



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116897201 A

(43) 申请公布日 2023. 10. 17

(21) 申请号 202280016734.1

(22) 申请日 2022.02.23

(30) 优先权数据

63/152,787 2021.02.23 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.08.23

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/017526 2022.02.23

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2022/182763 EN 2022.09.01

(71) 申请人 KSQ治疗公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 约翰·赵

凯雷姆·乔纳坦·通塞尔

(74) 专利代理机构 上海胜康律师事务所 31263

专利代理师 樊英如 张静

(51) Int.Cl.

C12N 5/0783 (2010.01)

权利要求书5页 说明书48页

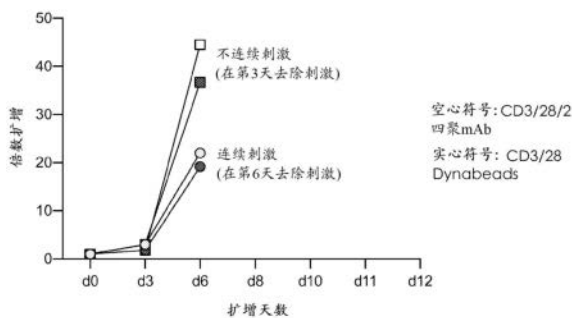
序列表6页 附图8页

(54) 发明名称

用于扩增调节性T细胞的方法

(57) 摘要

本文提供了用于扩增调节性T细胞(Treg)同时保持其稳定性和活性的离体方法,所述Treg包括工程化Treg。除了改善Treg的生长和扩增之外,可以包括使用调节性T细胞的不连续刺激(DSORT™)的方法还产生具有增加的稳定性和活性的Treg。



1. 一种用于扩增调节性T细胞(Treg)群体的方法,所述方法包括:
 - (a) 第一刺激步骤,包括在存在第一刺激剂的情况下培养Treg群体以产生第一刺激的Treg群体;以及
 - (b) 第一静息步骤,包括在不存在刺激剂的情况下继续培养所述第一刺激的Treg群体以产生第一静息的Treg群体。
2. 如权利要求1所述的方法,还包括:
 - (c) 第二刺激步骤,包括在存在第二刺激剂的情况下培养所述第一静息的Treg群体以产生第二刺激的Treg群体。
3. 如权利要求2所述的方法,还包括
 - (d) 第二静息步骤,包括在不存在刺激剂的情况下继续培养所述第二刺激的Treg群体以产生第二静息的Treg群体;任选地还包括
 - (e) 第三刺激步骤,包括在存在第三刺激剂的情况下培养所述第二静息的Treg群体以产生第三刺激的Treg群体;任选地还包括
 - (f) 第三静息步骤,包括在不存在刺激剂的情况下继续培养所述第三刺激的Treg群体以产生第三静息的Treg群体。
4. 如权利要求3所述的方法,还包括一个或多个附加刺激步骤以产生另外的刺激的Treg群体和/或一个或多个附加静息步骤以产生另外的静息的Treg群体。
5. 如权利要求1-4中任一项所述的方法,其中如权利要求1所述的方法还包括对所述第一静息的Treg群体进行基因工程化,其中如权利要求2所述的方法还包括对所述第二刺激的Treg群体进行基因工程化;其中如权利要求3所述的方法还包括对所述第二静息的Treg群体、所述第三刺激的Treg群体或所述第三静息的Treg群体进行基因工程化;或者其中如权利要求4所述的方法还包括对所述另外的刺激的Treg群体或所述另外的静息的Treg群体进行基因工程化。
6. 如权利要求1-5中任一项所述的方法,其中如权利要求1所述的方法还包括收获所述第一静息的Treg群体;其中如权利要求2所述的方法还包括收获所述第二刺激的Treg群体;其中如权利要求3所述的方法还收获所述第二静息的Treg群体、所述第三刺激的Treg群体或所述第三静息的Treg群体;其中如权利要求4所述的方法还包括收获所述另外的刺激的Treg群体或所述另外的静息的Treg群体;或者其中如权利要求5所述的方法还包括收获所述基因工程化的Treg群体。
7. 一种用于扩增调节性T细胞(Treg)群体的方法,所述方法包括:
 - (a) 刺激步骤,包括在包含刺激剂的培养基中培养Treg群体以产生第一刺激的Treg群体;以及
 - (b) 洗涤所述刺激的Treg群体以除去包含所述刺激剂的所述培养基,从而产生洗涤的Treg群体;以及
 - (c) 在新鲜培养基中培养所述洗涤的Treg群体以产生第一静息的Treg群体。
8. 如权利要求7所述的方法,其中所述新鲜培养基不包含任何刺激剂。
9. 如权利要求7或8所述的方法,还包括对所述第一静息的Treg群体进行基因工程化和/或在包含刺激剂的培养基中培养所述第一静息的Treg群体以产生第二刺激的Treg群体。

10. 一种用于扩增调节性T细胞(Treg)群体的方法,所述方法包括:

(a) 静息步骤,包括在不存在刺激剂的情况下培养先前刺激的Treg群体以产生第一静息的Treg群体;以及

(b) 刺激步骤,包括向所述第一静息的Treg群体中添加刺激剂以产生刺激的Treg群体。

11. 如权利要求7-10中任一项所述的方法,还包括对所述Treg进行基因工程化,任选地对所述第一静息的Treg群体进行基因工程化。

12. 如权利要求5或11所述的方法,其中所述方法还包括培养所述工程化的Treg群体。

13. 如权利要求12所述的方法,其中所述工程化的Treg群体的所述培养在存在刺激剂的情况下发生,任选地其中所述方法还包括在不存在所述刺激剂的情况下继续培养所述工程化的Treg群体。

14. 如权利要求12所述的方法,其中所述工程化的Treg群体的所述培养在不存在所述刺激剂的情况下发生,任选地其中所述方法还包括在存在刺激剂的情况下继续培养所述工程化的Treg群体。

15. 一种用于扩增调节性T细胞(Treg)群体的方法,所述方法包括:

(a) 对Treg群体进行基因工程化以产生工程化的Treg群体;

(b) 刺激步骤,包括在存在刺激剂的情况下培养所述工程化的Treg群体以产生刺激的工程化的Treg群体;以及

(c) 静息步骤,包括在不存在刺激剂的情况下继续培养所述刺激的工程化的Treg群体以产生静息的工程化的Treg群体。

16. 一种用于扩增调节性T细胞(Treg)群体的方法,所述方法包括:

(a) 对Treg群体进行基因工程化以产生工程化的Treg群体;

(b) 静息步骤,包括在不存在刺激剂的情况下培养所述工程化的Treg群体以产生静息的工程化的Treg群体;以及

(c) 刺激步骤,包括在存在刺激剂的情况下培养所述静息的工程化的Treg群体以产生刺激的工程化的Treg群体。

17. 如权利要求15或16所述的方法,其中在被基因工程化之前,使所述Treg群体经受刺激步骤,包括在存在刺激剂的情况下培养所述群体;或者其中在被基因工程化之前,使所述Treg群体经受刺激步骤,包括在存在刺激剂的情况下培养所述群体,然后经受静息步骤,包括在不存在刺激剂的情况下培养所述群体;或者其中在被基因工程化之前,使所述Treg群体经受刺激步骤,包括在存在刺激剂的情况下培养所述群体,然后经受静息步骤,包括在不存在刺激剂的情况下培养所述群体,然后经受另一刺激步骤,包括在存在刺激剂的情况下培养所述群体。

18. 如权利要求11-17中任一项所述的方法,其中所述基因工程化在不存在刺激剂的情况下发生。

19. 如权利要求7-18中任一项所述的方法,其中所述方法还包括收获所述Treg群体。

20. 如权利要求1-19中任一项所述的方法,还包括从受试者获得所述Treg群体。

21. 如权利要求1-19中任一项所述的方法,还包括从受试者的胸腺、外周血、脐带血或组织样品获得所述Treg群体;或者还包括在步骤(a)的所述培养之前从来自受试者的外周血获得所述Treg群体。

22. 如权利要求1-21中任一项所述的方法,其中从来自受试者的胸腺、外周血、脐带血或组织样品获得所述Treg群体;或者其中从来自所述受试者的外周血获得所述Treg群体。

23. 如权利要求20-22中任一项所述的方法,其中所述受试者是人。

24. 如权利要求1-23中任一项所述的方法,其中四聚抗体复合物是所述刺激步骤中的至少一个和/或所述工程化的群体的所述培养中的所述刺激剂;任选地其中所述四聚抗体复合物与CD3、CD28、CD2或它们的组合特异性结合。

25. 如权利要求1-24中任一项所述的方法,其中抗CD3抗体或其抗原结合片段和/或抗CD28抗体或其抗原结合片段是所述刺激步骤中的至少一个和/或所述工程化的群体的所述培养中的所述刺激剂。

26. 如权利要求1-25中任一项所述的方法,其中CD3结合和/或CD28结合超磁珠是所述刺激步骤中的至少一个和/或所述工程化的群体的所述培养中的所述刺激剂。

27. 如权利要求1-25中任一项所述的方法,其中所述方法不使用超磁珠。

28. 如权利要求1-27中任一项所述的方法,其中在整个所述方法中使用相同的刺激剂,或者其中在所述方法中使用至少两种不同的刺激剂;并且/或者其中所述刺激剂在所述方法的所有所述刺激步骤中以相同浓度存在,或者其中在所述方法中使用至少两种不同浓度的刺激剂。

29. 如权利要求1-28中任一项所述的方法,其中在存在IL-2的情况下培养所述Treg,任选地其中在所述方法期间降低IL-2浓度,或者任选地其中IL-2以约800单位/mL的浓度存在约7天,然后以约300单位/mL存在。

30. 如权利要求1-29中任一项所述的方法,其中在存在刺激剂的情况下培养所述Treg群体约1至约5天,然后在不存在刺激剂的情况下培养约1至约5天,然后在存在刺激剂的情况下培养约1至约5天,然后进行基因工程化;并且/或者其中在存在刺激剂的情况下培养所述Treg群体约3至约4天,然后在不存在刺激剂的情况下培养约3至约4天,然后在存在刺激剂的情况下培养约1至约4天,然后进行基因工程化。

31. 如权利要求1-30中任一项所述的方法,其中根据表A在存在和/或不存在刺激剂的情况下培养所述Treg群体。

32. 如权利要求1-31中任一项所述的方法,其中在存在N-乙酰基-L-半胱氨酸的情况下培养所述Treg,任选地,其中所述N-乙酰基-L-半胱氨酸以约5mM的浓度存在于所述培养物中。

33. 如权利要求1-32中任一项所述的方法,其中当所述Treg群体已扩增到约250倍时,对所述Treg群体进行基因工程化。

34. 如权利要求1-33中任一项所述的方法,其中在从受试者获得Treg后约6至约10天对所述Treg群体进行基因工程化,任选地其中在从受试者获得Treg后约7天对所述Treg群体进行基因工程化。

35. 如权利要求5、6和11-34中任一项所述的方法,其中所述基因工程化包括将核酸引入所述Treg群体中;

任选地,其中所述核酸是病毒核酸或者其中所述核酸不是病毒核酸;并且/或者

任选地,其中所述核酸编码蛋白质,任选地其中所述蛋白质是异源蛋白质,进一步任选地其中所述异源蛋白质是嵌合抗原受体(CAR)。

36. 如权利要求5、6和11-35中任一项所述的方法,其中所述基因工程化包括将基因调控系统引入所述Treg群体中。

37. 如权利要求36所述的方法,其中所述基因调控系统包含(i)核酸分子;(ii)酶蛋白;或者(iii)核酸分子和酶蛋白;或者

其中所述基因调控系统包含选自siRNA、shRNA、微小RNA(miR)、antagomiR或反义RNA的核酸分子;或者

其中所述基因调控系统包含酶蛋白,并且其中所述酶蛋白已被工程化以与所述Treg中的一个或多个基因中的靶序列特异性结合,任选地,其中所述酶蛋白是转录激活物样效应物核酸酶(TALEN)、锌指核酸酶或大范围核酸酶;或者

其中所述基因调控系统包含核酸分子和酶蛋白,其中所述核酸分子是指导RNA(gRNA)分子,并且所述酶蛋白是Cas蛋白或Cas直向同源物,任选地其中所述Cas蛋白是Cas9蛋白。

38. 如权利要求35-37中任一项所述的方法,其中所述引入使用电穿孔或核糖核蛋白(RNP)介导的方法。

39. 如权利要求1-38中任一项所述的方法,其中所述方法不使用人工抗原呈递细胞。

40. 如权利要求1-39中任一项所述的方法,其中所述方法不使用雷帕霉素或者其中所述方法包括使用雷帕霉素。

41. 如权利要求1-40中任一项所述的方法,其中所述方法使Treg的数量在11天内增加到至少1000倍。

42. 如权利要求1-41中任一项所述的方法,其中所述方法产生比在存在刺激剂的情况下培养6天的Treg具有更小表面积的Treg;并且/或者其中与在存在刺激剂的情况下培养6天的Treg相比,所述方法产生增加比例的Helios+Foxp3+Treg;并且/或者其中与在存在刺激剂的情况下培养6天的Treg相比,所述方法产生具有增加的抑制效应T细胞(Teff)增殖的能力的Treg;并且/或者其中所述方法防止所述Treg群体的过度刺激;并且/或者其中与在存在刺激剂的情况下培养6天的Treg相比,所述方法减少活化诱导的细胞死亡。

43. 如权利要求42所述的方法,其中所述增加的抑制Teff增殖的能力是至少8倍增加的能力。

44. 如权利要求1-43中任一项所述的方法,其中所述Treg中至少75%的Helios表达被维持。

45. 如权利要求1-44中任一项所述的方法,其中所述Treg是Helios+。

46. 如权利要求1-45中任一项所述的方法,其中所述Treg具有完全去甲基化的Treg特异性去甲基化区域(TSDR)。

47. 如权利要求1-46中任一项所述的方法,还包括冷冻保存所述Treg群体。

48. 一种通过如权利要求1-47中任一项所述的方法产生的Treg群体。

49. 一种通过如权利要求1-47中任一项所述的方法产生的冷冻保存的Treg群体。

50. 如权利要求1-47中任一项所述的方法,还包括向受试者施用所述Treg群体。

51. 一种治疗受试者的自身免疫性或炎性疾病的方法,包括向所述受试者施用有效量的使用如权利要求1-47中任一项所述的方法获得的Treg群体或如权利要求48所述的Treg。

52. 一种治疗或预防受试者的移植物抗宿主病(GVHD)的方法,包括向所述受试者施用有效量的使用如权利要求1-47中任一项所述的方法获得的Treg群体或如权利要求48所述

的Treg。

53. 一种降低受试者的免疫应答的方法,包括向所述受试者施用有效量的使用如权利要求1-47中任一项所述的方法获得的Treg群体或如权利要求48所述的Treg。

54. 如权利要求50-53中任一项所述的方法,其中所述Treg群体对所述受试者是同种异体的;或者其中所述Treg群体对所述受试者是自体的。

用于扩增调节性T细胞的方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2021年2月23日提交的美国临时申请号63/152,787的优先权权益,该美国临时申请以引入方式整体并入本文。

[0003] 以电子方式提交的序列表的引用

[0004] 2022年2月23日提交的序列表作为名称为“4195_022PC01_Seqlisting_ST25”的文本文件创建于2022年2月22日,并且大小为11,366字节,据此以引入方式并入。

[0005] 发明背景

技术领域

[0006] 本文提供了用于扩增调节性T细胞(Treg)(包括工程化Treg)同时保持其稳定性和活性的离体方法。

背景技术

[0007] 调节性T细胞(Treg)对于预防自身免疫至关重要。Treg是CD4⁺T细胞,可抑制炎症和效应T细胞(Teff)的活性以维持体内平衡。在患有自身免疫性疾病的患者中经常观察到Treg的数量和/或功能的缺陷。已经认识到Treg的潜在治疗用途,并且已经在用于治疗各种自身免疫性疾病和移植物抗宿主病(GvHD)的临床试验中对Treg进行了评估。

[0008] 尽管过去已经进行了使用新鲜分离的Treg的临床研究,但广泛使用Treg过继细胞疗法(ACT)需要离体扩增Treg以产生足够数量的细胞。离体扩增需要以不损害Treg的纯度、稳定性和固有抑制功能的方式进行。

[0009] 不能有效扩增稳定且活跃的Treg群体已经带来了重大挑战。Treg的临床生产通常使用封闭的经GMP认证的磁性富集系统诸如CliniMACS来分离表达CD25的细胞,这会导致活化的效应T细胞(Teff)的显著污染。通过向培养物中添加雷帕霉素(一种mTOR蛋白激酶抑制剂)可以至少部分地阻止此类细胞的生长。虽然Treg对mTOR抑制相对具有抵抗力,但研究已发现雷帕霉素在35天内使Treg的扩增减少约35%。此外,雷帕霉素影响Treg的表型,例如通过改变组织归巢受体诸如CCR4和CXCR3的表达以及它们的功能(例如,CTLA-4、LAP)和谱系(Helios和Foxp3),这可能模糊或改变基因编辑的效果。

