该表达,诸如通过TRAC基因或TRBC基因中的基因组修饰(例如基因破坏)。在一些实施方案中,T细胞过表达致耐受因子(例如CD47)和CAR,并且携有破坏以下基因中的一种或多种基因的基因组修饰:B2M、CIITA、TRAC和TRBC基因。

[1123] 在一些实施方案中,提供的经工程化的T细胞逃避免疫识别。在一些实施方案中,本文所述的经工程化的T细胞(诸如从一个或多个个体供体(例如健康供体)分离的原代T细胞或从来源于一个或多个个体供体(例如健康供体)的iPSC分化而来的T细胞)不会活化患者(例如,施用后的接受者)的免疫反应。提供了通过向有需要的受试者(例如,接受者)或患者施用本文所述的经工程化的T细胞群体来治疗疾病的方法。

[1124] 本文提供的T细胞可用于治疗适当的癌症,包括但不限于B细胞急性淋巴母细胞白血病(B-ALL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤、肝癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、结直肠癌、肺癌、非小细胞肺癌、急性髓系淋巴系白血病(acute myeloid lymphoid leukemia)、多发性骨髓瘤、胃癌、胃腺癌、胰腺腺癌、胶质母细胞瘤、神经母细胞瘤、肺鳞状细胞癌、肝细胞癌和膀胱癌。

[1125] d.自然杀伤细胞

[1126] 可以在细胞疗法产品制造过程的任何阶段对待用于细胞疗法产品中的NK细胞进行针对供体能力的特性分析。

[1127] 细胞疗法产品中使用的NK细胞可以是原代NK细胞。如本文任何地方所描述的用于对细胞群体进行针对供体能力的特性分析的方法可以对原代(例如,经基因组编辑的)NK细胞进行。

[1128] 如本文其他地方所述,细胞疗法产品中使用的NK细胞可以是多能干细胞(iPSC)来源的NK细胞。如本文任何地方所描述的用于对细胞群体进行针对供体能力的特性分析的方法也可以对能够分化形成NK细胞的干细胞进行。如本文任何地方所描述的用于对细胞群体进行针对供体能力的特性分析的方法也可以对干细胞来源的(例如,经基因组编辑的)NK细胞进行。

[1129] 如本公开的上下文中提及的有关NK细胞的相关信息(包括关于NK细胞在被用于细胞疗法时的所需特征的某些信息)在本领域中是已知的,并且例如可从WO2017214569A1、WO2011/068896A1中找到,其内容以引用的方式并入本文中。应当理解,本文所述的关于NK细胞的实施方案可以容易且适当地与描述HIP细胞(例如,表现出降低的MHC I类和/或MHC II类分子中的一种或多种分子的表达以及增加的至少一种致耐受因子的表达)的实施方案以及描述安全开关和如本文所述的其他经修饰的/经基因(例如CAR转基因)编辑的细胞的实施方案相组合。本文所述的NK细胞可用于治疗或预防受试者的疾病。可以在细胞疗法产品制造期间的编辑过程的任何阶段对待用于细胞疗法产品中的NK细胞进行针对供体能力的特性分析。

[1130] 在一些实施方案中,如本文所提供的那样被工程化或修饰的细胞是自然杀伤(NK)细胞。在一些实施方案中,NK细胞分离或获得自一个或多个个体供体受试者,诸如一个或多个个体健康供体(例如,未知或未被怀疑患有疾病或感染(例如,未表现出疾病或感染的临床体征)的受试者)。在一些情况下,NK细胞是来自一个或多个个体的NK细胞的群体或亚群。如本领域技术人员将理解的,从个体分离或获得NK细胞的方法可以使用已知技术来实现。本文提供了含有本文所述的修饰(例如,遗传修饰)的经工程化的原代NK细胞,用于随后移植或植入到受试者(例如,接受者)中。例如,通过将经工程化的NK细胞输注到受试者(例如接受者,诸如患者)中来将经工程化的T细胞施用于该受试者。

[1131] 在一些实施方案中,如本文所提供的细胞是从经工程化的多能细胞分化而来的NK细胞,该经工程化的多能细胞含有本文所述的修饰(例如遗传修饰)并且被分化为NK细胞。

如本领域技术人员将理解的,用于分化的方法取决于使用已知技术的所需细胞类型。在一些实施方案中,分化为NK细胞的细胞可以被用于随后施用于受试者(例如接受者,诸如患者),诸如通过将分化的NK细胞输注到该受试者中。

[1132] 用于从多能干细胞(例如iPSC)生成NK细胞的方法描述于例如美国专利号10626373;Shankar等人Stem Cell Res Ther.2020;11:234;Euchner等人Frontiers in Immunology,2021;12,Article 640672.doi=10.3389/fimmu.2021.640672中。

[1133] 在一些实施方案中,从受试者或个体获得(例如,收获、提取、移除或取出)NK细胞。在一些实施方案中,由NK细胞集合产生NK细胞,使得该NK细胞来自一个或多个受试者(例如,一个或多个人,包括一个或多个健康的人)。在一些实施方案中,原代NK细胞集合来自1-100个、1-50个、1-20个、1-10个、1个或多个、2个或更多个、3个或更多个、4个或更多个、5个或更多个、10个或更多个、20个或更多个、30个或更多个、40个或更多个、50个或更多个,或100个或更多个受试者。在一些实施方案中,供体受试者与患者(例如,施用经工程化的NK细胞的接受者)不同。在一些实施方案中,NK细胞集合不包括来自患者的细胞。在一些实施方案中,从中获得NK细胞集合的供体受试者中的一个或多个供体受试者与患者不同。

[1134] 在一些实施方案中,NK细胞(包括从一个或多个个体供体(例如健康供体)分离的原代NK细胞或从来源于一个或多个个体供体(例如健康供体)的iPSC分化而来的NK细胞)表达CD56(例如$CD56^{dim}$或$CD56^{bright}$)并且缺乏CD3(例如$CD3^{neg}$)。在一些实施方案中,如本文所述的NK细胞还可以表达介导ADCC的低亲和力Fcγ受体CD16。在一些实施方案中,NK细胞还表达一种或多种自然杀伤细胞受体NKG2A和NKG2D或一种或多种自然细胞毒性受体NKp46、NKp44、NKp30。例如,对于原代NK细胞的情况,在特定情况下,可以通过耗竭CD3、CD14和/或CD19阳性细胞,从NK细胞的起始来源(诸如含有外周血单核细胞(PBMC)的样本)中分离出该原代细胞。例如,可以使该细胞经受使用其上连接有分别针对CD3、CD14和/或CD19的抗体的免疫磁珠进行的耗竭,从而产生经富集的NK细胞群体。在其他情况下,可以通过选择细胞是否存在NK细胞上的一种或多种标志物(诸如CD56、CD16、NKp46和/或NKG2D)从作为混合群体(例如PBMC)的起始来源分离原代NK细胞。

[1135] 在一些实施方案中,在如本文所述的那样进行工程化之前,NK细胞(诸如分离的原代NK细胞)可以经受一个或多个扩增或活化步骤。在一些实施方案中,扩增可以通过将NK细胞与饲养层细胞(诸如可以被照射或可以不被照射的抗原呈递细胞)一起培养来实现。扩增步骤中NK细胞与抗原呈递细胞(APC)的比率可以是某个数,例如像1:1、1:1.5、1:2或1:3。在某些方面,APC被工程化为表达膜结合的IL-21(mblL-21)。在方面中,APC可替代地或另外地被工程化为表达IL-21、IL-15和/或IL-2。在实施方案中,其中发生一个或多个扩增步骤的培养基包含一种或多种促进扩增的剂,诸如一种或多种重组细胞因子。在具体实施方案中,培养基包含一种或多种来自IL-2、IL-15、IL-18和/或IL-21的重组细胞因子。在一些实施方案中,通过引入如本文所述的修饰工程化NK细胞的步骤在扩增启动后2-12天进行,诸如在第2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12天或者约第2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12天进行。

[1136] 在一些实施方案中,本文所述的经工程化的NK细胞(诸如分离自一个或多个个体供体(例如健康供体)的原代NK细胞)包含被工程化(例如,修饰)为表达嵌合抗原受体的NK细胞,该嵌合抗原受体包括但不限于本文所述的嵌合抗原受体。任何合适的CAR都可以被包含在NK细胞中,包括本文所述的CAR。在一些实施方案中,经工程化的NK细胞表达至少一种

嵌合抗原受体,该嵌合抗原受体与以下细胞中的至少一种的表面上表达的所关注的抗原或表位结合:受损细胞、发育异常细胞、受感染的细胞、免疫原性细胞、发炎细胞、恶性细胞、化生细胞、突变细胞及其组合。在其他情况下,经工程化的NK细胞包含引起细胞表达至少一种蛋白质的修饰,当该细胞接近相邻细胞、组织或器官时,该蛋白质在该相邻细胞、组织或器官中调节所关注的生物学效应。

[1137] 在一些实施方案中,NK细胞包含编码CAR的多核苷酸,其中将该多核苷酸插入在基因组基因座中。可以使用任何合适的方法将CAR插入到NK细胞的基因组基因座中,该方法包括基于慢病毒的转导方法或本文所述的基因编辑方法(例如,CRISPR/Cas系统)。在一些实施方案中,将多核苷酸插入到安全港基因座(诸如但不限于AAVS1、CCR5、CLYBL、ROSA26、SHS231、F3(也称为CD142)、MICA、MICB、LRP1(也称为CD91)、HMGB1、ABO、RHD、FUT1或KDM5D基因座)中。

[1138] 在一些实施方案中,本技术涉及经工程化的NK细胞(诸如从一个或多个个体供体(例如健康供体)分离的原代NK细胞或从来源于一个或多个个体供体(例如健康供体)的iPSC分化而来的NK细胞),其过表达致耐受因子(例如CD47),具有降低的一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子(例如,一种或多种MHC I类人白细胞抗原和/或一种或多种MHC II类人白细胞抗原)的表达或缺乏该表达。

[1139] 在一些实施方案中,提供的经工程化的NK细胞逃避免疫识别。在一些实施方案中,本文所述的经工程化的NK细胞(诸如从一个或多个个体供体(例如健康供体)分离的原代NK细胞)不会活化患者(例如,施用后的接受者)的免疫反应。提供了通过向有需要的受试者(例如,接受者)或患者施用本文所述的经工程化的NK细胞群体来治疗疾病的方法。

[1140] 本文提供的NK细胞可用于治疗合适的癌症,包括但不限于B细胞急性淋巴母细胞白血病(B-ALL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤、肝癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、结直肠癌、肺癌、非小细胞肺癌、急性髓系淋巴系白血病、多发性骨髓瘤、胃癌、胃腺癌、胰腺腺癌、胶质母细胞瘤、神经母细胞瘤、肺鳞状细胞癌、肝细胞癌和膀胱癌。

[1141] 本文公开的细胞可以是自然杀伤(NK)细胞,例如NK细胞群体。应当理解,下文中对“细胞”,例如“NK细胞”的任何提及也适用于如本申请中所描述的“细胞群体”,例如“NK细胞群体”。

[1142] NK细胞源自淋巴系谱系并且是先天免疫系统的一部分,可用于抗癌疗法,因为已发现它们能检测和杀伤某些类型的肿瘤细胞。

[1143] 自然杀伤(NK)细胞是能够进行人体免疫监视的细胞毒性淋巴细胞。WO2017214569A1(其内容以引用的方式整体并入本文中)描述了经基因组编辑的原代NK细胞、制造这些细胞的方法以及施用这些细胞的方法。

[1144] 在一些实施方案中,NK细胞可以是未成熟NK细胞,并且可以是CD56+和CD16-。在一些实施方案中,NK细胞可以是成熟NK细胞,并且可以是CD56-和CD16+,或CD561o和CD16+(如WO 2011/068896A1中所述(其内容以引用的方式整体并入本文中))。

[1145] 原代NK细胞可以表达CD16和/或CD56。在一些实施方案中,NK细胞不表达CD3。在一些实施方案中,“NK细胞”优选被定义作为CD56+和CD3-的细胞。在一些实施方案中,“NK细胞”被定义为作为CD16+和CD3-的细胞。NK细胞是先天免疫系统的淋巴细胞,其可杀伤受病毒感染或转化的细胞。与T细胞一样,NK细胞也是细胞毒性淋巴细胞。与T细胞不同,NK细胞

不需要抗原识别,而需要整合来自许多活化和抑制性受体的信号来发挥它们的功能。尽管NK细胞与T细胞相似,但NK细胞在刺激条件下的行为不同,并且不能像T细胞那样耐受电穿孔(如WO2017214569A1(其内容以引用的方式整体并入本文中)中所述)。

[1146] 生成自然杀伤(NK)细胞的方法在本领域中是已知的,例如WO 2011/068896A1(其内容以引用的方式整体并入本文中)中所述的方法,该方法包括:提供血管母细胞;在甲基纤维素和包含IL2、IL3、IL6、IL7、IL15、SCF和FL的第一细胞因子混合物上培养血管母细胞;收获经培养的细胞;以及在包含人血清和包含IL7、IL15、SCF和FL的第二细胞因子混合物的液体培养基中培养收获的细胞以生成NK细胞。

[1147] 原代NK细胞可以从例如外周血、脐带细胞、腹水和/或实体肿瘤中分离(如WO2017214569A1中所述,其内容以引用的方式整体并入本文中)。在一些实施方案中,"原代NK细胞"是新分离的NK细胞。在一些实施方案中,"原代NK细胞"是在被分离后经受了多达5次复制或分裂、在被分离之后经受了多达10次复制或分裂、在被分离之后经受了多达15次复制或分裂、在被分离之后经受了多达20次复制或分裂、在被分离之后经受了多达25次复制或分裂、在被分离之后经受了多达30次复制或分裂、在被分离之后经受了多达35次复制或分裂,或者在被分离之后经受了多达40次复制或分裂的NK细胞。在一些实施方案中,原代NK细胞是非克隆细胞。在一些实施方案中,原代NK细胞是增殖中的细胞。在一些实施方案中,原代NK细胞是经扩增的细胞。

[1148] 在一些实施方案中,NK细胞是哺乳动物细胞。在一些实施方案中,NK细胞优选为人细胞。在一些实施方案中,NK细胞是小鼠细胞。

[1149] 本文描述了NK细胞在被用于细胞疗法时的一些所需特征。

[1150] 可以使用许多种测定,例如如WO 2011/068896A1中所陈述的测定(其内容以引用的方式整体并入本文中)来区分NK细胞。

[1151] 例如,可以测量IL12-p70分泌:IL12p70由成熟的DC分泌,从而引发CD4+T细胞的Th1导向响应。人BM来源的DC可以产生>500pg/ml的IL12p70,但母细胞来源的DC在成熟后不会产生任何可检测到的IL12p70。混合淋巴细胞反应(MLR)测定:MLR测定确定DC刺激同种异体T细胞增殖的能力。将脐带血单核细胞(CBMC,其包括T细胞)用作响应者,进行荧光标记,并在与未成熟或成熟的母细胞来源的DC共培养4-5天后测量它们的增殖情况。初步结果表明,响应者细胞响应于成熟的(m)DC而增殖。血管母细胞来源的自然杀伤细胞:在母细胞来源和人骨髓来源的NK细胞中评价了细胞表面标志物CD45、CD7、CD94、CD56、CD16和NKG2D。

[1152] 使NK细胞分化的方法是本领域已知的,例如如WO 2011/068896A1(其内容以引用的方式整体并入本文中)中所述的。下面陈述了如WO 2011/068896A1中所述的示例性方法:

[1153] 如WO 2011/068896A1中所述的初始分化:两种细胞类型的初始分化程序可能相同,并且可能涉及在Stemline II(Sigma)加细胞因子中对hESC进行4天培养,以生成胚状体(EB)。细胞因子VEGF和BMP4可在整个EB培养过程中使用,而bFGF可在前2天后添加。总共4天后,可用0.05%胰蛋白酶使所得的EB解聚,然后可用含血清的培养基使胰蛋白酶失活。随后将单个细胞通过40μM细胞粗滤器过滤、计数,并接种到含有另外的细胞因子(诸如TPO(50μg/ml)、VEGF(50μg/ml)、FL(50μg/ml)和bFGF(20-50μg/ml))的H4436或H4536甲基纤维素(Stem Cell Technologies)中。对于NK分化,在此阶段还可以添加细胞因子IL2(1-10μg/ml)、IL7(1-20μg/ml)和/或IL15(1-10μg/ml)。可以将甲基纤维素培养物以50,000至150,

000个细胞/毫升的浓度铺板,以产生和扩增血管母细胞群体。可在第6天至第10天之间从甲基纤维素中收获母细胞样细胞,并将其通过以下程序之一进一步分化。

[1154] 如WO 2011/068896A1中所述的NK分化:可将母细胞重新铺板于H4236甲基纤维素加IL2(5-10ng/ml)、IL3(1-10ng/ml)、IL6(1-10ng/ml)、IL7(5-20ng/ml)、IL15(5-10ng/ml)、SCF(10-50ng/ml)和FL(10-50ng/ml)中,或重新铺板于含有相同细胞因子和10-20%人血清的液体培养物中。培养6-8天后,可收获细胞并将其重新铺板于液体培养基(aMEM或DMEM:F12)加10-20%人血清和细胞因子IL7(5-20ng/ml)、IL15(5-10ng/ml)、SCF(10-50ng/ml)和FL(10-50ng/ml)中,再培养14-21天。每周更换培养基以更新细胞因子混合液。

[1155] 可以在整个分化程序过程中间歇地使用流式细胞术来评估细胞的免疫表型和NK细胞表面标志物的获得情况。细胞表面标志物包括CD34、CD45、CD56、CD16、CD94、NKG2D、CD3、CD7、CD4、CD8a和CD45RA。用于检查血管母细胞来源的NK细胞功能的测试可包括:(1)使用K562红细胞白血病靶细胞的天然细胞毒性测定,(2)响应于IL12/IL18或佛波醇肉豆蔻酸酯乙酸酯处理的IFNγ产生,(3)利用细胞内流式细胞术检测穿孔素和颗粒酶B酶的存在,和(4)使用Raji细胞和抗CD20抗体的抗体依赖性细胞毒性测定。NK细胞可以由H7和HuES3 hESC两者生成。与51Cr释放测定类似的非放射性细胞毒性测定可能表明血管母细胞来源的NK细胞携有天然的细胞毒性功能,因为它们可能能够在标准的4小时共培养后有效地诱导靶K562红细胞母细胞性白血病细胞的凋亡。

[1156] 如WO 2011/068896A1中所述的血管母细胞生长条件的改变:可使用在H4436甲基纤维素中生长的血管母细胞进行以上NK和DC分化程序。然而,H4536(一种来自Stem Cell Technologies的不含促红细胞生成素的甲基纤维素)也可用于有效生成血管母细胞。这些“epo-”血管母细胞与原始的“epo+”血管母细胞非常相似;它们能够分化为多种造血和血管细胞类型。如WO 2011/068896A1中所述的初步结果表明,使用H4536比使用H4436甲基纤维素在将血管母细胞分化为各种造血谱系(包括NK细胞和DC)方面具有显著优势。可以发现,母细胞生长培养基中缺乏epo会降低表达红细胞标志物CD235a的细胞百分比,并增加表达CD34、CD45和CD41a的细胞的百分比。由于细胞表面标志物表达的这种差异,“epo-(epo-minus)”生长条件可能会增强沿着髓系和/或淋巴系谱系向下的分化。

[1157] 如WO 2011/068896A1中所述的人ESC向NK细胞的分化:

[1158] 分化程序可以如下进行:使H7 ESC分化为胚状体(EB),持续4天。可以收获EB并将其转移到富含细胞因子的甲基纤维素中并保持10至15天,以进行血管母细胞的产生和扩增。可以收获血管母细胞并将其放置到无饲养层液体培养基加10-20%人AB血清和一组细胞因子中,再保持14-17天,每3-4天更换一半培养基。

[1159] 如WO 2011/068896A1所述的免疫表型分型(使用流式细胞术):未成熟NK细胞可以是CD56明亮、CD161o、KIRlo、CD117+、CD94-、NKG2D+。通过使用上述程序的变型分化32天后,20-30%的能存活细胞可能是CD56+CD16-。成熟NK细胞可能是CD56dim、CD16hi、KIRhi、CD1171o/-、CD94+、NKG2D+。通过使用上述程序分化31天后,20%的能存活细胞可能是CD56-CD16+,并且5%的能存活细胞为CD561oCD16+。

[1160] 如WO 2011/068896A1所述的功能测定:天然细胞毒性:成熟NK细胞可引发靶细胞(诸如人K562红细胞白血病、MCF7、U87、PC3、NTERA2细胞)的凋亡。可以使用“3FC”测定来评估细胞毒性的效率。它与51Cr释放测定类似,但不需要放射性。参见Derby等人,

Immunol.Letters 78:35-39(2001)。可以发现,上面描述的成熟NK细胞的异质群体(项目B2-a)在标准的4小时实验中会引发65 -70%的K562细胞凋亡。

[1161] 如WO 2011/068896A1所述的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC):NK细胞表面上的FcγRIII(CD16)可与连接于靶细胞的抗CD20抗体的fc区结合并诱导ADCC。可以将Raji细胞(来源于Burkett淋巴瘤)与抗CD20抗体一起预孵育,并用作ADCC测定的靶标。(Tsirigotis等人,J of Steroid Biochem and Mol Bio 108:267-271(2008))。

[1162] 如WO 2011/068896A1中所述的IFNy细胞因子产生:未成熟NK细胞可响应于PMA(佛波醇肉豆蔻酸酯乙酸酯)加离子霉素或者IL12加IL18的过夜处理产生大量IFNy。可用布雷菲德菌素a阻断IFNy的分泌,并使用细胞内流式细胞术对细胞进行细胞表面标志物和IFNy染色。参见WoU等人,J.of Immunol.175:5095-5103(2005)。

[1163] 如WO 2011/068896A1中所述的使用异种移植小鼠模型的NK细胞体内免疫疗法潜力:可将生物发光的(含荧光素酶的)K562细胞注射到NOD/SCID小鼠中以植入肿瘤,随后弹丸式注射NK细胞并每日IP注射IL2和IL15。可使用生物发光成像随时间监测体内NK免疫治疗潜力。参见:WoU等人,Blood 113(24):6094-6101(2009)

[1164] 如WO 2011/068896A1中所述,脐带血和外周血单核细胞都可用作响应者,并且发明人使用人骨髓来源的树突状细胞(DC)作为阳性对照效应物。

[1165] E4BP4可能对NK谱系发育至关重要(参见Gascoyne等人,Nature Immunology 10(10):1118-1125,2009),并且可提供在体外更高效所必需的转录程序。

[1166] 如WO 2011/068896A1中所述的NK细胞分化:可将E4BP4 cDNA克隆到逆转录病毒载体中以使该E4BP4 cDNA在血管母细胞中过表达,并评价它增加NK分化的能力。可使用RT-PCR监测各种KIR受体同种型以及对NK细胞功能至关重要的酶穿孔素和颗粒酶B的表达。对于功能测定,母细胞来源的NK细胞可能展现出天然的细胞毒性,因此可以评估它们的抗体依赖性细胞毒性(ADCC)能力。ADCC测定所需的试剂可能包括伯基特氏淋巴瘤来源的Raji细胞和抗CD20抗体。CD20标记的Raji细胞与NK细胞的共培养应引发特定的ADCC响应,这可以通过流式细胞术手段进行监测。

[1167] 可以使用任何合适的方法刺激NK细胞并持续任何合适的时间长度(例如如WO2017214569A1中所述,其内容以引用的方式整体并入本文中)。在一些实施方案中,受刺激的NK细胞包括暴露于佛波醇-12-肉豆蔻酸酯-13-乙酸酯(PMA)的NK细胞。在一些实施方案中,受刺激的NK细胞包括暴露于细胞因子的NK细胞,该细胞因子包括例如IL-21、IL-2、IL-12、IL-15、I型干扰素等。在一些实施方案中,该细胞因子可以包括可溶性细胞因子。在一些实施方案中,该细胞因子是被结合的细胞因子。在一些实施方案中,该细胞因子可以结合到表面(包括例如组织培养烧瓶的表面)。

[1168] 在一些实施方案中,被结合的细胞因子可以结合到人工抗原呈递细胞(aAPC)。aAPC可以包括例如Denman等人,PLoS One,2012,7(1):e30264 doi:10.1371/journal.pone.0030264中描述的克隆9。在一些实施方案中,aAPC可以是珠。球形聚苯乙烯珠可以包被有针对NK细胞表面蛋白的抗体,并且可用于NK细胞活化。珠可以具有任何尺寸。在一些情况下,珠可以是或者可以是3和6微米。珠的尺寸可以是4.5微米。可以以任何细胞与珠的比率使用珠。例如,在每毫升100万个细胞的情况下,可以使用3:1的珠与细胞的比率。在一些实施方案中,aAPC可以是刚性球形颗粒、聚苯乙烯乳胶微珠、磁性纳米颗粒或微

粒、纳米级量子点、聚(乳酸-共-乙醇酸)(PLGA)微球、非球形颗粒、碳纳米管束、椭球PLGA微粒、纳米蠕虫(nanoworm)、含流体脂质双层的系统、2D支持的脂质双层(2D-SLB5)、脂质体、RAFT体(RAFTsome)/微结构域脂质体、支持的脂质双层颗粒,或其任何组合。

[1169] 在一些实施方案中,受刺激的NK细胞包括用可商购获得的试剂盒处理的NK细胞,该试剂盒包括例如CellXVivo Human NK Cell Expansion Kit(R&D Systems,Minneapolis,MN)、人NK细胞扩增活化子试剂盒(Miltenyi Biotech,Bergisch Gladbach,德国)等。

[1170] 在一些实施方案中,受刺激的NK细胞包括已被扩增至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少6倍、至少7倍或至少8倍的群体中的NK细胞。在一些实施方案中,受刺激的NK细胞包括已被扩增至多5倍、至多6倍、至多7倍、至多8倍、至多10倍、至多20倍或至多30倍的群体中的NK细胞。

[1171] 在一些实施方案中,NK细胞可能受到数小时的刺激。在一些实施方案中,NK细胞可能受到数天的刺激。例如,在一些实施方案中,可以将NK细胞与aAPC共培养至多1天、至多2天、至多3天、至多4天、至多5天、至多6天、至多7天、至多8天,或至多9天、至多2周、至多3周等等。

[1172] 在一些实施方案中,该方法包括扩增经编辑的NK细胞。在一些实施方案中,该扩增可以在选择NK细胞之后进行。在一些实施方案中,NK细胞可以通过与人工抗原呈递细胞(aAPC)共孵育来扩增。在一些实施方案中,NK细胞可以通过与结合至细胞因子的aAPC共孵育来扩增。在一些实施方案中,NK细胞可以通过与可溶性细胞因子共孵育来扩增。该细胞因子可以包括例如IL-21、IL-2、IL-12、IL-15、I型干扰素等。在一些实施方案中,NK细胞可以优选地通过与结合至IL-21或表达膜结合IL-21的aAPC共孵育来扩增。

[1173] 通过使用血管母细胞作为骨髓重新填充细胞或通过使血管母细胞分化为树突状细胞、自然杀伤细胞、T细胞和/或间充质干细胞(MSC),我们可以生产大规模、有效的基于细胞的疗法来对抗癌症、HIV和/或自身免疫性疾病。

[1174] 经基因组编辑的原代NK细胞或干细胞来源的NK细胞可用于治疗或预防受试者的疾病(例如,如WO2017214569A1中所述,其内容以引用的方式整体并入本文中)。一种方法可以包括向受试者施用包含本文所述的或通过本文所述的方法产生的经基因组编辑的原代NK细胞或干细胞来源的NK细胞的组合物。该疾病可以包括例如癌症、癌前疾患、受病原体的感染(例如疟疾)或病毒感染。在一些实施方案中,优选将细胞用于癌症免疫疗法。

[1175] 可以将经基因组编辑的原代NK细胞或干细胞来源的NK细胞单独地或者与一种或多种其他疗法组合施用于受试者。例如,可以将经基因组编辑的原代NK细胞或干细胞来源的NK细胞与包含活性剂和药学上可接受的载剂的药物组合物组合和/或与包含例如嵌合抗原受体T细胞(CAR-T)的细胞疗法组合施用于受试者。可以向患者(优选哺乳动物,并且更优选人)施用有效量的NK细胞以产生所需效果。NK细胞可以以多种途径施用,该途径包括例如静脉内、瘤内、动脉内、经皮、经由通过导管或支架的局部递送、经由针或其他用于瘤内注射的装置、皮下等。NK细胞可以被施用一次或多次。具有本领域普通技术的医师可确定和开出适应性NK细胞以及任选地所需的药物组合物的有效量和给药量。

[1176] 该癌症可以包括,例如,骨癌、脑癌、乳腺癌、宫颈癌、喉癌、肺癌、胰腺癌、前列腺癌、皮肤癌、脊柱癌、胃癌、子宫癌、造血系统癌症和/或淋巴系癌症等。造血系统癌症和/或

淋巴系癌症可以包括,例如,急性骨髓性白血病(AML)、急性淋巴母细胞白血病(ALL)、骨髓增生异常综合征(MDS)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、慢性骨髓性白血病(CML)、霍奇金病和/或多发性骨髓瘤。该癌症可能是转移性癌症。

[1177] 该病毒可以包括,例如,疱疹病毒,包括例如CMV、水痘带状疱疹病毒(VZV)、爱泼斯坦-巴尔病毒(EBV)、单纯疱疹病毒(HSV)或卡波西肉瘤相关疱疹病毒(KSHV);或慢病毒,包括例如人免疫缺陷病毒(HIV)。在进一步的方面,可以施用经基因组编辑的原代NK细胞以抑制受试者中肿瘤的生长。在一些实施方案中,该肿瘤可包括实体肿瘤。

[1178] 可以在其他治疗之前、期间和/或之后向受试者施用或在受试者中制备经基因组编辑的原代NK细胞或干细胞来源的NK细胞。此种组合疗法可以涉及在使用其他抗癌和/或抗病毒剂之前、期间和/或之后施用经基因组编辑的原代NK细胞或干细胞来源的NK细胞,该其他抗癌和/或抗病毒剂包括例如细胞因子;趋化因子;治疗性抗体,包括例如高亲和力抗CMV IgG抗体;NK细胞受体配体,包括例如BiKE或TRiKE;佐剂;抗氧化剂;化学治疗剂;和/或辐射。该施用或制备可以在时间上与其他抗癌剂和/或抗病毒剂的施用间隔数小时、数天,或甚至数周。另外或可替代地,该施用或制备可与其他生物活性剂或方式(诸如但不限于抗赘生物剂)和非药物疗法(诸如但不限于手术)组合。

[1179] e.内皮细胞

[1180] 可以在细胞疗法产品制造过程的任何阶段对待用于细胞疗法产品中的内皮细胞进行针对供体能力的特性分析。

[1181] 细胞疗法产品中使用的内皮细胞可以是原代内皮细胞。如本文任何地方所描述的用于对细胞群体进行针对供体能力的特性分析的方法可以对原代(例如,经基因组编辑的)内皮细胞进行。

[1182] 如本文其他地方所述,细胞疗法产品中使用的内皮细胞可以是多能干细胞(iPSC)来源的β胰岛细胞。如本文任何地方所描述的用于对细胞群体进行针对供体能力的特性分析的方法也可以对能够分化形成内皮细胞的干细胞进行。如本文任何地方所描述的用于对细胞群体进行针对供体能力的特性分析的方法也可以对干细胞来源的(例如,经基因组编辑的)内皮细胞进行。

[1183] 如本公开的上下文中提及的有关内皮细胞的相关信息(包括关于内皮细胞在被用于细胞疗法时的所需特征的某些信息)在本领域中是已知的。应当理解,本文所述的关于内皮细胞的实施方案可以容易且适当地与描述HIP细胞(例如,表现出降低的MHC I类和/或MHC II类分子中的一种或多种分子的表达以及增加的至少一种致耐受因子的表达)的实施方案以及描述安全开关和如本文所述的其他经修饰的/经基因编辑的细胞的实施方案相组合。可在细胞疗法产品制造期间的编辑过程的任何阶段对待用于细胞疗法产品中的内皮细胞进行针对供体能力的特性分析。

[1184] 本文所述的内皮细胞可用于治疗或预防受试者的疾病。

[1185] 在一些实施方案中,如本文所提供的那样被工程化或修饰的细胞是原代内皮细胞。在一些实施方案中,原代内皮细胞分离或获得自一个或多个个体供体受试者,诸如一个或多个个体健康供体(例如,未知或未被怀疑患有疾病或感染(例如,未表现出疾病或感染的临床体征)的受试者)。如本领域技术人员将理解的,从个体分离或获得内皮细胞的方法可以使用已知技术来实现。本文提供了含有本文所述的修饰(例如遗传修饰)的经工程化的

原代内皮细胞类型,用于随后移植或植入到受试者(例如,接受者)中。

[1186] 在一些实施方案中,从受试者或个体获得(例如,收获、提取、移除或取出)原代内皮细胞。在一些实施方案中,由内皮细胞集合产生原代内皮细胞,使得该内皮细胞来自一个或多个受试者(例如一个或多个人,包括一个或多个健康人)。在一些实施方案中,原代内皮细胞集合来自1-100、1-50、1-20、1-10、1或多个、2或更多个、3或更多个、4或更多个、5或更多个、10或更多个、20或更多个、30或更多个、40或更多个、50或更多个,或100或更多个受试者。在一些实施方案中,供体受试者与患者(例如,施用治疗性细胞的接受者)不同。在一些实施方案中,内皮细胞集合不包括来自患者的细胞。在一些实施方案中,从中获得内皮细胞集合的供体受试者中的一个或多个供体受试者与患者不同。

[1187] 在一些实施方案中,如本文所提供的细胞是从经工程化的iPSC分化而来的内皮细胞,该经工程化的iPSC含有本文所述的修饰(例如遗传修饰)并且被分化为内皮细胞类型。如本领域技术人员将理解的,用于分化的方法取决于使用已知技术的所需细胞类型。在一些实施方案中,分化为各种内皮细胞类型的细胞可以用于随后移植或植入到受试者(例如,接受者)中。

[1188] 在一些实施方案中,本文所述的经工程化的多能细胞被分化为内皮集落形成细胞(ECFC)以形成新血管,以解决外周动脉疾病。用于分化出内皮细胞的技术是已知的。参见例如Prasain等人,doi:10.1038/nbt.3048,其以引用的方式整体并入本文中,特别是用于从人多能干细胞生成内皮细胞以及用于移植技术的方法和试剂。可以如本领域已知的那样,通常通过评价内皮细胞相关或特异性标志物的存在或通过在功能上测量来测定分化。

[1189] 在一些实施方案中,通过体外分化从经工程化的多能细胞群体产生经工程化的内皮细胞群体的方法包括:(a)在包含GSK抑制剂的第一培养基中培养经工程化的iPSC细胞群体;(b)在包含VEGF和bFGF的第二培养基中培养经工程化的iPSC细胞群体以产生前内皮细胞群体;以及(c)在包含ROCK抑制剂和ALK抑制剂的第三培养基中培养前内皮细胞群体以产生被工程化为含有本文所述的修饰的分化的内皮细胞的群体。

[1190] 在一些实施方案中,GSK抑制剂是CHIR-99021、其衍生物或其变体。在一些情况下,GSK抑制剂的浓度范围为约1mM至约10mM。在一些实施方案中,ROCK抑制剂是Y-27632、其衍生物或其变体。在一些情况下,ROCK抑制剂的浓度范围为约1pM至约20pM。在一些实施方案中,ALK抑制剂是SB-431542、其衍生物或其变体。在一些情况下,ALK抑制剂的浓度范围为约0.5pM至约10pM。

[1191] 在一些实施方案中,第一培养基包含2pM至约10pM的CHIR-99021。在一些实施方案中,第二培养基包含50ng/ml VEGF和10ng/ml bFGF。在其他实施方案中,第二培养基进一步包含Y-27632和SB-431542。在各种实施方案中,第三培养基包含10pM Y-27632和1pM SB-431542。在某些实施方案中,第三培养基进一步包含VEGF和bFGF。在某些情况下,第一培养基和/或第二培养基不含胰岛素。

[1192] 可以将本文提供的细胞在表面(诸如合成表面)上培养,以支持和/或促进多能细胞分化为内皮细胞。在一些实施方案中,该表面包含聚合物材料,包括但不限于所选的一种或多种丙烯酸酯单体的均聚物或共聚物。丙烯酸酯单体和甲基丙烯酸酯单体的非限制性实例包括四(乙二醇)二丙烯酸酯、二甲基丙烯酸甘油酯、1,4-丁二醇二甲基丙烯酸酯、聚(乙二醇)二丙烯酸酯、二(乙二醇)二甲基丙烯酸酯、四(乙二醇)二甲基丙烯酸酯、1,6-己二醇

丙氧基化物二丙烯酸酯、新戊二醇二丙烯酸酯、三羟甲基丙烷苯甲酸二丙烯酸酯、乙氧基化三羟甲基丙烷(1EO/QH)甲酯、三环[5.2.1.02,6]癸烷二甲醇二丙烯酸酯、新戊二醇脱氧二丙烯酸酯和三羟甲基丙烷三丙烯酸酯。丙烯酸酯按照本领域已知的方式合成或从商业供应商获得,所述商业供应商诸如Polysciences,Inc.、Sigma Aldrich,Inc.和Sartomer,Inc。

[1193] 在一些实施方案中,可以将内皮细胞接种到聚合物基质上。在一些情况下,聚合物基质是可生物降解的。合适的可生物降解的基质是本领域众所周知的并且包括胶原蛋白-GAG、胶原蛋白、纤维蛋白、PLA、PGA和PLA/PGA共聚物。另外的可生物降解的材料包括聚(酸酐)、聚(羟基酸)、聚(原酸酯)、聚(富马酸丙酯)、聚(己内酯)、聚酰胺、聚氨基酸、聚缩醛、可生物降解的聚氰基丙烯酸酯、可生物降解的聚氨酯和多糖。

[1194] 也可以使用不可生物降解的聚合物。其他不可生物降解但生物相容的聚合物包括聚吡咯、聚苯胺、聚噻吩、聚苯乙烯、聚酯、不可生物降解的聚氨酯、聚脲、聚(乙烯乙酸乙烯酯)、聚丙烯、聚甲基丙烯酸酯、聚乙烯、聚碳酸酯和聚(环氧乙烷)。聚合物基质可以形成为任何形状,例如颗粒、海绵、管、球体、线、卷绕线、毛细管网络、膜、纤维、网或片。聚合物基质可被修饰为包含天然或合成的细胞外基质材料和因子。

[1195] 可以将聚合物材料分散在支持材料的表面上。适用于培养细胞的有用的支持材料包括陶瓷物质、玻璃、塑料、聚合物或共聚物、其任何组合,或一种材料在另一种材料上的涂层。在一些情况下,玻璃包括钠钙玻璃、耐热玻璃、高硅氧玻璃、石英玻璃、硅或这些玻璃的衍生物等。

[1196] 在一些情况下,包括树枝状聚合物的塑料或聚合物包括聚(氯乙烯)、聚(乙烯醇)、聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚(乙酸乙烯酯-马来酸酐)、聚(二甲基硅氧烷)单甲基丙烯酸酯、环烯烃聚合物、氟碳聚合物、聚苯乙烯、聚丙烯、聚乙烯亚胺或这些的衍生物等。在一些情况下,共聚物包括聚(乙酸乙烯酯-共-马来酸酐)、聚(苯乙烯-共-马来酸酐)、聚(乙烯-共-丙烯酸)或这些的衍生物等。

[1197] 用于本文提供的方法的内皮细胞及其分化的另外的描述可见于WO2020/018615,其公开内容以引用的方式整体并入本文中。

[1198] 在一些实施方案中,经工程化的内皮细胞(诸如从一个或多个个体供体(例如健康供体)分离的原代内皮细胞或从来源于一个或多个个体供体(例如健康供体)的iPSC分化而来的内皮细胞)的群体被维持在培养基中,在一些情况下在施用之前被扩增。在某些实施方案中,内皮细胞群体在施用前被冷冻保存。

[1199] 在一些实施方案中,本技术涉及经工程化的内皮细胞,诸如从一个或多个个体供体(例如健康供体)分离的原代内皮细胞或从来源于一个或多个个体供体(例如健康供体)的iPSC分化而来的内皮细胞,其过表达致耐受因子(例如CD47),具有降低的一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子(例如,一种或多种MHC I类人白细胞抗原和/或一种或多种MHC II类人白细胞抗原)的表达或缺乏该表达。

[1200] 在一些实施方案中,提供的经工程化的内皮细胞逃避免疫识别。在一些实施方案中,本文所述的经工程化的内皮细胞(诸如从一个或多个个体供体(例如健康供体)分离的原代内皮细胞或从来源于一个或多个个体供体(例如健康供体)的iPSC分化而来的内皮细胞)不会活化患者(例如,施用后的接受者)的免疫反应。提供了通过向有需要的受试者(例如接受者)或患者施用本文所述的经工程化的内皮细胞群体来治疗疾病的方法。

[1201] 在一些实施方案中,将经工程化的内皮细胞(诸如从一个或多个个体供体(例如健康供体)分离的原代内皮细胞或从来源于一个或多个个体供体(例如健康供体)的iPSC分化而来的内皮细胞)施用于患者(例如,有需要的人患者)。可以将经工程化的内皮细胞施用于患有疾病或疾患的患者,该疾病或疾患诸如但不限于心血管疾病、血管疾病、外周血管疾病、缺血性疾病、心肌梗塞、充血性心力衰竭、外周血管阻塞性疾病、中风、再灌注损伤、肢体缺血、神经病变(例如,周围神经病变或糖尿病性神经病变)、器官衰竭(例如,肝脏衰竭、肾衰竭等)、糖尿病、类风湿性关节炎、骨质疏松、血管损伤、组织损伤、高血压、心绞痛以及冠状动脉疾病引起的心肌梗塞、肾血管性高血压、肾动脉狭窄引起的肾功能衰竭、下肢跛行等。在某些实施方案中,患者已经患有或正患有短暂性脑缺血发作或中风,在一些情况下,这可能是由于脑血管疾病引起的。在一些实施方案中,施用经工程化的内皮细胞以治疗组织缺血(例如在动脉粥样硬化、心肌梗塞和肢体缺血中发生的组织缺血),并且修复损伤的血管。在一些情况下,该细胞被用于移植物的生物工程化。

[1202] 例如,经工程化的内皮细胞可以被用于细胞疗法中以用于修复缺血组织、形成血管和心脏瓣膜、对人工血管进行工程化、修复受损血管以及诱导经工程化的组织中血管的形成(例如,移植前)。此外,内皮细胞可以被进一步修饰以递送剂来靶向和治疗肿瘤。

[1203] 在许多实施方案中,本文提供了一种修复或替换需要血管细胞或血管形成的组织的方法。该方法涉及向需要此种治疗的人患者施用含有经工程化的内皮细胞(诸如分离的原代内皮细胞或分化的内皮细胞)的组合物以促进此种组织中的血管形成。需要血管细胞或血管形成的组织可以是心脏组织、肝脏组织、胰腺组织、肾组织、肌肉组织、神经组织、骨组织等,其可以是受损的并且以过度细胞死亡为特征的组织、有受损风险的组织或经人工工程化的组织。

[1204] 在一些实施方案中,可通过施用内皮细胞来治疗可能与心脏疾病或病症相关的血管疾病,该内皮细胞诸如但不限于如本文所述获得的定形血管内皮细胞和心内膜内皮细胞。此类血管疾病包括但不限于冠状动脉疾病、脑血管疾病、主动脉狭窄、主动脉瘤、外周动脉疾病、动脉粥样硬化、静脉曲张、血管病、缺乏冠状动脉灌注的心脏梗塞区域、不愈合的伤口、糖尿病或非糖尿病性溃疡,或希望诱导血管形成的任何其他疾病或病症。

[1205] 在某些实施方案中,内皮细胞被用于改进在血管重建手术中使用的假体植入物(例如,由诸如Dacron和Gortex的合成材料制成的血管)。例如,假体动脉移植物通常用于替换灌注重要器官或肢体的患病动脉。在其他实施方案中,经工程化的内皮细胞被用于覆盖假体心脏瓣膜的表面,以通过使瓣膜表面不易形成血栓来降低栓塞形成的风险。

[1206] 可使用众所周知的外科技术将所概述的内皮细胞移植到患者中,以将组织和/或分离的细胞移植到血管中。在一些实施方案中,通过注射(例如,心肌内注射、冠状动脉内注射、经心内膜注射、经心外膜注射、经皮注射)、输注、移植和植入将该细胞引入到患者的心脏组织中。

[1207] 内皮细胞的施用(递送)包括但不限于皮下或胃肠外施用,包括静脉内、动脉内(例如,冠状动脉内)、肌内、腹膜内、心肌内、经心内膜、经心外膜、鼻内施用以及鞘内施用,和输注技术。

[1208] 如本领域技术人员将理解的,使用本领域已知的技术移植细胞,这取决于细胞类型和这些细胞的最终用途。在一些实施方案中,静脉内或通过注射将本文提供的细胞移植

在患者体内的特定位置处。当将细胞移植在特定位置处时,可将细胞悬浮在凝胶基质中,以防止它们在固定时分散。

[1209] 示例性内皮细胞类型包括但不限于毛细血管内皮细胞、血管内皮细胞、主动脉内皮细胞、动脉内皮细胞、静脉内皮细胞、肾内皮细胞、脑内皮细胞、肝内皮细胞等。

[1210] 本文概述的内皮细胞,诸如分离的原代内皮细胞或分化的内皮细胞可以表达一种或多种内皮细胞标志物。此类标志物的非限制性实例包括VE-钙粘蛋白(CD144)、ACE(血管紧张素转换酶)(CD143)、BNH9/BNF13、CD31、CD34、CD54(ICAM-1)、CD62E(E-选择素)、CD105(内皮糖蛋白(Endoglin))、CD146、Endocan(ESM-1)、Endoglyx-1、内皮粘蛋白(Endomucin)、Eotaxin-3、EPAS1(内皮PAS结构域蛋白1)、因子VIII相关抗原、FLI-1、Flk-1(KDR、VEGFR-2)、FLT-1(VEGFR-1)、GATA2、GBP-1(鸟苷酸结合蛋白-1)、GRO-α、HEX、ICAM-2(细胞间粘附分子2)、LMO2、LYVE-1、MRB(神奇迂回(magic roundabout))、核仁素、PAL-E(病理解剖学Leiden-内皮(pathologische anatomie Leiden-endothelium))、RTK、sVCAM-1、TALI、TEM1(肿瘤内皮标志物1)、TEM5(肿瘤内皮标志物5)、TEM7(肿瘤内皮标志物7)、血栓调节蛋白(TM、CD141)、VCAM-1(血管细胞粘附分子-1)(CD106)、VEGF、vWF(冯威里氏因子(von Willebrand factor))、ZO-1、内皮细胞选择性粘附分子(ESAM)、CD102、CD93、CD184、CD304和DLL4。

[1211] 在一些实施方案中,内皮细胞被进一步遗传修饰为表达编码可用于治疗病症/疾患或改善该病症/疾患的症状的所关注的蛋白质(诸如但不限于酶、激素、受体、配体或药物)的外源性基因。用于遗传修饰内皮细胞的标准方法描述于例如US5,674,722中。

[1212] 此类内皮细胞可用于提供可用于预防或治疗疾病的多肽或蛋白质的组成型合成和递送。以此方式,多肽被直接分泌到个体的血流或身体其他区域(例如,中枢神经系统)中。在一些实施方案中,内皮细胞可以被修饰以分泌胰岛素、凝血因子(例如,因子VIII或血管性血友病因子(von Willebrand Factor))、α-1抗胰蛋白酶、腺苷脱氨酶、组织纤溶酶原活化子、白细胞介素(例如,IL-1、IL-2、IL-3)等。

[1213] 在某些实施方案中,可以以改善内皮细胞在植入的移植物的情况下的性能的方式修饰内皮细胞。非限制性例示性实例包括分泌或表达血栓溶解剂以防止管腔内凝块形成、分泌平滑肌增殖抑制剂以防止由于平滑肌肥大导致的管腔狭窄,以及表达和/或分泌内皮细胞有丝分裂原或自分泌因子以刺激内皮细胞增殖并改善移植物管腔内皮细胞内衬的程度或持续时间。

[1214] 在一些实施方案中,经工程化的内皮细胞被用于将治疗水平的分泌的产物递送至特定器官或肢体。例如,可将体外工程化(转导)的内皮细胞内衬的血管植入物移植到特定的器官或肢体中。经转导的内皮细胞的分泌的产物将以高浓度递送至灌注组织,从而达到靶向解剖位置的预期效果。

[1215] 在其他实施方案中,内皮细胞被进一步遗传修饰为含有当由血管化肿瘤中的内皮细胞表达时破坏或抑制血管生成的基因。在一些情况下,还可以将内皮细胞遗传修饰为表达本文所述的可选择自杀基因中的任何一种,其允许在完成肿瘤治疗后对植入的内皮细胞进行阴性选择。

[1216] 在一些实施方案中,将本文所述的内皮细胞(诸如分离的原代内皮细胞或分化的内皮细胞)施用于接受者受试者以治疗选自由以下组成的组的血管病症:血管损伤、心血管

疾病、血管疾病、外周血管疾病、缺血性疾病、心肌梗塞、充血性心力衰竭、外周血管阻塞性疾病、高血压、缺血性组织损伤、再灌注损伤、肢体缺血、中风、神经病变(例如,周围神经病变或糖尿病性神经病变)、器官衰竭(例如,肝脏衰竭、肾衰竭等)、糖尿病、类风湿性关节炎、骨质疏松、脑血管疾病、高血压、心绞痛以及冠状动脉疾病引起的心肌梗塞、肾血管性高血压、肾动脉狭窄引起的肾功能衰竭、其他血管疾患或疾病。

[1217] f.上皮细胞

[1218] 可以在细胞疗法产品制造过程的任何阶段对待用于细胞疗法产品中的上皮细胞进行针对供体能力的特性分析。

[1219] 细胞疗法产品中使用的上皮细胞可以是原代上皮细胞。如本文任何地方所描述的用于对细胞群体进行针对供体能力的特性分析的方法可以对原代(例如,经基因组编辑的)上皮细胞进行。

[1220] 如本文其他地方所述,细胞疗法产品中使用的上皮细胞可以是多能干细胞(iPSC)来源的上皮细胞。如本文任何地方所描述的用于对细胞群体进行针对供体能力的特性分析的方法也可以对能够分化形成上皮细胞的干细胞进行。如本文任何地方所描述的用于对细胞群体进行针对供体能力的特性分析的方法也可以对干细胞来源的(例如,经基因组编辑的)上皮细胞进行。

[1221] 如本公开的上下文中提及的有关上皮细胞的相关信息(包括关于上皮细胞在被用于细胞疗法时的所需特征的某些信息)在本领域中是已知的。应当理解,本文所述的关于上皮细胞的实施方案可以容易且适当地与描述HIP细胞(例如,表现出降低的MHC I类和/或MHC II类分子中的一种或多种分子的表达以及增加的至少一种致耐受因子的表达)的实施方案以及描述安全开关和如本文所述的其他经修饰的/经基因编辑的细胞的实施方案相组合。可在细胞疗法产品制造期间的编辑过程的任何阶段对待用于细胞疗法产品中的上皮细胞进行针对供体能力的特性分析。

[1222] 本文所述的上皮细胞可用于治疗或预防受试者的疾病。

[1223] 视网膜色素上皮(RPE)细胞

[1224] 如本公开的上下文中提及的有关RPE细胞的相关信息(包括关于RPE细胞在被用于细胞疗法时的所需特征的某些信息)在本领域中是已知的。在一些实施方案中,如本文所提供的那样被工程化或修饰的细胞是原代视网膜色素上皮(RPE)细胞。在一些实施方案中,原代RPE细胞分离或获得自一个或多个个体供体受试者,诸如一个或多个个体健康供体(例如,未知或未被怀疑患有疾病或感染(例如,未表现出疾病或感染的临床体征)的受试者)。如本领域技术人员将理解的,从个体分离或获得RPE细胞的方法可以使用已知技术来实现。本文提供了含有本文所述的修饰(例如遗传修饰)的经工程化的原代RPE细胞,用于随后移植或植入到受试者(例如,接受者)中。

[1225] 在一些实施方案中,从受试者或个体获得(例如,收获、提取、移除或取出)原代RPE细胞。在一些实施方案中,由RPE细胞集合产生原代RPE细胞,使得该RPE细胞来自一个或多个受试者(例如,一个或多个人,包括一个或多个健康人)。在一些实施方案中,原代RPE细胞集合来自1-100个、1-50个、1-20个、1-10个、1个或多个、2个或更多个、3个或更多个、4个或更多个、5个或更多个、10个或更多个、20个或更多个、30个或更多个、40个或更多个、50个或更多个,或100个或更多个受试者。在一些实施方案中,供体受试者与患者(例如,施用治疗

性细胞的接受者)不同。在一些实施方案中,RPE细胞集合不包括来自患者的细胞。在一些实施方案中,从中获得RPE细胞集合的供体受试者中的一个或多个供体受试者与患者不同。

[1226] 在一些实施方案中,如本文所提供的细胞是从经工程化的iPSC分化而来的RPE细胞,该经工程化的iPSC含有本文所述的修饰(例如遗传修饰)并且被分化为RPE细胞。如本领域技术人员将理解的,用于分化的方法取决于使用已知技术的所需细胞类型。在一些实施方案中,分化为RPE细胞的细胞可以用于随后移植或植入到受试者(例如,接受者)中。

[1227] 用于使多能干细胞分化为RPE细胞的可用方法描述于例如US9,458,428和US9,850,463中,其公开内容以引用的方式以其整体(包括说明书)并入本文中。用于从人诱导型多能干细胞产生RPE细胞的另外的方法可见于例如Lamba等人,PNAS,2006,103(34):12769-12774;Mellough等人,Stem Cells,2012,30(4):673-686;Idelson等人,Cell Stem Cell,2009,5(4):396-408;Rowland等人,Journal of Cellular Physiology,2012,227(2):457-466,Buchholz等人,Stem Cells Trans Med,2013,2(5):384-393,以及da Cruz等人,Nat Biotech,2018,36:328-337。

[1228] 已经使用Kamao等人,Stem Cell Reports 2014:2:205-18中概述的技术将人多能干细胞分化为RPE细胞,该文献据此以引用的方式整体并入,特别是其中概述的用于分化技术和试剂的方法和试剂;还参见Mandai等人,N Engl J Med,2017,376:1038-1046,其中的用于生成RPE细胞片层和移植到患者中的技术的内容整体并入本文中。可以如本领域已知的那样,通常通过评价RPE相关和/或特异性标志物的存在或通过在功能上测量来测定分化。参见例如Kamao等人,Stem Cell Reports,2014,2(2):205-18,其内容以引用的方式整体并入本文中,特别是结果小节的第一段中概述的标志物。

[1229] 在一些实施方案中,通过体外分化从经工程化的多能细胞群体产生经工程化的视网膜色素上皮(RPE)细胞群体的方法包括:(a)在包含选自由活化素A、bFGF、BMP4/7、DKK1、IGF1、头蛋白、BMP抑制剂、ALK抑制剂、ROCK抑制剂和VEGFR抑制剂组成的组的因子中的任一种因子的第一培养基中培养经工程化的多能细胞群体,以产生前RPE细胞群体;以及(b)在与第一培养基不同的第二培养基中培养前RPE细胞群体,以产生经工程化的RPE细胞群体。在一些实施方案中,ALK抑制剂是SB-431542、其衍生物或其变体。在一些情况下,ALK抑制剂的浓度范围为约2mM至约10pM。在一些实施方案中,ROCK抑制剂是Y-27632、其衍生物或其变体。在一些情况下,ROCK抑制剂的浓度范围为约1pM至约10pM。在一些实施方案中,第一培养基和/或第二培养基不含动物血清。

[1230] 可以如本领域已知的那样,通常通过评价RPE相关和/或特异性标志物的存在或通过在功能上测量来测定分化。参见例如Kamao等人,Stem Cell Reports,2014,2(2):205-18,其内容以引用的方式整体并入本文中,特别是结果小节。

[1231] RPE细胞的另外的描述(包括用于它们的分化的方法和在本技术中使用的方法)可见于WO2020/018615,其公开内容以引用的方式整体并入本文中。

[1232] 在一些实施方案中,经工程化的RPE细胞(诸如从一个或多个个体供体(例如健康供体)分离的原代RPE细胞或从来源于一个或多个个体供体(例如健康供体)的iPSC分化而来的RPE细胞)的群体被维持在培养基中,在一些情况下在施用之前被扩增。在某些实施方案中,RPE细胞群体在施用前被冷冻保存。

[1233] 示例性RPE细胞类型包括但不限于视网膜色素上皮(RPE)细胞、RPE祖细胞、未成熟

RPE细胞、成熟RPE细胞、功能性RPE细胞等。

[1234] 在一些实施方案中,RPE细胞(诸如从一个或多个个体供体(例如健康供体)分离的原代RPE细胞或从来源于一个或多个个体供体(例如健康供体)的iPSC分化而来的RPE细胞)具有与原生RPE细胞类似或基本上类似的遗传表达谱。当在平面基底上生长至融合时,此类RPE细胞可能具有原生RPE细胞的多边形、平面片状形态。

[1235] 在一些实施方案中,本技术涉及经工程化的RPE细胞(诸如从一个或多个个体供体(例如健康供体)分离的原代RPE细胞或从来源于一个或多个个体供体(例如健康供体)的iPSC分化而来的RPE细胞),其过表达致耐受因子(例如CD47),具有降低的一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子(例如,一种或多种MHC I类人白细胞抗原和/或一种或多种MHC II类人白细胞抗原)的表达或缺乏该表达。

[1236] 在一些实施方案中,提供的经工程化的RPE细胞逃避免疫识别。在一些实施方案中,本文所述的经工程化的RPE细胞(诸如从一个或多个个体供体(例如健康供体)分离的原代RPE细胞或从来源于一个或多个个体供体(例如健康供体)的iPSC分化而来的RPE细胞)不会活化患者(例如,施用后的接受者)的免疫反应。提供了通过向有需要的受试者(例如,接受者)或患者施用本文所述的经工程化的RPE细胞群体来治疗疾病的方法。

[1237] 可以将RPE细胞植入到患有黄斑变性的患者或具有受损的RPE细胞的患者。在一些实施方案中,患者患有年龄相关性黄斑变性(AMD)、早期AMD、中期AMD、晚期AMD、非新生血管性年龄相关性黄斑变性、干性黄斑变性(干性年龄相关性黄斑变性)、湿性黄斑变性(湿性年龄相关性黄斑变性)、青少年黄斑变性(JMD)(例如,斯塔加特病(Stargardt disease)、贝斯特病(Best disease)和青少年视网膜劈裂)、莱伯氏先天性黑蒙(Leber's Congenital Ameurosis)或色素性视网膜炎。在其他实施方案中,患者患有视网膜脱离。

[1238] 对于治疗应用,根据所公开的方法制备的细胞通常可以以包含等渗赋形剂的药物组合物的形式提供,并且在对于人施用足够无菌的条件下制备。对于细胞组合物的药物制剂的一般原则,参见"Cell Therapy:Stem Cell Transplantation,Gene Therapy,and Cellular Immunotherapy,"Morstyn和Sheridan编辑,Cambridge University Press,1996;和"Hematopoietic Stem Cell Therapy,"E.D.Ball、J.Lister和P.Law,Churchill Livingstone,2000。可以将细胞包装在适合分配或临床使用的装置或容器中。

[1239] 甲状腺细胞

[1240] 如本公开的上下文中提及的有关甲状腺细胞的相关信息(包括关于甲状腺细胞在被用于细胞疗法时的所需特征的某些信息)在本领域中是已知的。在一些实施方案中,如本文所提供的那样被工程化或修饰的细胞是原代甲状腺细胞。在一些实施方案中,原代甲状腺细胞分离或获得自一个或多个个体供体受试者,诸如一个或多个个体健康供体(例如,未知或未被怀疑患有疾病或感染(例如,未表现出疾病或感染的临床体征)的受试者)。如本领域技术人员将理解的,从个体分离或获得甲状腺细胞的方法可以使用已知技术来实现。本文提供了含有本文所述的修饰(例如遗传修饰)的经工程化的原代甲状腺细胞,用于随后移植或植入到受试者(例如,接受者)中。

[1241] 在一些实施方案中,从受试者或个体获得(例如,收获、提取、移除或取出)原代甲状腺细胞。在一些实施方案中,由甲状腺细胞集合产生原代甲状腺细胞,使得该甲状腺细胞来自一个或多个受试者(例如,一个或多个人,包括一个或多个健康的人)。在一些实施方案

中,原代甲状腺细胞集合来自1-100个、1-50个、1-20个、1-10个、1个或多个、2个或更多个、3个或更多个、4个或更多个、5个或更多个、10个或更多个、20个或更多个、30个或更多个、40个或更多个、50个或更多个,或100个或更多个受试者。在一些实施方案中,供体受试者与患者(例如,施用治疗性细胞的接受者)不同。在一些实施方案中,甲状腺细胞集合不包括来自患者的细胞。在一些实施方案中,从中获得甲状腺细胞集合的供体受试者中的一个或多个供体受试者与患者不同。

[1242] 在一些实施方案中,如本文所提供的细胞是从经工程化的iPSC分化而来的甲状腺细胞,该经工程化的iPSC含有本文所述的修饰(例如遗传修饰)并且被分化为甲状腺细胞。如本领域技术人员将理解的,用于分化的方法取决于使用已知技术的所需细胞类型。在一些实施方案中,分化为甲状腺细胞的细胞可以用于随后移植或植入到受试者(例如,接受者)中。

[1243] 在一些实施方案中,含有本文所述的修饰的经工程化的多能细胞被分化为甲状腺祖细胞和甲状腺滤泡类器官,它们可以分泌甲状腺激素以解决自身免疫性甲状腺炎。用于分化出甲状腺细胞的技术是本领域已知的。参见例如Kurmann等人,Cell Stem Cell,2015年11月5日;17(5):527-42,其以引用的方式整体并入本文中,特别是用于从人多能干细胞生成甲状腺细胞以及用于移植技术的方法和试剂。可以如本领域已知的那样,通常通过评价甲状腺细胞相关或特异性标志物的存在或通过在功能上测量来测定分化。

[1244] 在一些实施方案中,经工程化的甲状腺细胞(诸如从一个或多个个体供体(例如健康供体)分离的原代甲状腺细胞或从来源于一个或多个个体供体(例如健康供体)的iPSC分化而来的甲状腺细胞)的群体被维持在培养基中,在一些情况下在施用之前被扩增。在某些实施方案中,甲状腺细胞群体在施用前被冷冻保存。

[1245] 在一些实施方案中,本技术涉及经工程化的甲状腺细胞(诸如从一个或多个个体供体(例如健康供体)分离的原代甲状腺细胞或从来源于一个或多个个体供体(例如健康供体)的iPSC分化而来的甲状腺细胞),其过表达致耐受因子(例如CD47),并且具有降低的一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子(例如,一种或多种MHC I类人白细胞抗原和/或一种或多种MHC II类人白细胞抗原)的表达或缺乏该表达。

[1246] 在一些实施方案中,提供的经工程化的甲状腺细胞逃避免疫识别。在一些实施方案中,本文所述的经工程化的甲状腺细胞(诸如从一个或多个个体供体(例如健康供体)分离的原代甲状腺细胞或从来源于一个或多个个体供体(例如健康供体)的iPSC分化而来的β胰岛细胞)不会活化患者(例如,施用后的接受者)的免疫反应。

[1247] 提供了通过向有需要的受试者(例如,接受者)或患者施用本文所述的经工程化的内皮细胞群体来治疗疾病的方法。

[1248] g.心脏细胞

[1249] 可以在细胞疗法产品制造过程的任何阶段对待用于细胞疗法产品中的心脏细胞进行针对供体能力的特性分析。

[1250] 细胞疗法产品中使用的心脏细胞可以是原代心脏细胞。如本文任何地方所描述的用于对细胞群体进行针对供体能力的特性分析的方法可以对原代(例如,经基因组编辑的)心脏细胞进行。

[1251] 如本文其他地方所述,细胞疗法产品中使用的心脏细胞可以是多能干细胞(iPSC)

来源的心脏细胞。如本文任何地方所描述的用于对细胞群体进行针对供体能力的特性分析的方法也可以对能够分化形成心脏细胞的干细胞进行。如本文任何地方所描述的用于对细胞群体进行针对供体能力的特性分析的方法也可以对干细胞来源的(例如,经基因组编辑的)心脏细胞进行。

[1252] 如本公开的上下文中提及的有关心脏细胞的相关信息(包括关于心脏细胞在被用于细胞疗法时的所需特征的某些信息)在本领域中是已知的。应当理解,本文所述的关于心脏细胞的实施方案可以容易且适当地与描述HIP细胞(例如,表现出降低的MHC I类和/或MHC II类分子中的一种或多种分子的表达以及增加的至少一种致耐受因子的表达)的实施方案以及描述安全开关和如本文所述的其他经修饰的/经基因编辑的细胞的实施方案相组合。可以在细胞疗法产品制造期间的编辑过程的任何阶段对待用于细胞疗法产品中的心脏细胞进行针对供体能力的特性分析。

[1253] 本文所述的心脏细胞可用于治疗或预防受试者的疾病。

[1254] 本文提供了从HIP细胞分化而来的心脏细胞类型,用于随后移植或植入到受试者(例如,接受者)中。如本领域技术人员将理解的,用于分化的方法取决于使用已知技术的所需细胞类型。示例性心脏细胞类型包括但不限于心肌细胞、结节心肌细胞、传导心肌细胞、工作心肌细胞、心肌细胞前体细胞、心肌祖细胞、心脏干细胞、心脏肌肉细胞、心房心脏干细胞、心室心脏干细胞、心外膜细胞、造血细胞、血管内皮细胞、心内膜内皮细胞、心脏瓣膜间质细胞、心脏起搏细胞等。

[1255] 在一些实施方案中,将本文所述的心脏细胞施用于接受者受试者以治疗选自由以下组成的组的心脏病症:小儿心肌病、年龄相关性心肌病、扩张性心肌病、肥厚性心肌病、限制性心肌病、慢性缺血性心肌病、围产期心肌病、炎性心肌病、特发性心肌病、其他心肌病、心肌缺血再灌注损伤、心室功能障碍、心力衰竭、充血性心力衰竭、冠心病、终末期心脏疾病、动脉粥样硬化、缺血、高血压、再狭窄、心绞痛、风湿性心脏、动脉炎症、心血管疾病、心肌梗塞、心肌缺血、充血性心力衰竭、心肌梗塞、心肌缺血、心脏损伤、心肌缺血、血管疾病、获得性心脏疾病、先天性心脏疾病、动脉粥样硬化、冠状动脉疾病、传导系统功能障碍、冠状动脉功能障碍、肺动脉高压、心律失常、肌营养不良、肌肉质量异常、肌肉变性、心肌炎、感染性心肌炎、药物或毒素诱导的肌肉异常、过敏性心肌炎和自身免疫性心内膜炎。

[1256] 因此,本文提供了用于治疗和预防有需要的受试者中的心脏损伤或心脏疾病或心脏病症的方法。本文所述的方法可用于治疗、改善、预防许多种心脏疾病或其症状(诸如导致心脏结构和/或功能病理性损伤的那些疾病或其症状)或减缓其进展。术语“心脏疾病”、“心脏病症”和“心脏损伤”在本文中可互换使用,并且是指与心脏(包括瓣膜、内皮、梗塞区带或心脏的其他组成部分或结构)相关的疾患和/或病症。此类心脏疾病或心脏相关疾病包括但不限于心肌梗塞、心力衰竭、心肌病、先天性心脏缺陷、心脏瓣膜疾病或功能障碍、心内膜炎、风湿热、二尖瓣脱垂、感染性心内膜炎、肥厚性心肌病、扩张性心肌病、心肌炎、心脏扩大和/或二尖瓣关闭不全等。

[1257] 在一些实施方案中,心肌细胞前体包括能够产生包括成熟(末期)心肌细胞的后代的细胞。通常可以使用选自GATA-4、Nkx2.5和MEF-2转录因子家族的一种或多种标志物来鉴定心肌细胞前体细胞。在一些情况下,心肌细胞是指表达来自以下列表的一种或多种标志物(有时至少2、3、4或5种标志物)的未成熟心肌细胞或成熟心肌细胞:心肌肌钙蛋白I

(cTnl)、心肌肌钙蛋白T(cTnT)、肌节肌球蛋白重链(MHC)、GATA-4、Nkx2.5、N-钙粘蛋白、β2-肾上腺素受体、ANF、MEF-2转录因子家族、肌酸激酶MB(CK-MB)、肌红蛋白和心房利尿钠因子(ANF)。在一些实施方案中,心脏细胞表现出自发的周期性收缩活动。在一些情况下,当心脏细胞在具有适当Ca^{2+}浓度和电解质平衡的合适组织培养环境中培养时,不必向培养基中添加任何另外的组分就可以观察到细胞沿细胞的一个轴以周期性方式收缩,然后从收缩中释放。在一些实施方案中,心脏细胞是低免疫原性心脏细胞。

[1258] 在一些实施方案中,通过体外分化从低免疫原性多能(HIP)细胞群体产生低免疫原性心脏细胞群体的方法包括:(a)在包含GSK抑制剂的培养基中培养HIP细胞群体;(b)在包含WNT拮抗剂的培养基中培养HIP细胞群体以产生前心脏细胞群体;以及(c)在包含胰岛素的培养基中培养前心脏细胞群体以产生低免疫心脏细胞群体。在一些实施方案中,GSK抑制剂是CHIR-99021、其衍生物或其变体。在一些情况下,GSK抑制剂的浓度范围为约2mM至约10mM。在一些实施方案中,WNT拮抗剂是IWR1、其衍生物或其变体。在一些情况下,WNT拮抗剂的浓度范围为约2mM至约10mM。

[1259] 在一些实施方案中,低免疫原性心脏细胞群体与非心脏细胞分离。在一些实施方案中,在施用前扩增分离的低免疫原性心脏细胞群体。在某些实施方案中,分离的低免疫原性心脏细胞群体在施用之前被扩增和冷冻保存。

[1260] 用于使诱导型多能干细胞或多能干细胞分化为心脏细胞的其他有用的方法描述于例如US2017/0152485、US2017/0058263、US2017/0002325、US2016/0362661、US2016/0068814、US9,062,289、US7,897,389和US7,452,718中。用于从诱导型多能干细胞或多能干细胞产生心脏细胞的另外的方法描述于例如Xu等人,Stem Cells and Development,2006,15(5):631-9;Burridge等人,Cell Stem Cell,2012,10:16-28;以及Chen等人,Stem Cell Res,2015,15(2):365-375中。

[1261] 在各种实施方案中,可以将低免疫原性心脏细胞在包含以下的培养基中培养:BMP途径抑制剂、WNT信号传导活化子、WNT信号传导抑制剂、WNT激动剂、WNT拮抗剂、Src抑制剂、EGFR抑制剂、PCK活化子、细胞因子、生长因子、心性剂(cardiotropic agent)、化合物等。

[1262] WNT信号传导活化子包括但不限于CHIR99021。PCK活化子包括但不限于PMA。WNT信号传导抑制剂包括但不限于选自KY02111、SO3031(KY01-I)、SO2031(KY02-I)和SO3042(KY03-I)以及XAV939的化合物。Src抑制剂包括但不限于A419259。EGFR抑制剂包括但不限于AG1478。

[1263] 用于从iPSC生成心脏细胞的剂的非限制性实例包括活化素A、BMP4、Wnt3a、VEGF、可溶性卷曲蛋白、环孢菌素A、血管紧张素II、去氧肾上腺素、抗坏血酸、二甲基亚砜、5-氮杂-2'-脱氧胞苷等。

[1264] 可以将本文提供的细胞在表面诸如合成表面上培养,以支持和/或促进低免疫原性多能细胞分化为心脏细胞。在一些实施方案中,该表面包含聚合物材料,包括但不限于所选的一种或多种丙烯酸酯单体的均聚物或共聚物。丙烯酸酯单体和甲基丙烯酸酯单体的非限制性实例包括四(乙二醇)二丙烯酸酯、二甲基丙烯酸甘油酯、1,4-丁二醇二甲基丙烯酸酯、聚(乙二醇)二丙烯酸酯、二(乙二醇)二甲基丙烯酸酯、四(乙二醇)二甲基丙烯酸酯、1,6-己二醇丙氧基化物二丙烯酸酯、新戊二醇二丙烯酸酯、三羟甲基丙烷苯甲酸二丙烯酸酯、乙氧基化三羟甲基丙烷(1EO/QH)甲酯、三环[$5.2.1.0^{2,6}$]癸烷二甲醇二丙烯酸酯、新戊二醇

脱氧二丙烯酸酯和三羟甲基丙烷三丙烯酸酯。丙烯酸酯按照本领域已知的方式合成或从商业供应商获得,所述商业供应商诸如Polysciences,Inc.、Sigma Aldrich,Inc.和Sartomer,Inc。

[1265] 可以将聚合物材料分散在支持材料的表面上。适用于培养细胞的有用的支持材料包括陶瓷物质、玻璃、塑料、聚合物或共聚物、其任何组合,或一种材料在另一种材料上的涂层。在一些情况下,玻璃包括钠钙玻璃、耐热玻璃、高硅氧玻璃、石英玻璃、硅或这些玻璃的衍生物等。

[1266] 在一些情况下,包括树枝状聚合物的塑料或聚合物包括聚(氯乙烯)、聚(乙烯醇)、聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚(乙酸乙烯酯-马来酸酐)、聚(二甲基硅氧烷)单甲基丙烯酸酯、环烯烃聚合物、氟碳聚合物、聚苯乙烯、聚丙烯、聚乙烯亚胺或这些的衍生物等。在一些情况下,共聚物包括聚(乙酸乙烯酯-共-马来酸酐)、聚(苯乙烯-共-马来酸酐)、聚(乙烯-共-丙烯酸)或这些的衍生物等。

[1267] 可以在心脏冷冻损伤的动物模型中评估如本文所述制备的心脏细胞的功效,该心脏冷冻损伤导致55%的左心室壁组织在未经治疗的情况下变成疤痕组织(Li等人,Ann.Thorac.Surg.62:654,1996;Sakai等人,Ann.Thorac.Surg.8:2074,1999,Sakai等人,Thorac.Cardiovasc.Surg.118:715,1999)。成功的治疗可以减少疤痕面积,限制疤痕扩张,并改善心脏功能(通过收缩压、舒张压和发展压确定)。还可以使用左前降支的远端部分中的栓塞线圈来对心脏损伤进行建模(Watanabe等人,Cell Transplant.7:239,1998),并且可以通过组织学和心脏功能来评价治疗功效。

[1268] 在一些实施方案中,经工程化的心脏细胞(诸如从来源于一个或多个个体供体(例如健康供体)的iPSC分化而来的心脏细胞)的群体被维持在培养基中,在一些情况下在施用之前被扩增。在某些实施方案中,心脏细胞群体在施用前被冷冻保存。

[1269] 在一些实施方案中,本技术涉及经工程化的心脏细胞(诸如从来源于一个或多个个体供体(例如健康供体)的iPSC分化而来的心脏细胞),其过表达致耐受因子(例如CD47),具有降低的一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子(例如,一种或多种MHC I类人白细胞抗原和/或一种或多种MHC II类人白细胞抗原)的表达或缺乏该表达。

[1270] 在一些实施方案中,提供的经工程化的心脏细胞逃避免疫识别。在一些实施方案中,本文所述的经工程化的心脏细胞(诸如从来源于一个或多个个体供体(例如健康供体)的iPSC分化而来的心脏细胞)不会活化患者(例如,施用后的接受者)的免疫反应。提供了通过向有需要的受试者(例如,接受者)或患者施用本文所述的经工程化的心脏细胞群体来治疗疾病的方法。

[1271] 在一些实施方案中,施用包括植入到受试者的心脏组织中、静脉内注射、动脉内注射、冠状动脉内注射、肌内注射、腹膜内注射、心肌内注射、经心内膜注射、经心外膜注射或输注。

[1272] 在一些实施方案中,施用了经工程化的心脏细胞的患者还施用了心脏药物。适用于组合疗法的心脏药物的例示性实例包括但不限于生长因子、编码生长因子的多核苷酸、血管生成剂、钙通道阻断剂、抗高血压剂、抗有丝分裂剂、正性肌力剂、抗动脉粥样硬化剂、抗凝血剂、β-受体阻断剂、抗心律失常剂、抗炎剂、血管扩张剂、溶栓剂、强心苷、抗生素、抗病毒剂、抗真菌剂、原生动物抑制剂、硝酸盐、血管紧张素转换酶(ACE)抑制剂、血管紧张素

II受体拮抗剂、脑钠肽(BNP);抗赘生物剂、类固醇等。

[1273] 可以多种方式监测根据本文提供的方法的疗法的效果。例如,可以利用心电图(ECG)或霍特监测器(holier monitor)来确定治疗功效。ECG是心律和电脉冲的量度,并且是一种用于确定治疗是否改善或维持、预防或减缓受试者心脏电传导的退化的非常有效且非侵入性方式。使用可以长时间佩戴的便携式ECG霍特监测器来监测心脏异常、心律失常病症等也是评估治疗有效性的可靠方法。ECG或核研究可用于确定心室功能的改善。

[1274] 心肌细胞

[1275] 可以在细胞疗法产品制造过程的任何阶段对待用于细胞疗法产品中的心肌细胞进行针对供体能力的特性分析。

[1276] 细胞疗法产品中使用的心肌细胞可以是原代心肌细胞。如本文任何地方所描述的用于对细胞群体进行针对供体能力的特性分析的方法可以对原代(例如,经基因组编辑的)心肌细胞进行。

[1277] 如本文其他地方所述,细胞疗法产品中使用的心肌细胞可以是多能干细胞(iPSC)来源的心肌细胞。如本文任何地方所描述的用于对细胞群体进行针对供体能力的特性分析的方法也可以对能够分化形成心肌细胞的干细胞进行。如本文任何地方所描述的用于对细胞群体进行针对供体能力的特性分析的方法也可以对干细胞来源的(例如,经基因组编辑的)心肌细胞进行。

[1278] 如本公开的上下文中提及的有关心肌细胞的相关信息(包括关于心肌细胞在被用于细胞疗法时的所需特征的某些信息)在本领域中是已知的。应当理解,本文所述的关于心肌细胞的实施方案可以容易且适当地与描述HIP细胞(例如,表现出降低的MHC I类和/或MHC II类分子中的一种或多种分子的表达以及增加的至少一种致耐受因子的表达)的实施方案以及描述安全开关和如本文所述的其他经修饰的/经基因编辑的细胞的实施方案相组合。可在细胞疗法产品制造期间的编辑过程的任何阶段对待用于细胞疗法产品中的心肌细胞进行针对供体能力的特性分析。

[1279] 本文所述的心肌细胞可用于治疗或预防受试者的疾病。

[1280] 本文公开的细胞可以是心肌细胞,例如可以使用心肌细胞群体。应当理解,下文中对“细胞”,例如“心肌细胞”的任何提及也适用于如本申请中所描述的“细胞群体”,例如“心肌细胞群体”。

[1281] 心肌细胞通常表达蛋白质NKX2.5、cTNT、ACTN2、TNNI1、TNNI3、MYH6、MYH7、MYL2和MYL7。因此,这些蛋白质可用作心肌细胞的标志物。

[1282] 在一些实施方案中,一种或多种心肌细胞标志物包括选自由NKX2.5、cTNT、ACTN2、TNNI1、TNNI3、MYH6、MYH7、MYL2和MYL7组成的组的一种或多种标志物。在一些实施方案中,该一种或多种心肌细胞标志物包括MYH6和MYL7。在一些实施方案中,该一种或多种心肌细胞标志物包括NKX2.5、cTNT、MYH6和MYL7。在一些实施方案中,该一种或多种心肌细胞标志物包括NKX2.5和cTNT。

[1283] 可以通过本领域已知的任何方法来产生心肌细胞。

[1284] 在一些实施方案中,心肌细胞可能正在从多能干细胞分化,其中群体具有的一种或多种心肌细胞标志物的存在频率在第8天至第22天或者约第8天至第22天为或为至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、

90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％或98％，并且其中该分化是在第0天启动的。

[1285] 在一些实施方案中，心肌细胞可能从多能干细胞分化而来，其中群体具有的一种或多种心肌细胞标志物的存在频率在第8天至第22天或者约第8天至第22天为或为至少75％、76％、77％、78％、79％、80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％或98％，并且其中该分化是在第0天启动的。

[1286] 在一些实施方案中，该分化是在多能干细胞在包含糖原合酶激酶3(GSK3)抑制剂/Wnt/β-连环蛋白信号传导活化子的培养基中培养的第一天启动的。

[1287] 在一些实施方案中，该一种或多种心肌细胞标志物包括选自由NKX2.5、cTNT、ACTN2、TNNI1、TNNI3、MYH6、MYH7、MYL2和MYL7组成的组的一种或多种标志物。在一些实施方案中，该一种或多种心肌细胞标志物包括MYH6和MYL7。在一些实施方案中，该一种或多种心肌细胞标志物包括NKX2.5、cTNT、MYH6和MYL7。在一些实施方案中，该一种或多种心肌细胞标志物包括NKX2.5和cTNT。

[1288] 在一些实施方案中，群体具有的NKX2.5+/cTNT+细胞的频率在第8、9、10、11天或12天或者约第8、9、10、11天或12天为或为至少75％、76％、77％、78％、79％、80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％或98％。在一些实施方案中，群体具有的NKX2.5+/cTNT+细胞的频率在第8、9、10、11天或12天或者约第8、9、10、11天或12天为或为至少75％、76％、77％、78％、79％、80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％或98％。在一些实施方案中，群体具有的MYH6+/MYL7+细胞的频率在第8、9、10、11天或12天或者约第8、9、10、11天或12天为或为至少75％、76％、77％、78％、79％、80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％或98％。在一些实施方案中，群体具有的NKX2.5+/cTNT+/MYH6+/MYL7+细胞的频率在第8、9、10、11天或12天或者约第8、9、10、11天或12天为或为至少75％、76％、77％、78％、79％、80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％或98％。

[1289] 在一些实施方案中，群体具有的NKX2.5+/cTNT+细胞的频率在第20、21或22天或者约第20、21或22天为或为至少75％、76％、77％、78％、79％、80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％或98％。在一些实施方案中，群体具有的NKX2.5+/cTNT+细胞的频率在第20、21或22天或者约第20、21或22天为或为至少75％、76％、77％、78％、79％、80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％或98％。在一些实施方案中，群体具有的MYH6+/MYL7+细胞的频率在第20、21或22天或者约第20、21或22天为或为至少75％、76％、77％、78％、79％、80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％或98％。在一些实施方案中，群体具有的NKX2.5+/cTNT+/MYH6+/MYL7+细胞的频率在第20、21或22天或者约第20、21或22天为或为至少75％、76％、77％、78％、79％、80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％或98％。

[1290] 在一些实施方案中，群体具有的NKX2.5+/cTNT+细胞或MYH6+/MYL7+细胞或NKX2.5+/cTNT+/MYH6+/MYL7+细胞的频率在第9、10或11天或者约第9、10或11天为或为至少75％、

76％、77％、78％、79％、80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％或98％。在一些实施方案中,群体具有的NKX2.5+/cTNT+细胞或MYH6+/MYL7+细胞或NKX2.5+/cTNT+/MYH6+/MYL7+细胞的频率在第10天或者约第10天为或为至少75％、76％、77％、78％、79％、80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％或98％。

[1291] 在一些实施方案中,群体具有的NKX2.5+/cTNT+细胞或MYH6+/MYL7+细胞或NKX2.5+/cTNT+/MYH6+/MYL7+细胞的频率在第9、10、11或12天或者约第9、10、11或12天为或为至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％或98％。在一些实施方案中,群体具有的NKX2.5+/cTNT+细胞或MYH6+/MYL7+细胞或NKX2.5+/cTNT+/MYH6+/MYL7+细胞的频率在第9、10或11天或者约第9、10或11天为或为至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％或98％。在一些实施方案中,群体具有的NKX2.5+/cTNT+细胞或MYH6+/MYL7+细胞或NKX2.5+/cTNT+/MYH6+/MYL7+细胞的频率在第10天或者约第10天为或为至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％或98％。在一些实施方案中,群体具有的NKX2.5+/cTNT+细胞或MYH6+/MYL7+细胞或NKX2.5+/cTNT+/MYH6+/MYL7+细胞的频率在第8、9、10、11或12天或者约第8、9、10、11或12天为或为至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％或98％。在一些实施方案中,群体具有的NKX2.5+/cTNT+细胞或MYH6+/MYL7+细胞或NKX2.5+/cTNT+/MYH6+/MYL7+细胞的频率在第9、10或11天或者约第9、10或11天为或为至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％或98％。在一些实施方案中,群体具有的NKX2.5+/cTNT+细胞或MYH6+/MYL7+细胞或NKX2.5+/cTNT+/MYH6+/MYL7+细胞的频率在第10天或者约第10天为或为至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％或98％。

[1292] 在一些实施方案中,多能干细胞选自由诱导型多能干细胞、胚胎干细胞、骨髓间充质干细胞、心脏组织干细胞和脂肪组织干细胞组成的组。在一些实施方案中,多能干细胞是诱导型多能干细胞。

[1293] 在一些实施方案中,使用如本文所述的方法、孵育(例如第一次孵育、第二次孵育和/或第三次孵育)和通过接触(例如与解离剂接触)进行的解离中的一种或多种来产生心肌细胞群体。

[1294] 在一些实施方案中,在第2、3、4、5或6天或者约第2、3、4、5或6天使心肌细胞群体与解离剂接触。在一些实施方案中,在第2、3或4天或者约第2、3或4天使心肌细胞群体与解离剂接触。在一些实施方案中,在第4天或者约第4天使心肌细胞群体与解离剂接触。

[1295] 在一些实施方案中,解离剂是或者包括切割酶。在一些实施方案中,切割酶是蛋白酶。在一些实施方案中,蛋白酶是切割赖氨酸或精氨酸残基的C端侧上的肽键的重组酶。在一些实施方案中,蛋白酶是内切肽酶。在一些实施方案中,内切肽酶是胰蛋白酶。在一些实施方案中,蛋白酶选自由胰蛋白酶、胶原蛋白酶、糜蛋白酶、弹性蛋白酶、透明质酸酶、木瓜蛋白酶和分散酶组成的组。在一些实施方案中,胶原蛋白酶是I型胶原蛋白酶、II型胶原蛋白酶或III型胶原蛋白酶。在一些实施方案中,胶原蛋白酶是I型胶原蛋白酶、II型胶原蛋白酶或III型胶原蛋白酶。在一些实施方案中,蛋白酶是胶原蛋白酶。在一些实施方案中,蛋白酶是透明质酸酶。

[1296] 在一些实施方案中,心肌细胞群体处于第8-22天中的任一天或者约第8-22天中的任一天。在一些实施方案中,心肌细胞群体处于第8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21或22天,或者约第8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21或22天。在一些实施方案中,心肌细胞群体处于第8、9、10、11、12、13、14或15天,或者约第8、9、10、11、12、13、14或15天。在一些实施方案中,心肌细胞群体处于第8、9、10、11或12天,或者约第8、9、10、11或12天。在一些实施方案中,心肌细胞群体处于第9、10或11天,或者约第9、10或11天。在一些实施方案中,心肌细胞群体处于第10天或者约第10天。

[1297] 在一些实施方案中,心肌细胞群体是在第8-22天中的任一天或者约第8-22天中的任一天收获的。在一些实施方案中,心肌细胞群体是在第8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21或22天,或者约第8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21或22天收获的。在一些实施方案中,心肌细胞群体是在第8、9、10、11、12、13、14或15天,或者约第8、9、10、11、12、13、14或15天收获的。在一些实施方案中,心肌细胞群体是在第8、9、10、11或12天,或者约第8、9、10、11或12天收获的。在一些实施方案中,心肌细胞群体是在第9、10或11天,或者约第9、10或11天收获的。在一些实施方案中,心肌细胞群体是在第10天或者约第10天收获的。

[1298] 在一些实施方案中,心肌细胞群体具有的NKX2.5+/cTNT+细胞,或MYH6+/MYL7+细胞,或NKX2.5+/cTNT+/MYH6+/MYL7+细胞的频率为或为至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%或98%。在一些实施方案中,分化中的心肌细胞群体具有的NKX2.5+/cTNT+细胞,或MYH6+/MYL7+细胞,或NKX2.5+/cTNT+/MYH6+/MYL7+细胞的频率为或为至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%或98%。在一些实施方案中,分化中的心肌细胞群体具有的NKX2.5+/cTNT+细胞,或MYH6+/MYL7+细胞,或NKX2.5+/cTNT+/MYH6+/MYL7+细胞的频率为或为至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%或98%。在一些实施方案中,分化中的心肌细胞群体具有的NKX2.5+/cTNT+细胞,或MYH6+/MYL7+细胞,或NKX2.5+/cTNT+/MYH6+/MYL7+细胞的频率为或为至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%或98%。

[1299] 在一些实施方案中,心肌细胞群体具有的NKX2.5+/cTNT+细胞,或MYH6+/MYL7+细胞,或NKX2.5+/cTNT+/MYH6+/MYL7+细胞的频率为或为至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%或98%。在一些实施方案中,分化中的心肌细胞群体具有的NKX2.5+/cTNT+细胞,或MYH6+/MYL7+细胞,或NKX2.5+/cTNT+/MYH6+/MYL7+细胞的频率为或为至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%或98%。在一些实施方案中,分化中的心肌细胞群体具有的NKX2.5+/cTNT+细胞,或MYH6+/MYL7+细胞,或NKX2.5+/cTNT+/MYH6+/MYL7+细胞的频率为或为至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%或98%。在一些实施方案中,分化中的心肌细胞群体具有的NKX2.5+/cTNT+细胞,或MYH6+/MYL7+细胞,或NKX2.5+/cTNT+/MYH6+/MYL7+细胞的频率为或为至少95%、96%、97%或98%。

[1300] 在一些实施方案中,细胞群体可以是包含选自以下的一个或多个细胞群体的混合细胞群体:所述第一聚集体中的任何第一聚集体的细胞群体、解离的细胞群体(例如,从第一聚集体解离而来的细胞群体)、所述第二聚集体中的任何第二聚集体的细胞群体,和/或

心肌细胞群体。例如,在一些实施方案中,在某个时间点收获细胞可以包括收获混合细胞群体,诸如包含心肌细胞的第二聚集体和未形成第二聚集体的解离的细胞群体。

[1301] 在一些实施方案中,细胞群体可以是包含以下中的一种或多种的混合细胞群体:(a)第一聚集体,诸如本文所述的第一聚集体中的任何第一聚集体;(b)解离的细胞群体,诸如本文所述的解离的细胞群体中的任何解离的细胞群体;(c)第二聚集体,诸如本文所述的第二聚集体中的任何第二聚集体;和/或(d)心肌细胞群体,例如第二聚集体的心肌细胞群体和/或从第二聚集体分化和/或解离而来的心肌细胞群体。在一些实施方案中,解离的细胞群体按照第二次孵育和/或第三次孵育进行培养但未形成第二聚集体。

[1302] 在一些实施方案中,细胞群体是包含第一聚集体和第二聚集体(诸如本文所述的第一聚集体和/或第二聚集体中的任何第一聚集体和/或第二聚集体)的混合细胞群体。

[1303] 在一些实施方案中,细胞群体是包含第一聚集体、解离的细胞群体和第二聚集体(诸如本文所述的第一聚集体和/或解离的细胞群体和/或第二聚集体中的任何第一聚集体和/或解离的细胞群体和/或第二聚集体)的混合细胞群体。

[1304] 在一些实施方案中,细胞群体是包含第一聚集体和解离的细胞群体(诸如本文所述的第一聚集体和/或解离的细胞群体中的任何第一聚集体和/或解离的细胞群体)的混合细胞群体。

[1305] 在一些实施方案中,细胞群体是包含解离的细胞群体和第二聚集体(诸如本文所述的解离的细胞群体和/或第二聚集体中的任何解离的细胞群体和/或第二聚集体)的混合细胞群体。

[1306] 在一些实施方案中,细胞群体是从第一聚集体(诸如本文所述的第一聚集体中的任何第一聚集体)分化而来的细胞群体。在一些实施方案中,按照本文所述的试剂、条件和/或孵育中的任何试剂、条件和/或孵育使从第一聚集体分化而来的细胞群体分化。

[1307] 在一些实施方案中,细胞群体是从第二聚集体(诸如本文所述的第二聚集体中的任何第二聚集体)分化而来的细胞群体。在一些实施方案中,按照本文所述的试剂、条件和/或孵育中的任何试剂、条件和/或孵育(包括本文所述的第二次和/或第三次孵育中的任何第二次和/或第三次孵育)使从第二聚集体分化而来的细胞群体分化。

[1308] 在一些实施方案中,细胞群体是从第一聚集体(诸如本文所述的第一聚集体中的任何第一聚集体)解离而来的细胞群体。在一些实施方案中,细胞群体从第一聚集体的解离可以通过任何手段和/或试剂和/或条件发生,或由任何手段和/或试剂和/或条件导致。

[1309] 在一些实施方案中,解离的细胞群体按照第二次孵育和/或第三次孵育进行培养但未形成第二聚集体。

[1310] 在一些实施方案中,第一聚集体按照与解离剂的接触和/或第二次孵育和/或第三次孵育进行培养,但是未产生解离的细胞群体。

[1311] 在一些实施方案中,细胞群体是包含一个或多个选自由以下组成的组的细胞群体的混合细胞群体:(a)第一聚集体,诸如本文所述的第一聚集体中的任何第一聚集体,(b)解离的细胞群体,诸如本文所述的解离的细胞群体中的任何解离的细胞群体,(c)第二聚集体,诸如本文所述的第二聚集体中的任何第二聚集体,(d)心肌细胞群体,诸如本文所述的心肌细胞群体中的任何心肌细胞群体,(e)从第一聚集体解离而来的细胞群体,诸如从本文所述的第一聚集体中的任何第一聚集体解离而来的细胞群体,(f)从第二聚集体解离而来

的细胞群体,诸如从本文所述的第二聚集体中的任何第二聚集体解离而来的细胞群体,(g)按照第二次孵育和/或第三次孵育的条件培养的未解离成解离的细胞群体的第一聚集体,诸如本文所述的第一聚集体中的任何第一聚集体,以及(h)按照第二次孵育和/或第三次孵育的条件培养的未形成第二聚集体的解离的细胞群体,诸如本文所述的解离的细胞群体中的任何解离的细胞群体。在一些实施方案中,在第3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23或24天中的任一天或者约第3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23或24天中的任一天,收获以下中的一种或多种:第一聚集体、解离的细胞群体、第二聚集体、心肌细胞群体、从第一聚集体解离的细胞群体、从第二聚集体解离的细胞群体、按照第二次孵育和/或第三次孵育的条件培养的未解离成解离的细胞群体的第一聚集体,以及按照第二次孵育和/或第三次孵育的条件培养的未形成第二聚集体的解离的细胞群体。

[1312] 在一些实施方案中,可以收获、冷冻保存和/或诸如为了治疗疾病或疾患而向受试者施用任何此类细胞群体,例如多能干细胞群体、解离的细胞群体、心肌细胞群体和/或聚集体(例如第一聚集体和/或第二聚集体),包括这些的组合。

[1313] 本文公开的心肌细胞可从多能干细胞分化而来。用于从多能干细胞分化出心肌细胞的方法可以包括将通过培养多能干细胞群体而形成的聚集体与解离剂接触以形成解离的细胞群体,然后将该解离的细胞在一定条件下培养以使该解离的细胞聚集并使它们分化为心肌细胞群体。

[1314] 目前用于使多能干细胞在悬浮状态下分化为心肌细胞的方法是从细胞聚集体(有时也称为簇)(例如,平均直径为约250μm)开始,该细胞聚集体在分化的第一周期间在尺寸上迅速增加(例如,增加至大于500μm),并在整个分化过程中保持在约这一尺寸,直到该细胞聚集体被解离成单细胞以便在分化过程结束时收获和冷冻保存。

[1315] 据认为,将聚集体维持在分化的第一周期间所达到的尺寸(例如大于500μm)或者约分化的第一周期间所达到的尺寸(例如大于500μm)是必要的,以便允许实现多能干细胞向成熟心肌细胞的分化所需的信号传导。因此,在分化期间(例如在分化的第一周期间)将这些大聚集体解离,并允许它们重新聚集成比此种解离之前的聚集体尺寸更小的聚集体,这将是非常常规的。

[1316] 多能干细胞向心肌细胞的分化通常以使用糖原合酶激酶3(GSK3)抑制剂/Wnt/β-连环蛋白信号传导活化子(如CHIR99021)进行的诱导以及中胚层形成开始,随后是心脏定型。然而,当使多能干细胞分化为心肌细胞时,可能会出现可重复性挑战,部分原因是诱导不足(低中胚层)和过度诱导(高中胚层,随后是低心脏定型)之间的时间范围很窄。此外,在分化期间处于大聚集体中心的CD56+/PDFGRα+细胞可能会由于在整个分化过程中该细胞以大聚集体存在时出现的营养和/或空间限制而被阻止或延迟分化为心肌细胞。这可能导致所产生的分化的心肌细胞群体的一致性降低和/或纯度降低。

[1317] 在一些实施方案中,可以使用下文所述的其他方法,这些方法可以提供提高的分化潜力、改进的心肌细胞分化的一致性、改进的心肌细胞及其前体的收获和冷冻保存,以及冷冻保存解离的聚集体用于细胞疗法(例如心脏细胞疗法)和使用解离的聚集体进行细胞疗法(例如心脏细胞疗法)的能力。

[1318] 在一些实施方案中,可通过如下方法从多能干细胞分化出心肌细胞,该方法包括:

a)进行第一次孵育,第一次孵育包括将多能干细胞群体在一定条件下培养以形成第一聚集体,其中第一次孵育在第0天启动;b)使第一聚集体与解离剂接触以形成解离的细胞群体;c)进行第二次孵育,第二次孵育包括将解离的细胞群体在一定条件下培养以使解离的细胞聚集成第二聚集体;以及(d)进行第三次孵育,第三次孵育包括将第二聚集体在一定条件下培养以使第二聚集体中的细胞群体分化为心肌细胞群体。在一些实施方案中,该方法是以悬浮形式进行。在一些实施方案中,第一次孵育、接触、第二次孵育和第三次孵育各自以悬浮形式进行。在一些实施方案中,第一次孵育、接触、第二次孵育和第三次孵育中的一者或多者各自以悬浮形式进行。

[1319] 多能干细胞

[1320] 在一些实施方案中,多能干细胞(PSC)群体是任何多能干细胞,例如,能够分化为心肌细胞的任何多能干细胞的群体。在一些实施方案中,心肌细胞来源于多能干细胞。

[1321] 在一些实施方案中,多能干细胞选自由诱导型多能干细胞、胚胎干细胞、骨髓间充质干细胞、心脏组织干细胞和脂肪组织干细胞组成的组。在一些实施方案中,多能干细胞是人多能干细胞或者是人来源的多能干细胞。在一些实施方案中,多能干细胞是诱导型多能干细胞。在一些实施方案中,iPSC来源于供体,诸如人供体。

[1322] 可以使用任何可用的方法来生成iPSC群体。已知有多种不同的生成多能干细胞(通常称为iPSC;对于鼠细胞称为miPSC,或对于人细胞称为hiPSC)的方法。最初的诱导是使用四种转录因子Oct3/4、Sox2、c-Myc和Klf4的病毒引入在小鼠胚胎或成体纤维母细胞中进行的;参见Takahashi和Yamanaka Cell 126:663-676(2006),该文献特此以引用的方式整体并入,特别是其中概述的技术。从那时起,已经开发了许多方法;参见Seki等人,World J.Stem Cells 7(1):116-125(2015)进行回顾,以及Lakshmipathy和Vermuri编辑,Methods in Molecular Biology:Pluripotent Stem Cells,Methods and Protocols,Springer 2013,这两篇文献均以引用的方式整体据此明确并入,特别是用于生成hiPSC的方法(参见例如后一篇参考文献的第3章)。

[1323] 通常,iPSC是通过在宿主细胞中瞬时表达通常使用游离型载体引入的一种或多种“重新编程因子”生成的。在这些条件下,少量的细胞被诱导成为iPSC(一般来说,这一步的效率很低,因为没有使用选择标志物)。一旦细胞被“重编程”并成为多能细胞,它们就会失去一种或多种游离型载体并使用内源性基因产生所述因子。该一种或多种游离型载体的这种失去导致细胞被称为“零足迹”细胞。这是期望的,因为遗传修饰越少(特别是在宿主细胞的基因组中)越好。因此,优选所得的hiPSC不具有永久性的遗传修饰。

[1324] 可以使用或被使用的重编程因子的数量可以变化。通常,当使用较少的重编程因子时,细胞转化为多能状态的效率下降,“多能性”也下降,例如,较少的重编程因子可能导致细胞不是完全多能的,而是可能只能够分化为较少的细胞类型。

[1325] 在一些实施方案中,使用单个重编程因子OCT4。在其他实施方案中,使用两个重编程因子OCT4和KLF4。在其他实施方案中,使用三个重编程因子OCT4、KLF4和SOX2。在其他实施方案中,使用四个重编程因子OCT4、KLF4、SOX2和c-Myc。在其他实施方案中,可以使用选自SOKMNLT;SOX2、OCT4(POU5F1)、KLF4、MYC、NANOG、LIN28和SV40L T抗原的5、6或7个重编程因子。

[1326] 一般来说,这些重编程因子基因是在游离型载体(诸如本领域已知的和可商购获

得的)上提供的。例如,ThermoFisher/Invitrogen销售一种用于hiPSC的零足迹生成的仙台病毒重编程试剂盒,参见目录编号A34546。ThermoFisher也销售基于EBNA的系统,参见产品目录号A14703。

[1327] 此外,还有许多可商购获得的hiPSC系可用;参见,例如,Gibco®Episomal hiPSC系K18945,其是一种零足迹、无病毒整合的人iPSC细胞系(另参见Burridge等人,2011,上文)。

[1328] 一般来说,iPSC是通过瞬时表达如本文所述的重编程因子由非多能细胞(诸如CD34+脐血细胞、纤维母细胞等)制成的。例如,仅使用Oct3/4、Sox2和Klf4并同时省略C-Myc也能生成成功的iPSC,但是重编程效率会降低。

[1329] 一般来说,iPSC的特征在于包括KLF4、Nanog、OCT4、SOX2、ESRRB、TBX3、c-Myc和TCL1在内的某些因子的表达。这些因子的新的或增加的表达可能是通过诱导或调节内源性基因座或通过从转基因的表达来实现的。

[1330] 例如,可以使用Diecke等人,Sci Rep.2015,Jan.28;5:8081(doi:10.1038/srep08081)的方法来生成鼠iPSC,该文献据此以引用的方式整体并入,特别是用于生成miPSC的方法和试剂。另请参见,例如。Burridge等人,PLoS One,2011 6(4):18293,其据此以引用的方式整体并入,特别是其中概述的方法。

[1331] 在一些实施方案中,通过本文所述和/或本领域已知的方法中的任何方法生成的PSC(例如,iPSC)被分化为心肌细胞,诸如以产生高度富集心肌细胞的组合物。

[1332] 可以通过任何已知的方法使PSC(例如,iPSC)分化为心肌细胞,该方法包括但不限于以下文献中所述的那些:Murry和Keller,Cell(2008)132(4):661-80;Burridge等人,Cell Stem Cell(2012)10:16-28;Lian等人,Nature Protocols(2013)8:162-65;Batalov和Feiberg,Biomark.Insight(2015)10(Suppl.1):71-6;Denning等人,Biochim.Biophys.Acta Mol.Cell Res.(2016)1863:1728-48;Breckwoldt等人,Nature Protocols(2017)12:1177-97;Guo等人,Stem Cell Res.And Ther.(2018)9:44;以及Leitolis等人,Front.Cell Dev.Biol.(2019)8:164。

[1333] 在一些实施方案中,心肌细胞与接受心肌细胞移植的受试者是同种异体的。因此,在一些实施方案中,通过任何已知方法将心肌细胞所来源的PSC(例如,iPSC)工程化为低免疫原性。

[1334] 例如,可对PSC(例如,iPSC)内的核酸序列进行修饰以生成低免疫原性PSC。用于修饰细胞内的核酸序列的技术包括同源重组、敲入、敲除、ZFN(锌指核酸酶)、TALEN(转录活化因子样效应物核酸酶)、CRISPR(成簇规律间隔短回文重复序列)/Cas9和其他位点特异性核酸酶技术。这些技术能够在所需基因座位点处实现双链DNA断裂。这些受控的双链断裂促进特定基因座位点处的同源重组。此过程聚焦于用识别并且结合至核酸分子的特定序列并且在核酸分子内诱导双链断裂的核酸内切酶来靶向该特定序列(诸如染色体)。通过易错的非同源末端连接(NHEJ)或通过同源重组(HR)来修复双链断裂。

[1335] 可以使用许多种不同的技术将PSC(例如,iPSC)工程化为低免疫原性,该技术包括WO 2020/018615中所描述的技术,该文献以引用的方式整体并入本文中。在一些实施方案中,将PSC(iPSC)工程化为低免疫原性可降低接受者对该细胞(包括从低免疫原性PSC(例如,iPSC)分化而来的心肌细胞)的免疫反应。

[1336] 在一些实施方案中,可通过以适合于形成聚集体(例如,到第2、3、4、5或6天或者约第2、3、4、5或6天直径在300与约700μm之间或者在约300与约700μm之间的聚集体)的任何浓度接种多能干细胞来培养多能干细胞群体。

[1337] 在一些实施方案中,多能干细胞群体具有以下或约以下的能存活细胞浓度:1x 105与3x 107细胞/毫升之间、2x 105与2x 107细胞/毫升之间、3x 105与1x 107细胞/毫升之间、4x 105与9x 106细胞/毫升之间、5x 105与8x 106细胞/毫升之间、6x 105与7x 106细胞/毫升之间、7x 105与6x 106细胞/毫升之间、8x 105与5x 106细胞/毫升之间、9x 105与4x 106细胞/毫升之间、9x 105与3x 106细胞/毫升之间、1x 106与2x 106细胞/毫升之间、1.1x 106与1.9x 106细胞/毫升之间、1.2x 106与1.8x 106细胞/毫升之间、1.25x 106与1.75x 106细胞/毫升之间。在一些实施方案中,多能干细胞群体在第0天接种时或约第0天接种时或者在第0天启动第一次孵育时或约第0天启动第一次孵育时具有以下或约以下的能存活细胞浓度:1x 105与3x 107细胞/毫升之间、2x 105与2x 107细胞/毫升之间、3x 105与1x 107细胞/毫升之间、4x 105与9x 106细胞/毫升之间、5x 105与8x 106细胞/毫升之间、6x 105与7x 106细胞/毫升之间、7x 105与6x 106细胞/毫升之间、8x 105与5x 106细胞/毫升之间、9x 105与4x 106细胞/毫升之间、9x 105与3x 106细胞/毫升之间、1x 106与2x 106细胞/毫升之间、1.1x 106与1.9x 106细胞/毫升之间、1.2x 106与1.8x 106细胞/毫升之间、1.25x 106与1.75x 106细胞/毫升。

[1338] 在一些实施方案中,多能干细胞群体具有以下或约以下的能存活细胞浓度:1.0x 106细胞/毫升、1.05x 106细胞/毫升、1.1x 106细胞/毫升、1.15x 106细胞/毫升、1.2x 106细胞/毫升、1.25x 106细胞/毫升、1.3x 106细胞/毫升、1.35x 106细胞/毫升、1.4x 106细胞/毫升、1.45x 106细胞/毫升、1.5x 106细胞/毫升、1.55x 106细胞/毫升、1.6x 106细胞/毫升、1.65x 106细胞/毫升、1.7x 106细胞/毫升、1.75x 106细胞/毫升、1.8x 106细胞/毫升、1.85x 106细胞/毫升、1.9x 106细胞/毫升、1.95x 106细胞/毫升、2.0x 107细胞/毫升、2.05x 107细胞/毫升、2.1x 107细胞/毫升、2.15x 107细胞/毫升,或2.2x 107细胞/毫升。在一些实施方案中,多能干细胞群体在第0天接种时或约第0天接种时或者在第0天启动第一次孵育时或约第0天启动第一次孵育时具有以下或约以下的能存活细胞浓度:1.0x 106细胞/毫升、1.05x 106细胞/毫升、1.1x 106细胞/毫升、1.15x 106细胞/毫升、1.2x 106细胞/毫升、1.25x 106细胞/毫升、1.3x 106细胞/毫升、1.35x 106细胞/毫升、1.4x 106细胞/毫升、1.45x 106细胞/毫升、1.5x 106细胞/毫升、1.55x 106细胞/毫升、1.6x 106细胞/毫升、1.65x 106细胞/毫升、1.7x 106细胞/毫升、1.75x 106细胞/毫升、1.8x 106细胞/毫升、1.85x 106细胞/毫升、1.9x 106细胞/毫升、1.95x 106细胞/毫升、2.0x 107细胞/毫升、2.05x 107细胞/毫升、2.1x 107细胞/毫升、2.15x107细胞/毫升,或2.2x 107细胞/毫升。

[1339] 在一些实施方案中,多能干细胞群体具有以下或约以下的能存活细胞浓度:1.4x 106细胞/毫升、1.45x 106细胞/毫升、1.5x 106细胞/毫升、1.55x 106细胞/毫升、1.6x 106细胞/毫升、1.65x 106细胞/毫升、1.7x 106细胞/毫升、1.75x 106细胞/毫升或1.8x 106细胞/毫升。在一些实施方案中,多能干细胞群体在第0天接种时或约第0天接种时或者在第0天启动第一次孵育时或约第0天启动第一次孵育时具有以下或约以下的能存活细胞浓度:1.4x 106细胞/毫升、1.45x 106细胞/毫升、1.5x 106细胞/毫升、1.55x 106细胞/毫升、1.6x 106细胞/毫升、1.65x 106细胞/毫升、1.7x 106细胞/毫升、1.75x 106细胞/毫升,或

1.8x 106细胞/毫升。

[1340] 用于培养和解离的试剂和条件

[1341] 在一些实施方案中,用于从多能干细胞分化出心肌细胞的试剂和条件中的一种或多种试剂和条件(例如第一次孵育、第二次孵育和/或第三次孵育)可以包括已知方法或从已知方法修改而来。

[1342] 对胚胎心脏发育重要的可溶性因子包括活化素A、BMP4、nodal、Wnt激动剂和拮抗剂、bFGF以及其他分子(Conlon等人,Development120(7):1919(1994);Lough等人,Dev.Biol.(1996)178(1):198;Mima等人,PNAS(1995)92(2):467;Zaffran和Frasch,Circ.Res.(2002)91(6),457)。可以使用任何合适的诱导心肌细胞分化的方法,例如,以下文献中所述的那些:Fujiwara等人,PLoS One.(2001)6(2):e16734;Dambrot等人,Biochem J.(2011)434(1):25-35;Foldes等人,J Mol Cell Cardiol.(2011)50(2):367-76;Wang等人,Sci China Life Sci.(2010)53(5):581-9;Chen等人,J Cell Biochem.(2010)(1):29-39;Yang等人,Nature(2008)453:524-28;Kattman等人,Cell Stem Cell(2011)8:228-40;Laflamme等人,Nat.Biotechnol.(2007)25:1015-24;Paige等人,PLoS One(2010)5(6):e11134;Xu等人,Regen Med(2011)6(1):53-66;Mignone等人,Circ J(2010)74(12):2517-26;以及Takei等人,Am J Physiol Heart Circ Physiol.(2009)296(6):H1793-803,其各自以引用的方式整体并入本文中。PSC(例如,iPSC或ESC)也可以通过各自以引用的方式整体并入的WO2013013206和WO2013056072中描述的方法中的任何方法分化为心肌细胞。

[1343] 在一些实施方案中,从多能干细胞分化出心肌细胞的方法包括:a)进行第一次孵育,第一次孵育包括将多能干细胞群体在一定条件下培养以形成第一聚集体,其中第一次孵育在第0天启动;b)使第一聚集体与解离剂接触以形成解离的细胞群体;c)进行第二次孵育,第二次孵育包括将解离的细胞群体在一定条件下培养以使解离的细胞聚集成第二聚集体;以及(d)进行第三次孵育,第三次孵育包括将第二聚集体在一定条件下培养以使第二聚集体中的细胞群体分化为心肌细胞群体。下面提供了用于第一次孵育、通过将第一聚集体与解离剂接触而进行的解离、第二次孵育和第三次孵育的示例性试剂和条件,但这些示例性试剂和条件并非旨在限制。

[1344] 第一次孵育

[1345] 第一次孵育在第0天启动,并且包括在一定条件下培养多能干细胞群体以形成第一聚集体。

[1346] 在一些实施方案中,第一次孵育包括将多能干细胞群体在适合于允许多能干细胞形成第一聚集体的任何条件下培养,该条件诸如任何已知的用于从多能干细胞分化出心肌细胞的方法中的在第0、1、2、3、4、5和6天中的一天或多天使用的任何培养基、试剂和/或条件,该方法诸如例如以下文献中所述:Fujiwara等人,PLoS One.(2001)6(2):e16734;Dambrot等人,Biochem J.(2011)434(1):25-35;Foldes等人,J Mol Cell Cardiol.(2011)50(2):367-76;Wang等人,Sci China Life Sci.(2010)53(5):581-9;Chen等人,J Cell Biochem.(2010)(1):29-39;Yang等人,Nature(2008)453:524-28;Kattman等人,Cell Stem Cell(2011)8:228-40;Laflamme等人,Nat.Biotechnol.(2007)25:1015-24;Paige等人,PLoS One(2010)5(6):e11134;Xu等人,Regen Med(2011)6(1):53-66;Mignone等人,Circ J(2010)74(12):2517-26;Takei等人,Am J Physiol Heart Circ Physiol.(2009)296(6):

H1793-803;WO2013013206;以及WO2013056072。在一些实施方案中,第一次孵育包括将多能干细胞群体在适合于允许多能干细胞形成第一聚集体的任何一种或多种培养基中培养,该培养基诸如已知的、例如以下文献中所述的在第0、1、2、3、4、5和6天中的一天或多天使用的任何培养基:Fujiwara等人,PLoS One.(2001)6(2):e16734;Dambrot等人,Biochem J.(2011)434(1):25-35;Foldes等人,J Mol Cell Cardiol.(2011)50(2):367-76;Wang等人,Sci China Life Sci.(2010)53(5):581-9;Chen等人,J Cell Biochem.(2010)(1):29-39;Yang等人,Nature(2008)453:524-28;Kattman等人,Cell Stem Cell(2011)8:228-40;Laflamme等人,Nat.Biotechnol.(2007)25:1015-24;Paige等人,PLoS One(2010)5(6):e11134;Xu等人,Regen Med(2011)6(1):53-66;Mignone等人,Circ J(2010)74(12):2517-26;Takei等人,Am J Physiol Heart Circ Physiol.(2009)296(6):H1793-803;WO2013013206;以及WO2013056072。

[1347] 在一些实施方案中,第一次孵育包括在分化第0天(DD0)培养基中培养多能干细胞群体,该培养基包含糖原合酶激酶3(GSK3)抑制剂/Wnt/β-连环蛋白信号传导活化子。在一些实施方案中,第一次孵育包括在DD0培养基中培养多能干细胞群体,该培养基包含GSK3抑制剂/Wnt/β-连环蛋白信号传导活化子和L-丙氨酰-L-谷氨酰胺(L-谷氨酰胺的二肽替代品)。在一些实施方案中,DD0培养基进一步包含无血清且无胰岛素的生长补充剂。在一些实施方案中,无血清且无胰岛素的生长补充剂是B27™去除胰岛素补充剂(目录号A18956-01;Life Technologies)。

[1348] 在一些实施方案中,DD0培养基包含作为MCDB 131培养基(目录号10372-019;Life Technologies)的基础培养基。

[1349] 在一些实施方案中,L-丙氨酰-L-谷氨酰胺为GlutaMax™,诸如CTS GlutamMax™(目录号A12860-01;Life Technologies)或GlutaMax™(目录号35050-061;Life Technologies)。

[1350] 在一些实施方案中,GSK-3α和/或GSK-3β的抑制剂是GSK-3α和GSK-3β的抑制剂。在一些实施方案中,GSK-3α和/或GSK-3β的抑制剂是CHIR99021。在一些实施方案中,CHIR99021的浓度是在约4μM与约8μM之间。在一些实施方案中,CHIR99021的浓度是在约5μM与约7μM之间。在一些实施方案中,CHIR99021的浓度约为5μM、5.5μM、6μM、6.5μM或7μM,或者是前述任何值之间的任何值。在一些实施方案中,CHIR99021的浓度为约5μM、5.1μM、5.2μM、5.3μM、5.4μM、5.5μM、5.6μM、5.7μM、5.8μM、5.9μM、6μM、6.1μM、6.2μM、6.3μM、6.4μM、6.5μM、6.6μM、6.7μM、6.8μM、6.9μM或7μM。在一些实施方案中,CHIR99021的浓度是在约5μM与约6μM之间或者是在约4.5μM与约6.5μM之间。在一些实施方案中,CHIR99021的浓度为约5μM。在一些实施方案中,CHIR99021的浓度为约6μM。在一些实施方案中,CHIR99021的浓度为约5μM或约6μM。

[1351] 在一些实施方案中,第一次孵育包括在第0天在包含GSK-3α和/或GSK-3β的抑制剂的培养基(例如DD0培养基)中培养多能干细胞群体。在一些实施方案中,第一次孵育包括在第0天和第1天在包含GSK-3α和/或GSK-3β的抑制剂的培养基(例如DD0培养基)中培养多能干细胞群体。在一些实施方案中,第一次孵育包括在第0天和第1天以及第一次孵育的随后的一天或多天在包含GSK-3α和/或GSK-3β的抑制剂的培养基(例如DD0培养基)中培养多能干细胞群体。

[1352] 在一些实施方案中,第一次孵育包括在培养基(例如分化第1天(DD1)培养基)中培养多能干细胞群体,该培养基包含L-丙氨酰-L-谷氨酰胺和无血清且无胰岛素的生长补充剂。在一些实施方案中,该培养基(例如,DD1培养基)包含作为MCDB 131培养基的基础培养基。在一些实施方案中,L-丙氨酰-L-谷氨酰胺是GlutaMax™(目录号35050-061;Life Technologies)。在一些实施方案中,无血清且无胰岛素的生长补充剂是B27™去除胰岛素补充剂(目录号A18956-01;Life Technologies)。

[1353] 在一些实施方案中,第一次孵育包括在第1天或者约第1天在包含L-丙氨酰-L-谷氨酰胺和无血清且无胰岛素的生长补充剂的培养基(例如,DD1培养基)中培养多能干细胞群体。在一些实施方案中,第一次孵育包括在第1天和第2天在包含L-丙氨酰-L-谷氨酰胺和无血清且无胰岛素的生长补充剂的培养基(例如,DD1培养基)中培养多能干细胞群体。在一些实施方案中,第一次孵育包括在第1天和第2天以及第一次孵育的随后的一天或多天在包含L-丙氨酰-L-谷氨酰胺和无血清且无胰岛素的生长补充剂的培养基(例如,DD1培养基)中培养多能干细胞群体。

[1354] 在一些实施方案中,在第0天之后,第一次孵育包括在包含Wnt/β-连环蛋白信号传导抑制剂的培养基(例如,分化第2天(DD2)培养基)中培养多能干细胞群体。在一些实施方案中,该培养基(例如,DD2培养基)包含L-丙氨酰-L-谷氨酰胺和无血清分化补充剂。在一些实施方案中,该培养基(例如,DD2培养基)包含作为MCDB 131培养基的基础培养基。在一些实施方案中,Wnt/β-连环蛋白信号传导抑制剂选自由以下组成的组:WIKI4、NSC668036、iCRT3、iCRT5、iCRT14、IWP-2、XAV-939、ICG-001、LGK-974、OMP-18R5、FJ9、IWR-1-endo、KY02111、PFK115-584、Wnt-059、DKK1、FH-535、Box5,和肽Pen-N3。在一些实施方案中,Wnt/β-连环蛋白信号传导抑制剂是WIKI4。在一些实施方案中,L-丙氨酰-L-谷氨酰胺是GlutaMax™(目录号35050-061;Life Technologies)。在一些实施方案中,无血清分化补充剂是B27™补充剂(目录号A1486701;Life Technologies)。

[1355] 在一些实施方案中,所述的在包含Wnt/β-连环蛋白信号传导抑制剂的培养基(例如,DD2培养基)中培养多能干细胞群体是在第0天启动第一次孵育后约36至48小时开始的。在一些实施方案中,所述的在包含Wnt/β-连环蛋白信号传导抑制剂的培养基(例如,DD2培养基)中培养多能干细胞群体是在第0天启动第一次孵育后约40小时开始的。

[1356] 在一些实施方案中,第一次孵育包括在第2天或约第2天在包含Wnt/β-连环蛋白信号传导抑制剂的培养基(例如,DD2培养基)中培养多能干细胞群体。在一些实施方案中,第一次孵育包括在第1天、第2天和第3天中的一天或多天或者约第1天、第2天和第3天中的一天或多天在包含Wnt/β-连环蛋白信号传导抑制剂的培养基(例如,DD2培养基)中培养多能干细胞群体。在一些实施方案中,第一次孵育包括在第2天和第3天或者约第2天和第3天在包含Wnt/β-连环蛋白信号传导抑制剂的培养基(例如,DD2培养基)中培养多能干细胞群体。在一些实施方案中,第一次孵育包括在第2天和第3天或者约第2天和第3天以及第一次孵育的随后一天或多天在包含Wnt/β-连环蛋白信号传导抑制剂的培养基(例如,DD2培养基)中培养多能干细胞群体。

[1357] 在一些实施方案中,第一次孵育包括在包含L-丙氨酰-L-谷氨酰胺和无血清分化补充剂的培养基(例如,分化第3天(DD3)培养基)中培养多能干细胞群体。在一些实施方案中,该培养基(例如,DD3培养基)包含基础培养基,其为MCDB 131培养基。在一些实施方案

中,L-丙氨酰-L-谷氨酰胺是GlutaMax™(目录号35050-061;Life Technologies)。在一些实施方案中,无血清分化补充剂是B27™补充剂(目录号A1486701;Life Technologies)。

[1358] 在一些实施方案中,第一次孵育包括在第3天或约第3天在包含L-丙氨酰-L-谷氨酰胺和无血清分化补充剂的培养基(例如,分化第3天(DD3)培养基)中培养多能干细胞群体。在一些实施方案中,第一次孵育包括在约第3天、第4天、第5天和第6天中的一天或多天或者约在约第3天、第4天、第5天和第6天中的一天或多天在包含L-丙氨酰-L-谷氨酰胺和无血清分化补充剂的培养基(例如,分化第3天(DD3)培养基)中培养多能干细胞群体。在一些实施方案中,第一次孵育包括在第3天和第4天或者约第3天和第4天在包含L-丙氨酰-L-谷氨酰胺和无血清分化补充剂的培养基(例如,分化第3天(DD3)培养基)中培养多能干细胞群体。在一些实施方案中,第一次孵育包括在第3天和第4天或者约第3天和第4天以及第一次孵育的随后一天或多天在包含L-丙氨酰-L-谷氨酰胺和无血清分化补充剂的培养基(例如,分化第3天(DD3)培养基)中培养多能干细胞群体。

