



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118581047 A

(43) 申请公布日 2024.09.03

(21) 申请号 202410674648.0

(51) Int.CI.

(22) 申请日 2018.10.29

C12N 5/10 (2006.01)

(30) 优先权数据

C12N 9/22 (2006.01)

62/578,153 2017.10.27 US

C12N 15/113 (2010.01)

(62) 分案原申请数据

C12N 15/62 (2006.01)

201880084419.6 2018.10.29

C12N 15/90 (2006.01)

(71) 申请人 加利福尼亚大学董事会

C07K 19/00 (2006.01)

地址 美国加利福尼亚州

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(72) 发明人 T·L·罗斯 E·士夫洛特

A·曼森 C·皮格 召司

A·力巴斯

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100

专利代理人 陈扬扬 钱文字

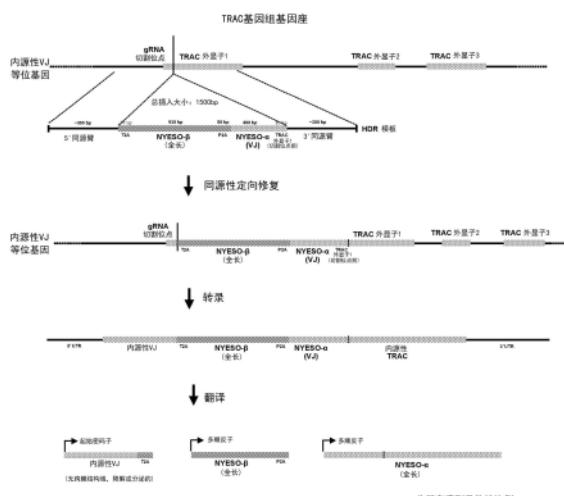
权利要求书6页 说明书26页 附图11页

(54) 发明名称

内源性T细胞受体的靶向置换

(57) 摘要

本申请涉及内源性T细胞受体的靶向置换。本文提供了用于编辑人T细胞基因组的组合物和方法。在一些实施方式中，将异源性T细胞受体(TCR)- β 链和异源性TCR- α 链插入T细胞基因组中TCR亚基恒定基因的外显子1。



1. 一种编辑人T细胞基因组的方法,所述方法包括将以下插入人T细胞中T细胞受体(TCR)-亚基恒定基因的外显子1的靶区域中,
核酸序列,其从N端到C端编码,
 - (i) 第一自切割肽序列;
 - (ii) 第一异源性TCR亚基链,其中所述TCR亚基链包含TCR亚基的可变区和恒定区;
 - (iii) 第二自切割肽序列;
 - (iv) 第二异源性TCR亚基链的可变区;和
 - (v) 内源性TCR亚基的N端的部分,其中,如果内源性TCR亚基为TCR- α (TCR-阿尔法) 亚基,则第一异源性TCR亚基链是异源性TCR- β (TCR-贝塔) 亚基链并且第二异源性TCR亚基链是异源性TCR- α 亚基链,并且其中,如果内源性TCR亚基是TCR- β 亚基,则第一异源性TCR亚基链是异源性TCR- α 亚基链并且第二异源性TCR亚基链是异源性TCR- β 亚基链。
2. 如权利要求1所述的方法,其中所述核酸序列从N端到C端编码,
 - (i) 第一自切割肽序列;
 - (ii) 异源性TCR- β 链;
 - (iii) 第二自切割肽序列;
 - (iv) 异源性TCR- α 链的可变区;和
 - (v) 内源性TCR- α 亚基的N端的部分,所述核酸序列被插入人T细胞中TCR- α 亚基恒定基因(TRAC)的外显子1。
3. 如权利要求1所述的方法,其中所述核酸序列从N端到C端编码,
 - (i) 第一自切割肽序列;
 - (ii) 异源性TCR- α 链;
 - (iii) 第二自切割肽序列;
 - (iv) 异源性TCR- β 链的可变区;和
 - (v) 内源性TCR- β 亚基的N端的部分,所述核酸序列被插入人T细胞中TCR- β 亚基恒定基因(TRBC)的外显子1。
4. 如权利要求1-3中任一项所述的方法,其中所述核酸序列是双链或单链核酸序列,并且其中所述核酸序列通过将所述核酸序列引入T细胞被插入。
5. 如权利要求1-4中任一项所述的方法,其中所述核酸通过将包含所述核酸的病毒载体引入T细胞被插入。
6. 如权利要求1、2、4或5中任一项所述的方法,其中所述核酸通过将以下引入T细胞被插入,
 - (a) 切割TRAC基因的外显子1中的靶区域以在T细胞的基因组中产生插入位点的靶向的核酸酶;和
 - (b) 核酸序列,其中所述核酸序列通过同源性定向修复(HDR)插入插入位点。
7. 如权利要求1、3、4或5中任一项所述的方法,其中所述核酸通过将以下引入T细胞被插入,
 - (a) 切割TRBC基因的外显子1中的靶区域以在T细胞的基因组中产生插入位点的靶向的核酸酶;和
 - (b) 核酸序列,其中所述核酸序列通过同源性定向修复(HDR)插入插入位点。

8. 如权利要求1-7中任一项所述的方法,其中所述核酸序列的5'末端和3'末端包含与侧接靶区域的基因组序列同源的核苷酸序列。

9. 如权利要求8所述的方法,其中所述核酸序列的5'末端和3'末端包含与侧接插入位点的基因组序列同源的核苷酸序列。

10. 如权利要求6-9中任一项所述的方法,其中所述靶向的核酸酶在插入位点引入双链断裂。

11. 如权利要求1-10中任一项所述的方法,其中所述核酸序列是单链DNA模板。

12. 如权利要求1-11中任一项所述的方法,其中所述核酸序列是线性DNA模板。

13. 如权利要求1-12中任一项所述的方法,其中所述第一自切割肽和所述第二自切割肽是相同或不同的病毒2A肽。

14. 如权利要求6-13中任一项所述的方法,其中所述靶向的核酸酶选自RNA向导的核酸酶结构域,转录激活物样效应核酸酶(TALEN),锌指核酸酶(ZFN)和megaTAL。

15. 如权利要求14所述的方法,其中所述RNA向导的核酸酶是Cpf1核酸酶或Cas9核酸酶,并且所述方法还包括将与TRAC的外显子1中的靶区域特异性杂交的向导RNA引入细胞中。

16. 如权利要求14所述的方法,其中所述RNA向导的核酸酶是Cpf1核酸酶或Cas9核酸酶,并且所述方法还包括将与TRBC的外显子1中的靶区域特异性杂交的向导RNA引入细胞中。

17. 如权利要求15或16所述的方法,其中将Cpf1核酸酶或Cas9核酸酶,向导RNA和核酸作为核糖核蛋白复合物(RNP)-DNA模板复合物引入细胞中,其中所述RNP-DNA模板复合物包含:

(i) RNP,其中RNP包含Cpf1核酸酶或Cas9核酸酶,和向导RNA;和

(ii) DNA模板。

18. 如权利要求17所述的方法,其中所述复合物中RNP与DNA模板的摩尔比为约3:1至约100:1。

19. 如权利要求17或18所述的方法,其中通过用所述DNA模板与所述RNP在约20°-25°C的温度孵育约10分钟至约30分钟形成所述RNP-DNA模板复合物。

20. 如权利要求17-19中任一项所述的方法,其中在将所述RNP-DNA模板复合物导入所述细胞之前,混合所述RNP-DNA模板复合物和所述细胞。

21. 如权利要求17-20中任一项所述的方法,其中所述RNP-DNA模板复合物包含至少两种结构不同的RNP复合物。

22. 如权利要求21所述的方法,其中所述至少两种结构不同的RNP复合物包含结构不同的向导RNA。

23. 如权利要求22所述的方法,其中所述结构不同的RNP复合物各自包含Cas9切口酶,并且其中所述结构不同的向导RNA杂交至所述靶区域的相对链。

24. 如权利要求4-23中任一项所述的方法,其中所述引入包括电穿孔。

25. 如权利要求4-24中任一项所述的方法,其中将所述核酸或所述RNP:DNA模板复合物引入约 1×10^5 至约 2×10^6 个T细胞。

26. 如权利要求25所述的方法,其中所述至少两种结构不同的DNA模板被引入细胞。

27. 如权利要求26所述的方法,其中所述至少两种结构不同的DNA模板中的每一个编码抗原特异性T细胞受体的异源性TCR- β 链的可变区和抗原特异性T细胞受体的异源性TCR- α 链的可变区的独特组合。

28. 如权利要求1-27中任一项所述的方法,其中所述T细胞是调节T细胞、效应T细胞或原初T细胞。

29. 如权利要求28所述的方法,其中所述T细胞是效应T细胞,并且其中所述效应T细胞是CD8+ T细胞或CD4+细胞。

30. 如权利要求29所述的方法,其中所述效应T细胞是CD4 $^{+}$ CD8 $^{+}$ T细胞。

31. 如权利要求1-30中任一项所述的方法,还包括在允许异源性TCR- β 链和异源性TCR- α 链表达以形成抗原特异性T细胞受体的条件下培养T细胞。

32. 如权利要求31所述的方法,还包括在有效扩增修饰细胞群的条件下培养修饰的T细胞。

33. 如权利要求31或32所述的方法,还包括纯化表达抗原特异性T细胞受体的T细胞。

34. 一种通过权利要求1-33中任一项所述的方法产生的修饰的T细胞。

35. 一种包含核酸序列的修饰的T细胞,所述核酸序列从N端到C端编码,

(i) 第一自切割肽序列;

(ii) 第一异源性TCR亚基链;

(iii) 第二自切割肽序列;

(iv) 第二异源性TCR亚基链的可变区;和

(v) 内源性TCR亚基的N端的部分,其中,如果内源性TCR亚基为TCR- α (TCR-阿尔法) 亚基,则第一异源性TCR亚基链是异源性TCR- β (TCR-贝塔) 亚基链并且第二异源性TCR亚基链是异源性TCR- α 亚基链,并且其中,如果内源性TCR亚基是TCR- β 亚基,则第一异源性TCR亚基链是异源性TCR- α 亚基链并且第二异源性TCR亚基链是异源性TCR- β 亚基链。

36. 如权利要求35所述的修饰的T细胞,其中所述核酸序列从N端到C端编码,

(i) 第一自切割肽序列;

(ii) 异源性T细胞受体 (TCR) - β 链;

(iii) 第二自切割肽序列;

(iv) 异源性TCR- α 链的可变区;和

(v) 内源性TCR- α 亚基的N端的部分,

其中核酸序列被整合到TRAC基因的外显子1中。

37. 如权利要求35所述的修饰的T细胞,其中所述核酸序列从N端到C端编码,

(i) 第一自切割肽序列;

(ii) 异源性T细胞受体 (TCR) - α 链;

(iii) 第二自切割肽序列;

(iv) 内源性TCR- β 亚基的N端的部分,其中核酸序列被整合到TRBC1或TRBC2基因的外显子1中。

38. 一种包含核酸序列的修饰的T细胞,所述核酸序列从N端到C端编码,

(i) 第一自切割肽序列;

(ii) 异源性T细胞受体 (TCR) - α 链的可变区;

- (iii) 第二自切割肽序列；
- (iv) 异源性TCR- β 链的可变区；和
- (v) 内源性TCR- β 亚基的N端的部分，

其中核酸序列被整合到TRBC基因的外显子1中。

39. 一种编辑T细胞基因组的方法,所述方法包括:

(a) 将第一核酸序列插入人T细胞中TCR α 亚基恒定基因 (TRAC) 的外显子1的靶区域中,所述第一核酸序列从N端到C端编码,

- (i) 自切割肽序列；

(ii) 抗原特异性T细胞受体的异源性TCR- α 链；和 (iii) 内源性TCR α 亚基的外显子1的N端的部分；和

(b) 将核酸序列插入人T细胞中TCR β 亚基恒定基因 (TRBC) 的外显子1的靶区域中,所述第一核酸序列从N端到C端编码,

- (i) 第二自切割肽序列；

(ii) 抗原特异性T细胞受体的异源性TCR- β 链；和 (iii) 内源性TCR β 亚基的外显子1的N端的部分。

40. 如权利要求39所述的方法,其中所述第一和/或第二核酸序列是双链或单链核酸序列,并且其中所述第一和/或第二核酸序列通过将所述第一和/或第二核酸序列引入T细胞被插入。

41. 如权利要求40所述的方法,其中通过将包含第一和/或第二核酸的病毒载体引入T细胞来插入第一和/或第二核酸序列。

42. 如权利要求40或41所述的方法,其中所述第一和第二核酸通过将以下引入T细胞来插入T细胞,

(a) 一种或多种靶向的核酸酶,所述靶向的核酸酶在TRAC基因的外显子1中产生第一插入位点,并在TRBC基因的外显子1中产生第二插入位点；

- (b) 第一核酸序列；和
- (c) 第二核酸序列。

43. 如权利要求39-42中任一项所述的方法,其中所述第一核酸序列的5'末端和3'末端包含与侧接TRAC的外显子1的第一靶区域的基因组序列同源的核苷酸序列。

44. 如权利要求43所述的方法,其中所述第二DNA模板的5'末端和3'末端包含与侧接TRBC的外显子1的第二靶区域的基因组序列同源的核苷酸序列。

45. 如权利要求42-44中任一项所述的方法,其中所述一种或多种靶向的核酸酶在第一和第二插入位点处引入双链断裂。

46. 如权利要求39-45中任一项所述的方法,其中所述第一和/或第二核酸序列是单链DNA模板。

47. 如权利要求39-46中任一项所述的方法,其中所述第一和/或第二核酸是线性DNA模板。

48. 如权利要求39-47中任一项所述的方法,其中所述第一自切割肽和所述第二自切割肽是相同或不同的病毒2A肽。

49. 如权利要求42-48中任一项所述的方法,其中所述一种或多种靶向的核酸酶选自

RNA向导的核酸酶结构域,转录激活物样效应核酸酶(TALEN),锌指核酸酶(ZFN)或megaTAL。

50. 如权利要求49所述的方法,其中所述RNA向导的核酸酶是Cpf1核酸酶或Cas9核酸酶,并且其中所述方法还包括将与所述TRAC的外显子1中的靶区域特异性杂交的第一向导RNA和与TRBC的外显子1中的靶区域特异性杂交的第二向导RNA引入细胞中。

51. 如权利要求50所述的方法,其中将Cpf1核酸酶或Cas9核酸酶,第一向导RNA和核酸序列作为核糖核蛋白复合物(RNP)-DNA模板复合物引入细胞,其中所述RNP-DNA模板复合物包含:

- (i) RNP,其中RNP包含Cas9核酸酶或Cpf1核酸酶,和第一向导RNA;和
- (ii) 第一DNA模板。

52. 如权利要求50所述的方法,其中将Cpf1核酸酶或Cas9核酸酶,第二向导RNA和第二核酸序列作为RNP-DNA模板复合物引入细胞,其中所述RNP-DNA模板复合物包含:

- (i) RNP,其中RNP包含Cpf1核酸酶或Cas9核酸酶,和第二向导RNA;和
- (ii) 第二DNA模板。

53. 如权利要求51或52所述的方法,其中所述复合物中RNP与DNA模板的摩尔比为约3:1至约100:1。

54. 如权利要求51-53中任一项所述的方法,其中通过用所述DNA模板与所述RNP在约20°-25°C的温度孵育约10分钟至约30分钟形成所述RNP-DNA模板复合物。

55. 如权利要求51-54中任一项所述的方法,其中所述RNP-DNA模板复合物包含至少两种结构不同的RNP复合物。

56. 如权利要求55所述的方法,其中所述结构不同的RNP复合物各自包含Cas9切口酶,并且其中所述结构不同的向导RNA杂交至所述靶区域的相对链。

57. 如权利要求39-56中任一项所述的方法,其中所述引入包括电穿孔。

58. 如权利要求39-57中任一项所述的方法,其中将一种或多种所述核酸序列或所述RNP:DNA模板复合物引入约 1×10^5 至约 2×10^6 个T细胞。

59. 如权利要求58所述的方法,其中将所述至少两种结构不同的第一DNA模板引入细胞。

60. 如权利要求59所述的方法,其中所述至少两种结构不同的第一DNA模板包含抗原特异性T细胞受体的TCR- α 链的不同可变区。

61. 如权利要求60所述的方法,其中将所述至少两种结构不同的第二DNA模板引入细胞。

62. 如权利要求61所述的方法,其中所述至少两种结构不同的第二DNA模板包含抗原特异性T细胞受体的TCR- β 链的不同可变区。

63. 如权利要求39-62中任一项所述的方法,其中所述T细胞是调节T细胞、效应T细胞或原初T细胞。

64. 如权利要求63所述的方法,其中所述T细胞是效应T细胞,并且其中所述效应T细胞是CD8+ T细胞或CD4+细胞。

65. 如权利要求64所述的方法,其中所述效应T细胞是CD4 $^+$ CD8 $^+$ T细胞。

66. 如权利要求39-65中任一项所述的方法,还包括在允许异源性TCR- β 链和异源性TCR- α 链表达以形成抗原特异性T细胞受体的条件下培养T细胞。

67. 如权利要求66所述的方法,其中所述方法还包括在允许异源性TCR- β 链和异源性TCR- α 链表达以形成抗原特异性T细胞受体的条件下培养T细胞。

68. 如权利要求67所述的方法,还包括在有效扩增修饰细胞群的条件下培养修饰的T细胞。

69. 如权利要求67或68所述的方法,还包括纯化表达抗原特异性T细胞受体的T细胞。

70. 一种通过权利要求39-69中任一项所述的方法产生的修饰的T细胞。

71. 一种修饰的T细胞,其包含:

a) 第一核酸序列,其从N端到C端编码,

(i) 第一自切割序列;

(ii) 异源性TCR- α 链的可变区;和

(iii) 内源性TCR- α 链的N端的部分;和

b) 第二核酸序列,其从N端到C端编码,

(i) 第一自切割序列;

(ii) 异源性TCR- β 链的可变区;和

(iii) 内源性TCR- β 链的N端的部分,

其中所述第一核酸序列被整合到TRAC基因的外显子1中并且所述第二核酸序列被整合到TRBC基因的外显子1中。

72. 一种治疗人类对象中癌症的方法,所述方法包括:

a) 使用权利要求1-33或39-69中任一项所述的方法修饰所述对象的T细胞以表达抗原特异性T细胞受体,其中所述T细胞受体识别所述对象中的肿瘤特异性抗原。

73. 如权利要求72所述的方法,其中所述对象的T细胞被体内修饰。

74. 如权利要求72所述的方法,其中所述方法包括:

a) 从所述对象获得T细胞;

b) 使用权利要求1-33或39-69中任一项所述的方法修饰所述T细胞以表达抗原特异性T细胞受体,其中所述T细胞受体识别所述对象中的肿瘤特异性抗原;和

c) 向所述对象给予所述修饰的T细胞。

内源性T细胞受体的靶向置换

[0001] 本申请是中国专利申请号201880084419.6的分案申请。

[0002] 在先相关申请

[0003] 本申请要求2017年10月27日提交的第62/578,153号美国临时申请的优先权，该临时申请通过引用整体纳入本文。

背景技术

[0004] T细胞是过继性细胞疗法发展领域中研究最活跃的细胞类型。T细胞与T细胞受体(TCR)的靶标特异性相互作用，从而实现高度特异性的反应，且副作用极小。通过将具有所需特异性的新受体插入T细胞，可以针对新型抗原和靶标就这些高度有效且特异性的反应进行工程改造。然而，开发完全新型的受体是费时，昂贵的，并且不能利用这样的事实，即通过开发内源性T细胞库，机体自然产生结合几乎任何可能的抗原靶标的TCR。获得人类T细胞并将其内源性TCR置换为具有所需抗原特异性的TCR的能力可能在过继T细胞疗法的开发和应用中具有变革性。

发明概述

[0006] 本公开涉及用于编辑人T细胞的基因组的组合物和方法。发明人发现，异源性TCR可以插入T细胞基因组中的靶向的区域中，使得异源性TCR处于内源性TCR启动子的控制之下。本文提供的方法和组合物可用于用具有所需抗原特异性的异源性TCR置换人T细胞中的内源性TCR。在一些实施方式中，T细胞基因组中的靶向的区域是天然T细胞受体基因座。

[0007] 在一些实施方式中，本公开提供了编辑人T细胞的基因组的方法。在一些实施方式中，该方法包括将核酸序列插入人T细胞中T细胞受体(TCR)-亚基恒定基因的外显子1的靶区域中，该核酸序列从N端到C端编码：(i)第一自切割肽序列；(ii)第一异源性TCR亚基链，其中TCR亚基链包含TCR亚基的可变区和恒定区；(iii)第二自切割肽序列；(iv)第二异源性TCR亚基链的可变区；和(v)内源性TCR亚基的N端的部分，其中，如果内源性TCR亚基为TCR- α (TCR-阿尔法)亚基，则第一异源性TCR亚基链为异源性TCR- β (TCR-贝塔)亚基链并且第二异源性TCR亚基链是异源性TCR- α 亚基链，并且其中，如果内源性TCR亚基是TCR- β 亚基，则第一异源性TCR亚基链是异源性TCR- α 亚基链并且第二异源性TCR亚基链是异源性TCR- β 亚基链。在一些实施方式中，该方法包括将核酸序列插入人T细胞中TCR α 亚基恒定基因(TRAC)的外显子1的靶区域中，该核酸序列从N端到C端的编码：(i)第一自切割肽序列；(ii)异源性TCR- β 链；(iii)第二自切割肽序列；(iv)异源性TCR- α 链的可变区；和(v)内源性TCR- α 亚基的N端的部分。

