(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119137262 A
(43)申请公布日 2024.12.13

(21)申请号 202380037757.5

(22)申请日 2023.03.02

(30)优先权数据
63/315,579 2022.03.02 US
63/315,581 2022.03.02 US
63/442,966 2023.02.02 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.10.31

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2023/063587 2023.03.02

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/168341 EN 2023.09.07

(71)申请人 加利福尼亚大学董事会
地址 美国

(72)发明人 盖伊·M·克鲁克斯 唐纳德·B·科恩 桑·皮尔·柳 帕特里克·常

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227
专利代理师 张福誉 韩晓帆

(51)Int.Cl.
C12N 5/0783(2006.01)
A61K 35/17(2006.01)
G01N 33/50(2006.01)
C12N 15/63(2006.01)

权利要求书4页 说明书70页
序列表（电子公布） 附图33页

(54)发明名称

经改造细胞及使用方法

(57)摘要

本公开内容提供了通过体外T细胞分化方法在干细胞或祖细胞中提供转基因的插入而不对T细胞分化产生有害作用的方法和组合物。为了实现这一点,本发明人已发现,在启动子区(例如颗粒酶A)的控制下的转基因表达允许协调的表达模式,该模式提供了以下二者:1)转基因在成熟T细胞中的高表达,和2)转基因在整个体外分化方法中协调的表达水平,这允许产生成熟T细胞群。

CN 119137262 A

1.核酸,其包含启动子区和位于启动子区的转录起始位点下游的转基因;其中所述启动子区包含来自表1基因的启动子区。

2.权利要求1所述的核酸,其中所述启动子区包含来自颗粒酶基因的启动子区。

3.权利要求2所述的核酸,其中颗粒酶启动子区包含来自颗粒酶A、B、H、K或M基因的启动子区。

4.权利要求3所述的核酸,其中所述启动子区包含来自所述颗粒酶A基因的启动子。

5.权利要求1至4中任一项所述的核酸,其中所述启动子区包含内源启动子区。

6.权利要求1至5中任一项所述的核酸,其中所述转基因包含嵌合抗原受体(CAR)或T细胞受体(TCR)。

7.权利要求1至6中任一项所述的核酸,其中所述转基因包含FOXP3。

8.权利要求1至7中任一项所述的核酸,其中所述转基因包含BCL11b。

9.权利要求1至8中任一项所述的核酸,其中所述核酸包含基因组DNA。

10.权利要求1至9中任一项所述的核酸,其中所述启动子区包含RAG1启动子区或RAG 2启动子区。

11.权利要求10所述的核酸,其中所述基因组DNA缺乏编码功能性RAG1蛋白和/或RAG2蛋白中的一者或二者的基因。

12.权利要求10或11所述的核酸,其中所述转基因插入到RAG1编码区或RAG2编码区,和/或其中所述转基因至少部分替代RAG1编码区或RAG2编码区。

13.权利要求1至12中任一项所述的核酸,其中所述核酸包含位于所述启动子区的转录起始位点下游的表1基因的编码区。

14.权利要求13所述的核酸,其中所述转基因和表1基因二者的转录均由所述表1基因的启动子调节。

15.权利要求13或14所述的核酸,其中所述转基因和表1基因在同一mRNA上表达。

16.权利要求13至15中任一项所述的核酸,其中所述核酸包含自切割肽位点或IRES。

17.权利要求13至16中任一项所述的核酸,其中所述转基因位于所述表1基因的3'近端。

18.权利要求13至16中任一项所述的核酸,其中所述转基因位于所述表1基因的5'近端。

19.权利要求1至18中任一项所述的核酸,其中所述核酸还包含所述表1基因和/或所述转基因的编码区下游的3'UTR区。

20.权利要求19所述的核酸,其中所述3'UTR包含内源3'UTR。

21.权利要求1至20中任一项所述的核酸,其中所述启动子区、3'UTR、转基因、和/或所述表1基因的编码区位于所述表1基因的内源基因座处的基因组DNA中。

22.权利要求9至21中任一项所述的核酸,其中所述基因组DNA缺乏编码功能性内源TCR-α(TCR-a)蛋白、功能性内源TCR-β(TCR-b)蛋白、功能性内源TCR-γ(TCR-g)蛋白或功能性内源TCR-δ(TCR-d)蛋白中的一种或更多种的基因。

23.权利要求9至22中任一项所述的核酸,其中所述基因组DNA缺乏编码功能性CD3γ蛋白、功能性CD3δ蛋白、功能性CD3ε蛋白或功能性CD3ζ蛋白中的一种或更多种的基因。

24.细胞,其包含至少一种权利要求1至22中任一项所述的核酸。

25.权利要求24所述的细胞,其中所述细胞包含第一核酸和第二核酸,所述第一核酸包含第一启动子区和位于所述启动子区的转录起始位点下游的第一转基因;其中所述启动子区包含来自基因RAG1或RAG2的启动子区,所述第二核酸包含第二启动子区和位于所述启动子区的转录起始位点下游的第二转基因;其中所述启动子区包含选自以下基因的启动子区:GZMA、GZMB、GZMH、GZMK、GZMM、TNFSF14、XCL2、PTGDS、SAMD3、NCALD或XCL1。

26.权利要求25所述的细胞,其中所述第二启动子区包含来自颗粒酶基因的启动子区。

27.权利要求26所述的细胞,其中所述颗粒酶启动子区包含来自颗粒酶A、B、H、K或M基因的启动子区。

28.权利要求27所述的细胞,其中所述第二启动子区包含来自所述颗粒酶A基因的启动子。

29.权利要求25至28中任一项所述的细胞,其中所述第一启动子区和/或第二启动子区包含内源启动子区。

30.权利要求25至29中任一项所述的细胞,其中所述第一转基因或第二转基因包含CAR或TCR。

31.权利要求30所述的细胞,其中所述第一转基因包含TCR,并且所述第二转基因包含CAR。

32.权利要求25至31中任一项所述的细胞,其中所述第一转基因和/或第二转基因包含FOXP3。

33.权利要求25至32中任一项所述的细胞,其中所述第一转基因和/或第二转基因包含BCL11b。

34.权利要求25至33中任一项所述的细胞,其中所述第一启动子区包含所述RAG1启动子区。

35.权利要求25至34中任一项所述的细胞,其中所述细胞缺乏编码功能性RAG1蛋白和/或RAG2蛋白中的一者或二者的基因。

36.权利要求25至35中任一项所述的细胞,其中所述第一转基因插入到RAG1编码区或RAG2编码区,和/或其中所述转基因至少部分替代RAG1编码区或RAG2编码区。

37.权利要求25至36中任一项所述的细胞,其中所述第一启动子区包含RAG1启动子区或RAG2启动子区,并且所述第一核酸包含分别位于所述RAG1启动子区或RAG2启动子区的转录起始位点下游的RAG1基因或RAG2基因。

38.权利要求25至37中任一项所述的细胞,其中所述第二启动子区包含GZMA、GZMB、GZMH、GZMK、GZMM、TNFSF14、XCL2、PTGDS、SAMD3、NCALD或XCL1启动子区,并且所述第二核酸包含分别位于所述GZMA、GZMB、GZMH、GZMK、GZMM、TNFSF14、XCL2、PTGDS、SAMD3、NCALD或XCL1启动子区的转录起始位点下游的GZMA、GZMB、GZMH、GZMK、GZMM、TNFSF14、XCL2、PTGDS、SAMD3、NCALD或XCL1基因。

39.权利要求37所述的细胞,其中所述第一转基因与RAG1基因或RAG2基因在同一mRNA上表达。

40.权利要求38所述的细胞,其中所述第二转基因与GZMA、GZMB、GZMH、GZMK、GZMM、TNFSF14、XCL2、PTGDS、SAMD3、NCALD或XCL1基因在同一mRNA上表达。

41.权利要求25至40中任一项所述的细胞,其中所述第一核酸或第二核酸包含自切割

肽位点或IRES。

42.权利要求25至41中任一项所述的细胞,其中所述第一转基因或第二转基因位于所述表1基因的3'近端。

43.权利要求25至41中任一项所述的细胞,其中所述第一转基因或第二转基因位于所述表1基因的5'近端。

44.权利要求25至41中任一项所述的细胞,其中所述第一核酸或第二核酸还包含所述基因和/或者所述第一转基因或第二转基因的编码区下游的3'UTR区。

45.权利要求44所述的细胞,其中所述3'UTR包含内源3'UTR。

46.权利要求24至45中任一项所述的细胞,其中所述细胞缺乏编码功能性内源TCR-α(TCR-a)蛋白、功能性内源TCR-β(TCR-b)蛋白、功能性内源TCR-γ(TCR-g)蛋白或功能性内源TCR-δ(TCR-d)蛋白中的一种或更多种的基因。

47.权利要求24至46中任一项所述的细胞,其中所述基因组DNA缺乏编码功能性CD3γ蛋白、功能性CD3δ蛋白、功能性CD3ε蛋白或功能性CD3ζ蛋白中的一种或更多种的基因。

48.权利要求24至47中任一项所述的细胞,其中所述细胞包含干细胞、造血干细胞或祖细胞(HSPC)、胚胎干细胞、诱导多能干细胞(iPSC)、人胚胎中胚层祖细胞或多能干细胞(PSC)。

49.权利要求48所述的细胞,其中所述细胞包含多能干细胞。

50.权利要求48所述的细胞,其中所述细胞包含胚胎干细胞或诱导多能干细胞(iPSC)。

51.权利要求24至50中任一项所述的细胞,其中所述细胞分离自或来源于脐带血、外周血、骨髓、外周血、脐带血、胎盘、脂肪组织或脐带组织。

52.权利要求24至51中任一项所述的细胞,其中所述细胞包含T细胞。

53.权利要求24至51中任一项所述的细胞,其中所述细胞包含成熟细胞。

54.权利要求53所述的细胞,其中所述成熟细胞包含成熟T细胞、成熟调节性T细胞(Treg)、iNKT细胞、先天淋巴细胞或NK细胞。

55.权利要求53所述的细胞,其中所述细胞包含CD4+CD8-或CD8ab+CD4-T细胞。

56.权利要求52至55中任一项所述的细胞,其中所述细胞包含体外分化的T细胞、成熟Treg、iNKT细胞、先天淋巴细胞或NK细胞。

57.权利要求24至56中任一项所述的细胞,其中所述细胞还限定为同种异体的。

58.用于制备细胞的方法,其包括在适合于所述细胞体外分化为成熟细胞的条件下培养权利要求24至57中任一项所述的细胞。

59.权利要求58所述的方法,其中所述成熟细胞包含成熟T细胞、成熟调节性T细胞(Treg)、iNKT细胞、先天淋巴细胞或NK细胞。

60.权利要求59所述的方法,其中所述细胞包含CD4+CD8-、CD8ab+CD4-T细胞、CD8aa+T细胞、TCRgd T细胞或先天免疫细胞。

61.权利要求58至60中任一项所述的方法,其中所述方法包括将所述细胞在三维(3D)细胞聚集体中进行培养,其中所述细胞聚集体还包含表达Notch配体的选定基质细胞群,并且其中将所述3D细胞聚集体在包含胰岛素、生物素、转铁蛋白和白蛋白的无血清培养基中培养足以使所述干细胞或祖细胞体外分化为T细胞的时间段。

62.权利要求61所述的方法,其中所述基质细胞包含MS5基质细胞。

63.权利要求61或62所述的方法,其中所述Notch配体是外源Notch配体。

64.权利要求61至63中任一项所述的方法,其中所述方法还包括对所述干细胞或祖细胞和所述基质细胞进行离心以形成3D细胞聚集体。

65.权利要求61至64中任一项所述的方法,其中所述培养基还包含以下的一种或更多种:外部添加的FLT3配体(FLT3L)、白介素7(IL-7)、干细胞因子(SCF)、血小板生成素(TPO)、血小板生成素(TPO)、IL-2、IL-4、IL-6、IL-15、IL-21、TNF-α、TGF-β、干扰素-γ、干扰素-λ、TSLP、胸腺五肽、多效营养因子、多效生长因子、中期因子或其组合。

66.权利要求61至65中任一项所述的方法,其中所述基质细胞具有编码完整的、部分的或经修饰的Notch配体的外源核苷酸序列,并且其中所述Notch配体是DLL4、DLL1、JAG1、JAG2或其组合。

67.用于治疗对象的方法,其包括施用权利要求24至57中任一项所述的细胞。

68.权利要求67所述的方法,其中所述细胞是同种异体的。

69.权利要求67或68所述的方法,其中所述对象患有癌症。

70.权利要求69所述的方法,其中所述方法用于在所述对象中治疗癌症。

71.权利要求69或70所述的方法,其中所述癌症选自肺癌、前列腺癌、卵巢癌、睾丸癌、脑癌、皮肤癌、黑素瘤、结肠癌、直肠癌、胃癌、食管癌、气管癌、头颈癌、胰腺癌、肝癌、乳腺癌、卵巢癌、包括淋巴瘤和多发性骨髓瘤的淋巴癌、白血病、骨肉瘤或软组织肉瘤、宫颈癌、和外阴癌。

经改造细胞及使用方法

[0001] 本申请要求于2022年3月2日提交的美国临时专利申请No.63/315,579、于2022年3月2日提交的美国临时专利申请No.63/315,581、和于2023年2月2日提交的美国临时专利申请No.63/442,966的优先权,其在此通过引用整体并入。

[0002] 序列表

[0003] 本申请包含按照ST.26格式制备的序列表,并在此将其通过引用整体并入。创建于2023年3月1日的所述序列表命名为UCLAP0162WO,并且大小为61,982字节。

背景技术

1.技术领域

[0004] 本发明总体上涉及细胞培养和发育领域。

[0005] 2.相关技术的描述

[0006] 使用干细胞或祖细胞作为用于过继性细胞治疗的T细胞来源,为目前依赖于操作成熟外周血T细胞的方法提供了替代方案的可能性。从PSC和HSPC产生的T细胞提供了优于使用从血液中收获的原代成熟T细胞的优点,因为干细胞具有在体内(在HSPC的情况下)或体外(在PSC的情况下)无限自我更新的能力。在干细胞或祖细胞的基因组中插入生物活性基因可使其在体外或体内分化成具有改变的功能特性的T细胞。然而,当某些生物活性基因在先于成熟T细胞的发育阶段表达时,可对T细胞发育有害。因此,本领域需要改造干细胞或祖细胞,使其可携带转基因并成功分化为成熟T细胞。

发明内容

[0007] 本公开内容提供了这样的方法和组合物,其在干细胞或祖细胞中提供转基因的插入而不对在体外或体内T细胞分化期间组成型表达转基因的T细胞分化产生有害作用。为了实现这一点,本发明人已发现,在启动子区(例如颗粒酶A)控制下的转基因表达允许协调的表达模式,该模式提供了以下二者:1)转基因在成熟T细胞中的高表达,和2)转基因在整个体外分化方法中的协调的表达水平,这允许产生成熟T细胞群。

[0008] 本公开内容描述了这样的核酸,其包含启动子区和位于启动子区的转录起始位点下游的转基因;其中启动子区包含来自表1基因的启动子区。还描述了包含本公开内容的核酸的细胞。本公开内容的细胞可包含多个本公开内容的核酸。细胞可包含第一核酸和第二核酸,所述第一核酸包含第一启动子区和位于该启动子区的转录起始位点下游的第一转基因;其中所述启动子区包含来自表1基因的启动子区,所述第二核酸包含第二启动子区和位于该启动子区的转录起始位点下游的第二转基因;其中所述启动子区包含选自表1基因的启动子区。细胞可包含第一启动子区和位于该启动子区的转录起始位点下游的第一转基因;其中所述启动子区包含来自基因RAG1或RAG2的启动子区;以及第二核酸,所述第二核酸包含第二启动子区和位于该启动子区的转录起始位点下游的第二转基因;其中所述启动子区包含选自以下基因的启动子区:GZMA、GZMB、GZMH、GZMK、GZMM、TNFSF14、XCL2、PTGDS、SAMD3、NCALD或XCL1。还描述了用于制备细胞的方法,其包括在适合于细胞体外分化为成熟

细胞的条件下培养本公开内容的细胞。还描述了用于治疗对象的方法,其包括施用本公开内容的细胞。

[0009] 表1-启动子区

[0010]

颗粒酶 A（GZMA）	肿瘤坏死因子配体超家族成员 14（TNFSF14）
颗粒酶 B（GZMB）	X-C 基序趋化因子配体 2(XCL2）
颗粒酶 H（GZMH）	前列腺素 D2 合酶（PTGDS）
颗粒酶 K（GZMK）	包含无菌 α 基序结构域 3（SAMD3）
颗粒酶 M（GZMM）	神经钙蛋白 δ（NCALD）
X-C 基序趋化因子配体 1（XCL1）	重组激活基因 1（RAG1）

[0011]

重组激活基因 2（RAG2）	

[0012] 来自表1的一个或更多个基因和/或其启动子区可不包括在本公开内容的方法、核酸、细胞或组合物中。启动子区、第一启动子区或第二启动子区可以是来自颗粒酶基因的启动子区。启动子区、第一启动子区或第二启动子区可以来自颗粒酶A、B、H、K或M基因。启动子区、第一启动子区或第二启动子区可以不包括来自颗粒酶A、B、H、K或M基因的一个或更多个的启动子区。启动子、第一启动子区或第二启动子区可以是来自颗粒酶A基因的启动子区。启动子区、第一启动子区或第二启动子区可以是来自颗粒酶B基因的启动子区。启动子区、第一启动子区或第二启动子区可以是来自颗粒酶H基因的启动子区。启动子区、第一启动子区或第二启动子区可以是来自颗粒酶K基因的启动子区。启动子区、第一启动子区或第二启动子区可以是来自颗粒酶M基因的启动子区。启动子区、第一启动子区或第二启动子区可包含RAG1启动子区或RAG2启动子区。RAG1启动子区或RAG2启动子区可以不包括在本公开内容的实施方案中。基因组DNA可缺乏编码功能性RAG1蛋白和/或RAG2蛋白中的一者或二者的基因。基因组DNA可编码功能性RAG1蛋白和/或RAG2蛋白中的一者或二者。转基因、第一转基因或第二转基因可插入到RAG1编码区或RAG2编码区中,和/或其中转基因、第一转基因或第二转基因可至少部分替代RAG1编码区或RAG2编码区。启动子区、第一启动子区或第二启动子区可包含内源启动子区。内源启动子区是指启动子区处于其内源基因组环境中的情况,使得启动子上游序列(即5’区)与处于野生型细胞中的那些基本上相同。基本上相同可以是指与野生型上游区域具有至少80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％或99％同一性的区域。内源启动子区还指启动子与野生型启动子位于相同基因组位置的情况。内源启动子可以是指细胞中未经修饰的启动子,或者其与野生型启动子具有70％、75％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98或99％同一性或者与野生型启动子具有至少70％、75％、80％、85％、

90％、95％、96％、97％、98％或99％同一性的启动子。

[0013] 转基因、第一转基因或第二转基因可包含嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor,CAR)或T细胞受体(T-cell receptor,TCR)。转基因、第一转基因或第二转基因可包含FOXP3。转基因、第一转基因或第二转基因可包含BCL11b。转基因、第一转基因或第二转基因可包含T细胞受体(TCR)。TCR可以是肿瘤抗原特异性TCR、病毒特异性TCR、异源特异性TCR、癌细胞特异性TCR、细菌特异性TCR或癌症-睾丸抗原特异性TCR。TCR可以是肿瘤抗原特异性TCR(即识别肿瘤抗原的TCR)。TCR可以是病毒抗原特异性TCR(即识别病毒抗原的TCR)。CAR可以是例如肿瘤抗原特异性CAR、病毒特异性CAR、异源特异性CAR或细菌特异性CAR。CAR可以是肿瘤抗原特异性CAR(即识别肿瘤抗原的CAR)。转基因、第一转基因或第二转基因可以是转录因子。

[0014] 转基因可以是细胞因子受体或细胞因子。转基因、第一转基因或第二转基因可以不包括嵌合抗原受体(CAR)或T细胞受体(TCR)。转基因、第一转基因或第二转基因可以不包括FOXP3。转基因、第一转基因或第二转基因可以不包括BCL11b。转基因、第一转基因或第二转基因可以不包括T细胞受体(TCR)。TCR可以不包括肿瘤抗原特异性TCR、病毒特异性TCR、异源特异性TCR、癌细胞特异性TCR、细菌特异性TCR或癌症-睾丸抗原特异性TCR。TCR可以不包括肿瘤抗原特异性TCR(即识别肿瘤抗原的TCR)。TCR可以不包括病毒抗原特异性TCR(即识别病毒抗原的TCR)。CAR可以不包括例如肿瘤抗原特异性CAR、病毒特异性CAR、异源特异性CAR或细菌特异性CAR。CAR可以不包括肿瘤抗原特异性CAR(即识别肿瘤抗原的CAR)。转基因、第一转基因或第二转基因可以不包括转录因子。转基因可以不包括细胞因子受体或细胞因子。

[0015] 转基因、第一转基因或第二转基因的尺寸可以是、至少是、或至多是和/或所编码蛋白质的尺寸是、至少是、或至多是

[0016] 500,505,510,515,520,525,530,535,540,545,550,555,560,565,570,575,580,585,590,595,600,605,610,615,620,625,630,635,640,645,650,655,660,665,670,675,680,685,690,695,700,705,710,715,720,725,730,735,740,745,750,755,760,765,770,775,780,785,790,795,800,805,810,815,820,825,830,835,840,845,850,855,860,865,870,875,880,885,890,895,900,905,910,915,920,925,930,935,940,945,950,955,960,965,970,975,980,985,990,995,1000,1100,1200,1300,1400,1500,1600,1700,1800,1900,2000,2100,2200,2300,2400,2500,2600,2700,2800,2900,3000,3100,3200,3300,3400,3500,3600,3700,3800,3900,4000,4500,5000,5500,6000,或7000个氨基酸或核酸长(或其中可推导出的任何范围)。

[0017] 核酸、第一核酸或第二核酸可包含基因组DNA。核酸、第一核酸或第二核酸可包含位于启动子区、第一启动子区或第二启动子区的转录起始位点下游的表1基因的编码区。转基因和表1基因的转录二者均可由表1基因的启动子调节。转基因、第一转基因或第二转基因和表1基因在同一mRNA上表达。核酸、第一核酸或第二核酸可包含或还包含自切割肽位点或IRES。核酸可以不包含自切割肽或IRES。转基因、第一转基因或第二转基因可位于表1基因的3’-近端。转基因、第一转基因或第二转基因可位于表1基因的5’-近端。当第一区域与第二区域的3’核酸末端连接时,第一区域可位于第二区域的3’近端。在第一区域与第二区域之间可以有其他插入氨基酸残基。也可以不包含第一区域与第二区域之间的插入氨基酸

残基。因此,除非特别指明不具有插入氨基酸残基,否则这些区域不需要紧邻,这也是被考虑的。术语“5’-近端”被类似地定义为,当第一区域与第二区域的5’核酸末端连接时,第一区域位于第二区域的5’-近端。类似地,除非另有说明,否则在第一区域与第二区域之间可以有其他插入氨基酸残基。核酸、第一核酸或第二核酸可包含或还包含表1编码区基因和/或转基因、第一转基因或第二转基因下游的3’UTR区。3’UTR可包含内源3’UTR。启动子区、第一启动子区、第二启动子区、3’UTR、转基因、第一转基因、第二转基因和/或表1编码区的基因位于表1基因的内源基因座处的基因组DNA中。

[0018] 核酸、第一核酸、第二核酸基因组DNA和/或细胞可缺乏编码功能性内源TCR-α(TCR-a)蛋白、功能性内源TCR-β(TCR-b)蛋白、功能性内源TCR-γ(TCR-g)蛋白或功能性内源TCR-δ(TCR-d)蛋白中的一种或更多种的基因。核酸、第一核酸、第二核酸基因组DNA和/或细胞可缺乏编码功能性CD3γ蛋白、功能性CD3δ蛋白、功能性CD3ε蛋白或功能性CD3ζ蛋白中的一种或更多种的基因。

[0019] 核酸、第一核酸、第二核酸基因组DNA和/或细胞可对编码功能性内源TCR-α(TCR-a)蛋白、功能性内源TCR-β(TCR-b)蛋白、功能性内源TCR-γ(TCR-g)蛋白或功能性内源TCR-δ(TCR-d)蛋白中的一种或更多种的基因有效。核酸、第一核酸、第二核酸基因组DNA和/或细胞可对编码功能性CD3γ蛋白、功能性CD3δ蛋白、功能性CD3ε蛋白或功能性CD3ζ蛋白中的一种或更多种的基因有效。

[0020] 细胞可包含多能干细胞(pluripotent stem cell,PSC)。细胞可包含胚胎干细胞或诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cell,iPSC)。细胞可包含干细胞、造血干细胞或祖细胞(hematopoietic stem or progenitor cell,HSPC)、胚胎干细胞、诱导多能干细胞(iPSC)、人胚胎中胚层祖细胞或多能干细胞(PSC)。细胞可分离自或来源于脐带血(cord blood)、外周血、骨髓、外周血、脐带血(umbilical cord blood)、胎盘、脂肪组织或脐带组织。细胞可包含T细胞。成熟细胞可包含成熟T细胞、成熟调节性T细胞(regulatory T cell,Treg)、iNKT细胞、先天淋巴细胞或NK细胞。细胞可包含CD4-单阳性(single positive,SP)细胞或CD8 SP细胞。细胞可包含CD4+CD8-或CD8ab+CD4-T细胞。细胞可包含体外分化的细胞。体外分化的细胞可以是T细胞、成熟Treg细胞、iNKT细胞、先天淋巴细胞或NK细胞。细胞可以是体内的和/或已施用于对象的。细胞可以是体外的。细胞可以是在体外已经历分化的细胞。细胞可以是在体内(即在人对象中)已经历分化的细胞。

[0021] 本公开内容的细胞可不包括PSC、iPSC、HSPC、胚胎干细胞、iPSC、人胚胎中胚层祖细胞、或者分离自或来源于脐带血、外周血、骨髓、外周血、脐带血、胎盘、脂肪组织或脐带组织的细胞。成熟细胞可以不包括成熟T细胞、成熟调节性T细胞(Treg)、iNKT细胞、先天淋巴细胞或NK细胞中的一种或更多种。细胞可包含CD4-单阳性(SP)细胞或CD8 SP细胞。细胞可包含CD4+CD8-或CD8ab+CD4-T细胞。细胞可以不包括体外分化的细胞和/或者成熟Treg细胞、iNKT细胞、先天淋巴细胞或NK细胞。

[0022] 方法还可包括或进一步包括在三维(three-dimensional,3D)细胞聚集体中培养细胞,其中所述细胞聚集体还包含表达Notch配体的选定基质细胞群,并且其中所述3D细胞聚集体在包含胰岛素、生物素、转铁蛋白和白蛋白的无血清培养基中培养一段时间,该时间足以使干细胞或祖细胞体外分化为成熟细胞,例如成熟T细胞。基质细胞可包含MS5基质细胞。基质细胞可以是人基质细胞。Notch配体可包含外源Notch配体。基质细胞可包含表达

Notch配体的转基因。方法可包括或进一步包括对干细胞或祖细胞和基质细胞进行离心以形成3D细胞聚集体。细胞培养基可包含或还包含以下中的一种或更多种:外部添加的FLT3配体(FLT3L)、白介素7(interleukin 7,IL-7)、干细胞因子(stem cell factor,SCF)、血小板生成素(thrombopoietin,TPO)、血小板生成素(TPO)、IL-2、IL-4、IL-6、IL-15、IL-21、TNF-α、TGF-β、干扰素-γ、干扰素-λ、TSLP、胸腺五肽、多效营养因子(pleotrophin)、多效生长因子(pleiotrophin)、中期因子、或其组合。基质细胞可具有编码完整的、部分的或经修饰的Notch配体的外源核苷酸序列,并且其中Notch配体是DLL4、DLL1、JAG1、JAG2或其组合。细胞培养基可以不包含以下中的一种或更多种:外部添加的FLT3配体(FLT3L)、白介素7(IL-7)、干细胞因子(SCF)、血小板生成素(TPO)、血小板生成素(TPO)、IL-2、IL-4、IL-6、IL-15、IL-21、TNF-α、TGF-β、干扰素-γ、干扰素-λ、TSLP、胸腺五肽、多效营养因子、多效生长因子、中期因子、或其组合。基质细胞可以不包含一种或更多种编码完整的、部分的或经修饰的Notch配体的外源核苷酸序列,并且其中Notch配体是DLL4、DLL1、JAG1、JAG2或其组合。

[0023] 细胞可以是同种异体的。细胞也可以进一步限定为自体的。对象可以是患有癌症的对象。方法可以用于治疗癌症。方法可以用于治疗自身免疫病。癌症或自身免疫病可以是本文中列出的一种。癌症可选自肺癌、前列腺癌、卵巢癌、睾丸癌、脑癌、皮肤癌、黑素瘤、结肠癌、直肠癌、胃癌、食管癌、气管癌、头颈癌、胰腺癌、肝癌、乳腺癌、卵巢癌、包括淋巴瘤和多发性骨髓瘤的淋巴癌、白血病、骨肉瘤或软组织肉瘤、宫颈癌、和外阴癌。癌症可以不包括以下中的一种或更多种:肺癌、前列腺癌、卵巢癌、睾丸癌、脑癌、皮肤癌、黑素瘤、结肠癌、直肠癌、胃癌、食管癌、气管癌、头颈癌、胰腺癌、肝癌、乳腺癌、卵巢癌、包括淋巴瘤和多发性骨髓瘤的淋巴癌、白血病、骨肉瘤或软组织肉瘤、宫颈癌、和外阴癌。

[0024] 一种或更多种细胞,特别是基质细胞可表达外源Notch配体。培养基可包含外部添加的Notch配体。外部添加的Notch配体可以与固体支持物连接或被固定化。Notch配体的一些非限制性实例包括完整的(全长)、部分的(截短形式)或经修饰的(包含一个或更多个突变,例如保守突变)DLL4、DLL1、JAG1、JAG2或其组合。例如,基质细胞具有编码Notch配体的外源核苷酸序列,其可通过转染或转导引入到细胞中。培养组合物可以不包含或可以以其他方式不包含Notch配体,或者可以不包含外部添加的Notch配体。Notch配体可以是人Notch配体。Notch配体可以是人DLL1或DLL4 Notch配体。

[0025] 基质细胞可以是鼠基质细胞系、人基质细胞系、选定的原代基质细胞群、由多能干细胞体外分化的选定基质细胞群、或其组合。基质细胞可以是MS5、OP9、S17、HS-5或HS-27a细胞。基质细胞系(例如MS5、OP9、S17、HS-5或HS-27a细胞)可以不包含在本公开内容的方法和组合物中。基质细胞可由人细胞分化。基质细胞可由人多能干细胞分化。基质细胞可由人或非人HSPC或PSC细胞分化。

[0026] 培养基可使用用于培养动物细胞的培养基作为其基础培养基来制备,例如以下中的任一种:AIM V、X-VIVO-15、NeuroBasal、EGM2、TeSR、BME、BGJb、CMRL1066、Glasgow MEM、经改良MEM锌选择(Improved MEM Zinc Option)、IMDM、培养基199、Eagle MEM、αMEM、DMEM、Ham、RPMI-1640和Fischer培养基,及其任意组合,但是培养基可不特别限于此,只要其可用于培养动物细胞即可。特别地,培养基可以是无异源(xeno-free)的或是化学限定的。

[0027] 培养基可以是含血清培养基或无血清培养基,或无异源培养基。从阻止异源动物来源组分污染的角度来看,血清可与干细胞来源于同一动物。无血清培养基是指不具有未

经加工或未经纯化血清的培养基,并因此可包括具有经纯化血液来源组分或动物组织来源组分(例如生长因子)的培养基。

[0028] 培养基可包含或可不包含血清的任何替代品。血清的替代品可包括这样的物质:其适当地包含白蛋白(例如富含脂质的白蛋白、牛白蛋白、白蛋白替代物例如重组白蛋白或人源化白蛋白、植物淀粉、右旋糖酐和蛋白质水解物)、转铁蛋白(或其他铁转运蛋白)、脂肪酸、胰岛素、胶原前体、微量元素、2-巯基乙醇、3'-硫代甘油(3'-thiolgiycerol),或其等同物。血清的替代品可通过例如国际公开No.98/30679中公开的方法来制备(其整体并入本文)。或者,可使用任何可商购获得的物质以获得更多便利。可商购获得的物质包括敲除血清替代品(Knockout Serum Replacement,KSR)、化学限定的脂质浓缩物(Gibco)和Glutamax(Gibco)。

[0029] 培养基可以是适合于神经细胞发育的无血清培养基。例如,培养基可包含以有效地由3D细胞聚集体产生成熟细胞的浓度的B-27®补充剂、无异源B-27®补充剂(可在万维网http://www.thermofisher.com/us/en/home/technical-resources/media-formulation.250.html获得)、NS21补充剂(Chen et al.,J Neurosci Methods,2008Jun30;171(2):239-247,其整体并入本文)、GS21™补充剂(可在万维网上amsbio.com/B-27.aspx获得)、或其组合。

[0030] 培养基可包含以下B-27补充剂成分中的一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、11种、12种、13种、14种、15种、16种、17种、18种、19种、20种或更多种:维生素,例如生物素;DLα生育酚乙酸酯;DLα-生育酚;维生素A(乙酸酯);蛋白质,例如BSA(牛血清白蛋白(bovine serum albumin))或人白蛋白;脂肪酸游离级分V;过氧化氢酶;人重组胰岛素;人转铁蛋白;超氧化物歧化酶;其他组分例如皮质酮;D-半乳糖;乙醇胺HCl;谷胱甘肽(还原型);左旋肉碱HCl;亚油酸;亚麻酸;孕酮;腐胺2HCl;亚硒酸钠;和T3(三碘-I-甲腺原氨酸(triodo-I-thyronine))。

[0031] 培养基可包含外部添加的抗坏血酸。培养基还可包含外部添加的脂肪酸或脂质、氨基酸(例如非必需氨基酸)、单糖、维生素、生长因子、细胞因子、抗氧化剂物质、2-巯基乙醇、丙酮酸、缓冲剂、无机离子和无机盐。维生素可包含生物素、DLα生育酚乙酸酯、DLα生育酚、维生素A、氯化胆碱、泛酸钙、泛酸、叶酸烟酰胺、吡哆醇、核黄素、硫胺素、肌醇、维生素B12或其组合或其盐。氨基酸可包含精氨酸、半胱氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、谷氨酰胺、苯丙氨酸、苏氨酸、色氨酸、组氨酸、酪氨酸或缬氨酸或其组合。无机离子可包含钠、钾、钙、镁、氮或磷,或其组合或盐。培养基还可包含钼、钒、铁、锌、硒、铜或锰,或其组合。

[0032] 培养基可以不包含以下中的一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、11种、12种、13种、14种、15种、16种、17种、18种、19种、20种或更多种:B-27补充剂、生物素、DLα生育酚乙酸酯、DLα生育酚、维生素A(乙酸酯)、BSA(牛血清白蛋白)、人白蛋白、脂肪酸游离级分V、过氧化氢酶、人重组胰岛素、人转铁蛋白、超氧化物歧化酶、皮质酮、D-半乳糖、乙醇胺HCl、谷胱甘肽(还原型)、左旋肉碱HCl、亚油酸、亚麻酸、孕酮、腐胺2HCl、亚硒酸钠、T3(三碘-I-甲腺原氨酸)、抗坏血酸、脂肪酸、脂质、氨基酸、单糖、维生素、生长因子、细胞因子、抗氧化剂物质、2-巯基乙醇、丙酮酸、缓冲剂、无机离子、无机盐、氯化胆碱、泛酸钙、泛酸、叶酸烟酰胺、吡哆醇、核黄素、硫胺素、肌醇、维生素B12、精氨酸、半胱氨酸、异亮氨酸、

亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、谷氨酰胺、苯丙氨酸、苏氨酸、色氨酸、组氨酸、酪氨酸、缬氨酸、钠、钾、钙、镁、氮、磷、钼、钒、铁、锌、硒、铜和/或锰。

[0033] 可以添加以下浓度的一种或更多种培养基组分:至少、至多或约0.1、0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、180、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900或1000ng/L、ng/ml、μg/ml、mg/ml,或其中可推导出的任何范围。

[0034] 所使用的培养基可补充有至少一种以下浓度的外部添加的生长因子或细胞因子:约0.1ng/mL至约500ng/mL,更特别地1ng/mL至100ng/mL,或至少,至多,或约0.1、0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、180、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900或1000ng/L、ng/ml、μg/ml、mg/ml,或其中可推导出的任何范围。合适的细胞因子包括但不限于FLT3配体(FLT3L)、白介素7(IL-7)、干细胞因子(SCF)、血小板生成素(TPO)、IL-2、IL-4、IL-6、IL-15、IL-21、TNF-α、TGF-β、干扰素-γ、干扰素-λ、TSLP、胸腺五肽、多效营养因子和中期因子。特别地,培养基可包含FLT3L和IL-7中的至少一种。更特别地,培养物可以包含FLT3L和IL-7二者。可以不包含以下中的一种或更多种:FLT3配体(FLT3L)、白介素7(IL-7)、干细胞因子(SCF)、血小板生成素(TPO)、IL-2、IL-4、IL-6、IL-15、IL-21、TNF-α、TGF-β、干扰素-γ、干扰素-λ、TSLP、胸腺五肽、多效营养因子和中期因子。

[0035] 可适当地限定另一些培养条件。例如,培养温度可以为约20℃至40℃,例如,至少,至多,或约20℃、21℃、22℃、23℃、24℃、25℃、26℃、27℃、28℃、29℃、30℃、31℃、32℃、33℃、34℃、35℃、36℃、37℃、38℃、39℃、40℃(或其中可推导出的任何范围),但不特别地限于此。CO_2浓度可以为约1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%或10%(或其中可推导出的任何范围),例如约2%至10%,例如约2%至5%,或其中可推导出的任何范围。氧张力可以是至少或约1%、5%、8%、10%、20%或其中可推导出的任何范围。

[0036] 经诱导分化为成熟细胞的基质细胞和PSC可以以任何比率存在,例如,约20:1、10:1、5:1、1:1、1:5、1:10、1:20,或其中可推导出的任何范围。

[0037] 任何细胞群,例如基质细胞、成熟细胞、干细胞、祖细胞或经诱导分化为成熟细胞的PSC,可包含至少、约或至多

[0038] 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,50,60,70,80,90,100,200,300,400,500,$1x10^3$,$2x10^3$,$3x10^3$,$4x10^3$,$5x10^3$,$6x10^3$,$7x10^3$,$8x10^3$,$9x10^3$,$1x10^4$,$2x10^4$,$3x10^4$,$4x10^3$,$5x10^4$,$6x10^4$,$7x10^4$,$8x10^4$,$9x10^4$,$1x10^5$,$2x10^5$,$3x10^5$,$4x10^5$,$5x10^5$,$6x10^5$,$7x10^5$,$8x10^5$,$9x10^5$,$1x10^6$,或$2x10^6$个细胞。

[0039] 培养可持续任何时间长度,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个小时、天或周或其中可推导出的任何范围。培养可涉及或可不涉及细胞传代。

[0040] 对象可包含实验室测试动物,例如小鼠、大鼠、兔、狗、猫、马或猪。对象可以是人。

[0041] 可使用任何遗传修饰组合物或方法(例如基因编辑、同源重组或非同源重组、RNA介导的遗传递送或任何常规核酸递送方法)来将外源核酸引入到细胞中。遗传修饰方法的一些非限制性实例可包括例如通过CRISPR/CAS9、锌指核酸酶或TALEN技术的基因编辑方法。

[0042] 可对本文中所述的组合物和方法进行改进,使得该方法用于制备具有某种表型的细胞。所述方法用于制备具有以下表型的T细胞:

[0043] $CD4^+CD8^-$ T细胞,$CD4^-CD8^+$ T细胞,$CD34^+CD7^+$ $CD1a^+$细胞,CD3+ TCRab+,CD3+ TCRgd+,CD3+ TCRab+ CD4+ CD8-,CD3+ TCRab+ CD8+ CD4-,CD3+ TCRab+ CD4+ CD8- CD45RO- CD45RA+,CD3+ TCRab+ CD8+ CD4- CD45RO- CD45RA+,CD3+ TCRab+ CD4+ CD8- CD45RO- CD45RA+ CCR7+,CD3+ TCRab+ CD8+ CD4- CD45RO- CD45RA+ CCR7+,CD3+ TCRab+ CD4+ CD8- CD45RO- CD45RA+ CD27+,CD3+ TCRab+ CD8+ CD4- CD45RO- CD45RA+ CD27+,$CD34^+$ $CD7^+$ $CD1a^+$细胞,CD34+CD5+CD7+,CD34+CD5+CD7-,

[0044] 自然杀伤T细胞、调节性T细胞、抗原特异性T细胞、上皮内淋巴细胞T细胞,或者是以下细胞:CD45+、CD11b+、CD11b-、

[0045] CD15+,CD15-,CD24+,CD24-,CD114+,CD114-,CD182+,CD182-,CD4+,CD4-,CD14+,CD14-,CD11a+,CD11a-,CD91+,CD91-,CD16+,CD16-,CD3+,CD3-,CD25+,CD25-,Foxp3+,Fox3p-,CD8+,CD8-,CD19+,CD19-,CD20+,CD20-,CD24+,CD24,CD38+,CD38-,CD22+,CD22-,CD61+,CD61-,CD16+,CD16-,CD56+,CD56-,CD31+,CD31-,CD30+,CD30-,CD38+,和/或CD38-

[0046] 或其组合。例如,上皮内淋巴细胞(intraepithelial lymphocyte,IEL)可以通过在基质细胞中表达关联抗原来制备。

[0047] 细胞可对CD4,CD8,CD34,CD7,

[0048] CD1a,CD3,TCRab,TCRgd,CD45RO,CD45RA,CCR7,CD27,CD45,CD11b,CD15,CD24,CD114,CD182,CD91,CD99,CD16,CD25,Foxp3,CD20,CD38,CD22,CD61,CD56,CD31,和CD30中的一种或更多种呈阳性或阴性,和/或者替代地或组合地可对

[0049] CD4,CD8,CD34,CD7,CD1a,CD3,TCRab,TCRgd,CD45RO,CD45RA,CCR7,CD27,CD45,CD11b,CD15,CD24,CD114,CD182,CD91,CD99,CD16,CD25,Foxp3,CD20,CD38,CD22,CD61,CD56,CD31,和CD30中的一种或更多种呈阴性。

[0050] 方法、细胞和组合物可不包括具有以下表型的T细胞:

[0051] $CD4^+CD8^-$ T细胞,$CD4^-CD8^+$ T细胞,$CD34^+$ $CD7^+$ $CD1a^+$细胞,CD3+ TCRab+,CD3+ TCRgd+,CD3+ TCRab+ CD4+ CD8-,CD3+ TCRab+ CD8+ CD4-,CD3+ TCRab+ CD4+ CD8- CD45RO- CD45RA+,CD3+ TCRab+ CD8+ CD4- CD45RO- CD45RA+,CD3+ TCRab+ CD4+ CD8- CD45RO- CD45RA+ CCR7+,CD3+ TCRab+ CD8+ CD4- CD45RO- CD45RA+ CCR7+,CD3+ TCRab+ CD4+ CD8- CD45RO- CD45RA+ CD27+,CD3+ TCRab+ CD8+ CD4- CD45RO- CD45RA+ CD27+,$CD34^+$ $CD7^+$ $CD1a^+$细胞,CD34+CD5+CD7+,CD34+CD5+CD7-,

[0052] 自然杀伤T细胞、调节性T细胞、抗原特异性T细胞、上皮内淋巴细胞T细胞,或者以下细胞:

[0053] CD45+,CD11b+,CD11b-,CD15+,CD15-,CD24+,CD24-,CD114+,CD114-,CD182+,CD182-,CD4+,CD4-,CD14+,CD14-,CD11a+,CD11a-,CD91+,CD91-,CD16+,CD16-,CD3+,CD3-,CD25+,CD25-,Foxp3+,Fox3p-,CD8+,CD8-,CD19+,CD19-,CD20+,CD20-,CD24+,CD24,CD38+,CD38-,CD22+,CD22-,CD61+,CD61-,CD16+,CD16-,CD56+,CD56-,CD31+,CD31-,CD30+,CD30-,CD38+,和/或CD38-

[0054] 细胞可以是成熟、常规的细胞,例如具有CD4+CD8-(SP4)或CD4-CD8ab表型的成熟、常规的T细胞。细胞也可以是NK细胞、iNKT细胞、Treg细胞、TCRgd T细胞、先天免疫细胞或表

达CD8aa的细胞。

[0055] 遗传修饰还可包括引入有助于体外或体内选择或筛选或成像的可选择标志物或可筛选标志物。特别地,体内成像剂或自杀基因可以外源表达或者添加至起始细胞或子代细胞。所述方法可涉及图像引导的过继性细胞治疗。

[0056] 术语“对象”和“患者”可互换使用,并且可指人对象。对象可限定为哺乳动物对象。对象也可以是小鼠、大鼠、猪、马、非人灵长类动物、猫、狗、牛等。

[0057] 在本申请通篇,术语“约”根据其在细胞和分子生物学领域中的清晰且普通含义使用,以指示值包含用于确定该值所采用的装置或方法的误差的标准偏差。

[0058] 当与术语“包含/包括”结合使用时,没有数量词修饰的名词的使用可意指“一个/种”,但是其也符合“一个/种或更多个/种”、“至少一个/种”和“一个/种或多于一个/种”的含义。

[0059] 本文中使用的术语“或/或者”和“和/或/或者”用于描述彼此组合或排斥的多个组分。例如,“x、y和/或z”可指单独的“x”、单独的“y”、单独的“z”、“x、y和z”、“(x和y)或z”、“x或(y和z)”或者“x或y或z”。特别地预期x、y或z可被特别地排除在一个实施方案或方面之外。

[0060] 词语“包含”(及其任何变化形式)、“具有”(及其任何变化形式)、“包括”(及其任何变化形式)、“特征为”(及其任何变化形式)或“含有”(及其任何变化形式)是包含性的或开放式的,并且不排除另外的未记载的要素或方法步骤。

[0061] 组合物及其使用方法可“包含/包括”在本说明书通篇公开的任何成分或步骤、“基本上由其组成”或“由其组成”。短语“由.....组成”不包括任何未指定的要素、步骤或成分。短语“基本上由.....组成”将所述主题的范围限制为指定的物质或步骤以及不实质影响其基本的和新的特征的那些。预期在术语“包含/包括”的上下文中描述的一些实施方案和方面也可在术语“由.....组成”或“基本上由.....组成”的上下文中实施。

[0062] 在治疗性、诊断性或生理性目的或作用的背景下的任何方法也可以以“用途”权利要求语言描述,例如“本文中所讨论的任何化合物、组合物或药剂用于实现或实施所述治疗性、诊断性或生理性目的或作用的用途”。

[0063] 可基于本文中所述的任何方法使用一种或更多种序列或组合物的用途。本申请通篇讨论了另一些实施方案和方面。关于本公开内容的一个方面讨论的任何实施方案同样可应用于本公开内容的另一些方面,反之亦然。此外,本发明的任何组合物均可用于本发明的任何方法,并且本发明的任何方法均可用于产生或利用本发明的任何组合物。在实施例中阐述的实施方案的一些方面也是可在不同实施例中的其他地方或在本申请中的其他地方(例如在发明内容、具体实施方式、权利要求书和附图说明)中讨论的一些实施方案的背景下实施的实施方案。

[0064] 从以下详细描述中,本发明的其他目的、特征和优点将变得明显。然而,应当理解,尽管详细描述和具体实例指示了本发明的一些具体实施方案,但是它们仅以示例的方式给出,因为根据该详细描述,本发明的精神和范围内的多种变化和修改对本领域技术人员将变得明显。

附图说明

[0065] 以下附图构成本说明书的一部分并且被包括在内以进一步表明本公开内容的某些方面。通过参照这些附图中的一幅或更多幅并结合本文中所示的具体实施方案的详细描述,可更好地理解本公开内容。

[0066] 图1A至B:整体转基因敲入方法用于实现内源基因表达之后的阶段特异性表达的一个实例。(A)使用CRISPR/Cas9介导的同源定向修复,将生物活性转基因(即报道子,嵌合抗原受体)插入内源基因3'非翻译区的框架中。在该过程中,终止密码子被丝氨酸-精氨酸接头和自切割肽序列(P2A)替代。这种方法允许通过内源启动子调节插入的转基因的表达,并且内源基因的翻译保持不变。另外,插入嘌呤霉素抗性基因盒有助于富集所编辑的多能干细胞。(B)在iPSC阶段进行CRE-TAT处理之后,可以去除嘌呤霉素抗性盒,留下单一loxp3序列。

[0067] 图2A至B:高组成型慢病毒载体介导的CAR19表达阻断多能干细胞的正常分化。将H1 hESC用共表达CAR19LH和报道子eGFP的慢病毒载体转导。选择高eGFP表达的细胞并进行克隆。克隆2在人工胸腺类器官(artificial thymic organoid,ATO)中分化,并在第2、3、4和5周进行分析。异常分化表现为低频率的(A)CD3+TCRab+细胞和SP4和SP8、以及(B)CD4-CD8-"DN"细胞的主要群体。

[0068] 图3:插入GZMA下游的外源基因的阶段特异性表达的说明。在H1hESC系中进行CRISPR/Cas9编辑以产生GZMA报道子细胞系。在未分化的H1 hESC中,在内源GZMA基因的下游进行mCitrine的敲入(knock-in,KI),并克隆细胞:然后在ATO中分化克隆,并在第1、3和5周进行分析,以评估特定T细胞群中报道子的表达。示出的是杂合克隆的分析。Mcitrine在23%的SP8和2%的SP4中表达,但在前体阶段ISP4或DP中不表达。

[0069] 图4A至B:表明延迟CAR19表达起始允许正常T细胞分化。外源基因CAR19LH在成熟T细胞中的表达是通过插入内源GZMA的下游实现的。通过在GZMA基因座处将CAR19LH敲入到来自T-iPSC系"n11"的未分化细胞中来产生纯合克隆。然后所编辑的T-iPSC的克隆在ATO系统中分化。该图示出了(3a)DP(第1周)和SP8细胞和SP4细胞(第3和4周)的正常分化。(3b)在第4周,67%的SP8细胞和6%的SP4细胞表达CAR。

[0070] 图5A至D。(A)从hPSC产生成熟T细胞的方案示意图。使用慢病毒转导或CRISPR/Cas9的所有遗传修饰均在多能阶段进行。(B)在组成型泛素启动子下表达第二代抗CD19 CAR(CAR19)的慢病毒载体的示意图。(C)WT和CAR19慢病毒转导的hPSC ATO的代表性流式细胞术图。转导的ATO示出了DP T细胞的显著损失和DN的富集。(D)对CAR19慢病毒转导的ATO中的DN的进一步分析显示2型先天淋巴细胞(ILC2)标志物的上调。所有FACS图均在CD45+CD56-上设门。

[0071] 图6A至B。(A)汇总了在T细胞分化的每个阶段时选择的候选基因和表达水平(RPKM)的表。该分析鉴定了候选基因,其表明了从PSC到DP后期为零至低表达,但在SP8和SP4二者中高表达。(B)GZMA-mCitrine报道子PSC的T细胞分化动力学。使用内源GZMA启动子驱动报道子的表达。报道子mCitrine的表达仅存在于成熟的SP中,而不存在于早期的T细胞阶段。