[0010] 雷帕霉素不是唯一用于提高Treg的纯度或诱导其体外生长的化合物。在临床前研究中已经显示TGF- β 与全反式视黄酸(ATRA)(一种维生素A衍生物)一起可支持Treg的离体生长,尽管对Treg表型具有显著影响,诸如肠归巢受体如CCR9和整联蛋白- α 4 β 7以及CD161的上调。

[0011] 使用雷帕霉素和ATRA的替代方法是从收获自胸腺、外周血或脐带血的更同质的原始CD45RA⁺原始Treg群体开始。此类分离的产物含有较少的效应T细胞,因此在不存在雷帕霉素的情况下更适于长期Treg扩增。已经显示离体扩增的原始Treg维持原始表型并表达淋巴结(LN)归巢标记物诸如CD62L和CCR7,已经显示这些标记物在临床前模型中对于预防自身免疫性疾病是必需的。然而,对于Treg纯度和稳定性而言,时间是最重要的因素之一。

Treg在体外活化时变得具有抑制性并在培养的前1-2周内维持高水平的抑制能力,在此期间Treg有效地阻止污染性T效应细胞的生长。然而,随着时间的推移,Treg控制其他T细胞生长的能力减弱,导致非Treg快速积累且纯Treg群体丧失。

[0012] 因此,目前可用的用于离体扩增Treg的方案导致生长和/或稳定性较差。因此,存在对扩增Treg以产生纯的、稳定的且高度功能性的Treg群体的有效方法的需要。

发明内容

[0013] 本文提供了扩增调节性T细胞(Treg)的方法,所述方法使Treg的生长在培养的前1-2周内最大化并利用活化后早期Treg的增强的抑制活性。如本文所证明,调节性T细胞的不连续刺激(DSORT™)可以通过使用刺激和静息的交替周期来实现快速Treg扩增。示例性DSORT™过程在图8中描绘。尽管扩增速率超过1000倍,但是此类方法可以产生纯的、稳定的且高度功能性的Treg产物。有利地,这些方法不要求在培养的前1-2周期间使用雷帕霉素来减缓细胞的生长。

[0014] 本文提供了一种用于扩增调节性T细胞(Treg)群体的方法,所述方法包括:(a) 第一刺激步骤,包括在存在第一刺激剂的情况下培养Treg群体以产生第一刺激的Treg群体;以及(b) 第一静息步骤,包括在不存在刺激剂的情况下继续培养第一刺激的Treg群体以产生第一静息的Treg群体。在一些方面,所述方法还包括(c) 第二刺激步骤,包括在存在第二刺激剂的情况下培养第一静息的Treg群体以产生第二刺激的Treg群体。在一些方面,所述方法还包括(d) 第二静息步骤,包括在不存在刺激剂的情况下继续培养第二刺激的Treg群体以产生第二静息的Treg群体。在一些方面,所述方法还包括(e) 第三刺激步骤,包括在存在第三刺激剂的情况下培养第二静息的Treg群体以产生第三刺激的Treg群体。在一些方面,所述方法还包括(f) 第三静息步骤,包括在不存在刺激剂的情况下继续培养第三刺激的Treg群体以产生第三静息的Treg群体。在一些方面,所述方法还包括一个或多个附加刺激步骤以产生另外的刺激的Treg群体和/或一个或多个附加静息步骤以产生另外的静息的Treg群体。

[0015] 在一些方面,所述方法还包括基因工程化第一静息的Treg群体、第二刺激的Treg群体、第二静息的Treg群体、第三刺激的Treg群体、第三静息的Treg群体、另外的刺激的Treg群体或另外的静息的Treg群体。

[0016] 在一些方面,所述方法还包括收获第一静息的Treg群体、第二刺激的Treg群体、第二静息的Treg群体、第三刺激的Treg群体、第三静息的Treg群体、另外的刺激的Treg群体、另外的静息的Treg群体或基因工程化的Treg群体。

[0017] 本文提供了一种用于扩增调节性T细胞(Treg)群体的方法,所述方法包括:(a) 刺激步骤,包括在包含刺激剂的培养基中培养Treg群体以产生第一刺激的Treg群体;以及(b) 洗涤刺激的Treg群体以除去包含刺激剂的培养基,从而产生洗涤的Treg群体;以及(c) 在新鲜培养基中培养洗涤的Treg群体以产生第一静息的Treg群体。在一些方面,新鲜培养基不包含任何刺激剂。在一些方面,所述方法还包括基因工程化第一静息的Treg群体。在一些方面,所述方法还包括在包含刺激剂的培养基中培养第一静息的Treg群体以产生第二刺激的Treg群体。

[0018] 本文提供了一种用于扩增调节性T细胞(Treg)群体的方法,所述方法包括:(a) 静

息步骤,包括在不存在刺激剂的情况下培养先前刺激的Treg群体以产生第一静息的Treg群体;以及(b)刺激步骤,包括向第一静息的Treg群体中添加刺激剂以产生刺激的Treg群体。

[0019] 在一些方面,所述方法还包括对Treg进行基因工程化。在一些方面,所述方法还包括基因工程化第一静息的Treg群体。

[0020] 在一些方面,所述方法还包括培养工程化的Treg群体。

[0021] 在一些方面,工程化的Treg群体的培养在存在刺激剂的情况下发生。在一些方面,所述方法还包括在不存在刺激剂的情况下继续培养工程化的Treg群体。

[0022] 在一些方面,工程化的Treg群体的培养在不存在刺激剂的情况下发生。在一些方面,所述方法还包括在存在刺激剂的情况下继续培养工程化的Treg群体。

[0023] 本文提供了一种用于扩增调节性T细胞(Treg)群体的方法,所述方法包括:(a)对Treg群体基因进行工程化以产生工程化的Treg群体;(b)刺激步骤,包括在存在刺激剂的情况下培养所述工程化的Treg群体以产生刺激的工程化的Treg群体;以及(c)静息步骤,包括在不存在刺激剂的情况下继续培养刺激的工程化的Treg群体以产生静息的工程化的Treg群体。

[0024] 本文提供了一种用于扩增调节性T细胞(Treg)群体的方法,所述方法包括:(a)对Treg群体进行基因工程化以产生工程化的Treg群体;(b)静息步骤,包括在不存在刺激剂的情况下培养所述工程化的Treg群体以产生静息的工程化的Treg群体;以及(c)刺激步骤,包括在存在刺激剂的情况下培养静息的工程化的Treg群体以产生刺激的工程化的Treg群体。

[0025] 在一些方面,在被基因工程化之前,使Treg群体经受刺激步骤,包括在存在刺激剂的情况下培养群体。

[0026] 在一些方面,在被基因工程化之前,使Treg群体经受刺激步骤,包括在存在刺激剂的情况下培养群体,然后经受静息步骤,包括在不存在刺激剂的情况下培养群体。

[0027] 在一些方面,在被基因工程化之前,使Treg群体经受刺激步骤,包括在存在刺激剂的情况下培养群体,然后经受静息步骤,包括在不存在刺激剂的情况下培养群体,然后经受另一刺激步骤,包括在存在刺激剂的情况下培养群体。

[0028] 在一些方面,基因工程化在不存在刺激剂的情况下发生。

[0029] 在一些方面,所述方法还包括收获Treg群体。

[0030] 在一些方面,所述方法还包括从受试者获得Treg群体。

[0031] 在一些方面,所述方法还包括从受试者的胸腺、外周血、脐带血或组织样品获得Treg群体。

[0032] 在一些方面,所述方法还包括在步骤(a)的培养之前从来自受试者的外周血获得Treg群体。

[0033] 在一些方面,从来自受试者的胸腺、外周血、脐带血或组织样品获得Treg群体。在一些方面,从来自受试者的外周血获得Treg群体。

[0034] 在一些方面,受试者是人。

[0035] 在一些方面,四聚抗体复合物是所述刺激步骤中的至少一个和/或工程化的群体的培养中的刺激剂。在一些方面,四聚抗体复合物特异性结合CD3、CD28、CD2或它们的组合。

[0036] 在一些方面,抗CD3抗体或其抗原结合片段和/或抗CD28抗体或其抗原结合片段是刺激步骤中的至少一个和/或工程化的群体的培养中的刺激剂。

[0037] 在一些方面,CD3结合和/或CD28结合超磁珠是刺激步骤中的至少一个和/或工程化的群体的培养中的刺激剂。

[0038] 在一些方面,所述方法不使用超磁珠。

[0039] 在一些方面,在整个方法中使用相同的刺激剂。在一些方面,在所述方法中使用至少两种不同的刺激剂。

[0040] 在一些方面,刺激剂在所述方法的所有刺激步骤中以相同浓度存在。在一些方面,在所述方法中使用至少两种不同浓度的刺激剂。

[0041] 在一些方面,在存在IL-2的情况下培养Treg。在一些方面,在所述方法期间降低IL-2浓度。在一些方面,IL-2以约800单位/mL的浓度存在约7天,然后以约300单位/mL存在。

[0042] 在一些方面,在存在刺激剂的情况下培养Treg群体约1至约5天,然后在不存在刺激剂的情况下培养约1至约5天,然后在存在刺激剂的情况下培养约1至约5天,然后进行基因工程化。

[0043] 在一些方面,在存在刺激剂的情况下培养Treg群体约3至约4天,然后在不存在刺激剂的情况下培养约3至约4天,然后在存在刺激剂的情况下培养约1至约4天,然后进行基因工程化。在一些方面,在存在和/或不存在根据表A的刺激剂的情况下培养Treg群体。

[0044] 在一些方面,在存在N-乙酰基-L-半胱氨酸的情况下培养Treg。在一些方面,N-乙酰基-L-半胱氨酸以约5mM的浓度存在于培养物中。

[0045] 在一些方面,当Treg群体已经扩增到约250倍时,对Treg群体进行基因工程化。在一些方面,在从受试者获得Treg后约6至约10天对Treg群体进行基因工程化。在一些方面,在从受试者获得Treg后约7天对Treg群体进行基因工程化。

[0046] 在一些方面,基因工程化包括将核酸引入Treg群体中。在一些方面,核酸是病毒核酸。在一些方面,核酸不是病毒核酸。在一些方面,核酸编码蛋白质。在一些方面,蛋白质是异源蛋白质。在一些方面,异源蛋白质是嵌合抗原受体(CAR)。

[0047] 在一些方面,基因工程化包括将基因调控系统引入Treg群体中。在一些方面,基因调控系统包含(i)核酸分子;(ii)酶蛋白;或者(iii)核酸分子和酶蛋白。在一些方面,基因调控系统包含选自siRNA、shRNA、微小RNA(miR)、antagomiR或反义RNA的核酸分子。在一些方面,基因调控系统包含酶蛋白,并且其中酶蛋白已被工程化以特异性结合Treg中的一个或多个基因中的靶序列。在一些方面,酶蛋白是转录激活物样效应物核酸酶(TALEN)、锌指核酸酶或大范围核酸酶。在一些方面,基因调控系统包含核酸分子和酶蛋白,其中核酸分子是指导RNA(gRNA)分子,并且酶蛋白是Cas蛋白或Cas直向同源物。在一些方面,Cas蛋白是Cas9蛋白。

[0048] 在一些方面,引入使用电穿孔或核糖核蛋白(RNP)介导的方法。

[0049] 在一些方面,所述方法不使用人工抗原呈递细胞。

[0050] 在一些方面,所述方法不使用雷帕霉素。在一些方面,所述方法包括使用雷帕霉素。

[0051] 在一些方面,所述方法使Treg的数量在11天内增加到至少1000倍。

[0052] 在一些方面,所述方法产生比在存在刺激剂的情况下培养6天的Treg具有更小面积的Treg。在一些方面,与在存在刺激剂的情况下培养6天的Treg相比,所述方法产生增加比例的Helios⁺Foxp3⁺Treg。在一些方面,与在存在刺激剂的情况下培养6天的Treg相比,

所述方法产生具有增加的抑制效应T细胞(Teff)增殖的能力的Treg。在一些方面,增加的抑制Teff增殖的能力是至少8倍增加的能力。

[0053] 在一些方面,所述方法防止Treg群体的过度刺激。

[0054] 在一些方面,与在存在刺激剂的情况下培养6天的Treg相比,所述方法减少活化诱导的细胞死亡。

[0055] 在一些方面,Treg中至少75%的Helios表达被维持。

[0056] 在一些方面,Treg是Helios+。

[0057] 在一些方面,Treg具有完全去甲基化的Treg特异性去甲基化区域(TSDR)。

[0058] 在一些方面,所述方法还包括冷冻保存Treg群体。

[0059] 本文提供了一种通过本文提供的任何产生的Treg群体。在一些方面,本文提供了一种通过本文提供的任何方法产生的冷冻保存的Treg群体。

[0060] 在一些方面,所述方法还包括向受试者施用Treg群体。

[0061] 本文提供了一种治疗受试者的自身免疫性或炎性疾病的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的使用本文提供的任何方法获得的Treg群体或本文提供的任何Treg。

[0062] 本文提供了一种治疗或预防受试者的移植物抗宿主病(GVHD)的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的使用本文提供的任何方法获得的Treg群体或本文提供的任何Treg。

[0063] 本文提供了一种降低受试者的免疫应答的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的使用本文提供的任何方法获得的Treg群体或本文提供的任何Treg。

[0064] 在一些方面,Treg群体对受试者是同种异体的。在一些方面,Treg群体对受试者是自体的。

附图说明

[0065] 图1示出了经受用CD3/28/2四聚单克隆抗体(mAb)或Dynabeads连续或不连续刺激的调节性T细胞(Treg)的扩增。(参见实施例2。)

[0066] 图2示出了经受连续(“标准”)或不连续(“DSORT™”)刺激的Treg的相对大小,作为活化的量度。(参见实施例3。)

[0067] 图3示出了经受连续刺激或具有延长的非刺激阶段的不连续刺激的Treg的扩增。用CD3/28/2四聚单克隆抗体(mAb)或Dynabeads进行刺激。(参见实施例4。)

[0068] 图4示出了经受连续(“Cont”)刺激或不连续(DSORT™)刺激的CRISPR工程化Treg的扩增。空心正方形表示n=3的平均值。(参见实施例5。)

[0069] 图5提供了示出使用DSORT™获得的Treg的细胞数量(左侧y轴)和扩增倍数(右侧y轴)的图(顶部)和示出除了另选的扩增方案之外使用DSORT™(“KSQ Tx”)获得的扩增倍数的表(底部)。“Thiel”研究是指THEIL,A.等人,“Adoptive transfer of allogeneic regulatory T cells into patients with chronic graft-versus-host disease,”*Cytotherapy*17(4):P473-486(2015年4月)。“Bluestone”研究是指BLUESTONE,J.A.等人,“Type 1 diabetes immunotherapy using polyclonal regulatory T cells,”*Sci Transl med* 7(315):315ra189(2015年11月)。“Canavan”研究是指CANAVAN,J.B.等人,“Developing in vitro expanded CD45RA+regulatory T cells as an adoptive cell therapy for

Crohn's disease," *Gut* 65(4):584-594 (2015年2月在线发布)。“Safina”研究是指SAFINIA, N.等人,“Successful expansion of functional and stable regulatory T cells for immunotherapy in liver transplantation,” *Oncotarget* 7(7):7563-7577 (2016年2月)。“Trzonkowska”研究是指MAREK-TRZONKOWSKA, N.等人,“Mild hypothermia provides Treg stability,” *Scientific Reports* 7:11915 (2017年9月)。“Lombardi”研究是指FRASER, H.等人,“A Rapamycin-Based GMP-Compatible Process for the Isolation and Expansion of Regulatory T Cells for Clinical Trials,” *Molecular Therapy—Methods & Clinical Development* 8:198-209 (2018年1月)。“Leventhal”研究是指MATHEW, J.M.等人,“A Phase I Clinical Trial with Ex Vivo Expanded Recipient Regulatory T cells in Living Donor Kidney Transplants,” *Scientific Reports* 8:7428 (2018年5月)。“Thonhoff”研究是指THONHOFF, J.R.等人,“Expanded autologous regulatory T-lymphocyte infusions in ALS,” *Neurology Neuroimmunology & Neuroinflammation* 5(4):1-7 (2018年7月)。“MacDonald”研究是指MACDONALD, K.N.等人,“Cryopreservation timing is a critical process parameter in a thymic regulatory T-cell therapy manufacturing protocol,” *Cytotherapy* 21(12):1216-1233 (2019年12月)。(参见实施例6。)

[0070] 图6(A-C)示出了(a)具有和不具有Helios和Foxp3表达的细胞中Treg特异性去甲基化区域(TSDR)的甲基化状态,(b)具有不同比例的表达Helios的细胞的细胞群体抑制效应T细胞增殖的能力,以及(c)Helios表达是使用不连续(“DSORT™”)或连续(“标准”)刺激扩增的细胞。(参见实施例7。)