[0008] 在一些实施方式中，该方法包括将核酸序列插入人T细胞中TCR- β 亚基恒定基因(TRBC)的外显子1的靶区域中，该核酸序列从N端到C端编码：(i)第一自切割肽序列；(ii)异源性TCR- α 链；(iii)第二自切割肽序列；(iv)异源性TCR- β 链的可变区；和(v)内源性TCR- β 亚基的N端的部分。

[0009] 在一些实施方式中，通过将包含所述核酸的病毒载体引入T细胞来插入所述核酸。

在一些实施方式中,通过将包含所述核酸的非病毒载体引入T细胞来插入所述核酸。在一些实施方式中,通过向T细胞中引入以下来将核酸插入T细胞中:(a)切割TCR- α 亚基恒定基因(TRAC)的外显子1中的靶区域以在T细胞的基因组中产生插入位点的靶向的核酸酶;和(b)核酸序列,其中所述核酸序列通过同源性定向修复(HDR)掺入插入位点。在一些实施方式中,通过向T细胞中引入以下来将核酸插入T细胞中:(a)切割TCR- β 亚基恒定基因(TRBC)的外显子1中的靶区域以在T细胞的基因组中产生插入位点的靶向的核酸酶;和(b)核酸序列,其中所述核酸序列通过同源性定向修复(HDR)掺入插入位点。在一些实施方式中,核酸的5'末端和3'末端包含与侧接靶区域的基因组序列同源的核苷酸序列。在一些实施方式中,核酸的5'末端和3'末端包含与侧接插入位点的基因组序列同源的核苷酸序列。在一些实施方式中,靶向的核酸酶在插入位点引入双链断裂。在一些实施方式中,将核酸序列作为双链或单链核酸引入细胞中。在一些实施方式中,将核酸作为双链或单链DNA模板引入细胞中。在一些实施方式中,将核酸序列作为线性核酸引入细胞。

[0010] 在一些实施方式中,第一自切割肽和第二自切割肽是相同或不同的病毒2A肽。

[0011] 在一些实施方式中,靶向的核酸酶选自RNA向导的核酸酶结构域,转录激活物样效应核酸酶(TALEN),锌指核酸酶(ZFN)和megaTAL。在一些实施方式中,RNA向导的核酸酶是Cpf1核酸酶或Cas9核酸酶,并且该方法进一步包括将与TRAC的外显子1中的靶区域特异性杂交的向导RNA引入细胞中。在一些实施方式中,将Cpf1核酸酶或Cas9核酸酶,向导RNA和核酸作为核糖核蛋白复合物(RNP)-DNA模板复合物引入细胞中,其中RNP-DNA模板复合物包含:(i)RNP,其中RNP包含Cpf1核酸酶或Cas9核酸酶,和向导RNA;以及(ii)DNA模板。

[0012] 在一些实施方式中,复合物中RNP与DNA模板的摩尔比为约3:1至约100:1。在一些实施方式中,通过用DNA模板与RNP在约20°-25°C的温度孵育约10-30分钟形成RNP-DNA模板复合物。在一些实施方式中,在将RNP-DNA模板复合物导入细胞之前混合RNP-DNA模板复合物和细胞。在一些实施方式中,RNP-DNA模板复合物包含至少2种结构不同的RNP复合物。在一些实施方式中,至少两种结构不同的RNP复合物包含结构不同的向导RNA。在一些实施方式中,所述结构不同的RNP复合物各自包含Cas9切口酶,并且其中所述结构不同的向导RNA杂交至所述靶区域的相对链。

[0013] 在一些实施方式中,引入包括电穿孔。在一些实施方式中,将核酸引入约 1×10^5 至约 2×10^6 个T细胞的群。在一些实施方式中,将靶向的核酸酶和DNA模板引入约 1×10^5 至约 2×10^6 个T细胞的群。在一些实施方式中,将至少两种结构不同的DNA模板引入细胞。在一些实施方式中,至少两种结构不同的DNA模板是非病毒模板。在一些实施方式中,至少两种结构不同的DNA模板中的每一个编码抗原特异性T细胞受体的异源性TCR- β 链的可变区和抗原特异性T细胞受体的异源性TCR- α 链的可变区的独特组合。在一些实施方式中,T细胞是调节T细胞、效应T细胞或原初T细胞。在一些实施方式中,T细胞是效应T细胞,并且其中效应T细胞是CD8+T细胞。在一些实施方式中,T细胞是效应T细胞,并且其中效应T细胞是CD4+T细胞。在一些实施方式中,效应T细胞是CD4+CD8+T细胞。

[0014] 在一些实施方式中,该方法进一步包括在允许异源性TCR- β 链和异源性TCR- α 链表达以形成抗原特异性T细胞受体的条件下培养T细胞。在一些实施方式中,该方法进一步包括在有效扩增修饰细胞群的条件下培养修饰的T细胞。在一些实施方式中,该方法进一步包括纯化表达抗原特异性T细胞受体的T细胞。

[0015] 在一些实施方式中,本公开提供了编辑人T细胞的基因组的方法,其包括:(a)将第一核酸序列插入人T细胞中TCR α 亚基恒定基因(TRAC)的外显子1的靶区域中,该第一核酸序列从N端到C端编码:(i)自切割肽序列;(ii)抗原特异性T细胞受体的异源性TCR- α 链;和(iii)内源性TCR α 亚基外显子1的N端的部分;和(b)将第二核酸序列插入人T细胞中TCR β 亚基恒定基因(TRBC)的外显子1的靶区域中,该第二核酸序列从N端到C端编码:(i)第二自切割肽序列;(ii)抗原特异性T细胞受体的异源性TCR- β 链;和(iii)内源性TCR β 亚基的外显子1的N端的部分。

[0016] 在一些实施方式中,通过将包含第一和/或第二核酸的病毒载体引入T细胞来插入第一和/或第二核酸序列。在一些实施方式中,通过将包含第一和/或第二核酸的非病毒载体引入T细胞来插入第一和/或第二核酸序列。在一些实施方式中,通过引入以下将第一和第二核酸插入T细胞:(a)一种或多种靶向的核酸酶,所述靶向的核酸酶在TRAC的外显子1中产生第一插入位点,在TCR β 亚基恒定基因(TRBC)的外显子1中产生第二插入位点;和(b)第一核酸序列;和(c)第二核酸序列,其中通过同源性定向修复(HDR),第一核酸序列被插入到TRAC的外显子1中的第一插入位点并且第二核酸序列被插入TRBC的外显子1中的第二插入位点。在一些实施方式中,将核酸序列作为双链或单链DNA模板引入细胞中。在一些实施方式中,将核酸序列作为线性DNA模板引入细胞中。

[0017] 在一些实施方式中,第一核酸序列的5'末端和3'末端包含与TRAC基因的外显子1的侧接靶区域的基因组序列同源的核苷酸序列。在一些实施方式中,第一核酸序列的5'末端和3'末端包含与侧接TRAC基因的外显子1的第一插入位点的基因组序列同源的核苷酸序列。在一些实施方式中,第二核酸序列的5'末端和3'末端包含与侧接TRBC基因的外显子1的靶区域的基因组序列同源的核苷酸序列。在一些实施方式中,第二核酸序列的5'末端和3'末端包含与侧接TRBC基因的外显子1的第二插入位点的基因组序列同源的核苷酸序列。

[0018] 在一些实施方式中,一种或多种靶向的核酸酶在第一和第二插入位点处引入双链断裂。在一些实施方式中,第一自切割肽和第二自切割肽是相同或不同的病毒2A肽。在一些实施方式中,一种或多种靶向的核酸酶选自RNA向导的核酸酶结构域,转录激活物样效应核酸酶(TALEN),锌指核酸酶(ZFN)或megaTAL。

[0019] 在一些实施方式中,RNA向导的核酸酶是Cpf1核酸酶或Cas9核酸酶,并且其中所述方法进一步包括将与所述TRAC的外显子1中的靶区域特异性杂交的第一向导RNA和与TRBC的外显子1中的靶区域特异性杂交的第二向导RNA引入细胞中。在一些实施方式中,将Cpf1核酸酶或Cas9核酸酶,第一向导RNA和第一核酸作为核糖核蛋白复合物(RNP)-DNA模板复合物引入细胞中,其中RNP-DNA模板复合物包含:(i)RNP,其中RNP包含Cpf1核酸酶或Cas9核酸酶,和第一向导RNA;以及(ii)第一DNA模板。在一些实施方式中,将Cpf1核酸酶或Cas9核酸酶,第二向导RNA和第二核酸作为核糖核蛋白复合物(RNP)-DNA模板复合物引入细胞中,其中RNP-DNA模板复合物包含:(i)RNP,其中RNP包含Cpf1核酸酶或Cas9核酸酶,和第二向导RNA;以及(ii)第二DNA模板。

[0020] 在一些实施方式中,复合物中RNP与DNA模板的摩尔比为约3:1至约100:1。在一些实施方式中,通过用DNA模板与RNP在约20°-25°C的温度孵育约10-30分钟形成RNP-DNA模板复合物。在一些实施方式中,RNP-DNA模板复合物包含至少2种结构不同的RNP复合物。在一些实施方式中,所述结构不同的RNP复合物各自包含Cas9切口酶,并且其中所述结构不同的

向导RNA杂交至所述靶区域的相对链。在一些实施方式中，引入包括电穿孔。

[0021] 在一些实施方式中，将第一和第二核酸引入约 1×10^5 至约 2×10^6 个T细胞。在一些实施方式中，将一种或多种靶向的核酸酶以及第一和第二核酸引入约 1×10^5 至约 2×10^6 个T细胞。在一些实施方式中，将至少两种结构不同的第一DNA模板引入细胞中。在一些实施方式中，至少两种结构不同的第一DNA模板包含抗原特异性T细胞受体的TCR- α 链的不同可变区。在一些实施方式中，将至少两种结构不同的第二DNA模板引入细胞中。在一些实施方式中，至少两种结构不同的第二DNA模板包含抗原特异性T细胞受体的TCR- β 链的不同可变区。

[0022] 在一些实施方式中，T细胞是调节T细胞、效应T细胞或原初T细胞。在一些实施方式中，T细胞是效应T细胞，并且其中效应T细胞是CD8+T细胞。在一些实施方式中，T细胞是效应T细胞，并且其中效应T细胞是CD4+T细胞。在一些实施方式中，效应T细胞是CD4⁺CD8⁺T细胞。

[0023] 在一些实施方式中，该方法进一步包括在允许异源性TCR- β 链和异源性TCR- α 链表达以形成抗原特异性T细胞受体的条件下培养T细胞。在一些实施方式中，该方法进一步包括在允许异源性TCR- β 链和异源性TCR- α 链表达以形成抗原特异性T细胞受体的条件下培养T细胞。在一些实施方式中，该方法进一步包括在有效扩增修饰细胞群的条件下培养修饰的T细胞。在一些实施方式中，该方法进一步包括纯化表达抗原特异性T细胞受体的T细胞。

[0024] 在其他实施方式中，本公开提供了修饰的T细胞，其包含核酸序列，该核酸序列从N端到C端编码：(i) 第一自切割肽序列；(ii) 异源性T细胞受体 (TCR) - β 链的可变区；(iii) 第二自切割肽序列；(iv) 异源性TCR- α 链的可变区；和(v) 内源性TCR α 亚基的N端的部分，其中核酸序列被整合到TRAC基因的外显子1中。

[0025] 在一些实施方式中，本公开进一步提供了修饰的T细胞，其包含：a) 第一核酸序列，其从N端到C端编码：(i) 第一自切割序列，(ii) 异源性TCR- α 链的可变区，和(iii) 内源性TCR- α 链的N端的部分；和b) 第二核酸序列，其从N端到C端编码：(i) 第一自切割序列，(ii) 异源性TCR- β 链的可变区，和(iii) 内源性TCR- β 链的N端的部分，其中第一核酸序列被整合到TRAC基因的外显子1中并且第二核酸序列被整合到TRBC基因的外显子1中。

[0026] 在一些实施方式中，本公开进一步提供了一种在人类对象中治疗癌症的方法，该方法包括：a) 从对象中获得T细胞；b) 修饰T细胞以表达异源性抗原特异性T细胞受体，其中所述T细胞受体识别对象中的肿瘤特异性抗原；和c) 将修饰的T细胞给予对象。

[0027] 使用本文描述的用于修饰T细胞以表达异源性TCR- α 链和异源性TCR- β 链的方法和组合物，人们还可以编辑人 $\gamma\delta$ (伽马达尔塔)T细胞。在一些实施方式中，该方法包括将核酸序列插入人T细胞中T细胞受体 γ 亚基恒定 (TRGC) 基因的外显子1的靶区域中，该核酸序列从N端到C端编码：(i) 第一自切割肽序列；(ii) 异源性TCR- β 链的可变区；(iii) 第二自切割肽序列；(iv) 异源性TCR- α 链的可变区；和(v) 内源性TCR- α 的N端的部分。

[0028] 在一些实施方式中，该方法包括将核酸序列插入人T细胞中T细胞受体 γ 亚基恒定 (TRGC) 基因的外显子1的靶区域中，该核酸序列从N端到C端编码：(i) 第一自切割肽序列；(ii) 异源性TCR- β 链的可变区；(iii) 第二自切割肽序列；(iv) 全长异源性TCR- α 链；和(v) 终止密码子，使得在插入所述核酸后，编码异源性TCR- β 和TCR- α 序列的核酸在内源性TCR- γ 启动子的控制下。

[0029] 在其他实施方式中，该方法包括将核酸序列插入人T细胞中T细胞受体 γ 亚基恒定 (TRGC) 基因的外显子1的靶区域中，该核酸序列从N端到C端编码：(i) 第一自切割肽序列；

(ii) 异源性TCR- δ 链的可变区；(iii) 第二自切割肽序列；(iv) 异源性TCR- γ 链的可变区；和(v) 内源性TCR- γ 亚基的N端的部分。还提供了编辑人T细胞的基因组的方法，该方法包括将核酸序列插入人T细胞中TRAC基因的外显子1的靶区域中，该核酸序列从N端到C端编码：(i) 第一自切割肽序列；(ii) 异源性TCR- γ 链的可变区；(iii) 第二自切割肽序列；(iv) 异源性TCR- δ 链的可变区；和(v) 内源性TCR- α 的N端的部分。在其他实施方式中，该方法包括将核酸序列插入人T细胞中T细胞受体 γ 亚基恒定(TRAC)基因的外显子1的靶区域中，该核酸序列从N端到C端编码：(i) 第一自切割肽序列；(ii) 异源性TCR- γ 链的可变区；(iii) 第二自切割肽序列；(iv) 全长异源性TCR- δ 链；和(v) 终止密码子，使得在插入所述核酸后，异源性TCR- γ 和TCR- δ 序列在内源性TCR- α 启动子的控制下。

附图说明

[0030] 本申请包括下述附图。这些附图用于说明组合物和方法的某些实施方式和/或特征，并对组合物和方法的描述构成补充。附图并不旨在限制组合物和方法的范围，除非书面说明明确地表明是这类情况。

[0031] 图1a是描述通过同源性定向修复将单个非病毒DNA模板插入T细胞的示意图，该模板包含核酸序列，该核酸序列从N端到C端编码：(i) T2A自切割肽序列；(ii) 异源性TCR- β 链(NYESO- β)的全长(即可变区和恒定区)；(iii) P2A自切割肽序列；(iv) 异源性TCR- α 链(NYESO- α)的可变区；和(v) 内源性TCR α 亚基的N端的部分。通过同源向导修复将DNA模板插入TRAC基因的外显子1后，转录并翻译DNA模板以产生全长NYESO- β 链和全长NYESO- α 链，其形成识别NY-ESO-1黑色素瘤新抗原的抗原特异性TCR。

[0032] 图1b是描述在TCR- β 基因座(TRBC1或TRBC2)上插入单个非病毒DNA模板的示意图。该模板包含核酸序列，该核酸序列从N端到C端编码：(i) T2A自切割肽序列；(ii) 异源性TCR- α 链(NYESO- α)的全长(即可变区和恒定区)；(iii) P2A自切割肽序列；(iv) 异源性TCR- β 链(NYESO- β)的可变区；和(v) 内源性TCR β 亚基的N端的部分，其通过同源性定向修复进入T细胞。

[0033] 图2是描述通过插入以下来同时置换内源性T细胞 α 和T细胞 β 受体链的示意图：(a) 非病毒DNA模板，该非病毒DNA模板核酸序列，该核酸序列从N端到C端编码：(i) P2A自切割肽序列，(ii) 抗原特异性T细胞受体的TCR- α 链(NYESO- α)的可变区；和(iii) 内源TCR- α 亚基的外显子1的N端的部分；和(b) DNA模板，其包含核酸序列，该核酸序列从N端到C端编码：(i) T2A自切割肽序列，(ii) 抗原特异性T细胞受体的TCR- β 链可变区；和(iii) 内源性TCR- β 亚基的外显子1的N端的部分。

[0034] 图3a是描绘异源性(TCR)- β 链和TCR- α 链在T细胞中插入以形成T细胞受体的多克隆文库的示意图。多种不同的DNA模板，例如非病毒DNA模板，其包含核酸序列，该核酸序列从N端到C端编码：(i) 第一自切割肽序列；(ii) 全长(例如可变区和恒定区)异源性T细胞受体(TCR)- β 链；(iii) 第二自切割肽序列；(iv) 异源性TCR- α 链的可变区；和(v) 内源性TCR α 亚基的N端的部分，所述DNA模板经同时电穿孔以产生具有所需TCR序列的合成T细胞库的T细胞群。

[0035] 图3b是显示根据先前已知的TCR序列或例如来自对象的内源性目的T细胞群中的天然库设计T细胞库的示意图。例如，TCR可以是但不限于肿瘤浸润淋巴细胞表达的TCR，自

身免疫性疾病部位的自身反应性T细胞表达的TCR或病原体反应性T细胞的TCR。

[0036] 图4a显示了用异源性NYESO TCR电穿孔的CD4⁺和CD8⁺T细胞的FACS分析。如本文所述,将来自两个健康人类献血者的CD4+和CD8+T细胞用包含异源性NYESO- α 和异源性NYESO- β 的非病毒构建体进行电穿孔。电穿孔后四天,将细胞用荧光标记的MHC-葡聚糖染色,所述MHC-葡聚糖含有被整合的NYESO特异性TCR识别的肽。

[0037] 图4b显示了用异源性NYESO TCR电穿孔的CD8⁺T细胞的FACS分析。如本文所述,将来自两个健康人类献血者的CD8+T细胞用包含异源性NYESO- α 和异源性NYESO- β 的非病毒DNA构建体进行电穿孔。电穿孔后四天,将细胞用荧光标记的MHC-葡聚糖染色,所述MHC-葡聚糖含有被整合的NYESO特异性TCR识别的肽。

[0038] 图5是用异源性NYESO TCR电穿孔的CD8⁺T细胞的FACS分析。如图3和图4所示处理细胞,并添加用NYESO MHC-葡聚糖进行针对抗原特异性染色的TCR表达染色(用结合所有潜在人类TCR的抗体)。在大多数没有TCR的同源性导向的内源性置换的T细胞中,内源性TCR被TRAC外显子1gRNA切割并通过非同源性末端连接引入小的插入缺失突变(indels)而被敲除。不出所料,几乎所有的NYESO阳性细胞也都对TCR表达呈阳性。

[0039] 图6a显示了含有异源性NYESO TCR原代人T细胞杀伤癌细胞是一种体外细胞杀伤测定法。

[0040] 图6b显示了使用含有异源性NYESO TCR杀伤力的人T细胞进行体外细胞杀伤测定的单个时间点的结果。

[0041] 图7a-f显示了具有非病毒TCR置换的T细胞的体内功能性。(a)体内人抗原特异性肿瘤异种移植模型的图。(b)转移 5×10^6 个大量(bu1k)非病毒靶向的T细胞(约10% TCR+ NYESO-1+, 约10% TCR+NYESO-1- 和约80% TCR-NYESO-1-)后两天,NY-ESO-1+非病毒编辑的T细胞相对于脾脏优先积聚在肿瘤中。对于四个人类T细胞供体中的每一个,n=5只小鼠。(c)在转移 5×10^6 个大量非病毒靶向的CFSE标记的T细胞后10天,NYESO-1TCR+细胞显示出比TCR-或TCR+NYESO-1-T细胞更大的增殖,并显示出在肿瘤中多于在脾脏中的更大的增殖(CFSE低)。转移后10天,很难在肿瘤中发现TCR-和TCR+NYESO-T细胞。(d)图8f中汇总的数据的各个纵向肿瘤体积轨迹。(e,f)在这些实验中,在T细胞转移后第17天(d),非病毒TCR置换的细胞似乎显示出更高的NY-ESO-1TCR表达和更低的耗尽标记物表达。慢病毒转导的和非病毒TCR置换的细胞的转移在第24天均显示出肿瘤负荷的显著减少。在该实验模型中,与慢病毒转导相比,非病毒TCR置换显示出进一步的减少(图8f)。