[0072] 图7A至D。(A)用于实现特异性CRISPR/Cas9介导的HDR将CAR19敲入到GZMA基因座的3'非翻译区(untranslated region,UTR)中的供体模板设计的示意图。(B)GZMA-CAR19LH

T-iPSC的T细胞分化的代表性流式细胞术图。(C)第5周ATO来源的T细胞的流式细胞术图。(D)使用GZMA-CAR19LH T-iPSC来源的T细胞进行体外共培养测定的代表性流式细胞术图。

[0073] 图8A至B:RAG1/RAG2双敲除(double knockout,DKO)使T细胞发育停止在T细胞发育的双阳性阶段。

[0074] 图9A至B:组成型外源TCR表达挽救RAG1/2DKO hPSC T细胞分化。

[0075] 图10:RNA测序数据。

[0076] 图11A至B。(A)在第2、4和5周,与分析的WT T-iPSC和仅TRAC破坏的对照ATO相比,TRAC破坏之后GZMA-CAR19LH T-iPSC的FACS分析。在T-iPSC分化的整个过程中,TRAC破坏阻止了TCRαβ的表面表达和CD3的表达。(B)在第2、4和5周,与分析的野生型和仅TRAC破坏的对照相比,TRAC破坏的GZMA-CAR19LH T-iPSC ATO的T细胞发育的FACS分析。由于缺乏TCRαβ和CD3表达,T细胞不能进行阳性选择,并且发育停止在DP阶段。(C)GZMA的胞内染色显示,在第5周,在两种TRAC破坏的DP T细胞中均无GZMA表达。从野生型(wildtype,WT)对照产生的成熟SP8 T细胞被用于产生同种型和阳性对照。(D)在第5周,CD19 CAR表达的FACS分析。因为DP T细胞不表达GZMA,所以无CAR表达。

[0077] 图12A至C。(A)在T细胞发育的每个阶段的RAG1-mCitrine T-iPSC ATO的FACS分析。mCitrine荧光报道蛋白被敲入到RAG1的3'UTR中。在第1、2和7周对报道子表达进行分析,以捕获DN、ISP4、DP和SP T细胞阶段。在T细胞定型(即T-iPSC,hEMP)之前,无mCitrine表达(数据未示出),但从DN到DP阶段,mCitrine表达提高。在阳性选择之后,在成熟、初始SP8和SP4 T细胞中完全没有报道子表达。(B)来自RAG1-mCitrine T-iPSC ATO的mCitrine报道子表达的直方图和量化。报道子表达只存在于DN至DP阶段,但在T细胞定型(即T-iSPC和hEMP)之前和阳性选择(即SP8和SP4 T细胞)之后不存在。(C)在离体培养和人工刺激之后分析RAG1-mCitrine SP8和SP4 T细胞。RAG1-mCitrine T-iPSC ATO在第7周解聚。用IL-2和IL-7培养SP8和SP4 T细胞,并且用PMA/PTI最大程度地刺激亚群,以测量激活之后任何可能的异常RAG1表达。在这两种条件下,SP8和SP4中均未检出mCitrine的表达。

[0078] 图13A至D。在第2、4和6周,与分析的野生型和仅TRAC破坏的对照相比,TRAC破坏的RAG1-NYESO TCR T-iPSC ATO的TCRαβ和CD3的FACS分析。外源NYESO(1G4)TCR被敲入到RAG1的3'UTR中。作为结果,外源TCR表达精确地反映了RAG1的表达谱。在6周的过程中,随着发育的T细胞实现阳性选择,NYESO TCR下调,导致不表达TCRαβ或CD3的SP8和SP4 T细胞的产生(另参见图13B)。(B)在第2、4和6周,来源于分析的TRAC破坏的RAG1-NYESO TCR T-iPSC ATO的T细胞发育的FACS分析。在第6周,约40%的T细胞实现了阳性选择,并随后下调了TCRαβ和CD3。成熟SP8和SP4 T细胞仅存在于TCRαβ-CD3-群体中,而剩余的TCRαβ+CD3+细胞则停滞在DP阶段。(C)在第6周,对分析的TRAC破坏的RAG1-NYESO TCR T-iPSC ATO的TCRαβ表达的分析。在发育过程中,随着细胞实现阳性选择,TCRαβ表达丧失。(D)在第6周,与野生型对照相比,从TRAC破坏的RAG1-NYESO TCR T-iPSC ATO产生的TCR-SP8 T细胞的表征。所得的TCRαβ-CD3-SP8T细胞稳健表达CD45RA+和CD62L+,并且是CD8α+/CD8β+。

[0079] 图14A至E。(A)在第2周和第6周,分析的TRAC破坏的RAG1-NYESO TCR,GZMA-CAR19LH T-iPSC ATO的FACS分析。这三种遗传修饰实现了以下:(1)TRAC破坏阻止了内源TCR表达,(2)RAG1-NYESO TCR提供了瞬时TCR表达以实现阳性选择,并随后失去,(3)然后所得成熟SP8 T细胞通过GZMA启动子表达CAR。这些策略的组合最终导致了TCRαβ-CD3-SP8

CAR T细胞的稳健产生。(B)在第6周由ATO产生的TCRαβ-CD3-SP CAR T细胞的表征。成熟T细胞稳健表达成熟、常规和初始T细胞标志物以及CD19 CAR。(C)TCRαβ-CD3-SP8CAR T细胞的功能表征。在第6周将T细胞从ATO中分离出,并与抗原阳性(CD19+K562)或阴性(K562 WT)aAPC共培养,以评价抗原特异性响应。响应于抗原,CART细胞上调活化标志物CD25和4-1BB(CD137)。(D)另外,T细胞表达多种细胞因子和脱颗粒标志物CD107a。所有图都在CD45+CD7+CD8+上设门。(E)TCRαβ-CD3-SP8 CAR T细胞的表征,所述细胞是使用相同三重基因敲入策略产生的,但表达不同CAR构建体。第一T-iPSC系通过GZMA表达CD19 CAR,其包含长铰链间隔区(LH)和CD28共刺激结构域(CD28CS)。第二T-iPSC系通过GZMA表达CD19 CAR,而无长间隔区(SH=短铰链)和4-1BB共刺激结构域(41BB)。这两种系都能够产生TCRαβ-CD3-SP8 CAR T细胞,其表达成熟、常规和初始T细胞标志物的水平类似。

[0080] 举例说明性实施方案的描述

[0081] I.引言

[0082] 本公开内容通过将外源基因表达限制于成熟T细胞,为表达对正常T细胞分化有害的转基因(例如FOXP3和CAR)的问题提供了解决方案。本发明人将颗粒酶A(Granzyme A,GZMA)鉴定为内源基因,其在体外和正常胸腺中T细胞分化期间具有严格调节的阶段特异性表达。他们将GZMA下游的报道基因插入到多能干细胞(PSC)中,以表明分化期间的表达高度受限于成熟CD8+CD3+TCRab+CD4-(SP8)T细胞和成熟CD4+CD3+TCRab+CD8-(SP4)T细胞(图3)。本发明人还将CAR19构建体插入到了PSC的GZMA基因座中,并表明了表达高水平CAR构建体的成熟T细胞的正常分化(图4)。因此,该方法可应用于体外分化技术,该体外分化技术使用本文中所述和本领域已知的作为成熟T细胞的前体的任何类型的多能(pluripotent)或多能(multipotent)细胞或者淋巴样细胞。

[0083] II.定义

[0084] 术语“转基因”是指在体外转移(即通过基因转移/转导/转染技术)到细胞中的基因。转基因可以是不在细胞中天然表达的基因,例如CAR或经改造TCR。

[0085] 术语“嵌合抗原受体”或“CAR”是指将任意特异性接枝到免疫效应细胞的经改造受体。这些受体用于将单克隆抗体的特异性接枝到T细胞;其中其编码序列的转移通过逆转录病毒或慢病毒载体促进。受体被称为嵌合体,因为其由来自不同来源的部分构成。这些分子的最常见形式是与CD3-ζ跨膜和内结构域、CD28或41BB细胞内结构域、或其组合融合的来源于单克隆抗体的单链可变片段(scFv)的融合体。这样的分子使得响应于scFv识别其靶标而传递信号。这样的构建体的一个实例是14g2a-ζ,其是来源于杂交瘤14g2a(其识别二唾液酸神经节苷脂GD2)的scFv的融合体。当T细胞表达该分子(通常通过致癌逆转录病毒载体转导实现)时,其识别并杀伤表达GD2的靶细胞(例如神经母细胞瘤细胞)。为了靶向恶性B细胞,研究人员使用对B谱系分子CD19具有特异性的嵌合免疫受体重定向T细胞的特异性。免疫球蛋白重链和轻链的可变部分通过柔性接头融合以形成scFv。在该scFv之前是信号肽以将新生蛋白引导至内质网并随后表面表达(这被切割)。柔性间隔区允许scFv在不同的方向上取向以实现抗原结合。跨膜结构域是典型的疏水性α螺旋,其通常来源于突出到细胞并传递期望信号的信号转导内结构域的原始分子。

[0086] 术语“抗原”是指引起免疫系统产生针对其的抗体或T细胞对其作出响应的任何物质。抗原可以是长度为5至50个氨基酸,或者至少、至多、或正好5、10、15、20、25、30、35、40、

45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、125、150、175、200、250或300个氨基酸或其中可推导出的任何范围的肽。

[0087] 术语“相对于接受者是同种异体的”旨在是指不是从接受者分离的细胞。该细胞可以是这样的细胞,其不是从患者分离的。细胞可以是这样的细胞,其不是从遗传匹配的个体(例如具有相容性基因型的亲属)分离的。

[0088] 当与培养基、胞外基质或培养条件相关使用时,术语“无异源(XF)”或“无动物组分(animal component-free,ACF)”或“无动物”,是指基本上不含异质动物来源组分的培养基、胞外基质或培养条件。对于培养人细胞,非人动物(例如小鼠)的任何蛋白质都是异源组分。无异源基质可以基本上不含任何非人动物来源组分,因此排除小鼠饲养细胞或Matrigel™。Matrigel™是从Engelbreth-Holm-Swarm(EHS)小鼠肉瘤提取的溶解的基底膜制备物,所述肉瘤是富含胞外基质蛋白包括层黏连蛋白(主要组分)、胶原IV、硫酸肝素蛋白聚糖和巢蛋白(entactin/nidogen)的肿瘤。

[0089] 当涉及培养基、胞外基质或培养条件使用时,术语“确定的”是指其中几乎所有组分的性质和量都已知的培养基、胞外基质或培养条件。

[0090] “化学成分确定的培养基”是指其中几乎所有成分的化学性质及其量都已知的培养基。这些培养基也被称为合成培养基。化学成分确定培养基的一些实例包括TeSR™。

[0091] 如本文所用,当细胞具有少于10%的成分时,细胞“大体上不含”某些试剂或成分,例如血清、信号转导抑制剂、动物组分或饲养细胞、外源遗传元件或载体元件,并且当细胞具有少于1%成分时,其“基本上不含”某些试剂或成分。然而,甚至更期望的是其中总细胞群中的少于0.5%或少于0.1%包含外源遗传元件或载体元件的细胞群。

[0092] 当使用本领域普通技术人员已知的常规检测方法的培养物、基质或培养基分别具有低于可检测水平的试剂水平或未向培养物、基质或培养基外在添加这些试剂时,培养物、基质或培养基“基本上不含”某些试剂或成分,例如血清、信号转导抑制剂、动物组分或饲养细胞。无血清培养基可以基本上不含血清。

[0093] “外周血细胞”是指血液的细胞组分,包括红细胞、白细胞和血小板,其见于血液的循环库中。

[0094] “造血干细胞和祖细胞”或“造血前体细胞”是指定型于造血谱系但能够进一步造血分化的细胞并且包括造血干细胞、多能造血干细胞(成血细胞)、骨髓祖细胞、巨核细胞祖细胞、红细胞祖细胞和淋巴祖细胞。“造血干细胞(HSC)”是产生所有血细胞类型的多能干细胞,所述血细胞类型包括骨髓谱系(单核细胞和巨噬细胞、中性粒细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞、红细胞、巨核细胞/血小板、树突细胞)和淋巴样谱系(T细胞、B细胞、NK细胞)。

[0095] “载体”或“构建体”(有时称为基因递送或基因转移“载剂”)是指包含待体外或体内递送至宿主细胞的多核苷酸的大分子、分子复合物或病毒颗粒。多核苷酸可以是线性或环状分子。

[0096] “质粒”(一种常见类型的载体)是与染色体DNA分离的染色体外DNA分子,其能够独立于染色体DNA进行复制。在某些情况下,其是环状和双链的。

[0097] “表达构建体”或“表达盒”意指能够指导转录的核酸分子。表达构建体至少包含启动子或在功能上等同于启动子的结构。还可以包含另外的元件,例如增强子和/或转录终止信号。

[0098] 术语“与…对应”在本文中用于意指多核苷酸序列与参考多核苷酸序列的全部或一部分同源(即相同,不严格地在进化上相关),或者多肽序列与参考多肽序列相同。相比之下,术语“与…互补”在本文中用于意指互补序列与参考多核苷酸序列的全部或一部分同源。为了举例说明,核苷酸序列“TATAC”与参考序列“TATAC”对应并且与参考序列“GTATA”互补。

[0099] “编码”特定蛋白质的“基因”、“多核苷酸”、“编码区”、“序列”、“区段”、“片段”或“转基因”是当置于合适调控序列的控制下时在体外或体内被转录并且任选地还被翻译成基因产物例如多肽的核酸分子。编码区可以以cDNA、基因组DNA或RNA形式存在。当以DNA形式存在时,核酸分子可以是单链的(即有义链)或双链的。编码区的边界由5’(氨基)末端的起始密码子和3’(羧基)末端的翻译终止密码子决定。基因可以包括但不限于来自原核或真核mRNA的cDNA、来自原核或真核DNA的基因组DNA序列,和合成DNA序列。转录终止序列将通常位于基因序列的3’。

[0100] 术语“细胞”在本文中以其在本领域中的最广泛含义使用,并且是指以下活体,其是多细胞生物体的组织的结构单元,被将其与外部隔离的膜结构包围,具有自我复制的能力,并且具有遗传信息和表达其的机制。本文使用的细胞可以是天然存在的细胞或人工修饰的细胞(例如融合细胞、经遗传修饰细胞等)。

[0101] 如本文所用,术语“干细胞”是指能够自我复制并且具有多能性或多潜能性的细胞。通常来说,干细胞可以使受伤组织再生。本文中的干细胞可以是但不限于胚胎干(ES)细胞、诱导多能干细胞或组织干细胞(也称为组织特异性干细胞或体干细胞)。

[0102] “胚胎干(ES)细胞”是来源于早期胚胎的多能干细胞。ES细胞最初于1981年建立,其自1989年以来也应用于敲除小鼠的产生。在1998年,建立了人ES细胞,其目前正变得可用于再生医学。

[0103] 与ES细胞不同,组织干细胞具有有限的分化潜能。组织干细胞存在于组织中的特定位置并且具有未分化的胞内结构。因此,组织干细胞的多能性通常较低。组织干细胞具有较高的核/质比并具有较少的胞内细胞器。大多数组织干细胞具有低多能性、长细胞周期和超过个体寿命的增殖能力。基于细胞来源于的部位例如皮肤系统、消化系统、骨髓系统、神经系统等,将组织干细胞分成几类。皮肤系统中的组织干细胞包括表皮干细胞、毛囊干细胞等。消化系统中的组织干细胞包括胰腺(常见)干细胞、肝干细胞等。骨髓系统中的组织干细胞包括造血干细胞、间充质干细胞等。神经系统中的组织干细胞包括神经干细胞、视网膜干细胞等。

[0104] “诱导多能干细胞”(通常缩写为iPS细胞或iPSC)是指通过引入某些称为重编程因子的因子由非多能细胞(通常体细胞)或终末分化细胞(例如成纤维细胞、造血细胞、肌细胞、神经元、表皮细胞等)人工制备的多能干细胞类型。

[0105] “多能性”是指具有分化成构成一个或更多个组织或器官或者特别地三个胚层中任一个的所有细胞的潜能的干细胞:内胚层(内胃衬、胃肠道、肺)、中胚层(肌肉、骨骼、血液、泌尿生殖器)或外胚层(表皮组织和神经系统)。本文使用的“多能干细胞”是指可以分化成来源于三个胚层中的任一个的细胞的细胞,例如全能细胞或诱导多能细胞的直接后代。

[0106] 本文中使用的“胚胎中胚层祖细胞”或“EMP细胞”是指多能干细胞(PSC),其可包括已定型于中胚层的造血干细胞和祖细胞、胚胎干细胞(embryonic stem cell,ESC)和诱导

多能干细胞(iPSC)。定型于中胚层是通过上皮细胞向间质细胞转化(epithelial-to-mesenchymal transition,EMT)以及细胞表面蛋白EpCAM/CD326和NCAM/CD56表达的相互变化启动的。EMP细胞可以进一步限定为EMP CD326-CD56+。EMP $CD326^{-}CD56^{+}$细胞可通过在存在包括但不限于一种或更多种以下的组分的情况下培养PSC而产生:激活素A、BMP4、VEGF、FGF2、及其组合。

[0107] 关于核酸分子的“可操作连接”意指两个或更多个核酸分子(例如待转录的核酸分子、启动子和增强子元件)以该方式连接以允许核酸分子的转录。关于肽和/或多肽分子的“可操作连接”意指两个或更多个肽和/或多肽分子以该方式连接以产生具有融合体的每个肽和/或多肽组分的至少一种特性的单多肽链,即融合多肽。融合多肽特别地是嵌合的,即由异源分子构成。

[0108] III.转基因

[0109] 转基因、第一转基因或第二转基因可包含抗原靶向分子,例如CAR或TCR。可被本公开内容的CAR和/或TCR靶向的肿瘤抗原的一些非限制性实例包括至少以下:分化抗原例如酪氨酸酶TRP-1、TRP-2,和肿瘤特异性多谱系抗原例如MAGE-1、MAGE-3、BAGE、GAGE-1、GAGE-2、pi5;过表达的胚胎抗原,例如CEA;过表达的癌基因和突变的肿瘤抑制基因,例如p53、Ras、HER-2/neu;染色体易位产生的独特肿瘤抗原,例如BCR-ABL、E2A-PRL、H4-RET、IGH-IGK、MYL-RAR;和病毒抗原,例如EB病毒抗原(Epstein Barr virus antigen,EBVA)和人乳头瘤病毒(human papillomavirus,HPV)抗原E6和E7。其他基于蛋白质的大抗原包括TSP-180,MAGE-4,

[0110] MAGE-5,MAGE-6,RAGE,NY-ESO,p185erbB2,p180erbB-3,c-met,nm-23H1,PSA,CA19-9,CA72-4,CAM17.1,NuMa,K-ras,β-联蛋白,CDK4,Mum-1,p15,p16,43-9F,5T4,791Tgp72,甲胎蛋白β-HCG,BCA225,BTAA,CA 125,CA 15-3\CA 27.29\BCAA,CA 195,CA 242,CA-50,CAM43,CD68\P1,CO-029,FGF-5,G250,Ga733\EpCAM,HTgp-175,M344,MA-50,MG7-Ag,MOV18,NB/70K,NY-CO-1,RCASI,SDCCAG16,TA-90\Mac-2结合蛋白\亲环蛋白(cyclophilm)C相关蛋白,TAAL6,TAG72,TLP,TPS,GPC3,MUC16,MUC18,LMP1,EBMA-1,BARF-1,CS1,CD319,HER1,B7H6,L1CAM,IL6,和MET。

[0111] 肿瘤抗原还包括,例如,胶质瘤相关抗原、癌胚抗原(carcinoembryonic antigen,CEA)、EGFRvlll、IL-IIRa、IL-13Ra、EGFR、FAP、B7H3、Kit、CALX、CS-1、MUC1、BCMA、bcr-abl、HER2、b-人绒毛膜促性腺激素、甲胎蛋白(alphafetoprotein,AFP)、ALK、CD19、细胞周期蛋白B1、凝集素反应性AFP、Fos相关抗原1、ADRB3、甲状腺球蛋白、EphA2、RAGE-1、RUI、RU2、SSX2、AKAP-4、LCK、OY-TESI、PAX5、SART3、CLL-1、岩藻糖基GM1、GloboH、MN-CAIX、EPCAM、EVT6-AML、TGS5、人端粒酶逆转录酶、plysialic酸、PLAC1、RUI、RU2(AS)、肠羧基酯酶、lewisY、sLe、LY6K、mut hsp70-2、M-CSF、MYCN、RhoC、TRP-2、CYPIBI、BORIS、前列腺酶、前列腺特异性抗原(prostate-specific antigen,PSA)、PAX3、PAP、NY-ESO-1、LAGE-la、LMP2、NCAM、p53、p53突变体、Ras突变体、gpl00、prostein、OR51 E2、PANX3、PSMA、PSCA、Her2/neu、hTERT、HMWMAA、HAVCR1、VEGFR2、PDGFR-β、存活蛋白和端粒酶,豆荚蛋白(legumain)、HPV E6、E7、精子蛋白17、SSEA-4、酪氨酸酶、TARP、WT1、前列腺癌肿瘤抗原-1(prostate-carcinoma tumor antigen-1,PCTA-1)、ML-IAP、MAGE、MAGE-A1.MAD-CT-1、MAD-CT-2、MelanA/MART 1、XAGE1、ELF2M、ERG(TMPRSS2 ETS融合基因)、NA17、中性粒细胞弹性蛋白酶、

肉瘤易位断点、NY-BR-1、ephnnB2、CD20、CD22、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44v6、CD97、CD171、CD179a、雄激素受体、FAP、胰岛素生长因子(insulin growth factor,IGF)-I、IGFII、IGF-I受体、GD2、邻乙酰基-GD2、GD3、GM3、GPRC5D、GPR20、CXORF61、叶酸受体(FRa)、叶酸受体β、ROR1、Flt3、TAG72、TN Ag、Tie 2、TEM1、TEM7R、CLDN6、TSHR、UPK2、间皮素、及其任意组合。

[0112] CAR和/或TCR可针对的肿瘤细胞抗原的另一些实例包括例如至少5T4、8H9、$\alpha_v\beta_6$整合素、BCMA、B7-H3、B7-H6、CAIX、CA9、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD38、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD70、CD123、CD138、CD171、CD133、CEA、c-Met、CSPG4、EGFR、EGFR家族包括ErbB2(HER2)、EGFRvIII、EGP2、EGP40、ERBB3、ERBB4、ErbB3/4、EPCAM、EphA2、EpCAM、叶酸受体-a、FAP、FBP、胎儿AchR、FRα、GD2、G250/CAIX、GD3、磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3(GPC3)、GUCY2C、HER1、HER2、ICAM-1、IL-13Rα2、IL-11Rα、Kras、Kras G12D、L1CAM、λ(Lambda)、Lewis-Y、κ(Kappa)、KDR、MAGE、MCSP、MET、间皮素、Muc1、Muc16、MUC18、NCAM、NKG2D配体、NY-ESO-1、PRAME、PSC1、PSCA、PSMA、ROR1、SP17、存活蛋白、TAG72、TEM、癌胚抗原、HMW-MAA、AFP、CA-125、ETA、酪氨酸酶、MAGE、层黏连蛋白受体、HPV E6、E7、BING-4、钙激活的氯离子通道2、细胞周期蛋白B1、9D7、EphA3、端粒酶、SAP-1、BAGE家族、CAGE家族、GAGE家族、MAGE家族、SAGE家族、XAGE家族、NY-ESO-1/LAGE-1、PAME、SSX-2、Melan-A/MART-1、GP100/pmel17、TRP-1/-2、P.多肽、MC1R、前列腺特异性抗原、β-联蛋白、BRCA1/2、CML66、纤连蛋白、MART-2、TGF-βRII、WT-1或VEGF受体(例如,VEGFR2)。CAR可以是第一代、第二代、第三代或更多代CAR。CAR可以对任何两种非同一性抗原具有双特异性,或者其可对超过两种的非同一性抗原具有特异性。

[0113] 可被本公开内容的CAR和/或TCR靶向的细菌抗原的一些非限制性实例包括至少以下:气单胞菌(Aeromonas)氨肽酶;球形节杆菌(Arthrobacter globiformis)嵌合蛋白;球形节杆菌DMGO蛋白;球形节杆菌(A.globiformis)二甲基甘氨酸氧化酶;芽孢杆菌(Bacillus)内含肽;芽孢杆菌嗜热菌蛋白酶;炭疽芽孢杆菌(Bacillus anthracis)致死因子;炭疽芽孢杆菌保护性抗原PA63;炭疽芽孢杆菌(B.anthracis)保护性抗原;环状芽孢杆菌(B.circulans)内含肽;B.多黏菌素B肽;炭疽芽孢杆菌水肿因子;炭疽芽孢杆菌水肿因子(S447N突变型);炭疽芽孢杆菌保护性抗原PA20;炭疽芽孢杆菌保护性抗原PA 63(活化的);苏云金芽孢杆菌(B.thuringiensis)Cry1Ab毒素;疏螺旋体(Borrelia)OspA;伯氏疏螺旋体(Borrelia Burgdorferi)NapA;疏螺旋体BmpA;疏螺旋体P41;疏螺旋体p45;伯氏疏螺旋体(B.burgdorferi)OspC;伯氏疏螺旋体OspA;伯氏疏螺旋体P41;伯氏疏螺旋体P41;伯氏疏螺旋体B31;伯氏疏螺旋体P100;伯氏疏螺旋体DbpA;伯氏疏螺旋体BmpA;伯氏疏螺旋体DbpB;伽氏疏螺旋体(B.garinii);伽氏疏螺旋体P58;斯柏曼疏螺旋体(B.spielmanii)OspC;伯氏疏螺旋体2级;牛布鲁氏菌(B.abortus);百日咳杆菌(B.pertussis)毒素;百日咳杆菌;百日咳杆菌FHA;百日咳杆菌165LPS;百日咳杆菌腺苷酸环化酶抗原;百日咳杆菌百日咳毒素亚单位(一种原聚体);百日咳杆菌百日咳杆菌黏附素;百日咳杆菌菌毛2/3;百日咳杆菌腺苷酸环化酶类毒素;百日咳鲍特菌(Bordetella pertussis)全细胞(Tohama I菌株);百日咳鲍特菌脂多糖;空肠弯曲菌(C.jejuni);白色念珠菌(C.albicans)烯醇酶;白色念珠菌(Candida albicans);肺炎衣原体(C.Pneumoniae)外膜蛋白VD3;肺炎衣原体;沙眼衣原体(Chlamydia trachomatis)MOMP;沙眼衣原体抗原;沙眼衣原体HSP70蛋白;沙眼衣原体外膜蛋白;沙眼衣原体HSP70;沙眼衣原体;沙眼衣原体MOMP;沙眼衣原体LGV II;沙眼衣原体

PGP-3D;沙眼衣原体活性MOMP;沙眼衣原体MOMP蛋白;沙眼衣原体活性MOMP;沙眼衣原体活性HSP70;沙眼衣原体W4 MOMP;沙眼衣原体W5 MOMP;沙眼衣原体MOMP,E78;艰难梭菌(Clostridium difficile)毒素A;艰难梭菌二元毒素A亚单位;艰难梭菌谷氨酸脱氢酶;艰难梭菌毒素B;肉毒梭菌(C.botulinum)BoNT-A轻链;肉毒梭菌BoNT-B轻链;肉毒梭菌BoNT-E轻链;艰难梭菌毒素B,TcdB;肉毒梭菌BoNT-F轻链;艰难梭菌毒素B;类腐败梭菌(Cl.Paraputrificum)几丁质酶;肉毒梭菌C3类毒素;艰难梭菌毒素A;艰难梭菌毒素A(核糖核酸型027);艰难梭菌毒素A(核糖核酸型078);艰难梭菌毒素B(核糖核酸型027);艰难梭菌毒素B(核糖核酸型078);白喉棒状杆菌(C.diphtheriae)白喉类毒素;白喉棒状杆菌毒素(突变CRM197);白喉棒状杆菌毒素;大肠杆菌(E.Coli)伴侣蛋白fimC;大肠杆菌GroEL,HSP60;大肠杆菌GroES,HSP10;大肠杆菌伴侣SURA;大肠杆菌O 158;大肠杆菌DnaJ蛋白;大肠杆菌HSP60;大肠杆菌热休克蛋白1;大肠杆菌Eco;大肠杆菌AmpC;大肠杆菌CoaA;大肠杆菌GroL;大肠杆菌GroS蛋白;大肠杆菌DnaK;大肠杆菌DsbA蛋白;HIV OmpP2;幽门螺杆菌(H.pylori);幽门螺杆菌外膜蛋白;幽门螺杆菌Cag抗原;幽门螺杆菌鞭毛蛋白A抗原;幽门螺杆菌脲酶小亚单位抗原;幽门螺杆菌Vac(毒素)抗原;幽门螺杆菌(Helicobacter pylori)蛋白;幽门螺杆菌脲酶大亚单位蛋白;嗜肺军团杆菌(L.pneumophila);问号状钩端螺旋体(L.interrogans)LipL32脂蛋白;双曲钩端螺旋体(L.biflexa);单核细胞增生李斯特菌(L.monocytogenes)内化蛋白;单核细胞增生李斯特菌鞭毛蛋白;活性李斯特菌溶血素(Listeriolysin);分枝杆菌(Mycobacterium);分枝杆菌热休克蛋白65;分枝杆菌热休克蛋白70;分枝杆菌PstS1;分枝杆菌分泌蛋白;分枝杆菌DESAT6;分枝杆菌热休克蛋白DnaK;分枝杆菌TB Ag85A;结核分枝杆菌(Mycobacterium Tuberculosis)早期分泌靶6蛋白;结核分枝杆菌ESAT-6;结核分枝杆菌(M.tuberculosis)FbpA;结核分枝杆菌;结核分枝杆菌PPD蛋白;结核分枝杆菌Old结核菌素;牛分枝杆菌(M.bovis)HSP65;结核分枝杆菌热休克蛋白70;结核分枝杆菌热休克蛋白65;结核分枝杆菌MTB热休克蛋白;结核分枝杆菌MTB脂蛋白;结核分枝杆菌MTB片段和esat6片段;铜绿假单胞菌(P.aeruginosa)外毒素A;解脲支原体(Urealyticum)(血清变型3);伤寒沙门氏菌(Salmonella typhi)OMP;鼠伤寒沙门氏菌(Salmonella Typhiurium);副伤寒沙门氏菌(Salmonella paratyphi)A抗原;副伤寒沙门氏菌B抗原;鼠伤寒沙门氏菌抗原;沙门氏菌β内酰胺酶;伤寒沙门氏菌pagC抗原;伤寒沙门氏菌flag;鼠伤寒沙门氏菌尿苷磷酸化酶;鼠伤寒沙门氏菌鞭毛蛋白蛋白质;明尼苏达沙门氏菌(Salmonella minnesota)(R595)脂质A单磷酰;鼠伤寒沙门氏LPS;肠道沙门氏菌(S.enterica)鞭毛蛋白;明尼苏达沙门氏菌(S.minnesota)LPS;金黄色葡萄球菌(Staphylococcus aureus)δ溶血素;金黄色葡萄球菌蛋白酶蛋白;葡萄球菌(Staphylococcus)蛋白A;金黄色葡萄球菌亚种青霉素结合蛋白2;金黄色葡萄球菌葡激酶;金黄色葡萄球菌蛋白A;金黄色葡萄球菌;金黄色葡萄球菌肠毒素B型类毒素;金黄色葡萄球菌HLA;金黄色葡萄球菌Hlg B;金黄色葡萄球菌杀白细胞素-D;金黄色葡萄球菌杀白细胞素-E;金黄色葡萄球菌LukF-PV;金黄色葡萄球菌LukS-PV;金黄色葡萄球菌酚溶调制肽α3;金黄色葡萄球菌毒性休克综合征毒素-1;肺炎链球菌(S.pneumoniae)细胞壁多糖抗原;肺炎链球菌细胞壁多糖抗原;肺炎链球菌β(1-4)-半乳糖苷酶;阿维丁链霉菌(Streptomyces avidinii)链霉亲和素;破伤风梭菌(C.tetani)破伤风类毒素抗原;破伤风梭菌TeNT轻链;破伤风杆菌毒素C片段;梅毒螺旋体(T.Pallidum)密螺旋体膜蛋白A;梅毒螺旋体活性p41;

梅毒螺旋体活性p47;梅毒螺旋体P17;密螺旋体(Treponema)膜蛋白A;梅毒螺旋体活性p15;梅毒螺旋体抗原;梅毒螺旋体Tp0453抗原;梅毒螺旋体tpp17;小肠结肠炎耶尔森菌(Y.enterocolitica)(O亚型:3);小肠结肠炎耶尔森菌(血清型O:8);小肠结肠炎耶尔森菌(血清型O:9);苯黑末节皮真菌(Arthroderma benhamiae)MEP4;苯黑末节皮真菌MEP5;苯黑末节皮真菌MEP3;石膏样节皮菌(Arthroderma gypseum)VPS10;石膏样节皮菌AMPP;石膏样节皮菌DAPB;太田节皮菌(Arthroderma otae)CHO2;太田节皮菌SEY1;太田节皮菌VPS10;极大螺旋藻(Spirulina maxima)铁氧化还原蛋白;钝顶节螺藻(Arthrospira platensis)desA;猪蛔虫(Ascaris suum)ATP6;猪蛔虫ND5;猪蛔虫ND4L;猪蛔虫V型质子ATP酶;棉阿舒囊霉(Ashbya gossypii)PET8;棉阿舒囊霉TIM21;和棉阿舒囊霉ATG22。

[0114] 可被本公开内容的CAR和/或TCR靶向的病毒抗原的一些非限制性实例包括至少以下:腺病毒(Adenovirus,ADV);ADV 3型;ADV 5型;ADV 2型六邻体;ADV 5型六邻体;ADV 40型;ADV 2级;巨细胞病毒(Cytomegalovirus,CMV);CMV AD169;CMV 2级;CMV Pp28;CMV;CMV Pp38;CMV Pp150;CMV糖蛋白B;CMV UL80a;CMV P38,P65,P150,P52;冠状病毒刺突糖蛋白;人SARS冠状病毒核蛋白;冠状病毒核衣壳229E蛋白;SARS冠状病毒刺突糖蛋白2;犬冠状病毒(菌株1-71)抗原;猫冠状病毒(菌株WSU 79-1146)抗原;SARS冠状病毒镶嵌刺突糖蛋白2;SARS M蛋白;SARS核衣壳;SARS刺突蛋白;SARS包膜蛋白;SARS S1;SARS S2;SARS核心蛋白;SARS基质蛋白;柯萨奇病毒(B5);柯萨奇病毒(B1);柯萨奇病毒(B6);柯萨奇病毒B1(图森菌株)VP1;柯萨奇病毒B6蛋白(施密特菌株);登革病毒(Dengue Virus,DENV);登革病毒亚型-2包膜蛋白;DENV;DENV 2型前膜;DENV 2型;DENV 1型衣壳;DENV 2型衣壳;DENV 3型衣壳;DENV 4型衣壳;DENV 4型PreM/M;DENV 1型PreM/M;DENV 2型PreM/M;DENV 3型PreM/M;DENV包膜蛋白1;DENV 1型包膜蛋白;DENV 2型包膜蛋白;DENV 3型包膜蛋白;DENV 4型包膜蛋白;EB病毒(Epstein-Barr Virus,EBV);EBV NA1;EBV镶嵌EBNA1蛋白;EBV;EBV 1型;EBV pg350/220;EBV p18;EBV P23;EBV早期抗原D;EBV 1型核抗原;EBV BFRF3;EBV BMRF1;EBV EBNA1;EBV早期抗原;肠病毒71(Enterovirus 71,EV71);EV71 VP1;EV71 VP0;肠病毒A Cox A16蛋白;肠病毒D EV70蛋白;埃博拉扎伊尔(Ebola Zaire)核蛋白;埃博拉-Z核蛋白;埃博拉-S核蛋白;埃博拉-Z糖蛋白;埃博拉-Z VP40;埃博拉病毒样颗粒;埃博拉病毒糖蛋白;埃博拉病毒VP40基质蛋白;雷斯顿埃博拉病毒(Reston Ebolavirus)糖蛋白;埃博拉NP抗原;埃博拉GP(Sudan-Nakisamata);埃博拉GP(扎伊尔);甲型肝炎(Hepatitis A,HAV);HAV抗原;HAV P3C;HAV P2C-P3A;HAV VP2-VP4;HAV VP3;HAV VP1-P2A;HAV P2C;HAV P2C-P3B;HAV P2C-P3A;HAV P3C;HAV VP1;HAV VP3;HAV VP4;乙型肝炎(Hepatitis B,HBV);HBV表面抗原;HBV核心抗原;HBV PreS1/S2;HBV E抗原;HBV 3型PreS1;HBV 2型PreS2;HBV 3型PreS2;HBV X蛋白;HBV表面抗原preS2;HBV PreS1;HBV PreS2;人巨细胞病毒(Human Cytomegalovirus,HCMV);HCMV白介素10;丙型肝炎(Hepatitis C,HCV);HCV多重抗原;HCV非结构蛋白3-3;HCV 1型核心+NS3抗原(Cap);HCV 1型核心+NS3抗原(Det);HCV核心,非结构蛋白3,非结构蛋白4,非结构蛋白5;HCV 2型非结构蛋白5;HCV 1型核心抗原;HCV 3型核心抗原;HCV 5型核心抗原;HCV 6型核心抗原;HCV 1a型非结构蛋白5;HCV 1a型非结构蛋白3;HCV 1a型非结构蛋白5;HCV核衣壳,非结构蛋白3,非结构蛋白4,非结构蛋白5;丁型肝炎(Hepatitis D,HDV);戊型肝炎(Hepatitis E,HEV);HEV ORF3;HEV ORF2,ORF3;HEV镶嵌ORF2,ORF3;HEV镶嵌-S ORF2,ORF3;HEV镶嵌蛋白;HEV镶嵌-S蛋白;HEV ORF2;人免疫缺陷病

毒(Human immunodeficiency virus,HIV);HIV-O抗原;HIV-1IIIB gp120蛋白;HIV-1IIIB gp160蛋白;HIV-1 451gp120蛋白;HIV-1 451gp160蛋白;HIV-1IIIB p24蛋白;HIV-1gp120和gp41嵌合抗原;HIV-1Gp160蛋白;HIV-1Gag多聚蛋白Pr55;HIV-1p17蛋白;HIV-1p24蛋白;人乳头瘤病毒(Human Papillomvirus,HPV);HPV 16型;HPV16 E6蛋白;HPV16 E7蛋白;HPV18E6蛋白;HPV18 E7蛋白;HPV 18型L1蛋白;HPV 2型,HPV 3型;HPV 18型;HPV 11型;HPV 16型L1蛋白;HPV 33型L1蛋白;HPV 6型L1蛋白;HPV 16型L1蛋白;单纯疱疹病毒(Herpes Simplex Virus,HSV);HSV 1型;HSV-2gG肽;HSV8 ORF8和ORF65蛋白;HSV 1型糖蛋白;HSV 2型糖蛋白;HSV镶嵌蛋白;HSV 2型;HSV 1型糖蛋白D;HSV 1型糖蛋白G;HSV 2型糖蛋白G;HSV糖蛋白D;HSV 1型糖蛋白G1;HSV 1型MacIntyre;HSV 1型III级抗原;人嗜T淋巴细胞病毒(Human T-lymphotropic Virus,HTLV);HTLV 1型、2型;HTLV gp21抗原;HTLV 1型糖蛋白21;HTLV 1型包膜蛋白;HTLV 1型糖蛋白46;HTLV 1型镶嵌;HTLV 1型p24蛋白;HTLV糖蛋白46镶嵌蛋白;HTLV镶嵌蛋白;人嗜T淋巴细胞病毒I型gp21+gp46嵌合抗原;人嗜T淋巴细胞病毒II型gp21+gp46嵌合抗原;人嗜T淋巴细胞病毒I型和II型嵌合抗原;甲型流感(IAV);IAV H2N2核蛋白蛋白质;重组IAV H2N2血凝素蛋白;IAV H3N2血凝素蛋白;重组IAV H3N2神经氨酸酶;IAV HIN1 2级抗原;IAV H3N2基质蛋白1;IAV H4N4血凝素蛋白;IAV H4N6血凝素蛋白;重组IAV H4N8血凝素蛋白;乙型流感(IBV);乙型流感病毒抗原;IBV血凝素;IBV血凝素1;IBV基质蛋白1;IBV核蛋白;日本脑炎(JEV);JEV核心蛋白;JEV PreM/M;MMLV白血病病毒逆转录酶;麻疹病毒(Measles Virus,MeV);麻疹病毒C蛋白;麻疹病毒大聚合酶;麻疹病毒镶嵌蛋白;MeV血凝素镶嵌;MeV大聚合酶;MeV聚合酶;MeV血凝素融合蛋白;MeV核衣壳;麻疹2级;传染性软疣病毒(Molluscum Contagiosum Virus,MCV);MCV MC148蛋白;MCV 2型趋化因子样蛋白;Orf病毒VEGFE;细小病毒VP2 VLP;细小病毒VP2;细小病毒VP1;细小病毒Pep D;细小病毒Pep C;细小病毒Pep B;细小病毒Pep A;细小病毒NS1;细小病毒B19 VLP VP2;细小病毒B19 VP2;细小病毒B19非结构蛋白;细小病毒B19,VP1,VP2;细小病毒B19;细小病毒B19型VLP VP1/VP2共衣壳蛋白;细小病毒B19 VP1/2;细小病毒B19 VP1;狂犬病病毒(Rabies Virus,RV);狂犬病病毒糖蛋白;RV M2;RV(菌株MRV)核蛋白;RV核蛋白;呼吸道合胞病毒(Respiratory Syncytial Virus,RSV);呼吸道合胞病毒(长菌株)抗原;小肠结肠炎耶尔森菌G蛋白;RSV Src;RSV Src激酶;RSV糖蛋白;RSV糖蛋白G;RSV核蛋白;裂谷热病毒(Rift Valley Fever Virus,RVFV);RVFV糖蛋白;RVFV核蛋白;RVFV非结构蛋白;风疹病毒(Rubella Virus,RuV);RuV IV级;RuV包膜蛋白1;RuV 2级;RuV K1S;RuV K2S;RuV核衣壳;RuV衣壳;RuV E1蛋白;RuV E2蛋白;RuV E1镶嵌;RuV衣壳C;轮状病毒3级;轮状病毒;蜱传脑炎病毒(Tick-Borne Encephalitis Virus,TBEV);TBEV gE,TBEV NE蛋白;TBEV gE、TBEV NE、TBEV GE、TBEV CE蛋白;TBEV糖蛋白E;TBEV PreM;TBEV核心抗原;TBEV非结构蛋白3;TBEV E肽;蜱传脑炎病毒gE蛋白;猿猴免疫缺陷病毒(Simian Immunodeficiency Virus,SIV);SIV糖蛋白120;SIV Gag;SIV P27;SIV Pol蛋白;SIV 1型Nef蛋白;烟草蚀纹病毒(Tobacco Etch Virus,TEV);TEV N1a蛋白;TEV核心蛋白;TEV PreM/M;TEV蛋白酶蛋白;EN-TEV活性EN-TEV蛋白酶;水痘带状疱疹病毒(Varicella Zoster Virus,VZV);VZV糖蛋白E;VZV ORF9;VZV ORF26;VZV糖蛋白;VZV 2级;天花病毒天花CRMB;西尼罗病毒(West Nile Virus,WNV);西尼罗病毒抗原;西尼罗病毒preM蛋白;西尼罗病毒NS3蛋白酶蛋白;WNV包膜蛋白;WNV PreM;WNV E抗原;WNV非结构蛋白1;WNV E蛋白肽;WNV E蛋白封闭肽;WNV M蛋白

封闭肽;WNV preM封闭肽;寨卡病毒(Zika Virus);寨卡病毒包膜蛋白;寨卡病毒NS1蛋白;寨卡病毒抗原;寨卡病毒H/PF/2013;寨卡衣壳;寨卡E(结构域III);寨卡Pre-M;基孔肯雅病毒(Chikungunya Virus,CHIKV);基孔肯雅病毒gp E1;基孔肯雅病毒gp E2;基孔肯雅病毒gp VLP;CHIKV E1蛋白;基孔肯雅E1抗原;基孔肯雅E2抗原;基孔肯雅E1 E2复合抗原;CHIKV衣壳蛋白;CHIKV包膜抗原2;HTNV N蛋白;FIV核心抗原;1型星状病毒;hMPV;腮腺炎病毒;HRV 3C蛋白酶;CDV HA;CDV基质蛋白;淮扬山病毒核衣壳;施马伦贝格病毒核衣壳;CDV核衣壳;MMTV Pr77;病毒MIP MIP-I;病毒MIP MIP-II;VACV Fc嵌合体;CCI Fc嵌合体;商陆(Phytolacca acinosa)商陆抗病毒蛋白;艾柯病毒9型;MuV;非洲猪瘟病毒(African Swine Fever Virus,ASFV);非洲猪瘟病毒p30蛋白;和非洲猪瘟病毒p54蛋白。

[0115] IV.本公开内容的细胞

[0116] 本公开内容的细胞包括以下细胞,例如多能干细胞或造血干细胞或祖细胞,以及成熟细胞,例如成熟T细胞。包含位于启动子区、第一启动子区或第二启动子区(例如表1基因的启动子区)转录起始位点下游的转基因、第一转基因或第二转基因的多能干细胞可在体外分化为成熟细胞类型。促进细胞分化为成熟细胞的系统和方法可使用与干细胞或祖细胞共培养的基质细胞。下文进一步描述了本公开内容的细胞。

[0117] A.基质细胞

[0118] 基质细胞是任何器官(如骨髓、胸腺、子宫黏膜(子宫内膜)、前列腺和卵巢)中的结缔组织细胞。它们是支持该器官的实质细胞的功能的细胞。成纤维细胞(也称为间充质基质细胞/MSC)和周细胞是最常见类型的基质细胞。

[0119] 已知基质细胞和肿瘤细胞之间的相互作用在癌症生长和进展中起主要作用。此外,通过调节局部细胞因子网络(例如M-CSF、LIF),已经描述了骨髓基质细胞参与人造血和炎症过程。

[0120] 骨髓、胸腺和其他造血器官中的基质细胞通过细胞-细胞配体-受体相互作用和通过释放包括细胞因子和趋化因子的可溶性因子来调节造血和免疫细胞的发育。这些组织中的基质细胞形成调节干细胞维持、谱系特化和定型以及分化为效应细胞类型的小生境。

[0121] 基质由非恶性宿主细胞构成。基质细胞还提供胞外基质,组织特异性细胞类型以及在某些情况下肿瘤可以在其上生长。

[0122] B.造血干细胞和祖细胞

[0123] 由于造血干细胞和祖细胞的显著的医学潜力,已经做了大量的工作来尝试改进从胚胎干细胞分化造血祖细胞的方法。在成年人中,主要存在于骨髓中的造血干细胞产生分化为血液系统的所有细胞的造血(CD34+)祖细胞的异质群体。在成年人中,造血祖细胞增殖和分化,导致每天产生数千亿成熟的血细胞。造血祖细胞也存在于脐带血中。在体外,人胚胎干细胞可以分化为造血祖细胞。如下所述,造血祖细胞也可以从外周血样品中扩增或富集。造血细胞可以是人源、鼠源或任何其他哺乳动物物种。

[0124] 造血祖细胞的分离包括任何选择方法,包括细胞分选器、使用抗体包被的磁珠的磁性分离、填充柱;亲和色谱;与单克隆抗体连接或与单克隆抗体结合使用的细胞毒剂,包括但不限于补体和细胞毒素;以及用附着于固体基质例如平板的抗体或任何其他方便的技术的“淘选(panning)”。

[0125] 分离或隔离技术的使用包括但不限于基于物理(密度梯度离心和逆流离心淘洗)、

细胞表面(凝集素和抗体亲和力)和活体染色性质(线粒体结合染料rho123和DNA结合染料Hoechst 33342)中的差异的那些。提供精确分离的技术包括但不限于FACS(荧光激活细胞分选)或MACS(磁激活细胞分选),其可以具有不同程度的复杂性,例如多个颜色通道、低角度和钝角光散射检测通道、阻抗通道等。

[0126] 可以将前述技术或用于评估细胞类型纯度的技术(例如流式细胞术)中使用的抗体与可鉴定的试剂缀合,所述试剂包括但不限于酶、磁珠、胶体磁珠、半抗原、荧光染料、金属化合物、放射性化合物、药物或半抗原。可与抗体缀合的酶包括但不限于碱性磷酸酶、过氧化物酶、脲酶和β-半乳糖苷酶。可以与抗体缀合的荧光染料包括但不限于异硫氰酸荧光素、异硫氰酸四甲基罗丹明、藻红蛋白、别藻蓝蛋白和德克萨斯红(Texas Red)。对于可以与抗体缀合的另外的荧光染料,参见Handbook ofFluorescent Probes and Research Chemicals(1992-1994)。可以与抗体缀合的金属化合物包括但不限于铁蛋白、胶体金,特别是胶体超顺磁珠。可以与抗体缀合的半抗原包括但不限于生物素、地高辛、唑酮和硝基酚。可以与抗体缀合或并入到抗体中的放射性化合物是本领域已知的,并且包括但不限于锝99m(99TC)、125I和包含任何放射性核素(包括但不限于14C、3H和35S)的氨基酸。

[0127] 可以采用允许准确分离的用于阳性选择的其他技术,例如亲和柱等。该方法应该允许去除至剩余量小于约20%,优选小于约5%的非靶细胞群体。

[0128] 可以基于光散射性质以及它们的多种细胞表面抗原的表达来选择细胞。通过FACS分析,纯化的干细胞具有低侧向散射和低至中等前向散射谱。细胞离心涂片制备物显示富集的干细胞具有在成熟淋巴细胞和成熟粒细胞之间的大小。

[0129] 也可以在培养之前富集$CD34^+$细胞的接种群,使用例如Sutherland etal.(1992)的方法和在美国专利No.4,714,680中描述的方法。例如,例如,对细胞进行阴性选择以去除表达谱系特异性标志物的那些细胞。细胞群可以经历进行阴性选择以耗尽非$CD34^+$造血细胞和/或特定的造血细胞亚群。可以基于多种分子的细胞表面表达来进行阴性选择,所述分子包括T细胞标志物如CD2、CD4和CD8;B细胞标志物如CD10、CD19和CD20;单核细胞标志物CD14;NK细胞标志物CD2、CD16和CD56或任何谱系特异性标志物。可以基于多种分子的细胞表面表达来进行阴性选择,所述分子为例如可用于分离其他细胞类型(例如通过MACS或柱分离)的抗体(例如CD2、CD3、CD11b、CD14、CD15、CD16、CD19、CD56、CD123和CD235a)的混合物。

[0130] 本文中使用的,谱系阴性(LIN-)是指缺少与谱系定型细胞相关的至少一种标志物的细胞,例如与以下相关的标志物:T细胞(如CD2、3、4和8)、B细胞(如CD10、19和20)、骨髓细胞(如CD14、15、16和33)、自然杀伤("NK")细胞(如CD2、16和56)、RBC(如血型糖蛋白A)、巨核细胞(CD41)、肥大细胞、嗜酸性粒细胞或嗜碱性粒细胞,或其他标志物,如CD38、CD71和HLA-DR。优选地,谱系特异性标志物包括但不限于CD2、CD14、CD15、CD16、CD19、CD20、CD33、CD38、HLA-DR和CD71中的至少一种。更优选地,LIN-将包括至少CD14和CD15。通过阳性选择例如c-kit+或Thy-1+可以实现进一步纯化。通过使用线粒体结合染料若丹明123并通过本领域已知的方法选择罗丹明+细胞可以获得进一步的富集。通过选择性分离$CD34^+$,优选$CD34^+LIN^-$,最优选$CD34^+Thy\text{-}1^+LIN^-$的细胞,可以获得高度富集的组合物。干细胞中高度富集的群体和获得它们的方法是本领域技术人员熟知的,参见例如PCT/US94/09760、PCT/US94/08574和PCT/US94/10501中描述的方法。