[1359] 在一些实施方案中,在第一次孵育期间形成的第一聚集体的直径在300μm与约1,000μm之间或者约300μm与约1,000μm之间。在一些实施方案中,在第一次孵育期间形成的第一聚集体的直径在300μm与约500μm、600μm、700μm、800μm、900或1,000μm之间或者约300μm与约500μm、600μm、700μm、800μm、900μm或1,000μm之间。在一些实施方案中,在第2天、第3天、第4天、第5天或第6天或者约第2天、第3天、第4天、第5天或第6天,在第一次孵育期间形成的第一聚集体的直径在300μm与约1,000μm之间或者约300μm与约1,000μm之间。在一些实施方案中,在第2天、第3天、第4天、第5天或第6天或者约第2天、第3天、第4天、第5天或第6天,在第一次孵育期间形成的第一聚集体的直径在300μm与约500μm、600μm、700μm、800μm、900μm或1,000μm之间或者约300μm与约500μm、600μm、700μm、800μm、900μm或1,000μm之间。在一些实施方案中,在第一次孵育期间形成的第一聚集体的直径在300μm与约700μm之间或者约300μm与约700μm之间。在一些实施方案中,在第2天、第3天、第4天、第5天或第6天或者约第2天、第3天、第4天、第5天或第6天,在第一次孵育期间形成的第一聚集体的直径在300μm与约700μm之间或者约300μm与约700μm之间。在一些实施方案中,在第2天、第3天、第4天、第5天或第6天或者约第2天、第3天、第4天、第5天或第6天,在第一次孵育期间形成的第一聚集体的直径在350μm与650μm之间、400μm与650μm之间、450μm与650μm之间、450μm与600μm之间、500μm与650μm之间、550μm与650μm之间,或550μm与600μm之间或者约350μm与650μm之间、400μm与650μm之间、450μm与650μm之间、450μm与600μm之间、500μm与650μm之间、550μm与650μm之间,或550μm与600μm之间。在一些实施方案中,在第一次孵育期间形成的第一聚集体的直径在500μm与约650μm之间或者约500μm与约650μm之间。在一些实施方案中,在第一次孵育期间形成的第一聚集体的直径在500μm与约600μm之间或者约500μm与约600μm之间。在一些实施方案中,在第3天或第4天或者约第3天或第4天,在第一次孵育期间形成的第一聚集体的直径在300μm与约700μm之间或者约300μm与约700μm之间。在一些实施方案中,在第3天或第4天或者约第3天或第4天,在第一次孵育期间形成的第一聚集体的直径在350μm与650μm之间、400μm与650μm之间、450μm与650μm之间、450μm与600μm之间、500μm与650μm之间、550μm与650μm之间,或550μm与600μm之间或者约350μm与650μm之间、400μm与650μm之间、450μm与650μm之间、450μm与600μm之间、500μm与650μm之间、550μm与650μm之间,或550μm与600μm之间。在一些实施方案中,在第3天或第4天或者约第3天或第4天,在第一次孵育期

间形成的第一聚集体的直径在500μm与约650μm之间或者约500μm与约650μm之间。在一些实施方案中,在第3天或第4天或者约第3天或第4天,在第一次孵育期间形成的第一聚集体的直径在550μm与约600μm之间或者约550μm与约600μm之间。

[1360] 在一些实施方案中,第一次孵育在DDO培养基第一次接触多能干细胞群体时启动。

[1361] 在一些实施方案中,第一次孵育以悬浮形式进行。在一些实施方案中,第一次孵育包括悬浮培养多能干细胞群体。在一些实施方案中,第一次孵育包括在第一次孵育的一天或多天、两天或更多天、三天或更多天,或四天或更多天,或五天或更多天悬浮培养多能干细胞群体。在一些实施方案中,第一次孵育包括在第一次孵育的整个过程中悬浮培养多能干细胞群体。

[1362] 使用解离剂进行的解离

[1363] 使用解离剂将第一次孵育期间形成的第一聚集体解离,以形成解离的细胞群体。例如,在一些实施方案中,该方法包括使第一聚集体与解离剂接触以形成解离的细胞群体。

[1364] 在一些实施方案中,该接触在第一聚集体的直径在300μm与1,000μm之间或约300μm与1,000μm之间时发生。在一些实施方案中,该接触在第一聚集体的直径在300μm与500μm、600μm、700μm、800μm、900或1,000μm之间或者约300μm与500μm、600μm、700μm、800μm、900μm或1,000μm之间时发生。

[1365] 在一些实施方案中,使第一聚集体与解离剂接触在第一聚集体的直径在300μm与约1,000μm之间或约300μm与约1,000μm之间,诸如直径在300μm与500μm、600μm、700μm、800μm、900μm或1,000μm之间或者约300μm与500μm、600μm、700μm、800μm、900μm或1,000μm之间,或直径在350μm与650μm之间、400μm与650μm之间、450μm与650μm之间、450μm与600μm之间、500μm与650μm之间、550μm与650μm之间,或550μm与600μm之间或者约350μm与650μm之间、400μm与650μm之间、450μm与650μm之间、450μm与600μm之间、500μm与650μm之间、550μm与650μm之间,或550μm与600μm之间时发生。在一些实施方案中,第一聚集体的直径在500μm与约650μm之间或者约500μm与约650μm之间。在一些实施方案中,第一聚集体的直径在550μm与约600μm之间或者约550μm与约600μm之间。在一些实施方案中,使第一聚集体与解离剂接触在第一聚集体的直径在400μm与1,000之间、400μm与950之间、400μm与900之间、400μm与850之间、400μm与800之间、400μm与750之间、400μm与700之间、450μm与1,000之间、450μm与950之间、450μm与900之间、450μm与850之间、450μm与800之间、450μm与750之间,或450μm与700μm之间或者约400μm与1,000之间、400μm与950之间、400μm与900之间、400μm与850之间、400μm与800之间、400μm与750之间、400μm与700之间、450μm与1,000之间、450μm与950之间、450μm与900之间、450μm与850之间、450μm与800之间、450μm与750之间,或450μm与700μm之间时发生。

[1366] 在一些实施方案中,使第一聚集体与解离剂接触在第一聚集体的直径在300μm与约1,000μm之间或约300μm与约1,000μm时的时间发生。在一些实施方案中,使第一聚集体与解离剂接触在第一聚集体的直径在300μm与约500μm、600μm、700μm、800μm、900μm或1,000μm之间或者约300μm与约500μm、600μm、700μm、800μm、900μm或1,000μm之间时的时间发生。在一些实施方案中,使第一聚集体与解离剂接触在第一聚集体的直径在350μm与650μm之间、400μm与650μm之间、450μm与650μm之间、450μm与600μm之间、500μm与650μm之间、550μm与650μm之间,或550μm与600μm之间或者约350μm与650μm之间、400μm与650μm之间、450μm与

650μm之间、450μm与600μm之间、500μm与650μm之间、550μm与650μm之间,或550μm与600μm之间时的时间发生。在一些实施方案中,使第一聚集体与解离剂接触在第一聚集体的直径在400μm与1,000μm之间、400μm与950μm之间、400μm与900μm之间、400μm与850μm之间、400μm与800μm之间、400μm与750μm之间、400μm与700μm之间、450μm与1,000μm之间、450μm与950μm之间、450μm与900μm之间、450μm与850μm之间、450μm与800μm之间、450μm与750μm之间,或450μm与700μm之间或者约400μm与1,000μm之间、400μm与950μm之间、400μm与900μm之间、400μm与850μm之间、400μm与800μm之间、400μm与750μm之间、400μm与700μm之间、450μm与1,000μm之间、450μm与950μm之间、450μm与900μm之间、450μm与850μm之间、450μm与800μm之间、450μm与750μm之间,或450μm与700μm之间时的时间发生。在一些实施方案中,使第一聚集体与解离剂接触在第一聚集体的直径在500μm与约650μm之间或约500μm与约650μm之间时的时间发生。在一些实施方案中,使第一聚集体与解离剂接触在第一聚集体的直径在550μm与约600μm之间或约550μm与约600μm之间时的时间发生。在一些实施方案中,该时间,例如,在使第一聚集体与解离剂接触时的时间,是第2天、第3天、第4天、第5天或第6天或者约第2天、第3天、第4天、第5天或第6天。在一些实施方案中,该时间,例如,在使第一聚集体与解离剂接触时的时间,是第2天或第3天或者约第2天或第3天。在一些实施方案中,该时间,例如,在使第一聚集体与解离剂接触时的时间,是第3天或第4天或者约第3天或第4天。在一些实施方案中,该时间,例如,在使第一聚集体与解离剂接触时的时间,是第4天或第5天或者约第4天或第5天。在一些实施方案中,该时间,例如,在使第一聚集体与解离剂接触时的时间,是第4天或者约第4天。

[1367] 在一些实施方案中,该接触发生在第2、3、4、5和6天中的任一天或者约第2、3、4、5和6天中的任一天。在一些实施方案中,该接触发生在第2天或第3天或者约第2天或第3天。在一些实施方案中,该接触发生在第3天或第4天或者约第3天或第4天。在一些实施方案中,该接触发生在第4天或第5天或者约第4天或第5天。在一些实施方案中,该接触发生在第5天或第6天或者约第5天或第6天。在一些实施方案中,该接触发生在第4天或者约第4天。在一些实施方案中,该接触发生在第2至6天中的任一天或者约第2至6天中的任一天,或第3至6天中的任一天或者约第3至6天中的任一天,或第4至6天中的任一天。

[1368] 在一些实施方案中,该接触在第一次孵育的最后一天,即在第一次孵育之后发生。在一些实施方案中,该发生在第一次孵育的最后一天的第二天接触。

[1369] 在一些实施方案中,在接触时,第一聚集体包含的CD56+/PDGFRα+细胞的频率为或为至少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%或95%。在一些实施方案中,在接触时,第一聚集体包含的CD56+/PDGFRα+细胞的频率为或为至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%或95%。在一些实施方案中,在接触时,第一聚集体包含的CD56+/PDGFRα+细胞的频率为或约为80%、81%、92%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。

[1370] 在一些实施方案中,解离剂可以是或者包括任何允许细胞聚集体彼此解离而不会影响解离的细胞随后在合适的培养条件下增殖和/或生长和/或分化的能力的剂。

[1371] 在一些实施方案中,解离剂是或者包括切割酶。在一些实施方案中,切割酶是蛋白

酶。在一些实施方案中,蛋白酶是切割赖氨酸或精氨酸残基的C端侧上的肽键的重组酶。在一些实施方案中,蛋白酶是TrypLE™Select(目录号A1217702;Life Technologies)。在一些实施方案中,蛋白酶是切割赖氨酸或精氨酸残基的C端侧上的肽键的重组酶,诸如TrypLE™Select。在一些实施方案中,蛋白酶是内切肽酶。在一些实施方案中,内切肽酶是胰蛋白酶。在一些实施方案中,蛋白酶选自由胰蛋白酶、胶原蛋白酶、糜蛋白酶、弹性蛋白酶、透明质酸酶、木瓜蛋白酶和分散酶组成的组。在一些实施方案中,胶原蛋白酶是I型胶原蛋白酶、II型胶原蛋白酶或III型胶原蛋白酶。在一些实施方案中,胶原蛋白酶是I型胶原蛋白酶、II型胶原蛋白酶或III型胶原蛋白酶。在一些实施方案中,蛋白酶是胶原蛋白酶。在一些实施方案中,蛋白酶是透明质酸酶。

[1372] 在一些实施方案中,该接触发生的持续时间足以产生解离的细胞群体。在一些实施方案中,该接触发生的持续时间为约15分钟至约2小时。在一些实施方案中,该接触发生的持续时间为约30分钟至约90分钟、约30分钟至约75分钟、约40分钟至约60分钟、约40分钟至约55分钟、约40分钟至约50分钟、约45分钟至55分钟,或约45分钟至约50分钟。在一些实施方案中,该接触发生的持续时间为约40至约55分钟。在一些实施方案中,该接触发生的持续时间为约45分钟至约50分钟。

[1373] 在一些实施方案中,该方法包括在该接触期间搅拌第一聚集体。在一些实施方案中,该搅拌使用振荡器(例如,平台振荡器)进行。在一些实施方案中,该搅拌以20与100RPM之间或约20与100RPM之间的每分钟转数(RPM)进行。在一些实施方案中,该搅拌以以下或约以下的RPM进行:20与100之间、20与90之间、20与80之间、20与70之间、20与60之间、20与50之间、30与100之间、30与90之间、30与80之间、30与70之间、30与60之间、30与50之间、40与100之间、40与90之间、40与80之间、40与70之间、40与60之间、40与50RPM之间、50与100之间、50与90之间、50与80之间、50与70之间、50与60之间、60与100之间、60与90之间、60与80之间,或60与70RPM。在一些实施方案中,该搅拌以45与55RPM之间或约45与55RPM之间的RPM进行,诸如以50RPM或约50RPM进行。在一些实施方案中,该搅拌以50RPM或约50RPM进行。在一些实施方案中,该搅拌以前述RPM中的一种或多种RPM和/或RPM范围,诸如一种、两种、三种或四种或更多种不同的RPM进行,每种RPM持续一段时间。

[1374] 在一些实施方案中,该方法进一步包括在接触期间和/或之后研磨解离的细胞群体。在一些实施方案中,该研磨是通过使解离的细胞群体通过移液器一次或多次来进行的。在一些实施方案中,该研磨是通过使解离的细胞群体通过移液器5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25次或者至少5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25次来进行的。在一些实施方案中,该研磨是通过使解离的细胞群体通过移液器约15至约25次(诸如约20次)来进行的。在一些实施方案中,该研磨导致解离的细胞群体与该方法不包括研磨解离的细胞群体的情况相比具有更高的单细胞频率。

[1375] 在一些实施方案中,解离的细胞群体具以下或或约以下的能存活细胞密度:1x 105与3x 107细胞/毫升之间、2x 105与2x 107细胞/毫升之间、3x 105与1x 107细胞/毫升之间、4x 105与9x 106细胞/毫升之间、5x 105与8x 106细胞/毫升之间、6x 105与7x 106细胞/毫升之间、7x 105与6x 106细胞/毫升之间、8x 105与5x 106细胞/毫升之间、9x 105与4x 106细胞/毫升之间、9x 105与3x 106细胞/毫升之间、1x 106与2x 106细胞/毫升之间、1.1x 106与1.9x 106细胞/毫升之间、1.2x 106与1.8x 106细胞/毫升之间、1.25x 106与

1.75x 106细胞/毫升之间。

[1376] 在一些实施方案中,在该接触和/或研磨之后,解离的细胞群体具有以下或约以下的能存活细胞密度:1x 105与3x 107细胞/毫升之间、2x 105与2x 107细胞/毫升之间、3x 105与1x 107细胞/毫升之间、4x 105与9x 106细胞/毫升之间、5x 105与8x 106细胞/毫升之间、6x 105与7x 106细胞/毫升之间、7x 105与6x 106细胞/毫升之间、8x 105与5x106细胞/毫升之间、9x 105与4x 106细胞/毫升之间、9x 105与3x106细胞/毫升之间、1x 106与2x 106细胞/毫升之间、1.1x 106与1.9x 106细胞/毫升之间、1.2x 106与1.8x 106细胞/毫升之间、1.25x 106与1.75x 106细胞/毫升之间。

[1377] 在一些实施方案中,在该接触被启动之后一或两小时或者约一或两小时,解离的细胞群体具有以下或约以下的能存活细胞密度:1x105与3x 107细胞/毫升之间、2x 105与2x 107细胞/毫升之间、3x 105与1x 107细胞/毫升之间、4x 105与9x 106细胞/毫升之间、5x 105与8x 106细胞/毫升之间、6x 105与7x 106细胞/毫升之间、7x 105与6x 106细胞/毫升之间、8x 105与5x 106细胞/毫升之间、9x 105与4x 106细胞/毫升之间、9x 105与3x 106细胞/毫升之间、1x 106与2x106细胞/毫升之间、1.1x 106与1.9x 106细胞/毫升之间、1.2x 106与1.8x 106细胞/毫升之间、1.25x 106与1.75x 106细胞/毫升之间。

[1378] 在一些实施方案中,该接触以悬浮形式进行。在一些实施方案中,该接触包括使第一聚集体与解离剂悬浮接触。在一些实施方案中,该研磨和/或搅拌以悬浮形式进行。

[1379] 第二次孵育

[1380] 第二次孵育在该接触之后进行,并且包括在一定条件下培养解离的细胞群体,以使解离的细胞聚集成第二聚集体。

[1381] 在一些实施方案中,第二次孵育发生的持续时间足以允许解离的细胞群体聚集成第二聚集体。在一些实施方案中,足以允许解离的细胞群体聚集成第二聚集体的持续时间为一至三天或约一至三天。在一些实施方案中,足以允许解离的细胞群体聚集成第二聚集体的持续时间为一天或两天或者约一天或两天。在一些实施方案中,足以允许解离的细胞群体聚集成第二聚集体的持续时间为一天或约一天。

[1382] 在一些实施方案中,第二次孵育包括在包含L-丙氨酰-L-谷氨酰胺和无血清分化补充剂的培养基(例如分化第4天(DD4)培养基)中培养解离的细胞群体。在一些实施方案中,该培养基(例如,DD3培养基)包含基础培养基,其为MCDB 131培养基。在一些实施方案中,L-丙氨酰-L-谷氨酰胺是GlutaMax™,诸如CTS GlutamMax™(目录号A12860-01;Life Technologies).在一些实施方案中,无血清分化补充剂是B27™补充剂(目录号A1486701;Life Technologies)。

[1383] 在一些实施方案中,第二次孵育包括在第2-7天中的一天或连续两天在例如DD4培养基中培养解离的细胞群体。在一些实施方案中,第二次孵育包括在第2、3、4、5、6或7天或者约第2、3、4、5、6或7天在例如DD4培养基中培养解离的细胞群体;并且/或者第二次孵育包括在第2天和第3天或者约第2天和第3天,在第3天和第4天或者约第3天和第4天,在第4天和第5天或者约第4天和第5天,在第5天和第6天或者约第5天和第6天,或在第6天和第7天或者约第6天和第7天在例如DD4培养基中培养解离的细胞群体。在一些实施方案中,第二次孵育包括在选自第2天和第3天、第3天和第4天、第4天和第5天、第5天和第6天,或第6天和第7天的连续两天在例如DD4培养基中培养解离的细胞群体。在一些实施方案中,第二次孵育包括

在第4天和第5天或者约第4天和第5天在例如DD4培养基中培养解离的细胞群体。

[1384] 在一些实施方案中,第二聚集体的直径小于第一聚集体的直径。在一些实施方案中,第二聚集体具有比第一聚集体的直径小至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%的直径。在一些实施方案中,在该接触后一天或两天或者约一天或两天,第二聚集体的直径小于紧接在该接触之前的第一聚集体的直径。在一些实施方案中,在该接触后一天或两天或者约一天或两天,第二聚集体具有比紧接在该接触之前的第一聚集体的直径小至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%的直径。

[1385] 在一些实施方案中,聚集体(例如,第一聚集体和/或第二聚集体)的直径是基于在相同条件下培养的多个此类聚集体(例如,多个第一聚集体或多个第二聚集体)的平均直径。

[1386] 在一些实施方案中,在第二次孵育的第二天和/或在该接触后24小时或约24小时,例如,在该接触被启动后24小时或约24小时,形成的第二聚集体的直径在25μm与200μm之间或约25μm与200μm之间。在一些实施方案中,在第二次孵育的第二天和/或在该接触后24小时或约24小时,例如,在该接触被启动后24小时或约24小时,形成的第二聚集体具有以下或约以下的直径:25μm与200μm之间、25μm与175μm之间、25μm与150μm之间、25μm与125μm之间、30μm与200μm之间、30μm与175μm之间、30μm与150μm之间、30μm与125μm之间、35μm与200μm之间、35μm与175μm之间、35μm与150μm之间、35μm与125μm之间、40μm与200μm之间、40μm与175μm之间、40μm与150μm之间、40μm与125μm之间、45μm与200μm之间、45μm与175μm之间、45μm与150μm之间、45μm与125μm之间、50μm与200μm之间、50μm与175μm之间、50μm与150μm之间、50μm与125μm之间、55μm与200μm之间、55μm与175μm之间、55μm与150μm之间、55μm与125μm之间、60μm与200μm之间、60μm与175μm之间、60μm与150μm之间、60μm与125μm之间、65μm与200μm之间、65μm与175μm之间、65μm与150μm之间、65μm与125μm之间、70μm与200μm之间、70μm与175μm之间、70μm与150μm之间、70μm与125μm之间、75μm与200μm之间、75μm与175μm之间、75μm与150μm之间,或75μm与125μm之间。

[1387] 在一些实施方案中,在第二次孵育的第二天和/或在接触后24小时或约24小时,例如在接触被启动后24小时或约24小时,形成的第二聚集体:(a)具有比紧接在与解离剂接触之前的第一聚集体的直径小50%的直径;和/或(b)具有为紧接在与解离剂接触之前的第一聚集体的直径的5-50%之间或约5-50%之间的直径;和/或(c)具有为紧接在与解离剂接触之前的第一聚集体的直径的5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%或50%或者约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%或50%的直径;并且/或者(d)具有为紧接在与解离剂接触之前的第一聚集体的直径的5-25%之间或约5-25%之间的直径。

[1388] 在一些实施方案中,在第二次孵育的第二天和/或在接触后24小时或约24小时,例如,在接触被启动后24小时或约24小时,第二聚集体具有为紧接在与解离剂接触之前的第一聚集体的直径的5-25%之间或约5-25%之间的直径。

[1389] 在一些实施方案中,在第二次孵育的第二天和/或在与解离剂接触之日后的第二天,第二聚集体具有以下或约以下的直径:25μm与200μm之间、25μm与175μm之间、25μm与150μm之间、25μm与125μm之间、30μm与200μm之间、30μm与175μm之间、30μm与150μm之间、30μm与125μm之间、35μm与200μm之间、35μm与175μm之间、35μm与150μm之间、35μm与125μm之间、40μm与200μm之间、40μm与175μm之间、40μm与150μm之间、40μm与125μm之间、45μm与200μm之间、

45μm与175μm之间、45μm与150μm之间、45μm与125μm之间、50μm与200μm之间、50μm与175μm之间、50μm与150μm之间、50μm与125μm之间、55μm与200μm之间、55μm与175μm之间、55μm与150μm之间、55μm与125μm之间、60μm与200μm之间、60μm与175μm之间、60μm与150μm之间、60μm与125μm之间、65μm与200μm之间、65μm与175μm之间、65μm与150μm之间、65μm与125μm之间、70μm与200μm之间、70μm与175μm之间、70μm与150μm之间、70μm与125μm之间、75μm与200μm之间、75μm与175μm之间、75μm与150μm之间,或75μm与125μm之间。在一些实施方案中,与解离剂接触之日后的第二天是第3、4、5、6或7天。在一些实施方案中,与解离剂接触之日后的第二天是第5天。

[1390] 在一些实施方案中,在第二次孵育的第二天,第二聚集体具有以下或约以下的直径:25μm与200μm之间、25μm与175μm之间、25μm与150μm之间、25μm与125μm之间、30μm与200μm之间、30μm与175μm之间、30μm与150μm之间、30μm与125μm之间、35μm与200μm之间、35μm与175μm之间、35μm与150μm之间、35μm与125μm之间、40μm与200μm之间、40μm与175μm之间、40μm与150μm之间、40μm与125μm之间、45μm与200μm之间、45μm与175μm之间、45μm与150μm之间、45μm与125μm之间、50μm与200μm之间、50μm与175μm之间、50μm与150μm之间、50μm与125μm之间、55μm与200μm之间、55μm与175μm之间、55μm与150μm之间、55μm与125μm之间、60μm与200μm之间、60μm与175μm之间、60μm与150μm之间、60μm与125μm之间、65μm与200μm之间、65μm与175μm之间、65μm与150μm之间、65μm与125μm之间、70μm与200μm之间、70μm与175μm之间、70μm与150μm之间、70μm与125μm之间、75μm与200μm之间、75μm与175μm之间、75μm与150μm,或75μm与125μm之间。在一些实施方案中,第二次孵育的第二天是第3、4、5、6或7天。在一些实施方案中,第二次孵育的第二天是第5天。

[1391] 在一些实施方案中,在与解离剂接触之日后的第二天和/或在第二次孵育开始后的第二天和/或在第三次孵育的第一天,第二聚集体具有以下或约以下的直径:25μm与300μm之间、25μm与275μm之间、25μm与250μm之间、40μm与300μm之间、40μm与275μm之间、40μm与250μm之间、50μm与300μm之间、50μm与275μm之间、50μm与250μm之间、60μm与300μm之间、60μm与275μm之间、60μm与250μm之间、70μm与300μm之间、70μm与275μm之间、70μm与250μm之间、80μm与300μm之间、80μm与275μm之间,或80μm与250μm之间。在一些实施方案中,与解离剂接触之日后的第二天和/或第二次孵育启动后的第二天和/或第三次孵育的第一天为第4、5、6、7或8天或者约第4、5、6、7或8天。在一些实施方案中,与解离剂接触之日后的第二天和/或第二次孵育启动后的第二天和/或第三次孵育的第一天为第6天或约第6天。

[1392] 在一些实施方案中,第二聚集体在第二次孵育的第二天和/或在第三次孵育的第一天具有以下或约以下的直径:25μm与200μm之间、25μm与175μm之间、25μm与150μm之间、25μm与125μm之间、30μm与200μm之间、30μm与175μm之间、30μm与150μm之间、30μm与125μm之间、35μm与200μm之间、35μm与175μm之间、35μm与150μm之间、35μm与125μm之间、40μm与200μm之间、40μm与175μm之间、40μm与150μm之间、40μm与125μm之间、45μm与200μm之间、45μm与175μm之间、45μm与150μm之间、45μm与125μm之间、50μm与200μm之间、50μm与175μm之间、50μm与150μm之间、50μm与125μm之间、55μm与200μm之间、55μm与175μm之间、55μm与150μm之间、55μm与125μm之间、60μm与200μm之间、60μm与175μm之间、60μm与150μm之间、60μm与125μm之间、65μm与200μm之间、65μm与175μm之间、65μm与150μm之间、65μm与125μm之间、70μm与200μm之间、70μm与175μm之间、70μm与150μm之间、70μm与125μm之间、75μm与200μm之间、75μm与

175μm之间、75μm与150μm之间,或75μm与125μm之间。在一些实施方案中,第二聚集体在第5天或约第5天具有以下或约以下的直径:25μm与200μm之间、25μm与175μm之间、25μm与150之间、25μm与μm与125μm之间、30μm与200μm之间、30μm与175μm之间、30μm与150μm之间、30μm与125μm之间、35μm与200μm之间、35μm与175μm之间、35μm与150μm之间、35μm与125μm之间、40μm与200μm之间、40μm与175μm之间、40μm与150μm之间、40μm与125μm之间、45μm与200μm之间、45μm与175μm之间、45μm与150μm之间、45μm与125μm之间、50μm与200μm之间、50μm与175μm之间、50μm与150μm之间、50μm与125μm之间、55μm与200μm之间、55μm与175μm之间、55μm与150μm之间、55μm与125μm之间、60μm与200μm之间、60μm与175μm之间、60μm与150μm之间、60μm与125μm之间、65μm与200μm之间、65μm与175μm之间、65μm与150μm之间、65μm与125μm之间、70μm与200μm之间、70μm与175μm之间、70μm与150μm之间、70μm与125μm之间、75μm与200μm之间、75μm与175μm之间、75μm与150μm之间,或75μm与125μm之间。

[1393] 在一些实施方案中,第二聚集体在第二次孵育启动后的第二天和/或在第三次孵育的第一天具有以下或约以下的直径:25μm与300μm之间、25μm与275μm之间、25μm与250μm之间、40μm与300μm之间、40μm与275μm之间、40μm与250μm之间、50μm与300μm之间、50μm与275μm之间、50μm与250μm之间、60μm与300μm之间、60μm与275μm之间、60μm与250μm之间、70μm与300μm之间、70μm与275μm之间、70μm与250μm之间、80μm与300μm之间、80μm与275μm之间,或80μm与250μm之间。第二聚集体在第6天具有以下或约以下的直径:25μm与300μm之间、25μm与275μm之间、25μm与250μm之间、40μm与300μm之间、40μm与275μm之间、40μm与250μm之间、50μm与300μm之间、50μm与275μm之间、50μm与250μm之间、60μm与300μm之间、60μm与275μm之间、60μm与250μm之间、70μm与300μm之间、70μm与275μm之间、70μm与250μm之间、80μm与300μm之间、80μm与275μm之间,或80μm与250μm之间。

[1394] 在一些实施方案中,第二聚集体在第二次孵育启动后的第三天和/或在第三次孵育的第二天具有以下或约以下的直径:25μm与400μm之间、25μm与350μm之间、25μm与300μm之间、25μm与275μm之间、25μm与250μm之间、40μm与400μm之间、40μm与350μm之间、40μm与300μm之间、40μm与275μm之间、40μm与250μm之间、50μm与400μm之间、60μm与350μm之间、50μm与300μm之间、50μm与275μm之间、50μm与250μm之间、60μm与400μm之间、60μm与350μm之间、60μm与300μm之间、60μm与275μm之间、60μm与250μm之间、70μm与400μm之间、70μm与350μm之间、70μm与300μm之间、70μm与275μm之间、70μm与250μm之间、80μm与400μm之间、80μm与350μm之间、80μm与300μm之间、80μm与275μm之间,或80μm与250μm之间。在一些实施方案中,第二聚集体在第7天具有以下或约以下的直径:25μm与400μm之间、25μm与350μm之间、25μm与300μm之间、25μm与275μm之间、25μm与250μm之间、40μm与400μm之间、40μm与350μm之间、40μm与300μm之间、40μm与275μm之间、40μm与250μm之间、50μm与400μm之间、60μm与350μm之间、50μm与300μm之间、50μm与275μm之间、50μm与250μm之间、60μm与400μm之间、60μm与350μm之间、60μm与300μm之间、60μm与275μm之间、60μm与250μm之间、70μm与400μm之间、70μm与350μm之间、70μm与300μm之间、70μm与275μm之间、70μm与250μm之间、80μm与400μm之间、80μm与350μm之间、80μm与300μm之间、80μm与275μm之间,或80μm与250μm之间。

[1395] 在一些实施方案中,第二聚集体在第二次孵育启动后的第四天和/或在第三次孵育的第三天具有以下或约以下的直径:25μm与400μm之间、25μm与350μm之间、25μm与300μm之间、25μm与275μm之间、25μm与250μm之间、40μm与400μm之间、40μm与350μm之间、40μm与

300μm之间、40μm与275μm之间、40μm与250μm之间、50μm与400μm之间、60μm与350μm之间、50μm与300μm之间、50μm与275μm之间、50μm与250μm之间、60μm与400μm之间、60μm与350μm之间、60μm与300μm之间、60μm与275μm之间、60μm与250μm之间、70μm与400μm之间、70μm与350μm之间、70μm与300μm之间、70μm与275μm之间、70μm与250μm之间、80μm与400μm之间、80μm与350μm之间、80μm与300μm之间、80μm与275μm之间,或80μm与250μm之间。在一些实施方案中,第二聚集体在第7天具有以下或约以下的直径:25μm与400μm之间、25μm与350μm之间、25μm与300μm之间、25μm与275μm之间、25μm与250μm之间、40μm与400μm之间、40μm与350μm之间、40μm与300μm之间、40μm与275μm之间、40μm与250μm之间、50μm与400μm之间、60μm与350μm之间、50μm与300μm之间、50μm与275μm之间、50μm与250μm之间、60μm与400μm之间、60μm与350μm之间、60μm与300μm之间、60μm与275μm之间、60μm与250μm之间、70μm与400μm之间、70μm与350μm之间、70μm与300μm之间、70μm与275μm之间、70μm与250μm之间、80μm与400μm之间、80μm与350μm之间、80μm与300μm之间、80μm与275μm之间,或80μm与250μm之间。

[1396] 在一些实施方案中,第二次孵育以悬浮形式进行。在一些实施方案中,第二次孵育包括悬浮培养解离的细胞群体。在一些实施方案中,第二次孵育包括在第二次孵育的一天或多天(诸如一天、两天或三天)内悬浮培养解离的细胞群体。在一些实施方案中,第二次孵育包括在第二次孵育的整个过程中悬浮培养解离的细胞群体。在一些实施方案中,第二次孵育包括悬浮培养解离的细胞群体,持续以下时间或约以下时间:12至72小时、12至60小时、12至48小时、12至36小时、12至24小时、18至72小时、18至60小时、18至48小时、18至36小时、18至24小时、24至72小时、24至60小时、24至48小时,或24至36小时。

[1397] 第三次孵育

[1398] 第三次孵育在第二聚集体形成之后(例如,在第二次孵育之后)进行,并且包括在一定条件下培养第二聚集体以使第二聚集体中的细胞群体分化为心肌细胞群体。

[1399] 在一些实施方案中,第三次孵育的培养包括在适合于使第二聚集体中的细胞群体分化为心肌细胞群体的任何条件下培养第二聚集体。例如,在一些实施方案中,第三次孵育的培养可以包括如在例如以下文献中所述的培养基、试剂和/或条件:Fujiwara等人,PLoS One.(2001)6(2):e16734;Dambrot等人,Biochem J.(2011)434(1):25-35;Foldes等人,J Mol Cell Cardiol.(2011)50(2):367-76;Wang等人,Sci China Life Sci.(2010)53(5):581-9;Chen等人,J Cell Biochem.(2010)(1):29-39;Yang等人,Nature(2008)453:524-28;Kattman等人,Cell Stem Cell(2011)8:228-40;Laflamme等人,Nat.Biotechnol.(2007)25:1015-24;Paige等人,PLoS One(2010)5(6):e11134;Xu等人,RegenMed(2011)6(1):53-66;Mignone等人,Circ J(2010)74(12):2517-26;Take等人,Am J Physiol Heart Circ Physiol.(2009)296(6):H1793-803;WO2013013206;以及WO2013056072,该培养基、试剂和/或条件包括在第0天启动分化方法后从第3天到收获心肌细胞(例如在第22天)中的任何一天或多天使用的那些。

[1400] 在一些实施方案中,第三次孵育包括在包含葡萄糖的培养基(例如,分化第6天(DD6)培养基)和包含乳酸钠的培养基(例如,分化第10天(DD10)培养基)中培养第二聚集体。在一些实施方案中,将细胞非同时地在包含葡萄糖的培养基和包含乳酸钠的培养基中培养。

[1401] 在一些实施方案中,第三次孵育包括在进一步包含无血清分化补充剂的包含葡萄

糖的培养基(例如分化第6天(DD6)培养基)中培养第二聚集体。在一些实施方案中,该培养基(例如,DD6培养基)包含作为RPMI 1640培养基(目录号11875-093;Life Technologies)的基础培养基。在一些实施方案中,无血清分化补充剂是B27™补充剂(目录号A1486701;Life Technologies)。

[1402] 在一些实施方案中,第三次孵育包括在包含葡萄糖和无血清分化补充剂的培养基(例如,DD6培养基)中培养第二聚集体,持续选自第4至第22天中的一天或多天或者直到收获心肌细胞群体。在一些实施方案中,第三次孵育包括在开始于第4天、第5天、第6天或第7天或者约第4天、第5天、第6天或第7天的连续3天或更多天、4天或更多天、5天或更多天,或6天或更多天在包含葡萄糖和无血清分化补充剂的培养基(例如,DD6培养基)中培养第二聚集体。在一些实施方案中,第三次孵育包括在开始于第5天、第6天或第7天或者约第5天、第6天或第7天的连续3天、4天或5天在包含葡萄糖和无血清分化补充剂的培养基(例如,DD6培养基)中培养第二聚集体。在一些实施方案中,第三次孵育包括在开始于第6天或者约第6天的连续5天在包含葡萄糖和无血清分化补充剂的培养基(例如,DD6培养基)中培养第二聚集体。

[1403] 在一些实施方案中,包含乳酸钠的培养基缺乏葡萄糖。在一些实施方案中,乳酸钠是S-乳酸钠(目录号106522;Millipore-Sigma)。

[1404] 在一些实施方案中,第三次孵育包括在包含葡萄糖的培养基(例如,DD6培养基)中培养第二聚集体,这在第三次孵育的启动时开始并且一直持续到收获(例如,在第22天或约第22天),但是开始于第7、8、9、10、11、12或13天或者约第7、8、9、10、11、12或13天的连续一天、两天、三天或四天的时段除外,在该时段期间,包含葡萄糖的培养基(例如,DD6培养基)被替换为包含乳酸钠的培养基(例如,DD10培养基)。在一些实施方案中,第三次孵育包括在包含葡萄糖和无血清分化补充剂的培养基(例如,DD6培养基)中培养第二聚集体,这在第三次孵育的启动时开始并且一直持续到收获(例如,在第22天或约第22天),但是开始于第7、8、9、10、11、12或13天或者约第7、8、9、10、11、12或13天的连续一天、两天、三天或四天的时段除外,在该时段期间,包含葡萄糖和无血清分化补充剂的培养基(例如,DD6培养基)被替换为包含乳酸钠的培养基(例如,DD10培养基)。

[1405] 在一些实施方案中,第三次孵育包括在包含葡萄糖的培养基(例如,DD6培养基)中培养第二聚集体,这在第三次孵育的启动时开始并且一直持续到收获(例如,在第22天或约第22天),但是开始于第10、11和12天或者约第10、11和12天的连续三天的时段除外,在该时段期间,包含葡萄糖的培养基(例如,DD6培养基)被替换为包含乳酸钠的培养基(例如,DD10培养基)。在一些实施方案中,第三次孵育包括在包含葡萄糖和无血清分化补充剂的培养基(例如,DD6培养基)中培养第二聚集体,这在第三次孵育的启动时开始并且一直持续到收获(例如,在第22天或约第22天),但是开始于第10、11和12天或者约第10、11和12天的连续三天的时段除外,在该时段期间,包含葡萄糖和无血清分化补充剂的培养基(例如,DD6培养基)被替换为包含乳酸钠的培养基(例如,DD10培养基)。

[1406] 在一些实施方案中,第三次温育包括在选自第7天到第15天的一天或多天在包含葡萄糖和无血清分化补充剂的培养基(例如,DD10培养基)中培养第二聚集体。在一些实施方案中,第三次孵育包括在选自第7天至第15天的连续1天、2天或更多天、3天或更多天,或4天或更多天在包含葡萄糖和无血清分化补充剂的培养基(例如,DD10培养基)中培养第二聚

集体。在一些实施方案中,第三次孵育包括在开始于第7、8、9、10、11、12或13天或者约第7、8、9、10、11、12或13天的连续1、2、3或4天在包含葡萄糖和无血清分化补充剂的培养基(例如,DD10培养基)中培养第二聚集体。在一些实施方案中,第三次孵育包括在开始于第9、10或11天或者约第9、10或11天的连续3天在包含葡萄糖和无血清分化补充剂的培养基(例如,DD10培养基)中培养第二聚集体。在一些实施方案中,第三次孵育包括在第10、11和12天在包含葡萄糖和无血清分化补充剂的培养基(例如,DD10培养基)中培养第二聚集体。

[1407] 在一些实施方案中,(a)在包含葡萄糖的培养基中培养第二聚集体包括在第6-10天和第12-22天或者约第6-10天和第12-22天在包含葡萄糖的培养基中培养第二聚集体;并且在包含乳酸钠的培养基中培养第二聚集体包括在第10-12天或者约第10-12天在包含乳酸钠的培养基中培养第二聚集体;或者(b)在包含葡萄糖的培养基中培养第二聚集体包括在第4-8天和第12-22天或者约第4-8天和第12-22天在包含葡萄糖的培养基中培养第二聚集体;并且在包含乳酸钠的培养基中培养第二聚集体包括在第8-12天或者约第8-12天在包含乳酸钠的培养基中培养第二聚集体;或者(c)在包含葡萄糖的培养基中培养第二聚集体包括在第5-9天和第13-22天或者约第5-9天和第13-22天在包含葡萄糖的培养基中培养第二聚集体;并且在包含乳酸钠的培养基中培养第二聚集体包括在第9-13天或者约第9-13天在包含乳酸钠的培养基中培养第二聚集体;或者(d)在包含葡萄糖的培养基中培养第二聚集体包括在第7-11天和第13-22天或者约第7-11天和第13-22天在包含葡萄糖的培养基中培养第二聚集体;并且在包含乳酸钠的培养基中培养第二聚集体包括在第11-13天或者约第11-13天在包含乳酸钠的培养基中培养第二聚集体;或着(e)在包含葡萄糖的培养基中培养第二聚集体包括在第8-12天和第14-22天或者约第8-12天和第14-22天在包含葡萄糖的培养基中培养第二聚集体;并且在包含乳酸钠的培养基中培养第二聚集体包括在第12-14天或者约第12-14天在包含乳酸钠的培养基中培养第二聚集体。

[1408] 在一些实施方案中,在包含葡萄糖的培养基中培养第二聚集体包括在第6-10天和第12-22天或者约第6-10天和第12-22天在包含葡萄糖的培养基中培养第二聚集体;并且在包含乳酸钠的培养基中培养第二聚集体包括在第10-12天或者约第10-12天在包含乳酸钠的培养基中培养第二聚集体。在一些实施方案中,在包含葡萄糖的培养基中培养第二聚集体包括在第4-8天和第12-22天或者约第4-8天和第12-22天在包含葡萄糖的培养基中培养第二聚集体;并且在包含乳酸钠的培养基中培养第二聚集体包括在第8-12天或者约第8-12天在包含乳酸钠的培养基中培养第二聚集体。在一些实施方案中,在包含葡萄糖的培养基中培养第二聚集体包括在第5-9天和第13-22天或者约第5-9天和第13-22天在包含葡萄糖的培养基中培养第二聚集体;并且在包含乳酸钠的培养基中培养第二聚集体包括在第9-13天或者约第9-13天在包含乳酸钠的培养基中培养第二聚集体。在一些实施方案中,在包含葡萄糖的培养基中培养第二聚集体包括在第7-11天和第13-22天或者约第7-11天和第13-22天在包含葡萄糖的培养基中培养第二聚集体;并且在包含乳酸钠的培养基中培养第二聚集体包括在第11-13天或者约第11-13天在包含乳酸钠的培养基中培养第二聚集体。在一些实施方案中,在包含葡萄糖的培养基中培养第二聚集体包括在第8-12天和第14-22天或者约第8-12天和第14-22天在包含葡萄糖的培养基中培养第二聚集体;并且在包含乳酸钠的培养基中培养第二聚集体包括在第12-14天或者约第12-14天在包含乳酸钠的培养基中培养第二聚集体。

[1409] 在一些实施方案中,在包含乳酸钠的培养基中培养第二聚集体包括在约9-13天中的任何一天的一天或多天在包含乳酸钠的培养基中培养第二聚集体。在一些实施方案中,在包含乳酸钠的培养基中培养第二聚集体包括在约10-12天中的一天或多天在包含乳酸钠的培养基中培养第二聚集体。在一些实施方案中,在包含乳酸钠的培养基中培养第二聚集体包括在第10-12天或者约第10-12天在包含乳酸钠的培养基中培养第二聚集体。

[1410] 在一些实施方案中,第三次孵育一直持续至收获心肌细胞群体。在一些实施方案中,第三次孵育在第4至8天中的任一天或约第4至8天中的任一天,例如第4、5、6、7或8天开始,并且一直持续至收获心肌细胞群体。在一些实施方案中,第三次孵育在第4天或第5天或者约第4天或第5天开始。在一些实施方案中,第三次孵育在第6至8天中的任一天或约第6至8天中的任一天,例如第6、7或7天开始,并且一直持续至收获心肌细胞群体。在一些实施方案中,第三次孵育在第6天或第7天或者约第6天或第7天开始。在一些实施方案中,第三次孵育在第6天或者约第6天开始。

[1411] 在一些实施方案中,心肌细胞群体包含的一种或多种心肌细胞标志物的频率在第8、9、10、11和12天中的任何一天的一天或多天和/或在与解离剂接触之日后的第六天为或为至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%或98%。心肌细胞标志物的实例包括,例如,蛋白质NKX2.5、cTNT、ACTN2、TNNI1、TNNI3、MYH6、MYH7、MYL2和MYL7。NKX2.5是NK2同源框5(也称为NKX2-5),并且由NKX2-5基因(NM_001166175;NCBI基因ID 1482)编码。cTNT是肌钙蛋白T2心脏型(也称为TNNT2),并且由TNNT2基因(NG_007556;NCBI基因ID 7139)编码。ACTN2是肌动蛋白α2,并且由ACTN2基因(NCBI接入号:NG_009081;NCBI基因ID 88)编码。TNNI1是肌钙蛋白I1慢骨骼型(也称为SSTNII),并且由TNNI1基因(NG_016649;NCBI基因ID 7135)编码。TNNI3是肌钙蛋白I3心脏类型,并且由TNNI3基因(NM_000363;NCBI基因ID 7137)编码。MYH6是肌球蛋白重链6,并且由MYH6基因(NM_002471;NCBI基因ID 4624)编码。MYH7是肌球蛋白重链7,并且由MYH7基因(NM_000257;NCBI基因ID 4625)编码。MYL2是肌球蛋白轻链2,并且由MYL2基因(NM_000432;NCBI基因ID 4633)编码。MYL7是肌球蛋白轻链7,并且由MYL2基因(NM_021223;NCBI基因ID 58498)编码。

[1412] 在一些实施方案中,该一种或多种心肌细胞标志物选自由NKX2.5、cTNT、ACTN2、TNNI1、TNNI3、MYH6、MYH7、MYL2和MYL7组成的组。在一些实施方案中,该一种或多种心肌细胞标志物包括NKX2.5和cTNT。在一些实施方案中,该一种或多种心肌细胞标志物包括MYH6和MYL7。在一些实施方案中,该一种或多种心肌细胞标志物包括NKX2.5、cTNT、MYH6和MYL7。

[1413] 在一些实施方案中,在第三次孵育期间,心肌细胞群体包含的NKX2.5+/cTNT+细胞的频率在第8-12天中的任何一天的一天或多天(即第8、9、10、11和12天中的任何一天或多天)和/或在与解离剂接触之日后的第六天为或为至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%或98%。在一些实施方案中,NKX2.5+/cTNT+细胞的频率在第8-12天,即第8、9、10、11和12天中的任何一天或多天和/或在与解离剂接触之日后的第六天为或为至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%或98%。在一些实施方案中,在第三次孵育期间,心肌细胞群体包含的NKX2.5+/cTNT+细胞的频率在第9-11天中的任何一天的一天或多天(即第9、10和11天中的任何一天或多天)和/或在与解离剂接触之

日后的第六天为或为至少75％、76％、77％、78％、79％、80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％或98％。在一些实施方案中,NKX2.5+/cTNT+细胞的频率在第9-11天中的任何一天的一天或多天(即第9、10和11天中的任何一天或多天)和/或在与解离剂接触之日后的第六天为或为至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％或98％。在一些实施方案中,在第三次孵育期间,心肌细胞群体包含的NKX2.5+/cTNT+细胞的频率在第10天或者约第10天和/或在与解离剂接触之日后的第六天为或为至少75％、76％、77％、78％、79％、80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％或98％。在一些实施方案中,NKX2.5+/cTNT+细胞的频率在第10天或者约第10天和/或在与解离剂接触之日后的第六天为或为至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％或98％。在一些实施方案中,NKX2.5+/cTNT+细胞的频率在第10天或者约第10天为或为至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％或98％。

[1414] 在一些实施方案中,NKX2.5+/cTNT+细胞的频率在第8-12天中的任何一天的一天或多天(即第8、9、10、11和12天中的任何一天或多天)和/或在与解离剂接触之日后的第六天为或为至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％或98％。在一些实施方案中,NKX2.5+/cTNT+细胞的频率在第9-11天中的任何一天的一天或多天(即在第9、10和11天中的任何一天的一天或多天)和/或在与解离剂接触之日后的第六天为或为至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％或98％。在一些实施方案中,NKX2.5+/cTNT+细胞的频率在第10天或者约第10天和/或在与解离剂接触之日后的第六天为或为至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％或98％。

[1415] 在一些实施方案中,第三次孵育以悬浮形式进行。在一些实施方案中,第三次孵育包括悬浮培养第二聚集体。在一些实施方案中,第三次孵育包括在第4、5、6、7、8、9或10天或者约第4、5、6、7、8、9或10天开始悬浮培养第二聚集体。在一些实施方案中,第三次孵育包括在第6天或者约第6天开始悬浮培养第二聚集体。在一些实施方案中,第三次孵育包括在与解离剂接触后1天、2天、3天或4天或者约与解离剂接触后1天、2天、3天或4天开始悬浮培养第二聚集体。在一些实施方案中,第三次孵育包括在与解离剂接触后2天或者约与解离剂接触后2天开始悬浮培养第二聚集体。

[1416] 心肌细胞群体

[1417] 在一些实施方案中,心肌细胞群体包含的一种或多种心肌细胞标志物的频率为或为至少75％、76％、77％、78％、79％、80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％或98％。在一些实施方案中,该一种或多种心肌细胞标志物选自由NKX2.5、cTNT、ACTN2、TNNI1、TNNI3、MYH6、MYH7、MYL2和MYL7组成的组。在在一些实施方案中,该一种或多种心肌细胞标志物包括NKX2.5和cTNT。在一些实施方案中,该一种或多种心肌细胞标志物包括MYH6和MYL7。在一些实施方案中,该一种或多种心肌细胞标志物包括NKX2.5、cTNT、MYH6和MYL7。

[1418] 在一些实施方案中,心肌细胞群体包含的选自由NKX2.5、cTNT、ACTN2、TNNI1、TNNI3、MYH6、MYH7、MYL2和MYL7组成的组的一种或多种心肌细胞标志物的频率为或为至少75％、76％、77％、78％、79％、80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、

90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％或98％。在一些实施方案中,心肌细胞群体包含的NKX2.5+/cTNT+的频率为或为至少75％、76％、77％、78％、79％80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％或98％。在在一些实施方案中,心肌细胞群体包含的MYH6+/MYL7+的频率为或为至少75％、76％、77％、78％、79％、80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％或98％。在一些实施方案中,心肌细胞群体包含的NKX2.5+/cTNT+/MYH6+/MYL7+的频率为或为至少75％、76％、77％、78％、79％、80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％或98％。在一些实施方案中,心肌细胞群体包含的NKX2.5+/cTNT+的频率为或为至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％或98％。在一些实施方案中,心肌细胞群体包含的MYH6+/MYL7+的频率为或为至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％或98％。在一些实施方案中,心肌细胞群体包含的NKX2.5+/cTNT+/MYH6+/MYL7+的频率为或为至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％或98％。

[1419] 在一些实施方案中,第二聚集体中的心肌细胞群体包含的成熟心肌细胞的频率与包含先前未被解离的细胞的聚集体中的参考的心肌细胞群体相比更高。在一些实施方案中,在第20、21、22、23或24天或者约20、21、22、23或24天,第二聚集体中的心肌细胞群体包含的成熟心肌细胞的频率与包含先前未被解离的细胞的聚集体中的参考的心肌细胞群体相比更高。在一些实施方案中,在第22天或者约22天,第二聚集体中的心肌细胞群体包含的成熟心肌细胞的频率与包含先前未被解离的细胞的聚集体中的参考的心肌细胞群体相比更高。

[1420] 在一些实施方案中,参考心肌细胞群体是在与第二聚集体中的心肌细胞群体相同或基本上相同的条件下分化的,但是b)和c)除外。在一些实施方案中,参考心肌细胞群体是在不包括使聚集体与解离剂接触以形成解离的细胞群体的条件下分化的。在一些实施方案中,参考心肌细胞群体是在除了不包括使聚集体与解离剂接触之外与第二聚集体中的心肌细胞群体相同或基本上相同的条件下分化的。在一些实施方案中,参考心肌细胞群体是在除了不包括使聚集体与解离剂接触之外与第二聚集体中的心肌细胞群体相同或基本上相同的条件下分化的。在一些实施方案中,参考心肌细胞群体先前未使用解离剂进行解离。

[1421] 在一些实施方案中,成熟心肌细胞的频率是基于第二聚集体中的心肌细胞群体中一种或多种成熟心肌细胞标志物的存在频率。心肌细胞标志物可以是用于识别心肌细胞的任何标志物,例如,任何细胞表面标志物。在一些实施方案中,该一种或多种心肌细胞标志物包括选自由以下组成的组中的一种或多种标志物:NKX2.5、cTNT、ACTN2、TNNI1、TNNI3、MYH6、MYH7、MYL2和MYL7。在一些实施方案中,该一种或多种心肌细胞标志物包括MYH6和MYL7。在一些实施方案中,该一种或多种心肌细胞标志物包括NKX2.5、cTNT、MYH6和MYL7。在一些实施方案中,该一种或多种心肌细胞标志物包括NKX2.5和cTNT。

[1422] 用于减少植入性心律失常(AE)的修饰

[1423] 在一些实施方案中,心肌细胞群体包含当移植到受试者中时减轻或防止植入性心律失常(EA)的一种或多种修饰。在一些实施方案中,解离的细胞群体包含当移植到受试者中时减轻或防止EA的一种或多种修饰。在一些实施方案中,第二聚集体中解离的细胞群体

包含当移植到受试者中时减轻或防止EA的一种或多种修饰。

[1424] 在一些实施方案中,该一种或多种修饰包括一种或多种这样的修饰,该修饰:(i)相对于不包含该一种或多种修饰的心肌细胞群体增加一种或多种致耐受因子的表达;和/或(ii)相对于不包含该一种或多种修饰的心肌细胞群体降低一种或多种主要组织相容性复合物(MHC)I类分子和/或MHC II类分子的表达。

[1425] 在一些实施方案中,该一种或多种修饰包括一种或多种这样的修饰,该修饰:(a)降低CACNA1G、HCN4和SLC8A1中的一种或多种的表达;和/或(b)增加KCNJ2、TRDN、SRL、HRC和CASQ2中的一种或多种的表达。

[1426] 在一些实施方案中,该一种或多种修饰包括一种或多种这样的修饰,该修饰:(a)降低CACNA1H、HCN4和SLC8A1中的一种或多种的表达;和/或(b)增加KCNJ2、TRDN、SRL、HRC和CASQ2中的一种或多种的表达。

[1427] 在一些实施方案中,该一种或多种修饰包括一种或多种这样的修饰,该修饰:(a)降低CACNA1H、HCN4和SLC8A1的表达;和(b)增加KCNJ2的表达。

[1428] 用于将修饰引入到细胞中以改变表达的示例性方法是已知的,并且在本文中也有描述。例如,可以使用用于使基因或蛋白质过表达或者增加基因或蛋白质的表达的多种方法中的任何方法,诸如通过引入或递送编码蛋白质的外源性多核苷酸(即,转基因)或者引入或递送DNA靶向结构域和靶向基因的转录活化因子的融合蛋白。而且,可以使用用于降低或消除基因或蛋白质的表达的多种方法中的任何方法,包括非基因编辑方法(诸如通过引入或递送抑制性核酸(例如,RNAi)),或涉及引入或递送靶向核酸酶系统(例如,CRISPR/Cas)的基因编辑方法。在一些实施方案中,用于降低或消除表达的方法是经由基于核酸酶的基因编辑技术。

[1429] 在一些实施方案中,利用罕见切割核酸内切酶(例如,CRISPR/Cas、TALEN、锌指核酸酶、大范围核酸酶和归巢核酸内切酶系统)的基因组编辑技术也被用于降低或消除人细胞中包括免疫基因在内的基因的表达(例如,通过缺失人细胞中关键免疫基因的基因组DNA)。在一些实施方案中,基因组编辑技术包括使用切口酶、碱基编辑、先导编辑和基因写入。

[1430] 在某些实施方案中,基因组编辑技术或其他基因调节技术被用于:插入KCNJ2、TRDN、SRL、HRC和CASQ2基因中的一种或多种;降低或消除CACNA1G、CACNA1H、HCN4和SLC8A1基因中的一种或多种的表达;或它们的任何组合,从而产生可以在植入受试者中后导致EA减轻或消除的经工程化的细胞(例如经工程化的心肌细胞群体)。

[1431] 因此,本文提供的细胞(例如心肌细胞群体,或解离的细胞群体,或第二聚集体中的细胞群体)可以在一些实施方案中表现出受到调节的CACNA1G、CACNA1H、HCN4和SLC8A1中的一种或多种的表达(例如,降低或消除的CACNA1G、CACNA1H、HCN4和SLC8A1中的一种或多种的表达),和/或受到调节的KCNJ2、TRDN、SRL、HRC和CASQ2中的一种或多种的表达(例如,增加的KCNJ2、TRDN、SRL、HRC和CASQ2中的一种或多种的表达或者KCNJ2、TRDN、SRL、HRC和CASQ2中的一种或多种的过表达)。在一些实施方案中,本文提供的细胞(例如心肌细胞群体,或解离的细胞群体,或第二聚集体中的细胞群体)表现出受到调节的CACNA1G、HCN4和SLC8A1的表达(例如,降低或消除的CACNA1G、HCN4和SLC8A1的表达),和/或受到调节的KCNJ2的表达(例如,增加的KCNJ2的表达或者KCNJ2的过表达)。

[1432] 在一些实施方案中,本文提供的细胞(例如心肌细胞群体,或解离的细胞群体,或第二聚集体中的细胞群体)在受试者中植入后不会引起植入性心律失常。

[1433] 用于降低所关注的靶基因的表达的方法是已知的。可以使用用于降低靶多核苷酸的表达的任何方法。在一些实施方案中,修饰(例如,遗传修饰)导致靶多核苷酸的表达的永久消除或降低。例如,在一些实施方案中,通过在靶多核苷酸中引入DNA断裂(诸如通过使用靶向核酸内切酶)来破坏靶多核苷酸或基因。在其他实施方案中,修饰(遗传修饰)导致靶多核苷酸的表达瞬时降低。例如,在一些实施方案中,使用与靶多核苷酸互补的抑制性核酸以选择性抑制或阻遏基因的表达(例如使用反义技术,诸如通过RNA干扰(RNAi)、短干扰RNA(siRNA)、短发夹(shRNA)和/或核酶)来实现基因阻遏。

[1434] 在一些实施方案中,靶多核苷酸序列是基因组序列。在一些实施方案中,靶多核苷酸序列是人基因组序列。在一些实施方案中,靶多核苷酸序列是哺乳动物基因组序列。在一些实施方案中,靶多核苷酸序列是脊椎动物基因组序列。在一些实施方案中,通常以靶向方式,通过诱导基因中一个或多个双链断裂和/或一个或多个单链断裂来进行基因破坏。在一些实施方案中,双链或单链断裂由核酸酶(例如核酸内切酶,诸如基因靶向核酸酶)产生。在一些实施方案中,靶向核酸酶选自专门设计用于被靶向于基因或其一部分的序列的锌指核酸酶(ZFN)、转录活化因子样效应物核酸酶(TALEN)和RNA指导的核酸酶诸如CRISPR相关核酸酶(Cas)。在一些实施方案中,靶向核酸酶生成双链或单链断裂,该双链或单链断裂然后经受通过易错非同源末端连接(NHEJ)进行的修复,或者在一些情况下,通过使用模板的精确同源定向修复(HDR)进行的修复。在一些实施方案中,靶向核酸酶生成DNA双链断裂(DSB)。在一些实施方案中,产生和修复断裂的过程通常容易出错并导致来自NHEJ修复的DNA碱基的插入和缺失(插入缺失)。在一些实施方案中,遗传修饰可诱导靶基因的核苷酸序列的缺失、插入或突变。在一些情况下,遗传修饰可导致移码突变,该移码突变可以导致提前终止密码子。在核酸酶介导的基因编辑的实例中,靶向编辑发生在基因的两个等位基因上,从而导致该基因的双等位基因破坏或编辑。在一些实施方案中,该基因的所有等位基因都被基因编辑靶向。在一些实施方案中,利用靶向核酸酶(诸如使用CRISPR/Cas系统)进行的遗传修饰导致该基因的完全敲除。

[1435] 收获和冷冻保存

[1436] 在一些实施方案中,该方法进一步包括收获心肌细胞群体。在一些实施方案中,该方法进一步包括收获解离的细胞群体。在一些实施方案中,该方法进一步包括收获第二聚集体。

[1437] 在一些实施方案中,心肌细胞群体是在任何合适的时间(例如在第三次孵育期间或第三次孵育之后的任何合适时间)收获的。在一些实施方案中,心肌细胞群体是基于一种或多种心肌细胞标志物的频率收获的。在一些实施方案中,心肌细胞群体是基于包括高于阈值的一个或多个心肌细胞标志物的频率的标准来收获的。在一些实施方案中,阈值等于或高于85%、96%、97%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。

[1438] 在一些实施方案中,心肌细胞群体是在第14、15、16、17、18、19、20、21、22、23或24天或者约第14、15、16、17、18、19、20、21、22、23或24天收获的。在一些实施方案中,心肌细胞群体是在第20、21、22、23或24天或者约第20、21、22、23或24天收获的。在一些实施方案中,

心肌细胞群体是在第21、22或23天或者约第21、22或23天收获的。在一些实施方案中,心肌细胞群体是在第22天或者约第22天收获的。

[1439] 在一些实施方案中,解离的细胞群体是在第2、3、4、5或6天或者约第2、3、4、5或6天收获的。在一些实施方案中,解离的细胞群体是在第3、4或5天或者约第3、4或5天收获的。在一些实施方案中,解离的细胞群体是在第4天或第5天或者约第4天或第5天收获的。在一些实施方案中,解离的细胞群体是在第4天或者约第4天收获的。

[1440] 在一些实施方案中,第二聚集体是在第3至22天中的任一天或者约第3至22天中的任一天收获的。在一些实施方案中,第二聚集体是在第3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15天中的任一天或者约第3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15天中的任一天收获的。在一些实施方案中,第二聚集体是在第4、5、6、7、8、9、10、11或12天中的任一天或者约第4、5、6、7、8、9、10、11或12天中的任一天收获的。在一些实施方案中,第二聚集体是在第4、5、6、7、8、9或10天或者约第4、5、6、7、8、9或10天收获的。在一些实施方案中,第二聚集体是在第5、6或7天或者约第5、6或7天收获的。

[1441] 收获(例如,心肌细胞群体、解离的细胞群体群体和/或第二聚集体的收获)可以使用任何合适的方法进行,该方法包括任何已知的方法,诸如如以下文献中描述或使用的任何方法:Fujiwara等人,PLoS One.(2001)6(2):e16734;Dambrot等人,Biochem J.(2011)434(1):25-35;Foldes等人,J Mol Cell Cardiol.(2011)50(2):367-76;Wang等人,Sci China Life Sci.(2010)53(5):581-9;Chen等人,J Cell Biochem.(2010)(1):29-39;Yang等人,Nature(2008)453:524-28;Kattman等人,Cell Stem Cell(2011)8:228-40;Laflamme等人,Nat.Biotechnol.(2007)25:1015-24;Paige等人,PLoS One(2010)5(6):e11134;Xu等人,Regen Med(2011)6(1):53-66;Mignone等人,Circ J(2010)74(12):2517-26;Takei等人,Am J Physiol Heart Circ Physiol.(2009)296(6):H1793-803;WO2013013206;以及WO2013056072。

[1442] 在一些实施方案中,心肌细胞群体的收获包括将心肌细胞群体离心成沉淀。在一些实施方案中,心肌细胞群体的收获进一步包括一个或多个洗涤步骤。在一些实施方案中,该方法进一步包括冷冻保存所收获的心肌细胞群体。

[1443] 在一些实施方案中,解离的细胞群体的收获包括将解离的细胞群体离心成沉淀。在一些实施方案中,解离的细胞群体的收获进一步包括一个或多个洗涤步骤。在一些实施方案中,该方法进一步包括冷冻保存所收获的解离的细胞群体。

[1444] 在一些实施方案中,第二聚集体的收获包括将第二聚集体离心成沉淀。在一些实施方案中,第二聚集体的收获进一步包括一个或多个洗涤步骤。在一些实施方案中,该方法进一步包括冷冻保存所收获的第二聚集体。

[1445] 冷冻保存可以使用包括任何已知方法在内的任何合适的方法进行。

[1446] 通过使用心肌细胞,可以产生用于对抗各种心脏疾病或疾患的大规模、有效的基于细胞的疗法。

[1447] 经基因组编辑的心肌细胞可用于治疗或预防受试者的疾病(例如,如WO2022187379A1中所述,其内容以引用的方式整体并入本文中)。方法可以包括向受试者施用包含本文所述的或通过本文所述的方法产生的经基因组编辑的心肌细胞的组合物。该疾病可包括例如心脏疾病或心脏疾患。

[1448] 可以将经基因组编辑的心肌细胞单独地或者与一种或多种其他疗法组合施用于受试者。例如,可以将经基因组编辑的心肌细胞与包含活性剂和药学上可接受的载剂的药物组合物组合和/或与细胞疗法组合施用于受试者。可以向患者(优选哺乳动物,并且更优选人)施用有效量的心肌细胞以产生所需效果。心肌细胞可以以多种途径施用,该途径包括例如静脉内、瘤内、动脉内、经皮、经由通过导管或支架的局部递送、经由针或其他用于瘤内注射的装置、皮下等。心肌细胞可以被施用一次或多次。具有本领域普通技术的医生可以确定并开出适应性心肌细胞,以及任选地所需药物组合物的有效量和给药量。

[1449] 心脏疾病或心脏疾患可以包括,例如,小儿心肌病、年龄相关性心肌病、扩张型心肌病、肥厚性心肌病、限制性心肌病、慢性缺血性心肌病、围产期心肌病、炎性心肌病、其他心肌病、心肌炎、心肌梗塞、心肌缺血再灌注损伤、心室功能障碍、心力衰竭、充血性心力衰竭、冠状动脉疾病、终末期心脏疾病、动脉粥样硬化、缺血、高血压、再狭窄、心绞痛、风湿性心脏、动脉炎症或心血管疾病。在一些实施方案中,心脏疾病或疾患是心肌梗塞(MI)。

[1450] 在所提供的实施方案中的任一个中,施用了心肌细胞疗法的受试者患有诸如心脏疾患或疾病的疾患或疾病。在一些实施方案中,心脏疾患或疾病选自由以下组成的组:小儿心肌病、年龄相关性心肌病、扩张型心肌病、肥厚性心肌病、限制性心肌病、慢性缺血性心肌病、围产期心肌病、炎性心肌病、其他心肌病、心肌炎、心肌梗塞(MI)、心肌缺血再灌注损伤、心室功能障碍、心力衰竭、充血性心力衰竭、冠状动脉疾病、终末期心脏疾病、动脉粥样硬化、缺血、高血压、再狭窄、心绞痛、风湿性心脏、动脉炎症或心血管疾病。在一些实施方案中,心脏疾患或疾病是心肌梗塞(MI)。因此,在一些实施方案中,心肌细胞疗法被施用于受试者以治疗MI(例如作为包含心肌细胞的组合物)。

[1451] h.神经细胞

[1452] 可以在细胞疗法产品制造过程的任何阶段对待用于细胞疗法产品中的神经细胞进行针对供体能力的特性分析。

[1453] 细胞疗法产品中使用的神经细胞可以是原代神经细胞。如本文任何地方所描述的用于对细胞群体进行针对供体能力的特性分析的方法可以对原代(例如,经基因组编辑的)神经细胞进行。

[1454] 如本文其他地方所述,细胞疗法产品中使用的神经细胞可以是多能干细胞(iPSC)来源的神经细胞。如本文任何地方所描述的用于对细胞群体进行针对供体能力的特性分析的方法也可以对能够分化形成神经细胞的干细胞进行。如本文任何地方所描述的用于对细胞群体进行针对供体能力的特性分析的方法也可以对干细胞来源的(例如,经基因组编辑的)神经细胞进行。

[1455] 如本公开的上下文中提及的有关神经细胞的相关信息(包括关于神经细胞在被用于细胞疗法时的所需特征的某些信息)在本领域中是已知的。应当理解,本文所述的关于神经细胞的实施方案可以容易且适当地与描述HIP细胞(例如,表现出降低的MHC I类和/或MHC II类分子中的一种或多种分子的表达以及增加的至少一种致耐受因子的表达)的实施方案以及描述安全开关和如本文所述的其他经修饰的/经基因编辑的细胞的实施方案相组合。可以在细胞疗法产品制造期间的编辑过程的任何阶段对待用于细胞疗法产品中的神经细胞进行针对供体能力的特性分析。

[1456] 本文所述的神经细胞可用于治疗或预防受试者的疾病。

[1457] 本文提供了从如所描述的经工程化的多能细胞(例如iPSC)分化而来的不同神经细胞类型,其可用于随后移植或植入到接受者受试者中。如本领域技术人员将理解的,用于分化的方法取决于使用已知技术的所需细胞类型。示例性神经细胞类型包括但不限于脑内皮细胞、神经元(例如,多巴胺能神经元)、胶质细胞等。

[1458] 在一些实施方案中,诱导型多能干细胞的分化是通过将该细胞暴露于已知会产生一种或多种特定细胞谱系的特定因子或使该细胞与已知会产生一种或多种特定细胞谱系的特定因子接触,以便使它们分化为特定的、期望的谱系和/或所关注的细胞类型来进行。在一些实施方案中,终末分化的细胞展现出专门的表型特性或特征。在某些实施方案中,本文所述的干细胞被分化为神经外胚层、神经元、神经内分泌、多巴胺能、胆碱能、血清素能(5-HT)、谷氨酸能、GABA能、肾上腺素能、去甲肾上腺素能、交感神经元、副交感神经元、交感周围神经元或胶质细胞群体。在一些情况下,胶质细胞群体包括小胶质(例如,变形虫样、分支、活化的吞噬和活化的非吞噬)细胞群体或大胶质(中枢神经系统细胞:星形胶质细胞、少突胶质细胞、室管膜细胞和放射状胶质细胞;和周围神经系统细胞:雪旺氏细胞(Schwann cell)和卫星细胞)细胞群体,或任何前述细胞的前体和祖细胞。

[1459] 用于生成不同类型的神经细胞的方案描述于PCT申请号WO2010144696、美国专利号9,057,053;9,376,664;和10,233,422。用于使低免疫原性多能细胞分化的方法的另外的描述可以见于例如Deuse等人,Nature Biotechnology,2019,37,252-258和Han等人,Proc Natl Acad Sci USA,2019,116(21),10441-10446。以下参考文献中描述了用于确定神经细胞移植在神经性病症或疾患的动物模型中的效果的方法:对于脊髓损伤,Curtis等人,Cell Stem Cell,2018,22,941-950;对于帕金森病(Parkinson's disease),Kikuchi等人,Nature,2017,548:592-596;对于ALS,Izrael等人,Stem Cell Research,2018,9(1):152和Izrael等人,IntechOpen,DOI:10.5772/intechopen.72862;对于癫痫,Upadhya等人,PNAS,2019,116(1):287-296。

[1460] 在一些实施方案中,经工程化的神经细胞(诸如从来源于一个或多个个体供体(例如健康供体)的iPSC分化而来的神经细胞)的群体被维持在培养基中,在一些情况下在施用之前被扩增。在某些实施方案中,神经细胞群体在施用前被冷冻保存。

[1461] 在一些实施方案中,本技术涉及经工程化的神经细胞(诸如从来源于一个或多个个体供体(例如健康供体)的iPSC分化而来的神经细胞),其过表达致耐受因子(例如CD47),并且具有降低的一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子(例如,一种或多种MHC I类人白细胞抗原分子和/或一种或多种MHC II类人白细胞抗原分子)的表达或缺乏该表达。

[1462] 在一些实施方案中,提供的经工程化的神经细胞逃避免疫识别。在一些实施方案中,本文所述的经工程化的神经细胞(诸如从来源于一个或多个个体供体(例如健康供体)的iPSC分化而来的神经细胞)不会活化患者(例如,施用后的接受者)的免疫反应。提供了通过向有需要的受试者(例如,接受者)或患者施用本文所述的经工程化的神经细胞群体来治疗疾病的方法。

[1463] 在一些实施方案中,将神经细胞施用于受试者以治疗帕金森病、亨廷顿病(Huntington disease)、多发性硬化症、其他神经变性疾病或疾患、注意力缺陷多动障碍(ADHD)、抽动秽语综合征(TS)、精神分裂症、精神病、抑郁症、其他神经精神病症。在一些实

施方案中,将本文所述的神经细胞施用于受试者以治疗或改善中风。在一些实施方案中,将神经元和胶质细胞施用于患有肌萎缩侧索硬化症(ALS)的受试者。

[1464] 1)脑内皮细胞

[1465] 可以在细胞疗法产品制造过程的任何阶段对待用于细胞疗法产品中的脑内皮细胞进行针对供体能力的特性分析。

[1466] 细胞疗法产品中使用的脑内皮细胞可以是原代脑内皮细胞。如本文任何地方所描述的用于对细胞群体进行针对供体能力的特性分析的方法可以对原代(例如,经基因组编辑的)脑内皮细胞进行。

[1467] 如本文其他地方所述,细胞疗法产品中使用的脑内皮细胞可以是多能干细胞(iPSC)来源的脑内皮细胞。如本文任何地方所描述的用于对细胞群体进行针对供体能力的特性分析的方法也可对能够分化形成脑内皮细胞的干细胞进行。如本文任何地方所描述的用于对细胞群体进行针对供体能力的特性分析的方法也可以对干细胞来源的(例如,经基因组编辑的)脑内皮细胞进行。

[1468] 如本公开的上下文中提及的有关脑内皮细胞的相关信息(包括关于脑内皮细胞在被用于细胞疗法时的所需特征的某些信息)在本领域中是已知的。应当理解,本文所述的关于脑内皮细胞的实施方案可以容易且适当地与描述HIP细胞(例如,表现出降低的MHC I类和/或MHC II类分子中的一种或多种分子的表达以及增加的至少一种致耐受因子的表达)的实施方案以及描述安全开关和如本文所述的其他经修饰的/经基因编辑的细胞的实施方案相组合。可以在细胞疗法产品制造期间的编辑过程的任何阶段对待用于细胞疗法产品中的脑内皮细胞进行针对供体能力的特性分析。

[1469] 在一些实施方案中,脑内皮细胞(EC)、其前体和祖细胞是通过如下方式从表面上的多能干细胞(例如,诱导型多能干细胞)分化而来的:将该细胞在包含一种或多种促进EC或神经细胞产生的因子的培养基中培养。在一些情况下,该培养基包含以下中的一种或多种:CHIR-99021、VEGF、碱性FGF(bFGF)和Y-27632。在一些实施方案中,该培养基包含设计用于促进神经细胞的存活和功能的补充剂。

[1470] 在一些实施方案中,脑内皮细胞(EC)、其前体和祖细胞是通过如下方式从表面上的多能干细胞分化而来的:将该细胞在非条件或条件培养基中培养。在一些情况下,该培养基包含促进或促成分化的因子或小分子。在一些实施方案中,该培养基包含一种或多种选自由以下组成的组的因子或小分子:VEGR、FGF、SDF-1、CHIR-99021、Y-27632、SB 431542及其任何组合。在一些实施方案中,用于分化的表面包含一种或多种细胞外基质蛋白。该表面可以包被有一种或多种细胞外基质蛋白。可以使细胞以悬浮形式分化,然后将其放入凝胶基质形式(诸如基质胶、明胶或纤维蛋白/凝血酶形式)中以促进细胞存活。在一些情况下,如本领域已知的那样,通常通过评价细胞特异性标志物的存在来测定分化。

[1471] 在一些实施方案中,脑内皮细胞表达或分泌选自由CD31、VE钙粘蛋白及其组合组成的组的因子。在某些实施方案中,脑内皮细胞表达或分泌选自由以下组成的组的因子中的一种或多种因子:CD31、CD34、CD45、CD117(c-kit)、CD146、CXCR4、VEGF、SDF-1、PDGF、GLUT-1、PECAM-1、eNOS、封闭蛋白-5、闭锁蛋白、ZO-1、p-糖蛋白、冯威里氏因子(von Willebrand factor)、VE-钙粘蛋白、低密度脂蛋白受体LDLR、低密度脂蛋白受体相关蛋白1LRP1、胰岛素受体INSR、瘦素受体LEPR、基底细胞粘附分子BCAM、转铁蛋白受体TFRC、晚期

糖基化终产物特异性受体AGER、视黄醇摄取受体STRA6、大中性氨基酸转运蛋白小亚基1SLC7A5、兴奋性氨基酸转运蛋白3SLC1A1、钠偶联中性氨基酸转运蛋白5SLC38A5、溶质载体家族16成员1SLC16A1、ATP依赖性转位酶ABCB1、ATP-ABCC2结合盒转运蛋白ABCG2、多药抗性相关蛋白1ABCC1、小管多特异性有机阴离子转运蛋白1ABCC2、多药抗性相关蛋白4ABCC4和多药抗性相关蛋白5ABCC5。

[1472] 在一些实施方案中,脑EC的特征在于具有选自由以下组成的组的特征中的一种或多种特征:紧密连接的高表达、高电阻、低开窗、小血管周围空间、胰岛素和转铁蛋白受体的普遍存在以及高线粒体数量。

[1473] 在一些实施方案中,使用阳性选择策略来选择或纯化脑EC。在一些情况下,根据内皮细胞标志物(诸如但不限于CD31)对脑EC进行分选。换句话说,将CD31阳性脑EC分离出来。在一些实施方案中,使用阴性选择策略来选择或纯化脑EC。在一些实施方案中,通过选择表达多能性标志物(包括但不限于TRA-1-60和SSEA-1)的细胞来去除未分化或多能干细胞。

[1474] 在一些实施方案中,施用脑内皮细胞以缓和脑出血的症状或影响。在一些实施方案中,将多巴胺能神经元施用于患有帕金森病的患者。在一些实施方案中,将去甲肾上腺素能神经元、GABA能中间神经元施用于经历过癫痫发作的患者。在一些实施方案中,将运动神经元、中间神经元、雪旺氏细胞、少突胶质细胞和小胶质细胞施用于经历过脊髓损伤的患者。

[1475] 2)多巴胺能神经元

[1476] 可以在细胞疗法产品制造过程的任何阶段对待用于细胞疗法产品中的多巴胺能神经元进行针对供体能力的特性分析。

[1477] 细胞疗法产品中使用的多巴胺能神经元可以是原代多巴胺能神经元。如本文任何地方所描述的用于对细胞群体进行针对供体能力的特性分析的方法可以对原代(例如,经基因组编辑的)多巴胺能神经元进行。

[1478] 如本文其他地方所述,细胞疗法产品中使用的多巴胺能神经元可以是多能干细胞(iPSC)来源的多巴胺能神经元。如本文任何地方所描述的用于对细胞群体进行针对供体能力的特性分析的方法也可以对能够分化形成多巴胺能神经元的干细胞进行。如本文任何地方所描述的用于对细胞群体进行针对供体能力的特性分析的方法也可以对干细胞来源的(例如,经基因组编辑的)多巴胺能神经元进行。

[1479] 如本公开的上下文中提及的有关多巴胺能神经元的相关信息(包括关于多巴胺能神经元在被用于细胞疗法时的所需特性的某些信息)在本领域中是已知的。应当理解,本文所述的关于多巴胺能神经元的实施方案可以容易且适当地与描述HIP细胞(例如,表现出降低的MHC I类和/或MHC II类分子中的一种或多种分子的表达以及增加的至少一种致耐受因子的表达)的实施方案以及描述安全开关和如本文所述的其他经修饰的/经基因编辑的细胞的实施方案相组合。可以在细胞疗法产品制造期间的编辑过程的任何阶段对待用于细胞疗法产品中的多巴胺能神经元进行针对供体能力的特性分析。

[1480] 在一些实施方案中,本文所述的HIP细胞被分化为多巴胺能神经元,包括神经元干细胞、神经元祖细胞、未成熟多巴胺能神经元和成熟多巴胺能神经元。

[1481] 在一些情况下,术语“多巴胺能神经元”包括表达酪氨酸羟化酶(TH)的神经元细胞,该酪氨酸羟化酶是多巴胺合成的限速酶。在一些实施方案中,多巴胺能神经元分泌神经

递质多巴胺,并且很少或不表达多巴胺羟化酶。多巴胺能(DA)神经元可以表达以下标志物中的一种或多种:神经元特异性烯醇化酶(NSE)、1-芳香族氨基酸脱羧酶、囊泡单胺转运蛋白2、多巴胺转运蛋白、Nurr-1和多巴胺-2受体(D2受体)。在某些情况下,术语"神经干细胞"包括沿着神经细胞途径部分分化并表达一种或多种神经标志物(包括例如巢蛋白)的多能细胞群体。神经干细胞可以分化为神经元或胶质细胞(例如,星形胶质细胞和少突胶质细胞)。术语"神经祖细胞"包括表达FOXA2和低水平b-微管蛋白但不表达酪氨酸羟化酶的经培养的细胞。在培养适当的因子(诸如本文所述的因子)后,此类神经祖细胞具有分化为多种神经元亚型;例如,多种多巴胺能神经元亚型的能力。

[1482] 在一些实施方案中,将来源于HIP细胞的DA神经元施用于患者,例如人患者,以治疗神经变性疾病或疾患。在一些情况下,神经变性疾病或疾患选自由帕金森病、亨廷顿病和多发性硬化症组成的组。在其他实施方案中,DA神经元被用于治疗或改善神经精神障碍的一种或多种症状,诸如注意力缺陷多动障碍(ADHD)、抽动秽语综合征(TS)、精神分裂症、精神病和抑郁症。在又其他实施方案中,DA神经元被用于治疗DA神经元受损的患者。

[1483] 在一些实施方案中,DA神经元、其前体和祖细胞是通过如下方式从多能干细胞分化而来的:将该干细胞在包含一种或多种因子或添加剂的培养基中培养。促进DA神经元分化、生长、扩增、维持和/或成熟的有用因子和添加剂包括但不限于Wnt1、FGF2、FGF8、FGF8a、音猬因子(SHH)、脑源性神经营养因子(BDNF)、转化生长因子a(TGF-a)、TGF-b、白细胞介素1β、胶质细胞系源性神经营养因子(GDNF)、GSK-3抑制剂(例如,CHIR-99021)、TGF-b抑制剂(例如,SB-431542)、B-27补充剂、多索吗啡(dorsomorphin)、嘌吗啡胺(purmorphamine)、头蛋白(noggin)、视黄酸、cAMP、抗坏血酸、神经秩蛋白(neurturin)、敲除血清替换物、N-乙酰半胱氨酸、c-kit配体、其修饰形式、其模拟物、其类似物、及其变体。在一些实施方案中,DA神经元在活化或抑制WNT途径、NOTCH途径、SHH途径、BMP途径、FGF途径等的一种或多种因子的存在下被分化。分化方案及其详细描述提供于例如US9,968,637,US7,674,620,Kim等人,Nature,2002,418,50-56;Bjorklund等人,PNAS,2002,99(4),2344-2349;Grow等人,Stem Cells Transl Med.2016,5(9):1133-44;以及Cho等人,PNAS,2008,105:3392-3397中,这些文献中的包括实施例、方法、附图和结果的详细描述的公开内容以引用的方式并入本文中。

[1484] 在一些实施方案中,低免疫原性多巴胺能神经元群体是从非神经元细胞中分离的。在一些实施方案中,在施用前扩增分离的低免疫原性多巴胺能神经元群体。在某些实施方案中,在施用前扩增分离的低免疫原性多巴胺能神经元群体并将其冷冻保存。

[1485] 为了表征和监测DA分化并评估DA表型,可以评价任何数量的分子和遗传标志物的表达。例如,遗传标志物的存在可以通过本领域技术人员已知的各种方法来确定。分子标志物的表达可以通过定量方法来确定,该定量方法诸如但不限于基于qPCR的测定、免疫测定、免疫细胞化学测定、免疫印迹测定等。DA神经元的示例性标志物包括但不限于TH、b-微管蛋白、配对盒蛋白(Pax6)、胰岛素基因增强蛋白(Isl1)、巢蛋白、二氨基联苯胺(DAB)、G蛋白活化的内向整流钾通道2(GIRK2)、微管相关蛋白2(MAP-2)、NURR1、多巴胺转运蛋白(DAT)、叉头盒蛋白A2(FOXA2)、FOX3、双皮质素和LIM同源盒转录因子1-β(LMX1B)等。在一些实施方案中,DA神经元表达选自corin、FOXA2、TuJ1、NURR1及其任何组合的标志物中的一种或多种标志物。

[1486] 在一些实施方案中,根据细胞电生理活性评估DA神经元。细胞的电生理学可以通

过使用本领域技术人员已知的测定来评价。例如,全细胞和穿孔膜片钳、用于检测细胞电生理活性的测定、用于测量细胞动作电位大小和持续时间的测定、以及用于检测DA细胞的多巴胺产生的测定。

[1487] 在一些实施方案中,DA神经元分化的特征在于自发节律性动作电位和在注入去极化电流后具有尖峰频率适应的高频动作电位。在其他实施方案中,DA分化的特征在于多巴胺的产生。产生的多巴胺水平是通过测量动作电位达到其最大幅度一半(尖峰半最大宽度)时的宽度来计算的。

[1488] 在一些实施方案中,静脉内或通过注射将分化的DA神经元移植到患者中的特定位置处。在一些实施方案中,将分化的DA细胞移植到脑的黑质(特别是致密区域中或附近)、腹侧被盖区(VTA)、尾状核、壳核、伏隔核、丘脑底核或其任何组合中,以替换其变性导致帕金森病的DA神经元。分化的DA细胞可以作为细胞悬浮液注射到目标区域中。可替代地,当分化的DA细胞被包含在此种递送装置中时,可将该分化的DA细胞嵌入支持基质或支架中。在一些实施方案中,支架是可生物降解的。在其他实施方案中,支架是不可生物降解的。支架可包含天然或合成(人工)材料。

[1489] DA神经元的递送可通过使用合适的媒介物来实现,该媒介物诸如但不限于脂质体、微粒或微胶囊。在其他实施方案中,分化的DA神经元以包含等渗赋形剂的药物组合物的形式施用。该药物组合物是在对于人施用而言足够无菌的条件下制备的。在一些实施方案中,从HIP细胞分化而来的DA神经元以药物组合物的形式提供。细胞组合物的治疗制剂的一般原则可见于Cell Therapy:Stem Cell Transplantation,Gene Therapy,and Cellular Immunotherapy,G.Morstyn和W.Sheridan编辑,Cambridge University Press,1996和Hematopoietic Stem Cell Therapy,E.Ball、J.Lister和P.Law,Churchill Livingstone,2000,其公开内容以引用的方式并入本文中。

[1490] 对来源于干细胞的神经元及其制备方法的有用描述可见于例如Kirkeby等人,Cell Rep,2012,1:703-714;Kriks等人,Nature,2011,480:547-551;Wang等人,Stem Cell Reports,2018,11(1):171-182;Lorenz Studer,“Chapter 8-Strategies for Bringing Stem Cell-Derived Dopamine Neurons to the clinic-The NYSTEM Trial”in Progress in Brain Research,2017,第230卷,第191-212页;Liu等人,Nat Protoc,2013,8:1670-1679;Upadhya等人,Curr Protoc Stem Cell Biol,38,2D.7.1-2D.7.47;美国公布申请号20160115448,及US8,252,586;US8,273,570;US9,487,752以及US10,093,897,这些文献的内容据此以引用的方式整体并入本文中。

[1491] 除了DA神经元之外,其他神经元细胞、其前体和祖细胞也可以通过如下方式从本文概述的HIP细胞分化而来:将该细胞在包含一种或多种因子或添加剂的培养基中培养。因子和添加剂的非限制性实例包括GDNF、BDNF、GM-CSF、B27、碱性FGF、碱性EGF、NGF、CNTF、SMAD抑制剂、Wnt拮抗剂、SHH信号传导活化子及其任何组合。在一些实施方案中,SMAD抑制剂选自由以下组成的组:SB431542、LDN-193189、头蛋白PD169316、SB203580、LY364947、A77-01、A-83-01、BMP4、GW788388、GW6604、SB-505124、乐德木单抗(lerdelimumab)、美替木单抗(metelimumab)、GC-1008、AP-12009、AP-110I4、LY550410、LY580276、LY364947、LY2109761、SB-505124、E-616452(RepSox ALK抑制剂)、SD-208、SMI6、NPC-30345、K 26894、SB-203580、SD-093、活化素-M108A、P144、可溶性TBR2-Fc、DMH-1、多索吗啡二盐酸盐及其衍

生物。在一些实施方案中,Wnt拮抗剂选自由以下组成的组:XAV939、DKK1、DKK-2、DKK-3、DKK-4、SFRP-1、SFRP-2、SFRP-3、SFRP-4、SFRP-5、WIF-1、Soggy、IWP-2、IWR1、ICG-001、KY0211、Wnt-059、LGK974、IWP-L6及其衍生物。在一些实施方案中,SHH信号传导活化子选自由以下组成的组:平滑激动剂(SAG)、SAG类似物、SHH、C25-SHH、C24-SHH、嘌吗啡胺、Hg-Ag和/或其衍生物。

[1492] 在一些实施方案中,神经元表达选自由以下组成的组的标志物中的一种或多种标志物:谷氨酸离子型受体NMDA型亚基1GRIN1、谷氨酸脱羧酶1GAD1、γ-氨基丁酸GABA、酪氨酸羟化酶TH、LIM同源盒转录因子1-αLMX1A、叉头盒蛋白O1 FOXO1、叉头盒蛋白A2 FOXA2、叉头盒蛋白O4 FOXO4、FOXG1、2',3'-环核苷酸3'-磷酸二酯酶CNP、髓鞘碱性蛋白MBP、微管蛋白β链3TUB3、微管蛋白β链3NEUN、溶质载体家族1成员6SLC1A6、SST、PV、钙结合蛋白、RAX、LHX6、LHX8、DLX1、DLX2、DLX5、DLX6、SOX6、MAFB、NPAS1、ASCL1、SIX6、OLIG2、NKX2.1、NKX2.2、NKX6.2、VGLUT1、MAP2、CTIP2、SATB2、TBR1、DLX2、ASCL1、ChAT、NGFI-B、c-fos、CRF、RAX、POMC、下视丘分泌素、NADPH、NGF、Ach、VAChT、PAX6、EMX2p75、CORIN、TUJ1、NURR1和/或其任何组合。

[1493] 3)胶质细胞

[1494] 可以在细胞疗法产品制造过程的任何阶段对待用于细胞疗法产品中的胶质细胞进行针对供体能力的特性分析。

[1495] 细胞疗法产品中使用的胶质细胞可以是原代胶质细胞。如本文任何地方所描述的用于对细胞群体进行针对供体能力的特性分析的方法可以对原代(例如,经基因组编辑的)胶质细胞进行。

[1496] 如本文其他地方所述,细胞疗法产品中使用的胶质细胞可以是多能干细胞(iPSC)来源的胶质细胞。如本文任何地方所描述的用于对细胞群体进行针对供体能力的特性分析的方法也可以对能够分化形成胶质细胞的干细胞进行。如本文任何地方所描述的用于对细胞群体进行针对供体能力的特性分析的方法也可以对干细胞来源的(例如,经基因组编辑的)胶质细胞进行。

[1497] 如本公开的上下文中提及的有关胶质细胞的相关信息(包括关于胶质细胞在被用于细胞疗法时的所需特征的某些信息)在本领域中是已知的。应当理解,本文所述的关于胶质细胞的实施方案可以容易且适当地与描述HIP细胞(例如,表现出降低的MHC I类和/或MHC II类分子中的一种或多种分子的表达以及增加的至少一种致耐受因子的表达)的实施方案以及描述安全开关和如本文所述的其他经修饰的/经基因编辑的细胞的实施方案相组合。可以在细胞疗法产品制造期间的编辑过程的任何阶段对待用于细胞疗法产品中的胶质细胞进行针对供体能力的特性分析。

[1498] 在一些实施方案中,所描述的神经细胞包括胶质细胞,诸如但不限于小胶质细胞、星形胶质细胞、少突胶质细胞、室管膜细胞和雪旺氏细胞、胶质前体,并且其胶质祖细胞是通过将多能干细胞分化为治疗有效的胶质细胞等产生的。低免疫原性多能干细胞的分化产生低免疫原性神经细胞,诸如低免疫原性胶质细胞。

[1499] 在一些实施方案中,通过在包含选自由以下组成的组的一种或多种剂的培养基中培养多能干细胞来生成胶质细胞、其前体和祖细胞:视黄酸、IL-34、M-CSF、FLT3配体、GM-CSF、CCL2、TGFβ抑制剂、BMP信号传导抑制剂、SHH信号传导活化子、FGF、血小板衍生生长因

子PDGF、PDGFR-α、HGF、IGF1、头蛋白、SHH、多索吗啡、头蛋白及其任何组合。在某些情况下，BMP信号传导抑制剂是LDN193189、SB431542或其组合。在一些实施方案中，胶质细胞表达NKX2.2、PAX6、SOX10、脑源性神经营养因子BDNF、中性粒细胞营养因子-3NT-3、NT-4、EGF、睫状神经营养因子CNTF、神经生长因子NGF、FGF8、EGFR、OLIG1、OLIG2、髓磷脂碱性蛋白MBP、GAP-43、LNGFR、巢蛋白、GFAP、CD11b、CD11c、CX3CR1、P2RY12、IBA-1、TMEM119、CD45及其任何组合。示例性分化培养基可以包含可促进本领域技术人员所认识的胶质细胞类型的生成或使其能够生成的任何特定因子和/或小分子。

[1500] 为了确定根据体外分化方案生成的细胞是否展现出胶质细胞的特性和特征，可将该细胞移植到动物模型中。在一些实施方案中，将胶质细胞注射到免疫受损的小鼠，例如免疫受损的shiverer小鼠中。将胶质细胞施用于小鼠的脑中，并在预先选择的时间后对植入的细胞进行评价。在一些情况下，通过使用免疫染色和成像方法来使脑中的植入的细胞可视化。在一些实施方案中，确定胶质细胞表达已知的胶质细胞生物标志物。

[1501] 用于从干细胞生成胶质细胞、其前体和祖细胞的有用方法可见于例如US7,579,188;US7,595,194;US8,263,402;US8,206,699;US8,252,586;US9,193,951;US9,862,925;US8,227,247;US9,709,553;US2018/0187148;US2017/0198255;US2017/0183627;US2017/0182097;US2017/253856;US2018/0236004;WO2017/172976;和WO2018/093681。用于使多能干细胞分化的方法描述于例如Kikuchi等人,Nature,2017,548,592-596;Kriks等人,Nature,2011,547-551;Doi等人,Stem Cell Reports,2014,2,337-50;Perrier等人,Proc Natl Acad Sci USA,2004,101,12543-12548;Chambers等人,Nat Biotechnol,2009,27,275-280;和Kirkeby等人,Cell Reports,2012,1,703-714。

[1502] 神经细胞移植对于脊髓损伤的功效可在例如急性脊髓损伤的大鼠模型中进行评估,如McDonald等人,Nat.Med.,1999,5:1410)和Kim等人,Nature,2002,418:50所述。例如，成功的移植可能会显示移植源性细胞在2-5周后出现在病灶处，分化为星形胶质细胞、少突胶质细胞和/或神经元，并从病灶端沿着脊髓迁移，并且显示步态、协调性和负重能力改善。基于神经细胞类型和待治疗的神经性疾病或疾患选择特定的动物模型。

[1503] 神经细胞可以以允许它们植入到预期组织部位并重建功能缺陷区域或使功能缺陷区域再生的方式施用。例如，根据所治疗的疾病，神经细胞可以直接移植到中枢神经系统的实质或鞘内部位。在一些实施方案中，通过静脉内、脊柱内、脑室内、鞘内、动脉内、肌内、腹膜内、皮下、肌内、腹内、眼内、球后及其组合将本文所述的神经细胞中的任何神经细胞(包括脑内皮细胞、神经元、多巴胺能神经元、室管膜细胞、星形胶质细胞、小胶质细胞、少突胶质细胞和雪旺氏细胞)注射到患者体内。在一些实施方案中，所述细胞以弹丸式注射或连续输注的形式注射或沉积。在某些实施方案中，神经细胞通过注射到脑内、脑部附近及其组合来施用。例如，可通过在受试者的头骨中开的钻孔来进行注射。向脑施用神经细胞的合适位点包括但不限于脑室、侧脑室、枕大池、壳核、基底核、海马皮层、纹状体、脑尾状区及其组合。

[1504] 用于本技术的包括多巴胺能神经元的神经细胞的另外的描述可见于WO2020/018615,其公开内容以引用的方式整体并入本文中。

[1505] 本文公开的细胞可以是胶质细胞，例如胶质细胞群体。应当理解，下文中对“细胞”，例如“胶质细胞”的任何提及也适用于如本申请中所描述的“细胞群体”，例如“胶质细

胞群体”。如本公开的上下文中提及的有关胶质细胞的相关信息可从WO2021195426中找到，其内容以引用的方式并入本文中。应当理解，本文所述的关于胶质细胞的实施方案可以容易且适当地与描述安全开关的实施方案以及描述HIP细胞、CAR细胞和如本文所述的其他经修饰的/经基因编辑的细胞的实施方案相组合。

[1506] 用于生成神经细胞的分化方法

[1507] 不同的神经细胞类型可由多能干细胞(包括诱导型多能干细胞)分化而来。该神经细胞类型可用于随后移植或植入到有需要的受试者中。如本领域技术人员将理解的，用于分化的方法取决于使用已知技术的所需细胞类型。此类方法的实例在WO2021195426中有描述，其内容以引用的方式整体并入本文中。

[1508] 在一些实施方案中，诸如诱导型多能干细胞的多能干细胞的分化是通过将该细胞暴露于已知会产生一种或多种特定细胞谱系的特定因子或使该细胞与已知会产生一种或多种特定细胞谱系的特定因子接触，以便使它们分化为特定的、期望的谱系和/或所关注的细胞类型来进行。在一些实施方案中，终末分化的神经细胞展现出专门的表型特性或特征。在一些实施方案中，多能干细胞被分化为神经外胚层细胞、神经元细胞、神经内分泌细胞、多巴胺能神经元、胆碱能神经元、血清素能神经元、谷氨酸能神经元、GABA能神经元、肾上腺素能神经元、去甲肾上腺素能神经元、交感神经元、副交感神经元、交感周围神经元、胶质细胞、其祖细胞或其前体。在一些实施方案中，胶质细胞包括小胶质(例如，变形虫样、分支状、活化的吞噬和活化的非吞噬)细胞或大胶质细胞(中枢神经系统细胞：星形胶质细胞、少突胶质细胞、室管膜细胞和放射状胶质细胞；和周围神经系统细胞：雪旺氏细胞和卫星细胞)、其前体以及任何前述细胞的祖细胞。

[1509] 在一些实施方案中，所描述的神经细胞包括胶质细胞，诸如但不限于小胶质细胞、星形胶质细胞、少突胶质细胞、室管膜细胞和雪旺氏细胞、胶质前体，并且其胶质祖细胞是通过将多能干细胞分化为治疗有效的胶质细胞等产生的。

[1510] 神经细胞可来源于干细胞，然后被用于治疗神经性病症和疾患。神经细胞类型可以由其他非神经细胞类型产生，该非神经细胞类型包括但不限于多能干细胞、诱导型多能干细胞(iPSC)等。获得此类细胞的方法例如在WO2021195426中有描述，其内容以引用的方式整体并入本文中。

[1511] 本文描述了胶质细胞在被用于细胞疗法时的一些所需特征。

[1512] 在一些实施方案中，胶质细胞表达NKX2.2、PAX6、SOX1 0、脑源性神经营养因子BDNF、中性粒细胞营养因子-3NT-3、NT-4、表皮生长因子EGF、睫状神经营养因子CNTF、神经生长因子NGF、FGF8、EGFR、OLIG1、OLIG2、髓磷脂碱性蛋白MBP、GAP-43、LNGFR、巢蛋白、GFAP、CD11b、CD11c、CD105、CX3CR1、P2RY12、IBA-1、TMEM119、CD45，及其任何组合。这些示例性标志物中的任一种标志物均可用于表征本文所述的胶质细胞。为了监测胶质细胞分化以及评估胶质细胞的表型，可以评价胶质细胞及其祖细胞特有的任意数量的分子和遗传标志物的表达。例如，遗传标志物的存在可以通过本领域技术人员已知的各种方法来确定。分子标志物的表达可以通过定量方法来确定，该定量方法诸如但不限于基于qPCR的测定、RNA-seq测定、蛋白质组测定、免疫测定、免疫细胞化学测定、免疫印迹测定等。

[1513] 在一些实施方案中，包括少突胶质细胞、星形胶质细胞及其祖细胞在内的胶质细胞表达选自以下的标志物中的一种或多种标志物：A2B5、CD9、CD133、CD140a、FOXG1、Ga1C、

GD3、GFAP、巢蛋白、NG2、MBP、Musashi、04、Olig1、Olig2、PDGFaR、S100P、谷氨酰胺合成酶、连接蛋白43、波形蛋白、BLBP、GLAST等。在一些实施方案中,包括少突胶质细胞、星形胶质细胞及其祖细胞在内的胶质细胞不表达选自PSA-NCAM、CD9、CD1 1、CD32、CD36、CD105、CD140a、巢蛋白、PDGFaR等的标志物中的一种或多种标志物。在一些实施方案中,使用阳性选择策略、阴性选择策略或两者来选择或纯化胶质细胞。

[1514] 在一些实施方案中,根据如通过免疫细胞化学和免疫组织化学确定的形态来表征胶质细胞。在一些实施方案中,根据功能表征测定来评估胶质细胞,该功能表征测定诸如但不限于神经元共培养测定、使用脂多糖(LPS)的刺激测定、体外髓鞘形成测定、ATP流入与钙波振荡测定等。

[1515] 在一些实施方案中,为了确定胶质细胞展现出细胞特异性的特性和特征,可以将细胞移植到动物模型中。在一些实施方案中,将胶质细胞注射到免疫受损的小鼠,例如免疫受损的shiverer小鼠中。将胶质细胞施用于小鼠的脑中,并在预先选择的时间后对植入的细胞进行评价。在一些实施方案中,使用免疫染色和成像方法来使脑中的植入的细胞可视化。在一些实施方案中,可以确定植入的细胞中已知胶质细胞生物标志物的表达。

[1516] 用于生成不同类型的神经细胞的方案描述于PCT申请号WO2010144696、美国专利号9,057,053;9,376,664;和10,233,422中。用于使低免疫原性多能细胞分化的方法的另外的描述可以见于例如Deuse等人,Nature Biotechnology,2019,37,252-258和Han等人,Proc Natl Acad Sci USA,2019,116(21),10441-10446。

[1517] 在一些实施方案中,通过在包含选自由以下组成的组的一种或多种剂的培养基中培养多能干细胞来生成胶质细胞、其前体和祖细胞:视黄酸、IL-34、M-CSF、FLT3配体、GM-CSF、CCL2、TGFβ抑制剂、BMP信号传导抑制剂、SHH信号传导活化子、FGF、血小板衍生生长因子PDGF、PDGFR-α、HGF、IGF-1、头蛋白、音猬因子(SHH)、多索吗啡、头蛋白及其任何组合。在某些情况下,BMP信号传导抑制剂是LDN193189、SB431542或其组合。示例性分化培养基可以包含可促进本领域技术人员所认识的胶质细胞类型的生成或使其能够生成的任何特定因子和/或小分子。

[1518] 在一些实施方案中,多能干细胞的分化是通过将该细胞暴露于已知会产生胶质细胞的特定因子或者使该细胞与已知会产生胶质细胞的特定因子接触来进行,该胶质细胞诸如小胶质细胞(诸如变形虫样、分支状、活化的吞噬细胞和活化的非吞噬细胞)、大胶质细胞(诸如星形胶质细胞、少突胶质细胞、室管膜细胞、放射状胶质细胞、雪旺氏细胞和卫星细胞、其前体细胞及其祖细胞。用于从干细胞生成胶质细胞、其前体和祖细胞的有用方法可见于例如美国专利号7,579,188;7,595,194;8,263,402;8,206,699;8,227,247;8,252,586;9,193,951;9,709,553;和9,862,925;以及美国公布申请号2018/0187148;2017/0198255;2017/0183627;2017/0182097;2017/253856;2018/0236004;以及PCT公布申请号WO2017/172976和WO2018/093681。

[1519] 本文所述的胶质细胞可用于治疗或预防受试者的疾病。

[1520] 本文所述的胶质细胞可用于治疗各种神经性病症和疾患。

[1521] 在一些实施方案中,将本文所述的胶质细胞施用于受试者以改善或治疗中风。在一些实施方案中,将胶质细胞施用于经历过中风的受试者。

[1522] 在一些实施方案中,将本文所述的胶质细胞施用于受试者以缓和肌萎缩侧索硬化

症(ALS)的症状或影响。在一些实施方案中,将胶质细胞施用于患有ALS的受试者。

[1523] 在一些实施方案中,将本文所述的胶质细胞施用于受试者以缓和脑出血的症状或影响。在一些实施方案中,将胶质细胞施用于经历过脑出血的受试者。

[1524] 在一些实施方案中,将本文所述的胶质细胞施用于受试者以缓和帕金森病的症状或影响。在一些实施方案中,将胶质细胞施用于患有帕金森病的患者。

[1525] 在一些实施方案中,将本文所述的胶质细胞施用于受试者以缓和癫痫发作的症状或影响。在一些实施方案中,将胶质细胞施用于经历过癫痫发作的患者。

[1526] 在一些实施方案中,将本文所述的胶质细胞施用于受试者以缓和脊髓损伤的症状或影响。在一些实施方案中,将胶质细胞施用于经历过脊髓损伤的患者。

[1527] 在一些实施方案中,将本文所述的胶质细胞施用于受试者以缓和佩利扎伊斯-梅茨巴赫氏病(Pelizaeus-Merzbacher Disease)的症状或影响。在一些实施方案中,将胶质细胞施用于患有佩利扎伊斯-梅茨巴赫氏病的受试者。

[1528] 在一些实施方案中,将本文所述的胶质细胞施用于受试者以缓和进行性多发性硬化症的症状或影响。在一些实施方案中,将胶质细胞施用于患有进行性多发性硬化症的受试者。

[1529] 在一些实施方案中,将本文所述的胶质细胞施用于受试者以缓和亨廷顿病的症状或影响。在一些实施方案中,将胶质细胞施用于患有亨廷顿病的受试者。

[1530] i.巨噬细胞

[1531] 可以在细胞疗法产品制造过程的任何阶段对待用于细胞疗法产品中的巨噬细胞进行针对供体能力的特性分析。

[1532] 细胞疗法产品中使用的巨噬细胞可以是原代巨噬细胞。如本文任何地方所描述的用于对细胞群体进行针对供体能力的特性分析的方法可以对原代(例如,经基因组编辑的)巨噬细胞进行。

[1533] 细胞疗法产品中使用的巨噬细胞可以是多能干细胞(iPSC)来源的巨噬细胞。如本文任何地方所描述的用于对细胞群体进行针对供体能力的特性分析的方法也可以对能够分化形成巨噬细胞的干细胞进行。如本文任何地方所描述的用于对细胞群体进行针对供体能力的特性分析的方法也可对干细胞来源的(例如,经基因组编辑的)巨噬细胞进行。

[1534] 在本公开的上下文中提及的有关巨噬细胞的相关信息(包括关于巨噬细胞在被用于细胞疗法时的所需特征的信息)在本领域中是已知的,并且例如可从WO2017019848中找到,其内容以引用的方式并入本文中。应当理解,本文所述的关于巨噬细胞的实施方案可以容易且适当地与描述HIP细胞(例如,表现出降低的MHC I类和/或MHC II类分子中的一种或多种分子的表达以及增加的至少一种致耐受因子的表达)的实施方案以及描述安全开关和如本文所述的其他经修饰的/经基因(例如CAR转基因)编辑的细胞的实施方案相组合。可以在细胞疗法产品制造期间的编辑过程的任何阶段对待用于细胞疗法产品中的巨噬细胞进行针对供体能力的特性分析。

[1535] 本文所述的巨噬细胞可用于治疗或预防受试者的疾病。

[1536] 实施方案中使用的细胞可以是巨噬细胞或其他吞噬细胞,例如巨噬细胞群体。应当理解,下文中对“细胞”,例如“巨噬细胞”的任何提及也适用于如本申请中所描述的“细胞群体”,例如“巨噬细胞群体”。

[1537] 吞噬细胞,诸如单核细胞、巨噬细胞和/或树突状细胞,可从受试者获得(例如,如WO2017019848A1中所述,其内容以引用的方式整体并入本文中)。受试者的非限制性实例包括人、狗、猫、小鼠、大鼠及其转基因物种。优选地,受试者是人。所述细胞可以从许多种来源获得,该来源包括外周血单核细胞、骨髓、淋巴结组织、脾组织、脐带和肿瘤。在一些实施方案中,可以使用任意数量的本领域中可获得的单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞或祖细胞系。在一些实施方案中,可以使用任意数量的本领域技术人员已知的技术(例如Ficoll分离)从自受试者收集的单位血液中获取细胞。在一些实施方案中,通过血液成分单采术(apheresis)或白细胞除去法(leukapheresis)获取来自个体的循环血液的细胞。血液成分单采术产物通常含有淋巴细胞,包括T细胞、单核细胞、粒细胞、B细胞、其他有核白血细胞、红血细胞和血小板。可以洗涤通过血液成分单采术收集的细胞以去除血浆级分,并将该细胞置于适当的缓冲液或培养基(诸如磷酸盐缓冲盐水(PBS)或缺乏钙并且可能缺乏镁或者可能缺乏许多(如果不是全部的话)二价阳离子的洗涤溶液)中以用于后续加工步骤。洗涤后,可将细胞重新悬浮在各种生物相容性缓冲液,诸如例如无钙、无镁的PBS中。可替代地,可以去除血液成分单采术样本中不需要的组分,并将细胞直接重新悬浮在培养基中。

[1538] 在一些实施方案中,通过裂解红血细胞并耗竭淋巴细胞和红血细胞(例如通过经由PERCOLL™梯度离心)从外周血中分离细胞。可替代地,可以从脐带中分离细胞。在任何情况下,单核细胞、巨噬细胞和/或树突状细胞的特定亚群都可以通过阳性或阴性选择技术进一步分离。

[1539] 在一些实施方案中,细胞群体包括单核细胞、巨噬细胞或树突状细胞。细胞群体的实例包括但不限于外周血单核细胞,脐带血细胞,纯化的单核细胞、巨噬细胞或树突状细胞的群体,以及细胞系。在一些实施方案中,外周血单核细胞包括单核细胞、巨噬细胞或树突状细胞的群体。在一些实施方案中,纯化的细胞包括单核细胞、巨噬细胞或树突状细胞的群体。

[1540] 本文描述了巨噬细胞在被用于细胞疗法时的一些所需特征。

[1541] 在一些实施方案中,该细胞具有上调的M1标志物和下调的M2标志物。例如,至少一种M1标志物(诸如HLA DR、CD86、CD80和PDL1)在吞噬细胞中被上调。在另一个实例中,至少一种M2标志物(诸如CD206、CD163)在吞噬细胞中被下调(例如,如WO2017019848A1中所述,其内容以引用的方式整体并入本文中)。在一些实施方案中,该细胞具有至少一种上调的M1标志物和至少一种下调的M2标志物。

[1542] 在一些实施方案中,通过抑制CD47或SIRPa活性来增强吞噬细胞中的靶向效应物活性。可以通过用抗CD47或抗SIRPa抗体处理吞噬细胞来抑制CD47和/或SIRPa活性。可替代地,可以通过本领域技术人员已知的任何方法来抑制CD47或SIRPa活性。

[1543] 可以根据以下示例性方法获得巨噬细胞,如WO2017019848A1(其内容以引用的方式整体并入本文中)中所述。

[1544] 如WO2017019848A1中所述的细胞培养:可以将THP1、K562、SKOV3、SKBR3、HDLM2、MD468和所有细胞系在37C、5%C02下在补充有10%胎牛血清和青霉素/链霉素的RPMI 1640中培养。可以通过慢病毒转导和mRFP+细胞系的FACS纯化来生成THP1 mRFP+亚系(Wt)。THP1 mRFP+亚系可用于生成THP1 mRFP+CAR19z+(CAR19z;CARMA19z)、THP1 mRFP+CAR19Az+(CAR19Az;CARMA19Az)、THP1 mRFP+MesoZ+和THP1 mRFP+CARHer2z+(CARHer2z;

CARMAHer2z)亚系。可以通过在培养基中用1ng/mL佛波醇12-肉豆蔻酸酯13-乙酸酯培养细胞48小时来诱导单核细胞分化。

[1545] 如WO2017019848A1中所述的原代人巨噬细胞:可以使用Miltenyi CD14微珠(Miltenyi,130-050-201)从正常供体血液成分单采术产物中纯化原代人单核细胞。可以将单核细胞在补充有5%人AB血清的X-Vivo培养基或补充有10%胎牛血清并补充有青霉素/链霉素、glutamax和10ng/mL重组人GM-CSF(PeproTech,300-03)的RPMI 1640中在MACS GMP细胞分化袋(Miltenyi,170-076-400)中培养7天。可在第7天收获巨噬细胞,并将其在FBS+10% DMSO中冷冻保存,以备后续使用。

[1546] 如WO2017019848A1中所述的吞噬作用测定:可使用1ng/mL佛波醇12-肉豆蔻酸酯13-乙酸酯将Wt或CARMA mRFP+THP1亚系分化48小时。可以在PMA冲洗后将带有GFP+抗原的肿瘤亚系(即K562 CD19+GFP+细胞)以1:1的比率添加到分化的ＴＨＰ1巨噬细胞中。可以将巨噬细胞与靶肿瘤细胞共培养4小时,然后使用EVOS FL自动细胞成像系统通过荧光显微镜检查对吞噬作用进行定量。可以将三个视野的平均值视为n,并且可以一式三份对全部条件进行定量。可以在BD LSR-Fortessa上分析基于FACS的吞噬作用。FlowJo(Treestar,Inc.)可用于分析流式细胞数据。活的、单线态门控的mRFP/GFP双阳性事件可被视为吞噬作用。可以通过在共培养启动时添加指定浓度的阻断单克隆抗体(小鼠抗人CD47克隆B6H12,eBioscience#14-0479-82;作为阴性对照的小鼠抗人CD47克隆2D3,eBioscience#14-0478-82;小鼠抗人SIRPa克隆SE5A5,BioLegend#323802)来进行CD47/SIRPa轴阻断。可以通过在共培养时添加TLR1-9激动剂(人TLR 1-9激动剂试剂盒;Invivogen#tlrl-kitlhw)来进行TLR共刺激。

[1547] 如WO2017019848A1中所述的体外杀伤测定:可以将Wt巨噬细胞或携带CAR的巨噬细胞与携带抗原的或对照的叩头虫绿色荧光素酶(CBG)/绿色荧光蛋白(GFP)阳性靶肿瘤细胞以不同的效应物与靶标比率(以30:1开始并且以三倍稀释倍数递减)共培养。可以利用生物发光成像使用IVIS光谱成像系统(Perkin Elmer)来确定肿瘤负担。特异性裂解百分比计算如下:特异性裂解百分比＝((经处理的孔-单独肿瘤孔)/(最大杀伤-单独肿瘤孔)*100)

[1548] 如WO2017019848A1中所述的延时显微镜检查:可以使用EVOS FL自动细胞成像系统对CAR介导的吞噬作用进行荧光延时视频显微镜检查。可以每40秒捕获一次图像,持续18小时。使用FIJI成像软件进行图像分析。

[1549] 如WO2017019848A1中所述的慢病毒生产和转染:可通过GeneArt(Life Technologies)从头合成嵌合抗原受体构建体并且如之前所描述的那样将该构建体克隆到慢病毒载体中。可以如先前所述的那样使用HEK293T细胞生成浓缩慢病毒。

[1550] 如WO2017019848A1中所述的腺病毒产生和转染:可以按照标准分子生物学程序产生并滴定在CMV启动子下编码GFP、CAR或不编码转基因的Ad5f35嵌合腺病毒载体。可以将原代人巨噬细胞以不同的感染倍数转导,并使用EVOS-FL自动细胞成像系统连续成像,以获得GFP表达和存活力。可以通过使用His-标记的抗原和抗His-APC二级抗体(R&D Biosystems Clone AD1.1.10)进行的表面CAR表达的FACS分析来评估CAR表达。

[1551] 如WO2017019848A1中所述的流式细胞术:可在BD LSR Fortessa上进行FACS。用生物素化蛋白L(GenScript M00097)和抗生蛋白链菌素APC(BioLegend,#405207)或His-标记的抗原和抗-His-APC二级抗体(R&D Biosystems Clone AD1.1.10)检测表面CAR表达。可以

在染色之前用人Trustain FcX(BioLegend,#422301)阻断Fc受体。可以使用小鼠抗人CD47 APC(eBioscience#17-0479-41)连同用于确定背景的小鼠IgGlκAPC同种型对照来确定CD47表达。可以用小鼠抗钙网织蛋白PE克隆FMC75(Abcam#ab83220)确定钙网织蛋白表达。可以基于活(Live/Dead Aqua Fixable Dead Cell Stain,Life Technologies L34957)单个细胞对所有流式结果进行门控。

[1552] 如WO2017019848A1中所述的Imagestream细胞术:可在ImageStream MarkII成像流式细胞仪(EMD Millipore)上进行利用单细胞荧光成像的FACS。简言之,可以在固定和ImageStream数据采集之前将mRFP+或DiI染色的巨噬细胞(CAR或对照)与GFP+肿瘤细胞共培养4小时。可以使用ImageStream软件(EMD Millipore)分析数据。

[1553] 如WO2017019848A1中所述的RNA电穿孔:可以使用标准分子生物学技术将CAR构建体在T7启动子控制下克隆到体外转录质粒中。可以将CAR mRNA使用mMessage mMachine T7 Ultra体外转录试剂盒(Thermo Fisher)在体外进行转录,使用RNEasy RNA纯化试剂盒(Qiagen)进行纯化,并使用BTX ECM850电穿孔仪(BTX Harvard仪器)电穿孔到人巨噬细胞中。可以使用FACS分析在电穿孔后的不同时间点测定CAR表达。

[1554] 如WO2017019848A1中所述的TLR/Dectin-1引发:通过如下方式在体外吞噬作用或杀伤测定之前在Wt巨噬细胞或CAR巨噬细胞中进行TLR或Dectin-1引发:在共培养之前将该细胞分别与推荐剂量的TLR 1-9激动剂(人TLR1-9激动剂试剂盒,Invivogen)或β-葡聚糖(MP Biomedicals,LLC)一起预孵育30分钟。可以在未经引发和经引发的条件之间比较Wt或CAR巨噬细胞的体外功能。

[1555] 如WO2017019848A1中所述的巨噬细胞/单核细胞表型:可以将以下表面标志物作为巨噬细胞/单核细胞免疫表型FACS套组的一部分进行评估,以获得M1/M2区分:CD80、CD86、CD163、CD206、CD11B、HLA-DR、HLA-A/B/C、PDL1和PDL2(BioLegend)。TruStain FcX可被用于免疫染色之前的Fc受体阻断。在表型评估之前,可以将巨噬细胞/单核细胞暴露于活化条件(即,Ad5f35转导)48小时或者不暴露于活化条件。

[1556] 如WO2017019848A1中所述的海马测定:可以使用海马测定(Seahorse XF,Agilent)确定巨噬细胞的代谢表型和氧消耗。在测定之前,可以将对照或CAR巨噬细胞暴露于培养基对照或免疫抑制细胞因子24小时。在整个海马测定过程中,可依序用寡霉素、FCCP和鱼藤酮处理细胞。该测定以每个条件6个重复来进行。

[1557] 如WO2017019848A1中所述的体内测定:NOD-scid IL2Rg-null-IL3/GM/SF、NSG-SGM3(NSGS)小鼠可用于人异种移植模型。对植入有CBG-荧光素酶阳性人SKOV3卵巢癌细胞的小鼠要么不进行处理,要么用不同剂量的未经转导的、经空白Ad5f35转导的,或经Ad5f35 CAR-HER2转导的人巨噬细胞进行处理。可以进行连续生物发光成像来监测肿瘤负担(IVIS Spectrum,Perkin Elmer)。可以在牺牲后收获器官和肿瘤以进行FACS分析。可以使用Kaplan-Meier分析来监测和比较总体生存率。

[1558] 本文所述的巨噬细胞可用于治疗或预防受试者的疾病。

[1559] 在一些实施方案中,该疾病是自身免疫性疾病。本文使用的术语“自身免疫性疾病”被定义为由自身免疫反应引起的病症。自身免疫性疾病是对自身抗原的不适当且过度的响应的结果。自身免疫性疾病的实例包括但不限于阿狄森氏病(Addision’s disease)、斑秃、强直性脊柱炎、自身免疫性肝炎、自身免疫性腮腺炎、克罗恩氏病、糖尿病(I型)、营养

不良性表皮松解症、附睾炎、肾小球肾炎、格雷夫氏病(Graves'disease)、格林巴利综合征、桥本氏病(Hashimoto's disease)、溶血性贫血、系统性红斑狼疮、多发性硬化症、重症肌无力、寻常天疱疮、银屑病、风湿热、类风湿性关节炎、肉瘤病、硬皮病、斯耶格伦氏综合征、脊柱关节病、甲状腺炎、血管炎、白癜风、粘液性水肿、恶性贫血、溃疡性结肠炎等。

[1560] 自身免疫性疾病的实例包括但不限于:获得性免疫缺陷综合征(AIDS,具有自体免疫组分的病毒性疾病)、斑秃、关节强硬性脊椎炎、抗磷脂综合征、自身免疫性阿狄森氏病(autoimmune Addison'sdisease)、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性肝炎、自身免疫性内耳病(AIED)、自身免疫性淋巴细胞增殖综合征(ALPS)、自身免疫性血小板减少性紫癜(ATP)、贝切特氏病(Behcet's disease)、心肌病、乳糜泻-疱疹样皮炎;慢性疲劳免疫功能异常综合征(CFIDS)、慢性炎性脱髓鞘性多神经病(CIPD)、瘢痕类天疱疮、冷凝集素疾病、crest综合征、克罗恩氏病(Crohn's disease)、德戈斯氏病(Degos'disease)、幼年型皮肌炎、盘状狼疮、特发性混合性冷球蛋白血症、纤维肌痛-纤维肌炎、格雷夫氏病、格林巴利综合征、桥本氏甲状腺炎、特发性肺纤维化、特发性血小板减少性紫癜(ITP)、IgA肾病、胰岛素依赖性糖尿病、青少年慢性关节炎(斯提耳病(Still's disease))、青少年类风湿性关节炎、美尼尔氏病(Meniere's disease)、混合型结缔组织病、多发性硬化、重症肌无力、恶性贫血、结节性多动脉炎、多软骨炎、多腺体综合征、风湿性多肌痛、多肌炎和皮肌炎、原发性无丙种球蛋白血症、原发性胆汁性肝硬化、牛皮癣、牛皮癣性关节炎、雷诺现象(Raynaud'sphenomena)、莱特尔氏综合征(Reiter's syndrome)、风湿热、类风湿性关节炎、结节病、硬皮病(进行性系统性硬化症(PSS),也称为全身性硬化症(SS))、斯耶格伦氏综合征(jogren's syndrome)、僵人综合征(stiff-man syndrome)、系统性红斑狼疮、高压性大动脉炎、颞动脉炎/巨细胞性动脉炎、溃疡性结肠炎、葡萄膜炎、白癜风和韦格内氏肉芽肿症(Wegener'sgranulomatosis)。

[1561] 本文所述的巨噬细胞还可以用于治疗炎性病症。炎性病症的实例包括但不限于慢性和急性炎性病症。炎性病症的实例包括阿尔茨海默病、哮喘、特应性过敏、过敏、动脉粥样硬化、支气管哮喘、湿疹、肾小球肾炎、移植物抗宿主病、溶血性贫血、骨关节炎、脓毒症、中风、组织和器官移植、血管炎、糖尿病视网膜病变和呼吸机诱导的肺损伤。

[1562] 在一些实施方案中,该疾病是癌症。本文所述的巨噬细胞可用于治疗癌症。癌症包括未血管化或尚未充分血管化的肿瘤以及血管化肿瘤。癌症可以包括非实体肿瘤(诸如血液性肿瘤,例如白血病和淋巴瘤)或可以包括实体肿瘤。待用本文公开的细胞治疗的癌症的类型包括但不限于癌、母细胞瘤和肉瘤,以及某些白血病或淋巴系恶性疾病、良性和恶性肿瘤,以及恶性疾病,例如肉瘤、癌和黑色素瘤。还包括成人肿瘤/癌症和小儿肿瘤/癌症。

[1563] 实体肿瘤是异常的组织块,其通常不含囊肿或液体区域。实体肿瘤可以是良性的,也可以是恶性的。不同类型的实体肿瘤根据形成它们的细胞类型命名(诸如肉瘤、癌和淋巴瘤)。

[1564] 实体肿瘤(诸如肉瘤)和癌的实例包括纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、骨肉瘤和其他肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤文氏瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、淋巴系恶性疾病、胰腺癌、乳腺癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、肝细胞癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、髓质甲状腺癌、乳头状甲状腺癌、嗜铬细胞瘤、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、髓质癌、支气管癌、肾细胞癌、肝细胞瘤、胆管癌、绒毛膜癌、维尔姆斯氏瘤、宫颈癌、睾丸

肿瘤、精原细胞瘤、膀胱癌、黑色素瘤和中枢神经系统肿瘤(诸如胶质瘤(诸如脑干胶质瘤和混合性胶质瘤)、胶质母细胞瘤(也称为多形性胶质母细胞瘤)、星形细胞瘤、中枢神经系统淋巴瘤、生殖细胞瘤、髓母细胞瘤、雪旺氏细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、血管母细胞瘤、听神经瘤、少突胶质瘤、脑膜瘤、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤和脑转移瘤)。