[0042] 图8a显示了用TCR置换的CD8+T细胞中抗原特异性细胞因子的产生和脱粒。

[0043] 图8b显示了用TCR置换的CD8+T细胞的抗原特异性靶细胞杀伤。

[0044] 图8c是肿瘤小鼠异种移植模型的示意图。

[0045] 图8d显示了非病毒置换内源性TCR用于过继细胞治疗的可扩展性。

[0046] 图8e显示了NY-ESO-1TCR+T细胞在肿瘤中的优先体内定位。

[0047] 图8f显示了非病毒或慢病毒修饰的NY-ESO-1TCR+的过继转移或单独载体(盐水)过继转移后的肿瘤生长.n=2(a,b)个独立的健康供者,带技术重复样本的平均值和标准差(a,b)。在5只(e)或7只小鼠(f)中,n=6(d)或n=2(e,f)个独立的健康供体,带平均值和标准差(d-f)。**P<0.01,***P<0.001,****P<0.0001(采用Holm-Sidak多重比较检验的双向方差分析)。

[0048] 图9a显示了门选的CD4+或CD8+T细胞中NY-ESO-1特异性TCR的逆转录病毒递送或非病毒TCR置换后的TCR错配分析。与逆转录病毒递送的TCR相比,非病毒TCR置换导致更少的TCR错配。随着新TCR的病毒引入,被感染的细胞可能会表达至少四种不同的TCR(新TCR- α +新TCR- β ;新TCR- α +内源性TCR- β ;内源性TCR- α 和新TCR- β ;内源性TCR- α +内源性TCR- β)。对新引入的TCR(VB13.1)和MHC肽多聚体(NYESO)的特定 β 链染色可通过区分主要表达引入的TCR的细胞(VB13.1+NYESO+;新TCR- α +新TCR- β)对比主要表达潜在错配的TCR之一的那些(VB13.1+NYESO-;内源性TCR- α +新TCR- β)来粗略估计TCR错配。

[0049] 图9b-9c显示了通过将整个新TCR靶向进入TRAC(图9b,也可以通过多重敲除TCR- β),将整个新TCR靶向TRBC1/2(图9c),或用新TCR- α 进入TRAC和新TCR- β 进入TRBC1/2多重置换的TCR置换。

[0050] 图9d显示了在门控CD4+T细胞中抗原暴露后选择性地观察到功能性细胞因子的产生,类似于门控CD8+T细胞(图8a)。

[0051] 图9e显示,在六名健康献血者中,CD8+和CD4+T细胞在电穿孔后4天持续观察到非病毒TCR置换。

[0052] 图9f显示,在另外六个健康献血者的第二个组中,使用NY-ESO-1TCR置换HDR模板和中靶gRNA/Cas9电穿孔来自每个献血者的1亿个T细胞(图8d)。在电穿孔后扩增的十天内,NY-ESO-1TCR+的CD4+和CD8+T细胞的百分比一致。

[0053] 图9g显示,在非病毒基因组靶向后经过10天的扩增,与CD4+T细胞相比,CD8+T细胞显示出小幅增殖优势。

[0054] 图9h显示了所指示的黑素瘤细胞系与所指示的分选的T细胞群以1:5T细胞与癌细胞的比例共孵育的结果。在共孵育后72小时,通过自动显微镜(其中核RFP标记癌细胞)记录癌细胞融合百分数。通过逆转录病毒转导或通过非病毒敲入的内源性TCR置换表达NY-ESO-1抗原特异性TCR的T细胞都显示出仅在同时表达NY-ESO-1和HLA-A*0201I类MHC等位基因的靶癌细胞系中稳健的靶细胞杀伤。

[0055] 图9i显示了使用中靶/脱靶gRNA矩阵和中靶/脱靶HDR模板对NY-ESO-1+HLA-A*0201+A375癌细胞系进行靶细胞杀伤的结果(脱靶gRNA和HDRT对RAB11A-GFP融合蛋白敲入具有特异性)。只有同时具有中靶gRNA和中靶HDR模板的细胞才表现出靶细胞杀伤作用。

[0056] 图9j显示,来自大量T细胞编辑群(中靶gRNA,中靶HDR模板)的分选NY-ESO-1+TCR+细胞显示出对靶癌细胞杀伤的强剂量反应效应。在48小时内,T细胞与癌细胞的比例为2:1或更高,表明靶癌细胞几乎完全被杀伤。截至144小时,小于1:16的T细胞与癌细胞的比例表现出了强大的靶细胞杀伤。

[0057] 图9k显示特别是由于非病毒TCR置换后通过流式细胞术观察到的NY-ESO-1识别性TCR+细胞群的非病毒TCR置换T细胞杀伤靶细胞。从大量编辑的T细胞群开始(所有这些均已用中靶gRNA和HDR模板电穿孔),我们分别分选了三个细胞群:NY-ESO-1+TCR+细胞(非病毒置换的TCR),NY-ESO-1-TCR-细胞(TCR敲除)(灰色),和NY-ESO-1-TCR+细胞(保留其天然TCR但不具有NY-ESO特异性敲入TCR的细胞)。仅分选的NY-ESO-1+TCR+群显示出靶细胞杀伤(T细胞与癌细胞的比例为4:1)。来自n=2(a,d)或n=3(b,c)的独立健康供者中的一名代表性供者,带三次技术重复的平均值和标准差(d)。显示了n=6个独立健康供者(e,f)或n=2个独立健康供者的四个技术重复(i-k)的平均值和标准差。n=2个独立健康供者的平均值和

个体值(h)。

[0058] 定义

[0059] 本说明书和所附权利要求书中,单数形式“一”和“所述”包括复数含意,除非另有明确说明。

[0060] 术语“核酸”或“核苷酸”是指单链或双链形式的脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)及其聚合物。除非特别限定,否则该术语涵盖含有天然核苷酸的已知类似物的核酸,其具有与参比核酸相似的结合特性,并以与天然存在的核苷酸相似的方式代谢。除非另有说明,否则具体核酸序列还隐含地包括其保守修饰的变体(例如,简并密码子取代),等位基因,直系同源物,SNP和互补序列以及明确指出的序列。具体而言,可通过产生一个或多个选定(或所有)密码子的第三个位置被混合碱基和/或脱氧肌苷残基取代的序列来获得简并密码子取代形式(Batzer等,Nucleic Acid Res.19:5081(1991);Ohtsuka等,J.Biol.Chem.260:2605-2608(1985);和Rossolini等,Mol.Cell.Probes 8:91-98(1994))。

[0061] 术语“基因”可以表示参与产生或编码多肽链的DNA区段。它可以包括编码区之前和之后的区域(前导区和尾区)以及个体编码区段(外显子)之间的间插序列(内含子)。或者,术语“基因”可以表示涉及产生或编码非翻译的RNA,如rRNA、tRNA、向导RNA(例如,单向导RNA)或微小RNA的DNA区段。

[0062] “治疗”指对疾病、病症或紊乱的治疗或缓解或预防的各种成功表现,包括各种客观或主观参数,例如症状的减轻、消退、消除或使病症对患者而言更可耐受,减慢退行或衰退的速度,或使退行终点不那么衰弱。

[0063] “启动子”定义为指导核酸转录的一种或多种核酸控制序列。本文中,启动子包括转录起始位点附近的必需核酸序列,例如聚合酶II型启动子的TATA元件。启动子还任选地包括远端增强子或阻抑物元件,其可位于距转录起始位点多达几千个碱基对处。

[0064] 当将核酸置于与另一核酸序列的功能性关系中时,其是“操作性连接”。例如,如果启动子或增强子影响编码序列的转录,则该启动子或增强子操作性连接至该序列;或如果核糖体结合位点被定位以便于翻译,则该核糖体结合位点可操作性连接至编码序列。

[0065] “多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用,指氨基酸残基的聚合物。本文中,这些术语涵盖任意长度的氨基酸链,包括全长蛋白质,其中氨基酸残基通过共价肽键相连。

[0066] 本文中,“互补”或“互补性”指核苷酸之间或核酸之间特定的碱基配对。一些实施方式中,举例来说而非限定,描述了TRAC基因的外显子1中靶区域和向导RNA之间的碱基配对。互补核苷酸通常是A和T(或A和U)以及G和C。本文所述的向导RNA可以包含序列,例如,与TRAC基因的外显子1中基因组序列完美互补或基本互补(例如,具有1-4个错配)的DNA靶向序列。

[0067] 本文中,对象指个体。例如,对象是哺乳动物,例如灵长类,尤其人。该术语不表示特定年龄或性别。因此,旨在覆盖雄性或雌性的成年和新生对象。本文所用患者和对象可以互换使用并且可以表示经受疾病或紊乱的对象。

[0068] “CRISPR/Cas”系统是指用于防御外来核酸的一类广泛的细菌系统。CRISPR/Cas系统存在于广泛的真细菌和古细菌中。CRISPR/Cas系统包括如下类型:I、II和III亚型。野生型II型CRISPR/Cas系统利用RNA介导的核酸酶,例如Cas9,与向导和活化RNA一起,识别和切割外来核酸。本领域也已知具有向导RNA和活化RNA活性的向导RNA。在一些情况中,这类双

活性向导RNA称之为单向导RNA(sgRNA)。

[0069] Cas9同源物存在于多种真细菌,包括但不限于,下述分类学组的细菌:放线菌(Actinobacteria)、产水菌(Aquificae)、拟杆菌-绿菌(Bacteroidetes-Chlorobi)、衣原体-疣微菌(Chlamydiae-Verrucomicrobia)、绿屈挠菌(Chlroflexi)、蓝藻细菌(Cyanobacteria)、厚壁菌(Firmicutes)、变形菌(Proteobacteria)、螺旋体(Spirochaetes)、和热孢菌(Thermotogae)。示例性的Cas9蛋白是酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)Cas9蛋白。其他Cas9蛋白和其同源物述于,例如,Chylinks,等,RNA Biol.2013年5月1日;10(5):726-737;Nat. Rev. Microbiol.2011年6月;9(6):467-477;Hou,等,Proc Natl Acad Sci U S A.2013年9月24日;110(39):15644-9;Sampson等Nature.2013年5月9日;497(7448):254-7;和Jinek,等Science.2012年8月17日;337(6096):816-21。本文所提供的任何Cas9核酸酶的变体可以经优化以在宿主细胞中提供高效活性或增强稳定性。因此,还考虑了工程改造的Cas9核酸酶。

[0070] 本文所用术语“Cas9”指RNA介导的核酸酶(例如,来自细菌或古细菌来源,或由其衍生)。示例性的RNA介导的核酸酶包括前述的Cas9蛋白及其同源物。其他RNA介导的核酸酶包括Cpf1(参见,例如Zetsche等,Cel11,第163卷,第3期,p759-771,2015年10月22日)及其同源物。相似地,本文所用术语“Cas9核糖核蛋白”复合物等术语指这样的复合物:Cas9蛋白和crRNA(例如,向导RNA或单向导RNA),Cas9蛋白和反式活化crRNA(tracrRNA)之间的复合物,Cas9蛋白和向导RNA,或其组合(例如,包含Cas9蛋白、tracrRNA或crRNA向导RNA的复合物)。应当理解,在本文所述的任何实施方式中,Cas9核酸酶可以用Cpf1核酸酶替代。

[0071] 本文所用短语“编辑”在编辑细胞的基因组的上下文中指在靶基因组区域诱导基因组序列中的结构改变。例如,编辑可以采取将核苷酸序列插入细胞基因组的形式。核苷酸序列可以编码多肽或其片段。这类编辑可以例如通过诱导靶基因组区域内的双链断裂进行,或位于相对链且侧接靶基因组区域的单链切口对。在靶基因组区域处或其中诱导单链或双链断裂的方法包括使用Cas9核酸酶结构域或其衍生物和针对靶基因组区域的向导RNA或向导RNA对。

[0072] 如本文所用,在引入核酸或包含核酸的复合物,例如RNP-DNA模板复合物的上下文中,短语“引入”是指核酸序列或RNP-DNA模板复合物从细胞外部到细胞内部的易位。在一些情况下,引入指核酸或复合物由细胞外至细胞核内的易位。考虑了这类易位的各种方法,包括但不限于,电穿孔,与纳米线或纳米管接触,受体介导的内化,经由细胞穿透肽的易位,脂质体介导的易位等。

[0073] 如本文所用,短语“异源(性)”是指在人类T细胞中非天然存在的核酸序列或多肽。术语“异源性序列”指通常不天然存在于给定T细胞的序列。因此,异源性核苷酸或蛋白质序列可以是:(a)对其宿主细胞而言是外来的(即,对所述细胞而言为外源性的);(b)天然存在于宿主细胞中(即,内源性),但以不自然量存在于细胞中(即,比宿主细胞中天然存在的量大或少);或(c)天然存在于宿主细胞中但位于其天然基因座外。

[0074] 本文所用短语“原代”在原代细胞的上下文中指尚未经转化或永生化的细胞。可以培养、继代培养或传代有限次数(例如,培养0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20次)这类原代细胞。在一些情况下,原代细胞可以适应体外培养条件。在一些情况下,原代细胞分离自生物体、系统、器官或组织,仍选地,经分选,并在不存在培养或

继代培养的情况下利用。在一些情况下,可以刺激、激活或分化原代细胞。例如,通过与CD3、CD28激动剂、IL-2、IFN- γ 或其组合接触(例如,在其存在的情况下培养)可以激活原代T细胞。

[0075] 本文所用短语“T细胞”指表达T细胞受体分子的淋巴细胞。T细胞包括人类 $\alpha\beta$ (阿尔法贝塔)T细胞和人类 $\gamma\delta$ (伽马达尔塔)T细胞。T细胞包括但不限于,原初T细胞,刺激性T细胞,原代T细胞(例如,未培养的T细胞),培养的T细胞,永生T细胞,辅助T细胞,细胞毒性T细胞,记忆T细胞,调节T细胞,天然杀伤T细胞,其组合或其亚群。T细胞可以是CD4 $^+$ 、CD8 $^+$ 或CD4 $^+$ 和CD8 $^+$ 。T细胞可以是辅助细胞,例如, T_H1 、 T_H2 、 T_H3 、 T_H9 、 T_H17 或 T_{FH} 型辅助细胞。T细胞可以是细胞毒性T细胞。调节T细胞可以是FOXP3 $^+$ 或FOXP3 $-$ 。T细胞可以是 α/β T细胞或 γ/δ T细胞。在一些情况下,T细胞是CD4 $^+$ CD25 hi CD127 lo 调节T细胞。在一些情况下,T细胞是选自下组的调节T细胞:1型调节($Tr1$)、 T_H3 、CD8+CD28-、 $Treg17$ 和Qa-1限制性T细胞或其组合或其亚群。在一些情况下,T细胞是FOXP3 $^+$ T细胞。在一些情况下,T细胞是CD4 $^+$ CD25 lo CD127 hi 效应T细胞。在一些情况下,T细胞是CD4 $^+$ CD25 lo CD127 hi CD45RA hi CD45RO $^{-}$ 原初T细胞。T细胞可以是经遗传操纵的重组T细胞。在某些情况下,重组T细胞具有重组(例如异源性)T细胞受体。

[0076] 如本文所用,术语“TCR受体”是由两条TCR亚基链(例如TCR- α 和TCR- β ,TCR γ 和TCR δ)组成的异二聚体,其响应于抗原而激活T细胞。当在T细胞中表达时,TCR受体的每个TCR亚基链均包含将TCR亚基链锚定至细胞膜的恒定区和在抗原识别和结合中起作用的可变区,例如,当第一TCR亚基链(例如,TCR- α)和第二TCR亚基链(例如,TCR- β)链形成异二聚体TCR受体时。

[0077] 本文所用术语“非同源性末端连接”或NHEJ指这样的细胞过程,其中DNA链的切割或切口端在不需要同源性核酸模板的情况下直接连接。NHEJ可以导致修复位点处一个或多个核苷酸的添加、缺失、取代或其组合。

[0078] 本文所用术语“同源性定向修复”或HDR指这样的细胞过程,其中DNA链的切割或切口端通过同源模板核酸的聚合反应修复。因此,原始序列被模板的序列替代。同源性模板核酸可以通过基因组中其他位置的同源性序列(姐妹染色单体,同源性染色体或相同或不同染色体上的重复区域)提供。或者,可以导入外源性模板核酸以在靶位点获得特定的HDR诱导的序列改变。以此方式,可以将特定突变导入切割位点。

[0079] 本文所用单链DNA模板或双链DNA模板指可以被细胞用作例如通过HDR编辑T细胞基因组的模板的DNA寡核苷酸。通常,单链DNA模板或双链DNA模板具有与靶位点同源的至少一个区域。在一些情况下,单链DNA模板或双链DNA模板具有两个同源区域,例如5'端和3'端,其侧接包含待插入靶切割或插入位点的异源性序列的区域。

具体实施方式

[0080] 以下描述列举了本发明组合物和方法的各个方面和实施方式。任一特定实施方式都不限定组合物和方法的范围。相反,实施方式仅提供了至少包括在所公开的组合物和方法范围内的各种组合物和方法的非限制性示例。应当从本领域普通技术人员的角度阅读该描述;因此,并不一定包括技术人员众所周知的信息。

[0081] 本文提供了用于编辑人T细胞基因组的组合物和方法。发明人发现,异源性TCR可以插入T细胞基因组中的靶向的区域中,使得异源性TCR处于内源性TCR启动子的控制之下。

本文提供的方法和组合物可用于制备具有所需抗原特异性的修饰的T细胞。这些修饰的T细胞可用于例如治疗对象的癌症，自身免疫疾病或感染。

[0082] 在一些实施方式中，将编码异源性TCR- β 链的可变区和异源性TCR- α 链的可变区的核酸序列插入T细胞基因组中TRAC基因的外显子1。在一些实施方式中，将编码异源性TCR- α 链的可变区和异源性TCR- β 链的可变区的核酸序列在T细胞的基因组中插入TRBC基因的外显子1，例如，插入TRBC1或TRBC2的外显子1。在一些实施方式中，通过同源性定向修复或如本文另外描述的引入核酸序列。

[0083] 在一些实施方式中，(a) 编码T细胞受体的异源性TCR- α 链的可变区的第一核酸序列；和(b) 编码抗原特异性T细胞受体的异源性TCR- β 链的可变区的第二核酸序列分别插入TRAC基因的外显子1和TRBC基因的外显子1。在一些实施方式中，通过同源性定向修复或如本文另外描述的引入核酸序列。

[0084] 制备修饰的人T细胞的方法

[0085] 用于编辑T细胞的基因组的方法包括用于编辑人T细胞的基因组的方法，该方法包括将核酸序列或构建体插入人T细胞中T细胞受体 (TCR) - 亚基恒定基因的外显子1的靶区域中。核酸构建体从N端到C端依次编码第一异源性TCR亚基链，其中TCR亚基链包含TCR亚基链的可变区和恒定区，以及第二异源性TCR亚基链的可变区。该构建体进一步编码在第一异源性TCR亚基链的可变区之前的第一自切割肽，以及在第一异源性TCR亚基链和第二异源性TCR亚基链之间的第二自切割肽。在一些方法中，如果内源性TCR亚基是TCR- α (TCR-阿尔法) 亚基，则第一异源TCR亚基链是异源性TCR- β (TCR-贝塔) 亚基链，而第二异源性TCR亚基链是异源性TCR- α 亚基链。在一些方法中，如果内源性TCR亚基是TCR- β 亚基，则第一异源TCR亚基链是异源性TCR- α 亚基链，而第二异源性TCR亚基链是异源性TCR- β 亚基链。

[0086] 在一些实施方式中，编码TCR亚基链的可变区的核酸构建体或序列是编码TCR亚基链的核酸构建体或序列，即，编码TCR亚基链的可变区和恒定区的核酸，例如全长TCR亚基链。在一些实例中，核酸编码全长TCR- α ，TCR- β ，TCR- γ 或TCR- δ 亚基链。在一些实例中，核酸构建体或序列编码第一异源性TCR亚基链(例如，全长TCR亚基链)和第二异源性TCR亚基链的可变区。在一些实例中，第一和第二异源性TCR亚基链是不同的。在一些实例中，核酸构建体从N端到C端编码异源性全长TCR- β 亚基链和异源性TCR- α 亚基链的可变区。在其他实例中，核酸构建体从N端到C端编码异源性全长TCR- α 亚基链和异源性TCR- β 亚基链的可变区。