[0131] 可以采用多种技术通过首先去除专用谱系的细胞来分离细胞。单克隆抗体对鉴定与特定细胞谱系和/或分化阶段相关的标志物特别有用。抗体可以连接到固体支持物上以允许粗分离。采用的分离技术应该最大限度地保留待收集级分的活力。可以采用不同效力的多种技术来获得“相对较粗”的分离。这种分离是其中存在的总细胞的多至10％,通常不多于约5％,优选不多于约1％是与待保留细胞群一起保留的不期望的细胞。所采用的特定技术将取决于分离效率、相关的细胞毒性、操作的容易性和速度以及精密设备和/或技术技能的必要性。

[0132] 造血祖细胞的选择不需要仅利用细胞特异性标志物来实现。通过使用阴性选择和阳性选择的组合,可以获得富集的细胞群。

[0133] C.血细胞来源

[0134] 造血干细胞(HSC)通常存在于骨髓中,但可被迫进入血液,这是临床上用于在外周血中收获大量的HSC的被称为动员的过程。一种选择的动员剂是粒细胞集落刺激因子(granulocyte colony-stimulating factor,G-CSF)。

[0135] 在外周血中循环的$CD34^+$造血干细胞或祖细胞可以通过单采血液成分术技术在未干扰状态下或在在外部施用造血生长因子如G-CSF后动员后收集。动员后收集的干细胞或祖细胞的数目大于未干扰状态下的单采血液成分术后获得的数目。细胞群的来源可以是其细胞未被外部施加的因子动员的对象,因为不需要在体内富集造血干细胞或祖细胞。

[0136] 用于本文所述方法的细胞群可以是哺乳动物细胞,例如人细胞、非人灵长类动物细胞、啮齿类动物细胞(例如小鼠或大鼠)、牛细胞、羊细胞、猪细胞、马细胞、绵羊细胞、犬细胞和猫细胞或其混合物。非人灵长类动物细胞包括恒河猴细胞。细胞可以从动物如人患者获得,或者它们可以来自细胞系。如果细胞从动物获得,则它们可以原样使用,例如作为未分离的细胞(即混合群);它们可以已经首先在培养中建立,例如通过转化;或者它们可以已经经过初步纯化方法。例如,细胞群可以如下操作:基于细胞表面标志物的表达通过阳性或阴性选择;在体外或体内用一种或更多种抗原进行刺激;在体外或体内用一种或更多种生物调节剂进行处理;或者这些的任何或全部组合。

[0137] 细胞群包括外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell,PBMC)、含有混合群的全血或其级分、脾细胞、骨髓细胞、肿瘤浸润淋巴细胞、通过白细胞分离术获得的细胞、活检组织、淋巴结,例如从肿瘤中排出的淋巴结。合适的供体包括经免疫的供体、未经免疫的(初始(naive))供体、经处理或未经处理的供体。“经处理”的供体是已经暴露于一种或更多种生物调节剂的供体。未经处理的供体尚未暴露于一种或更多种生物调节剂。

[0138] 例如,可根据本领域已知的方法所述获得外周血单个核细胞(PBMC)。Kim et al.(1992)、Biswas et al.(1990)、Biswas et al.(1991)讨论了这样的方法的一些实例。

[0139] 从细胞群中获得造血前体细胞的方法也是本领域公知的。可使用多种细胞因子,例如hSCF、hFLT3和/或IL-3(Akkina et al.,1996)扩增造血前体细胞,或者可使用MACS或FACS富集$CD34^+$细胞。如上所述,阴性选择技术也可用于富集$CD34^+$细胞。

[0140] 也可以从对象获得细胞样品,并随后针对期望的细胞类型对其进行富集。例如,PBMC和/或$CD34^+$造血细胞可以如本文中所述从血液中分离。还可以使用多种技术将细胞与其他细胞分离,例如用与期望细胞类型的细胞表面上的表位结合的抗体分离和/或活化。可以使用的另一种方法包括使用针对细胞表面标志物的抗体进行阴性选择以选择性富集特

定细胞类型,而不通过受体接合活化细胞。

[0141] 骨髓细胞可以从髂嵴、股骨、胫骨、脊柱、肋骨或其他髓质空间获得。骨髓可以从患者中取出并通过多种分离和洗涤程序分离。用于分离骨髓细胞的示例性程序包括以下步骤:a)将骨髓悬液离心分离成三个级分,并收集中间级分或棕黄层(buffycoat);b)将来自步骤(a)的棕黄层级分在分离液(通常为Ficoll(Pharmacia Fine Chemicals AB的商标))中再一次离心分离并收集含有骨髓细胞的中间级分;以及c)洗涤来自步骤(b)的收集的级分以回收可再输注的骨髓细胞。

[0142] D.多能干细胞

[0143] 造血干细胞和祖细胞也可通过多能干细胞的体外分化来制备。本文中所述方法中使用的细胞可以是直接接种到细胞分化系统中的多能干细胞(造血干细胞和祖细胞、胚胎干细胞或诱导多能干细胞),所述细胞分化系统将细胞分化为成熟细胞,例如人工胸腺类器官(ATO)。本文中所述方法和组合物中使用的细胞可以是PSC的衍生物或后代,例如但不限于中胚层祖细胞、造血-内皮祖细胞或造血祖细胞。

[0144] 多能干细胞可以是来源于胚泡的内细胞团的胚胎干(ES)细胞。多能干细胞可以是通过重编程体细胞而获得的诱导多能干细胞。多能干细胞可以是通过体细胞核移植而获得的胚胎干细胞。

[0145] 胚胎干(ES)细胞是来源于胚泡的内细胞团的多能细胞。可以通过除去发育中的胚胎的滋养外胚层,然后在非生长细胞的饲养层上培养内团细胞来分离ES细胞。在适当条件下,产生增殖的、未分化ES细胞的集落。可以取出集落,解离成单细胞,然后重新铺平板在新鲜的饲养层上。重新铺平板的细胞可以继续增殖,产生新的未分化ES细胞集落。然后可以取出新的集落,解离,再次重新铺平板并允许生长。这种“传代培养”或“传代”未分化ES细胞的过程可以重复多次以产生含有未分化ES细胞的细胞系(美国专利No.5,843,780;6,200,806;7,029,913)。“原代细胞培养物”是从组织如胚泡的内细胞团直接获得的细胞的培养物。“传代培养物”是源自原代细胞培养物的任何培养物。

[0146] 获得小鼠ES细胞的方法是众所周知的。在一种方法中,将来自129品系小鼠的植入前胚泡用小鼠抗血清处理以去除滋养外胚层,并将内细胞团在含有胎牛血清的培养基中的化学灭活的小鼠胚胎成纤维细胞的饲养细胞层上培养。将出现的未分化ES细胞的集落在胎牛血清的存在下在小鼠胚胎成纤维细胞饲养层上传代培养以产生ES细胞群。在一些方法中,可以通过向含血清培养基中加入细胞因子白血病抑制因子(LIF)来使小鼠ES细胞在没有饲养层的情况下生长(Smith,2000)。在另一些方法中,小鼠ES细胞可以在骨形态发生蛋白和LIF的存在下在无血清培养基中生长(Ying et al.,2003)。

[0147] 可以使用先前描述的方法(Thomson et al.,1995;Thomson et al.,1998;Thomson and Marshall,1998;Reubinoff et al.,2000)从胚泡获得人ES细胞。在一种方法中,使第5天的人胚泡暴露于兔抗人脾细胞抗血清,然后暴露于豚鼠补体的1:5稀释液以裂解滋养外胚层细胞。在从完整的内细胞团除去裂解的滋养外胚层细胞后,将内细胞团在γ-灭活的小鼠胚胎成纤维细胞的饲养层上并在胎牛血清的存在下培养。9至15天后,来源于内细胞团的细胞团可以化学地(即暴露于胰蛋白酶)或机械地解离并重新铺平板在含有胎牛血清和小鼠胚胎成纤维细胞饲养层的新鲜培养基中。在进一步增殖后,通过微量移液管选择具有未分化形态的集落,机械地解离成团块并重新铺平板(参见美国专利号6,833,269)。

ES样形态的特征是致密集落,具有明显高的细胞核比细胞质的比例,以及明显的核仁。可以通过简单的胰蛋白酶消化或通过微量移液管选择单个集落来使得到的ES细胞常规传代。在一些方法中,通过在存在碱性成纤维细胞生长因子的情况下在成纤维细胞的饲养层上培养ES细胞,可以在没有血清的情况下培养人ES细胞(Amit et al.,2000)。在另一些方法中,通过在含有碱性成纤维细胞生长因子的"调节(conditioned)"培养基的存在下将细胞在诸如Matrigel™或层黏连蛋白的蛋白质基质上培养,可以在没有饲养细胞层的情况下培养人ES细胞(Xu et al.,2001)。该培养基预先通过与成纤维细胞共培养进行调节。

[0148] 用于分离恒河猴(rhesus monkey)和普通狨猴(common marmoset)ES细胞的方法也是已知的(Thomson,and Marshall,1998;Thomson et al.,1995;Thomson and Odorico,2000)。

[0149] ES细胞的另一来源是建立的ES细胞系。多种小鼠细胞系和人ES细胞系是已知的,并且已经确定了它们的生长和增殖条件。例如,从小鼠品系129胚胎的内细胞团建立小鼠CGR8细胞系,并且CGR8细胞的培养物可以在没有饲养层的LIF的存在下生长。作为另一个实例,Thompson等建立了人ES细胞系H1、H7、H9、H13和H14。另外,已经开发了H9系的亚克隆H9.1和H9.2。

[0150] ES细胞的来源可以是胚泡、来源于培养胚泡的内细胞团的细胞或从已建立的细胞系的培养物获得的细胞。因此,如本文所用,术语"ES细胞"可以指胚泡的内细胞团细胞、从内团细胞培养物获得的ES细胞和从ES细胞系的培养物获得的ES细胞。

[0151] 诱导多能干(iPS)细胞是具有ES细胞的特征但是通过已分化体细胞的重编程获得的细胞。已经通过多种方法获得诱导多能干细胞。在一种方法中,使用逆转录病毒转导,用转录因子Oct4、Sox2、c-Myc和Klf4转染成人皮肤成纤维细胞(Takahashi et al.,2007)。将转染的细胞铺平板在补充有碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)的培养基中的SNL饲养细胞(产生LIF的小鼠细胞成纤维细胞系)上。大约25天后,培养物中出现类似人ES细胞集落的集落。挑取ES细胞样集落并在bFGF的存在下在饲养细胞上扩增。

[0152] 基于细胞特征,ES细胞样集落的细胞是诱导多能干细胞。诱导多能干细胞在形态上类似于人ES细胞,并表达多种人ES细胞标志物。而且,当在已知导致人ES细胞分化的条件下生长时,诱导多能干细胞相应地分化。例如,诱导多能干细胞可以分化成具有神经元结构和神经元标志物的细胞。

[0153] 在另一种方法中,使用慢病毒转导,用四种基因Oct4、Sox2、Nanog和Lin28转染人胎儿或新生儿成纤维细胞(Yu et al.,2007)。在感染后第12至20天,具有人ES细胞形态的集落变得可见。挑取该集落并扩增。构成集落的诱导多能干细胞在形态上类似于人ES细胞,表达多种人ES细胞标志物,并且在注射到小鼠中后形成具有神经组织、软骨和肠上皮的畸胎瘤。

[0154] 从小鼠制备诱导多能干细胞的方法也是已知的(Takahashi and Yamanaka,2006)。诱导iPS细胞通常需要表达或暴露于来自Sox家族的至少一个成员和来自Oct家族的至少一个成员。Sox和Oct被认为是指定ES细胞身份的转录调控层级的核心。例如,Sox可以是Sox-1、Sox-2、Sox-3、Sox-15或Sox-18;Oct可以是Oct-4。另一些因素可以提高重编程效率,如Nanog、Lin28、Klf4或c-Myc;特定的重编程因子组可以是包含Sox-2、Oct-4、Nanog和任选的Lin-28的组;或包含Sox-2、Oct4、Klf和任选的c-Myc的组。

[0155] 如ES细胞一样,IPS细胞具有可使用SSEA-1、SSEA-3和SSEA-4的抗体(Developmental Studies Hybridoma Bank,National Institute of Child Health and Human Development,Bethesda Md.)和TRA-1-60和TRA-1-81的抗体(Andrews et al.,1987)通过免疫组织化学或流式细胞术鉴定或确认的典型抗原。胚胎干细胞的多能性可以通过将约0.5至10×10^6个细胞注入8至12周龄雄性SCID小鼠的后腿肌肉来确认。畸胎瘤发育证明三个胚层中的每一个的至少一种细胞类型。

[0156] E.胚胎中胚层祖细胞

[0157] 胚胎中胚层祖(embryonic mesodermal progenitor,EMP)细胞是来源于PSC的细胞。EMP细胞可以通过在补充有最佳浓度的人VEGF、bFGF、BMP4和任选的激活素A的基础培养基中培养PSC(例如ESC)来制备。EMP细胞是在培养的第3.5天下调CD326并获得CD56细胞表面表达的细胞群,即经历了EMT过程的$CD326^-CD56^+$EMP。EMT、Snail-1、Snail-2和Twist的关键转录调节因子的明显上调与E-钙黏蛋白和CD326以及紧密连接相关基因(例如密封蛋白、黏结蛋白聚糖和闭合蛋白)的下调相一致。基于波形蛋白上调,可记录细胞骨架蛋白的明显重组。还可以看到纤连蛋白表达的上调,这与该胞外基质蛋白在促进细胞迁移中的作用一致。此外,正如CD9和SSEA-4(通常用于鉴定未分化细胞的细胞表面标志物)以及Nanog、Sox-2和Oct-4/Pou5f1(与ESC多能性相关的三个关键转录因子)的下调所证明的,$CD326^-CD56^+$EMP失去了其多能性。由$CD326^-CD56^+$EMP表达的已知中胚层标志物KDR、PDGFR-α和CD34在中胚层诱导之后2周持续提高。因此,$CD326^-CD56^+$EMP代表了通过上皮细胞向间充质细胞转化过程从PSC产生的原始细胞群。$CD326-CD56^+$细胞在更多谱系限制性中胚层群体之前出现,此时中胚层潜能仍然存在。

[0158] 在中胚层诱导之后,$CD326^-CD56^+$细胞可在第3.5天通过荧光激活细胞分选(fluorescence activated cell sorting,FACS)来分离,并任选地,在造血内皮细胞、心脏细胞或间充质干细胞的条件下进一步分化为中胚层谱系。

[0159] V.转基因

[0160] A.靶向抗原的转基因

[0161] 转基因、第一转基因或第二转基因可包含靶向抗原的分子,例如CAR或TCR。可被本公开内容的CAR和/或TCR靶向的肿瘤抗原的一些非限制性实例包括至少以下:分化抗原例如酪氨酸酶TRP-1、TRP-2,和肿瘤特异性多谱系抗原例如MAGE-1、MAGE-3、BAGE、GAGE-1、GAGE-2、pi 5;过表达的胚胎抗原,例如CEA;过表达的癌基因和突变的肿瘤抑制基因,例如p53、Ras、HER-2/neu;染色体易位产生的独特肿瘤抗原,例如BCR-ABL、E2A-PRL、H4-RET、IGH-IGK、MYL-RAR;和病毒抗原,例如EB病毒抗原(Epstein Barr virus antigen,EBVA)和人乳头瘤病毒(human papillomavirus,HPV)抗原E6和E7。其他基于蛋白质的大抗原包括TSP-180,MAGE-4,

[0162] MAGE-5,MAGE-6,RAGE,NY-ESO,p185erbB2,p180erbB-3,c-met,nm-23H1,PSA,CA 19-9,CA 72-4,CAM17.1,NuMa,K-ras,β-联蛋白,CDK4,Mum-1,p15,p16,43-9F,5T4,791Tgp72,甲胎蛋白β-HCG,BCA225,BTAA,CA 125,CA 15-3\CA27.29\BCAA,CA 195,CA 242,CA-50,CAM43,CD68\P1,CO-029,FGF-5,G250,Ga733\EpCAM,HTgp-175,M344,MA-50,MG7-Ag,MOV18,NB/70K,NY-CO-1,RCASI SDCCAG16,TA-90\Mac-2结合蛋白\亲环蛋白C相关蛋白,TAAL6,TAG72,TLP,TPS,GPC3,MUC16,MUC18,LMP1,EBMA-1,BARF-1,CS1,CD319,HER1,B7H6,

L1CAM,IL6,和MET。

[0163] 肿瘤抗原还包括,例如,胶质瘤相关抗原、癌胚抗原(CEA)、EGFRvlll、IL-IIRa、IL-13Ra、EGFR、FAP、B7H3、Kit、CALX、CS-1、MUC1、BCMA、bcr-abl、HER2、b-人绒毛膜促性腺激素、甲胎蛋白(AFP)、ALK、CD19、细胞周期蛋白B1、凝集素反应性AFP、Fos相关抗原1、ADRB3、甲状腺球蛋白、EphA2、RAGE-1、RUI、RU2、SSX2、AKAP-4、LCK、OY-TESI、PAX5、SART3、CLL-1、岩藻糖基GM1、GloboH、MN-CAIX、EPCAM、EVT6-AML、TGS5、人端粒酶逆转录酶、plysialic酸、PLAC1、RUI、RU2(AS)、肠羧基酯酶、lewisY、sLe、LY6K、mut hsp70-2、M-CSF、MYCN、RhoC、TRP-2、CYPIBI、BORIS、前列腺酶、前列腺特异性抗原(PSA)、PAX3、PAP、NY-ESO-1、LAGE-1a、LMP2、NCAM、p53、p53突变体、Ras突变体、gp100、prostein、OR51 E2、PANX3、PSMA、PSCA、Her2/neu、hTERT、HMWMAA、HAVCR1、VEGFR2、PDGFR-β、存活蛋白和端粒酶,豆荚蛋白、HPV E6、E7、精子蛋白17、SSEA-4、酪氨酸酶、TARP、WT1、前列腺癌肿瘤抗原-1(PCTA-1)、ML-IAP、MAGE、MAGE-A1.MAD-CT-1、MAD-CT-2、MelanA/MART 1、XAGE1、ELF2M、ERG(TMPRSS2 ETS融合基因)、NA17、中性粒细胞弹性蛋白酶、肉瘤易位断点、NY-BR-1、ephnnB2、CD20、CD22、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44v6、CD97、CD171、CD179a、雄激素受体、FAP、胰岛素生长因子(IGF)-I、IGFII、IGF-I受体、GD2、邻乙酰基-GD2、GD3、GM3、GPRC5D、GPR20、CXORF61、叶酸受体(FRa)、叶酸受体β、ROR1、Flt3、TAG72、TN Ag、Tie 2、TEM1、TEM7R、CLDN6、TSHR、UPK2、间皮素、及其任意组合。

[0164] CAR和/或TCR可针对的肿瘤细胞抗原的另一些实例包括例如至少5T4、8H9、$\alpha_v\beta_6$整合素、BCMA、B7-H3、B7-H6、CAIX、CA9、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD38、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD70、CD123、CD138、CD171、CD133、CEA、c-Met、CSPG4、EGFR、EGFR家族包括ErbB2(HER2)、EGFRvIII、EGP2、EGP40、ERBB3、ERBB4、ErbB3/4、EPCAM、EphA2、EpCAM、叶酸受体-a、FAP、FBP、胎儿AchR、FRα、GD2、G250/CAIX、GD3、磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3(GPC3)、GUCY2C、HER1、HER2、ICAM-1、IL-13Rα2、IL-11Rα、Kras、Kras G12D、L1CAM、λ(Lambda)、Lewis-Y、κ(Kappa)、KDR、MAGE、MCSP、MET、间皮素、Muc1、Muc16、MUC18、NCAM、NKG2D配体、NY-ESO-1、PRAME、PSC1、PSCA、PSMA、ROR1、SP17、存活蛋白、TAG72、TEM、癌胚抗原、HMW-MAA、AFP、CA-125、ETA、酪氨酸酶、MAGE、层黏连蛋白受体、HPV E6、E7、BING-4、钙激活的氯离子通道2、细胞周期蛋白B1、9D7、EphA3、端粒酶、SAP-1、BAGE家族、CAGE家族、GAGE家族、MAGE家族、SAGE家族、XAGE家族、NY-ESO-1/LAGE-1、PAME、SSX-2、Melan-A/MART-1、GP100/pmel17、TRP-1/-2、P.多肽、MC1R、前列腺特异性抗原、β-联蛋白、BRCA1/2、CML66、纤连蛋白、MART-2、TGF-βRII、WT-1或VEGF受体(例如,VEGFR2)。CAR可以是第一代、第二代、第三代或更多代CAR。CAR可以对任何两种非同一性抗原具有双特异性,或者其可对超过两种的非同一性抗原具有特异性。

[0165] 可被本公开内容的CAR和/或TCR靶向的细菌抗原的一些非限制性实例包括至少以下:气单胞菌氨肽酶;球形节杆菌嵌合蛋白;球形节杆菌DMGO蛋白;球形节杆菌二甲基甘氨酸氧化酶;芽孢杆菌内含肽;芽孢杆菌嗜热菌蛋白酶;炭疽芽孢杆菌致死因子;炭疽芽孢杆菌保护性抗原PA63;炭疽芽孢杆菌保护性抗原;环状芽孢杆菌内含肽;B.多黏菌素B肽;炭疽芽孢杆菌水肿因子;炭疽芽孢杆菌水肿因子(S447N突变型);炭疽芽孢杆菌保护性抗原PA20;炭疽芽孢杆菌保护性抗原PA63(活化的);苏云金芽孢杆菌Cry1Ab毒素;疏螺旋体OspA;伯氏疏螺旋体NapA;疏螺旋体BmpA;疏螺旋体P41;疏螺旋体p45;伯氏疏螺旋体OspC;伯氏疏螺旋体OspA;伯氏疏螺旋体P41;伯氏疏螺旋体P41;伯氏疏螺旋体B31;伯氏疏螺旋体

P100;伯氏疏螺旋体DbpA;伯氏疏螺旋体BmpA;伯氏疏螺旋体DbpB;伽氏疏螺旋体;伽氏疏螺旋体P58;斯柏曼疏螺旋体OspC;伯氏疏螺旋体2级;牛布鲁氏菌;百日咳杆菌毒素;百日咳杆菌;百日咳杆菌FHA;百日咳杆菌165LPS;百日咳杆菌腺苷酸环化酶抗原;百日咳杆菌百日咳毒素亚单位(一种原聚体);百日咳杆菌百日咳杆菌黏附素;百日咳杆菌菌毛2/3;百日咳杆菌腺苷酸环化酶类毒素;百日咳鲍特菌全细胞(Tohama I菌株);百日咳鲍特菌脂多糖;空肠弯曲菌;白色念珠菌烯醇酶;白色念珠菌;肺炎衣原体外膜蛋白VD3;肺炎衣原体;沙眼衣原体MOMP;沙眼衣原体抗原;沙眼衣原体HSP70蛋白;沙眼衣原体外膜蛋白;沙眼衣原体HSP70;沙眼衣原体;沙眼衣原体MOMP;沙眼衣原体LGV II;沙眼衣原体PGP-3D;沙眼衣原体活性MOMP;沙眼衣原体MOMP蛋白;沙眼衣原体活性MOMP;沙眼衣原体活性HSP70;沙眼衣原体W4 MOMP;沙眼衣原体W5 MOMP;沙眼衣原体MOMP,E78;艰难梭菌毒素A;艰难梭菌二元毒素A亚单位;艰难梭菌谷氨酸脱氢酶;艰难梭菌毒素B;肉毒梭菌BoNT-A轻链;肉毒梭菌BoNT-B轻链;肉毒梭菌BoNT-E轻链;艰难梭菌毒素B,TcdB;肉毒梭菌BoNT-F轻链;艰难梭菌毒素B;类腐败梭菌几丁质酶;肉毒梭菌C3类毒素;艰难梭菌毒素A;艰难梭菌毒素A(核糖核酸型027);艰难梭菌毒素A(核糖核酸型078);艰难梭菌毒素B(核糖核酸型027);艰难梭菌毒素B(核糖核酸型078);白喉棒状杆菌白喉类毒素;白喉棒状杆菌毒素(突变CRM197);白喉棒状杆菌毒素;大肠杆菌伴侣蛋白fimC;大肠杆菌GroEL,HSP60;大肠杆菌GroES,HSP10;大肠杆菌伴侣SURA;大肠杆菌O 158;大肠杆菌DnaJ蛋白;大肠杆菌HSP60;大肠杆菌热休克蛋白1;大肠杆菌Eco;大肠杆菌AmpC;大肠杆菌CoaA;大肠杆菌GroL;大肠杆菌GroS蛋白;大肠杆菌DnaK;大肠杆菌DsbA蛋白;HIV OmpP2;幽门螺杆菌;幽门螺杆菌外膜蛋白;幽门螺杆菌Cag抗原;幽门螺杆菌鞭毛蛋白A抗原;幽门螺杆菌脲酶小亚单位抗原;幽门螺杆菌Vac(毒素)抗原;幽门螺杆菌蛋白;幽门螺杆菌脲酶大亚单位蛋白;嗜肺军团杆菌;问号状钩端螺旋体LipL32脂蛋白;双曲钩端螺旋体;单核细胞增生李斯特菌内化蛋白;单核细胞增生李斯特菌鞭毛蛋白;活性李斯特菌溶血素;分枝杆菌;分枝杆菌热休克蛋白65;分枝杆菌热休克蛋白70;分枝杆菌PstS1;分枝杆菌分泌蛋白;分枝杆菌DESAT6;分枝杆菌热休克蛋白DnaK;分枝杆菌TB Ag85A;结核分枝杆菌早期分泌靶6蛋白;结核分枝杆菌ESAT-6;结核分枝杆菌FbpA;结核分枝杆菌;结核分枝杆菌PPD蛋白;结核分枝杆菌Old结核菌素;牛分枝杆菌HSP65;结核分枝杆菌热休克蛋白70;结核分枝杆菌热休克蛋白65;结核分枝杆菌MTB热休克蛋白;结核分枝杆菌MTB脂蛋白;结核分枝杆菌MTB片段和esat6片段;铜绿假单胞菌外毒素A;解脲支原体(血清变型3);伤寒沙门氏菌OMP;鼠伤寒沙门氏菌;副伤寒沙门氏菌A抗原;副伤寒沙门氏菌B抗原;鼠伤寒沙门氏菌抗原;沙门氏菌β内酰胺酶;伤寒沙门氏菌pagC抗原;伤寒沙门氏菌flag;鼠伤寒沙门氏菌尿苷磷酸化酶;鼠伤寒沙门氏菌鞭毛蛋白蛋白质;明尼苏达沙门氏菌(R595)脂质A单磷酰;鼠伤寒沙门氏LPS;肠道沙门氏菌鞭毛蛋白;明尼苏达沙门氏菌LPS;金黄色葡萄球菌δ溶血素;金黄色葡萄球菌蛋白酶蛋白;葡萄球菌蛋白A;金黄色葡萄球菌亚种青霉素结合蛋白2;金黄色葡萄球菌葡激酶;金黄色葡萄球菌蛋白A;金黄色葡萄球菌;金黄色葡萄球菌肠毒素B型类毒素;金黄色葡萄球菌HLA;金黄色葡萄球菌Hlg B;金黄色葡萄球菌杀白细胞素-D;金黄色葡萄球菌杀白细胞素-E;金黄色葡萄球菌LukF-PV;金黄色葡萄球菌LukS-PV;金黄色葡萄球菌酚溶调制肽α3;金黄色葡萄球菌毒性休克综合征毒素-1;肺炎链球菌细胞壁多糖抗原;肺炎链球菌细胞壁多糖抗原;肺炎链球菌β(1-4)-半乳糖苷酶;阿维丁链霉菌链霉亲和素;破伤风梭菌破伤风类毒素抗原;破伤风梭菌TeNT轻链;破伤风杆菌

毒素C片段;梅毒螺旋体密螺旋体膜蛋白A;梅毒螺旋体活性p41;梅毒螺旋体活性p47;梅毒螺旋体P17;密螺旋体膜蛋白A;梅毒螺旋体活性p15;梅毒螺旋体抗原;梅毒螺旋体Tp0453抗原;梅毒螺旋体tpp17;小肠结肠炎耶尔森菌(O亚型:3);小肠结肠炎耶尔森菌(血清型O:8);小肠结肠炎耶尔森菌(血清型O:9);苯黑末节皮真菌MEP4;苯黑末节皮真菌MEP5;苯黑末节皮真菌MEP3;石膏样节皮菌VPS10;石膏样节皮菌AMPP;石膏样节皮菌DAPB;太田节皮菌CHO2;太田节皮菌SEY1;太田节皮菌VPS10;极大螺旋藻铁氧化还原蛋白;钝顶节螺藻desA;猪蛔虫ATP6;猪蛔虫ND5;猪蛔虫ND4L;猪蛔虫V型质子ATP酶;棉阿舒囊霉PET8;棉阿舒囊霉TIM21;和棉阿舒囊霉ATG22。

[0166] 可被本公开内容的CAR和/或TCR靶向的病毒抗原的一些非限制性实例包括至少以下:腺病毒(ADV);ADV 3型;ADV 5型;ADV 2型六邻体;ADV 5型六邻体;ADV 40型;ADV 2级;巨细胞病毒(CMV);CMV AD169;CMV 2级;CMV Pp28;CMV;CMV Pp38;CMV Pp150;CMV糖蛋白B;CMV UL80a;CMV P38,P65,P150,P52;冠状病毒刺突糖蛋白;人SARS冠状病毒核蛋白;冠状病毒核衣壳229E蛋白;SARS冠状病毒刺突糖蛋白2;犬冠状病毒(菌株1-71)抗原;猫冠状病毒(菌株WSU 79-1146)抗原;SARS冠状病毒镶嵌刺突糖蛋白2;SARS M蛋白;SARS核衣壳;SARS刺突蛋白;SARS包膜蛋白;SARS S1;SARS S2;SARS核心蛋白;SARS基质蛋白;柯萨奇病毒(B5);柯萨奇病毒(B1);柯萨奇病毒(B6);柯萨奇病毒B1(图森菌株)VP1;柯萨奇病毒B6蛋白(施密特菌株);登革病毒(DENV);登革病毒亚型-2包膜蛋白;DENV;DENV 2型前膜;DENV 2型;DENV 1型衣壳;DENV 2型衣壳;DENV 3型衣壳;DENV 4型衣壳;DENV 4型PreM/M;DENV 1型PreM/M;DENV 2型PreM/M;DENV 3型PreM/M;DENV包膜蛋白1;DENV 1型包膜蛋白;DENV 2型包膜蛋白;DENV 3型包膜蛋白;DENV 4型包膜蛋白;EB病毒(EBV);EBV NA1;EBV镶嵌EBNA1蛋白;EBV;EBV 1型;EBV pg350/220;EBV p18;EBV P23;EBV早期抗原D;EBV 1型核抗原;EBV BFRF3;EBV BMRF1;EBV EBNA1;EBV早期抗原;肠病毒71(EV71);EV71 VP1;EV71 VP0;肠病毒ACox A16蛋白;肠病毒D EV70蛋白;埃博拉扎伊尔核蛋白;埃博拉-Z核蛋白;埃博拉-S核蛋白;埃博拉-Z糖蛋白;埃博拉-Z VP40;埃博拉病毒样颗粒;埃博拉病毒糖蛋白;埃博拉病毒VP40基质蛋白;雷斯顿埃博拉病毒糖蛋白;埃博拉NP抗原;埃博拉GP(Sudan-Nakisamata);埃博拉GP(扎伊尔);甲型肝炎(HAV);HAV抗原;HAV P3C;HAV P2C-P3A;HAV VP2-VP4;HAV VP3;HAV VP1-P2A;HAV P2C;HAV P2C-P3B;HAV P2C-P3A;HAV P3C;HAV VP1;HAV VP3;HAV VP4;乙型肝炎(HBV);HBV表面抗原;HBV核心抗原;HBV PreS1/S2;HBV E抗原;HBV 3型PreS1;HBV 2型PreS2;HBV 3型PreS2;HBV X蛋白;HBV表面抗原preS2;HBV PreS1;HBV PreS2;人巨细胞病毒(HCMV);HCMV白介素10;丙型肝炎(HCV);HCV多重抗原;HCV非结构蛋白3-3;HCV 1型核心+NS3抗原(Cap);HCV 1型核心+NS3抗原(Det);HCV核心,非结构蛋白3,非结构蛋白4,非结构蛋白5;HCV 2型非结构蛋白5;HCV 1型核心抗原;HCV 3型核心抗原;HCV 5型核心抗原;HCV 6型核心抗原;HCV 1a型非结构蛋白5;HCV 1a型非结构蛋白3;HCV 1a型非结构蛋白5;HCV核衣壳,非结构蛋白3,非结构蛋白4,非结构蛋白5;丁型肝炎(HDV);戊型肝炎(HEV);HEV ORF3;HEV ORF2,ORF3;HEV镶嵌ORF2,ORF3;HEV镶嵌-S ORF2,ORF3;HEV镶嵌蛋白;HEV镶嵌-S蛋白;HEV ORF2;人免疫缺陷病毒(HIV);HIV-O抗原;HIV-1IIIB gp120蛋白;HIV-1IIIB gp160蛋白;HIV-1 451gp120蛋白;HIV-1 451gp160蛋白;HIV-1IIIB p24蛋白;HIV-1gp120和gp41嵌合抗原;HIV-1Gp160蛋白;HIV-1Gag多聚蛋白Pr55;HIV-1p17蛋白;HIV-1p24蛋白;人乳头瘤病毒(HPV);HPV 16型;HPV16 E6蛋白;HPV16 E7蛋白;HPV18 E6蛋

白;HPV18 E7蛋白;HPV 18型L1蛋白;HPV 2型,HPV 3型;HPV 18型;HPV 11型;HPV 16型L1蛋白;HPV 33型L1蛋白;HPV 6型L1蛋白;HPV 16型L1蛋白;单纯疱疹病毒(HSV);HSV 1型;HSV-2gG肽;HSV8 ORF8和ORF65蛋白;HSV 1型糖蛋白;HSV 2型糖蛋白;HSV镶嵌蛋白;HSV 2型;HSV 1型糖蛋白D;HSV 1型糖蛋白G;HSV 2型糖蛋白G;HSV糖蛋白D;HSV 1型糖蛋白G1;HSV 1型MacIntyre;HSV 1型III级抗原;人嗜T淋巴细胞病毒(HTLV);HTLV 1型、2型;HTLV gp21抗原;HTLV 1型糖蛋白21;HTLV 1型包膜蛋白;HTLV 1型糖蛋白46;HTLV 1型镶嵌;HTLV 1型p24蛋白;HTLV糖蛋白46镶嵌蛋白;HTLV镶嵌蛋白;人嗜T淋巴细胞病毒I型gp21+gp46嵌合抗原;人嗜T淋巴细胞病毒II型gp21+gp46嵌合抗原;人嗜T淋巴细胞病毒I型和II型嵌合抗原;甲型流感(IAV);IAV H2N2核蛋白蛋白质;重组IAV H2N2血凝素蛋白;IAV H3N2血凝素蛋白;重组IAV H3N2神经氨酸酶;IAV HIN1 2级抗原;IAV H3N2基质蛋白1;IAV H4N4血凝素蛋白;IAV H4N6血凝素蛋白;重组IAV H4N8血凝素蛋白;乙型流感(IBV);乙型流感病毒抗原;IBV血凝素;IBV血凝素1;IBV基质蛋白1;IBV核蛋白;日本脑炎(JEV);JEV核心蛋白;JEV PreM/M;MMLV白血病病毒逆转录酶;麻疹病毒(MeV);麻疹病毒C蛋白;麻疹病毒大聚合酶;麻疹病毒镶嵌蛋白;MeV血凝素镶嵌;MeV大聚合酶;MeV聚合酶;MeV血凝素融合蛋白;MeV核衣壳;麻疹2级;传染性软疣病毒(MCV);MCV MC148蛋白;MCV 2型趋化因子样蛋白;Orf病毒VEGFE;细小病毒VP2 VLP;细小病毒VP2;细小病毒VP1;细小病毒Pep D;细小病毒Pep C;细小病毒Pep B;细小病毒Pep A;细小病毒NS1;细小病毒B19 VLP VP2;细小病毒B19 VP2;细小病毒B19非结构蛋白;细小病毒B19,VP1,VP2;细小病毒B19;细小病毒B19型VLP VP1/VP2共衣壳蛋白;细小病毒B19 VP1/2;细小病毒B19 VP1;狂犬病病毒(RV);狂犬病病毒糖蛋白;RV M2;RV(菌株MRV)核蛋白;RV核蛋白;呼吸道合胞病毒(RSV);呼吸道合胞病毒(长菌株)抗原;小肠结肠炎耶尔森菌G蛋白;RSV Src;RSV Src激酶;RSV糖蛋白;RSV糖蛋白G;RSV核蛋白;裂谷热病毒(RVFV);RVFV糖蛋白;RVFV核蛋白;RVFV非结构蛋白;风疹病毒(RuV);RuV IV级;RuV包膜蛋白1;RuV 2级;RuV K1S;RuV K2S;RuV核衣壳;RuV衣壳;RuV E1蛋白;RuV E2蛋白;RuV E1镶嵌;RuV衣壳C;轮状病毒3级;轮状病毒;蜱传脑炎病毒(TBEV);TBEV gE,TBEV NE蛋白;TBEV gE、TBEV NE、TBEV GE、TBEV CE蛋白;TBEV糖蛋白E;TBEV PreM;TBEV核心抗原;TBEV非结构蛋白3;TBEV E肽;蜱传脑炎病毒gE蛋白;猿猴免疫缺陷病毒(SIV);SIV糖蛋白120;SIV Gag;SIV P27;SIV Pol蛋白;SIV 1型Nef蛋白;烟草蚀纹病毒(TEV);TEV N1a蛋白;TEV核心蛋白;TEV PreM/M;TEV蛋白酶蛋白;EN-TEV活性EN-TEV蛋白酶;水痘带状疱疹病毒(VZV);VZV糖蛋白E;VZV ORF9;VZV ORF26;VZV糖蛋白;VZV 2级;天花病毒天花CRMB;西尼罗病毒(WNV);西尼罗病毒抗原;西尼罗病毒preM蛋白;西尼罗病毒NS3蛋白酶蛋白;WNV包膜蛋白;WNV PreM;WNV E抗原;WNV非结构蛋白1;WNV E蛋白肽;WNV E蛋白封闭肽;WNV M蛋白封闭肽;WNV preM封闭肽;寨卡病毒;寨卡病毒包膜蛋白;寨卡病毒NS1蛋白;寨卡病毒抗原;寨卡病毒H/PF/2013;寨卡衣壳;寨卡E(结构域III);寨卡Pre-M;基孔肯雅病毒(CHIKV);基孔肯雅病毒gp E1;基孔肯雅病毒gp E2;基孔肯雅病毒gp VLP;CHIKV E1蛋白;基孔肯雅E1抗原;基孔肯雅E2抗原;基孔肯雅E1 E2复合抗原;CHIKV衣壳蛋白;CHIKV包膜抗原2;HTNV N蛋白;FIV核心抗原;1型星状病毒;hMPV;腮腺炎病毒;HRV 3C蛋白酶;CDV HA;CDV基质蛋白;淮扬山病毒核衣壳;施马伦贝格病毒核衣壳;CDV核衣壳;MMTV Pr77;病毒MIP MIP-I;病毒MIP MIP-II;VACV Fc嵌合体;CCI Fc嵌合体;商陆(Phytolacca acinosa)商陆抗病毒蛋白;艾柯病毒9型;MuV;非洲猪瘟病毒(ASFV);非洲猪瘟病毒p30蛋白;和非洲猪瘟病毒p54蛋白。

[0167] 本文中公开的转基因、第一转基因或第二转基因可包含在编码多肽的核苷酸序列中。本文中使用的“蛋白质”或“多肽”是指包含至少五个氨基酸残基的分子。本文中使用的术语“野生型”是指在生物体中天然存在的分子的内源形式。采用蛋白质或多肽的野生型形式,然而,采用经修饰的蛋白质或多肽来产生免疫应答。上述术语可互换使用。“经修饰的蛋白质”或“经修饰的多肽”或“变体”是指其化学结构,特别是其氨基酸序列相对于野生型蛋白质或多肽发生了改变的蛋白质或多肽。经修饰/变体蛋白质或多肽可具有至少一种经修饰的活性或功能(认识到蛋白质或多肽可具有多种活性或功能)。特别考虑了经修饰/变体蛋白质或多肽可在一种活性或功能方面改变,但在另一些方面(例如免疫原性)保留野生型活性或功能。

[0168] 转基因(野生型或经修饰的)的尺寸可包括但不限于

[0169] 5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100,110,120,130,140,150,160,170,180,190,200,210,220,230,240,250,275,300,325,350,375,400,425,450,475,500,525,550,575,600,625,650,675,700,725,750,775,800,825,850,875,900,925,950,975,1000,1100,1200,1300,1400,1500,1750,2000,2250,2500个氨基酸残基或更多,以及其中可推导出的任何范围,或本文中所述或提及的相应氨基酸序列的衍生物。

[0170] B.T细胞受体(TCR)和用于产生经改造TCR的方法。

[0171] T细胞受体或TCR是在T淋巴细胞(T细胞)的表面上发现的分子,其负责识别为与主要组织相容性复合体(MHC)分子结合的肽的抗原片段。TCR由两条不同的蛋白质链构成(即其是异二聚体)。在人中的95%T细胞中,TCR由α链(α,本文也称为“a”)和β(β,在本文中也称为“b”)链组成,而在5%的T细胞中,TCR由γ和δ(γ/δ)链组成。该比例在个体发育和在疾病状态以及在不同物种中改变。

[0172] 当TCR与抗原性肽和MHC(肽/MHC)接合时,T淋巴细胞通过信号转导被活化,即由相关酶、共受体、特化衔接子分子和活化或释放的转录因子介导的一系列生物化学事件。TCR是二硫键连接的膜锚定异二聚体蛋白,其通常由作为与不变CD3链分子的复合物的一部分表达的高度可变α(α)和β(β)链组成。表达该受体的T细胞被称为α:β(或αβ或ab)T细胞,但是少数T细胞表达由可变γ链(γ,在本文中也称为“g”)和δ链(δ,在本文中也称为“d”)形成的替选受体,称为γδ(或gd)T细胞。

[0173] 每条链由两个胞外结构域构成:可变(V)区和恒定(C)区,二者都是形成反平行β-折叠的免疫球蛋白超家族(Immunoglobulin superfamily,IgSF)结构域。恒定区靠近细胞膜,接着是跨膜区和短的胞质尾,而可变区与肽/MHC复合物结合。

[0174] TCRα链和β链二者的可变结构域各自具有三个高变区或互补性决定区(CDR),而β链的可变区具有另外的高变区(HV4),其通常不接触抗原,并且因此不被认为是CDR。

[0175] 残基位于TCR的两个区域:在α链和β链的界面以及在被认为靠近CD3信号转导复合物的β链构架区中。CDR3是负责识别经加工抗原的主要CDR,但是α链的CDR1也已显示与抗原性肽的N端部分相互作用,而β链的CDR1与肽的C端部分相互作用。CDR2被认为识别MHC。β链的CDR4不被认为参与抗原识别,但已显示其与超级抗原相互作用。TCR结构域的恒定结构域

由其中半胱氨酸残基形成二硫键的短连接序列组成,所述二硫键形成两条链之间的连接。

[0176] TCR是IgSF蛋白的成员意指其可以与抗体和BCR相比较。就相似性而言,TCR类似于具有重链和轻链的抗体的一半,不同之处在于重链不具有其可结晶部分(Fc)(注意:在个体发育方面TCRα经历VJ重组,因此其类似于轻链;TCRβ经历VDJ重组,因此其类似于重链)。因此TCR在本体发育方面类似于抗体的抗体结合片段之一。TCR的两个亚基扭在一起。鉴于抗体使用其Fc区与天然白细胞上的Fc受体结合,TCR已经停靠在细胞膜上。然而,由于其细胞质尾短,其不能够介导信号转导本身,因此TCR仍然需要CD3和ζ来在其位置进行信号转导,如同抗体需要与FcR结合以启动信号转导。以这样的方式,T细胞的MHC-TCR-CD3相互作用在功能上类似于髓样白细胞的Ag-Ig-FcR相互作用和B细胞的Ag-Ig-CD79相互作用。

[0177] 外源TCR包含可由TCR-α和TCR-β基因表达的蛋白质。外源TCR可包含由TCR-γ和TCR-δ基因表达的蛋白质。外源TCR可包含由TCR-α和TCR-β基因表达的蛋白质,并且抗原识别受体包含由TCR-γ和TCR-δ基因表达的蛋白质。外源TCR可包含由TCR-γ和TCR-δ基因表达的蛋白质,并且抗原识别受体包含由TCR-α和TCR-β基因表达的蛋白质。

[0178] 产生抗原特异性TCR的方法是本领域已知的。方法可以包括例如:1)合成来源于目的蛋白(例如肿瘤抗原、来自测序数据的新抗原等)的已知或预测的HLA限制性肽表位;2)通过抗原呈递细胞(用于扩增)或四聚体(用于直接分选)将这些呈递给从中提取TCR序列的T细胞库(例如在肿瘤ag特异性T细胞的情况下,肿瘤浸润淋巴细胞);3)选择或筛选抗原特异性T细胞(例如基于四聚体结合的FACS分选抗原特异性T细胞);4)克隆(通过RT-PCR)和对TCR基因(即TCR的α和β链或γ和δ链)进行测序;克隆和测序可以在群体或单细胞水平进行;和5)通过例如通过用这些序列转导外周血T细胞并评估其对表达关联肽-MHC复合物的靶细胞的反应性测试TCR克隆的功能来确定和分析TCR特异性。反应性通常基于细胞因子产生(例如干扰素γ)来测量。

[0179] C.嵌合抗原受体(CAR)和产生CAR的方法。

[0180] 术语“嵌合抗原受体”或“CAR”是指将任意特异性接枝到免疫效应细胞上的经改造受体。这些受体用于将单克隆抗体的特异性接枝到免疫细胞上;其编码序列的转移通过逆转录病毒或慢病毒载体促进。受体被称为嵌合的,因为其由来自不同来源的部分构成。

[0181] 这些分子最常见形式是与CD3-ζ跨膜和内结构域、CD28或41BB胞内结构域、或其组合融合的来源于单克隆抗体的单链可变片段(scFv)的融合体。这样的分子使得响应于scFv识别其靶标而传递信号。这样的构建体的一个实例是14g2a-ζ,其是来源于杂交瘤14g2a的scFv(其识别二唾液酸神经节苷脂GD2)的融合体。当免疫细胞表达该分子时(例如通过癌逆转录病毒载体转导实现),其识别并杀伤表达GD2的靶细胞(例如神经母细胞瘤细胞)。

[0182] 免疫球蛋白重链和轻链的可变部分通过柔性接头融合以形成scFv。该scFv之前是信号肽,以将新生蛋白定向至内质网并随后进行表面表达(这是经切割的)。柔性间隔区允许scFv在不同的方向上取向,以使得能够进行抗原结合。跨膜结构域是通常来源于信号传导内结构域的原始分子的典型疏水α螺旋,所述信号传导内结构域突出到细胞中并传递所期望的信号。

[0183] CAR可包含至少一个胞外结构域和至少一个胞内结构域。胞外结构域可包含与任何特定的目的抗原特异性结合的靶特异性结合元件(在其他情况下称为抗原结合部分或配体结合部分)。

[0184] 胞内结构域或在其他情况下胞质结构域可包含一个或更多个共刺激信号传导区和ζ链部分。共刺激信号传导区是指包含共刺激分子的胞内结构域的CAR部分。共刺激分子可以是除抗原受体或其配体之外的细胞表面分子,其是免疫细胞对抗原进行有效应答所需要的。

[0185] 1.信号肽

[0186] 本公开内容的多肽可包含信号肽。“信号肽”是指引导蛋白质在细胞内转运和定位(例如,至某个细胞器(如内质网)和/或细胞表面)的肽序列。信号肽可引导新生蛋白到内质网中。如果受体要被糖基化并锚定在细胞膜中,则这是必不可少的。通常,使用天然连接到最氨基末端组分的信号肽(例如,在具有轻链-接头-重链取向的scFv中,使用轻链的天然信号)。

[0187] 信号肽可在通过内质网(endoplasmic reticulum,ER)之后被切割,即,是可切割的信号肽。限制位点可位于信号肽的羧基端以促进切割。

[0188] 2.抗原结合结构域

[0189] 本公开内容的多肽可包含一个或更多个抗原结合结构域。“抗原结合结构域”描述了在适当条件下能够结合抗原的多肽区域。抗原结合结构域可基于一种或更多种抗体(例如,CD20抗体)的单链可变片段(scFv)。抗原结合结构域可包含重可变(VH)区和轻可变(VL)区,其中VH和VL区位于同一多肽上。抗原结合结构域可包含VH和VL区之间的接头。接头可使抗原结合结构域能够形成用于抗原结合的所期望结构。

[0190] 本公开内容的多肽的抗原结合结构域的可变区可通过使VH和/或VL CDR 1、CDR 2和/或CDR 3区内的氨基酸残基突变来进行修饰,以改善抗体的一种或更多种结合特性(例如亲和力)。术语“CDR”指互补决定区,其基于分别由B细胞和T细胞产生的免疫球蛋白(抗体)和T细胞受体中的可变链的一部分,其中这些分子结合其特异性抗原。由于与免疫球蛋白和T细胞受体相关的大多数序列变异存在于CDR中,因此有时将这些区域称为高变区。突变可通过定点诱变或PCR介导的诱变引入,并且对抗体结合或其他目的功能特性的影响可在适当的体外或体内测定中进行评价。优选地,引入保守的修饰,并且通常改变CDR区域内的不超过1、2、3、4或5个残基。突变可以是氨基酸替换、添加或缺失。

[0191] 可对抗体进行框架修饰以降低免疫原性,例如,通过将一个或更多个框架残基“回复突变”为相应的种系序列。

[0192] 还预期了通过使抗原结合结构域与结合同一抗原(多价)或不同抗原(多特异性)的VH和VL区对多聚,抗原结合结构域可以是多特异性或多价的。

[0193] 抗原结合区例如可变区(重链和/或轻链可变区)或CDR的结合亲和力可为至少10^{-5}M、10^{-6}M、10^{-7}M、10^{-8}M、10^{-9}M、10^{-10}M、10^{-11}M、10^{-12}M或10^{-13}M。在一些实施方案中,抗原结合区例如可变区(重链和/或轻链可变区)或CDR的KD可为至少10^{-5}M、10^{-6}M、10^{-7}M、10^{-8}M、10^{-9}M、10^{-10}M、10^{-11}M、10^{-12}M或10^{-13}M(或其中可推导出的任何范围)。

[0194] 结合亲和力、KA或KD可通过本领域已知的方法来确定,例如通过基于表面等离振子共振(surface plasmon resonance,SRP)的生物传感器,通过动力学排斥测定(kinetic e×clusion assay,KinExA),通过基于偏振调制斜入射反射差(oblique-incidence reflectivity difference,OI-RD)用于微阵列检测的光学扫描仪,或通过ELISA。