[0071] 图7示出了经受连续刺激(标准扩增)或不连续刺激(DSORT™)的Treg抑制CD4⁺效应T细胞增殖的能力。(参见实施例8。)

[0072] 图8是其中使Treg经受交替的刺激和静息周期和基因工程化的示例性DSORT™过程的示意图。“烧瓶”表示将Treg从板移至烧瓶。

具体实施方式

[0073] 定义

[0074] 除非另外定义,否则本文所用的所有技术和科学术语具有与本公开所属领域的普通技术人员通常理解的含义。如有冲突,将以本申请(包括定义)为准。除非上下文另有要求,否则单数术语应包括复数并且复数术语应包括单数。本文提及的所有出版物、专利和其他参考文献以引用方式整体并入用于所有目的,如同每个单独的出版物或专利申请被具体且单独地指示以引用方式并入一样。

[0075] 尽管与本文所述的那些类似或等同的方法和材料可以用于本公开的实践或测试,但是合适的方法和材料在以下描述。材料、方法和实施例仅是说明性的并且不旨在进行限制。根据详细描述和权利要求,本公开的其他特征和优点将变得显而易见。

[0076] 为了进一步定义本公开,提供了以下术语和定义。

[0077] 应当理解,本文无论在哪里用语言“包含”描述各方面,还提供了关于“由……组成”和/或“基本上由……组成”描述的其他类似方面。

[0078] 如本文所用,单数形式“一”、“一个”和“该”包括复数引用,除非另有指示。

[0079] 本文中术语“或”的使用并不意味着暗示替代项是相互排斥的。在本申请中，“或”的使用意指“和/或”，除非本领域技术人员明确规定或理解。在多项从属权利要求的上下文中，“或”的使用参考多于一项前述独立或从属权利要求。术语“和/或”在本文中使用的情况下应被视为两个指定特征或组分中的每一个在具有或不具有另一个的情况下的具体公开。因此，如本文在诸如“A和/或B”的短语中所用的术语“和/或”旨在包括“A和B”、“A或B”、“A”（单独）和“B”（单独）。同样地，如在诸如“A、B和/或C”的短语中所用的术语“和/或”旨在涵盖以下方面中的每一个：A、B和C；A、B或C；A或C；A或B；B或C；A和C；A和B；B和C；A（单独）；B（单独）；以及C（单独）。

[0080] 单位、前缀和符号以其国际单位制(SI)可接受的形式表示。数值范围包括限定该范围的数值。本文提供的标题不是对本公开的各个方面的限制，这些方面可以通过整体参考说明书而获得。因此，下面紧接着定义的术语通过整体参考说明书来更全面地定义。

[0081] 如本文所用的术语“约”包括所列举的数字 $\pm 10\%$ 。因此，“约10”意指9至11。如本领域技术人员所理解的，本文提及“约”值或参数包括（并描述）针对该值或参数本身的示例。例如，涉及“约X”的描述包括对“X”的描述。

[0082] 如本文所用，术语“调节性T细胞”或“Treg”是指组成型表达叉头盒P3(Foxp3)转录因子的T细胞亚群，该亚群调节免疫系统、维持对自身抗原的耐受性并消除自身免疫性和炎性疾病。这些细胞通常抑制或下调效应T细胞的诱导和增殖并调节抗原呈递细胞功能。Treg是能够通过细胞-细胞接触或通过免疫抑制细胞因子的释放而具有抑制活性（即，抑制常规T细胞的增殖）的细胞。

[0083] 如本文所用，术语“群体”是指其中细胞总数的大部分（即，至少50%（任选地至少60%、至少70%或至少约80%））具有感兴趣的细胞的指定特征（例如，功能特征和/或感兴趣的标记物）的细胞群体。因此，“Treg群体”是指其中大部分细胞是Treg但一些细胞可以是非Treg的细胞（例如，一些细胞可以是Teff）的细胞群体。

[0084] 如本文所用，“培养”是指使一种或多种细胞在限定或受控条件下体外生长。可以限定的培养条件的示例包括温度、气体混合物、时间和培养基配方。

[0085] 如本文所用，术语“培养基”和“细胞培养基”和“补料培养基”和“发酵培养基”是指用于使细胞、尤其是哺乳动物细胞生长和/或维持这些细胞的营养溶液。非限制性地，这些溶液通常提供来自以下一个或多个类别的至少一种组分：(1) 能量源，通常呈碳水化合物诸如葡萄糖的形式；(2) 所有必需氨基酸，通常为二十个氨基酸的基本组；(3) 低浓度的维生素和/或其他有机化合物；(4) 游离脂肪酸或脂质，例如亚油酸；以及(5) 痕量元素，其中痕量元素被定义为通常以极低浓度（通常在微摩尔范围内）需要的无机化合物或天然存在的元素。营养溶液可以选择性地补充有来自以下类别中的任一种的一种或多种组分：(1) 激素和其他生长因子，诸如血清、胰岛素、转铁蛋白和表皮生长因子；(2) 盐，例如镁、钙和磷酸盐；(3) 缓冲剂，诸如HEPES；(4) 核苷和碱基，诸如腺苷、胸苷和次黄嘌呤；(5) 蛋白质和组织水解产物，例如可以从纯化的明胶、植物材料或动物副产物获得的蛋白胨或蛋白胨混合物；(6) 抗生素，诸如庆大霉素；(7) 细胞保护剂，例如普朗尼克多元醇；以及(8) 半乳糖。可商购获得的培养基诸如Ham's F10(Sigma)、Minimal Essential Medium(MEM)，(Sigma)、RPMI-1640(Sigma)和Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM)，(Sigma)适于培养宿主细胞。另外，Ham等人，Meth.Enz.58:44(1979)、Barnes等人，Anal.Biochem.102:255(1980)中所述

的任何培养基可以用作宿主细胞的培养基。还可以以适当的浓度包括任何其他必要的补充物。

[0086] 如本文所用,“刺激剂”是指活化(直接或间接)Treg上的T细胞受体和/或共刺激分子诸如CD28或GITR和/或具有促有丝分裂活性的药剂。刺激剂可以增加Treg的增殖。药剂充当刺激剂的能力可以通过其增加CD3 ζ 亚基上ITAM基序的磷酸化的能力来证明。

[0087] 如本文所用,在“存在刺激剂”的情况下培养是指在存在足以活化Treg上的T细胞受体和/或共刺激分子诸如CD28或GITR的量的刺激剂的情况下培养Treg。

[0088] 如本文所用,在“不存在刺激剂”的情况下培养可以指在不存在足以活化Treg上的T细胞受体和/或共刺激分子诸如CD28或GITR的量的刺激剂的情况下培养。在“不存在刺激剂”的情况下培养包括在没有任何刺激剂的情况下培养。

[0089] 如本文所用的术语“接种”是指将细胞添加到培养基中以开始培养。

[0090] 如本文所用,术语“基因工程化”是指通过使用生物技术直接操纵细胞中的核酸来改变(添加、抑制或取代)细胞的遗传组成(即,至少一种核酸的遗传组成)的过程。基因工程化包括例如将异源核酸引入细胞或细胞群体中。可以例如通过转导或转染将核酸引入细胞或细胞群体中。

[0091] 术语“转导(transduction)”或“转导(transducing)”是指遗传物质的病毒转移及其在受体细胞中的表达。

[0092] 如本文所用的术语“转染(transfection)”或“转染(transfecting)”是指将DNA(例如,配制的DNA表达载体)引入细胞中从而允许细胞转化的过程。

[0093] 如本文所用,术语“载体”是指允许插入外源核酸而不破坏载体在宿主细胞中复制和/或整合的能力的核酸分子。

[0094] 如本文所用的术语“重组载体”是指能够转移或转运插入载体中的另一多核苷酸的多核苷酸分子。插入的多核苷酸可以是表达盒。在一些方面,重组载体可以是病毒载体或非病毒载体(例如,质粒)。

[0095] “表达盒”或“表达构建体”是指可操作地连接至启动子的DNA多核苷酸序列。“可操作地连接”是指其中所述组分处于允许它们以其预期的方式起作用的关系的并置。例如,如果启动子影响多核苷酸序列的转录或表达,则启动子可操作地连接到多核苷酸序列。

[0096] 如本文所用,术语“表达”用于指在细胞内发生的转录和翻译。产物基因在宿主细胞中的表达水平可以基于细胞中存在的相应mRNA的量或由细胞产生的产物基因所编码的蛋白质的量或两者来确定。

[0097] 术语“样品”是指生物组合物(例如,细胞或组织的一部分)。在一些方面,样品是直接受试者获得的“原始样品”;在一些方面,“样品”是处理原始样品的结果,例如除去某些组分和/或分离或纯化某些感兴趣的组分。在一些方面,样品是血液样品。

[0098] 术语“多肽”和“蛋白质”可互换使用,是指氨基酸残基的聚合物并且不限于最小长度。此类氨基酸残基的聚合物可含有天然或非天然氨基酸残基,并且包括但不限于氨基酸残基的肽、寡肽、二聚体、三聚体和多聚体。全长蛋白质及其片段都涵盖在该定义中。该术语还包括多肽的表达后修饰,例如糖基化、唾液酸化、乙酰化、磷酸化等。此外,出于本公开的目的,“多肽”是指包括对天然序列的修饰(诸如缺失、添加和取代(通常在性质上是保守的))的蛋白质,只要蛋白质保持所需的活性即可。这些修饰可以有意的,如通过定点诱

变,或可以是偶然的,诸如通过产生蛋白质的宿主的突变或由于PCR扩增的错误。

[0099] 术语“抗体”意指通过免疫球蛋白分子的可变区内的至少一个抗原识别位点识别并特异性结合靶标(诸如蛋白质、多肽、肽、碳水化合物、多核苷酸、脂质或前述项的组合)的免疫球蛋白分子。如本文所用,术语“抗体”涵盖完整多克隆抗体、完整单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体、人抗体、包含抗体的融合蛋白和任何其他修饰的免疫球蛋白分子,只要抗体表现出所需的生物活性即可。抗体可以是任何类别的免疫球蛋白:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,或它们的亚类(同种型)(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2),基于它们的重链恒定结构域的身份,分别称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。不同类别的免疫球蛋白具有不同且熟知的亚基结构和三维构型。抗体可以是裸露的或与其他分子诸如毒素、放射性同位素等缀合。

[0100] 术语“抗体片段”是指完整抗体的一部分。“抗原结合片段”、“抗原结合结构域”或“抗原结合区”是指完整抗体的与抗原结合的一部分。抗原结合片段可以含有完整抗体的抗原决定区(例如,互补决定区(CDR))。抗体的抗原结合片段的示例包括但不限于Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段、线性抗体和单链抗体。抗体的抗原结合片段可以源自任何动物物种,诸如啮齿动物(例如,小鼠、大鼠或仓鼠)和人,或者可以是人工产生的。

[0101] 如本文所用,术语“可变区”或“可变结构域”可互换使用并且在本领域中是常见的。可变区通常是指抗体的一部分,通常是轻链或重链的一部分,通常是成熟重链中的约110-120个氨基酸或110-125个氨基酸的氨基末端和成熟轻链中约90-115个氨基酸的氨基末端,它们在抗体之间的序列上有很大不同并且用于特定抗体对其特定抗原的结合和特异性。序列的可变性集中在称为互补决定区(CDR)的那些区域中,而可变结构域中更高度保守的区域称为框架区(FR)。不希望受任何特定机制或理论的束缚,据信轻链和重链的CDR主要负责抗体与抗原的相互作用和特异性。在一些方面,可变区是人类可变区。在一些方面,可变区包含啮齿动物或鼠CDR和人类框架区(FR)。在一些方面,可变区是灵长类(例如,非人灵长类)可变区。在一些方面,可变区包含啮齿动物或鼠CDR和灵长类(例如,非人灵长类)框架区(FR)。

[0102] 术语“VL”和“VL结构域”可互换使用,是指抗体的轻链可变区。术语“VH”和“VH结构域”可互换使用,是指抗体的重链可变区。

[0103] 在一些方面,抗体的抗原结合片段是scFv。如本文所用,术语“单链可变片段”或“scFv”是免疫球蛋白的重链(VH)和轻链(VL)可变区的融合蛋白。重链(VH)和轻链(VL)直接连接或通过编码肽的接头(例如,10、15、20或25个氨基酸)连接,该接头将VH的N末端与VL的C末端连接起来,或将VH的C末端与VL的N末端连接起来。接头可以富含甘氨酸以获得柔性,以及富含丝氨酸或苏氨酸以获得溶解性。尽管除去了恒定区并引入了接头,但scFv蛋白仍保留了原始免疫球蛋白的特异性。单链Fv多肽抗体可以由包括VH和VL编码序列的核酸表达。

[0104] 本文可互换使用的术语“多核苷酸”和“核酸”是指任何长度的核苷酸(核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸)的聚合形式。因此,此术语包括但不限于单链、双链或多链DNA或RNA、基因组DNA、cDNA、DNA-RNA杂交体或包含嘌呤碱基和嘧啶碱基或其他天然的、化学或生物化学修饰的、非天然的或衍生的核苷酸碱基的聚合物。术语“多核苷酸”和“核酸”应被理解为包括(如适用于所描述的方面)单链(诸如正义或反义)和双链多核苷酸。

[0105] 术语“工程化抗原受体”是指非天然存在的抗原特异性受体,诸如嵌合抗原受体

(CAR) 或重组T细胞受体 (TCR)。术语“嵌合抗原受体”或“CAR”具有其在本领域中的一般含义,并且是指含有连接到T细胞信号传导结构域的抗原结合结构域(例如,抗体的抗原结合结构域(例如,scFv))的人工构建的杂合多肽。抗原结合结构域和T细胞信号传导结构域可以经由铰链连接。“TCR”具有其在本领域中的一般含义,并且是指识别特定靶标并且包含TCR α 和/或TCR β 链的蛋白复合物。

[0106] 术语“铰链”或“铰链区”是指为侧接多肽区提供结构柔性和间隔的柔性结合物区,例如天然或合成的多肽。

[0107] 术语“修饰的”是指与对应的未修饰的物质或化合物相比已改变或变化的物质或化合物(例如,细胞、多核苷酸序列和/或多肽序列)。

[0108] 如本文所用,当用于核酸、多肽、细胞或生物体时,术语“天然存在的”是指在自然界中发现的核酸、多肽、细胞或生物体。例如,可从自然中的来源分离并且不通过人在实验室中有意修饰的存在于生物体(包括病毒)中的多肽或多核苷酸序列为天然存在的。

[0109] “分离的”多肽、抗体、多核苷酸、载体、细胞或组合物是呈在自然界中未发现的形式多肽、抗体、多核苷酸、载体、细胞或组合物。分离的多肽、抗体、多核苷酸、载体、细胞或组合物包括已被纯化至其不再呈在自然界中发现的形式的程度的那些。在一些方面,分离的抗体、多核苷酸、载体、细胞或组合物是基本上纯的。如本文所用,“基本上纯的”是指至少50%纯(即,不含污染物)的材料。因此,“基本上纯的”还包括至少90%纯、至少95%纯、至少98%纯或至少99%纯的材料。

[0110] 术语“体内”是指在哺乳动物受试者体内发生的事件,而不是指在细胞培养物(包括哺乳动物细胞培养物)中发生的事件。

[0111] 术语“离体”是指在哺乳动物受试者体外、在人工环境中发生的事件。

[0112] 术语“体外”是指在测试系统中发生的事件。体外测定涵盖其中可使用活细胞或死细胞的基于细胞的测定,并且也可涵盖其中不使用完整细胞的无细胞测定。

[0113] 如本文所用,“治疗”是用于获得有益或所需临床结果的方法。如本文所用的“治疗”涵盖用于哺乳动物(包括人)的疾病的治疗剂的任何施用或施加。出于本公开的目的,有益或所需临床结果包括但不限于以下项中的任何一个或多个:减轻一种或多种症状、减轻疾病的程度、预防或延迟疾病的扩散(例如,转移)、预防或延迟疾病的复发、延迟或减缓疾病进展、改善疾病状态、抑制疾病或疾病进展、抑制或减缓疾病或其进展、阻止其发展以及缓解(无论部分或全部)。“治疗”还涵盖减轻增殖性疾病的病理后果。本文提供的方法考虑了治疗的这些方面中的任何一个或多个。与上述一致,术语治疗不要求百分之百消除障碍的所有方面。

[0114] 如本文所用,“延迟”意指推迟、阻碍、减缓、延缓、稳定和/或延迟疾病的发展或进展。这种延迟可以具有不同的时间长度,这取决于疾病史和/或被治疗的个体。

[0115] 物质的“治疗有效量”可以根据诸如个体的疾病状态、年龄、性别和体重以及物质在个体中引发所需反应的能力的因素而变化。治疗有效量也是其中物质的任何毒性或有害作用被治疗有益作用超过的量。治疗有效量可以在一次或多次施用中递送。治疗有效量是指在必要的剂量下和时间段内有效实现所需治疗效果的量。