[0087] 用于编辑T细胞的基因组的方法包括用于编辑人T细胞的基因组的方法，该方法包括将核酸序列或构建体在人T细胞中插入TCR- α 亚基 (TRAC) 基因的外显子1的靶区域中。在一些实施方式中，靶区域在TRAC基因的恒定结构域的外显子1中。在其他实施方式中，在编码TCR- α 跨膜结构域的序列开始之前，靶区域在外显子1，外显子2或外显子3中。该核酸构建体从N端到C端依次编码异源性T细胞受体 (TCR) - β 链的可变区，然后是异源性TCR- α 链的可变区。该构建体进一步编码在异源性TCR- β 链的可变区之前的第一自切割肽，以及在异源性TCR- β 链的可变区和异源性TCR- α 链的可变区之间的第二自切割肽。该构建体进一步编码异源性TCR- α 链可变区之后的内源性TCR- α 亚基的N端的部分。取决于TRAC基因中的插入位点，编码内源性TCR- α 亚基的N端部分的核酸的大小可以变化。编码内源性TCR- α 亚基的N端部分的核酸大小将取决于TRAC外显子1的起始与靶向的插入位点之间的内源性TRAC核酸序列中核苷酸的数目。参见，例如，图1a，其中构建体中包含编码内源性TCR- α 亚基N端的25个核苷

酸,因为TRAC外显子1的起始与插入位点之间的核苷酸数目为25个核苷酸。类似地,如果TRAC外显子1的起始和插入位点之间的核苷酸数目小于或大于25个核苷酸,则构建体中可具有编码内源性TCR- α 亚基的N端部分的小于或大于25个核苷酸的核酸。在一些实例中,该核酸构建体从N端到C端编码第一自切割肽序列,异源性(即,可变区和恒定区)TCR- β 亚基链(例如,全长TCR- β 亚基链),第二自切割肽序列,异源性TCR- α 亚基链的可变区和内源性TCR- α 亚基N端的部分。示例性的构建体包括图1a所示的那些。

[0088] 用于编辑T细胞的基因组的方法也包括用于编辑人T细胞的基因组的方法,该方法包括将核酸序列或构建体在人T细胞中插入TCR- β 亚基(TRBC)基因的外显子1的靶区域中。在一些实施方式中,靶区域在TRBC1或TRBC2基因的外显子1中。所述核酸构建体从N端到C端依次编码异源性T细胞受体(TCR)- α 链的可变区,然后是异源性TCR- β 链的可变区。该构建体进一步编码在异源性TCR- α 链的可变区之前的第一自切割肽,以及在异源性TCR- α 链的可变区和异源性TCR- β 链的可变区之间的第二自切割肽。该构建体进一步编码异源性TCR- β 链可变区之后的内源性TCR- β 亚基的N端的部分。取决于TRBC1或TRBC2中的插入位点,编码内源性TCR- β 亚基的N端部分的核酸的大小可以变化。编码内源性TCR- α 亚基的N端部分的核酸大小将取决于TRBC1或TRBC2 TRBC外显子1的起始与靶向的插入位点之间的内源性TRBC核酸序列中核苷酸的数目。参见,例如,图1b,其中构建体中包含编码内源性TCR- β 亚基N端的25个核苷酸,因为TRBC外显子1的起始与插入位点之间的核苷酸数目为25个核苷酸。类似地,如果TRBC1或TRBC2外显子1的起始和插入位点之间的核苷酸数目小于或大于25个核苷酸,则构建体中可具有编码内源性TCR- β 亚基的N端部分的小于或大于25个核苷酸的核酸。在一些实例中,该核酸构建体从N端到C端编码第一自切割肽序列,异源性(即,可变区和恒定区)TCR- α 亚基链(例如,全长TCR- α 亚基链),第二自切割肽序列,异源性TCR- β 亚基链的可变区和内源性TCR- β 亚基N端的部分。示例性的构建体包括图1b所示的那些。

[0089] 自切割肽的实例包括但不限于自切割病毒2A肽,例如猪捷申病毒-1(P2A)肽,明脉扁刺蛾病毒(T2A)肽,马鼻炎A病毒(E2A)肽,或口蹄疫病毒(F2A)肽。自切割2A肽可从单个构建体表达多个基因产物。(参见,例如Chng等,“在CHO细胞中裂解高效2A肽用于高水平的单克隆抗体表达(Cleavage efficient 2A peptides for high level monoclonal antibody expression in CHO cells)”Mabs 7(2):403-412(2015))。在一些实施方式中,第一和第二自切割肽是相同的。在其他实施方式中,第一和第二自切割肽是不同的。

[0090] 插入后,按以下顺序编码:第一自切割肽,异源性全长TCR- β 链,第二自切割肽,TCR- α 链的可变区和内源性TCR- α 亚基的N端部分的构建体受内源性TCR- α 启动子和TCR- α 调控元件的控制。一旦将构建体掺入到T细胞的基因组中并在内源性TCR- α 启动子的控制下,就可以在允许插入的构建体转录成编码融合多肽的单个mRNA序列的条件下培养T细胞。融合多肽按以下顺序包含:第一自切割肽,异源性全长TCR- β 链,第二自切割肽,异源性全长TCR- α 链和内源性TCR- α 亚基的N端部分。

[0091] 类似地,插入后,按以下顺序编码:第一自切割肽,异源性全长TCR- α 链,第二自切割肽,TCR- β 链的可变区和内源性TCR- β 亚基的N端部分的构建体受内源性TCR- β 启动子和TCR- β 调控元件的控制。一旦将构建体掺入到T细胞的基因组中并在内源性TCR- β 启动子的控制下,就可以在允许插入的构建体转录成编码融合多肽的单个mRNA序列的条件下培养T细胞。融合多肽按以下顺序包含:第一自切割肽,异源性全长TCR- α 链,第二自切割肽,异源

性全长TCR- β 链和内源性TCR- β 亚基的N端部分。

[0092] 通过将构建体插入TRAC基因的外显子1,将TRAC基因的其余外显子(外显子2和3)与外显子1一起剪接到最终的mRNA序列中。该mRNA序列的翻译导致一种蛋白质的表达,该蛋白质可自切割成三种独立的多肽序列,即缺少跨膜结构域的无活性内源性可变区肽,(其翻译后可在内质网中降解或分泌),全长异源性抗原特异性TCR- β 链,和全长异源性抗原特异性TCR- α 链(参见图1a)。全长抗原特异性TCR- β 链和全长抗原特异性TCR- α 链形成具有所需抗原特异性的TCR。

[0093] 类似地,通过将构建体插入TRBC1/2基因的外显子1,将TRBC1/2基因的其余外显子(外显子2-4)与外显子1一起剪接到最终的mRNA序列中。该mRNA序列的翻译导致一种蛋白质的表达,该蛋白质可自切割成三种独立的多肽序列,即缺少跨膜结构域的无活性内源性可变区肽,(其翻译后可在内质网中降解或分泌),全长异源性抗原特异性TCR- β 链,和全长异源性抗原特异性TCR- α 链。全长抗原特异性TCR- β 链和全长抗原特异性TCR- α 链形成具有所需抗原特异性的TCR。

[0094] 或者,将异源性TCR- α 链编码序列,例如,编码TCR- α 链的可变区的序列,和异源TCR- β 链编码序列,例如,编码TCR- β 链的可变区的序列插入T细胞的基因组中,其中异源性TCR- α 链插入TRAC基因的外显子1,并且异源性TCR- β 链插入TRBC基因的外显子1。在一些实施方式中,使用编码异源性TCR- α 链的第一核酸序列或构建体和编码异源性TCR- β 链的第二核酸序列或构建体将异源性TCR- α 链插入TRAC基因的外显子1并将异源性TCR- β 链插入TRBC基因的外显子1。

[0095] 在使用第一和第二核酸构建体的方法中,用于插入编码异源性TCR- α 链的核酸的靶区域在TRAC基因的外显子1中。在一些实施方式中,用于插入编码异源性TCR- β 链的核酸的靶区域在内源性TRBC1或TRBC2启动子的下游并且位于TRBC1或TRBC2基因的外显子1中。第一核酸从N端到C端依次编码第一自切割肽,然后是异源性TCR- α 链,然后是内源性TCR- α 亚基的N端部分。第二核酸构建体从N端到C端依次编码第二自切割肽,然后是编码异源性TCR- β 链的核酸,随后是编码内源性TCR- β 亚基的N端部分。示例性的构建体包括图2所示的那些。

[0096] 插入后,按此顺序编码第一自切割肽和异源性TCR- α 链的第一构建体在内源性TCR- α 启动子和TCR- α 调控元件的控制下。按此顺序编码第二自切割肽和异源性TCR- β 链的第二构建体在内源性TCR- β 启动子和TCR- β 调控元件的控制下。一旦将构建体掺入到T细胞的基因组中并在内源性TCR α 和TCR- β 启动子的控制下,就在允许第一构建体和第二构建体转录成单独的mRNA序列的条件下培养T细胞。通过将第一构建体插入TRAC基因的外显子1,将TRAC基因的其余外显子(外显子2和3)与外显子1一起剪接到编码全长异源性TCR- α 链的最终mRNA序列中。类似地,通过将第二构建体插入TRBC基因的外显子1,将TRBC基因的其余外显子(外显子2和3)与外显子1一起剪接到编码全长异源性TCR- β 链的mRNA序列中。

[0097] 编码第一自切割肽和全长异源性TCR- α 链的mRNA序列的翻译会导致表达缺乏跨膜结构域的无活性内源性可变区肽(例如,其可在翻译后于内质网中降解或分泌),以及全长异源性抗原特异性TCR- α 链。编码第二自切割肽和全长异源性TCR- β 链的mRNA序列的翻译会导致表达缺乏跨膜结构域的无活性内源性可变区肽(例如,其可在翻译后于内质网中降解或分泌),以及全长异源性抗原特异性TCR- β 链。全长抗原特异性抗原特异性TCR- β 链和全长

异源性抗原特异性TCR- α 链形成具有所需抗原特异性的TCR。

[0098] 在本文提供的方法中,异源性TCR- β 链的可变区包含可变(V),多样性(D)和连接(J)等位基因。在本文提供的方法中,异源性TCR- α 链的可变区包含V和J等位基因。参见,例如,Kuby,J.,《免疫学》(Immunology),第七版,纽约的WHF公司(W.H.Freeman&Co.,New York) (2013)。

[0099] 在一些实施方式中,通过引入包含核酸的载体,例如病毒载体,将核酸序列插入T细胞的基因组中。病毒载体的实例包括但不限于腺相关病毒(AAV)载体,逆转录病毒载体或慢病毒载体。在一些实施方式中,慢病毒载体是整合酶缺陷型慢病毒载体。

[0100] 在一些实施方式中,通过非病毒递送将核酸序列插入到T细胞的基因组中。在非病毒递送方法中,核酸可以是裸DNA,或在非病毒质粒或载体中。

[0101] 在一些实施方式中,通过向T细胞中引入以下来将核酸插入T细胞中:(a)切割TRAC基因的外显子1中的靶区域以在T细胞的基因组中产生插入位点的靶向的核酸酶;和(b)核酸序列,其中所述核酸序列通过HDR掺入插入位点。在一些实施方式中,通过向T细胞中引入以下来将核酸插入T细胞中:(a)切割TRBC基因的外显子1中的靶区域以在T细胞的基因组中产生插入位点的靶向的核酸酶;和(b)核酸序列,其中所述核酸序列通过HDR掺入插入位点。

[0102] 在一些实施方式中,所述方法进一步包括将与所述TRAC基因的外显子1的靶区域特异性杂交的向导RNA引入细胞。在一些实施方式中,所述方法进一步包括将与所述TRBC基因的外显子1的靶区域特异性杂交的向导RNA引入细胞。

[0103] 在使用第一和第二核酸序列分别将异源性TCR- α 链和异源性TCR- β 链插入TRAC基因的外显子1和TRBC基因的外显子1的实施方式中,通过将以下引入细胞来将第一和第二核酸插入T细胞:(a)一种或多种靶向的核酸酶,其在TRAC基因的外显子1中产生第一插入位点,并在TRBC基因的外显子1中产生第二插入位点;(b)第一核酸序列;和(c)第二核酸序列。在一些实施方式中,该方法进一步包括将与TRAC基因的外显子1的靶区域特异性杂交的向导RNA和与TRBC基因的外显子1的靶区域特异性杂交的向导RNA引入细胞。

[0104] 在一些实施方式中,核酸序列的5'和3'末端中的每一个包含与侧接T细胞基因组中靶区域(例如,TRAC基因外显子1中的靶区域或TRBC基因外显子1中的靶区域)的基因组序列同源的核苷酸序列。在某些情况下,与基因组序列同源的核苷酸序列的长度为约50至300个核苷酸。在一些情况下,与基因组序列或其部分同源的核苷酸序列与基因组序列至少80%,90%,95%互补。在一些实施方式中,核酸序列的5'和3'末端包含与TRAC基因的外显子1中的插入位点处的基因组序列同源的核苷酸序列。在一些实施方式中,核酸序列的5'和3'末端包含与侧接TRBC基因的外显子1中的插入位点的基因组序列同源的核苷酸序列。

[0105] 在一些情况中,将核酸序列作为线性DNA模板引入细胞中。在一些情况中,将核酸序列作为双链DNA模板引入细胞中。在一些情况中,DNA模板是单链DNA模板。在一些情况中,单链DNA模板是纯单链DNA模板。如本文所用,述及“纯单链DNA”表示基本上没有DNA的其他或相对链的单链DNA。述及“基本上没有”表示纯单链DNA的一条DNA链比另一条DNA链少至少100倍。在一些情况下,DNA模板是双链或单链质粒或小环。

[0106] 在一些实施方式中,靶向的核酸酶选自RNA向导的核酸酶结构域,转录激活物样效应核酸酶(TALEN),锌指核酸酶(ZFN)和megaTAL(参见,例如,Merkert和Martin,“人类多能干细胞的位点特异性基因组工程改造(Site-Specific Genome Engineering in Human

Pluripotent Stem Cells)”, Int. J. Mol. Sci. 18(7) :1000 (2016)。在一些实施方式中, RNA向导的核酸酶是Cas9核酸酶, 并且该方法进一步包括将与该T细胞的基因组中的靶区域例如该TRAC基因的外显子1的靶区域特异性杂交的向导RNA引入细胞。在其他实施方式中, RNA向导的核酸酶是Cas9核酸酶, 并且该方法进一步包括将与TRBC基因的外显子1中的靶区域特异性杂交的向导RNA引入细胞。

[0107] 如通篇所用, 向导RNA (gRNA) 序列是与位点特异性或靶向的核酸酶相互作用并与细胞基因组内的靶核酸特异性结合或杂交的序列, 从而使gRNA和靶向的核酸酶共定位于细胞基因组中的靶核酸。gRNA各自包括长度约为10至50个核苷酸的DNA靶向序列, 其与基因组中靶DNA序列特异性结合或杂交。每个gRNA包括一个长度约为10至50个核苷酸的DNA靶向序列或原型间隔区序列, 该序列与基因组中的靶DNA序列特异性结合或杂交。例如, DNA靶向序列的长度为约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或50个核苷酸。在一些实施方式中, gRNA包含crRNA序列和反式激活crRNA (tracrRNA) 序列。在一些实施方式中, gRNA不包含tracrRNA序列。

[0108] 通常, 将DNA靶向序列设计为与靶DNA序列互补(例如, 完美互补)或基本上互补。在某些情况下, DNA靶向序列可以纳入摆动或简并碱基以结合多个遗传元件。在某些情况下, 结合区3'或5'端的19个核苷酸与一个或多个靶遗传元件完美互补。在某些情况下, 可以改变结合区以增加稳定性。例如, 可以纳入非天然核苷酸以增加RNA对降解的抗性。在某些情况下, 可以改变或设计结合区, 以避免或减少结合区中的二级结构形成。在某些情况下, 可以设计结合区以优化G-C含量。一些情形中, G-C含量以约40%至约60% (例如40%、45%、50%、55%、60%) 为佳。在一些实施方式中, Cas9蛋白可以处于激活的内切核酸酶形式, 因此当与靶核酸结合作为具有向导RNA的复合物的部分或者具有DNA模板的复合物的部分时, 双链断裂导入靶核酸。在本文提供的方法中, 可以将Cas9多肽或编码Cas9多肽的核酸引入T细胞。可以用HDR修复双链断裂以将DNA模板插入T细胞的基因组中。本文所述方法可以利用各种Cas9核酸酶。例如, 可以利用这样的Cas9核酸酶, 所述Cas9核酸酶需要紧邻向导RNA靶向的区域3'的NGG原型间隔子邻近基序 (PAM)。这样的Cas9核酸酶可以靶向TRAC的外显子1或TRBC的外显子1的区域, 其包含NGG序列。又例如, 具有正交PAM基序要求的Cas9蛋白可以用于靶向不具有邻近的NGG PAM序列的序列。具有正交PAM序列特异性的示例性Cas9蛋白包括但不限于在Esvelt等 (Nature Methods 10:1116-1121 (2013)) 中所述的那些。

[0109] 在一些情况下, Cas9蛋白是切口酶, 因此在与靶核酸结合作为与向导RNA的复合物的部分时将单链断裂或切口引入靶核酸。各自结合结构不同的向导RNA的一对Cas9切口酶可以靶向靶基因组区域的2个近端位点, 并且因此将一对近端单链断裂导入靶基因组区域, 例如, TRAC基因的外显子1或TRBC基因的外显子1。切口酶对可以提供增强的特异性, 因为脱靶作用有可能导致单一缺口, 这通常通过碱基切除修复机制在无损伤的情况下修复。示例性Cas9切口酶包含具有D10A或H840A突变的Cas9核酸酶(参见例如, Ran等“用于增强基因组编辑特异性的通过RNA向导的CRISPR Cas9形成的双切口 (Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity), ”Cell 154 (6) :1380-1389 (2013))。

[0110] 在一些实施方式中, 将Cas9核酸酶, 向导RNA和核酸序列作为核糖核蛋白复合物

(RNP) -DNA模板复合物引入细胞中,其中RNP-DNA模板复合物包括:(i) RNP,其中该RNP包含Cas9核酸酶和向导RNA;和(ii) 编码异源性TCR- β 链和异源性TCR- α 链的DNA模板,其中该DNA模板通过HDR插入到TRAC基因的外显子1中。在一些实施方式中,将Cas9核酸酶,向导RNA和核酸序列作为核糖核蛋白复合物(RNP) -DNA模板复合物引入细胞中,其中RNP-DNA模板复合物包括:(i) RNP,其中该RNP包含Cas9核酸酶和向导RNA;和(ii) 编码异源性TCR- β 链和异源性TCR- α 链的DNA模板,其中该DNA模板通过HDR插入到TRBC基因的外显子1中。

[0111] 在一些实施方式中,其中使用分开的构建体将异源性TCR- α 链插入T细胞中TRAC基因的外显子1中,并将异源性TCR- β 链插入T细胞中TRBC基因的外显子1中,将以下引入细胞:(a) 第一(RNP) -DNA模板复合物,其中第一RNP-DNA模板复合物包含:(i) 第一RNP,其中RNP包含Cas9核酸酶和与TRAC基因的外显子1的靶区域特异性杂交的第一向导RNA;和(ii) 编码异源性TCR α 亚基的DNA模板;和(b) 第二(RNP) -DNA模板复合物,其中第二RNP-DNA模板复合物包含:(i) 第二RNP,其中第二RNP包含Cas9核酸酶和与TRBC基因的外显子1中的靶区域特异性杂交的第二向导RNA;和(ii) 编码异源性TCR β 亚基的DNA模板。在一些实施方式中,第一RNP-DNA模板复合物中的Cas9核酸酶和第二RNP-DNA模板复合物中的Cas9核酸酶是相同的。在一些实施方式中,第一RNP-DNA模板复合物中的Cas9核酸酶和第二RNP-DNA模板复合物中的Cas9核酸酶是不同的。

[0112] 在一些实施方式中,RNP与DNA模板的摩尔比可为约3:1至约100:1。例如,摩尔比可以为约5:1至10:1,约5:1至约15:1,5:1至约20:1;5:1至约25:1;约8:1至约12:1;约8:1至约15:1,约8:1至约20:1,或约8:1至约25:1。

[0113] 在一些实施方式中,RNP-DNA模板复合物中的DNA模板的浓度为约2.5pM至约25pM。在一些实施方式中,DNA模板的量为约1 μ g至约10 μ g。

[0114] 在一些实施方式中,通过用DNA模板与RNP在约20°C-约25°C的温度孵育不到约1分钟-30分钟形成RNP-DNA模板复合物。在一些实施方式中,在将RNP-DNA模板复合物导入细胞之前混合RNP-DNA模板复合物和细胞。