[0195] 与包含非人源化结合区(例如来自小鼠的结合区)的多肽相比,包含人源化结合区

的多肽在宿主细胞中可具有相等、更好或至少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％、104％、106％、106％、108％、109％、110％、115％或120％的结合亲和力和/或表达水平。

[0196] 相对于小鼠框架,人框架的框架区(例如FR1、FR2、FR3和/或FR4)可各自或共同具有至少、至多或恰好1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100,101,102,103,104,105,106,107,108,109,110,111,112,113,114,115,116,117,118,119,120,121,122,123,124,125,126,127,128,129,130,131,132,133,134,135,136,137,138,139,140,141,142,143,144,145,146,147,148,149,150,151,152,153,154,155,156,157,158,159,160,161,162,163,164,165,166,167,168,169,170,171,172,173,174,175,176,177,178,179,180,181,182,183,184,185,186,187,188,189,190,191,192,193,194,195,196,197,198,199,或200个(或其中可推导出的任何范围)氨基酸替换、连续氨基酸添加或连续氨基酸缺失。

[0197] 相对于人框架,小鼠框架的框架区(例如FR1、FR2、FR3和/或FR4)可各自或共同具有至少、至多或恰好1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100,101,102,103,104,105,106,107,108,109,110,111,112,113,114,115,116,117,118,119,120,121,122,123,124,125,126,127,128,129,130,131,132,133,134,135,136,137,138,139,140,141,142,143,144,145,146,147,148,149,150,151,152,153,154,155,156,157,158,159,160,161,162,163,164,165,166,167,168,169,170,171,172,173,174,175,176,177,178,179,180,181,182,183,184,185,186,187,188,189,190,191,192,193,194,195,196,197,198,199,或200个(或其中可推导出的任何范围)氨基酸替换、连续氨基酸添加或连续氨基酸缺失。

[0198] 替换可在重链或轻链可变区的FR1、FR2、FR3或FR4的第

[0199] 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,或100位。

[0200] 3.胞外肽间隔区

[0201] 在CAR的胞外结构域与跨膜结构域之间,和/或在CAR的胞质结构域与跨膜结构域之间,可并入间隔区结构域。本文中使用的术语“间隔区结构域”通常意指发挥将多肽链中的跨膜结构域与胞外结构域或胞质结构域连接的功能的任何寡肽或多肽。胞外间隔区可将抗原结合结构域与跨膜结构域连接。肽间隔区可足够柔性,以使得抗原结合结构域以不同方向取向,以促进抗原结合。

[0202] 间隔区可包含来自IgG的铰链区。间隔区可包含或还包含免疫球蛋白的CH2CH3区和CD3部分。CH2CH3区可具有L235E/N297Q或L235D/N297Q修饰,或与CH2CH3区具有至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％或100％氨基酸序列同一性。间隔区可来自IgG4。胞外间隔区可包含铰链区。

[0203] 本文中使用的术语“铰链”是指提供结构柔性和分隔侧翼多肽区域的柔性多肽连接区(本文也称为“铰链区”或“间隔区”),并且可由天然或合成多肽组成。来源于免疫球蛋白(例如,IgG1)的“铰链”或“间隔区”通常被定义为从人IgG1的Glu216延伸至Pro230,例如(Burton(1985)Molec.Immunol.,22:161-206)。通过将形成重链间二硫键(S-S)的第一个和最后一个半胱氨酸残基置于相同位置,可将其他IgG同种型的铰链区与IgG1序列进行比对。铰链区可以是天然存在的或非天然存在的,包括但不限于如美国专利No.5,677,425中描述的改变的铰链区。铰链区可包含来源于与CH1结构域的抗体不同类别或亚类的抗体的完整铰链区。术语“铰链”还可包含来源于CD8以及在提供柔性和分隔侧翼区域方面提供类似功能的其他受体。其他替代物包括免疫球蛋白的CH2CH3区和CD3部分。

[0204] 胞外间隔区的长度可为至少、至多或恰好4,5,6,7,8,9,10,12,15,16,17,18,19,20,20,25,30,35,40,45,50,75,100,110,119,120,130,140,150,160,170,180,190,200,201,202,203,204,205,206,207,208,209,210,211,212,213,214,215,216,217,218,219,220,225,226,227,228,229,230,231,232,233,234,235,236,237,238,239,240,241,242,243,244,245,246,247,248,249,250,260,270,280,290,300,325,350,或400

[0205] 个氨基酸(或其中可推导出的任何范围)。胞外间隔区可由来自免疫球蛋白(例如IgG)的铰链区组成或包含来自免疫球蛋白(例如IgG)的铰链区。免疫球蛋白铰链区氨基酸序列是本领域已知的;参见例如Tan et al.(1990)Proc.Natl.Acad.Sci.USA87:162;和Huck et al.(1986)Nucl.Acids Res。

[0206] 胞外间隔区的长度可对CAR的信号传导活性和/或响应于抗原刺激的CAR信号传导的CAR-T细胞的扩增特性具有影响。可使用较短的间隔区,例如小于50、45、40、30、35、30、25、20、15、14、13、12、11或10个氨基酸。较长的间隔区,例如至少50,60,70,80,90,100,110,120,130,140,150,200,201,202,203,204,205,206,207,208,209,210,211,212,213,214,215,216,217,218,219,220,225,226,227,228,229,230,231,232,233,234,235,236,237,238,239,240,241,242,243,244,245,246,247,248,249,250,260,270,280,或290个氨基酸的较长的间隔区可具有提高的体内或体外扩增的优势。

[0207] 作为非限制性实例,免疫球蛋白铰链区可包含以下氨基酸序列之一:

[0208] 表:示例性铰链区

[0209]

序列	SEQ ID NO:
DKTHT	1
CPPC	2
CPEPKSCDTPPPCPR	3
ELKTPLGDTTHT	4
KSCDKTHTCP	5
KCCVDCP	6
KYGPPCP	7
EPKSCDKTHTCPPCP	8
ELKTPLGDTTHTCPRCP	9
SPNMVPHAHHAQ	10
ESKYGPPCPPCP	11
EPKSCDKTYTCPPCP	12

[0210] 胞外间隔区可包含人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4铰链区的氨基酸序列。与野生型(天然存在的)铰链区相比,胞外间隔区还可包含一个或更多个氨基酸替换和/或插入和/或缺失。例如,人IgG1铰链的His229可被Tyr替换,使得铰链区包含序列EPKSCDKTYTCPPCP (SEQ ID NO:12)。

[0211] 胞外间隔区可包含来源于人CD8的氨基酸序列;例如,铰链区可包含氨基酸序列:

[0212] TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD (SEQ ID NO:13),或其变体。

[0213] 胞外间隔区可包含或还包含CH2区。示例性CH2区是APEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK (SEQ ID NO:14)。

[0214] 胞外间隔区可包含或还包含CH3区。示例性CH3区是GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO:15)。

[0215] 当胞外间隔区包含多个部分时,在多个部分之间的任何地方可存在0至50个氨基酸。例如,在铰链与CH2或CH3区之间或者在CH2与CH3区之间(当二者都存在时),可存在至少、至多或恰好0、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、35、40、45或50个氨基酸(或其中任意可推导出的范围)。胞外间隔区可基本上由铰链、CH2和/或CH3区组成,意味着铰链、CH2和/或CH3区是存在的仅有的可鉴定区域,并且排除了所有其他结构域或区域,但还可以存在不是可鉴定区域的一部分的氨基酸。

[0216] 4.跨膜结构域

[0217] 关于跨膜结构域,CAR可设计成包含与CAR的胞外结构域融合的跨膜结构域。跨膜结构域可以是跨越膜的疏水性α螺旋。不同的跨膜结构域可导致不同的受体稳定性。

[0218] 可使用与CAR中的结构域之一天然相关的跨膜结构域。在一些情况下,可对跨膜结构域进行选择或通过氨基酸替换进行修饰,以避免这样的结构域与相同或不同表面膜蛋白的跨膜结构域结合,从而使与受体复合物的其他成员的相互作用最小化。

[0219] 跨膜结构域可来源于天然或合成来源。在来源是天然的情况下,结构域可来源于任何膜结合蛋白或跨膜蛋白。在此考虑的CAR构建体中特别使用的跨膜区的说明性而非限制性的一些实例可来源于以下(即包含至少以下的跨膜区):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。或者,跨膜结构域可以是合成的,在这种情况下其可主要包含疏水性残基例如亮氨酸和缬氨酸。苯丙氨酸、色氨酸和缬氨酸的三联体可存在于合成跨膜结构域的每个末端。任选地,短的寡肽接头或多肽接头(例如,长度为2至约10个氨基酸)可在CAR的跨膜结构域和胞质信号传导结构域之间形成键联。甘氨酸-丝氨酸双联体可提供特别合适的接头。

[0220] 跨膜结构域插入在胞外间隔区和胞质区之间。跨膜结构域可插入在胞外间隔区和一个或更多个共刺激区之间。接头可位于跨膜结构域和一个或更多个共刺激区之间。

[0221] 提供将多肽插入在真核(例如哺乳动物)细胞的细胞膜中的任何跨膜结构域都可适合于使用。跨膜结构域可来源于CD28、CD8、CD4、CD3-ζ、CD134或CD7。

[0222] 可用于本公开内容的任何组合物和方法的示例性跨膜结构域包括下表中的那些:

[0223] 表:示例性跨膜结构域序列

[0224]

描述	序列	SEQ ID NO:
CD28来源的	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	16
CD8 β来源的	LGLLVAGVLVLLVSLGVAIHLCC	17
CD4 来源的	ALIVLGGVAGLLLFIGLGIFFCVRC	18
CD3ζ来源的	LCYLLDGILFIYGVILTALFLRV	19
CD28来源的	WVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	20
CD134 (OX40) 来源的	VAAILGLGLVLGLLGPLAILLALYLL	21
CD7 来源的	ALPAALAVISFLLGLGLGVACVLA	22

[0225] 5.胞质结构域

[0226] CAR的胞质结构域或另外的胞内信号传导结构域负责活化其中已放置CAR的免疫细胞的至少一种正常效应子功能。在抗原和/或配体识别之后,受体聚集并且信号通过胞质区传递到细胞。胞质区可包含胞内信号传导结构域。胞内信号传导结构域可包含主要信号传导结构域和一个或更多个共刺激结构域。本文中所述的共刺激结构域可以是胞质区的一部分。

[0227] 术语“效应子功能”是指细胞的特化功能。例如,T细胞的效应子功能可以是细胞裂解活性或辅助活性,包括分泌细胞因子。因此,术语“胞内信号传导结构域”是指转导效应子

功能信号并指导细胞进行特化功能的蛋白质部分。虽然通常可使用整个胞内信号传导结构域,但是在许多情况下不需要使用整个链。就使用胞内信号传导结构域的截短部分而言,这样的截短部分可用于代替完整链,只要其转导效应子功能信号即可。术语胞内信号传导结构域因此意味着包含胞内信号传导结构域的足以转导效应子功能信号的任何截短部分。

[0228] 适用于本公开内容的CAR的胞质区和/或共刺激区包含任何期望的信号传导结构域,其响应于通过抗原与抗原结合结构域结合的方式激活而提供不同且可检测的信号(例如,通过细胞的一种或更多种细胞因子产生提高;靶基因转录的变化;蛋白质活性的变化;细胞行为的变化,例如细胞死亡;细胞增殖;细胞分化;细胞存活;细胞信号传导响应的调节等)。胞质区可包含如本文中所述的至少一个(例如,一个、两个、三个、四个、五个、六个等)ITAM基序。胞质区可包含DAP10/CD28型信号传导链。胞质区可包含CD3-ζ、DAP10、CD28、2B4、DNAM-1、4-1BB、OX40、CD30、CD40、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1(lymphocyte function-associated antigen-1,LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT和NKG2C型信号传导链。

[0229] 适用于本公开内容多肽的胞质区包含含有基于免疫受体酪氨酸的激活基序(immunoreceptor tyrosine-based activation motif,ITAM)的胞内信号传导多肽。ITAM基序是YX1X2(L/I),其中X1和X2独立地为任何氨基酸。在一些情况下,胞质区包含1、2、3、4或5个ITAM基序。在一些情况下,ITAM基序在胞内结构域中重复两次,其中ITAM基序的第一和第二个实例彼此由6至8个氨基酸隔开,例如(YX1X2(L/I))(X3)m(YX1X2(L/I)),其中n为6至8的整数,并且6至8个X3各自可以是任何氨基酸。

[0230] 合适的胞质区可以是来源于包含ITAM基序的多肽的含ITAM基序部分。例如,合适的胞质区可以是来自任何含ITAM基序蛋白质的含ITAM基序结构域。因此,合适的胞内结构域无需包含其所来源的整个蛋白质的整个序列。合适的含ITAM基序的多肽的一些实例包括但不限于:DAP12、DAP10、FCER1G(Fcε受体Iγ链);CD3D(CD3δ);CD3E(CD3ε);CD3G(CD3γ);CD3-ζ;以及CD79A(抗原受体复合物相关蛋白α链)。

[0231] 示例性胞质区是本领域已知的。下面所示的胞质区还提供了可并入本公开内容的CAR中的区域的一些实例:

[0232] 在一些情况下,胞质区来源于DAP12(也被称为TYROBP;TYRO蛋白酪氨酸激酶结合蛋白;KARAP;PLOSL;DN AX-激活蛋白12;KAR相关蛋白;TYRO蛋白酪氨酸激酶结合蛋白;杀伤激活受体相关蛋白;杀伤激活受体相关蛋白等)。合适的胞质区可包含全长DAP12氨基酸序列的含ITAM基序的部分。

[0233] 胞质区可来源于FCER1G(也被称为FCRG;Fcε受体Iγ链;Fc受体γ链;fc-εRl-γ;fcRγ;fceRIγ;高亲和力免疫球蛋白ε受体亚基γ;免疫球蛋白E受体,高亲和力,γ链等)。合适的胞质区可包含全长FCER1G氨基酸序列的含ITAM基序的部分。

[0234] 胞质区可来源于T细胞表面糖蛋白CD3δ链(也被称为CD3D;CD3-δ;T3D;CD3抗原,δ亚基;CD3δ;CD3d抗原,δ多肽(TiT3复合物);OKT3,δ链;T细胞受体T3δ链;T细胞表面糖蛋白CD3δ链;等)。合适的胞质区可包含全长CD3δ氨基酸序列的含ITAM基序的部分。

[0235] 胞质区可来源于T细胞表面糖蛋白CD3ε链(也被称为CD3e、T细胞表面抗原T3/Leu-4ε链、T细胞表面糖蛋白CD3ε链、AI504783、CD3、CD3ε、T3e等)。合适的胞质区可包含全长CD3ε氨基酸序列的含ITAM基序的部分。

[0236] 胞质区可来源于T细胞表面糖蛋白CD3γ链(也被称为CD3G、T细胞受体T3γ链、CD3-

γ、T3G、γ多肽(TiT3复合物)等)。合适的胞质区可包含全长CD3γ氨基酸序列的含ITAM基序的部分。

[0237] 胞质区可来源于T细胞表面糖蛋白CD3ζ链(也被称为CD3Z、T细胞受体T3ζ链、CD247、CD3-ζ、CD3H、CD3Q、T3Z、TCRZ等)。合适的胞质区可包含全长CD3ζ氨基酸序列的含ITAM基序的部分。

[0238] 胞质区可来源于CD79A(也被称为B细胞抗原受体复合物相关蛋白α链;CD79a抗原(免疫球蛋白相关α);MB-1膜糖蛋白;ig-α;膜结合免疫球蛋白相关蛋白;表面IgM相关蛋白;等)。合适的胞质区可包含全长CD79A氨基酸序列的含ITAM基序的部分。

[0239] 合适的胞质区可包含CD28型信号传导链。适用于本公开内容的CAR的另一些胞质区包含ZAP70多肽。

[0240] 具体的示例性胞质区是本领域已知的,并在下表中进一步示出。

[0241] 表:胞质区

[0242]

序列	SEQ ID NO:
MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSGLRPVQAQAQSDCSCSTVSPGVLAGIVM GDLVLTVLIALAVYFLGRLVPRGRGAAEAATRKQRITETESPYQELQG QRSDVYSDLNTQRPYYK	23
MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSGLRPVQAQAQSDCSCSTVSPGVLAGIVM GDLVLTVLIALAVYFLGRLVPRGRGAAEATRKQRITETESPYQELQGQ RSDVYSDLNTQRPYYK	24
MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSDCSCSTVSPGVLAGIVMGDLVLTVLIALA VYFLGRLVPRGRGAAEAATRKQRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQ RPYYK	25
MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSDCSCSTVSPGVLAGIVMGDLVLTVLIALA VYFLGRLVPRGRGAAEATRKQRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQR PYYK	26
MIPAVVLLLLLLVEQAAALGEPQLCYILDAILFLYGIVLTLLYCRLKIQV RKAAITSYEKSDGVYTGLSTRNQETYETLKHEKPPQ	27
DGVYTGLSTRNQETYETLKHE	28
MEHSTFLSGLVLATLLSQVSPFKIPIEELEDRVFVNCNTSITWVEGTVGT LLSDITRLDLGKRILDPRGIYRCNGTDIYKDKESTVQVHYRMCQSCVEL DPATVAGIIVTDVIATLLLALGVFCFAGHETGRLSGAADTQALLRNDQ VYQPLRDRDDAQYSHLGGNWARNK	29
MEHSTFLSGLVLATLLSQVSPFKIPIEELEDRVFVNCNTSITWVEGTVGT LLSDITRLDLGKRILDPRGIYRCNGTDIYKDKESTVQVHYRTADTQALL RNDQVYQPLRDRDDAQYSHLGGNWARNK	30
DQVYQPLRDRDDAQYSHLGGN	31
MQSGTHWRVLGLCLLSVGVWGQDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVIL TCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGY YVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMEMDVMSVATIVIVDICITGG LLLLVYYWSKNRKAKAKPVTRGAGAGGRQRGQNKERPPPVPNPDYE PIRKGQRDLYSGLNQRRI	32
NPDYEPIRKGQRDLYSGLNQR	33
MEQGKGLAVLILAIILLQGTLAQSIKGNHLVKVYDYQEDGSVLLTCDA EAKNITWFKDGKMIGFLTEDKKKWNLGSNAKDPRGMYQCKGSQNKS	34

[0243]

序列	SEQ ID NO:
KPLQVYYRMCQNCIELNAATISGFLFAEIVSIFVLAVGVYFIAGQDGVR QSRASDKQTLLPNDQLYQPLKDREDDQYSHLQGNQLRRN	
DQLYQPLKDREDDQYSHLQGN	35
MKWKALFTAAILQAQLPITEAQSFGLLDPKLCYLLDGILFIYGVILTALF LRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM GGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQ GLSTATKDTYDALHMQALPPR	36
MKWKALFTAAILQAQLPITEAQSFGLLDPKLCYLLDGILFIYGVILTALF LRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM GGKPQRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLY QGLSTATKDTYDALHMQALPPR	37
RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQG LSTATKDTYDALHMQALPPR	38
NQLYNELNLGRREEYDVLDKR	39
EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK	40
DGLYQGLSTATKDTYDALHMQ	41
MPGGPGVLQALPATIFLLFLLSAVYLGPGCQALWMHKVPASLMVSLG EDAHFQCPHNSSNNANVTWWRVLHGNYTWPPEFLGPGEDPNGTLIIQ NVNKSHGGIYVCRVQEGNESYQQSCGTYLRVRQPPPRPFLDMGEGTK NRIITAEGIILLFCAVVPGTLLLFRKRWQNEKLGLDAGDEYEDENLYEG LNLDDCSMYEDISRGLQGTYQDVGSLNIGDVQLEKP	42
MPGGPGVLQALPATIFLLFLLSAVYLGPGCQALWMHKVPASLMVSLG EDAHFQCPHNSSNNANVTWWRVLHGNYTWPPEFLGPGEDPNEPPPRP FLDMGEGTKNRIITAEGIILLFCAVVPGTLLLFRKRWQNEKLGLDAGDE YEDENLYEGLNLDDCSMYEDISRGLQGTYQDVGSLNIGDVQLEKP	43
ENLYEGLNLDDCSMYEDISRG	44
FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRP GPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS	45

[0244] 6.共刺激区

[0245] 本文中使用的术语“共刺激配体”包括抗原呈递细胞(例如,APC、树突细胞、B细胞等)上的分子,其特异性结合免疫效应细胞上的关联共刺激分子或结构域,从而提供这样的信号:该信号除介导免疫效应细胞响应的主要信号之外,还包括但不限于增殖、活化、分化等。共刺激配体还涵盖尤其与免疫效应细胞上存在的共刺激分子特异性结合的抗体。“共刺激分子”是指免疫效应细胞上的关联结合配偶体,其与共刺激配体特异性结合,从而介导通过免疫效应子的共刺激响应,例如但不限于增殖和/或活化。本文中使用的“共刺激信号”是

指与主要信号结合导致免疫细胞活化、增殖和/或关键分子上调或下调的信号。

[0246] 术语“刺激”意指由刺激性分子与其关联配体结合从而介导信号转导事件(例如但不限于信号转导)而诱导的初级响应。刺激可介导某些分子表达的改变。本文中使用的术语“刺激分子”意指免疫效应细胞上的分子,其与存在于抗原呈递细胞上的关联刺激配体特异性结合。本文中使用的“刺激配体”意指这样的配体:当存在于抗原呈递细胞(例如APC、树突细胞、B细胞等)上时,能与免疫效应细胞上的关联结合配偶体(本文中被称为“刺激性分子”)特异性结合,从而介导通过免疫效应细胞的初级响应,其包括但不限于活化、免疫应答的启动,增殖等。

[0247] 合适的共刺激区的一些非限制性实例,例如包含在胞质区中的那些,包括但不限于来自以下的多肽:4-1BB(CD137)、CD28、ICOS、OX-40、BTLA、CD27、CD30、CD40、GITR、2B4、DNAM-1、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C和HVEM。

[0248] 共刺激区可具有至少、至多、或恰好10、15、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、150、200或300个氨基酸或者其中可推导出的任何范围的长度。

[0249] 共刺激区可来源于DAP10(也被称为HCST、DAP10、KAP10、PIK3AP、造血细胞信号转导分子等)。共刺激区可来源于跨膜蛋白4-1BB(也被称为肿瘤坏死因子受体超家族成员9,TNFRSF9(tumor necrosis factor receptor superfamily member 9);CD137;CDw137;ILA等)的胞内部分。共刺激区可来源于跨膜蛋白CD28(也被称为Tp44)的胞内部分。共刺激区可来源于跨膜蛋白ICOS(也被称为诱导性T细胞共刺激、AILIM、CD278和CVID1)的胞内部分。共刺激区可来源于跨膜蛋白OX-40(也被称为肿瘤坏死因子受体超家族成员4、TNFRSF4、RP5-902P8.3、ACT35、CD134、OX40、TXGP1L)的胞内部分。共刺激区可来源于跨膜蛋白BTLA(也被称为B和T淋巴细胞相关蛋白、BTLA1和CD272)的胞内部分。共刺激区可来源于跨膜蛋白CD27(也被称为S152、T14、肿瘤坏死因子受体超家族成员7、TNFRSF7和Tp55)的胞内部分。共刺激区可来源于跨膜蛋白CD30(也被称为肿瘤坏死因子受体超家族成员8、TNFRSF8、D1S166E和Ki-1)的胞内部分。共刺激区可来源于跨膜蛋白GITR(也被称为肿瘤坏死因子受体超家族成员18、TNFRSF18、RP5-902P8.2、AITR、CD357、ENERGEN和GITR-D)的胞内部分。共刺激区可来源于跨膜蛋白HVEM(也被称为肿瘤坏死因子受体超家族成员14、TNFRSF14、RP3-395M20.6、ATAR、CD270、HVEA、LIGHTR和TR2)的胞内部分。共刺激区可来源于2B4(也被称为CD244、NAIL、NKR2B4、Nmrk、SLAMF4、CD244分子等)。共刺激区可来源于DNAM-1(也被称为CD226、DNAM1、PTA1、TLiSA1、CD226分子等)。共刺激区可来源于CD40(也被称为Bp50、CDW40、TNFRSF5、p50、CD40(蛋白质)、CD40分子等)。共刺激区可来源于LFA-1(也被称为淋巴细胞功能相关抗原1、整合素αL、ITGAL、CD11A、LFA1A、整合素亚基αL等)。共刺激区可来源于CD2(也被称为淋巴细胞功能抗原-2、LFA-2、SRBC、T11、CD2分子等)。共刺激区可来源于CD7(也被称为GP40、LEU-9、TP41、Tp40、CD7分子等)。共刺激区可来源于LIGHT(也被称为TNFSF14、CD258、HVEML、LIGHT、LTg、TR2、TNLG1D、肿瘤坏死因子超家族成员14等)。共刺激区可来源于NKG2C(也被称为KLRC2、CD159c、NKG2-C、杀伤细胞凝集素样受体C2等)。

[0250] 具体示例性共刺激结构域由以下氨基酸序列表示:

[0251] 表:共刺激结构域

[0252]

序列	SEQ ID NO:
KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	46
FWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS	47
TKKKYSSSVHDPNGEYMFMRAVNTAKKSRLTDVTL	48
RRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI	49
CCLRRHQGKQNELSDTAGREINLVDAHLKSEQTEASTRQNSQVLLSETGIYDNDPDLCFRMQEGSEVYSNPCLEENKPGIVYASLNHSVIGPNSRLARNVKEAPTEYASICVRS	50
HQRRKYRSNKGESPVEPAEPCRYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSP	51
RRACRKRIRQKLHLCYPVQTSQPKLELVDSRPRRSSTQLRSGASVTEPVAEERGLMSQPLMETCHSVGAAYLESLPLQDASPAGGPSSPRDLPEPRVSTEHTNNKIEKIYIMKADTVIVGTVKAELPEGRGLAGPAEPELEEELEADHTPHYPEQETEPPLGSCSDVMLSVEEEGKEDPLPTAASGK	52
HIWQLRSQCMWPRETQLLLEVPPSTEDARSCQFPEEERGERSAEEKGRLGDLWV	53
CVKRRKPRGDVVKVIVSVQRKRQEAEGEATVIEALQAPPDVTTVAVEETIPSFTGRSPNH	54
RSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS	55

[0253] 7.检测肽

[0254] 本文中所述的CAR还可包含检测肽或分子。合适的检测肽包括血凝素(hemagglutinin,HA;例如YPYDVPDYA;SEQ ID NO:56);FLAG(例如DYKDDDDK;SEQ ID ON:57);c-myc(例如EQKLISEEDL;SEQ ID NO:58)等。其他合适的检测肽是本领域已知的。

[0255] 8.肽接头

[0256] 在一些实施方案中,本公开内容的多肽包含肽接头(有时称为接头)。可使用肽接头来隔开任何本文中所述的肽结构域/区。例如,接头可在信号肽与抗原结合结构域之间、抗原结合结构域的VH与VL之间、抗原结合结构域与肽间隔区之间、肽间隔区与跨膜结构域之间、侧接共刺激区或在共刺激区的N-或C-区上、和/或在跨膜结构域与胞内结构域之间。肽接头可具有多种氨基酸序列中的任一种。结构域和区可通过一般具有柔性性质的肽接头连接,但是不排除其他化学键联。接头可以是长度为约6至约40个氨基酸、或长度为约6至约25个氨基酸的肽。这些接头可通过使用合成的编码接头的寡核苷酸来偶联蛋白质而产生。

[0257] 可使用具有一定程度柔性的肽接头。肽接头实际上可具有任何氨基酸序列,应记住合适的肽接头将具有导致一般柔性肽的序列。使用小氨基酸(例如甘氨酸和丙氨酸)可用于产生柔性肽。这样的序列的产生对于本领域技术人员是常规的。

[0258] 合适的接头可容易地选择并且可具有任何合适的长度,例如1个氨基酸(例如Gly)至20个氨基酸、2个氨基酸至15个氨基酸、3个氨基酸至12个氨基酸,包含4个氨基酸至10个氨基酸、5个氨基酸至9个氨基酸、6个氨基酸至8个氨基酸、或7个氨基酸至8个氨基酸,并且

可以是1、2、3、4、5、6或7个氨基酸。

[0259] 合适的接头可容易地选择并且可具有任何合适的不同长度,例如1个氨基酸(例如Gly)至20个氨基酸、2个氨基酸至15个氨基酸、3个氨基酸至12个氨基酸,包含4个氨基酸至10个氨基酸、5个氨基酸至9个氨基酸、6个氨基酸至8个氨基酸、或7个氨基酸至8个氨基酸,并且可以是1、2、3、4、5、6或7个氨基酸。

[0260] 示例性的柔性接头包括甘氨酸聚合物(G)n、甘氨酸-丝氨酸聚合物(包括例如(GS)n、(GSGGS)n(SEQ ID NO:59)、(G4S)n和(GGGS)n(SEQ ID NO:60),其中n是至少1的整数。n可以是至少、至多、或者恰好1、2、3、4、5、6、7、8、9或10(或其中可推导出的任何范围)。甘氨酸-丙氨酸聚合物、丙氨酸-丝氨酸聚合物和本领域已知的其他柔性接头。可使用甘氨酸和甘氨酸-丝氨酸聚合物;Gly和Ser二者均是相对未结构化的,并且因此可充当组分之间的中性链(tether)。可使用甘氨酸聚合物;甘氨酸比甚至丙氨酸获得显著更多的phi-psi空间,并且比具有更长侧链的残基的限制少得多。示例性的间隔区可包含氨基酸序列,包括但不限于GGSG(SEQ ID NO:61),GGSGG(SEQ ID NO:62),GSGSG(SEQ ID NO:63),GSGGG(SEQ ID NO:64),GGGSG(SEQ ID NO:65),GSSSG(SEQ ID NO:66)等。接头可包含重复,例如SEQ ID NO:61至66中的一个或更多个的连续重复,例如包含与SEQ ID NO:61至66之一对应的氨基酸序列的接头,重复至少、至多或恰好2、3、4、5、6、7、8、9或10次,或其中可推导出的任何范围。

[0261] 接头可包含(EAAAK)n(SEQ ID NO:67),其中n是至少一的整数。n可至少、至多或恰好为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10(或其中可推导出的任何范围)。

[0262] B.治疗性对照

[0263] 转基因、第一转基因或第二转基因可与治疗性对照共表达。治疗性对照调节细胞增殖,促进细胞选择(例如选择表达本发明的嵌合抗原受体的细胞)或其组合。调节细胞增殖可包含上调细胞增殖以促进细胞增殖。调节细胞增殖可包含下调细胞增殖以减少或抑制细胞增殖。用作治疗性对照的药剂可促进细胞的富集,所述细胞表达可导致治疗性优势的嵌合抗原受体。用作治疗性对照的药剂可与另外的组合物进行生物化学相互作用以调节治疗性对照的功能。例如,EGFRt(治疗性对照)可与西妥昔单抗(cetuximab)进行生物化学相互作用以调节EGFRt在选择、追踪、细胞消融、或其组合中的功能。

[0264] 示例性的治疗性对照包括截短的表皮生长因子受体(truncated epidermal growth factor receptor,EGFRt)、嵌合细胞因子受体(chimeric cytokine receptor,CCR)和/或二羟基叶酸受体(dihydroxyfolate receptor,DHFR)(例如,突变DHFR)。可通过IRES序列或通过编码可切割接头的多核苷酸序列来连接编码CAR和治疗性对照的多核苷酸。构建本发明的CAR,使得其可在细胞中表达,所述细胞继而响应于至少一种与至少一种抗原特异性靶向区相互作用的分子(例如抗原)的存在而增殖。治疗性对照可包含细胞表面蛋白,其中该蛋白缺乏胞内信号传导结构域。预期可使用缺乏胞内信号传导或经修饰(例如通过截短)以缺乏胞内信号传导的任何细胞表面蛋白。治疗性对照的另一些实例包括截短的LNGFR、截短的CD19等,其中截短的蛋白质缺乏胞内信号传导结构域。

[0265] 本文中使用的“共表达”是指两个或更多个基因的同时表达。基因可以是编码例如单个蛋白或作为单个多肽链的嵌合蛋白的核酸。例如,本公开内容的CAR可与治疗性对照(例如,截短的表皮生长因子(EGFRt))共表达,其中CAR由第一多核苷酸链编码并且治疗性对照由第二多核苷酸链编码。第一和第二多核苷酸链可通过编码可切割接头的核酸序列连

接。编码CAR和治疗性控制系统的多核苷酸可通过IRES序列连接。或者,CAR和治疗性对照由不通过接头连接而是由例如两个不同的载体编码的两个不同的多核苷酸编码。此外,本公开内容的CAR可与治疗性对照和CCR、治疗性对照和DHFR(例如突变DHFR)或治疗性对照以及CCR和DHFR(例如突变DHFR)共表达。CAR、治疗性对照和CCR可分别由第一、第二和第三多核苷酸序列共表达并编码,其中第一、第二和第三多核苷酸序列通过IRES序列或编码可切割接头(例如,T2A)的序列连接。或者,这些序列不通过接头连接,而是通过例如不同的载体编码。CAR、治疗性对照和DHFR(例如突变DHFR)可分别由第一、第二和第四多核苷酸序列共表达并编码,其中第一、第二和第四多核苷酸序列通过IRES序列或通过编码可切割接头的序列连接。或者,这些序列不通过接头连接,而是通过例如不同的载体编码。CAR、治疗性对照、CCR和DHFR(例如突变DHFR)可分别由第一、第二、第三和第四多核苷酸序列共表达并编码,其中第一、第二、第三和第四多核苷酸序列通过IRES序列或编码可切割接头的序列连接。或者,这些序列不通过接头连接,而是通过例如不同的载体编码。如果前述序列由不同的载体编码,则这些载体可同时或依次进行转染。

[0266] 本公开内容组合物的治疗性控制、CAR分子和使用方法的另一些方面可见于美国专利No.:9447194,其出于所有目的通过引用并入本文VI.基因转移技术

[0267] A.基因编辑

[0268] 经改造核酸酶可用于将转基因引入到细胞中,例如祖细胞、干细胞、HSPC、ES细胞、iPSC和人胚胎中胚层祖细胞。在细胞被遗传修饰的情况下,例如添加或减少一个或更多个特征,遗传修饰可通过任何合适的方法进行。例如,可使用任何遗传修饰组合物或方法来将外源核酸引入至细胞中或对基因组DNA进行编辑,例如基因编辑、同源重组或非同源重组、RNA介导的遗传递送或任何常规核酸递送方法。基因转移技术可包含靶向整合到细胞的基因组的内源基因座,例如整合到表1中的基因的基因座。遗传修饰方法的一些非限制性实例可包括例如通过CRISPR/CAS9、锌指核酸酶或TALEN技术的基因编辑方法。

[0269] 基因组编辑或用经改造核酸酶的基因组编辑(genome editing with engineered nuclease,GEEN)是一种类型的遗传改造,其中使用经人工改造的核酸酶或“分子剪刀”从基因组中进行DNA的插入、替换或移除。核酸酶在基因组的期望位置处产生特定的双链断裂(double-stranded break,DSB),并通过同源重组(homologous recombination,HR)和非同源末端连接(nonhomologous end-joining,NHEJ)的自然过程阻止修复诱导的断裂的细胞内源机制。

[0270] 非限制性经改造核酸酶包括:锌指核酸酶(zinc finger nuclease,ZFN)、转录激活因子样效应物核酸酶(Transcription Activator-Like Effector Nuclease,TALEN)、CRISPR/Cas9系统和经改造的兆核酸酶重组归巢内切核酸酶(engineered meganuclease re-engineered homing endonuclease)。本领域已知的任何经改造核酸酶均可用于本方法和组合物。

[0271] 遗传分析中的一般实践是,为了理解基因的功能或蛋白质功能,以序列特异性方式干扰基因或蛋白质功能并监测其对生物体的影响。然而,在一些生物体中,难以或不可能进行位点特异性诱变,因此必须使用更多间接方法,例如通过短RNA干扰(siRNA)使目的基因沉默。然而,siRNA的基因破坏可能是可变的和不完整的。用诸如ZFN的核酸酶进行基因组编辑与siRNA不同,因为经改造核酸酶能够改变DNA结合特异性,因此原则上可以切割基因

组中的任何靶位置,并且为通过常规RNAi不可能特异性靶向的基因的内源序列引入修饰。此外,ZFN和TALEN的特异性增强,因为在其靶标部分的识别中需要两个ZFN并随后指向相邻序列。

[0272] 通常在微生物物种中发现的兆核酸酶具有具非常长的识别序列(>14bp)的独特特性,因此使它们天然地非常特异。这可以被利用来在基因组编辑中进行位点特异性DSB;然而,挑战是没有足够的兆核酸酶被已知或可能曾经已知覆盖所有可能的靶序列。为了克服该挑战,已经使用诱变和高通量筛选方法来产生识别独特序列的兆核酸酶变体。另一些人已经能够融合多种兆核酸酶并产生识别新序列的杂合酶。还有一些人试图在被称为合理设计的兆核酸酶的方法中改变兆核酸酶的DNA相互作用氨基酸以设计序列特异性兆核酸酶(美国专利8,021,867B2,其通过引用并入本文)。

[0273] 与例如ZFN的方法相比,兆核酸酶具有在细胞中引起较小毒性的益处,可能是因为更严格的DNA序列识别;然而,构建用于所有可能序列的序列特异性酶是昂贵且耗时的,因为不能从例如ZFN和TALEN的方法利用的组合可能性中受益。因此,具有优点和缺点二者。

[0274] 与兆核酸酶相反,ZFN和TALEN背后的概念更多地基于非特异性DNA切割酶,所述酶然后与特异性DNA序列识别肽如锌指和转录激活物样效应子(TALE)连接。一种方法是找到DNA识别位点和切割位点彼此分离的内切核酸酶,这是限制性酶中不常见的情况。一旦发现这种酶,可以分离其切割部分,这将是非常非特异性的,因为其不具有识别能力。然后可以将该部分与序列识别肽连接,这将导致非常高的特异性。具有这种性质的限制酶的实例是FokI。另外,FokI的优点是需要二聚化来具有核酸酶活性,这意味着特异性显著提高,因为每个核酸酶配偶体识别独特的DNA序列。为了增强这种效应,FokI核酸酶已被改造仅作为异二聚体作用并且具有提高的催化活性。异二聚体功能性核酸酶将避免不需要的同二聚体活性的可能性,因此提高了DSB的特异性。

[0275] 虽然ZFN和TALEN两者的核酸酶部分具有类似的性质,但这些经改造核酸酶之间的差异在于它们的DNA识别肽。ZFN依赖于Cys2-His2锌指,TALEN依赖于TALE。这两种DNA识别肽结构域的特征在于它们在其蛋白质中以组合天然发生。Cys2-His2锌指通常以相距3bp的重复存在,并且在多种核酸相互作用蛋白中如转录因子中以不同组合存在。另一方面,TALE以氨基酸和识别的核苷酸对之间一对一识别比的重复存在。由于锌指和TALE两者以重复模式存在,因此可尝试不同的组合来产生多种序列特异性。锌指在这些术语和方法中已经更加成熟,例如模块化组装(其中与三联体序列相关的锌指连接成一排以覆盖期望序列)、OPEN(肽结构域与三联体核苷酸的低严格性选择,然后是肽组合与细菌系统中的最终靶标的高严格性选择)以及锌指文库的细菌单杂交筛选等方法已用于制备位点特异性核酸酶。

[0276] B.转基因递送

[0277] 载体可构建成包含转基因核酸序列,用于对本文中使用的任何细胞进行遗传修饰,特别是起始细胞,例如诱导分化为成熟细胞的干细胞或祖细胞。以下公开了这些载体的组分和递送方法的细节。

[0278] 细胞可通过在分化之前或之后对细胞进行遗传改造而包含一个或更多个遗传改变(US2002/0168766)。当通过任何合适的人工操作手段将外源核酸或多核苷酸转移到细胞中时,或者当细胞是遗传了多核苷酸的最初改变的细胞的后代时,细胞被称为是“遗传改变的”、“遗传修饰的”或“转基因的”。例如,可以在细胞进展至受限的发育谱系细胞或终末分

化细胞之前或之后通过遗传改变细胞以表达端粒酶逆转录酶来处理细胞以提高其复制潜能(US2003/0022367)。

[0279] C.载体

[0280] 本领域技术人员将能够通过标准重组技术(参见例如Maniatis et al.,1988和Ausubel et al.,1994,二者均通过引用并入本文)很熟练地构建载体。

[0281] 载体还可包含进一步调节基因递送和/或基因表达、或者以其他方式为靶细胞提供有益特性的其他组分或功能。这样的其他组分包括例如影响与细胞结合或靶向的组分(包括介导细胞类型或组织特异性结合的组分);影响细胞对载体核酸的摄取的组分;在摄取之后影响多核苷酸在细胞内的定位的组分(例如介导核定位的试剂);以及影响多核苷酸的表达的组分。

[0282] 这样的组分还可包括标志物,例如可用于检测或选择已经摄取并表达由载体递送之核酸的细胞的可检测标志物和/或选择标志物。这样的组分可作为载体的天然特征提供(例如使用具有介导结合和摄取的组分或功能的某些病毒载体),或者可修饰载体以提供这样的功能。大量这样的载体是本领域已知的并且通常是可获得的。当载体维持在宿主细胞中时,该载体可在有丝分裂期间作为自主结构由细胞稳定复制、并入宿主细胞的基因组中,或者维持在宿主细胞的核或胞质中。

[0283] D.调节元件

[0284] 包含在载体中的真核表达盒特别含有(以5'至3'方向)与蛋白质编码序列可操作地连接的真核转录启动子、包含插入序列的剪接信号和转录终止/聚腺苷酸化序列。

[0285] 1.启动子/增强子

[0286] "启动子"是控制序列,其是控制转录的起始和速率的核酸序列的区域。启动子或增强子可包括来自表1基因的启动子或增强子。其可包含调节蛋白和分子(例如RNA聚合酶和其他转录因子)可结合的遗传元件,以启动核酸序列的特异性转录。短语"有效定位","有效连接"、"在控制下"和"在转录控制下"意指启动子相对于核酸序列处于正确的功能位置和/或取向以控制该序列的转录起始和/或表达。

[0287] 本公开内容的启动子区域可是内源启动子区。内源启动子区是指启动子区处于其内源基因组环境中的情况,使得启动子的序列上游(即5'区)与野生型细胞中的那些基本上相同。基本上相同可以是指与野生型的上游区域具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的区域。内源启动子区还是指启动子与野生型启动子位于相同基因组位置的情况。内源启动子可以是指未经修饰的细胞中的启动子,或者与野生型启动子具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的启动子。

[0288] 启动子通常包含功能是定位RNA合成的起始位点的序列。其最为人知的实例是TATA盒,但在一些缺少TATA盒的启动子(例如如哺乳动物末端脱氧核苷酸转移酶基因的启动子和SV40晚期基因的启动子)中,覆盖起始位点的离散元件本身有助于确定起始位置。另外的启动子元件调节转录起始的频率。通常,这些位于起始位点上游30至110bp的区域,尽管已经显示许多启动子也包含起始位点下游的功能元件。为了使编码序列在启动子的"控制下",将转录阅读框的转录起始位点的5'末端定位于所选择启动子的"下游"(即3')。"上游"启动子刺激DNA的转录并促进编码的RNA的表达。

[0289] 启动子元件之间的间隔通常是柔性的,以使得当该元件相对于彼此倒置或移动时

保持启动子功能。在tk启动子中,启动子元件之间的间隔在活性开始下降之前可提高至相距50bp。根据启动子,显示出各个元件可协作地或独立地发挥功能以激活转录。启动子可与或可不与“增强子”结合使用,“增强子”是指参与核酸序列的转录激活的顺式作用调节序列。

[0290] 2.蛋白酶切割位点/自切割肽和内部核糖体结合位点

[0291] 合适的蛋白酶切割位点和自切割肽是技术人员已知的(参见例如Ryan et al.,1997;Scymczak et al.,2004中)。蛋白酶切割位点的一些实例是以下的切割位点:马铃薯Y病毒(potyvirus)Nla蛋白酶(例如烟草蚀纹病毒蛋白酶)、马铃薯Y病毒HC蛋白酶、马铃薯Y病毒P1(P35)蛋白酶、byovirus Nla蛋白酶、byovirus RNA-2编码的蛋白酶、口蹄疫病毒L蛋白酶、肠病毒2A蛋白酶、鼻病毒2A蛋白酶、细小核糖核酸病毒(picorna)3C蛋白酶、豇豆花叶病毒(comovirus)24K蛋白酶、线虫传多面体病毒(nepovirus)24K蛋白酶、RTSV(稻东格鲁球状病毒(rice tungro spherical virus))3C样蛋白酶、PY\IF(欧防风黄点病毒(parsnip yellow fleck virus))3C样蛋白酶、凝血酶、因子Xa和肠激酶。由于其高切割严格性,可使用TEV(烟草蚀纹病毒)蛋白酶切割位点。

[0292] 示例性的自切割肽(也称为“顺式作用水解元件”,CHYSEL;参见deFelipe(2002))来源于马铃薯Y病毒和心脏病毒2A肽。具体自切割肽可以选自来源于FMDV(口蹄疫病毒)、马鼻炎A病毒,Thoseàasigna病毒和猪捷申病毒(porcine teschovirus)的2A肽。

[0293] 还可使用特定的起始信号来有效翻译多顺反子信息中的编码序列。这些信号包括ATG起始密码子或邻近序列。可能需要提供外源翻译控制信号,包括ATG起始密码子。本领域普通技术人员将能够容易地确定这一点并提供必要的信号。公知的是起始密码子必须与期望编码序列的阅读框“同框”,以确保整个插入物的翻译。外源翻译控制信号和起始密码子可以是天然的或合成的。通过包含适当的转录增强子元件可增强表达效率。

[0294] 内部核糖体进入位点(internal ribosome entry site,IRES)元件的使用可用于产生多基因或多顺反子信息。IRES元件能够绕过5’甲基化帽依赖性翻译的核糖体扫描模型并在内部位点处开始翻译(Pelletier and Sonenberg,1988)。已经描述了来自小核糖核酸病毒科的两个成员(脊髓灰质炎和脑心肌炎)的IRES元件(Pelletier and Sonenberg,1988),以及来自哺乳动物信息的IRES(Macejakand Sarnow,1991)。IRES元件可与异源开放阅读框连接。多个开放阅读框架可以一起转录,每个由IRES分隔开,从而产生多顺反子信息。凭借IRES元件,每个开放阅读框可利用核糖体来进行高效翻译。使用单个启动子/增强子转录单个信息,多基因可有效表达(参见美国专利No.5,925,565和5,935,819,其各自均通过引用并入本文)。

[0295] 3.多克隆位点

[0296] 载体可包含多克隆位点(multiple cloning site,MCS),其是包含多个限制酶位点的核酸区域,其中的任何一个可以与标准重组技术结合用于消化载体(参见例如Carbonelli et al.,1999,Levenson et al.,1998和Cocea,1997,其通过引用并入本文)。“限制酶消化”是指用仅在核酸分子中的特定位置处发挥功能的酶对核酸分子的催化切割。这些限制酶中的许多是可商购的。这样的酶的使用是本领域技术人员广泛理解的。通常,使用在MCS内切割的限制酶将载体线性化或片段化,以使外源序列能够与载体连接。“连接”是指在两个核酸片段之间形成磷酸二酯键的过程,所述两个核酸片段可彼此连续或可彼此不

连续。涉及限制酶和连接反应的技术是重组技术领域的技术人员公知的。

[0297] 4.剪接位点

[0298] 大多数转录的真核生物RNA分子将经历RNA剪接以从初级转录物除去内含子。包含基因组真核序列的载体可能需要供体和/或接受体剪接位点以确保对转录物的正确加工以用于蛋白质表达(参见例如Chandler etal.,1997,其通过引用并入本文)。

[0299] 5.终止信号

[0300] 载体或构建体可包含至少一个终止信号。“终止信号”或“终止子”由参与通过RNA聚合酶的RNA转录物的特异性终止的DNA序列构成。因此,考虑了结束RNA转录物产生的终止信号。终止子可以是在体内必需的以达到期望的信息水平。

[0301] 在真核系统中,终止子区域还可包含允许对新转录物进行位点特异性切割以暴露多腺苷酸化位点的特异性DNA序列。其发出信号使特化的内源聚合酶将一段约200个A残基(polyA)添加至转录物的3’端。用这种polyA尾修饰的RNA分子显示出更稳定并且更有效地翻译。因此,终止子可包含用于RNA切割的信号,并且终止子信号促进信息的多腺苷酸化。终止子和/或多腺苷酸化位点元件可用于增强信息水平并使从盒向其他序列的读数最小化。

[0302] 考虑终止子包括本文中所述或本领域普通技术人员已知的任何已知的转录终止子,包括但不限于例如基因的终止序列,例如如牛生长激素终止子或病毒终止序列,例如如SV40终止子。终止信号可能缺少可转录或可翻译的序列,例如由于序列截短。

[0303] 6.多腺苷酸化信号

[0304] 在表达中,特别是真核表达中,通常包含多腺苷酸化信号以实现转录物的适当多腺苷酸化。不认为多腺苷酸化信号的性质对成功实践是关键的,并且可使用任何这样的序列。一些示例性实施方案包括SV40多腺苷酸化信号或牛生长激素多腺苷酸化信号,方便且已知在多种靶细胞中良好地发挥作用。多腺苷酸化可提高转录物的稳定性或可促进胞质运输。

[0305] E.载体递送

[0306] 在本公开内容的细胞中的遗传修饰或转基因核酸的引入可使用用于核酸递送以转化细胞的任何合适的方法,如本文中所述或如本领域普通技术人员已知的。将基因引入和表达到细胞中的方法是本领域已知的。在表达载体的背景下,可通过本领域中的任何方法将载体容易地引入到宿主细胞,例如哺乳动物、细菌、酵母或昆虫细胞中。例如,表达载体可通过物理、化学或生物手段转移到宿主细胞中。

[0307] 这样的方法包括但不限于直接递送DNA,例如通过离体转染(Wilson et al.,1989,Nabel et al,1989);通过注射(美国专利No.5,994,624,5,981,274,5,945,100,5,780,448,5,736,524,5,702,932,5,656,610,5,589,466和5,580,859,其各自通过引用并入本文),包括显微注射(Harland and Weintraub,1985;美国专利No.5,789,215,其通过引用并入本文);通过电穿孔(美国专利No.5,384,253,其通过引用并入本文;Tur-Kaspa et al.,1986;Potter et al.,1984);通过磷酸钙沉淀(Graham and Van Der Eb,1973;Chen and Okayama,1987;Rippe et al.,1990);通过使用DEAE-右旋糖酐随后是聚乙二醇(Gopal,1985);通过直接声波加载(Fechheimer et al.,1987);通过脂质体介导的转染(Nicolau and Sene,1982;Fraley et al.,1979;Nicolau et al.,1987;Wong et al.,1980;Kaneda et al.,1989;Kato et al.,1991)和受体介导的转染(Wu and Wu,1987;Wu

and Wu,1988);通过微粒轰击(PCT申请No.WO 94/09699和95/06128;美国专利5,610,042;5,322,783 5,563,055,5,550,318,5,538,877和5,538,880,并且其各自通过引用并入本文);通过用碳化硅纤维搅拌(Kaeppler et al.,1990;美国专利No.5,302,523和5,464,765,其各自通过引用并入本文);通过农杆菌(Agrobacterium)介导的转化(美国专利No.5,591,616和5,563,055,其各自通过引用并入本文);通过PEG介导的原生质体转化(Omirulleh et al.,1993;美国专利No.4,684,611和4,952,500,其各自通过引用并入本文);通过干燥/抑制介导的DNA摄取(Potrykus et al.,1985),以及这样的方法的任意组合。通过应用例如这些的技术,细胞器、细胞、组织或生物体可被稳定或瞬时转化。