[1565] 血液性癌症是血液或骨髓的癌症。血液性(或血源性)癌症的实例包括白血病,包括急性白血病(诸如急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞白血病、急性骨髓性白血病和髓母细胞白血病、原髓细胞白血病、髓单核细胞白血病、单核细胞白血病和红细胞白血病)、慢性白血病(诸如慢性髓细胞(粒细胞)白血病、慢性骨髓性白血病和慢性淋巴细胞白血病)、红细胞增多症、淋巴瘤、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤(惰性和高级形式)、多发性骨髓瘤、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症(Waldenstrom'smacroglobulinemia)、重链病、骨髓增生异常综合征、毛细胞白血病和骨髓增生异常。

[1566] 各种癌症的进一步实例包括但不限于乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、宫颈癌、皮肤癌、胰腺癌、结直肠癌、肾癌、肝癌、脑癌、淋巴瘤、白血病、肺癌等。在一些实施方案中,癌症是髓质甲状腺癌。

[1567] j.B细胞

[1568] 可以在细胞疗法产品制造过程的任何阶段对待用于细胞疗法产品中的B细胞进行针对供体能力的特性分析。

[1569] 细胞疗法产品中使用的B细胞可以是原代B细胞。如本文任何地方所描述的用于对细胞群体进行针对供体能力的特性分析的方法可以对原代(例如,经基因组编辑的)B细胞进行。

[1570] 如本文其他地方所述,细胞疗法产品中使用的B细胞可以是多能干细胞(iPSC)来源的B细胞。如本文任何地方所描述的用于对细胞群体进行针对供体能力的特性分析的方法也可以对能够分化形成B细胞的干细胞进行。如本文任何地方所描述的用于对细胞群体进行针对供体能力的特性分析的方法也可以对干细胞来源的(例如,经基因组编辑的)B细胞进行。

[1571] 如本公开的上下文中提及的有关B细胞的相关信息(包括关于B细胞在被用于细胞疗法时的所需特征的某些信息)在本领域中是已知的,并且例如可从US2019321403A1中找到,其内容以引用的方式并入本文中。应当理解,本文所述的关于B细胞的实施方案可以容易且适当地与描述HIP细胞(例如,表现出降低的MHC I类和/或MHC II类分子中的一种或多种分子的表达以及增加的至少一种致耐受因子的表达)的实施方案以及描述安全开关和如本文描述的其他经修饰的/经基因(例如CAR转基因)编辑的细胞的实施方案相组合。可以在细胞疗法产品制造期间的编辑过程的任何阶段对待用于细胞疗法产品中的B细胞进行针对供体能力的特性分析。

[1572] 本文所述的B细胞可用于治疗或预防受试者的疾病。

[1573] 本文公开的细胞可以是B细胞,例如B细胞群体。应当理解,下文中对"细胞",例如"B细胞"的任何提及也适用于如本申请中所描述的"细胞群体",例如"B细胞群体"。

[1574] 在B细胞的亚型和亚群中,有前体或未成熟B细胞、原初成熟B细胞、记忆B细胞、浆母细胞和浆细胞。前体或未成熟B细胞包括HSC、多潜能祖细胞(MPP)、共同淋巴系祖细胞(CLP)、早期祖B细胞、晚期祖B细胞、大前B细胞、小前B细胞、未成熟B细胞、T1 B细胞和T2 B

细胞(例如,如US2019321403A1中所述,其内容以引用的方式整体并入本文中)。

[1575] 获取B细胞或B细胞群体的方法是本领域已知的(例如,如US2019321403A1中所述,其内容以引用的方式整体并入本文中)。已知各种用于使HSC体外成熟为分泌中的B淋巴细胞和浆细胞的技术(参见例如Luo,X.M.,等人(2009).Blood,113(7),1422-1431)。

[1576] 如US2019321403A1所述,例如,所用的起始细胞群体可能来自多个来源。起始细胞群体可以来源于PBMC或其他血液样本、扁桃体、骨髓或其中存在B细胞的其他类似制备物。在一些实施方案中,起始细胞群体可以包括大量(未经选择的)B细胞或特定的B细胞亚组,诸如成熟、未成熟、记忆、原初或其他B细胞亚组。在一些实施方案中,起始细胞群体可以包含能够分化为B细胞的前体细胞,诸如造血干细胞(HSC)。关于待治疗的受试者,该起始细胞可以是同种异体的和/或自体的。这些方法中包括现成的方法。在一些方面,诸如对于现成的技术,起始细胞是多能的和/或多潜能的,诸如干细胞,诸如诱导型多能干细胞(iPSC)。在一些实施方案中,该方法包括从受试者分离细胞,如本文所述的那样对它们进行制备、加工、培养和/或工程化,以及在冷冻保存之前或之后将它们重新引入到同一患者中。

[1577] 本文描述了B细胞在被用于细胞疗法时的一些所需特征。

[1578] 在一些实施方案中,B细胞群体中的一个或多个B细胞群体被富集或耗竭了对一种或多种特定标志物(诸如表面标志物)呈阳性(标志物+)或表达高水平的一种或多种特定标志物(诸如表面标志物)(标志物高)的细胞,或对一种或多种标志物呈阴性(标志物-)或表达相对低水平的一种或多种标志物(标志物低)的细胞。在一些情况下,此类标志物是在某些B细胞群体(诸如原初细胞)中不存在或以相对较低的水平表达,但在某些其他B细胞群体(诸如非原初细胞)中存在或以相对较高的水平表达的那些标志物。

[1579] 在一些实施方案中,细胞(1)被富集了对PAX5、BACH2、BCL-2、OBF1、OCT2、PU.1、SPIB、ETS1和IRF8中的一种或多种(诸如全部)呈阳性或表达高水平的PAX5、BACH2、BCL-2、OBF1、OCT2、PU.1、SPIB、ETS1和IRF8中的一种或多种(诸如全部)的细胞(即,经受了针对该细胞的阳性选择),并且/或者被耗竭了对IRF4、BLIMP1和XBP1中的一种或多种(诸如全部)呈阳性或表达高水平的IRF4、BLIMP1和XBP1中的一种或多种(诸如全部)的细胞(例如,经受了针对该细胞的阴性选择);以及/或者(2)被富集了对CD19、CD20、CD21、CD22、CD23和CD24中的一种或多种(诸如全部)呈阳性或表达高表面水平的CD19、CD20、CD21、CD22、CD23和CD24中的一种或多种(诸如全部)的细胞(即,经受了针对该细胞的阳性选择),并且/或者被耗竭了对CD10、CD27和CD38中的一种或多种(诸如全部)呈阳性或表达高表面水平的CD10、CD27和CD38中的一种或多种(诸如全部)的细胞(例如,经受了针对该细胞的阴性选择)。在一些实施方案中,细胞被富集了原初成熟B细胞。

[1580] 在一些实施方案中,细胞(1)被富集了对IRF4、BLIMP1和XBP1中的一种或多种(诸如全部)呈阳性或表达高水平的IRF4、BLIMP1和XBP1中的一种或多种(诸如全部)的细胞(即,经受了针对该细胞的阳性选择),并且/或者被耗竭了对PAX5、BACH2、BCL-2、OBF1、OCT2、PU.1、SPIB、ETS1和IRF8中的一种或多种(诸如全部)呈阳性或表达高水平的PAX5、BACH2、BCL-2、OBF1、OCT2、PU.1、SPIB、ETS1和IRF8中的一种或多种(诸如全部)的细胞(例如,经受了针对该细胞的阴性选择);以及/或者(2)被富集了对CD19、CD38、CD27、CD269和MHCII中的一种或多种(诸如全部)呈阳性或表达高表面水平的CD19、CD38、CD27、CD269和MHCII中的一种或多种(诸如全部)的细胞(即,经受了针对该细胞的阳性选择),并且/或者

被耗竭了对CD20和/或CD138呈阳性或表达高表面水平的CD20和/或CD138的细胞(例如,经受了针对该细胞的阴性选择)。在一些实施方案中,细胞被富集了浆母细胞。

[1581] 在一些实施方案中,该细胞(1)被富集了对IRF4、BLIMP1和XBP1中的一种或多种(诸如全部)呈阳性或表达高水平的IRF4、BLIMP1和XBP1中的一种或多种(诸如全部)的细胞(即,经受了针对该细胞的阳性选择),并且/或者被耗竭了对PAX5、BACH2、BCL-2、OBF1、OCT2、PU.1、SPIB、ETS1和IRF8中的一种或多种(诸如全部)呈阳性或表达高水平的PAX5、BACH2、BCL-2、OBF1、OCT2、PU.1、SPIB、ETS1和IRF8中的一种或多种(诸如全部)的细胞(例如,经受了针对该细胞的阴性选择);以及/或者(2)被富集了对CXCR4、CD27、CD38、CD138和CD269中的一种或多种(诸如全部)呈阳性或表达高表面水平的CXCR4、CD27、CD38、CD138和CD269中的一种或多种(诸如全部)的细胞(即,经受了针对该细胞的阳性选择),并且/或者被耗竭了对CD19、CD20和MHCII中的一种或多种(诸如全部)呈阳性或表达高表面水平的CD19、CD20和MHCII中的一种或多种(诸如全部)的细胞(例如,经受了针对该细胞的阴性选择)。在一些实施方案中,细胞被富集了浆细胞。

[1582] 在一些实施方案中,细胞(1)被富集了对PAX5、BACH2、BCL-2、OBF1、OCT2、PU.1、SPIB、ETS1和IRF8中的一种或多种(诸如全部)呈阳性或表达高水平的PAX5、BACH2、BCL-2、OBF1、OCT2、PU.1、SPIB、ETS1和IRF8中的一种或多种(诸如全部)的细胞(即,经受了针对该细胞的阳性选择),并且/或者被耗竭了对IRF4、BLIMPL和XBP1中的一种或多种(诸如全部)呈阳性或表达高水平的IRF4、BLIMP1和XBP1中的一种或多种(诸如全部)的细胞(例如,经受了针对该细胞的阴性选择);以及/或者(2)被富集了对CD19、CD20、CD40、CXCR4、CXCR5和CXCR7中的一种或多种(诸如全部)呈阳性或表达高表面水平的CD19、CD20、CD40、CXCR4、CXCR5和CXCR7中的一种或多种(诸如全部)的细胞(即,经受了针对该细胞的阳性选择),并且/或者被耗竭了对CD23和CD38呈阳性或表达高表面水平的CD23和CD38的细胞(例如,经受了针对该细胞的阴性选择)。在一些实施方案中,细胞被富集了记忆B细胞。

[1583] 一旦将细胞施用于受试者(例如人),就可以通过许多种已知方法中的任一种来测量经工程化的B细胞群体在一些方面的生物活性。在一些实施方案中,可以通过测定外源性蛋白(诸如治疗性蛋白质)的表达和/或分泌来测量细胞的生物活性。在一些实施方案中,还可以通过测定某些细胞因子(诸如IFNγ、IL-2、IL-4、IL-6、IL-12和TNFα)的表达和/或分泌来测量细胞的生物活性。在一些实施方案中,通过评估临床结局(诸如肿瘤负担或负荷的减少)来测量生物活性。在一些实施方案中,评估了毒性结局、细胞的持续存在和/或扩增,和/或宿主免疫反应的存在或不存在。

[1584] 在一些实施方案中,该方法包括诱导经工程化的B细胞增加外源性蛋白的产生和/或分泌。在一些实施方案中,该诱导包括向受试者施用与经工程化的B细胞中表达的内源性B细胞受体的配体结合结构域结合的剂。在一些实施方案中,该剂是被内源性B细胞受体(诸如如所描述的任何受体)识别的疫苗。在一些实施方案中,该诱导包括向受试者施用与经工程化的B细胞中表达的驱动受体(诸如重组或嵌合受体)的配体结合结构域结合的剂。在一些实施方案中,配体与经工程化的B细胞的驱动受体的结合诱导经工程化的B细胞分化为浆母细胞或浆细胞。在一些实施方案中,经工程化的B细胞是浆母细胞或浆细胞。在一些实施方案中,外源性蛋白处于内源性免疫球蛋白启动子或组成型活性启动子的控制之下。在一些实施方案中,外源性蛋白处于诱导型启动子的控制之下,并且该方法进一步包括向受试

者施用活化诱导型启动子的剂。

[1585] 在一些实施方案中,该方法导致在受试者中的作用持续时间(特定方法有效的时间长度)为至少约1个月、至少2个月、至少6个月、至少1年、至少2年或更长时间。在一些实施方案中,与将外源性蛋白单次直接施用于受试者所产生的最大可耐受作用持续时间(最大可耐受剂量的治疗剂的作用持续时间)相比,将经工程化的B细胞或组合物单次施用于受试者可导致在受试者中的作用持续时间增加。在一些实施方案中,该增加是至少1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍或5倍。

[1586] 本文所述的B细胞可用于治疗或预防受试者的疾病。

[1587] 在可使用本文所述的B细胞治疗的疾病、疾患和病症中,有肿瘤(包括实体肿瘤、血液性恶性疾病和黑色素瘤)和感染性疾病(诸如,受病毒或其他病原体的感染,例如HIV、HCV、HBV、CMV和寄生虫病)。在一些实施方案中,该疾病或疾患是肿瘤、癌症、恶性疾病、赘生物或其他增殖性疾病。此类疾病包括但不限于血液性(或血源性)癌症,包括白血病,包括急性白血病(诸如急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞白血病、急性骨髓性白血病和髓母细胞白血病、原髓细胞白血病、髓单核细胞白血病、单核细胞白血病和红细胞白血病)、慢性白血病(诸如慢性髓细胞(粒细胞)白血病、慢性骨髓性白血病和慢性淋巴细胞白血病)、红细胞增多症、淋巴瘤、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤(惰性和高级形式)、多发性骨髓瘤、浆细胞瘤、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、重链病、骨髓增生异常综合征、毛细胞白血病和骨髓增生异常,以及实体肿瘤,包括肉瘤和癌,包括肾上腺皮质癌、胆管癌、纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、骨肉瘤和其他肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤文氏瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、胃癌、淋巴系恶性疾病、胰腺癌、乳腺癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、肝细胞癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、甲状腺癌(例如,髓质甲状腺癌和乳头状甲状腺癌)、嗜铬细胞瘤、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、髓质癌、支气管癌、肾细胞癌、肝细胞瘤、胆道癌、绒毛膜癌、维尔姆斯氏瘤(Wilms'tumor)、宫颈癌(例如,宫颈癌和宫颈浸润前发育不良)、结直肠癌、肛门癌、肛管癌或肛门直肠癌、阴道癌、外阴癌(例如,鳞状细胞癌、上皮内癌、腺癌和纤维肉瘤)、阴茎癌、口咽癌、食道癌、头部癌(例如,鳞状细胞癌)、颈部癌(例如,鳞状细胞癌)、睾丸癌(例如,精原瘤、畸胎瘤、胚胎癌、畸胎癌、绒毛膜癌、肉瘤、间质细胞瘤、纤维瘤、纤维腺瘤、腺瘤样瘤和脂肪瘤)、膀胱癌、肾癌、黑色素瘤、子宫癌(例如子宫内膜癌)、尿路上皮癌(例如鳞状细胞癌、移行细胞癌、腺癌、输尿管癌和膀胱癌)和中枢神经系统肿瘤(诸如胶质瘤(诸如脑干胶质瘤和混合胶质瘤)、胶质母细胞瘤(也称为多形性胶质母细胞瘤)、星形细胞瘤、中枢神经系统淋巴瘤、生殖细胞瘤、髓母细胞瘤、雪旺氏细胞瘤(Schwannoma)、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、血管母细胞瘤、听神经瘤、少突胶质瘤、脑膜瘤、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤和脑转移瘤)。

[1588] 在一些实施方案中,该疾病或疾患是感染性疾病或疾患,诸如但不限于病毒、逆转录病毒、细菌和原生动物感染。此类疾病包括但不限于受选自以下的病原体的感染:鲍氏不动杆菌(Acinetobacter baumannii)、无形体属(Anaplasma genus)、嗜吞噬细胞无形体(Anaplasma phagocytophilum)、巴西钩虫(Ancylostoma braziliense)、十二指肠钩虫(Ancylostoma duodenale)、溶血隐秘杆菌(Arcanobacterium haemolyticum)、人蛔虫(Ascaris lumbricoides)、曲霉属(Aspergillus genus)、星状病毒科(Astroviridae)、巴贝斯属(Babesia genus)、炭疽杆菌(Bacillus anthracis)、蜡状芽孢杆菌(Bacillus

cereus)、汉赛巴尔通体(Bartonella henselae)、BK病毒、人芽囊原虫(Blastocystis hominis)、皮炎芽生菌(Blastomyces dermatitidis)、百日咳博德特菌(Bordetella pertussis)、伯氏疏螺旋体(Borrelia burgdorferi)、疏螺旋体属(Borrelia genus)、疏螺旋体属某些种(Borrelia spp)、布鲁氏菌属(Brucella genus)、马来丝虫(Brugia malayi)、布尼亚病毒科(Bunyaviridae family)、洋葱伯克霍尔德氏菌(Burkholderia cepacia)和其他伯克霍尔德氏菌种、鼻疽伯克霍尔德氏菌(Burkholderia mallei)、类鼻疽伯克霍尔德氏菌(Burkholderia pseudomallei)、杯状病毒科(Caliciviridae family)、弯曲杆菌属(Campylobacter genus)、白色念珠菌(Candida albicans)、念珠菌属某些种(Candida spp)、沙眼衣原体(Chlamydia trachomatis)、肺炎衣原体(Chlamydophila pneumoniae)、鹦鹉热衣原体(Chlamydophila psittaci)、CJD朊病毒(CJD prion)、华支睾吸虫(Clonorchis sinensis)、肉毒梭菌(Clostridium botulinum)、艰难梭菌(Clostridium difficile)、产气荚膜梭菌(Clostridium perfringens)、产气荚膜梭菌(Clostridium perfringens)、梭菌属某些种(Clostridium spp)、破伤风梭菌(Clostridium tetani)、球孢子菌属某些种(Coccidioides spp)、冠状病毒(coronaviruses)、白喉杆菌(Corynebacterium diphtheriae)、贝氏柯克斯体(Coxiella burnetii)、克里米亚-刚果出血热病毒(Crimean-Congo hemorrhagic fever virus)、新型隐球菌(Cryptococcus neoformans)、隐孢子虫属(Cryptosporidium genus)、巨细胞病毒(Cytomegalovirus,CMV)、登革热病毒(Dengue viruses,DEN-1、DEN-2、DEN-3和DEN-4)、脆双核阿米巴(Dientamoeba fragilis)、埃博拉病毒(Ebolavirus,EBOV)、棘球绦虫属(Echinococcus genus)、查菲埃立克体(Ehrlichia chaffeensis)、伊氏埃立克体(Ehrlichia ewingii)、埃立克体属(Ehrlichia genus)、溶组织内阿米巴(Entamoeba histolytica)、肠球菌属(Enterococcus genus)、肠道病毒属(Enterovirus genus)、肠道病毒(Enteroviruses)、主要地甲类柯萨奇病毒(Coxsackie A virus)和肠道病毒71型(Enterovirus 71)(EV71)、表皮癣菌属某些种(Epidermophyton spp)、爱泼斯坦-巴尔病毒(EBV)、大肠杆菌(Escherichia coli)O 157:H7、O111和O104:H4,肝片吸虫(Fasciola hepatica)和巨片吸虫(Fasciola gigantica)、FPI朊病毒(FPIprion)、丝虫目超家族(Filarioidea superfamily)、黄病毒属(Flaviviruses)、土拉弗朗西斯菌(Francisella tularensis)、梭杆菌属(Fusobacterium genus)、白地霉(Geotrichumcandidum)、肠贾第虫(Giardia intestinalis)、颚口线虫属某些种(Gnathostoma spp)、GSS朊病毒(GSS prion)、瓜纳里托病毒(Guanarito virus)、杜克雷嗜血杆菌(Haemophilus ducreyi)、流感嗜血杆菌(Haemophilus influenzae)、幽门螺杆菌(Helicobacter pylori)、亨德拉尼帕病毒(Henipavirus)(亨德拉病毒尼帕病毒,Hendra virus Nipah virus)、甲型肝炎病毒(Hepatitis A Virus)、乙型肝炎病毒(Hepatitis B Virus,HBV)、丙型肝炎病毒(Hepatitis C Virus,HCV)、丁型肝炎病毒(Hepatitis D Virus)、戊型肝炎病毒(Hepatitis E Virus)、单纯疱疹病毒(Herpes simplex virus)1和2(HSV-1和HSV-2)、荚膜组织胞浆菌(Histoplasma capsulatum)、HIV(人类免疫缺陷病毒)、威尼克外瓶霉(Hortaea werneckii)、人博卡病毒(Human bocavirus,HBoV)、人疱疹病毒6(Human herpesvirus 6,HHV-6)和人疱疹病毒7(Human herpesvirus 7,HHV-7)、人偏肺病毒(Human metapneumovirus,hMPV)、人乳头瘤病毒(Human papillomavirus,HPV)、人副流感病毒

(Human parainfluenza viruses,HPIV)、人T细胞白血病病毒1型(HTLV-1)、日本脑炎病毒(Japanese encephalitis virus)、JC病毒(JC virus)、胡宁病毒(Junin virus)、卡波西肉瘤相关疱疹病毒(KSHV)、金氏金氏菌(Kingella kingae)、肉芽肿克雷白式杆菌(Klebsiella granulomatis)、库鲁朊病毒(Kuru prion)、拉沙病毒(Lassa virus)、嗜肺军团菌(Legionella pneumophila)、利什曼原虫属(Leishmania genus)、钩端螺旋体属(Leptospira genus)、单核细胞增生性李斯特菌(Listeria monocytogenes)、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(Lymphocytic choriomeningitis virus,LCMV)、马丘波病毒(Machupo virus)、马拉色菌属某些种(Malassezia spp)、马尔堡病(Marburg virus)、麻疹病毒(Measles virus)、横川后殖吸虫(Metagonimus yokagawai)、微孢子虫门(Microsporidia phylum)、传染性软疣病毒(Molluscum contagiosum virus,MCV)、腮腺炎病毒(Mumps virus)、麻风分枝杆菌(Mycobacterium leprae)和弥漫型麻风分枝杆菌(Mycobacterium lepromatosis)、结核分枝杆菌(Mycobacterium tuberculosis)、溃疡分枝杆菌(Mycobacterium ulcerans)、肺炎支原体(Mycoplasma pneumoniae)、福氏耐格里阿米巴(Naegleria fowleri)、美洲钩虫(Necator americanus)、淋病奈瑟菌(Neisseria gonorrhoeae)、脑膜炎奈瑟球菌(Neisseria meningitidis)、星状诺卡氏菌(Nocardia asteroides)、诺卡氏菌属某些种(Nocardia spp)、旋盘尾丝虫(Onchocerca volvulus)、恙虫病东方体(Orientia tsutsugamushi)、正粘病毒科(流感)(Orthomyxoviridae family (Influenza))、巴西副球孢子菌(Paracoccidioides brasiliensis)、并殖吸虫属某些种(Paragonimus spp)、卫氏并殖吸虫(Paragonimus westermani)、细小病毒B19(Parvovirus B19)、巴氏杆菌属(Pasteurella genus)、疟原虫属(Plasmodium genus)、卡氏肺孢子虫(Pneumocystis jirovecii)、脊髓灰质炎病毒(Poliovirus)、狂犬病病毒(Rabies virus)、呼吸道合胞病毒(Respiratory syncytial virus,RSV)、鼻病毒(Rhinovirus)、鼻病毒(rhinoviruses)、小蛛立克次氏体(Rickettsia akari)、立克次氏体属(Rickettsia genus)、普氏立克次氏体(Rickettsia prowazekii)、立氏立克次氏体(Rickettsia rickettsii)、斑疹伤寒立克次氏体(Rickettsia typhi)、裂谷热病毒(Rift Valley fever virus)、轮状病毒(Rotavirus)、风疹病毒(Rubella virus)、沙比亚病毒(Sabia virus)、沙门氏菌属(Salmonella genus)、疥螨(Sarcoptes scabiei)、SARS冠状病毒(SARS coronavirus)、血吸虫属(Schistosoma genus)、志贺氏菌属(Shigella genus)、辛诺柏病毒(Sin Nombre virus)、汉坦病毒(Hantavirus)、申克孢子丝菌(Sporothrix schenckii)、葡萄球菌属(Staphylococcus genus)、葡萄球菌属(Staphylococcus genus)、无乳链球菌(Streptococcus agalactiae)、肺炎链球菌(Streptococcus pneumoniae)、酿脓链球菌(Streptococcus pyogenes)、粪类圆线虫(Strongyloides stercoralis)、绦虫属(Taenia genus)、有钩绦虫(Taenia solium)、蜱传脑炎病毒(Tick-borne encephalitis virus, TBEV)、犬弓蛔虫(Toxocara canis)或猫弓蛔虫(Toxocara cati)、刚地弓形虫(Toxoplasma gondii)、梅毒螺旋体(Treponema pallidum)、旋毛虫(Trichinella spiralis)、阴道毛滴虫(Trichomonas vaginalis)、毛癣菌属某些种(Trichophyton spp)、鞭虫(Trichuris trichiura)、布氏锥虫(Trypanosoma brucei)、克氏锥虫(Trypanosoma cruzi)、解脲支原体(Ureaplasma urealyticum)、水痘带状疱疹病毒(Varicella zoster virus,VZV)、水痘带状疱疹病毒(Varicella zoster virus,VZV)、重型天花(Variola major)或类天花

(Variola minor)、vCJD朊病毒(vCJD prion)、委内瑞拉马脑炎病毒(Venezuelan equine encephalitis virus)、霍乱弧菌(Vibrio cholerae)、西尼罗病毒(West Nile virus)、西部马脑炎病毒(Western equine encephalitis virus)、班氏吴策线虫(Wuchereria bancrofti)、黄热病毒(Yellow fever virus)、小肠结肠炎耶尔森氏菌(Yersinia enterocolitica)、鼠疫耶尔森氏菌(Yersinia pestis)和假结核耶尔森氏菌(Yersinia pseudotuberculosis)。

[1589] 在一些实施方案中,该疾病或疾患是HIV感染。在一些实施方案中,HIV感染是HIV-1或HIV-2感染,包括受本文所述的HIV组、亚型或变体中的任何HIV组、亚型或变体的感染。示例性HIV-1组包括HIV-1M组、HIV-1N组、HIV-1O组和HIV-1P组。其亚型和重组形式是已知的;示例性亚型包括A亚型(包括A1和A2)、B亚型、C亚型和包括CRF_AE的重组形式。示例性HIV-2组包括HIV-2A组、HIV-2B组、HIV-2C组、HIV-2D组、HIV-2E组、HIV-2F组、HIV-2G组和HIV-2H组。

[1590] k.造血干细胞(HSC)

[1591] 如本文任何地方所描述的用于对细胞群体进行针对供体能力的特性分析的方法也可以对造血干细胞(例如,经基因组编辑的)进行。

[1592] 如本公开的上下文中提及的有关造血干细胞的相关信息(包括关于造血干细胞在被用于细胞疗法时的所需特性的信息)是本领域已知的。应当理解,本文所述的关于HSC的实施方案可以容易且适当地与描述HIP细胞(例如,表现出降低的MHC I类和/或MHC II类分子中的一种或多种分子的表达以及增加的至少一种致耐受因子的表达)的实施方案以及描述安全开关和如本文所述的其他经修饰的/经基因编辑的细胞的实施方案相组合。可以在细胞疗法产品制造过程的任何阶段对待用于细胞疗法产品中的HSC进行针对供体能力的特性分析。

[1593] 本文所述的HSC细胞可用于治疗或预防受试者的疾病。

[1594] 在一些实施方案中,经工程化的细胞是造血干细胞。在一些情况下,造血干细胞是未成熟细胞,其可以发育成所有类型的血细胞,包括白血细胞、红血细胞和血小板。造血干细胞(HSC)存在于外周血和骨髓中。在一些情况下,从外周血或骨髓中分离造血干细胞。

[1595] 在一些实施方案中,施用经工程化的HSC或包含经工程化的HSC的群体以治疗造血疾病或病症。在一些实施方案中,造血系统疾病或病症是骨髓增生异常、再生障碍性贫血、范科尼贫血(Fanconi anemia)、阵发性睡眠性血红蛋白尿、镰状细胞病、先天性纯红细胞再生障碍性贫血(Diamond Blackfan anemia)、施瓦赫曼-戴蒙德病(Schachman Diamond disorder)、柯士文综合征(Kostmann's syndrome)、慢性肉芽肿病、肾上腺脑白质营养不良、白细胞粘附缺陷、血友病、地中海贫血、β-地中海贫血、白血病(诸如急性淋巴细胞白血病(ALL)、急性骨髓性(髓系)白血病(AML)、成年淋巴母细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、B细胞慢性淋巴细胞白血病(B-CLL)、慢性髓系白血病(CML)、幼年型慢性骨髓性白血病(CML)和幼年型髓单核细胞性白血病(JMML))、严重联合免疫缺陷病(SCID)、X连锁严重联合免疫缺陷、威斯科特-奥尔德里奇综合征(Wiskott-Aldrich syndrome)(WAS)、腺苷脱氨酶(ADA)缺乏症、慢性肉芽肿病、谢迪埃克-赫加希综合征(Chediak-Higashi syndrome)、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤(NHL)或AIDS。

[1596] 在一些实施方案中,施用经工程化的HSC或包含经工程化的HSC的群体以治疗与白

血病或骨髓瘤相关的细胞缺陷,或治疗白血病或骨髓瘤。

[1597] 在一些实施方案中,施用经工程化的HSC或包含经工程化的HSC的群体以治疗与自身免疫性疾病或疾患相关的细胞缺乏症,或治疗自身免疫性疾病或疾患。在一些实施方案中,自身免疫性疾病或疾患是急性播散性脑脊髓炎、急性出血性白质脑炎、阿狄森病、无丙种球蛋白血症、斑秃、肌萎缩侧索硬化症、强直性脊柱炎、抗磷脂综合征、抗合成酶综合征、特应性过敏、自身免疫性再生障碍性贫血、自身免疫性心肌病、自身免疫性肠病、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性肝炎、自身免疫性内耳疾病、自身免疫性淋巴细胞增殖综合征、自身免疫性周围神经病变、自身免疫性胰腺炎、自身免疫性多内分泌腺病综合征、自身免疫性黄体酮皮炎、自身免疫性血小板减少性紫癜、自身免疫性荨麻疹、自身免疫性葡萄膜炎、巴洛病、巴洛同心性硬化、贝赫切特综合征、伯格病、比克斯塔夫脑炎、布劳综合征、大疱性类天疱疮、癌症、卡斯尔曼病、乳糜泻、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病、慢性复发性多灶性骨髓炎、查格-施特劳斯综合征、瘢痕性类天疱疮、科干综合征、冷凝集素病、补体成分2缺乏症、颅动脉炎、CREST综合征、克罗恩氏病、库欣综合征、皮肤白细胞破碎性血管炎、德戈病、德库姆病、疱疹样皮炎、皮肌炎、1型糖尿病、弥漫性皮肤全身性硬化症、德雷斯勒综合征、盘状红斑狼疮、湿疹、附着点炎相关性关节炎、嗜酸性筋膜炎、嗜酸细胞性胃肠炎、获得性大疱性表皮松解症、结节性红斑、原发性混合性冷凝球蛋白血症、埃文斯综合征、进行性骨化性纤维发育不良、纤维性肺泡炎、胃炎、胃肠道类天疱疮、巨细胞动脉炎、肾小球肾炎、肾炎综合征、葛瑞夫兹氏病、吉兰-巴雷综合症(GBS)、桥本脑炎、桥本甲状腺炎、溶血性贫血、过敏性紫癜、妊娠疱疹、低丙种球蛋白血症、特发性炎性脱髓鞘疾病、特发性肺纤维化、特发性血小板减少性紫癜、IgA肾病、包涵体肌炎、炎性脱髓鞘性多发性神经病、间质性膀胱炎、幼年型特发性关节炎、幼年型类风湿性关节炎、川崎病、兰伯特-伊顿肌无力综合征、白细胞破碎性血管炎、扁平苔藓、硬化性苔藓、线性IgA病(LAD)、葛雷克氏病、狼疮性肝炎、红斑狼疮、马吉德综合征、梅尼埃病、显微镜下多血管炎、米勒-费雪综合征、混合性结缔组织病、硬斑病、急性痘疮样苔藓样糠疹、多发性硬化症、重症肌无力、肌炎、视神经脊髓炎、神经性肌强直、眼瘢痕性类天疱疮、斜视性眼阵挛肌阵挛综合征、甲状腺炎、复发性风湿病、副肿瘤性小脑变性、阵发性睡眠性血红蛋白尿(PNH)、帕罗综合征、帕森斯-特纳综合征、扁平部炎、天疱疮、寻常型天疱疮、恶性贫血、静脉周围脑脊髓炎、POEMS综合征、结节性多动脉炎、风湿性多发性肌痛症、多发性肌炎、原发性胆汁性肝硬化、原发性硬化性胆管炎、进行性炎性神经病、银屑病、银屑病关节炎、坏疽性脓皮病、纯红细胞再生障碍、拉斯穆森脑炎、雷诺现象、复发性多软骨炎、赖特综合征、不宁腿综合征、腹膜后纤维化、类风湿性关节炎、类风湿热、结节病、施密特综合征、施尼茨勒综合征、巩膜炎、硬皮病、斯耶格伦氏综合征、脊柱关节病、斯蒂尔病、僵人综合征、亚急性细菌性心内膜炎、苏萨克综合征、斯维特综合征、西德纳姆舞蹈病、交感性眼炎、高压性大动脉炎、颞动脉炎、痛性眼肌麻痹综合征、横贯性脊髓炎、溃疡性结肠炎、未分化结缔组织病、未分化脊柱关节病、血管炎、白癜风或韦格内氏肉芽肿症。

[1598] 4.ABO血型和Rh抗原表达

[1599] 根据人体内每个红血细胞表面存在或不存在抗原(ABO血型),血液制品可以分成不同的组。A、B、AB和A1抗原是通过红细胞糖蛋白上的寡糖序列来确定的。血型抗原组中的基因提供了制造抗原蛋白质的指令。血型抗原蛋白质在红血细胞的细胞膜内发挥多种功

能。这些蛋白质功能包括将其他蛋白质和分子转运进出细胞、维持细胞结构、连接到其他细胞和分子以及参与化学反应。

[1600] 恒河猴因子(Rh)血型是仅次于ABO血型系统的第二重要血型系统。Rh血型系统由49种确定的血型抗原组成,其中五种抗原D、C、c、E和e是最重要的。个体的Rh(D)状态通常在ABO型后用阳性或阴性后缀描述。术语"Rh因子"、"Rh阳性"和"Rh阴性"仅指Rh(D)抗原。Rh抗原的抗体可能参与溶血性输血反应,抗Rh(D)和Rh(c)抗原的抗体会给胎儿和新生儿带来重大的溶血病风险。ABO抗体在每个人的生命早期都会产生。然而,Rh-人体内的恒河猴抗体通常仅在人敏感时才会产生。举例来说,通过生下Rh+婴儿或通过接受Rh+输血可能会发生这种情况。

[1601] A、B、H和Rh抗原是血液、组织和细胞移植供体与接受者之间组织相容性的主要决定因素。ABO基因编码的糖基转移酶活性负责产生A、B、AB、O组织血型抗原,这些抗原展示在细胞表面上。A型个体编码ABO基因产物,具有产生α(1,3)N-乙酰半乳糖氨基转移酶活性的特异性,而B型个体具有产生α(1,3)半乳糖基转移酶活性的特异性。O型个体根本不产生功能性半乳糖基转移酶,因此不产生这两种修饰中的任一种。AB型个体各自携有每种的一个拷贝,并产生这两种类型的修饰。ABO基因的酶产物作为底物作用于H抗原,因此缺乏ABO活性的O型个体呈现未经修饰的H抗原,并因此通常称为O(H)型。

[1602] H抗原本身是由FUTI基因编码的a(1,2)岩藻糖基转移酶的产物。在非常罕见的个体中,由于FUTI基因的破坏而完全丧失了H抗原,并且不存在ABO产生A或B组织血型的底物。据说这些个体属于孟买(Bombay)组织血型。Rh抗原由RHD基因编码,并且Rh阴性的个体携带RHD基因的缺失或破坏。

[1603] 在一些实施方案中,本文提供的细胞或细胞群体是ABO O型Rh因子阴性的。在一些实施方案中,本文所述的ABO O型Rh因子阴性细胞来源于ABO O型Rh因子阴性供体。在一些实施方案中,本文所述的ABO O型Rh因子阴性细胞被工程化为缺乏ABO A型、ABO B型或Rh因子抗原的呈递。在一些实施方案中,ABO O型和/或Rh阴性细胞包含ABO基因的部分或完全失活(例如,通过ABO基因的有害变型或通过插入ABO基因的外显子6 258delG变型),且/或RHD基因的有害变型使RHD基因的表达部分或完全失活。在一些实施方案中,ABO O型Rh阴性细胞包含FUT1基因的部分或完全失活,且/或RHD基因的有害变型使RHD基因的表达部分或完全失活。在一些实施方案中,使用用于例如进行以下修饰的基因编辑生成经工程化的ABO O型和/或Rh因子阴性细胞:将A型细胞修饰为O型细胞、B型细胞修饰为O型细胞、AB型细胞修饰为O型细胞、A+型细胞修饰为O-型细胞、A-型细胞修饰为O-型细胞、AB+型细胞修饰为O-型细胞、AB-型细胞修饰为O-型细胞、B+型细胞修饰为O-型细胞和B-型细胞修饰为O-型细胞。示例性经工程化的ABO O型Rh因子阴性细胞及生成其的方法描述于WO2021/146222,其内容以引用的方式整体并入本文中。

[1604] 在一些实施方案中,本文提供的包含增加的CD46和CD59表达的细胞或细胞群体是ABO A型、ABO B型或ABO AB型,且/或本文提供的包含增加的CD46和CD59表达的细胞或细胞群体为Rh因子阳性。在一些实施方案中,可以将包含增加的CD46和CD59表达的细胞施用于ABO和/或Rh因子不相容的接受者患者而不触发CDC反应。

[1605] 5.性染色体

[1606] 在某些方面,具有性染色体的细胞可以表达某些抗原(例如,Y抗原),并且接受者

可以对此类抗原具有预先存在的敏感性。例如,在一些实施方案中,怀有男性胎儿的女性可能会排斥来自男性供体的细胞。因此,在一些实施方案中,供体是男性并且接受者是男性。在一些实施方案中,供体是女性并且接受者是女性。在一些实施方案中,经工程化的细胞包含减少抗原(诸如原钙粘蛋白Y和/或神经连接蛋白Y)的表达的修饰。在一些实施方案中,编码原钙粘附因子Y的基因(PCDH11Y;Ensembl ID ENSG00000099715)在经工程化的细胞中被降低或消除,例如敲除。在一些实施方案中,编码神经连接蛋白Y的基因(NLGN4Y;Ensembl ID ENSG00000165246)在经工程化的细胞中被降低或消除,例如敲除。可以使用用于降低或消除基因表达的任何方法,诸如本文所述的任何方法。在一些实施方案中,通过核酸酶介导的基因编辑方法(诸如使用CRISPR/Cas系统)降低或消除经工程化的细胞中的PCDH11Y和/或NLGN4Y。

[1607] D.用于插入转基因的基因编辑系统

[1608] 在一些方面,可以使用本文所述的某些方法和组合物将编码致耐受因子的第一转基因和/或编码CAR的第二转基因整合到宿主细胞(例如,T细胞)的基因组中。

[1609] 1.随机插入

[1610] 在一些实施方案中,可以将编码致耐受因子的第一转基因和/或编码CAR的第二转基因插入到宿主细胞的随机基因组基因座中。如本领域技术人员已知的,病毒载体(包括例如逆转录病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体和腺相关病毒载体)通常被用于将遗传物质递送至宿主细胞中并将外来或外源性基因随机插入到宿主细胞基因组中以促进该基因的稳定表达和复制。

[1611] 2.定点插入(敲入)

[1612] 在一些实施方案中,可以将编码致耐受因子的第一转基因和/或编码CAR的第二转基因插入到宿主细胞的特定基因组基因座中。许多基因编辑方法可用于将转基因插入到所选的特定基因组基因座中基因编辑是一种类型的遗传工程化,其中可以在活生物体的基因组中插入、缺失、修饰或替换核苷酸序列。在一些实施方案中,基因编辑技术可以包括涉及核酸酶、整合酶、转座酶和/或重组酶的系统。在一些实施方案中,基因编辑技术介导单链断裂(SSB)。在一些实施方案中,基因编辑技术介导双链断裂(DSB),包括与非同源末端连接(NHEJ)或同源定向修复(HDR)有关的双链断裂。在一些实施方案中,基因编辑技术可以包括基于DNA的编辑或先导编辑。在一些实施方案中,基因编辑技术可以包括经由位点特异性靶向元件进行的可编程添加(PASTE)。在一些实施方案中,基因编辑技术可以包括TnpB多肽。许多基因编辑技术通常利用细胞的先天机制来修复DNA中的双链断裂(DSB)。

[1613] 真核细胞通过以下两种主要修复途径修复DSB:非同源末端连接(NHEJ)和同源定向修复(HDR)。HDR通常发生在晚S期或G2期,此时姐妹染色单体可用作修复模板。NHEJ更常见,可以发生在细胞周期的任何时期,但更容易出错。在基因编辑中,NHEJ通常用于产生插入/缺失突变(indel),该突变可以通过移动开放阅读框(ORF)并在编码区或相关调控区中产生改变,在靶基因中产生靶向功能丧失。另一方面,HDR是在具有同源序列的修复模板的存在下产生靶向敲入、敲除或特定突变插入的优选途径。本领域技术人员已知几种提高HDR效率的方法,包括例如化学调节(例如,用NHEJ途径中关键酶的抑制剂处理细胞);在细胞周期的S期和G2期定时递送基因编辑系统;细胞周期停滞在S期和G2期;以及引入具有同源序列的修复模板。本文提供的方法可以利用HDR介导的修复、NHEJ介导的修复或其组合。

[1614] 在一些实施方案中,本文提供的用于HDR介导的插入的方法利用定点核酸酶,包括例如锌指核酸酶(ZFN)、转录活化因子样效应物核酸酶(TALEN)、大范围核酸酶、转座酶和成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)/Cas系统。

[1615] a.ZFN

[1616] ZFN是包含一系列位点特异性DNA结合结构域的融合蛋白,该位点特异性DNA结合结构域改造自连接至细菌FokI限制酶的核酸内切酶结构域的含锌指的转录因子。ZFN可具有一个或多个(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个)DNA结合结构域或锌指结构域。参见,例如,Carroll等人,Genetics Society of America(2011)188:773-782;Kim等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA(1996)93:1156-1160。每个锌指结构域均是被一个或多个锌离子稳定的小蛋白质结构基序,并且通常识别3至4bp的DNA序列。因此,串联结构域可以潜在地与细胞基因组内独特的延伸的核苷酸序列结合。

[1617] 可以组合特异性已知的各种锌指以产生识别约6、9、12、15或18bp序列的多指多肽。各种选择和模块化组装技术可用于生成识别特定序列的锌指(及其组合),该技术包括噬菌体展示、酵母单杂交系统、细菌单杂交和双杂交系统以及哺乳动物细胞。可以将锌指工程化为结合预定的核酸序列。用于将锌指工程化为结合至预定核酸序列的标准是本领域已知的。参见,例如,Sera等人,Biochemistry(2002)41:7074-7081;Liu等人,Bioinformatics(2008)24:1850-1857。

[1618] 含有FokI核酸酶结构域或其他二聚核酸酶结构域的ZFN作为二聚体发挥作用。因此,需要一对ZFN来靶向非回文DNA位点。两个单独的ZFN必须以它们的适当间隔开的核酸酶结合DNA的相对链。参见Bitinaite等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA(1998)95:10570-10575。为了切割基因组中的特定位点,设计了一对ZFN以识别侧接该位点的两个序列,一个在正向链上,而另一个在反向链上。在ZFN在该位点的任一侧结合后,核酸酶结构域二聚化并且切割该位点处的DNA,从而生成具有5'突出端的DSB。然后可以借助含有侧接有同源臂的期望突变的修复模板,利用HDR来引入特定突变。修复模板通常是引入到细胞中的外源性双链DNA载体。参见Miller等人,Nat.Biotechnol.(2011)29:143-148;Hockemeyer等人,Nat.Biotechnol.(2011)29:731-734。

[1619] b.TALEN

[1620] TALEN是可以用于编辑靶基因的人工核酸酶的另一个实例。TALEN来源于被称为TALE重复序列的DNA结合结构域,该DNA结合结构域通常包含具有10至30个重复序列的串联阵列,该重复序列结合并识别延伸的DNA序列。每个重复序列长度为33至35个氨基酸,两个相邻的氨基酸(称为重复可变双残基或RVD)对四个DNA碱基对之一赋予特异性。因此,重复序列与靶DNA序列中的碱基对之间存在一一对应关系。

[1621] 通过使一个或多个TALE DNA结合结构域(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个)与核酸酶结构域(例如,FokI核酸内切酶结构域)融合而人工产生TALEN。参见Zhang,Nature Biotech.(2011)29:149-153。为了在TALEN中使用FokI,已经对FokI进行了若干种突变;例如,这些突变改善了切割特异性或活性。参见Cermak等人,Nucl.Acids Res.(2011)39:e82;Miller等人,Nature Biotech.(2011)29:143-148;Hockemeyer等人,Nature Biotech.(2011)29:731-734;Wood等人,Science(2011)333:307;Doyon等人,Nature Methods(2010)8:74-79;Szczepek等人,Nature Biotech(2007)25:786-793;Guo等人,

J.Mol.Biol.(2010)200:96。FokI结构域作为二聚体发挥作用,对于靶基因组中的具有正确的取向和间距的位点需要具有独特的DNA结合结构域的两个构建体。TALE DNA结合结构域与FokI核酸酶结构域之间的氨基酸残基数量以及两个单独的TALEN结合位点之间的碱基数量似乎都是实现高水平活性的重要参数。Miller等人,Nature Biotech.(2011)29:143-148。

[1622] 通过将经工程化的TALE重复序列与核酸酶结构域相组合,可以产生对任何期望的DNA序列具有特异性的位点特异性核酸酶。与ZFN类似,TALEN可以被引入到细胞中以在基因组中的期望靶位点处生成DSB,并且因此可以被用于以类似的HDR介导的途径敲除基因或敲入突变。参见Boch,Nature Biotech.(2011)29:135-136;Boch等人,Science(2009)326:1509-1512;Moscou等人,Science(2009)326:3501。

[1623] c.大范围核酸酶

[1624] 大范围核酸酶是核酸内切酶家族中的酶,该酶的特征在于它们能够识别并切割大DNA序列(14至40个碱基对)。基于大范围核酸酶的影响核酸酶活性和/或DNA识别的结构基序,将大范围核酸酶分为多个家族。最广泛和最有名的大范围核酸酶是LAGLIDADG家族中的蛋白质,其名称来源于保守的氨基酸序列。参见Chevalier等人,Nucleic Acids Res.(2001)29(18):3757-3774。另一方面,GIY-YIG家族成员具有GIY-YIG模块,其长度为70-100个残基,并且包括具有四个不变残基的四个或五个保守序列基序,其中两个是活性所需的。参见Van Roey等人,Nature Struct.Biol.(2002)9:806-811。His-Cys家族大范围核酸酶的特征在于在涵盖数百个氨基酸残基的区域中的一系列高度保守的组氨酸和半胱氨酸。参见Chevalier等人,Nucleic Acids Res.(2001)29(18):3757-3774。NHN家族的成员由含有被天冬酰胺残基包围的两对保守组氨酸的基序定义。参见Chevalier等人,Nucleic Acids Res.(2001)29(18):3757-3774。

[1625] 由于高特异性要求,鉴定特定靶DNA序列的天然大范围核酸酶的机会较低,因此已使用各种方法(包括诱变和高通量筛选方法)来产生识别独特序列的大范围核酸酶变体。用于对具有改变的DNA结合特异性的大范围核酸酶进行工程化(例如,以结合至预定核酸序列)的策略是本领域已知的。参见,例如,Chevalier等人,Mol.Cell.(2002)10:895-905;Epinat等人,Nucleic Acids Res(2003)31:2952-2962;Silva等人,J Mol.Biol.(2006)361:744-754;Seligman等人,Nucleic Acids Res(2002)30:3870-3879;Sussman等人,J Mol Biol(2004)342:31-41;Doyon等人,J Am Chem Soc(2006)128:2477-2484;Chen等人,Protein Eng Des Sel(2009)22:249-256;Arnould等人,J Mol Biol.(2006)355:443-458;Smith等人,Nucleic Acids Res.(2006)363(2):283-294。

[1626] 与ZFN和TALEN一样,大范围核酸酶可以在基因组DNA中产生DSB,如果修复不当(例如,经由NHEJ),它可以产生移码突变,从而导致靶基因在细胞中的表达降低。可替代地,可以将外来DNA与大范围核酸酶一起引入到细胞中。根据外来DNA的序列和染色体序列,此过程可用于修饰靶基因。参见Silva等人,Current Gene Therapy(2011)11:11-27。

[1627] d.转座酶

[1628] 转座酶是结合至转座子的末端并且通过剪切和粘贴机制或复制性转座机制催化该转座子移动到基因组的另一部分的酶。通过将转座酶连接至其他系统(诸如CRISPR/Cas系统),可以开发新的基因编辑工具以实现基因组DNA的位点特异性插入或操作。有两种已

知的使用转座子的DNA整合方法,其使用无催化活性的Cas效应蛋白和Tn7样转座子。转座酶依赖性DNA整合不在基因组中引发DSB,这可以保证更安全和更具特异性的DNA整合。

[1629] e.CRISPR/Cas

[1630] CRISPR系统作为提供一种形式的获得性免疫的参与防御入侵噬菌体和质粒的系统最初在原核生物体(例如,细菌和古细菌)中被发现。现在它已被改造并用作研究和临床应用中流行的基因编辑工具。

[1631] CRISPR/Cas系统通常包含至少两种组分:一种或多种指导RNA(gRNA)和Cas蛋白。Cas蛋白是一种将DSB引入到靶位点中的核酸酶。CRISPR-Cas系统有两大类:1类系统使用多种Cas蛋白的复合物来降解核酸;2类系统使用单一大Cas蛋白来达到相同目的。1类分为I、III和IV型;2类分为II、V和VI型。适用于基因编辑应用的不同Cas蛋白包括但不限于Cas3、Cas4、Cas5、Cas8a、Cas8b、Cas8c、Cas9、Cas10、Cas12、Cas12a(Cpf1)、Cas12b(C2c1)、Cas12c(C2c3)、Cas12d(CasY)、Cas12e(CasX)、Cas12f(C2c10)、Cas12g、Cas12h、Cas12i、Cas12k(C2c5)、Cas13、Cas13a(C2c2)、Cas13b、Cas13c、Cas13d、C2c4、C2c8、C2c9、Cmr5、Cse1、Cse2、Csf1、Csm2、Csn2、Csx10、Csx11、Csy1、Csy2、Csy3和Mad7。参见,例如Jinek等人,Science(2012)337(6096):816-821;Dang等人,Genome Biology(2015)16:280;Ran等人,Nature(2015)520:186-191;Zetsche等人,Cell(2015)163:759-771;Strecker等人,Nature Comm.(2019)10:212;Yan等人,Science(2019)363:88-91。最广泛使用的Cas9是II型Cas蛋白并且在本文中被描述为例示性的。这些Cas蛋白可来源于不同的来源物种。例如,Cas9可以来源于化脓性链球菌或金黄色葡萄球菌。

[1632] 在原始微生物基因组中,II型CRISPR系统将来自入侵DNA的序列并入到宿主基因组内编码为阵列的CRISPR重复序列之间。来自CRISPR重复序列阵列的转录物被加工成CRISPR RNA(crRNA),每个CRISPR RNA均携有从入侵DNA转录的可变序列(称为“原型间隔区”序列),以及CRISPR重复序列的一部分。每个crRNA与第二反式活化CRISPR RNA(tracrRNA)杂交,并且这两个RNA与Cas9核酸酶形成复合物。crRNA的原型间隔区编码部分引导Cas9复合物切割互补的靶DNA序列,前提条件是该序列与被称为“原型间隔区相邻基序”(PAM)的短序列相邻。

[1633] 虽然前述描述集中于Cas9核酸酶,但应当理解,存在其他RNA指导的核酸酶,其利用的gRNA在某些方面与目前所描述的那些不同。例如,Cpf1(来自普雷沃氏菌(Prevotella)和弗朗西斯菌(Franciscella)1的CRISPR;也称为Cas12a)是只需要crRNA,不需要tracrRNA即可发挥功能的RNA指导的核酸酶。

[1634] 自发现以来,CRISPR系统已被改造用于在从细菌到真核细胞(包括人细胞)的广泛细胞和生物体中诱导序列特异性DSB和靶向基因组编辑。在它在基因编辑应用中的使用中,人工设计的合成gRNA已经替换了原始的crRNA:tracrRNA复合物,包括在某些实施方案中经由单个gRNA替换。例如,gRNA可以是由crRNA、四环和tracrRNA构成的单一指导RNA(sgRNA)。crRNA通常包含被用户设计为识别所关注的靶DNA的互补区域(也称为间隔区,长度通常为约20个核苷酸)。tracrRNA序列包含用于Cas核酸酶结合的支架区域。crRNA序列和tracrRNA序列通过四环连接,并且各自具有用于彼此杂交的短重复序列,因此生成嵌合sgRNA。可以通过简单地改变gRNA中存在的间隔区或互补区域序列来改变Cas核酸酶的基因组靶标。互补区域将通过标准的RNA-DNA互补碱基配对规则将Cas核酸酶引导至靶DNA位点。

[1635] 为了使Cas核酸酶发挥作用,紧邻基因组DNA中的靶序列的下游必须存在PAM。Cas蛋白对PAM的识别被认为会使相邻基因组序列不稳定,从而允许gRNA对所述序列进行询问,并且在存在匹配序列时导致gRNA-DNA配对。PAM的特定序列根据Cas基因的种类而变化。例如,最常用的来源于化脓性链球菌的Cas9核酸酶识别5'-NGG-3'的PAM序列,或者以较低的效率识别5'-NAG-3'的PAM序列,其中"N"可以是任何核苷酸。具有替代PAM的其他Cas核酸酶变体也已经被表征并成功用于基因组编辑,该变体总结在表1a中。

[1636] 在一些实施方案中,Cas核酸酶可包含一个或多个突变以改变它们的活性、特异性、识别和/或其他特征。例如,Cas核酸酶可具有改变其保真度以减轻脱靶效应的一个或多个突变(例如,SpCas9的eSpCas9、SpCas9-HF1、HypaSpCas9、HeFSpCas9和evoSpCas9高保真度变体)。再例如,Cas核酸酶可能具有改变其PAM特异性的一个或多个突变。

[1637] 在一些实施方案中,本公开的CRISPR系统包含TnpB多肽。在一些实施方案中,TnpB多肽可以包含Ruv-C样结构域。RuvC结构域可以是包含RuvC-I、RuvC-II和RuvC-III子结构域的分裂式RuvC结构域。在一些实施方案中,TnpB可以进一步包含HTH结构域、桥螺旋结构域和锌指结构域中的一个或多个。TnpB多肽不包含HNH结构域。在一些实施方案中,TnpB蛋白从N端开始包含:HTH结构域、RuvC-I子结构域、桥螺旋结构域、RuvC-II子结构域、zinger指结构域和RuvC-III子结构域。在一些实施方案中,RuvC-III亚结构域形成TnpB多肽的C端。在一些实施方案中,TnpB多肽来自ε变形菌细菌、小叶游动放线菌菌株DSM 43150、纤维素性马杜拉放线菌菌株DSM 45823、纳米比亚马杜拉放线菌菌株DSM 44197、巨大肠脂环酸芽孢杆菌菌株DSM 17980、嗜盐李平张氏菌菌株DSM 102030,或总状花序纤线杆菌。在一些实施方案中,TnpB多肽来自总状花序纤线杆菌,或包含与总状花序纤线杆菌TnpB基因座的5'ITR具有相似性的保守的RNA区域。在一些实施方案中,TnpB可包含Fanzor蛋白,即在真核生物基因组中发现的TnpB同源物。在一些实施方案中,包含TnpB多肽的CRISPR系统结合靶多核苷酸的5'处的靶标相邻基序(TAM)序列。在一些实施方案中,TAM是转座子相关基序。在一些实施方案中,TAM序列包含TCA。在一些实施方案中,TAM序列包含TTCAN。在一些实施方案中,TAM序列包含TTGAT。在一些实施方案中,TAM序列包含ATAAA。

[1638] 在某些实施方案中,第一和/或第二转基因可充当DNA修复模板,以通过与如所述的基因编辑系统(例如,CRISPR/Cas系统)相关的HDR整合到靶位点中。通常,待插入的转基因至少包含编码所关注的蛋白质(例如,致耐受因子或CAR)的表达盒,并且还任选地包含一个或多个调控元件(例如,启动子、绝缘子、增强子)。在这些实施方案的某些中,待插入的转基因将侧接有紧邻靶标上游和下游的同源序列(即左同源臂(LHA)和右同源臂(RHA)),该同源序列专门为靶基因组基因座设计来用作HDR的模板。每个同源臂的长度通常取决于所引入的插入物的大小,较大的插入物需要较长的同源臂。

[1639] 在一些实施方案中,可使用靶标引发的逆转录(TPRT)或先导编辑来将外源性基因(诸如编码致耐受因子(例如CD47)的外源性转基因)工程化到特定基因座中。在一些实施方案中,先导编辑介导人细胞中的靶向插入、缺失、所有12种可能的碱基到碱基转换及其组合,而不需要DSB或供体DNA模板。

[1640] 先导编辑是一种基因组编辑方法,其使用与聚合酶联合工作(即,以与napDNAbp反式提供的融合蛋白形式或其他方式)的核酸可编程DNA结合蛋白("napDNAbp")将新的遗传信息直接写入指定的DNA位点中,其中用先导编辑(PE)指导RNA("PEgRNA")对先导编辑系统

进行编程,该先导编辑(PE)指导RNA既指定靶位点,又以替换DNA链的形式通过工程化到指导RNA上(例如,在5′或3′端,或在指导RNA的内部部分处)的延伸(DNA或RNA)来将所需编辑的合成模板化。含有所需编辑(例如,单个核碱基取代)的替换链与待编辑的靶位点的内源性链共享相同的序列(除了其包含所需编辑)。通过DNA修复和/或复制机制,靶位点的内源性链被新合成的含有所需编辑的替换链替换。在一些情况下,先导编辑可以被认为是一种“搜索和替换”基因组编辑技术,因为先导编辑器搜索并定位待编辑的期望靶位点,并编码含有期望编辑的替换链,该替换链同时被安装以替代对应靶位点内源性DNA链。例如,先导编辑可以适用于进行精确的基于CRISPR/Cas的基因组编辑,以避开双链断裂。在一些实施方案中,同源蛋白是Cas蛋白-逆转录酶融合体或相关系统,或编码Cas蛋白-逆转录酶融合体或相关系统,以用指导RNA靶向特定DNA序列,在靶位点处生成单链切口,并使用带切口DNA作为引物用于与指导RNA整合的经工程化的逆转录酶模板的逆转录。在一些实施方案中,先导编辑器蛋白与两个先导编辑指导RNA(pegRNA)配对,该两个先导编辑指导RNA(pegRNA)将基因组DNA的对立链上的互补DNA瓣的合成模板化,从而导致PE诱导的切口位点之间的内源性DNA序列被替换为pegRNA编码的序列。

[1641] 在一些实施方案中,基因编辑技术与作为逆转录酶或本领域已知的任何DNA聚合酶的先导编辑器相关。因此,在一个方面,先导编辑器可以包含Cas9(或等效的napDNAbp),其被编程为通过将DNA序列与含有与靶DNA中的互补原型间隔区退火的间隔区序列的专门指导RNA(即,PEgRNA)缔合来靶向该DNA序列。此类方法包括Anzalone等人(doi.org/10.1038/s41586-019-1711-4)或PCT公布号WO2020191248、WO2021226558或WO2022067130中公开的任何方法,这些文献据此整体并入。

[1642] 在一些实施方案中,碱基编辑技术可用于将单核苷酸变体(SNV)引入到活细胞中的DNA或RNA中。碱基编辑是基于CRISPR-Cas9的基因组编辑技术,其允许在RNA或DNA中引入点突变而不生成DSB。碱基编辑器(BE)通常是Cas(“CRISPR相关”)结构域和核碱基修饰结构域(例如,天然或进化的脱氨酶,诸如胞苷脱氨酶,其包括APOBEC1(“载脂蛋白B mRNA编辑酶,催化多肽1”)、CDA(“胞苷脱氨酶”)和AID(“活化诱导胞苷脱氨酶”)结构域)的融合体。在一些情况下,碱基编辑器还可以包含改变细胞DNA修复过程的蛋白质或结构域,以提高所得单核苷酸变化的效率和/或稳定性。已经开发了两大类碱基编辑器:允许C:G到T:A转换的胞苷碱基编辑器(CBE)(例如,BE4)和允许A:T到G:C转换的腺嘌呤碱基编辑器(ABE)(例如,ABE7.10)。碱基编辑器由催化死亡的Cas9(dCas9)或与脱氨酶融合的切口酶Cas9(nCas9)组成,并由sgRNA指导至所关注的基因座。d/nCas9识别特定的PAM序列,并且DNA由于sgRNA与通常位于PAM上游的DNA序列(也被称为原型间隔区)之间的互补性而解旋。然后,相对的DNA链就可以被脱氨酶所接近,该脱氨酶转化位于原型间隔区的特定DNA段中的碱基。与基于HDR的策略相比,碱基编辑是精确纠正遗传突变的有前途的工具,因为它避免了与失败的HDR介导的基因纠正相关的NHEJ所造成的基因破坏。与失活的Cas9(dCas9)融合的大鼠脱氨酶APOBEC1(rAPOBEC1)已被用于成功地将sgRNA的PAM上游的胞苷转化为胸苷。在一些实施方案中,通过将dCas9改变为“切口酶”Cas9D10A来优化此第一BE系统,该切口酶在与脱氨基胞苷相对的链上切口。不受理论的束缚,预期这将启动长补丁(long-patch)碱基切除修复(BER),其中脱氨基的链优先被用于将修复模板化以产生U:A碱基对,其然后在DNA复制期间被转化为T:A。

[1643] 在一些实施方案中,碱基编辑器是核碱基编辑器,其含有无催化活性的第一DNA结合蛋白结构域、具有碱基编辑活性的结构域和具有切口酶活性的第二DNA结合蛋白结构域,其中DNA结合蛋白结构域在单一融合蛋白上表达或单独表达(例如,在单独的表达载体上)。在一些实施方案中,碱基编辑器是融合蛋白,其包含具有碱基编辑活性的结构域(例如,胞苷脱氨酶或腺苷脱氨酶)和两个核酸可编程DNA结合蛋白结构域(napDNAbp),第一个包含切口酶活性,且第二个na pDNAbp是无催化活性的,其中至少两个napDNAbp通过接头连接。在一些实施方案中,碱基编辑器是融合蛋白,其包含具有切口酶活性的CRISPR-Cas(例如,Cas9)的DNA结构域(nCas;nCas9)、具有核酸可编程DNA结合活性的CRISPR-Cas蛋白(例如,Cas9)的无催化活性的结构域(dCas;例如,dCas9)和脱氨酶结构域,其中dCas通过接头与nCas连接,并且dCas紧邻脱氨酶结构域。在一些实施方案中,碱基编辑器是腺嘌呤到胸腺嘧啶或"ATBE"(或胸腺嘧啶到腺嘌呤或"TA BE")颠换碱基编辑器。示例性碱基编辑器和碱基编辑器系统包括如专利公布号US20220127622、US20210079366、US20200248169、US20210093667、US20210071163、WO2020181202、WO2021158921、WO 2019126709、WO2020181178、WO2020181195、WO2020214842、WO2020181193中所述的任何碱基编辑器和碱基编辑器系统,这些专利公布据此整体并入。

[1644] 在一些实施方案中,基因编辑技术是经由位点特异性靶向元件(PASTE)的可编程添加。在一些方面,PASTE是其中经由与逆转录酶和丝氨酸整合酶两者融合的CRISPR-Cas9切口酶引导基因组插入的平台。如Ioannidi等人(doi.org/10.1101/2021.11.01.466786)所述,PASTE不会生成双链断裂,但允许整合大至约36kb的序列。在一些实施方案中,丝氨酸整合酶可以是本领域中已知的任何丝氨酸整合酶。在一些实施方案中,丝氨酸整合酶具有足够的正交性,使得PASTE可用于在至少两个基因组基因座处同时整合至少两个不同的基因的多重基因整合。在一些实施方案中,PASTE具有与基于同源定向修复或非同源末端连接的整合相当或比其更优的编辑效率,具有在非分裂细胞中的活性和更少的可检测到的脱靶事件。

[1645] 3.用于插入第一转基因的基因组基因座

[1646] 在一些实施方案中,用于定点插入编码致耐受因子的第一转基因的基因组基因座是内源性TCR基因座。在一些实施方案中,内源性TCR基因座选自由TRAC基因座、TRBC1基因座和TRBC2基因座组成的组。基因座内的用于插入的特定位点可位于基因的任何合适区域内,该区域包括但不限于基因编码区(也称为编码序列或"CDS")、外显子、内含子、跨越部分外显子和部分相邻内含子的序列,或调控区(如启动子、增强子)。在一些实施方案中,插入发生在特定基因组基因座的一个等位基因中。在一些实施方案中,插入发生在特定基因组基因座的两个等位基因中。在这些实施方案的任一个中,插入到靶基因组基因座中的转基因的取向可以与此基因座中的内源性基因的方向相同或相反。

[1647] a.TRAC

[1648] TCR识别被加工成小肽并与抗原呈递细胞(APC)表面处的MHC分子结合的外来抗原。每个TCR均是由一条α链和一条β链(最常见)或一条δ链和一条γ链组成的二聚体。编码TCRα链的基因簇聚在14号染色体上。当编码N端抗原识别结构域的至少70个可变(V)基因之一重新排列为61个连接(J)基因区段中的1个从而产生被转录并被剪接为编码分子的C端部分的恒定区基因区段的功能性可变区时,就会形成TCRα链。另一方面,β链是由V、D(多样性)

和J区段基因的重组生成的。

[1649] TRAC基因编码TCRα链恒定区。人TRAC基因驻留在14号染色体的正向链22,547,506-22,552,156上。TRAC基因组序列示于Ensembl ID ENSG00000277734中。

[1650] b.TRBC1和TRBC2

[1651] TRBC基因编码TCRβ链恒定区。TRBC1和TRBC2是同一基因的类似物,并且T细胞相互排斥地表达TRBC1或TRBC2。人TRBC1基因驻留在7号染色体的正向链142,791,694-142,793,368上,并且它的基因组序列示于Ensembl ID ENSG00000211751中。人TRBC2基因驻留在7号染色体的正向链142,801,041-142,802,748上,并且它的基因组序列示于Ensembl ID ENSG00000211772中。

[1652] 4.用于插入第二转基因的基因组基因座

[1653] 在一些实施方案中,用于插入编码CAR的第二转基因的基因组基因座可以是随机基因座(通过随机插入)或特定基因座(通过定点插入)。如果需要特定的基因座,它可以是与第一转基因的基因座相同或不同的基因座。在一些实施方案中,用于插入编码CAR的第二转基因的基因组基因座是选自由TRAC基因座、TRBC1基因座、TRBC2基因座、B2M基因座、CIITA基因座和安全港基因座组成的组的特定基因座。安全港基因座的非限制性实例包括但不限于AAVS1(也称为PPP1R12C)、ABO、CCR5、CLYBL、CXCR4、F3(也称为CD142)、FUT1、HMGB1、KDM5D、LRP1(也称为CD91)、MICA、MICB、RHD、ROSA26和SHS231基因座。在一些实施方案中,用于插入编码CAR的第二转基因的基因组基因座是特定基因座,包括TRAC基因座、TRBC1基因座、TRBC2基因座、B2M基因座、CIITA基因座、AAVS1(也称为PPP1R12C)基因座、ABO基因座、CCR5基因座、CLYBL基因座、aCXCR4基因座、F3(也称为CD142)基因座、FUT1基因座、HMGB1基因座、KDM5D基因座、LRP1(也称为CD91)基因座、MICA基因座、MICB基因座、RHD基因座、ROSA26基因座或SHS231基因座。第二转基因可被插入在所描述的基因座中的任何基因座中的任何合适区域中,该区域包括但不限于基因编码区(也称为编码序列或"CDS")、外显子、内含子、跨越部分外显子和部分相邻内含子的序列,或调控区(如启动子、增强子)。在一些实施方案中,该插入发生在基因组基因座的一个等位基因中。在一些实施方案中,该插入发生在基因组基因座的两个等位基因中。在这些实施方案中的任一个中,插入到基因组基因座中的转基因的取向可以与此基因座中的原始基因的方向相同或相反。在一些实施方案中,第二转基因与第一转基因一起被插入,诸如第一转基因和第二转基因由多顺反子载体携带。

[1654] 5.用于定点插入的指导RNA(gRNA)

[1655] 在一些实施方案中,提供了用于根据本文提供的各种实施方案定点插入转基因的gRNA,特别是与CRISPR/Cas系统相关的gRNA。gRNA包含crRNA序列,该crRNA序列又包含识别并结合所关注的互补靶DNA的互补区(也称为间隔区)。间隔区或互补区的长度通常在15与30个核苷酸之间,通常长度为约20个核苷酸,但将会基于特定CRISPR/Cas系统的要求而变化。在某些实施方案中,间隔区或互补区与靶DNA序列完全互补。在其他实施方案中,间隔区与靶DNA序列部分互补,例如至少80%、85%、90%、95%、98%或99%互补。

[1656] 在某些实施方案中,本文提供的gRNA进一步包含tracrRNA序列,该tracrRNA序列包含用于结合至核酸酶的支架区。tracrRNA的长度和/或序列可根据用于编辑的特定核酸酶而变化。在某些实施方案中,gRNA结合核酸酶不需要tracrRNA序列。在gRNA包含tracrRNA

的那些实施方案中,crRNA序列可进一步包含用于与tracrRNA的互补序列杂交的重复区。

[1657] 在一些实施方案中,本文提供的gRNA包含两个或更多个gRNA分子,例如作为两个单独的分子的crRNA和tracrRNA。在其他实施方案中,gRNA是单指导RNA(sgRNA),包括在单个RNA分子上包含crRNA和tracrRNA的sgRNA。在这些实施方案的某些中,crRNA和tracrRNA通过间插的四环连接。

[1658] 在一些实施方案中,一种gRNA可以与定点核酸酶联合用于所关注的基因座的靶向编辑。在其他实施方案中,靶向同一所关注的基因座的两个或更多个gRNA可以与定点核酸酶联合使用。

[1659] 在一些实施方案中,表27中提供了用于与需要crRNA和tracrRNA两者的各种常见Cas核酸酶(包括Cas9和Cas12b(C2c1))一起使用的示例性gRNA(例如,sgRNA)。参见,例如,Jinek等人,Science(2012)337(6096):816-821;Dang等人,Genome Biology(2015)16:280;Ran等人,Nature(2015)520:186-191;Strecker等人,Nature Comm.(2019)10:212。对于每个示例性gRNA,示出了gRNA的包括互补区或间隔区、crRNA重复区、四环和tracrRNA在内的不同部分的序列。在一些实施方案中,gRNA包含SEQ ID NO:324、325、326、327中所示的核苷酸序列的全部或一部分。在一些实施方案中,gRNA包含SEQ ID NO:328、329、330、331中所示的核苷酸序列的全部或一部分。在一些实施方案中,gRNA包含SEQ ID NO:332、333、334、335中所示的核苷酸序列的全部或一部分。在一些实施方案中,gRNA包含SEQ ID NO:336、337、338、339中所示的核苷酸序列的全部或一部分。

[1660] 在一些实施方案中,gRNA包含crRNA重复区,该重复区包含SEQ ID NO:325、SEQ ID NO:329、SEQ ID NO:333或SEQ ID NO:122A中所示的核苷酸序列、由该核苷酸序列组成或实质上由该核苷酸序列组成。在一些实施方案中,gRNA包含四环,该四环包含SEQ ID NO:326或SEQ ID NO:337中所示的核苷酸序列、由该核苷酸序列组成或实质上由该核苷酸序列组成。在一些实施方案中,gRNA包含tracrRNA,该tracrRNA包含SEQ ID NO:327、SEQ ID NO:331、SEQ ID NO:335或SEQ ID NO:336中所示的核苷酸序列、由该核苷酸序列组成或实质上由该核苷酸序列组成。

[1661] 表27.CRISPR/Cas的示例性gRNA结构和序列

[1662]

SEQ ID NO:	序列(5'→3')	描述
324	nnnnnnnnnnnnnnnnnnnn	示例性 spCas9 1 互补区(间隔区)
325	guuuuagagcua	示例性 spCas9 1 crRNA 重复区
326	gaaa	示例性 spCas9 1 四环
327	uagcaaguuaaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaagug gcaccgagucggugcuuuuuu	示例性 spCas9 1 tracrRNA
328	nnnnnnnnnnnnnnnnnnnn	示例性 spCas9 2 互补区(间隔区)
329	guuusagagcuaugcug	示例性 spCas9 2 crRNA 重复区
330	gaaa	示例性 spCas9 2 四环
331	cagcauagcaaguusaaauaaggcuaguccguuaucaacu ugaaaa aguggcaccgagucggugcuuuuuu	示例性 spCas9 2 tracrRNA
332	nnnnnnnnnnnnnnnnnnnn	示例性 saCas9 互补区(间隔区)
333	guuuuaguacucug	示例性 saCas9 crRNA 重复区
334	gaaa	示例性 saCas9 四环
335	cagaaucuacuaaaacaaggcaaaaugccguguuuaucuc gucaac uuguuggcgagauuuuuu	示例性 saCas9 tracrRNA
336	gucgucuauaggacggcgaggacaacgggaagugccaau gugcuc uuuccaagagcaaacaccccguuggcuucaagaugaccgc ucg	示例性 AkCas12b tracrRNA
337	aaaa	示例性 AkCas12b 四环
338	cgagcggucugagaaguggcacu	示例性 AkCas12b crRNA 重复区
339	nnnnnnnnnnnnnnnnnnnn	示例性 AkCas12b 互补区(间隔区)

[1663] s=c或g;n=任何碱基

[1664] 在一些实施方案中,gRNA包含对所关注的靶基因座具有特异性的互补区,该所关注的靶基因座例如TRAC基因座、TRBC1基因座、TRBC2基因座、B2M基因座、CIITA基因座或选自由以下组成的组的安全港基因座:AAVS1、ABO、CCR5、CLYBL、CXCR4、F3、FUT1、HMGB1、KDM5D、LRP1、MICA、MICB、RHD、ROSA26和SHS231基因座。互补区可以结合靶基因座的任何区域中的序列,该区域包括例如CDS、外显子、内含子、跨越外显子的一部分和相邻内含子的一部分的序列,或调控区(例如,启动子、增强子)。在靶序列是CDS、外显子、内含子或跨越外显子和内含子的一部分的序列的情况下,CDS、外显子、内含子或外显子/内含子边界可以根据靶基因的任何剪接变体来定义。在一些实施方案中,gRNA靶向的基因组基因座位于如所描述的基因座或其区域中的任何基因座或其区域的4000bp内、3500bp内、3000bp内、2500bp

内、2000bp内、1500bp内、1000bp内或500bp内。本文进一步提供了包含本文提供的一种或多种gRNA和Cas蛋白或编码Cas蛋白的核苷酸序列的组合物。在这些实施方案的某些中,该一种或多种gRNA和编码Cas蛋白的核苷酸序列被包含在载体,例如病毒载体内。

[1665] 在一些实施方案中,提供了鉴定用于在如所描述的定点基因组插入方法中使用的新基因座和/或gRNA序列的方法。例如,对于CRISPR/Cas系统,当已知针对特定基因座(例如,在内源性TCR基因座内)的现有gRNA时,可以使用“英寸蠕动”方法通过扫描PAM序列的基因座的任一侧上的侧接区来鉴定用于靶向插入转基因的另外的基因座,其通常在整个基因组中约每100个碱基对(bp)出现一次。PAM序列将取决于使用的特定Cas核酸酶,因为不同的核酸酶通常具有不同的对应PAM序列。基因座任一侧上的侧接区域可以是约500至4000bp长,例如约500bp、约1000bp、约1500bp、约2000bp、约2500bp、约3000bp、约3500bp或约4000bp长。当在搜索范围内鉴定出PAM序列时,可以根据该基因座的序列设计新的指导,用于转基因的定点插入。尽管CRISPR/Cas系统被描述为例示性的,但如所描述的任何基因编辑方法都可以用于这种鉴定新基因座的方法,包括使用ZFN、TALEN、大范围核酸酶和转座酶的那些方法。

[1666] 在一些实施方案中,gRNA的活性、稳定性和/或其他特征可以通过并入化学和/或序列修饰来改变。作为一个实例,瞬时表达或递送的核酸可能易于被例如细胞核酸酶降解。因此,本文所述的gRNA可含有一种或多种引入对核酸酶的稳定性的经修饰的核苷或核苷酸。虽然不受特定理论的束缚,但据信本文所述的某些经修饰的gRNA在被引入到细胞群体,特别是本技术的细胞中时可以表现出降低的先天免疫反应。如本文所用,术语“先天免疫反应”包括对外源性核酸(包括单链核酸,通常是病毒或细菌来源的外源性核酸)的细胞反应,其涉及诱导细胞因子表达和释放,例如干扰素,以及细胞死亡。为提高稳定性、增加核酸酶抗性和/或减少免疫反应而对gRNA进行的其他常见化学修饰包括2'-O-甲基修饰、2'-氟修饰、2'-O-甲基硫代磷酸酯键联修饰和2'-O-甲基3'硫代PACE修饰。

[1667] 一种常见的3'末端修饰是添加包含一个或多个(通常为5-200个)腺嘌呤(A)残基的poly(A)束。Poly(A)束可以被包含在编码gRNA的核酸序列中,或者可以在化学合成期间或在使用聚腺苷聚合酶(例如,大肠杆菌poly(A)聚合酶)的体外转录之后被添加至gRNA中。在体内,可以通过使用聚腺苷酸化信号将poly(A)束添加到从DNA载体转录的序列中。Maeder中提供了此类信号的实例。其他合适的gRNA修饰包括但不限于美国专利申请号US2017/0073674 A1和国际公布号WO 2017/165862A1中描述的那些,它们各自的全部内容以引用的方式并入本文中。

[1668] 在一些实施方案中,用于设计如本文公开的gRNA的工具包括:Benchling、Broad Institute GPP、CasOFFinder、CHOPCHOP、CRISPick、CRISPOR、Deskgen、E-CRISP、Geneious、Guides、Horizon Discovery、IDT、Off-Spotter、Synthego,或TrueDesign(ThermoFisher)。本领域的普通技术人员将理解,预测活性和特异性(例如,以限制脱靶修饰)的工具将可用于在如本文公开的某些情况下设计gRNA。

[1669] F.基因编辑系统向宿主细胞中的递送

[1670] 在一些实施方案中,提供了包含本文所述的基因编辑系统的一种或多种组分的组合物,该组分包括一种或多种gRNA、定点核酸酶(例如,Cas核酸酶)或编码定点核酸酶蛋白的核苷酸序列,以及用于靶向插入的转基因。在一些实施方案中,该组合物被配制用于递送

至细胞中。

[1671] 在一些实施方案中,本文提供的基因编辑系统的组分(包括一种或多种gRNA、定点核酸酶(例如,Cas核酸酶)或编码定点核酸酶蛋白的核苷酸序列,以及用于靶向插入的转基因(例如,编码致耐受因子的第一转基因和/或编码CAR的第二转基因))可以以递送载体的形式被递送至细胞中。递送载体可以是适合于将核苷酸序列引入到细胞中的任何类型的载体,包括例如质粒、腺病毒载体、腺相关病毒(AAV)载体、逆转录病毒载体、慢病毒载体、噬菌体和基于HDR的供体载体。不同的组分可以被一起或单独地引入到细胞中,并且可以在单个载体或多个载体中递送。

[1672] 在一些实施方案中,递送载体可以通过本领域中任何已知的方法引入到细胞中,该已知方法包括例如病毒转化、磷酸钙转染、脂质介导的转染、DEAE-葡聚糖、电穿孔、显微注射、核穿孔、脂质体、纳米颗粒或其他方法。

[1673] 在一些实施方案中,本技术提供了包含根据本文公开的各个实施方案的递送载体的组合物。在一些实施方案中,该组合物可进一步包含一种或多种药学上可接受的载剂、赋形剂、防腐剂或其组合。“药学上可接受的载剂或赋形剂”是指参与将所关注的化合物从身体的一个组织、器官或部分携带或转运到身体的另一个组织、器官或部分的药学上可接受的材料、组合物或媒介物。例如,载剂或赋形剂可以是液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂、溶剂或包封材料,或其某种组合。载剂或赋形剂的每种组分必须是“药学上可接受的”,因为它必须与制剂的其他成分相容。它还必须适合与它可能遇到的身体的任何组织、器官或部分接触,这意味着它不得带来过度超过其治疗益处的毒性、刺激性、过敏响应、免疫原性或任何其他并发症的风险。合适的赋形剂包括水、盐水、右旋糖、甘油等及其组合。在一些实施方案中,包含如本文所公开的细胞的组合物进一步包含合适的输注介质。

[1674] 在一些实施方案中,提供了包含本文所述的基因编辑系统的一种或多种组分的细胞或其组合物,该组分包括一种或多种gRNA、定点核酸酶(例如,Cas核酸酶)或编码定点核酸酶蛋白的核苷酸序列,以及用于靶向插入的转基因。

[1675] E.经工程化的细胞的示例性实施方案

[1676] 如上所陈述,本文公开的用于对细胞群体进行针对供体能力的特性分析的方法可以有利地形成用于制造细胞疗法产品的总体方法的一部分。应当理解,在制造细胞疗法的过程中,可以向细胞中引入被认为对于细胞疗法产品是理想的某些修饰,例如以辅助细胞逃避免疫识别。在一些实施方案中,经工程化的细胞及其群体表现出降低的MHC I类和/或MHC II类分子中的一种或多种分子的表达。在一些实施方案中,经工程化的细胞及其群体表现出增加的至少一种致耐受因子的表达。在一些实施方案中,经工程化的细胞及其群体表现出降低的MHC I类和/或MHC II类分子中的一种或多种分子的表达和增加的至少一种致耐受因子的表达。

[1677] 在一些实施方案中,细胞(例如,经工程化的β胰岛细胞、肝细胞或在移植期间与血液接触的其他细胞类型)及其群体表现出增加的CD47的表达,具有增加的至少一种致耐受因子的表达,以及降低的MHC I类复合物中的一种或多种分子的表达。在一些实施方案中,细胞及其群体表现出增加的CD47的表达,增加的至少一种致耐受因子的表达,以及降低的MHC I类和/或MHC II类复合物中的一种或多种分子的表达。在一些实施方案中,经工程化的细胞表达一种或多种选自CD46、CD59、DAF/CD55及其任何组合的外源性补体抑制剂多肽。

在一些实施方案中,至少一种致耐受因子是本文所述的致耐受因子中的至少一种。

[1678] F.从低免疫原性多能干细胞分化而来的治疗性细胞

[1679] 本文提供了低免疫原性细胞,其包括来源于多能干细胞的逃避免疫识别的细胞。在一些实施方案中,该细胞不活化患者或受试者(例如,施用后的接受者)的先天和/或适应性免疫反应。提供了治疗病症的方法,该方法包括向有需要的接受者受试者重复给药低免疫原性细胞群体。

[1680] 在一些实施方案中,多能干细胞和任何从此种多能干细胞分化而来的细胞被修饰为表现出降低的MHC I类人白细胞抗原的表达。在其他实施方案中,多能干细胞和任何从此种多能干细胞分化而来的细胞被修饰为表现出降低的MHC II类人白细胞抗原的表达。在某些实施方案中,多能干细胞和任何从此种多能干细胞分化而来的细胞被修饰为表现出降低的TCR复合物的表达。在某些实施方案中,多能干细胞和任何从此种多能干细胞分化而来的细胞被修饰为表现出降低的MHC I类和II类人白细胞抗原的表达。在一些实施方案中,多能干细胞和任何从此种多能干细胞分化而来的细胞被修饰为表现出降低的MHC I类和II类人白细胞抗原以及TCR复合物的表达。

[1681] 在一些实施方案中,多能干细胞和任何从此种多能干细胞分化而来的细胞被修饰为表现出降低的MHC I类和/或II类人白细胞抗原的表达并且表现出增加的CD47表达。在一些情况下,该细胞通过携有一个或多个CD47转基因而过表达CD47。在一些实施方案中,多能干细胞和任何从此种多能干细胞分化而来的细胞被修饰为表现出降低的MHC I类和II类人白细胞抗原的表达并且表现出增加的CD47表达。在一些实施方案中,多能干细胞和任何从此种多能干细胞分化而来的细胞被修饰为表现出降低的MHC I类和II类人白细胞抗原以及TCR复合物的表达,并且表现出增加的CD47表达。

[1682] 在一些实施方案中,多能干细胞和任何从此种多能干细胞分化而来的细胞被修饰为表现出降低的MHC I类和/或II类人白细胞抗原的表达,表现出增加的CD47表达,并且外源性表达嵌合抗原受体。在一些情况下,该细胞通过携有一个或多个CD47转基因而过表达CD47多肽。在一些情况下,细胞通过携有一个或多个CAR转基因而过表达CAR多肽。在一些实施方案中,多能干细胞和任何从此种多能干细胞分化而来的细胞被修饰为表现出降低的MHC I类和II类人白细胞抗原的表达,表现出增加的CD47表达,并且外源性表达嵌合抗原受体。在一些实施方案中,多能干细胞和任何从此种多能干细胞分化而来的细胞被修饰为表现出降低的MHC I类和II类人白细胞抗原以及TCR复合物的表达,表现出增加的CD47表达,并且外源性表达嵌合抗原受体。

[1683] 此类多能干细胞是低免疫原性干细胞。此类分化的细胞是低免疫原性细胞。

[1684] 本文所述的多能干细胞中的任何多能干细胞都可以被分化为生物体和组织的任何细胞。在一些实施方案中,该细胞表现出降低的MHC I类和/或II类人白细胞抗原的表达和降低的TCR复合物的表达。在一些情况下,MHC I类和/或II类人白细胞抗原的表达与相同细胞类型的未经修饰或野生型的细胞相比降低。在一些情况下,TCR复合物的表达与相同细胞类型的未经修饰或野生型的细胞相比降低。在一些实施方案中,该细胞表现出增加的CD47表达。在一些情况下,本公开所涵盖的细胞中的CD47的表达与相同细胞类型的未经修饰或野生型的细胞相比增加。在一些实施方案中,该细胞表现出外源性CAR表达。本文描述了用于降低MHC I类和/或II类人白细胞抗原和TCR复合物的水平并增加CD47和CAR的表达

的方法。

[1685] 在一些实施方案中,当施用于患者(例如,接受者受试者)时,本文所述的方法中使用的细胞逃避免疫识别和反应。该细胞可以逃避免疫细胞在体外和体内的杀伤。在一些实施方案中,该细胞逃避巨噬细胞和NK细胞的杀伤。在一些实施方案中,该细胞被免疫细胞或受试者的免疫系统忽略。换句话说,按照本文所述的方法施用的细胞不能被免疫系统的免疫细胞检测到。在一些实施方案中,该细胞被掩蔽并因此避免免疫排斥。

[1686] 确定多能干细胞和任何从此种多能干细胞分化而来的细胞是否逃避免疫识别的方法包括但不限于IFN-γElispot测定、小胶质细胞杀伤测定、细胞植入动物模型、细胞因子释放测定、ELISA、使用生物发光成像或铬释放测定或用于细胞分析的实时定量微电子生物传感器系统(xCELLigence® RTCA系统,Agilent)进行的杀伤测定、混合淋巴细胞反应、免疫荧光分析等。

[1687] 本文概述的治疗性细胞可用于治疗病症,诸如但不限于癌症、遗传病症、慢性感染性疾病、自身免疫性病症、神经性病症等。

[1688] 1.从低免疫原性多能细胞分化而来的T淋巴细胞

[1689] 本文提供的T淋巴细胞(T细胞,包括原代T细胞)来源于本文所述的HIP细胞(例如,低免疫原性iPSC)。用于从多能干细胞(例如,iPSC)生成T细胞(包括CAR-T细胞)的方法在例如Iriguchi等人,Nature Communications 12,430(2021);Themeli等人,Cell Stem Cell,16(4):357-366(2015);Themeli等人,Nature Biotechnology 31:928-933(2013)中有描述。

[1690] T淋巴细胞来源的低免疫原性细胞包括但不限于逃避免疫识别的原代T细胞。在一些实施方案中,低免疫原性细胞由T细胞(诸如原代T细胞)产生(例如,生成、培养或获得)。在一些情况下,从受试者或个体获得(例如,收获、提取、移除或取出)原代T细胞。在一些实施方案中,由T细胞集合产生原代T细胞,使得该T细胞来自一个或多个受试者(例如,一个或多个人,包括一个或多个健康的人)。在一些实施方案中,原代T细胞的集合来自1-100个、1-50个、1-20个、1-10个、1个或多个、2个或更多个、3个或更多个、4个或更多个、5个或更多个、10个或更多个、20个或更多个、30个或更多个、40个或更多个、50个或更多个,或100个或更多个受试者。在一些实施方案中,供体受试者与患者(例如,施用治疗性细胞的接受者)不同。在一些实施方案中,T细胞集合不包括来自患者的细胞。在一些实施方案中,从中获得T细胞集合的供体受试者中的一个或多个供体受试者与患者不同。

[1691] 在一些实施方案中,低免疫原性细胞不会活化患者(例如,施用后的接受者)的免疫反应。提供了通过向有需要的受试者(例如,接受者)或患者施用低免疫原性细胞群体来治疗病症的方法。在一些实施方案中,本文所述的低免疫原性细胞包含被工程化(例如,修饰)为表达嵌合抗原受体的T细胞,该嵌合抗原受体包括但不限于本文所述的嵌合抗原受体。在一些情况下,T细胞是来自一个或多个个体的原代T细胞群体或亚群。在一些实施方案中,本文所述的T细胞(诸如经工程化或经修饰的T细胞)包含降低的内源性T细胞受体的表达。

[1692] 在一些实施方案中,HIP来源的T细胞包含嵌合抗原受体(CAR)。任何合适的CAR都可以被包含在hyHIP来源的T细胞中,包括本文所述的CAR。在一些实施方案中,低免疫原性诱导型多能干细胞来源的T细胞包括编码CAR的多核苷酸,其中将该多核苷酸插入到基因组

基因座中。在一些实施方案中,将多核苷酸插入到安全港或靶标基因座中。在一些实施方案中,将多核苷酸插入到B2M、CIITA、TRAC、TRB、PD-1或CTLA-4基因中。可以使用任何合适的方法将CAR插入到低免疫原性细胞的基因组基因座中,该方法包括本文所述的基因编辑方法(例如,CRISPR/Cas系统)。

[1693] 本文提供的HIP来源的T细胞可用于治疗合适的癌症,包括但不限于B细胞急性淋巴母细胞白血病(B-ALL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤、肝癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、结直肠癌、肺癌、非小细胞肺癌、急性髓系淋巴系白血病、多发性骨髓瘤、胃癌、胃腺癌、胰腺癌、胶质母细胞瘤、神经母细胞瘤、肺鳞状细胞癌、肝细胞癌和膀胱癌。

[1694] 2.来源于低免疫原性多能细胞的NK细胞

[1695] 本文提供的自然杀伤(NK)细胞来源于本文所述的HIP细胞(例如,低免疫原性iPSC)。

[1696] NK细胞(也被定义为大颗粒淋巴细胞)代表一种从普通淋巴系祖细胞分化而来的细胞谱系(其也产生B淋巴细胞和T淋巴细胞)。与T细胞不同,NK细胞在质膜上不天然包含CD3。重要的是,NK细胞不表达TCR,并且通常也缺乏其他抗原特异性细胞表面受体(以及TCR和CD3,它们也不表达免疫球蛋白B细胞受体,而是通常表达CD16和CD56)。NK细胞的细胞毒性活性不需要致敏,但在包括IL-2在内的多种细胞因子的活化下会得到增强。NK细胞通常被认为缺乏抗原受体介导的信号传导所必需的适当或完整的信号传导途径,因此不被认为能够进行抗原受体依赖性信号传导、活化和扩增。NK细胞具有细胞毒性,并且平衡活化和抑制性受体信号传导以调节它们的细胞毒性活性。例如,表达CD16的NK细胞可结合至与受感染的细胞结合的抗体的Fc结构域,从而导致NK细胞活化。相比之下,对表达高水平MHC I类蛋白的细胞则会降低活性。在与靶细胞接触时,NK细胞释放蛋白(诸如穿孔素)和酶(诸如蛋白酶(颗粒酶))。穿孔素可以在靶细胞的细胞膜上形成孔,从而诱导细胞凋亡或细胞裂解。

[1697] 有许多技术可以用于从多能干细胞(例如iPSC)生成NK细胞(包括CAR-NK细胞);参见,例如Zhu等人,Methods Mol Biol.2019;2048:107-119;Knorr等人,Stem Cells Transl Med.2013 2(4):274-83.doi:10.5966/sctm.2012-0084;Zeng等人,Stem Cell Reports.2017Dec12;9(6):1796-1812;Ni等人,Methods Mol Biol.2013;1029:33-41;Bernareggi等人,Exp Hematol.2019 71:13-23;Shankar等人,Stem Cell Res Ther.2020;11(1):234,所有这些文献都以引用的方式整体并入本文中,特别是用于分化的方法和试剂。可以如本领域已知的那样,通常通过评价NK细胞相关和/或特异性标志物的存在来测定分化,该标志物包括但不限于CD56、KIRs、CD16、NKp44、NKp46、NKG2D、TRAIL、CD122、CD27、CD244、NK1.1、NKG2A/C、NCR1、Ly49、CD49b、CD11b、KLRG1、CD43、CD62L和/或CD226。

[1698] 在一些实施方案中,低免疫原性多能细胞被分化为肝细胞以解决肝细胞功能丧失或肝脏硬化。有许多技术可以用于使HIP细胞分化为肝细胞;参见例如Pettinato等人,doi:10.1038/spre32888、Snykers等人,Methods Mol Biol,2011 698:305-314、Si-Tayeb等人,Hepatology,2010,51:297-305和Asgari等人,Stem Cell Rev,2013,9(4):493-504,所有这些文献都以引用的方式整体并入本文中,特别是用于分化的方法和试剂。可以如本领域已知的那样,通常通过评价肝细胞相关和/或特异性标志物的存在来测定分化,该标志物包括但不限于白蛋白、甲胎蛋白和纤维蛋白原。还可以在功能上(诸如氨的代谢、LDL储存和摄取、ICG摄取和释放以及糖原储存)测量分化。

[1699] 在一些实施方案中,NK细胞不会活化患者(例如,施用后的接受者)的先天和/或适应性免疫反应。提供了通过向有需要的受试者(例如,接受者)或患者施用NK细胞群体来治疗病症的方法。在一些实施方案中,本文所述的NK细胞包含被工程化(例如,修饰)为表达嵌合抗原受体的NK细胞,该嵌合抗原受体包括但不限于本文所述的嵌合抗原受体。任何合适的CAR都可以被包含在NK细胞中,包括本文所述的CAR。在一些实施方案中,NK细胞包括编码CAR的多核苷酸,其中将该多核苷酸插入到基因组基因座中。在一些实施方案中,将多核苷酸插入到安全港或靶标基因座中。在一些实施方案中,将多核苷酸插入到B2M、CIITA、PD1或CTLA4基因中。可以使用任何合适的方法将CAR插入到NK细胞的基因组基因座中,该方法包括本文所述的基因编辑方法(例如,CRISPR/Cas系统)。

[1700] G.针对低免疫原性表型和多能性保留的测定

[1701] 一旦已经生成低免疫原性细胞,就可如WO2016183041和WO2018132783中所述的那样测定它们的低免疫原性和/或多能性保留。

[1702] 在一些实施方案中,使用如WO2018132783的图13和图15中例示的多种技术测定低免疫原性。这些技术包括移植到同种异体宿主中和监测逃脱宿主免疫系统的低免疫原性多能细胞生长(例如畸胎瘤)。在一些情况下,低免疫原性多能细胞衍生物被转导为表达荧光素酶,然后可以使用生物发光成像进行跟踪。类似地,测试宿主动物对此类细胞的T细胞和/或B细胞反应,以确认这些细胞不会引起宿主动物的免疫反应。可以通过Elispot、ELISA、FACS、PCR或质谱流式细胞术(CYTOF)来评估T细胞反应。使用FACS或Luminex来评估B细胞反应或抗体反应。另外或替代地,可以如WO2018132783的图14和15中一般性地示出的那样测定细胞避免先天免疫反应,例如NK细胞杀伤的能力。

[1703] 在一些实施方案中,使用本领域技术人员认可的T细胞免疫测定,诸如T细胞增殖测定、T细胞活化测定和T细胞杀伤测定来评价细胞的免疫原性。在一些情况下,T细胞增殖测定包括用干扰素-γ预处理细胞以及将细胞与经标记的T细胞共培养以及在预选的时间量后测定T细胞群体(或增殖中的T细胞群体)的存在。在一些情况下,T细胞活化测定包括将T细胞与本文概述的细胞共培养,以及确定T细胞中T细胞活化标志物的表达水平。

[1704] 可以进行体内测定以评估本文概述的细胞的免疫原性。在一些实施方案中,使用同种异体人源化免疫缺陷小鼠模型来确定低免疫原性细胞的存活率和免疫原性。在一些情况下,将低免疫原性多能干细胞移植到同种异体人源化NSG-SGM3小鼠中并测定细胞排斥、细胞存活率和畸胎瘤形成。在一些情况下,植入的低免疫原性多能干细胞或其分化的细胞在小鼠模型中表现出长期存活。

[1705] 用于确定免疫原性(包括细胞的低免疫原性)的另外的技术描述于例如Deuse等人,Nature Biotechnology,2019,37,252-258和Han等人,Proc Natl Acad Sci USA,2019,116(21),10441-10446,这些文献中的包括附图、附图说明和方法描述的公开内容以引用的方式整体并入本文中。

[1706] 类似地,以多种方式测试多能性保留。在一些实施方案中,如本文一般性地描述和WO2018132783的图29中所示出的那样通过某些多能性特异性因子的表达来测定多能性。另外或替代地,使多能细胞分化为作为多能性的指示的一种或多种细胞类型。

[1707] 如本领域技术人员将理解的,可以使用本领域已知并且如下文所述的技术(例如,使用结合HLA复合物的经标记的抗体(例如,使用与人主要组织相容性HLA I类抗原的α链结

合的可商购获得的HLA-A、B、C抗体)的FACS技术)来测量多能细胞中MHC I功能(当细胞来源于人细胞时,为HLA I)的成功降低。

[1708] 另外,可以对细胞进行测试,以确认HLA I复合物未在细胞表面上表达。这可以通过使用如上文所讨论的针对一种或多种HLA细胞表面组分的抗体的FACS分析来测定。

[1709] 可以使用本领域已知的技术(诸如使用针对蛋白质的抗体的蛋白质印迹、FACS技术、RT-PCR技术等)来测量多能细胞或其衍生物中MHC II功能(当细胞来源于人细胞时,为HLA II)的成功降低。

[1710] 另外,可以对细胞进行测试,以确认HLA II复合物未在细胞表面上表达。再次,这种测定如本领域已知的那样进行(例如参见WO2018132783的图21)并且通常使用基于与人HLA II类HLA-DR、DP和大多数DQ抗原结合的商业抗体的蛋白质印迹或FACS分析进行。

[1711] 除了减少HLA I和II(或MHC I和II)之外,本技术的低免疫原性细胞对巨噬细胞吞噬作用和NK细胞杀伤的易感性降低。由于TCR复合物的减少或缺乏以及一种或多种CD47转基因的表达,所得的低免疫原性细胞"逃脱"免疫巨噬细胞和先天途径。

[1712] 在一些方面,本技术提供了T细胞(诸如免疫逃避同种异体T细胞),其来源于本文公开的各种实施方案或通过根据本文公开的各种实施方案的方法生成。在一些实施方案中,所生成的T细胞适用于过继细胞疗法,因为它们已被制成具有免疫逃避性(例如,通过将致耐受因子插入到内源性TCR基因座中和/或通过修饰如所述的MHC I和/或MHC II基因)并且表达一种或多种CAR。

[1713] 在一些实施方案中,该T细胞是原初T细胞、辅助T细胞(CD4+)、细胞毒性T细胞(CD8+)、调节T细胞(Treg)、中枢记忆T细胞(T_{CM})、效应记忆T细胞(T_{EM})、干细胞记忆T细胞(T_{SCM}),或其任何组合。更具体地说,该T细胞可以是原初T细胞(未暴露于抗原;与T_{CM}相比,CD62L、CCR7、CD28、CD3、CD127和CD45RA表达增加且CD45RO表达降低)、记忆T细胞(经历过抗原且长寿命的),或效应细胞(经历过抗原、有细胞毒性)。记忆T细胞可进一步分为T_{CM}亚组(与原初T细胞相比,CD62L、CCR7、CD28、CD127、CD45RO和CD95的表达增加且CD54RA的表达降低)和T_{EM}亚组(与原初T细胞或T_{CM}相比,CD62L、CCR7、CD28、CD45RA的表达降低且CD127表达增加)。效应T细胞是指经历过抗原的CD8+细胞毒性T细胞,其与T_{CM}相比具有降低的CD62L、CCR7、CD28的表达并且对颗粒酶和穿孔素呈阳性。辅助T细胞是通过释放细胞因子影响其他免疫细胞的活性的CD4+细胞。CD4+T细胞可以活化或阻抑适应性免疫反应,这两种功能中的哪一种被诱导将取决于其他细胞和信号的存在。可以使用已知技术收集T细胞,并且可以通过已知技术,诸如通过与抗体的亲和结合、流式细胞术或免疫磁性选择对各种亚群或其组合进行富集或耗竭。

[1714] 在一些实施方案中,T细胞是自体细胞,即从将接受修饰后的T细胞的受试者获得。在一些实施方案中,T细胞是同种异体T细胞,即从除将接受修饰后的T细胞的受试者以外的人获得。在这些实施方案的任一个中,T细胞可以是从许多种来源获得的原代T细胞,这些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、脾组织和肿瘤。在其他实施方案中,尤其是在同种异体T细胞的情况下,

[1715] T细胞可以源自或分化自胚胎干细胞(ESC)或诱导型多能细胞(iPSC)。

[1716] 在一些方面,本技术提供了包含根据本文公开的各种实施方案的T细胞的药物组合物。

[1717] 在一些实施方案中,该组合物可以具有各种制剂,例如注射制剂、冻干制剂、液体制剂、口服制剂等,这取决于合适的施用途径。

[1718] 在一些实施方案中,该组合物可以被共同配制在同一剂量单位中或者可以被单独配制在单独的剂量单位中。本文中的术语“剂量单位(dose unit)”和“剂量单位(dosage unit)”是指含有适合于单次施用以提供治疗效果的量的治疗剂的药物组合物的一部分。此类剂量单位可以每天施用一次至多次(即,1至10次、1至8次、1至6次、1至4次或1至2次),或根据引发治疗响应所需多次施用。

[1719] 在一些实施方案中,单次剂量单位包括至少约1x 10^2、5x 10^2、1x 10^3、5x 10^3、1x 10^4、5x 10^4、1x 10^5、5x 10^5、1x 10^6、5x 10^6、1x 10^7、5x 10^7、1x 10^8、5x10^8、1x 10^9、5x 10^9、1x 10^{10}或5x 10^{10}个细胞。

[1720] 在一些实施方案中,提供的经工程化的细胞被修饰为使得它们在被施用于患者(例如,接受者受试者)时能够逃避免疫识别和反应。该细胞可以逃避免疫细胞在体外和体内的杀伤。在一些实施方案中,该细胞逃避巨噬细胞和NK细胞的杀伤。在一些实施方案中,该细胞被免疫细胞或受试者的免疫系统忽略。换句话说,按照本文所述的方法施用的细胞不能被免疫系统的免疫细胞检测到。在一些实施方案中,该细胞被掩蔽并因此避免免疫排斥。

[1721] 确定本文提供的经工程化的细胞是否逃避免疫识别的方法包括但不限于IFN-γ Elispot测定、小胶质细胞杀伤测定、细胞植入动物模型、细胞因子释放测定、ELISA、使用生物发光成像的杀伤测定或铬释放测定或Xcelligence分析、混合淋巴细胞反应、免疫荧光分析等。

[1722] 在一些实施方案中,在补体依赖性细胞毒性(CDC)测定中评价该细胞的免疫原性。可以通过在含有补体的血清存在下将细胞与针对细胞表面上表达的HLA非依赖性抗原的IgG或IgM抗体一起孵育并分析细胞杀伤来体外测定CDC。在一些实施方案中,可以通过将细胞与ABO血型不相容血清一起孵育来测定CDC,其中该细胞包含A抗原或B抗原,并且该血清包含针对该细胞的A抗原和/或B抗原的抗体。

[1723] 在一些实施方案中,一旦已如本文所述的那样修饰或生成经工程化的细胞,就可以测定它们的低免疫原性。可以使用多种测定中的任一种来评估细胞是否具有低免疫原性或是否可以逃避免疫系统。示例性测定包括如WO2016183041和WO2018132783中描述的任何测定。在一些实施方案中,本文所述的经工程化的细胞在不刺激宿主免疫反应的情况下在宿主中存活而一周或更长时间(例如,一周、两周、一个月、两个月、三个月、六个月、一年、两年、三年、四年、五年或更长时间,例如,细胞和/或其后代的一生)。只要该细胞在宿主中存活,该细胞就会维持转基因的表达且/或该细胞中靶基因的表达就会被缺失或降低。在一些方面,如果不再表达转基因并且/或者如果表达了靶基因,则经工程化的细胞可能会被宿主的免疫系统去除。在一些实施方案中,在经工程化的细胞施用于接受者之后,经工程化的细胞的持续存在或存活可以通过进一步表达编码允许该细胞在体内被检测到的蛋白质(例如,荧光蛋白(诸如GFP)、经截短的受体或其他替代标志物或其他可检测标志物)的转基因来监测。

[1724] 低免疫原性细胞以允许它们植入到预期组织部位并重建功能缺陷区域或使功能缺陷区域再生的方式施用。在一些实施方案中,测定低免疫原性细胞的植入(例如,成功植

入)。在一些实施方案中,在预选的时间量后评价低免疫原性细胞的植入。在一些实施方案中,监测植入的细胞的细胞存活。例如,可以经由生物发光成像(BLI)监测细胞存活,其中用荧光素酶表达构建体转导细胞以监测细胞存活。在一些实施方案中,通过本领域已知的免疫染色和成像方法使植入的细胞可视化。在一些实施方案中,植入的细胞表达已知的生物标志物,可以检测该生物标志物以确定成功植入。例如,流式细胞术可以用于确定特定生物标志物的表面表达。在一些实施方案中,低免疫原性细胞按预期被植入到期望组织部位(例如,低免疫原性细胞的成功植入)。在一些实施方案中,将低免疫原性细胞按需要植入到预期的组织部位,诸如植入在细胞缺陷部位处。在一些实施方案中,将低免疫原性细胞以与不包含修饰的相同类型的细胞相同的方式植入到预期组织部位。

[1725] 在一些实施方案中,测定低免疫原性细胞的功能。在一些实施方案中,在将低免疫原性细胞植入到预期的组织部位之前,测定它们的功能。在一些实施方案中,在将低免疫原性细胞植入到预期的组织部位之后,测定它们的功能。在一些实施方案中,在预选量之后评价低免疫原性细胞的功能。在一些实施方案中,植入的细胞的功能通过该细胞产生可检测表型的能力来评价。例如,可以基于糖尿病导致的葡萄糖失去控制的恢复来评价植入的β胰岛细胞功能。在一些实施方案中,低免疫原性细胞的功能如预期一样(例如,低免疫原性细胞成功发挥作用,同时避免抗体介导的排斥)。在一些实施方案中,低免疫原性细胞的功能如需要的一样,诸如在细胞缺陷位点具有足够的功能,同时避免抗体介导的排斥。在一些实施方案中,经工程化的细胞以与相同类型的非经工程化的细胞相同的方式发挥作用。

[1726] 应当理解,涉及HIP细胞的实施方案可容易地应用于如本文所述的任何细胞类型,并且可容易地与如本文所述的安全开关、CAR修饰和其他修饰/基因编辑相组合。

[1727] H.安全开关

[1728] 如本文所公开,在一些实施方案中,可以将安全开关并入(诸如引入)到本文提供的经工程化的细胞中,以提供诱导含有安全开关的经工程化的细胞的死亡或凋亡(例如如果该细胞以不期望的方式生长和分裂或对宿主造成过度的毒性)的能力。因此,安全开关的使用使得人们能够有条件地消除体内异常细胞,并且可能是细胞疗法在临床应用中的关键步骤。如本公开的上下文中提及的有关安全开关的相关信息可从WO2021/146627中找到,其内容以引用的方式并入本文中。应当理解,关于安全开关的实施方案可以容易地应用于如本文所述的任何细胞类型,并且可以容易地与如本文所述的与HIP细胞、CAR修饰和其他修饰/基因编辑有关的实施方案相组合。以下定义适用于本公开:

[1729] 本文所用的术语“安全开关”是指用于控制所关注的基因或蛋白质的表达的系统,该所关注的基因或蛋白质在被下调或上调时导致细胞的清除或死亡(例如通过宿主免疫系统的识别)。安全开关可以被设计成在发生不良临床事件时由外源性分子触发。可以通过调控DNA、RNA和蛋白质水平的表达来设计安全开关。安全开关包括允许响应于不良事件而控制细胞活性的蛋白质或分子。在一些实施方案中,安全开关是“杀伤开关”,其以无活性状态表达,并且在通过选择性的外部提供的剂活化开关时对表达安全开关的细胞是致命的。在一些实施方案中,安全开关基因相对于构建体中的所关注的基因是顺式作用的。在一些实施方案中,安全开关是一种“解除掩蔽”系统,其中在活化后,细胞会下调免疫抑制因子的表达和/或上调免疫信号传导分子的表达,从而标记供宿主免疫系统消除的细胞。安全开关的活化导致细胞通过凋亡或坏死单独杀伤自身或杀伤自身和邻近细胞,或者导致细胞被宿主

免疫系统杀伤。

[1730] “HLA”或“人白细胞抗原”复合物,是编码人主要组织相容性复合物(MHC)蛋白的基因复合物。构成HLA复合物的这些细胞表面蛋白负责调控对抗原的免疫反应。在人中,有两种MHC,即I类和II类,“HLA-I”和“HLA-II”。HLA-I包括三种蛋白质HLA-A、HLA-B和HLA-C,该三种蛋白质从细胞内部呈递肽,并且由HLA-I复合物呈递的抗原吸引杀伤T细胞(也称为CD8+T细胞或细胞毒性T细胞)。HLA-I蛋白与β-2微球蛋白(B2M)相关。HLA-II包括五种蛋白质,即HLA-DP、HLA-DM、HLA-DOB、HLA-DQ和HLA-DR,这五种蛋白质将来自细胞外的抗原呈递到T淋巴细胞。这会刺激CD4+T细胞(也称为辅助T细胞)。应当理解,“MHC”或“HLA”的使用并不意味着限制,因为它取决于基因是来自人(HLA)还是来自鼠(MHC)。因此,当它涉及哺乳动物细胞时,这些术语在本文中可互换使用。

[1731] 1.免疫信号传导基因座

[1732] 本文提供了一种分离的细胞或其群体,该分离的细胞或其群体包含所描述的构建体。在一些实施方案中,构建体已被引入到靶基因座中。在一些实施方案中,该基因座是选自由AAVS1基因座、CLBYL基因座、CXCR4基因座、Rosa26基因座和CCR5基因座组成的组的安全港基因座,或者选自由B2M、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-D、HLA-E、RFXANK、CIITA、CTLA-4、PD-1、RAET1E/ULBP4、RAET1G/ULBP5、RAET1H/ULBP2、RAET1/ULBP1、RAET1L/ULB P6、RAET1N/ULBP3和NKG2D的其他配体组成的组的免疫信号传导基因座。在一些实施方案中,分离的细胞是分离的经工程化的人细胞,与未经修饰的人细胞相比,该分离的经工程化人细胞进一步包含MHC I类人白细胞抗原的缺失或降低的表达和/或MHC II类人白细胞抗原的缺失或降低的表达。在一些实施方案中,分离的细胞还包含CIITA、B2M和/或NLRC5的缺失或降低表达。在一些实施方案中,分离的细胞是低免疫原性的并且是干细胞。

[1733] 在一些实施方案中,免疫信号传导基因座选自由以下组成的组:B2M、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-D、HLA-E、RFXANK、CIITA、CTLA-4、PD-1、RAET1E/ULBP4、RAET1G/ULBP5、RAET1H/ULBP2、RAET1/ULBP1、RAE11L/ULBP6、RAET1N/ULBP3和NKG2D的其他配体。

[1734] 在一些实施方案中,免疫信号传导基因座选自由B2M、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-D和HLA-E组成的组。

[1735] 在一些方面,CIITA的表达的降低或消除会降低或消除以下MHC II类中的一种或多种的表达:HLA-DP、HLA-DM、HLA-DOA、HLA-DOB、HLA-DQ和HLA-DR。

[1736] 2.条件性HIP细胞和用于条件性下调免疫抑制因子的方法

[1737] 安全开关的引入提高了使用低免疫原性细胞(HIP细胞)开发的细胞疗法的安全性。本文所述的HIP细胞的特征是一种或多种免疫调控(免疫抑制)因子的诱导型表达。在一些实施方案中,免疫抑制因子(本文也称为“低免疫性因子”或“致耐受因子”)包括但不限于CD47、CD24、CD200、HLA-G、HLA-E、HLA-C、HLA-E重链、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1抑制剂、IL-10、IL-35、FASL、Serpinb9、CCl21和Mfge8。在某些实施方案中,免疫抑制因子是CD47。免疫抑制因子的调控型或诱导型表达起到控制接受者受试者对植入的低免疫原性细胞的免疫反应的作用。

[1738] 本文描述了用于表达免疫抑制因子的方法,该方法需要以受控方式“关闭”免疫调控蛋白的表达的机制。还描述了具有一种或多种免疫抑制因子的可控表达的HIP细胞。在一些情况下,该细胞过表达一种或多种免疫抑制因子并且可以被诱导下调该一种或多种免疫

抑制因子的表达。因此,该细胞不再具有低免疫原性并且被接受者的针对细胞死亡的免疫细胞识别。在一些实施方案中,引入到接受者受试者中的细胞的低免疫性是通过免疫抑制分子(包括低免疫性因子和补体抑制剂)的过表达伴随着HLA-I和HLA-II基因座的阻遏或遗传破坏实现的。这些修饰掩蔽细胞,使其免受负责清除受感染的恶性或非自身细胞(诸如T细胞、B细胞、NK细胞和巨噬细胞)的接受者免疫系统效应细胞的影响。细胞的免受免疫系统的掩蔽允许同种异体细胞在体内存在和持续存在。经工程化的细胞从身体的受控去除对于患者的安全至关重要,并且可以通过解除细胞的免受免疫系统侵害的掩蔽来实现。解除掩蔽起到安全开关的作用,并且可以通过下调免疫抑制分子或上调免疫信号传导分子来实现。可以在细胞中的蛋白质水平、mRNA水平或DNA水平上控制所描述的免疫抑制分子中的任何免疫抑制分子的表达水平。类似地,可以在细胞中的蛋白质水平、mRNA水平或DNA水平上控制所描述的免疫信号传导分子中的任何免疫信号传导分子的表达水平。

[1739] 在一些实施方案中,所描述的安全开关方法中的任何安全开关方法(例如,蛋白质水平、RNA水平和DNA水平安全开关)被用于降低细胞中免疫抑制因子的水平,使得免疫抑制因子的较低水平低于阈值水平。在一些实施方案中,细胞中免疫抑制因子的水平被降低了低于表达阈值水平约10倍、9倍、8倍、7倍、6倍、5倍、4倍、3倍、2倍、1倍或0.5倍。在一些实施方案中,细胞中免疫抑制因子的水平被降低了低于表达阈值水平约10倍至5倍、10倍至3倍、9倍至1倍、8倍至1倍、7倍至0.5倍、6倍至1倍、5倍至0.5倍、4倍至0.5倍、3倍至0.5倍、2倍至0.5倍或1倍至0.5倍。在一些实施方案中,免疫抑制因子的表达的阈值水平是基于此种因子在诱导型多能干细胞中的表达确立的。在一些实施方案中,免疫抑制因子表达的阈值水平是基于免疫抑制因子在对应低免疫细胞(诸如MHC I和MHC II敲除细胞或MHC I/MHC II/TCR敲除细胞)中的表达水平确立的。

[1740] 3.蛋白质水平控制

[1741] 在一些实施方案中,通过将降解决定子并入到免疫抑制因子的氨基酸序列中来建立免疫抑制蛋白的受调控的降解,这允许募集到内源性蛋白周转机制。靶向蛋白质降解的机制包括但不限于募集到E3连接酶以进行泛素化和随后的蛋白酶体降解、直接募集到蛋白酶体和募集到溶酶体。

[1742] 诱导型降解决定子基序与免疫抑制分子的融合使得能够通过添加或去除使降解决定子稳定或不稳定并从而使免疫抑制分子稳定或不稳定的小分子外源性地控制免疫抑制分子的稳定性。

[1743] 在一些实施方案中,降解决定子进行诱导型蛋白质降解的方法包括但不限于使用SMASH标签的配体诱导的降解(LID)、使用Shield-1的配体诱导的降解、使用生长素的配体诱导型降解、使用雷帕霉素的配体诱导的降解、肽降解决定子(例如,基于IKZF3的降解决定子)和蛋白质水解靶向嵌合体(PROTAC)。在配体诱导的降解方法的一些实施方案中,降解决定子标签保持在非活性构象但被诱导采用在结合特定分子(诸如但不限于Shield-1分子)后能够被蛋白酶体识别的构象。参见例如Roth等人,Cellular Molecular Life Sciences,2019,76(14),2761-2777,其以引用的方式整体并入本文中。SMASH降解决定子技术的详细描述可以见于Hannah和Zhou,Nat Chem Biol,2015,11:637-638以及Chung等人,Nat Chem Biol,2015,11:713-720,它们以引用的方式整体并入本文中。LID降解决定子技术的详细描述可以见于Bonger等人,Nat Chem Biol,2011,7(8):531-7,其以引用的方式整体并入本文

中。在一些方面,提供了通过获得分离的细胞并引入含有可操作地连接到诱导型降解决定子元件(其可操作地连接到编码免疫抑制因子的基因)的组成型启动子的构建体来控制哺乳动物细胞(例如,人细胞)的免疫原性的方法。在一些实施方案中,构建体包括可操作地连接到诱导型降解决定子元件的组成型启动子,该诱导型降解决定子元件可操作地连接到编码柔性接头的核酸序列,该编码柔性接头的核酸序列可操作地连接到编码免疫抑制因子的基因。在一些实施方案中,构建体包含可操作地连接到编码免疫抑制因子的基因的组成型启动子,该编码免疫抑制因子的基因可操作地连接到诱导型降解决定子元件。在一些实施方案中,构建体包括可操作地连接到编码免疫抑制因子的基因的组成型启动子,该编码免疫抑制因子的基因可操作地连接到编码柔性接头的序列,该编码柔性接头的序列可操作地连接到诱导型降解决定子元件。因此,在细胞与降解决定子配体或分子接触后,降解决定子靶向免疫抑制因子以进行降解。

[1744] 在一些实施方案中,诱导型降解决定子元件选自由以下组成的组:配体诱导型降解决定子元件(诸如小分子辅助关闭(SMASH)降解决定子元件、Shield-1响应型降解决定子元件、生长素响应型降解决定子元件和雷帕霉素响应型降解决定子元件)、肽降解决定子元件和肽蛋白水解靶向嵌合体(PROTAC)元件。在有用的实施方案中,配体诱导型降解决定子元件是小分子辅助关闭(SMASH)降解决定子元件并且用于控制免疫原性的外源性因子是阿孙普韦。在一些实施方案中,免疫抑制因子基因选自由以下组成的组:CD47、CD24、CD200、HLA-G、HLA-E、HLA-C、HLA-E重链、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1-抑制剂、IL-10、IL-35、FASL、Serpinb9、CCl21和Mfge8。在许多实施方案中,免疫抑制因子基因是CD47。在一些情况下,构建体的组成型启动子选自由以下组成的组:EF1A启动子、EFS启动子、CMV启动子、CAGGS启动子、SV40启动子、COPIA启动子、ACT5C启动子、TRE启动子、CBh启动子、PGK启动子和UBC启动子。在一些情况下,任选的柔性接头选自由(GSG)n(SEQ ID NO:3)、(GGGS)n(SEQ ID NO:1)和(GGGSGGGS)n(SEQ ID NO:2)组成的组,其中n为1-10。在一些实施方案中,将构建体引入到细胞中以整合到安全港基因座(诸如但不限于AAVS1基因座、CLBYL基因座、CXCR4基因座、Rosa26基因座和CCR5基因座)中。在一些实施方案中,通过同源定向重组将构建体引入到细胞中的AAVS基因座中。因此,构建体包含对靶向安全港基因座具有特异性的5'和3'同源臂。在一些实施方案中,构建体从5'末端到3'末端包含:AAVS1基因座的5'同源臂、外源性组成型启动子、诱导型降解决定子元件、编码免疫抑制因子的基因和AAVS1基因座的3'同源臂。在其他实施方案中,构建体从5'末端到3'末端包含:AAVS1基因座的5'同源臂、外源性组成型启动子、诱导型降解决定子元件、编码柔性接头的序列、编码免疫抑制因子的基因和AAVS1基因座的3'同源臂。在有用的实施方案中,经工程化的细胞包含外源性核酸序列,该外源性核酸序列包含可操作地连接到诱导型降解决定子元件的组成型启动子,该诱导型降解决定子元件可操作地连接到编码柔性接头的任选序列,该柔性接头可操作地连接到编码免疫抑制因子的基因。经工程化的细胞表达与免疫抑制因子融合或连接的诱导型降解决定子元件。在一些实施方案中,细胞与活化降解决定子元件从而使免疫抑制因子降解的因子或剂(诸如但不限于配体、分子、肽或小分子)接触。

[1745] 在肽降解决定子的一些实施方案中,使用将小分子介导的募集赋予E3连接酶的肽标签。在一些实施方案中,肽标签包含以免疫调节药物(IMiD)依赖性方式募集到E3连接酶受体(CRBN)的淋巴系限制性转录因子IKZF3,如Koduri等人,Proc Natl Acad Sci,2019,

116(7),2539-2544(其以引用的方式整体并入本文中)中所述。在某些实施方案中,降解决定子能够靶向免疫抑制因子以进行降解(例如,通过泛素化途径),诱导蛋白质降解或降解蛋白质。

[1746] 在一些方面,提供了通过获得分离的细胞并引入包括组成型启动子、诱导型肽降解决定子元件和编码免疫抑制因子的基因的构建体来控制哺乳动物细胞(例如,人细胞)的免疫原性的方法。在一些实施方案中,构建体包括组成型启动子、诱导型肽降解决定子元件、编码柔性接头的核酸序列和编码免疫抑制因子的基因。本文所述的组成型启动子、免疫抑制因子、柔性接头和细胞中的任一种都适用于该方法。

[1747] 在PROTAC的一些实施方案中,使用双功能分子将免疫抑制因子募集到细胞的蛋白质降解机制。在一些实施方案中,双功能分子与表达以高亲和力与双功能分子结合的结构域的免疫抑制蛋白的原生或野生型序列或者免疫抑制蛋白的经工程化型式结合。在一些实施方案中,双功能分子包括小分子或生物制剂(例如,抗体或其片段)。参见,例如Burslem等人,Cell Chemical Biology,2018,25,67-77和Roth等人,Cellular Molecular Life Sciences,2019,76(14),2761-2777,其以引用的方式整体并入本文中。