[0116] “预防有效量”是指在必要的剂量下和时间段内有效实现所需预防结果(例如,预防感染或疾病发作)的量。

[0117] “减小”或“降低”是指与参考值相比特定值减小或降低至少5%，例如减小5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或100%。

[0118] “增加”是指与参考值相比特定值增加至少5%，例如增加5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、100%、200%、300%、400%、500%或更多。

[0119] 术语“施用(administer)”、“施用(administering)”、“施用(administration)”等是指可以用于将治疗剂递送到所需的生物作用部位的方法。可以与本文所述的药剂和方法一起使用的施用技术可见于例如Goodman和Gilman, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 当前版本; Pergamon; 以及Remington's, *Pharmaceutical Sciences* (当前版本), Mack Publishing Co., Easton, Pa. 两种或更多种治疗剂的施用包括同时(并发)施用和以任何顺序连续施用。

[0120] 术语“个体”或“受试者”在本文中可互换使用,是指动物,例如哺乳动物,诸如人。在一些情况下,提供了治疗哺乳动物(包括但不限于人、啮齿动物、猿、猫科动物、犬科动物、马科动物、牛科动物、猪科动物、绵羊科动物、山羊科动物、哺乳动物实验动物、哺乳动物农场动物、哺乳动物运动动物和哺乳动物宠物)的方法。在一些实例中,“个体”或“受试者”是指需要治疗疾病或障碍的个体或受试者。在一些情况下,接受治疗的受试者可以是患者,指定该受试者已被鉴定为患有与治疗相关的障碍或处于患上该障碍的特定风险中的事实。

[0121] 出于本公开的目的,疗法中所用的调节性T细胞可以从随后施用它们的受试者(“自体细胞”)或从另一个体(“同种异体细胞”)分离。如本文所用,“同种异体细胞”是指从一名受试者(供体)分离并输注给另一名受试者(受体或宿主)的细胞。如本文所用,“自体细胞”是指分离并输注回同一受试者(受体或宿主)的细胞。

[0122] 术语“药物制剂”和“药物组合物”是指呈允许活性成分的生物活性有效的形式并且不含对将施用制剂的受试者具有不可接受的毒性的附加组分的制备物。此类制剂可以是无菌的。

[0123] 如本文所用的术语“药学上可接受的”是指在合理的医学判断范围内适用于与人类和动物的组织接触而没有过度毒性、刺激、过敏反应或其他问题或并发症、与合理的益处/风险比相称的那些化合物、材料、组合物和/或剂型。

[0124] “药学上可接受的载剂”是指与治疗剂一起使用的无毒固体、半固体或液体填充剂、稀释剂、包封材料、制剂助剂或本领域中常规的载剂,它们一起构成用于向受试者施用的“药物组合物”。药学上可接受的载剂在所用的剂量和浓度下对受体是无毒的并且与制剂的其他成分相容。药学上可接受的载剂适合所用的制剂。

[0125] “无菌”制剂是无菌的或基本上不含活微生物及其孢子。

[0126] 分子和细胞生物化学中的一般方法可以见于标准教科书,诸如Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第3版(Sambrook等人, Harbor Laboratory Press 2001); Short Protocols in Molecular Biology, 第4版(Ausubel等人编辑, John Wiley & Sons 1999); Protein Methods (Bollag等人, John Wiley & Sons 1996); Nonviral Vectors for Gene Therapy (Wagner等人编辑, Academic Press 1999); Viral Vectors (Kaplift & Loewy 编辑, Academic Press 1995); Immunology Methods Manual (I. Lefkovits 编辑, Academic

Press 1997);以及Cell and Tissue Culture:Laboratory Procedures in Biotechnology(Doyle&Griffiths,John Wiley&Sons 1998)。

[0127] Treg和Treg群体

[0128] 表达转录因子叉头盒P3(FOXP3)的Treg天然存在于免疫系统中。因此,在本文提供的一些方面,Treg是FoxP3⁺CD4⁺T细胞。转录因子Helios也在天然存在于免疫系统中的许多Treg中表达。因此,在本文提供的一些方面,Treg是FoxP3⁺Helios⁺或FoxP3⁺CD4⁺Helios⁺T细胞。

[0129] 在一些方面,Treg具有完全去甲基化的Treg特异性去甲基化区域(TSDR)。

[0130] FoxP3、Helios和TSDR的去甲基化是细胞内Treg标记物。然而,包括CD25^{hi}(高分子密度)和CD127^{lo}(低分子密度)在内的细胞表面标记物也可以充当Treg的标记物,并且可以用于例如使用流式细胞术鉴定Treg。因此,在一些方面,Treg是CD25⁺T细胞。在一些方面,Treg是CD25⁺CD4⁺T细胞。在一些方面,Treg是CD25^{hi}CD4⁺T细胞。在一些方面,Treg是CD127^{lo}T细胞。在一些方面,Treg是CD127^{lo}CD4⁺T细胞。在一些方面,Treg是CD25^{hi} CD127^{lo} CD4⁺T细胞。

[0131] 在一些方面,Treg是CD25⁺FoxP3⁺T细胞。在一些方面,Treg是CD25⁺CD4⁺FoxP3⁺T细胞。在一些方面,Treg是CD25^{hi}CD4⁺FoxP3⁺T细胞。在一些方面,Treg是CD127^{lo}FoxP3⁺T细胞。在一些方面,Treg是CD127^{lo}CD4⁺FoxP3⁺T细胞。在一些方面,Treg是CD25^{hi} CD127^{lo} CD4⁺FoxP3⁺T细胞。

[0132] 在一些方面,Treg是CD45RA^{hi}CD25^{hi}CD127^{lo}CD4⁺T细胞。在一些方面,Treg是CD45RA^{hi}CD25^{hi}CD127^{lo}CD4⁺FoxP3⁺T细胞。

[0133] 在一些方面,Treg是CD25⁺FoxP3⁺Helios⁺T细胞。在一些方面,Treg是CD25⁺CD4⁺FoxP3⁺Helios⁺T细胞。在一些方面,Treg是CD25^{hi}CD4⁺FoxP3⁺Helios⁺T细胞。在一些方面,Treg是CD127^{lo}FoxP3⁺Helios⁺T细胞。在一些方面,Treg是CD127^{lo}CD4⁺FoxP3⁺Helios⁺T细胞。在一些方面,Treg是CD25^{hi} CD127^{lo} CD4⁺FoxP3⁺Helios⁺T细胞。

[0134] 在一些方面,Treg是CD45RA^{hi}CD25^{hi}CD127^{lo}CD4⁺Helios⁺T细胞。在一些方面,Treg是CD45RA^{hi}CD25^{hi}CD127^{lo}CD4⁺FoxP3⁺Helios⁺T细胞。

[0135] 在一些方面,Treg表达SOCS、PD-1、CLTA4、神经纤毛蛋白、TRAIL和/或GITR。

[0136] 在一些方面,Treg表达IL-10和/或TGFβ。

[0137] 在一些方面,Treg是人Treg。

[0138] 可以基于活化细胞的前向散射(FSC)分布来对它们进行表征。与细胞的相对大小成比例的更高的FSC值指示更大的活化。根据本文提供的方法产生的Treg的细胞大小(FSC-A)可以小于根据常规方法产生的Treg,例如已连续刺激6天(约144小时)的Treg。(参见例如实施例3。)在一些方面,根据本文提供的方法产生的Treg具有小于已连续刺激6天(约144小时)的Treg的相对细胞大小(FSC-A)的0.75倍的相对细胞大小。在一些方面,根据本文提供的方法产生的Treg具有小于已连续刺激6天(约144小时)的Treg的相对细胞大小(FSC-A)的0.8倍的相对细胞大小。在一些方面,根据本文提供的方法产生的Treg具有小于已连续刺激6天(约144小时)的Treg的相对细胞大小(FSC-A)的0.75倍的相对细胞大小。

[0139] 本文还提供了Treg群体。在一些方面,群体包含至少1x10³个细胞、至少1x10⁴个细胞、至少1x10⁵个细胞、至少1x10⁶个细胞、至少1x10⁷个细胞、至少1x10⁸个细胞、至少1x10⁹个

细胞或至少 1×10^{10} 个细胞。在一些方面,群体包含至少 1×10^3 个Treg、至少 1×10^4 个Treg、至少 1×10^5 个Treg、至少 1×10^6 个Treg、至少 1×10^7 个Treg、至少 1×10^8 个Treg、至少 1×10^9 个Treg或至少 1×10^{10} 个Treg。

[0140] 在一些方面,Treg群体中至少60%的细胞是Treg。在一些方面,Treg群体中至少70%的细胞是Treg。在一些方面,Treg群体中至少75%的细胞是Treg。在一些方面,Treg群体中至少80%的细胞是Treg。在一些方面,Treg群体中至少85%的细胞是Treg。在一些方面,Treg群体中至少90%的细胞是Treg。在一些方面,Treg群体中至少95%的细胞是Treg。在一些方面,Treg群体中至少96%的细胞是Treg。在一些方面,Treg群体中至少97%的细胞是Treg。在一些方面,Treg群体中至少98%的细胞是Treg。在一些方面,Treg群体中至少99%的细胞是Treg。

[0141] 在一些方面,Treg群体中少于1%的细胞是效应T细胞。在一些方面,Treg群体中少于2%的细胞是效应T细胞。在一些方面,Treg群体中少于3%的细胞是效应T细胞。在一些方面,Treg群体中少于4%的细胞是效应T细胞。在一些方面,Treg群体中少于5%的细胞是效应T细胞。在一些方面,Treg群体中少于10%的细胞是效应T细胞。

[0142] 在一些方面,Treg群体中少于1%的细胞是 $CD25^-CD4^+$ 或 $CD8^+$ T细胞。在一些方面,Treg群体中少于2%的细胞是 $CD25^-CD4^+$ 或 $CD8^+$ T细胞。在一些方面,Treg群体中少于3%的细胞是 $CD25^-CD4^+$ 或 $CD8^+$ T细胞。在一些方面,Treg群体中少于4%的细胞是 $CD25^-CD4^+$ 或 $CD8^+$ T细胞。在一些方面,Treg群体中少于5%的细胞是 $CD25^-CD4^+$ 或 $CD8^+$ T细胞。在一些方面,Treg群体中少于10%的细胞是 $CD25^-CD4^+$ 或 $CD8^+$ T细胞。可以使用流式细胞术来确定群体中作为 $CD25^-CD4^+$ 或 $CD8^+$ T细胞的细胞比例。

[0143] 在一些方面,根据提供的方法产生的Treg群体具有小于已连续刺激6天(约144小时)的Treg群体的平均相对细胞大小(FSC-A)的0.75倍的平均相对细胞大小。在一些方面,根据本文提供的方法产生的Treg群体具有小于已连续刺激6天(约144小时)的Treg群体的平均相对细胞大小(FSC-A)的0.8倍的平均相对细胞大小。在一些方面,根据本文提供的方法产生的Treg群体具有小于已连续刺激6天(约144小时)的Treg群体的相对细胞大小(FSC-A)的0.75倍的相对细胞大小。

[0144] 根据本文提供的方法产生的Treg群体中 $Helios^+Foxp3^+$ Treg的比例可以小于根据常规方法产生的Treg群体,例如已连续刺激6天(约144小时)的Treg群体。(参见例如实施例7。)在一些方面,根据本文提供的方法产生的Treg群体可以具有是已连续刺激6天(约144小时)的Treg群体的至少1.5倍的 $Helios^+Foxp3^+CD4^+$ T细胞百分比。在一些方面,根据本文提供的方法产生的Treg群体可以具有是已连续刺激6天(约144小时)的Treg群体的至少2倍的 $Helios^+Foxp3^+CD4^+$ T细胞百分比。在一些方面,根据本文提供的方法产生的Treg群体可以具有是已连续刺激6天(约144小时)的Treg群体的1.5至3倍的 $Helios^+Foxp3^+CD4^+$ T细胞百分比。在一些方面,根据本文提供的方法产生的Treg群体可以具有是已连续刺激6天(约144小时)的Treg群体的1.5至2.5倍的 $Helios^+Foxp3^+CD4^+$ T细胞百分比。可以使用流式细胞术来确定Treg群体中 $Helios^+Foxp3^+$ Treg的比例。

[0145] 在一些方面,通过本文所述的方法产生的Treg群体中至少50%的细胞表达Helios。在一些方面,通过本文所述的方法产生的Treg群体中至少60%的细胞表达Helios。在一些方面,通过本文所述的方法产生的Treg群体中至少70%的细胞表达Helios。在一些

方面,通过本文所述的方法产生的Treg群体中至少75%的细胞表达Helios。在一些方面,通过本文所述的方法产生的Treg群体中至少80%的细胞表达Helios。在一些方面,通过本文所述的方法产生的Treg群体中至少85%的细胞表达Helios。在一些方面,通过本文所述的方法产生的Treg群体中至少90%的细胞表达Helios。在一些方面,通过本文所述的方法产生的Treg群体中至少95%的细胞表达Helios。在一些方面,通过本文所述的方法产生的Treg群体中至少96%的细胞表达Helios。在一些方面,通过本文所述的方法产生的Treg群体中至少97%的细胞表达Helios。在一些方面,通过本文所述的方法产生的Treg群体中至少98%的细胞表达Helios。可以使用流式细胞术来确定Treg群体中表达Helios的细胞百分比。

[0146] 在一些方面,当根据本文提供的方法扩增(并且任选地基因工程化)Treg时,表达Helios的Treg的比例降低不超过50%。在一些方面,当根据本文提供的方法扩增(并且任选地基因工程化)Treg时,表达Helios的Treg的比例降低不超过40%。在一些方面,当根据本文提供的方法扩增(并且任选地基因工程化)Treg时,表达Helios的Treg的比例降低不超过30%。在一些方面,当根据本文提供的方法扩增(并且任选地基因工程化)Treg时,表达Helios的Treg的比例降低不超过25%。

[0147] 在一些方面,通过本文所述的方法产生的Treg群体中至少60%的细胞表达FOXP3。在一些方面,通过本文所述的方法产生的Treg群体中至少70%的细胞表达FOXP3。在一些方面,通过本文所述的方法产生的Treg群体中至少75%的细胞表达FOXP3。在一些方面,通过本文所述的方法产生的Treg群体中至少80%的细胞表达FOXP3。在一些方面,通过本文所述的方法产生的Treg群体中至少85%的细胞表达FOXP3。在一些方面,通过本文所述的方法产生的Treg群体中至少90%的细胞表达FOXP3。在一些方面,通过本文所述的方法产生的Treg群体中至少95%的细胞表达FOXP3。在一些方面,通过本文所述的方法产生的Treg群体中至少96%的细胞表达FOXP3。在一些方面,通过本文所述的方法产生的Treg群体中至少97%的细胞表达FOXP3。在一些方面,通过本文所述的方法产生的Treg群体中至少98%的细胞表达FOXP3。可以使用流式细胞术来确定Treg群体中表达FOXP3的细胞百分比。

[0148] 在一些方面,通过本文所述的方法产生的Treg群体中至少50%的细胞表达FOXP3和Helios。在一些方面,通过本文所述的方法产生的Treg群体中至少60%的细胞表达FOXP3和Helios。在一些方面,通过本文所述的方法产生的Treg群体中至少70%的细胞表达FOXP3和Helios。在一些方面,通过本文所述的方法产生的Treg群体中至少75%的细胞表达FOXP3和Helios。在一些方面,通过本文所述的方法产生的Treg群体中至少80%的细胞表达FOXP3和Helios。在一些方面,通过本文所述的方法产生的Treg群体中至少85%的细胞表达FOXP3和Helios。在一些方面,通过本文所述的方法产生的Treg群体中至少90%的细胞表达FOXP3和Helios。在一些方面,通过本文所述的方法产生的Treg群体中至少95%的细胞表达FOXP3和Helios。在一些方面,通过本文所述的方法产生的Treg群体中至少96%的细胞表达FOXP3和Helios。在一些方面,通过本文所述的方法产生的Treg群体中至少97%的细胞表达FOXP3和Helios。在一些方面,通过本文所述的方法产生的Treg群体中至少98%的细胞表达FOXP3和Helios。可以使用流式细胞术来确定Treg群体中表达FOXP3和Helios的细胞百分比。

[0149] 如本文所证明,与根据常规方法产生的Treg群体(例如,已连续刺激6天(约144小时)的Treg群体)相比,根据本文提供的方法产生的Treg群体可以具有增加的抑制效应T细

胞(Teff)增殖的能力。(参见例如实施例8。)

[0150] 可以例如使用如本文实施例1中提供的体外抑制测定法来确定Treg群体抑制Teff增殖的能力。可以在体外检测Treg群体抑制Teff增殖的能力。

[0151] 在本文提供的一个方面,使用以下测定法来确定Treg群体抑制Teff增殖的能力:(i)刺激已在含有10 μ l/mL ImmunoCult CD3/28/2四聚体(StemCell Technologies,目录号10970)和IL-2(300单位/mL)的Treg培养基中静息过夜的Treg,(ii)洗涤Treg以除去四聚体和IL-2,(iii)将Treg重悬于Treg培养基中,(iv)将Treg与细胞示踪紫(CTV)标记的PBMC混合(例如,以1:1至1:16的比率),(v)添加0.1mL ImmunoCult CD3/28/2四聚体(3 μ l/mL)持续4天(约96小时),以及(vi)对细胞进行CD3、CD4和CD8染色。与不存在Treg的情况相比,在存在Treg的情况下来自CD4+或CD8+T效应细胞的CTV信号较低,表明Treg抑制Teff增殖。