[0308] 用于将多核苷酸引入到宿主细胞中的物理方法包括磷酸钙沉淀、脂质体转染、粒子轰击、显微注射、电穿孔等。用于产生包含载体和/或外源核酸的细胞的方法是本领域公知的(参见例如Sambrook et al.(2001)Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,New York)。用于将多核苷酸引入到宿主细胞中的一种说明性而非限制性的方法是磷酸钙转染。

[0309] 用于将目的多核苷酸引入到宿主细胞中的生物学方法可包括使用DNA和RNA载体。病毒载体并且尤其是反转录病毒载体已成为用于将基因插入到哺乳动物(例如人)细胞中的最广泛使用的方法。其他病毒载体可来源于慢病毒、痘病毒、单纯疱疹病毒I、腺病毒和腺相关病毒等(参见例如美国专利No.5,350,674和5,585,362等)。

[0310] 用于将多核苷酸引入到宿主细胞中的化学方法包括胶体分散体系,例如大分子复合物、纳米胶囊、微球、珠和基于脂质的体系,包括水包油乳液、胶束、混合胶束和脂质体。用作体外和体内递送载剂的说明性胶体体系是脂质体(例如,人工膜囊泡)。

[0311] 1.脂质体介导的转染

[0312] 在使用非病毒递送系统的情况下,一种说明性递送载剂是脂质和/或脂质体。考虑使用脂质制剂将核酸引入到宿主细胞(体外、离体或体内)中。核酸可与脂质缔合。与脂质缔合的核酸可封装在脂质体的水性内部中,散布在脂质体的脂质双层内,通过与脂质体和寡核苷酸二者缔合的连接分子与脂质体连接,包埋在脂质体中、与脂质体复合、分散在含有脂质的溶液中、与脂质混合、与脂质组合、作为悬浮剂包含在脂质中、包含或与胶束复合、或以其他方式与脂质缔合。脂质、脂质/DNA或脂质/表达载体相关的组合物不限于溶液中的任何特定结构。例如,它们可以以双层结构存在,如胶束,或具有“塌陷”结构。它们也可能简单地散布在溶液中,可能形成尺寸或形状不均匀的聚集体。脂质是脂肪物质,其可以是天然存在的或合成的脂质。例如,脂质包括天然存在于胞质中的脂肪滴以及含有长链脂肪族烃及其衍生物的一类化合物,例如脂肪酸、醇、胺、氨基醇和醛。

[0313] 核酸可包埋在脂质复合物(例如如脂质体)中。脂质体是以磷脂双层膜和内部水性介质为特征的囊状结构。多层脂质体具有通过水性介质分开的多个脂质层。当磷脂悬浮在过量的水溶液中时,它们自发形成。在封闭结构形成之前脂质组分经历自身重排,并在脂质双层之间包埋水和溶解的溶质(Ghosh and Bachhawat,1991)。还考虑了与Lipofectamine(Gibco BRL)或Superfect(Qiagen)复合的核酸。所使用脂质体的量可根据脂质体的性质以及使用的细胞而变化,例如,可考虑每1至1,000万个细胞约5至约20μg载体DNA。

[0314] 脂质体介导的核酸递送和外来DNA的体外表达已经非常成功(Nicolau and Sene,1982;Fraley et al.,1979;Nicolau et al.,1987)。还已经证明了培养的鸡胚、HeLa和肝

癌细胞中外来DNA的脂质体介导的递送和表达的可行性(Wong et al.,1980)。

[0315] 脂质体可与血凝病毒(HVJ)复合。已显示这有助于与细胞膜融合并促进脂质体包封的DNA进入细胞(Kaneda et al.,1989)。脂质体可与核非组蛋白染色体蛋白(HMG-1)复合或联合使用(Kato et al.,1991)。脂质体可与HVJ和HMG-1二者复合或联合使用。递送载剂可包含配体和脂质体。

[0316] 适合使用的脂质可以从商业来源获得。例如,二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱("DMPC(dimyristyl phosphatidylcholine)")可从Sigma,St.Louis,Mo.获得;磷酸二鲸蜡酯("DCP(dicetyl phosphate)")可从K&K实验室(Plainview,N.Y.)获得;胆固醇("Choi(cholesterol)")可从Calbiochem-Behring获得;二肉豆蔻酰磷脂酰甘油("DMPG(dimyristyl phosphatidylglycerol)")和其他脂质可从Avanti Polar Lipids,Inc.(Birmingham,Ala.)获得。脂质在氯仿或氯仿/甲醇中的储备溶液可储存在约-20℃下。氯仿可作为唯一的溶剂使用,因为其比甲醇更容易蒸发。"脂质体"是通用术语,其涵盖通过产生封闭的脂双层或脂质聚集体而形成的多种单一和多层脂质载剂。脂质体可表征为具有有磷脂双层膜和内部水性介质的囊泡结构。多层脂质体具有通过水性介质分开的多个脂质层。当磷脂混悬在过量的水溶液中时,它们自发形成。在封闭结构形成之前脂质组分经历自身重排,并且在脂质双层之间包埋水和溶解的溶质(Ghosh et al.(1991)Glycobiology 5:505-510)。然而,还涵盖在溶液中具有与正常囊泡结构不同的结构的组合物。例如,脂质可呈现(assume)胶束结构,或者仅作为脂质分子的非均匀聚集体而存在。还考虑了lipofectamine-核酸复合物。

[0317] 2.电穿孔

[0318] 通过电穿孔将核酸引入到细胞中。电穿孔涉及将细胞和DNA的混悬液暴露于高压放电。可使接受者细胞更易受通过机械伤害的转化的影响。所使用载体的量也可根据使用的细胞的性质而变化,例如,可考虑每1至1,000万个细胞约5至约20μg载体DNA。

[0319] 使用电穿孔转染真核细胞已经相当成功。已经以这种方式用人κ免疫球蛋白基因转染了小鼠前B淋巴细胞(Potter et al.,1984),并且用氯霉素乙酰转移酶基因转染了大鼠肝细胞(Tur-Kaspa et al.,1986)。

[0320] 3.磷酸钙

[0321] 使用磷酸钙沉淀可将核酸引入至细胞。已使用这种技术用腺病毒5DNA转染了人KB细胞(Graham and Van Der Eb,1973)。同样以这种方式,用新霉素标志物基因转染了小鼠L(A9)、小鼠C127、CHO、CV-1、BHK、NIH3T3和HeLa细胞(Chen and Okayama,1987),并用多种标志物基因转染了大鼠肝细胞(Rippe et al.,1990)。

[0322] 4.DEAE-右旋糖酐

[0323] 使用DEAE-右旋糖酐随后是聚乙二醇可将核酸递送到细胞中。以这种方式,将报道质粒引入到小鼠骨髓瘤和红白血病细胞中(Gopal,1985)。VII.可选择或可筛选标志物

[0324] 无论用于将外源核酸引入到宿主细胞中或以其他方式将细胞暴露于本公开内容的抑制剂的方法如何,为了确认宿主细胞中重组DNA序列的存在,可进行多种测定。这样的测定包括例如本领域技术人员公知的"分子生物学"测定,例如Southern和Northern印迹、RT-PCR和PCR;"生物化学"测定,例如如通过免疫学方式(ELISA和Western印迹)或通过本文中所述的测定来检测特异性肽的存在或不存在,以鉴定落入本公开内容范围内的药剂。

[0325] 包含外源核酸的细胞可通过在表达载体或外源核酸中包含标志物而被体外或体内鉴定。这样的标志物会赋予细胞以可鉴定变化,从而允许容易地鉴定包含表达载体的细胞。一般而言,选择标志物可以是赋予允许选择的特性的标志物。阳性选择标志物可以是其中标志物的存在允许其选择的标志物,而阴性选择标志物是其中其存在阻止其选择的标志物。阳性选择标志物的一个实例是药物抗性标志物。

[0326] 通常包含药物选择标志物有助于转化体的克隆和鉴定,例如赋予针对新霉素、嘌呤霉素、潮霉素、DHFR、GPT、博来霉素(zeocin)和组氨醇之抗性的基因是有用的选择标志物。除赋予允许基于条件的实施来区分转化体的表型的标志物之外,其他类型的标志物(包括可筛选标志物,例如GFP,其基于比色分析)也在考虑之内。或者,可利用可筛选酶作为阴性选择标志物,例如单纯疱疹病毒胸苷激酶(thymidine kinase,tk)或氯霉素乙酰转移酶(chloramphenicol acetyltransferase,CAT)。本领域技术人员也知道如何使用免疫学标志物,可以与FACS分析联合使用。所使用的标志物不被认为是重要的,只要其能够与编码基因产物的核酸同时表达即可。选择标志物和可筛选标志物的另一些实例对于本领域技术人员而言是公知的。

[0327] 可选择标志物可包括实验室微生物学、分子生物学和遗传改造中使用的报道基因类型,以指示转染或旨在将外来DNA引入到细胞中的其他操作的成功。可选择标志物通常是抗生素抗性基因;使已进行引入外来DNA的操作的细胞在包含抗生素的培养基上生长,并且可以生长的这些细胞已经成功地摄取并表达引入的遗传物质。可选择标志物的一些实例包括:来自Tn5的Abicr基因或Neo基因,其赋予针对遗传霉素的抗生素抗性。

[0328] 可筛选标志物可包含报道基因,其允许研究者区分期望的细胞与不期望的细胞。可利用报道基因来指示特定细胞谱系。例如,报道基因可位于表达元件内并且在通常与心室或心房选择性基因的编码区相关的心室或心房选择性调节元件的控制下以同时表达。报道子允许分离特定谱系的细胞而不将其置于药物或其他选择性压力下或以其他方式危害细胞生存力。

[0329] 这样的报道子的一些实例包括编码细胞表面蛋白(例如CD4、HA表位)、荧光蛋白、抗原决定簇和酶(例如β-半乳糖苷酶)的基因。包含载体的细胞可通过例如FACS使用针对细胞表面蛋白的带荧光标签抗体或可通过载体编码的酶转化为荧光产物的底物来分离。

[0330] 报道基因可以是荧光蛋白。已经开发了宽范围的荧光蛋白遗传变体,其特征在于横跨几乎整个可见光谱的荧光发射光谱分布。在原始维多利亚多管发光水母(Aequorea victoria)水母绿色荧光蛋白中的诱变努力已经产生新的荧光探针,其范围从蓝色到黄色,并且是生物研究中最广泛使用的体内报道分子中的一些。已经从海葵(marine anemone)、Discosoma striata和属于珊瑚动物纲(Anthozoa)类别的珊瑚礁开发了波长更长的荧光蛋白,其在橙色和红色光谱区域内发射。还开发了其他物种来产生具有青色、绿色、黄色、橙色和深红色荧光发射的类似蛋白。目前正在进行开发性研究努力以提高荧光蛋白的亮度和稳定性,由此提高其整体有用性。

[0331] VIII.细胞培养条件

[0332] 可为本文中所述的3D细胞聚集体的培养和包含转基因的成熟细胞的产生提供细胞培养条件。所选择群体的起始细胞可包含至少或约10^4、10^5、10^6、10^7、10^8、10^9、10^{10}、10^{11}、10^{12}、10^{13}个细胞或其中可推导出的任何范围。起始细胞群的接种密度可为至少或约10、10^1、

10^2、10^3、10^4、10^5、10^6、10^7、10^8个细胞/ml,或其中可推导出的任何范围。

[0333] A.培养基

[0334] 可在产生表达转基因的成熟细胞的过程的任何阶段,在特定的培养基中培养细胞。细胞可以以适于递送至接受体而无有害作用的这样的方式配制。

[0335] 培养基可使用用于培养动物细胞的培养基作为其基础培养基来制备,例如以下中的任一种:AIM V、X-VIVO-15、NeuroBasal、EGM2、TeSR、BME、BGJb、CMRL 1066、Glasgow MEM、经改良MEM锌选择、IMDM、培养基199、Eagle MEM、αMEM、DMEM、Ham、RPMI-1640和Fischer培养基,及其任意组合,但是培养基可不特别限于此,只要其可用于培养动物细胞即可。特别地,培养基可以是无异源的或是化学限定的。

[0336] 培养基可以是含血清培养基或无血清培养基或无异源培养基。从阻止异源动物来源组分污染的角度来看,血清可与干细胞来源于同一动物。无血清培养基是指不具有未经加工或未经纯化血清的培养基,并且因此可包括具有经纯化血液来源组分或动物组织来源组分(例如生长因子)的培养基。

[0337] 培养基可包含或可不包含血清的任何替代品。血清的替代品可包括这样的物质:其适当地包含白蛋白(例如富含脂质的白蛋白、牛白蛋白、白蛋白替代物例如重组白蛋白或人源化白蛋白、植物淀粉、右旋糖酐和蛋白质水解物)、转铁蛋白(或其他铁转运蛋白)、脂肪酸、胰岛素、胶原前体、微量元素、2-巯基乙醇、3'-硫代甘油(3'-thiolgiycerol),或其等同物。血清的替代品可通过例如国际公开No.98/30679中公开的方法制备(其整体并入本文)。或者,可使用任何可商购获得的物质以获得更多便利。可商购获得的物质包括敲除血清替代品(knockout Serum Replacement,KSR)、化学限定的脂质浓缩物(Gibco)和Glutamax(Gibco)。

[0338] 培养基可以是适合于细胞发育的无血清培养基。例如,培养基可包含以有效地由3D细胞聚集体产生T细胞的浓度的B-27®补充剂、无异源B-27®补充剂(可在万维网thermofisher.com/us/en/home/technical-resources/media-formulation.250.html获得)、NS21补充剂(Chen et al.,J Neurosci Methods,2008Jun 30;171(2):239-247,其整体并入本文)、GS21TM补充剂(可在万维网amsbio.com/B-27.aspx获得),或其组合。

[0339] 培养基可包含以下中的一、二、三、四、五、六、七、八、九、十、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20种或更多种:维生素例如生物素;DLα生育酚乙酸酯;DLα-生育酚;维生素A(乙酸酯);蛋白质例如BSA(牛血清白蛋白)或人白蛋白;脂肪酸游离级分V;过氧化氢酶;人重组胰岛素;人转铁蛋白;超氧化物歧化酶;其他组分例如皮质酮、D-半乳糖、乙醇胺HCl、谷胱甘肽(还原型)、L-肉碱HCl、亚油酸、亚麻酸、孕酮、腐胺2HCl、亚硒酸钠、和/或T3(三碘-I-甲腺原氨酸)。

[0340] 培养基还可包含维生素。培养基可包含以下中的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或13种(和其中可推导出的任何范围):生物素、DLα生育酚乙酸酯、DLα-生育酚、维生素A、氯化胆碱、泛酸钙、泛酸、叶酸烟酰胺、吡哆醇、核黄素、硫胺、肌醇、维生素B12,或者培养基包含其组合或其盐。培养基可包含以下或基本上由以下组成:生物素、DLα生育酚乙酸酯、DLα-生育酚、维生素A、氯化胆碱、泛酸钙、泛酸、叶酸烟酰胺、吡哆醇、核黄素、硫胺、肌醇和维生素B12。维生素可包含以下或基本上由以下组成:生物素、DLα生育酚乙酸酯、DLα-生育酚、维生素A,或其组合或其盐。培养基还可包含蛋白质。蛋白质可包含白蛋白或牛血清白蛋白、人白

蛋白的级分、过氧化氢酶、胰岛素、转铁蛋白、超氧化物歧化酶,或其组合。培养基还可包含以下中的一种或更多种:皮质酮、D-半乳糖、乙醇胺、谷胱甘肽、L-肉碱、亚油酸、亚麻酸、孕酮、腐胺、亚硒酸钠或三碘-I-甲腺原氨酸,或其组合。培养基可包含以下中的一种或更多种:B-27®补充剂、无异源B-27®补充剂、GS21TM补充剂,或其组合。培养基可包含或还包含氨基酸、单糖、无机离子。氨基酸可包含精氨酸、半胱氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、谷氨酰胺、苯丙氨酸、苏氨酸、色氨酸、组氨酸、酪氨酸或缬氨酸,或其组合。无机离子可包含钠、钾、钙、镁、氮或磷,或其组合或其盐。培养基还可包含以下中的一种或更多种:钼、钒、铁、锌、硒、铜或锰,或其组合。培养基可包含一种或更多种本文中讨论的维生素和/或一种或更多种本文中讨论的蛋白质和/或以下中的一种或更多种,或者基本上由其组成:皮质酮、D-半乳糖、乙醇胺、谷胱甘肽、L-肉碱、亚油酸、亚麻酸、孕酮、腐胺、亚硒酸钠、或三碘-I-甲腺原氨酸、B-27®补充剂、无异源B-27®补充剂、GS21TM补充剂、氨基酸(例如精氨酸、半胱氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、谷氨酰胺、苯丙氨酸、苏氨酸、色氨酸、组氨酸、酪氨酸或缬氨酸)、单糖、无机离子(例如钠、钾、钙、镁、氮和/或磷)或其盐、和/或钼、钒、铁、锌、硒、铜或锰。

[0341] 培养基可包含外部添加的抗坏血酸。培养基还可包含一种或更多种外部添加的脂肪酸或脂质、氨基酸(例如非必需氨基酸)、维生素、生长因子、细胞因子、抗氧化剂物质、2-巯基乙醇、丙酮酸、缓冲剂、和/或无机盐。

[0342] 一种或更多种培养基组分可以以下浓度添加:至少、至多或约0.1、0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、180、200、250ng/L、ng/ml、μg/ml、mg/ml,或其中可推导出的任何范围。

[0343] 所使用培养基可以补充有至少一种以下浓度的外部添加的细胞因子:约0.1ng/mL至约500ng/mL,更特别地1ng/mL至100ng/mL,或至少、至多或约0.1、0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、180、200、250ng/L、ng/ml、μg/ml、mg/ml,或可从其中来源的任何范围。合适的细胞因子包括但不限于FLT3配体(FLT3L)、白介素7(IL-7)、干细胞因子(SCF)、促血小板生成素(TPO)、IL-2、IL-4、IL-6、IL-15、IL-21、TNF-α、TGF-β、干扰素γ、干扰素-λ、TSLP、胸腺五肽、多效营养因子和/或中期因子。特别地、培养基可以包含FLT3L和IL-7中的至少一种。更特别地、培养物可以包含FLT3L和IL-7二者。

[0344] 另一些培养条件可以适当地限定。例如,培养温度可以为约20℃至40℃,例如至少、至多或约20℃、21℃、22℃、23℃、24℃、25℃、26℃、27℃、28℃、29℃、30℃、31℃、32℃、33℃、34℃、35℃、36℃、37℃、38℃、39℃、40℃(或可从其中来源的任何范围),但是温度可以高于或低于这些值。CO_2浓度可以为约1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%或10%(或其中可推导出的任何范围),例如约2%至10%,例如约2%至5%,或其中可推导出的任何范围。氧张力可以是至少或约1%、5%、8%、10%、20%或其中可推导出的任何范围。

[0345] B.培养容器

[0346] 用于培养细胞和/或3D细胞聚集体或其子代细胞的培养容器可以包括但特别地不限于:瓶、用于组织培养的瓶、皿、培养皿、用于组织培养的皿、多皿、微板、微孔板、多板、多孔板、微载片、室载片、管、托盘、CellSTACK®室、培养袋和滚瓶,只要其能够在其中培养干细胞即可。干细胞可以以以下体积培养:至少或约0.2、0.5、1、2、5、10、20、30、40、50ml、

100ml、150ml、200ml、250ml、300ml、350ml、400ml、450ml、500ml、550ml、600ml、800ml、1000ml、1500ml,或可从其中来源的任何范围,这取决于培养的需求。培养容器可以是生物反应器,其可以是指支持生物活性环境的任何装置或系统。生物反应器的体积可以为至少或约2、4、5、6、8、10、15、20、25、50、75、100、150、200、500升,1、2、4、6、8、10、15立方米,或其中可推导出的任何范围。

[0347] 培养容器可以具有细胞黏附性或不具有细胞黏附性,并且根据目的进行选择。细胞黏附性培养容器可以涂覆有任何用于细胞黏附的物质,例如胞外基质(ECM)以改善血管表面与细胞的黏附性。用于细胞黏附的基底可以是意图用于附着干细胞或饲养细胞(如果使用的话)的任何材料。用于细胞黏附的基底包括胶原、明胶、多聚-L-赖氨酸、多聚-D-赖氨酸、层黏连蛋白和纤连蛋白及其混合物,例如Matrigel™,以及裂解的细胞膜制备物。

[0348] C.基质组分

[0349] 多种确定的基质组分可以用于培养方法或组合物中。例如,可使用组合的重组胶原IV、纤连蛋白、层黏连蛋白和玻连蛋白来涂覆培养表面,作为向多能细胞生长提供固体支持物的手段,如Ludwig et al.(2006a;2006b)中所述的,其通过引用整体并入。

[0350] 基质组合物可以固定在表面上以提供对细胞的支持。基质组合物可以包含一种或更多种胞外基质(ECM)蛋白和水性溶剂。术语“胞外基质”在本领域中是公认的。其组分包含一种或更多种以下蛋白质:纤连蛋白、层黏连蛋白、玻连蛋白、腱生蛋白、触觉蛋白、血小板反应蛋白、弹性蛋白、明胶、胶原、原纤蛋白、分区蛋白、锚定蛋白、软骨黏连蛋白、连接蛋白、骨涎蛋白、骨钙蛋白、骨桥蛋白、epinectin、透明质黏连蛋白(hyaluronectin)、波动蛋白(undulin)、表皮整联配体蛋白和缰蛋白(kalinin)。另一些胞外基质蛋白描述于Kleinman et al,(1993)中,其通过引用并入本文。预期,术语“胞外基质”涵盖将来可能发现的目前未知的胞外基质,因为其作为胞外基质的表征将容易地由本领域技术人员确定。

[0351] 基质组合物中的总蛋白质浓度可为约1ng/mL至约1mg/mL。基质组合物中的总蛋白质浓度可为约1μg/mL至约300μg/mL。基质组合物中的总蛋白质浓度可为约5μg/mL至约200μg/mL。

[0352] 胞外基质(ECM)蛋白可以是天然来源的并且从人组织或动物组织中纯化。或者,ECM蛋白可以是经遗传改造的重组蛋白或是天然合成的。ECM蛋白可以是完全蛋白或者以天然或经改造的肽片段的形式。可用于细胞培养的基质的ECM蛋白的一些实例包括层黏连蛋白、胶原I、胶原IV、纤连蛋白和玻连蛋白。基质组合物可包含合成产生的纤连蛋白或重组纤连蛋白的肽片段。

[0353] 基质组合物可包含至少纤连蛋白和玻连蛋白的混合物。基质组合物可包含层黏连蛋白。

[0354] 基质组合物优选地包含单一类型的胞外基质蛋白。基质组合物可包含纤连蛋白,特别地用于培养造血干细胞或祖细胞。例如,合适的基质组合物可以通过将人纤连蛋白在Dulbecco磷酸缓冲盐水(Dulbecco's phosphate buffered saline,DPBS)中稀释至蛋白质浓度为5μg/mL至约200μg/mL来制备,所述人纤连蛋白例如由Franklin Lakes,N.J.(BD)的Becton,Dickinson&Co.销售的人纤连蛋白(目录号354008)。在一个具体实例中,基质组合物包含纤连蛋白片段,例如RetroNectin®。RetroNectin®是约63kDa的蛋白质(574个氨基酸),其包含中心细胞结合结构域(III型重复,8、9、10)、高亲和力肝素结合结构域II(III

型重复,12、13、14)和人纤连蛋白的选择性剪接IIICS区内的CS1位点。

[0355] 基质组合物可包含层黏连蛋白。例如,合适的基质组合物可以通过将层黏连蛋白(Sigma-Aldrich(St.Louis,Mo.);目录号L6274和L2020)在Dulbecco磷酸缓冲盐水(DPBS)中稀释至蛋白质浓度为5μg/ml至约200μg/ml来制备。

[0356] 基质组合物可以是无异源的,即基质或其组分蛋白仅仅是人来源的。这对某些研究应用可能是期望的。例如,在培养人细胞的无异源基质中,可以使用人来源的基质组分,其中可以排除任何非人动物组分。Matrigel™可作为基底从培养组合物中排除。Matrigel™是由小鼠肿瘤细胞分泌的凝胶状蛋白质混合物,并且可从BD Biosciences(New Jersey,USA)商购获得。该混合物类似于见于许多组织中的复杂胞外环境,并且经常被细胞生物学家用作细胞培养的基底,但是其可能引入不期望的异源抗原或污染物。

[0357] IX.细胞培养组合物和方法

[0358] 3D培养组合物例如人工胸腺类器官(artificial thymic organoid,ATO)是用于从多能起始细胞来源体外产生成熟细胞的经优化、高效且高度可重现的现成解决方案。3D培养组合物可使用无血清条件,避免使用人胸腺组织或专有支架材料,并且有利于来自干细胞的完全功能性成熟人细胞(例如成熟人T细胞和NK细胞)的阳性选择和稳健产生。作为体外细胞发育的潜在商业化平台,与竞争性技术相比,3D培养组合物提供了效率、可重复性、可扩展性以及降低的成本和劳动力。非限制性商业化应用可包括人细胞发育的体外实验建模,以及从多种干细胞来源体外产生经改造靶向抗原的细胞和/或转基因表达细胞,其可用于细胞治疗,例如用于治疗癌症和自身免疫病症的免疫治疗。

[0359] 还提供了用于体外产生功能性成熟细胞的经优化三维(three-dimensional,3D)培养系统。所得细胞3D结构可被称为人工胸腺类器官(ATO)。

[0360] 该系统可包含在存在包含FLT3配体(FLT3L)、白介素7(IL-7)、B27和抗坏血酸的经优化培养基的情况下,使PSC与表达Notch配体的基质细胞以3D结构聚集。也可存在允许在气-液界面培养的条件。

[0361] 还提供了如所开发的3D培养组合物的方法(例如ATO生产),其涉及将经人DLL4转导的MS-5鼠基质细胞系(下文称为MS5-hDLL4)与从人脐带血、骨髓、全血样品或外周血单个核细胞(PBMC)中分离的干细胞或祖细胞和/或$CD34^+$PSC聚集。将多至1×10^6个干细胞或祖细胞和/或$CD34^+$PSC与MS5-hDLL4细胞以经优化的比率混合(HSPC:基质细胞通常为1:10)。

[0362] 例如,聚集通过将混合的细胞悬液离心(“压实聚集”),随后抽吸无细胞上清液来实现。然后,可将细胞沉淀物作为浆液抽吸在5至10μl的分化培养基中并作为液滴转移到0.4μm尼龙transwell培养插入物上,所述插入物漂浮在分化培养基的孔中,使得插入物的底部与培养基接触,并且顶部与空气接触。

[0363] 例如,分化培养基由RPMI-1640、5ng/ml人FLT3L、5ng/ml人IL-7、4%无血清B27补充剂和30μM L-抗坏血酸构成。培养插入物周围可以每3至4天完全更换培养基。方案的变化允许使用对效力具有不同影响的替代组分,具体地:基础培养基RPMI可以替换成数种可商购获得的替代物(例如IMDM)。所使用的基质细胞系是先前描述的鼠骨髓细胞系MS-5(Itoh et al,1989),然而MS-5可以替换成类似的鼠基质细胞系(例如OP9、S17)、人基质细胞系(例如HS-5、HS-27a)、原代人基质细胞或人多能干细胞来源的基质细胞。

[0364] 基质细胞系用编码人DLL4 cDNA的慢病毒转导;然而,基因递送的方法以及Notch

配体基因可以变化。替代的Notch配体基因包括DLL1、JAG1、JAG2等。Notch配体还包括在美国专利7795404和8377886中描述的那些,其通过引用并入本文。Notch配体还包括δ1、3和4以及Jagged1、2。Notch配体还包括Notch配体的功能片段。PSC的类型和来源可包括骨髓、全血、脐带血、外周血、外周血单个核细胞或胸腺,或者PSC或造血干细胞或祖细胞可在体外从胚胎干细胞(ESC)或诱导多能干细胞(iPSC)分化而来。来自原代组织或ESC或iPSC的PSC或造血干细胞或祖细胞可来源于人或非人动物(例如小鼠)。

[0365] X.疾病治疗

[0366] 方法可用于对于这样的疾病的测试呈阳性或被认为处于发生这样的病症或相关病症风险之中的个体。本文中所述的组合物和方法可用于治疗本文中列举的和/或本领域已知的疾病的炎性或自身免疫组分。

[0367] 本公开内容涉及癌症的治疗和/或癌症抗原的使用。待治疗的癌症或抗原可以是与本领域已知的任何癌症相关的抗原,或例如:上皮癌(例如乳腺癌、胃肠癌、肺癌)、前列腺癌、膀胱癌、肺(例如小细胞肺)癌、结肠癌、卵巢癌、脑癌、胃癌、肾细胞癌、胰腺癌、肝癌、食管癌、头颈癌或结直肠癌。待治疗的癌症或抗原可来自以下癌症之一:腺皮质癌、原因不明的髓样化生、AIDS相关癌症(例如AIDS相关淋巴瘤)、肛门癌、阑尾癌、星形细胞瘤(例如小脑和脑)、基底细胞癌、胆管癌(例如肝外)、膀胱癌、骨癌、(骨肉瘤和恶性纤维组织细胞瘤)、脑瘤(例如胶质瘤、脑干胶质瘤、小脑或大脑星形细胞瘤(例如毛细胞性星形细胞瘤、弥漫性星形细胞瘤、间变性(恶性)星形细胞瘤)、恶性胶质瘤、室管膜瘤、少突神经胶质瘤(oligodenglioma)、脑脊膜瘤、脑脊膜肉瘤(meningiosarcoma)、颅咽管瘤、成血管细胞瘤(haemangioblastomas)、成神经管细胞瘤、幕上原始神经外胚层肿瘤、视觉通路和下丘脑胶质瘤和成胶质细胞瘤)、乳腺癌、支气管腺癌/类癌、类癌肿瘤(例如胃肠类癌肿瘤)、未知原发癌、中枢神经系统淋巴瘤、宫颈癌、结肠癌、结直肠癌、慢性骨髓增殖性疾病、子宫内膜癌(例如子宫癌)、室管膜瘤、食管癌、尤因家族肿瘤(Ewing'sfamily of tumor)、眼癌(例如眼内黑素瘤和视网膜母细胞瘤)、胆囊癌、胃(胃部)癌、胃肠类癌肿瘤、胃肠道间质瘤(gastrointestinal stromal tumor,GIST)、生殖细胞瘤(例如颅外、性腺外、卵巢)、妊娠滋养细胞肿瘤、头颈癌、肝细胞(肝)癌(例如hepatic carcinoma和heptoma)、下咽癌、岛细胞癌(内分泌胰腺)、喉癌、喉癌、白血病、唇和口腔癌症、口腔癌、肝癌、肺癌(例如小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌和肺鳞状癌)、淋巴样赘生物(例如淋巴瘤)、成神经管细胞瘤、卵巢癌、间皮瘤、转移性鳞状颈癌、口癌、多发性内分泌瘤形成综合征、骨髓增生异常综合征、骨髓增生异常/骨髓增殖性疾病、鼻腔和鼻旁窦癌、鼻咽癌、神经母细胞瘤、神经内分泌癌、口咽癌、卵巢癌(例如卵巢上皮癌、卵巢生殖细胞瘤、卵巢低度恶性潜在肿瘤)、胰腺癌、甲状旁腺癌、阴茎癌、腹膜癌、咽癌、嗜铬细胞瘤、松果体母细胞瘤和幕上原始神经外胚层肿瘤、垂体瘤、胸膜肺母细胞瘤、淋巴瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤(小胶质细胞瘤)、肺淋巴管肌瘤病、直肠癌、肾癌、肾盂和输尿管癌(移行细胞癌)、横纹肌肉瘤、唾液腺癌、皮肤癌(例如非黑素瘤(例如鳞状细胞癌)、黑素瘤和梅克尔细胞癌(Merkel cell carcinoma))、小肠癌、鳞状细胞癌、睾丸癌、喉癌、胸腺瘤和胸腺癌、甲状腺癌、结节性硬化症、尿道癌、阴道癌、外阴癌、维尔姆斯瘤(Wilms'tumor)和移植后淋巴增殖性疾病(post-transplant lymphoproliferative disorder,PTLD)、与瘢痣病(phakomatoses)相关的异常血管增生、水肿(例如与脑瘤相关)或梅格斯综合征(Meigs'syndrome)。

[0368] 本公开内容涉及自身免疫病症的治疗和/或自身免疫相关抗原的使用。待治疗的自身免疫疾病或抗原可以是与本领域已知的任何自身免疫病症或例如以下相关的抗原:糖尿病、移植物排斥、GVHC、关节炎(类风湿性关节炎例如急性关节炎、慢性类风湿性关节炎、痛风或痛风性关节炎、急性痛风性关节炎、急性免疫性关节炎、慢性炎性关节炎、退行性关节炎、II型胶原诱导的关节炎、感染性关节炎、莱姆关节炎(Lyme arthritis)、增生性关节炎、银屑病关节炎、斯蒂尔病(Still's disease)、椎骨关节炎和青少年型类风湿性关节炎、骨关节炎、慢性进行性关节炎(arthritis chronica progrediente)、变形性关节炎、原发性慢性多发性关节炎(polyarthritis chronica primaria)、反应性关节炎和强直性脊柱炎)、炎性过度增殖性皮肤病,银屑病例如斑块状银屑病、滴状银屑病(gutatte psoriasis)、脓疱性银屑病和指甲银屑病,特应性包括特应性疾病如枯草热和乔布综合征(Job'ssyndrome),皮炎包括接触性皮炎、慢性接触性皮炎、剥脱性皮炎、过敏性皮炎、过敏性接触性皮炎、疱疹样皮炎、钱币状皮炎、脂溢性皮炎、非特异性皮炎、原发性刺激性接触性皮炎和特应性皮炎,x-连锁高IgM综合征,变应性眼内炎性疾病,荨麻疹例如慢性变应性荨麻疹和慢性特发性荨麻疹,包括慢性自身免疫性荨麻疹,肌炎、多肌炎/皮肌炎、幼年型皮肌炎、中毒性表皮坏死松解症,硬皮病(包括系统性硬皮病),硬化,例如系统性硬化、多发性硬化(multiple sclerosis,MS)如脊髓-眼MS、原发进行性MS(PPMS)和复发缓解MS(RRMS)、进行性系统性硬化、动脉粥样硬化、动脉硬化、散播性硬化、共济失调硬化(ataxic sclerosis),视神经脊髓炎(neuromyelitis optica,NMO),炎性肠病(inflammatory bowel disease,IBD)(例如克罗恩病(Crohn's disease),自身免疫介导的胃肠疾病,结肠炎例如溃疡性结肠炎、结肠炎溃疡、微小性结肠炎、胶原性结肠炎、息肉性结肠炎、坏死性小肠结肠炎和透壁性结肠炎,以及自身免疫性炎症性肠病),肠炎,坏疽性脓皮病,结节性红斑,原发性硬化性胆管炎,呼吸窘迫综合征,包括成人或急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome,ARDS),脑膜炎,葡萄膜、虹膜、脉络膜中的全部或一部分的炎症,自身免疫性血液病症,类风湿性脊椎炎,类风湿性滑膜炎,遗传性血管性水肿,颅神经损伤如脑膜炎,妊娠疱疹,妊娠类天疱疮瘙,阴囊痒症,自身免疫性卵巢早衰,由于自身免疫病引起的突发性听力丧失,IgE介导的疾病如过敏症和变应性和特应性鼻炎,脑炎例如拉斯穆森脑炎(Rasmussen's encephalitis)和边缘和/或脑干脑炎,葡萄膜炎例如前葡萄膜炎、急性前葡萄膜炎、肉芽肿葡萄膜炎、非肉芽肿葡萄膜炎、晶状体抗原性葡萄膜炎(phacoantigenic uveitis)、后葡萄膜炎或自身免疫性葡萄膜炎,具有和不具有肾病综合征的肾小球肾炎(glomerulonephritis,GN)例如慢性或急性肾小球肾炎,如原发性GN、免疫介导的GN、膜性GN(膜性肾病)、特发性膜性GN或特发性膜性肾病、膜或膜性增生性GN(MPGN)(包括I型和II型)和急进性GN,增殖性肾炎,自身免疫性多腺体内分泌障碍,龟头炎包括浆细胞性局限性龟头炎(balanitis circumscripta plasmacellularis)、包皮龟头炎,离心性环状红斑(erythema annulare centrifugum),持久性色素异常性红斑(erythema dyschromicum perstans)、多形性红斑(eythema multiform),环状肉芽肿,光泽苔藓(lichen nitidus),硬化性萎缩性苔藓(lichen sclerosus et atrophicus),慢性单纯性苔藓,小棘苔藓(lichen spinulosus),扁平苔癣,片层状鱼鳞病,表皮松解性角化过度,恶变前角化,坏疽性脓皮,过敏病症和响应,过敏反应,湿疹包括变应性或特应性湿疹、干性湿疹、湿汗症和泡状掌跖湿疹,哮喘例如哮喘支气管,支气管哮喘和自身免疫性哮喘,涉及T细胞浸润和慢性

炎症反应的病症,针对外来抗原的免疫反应例如妊娠期间胎儿A-B-O血型,慢性肺部炎性疾病,自身免疫性心肌炎,白细胞黏附不足,狼疮,包括狼疮性肾炎、狼疮性脑炎、小儿狼疮、非肾脏狼疮、肾外狼疮、盘状狼疮和盘状红斑狼疮、脱发性狼疮、系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus,SLE)例如皮肤SLE或亚急性皮肤SLE、新生儿狼疮综合征(neonatal lupus syndrome,NLE)和散播性红斑狼疮传染,青少年(I型)糖尿病,包括小儿胰岛素依赖型糖尿病(insulin-dependent diabetes mellitu,IDDM)和成人糖尿病(II型糖尿病)和自身免疫性糖尿病。还考虑了与由细胞因子和T-淋巴细胞介导的急性和迟发性超敏反应有关的免疫应答,结节病,肉芽肿病包括淋巴瘤样肉芽肿病、韦格纳肉芽肿病(Wegener's granulomatosis),粒细胞缺少症,脉管炎,包括血管炎、大血管血管炎(包括风湿性多肌痛和巨细胞(gianT cell)(Takayasu's)动脉炎)、中血管血管炎(包括川崎病(Kawasaki's disease)和结节性多动脉炎/结节性动脉周围炎),微小性多动脉炎,免疫血管炎,CNS血管炎,皮肤血管炎,超敏性血管炎,坏死性血管炎例如全身性坏死性血管炎和ANCA相关性血管炎,例如Churg-Strauss血管炎或综合征(CSS)以及ANCA相关小血管血管炎,颞动脉炎,再生障碍性贫血,自身免疫性再生障碍性贫血,库姆斯阳性贫血(Coombs positive anemia),Diamond Blackfan贫血,溶血性贫血或免疫性溶血性贫血包括自身免疫性溶血性贫血(autoimmune hemolytic anemia,AIHA),阿狄森病(Addison's disease),自身免疫性中性粒细胞减少症,全血细胞减少症,白细胞减少症,涉及白细胞渗出的疾病,CNS炎性病症,阿尔茨海默病(Alzheimer's disease),帕金森病(Parkinson's disease),多器官损伤综合征例如继发于败血症、创伤或出血的那些,抗原-抗体复合物介导的疾病,抗肾小球基底膜病,抗磷脂抗体综合征,变应性神经炎,白塞病/综合征(Behcet's disease/syndrome),Castleman综合征、Goodpasture综合征、Reynaud综合征、Sjogren综合征、Stevens-Johnson综合征,类天疱疮例如大疱性类天疱疮和皮肤类天疱疮,天疱疮(包括寻常型天疱疮、落叶型天疱疮、天疱疮黏膜类天疱疮和红斑性天疱疮),自身免疫性多内分泌腺病,赖特尔病(Reiter's disease)或综合征,热损伤,先兆子痫,免疫复合物病症例如免疫复合物肾炎,抗体介导的肾炎,多发性神经病,慢性神经病例如IgM多发性神经病或IgM介导的神经病,自身免疫或免疫介导的血小板减少症例如特发性血小板减少性紫癜(idiopathic thrombocytopenic purpura,ITP)包括慢性或急性ITP,巩膜炎例如特发性cerato-巩膜炎,巩膜外层炎,睾丸和卵巢的自身免疫病包括自身免疫性睾丸炎和卵巢炎,原发性甲状腺功能减退,甲状旁腺功能减退,自身免疫性内分泌疾病包括甲状腺炎,例如自身免疫性甲状腺炎,桥本病(Hashimoto's disease),慢性甲状腺炎(桥本甲状腺炎)或亚急性甲状腺炎,自身免疫性甲状腺疾病,特发性甲状腺功能减退,格雷夫斯病(Grave's disease),多腺综合征例如自身免疫性多腺综合征(或多腺内分泌病综合征),副肿瘤综合征,包括神经副肿瘤综合征例如Lambert-Eaton肌无力综合征或Eaton-Lambert综合征、stiff-man或stiff-person综合征,脑脊髓炎例如变应性脑脊髓炎或脑脊髓炎过敏性和实验性变应性脑脊髓炎(EAE)、实验性自身免疫性脑脊髓炎,重症肌无力例如胸腺瘤相关性重症肌无力,小脑变性,神经性肌强直,斜视眼阵挛(opsoclonus)或斜视眼阵挛肌阵挛综合征(opsoclonus myoclonus syndrome,OMS),以及感觉神经病变,多灶性运动神经病变,Sheehan综合征,自身免疫性肝炎,慢性肝炎,狼疮样肝炎,巨细胞肝炎,慢性活动性肝炎或自身免疫性慢性活动性肝炎,淋巴样间质性肺炎(lymphoid interstitial pneumonitis,LIP),梗阻性细支气

管炎(非移植)vs NSIP,吉兰-巴雷综合征(Guillain-Barre syndrome),贝格尔病(Berger's disease)(IgA肾病),特发性IgA肾病,线性IgA皮肤病,急性热性中性粒细胞性皮肤病,角膜下脓疱性皮肤病,短暂性棘层松解型皮肤病,肝硬化例如原发性胆汁性肝硬化和肺硬化,自身免疫性肠病综合征,Celiac或Coeliac病,乳糜泻(celiac sprue)(麸质肠病),难治性口炎性腹泻,特发口炎性腹泻,冷球蛋白血症,肌萎缩性侧索硬化(amylotrophic lateral sclerosis,ALS;Lou Gehrig病),冠状动脉病,自身免疫性耳病例如自身免疫性内耳病(autoimmune inner ear disease,AIED)、自身免疫性听力丧失,多软骨炎例如顽固性或复发的或复发性多软骨炎,肺泡蛋白沉积症,科根综合征(Cogan's syndrome)/nonsyphilitic间质性角膜炎,贝尔麻痹(Bell's palsy),Sweet病/综合征,自身免疫性红斑痤疮,带状疱疹相关疼痛,淀粉样变性,非癌性淋巴细胞增多症,原发性淋巴细胞增多症,其包括单克隆B细胞淋巴细胞增多症(例如,良性单克隆丙种球蛋白病和意义不明的的单克隆丙种球蛋白病,monoclonal gammopathy of undetermined significance,MGUS),周围神经病,副肿瘤综合征,通道病(channelopathy)例如癫痫、偏头痛、心律失常、肌肉疾病、耳聋、失明、周期性瘫痪和CNS通道病,自闭症,炎性肌病,局灶或节段性或局灶节段性肾小球硬化症(focal segmental glomerulosclerosis,FSGS),内分泌眼病,葡萄膜视网膜炎,脉络膜视网膜炎,自身免疫性肝病,纤维肌痛,多发性内分泌衰竭,施密特综合征(Schmidt's syndrome),肾上腺炎,胃萎缩,早老性痴呆,脱髓鞘病例如自身免疫性脱髓鞘病和慢性炎性脱髓鞘性多发性神经病,Dressler综合征,斑秃(alopecia greata),全秃,CREST综合征(钙质沉着,雷诺现象(Raynaud's phenomenon),食管动力障碍,sclerodactyl)和毛细血管扩张),男性和女性自身免疫性不孕,例如由于抗精子抗体,混合性结缔组织病,Chagas病,风湿热,反复流产,农民肺(farmer's lung),多形性红斑,心切开术后综合征,库欣综合征(Cushing's syndrome),养鸟人肺(bird-fancier's lung),变应性肉芽肿脉管炎,良性淋巴细胞性脉管炎,Alport综合征,肺泡炎例如变应性肺泡炎和纤维化肺泡炎,间质性肺病,输血反应,麻风病,疟疾,寄生虫病例如利什曼病,kypanosomiasis,血吸虫病,蛔虫病,曲霉病,桑普特综合征(Sampter's syndrome),卡普兰综合征(Caplan's syndrome),登革热,心内膜炎,心内膜心肌纤维化,弥漫性肺间质纤维化,间质性肺纤维化,肺纤维化,特发性肺纤维化,囊性纤维化,眼内炎,持久隆起性红斑(erythema elevatum et diutinum),胎儿成红细胞增多,嗜酸性筋膜炎,舒尔曼综合征(Shulman's syndrome),费尔提综合征(Felty's syndrome),flariasis,睫状体炎例如慢性睫状体炎、异时性睫状体炎、虹膜睫状体炎(急性或慢性),或Fuch睫状体炎,Henoch-Schonlein紫癜,人免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus,HIV)感染,SCID,获得性免疫缺陷综合征(acquired immune deficiency syndrome,AIDS),埃可病毒感染,败血症,内毒素血症,胰腺炎,thyroxicosis,细小病毒感染,风疹病毒感染,接种后综合征,先天风疹感染,Epstein-Barr病毒感染,腮腺炎,Evan综合征,自身免疫性腺衰竭,Sydenham舞蹈病(Sydenham's chorea),链球菌后肾炎,血管闭塞性脉管炎(thromboangitis ubiterans),甲状腺毒症,脊髓痨,脉络膜炎(chorioiditis),巨细胞多肌痛,慢性过敏性肺炎,干燥性角膜结膜炎,流行性角膜结膜炎、特发性肾炎综合征,微小病变肾病,良性家族性和缺血再灌注损伤,移植器官再灌注,自身免疫性视网膜,关节炎症,支气管炎,慢性阻塞性气道/肺部疾病,矽肺,口疮,口疮性口炎,动脉硬化症,asperniogenese,自身免疫性溶血,博克病(Boeck'sdisease),冷球蛋白血症,

杜皮耶伦挛缩症(Dupuytren's contracture),endophthalmia phacoanaphylactica,变应性肠炎,麻风结节性红斑,特发性面瘫,慢性疲劳综合征,febris rheumatica,Hamman-Rich病,感觉神经性听力损失,阵发性血红蛋白尿(haemoglobinuria paroxysmatica),性腺机能减退,节段性结肠炎(ileitis regionalis),白细胞减少症,传染性单核细胞增多症,横贯性脊髓炎(traverse myelitis),原发性特发性黏液性水肿,肾病,交感性眼炎(ophthalmia symphatica),睾丸炎肉芽肿,胰腺炎,急性多发性神经根炎,坏疽性脓皮病,Quervain甲状腺炎,获得性脾萎缩,非恶性胸腺瘤,白癜风,中毒性休克综合征,食物中毒,涉及T细胞浸润的病症,白细胞黏附缺陷,与由细胞因子和T-淋巴细胞介导的急性和迟发性超敏反应有关的免疫应答,涉及白细胞渗出的疾病,多器官损伤综合征,抗原-抗体复合物介导的疾病,抗肾小球基底膜病,变应性神经炎,自身免疫性多内分泌病,卵巢炎,原发性黏液性水肿,自身免疫性萎缩性胃炎,交感神经眼炎,风湿性疾病,混合性结缔组织病,肾病综合征,胰岛炎,多内分泌衰竭,自身免疫性多腺体综合征I型,成人特发性甲状旁腺功能减退症(adult-onset idiopathic hypoparathyroidism,AOIH),心肌病例如扩张型心肌病,大疱性表皮松解症(epidermolisis bullosa acquisita,EBA),血色素沉着症,心肌炎,肾病综合征,原发性硬化性胆管炎,化脓性或非脓性鼻窦炎,急性或慢性鼻窦炎,筛骨、额骨、上颌骨或蝶骨鼻窦炎,嗜酸细胞相关病症例如嗜酸性粒细胞增多症、肺渗入嗜酸性粒细胞增多症、嗜酸性粒细胞增多症-肌痛综合征、洛夫勒综合征(Loffler's syndrome)、慢性嗜酸性肺炎、热带肺嗜酸性粒细胞增多症、含有嗜酸细胞的支气管肺炎性曲霉病、曲霉肿或肉芽肿,过敏症,血清阴性脊柱关节炎,多内分泌自身免疫病,硬化性胆管炎,巩膜,巩膜外层,慢性黏膜皮肤念珠菌病,布鲁顿综合征(Bruton's syndrome),婴儿期短暂性低丙种球蛋白血症,Wiskott-Aldrich综合征,共济失调毛细血管扩张综合征,血管扩张症,与胶原病有关的自身免疫病,风湿病,神经病,淋巴结炎,血压响应降低,血管功能障碍,组织损伤,心血管缺血,痛觉过敏,肾缺血,脑缺血和伴有血管形成的疾病,变应性超敏反应病症,肾小球性肾炎,再灌注损伤,缺血性再灌注障碍,心肌或其他组织的再灌注损伤,淋巴瘤性气管支气管炎,炎性皮肤病,伴随急性炎性成分的皮肤病,多器官衰竭,大疱性疾病,肾皮质坏死,急性化脓性脑膜炎或其他中枢神经系统炎性病症,眼和眼眶炎性病症,粒细胞输血相关综合征,细胞因子诱导的毒性,发作性睡病,急性严重炎症,慢性难治性炎症,肾盂炎,动脉内增生,消化性溃疡,瓣膜炎,移植物抗宿主病,接触性超敏反应,哮喘性气道高反应和子宫内膜异位症。

[0369] 细胞可以以适于递送至接受体而无有害作用的方式配制。它们可被配制成细胞悬液,或可不配制成细胞悬液。在特定情况下,它们以单剂量形式配制。它们可被配制成用于全身施用或局部施用。在一些情况下,细胞被配制成用于在使用之前储存,并且细胞制剂可包含一种或更多种冷冻保存剂,例如DMSO(例如,在5% DMSO中)。细胞制剂可包含白蛋白,包括人白蛋白,特定制剂包含2.5%人白蛋白。细胞可被配制成特别用于静脉内施用;例如,它们被配制成用于静脉内施用持续少于1小时。细胞可处于配制的细胞悬液中,所述细胞悬液从解冻时起在室温下稳定1、2、3或4小时或更长时间。

[0370] 本文中公开的治疗性组合物和治疗可包括施用治疗剂(例如第一治疗性组合物或药物组合物或治疗和第二治疗性组合物或药物组合物或治疗)的组合。治疗可以以本领域已知的任何合适的方式进行施用。例如,治疗性组合物或药物组合物或治疗可顺序(在不同

时间)或同时(在同一时间)施用。治疗性组合物或药物组合物或者治疗可以以单独的组合物施用。治疗性组合物或药物组合物或者治疗可在同一组合物中。

[0371] 本公开内容还描述了组合物和方法,其包含治疗性组合物。不同的治疗性组合物或药物组合物或治疗可以以一种组合物或以多于一种组合物,例如2种组合物、3种组合物或4种组合物施用。可使用药剂的多种组合。