[1748] 在双功能抗体的一些实施方案中,抗体靶向免疫抑制因子和第二内源性受体,从而导致内化和降解。一种或多种免疫抑制因子的可控表达可以通过双功能抗体(例如,化学重编程的双功能抗体)、降解决定子进行的诱导型蛋白质降解、诱导型RNA调控、诱导型DNA调控和诱导型表达方法来提供。参见例如Natsume and Kanemaki,Annu Rev Genet,2017,51,82-102;Burslem and Crews,Chem Rev,2017,117,11269-11301;Banik等人,ChemRxiv,2019;它们以引用的方式整体并入本文中。在一些实施方案中,表达免疫抑制因子的细胞与结合细胞的抗体接触以进行降解。

[1749] 在一些情况下,通过添加结合细胞外表面上的表位的抗体,免疫系统可以利用和清除低免疫细胞。表位对于过表达的免疫抑制因子可以是原生的,或者可以是位于免疫抑制因子内或明显位于细胞外表面的另一个表位。抗体与表面的结合解除了细胞的掩蔽并导致抗体依赖性细胞的细胞毒性(ADCC)或补体依赖性细胞毒性(CDC)。

[1750] 在一些实施方案中,ADCC/CDC安全开关表位选自由EGFR、CD20、CD19、CCR4、HER2、MUC1、GD2、PSMA、CD30、CD16及其片段、衍生物和变体组成的组。在一些情况下,本文所述的细胞中的任何细胞表达选自EGFR表位、CD20表位、CD19表位、CCR4表位、HER2表位、MUC1表位、GD2表位、PSMA表位、CD30表位或CD16表位的表位。在一些实施方案中,该细胞与对EGFR、CD20、CD19、CCR4、HER2、MUC1、GD2、PSMA、CD30或CD16具有特异性的抗体结合,从而导致ADCC/CDC。

[1751] 如本文所述的涉及蛋白质水平安全开关的方法提供了一种用于在本文所述的经工程化的细胞(例如,低免疫细胞)中以可调控的方式降低免疫抑制因子(例如,CD47)水平的方式。通过使用本文所述的安全开关方法中的任何安全开关方法使细胞中免疫抑制因子诸如CD47的水平下降到阈值水平以下,接受者受试者的免疫系统可以启动对此类细胞的免疫反应。在一些实施方案中,经工程化的细胞中CD47的水平被安全开关降低了低于表达阈值水平约10倍、9倍、8倍、7倍、6倍、5倍、4倍、3倍、2倍、1倍或0.5倍。在一些实施方案中,经工程化的细胞中CD47的水平被降低了低于表达阈值水平约10倍至5倍、10倍至3倍、9倍至1倍、8倍至1倍、7倍至0.5倍、6倍至1倍、5倍至0.5倍、4倍至0.5倍、3倍至0.5倍、2倍至0.5倍,或1

倍至0.5倍。在一些情况下,CD47表达的阈值水平是基于CD47在诱导型多能干细胞中的外源性表达确立的。在其他情况下,CD47表达的阈值水平是基于CD47在对应低免疫细胞(诸如MHC I和MHC II敲除细胞或MHC I/MHC II/TCR敲除细胞)中的表达水平确立的。在一些情况下,使用基于降解决定子的安全开关(诸如但不限于SMASH降解决定子或LID降解决定子)来降低CD47的水平。在一些实施方案中,将表达与外源性CD47转基因连接的SMASH降解决定子的细胞暴露于小分子阿孙普韦(降解决定子诱导剂),从而诱导该细胞对外源性CD47的表达的降低。

[1752] 4.RNA水平控制

[1753] 免疫抑制因子可以被siRNA或miRNA靶向,从而导致编码这些因子的转录物被降解。可以外源性提供或遗传编码siRNA以提供对抑制性RNA转录的控制。siRNA或miRNA可以与免疫抑制因子的转录物退火,导致被RISC复合物降解。

[1754] 在一些实施方案中,用于下调免疫抑制因子的表达的诱导型RNA调控方法包括但不限于由小分子或生物制剂诱导的shRNA、诱导型siRNA、诱导型miRNA、诱导型CRISPR干扰(CRISPRi)和诱导型RNA靶向核酸酶。

[1755] 在一些实施方案中,该方法包括靶向免疫抑制因子的RNA的shRNA或siRNA。在一些情况下,shRNA或siRNA的表达由小分子或生物制剂诱导。

[1756] 在一些方面,提供了通过获得分离的细胞并引入含有可操作地连接到靶向免疫抑制因子的shRNA序列(该shRNA序列可操作地组成型启动子,该组成型启动子可操作地连接到可以控制诱导型RNA聚合酶启动子的反式活化因子元件)的诱导型RNA聚合酶启动子的构建体来控制哺乳动物细胞(例如,人细胞)的免疫原性的方法。在一些实施方案中,构建体包括U6Tet启动子、靶向免疫抑制因子的shRNA、组成型启动子和对四环素或其衍生物(例如,多西环素)有响应的Tet阻遏子元件。在其他情况下,shRNA消除了免疫抑制因子的表达。在其他情况下,shRNA使免疫抑制因子的表达降低了约99%或更少,例如99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、90%、85%或更少。在一些实施方案中,诱导型启动子是四环素响应性启动子。本文所述的组成型启动子、免疫抑制因子和细胞中的任一种都适用于该方法。

[1757] 在许多实施方案中,经工程化的细胞表达靶向免疫抑制因子的诱导型shRNA。在一些实施方案中,该细胞还表达介导细胞的低免疫原性的外源性免疫抑制因子。在一些实施方案中,该细胞与活化shRNA表达从而使免疫抑制因子降解的因子(诸如但不限于配体、分子、肽或小分子)接触。

[1758] 在一些实施方案中,该方法包括用于靶向免疫抑制因子的启动子以下调其转录的CRISPR干扰系统(CRISPRi)。在一些情况下,CRISPRi的表达和/或靶向免疫抑制因子的gRNA的表达由小分子或生物制剂诱导。CRISPRi方法的详细描述见于例如Engreitz等人,Cold Spring Harb Perspect Biol,2019,11:a035386,其以引用的方式整体并入本文中。在一些实施方案中,CRISPRi系统利用由组成型启动子控制的dCas9-阻遏子融合蛋白和在诱导型启动子控制下对免疫抑制因子具有特异性的gRNA。

[1759] 在一些方面,提供了通过获得分离的细胞并向细胞中引入以下项来控制哺乳动物细胞(例如,人细胞)的免疫原性的方法:(i)第一构建体,该第一构建体含有可操作地连接到编码免疫抑制因子的基因的组成型启动子;(ii)第二构建体,该第二构建体含有可操作

地连接到编码Cas9核酸酶或其变体(诸如dCas9-阻遏子融合蛋白)的基因的组成型启动子;以及(iii)第三构建体,该第三构建体包含诱导型RNA聚合酶启动子,该诱导型RNA聚合酶启动子可操作地连接到靶向编码免疫抑制因子的序列的gRNA序列,使得gRNA序列可操作地连接到对应于诱导型RNA聚合酶启动子的反式活化因子元件。在一些情况下,第一构建体、第二构建体和第三构建体存在于单个载体中。在一些情况下,第一构建体、第二构建体和第三构建体存在于两个载体中。

[1760] 在一些实施方案中,基于CRISPR的方法包括用于靶向对应于免疫抑制因子(诸如但不限于Cas13、Cas7或Csx1)的mRNA序列的核酸酶。在一些情况下,核酸酶的表达和/或靶向免疫抑制因子的gRNA的表达由小分子或生物制剂诱导。

[1761] 在一些方面,提供了通过获得分离的细胞并向细胞中引入以下项来控制哺乳动物细胞(例如,人细胞)的免疫原性的方法:(i)第一构建体,该第一构建体包含可操作地连接到编码免疫抑制因子的基因的组成型启动子;(ii)第二构建体,该第二构建体包含可操作地连接到编码Cas13a核酸酶、其变体或其融合蛋白的基因的组成型启动子;以及(iii)第三构建体,该第三构建体包含诱导型RNA聚合酶启动子,该诱导型RNA聚合酶启动子可操作地连接到靶向编码免疫抑制因子的序列的gRNA序列,使得gRNA序列可操作地连接到对应于诱导型RNA聚合酶启动子的反式活化因子元件。

[1762] 在一些实施方案中,可用于免疫抑制因子的RNA水平控制的诱导型表达系统包括但不限于配体诱导型转录因子系统、受体介导的表达控制系统和配体调控的核糖开关。在一些实施方案中,诱导型表达系统包括四环素控制的操纵子系统、合成的基于Notch的(SynNotch)系统(参见例如Morsut等人,Cell,2016,164:780-791和Yang等人,Commun Biol,2020,3:116)和通过配体(例如,适体、肽或小分子)介导的所得前体mRNA的选择性剪接来调控免疫抑制因子基因的表达的核糖开关。有用的核糖开关包括感应配体的存在并改变靶免疫抑制因子基因的剪接的感应区和效应区。核糖开关gRNA的详细描述和实例见于例如US 9,228,207、US 9,993,491和US10,421,989,以及Seeliger等人,PLoS One,2012,7(1):e29266;这些文献的内容以引用的方式整体并入本文中。

[1763] 在一些实施方案中,经工程化的细胞中免疫抑制因子诸如CD47的水平被RNA水平安全开关降低了低于表达阈值水平约10倍、9倍、8倍、7倍、6倍、5倍、4倍、3倍、2倍、1倍或0.5倍。在一些实施方案中,经工程化的细胞中CD47的水平被降低了低于表达阈值水平约10倍至5倍、10倍至3倍、9倍至1倍、8倍至1倍、7倍至0.5倍、6倍至1倍、5倍至0.5倍、4倍至0.5倍、3倍至0.5倍、2倍至0.5倍,或1倍至0.5倍。在一些情况下,CD47表达的阈值水平是基于CD47在诱导型多能干细胞中的外源性表达确立的。在其他情况下,CD47表达的阈值水平是基于CD47在对应低免疫细胞(诸如MHC I和MHC II敲除细胞或MHC I/MHC II/TCR敲除细胞)中的表达水平确立的。

[1764] 5.DNA水平控制

[1765] 通过使用诱导型启动子对免疫抑制因子进行转录调控提供了通过添加或去除小分子(诸如但不限于多西环素)随意开启或关闭开关的表达的能力。经由靶向核酸酶活性进行遗传破坏也可以消除免疫抑制因子的表达以解除细胞的掩蔽。

[1766] 在一些实施方案中,用于诱导型DNA调控的方法包括但不限于使用组织特异性启动子、诱导型启动子、可控核糖开关,以及使用诱导型核酸酶(例如,诱导型CRISPR、诱导型

TALEN、诱导型锌指核酸酶、诱导型归巢核酸内切酶、诱导型大范围核酸酶等)靶向一种或多种免疫抑制因子的DNA序列来进行的敲除。在一些实施方案中,诱导型核酸酶包含核酸酶,使得其表达受小分子的存在控制。在一些实施方案中,诱导型核酸酶包含核酸酶,使得核酸酶RNA或蛋白质向细胞的递送受小分子的存在控制。在一些实施方案中,核酸酶的表达由小分子或生物制剂诱导。在一些实施方案中,Cas核酸酶和/或指导RNA(gRNA)的表达由小分子或生物制剂诱导。

[1767] 在一些实施方案中,用于诱导型表达的方法包括但不限于配体诱导型转录因子系统(例如,四环素控制的操纵子系统)、受体介导的表达系统控制(例如,SynNotch系统)和配体调控的用于控制mRNA或gRNA活性的核糖开关系统。诱导型表达方法的详细描述见于例如Kallunki等人,Cells,2019,796(doi:10.3390/cells8080796),其以引用的方式整体并入本文中。

[1768] 在一些实施方案中,使用诱导型表达载体在细胞中表达免疫抑制因子。表达载体可以是病毒载体,诸如但不限于慢病毒载体。在一些实施方案中,通过慢病毒转导将本文所述的诱导型免疫抑制因子引入到细胞中。

[1769] 在一些实施方案中,编码免疫抑制因子的构建体的沉默导致经工程化的细胞被接受者受试者的免疫系统消除。此外,可以将含有免疫抑制因子和诱导型表达系统的构建体整合到内源性基因座中以保护盒的表达,因为基因的沉默将消除经工程化的细胞。在一些实施方案中,可用于整合的内源性基因座是核心必需基因座或免疫信号传导因子基因座。用于此种整合的核心必需基因座的非限制性实例包括RpS2、RpS9、RpS11、RpS13、RpS18、RpL8、RpL11、RpL32、RpL36、Rpn11、Psmd14和PSMA3。用于此种整合的免疫信号传导因子基因座的非限制性实例包括B2M、MIC-A/B、HLA-A、HLA-B、HLA-C、RFXANK、CTLA4、PD1和NKG2D的配体(例如,MICA、MICB、RAET1E/ULBP4、RAET1G/ULBP5、RAET1H/ULBP2、RAET1/ULBP1、RAET1L/ULBP6和RAET1N/ULBP3)。

[1770] 在一些实施方案中,免疫抑制因子的条件性表达基于调控免疫调控因子CD47的表达。CD47是先天免疫系统的组分,其作为先天免疫系统的一部分发挥“不要吃掉我”信号的作用,从而阻断巨噬细胞的吞噬作用。可以被工程化用于受控表达的有用免疫抑制因子包括但不限于CD47、CD27、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重链、HLA-G、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1抑制剂、IL-10、IL-35、FASL、Serpinb9、CCL21和Mfge8。

[1771] 在一些实施方案中,本公开提供了一种产生已被修饰为条件性表达选自由以下组成的组的免疫抑制因子中的任何一种免疫抑制因子的干细胞(例如,低免疫原性多能干细胞或低免疫原性诱导型多能干细胞)或其分化细胞的方法:CD47、CD27、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重链、HLA-G、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1抑制剂、IL-10、IL-35、FASL、Serpinb9、CCL21和Mfge8。在其他实施方案中,免疫抑制因子选自由以下组成的组:HLA-A、HLA-B、HLA-C、RFX-ANK、CIITA、NFY-A、NLRC5、B2M、RFX5、RFX-AP、HLA-G、HLA-E、NFY-B、PD-L1、NFY-C、IRF1、TAP1、GITR、4-1BB、CD28、B7-1、CD47、B7-2、OX40、CD27、HVEM、SLAM、CD226、ICOS、LAG3、TIGIT、TIM3、CD160、BTLA、CD244、LFA-1、ST2、HLA-F、CD30、B7-H3、VISTA、TLT、PD-L2、CD58、CD2和HELIOS。

[1772] 在一些实施方案中,细胞条件性表达这些免疫抑制因子中的一种或多种免疫抑制因子,使得在不存在外源性控制信号的情况下,细胞是低免疫原性的或具有降低的低免疫

原性。在存在外源性控制信号的情况下,细胞被免疫细胞识别并被细胞死亡或清除靶向。在一些情况下,HIP细胞表达免疫抑制因子,该免疫抑制因子的功能允许HIP细胞逃避接受者受试者的免疫反应。在将HIP细胞暴露于外源性控制信号后,免疫抑制因子的表达(例如,DNA水平表达、RNA水平表达或蛋白质水平表达)被下调,因此HIP细胞被接受者受试者体内的先天免疫系统识别。因此,HIP细胞在接受者中经历细胞死亡和/或细胞清除。

[1773] 在一些实施方案中,经工程化的细胞中免疫抑制因子诸如CD47的水平被DNA水平安全开关降低了低于表达阈值水平约10倍、9倍、8倍、7倍、6倍、5倍、4倍、3倍、2倍、1倍或0.5倍。在一些实施方案中,经工程化的细胞中CD47的水平被降低了低于表达阈值水平约10倍至5倍、10倍至3倍、9倍至1倍、8倍至1倍、7倍至0.5倍、6倍至1倍、5倍至0.5倍、4倍至0.5倍、3倍至0.5倍、2倍至0.5倍,或1倍至0.5倍。在一些情况下,CD47表达的阈值水平是基于CD47在诱导型多能干细胞中的外源性表达确立的。在其他情况下,CD47表达的阈值水平是基于CD47在对应低免疫细胞(诸如MHC I和MHC II敲除细胞或MHC I/MHC II/TCR敲除细胞)中的表达水平确立的。

[1774] 6.条件性HIP细胞和用于条件性上调免疫信号传导因子的方法

[1775] 本文描述了以可控方式表达免疫信号传导因子以增加该因子的表达从而改变细胞的低免疫原性的方法。还描述了具有一种或多种免疫信号传导因子的可控表达的HIP细胞。在一些方面,免疫信号传导因子选自由以下组成的组:B2M、MIC-A/B、HLA-A、HLA-B、HLA-C、RFXANK、CTLA-4、PD-1和NKG2D的配体(例如,MICA、MICB、RAET1E/ULBP4、RAET1G/ULBP5、RAET1H/ULBP2、RAET1/ULBP1、RAET1L/ULBP6和RAET1N/ULBP3)。

[1776] 一种或多种免疫信号传导因子的可控表达可以通过使用降解决定子的诱导型配体稳定系统、诱导型RNA上调系统(例如,诱导型CRISPR活化)和诱导型DNA上调系统来提供。在一些实施方案中,诱导型DNA上调系统包含诱导型CRISPR活化(CRISPRa)、组织特异性启动子、诱导型启动子和核糖开关。

[1777] CRISPRa方法的详细描述见于例如Engreitz等人,Cold Spring Harb Perspect Biol,2019,11:a035386,其以引用的方式整体并入本文中。诱导型核糖开关的详细描述和实例见于例如US 9,228,207、US 9,993,491和US10,421,989,以及Seeliger等人,PLoS One,2012,7(1):e29266;它们的内容以引用方式整体并入本文中。

[1778] 在通过遗传、转录后和翻译后调控解除低免疫细胞的掩蔽的实例中,低免疫性是通过低免疫分子(诸如CD47)、补体抑制剂的过表达伴随着HLA-I和HLA-II基因座的阻遏或遗传破坏来实现的。这些修饰掩蔽细胞,使其免受负责清除受感染的恶性或非自身细胞(诸如T细胞、B细胞、NK细胞和巨噬细胞)的免疫系统效应细胞的影响。细胞的免受免疫系统的掩蔽允许同种异体细胞在体内存在和持续存在。从身体内移除经工程化的细胞对于患者安全至关重要并且可以通过解除细胞的免受免疫系统侵害的掩蔽来实现。解除掩蔽起到安全开关的作用,并且可通过下调低免疫分子(例如CD47、CD27、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重链、HLA-G、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1-抑制剂、IL-10、IL-35、FASL、Serpinb9、CCL21或Mfge8)或上调免疫信号传导分子(例如B2M、MIC-A/B、HLA-A、HLA-B、HLA-C、RFXANK、CTLA-4、PD-1和NKG2D配体(例如MICA、MICB、RAET1E/ULBP4、RAET1G/ULBP5、RAET1H/ULBP2、RAET1/ULBP1、RAET1L/ULBP6或RAET1N/ULBP3)来实现。这些活动中的任一个都将使细胞利用原生效应细胞,从而清除同种异体细胞。

[1779] X.经工程化的细胞群体和药物组合物

[1780] 如本文其他部分所述,在制造细胞疗法的过程中,可将某些修饰引入到细胞中。本文提供了含有多个所提供的经工程化的细胞的细胞群体。本文还提供了含有多个经工程化的细胞的细胞群体。

[1781] 在'最终'细胞群体,即在细胞疗法产品(药物组合物)中使用的细胞群体中,未经编辑或经部分编辑的细胞可能被视为可能对细胞疗法产品的功能产生不利影响的污染物。在一些情况下,经编辑的细胞的百分比可被视为相对于群体中经编辑的细胞与未经编辑的细胞或经部分编辑的细胞的比例的纯度度量。这尤其与能够实现免疫逃避的低免疫基因修饰有关,其中不具有低免疫基因修饰的细胞的存在预计可能会对细胞疗法产品的体内功效产生不利影响。令人惊讶的是,正如本发明人所证明的那样,即使细胞群体含有未经编辑的或经部分编辑的细胞,细胞群体内的经工程化的细胞也可能具有功能。因此,据此提供了一种包含细胞群体的新型细胞疗法产品,其中该细胞群体含有一些未经编辑的或经部分编辑的细胞。

[1782] 在一些实施方案中,群体中高达20%、高达30%、高达40%、高达50%、高达60%或高达65%的细胞不是经HIP修饰的细胞(例如,没有表现出降低的MHC I类和/或MHC II类分子中的一种或多种分子的表达,并且任选地也没有表现出增加的至少一种致耐受因子的表达)。

[1783] 在一些实施方案中,细胞疗法产品中高达20%、高达30%、高达40%、高达50%、高达60%或高达65%的细胞没有表现出降低的MHC I类和/或MHC II类分子中的一种或多种分子的表达。在一些实施方案中,细胞疗法产品中高达20%、高达30%、高达40%、高达50%、高达60%或高达65%的细胞(i)没有表现出降低的MHC I类和/或MHC II类分子中的一种或多种分子的表达,并且(ii)也没有表现出增加的至少一种致耐受因子的表达。在这些实施方案的任何一个中,细胞疗法产品中表达CAR的细胞的比例可以在70-100%、80-100%、90-100%的范围内。在一些实施方案中,细胞疗法产品中至少10%、至少20%、30%、40%、50%、60%或70%的细胞没有表现出降低的MHC I类和/或MHC II类分子中的一种或多种分子的表达。在一些实施方案中,细胞疗法产品中至少10%、至少20%、30%、40%、50%、60%,或70%的细胞(i)没有表现出降低的MHC I类和/或MHC II类分子中的一种或多种分子的表达,并且(ii)没有表现出增加的至少一种致耐受因子的表达。在这些实施方案的任何一个中,细胞疗法产品中表达CAR的细胞的比例可以在70-100%、80-100%、90-100%的范围内。

[1784] 在一些实施方案中,群体中至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%或99.99%的细胞包含本文所述的修饰的集合。在一些实施方案中,该修饰的集合降低了MHC I类和/或MHC II类分子中的一种或多种分子的表达并且增加了至少一种致耐受因子(诸如本文所述的致耐受因子)的表达。在一些实施方案中,该修饰的集合降低了MHC I类和/或MHC II类分子中的一种或多种分子的表达并且增加了至少一种致耐受因子(诸如本文所述的致耐受因子)的表达并且并入了CAR基因。在一些实施方案中,该修饰的集合降低了MHC I类和/或MHC II类分子中的一种或多种分子的表达,并并入了CAR转基因。

[1785] 在一些实施方案中,群体中至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、

96％、97％、98％、99％、99.9％或99.99％的细胞包含降低一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子的表达,以及增加一种或多种致耐受因子的表达的修饰的集合。在一些实施方案中,该一种或多种致耐受因子是以下中的一种或多种:A20/TNFAIP3、B2M-HLA-E、CD16、CD16 Fc受体、CD24、CD27、CD35、CD39、CD46、CD47、CD52、CD55、CD59、CD64、CD200、CCL21、CCL22、CTLA4-Ig、C1抑制剂、CR1、DUX4、FASL、HLA-C、HLA-E、HLA-E重链、HLA-F、HLA-G、H2-M3、IDO1、IL-10、IL15-RF、IL-35、IL-39、MANF、Mfge8、PD-L1、Serpinb9,或其任何组合。在一些实施方案中,该一种或多种致耐受因子是CD47。在一些实施方案中,群体中至少30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、95％、96％、97％、98％、99％、99.9％或99.99％的细胞包含编码CD47的外源性多核苷酸。

[1786] 在一些实施方案中,群体中至少30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、95％、96％、97％、98％、99％、99.9％或99.99％的细胞包含一种或多种使B2M基因的两个等位基因失活的改变。在一些实施方案中,群体中至少30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、95％、96％、97％、98％、99％、99.9％或99.99％的细胞包含一种或多种使CIITA基因的两个等位基因失活的改变。

[1787] 在一些实施方案中,细胞疗法产品中高达40％的细胞没有表现出降低的MHC I类和/或MHC II类分子中的一种或多种分子的表达,并且细胞疗法产品中表达CAR的细胞的比例在70-100％、80-100％、90-100％的范围内。在一些实施方案中,细胞疗法产品中高达50％的细胞没有表现出降低的MHC I类和/或MHC II类分子中的一种或多种分子的表达,并且细胞疗法产品中表达CAR的细胞的比例在70-100％、80-100％、90-100％的范围内。在一些实施方案中,细胞疗法产品中高达60％的细胞没有表现出降低的MHC I类和/或MHC II类分子中的一种或多种分子的表达,并且细胞疗法产品中表达CAR的细胞的比例在70-100％、80-100％、90-100％的范围内。

[1788] 在一些实施方案中,细胞疗法产品中至少40％的细胞(i)没有表现出降低的MHC I类和/或MHC II类分子中的一种或多种分子的表达,并且(ii)没有表现出增加的至少一种致耐受因子的表达,并且细胞疗法产品中表达CAR的细胞的比例在70-100％、80-100％、90-100％的范围内。在一些实施方案中,细胞疗法产品中至少50％的细胞(i)没有表现出降低的MHC I类和/或MHC II类分子中的一种或多种分子的表达,并且(ii)没有表现出增加的至少一种致耐受因子的表达,并且细胞疗法产品中表达CAR的细胞的比例在70-100％、80-100％、90-100％的范围内。在一些实施方案中,细胞疗法产品中至少60％的细胞(i)没有表现出降低的MHC I类和/或MHC II类分子中的一种或多种分子的表达,并且(ii)没有表现出增加的至少一种致耐受因子的表达,并且细胞疗法产品中表达CAR的细胞的比例在70-100％、80-100％、90-100％的范围内。

[1789] 在一些实施方案中,群体中包含如本文所述的修饰的集合的细胞的比例为30-90％、30-80％、30-70％、30-60％、30-50％或40-50％。在一些实施方案中,群体中包含如本文所述的修饰的集合的细胞的比例为40-90％、40-80％、40-70％、40-60％或40-50％。在一些实施方案中,群体中包含如本文所述的修饰的集合的细胞的比例为50-90％、50-80％、50-70％或50-60％。

[1790] 在一些实施方案中,细胞治疗产品中30-90％、30-80％、30-70％、30-60％、30-50％或40-50％的细胞是经HIP修饰的细胞(例如,表现出降低的MHC I类和/或MHC II类分

子中的一种或多种分子的表达,以及任选的增加的至少一种致耐受因子的表达)。在一些实施方案中,细胞治疗产品中40-90%、40-80%、40-70%、40-60%或40-50%的细胞是经HIP修饰的细胞(例如,表现出降低的MHC I类和/或MHC II类分子中的一种或多种分子的表达,以及任选的增加的至少一种致耐受因子的表达)。在一些实施方案中,细胞治疗产品中50-90%、50-80%、50-70%或50-60%的细胞是经HIP修饰的细胞(例如,表现出降低的MHC I类和/或MHC II类分子中的一种或多种分子的表达,以及任选的增加的至少一种致耐受因子的表达)。在这些实施方案中的任一个中,细胞疗法产品中表达CAR的细胞的比例可以在70-100%、80-100%、90-100%的范围内。

[1791] 在一些实施方案中,细胞疗法产品中的30-80%的细胞是表现出降低的MHC I类和/或MHC II类分子中的一种或多种分子的表达的经HIP修饰的细胞,并且80-100%的细胞表达CAR。在一些实施方案中,细胞疗法产品中的30-70%的细胞是表现出降低的MHC I类和/或MHC II类分子中的一种或多种分子的表达的经HIP修饰的细胞,并且80-100%的细胞表达CAR。在一些实施方案中,细胞疗法产品中的30-60%的细胞是表现出降低的MHC I类和/或MHC II类分子中的一种或多种分子的表达的经HIP修饰的细胞,并且80-100%的细胞表达CAR。在一些实施方案中,细胞疗法产品中的30-50%的细胞是表现出降低的MHC I类和/或MHC II类分子中的一种或多种分子的表达的经HIP修饰的细胞,并且80-100%的细胞表达CAR。

[1792] 在一些实施方案中,细胞疗法产品中的30-80%的细胞是表现出降低的MHC I类和/或MHC II类分子中的一种或多种分子的表达以及增加的至少一种致耐受因子的表达的经HIP修饰的细胞,并且90-100%的细胞表达CAR。在一些实施方案中,细胞疗法产品中的30-70%的细胞是表现出降低的MHC I类和/或MHC II类分子中的一种或多种分子的表达以及增加的至少一种致耐受因子的表达的经HIP修饰的细胞,并且90-100%的细胞表达CAR。在一些实施方案中,细胞疗法产品中的30-60%的细胞是表现出降低的MHC I类和/或MHC II类分子中的一种或多种分子的表达以及增加的至少一种致耐受因子的表达的经HIP修饰的细胞,并且90-100%的细胞表达CAR。在一些实施方案中,细胞疗法产品中的30-50%的细胞是表现出降低的MHC I类和/或MHC II类分子中的一种或多种分子的表达以及增加的至少一种致耐受因子的表达的经HIP修饰的细胞,并且90-100%的细胞表达CAR。

[1793] 在一些实施方案中,细胞疗法产品中的30-80%的细胞是表现出降低的MHC I类和/或MHC II类分子中的一种或多种分子的表达以及增加的至少一种致耐受因子的表达的经HIP修饰的细胞,并且80-100%的细胞表达CAR。在一些实施方案中,细胞疗法产品中的30-70%的细胞是表现出降低的MHC I类和/或MHC II类分子中的一种或多种分子的表达以及增加的至少一种致耐受因子的表达的经HIP修饰的细胞,并且80-100%的细胞表达CAR。在一些实施方案中,细胞疗法产品中的30-60%的细胞是表现出降低的MHC I类和/或MHC II类分子中的一种或多种分子的表达以及增加的至少一种致耐受因子的表达的经HIP修饰的细胞,并且80-100%的细胞表达CAR。在一些实施方案中,细胞疗法产品中的30-50%的细胞是表现出降低的MHC I类和/或MHC II类分子中的一种或多种分子的表达以及增加的至少一种致耐受因子的表达的经HIP修饰的细胞,并且80-100%的细胞表达CAR。

[1794] 在一些实施方案中,细胞疗法产品中的30-80%的细胞是表现出降低的MHC I类和/或MHC II类分子中的一种或多种分子的表达以及增加的至少一种致耐受因子的表达的

经HIP修饰的细胞,并且90-100％的细胞表达CAR。在一些实施方案中,细胞疗法产品中的30-70％的细胞是表现出降低的MHC I类和/或MHC II类分子中的一种或多种分子的表达以及增加的至少一种致耐受因子的表达的经HIP修饰的细胞,并且90-100％的细胞表达CAR。在一些实施方案中,细胞疗法产品中的30-60％的细胞是表现出降低的MHC I类和/或MHC II类分子中的一种或多种分子的表达以及增加的至少一种致耐受因子的表达的经HIP修饰的细胞,并且90-100％的细胞表达CAR。在一些实施方案中,细胞疗法产品中的30-50％的细胞是表现出降低的MHC I类和/或MHC II类分子中的一种或多种分子的表达以及增加的至少一种致耐受因子的表达的经HIP修饰的细胞,并且90-100％的细胞表达CAR。

[1795] 本文还提供了包含经工程化的细胞或经工程化的细胞群体的组合物。在一些实施方案中,组合物是药物组合物。

[1796] 在一些实施方案中,本文提供的药物组合物进一步包含药学上可接受的赋形剂或载剂。可接受的载剂、赋形剂或稳定剂在所采用的剂量和浓度下对接受者是无毒的,并且包括缓冲剂,如磷酸盐、柠檬酸盐及其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯化六烃季铵;苯扎氯铵、苄索氯铵;苯酚、丁醇或苄醇;对羟基苯甲酸烷基酯,如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖及其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,如EDTA;糖,如蔗糖、甘露糖醇、海藻糖或山梨糖醇;成盐抗衡离子,如钠;金属络合物(例如,Zn-蛋白质络合物);和/或非离子表面活性剂,如聚山梨醇酯(TWEEN™)、泊洛沙姆(PLURONICS™)或聚乙二醇(PEG)。在一些实施方案中,药物组合物包含药学上可接受的缓冲液(例如,中性缓冲盐水或磷酸盐缓冲盐水)。在一些实施方案中,药物组合物可以含有用于改变、维持或保持例如组合物的pH、渗透压、粘度、透明度、颜色、等渗性、气味、无菌性、稳定性、溶解或释放速率、吸附或渗透的一种或多种赋形剂。在一些方面,技术人员理解含有细胞的药物组合物可以不同于含有蛋白质的药物组合物。

[1797] 术语“药物制剂”是指这样的制备物,该制备物呈允许包含在其中的活性成分的生物活性有效的形式,并且不含对将施用制剂的受试者具有不可接受的毒性的另外的组分。

[1798] “药学上可接受的载剂”是指药物制剂中的除活性成分以外的对受试者无毒的成分。药学上可接受的载剂包括但不限于缓冲剂、赋形剂、稳定剂或防腐剂。

[1799] 在一些实施方案中,药物组合物含有有效治疗或预防疾病或疾患的量(诸如治疗有效量或预防有效量)的如本文所述的经工程化的细胞。在一些实施方案中,药物组合物含有有效治疗或预防疾病或疾患的量(诸如治疗有效量或预防有效量)的如本文所述的经工程化的细胞。在一些实施方案中,通过对受治疗的受试者进行定期评估来监测治疗或预防功效。对于在几天或更长时间内的重复施用,根据病情重复治疗,直到出现疾病症状的所需抑制。然而,其他剂量方案可能是有用的,并且可以被确定。可以通过组合物的单次弹丸式施用、通过组合物的多次弹丸式施用或通过组合物的连续输注施用来递送所需剂量。

[1800] 在一些实施方案中,使用标准施用技术、制剂和/或装置来施用如本文所述的经工程化的细胞。在一些实施方案中,使用标准施用技术、制剂和/或装置来施用如本文所述的经工程化的细胞。提供了用于储存和施用组合物的制剂和装置,诸如注射器和小瓶。经工程

化的细胞可以经由局部注射(包括导管施用)、全身性注射、局部注射、静脉内注射或肠胃外施用来施用。当施用治疗组合物(例如,含有经工程化的细胞的药物组合物)时,通常将其配制为单位剂量可注射形式(溶液、悬浮液、乳液)。

[1801] 制剂包括用于静脉内、腹膜内或皮下施用的制剂。在一些实施方案中,细胞群体是胃肠外施用的。如本文所用,术语"胃肠外"包括静脉内、肌内、皮下、直肠、阴道和腹膜内施用。在一些实施方案中,使用通过静脉内、腹膜内或皮下注射进行的外周全身性递送向受试者施用细胞群体。

[1802] 在一些实施方案中,组合物是作为无菌液体制备物(例如等渗水溶液、悬浮液、乳液或分散体)提供的,该无菌液体制备物在一些方面可以被缓冲至选定的pH。液体组合物在某种程度上更便于施用,特别是通过注射施用。液体组合物可以包含载剂,该载剂可以是含有例如水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、多元醇(例如甘油、丙二醇、液体聚乙二醇)及其合适的混合物的溶剂或分散介质。无菌注射溶液可以通过将细胞并入在溶剂,诸如与合适的载剂、稀释剂或赋形剂(诸如无菌水、生理盐水、葡萄糖、右旋糖等)混合的溶剂中来制备。

[1803] 在一些实施方案中,药学上可接受的载剂可包括与药物施用相容的所有溶剂、分散介质、包衣、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等(Gennaro,2000,Remington:The science and practice of pharmacy,Lippincott,Williams&Wilkins,Philadelphia,PA)。此类载剂或稀释剂的实例包括但不限于水、盐水、林格氏溶液(Ringer's solution)、右旋糖溶液和5%人血清白蛋白。也可以使用脂质体和非水性媒介物诸如固定油。补充性活性化合物也可以并入到组合物中。药物载剂应该是适合于经工程化的细胞的药物载剂,诸如盐水溶液、右旋糖溶液或包含人血清白蛋白的溶液。在一些实施方案中,此类组合物的药学上可接受的载剂或媒介物是任何无毒的水性溶液,其中经工程化的细胞可以被维持或保持能存活足以允许施用活细胞的时间。例如,药学上可接受的载剂或媒介物可以是盐水溶液或缓冲盐水溶液。

[1804] 在一些实施方案中,组合物(包括药物组合物)是无菌的。在一些实施方案中,细胞的分离、富集或培养在封闭或无菌环境中(例如在无菌培养袋中)进行,以最大程度地减少错误、用户操纵和/或污染。在一些实施方案中,例如通过经过无菌过滤膜过滤可以容易地实现无菌。在一些实施方案中,使用透气培养器皿进行培养。在一些实施方案中,使用生物反应器进行培养。

[1805] 在一些实施方案中,本文提供的细胞和组合物可以被储存。在一些实施方案中,本文提供的细胞和组合物可以被储存1-72小时。在一些实施方案中,本文提供的细胞和组合物可以被储存1-7天。在一些实施方案中,本文提供的细胞和组合物可以被储存1-5周。在一些实施方案中,本文提供的细胞和组合物可以被储存1-12个月。在一些实施方案中,本文提供的细胞和组合物可以被储存1-30年。

[1806] 在一些实施方案中,本文提供的细胞和组合物可以在它们已从供体或供体集合中收集后被储存。在一些实施方案中,本文提供的细胞和组合物可以在制造之前被储存。在一些实施方案中,本文提供的细胞和组合物可以在开始制造之后被储存。在一些实施方案中,本文提供的细胞和组合物可以在完成制造过程的1、2、3、4、5、6、7、8、9、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个步骤之后被储存。在一些实施方案中,本文提供的细胞和组合物可以在完成制造过程的一个或多个步骤之后被储存。在一些实施方案中,本文提供的细胞和组合

物可以在完成制造过程之后被储存。在一些实施方案中,本文提供的细胞和组合物可以在修饰之前被储存。在一些实施方案中,本文提供的细胞和组合物可以在开始修饰之后被储存。在一些实施方案中,本文提供的细胞和组合物可以在完成1、2、3、4、5、6、7、8、9、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20次修饰后被储存。在一些实施方案中,本文提供的细胞和组合物可以在完成1次或多次修饰之后被储存。在一些实施方案中,本文提供的细胞和组合物可以在完成修饰之后被储存。在一些实施方案中,本文提供的细胞和组合物可以在基因编辑之前被储存。在一些实施方案中,本文提供的细胞和组合物可以在开始基因编辑之后被储存。在一些实施方案中,本文提供的细胞和组合物可以在完成1、2、3、4、5、6、7、8、9、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20次基因编辑之后被储存。在一些实施方案中,本文提供的细胞和组合物可以在完成1次或多次基因编辑之后被储存。在一些实施方案中,本文提供的细胞和组合物可以在完成基因编辑之后被储存。在一些实施方案中,本文提供的细胞和组合物可以在病毒转导之前被储存。在一些实施方案中,本文提供的细胞和组合物可以在开始病毒转导之后被储存。在一些实施方案中,本文提供的细胞和组合物可以在完成1、2、3、4、5、6、7、8、9、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20次病毒转导后被储存。在一些实施方案中,本文提供的细胞和组合物可以在完成1次或多次病毒转导之后被储存。在一些实施方案中,本文提供的细胞和组合物可以在完成病毒转导之后被储存。

[1807] 在一些实施方案中,该细胞和组合物可以被储存在液氮中。在一些实施方案中,该细胞和组合物可以被储存在-80℃的冰箱中。在一些实施方案中,该细胞和组合物可以被储存在-20℃的冰箱中。在一些实施方案中,该细胞和组合物可以被储存在冰上。在一些实施方案中,该细胞和组合物可以被储存在干冰上。在一些实施方案中,该细胞和组合物可以被储存在4℃的致冷器中。

[1808] 本文还提供了适用于冷冻保存所提供的经工程化的细胞的组合物。在一些实施方案中,提供的经工程化的细胞冷冻保存在冷冻保存介质中。在一些实施方案中,冷冻保存介质是无血清冷冻保存介质。在一些实施方案中,组合物包含冷冻保护剂。在一些实施方案中,冷冻保护剂是或者包含DMSO和/或甘油。在一些实施方案中,冷冻保存介质是在5%或约5%与10%或约10%之间的DMSO(体积/体积)。在一些实施方案中,冷冻保存介质是5% DMSO(体积/体积)或者约5% DMSO(体积/体积)。在一些实施方案中,冷冻保存介质是6% DMSO(体积/体积)或者约6% DMSO(体积/体积)。在一些实施方案中,冷冻保存介质是7% DMSO(体积/体积)或约7% DMSO(体积/体积)。在一些实施方案中,冷冻保存介质是7.5% DMSO(体积/体积)或者约7.5% DMSO(体积/体积)。在一些实施方案中,冷冻保存介质是8% DMSO(体积/体积)或者约8%DMSO(体积/体积)。在一些实施方案中,冷冻保存介质是9% DMSO(体积/体积)或者约9% DMSO(体积/体积)。在一些实施方案中,冷冻保存介质是10% DMSO(体积/体积)或者约10% DMSO(体积/体积)。在一些实施方案中,冷冻保存介质含有可商购获得的冷冻保存溶液(CryoStor™CS10)。CryoStor™CS10是含有10%二甲基亚砜(DMSO)的冷冻保存介质。在一些实施方案中,配制用于冷冻保存的组合物可以在低温,诸如超低温下储存,例如在-40℃至-150℃的温度范围(诸如或约80℃±6.0℃)下储存。

[1809] 应当理解,在冷冻保存后,细胞群体中的一些细胞可能会死亡,诸如高达10%、高达5%、高达1%、高达0.5%或高达0.1%的细胞。可替代地,冷冻保存后的细胞回收率可高达20%或高达10%。在一些实施方案中,药物组合物包含本文所述的经工程化的细胞和药

学上可接受的载剂,该载剂包含31.25%(体积/体积)Plasma-Lyte A、31.25%(体积/体积)的5%右旋糖/0.45%氯化钠、10%葡聚糖40(LMD)/5%右旋糖、20%(体积/体积)的25%人血清白蛋白(HSA)和7.5%(体积/体积)二甲基亚砜(DMSO)。

[1810] 在一些实施方案中,制备冷冻保存的经工程化的细胞用于通过解冻施用。在一些情况下,经工程化的细胞可以在解冻后立即施用于受试者。在一些此类实施方案中,组合物无需任何进一步加工即可使用。在其他情况下,经工程化的细胞在解冻后被进一步加工(如通过用药学上可接受的载剂重悬、与活化剂或刺激剂一起孵育),或者在施用于受试者前被活化洗涤并重悬于药学上可接受的缓冲液中。

[1811] XI.试剂盒、组分和制品

[1812] 在一些方面,本文提供了本文所述的方法、装置和系统的试剂盒、组分和组合物(诸如消耗品)。在一些实施方案中,试剂盒包括对于根据本文公开的使用的说明。

[1813] 在一些实施方案中,本文提供了一种试剂盒,该试剂盒包括本文所述的经工程化的细胞群体。在一些实施方案中,本文提供了一种试剂盒,该试剂盒包括:(a)包含多个经工程化的细胞的细胞群体,以及(ii)降低一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子(例如,一种或多种MHC I类人白细胞抗原和/或一种或多种MHC II类人白细胞抗原)的表达,其中(i)的增加的表达和(ii)的降低的表达是相对于不包含修饰的相同细胞类型的细胞而言的。在一些实施方案中,本文提供了一种试剂盒或组合,该试剂盒或组合包括:包含多个经工程化的细胞的细胞群体,;(ii)增加CD47的表达;以及(iii)降低一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子(例如,一种或多种MHC I类人白细胞抗原和/或一种或多种MHC II类人白细胞抗原)的表达,其中(i)和(ii)的增加的表达以及(iii)的降低的表达是相对于不包含修饰的相同细胞类型的细胞而言的。

[1814] 在一些实施方案中,提供了含有可用于临床移植疗法(包括细胞疗法)的材料的制品。在一些实施方案中,制品中含有可用于治疗细胞缺陷的材料,该细胞缺陷诸如但不限于糖尿病(例如,I型糖尿病)、血管疾患或疾病、自身免疫性甲状腺炎、肝脏疾病(例如,肝脏硬化)、角膜疾病(例如,Fuchs营养不良或先天性遗传性内皮营养不良)、肾脏疾病和癌症(例如,B细胞急性淋巴母细胞白血病(B-ALL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤、肝癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、结直肠癌、肺癌、非小细胞肺癌、急性髓系淋巴系白血病、多发性骨髓瘤、胃癌、胃腺癌、胰腺腺癌、胶质母细胞瘤、神经母细胞瘤、肺鳞状细胞癌、肝细胞癌和膀胱癌)。该制品可以包括容器和在该容器上或与该容器相关的标签或包装说明书。合适的容器包括例如瓶子、小瓶、注射器等(例如玻璃或塑料容器)。通常,容器容纳对同种异体细胞疗法有效的组合物,并且可以具有无菌进入端口(例如容器可以是静脉注射液袋(intravenous solution bag)或具有可被皮下注射针刺穿的塞子的小瓶)。

[1815] 在一些方面,本文提供的试剂盒或制品包括经工程化的细胞(诸如本文提供的经工程化的细胞中的任一种经工程化的细胞)的群体。在一些实施方案中,试剂盒或制品包括包含经工程化的细胞群体的组合物,其中该经工程化的细胞包含:(i)包含编码CD47的外源性多核苷酸的转基因,(ii),和(iii)B2M基因的两个等位基因的失活或破坏。在一些实施方案中,经工程化的β细胞进一步包含CIITA基因的两个等位基因的失活或破坏。

[1816] 标签或包装说明书指示组合物用于治疗特定疾患。标签或包装说明书将进一步包括对于向患者施用药物组合物的说明。在一些实施方案中,制品包括组合治疗。

[1817] 制品和/或试剂盒可以进一步包括包装说明书。该说明书是指通常包括在治疗产品的商业包装中的说明,其含有关于此类治疗产品的使用的适应症、用法、剂量、施用、禁忌症和/或警告的信息。

[1818] XII.治疗方法

[1819] 本文提供了与所提供的细胞组合物有关的组合物和方法,该细胞组合物包含本文所述的用于治疗受试者的疾病或疾患的经工程化的细胞群体。本文提供了通过施用本文所述的经工程化的细胞群体来治疗患者的方法。在一些实施方案中,细胞群体被配制用于以药物组合物,如本文所述的任何药物组合物施用。此类方法和用途包括例如涉及将经工程化的细胞群体或含有其的组合物施用于患有疾病、疾患或病症的受试者的治疗方法和用途。选择如本文所提供的用于特定疾病适应症的适当的经工程化的细胞在本领域技术人员的水平之内。在一些实施方案中,以有效量施用细胞或其药物组合物以实现疾病或病症的治疗。用途包括经工程化的细胞或其药物组合物在此类方法和治疗中的用途,以及在制备药物以进行此类治疗方法中的用途。在一些实施方案中,该方法由此治疗受试者的疾病或疾患或病症。

[1820] 本文提供的经工程化的细胞可以施用于任何合适的患者,包括例如用于治疗疾病或病症的细胞疗法的候选者。细胞疗法的候选者包括患有可能受益于本文提供的主题经工程化的细胞的治疗效果的疾病或疾患的任何患者。在一些实施方案中,患者是被施用的细胞的同种异体接受者。在一些实施方案中,提供的经工程化的细胞可有效地用于同种异体细胞疗法。受益于本文提供的主题经工程化的细胞的治疗效果的候选者表现出疾病或疾患的消除、减少或改善。

[1821] 在一些实施方案中,如本文所提供的经工程化的细胞(包括通过本文提供的方法中的任何方法产生的那些)可以用于细胞疗法。本文概述的治疗性细胞可用于治疗病症,诸如但不限于癌症、遗传病症、慢性感染性疾病、自身免疫性病症、神经性病症等。

[1822] 在一些实施方案中,患者具有细胞缺陷。如本文所用,“细胞缺陷”是指导致患者体内细胞群体的功能障碍或丧失的任何疾病或疾患,其中患者不能自然替换或再生细胞群体。示例性细胞缺陷包括但不限于自身免疫性疾病(例如,多发性硬化症、重症肌无力、类风湿性关节炎、糖尿病、全身性红斑狼疮)、神经变性疾病(例如,亨廷顿病和帕金森病)、心血管疾患和疾病、血管疾患和疾病、角膜疾患和疾病、肝脏疾患和疾病、甲状腺疾患和疾病以及肾脏疾患和疾病。在一些实施方案中,施用经工程化的细胞的患者患有癌症。可以通过本文提供的经工程化的细胞治疗的示例性癌症包括但不限于B细胞急性淋巴母细胞白血病(B-ALL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤、肝癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、结直肠癌、肺癌、非小细胞肺癌、急性髓系淋巴系白血病、多发性骨髓瘤、胃癌、胃腺癌、胰腺腺癌、胶质母细胞瘤、神经母细胞瘤、肺鳞状细胞癌、肝细胞癌和膀胱癌。在某些实施方案中,癌症患者通过施用本文提供的经工程化的CAR T细胞来治疗。

[1823] 在一些实施方案中,本文提供了一种向有需要的患者施用经工程化的细胞群体的方法,其中经工程化的细胞在施用过程中或施用后与血液接触,并且其中经工程化的细胞包含在经工程化的细胞与血液接触时防止或减弱IBMIR的修饰。在一些实施方案中,经工程化的细胞是通过静脉内施用或经由肌内注射施用。在一些实施方案中,该经工程化的细胞过表达致耐受因子(例如CD47),具有降低的一种或多种MHC I类分子的表达或缺乏该表达。

在一些实施方案中,经工程化的细胞是β胰岛细胞或肝细胞。在一些实施方案中,经工程化的细胞进一步包含一种或多种补体抑制剂的过表达。

[1824] 在一些实施方案中,细胞缺陷与糖尿病相关,或者细胞疗法用于治疗糖尿病,任选地其中糖尿病是I型糖尿病。在一些实施方案中,经工程化的细胞群体是包括β胰岛细胞在内的胰岛细胞的群体。在一些实施方案中,胰岛细胞选自由胰岛祖细胞、未成熟胰岛细胞和成熟胰岛细胞组成的组。在一些实施方案中,该方法包括向患者施用包含经工程化的β胰岛细胞群体的组合物,其中该经工程化的细胞包含:(i)包含编码CD47的外源性多核苷酸的多顺反子载体,和(ii)B2M基因的两个等位基因的失活或破坏。在一些实施方案中,该方法包括向患者施用包含经工程化的β胰岛细胞群体的组合物,其中该经工程化的β胰岛细胞包含:(i)包含编码CD47的外源性多核苷酸的转基因。在一些实施方案中,经工程化的β细胞包含CIITA基因的两个等位基因的失活或破坏。在一些实施方案中,包含编码CD47的多核苷酸的转基因是转基因是多顺反子载体。

[1825] 在一些实施方案中,细胞缺陷与肝脏疾病相关,或者细胞疗法用于治疗肝脏疾病。在一些实施方案中,肝脏疾病包括肝脏硬化。在一些实施方案中,细胞群体是肝细胞或肝祖细胞的群体。在一些实施方案中,该方法包括向患者施用包含经工程化的肝细胞群体的组合物,其中该经工程化的肝细胞包含:(i)包含编码CD47的外源性多核苷酸的转基因,和(ii)B2M基因的两个等位基因的失活或破坏。在一些实施方案中,该方法包括向患者施用包含经工程化的肝细胞群体的组合物,其中该经工程化的肝细胞包含:(i)包含编码CD47的外源性多核苷酸的转基因,和(ii)B2M基因的两个等位基因的失活或破坏。在一些实施方案中,经工程化的肝细胞包含CIITA基因的两个等位基因的失活或破坏。在一些实施方案中,包含编码CD47的多核苷酸的转基因是转基因是多顺反子载体。

[1826] 在一些实施方案中,本文提供的经工程化的细胞或含有其的组合物可用于治疗被先前的移植物(例如像细胞移植物、输血、组织移植物或器官移植物)中存在的一种或多种抗原致敏的患者。在某些实施方案中,先前的移植物是同种异体移植物并且患者对来自同种异体移植物的一种或多种自体抗原敏感。同种异体移植物包括但不限于同种异体细胞移植物、同种异体输血、同种异体组织移植物或同种异体器官移植物。在一些实施方案中,患者是怀孕或已经怀孕的致敏患者(例如,在怀孕期间进行或已经进行过同种免疫)。在某些实施方案中,患者被先前的移植物中包含的一种或多种抗原致敏,其中先前的移植物是修饰的人细胞、组织或器官。在一些实施方案中,修饰的人细胞、组织或器官是修饰的自体人细胞、组织或器官。在一些实施方案中,先前的移植物是非人细胞、组织或器官。在示例性实施方案中,先前的移植物是修饰的非人细胞、组织或器官。在某些实施方案中,先前的移植物是包含人组分的嵌合体。在某些实施方案中,先前的移植物是CAR T细胞。在某些实施方案中,先前的移植物是自体移植物并且患者对来自自体移植物的一种或多种自体抗原敏感。在某些实施方案中,先前的移植物是自体细胞、组织或器官。在某些实施方案中,致敏患者患有过敏并且对一种或多种过敏原敏感。在示例性实施方案中,患者患有花粉热、食物过敏、昆虫过敏、药物过敏或特应性皮炎。

[1827] 在一些实施方案中,经历使用提供的经工程化的细胞或含有其的组合物的治疗的患者接受了先前的治疗。在一些实施方案中,经工程化的细胞或含有其的组合物用于治疗与先前的治疗相同的疾患。在某些实施方案中,经工程化的细胞或含有其的组合物用于治

疗与先前的治疗不同的疾患。在一些实施方案中,施用于患者的经工程化的细胞或含有其的组合物对于治疗通过先前的治疗治疗的相同疾患或疾病表现出增强的治疗效果。在某些实施方案中,与先前的治疗相比,施用的经工程化的细胞或含有其的组合物对于治疗患者的疾患或疾病表现出更长的治疗效果。在示例性实施方案中,与先前的治疗相比,施用的细胞表现出针对癌细胞的增强的效力、功效和/或特异性。在实施方案中,经工程化的细胞是用于治疗癌症的CAR T细胞。

[1828] 本文提供的方法可以用作一线治疗失败后特定疾患或疾病的二线治疗。在一些实施方案中,先前的治疗是治疗上无效的治疗。如本文所用,“治疗无效”的治疗是指在患者中产生小于期望的临床结局的治疗。例如,就细胞缺陷的治疗而言,治疗上无效的治疗可以指未达到替换患者体内缺陷细胞的期望的功能性细胞和/或细胞活性水平,和/或缺乏治疗持久性的治疗。对于癌症治疗,治疗无效的治疗是指未达到期望水平的效力、功效和/或特异性的治疗。可以使用本领域已知的任何合适的技术来测量治疗效果。在一些实施方案中,患者对先前的治疗产生免疫反应。在一些实施方案中,先前的治疗是被患者排斥的细胞、组织或器官移植物。在一些实施方案中,先前的治疗包括机械辅助治疗。在一些实施方案中,机械辅助治疗包括血液透析或心室辅助装置。在一些实施方案中,患者对机械辅助治疗产生免疫反应。在一些实施方案中,先前的治疗包括包含安全开关的治疗性细胞群体,如果治疗性细胞以不期望的方式生长和分裂,则该安全开关可以导致治疗性细胞死亡。在某些实施方案中,由于安全开关诱导治疗性细胞死亡,患者产生免疫反应。在某些实施方案中,患者被先前的治疗致敏。在示例性实施方案中,患者不会被施用的如本文所提供的经工程化的细胞致敏。

[1829] 在一些实施方案中,在对有需要的患者提供组织、器官或部分器官移植之前施用所提供的经工程化的细胞或含有其的组合物。在实施方案中,患者没有表现出对经工程化的细胞的免疫反应。在某些实施方案中,将经工程化的细胞施用于患者以治疗特定组织或器官中的细胞缺陷,并且患者随后接受针对相同特定组织或器官的组织或器官移植。在此类实施方案中,经工程化的细胞治疗作为针对最终组织或器官替换的过渡疗法发挥作用。例如,在一些实施方案中,患者患有肝脏病症并且在接受肝脏移植前接受如本文所提供的经工程化的肝细胞治疗。在某些实施方案中,将经工程化的细胞施用于患者以治疗特定组织或器官中的细胞缺陷,并且患者随后接受针对不同组织或器官的组织或器官移植。例如,在一些实施方案中,患者是在接受肾移植前用如本文所提供的经工程化胰腺β细胞治疗的糖尿病患者。在一些实施方案中,该方法用于治疗细胞缺陷。在示例性实施方案中,组织或器官移植是心脏移植、肺移植、肾移植、肝移植、胰腺移植、肠移植、胃移植、角膜移植、骨髓移植、血管移植、心脏瓣膜移植或骨移植。

[1830] 治疗患者的方法通常是通过施用如本文所提供的经工程化的细胞或含有其的组合物来进行。应当理解,对于本文所述的与疗法的细胞和/或时间安排有关的所有多个实施方案,细胞的施用是通过导致引入的细胞至少部分定位于期望部位的方法或途径来完成的。可以将细胞直接植入到期望部位,或通过任何适当的途径施用,该途径导致递送至受试者的期望部位,植入的细胞或细胞组分的至少一部分在该部位保持能存活。在一些实施方案中,施用细胞以治疗疾病或病症,诸如可以通过细胞疗法缓和的任何疾病、病症、疾患或其症状。

[1831] 在一些实施方案中,在患者被致敏后至少1天、至少2天、至少3天、至少4天、至少5天、至少6天、至少1周或至少1个月或更长时间施用经工程化的细胞群体或含有其的组合物。在一些实施方案中,在患者被致敏或表现出致敏的特性或特征后至少1周(例如,1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周、11周、12周、13周、14周、15周、16周、17周、18周、19周、20周或更长时间)或更长时间施用经工程化的细胞群体或含有其的组合物。在一些实施方案中,在患者已接受移植(例如,同种异体移植)、已怀孕(例如,在怀孕期具有或已经具有同种异体免疫)或被致敏或表现出致敏的特性或特征后至少1个月(例如,1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、12个月、13个月、14个月、15个月、16个月、17个月、18个月、19个月、20个月或更长时间)或更长时间施用经工程化的细胞群体或含有其的组合物。

[1832] 在一些实施方案中,给已接受移植、已怀孕(例如,在怀孕期具有或已经具有同种异体免疫)和/或针对抗原(例如,同种异体抗原)被致敏的患者施用这样的给药方案,所述给药方案包括本文所述的经工程化的细胞群体的第一次剂量施用、在第一次剂量之后的恢复时段和所描述的经工程化的细胞群体的第二次剂量施用。在一些实施方案中,第一细胞群体和第二细胞群体中存在的细胞类型的复合物是不同的。在某些实施方案中,存在于第一经工程化的细胞群体和第二经工程化的细胞群体中的细胞类型的复合物是相同或基本上等同的。在许多实施方案中,第一经工程化的细胞群体和第二经工程化的细胞群体包含相同的细胞类型。在一些实施方案中,第一经工程化的细胞群体和第二经工程化的细胞群体包含不同的细胞类型。在一些实施方案中,第一经工程化的细胞群体和第二经工程化的细胞群体包含相同百分比的细胞类型。在其他实施方案中,第一经工程化的细胞群体和第二细胞群体包含不同百分比的细胞类型。

[1833] 在一些实施方案中,恢复时段在第一次施用经工程化的细胞群体或含有其的组合物之后开始,并在此类细胞在患者体内不再存在或不再可检测到时结束。在一些实施方案中,恢复时段的持续时间为初始施用细胞后至少1周(例如,1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周、11周、12周、13周、14周、15周、16周、17周、18周、19周、20周或更长时间)或更长时间。在一些实施方案中,恢复时段的持续时间为初始施用细胞后至少1个月(例如,1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、12个月、13个月、14个月、15个月、16个月、17个月、18个月、19个月、20个月或更长时间)或更长时间。

[1834] 在一些实施方案中,施用的经工程化的细胞群体或含有其的组合物在被施用给受试者时是低免疫原性的。在一些实施方案中,经工程化的细胞是低免疫的。在一些实施方案中,针对经工程化的细胞的免疫反应与通过施用免疫原性细胞(例如相同或相似细胞类型或表型但不含经工程化的细胞的修饰(例如遗传修饰)的细胞的群体)产生的免疫反应的水平相比被减少了或低了至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。在一些实施方案中,施用的经工程化的细胞群体或含有其的组合物未能在患者中引发针对经工程化的细胞的免疫反应。

[1835] 在一些实施方案中,施用的经工程化的细胞群体或含有其的组合物在患者中引发降低或较低水平的全身TH1活化。在一些情况下,由该细胞引发的全身TH1活化的水平与由免疫原性细胞(例如相同或相似细胞类型或表型但不含经工程化的细胞的修饰(例如遗传

修饰)的细胞的群体)的施用产生的全身TH1活化的水平相比低了至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。在一些实施方案中,施用的经工程化的细胞群体或含有其的组合物未能在患者中引发全身TH1活化。

[1836] 在一些实施方案中,施用的经工程化的细胞群体或含有其的组合物在患者中引发降低或较低水平的外周血单核细胞(PBMC)的免疫活化。在一些情况下,由该细胞引发的PBMC的免疫活化的水平与由免疫原性细胞(例如相同或相似细胞类型或表型但不含经工程化的细胞的修饰(例如遗传修饰)的细胞的群体)的施用产生的PBMC的免疫活化的水平相比低了至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。在一些实施方案中,施用的经工程化的细胞群体或含有其的组合物不能在患者中引发PBMC的免疫活化。

[1837] 在一些实施方案中,施用的经工程化的细胞群体或含有其的组合物在患者中引发降低或较低水平的供体特异性IgG抗体。在一些情况下,由该细胞引发的供体特异性IgG抗体的水平与由免疫原性细胞(例如相同或相似细胞类型或表型但不含经工程化的细胞的修饰(例如遗传修饰)的细胞的群体)的施用产生的供体特异性IgG抗体的水平相比低了至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。在一些实施方案中,施用的经工程化的细胞群体不能在患者中引发供体特异性IgG抗体。

[1838] 在一些实施方案中,施用的经工程化的细胞群体或含有其的组合物在患者中引发降低或较低水平的IgM和IgG抗体产生。在一些情况下,由该细胞引发的IgM和IgG抗体产生的水平与由免疫原性细胞(例如相同或相似细胞类型或表型但不含经工程化的细胞的修饰(例如遗传修饰)的细胞的群体)的施用产生的IgM和IgG抗体产生的水平相比低了至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。在一些实施方案中,施用的经工程化的细胞群体或含有其的组合物未能在患者中引发IgM和IgG抗体产生。

[1839] 在一些实施方案中,施用的经工程化的细胞群体或含有其的组合物在患者中引发降低或较低水平的细胞毒性T细胞杀伤。在一些情况下,由该细胞引发的细胞毒性T细胞杀伤的水平与由免疫原性细胞(例如相同或相似细胞类型或表型但不含经工程化的细胞的修饰(例如遗传修饰)的细胞的群体)的施用产生的细胞毒性T细胞杀伤的水平相比低了至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%在一些实施方案中,施用的经工程化的细胞群体或含有其的组合物不能在患者中引发细胞毒性T细胞杀伤。

[1840] 如上文所论述,本文提供了在某些实施方案中可以被施用于针对同种异体抗原(如人白细胞抗原)被致敏的患者的细胞。在一些实施方案中,患者正在或已经怀孕,例如在怀孕期具有同种异体免疫(例如,胎儿和新生儿溶血病(HDFN)、新生儿同种异体免疫中性粒细胞减少症(NAN)或胎儿和新生儿同种异体免疫血小板减少症(FNAIT))。换言之,患者患有或曾经患有与妊娠期同种异体免疫相关的病症或疾患,诸如但不限于胎儿和新生儿溶血病(HDFN)、新生儿同种异体免疫中性粒细胞减少症(NAN)以及胎儿和新生儿同种异体免疫血

小板减少症(FNAIT)。在一些实施方案中,患者已经接受了同种异体移植,诸如但不限于同种异体细胞移植、同种异体输血、同种异体组织移植或同种异体器官移植。在一些实施方案中,患者表现出针对同种异体抗原的记忆B细胞。在一些实施方案中,患者表现出针对同种异体抗原的记忆T细胞。此类患者可以表现出针对同种异体抗原的记忆B细胞和记忆T细胞。

[1841] 在施用所描述的细胞后,患者没有表现出全身免疫反应或者表现出与对非低免疫原性的细胞的响应相比降低的水平的全身免疫反应。在一些实施方案中,患者没有表现出适应性免疫反应或者表现出与对非低免疫原性的细胞的响应相比降低的水平的适应性免疫反应。在一些实施方案中,患者没有表现出先天免疫反应或者表现出与对非低免疫原性的细胞的响应相比降低的水平的先天免疫反应。在一些实施方案中,患者没有表现出T细胞反应或者表现出与对非低免疫原性的细胞的反应相比降低的水平的T细胞反应。在一些实施方案中,患者没有表现出B细胞反应或者表现出与对非低免疫原性的细胞的反应相比降低的水平的B细胞反应。

[1842] A.给药和剂量方案

[1843] 任何治疗有效量的本文所述的细胞都可以被包含在药物组合物中,这取决于所治疗的适应症。该细胞的非限制性实例包括原代细胞(例如原代β胰岛细胞)和从如所描述的经工程化的诱导型多能干细胞分化而来的细胞(例如从iPSC分化而来的β胰岛细胞或肝细胞)。在一些实施方案中,药物组合物包括至少约1x 10^2、5x 10^2、1x 10^3、5x10^3,1x 10^4、5x 10^4,1x 10^5、5x 10^5、1x 10^6、5x 10^6、1x10^7、5x 10^7、1x 10^8、5x 10^8、1x 10^9、5x 10^9、1x 10^{10},或5x 10^{10}个细胞。在一些实施方案中,药物组合物包含至多约1x 10^2、5x 10^2、1x 10^3、5x 10^3、1x 10^4、5x 10^4、1x 10^5、5x 10^5、1x 10^6、5x 10^6、1x 10^7、5x 10^7,1x 10^8、5x 10^8、1x 10^9、5x 10^9、1x 10^{10},或5x 10^{10}个细胞。在一些实施方案中,药物组合物包含至多约6.0x 10^8个细胞。在一些实施方案中,药物组合物包含至多约8.0x 10^8个细胞。在一些实施方案中,药物组合物包含至多约1x 10^2-5x10^2、5x 10^2-1x 10^3、1x 10^3-5x 10^3、5x 10^3-1x 10^4、1x 10^4-5x 10^4、5x 10^4-1x 10^5、1x 10^5-5x10^5、5x 10^5-1x 10^6、1x 10^6-5x 10^6、5x 10^6-1x 10^7、1x 10^7-5x 10^7、5x 10^7-1x 10^8、1x 10^8-5x10^8、5x 10^8-1x 10^9、1x 10^9-5x 10^9、5x 10^9-1x 10^{10},或1x 10^{10}-5x 10^{10}个细胞。在示例性实施方案中,药物组合物包含约1.0x 10^6至约2.5x 10^8个细胞。

[1844] 在一些实施方案中,药物组合物具有至少5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、250、300、350、400或500ml的体积。在示例性实施方案中,药物组合物具有至多约5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、250、300、350、400或500ml的体积。在示例性实施方案中,药物组合物具有约5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、250、300、350、400,或500ml的体积。在一些实施方案中,药物组合物具有约1-50ml、50-100ml、100-150ml、150-200ml、200-250ml、250-300ml、300-350ml、350-400ml、400-450ml,或450-500ml的体积。在一些实施方案中,药物组合物具有约1-50ml、50-100ml、100-150ml、150-200ml、200-250ml、250-300ml、300-350ml、350-400ml、400-450ml,或450-500ml的体积。在一些实施方案中,药物组合物具有约1-10ml、10-20ml、20-30ml、30-40ml、40-50ml、50-60ml、60-70ml、70-80ml、70-80ml、80-90ml、或90-100ml的体积。在一些

实施方案中,药物组合物具有范围为约5ml至约80ml的体积。在示例性实施方案中,药物组合物具有范围为约10ml至约70ml的体积。在许多实施方案中,药物组合物具有范围为约10ml至约50ml的体积。

[1845] 具体的量/剂量方案将因以下因素而不同:个体的体重、性别、年龄和健康状况;制剂、生化性质、生物活性、生物利用度和细胞的副作用以及完整治疗方案中细胞的数量和身份(identity)。

[1846] 在一些实施方案中,药物组合物的剂量包括体积为约10mL至50mL的约1.0x 10^5至约2.5x 10^8个细胞,并且药物组合物作为单次剂量施用。

[1847] 在许多实施方案中,该细胞是T细胞,并且药物组合物包含约2.0x 10^6至约2.0x 10^8个细胞,诸如但不限于原代T细胞、从经工程化的诱导型多能干细胞分化而来的T细胞。在一些情况下,该剂量包含体积为约10ml至50ml的约1.0x 10^5至约2.5x 10^8个本文所述的原代T细胞。在若干情况下,该剂量包含体积为约10ml至50ml的约1.0x 10^5至约2.5x 10^8个上文已经描述的原代T细胞。在各种情况下,该剂量包含体积为约10ml至50ml的约1.0x 10^5至约2.5x 10^8个从本文所述的经工程化的诱导型多能干细胞分化而来的T细胞。在其他情况下,该剂量在低于约1.0x 10^5至约2.5x 10^8个T细胞(包括原代T细胞或从经工程化的诱导型多能干细胞分化而来的T细胞)的范围内。在又其他情况下,该剂量在高于约1.0x 10^5至约2.5x 10^8个T细胞(包括原代T细胞和从经工程化的诱导型多能干细胞分化而来的T细胞)的范围内。

[1848] 在一些实施方案中,药物组合物作为单次剂量施用,该单次剂量对于50kg或更轻的受试者为约1.0x 10^5至约1.0x 10^7个经工程化的细胞(诸如原代细胞或从经工程化的诱导型多能干细胞分化而来的细胞)/kg体重。在一些实施方案中,该药物组合物以单次剂量施用,该单次剂量对于50kg或更轻的受试者为约0.5x 10^5至约1.0x 10^7、约1.0x 10^5至约1.0x 10^7、约1.0x 10^5至约1.0x 10^7、约5.0x 10^5至约1x 10^7、约1.0x 10^6至约1x 10^7、约5.0x 10^6至约1.0x 10^7、约1.0x10^5至约5.0x 10^6、约1.0x 10^5至约1.0x 10^6、约1.0x 10^5至约5.0x 10^5、约1.0x 10^5至约5.0x 10^6、约2.0x 10^5至约5.0x 10^6,约3.0x 10^5至约5.0x 10^6、约4.0x 10^5至约5.0x 10^6、约5.0x 10^5至约5.0x 10^6、约6.0x 10^5至约5.0x 10^6、约7.0x 10^5至约5.0x 10^6、约8.0x 10^5至约5.0x 10^6,或约9.0x 10^5至约5.0x 10^6个细胞/kg体重。在一些实施方案中,该剂量对于50kg或更轻的受试者为约0.2x 10^6至约5.0x 10^6个细胞/kg体重。在许多实施方案中,该剂量对于50kg或更轻的受试者在小于约0.2x 10^6至约5.0x 10^6个细胞/kg体重的范围内。在许多实施方案中,该剂量对于50kg或更轻的受试者在高于约0.2x 10^6至约5.0x 10^6个细胞/kg体重的范围内。在示例性实施方案中,该单次剂量的体积为约10ml至50ml。在一些实施方案中,该剂量是静脉内施用的。

[1849] 在示例性实施方案中,该细胞以单次剂量施用,该单次剂量对于超过50kg的受试者为约1.0x 10^6至约5.0x 10^8个细胞(诸如原代细胞和从经工程化的诱导型多能干细胞分化而来的细胞)。在一些实施方案中,该药物组合物以单次剂量施用,该单次剂量对于50kg或更轻的受试者为约0.5x 10^6至约1.0x 10^9、约1.0x 10^6至约1.0x 10^9、约1.0x 10^6至约1.0x 10^9、约5.0x 10^6至约1.0x 10^9、约1.0x 10^7至约1.0x 10^9、约5.0x 10^7至约1.0x 10^9、约1.0x10^6至约5.0x 10^7、约1.0x 10^6至约1.0x 10^7、约1.0x 10^6至约5.0x 10^7、约1.0x 10^7至约5.0x 10^8、约2.0x 10^7至约5.0x 10^8、约3.0x 10^7至约5.0x 10^8,约4.0x 10^7至约5.0x

10^8、约5.0x 10^7至约5.0x 10^8、约6.0x 10^7至约5.0x 10^8、约7.0x 10^7至约5.0x 10^8、约8.0x 10^7至约5.0x 10^8,或约9.0x 10^7至约5.0x 10^8个细胞/kg体重。在许多实施方案中,该细胞以单次剂量施用,该单次剂量对于超过50kg的受试者为约1.0x 10^7至约2.5x 10^8个细胞。在一些实施方案中,该细胞以单次剂量施用,该单次剂量对于超过50kg的受试者在小于约1.0x 10^7至约2.5x 10^8个细胞的范围内。在一些实施方案中,该细胞以单次剂量施用,该单次剂量对于超过50kg的受试者在高于约1.0x 10^7至约2.5x 10^8个细胞的范围内。在一些实施方案中,该剂量是静脉内施用的。在示例性实施方案中,该单次剂量的体积为约10ml至50ml。在一些实施方案中,该剂量是静脉内施用的。

[1850] 在示例性实施方案中,该剂量是以约1至50ml/分钟、1至40ml/分钟、1至30ml/分钟、1至20ml/分钟、10至20ml/分钟、10至30ml/分钟、10至40ml/分钟、10至50ml/分钟、20至50ml/分钟、30至50ml/分钟,40至50ml/分钟的速率静脉内施用的。在多个实施方案中,药物组合物储存在一个或多个输液袋中用于静脉内施用。在一些实施方案中,该剂量以不超过10分钟、15分钟、20分钟、25分钟、30分钟、35分钟、40分钟、45分钟、50分钟、55分钟、60分钟、70分钟、80分钟、90分钟、120分钟、150分钟、180分钟、240分钟或300分钟完全施用。

[1851] 在一些实施方案中,单次剂量的药物组合物存在于单个输液袋中。在其他实施方案中,将单次剂量的药物组合物分成2、3、4或5个单独的输液袋。

[1852] 在一些实施方案中,本文所述的细胞以多次剂量(诸如2、3、4、5、6或更多次剂量)施用。在一些实施方案中,多次剂量中的每次剂量以间隔1至24小时的范围施用于受试者。在一些情况下,后续剂量在初始剂量或先前剂量后约1小时至约24小时(例如,约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23或约24小时)施用。在一些实施方案中,多次剂量中的每次剂量以间隔约1天至28天的范围施用于受试者。在一些情况下,后续剂量在初始剂量或先前剂量后约1天至约28天(例如,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、26、27或约28天)施用。在许多实施方案中,多次剂量中的每次剂量以间隔1周至约6周的范围施用于受试者。在某些情况下,后续剂量在初始剂量或先前剂量后约1周至约6周(例如,约1、2、3、4、5或6周)施用。在若干实施方案中,多次剂量中的每次剂量以间隔约1个月至约12个月的范围施用于受试者。在若干种情况下,后续剂量在初始剂量或先前剂量后约1个月至约12个月(例如,约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个月)施用。

[1853] 在一些实施方案中,在第一时间点向受试者施用第一剂量方案,然后随后在第二时间点向受试者施用第二剂量方案。在一些实施方案中,第一剂量方案与第二剂量方案相同。在其他实施方案中,第一剂量方案与第二剂量方案不同。在一些情况下,第一剂量方案和第二剂量方案中的细胞数量相同。在一些情况下,第一剂量方案和第二剂量方案中的细胞数量不同。在一些情况下,第一剂量方案和第二剂量方案的剂量次数相同。在一些情况下,第一剂量方案和第二剂量方案的剂量次数不同。

[1854] 在一些实施方案中,该细胞是经工程化的T细胞(例如原代T细胞或从经工程化的诱导型多能干细胞分化而来的T细胞),并且第一剂量方案包括表达第一CAR的经工程化的T细胞,而第二剂量方案包括表达第二CAR的经工程化的T细胞,使得第一CAR和第二CAR不同。例如,第一CAR和第二CAR结合不同的靶抗原。在一些情况下,第一CAR包含结合抗原的scFv,而第二CAR包含结合不同抗原的scFv。在一些实施方案中,第一剂量方案包括表达第一CAR

的经工程化的T细胞,并且第二剂量方案包括表达第二CAR的经工程化的T细胞或原代T细胞,使得第一CAR和第二CAR相同。第一剂量方案可以与第二剂量方案间隔至少1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、12个月、1-3个月、1-6个月、4-6个月、3-9个月、3-12个月或更多个月施用于受试者。在一些实施方案中,在疾病(例如,癌症)过程期间向受试者施用多个剂量方案,并且这些剂量方案中的至少两个剂量方案包含相同类型的本文所述的经工程化的T细胞。在其他实施方案中,该多个剂量方案中的至少两个剂量方案包括不同类型的本文所述的经工程化的T细胞。

[1855] B.免疫抑制剂

[1856] 在一些实施方案中,在第一次施用经工程化的细胞群体或含有其的组合物前,不向患者施用免疫抑制剂和/或免疫调节剂。

[1857] 在一些实施方案中,可以向接受经工程化的细胞施用的患者施用免疫抑制剂和/或免疫调节剂。在一些实施方案中,在施用经工程化的细胞前施用免疫抑制剂和/或免疫调节剂。在一些实施方案中,在第一次和/或第二次施用经工程化的细胞的施用前,施用免疫抑制剂和/或免疫调节剂。

[1858] 免疫抑制剂和/或免疫调节剂的非限制性实例包括环孢菌素、硫唑嘌呤、霉酚酸、霉酚酸酯、皮质类固醇诸如泼尼松、甲氨蝶呤、金盐、柳氮磺吡啶、抗疟药、布喹那、来氟米特、咪唑立宾、15-脱氧精胍菌素、6-巯基嘌呤、环磷酰胺、雷帕霉素、他克莫司(FK-506)、OKT3、抗胸腺细胞球蛋白、胸腺五肽、胸腺肽-α和类似剂。在一些实施方案中,免疫抑制剂和/或免疫调节剂选自由以下组成的免疫抑制抗体组:与IL-2受体的p75结合的抗体;与例如MHC、CD2、CD3、CD4、CD7、CD28、B7、CD40、CD45、IFN-γ、TNF-α、IL-4、IL-5、IL-6R、IL-6、IGF、IGFR1、IL-7、IL-8、IL-10、CD11a或CD58结合的抗体;以及与它们的配体中的任何配体结合的抗体。在其中在第一次施用细胞之前或之后对患者施用免疫抑制剂和/或免疫调节剂的一些实施方案中,该施用以比具有MHC I类分子和/或MHC II类分子表达且没有外源性的CD47表达的细胞所需的剂量低的剂量进行。

[1859] 在一些实施方案中,此种免疫抑制剂和/或免疫调节剂可选自可溶性IL-15R、IL-10、B7分子(例如,B7-1、B7-2、其变体及其片段)、ICOS和OX40、阴性T细胞调控因子的抑制剂(如针对CTLA-4的抗体)和类似的剂。

[1860] 在一些实施方案中,在第一次施用经工程化的细胞群体前,可以向患者施用免疫抑制剂和/或免疫调节剂。在一些实施方案中,在第一次施用细胞前至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14天或更多天施用免疫抑制剂和/或免疫调节剂。在一些实施方案中,在第一次施用细胞前至少1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周或更长时间施用免疫抑制剂和/或免疫调节剂。

[1861] 在实施方案中,在第一次施用细胞后不对患者施用免疫抑制剂和/或免疫调节剂,或者在第一次施用所述细胞后至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14天或更长时间施用免疫抑制剂和/或免疫调节剂。在一些实施方案中,在第一次施用细胞后至少1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周或更长时间施用免疫抑制剂和/或免疫调节剂。

[1862] 在一些实施方案中,在施用经工程化的细胞群体前,不向患者施用免疫抑制剂和/或免疫调节剂。在许多实施方案中,在第一次和/或第二次施用经工程化的细胞群体前,向患者施用免疫抑制剂和/或免疫调节剂。在一些实施方案中,在施用细胞前至少1、2、3、4、5、

6、7、8、9、10、11、12、13、14天或更多天施用免疫抑制剂和/或免疫调节剂。在一些实施方案中,在第一次和/或第二次施用细胞前至少1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周或更长时间施用免疫抑制剂和/或免疫调节剂。在实施方案中,在施用细胞后至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14天或更长时间施用免疫抑制剂和/或免疫调节剂。在一些实施方案中,在第一次和/或第二次施用细胞后至少1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周或更长时间施用免疫抑制剂和/或免疫调节剂。

[1863] 在其中在施用细胞之前或之后对患者施用免疫抑制剂和/或免疫调节剂的一些实施方案中,该施用以比免疫原性细胞(例如,相同或相似细胞类型或表型但不含经工程化的细胞的修饰(例如遗传修饰)的细胞的群体,例如具有内源性水平的MHC I类和/或MHC II类表达并且没有增加的(例如,外源性的)CD47表达的细胞的群体)所需的剂量低的剂量进行。

[1864] XIII.结论

[1865] 以上对本技术的实施方案的详细描述并不旨在是穷举的或将本技术限制于上面公开的精确形式。尽管本文出于例示性目的公开了本技术的具体实施方案和实例,但是如相关领域的技术人员将认识到的,在本技术的范围内可以进行各种等效修改。例如,尽管步骤以给定顺序呈现,但是替代实施方案可以以不同顺序执行步骤。本文所公开的各个实施方案也可以被组合以提供进一步的实施方案。

[1866] 从前述内容可以理解,出于说明的目的,本文已经公开了本技术的具体实施方案,但是没有详细示出或公开公知的组分和功能,以避免不必要地模糊对本技术的实施方案的描述。在上下文容许的情况下,单数或复数术语还可以分别包括复数或单数术语。进一步地,虽然与本技术的一些实施方案相关的优点已经在那些实施方案的上下文中被公开,但是其他实施方案也可以表现出此类优点,并且并非所有实施方案都必须表现出此类优点才落入本技术的范围内。因此,本公开和相关技术可以涵盖本文中未明确示出或公开的其他实施方案。

[1867] 实施例

[1868] 可通过以下非限制性实施例进一步描述本公开,在这些实施例中,在适当的情况下可使用本领域技术人员已知的标准技术和与这些实施例中描述的那些技术类似的技术。应当理解,本领域技术人员将设想与本文提供的公开内容一致的另外的实施方案。

[1869] 实施例1.使用RNA-seq测量CD47同种型表达

[1870] 在两种人干细胞样本Gibco WT和RUES2 WT中通过RNA-seq测量了每种CD47同种型的表达。具体来说,使用Qiagen AllPrep DNA/RNA分离试剂盒从每个样本的1x10^6个细胞中提取RNA。在提取过程期间,使用Qiashredder将裂解物均质化。使用Bioanalyzer来对RNA进行定量并评估RNA质量。使用来自RUES2 WT样本的500ng RNA和来自Gibco WT样本的100ng RNA生成文库(因为从Gibco WT样本中提取的RNA少于500ng)。使用Illumina TruSeq Stranded mRNA试剂盒生成文库。使用了制造商的协议。IDT for Illumina Truseq Indices(96个样本,96个索引)板被用于衔接子。将文库在Bioanalyzer上运行以检查质量,并使用qPCR(Kappa定量试剂盒)进行定量。

[1871] RNA-seq结果汇总于表28中。根据RNA-seq结果,CD47-202和CD47-201在Gibco和Rues2人干细胞系中以相对相等的水平表达。CD47-206、205、204在这些干细胞系中似乎也高度表达。在这些干细胞系中没有检测到CD47-203表达的证据。

[1872] 表28.RNA-seq结果

[1873]

转录物名称	转录物 ID (以 bp 为单位的长度)	Gibco WT 的 TPM* (SSAM000366)	RUES2 WT 的 TPM (SSAM000361)
CD47-202	ENST00000361309 (5292)	0.21	1.07
CD47-201	ENST00000355354 (5228)	1.90	0.84
CD47-206	ENST00000644850 (766)	3.38	5.96
CD47-205	ENST00000517766 (538)	4.68	2.81
CD47-204	ENST00000471694 (6796)	0.90	2.46
* TPM 指每百万条转录物的数量。 ** CD47-203 没有读段支持			

[1874] 实施例2.在CD47KO细胞中表达经截短的CD47变体

[1875] 这些实验的总体目标是设计可以被递送至靶细胞并实现与SIRPα的功能性相互作用的CD47的截短变体。下表29示出了作为本研究的一部分设计的经截短的CD47变体。

[1876] 表29.经截短的CD47变体

[1877]

设计的经截短的 CD47 变体	核酸 SEQ ID NO:	氨基酸 SEQ ID NO:
野生型 hCD47	19	N/A
CD47-202	14	2
CD47-201	13	1
无 N 端的 CD47-206	133	80
具有恢复的 N 端的 CD47-206	134	81
缺失 TMD3	135	82
缺失 EC + TMD3	136	83
缺失 TMD2 + EC + TMD3	137	84
缺失最后一个 IC	138	85
缺失 TMD5 +最后一个 IC	139	86
缺失 EC + TMD5 +最后一个 IC	140	87
缺失 TMD4	141	88
具有 DAF/CD55 GPI 锚的 CD47 ECD	142	89
具有长 TRAILR3- GPI 锚的 CD47 ECD	143	90
具有短 TRAILR3- GPI 锚的 CD47 ECD	144	91
具有 CD8a TMD 和短 ICD (9aa)的 CD47 ECD	145	92
具有 CD28 TMD 和短 ICD (9aa)的 CD47 ECD	146	93
具有 PDGFR TMD 和短 ICD (9aa)的 CD47 ECD	147	94
CD47 IgV、来自铰链区的 3aa，具有 PDGFR 铰链、TMD 和短 ICD (9aa)	148	95
CD47 IgV、来自铰链区的 3aa、IgG4 铰链- CD28 TM	149	96
CD47 IgV、来自铰链区的 3aa、IgG4 铰链- CD8a TM	150	97
CD47 IgV、来自铰链区的 3aa、CD28 铰链- CD28 TM	151	98
CD47 IgV、来自铰链区的 3aa、CD28 铰链- CD8a TM	152	99
CD47 IgV、来自铰链区的 3aa、CD8a 铰链- CD28 TM	153	100
CD47 IgV、来自铰链区的 3aa、CD8a 铰链- CD8a TM	154	101
来源于 CDA Bicistronic 的 Cod Opt CD47	200	199
hCD47 N361 突变体	171	118
hCD47 N362 突变体	172	119
hCD47 N363 突变体	173	120
hCD47 N364 突变体	174	121
hCD47 N366 突变体	175	122
hCD47 N368 突变体	176	123
hCD47 N369 突变体	177	124
hCD47 N3610 突变体	178	125
hCD47 N3612 突变体	179	126

[1878]

hCD47 N3614 突变体	180	127
hCD47 N3617 突变体	181	128
hCD47 N3618 突变体	182	129
hCD47 N3621 突变体	183	130
hCD47 N3623 突变体	184	131
hCD47 N3624 突变体	185	132

[1879] 进行以下实验以生成针对每个经截短的CD47变体(如上表5所述)的LVV,并确定如通过抗CD47抗体染色和SIRPa-Fc染色测量的CD47细胞外结构域(ECD)表达是否存在差异。

[1880] 方法

[1881] 慢病毒载体(LVV)产生

[1882] 在本实施例中,采用第三代慢病毒产生方法产生慢病毒载体(LVV)。普通技术人员将理解,本领域已知的用于产生LVV的其他方法可以与本文所述的方法一起使用。

[1883] 示例性方法可通过万维网在addgene.org/guides/lentivirus处获得。简而言之,在第1天,将293T铺板在组织培养板中。第二天,用编码表5(见上文)中描述的CD47变体之一的慢病毒转移载体、慢病毒包膜质粒和慢病毒包装质粒转染细胞。2天后,收获含有LVV的细胞培养基并将其冷冻以备后用。

[1884] 经由p24 ELISA测定的LVV滴度

[1885] 在本实施例中,在Ella自动免疫测定系统上经由p24 ELISA评估LVV滴度。普通技术人员将理解,本领域已知的用于评估LVV滴度的其他方法可以与本文所述的方法一起使用。简而言之,将LVV样本解冻,并将每个样本的等分试样添加到96孔板的孔中。接下来,向每个孔中加入等体积的裂解缓冲液(在RIPA缓冲液中稀释的蛋白酶抑制剂),并将混合物在4℃的振荡器上孵育30分钟。孵育后,将混合物稀释并添加到p24 Ella盒中,并在Ella自动免疫测定系统上运行。

[1886] 用经截短的CD47 LVV感染CD47KO HEK293T

[1887] 将已被修饰为不再表达CD47的HEK293T细胞(CD47KO HEK293T)铺板在组织培养板上并在37℃和5% CO_2下孵育。接下来,将LVV样本解冻,经由轻轻移液混合,并施加到含有CD47KO HEK293T细胞的孔中,并在室温下以1000xg旋转接种板30分钟。接下来,将所有接受者细胞板放置到37℃、5% CO_2的细胞培养孵育器中生长3天。

[1888] 用抗CD47对CD47KO HEK293T进行染色

[1889] 收获用经截短的CD47 LVV处理的CD47KO HEK293T细胞,并将其重新悬浮在细胞染色缓冲液(BioLegend目录编号420201)中。然后将细胞离心,并重新悬浮在具有细胞存活力染料(eBiosciences目录号65-0865-14)的细胞染色缓冲液中,在冰上孵育30分钟,洗涤,并重新悬浮在细胞染色缓冲液中。接下来,将细胞离心,并重新悬浮在具有PE抗人CD47抗体克隆CC2C6(BioLegend目录号323108)或FITC抗人CD47抗体克隆CC2C6(BioLegend目录号323106)的细胞染色缓冲液中,在冰上孵育30分钟,洗涤,并重新悬浮在细胞染色缓冲液中。最后,经由流式细胞术评估CD47表达。

[1890] 使用SIRPα-FC对CD47KO HEK293T进行染色

[1891] 收获用经截短的CD47 LVV处理的CD47KO HEK293T细胞,并将其重新悬浮在细胞染色缓冲液(BioLegend目录编号420201)中。然后将细胞离心,并重新悬浮在具有细胞存活力染料(eBiosciences目录号65-0865-14)的细胞染色缓冲液中,在冰上孵育30分钟,洗涤,并重新悬浮在细胞染色缓冲液中。接下来,将细胞离心并重新悬浮在具有PE SIRPα-Fc-PE(AcroBiosystems目录号SIA-HP252)的细胞染色缓冲液中,在冰上孵育30分钟,洗涤,并重新悬浮在细胞染色缓冲液中。最后,经由流式细胞术评估CD47表达。

[1892] 结果

[1893] 图6示出包含示例性CD47截短变体的LVV的如经由Ella自动免疫测定系统评估的

病毒滴度。

[1894] 图7-14和图18A示出了在用经截短的CD47 LVV处理后表达CD47的CD47KO HEK293T细胞的百分比(如通过抗CD47流式细胞术评估)。数据表明,许多经截短的CD47变体(例如,CAG-CD47 ECD-CD59 GPI和CAG-CD47 ECD-DAF/CD55 GPI)以与过表达的WT CD47相似的水平表达。

[1895] 图15-17和图18B示出在用经截短的CD47 LVV处理后表达CD47的CD47KO HEK293T细胞的百分比(如通过SIRPα-FC流式细胞术评估)。数据表明,许多经截短的CD47变体(例如,CAG-CD47ECD-CD59 GPI和CAG-CD47 ECD-DAF/CD55 GPI)以与过表达的WT CD47相似的水平表达。

[1896] 实施例3.确定经截短的CD47变体的表达水平

[1897] 进行以下实验以针对每种经截短的CD47变体(如上表5所述)生成LVV,并确定CD47变体与不同细胞类型中的外源性野生型CD47表达相比的相对外源性表达水平,如通过抗CD47抗体染色和SIRPα-Fc染色所测量的。

[1898] 这些实验可以包括本文公开的任何细胞类型,包括(但不限于)胰岛细胞、β胰岛细胞、胰腺胰岛细胞、免疫细胞、B细胞、T细胞、自然杀伤(NK)细胞、自然杀伤T(NKT)细胞、巨噬细胞、内皮细胞、肌肉细胞、心脏肌肉细胞、平滑肌细胞、骨骼肌细胞、多巴胺能神经元、视网膜色素上皮细胞、视细胞、肝细胞、甲状腺细胞、皮肤细胞、胶质祖细胞、神经细胞、心脏细胞、干细胞、造血干细胞、诱导型多能干细胞(iPSC)、间充质干细胞(MSC)、胚胎干细胞(ESC)、多能干细胞(PSC)和/或血细胞。

[1899] 示例性方法包括实施例2中描述的方法,该方法包括用编码表5(见上文)中描述的CD47变体之一的慢病毒转移载体、慢病毒包膜质粒和慢病毒包装质粒转染细胞。

[1900] 示例性结果包括在用0.25倍、0.5倍、0.75倍、1倍、1.25倍、1.5倍、1.75倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍或10倍剂量(例如慢病毒滴度)的经截短的CD47变体递送(例如转染)细胞后,在细胞中实现等于或高于用野生型CD47实现的外源性表达水平的外源性表达水平。

[1901] 实施例4.确定经截短的CD47变体的表达水平以实现低免疫性

[1902] 进行以下实验以确定实现低免疫性所需的经截短的CD47变体(如上表5所述)的表达水平。

[1903] 这些实验可以包括本文公开的任何细胞类型,包括(但不限于)胰岛细胞、β胰岛细胞、胰腺胰岛细胞、免疫细胞、B细胞、T细胞、自然杀伤(NK)细胞、自然杀伤T(NKT)细胞、巨噬细胞、内皮细胞、肌肉细胞、心脏肌肉细胞、平滑肌细胞、骨骼肌细胞、多巴胺能神经元、视网膜色素上皮细胞、视细胞、肝细胞、甲状腺细胞、皮肤细胞、胶质祖细胞、神经细胞、心脏细胞、干细胞、造血干细胞、诱导型多能干细胞(iPSC)、间充质干细胞(MSC)、胚胎干细胞(ESC)、多能干细胞(PSC)和/或血细胞。

[1904] 在XCELLIGENCE SP平台和MP平台(ACEA BioSciences,San Diego,CA)上进行NK细胞杀伤测定和巨噬细胞杀伤测定。将96孔E板(ACEA BioSciences)用胶原蛋白(Sigma-Aldrich)包被,并将4×10^5个表达外源性野生型CD47或经截短的CD47的MHC-I敲除、MHC-II敲除,或MHC-I和MHC-II敲除的细胞铺板在100μL细胞特异性培养基中。在细胞指数值达到0.7后,在添加或不添加1ng/ml人IL-2或人IL-15(两者都为Peprotech)的情况下以0.5:1、

0.8:1或1:1的效应细胞与靶细胞(E:T)的比率添加人NK细胞或人巨噬细胞。作为阴性对照,用2% Triton™X-100处理细胞。使用RTCA软件(ACEA)对数据进行标准化和分析。使用NK细胞和巨噬细胞时,没有外源性表达的CD47的MHC-I敲除、MHC-II敲除,或MHC-I和MHC-II敲除的细胞被迅速杀伤。如果成功,经截短的CD47的外源性表达会逆转杀伤效应。示例性结果包括达到为使用野生型的外源性表达所达到的水平的0.5倍、0.75倍、1倍、1.25倍、1.5倍、1.75倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍或10倍的低免疫性水平。

[1905] 通过过继转移测量NK细胞和巨噬细胞在体内对细胞的杀伤。将5×10^6个野生型细胞与5×10^6个经截短的CD47表达细胞混合,并将该混合物用5μM CFSE(ThermoFisher)染色。将在具有人IL-2(1ng/mL,Peprotech)和2.5×10^6个人原代NK细胞(StemCell Technologies)或2.5×10^6个人巨噬细胞(由PBMC分化而来)的生理盐水中的细胞腹膜内注射到免疫缺陷的NSG-SGM3小鼠(013062,Jackson Laboratory)中。将人原代NK细胞在注射前12小时在体外用人IL-2进行预处理。48小时后,从腹部收集细胞,并将其在4℃下用APC缀合的抗HLA-A、B、C抗体(克隆G46_2.6,BD Biosciences)染色45分钟。通过流式细胞术(FACS Calibur,BD Bioscience)分析CFSE阳性和HLA-A、B、C阴性群体,并比较野生型细胞和表达外源性的经截短的CD47的细胞。如果成功,则看不到经截短的CD47细胞的CSFE+/HLA-群体的减少。

[1906] 还通过BLI测量巨噬细胞的吞噬。对表达外源性的经截短的CD47细胞或野生型细胞的荧光素酶表达细胞进行计数,并将该细胞以每24孔1×10^5个细胞的浓度铺板。16小时后,以1:1的E:T比率添加人巨噬细胞。120分钟后,通过添加D-荧光素(Promega,Madison,WI)来确认荧光素酶的表达。作为对照,靶细胞未经处理或用2%TRITON X100处理。使用Ami HT(Spectral Instruments Imaging,Tucson,AZ)以每球面度每平方厘米每秒的最大光子数(p/s/cm^2/sr)对信号进行定量。如果成功,野生型细胞和表达外源性的经截短的CD47的细胞的吞噬水平将相似。

[1907] 对于NK细胞特异性Elispot测定,将人原代NK细胞与野生型细胞和表达外源性的经截短的CD47的细胞共培养,并测量它们的IFN-γ释放。K562细胞(Sigma-Aldrich)用作阳性对照。将经丝裂霉素处理(50μg/mL,30分钟)的刺激细胞与NK细胞(用1ng/mL人IL-2刺激)一起以1:1的E:T比率孵育24小时,然后使用Elispot酶标仪计算出IFN-γ斑点频率。如果成功,野生型细胞和表达外源性的经截短的CD47的细胞的NK细胞活化水平将相似。

[1908] 在接受人源化CD34+造血干细胞移植的NSG-SGM3小鼠(Wunderlich等人,2010,Leukemia 24:1785-88)中进行移植研究,这些小鼠与测试细胞是同种异体的。由于在此人源化小鼠模型中没有获得同基因对照,因此在原初小鼠中收集背景测量值。如果成功,5天后,野生型细胞的接受者会显示出高的脾细胞IFN-γ斑点频率和升高的IgM水平,而表达外源性的经截短的CD47的细胞的接受者不会产生可检测到的细胞IFN-γ反应或抗体反应,或产生明显较低的细胞IFN-γ反应或抗体反应。

[1909] 示例性序列

[1910] 表30.CD47蛋白的示例性氨基酸序列

[1911]

描述	SEQ ID NO:	氨基酸序列
CD47-201	SEQ ID NO:1	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPC FVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDF SSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTRE GETIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKY RSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATG LGLIVTSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVV GLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQ KTIQPPRNN
CD47-202	SEQ ID NO:2	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPC FVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDF SSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTRE GETIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKY RSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATG LGLIVTSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVV GLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQ KTIQPPRKAVEEPLNAFKESKGMMNDE

[1912]

无信号序列的 CD47-202	SEQ ID NO:3	QLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFVTNMEAQNTTEVYVKWKF KGRDIYTFDGALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDK SDAVSHTGNYTCEVTELTREGETIIELKYRVVSWFSPNENILIV IFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVI VGAILFVPGEYSLKNATGLGLIVTSTGILILLHYYVFSTAIGLTS FVIAILVIQVIAYILAVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQ LLGLVYMKFVASNQKTIQPPRKAVEEPLNAFKESKGMMNDE
CD47-203	SEQ ID NO:4	XWTESLYCGVYTNAWPSSDFRFEYLSSSTITWTSLYEICGVQR DTYSQLKGKKRQASNQKTIQPPRKAVEEPLNAFKESKGMMN DE
CD47-205	SEQ ID NO:5	XKNATGLGLIVTSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAY ILAVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVA SNQKTIQPPRKAVEEPLNE
CD47-206	SEQ ID NO:6	MEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDFSSAKIE VSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETIIELK YRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGGMDE KTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIVTSTGI LILLHYYVF
CD47t-1	SEQ ID NO:7	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCF VTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDFSS AKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGE TIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTL
CD47t-2	SEQ ID NO:8	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCF VTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDFSS AKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETI IELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGG MDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPG
CD47t-3	SEQ ID NO:9	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCF VTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDFSS AKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETI IELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGG MDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIVT STGILILLHYYVFSTA
CD47t-4	SEQ ID NO:10	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCF VTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDFSS AKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETI IELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGG MDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIVT STGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVVGLSLC
CD47t-5	SEQ ID NO:11	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCF VTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDFSS AKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETI IELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGG MDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIVT STGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVVGLSLCIAA CIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFV
CD47t-6	SEQ ID NO:12	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCF VTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDFSS AKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETI IELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGG MDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIVT STGILILLHYYVF
无 N 端的 CD47-206	SEQ ID NO:80	MEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDFSSAKI EVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETII ELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGG MDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIV TSTGILILLHYYVF

[1913]

具有恢复的N端的CD47-206	SEQ ID NO:81	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPC FVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDF SSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTRE GETIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKY RSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATG LGLIVTSTGILILLHYYVF
缺失TMD3	SEQ ID NO:82	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPC FVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDF SSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTRE GETIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKY RSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNA
缺失EC+TMD3	SEQ ID NO:83	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPC FVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDF SSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTRE GETIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKY RSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILF
缺失TMD2+EC+TMD3	SEQ ID NO:84	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPC FVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDF SSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTRE GETIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKY RSGGMDEKT
缺失最后一个IC	SEQ ID NO:85	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPC FVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDF SSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTRE GETIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKY RSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATG LGLIVTSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVV GLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYM
缺失TMD5+最后一个IC	SEQ ID NO:86	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCF VTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDFSS AKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGE TIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRS GGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGL IVTSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVVGLSL CIAACIPMHG
缺失EC+TMD5+最后一个IC	SEQ ID NO:87	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPC FVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDF SSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTRE GETIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKY RSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATG LGLIVTSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVV GL
缺失TMD4	SEQ ID NO:88	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPC FVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDF SSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTRE GETIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKY RSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATG LGLIVTSTGILILLHYYVFSTAIGLT
具有DAF/CD55GPI锚的CD47 ECD	SEQ ID NO:89	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPC FVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDF SSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTRE GETIIELKYRVVSWFSPNEPNKGSGTTSGTTRLLSGHTCFTLT GLLGTLVTMGLLT
具有长TRAILR3-GPI锚的CD47 ECD	SEQ ID NO:90	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPC FVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDF SSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTRE GETIIELKYRVVSWFSPNEATVETPAAEETMNTSPGTPAPAA EETMNTSPGTPAPAAEETMTTSPGTPAPAAEETMTTSPGTPA PAAEETMITSPGTPASSHYLSCTIVGIIVLIVLLIVFV

[1914]

具有短 TRAILR3-GPI 锚的 CD47 ECD	SEQ ID NO:91	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPC FVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDF SSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTRE GETIIELKYRVVSWFSPNEMITSPGTPASSHYLSCTIVGIIVLIV LLIVFV
具有 CD8a TMD 和短 ICD (9aa)的 CD47 ECD	SEQ ID NO:92	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPC FVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDF SSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTRE GETIIELKYRVVSWFSPNEIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC NHRNRR
具有 CD28 TMD 和短 ICD (9aa)的 CD47 ECD	SEQ ID NO:93	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPC FVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDF SSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTRE GETIIELKYRVVSWFSPNEFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFI IFWVRSKRSRLLH
具有 PDGFR TMD 和短 ICD (9aa)的 CD47 ECD	SEQ ID NO:94	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPC FVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDF SSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTRE GETIIELKYRVVSWFSPNEVVISAILALVVLTIISLIILIMLWQK KPRY
CD47 IgV、来自铰链区的 3aa、具有 PDGFR 铰链、TMD 和短 ICD (9aa)	SEQ ID NO:95	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPC FVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDF SSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTRE GETIIELKAVGQDTQEVIVVPHSLPFKVVVISAILALVVLTIIS LIILIMLWQKKPRY
CD47 IgV、来自铰链区的 3aa、IgG4 铰链- CD28 TM	SEQ ID NO:96	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPC FVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDF SSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTRE GETIIELKESKYGPPCPPCPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAF IIFWVRSKRSRLLH
CD47 IgV、来自铰链区的 3aa、IgG4 铰链- CD8a TM	SEQ ID NO:97	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPC FVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDF SSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTRE GETIIELKESKYGPPCPPCPIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC NHRNRR
CD47 IgV、来自铰链区的 3aa、CD28 铰链- CD28 TM	SEQ ID NO:98	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPC FVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDF SSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTRE GETIIELKIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGP SKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLH
CD47 IgV、来自铰链区的 3aa、CD28 铰链- CD8a TM	SEQ ID NO:99	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPC FVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDF SSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTRE GETIIELKIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGP SKPIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRR
CD47 IgV、来自铰链区的 3aa、CD8a 铰链- CD28 TM	SEQ ID NO:100	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPC FVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDF SSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTRE GETIIELKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVH TRGLDFACDFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRS RLLH

[1915]

CD47 IgV、来自铰链区的 3aa、CD8a 铰链- CD8a TM	SEQ ID NO:101	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPC FVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDF SSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTRE GETIIELKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVH TRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRR
WT，C15G	SEQ ID NO:102	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFGNDTVVIPC FVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDF SSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTRE GETIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKY RSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATG LGLIVTSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVV GLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQ KTIQPPRKAVEEPLNAFKESKGMMNDE
N361，C15G	SEQ ID NO:103	MWPLVAALLLGSACCGSAWQRPLRFNKTKSVEFTFGNDTV VIPCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGWANKSTV PTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTE LTREGETIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIK TLKYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLK NATGLGLIVTSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYI LAVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFV ASNQKTIQPPRKAVEEPLNAFKESKGMMNDE
N362，C15G	SEQ ID NO:104	MWPLVAALLLGSACCGSAWAPPLRFNKTKSVEFTFGNDTV VIPCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGYTNKSTVP TDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTEL TREGETIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKT LKYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKN ATGLGLIVTSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYIL AVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVA SNQKTIQPPRKAVEEPLNAFKESKGMMNDE
N363，C15G	SEQ ID NO:105	MWPLVAALLLGSACCGSAWQLPLLFNKTKSVEFTFGNDTV VIPCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGDKNKSTV PTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTE LTREGETIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIK TLKYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLK NATGLGLIVTSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYI LAVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFV ASNQKTIQPPRKAVEEPLNAFKESKGMMNDE
N364，C15G	SEQ ID NO:106	MWPLVAALLLGSACCGSAWQPLLAFNKTKSVEFTFGNDTV VIPCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGAMNKSTV PTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTE LTREGETIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIK TLKYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLK NATGLGLIVTSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYI LAVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFV ASNQKTIQPPRKAVEEPLNAFKESKGMMNDE
N366，C15G	SEQ ID NO:107	MWPLVAALLLGSACCGSAWQTPLKFNKTKSVEFTFGNDTV VIPCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVP TDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTEL TREGETIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKT LKYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKN ATGLGLIVTSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYIL AVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVA SNQKTIQPPRKAVEEPLNAFKESKGMMNDE

[1916]

N368，C15G	SEQ ID NO:108	MWPLVAALLLGSACCGSAWQFPLRFNKTKSVEFTFGNDTV VIPCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGAENKSTVP TDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTEL TREGETIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKT LKYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKN ATGLGLIVTSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYIL AVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVA SNQKTIQPPRKAVEEPLNAFKESKGMMNDE
N369，C15G	SEQ ID NO:109	MWPLVAALLLGSACCGSAWQIPLNFNKTKSVEFTFGNDTV VIPCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGAWNKSTV PTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTE LTREGETIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIK TLKYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLK NATGLGLIVTSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYI LAVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFV ASNQKTIQPPRKAVEEPLNAFKESKGMMNDE
N3610，C15G	SEQ ID NO:110	MWPLVAALLLGSACCGSAWQPLLLFNKTKSVEFTFGNDTV VIPCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGASNKSTVP TDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTEL TREGETIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKT LKYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKN ATGLGLIVTSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYIL AVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVA SNQKTIQPPRKAVEEPLNAFKESKGMMNDE
N3612，C15G	SEQ ID NO:111	MWPLVAALLLGSACCGSAWQPPLLFNKTKSVEFTFGNDTV VIPCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGQANKSTV PTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTE LTREGETIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIK TLKYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLK NATGLGLIVTSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYI LAVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFV ASNQKTIQPPRKAVEEPLNAFKESKGMMNDE
N3614，C15G	SEQ ID NO:112	MWPLVAALLLGSACCGSAWQPLLKFNKTKSVEFTFGNDTV VIPCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGAANKSTV PTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTE LTREGETIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIK TLKYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLK NATGLGLIVTSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYI LAVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFV ASNQKTIQPPRKAVEEPLNAFKESKGMMNDE
N3617，C15G	SEQ ID NO:113	MWPLVAALLLGSACCGSAWQRPLRFNKTKSVEFTFGNDTV VIPCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVP TDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTEL TREGETIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKT LKYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKN ATGLGLIVTSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYIL AVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVA SNQKTIQPPRKAVEEPLNAFKESKGMMNDE
N3618，C15G	SEQ ID NO:114	MWPLVAALLLGSACCGSAWQLPLLFNKTKSVEFTFGNDTV VIPCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGAINKSTVP TDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTEL TREGETIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKT LKYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKN ATGLGLIVTSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYIL AVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVA SNQKTIQPPRKAVEEPLNAFKESKGMMNDE

[1917]

N3621, C15G	SEQ ID NO:115	MWPLVAALLLGSACCGSAWQIPLEFNKTKSVEFTFGNDTV VIPCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVP TDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTEL TREGETIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKT LKYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKN ATGLGLIVTSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYIL AVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVA SNQKTIQPPRKAVEEPLNAFKESKGMMNDE
N3623, C15G	SEQ ID NO:116	MWPLVAALLLGSACCGSAWQMPLVFNKTKSVEFTFGNDTV VIPCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGVTNKSTVP TDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTEL TREGETIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKT LKYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKN ATGLGLIVTSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYIL AVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVA SNQKTIQPPRKAVEEPLNAFKESKGMMNDE
N3624, C15G	SEQ ID NO:117	MWPLVAALLLGSACCGSAWQIPLRFNKTKSVEFTFGNDTV VIPCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGQVNKSTV PTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTE LTREGETIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIK TLKYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLK NATGLGLIVTSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYI LAVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFV ASNQKTIQPPRKAVEEPLNAFKESKGMMNDE
hCD47 N361 突变体	SEQ ID NO:118	MWPLVAALLLGSACCGSAWQRPLRFNKTKSVEFTFCNDTV VIPCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGWANKSTV PTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTE LTREGETIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIK TLKYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLK NATGLGLIVTSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYI LAVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFV ASNQKTIQPPRKAVEEPLNAFKESKGMMNDE
hCD47 N362 突变体	SEQ ID NO:119	MWPLVAALLLGSACCGSAWAPPLRFNKTKSVEFTFCNDTV VIPCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGYTNKSTVP TDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTEL TREGETIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKT LKYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKN ATGLGLIVTSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYIL AVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVA SNQKTIQPPRKAVEEPLNAFKESKGMMNDE
hCD47 N363 突变体	SEQ ID NO:120	MWPLVAALLLGSACCGSAWQLPLLFNKTKSVEFTFCNDTV VIPCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGDKNKSTV PTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTE LTREGETIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIK TLKYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLK NATGLGLIVTSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYI LAVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFV ASNQKTIQPPRKAVEEPLNAFKESKGMMNDE
hCD47 N364 突变体	SEQ ID NO:121	MWPLVAALLLGSACCGSAWQPLLAFNKTKSVEFTFCNDTV VIPCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGAMNKSTV PTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTE LTREGETIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIK TLKYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLK NATGLGLIVTSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYI LAVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFV ASNQKTIQPPRKAVEEPLNAFKESKGMMNDE

[1918]

hCD47 N366 突变体	SEQ ID NO:122	MWPLVAALLLGSACCGSAWQTPLKFNKTKSVEFTFCNDTV VIPCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVP TDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTEL TREGETIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKT LKYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKN ATGLGLIVTSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYIL AVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVA SNQKTIQPPRKAVEEPLNAFKESKGMMNDE
hCD47 N368 突变体	SEQ ID NO:123	MWPLVAALLLGSACCGSAWQFPLRFNKTKSVEFTFCNDTV VIPCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGAENKSTVP TDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTEL TREGETIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKT LKYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKN ATGLGLIVTSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYIL AVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVA SNQKTIQPPRKAVEEPLNAFKESKGMMNDE
hCD47 N369 突变体	SEQ ID NO:124	MWPLVAALLLGSACCGSAWQIPLNFNKTKSVEFTFCNDTV VIPCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGAWNKSTV PTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTE LTREGETIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIK TLKYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLK NATGLGLIVTSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYI LAVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFV ASNQKTIQPPRKAVEEPLNAFKESKGMMNDE
hCD47 N3610 突变体	SEQ ID NO:125	MWPLVAALLLGSACCGSAWQPLLLFNKTKSVEFTFCNDTV VIPCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGASNKSTVP TDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTEL TREGETIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKT LKYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKN ATGLGLIVTSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYIL AVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVA SNQKTIQPPRKAVEEPLNAFKESKGMMNDE
hCD47 N3612 突变体	SEQ ID NO:126	MWPLVAALLLGSACCGSAWQPPLLFNKTKSVEFTFCNDTV VIPCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGQANKSTV PTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTE LTREGETIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIK TLKYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLK NATGLGLIVTSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYI LAVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFV ASNQKTIQPPRKAVEEPLNAFKESKGMMNDE
hCD47 N3614 突变体	SEQ ID NO:127	MWPLVAALLLGSACCGSAWQPLLKFNKTKSVEFTFCNDTV VIPCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGAANKSTV PTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTE LTREGETIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIK TLKYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLK NATGLGLIVTSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYI LAVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFV ASNQKTIQPPRKAVEEPLNAFKESKGMMNDE
hCD47 N3617 突变体	SEQ ID NO:128	MWPLVAALLLGSACCGSAWQRPLRFNKTKSVEFTFCNDTV VIPCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVP TDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTEL TREGETIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKT LKYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKN ATGLGLIVTSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYIL AVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVA SNQKTIQPPRKAVEEPLNAFKESKGMMNDE

[1919]

hCD47 N3618 突变体	SEQ ID NO:129	MWPLVAALLLGSACCGSAWQIPLEFNKTKSVEFTFCNDTVV IPCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPT DFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELT REGETIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTL KYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNA TGLGLIVTSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILA VVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVAS NQKTIQPPRKAVEEPLNAFKESKGMMNDE
hCD47 N3621 突变体	SEQ ID NO:130	MWPLVAALLLGSACCGSAWQIPLEFNKTKSVEFTFCNDTVV IPCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPT DFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELT REGETIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTL KYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNA TGLGLIVTSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILA VVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVAS NQKTIQPPRKAVEEPLNAFKESKGMMNDE
hCD47 N3623 突变体	SEQ ID NO:131	MWPLVAALLLGSACCGSAWQMPLVFNKTKSVEFTFCNDTV VIPCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGVTNKSTVP TDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTEL TREGETIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKT LKYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKN ATGLGLIVTSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYIL AVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVA SNQKTIQPPRKAVEEPLNAFKESKGMMNDE
hCD47 N3624 突变体	SEQ ID NO:132	MWPLVAALLLGSACCGSAWQIPLRFNKTKSVEFTFCNDTV VIPCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGQVNKSTV PTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTE LTREGETIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIK TLKYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLK NATGLGLIVTSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYI LAVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFV ASNQKTIQPPRKAVEEPLNAFKESKGMMNDE
CAG-CD47 (202) –CodOpt	SEQ ID NO:199	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPC FVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDF SSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTRE GETIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKY RSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATG LGLIVTSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVV GLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQ KTIQPPRKAVEEPLNAFKESKGMMNDE
CD47 ECD-CD59 GPI	SEQ ID NO:340	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPC FVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDF SSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTRE GETIIELKYRVVSWFSPNEQLENGGTSLSEKTVLLLVTPFLA AAWSLHP*

[1920] 表31.CD47蛋白的示例性核苷酸序列

[1921]

描述	SEQ ID NO:	核苷酸序列
CD47-201 CDS	SEQ ID NO:13	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTGCTG CGGATCAGCTCAGCTACTATTTAATAAAACAAAATCTGTAGAAT TCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCATTCCATGCTTTGTTACTA ATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATACGTAAAGTGGAA ATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGATGGAGCTCTAAACA AGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTAGTGCAAAAATTGAAGTC TCACAATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTTGAAGATGGATAAGA GTGATGCTGTCTCACACACAGGAAACTACACTTGTGAAGTAACA

[1922]

		GAATTAACCAGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAAATATC GTGTTGTTTCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTCTTATTGTTA TTTTCCCAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGTA TTAAAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGATGAGAAAAC AATTGCTTTACTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTGTCAT TGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTCATTAAAGA ATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAGGGATATTAA TATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGATTGGATTAACCT CCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGGTGATAGCCTATATCC TCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTATTGCGGCGTGTATACCA ATGCATGGCCCTCTTCTGATTTCAGGTTTGAGTATCTTAGCTCTA GCACAATTACTTGGACTAGTTTATATGAAATTTGTGGCTTCCAAT CAGAAGACTATACAACCTCCTAGGAATAACTGA
CD47-202 CDS	SEQ ID NO:14	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTGCTG CGGATCAGCTCAGCTACTATTTAATAAAACAAAATCTGTAGAAT TCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCATTCCATGCTTTGTTACTA ATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATACGTAAAGTGGAA ATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGATGGAGCTCTAAACA AGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTAGTGCAAAAATTGAAGTC TCACAATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTTGAAGATGGATAAGA GTGATGCTGTCTCACACACAGGAAACTACACTTGTGAAGTAACA GAATTAACCAGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAAATATC GTGTTGTTTCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTCTTATTGTTA TTTTCCCAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGTA TTAAAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGATGAGAAAAC AATTGCTTTACTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTGTCAT TGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTCATTAAAGA ATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAGGGATATTAA TATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGATTGGATTAACCT CCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGGTGATAGCCTATATCC TCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTATTGCGGCGTGTATACCA ATGCATGGCCCTCTTCTGATTTCAGGTTTGAGTATCTTAGCTCTA GCACAATTACTTGGACTAGTTTATATGAAATTTGTGGCTTCCAAT CAGAAGACTATACAACCTCCTAGGAAAGCTGTAGAGGAACCCC TTAATGCATTCAAAGAATCAAAAGGAATGATGAATGATGAATA A
CD47-203 CDS	SEQ ID NO:15	TGGACTGAGTCTCTGTATTGCGGCGTGTATACCAATGCATGGCC CTCTTCTGATTTCAGGTTTGAGTATCTTAGCTCTAGCACAATTAC TTGGACTAGTTTATATGAAATTTGTGGGGTTCAGAGGGACACCT ACAGTCAGTTGAAAGGCAAGAAGAGACAAGCTTCCAATCAGAA GACTATACAACCTCCTAGGAAAGCTGTAGAGGAACCCCTTAATG CATTCAAAGAATCAAAAGGAATGATGAATGATGAATAA
CD47-204 CDS	SEQ ID NO:16	AGATATTTTCTTGTTCAATTTAAGGAGAGGTAAATTTGGTATCA ATAGAAAAAATGTTTCTGAAAAATTTAAACCCTGGAAATGTATT TATGGCATGGAGTCAGATGTTTCAGGGAGAGAAGAACAAATCA AGAAGCATTGCAAGTATGCTCATATGGAATGCTTAAGGCTTGTG GTTAAAAAATATATATATATGGCTGTCAATGTCTTAGGCTCATG GTAGCAGCAGAAATCGTAATAATTCTTTTGTCACATGGGTTATA TCCATATTGGAGAGAATTAACTCAGGTGAAATTAACTTGTACAC TGTTTGGTTTTATAATATTTAGAGGGATCACAACTGACTGATGTC CCTTTGAAGTACCATTCTTCATAAATCTTTTTTTTTCAGAATGGG CCAGCCAACTGTGACATCCCTTGGATCGGAGATTTAGAACTAGA AAGTATTCTTTCTACATTATTAGGGAAGAAAAGGAGTTACTTGG CGGTTAGCAATATTCTATTTTGTTTTGTTTTGTTTTTAGAGACAG GGTCTCATTATGTTGACCAGGCTGGCCTCGAGCTCCTGGGCTCA AGCAATGCTCCCACCTCAGCCTCCCAAGTAGCTGGGACTACAGG CATGTGCCACTACACCTGGCAGTGTTTATTCTGATAAATACATTT ATGAGCTCAAAAATGTAACTCTAAAACCTTATCTCTGAACTTCC ATATTACCATCAGAAATTTAGATAGTTGTTTAGTTCTCTTTTTCT TTGTAGAACATAGATATAAGGCATGGTTTCATTGAAGTCAGTTG

[1923]

		TATATACATGTAACTATCCTGATGTTCCCAAATAAAGCTCTGTAT
		TTCTGCTTAGTTTATTGGGGAGGCTGCTAAATGTAGTGCATCCC
		AACCCATTTTACCCTGTTCTACTTTAAAAAGAGGTTGGCTTCTTG
		TTTGGATACAAGGACCAAGTCACTCCCCCAGGTTCCTCCACAGT
		AAGGGAGGCCTATTTAAAGCCGCCCATGGCACTAACAGAAACT
		GGACTCCTATGAGCTCAGATACATAACTGGGCCTCACAGGGGTG
		GGACAGTATGTAGTCTAGGAATTGGAAGGATCCATTCCATATCA
		AAGAACTGAAGCATCGTGTTGCCCTCTCAGCAGCAAGAGTAAG
		GTGATGCCCCTGTCAGTTATAGTTCCTGAGTTCCTCTGTCTTTGA
		TTCTTTGCCTATTAGCCAGCTAGCTCACCCTCTTGTTTATGCCAC
		TGTTTTTTATCCTATTCATGCCTTCTCACAGACAACTTTTCTTACC
		TACAGCTTTGGACTCATCCTTGTCTCCTTTCTGTTTCTTTTTCACT
		TTCCCTTCCCATCACCAACTTTCTGGGTTTTTTTCTGTTTCTTCTT
		AGAGTCCAGTGGCAGGGAGAAACTTGTCAGTCCAGTCTGTTGCC
		ATTTTTCCTGTTTGAGAAAGACTCACCAGCTTTTGGCTGGCTCAC
		AGATTGGCTTTCCTTGGGTCAGGACCCACCCTTTTCCCTGCCAGC
		TTTGGAAGCTTGACAGAATTCGAGTGTGCAGTGGTGGTAAATAA
		ATAGTAAGGAACACAGAGCAGTCCTGGAGGCGTGCCTCCATCT
		GCTGATGAGAAAATCCAGTGCTGTCATCCAGCCCAGGTCCCAGC
		GGAATGGGCCTCTCTGTTCAGTAGGATCCCCCTCCTGCTGAGTG
		GTTCATGGCATGTTTCTGTTCAACGCTTTTCCATCTGTAGGATTC
		TTATTCTGTATTTATTTGTTTTTTTGGGTTTTTTTATTTTTTGAGAT
		GGAGTCTCGCTCTGTCGCCCAGGCTGGAGTGCAGTGGCACGACC
		CCAGCTCGCTGCAGCCTCTGCCTCCCAGGACGAGGGAGATCCTC
		CCACCTCAGCCTTCCACGTAGCTGGGACTACAGGCATGCACCAC
		AGGCATGCACCACCACGCCAGCTAATTTTTGTATTTTTGGTAGA
		GACAGGGTTGCATCATGTTGCCCAGGCTGGTCTTGAATGCCTGA
		GCTCAAGCAATCTATTTGCCTTGGCCTCCCAAAGTGCTGGGATT
		ACAGGCATGAGCCACCACGGCCAGCCTTCTCATTTGTTTTTTTTA
		TAAGGAAGCTATCTCTTCTTCCCTCCCCAACTAGGGTATTCTTTT
		TCCCTTTCGTCACTTTGCTCATGTACTGTATTCCTTCAACTTCATT
		AATGAATCCATTTGGAAGCAGTGAAAAAGGCAACTCAGAAAGC
		TAAGAAGAAATAGATAGAGGAATACTCAGAGCTATCTGAGTAT
		TTTCTTTAGTTTGTTAGCTCTTTGGAGCTTTGAAACTGGAAAGAC
		CCAGGGAGTGATGTGGAGAAAGAGACTGAGCTTGTAAGACACA
		GGAGCAGTGAGCTAAGGGAGATGGAGTAGTGGGGACAAATTCT
		GGCACATTCTGTCTACACTCTGGGTAGATAGAGGAGGGAGGAT
		GGAGCACCCATGGTGGGGGTATGTTGGTGACAGCATTTTCCCAC
		CAGCCAGTGTAACAAGTGGCTGATTTGGGGGAAAGATGGCATA
		AACAAATGAGAGAATGTGTTTACTATTTGATGTAGATGGGTTAT
		TTGCTTCATTTTTCAAATCAGTGTATATAATCAAGAATATTCAGC
		ATGTTTGAATAGACTGTCAGAGCTGGAACTCTTTCATTAACATC
		TCTGGCACCTTTAGTTTTAGCCCTGAACATTTTATCTTAAAATTA
		AACATTACCAAATGCCTTAGTTTATTTCATTTATTAAATTTATAT
		TCTTATTTGTTATTTATATCAGCTTCCAATCAGAAGACTATACAA
		CCTCCTAGGAATAACTGAAGTGAAGTGATGGACTCCGATTTGGA
		GAGTAGTAAGACGTGAAAGGAATACACTTGTGTTTAAGCACCA
		TGGCCTTGATGATTCACTGTTGGGGAGAAGAAACAAGAAAAGT
		AACTGGTTGTCACCTATGAGACCCTTACGTGATTGTTAGTTAAG
		TTTTTATTCAAAGCAGCTGTAATTTAGTTAATAAAATAATTATGA
		TCTATGTTGTTTGCCCAATTGAGATCCAGTTTTTTGTTGTTATTTT
		TAATCAATTAGGGGCAATAGTAGAATGGACAATTTCCAAGAAT
		GATGCCTTTCAGGTCCTAGGGCCTCTGGCCTCTAGGTAACCAGT
		TTAAATTGGTTCAGGGTGATAACTACTTAGCACTGCCCTGGTGA
		TTACCCAGAGATATCTATGAAAACCAGTGGCTTCCATCAAACCT
		TTGCCAACTCAGGTTCACAGCAGCTTTGGGCAGTTATGGCAGTA
		TGGCATTAGCTGAGAGGTGTCTGCCACTTCTGGGTCAATGGAAT
		AATAAATTAAGTACAGGCAGGAATTTGGTTGGGAGCATCTTGTA
		TGATCTCCGTATGATGTGATATTGATGGAGATAGTGGTCCTCAT
		TCTTGGGGGTTGCCATTCCCACATTCCCCCTTCAACAAACAGTG