[0152] 在一些方面,根据本文提供的方法产生的Treg群体可以具有是已连续刺激6天(约144小时)的Treg群体的至少两倍的抑制Teff增殖的能力。在一些方面,根据本文提供的方法产生的Treg群体可以具有是已连续刺激6天(约144小时)的Treg群体的至少三倍的抑制Teff增殖的能力。在一些方面,根据本文提供的方法产生的Treg群体可以具有是已连续刺激6天(约144小时)的Treg群体的至少四倍的抑制Teff增殖的能力。在一些方面,根据本文提供的方法产生的Treg群体可以具有是已连续刺激6天(约144小时)的Treg群体的至少五倍的抑制Teff增殖的能力。在一些方面,根据本文提供的方法产生的Treg群体可以具有是已连续刺激6天(约144小时)的Treg群体的至少六倍的抑制Teff增殖的能力。在一些方面,根据本文提供的方法产生的Treg群体可以具有是已连续刺激6天(约144小时)的Treg群体的至少七倍的抑制Teff增殖的能力。在一些方面,根据本文提供的方法产生的Treg群体可以具有是已连续刺激6天(约144小时)的Treg群体的至少八倍的抑制Teff增殖的能力。

[0153] 在一些方面,根据本文提供的方法产生的Treg群体可以具有是已连续刺激6天(约144小时)的Treg群体的约2至约10倍的抑制Teff增殖的能力。在一些方面,根据本文提供的方法产生的Treg群体可以具有是已连续刺激6天(约144小时)的Treg群体的约4至约10倍的抑制Teff增殖的能力。在一些方面,根据本文提供的方法产生的Treg群体可以具有是已连续刺激6天(约144小时)的Treg群体的约6至约10倍的抑制Teff增殖的能力。

[0154] 在一些方面,本文所述的方法的步骤(例如,所有刺激步骤、所有静息步骤和所有编辑步骤(当存在时))在不到30天、或不到29天、或不到28天、或不到27天、或不到26天、或不到25天、或不到24天、或不到23天、或不到22天、或不到21天、或不到20天、或不到19天、或不到18天、或不到17天、或不到16天、或不到14天、或不到14天、或14至30天、或14至25天、或15至28天、或15至25天内完成。

[0155] Treg的刺激

[0156] 如本文所提供,扩增Treg群体的方法可以包括刺激步骤,其中在存在刺激剂的情况下培养Treg群体。刺激步骤可以导致刺激的Treg群体的产生。

[0157] 在本文提供的方法的一些方面,在存在刺激剂的情况下培养Treg群体导致群体中的Treg上至少40%的T细胞受体和/或共刺激分子(例如,CD28或GITR)被活化。在本文提供的方法的一些方面,在存在刺激剂的情况下培养Treg群体导致群体中的Treg上至少50%的T细胞受体和/或共刺激分子(例如,CD28或GITR)被活化。在本文提供的方法的一些方面,在存在刺激剂的情况下培养Treg群体导致群体中的Treg上至少60%的T细胞受体和/或共刺

激分子(例如,CD28或GITR)被活化。在本文提供的方法的一些方面,在存在刺激剂的情况下培养Treg群体导致群体中的Treg上至少70%的T细胞受体和/或共刺激分子(例如,CD28或GITR)被活化。在本文提供的方法的一些方面,在存在刺激剂的情况下培养Treg群体导致群体中的Treg上至少80%的T细胞受体和/或共刺激分子(例如,CD28或GITR)被活化。在本文提供的方法的一些方面,在存在刺激剂的情况下培养Treg群体导致群体中的Treg上至少90%的T细胞受体和/或共刺激分子(例如,CD28或GITR)被活化。在本文提供的方法的一些方面,在存在刺激剂的情况下培养Treg群体导致群体中的Treg上至少95%的T细胞受体和/或共刺激分子(例如,CD28或GITR)被活化。在本文提供的方法的一些方面,在存在刺激剂的情况下培养Treg群体导致群体中的Treg上至少96%的T细胞受体和/或共刺激分子(例如,CD28或GITR)被活化。在本文提供的方法的一些方面,在存在刺激剂的情况下培养Treg群体导致群体中的Treg上至少97%的T细胞受体和/或共刺激分子(例如,CD28或GITR)被活化。在本文提供的方法的一些方面,在存在刺激剂的情况下培养Treg群体导致群体中的Treg上至少98%的T细胞受体和/或共刺激分子(例如,CD28或GITR)被活化。在本文提供的方法的一些方面,在存在刺激剂的情况下培养Treg群体导致群体中的Treg上至少99%的T细胞受体和/或共刺激分子(例如,CD28或GITR)被活化。

[0158] 在单独的刺激步骤中,在存在刺激剂的情况下连续培养Treg。在一些方面,单独的刺激步骤涉及向Treg培养物中单次添加刺激剂(在刺激步骤开始时),使得刺激剂的浓度可以在整个刺激步骤中变化(例如,降低)。在一些方面,单独的刺激步骤涉及向Treg培养物中重复添加刺激剂以维持期望的刺激剂浓度。

[0159] 本文提供的一些方法从刺激步骤开始。刺激步骤也可以发生在静息步骤之后和/或可以在静息步骤之前。在一些方面,刺激步骤发生在两个静息步骤之间。

[0160] 刺激剂可以是抗原非特异性刺激剂(诸如抗CD3抗体)或抗原特异性刺激剂,诸如MHC肽多聚体。在一些方面,刺激剂例如通过结合TCR活化Treg上的T细胞受体。在一些方面,刺激剂例如通过结合CD28活化Treg上的CD28。在一些方面,刺激剂例如通过结合TCR和CD28活化Treg上的T细胞受体和CD28。在一些方面,刺激剂是有丝分裂原,诸如PHA或ConA。

[0161] 在一些方面,刺激剂是抗体或其抗原结合片段。在一些方面,刺激剂是抗体复合物。在一些方面,刺激剂是四聚抗体复合物。在一些方面,四聚抗体复合物特异性结合CD3、CD28和/或CD2。在一些方面,四聚抗体复合物特异性结合CD3、CD28和CD2。特异性结合CD3、CD28和CD2的示例性四聚抗体复合物可作为ImmunoCult CD3/28/2四聚体得自StemCell Technologies,目录号为10970。

[0162] 在一些方面,四聚抗体复合物以至少0.5ng/ml的浓度存在。

[0163] 在一些方面,刺激剂是抗CD3抗体或其抗原结合片段。在一些方面,抗CD3抗体或其抗原结合片段是OKT3。这种刺激剂可以以至少0.5ng/ml的浓度存在。

[0164] 术语“抗CD3抗体”是指针对成熟T细胞的T细胞抗原受体中的CD3受体的抗体,例如单克隆抗体,包括人、人源化、嵌合和鼠抗体。抗CD3抗体包括OKT-3,也称为莫罗单抗(muromonab)。抗CD3抗体还包括UHCT1克隆,也称为T3和CD3c。其他抗CD3抗体包括例如奥特利珠单抗(otelixizumab)、特普利珠单抗(teplizumab)和维西利珠单抗(visilizumab)。

[0165] “OKT-3”抗体(在本文中也称为“OKT3”)可例如作为OKT-3 30ng/mL(MACS GMP CD3纯)从Miltenyi Biotech, Inc., San Diego, Calif., USA商购获得。莫罗单抗的重链和轻链

的氨基酸序列分别在SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2中给出。

[0166] QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKA
TLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGGTTGSSVTL
GCLVKGYFPEPVTLTWNSSGLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSI TCNVAHPASSTKVDKKIEPRP
KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSP
GK (SEQ ID NO:1)

[0167] QIVLTQSPAIMASAPGKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAHFRGSGSGT
SYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEINRADTAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDIN
VKWKIDGSERQNGVLNSWTDQSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKSTSTSPIVKSFNREK (SEQ ID
NO:2)

[0168] 在一些方面,刺激剂是抗CD28抗体或其抗原结合片段。这种刺激剂可以以至少0.5ng/ml的浓度存在。

[0169] 刺激剂可以在基底(诸如细胞或珠)上。珠可以是塑料、玻璃或任何其他合适的材料,通常在1-20微米范围内。在一些方面,珠是顺磁珠。在一些方面,珠是超磁珠。因此,例如,刺激剂可以是抗CD3包被的超磁珠和/或抗CD28包被的超磁珠。这种刺激剂可以例如以约5 μ g/ml或约10 μ g/ml的浓度存在。这种刺激剂可以例如以约2.5 μ g/ml至约15 μ g/ml的浓度存在。

[0170] 适合用作基底的细胞包括抗原呈递细胞(APC)和人工抗原呈递细胞(aAPC)。

[0171] 在一些方面,刺激剂是抗原呈递细胞(APC)或人工抗原呈递细胞(aAPC)。aAPC可以是辐照的aAPC。

[0172] 在一些方面,刺激剂不在珠上。

[0173] 在一些方面,刺激剂是特异性结合CD3、CD28和/或CD2的四聚抗体复合物、抗CD3抗体或其抗原结合片段、抗CD28抗体或其抗原结合片段和/或抗原呈递细胞或人工抗原呈递细胞。

[0174] 在一些方面,刺激剂以足以Treg增殖例如在72小时内增加到至少1.5倍的浓度存在。在一些方面,刺激剂以足以Treg增殖例如在72小时内增加到至少2倍的浓度存在。在一些方面,刺激剂以足以Treg增殖例如在72小时内增加到至少3倍的浓度存在。Treg增殖可以使用发光细胞活力测定法(诸如Cell TiterGlo®)来测量,该测定法基于ATP的定量来确定培养物中存活的、代谢活跃的细胞的数量。

[0175] 在一些方面,刺激剂以足以增加细胞前向散射(FSC)分布(是体外培养的T细胞的活化状态的常用指标)的浓度存在。

[0176] 如本文所提供,扩增Treg群体的方法可以包括多个刺激步骤。在这些方面,刺激步骤可以使用相同的刺激剂,或者刺激步骤可以使用不同的刺激剂。在多个刺激步骤使用相同的刺激剂的情况下,刺激剂可以使用相同浓度的刺激剂或可以使用不同浓度的刺激剂。可以组合使用刺激剂,使得单个刺激步骤可以涉及使用两种刺激剂(同时和/或连续)。因此,在一些方面,刺激剂是CD3和CD28包被的超磁珠。

[0177] 在一些方面,本文提供的方法包括两个刺激步骤(被静息步骤分开)。在一些方面,

本文提供的方法包括至少两个刺激步骤(每个被静息步骤分开)。在一些方面,本文提供的方法包括至少三个刺激步骤(每个被静息步骤分开)。

[0178] 在一些方面,刺激步骤为至少1天(约24小时)。在一些方面,刺激步骤为至少2天(约48小时)。在一些方面,刺激步骤为至少3天(约72小时)。在一些方面,刺激步骤为至少4天(约96小时)。

[0179] 在一些方面,刺激步骤为约一天(约24小时)。在一些方面,刺激步骤为约两天(约48小时)。在一些方面,刺激步骤为约三天(约72小时)。在一些方面,刺激步骤为约四天(约96小时)。

[0180] 在一些方面,刺激步骤为约1天(约24小时)至约5天(约120小时)。在一些方面,刺激步骤为约1天(约24小时)至约4天(约96小时)。在一些方面,刺激步骤为约1天(约24小时)至约3天(约72小时)。在一些方面,刺激步骤为约2天(约48小时)至约5天(约120小时)。在一些方面,刺激步骤为约2天(约48小时)至约4天(约96小时)。在一些方面,刺激步骤为约3天(约72小时)至约4天(约96小时)。

[0181] 在一些天中,刺激步骤不超过6天(约144小时)或不超过5天(约120小时)。

[0182] 在一些方面,本文提供的方法包括至少两个(例如,两个)刺激步骤(每个被静息步骤分开),其中第一刺激步骤比第二刺激步骤长。在一些方面,第一刺激步骤比第二刺激步骤长至少约12小时、至少约24小时、至少约36小时、至少约48小时、至少约60小时或至少约72小时。第一刺激步骤可以为例如约1天(约24小时)至约4天(约96小时),并且第二刺激步骤可以为例如约1天(约24小时)至约3天(约72小时)。在一些方面,第一刺激步骤为约3天(约72小时),并且第二刺激步骤为约2天(约48小时)。

[0183] 在一些方面,本文提供的方法包括在对Treg进行基因工程化之前的至少一个刺激步骤。在一些方面,本文提供的方法包括在对Treg进行基因工程化之前的至少两个刺激步骤(每个被静息步骤分开)。

[0184] 在一些方面,本文提供的方法包括在对Treg进行基因工程化之后的至少一个刺激步骤。

[0185] 静息Treg

[0186] 如本文所提供,扩增Treg群体的方法可以包括静息步骤,其中在不存在刺激剂的情况下培养Treg群体。静息步骤可以导致静息的Treg群体的产生。如本文所用,静息是指不存在刺激剂(而不是指例如不存在细胞生长、分裂、扩增或Treg的任何其他活性)。

[0187] 在本文提供的方法的一些方面,在不存在刺激剂的情况下培养的Treg群体中的大部分Treg不包含活性T细胞受体和/或共刺激分子,诸如CD28或GITR。在本文提供的方法的一些方面,在不存在刺激剂的情况下培养Treg群体导致群体中的Treg上不超过20%的T细胞受体和/或共刺激分子(例如,CD28或GITR)被活化。在本文提供的方法的一些方面,在不存在刺激剂的情况下培养Treg群体导致群体中的Treg上不超过15%的T细胞受体和/或共刺激分子(例如,CD28或GITR)被活化。在本文提供的方法的一些方面,在不存在刺激剂的情况下培养Treg群体导致群体中的Treg上不超过10%的T细胞受体和/或共刺激分子(例如,CD28或GITR)被活化。在本文提供的方法的一些方面,在不存在刺激剂的情况下培养Treg群体导致群体中的Treg上不超过5%的T细胞受体和/或共刺激分子(例如,CD28或GITR)被活化。

[0188] 本领域普通技术人员知道用于确定是否在不存在刺激剂的情况下培养Treg群体的方法。例如,可使用本领域普通技术人员已知的方法(例如,通过确定细胞大小和/或粒度的变化、通过确定Treg活化标记物的下调和/或通过免疫抑制细胞因子产生的下调)来定量刺激剂的去除/不存在。

[0189] 在一些方面,通过确定细胞大小和/或粒度的变化来确定刺激剂的不存在。在一些方面,使用流式细胞仪来测量细胞大小和/或粒度的变化(即,FSC/SSC测量)。如本文所述,可以基于活化细胞的前向散射(FSC)分布来对它们进行表征。在一些方面,在不存在刺激剂的情况下,与去除刺激剂之前Treg群体的细胞大小(FSC-A)相比,Treg群体的细胞大小(FSC-A)小约40%、或小约50%、或小约60%、或小约70%、或小约75%、或小约80%、或小约90%、或更小。在一些方面,在去除刺激剂后约12小时、或约18小时、或约24小时、或约36小时、或约48小时、或约72小时确定在不存在刺激剂的情况下Treg群体的细胞大小(FSC-A)。在一些方面,在去除刺激剂之前约2小时、约1小时、约30分钟、约15分钟或更短时间确定去除刺激剂之前Treg群体的细胞大小(FSC-A)。

[0190] 用于确定刺激剂的不存在的其他非限制性示例包括确定Treg活化标记物(例如,Foxp3、Helios、CTLA4、CD25、CD69、HLA-DR)的下调和/或确定免疫抑制性细胞因子产生(例如,IL-10、TGF β)的下调。在一些方面,在不存在刺激剂的情况下,与去除刺激剂之前Treg群体的Treg活化标记物的表达和/或免疫抑制性细胞因子产生相比,Treg活化标记物的表达和/或免疫抑制性细胞因子产生少约40%、或少约50%、或少约60%、或少约70%、或少约75%、或少约80%、或少约90%、或更少。在一些方面,在去除刺激剂后约12小时、或约18小时、或约24小时、或约36小时、或约48小时、或约72小时确定在不存在刺激剂的情况下Treg群体的Treg活化标记物的表达和/或免疫抑制性细胞因子产生。在一些方面,在去除刺激剂之前约2小时、约1小时、约30分钟、约15分钟或更短时间确定去除刺激剂之前Treg群体的Treg活化标记物的表达和/或免疫抑制性细胞因子产生。

[0191] 可以通过从Treg培养物中去除刺激剂来启动静息步骤。可以例如通过洗涤步骤和/或离心步骤来去除刺激剂。如本文所证明,例如在刺激2天(约48小时)、或3天(约72小时)、或4天(约96小时)或更长时间之后去除刺激以用于静息步骤可以产生改善的Treg生长。