[0372] 本文中公开的治疗性组合物或药物组合物和治疗可在另一治疗或药剂之前、与之同时和/或在其之后进行,间隔为数分钟至数周。在将药剂分别施加于细胞、组织或生物体的情况下,通常将确保在每次递送的时间之间重要的时段没有到期(expire),使得治疗剂或药剂仍将能够对细胞、组织或生物体发挥有利的组合作用。例如,在这样的情况下,预期可使细胞、组织或生物体与两种、三种、四种或更多种药剂或治疗基本上同时(即,在小于约一分钟内)接触。在另一些方面中,一种或更多种治疗剂或治疗可在施用另一治疗剂或治疗之前和/或之后在以下时间内施用或提供:1分钟、5分钟、10分钟、20分钟、30分钟、45分钟、60分钟、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、11小时、12小时、13小时、14小时、15小时、16小时、17小时、18小时、19小时、20小时、21小时、22小时、22小时、23小时、24小时、25小时、26小时、27小时、28小时、29小时、30小时、31小时、32小时、33小时、34小时、35小时、36小时、37小时、38小时、39小时、40小时、41小时、42小时、43小时、44小时、45小时、46小时、47小时、48小时、1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周或8周或更长,以及其中可推导出的任何范围。

[0373] 治疗可包括多个“单位剂量”。单位剂量被限定为含有预定量的治疗性组合物。待施用的量以及特定途径和配制在临床领域技术人员的技能确定范围内。单位剂量不需要作为单次注射施用,但可包含在设定时间段内连续输注。单位剂量可包含单次可施用剂量。

[0374] 施用于人的治疗性组合物或治疗的治疗有效或足够量可以在每kg患者体重约10^2多至约10^{10}个细胞的范围内,无论是通过一次或更多次施用。例如,所使用的治疗可以是每天例如施用约10^2个细胞至约10^9个细胞/kg、约10^2个细胞至约10^8个细胞/kg、约10^2个细胞至约10^7个细胞/kg、约10^2个细胞至约10^6个细胞/kg、约10^2个细胞至约10^5个细胞/kg、约10^2个细胞至约10^4个细胞/kg、或约10^2个细胞至约10^3个细胞/kg。本文中所述的治疗可以以约10^2个细胞、约10^3个细胞、约10^4个细胞、约10^5个细胞、约10^6个细胞、约10^7个细胞、约10^8个细胞、约10^9个细胞或约10^{10}个细胞的剂量施用于对象。该剂量可作为单剂量或作为多剂量(例如2或3剂)施用,例如输注。这种治疗的进展容易通过常规技术进行监测。

[0375] 当指示“免疫有效量”、“抗肿瘤有效量”、“肿瘤抑制有效量”或“治疗量”时,医师可考虑患者(对象)的年龄、体重、肿瘤尺寸、感染或转移程度和状况的个体差异来确定待施用的本公开内容组合物的精确量。

[0376] XI.药盒

[0377] 本公开内容还描述了包含本公开内容的组合物或实施本公开内容的方法的组合物的药盒。药盒可用于评价转基因的表达、转基因在基因组中的并入,或用于将包含转基因的干细胞或祖细胞分化为成熟细胞。药盒可包含、包含至少或包含至多1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,100,500,1,000种或更多种探针、

引物或引物组、合成分子或抑制剂、或从其中可推导出的任何值或范围和组合。

[0378] 药盒可包含组分,所述组分可单独包装或放置在容器,例如管、瓶、小瓶、注射器或其他合适的容器装置中。药盒可包含本文中所述的细胞培养组分、组合物和培养容器。

[0379] XII.实施例

[0380] 包括以下实施例以说明本发明的一些优选实施方案。本领域技术人员应理解,在以下实施例中公开的技术代表本发明人发现在本发明的实践中发挥良好作用的技术,并因此可被认为构成了用于其实践的优选模式。然而,根据本公开内容,本领域技术人员应理解,可在不脱离本发明的精神和范围的情况下对所公开的一些具体实施方案进行许多改变并仍然获得相同或相似的结果。

[0381] 实施例1-在成熟T细胞的分化期间受调节的基因表达

[0382] 将H1 hESC用共表达CAR19LH和报道子eGFP的慢病毒载体进行转导。针对高eGFP表达对细胞进行分选,并评价克隆的平均载体拷贝数。H1 CAR19LH-eGFP克隆2(VCN:4.6)在ATO中与野生型H1对照一起分化,并在第2至5周进行分析。与野生型相比,H1 CAR19LH-eGFP克隆2表现出具有CD3+TCRab+细胞低频率的异常分化(图2A)。此外,克隆2还显示出SP4和SP8细胞发育停滞,以及占优势的CD4-CD8-“双阴性”细胞群体(图2B)。

[0383] 如图3所示,细胞显示出GZMA下游插入的转基因的阶段特异性表达。在H1 hESC系中进行CRISPR/Cas9介导的同源定向修复,以将报道子mCitrine插入在内源GZMA基因的3’UTR中。将杂合H1GZMA-mCitrine报道子进行克隆并在ATO中与野生型H1对照一起分化。在第1、3和5周期间在T细胞发育的不同阶段评价报道子表达的水平。示出了对H1 GZMA-mCitrine Het克隆9的分析。Mcitrine在23%的SP8和2%的SP4中表达,但在前体阶段ISP4或DP中不表达。

[0384] 通过控制内源GZMA启动子表达CAR19LH允许CAR T细胞正常发育。使用类似的敲入方案,将CAR19LH外源基因插入在T-iPSC系“n11:”中的内源GZMA基因的3’UTR中。这种方法将延迟CAR19LH的表达,直至T细胞达到成熟的SP8和SP4阶段,如通过先前的报道子实验所证明的。N11 GZMA-CAR19LH纯合克隆在ATO中经历分化。图3a示出了高频率的CD3+TCRab+细胞以及DP细胞(第1周)、SP8细胞(第3周)和SP4细胞(第4周)的正常发育模式。图3b示出了使用抗FMC63 scFv抗体对CAR的染色。在第4周,67.8%的SP8和6.37%的SP4表达CAR,并且在第9周,76.9%的SP8和7.15%的SP4表达CAR。这在图4中示出。实施例2.围绕针对同种异体的iPSC来源的嵌合抗原受体治疗的生物屏障的改造绕行

[0385] 嵌合抗原受体(CAR)T细胞治疗在另外地治疗难治性血液恶性病方面产生了显著的结果。目前,由于需要从头产生每种个性化治疗以及患者之间T细胞生物学中的固有可变性,因此制造自体CAR T细胞的过程具有挑战性,导致不可预测且不一致的临床响应。因此,对从无限更新的同种异体来源的人多能干细胞(human pluripotent stem cell,hPSC)中体外产生CAR T细胞的兴趣日益增加。

[0386] 然而,从hPSC产生CART细胞存在数个生物屏障。首先,在T细胞分化早期表达CAR转基因使发育转向固有的淋巴途径,而不是常规的T谱系。第二,去除内源T细胞受体(T cell receptor,TCR)以阻止同种异体反应性导致发育受阻,因为成熟的T细胞不能再经历阳性选择。该方案试图通过部署创新的阶段特异性表达策略和诱导成熟、常规的T细胞分化的新的体外方法(人工胸腺类器官(ATO)系统),来克服产生非同种异体反应性干细胞来源的CART

细胞的这些挑战。

[0387] ATO是用于从多种干细胞来源(包括hPSC)有效产生成熟的单阳性(single positive,SP)CD8+和CD4+T细胞的首创的体外方法。在先前建立的系统上改进,ATO可稳健地支持阳性选择和成熟至SP阶段。我们的初步研究已表明可通过实现受限于成熟T细胞的CAR转基因的延迟、阶段特异性表达来克服固有命运转向。在该方案中,我们将以延迟CAR表达模型为基础,并评价内源TCR的破坏如何影响ATO中CAR T细胞的发育。然后,我们将评价在不存在内源TCR的情况下递送外源阳性选择信号以挽救发育的两种不同方法。这些方法包括在生理学上合适的DP T细胞阶段表达强直信号传导CAR或瞬时表达外源TCR。该方案中开发的方法将使产生hPSC来源的非同种异体反应性T细胞治疗能够实现,提高更多有需要的患者获得治疗的机会。

[0388] 如图5所示,CAR的早期表达将T细胞分化转向ATO系统中的固有淋巴途径。本发明人将颗粒酶A(GZMA)确定为抗CD19 CAR敲入的潜在候选基因座(图6A至B)。CAR19通过GZMA基因座的阶段特异性表达使得产生成熟、常规的CART细胞(图7A至D)。将CAR19表达限于仅成熟的SP T细胞阻止了早期转向至固有淋巴途径并允许了常规发育(图7B)。到第5周,大多数ATO来源的T细胞是CD8αβ+和CAR19+(图7C)。如图7D所示,成熟的SP8 CAR T细胞稳健地释放细胞毒性细胞因子,并上调响应于抗原CD19的活化标志物。

[0389] 在此,本发明人报道了从T-iPSC产生非同种异体的无TCR的CAR T细胞。已建立了阶段特异性表达系统,该阶段特异性表达系统在T细胞分化期间提供了转基因表达的稳健且可重复的时间控制。在该平台的基础上,本发明人已从T-iPSC中产生了成熟、常规的CAR T细胞,其表现出抗原特异性杀伤、活化和增殖。

[0390] 实施例3-在成熟T细胞的分化期间受调节的基因表达

[0391] 本发明的目标是实现插入的(转基因/外源)T细胞受体(TCR)的受调节的基因表达,其限于T细胞分化的特定阶段。胸腺中正常T细胞发育需要TCR的表达,以使得通过阳性选择产生成熟T细胞。去除T细胞前体中TCR表达的方法[为了阻止同种异体响应(allo-response)(移植物抗宿主病)]也阻止成熟T细胞的阳性选择。将TCR表达限于T细胞分化的特定阶段的能力将允许“阳性选择”和诱导T细胞前体的成熟,同时避免成熟T细胞中正在进行的转基因TCR表达的负面结果。本发明最容易应用的应用是稳定修饰多能干细胞(PSC),但该方法可潜在地用于靶向早期T细胞发育中体外或体内产生的任何细胞类型,例如PSC、造血干细胞或祖细胞(HSPC)或者胸腺细胞前体。该技术最直接的应用是允许从已去除内源TCR表达的同种异体PSC中体外产生治疗性T细胞。被确定为TCR插入的内源基因座的特异性基因是RAG1和RAG2。

[0392] 过继性T细胞治疗,例如FDA批准的CART治疗,目前依赖于使用从患者血液中收获的自体T细胞。该逻辑上困难且昂贵的过程导致了对使用同种异体来源T细胞的探索,这为目前使用来自自体(患者特异性)来源的T细胞的方法提供了潜在的现成替代方案。

[0393] 同种异体T细胞同样可以来源于健康供体的血液,或从HSPC或iPSC中体外产生。任何同种异体T细胞产品的临床使用都需要基因修饰,以去除1)内源TCR表达,以避免移植物抗宿主病(graft versus host disease,GvHD),和2)主要组织相容性复合物抗原(I类和II类)的表达,以阻止供体细胞被不匹配的接受者免疫系统排斥。同种异体细胞治疗领域已开发出用于两种类型的功能修饰的方法。例如,内源TCR表达的去除可通过破坏TRAC基因座或

缺失RAG1+/-RAG2基因表达来实现。MHC I类表达的破坏可通过缺失特定的I类基因或为所有MHC I类分子组分的β2微球蛋白(beta 2microglobulin,b2m)来实现。II类的缺失可以通过缺失CIITA来实现。

[0394] 然而,在同种异体环境中引起同种异体反应性/排斥问题的相同TCR-MHC相互作用对正常的T细胞发育过程也至关重要。所谓的双阳性/DP T细胞前体(因为它们共表达CD8和CD4二者而命名)表面上的TCR与MHC分子(由胸腺微环境提供,并且也在发育中的T细胞自身上)的相互作用对于内源胸腺中发生的正常的"阳性选择"过程至关重要。阳性选择使得具有最佳TCR-MHC亲和力的DP存活并分化为所谓的单阳性/SP T谱系细胞(因为它们表达CD4或CD8中的一种而不是二者而命名)。阳性选择可在Crooks组先前已开发的"人工胸腺类器官"(ATO)技术中在体外重现,以诱导干细胞分化为SP4和SP8细胞。

[0395] 在阳性选择之前去除内源TCR表达机制的问题的一个解决方案是在整个T细胞分化中(包括在β选择和阳性选择期间)组成型表达外源(转基因的)TCR。然而,在分化期间产生并被输注到患者中的成熟T细胞中持续表达外源TCR可产生新的问题-外源TCR通过健康组织中的抗原表达或同种异体响应/GvHD而产生脱靶效应的可能性。本发明提供了提供TCR表达的方法,该TCR表达限于β和阳性选择的前体阶段,即在成熟T细胞中丧失。本申请在基于PSC的T细胞治疗领域最相关,其中基因缺失和插入通常应用于自我更新的PSC,但它也可用于在阳性选择阶段时或之前对TCR表达的任何操作。

[0396] 本发明人已确定RAG1和RAG2基因具有严格调节的阶段特异性表达,其在T细胞分化的β选择和阳性选择期间高,但在成熟T细胞中下降。该方法是将转基因TCR插入到内源RAG1或RAG2基因的调节区/或下游。以这种方式,任何转基因TCR将可用于在任何T细胞分化系统中的直接阳性选择,但在随后产生的成熟T细胞中下调,从而避免潜在的GvHD。

[0397] 使用CRISPR/Cas9介导的同源性定向修复将生物活性转基因(即报道子、嵌合抗原受体)插入内源基因3'非翻译区的框架中。在该过程中,终止密码子被丝氨酸-精氨酸接头和自切割肽序列(P2A)所替换。这种方法允许通过内源启动子调节插入的转基因的表达,并且内源基因的翻译保持不变。另外,可插入嘌呤霉素抗性基因盒以帮助富集经编辑的多能干细胞(图1A)。在iPSC阶段进行CRE-TAT治疗之后,可去除嘌呤霉素抗性盒,留下单一loxp3序列(图1B)。

[0398] 图8A至B示出了RAG1/2KO人多能干细胞(hPSC)及其WT(未经编辑)亲本系(H1,HLA-A*0201+;ESI017,HLA-A*0201-)在七周内的T细胞分化动力学的代表性流式细胞术分析。图8A示出了来自RAG1/2DKO hPSC和WT亲本系的T谱系定型祖细胞(CD45+CD5+CD7+)在七周内的TCRab和CD3的表面染色。图8B示出了通过CD8a和CD4的表面染色显示的来自相同T谱系定型祖细胞群的T细胞发育在七周内的进展。祖细胞按以下顺序分化:双阴性(DN,CD4-CD8-),未成熟单阳性4(ISP4,CD4+CD8-),双阳性(DP,CD4+CD8+),单阳性(SP8,CD4-CD8+;SP4,CD4+CD8-)。

[0399] 图9示出了在从hPSC分化T细胞期间,缺失内源TCR表达对阳性选择的影响。将RAG1/2KO hPSC和WT(未经编辑)亲本系(H1,HLA-A*0201+;ESI017,HLA-A*0201-)用表达HLA-A*0201限制性NYESO TCR的慢病毒载体(可使用VB13.1抗体检测)稳定转导(图3)。图9A示出了在T细胞分化的七周内来自总造血细胞(CD45+)的VB13.1和CD3表面表达的代表性流式细胞术分析。图9B示出了来自NYESO TCR转导的RAG1/2DKO和亲本WT hPSC系的SP8 T细胞

的阳性选择。表达VB13.1和CD3的总造血细胞(CD45+VB13.1+CD3+)在分化的七周内显示出来。当RAG1/2被敲除时,SP8发育的挽救是HLA-A*0201+系H1所独有的。

[0400] 图10示出了RAG1和RAG2基因的表达水平限于体外ATO分化过程的多个点,包括DP群体中的阳性选择。

[0401] 实施例4--在成熟T细胞的分化期间受调节的基因表达

[0402] 嵌合抗原受体(CAR)T细胞治疗在另外地治疗难治性血液恶性病方面产生了显著的结果[1-2]。目前,由于需要从头产生每种个性化治疗以及患者之间T细胞生物学中的固有可变性,因此制造自体CAR T细胞的过程具有挑战性,导致不可预测且不一致的临床响应[3-5]。作为结果,对从无限更新的同种异体来源的人多能干细胞(hPSC)中体外产生CAR T细胞的兴趣日益增加。该方法的一个优点是hPSC高度适用于遗传编辑,提供了多种途径来操纵最终T细胞产物的功能。

[0403] 然而,从hPSC产生CART细胞有两个关键的生物屏障。

[0404] 1.)T细胞分化早期CAR转基因的表达使发育转向固有淋巴途径[6-10]。由本发明人团队使用人工胸腺类器官(ATO)系统使PSC分化为T细胞类似地报道了该结果,因为第二代CD19 CAR的组成型表达导致固有淋巴样细胞2型(innate lymphoid cell type 2,ILC2)细胞的产生,而不是常规的单阳性CD8+(SP8)和CD4(SP4)T细胞(图2A至B)[11]。为了克服这种早期命运转向,该方法利用CRISPR/Cas9编辑来实现相同CD19 CAR的延迟、阶段特异性表达。CAR转基因插入在基因颗粒酶A(GZMA)的3'非翻译区(UTR),使其表达位于内源GZMA启动子及其调节元件的控制下。GZMA仅在单阳性CD8(亦称"SP8")(CD3+TCR+CD8+CD4-)和单阳性CD4+(亦称"SP4")(CD3+TCR+CD8-CD4+)T细胞的分化晚期表达,并在早期T阶段不存在。使用经改造的GZMA-mCitrine报道子ATO实验验证了阶段特异性表达(图3)。作为结果,使用ATO系统的GZMA-CAR19LH T-iPSC的分化表明了具有稳健的CAR表达的成熟、常规的SP8和SP4 T细胞的有效发育(图4B),而没有任何命运转向为固有谱系的迹象(图4A)。本发明人已鉴定了具有类似表达模式的其他内源基因,其可用作GZMA的替代物:这些基因在表2A中列出。

[0405] 2.)为了解决从同种异体hPSC来源产生T细胞的同种异体反应性,必须敲除内源T细胞受体(TCR),以阻止在过继转移时TCR/MHC错配的风险以及随后的移植物抗宿主病。然而,TCR表达的去除(例如通过破坏TRAC基因座)导致T细胞发育的完全阻断,因为成熟的T细胞不再经历阳性选择(图11A至D)。本发明人恢复阳性选择的解决方案依赖于类似的3'UTR敲除,以在阳性选择阶段(即在双阳性,亦称DP,亦称CD4+CD8+)细胞中瞬时表达外源TCR(例如识别NYESO抗原的1G4TCR)。基于他们自己的RNA-Seq研究,他们将RAG1基因鉴定为具有正确表达模式的候选内源基因;RAG1在双阴性(DN)至双阳性(DP)T细胞期间表达,但在实现阳性选择之后在SP8和SP4 T细胞中不存在。使用相同的阶段特异性方法产生了报道子系,确定了在分化期间RAG1调节的报道子表达遵循RNA-Seq模式。(图12A至C)。另外,即使在活化之后,成熟T细胞中仍不可检出报道子(图12C)。我们然后使用相同的策略以从RAG1基因座驱动1G4 TCR表达,并表明可在由TRAC破坏的T-iPSC系产生的细胞中恢复阳性选择。因此,转基因的TCR的表达仅发生在阳性选择的关键时期(DP阶段)期间,并在SP8/SP4成熟之后不存在(图13A至C),最终导致TCRαβ-CD3-成熟、初始SP8 T细胞的产生(图6D)。本发明人已经鉴定了具有类似表达模式的其他内源基因,其可以用作RAG1的替代物:这些基因在表2B中列出。

[0406] 然后,本发明人在TRAC破坏的PSC系中组合了两种编辑策略,1)通过GZMA表达CD19 CAR(GZMA-CAR19LH),以避免在组成型表达的情况下发生的阻断和转向为固有谱系,以及2)通过RAG1瞬时表达外源1G4(NYESO)TCR(RAG1-NYESO TCR)。数据显示本发明人开发了产生非同种异体反应性的TCRαβ-CD3-初始CAR T细胞的平台(图14A至B)。所得T细胞表现出稳健的抗原特异性活化和细胞因子产生(图14C),并且该方法可推广到不同的CAR设计(图14D)。

[0407]

表2A

基因	ES	EMP	CD34+ CD90+ CD43-	CD34+ CD90+ CD43+ CD45-	CD34+ CD90+ CD43+ CD45+	CD34med CD90med CD43+ CD45-	CD34med CD90med 43lo CD45+	DN (Thy1- Thy3)	ISP4	DP早期	DP晚期	SP8	SP8 RA	SP4	SP4 RA
GZMA	0.04	0.00	0.01	0.06	0.06	0.29	0.38	1.31	0.06	0.02	0.37	373.68	11.08	205.48	18.03
GZMB	0.00	0.00	0.08	0.00	0.01	0.01	0.01	0.25	14.97	0.43	0.21	183.29	1.79	3.41	0.01
GZMH	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.07	1.33	0.21	0.00	16.36	0.77	2.16	0.00
GZMK	0.02	0.01	0.00	0.00	0.00	0.04	0.00	0.18	0.08	0.02	2.08	153.34	86.17	79.05	0.25
GZMM	0.23	0.12	0.25	0.00	0.00	0.09	0.11	0.13	0.11	0.05	0.50	122.84	18.46	33.89	15.45
XCL1	0.19	0.22	0.01	0.10	0.35	0.49	0.37	1.02	0.37	0.47	3.40	47.59	121.02	48.59	0.06
XCL2	0.00	0.04	0.08	0.68	0.97	0.95	0.80	1.82	0.47	0.00	4.33	88.20	133.01	15.71	0.14
TNFSF14	0.03	0.18	0.01	0.03	0.06	0.18	0.11	0.57	0.68	0.62	1.26	19.02	16.52	10.53	1.19
PTGDS	0.00	0.26	0.12	0.00	0.00	0.03	0.12	0.09	0.19	0.00	1.01	86.78	6.22	63.62	0.07
SAMD3	0.47	0.58	0.27	0.03	0.00	0.07	0.04	0.22	0.21	0.25	1.57	60.87	46.41	66.04	23.32
NCALD	0.75	0.64	1.54	0.10	0.18	0.37	0.96	1.56	0.27	0.16	0.44	16.19	11.05	12.24	1.54

[0408]

表2B

基因	ES	EMP	CD34+CD90+CD43-	CD34+CD90+CD43+CD45-	CD34+CD90+CD43+CD45+	CD34medCD90medCD43+CD45-	CD34medCD90med 43loCD45+	DN (Thy1-Thy3)	ISP4	DP早期	DP晚期	SP8	SP8 RA	SP4	SP4 RA
RAG1	0.42	0.52	1.50	0.57	0.52	0.57	0.28	65.33	623.49	1326.27	1707.96	0.64	3.09	0.39	4.65
RAG2	0.00	0.00	0.28	0.07	0.11	0.03	0.02	40.91	245.41	243.57	449.94	0.00	0.93	0.05	2.14

[0409] 表2A至B:在T细胞分化期间使用ATO系统的选择基因的表达谱。(2A)选择基因表现出从多能干细胞到DP T细胞阶段的低表达至不存在表达,以及在成熟SP8和SP4 T细胞中的

高表达。(2B)选择基因表现出从多能干细胞到CD34+细胞阶段的低表达至不存在表达,以及从DN至DP T细胞阶段越来越高的表达。在阳性选择之后,SP8和SP4 T细胞中的表达水平恢复至低水平或不存在水平。

[0410] 表达谱是由来自多种细胞来源(即PSC-ATO、脐带血CD34+ATO、胸腺)的已公开[1]和未公开的大量RNA测序数据的组合产生的。表中的所有值均以RPKM为单位表示。

[0411] ＊＊＊

[0412] ————

[0413] 根据本公开内容,本文中公开和要求保护的所有方法无需过度实验即可进行和实施。尽管已根据一些优选实施方案描述了本发明的组合物和方法,但对于本领域技术人员而言明显的是,可对本文中所述方法以及所述方法的步骤或步骤顺序进行改变而不脱离本发明的概念、精神和范围。更具体地,将明显的是,可用某些在化学和生理学两个方面均相关的药剂代替本文中所述的药剂,同时实现相同或类似的结果。对于本领域技术人员而言明显的所有这样的类似替代和改变都被视为在由所附权利要求书所限定的本发明的精神、范围和概念内。

[0414] 在本公开内容中引用的参考文献就其提供了补充本文中阐述的那些的示例性操作或其他细节而言特别地通过引用并入本文。

[0415] 1.GillS,Maus,Porter D.Chimeric antigen receptor T cell therapy:25 years in the making.Blood Rev.2016May;30(3):157-67.PMID:26574053

[0416] 2.Schultz L,Mackall C.Driving CAR T cell translation forward.Sci.Transl.Med.2019Feb27;11(481):21-27.PMID:30814337

[0417] 3.Fraietta J,Lacey S,Orlando E,Pruteanu-Malinici L,Gohil M,Lundh S,BoesteanuA,WangY,O′ConnorR,et al.Determinants of response and resistance to CD19chimeric antigen receptor(CAR)Tcell therapy of chronic lymphocytic leukemia.Nat.Med.2018May;24(5):563-571.PMCID:PMC6117613

[0418] 4.PapathanasiouM,Stamatis C,Lakelin M,Farid S,Titchener-Hooker N,ShahN.AutologousCAR T-cell therapies supply chain:challengesandopportunities?Cancer Gene Ther.2020Nov;27(10-11):799-809.PMID:31932694

[0419] 5.CongL,Ran F,Cox D,LinS,Barretto R,Habib N,Hsu P,Wu X,Jiang W,Marraffini L,Zhang F.Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems.Science.2013Feb15;339(6121):819-23.PMCID:PMC3795411

[0420] 6.ThemeliM,Kloss C,Ciriello G,Fedorov V,Perna F,Gonen M,Sadelain M.Generation of tumor-targeted human T lymphocytes from induced pluripotent stem cells for cancer therapy.Nat.Biotechnol.2013Oct;31(10):928-33.PMCID:PMC5722218

[0421] 7.Feucht J,Sun J,Eyquem J,Ho Y,Zhao Z,Leibold J,Dobrin A,Cabriolu A,Hamieh M,Sadelain M.Calibration of CAR activation potential directs alternative T cell fates and therapeutic potency.Nat.Med.2019 Jan;25(1):82-88.PMCID:PMC6532069

[0422] 8.Maluski M,Ghosh A,Herbst J,Scholl V,Baumann R,Heuhn J,Geffers R,

Meyer J,Maul H,Eiz-Vesper B,Krueger A,Schambach A,van den Brink M,Suer M.Chimeric antigen receptor-induced BCL11B suppression propagates NK-like cell development.J Clin Invest.2019Dec2;129(12):5108-5122.PMCID:PMC6877334

[0423] 9.Albert S,Koristka S,Gerbaulet A,Cartellieri M,Arndt C,Feldman A,Berndt N,Loureiro L,Bonin M,Ehninger G,Eugster A,Bonifacio E,Bornhauser M,Bachmann M,Ehninger A.TonicSignaling and Its Effects on Lymphopoiesis of CAR-Armed Hematopoietic Stem and Progenitor Cells.J.Immunol.2019Mar15;202(6):1735-1746.PMID:30728213.

[0424] 10.Ueda T,Shiina S,Iriguchi S,Terakura S,Kawai Y,Kabai R,Sakamoto S,Watanabe A,Ohara K,Wang B,Xu H,Minagawa A,Hotta A,Woltjen K,Uemura Y,Kodama Y,Seno H,Nakatsura T,Tamada K,Kaneko S.Optimization of the proliferation and persistency of CAR T cells derived from human induced pluripotent stem cells.

[0425] 11.LiS,Wang CS,Montel-Hagen A,Casero D,Lopez S,Chen H-C,Zhou O,Botero C,Tsai SC,Wong C,Crooks GM,Seet CS.J.Immunol.2022.208(1_Supplement):107.11.

[0426] 12.Montel-Hagen A,Seet S,Li S,Chick B,Zhu Y,Chang P,Tsai S,Sun V,Lopez S,Chen H,He C,Chin C,Casero D,Crooks G.Organoid-Induced Differentiation of Conventional Tcells from Human Pluripotent Stem Cells.Cell Stem Cell.2019Mar7;24(3):376-389.PMCID:PMC6687310

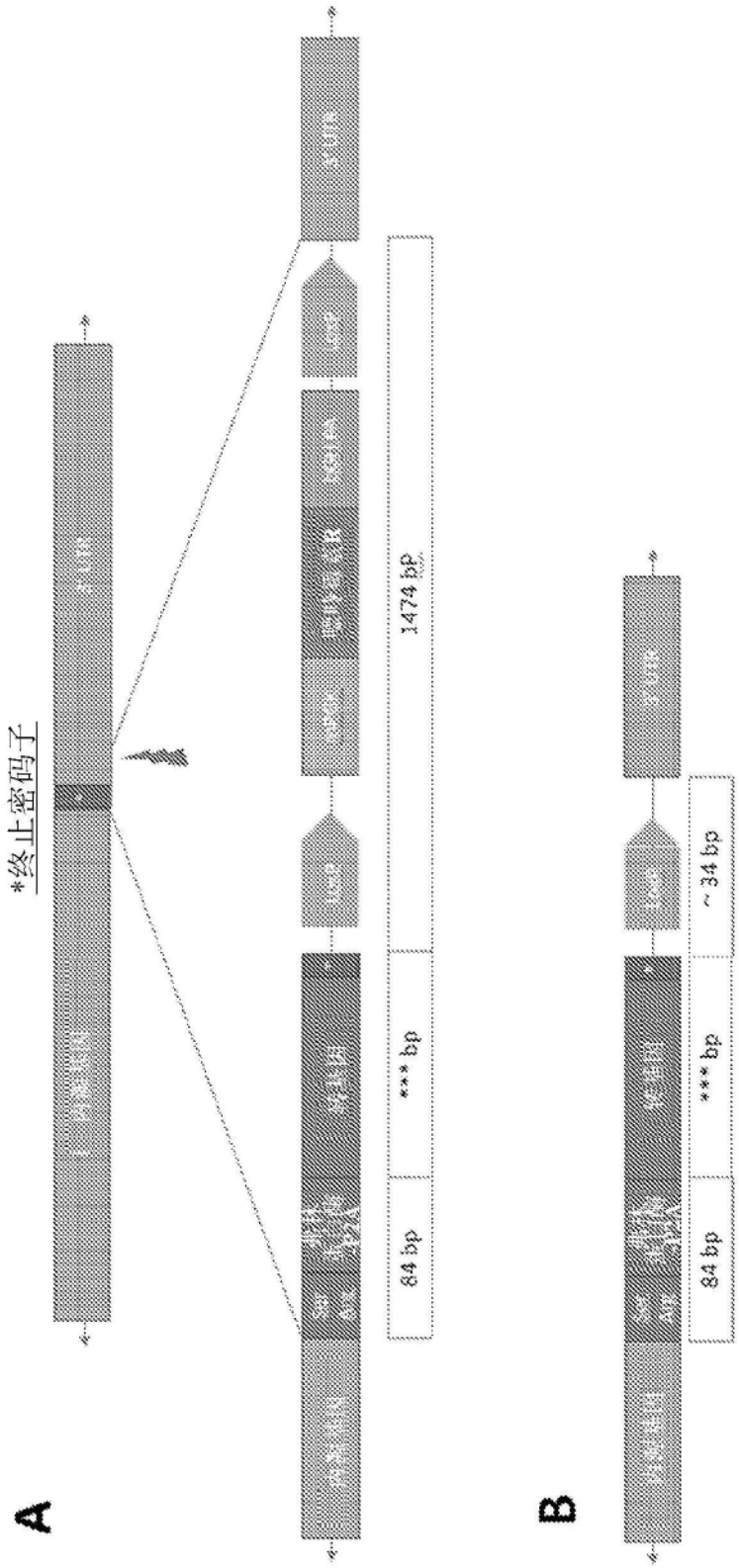


图1A-B

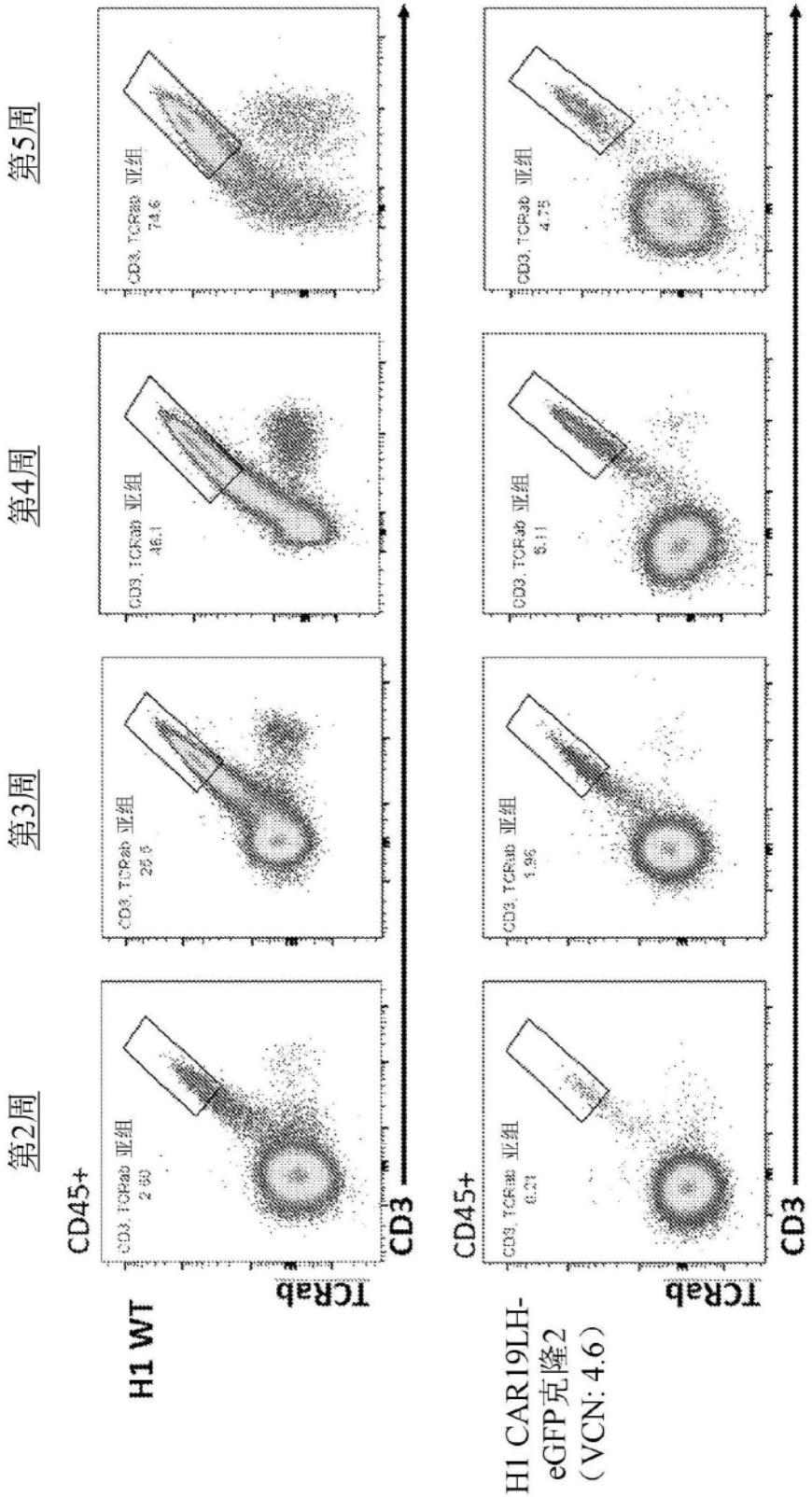


图2A

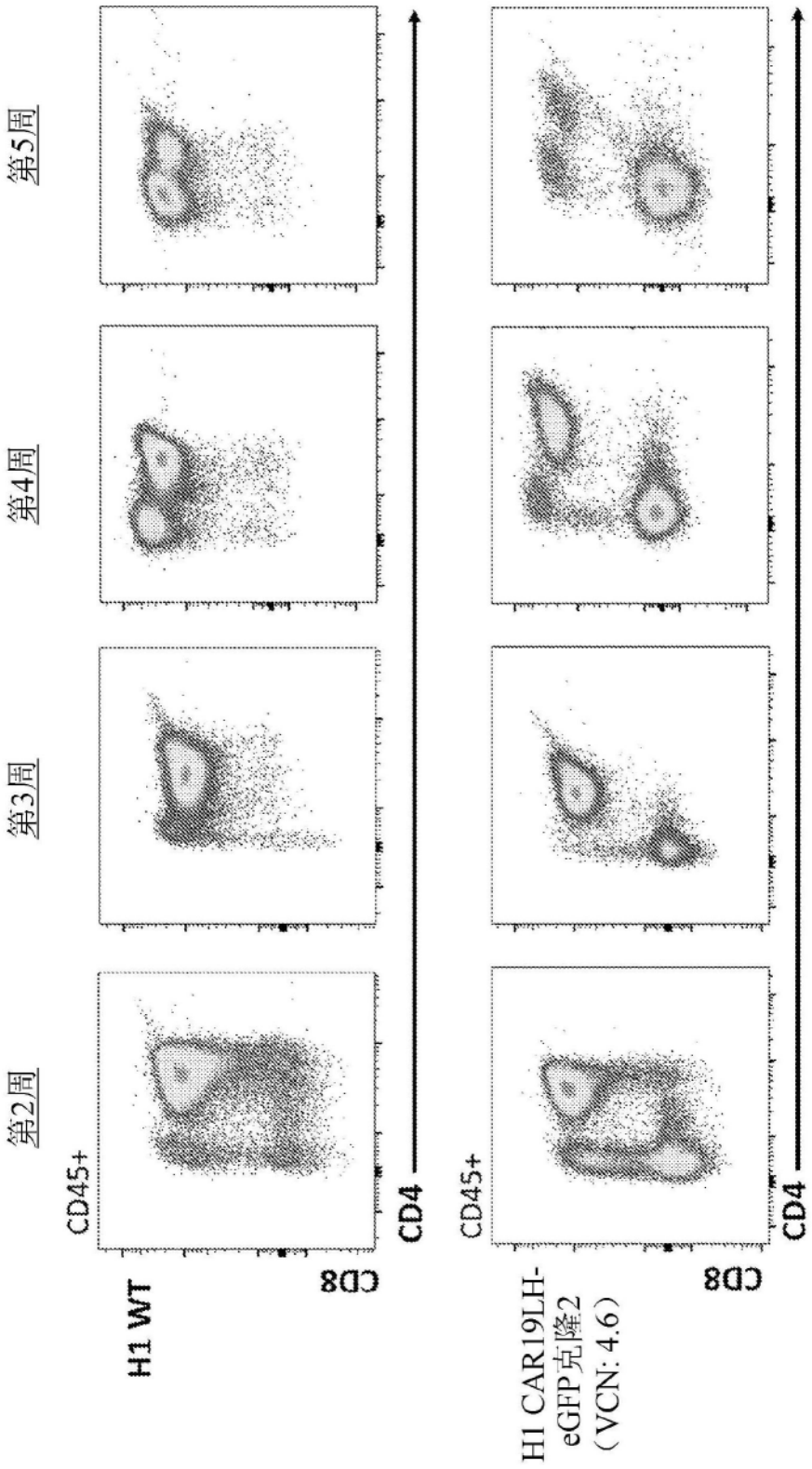


图2B

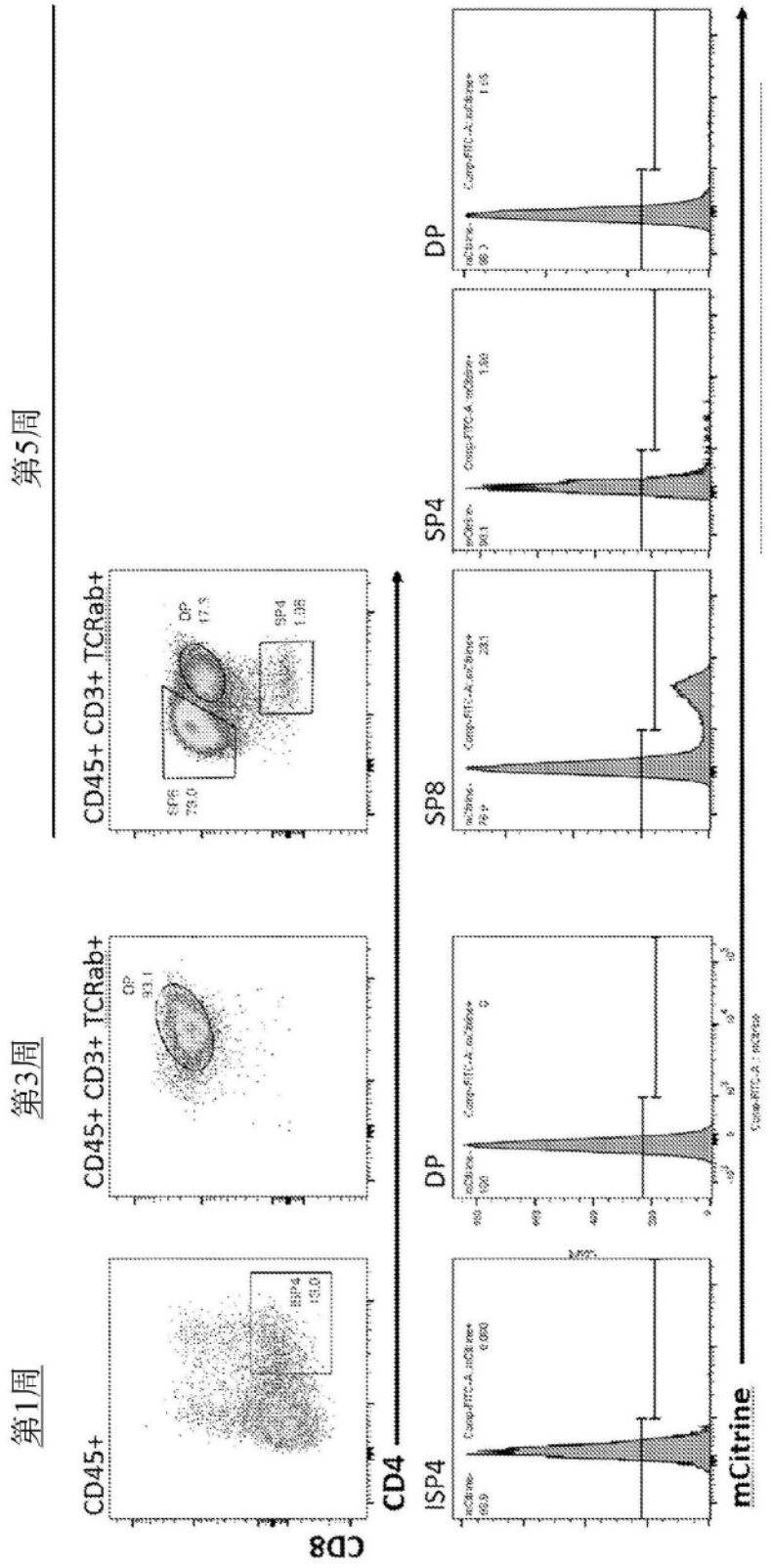

第1周
第3周
第5周
CD45+
CD45+ CD3+ TCRab+
CD45+ CD3+ TCRab+
CD8
CD4
ISP4
DP
SP8
SP4
DP
mCitrine

图3

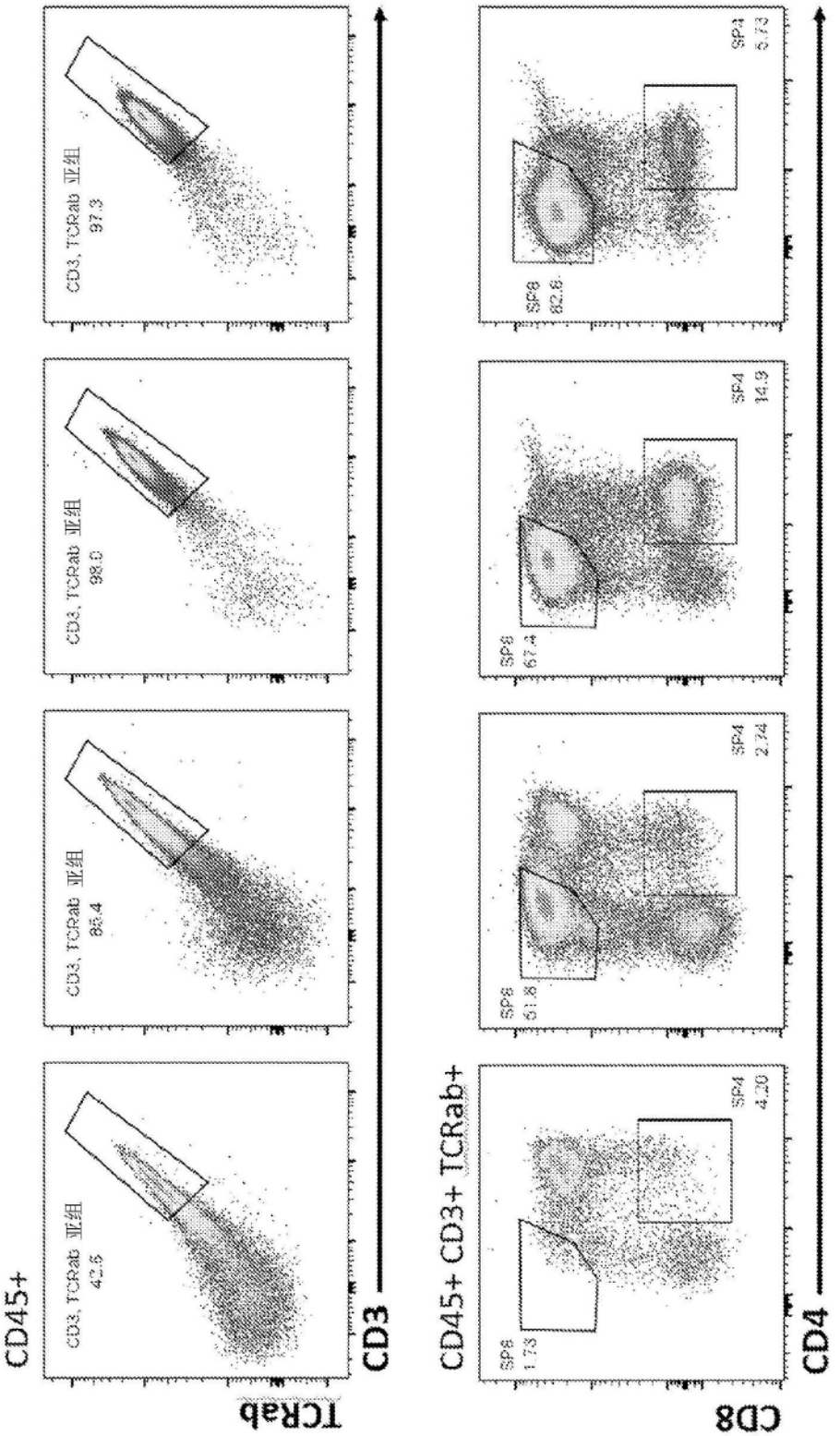

第2周
第3周
第4周
第9周
CD45+
CD45+ CD3+ TCRab+
TCRab
CD3
CD8
CD4
CD3, TCRab 亚组
42.5
86.4
98.0
97.3
SP8
1.73
61.8
67.4
82.6
SP4
4.20
2.74
14.9
5.73

图4A

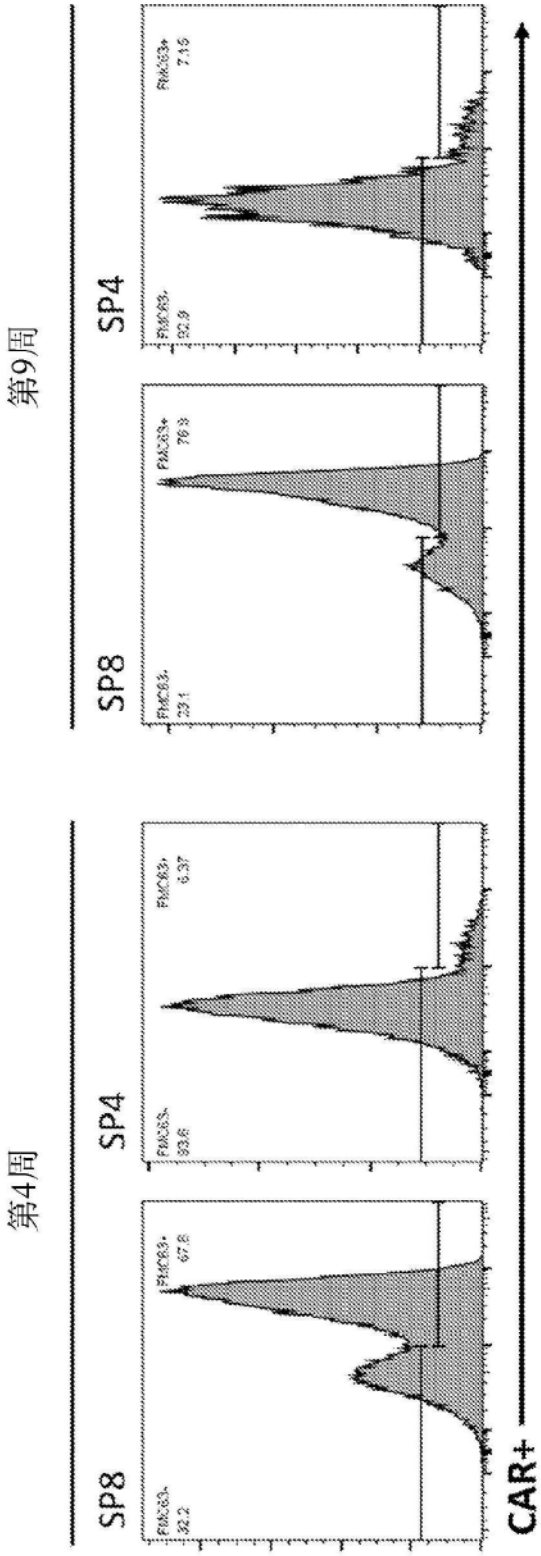


图4B

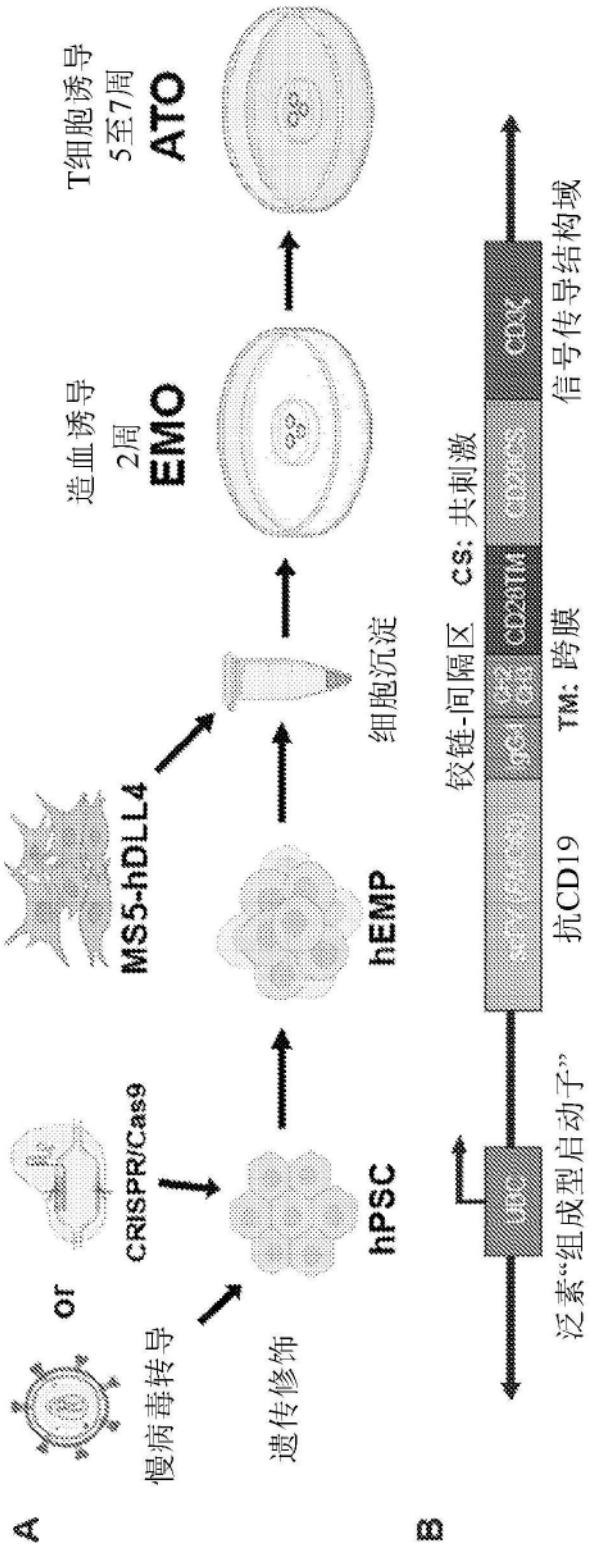

A
慢病毒转导
or
CRISPR/Cas9
遗传修饰
hPSC
hEMP
MS5-hDLL4
细胞沉淀
造血诱导
2周
EMO
T细胞诱导
5至7周
ATO
B
泛素"组成型启动子"
抗CD19
铰链-间隔区
CS: 共刺激
TM: 跨膜
信号传导结构域