[0115] 在一些实施方式中,通过电穿孔将核酸序列或RNP-DNA模板复合物引入T细胞。用于电穿孔细胞以导入RNP-DNA模板复合物的方法、组合物和装置可以包括本文实施例中所述的那些。用于电穿孔细胞以导入RNP-DNA模板复合物的其他或另外的方法、组合物和装置可以包括述于WO/2006/001614或Kim, J.A. 等Biosens. Bioelectron. 23, 1353-1360 (2008) 中的那些。用于电穿孔细胞以导入RNP-DNA模板复合物的其他或另外的方法、组合物和装置可以包括述于美国专利申请公开号2006/0094095;2005/0064596;或2006/0087522中的那些。用于电穿孔细胞以导入RNP-DNA模板复合物的其他或另外的方法、组合物和装置可以包括述于Li, L.H. 等Cancer Res. Treat. 1, 341-350 (2002);美国专利号6,773,669;7,186,559;7,771,984;7,991,559;6485961;7029916;和美国专利申请公开号2014/0017213和2012/0088842中的那些。用于电穿孔细胞以导入RNP-DNA模板复合物的其他或另外的方法、组合物和装置可以包括述于Geng, T. 等J. Control Release 144, 91-100 (2010);和Wang, J., 等Lab. Chip 10, 2057-2061 (2010) 中的那些。

[0116] 在一些实施方式中,将包含至少两种结构不同的RNP-DNA模板复合物的多个RNP-DNA模板复合物引入细胞。在全文中,短语“多个”是指两个或多个。在一些实施方式中,至少两种结构不同的RNP-DNA模板复合物包含结构不同的向导RNA。在一些实施方式中,其中至

少两种结构不同的RNP复合物包含结构不同的向导RNA,结构不同的RNA复合物各自包含Cas9切口酶,并且结构不同的向导RNA杂交靶区域的相对链。

[0117] 在一些实施方式中,将编码异源性TCR- β 链的可变区和异源性TCR- α 链的可变区的至少两种结构不同的核酸插入T细胞群中TRAC基因的外显子1。这样,可以将多个核酸序列(其中每个核酸序列编码异源性TCR- β 链和异源性TCR- α 链的独特组合)引入T细胞群。可以将每个核酸序列作为RNP-DNA模板复合物的部分引入细胞。

[0118] 例如,靶向的核酸酶可以与多个(例如2、3、4、5或更多,例如2-10、5-100、20-100)编码异源性TCR- β 链的可变区和异源性TCR- α 链的可变区的独特DNA模板复合。可以将多种复合物同时引入T细胞群,以将编码异源性TCR- β 链的可变区和异源性TCR- α 链的可变区的独特组合的单个DNA模板插入个体T细胞的TRAC基因的外显子1。尽管每个T细胞只能获得单个DNA模板,但在整个细胞群中,许多独特的,结构不同的DNA模板将整合到T细胞中,以建立异源性TCR序列文库。

[0119] 在一些实施方式中,当使用分开的构建体将异源性TCR- α 链插入TRAC基因的外显子1并将异源性TCR- β 链插入TRBC基因的外显子1时,第一靶向的核酸酶可与多个独特的DNA模板复合,该模板编码异源性TCR- β 链的可变区以形成多个第一RNP-DNA模板复合物,并且第二靶向的核酸酶可与多个独特的DNA模板复合,该模板编码异源性TCR- α 链的可变区以形成多个第二RNP-DNA模板复合物。可以将第一和第二多个复合物同时引入T细胞群,以建立异源性TCR序列的文库。

[0120] 异源性T细胞库可以从先前已知的TCR序列以及在感兴趣的内源性T细胞群中发现的天然库来设计和产生。例如,TCR序列可以是从肿瘤浸润淋巴细胞,自身免疫性疾病部位的自身反应性T细胞或病原体应答性T细胞获得的TCR序列。

[0121] 在一些实施方式中,将核酸序列或RNP-DNA模板复合物引入约 1×10^5 至约 2×10^6 个T细胞。例如,可以将核酸序列或RNP-DNA模板复合物引入约 1×10^5 个细胞至约 5×10^5 个细胞,约 1×10^5 个细胞至约 1×10^6 个细胞, 1×10^5 个细胞至约 1.5×10^6 个细胞, 1×10^5 个细胞至约 2×10^6 个细胞,约 1×10^6 个细胞至约 1.5×10^6 个细胞或约 1×10^6 个细胞至约 2×10^6 个细胞。

[0122] 在本文提供的方法和组合物中,人T细胞可以是原代T细胞。在一些实施方式中,T细胞是调节T细胞、效应T细胞或原初T细胞。在一些实施方式中,效应T细胞是CD8 $^+$ T细胞。在一些实施方式中,T细胞是CD4 $^+$ CD8 $^+$ T细胞。还提供了通过本文所述任何方法修饰的任何细胞的群体。细胞可以是体外、离体和/或体内的。在一些情况中,将T细胞从对象移除,使用本文所述任何方法修饰并给予患者。

[0123] 在一些实施方式中,在允许异源性TCR- β 链和异源性TCR- α 链表达以形成异源性抗原特异性T细胞受体的条件下培养修饰的T细胞。在其他实施方式中,在有效扩大修饰细胞群的条件下培养T细胞。在一些实施方式中,表达抗原特异性T细胞受体的T细胞被纯化。

[0124] 组合物

[0125] 还提供了通过本文提供的任何方法产生的人T细胞。还提供了通过本文提供的任何方法产生的人T细胞群。本文还提供了多个人T细胞,其中至少20%,30%,40%,50%,60%,70%,80%,90%,95%,99%或更多细胞的基因组包含异源性核酸的靶向的插入,其中该核酸插入TRAC的外显子1或TRBC的外显子1。在一些实施方式中,T细胞是调节T细胞、效

应T细胞或原初T细胞。某些实施方式中，效应T细胞为CD8⁺T细胞。在一些实施方式中，效应T细胞为CD4⁺CD8⁺T细胞。

[0126] 还提供了包含核酸序列的T细胞，该核酸序列从N端到C端编码：(i) 第一自切割肽序列；(ii) 第一异源性TCR亚基链，其中TCR亚基链包含TCR亚基链的可变区和恒定区；(iii) 第二自切割肽序列；(iv) 第二异源性TCR亚基链的可变区；和(v) 内源性TCR亚基的N端的部分，其中，如果内源性TCR亚基为TCR- α (TCR-阿尔法)亚基，则第一异源性TCR亚基链为异源性TCR- β (TCR-贝塔)亚基链并且第二异源性TCR亚基链是异源性TCR- α 亚基链，并且其中，如果内源性TCR亚基是TCR- β 亚基，则第一异源性TCR亚基链是异源性TCR- α 亚基链并且第二异源性TCR亚基链是异源性TCR- β 亚基链。在一些实施方式中，该核酸序列从N端到C端编码：(i) 第一自切割肽序列，(ii) 异源性TCR- β 亚基链，(iii) 第二自切割肽序列；(iv) 异源性TCR- α 亚基链的可变区，和(v) 内源性TCR- α 亚基链的N端的部分。在一些实例中，该核酸从N端到C端编码：(i) 第一自切割肽序列，(ii) 异源性TCR- α 亚基链，(iii) 第二自切割肽序列，(iv) 异源性TCR- β 亚基链的可变区，和(v) 内源性TCR- β 亚基N端的部分。

[0127] 还提供了修饰的T细胞，其包含核酸序列，该核酸序列从N端到C端编码：(i) 第一自切割肽序列；(ii) 异源性TCR- β 链的可变区；(iii) 第二自切割肽序列；(iv) 异源性TCR- α 链的可变区；和(v) 内源性TCR- α 亚基的N端的部分，其中核酸序列被整合到TRAC基因的外显子1中。在一些实例中，核酸从N端到C端编码第一自切割肽序列，异源性(例如全长)TCR- β 亚基链，第二自切割肽序列和异源性TCR- α 亚基链的可变区。

[0128] 还提供了修饰的T细胞，其包含核酸序列，该核酸序列从N端到C端编码：(i) 第一自切割肽序列；(ii) 异源性TCR- α 链的可变区；(iii) 第二自切割肽序列；(iv) 异源性TCR- β 链的可变区；和(v) 内源性TCR- β 亚基的N端的部分，其中核酸序列被整合到TRBC基因的外显子1中。在一些实例中，核酸从N端到C端编码第一自切割肽序列，异源性(例如全长)TCR- α 亚基链，第二自切割肽序列和异源性TCR- β 亚基链的可变区。

[0129] 还提供了修饰的T细胞，其包含核酸序列，该核酸序列从N端到C端编码：(i) 第一自切割肽序列；(ii) 异源性TCR- β 链的可变区；(iii) 第二自切割肽序列；(iv) 异源性TCR- α 链的可变区；和(v) 内源性TCR- γ 亚基的N端的部分，其中核酸序列被整合到TRGC基因的外显子1的外显子1中。

[0130] 还提供了修饰的T细胞，其包含：a) 第一核酸序列，其从N端到C端编码：(i) 第一自切割序列，(ii) 异源性TCR- α 链的可变区，和(iii) 内源性TCR- α 链的N端的部分；和b) 第二核酸序列，其从N端到C端编码：(i) 第一自切割序列，(ii) 异源性TCR- β 链的可变区，和(iii) 内源性TCR- β 链的N端的部分，其中第一核酸序列被整合到TRAC基因的外显子1中并且第二核酸序列被整合到TRBC基因的外显子1中。

[0131] 治疗方法

[0132] 本文所述的任何方法和组合物均可用于治疗或预防对象的疾病(例如，癌症，传染病，自身免疫病，移植排斥，移植物抗宿主病或其他炎性疾病)。在本文提供的治疗方法中，在患有例如癌症，传染病，自身免疫病，移植排斥的可能性，移植物抗宿主疾病或其他炎性疾病的对象中，包含TCR的TCR- α 或TCR- β 链的核酸序列可从对象的T细胞获得。例如，可以从对象分离肿瘤浸润淋巴细胞，自身免疫位点处的T细胞或来自病原体应答性淋巴细胞的T细胞，以获得包含TCR的TCR- α 或TCR- β 链的核酸序列。在一些实施方式中，可以使用从患者样

品中鉴定的单克隆或多克隆TCR序列。例如,可以从肿瘤或发炎部位获得TCR库,并且可以通过合成TCR序列并将其用作DNA模板来制备具有这些抗原特异性的细胞。或者,可以从来自对象的克隆/单细胞扩增序列,例如PCR扩增,并且扩增的序列可以用作DNA模板。一旦获得了TCR的TCR- α 和TCR- β 链的序列,就可以将这些序列插入对象体内或来自对象的T细胞群中,从而用具有所需抗原特异性的异源性TCR置换对象体内T细胞的内源性TCR。在一些实施方式中,可以将修饰的T细胞群体给予对象以治疗该疾病。参见例如图3B。

[0133] 本文提供了一种治疗人类对象的癌症的方法,其包括:使用本文所述的任何方法修饰对象的T细胞以表达抗原特异性T细胞受体,其中所述T细胞受体识别对象中的肿瘤特异性抗原。

[0134] 在一些实施方式中,待治疗的癌症选自B细胞来源的癌症,乳腺癌,胃癌,神经母细胞瘤,骨肉瘤,肺癌,结肠癌,慢性髓样癌,白血病(例如,急性髓样白血病,慢性淋巴细胞性白血病(CLL)或急性淋巴细胞性白血病(ALL)),前列腺癌,结肠癌,肾细胞癌,肝癌,肾癌,卵巢癌,胃癌,睾丸癌,横纹肌肉瘤和霍奇金淋巴瘤。在一些实施方式中,B细胞来源的癌症选自B谱系急性淋巴细胞性白血病,B细胞慢性淋巴细胞性白血病和B细胞非霍奇金淋巴瘤。

[0135] 在本文所述的治疗,例如治疗癌症,传染病或自身免疫病的方法的一些实施方式中,所述T细胞在体内被修饰。将本文所述的任何构建体递送至患者体内。参见例如,美国专利号9737604和Zhang等“脂质纳米颗粒介导的CRISPR/Cas9高效递送用于肿瘤治疗(Lipid nanoparticle-mediated efficient delivery of CRISPR/Cas9 for tumor therapy),”NPG Asia Materials第9卷,第e441页(2017)。

[0136] 在一些实施方式中,在人类对象中治疗癌症的方法包括:a)从对象中获得T细胞;b)使用本文提供的任何方法修饰T细胞以表达异源性抗原特异性T细胞受体,其中所述T细胞受体识别对象中的肿瘤特异性抗原;和c)将修饰的T细胞给予对象。贯穿全文使用的短语“肿瘤特异性抗原”是指癌细胞特有的或在癌细胞中比在非癌细胞中更大量表达的抗原。

[0137] 本文还提供了一种治疗人类对象的自身免疫病的方法,其包括:使用本文所述的任何方法修饰对象的T细胞以表达异源性抗原特异性T细胞受体,其中所述T细胞受体识别自身免疫病相关抗原。

[0138] 在一些实施方式中,在人类对象中治疗自身免疫病的方法包括:a)从对象中获得T细胞;b)使用本文提供的任何方法修饰T细胞以表达异源性抗原特异性T细胞受体,其中所述T细胞受体识别对象中的自身免疫病相关抗原;和c)将修饰的T细胞给予对象。在一些实施方式中,T细胞是调节T细胞。

[0139] 本文还提供了一种治疗人类对象的感染的方法,其包括:使用本文所述的任何方法修饰对象的T细胞以表达异源性抗原特异性T细胞受体,其中所述T细胞受体识别对象中的感染相关抗原。

[0140] 在一些实施方式中,在人类对象中治疗感染的方法包括:a)从对象中获得T细胞;b)使用本文提供的任何方法修饰T细胞以表达异源性抗原特异性T细胞受体,其中所述T细胞受体识别对象中的感染相关抗原;和c)将修饰的T细胞给予对象。

[0141] 本文提供的任何治疗方法可以进一步包括在用异源性TCR代替内源性TCR之前扩增T细胞群。本文提供的任何治疗方法可以进一步包括在用异源性TCR代替内源性TCR之后并在给予对象之前扩增T细胞群。

[0142] 在此公开的材料、组合物以及组分可用于在此公开的方法和组合物、可与在此公开的方法和组合物联用、可用于制备在此公开的方法和组合物，或者是在此公开的方法和组合物的产物。本文公开了以上及其他材料，应理解的是，在公开这些材料的组合、子集、相互作用、组等时，既便没有明确具体指向这些化合物的多种个体或各别组合和集合性组合以及排列组合中的每一种，这每一种都是本文所具体涵盖和具体描述的。例如，如果公开和论述了一种方法，并且论述了可对该方法中一个或多个分子实施的多种改变，则于是具体涵盖了所述改变的和所述方法的每一种和所有可能的组合与排列，除非特别说明并非如此。同样地，还特别考虑和公开了这些的任何子集或组合。这一概念适用于本申请所有方面的内容，包括但不限于采用本文所述组合物的方法的步骤。这样，如果有多种可执行的其他步骤，则应认为，这些其他步骤中的每一个都可与本文所述方法的任何特定方法步骤或方法步骤的组合联合执行，并且就此具体涵盖并视为公开了此类组合或组合子集中的每一个。

[0143] 本文引用的出版物及其中援引相关的材料都具体通过引用整体纳入本文。

[0144] 实施例

[0145] 提供以下实施例仅为说明而非限定。本领域技术人员不难发现有多项非关键参数可变或可修饰并得出基本相同或相似的结果。

[0146] 分离人原代T细胞用于基因靶向

[0147] 由健康人供体中分离原代人T细胞是来自新鲜全血样品，来自Trima A β heresis (太平洋血液中心) 后的白细胞减少 (leukoreduction) 腔室的残留物或白细胞分离术产品 (干细胞公司 (StemCell))。使用SepMate管 (干细胞公司，按照制造商的说明) 通过Ficoll离心从全血样品中分离外周血单核细胞 (PBMC)。使用EasySep人T细胞分离试剂盒 (干细胞公司，按照制造商的说明) 通过磁性负选择由所有细胞来源的PBMC中分离出T细胞。除非另有说明，否则直接刺激和使用分离的T细胞 (新鲜)。使用冷冻细胞时，将按照制造商说明在 Bambanker冷冻培养基 (斗牛犬生物公司 (Bulldog Bio)) 中冷冻的先前分离的T细胞融化，在没有刺激的培养基中培养1天，然后按照针对新鲜分离的样品所述进行刺激和处理。根据 UCSF人类研究委员会 (CHR) 批准的方案，告知新鲜健康人类献血者知情同意。根据耶鲁大学内部审查委员会 (IRB) 批准的方案获得用于基因编辑的患者样品。

[0148] 原代T细胞培养

[0149] 除非另有说明，否则将大量T细胞在含有5%胎牛血清、50mM 2-巯基乙醇和10mM N-乙酰L-胱氨酸的XVivoTM 15培养基 (干细胞公司) 中培养。在指定实验中使用无添加剂以及RPMI+10%FBS的无血清培养基 (ImmunoCult XF T细胞扩增培养基, STEMCELL公司) (图15)。分离后，立即使用抗-人CD3/CD28磁性dyna珠 (赛默飞世尔公司 (ThermoFisher)) 以1:1的珠粒比细胞浓度以及200U/mL的IL-2 (UCSF药物公司 (UCSF Pharmacy))、5ng/mL的IL-7 (赛默飞世尔公司) 和5ng/mL的IL-15 (生命技术公司 (Life Tech)) 的细胞因子混合物刺激T细胞2天。电穿孔后，将T细胞在含有500U/mL的IL-2的培养基中培养。整个培养过程中，T细胞的密度维持在每mL培养基1百万个细胞左右。电穿孔后每隔2-3天，另添加培养基，与另添加的新鲜IL-2一起，以使最终浓度达到500U/mL，并根据需要将细胞转移至更大的培养容器中，以保持100万个细胞/mL的密度。

[0150] RNP产生

[0151] 如前所述,通过将双组分gRNA与Cas9退火来产生RNP (Schumann等,PNAS112:10437-10442(2015);和Hultquist等,Cell Rep.17:1438-1452(2016)))。简言之,化学合成crRNA和tracrRNA (Dharmacon, IDT),并重组产生和纯化重组Cas9-NLS、D10A-NLS或dCas9-NLS (QB3 Macrolab) 将冻干的RNA以160uM的浓度重悬于具有150mM KC1的Tris-HCL (7.4pH) 中,并以等分试样储存在-80℃。解冻crRNA和tracrRNA等分试样,按体积1:1混合,并在37℃下孵育30分钟以形成80uM gRNA溶液。然后将以40uM存储在20mM HEPES-KOH pH 7.5、150mM KC1、10%甘油、1mM DTT中的重组Cas9及其变体与80uM的gRNA以1:1的体积(gRNA与Cas9摩尔比为2:1)在37℃下混合15分钟以形成20uM的RNP。RNP通常在复合后立即进行电穿孔。

[0152] dsDNA HDRT产生

[0153] 由PCR产物产生双链DNA HDRT序列。使用吉布森组装构建新型HDR序列以将HDR模板序列(由同源臂(通常由IDT合成为gBlock)和所需的插入(如GFP)组成)置入克隆载体中,用于进行序列确认和进一步的增殖。将这些质粒用作高输出PCR扩增(Kapa Hotstart聚合酶)的模板。PCR扩增子(dsDNA HDRT)经SPRI纯化(1.0X)并洗脱至3μL H₂O/100μL PCR反应输入物的最终体积。通过分光光度计(nanodrop)以1:20的稀释度分析HDRT的浓度。通过凝胶电泳在1.0%琼脂糖凝胶中确认扩增的HDRT大小。

[0154] 通过外切核酸酶消化产生ssDNA HDRT

[0155] 为了产生长ssDNA作为HDR供体,经由使用常规未修饰的PCR引物以及第二磷酸化PCR引物的PCR扩增感兴趣的DNA。将使用磷酸化引物扩增的DNA链将会是使用该方法将会降解的链。这允许使用相应的磷酸化PCR引物制备单链正义或单链反义DNA。为了产生感兴趣的ssDNA链,PCR产物的磷酸化链经由使用两种酶(链酶(Strandase)混合物A和链酶混合物B)的后续处理在37℃下处理5分钟(每1kb)降解。在80℃孵育5分钟使酶失活。将得到的ssDNA HDR模板进行SPRI纯化(1.0X)并在H₂O中洗脱。可在制造商的网站上找到有关Guide-it™长ssDNA生产系统的更详细的方案(美国宝生物工程有限公司(Takara Bio USA, Inc.)目录号632644)。

[0156] 通过逆转录合成产生ssDNA HDRT

[0157] 通过以下方式合成ssDNA供体:逆转录RNA中间体,然后水解所得的RNA:DNA杂交产物中的RNA链,如(Leonetti等,<http://www.biorxiv.org/content/early/2017/08/21/178905>)中所述。简言之,首先将所需HDR供体克隆到T7启动子下游,并通过PCR扩增T7-HDR供体序列。使用HiScribe T7 RNA聚合酶(新英格兰生物实验室公司(New England Biolabs))通过体外转录合成RNA,并使用TGIRT-III (InGex) 进行逆转录。逆转录后,分别添加NaOH和EDTA至0.2M和0.1M,并在95℃下进行10分钟的RNA水解。使用HC1淬灭反应,使用Ampure XP磁珠(贝克曼库尔特公司(Beckman Coulter))纯化最终的ssDNA产物,并在无菌的无RNA酶H2O中洗脱。通过毛细管电泳(生物分析仪(Bioanalyzer),安捷伦(Agilent))分析ssDNA质量。