[0192] 在一些方面,与刺激步骤中存在的刺激剂的浓度相比,刺激剂的浓度在静息步骤中降低至少25%。在一些方面,与刺激步骤中存在的刺激剂的浓度相比,刺激剂的浓度在静息步骤中降低至少50%。在一些方面,与刺激步骤中存在的刺激剂的浓度相比,刺激剂的浓度在静息步骤中降低至少60%。在一些方面,与刺激步骤中存在的刺激剂的浓度相比,刺激剂的浓度在静息步骤中降低至少70%。在一些方面,与刺激步骤中存在的刺激剂的浓度相比,刺激剂的浓度在静息步骤中降低至少80%。在一些方面,与刺激步骤中存在的刺激剂的浓度相比,刺激剂的浓度在静息步骤中降低至少90%。在一些方面,与刺激步骤中存在的刺激剂的浓度相比,刺激剂的浓度在静息步骤中降低至少91%。在一些方面,与刺激步骤中存在的刺激剂的浓度相比,刺激剂的浓度在静息步骤中降低至少92%。在一些方面,与刺激步骤中存在的刺激剂的浓度相比,刺激剂的浓度在静息步骤中降低至少93%。在一些方面,与刺激步骤中存在的刺激剂的浓度相比,刺激剂的浓度在静息步骤中降低至少94%。在一些方面,与刺激步骤中存在的刺激剂的浓度相比,刺激剂的浓度在静息步骤中降低至少95%。

在一些方面,与刺激步骤中存在的刺激剂的浓度相比,刺激剂的浓度在静息步骤中降低至少96%。在一些方面,与刺激步骤中存在的刺激剂的浓度相比,刺激剂的浓度在静息步骤中降低至少97%。在一些方面,与刺激步骤中存在的刺激剂的浓度相比,刺激剂的浓度在静息步骤中降低至少98%。在一些方面,与刺激步骤中存在的刺激剂的浓度相比,刺激剂的浓度在静息步骤中降低至少99%。在一些方面,在静息步骤中不存在刺激剂,即,在没有任何刺激剂的情况下培养Treg。本文提供的一些方法从静息步骤开始。静息步骤也可以发生在刺激步骤之后和/或可以在刺激步骤之前。在一些方面,静息步骤发生在两个刺激步骤之间。

[0193] 在一些方面,本文提供的方法包括至少一个静息步骤。在一些方面,本文提供的方法包括至少两个静息步骤。

[0194] 在一些方面,静息步骤为至少1天(约24小时)。

[0195] 在一些方面,静息步骤为至少2天(约48小时)。

[0196] 在一些方面,静息步骤为约3天(约72小时)。

[0197] 在一些方面,静息步骤为约4天(约96小时)。

[0198] 在一些方面,静息步骤为约5天(约120小时)。

[0199] 在一些方面,静息步骤为约1天(约24小时)至约5天(约120小时)。在一些方面,静息步骤为约1天(约24小时)至约4天(约96小时)。在一些方面,静息步骤为约1天(约24小时)至约3天(约72小时)。在一些方面,静息步骤为约2天(约48小时)至约4天(约96小时)。在一些方面,静息步骤为约2天(约48小时)至约5天(约120小时)。在一些方面,静息步骤为约3天(约72小时)至约4天(约96小时)。

[0200] 在一些方面,本文提供的方法包括在对Treg进行基因工程化之前的至少一个静息步骤。如本文所用,“在基因工程化之前”的静息步骤不要求静息步骤在即将基因工程化之前发生。因此,包括刺激步骤、然后是静息步骤、然后是刺激步骤、然后是基因工程化的方法是在基因工程化之前包括静息步骤的方法。

[0201] 在一些方面,本文提供的方法包括在对Treg进行基因工程化之后的至少一个静息步骤。

[0202] 在一些方面,本文提供的方法包括在对Treg进行基因工程化之后的静息步骤。在一些方面,对Treg进行基因工程化,然后在基因工程化与静息步骤之间没有刺激步骤的情况下静息。

[0203] 在一些方面,本文提供的方法包括(i)在对Treg进行基因工程化之前的至少一个静息步骤以及(ii)在对Treg进行基因工程化之后(例如,在再次刺激Treg之前)的至少一个静息步骤。

[0204] Treg的扩增

[0205] 如本文所提供,扩增Treg的方法可以包括刺激Treg和静息Treg或“不连续刺激”的交替周期。因此,在一些方面,本文提供的方法包括至少一个刺激步骤和至少一个静息步骤。在一些方面,本文提供的方法包括被静息步骤分开的至少两个刺激步骤。在一些方面,本文提供的方法包括至少三个刺激步骤,每个被静息步骤分开。在一些方面,可以例如在静息步骤期间对Treg进行基因工程化(如本文别处所讨论)(即,可以在不存在刺激剂的情况下对Treg进行基因工程化)。在一些方面,本文提供的方法不包括基因工程化。

[0206] 在一些方面,本文提供的方法包括第一刺激步骤,之后是第一静息步骤,之后是第

二刺激步骤,之后是第二静息步骤。在一些方面,在第二静息步骤后收获Treg。

[0207] 在一些方面,本文提供的方法包括第一刺激步骤,之后是第一静息步骤,之后是第二刺激步骤,之后是第二静息步骤,之后是第三刺激步骤,之后是第三静息步骤。在一些方面,在第三静息步骤后收获Treg。

[0208] 在一些方面,本文提供的方法包括第一刺激步骤,之后是第一静息步骤,之后是第二刺激步骤,之后是第二静息步骤,在此期间对Treg进行基因工程化,之后是第三刺激步骤,之后是第三静息步骤。在一些方面,在第三静息步骤后收获Treg。

[0209] 本文描述了刺激步骤和静息步骤的时间的非限制性示例。在一个非限制性方面,第一刺激步骤可以为约2天(约48小时)至约5天(约120小时)(例如,约3天(约72小时));第一静息步骤可以为约2天(约48小时)至约5天(约120小时)(例如,约3天(约72小时));第二刺激步骤可以为约2天(约48小时)至约5天(约120小时)(例如,约2天(约48小时));第二静息步骤可以为约2天(约48小时)至约5天(约120小时)(例如,约3天(约72小时));第三刺激步骤可以为约2天(约48小时)至约5天(约72小时)(例如,约2天(约48小时));并且第三静息步骤可以为约2天(约48小时)至约5天(约120小时)(例如,约2天(约48小时))。静息和刺激步骤的时间段的非限制性示例在表A中提供。

[0210] 表A:用于静息和刺激步骤的示例性时间段

	第一刺激 步骤(天)	第一静息 步骤(天)	第二刺激 步骤(天)	第二静息 步骤(天)	任选的第三 刺激步 骤(天)	任选的第三 静息步 骤(天)
	1-5	1-5	1-5	1-5	1-5	1-5
	1-5	1-4	1-5	1-4	1-5	1-4
	1-5	1-3	1-5	1-3	1-5	1-3
	1-5	2-5	1-5	2-5	1-5	2-5
	1-5	2-4	1-5	2-4	1-5	2-4
	1-5	2-3	1-5	2-3	1-5	2-3
	1-4	1-5	1-4	1-5	1-4	1-5
	1-4	1-4	1-4	1-4	1-4	1-4
	1-4	1-3	1-4	1-3	1-4	1-3
	1-4	2-5	1-4	2-5	1-4	2-5
	1-4	2-4	1-4	2-4	1-4	2-4
	1-4	2-3	1-4	2-3	1-4	2-3
[0211]	1-3	1-5	1-3	1-5	1-3	1-5
	1-3	1-4	1-3	1-4	1-3	1-4
	1-3	1-3	1-3	1-3	1-3	1-3
	1-3	2-5	1-3	2-5	1-3	2-5
	1-3	2-4	1-3	2-4	1-3	2-4
	1-3	2-3	1-3	2-3	1-3	2-3
	2-5	1-5	2-5	1-5	2-5	1-5
	2-5	1-4	2-5	1-4	2-5	1-4
	2-5	1-3	2-5	1-3	2-5	1-3
	2-5	2-5	2-5	2-5	2-5	2-5
	2-5	2-4	2-5	2-4	2-5	2-4
	2-5	2-3	2-5	2-3	2-5	2-3
	2-4	1-5	2-4	1-5	2-4	1-5
	2-4	1-4	2-4	1-4	2-4	1-4
	2-4	1-3	2-4	1-3	2-4	1-3
	2-4	2-5	2-4	2-5	2-4	2-5
	2-4	2-4	2-4	2-4	2-4	2-4
	2-4	2-3	2-4	2-3	2-4	2-3
[0212]	2-3	1-5	2-3	1-5	2-3	1-5
	2-3	1-4	2-3	1-4	2-3	1-4
	2-3	1-3	2-3	1-3	2-3	1-3
	2-3	2-5	2-3	2-5	2-3	2-5
	2-3	2-4	2-3	2-4	2-3	2-4
	2-3	2-3	2-3	2-3	2-3	2-3

[0213] 在一些方面,对Treg进行冷冻保存。

[0214] 如本文所提供,可以在适于Treg的培养基中培养Treg。示例性T细胞培养基可以包含例如(i)补充有10%人灭活血清的X-VIVO 15T细胞扩增培养基(Lonza,目录号04-418Q), (ii)补充有5mM HEPES、2mM L-葡糖胺、50mg/ml青霉素、50mg/ml链霉素、5mM非必需氨基酸、5mM丙酮酸钠和10%FBS的RPMI 1640培养基,或者(iii)10%热灭活胎牛血清(Biosource International)、非必需氨基酸、0.5mM丙酮酸钠、5mM Hepes、1mM glutaMax I和55 μ M β -巯基乙醇的DMEM基料。

[0215] Treg培养基还可以包含细胞因子,诸如白介素,诸如白介素-2(IL-2)、白介素-15(IL-15)和/或白介素-7(IL-7)。

[0216] 术语“IL-2”(或“IL2”)是指称为白介素-2的细胞因子和T细胞生长因子,并且包括IL-2的所有形式,包括人和哺乳动物形式、具有保守氨基酸取代的形式、糖型、生物仿制药及其变体。IL-2描述于例如Nelson, J. Immunol. 2004, 172, 3983-88和Malek, Annu. Rev. Immunol. 2008, 26, 453-79, 它们的公开内容以引用方式整体并入本文。术语IL-2涵盖IL-2的人重组形式,诸如阿地白介素(PROLEUKIN, 可从多个供应商以每单次使用小瓶2200万IU商购获得), 以及重组IL-2的形式(CellGenix, Inc., Portsmouth, N.H., USA (CELLGRO GMP)或ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, N.J., USA(目录号CYT-209-b)商业供应)和来自其他供应商的其他商业等效物。阿地白介素(脱丙氨酰-1, 丝氨酸-125人IL-2)是一种分子量为大约15kDa的非糖基化人重组形式的IL-2。术语IL-2还涵盖IL-2的聚乙二醇化形式, 包括可从Nektar Therapeutics, South San Francisco, Calif., USA获得的聚乙二醇化IL-2前药NKTR-214。适用于本发明的NKTR-214和聚乙二醇化IL-2描述于美国专利申请公布号US2014/0328791 A1和国际专利申请公布号WO 2012/065086 A1, 它们的公开内容以引用方式整体并入本文。适用于本发明的缀合IL-2的替代形式描述于美国专利号4,766,106、5,206,344、5,089,261和4,902,502, 它们的公开内容以引用方式整体并入本文。适用于本发明的IL-2的制剂描述于美国专利号6,706,289, 其公开内容以引用方式整体并入本文。人IL2基因由NCBI Gene ID 3558鉴定。人IL2基因的示例性核苷酸序列是NCBI参考序列:NG_016779.1。

[0217] 适用于本文的重组人IL-2的氨基酸序列是:

[0218] MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLT FKFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI SNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT (SEQ ID NO:3)。

[0219] 阿地白介素(脱丙氨酰-1, 丝氨酸-125人IL-2)是一种分子量为大约15kDa的非糖基化人重组形式的IL-2。适用于本文提供的方法的阿地白介素的氨基酸序列是:

[0220] PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFK FYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNI NVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT (SEQ ID NO:4)。

[0221] 据报道,白介素-2(IL-2)是免疫系统的一种类型的细胞因子信号传导分子,并且它是调控负责免疫性的白细胞(白血球,通常是淋巴细胞)的活性的15.5-16kDa蛋白质。IL-2被理解为是机体对微生物感染的自然反应的一部分,并通过结合淋巴细胞表达的IL-2受体来介导其作用。IL-2的主要来源是活化的CD4+T细胞和活化的CD8+T细胞。

[0222] IL-2被认为主要经由其对T细胞的直接作用而在免疫系统的关键功能、耐受性和

免疫性中具有重要作用。在T细胞成熟的胸腺中,它通过促进某些未成熟T细胞分化成调节性T细胞来预防自身免疫性疾病,所述调节性T细胞会抑制其他准备攻击体内正常健康细胞的T细胞。IL-2增强活化诱导的细胞死亡(AICD)。当初始T细胞也被抗原刺激时,IL-2也促进T细胞分化成效应T细胞和记忆T细胞,从而帮助机体抵抗感染。IL-2与其他极化细胞因子一起刺激原始CD4+T细胞分化成Th1和Th2淋巴细胞,同时阻止分化成Th17和滤泡Th淋巴细胞。它的表达和分泌受到严格调控,并在启动和抑制免疫应答中作为瞬时正反馈回路和负反馈回路的一部分起作用。通过其在T细胞免疫记忆发展中的作用(依赖于抗原选择的T细胞克隆的数量和功能的扩展),其在持续的细胞介导的免疫性中发挥作用。

[0223] 在一些方面,在存在白介素(例如,IL-2)的情况下培养Treg。白介素(例如,IL-2)可以是重组白介素(例如,IL-2)。在一些方面,白介素(例如,IL-2)的浓度为至少400单位/mL。在一些方面,白介素(例如,IL-2)的浓度为至少500单位/mL。在一些方面,白介素(例如,IL-2)的浓度为至少550单位/mL。在一些方面,白介素(例如,IL-2)的浓度为至少600单位/mL。

[0224] 在一些方面,白介素(例如,IL-2)的浓度小于或等于1,000单位/mL。在一些方面,白介素(例如,IL-2)的浓度小于或等于900单位/mL。在一些方面,白介素(例如,IL-2)的浓度小于或等于800单位/mL。

[0225] 在一些方面,白介素(例如,IL-2)的浓度为约200单位/mL至约2,500单位/mL。在一些方面,白介素(例如,IL-2)的浓度为约500单位/mL至约1,000单位/mL。在一些方面,白介素(例如,IL-2)的浓度为约500单位/mL至约900单位/mL。在一些方面,白介素(例如,IL-2)的浓度为约500单位/mL至约800单位/mL。在一些方面,白介素(例如,IL-2)的浓度为约550单位/mL至约900单位/mL。在一些方面,白介素(例如,IL-2)的浓度为约550单位/mL至约800单位/mL。在一些方面,白介素(例如,IL-2)的浓度为约600单位/mL至约1,000单位/mL。在一些方面,白介素(例如,IL-2)的浓度为约600单位/mL至约900单位/mL。在一些方面,白介素(例如,IL-2)的浓度为约600单位/mL至约800单位/mL。

[0226] 可以在本文提供的方法期间改变白介素(例如,IL-2)的浓度。例如,可以降低白介素(例如,IL-2)的浓度。在一些方面,白介素(例如,IL-2)以约800单位/mL的浓度存在,然后降低至约300单位/mL的浓度。在一些方面,白介素(例如,IL-2)以约800单位/mL的浓度存在约7天(约168小时),然后以约300单位/mL存在。

[0227] 术语“IL-7”(在本文中也称为“IL7”)是一种由骨髓和胸腺中的基质细胞分泌的细胞因子。它也由角化细胞、树突细胞、肝细胞、神经元和上皮细胞产生,但不由正常淋巴细胞产生。IL-7刺激多能(多能性)造血干细胞分化成淋巴祖细胞(与由IL-3刺激分化的骨髓祖细胞不同)。据报道,IL-7会刺激淋巴谱系中所有细胞(B细胞、T细胞和NK细胞)的增殖。据信其对于B细胞成熟的某些阶段期间的增殖、T和NK细胞存活、发育和体内平衡很重要。人IL7基因的示例性核苷酸序列是NCBI参考序列:AH006906.2。适用于本文提供的方法的重组人IL-7的氨基酸序列是:

[0228] MDCDIEGKDGKQYESVLMVSIQQLLDMSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTIILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKQLNDLCLFLKRLLEIKTCWNKILMGTKEH(SEQ ID NO:5)。

[0229] 如本文提供的方法中所用,IL-7的浓度可以为约10U/ml至约7,000U/ml。在一些方面,IL-7的浓度可以为约5ng/ml至约3,500ng/ml。