图5A-B

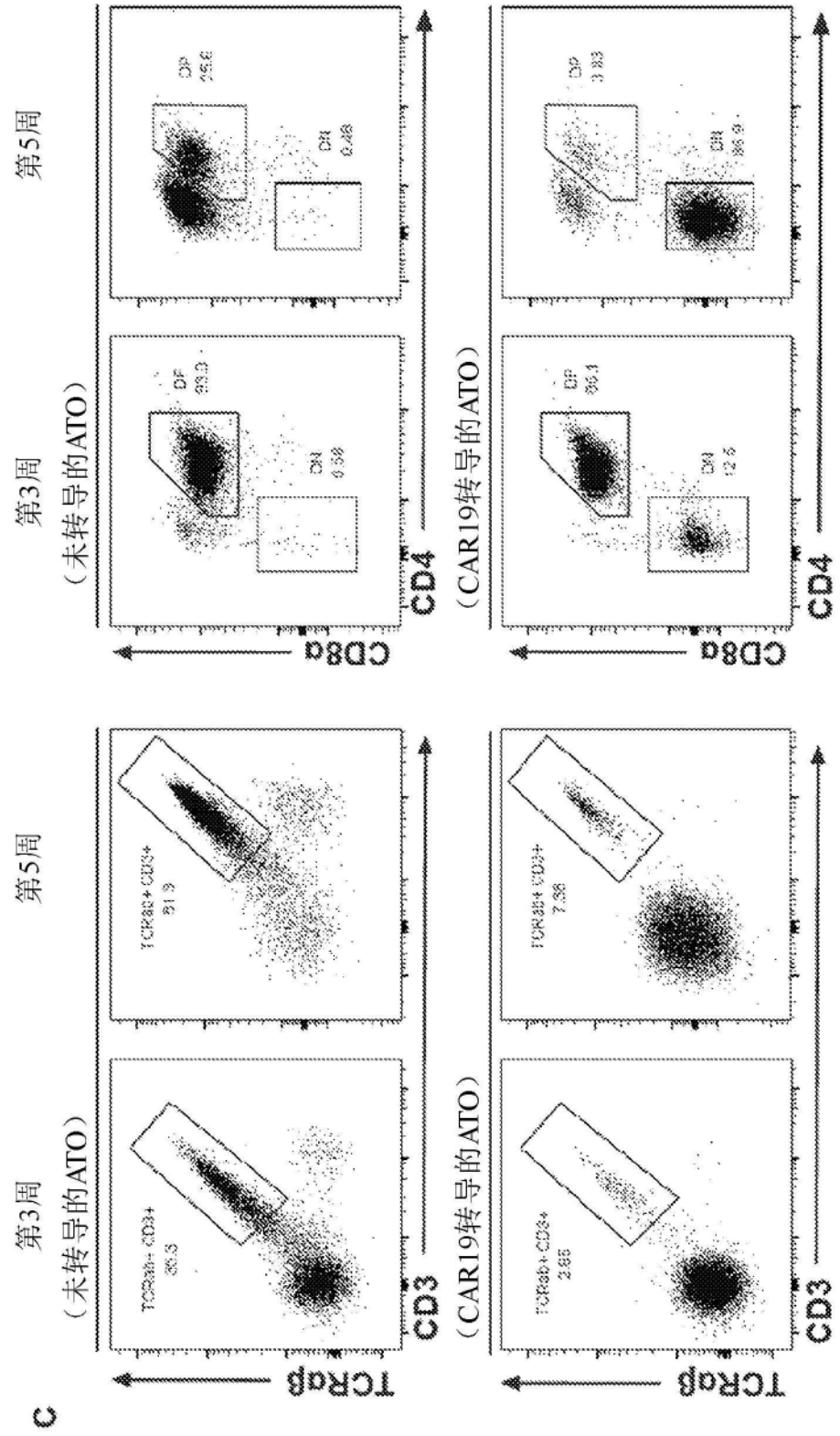


图5C

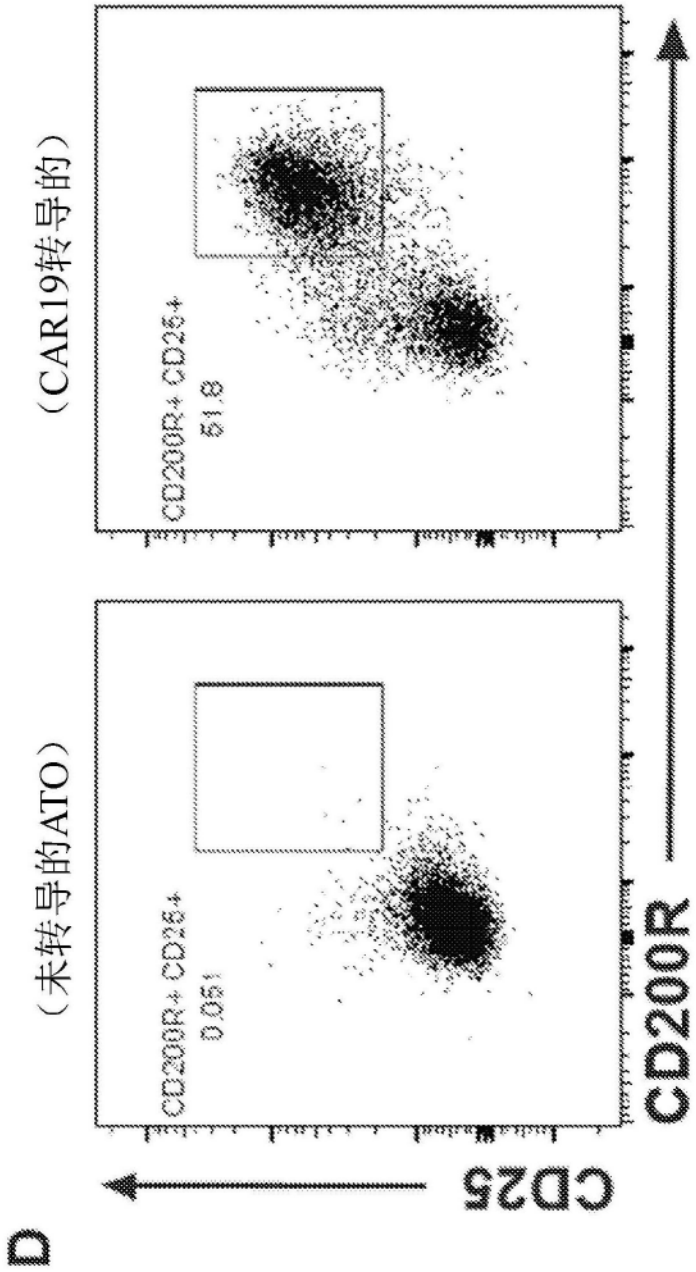
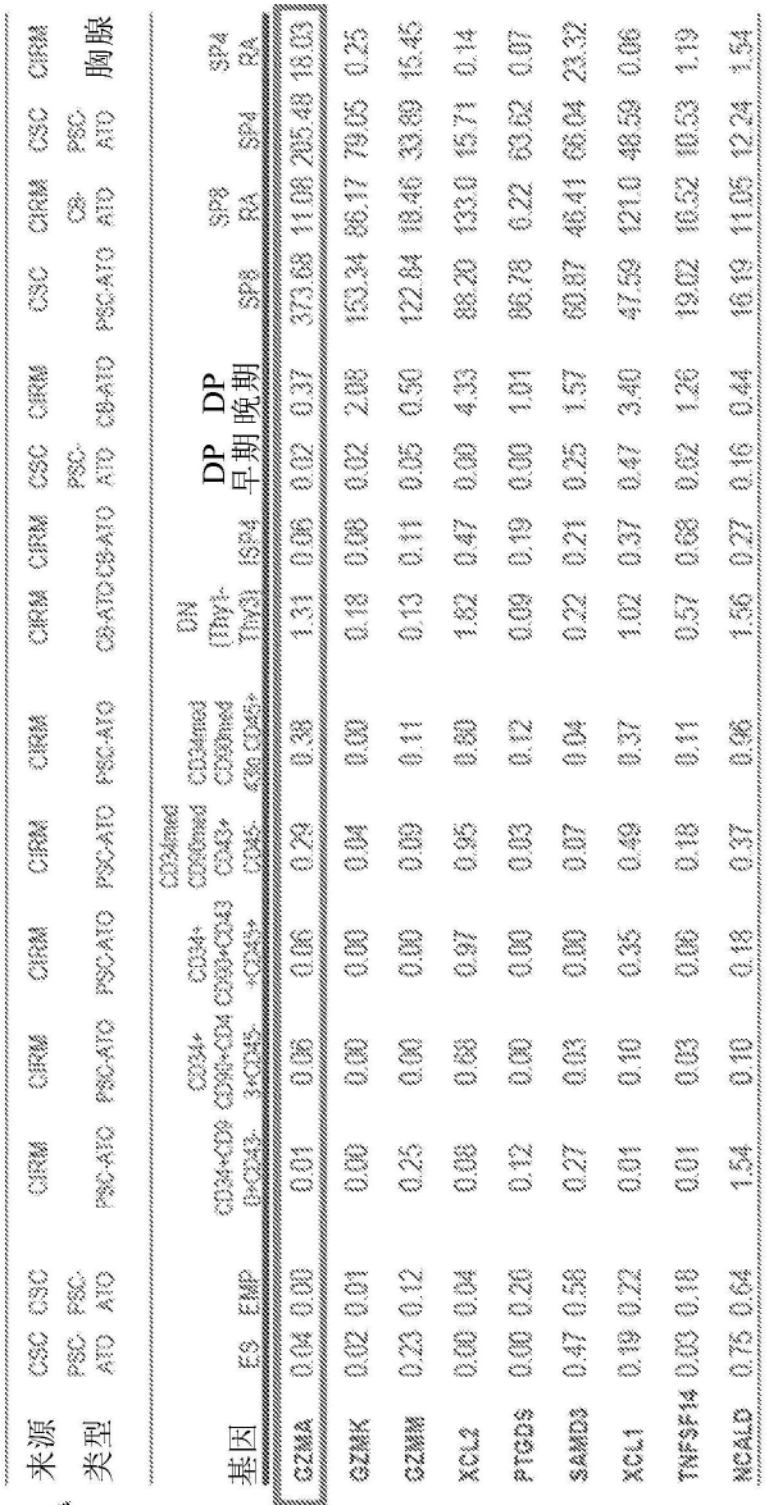

D
（未转导的ATO）
CD200R+ CD25+
0.051
（CAR19转导的）
CD200R+ CD25+
61.8
CD25
CD200R

图5D



A 来源	CSC	CSC	CRM	CRM	CRM	CRM	CRM	CRM	CRM	CSC	CRM	CSC	CRM	CSC	CRM
类型	PSC ATO	PSC-ATO						CB-ATO	CB-ATO	PSC-ATO	CB-ATO		CB-ATO	PSC-ATO	胸腺
基因	ES	EMP	CD34+CD9 (hCD43-	CD34+CD9 3+CD45-	CD34+ CD9+CD43 +CD45+	CD34med CD9med CD43+ CD45-	CD34med CD9med Can CD45+	DN (Thy1- Tm29)	ISP4	DP 早期	DP 晚期	SP8	SP8 RA	SP4	SP4 RA
GZMA	0.04	0.00	0.01	0.06	0.06	0.29	0.38	1.31	0.06	0.02	0.37	323.68	11.08	205.48	18.03
GZMK	0.02	0.01	0.00	0.00	0.00	0.04	0.00	0.18	0.08	0.02	2.88	153.34	86.17	79.05	0.25
GZMM	0.23	0.12	0.25	0.00	0.00	0.09	0.11	0.13	0.11	0.05	0.90	122.84	18.46	33.89	15.45
XCL2	0.00	0.04	0.08	0.06	0.97	0.95	0.80	1.82	0.47	0.03	4.33	88.20	133.0	15.71	0.14
PTGDS	0.00	0.26	0.12	0.00	0.00	0.03	0.12	0.09	0.19	0.00	1.01	86.78	0.22	63.82	0.07
SAMD3	0.47	0.58	0.27	0.03	0.00	0.07	0.04	0.22	0.21	0.25	1.57	60.87	46.41	66.04	23.32
XCL1	0.19	0.22	0.01	0.10	0.35	0.49	0.37	1.02	0.37	0.47	3.40	47.59	121.0	48.59	0.06
TNFSF14	0.03	0.18	0.01	0.03	0.00	0.18	0.11	0.57	0.68	0.02	1.26	19.02	16.52	10.53	1.19
NCALD	0.75	0.64	1.54	0.10	0.18	0.37	0.06	1.56	0.27	0.16	0.44	16.19	11.05	12.24	1.54

图6A

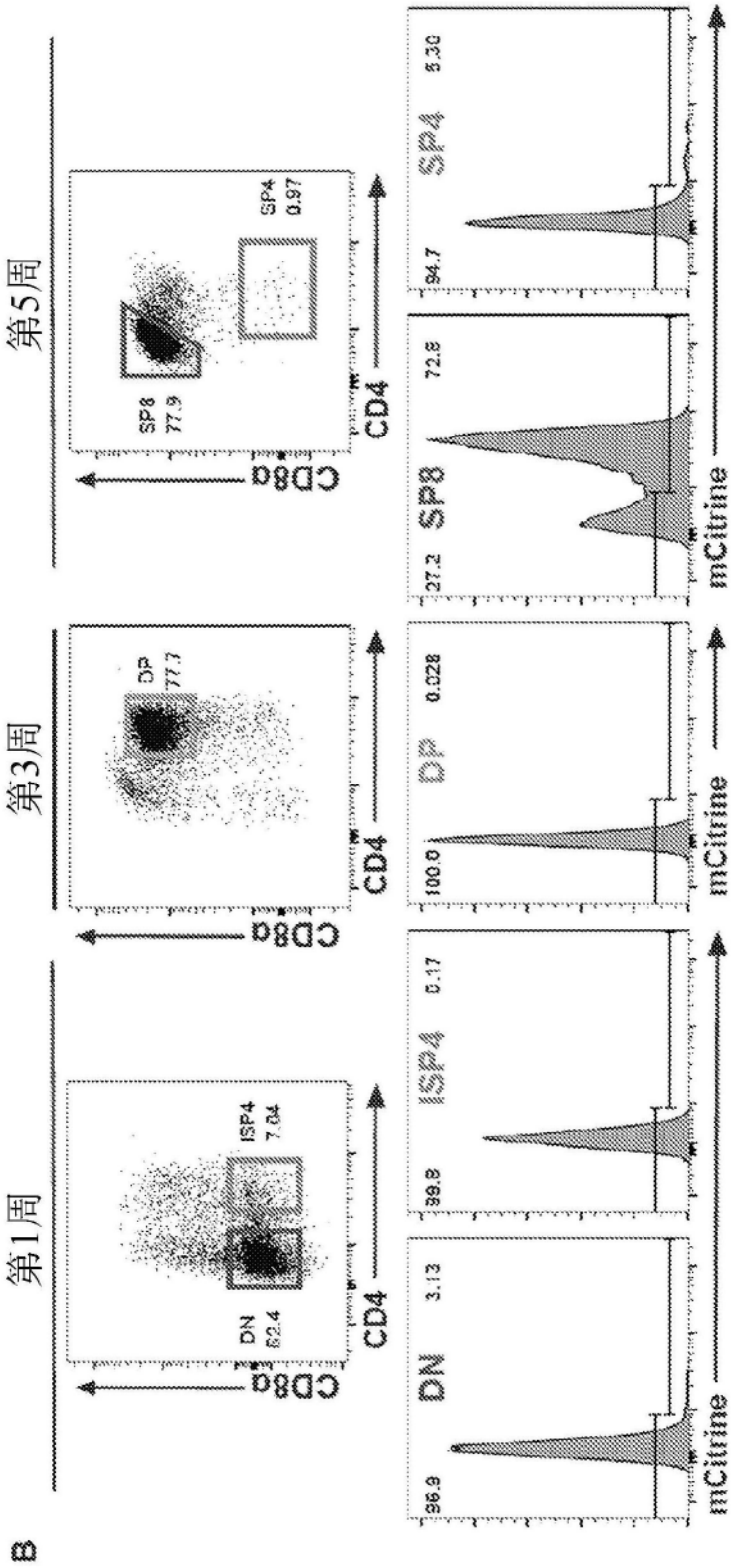

B
第1周
第3周
第5周
CD8a
CD4
DN
62.4
ISP4
7.04
DP
77.7
SP8
77.9
SP4
0.97
DN
3.13
ISP4
5.17
DP
0.028
SP8
72.8
SP4
5.30
96.9
99.8
100.0
27.2
94.7
mCitrine

图6B

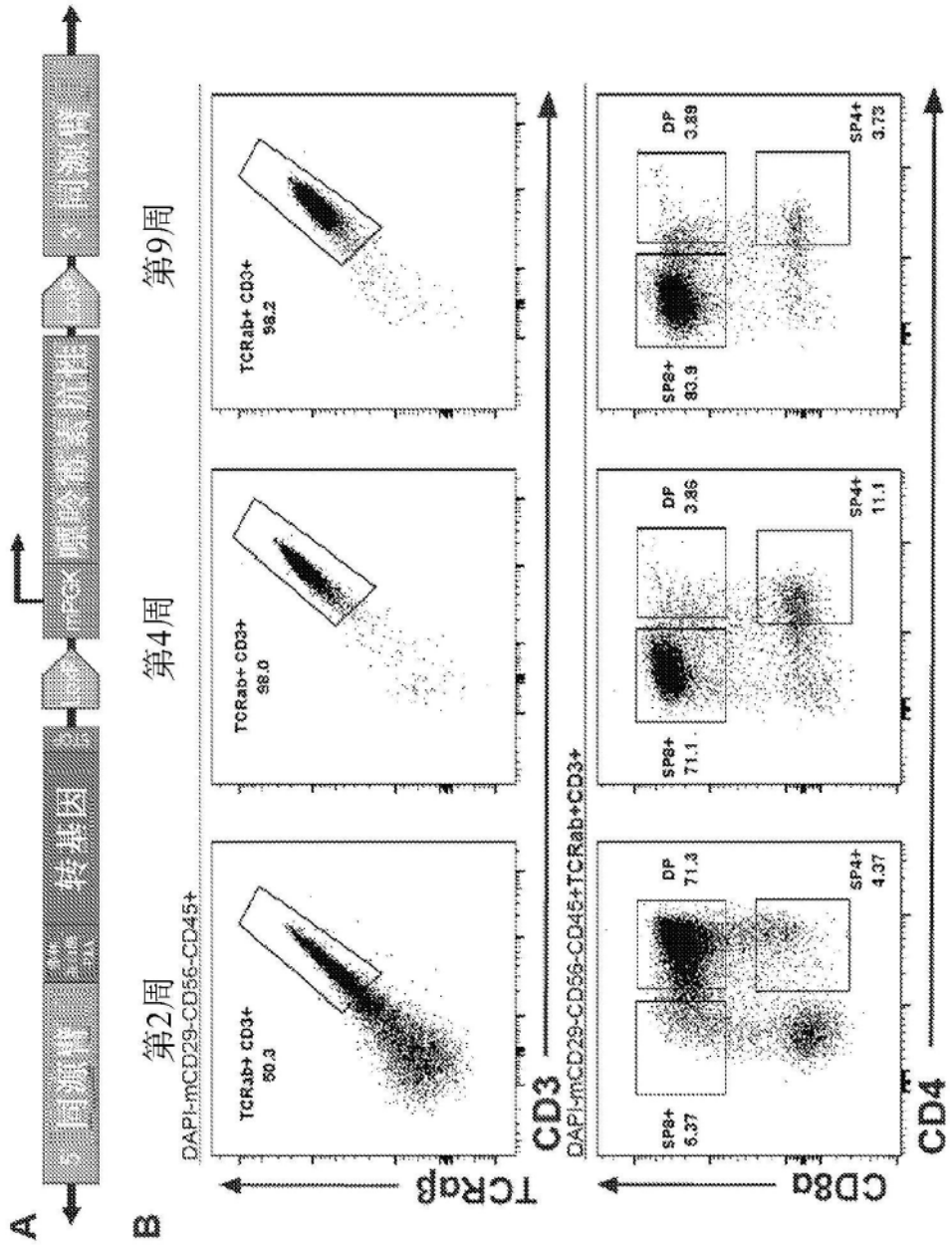

A
B
第2周
第4周
第9周
DAPI-mCD29-CD56-CD45+
DAPI-mCD29-CD56-CD45+TCRab+CD3+
TCRab+ CD3+
90.3
98.0
98.2
TCRαβ
CD3
CD8α
CD4
SP8+
6.37
DP
71.3
SP4+
4.37
SP8+
71.1
DP
3.36
SP4+
11.1
SP8+
83.9
DP
3.89
SP4+
3.72

图7A-B

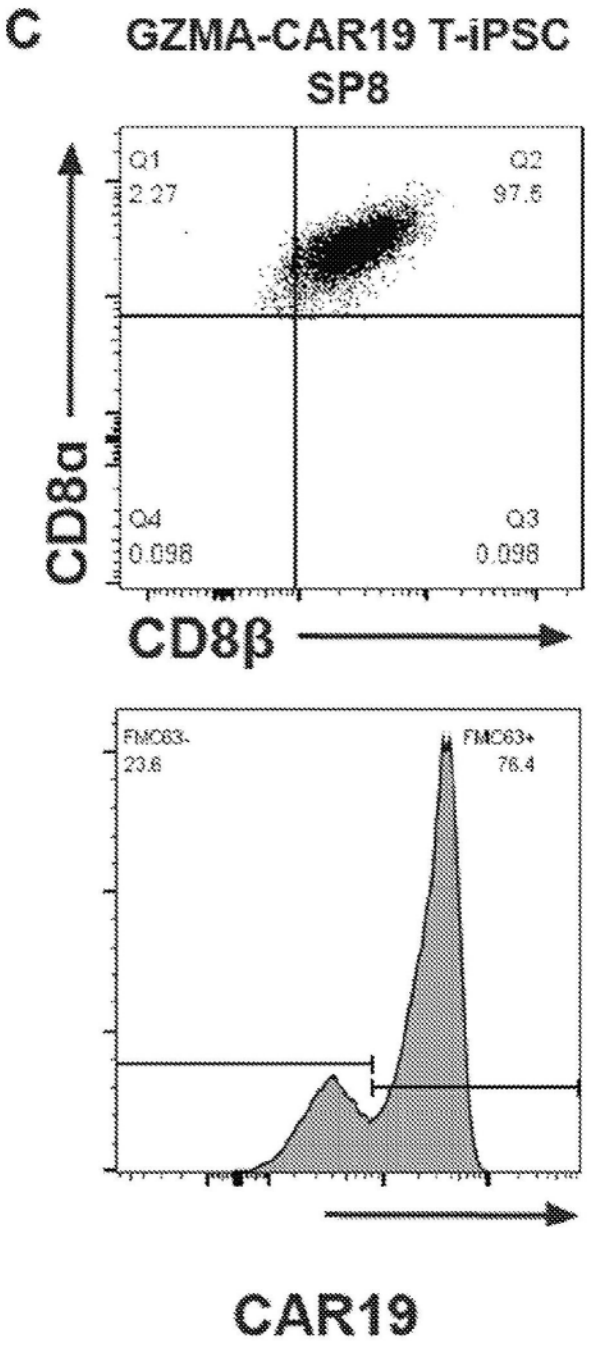

C
GZMA-CAR19 T-iPSC
SP8
Q1
2.27
Q2
97.6
Q4
0.098
Q3
0.098
CD8α
CD8β
FMC63-
23.6
FMC63+
76.4
CAR19

图7C

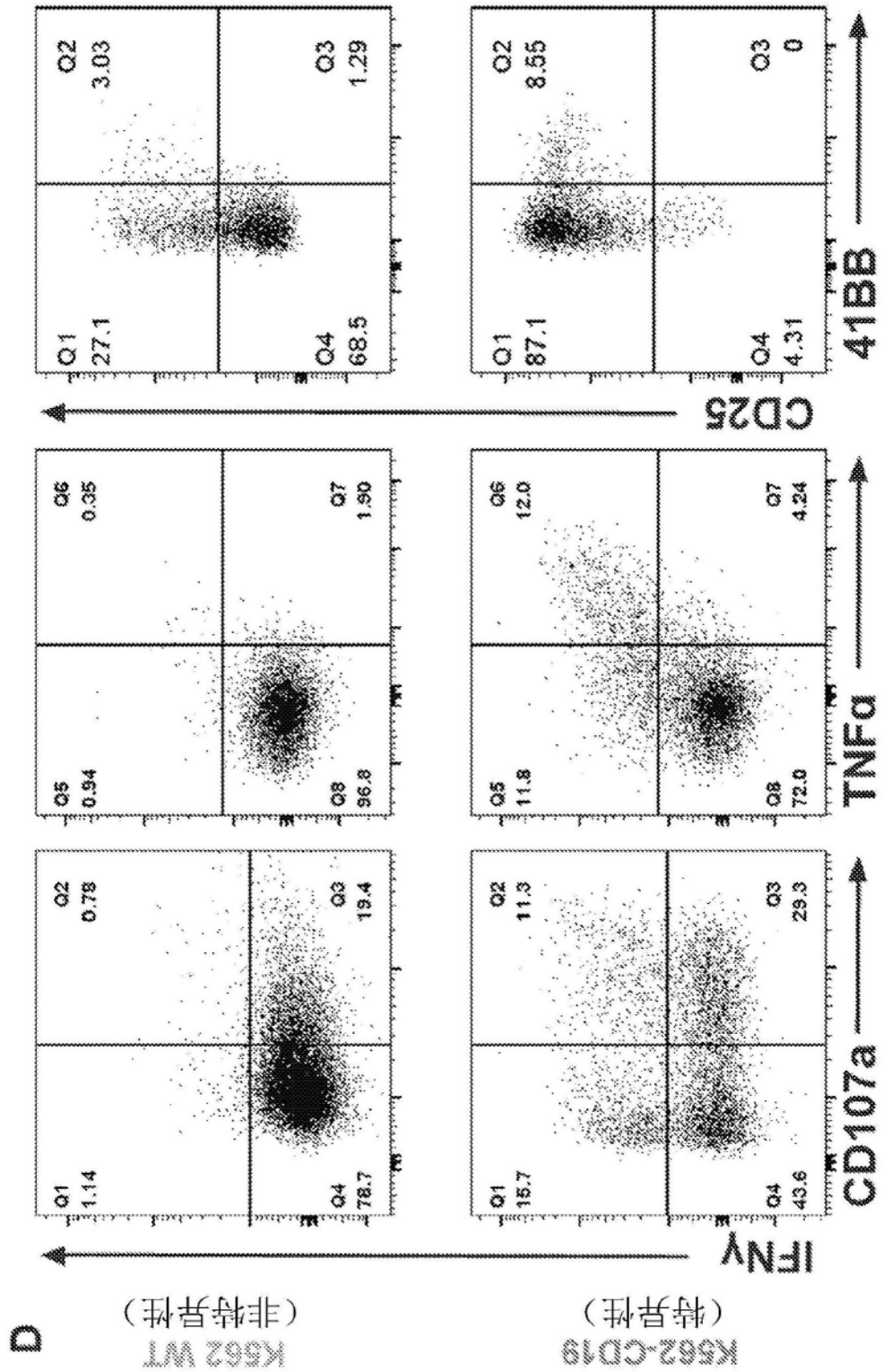

D
K562-CD19
（特异性）
K562 WT
（非特异性）
IFNγ
CD107a
TNFα
CD25
41BB
Q1 15.7
Q2 11.3
Q3 29.3
Q4 43.6
Q5 11.8
Q6 12.0
Q7 4.24
Q8 72.0
Q1 87.1
Q2 8.55
Q3 0
Q4 4.31
Q1 1.14
Q2 0.78
Q3 19.4
Q4 78.7
Q5 0.94
Q6 0.35
Q7 1.90
Q8 96.8
Q1 27.1
Q2 3.03
Q3 1.29
Q4 68.5

图7D

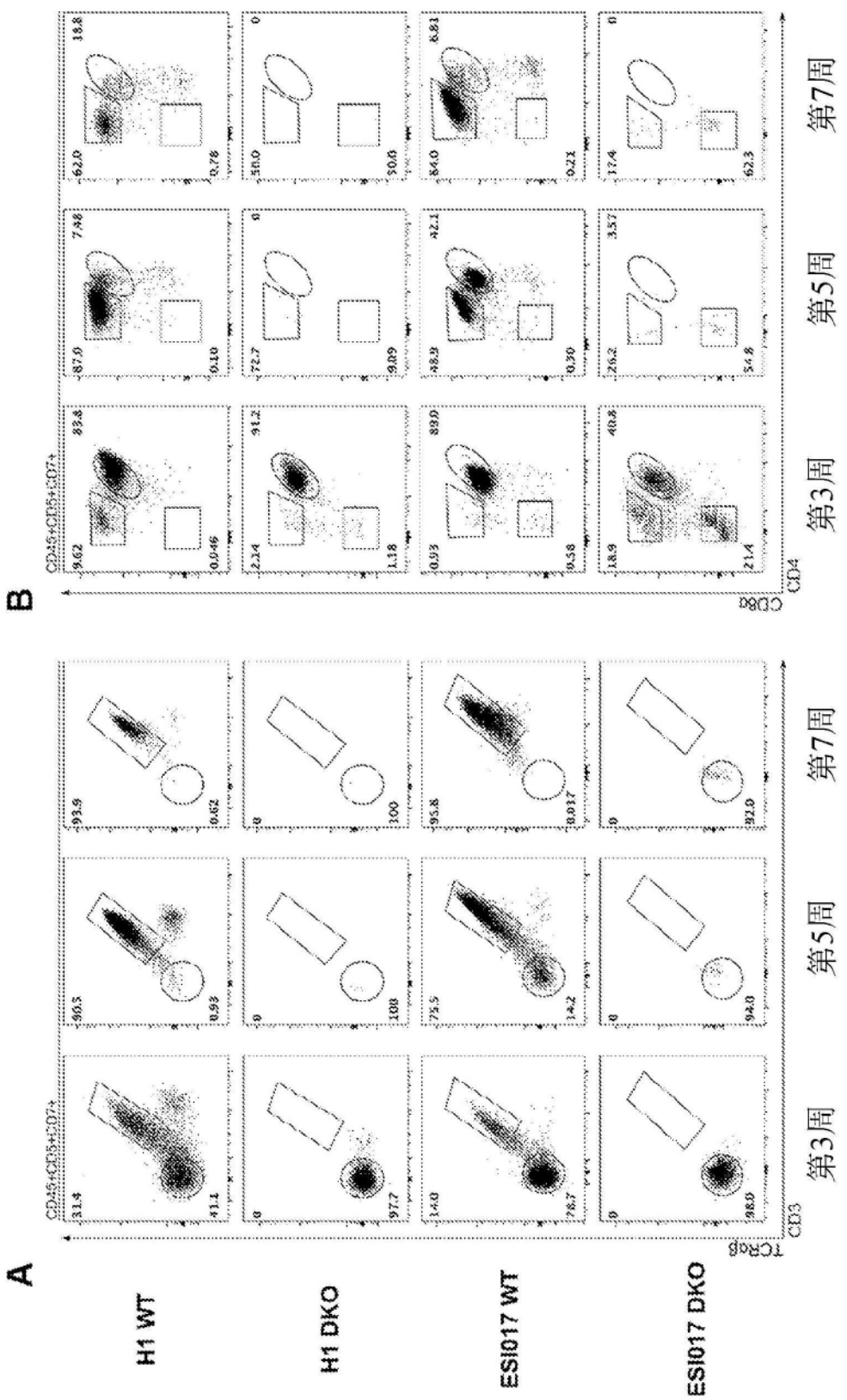

A
B
H1 WT
H1 DKO
ESI017 WT
ESI017 DKO
第3周
第5周
第7周
TCRαβ
CD3
CD8α
CD4

图8A-B

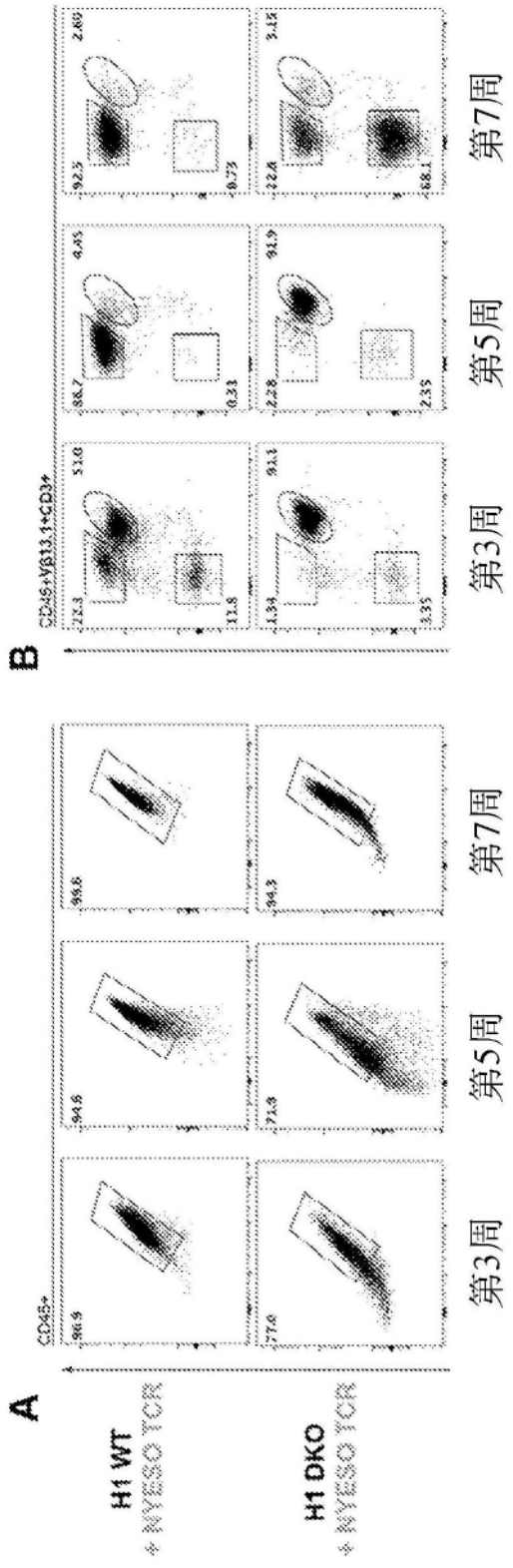

A
B
H1 WT
+ NYESO TCR
H1 DKO
+ NYESO TCR
CD45+
CD45+Vβ13.1+CD3+
第3周
第5周
第7周
第3周
第5周
第7周

图9A-B

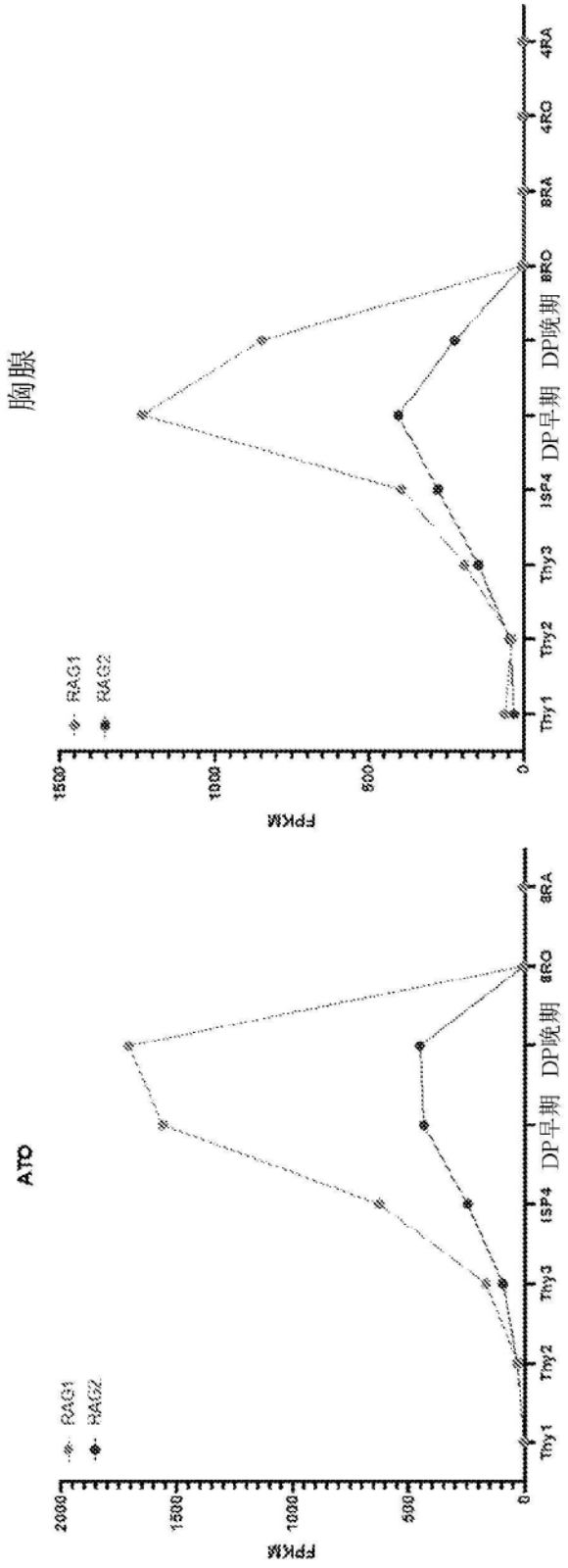

胸腺
RAG1
RAG2
FPKM
1500
1000
500
0
Thy1
Thy2
Thy3
ISP4
DP早期
DP晚期
8RO
8RA
4RO
4RA
ATO
RAG1
RAG2
FPKM
2000
1500
1000
500
0
Thy1
Thy2
Thy3
ISP4
DP早期
DP晚期
8RO
8RA

图10

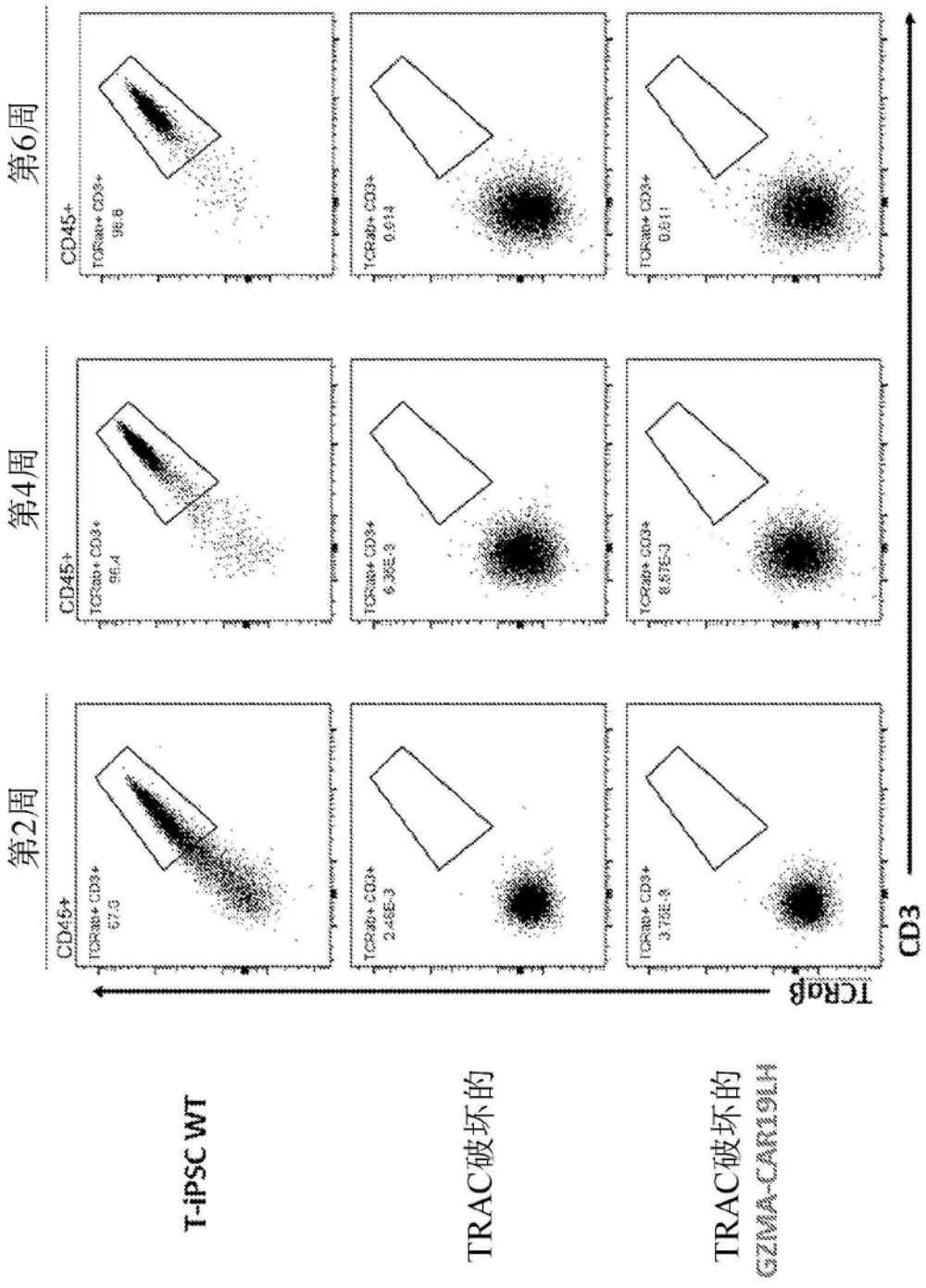

第2周
第4周
第6周
CD45+
TCRαβ+ CD3+
97.3
96.4
98.8
2.46E-3
6.38E-3
0.614
3.76E-3
8.87E-3
0.611
TCRαβ
CD3
T-iPSC WT
TRAC破坏的
TRAC破坏的
GZMA-CAR19LH

图11A

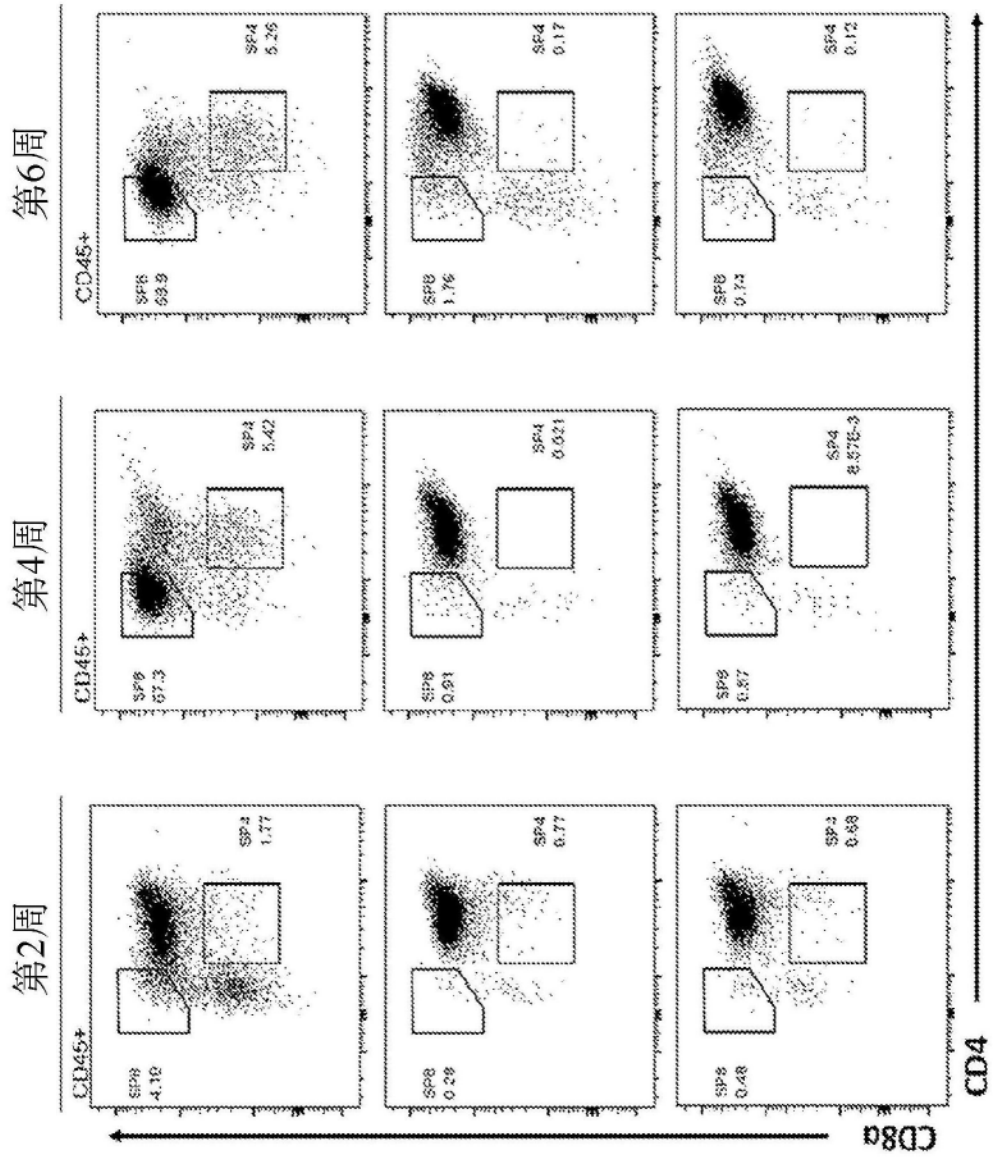

第2周
第4周
第6周
CD45+
CD8α
CD4
T-iPSC WT
TRAC破坏的
TRAC破坏的
GZMA-CAR19LH

图11B

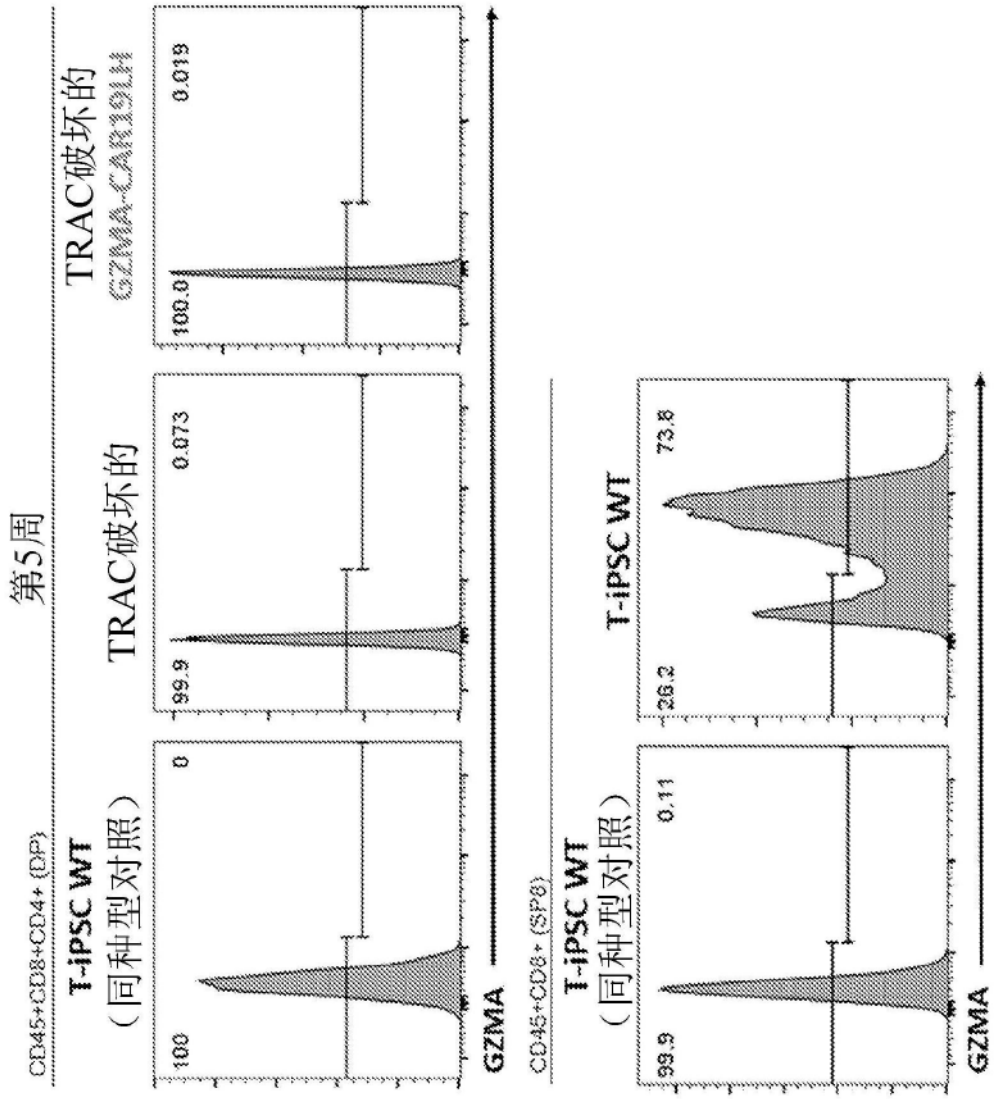

第5周
CD45+CD8+CD4+ (DP)
T-iPSC WT
（同种型对照）
TRAC破坏的
TRAC破坏的
GZMA-CAR19LH
100
0
99.9
0.073
100.0
0.019
GZMA
CD45+CD8+ (SP8)
T-iPSC WT
（同种型对照）
T-iPSC WT
99.9
0.11
26.2
73.8
GZMA