[1924]

		TAACAGGTCCTTCCCAGATTTAGGGTACTTTTATTGATGGATATG
		TTTTCCTTTTATTCACATAACCCCTTGAAACCCTGTCTTGTCCTCC
		TGTTACTTGCTTCTGCTGTACAAGATGTAGCACCTTTTCTCCTCT
		TTGAACATGGTCTAGTGACACGGTAGCACCAGTTGCAGGAAGG
		AGCCAGACTTGTTCTCAGAGCACTGTGTTCACACTTTTCAGCAA
		AAATAGCTATGGTTGTAACATATGTATTCCCTTCCTCTGATTTGA
		AGGCAAAAATCTACAGTGTTTCTTCACTTCTTTTCTGATCTGGGG
		CATGAAAAAAGCAAGATTGAAATTTGAACTATGAGTCTCCTGCA
		TGGCAACAAAATGTGTGTCACCATCAGGCCAACAGGCCAGCCC
		TTGAATGGGGATTTATTACTGTTGTATCTATGTTGCATGATAAAC
		ATTCATCACCTTCCTCCTGTAGTCCTGCCTCGTACTCCCCTTCCC
		CTATGATTGAAAAGTAAACAAAACCCACATTTCCTATCCTGGTT
		AGAAGAAAATTAATGTTCTGACAGTTGTGATCGCCTGGAGTACT
		TTTAGACTTTTAGCATTCGTTTTTTACCTGTTTGTGGATGTGTGTT
		TGTATGTGCATACGTATGAGATAGGCACATGCATCTTCTGTATG
		GACAAAGGTGGGGTACCTACAGGAGAGCAAAGGTTAATTTTGT
		GCTTTTAGTAAAAACATTTAAATACAAAGTTCTTTATTGGGTGG
		AATTATATTTGATGCAAATATTTGATCACTTAAAACTTTTAAAAC
		TTCTAGGTAATTTGCCACGCTTTTTGACTGCTCACCAATACCCTG
		TAAAAATACGTAATTCTTCCTGTTTGTGTAATAAGATATTCATAT
		TTGTAGTTGCATTAATAATAGTTATTTCTTAGTCCATCAGATGTT
		CCCGTGTGCCTCTTTTATGCCAAATTGATTGTCATATTTCATGTT
		GGGACCAAGTAGTTTGCCCATGGCAAACCTAAATTTATGACCTG
		CTGAGGCCTCTCAGAAAACTGAGCATACTAGCAAGACAGCTCTT
		CTTGAAAAAAAAAATATGTATACACAAATATATACGTATATCTA
		TATATACGTATGTATATACACACATGTATATTCTTCCTTGATTGT
		GTAGCTGTCCAAAATAATAACATATATAGAGGGAGCTGTATTCC
		TTTATACAAATCTGATGGCTCCTGCAGCACTTTTTCCTTCTGAAA
		ATATTTACATTTTGCTAACCTAGTTTGTTACTTTAAAAATCAGTT
		TTGATGAAAGGAGGGAAAAGCAGATGGACTTGAAAAAGATCCA
		AGCTCCTATTAGAAAAGGTATGAAAATCTTTATAGTAAAATTTT
		TTATAAACTAAAGTTGTACCTTTTAATATGTAGTAAACTCTCATT
		TATTTGGGGTTCGCTCTTGGATCTCATCCATCCATTGTGTTCTCT
		TTAATGCTGCCTGCCTTTTGAGGCATTCACTGCCCTAGACAATG
		CCACCAGAGATAGTGGGGGAAATGCCAGATGAAACCAACTCTT
		GCTCTCACTAGTTGTCAGCTTCTCTGGATAAGTGACCACAGAAG
		CAGGAGTCCTCCTGCTTGGGCATCATTGGGCCAGTTCCTTCTCTT
		TAAATCAGATTTGTAATGGCTCCCAAATTCCATCACATCACATT
		TAAATTGCAGACAGTGTTTTGCACATCATGTATCTGTTTTGTCCC
		ATAATATGCTTTTTACTCCCTGATCCCAGTTTCTGCTGTTGACTC
		TTCCATTCAGTTTTATTTATTGTGTGTTCTCACAGTGACACCATT
		TGTCCTTTTCTGCAACAACCTTTCCAGCTACTTTTGCCAAATTCT
		ATTTGTCTTCTCCTTCAAAACATTCTCCTTTGCAGTTCCTCTTCAT
		CTGTGTAGCTGCTCTTTTGTCTCTTAACTTACCATTCCTATAGTA
		CTTTATGCATCTCTGCTTAGTTCTATTAGTTTTTTGGCCTTGCTCT
		TCTCCTTGATTTTAAAATTCCTTCTATAGCTAGAGCTTTTCTTTCT
		TTCATTCTCTCTTCCTGCAGTGTTTTGCATACATCAGAAGCTAGG
		TACATAAGTTAAATGATTGAGAGTTGGCTGTATTTAGATTTATC
		ACTTTTTAATAGGGTGAGCTTGAGAGTTTTCTTTCTTTCTGTTTTT
		TTTTTTTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGACTAATT
		TCACATGCTCTAAAAACCTTCAAAGGTGATTATTTTTCTCCTGGA
		AACTCCAGGTCCATTCTGTTTAAATCCCTAAGAATGTCAGAATT
		AAAATAACAGGGCTATCCCGTAATTGGAAATATTTCTTTTTTCA
		GGATGCTATAGTCAATTTAGTAAGTGACCACCAAATTGTTATTT
		GCACTAACAAAGCTCAAAACACGATAAGTTTACTCCTCCATCTC
		AGTAATAAAAATTAAGCTGTAATCAACCTTCTAGGTTTCTCTTGT
		CTTAAAATGGGTATTCAAAAATGGGGATCTGTGGTGTATGTATG
		GAAACACATACTCCTTAATTTACCTGTTGTTGGAAACTGGAGAA
		ATGATTGTCGGGCAACCGTTTATTTTTTATTGTATTTTATTTGGTT
		GAGGGATTTTTTTATAAACAGTTTTACTTGTGTCATATTTTAAAA

[1925]

		TTACTAACTGCCATCACCTGCTGGGGTCCTTTGTTAGGTCATTTT CAGTGACTAATAGGGATAATCCAGGTAACTTTGAAGAGATGAG CAGTGAGTGACCAGGCAGTTTTTCTGCCTTTAGCTTTGACAGTTC TTAATTAAGATCATTGAAGACCAGCTTTCTCATAAATTTCTCTTT TTGAAAAAAAGAAAGCATTTGTACTAAGCTCCTCTGTAAGACAA CATCTTAAATCTTAAAAGTGTTGTTATCATGACTGGTGAGAGAA GAAAACATTTTGTTTTTATTAAATGGAGCATTATTTACAAAAAG CCATTGTTGAGAATTAGATCCCACATCGTATAAATATCTATTAA CCATTCTAAATAAAGAGAACTCCAGTGTTGCTATGTGCAAGATC CTCTCTTGGAGCTTTTTTGCATAGCAATTAAAGGTGTGCTATTTG TCAGTAGCCATTTTTTTGCAGTGATTTGAAGACCAAAGTTGTTTT ACAGCTGTGTTACCGTTAAAGGTTTTTTTTTTTATATGTATTAAA TCAATTTATCACTGTTTAAAGCTTTGAATATCTGCAATCTTTGCC AAGGTACTTTTTTATTTAAAAAAAAACATAACTTTGTAAATATT ACCCTGTAATATTATATATACTTAATAAAACATTTTAAGCTAT
CD47-205 CDS	SEQ ID NO:17	AAGAATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAGGGAT ATTAATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGATTGGATT AACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGGTGATAGCCTA TATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTATTGCGGCGTGTAT ACCAATGCATGGCCCTCTTCTGATTTCAGGTTTGAGTATCTTAGC TCTAGCACAATTACTTGGACTAGTTTATATGAAATTTGTGGCTTC CAATCAGAAGACTATACAACCTCCTAGGAAAGCTGTAGAGGAA CCCCTTAATGAATAA
CD47-206 CDS	SEQ ID NO:18	ATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATACGTAAAGTGGAAAT TTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGATGGAGCTCTAAACAAG TCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTAGTGCAAAAATTGAAGTCTC ACAATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTTGAAGATGGATAAGAGT GATGCTGTCTCACACACAGGAAACTACACTTGTGAAGTAACAG AATTAACCAGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAAATATCG TGTTGTTTCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTCTTATTGTTAT TTTCCCAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGTAT TAAAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGATGAGAAAACA ATTGCTTTACTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTGTCATT GTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTCATTAAAGAA TGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAGGGATATTAAT ATTACTTCACTACTATGTGTTT
人 CD47 基因	SEQ ID NO:19	CTCATTCTATTTATTCTTTTAACAACGATTTGTTGAGTACATACT ATGTGTCAGGCAAAGGGGCTAGCAGTAAAGAAGACTCATATGG TCCCTCCCCTCATTGAGCTTACAGTATAGGAAACAGTTATTACT GAACACGAAGACAGCTATATAAACATAATTTCAATAAAAGATG GTAACTGATATGCACCAAAGTAAGACTAAAACACAGAGAAGTG CACTTAACTTATACTGGCATTATCATGGGCCTTGATTTACTGTGG GATCCTTTGCTGTTATGTTCCCTTACGTTGAAAGATGCATCTGGC CCTACACAAAGCACAGACTATGAGTAGGTAGGCACATACAGTT CTAAGCCAACCCCTTGGGGCACCAGGAGACAGCACTGTCTCATG TCGTTGCATGACACACCACCATGGGGCAAAACATTTGCTGAATG AAGTTACAATAAGGATACAATTGTATCTACATAAACATTTAAAG ATACTATCATATCAATACCTACTATGTGGCAGGATCTTGATGTT GTGTGGGGAGGAAGATAAAAGTAGATGTATCGTTGAGACAGAA ATGAGGGCAAGGGAAATTTTTTATGCATTGAGAGAGGAAGTTT GTGAATTTTTTCGCTGGCCATGGAGTCAGGGAGACTTCAGTCCA ACCACCGTCCCTCCCTGAGCTTGTGACCAAGCCTCACTTTCCTTA TCTATAAAGGTGACAAGAGTGATTTTTTTAAGTTTATTTATCTGT AAAGGGGAAACTGTAGCAACTTTGCTATTATAGGGTAAAAAGA AAAAAGGATGAAAACCAGAACAAGGGAGAGAGACAAGAGAGA GAGCAGTGTCACTTATAACTGTGGGCAAAGTGCTCACCATTCCT CTTTCCCTTTGTTTCCTCATCTCAAAAAGGGAGATCATAACATTT ATCCTTTCTGAGGTTGTTATGAAGATTAACTTAGGTGATATAGCT AATGTGTACTTCCTGTGTTCAAAACATTCTAATATGTATTATCCC CTCCCTCTCTACCCAAGAAACTCCTTACATACAGATAAGATGAG

[1926]

		CTCAACATCCAAATTAAAATGCTTTGAAAAGTTAAAAGGCAAA
		CCTTTAAAATGATTAAATACTGAAAAGAGCTTAAGGTTATCTCA
		GAGAGAGGATAATCAAACCTAGGCAGGCTGCTTTGGACTGTCTC
		TCCTGGGATATGCCTGCTTTTGCCCCACCACCAAAACATACCCC
		AGCTAGATTCCCAAGAGCAGCAGTGGTCACCCAGGTGGCCTCTC
		ATTCCATTTTCTGCACAAAAAGACGTTAAGCATATAGCTCAGTA
		GCTCCCAGTGTAAAACAGAACATCACCCGATCTCCACCTCTGAA
		GGTTGGGGACAGTCCTTTCTAGTCACTCTTCAGCTTTAGGGGGG
		TTGGTTGGTATCAGGGACAGCTGACAGCCTTATTTAGCCAACCA
		GCTGCTCTGTGATACACAATGTCCCTAATGCTCAAAGTCTGGTG
		GATGATTCTTTTGTATCCACATAAGCAGCAGTTGGAGGAGAATC
		GATGAGTCCCTTTGGTTGCCTCGGGGTGTCAAGGCTGCCATTCA
		AATCATTACCACCATAATTATTAACCATTGTTTTAGTGAGATGTC
		TGCCAGGCAATTGTTTTTATTTTTCAATCATTAAAAAAGCAATCA
		AATTTCACTAGAGCAATGCCTGCCTCACGCCGCATCAACACATT
		TATTAAACCCCTTCTGTTTGCCGAGCTCAATGGAAAGTCTTGGA
		GGAGGGAATACTTAAAATGCTCTCGGATTTAAAAGAATTGATA
		ATGCTGTGGGGAAGAGGTTCACACAAAAAAGCAATTACAGGAA
		GAAGCTCGATAGTATACAATACACTGGTACAGAGTGTCATAGA
		CAGTGCCACTTTCATACGCTGGATTTTATTTCTGTGGCAATGGGA
		TGCTTGGGAGGAGCCGCACTGTGTAGAGGATTTGGAGAAGTGG
		GGTATTGTGGTGGGAAATTGCTTTCTTTCCCAGGAGGTAGGAGG
		AAAACAATCAAGGAGGTGGACAGGATGTGCACTCCATTAGAGC
		AGCCACCAGAGCCTGACTTTTTGATAAGAGAGTACATCAGTTAG
		GATAACGGTTAAAAGTATCTTTAAAAGACTTTTGCTTCAGGATG
		AATGATGTGGCCTGTGTGATTCAGCGATAAATTCAAAAGCCTTG
		TCCCTATTGTGGCTTGCGGCCACATTTCGAACCCATTTTTCAAGC
		ATGTTAAACCCAAGCGCAGCGCAGAGGGCTGCACATGGGGCAG
		TCACAAACCAAGCTCAATAACCTTGCTGGTGGGGATGTGTTGGA
		TACGCTGCTAATGCCTGTTTGCGACAATGCTCGCTAGTCCCGGT
		GGTGGCGGTGTTCACAGGTAACAATGTTTACCACCGTGAATGGA
		ACTTGTTTGATTAACCCTGATCAGAGGATGAAAACACTAAAGAA
		CCAAGTGAGAAAGAGGGAAGAGAACCGCATAGGGAAGAGCAG
		AGCGAGTAGACGAGCCGAACGCAGAGCCCGCGAGGGGCGAGT
		GGAAGCTCCCTGCGGGCAGGTACCCGACCACCGCCCTGCCCTGG
		GCGTGGCGGCCTCGGGCTCAGGGACCGCTTCGGCGCTAGACGG
		CCGCGTCCGGAGGAAACGGGCGCTGGTGAAAGCCTAGGTGTCC
		TGGTCCACGCGCGCAGCCGGACGTCGGGTCCAGGGAGAGACGC
		GGGCTGGGGCGGGACGGGACCCGGCCCCTGAAGCGCGAGGGTG
		GGAGTGAAAGCAAAGAGGAGAAAAGTAGAGAGAGAGGACAGT
		GGGGCCCAGCGCCGCGCGAAAGGCAGGAACCGACCCGCGGACA
		GGAACGGGTGCAATGAGGTCCCCGGCGAGCGTGGGAACACAGG
		GTTCAGCCTCCTGCGGCGGGCGAGCACGCGGACCCCAGGGGCG
		GGCGGGTGCGACAGGACGTGACCTGGAAGCGCGGCGCGTGCCA
		CCGCCCTGGAGCAGGCATCCGGCCTCCGTGGAGCGGGCAGGCG
		GGCCCCGGGTCTGGAGCCTGCGACTGGGGAGGGCGCCGCGTCA
		ACAGCAGCGGTTGCGGGGCGGGGCCGAGTGCGCGTGCGCGGCT
		CTCGCGGGCGGGGAGCAGGCGGGGGAGCGGGCGGGAAGCAGT
		GGGAGCGCGCGTGCGCGCGGCCGTGCAGCCTGGGCAGTGGGTC
		CTGCCTGTGACGCGCGGCGGCGGTCGGTCCTGCCTGTAACGGCG
		GCGGCGGCTGCTGCTCCGGACACCTGCGGCGGCGGCGGCGACC
		CCGCGGCGGGCGCGGAGATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTT
		GCTGGGCTCGGCGTGCTGCGGTGAGTGGCTCCTCGCTCCCAGCC
		CTGCGGCTGCTGTCGCTTCGCCCCCGCGGGCGTGTGGGCTGCGC
		CCCAGCCAGCCCGGCGGCGCCCTGAAGAGGGTGGCCGGGGCGC
		AGAACACTCGGGCCCTGAGCGCCCGAAGTGCAGACGTGGGAGG
		GCCCCACGGGGAATCGGGCGCCCCCCTTCTTCCTCCCTTCCTTTC
		CCTGGTCGTCTTCTTCCCCCTGGGTGAGAGCGGGGCTCATCTCCT
		CCACCCGGTTCTCCATCTCCAAATGCACACACACAGGAAGACTC
		CAAACCGCGCACCTCGCGCAAAAATTAACTAGCAAGAAAGGGC

[1927]

		GCGATCAGAGGCAAGGGGCTGCAGCTGCTAGGGATCCCCTTCTT
		TCGCACCCCTCTCCCTTCTCAGTGCTTAGACGCATTTGGGGTTGA
		GGGAGGGAGAGTGGGAGGGCCCGGGCCTCTTGCGATGGAAGTG
		CGCATTTTGGCGAAGTCGGTGAGAAGGGGTTTCTGCCGTTTGCC
		TCCCACATGAACATAGGAGCGAAGAGGACGTAAAGGACACAAT
		TAAGTTTCATTTTCAACTCAGCATTCAATCAGAAGAATCTTCCG
		GCCGTGTAATTTTTGCTGTCGTTTTTAATCCTAAAAATAAGCTTG
		CTGGAAACTCTTCCTTTCTCGTGACCCTCACGCCCCATCAGCCAC
		TTGCATACATTCTAAATTGTACGTTGAAGTTTTTCCCACTTTATT
		TGGGGGAACCGTTTTAAAAGTAATCTGGTTTTCGCCTGAAATAG
		GAAGACAGTAACCTCCAGTCAAAACATGTGCAGCAGAATGGGA
		TTTGGTGTTTTTCGACGCCAAAGAACCTCCACCCCCCCACCCCC
		ACCCCGAGCTTTTGGAATCCATTTCGCTTTTGTAAAACGTGTGCT
		TCGTCTGTAAAAACTGAGCAAGGAATAGAAACATTCGTAGCTCT
		ACAGTGAGTGCCTGTCACACTTCACATCCATAGAGCCTTTTGTG
		AACTTTTATAAGATTCAGAATTCAGCTTGAGCACCAGTGACAGC
		AATTGTTACATTTATTCTAGAATGCTAAATTAATTCGATTTTAAA
		CTGATTATTAGCCTCGGTGTGCCGTTCCTAAAGGCTTGTGACTTT
		AGGTATTTCCAAGATGCCCTTAAGTCTCTGCTTACCACTTTCCTC
		CCTCCCCGAGCATCCTGGATGTTGGGACTGTGAATCCAGGTCTC
		CGTTATCTAAATGGTTGATGTTAGTGTTTCCTGTCATCACGTTTA
		GTATGCTTGTTGCCTTTACTATCATTATAGCTAAAATAATACTGC
		TTTCAGAGATGTGTTGTATAATCGCATAATAATTTCAGAACGCC
		TTCATATTGAACCAGATATGAAGTGATACAGTATCATTTATTCA
		AACTGCCTAAAAAGTAAAAAGTATAAACCATATACTATTTTTAA
		AACAGGTAGGTTAGATTTAAATCACGTAGTTTAGAACTGTTGGA
		ATGGTACTTTGAGTGATAGGATTTATGTTAGGCCTTCTTTAGTAA
		TAGTTAATATCATGTAATTAGCACTCGTTTACACACAATTTTAAT
		GTGTTCGAATCCCTAGAGTCATCGAATTCAGAATTTATAGTATTT
		TATTTTACTTAGTTAATATTAACCTAAAAAAAAAAGCAAAATACA
		GGCATTATGCAGTTGAGTTGTGTTAAGTGTGGACTGTAAAACAG
		GATAGTATTTGTTATAAAATATGTTTTTGTATGTGTTTAATATAT
		AGCTTCAAAAGGACATGTATGAAGAAAGATGTCTCAGCACATA
		GGTAGTTATAAACCAAGGGTTTGAGAGACTGACTTTAGAATCTA
		GAATGAGTAAGAAAGTGATGGATCTGTACATTCATTTGTATTGA
		AGTTTGATTTTGCTTTCAGTTTCGTTAATTAAGCCCCGGGAATCA
		GGGACCTTTCCTGGCACCCTCTACAGTGTTAGTGGCCTTTGTGGT
		AAAAGAAGTTATCTCAGATACTCATTTCATGCAATTACAGGCAA
		ACTGGAAGGCACCTTAATGGTATGCAAGATGTGAAATGAATTA
		CTATGTTGCATTCCACTCTGCCCCCACTCATGTACAATTATACTT
		TGTTTAAAAGTGCATAGTTTCAGTGGTATTTATTAGCTAGCAAA
		TAAAACTTTAAATAAATAATGATGGTGTTGTGAACTGTCTTTTC
		AGTGGTTGAATGATTCCTCTTTGTTCAAAATGAGTTGTTTTTTTT
		TTTAAATCAGGGTACATATGATTAAATAAAATTTTTTTCCATCGT
		CTAAGTCTAGTAGTAATTTGGCTTGTTTAAATAAAAATGTTTTCT
		CTTAAAGAATATATTATTTTTAATTACAAGTTGCCATTTTAAGGA
		AGTAAATGCCTATTTAAAAGTACGTATTTATGGGGCCGCCCCAG
		CAGTCTAGAGGCAGTGTTTTTTAAAGCATTACACTAAATGCCTA
		CCATTAGGACACTTGCTCATGCTGTCATCTGTGTTTTGGCAGATG
		TTTTATCTTTGTCACTGAGTTGTTCATGGAGATTTGAAAGGCCAA
		GTTCTAAAGATGAGAGATAGATGACTTTCCCCCCAAATTGATAC
		ATATTCTAAATCCAAAATAATCACGCATATTCGCAAAACTAGAT
		TTGCATTTCATAGTATGAATTCAGCTATAGCTAGTATATAGGCA
		TTGCTTTTAATATAGTAATGTTCTTTTTGTGGCATAATTTTCAAT
		CACTTTCCCTGTCTTAGGTTTCTGCCTACCTTTTTATACAAGATA
		AACATTTCTATTTTCATATCTTATCTCTCAGTCTGATTTTAATAAT
		ATCGTCTTGGGTTATCATAAAGTTACTTTCACTTTGTATACTAGT
		GTAGATATTTCTTCTGTGATAAAAAGAACAAGAATAATAGTGTA
		GGATCAGTTTTGTTAAACTCATTGTAGTACTAAAGTAGAAAATA
		CAGAGCACCCAGGAAATTTGATTCTGATATACCTAGACTAAGAC

[1928]

		AATAGAATCTGGGTTTTTCCTCTTTACGATTATACAGTGTTGAAA
		CAGAAATCAAGCTACACCCACCTCTGAATATTTCATTCCAAATC
		CATGGAGCAGTTGCATAAGACTCAGAATCTGGTCAATCTCATGG
		TTTGAGATTCAGATTAGGAGAATTAATGTGCATATTTGAATATA
		TATCACACTTGTAGGTTAAAAGGTAAAGCAAGGGGTTTGGCTAG
		TTCAAGGCCTGTCAAAACCACTTTTTTCCATTTCAAGCAAGTAT
		GAGCCTATACTACACACCAAGCAGTTTGCAAAGCCCTCTTTGGC
		ATATAGACAAATTTCAGACAGTATGTCAGTATGTCTCTTAATGA
		CTTAAGATGTAGTATATAGACAGTAGGGATATCTTGTTTTTATTC
		CCTCATGGTACTTAGGTGCTTGTTAAGGCCATAATTCTGGATGTT
		ATTGACTTTAAACTGCCCTGCCCTTTTTAATTCTAAGTTGGCCTC
		TTCCATTCTTATAAGGCCACTTTTAAATTCATTAGGGGGATTGCG
		TTGGGTCAGAACTAAGTACAACTTGTGGACACCCCACTCTACCC
		CAGACCTTTATTTTAGTGTCCATTGAGGAGAGATCTGACTTCATC
		CTTTTTGTACGTAACCCAGTGTAGCTAGAGACTCCAGTTCTTCA
		AGCCAGACACTAGTTCTAAGGGGCAAAAGTAGGTAGGATTGCT
		TTCTGGCATGTGTCTTTACTGATGATCTTTGCTTCTTTACCTAAG
		AGGCTGCTGAGACTTCTTACTCCATTCCTGAACATCCATTCCCA
		GCAGATAATTAACTTCCTACTCTACTGCAAAAAATAGTGGTGTG
		TGGTTTGGACTCCCTCTGCTTCCCTCCCACCATTACTAAACTGAT
		CTATAACATCTTAGATAACCTTCGTCTCATTCTCTTCCGTCATCC
		AGCTTCAGAAGAAAACCTACTCACTTTTCCAACGAAAGGACAA
		CCTGTCTACCACCTTTTCACTTCTACCATCTTGGAGACCTGCTCA
		GTCAGCATAATTCTTCAGTCTTGCATCTTAGATCTTTCCCTCTCC
		ATTGACTCCTTCCCCGTAGCTTGCACACATGATCAAATTTTACCC
		CATATTAAAAAATAAAACAAAAAACCTCAAGAACCAAAATGTC
		CTTGCCCTTGTTCCTGCCTGCACATTGTCAGTTGTTGCCTTCTCT
		GCTTTCTTACACTGCCAAATTTATTGTAAAAGAATCACTGCCAC
		TTAATATATTTTAAGTGCTTGATAAAGCCATCTTGTTTCTCTCTC
		ATTTCTCAAACATAGTGTGCATCAGATCTCACTAGTCCATTGAC
		AGATGGAAAGATATTCTCCCCAAATATTTAAGCCTCTTTTCTCTA
		TAATTAGCCTACCATCTAACTAGCTACACATACTATTTTGGTTCA
		CAATTTTAATTTTCCCCTCTTTATCTCCCCTGCTTCCCACAACTA
		ACTTCTGTTGATTACTGTAAGTTTTAGGTCTTCTCTCCAGTTGTT
		CTTTACCTGGACTATTGCAGTAGTCTGTTAACGGATCTCCCTTTC
		TCTTTTCCCTTGCTGCCCTCAGTCCTTCCTTTACACTGCTGTCAAT
		GTTTTTTTTTTAATGAAATTAAATCTGAGTGGTTTACAGTTGTTT
		ATGTTATCAAGTCTAAACTCAGCATGACATTCAAGGAAGCCCTT
		TAGAATTTTTCTTATTCATCTTTTCCAACCTCATTTCCTAGAGCTC
		ACCTAAATAATTCTCTGCTTTCAGTTCTTCACTTTCTTTATCTGGC
		TGTACACGTTACTCTGCCTAGAAAGCCCCTTCTTTCCCATAACAT
		TCTTACTCATCCTTTAAGACCCAGTTTAAACATCACCCTCTAGGA
		AGATCATTCATAGACACATTCTTGTGATTTTTAAGGAACTTTTCT
		ATCCAACCATACAAGTGACTTGAGATTTTCCATGAAAATATGCA
		GCTTCATGATTTCATAATCAAGTCTATACAAGTGAGAAGCAGTG
		GCAGGTTCTCTTGAAATACAGAAGAAAAATCTATCTTCTCCCAC
		ATGATTTTTAGATTTTTCTTCTATGGAATTTATACTTTAAACTTTT
		TACATTCACAAGGAAGGTATTGAATCCTACTTTCTGGACCCTGT
		GTTAGATTCTTAGGATACCAAATGAAGACAGTGTCTTACTTTCT
		GAGCCTGGAGAGATCAGTTAAGTAAAATAGTAATTACACAGTA
		GTAGGTACAGTGACAACATTTGAACACAAGGCAATGGGAGCAA
		TAAGGAGGGGAAGAATACAATTGAGTAATGGTAGGGAAGGGG
		AACAAGATTGAACAACTCAACTGTGCTTTAGTAGGAAGAGCAA
		AAGTTAGCAAACTGTAGCTGCCATTTATTGAGTACTTGCTGTAT
		ATGTGAAAGGTGATACAAAAACATGTTATCTTATTAAATCTTAA
		CAATATCTCTATGAGGTATATACCATCACTATGCACATTTTATAG
		ATGAGGAAACTGAGGAGCAGAGGTAAGTAACTTGCCTAAGGTT
		ATACAGCTAAGAAGTACATGAGGTGAATCTTAAACTAGGGTCG
		ACCCCTTAATGTGTGCACTTAACTATTATACACCCTATGTACTCA
		GTGGGGTAATAGTGTATAACAGTTAAGAGGCTATTTAGGTTTGA

[1929]

		GGAACAGTATGTGCTAAGGCATGGGGATGAGAGTGCATTTGCA
		TAGTCATGGAATTGCAATAACGTCATTATGATTGGAGCTTAGTG
		TGGAAATGAGGGAGTACAGGAGGTGGGGCTGGAAAGGATCTTG
		AAGGACCTCGTTTGTATTCCATGCTAATGTACTTAGAATTTAGCC
		TGAAAAGGGTTGAGGGTGTTGTTAAAGTATCTTAGGCAAAGGA
		GTGCACATTTGCATTTAGAACAGTTATTTTGGGAACTGTAGAAA
		ATACATCAGGGCCAGGATGGAGAAACCTTGAGGATGGAGGCAG
		GGAGCTGGTTAGAAGGGTATGGCAGTAGTTCGAGGGGGGAGGA
		TGAGTGTCTAATTCATTCATTCAACAGACATTGGATTTAGGAAC
		TATTAATTAGGTTGAACCTACTAAGAATTCTCCATGGCTAAGGA
		GAGGGAGTAATCTAATGTGATTCTTAGGTCCAGGTCTGGTTCAC
		TGGTAGATGATAGAAAATACTTTAGCAAAGTGATTTAGGCTGAG
		GGTAAGAAGTGGGGGTACGTAAGTTTTTGGACATACTGACTTTG
		AAGTAACTGTATTACATCCAAGTGGAAGTGCACAGCAGACAGT
		TGGCTGTCCAACATCTGCAGTTTAGAAGAAAGGCAGTGCATGAT
		TCAGTTTTTTATTTAAAAGTTTGCAGGTGAAGAAAACCATGGGA
		GTCAGGGAAAATACTAGGGGGCAGAGGGTACTGAATCTGAAGC
		CCTTAGGGACACTAACATTTAGTGTGAGTCAAGGAATAGATTTC
		AACAAAGAAAGCAAACTAGGATGGGGTGGACAAAGCAGGAGG
		AAATTCGTAATCAGGAGATACCATGGAGGCCAAGAGAGAAGAG
		CAAGAAAGAGACTGCCCACTGGCTCAAGAACTGTGGAAAAGTC
		AAGACAGAAAGTGAACCATGCATATTTGATTTTTCACAAGGGAT
		TGGTGGTGACTTTGGCAAGAGCTGTAGTAATGAAGAAGTAGGG
		GTGAATGGGTGGAGGCCACGTAACAGATTTAAGGAGTGAATTG
		GAAGTGAGGAAATGCTTATAGATTGTTAATTTGGGATGCTAGGG
		AGAGAGAAAGTATGAGGGATTTTTTTTAAGTTGGCAAATATTCA
		AGCAATTTTTAAAGACACACACAAAAACAACACCTTGTAAATG
		GAATGGGGGATGTGGGAGGCTGATAATCAACTAAGGAAAGTCG
		TTGAGGAGACTGATGGGTATGGAGGCAGAAATGGAAACTAGCT
		TTCAGGTGATGGGATTCATTTCAGAAAAGGAAGCAAAAAAAAA
		AAAAAGGTGTGGATAGTTGGGGTTACAGGTAGGTTTATAGGGA
		AGGAGTATTGGAAGCTTCAGGATTCTCCTCTGAAGGTTTCAGTT
		TGTATTAAGAAATAGGGAGAGAGGACTGTTGGAGAGTATGGGA
		TAAAGGGCAGAAGGGAGTAATTTAAGAGTTGTTAAAAAGAAGC
		GAACATTTACATGAAATATGTAAAATGGTAAAGATTGAAGGCC
		CGGAGGAGCAGGGACTATGACATTCTTCTGTTTTTGCCTATTAG
		CAACATGAATTTTCTTAGAAATCTGTAAGACCAATTACTCTTCTG
		CCCATCCATAAGGACGTTGTCCATGCAGAAAAGATAACACTTGT
		AACCTTGTATTATATACTTATCATCGCCCATTTGAGAATTGTAAG
		CTCCTAAAAGATAATAACTATATTTTTTCATCACTATATCCCCAC
		ATCCTATCACAATATTTCATCACAGGTAATTCTTGACAAATGTTG
		ATTGCATTTTTAAAATTTCTAACCTGAACTTGTGTGCTGTGACCA
		CCATGGATTGAGTCTTCTCTGCCACTACAAAGCTCTTTTCTAGAC
		TATGATATGAGATGGTTTGGGCTGATAGTCTATATTCACCAATA
		CTTGTACAGTTCCAATGAAGGTTTCAAGTCTAATACTTTTGGCAT
		TTGATATAAAATCATTTTCCCATTTTATTTGCTAATTTATCTATA
		ACTCTGGCATTACTCTTGGTTACATTTGTCTGCTGCTATCTGATT
		TAGACTGCTATAAGCATATCTTGTTTATTCAGAGTTTTCTTATTC
		ATGTTAATTATCTGTGTTTCTTTATTTGCTCTCTACATTTTAAATA
		GTTTCTTCACTTTGCTGTTTTATGAGAAGGGAGTAGGCAAAAGG
		AAAAAACCCCAAATCAGACAGTTTTACTACTTAATAGTTTTTTA
		ATGCATCTTTATAGAGATTGAAGTTGTAGTTAACAGCTAGAGTG
		ATATTTTTGGCCTGCCCTTATTTATTAATTACTAGTGCAAAGGTT
		ATTCAAATTGTGGTTTATCCAGGTCAATTTTACTGTTATTTTTAC
		TAATAGCATTTATTCTACTTAAATTGCTTCAGCTATAAAATGTTT
		TTATTGTAACAAATAATGCAGTATAATTATTGCTTTCTGTATTCC
		TTTGAAAATTCATTCTCTAAACATATGTTATGAAATGGTGGATT
		GTTCACCAACTACTTCTTACTTACTTAATTAAAGCCTTTGCAAAA
		AGTTTCATAGGATGACTGAGTTCTTCATTCGTACCTCTTTTTTTT
		AAGAATAATCTCTTGAAAGTCAAACCATGATTCATACAAATATA

[1930]

		AAATGAACATGTGTCAAAGATTTTATTTCACTAATTAATTAACA
		AGCAAACTAGCAAGAAGGCAAAACCCTTTTAAAAGAAAATTGG
		AAAAACAGACACATTTATAGGCAATCAAGAATGCCTAAATGAA
		TTTGCTAATAAATGCAAAATTGGTCAATATCCTCAGGGCAGTAA
		AATGTAGTCTTTTGGAATCCTCTCTTCCACCAGGTGGAAATCAA
		TTGCAGAACAAGATTTATTTTTATCTGTATGGACAGCAATCCATT
		TGAATTACTCTCAGTTTTCTACAACTTATGAAACTGTAAAACAG
		CCCAGTCAAAGTCAGTGAAAGGCACAGGCTTCTATAGAGTCAG
		ATAATTCCAAAGCGTCTGTTAGACATTGCCCAGCACTTGACTGA
		AAGGATACCCAGTAGTCTTTGTATCCCTTTCAAAATCTTCACCAT
		ATTTTCTGATACTTTCCTTCCTTTATAATTTGAACATCTTCACCCC
		TTTATTCTTCTCTGGTATACTATGTCCTCTCTCCCTCAGTGTTTCT
		CTCTCAGGGGAAATAATTCACAATTCCAAAGTTTTAAAGAATGC
		AACGGAAGTCCAGGTTTTGCCTTGGGCTTCCTAGTATTTGGGTG
		GCTAGAAATGTAGAAAACTGGGAAGAGGTGAGCTGTGGATGCC
		CACAATATAGGTTCAGACTGCAATTTCCCAGAAATATAACAATT
		TGGACTAGTCAAAGAGGGCCCATATCATTACATTAAAATGCCAG
		ATTATCTAGTTTTTATAGTATCACCCTACATTTTTACAGCATAGT
		ATTGTTTAGAGAGCACTTGCCGCTATGTTTTCCATGTTAATGCTC
		AACACAGTTCTGTGAAGTAGCCCGGTGTTTGTTTTTGATCCTCCT
		ACTTAAGAGATCCTCCTATTTTAGAGAGTAAACCAAGGCATAGA
		AAAGTGAGTTGCTTAAGGCAGCATATTAAAAAGGGGCAGAAAT
		AGTATTTTTACTCAGGTGTTTTGAACATTGTCCAGTACCTATATT
		CCAGTATGCATCCTTGCATTCAATTCATGGGGTATTTATTGAGTA
		AACATAGTGTTCTTACAATAGAAACATTCTATGCCTCTGATTTTT
		ATTCCAGTTTATGTAGAAGTAAATCTTAAGTGTGAACTATTAAC
		AAAGTTGATATTTTATTTATATTTGTTAGTAATTTGTGTTTTGTTT
		TTGTTTATGTTTTGAGGGGAAGGCCAAGTAGCTACTTAGGTAAA
		AGAGTTGCTGAGTGGCTGAAGAATATGGAAGACAACTACAATT
[1930]		CCTACACATTCTTGTACATTTTAGTTGAACAATGAGTGATTACAT
		TTATTTACCCAGTGCCTCTTCTATAAGGCAACAACTGGTAGTTTA
		TCCTATTGAGAAGCGTAGATAGGATGCTTATTAGCAGTAACTGC
		TCTTGGTTTCAACTTGCATCTTACTTAGCTTTTTCACCGTTTTGTG
		GTTTCTTGGAGGAAGAATACCCATAATATACATTTGGAGACTGT
		TGTTCTGTAGTGTCAATGAAATGTGGGGGTGGGAAAATGTCATT
		CAAGACTCCCATACAAAATGTCTATTGCTGCCTATATTTTGCTAT
		GGGAAAGTAGCCACAGATAATGTTTTTTTTTTCCTCATTAGTATT
		TTAAGATTTTCCATCCTAGTGGAAAGATATGATTTGATTCATCCT
		ATTTACTTTGTATATTAAAGTACAGTAGAACCTGCCACTTTTTTT
		GGAAATGCAGCATAAGGATAAAGATAAATTTCATATCAGTTCA
		GCAAGTTCTATTTAGCAGTGTGTTGAAGTTGAGACTGAATAAAA
		TATTTGGTTTGGTTTTCTGTTCAAAATTTTACCTTGATAAGGACA
		ATATTTTTCTACATATATCAGTAGGCAGTAATGATTACTTCAAA
		GCTTCCAAAGCCAGATACTACACCTGCATGTTCCAACATAGTTG
		CTGAATTTATTCCCAAGATGCATGTAATGTATACTTTGTATTATT
		GAGAATGAATAAAGAAAAGTCATAATGATGCCTTCCAGCTGTG
		CAAGTTAATATTAAAATATAATTTGTTTGCATATTTCACCTAATA
		GGTCTTCTTCATTGCTATACTGTTTACTTAAGTGAACAATGGAAA
		TGTTGCTGTTTATCTTAAGGATTTGTAACATGCCTAAGATCTTAC
		AGTACAGACTTCTATAATTAATGAAACATTTTTCTTTTTCCTTTC
		CAGGATCAGCTCAGCTACTATTTAATAAAACAAAATCTGTAGAA
		TTCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCATTCCATGCTTTGTTACT
		AATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATACGTAAAGTGGA
		AATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGATGGAGCTCTAAAC
		AAGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTAGTGCAAAAATTGAAGT
		CTCACAATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTTGAAGATGGATAAGA
		GTGATGCTGTCTCACACACAGGAAACTACACTTGTGAAGTAACA
		GAATTAACCAGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAAATATC
		GTGTTGGTAAGACTTCTATGAAAGCTTCTTTTTTTATTTGTCCTG
		GTGCAACCTGATCCTCTTTCGAGAGGAGGCCAAATGGGGATAG

[1931]

		GTACTCCTTTGAATCAAAAAGCAGGCTGTTATTAATAAATGTTG
		ATGTAATGTTTAGCAAGTTTAAGATTGTGATTTCTATCCTATTTG
		TTAATCTACTCTTCATGGTAAAACACATTTACTATTTAATTTGTA
		TTACTTGTTAATTTGTATATTGTGTGGTTCTCAAACTTTTGGTCT
		AAGGACCATTTTATTTGGCTGATTGGTCCTGGGGTAATGTACTCT
		TCATTTCTGTTTGCTGCCATCCAAGTGCTTTCTTTCCTGTGACTA
		ATTTTCAAGTCTCTTTCCAATTATTCAGCCTTCTGTTTTTTGTGTT
		TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAACCTTACACTTTGACCAAGG
		GATGACAAGTCCCAGCCATGCTCCCTCTGGAGAGAATAGAGGA
		GAGTCAGGAGATTAAATCACGTTATCATGGATGATTTCTTCAGA
		TTTTCTGTGCTTAGCCTTACTTTGGTCTTCTTTTTGTTGGCCAAAA
		TATGAGAGAACTAGAGATTCAAATTCATTTATTCAAATTCAGAC
		TTGATGATAGCACCATGATTCTGCCCTTTTTATCACAAACTTGGG
		TTGCTGAGGTGTAGAAGGTAGTAAAATTAGCTGAAGTAAATAG
		TCTCCTCTCCTTGCTGTTTCCTGCTGTGCTAGCTGAGTTCTTCAA
		CCCCATATGAGTATGTTCTTTCTGTTTTGAAATCTCTATTTAGAA
		TTACCTGTCATATTACCGATCATGGCTTAACCACATTTTGAGAA
		CCTTAACTCTAGATAGGTTCAGTTCTGTTCAGTTGGATCAACTAT
		TTGCCTAGCTTTTATAAAATAATCTACTACCAGATTAGGAATGG
		GGTGTTTGGTTTGATGAAATGTTTGCACATTACTTAGGATTGAG
		AATCAGGAGGTCTGAGTTACAGCCCCTGTTCAGCAACTTACTAT
		TCACCTGTGTGATCTTGAGAAGGTGCTTAACCGAGTCCAAGTTA
		CCTCATGTCCGAAATGGAGATGACAATAGATACTTGCTTTTATG
		TATTCTACAGTCTAATGAGCATAAACCAAAGTGTGTTGTAAATG
		TTAGTTGTTTTCCTGGGATGTTTATTTTATGAAGTAAGGTATCAA
		GTTGTTGAAGTTAGCCTAGAGCATTGTGAGAGGGATTTGTGTGC
		AGTGAGGAATGGGCAAGGGATGGCTCCGAGTAGGCAAGGAGA
		ATTTGAAAGGTCTTTCTGCTCAGAAATCTCTCTTACATTGTAGCT
		TTTACTATTGATATTAATTTGGGCAAAGGAGCTTTTTTTGTTGTT
		GTTAAGTATACCTTTAATGAAGGGTGTAATCAGTCAGTCATATC
		CACTGCAACTAACTGGTATTAGATCATCTAATACCTAGTTGAAA
		TTTTTCTGAGGTAATGTACAATTTTGTGGAAATGAAAGAATAAG
		ATATGGGGGAACAGTAACTTTTGGGGGGTAATGCAGGTCACTG
		AGAGGTAAACTGGAAAACTCAAAATATGAGATTTGAAAGGCCA
		GAAGATGAAATGAAGATGGAAGAGAAAGGAATGCCAGGATCT
		GAGATAAAAACAGTTTATTATTTTGCGTGTGATTGAAAGACTGT
		TTTATCTTTGTTTGCAAAATACCCTATAAAAATAAAAACTAGAC
		TTATTTTGGGAGCCATTAAAAGGAGAAAGTATTGTTTTATTATA
		GAGAATGTAGAAAATTCTACCAGAGGTTTGAGACATTTGGCTTT
		GCATCCATTTTAATTTTTTGAAATAATTATTGATTTACAGGACGA
		TTCAAAGATAGAGAGCTTCCATGTGCCCTTCACCCAGTCCCCCC
		AATGGTTTCCTCTTATGTGACACAATATGAAAATCAGGAAGTTC
		ACAATGGTGCAGTGTGTGTTAATGGTTCGCTCTCATTTTATCACG
		TGTTTATTTGCGTAACTACCTACACAATCAGGACATAGACCTAT
		CCATCATAACAAACATCTCCCTCATGCTTATTCTTACTAGTCATA
		CCGCCACCTCCCACTGTCCCTAACCTGGCAAGCACCAATTTGTC
		CTCCATATCTATAATTTTGTCATTTCAACAATGCTATATAAATGG
		AATGATACAAGATGTGACCTTTTGAGAAGGGCTTTTTCACTAAG
		CACAATGCCCTTGAGATCTATCCAAGTTTTTGCATCTATCAATA
		GTTCTTTTTTCCTTACTTTTTTTTTTGCTGAGTAGTAGTCCATAGT
		ATGAATATATCACAGTTTGTTTAACCACTTACCTATAGTAGGAC
		ATTTTGGTTGTTTCCAAGTTTGGGCTGTTACAAATGAAACTGCTC
		TGAACAATTGTGTACAGGTTCTTGTGTAGACACAGTTTTCATTTC
		TCTGGGATAAATGCTCAGAAGTATGGTTACTGGGCTGTATGGTA
		AGTATATGCTTAGTTTTTAAAGAAACTGCCAGACTTTTCCAGAG
		TGGCTATTTCATTTTACATTTCCATCAACAATGTAAGAGTGATCT
		GGTTTCTCCACATCCTCACCAGTATCTGGTGCCACTATGTTGTAA
		CCATTTTTAACTGAAAAAAACAACAAACAAACAAAAACCAGTT
		AAAAAGTTATCTGCACAAAAAGGTTAAATGGGGCAGGACTCTT
		ACTATGGAGTATAAGTTCTTTTCTAATAAGAATACTTACTTGTCA

[1932]

		CGGACTTTGAGGATTTAAGCATTAGAAACCATTTTTACTATGTC
		GTGATTTTTGCAAATACAGGCATAAATGAGAAACAGAATTTGCT
		CAATAGAGAAGTGAATTCTACTTAATAGAATGCAGATAATAGT
		GACCATTCTTTGTGCCTTTTTAAATTTTTTGGAGGACTAGGACTG
		AATACATGGAAACACTATAAGATATAGTTTTATATACCTCTGTG
		CCTATGTATGATATAGTCCATTAGAAGGAGCACTGGACTTGAAA
		TTAGAAAGCTGTTTTCTAGACTTCACTGTTTAATAGCTTAAGAA
		AAGTTGGATAAAAAACTCAACCTATCTGTCCCTCAAATTCTTCT
		TAGTACAGTAAAGATGGCATCACCATCATGGAAATGTTTGAGAT
		ATAAATAATACCTCTCTTACTTAACAAAATTTTACTAAGTGCCTA
		CCATGTGCCAGTCACCGTACTAGGCATCACAGATTCTGTGATGA
		ATAAGACATTATTGCTGATTTCAAGGAAGTGGTTGCAGTACAAA
		TATGAAGAGTGAAGTGACCTAACATTTATTTGCACATGTGCCAC
		ATACTTTATGTAAGTCGTGTCCTGTTATCCTCTCAAGAACTCTAG
		GAGATAGATGGAGTTCTTACCATTTAACAAATAGGGAAGCAAA
		AGAGATTCAAGGTATTGTTCAAGGTCAGAGTAATAGCCAAGAA
		TTAAACCTAGATCTCTTTGGCATCAAAACCCAGTATTTTTACCAC
		CGTAATATGTGGTTCATGTGAAAACACCTTGTAAATAACTAAAT
		ACTGAATGCAAATACTAGTAATCATAAAATTTATCATTAATATT
		TCTGTTCTATTAGCAATACAAAAACTTGAAAACTTAAAGTTTAT
		TTTTCTCTAAGCTATTAGAGTTTTGTTTAGAAAGGTCAGTTCAAG
		TTCCGCAGTGTTGCCAATTCCATTATTATCAACAGGACATATGG
		TCTGTTTATAATGAAGACATGAAGGCATTGCAAGATCTTTGTAT
		TAGTTTTCTAGTGCTGCATAACAACTACAAATATAGCAGCTTAA
		AACACTACCCATTTTTTAGCTCAAAGTTTTGTAGGTGGCAAGCC
		TGGTCATGGCATGACTGGGTTCTCTGATCAAAGTCTTAAAAGAC
		TAAAATCAAGGTGTTGCCCAGGGCATACTTTATTTGGAGTTTGG
		GGTCTTGTTCTAGGCTCACATAATTGTGACAGAATTCAATTCCTT
		GTGATTGTAAGACTGGGGTCCCTGTTTCTTTGCTAAGTATCTGCC
[1932]		AAGGAATTGTAGCAGCTCCTAGAGATTGCCCTCATTTCTTGCCC
		CATGGCCCCTTGCATATTTAAAGCCAGCAAAGGAGAATCTTCCT
		CTTGTTGAATCCCTCTCACATATTGAGTTTATTTTGCCAGGAAGA
		ACCCAGACCCTTTTAAGAGACCACTTGGTTAGGTCAGCTCTCTC
		TCCCTCAAAAATAATCTCTCTTTCTTAAAGTCAGCTGATTTGGGA
		TCTTAATTACATCAGCAAACTCCCTTTTGCTGGGTGATATAATCA
		TGAAAATGAAATCCAATACATTCACAGTCCTAGTCTCCCACACA
		CAAGGGGAGGGAATTATAAAAGATGCATGGCTAGGGCAGGGGT
		TTTGGGACCACCTTAGAATTCTGGGTTTGATTAAATAAATAATG
		GGACTGTAGCCTAGCAAGTCGACACATCAGAAAAGCCATCACA
		ATCCTGAAACATCAAGTAAAAATTTGGTTTGCATTTTAGGATTG
		TAAATGTTACTGTGGTGTATGCGTGTGTGTGTGTGTGTAACCTG
		GTGTTCCCTATGTTTGTGGGAGTTTGAAGGAGACACTTTGTTGAT
		AGGAATGGTGTCTTCACTTTTTTAGGTTGTCTCATTTTTGTACAG
		TGATAAGACAAATGAGGTCCTGGGTTTTAATAACACTTCAGCTT
		GAAAGCAAAAATTAAACACTTATTCATTGACTACACCCTTGTAA
		TATCACTTCTTTGCCTTTCCACTAGCAAGAAGTTCATTTTCGTGG
		AAGCCATTCTGCCTGTCCAGGAATTGGAGGAGAGTGATAGACA
		CAGTTGTCAGCCATAGCTTGGGTAGAATAAGGATGTGAATGTCC
		TTGGCTTATCTTTATTAATCTTGTGATGGAAAAATATCTGACATT
		GTTCTTAGTCCATTTTAAGCTTAATTTATGTTCTTAGTGGCATAG
		AAATTCAGAGCTGAAAGAAGTATCATGTCTCACTCTCCCCTTGA
		GGAACAAGAGTTAACGTCATCTGACAGTACTACCATAACAAAT
		CAATAGCTTAATAGGCATATAAGTGGCTTTATATAAAATGTTGG
		TTTTTTTCCCCCAGCATCTCAGTTGGTTCTTAAATATCTAATTCC
		ATGATCCTCAAACTTTTCCCACTGTAACAAATTAGAGAGAGGAG
		GAACATGTTCATCAGTGACTGTAGTTCAAATACAGCAGAAATGT
		GCAGCAGTGATTTCAAACTGAGAGAATCCTGGATGCCCTTCTCC
		ATTGTGTGCCCCCCCCCCCCACCCGCCCCACATATCAGGGAACA
		ATTTAAAATCCTGGCACAATAATGAGAAGGGAGAGTGACAAAC
		TGATAAGTTCCAGTTAAGAATCACTTAGACAGGCCAGGTGTGGC

[1933]

		AGCCCACGCCTGTAATACCAGCACTTTGGGAGGCTGAGGCAGG
		TGGATCACCTGAGGTCAGGAATTTGAGACCAGCCTGGCCAACAT
		GATAAAACCCTGTCTCTACCAAAATTACAAAATTTAGCTGGGCA
		TGGTGGCGCCTGCCTATAATCCCAGCTACTTGGGAGGCTGAGAC
		AGGAGAATTGCTTGAACCCGGGAGGTGGAGGTTGCAGTGAGCT
		GAGACCACACCACTGCACTCCAGCCTGGGCAACAGAGTGAGAC
		TCCATCTCAAAAATAAAAAAAAAAAGAATCACTTAGACAGTATTT
		TTTGTTCTGTAATCTTCCTCTCTGTCATTGAAATGTCTCATATTTC
		TTGTTTCACATAGAATCTGGGAGTCATCAAGTAGTCATCTAGTC
		TATCTCATCATCTAATTTACGAATTATTTCTATCACACCCCAAGT
		AGCTGGCGATTCAGATTTTTTACTGAAAGCTTGACATGATGAGA
		CATTATTACTTCCCAGAGGATCTTGGTCTGTTATCAGGCAATTTC
		AGTTCTTCCTTAAATCAAGCTAAAACTTGCTACTATTCTCACTCA
		CTGGGAGGGCTGTAGTATTTCTCTCAAGTTTATACCTCTCTGTGA
		TGAAAATCTCTGTTCTTTTAGCCATTGCTCATGGTTTCGGGATCC
		CCATTCTAGTCATCTTCCTTTGGAGCAATTCCCTGTTAGATCTTC
		AAATGTGATGAGTAAAACTGAGCTCAGGACTGCGTTTGTTGGTC
		ACACCCTTCTCCCTTCCAAATGACTGCTGCTGTAACTTTCTGACA
		GGTCCTGCTTCCCTGTAATCCATTCTCCATGTGGCTGCCAAAGA
		AGATTTGAAATAAGTCAGGTTATTTTTCTTCCCTATTTAAAGCCT
		TCCAGCCGCTTGTCATTGCTCTTAGAATAAAATCCAAACTCTCC
		CAACAAGCTTTTAAGACTCTACATGGTCTTGCCCCAGCAAACTC
		TTCCCATTTGATCTCATCACTGAATTCCAGTCACAATGGCCATCC
		TTTGGTTTCTCAAAGTTGCCGTTCCTTTGGCATCTCTTCCTCCCTG
		TCTTCACAATGTAGGCTCCTTCCCATCCTAGGCTTAGTTTCGTTC
		CTCTCCCTAGAGGCCTTTCCTTACTGCCTCAGCTTCTCCCACTCT
		GCACACTCAGGGTCCTCTGCATTGTTCACTGCTGGCCTTCAAGA
		GCCTAGAGGAGTTCCTCCCCATGGTGGGCTTTCAATAAGTGTTT
		GTGGAATAAGTGAAAAATGAGTGGTCACACCAGGATCGAATGC
		ACCTCTTACTTTTGTTAATATATTCAAATTAATATTAATATATTA
		ATATTCTATTAATATATCCTAAAATTTTGTTGTGTATAGGGGCAG
		GGACCAATGAAAGAACATTTCATTGTCAGCTCATCTTGACTATG
		AGATCAGATATTGGCTATATTTTGAAGGTAGAGTCAGCAGGATT
		TGCTGTTTAACTAGAGTGGGATGTGGGAGAAATCAGGGAGTCA
		GGTATAACTCCAAGGTTTTCAGCCTCAAGCAACTGAAGAAATGG
		GGTCACCACGACTGAAATGAGGAAAATGAGAGGGGGAGTTTAG
		TGGGGGATGGGGTGATGAAAATATCAGGATTCATTGTGGAACA
		TGAACAGTTAAGATTAACTGAAGAGCCTGAATTCACTGTTCCTC
		AGTTTCTACAACTATAAGGAGGGGTTAATAATTTCTCACATCAT
		AATTGTGAGGATTTGAGGAGTTGAGGTACACAATTAAAAACAA
		AAGCACAGGGGAAGTAAGGAAAAATACATCAATTAAGCATGGC
		TATTAGACCATACAGCCTTACCAAATCCATTGGGGATTAGATAC
		AAAAATCCAAGCATGATCTCCAAAATTTTTTCCTGGTAGGGTTT
		TAGGCTATACTGAAGTGACTTTTCTTTGGCATAAGAAGATATTC
		AGTTATACAGTTGGAAATAAAGGTATTGATTTGGAGTATCCAAA
		AACATCTCTCAGTAGAGATCCACAACCAAAGAAGCATAAAAAA
		AAGTCTTCCATTCACTCGCAAAACTGTCTTATGACCATTGCAAC
		CCTCAACAGCAAACATATGGAGTCTCTACTACATATAGAGGAA
		AATGCTAGATTCTGAAAAGCTAATATCTATAAAACAGAGTTTAT
		GATGTTGTTATATTCTGGGGATTGATGTAAGCATTTTACCAGGA
		CTTATTATAGCATTATAAGCTTAACACAAGAAATATGTGGCTAT
		CATTATGGAGTGAAAGGCTGGAAAATTCCTCACCTGTGACCTGA
		GAGATAGTGCGTGGTAGAATTTGAAAGAAGTGTTGATTTCAGA
		GGAATGCTAGTGCTTGCTTAGGGCAGTATTCAGAAGAACTCTTC
		CAATCACACAGCCCCTTGTACAGGCAAACTCCGGAATACTTTCA
		GTACATTTACTTGGCTTTATTGTTAGAGCAGAAACTTCACAGCT
		AAAATTATGGTCTTAGGGGTTTATAAGATGCAATTAAACTTAAT
		TTTTAAAAGTTCTCACAAATCTTATTTGAAGTCTTAATATCTTAA
		TTTCCTTTATATAGGATATGTGGATATATTTTTATGATAAAAGTA
		ACATGTGACCAACTTAATAACAGCTTCGTTAATATCCTAAAGCC

[1934]

		ACTCATCTTACTTTACATATAAACAGTCCTTCTGAAGCCTAATTA
		TGCATGGATAATTGCAGAGTGAGTTTGGGAAAAGACCAACCGG
		GCACATCTCTCTCCATTTTAACCACAATGAGAAGAGAGTACCTA
		GTGGTGCATCTTCCTCGCTTAGGTTCCCTGAGTCTGTCTTTACAG
		GAAGACTTCATTGTTACTTGAAGGTACATTCTTGGAACTTTACA
		CACCCAGCCACTCAACACATGAATACATACTTATTTTAGTTAAC
		TGAGTACTTAGTGAGTGCTAAGCTTTGTTTTAAGCCCTTTGCATG
		TAGTTTATTAACTTTGTTAATAGTTACAACAGTCCTTCAAGATAC
		ATGTACTGTGTTATACTAGTGTAACAGTTGAGGACACCAAAGAA
		CAAAGAGGTGTTGACACGTGGTCACGGTTCCATAGAGTGTTAAG
		TTAGAGTTGGGTTCAAACCCTGGCAGTGTGGCCACAGAGCCTTG
		TTCTCAGCCACTGCACTGCACTACCTCCTCCCGTGAAACATAAG
		AAAAATGTGAGAAATGCTTAAGTAAGTGTAGTTTTTATTCATAA
		ATAAAATTTACATAAGTACATTATGTGTAATTTGTTTTATGTATA
		TGTGTGTATGTATAAATAAATACATGTAAAAATAAGGCCACAGT
		TTTAATTTTTTTCCATCTCTATAATAAAGCATGTATTATAGACCA
		TTAGCAGAATTTAAAGTGTTATAGTAAATATTAATTGTGACTTTT
		GTTTTCTTCTTCCCCAGTTTCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATAT
		TCTTATTGTTATTTTCCCAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGA
		CAGTTTGGTATTAAAAGTAAGTATTATTTCTACTTTTCATTTATG
		TTTCAGTGATGATATAGTTATTTCTACGAGACATTGTCAGCGAA
		ATATTTAAAGTTGTACTAGGAAAAGTGCTATTATGATAAATATG
		AGTATGTAATTTGAATACTACTAGTCTCCTTGAAGTATATGTTGT
		CGCCCACATTTTGCTGCAGTTCACTTTTAATTCCTAAGAAGGTTG
		TTTTCACTTGGTGTTTTTTTAATCTCTTAAGAATGAATAGTAGGA
		ATATTAGTACCAACACCTTAAACTCATGTCACATTTTAATATTCA
		CAGAACATCTACACACACATTATGTTATTAGGTAAACAGGTGGT
		GACAGCCTGCATTAGTTTTAAGGTAGGACGTTATACTTTGGAGC
		ATTTAGATTCCCCTCTTTTTATTTTCCCAGTTTGATTTTCTCTGTG
		TACACGTGTTCACCCTTGGAAAAGTCCAGTCGGAACTATGTTTT
		GTCATCCTCTGCGTGCAGTTCTGCAGCCTCTAAAGAAGCAGCCA
		CCAGAGAGTTAGGTTCTTTGATCTTGCTTTCCTATAATAGTAACG
		TAACCAGACTTCTGAAGGCAGATCTTGATGCTGCATTAGATTTA
		GCTTCAACAACACAGAATTGTCATTACTAGGCAAATAGGTAATA
		TGCATTACGGTTAATGTTTAATCAACCATATTTTCATATTTTGGT
		AAAGAAAATTTACAAAATTAATGAAGTTCTGAGGTGACAGTCT
		AAACTTTTAAGCTTTTTAAATACAAGATTTATTCCTTCTTTCCTT
		GTAGCATCCTGAAGACCAGTAAACATTTATATAAGCAAGGAAT
		AAATACTGCTTATTTAATTTATTCTGCAACCTTTAAACACACAAA
		AGCTAGTAAACTATTGCAGTGGATTGCCCTGTTGTATATTTTATG
		AATTTTACTTTTACTCAGCAGTTTAAGCTGTCTATATCTATGGTG
		GTGTATAAACATGGAAGGGAGATGACTGATTGATTATATGTTTT
		AAGCGCTTTTCTCAGTGTATGGCATTCTGGAAATGCTTAGTGATT
		TCAGAAATGTTCTCAACTTTTGTCTGAAAGGAAAAAAGGGGGA
		AGAAAGGGGTGGCAGTGGCAACTGTCAAGACATTTTATAACTTT
		TACTTTCAAGATAGTGTCTAGACTTCTTTTGGAAATTTTCTTATA
		ATCTCTTAGTTTTTTATGTCAAGAAAAGGACTGGTGTAGCATTA
		AGACCTATTCTGGCATCAATGATATTAGGGAAAGCTTTTAACCA
		TATTGGCAGAGCCAGACTTTAAGGGCTAAGTCATATGACTTGGG
		CAGGGAACAGCCTTTTTCAAAGATCATGAAATTATTTCACATAG
		TGCGATTTTTTGAGTTTGGCTTGATGGATGTTTGCTGATCCAGAC
		GTTATCATTGGTGACATTATTTTTAGTGAAATGAACCAGGAGTG
		AGTTTGTTCACTGTTGGCTGTATTTTTACAAAATGAGCTTTACAA
		TATTTTTTCTGACTTAAAAAAGTCATACATATCACTTTAGAACAC
		CTCGTACAAAGTAGGGAGTTATTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAC
		TCATCTGTAGTCCCCAAACCTAGAAATAAACTATTGGTATATTC
		TGGTGAATTTCCTGTTTCCCTTTCTGTCTTTTTCTATTCATTTTTG
		TTATCTTTTTTTTAAAAAAAGGTAACCATAAATGGACTCGTACA
		GCTTATATGCTTGTACGTTCTGATGTTCCCCCATGTCTTCAGAAA
		TCTTGTTATAGCTGCCTGTGTTCTACTTTTGTGGATGCACTATAA

[1935]

		TTTACTTAACTCTCATCTTGATGGATTTTAAGGATGTTTCCAATT
		TTTTTGATACTATGAAAATAACTCTGCTAAAGATATGAAGCCTG
		GAATTGGCAGAGATATTTTAAGACTCTAGATACATACTGGCAAA
		ATGTTTTCCAGAAACGTTTGTATCAACTACTATTGCAGATGAGA
		ATACCTGTCTTTCACCTCAGTTATAATTCTGATATTATAACGCTA
		AAATCTCTGCAAATTTGATGGGTGAAAAAGCATCTTATTGTAAT
		TGTAATTTTTGTGTTAGTAAGGTGGAATGTTCTTTTTTATATTTTT
		TGTACTGGTCATATTTTAAGGAACGTGCTTATAAACCTAAAGAA
		ATATTTTGGTGGGAATTTTTTGTTTTGGCTCATCTTGAAACAGGT
		AGATGTGTGTGTATGTGCATGGAAGAGGTATGTCTATACATGAT
		TCACCCAGCCTGCGCTCACATTTAAAGGTGTTGATGATAATAGT
		AGCTAACCATTTGTGGAGCTCTTGCTCTGCTTGACAGGTTCTGTG
		CAAAGTACTCTATATCTGAAATGACATTTATTTCTCCCAGAAAC
		TCTATGGGCATAGACACTGTTGTTATTCCCGTTTTGTAGATAAGA
		AACAGGCACAGATAGATTAGGCAATTTGCCCGCAATCACCCAG
		CCGTTTCCTGATAGTACTGGGATTTGAACTAGTACTGTTTACCAC
		TGCACTGTACTGCCTCCCCGTTTTGCATTTATTTTGAGGATTTTA
		TTTCCATGAAGGGTGAACCTATATCTAAGCACATAATACTGAGT
		AGCTAAAACTTATTAGGAGAGCAGAATGTTGACCTGATTTGTTT
		ACTTATTCTGCAAATACCTAGTGACAGGGTGCCTACTGATTGCT
		GGACACCAAGCTACATGCCTGAAATGTGGGTGTGATGTGCATAT
		TGCCCTGGTTTTGTAGCACCCACATTTAAGCCAGGGAGACACGA
		ATGTATGTGCATCCCATGCCTTGTCACATCTTTGAGATAGTCATG
		GATCCAAATCTAACTTTTCTGTTAGTGCCTCTGTTGATGGCCTGA
		GCATTCCACCAAATAGAAATAGAAAGCACCTCTATTCTCCACCT
		GCTTAGATGTATATTTTTTAGAATCCAGTATGGTAAATCTTCTAA
		AGCATTCATAATAACTCAGACCCATGACTTTTATTTTATAGATTT
		CTAGTTCTGCTTAACTTTTCCTGATTACCATTTATGGTCTGTACTT
		GGCTACAGGGGATTTCTCTCAGTGGTTTTTCCAGCTCTGCATGTG
		AGTCTTTGTGGTCCAAGACAAACCTGGACCTTTACCAGGCTAAA
		CTTTCAGTAAAGACAGCAGGTTATGCCCTCATTTGCTCACTCTG
		AGGAGAAAGAGTTTCTTTATACCAGAGCTGTATCTTGAAAGATG
		TCTCAGGATGCCATTGGTCCTACTGAGGAAGAAGCCTGAGAAG
		ACTCTTAAACTCCCAGAGCCCAGCCAGCACTTGGTGAGCCCTGG
		ACCACGTTTCAAAGATAAAGGCCTCTTACAGGGAAATGTTCCTA
		AATACCTTCACCTTTAGCTTAGCTTTAACTTAGGAACTTTTAAGC
		AGAATCTCTATGCTTAGCAAACAGCTCAGAGATTGCTAGAATCA
		AACACCAAGGCTTAACTGATAGTATTGAATTTCAGACGCTTTGT
		TTGTGTTCTGAAAACTACACCAACTCACAGTTTGCCACTCTACT
		GACAATTAAGTTCCTGGCTGATTTTCAGGATTCTTCTTTCTCACT
		CTGATATCATTTTAAGTGCTGTCCACCTAGTCCTCCAGTTCCTGC
		AGGATTAAGGTCCAACTGTATGTAAAGAACTGGCTAACATTTTG
		AAATTCTTTGAGATAGGCCTATCTGTTCTTTCTTTGCCTTTGTAA
		CTTTGTTTTATACAGGCAATACTGGCTTCGCACAAAACCGCAAG
		ACCATAAACATGACCATGTAAGCTGAAATTCTGCAAAACAATCT
		TCATGATGAATGGGAAAAACTATTATTATATTGTTCCATGACCT
		TTAAAATTTTTTTTGTTGTTAAAACCTTAAAAACTCTGTTATTAT
		CAATAACAACGGCATTGGGAAATGAAAAATAGTAAAGCTAGTA
		TTTAGTATGTGGTAAATTAAATCATTAGAAACATCGAGAATGAA
		AGTGTGTTATCAAGAGTAGTTTGAACAACACTTGTGTGTTCTTCT
		TGCATAACTTTGGATACAGAGCAAGCATCTTCTCTATGGCTTGG
		TGAATTGTCATACCCCTTTCTAAGTTTGGATCGGTTTCTACCGTT
		TTATCCTTTGCACTCTCAATGTCATGAAAGAATTCCTTTAATGTT
		TTTTTGAATGTTTAAAGTTTATTTTATTGCCAGTCACTTCCTCTG
		GGACATCTTTATTCTTTTTGTTACATCCTCCTCACTTTCCTCATTT
		ATATCAGTAAGTCCACCTTCGCTGAGTTCTTCTGGCTTCATCTCT
		AGAGTTTCTTGCATTGCAGTAATGTCGACATTCGCACAATCAGC
		TATTTCTTCTCTTACTCCATTTATGGTCTATTCAAATTTCACTCCT
		AGCATTTGTCAGTTTTTATTTCTTTACTCTTTCATCTTTCTTGCCT
		AGTTTCCTCTTTTGATTTATCCATTATAAAATGTCACATGGGTTT

[1936]

		ATCACTGGGAAACAAGGAGGTAACAAAACTCCATACTTTGCTGT
		CTGTGCATGACCTAAATATCAGATGTACAGTGACTAGTCACCAA
		CAGTCTTCAAAAGAAGTGACATGGTTGATCACTGATCATGATGG
		GACATCTGCTATTTACATAGTTATTTTTGAACTGAAGAAATAGC
		AGTGAAGTTGTACTTTATGCAGTTACTCAGTTAATATATTGTGGT
		AATTGAAATTTGGACTGTTTATGAGGGATTTATTTGATTAAACC
		ATGGTAACTGGAATTCATATCAGAATAGTGCAAAGTGAGGACT
		GCTGTACTTGATTCCAAATTTAAAACTGTATTCTAGGCATCTTTA
		ATTTTTTTTTTTCAACTTTCCCCTCCCTGCTCAAAATTACTCCACA
		GAGATTTTGGTTACGGCTCAGATGTCTTTGAGTAGATGTTCCTGT
		AGAAATCATTGTTAGAAAATTCAAGGAAAAAAGTTCTCATTACA
		CTACCTTGAGATCCTACCAAGTCCTTGAGTTTTGACTTGAGGAC
		AGCTTAATAATGAAAGTAATTCAGCCATGAAAGCATATTTAAAA
		TAAGTAATGGAACAGGAAATTTCTTCATAGATTAGAAAAATTAT
		TCTGAAAAAGTGAAGACATAGCCTATCTTGGACTAGGAAATTTC
		CATCCAAGAAAGTAAAATATACAATAAATATTATCACAAAGAA
		TCATTCTGTGACCTGGTTGATGGCCCCTGGTAATAAGACTTTGTT
		ATTAAGTTTACTGTGAATTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
		TTTTTTGAGACGGAGTCTCGCTCTGTTGCCCAGGCTGGAGTGCA
		GTGGCGTGATCTCGGCTCACTGCAACCTCCGCCTCCCAGGTTCA
		AGCGATTCTTCTGTCTCAGCCTCCCGAGTAGCTACAGGCTACTG
		GCGTGCACCACCATGCCTGGGTAATTTTTGTATTTTTAGTAGTGA
		TGGGGTTTCACCATATTGGCCAGGCTGGTCTCGAACTCCTGACC
		TCGTGATCCGTCTGTCTCGGCCTCCCAAAGTGCTGAGATTACAG
		GCATTAGCCACCATGCATGGCCCCTTACAGTGAATTCTGTTCAA
		TAATCTTGAACTCCCAGTGCTTTCCCTTGGTCCTGTCCATATAAT
		GATCACATTCTGTTATTAAATAATGTGCTTATGTGCTGATTTTAT
		TGTAGGAGGAATTGAACAAATCTATAGCTCAGCATTTTACTCTT
		TTGTAGAAATCCCTTGACCCTTTCCAAATCCAGACATCACAACC
		TTCTCCATATACTCAAAAATTGTGAAATCCACAAGGCAGGGAAA
		GTTGATAATGAAAAAAAGGAAGTTTGGTCTGTTGGACATCCTCT
		TCTTTCATCTTTTATGTTCAAAGTACTTGATGCACAAAGCCTGGA
		CTCTTTTATCTCTGTCCTATAGACTGATGTCTAGTCAGTATTCAT
		TGTGACAAAATTGTTTCATTAGAGCAAGTTGGATAGTGTATGGA
		GATTATTATAAAATGATTTAACTTGTCTTCTGTCAAGTAATTTTA
		TAATTGGTATTAATGTTCATTTTTTTCCAGTACCAGTTTCAGAAG
		CTTTCATTTGTGTATGCATGTGTGTGTTAAATAAGTGTATTAGAT
		ACTTGAAAAATAGTAATTTAAATTTAAACAATTTAAAAAATGAA
		ATTGTAATTTTATGTGTAAAGGTGTCTGATGTGCTTTATTCTGCA
		CTGAAAACAATATTCATTTACAGCTCAACAGACACCAAATATAT
		TCTAAAATTACTTTCCTAGAGTTATCAGAAAACAGCACTGTAAT
		AATGAAATCAAACCCATCTTTCTTTATGATTTATTCTTAGTCTGA
		TACGCATCAGCCTGGTAAGCCTTCCTGTCTCTCTGCTTACTTACC
		AATCACTCCAAATGTCATGTCTTTGGGCAGGCATTAAATTCTTG
		GGTTTTGGGTTTTGTTGGATGGACTGCAGTCTGTGTGAGCCTATA
		TGGGTGTGTCAAATCCAGTCTTTGGGGTGTCATGGAAACTTAGC
		ATGATAGACTTGATTTTATCCCCAAGTTGACTTGGTAATTTCATT
		AGATTTCATCAGTCACAACCTGCATTTTATCTTGTATGTGCTGTC
		TATTGGTCACAAAATCAGAAAACCTTCTTGTCCATTCATAACAT
		TAGCTGTTTTTTCAGGTGGCTAGAGGGACATGTCATTGCTTCATC
		TGCATGAATTTGAAAGATTAAATGCATAAAGGAATTTTCTTAGA
		GTAGAGTAGGCCTTCACCATCTCTTTAACTGGGAAAGAAGTTTT
		GGGAGTAACATACTCATCACTCACACCCCCCTCCCCTCAAACAC
		ACACACTCACCCATTAGAATGTAAGGGCCTTGAGGCAGGCCTTG
		TGTTTGCTTTTCGTGTTCACTGTCAGCATTTAGAATAGTGATAGT
		CATATAGATGGATAGTGCTCAATCAATTATTGTCAAATAAAGTA
		ATCTACTTGTTCCTTGATTTAGACTAGCAAAAGGGGCTGGTACA
		TTGTAGGTACACAGTAAATATTTGTAGAACAGATGAATGAACCA
		ACCCAACAGATTTCTTAGAAGTAGCCTGCTTTTGGTTACTAATTA
		TTTTATAGAACATATAAAAGAAAATTTTAGAATACCTAATTTGT

[1937]

		TCACAAAAATGTTATATTGTCTCCCCTGATACTTGGTATTCCTGT GTCAGGCTGAGCACTAAGGTTATACATTTTTTGTTAAGCATGTA ATTACTGTTATTTCTCATGTACTTTATTTTGTGTATTGATTTCAGT AGTTGTAGCTGAGGGTAATCCTTAAGAGCATGCAGATTTTAAAA ATTACATAGATTGCCTTGCCAAGCCGTCTGAAAGTCATACTAGA AAATTTGATAAGAGCCTGCTGTTAACAACACATTGAGTTATTTT TATCTTAATGCTAAGTGGAGAATTACTTGAATTTATTTTTTTGC TGCATTTAATGTTTTGATACATTCAATAAATAAGGATAAATCCA CTTACTGAAGGACAAGAAAAGATCAATAAGAGATCCTTGAGGT TATTGGGTTCTATGGCATCTATTATATCAAATTCCTTGCCCTTTC ACTATACTGAGAAATTTGACGACTGGGCTAGCAACAAGATACCT ACCCCACATTAGCTGTGGTACCTGCTGAAATGTGACCATGTGAG CAAAGAAAATGAGCCAAAAGAAACTCTTTCTGAAGATTCACTG AAGAAAACCTGGAGATACTCTTTCATTAGTAGACCCCACAGAG ACAGGTGGAGTGTCCGTTATCCAGAATGCCTGGGACCAGAAGT GTTTTGGATTTCAGATTTTTTCACACTTGGGATCCTCAACATGTG TATTTGTTGGAAATGGCTACTTAATTTAAGGAAAAGTTTAAGGT GGCCTGGAAAATAAGTAGTAGTTGAACTAATCAACAGGAACCA AAACTACTTTCAATATATAGTGTACTTATACTCAAAGAGAGACG GACCATTTTATGGTGGAACCCTGTCTATGGTAGTATTTTGTGATG TTTTATTTTTGTTGCTATTGTTTGCACTGTTTTCTCCTATAACAGC TCTTCTAAGCCTTAAGAGGATAAATTTTATATGAGATTCAAACT CTTATTTTTGTTAAGAAGGATGTAAGTCACCAGGCATGGTGGCT CACACCTGTAATCCCAGCACTTTGGGAGGCCGTGGCAGGTGGAT CATGAGGTAAGGAGCTCGAGATCAGCCTGGCCAACAATGTGAA ACCCCGTCTCTACTAAAAAAAAAAAAAAAAAGAATTCAAAAATT AGCCAGGCCTGGTGGCGCATGCCTGTAGTCCCAGCTACTCGGGA GGCTGAGGCAGGAGAATCATTGAACCTGGGAGGCAGAGTTTGC AGTGAGCCGAGATTGTGCCACTGCACTCCAGCCTGGGTAACGG AGTGAGAGACTCTGTCTCCAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAAGAA AAAGAAAAATATAGAAGAAGAACATAAGTCAACCTTTTTCCAT GAAATTATACTGTACTCTAAGGCAAATTCTTGTTGCTTGATCTTA GTAGCTTTTTTATGCATTGACTTAAACCTGGAAGAGTTTCTTATG AATGTTTGATTGACTGTGAGGTGCATTTGAAACAGCTTCTACTTT ATAACCCTTTGCAGAACTTTCAAGCTCTATTTAGATAACAATAT ATATGGGATTAAAATGGAAAATGTGACATATGTCTAGAGAAAG TTCCTTTTTCTGTGTATGTGCCTTTTGTGACTTATACACTCAGTTT CATTCTAGCCAGCATTTGAGCCTAGAAAATAGGGAAGTTATGAA AACTCTGTGCCTTATAAGAAGGCAAGGCTATGACTGAGTATTAG ACACATAAGTCCAGGGCTGGGCGGAAGTAATGAATCAAATAAA AACTTGGGGAACTTGCCATAGGATGTTTTCTGATTAATATGGGT TTCTCTTCTCTGATTAATGTGGATTTCAGTTACTCAACTGTGTAA CTGAAATCCACATTAATAAATTGGTTATTTATTGCTTAGGACTTA TCTCCCCATAAAGAGACTAAAATTGAGGTTATAAATTATGGGTA GATAGAAATTCCAGAAATATTTAGGTACCTGTCATATACCTTAA ACATAGATTTTTATCACAATCATTTAGGGGCTTATTTATTGCTTT TACTTTATTTAATGTTTGTCACTGTAGAAGAAAAAAAACTAAAT GCTAAATATAACATTTAAAATATTTTCCCCTTCATGACAGCCAC CAATTGATTACTGTCATGGAGACTATCTCTATGTGGATGACACA CAGCAGCATTTCAATCACACGCTGTTTCTTTCCGCTACTCAGTTT GCTTTTAGGTTGCCTTAAACAACTTCCTTGGTGAAAAAATCAAC TTCAATATTAACCAAAATTTAAAAGATTCATATATAGTAAAAGA ACTAATATTCGCAGATTGACCCATTCCATTCTTTCAGAGAAGGT ATGAGATACTTGACAGTGGAGCTAGCAGCAGAAACAATAACAT GTATGATGAATCCCATTGAGTCTTTGCAGTTTATTTTTATTAAAA TATTTTAATTGAACAATTTAAGCTTTTTTTCTTCATCAGGATTTC ACAAGGGTGTAATCTGCCCAGTTTTATTCTGTCATTTTTTTCAAA ACAAA
无 N 端的 CD47-206	SEQ ID NO:133	ATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATACGTAAAGTGGAAAT TTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGATGGAGCTCTAAACAAG

[1938]

		TCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTAGTGCAAAAATTGAAGTCTC ACAATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTTGAAGATGGATAAGAGT GATGCTGTCTCACACACAGGAAACTACACTTGTGAAGTAACAG AATTAACCAGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAAATATCG TGTTGTTTCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTCTTATTGTTAT TTTCCCAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGTAT TAAAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGATGAGAAAACA ATTGCTTTACTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTGTCATT GTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTCATTAAAGAA TGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAGGGATATTAAT ATTACTTCACTACTATGTGTTT
具有恢复的N端的CD47-206	SEQ ID NO:134	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTGCTG CGGATCAGCTCAGCTACTATTTAATAAAACAAAATCTGTAGAAT TCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCATTCCATGCTTTGTTACTA ATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATACGTAAAGTGGAA ATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGATGGAGCTCTAAACA AGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTAGTGCAAAAATTGAAGTC TCACAATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTTGAAGATGGATAAGA GTGATGCTGTCTCACACACAGGAAACTACACTTGTGAAGTAACA GAATTAACCAGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAAATATC GTGTTGTTTCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTCTTATTGTTA TTTTCCCAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGTA TTAAAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGATGAGAAAAC AATTGCTTTACTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTGTCAT TGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTCATTAAAGA ATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAGGGATATTAA TATTACTTCACTACTATGTGTTT
缺失 TMD3	SEQ ID NO:135	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTGCTG CGGATCAGCTCAGCTACTATTTAATAAAACAAAATCTGTAGAAT TCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCATTCCATGCTTTGTTACTA ATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATACGTAAAGTGGAA ATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGATGGAGCTCTAAACA AGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTAGTGCAAAAATTGAAGTC TCACAATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTTGAAGATGGATAAGA GTGATGCTGTCTCACACACAGGAAACTACACTTGTGAAGTAACA GAATTAACCAGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAAATATC GTGTTGTTTCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTCTTATTGTTA TTTTCCCAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGTA TTAAAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGATGAGAAAAC AATTGCTTTACTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTGTCAT TGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTCATTAAAGA ATGCT
缺失 EC+TMD3	SEQ ID NO:136	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTGCTG CGGATCAGCTCAGCTACTATTTAATAAAACAAAATCTGTAGAAT TCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCATTCCATGCTTTGTTACTA ATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATACGTAAAGTGGAA ATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGATGGAGCTCTAAACA AGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTAGTGCAAAAATTGAAGTC TCACAATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTTGAAGATGGATAAGA GTGATGCTGTCTCACACACAGGAAACTACACTTGTGAAGTAACA GAATTAACCAGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAAATATC GTGTTGTTTCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTCTTATTGTTA TTTTCCCAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGTA TTAAAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGATGAGAAAAC AATTGCTTTACTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTGTCAT TGTTGGAGCCATTCTTTTC
缺失 TMD2+EC+TMD3	SEQ ID NO:137	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTGCTG CGGATCAGCTCAGCTACTATTTAATAAAACAAAATCTGTAGAAT TCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCATTCCATGCTTTGTTACTA ATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATACGTAAAGTGGAA

[1939]

		ATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGATGGAGCTCTAAACA AGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTAGTGCAAAAATTGAAGTC TCACAATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTTGAAGATGGATAAGA GTGATGCTGTCTCACACACAGGAAACTACACTTGTGAAGTAACA GAATTAACCAGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAAATATC GTGTTGTTTCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTCTTATTGTTA TTTTCCCAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGTA TTAAAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGATGAGAAAAC A
缺失最后一个 IC	SEQ ID NO:138	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTGCTG CGGATCAGCTCAGCTACTATTTAATAAAACAAAATCTGTAGAAT TCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCATTCCATGCTTTGTTACTA ATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATACGTAAAGTGGAA ATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGATGGAGCTCTAAACA AGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTAGTGCAAAAATTGAAGTC TCACAATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTTGAAGATGGATAAGA GTGATGCTGTCTCACACACAGGAAACTACACTTGTGAAGTAACA GAATTAACCAGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAAATATC GTGTTGTTTCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTCTTATTGTTA TTTTCCCAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGTA TTAAAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGATGAGAAAAC AATTGCTTTACTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTGTCAT TGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTCATTAAAGA ATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAGGGATATTAA TATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGATTGGATTAACCT CCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGGTGATAGCCTATATCC TCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTATTGCGGCGTGTATACCA ATGCATGGCCCTCTTCTGATTTCAGGTTTGAGTATCTTAGCTCTA GCACAATTACTTGGACTAGTTTATATGTAA
缺失 TMD5+最后一个 IC	SEQ ID NO:139	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTGCTG CGGATCAGCTCAGCTACTATTTAATAAAACAAAATCTGTAGAAT TCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCATTCCATGCTTTGTTACTA ATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATACGTAAAGTGGAA ATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGATGGAGCTCTAAACA AGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTAGTGCAAAAATTGAAGTC TCACAATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTTGAAGATGGATAAGA GTGATGCTGTCTCACACACAGGAAACTACACTTGTGAAGTAACA GAATTAACCAGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAAATATC GTGTTGTTTCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTCTTATTGTTA TTTTCCCAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGTA TTAAAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGATGAGAAAAC AATTGCTTTACTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTGTCAT TGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTCATTAAAGA ATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAGGGATATTAA TATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGATTGGATTAACCT CCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGGTGATAGCCTATATCC TCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTATTGCGGCGTGTATACCA ATGCATGGCTAA
缺失 EC+TMD5 +最后一个 IC	SEQ ID NO:140	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTGCTG CGGATCAGCTCAGCTACTATTTAATAAAACAAAATCTGTAGAAT TCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCATTCCATGCTTTGTTACTA ATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATACGTAAAGTGGAA ATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGATGGAGCTCTAAACA AGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTAGTGCAAAAATTGAAGTC TCACAATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTTGAAGATGGATAAGA GTGATGCTGTCTCACACACAGGAAACTACACTTGTGAAGTAACA GAATTAACCAGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAAATATC GTGTTGTTTCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTCTTATTGTTA TTTTCCCAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGTA TTAAAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGATGAGAAAAC

[1940]

		AATTGCTTTACTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTGTCAT TGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTCATTAAAGA ATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAGGGATATTAA TATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGATTGGATTAACCT CCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGGTGATAGCCTATATCC TCGCTGTGGTTGGACTGTAA
缺失 TMD4	SEQ ID NO:141	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTGCTG CGGATCAGCTCAGCTACTATTTAATAAAACAAAATCTGTAGAAT TCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCATTCCATGCTTTGTTACTA ATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATACGTAAAGTGGAA ATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGATGGAGCTCTAAACA AGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTAGTGCAAAAATTGAAGTC TCACAATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTTGAAGATGGATAAGA GTGATGCTGTCTCACACACAGGAAACTACACTTGTGAAGTAACA GAATTAACCAGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAAATATC GTGTTGTTTCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTCTTATTGTTA TTTTCCCAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGTA TTAAAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGATGAGAAAAC AATTGCTTTACTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTGTCAT TGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTCATTAAAGA ATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAGGGATATTAA TATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGATTGGATTAACCT AA
具有 DAF/CD55 GPI 锚的 CD47 ECD	SEQ ID NO:142	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTGCTG CGGATCAGCTCAGCTACTATTTAATAAAACAAAATCTGTAGAAT TCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCATTCCATGCTTTGTTACTA ATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATACGTAAAGTGGAA ATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGATGGAGCTCTAAACA AGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTAGTGCAAAAATTGAAGTC TCACAATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTTGAAGATGGATAAGA GTGATGCTGTCTCACACACAGGAAACTACACTTGTGAAGTAACA GAATTAACCAGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAAATATC GTGTTGTTTCATGGTTTTCTCCAAATGAACCAAATAAAGGAAGT GGAACCACTTCAGGTACTACCCGTCTTCTATCTGGGCACACGTG TTTCACGTTGACAGGTTTGCTTGGGACGCTAGTAACCATGGGCT TGCTGACTTAA
具有长 TRAILR3-GPI 锚的 CD47 ECD	SEQ ID NO:143	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTGCTG CGGATCAGCTCAGCTACTATTTAATAAAACAAAATCTGTAGAAT TCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCATTCCATGCTTTGTTACTA ATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATACGTAAAGTGGAA ATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGATGGAGCTCTAAACA AGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTAGTGCAAAAATTGAAGTC TCACAATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTTGAAGATGGATAAGA GTGATGCTGTCTCACACACAGGAAACTACACTTGTGAAGTAACA GAATTAACCAGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAAATATC GTGTTGTTTCATGGTTTTCTCCAAATGAAGCCACTGTGGAAAcccc agctgctgaagagacaatgaacaccagcccggggactcctgccccagctgctgaagagacaatgaacac cagcccggggactcctgccccagctgctgaagagacaatgaccaccagcccggggactcctgccccag ctgctgaagagacaatgaccaccagcccggggactcctgccccagctgctgaagagacaatgatcacca gcccggggactcctgccTCTTCTCATTACCTCTCATGCACCATCGTAGGGA TCATAGTTCTAATTGTGCTTCTGATTGTGTTTGTTTAA
具有短 TRAILR3-GPI 锚的 CD47 ECD	SEQ ID NO:144	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTGCTG CGGATCAGCTCAGCTACTATTTAATAAAACAAAATCTGTAGAAT TCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCATTCCATGCTTTGTTACTA ATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATACGTAAAGTGGAA ATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGATGGAGCTCTAAACA AGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTAGTGCAAAAATTGAAGTC TCACAATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTTGAAGATGGATAAGA GTGATGCTGTCTCACACACAGGAAACTACACTTGTGAAGTAACA GAATTAACCAGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAAATATC

[1941]

		GTGTTGTTTCATGGTTTTCTCCAAATGAAatgatcaccagcccggggactcctg ccTCTTCTCATTACCTCTCATGCACCATCGTAGGGATCATAGTTCT AATTGTGCTTCTGATTGTGTTTGTTTAA
具有 CD8a TMD 和短 ICD (9aa)的 CD47 ECD	SEQ ID NO:145	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTGCTG CGGATCAGCTCAGCTACTATTTAATAAAACAAAATCTGTAGAAT TCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCATTCCATGCTTTGTTACTA ATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATACGTAAAGTGGAA ATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGATGGAGCTCTAAACA AGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTAGTGCAAAAATTGAAGTC TCACAATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTTGAAGATGGATAAGA GTGATGCTGTCTCACACACAGGAAACTACACTTGTGAAGTAACA GAATTAACCAGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAAATATC GTGTTGTTTCATGGTTTTCTCCAAATGAAATCTACATCTGGGCGC CCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCA CCCTTTACTGCAACCACAGGAACCGAAGATAA
具有 CD28 TMD 和短 ICD (9aa)的 CD47 ECD	SEQ ID NO:146	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTGCTG CGGATCAGCTCAGCTACTATTTAATAAAACAAAATCTGTAGAAT TCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCATTCCATGCTTTGTTACTA ATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATACGTAAAGTGGAA ATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGATGGAGCTCTAAACA AGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTAGTGCAAAAATTGAAGTC TCACAATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTTGAAGATGGATAAGA GTGATGCTGTCTCACACACAGGAAACTACACTTGTGAAGTAACA GAATTAACCAGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAAATATC GTGTTGTTTCATGGTTTTCTCCAAATGAATTTTGGGTGCTGGTGG TGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTG GCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCT GCACTAA
具有 PDGFR TMD 和短 ICD (9aa)的 CD47 ECD	SEQ ID NO:147	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTGCTG CGGATCAGCTCAGCTACTATTTAATAAAACAAAATCTGTAGAAT TCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCATTCCATGCTTTGTTACTA ATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATACGTAAAGTGGAA ATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGATGGAGCTCTAAACA AGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTAGTGCAAAAATTGAAGTC TCACAATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTTGAAGATGGATAAGA GTGATGCTGTCTCACACACAGGAAACTACACTTGTGAAGTAACA GAATTAACCAGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAAATATC GTGTTGTTTCATGGTTTTCTCCAAATGAAgtggtgatctcagccatcctggccct ggtggtgctcaccatcatctccctTATCATCCTCATCATGCTTTGGCAGAAGAA GCCACGTTACTAA
CD47 IgV、来自铰链区的 3aa、具有 PDGFR 铰链、TMD 和短 ICD (9aa)	SEQ ID NO:148	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTGCTG CGGATCAGCTCAGCTACTATTTAATAAAACAAAATCTGTAGAAT TCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCATTCCATGCTTTGTTACTA ATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATACGTAAAGTGGAA ATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGATGGAGCTCTAAACA AGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTAGTGCAAAAATTGAAGTC TCACAATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTTGAAGATGGATAAGA GTGATGCTGTCTCACACACAGGAAACTACACTTGTGAAGTAACA GAATTAACCAGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAAAGCTG TGGGCCAGGACACGCAGGAGGTCATCGTGGTGCCACACTCCTTG CCCTTTAAGGtggtggtgatctcagccatcctggccctggtggtgctcaccatcatctccctTAT CATCCTCATCATGCTTTGGCAGAAGAAGCCACGTTACTAA
CD47 IgV、来自铰链区的 3aa、IgG4 铰链-CD28 TM	SEQ ID NO:149	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTGCTG CGGATCAGCTCAGCTACTATTTAATAAAACAAAATCTGTAGAAT TCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCATTCCATGCTTTGTTACTA ATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATACGTAAAGTGGAA ATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGATGGAGCTCTAAACA AGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTAGTGCAAAAATTGAAGTC TCACAATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTTGAAGATGGATAAGA GTGATGCTGTCTCACACACAGGAAACTACACTTGTGAAGTAACA

[1942]

		GAATTAACCAGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAAAGaatcta agtacggaccgccctgccccccttgccctTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGG AGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTAT TTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACTAA
CD47 IgV、来自铰链区的 3aa、IgG4 铰链-CD8a TM	SEQ ID NO:150	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTGCTG CGGATCAGCTCAGCTACTATTTAATAAAACAAAATCTGTAGAAT TCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCATTCCATGCTTTGTTACTA ATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATACGTAAAGTGGAA ATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGATGGAGCTCTAAACA AGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTAGTGCAAAAATTGAAGTC TCACAATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTTGAAGATGGATAAGA GTGATGCTGTCTCACACACAGGAAACTACACTTGTGAAGTAACA GAATTAACCAGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAAAGaatcta agtacggaccgccctgccccccttgccctATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGG GACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCTTTACTG CAACCACAGGAACCGAAGATAA
CD47 IgV、来自铰链区的 3aa、CD28 铰链-CD28 TM	SEQ ID NO:151	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTGCTGC GGATCAGCTCAGCTACTATTTAATAAAACAAAATCTGTAGAATTC ACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCATTCCATGCTTTGTTACTAATA TGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATACGTAAAGTGGAAATTT AAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGATGGAGCTCTAAACAAGTC CACTGTCCCCACTGACTTTAGTAGTGCAAAAATTGAAGTCTCACA ATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTTGAAGATGGATAAGAGTGATG CTGTCTCACACACAGGAAACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTA ACCAGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAAAATTGAAGTTAT GTATCCTCCTCCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCAATGGAACCA TTATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTTGTCCAAGTCCCCTATTTC CCGGACCTTCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAG TCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTT CTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACTAA
CD47 IgV、来自铰链区的 3aa、CD28 铰链- CD8a TM	SEQ ID NO:152	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTGCTG CGGATCAGCTCAGCTACTATTTAATAAAACAAAATCTGTAGAAT TCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCATTCCATGCTTTGTTACTA ATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATACGTAAAGTGGAA ATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGATGGAGCTCTAAACA AGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTAGTGCAAAAATTGAAGTC TCACAATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTTGAAGATGGATAAGA GTGATGCTGTCTCACACACAGGAAACTACACTTGTGAAGTAACA GAATTAACCAGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAAAATTG AAGTTATGTATCCTCCTCCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCAAT GGAACCATTATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTTGTCCAAGTCC CCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCATCTACATCTGGGCGCCCTT GGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCT TTACTGCAACCACAGGAACCGAAGATAA
CD47 IgV、来自铰链区的 3aa，CD8a 铰链-CD28 TM	SEQ ID NO:153	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTGCTG CGGATCAGCTCAGCTACTATTTAATAAAACAAAATCTGTAGAAT TCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCATTCCATGCTTTGTTACTA ATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATACGTAAAGTGGAA ATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGATGGAGCTCTAAACA AGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTAGTGCAAAAATTGAAGTC TCACAATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTTGAAGATGGATAAGA GTGATGCTGTCTCACACACAGGAAACTACACTTGTGAAGTAACA GAATTAACCAGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAAAACCA CGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCCACCATCGC GTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAgcggcg gggggcgcagTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATTTTTG GGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGC TAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGG AGCAGGCTCCTGCACTAA

[1943]

CD47 IgV、来自铰链区的 3aa、CD8a 铰链-CD8a TM	SEQ ID NO:154	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTGCTG CGGATCAGCTCAGCTACTATTTAATAAAACAAAATCTGTAGAAT TCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCATTCCATGCTTTGTTACTA ATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATACGTAAAGTGGAA ATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGATGGAGCTCTAAACA AGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTAGTGCAAAAATTGAAGTC TCACAATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTTGAAGATGGATAAGA GTGATGCTGTCTCACACACAGGAAACTACACTTGTGAAGTAACA GAATTAACCAGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAAAACCA CGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCCACCATCGC GTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAgcggcg gggggcgcagTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTA CATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGT CACTGGTTATCACCCTTTACTGCAACCACAGGAACCGAAGATAA
WT，C15G	SEQ ID NO:155	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTGCTG CGGATCAGCTCAGCTACTATTTAATAAAACAAAATCTGTAGAAT TCACGTTTGGAAATGACACTGTCGTCATTCCATGCTTTGTTACTA ATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATACGTAAAGTGGAA ATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGATGGAGCTCTAAACA AGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTAGTGCAAAAATTGAAGTC TCACAATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTTGAAGATGGATAAGA GTGATGCTGTCTCACACACAGGAAACTACACTTGTGAAGTAACA GAATTAACCAGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAAATATC GTGTTGTTTCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTCTTATTGTTA TTTTCCCAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGTA TTAAAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGATGAGAAAAC AATTGCTTTACTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTGTCAT TGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTCATTAAAGA ATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAGGGATATTAA TATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGATTGGATTAACCT CCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGGTGATAGCCTATATCC TCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTATTGCGGCGTGTATACCA ATGCATGGCCCTCTTCTGATTTCAGGTTTGAGTATCTTAGCTCTA GCACAATTACTTGGACTAGTTTATATGAAATTTGTGGCTTCCAAT CAGAAGACTATACAACCTCCTAGGAAAGCTGTAGAGGAACCCC TTAATGCATTCAAAGAATCAAAAGGAATGATGAATGATGAATA A
N361，C15G	SEQ ID NO:156	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTGCTG CGGATCAGCTTGGCAGAGACCACTAAGATTTAATAAAACAAAA TCTGTAGAATTCACGTTTGGAAATGACACTGTCGTCATTCCATG CTTTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATACG TAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGATGGA TGGGCTAACAAGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTAGTGCAAA AATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTTGAAGA TGGATAAGAGTGATGCTGTCTCACACACAGGAAACTACACTTGT GAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGC TAAAATATCGTGTTGTTTCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTC TTATTGTTATTTTCCCAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGAC AGTTTGGTATTAAAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGAT GAGAAAACAATTGCTTTACTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGT CATTGTCATTGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTC ATTAAAGAATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAG GGATATTAATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGATTG GATTAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGGTGATAG CCTATATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTATTGCGGCGT GTATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGATTTCAGGTTTGAGTATCT TAGCTCTAGCACAATTACTTGGACTAGTTTATATGAAATTTGTG GCTTCCAATCAGAAGACTATACAACCTCCTAGGAAAGCTGTAGA GGAACCCCTTAATGCATTCAAAGAATCAAAAGGAATGATGAAT GATGAATAA

[1944]

N362, C15G	SEQ ID NO:157	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTGCTG CGGATCAGCTTGGGCTCCACCACTAAGATTTAATAAAACAAAAT CTGTAGAATTCACGTTTGGAAATGACACTGTCGTCATTCCATGC TTTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATACGT AAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGATGGAT ACACAAACAAGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTAGTGCAAAA ATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTTGAAGAT GGATAAGAGTGATGCTGTCTCACACACAGGAAACTACACTTGTG AAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCT AAAATATCGTGTTGTTTCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTCT TATTGTTATTTTCCCAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGACA GTTTGGTATTAAAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGATG AGAAAACAATTGCTTTACTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGTC ATTGTCATTGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTCA TTAAAGAATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAGG GATATTAATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGATTGG ATTAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGGTGATAGC CTATATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTATTGCGGCGTG TATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGATTTCAGGTTTGAGTATCTT AGCTCTAGCACAATTACTTGGACTAGTTTATATGAAATTTGTGG CTTCCAATCAGAAGACTATACAACCTCCTAGGAAAGCTGTAGAG GAACCCCTTAATGCATTCAAAGAATCAAAAGGAATGATGAATG ATGAATAA
N363, C15G	SEQ ID NO:158	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTGCTG CGGATCAGCTTGGCAGCTACCACTACTATTTAATAAAACAAAAT CTGTAGAATTCACGTTTGGAAATGACACTGTCGTCATTCCATGC TTTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATACGT AAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGATGGA GACAAAAACAAGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTAGTGCAAA AATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTTGAAGA TGGATAAGAGTGATGCTGTCTCACACACAGGAAACTACACTTGT GAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGC TAAAATATCGTGTTGTTTCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTC TTATTGTTATTTTCCCAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGAC AGTTTGGTATTAAAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGAT GAGAAAACAATTGCTTTACTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGT CATTGTCATTGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTC ATTAAAGAATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAG GGATATTAATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGATTG GATTAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGGTGATAG CCTATATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTATTGCGGCGT GTATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGATTTCAGGTTTGAGTATCT TAGCTCTAGCACAATTACTTGGACTAGTTTATATGAAATTTGTG GCTTCCAATCAGAAGACTATACAACCTCCTAGGAAAGCTGTAGA GGAACCCCTTAATGCATTCAAAGAATCAAAAGGAATGATGAAT GATGAATAA
N364, C15G	SEQ ID NO:159	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTGCTG CGGATCAGCTTGGCAGCCACTACTAGCTTTTAATAAAACAAAAT CTGTAGAATTCACGTTTGGAAATGACACTGTCGTCATTCCATGC TTTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATACGT AAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGATGGA GCTATGAACAAGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTAGTGCAAA AATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTTGAAGA TGGATAAGAGTGATGCTGTCTCACACACAGGAAACTACACTTGT GAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGC TAAAATATCGTGTTGTTTCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTC TTATTGTTATTTTCCCAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGAC AGTTTGGTATTAAAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGAT GAGAAAACAATTGCTTTACTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGT CATTGTCATTGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTC

[1945]

		ATTAAAGAATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAG GGATATTAATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGATTG GATTAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGGTGATAG CCTATATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTATTGCGGCGT GTATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGATTTCAGGTTTGAGTATCT TAGCTCTAGCACAATTACTTGGACTAGTTTATATGAAATTTGTG GCTTCCAATCAGAAGACTATACAACCTCCTAGGAAAGCTGTAGA GGAACCCCTTAATGCATTCAAAGAATCAAAAGGAATGATGAAT GATGAATAA
N366, C15G	SEQ ID NO:160	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTGCTG CGGATCAGCTTGGCAGACACCACTAAAATTTAATAAAACAAAA TCTGTAGAATTCACGTTTGGAAATGACACTGTCGTCATTCCATG CTTTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATACG TAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGATGGA GCTCTAAACAAGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTAGTGCAAA AATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTTGAAGA TGGATAAGAGTGATGCTGTCTCACACACAGGAAACTACACTTGT GAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGC TAAAATATCGTGTTGTTTCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTC TTATTGTTATTTTCCCAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGAC AGTTTGGTATTAAAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGAT GAGAAAACAATTGCTTTACTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGT CATTGTCATTGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTC ATTAAAGAATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAG GGATATTAATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGATTG GATTAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGGTGATAG CCTATATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTATTGCGGCGT GTATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGATTTCAGGTTTGAGTATCT TAGCTCTAGCACAATTACTTGGACTAGTTTATATGAAATTTGTG GCTTCCAATCAGAAGACTATACAACCTCCTAGGAAAGCTGTAGA GGAACCCCTTAATGCATTCAAAGAATCAAAAGGAATGATGAAT GATGAATAA
N368, C15G	SEQ ID NO:161	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTGCTG CGGATCAGCTTGGCAGTTCCCACTAAGATTTAATAAAACAAAAT CTGTAGAATTCACGTTTGGAAATGACACTGTCGTCATTCCATGC TTTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATACGT AAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGATGGA GCTGAGAACAAGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTAGTGCAAA AATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTTGAAGA TGGATAAGAGTGATGCTGTCTCACACACAGGAAACTACACTTGT GAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGC TAAAATATCGTGTTGTTTCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTC TTATTGTTATTTTCCCAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGAC AGTTTGGTATTAAAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGAT GAGAAAACAATTGCTTTACTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGT CATTGTCATTGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTC ATTAAAGAATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAG GGATATTAATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGATTG GATTAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGGTGATAG CCTATATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTATTGCGGCGT GTATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGATTTCAGGTTTGAGTATCT TAGCTCTAGCACAATTACTTGGACTAGTTTATATGAAATTTGTG GCTTCCAATCAGAAGACTATACAACCTCCTAGGAAAGCTGTAGA GGAACCCCTTAATGCATTCAAAGAATCAAAAGGAATGATGAAT GATGAATAA
N369, C15G	SEQ ID NO:162	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTGCTG CGGATCAGCTTGGCAGATTCCACTAAACTTTAATAAAACAAAAT CTGTAGAATTCACGTTTGGAAATGACACTGTCGTCATTCCATGC TTTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATACGT AAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGATGGA

[1946]

		GCTTGGAACAAGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTAGTGCAAA AATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTTGAAGA TGGATAAGAGTGATGCTGTCTCACACACAGGAAACTACACTTGT GAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGC TAAAATATCGTGTTGTTTCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTC TTATTGTTATTTTCCCAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGAC AGTTTGGTATTAAAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGAT GAGAAAACAATTGCTTTACTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGT CATTGTCATTGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTC ATTAAAGAATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAG GGATATTAATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGATTG GATTAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGGTGATAG CCTATATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTATTGCGGCGT GTATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGATTTCAGGTTTGAGTATCT TAGCTCTAGCACAATTACTTGGACTAGTTTATATGAAATTTGTG GCTTCCAATCAGAAGACTATACAACCTCCTAGGAAAGCTGTAGA GGAACCCCTTAATGCATTCAAAGAATCAAAAGGAATGATGAAT GATGAATAA
N3610, C15G	SEQ ID NO:163	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTGCTG CGGATCAGCTTGGCAGCCACTACTACTATTTAATAAAACAAAAT CTGTAGAATTCACGTTTGGAAATGACACTGTCGTCATTCCATGC TTTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATACGT AAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGATGGA GCTTCTAACAAGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTAGTGCAAA AATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTTGAAGA TGGATAAGAGTGATGCTGTCTCACACACAGGAAACTACACTTGT GAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGC TAAAATATCGTGTTGTTTCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTC TTATTGTTATTTTCCCAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGAC AGTTTGGTATTAAAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGAT GAGAAAACAATTGCTTTACTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGT CATTGTCATTGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTC ATTAAAGAATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAG GGATATTAATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGATTG GATTAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGGTGATAG CCTATATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTATTGCGGCGT GTATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGATTTCAGGTTTGAGTATCT TAGCTCTAGCACAATTACTTGGACTAGTTTATATGAAATTTGTG GCTTCCAATCAGAAGACTATACAACCTCCTAGGAAAGCTGTAGA GGAACCCCTTAATGCATTCAAAGAATCAAAAGGAATGATGAAT GATGAATAA
N3612, C15G	SEQ ID NO:164	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTGCTG CGGATCAGCTTGGCAGCCACCACTACTATTTAATAAAACAAAAT CTGTAGAATTCACGTTTGGAAATGACACTGTCGTCATTCCATGC TTTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATACGT AAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGATGGA CAGGCTAACAAGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTAGTGCAAA AATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTTGAAGA TGGATAAGAGTGATGCTGTCTCACACACAGGAAACTACACTTGT GAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGC TAAAATATCGTGTTGTTTCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTC TTATTGTTATTTTCCCAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGAC AGTTTGGTATTAAAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGAT GAGAAAACAATTGCTTTACTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGT CATTGTCATTGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTC ATTAAAGAATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAG GGATATTAATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGATTG GATTAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGGTGATAG CCTATATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTATTGCGGCGT GTATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGATTTCAGGTTTGAGTATCT

[1947]

		TAGCTCTAGCACAATTACTTGGACTAGTTTATATGAAATTTGTG GCTTCCAATCAGAAGACTATACAACCTCCTAGGAAAGCTGTAGA GGAACCCCTTAATGCATTCAAAGAATCAAAAGGAATGATGAAT GATGAATAA
N3614, C15G	SEQ ID NO:165	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTGCTG CGGATCAGCTTGGCAGCCACTACTAAAATTTAATAAAACAAAAT CTGTAGAATTCACGTTTGGAAATGACACTGTCGTCATTCCATGC TTTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATACGT AAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGATGGA GCTGCTAACAAGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTAGTGCAAA AATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTTGAAGA TGGATAAGAGTGATGCTGTCTCACACACAGGAAACTACACTTGT GAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGC TAAAATATCGTGTTGTTTCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTC TTATTGTTATTTTCCCAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGAC AGTTTGGTATTAAAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGAT GAGAAAACAATTGCTTTACTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGT CATTGTCATTGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTC ATTAAAGAATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAG GGATATTAATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGATTG GATTAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGGTGATAG CCTATATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTATTGCGGCGT GTATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGATTTCAGGTTTGAGTATCT TAGCTCTAGCACAATTACTTGGACTAGTTTATATGAAATTTGTG GCTTCCAATCAGAAGACTATACAACCTCCTAGGAAAGCTGTAGA GGAACCCCTTAATGCATTCAAAGAATCAAAAGGAATGATGAAT GATGAATAA
N3617, C15G	SEQ ID NO:166	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTGCTG CGGATCAGCTTGGCAGAGACCACTAAGATTTAATAAAACAAAA TCTGTAGAATTCACGTTTGGAAATGACACTGTCGTCATTCCATG CTTTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATACG TAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGATGGA GCTCTAAACAAGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTAGTGCAAA AATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTTGAAGA TGGATAAGAGTGATGCTGTCTCACACACAGGAAACTACACTTGT GAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGC TAAAATATCGTGTTGTTTCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTC TTATTGTTATTTTCCCAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGAC AGTTTGGTATTAAAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGAT GAGAAAACAATTGCTTTACTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGT CATTGTCATTGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTC ATTAAAGAATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAG GGATATTAATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGATTG GATTAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGGTGATAG CCTATATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTATTGCGGCGT GTATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGATTTCAGGTTTGAGTATCT TAGCTCTAGCACAATTACTTGGACTAGTTTATATGAAATTTGTG GCTTCCAATCAGAAGACTATACAACCTCCTAGGAAAGCTGTAGA GGAACCCCTTAATGCATTCAAAGAATCAAAAGGAATGATGAAT GATGAATAA
N3618, C15G	SEQ ID NO:167	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTGCTG CGGATCAGCTTGGCAGCTACCACTACTATTTAATAAAACAAAAT CTGTAGAATTCACGTTTGGAAATGACACTGTCGTCATTCCATGC TTTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATACGT AAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGATGGA GCTATTAACAAGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTAGTGCAAA AATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTTGAAGA TGGATAAGAGTGATGCTGTCTCACACACAGGAAACTACACTTGT GAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGC TAAAATATCGTGTTGTTTCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTC

[1948]

		TTATTGTTATTTTCCCAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGAC AGTTTGGTATTAAAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGAT GAGAAAACAATTGCTTTACTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGT CATTGTCATTGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTC ATTAAAGAATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAG GGATATTAATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGATTG GATTAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGGTGATAG CCTATATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTATTGCGGCGT GTATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGATTTCAGGTTTGAGTATCT TAGCTCTAGCACAATTACTTGGACTAGTTTATATGAAATTTGTG GCTTCCAATCAGAAGACTATACAACCTCCTAGGAAAGCTGTAGA GGAACCCCTTAATGCATTCAAAGAATCAAAAGGAATGATGAAT GATGAATAA
N3621, C15G	SEQ ID NO:168	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTGCTG CGGATCAGCTTGGCAGATTCCACTAGAGTTTAATAAAACAAAAT CTGTAGAATTCACGTTTGGAAATGACACTGTCGTCATTCCATGC TTTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATACGT AAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGATGGA GCTCTAAACAAGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTAGTGCAAA AATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTTGAAGA TGGATAAGAGTGATGCTGTCTCACACACAGGAAACTACACTTGT GAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGC TAAAATATCGTGTTGTTTCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTC TTATTGTTATTTTCCCAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGAC AGTTTGGTATTAAAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGAT GAGAAAACAATTGCTTTACTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGT CATTGTCATTGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTC ATTAAAGAATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAG GGATATTAATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGATTG GATTAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGGTGATAG CCTATATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTATTGCGGCGT GTATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGATTTCAGGTTTGAGTATCT TAGCTCTAGCACAATTACTTGGACTAGTTTATATGAAATTTGTG GCTTCCAATCAGAAGACTATACAACCTCCTAGGAAAGCTGTAGA GGAACCCCTTAATGCATTCAAAGAATCAAAAGGAATGATGAAT GATGAATAA
N3623, C15G	SEQ ID NO:169	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTGCTG CGGATCAGCTTGGCAGATGCCACTAGTTTTTAATAAAACAAAAT CTGTAGAATTCACGTTTGGAAATGACACTGTCGTCATTCCATGC TTTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATACGT AAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGATGGA GTTACAAACAAGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTAGTGCAAA AATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTTGAAGA TGGATAAGAGTGATGCTGTCTCACACACAGGAAACTACACTTGT GAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGC TAAAATATCGTGTTGTTTCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTC TTATTGTTATTTTCCCAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGAC AGTTTGGTATTAAAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGAT GAGAAAACAATTGCTTTACTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGT CATTGTCATTGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTC ATTAAAGAATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAG GGATATTAATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGATTG GATTAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGGTGATAG CCTATATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTATTGCGGCGT GTATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGATTTCAGGTTTGAGTATCT TAGCTCTAGCACAATTACTTGGACTAGTTTATATGAAATTTGTG GCTTCCAATCAGAAGACTATACAACCTCCTAGGAAAGCTGTAGA GGAACCCCTTAATGCATTCAAAGAATCAAAAGGAATGATGAAT GATGAATAA
N3624,	SEQ ID	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTGCTG

[1949]

C15G	NO:170	CGGATCAGCTTGGCAGATTCCACTAAGATTTAATAAAACAAAAT CTGTAGAATTCACGTTTGGAAATGACACTGTCGTCATTCCATGC TTTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATACGT AAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGATGGA CAGGTTAACAAGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTAGTGCAAA AATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTTGAAGA TGGATAAGAGTGATGCTGTCTCACACACAGGAAACTACACTTGT GAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGC TAAAATATCGTGTTGTTTCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTC TTATTGTTATTTTCCCAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGAC AGTTTGGTATTAAAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGAT GAGAAAACAATTGCTTTACTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGT CATTGTCATTGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTC ATTAAAGAATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAG GGATATTAATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGATTG GATTAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGGTGATAG CCTATATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTATTGCGGCGT GTATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGATTTCAGGTTTGAGTATCT TAGCTCTAGCACAATTACTTGGACTAGTTTATATGAAATTTGTG GCTTCCAATCAGAAGACTATACAACCTCCTAGGAAAGCTGTAGA GGAACCCCTTAATGCATTCAAAGAATCAAAAGGAATGATGAAT GATGAATAA
hCD47 N361 突变体	SEQ ID NO:171	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTGCTG CGGATCAGCTTGGCAGAGACCACTAAGATTTAATAAAACAAAA TCTGTAGAATTCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCATTCCATGC TTTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATACGT AAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGATGGAT GGGCTAACAAGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTAGTGCAAAA ATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTTGAAGAT GGATAAGAGTGATGCTGTCTCACACACAGGAAACTACACTTGTG AAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCT AAAATATCGTGTTGTTTCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTCT TATTGTTATTTTCCCAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGACA GTTTGGTATTAAAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGATG AGAAAACAATTGCTTTACTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGTC ATTGTCATTGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTCA TTAAAGAATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAGG GATATTAATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGATTGG ATTAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGGTGATAGC CTATATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTATTGCGGCGTG TATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGATTTCAGGTTTGAGTATCTT AGCTCTAGCACAATTACTTGGACTAGTTTATATGAAATTTGTGG CTTCCAATCAGAAGACTATACAACCTCCTAGGAAAGCTGTAGAG GAACCCCTTAATGCATTCAAAGAATCAAAAGGAATGATGAATG ATGAATAA
hCD47 N362 突变体	SEQ ID NO:172	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTGCTG CGGATCAGCTTGGGCTCCACCACTAAGATTTAATAAAACAAAAT CTGTAGAATTCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCATTCCATGCT TTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATACGTA AAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGATGGATA CACAAACAAGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTAGTGCAAAAA TTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTTGAAGATG GATAAGAGTGATGCTGTCTCACACACAGGAAACTACACTTGTGA AGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTA AAATATCGTGTTGTTTCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTCTT ATTGTTATTTTCCCAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGACAG TTTGGTATTAAAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGATGA GAAAACAATTGCTTTACTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGTCA TTGTCATTGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTCAT TAAAGAATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAGGG

[1950]

		ATATTAATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGATTGGA TTAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGGTGATAGCC TATATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTATTGCGGCGTGT ATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGATTTCAGGTTTGAGTATCTTA GCTCTAGCACAATTACTTGGACTAGTTTATATGAAATTTGTGGCT TCCAATCAGAAGACTATACAACCTCCTAGGAAAGCTGTAGAGG AACCCCTTAATGCATTCAAAGAATCAAAAGGAATGATGAATGA TGAATAA
hCD47 N363 突变体	SEQ ID NO:173	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTGCTG CGGATCAGCTTGGCAGCTACCACTACTATTTAATAAAACAAAAT CTGTAGAATTCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCATTCCATGCT TTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATACGTA AAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGATGGAG ACAAAAACAAGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTAGTGCAAAA ATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTTGAAGAT GGATAAGAGTGATGCTGTCTCACACACAGGAAACTACACTTGTG AAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCT AAAATATCGTGTTGTTTCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTCT TATTGTTATTTTCCCAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGACA GTTTGGTATTAAAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGATG AGAAAACAATTGCTTTACTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGTC ATTGTCATTGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTCA TTAAAGAATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAGG GATATTAATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGATTGG ATTAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGGTGATAGC CTATATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTATTGCGGCGTG TATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGATTTCAGGTTTGAGTATCTT AGCTCTAGCACAATTACTTGGACTAGTTTATATGAAATTTGTGG CTTCCAATCAGAAGACTATACAACCTCCTAGGAAAGCTGTAGAG GAACCCCTTAATGCATTCAAAGAATCAAAAGGAATGATGAATG ATGAATAA
hCD47 N364 突变体	SEQ ID NO:174	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTGCTG CGGATCAGCTTGGCAGCCACTACTAGCTTTTAATAAAACAAAAT CTGTAGAATTCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCATTCCATGCT TTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATACGTA AAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGATGGAG CTATGAACAAGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTAGTGCAAAA ATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTTGAAGAT GGATAAGAGTGATGCTGTCTCACACACAGGAAACTACACTTGTG AAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCT AAAATATCGTGTTGTTTCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTCT TATTGTTATTTTCCCAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGACA GTTTGGTATTAAAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGATG AGAAAACAATTGCTTTACTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGTC ATTGTCATTGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTCA TTAAAGAATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAGG GATATTAATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGATTGG ATTAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGGTGATAGC CTATATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTATTGCGGCGTG TATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGATTTCAGGTTTGAGTATCTT AGCTCTAGCACAATTACTTGGACTAGTTTATATGAAATTTGTGG CTTCCAATCAGAAGACTATACAACCTCCTAGGAAAGCTGTAGAG GAACCCCTTAATGCATTCAAAGAATCAAAAGGAATGATGAATG ATGAATAA
hCD47 N366 突变体	SEQ ID NO:175	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTGCTG CGGATCAGCTTGGCAGACACCACTAAAATTTAATAAAACAAAA TCTGTAGAATTCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCATTCCATGC TTTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATACGT AAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGATGGA GCTCTAAACAAGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTAGTGCAAA

[1951]

		AATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTTGAAGA TGGATAAGAGTGATGCTGTCTCACACACAGGAAACTACACTTGT GAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGC TAAAATATCGTGTTGTTTCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTC TTATTGTTATTTTCCCAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGAC AGTTTGGTATTAAAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGAT GAGAAAACAATTGCTTTACTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGT CATTGTCATTGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTC ATTAAAGAATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAG GGATATTAATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGATTG GATTAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGGTGATAG CCTATATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTATTGCGGCGT GTATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGATTTCAGGTTTGAGTATCT TAGCTCTAGCACAATTACTTGGACTAGTTTATATGAAATTTGTG GCTTCCAATCAGAAGACTATACAACCTCCTAGGAAAGCTGTAGA GGAACCCCTTAATGCATTCAAAGAATCAAAAGGAATGATGAAT GATGAATAA
hCD47 N368 突变体	SEQ ID NO:176	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTGCTG CGGATCAGCTTGGCAGTTCCCACTAAGATTTAATAAAACAAAAT CTGTAGAATTCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCATTCCATGCT TTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATACGTA AAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGATGGAG CTGAGAACAAGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTAGTGCAAAA ATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTTGAAGAT GGATAAGAGTGATGCTGTCTCACACACAGGAAACTACACTTGTG AAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCT AAAATATCGTGTTGTTTCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTCT TATTGTTATTTTCCCAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGACA GTTTGGTATTAAAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGATG AGAAAACAATTGCTTTACTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGTC ATTGTCATTGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTCA TTAAAGAATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAGG GATATTAATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGATTGG ATTAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGGTGATAGC CTATATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTATTGCGGCGTG TATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGATTTCAGGTTTGAGTATCTT AGCTCTAGCACAATTACTTGGACTAGTTTATATGAAATTTGTGG CTTCCAATCAGAAGACTATACAACCTCCTAGGAAAGCTGTAGAG GAACCCCTTAATGCATTCAAAGAATCAAAAGGAATGATGAATG ATGAATAA
hCD47 N369 突变体	SEQ ID NO:177	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTGCTG CGGATCAGCTTGGCAGATTCCACTAAACTTTAATAAAACAAAAT CTGTAGAATTCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCATTCCATGCT TTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATACGTA AAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGATGGAG CTTGGAACAAGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTAGTGCAAAA ATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTTGAAGAT GGATAAGAGTGATGCTGTCTCACACACAGGAAACTACACTTGTG AAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCT AAAATATCGTGTTGTTTCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTCT TATTGTTATTTTCCCAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGACA GTTTGGTATTAAAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGATG AGAAAACAATTGCTTTACTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGTC ATTGTCATTGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTCA TTAAAGAATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAGG GATATTAATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGATTGG ATTAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGGTGATAGC CTATATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTATTGCGGCGTG TATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGATTTCAGGTTTGAGTATCTT AGCTCTAGCACAATTACTTGGACTAGTTTATATGAAATTTGTGG

[1952]

		CTTCCAATCAGAAGACTATACAACCTCCTAGGAAAGCTGTAGAG GAACCCCTTAATGCATTCAAAGAATCAAAAGGAATGATGAATG ATGAATAA
hCD47 N3610 突变体	SEQ ID NO:178	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTGCTG CGGATCAGCTTGGCAGCCACTACTACTATTTAATAAAACAAAAT CTGTAGAATTCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCATTCCATGCT TTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATACGTA AAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGATGGAG CTTCTAACAAGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTAGTGCAAAA ATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTTGAAGAT GGATAAGAGTGATGCTGTCTCACACACAGGAAACTACACTTGTG AAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCT AAAATATCGTGTTGTTTCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTCT TATTGTTATTTTCCCAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGACA GTTTGGTATTAAAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGATG AGAAAACAATTGCTTTACTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGTC ATTGTCATTGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTCA TTAAAGAATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAGG GATATTAATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGATTGG ATTAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGGTGATAGC CTATATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTATTGCGGCGTG TATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGATTTCAGGTTTGAGTATCTT AGCTCTAGCACAATTACTTGGACTAGTTTATATGAAATTTGTGG CTTCCAATCAGAAGACTATACAACCTCCTAGGAAAGCTGTAGAG GAACCCCTTAATGCATTCAAAGAATCAAAAGGAATGATGAATG ATGAATAA
hCD47 N3612 突变体	SEQ ID NO:179	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTGCTG CGGATCAGCTTGGCAGCCACCACTACTATTTAATAAAACAAAAT CTGTAGAATTCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCATTCCATGCT TTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATACGTA AAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGATGGAC AGGCTAACAAGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTAGTGCAAAA ATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTTGAAGAT GGATAAGAGTGATGCTGTCTCACACACAGGAAACTACACTTGTG AAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCT AAAATATCGTGTTGTTTCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTCT TATTGTTATTTTCCCAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGACA GTTTGGTATTAAAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGATG AGAAAACAATTGCTTTACTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGTC ATTGTCATTGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTCA TTAAAGAATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAGG GATATTAATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGATTGG ATTAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGGTGATAGC CTATATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTATTGCGGCGTG TATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGATTTCAGGTTTGAGTATCTT AGCTCTAGCACAATTACTTGGACTAGTTTATATGAAATTTGTGG CTTCCAATCAGAAGACTATACAACCTCCTAGGAAAGCTGTAGAG GAACCCCTTAATGCATTCAAAGAATCAAAAGGAATGATGAATG ATGAATAA
hCD47 N3614 突变体	SEQ ID NO:180	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTGCTG CGGATCAGCTTGGCAGCCACTACTAAAATTTAATAAAACAAAAT CTGTAGAATTCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCATTCCATGCT TTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATACGTA AAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGATGGAG CTGCTAACAAGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTAGTGCAAAA ATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTTGAAGAT GGATAAGAGTGATGCTGTCTCACACACAGGAAACTACACTTGTG AAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCT AAAATATCGTGTTGTTTCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTCT TATTGTTATTTTCCCAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGACA

[1953]

		GTTTGGTATTAAAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGATG AGAAAACAATTGCTTTACTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGTC ATTGTCATTGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTCA TTAAAGAATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAGG GATATTAATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGATTGG ATTAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGGTGATAGC CTATATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTATTGCGGCGTG TATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGATTTCAGGTTTGAGTATCTT AGCTCTAGCACAATTACTTGGACTAGTTTATATGAAATTTGTGG CTTCCAATCAGAAGACTATACAACCTCCTAGGAAAGCTGTAGAG GAACCCCTTAATGCATTCAAAGAATCAAAAGGAATGATGAATG ATGAATAA
hCD47 N3617 突变体	SEQ ID NO:181	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTGCTG CGGATCAGCTTGGCAGAGACCACTAAGATTTAATAAAACAAAA TCTGTAGAATTCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCATTCCATGC TTTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATACGT AAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGATGGA GCTCTAAACAAGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTAGTGCAAA AATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTTGAAGA TGGATAAGAGTGATGCTGTCTCACACACAGGAAACTACACTTGT GAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGC TAAAATATCGTGTTGTTTCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTC TTATTGTTATTTTCCCAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGAC AGTTTGGTATTAAAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGAT GAGAAAACAATTGCTTTACTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGT CATTGTCATTGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTC ATTAAAGAATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAG GGATATTAATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGATTG GATTAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGGTGATAG CCTATATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTATTGCGGCGT GTATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGATTTCAGGTTTGAGTATCT TAGCTCTAGCACAATTACTTGGACTAGTTTATATGAAATTTGTG GCTTCCAATCAGAAGACTATACAACCTCCTAGGAAAGCTGTAGA GGAACCCCTTAATGCATTCAAAGAATCAAAAGGAATGATGAAT GATGAATAA
hCD47 N3618 突变体	SEQ ID NO:182	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTGCTG CGGATCAGCTTGGCAGATTCCACTAGAGTTTAATAAAACAAAAT CTGTAGAATTCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCATTCCATGCT TTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATACGTA AAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGATGGAG CTCTAAACAAGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTAGTGCAAAA ATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTTGAAGAT GGATAAGAGTGATGCTGTCTCACACACAGGAAACTACACTTGTG AAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCT AAAATATCGTGTTGTTTCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTCT TATTGTTATTTTCCCAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGACA GTTTGGTATTAAAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGATG AGAAAACAATTGCTTTACTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGTC ATTGTCATTGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTCA TTAAAGAATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAGG GATATTAATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGATTGG ATTAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGGTGATAGC CTATATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTATTGCGGCGTG TATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGATTTCAGGTTTGAGTATCTT AGCTCTAGCACAATTACTTGGACTAGTTTATATGAAATTTGTGG CTTCCAATCAGAAGACTATACAACCTCCTAGGAAAGCTGTAGAG GAACCCCTTAATGCATTCAAAGAATCAAAAGGAATGATGAATG ATGAATAA
hCD47 N3621 突变	SEQ ID NO:183	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTGCTG CGGATCAGCTTGGCAGATTCCACTAGAGTTTAATAAAACAAAAT

[1954]

体		CTGTAGAATTCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCATTCCATGCT TTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATACGTA AAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGATGGAG CTCTAAACAAGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTAGTGCAAAA ATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTTGAAGAT GGATAAGAGTGATGCTGTCTCACACACAGGAAACTACACTTGTG AAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCT AAAATATCGTGTTGTTTCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTCT TATTGTTATTTTCCCAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGACA GTTTGGTATTAAAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGATG AGAAAACAATTGCTTTACTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGTC ATTGTCATTGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTCA TTAAAGAATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAGG GATATTAATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGATTGG ATTAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGGTGATAGC CTATATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTATTGCGGCGTG TATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGATTTCAGGTTTGAGTATCTT AGCTCTAGCACAATTACTTGGACTAGTTTATATGAAATTTGTGG CTTCCAATCAGAAGACTATACAACCTCCTAGGAAAGCTGTAGAG GAACCCCTTAATGCATTCAAAGAATCAAAAGGAATGATGAATG ATGAATAA
hCD47 N3623 突变体	SEQ ID NO:184	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTGCTG CGGATCAGCTTGGCAGATGCCACTAGTTTTTAATAAAACAAAAT CTGTAGAATTCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCATTCCATGCT TTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATACGTA AAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGATGGAGT TACAAACAAGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTAGTGCAAAAA TTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTTGAAGATG GATAAGAGTGATGCTGTCTCACACACAGGAAACTACACTTGTGA AGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTA AAATATCGTGTTGTTTCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTCTT ATTGTTATTTTCCCAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGACAG TTTGGTATTAAAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGATGA GAAAACAATTGCTTTACTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGTCA TTGTCATTGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTCAT TAAAGAATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAGGG ATATTAATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGATTGGA TTAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGGTGATAGCC TATATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTATTGCGGCGTGT ATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGATTTCAGGTTTGAGTATCTTA GCTCTAGCACAATTACTTGGACTAGTTTATATGAAATTTGTGGCT TCCAATCAGAAGACTATACAACCTCCTAGGAAAGCTGTAGAGG AACCCCTTAATGCATTCAAAGAATCAAAAGGAATGATGAATGA TGAATAA
hCD47 N3624 突变体	SEQ ID NO:185	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTGCTG CGGATCAGCTTGGCAGATTCCACTAAGATTTAATAAAACAAAAT CTGTAGAATTCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCATTCCATGCT TTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATACGTA AAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGATGGAC AGGTTAACAAGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTAGTGCAAAA ATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTTGAAGAT GGATAAGAGTGATGCTGTCTCACACACAGGAAACTACACTTGTG AAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCT AAAATATCGTGTTGTTTCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTCT TATTGTTATTTTCCCAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGACA GTTTGGTATTAAAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGATG AGAAAACAATTGCTTTACTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGTC ATTGTCATTGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTCA TTAAAGAATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAGG GATATTAATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGATTGG

[1955]

		ATTAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGGTGATAGC CTATATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTATTGCGGCGTG TATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGATTTCAGGTTTGAGTATCTT AGCTCTAGCACAATTACTTGGACTAGTTTATATGAAATTTGTGG CTTCCAATCAGAAGACTATACAACCTCCTAGGAAAGCTGTAGAG GAACCCCTTAATGCATTCAAAGAATCAAAAGGAATGATGAATG ATGAATAA
CAG-CD47 (202) –CodOpt	SEQ ID NO:200	ATGTGGCCCCTGGTCGCCGCCCTGTTGCTGGGCTCGGCTTGCTG CGGATCAGCTCAGCTACTGTTTAATAAAACAAAATCTGTAGAAT TCACGTTTTGTAACGACACTGTCGTGATCCCATGCTTTGTTACTA ATATGGAGGCACAAAACACCACTGAAGTGTACGTGAAGTGGAA ATTCAAAGGCAGAGACATTTACACCTTTGACGGCGCCCTCAACA AGTCCACCGTGCCCACTGACTTTAGTAGCGCAAAAATTGAGGTC AGCCAATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTTGAAGATGGACAAGA GCGATGCTGTCAGCCACACAGGGAACTACACTTGTGAAGTAAC AGAGTTAACCCGCGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTGAAGTAT CGAGTGGTGTCCTGGTTTTCTCCGAACGAGAATATCCTTATCGT AATTTTCCCAATTTTCGCTATCCTCCTGTTCTGGGGCCAGTTTGG TATCAAGACACTCAAATATCGGTCCGGTGGGATGGATGAGAAG ACAATTGCCCTGCTTGTTGCTGGACTCGTGATCACCGTCATCGT GATTGTTGGGGCCATCCTTTTCGTCCCAGGGGAGTACAGCCTGA AGAATGCTACGGGCCTGGGATTAATTGTGACCTCTACAGGGATA CTCATCCTGCTTCACTACTATGTGTTCAGTACCGCGATTGGACTG ACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTGATTCAGGTGATAGCCTAC ATCCTCGCCGTGGTTGGCCTGAGTCTCTGTATCGCGGCGTGCAT ACCCATGCATGGCCCTCTTCTGATTTCAGGGTTGAGTATCCTCGC ACTAGCACAGTTGCTGGGACTGGTTTATATGAAATTTGTGGCCT CCAACCAGAAGACTATACAGCCTCCTAGGAAGGCTGTAGAGGA GCCCCTGAATGCATTCAAGGAATCAAAAGGCATGATGAATGAT GAATAA
CD47 ECD-CD59 GPI	SEQ ID NO:341	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTGCTG CGGATCAGCTCAGCTACTATTTAATAAAACAAAATCTGTAGAAT TCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCATTCCATGCTTTGTTACTA ATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATACGTAAAGTGGAA ATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGATGGAGCTCTAAACA AGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTAGTGCAAAAATTGAAGTC TCACAATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTTGAAGATGGATAAGA GTGATGCTGTCTCACACACAGGAAACTACACTTGTGAAGTAACA GAATTAACCAGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAAATATC GTGTTGTTTCATGGTTTTCTCCAAATGAACAGCTTGAGAACGGG GGCACATCTCTCTCCGAAAAGACTGTCCTGTTACTGGTGACCCC TTTCTTGGCTGCCGCATGGAGCCTGCACCCCTAA
CAG-CD47 ECD-CD59 GPI	SEQ ID NO:342	ACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAG CCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCC CGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATA ATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTG ACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAG TACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTC AATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGAC CTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCAT CGCTATTACCATGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTC TCCCCATCTCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTATTTAT TTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGG GGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCG GGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCG CGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCGG CCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGGCGGGAGTCGCTGCGC GCTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCCGCCGCCTCGCGCCGC CCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTGAGCGG GCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTT

[1956]

		AATGACGGCTTGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTGAG GGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGG GTGCGTGCGTGTGTGTGTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCTCC GCGCTGCCCGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGCGCGGGGC TTTGTGCGCTCCGCAGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCCGGGGG CGGTGCCCCGCGGTGCGGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGC TGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGG GCGCGTCGGTCGGGCTGCAACCCCCCCTGCACCCCCCTCCCCGA GTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTACGGG GCGTGGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGGTGGCGGCAG GTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCCGCCTCGGGCCGGGGAGG GCTCGGGGGAGGGGCGCGGCGGCCCCCGGAGCGCCGGCGGCTG TCGAGGCGCGGCGAGCCGCAGCCATTGCCTTTTATGGTAATCGT GCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAAATCTGTGCGGAG CCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGCACCCCCTCTAGCGGGCGCG GGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGG AGGGCCTTCGTGCGTCGCCGCGCCGCCGTCCCCTTCTCCCTCTCC AGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGG ACGGGGCAGGGCGGGGTTCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGC TCTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTCATGCCTTCTTCTTTTTCCTA CAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGCTGTCTCATCATTTT GGCAAAGAATTCCGTTTATTAATTAAGTGAACCGTCAGAGCCAC CATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTGCT GCGGATCAGCTCAGCTACTATTTAATAAAACAAAATCTGTAGAA TTCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCATTCCATGCTTTGTTACT AATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATACGTAAAGTGGA AATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGATGGAGCTCTAAAC AAGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTAGTGCAAAAATTGAAGT CTCACAATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTTGAAGATGGATAAGA GTGATGCTGTCTCACACACAGGAAACTACACTTGTGAAGTAACA GAATTAACCAGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAAATATC GTGTTGTTTCATGGTTTTCTCCAAATGAACAGCTTGAGAACGGG GGCACATCTCTCTCCGAAAAGACTGTCCTGTTACTGGTGACCCC TTTCTTGGCTGCCGCATGGAGCCTGCACCCCTAA

[1957] 表32.CD47蛋白结构域和另外的结构域的示例性氨基酸序列

[1958]

描述	SEQ ID NO:	氨基酸序列
CD47 SP 结构域	SEQ ID NO:20	MWPLVAALLLGSACCGSA
CD47 IgV 结构域	SEQ ID NO:21	QLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKG RDIYTFDGALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVS HTGNYTCEVTELTREGETII
CD47 EC 结构域	SEQ ID NO:22	QLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKG RDIYTFDGALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVS HTGNYTCEVTELTREGETIIELKYRVVSWFSPNE
CD47 TM1 结构域	SEQ ID NO:23	NILIVIFPIFAILLFWGQFGI
CD47 IC1 结构域	SEQ ID NO:24	KTLKYRSGGMDEKT
CD47 TM2 结构域	SEQ ID NO:25	IALLVAGLVITVIVIVGAILF
CD47 EC1 结构域	SEQ ID NO:26	VPGEYSLKNA
CD47 TM3 结构域	SEQ ID NO:27	TGLGLIVTSTGILILLHYYVF

[1959]

CD47 IC2 结构域	SEQ ID NO:28	STAIGLT
CD47 TM4 结构域	SEQ ID NO:29	SFVIAILVIQVIAYILAVVGL
CD47 EC2 结构域	SEQ ID NO:30	SLCIAACIPMHG
CD47 TM5 结构域	SEQ ID NO:31	PLLISGLSILALAQLLGLVYM
CD47(202) IC3 结构域	SEQ ID NO:32	KFVASNQKTIQPPRKAVEEPLNAFKESKGMMNDE
CD47(201) IC3 结构域	SEQ ID NO:33	KFVASNQKTIQPPRNN
DAF/CD55 GPI	SEQ ID NO:34	PNKGSGTTSGTTRLLSGHTCFTLTGLLGTLVTMGLLT
TRAILR3 GPI 长(具有 TAPE 重复序列)	SEQ ID NO:35	ATVETPAAEETMNTSPGTPAPAAEETMNTSPGTPAPAAEETMTTSPGTPAPAAEETMTTSPGTPAPAAEETMITSPGTPASSHYLSCTIVGIIVLIVLLIVFV
TRAILR3 GPI 短(无 TAPE 重复序列)	SEQ ID NO:36	MITSPGTPASSHYLSCTIVGIIVLIVLLIVFV
CD59 GPI	SEQ ID NO:37	QLENGGTSLSEKTVLLLVTPFLAAAWSLHP
CD8a TM 结构域	SEQ ID NO:38	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVIT
CD8a 9AA ICD	SEQ ID NO:39	LYCNHRNRR
CD28 TM 结构域	SEQ ID NO:40	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV
CD28 9AA ICD	SEQ ID NO:41	RSKRSRLLH
PDGFR TM 结构域	SEQ ID NO:42	VVISAILALVVLTIISLIILI
PDGFR 9AA ICD	SEQ ID NO:43	MLWQKKPRY
CD47 3AA 铰链结构域	SEQ ID NO:44	ELK
CD8a 铰链结构域	SEQ ID NO:45	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD
CD28 铰链结构域	SEQ ID NO:46	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKP
PDGFR 铰链结构域	SEQ ID NO:47	AVGQDTQEVIVVPHSLPFKV
IgG4 铰链结构域	SEQ ID NO:48	ESKYGPPCPPCP

[1960] 表33.CD47蛋白结构域和另外的结构域的示例性核苷酸序列

[1961]

描述	SEQ ID NO:	核苷酸序列
CAG 启动子	SEQ ID NO:49	ACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGA

[1962]

		CGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGG ACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACT GCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTAC GCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGC ATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGC AGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTCGAGG TGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCT CCCCACCCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTTTAATTATTTTG TGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCA GGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGG CGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCC GAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCGGCCC TATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGGCGGGAGTCGCTGCGC GCTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCCGCCGCCTCGCGCC GCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTG AGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCG CTTGGTTTAATGACGGCTTGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGA AAGCCTTGAGGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGA GCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGTGTGCGTGGGGAGC GCCGCGTGCGGCTCCGCGCTGCCCGGCGGCTGTGAGCGCTG CGGGCGCGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCAGTGTGCGCG AGGGGAGCGCGGCCGGGGGCGGTGCCCCGCGGTGCGGGGG GGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTGC GTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGTCGGTCGGGC TGCAACCCCCCCTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCAC GGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTACGGGGCGTGGCGC GGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGG GTGCCGGGCGGGGCGGGGCCGCCTCGGGCCGGGGAGGGCT CGGGGGAGGGGCGCGGCGGCCCCCGGAGCGCCGGCGGCTG TCGAGGCGCGGCGAGCCGCAGCCATTGCCTTTTATGGTAAT CGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAAATCTGT GCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGCACCCCCTCTAG CGGGCGCGGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGGCAGGAAGGAA ATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGCCGCGCCGCCGTCC CCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGGACG GCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTCGGCTTC TGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCATGT TCATGCCTTCTTCTTTTTCCTACAGCTCCTGGGCAACGTGCT GGTTATTGTGCTGTCTCATCATTTTGGCAAAGAATTC
EF1α 启动子	SEQ ID NO:50	GCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCCACA GTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAACCG GTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGA TGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAG AACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTC GCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGT GGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTGC GTGCCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTT GATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAG GCCTTGCGCTTAAGGAGCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGA GGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGT GGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAG CCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCT GGCAAGATAGTCTTGTAAATGCGGGCCAAGATCTGCACACT GGTATTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCG TGCGTCCCAGCGCACATGTTCGGCGAGGCGGGGCCTGCGAG CGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGC CGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGTGTATCGCC CCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTCGGCACCAGTTGC GTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGA GCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGG

[1963]

		TGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCCTCAG CCGTCGCTTCATGTGACTCCACTGAGTACCGGGCGCCGTCC AGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCT TTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCA CACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACT TGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGAT CTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTT TTCTTCCATTTCAGGTGTCGTGA
CD47 SP 结构域	SEQ ID NO:51	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCT
CD47 IgV 结构域	SEQ ID NO:52	CAGCTACTATTTAATAAAACAAAATCTGTAGAATTCACGTTT TGTAATGACACTGTCGTCATTCCATGCTTTGTTACTAATATG GAGGCACAAAACACTACTGAAGTATACGTAAAGTGGAAATT TAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGATGGAGCTCTAAACA AGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTAGTGCAAAAATTGAA GTCTCACAATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTTGAAGATGGA TAAGAGTGATGCTGTCTCACACACAGGAAACTACACTTGTG AAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGTGAAACGATCATC
CD47 EC 结构域	SEQ ID NO:53	CAGCTACTATTTAATAAAACAAAATCTGTAGAATTCACGTTT TGTAATGACACTGTCGTCATTCCATGCTTTGTTACTAATATG GAGGCACAAAACACTACTGAAGTATACGTAAAGTGGAAATT TAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGATGGAGCTCTAAACA AGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTAGTGCAAAAATTGAA GTCTCACAATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTTGAAGATGGA TAAGAGTGATGCTGTCTCACACACAGGAAACTACACTTGTG AAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGTGAAACGATCATCGA GCTAAAATATCGTGTTGTTTCATGGTTTTCTCCAAATGAA
CD47 TM1 结构域	SEQ ID NO:54	AATATTCTTATTGTTATTTTCCCAATTTTTGCTATACTCCTGT TCTGGGGACAGTTTGGTATT
CD47 IC1 结构域	SEQ ID NO:55	AAAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGATGAGAAAACA
CD47 TM2 结构域	SEQ ID NO:56	ATTGCTTTACTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTGTC ATTGTTGGAGCCATTCTTTTC
CD47 EC1 结构域	SEQ ID NO:57	GTCCCAGGTGAATATTCATTAAAGAATGCT
CD47 TM3 结构域	SEQ ID NO:58	ACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAGGGATATTAATA TTACTTCACTACTATGTGTTT
CD47 IC2 结构域	SEQ ID NO:59	AGTACAGCGATTGGATTAACC
CD47 TM4 结构域	SEQ ID NO:60	TCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGGTGATAGCCTAT ATCCTCGCTGTGGTTGGACTG
CD47 EC2 结构域	SEQ ID NO:61	AGTCTCTGTATTGCGGCGTGTATACCAATGCATGGC
CD47 TM5 结构域	SEQ ID NO:62	CCTCTTCTGATTTCAGGTTTGAGTATCTTAGCTCTAGCACAA TTACTTGGACTAGTTTATATG
CD47(202) IC3 结构域	SEQ ID NO:63	AAATTTGTGGCTTCCAATCAGAAGACTATACAACCTCCTAG GAAAGCTGTAGAGGAACCCCTTAATGCATTCAAAGAATCAA AAGGAATGATGAATGATGAA
CD47(201) IC3 结构域	SEQ ID NO:64	AAATTTGTGGCTTCCAATCAGAAGACTATACAACCTCCTAG GAATAAC
DAF/CD55 GPI	SEQ ID NO:65	CCAAATAAAGGAAGTGGAACCACTTCAGGTACTACCCGTCT TCTATCTGGGCACACGTGTTTCACGTTGACAGGTTTGCTTGG GACGCTAGTAACCATGGGCTTGCTGACT
TRAILR3 GPI长(具有TAPE重复序列)	SEQ ID NO:66	GCCACTGTGGAAAccccagctgctgaagagacaatgaacaccagcccggggactcct gccccagctgctgaagagacaatgaacaccagcccggggactcctgccccagctgctgaagaga caatgaccaccagcccggggactcctgccccagctgctgaagagacaatgaccaccagcccggg gactcctgccccagctgctgaagagacaatgatcaccagcccggggactcctgccTCTTCTC

[1964]

		ATTACCTCTCATGCACCATCGTAGGGATCATAGTTCTAATTG TGCTTCTGATTGTGTTTGTT
TRAILR3 GPI 短(无 TAPE 重复序列)	SEQ ID NO:67	atgatcaccagcccggggactcctgccTCTTCTCATTACCTCTCATGCACCAT CGTAGGGATCATAGTTCTAATTGTGCTTCTGATTGTGTTTGTT
CD59 GPI	SEQ ID NO:68	CAGCTTGAGAACGGGGGCACATCTCTCTCCGAAAAGACTGT CCTGTTACTGGTGACCCCTTTCTTGGCTGCCGCATGGAGCCT GCACCCC
CD8a TM 结构域	SEQ ID NO:69	ATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTT CTCCTGTCACTGGTTATCACC
CD8a 9AA ICD	SEQ ID NO:70	CTTTACTGCAACCACAGGAACCGAAGA
CD28 TM 结构域	SEQ ID NO:71	TTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTAT AGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTG
CD28 9AA ICD	SEQ ID NO:72	AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCAC
PDGFR TM 结构域	SEQ ID NO:73	gtggtgatctcagccatcctggccctggtggtgctcaccatcatctccctTATCATCCTCATC
PDGFR 9AA ICD	SEQ ID NO:74	ATGCTTTGGCAGAAGAAGCCACGTTAC
CD47 3AA 铰链结构域	SEQ ID NO:75	GAGCTAAAA
CD8a 铰链结构域	SEQ ID NO:76	ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCCAC CATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCC GGCCAgcggcgggggggcgcagTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGC CTGTGAT
CD28 铰链结构域	SEQ ID NO:77	ATTGAAGTTATGTATCCTCCTCCTTACCTAGACAATGAGAAG AGCAATGGAACCATTATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTTG TCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCC
PDGFR 铰链结构域	SEQ ID NO:78	GCTGTGGGCCAGGACACGCAGGAGGTCATCGTGGTGCCACA CTCCTTGCCCTTTAAGGtg
IgG4 铰链结构域	SEQ ID NO:79	gaatctaagtacggaccgccctgcccccttgccct

[1965] 表34.示例性抗SIRPα抗体氨基酸序列

[1966]

Ab 结构域	SEQ ID NO:	氨基酸序列
VH 或 HC	SEQ ID NO:186	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDYYIHWVQQRTE QGLEWIGRIDPEDGETKYAPKFQDKATITADTSSNTAYLHLSS LTSEDTAVYYCARWGAYWGQGTLVTVSA
VL 或 LC	SEQ ID NO:187	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTLTCSASSSVSSSYLYWYQQKPGS SPKLWIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAASY FCHQWSSYPRTFGAGTKLELK
VH 或 HC	SEQ ID NO:188	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDYYIHWVQQRTE QGLEWIGRIDPEDGETKYAPKFQDKATITADTSSNTAYLHLSS LTSEDTAVYYCARWGAYWGQGTLVTVSS
scFv	SEQ ID NO:189	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDYYIHWVQQRTE QGLEWIGRIDPEDGETKYAPKFQDKATITADTSSNTAYLHLSS LTSEDTAVYYCARWGAYWGQGTLVTVSGGGGSGGGGSGGG GSQIVLTQSPAIMSASPGEKVTLTCSASSSVSSSYLYWYQQKP GSSPKLWIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAA SYFCHQWSSYPRTFGAGTKLELK
scFv	SEQ ID	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTLTCSASSSVSSSYLYWYQQKPGS

[1967]

	NO:190	SPKLWIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAASY FCHQWSSYPRTFGAGTKLELKGTTAASGSSGGSSSGAEVQLQ QSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDYYIHWVQQRTEQGLEW IGRIDPEDGETKYAPKFQDKATITADTSSNTAYLHLSSLTSEDT AVYYCARWGAYWGQGTLVTVS
VH 或 HC	SEQ ID NO:191	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYTFTSYWVHWVRQMP GKGLEWIGNIDPSDSDTHYNQKFKDHVTLSVDKSISTAYLQLS SLKASDTAMYYCVRGGTGTMAWFAYWGQGTLVTVSS
VL 或 LC	SEQ ID NO:192	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHSYGNTYLYWYQ QRPGQSPRLLIYRVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGVYFCFQGTHVPYTFGGGTKVEIK
VL 或 LC	SEQ ID NO:193	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHSYGNTYLYWFQ QRPGQSPRLLIYRVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGVYYCFQGTHVPYTFGGGTKVEIK
VH 或 HC	SEQ ID NO:194	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYSFTSYWVHWVRQMP GKGLEWMGNIDPSDSDTHYNQKFKDHVTLSVDKSISTAYLQL SSLKASDTAMYYCVRGGTGTMAWFAYWGQGTLVTVSS
VH 或 HC	SEQ ID NO:195	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYSFTSYWVHWVRQMP GKGLEWMGNIDPSDSDTHYSPSFQGHVTLSVDKSISTAYLQLS SLKASDTAMYYCVRGGTGTMAWFAYWGQGTLVTVSS
VH 或 HC	SEQ ID NO:196	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYSFTSYWVHWVRQMP GKGLEWMGNIDPSDSDTHYSPSFQGHVTLSVDKSISTAYLQLS SLKASDTAMYYCVRGGTGTLAWFAYWGQGTLVTVSS
VH 或 HC	SEQ ID NO:197	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYSFTSYWVHWVRQMP GKGLEWMGNIDPSDSDTHYSPSFQGHVTLSVDKSISTAYLQLS SLKASDTAMYYCVRGGTGTMAYFAYWGQGTLVTVSS
VH 或 HC	SEQ ID NO:198	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYSFTSYWVHWVRQMP GKGLEWMGNIDPSDSDTHYSPSFQGHVTLSVDKSISTAYLQLS SLKASDTAMYYCVRGGTGTLAYFAYWGQGTLVTVSS

[1968] 某些实施方案

[1969] 实施方案I-1.一种经工程化的CD47蛋白,其包含

[1970] 人CD47细胞外结构域或其部分、

[1971] 至少一个人CD47跨膜结构域或其部分、以及

[1972] 包含至少一个氨基酸缺失的人CD47细胞内结构域的一部分,其中所述缺失不是C端18个氨基酸缺失。

[1973] 实施方案I-2.一种经工程化的CD47蛋白,其包含

[1974] 人CD47细胞外结构域的一部分、

[1975] 至少一个人CD47跨膜结构域或其部分、以及包含C端18个氨基酸缺失的人CD47细胞内结构域的一部分。实施方案I-3.一种经工程化的CD47蛋白,其包含人CD47细胞外结构域或其部分、

[1976] 至少一个且少于五个人CD47跨膜结构域或其部分、以及包含C端18个氨基酸缺失的人CD47细胞内结构域的一部分。实施方案I-4.一种经工程化的CD47蛋白,其包含人CD47细胞外结构域或其部分、

[1977] 至少一个人CD47跨膜结构域或其部分、以及信号肽,其中所述经工程化的CD47蛋白不包含细胞内结构域。

[1978] 实施方案I-5.一种经工程化的CD47蛋白,其包含人CD47细胞外结构域、和

[1979] 至少一个人CD47跨膜结构域或其部分,

[1980] 其中所述经工程化的CD47蛋白不包含细胞内结构域。

[1981] 实施方案I-6.一种经工程化的CD47蛋白,其包含人CD47细胞外结构域或其部分、和至少一个且少于五个人CD47跨膜结构域或其部分,其中所述经工程化的CD47蛋白不包含细胞内结构域。

[1982] 实施方案I-7.一种经工程化的CD47蛋白,其包含人CD47细胞外结构域或其部分、和

[1983] 至少一个人CD47跨膜结构域或其部分,

[1984] 不包含细胞内结构域或包含至少一个氨基酸缺失的人CD47细胞内结构域,

[1985] 其中所述经工程化的CD47蛋白具有与SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:6具有最多99%的同一性的氨基酸序列。

[1986] 实施方案I-8.如实施方案1-7中任一项所述的经工程化的CD47蛋白,其包含比野生型人CD47蛋白更少的糖基化修饰位点。

[1987] 实施方案I-9.如实施方案1-8中任一项所述的经工程化的CD47蛋白,其包含比野生型人CD47蛋白更少的糖基化修饰。

[1988] 实施方案I-10.如实施方案1-9中任一项所述的经工程化的CD47蛋白,其包含少于两个硫酸乙酰肝素和/或硫酸软骨素糖胺聚糖修饰位点。

[1989] 实施方案I-11.如实施方案1-10中任一项所述的经工程化的CD47蛋白,其包含少于两个硫酸乙酰肝素和/或硫酸软骨素糖胺聚糖链。

[1990] 实施方案I-12.如实施方案1-11中任一项所述的经工程化的CD47蛋白,其包含少于五个N-糖基化修饰位点。

[1991] 实施方案I-13.如实施方案1-12中任一项所述的经工程化的CD47蛋白,其包含少于四个N-糖基化修饰链。

[1992] 实施方案I-14.如实施方案1-13中任一项所述的经工程化的CD47蛋白,其中与野生型人CD47蛋白相比,所述人CD47细胞外结构域或其部分缺少一个或多个血小板反应蛋白-1结合位点。

[1993] 实施方案I-15.如实施方案1-14中任一项所述的经工程化的CD47蛋白,其中与野生型人CD47蛋白相比,所述人CD47细胞外结构域或其部分缺少一个或多个整联蛋白结合位点。

[1994] 实施方案I-16.如实施方案15所述的经工程化的CD47蛋白,其中所述整联蛋白选自由αvβ3整联蛋白、αIIbβ3整联蛋白、α2β1整联蛋白、α4β1整联蛋白、α6β1整联蛋白和α5整联蛋白组成的组。

[1995] 实施方案I-17.如实施方案1-16中任一项所述的经工程化的CD47蛋白,其中所述细胞外结构域或其部分包含至少一个SIRPα相互作用基序。

[1996] 实施方案I-18.如实施方案1-17中任一项所述的经工程化的CD47蛋白,其包含介于位于所述人CD47细胞外结构域或其部分内的半胱氨酸与位于一个或多个人CD47跨膜结构域内或之间的半胱氨酸之间的二硫键。

[1997] 实施方案I-19.如实施方案1-18中任一项所述的经工程化的CD47蛋白,其中所述经工程化的CD47蛋白是致耐受因子。

[1998] 实施方案I-20.如实施方案1-19中任一项所述的经工程化的CD47蛋白,其中所述经工程化的CD47蛋白是跨膜蛋白。

[1999] 实施方案I-21.如实施方案1-20中任一项所述的经工程化的CD47蛋白,其中所述人CD47细胞外结构域包含与SEQ ID NO:2的氨基酸19-141具有至少80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[2000] 实施方案I-22.如实施方案1-21中任一项所述的经工程化的CD47蛋白,其中所述至少一个人CD47跨膜结构域中的任一个包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:

[2001] 与SEQ ID NO:2的氨基酸142-162具有至少80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列,

[2002] 与SEQ ID NO:2的氨基酸177-197具有至少80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列,

[2003] 与SEQ ID NO:2的氨基酸208-228具有至少80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列,

[2004] 与SEQ ID NO:2的氨基酸236-257具有至少80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列,以及

[2005] 与SEQ ID NO:2的氨基酸269-289具有至少80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[2006] 实施方案I-23.如实施方案1-3、7-22中任一项所述的经工程化的CD47蛋白,其中所述人CD47细胞内结构域包含与SEQ ID NO:2的氨基酸序列290-323具有至少80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[2007] 实施方案I-24.如实施方案1、7-23中任一项所述的经工程化的CD47蛋白,其包含与SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列具有至少80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[2008] 实施方案I-25.如实施方案1、7-24中任一项所述的经工程化的CD47蛋白,其包含与SEQ ID NO:8中所示的氨基酸序列具有至少80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[2009] 实施方案I-26.如实施方案1、7-25中任一项所述的经工程化的CD47蛋白,其包含与SEQ ID NO:9中所示的氨基酸序列具有至少80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[2010] 实施方案I-27.如实施方案1、7-26中任一项所述的经工程化的CD47蛋白,其包含与SEQ ID NO:12中所示的氨基酸序列具有至少80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[2011] 实施方案I-28.如实施方案1、7-27中任一项所述的经工程化的CD47蛋白,其包含与SEQ ID NO:10中所示的氨基酸序列具有至少80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[2012] 实施方案I-29.如实施方案1、7-28中任一项所述的经工程化的CD47蛋白,其包含与SEQ ID NO:11中所示的氨基酸序列具有至少80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[2013] 实施方案I-30.如实施方案1-29中任一项所述的经工程化的CD47蛋白,其中所述经工程化的CD47蛋白是经工程化的人CD47蛋白、经工程化的人源化CD47蛋白或经工程化的部分人源化CD47蛋白。

[2014] 实施方案I-31.一种编码实施方案1-30中任一项所述的经工程化的CD47蛋白的多核苷酸。

[2015] 实施方案I-32.一种载体,其包含实施方案31所述的多核苷酸。

[2016] 实施方案I-33.如实施方案32所述的载体,其中所述载体是多顺反子载体。

[2017] 实施方案I-34.如实施方案33所述的载体,其中所述多顺反子载体是双顺反子载体或三顺反子载体。

[2018] 实施方案I-35.如实施方案32-34中任一项所述的载体,其中所述载体是质粒或病毒载体。

[2019] 实施方案I-36.如实施方案35所述的载体,其中所述病毒载体是假型化的自失活慢病毒载体。

[2020] 实施方案I-37.一种包含实施方案31所述的多核苷酸和/或实施方案32-36中任一项所述的载体的细胞。

[2021] 实施方案I-38.一种包含实施方案1-30中任一项所述的经工程化的CD47蛋白的细胞。

[2022] 实施方案I-39.如实施方案37-38中任一项所述的细胞,其中所述细胞是干细胞。

[2023] 实施方案I-40.如实施方案39所述的细胞,其中所述干细胞是多能干细胞。

[2024] 实施方案I-41.如实施方案40所述的细胞,其中所述多能干细胞是诱导型多能干细胞(iPSC)或胚胎干细胞。

[2025] 实施方案I-42.如实施方案37-38中任一项所述的细胞,其中所述细胞是胰腺胰岛细胞。

[2026] 实施方案I-43.如实施方案42所述的细胞,其中所述细胞是原代胰腺胰岛细胞。

[2027] 实施方案I-44.如实施方案42所述的细胞,其中所述胰腺胰岛细胞从多能干细胞分化而来。

[2028] 实施方案I-45.如实施方案44所述的细胞,其中所述多能干细胞是iPSC或ESC。

[2029] 实施方案I-46.如实施方案37-38中任一项所述的细胞,其中所述细胞是T细胞。

[2030] 实施方案I-47.如实施方案46所述的细胞,其中所述T细胞是原代T细胞。

[2031] 实施方案I-48.如实施方案47的细胞,其中所述原代T细胞是包含嵌合抗原受体(CAR)的T细胞。

[2032] 实施方案I-49.如实施方案48所述的细胞,其中所述T细胞是CAR-T细胞。

[2033] 实施方案I-50.如实施方案46所述的细胞,其中所述T细胞从多能干细胞分化而来。

[2034] 实施方案I-51.如实施方案50所述的细胞,其中所述多能干细胞是iPSC或ESC。

[2035] 实施方案I-52.如实施方案37-38中任一项所述的细胞,其中所述细胞选自由干细胞、胰腺胰岛细胞、T细胞、CAR-T细胞、心脏细胞、心脏祖细胞、神经细胞、胶质祖细胞、内皮细胞、B细胞、视网膜色素上皮细胞、肝细胞、甲状腺细胞、皮肤细胞、血细胞、浆细胞、血小板、肾细胞、上皮细胞、自然杀伤细胞(NK细胞)和CAR-NK细胞组成的细胞的组。

[2036] 实施方案I-53.如实施方案52所述的细胞,其中所述细胞是原代细胞。

[2037] 实施方案I-54.如实施方案52所述的细胞,其中所述细胞是分化的细胞。

[2038] 实施方案I-55.如实施方案37-54中任一项所述的细胞,其中所述细胞是低免疫原

性细胞。

[2039] 实施方案I-56.如实施方案37-55中任一项所述的细胞,其中一种或多种主要组织相容性(MHC)I类蛋白和/或一种或多种MHC II类蛋白的表达与野生型或对照细胞相比降低。

[2040] 实施方案I-57.如实施方案37-55中任一项所述的细胞,其中所述细胞不表达一种或多种MHC I类蛋白和/或一种或多种MHC II类蛋白。

[2041] 实施方案I-58.如实施方案56-57中任一项所述的细胞,其中所述MHC蛋白是HLA蛋白。

[2042] 实施方案I-59.如实施方案56-58中任一项所述的细胞,其中通过敲除或降低B2M的表达来降低MHC I类蛋白的表达。

[2043] 实施方案I-60.如实施方案56-58中任一项所述的细胞,其中通过敲除或降低CIITA的表达来降低MHC II类蛋白的表达。

[2044] 实施方案I-61.如实施方案41、45-55中任一项所述的细胞,其中TRAC和/或TRBC被敲除,或者它们的表达被降低。

[2045] 实施方案I-62.如实施方案37-61中任一项所述的细胞,其中用于产生所述细胞的起始材料包括野生型细胞和/或对照细胞。

[2046] 实施方案I-63.一种组合物,其包含实施方案1-30中任一项所述的经工程化的CD47蛋白。

[2047] 实施方案I-64.一种组合物,其包含实施方案37-62中任一项所述的细胞。

[2048] 实施方案II-1.一种核酸构建体,其包含编码经工程化的蛋白质的一个或多个核酸序列,所述经工程化的蛋白质包含:

[2049] (a)一个或多个细胞外结构域;和

[2050] (b)一个或多个膜栓系物;

[2051] 其中所述一个或多个细胞外结构域包含信号调控蛋白α(SIRPα)相互作用基序。

[2052] 实施方案II-1a.如实施方案1所述的核酸构建体,其中所述核酸构建体不包含编码一个或多个全长CD47细胞内结构域的核酸序列。

[2053] 实施方案II-2.如实施方案1所述的核酸构建体,其中所述SIRPα相互作用基序是或者包含CD47细胞外结构域或其部分。

[2054] 实施方案II-3.如实施方案2所述的核酸构建体,其中所述CD47细胞外结构域是或者包含CD47免疫球蛋白可变(IgV)样结构域。

[2055] 实施方案II-4.如实施方案1或2所述的核酸构建体,其中所述CD47细胞外结构域是人CD47细胞外结构域。

[2056] 实施方案II-5.如实施方案2-4中任一项所述的核酸构建体,其中所述CD47细胞外结构域由与SEQ ID NO:52具有至少80%同一性的核酸序列编码。

[2057] 实施方案II-6.如实施方案2-4中任一项所述的核酸构建体,其中所述CD47细胞外结构域由与SEQ ID NO:53具有至少80%同一性的核酸序列编码。

[2058] 实施方案II-7.如实施方案2-4中任一项所述的核酸构建体,其中所述CD47细胞外结构域由与SEQ ID NO:57具有至少80%同一性的核酸序列编码。

[2059] 实施方案II-8.如实施方案2-4中任一项所述的核酸构建体,其中所述CD47细胞外

结构域由与SEQ ID NO:59具有至少80％同一性的核酸序列编码。

[2060] 实施方案II-9.如实施方案1所述的核酸构建体,其中所述SIRPα相互作用基序是或者包含SIRPα抗体或其部分。

[2061] 实施方案II-10.如实施方案1-9中任一项所述的核酸构建体,其中所述一个或多个膜栓系物是或者包含跨膜结构域。

[2062] 实施方案II-11.如实施方案10所述的核酸构建体,其中所述跨膜结构域是或者包括CD3ζ、CD8a、CD16a、CD28、CD32a、CD32c、CD40、CD47、CD64、ICOS、Dectin-1、DNGR1、EGFR、GPCR、MyD88、PDGFR、SLAMF7、TRL1、TLR2、TLR3、TRL4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9或VEGFR跨膜结构域。

[2063] 实施方案II-12.如实施方案10或11所述的核酸构建体,其中所述跨膜结构域是或者包括CD47跨膜结构域。

[2064] 实施方案II-13.如实施方案10-12中任一项所述的核酸构建体,其中所述跨膜结构域由与SEQ ID NO:54具有至少80％同一性的核酸序列编码。

[2065] 实施方案II-14.如实施方案10-12中任一项所述的核酸构建体,其中所述跨膜结构域由与SEQ ID NO:56具有至少80％同一性的核酸序列编码。

[2066] 实施方案II-15.如实施方案10-12中任一项所述的核酸构建体,其中所述跨膜结构域由与SEQ ID NO:58具有至少80％同一性的核酸序列编码。

[2067] 实施方案II-16.如实施方案10-12中任一项所述的核酸构建体,其中所述跨膜结构域由与SEQ ID NO:60具有至少80％同一性的核酸序列编码。

[2068] 实施方案II-17.如实施方案10-12中任一项所述的核酸构建体,其中所述跨膜结构域由与SEQ ID NO:62具有至少80％同一性的核酸序列编码。

[2069] 实施方案II-18.如实施方案10或11所述的核酸构建体,其中所述跨膜结构域是或者包括CD8a跨膜结构域。

[2070] 实施方案II-19.如实施方案10、11或18所述的核酸构建体,其中所述跨膜结构域由与SEQ ID NO:69具有至少80％同一性的核酸序列编码。

[2071] 实施方案II-20.如实施方案10或11所述的核酸构建体,其中所述跨膜结构域是或者包括CD28跨膜结构域。

[2072] 实施方案II-21.如实施方案10、11或20所述的核酸构建体,其中所述跨膜结构域由与SEQ ID NO:71具有至少80％同一性的核酸序列编码。

[2073] 实施方案II-22.如实施方案10或11所述的核酸构建体,其中所述跨膜结构域是或者包括PDGFR跨膜结构域。

[2074] 实施方案II-23.如实施方案10、11或22所述的核酸构建体,其中所述跨膜结构域由与SEQ ID NO:73具有至少80％同一性的核酸序列编码。

[2075] 实施方案II-24.如实施方案1-9中任一项所述的核酸构建体,其中所述一个或多个膜栓系物是或者包括糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚。

[2076] 实施方案II-25.如实施方案24所述的核酸构建体,其中所述GPI锚是或者包括DAF/CD55 GPI锚、TRAILR3 GPI锚或CD59 GPI锚。

[2077] 实施方案II-26.如实施方案24或25所述的核酸构建体,其中所述GPI锚是或者包括DAF/CD55 GPI锚。

[2078] 实施方案II-27.如实施方案24-26中任一项所述的核酸构建体,其中所述DAF/CD55 GPI锚由与SEQ ID NO:65具有至少80%同一性的核酸序列编码。

[2079] 实施方案II-28.如实施方案24或25所述的核酸构建体,其中所述GPI锚是或者包括TRAILR3 GPI锚。

[2080] 实施方案II-29.如实施方案24、25或28中任一项所述的核酸构建体,其中所述TRAILR3 GPI锚由与SEQ ID NO:66具有至少80%同一性的核酸序列编码。

[2081] 实施方案II-30.如实施方案24、25或28中任一项所述的核酸构建体,其中所述TRAILR3 GPI锚由与SEQ ID NO:67具有至少80%同一性的核酸序列编码。

[2082] 实施方案II-31.如实施方案24或25所述的核酸构建体,其中所述GPI锚是或者包括CD59 GPI锚。

[2083] 实施方案II-32.如实施方案24、25或31中任一项所述的核酸构建体,其中所述CD59 GPI锚由与SEQ ID NO:68具有至少80%同一性的核酸序列编码。

[2084] 实施方案II-33.如实施方案1-24中任一项所述的核酸构建体,其进一步包含一个或多个控制序列。

[2085] 实施方案II-34.如实施方案33所述的核酸构建体,其中所述一个或多个控制序列编码细胞外信号肽。

[2086] 实施方案II-35.如实施方案33或34所述的核酸构建体,其中所述细胞外信号肽由与SEQ ID NO:51具有至少80%同一性的核酸序列编码。

[2087] 实施方案II-36.如实施方案33所述的核酸构建体,其中所述一个或多个控制序列包括启动子。

[2088] 实施方案II-37.如实施方案36所述的核酸构建体,其中所述启动子是组成型启动子或诱导型启动子。

[2089] 实施方案II-38.如实施方案36或37所述的核酸构建体,其中所述启动子是天然存在的启动子、杂合启动子或合成启动子。

[2090] 实施方案II-39.如实施方案36-38中任一项所述的核酸构建体,其中所述启动子是或者包括EF1α启动子、EF1α短启动子、CAG启动子、泛素/S27a启动子、SV40早期启动子、腺病毒主要晚期启动子、小鼠金属硫蛋白-I启动子、RSV启动子、MMTV启动子、莫洛尼(Moloney)鼠白血病病毒长末端重复区、CMV启动子、肌动蛋白启动子、免疫球蛋白启动子、热休克启动子、多瘤病毒启动子、禽痘病毒启动子、牛乳头瘤病毒启动子、禽肉瘤病毒启动子、逆转录病毒启动子、乙型肝炎病毒启动子、PGK启动子、腺病毒晚期启动子、痘苗病毒7.5K启动子、SV40启动子、HSV的tk启动子,小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)启动子、HIV的LTR启动子、莫洛尼病毒启动子、爱泼斯坦巴尔病毒(Epstein Barr virus,EBV)启动子、劳斯肉瘤病毒(Rous sarcoma virus,RSV)启动子、U6启动子或UBC启动子。

[2091] 实施方案II-40.如实施方案36-39中任一项所述的核酸构建体,其中所述启动子是或者包括CAG启动子。

[2092] 实施方案II-41.如实施方案36-40中任一项所述的核酸构建体,其中所述启动子包含与SEQ ID NO:49具有至少80%同一性的核酸序列。

[2093] 实施方案II-42.如实施方案36-39中任一项所述的核酸构建体,其中所述启动子是或者包括EF1α启动子。

[2094] 实施方案II-43.如实施方案36-40,或42中任一项所述的核酸构建体,其中所述启动子包含与SEQ ID NO:50具有至少80%同一性的核酸序列。

[2095] 实施方案II-44.如实施方案33所述的核酸构建体,其中所述一个或多个控制序列包括核糖体结合位点、增强子元件、活化子元件、翻译起始序列、翻译终止序列、转录起始序列、转录终止序列、多聚腺苷酸化信号序列、复制元件、RNA加工和输出元件、转座子序列、转座酶序列、绝缘子序列、内部核糖体进入位点(IRES)、5'UTR、3'UTR、mRNA 3'末端加工序列、边界元件、基因座控制区(LCR)、基质结合区(MAR)、重组或盒式交换序列、接头序列、分泌信号、抗性标志物、锚定肽、定位信号、融合标签、亲和标签、伴侣蛋白、蛋白酶或其组合。

[2096] 实施方案II-45.如实施方案1-44中任一项所述的核酸构建体,其中所述一个或多个细胞外结构域进一步包含细胞外铰链结构域。

[2097] 实施方案II-46.如实施方案45所述的核酸构建体,其中所述细胞外铰链结构域是或者包括CD47铰链、CD8a铰链、CD28铰链、PDGFR铰链或IgG4铰链。

[2098] 实施方案II-47.如实施方案45或46所述的核酸构建体,其中所述细胞外铰链结构域是或者包括CD47铰链。

[2099] 实施方案II-48.如实施方案45-47中任一项所述的核酸构建体,其中所述细胞外铰链结构域由与SEQ ID NO:75具有至少80%同一性的核酸序列编码。

[2100] 实施方案II-49.如实施方案45或46所述的核酸构建体,其中所述细胞外铰链结构域是或者包括CD8a铰链。

[2101] 实施方案II-50.如实施方案45、46,或49所述的核酸构建体,其中所述细胞外铰链结构域由与SEQ ID NO:76具有至少80%同一性的核酸序列编码。

[2102] 实施方案II-51.如实施方案45或46所述的核酸构建体,其中所述细胞外铰链结构域是或者包括CD28铰链。

[2103] 实施方案II-52.如实施方案45、46,或7f51所述的核酸构建体,其中所述细胞外铰链结构域由与SEQ ID NO:77具有至少80%同一性的核酸序列编码。

[2104] 实施方案II-53.如实施方案45或46所述的核酸构建体,其中所述细胞外铰链结构域是或者包括PDGFR铰链。

[2105] 实施方案II-54.如实施方案45、46,或53所述的核酸构建体,其中所述细胞外铰链结构域由与SEQ ID NO:78具有至少80%同一性的核酸序列编码。

[2106] 实施方案II-55.如实施方案45或46所述的核酸构建体,其中所述细胞外铰链结构域是或者包括IgG4铰链。

[2107] 实施方案II-56.如实施方案45、46,或55所述的核酸构建体,其中所述细胞外铰链结构域由与SEQ ID NO:79具有至少80%同一性的核酸序列编码。

[2108] 实施方案II-57.如前述实施方案中任一项所述的核酸构建体,其进一步包含编码细胞内结构域的一个或多个核酸序列。

[2109] 实施方案II-58.如实施方案57所述的核酸构建体,其中所述细胞内结构域是或者包括CD47细胞内结构域或其部分。

[2110] 实施方案II-59.如实施方案57或58所述的核酸构建体,其中所述细胞内结构域由与SEQ ID NO:55具有至少80%同一性的核酸序列编码。

[2111] 实施方案II-60.如实施方案57或58所述的核酸构建体,其中所述细胞内结构域由

与SEQ ID NO:59具有至少80％同一性的核酸序列编码。

[2112] 实施方案II-61.如实施方案57或58所述的核酸构建体,其中所述细胞内结构域由与SEQ ID NO:63具有至少80％同一性的核酸序列编码。

[2113] 实施方案II-62.如实施方案57或58所述的核酸构建体,其中所述细胞内结构域由与SEQ ID NO:64具有至少80％同一性的核酸序列编码。

[2114] 实施方案II-63.如实施方案57所述的核酸构建体,其中所述细胞内结构域是或者包括CD8a细胞内结构域或其部分。

[2115] 实施方案II-64.如实施方案57或63所述的核酸构建体,其中所述细胞内结构域由与SEQ ID NO:70具有至少80％同一性的核酸序列编码。

[2116] 实施方案II-65.如实施方案57所述的核酸构建体,其中所述细胞内结构域是或者包括CD28细胞内结构域或其部分。

[2117] 实施方案II-66.如实施方案57或58所述的核酸构建体,其中所述细胞内结构域由与SEQ ID NO:72具有至少80％同一性的核酸序列编码。

[2118] 实施方案II-67.如实施方案57所述的核酸构建体,其中所述细胞内结构域是或者包括PDGFR细胞内结构域或其部分。

[2119] 实施方案II-68.如实施方案57或67所述的核酸构建体,其中所述细胞内结构域由与SEQ ID NO:74具有至少80％同一性的核酸序列编码。

[2120] 实施方案II-69.如实施方案57-68中任一项所述的核酸构建体,其中所述细胞内结构域包含相对于野生型CD47细胞内结构域的一种或多种修饰。

[2121] 实施方案II-70.如实施方案57-69中任一项所述的核酸构建体,其中所述细胞内结构域包含相对于野生型CD47细胞内结构域的一个或多个缺失。

[2122] 实施方案II-71.如实施方案57-69中任一项所述的核酸构建体,其中所述细胞内结构域包含相对于野生型CD47细胞内结构域的一个或多个插入。

[2123] 实施方案II-72.如实施方案57-71中任一项所述的核酸构建体,其中所述细胞内结构域包含相对于野生型CD47细胞内结构域改变的功能。

[2124] 实施方案II-73.如实施方案57-72中任一项所述的核酸构建体,其中所述细胞内结构域包含相对于野生型CD47细胞内结构域降低的功能。

[2125] 实施方案II-74.如实施方案57-73中任一项所述的核酸构建体,其中所述细胞内结构域包含相对于野生型CD47细胞内结构域降低的水平的CD47细胞内信号传导。

[2126] 实施方案II-75.如实施方案57-74中任一项所述的核酸构建体,其中所述细胞内结构域包括非功能性细胞内结构域。

[2127] 实施方案II-76.如前述实施方案中任一项所述的核酸构建体,其包含与选自表31的序列具有至少80％同一性的核酸序列。

[2128] 实施方案II-77.如实施方案1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:13具有至少80％同一性的核酸序列。

[2129] 实施方案II-78.如实施方案1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:14具有至少80％同一性的核酸序列。

[2130] 实施方案II-79.如实施方案1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:18具有至少80％同一性的核酸序列。

[2131] 实施方案II-80.如实施方案1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:133具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2132] 实施方案II-81.如实施方案1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:134具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2133] 实施方案II-82.如实施方案1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:135具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2134] 实施方案II-83.如实施方案1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:136具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2135] 实施方案II-84.如实施方案1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:137具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2136] 实施方案II-85.如实施方案1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:138具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2137] 实施方案II-86.如实施方案1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:139具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2138] 实施方案II-87.如实施方案1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:140具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2139] 实施方案II-88.如实施方案1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:141具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2140] 实施方案II-89.如实施方案1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:142具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2141] 实施方案II-90.如实施方案1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:143具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2142] 实施方案II-91.如实施方案1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:144具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2143] 实施方案II-92.如实施方案1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:145具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2144] 实施方案II-93.如实施方案1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:146具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2145] 实施方案II-94.如实施方案1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:147具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2146] 实施方案II-95.如实施方案1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:148具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2147] 实施方案II-96.如实施方案1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:149具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2148] 实施方案II-97.如实施方案1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:150具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2149] 实施方案II-98.如实施方案1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:151具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2150] 实施方案II-99.如实施方案1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID

NO:152具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2151] 实施方案II-100.如实施方案1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:153具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2152] 实施方案II-101.如实施方案1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:154具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2153] 实施方案II-102.如实施方案1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:155具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2154] 实施方案II-103.如实施方案1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:156具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2155] 实施方案II-104.如实施方案1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:157具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2156] 实施方案II-105.如实施方案1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:158具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2157] 实施方案II-106.如实施方案1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:159具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2158] 实施方案II-107.如实施方案1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:160具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2159] 实施方案II-108.如实施方案1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:161具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2160] 实施方案II-109.如实施方案1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:162具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2161] 实施方案II-110.如实施方案1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:163具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2162] 实施方案II-111.如实施方案1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:164具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2163] 实施方案II-112.如实施方案1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:165具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2164] 实施方案II-113.如实施方案1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:166具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2165] 实施方案II-114.如实施方案1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:167具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2166] 实施方案II-115.如实施方案1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:168具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2167] 实施方案II-116.如实施方案1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:169具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2168] 实施方案II-117.如实施方案1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:170具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2169] 实施方案II-118.如实施方案1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:171具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2170] 实施方案II-119.如实施方案1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:172具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2171] 实施方案II-120.如实施方案1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:173具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2172] 实施方案II-121.如实施方案1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:174具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2173] 实施方案II-122.如实施方案1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:175具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2174] 实施方案II-123.如实施方案1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:176具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2175] 实施方案II-124.如实施方案1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:177具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2176] 实施方案II-125.如实施方案1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:178具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2177] 实施方案II-126.如实施方案1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:179具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2178] 实施方案II-127.如实施方案1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:180具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2179] 实施方案II-128.如实施方案1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:181具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2180] 实施方案II-129.如实施方案1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:182具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2181] 实施方案II-130.如实施方案1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:183具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2182] 实施方案II-131.如实施方案1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:184具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2183] 实施方案II-132.如实施方案1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:185具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2184] 实施方案II-133.如实施方案1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:341具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2185] 实施方案II-134.如实施方案1-76中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:342具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2186] 实施方案II-135.如实施方案1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与选自表33的一个或多个序列具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

[2187] 实施方案II-136.如前述实施方案中的任一项所述的核酸构建体,其包含与选自表33和/或表31的一个或多个序列具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

[2188] 实施方案II-137.如实施方案1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:49和SEQ ID NO:14具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

[2189] 实施方案II-138.如实施方案1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID

NO:14具有至少80％同一性的一个或多个核酸序列。

[2190] 实施方案II-139.如实施方案1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:49和SEQ ID NO:13具有至少80％同一性的一个或多个核酸序列。

[2191] 实施方案II-140.如实施方案1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:13具有至少80％同一性的一个或多个核酸序列。

[2192] 实施方案II-141.如实施方案1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:49和SEQ ID NO:18具有至少80％同一性的一个或多个核酸序列。

[2193] 实施方案II-142.如实施方案1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:18具有至少80％同一性的一个或多个核酸序列。

[2194] 实施方案II-143.如实施方案1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID No:51、52、54、55、56和57具有至少80％同一性的一个或多个核酸序列。

[2195] 实施方案II-144.如实施方案1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID No:51、52、54、55和56具有至少80％同一性的一个或多个核酸序列。

[2196] 实施方案II-145.如实施方案1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID No:51、52、54和55具有至少80％同一性的一个或多个核酸序列。

[2197] 实施方案II-146.如实施方案1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID No:51、52、54、55、56、57、58、59、60、61和62具有至少80％同一性的一个或多个核酸序列。

[2198] 实施方案II-147.如实施方案1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID No:51、52、54、55、56、57、58、59、60和61具有至少80％同一性的一个或多个核酸序列。

[2199] 实施方案II-148.如实施方案1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID No:51、52、54、55、56、57、58、59和60具有至少80％同一性的一个或多个核酸序列。

[2200] 实施方案II-149.如实施方案1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID No:51、52、54、55、56、57、58和59具有至少80％同一性的一个或多个核酸序列。

[2201] 实施方案II-150.如实施方案1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:49、53和65具有至少80％同一性的一个或多个核酸序列。

[2202] 实施方案II-151.如实施方案1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:53和65具有至少80％同一性的一个或多个核酸序列。

[2203] 实施方案II-152.如实施方案1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:49、53和66具有至少80％同一性的一个或多个核酸序列。

[2204] 实施方案II-153.如实施方案1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:53和66具有至少80％同一性的一个或多个核酸序列。

[2205] 实施方案II-154.如实施方案1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:49、53和67具有至少80％同一性的一个或多个核酸序列。

[2206] 实施方案II-155.如实施方案1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:53和67具有至少80％同一性的一个或多个核酸序列。

[2207] 实施方案II-156.如实施方案1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:49、53、69和70具有至少80％同一性的一个或多个核酸序列。

[2208] 实施方案II-157.如实施方案1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:53、69和70具有至少80％同一性的一个或多个核酸序列。

[2209] 实施方案II-158.如实施方案1-8k中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:49、53、71和72具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

[2210] 实施方案II-159.如实施方案1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:53、71和72具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

[2211] 实施方案II-160.如实施方案1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:49、53、73和74具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

[2212] 实施方案II-161.如实施方案1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:53、73和74具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

[2213] 实施方案II-162.如实施方案1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:49、52、78、73和74具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

[2214] 实施方案II-163.如实施方案1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:52、78、73和74具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

[2215] 实施方案II-164.如实施方案1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:49、52、79、71和72具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

[2216] 实施方案II-165.如实施方案1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:52、79、71和72具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

[2217] 实施方案II-166.如实施方案1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:49、52、79、69和70具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

[2218] 实施方案II-167.如实施方案1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:52、79、69和70具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

[2219] 实施方案II-168.如实施方案1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:49、52、77、71和72具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

[2220] 实施方案II-169.如实施方案1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:52、77、71和72具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

[2221] 实施方案II-170.如实施方案1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:49、52、77、69和70具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

[2222] 实施方案II-171.如实施方案1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:52、77、69和70具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

[2223] 实施方案II-172.如实施方案1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:49、52、76、71和72具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

[2224] 实施方案II-173.如实施方案1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:52、76、71和72具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

[2225] 实施方案II-174.如实施方案1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:49、52、76、69和70具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

[2226] 实施方案II-175.如实施方案1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:52、76、69和70具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

[2227] 实施方案II-176.如实施方案1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:49和200具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

[2228] 实施方案II-177.如实施方案1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID

NO:50和200具有至少80％同一性的一个或多个核酸序列。

[2229] 实施方案II-178.如实施方案1-68中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:200具有至少80％同一性的一个或多个核酸序列。

[2230] 实施方案II-179.一种载体,其包含实施方案1-178中任一项所述的核酸构建体。

[2231] 实施方案II-180.如实施方案179所述的载体,其中所述载体是多顺反子载体。

[2232] 实施方案II-181.如实施方案180所述的载体,其中所述多顺反子载体是双顺反子载体或三顺反子载体。

[2233] 实施方案II-182.如实施方案179-181中任一项所述的载体,其中所述载体是质粒或病毒载体。

[2234] 实施方案II-183.如实施方案182所述的载体,其中所述病毒载体是假型化的自失活慢病毒载体。

[2235] 实施方案II-184.一种由实施方案1-178中任一项所述的核酸构建体编码的经工程化的蛋白质。

[2236] 实施方案II-185.一种经工程化的蛋白质,其包含:

[2237] (a)一个或多个细胞外结构域;和

[2238] (b)一个或多个膜栓系物;

[2239] 其中所述一个或多个细胞外结构域包含信号调控蛋白α(SIRPα)相互作用基序。

[2240] 实施方案II-185a.如实施方案185所述的经工程化的蛋白质,其中所述经工程化的蛋白质不包含一个或多个全长CD47细胞内结构域。

[2241] 实施方案II-186.如实施方案185所述的经工程化的蛋白质,其中所述SIRPα相互作用基序是或者包含CD47细胞外结构域或其部分。

[2242] 实施方案II-187.如实施方案186所述的经工程化的蛋白质,其中所述CD47细胞外结构域是CD47免疫球蛋白可变(IgV)样结构域。

[2243] 实施方案II-188.如实施方案185或186所述的经工程化的蛋白质,其中所述CD47细胞外结构域是人CD47细胞外结构域。

[2244] 实施方案II-189.如实施方案186-188中任一项所述的经工程化的蛋白质,其中所述CD47细胞外结构域包含与SEQ ID NO:21具有至少80％同一性的氨基酸序列。

[2245] 实施方案II-190.如实施方案186-188中任一项所述的经工程化的蛋白质,其中所述CD47细胞外结构域包含与SEQ ID NO:22具有至少80％同一性的氨基酸序列。

[2246] 实施方案II-191.如实施方案186-188中任一项所述的经工程化的蛋白质,其中所述CD47细胞外结构域包含与SEQ ID NO:26具有至少80％同一性的氨基酸序列。

[2247] 实施方案II-192.如实施方案186-188中任一项所述的经工程化的蛋白质,其中所述CD47细胞外结构域包含与SEQ ID NO:30具有至少80％同一性的氨基酸序列。

[2248] 实施方案II-193.如实施方案185所述的经工程化的蛋白质,其中所述SIRPα相互作用基序是或者包含SIRPα抗体或其部分。

[2249] 实施方案II-194.如实施方案193所述的经工程化的蛋白质,其中所述SIRPα抗体或其部分包含与SEQ ID NO:186具有至少80％同一性的氨基酸序列。

[2250] 实施方案II-195.如实施方案193所述的经工程化的蛋白质,其中所述SIRPα抗体或其部分包含与SEQ ID NO:187具有至少80％同一性的氨基酸序列。

[2251] 实施方案II-196.如实施方案193所述的经工程化的蛋白质,其中所述SIRPα抗体或其部分包含与SEQ ID NO:188具有至少80%同一性的氨基酸序列。

[2252] 实施方案II-197.如实施方案193所述的经工程化的蛋白质,其中所述SIRPα抗体或其部分包含与SEQ ID NO:189具有至少80%同一性的氨基酸序列。

[2253] 实施方案II-198.如实施方案193所述的经工程化的蛋白质,其中所述SIRPα抗体或其部分包含与SEQ ID NO:190具有至少80%同一性的氨基酸序列。

[2254] 实施方案II-199.如实施方案193所述的经工程化的蛋白质,其中所述SIRPα抗体或其部分包含与SEQ ID NO:191具有至少80%同一性的氨基酸序列。

[2255] 实施方案II-200.如实施方案193所述的经工程化的蛋白质,其中所述SIRPα抗体或其部分包含与SEQ ID NO:192具有至少80%同一性的氨基酸序列。

[2256] 实施方案II-201.如实施方案193所述的经工程化的蛋白质,其中所述SIRPα抗体或其部分包含与SEQ ID NO:193具有至少80%同一性的氨基酸序列。

[2257] 实施方案II-202.如实施方案193所述的经工程化的蛋白质,其中所述SIRPα抗体或其部分包含与SEQ ID NO:194具有至少80%同一性的氨基酸序列。

[2258] 实施方案II-203.如实施方案193所述的经工程化的蛋白质,其中所述SIRPα抗体或其部分包含与SEQ ID NO:195具有至少80%同一性的氨基酸序列。

[2259] 实施方案II-204.如实施方案193所述的经工程化的蛋白质,其中所述SIRPα抗体或其部分包含与SEQ ID NO:196具有至少80%同一性的氨基酸序列。

[2260] 实施方案II-205.如实施方案193所述的经工程化的蛋白质,其中所述SIRPα抗体或其部分包含与SEQ ID NO:197具有至少80%同一性的氨基酸序列。

[2261] 实施方案II-206.如实施方案193所述的经工程化的蛋白质,其中所述SIRPα抗体或其部分包含与SEQ ID NO:198具有至少80%同一性的氨基酸序列。

[2262] 实施方案II-207.如实施方案185-193中任一项所述的经工程化的蛋白质,其中所述一个或多个膜栓系物是或者包含跨膜结构域。

[2263] 实施方案II-208.如实施方案207所述的经工程化的蛋白质,其中所述跨膜结构域是或者包括CD3ζ、CD8a、CD16a、CD28、CD32a、CD32c、CD40、CD47、CD64、ICOS、Dectin-1、DNGR1、EGFR、GPCR、MyD88、PDGFR、SLAMF7、TRL1、TLR2、TLR3、TRL4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9或VEGFR跨膜结构域。

[2264] 实施方案II-209.如实施方案207或208所述的经工程化的蛋白质,其中所述跨膜结构域是或者包括CD47跨膜结构域。

[2265] 实施方案II-210.如实施方案207-209中任一项所述的经工程化的蛋白质,其中所述跨膜结构域包含与SEQ ID NO:23具有至少80%同一性的氨基酸序列。

[2266] 实施方案II-211.如实施方案207-209中任一项所述的经工程化的蛋白质,其中所述跨膜结构域包含与SEQ ID NO:25具有至少80%同一性的氨基酸序列。

[2267] 实施方案II-212.如实施方案207-209中任一项所述的经工程化的蛋白质,其中所述跨膜结构域包含与SEQ ID NO:27具有至少80%同一性的氨基酸序列。

[2268] 实施方案II-213.如实施方案207-209中任一项所述的经工程化的蛋白质,其中所述跨膜结构域包含与SEQ ID NO:29具有至少80%同一性的氨基酸序列。

[2269] 实施方案II-214.如实施方案207-209中任一项所述的经工程化的蛋白质,其中所

述跨膜结构域包含与SEQ ID NO:31具有至少80％同一性的氨基酸序列。

[2270] 实施方案II-215.如实施方案207或208所述的经工程化的蛋白质,其中所述跨膜结构域是或者包括CD8a跨膜结构域。

[2271] 实施方案II-216.如实施方案207、208或215所述的经工程化的蛋白质,其中所述跨膜结构域包含与SEQ ID NO:38具有至少80％同一性的氨基酸序列。

[2272] 实施方案II-217.如实施方案207或208所述的经工程化的蛋白质,其中所述跨膜结构域是或者包括CD28跨膜结构域。

[2273] 实施方案II-218.如实施方案207、208或217所述的经工程化的蛋白质,其中所述跨膜结构域包含与SEQ ID NO:40具有至少80％同一性的氨基酸序列。

[2274] 实施方案II-219.如实施方案207或208所述的经工程化的蛋白质,其中所述跨膜结构域是或者包括PDGFR跨膜结构域。

[2275] 实施方案II-220.如实施方案207、208或219所述的经工程化的蛋白质,其中所述跨膜结构域包含与SEQ ID NO:42具有至少80％同一性的氨基酸序列。

[2276] 实施方案II-221.如实施方案85-193中任一项所述的经工程化的蛋白质,其中所述一个或多个膜栓系物是或者包括糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚。

[2277] 实施方案II-222.如实施方案221所述的经工程化的蛋白质,其中所述GPI锚是或者包括DAF/CD55 GPI锚、TRAILR3 GPI锚或CD59GPI锚。

[2278] 实施方案II-223.如实施方案221或222所述的经工程化的蛋白质,其中所述GPI锚是或者包括DAF/CD55 GPI锚。

[2279] 实施方案II-224.如实施方案221-223中任一项所述的经工程化的蛋白质,其中所述DAF/CD55 GPI锚包含与SEQ ID NO:34具有至少80％同一性的氨基酸序列。

[2280] 实施方案II-225.如实施方案221或222所述的经工程化的蛋白质,其中所述GPI锚是或者包括TRAILR3 GPI锚。

[2281] 实施方案II-226.如实施方案221、222或225中任一项所述的经工程化的蛋白质,其中所述TRAILR3 GPI锚包含与SEQ ID NO:35具有至少80％同一性的氨基酸序列。

[2282] 实施方案II-227.如实施方案221、222或225中任一项所述的经工程化的蛋白质,其中所述TRAILR3 GPI锚包含与SEQ ID NO:36具有至少80％同一性的氨基酸序列。

[2283] 实施方案II-228.如实施方案221或222所述的经工程化的蛋白质,其中所述GPI锚是或者包括CD59 GPI锚。

[2284] 实施方案II-229.如实施方案221、222或228中任一项所述的经工程化的蛋白质,其中所述CD59 GPI锚包含与SEQ ID NO:37具有至少80％同一性的氨基酸序列。

[2285] 实施方案II-230.如实施方案185-221中任一项所述的经工程化的蛋白质,其进一步包含细胞外信号肽。

[2286] 实施方案II-231.如实施方案230所述的经工程化的蛋白质,其中所述细胞外信号肽由与SEQ ID NO:20具有至少80％同一性的核酸序列编码。

[2287] 实施方案II-232.如实施方案185-231中任一项所述的经工程化的蛋白质,其中所述一个或多个细胞外结构域进一步包含细胞外铰链结构域。

[2288] 实施方案II-233.如实施方案232所述的经工程化的蛋白质,其中所述细胞外铰链结构域是或者包括CD47铰链、CD8a铰链、CD28铰链、PDGFR铰链或IgG4铰链。

[2289] 实施方案II-234.如实施方案232或17a所述的经工程化的蛋白质,其中所述细胞外铰链结构域是或者包括CD47铰链。

[2290] 实施方案II-235.如实施方案232-234中任一项所述的经工程化的蛋白质,其中所述细胞外铰链结构域包含与SEQ ID NO:44具有至少80%同一性的氨基酸序列。

[2291] 实施方案II-236.如实施方案232或233所述的经工程化的蛋白质,其中所述细胞外铰链结构域是或者包括CD8a铰链。

[2292] 实施方案II-237.如实施方案232、233或236所述的经工程化的蛋白质,其中所述细胞外铰链结构域包含与SEQ ID NO:45具有至少80%同一性的酸序列。

[2293] 实施方案II-238.如实施方案232或233所述的经工程化的蛋白质,其中所述细胞外铰链结构域是或者包括CD28铰链。

[2294] 实施方案II-239.如实施方案232、233或238所述的经工程化的蛋白质,其中所述细胞外铰链结构域包含与SEQ ID NO:46具有至少80%同一性的氨基酸序列。

[2295] 实施方案II-240.如实施方案232或233所述的经工程化的蛋白质,其中所述细胞外铰链结构域是或者包含PDGFR铰链。

[2296] 实施方案II-241.如实施方案232、233或240所述的经工程化的蛋白质,其中所述细胞外铰链结构域包含与SEQ ID NO:47具有至少80%同一性的氨基酸序列。

[2297] 实施方案II-242.如实施方案232或233所述的经工程化的蛋白质,其中所述细胞外铰链结构域是或者包含IgG4铰链。

[2298] 实施方案II-243.如实施方案232、233或242所述的经工程化的蛋白质,其中所述细胞外铰链结构域包含与SEQ ID NO:48具有至少80%同一性的氨基酸序列。

[2299] 实施方案II-244.如前述实施方案中任一项所述的经工程化的蛋白质,其进一步包含细胞内结构域。

[2300] 实施方案II-245.如实施方案244所述的经工程化的蛋白质,其中所述细胞内结构域是或者包括CD47细胞内结构域或其部分。

[2301] 实施方案II-246.如实施方案244或245所述的经工程化的蛋白质,其中所述细胞内结构域包含与SEQ ID NO:24具有至少80%同一性的氨基酸序列。

[2302] 实施方案II-247.如实施方案244或245所述的经工程化的蛋白质,其中所述细胞内结构域包含与SEQ ID NO:28具有至少80%同一性的氨基酸序列。

[2303] 实施方案II-248.如实施方案244或245所述的经工程化的蛋白质,其中所述细胞内结构域包含与SEQ ID NO:32具有至少80%同一性的氨基酸序列。

[2304] 实施方案II-249.如实施方案244或245所述的经工程化的蛋白质,其中所述细胞内结构域包含与SEQ ID NO:33具有至少80%同一性的氨基酸序列。

[2305] 实施方案II-250.如实施方案244所述的经工程化的蛋白质,其中所述细胞内结构域是或者包括CD8a细胞内结构域或其部分。

[2306] 实施方案II-251.如实施方案244或250所述的经工程化的蛋白质,其中所述细胞内结构域包含与SEQ ID NO:39具有至少80%同一性的氨基酸序列。

[2307] 实施方案II-252.如实施方案244所述的经工程化的蛋白质,其中所述细胞内结构域是或者包括CD28细胞内结构域或其部分。

[2308] 实施方案II-253.如实施方案244或245所述的经工程化的蛋白质构建体,其中所

述细胞内结构域包含与SEQ ID NO:41具有至少80％同一性的氨基酸序列。

[2309] 实施方案II-254.如实施方案244所述的经工程化的蛋白质,其中所述细胞内结构域是或者包括PDGFR细胞内结构域或其部分。

[2310] 实施方案II-255.如实施方案244或254所述的经工程化的蛋白质,其中所述细胞内结构域包含与SEQ ID NO:43具有至少80％同一性的氨基酸序列。

[2311] 实施方案II-256.如实施方案244-255中任一项所述的经工程化的蛋白质,其中所述细胞内结构域包含相对于野生型CD47细胞内结构域的一种或多种修饰。

[2312] 实施方案II-257.如实施方案244-256中任一项所述的经工程化的蛋白质,其中所述细胞内结构域包含相对于野生型CD47细胞内结构域的一个或多个缺失。

[2313] 实施方案II-258.如实施方案244-256中任一项所述的经工程化的蛋白质,其中所述细胞内结构域包含相对于野生型CD47细胞内结构域的一个或多个插入。

[2314] 实施方案II-259.如实施方案244-258中任一项所述的经工程化的蛋白质,其中所述细胞内结构域包含相对于野生型CD47细胞内结构域改变的功能。

[2315] 实施方案II-260.如实施方案244-259中任一项所述的经工程化的蛋白质,其中所述细胞内结构域包含相对于野生型CD47细胞内结构域降低的功能。

[2316] 实施方案II-261.如实施方案244-260中任一项所述的经工程化的蛋白质,其中所述细胞内结构域包含相对于野生型CD47细胞内结构域降低的水平的CD47细胞内信号传导。

[2317] 实施方案II-262.如实施方案244-261中任一项所述的经工程化的蛋白质,其中所述细胞内结构域包括非功能性细胞内结构域。

[2318] 实施方案II-263.如实施方案185-262中任一项所述的经工程化的蛋白质,其包含与选自表30的序列具有至少80％同一性的氨基酸序列。

[2319] 实施方案II-264.如实施方案185-263中任一项所述的经工程化的蛋白质,其包含与SEQ ID NO:1具有至少80％同一性的氨基酸序列。

[2320] 实施方案II-265.如实施方案185-263中任一项所述的经工程化的蛋白质,其包含与SEQ ID NO:2具有至少80％同一性的氨基酸序列。

[2321] 实施方案II-266.如实施方案185-263中任一项所述的经工程化的蛋白质,其包含与SEQ ID NO:6具有至少80％同一性的氨基酸序列。

[2322] 实施方案II-267.如实施方案185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:80具有至少80％同一性的核苷酸序列。

[2323] 实施方案II-268.如实施方案185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:81具有至少80％同一性的核苷酸序列。

[2324] 实施方案II-269.如实施方案185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:82具有至少80％同一性的核苷酸序列。

[2325] 实施方案II-270.如实施方案185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:83具有至少80％同一性的核苷酸序列。

[2326] 实施方案II-271.如实施方案185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:84具有至少80％同一性的核苷酸序列。

[2327] 实施方案II-272.如实施方案185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:85具有至少80％同一性的核苷酸序列。

[2328] 实施方案II-273.如实施方案185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:86具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2329] 实施方案II-274.如实施方案185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:87具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2330] 实施方案II-275.如实施方案185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:88具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2331] 实施方案II-276.如实施方案185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:89具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2332] 实施方案II-277.如实施方案185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:90具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2333] 实施方案II-278.如实施方案185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:91具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2334] 实施方案II-279.如实施方案185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:92具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2335] 实施方案II-280.如实施方案185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:93具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2336] 实施方案II-281.如实施方案185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:94具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2337] 实施方案II-282.如实施方案185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:95具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2338] 实施方案II-283.如实施方案185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:96具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2339] 实施方案II-284.如实施方案185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:97具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2340] 实施方案II-285.如实施方案185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:98具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2341] 实施方案II-286.如实施方案185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:99具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2342] 实施方案II-287.如实施方案185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:100具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2343] 实施方案II-288.如实施方案185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:101具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2344] 实施方案II-289.如实施方案185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:102具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2345] 实施方案II-290.如实施方案185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:103具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2346] 实施方案II-291.如实施方案185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:104具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2347] 实施方案II-292.如实施方案185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ

ID NO:105具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2348] 实施方案II-293.如实施方案185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:106具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2349] 实施方案II-294.如实施方案185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:107具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2350] 实施方案II-295.如实施方案185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:108具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2351] 实施方案II-296.如实施方案185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:109具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2352] 实施方案II-297.如实施方案185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:110具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2353] 实施方案II-298.如实施方案185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:111具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2354] 实施方案II-299.如实施方案185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:112具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2355] 实施方案II-300.如实施方案185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:113具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2356] 实施方案II-301.如实施方案185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:114具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2357] 实施方案II-302.如实施方案185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:115具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2358] 实施方案II-303.如实施方案185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:116具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2359] 实施方案II-304.如实施方案185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:117具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2360] 实施方案II-305.如实施方案185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:118具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2361] 实施方案II-306.如实施方案185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:119具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2362] 实施方案II-307.如实施方案185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:120具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2363] 实施方案II-308.如实施方案185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:121具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2364] 实施方案II-309.如实施方案185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:122具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2365] 实施方案II-310.如实施方案185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:123具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2366] 实施方案II-311.如实施方案185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:124具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2367] 实施方案II-312.如实施方案185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:125具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2368] 实施方案II-313.如实施方案185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:126具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2369] 实施方案II-314.如实施方案185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:127具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2370] 实施方案II-315.如实施方案185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:128具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2371] 实施方案II-316.如实施方案185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:129具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2372] 实施方案II-317.如实施方案185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:130具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2373] 实施方案II-318.如实施方案185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:131具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2374] 实施方案II-319.如实施方案185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:132具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2375] 实施方案II-320.如实施方案185-263中任一项所述的核酸构建体,其包含与SEQ ID NO:340具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2376] 实施方案II-321.如实施方案185-255中任一项所述的经工程化的蛋白质,其包含与选自表32的一个或多个序列具有至少80%同一性的一个或多个氨基酸序列。

[2377] 实施方案II-322.如前述实施方案中的任一项所述的经工程化的蛋白质,其包含与选自表32和/或表30的一个或多个序列具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

[2378] 实施方案II-323.如实施方案185-255中任一项所述的经工程化的蛋白质,其包含与SEQ ID NO:20、21、23、24、25和26具有至少80%同一性的一个或多个氨基酸序列。

[2379] 实施方案II-324.如实施方案185-255中任一项所述的经工程化的蛋白质,其包含与SEQ ID NO:20、21、23、24和25具有至少80%同一性的一个或多个氨基酸序列。

[2380] 实施方案II-325.如实施方案185-255中任一项所述的经工程化的蛋白质,其包含与SEQ ID NO:20、21、23和24具有至少80%同一性的一个或多个氨基酸序列。

[2381] 实施方案II-326.如实施方案185-255中任一项所述的经工程化的蛋白质,其包含与SEQ ID NO:20、21、23、24、25、26、27、28、29、30和31具有至少80%同一性的一个或多个氨基酸序列。实施方案II-327.如实施方案185-255中任一项所述的经工程化的蛋白质,其包含与SEQ ID NO:20、21、23、24、25、26、27、28、29和30具有至少80%同一性的一个或多个氨基酸序列。

[2382] 实施方案II-328.如实施方案185-255中任一项所述的经工程化的蛋白质,其包含与SEQ ID NO:20、21、23、24、25、26、27、28和29具有至少80%同一性的一个或多个氨基酸序列。

[2383] 实施方案II-329.如实施方案185-255中任一项所述的经工程化的蛋白质,其包含与SEQ ID NO:20、21、23、24、25、26、27和28具有至少80%同一性的一个或多个氨基酸序列。

[2384] 实施方案II-330.如实施方案185-255中任一项所述的经工程化的蛋白质,其包含

与SEQ ID NO:22和34具有至少80％同一性的一个或多个氨基酸序列。

[2385] 实施方案II-331.如实施方案185-255中任一项所述的经工程化的蛋白质,其包含与SEQ ID NO:22和35具有至少80％同一性的一个或多个氨基酸序列。

[2386] 实施方案II-332.如实施方案185-255中任一项所述的经工程化的蛋白质,其包含与SEQ ID NO:22和36具有至少80％同一性的一个或多个氨基酸序列。

[2387] 实施方案II-333.如实施方案185-255中任一项所述的经工程化的蛋白质,其包含与SEQ ID NO:22、38和39具有至少80％同一性的一个或多个氨基酸序列。

[2388] 实施方案II-334.如实施方案185-255中任一项所述的经工程化的蛋白质,其包含与SEQ ID NO:22、40和41具有至少80％同一性的一个或多个氨基酸序列。

[2389] 实施方案II-335.如实施方案185-255中任一项所述的经工程化的蛋白质,其包含与SEQ ID NO:22、42和43具有至少80％同一性的一个或多个氨基酸序列。

[2390] 实施方案II-336.如实施方案185-255中任一项所述的经工程化的蛋白质,其包含与SEQ ID NO:21、47、42和43具有至少80％同一性的一个或多个氨基酸序列。

[2391] 实施方案II-337.如实施方案185-255中任一项所述的经工程化的蛋白质,其包含与SEQ ID NO:21、48、40和41具有至少80％同一性的一个或多个氨基酸序列。

[2392] 实施方案II-338.如实施方案185-255中任一项所述的经工程化的蛋白质,其包含与SEQ ID NO:21、48、38和39具有至少80％同一性的一个或多个氨基酸序列。

[2393] 实施方案II-339.如实施方案185-255中任一项所述的经工程化的蛋白质,其包含与SEQ ID NO:21、46、40和41具有至少80％同一性的一个或多个氨基酸序列。

[2394] 实施方案II-340.如实施方案185-255中任一项所述的经工程化的蛋白质,其包含与SEQ ID NO:21、46、38和39具有至少80％同一性的一个或多个氨基酸序列。

[2395] 实施方案II-341.如实施方案185-255中任一项所述的经工程化的蛋白质,其包含与SEQ ID NO:21、45、40和41具有至少80％同一性的一个或多个氨基酸序列。

[2396] 实施方案II-342.如实施方案185-255中任一项所述的经工程化的蛋白质,其包含与SEQ ID NO:21、45、38和39具有至少80％同一性的一个或多个氨基酸序列。

[2397] 实施方案II-343.如实施方案185-342中任一项所述的经工程化的蛋白质,其包含比野生型人CD47蛋白更少的糖基化修饰位点。

[2398] 实施方案II-344.如实施方案343所述的经工程化的蛋白质,其中所述经工程化的蛋白质不包含N206糖基化位点。

[2399] 实施方案II-345.一种包含实施方案185-344中任一项所述的经工程化的蛋白质的经遗传工程化的细胞。

[2400] 实施方案II-346.一种包含编码经工程化的蛋白质的第一转基因的经遗传工程化的细胞,

[2401] 其中,所述经工程化的蛋白质包含:

[2402] (a)一个或多个细胞外结构域;和

[2403] (b)一个或多个膜栓系物;

[2404] 其中所述一个或多个细胞外结构域包含信号调控蛋白α(SIRPα)相互作用基序。

[2405] 实施方案II-346a.如实施方案346所述的经遗传工程化的细胞,其中所述经工程化的蛋白质不包含一个或多个全长CD47细胞内结构域。

[2406] 实施方案II-347.如实施方案346所述的经遗传工程化的细胞,其中所述SIRPα相互作用基序是或者包含CD47细胞外结构域或其部分。

[2407] 实施方案II-348.如实施方案347所述的经遗传工程化的细胞,其中所述CD47细胞外结构域是CD47免疫球蛋白可变(IgV)样结构域。

[2408] 实施方案II-349.如实施方案23或347所述的经遗传工程化的细胞,其中所述CD47细胞外结构域是人CD47细胞外结构域。

[2409] 实施方案II-350.如实施方案347-349中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述CD47细胞外结构域由所述第一转基因编码,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:52具有至少80%同一性的核酸序列。

[2410] 实施方案II-351.如实施方案347-349中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述CD47细胞外结构域由所述第一转基因编码,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:53具有至少80%同一性的核酸序列。

[2411] 实施方案II-352.如实施方案347-349中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述CD47细胞外结构域由与SEQ ID NO:57具有至少80%同一性的核酸序列编码。

[2412] 实施方案II-353.如实施方案347-349中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述CD47细胞外结构域由与SEQ ID NO:59具有至少80%同一性的核酸序列编码。

[2413] 实施方案II-354.如实施方案346所述的经遗传工程化的细胞,其中所述SIRPα相互作用基序是或者包含SIRPα抗体或其部分。

[2414] 实施方案II-355.如实施方案346-354中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述一个或多个膜栓系物是或者包含跨膜结构域。

[2415] 实施方案II-356.如实施方案355所述的经遗传工程化的细胞,其中所述跨膜结构域是或者包括CD3ζ、CD8a、CD16a、CD28、CD32a、CD32c、CD40、CD47、CD64、ICOS、Dectin-1、DNGR1、EGFR、GPCR、MyD88、PDGFR、SLAMF7、TRL1、TLR2、TLR3、TRL4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9,或VEGFR跨膜结构域。

[2416] 实施方案II-357.如实施方案355或356所述的经遗传工程化的细胞,其中所述跨膜结构域是或者包括CD47跨膜结构域。

[2417] 实施方案II-358.如实施方案355-357中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述跨膜结构域由所述第一转基因编码,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:54具有至少80%同一性的核酸序列。

[2418] 实施方案II-359.如实施方案355-357中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述跨膜结构域由所述第一转基因编码,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:56具有至少80%同一性的核酸序列。

[2419] 实施方案II-360.如实施方案355-357中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述跨膜结构域由所述第一转基因编码,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:58具有至少80%同一性的核酸序列。

[2420] 实施方案II-361.如实施方案355-357中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述跨膜结构域由所述第一转基因编码,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:60具有至少80%同一性的核酸序列。

[2421] 实施方案II-362.如实施方案355-357中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中

所述跨膜结构域由所述第一转基因编码,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:62具有至少80%同一性的核酸序列。

[2422] 实施方案II-363.如实施方案355或356所述的经遗传工程化的细胞,其中所述跨膜结构域是或者包括CD8a跨膜结构域。

[2423] 实施方案II-364.如实施方案355、356或363所述的经遗传工程化的细胞,其中所述跨膜结构域由所述第一转基因编码,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:69具有至少80%同一性的核酸序列。

[2424] 实施方案II-365.如实施方案355或356所述的经遗传工程化的细胞,其中所述跨膜结构域是或者包括CD28跨膜结构域。

[2425] 实施方案II-366.如实施方案355、356或365所述的经遗传工程化的细胞,其中所述跨膜结构域由所述第一转基因编码,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:71具有至少80%同一性的核酸序列。

[2426] 实施方案II-367.如实施方案355或356所述的经遗传工程化的细胞,其中所述跨膜结构域是或者包括PDGFR跨膜结构域。

[2427] 实施方案II-368.如实施方案355、356或367所述的经遗传工程化的细胞,其中所述跨膜结构域由所述第一转基因编码,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:73具有至少80%同一性的核酸序列。

[2428] 实施方案II-369.如实施方案346-354中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述一个或多个膜栓系物是或者包括糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚。

[2429] 实施方案II-370.如实施方案369所述的经遗传工程化的细胞,其中所述GPI锚是或者包括DAF/CD55 GPI锚、TRAILR3 GPI锚或CD59 GPI锚。

[2430] 实施方案II-371.如实施方案369或370所述的经遗传工程化的细胞,其中所述GPI锚是或者包括DAF/CD55 GPI锚。

[2431] 实施方案II-372.如实施方案369-371中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述DAF/CD55 GPI锚由所述第一转基因编码,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:65具有至少80%同一性的核酸序列。

[2432] 实施方案II-373.如实施方案369或370所述的经遗传工程化的细胞,其中所述GPI锚是或者包括TRAILR3 GPI锚。

[2433] 实施方案II-374.如实施方案369、370或373中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述TRAILR3 GPI锚由所述第一转基因编码,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:66具有至少80%同一性的核酸序列。

[2434] 实施方案II-375.如实施方案369、370或373中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述TRAILR3 GPI锚由所述第一转基因编码,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:67具有至少80%同一性的核酸序列。

[2435] 实施方案II-376.如实施方案369或370所述的经遗传工程化的细胞,其中所述GPI锚是或者包括CD59 GPI锚。

[2436] 实施方案II-377.如实施方案369、370或376中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述CD59 GPI锚由所述第一转基因编码,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:68具有至少80%同一性的核酸序列。

[2437] 实施方案II-378.如实施方案346-369中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其进一步包含一个或多个控制序列。

[2438] 实施方案II-379.如实施方案378所述的经遗传工程化的细胞,其中所述一个或多个控制序列编码细胞外信号肽。

[2439] 实施方案II-380.如实施方案378或379所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细胞外信号肽由所述第一转基因编码,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:51具有至少80%同一性的核酸序列。

[2440] 实施方案II-381.如实施方案378所述的经遗传工程化的细胞,其中所述一个或多个控制序列包括启动子。

[2441] 实施方案II-382.如实施方案381所述的经遗传工程化的细胞,其中所述启动子是组成型启动子或诱导型启动子。

[2442] 实施方案II-383.如实施方案381或382所述的经遗传工程化的细胞,其中所述启动子是天然存在的启动子、杂合启动子或合成启动子。

[2443] 实施方案II-384.如实施方案381-383中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述启动子是或者包括EF1α启动子、EF1α短启动子、CAG启动子、泛素/S27a启动子、SV40早期启动子、腺病毒主要晚期启动子、小鼠金属硫蛋白-I启动子、RSV启动子、MMTV启动子、莫洛尼鼠白血病病毒长末端重复区、CMV启动子、肌动蛋白启动子、免疫球蛋白启动子、热休克启动子、多瘤病毒启动子、禽痘病毒启动子、牛乳头瘤病毒启动子、禽肉瘤病毒启动子、逆转录病毒启动子、乙型肝炎病毒启动子、PGK启动子、腺病毒晚期启动子、痘苗病毒7.5K启动子、SV40启动子、HSV的tk启动子,小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)启动子、HIV的LTR启动子、莫洛尼病毒启动子、爱泼斯坦巴尔病毒(EBV)启动子、劳斯肉瘤病毒(RSV)启动子,或UBC启动子。

[2444] 实施方案II-385.如实施方案381-384中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述启动子是或者包括CAG启动子。

[2445] 实施方案II-386.如实施方案381-385中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含所述启动子,并且其中所述启动子包含与SEQ ID NO:49具有至少80%同一性的核酸序列。

[2446] 实施方案II-387.如实施方案381-384中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述启动子是或者包括EF1α启动子。

[2447] 实施方案II-388.如实施方案381-385,或387中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含所述启动子,并且其中所述启动子包含与SEQ ID NO:50具有至少80%同一性的核酸序列。

[2448] 实施方案II-389.如实施方案378所述的经遗传工程化的细胞,其中所述一个或多个控制序列包括核糖体结合位点、增强子元件、活化子元件、翻译起始序列、翻译终止序列、转录起始序列、转录终止序列、多聚腺苷酸化信号序列、复制元件、RNA加工和输出元件、转座子序列、转座酶序列、绝缘子序列、内部核糖体进入位点(IRES)、5'UTR、3'UTR、mRNA 3'末端加工序列、边界元件、基因座控制区(LCR)、基质结合区(MAR)、重组或盒式交换序列、接头序列、分泌信号、抗性标志物、锚定肽、定位信号、融合标签、亲和标签、伴侣蛋白、蛋白酶或其组合。

[2449] 实施方案II-390.如实施方案346-389中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中

所述一个或多个细胞外结构域进一步包含细胞外铰链结构域。

[2450] 实施方案II-391.如实施方案390所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细胞外铰链结构域是或者包括CD47铰链、CD8a铰链、CD28铰链、PDGFR铰链或IgG4铰链。

[2451] 实施方案II-392.如实施方案390或391所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细胞外铰链结构域是或者包括CD47铰链。

[2452] 实施方案II-393.如实施方案390-392中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细胞外铰链结构域由所述第一转基因编码,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:75具有至少80%同一性的核酸序列。

[2453] 实施方案II-394.如实施方案390或391所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细胞外铰链结构域是或者包括CD8a铰链。

[2454] 实施方案II-395.如实施方案390、391或394所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细胞外铰链结构域由所述第一转基因编码,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:76具有至少80%同一性的核酸序列。

[2455] 实施方案II-396.如实施方案390或391所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细胞外铰链结构域是或者包括CD28铰链。

[2456] 实施方案II-397.如实施方案390、391或396所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细胞外铰链结构域由所述第一转基因编码,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:77具有至少80%同一性的核酸序列。

[2457] 实施方案II-398.如实施方案390或391所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细胞外铰链结构域是或者包括PDGFR铰链。

[2458] 实施方案II-399.如实施方案390、391或398所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细胞外铰链结构域由所述第一转基因编码,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:78具有至少80%同一性的核酸序列。

[2459] 实施方案II-400.如实施方案390或391所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细胞外铰链结构域是或者包括IgG4铰链。

[2460] 实施方案II-401.如实施方案390、391或400所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细胞外铰链结构域由所述第一转基因编码,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:79具有至少80%同一性的核酸序列。

[2461] 实施方案II-402.如实施方案346-401中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因进一步包含编码细胞内结构域的一个或多个核酸序列。

[2462] 实施方案II-403.如实施方案402所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细胞内结构域是或者包括CD47细胞内结构域或其部分。

[2463] 实施方案II-404.如实施方案402或403所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细胞内结构域由所述第一转基因编码,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:55具有至少80%同一性的核酸序列。

[2464] 实施方案II-405.如实施方案402或403所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细胞内结构域由所述第一转基因编码,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:59具有至少80%同一性的核酸序列。

[2465] 实施方案II-406.如实施方案402或403所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细

胞内结构域由所述第一转基因编码,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:63具有至少80%同一性的核酸序列。

[2466] 实施方案II-407.如实施方案402或403所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细胞内结构域由所述第一转基因编码,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:64具有至少80%同一性的核酸序列。

[2467] 实施方案II-408.如实施方案402所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细胞内结构域是或者包括CD8a细胞内结构域或其部分。

[2468] 实施方案II-409.如实施方案402或408所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细胞内结构域由所述第一转基因编码,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:70具有至少80%同一性的核酸序列。

[2469] 实施方案II-410.如实施方案402所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细胞内结构域是或者包括CD28细胞内结构域或其部分。

[2470] 实施方案II-411.如实施方案402或403所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细胞内结构域由所述第一转基因编码,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:72具有至少80%同一性的核酸序列。

[2471] 实施方案II-412.如实施方案402所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细胞内结构域是或者包括PDGFR细胞内结构域或其部分。

[2472] 实施方案II-413.如实施方案402或412所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细胞内结构域由所述第一转基因编码,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:74具有至少80%同一性的核酸序列。

[2473] 实施方案II-414.如实施方案402-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细胞内结构域包含相对于野生型CD47细胞内结构域的一种或多种修饰。

[2474] 实施方案II-415.如实施方案402-414中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细胞内结构域包含相对于野生型CD47细胞内结构域的一个或多个缺失。

[2475] 实施方案II-416.如实施方案402-414中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细胞内结构域包含相对于野生型CD47细胞内结构域的一个或多个插入。

[2476] 实施方案II-417.如实施方案402-416中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细胞内结构域包含相对于野生型CD47细胞内结构域改变的功能。

[2477] 实施方案II-418.如实施方案402-417中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细胞内结构域包含相对于野生型CD47细胞内结构域降低的功能。

[2478] 实施方案II-419.如实施方案402-418中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细胞内结构域包含相对于野生型CD47细胞内结构域降低的水平的CD47细胞内信号传导。

[2479] 实施方案II-420.如实施方案402-419中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细胞内结构域包括非功能性细胞内结构域。

[2480] 实施方案II-421.如实施方案346-420中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与选自表31的序列具有至少80%同一性的核酸序列。

[2481] 实施方案II-422.如实施方案346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:13具有至少80%同一性的核酸序列。

[2482] 实施方案II-423.如实施方案346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:14具有至少80%同一性的核酸序列。

[2483] 实施方案II-424.如实施方案346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:18具有至少80%同一性的核酸序列。

[2484] 实施方案II-425.如实施方案346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:133具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2485] 实施方案II-426.如实施方案346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:134具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2486] 实施方案II-427.如实施方案346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:135具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2487] 实施方案II-428.如实施方案346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:136具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2488] 实施方案II-429.如实施方案346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:137具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2489] 实施方案II-430.如实施方案346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:138具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2490] 实施方案II-431.如实施方案346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:139具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2491] 实施方案II-432.如实施方案346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:140具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2492] 实施方案II-433.如实施方案346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:141具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2493] 实施方案II-434.如实施方案346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:142具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2494] 实施方案II-435.如实施方案346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:143具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2495] 实施方案II-436.如实施方案346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:144具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2496] 实施方案II-437.如实施方案346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:145具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2497] 实施方案II-438.如实施方案346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:146具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2498] 实施方案II-439.如实施方案346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:147具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2499] 实施方案II-440.如实施方案346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:148具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2500] 实施方案II-441.如实施方案346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:149具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2501] 实施方案II-442.如实施方案346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包

含与SEQ ID NO:150具有至少80％同一性的核苷酸序列。

[2502] 实施方案II-443.如实施方案346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:151具有至少80％同一性的核苷酸序列。

[2503] 实施方案II-444.如实施方案346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:152具有至少80％同一性的核苷酸序列。

[2504] 实施方案II-445.如实施方案346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:153具有至少80％同一性的核苷酸序列。

[2505] 实施方案II-446.如实施方案346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:154具有至少80％同一性的核苷酸序列。

[2506] 实施方案II-447.如实施方案346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:155具有至少80％同一性的核苷酸序列。

[2507] 实施方案II-448.如实施方案346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:156具有至少80％同一性的核苷酸序列。

[2508] 实施方案II-449.如实施方案346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:157具有至少80％同一性的核苷酸序列。

[2509] 实施方案II-450.如实施方案346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:158具有至少80％同一性的核苷酸序列。

[2510] 实施方案II-451.如实施方案346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:159具有至少80％同一性的核苷酸序列。

[2511] 实施方案II-452.如实施方案346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:160具有至少80％同一性的核苷酸序列。

[2512] 实施方案II-实施方案II-453.如实施方案346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:161具有至少80％同一性的核苷酸序列。

[2513] 实施方案II-454.如实施方案346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:162具有至少80％同一性的核苷酸序列。

[2514] 实施方案II-455.如实施方案346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:163具有至少80％同一性的核苷酸序列。

[2515] 实施方案II-456.如实施方案346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:164具有至少80％同一性的核苷酸序列。

[2516] 实施方案II-457.如实施方案346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:165具有至少80％同一性的核苷酸序列。

[2517] 实施方案II-458.如实施方案346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:166具有至少80％同一性的核苷酸序列。

[2518] 实施方案II-459.如实施方案346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:167具有至少80％同一性的核苷酸序列。

[2519] 实施方案II-460.如实施方案346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:168具有至少80％同一性的核苷酸序列。

[2520] 实施方案II-461.如实施方案346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:169具有至少80％同一性的核苷酸序列。

[2521] 实施方案II-462.如实施方案346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:170具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2522] 实施方案II-463.如实施方案346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:171具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2523] 实施方案II-464.如实施方案346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:172具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2524] 实施方案II-465.如实施方案346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:173具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2525] 实施方案II-466.如实施方案346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:174具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2526] 实施方案II-467.如实施方案346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:175具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2527] 实施方案II-468.如实施方案346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:176具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2528] 实施方案II-469.如实施方案346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:177具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2529] 实施方案II-470.如实施方案346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:178具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2530] 实施方案II-471.如实施方案346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:179具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2531] 实施方案II-472.如实施方案346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:180具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2532] 实施方案II-473.如实施方案346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:181具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2533] 实施方案II-474.如实施方案346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:182具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2534] 实施方案II-475.如实施方案346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:183具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2535] 实施方案II-476.如实施方案346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:184具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2536] 实施方案II-477.如实施方案346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:185具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2537] 实施方案II-478.如实施方案346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:341具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2538] 实施方案II-479.如实施方案346-421中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其包含与SEQ ID NO:342具有至少80%同一性的核苷酸序列。

[2539] 实施方案II-480.如实施方案346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与选自表33的一个或多个序列具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

[2540] 实施方案II-481.如实施方案346中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与选自表33和/或表31的一个或多个序列具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

[2541] 实施方案II-482.如实施方案346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:49和SEQ ID NO:14具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

[2542] 实施方案II-483.如实施方案346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:14具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

[2543] 实施方案II-484.如实施方案346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:49和SEQ ID NO:13具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

[2544] 实施方案II-485.如实施方案346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:13具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

[2545] 实施方案II-486.如实施方案346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:49和SEQ ID NO:18具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

[2546] 实施方案II-487.如实施方案346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:18具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

[2547] 实施方案II-488.如实施方案346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:51、52、54、55、56和57具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

[2548] 实施方案II-489.如实施方案346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:51、52、54、55和56具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

[2549] 实施方案II-490.如实施方案346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:51、52、54和55具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

[2550] 实施方案II-491.如实施方案346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:51、52、54、55、56、57、58、59、60、61和62具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

[2551] 实施方案II-492.如实施方案346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:51、52、54、55、56、57、58、59、60和61具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

[2552] 实施方案II-493.如实施方案346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:51、52、54、55、56、57、58、59和60具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

[2553] 实施方案II-494.如实施方案346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:51、52、54、55、56、57、58和59具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

[2554] 实施方案II-495.如实施方案346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:49、53和65具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

[2555] 实施方案II-496.如实施方案346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:53和65具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

[2556] 实施方案II-497.如实施方案346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:49、53和66具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

[2557] 实施方案II-498.如实施方案346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:53和66具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

[2558] 实施方案II-499.如实施方案346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:49、53和67具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

[2559] 实施方案II-500.如实施方案346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:53和67具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

[2560] 实施方案II-501.如实施方案346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:49、53、69和70具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

[2561] 实施方案II-502.如实施方案346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:53、69和70具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

[2562] 实施方案II-503.如实施方案346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:49、53、71和72具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

[2563] 实施方案II-504.如实施方案346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:53、71和72具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

[2564] 实施方案II-505.如实施方案346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:49、53、73和74具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

[2565] 实施方案II-506.如实施方案346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:53、73和74具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

[2566] 实施方案II-507.如实施方案346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:49、52、78、73和74具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

[2567] 实施方案II-508.如实施方案346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:52、78、73和74具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

[2568] 实施方案II-实施方案II-509.如实施方案346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:49、52、79、71和72具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

[2569] 实施方案II-510.如实施方案346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:52、79、71和72具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

[2570] 实施方案II-511.如实施方案346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:49、52、79、69和70具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

[2571] 实施方案II-512.如实施方案346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:52、79、69和70具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

[2572] 实施方案II-513.如实施方案346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:49、52、77、71和72具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

[2573] 实施方案II-514.如实施方案346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:52、77、71和72具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

[2574] 实施方案II-515.如实施方案346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:49、52、77、69和70具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

[2575] 实施方案II-516.如实施方案346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:52、77、69和70具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

[2576] 实施方案II-517.如实施方案346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:49、52、76、71和72具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

[2577] 实施方案II-518.如实施方案346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:52、76、71和72具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

[2578] 实施方案II-519.如实施方案346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:49、52、76、69和70具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

[2579] 实施方案II-520.如实施方案346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:52、76、69和70具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

[2580] 实施方案II-521.如实施方案346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:49和200具有至少80%同一性的一个或多个核酸序列。

[2581] 实施方案II-522.如实施方案346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中

所述第一转基因包含与SEQ ID NO:50和200具有至少80％同一性的一个或多个核酸序列。

[2582] 实施方案II-523.如实施方案346-413中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因包含与SEQ ID NO:200具有至少80％同一性的一个或多个核酸序列。

[2583] 实施方案II-524.如权利要求346-523中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其在其基因组中包含位于第一插入位点处的所述第一转基因。

[2584] 实施方案II-525.如实施方案524所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一插入位点是T细胞受体(TCR)基因座。

[2585] 实施方案II-526.如实施方案525所述的经遗传工程化的细胞,其中所述TCR基因座是或者包括:TRAC基因座、TRBC1基因座或TRBC2基因座。

[2586] 实施方案II-527.如实施方案525所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一插入位点是β2微球蛋白(B2M)基因座。

[2587] 实施方案II-528.如实施方案525所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一插入位点是II类反式活化因子(CIITA)基因座。

[2588] 实施方案II-529.如实施方案525所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一插入位点是安全港基因座。

[2589] 实施方案II-530.如实施方案529所述的经遗传工程化的细胞,其中所述安全港基因座是AAVS1、ABO、CCR5、CLYBL、CXCR4、F3、FUT1、HMGB1、KDM5D、LRP1、MICA、MICB、RHD、ROSA26,或SHS231基因座。

[2590] 实施方案II-531.如实施方案525-530中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一插入位点是外显子。

[2591] 实施方案II-532.如实施方案525-530中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一插入位点是内含子。

[2592] 实施方案II-533.如实施方案525-530中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一插入位点位于内含子和外显子之间。

[2593] 实施方案II-534.如实施方案525-530中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一插入位点位于调控区中。

[2594] 实施方案II-535.如实施方案346-534中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述经遗传工程化的细胞具有所述经工程化的蛋白质的细胞表面表达。

[2595] 实施方案II-536.如实施方案346-535中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述经遗传工程化的细胞具有与未被遗传工程化的相当细胞相比降低的TCR细胞表面表达。

[2596] 实施方案II-537.如实施方案346-536中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述经遗传工程化的细胞具有与未被遗传工程化的相当细胞相比降低的B2M细胞表面表达。

[2597] 实施方案II-538.如实施方案346-537中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述经遗传工程化的细胞具有与未被遗传工程化的相当细胞相比降低的CIITA表达。

[2598] 实施方案II-539.如实施方案346-538中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述经遗传工程化的细胞包含位于TCR基因座、B2M基因座、TAP I基因座、NLRC5基因座、CIITA基因座、HLA-A基因座、HLA-B基因座、HLA-C基因座、HLA-DP基因座、HLA-DM基因座、

HLA-DOA基因座、HLA-DOB基因座、HLA-DQ基因座、HLA-DR基因座、RFX5基因座、RFXANK基因座、RFXAP基因座、NFY-A基因座、NFY-B基因座、NFY-C基因座,或其组合处的修饰。

[2599] 实施方案II-540.如实施方案346-539中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述经遗传工程化的细胞已被遗传工程化以敲除HLA-A基因座、HLA-B基因座、HLA-C基因座,或其组合。

[2600] 实施方案II-541.如实施方案346-539中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述经遗传工程化的细胞已被遗传工程化以敲除HLA-DM基因座、HLA-DO基因座、HLA-DP基因座、HLA-DQ基因座、HLA-DR基因座,或其组合。

[2601] 实施方案II-542.如实施方案346-541中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述经遗传工程化的细胞已被遗传工程化以敲除TCR基因座。

[2602] 实施方案II-543.如实施方案346-542中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述经遗传工程化的细胞已被遗传工程化以敲除B2M基因座。

[2603] 实施方案II-544.如实施方案346-543中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述经遗传工程化的细胞已被遗传工程化以敲除CIITA基因座。

[2604] 实施方案II-545.如实施方案346-544中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细胞包含一种或多种修饰,所述一种或多种修饰使以下的一个或多个等位基因失活或破坏:

[2605] (a)一种或多种主要组织相容性复合物(MHC)I类分子或调控所述一种或多种MHC I类分子的表达的一种或多种分子,和/或

[2606] (b)一种或多种MHC II类分子或调控所述一种或多种MHC II类分子的表达的一种或多种分子。

[2607] 实施方案II-546.如实施方案346-545中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细胞包含一种或多种修饰,所述一种或多种修饰使一种或多种MHC I类分子或调控所述一种或多种MHC I类分子的表达的一种或多种分子的一个或多个等位基因失活或破坏。

[2608] 实施方案II-547.如实施方案346-546中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细胞包含一种或多种修饰,所述一种或多种修饰使一种或多种MHC II类分子或调控所述一种或多种MHC II类分子的表达的一种或多种分子的一个或多个等位基因失活或破坏。

[2609] 实施方案II-548.如实施方案346-547中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细胞包含一种或多种修饰,所述一种或多种修饰使以下的一个或多个等位基因失活或破坏:

[2610] (a)一种或多种MHC I类分子或调控所述一种或多种MHC I类分子的表达的一种或多种分子,和

[2611] (b)一种或多种MHC II类分子或调控所述一种或多种MHC II类分子的表达的一种或多种分子。

[2612] 实施方案II-549.如实施方案346-548中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述一种或多种修饰降低所述一种或多种MHC I类分子的细胞表面蛋白表达。

[2613] 实施方案II-550.如实施方案346-549中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述一种或多种修饰降低所述一种或多种MHC I类分子的细胞表面运输。

[2614] 实施方案II-551.如实施方案346-550中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中

所述一种或多种修饰降低所述一种或多种MHC I类分子的功能,任选地其中所述功能是抗原呈递。

[2615] 实施方案II-552.如实施方案346-551中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述一种或多种MHC I类分子是一种或多种人白细胞抗原(HLA)I类分子。

[2616] 实施方案II-553.如实施方案552所述的经遗传工程化的细胞,其中所述一种或多种HLA I类分子选自由HLA-A、HLA-B和HLA-C组成的组。

[2617] 实施方案II-554.如实施方案346-551中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述的调控所述一种或多种MHC I类分子的表达的一种或多种分子选自由B2M、NLRC5和TAP1组成的组。

[2618] 实施方案II-555.如实施方案346-554中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述一种或多种修饰降低所述一种或多种MHC II类分子的细胞表面蛋白表达。

[2619] 实施方案II-556.如实施方案346-555中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述一种或多种修饰降低所述一种或多种MHC II类分子的细胞表面运输。

[2620] 实施方案II-557.如实施方案346-556中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述一种或多种修饰降低所述一种或多种MHC II类分子的功能,任选地其中所述功能是抗原呈递。

[2621] 实施方案II-558.如实施方案346-557中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述一种或多种MHC II类分子是一种或多种人白细胞抗原(HLA)II类分子。

[2622] 实施方案II-559.如实施方案558所述的经遗传工程化的细胞,其中所述一种或多种HLA II类分子选自由HLA-DP、HLA-DQ,和/或HLA-DR组成的组。

[2623] 实施方案II-560.如实施方案346-557中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述的调控所述一种或多种MHC II类分子的表达的一种或多种分子选自由CIITA和CD74组成的组。

[2624] 实施方案II-561.如实施方案346-547中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其进一步包含编码致耐受因子的第二转基因。

[2625] 实施方案II-562.如实施方案561所述的经遗传工程化的细胞,其中所述致耐受因子是或者包括A20/TNFAIP3、B2M-HLA-E、CD16、CD16 Fc受体、CD24、CD27、CD35、CD39、CD46、CD47、CD52、CD55、CD59、CD64、CD200、CCL21、CCL22、CTLA4-Ig、C1抑制剂、CR1、DUX4、FASL、HLA-C、HLA-E、HLA-E重链、HLA-F、HLA-G、H2-M3、IDO1、IL-10、IL15-RF、IL-35、IL-39、MANF、Mfge8、PD-L1或Serpinb9。

[2626] 实施方案II-563.如实施方案561或562所述的经遗传工程化的细胞,其中编码所述致耐受因子的所述第二转基因被插入在位于TCR基因座处的插入位点处。

[2627] 实施方案II-564.如实施方案561或562所述的经遗传工程化的细胞,其中编码所述致耐受因子的所述第二转基因被插入在位于B2M基因座处的插入位点处。

[2628] 实施方案II-565.如实施方案561或562所述的经遗传工程化的细胞,其中编码所述致耐受因子的所述第二转基因被插入在位于CIITA基因座处的插入位点处。

[2629] 实施方案II-566.如实施方案561或562所述的经遗传工程化的细胞,其中编码所述致耐受因子的所述第二转基因被插入在位于安全港基因座处的插入位点处。

[2630] 实施方案II-567.如实施方案566所述的经遗传工程化的细胞,其中所述安全港基

因座是AAVS1、ABO、CCR5、CLYBL、CXCR4、F3、FUT1、HMGB1、KDM5D、LRP1、MICA、MICB、RHD、ROSA26,或SHS231基因座。

[2631] 实施方案II-568.如实施方案561-565中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述经遗传工程化的细胞具有所述致耐受因子的细胞表面表达。

[2632] 实施方案II-569.如实施方案346-568中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其进一步包含编码嵌合抗原受体(CAR)的第三转基因。

[2633] 实施方案II-570.如实施方案569所述的经遗传工程化的细胞,其中所述CAR是或者包括CD5特异性CAR、CD19特异性CAR、CD20特异性CAR、CD22特异性CAR、CD23特异性CAR、CD30特异性CAR、CD33特异性CAR、CD38特异性CAR、CD70特异性CAR、CD123特异性CAR、CD138特异性CAR、κ,λ,B细胞成熟剂(BCMA)特异性CAR、g蛋白偶联受体家族C组5成员D(GPRC5D)特异性CAR、CD123特异性CAR、LeY特异性CAR、NKG2D配体特异性CAR、WT1特异性CAR、GD2特异性CAR、HER2特异性CAR、EGFR特异性CAR、EGFRvIII特异性CAR、B7H3特异性CAR、PSMA特异性CAR、PSCA特异性CAR、CAIX特异性CAR、CD171特异性CAR、CEA特异性CAR、CSPG4特异性CAR、EPHA2特异性CAR、FAP特异性CAR、FRα特异性CAR、IL-13Rα特异性CAR、间皮素特异性CAR、MUC1特异性CAR、MUC16特异性CAR、ROR1特异性CAR、C-Met特异性CAR、CD133特异性CAR、Ep-CAM特异性CAR、GPC3特异性CAR、HPV16-E6特异性CAR、IL13Ra2特异性CAR、MAGEA3特异性CAR、MAGEA4特异性CAR、MART1特异性CAR、NY-ESO-1特异性CAR、VEGFR2特异性CAR、α-叶酸受体特异性CAR、CD24特异性CAR、CD44v7/8特异性CAR、EGP-2特异性CAR、EGP-40特异性CAR、erb-B2特异性CAR、erb-B 2,3,4特异性CAR、FBP特异性CAR、胎儿乙酰胆碱e受体特异性CAR、GD2特异性CAR、GD3特异性CAR、HMW-MAA特异性CAR、IL-11Rα特异性CAR、KDR特异性CAR、Lewis Y特异性CAR、L1细胞粘附分子特异性CAR、MAGE-A1特异性CAR、癌胚抗原(h5T4)特异性CAR、TAG-72特异性CAR或CD19/CD22双特异性CAR。

[2634] 实施方案II-571.如实施方案569或570所述的经遗传工程化的细胞,其中所述CAR是或者包括CD19特异性CAR、CD20特异性CAR、CD22特异性CAR、CD38特异性CAR、CD123特异性CAR、CD138特异性CAR、BCMA特异性CAR或CD19/CD22双特异性CAR。

[2635] 实施方案II-572.如实施方案569-571中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述经遗传工程化的细胞具有所述CAR的细胞表面表达。

[2636] 实施方案II-573.如实施方案346-567中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其进一步包含编码嵌合自身抗原受体(CAAR)的第三转基因。

[2637] 实施方案II-574.如实施方案573所述的经遗传工程化的细胞,其中所述CAAR包含选自由胰腺β细胞抗原、滑膜关节抗原、髓鞘碱性蛋白、蛋白脂质蛋白、髓鞘少突糖蛋白、MuSK、角质形成细胞粘附蛋白桥粒芯糖蛋白3(Dsg3)、Ro-RNP复合物、La抗原、髓过氧化物酶、蛋白酶3、心磷脂、瓜氨酸化蛋白、氨基甲酰化蛋白和基膜胶原蛋白α3链组成的组的抗原。

[2638] 实施方案II-575.如实施方案573或574所述的经遗传工程化的细胞,其中所述经遗传工程化的细胞具有所述CAAR的细胞表面表达。

[2639] 实施方案II-576.如实施方案346-567中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其进一步包含编码B细胞自身抗体受体(BAR)的第三转基因。

[2640] 实施方案II-577.如实施方案576所述的经遗传工程化的细胞,其中所述经遗传工

程化的细胞具有所述BAR的细胞表面表达。

[2641] 实施方案II-578.如实施方案569-577中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第三转基因被插入在安全港基因座处。

[2642] 实施方案II-579.如实施方案569-578中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第三转基因被插入在TRAC基因座、TRBC1基因座、TRBC2基因座、B2M基因座、CIITA基因座、MICA基因座、MICB基因座或安全港基因座处。

[2643] 实施方案II-580.如实施方案569-579中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第三转基因被插入在AAVS1基因座、ABO基因座、CCR5基因座、CLYBL基因座、CXCR4基因座、F3基因座、FUT1基因座、HMGB1基因座、KDM5D基因座、LRP1基因座、RHD基因座、ROSA26基因座或SHS231基因座处。

[2644] 实施方案II-581.如实施方案346-566中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因和所述第二转基因被插入到相同的插入位点中。