[0158] 原代T细胞电穿孔

[0159] 最初T细胞刺激后2天,对RNP和HDR模板进行电穿孔。T细胞从它们的培养容器中收获,并通过将细胞放在磁体上2分钟来去除磁性CD3/CD28dyna珠。进行电穿孔之前,立即将去珠化(de-beaded)的细胞以90Xg离心10分钟,吸取,并以20μL缓冲液/100万个细胞重悬于Lonza电穿孔缓冲液P3中。为了进行最佳编辑,使用具有脉冲编码EH115的Lonza 4D 96孔电

穿孔系统对各孔的100个T细胞进行电穿孔。200,000至多至200万个细胞/孔的替代细胞浓度显示出较低的效率。按指示使用替代电穿孔缓冲液,但具有不同的最佳脉冲设置 (OMEM缓冲液为EQ155)。除非另有说明,否则将2.5 μ L的RNP (总共50pmol) 与2 μ L的HDR模板以每次2 μ g/ μ L (总共4 μ g的HDR模板) 一起电穿孔。

[0160] 对于96孔实验,首先将HDRT等分到96孔聚丙烯V型底板的孔中。然后将RNP添加到HDRT中,并允许其在室温下一起孵育至少30秒。最后,添加重悬于电穿孔缓冲液中的细胞,通过吹打与HDRT和RNP短暂混合,然后将24 μ L的总体积(细胞+RNP+HDRT)转移到96孔电穿孔比色皿中。电穿孔后,立即将80 μ L预热培养基(无细胞因子)添加到各孔中,并将细胞在孵育箱中于37°C静置15分钟,同时保留在电穿孔比色皿中。15分钟后,将细胞移至最终培养容器中。

[0161] 用单个HDR模板对内源性T细胞受体的非病毒置换

[0162] TCR- α 和TCR- β 链都可以在单个多重轮编辑中同时敲入(图2)。这与图1a和图1b中的靶向策略相似,除了在TCR- α 和TCR- β 恒定基因座处,仅插入了所需抗原特异性TCR的可变区。这样做的好处是可以减少插入的总大小(从一个1.5kbp的插入减少到两个500bp的插入),而且还意味着同时表达所需抗原特异性TCR的两条链的任何T细胞都将敲除其先前重组的内源性TCR- α 和TCR- β 两条链,从而例如防止插入的抗原特异性TCR- α 链与内源性TCR- β 链的潜在不希望的配对。

[0163] 用T细胞受体的多克隆文库的内源性TCR置换

[0164] 由于用任何所需的新异源性TCR序列置换内源性TCR的gRNA和同源臂均相同,因此可以同时对包含多种所需TCR的多个不同DNA模板进行电穿孔。尽管任何特异性T细胞只能从各种所需的TCR中获得单个TCR,但许多TCR DNA模板将在整个电穿孔细胞群整合,从而创建了所需序列的合成T细胞库(图3a)。

[0165] 合成T细胞库可以从先前已知的TCR序列或在感兴趣的内源性T细胞群中发现的天然库来设计和产生(图3b)。一些例子包括肿瘤浸润淋巴细胞表达的TCR(将被插入新的CD8+或CD4+T细胞效应物群中),在自身免疫疾病部位由自身反应性T细胞表达的TCR(将被插入调节T细胞群中),或来自病原体反应性T细胞的TCR(被插入CD8+或CD4+T细胞效应物)。

[0166] 用单个HDR模板对内源性T细胞受体的非病毒置换

[0167] T细胞受体的基因座非常复杂,具有多种可变的等位基因(对于TCR- α 链称为V和J等位基因,对于TCR- β 链称为V,D和J等位基因),这些基因在T细胞发育过程中经过体细胞基因重排以产生功能性T细胞受体。对于TCR库的多样性很重要,但对TCR基因座的靶向的基因组编辑(无论是敲除还是敲入)具有挑战性的是,这些重组序列在T细胞的多克隆群中是不同的。对于靶向应用,对于TCR- α 和TCR- β 链两者而言,无论已重新排列了V-J或V-D-J区段,所有T细胞都在该蛋白质的C端有恒定结构域。TCR- β 基因座有两个恒定区(TRBC1和TRBC2),如图1b所示,它们可以被靶向。该恒定序列(恒定外显子,标记为TRAC或TRBC外显子1,外显子2等)允许使用单组基因组靶向试剂(本申请中的CRISPR/Cas9系统,即单个gRNA序列)以修饰每个T细胞,无论它们表达了何种重排的TCR。

[0168] 使用上述方法,制备了编码与肿瘤抗原特异性结合的异源性TCR的DNA模板,并用于替代人T细胞中的内源性TCR。用于替代内源性TCR的同源性定向修复模板(通过PCR产生的dsDNA或通过本文所述的多种方法产生的ssDNA)长约2.1kb,包括5'和3'同源臂(约

300bp),其与侧接gRNA切割位点的基因组序列同源(图1a)。在这些同源臂之间是约1.5kb序列,该序列通过同源性定向修复在gRNA切割位点处插入。该插入序列以多顺反子元件(T2A自切除肽)开头,然后是所需抗原特异性T细胞受体的TCR- β 链的全长序列(在此示例中,是对NY-ESO-1黑色素瘤新抗原特异性的TCR)。第二多顺反子元件(P2A自切除肽)跟随TCR- β 链,并将其与所需抗原特异性TCR- α 链的可变(重组的V和J等位基因)序列分开。仅在gRNA切割位点之前(5'端)插入TCR- α 链的可变区和TRAC外显子1的序列,因为其余TRAC外显子被拼接在一起成为最终的mRNA序列。如上所述,将DNA模板作为RNP:DNA模板复合物的部分引入T细胞。

[0169] 在具有成功的HDR的细胞中转录产生了编码TCR- β 和TCR- α 的多顺反子mRNA。这种靶向策略产生了三种肽链-(1)残余的内源性可变区肽,它不具有跨膜通道(因此不应在细胞表面表达)并且在内质网中降解或在转录后分泌;(2)全长的所需抗原特异性TCR- β 链;和(3)全长的所需抗原特异性TCR- α 链。结果是在内源性TCR启动子的控制下表达所需抗原特异性TCR的两条链的T细胞。T细胞表达两条链以形成异源性TCR,该异源性TCR特异性识别NY-ESO-1黑色素瘤新抗原。

[0170] 如图4a所示,在对上述构建体进行电穿孔后四天,将两个健康人类献血者的CD4+和CD8+T细胞用荧光标记的MHC-葡聚糖染色,该MHC-葡聚糖含有被整合的NY-ESO-1特异性TCR识别的肽(NYESO)。图4b是第二个实验,显示在其他健康人类供者中的相似结果,因此证明了非病毒内源性TCR置换的稳健性和可重复性。

[0171] 在TCR- β 基因座也可以用与靶向TCR- α 相似的策略完成TCR置换,尽管 β 基因座因存在彼此高度同源的两个恒定区(TRBC1和TRBC2)而更为复杂。HDR模板使用靶向TRBC1和TRBC2中均存在的序列的gRNA,在第一TRBC1外显子的5'端插入了新的全长TCR- α 和新TCR- β 的VDJ区。由于TRBC1和TRBC2基因组区域之间的序列相似性,该构建体的3'同源臂与TRBC2中的等价区域几乎完全同源,而5'同源臂在最接近插入位点的150bp中与TRBC2基因组区域具有约85%的同源性。因此,插入可能在TRBC1处为主,但也可能在TRBC2处,或者在TRBC1和TRBC2之间间插删除。也可以使用在TRBC1或TRBC2处特异性切割的gRNA代替靶向两者的gRNA。

[0172] 图9a显示了门选的CD4+或CD8+T细胞中NY-ESO-1特异性TCR的逆转录病毒递送或非病毒TCR置换后的TCR错配分析。与逆转录病毒递送的TCR相比,非病毒TCR置换导致更少的TCR错配。用靶向TRAC的新TCR- α VJ结构域和靶向TRBC1的新TRB- β VDJ结构域对TCR进行多重置换也是可行的,并且可以提出进一步减少TCR错配的策略(图9b-c)。

[0173] 采用葡聚糖的置换TCR和TCR染色

[0174] 如上所述,用单个构建体电穿孔来自两个健康人类献血者的CD4+和CD8+T细胞。电穿孔后四天,用NYESO MHC-葡聚糖对抗原特异性染色进行TCR表达染色(用结合所有潜在人类TCR的抗体)。在大多数没有内源性TCR的同源性定向置换的T细胞中(图5),内源性TCR被TRAC外显子1gRNA切割并通过非同源性末端连接引入小的插入缺失突变(indels)而被敲除。不出所料,几乎所有的NYESO阳性细胞也都对TCR表达呈阳性。

[0175] 通过TCR敲入原代人T细胞的体外癌细胞杀伤

[0176] 体外癌细胞杀伤试验证明了TCR敲入细胞的功能性靶细胞杀伤能力。如上所述,将1G4(NYESO特异性)TCR序列插入来自健康人供者的CD3+原代T细胞中的内源性TCR α 基因座。

电穿孔后第7天,用荧光NYESO肽-MHC葡聚糖对细胞进行染色,并通过荧光激活细胞分选对NYESO+细胞进行分选,以获得纯种群。在标准T细胞培养条件(培养基和IL-2)中进一步培养该群另外五天。电穿孔后12天,将分选的T细胞(其内源性TCR被1G4 TCR取代)与在其MHC上呈递NYESO抗原的癌细胞系(源自黑素瘤的A375细胞,也内源性表达NYESO抗原,例如MHC-A2,被1G4 TCR识别的MHC等位基因)共培养。每隔12小时,通过定量荧光成像对癌细胞的数量进行计数(A375细胞表达红色荧光蛋白,从而可以与T细胞分开进行特异性计数)。使用Incucyte自动荧光显微镜自动进行荧光计数。用3000个癌细胞和指定比例的1G4+T细胞接种培养物(参见图4a)。在由两名健康人类供者编辑的T细胞中,观察到剂量和时间依赖性地杀伤靶癌细胞,这表明1G4 TCR敲入T细胞的功能性。通过将给定孔中的活癌细胞数除以不存在T细胞的对照孔中的活癌细胞数来确定癌细胞的杀灭百分比。高比例(约10:1)的T细胞与癌细胞表现出快速(<24小时)杀伤几乎所有癌细胞的杀伤力,但即使极低比例(约0.1:1)的T细胞与癌细胞在附加培养时间中也表现出强大的杀伤力(见图6a)。

[0177] 证明了在单个时间点通过1G4 TCR敲入T细胞的体外癌症杀伤(见图6b)。从上述细胞杀伤试验中的单个时间点(共孵育后36小时)获取摘要数据。按上述方法分选NYESO葡聚糖+(1G4+)T细胞,以产生100%1G4阳性细胞,然后用来自同一供者的NYESO葡聚糖-(1G4-)T细胞稀释,以得到指示百分比的NYESO+染色T细胞(10%,1%或0%)。然后,按照上述方法,在体外癌症杀伤试验中,将这些群中的每一个与癌细胞共培养,比例为8个T细胞对1个癌细胞(对于100%,10%,1%和0%NYESO+T细胞群产生比例分别为8:1、0.8:1、0.08:1和0:1的1G4+T细胞:癌细胞)。作为癌细胞杀伤的阳性对照,用慢病毒转导了来自另一名健康供者的细胞,该慢病毒将1G4 TCR表达盒随机整合到T细胞的基因组中(注意,在这种情况下,TCR是随机整合并表达的,与1G4 TCR敲入T细胞不同,在1T4 TCR敲入T细胞中,1G4 TCR取代了内源性TCR基因座,因此它从内源性TCR启动子表达出来,同时敲除内源性TCR)。将来自该附加供体的慢病毒转导的T细胞进行类似分选,以产生100%1G4+群,并与靶A375癌细胞系类似地以8:1T细胞与癌细胞的比例共培养。

[0178] 体内小鼠实体瘤模型

[0179] 所有小鼠实验均根据UCSF机构动物护理和使用委员会的规程完成。所有实验均使用8至12周龄的NOD/SCID/IL-2R γ -无(NSG)雄性小鼠(杰克逊实验室)。通过皮下注射 1×10^6 个A375人黑素瘤细胞(ATCC CRL-1619)将肿瘤接种到小鼠的剃毛的右胁腹。接种肿瘤后第7天,评估肿瘤大小,将肿瘤体积在15-30mm³之间的小鼠随机分为实验组和对照治疗组。将指示数量的T细胞重悬于100μl无血清 RPMI 中,并进行眼眶后注射。对于肿瘤大小实验,使用电子卡尺测量肿瘤的长度和宽度,并以 $v = 1/6 * \pi * \text{长度} * \text{宽度} * (\text{长度} + \text{宽度}) / 2$ 计算体积。在尺寸测量中,研究者对实验治疗组不知情。如图和图例所示,转移了大量编辑的T细胞群(5×10^6)或分选的NY-ESO-1TCR+群(3×10^6)。对于大量编辑的T细胞转移,慢病毒编辑的细胞通常具有较高百分比的NY-ESO-1阳性细胞,因此添加模拟感染的细胞以将总T细胞NY-ESO-1+的百分比标准化为等于非病毒编辑的T细胞的大量种群的百分比(约10%NY-ESO-1+)。对于分选的T细胞转移,在电穿孔后八天通过FACS分选NY-ESO-1+T细胞,再扩增两天,然后冷冻(Bambanker冷冻培养基,斗牛犬生物公司(Bulldog Bio))。然后将非病毒或慢病毒修饰的人T细胞解冻,并在过继转移之前在培养基中静置过夜。对于过继转移的T细胞的流式细胞术分析,通过将组织通过70μm过滤器进行机械解离,产生了来自肿瘤和脾脏的单细胞悬液。

根据批准的IACUC协议(UCSF),按照相关的道德规范进行所有动物实验,包括在任何维度上2.0cm的肿瘤大小限制。

[0180] 具有非病毒TCR置换的T细胞的体内功能性

[0181] 使用人类抗原特异性肿瘤异种移植模型(图7a)评估具有非病毒TCR置换的T细胞的体内功能性。将 1×10^6 个A375细胞(人黑素瘤细胞系;NY-ESO-1抗原+和HLA-A*0201+)皮下接种到8至12周龄的NSG小鼠的剃毛的右肋腹。生成经过编辑以表达NY-ESO-1抗原特异性TCR的原代人T细胞(通过慢病毒转导或非病毒TCR置换),在转导或电穿孔后扩增10天,然后冷冻。使用大量编辑的群(图7b-c)或使用NY-ESO-1TCR+分选的群(图7d-f)。肿瘤接种后7天,将T细胞解冻,并通过眼眶后注射过继转移。如图7B所示,在转移 5×10^6 个大量非病毒靶向的T细胞(约10% TCR+NYESO-1+(红色),约10% TCR+NYESO-1-(橙色)和约80% TCR-NYESO-1-(绿色),参见图7b)后两天,NY-ESO-1+非病毒编辑的T细胞相对于脾脏优先积聚在肿瘤中。对于四个人类T细胞供体中的每一个,n=5只小鼠。在转移 5×10^6 个大量非病毒靶向的CFSE标记的T细胞后10天,NYESO-1TCR+细胞显示出比TCR-或TCR+NYESO-1-T细胞更大的增殖,并显示出在肿瘤中多于在脾脏中的更大的增殖(CFSE低)(图7c)。转移后10天,很难在肿瘤中发现TCR-和TCR+NYESO-1-T细胞(图7d)。图7d显示了图8f中汇总的数据的各个纵向肿瘤体积轨迹。通过慢病毒转导或非病毒TCR置换产生的 3×10^6 个分选的NY-ESO-1TCR+T细胞在肿瘤接种后第7天转移,并与仅载剂注射比较直至肿瘤接种后24天。请注意,与慢病毒递送(上方)和非病毒TCR置换(下方)相比,每个供者的载剂对照数据均显示相同的数据。在这些实验中(图7e-f),在T细胞转移后第17天,非病毒TCR替换的细胞似乎显示出更高的NY-ESO-1TCR表达和更低的耗尽标记物表达。慢病毒转导的和非病毒TCR置换的细胞的转移在第24天均显示出肿瘤负荷的显著减少。在该实验模型中,与慢病毒转导相比,非病毒TCR置换显示出进一步的减少(图8f)。在5只(图7b,7c)或7只小鼠(图7d-f)中,n=4(图7b),n=2(图7d-f)或n=1(图7c)独立健康供者,每个供者的平均数(图7b,7e,7f)和标准差(图7b)。

[0182] 肿瘤抗原特异性功能

[0183] 还评估了靶向的人T细胞的肿瘤抗原特异性功能。当将靶向的T细胞与两种不同的NY-ESO-1+黑色素瘤细胞系M257和M407共培养时,修饰的T细胞牢固地特异性产生IFN- γ 和TNF- α ,并诱导T细胞脱粒(通过CD107a表面表达测量)(图8a)。仅当将NY-ESO-1TCR T细胞暴露于表达呈递相关NY-ESO-1肽所需的适当HLA-A*0201I类MHC等位基因的细胞系时,才会发生细胞因子的产生和脱粒。CD8+和CD4+T细胞的反应在所有健康供者中均一致,并且与来自同一健康供者的T细胞反应相当,在该反应中,NY-ESO-1TCR通过 γ 逆转录病毒转导并使用病毒启动子异源表达(图8a和图9d)。NY-ESO-1TCR敲入T细胞在体外以与阳性对照,逆转录病毒转导的T细胞相似的速率迅速杀伤了靶M257-HLA-A*0201癌细胞(图8b)。杀伤对于表达NY-ESO-1抗原和HLA-A*0201等位基因的靶细胞是选择性的,在供者之间是一致的,并且取决于使用正确的gRNA和HDR模板修饰的T细胞(图9h-k)。

[0184] 最后,证实了非病毒基因组靶向可用于大规模生产NY-ESO-1TCR细胞,并且这些细胞具有体内抗肿瘤功能(图8c和图7a)。鉴于非病毒靶向的敲入效率比同等大小的AAV模板低,因此确保是否足够数量的NY-ESO-1阳性细胞用于过继细胞治疗。来自六个健康供者的1亿个T细胞,经过十天的扩增,每个供者平均产生了3.85亿个NY-ESO-1TCR T细胞(图8d)。与阳性对照慢病毒转导的T细胞相似,NY-ESO-1TCR敲入T细胞优先定位于肿瘤(而不是脾),并