[0230] 术语“IL-15”(在本文中也称为“IL15”)是指称为白介素-15的细胞因子和T细胞生长因子,并且如本发明中所用,包括IL-15的所有形式,包括人和其他哺乳动物形式、具有保守氨基酸取代的形式、糖型、生物仿制药及其变体。IL-15描述于例如Steel JC,Waldmann TA,Morris JC(2012年1月)“Interleukin-15biology and its therapeutic implications in cancer,”Trends in Pharmacological Sciences,33(1):35-41以及Waldmann TA,Tagaya Y(1999)“The multifaceted regulation of interleukin-15expression and the role of this cytokine in NK cell differentiation and host response to intracellular pathogens,”Annual Review of Immunology,17:19-49,它们的公开内容以引用方式整体并入本文。术语IL-15还涵盖IL-15的重组形式。如本文所用,术语IL-15还涵盖IL-15的聚乙二醇化形式。人IL15基因由NCBI Gene ID 3600鉴定。人IL15基因的示例性核苷酸序列是NCBI参考序列:NG_029605.2。适用于本文提供的方法的重组人IL-15的氨基酸序列是:

[0231] MNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGDASIHTVENLII
LANNLSNNGNVTESGCKECELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

[0232] (SEQ ID NO:6)。

[0233] IL-15可以以大于0.5ng/ml的浓度用于本文提供的方法中。在一些方面,所用的IL-15的浓度大于1ng/ml。在一些方面,所用的IL-15的浓度大于2ng/ml。在一些方面,所用的IL-15的浓度大于10ng/ml。在一些方面,所用的IL-15的浓度大于50ng/ml。在一些方面,所用的IL-15的浓度大于75ng/ml。在一些方面,所用的IL-15的浓度大于100ng/ml。在一些方面,所用的IL-15的浓度大于150ng/ml。在一些方面,所用的IL-15的浓度大于200ng/ml。在一些方面,所用的IL-15的浓度小于10,000ng/ml,任选地小于9000、8000、7000、6000、5000、4000、3000、2000或1000ng/ml。在一些方面,所用的IL-15的浓度为约300ng/ml。在一些方面,所用的IL-15的浓度为约1000ng/ml。在一些方面,所用的IL-15的浓度大于1000ng/ml。在一些方面,IL-15的浓度大于100ng/ml。在一些方面,IL-15的浓度为约100ng/ml至约1000ng/ml。在一些方面,IL-15的浓度为约300ng/ml。

[0234] IL-15可以以大于1U/ml的浓度用于所提供的方法中。在一些方面,所用的IL-15的浓度大于2U/ml。在一些方面,所用的IL-15的浓度大于4U/ml。在一些方面,所用的IL-15的浓度大于20U/ml。在一些方面,所用的IL-15的浓度大于200U/ml。在一些方面,所用的IL-15的浓度小于20,000U/ml,任选地小于18,000、16,000、14,000、12,000、10,000、8000、6000、4000或2000ng/ml。在一些方面,所用的IL-15的浓度为约600U/ml。在一些方面,所用的IL-15的浓度为约2000U/ml。在一些方面,所用的IL-15的浓度大于2000U/ml。在一些方面,IL-15的浓度大于200U/ml。在一些方面,IL-15的浓度为200U/ml至约2000U/ml。在一些方面,IL-15的浓度为约600U/ml。

[0235] 在一些方面,在存在N-乙酰基-L-半胱氨酸(NAC)的情况下培养Treg。在一些方面,NAC以约5mM的浓度存在于培养物中。在一些方面,NAC以约8.2mg/ml的浓度存在于培养物中。

[0236] 在一些方面,以约12.5万个细胞/ml的浓度培养Treg。在一些方面,以约25万个细

胞/ml的浓度培养Treg。在一些方面,以约50万个细胞/ml的浓度培养Treg。

[0237] 在一些方面,以约12.5万个细胞/ml至约500万个细胞/ml的浓度培养Treg。在一些方面,以约25万个细胞/ml至约500万个细胞/ml的浓度培养Treg。在一些方面,以约50万个细胞/ml至约500万个细胞/ml的浓度培养Treg。

[0238] 在一些方面,以约12.5万个细胞/ml至约300万个细胞/ml的浓度培养Treg。在一些方面,以约25万个细胞/ml至约300万个细胞/ml的浓度培养Treg。在一些方面,以约50万个细胞/ml至约300万个细胞/ml的浓度培养Treg。

[0239] 在一些方面,以约12.5万个细胞/ml至约250万个细胞/ml的浓度培养Treg。在一些方面,以约25万个细胞/ml至约250万个细胞/ml的浓度培养Treg。在一些方面,以约50万个细胞/ml至约250万个细胞/ml的浓度培养Treg。

[0240] 在一些方面,以约12.5万个细胞/ml至约200万个细胞/ml的浓度培养Treg。在一些方面,以约25万个细胞/ml至约200万个细胞/ml的浓度培养Treg。在一些方面,以约50万个细胞/ml至约200万个细胞/ml的浓度培养Treg。

[0241] 在一些方面,以约12.5万个细胞/ml至约150万个细胞/ml的浓度培养Treg。在一些方面,以约25万个细胞/ml至约150万个细胞/ml的浓度培养Treg。在一些方面,以约50万个细胞/ml至约150万个细胞/ml的浓度培养Treg。

[0242] 在一些方面,以约12.5万个细胞/ml至约100万个细胞/ml的浓度培养Treg。在一些方面,以约25万个细胞/ml至约100万个细胞/ml的浓度培养Treg。在一些方面,以约50万个细胞/ml至约100万个细胞/ml的浓度培养Treg。

[0243] 在一些方面,以不超过500万个细胞/ml的浓度培养Treg。在一些方面,以不超过300万个细胞/ml的浓度培养Treg。在一些方面,以不超过250万个细胞/ml的浓度培养Treg。在一些方面,以不超过200万个细胞/ml的浓度培养Treg。在一些方面,以不超过150万个细胞/ml的浓度培养Treg。在一些方面,以不超过100万个细胞/ml的浓度培养Treg。

[0244] 在一些方面,在适于T细胞生长的温度(例如,至少25摄氏度、至少30摄氏度或约37摄氏度)下培养Treg。

[0245] 在一些方面,所述方法包括使用雷帕霉素,其可以限制效应T细胞(Teff)的生长。可以在例如培养的第一周使用雷帕霉素。在一些方面,可以在培养的前两周使用雷帕霉素。在一些方面,所述方法不包括使用雷帕霉素。在一些方面,所述方法不包括在基因工程化之前使用雷帕霉素。在一些方面,所述方法不包括在培养的前两周使用雷帕霉素。在一些方面,所述方法不包括使用雷帕霉素。在培养的第一周。

[0246] 在一些方面,本文提供的方法包括使用超磁珠。在一些方面,所述方法不包括使用超磁珠。在一些方面,所述方法不包括使用珠。

[0247] 在一些方面,本文提供的方法包括使用人工抗原呈递细胞。在一些方面,本文提供的方法不包括使用人工抗原呈递细胞。

[0248] 在一些方面,本文提供的扩增Treg的方法包括:(a)在存在刺激剂(例如,特异性结合CD3、CD28和CD2的四聚抗体复合物,任选地浓度为10 μ l/ml)的情况下培养Treg约3天(约72小时)(例如,第0天至第3天);以及(b)任选地通过洗涤去除刺激剂(例如,特异性结合CD3、CD28和CD2的四聚抗体复合物);任选地以50万个细胞/ml将细胞重新铺板;以及在不存在刺激剂的情况下培养细胞约3天(约72小时)(例如,第3天至第6天),其中所述方法导致

Treg扩增到至少40倍、至少50倍、至少60倍、至少70倍或约80倍。

[0249] 在一些方面,本文提供的扩增Treg的方法包括:

[0250] (a) 在存在刺激剂(例如,特异性结合CD3、CD28和CD2的四聚抗体复合物,任选地浓度为10 μ l/ml)的情况下培养Treg约3天(约72小时)(例如,第0天至第3天);

[0251] (b) 任选地通过洗涤去除刺激剂(例如,特异性结合CD3、CD28和CD2的四聚抗体复合物);任选地以50万个细胞/ml将细胞重新铺板;以及在不存在刺激剂的情况下培养细胞约3天(约72小时)(例如,第3天至第6天);

[0252] (c) 在存在刺激剂(例如,特异性结合CD3、CD28和CD2的四聚抗体复合物,任选地浓度为10 μ l/ml)的情况下培养Treg约2天(约48小时)(例如,第6天至第8天);将细胞的浓度调节至50万个细胞/ml;

[0253] (d) 任选地通过洗涤去除刺激剂(例如,特异性结合CD3、CD28和CD2的四聚抗体复合物);对Treg进行基因工程化;以及在不存在刺激剂的情况下培养细胞约3天(约72小时)(例如,第8天至第11天);

[0254] (e) 在存在刺激剂(例如,特异性结合CD3、CD28和CD2的四聚抗体复合物,任选地浓度为10 μ l/ml)的情况下培养Treg约2天(约48小时)(例如,第11天至第13天);

[0255] (f) 任选地通过洗涤去除刺激剂(例如,特异性结合CD3、CD28和CD2的四聚抗体复合物);任选地以50万个细胞/ml将细胞重新铺板;以及在不存在刺激剂的情况下培养细胞约2天(约48小时)(例如,第13天至第15天);以及

[0256] (g) 收获细胞。

[0257] 包括步骤(a) - (g)的这种可以包括在存在IL-2(任选地浓度为400IU/ml)和/或NAC(任选地浓度为8.2mg/ml)的情况下培养Treg。在一些方面,在第2-9、11、13和14天将IL-2的浓度调节至400IU/ml。

[0258] 包括步骤(a) - (g)的这种可以包括多次分离细胞,例如在第4、5、7、11、13和14天。

[0259] 在一些方面,Treg到步骤(b)结束时(例如,到第6天)已扩增到至少60倍或至少70倍,到步骤(b)结束时(例如,到第6天)已扩增到80倍。

[0260] 在一些方面,Treg到步骤(b)结束时(例如,到第6天)已扩增到约80倍。

[0261] 在一些方面,步骤(c)还包括将Treg转移到T25烧瓶。

[0262] 使用本文提供的扩增方法,Treg群体中Treg的数量可以扩增到至少500倍、至少1000倍、至少1500倍、至少2000倍、至少2500倍、至少3000倍、至少3500倍或至少4000倍。

[0263] 在一些方面,Treg的数量在10天内扩增到至少500倍。

[0264] 在一些方面,Treg的数量在20天内扩增到至少1000倍。在一些方面,Treg的数量在19天内扩增到至少1000倍。在一些方面,Treg的数量在18天内扩增到至少1000倍。在一些方面,Treg的数量在17天内扩增到至少1000倍。在一些方面,Treg的数量在16天内扩增到至少1000倍。在一些方面,Treg的数量在15天内扩增到至少1000倍。在一些方面,Treg的数量在14天内扩增到至少1000倍。在一些方面,Treg的数量在13天内扩增到至少1000倍。在一些方面,Treg的数量在12天内扩增到至少1000倍。在一些方面,Treg的数量在11天内扩增到至少1000倍。

[0265] 在一些方面,Treg的数量在20天内扩增到至少2500倍。在一些方面,Treg的数量在

20天内扩增到至少3000倍。在一些方面，Treg的数量在20天内扩增到至少3500倍。在一些方面，Treg的数量在20天内扩增到至少4000倍。

[0266] 根据本文提供的方法产生的Treg具有改善的特性，例如因为本文提供的方法防止Treg群体的过度刺激和/或防止活化诱导的细胞死亡。例如，在一些方面，例如，与在存在刺激剂的情况下培养6天(约144小时)的Treg相比，根据本文提供的方法产生的Treg具有更小的表面积。在一些方面，根据本文提供的方法产生的Treg具有小于在存在刺激剂的情况下培养6天(约144小时)的Treg的表面积的0.9倍、0.85倍、0.8倍或0.75倍的表面积。在一些方面，例如，与在存在刺激剂的情况下培养6天(约144小时)的Treg相比，根据本文提供的方法产生的Treg具有增加比例的Helios+Foxp3+Treg。在一些方面，例如，与在存在刺激剂的情况下培养6天(约144小时)的Treg相比，根据本文提供的方法产生的Treg具有增加的倍数扩增。在一些方面，根据本文提供的方法产生的Treg具有是在存在刺激剂的情况下培养6天(约144小时)的Treg的倍数扩增的至少1.5倍或至少2倍的倍数扩增。在一些方面，例如，与在存在刺激剂的情况下培养6天(约144小时)的Treg相比，根据本文提供的方法产生的Treg具有增加的抑制效应T细胞(Teff)增殖的能力。在一些方面，例如，与在存在刺激剂的情况下培养6天(约144小时)的Treg相比，根据本文提供的方法产生的Treg具有至少6倍、至少7倍、至少8倍、至少9倍或至少10倍增加的抑制Teff增殖的能力。

[0267] 在一些方面，与扩增前的Treg群体相比，根据本文提供的方法扩增的Treg维持至少60%、至少70%、至少80%或至少90%的Helios表达。

[0268] 在一些方面，根据本文提供的方法产生的Treg在基因工程化后继续扩增。在一些方面，根据本文提供的方法产生的Treg在基因工程化后(例如，在基因工程化后3天(约72小时)内或4天(约96小时)内)扩增到至少1.5倍。在一些方面，根据本文提供的方法产生的Treg在基因工程化后(例如，在基因工程化后3天(约72小时)内或4天(约96小时)内)扩增到至少2倍。在一些方面，根据本文提供的方法产生的Treg在基因工程化后(例如，在基因工程化后3天(约72小时)内或4天(约96小时)内)扩增到至少3倍。

[0269] 在一些方面，本文提供的方法包括收获扩增的(和任选地基因工程化的)Treg群体。在一些方面，收获紧接在刺激步骤之后。在一些方面，收获紧接在静息步骤之后。

[0270] 在一些方面，刺激步骤发生在基因工程化之后和收获之前。在一些方面，静息步骤发生在基因工程化之后和收获之前。在一些方面，刺激步骤和静息步骤都发生在基因工程化之后和收获之前。

[0271] 在一些方面，本文提供的方法包括冷冻保存扩增的(和任选地基因工程化的)Treg群体。在一些方面，冷冻保存紧接在刺激步骤之后。在一些方面，冷冻保存紧接在静息步骤之后。

[0272] Treg的基因工程化

[0273] 在本文提供的方法的一些方面，对Treg进行基因工程化。基因工程化可以包括例如将核酸或基因调控系统引入Treg或Treg群体中。可以使用本领域已知的方法(包括例如通过电穿孔和/或核糖核蛋白(RNP)介导的方法)引入核酸或基因调控系统。

[0274] 可以经由基因工程化引入Treg中的核酸可以是病毒核酸或非病毒核酸。

[0275] 引入Treg或Treg群体中的核酸可以是编码蛋白质的核酸。蛋白质可以是对Treg异源的蛋白质。例如，蛋白质可以是工程化抗原受体，诸如嵌合抗原受体(CAR)或工程化TCR。

[0276] 在一些方面,工程化抗原受体是包含细胞外抗原结合结构域的CAR,该细胞外抗原结合结构域经由铰链和跨膜结构域融合到包含信号传导结构域的细胞质结构域。在一些方面,CAR的细胞外结构域包含衍生自抗体的抗原结合片段。可用于本公开的抗原结合结构域包括例如scFv。在一些方面,CAR的细胞内信号传导结构域可以衍生自TCR复合物 ζ 链(诸如CD3 ξ 信号传导结构域)、Fc γ RIII、Fc ϵ RI或T淋巴细胞活化结构域。在一些方面,CAR的细胞内信号传导结构域还包含共刺激结构域,例如4-1BB、CD28、CD40、MyD88或CD70结构域。在一些方面,CAR的细胞内信号传导结构域包含两个共刺激结构域,例如4-1BB、CD28、CD40、MyD88或CD70结构域中的任两个。示例性CAR结构和细胞内信号传导结构域是本领域已知的(参见例如WO 2009/091826、US20130287748、WO 2015/142675、WO 2014/055657和WO 2015/090229,它们以引用方式并入本文)。

[0277] 对与自身免疫性疾病(例如,GVHD、结肠炎和多发性硬化症)相关的抗原特异的CAR在例如以下文献中讨论:Zhang等人,Frontiers in Immunology 9:1-8(2018);国际公布号WO2017218850A1;以及MacDonald等人,JCI 2016;126(4):1413-1424,它们中的每一者以引用方式整体并入本文。

[0278] 在一些方面,工程化抗原受体是工程化TCR。工程化TCR包含已从识别特定靶抗原的T细胞群体中分离并克隆的TCR α 和/或TCR β 链。工程化TCR通过与其内源对应物相同的机制识别抗原(例如,通过识别它们在靶细胞的表面上表达的主要组织相容性复合物(MHC)蛋白的背景下呈递的同源抗原)。这种抗原接合刺激内源信号转导途径,从而导致TCR工程化细胞的活化和增殖。