[2645] 实施方案II-582.如实施方案346-566或576-580中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因和所述第三转基因被插入到相同的插入位点中。

[2646] 实施方案II-583.如实施方案561-580中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第二转基因和所述第三转基因被插入到相同的插入位点中。

[2647] 实施方案II-584.如实施方案346-580中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因、所述第二转基因和所述第三转基因被插入到相同的插入位点中。

[2648] 实施方案II-585.如实施方案346-584中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因、所述第二转基因和所述第三转基因由三个单独的构建体编码。

[2649] 实施方案II-586.如实施方案346-584中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因、所述第二转基因和所述第三转基因由两个单独的构建体编码。

[2650] 实施方案II-587.如实施方案346-584中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因、所述第二转基因和所述第三转基因由多顺反子构建体编码。

[2651] 实施方案II-588.如实施方案346-587中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述第一转基因和/或所述第二转基因和/或所述第三转基因编码基因组编辑复合物。

[2652] 实施方案II-589.如588所述的经遗传工程化的细胞,其中所述基因组编辑复合物包含基因组靶向实体和基因组修饰实体。

[2653] 实施方案II-590.如589所述的经遗传工程化的细胞,其中所述基因组靶向实体是核酸指导的靶向实体。

[2654] 实施方案II-591.如实施方案589或590所述的经遗传工程化的细胞,其中所述基因组靶向实体选自由以下组成的组:序列特异性核酸酶、核酸可编程DNA结合蛋白、RNA指导的核酸酶、包含Cas核酸酶和指导RNA的RNA指导的核酸酶(CRISPR-Cas组合)、包含gRNA和Cas核酸酶的核糖核蛋白(RNP)复合物、归巢核酸内切酶、锌指核酸酶(ZF)核酸结合实体、转录激活因子样效应物(TALE)核酸结合实体、大范围核酸酶、Cas核酸酶、核心Cas蛋白、归巢核酸内切酶、核酸内切酶缺陷型Cas蛋白、无酶活性的Cas蛋白、CRISPR相关转座酶(CAST)、II型或V型Cas蛋白,或其功能部分。

[2655] 实施方案II-592.如实施方案589-591中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述基因组靶向实体选自由以下组成的组:Cas1、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、

Cas8a、Cas8b、Cas8c、Cas9、Cas10、Cas12、Cas12a(Cpf1)、Cas12b(C2c1)、Cas12c(C2c3)、Cas12d(CasY)、Cas12e(CasX)、Cas12f(C2c10)、Cas12g、Cas12h、Cas12i、Cas12k(C2c5)、Cas13、Cas13a(C2c2)、Cas13b、Cas13c、Cas13d、C2c4、C2c8、C2c9、Cmr1、Cmr2、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csd1、Csd2、Cas5d、Cse1、Cse2、Cse3、Cse4、Cas5e、Csf1、Csm1、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csn1、Csn2、Cst1、Cst2、Cas5t、Csh1、Csh2、Cas5h、Csa1、Csa2、Csa3、Csa4、Csa5、Cas5a、Csx10、Csx11、Csy1、Csy2、Csy3、Csy4、Mad7、SpCas9、SpCas9的eSpCas9、SpCas9-HF1、HypaSpCas9、HeFSpCas9和evoSpCas9高保真变体、SaCas9、NmeCas9、CjCas9、StCas9、TdCas9、LbCas12a、AsCas12a、AacCas12b、BhCas12bv4、TnpB、dCas(D10A)、dCas(H840A)、dCas13a、dCas13b,或其功能部分。

[2656] 实施方案II-593.如实施方案589-592中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述基因组修饰实体对靶基因座进行切割、脱氨基、切口、聚合、询问、整合、切割、解旋、断裂、改变、甲基化、去甲基化,或以其他方式使靶基因座不稳定。

[2657] 实施方案II-594.如实施方案589-593中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述基因组修饰实体包含重组酶、整合酶、转座酶、核酸内切酶、核酸外切酶、切口酶、解旋酶、DNA聚合酶、RNA聚合酶、逆转录酶、脱氨酶、翻转酶、甲基化酶、脱甲基酶、乙酰化酶、核酸修饰蛋白、RNA修饰蛋白、DNA修饰蛋白、Argonaute蛋白、表观遗传修饰蛋白、组蛋白修饰蛋白,或其功能部分。

[2658] 实施方案II-595.如实施方案589-594中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述基因组修饰实体选自由以下组成的组:序列特异性核酸酶、核酸可编程DNA结合蛋白、RNA引导核酸酶、包含Cas核酸酶和指导RNA的RNA指导的核酸酶(CRISPR-Cas组合)、包含gRNA和Cas核酸酶的核糖核蛋白(RNP)复合物、归巢核酸内切酶、锌指核酸酶(ZFN)、转录活化因子样效应物核酸酶(TALEN)、大范围核酸酶、Cas核酸酶、核心Cas蛋白、TnpB核酸酶、核酸内切酶缺陷型Cas蛋白、无酶活性的Cas蛋白、CRISPR相关转座酶(CAST)、II型或V型Cas蛋白、碱基编辑、先导编辑、经由位点特异性靶向元件的可编程添加(PASTE),或其功能部分。

[2659] 实施方案II-596.如实施方案589-595中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述基因组修饰实体选自由以下组成的组:Cas1、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8a、Cas8b、Cas8c、Cas9、Cas10、Cas12、Cas12a(Cpf1)、Cas12b(C2c1)、Cas12c(C2c3)、Cas12d(CasY)、Cas12e(CasX)、Cas12f(C2c10)、Cas12g、Cas12h、Cas12i、Cas12k(C2c5)、Cas13、Cas13a(C2c2)、Cas13b、Cas13c、Cas13d、C2c4、C2c8、C2c9、Cmr1、Cmr2、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csd1、Csd2、Cas5d、Cse1、Cse2、Cse3、Cse4、Cas5e、Csf1、Csm1、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csn1、Csn2、Cst1、Cst2、Cas5t、Csh1、Csh2、Cas5h、Csa1、Csa2、Csa3、Csa4、Csa5、Cas5a、Csx10、Csx11、Csy1、Csy2、Csy3、Csy4、Mad7、SpCas9、SpCas9的eSpCas9、SpCas9-HF1、HypaSpCas9、HeFSpCas9和evoSpCas9高保真变体、SaCas9、NmeCas9、CjCas9、StCas9、TdCas9、LbCas12a、AsCas12a、AacCas12b、BhCas12b v4、TnpB、FokI、dCas(D10A)、dCas(H840A)、dCas13a、dCas13b、碱基编辑器、先导编辑器、靶标引发的逆转录(TPRT)编辑器、APOBEC1、胞苷脱氨酶、腺苷脱氨酶、尿嘧啶糖基化酶抑制剂(UGI)、腺嘌呤碱基编辑器(ABE)、胞嘧啶碱基编辑器(CBE)、逆转录酶、丝氨酸整合酶、重组酶、转座酶、聚合酶、腺嘌呤到胸腺嘧啶或“ATBE”(或胸腺嘧啶到腺嘌呤或“TABE”)颠换碱基编辑器、十-十一易位甲基胞嘧啶双加氧酶(TET)、TET1、TET3、TET1CD、组蛋白乙酰转移酶p300、组蛋白甲基转移酶

SMYD3、组蛋白甲基转移酶PRDM9、H3K79甲基转移酶DOT1L、转录阻遏子或其功能部分。

[2660] 实施方案II-597.如实施方案589-596中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述基因组靶向实体和所述基因组修饰实体是单个多肽的不同结构域。

[2661] 实施方案II-598.如实施方案589-597中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述基因组靶向实体和基因组修饰实体是可操作地连接在一起的两种不同的多肽。

[2662] 实施方案II-599.如实施方案589-597中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述基因组靶向实体和基因组修饰实体是未连接在一起的两种不同的多肽。

[2663] 实施方案II-600.如实施方案589-599中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述基因组编辑复合物包含具有与至少一个靶基因座互补的靶向结构域的指导核酸,任选地其中所述指导核酸是指导RNA(gRNA)。

[2664] 实施方案II-601.如实施方案588-598中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述基因组编辑复合物包含RNA指导的核酸酶。

[2665] 实施方案II-602.如实施方案601所述的经遗传工程化的细胞,其中所述RNA指导的核酸酶包括Cas核酸酶。

[2666] 实施方案II-603.如实施方案602所述的经遗传工程化的细胞,其中所述基因组编辑复合物包括包含所述Cas核酸酶和所述gRNA的核糖核蛋白(RNP)复合物。

[2667] 实施方案II-604.如实施方案602或603所述的经遗传工程化的细胞,其中所述Cas核酸酶是II型或V型Cas蛋白。

[2668] 实施方案II-605.如实施方案602-604中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述Cas核酸酶选自由以下组成的组:Cas3、Cas4、Cas5、Cas8a、Cas8b、Cas8c、Cas9、Cas10、Cas12、Cas12a(Cpf1)、Cas12b(C2c1)、Cas12c(C2c3)、Cas12d(CasY)、Cas12e(CasX)、Cas12f(C2c10)、Cas12g、Cas12h、Cas12i、Cas12k(C2c5)、Cas13、Cas13a(C2c2)、Cas13b、Cas13c、Cas13d、C2c4、C2c8、C2c9、Cmr5、Cse1、Cse2、Csf1、Csm2、Csn2、Csx10、Csx11、Csy1、Csy2、Csy3和Mad7。

[2669] 实施方案II-606.如实施方案346-587中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述经遗传工程化的细胞是人细胞或非人动物细胞。

[2670] 实施方案II-607.如实施方案606所述的经遗传工程化的细胞,其中所述非人动物细胞是猪、牛或绵羊细胞。

[2671] 实施方案II-608.如实施方案606所述的经遗传工程化的细胞,其中所述经遗传工程化的细胞是人细胞。

[2672] 实施方案II-609.如实施方案346-608中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述经遗传工程化的细胞是来源于干细胞或祖细胞的分化的细胞。

[2673] 实施方案II-610.如实施方案609所述的经遗传工程化的细胞,其中所述干细胞是多能干细胞。

[2674] 实施方案II-611.如实施方案610所述的经遗传工程化的细胞,其中所述多能干细胞是诱导型多能干细胞(iPSC)。

[2675] 实施方案II-612.如实施方案610所述的经遗传工程化的细胞,其中所述多能干细胞是胚胎干细胞(ESC)。

[2676] 实施方案II-613.如实施方案346-612中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中

所述细胞是从供体分离的原代细胞。

[2677] 实施方案II-614.如实施方案613所述的经遗传工程化的细胞,其中在从所述供体获取所述原代细胞时所述供体是健康的且/或没有被怀疑患有疾病或疾患。

[2678] 实施方案II-615.如实施方案346-614中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述经遗传工程化的细胞是从多个供体分离的原代细胞群体的一部分。

[2679] 实施方案II-616.如实施方案346-615中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中在从所述供体获取所述原代细胞时所述多个供体是健康的且/或没有被怀疑患有疾病或疾患。

[2680] 实施方案II-617.如实施方案346-616中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细胞是胰岛细胞、β胰岛细胞、胰腺胰岛细胞、免疫细胞、B细胞、T细胞、自然杀伤(NK)细胞、自然杀伤T(NKT)细胞、巨噬细胞、内皮细胞、肌肉细胞、心脏肌肉细胞、平滑肌细胞、骨骼肌细胞、多巴胺能神经元、视网膜色素上皮细胞、视细胞、肝细胞、甲状腺细胞、皮肤细胞、胶质祖细胞、神经细胞、心脏细胞、干细胞、造血干细胞、诱导型多能干细胞(iPSC)、间充质干细胞(MSC)、胚胎干细胞(ESC)、多能干细胞(PSC)、血细胞或其组合。

[2681] 实施方案II-618.如实施方案346-617中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细胞是T细胞。

[2682] 实施方案II-619.如实施方案618所述的经遗传工程化的细胞,其中所述T细胞是CD3+T细胞、CD4+T细胞、CDS+T细胞、原初T细胞、调节T(Treg)细胞、非调节T细胞、Th1细胞、Th2细胞、Th9细胞、Th17细胞、滤泡辅助T(Tfh)细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、效应T(Teff)细胞、中央记忆T细胞、效应记忆T细胞、表达CD45RA的效应记忆T细胞(TEMRA细胞)、组织驻留记忆(Trm)细胞、虚拟记忆T细胞、先天记忆T细胞、记忆干细胞(Tse)、γδT细胞,或其组合。

[2683] 实施方案II-620.如实施方案618或619所述的经遗传工程化的细胞,其中所述T细胞是细胞毒性T细胞、辅助T细胞、记忆T细胞、调节T细胞、肿瘤浸润淋巴细胞或其组合。

[2684] 实施方案II-621.如实施方案618-620中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细胞是人T细胞。

[2685] 实施方案II-622.如实施方案618-621中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细胞是自体T细胞。

[2686] 实施方案II-623.如实施方案618-621中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述细胞是同种异体T细胞。

[2687] 实施方案II-624.如实施方案623所述的经遗传工程化的细胞,其中所述同种异体T细胞是原代T细胞。

[2688] 实施方案II-625.如623或624所述的经遗传工程化的细胞,其中所述同种异体T细胞已从胚胎干细胞(ESC)或诱导型多能干细胞(iPSC)分化而来。

[2689] 实施方案II-626.如实施方案346-625中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述经工程化的蛋白质以是与所述经遗传工程化的细胞相同的细胞类型的对照细胞中的内源性CD47蛋白的至少约1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、25倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、150倍、200倍、300倍、400倍、500倍、600倍、700倍、800倍、900倍、1000倍、1100倍、1200倍、1300倍、1400倍、1500倍、2000倍、2500倍、3000倍、3500倍、4000倍、

4500倍或5000倍的水平在所述经遗传工程化的细胞中表达。

[2690] 实施方案II-627.如实施方案346-625中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述经工程化的蛋白质以是与所述经遗传工程化的细胞相同的细胞类型的对照细胞中的内源性CD47蛋白的至少约1倍至至少约15倍的水平在所述经遗传工程化的细胞中表达。

[2691] 实施方案II-628.如实施方案346-625中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述经工程化的蛋白质以是与所述经遗传工程化的细胞相同的细胞类型的对照细胞中的内源性CD47蛋白的至少约1倍至至少约10倍的水平在所述经遗传工程化的细胞中表达。

[2692] 实施方案II-629.如实施方案346-625中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述经工程化的蛋白质以是与所述经遗传工程化的细胞相同的细胞类型的对照细胞中的内源性CD47蛋白的至少约1倍至至少约5倍的水平在所述经遗传工程化的细胞中表达。

[2693] 实施方案II-630.如实施方案346-625中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述经工程化的蛋白质以是与所述经遗传工程化的细胞相同的细胞类型的对照细胞中的内源性CD47蛋白的至少约3倍至至少约4倍的水平在所述经遗传工程化的细胞中表达。

[2694] 实施方案II-631.如实施方案346-625中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述经工程化的蛋白质是比与所述经遗传工程化的细胞相同的细胞类型的对照细胞中的内源性CD47蛋白的至少约3倍至至少约10倍的水平在所述经遗传工程化的细胞中表达。

[2695] 实施方案II-632.如实施方案346-625中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述经工程化的蛋白质以是与所述经遗传工程化的细胞相同的细胞类型的对照细胞中的内源性CD47蛋白的至少约4倍至至少约10倍的水平在所述经遗传工程化的细胞中表达。

[2696] 实施方案II-633.如实施方案346-625中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述经工程化的蛋白质以是与所述经遗传工程化的细胞相同的细胞类型的对照细胞中的内源性CD47蛋白的至少约500倍至至少约2000倍的水平在所述经遗传工程化的细胞中表达。

[2697] 实施方案II-634.如实施方案346-625中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述经工程化的蛋白质以是与所述经遗传工程化的细胞相同的细胞类型的对照细胞中的内源性CD47蛋白的至少约500倍至至少约1500倍的水平在所述经遗传工程化的细胞中表达。

[2698] 实施方案II-635.如实施方案346-625中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述经工程化的蛋白质以是与所述经遗传工程化的细胞相同的细胞类型的对照细胞中的内源性CD47蛋白的至少约900倍至至少约1000倍的水平在所述经遗传工程化的细胞中表达。

[2699] 实施方案II-636.如实施方案346-625中任一项所述的经遗传工程化的细胞,其中所述经工程化的蛋白质以是与所述经遗传工程化的细胞相同的细胞类型的对照细胞中的内源性CD47蛋白的至少约1000倍的水平在所述经遗传工程化的细胞中表达。

[2700] 实施方案II-637.一种组合物,其包含实施方案345-636中任一项所述的经遗传工程化的细胞。

[2701] 实施方案II-638.一种药物组合物,其包含(i)实施方案345-636中任一项所述的经遗传工程化的细胞,和(ii)药学上可接受的赋形剂。

[2702] 实施方案II-639.一种方法,其包括向受试者施用实施方案345-636中任一项所述

的经遗传工程化的细胞、实施方案637所述的组合物,或实施方案638所述的药物组合物。

[2703] 实施方案II-640.如实施方案639所述的方法,其中所述方法是治疗受试者的疾病的方法。

[2704] 实施方案II-641.一种包含实施方案345-636中任一项所述的经遗传工程化的细胞的细胞群体,其用于治疗受试者的疾病。

[2705] 实施方案II-642.如实施方案637所述的组合物,其用于治疗受试者的疾病。

[2706] 实施方案II-643.如实施方案638所述的药物组合物,其用于治疗受试者的疾病。

[2707] 实施方案II-644.实施方案345-636中任一项所述的经遗传修饰的细胞、实施方案56所述的细胞群体、实施方案54或56a所述的组合物,或实施方案54a或54b所述的药物组合物用于治疗受试者的疾病的用途。

[2708] 实施方案II-645.实施方案345-636中任一项所述的经遗传修饰的细胞、实施方案56所述的细胞群体、实施方案54或56a所述的组合物,或实施方案54a或54b所述的药物组合物在制造用于治疗疾病的药物中的用途。

[2709] 实施方案II-646.如前述实施方案中任一项所述的经遗传修饰的细胞、细胞群体、组合物、药物组合物或用途,其中所述疾病是癌症。

[2710] 实施方案II-647.如前述实施方案中任一项所述的经遗传修饰的细胞、细胞群体、组合物、药物组合物或用途,其中所述癌症与以下相关:CD5、CD19、CD20、CD22、CD23、CD30、CD33、CD70、κ,λ,B细胞成熟剂(BCMA)、G蛋白偶联受体家族C组5成员D(GPRC5D)、CD123、LeY、NKG2D配体、WT1、GD2、HER2、EGFR、EGFRvIII、B7H3、PSMA、PSCA、CAIX、CD171、CEA、CSPG4、EPHA2、FAP、FRα、IL-13Rα、间皮素、MUC1、MUC16、ROR1、C-Met、CD133、Ep-CAM、GPC3、HPV16-E6、IL13Ra2、MAGEA3、MAGEA4、MART1、NY-ESO-1、VEGFR2、α-叶酸受体、CD24、CD44v7/8、EGP-2、EGP-40、erb-B2、erb-B 2,3,4、FBP、胎儿乙酰胆碱e受体、GD2、GD3、HMW-MAA、IL-11Rα、KDR、Lewis Y、L1细胞粘附分子、MAGE-A1、癌胎抗原(h5T4)和/或TAG-72表达。

[2711] 实施方案II-648.如前述实施方案中任一项所述的经遗传修饰的细胞、细胞群体、组合物、药物组合物或用途,其中所述癌症是血液恶性疾病。

[2712] 实施方案II-649.如前述实施方案中任一项所述的经遗传修饰的细胞、细胞群体、组合物、药物组合物或用途,其中所述血液恶性疾病选自由以下组成的组:髓系赘生物、骨髓增生异常综合征(MDS)、骨髓增殖/骨髓增生异常综合征、急性淋巴母细胞白血病(ALL)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、急性髓系白血病(AML)、慢性骨髓性白血病(CML)、母细胞危象慢性骨髓性白血病(bcCML)、B细胞急性淋巴系白血病(B-ALL)、T细胞急性淋巴系白血病(T-ALL)、T细胞淋巴瘤和B细胞淋巴瘤。

[2713] 实施方案II-650.如前述实施方案中任一项所述的经遗传修饰的细胞、细胞群体、组合物、药物组合物或用途,其中所述癌症是实体恶性疾病。

[2714] 实施方案II-651.如前述实施方案中任一项所述的经遗传修饰的细胞、细胞群体、组合物、药物组合物或用途,其中所述实体恶性疾病选自乳腺癌、卵巢癌、结肠癌、前列腺癌、上皮癌、肾细胞癌、胰腺腺癌、宫颈癌、结直肠癌、胶质母细胞瘤、横纹肌肉瘤、神经母细胞瘤、黑色素瘤、尤文氏肉瘤、骨肉瘤、间皮瘤和腺癌。

[2715] 实施方案II-652.如前述实施方案中任一项所述的经遗传修饰的细胞、细胞群体、组合物、药物组合物或用途,其中所述疾病是自身免疫性疾病。

[2716] 实施方案II-653.如前述实施方案中任一项所述的经遗传修饰的细胞、细胞群体、组合物、药物组合物或用途,其中所述自身免疫性疾病选自由以下组成的组:狼疮、全身性红斑狼疮、类风湿性关节炎、银屑病、银屑病关节炎、多发性硬化症、克罗恩氏病、溃疡性结肠炎、阿狄森氏病(Addison's disease)、格雷夫氏病、舍格伦综合征(Sjögren's syndrome)、桥本氏甲状腺炎和乳糜泻。

[2717] 实施方案II-654.如前述实施方案中任一项所述的经遗传修饰的细胞、前述实施方案中任一项所述的细胞群体、前述实施方案中任一项所述的组合物、前述实施方案中任一项所述的药物组合物,或前述实施方案中任一项所述的用途,其中所述疾病是糖尿病。

[2718] 实施方案II-655.如前述实施方案中任一项所述的经遗传修饰的细胞、细胞群体、组合物、药物组合物或用途,其中所述糖尿病选自由以下组成的组:I型糖尿病、II型糖尿病、前驱糖尿病和妊娠期糖尿病。

[2719] 实施方案II-656.如前述实施方案中任一项所述的经遗传修饰的细胞、细胞群体、组合物、药物组合物或用途,其中所述疾病是神经性疾病。

[2720] 实施方案II-657.如前述实施方案中任一项所述的经遗传修饰的细胞、细胞群体、组合物、药物组合物或用途,其中所述神经性疾病选自由以下组成的组:全身僵硬症、癫痫、脑炎、脑膜炎、偏头痛、亨廷顿病、阿尔茨海默病、帕金森病、佩利扎伊斯-梅茨巴赫氏病和多发性硬化症。

[2721] 实施方案II-658.一种制造包含核酸构建体的经遗传工程化的细胞的方法,所述方法包括:

[2722] 将实施方案1-184中任一项所述的核酸构建体递送至细胞,从而制成经遗传工程化的细胞。

[2723] 实施方案II-659.如实施方案658所述的方法,其中所述核酸构建体包含编码所述经工程化的蛋白质的第一转基因。

[2724] 实施方案II-660.如实施方案658或659所述的方法,其中所述方法包括将编码所述经工程化的蛋白质的第一转基因插入到所述细胞基因组中的第一插入位点中。

[2725] 实施方案II-661.如实施方案660所述的方法,其中所述第一插入位点是T细胞受体(TCR)基因座。

[2726] 实施方案II-662.如实施方案661所述的方法,其中所述TCR基因座是或者包括:TRAC基因座、TRBC1基因座或TRBC2基因座。

[2727] 实施方案II-663.如实施方案661所述的方法,其中所述第一插入位点是β2微球蛋白(B2M)基因座。

[2728] 实施方案II-664.如实施方案661所述的方法,其中所述第一插入位点是II类反式活化因子(CIITA)基因座。

[2729] 实施方案II-665.如实施方案661所述的方法,其中所述第一插入位点是安全港基因座。

[2730] 实施方案II-666.如实施方案665所述的方法,其中所述安全港基因座是AAVS1、ABO、CCR5、CLYBL、CXCR4、F3、FUT1、HMGB1、KDM5D、LRP1、MICA、MICB、RHD、ROSA26或SHS231基因座。

[2731] 实施方案II-667.如实施方案660-664中任一项所述的方法,其中所述第一插入位

点是外显子。

[2732] 实施方案II-668.如实施方案660-664中任一项所述的方法,其中所述第一插入位点是内含子。

[2733] 实施方案II-669.如实施方案660-664中任一项所述的方法,其中所述第一插入位点位于内含子和外显子之间。

[2734] 实施方案II-670.如实施方案660-664中任一项所述的方法,其中所述第一插入位点位于调控区中。

[2735] 实施方案II-671.如实施方案660-670中任一项所述的方法,其中插入步骤包括使用基因疗法载体、转座酶、慢病毒载体、逆转录病毒、融合体、PiggyBac转座子、睡美人(SB11)转座子、Mos1转座子或Tol2转座子插入。

[2736] 实施方案II-672.如实施方案660-671中任一项所述的方法,其中插入步骤包括使用慢病毒载体插入。

[2737] 实施方案II-673.如实施方案660-670中任一项所述的方法,其中插入步骤包括使用基因组修饰蛋白的同源性定向修复(HDR)介导的插入。

[2738] 实施方案II-674.如实施方案658-673中任一项所述的方法,其进一步包括向所述细胞中引入基因组编辑复合物。

[2739] 实施方案II-675.如实施方案674所述的方法,其中所述基因组编辑复合物包含基因组靶向实体和基因组修饰实体。

[2740] 实施方案II-676.如实施方案675所述的方法,其中所述基因组靶向实体将所述基因组编辑复合物定位到安全港位点,任选地其中所述基因组靶向实体是核酸指导的靶向实体。

[2741] 实施方案II-677.如实施方案675或676所述的方法,其中所述基因组靶向实体选自由以下组成的组:序列特异性核酸酶、核酸可编程DNA结合蛋白、RNA指导的核酸酶、包含Cas核酸酶和指导RNA的RNA指导的核酸酶(CRISPR-Cas组合)、包含gRNA和Cas核酸酶的核糖核蛋白(RNP)复合物、归巢核酸内切酶、锌指核酸酶(ZF)核酸结合实体、转录活化因子样效应物(TALE)核酸结合实体、大范围核酸酶、Cas核酸酶、核心Cas蛋白、归巢核酸内切酶、核酸内切酶缺陷型Cas蛋白、无酶活性的Cas蛋白、CRISPR相关转座酶(CAST)、II型或V型Cas蛋白,或其功能部分。

[2742] 实施方案II-678.如实施方案675-677中任一项所述的方法,其中所述基因组靶向实体选自由以下组成的组:Cas1、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8a、Cas8b、Cas8c、Cas9、Cas10、Cas12、Cas12a(Cpf1)、Cas12b(C2c1)、Cas12c(C2c3)、Cas12d(CasY)、Cas12e(CasX)、Cas12f(C2c10)、Cas12g、Cas12h、Cas12i、Cas12k(C2c5)、Cas13、Cas13a(C2c2)、Cas13b、Cas13c、Cas13d、C2c4、C2c8、C2c9、Cmr1、Cmr2、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csd1、Csd2、Cas5d、Cse1、Cse2、Cse3、Cse4、Cas5e、Csf1、Csm1、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csn1、Csn2、Cst1、Cst2、Cas5t、Csh1、Csh2、Cas5h、Csa1、Csa2、Csa3、Csa4、Csa5、Cas5a、Csx10、Csx11、Csy1、Csy2、Csy3、Csy4、Mad7、SpCas9、SpCas9的eSpCas9、SpCas9-HF1、HypaSpCas9、HeFSpCas9和evoSpCas9高保真变体、SaCas9、NmeCas9、CjCas9、StCas9、TdCas9、LbCas12a、AsCas12a、AacCas12b、BhCas12b v4、TnpB、dCas(D10A)、dCas(H840A)、dCas13a、dCas13b,或其功能部分。

[2743] 实施方案II-679.如实施方案675-678中任一项所述的方法,其中所述基因组修饰实体对所述靶基因座进行切割、脱氨基、切口、聚合、询问、整合、切割、解旋、断裂、改变、甲基化、去甲基化,或以其他方式使所述靶基因座不稳定。

[2744] 实施方案II-680.如实施方案675-679中任一项所述的方法,其中所述基因组修饰实体包含重组酶、整合酶、转座酶、核酸内切酶、核酸外切酶、切口酶、解旋酶、DNA聚合酶、RNA聚合酶、逆转录酶、脱氨酶、翻转酶、甲基化酶、脱甲基酶、乙酰化酶、核酸修饰蛋白、RNA修饰蛋白、DNA修饰蛋白、Argonaute蛋白、表观遗传修饰蛋白、组蛋白修饰蛋白,或其功能部分。

[2745] 实施方案II-681.如实施方案675-680中任一项所述的方法,其中所述基因组修饰实体选自由以下组成的组:序列特异性核酸酶、核酸可编程DNA结合蛋白、RNA指导的核酸酶、包含Cas核酸酶和指导RNA的RNA指导的核酸酶(CRISPR-Cas组合)、包含gRNA和Cas核酸酶的核糖核蛋白(RNP)复合物、归巢核酸内切酶、锌指核酸酶(ZFN)、转录活化因子样效应物核酸酶(TALEN)、大范围核酸酶、Cas核酸酶、核心Cas蛋白、TnpB核酸酶、核酸内切酶缺陷型Cas蛋白、无酶活性的Cas蛋白、CRISPR相关转座酶(CAST)、II型或V型Cas蛋白、碱基编辑、先导编辑、经由位点特异性靶向元件的可编程添加(PASTE),或其功能部分。

[2746] 实施方案II-682.如实施方案675-681中任一项所述的方法,其中所述基因组修饰实体选自由以下组成的组:Cas1、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8a、Cas8b、Cas8c、Cas9、Cas10、Cas12、Cas12a(Cpf1)、Cas12b(C2c1)、Cas12c(C2c3)、Cas12d(CasY)、Cas12e(CasX)、Cas12f(C2c10)、Cas12g、Cas12h、Cas12i、Cas12k(C2c5)、Cas13、Cas13a(C2c2)、Cas13b、Cas13c、Cas13d、C2c4、C2c8、C2c9、Cmr1、Cmr2、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csd1、Csd2、Cas5d、Cse1、Cse2、Cse3、Cse4、Cas5e、Csf1、Csm1、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csn1、Csn2、Cst1、Cst2、Cas5t、Csh1、Csh2、Cas5h、Csa1、Csa2、Csa3、Csa4、Csa5、Cas5a、Csx10、Csx11、Csy1、Csy2、Csy3、Csy4、Mad7、SpCas9、SpCas9的eSpCas9、SpCas9-HF1、HypaSpCas9、HeFSpCas9和evoSpCas9高保真变体、SaCas9、NmeCas9、CjCas9、StCas9、TdCas9、LbCas12a、AsCas12a、AacCas12b、BhCas12b v4、TnpB、FokI、dCas(D10A)、dCas(H840A)、dCas13a、dCas13b、碱基编辑器、先导编辑器、靶标引发的逆转录(TPRT)编辑器、APOBEC1、胞苷脱氨酶、腺苷脱氨酶、尿嘧啶糖基化酶抑制剂(UGI)、腺嘌呤碱基编辑器(ABE)、胞嘧啶碱基编辑器(CBE)、逆转录酶、丝氨酸整合酶、重组酶、转座酶、聚合酶、腺嘌呤到胸腺嘧啶或“ATBE”(或胸腺嘧啶到腺嘌呤或“TABE”)颠换碱基编辑器、十-十一易位甲基胞嘧啶双加氧酶(TET)、TET1、TET3、TET1CD、组蛋白乙酰转移酶p300、组蛋白甲基转移酶SMYD3、组蛋白甲基转移酶PRDM9、H3K79甲基转移酶DOT1L、转录阻遏子或其功能部分。

[2747] 实施方案II-683.如实施方案675-682中任一项所述的方法,其中所述基因组靶向实体和所述基因组修饰实体是单个多肽的不同结构域。

[2748] 实施方案II-684.如实施方案675-683中任一项所述的方法,其中所述基因组靶向实体和基因组修饰实体是可操作地连接在一起的两种不同的多肽。

[2749] 实施方案II-685.如实施方案675-683中任一项所述的方法,其中所述基因组靶向实体和基因组修饰实体是未连接在一起的两种不同的多肽。

[2750] 实施方案II-686.如实施方案674-685中任一项所述的方法,其中所述基因组编辑复合物包含具有与基因组安全港位点内的至少一个序列互补的靶向结构域的指导核酸,任

选地其中所述指导核酸是指导RNA(gRNA)。

[2751] 实施方案II-687.如实施方案674-686中任一项所述的方法,其中所述基因组编辑复合物包含RNA指导的核酸酶。

[2752] 实施方案II-688.如实施方案687所述的方法,其中所述RNA指导的核酸酶包括Cas核酸酶。

[2753] 实施方案II-689.如实施方案688所述的方法,其中所述基因组编辑复合物包括包含所述Cas核酸酶和所述gRNA的核糖核蛋白(RNP)复合物。

[2754] 实施方案II-690.如实施方案688或689所述的方法,其中所述Cas核酸酶是II型或V型Cas蛋白。

[2755] 实施方案II-691.如实施方案688-690中任一项所述的方法,其中所述Cas核酸酶选自由以下组成的组:Cas3、Cas4、Cas5、Cas8a、Cas8b、Cas8c、Cas9、Cas10、Cas12、Cas12a(Cpf1)、Cas12b(C2c1)、Cas12c(C2c3)、Cas12d(CasY)、Cas12e(CasX)、Cas12f(C2c10)、Cas12g、Cas12h、Cas12i、Cas12k(C2c5)、Cas13、Cas13a(C2c2)、Cas13b、Cas13c、Cas13d、C2c4、C2c8、C2c9、Cmr5、Cse1、Cse2、Csf1、Csm2、Csn2、Csx10、Csx11、Csy1、Csy2、Csy3和Mad7。

[2756] 实施方案II-692.如实施方案678所述的方法,其中所述gRNA包含互补区,其中所述互补区包含与基因座内的靶核酸序列互补的核酸序列,并且其中所述靶核酸序列包含所述插入位点。

[2757] 实施方案II-693.如实施方案692所述的方法,其中所述基因座是TCR基因座。

[2758] 实施方案II-694.如实施方案692所述的方法,其中所述基因座是B2M基因座。

[2759] 实施方案II-695.如实施方案692所述的方法,其中所述基因座是CIITA基因座。

[2760] 实施方案II-696.如实施方案660-695中任一项所述的方法,其中所述第一插入位点距离原型间隔区相邻基序(PAM)序列25个或更少的核苷酸,其中所述PAM序列为ngg、nag、ngrrt、ngrrn、nnnngatt、nnnnryac、nnagaaw、naaaac、tttv、ttn、attn、tttn、gttn或yttn,并且其中:

[2761] (i)r=a或g,

[2762] (ii)y=c或t,

[2763] (iii)w=a或t,

[2764] (iv)v=a或c或g,且

[2765] (v)n=a、c、t或g。

[2766] 实施方案II-697.如实施方案660-696中任一项所述的方法,其中插入步骤包括使用SpCas9的同源性定向修复(HDR)介导的插入并且所述PAM是ngg或nag,其中n=a、c、t或g。

[2767] 实施方案II-698.如实施方案660-696中任一项所述的方法,其中插入步骤包括使用SaCas9的同源性定向修复(HDR)介导的插入并且所述PAM是ngrrt或ngrrn,其中:

[2768] (i)r=a或g,且

[2769] (ii)n=a、c、t或g。

[2770] 实施方案II-699.如实施方案660-696中任一项所述的方法,其中插入步骤包括使用NmeCas9的同源性定向修复(HDR)介导的插入并且所述PAM是nnnngatt,其中n=a、c、t或g。

[2771] 实施方案II-700.如实施方案660-696中任一项所述的方法,其中插入步骤包括使用CjCas9的同源性定向修复(HDR)介导的插入并且所述PAM是nnnnryac,其中:

[2772] (i)r=a或g,

[2773] (ii)y=c或t,且

[2774] (iii)n=a、c、t或g。

[2775] 实施方案II-701.如实施方案660-696中任一项所述的方法,其中插入步骤包括使用StCas9的同源性定向修复(HDR)介导的插入并且所述PAM是nnagaaw,其中:

[2776] (i)w=a或t,且

[2777] (ii)n=a、c、t或g。

[2778] 实施方案II-702.如实施方案660-696中任一项所述的方法,其中插入步骤包括使用TdCas9的同源性定向修复(HDR)介导的插入并且所述PAM是naaaac,其中n=a、c、t或g。

[2779] 实施方案II-703.如实施方案660-696中任一项所述的方法,其中插入步骤包括使用LbCas12a的同源性定向修复(HDR)介导的插入并且所述PAM是tttv,其中v=a或c或g。

[2780] 实施方案II-704.如实施方案660-696中任一项所述的方法,其中插入步骤包括使用AsCas12a的同源性定向修复(HDR)介导的插入并且所述PAM是tttv,其中v=a或c或g。

[2781] 实施方案II-705.如实施方案660-696中任一项所述的方法,其中插入步骤包括使用AacCas12b的同源性定向修复(HDR)介导的插入并且所述PAM是ttn,其中n=a、c、t或g。

[2782] 实施方案II-706.如实施方案660-696中任一项所述的方法,其中插入步骤包括使用BhCas12b的同源性定向修复(HDR)介导的插入并且所述PAM是attn.、tttn或gttn,其中n=a、c、t或g。

[2783] 实施方案II-707.如实施方案660-696中任一项所述的方法,其中插入步骤包括使用MAD7(ErCas12a)的同源性定向修复(HDR)介导的插入并且所述PAM是yttn,其中:

[2784] (i)y=c或t,且

[2785] (ii)n=a、c、t或g。

[2786] 实施方案II-708.如实施方案660、678或697-707中任一项所述的方法,其中使用定点核酸酶的同源性定向修复(HDR)介导的插入以等于或大于使用慢病毒的HDR插入的HDR效率进行。

[2787] 实施方案II-709.如实施方案660-673、675、676或677中任一项所述的方法,其中插入步骤包括使用ZFN的同源性定向修复(HDR)介导的插入。

[2788] 实施方案II-710.如实施方案660-673、675、676、677或709中任一项所述的方法,其中所述第一插入位点距离锌指结合序列25个或更少的核苷酸。

[2789] 实施方案II-711.如实施方案660-673、675、676或677中任一项所述的方法,其中插入步骤包括使用TALEN的同源性定向修复(HDR)介导的插入。

[2790] 实施方案II-712.如实施方案660-673、675、676、677或711中任一项所述的方法,其中所述第一插入位点距离转录活化因子样效应物(TALE)结合序列25个或更少的核苷酸。

[2791] 实施方案II-713.如实施方案660-675或677中任一项所述的方法,其中插入步骤包括使用指导RNA(gRNA)和TnpB多肽的同源性定向修复(HDR)介导的插入。

[2792] 实施方案II-714.如实施方案713所述的方法,其中所述gRNA包含互补区,

[2793] 其中所述互补区包含与基因座内的靶核酸序列互补的核酸序列,并且其中所述靶

核酸序列包含所述插入位点。

[2794] 实施方案II-715.如实施方案714所述的方法,其中所述基因座是TCR基因座。

[2795] 实施方案II-716.如实施方案714所述的方法,其中所述基因座是B2M基因座。

[2796] 实施方案II-717.如实施方案714所述的方法,其中所述基因座是CIITA基因座。

[2797] 实施方案II-718.如实施方案714所述的方法,其中所述基因座是安全港基因座。

[2798] 实施方案II-719.如实施方案718所述的方法,其中所述安全港基因座是AAVS1、ABO、CCR5、CLYBL、CXCR4、F3、FUT1、HMGB1、KDM5D、LRP1、MICA、MICB、RHD、ROSA26或SHS231基因座。

[2799] 实施方案II-720.如实施方案713-719中任一项所述的方法,其中所述插入位点距离靶标相邻基序(TAM)序列25个核苷酸或更少核苷酸,其中所述TAM序列是tca、tcac、tcag、tcat、tcaa、ttcan、ttcaa、ttcag或ttgat,并且其中:

[2800] (i)n=a、c、t或g。

[2801] 实施方案II-721.如实施方案713-720中任一项所述的方法,其中插入步骤包括使用TnpB多肽的同源性定向修复(HDR)介导的插入并且所述TAM是tca。

[2802] 实施方案II-722.如实施方案713-720中任一项所述的方法,其中插入步骤包括使用TnpB多肽的同源性定向修复(HDR)介导的插入并且所述TAM是tcac。

[2803] 实施方案II-723.如实施方案713-720中任一项所述的方法,其中插入步骤包括使用TnpB多肽的同源性定向修复(HDR)介导的插入并且所述TAM是tcag。

[2804] 实施方案II-724.如实施方案713-720中任一项所述的方法,其中插入步骤包括使用TnpB多肽的同源性定向修复(HDR)介导的插入并且所述TAM是tcat。

[2805] 实施方案II-725.如实施方案713-720中任一项所述的方法,其中插入步骤包括使用TnpB多肽的同源性定向修复(HDR)介导的插入并且所述TAM是tcaa。

[2806] 实施方案II-726.如实施方案713-720中任一项所述的方法,其中插入步骤包括使用TnpB多肽的同源性定向修复(HDR)介导的插入并且所述TAM是ttcan,其中n=a、c、t或g。

[2807] 实施方案II-727.如实施方案713-720中任一项所述的方法,其中插入步骤包括使用TnpB多肽的同源性定向修复(HDR)介导的插入并且所述TAM是ttcaa。

[2808] 实施方案II-728.如实施方案713-720中任一项所述的方法,其中插入步骤包括使用TnpB多肽的同源性定向修复(HDR)介导的插入并且所述TAM是ttcag。

[2809] 实施方案II-729.如实施方案713-720中任一项所述的方法,其中插入步骤包括使用TnpB多肽的同源性定向修复(HDR)介导的插入并且所述TAM是ttgat。

[2810] 实施方案II-730.如实施方案658或659所述的方法,其中将所述核酸构建体递送至所述细胞的步骤包括利用逆转录病毒或腺相关病毒(AAV)载体进行病毒转导。

[2811] 实施方案II-731.如实施方案730所述的方法,其中所述逆转录病毒是或者包括莫洛尼鼠白血病病毒(M-MuLV)、莫洛尼鼠肉瘤病毒(MoMSV)、哈维鼠肉瘤病毒(HaMuSV)、鼠乳腺肿瘤病毒(MuMTV)、长臂猿白血病病毒(GaLV)、猫白血病病毒(FLV)、泡沫病毒(spumavirus)、弗瑞德鼠(Friend murine)白血病病毒、鼠干细胞病毒(MSCV)、劳斯肉瘤病毒(RSV)、慢病毒、γ逆转录病毒、ε逆转录病毒、α逆转录病毒、β逆转录病毒、δ逆转录病毒或泡沫逆转录病毒。

[2812] 实施方案II-732.如实施方案730所述的方法,其中所述AAV载体是AAV6载体或

AAV9载体。

[2813] 实施方案II-733.如实施方案660、661、662、673-693、696-715或720-732中任一项所述的方法,其中在所述位于TCR基因座处的插入位点处的编码所述经工程化的蛋白质的所述第一转基因降低功能性TCR的表达。

[2814] 实施方案II-734.如实施方案660、661、662、673-693、696-715或720-733中任一项所述的方法,其中在所述位于TCR基因座处的插入位点处的编码所述经工程化的蛋白质的所述第一转基因破坏功能性TCR的表达。

[2815] 实施方案II-735.如实施方案660、661、662、673-693、696-715或720-732中任一项所述的方法,其中在所述位于B2M基因座处的插入位点处的编码所述经工程化的蛋白质的所述第一转基因降低功能性B2M的表达。

[2816] 实施方案II-736.如实施方案660、661、662、673-693、696-715或720-732,或735中任一项所述的方法,其中在所述位于B2M基因座处的插入位点处的编码所述经工程化的蛋白质的所述第一转基因降低功能性MHC I分子的表达。

[2817] 实施方案II-737.如实施方案660、661、662、673-693、696-715或720-732,或735-736中任一项所述的方法,其中在所述位于B2M基因座的插入位点处的编码所述经工程化的蛋白质的所述第一转基因破坏功能性B2M的表达。

[2818] 实施方案II-738.如实施方案660、661、662、673-693、696-715或720-732,或735-737中任一项所述的方法,其中在所述位于B2M基因座处的插入位点处的编码所述经工程化的蛋白质的所述第一转基因破坏功能性MHC I分子的表达。

[2819] 实施方案II-739.如实施方案660、661、662、673-693、696-715或720-732中任一项所述的方法,其中在所述位于CIITA基因座处的插入位点处的编码所述经工程化的蛋白质的所述第一转基因降低功能性CIITA的表达。

[2820] 实施方案II-740.如实施方案660、661、662、673-693、696-715或720-732,或739中任一项所述的方法,其中在所述位于CIITA基因座处的插入位点处的编码所述经工程化的蛋白质的所述第一转基因降低功能性MHC II分子的表达。

[2821] 实施方案II-741.如实施方案660、661、662、673-693、696-715或720-732,或739-740中任一项所述的方法,其中在所述位于CIITA基因座处的插入位点处的编码所述经工程化的蛋白质的所述第一转基因破坏功能性CIITA的表达。

[2822] 实施方案II-742.如实施方案660、661、662、673-693、696-715或720-732,或739-741中任一项所述的方法,其中在所述位于CIITA基因座处的插入位点处的编码所述经工程化的蛋白质的所述第一转基因破坏功能性MHC II分子的表达。

[2823] 实施方案II-743.如实施方案658-742中任一项所述的方法,其中所述细胞包含一种或多种修饰,所述一种或多种修饰使以下的一个或多个等位基因失活或破坏:

[2824] (a)一种或多种主要组织相容性复合物(MHC)I类分子或调控所述一种或多种MHC I类分子的表达的一种或多种分子,和/或

[2825] (b)一种或多种MHC II类分子或调控所述一种或多种MHC II类分子的表达的一种或多种分子。

[2826] 实施方案II-744.如实施方案658-743中任一项所述的方法,其中所述细胞包含一种或多种修饰,所述一种或多种修饰使一种或多种MHC I类分子或调控所述一种或多种MHC

I类分子的表达的一种或多种分子的一个或多个等位基因失活或破坏。

[2827] 实施方案II-745.如实施方案658-744中任一项所述的方法,其中所述细胞包含一种或多种修饰,所述一种或多种修饰使一种或多种MHC II类分子或调控所述一种或多种MHC II类分子的表达的一种或多种分子的一个或多个等位基因失活或破坏。

[2828] 实施方案II-746.如实施方案658-745中任一项所述的方法,其中所述细胞包含一种或多种修饰,所述一种或多种修饰使以下的一个或多个等位基因失活或破坏:

[2829] (a)一种或多种MHC I类分子或调控所述一种或多种MHC I类分子的表达的一种或多种分子,和

[2830] (b)一种或多种MHC II类分子或调控所述一种或多种MHC II类分子的表达的一种或多种分子。

[2831] 实施方案II-747.如实施方案743-746中任一项所述的方法,其中所述一种或多种修饰降低所述一种或多种MHC I类分子的细胞表面蛋白表达。

[2832] 实施方案II-748.如实施方案743-747中任一项所述的方法,其中所述一种或多种修饰降低所述一种或多种MHC I类分子的细胞表面运输。

[2833] 实施方案II-749.如实施方案743-748中任一项所述的方法,其中所述一种或多种修饰降低所述一种或多种MHC I类分子的功能,任选地其中所述功能是抗原呈递。

[2834] 实施方案II-750.如实施方案743-749中任一项所述的v,其中所述一种或多种MHC I类分子是一种或多种人白细胞抗原(HLA)I类分子。

[2835] 实施方案II-751.如实施方案750所述的方法,其中所述一种或多种HLA I类分子选自由HLA-A、HLA-B和HLA-C组成的组。

[2836] 实施方案II-752.如实施方案743-751中任一项所述的方法,其中所述的调控所述一种或多种MHC I类分子的表达的一种或多种分子选自由B2M、NLRC5和TAP1组成的组。

[2837] 实施方案II-753.如实施方案743-752中任一项所述的方法,其中所述一种或多种修饰降低所述一种或多种MHC II类分子的细胞表面蛋白表达。

[2838] 实施方案II-754.如实施方案743-753中任一项所述的方法,其中所述一种或多种修饰降低所述一种或多种MHC II类分子的细胞表面运输。

[2839] 实施方案II-755.如实施方案743-754中任一项所述的方法,其中所述一种或多种修饰降低所述一种或多种MHC II类分子的功能,任选地其中所述功能是抗原呈递。

[2840] 实施方案II-756.如实施方案743-755中任一项所述的方法,其中所述一种或多种MHC II类分子是一种或多种人白细胞抗原(HLA)II类分子。

[2841] 实施方案II-757.如实施方案756所述的方法,其中所述一种或多种HLA II类分子选自由HLA-DP、HLA-DQ,和/或HLA-DR组成的组。

[2842] 实施方案II-758.如实施方案743-757中任一项所述的方法,其中所述的调控所述一种或多种MHC II类分子的表达的一种或多种分子选自由CIITA和CD74组成的组。

[2843] 实施方案II-759.如实施方案660-758中任一项所述的方法,其中在所述位于安全港基因座处的插入位点处的编码所述经工程化的蛋白质的所述第一转基因破坏功能性AAVS1、ABO、CCR5、CLYBL、CXCR4、F3、FUT1、HMGB1、KDM5D、LRP1、MICA、MICB、RHD、ROSA26或SHS231的表达。

[2844] 实施方案II-760.如实施方案660-758中任一项所述的方法,其中在所述位于安全

港基因座处的插入位点处的编码所述经工程化的蛋白质的所述第一转基因破坏功能性AAVS1、ABO、CCR5、CLYBL、CXCR4、F3、FUT1、HMGB1、KDM5D、LRP1、MICA、MICB、RHD、ROSA26或SHS231分子的表达。

[2845] 实施方案II-761.如实施方案658-760中任一项所述的方法,其中所述经遗传工程化的细胞具有所述经工程化的蛋白质的细胞表面表达。

[2846] 实施方案II-762.如实施方案658-761中任一项所述的方法,其中所述核酸构建体进一步包含编码致耐受因子的第二转基因。

[2847] 实施方案II-763.如实施方案762所述的方法,其中所述方法进一步包括将所述第二转基因插入到所述细胞的基因组中的第二插入位点中。

[2848] 实施方案II-764.如实施方案762所述的方法,其中所述致耐受因子是或者包括A20/TNFAIP3、B2M-HLA-E、CD16、CD16 Fc受体、CD24、CD27、CD35、CD39、CD46、CD47、CD52、CD55、CD59、CD64、CD200、CCL21、CCL22、CTLA4-Ig、C1抑制剂、CR1、DUX4、FASL、HLA-C、HLA-E、HLA-E重链、HLA-F、HLA-G、H2-M3、IDO1、IL-10、IL15-RF、IL-35、IL-39、MANF、Mfge8、PD-L1或Serpinb9。

[2849] 实施方案II-765.如实施方案762-764中任一项所述的方法,其中编码所述致耐受因子的所述第二转基因被插入在位于TCR基因座处的第二插入位点处。

[2850] 实施方案II-766.如实施方案762-764中任一项所述的方法,其中编码所述致耐受因子的所述第二转基因被插入在位于B2M基因座处的第二插入位点处。

[2851] 实施方案II-767.如实施方案762-121b764中任一项所述的方法,其中编码所述致耐受因子的所述第二转基因被插入在位于CIITA基因座处的第二插入位点处。

[2852] 实施方案II-768.如实施方案762-764中任一项所述的方法,其中编码所述致耐受因子的所述第二转基因被插入在位于安全港基因座处的第二插入位点处。

[2853] 实施方案II-769.如实施方案768所述的方法,其中所述安全港基因座是AAVS1、ABO、CCR5、CLYBL、CXCR4、F3、FUT1、HMGB1、KDM5D、LRP1、MICA、MICB、RHD、ROSA26或SHS231基因座。

[2854] 实施方案II-770.如实施方案762-769中任一项所述的方法,其中所述经遗传工程化的细胞具有所述致耐受因子的细胞表面表达。

[2855] 实施方案II-771.如实施方案658-770中任一项所述的方法,其中所述核酸构建体进一步包含编码嵌合抗原受体(CAR)的第三转基因。

[2856] 实施方案II-772.如实施方案771所述的方法,其中所述方法进一步包括将所述第三转基因插入到所述细胞的基因组中的第三插入位点中。

[2857] 实施方案II-773.如实施方案771所述的方法,其中所述CAR是或者包括CD5特异性CAR、CD19特异性CAR、CD20特异性CAR、CD22特异性CAR、CD23特异性CAR、CD30特异性CAR、CD33特异性CAR、CD38特异性CAR、CD70特异性CAR、CD123特异性CAR、CD138特异性CAR、κ,λ,B细胞成熟剂(BCMA)特异性CAR、G蛋白偶联受体家族C组5成员D(GPRC5D)特异性CAR、CD123特异性CAR、LeY特异性CAR、NKG2D配体特异性CAR、WT1特异性CAR、GD2特异性CAR、HER2特异性CAR、EGFR特异性CAR、EGFRvIII特异性CAR、B7H3特异性CAR、PSMA特异性CAR、PSCA特异性CAR、CAIX特异性CAR、CD171特异性CAR、CEA特异性CAR、CSPG4特异性CAR、EPHA2特异性CAR、FAP特异性CAR、FRα特异性CAR、IL-13Rα特异性CAR、间皮素特异性CAR、MUC1特异性CAR、

MUC16特异性CAR、ROR1特异性CAR、C-Met特异性CAR、CD133特异性CAR、Ep-CAM特异性CAR、GPC3特异性CAR、HPV16-E6特异性CAR、IL13Ra2特异性CAR、MAGEA3特异性CAR、MAGEA4特异性CAR、MART1特异性CAR、NY-ESO-1特异性CAR、VEGFR2特异性CAR、α-叶酸受体特异性CAR、CD24特异性CAR、CD44v7/8特异性CAR、EGP-2特异性CAR、EGP-40特异性CAR、erb-B2特异性CAR、erb-B 2,3,4特异性CAR、FBP特异性CAR、胎儿乙酰胆碱e受体特异性CAR、GD2特异性CAR、GD3特异性CAR、HMW-MAA特异性CAR、IL-11Rα特异性CAR、KDR特异性CAR、Lewis Y特异性CAR、L1细胞粘附分子特异性CAR、MAGE-A1特异性CAR、癌胚抗原(h5T4)特异性CAR、TAG-72特异性CAR或CD19/CD22双特异性CAR。

[2858] 实施方案II-774.如实施方案771-773中任一项所述的方法,其中所述CAR是或者包括CD19特异性CAR、CD20特异性CAR、CD22特异性CAR、CD38特异性CAR、CD123特异性CAR、CD138特异性CAR、BCMA特异性CAR或CD19/CD22双特异性CAR。

[2859] 实施方案II-775.如实施方案771-774中任一项所述的方法,其中所述经遗传工程化的细胞具有所述CAR的细胞表面表达。

[2860] 实施方案II-776.如实施方案658-770中任一项所述的方法,其中所述核酸构建体进一步包含编码嵌合自身抗原受体(CAAR)的第三转基因。

[2861] 实施方案II-777.如实施方案776所述的方法,其中所述方法进一步包括将所述第三转基因插入到所述细胞的基因组中的第三插入位点中。

[2862] 实施方案II-778.如实施方案776所述的方法,其中所述CAAR包含选自由胰腺β细胞抗原、滑膜关节抗原、髓鞘碱性蛋白、蛋白脂质蛋白、髓鞘少突糖蛋白、MuSK、角质形成细胞粘附蛋白桥粒芯糖蛋白3(Dsg3)、Ro-RNP复合物、La抗原、髓过氧化物酶、蛋白酶3、心磷脂、瓜氨酸化蛋白、氨基甲酰化蛋白和基膜胶原蛋白α3链组成的组的抗原。

[2863] 实施方案II-779.如实施方案776-778中任一项所述的方法,其中所述经遗传工程化的细胞具有所述CAAR的细胞表面表达。

[2864] 实施方案II-780.如实施方案658-770中任一项所述的方法,其中所述核酸构建体进一步包含编码B细胞自身抗体受体(BAR)的第三转基因。

[2865] 实施方案II-781.如实施方案780所述的方法,其中所述方法进一步包括将所述第三转基因插入到所述细胞的基因组中的第三插入位点中。

[2866] 实施方案II-782.如实施方案780所述的方法,其中所述经遗传工程化的细胞具有所述BAR的细胞表面表达。

[2867] 实施方案II-783.如实施方案771-782中任一项所述的方法,其中所述第三转基因被插入在安全港基因座处。

[2868] 实施方案II-784.如实施方案771-783中任一项所述的方法,其中所述第三转基因被插入在TRAC基因座、TRBC1基因座、TRBC2基因座、B2M基因座、CIITA基因座、MICA基因座、MICB基因座或安全港基因座处。

[2869] 实施方案II-785.如实施方案771-784中任一项所述的方法,其中所述第三转基因被插入在AAVS1基因座、ABO基因座、CCR5基因座、CLYBL基因座、CXCR4基因座、F3基因座、FUT1基因座、HMGB1基因座、KDM5D基因座、LRP1基因座、RHD基因座、ROSA26基因座或SHS231基因座处。

[2870] 实施方案II-786.如实施方案658-785中任一项所述的方法,其中所述第一转基因

和所述第二转基因被插入到相同的插入位点中。

[2871] 实施方案II-787.如实施方案658-768或780-785中任一项所述的方法,其中所述第一转基因和所述第三转基因被插入到相同的插入位点中。

[2872] 实施方案II-788.如实施方案762-785中任一项所述的方法,其中所述第二转基因和所述第三转基因被插入到相同的插入位点中。

[2873] 实施方案II-789.如实施方案658-785中任一项所述的方法,其中所述第一转基因、所述第二转基因和所述第三转基因被插入到相同的插入位点中。

[2874] 实施方案II-790.如实施方案658-789中任一项所述的方法,其中所述第一转基因、所述第二转基因和所述第三转基因由三个单独的构建体编码。

[2875] 实施方案II-791.如实施方案658-789中任一项所述的方法,其中所述第一转基因、所述第二转基因和所述第三转基因由两个单独的构建体编码。

[2876] 实施方案II-792.如实施方案658-789中任一项所述的方法,其中所述第一转基因、所述第二转基因和所述第三转基因由多顺反子构建体编码。

[2877] 实施方案II-793.如实施方案658-792中任一项所述的方法,其中所述经遗传工程化的细胞是人细胞或非人动物细胞。

[2878] 实施方案II-794.如实施方案793所述的方法,其中所述非人动物细胞是猪、牛或绵羊细胞。

[2879] 实施方案II-795.如实施方案793所述的方法,其中所述经遗传工程化的细胞是人细胞。

[2880] 实施方案II-796.如实施方案658-795中任一项所述的方法,其中所述经遗传工程化的细胞是来源于干细胞或祖细胞的分化的细胞。

[2881] 实施方案II-797.如实施方案658-796中任一项所述的方法,其中所述细胞是干细胞或祖细胞。

[2882] 实施方案II-798.如实施方案658-796中任一项所述的方法,其中所述细胞是来源于干细胞或祖细胞的分化的细胞。

[2883] 实施方案II-799.如实施方案796所述的方法,其中所述干细胞是多能干细胞。

[2884] 实施方案II-800.如实施方案799所述的方法,其中所述多能干细胞是诱导型多能干细胞(iPSC)。

[2885] 实施方案II-801.如实施方案799所述的方法,其中所述多能干细胞是胚胎干细胞(ESC)。

[2886] 实施方案II-802.如实施方案658-801中任一项所述的方法,其中所述细胞是从供体分离的原代细胞。

[2887] 实施方案II-803.如实施方案802所述的方法,其中在从所述供体获取所述原代细胞时所述供体是健康的且/或没有被怀疑患有疾病或疾患。

[2888] 实施方案II-804.如实施方案658-803中任一项所述的方法,其中所述细胞是胰岛细胞、β胰岛细胞、胰腺胰岛细胞、免疫细胞、B细胞、T细胞、自然杀伤(NK)细胞、自然杀伤T(NKT)细胞、巨噬细胞、内皮细胞、肌肉细胞、心脏肌肉细胞、平滑肌细胞、骨骼肌细胞、多巴胺能神经元、视网膜色素上皮细胞、视细胞、肝细胞、甲状腺细胞、皮肤细胞、胶质祖细胞、神经细胞、心脏细胞、干细胞、造血干细胞、诱导型多能干细胞(iPSC)、间充质干细胞(MSC)、胚

胎干细胞(ESC)、多能干细胞(PSC)、血细胞或其组合。

[2889] 实施方案II-805.如实施方案658-804中任一项所述的方法,其中所述细胞是T细胞。实施方案II-806.如实施方案805所述的方法,其中所述T细胞是CD3+T细胞、CD4+T细胞、CDS+T细胞、原初T细胞、调节T(Treg)细胞、非调节T细胞、Th1细胞、Th2细胞、Th9细胞、Th17细胞、滤泡辅助T(Tfh)细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、效应T(Teff)细胞、中央记忆T细胞、效应记忆T细胞、表达CD45RA的效应记忆T细胞(TEMRA细胞)、组织驻留记忆(Trm)细胞、虚拟记忆T细胞、先天记忆T细胞、记忆干细胞(Tse)、γδT细胞,或其组合。

[2890] 实施方案II-807.如实施方案805或806所述的方法,其中所述T细胞是细胞毒性T细胞、辅助T细胞、记忆T细胞、调节T细胞、肿瘤浸润淋巴细胞,或其组合。

[2891] 实施方案II-808.如实施方案805-807中任一项所述的方法,其中所述细胞是人T细胞。

[2892] 实施方案II-809.如实施方案805-808中任一项所述的方法,其中所述细胞是自体T细胞。

[2893] 实施方案II-810.如实施方案805-808中任一项所述的方法,其中所述细胞是同种异体T细胞。

[2894] 实施方案II-811.如实施方案810所述的方法,其中所述同种异体T细胞是原代T细胞。

[2895] 实施方案II-812.如810或811所述的方法,其中所述同种异体T细胞已从胚胎干细胞(ESC)或诱导型多能干细胞(iPSC)分化而来。

[2896] 实施方案III-386.一种包含一种或多种修饰的经工程化的细胞,所述修饰(i)降低一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子的表达,且/或(ii)增加一种或多种致耐受因子的表达,其中(i)的降低的表达和(ii)的增加的表达是相对于不包含所述修饰的相同细胞类型的细胞而言的。

[2897] 实施方案III-386a.一种包含一种或多种修饰的经工程化的细胞,其中所述修饰

[2898] (a)使以下的一个或多个等位基因失活或破坏:

[2899] (i)一种或多种MHC I类分子和/或调控所述一种或多种MHC I类分子的表达的一种或多种分子,和/或

[2900] (ii)一种或多种MHC II类分子和/或调控所述一种或多种MHC II类分子的表达的一种或多种分子,且/或

[2901] (b)增加一种或多种致耐受因子的表达,

[2902] 其中(ii)的增加的表达是相对于不包含所述修饰的胰岛细胞而言的。

[2903] 实施方案III-387.如实施方案388所述的经工程化的细胞,其中(i)中的所述一种或多种修饰降低以下的表达:

[2904] a.一种或多种MHC I类分子;

[2905] b.一种或多种MHC II类分子;或

[2906] c.一种或多种MHC I类分子和一种或多种MHC II类分子。

[2907] 实施方案III-388.如实施方案388或实施方案389所述的经工程化的细胞,其中(i)中的所述一种或多种修饰降低选自由以下组成的组的一种或多种分子的表达:B2M、TAPI、NLRC5、CIITA、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DP、HLA-DQ、HLA-DR、HLA-DM、HLA-DO、RFX5、

RFXANK、RFXAP、NFY-A、NFY-B、NFY-C,以及其任何组合。

[2908] 实施方案III-389.如实施方案390所述的经工程化的细胞,其中所述经工程化的细胞不表达选自由以下组成的组的一种或多种分子:B2M、TAP I、NLRC5、CIITA、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DP、HLA-DQ、HLA-DR、HLA-DM、HLA-DO、RFX5、RFXANK、RFXAP、NFY-A、NFY-B、NFY-C,以及其组合。

[2909] 实施方案III-390.如实施方案388-391中任一项所述的经工程化的细胞,其中增加表达的所述一种或多种修饰包括增加的细胞表面表达,并且/或者降低表达的所述一种或多种修饰包括减少的细胞表面表达。

[2910] 实施方案III-391.如实施方案388-392中任一项所述的经工程化的细胞,其中(i)中的所述一种或多种修饰降低一种或多种MHC I类分子的表达。

[2911] 实施方案III-392.如实施方案388-393中任一项所述的经工程化的细胞,其中(i)中的所述一种或多种修饰降低B2M的表达。

[2912] 实施方案III-393.如实施方案388-394中任一项所述的经工程化的细胞,其中(i)中的所述一种或多种修饰降低HLA-A、HLA-B和/或HLA-C的表达。

[2913] 实施方案III-394.如实施方案388-395中任一项所述的经工程化的细胞,其中(i)中的所述一种或多种修饰降低一种或多种MHC II类分子的表达。

[2914] 实施方案III-395.如实施方案388-396中任一项所述的经工程化的细胞,其中(i)中的所述一种或多种修饰降低CIITA的表达。

[2915] 实施方案III-396.如实施方案388-397中任一项所述的经工程化的细胞,其中(i)中的所述一种或多种修饰降低HLA-DM、HLA-DO、HLA-DP、HLA-DQ、HLA-DR、RFX5、RFXANK和/或RFXAP的表达。

[2916] 实施方案III-397.如实施方案388-398中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述一种或多种致耐受因子包括选自由以下组成的组的一种或多种致耐受因子:A20/TNFAIP3、C1-抑制剂、CCL21、CCL22、CD16、CD16 Fc受体、CD24、CD27、CD35、CD39、CD46、CD47、CD52、CD55、CD59、CD64、CD200、CR1、CTLA4-Ig、DUX4、FasL、H2-M3、HLA-C、HLA-E、HLA-E重链、HLA-F、HLA-G、IDO1、IL-10、IL15-RF、IL-35、MANF、Mfge8、PD-L1、Serpinb9、A20/TNFAIP3、CD39、CR1、HLA-F、IL15-RF、MANF,以及其任何组合。

[2917] 实施方案III-398.如实施方案388-399中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述一种或多种致耐受因子包括CD47。

[2918] 实施方案III-399.如实施方案388-400中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述一种或多种致耐受因子包括CCL22。

[2919] 实施方案III-400.如实施方案388-401中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述一种或多种致耐受因子包括CD16或CD16 Fc受体。

[2920] 实施方案III-401.如实施方案388-402中任一项所述的工程化细胞,其中所述一种或多种致耐受因子包括CD24。

[2921] 实施方案III-402.如实施方案388-403中任一项所述的工程化细胞,其中所述一种或多种致耐受因子包括CD39。

[2922] 实施方案III-403.如实施方案388-404中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述一种或多种致耐受因子包括CR1。

[2923] 实施方案III-404.如实施方案388中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述一种或多种致耐受因子包括CD52。

[2924] 实施方案III-405.如实施方案388-406中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述一种或多种致耐受因子包括CD55。

[2925] 实施方案III-406.如实施方案388-407中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述一种或多种致耐受因子包括CD200。

[2926] 实施方案III-407.如实施方案388-408中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述一种或多种致耐受因子包括DUX4。

[2927] 实施方案III-408.如实施方案388-409中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述一种或多种致耐受因子包括HLA-E。

[2928] 实施方案III-409.如实施方案388-410中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述一种或多种致耐受因子包括HLA-G。

[2929] 实施方案III-410.如实施方案388-411中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述一种或多种致耐受因子包括IDO1。

[2930] 实施方案III-411.如实施方案388-412中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述一种或多种致耐受因子包括IL15-RF。

[2931] 实施方案III-412.如实施方案388-413中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述一种或多种致耐受因子包括IL35。

[2932] 实施方案III-413.如实施方案388-414中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述一种或多种致耐受因子包括PD-L1。

[2933] 实施方案III-414.如实施方案388-415中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述一种或多种致耐受因子包括MANF。

[2934] 实施方案III-415.如实施方案388-416中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述一种或多种致耐受因子包括A20/TNFAIP3。

[2935] 实施方案III-416.如实施方案388-417中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述一种或多种致耐受因子包括HLA-E和CD47。

[2936] 实施方案III-417.如实施方案388-31中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述一种或多种致耐受因子包括选自由CD47、CD46和CD59组成的组的两种或更多种致耐受因子,任选地其中所述一种或多种致耐受因子包括CD47、CD46和CD59。

[2937] 实施方案III-418.如实施方案388-419中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述一种或多种致耐受因子包括选自由CD47和CD39组成的组的两种或更多种致耐受因子,任选地其中所述一种或多种致耐受因子包括CD47和CD39。

[2938] 实施方案III-419.如实施方案388-420中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述一种或多种致耐受因子包括选自由CD47和CCL22组成的组的两种或更多种致耐受因子,任选地其中所述一种或多种致耐受因子包括CD47和CCL22。

[2939] 实施方案III-420.如实施方案388-421中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述一种或多种致耐受因子包括选自由CD47、HLA-G和PD-L1组成的组的两种或更多种致耐受因子,任选地其中所述一种或多种致耐受因子包括CD47和PD-L1,并且任选地其中所述一种或多种致耐受因子包括CD47、HLA-G和PD-L1。

[2940] 实施方案III-421.如实施方案388-422中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述一种或多种致耐受因子包括选自由CD24、CD47和PD-L1组成的组的两种或更多种致耐受因子,任选地其中所述一种或多种致耐受因子包括CD24、CD47和PD-L1。

[2941] 实施方案III-422.如实施方案388-423中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述一种或多种致耐受因子包括选自由HLA-E、CD24、CD47和PD-L1组成的组的两种或更多种致耐受因子,任选地其中所述一种或多种致耐受因子包括HLA-E、CD24、CD47和PD-L1。

[2942] 实施方案III-423.如实施方案388-424中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述一种或多种致耐受因子包括选自由CD46、CD55、CD59和CR1组成的组的两种或更多种致耐受因子,任选地其中所述一种或多种致耐受因子包括CD46、CD55、CD59和CR1。

[2943] 实施方案III-424.如实施方案388-425中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述一种或多种致耐受因子包括选自由HLA-E、CD46、CD55、CD59和CR1组成的组的两种或更多种致耐受因子,任选地其中所述一种或多种致耐受因子包括HLA-E、CD46、CD55、CD59和CR1。

[2944] 实施方案III-425.如实施方案388-426中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述一种或多种致耐受因子包括选自由HLA-E、CD24、CD47、PD-L1、CD46、CD55、CD59和CR1组成的组的两种或更多种致耐受因子,任选地其中所述一种或多种致耐受因子包括HLA-E、CD24、CD47、PD-L1、CD46、CD55、CD59和CR1。

[2945] 实施方案III-426.如实施方案388-427中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述一种或多种致耐受因子包括HLA-E和PD-L1。

[2946] 实施方案III-427.如实施方案388-428中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述一种或多种致耐受因子包括选自由HLA-E、PD-L1和A20/TNFAIP组成的组的两种或更多种致耐受因子,任选地其中所述一种或多种致耐受因子包括HLA-E、PD-L1和A20/TNFAIP。

[2947] 实施方案III-428.如实施方案388-429中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述一种或多种致耐受因子包括选自由HLA-E、PD-L1和MANF组成的组的两种或更多种致耐受因子,任选地其中所述一种或多种致耐受因子包括HLA-E、PD-L1和MANF。

[2948] 实施方案III-429.如实施方案388-430中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述一种或多种致耐受因子包括选自由HLA-E、PD-L1、A20/TNFAIP和MANF组成的组的两种或更多种致耐受因子,任选地其中所述一种或多种致耐受因子包括HLA-E、PD-L1、A20/TNFAIP和MANF。

[2949] 实施方案III-430.一种经工程化的细胞,其包含一种或多种修饰,所述一种或多种修饰(i)降低一种或多种MHC I类分子和一种或多种MHC II类分子的表达,并且(ii)增加CD47的表达,其中(i)的降低的表达和(ii)的增加的表达是相对于不包含所述修饰的相同细胞类型的细胞而言的。

[2950] 实施方案III-431.如实施方案432所述的经工程化的细胞,其中(i)中的所述一种或多种修饰降低选自由以下组成的组的一种或多种分子的表达:B2M、TAP I、NLRC5、CIITA、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DP、HLA-DQ、HLA-DR、HLA-DM、HLA-DO、RFX5、RFXANK、RFXAP、NFY-A、NFY-B、NFY-C,以及其任何及其任何组合。

[2951] 实施方案III-432.如实施方案432或实施方案46所述的经工程化的细胞,其中(i)中的所述一种或多种修饰减少B2M的表达。

[2952] 实施方案III-433.如实施方案432-434中任一项所述的经工程化的细胞,其中(i)

中的所述一种或多种修饰降低HLA-A、HLA-B和/或HLA-C的表达。

[2953] 实施方案III-434.如实施方案432-435中任一项所述的经工程化的细胞,其中(i)中的所述一种或多种修饰降低CIITA的表达。

[2954] 实施方案III-435.如实施方案432-435中任一项所述的经工程化的细胞,其中(i)中的所述一种或多种修饰降低HLA-DP、HLA-DR和/或HLA-DQ的表达。

[2955] 实施方案III-436.如实施方案388-437中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述经工程化的细胞进一步包含增加一种或多种另外的致耐受因子的表达的一种或多种修饰。

[2956] 实施方案III-437.如实施方案438所述的经工程化的细胞,其中所述一种或多种另外的致耐受因子包括选自由以下组成的组的一种或多种致耐受因子:A20/TNFAIP3、C1-抑制剂、CCL21、CCL22、CD16、CD16 Fc受体、CD24、CD27、CD35、CD39、CD46、CD47、CD52、CD55、CD59、CD64、CD200、CR1、CTLA4-Ig、DUX4、FasL、H2-M3、HLA-C、HLA-E、HLA-E重链、HLA-F、HLA-G、IDO1、IL-10、IL15-RF、IL-35、MANF、Mfge8、PD-L1、Serpinb9、A20/TNFAIP3、CD39、CR1、HLA-F、IL15-RF、MANF,以及其任何组合。

[2957] 实施方案III-438.如实施方案439所述的经工程化的细胞,其中所述一种或多种另外的致耐受因子包括CD47。

[2958] 实施方案III-439.如实施方案388-440中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述经工程化的细胞进一步包含降低一种或多种另外的分子的表达的一种或多种修饰。

[2959] 实施方案III-440.如实施方案441所述的经工程化的细胞,其中所述一种或多种另外的分子包括B2M、TAP I、NLRC5、CIITA、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DP、HLA-DQ、HLA-DR、HLA-DM、HLA-DO、RFX5、RFXANK、RFXAP、NFY-A、NFY-B、NFY-C、ABO、CADM1、CD58、CD38、CD142、CD155、CEACAM1、CTLA-4、FUT1、ICAM1、IRF1、MIC-A、MIC-B、NLGN4Y、PCDH11Y、PD-1、参与氧化或ER应激的蛋白质、RHD、TRAC、TRB,任选地其中所述参与氧化或ER应激的蛋白质选自由TXNIP、PERK、IRE1α和DJ-1(PARK7)组成的组。

[2960] 实施方案III-441.如实施方案441或442所述的经工程化的细胞,其中所述一种或多种另外的分子包括一种或多种Y染色体蛋白质,任选原钙粘蛋白-11Y-连接的(PCDH11Y)和/或神经连接蛋白-4Y-连接的(NLGN4Y)。

[2961] 实施方案III-442.如实施方案441-443中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述一种或多种另外的分子包括一种或多种NK细胞配体,任选MIC-A和/或MIC-B。

[2962] 实施方案III-443.如实施方案441-444中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述一种或多种另外的分子包括参与氧化或ER应激的一种或多种蛋白质,任选硫氧还蛋白-相互作用蛋白(TXNIP)、PKR样ER激酶(PERK)、需要肌醇的酶1α(IRE1α)和/或DJ-1(PARK7)。

[2963] 实施方案III-444.如实施方案441-446中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述一种或多种另外的分子包括一种或多种血液抗原蛋白质,任选ABO、FUT1和/或RHD。

[2964] 实施方案III-445.如实施方案388-446中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述经工程化的细胞进一步包含降低以下的表达的一种或多种修饰:B2M、TAP I、NLRC5、CIITA、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DP、HLA-DQ、HLA-DR、HLA-DM、HLA-DO、RFX5、RFXANK、RFXAP、NFY-A、NFY-B、NFY-C、ABO、CADM1、CD58、CD38、CD142、CD155、CEACAM1、CTLA-4、FUT1、ICAM1、IRF1、MIC-A、MIC-B、NLGN4Y、PCDH11Y、PD-1、参与氧化或ER应激的蛋白质、RHD、TRAC、TRB,任

选地其中所述参与氧化或ER应激的蛋白质选自由TXNIP、PERK、IRE1α和DJ-1(PARK7)组成的组。

[2965] 实施方案III-446.如实施方案447所述的经工程化的细胞,其中TRB是TRBC1,TRBC2,或TRBC1和TRBC2。

[2966] 实施方案III-447.如实施方案388-448中任一项所述的经工程化的细胞,其中降低的表达包括没有细胞表面表达或没有可检测的细胞表面表达。

[2967] 实施方案III-448.如实施方案388-449中任一项所述的经工程化的细胞,其中降低的表达包括降低的mRNA表达,任选地其中降低的表达包括无可检测到的mRNA表达。

[2968] 实施方案III-449.如实施方案388-460中任一项所述的经工程化的细胞,其中降低的表达包括降低的蛋白质表达或降低的蛋白质活性,任选地其中降低的表达包括无可检测到的蛋白质表达或蛋白质活性。

[2969] 实施方案III-450.如实施方案388-451中任一项所述的经工程化的细胞,其中降低的表达包括消除编码或调控i)所述一种或多种MHC I类分子和/或所述一种或多种MHC II类分子,或ii)所述一种或多种另外的分子的表达的基因的活性。

[2970] 实施方案III-451.如实施方案388-452中任一项所述的经工程化的细胞,其中降低的表达包括编码或调控i)所述一种或多种MHC I类分子和/或所述一种或多种MHC II类分子,或ii)所述一种或多种另外的分子的表达的基因的等位基因的失活或破坏。

[2971] 实施方案III-452.如实施方案388-453中任一项所述的经工程化的细胞,其中降低的表达包括编码或调控i)所述一种或多种MHC I类分子和/或所述一种或多种MHC II类分子,或ii)所述一种或多种另外的分子的表达的基因的两个等位基因的失活或破坏。

[2972] 实施方案III-453.如实施方案388-454中任一项所述的经工程化的细胞,其中用于降低表达的一种或多种修饰包括编码或调控i)所述一种或多种MHC I类分子和/或所述一种或多种MHC II类分子,或ii)所述一种或多种另外的分子的表达的基因中的插入缺失。

[2973] 实施方案III-454.如实施方案388-455中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述用于降低表达的一种或多种修饰包括编码或调控i)所述一种或多种MHC I类分子和/或所述一种或多种MHC II类分子或ii)所述一种或多种另外的分子的表达的基因的一段连续基因组DNA的移码突变或缺失。

[2974] 实施方案III-455.如实施方案388-456中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述用于降低表达的一种或多种修饰包括编码或调控i)所述一种或多种MHC I类分子和/或所述一种或多种MHC II类分子,或ii)所述一种或多种另外的分子的表达的基因的所有编码序列的失活或破坏。

[2975] 实施方案III-456.如实施方案388-456中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述用于降低表达的一种或多种修饰包括敲除编码或调控i)所述一种或多种MHC I类分子和/或所述一种或多种MHC II类分子,或ii)所述一种或多种另外的分子的表达的基因。

[2976] 实施方案III-457.如实施方案388-458中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述经工程化的细胞包含一种或多种修饰,所述一种或多种修饰:

[2977] a.降低MHC I类和/或MHC II类分子的表达;

[2978] b.增加CD47的表达,并且

[2979] c.增加CCL22的表达。

[2980] 实施方案III-458.如实施方案388-458中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述经工程化的细胞包含一种或多种修饰,所述一种或多种修饰:

[2981] a.降低MHC I类和/或MHC II类分子的表达;

[2982] b.增加CD47的表达,并且

[2983] c.增加CD39的表达。

[2984] 实施方案III-459.如实施方案388-458中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述经工程化的细胞包含一种或多种修饰,所述一种或多种修饰:

[2985] a.降低MHC I类和/或MHC II类分子的表达;

[2986] b.增加CD47的表达,并且

[2987] c.增加CD46和CD59的表达。

[2988] 实施方案III-460.如实施方案388-458中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述经工程化的细胞包含一种或多种修饰,所述一种或多种修饰:

[2989] a.降低MHC I类和/或MHC II类分子的表达;

[2990] b.增加CD47的表达,并且

[2991] c.增加PD-L1的表达。

[2992] 实施方案III-461.如实施方案388-458中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述经工程化的细胞包含一种或多种修饰,所述一种或多种修饰:

[2993] a.降低MHC I类和/或MHC II类分子的表达;

[2994] b.增加CD47的表达,并且

[2995] c.增加HLA-G和PD-L1的表达。

[2996] 实施方案III-462.如实施方案388-458中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述经工程化的细胞包含一种或多种修饰,所述一种或多种修饰:

[2997] a.降低MHC I类和/或MHC II类分子的表达;

[2998] b.增加CD47的表达,并且

[2999] c.降低CD142的表达。

[3000] 实施方案III-463.如实施方案388-458中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述经工程化的细胞包含一种或多种修饰,所述一种或多种修饰:

[3001] a.降低MHC I类和/或MHC II类分子的表达;

[3002] b.增加CD47的表达,并且

[3003] c.降低MIC-A和/或MIC-B的表达。

[3004] 实施方案III-464.如实施方案388-458中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述经工程化的细胞包含一种或多种修饰,所述一种或多种修饰:

[3005] a.降低MHC I类和/或MHC II类分子的表达;并且

[3006] b.增加CD24的表达。

[3007] 实施方案III-465.如实施方案388-458中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述经工程化的细胞包含一种或多种修饰,所述一种或多种修饰:

[3008] a.降低MHC I类和/或MHC II类分子的表达;并且

[3009] b.增加CD200的表达。

[3010] 实施方案III-466.如实施方案388-458中任一项所述的经工程化的细胞,其中所

述经工程化的细胞包含一种或多种修饰,所述一种或多种修饰:

[3011] a.降低MHC I类和/或MHC II类分子的表达;并且

[3012] b.增加CD52的表达。

[3013] 实施方案III-467.如实施方案388-458中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述经工程化的细胞包含一种或多种修饰,所述一种或多种修饰:

[3014] a.降低MHC I类和/或MHC II类分子的表达;并且

[3015] b.增加DUX4的表达。

[3016] 实施方案III-468.如实施方案388-458中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述经工程化的细胞包含一种或多种修饰,所述一种或多种修饰:

[3017] a.降低MHC I类和/或MHC II类分子的表达;并且

[3018] b.增加IDO1的表达。

[3019] 实施方案III-469.如实施方案388-458中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述经工程化的细胞包含一种或多种修饰,所述一种或多种修饰:

[3020] a.降低MHC I类和/或MHC II类分子的表达;并且

[3021] b.增加IL-35的表达。

[3022] 实施方案III-470.如实施方案388-458中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述经工程化的细胞包含一种或多种修饰,所述一种或多种修饰:

[3023] a.降低MHC I类和/或MHC II类分子的表达;并且

[3024] b.增加PD-L1的表达。

[3025] 实施方案III-471.如实施方案388-458中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述经工程化的细胞包含一种或多种修饰,所述一种或多种修饰:

[3026] a.降低MHC I类和/或MHC II类分子的表达;并且

[3027] b.增加HLA-E的表达。

[3028] 实施方案III-472.如实施方案388-458中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述经工程化的细胞包含一种或多种修饰,所述一种或多种修饰:

[3029] a.降低MHC I类和/或MHC II类分子的表达;并且

[3030] b.增加HLA-G的表达。

[3031] 实施方案III-473.如实施方案388-458中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述经工程化的细胞包含一种或多种修饰,所述一种或多种修饰:

[3032] a.降低MHC I类和/或MHC II类分子的表达;

[3033] b.降低CD155的表达;并且

[3034] c.增加HLA-E的表达。

[3035] 实施方案III-474.如实施方案388-458中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述经工程化的细胞包含一种或多种修饰,所述一种或多种修饰:

[3036] a.降低MHC I类分子的表达;

[3037] b.降低RFXANK的表达;

[3038] c.增加HLA-E的表达。

[3039] 实施方案III-475.如实施方案388-458中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述经工程化的细胞包含一种或多种修饰,所述一种或多种修饰:

[3040] a.降低MHC I类和/或MHC II类分子的表达;

[3041] b.降低MIC-A和/或MIC-B的表达;

[3042] c.增加CD47、CD24和PD-L1中的一种或多种的表达;并且

[3043] d.增加CD46、CD55、CD59和CR1的表达。

[3044] 实施方案III-476.如实施方案388-458中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述经工程化的细胞包含一种或多种修饰,所述一种或多种修饰:

[3045] a.降低MHC I类分子的表达;

[3046] b.降低MIC-A和/或MIC-B的表达;

[3047] c.降低TXNIP的表达;并且

[3048] d.增加PD-L1和HLA-E的表达。

[3049] 实施方案III-477.如实施方案477所述的经工程化的细胞,其中所述修饰进一步增加A20/TNFAIP3和MANF的表达。

[3050] 实施方案III-478.如实施方案388-479中任一项所述的经工程化的细胞,其中降低MHC I类和/或MHC II类分子的表达的所述一种或多种修饰由降低MHC I类分子的表达的一种或多种修饰组成。

[3051] 实施方案III-479.如实施方案388-479中任一项所述的经工程化的细胞,其中降低MHC I类和/或MHC II类分子的表达的所述一种或多种修饰由降低MHC II类分子的表达的一种或多种修饰组成。

[3052] 实施方案III-480.如实施方案388-479中任一项所述的经工程化的细胞,其中降低MHC I类和/或MHC II类分子的表达的所述一种或多种修饰由降低MHC I类分子和MHC II类分子的表达的一种或多种修饰组成。

[3053] 实施方案III-481.如实施方案388-482所述的经工程化的细胞,其中增加的表达包括增加的mRNA表达。

[3054] 实施方案III-482.如实施方案388-483所述的经工程化的细胞,其中增加的表达包括增加的蛋白质表达或蛋白质活性。

[3055] 实施方案III-483.如实施方案388-484中任一项所述的经工程化的细胞,其中增加的表达包括增加编码或调控i)所述一种或多种致耐受因子或ii)所述一种或多种另外的致耐受因子的表达的基因的活性。

[3056] 实施方案III-484.如实施方案485所述的经工程化的细胞,其中所述基因是内源性基因,并且所述一种或多种修饰包括内源性启动子的一种或多种修饰。

[3057] 实施方案III-485.如实施方案485所述的经工程化的细胞,其中所述基因是内源性基因,并且所述一种或多种修饰包括引入异源性启动子。

[3058] 实施方案III-486.如实施方案487所述的经工程化的细胞,其中所述异源启动子选自由以下组成的组:CAG启动子、巨细胞病毒(CMV)启动子、EF1α启动子、EF1α短启动子、PGK启动子、腺病毒晚期启动子、牛痘病毒7.5K启动子、SV40启动子、HSV的tk启动子、小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)启动子、HIV的LTR启动子、莫洛尼病毒的启动子、爱泼斯坦巴尔病毒(EBV)启动子和劳斯肉瘤病毒(RSV)启动子,以及UBC启动子。

[3059] 实施方案III-487.如实施方案388-481中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述经工程化的细胞包含一种或多种转基因。

[3060] 实施方案III-488.如实施方案489所述的经工程化的细胞,其中所述一种或多种转基因编码所述一种或多种致耐受因子或所述一种或多种另外的致耐受因子中的至少一种。

[3061] 实施方案III-489.如实施方案489或490所述的经工程化的细胞,其中所述一种或多种转基因编码所述一种或多种另外的致耐受因子中的至少一种。

[3062] 实施方案III-490.如实施方案489-491中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述一种或多种转基因编码一种或多种另外的分子。

[3063] 实施方案III-491.如实施方案489-492中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述一种或多种转基因包含一个或多个调控元件。

[3064] 实施方案III-492.如实施方案489-493中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述一种或多种转基因与所述一个或多个调控元件可操作地连接。

[3065] 实施方案III-493.如实施方案493或实施方案107所述的经工程化的细胞,其中所述一个或多个调控元件包括一个或多个启动子、增强子、内含子、终止子、翻译启动信号、多聚腺苷酸化信号、复制元件、RNA加工和输出元件、转座子、转座酶、绝缘子、内部核糖体进入位点(IRES)、5'UTR、3'UTR、mRNA 3'末端加工序列、边界元件、基因座控制区(LCR)、基质结合区(MAR)、重组或盒式交换序列、接头序列、分泌信号、抗性标志物、锚定肽、定位信号、融合标签、亲和标签、伴侣蛋白和蛋白酶。

[3066] 实施方案III-494.如实施方案493、实施方案495或实施方案107所述的经工程化的细胞,其中所述一个或多个调控元件包括启动子。

[3067] 实施方案III-497.如实施方案495或496所述的经工程化的细胞,其中所述启动子选自由以下组成的组:CAG启动子、巨细胞病毒(CMV)启动子、EF1α启动子、EF1α短启动子、PGK启动子、腺病毒晚期启动子、牛痘病毒7.5K启动子、SV40启动子、HSV的tk启动子、小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)启动子、HIV的LTR启动子、莫洛尼病毒的启动子、爱泼斯坦巴尔病毒(EBV)启动子和劳斯肉瘤病毒(RSV)启动子,以及UBC启动子。

[3068] 实施方案III-498.如实施方案489-497中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述经工程化的细胞包含编码所述一种或多种转基因的一种或多种载体。

[3069] 实施方案III-499.如实施方案498所述的经工程化的细胞,其中所述一种或多种载体中的至少一种是多顺反子载体。

[3070] 实施方案III-500.如实施方案499所述的经工程化的细胞,其中所述多顺反子载体编码所述一种或多种致耐受因子或所述一种或多种另外的致耐受因子中的至少一种。

[3071] 实施方案III-501.如实施方案499或实施方案113所述的经工程化的细胞,其中所述多顺反子载体进一步编码所述一种或多种致耐受因子或所述一种或多种另外的致耐受因子中的至少一种。

[3072] 实施方案III-502.如实施方案500或实施方案501的实施方案所述的经工程化的细胞,其中所述多顺反子载体进一步编码所述一种或多种另外的分子中的至少一种。

[3073] 实施方案III-503.如实施方案489-502中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述一种或多种转基因由一个或多个接头序列分隔。

[3074] 实施方案III-504.如实施方案503所述的经工程化的细胞,其中所述一个或多个接头序列包括IRES序列或可切割的肽序列。

[3075] 实施方案III-505.如实施方案504所述的经工程化的细胞,其中所述可切割的肽序列包括可自切割的肽,任选2A肽。

[3076] 实施方案III-506.如实施方案505所述的经工程化的细胞,其中所述2A肽选自由F2A序列、E2A序列、P2A序列和T2A序列组成的组。

[3077] 实施方案III-507.如实施方案504-506中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述可切割的肽序列包括蛋白酶可切割的序列或化学可切割的序列。

[3078] 实施方案III-508.如实施方案500-507中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述一种或多种致耐受因子、所述一种或多种另外的致耐受因子和/或所述一种或多种另外的分子与同一启动子可操作地连接。

[3079] 实施方案III-509.如实施方案508中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述启动子是组成型启动子。

[3080] 实施方案III-510.如实施方案508或509所述的经工程化的细胞,其中所述启动子选自由以下组成的组:CAG启动子、巨细胞病毒(CMV)启动子、EF1α启动子、EF1α短启动子、PGK启动子、腺病毒晚期启动子、牛痘病毒7.5K启动子、SV40启动子、HSV的tk启动子、小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)启动子、HIV的LTR启动子、莫洛尼病毒的启动子、爱泼斯坦巴尔病毒(EBV)启动子和劳斯肉瘤病毒(RSV)启动子,以及UBC启动子。

[3081] 实施方案III-511.如实施方案492-510中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述一种或多种额外的分子包括嵌合抗原受体(CAR)。

[3082] 实施方案III-512.如实施方案511所述的经工程化的细胞,其中所述CAR包含信号肽、对CD19具有特异性的细胞外结合结构域、铰链结构域、跨膜结构域、细胞内共刺激结构域和/或细胞内信号传导结构域。

[3083] 实施方案III-513.如实施方案511或实施方案125所述的经工程化的细胞,其中所述CAR对CD19、CD20、CD22、CD38、CD123、CD138、BCMA或其任何组合具有特异性。

[3084] 实施方案III-514.如实施方案513所述的经工程化的细胞,其中所述CAR是CD19/CD22双特异性CAR。

[3085] 实施方案III-515.如实施方案492-514中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述一种或多种另外的分子包括一个或多个安全开关。

[3086] 实施方案III-516.如实施方案515所述的经工程化的细胞,其中所述一个或多个安全开关能够受控杀伤所述经工程化的细胞。

[3087] 实施方案III-517.如实施方案515或516所述的经工程化的细胞,其中所述一个或多个安全开关在药物或前药的存在下或在被选择性外源性化合物活化后诱导受控的细胞死亡。

[3088] 实施方案III-518.如实施方案515-517中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述一个或多个安全开关包括是能够诱导所述经工程化的细胞凋亡的诱导型蛋白质。

[3089] 实施方案III-519.如实施方案518所述的经工程化的细胞,其中所述能够诱导所述经工程化的细胞凋亡的诱导型蛋白质是半胱天冬酶蛋白。

[3090] 实施方案III-520.如实施方案519所述的经工程化的细胞,其中所述半胱天冬酶蛋白是半胱天冬酶9。

[3091] 实施方案III-521.如实施方案515-520中任一项所述的经工程化的细胞,其中所

述一个或多个安全开关包括一个或多个自杀基因。

[3092] 实施方案III-522.如实施方案521所述的经工程化的细胞,其中所述一个或多个自杀基因选自由以下组成的组:胞嘧啶脱氨酶(CyD)、疱疹病毒胸苷激酶(HSV-Tk)、诱导型半胱天冬酶9(iCaspase9)和雷帕霉素活化的半胱天冬酶9(rapaCasp9)。

[3093] 实施方案III-523.如实施方案489-522中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述一种或多种转基因中的至少一个被整合到所述经工程化的细胞的基因组中。

[3094] 实施方案III-524.如实施方案523所述的经工程化的细胞,其中整合是通过非靶向插入到经工程化的细胞的基因组中来进行的。

[3095] 实施方案III-525.如实施方案524所述的经工程化的细胞,其中整合是通过使用慢病毒载体非靶向插入到所述经工程化的细胞的基因组中来进行的。

[3096] 实施方案III-526.如实施方案523所述的经工程化的细胞,其中整合是通过靶向插入到所述经工程化的细胞的靶基因组基因座中来进行的。

[3097] 实施方案III-527.如实施方案526所述的经工程化的细胞,其中靶向插入是通过核酸酶介导的基因编辑连同同源定向修复来进行的。

[3098] 实施方案III-528.如实施方案526或527所述的经工程化的细胞,其中所述靶基因组基因座选自由以下组成的组:白蛋白基因座、ABO基因座、B2M基因座、CIITA基因座、CCR5基因座、CD142基因座、CLYBL基因座、CXCR4基因座、F3基因座、FUT1基因座、HMGB1基因座、KDM5D基因座、LRP1基因座、MIC-A基因座、MIC-B基因座、PPP1R12C(也被称为AAVS1)基因座、RHD基因座、ROSA26基因座、安全港基因座、SHS231基因座、TAP1基因座、TRAC基因座和TRBC基因座。

[3099] 实施方案III-529.如实施方案388-528中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述经工程化的细胞的基因组在编码具有减少的表达的实施方案388-141中任一项所述的一种或多种分子的一种或多种基因中包含一个或多个基因编辑。

[3100] 实施方案III-530.如实施方案388-529中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述所述经工程化的细胞包含基因组编辑复合物。

[3101] 实施方案III-531.如实施方案530所述的经工程化的细胞,其中所述基因组编辑复合物包含基因组靶向实体和基因组修饰实体。

[3102] 实施方案III-532.如实施方案531所述的经工程化的细胞,其中所述基因组靶向实体将所述基因组编辑复合物定位至所述靶基因座,任选地其中所述基因组靶向实体是核酸指导的靶向实体。

[3103] 实施方案III-533.如实施方案531或实施方案532所述的经工程化的细胞,其中所述基因组靶向实体包含转录活化因子样效应物(TALE)结合蛋白、锌指(ZF)结合蛋白、大范围核酸酶、Cas蛋白、TnpB蛋白、归巢核酸内切酶、核酸内切酶缺陷型Cas蛋白、无酶活性的Cas蛋白、核酸可编程DNA结合蛋白或其功能部分。

[3104] 实施方案III-534.如实施方案531-533中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述基因组靶向实体选自由以下组成的组:Cas1、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8a、Cas8b、Cas8c、Cas9、Cas10、Cas12、Cas12a(Cpf1)、Cas12b(C2c1)、Cas12c(C2c3)、Cas12d(CasY)、Cas12e(CasX)、Cas12f(C2c10)、Cas12g、Cas12h、Cas12i、Cas12k(C2c5)、Cas13、Cas13a(C2c2)、Cas13b、Cas13c、Cas13d、C2c4、C2c8、C2c9、Cmr1、Cmr2、Cmr3、Cmr4、Cmr5、

Cmr6、Csd1、Csd2、Cas5d、Cse1、Cse2、Cse3、Cse4、Cas5e、Csf1、Csm1、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csn1、Csn2、Cst1、Cst2、Cas5t、Csh1、Csh2、Cas5h、Csa1、Csa2、Csa3、Csa4、Csa5、Cas5a、Csx10、Csx11、Csy1、Csy2、Csy3、Csy4、Mad7、SpCas9、SpCas9的eSpCas9、SpCas9-HF1、HypaSpCas9、HeFSpCas9和evoSpCas9高保真变体、SaCas9、NmeCas9、CjCas9、StCas9、TdCas9、LbCas12a、AsCas12a、AacCas12b、BhCas12bv4、TnpB、dCas(D10A)、dCas(H840A)、dCas13a、dCas13b、核心Cas蛋白、核酸可编程DNA结合蛋白、RNA指导的核酸酶、归巢核酸内切酶、锌指核酸酶(ZFN)、转录活化因子样效应物核酸酶(TALEN)、大范围核酸酶、CRISPR相关转座酶,或其功能部分。

[3105] 实施方案III-535.如实施方案531所述的经工程化的细胞,其中所述基因组修饰实体对所述靶基因座进行切割、脱氨基、切口、聚合、询问、整合、切割、解旋、断裂、改变、甲基化、去甲基化或以其他方式使所述靶基因座不稳定。

[3106] 实施方案III-536.如实施方案531或实施方案535所述的经工程化的细胞,其中所述基因组修饰实体包含重组酶、整合酶、转座酶、核酸内切酶、核酸外切酶、切口酶、解旋酶、聚合酶、逆转录酶、脱氨酶、翻转酶、甲基化酶、去甲基化酶、乙酰化酶、核酸修饰蛋白、RNA修饰蛋白、DNA修饰蛋白、Argonaute蛋白、表观遗传修饰蛋白、组蛋白修饰蛋白或其功能部分。

[3107] 实施方案III-537.如实施方案536所述的经工程化的细胞,其中所述基因组修饰实体选自由以下组成的组:Cas1、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8a、Cas8b、Cas8c、Cas9、Cas10、Cas12、Cas12a(Cpf1)、Cas12b(C2c1)、Cas12c(C2c3)、Cas12d(CasY)、Cas12e(CasX)、Cas12f(C2c10)、Cas12g、Cas12h、Cas12i、Cas12k(C2c5)、Cas13、Cas13a(C2c2)、Cas13b、Cas13c、Cas13d、C2c4、C2c8、C2c9、Cmr1、Cmr2、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csd1、Csd2、Cas5d、Cse1、Cse2、Cse3、Cse4、Cas5e、Csf1、Csm1、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csn1、Csn2、Cst1、Cst2、Cas5t、Csh1、Csh2、Cas5h、Csa1、Csa2、Csa3、Csa4、Csa5、Cas5a、Csx10、Csx11、Csy1、Csy2、Csy3、Csy4、Mad7、SpCas9、SpCas9的eSpCas9、SpCas9-HF1、HypaSpCas9、HeFSpCas9和evoSpCas9高保真变体、SaCas9、NmeCas9、CjCas9、StCas9、TdCas9、LbCas12a、AsCas12a、AacCas12b、BhCas12b v4、TnpB、FokI、dCas(D10A)、dCas(H840A)、dCas13a、dCas13b、核心Cas蛋白、核酸可编程DNA结合蛋白、RNA指导的核酸酶、归巢核酸内切酶、锌指核酸酶(ZFN)、转录活化因子样效应物核酸酶(TALEN)、大范围核酸酶、CRISPR相关转座酶、APOBEC1、胞苷脱氨酶、腺苷脱氨酶、尿嘧啶糖基化酶抑制剂(UGI)、腺嘌呤碱基编辑器(ABE)、胞嘧啶碱基编辑器(CBE)、逆转录酶、丝氨酸整合酶、聚合酶、腺嘌呤到胸腺嘧啶或“ATBE”(或胸腺嘧啶到腺嘌呤或“TABE”)颠换碱基编辑器、十-十一易位甲基胞嘧啶双加氧酶(TET)、TET1、TET3、TET1CD、组蛋白乙酰转移酶p300、组蛋白甲基转移酶SMYD3、组蛋白甲基转移酶PRDM9、H3K79甲基转移酶DOT1L、转录阻遏子,或其功能部分。

[3108] 实施方案III-538.如实施方案531-537中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述基因组靶向实体和所述基因组修饰实体是单个多肽的不同结构域。

[3109] 实施方案III-539.如实施方案531-538中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述基因组编辑实体和基因组修饰实体是可操作地连接在一起的两种不同的多肽。

[3110] 实施方案III-540.如实施方案531-538中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述基因组编辑实体和基因组修饰实体是未连接在一起的两种不同的多肽。

[3111] 实施方案III-541.如实施方案462-469中任一项所述的经工程化的细胞,其中所

述修饰通过基因组修饰蛋白进行。

[3112] 实施方案III-542.如实施方案470中任一项所述的经工程化的细胞,其中通过基因组修饰蛋白进行的所述修饰是通过CRISPR相关转座酶、先导编辑,或经由位点特异性靶向元件的可编程添加(PASTE)进行的修饰。

[3113] 实施方案III-543.如实施方案470-471中任一项所述的经工程化的细胞,其中通过所述基因组修饰蛋白进行的所述修饰是核酸酶介导的基因编辑。

[3114] 实施方案III-544.如实施方案472所述的经工程化的细胞,其中所述核酸酶介导的基因编辑是通过靶向所述B2M基因的锌指核酸酶(ZFN)、TAL效应物核酸酶(TALEN)或CRISPR-Cas组合进行的,任选地其中所述Cas选自Cas9或Cas12。

[3115] 实施方案III-545.如实施方案470-472中任一项所述的经工程化的细胞,其中通过所述基因组修饰蛋白进行的所述修饰通过选自由以下组成的组的一种或多种蛋白质进行:Cas3、Cas4、Cas5、Cas8a、Cas8b、Cas8c、Cas9、Cas10、Cas12、Cas12a(Cpf1)、Cas12b(C2c1)、Cas12c(C2c3)、Cas12d(CasY)、Cas12e(CasX)、Cas12f(C2c10)、Cas12g、Cas12h、Cas12i、Cas12k(C2c5)、Cas13、Cas13a(C2c2)、Cas13b、Cas13c、Cas13d、C2c4、C2c8、C2c9、Cmr5、Cse1、Cse2、Csf1、Csm2、Csn2、Csx10、Csx11、Csy1、Csy2、Csy3、Mad7、锌指核酸酶(ZFN)、转录活化因子样效应物核酸酶(TALEN)、大范围核酸酶和CRISPR相关转座酶。

[3116] 实施方案III-546.如实施方案473所述的经工程化的细胞,其中所述核酸酶介导的基因编辑是通过CRISPR-Cas组合进行的,并且所述CRISPR-Cas组合包含具有与所述B2M基因内的至少一个靶位点互补的靶向结构域的指导RNA(gRNA)。

[3117] 实施方案III-547.如实施方案475所述的经工程化的细胞,其中所述CRISPR-Cas组合是包含所述gRNA和Cas蛋白的核糖核蛋白(RNP)复合物。

[3118] 实施方案III-548.如实施方案1-547中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述经工程化的细胞是人细胞或动物细胞。

[3119] 实施方案III-549.如实施方案548所述的经工程化的细胞,其中所述动物细胞是猪细胞、牛细胞或绵羊细胞。

[3120] 实施方案III-550.如实施方案548所述的经工程化的细胞,其中所述经工程化的细胞是人细胞。

[3121] 实施方案III-551.如实施方案388-550中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述经工程化的细胞是干细胞或祖细胞。

[3122] 实施方案III-552.如实施方案551所述的经工程化的细胞,其中所述经工程化的细胞是来源于干细胞或祖细胞的分化的细胞。

[3123] 实施方案III-553.如实施方案551或552所述的经工程化的细胞,其中所述干细胞或祖细胞选自由以下组成的组:诱导型多能干细胞、胚胎干细胞、造血干细胞、间充质干细胞、内皮干细胞、上皮干细胞、脂肪干细胞、生殖干细胞、肺干细胞、脐带血干细胞、多能干细胞(PSC)和多潜能干细胞。

[3124] 实施方案III-554.如实施方案388-550中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述经工程化的细胞是来源于多能干细胞或其后代的分化的细胞。

[3125] 实施方案III-555.如实施方案554所述的经工程化的细胞,其中所述多能干细胞是诱导型多能干细胞。

[3126] 实施方案III-556.如实施方案388-550中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述经工程化的细胞是从供体受试者分离的原代细胞。

[3127] 实施方案III-557.如实施方案556所述的经工程化的细胞,其中在从所述个体供体获取供体样本时所述供体受试者是健康的或没有被怀疑患有疾病或疾患。

[3128] 实施方案III-558.如实施方案388-557中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述经工程化的细胞选自由以下组成的组:胰岛细胞、β胰岛细胞、胰腺胰岛细胞、免疫细胞、B细胞、T细胞、自然杀伤(NK)细胞、自然杀伤T(NKT)细胞、巨噬细胞、内皮细胞、肌肉细胞、心脏肌肉细胞、平滑肌细胞、骨骼肌细胞、多巴胺能神经元、视网膜色素上皮细胞、视细胞、肝细胞、甲状腺细胞、皮肤细胞、胶质祖细胞、神经细胞、心脏细胞、干细胞、造血干细胞、诱导型多能干细胞(iPSC)、间充质干细胞(MSC)、胚胎干细胞(ESC)、多能干细胞(PSC)和血细胞。

[3129] 实施方案III-559.如实施方案388-558中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述细胞是ABO血型O型。

[3130] 实施方案III-560.如实施方案388-559中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述细胞包含功能性ABO A等位基因和/或功能性ABO B等位基因。

[3131] 实施方案III-561.如实施方案388-560中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述细胞为恒河猴因子阴性(Rh-)的。

[3132] 实施方案III-562.如实施方案388-560中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述细胞为恒河猴因子阳性(Rh+)的。

[3133] 实施方案III-563.一种生成实施方案388-562中任一项所述的经工程化的细胞的方法,其包括

[3134] a.获取细胞;以及

[3135] b.将实施方案388-562中任一项所述的一种或多种修饰引入到所述细胞。

[3136] 实施方案III-564.如实施方案563所述的方法,其中所述方法进一步包括基于所述修饰中的一种或多种修饰的存在和/或水平从细胞群体中选择所述经工程化的细胞。

[3137] 实施方案III-565.如实施方案563或564所述的方法,其中所述细胞是干细胞或祖细胞并且所述方法进一步包括使所述干细胞或所述祖细胞分化。

[3138] 实施方案III-566.如实施方案563或564所述的方法,其中所述细胞是多能干细胞或其后代,并且所述方法包括使所述多能干细胞或其后代分化。

[3139] 实施方案III-567.如实施方案563或564所述的方法,其中所述细胞是原代细胞。

[3140] 实施方案III-568.如实施方案563-567中任一项所述的方法,其中所述方法包括将一个或多个基因编辑引入到所述细胞的基因组中。

[3141] 实施方案III-569.如实施方案568所述的方法,其中所述一个或多个基因编辑通过非靶向插入被引入到所述细胞的基因组中。

[3142] 实施方案III-570.如实施方案568所述的方法,其中所述一个或多个基因编辑通过靶向插入被引入到所述细胞的基因组中。

[3143] 实施方案III-571.如实施方案568或570所述的方法,其中将所述一个或多个基因编辑引入到编码实施方案388-561中任一项所述的一种或多种分子的一种或多种基因中。

[3144] 实施方案III-572.如实施方案571所述的方法,其中所述经工程化的细胞具有增加的由所述一个或多个经编辑的基因编码的一种或多种分子的表达。

[3145] 实施方案III-573.如实施方案571或572所述的方法,其中所述经工程化的细胞具有减少的由所述一个或多个经编辑的基因编码的一种或多种分子的表达。

[3146] 实施方案III-574.如实施方案568-185中任一项所述的方法,其中使用如实施方案530-547中任一项所述的基因组编辑复合物中的至少一种将所述一个或多个基因编辑引入到细胞的基因组中。

[3147] 实施方案III-575.如实施方案568-574中任一项所述的方法,其中将所述一个或多个基因编辑在一个或多个靶基因组基因座处引入到细胞的基因组中,所述靶基因组基因座选自由以下组成的组:白蛋白基因座、ABO基因座、B2M基因座、CIITA基因座、CCR5基因座、CD142基因座、CLYBL基因座、CXCR4基因座、F3基因座、FUT1基因座、HMGB1基因座、KDM5D基因座、LRP1基因座、MIC-A基因座、MIC-B基因座、PPP1R12C(也被称为AAVS1)基因座、RHD基因座、ROSA26基因座、安全港基因座、SHS231基因座、TAP1基因座、TRAC基因座和TRBC基因座。

[3148] 实施方案III-576.一种根据实施方案563-575中任一项所述的方法产生的经工程化的细胞。

[3149] 实施方案III-577.如实施方案388-562和576中任一项所述的经工程化的细胞,其中与不包含所述一种或多种修饰的相同类型的细胞相比,所述经工程化的细胞或后代或分化的细胞在施用于受试者后具有增加的逃避NK细胞介导的细胞毒性的能力。

[3150] 实施方案III-578.如实施方案388-562、576和577中任一项所述的经工程化的细胞,其中与不包含所述一种或多种修饰的相同类型的细胞相比,所述经工程化的细胞或后代或来源于所述经工程化的细胞的分化的细胞在施用于受试者后经历成熟NK细胞的细胞的裂解减少。

[3151] 实施方案III-579.如实施方案388-562和576-578中任一项所述的经工程化的细胞,其中与不包含所述一种或多种修饰的相同类型的细胞相比,所述经工程化的细胞或后代或来源于所述经工程化的细胞的分化的细胞在施用于受试者后诱导降低的免疫反应。

[3152] 实施方案III-580.如实施方案388-562和576-579中任一项所述的经工程化的细胞,其中与不包含所述一种或多种修饰的相同类型的细胞相比,所述经工程化的细胞或后代或来源于所述经工程化的细胞的分化的细胞在施用于受试者后诱导降低的全身炎性反应。

[3153] 实施方案III-581.如实施方案388-562和576-580中任一项所述的经工程化的细胞,其中与不包含所述一种或多种修饰的相同类型的细胞相比,所述经工程化的细胞或后代或来源于所述经工程化的细胞的分化的细胞在施用于受试者后诱导降低的局部炎性反应。

[3154] 实施方案III-582.如实施方案388-562和576-581中任一项所述的经工程化的细胞,其中与不包含所述一种或多种修饰的[相同类型的]细胞相比,所述经工程化的细胞或后代或来源于所述经工程化的细胞的分化的细胞在施用于受试者后诱导降低的补体途径活化。

[3155] 实施方案III-583.如实施方案388-562和576-582中任一项所述的经工程化的细胞,其中所述经工程化的细胞或后代或来源于所述经工程化的细胞的分化的细胞在施用于受试者后保留植入和发挥作用的能力。

[3156] 实施方案III-584.如实施方案388-562和576-583中任一项所述的经工程化的细

胞,其中与不包含所述一种或多种修饰的[相同类型的]细胞相比,所述经工程化的细胞或后代或来源于所述经工程化的细胞的分化的细胞在施用于受试者后具有增强的植入和发挥作用的能力。

[3157] 实施方案III-585.一种经工程化的细胞群体,其包含多个如实施方案388-562和576-584中任一项所述的经工程化的细胞。

[3158] 实施方案III-586.如实施方案585所述的经工程化的细胞群体,其中所述群体中的至少约30%的细胞包含所述多个经工程化的细胞。

[3159] 实施方案III-587.如实施方案585或实施方案586所述的经工程化的细胞群体,其中所述多个经工程化的细胞是从不止一个供体受试者分离的原代细胞。

[3160] 实施方案III-588.如实施方案587所述的经工程化的细胞群体,其中在从个体供体获取供体样本时每个供体受试者都是健康的或者没有被怀疑患有疾病或疾患。

[3161] 实施方案III-589.一种产生组合物的方法,所述组合物包含实施方案1-562和576-196中任一项所述的经工程化的细胞或实施方案585-588中任一项所述的经工程化的细胞群体,所述方法包括

[3162] a.获取实施方案548-562中任一项所述的细胞;

[3163] b.将实施方案388-562中任一项所述的一种或多种修饰引入到所述所述细胞中;

[3164] c.基于所述修饰中的一种或多种修饰的水平从细胞群体中选择所述经工程化的细胞或选择所述经工程化的细胞群体;以及

[3165] d.配制包含所选择的经工程化的细胞或所选择的经工程化的细胞群体的组合物。

[3166] 实施方案III-590.如实施方案589所述的方法,其中方法包括基于实施方案388-561中的任一项中的所述一种或多种经修饰的分子的细胞表面表达水平选择所述经工程化的细胞或所述经工程化的细胞群体。

[3167] 实施方案III-591.如实施方案589或实施方案590所述的方法,其中基于在所述经工程化的细胞或所述经工程化的细胞群体中具有降低的表达的一种或多种经修饰的分子的水平来选择所述经工程化的细胞或所述经工程化的细胞群体。

[3168] 实施方案III-592.如实施方案589-591中任一项所述的方法,其中基于在所述经工程化的细胞或所述经工程化的细胞群体中具有增加的表达的一种或多种经修饰的分子的水平来选择所述经工程化的细胞或所述经工程化的细胞群体。

[3169] 实施方案III-593.如实施方案589-592中任一项所述的方法,其中所述方法包括在药学上可接受的添加剂、载剂、稀释剂或赋形剂中配制所述组合物。

[3170] 实施方案III-594.如实施方案593所述的方法,其中所述药学上可接受的添加剂、载剂、稀释剂或赋形剂包括药学上可接受的缓冲液。

[3171] 实施方案III-595.如实施方案594所述的方法,其中所述药学上可接受的缓冲液包括中性缓冲盐水或磷酸盐缓冲盐水。

[3172] 实施方案III-596.如实施方案589-595中任一项所述的方法,其中所述方法包括将所述组合物与Plasma-Lyte A®、右旋糖、葡聚糖、氯化钠、人血清白蛋白(HSA)、二甲基亚砜(DMSO)或其组合一起配制。

[3173] 实施方案III-597.如实施方案589-596中任一项所述的方法,其中所述方法包括将所述组合物与冷冻保护剂一起配制。

[3174] 实施方案III-598.如实施方案589-597中任一项所述的方法,其中所述方法包括在包含冷冻保护剂的无血清冷冻保存介质中配制所述组合物。

[3175] 实施方案III-599.如实施方案597或实施方案598所述的方法,其中所述冷冻保护剂包括DMSO。

[3176] 实施方案III-600.如实施方案598或实施方案599所述的方法,其中所述无血清冷冻保存介质包含约5%至约10%的DMSO(v/v)。

[3177] 实施方案III-601.如实施方案598-600中任一项所述的方法,其中所述无血清冷冻保存介质包含约10%的DMSO(v/v)。

[3178] 实施方案III-602.如实施方案589-601中任一项所述的方法,其中所述方法进一步包括将所述组合物储存在容器中。

[3179] 实施方案III-603.如实施方案589-602中任一项所述的方法,其中所述方法进一步包括在步骤(b)之前解冻所述细胞。

[3180] 实施方案III-604.如实施方案589-603中任一项所述的方法,其中所述方法进一步包括冷冻所述经工程化的细胞、所述经工程化的细胞群体或所述组合物。

[3181] 实施方案III-605.如实施方案604所述的方法,其中所述经工程化的细胞或所述经工程化的细胞群体在步骤(b)之后被冷冻。

[3182] 实施方案III-606.如实施方案605所述的方法,其中所述经工程化的细胞或所述经工程化的细胞群体在步骤(c)之前被解冻。

[3183] 实施方案III-607.如实施方案604所述的方法,其中所述经工程化的细胞或所述经工程化的细胞群体在步骤(c)之后被冷冻。

[3184] 实施方案III-608.如实施方案607所述的方法,其中所述经工程化的细胞或所述经工程化的细胞群体在步骤(d)之前被解冻。

[3185] 实施方案III-609.如实施方案604所述的方法,其中所述经工程化的细胞或所述经工程化的细胞群体在步骤(c)之后被冷冻。

[3186] 实施方案III-610.如实施方案589-609中任一项所述的方法,其中所述组合物在步骤(d)之后被冷冻。

[3187] 实施方案III-611.一种组合物,其包含实施方案1-562和576-196中任一项所述的经工程化的细胞或实施方案585-588中任一项所述的经工程化的细胞群体。

[3188] 实施方案III-612.一种通过实施方案589-610中任一项所述的方法产生的组合物。

[3189] 实施方案III-613.如实施方案611或实施方案612所述的组合物,其中所述组合物包含药学上可接受的添加剂、载剂、稀释剂或赋形剂。

[3190] 实施方案III-614.如实施方案611-613中任一项所述的组合物,其中所述组合物是无菌的。

[3191] 实施方案III-615.一种容器,其包括实施方案612-614中任一项所述的组合物。

[3192] 实施方案III-616.如实施方案615所述的容器,其中所述容器是无菌袋。

[3193] 实施方案III-617.如实施方案616所述的无菌袋,其中所述袋是冷冻保存相容袋。

[3194] 实施方案III-618.一种试剂盒,其包括实施方案612-614中任一项所述的组合物或实施方案615-617中任一项所述的容器。

[3195] 实施方案III-619.如实施方案618所述的试剂盒,其中所述试剂盒进一步包括对于使用所述经工程化的细胞或所述的经工程化的细胞群体的说明。

[3196] 实施方案III-620.一种治疗有需要的受试者的疾患或疾病的方法,其包括向所述受试者施用有效量的实施方案1-562和576-196中任一项所述的经工程化的细胞、实施方案585-588中任一项所述的经工程化的细胞群体,或实施方案611-613中任一项所述的组合物,任选地其中所述疾病或疾患是细胞缺陷。

[3197] 实施方案III-621.如实施方案620所述的方法,其中所述疾患或疾病选自由以下组成的组:糖尿病、癌症、血管形成障碍、眼部疾病、甲状腺疾病、皮肤疾病和肝脏疾病。

[3198] 实施方案III-622.如实施方案620或621所述的方法,其中所述疾患或疾病与糖尿病相关或者是糖尿病,任选地其中所述糖尿病是I型糖尿病。

[3199] 实施方案III-623.如实施方案622所述的方法,其中所述经工程化的细胞群体是胰岛细胞(包括β胰岛细胞)的群体。

[3200] 实施方案III-624.如实施方案623所述的方法,其中所述胰岛细胞选自由胰岛祖细胞、未成熟胰岛细胞和成熟胰岛细胞组成的组。

[3201] 实施方案III-625.如实施方案620所述的方法,其中所述疾患或疾病与血管疾患或疾病相关,或者是血管疾患或疾病。

[3202] 实施方案III-626.如实施方案625所述的方法,其中所述经工程化的细胞或所述经工程化的细胞群体包括内皮细胞。

[3203] 实施方案III-627.如实施方案620所述的方法,其中所述疾患或疾病与自身免疫性甲状腺炎相关,或者是自身免疫性甲状腺炎。

[3204] 实施方案III-628.如实施方案627所述的方法,其中所述经工程化的细胞或所述经工程化的细胞群体包括甲状腺祖细胞。

[3205] 实施方案III-629.如实施方案620所述的方法,其中所述疾患或疾病与肝脏疾病相关,或者是肝脏疾病。

[3206] 实施方案III-630.如实施方案629所述的方法,其中所述肝脏疾病包括肝脏硬化。

[3207] 实施方案III-631.如实施方案629或630所述的方法,其中所述经工程化的细胞或所述经工程化的细胞群体包括肝细胞或肝祖细胞。

[3208] 实施方案III-632.如实施方案620所述的方法,其中所述疾患或疾病与角膜疾病相关,或者是角膜疾病。

[3209] 实施方案III-633.如实施方案632所述的方法,其中所述角膜疾病是福克斯营养不良或先天性遗传性内皮营养不良。

[3210] 实施方案III-634.如实施方案632或633所述的方法,其中经工程化的细胞或经工程化的细胞群体包括角膜内皮祖细胞或角膜内皮细胞。

[3211] 实施方案III-635.如实施方案620所述的方法,其中所述疾患或疾病与肾脏疾病相关,或者是肾脏疾病。

[3212] 实施方案III-636.如实施方案635所述的方法,其中所述经工程化的细胞或所述经工程化的细胞群体包括肾前体细胞或肾细胞。

[3213] 实施方案III-637.如实施方案620所述的方法,其中所述疾患或疾病与癌症相关,或者是癌症。

[3214] 实施方案III-638.如实施方案637所述的方法,其中所述癌症选自由以下组成的组:B细胞急性淋巴母细胞白血病(B-ALL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤、肝癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、结直肠癌、肺癌、非小细胞肺癌、急性髓系淋巴系白血病、多发性骨髓瘤、胃癌、胃腺癌、胰腺腺癌、胶质母细胞瘤、神经母细胞瘤、肺鳞状细胞癌、肝细胞癌和膀胱癌。

[3215] 实施方案III-639.如实施方案637或638所述的方法,其中所述经工程化的细胞或所述经工程化的细胞群体包括T细胞、NK细胞或NKT细胞。

[3216] 实施方案III-640.如实施方案620所述的方法,其中所述疾患或疾病与造血系统疾病或病症相关,或者是造血系统疾病或病症。

[3217] 实施方案III-641.如实施方案640所述的方法,其中所述造血疾病或病症是骨髓增生异常、再生障碍性贫血、范科尼贫血、阵发性睡眠性血红蛋白尿、镰状细胞病、先天性纯红细胞再生障碍性贫血、施瓦赫曼-戴蒙德病、柯士文综合征、慢性肉芽肿病、肾上腺脑白质营养不良、白细胞粘附缺陷、血友病、地中海贫血、β-地中海贫血、白血病(诸如急性淋巴细胞白血病(ALL)、急性骨髓性(髓系)白血病(AML)、成年淋巴母细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、B细胞慢性淋巴细胞白血病(B-CLL)、慢性髓系白血病(CML)、幼年型慢性骨髓性白血病(CML)和幼年型髓单核细胞性白血病(JMML))、严重联合免疫缺陷病(SCID)、X连锁严重联合免疫缺陷、威斯科特-奥尔德里奇综合征(WAS)、腺苷脱氨酶(ADA)缺乏症、慢性肉芽肿病、谢迪埃克-赫加希综合征、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤(NHL)或AIDS。