在肿瘤中持久存在(图8e和图7b-f)。分选的NY-ESO-1TCR T细胞的过继转移也减少了治疗动物的肿瘤负担(图8f)。

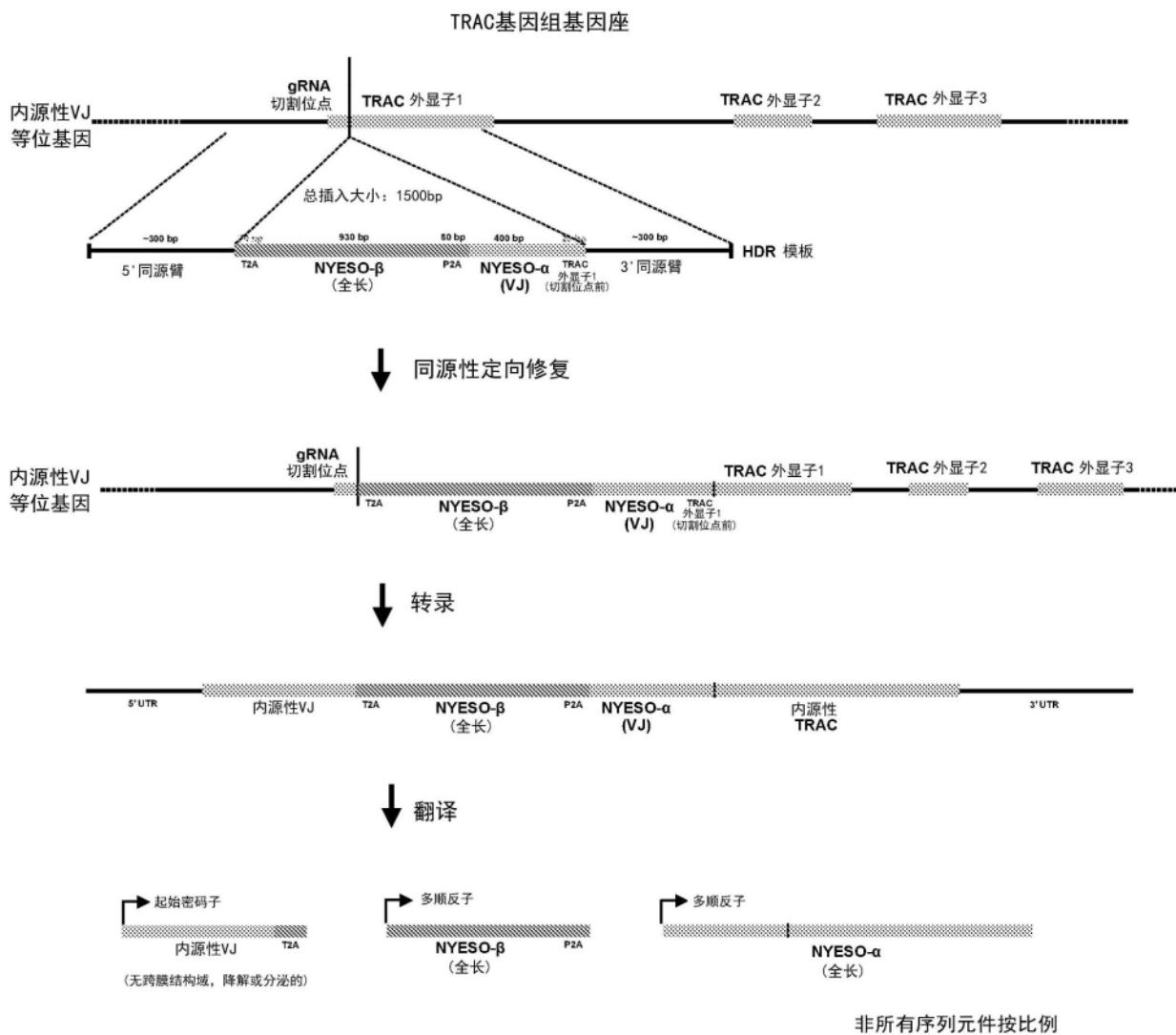


图1a

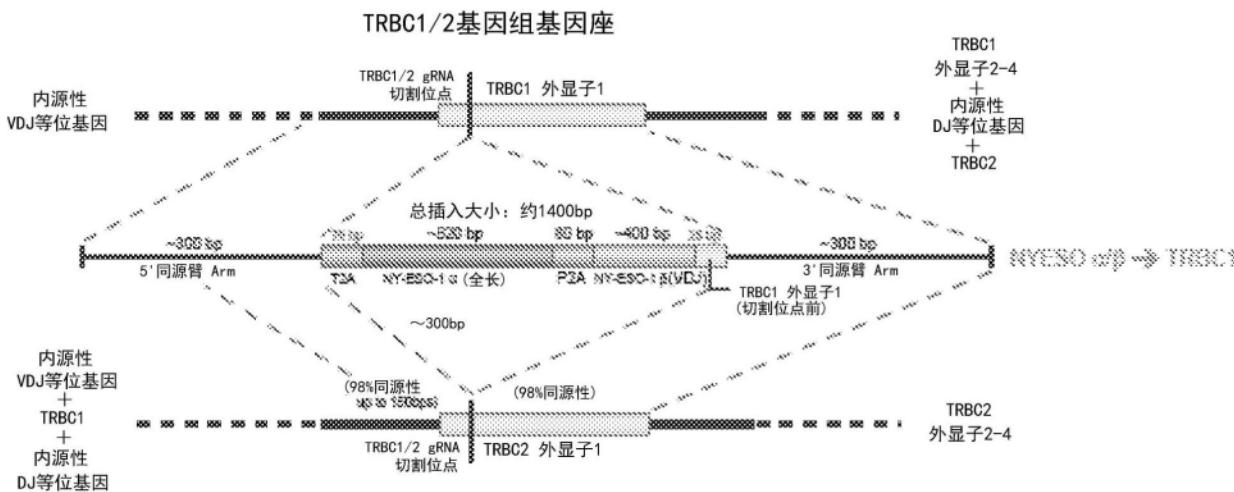
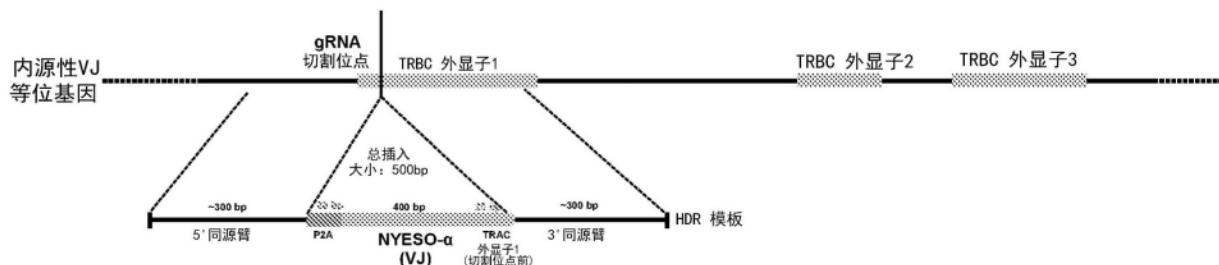
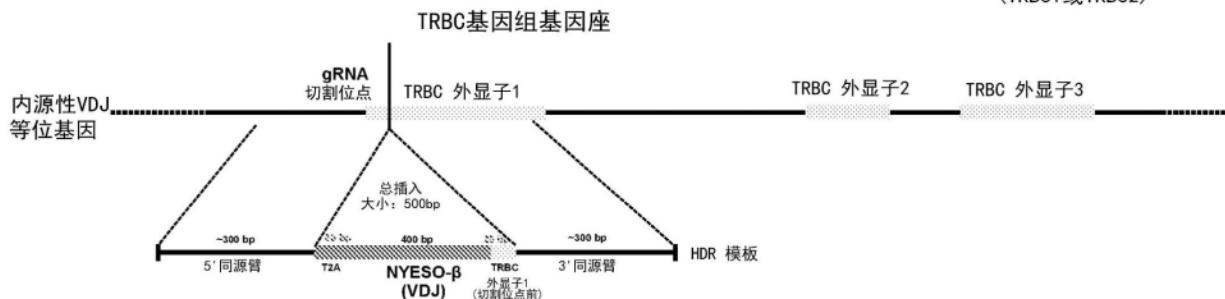


图1b

TRAC基因组基因座



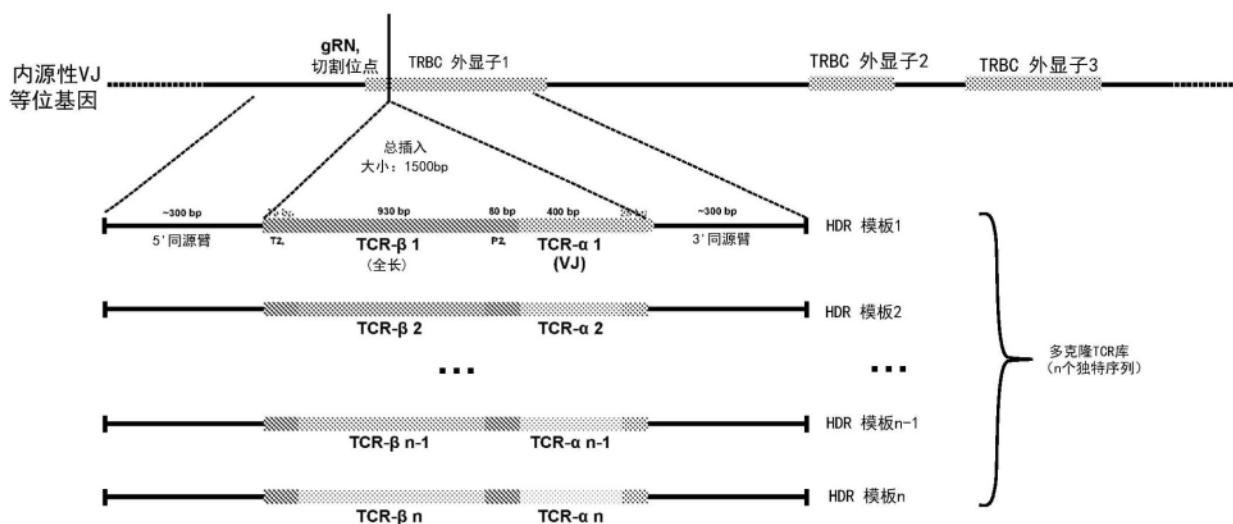
(TRBC1或TRBC2)