图11C

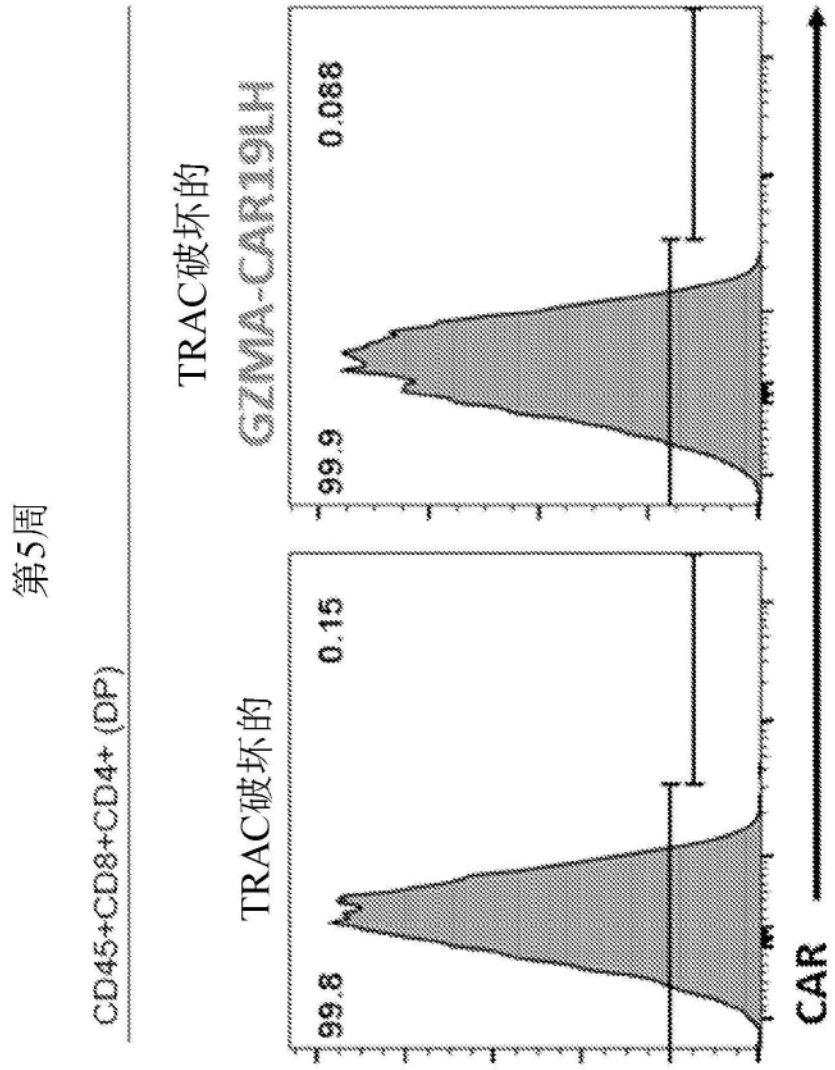

第5周
CD45+CD8+CD4+ (DP)
TRAC破坏的
GZMA-CAR19LH
0.088
99.9
TRAC破坏的
0.15
99.8
CAR

图11D

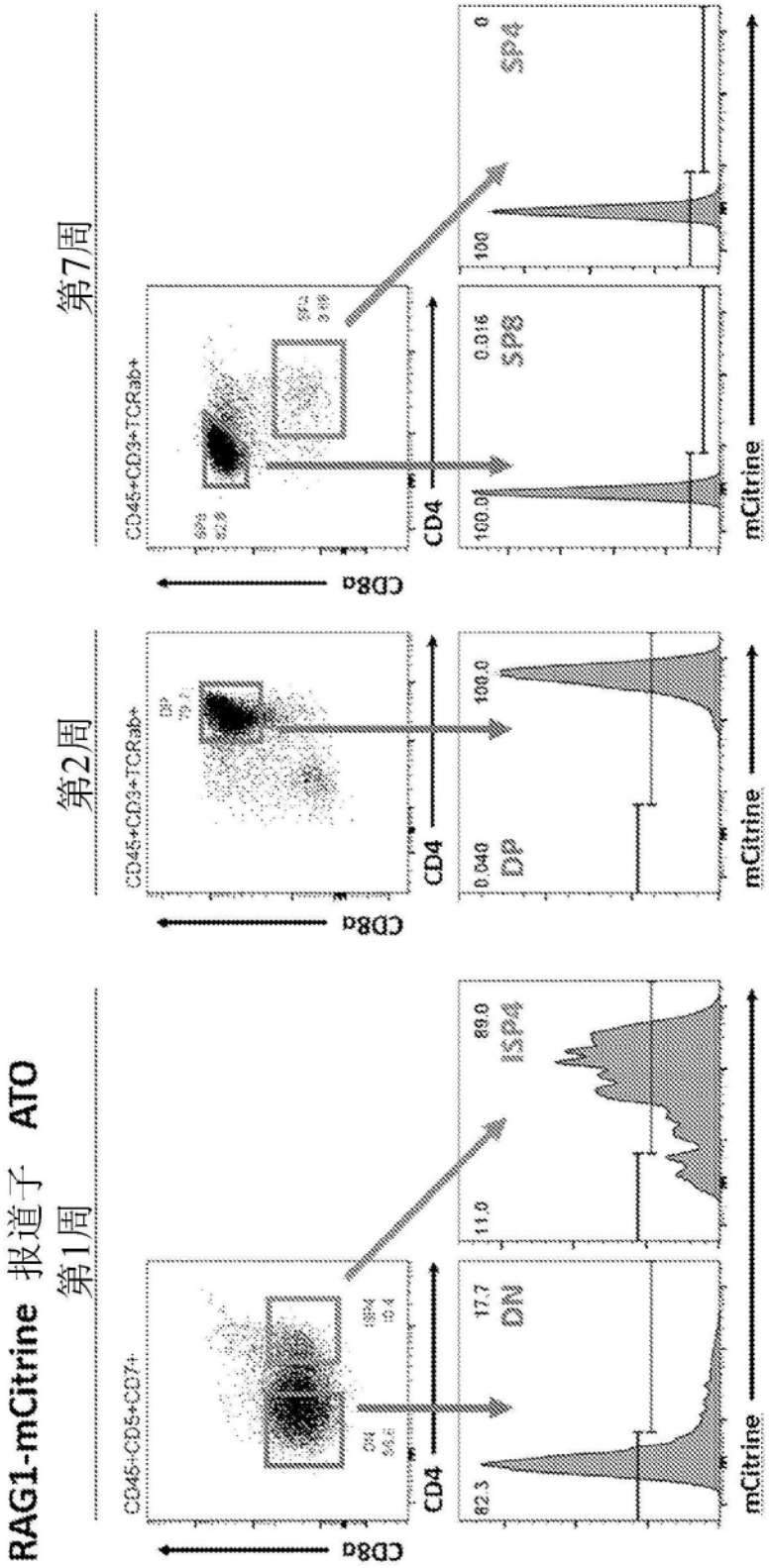

RAG1-mCitrine 报道子 ATO
第1周
第2周
第7周
CD45+CD5+CD7+
CD45+CD3+TCRab+
CD8a
CD4
mCitrine
82.3
17.7
DN
11.0
89.0
ISP4
0.040
DP
100.0
100.0
0.016
SP8
100
0
SP4

图12A

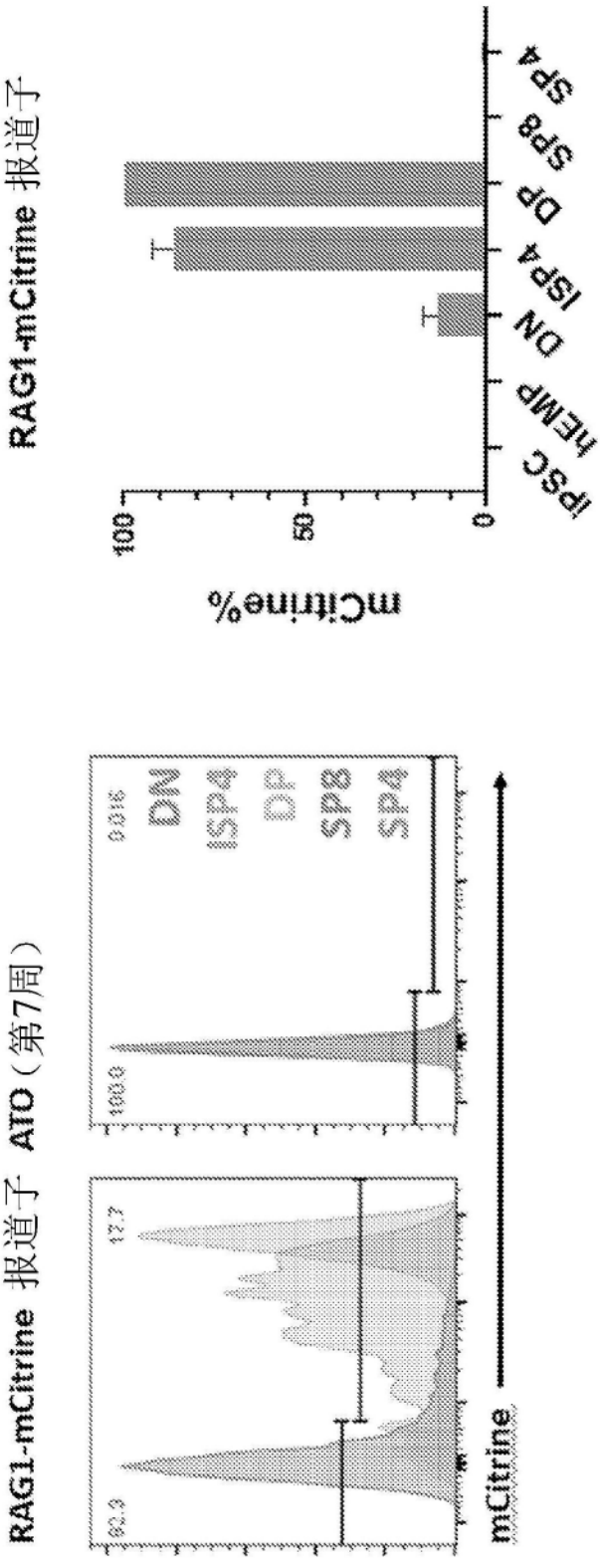

RAG1-mCitrine 报道子
mCitrine%
100
50
0
iPSC
hEMP
DN
ISP4
DP
SP8
SP4
RAG1-mCitrine 报道子 ATO（第7周）
62.3
12.7
1003.0
0.018
DN
ISP4
DP
SP8
SP4
mCitrine

图12B

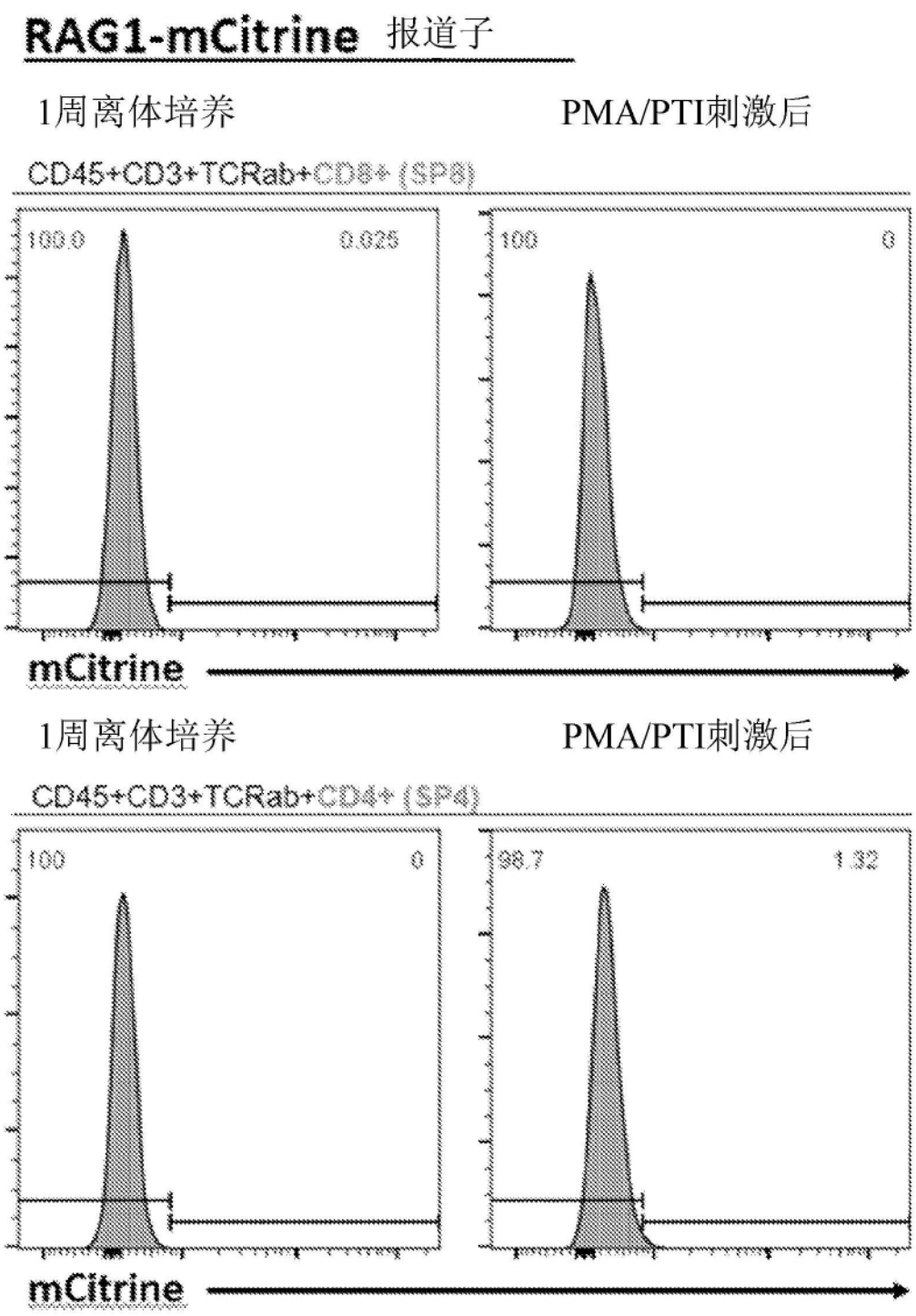

RAG1-mCitrine 报道子
1周离体培养
PMA/PTI刺激后
CD45+CD3+TCRab+CD8+ (SP8)
100.0
0.025
100
0
mCitrine
1周离体培养
PMA/PTI刺激后
CD45+CD3+TCRab+CD4+ (SP4)
100
0
98.7
1.32
mCitrine

图12C

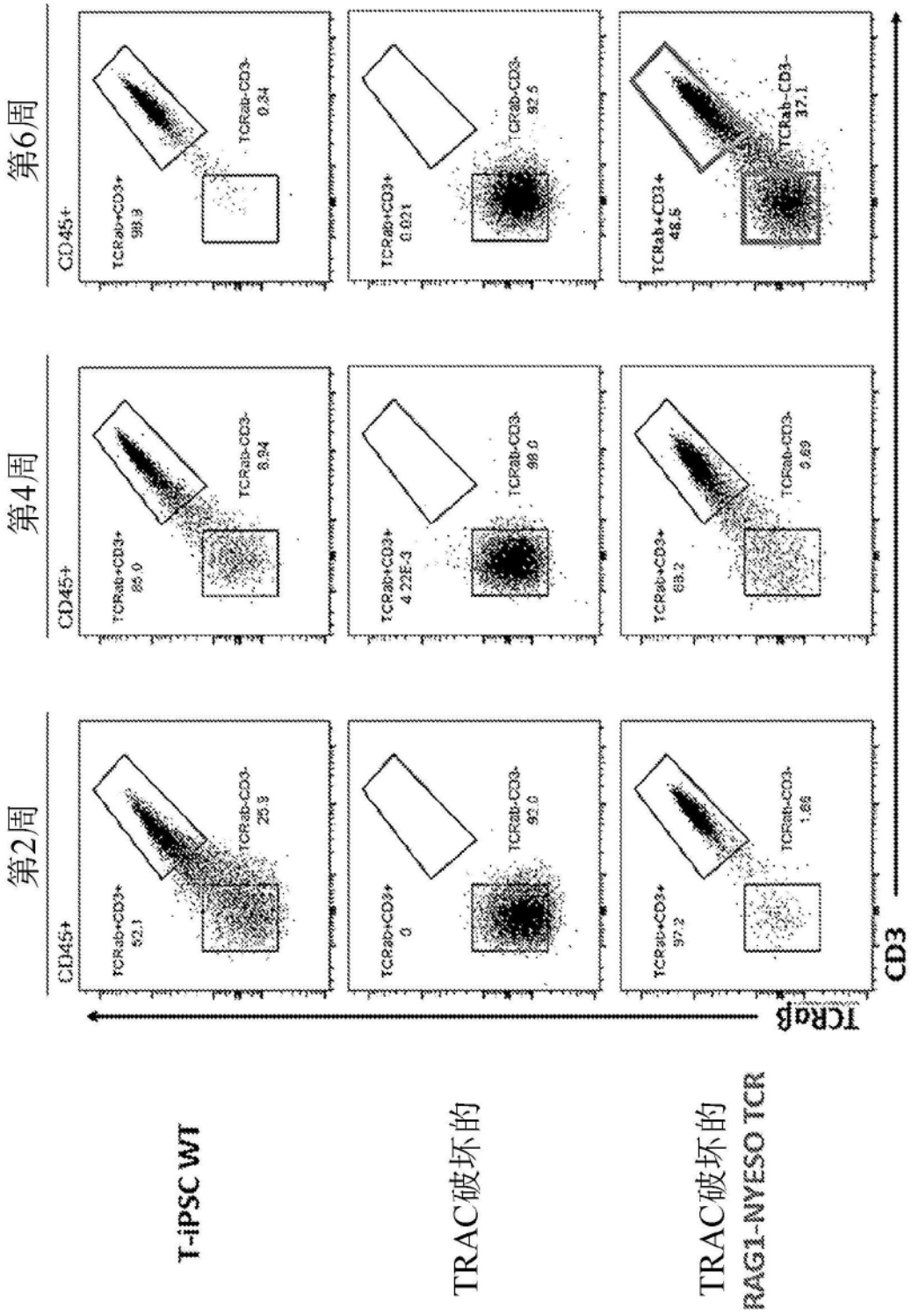

第2周
第4周
第6周
CD45+
TCRab+CD3+
TCRab-CD3-
52.1
25.8
85.0
8.84
98.3
0.34
0
92.0
4.22E-3
98.0
0.021
92.5
97.2
1.66
88.2
9.69
48.5
37.1
TCRαβ
CD3
T-iPSC WT
TRAC破坏的
TRAC破坏的
RAG1-NYESO TCR

图13A

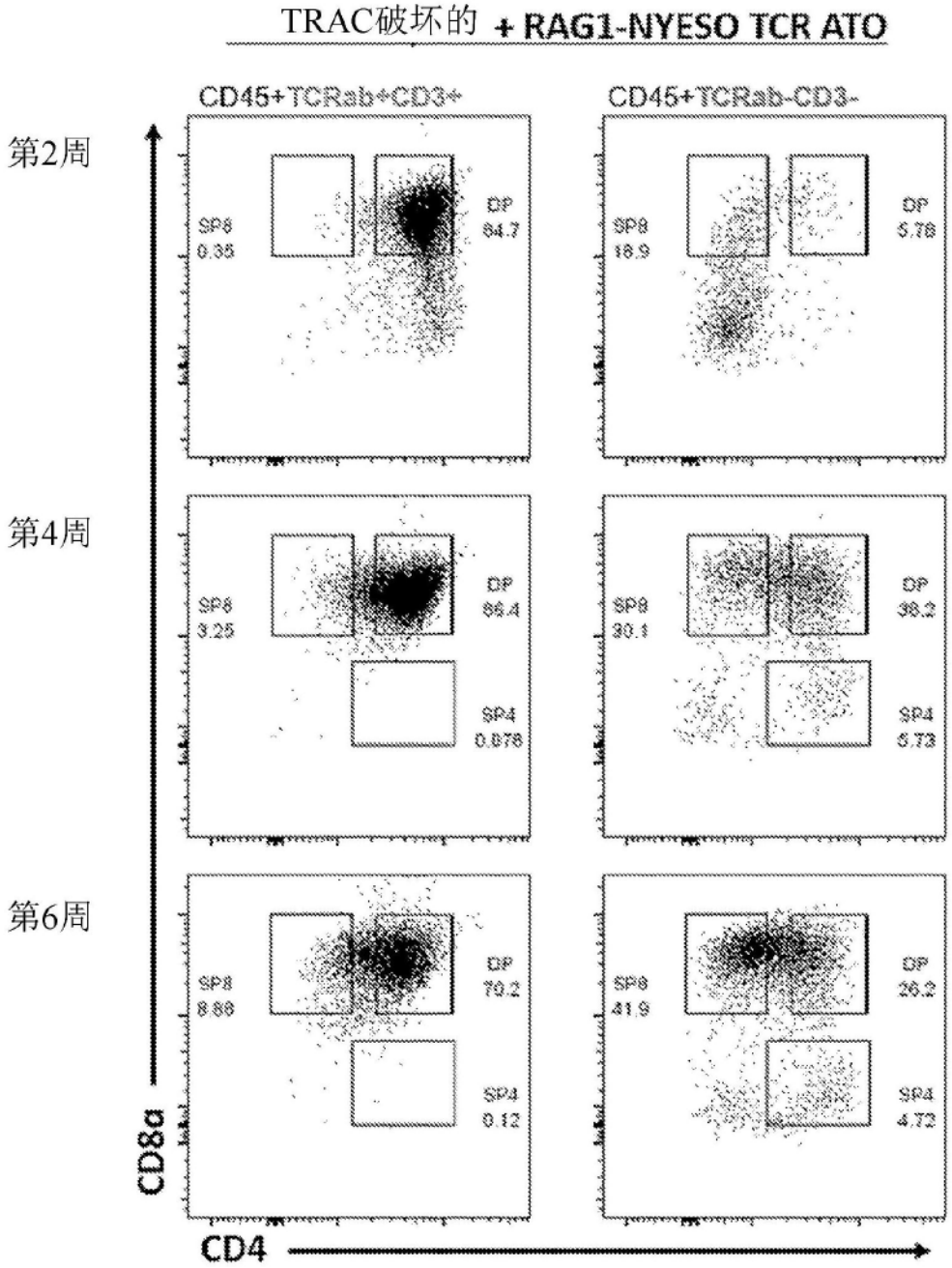

TRAC破坏的 + RAG1-NYESO TCR ATO
CD45+TCRab+CD3+
CD45+TCRab-CD3-
第2周
第4周
第6周
SP8
0.35
DP
84.7
SP8
18.9
DP
5.78
SP8
3.25
DP
86.4
SP4
0.878
SP8
30.1
DP
38.2
SP4
5.73
SP8
8.88
DP
70.2
SP4
0.12
SP8
41.9
DP
36.2
SP4
4.72
CD8a
CD4

图13B

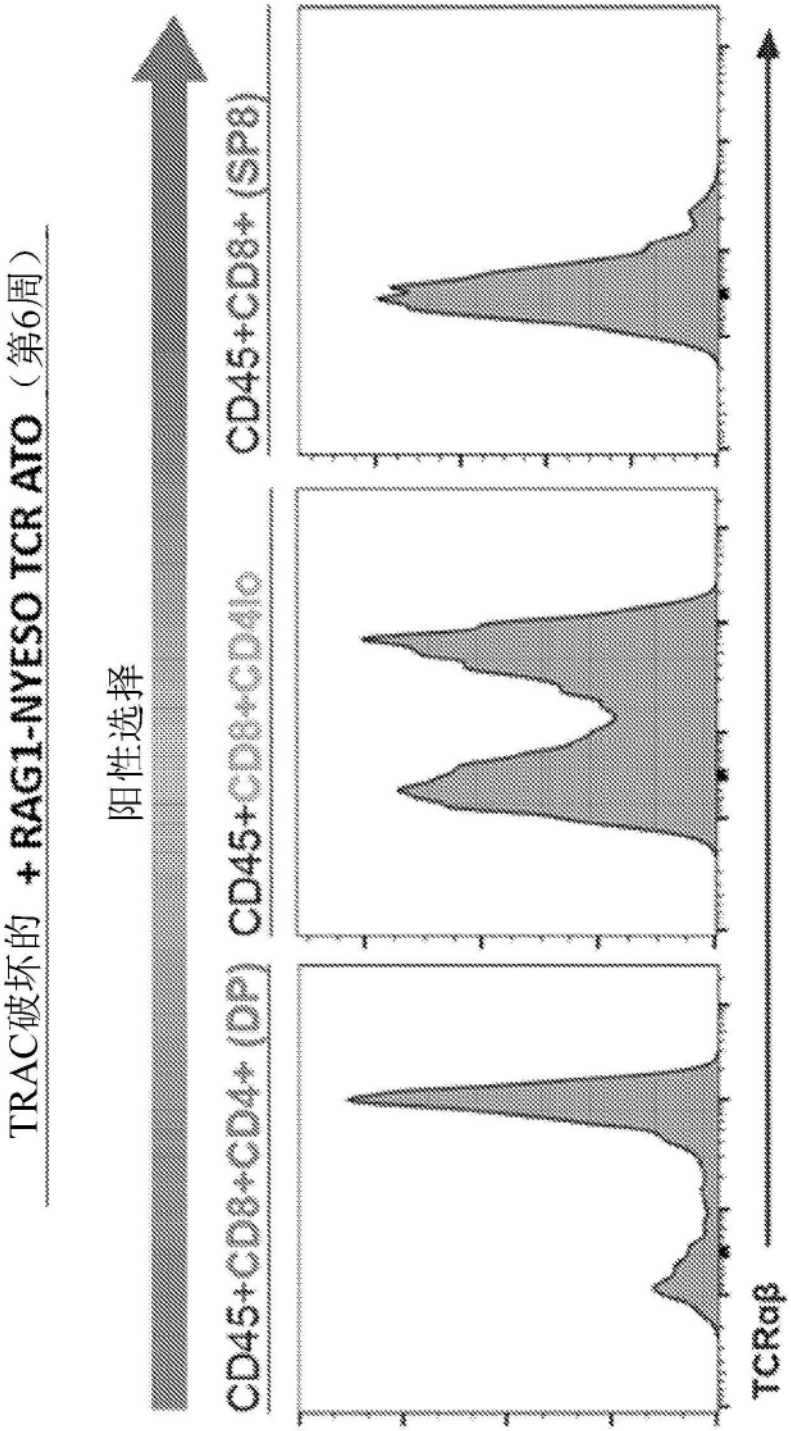

TRAC破坏的 + RAG1-NYESO TCR ATO（第6周）
阳性选择
CD45+CD8+CD4+ (DP)
CD45+CD8+CD4lo
CD45+CD8+ (SP8)
TCRαβ

图13C

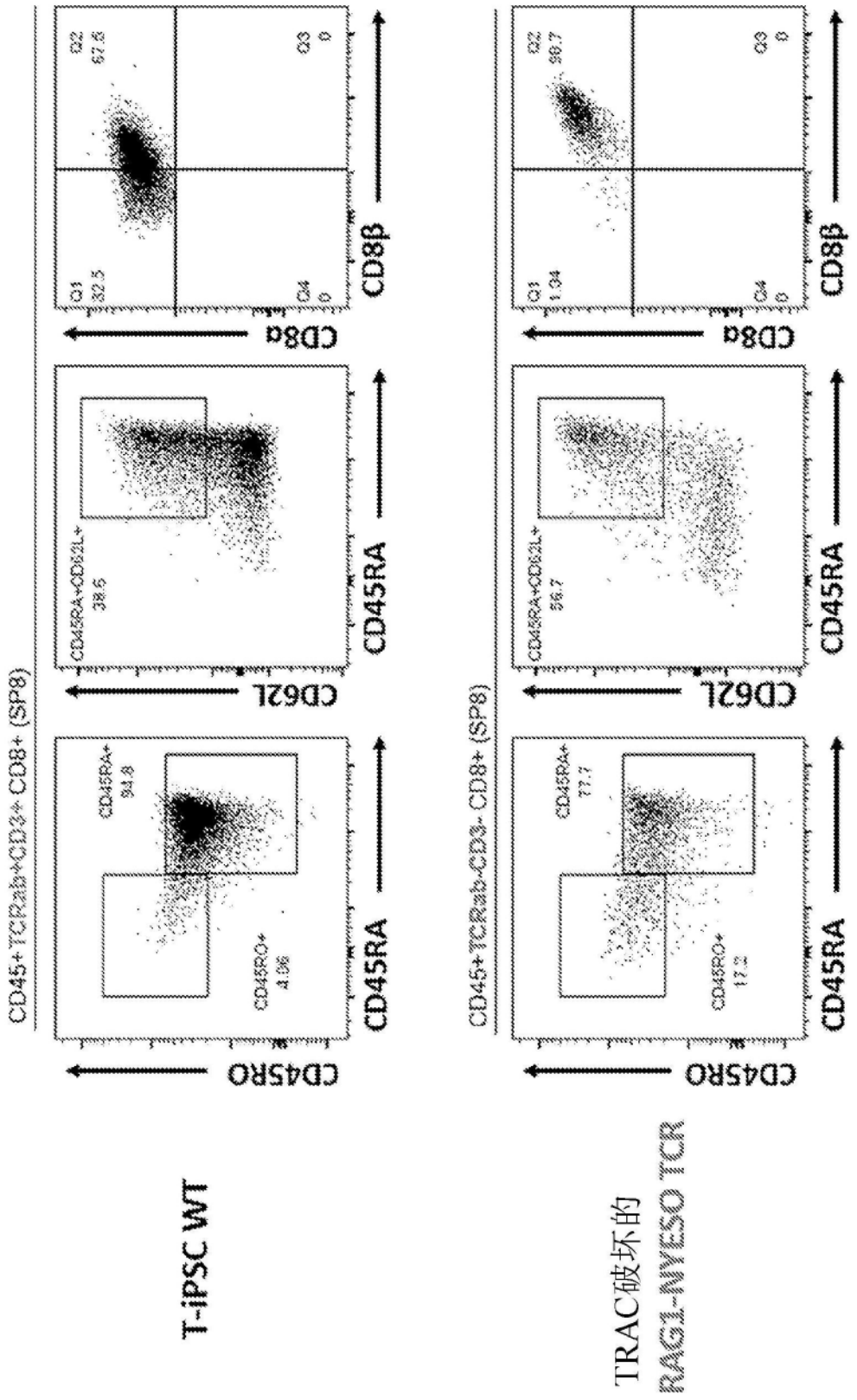

CD45+TCRαβ+CD3+ CD8+ (SP8)
CD45RA+
94.8
CD45RO+
4.96
CD45RA
CD45RO
CD45RA+CD62L+
38.6
CD62L
CD45RA
Q1
32.5
Q2
67.5
Q3
0
Q4
0
CD8α
CD8β
T-iPSC WT
CD45+TCRαβ-CD3- CD8+ (SP8)
CD45RA+
77.7
CD45RO+
17.2
CD45RA
CD45RO
CD45RA+CD62L+
56.7
CD62L
CD45RA
Q1
1.34
Q2
98.7
Q3
0
Q4
0
CD8α
CD8β
TRAC破坏的
RAG1-MYESO TCR

图13D

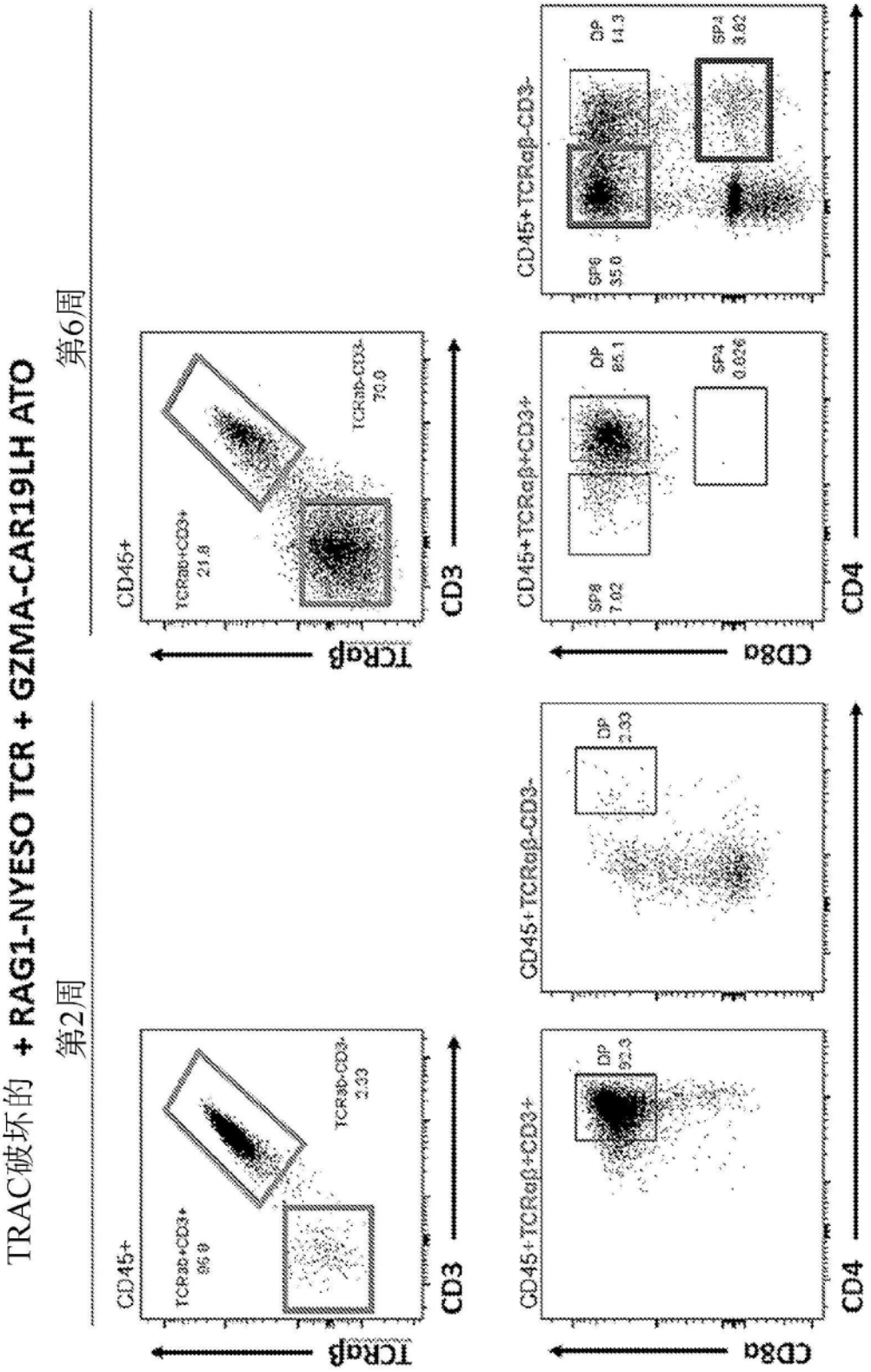

TRAC破坏的 + RAG1-NYESO TCR + GZMA-CAR19LH ATO
第2周
第6周
CD45+
TCRαβ+CD3+
95.9
TCRαβ-CD3-
2.33
TCRαβ
CD3
CD45+TCRαβ+CD3+
DP
92.3
CD8α
CD4
CD45+TCRαβ-CD3-
DP
2.33
CD45+
TCRαβ+CD3+
21.8
TCRαβ-CD3-
70.0
CD45+TCRαβ+CD3+
DP
85.1
SP4
0.026
SP8
7.02
CD45+TCRαβ-CD3-
DP
14.3
SP4
3.62
SP8
35.0

图14A

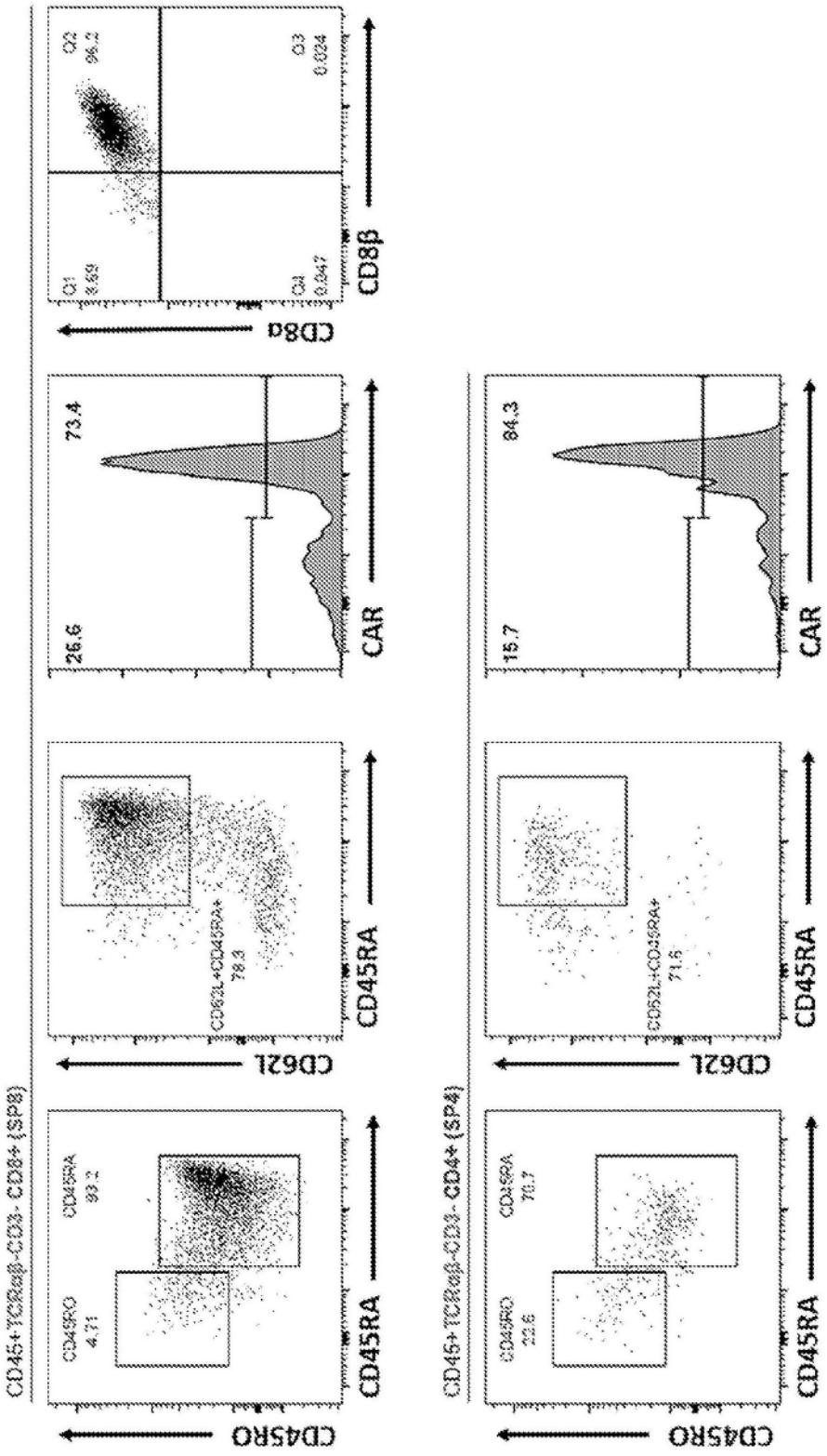

CD45+TCRαβ-CD3- CD8+ (SP8)
CD45+TCRαβ-CD3- CD4+ (SP4)
CD45RO
CD45RA
CD62L
CD45RA
CAR
CD45RA
CD8α
CD8β
CD45RO 4.71
CD45RA 93.2
CD62L+CD45RA+ 78.3
73.4
26.6
Q1 8.69
Q2 96.2
Q3 0.024
Q4 0.047
CD45RO 22.6
CD45RA 70.7
CD62L+CD45RA+ 71.6
84.3
15.7

图14B

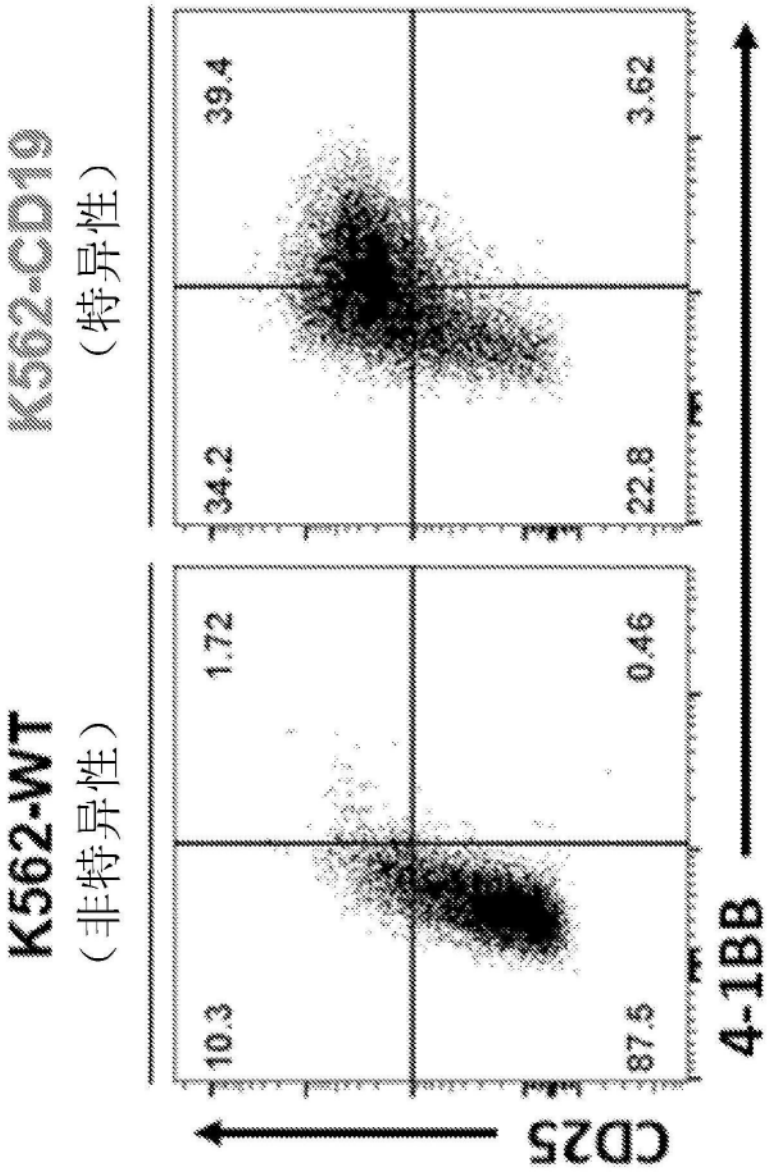

K562-CD19
（特异性）
39.4
3.62
34.2
22.8
K562-WT
（非特异性）
1.72
0.46
10.3
87.5
CD25
4-1BB

图14C

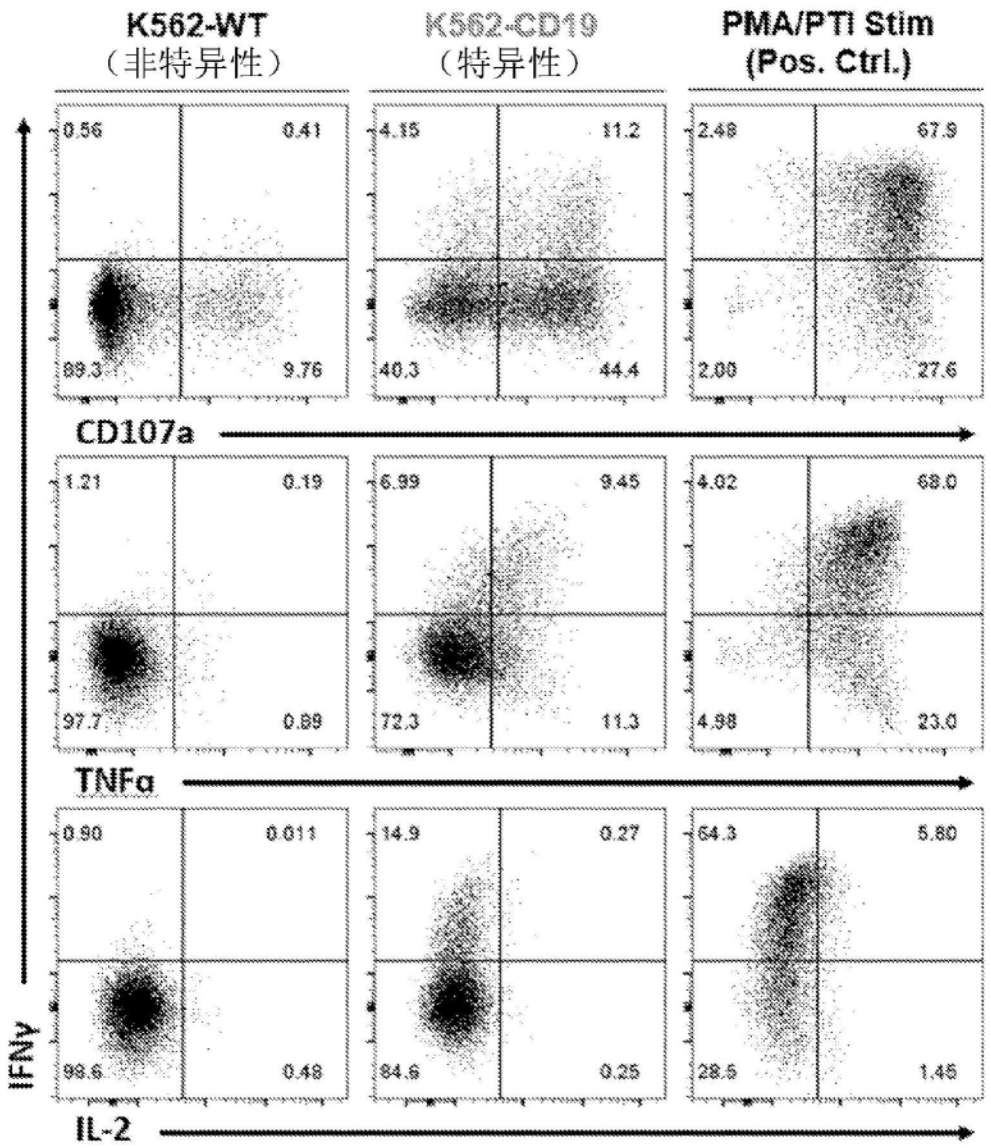

K562-WT
（非特异性）
K562-CD19
（特异性）
PMA/PTI Stim
(Pos. Ctrl.)
0.56
0.41
89.3
9.76
4.15
11.2
40.3
44.4
2.48
67.9
2.00
27.6
CD107a
1.21
0.19
97.7
0.89
6.99
9.45
72.3
11.3
4.02
68.0
4.98
23.0
TNFα
0.90
0.011
99.6
0.48
14.9
0.27
84.6
0.25
64.3
5.80
28.5
1.45
IFNγ
IL-2

图14D

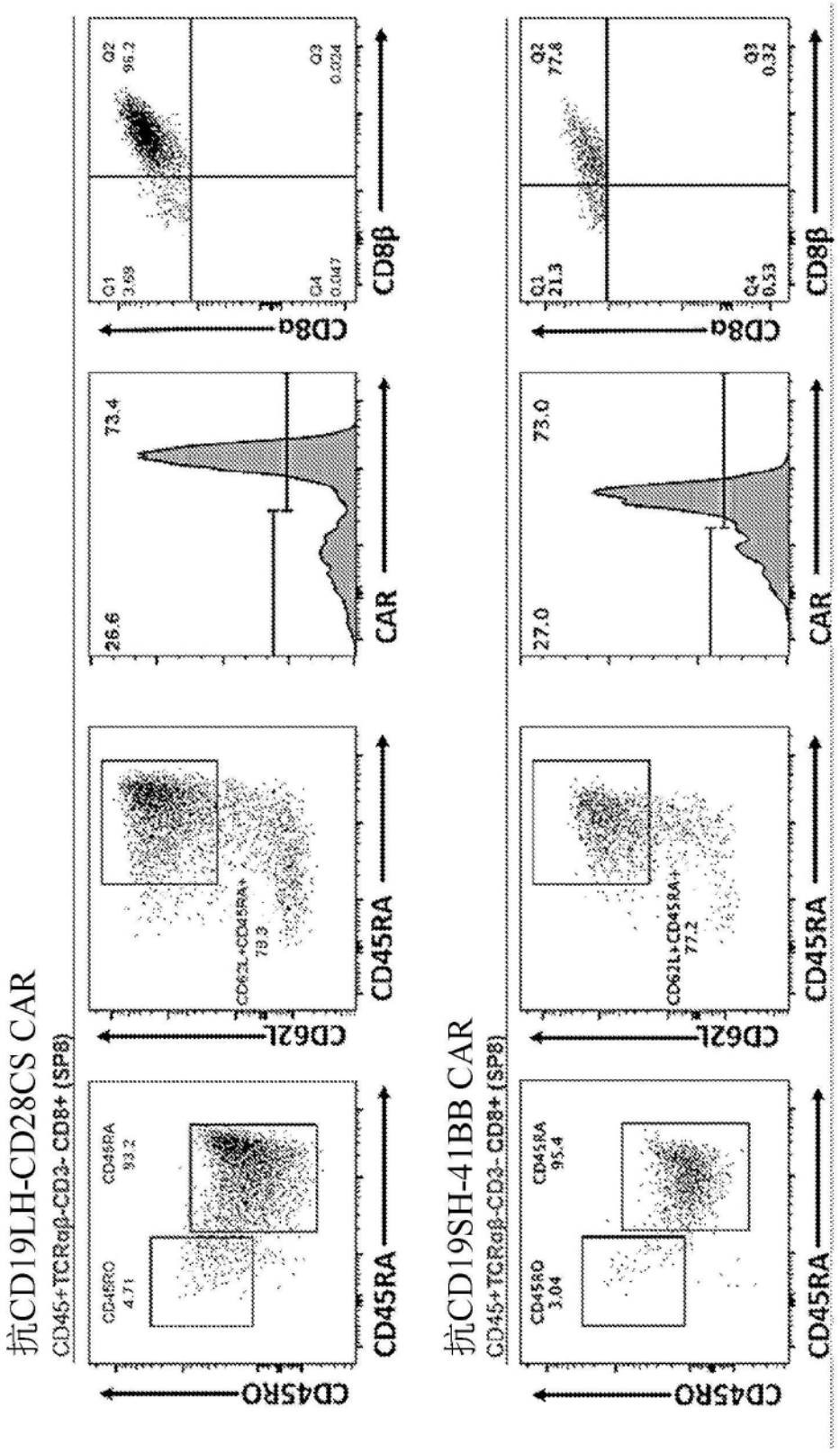

抗CD19LH-CD28CS CAR
CD45+TCRαβ-CD3- CD8+ (SP8)
CD45RO
CD45RA
CD45RO 4.71
CD45RA 93.2
CD62L
CD45RA
CD62L+CD45RA+ 78.3
CD8α
CD8β
Q1 3.69
Q2 95.2
Q4 0.047
Q3 0.024
CAR
26.6
73.4
抗CD19SH-41BB CAR
CD45+TCRαβ-CD3- CD8+ (SP8)
CD45RO
CD45RA
CD45RO 3.04
CD45RA 95.4
CD62L
CD45RA
CD62L+CD45RA+ 77.2
CD8α
CD8β
Q1 21.3
Q2 77.8
Q4 0.53
Q3 0.32
CAR
27.0
73.0

图14E