[3218] 实施方案III-642.如实施方案620所述的方法,其中所述疾患或疾病与白血病或骨髓瘤相关,或者是白血病或骨髓瘤。

[3219] 实施方案III-643.如实施方案620所述的方法,其中所述疾患或疾病与自身免疫性疾病或疾患相关,或者是自身免疫性疾病或疾患。

[3220] 实施方案III-644.如实施方案643所述的方法,其中所述自身免疫性疾病或疾患是急性播散性脑脊髓炎、急性出血性白质脑炎、阿狄森氏病、无丙种球蛋白血症、斑秃、肌萎缩侧索硬化症、强直性脊柱炎、抗磷脂综合征、抗合成酶综合征、特应性过敏、自身免疫性再生障碍性贫血、自身免疫性心肌病、自身免疫性肠病、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性肝炎、自身免疫性内耳疾病、自身免疫性淋巴细胞增殖综合征、自身免疫性周围神经病变、自身免疫性胰腺炎、自身免疫性多内分泌腺病综合征、自身免疫性黄体酮皮炎、自身免疫性血小板减少性紫癜、自身免疫性荨麻疹、自身免疫性葡萄膜炎、巴洛病、巴洛同心性硬化、贝赫切特综合征、伯格病、比克斯塔夫脑炎、布劳综合征、大疱性类天疱疮、癌症、卡斯尔曼病、乳糜泻、慢性炎性脱髓鞘性多发性神经病、慢性复发性多灶性骨髓炎、查格-施特劳斯综合征、瘢痕性类天疱疮、科干综合征、冷凝集素病、补体成分2缺乏症、颅动脉炎、CREST综合征、克罗恩氏病、库欣综合征、皮肤白细胞破碎性血管炎、德戈病、德库姆病、疱疹样皮炎、皮肌炎、1型糖尿病、弥漫性皮肤全身性硬化症、德雷斯勒综合征、盘状红斑狼疮、湿疹、附着点炎相关性关节炎、嗜酸性筋膜炎、嗜酸细胞性胃肠炎、获得性大疱性表皮松解症、结节性红斑、原发性混合性冷凝球蛋白血症、埃文氏综合征、进行性骨化性纤维发育不良、纤维性肺泡炎、胃炎、胃肠道类天疱疮、巨细胞动脉炎、肾小球肾炎、肾炎综合征、格雷夫氏病、格林巴利综合征(GBS)、桥本氏脑炎、桥本氏甲状腺炎、溶血性贫血、过敏性紫癜、妊娠疱疹、低丙种球蛋白血症、特发性炎性脱髓鞘疾病、特发性肺纤维化、特发性血小板减少性紫癜、IgA肾病、包涵体肌炎、炎性脱髓鞘性多发性神经病、间质性膀胱炎、幼年型特发性关节炎、幼年型类

风湿性关节炎、川崎病、兰伯特-伊顿肌无力综合征、白细胞破碎性血管炎、扁平苔藓、硬化性苔藓、线性IgA病(LAD)、葛雷克氏病、狼疮性肝炎、红斑狼疮、马吉德综合征、梅尼埃病、显微镜下多血管炎、米勒-费雪综合征、混合性结缔组织病、硬斑病、急性痘疮样苔藓样糠疹、多发性硬化症、重症肌无力、肌炎、视神经脊髓炎、神经性肌强直、眼瘢痕性类天疱疮、斜视性眼阵挛肌阵挛综合征、甲状腺炎、复发性风湿病、副肿瘤性小脑变性、阵发性睡眠性血红蛋白尿(PNH)、帕罗综合征、帕森斯-特纳综合征、扁平部炎、天疱疮、寻常型天疱疮、恶性贫血、静脉周围脑脊髓炎、POEMS综合征、结节性多动脉炎、风湿性多发性肌痛症、多发性肌炎、原发性胆汁性肝硬化、原发性硬化性胆管炎、进行性炎性神经病、银屑病、银屑病关节炎、坏疽性脓皮病、纯红细胞再生障碍、拉斯穆森脑炎、雷诺现象、复发性多软骨炎、赖特综合征、不宁腿综合征、腹膜后纤维化、类风湿性关节炎、类风湿热、结节病、施密特综合征、施尼茨勒综合征、巩膜炎、硬皮病、斯耶格伦氏综合征、脊柱关节病、斯蒂尔病、僵人综合征、亚急性细菌性心内膜炎、苏萨克综合征、斯维特综合征、西德纳姆舞蹈病、交感性眼炎、高压性大动脉炎、颞动脉炎、痛性眼肌麻痹综合征、横贯性脊髓炎、溃疡性结肠炎、未分化结缔组织病、未分化脊柱关节病、血管炎、白癜风或韦格内氏肉芽肿症。

[3221] 实施方案III-645.如实施方案640-644中任一项所述的方法,其中经工程化的细胞或经工程化的细胞群体包括造血干细胞(HSC)或其衍生物。

[3222] 实施方案III-646.如实施方案620所述的方法,其中所述疾患或疾病与帕金森病、亨廷顿病、多发性硬化症、神经变性疾病或疾患、注意力缺陷多动障碍(ADHD)、抽动秽语综合征(TS)、精神分裂症、精神病、抑郁症、神经精神障碍性中风或肌萎缩侧索硬化症(ALS)相关,或者其中所述疾病或疾患是帕金森病、亨廷顿病、多发性硬化症、神经变性疾病或疾患、注意力缺陷多动障碍(ADHD)、抽动秽语综合征(TS)、精神分裂症、精神病、抑郁症、神经精神障碍性中风或肌萎缩侧索硬化症(ALS)。

[3223] 实施方案III-647.如实施方案646所述的方法,其中所述经工程化的细胞或经工程化的细胞群体包括神经细胞或胶质细胞。

[3224] 实施方案III-648.如实施方案620-647中任一项所述的方法,其中所述经工程化的细胞或所述经工程化的细胞群体在施用之前被扩增和冷冻保存。

[3225] 实施方案III-649.如实施方案620-648中任一项所述的方法,其中所述方法包括静脉内注射、肌肉内注射、血管内注射,或所述经工程化的细胞、所述经工程化的细胞群体或所述组合物的移植。

[3226] 实施方案III-650.如实施方案649所述的方法,其中移植包括血管内注射或肌内注射。

[3227] 实施方案III-651.如实施方案620-650中任一项所述的方法,其中所述方法进一步包括向所述受试者施用一种或多种免疫抑制剂。

[3228] 实施方案III-652.如实施方案620-651中任一项所述的方法,其中已经向所述受试者施用了一种或多种免疫抑制剂。

[3229] 实施方案III-653.如实施方案651或实施方案652所述的方法,其中所述一种或多种免疫抑制剂是小分子或抗体。

[3230] 实施方案III-654.如实施方案651-653中任一项所述的方法,其中所述一种或多种免疫抑制剂选自由以下组成的组:环孢菌素、硫唑嘌呤、霉酚酸、霉酚酸酯、皮质类固醇、

泼尼松、甲氨蝶呤、金盐、柳氮磺吡啶、抗疟药、布喹那、来氟米特、咪唑立宾、15-脱氧精胍菌素、6-巯基嘌呤、环磷酰胺、雷帕霉素、他克莫司(FK-506)、OKT3、抗胸腺细胞球蛋白、胸腺五肽(胸腺素-α)、免疫调节剂和免疫抑制抗体。

[3231] 实施方案III-655.如实施方案651-654中任一项所述的方法,其中所述一种或多种免疫抑制剂包括环孢菌素。

[3232] 实施方案III-656.如实施方案651-654中任一项所述的方法,其中所述一种或多种免疫抑制剂包括霉酚酸酯。

[3233] 实施方案III-657.如实施方案651-654任一项所述的方法,其中所述一种或多种免疫抑制剂包括皮质类固醇。

[3234] 实施方案III-658.如实施方案651-654中任一项所述的方法,其中所述一种或多种免疫抑制剂包括环磷酰胺。

[3235] 实施方案III-659.如实施方案651-654中任一项所述的方法,其中所述一种或多种免疫抑制剂包括雷帕霉素。

[3236] 实施方案III-660.如实施方案651-654中任一项所述的方法,其中所述一种或多种免疫抑制剂包括他克莫司(FK-506)。

[3237] 实施方案III-661.如实施方案651-654中任一项所述的方法,其中所述一种或多种免疫抑制剂包括抗胸腺细胞球蛋白。

[3238] 实施方案III-662.如实施方案651-654中任一项所述的方法,其中所述一种或多种免疫抑制剂是一种或多种免疫调节剂。

[3239] 实施方案III-663.如实施方案662所述的方法,其中所述一种或多种免疫调节剂是小分子或抗体。

[3240] 实施方案III-664.如实施方案662或实施方案663所述的方法,其中所述抗体与选自由以下组成的组的一种或多种受体或配体结合:IL-2受体的p75、MHC、CD2、CD3、CD4、CD7、CD28、B7、CD40、CD45、IFN-γ、TNF-α、IL-4、IL-5、IL-6R、IL-6、IGF、IGFR1、IL-7、IL-8、IL-10、CD11a、CD58,以及与它们的配体中的任何配体结合的抗体。

[3241] 实施方案III-665.如实施方案651-664中任一项所述的方法,其中在施用所述经工程化的细胞、所述经工程化的细胞群体,或所述组合物之前向所述受试者施用或已经施用了所述一种或多种免疫抑制剂。

[3242] 实施方案III-666.如实施方案651-665中任一项所述的方法,其中在施用所述经工程化的细胞、所述经工程化的细胞群体,或所述组合物之前至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天向所述受试者施用或已经施用了所述一种或多种免疫抑制剂。

[3243] 实施方案III-667.如实施方案651-666中任一项所述的方法,其中在施用所述经工程化的细胞、所述经工程化的细胞群体,或所述组合物之前至少1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周或更长时间向所述受试者施用或已经施用了所述一种或多种免疫抑制剂。

[3244] 实施方案III-668.如实施方案651-664中任一项所述的方法,其中在施用所述经工程化的细胞、所述经工程化的细胞群体,或所述组合物之后向所述受试者施用或已经施用了所述一种或多种免疫抑制剂。

[3245] 实施方案III-669.如实施方案651-664和668中任一项所述的方法,其中在施用所

述经工程化的细胞、所述经工程化的细胞群体,或所述组合物之后至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天向所述受试者施用或已经施用了所述一种或多种免疫抑制剂。

[3246] 实施方案III-670.如实施方案651-664、668和669中任一项所述的方法,其中在施用所述经工程化的细胞、所述经工程化的细胞群体,或所述组合物之后至少1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周或更长时间向所述受试者施用或已经施用了所述一种或多种免疫抑制剂。

[3247] 实施方案III-671.如实施方案651-664中任一项所述的方法,其中在第一次施用所述经工程化的细胞、所述经工程化的细胞群体,或所述组合物的同一天向所述受试者施用或已经施用了所述一种或多种免疫抑制剂。

[3248] 实施方案III-672.如实施方案651-664中任一项所述的方法,其中在第一次和/或第二次施用所述经工程化的细胞、所述经工程化的细胞群体,或所述组合物的施用之后向所述受试者施用或已经施用了所述一种或多种免疫抑制剂。

[3249] 实施方案III-673.如实施方案651-664中任一项所述的方法,其中在第一次和/或第二次施用所述经工程化的细胞、所述经工程化的细胞群体,或所述组合物的施用之前向所述受试者施用或已经施用了所述一种或多种免疫抑制剂。

[3250] 实施方案III-674.如实施方案651-664中任一项所述的方法,其中在第一次和/或第二次施用所述经工程化的细胞、所述经工程化的细胞群体,或所述组合物的施用之前至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天向所述受试者施用或已经施用了所述一种或多种免疫抑制剂。

[3251] 实施方案III-675.如实施方案651-664中任一项所述的方法,其中在第一次和/或第二次施用所述经工程化的细胞、所述经工程化的细胞群体,或所述组合物的施用之前至少1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周或更长时间向所述受试者施用或已经施用了所述一种或多种免疫抑制剂。

[3252] 实施方案III-676.如实施方案651-664中任一项所述的方法,其中在第一次和/或第二次施用所述经工程化的细胞、所述经工程化的细胞群体,或所述组合物的施用之后至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天向所述受试者施用或已经施用了所述一种或多种免疫抑制剂。

[3253] 实施方案III-677.如实施方案651-664中任一项所述的方法,其中在第一次和/或第二次施用所述经工程化的细胞、所述经工程化的细胞群体,或所述组合物的施用之后至少1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周或更长时间向所述受试者施用或已经施用了所述一种或多种免疫抑制剂。

[3254] 实施方案III-678.如实施方案651-677中任一项所述的方法,其中所述一种或多种免疫抑制剂以与为减少不包含所述经工程化的细胞或所述经工程化的细胞群体的所述一种或多种修饰的细胞的免疫排斥而施用的剂量相比较低的剂量施用。

[3255] 实施方案III-679.如实施方案620-678中任一项所述的方法,其中所述方法进一步包括在向所述受试者施用所述经工程化的细胞、所述经工程化的细胞群体,或所述组合物之后活化所述安全开关以诱导受控的细胞死亡。

[3256] 实施方案III-680.如实施方案620-679中任一项所述的方法,其中在向所述受试者施用所述一种或多种免疫抑制剂之后,所述自杀基因或所述自杀开关被活化来诱导受控

的细胞死亡。

[3257] 实施方案III-681.如实施方案620-679中任一项所述的方法,其中在向所述受试者施用所述一种或多种免疫抑制剂之前,所述自杀基因或所述自杀开关被活化来诱导受控的细胞死亡。

[3258] 实施方案III-682.如实施方案620-681中任一项所述的方法,其中所述安全开关被活化为在对所述受试者产生细胞毒性或其他负面后果的情况下诱导受控的细胞死亡。

[3259] 实施方案III-683.如实施方案620-682中任一项所述的方法,其中所述方法包括施用允许所述经工程化的细胞、所述经工程化的细胞群体,或所述组合物耗竭的剂。

[3260] 实施方案III-684.如实施方案683所述的方法,其中允许所述经工程化的细胞耗竭的所述剂是识别在所述细胞表面上表达的蛋白质的抗体。

[3261] 实施方案III-685.如实施方案684所述的方法,其中所述抗体选自由识别CCR4、CD16、CD19、CD20、CD30、EGFR、GD2、HER1、HER2、MUC1、PSMA和RQR8的抗体组成的组。

[3262] 实施方案III-686.如实施方案684或实施方案685所述的方法,其中所述抗体选自由莫格利珠单抗、AFM13、MOR208、奥比妥珠单抗、乌妥昔单抗、奥卡妥珠单抗、利妥昔单抗、利妥昔单抗-R11b、托木妥昔单抗、RO5083945(GA201)、西妥昔单抗、Hu14.18K322A、Hu14.18-IL2、Hu3F8、地尼妥昔单抗、c.60C3-R11c及其生物类似物组成的组。

[3263] 实施方案III-687.如实施方案620-684中任一项所述的方法,其中所述方法包括施用识别所述细胞表面上的所述一种或多种致耐受因子或所述一种或多种另外的致耐受因子的剂。

[3264] 实施方案III-688.如实施方案620-687中任一项所述的方法,其中所述方法进一步包括向所述受试者施用一种或多种另外的治疗剂。

[3265] 实施方案III-689.如实施方案620-687中任一项所述的方法,其中已经向所述受试者施用了一种或多种另外的治疗剂。

[3266] 实施方案III-690.如实施方案620-689中任一项所述的方法,其中所述方法进一步包括监测所述方法的治疗功效。

[3267] 实施方案III-691.如实施方案620-690中任一项所述的方法,其进一步包括监测所述方法的预防功效。

[3268] 实施方案III-692.如实施方案690或实施方案691所述的方法,其中重复所述方法,直到出现一种或多种疾病症状的所需抑制。

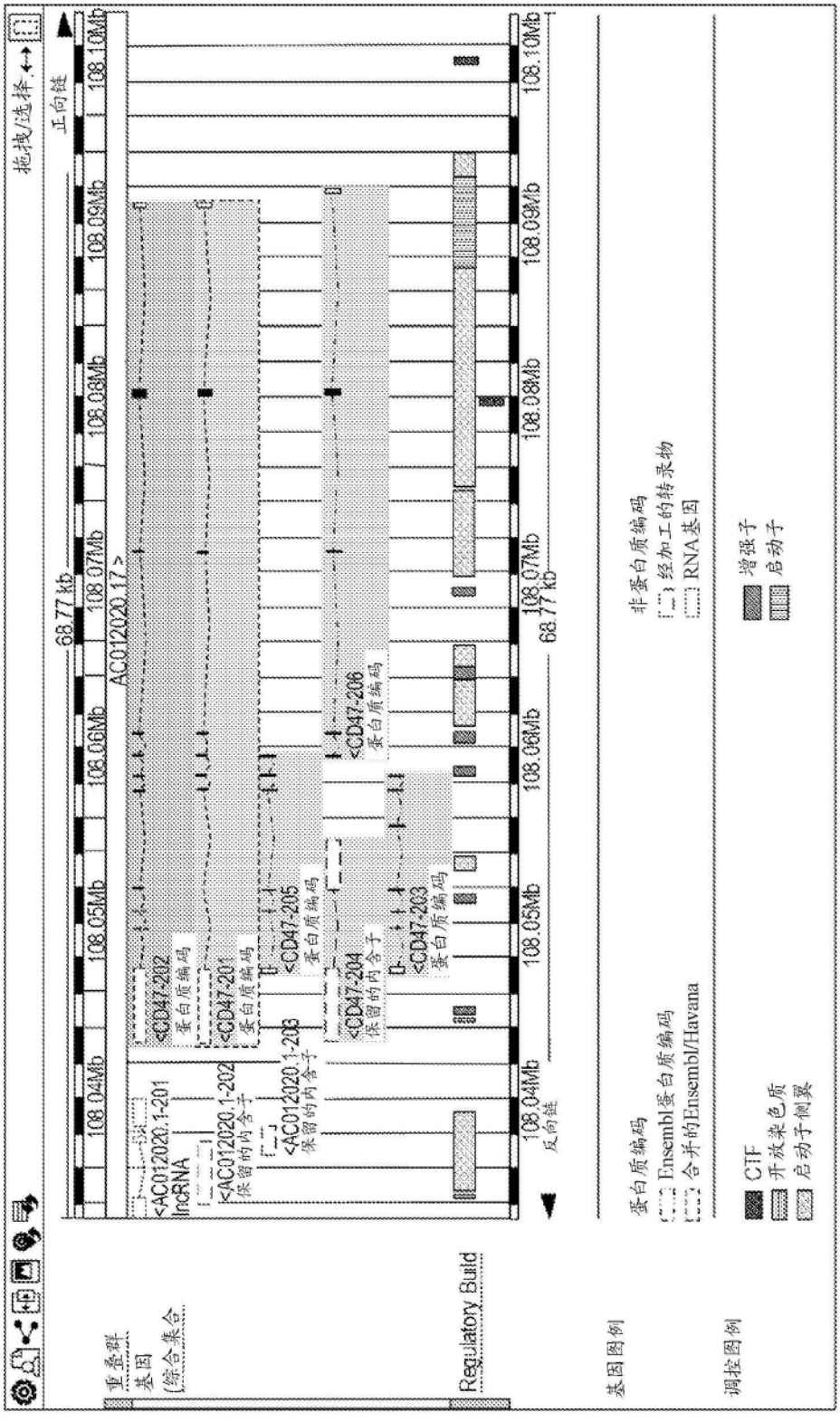

拖拽/选择
正向链
68.77 kb
108.04Mb
108.05Mb
108.06Mb
108.07Mb
108.08Mb
108.09Mb
108.10Mb
AC012020.17 >
重叠群
基因
(综合集合...
<AC012020.1-201
lncRNA
<AC012020.1-202
保留的内含子
<CD47-202
蛋白质编码
<CD47-201
蛋白质编码
<AC012020.1-203
保留的内含子
<CD47-205
蛋白质编码
<CD47-204
保留的内含子
<CD47-203
蛋白质编码
<CD47-206
蛋白质编码
Regulatory Build
反向链
68.77 kb
基因图例
蛋白质编码
Ensembl蛋白质编码
合并的Ensembl/Havana
非蛋白质编码
经加工的转录物
RNA基因
调控图例
CTF
开放染色质
启动子侧翼
增强子
启动子

图1

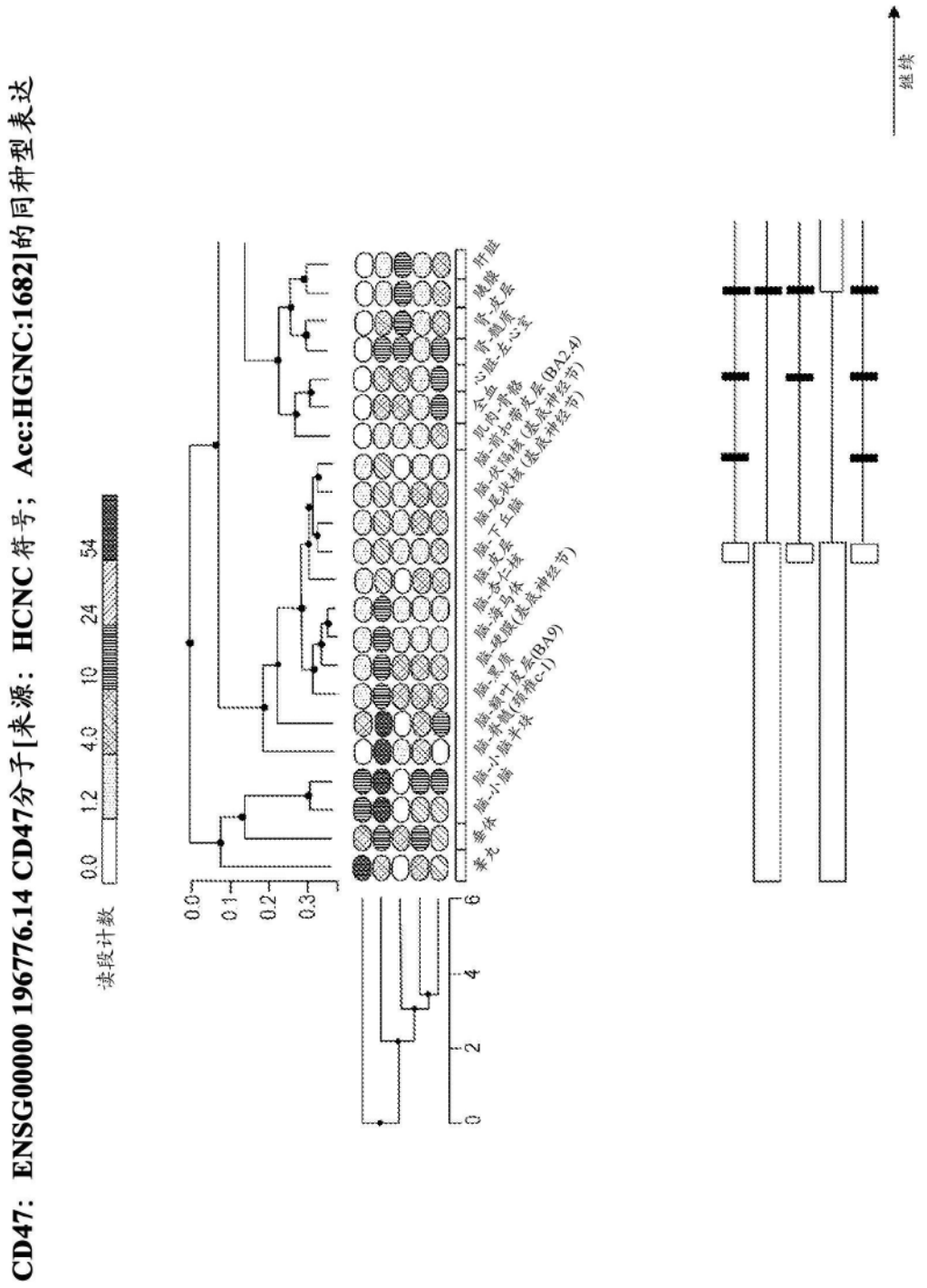

CD47: ENSG00000 196776.14 CD47分子[来源: HCNC 符号; Acc:HGNC:1682]的同种型表达
读段计数
0.0
1.2
4.0
10
24
54
0.0
0.1
0.2
0.3
0
2
4
6
睾丸
脑-小脑
脑-小脑半球
脑-丘脑
脑-额叶皮层(BA9)
脑-海马体
脑-杏仁核
脑-尾核
脑-下丘脑
脑-皮层
脑-皮层(皮质神经节)
脑-皮质(皮质神经节)
脑-皮质(皮质神经节)
脑-皮层(BA24)
脑-前扣带皮层(皮质神经节)
脑-皮质(皮质神经节)
肌肉-骨骼
全血
心脏-左心室
肾-髓质
肾-皮质
脾脏
肝脏
继续

图2A

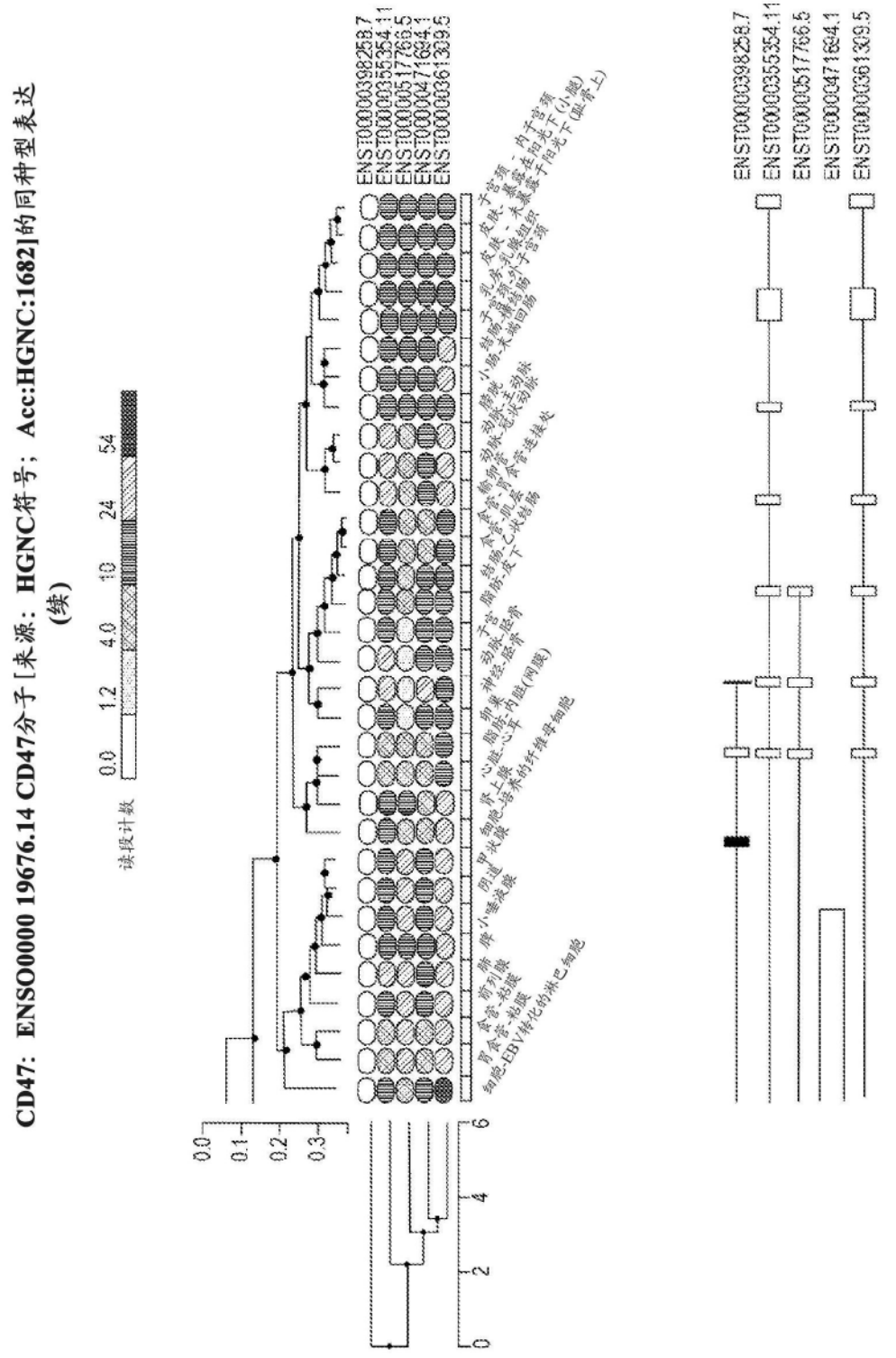

CD47: ENSO0000 19676.14 CD47分子[来源: HGNC符号; Acc:HGNC:1682]的同种型表达
(续)
读段计数
0.0
1.2
4.0
10
24
54
ENST00000398258.7
ENST00000355354.11
ENST00000517766.5
ENST00000471694.1
ENST00000361309.5
0.0
0.1
0.2
0.3
0
2
4
6

图2B

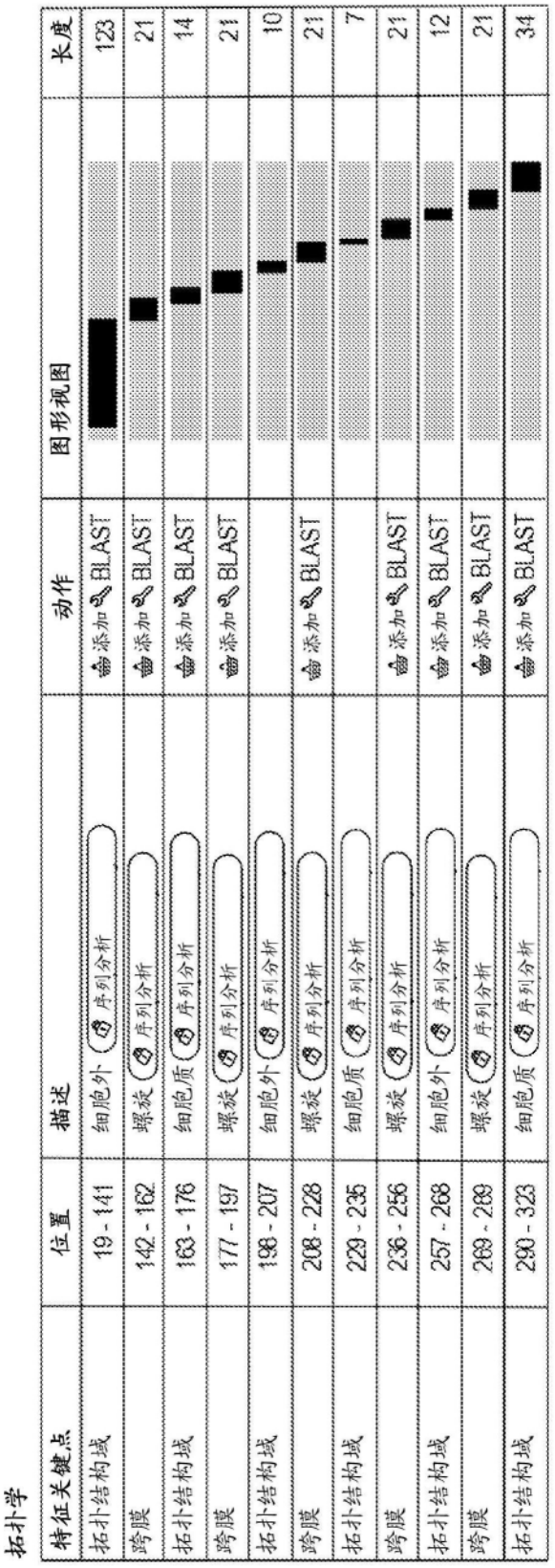

拓扑学
特征关键点
位置
描述
动作
图形视图
长度
拓扑结构域
19 - 141
细胞外
序列分析
添加
BLAST
123
跨膜
142 - 162
螺旋
序列分析
添加
BLAST
21
拓扑结构域
163 - 176
细胞质
序列分析
添加
BLAST
14
跨膜
177 - 197
螺旋
序列分析
添加
BLAST
21
拓扑结构域
198 - 207
细胞外
序列分析
添加
BLAST
10
跨膜
208 - 228
螺旋
序列分析
添加
BLAST
21
拓扑结构域
229 - 235
细胞质
序列分析
添加
BLAST
7
跨膜
236 - 256
螺旋
序列分析
添加
BLAST
21
拓扑结构域
257 - 268
细胞外
序列分析
添加
BLAST
12
跨膜
269 - 289
螺旋
序列分析
添加
BLAST
21
拓扑结构域
290 - 323
细胞质
序列分析
添加
BLAST
34

图3

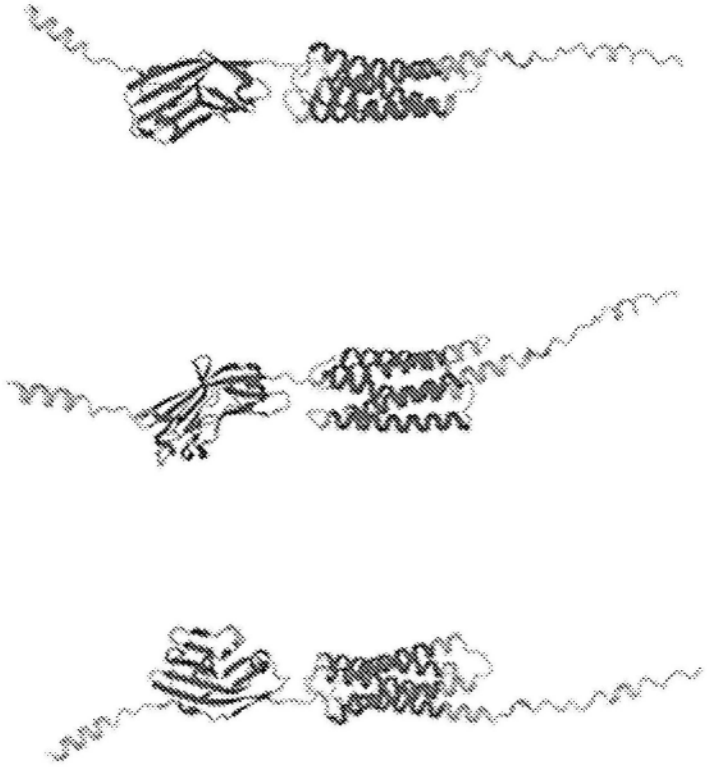


图4

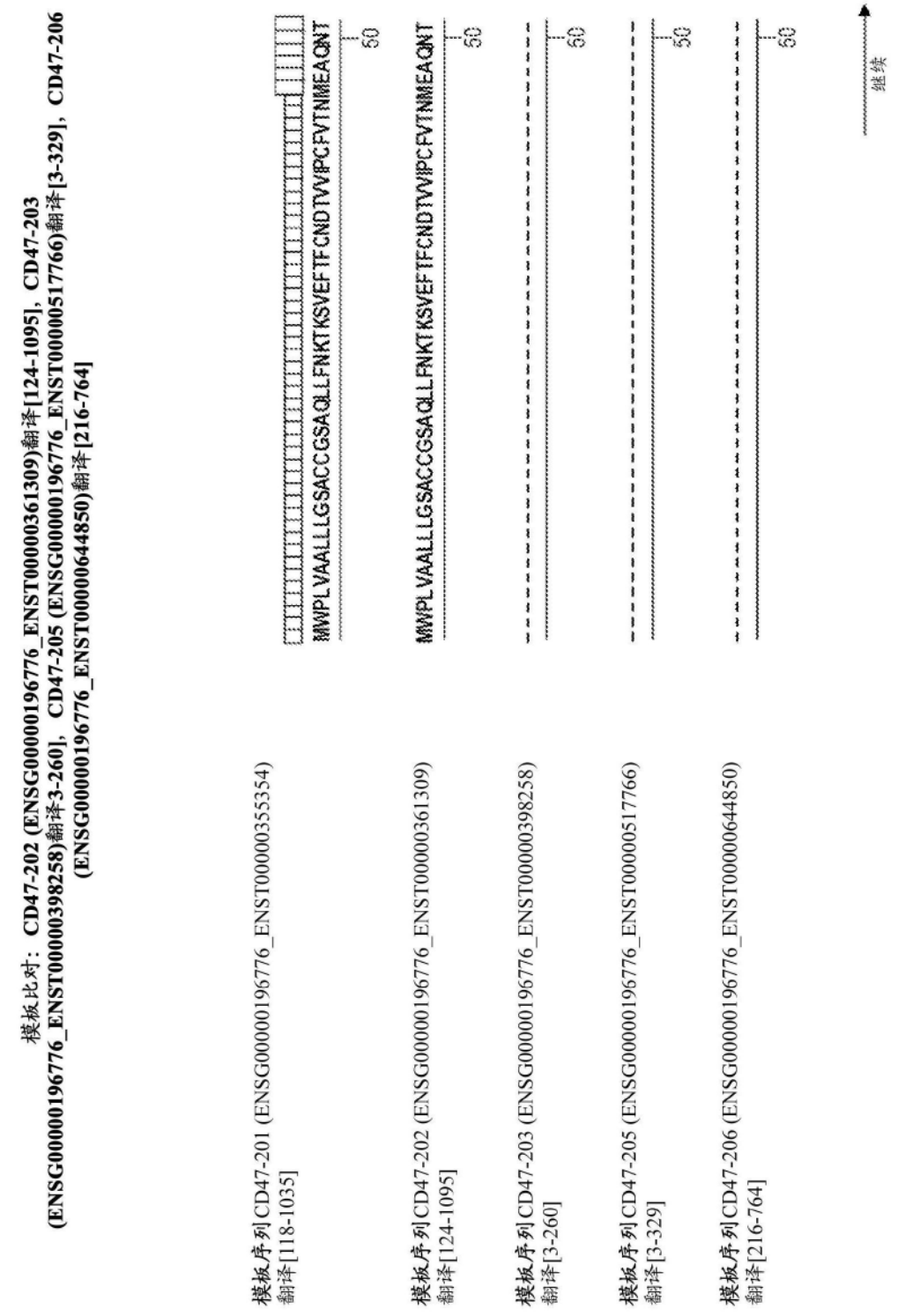

模板比对：CD47-202 (ENSG00000196776_ENST00000361309)翻译[124-1095]，CD47-203
(ENSG00000196776_ENST00000398258)翻译3-260]，CD47-205 (ENSG00000196776_ENST00000517766)翻译[3-329]，CD47-206
(ENSG00000196776_ENST00000644850)翻译[216-764]
模板序列CD47-201 (ENSG00000196776_ENST00000355354)
翻译[118-1035]
MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFVTNMEAQNT
60
模板序列CD47-202 (ENSG00000196776_ENST00000361309)
翻译[124-1095]
MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFVTNMEAQNT
60
模板序列CD47-203 (ENSG00000196776_ENST00000398258)
翻译[3-260]
60
模板序列CD47-205 (ENSG00000196776_ENST00000517766)
翻译[3-329]
60
模板序列CD47-206 (ENSG00000196776_ENST00000644850)
翻译[216-764]
60
继续

图5A

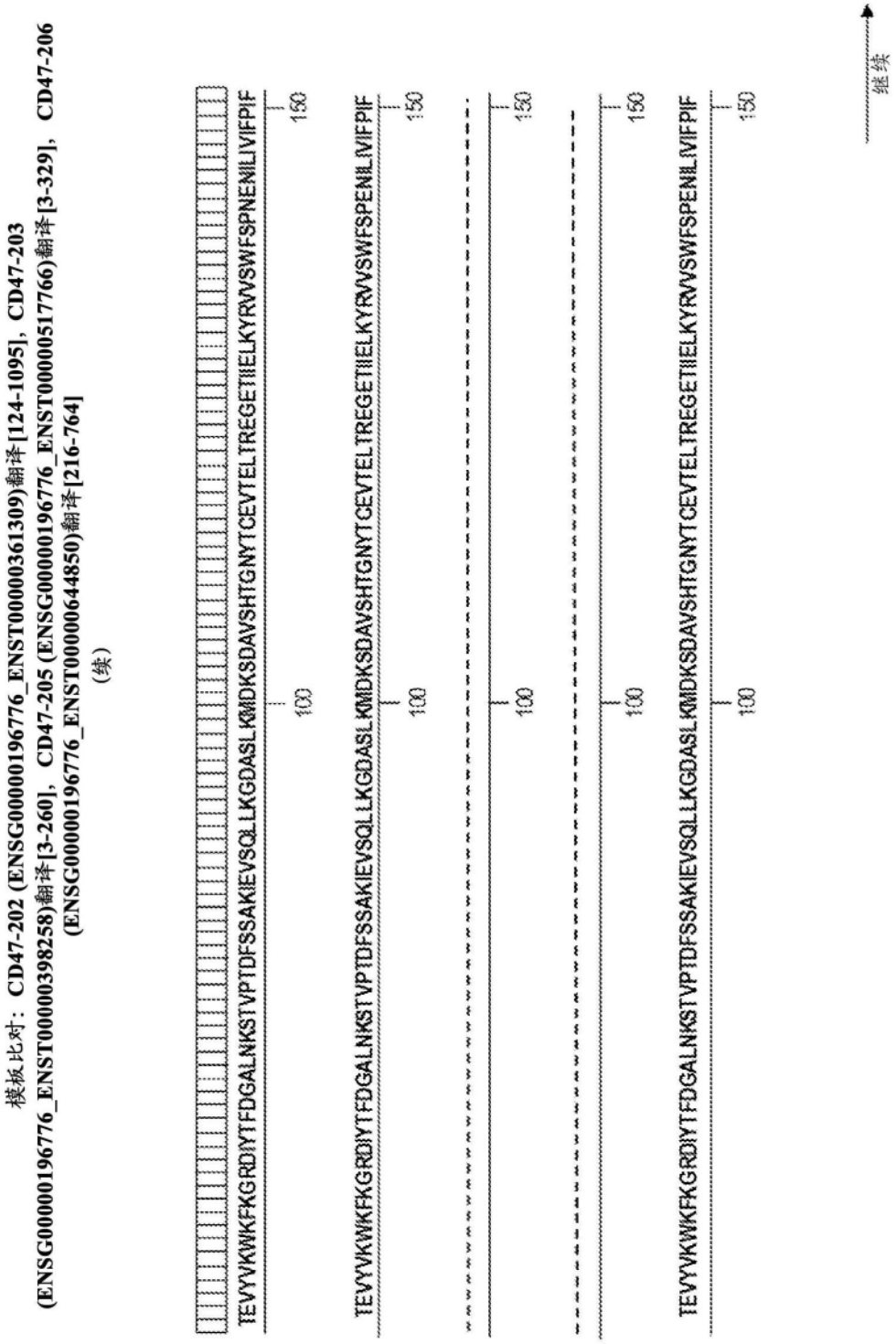
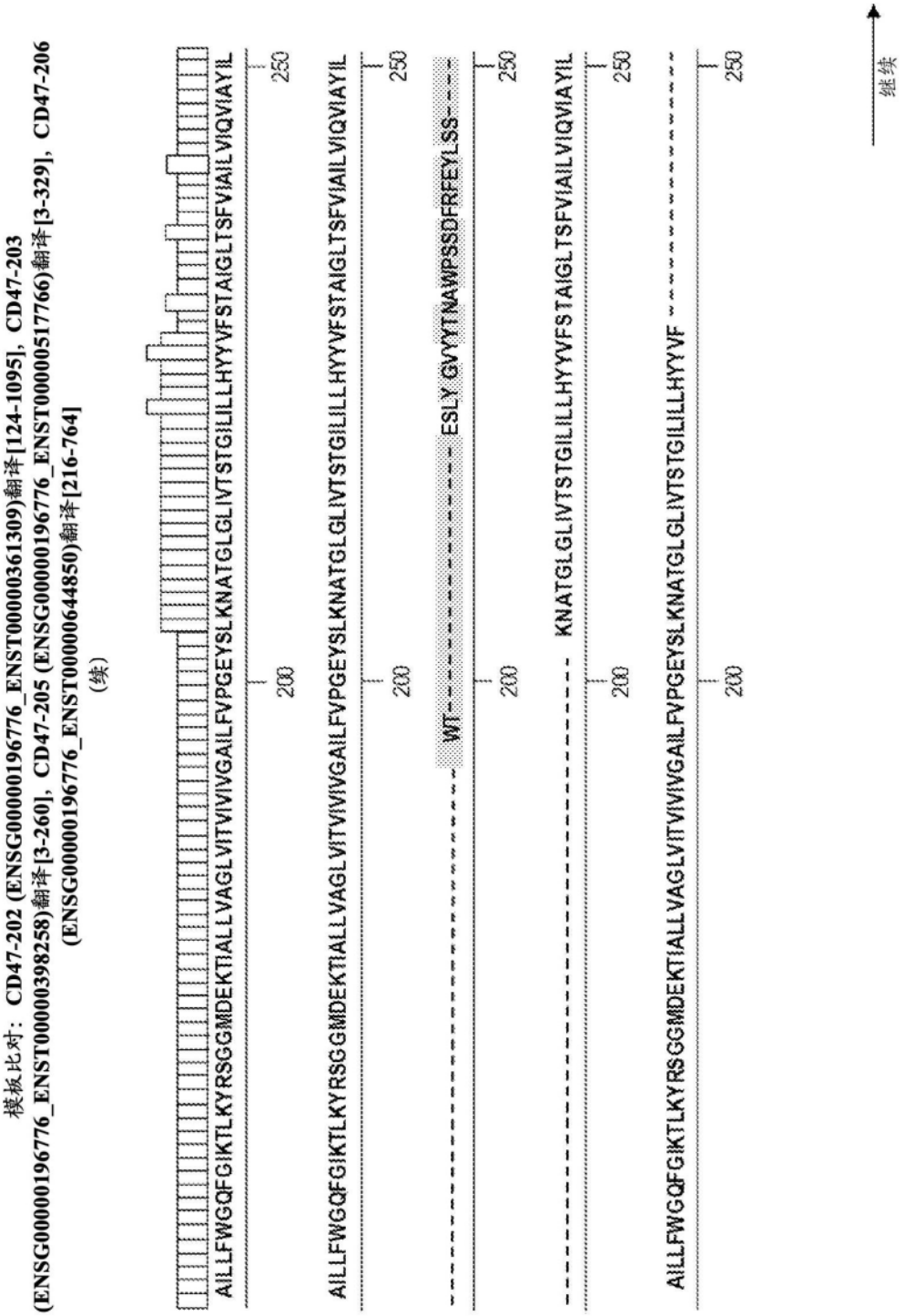

模板比对：CD47-202 (ENSG00000196776_ENST00000361309)翻译[124-1095]，CD47-203
(ENSG00000196776_ENST00000398258)翻译[3-260]，CD47-205 (ENSG00000196776_ENST00000517766)翻译[3-329]，CD47-206
(ENSG00000196776_ENST00000644850)翻译[216-764]
(续)
TEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIF
TEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIF
TEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIF
TEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIF
100
150
继续

图5B


模板比对：CD47-202 (ENSG00000196776_ENST00000361309)翻译[124-1095]，CD47-203
(ENSG00000196776_ENST00000398258)翻译[3-260]，CD47-205 (ENSG00000196776_ENST00000517766)翻译[3-329]，CD47-206
(ENSG00000196776_ENST00000644850)翻译[216-764]
(续)
AILLFWGQFGIKTLKYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIVTSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYIL
200
250
AILLFWGQFGIKTLKYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIVTSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYIL
200
250
WT - - -

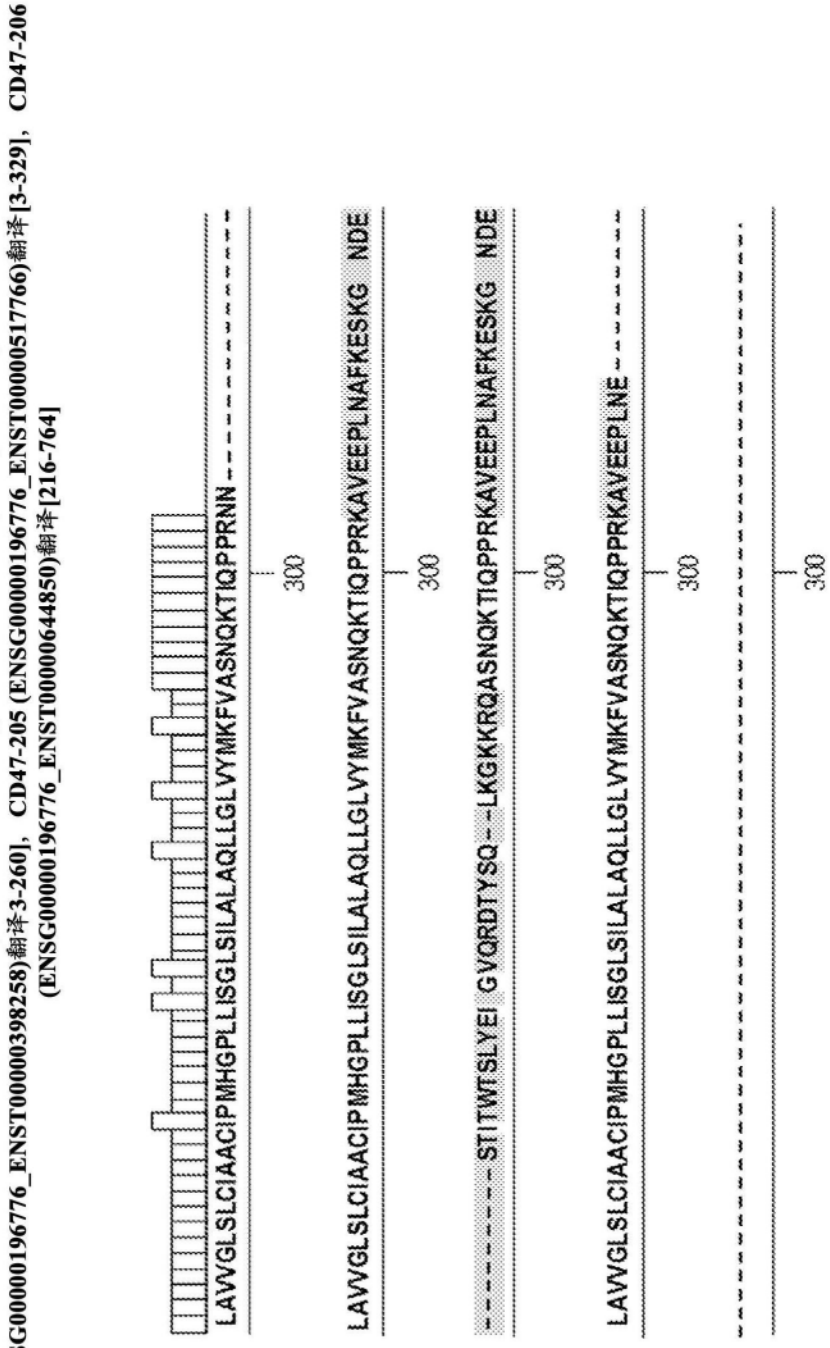

模板比对: CD47-202 (ENSG00000196776_ENST00000361309)翻译[124-1095], CD47-203 (ENSG00000196776_ENST00000398258)翻译3-260], CD47-205 (ENSG00000196776_ENST00000517766)翻译[3-329], CD47-206 (ENSG00000196776_ENST00000644850)翻译[216-764]
LAVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRNN----------
300
LAVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRKAVEEPLNAFKESKG NDE
300
---------STITWTSLYEI GVQRDTYSQ--LKGKKRQASNQKTIQPPRKAVEEPLNAFKESKG NDE
300
LAVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRKAVEEPLNE----------
300
300

图5D

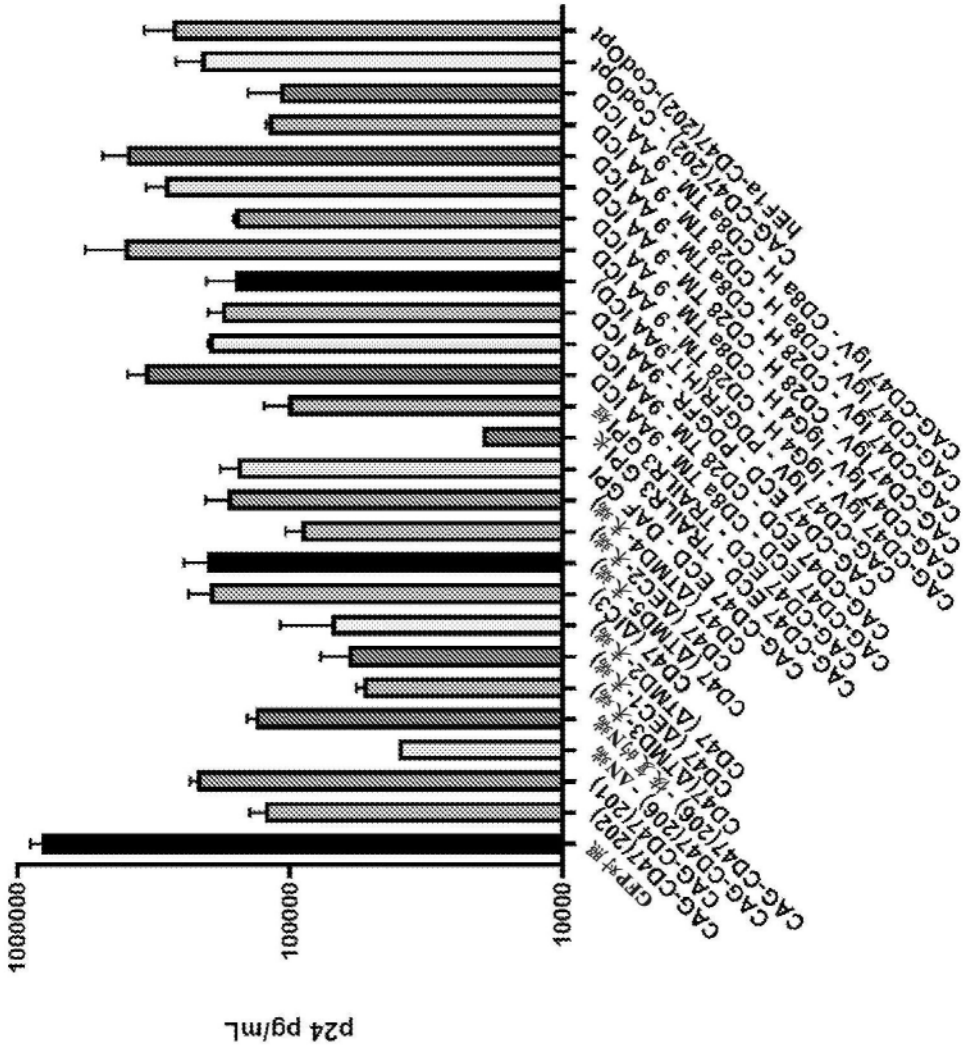

p24 pg/mL
1000000
100000
10000
CAG-CD47(202)
CAG-CD47(206)
CD47(206)-AN突
CD47(ATMD3-AN突
CD47 (AEC1-*突)
CD47 (ATMD2-*突)
CD47 (ATMD5-AIC3)
CD47 (AEC2-*突)
CD47 (ATMD4-*突)
CAG-CD47 ECD - DAF - *突)
CAG-CD47 ECD - TRAILR3 GPI*突
CAG-CD47 ECD - CD28 TM - 9AA ICD
CAG-CD47 ECD - PDGFR(H_T_9AA ICD
CAG-CD47 IgV - IgG4 H - CD28 TM - 9AA ICD
CAG-CD47 IgV - CD28 H - CD28 TM - 9AA ICD
CAG-CD47 IgV - CD8a H - CD28 TM - 9AA ICD
CAG-CD47 IgV - CD8a H - CD8a TM - 9AA ICD
CAG-CD47(202) - CD8a TM - 9AA ICD
NEF1a-CD47(202)-CodOpt
CAG-CD47 IgV - CD8a H - CodOpt

图6

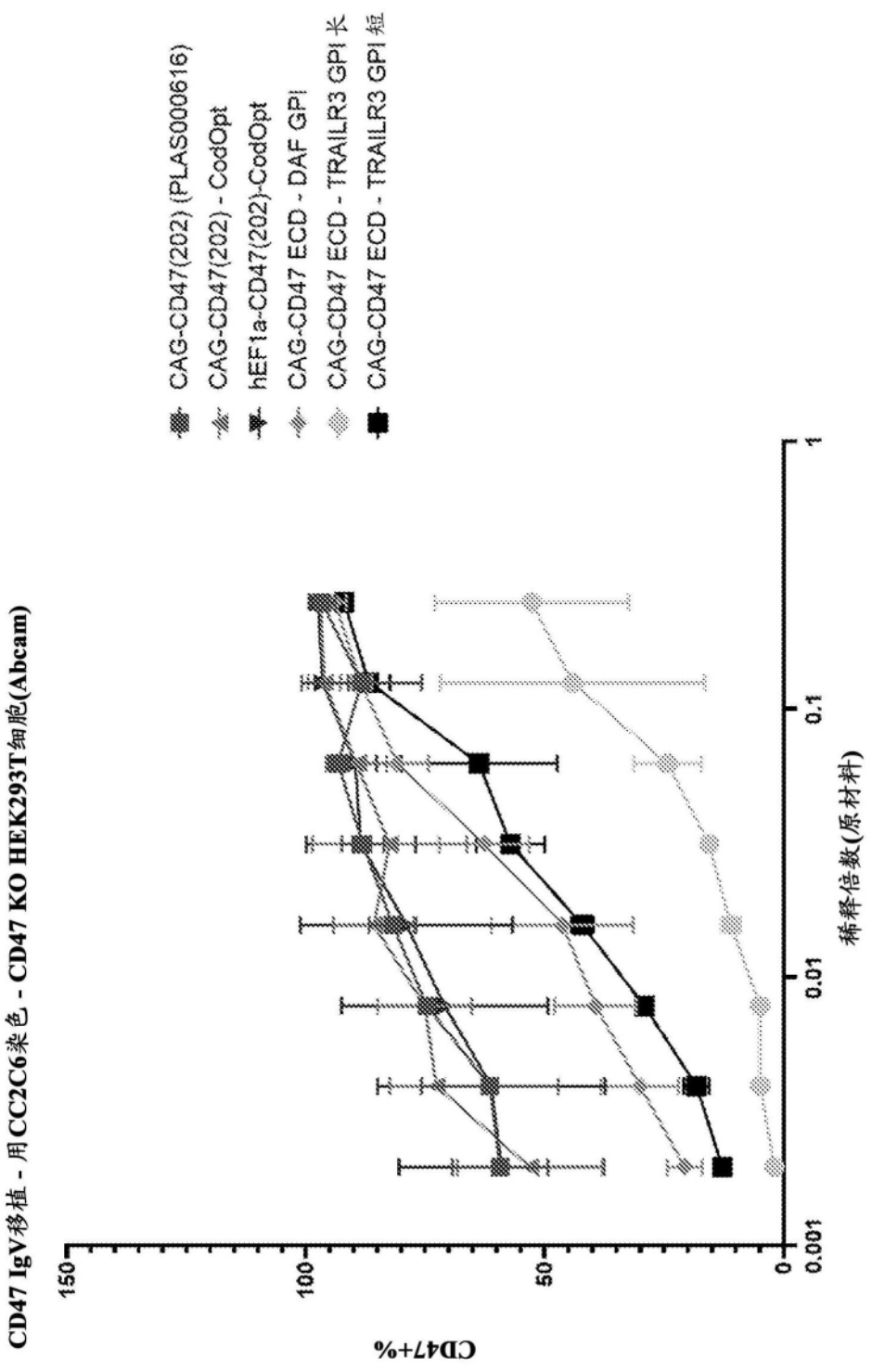

CD47 IgV移植 - 用CC2C6染色 - CD47 KO HEK293T细胞(Abcam)
CAG-CD47(202) (PLAS000616)
CAG-CD47(202) - CodOpt
hEF1a-CD47(202)-CodOpt
CAG-CD47 ECD - DAF GPI
CAG-CD47 ECD - TRAILR3 GPI 长
CAG-CD47 ECD - TRAILR3 GPI 短
CD47+%
150
100
50
0
0.001
0.01
0.1
1
稀释倍数(原材料)

图7

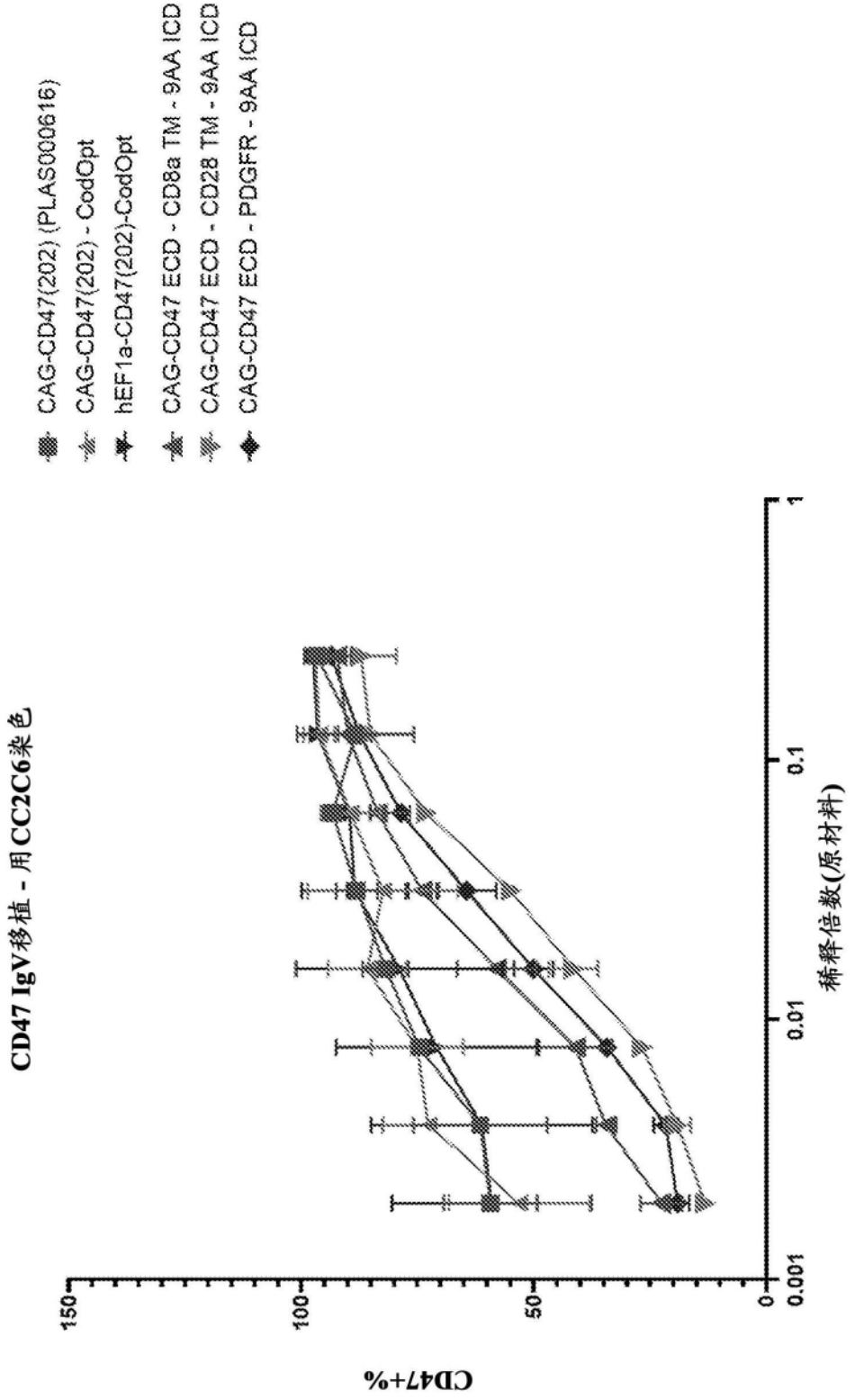

CD47 IgV移植 - 用CC2C6染色
CAG-CD47(202) (PLAS000616)
CAG-CD47(202) - CodOpt
hEF1a-CD47(202)-CodOpt
CAG-CD47 ECD - CD8a TM - 9AA ICD
CAG-CD47 ECD - CD28 TM - 9AA ICD
CAG-CD47 ECD - PDGFR - 9AA ICD
CD47+%
150
100
50
0
0.001
0.01
0.1
1
稀释倍数(原材料)

图8

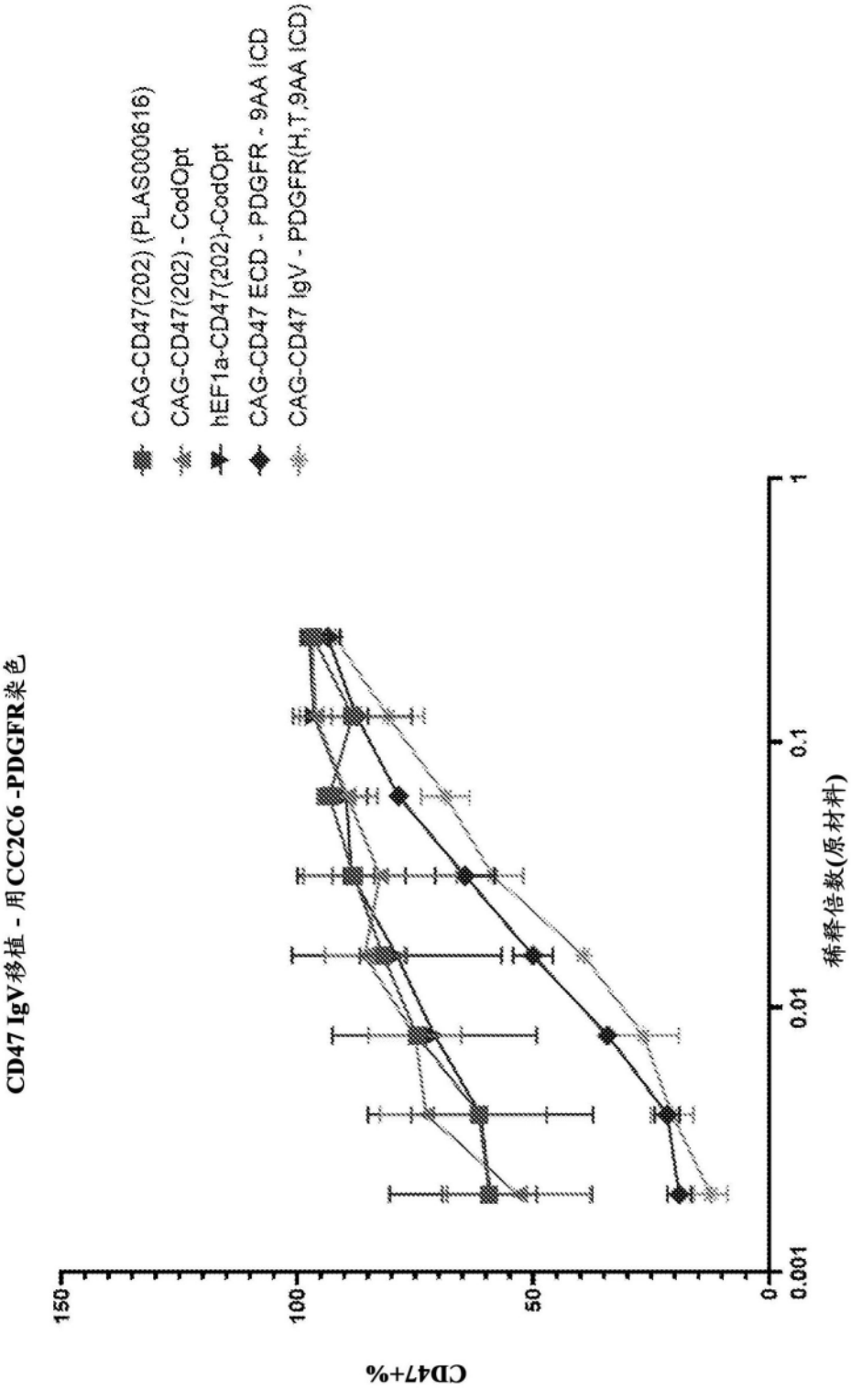

CD47 IgV移植 - 用CC2C6 -PDGFR染色
CAG-CD47(202) (PLAS000616)
CAG-CD47(202) - CodOpt
hEF1a-CD47(202)-CodOpt
CAG-CD47 ECD - PDGFR - 9AA ICD
CAG-CD47 IgV - PDGFR(H,T,9AA ICD)
CD47+%
150
100
50
0
0.001
0.01
0.1
1
稀释倍数(原材料)

图9

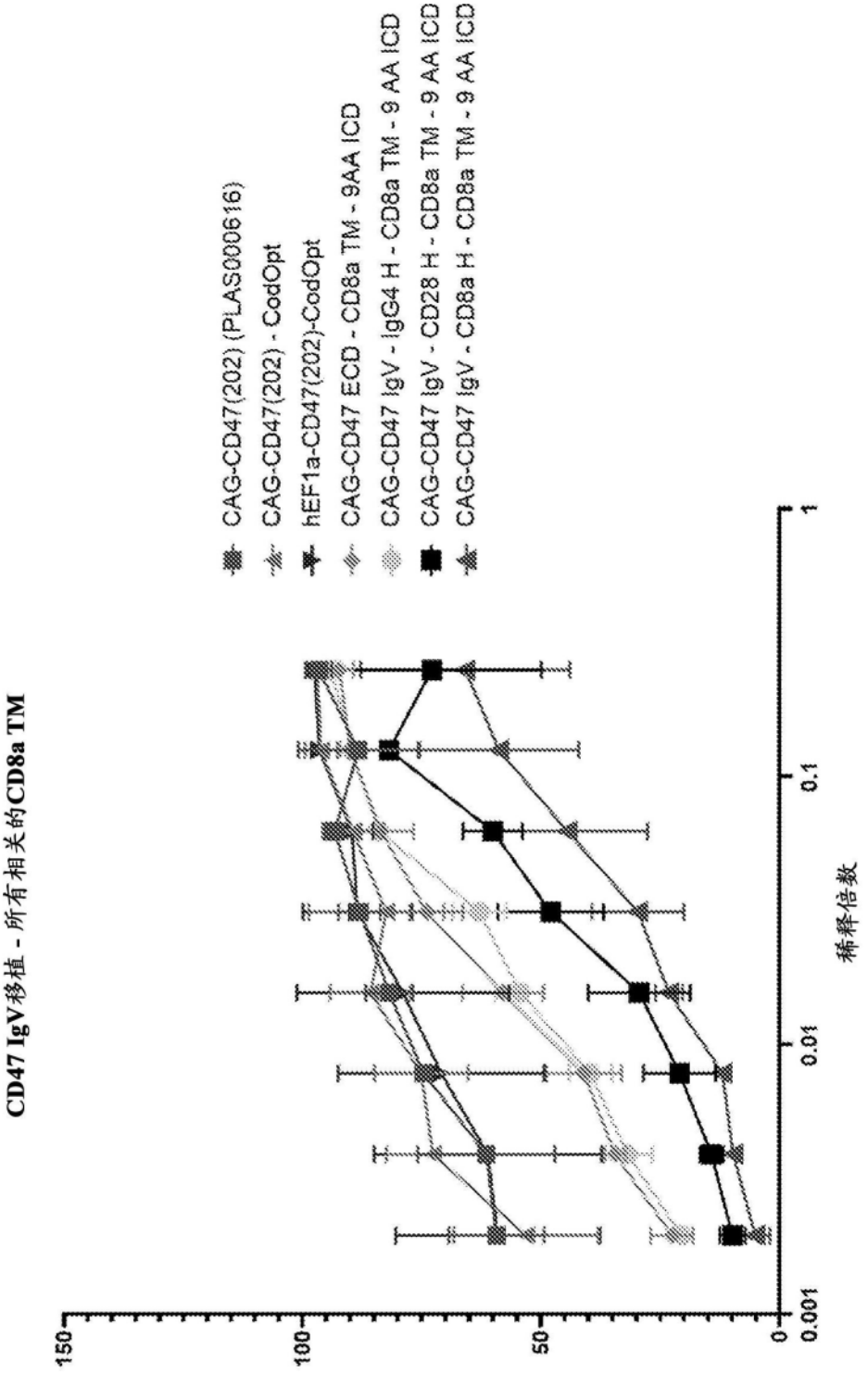

CD47 IgV移植 - 所有相关的CD8a TM
CAG-CD47(202) (PLAS000616)
CAG-CD47(202) - CodOpt
hEF1a-CD47(202)-CodOpt
CAG-CD47 ECD - CD8a TM - 9AA ICD
CAG-CD47 IgV - IgG4 H - CD8a TM - 9 AA ICD
CAG-CD47 IgV - CD28 H - CD8a TM - 9 AA ICD
CAG-CD47 IgV - CD8a H - CD8a TM - 9 AA ICD
150
100
50
0
0.001
0.01
0.1
1
稀释倍数

图10

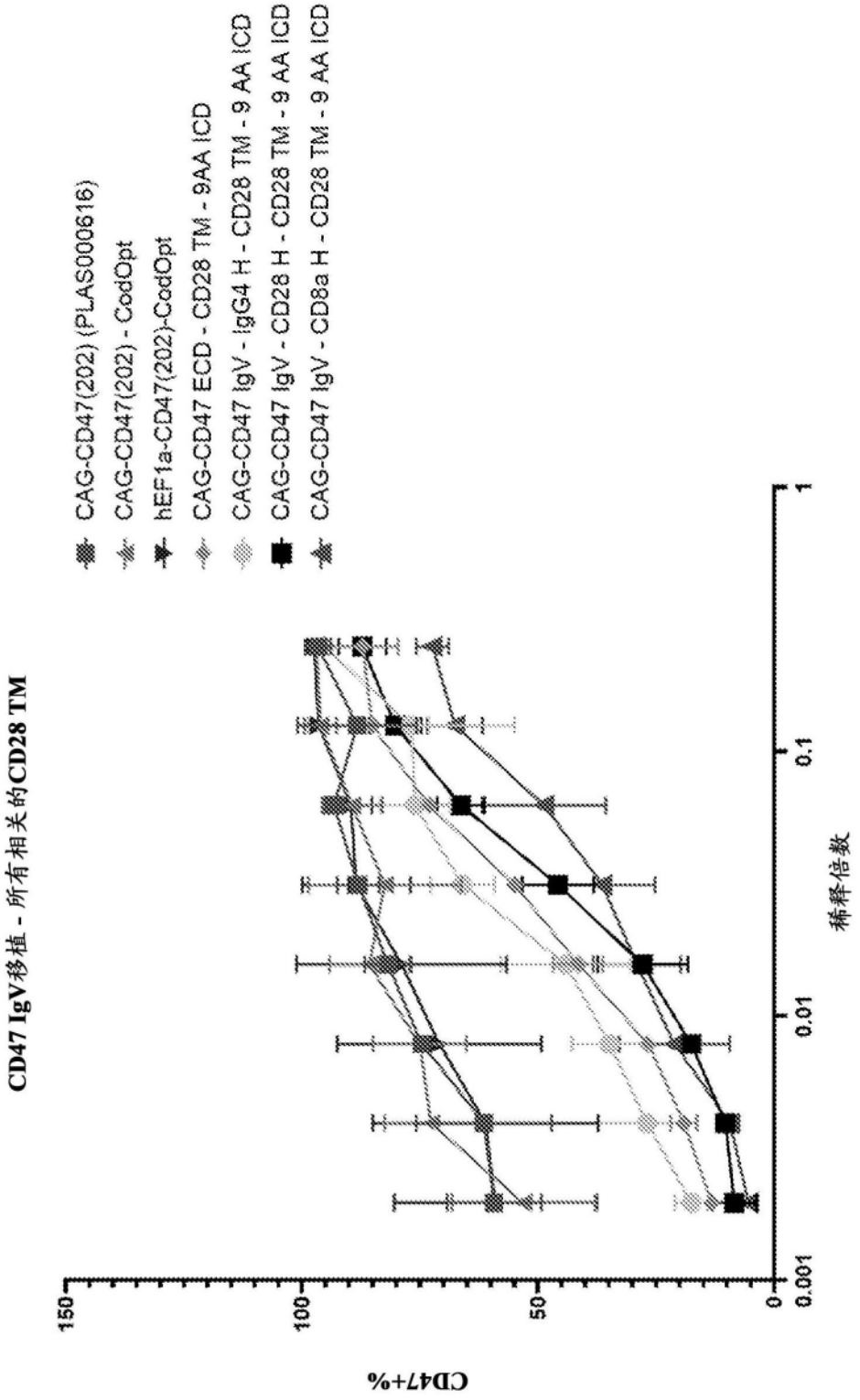

CD47 IgV移植 - 所有相关的CD28 TM
CAG-CD47(202) (PLAS000616)
CAG-CD47(202) - CodOpt
hEF1a-CD47(202)-CodOpt
CAG-CD47 ECD - CD28 TM - 9AA ICD
CAG-CD47 IgV - IgG4 H - CD28 TM - 9 AA ICD
CAG-CD47 IgV - CD28 H - CD28 TM - 9 AA ICD
CAG-CD47 IgV - CD8a H - CD28 TM - 9 AA ICD
CD47+%
150
100
50
0
0.001
0.01
0.1
1
稀释倍数

图11

WT CD47(202)	SP	IgV	TM1	IC1	TM2	EC1	TM3	IC2	TM4	EC2	TM5	IC3
WT CD47(201)	SP	IgV	TM1	IC1	TM2	EC1	TM3	IC2	TM4	EC2	TM5	IC3

CD47(202)的IC3与CD47(201)不同，相差几个氨基酸，而且更短。

图12A

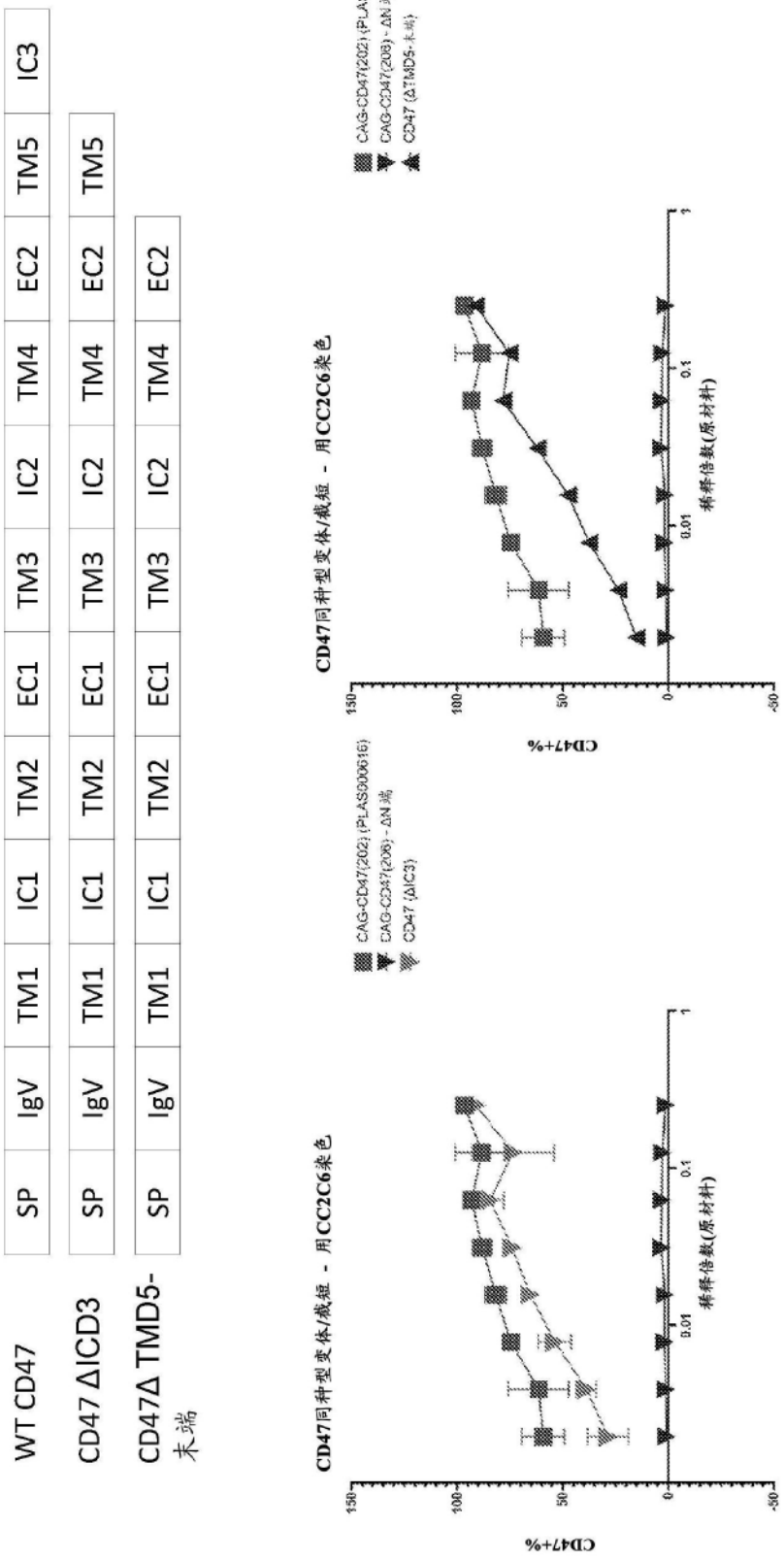

WT CD47
SP IgV TM1 IC1 TM2 EC1 TM3 IC2 TM4 EC2 TM5 IC3
CD47 ΔICD3
SP IgV TM1 IC1 TM2 EC1 TM3 IC2 TM4 EC2 TM5
CD47Δ TMD5-末端
SP IgV TM1 IC1 TM2 EC1 TM3 IC2 TM4 EC2
CD47同种型变体/截短 - 用CC2C6染色
CD47+%
稀释倍数(原材料)
CAG-CD47(202)-(PLAS00006-16)
CAG-CD47(208)-ΔN 端
CD47 (ΔIC3)
CD47同种型变体/截短 - 用CC2C6染色
CD47+%
稀释倍数(原材料)
CAG-CD47(202)-(PLAS00006-16)
CAG-CD47(208)-ΔN 端
CD47 (ΔTMD5-末端)

图12B

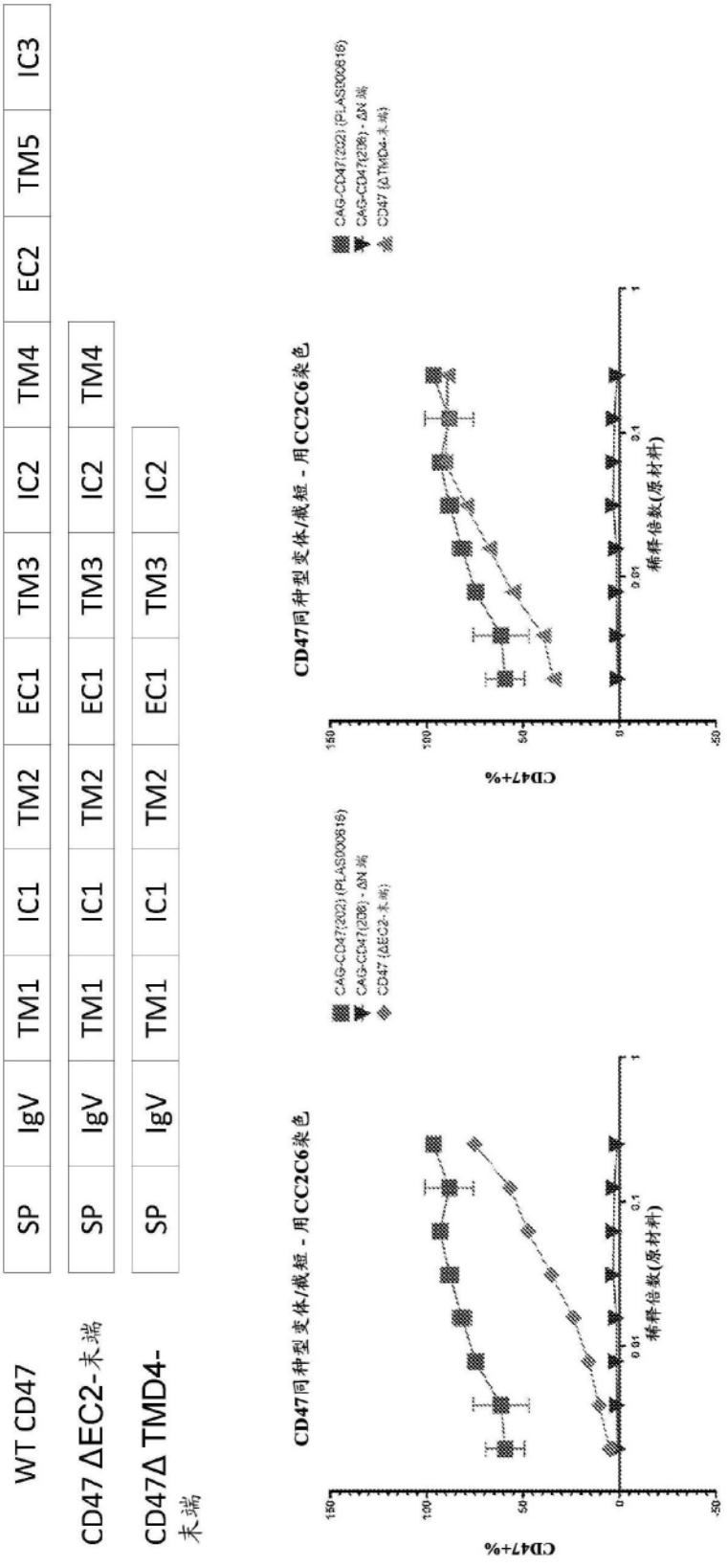

WT CD47
SP IgV TM1 IC1 TM2 EC1 TM3 IC2 TM4 EC2 TM5 IC3
CD47 ΔEC2-末端
SP IgV TM1 IC1 TM2 EC1 TM3 IC2 TM4
CD47Δ TMD4-末端
SP IgV TM1 IC1 TM2 EC1 TM3 IC2
CD47同种型变体/截短 - 用CC2C6染色
CD47+%
稀释倍数(原材料)
CD47同种型变体/截短 - 用CC2C6染色
CD47+%
稀释倍数(原材料)

图12C

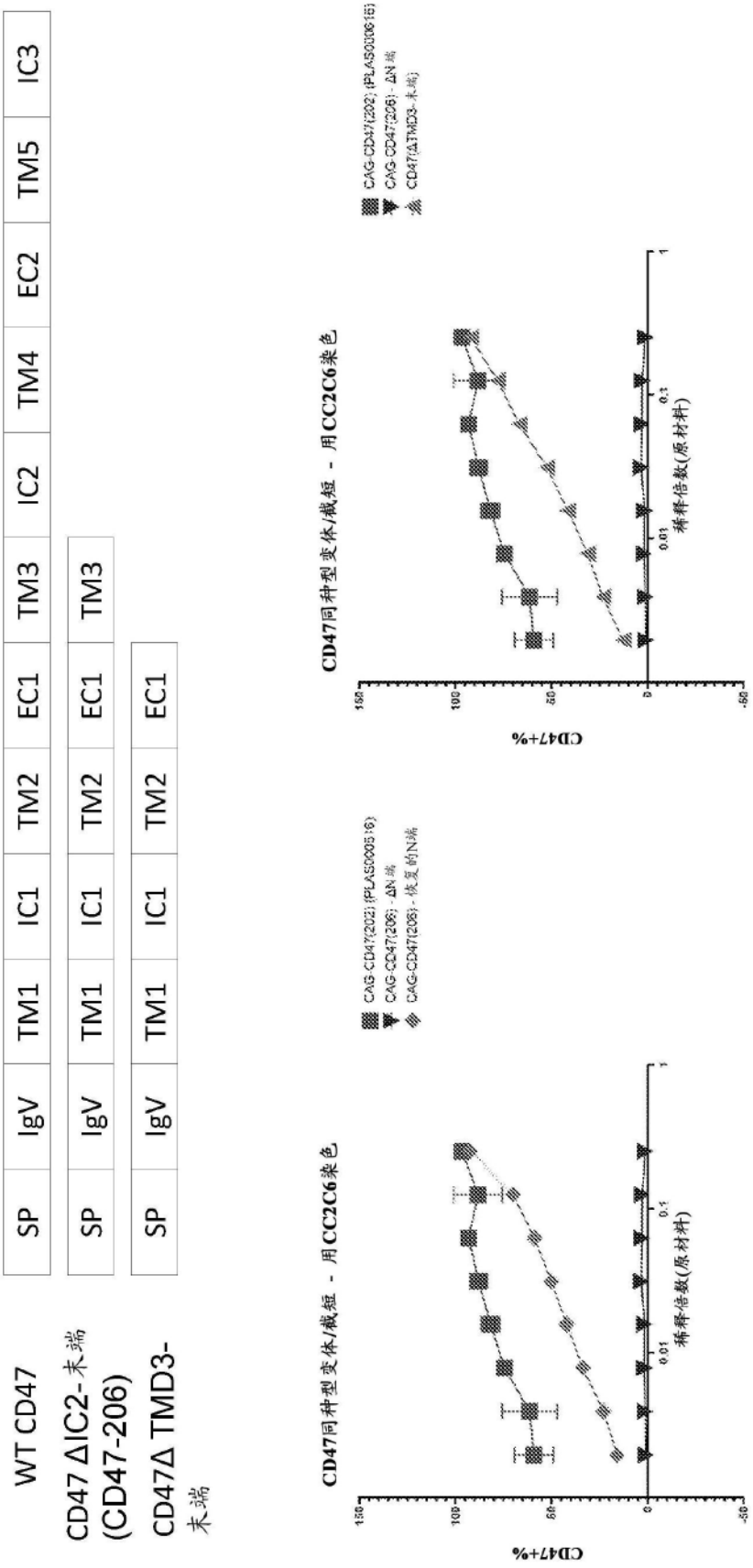

WT CD47
SP
IgV
TM1
IC1
TM2
EC1
TM3
IC2
TM4
EC2
TM5
IC3
CD47 ΔIC2-末端 (CD47-206)
SP
IgV
TM1
IC1
TM2
EC1
TM3
CD47Δ TMD3-末端
SP
IgV
TM1
IC1
TM2
EC1
CD47同种型变体/截短 - 用CC2C6染色
CD47+%
稀释倍数(原材料)
CD47同种型变体/截短 - 用CC2C6染色
CD47+%
稀释倍数(原材料)

图12D

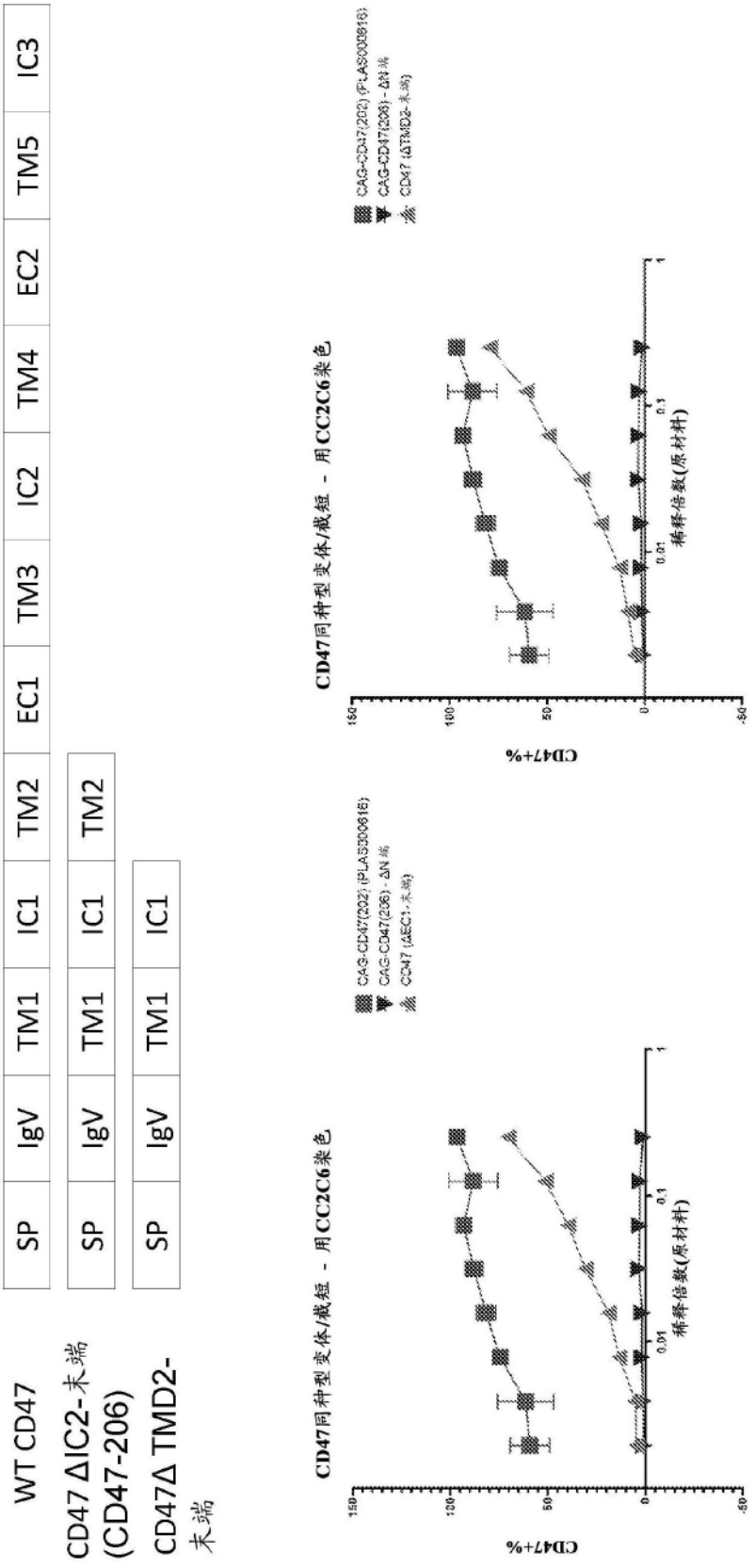

WT CD47
SP IgV TM1 IC1 TM2 EC1 TM3 IC2 TM4 EC2 TM5 IC3
CD47 ΔIC2-末端 (CD47-206)
SP IgV TM1 IC1 TM2
CD47Δ TMD2-末端
SP IgV TM1 IC1
CD47同种型变体/截短 - 用CC2C6染色
CD47+%
稀释倍数(原材料)
CD47同种型变体/截短 - 用CC2C6染色
CD47+%
稀释倍数(原材料)

图12E

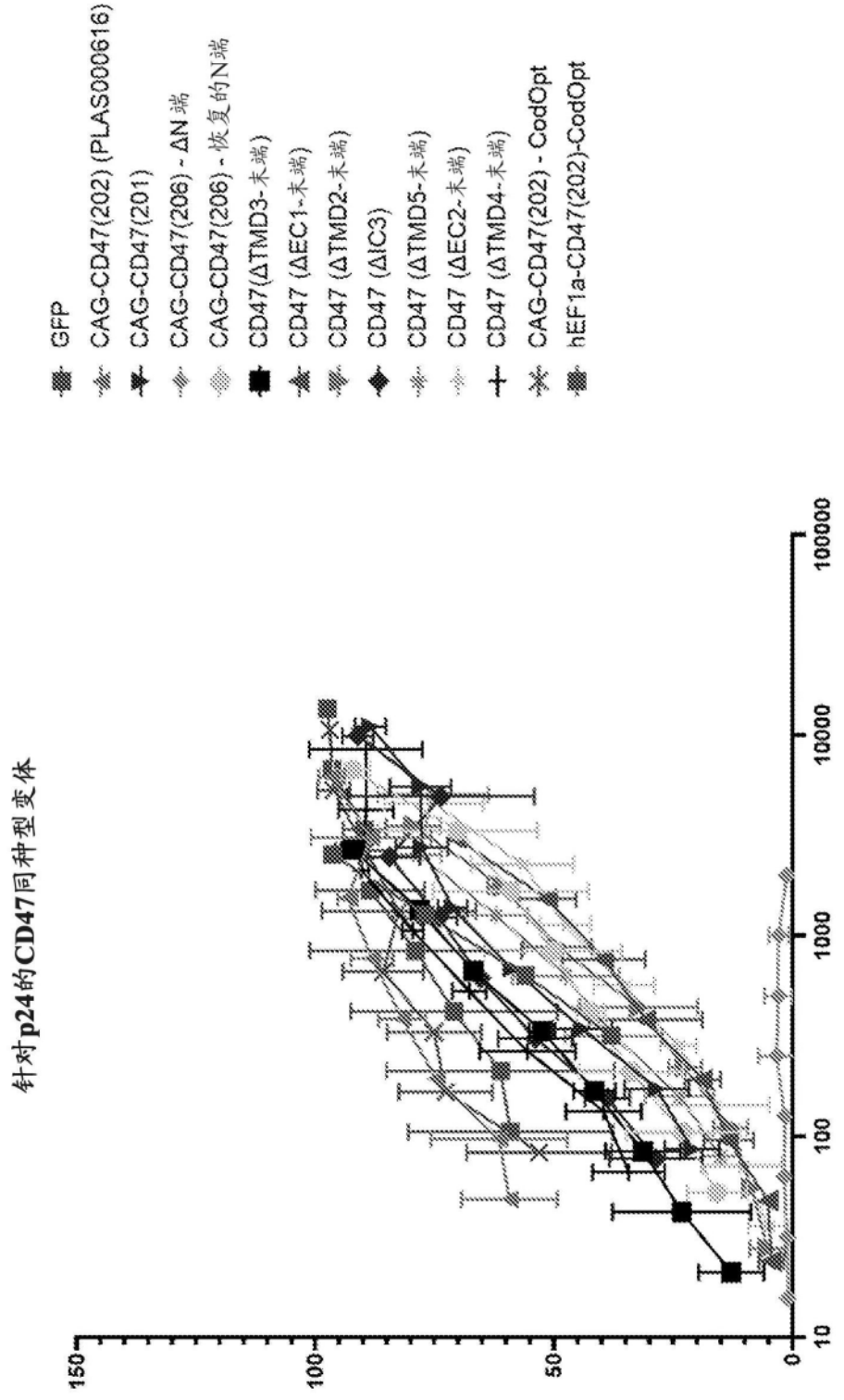

GFP
CAG-CD47(202) (PLAS000616)
CAG-CD47(201)
CAG-CD47(206) - ΔN 端
CAG-CD47(206) - 恢复的N端
CD47(ΔTMD3-末端)
CD47 (ΔEC1-末端)
CD47 (ΔTMD2-末端)
CD47 (ΔIC3)
CD47 (ΔTMD5-末端)
CD47 (ΔEC2-末端)
CD47 (ΔTMD4-末端)
CAG-CD47(202) - CodOpt
hEF1a-CD47(202)-CodOpt
针对p24的CD47同种型变体
150
100
50
0
10
100
1000
10000
100000

图13

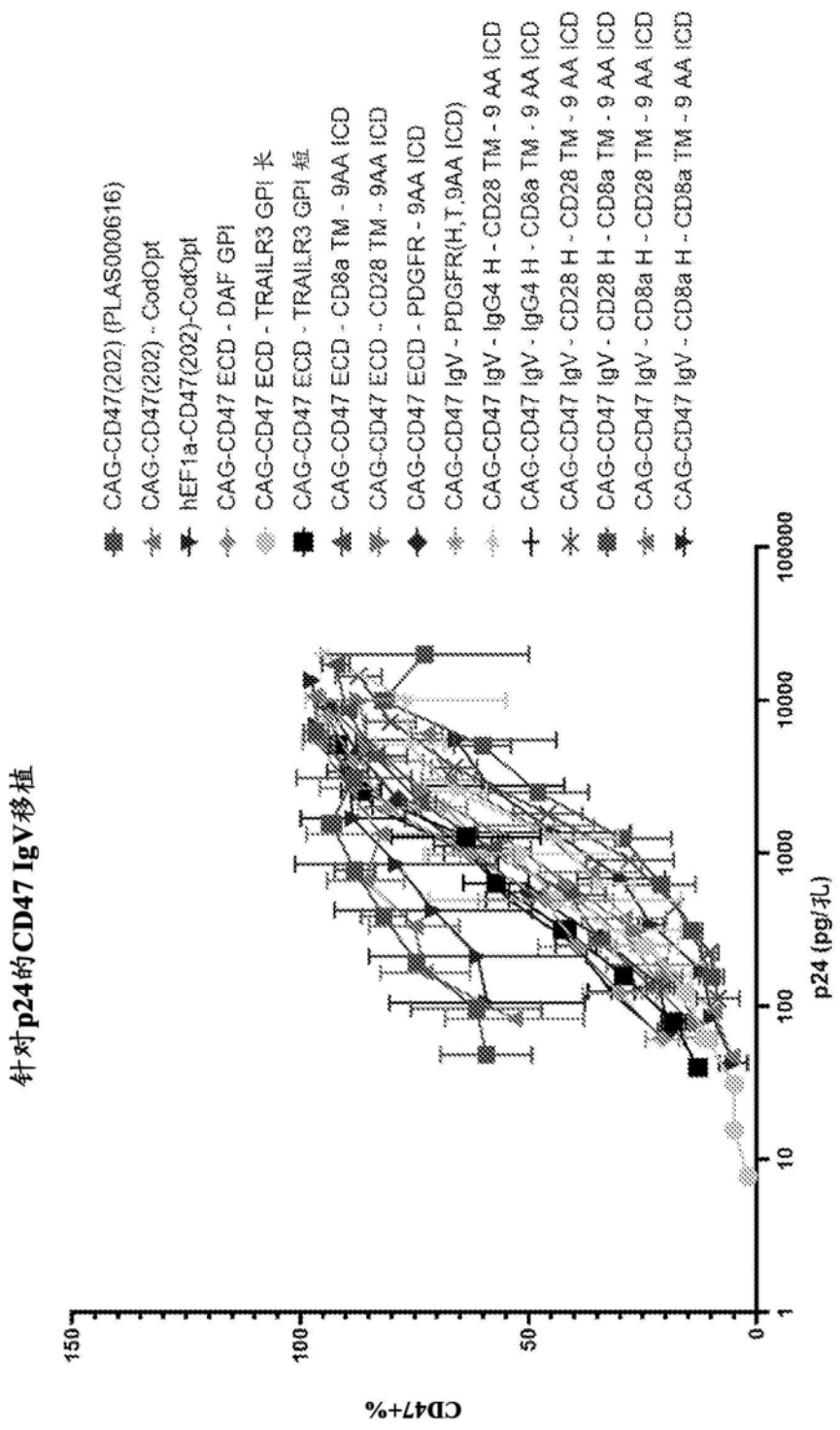

针对p24的CD47 IgV移植
CD47+%
p24 (pg/孔)
CAG-CD47(202) (PLAS000616)
CAG-CD47(202) - CodOpt
hEF1a-CD47(202)-CodOpt
CAG-CD47 ECD - DAF GPI
CAG-CD47 ECD - TRAILR3 GPI 长
CAG-CD47 ECD - TRAILR3 GPI 短
CAG-CD47 ECD - CD8a TM - 9AA ICD
CAG-CD47 ECD - CD28 TM - 9AA ICD
CAG-CD47 ECD - PDGFR - 9AA ICD
CAG-CD47 IgV - PDGFR(H,T,9AA ICD)
CAG-CD47 IgV - IgG4 H - CD28 TM - 9 AA ICD
CAG-CD47 IgV - IgG4 H - CD8a TM - 9 AA ICD
CAG-CD47 IgV - CD28 H - CD28 TM - 9 AA ICD
CAG-CD47 IgV - CD28 H - CD8a TM - 9 AA ICD
CAG-CD47 IgV - CD8a H - CD28 TM - 9 AA ICD
CAG-CD47 IgV - CD8a H - CD8a TM - 9 AA ICD

图14

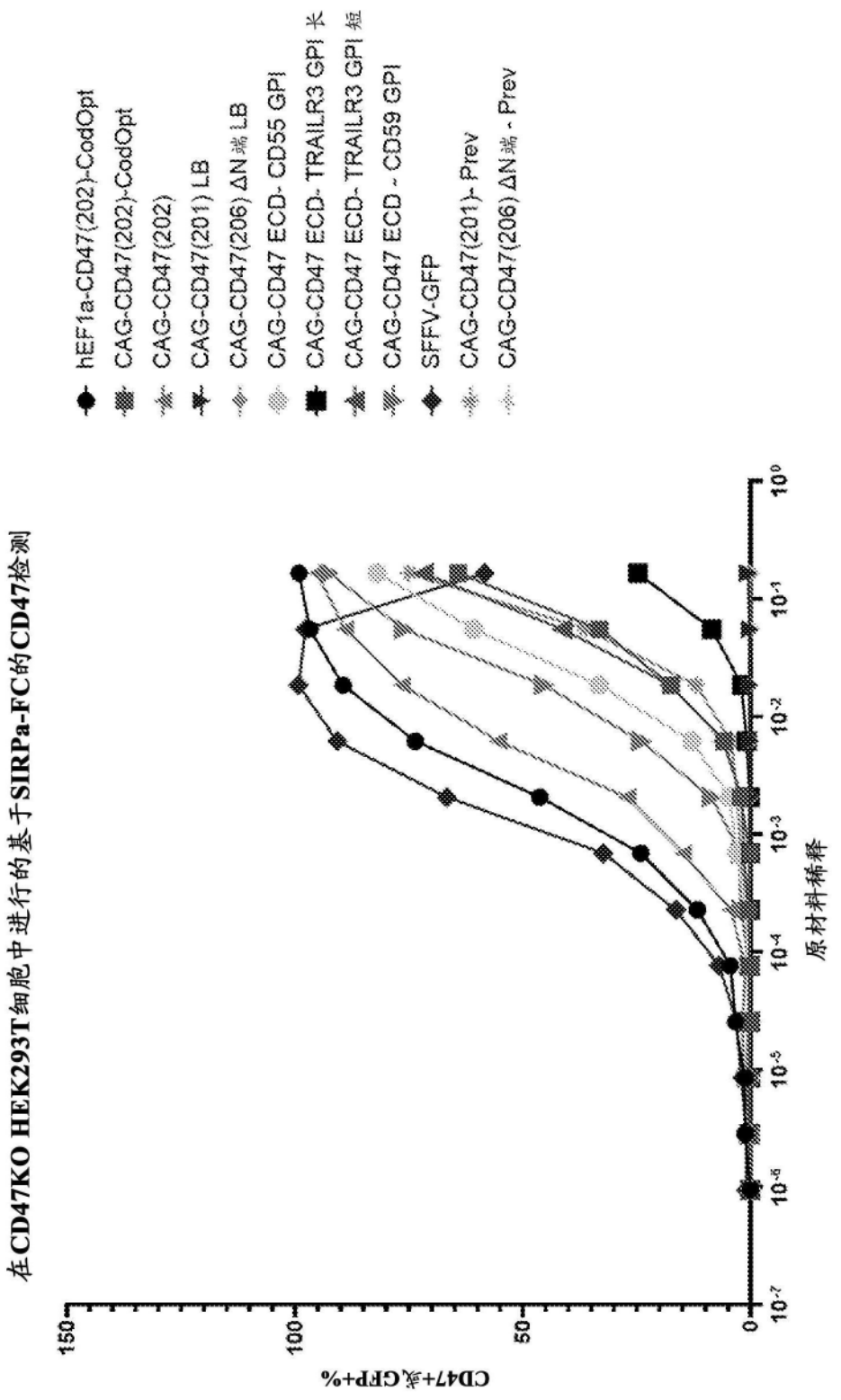

在CD47KO HEK293T细胞中进行的基于SIRPa-FC的CD47检测
hEF1a-CD47(202)-CodOpt
CAG-CD47(202)-CodOpt
CAG-CD47(202)
CAG-CD47(201) LB
CAG-CD47(206) ΔN端 LB
CAG-CD47 ECD- CD55 GPI
CAG-CD47 ECD- TRAILR3 GPI 长
CAG-CD47 ECD- TRAILR3 GPI 短
CAG-CD47 ECD - CD59 GPI
SFFV-GFP
CAG-CD47(201)- Prev
CAG-CD47(206) ΔN端 - Prev
CD47+或GFP+%
150
100
50
0
10-7
10-6
10-5
10-4
10-3
10-2
10-1
100
原材料稀释

图15

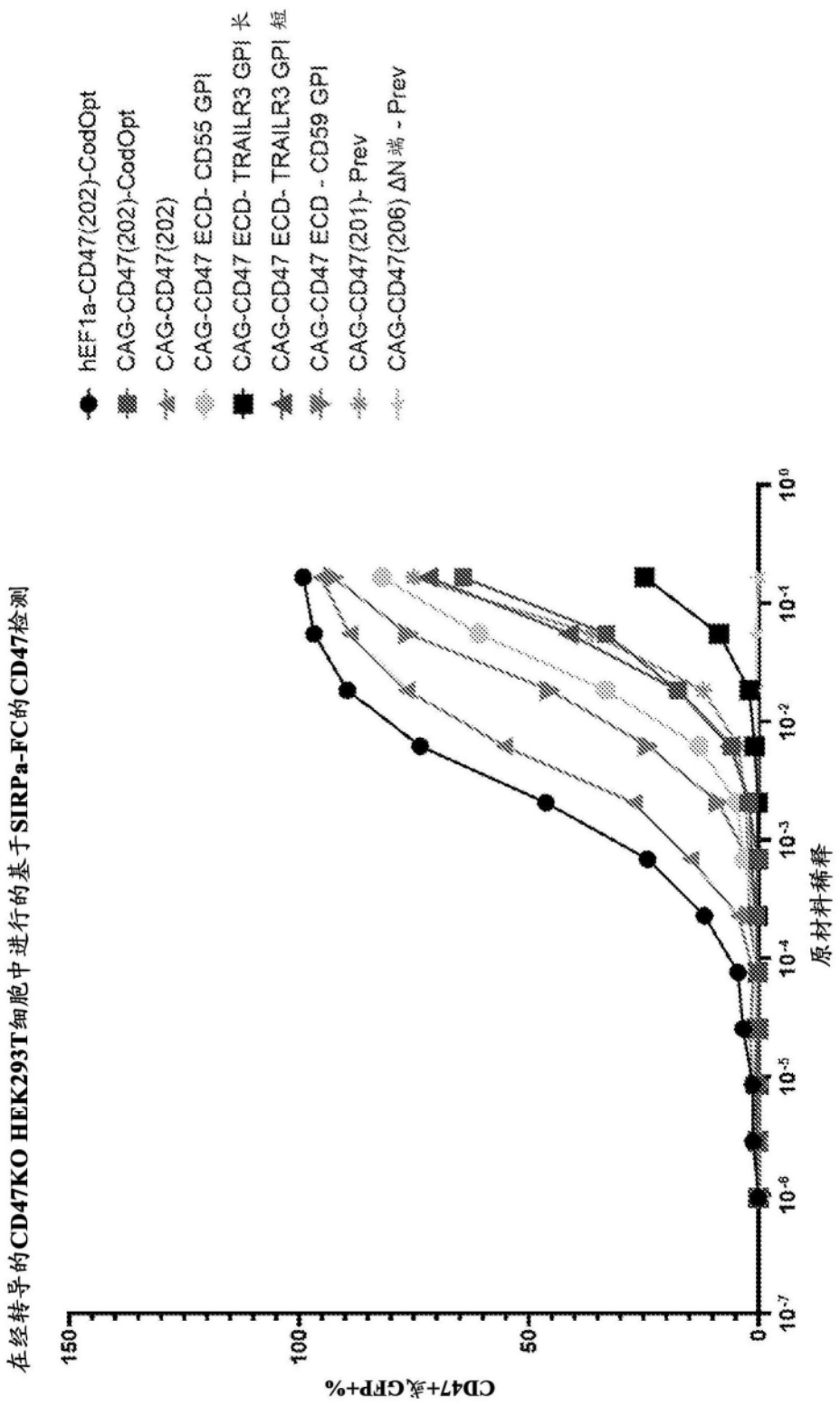

在经转导的CD47KO HEK293T细胞中进行的基于SIRPa-FC的CD47检测
hEF1a-CD47(202)-CodOpt
CAG-CD47(202)-CodOpt
CAG-CD47(202)
CAG-CD47 ECD- CD55 GPI
CAG-CD47 ECD- TRAILR3 GPI 长
CAG-CD47 ECD- TRAILR3 GPI 短
CAG-CD47 ECD - CD59 GPI
CAG-CD47(201)- Prev
CAG-CD47(206) ΔN端 - Prev
CD47+或GFP+%
150
100
50
0
10-7
10-6
10-5
10-4
10-3
10-2
10-1
100
原材料稀释

图16

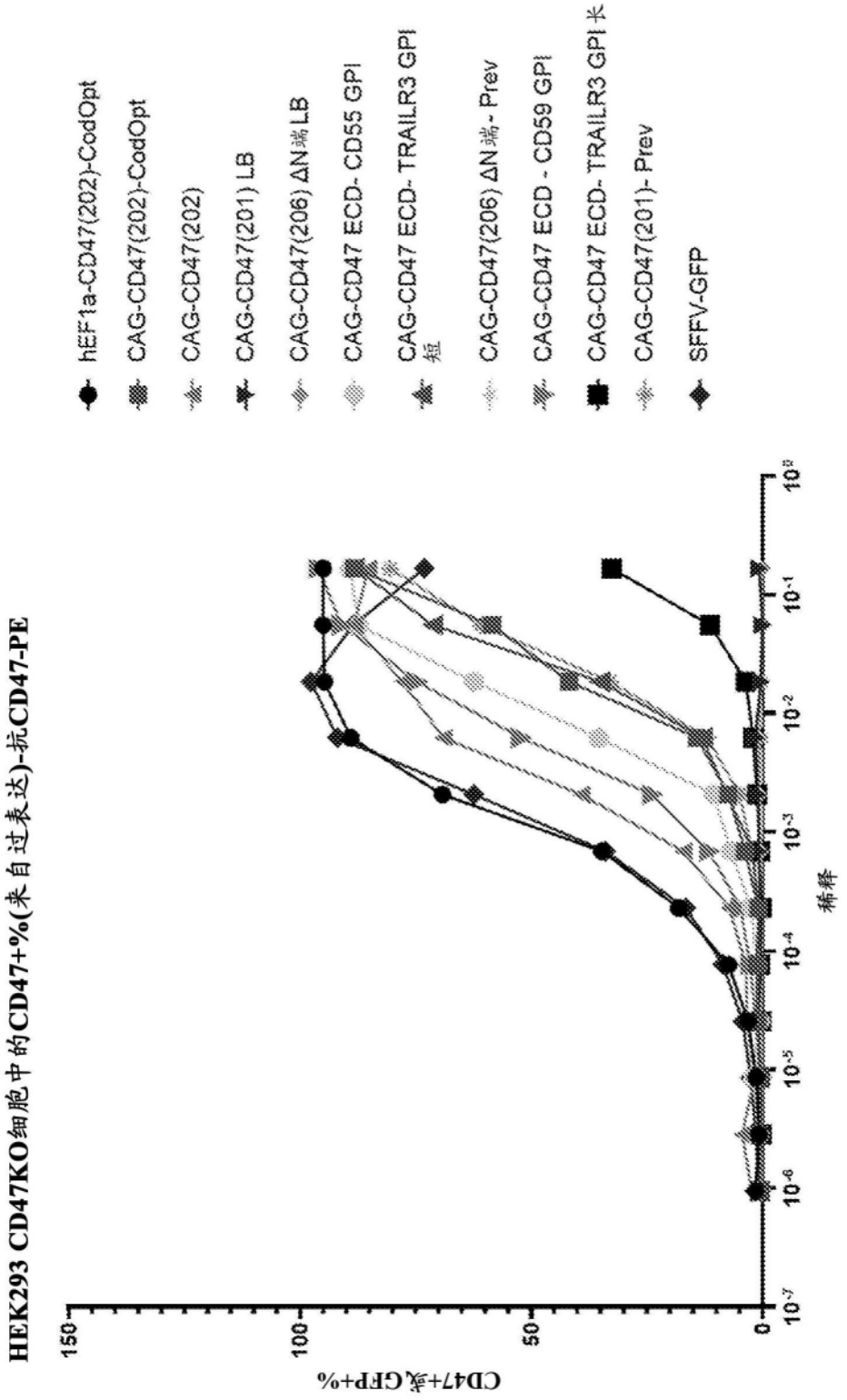

HEK293 CD47KO细胞中的CD47+%(来自过表达)-抗CD47-PE
CD47+或GFP+%
150
100
50
0
稀释
hEF1a-CD47(202)-CodOpt
CAG-CD47(202)-CodOpt
CAG-CD47(202)
CAG-CD47(201) LB
CAG-CD47(206) ΔN端 LB
CAG-CD47 ECD- CD55 GPI
CAG-CD47 ECD- TRAILR3 GPI 短
CAG-CD47(206) ΔN端- Prev
CAG-CD47 ECD - CD59 GPI
CAG-CD47 ECD- TRAILR3 GPI 长
CAG-CD47(201)- Prev
SFFV-GFP

图17

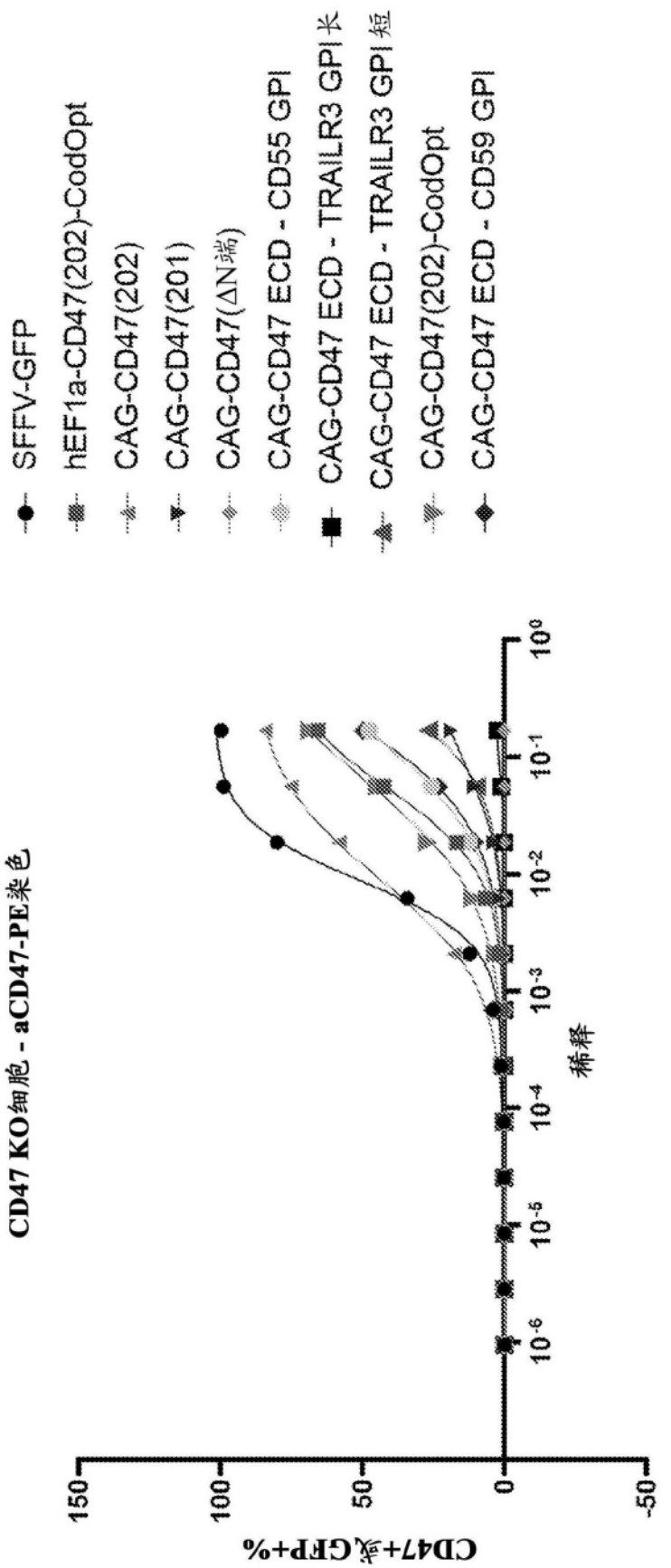

SFFV-GFP
hEF1a-CD47(202)-CodOpt
CAG-CD47(202)
CAG-CD47(201)
CAG-CD47(ΔN端)
CAG-CD47 ECD - CD55 GPI
CAG-CD47 ECD - TRAILR3 GPI 长
CAG-CD47 ECD - TRAILR3 GPI 短
CAG-CD47(202)-CodOpt
CAG-CD47 ECD - CD59 GPI
CD47 KO细胞 - aCD47-PE染色
CD47+或GFP+%
150
100
50
0
-50
稀释
10-6
10-5
10-4
10-3
10-2
10-1
100

图18A

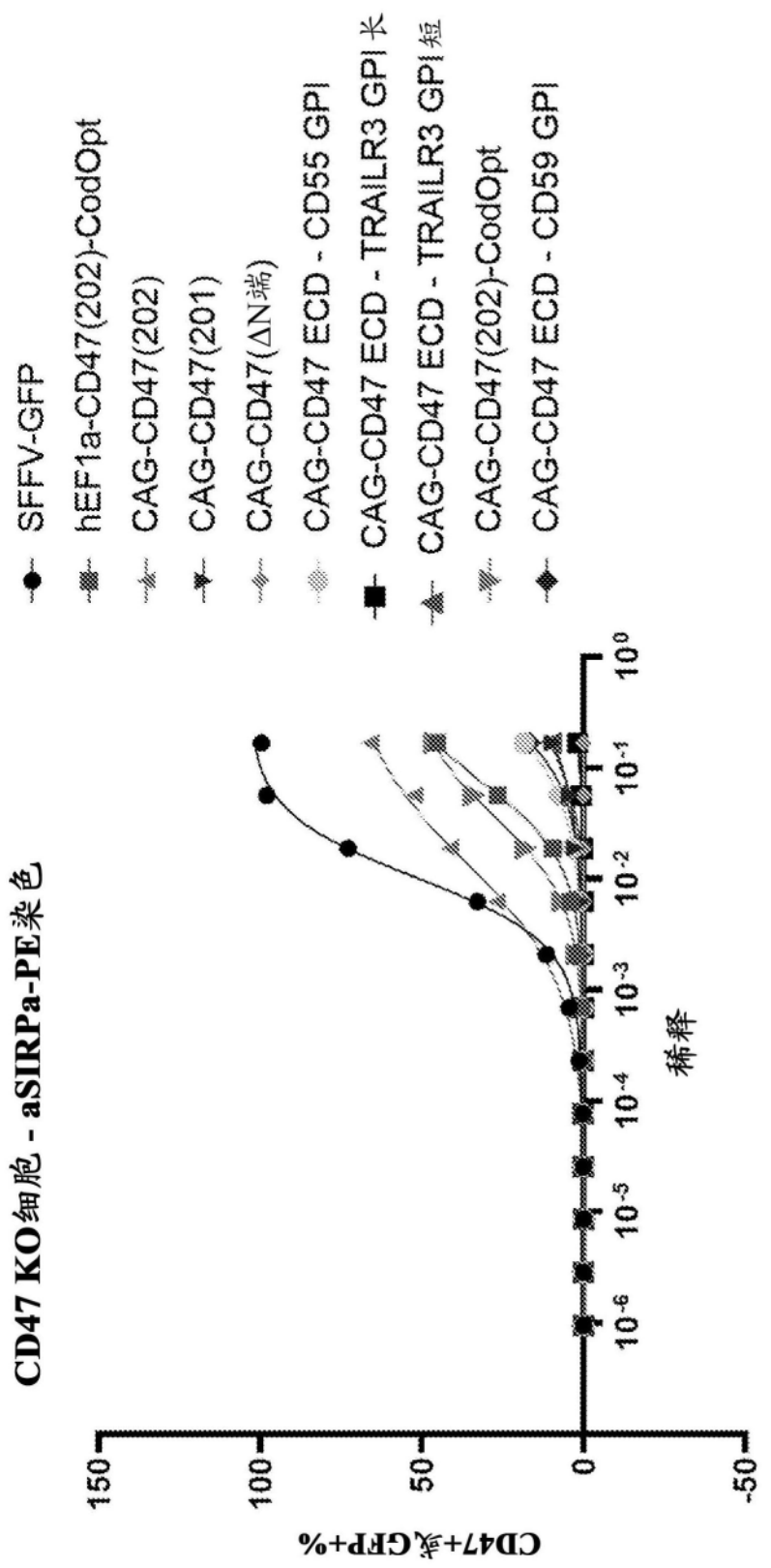

CD47 KO细胞 - aSIRPa-PE染色
CD47+或GFP+%
150
100
50
0
-50
稀释
10^{-6}
10^{-5}
10^{-4}
10^{-3}
10^{-2}
10^{-1}
10^{0}
SFFV-GFP
hEF1a-CD47(202)-CodOpt
CAG-CD47(202)
CAG-CD47(201)
CAG-CD47(ΔN端)
CAG-CD47 ECD - CD55 GPI
CAG-CD47 ECD - TRAILR3 GPI 长
CAG-CD47 ECD - TRAILR3 GPI 短
CAG-CD47(202)-CodOpt
CAG-CD47 ECD - CD59 GPI

图18B