非所有序列元件按比例

图2

TR, C基因组基因座



非所有序列元件按比例

图3a

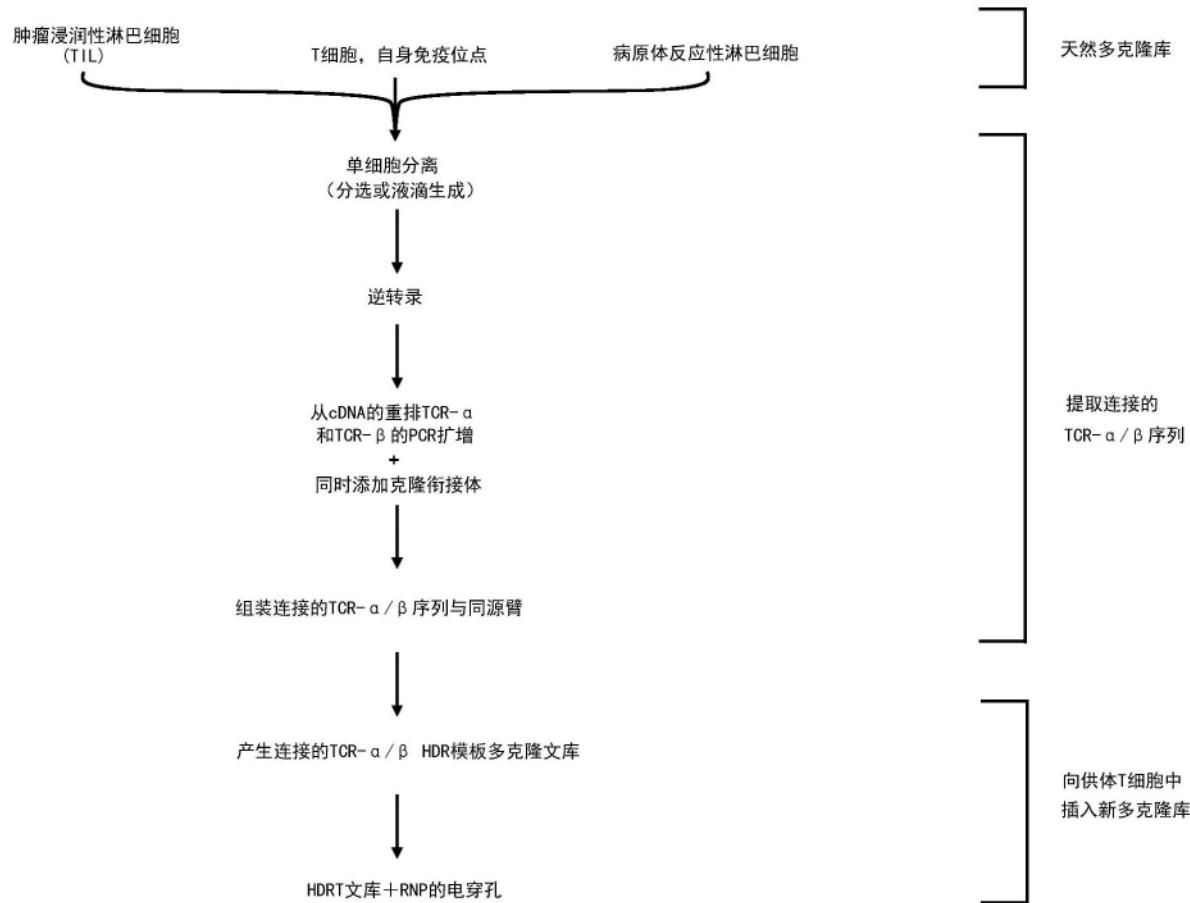


图3b

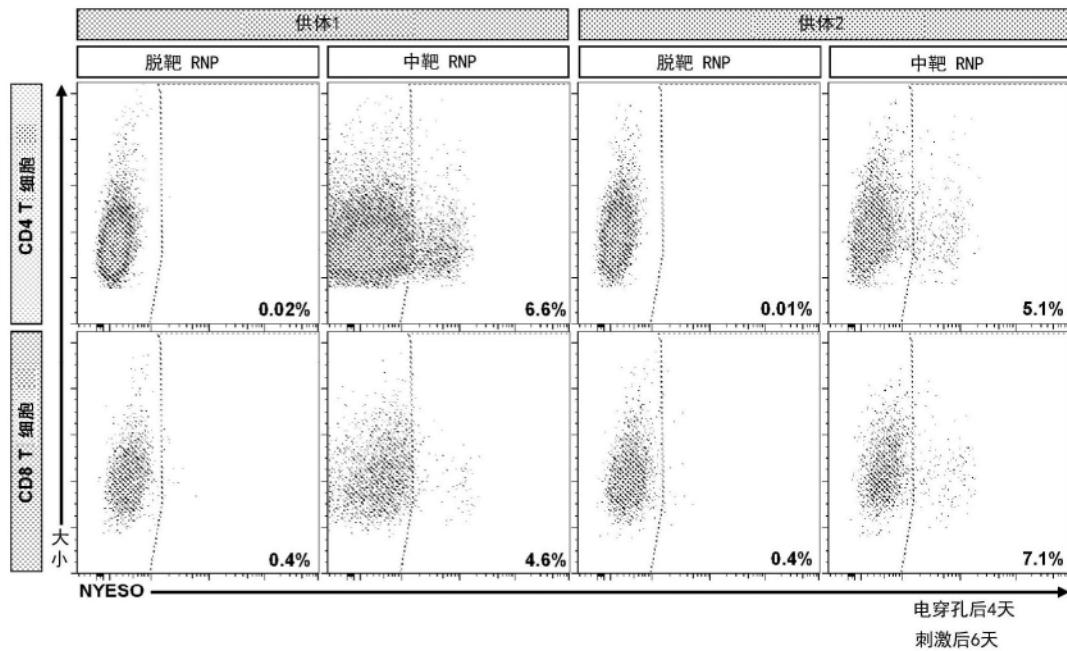


图4a

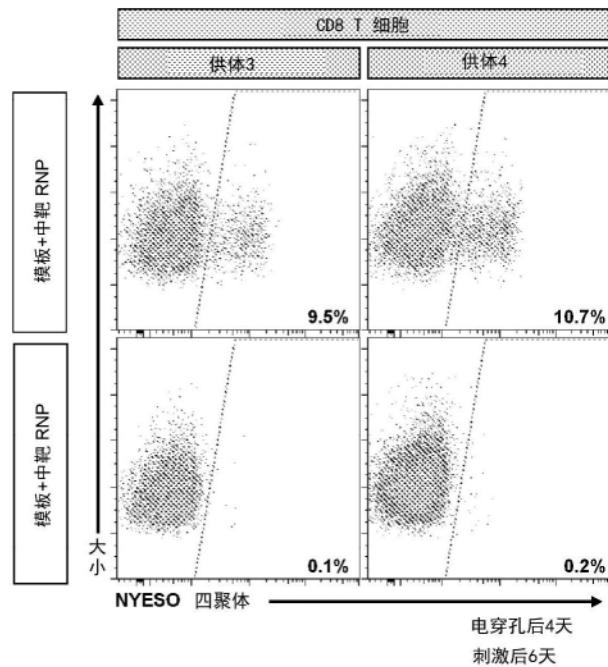


图4b

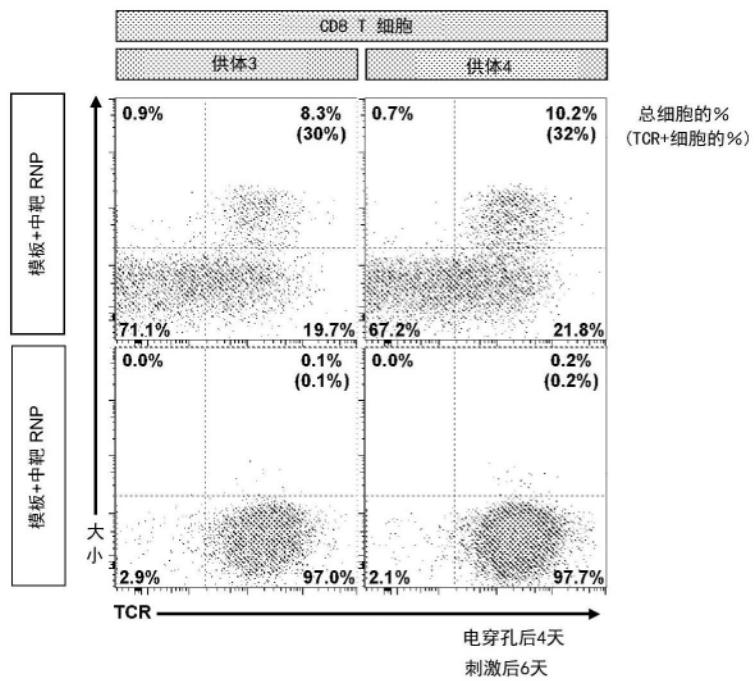


图5

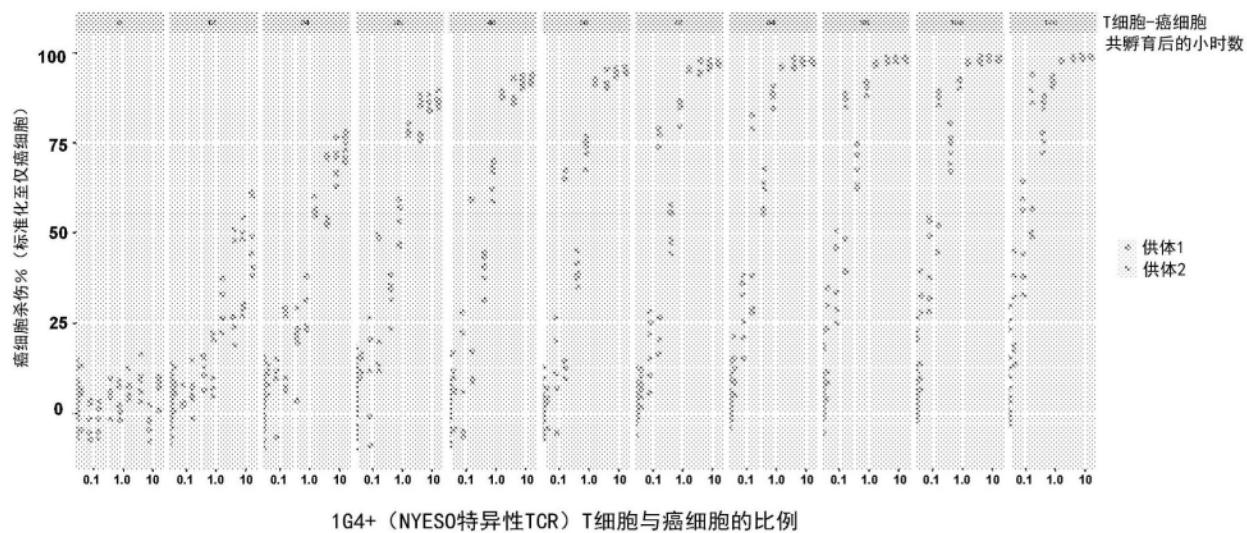


图6a

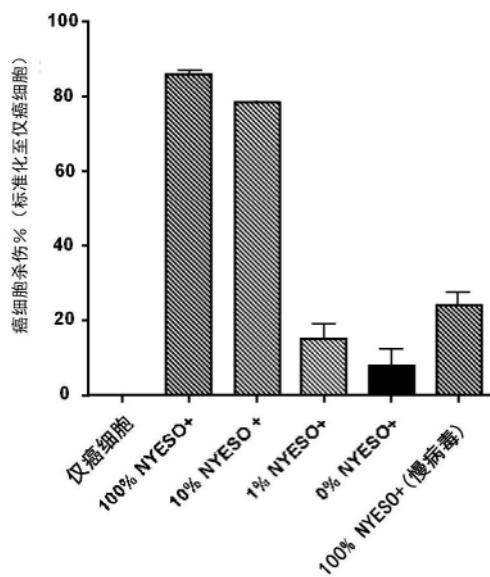


图6b

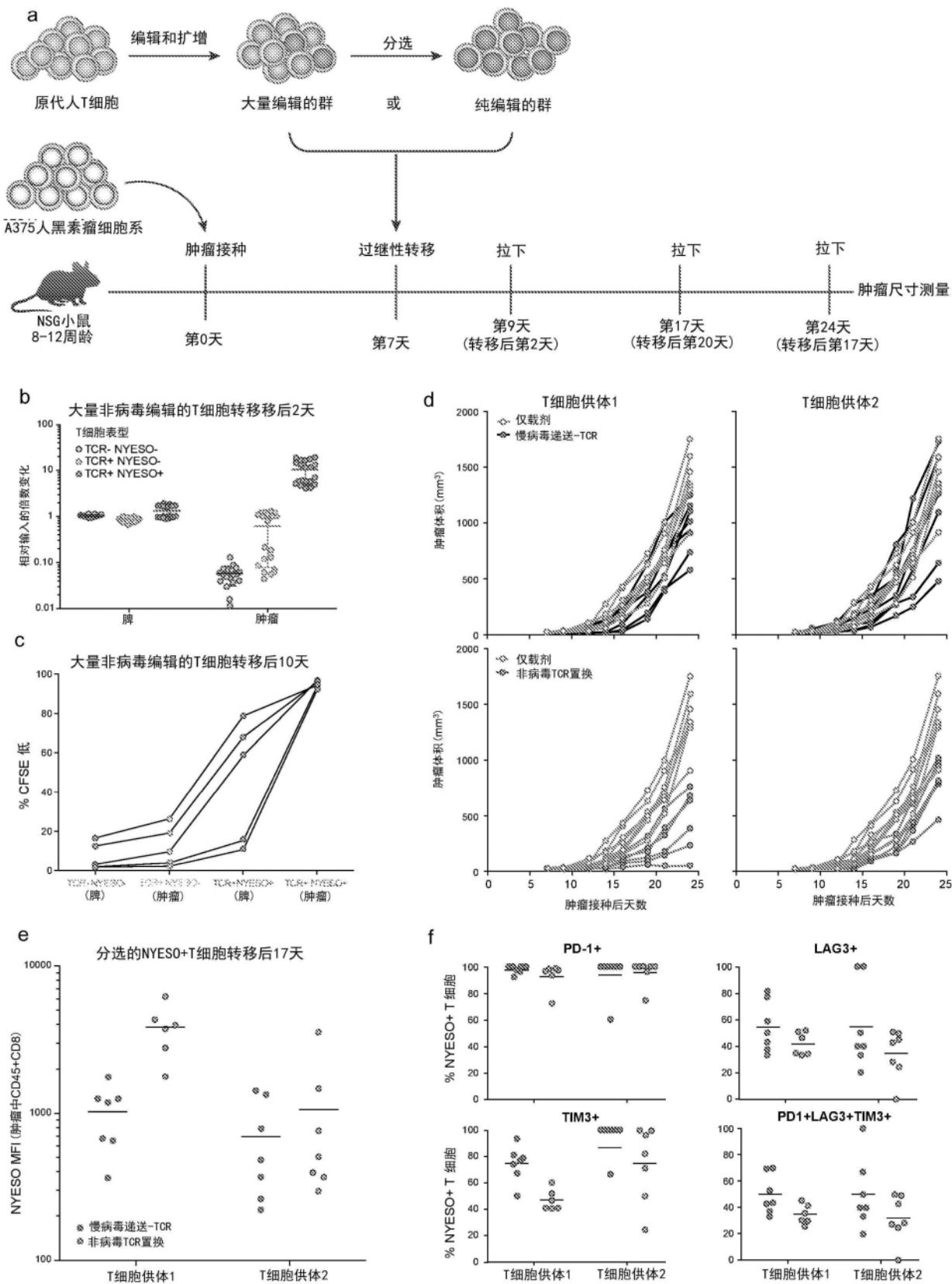


图7

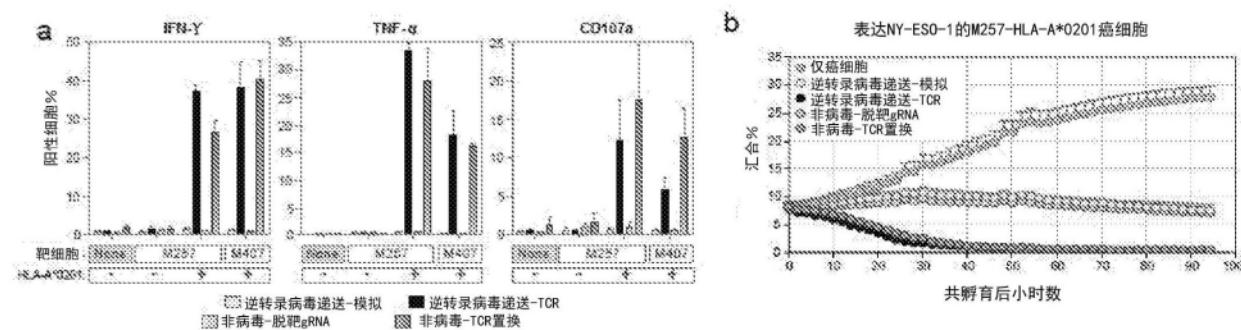


图8a-8b

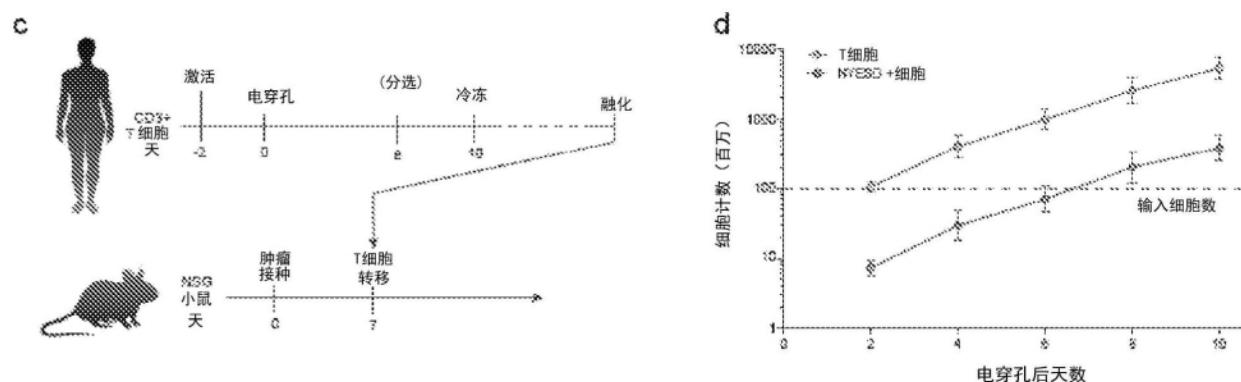


图8c-8d

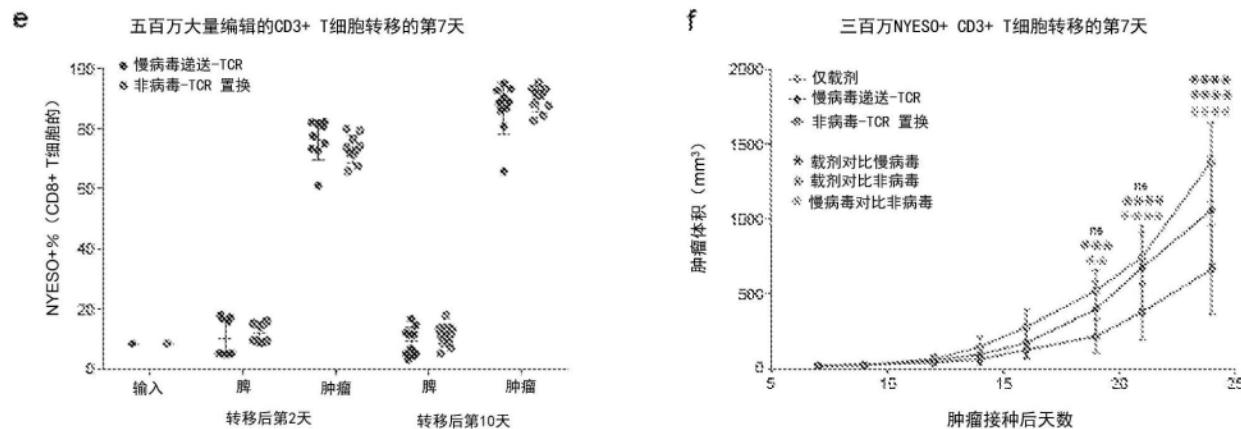


图8e-8f

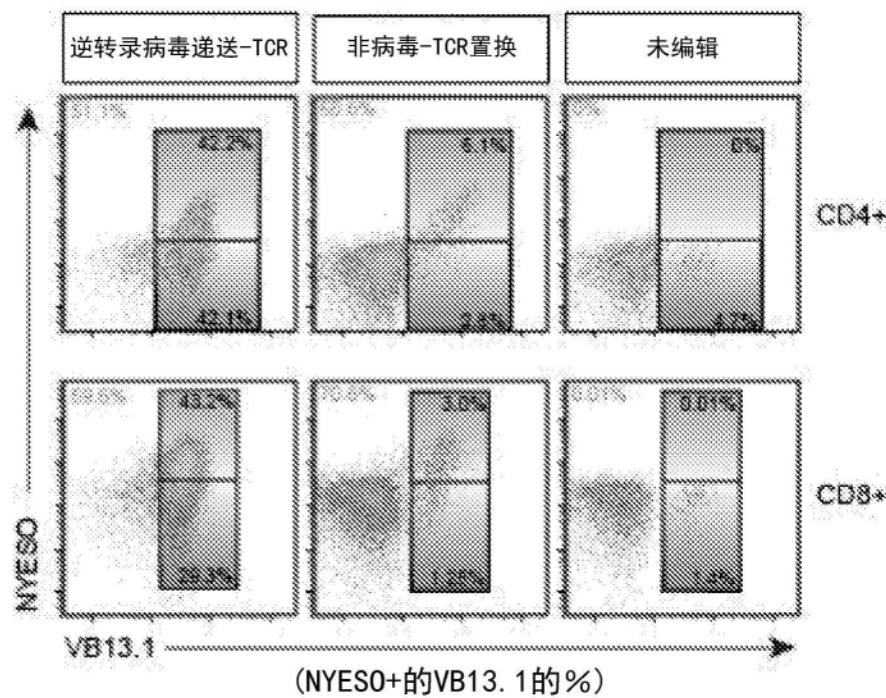
a

图9a

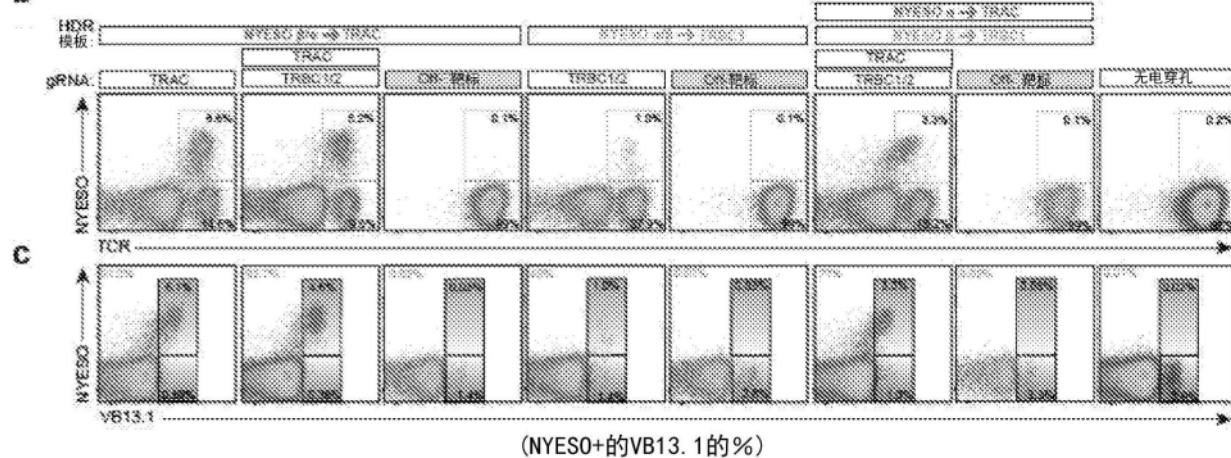
b

图9b-c

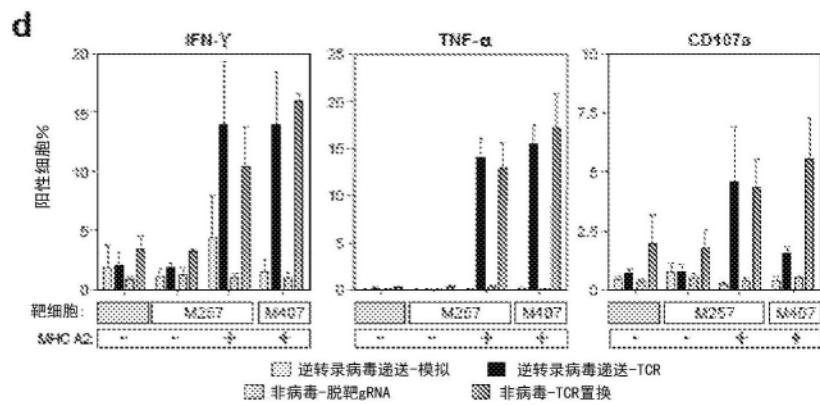


图9d

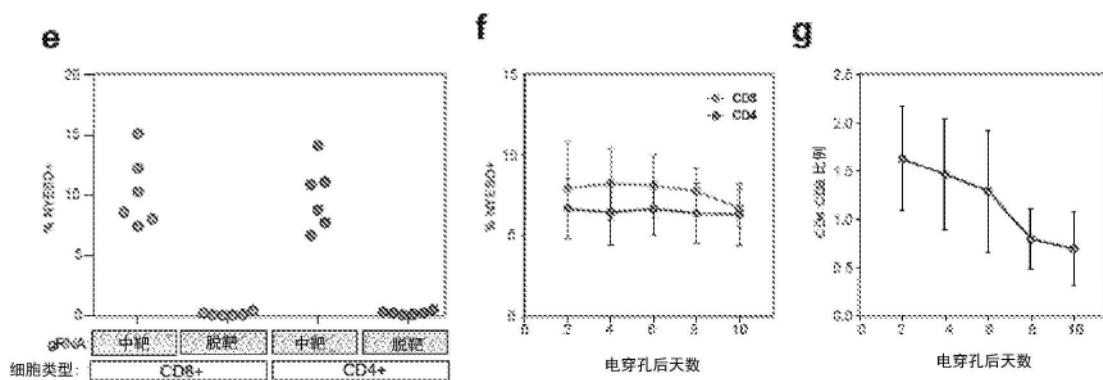


图9e-g

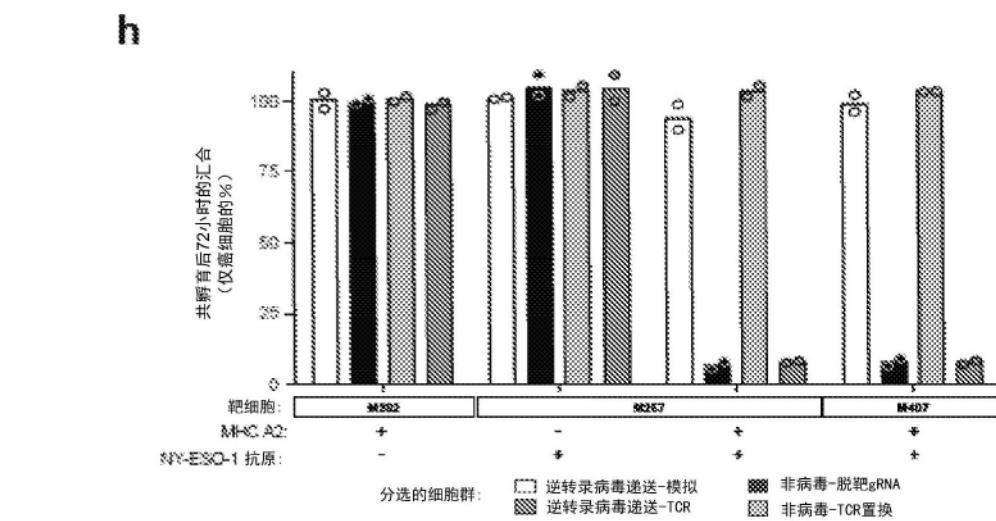


图9h

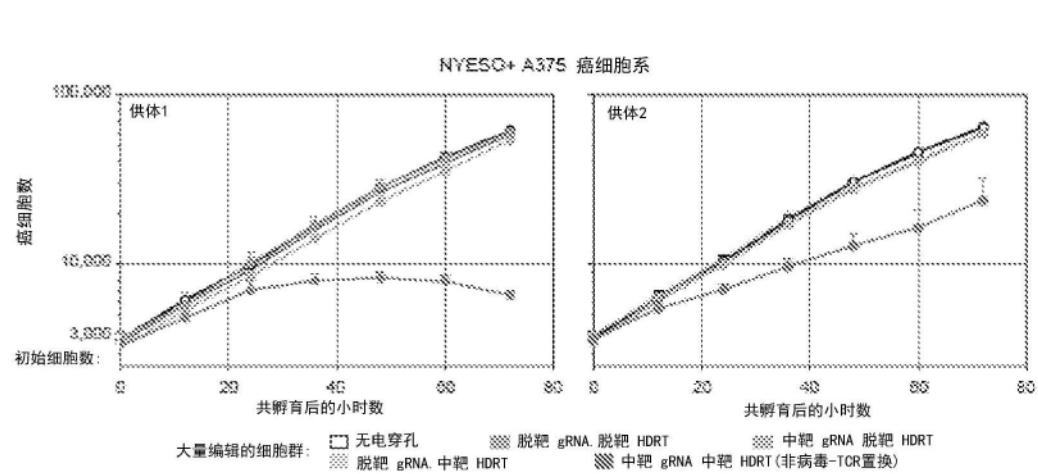


图9i

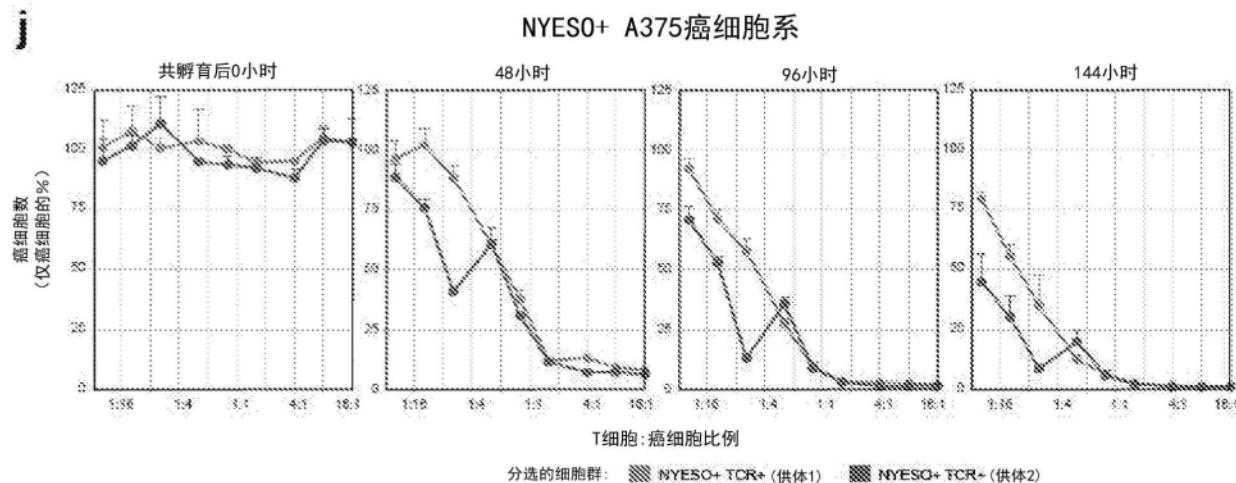


图9j

k

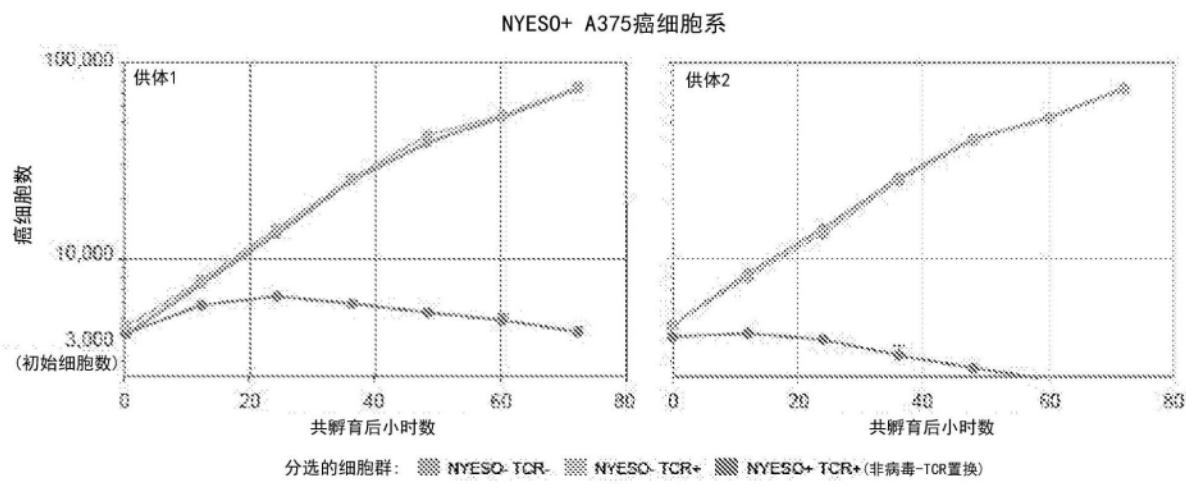


图9k