[0279] 本文中,术语“基因调控系统”是指当引入细胞中时能够修饰内源靶DNA序列从而调控编码的基因产物的表达或功能的蛋白质、核酸或其组合。适用于本公开的方法的多种基因编辑系统是本领域已知的,包括但不限于shRNA、siRNA、锌指核酸酶系统、TALEN系统和CRISPR/Cas系统。可用于本文的方法的基因调控系统例如在WO 2020/160489中提供,该文献以引入方式整体并入本文。

[0280] 如本文所用,“调控”在提及基因调控系统对内源靶基因的作用时涵盖内源靶基因序列的任何变化,内源靶基因的表现遗传状态的任何变化,和/或由内源靶基因编码的蛋白质的表达或功能的任何变化。

[0281] 在一些方面,基因调控系统可以例如通过将一个或多个突变引入内源靶序列中(诸如通过在内源靶序列中插入或缺失一个或多个核酸)来介导内源靶基因序列的改变。可以介导内源靶序列的改变的示例性机制包括但不限于非同源末端连接(NHEJ)(例如,经典或替代)、微同源性介导的末端连接(MMEJ)、同源性定向修复(例如,内源供体模板介导的)、SDSA(合成依赖性链退火)、单链退火或单链入侵。

[0282] 在一些方面,基因调控系统可以介导内源靶序列的表现遗传状态的改变。例如,在一些方面,基因调控系统可以介导内源靶基因DNA的共价修饰(例如,胞嘧啶甲基化和羟甲基化)或相关组蛋白的共价修饰(例如,赖氨酸乙酰化、赖氨酸和精氨酸甲基化、丝氨酸和苏氨酸磷酸化以及赖氨酸泛素化和苏素化)。

[0283] 在一些方面,基因调控系统可以介导由内源靶基因编码的蛋白质的表达的变化。在这些方面,基因调控系统可以通过修饰内源靶DNA序列或通过作用于由DNA序列编码的mRNA产物来调控所编码的蛋白质的表达。在一些方面,基因调控系统可以导致修饰的内源

蛋白的表达。在这些方面,对由基因调控系统介导的内源DNA序列的修饰导致内源蛋白的表达,与非基因工程化Treg中的对应内源蛋白相比,该内源蛋白表现出降低的功能。在这些方面,修饰的内源蛋白的表达水平可以增加、降低,可以与非基因工程化Treg中的对应内源蛋白的表达水平相同或基本相似。

[0284] 可以经由基因工程化引入Treg中的基因调控系统可以包含(i)核酸分子;(ii)酶蛋白;或者(iii)核酸分子和酶蛋白。这种基因调控系统可以包含选自siRNA、shRNA、微小RNA(miR)、antagomiR或反义RNA的核酸分子。这种基因调控系统可以包含已被工程化以特异性结合Treg中的一个或多个基因中的靶序列的酶蛋白。酶蛋白可以是例如转录激活物样效应物核酸酶(TALEN)、锌指核酸酶或大范围核酸酶。这种基因调控系统可以包含核酸分子和酶蛋白,其中核酸分子是指导RNA(gRNA)分子,并且酶蛋白是Cas蛋白或Cas直向同源物。Cas蛋白可以是Cas9蛋白。

[0285] 基于核酸的基因调控系统

[0286] 如本文所用,基于核酸的基因调控系统是包含一种或多种能够调控内源靶基因的表达而无需外源蛋白的核酸分子的系统。在一些方面,基于核酸的基因调控系统包含与靶核酸序列互补的RNA干扰分子或反义RNA分子。

[0287] “反义RNA分子”是指与mRNA转录物互补的RNA分子,无论长度如何。反义RNA分子是指可以引入细胞、组织或受试者中并通过不依赖于内源基因沉默途径而是依赖于RNaseH介导的靶mRNA转录物的降解的机制导致内源靶基因产物的表达降低的单链RNA分子。在一些方面,反义核酸包含修饰的主链,例如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯或本领域已知的其他主链,或者可包含非天然核苷间键。在一些方面,反义核酸可以包含锁核酸(LNA)。

[0288] 如本文所用的“RNA干扰分子”是指通过内源基因沉默途径(例如,Dicer和RNA诱导的沉默复合物(RISC))降解靶mRNA来介导内源靶基因产物的降低的表达的RNA多核苷酸。示例性RNA干扰剂包括微小RNA(在本文中也称为“miRNA”)、短发夹RNA(shRNA)、小干扰RNA(siRNA)、RNA适体和吗啉代。

[0289] 在一些方面,基于核酸的基因调控系统包含一种或多种miRNA。miRNA是指长度为约21-25个核苷酸的天然存在的小非编码RNA分子。miRNA与一种或多种靶mRNA分子至少部分地互补。miRNA可以通过翻译抑制、mRNA切割和/或去腺苷化来下调(例如,降低)内源靶基因产物的表达。

[0290] 在一些方面,基于核酸的基因调控系统包含一种或多种shRNA。shRNA是长度为约50-70个核苷酸的单链RNA分子,其形成茎环结构并导致互补mRNA序列的降解。可以将shRNA克隆到质粒或非复制型重组病毒载体中以引入细胞内并导致shRNA编码序列整合到基因组中。因此,shRNA可以提供对内源靶基因翻译和表达的稳定且一致的抑制。

[0291] 在一些方面,基于核酸的基因调控系统包含一种或多种siRNA。是指长度通常为约21-23个核苷酸的双链RNA分子。siRNA与称为RNA诱导的沉默复合物(RISC)的多蛋白复合物缔合,在此期间,“过客”有义链被酶促切割。由于序列同源性,活化的RISC中包含的反义“指导”链然后将RISC引导到对应的mRNA,并且相同的核酸酶切割靶mRNA,从而导致特异性基因沉默。最佳地,siRNA的长度为18、19、20、21、22、23或24个核苷酸并且在其3'端具有2个碱基突出端。可以将siRNA引入单个细胞和/或培养系统并且导致靶mRNA序列的降解。siRNA和shRNA进一步描述于Fire等人,Nature,391:19,1998以及美国专利号7,732,417、8,202,846

和8,383,599。

[0292] 在一些方面,基于核酸的基因调控系统包含一种或多种吗啉代。如本文所用的“吗啉代”是指修饰的核酸寡聚体,其中标准核酸碱基与吗啉环结合并通过磷酸二酰胺键连接。类似于siRNA和shRNA,吗啉代与互补mRNA序列结合。然而,吗啉代通过空间抑制mRNA翻译和改变mRNA剪接而不是靶向互补mRNA序列进行降解而起作用。

[0293] 在一些方面,基于核酸的基因调控系统包含结合与由选自表1中所列的那些的靶基因的DNA序列编码的RNA至少90%同一的靶RNA序列的核酸分子(例如,siRNA、shRNA、RNA适体或吗啉代)。在一些方面,基于核酸的基因调控系统包含结合与由选自表1中所列的那些的靶基因的DNA序列编码的RNA至少95%、96%、97%、98%或99%同一的靶RNA序列的核酸分子(例如,siRNA、shRNA、RNA适体或吗啉代)。在一些方面,基于核酸的基因调控系统包含结合与由选自表1中所列的那些的靶基因的DNA序列编码的RNA 100%同一的靶RNA序列的核酸分子(例如,siRNA、shRNA、RNA适体或吗啉代)。

[0294] 表1:示例性内源基因

[0295]	基因符号	基因名称	人 UniProt 参考号	鼠 UniProt 参考号
	<i>PRDM1</i>	PR 结构域锌指蛋白 1	O75626	Q60636
	<i>TNFRSF4</i>	肿瘤坏死因子受体超家族成员 4	P43489	P47741
	<i>REEP3</i>	受体辅助蛋白 3	Q6NUK4	Q99KK1
	<i>MRPL32</i>	39S 核糖体蛋白 L32, 线粒体	Q9BYC8	Q9DCI9
[0296]	<i>FSCN3</i>	成束蛋白-3	Q9NQT6	Q9QXW4
	<i>KLC3</i>	驱动蛋白轻链 3	Q6P597	Q91W40
	<i>C4BPA</i>	补体组分 4 结合蛋白 α	P04003	P08607
	<i>LZTS1</i>	亮氨酸拉链推定肿瘤抑制因子 1	Q9Y250	P60853
	<i>CDK16</i>	细胞周期蛋白依赖性激酶 16	Q00536	Q04735
	<i>ADNP</i>	活性依赖性神经保护剂同源框	Q9H2P0	Q9Z103

[0297] 在一些方面,基于核酸的基因调控系统包含选自本领域已知的那些的siRNA分子或shRNA分子,诸如可从商业供应商诸如Sigma Aldrich、Dharmacon、ThermoFisher等获得的siRNA和shRNA构建体。

[0298] 在一些方面,基因调控系统包含两种或更多种核酸分子(例如,两种或更多种siRNA、两种或更多种shRNA、两种或更多种RNA适体或者两种或更多种吗啉代),其中核酸分子中的至少一种结合与由选自表1的靶基因的DNA序列编码的RNA序列至少90%同一的靶RNA序列。在一些方面,基因调控系统包含两种或更多种核酸分子(例如,两种或更多种

siRNA、两种或更多种shRNA、两种或更多种RNA适体或者两种或更多种吗啉代),其中核酸分子中的至少一种结合与由选自表1的靶基因的DNA序列编码的RNA序列至少95%、96%、97%、98%或99%同一的靶RNA序列。在一些方面,基因调控系统包含两种或更多种核酸分子(例如,两种或更多种siRNA、两种或更多种shRNA、两种或更多种RNA适体或者两种或更多种吗啉代),其中核酸分子中的至少一种结合与由选自表1的靶基因的DNA序列编码的RNA序列100%同一的靶RNA序列。

[0299] 基于蛋白质的基因调控系统

[0300] 在一些方面,基于蛋白质的基因调控系统是包含一种或多种能够以序列特异性方式调控内源靶基因的表达而无需核酸指导分子的蛋白质的系统。在一些方面,基于蛋白质的基因调控系统包含含有一个或多个锌指结合结构域和酶结构域的蛋白质。在一些方面,基于蛋白质的基因调控系统包含含有转录激活物样效应物核酸酶(TALEN)结构域和酶结构域的蛋白质。这些方面在本文中称为“TALEN”。

[0301] 1. 锌指系统

[0302] 基于锌指的系统包含含有两个蛋白结构域的融合蛋白:锌指DNA结合结构域和酶结构域。“锌指DNA结合结构域”、“锌指蛋白”或“ZFP”是通过一种或多种锌指以序列特异性方式结合DNA的蛋白质或较大蛋白质内的结构域,所述一种或多种锌指是其结构通过锌离子配位而稳定的结合结构域内的氨基酸序列区。锌指结构域通过与靶DNA序列结合,将酶结构域的活性导向序列的附近,并因此诱导靶序列附近的内源靶基因的修饰。锌指结构域可以被工程化以结合几乎任何所需的序列。因此,在鉴定含有期望切割或重组的靶DNA序列的靶遗传基因座(例如,表1中提及的靶基因中的靶基因座)后,一个或多个锌指结合结构域可以被工程化以结合靶遗传基因座中的一个或多个靶DNA序列。包含锌指结合结构域和酶结构域的融合蛋白在细胞中的表达影响靶遗传基因座的修饰。

[0303] 在一些方面,锌指结合结构域包含一个或多个锌指。Miller等人(1985)EMBO J.4:1609-1614;Rhodes(1993)Scientific American February:56-65;美国专利号6,453,242。通常,单个锌指结构域的长度为约30个氨基酸。单个锌指与三核苷酸(即,三联体)序列(或可以与相邻锌指的四核苷酸结合位点重叠一个核苷酸的四核苷酸序列)结合。因此,锌指结合结构域被工程化以结合的序列(例如,靶序列)的长度将决定工程化锌指结合结构域中锌指的数目。例如,对于其中指基序不与重叠的亚位点结合的ZFP,六核苷酸靶序列被两指结合结构域结合;九核苷酸靶序列被三指结合结构域结合,等等。靶位点中单独的锌指的结合位点(即,亚位点)不必是连续的,而是可以被一个或若干个核苷酸隔开,这取决于多指结合结构域中锌指之间的氨基酸序列(即,指间接头)的长度和性质。在一些方面,单独的ZFN的DNA结合结构域包含三至六个单独的锌指重复并且可以各自识别9至18个碱基对。

[0304] 锌指结合结构域可以被工程化以与选择的序列结合。参见例如Beerli等人(2002)Nature Biotechnol.20:135-141;Pabo等人(2001)Ann.Rev.Biochem.70:313-340;Isalan等人(2001)Nature Biotechnol.19:656-660;Segal等人(2001)Curr.Opin.Biotechnol.12:632-637;Choo等人(2000)Curr.Opin.Struct.Biol.10:411-416。与天然存在的锌指蛋白相比,工程化锌指结合结构域可以具有新颖的结合特异性。工程化方法包括但不限于合理设计和各种类型的选择。

[0305] 用于被锌指结构域结合的靶DNA序列的选择可以例如根据美国专利号6,453,242

中公开的方法来完成。本领域技术人员将清楚,核苷酸序列的简单视觉检查也可用于选择靶DNA序列。因此,用于靶DNA序列选择的任何手段均可用于本文所述的方法。靶位点通常具有至少9个核苷酸的长度,并因此被包含至少三个锌指的锌指结合结构域结合。然而,例如4指结合结构域与12核苷酸靶位点的结合,5指结合结构域与15核苷酸靶位点的结合或6指结合结构域与18核苷酸靶位点的结合也是可以的。如将显而易见的,较大的结合结构域(例如,7、8、9指和更多指)与较长的靶位点的结合也是可能的。

[0306] 在一些方面,锌指结合结构域结合与选自表1中所列的那些的靶基因的靶DNA序列至少90%同一的靶DNA序列。在一些方面,锌指结合结构域结合与选自表1中所列的那些的靶基因的靶DNA序列至少95%、96%、97%、98%或99%同一的靶DNA序列。在一些方面,锌指结合结构域结合与选自表1中所列的那些的靶基因的靶DNA序列100%同一的靶DNA序列。在一些方面,锌指系统选自本领域已知的那些,诸如可从商业供应商诸如Sigma Aldrich获得的那些。

[0307] 在一些方面,基因调控系统包含各自包含锌指结合结构域的两个或更多个ZFP融合蛋白,其中锌指结合结构域中的至少一个结合与选自表1的靶基因的靶DNA序列至少90%同一的靶DNA序列。在一些方面,基因调控系统包含各自包含锌指结合结构域的两个或更多个ZFP融合蛋白,其中锌指结合结构域中的至少一个结合与选自表1的靶基因的靶DNA序列至少95%、96%、97%、98%或99%同一的靶DNA序列。在一些方面,基因调控系统包含各自包含锌指结合结构域的两个或更多个ZFP融合蛋白,其中锌指结合结构域中的至少一个结合与选自表1的靶基因的靶DNA序列100%同一的靶DNA序列。

[0308] 锌指融合蛋白的酶结构域部分可从任何内切酶或核酸外切酶获得。可以衍生出酶结构域的示例性内切酶包括但不限于限制性内切酶和归巢内切酶。参见例如2002-2003 Catalogue, New England Biolabs, Beverly, Mass.; 以及Belfort等人(1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3379-3388。切割DNA的其他酶是已知的(例如,51核酸酶;绿豆核酸酶;胰腺DNA酶I;微球菌核酸酶;酵母H0内切酶;也参见Linn等人(编辑) *Nucleases*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993)。这些酶(或其功能片段)中的一种或多种可以用作切割结构域的来源。

[0309] 适合用作本文所述的ZFP的酶结构域的示例性限制性内切酶(限制性酶)存在于许多物种中,并且能够与DNA进行序列特异性结合(在识别位点处),并能够在结合位点处或附近切割DNA。某些限制性酶(例如,IIS型)在从识别位点去除的位点处切割DNA,并具有可分离的结合和切割结构域。例如,IIS型酶FokI在一条链上距其识别位点9个核苷酸处和在另一条链上距其识别位点13个核苷酸处催化DNA的双链切割。参见例如美国专利号5,356,802、5,436,150和5,487,994;以及Li等人(1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4275-4279; Li等人(1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2764-2768; Kim等人(1994a) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:883-887; Kim等人(1994b) *J. Biol. Chem.* 269:31,978-31,982。因此,在一些方面,融合蛋白包含来自至少一种IIS型限制性酶的酶结构域和一个或多个锌指结合结构域。

[0310] 其切割结构域可与结合结构域分离的示例性IIS型限制性酶是FokI。这种特定的酶作为二聚体具有活性。Bitinaite等人(1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:10,570-10,575。因此,对于使用锌指-FokI融合物的靶向双链DNA切割,可以使用两个融合蛋白(每个包

含FokI酶结构域)来重构催化活性的切割结构域。可替代地,也可以使用包含锌指结合结构域和两个FokI酶结构域的单多肽分子。在美国专利号9,782,437中描述了包含FokI酶结构域的示例性ZFP。

[0311] 2. TALEN系统

[0312] 基于TALEN的系统包含含有TAL效应物DNA结合结构域和酶结构域的蛋白质。它们是通过将TAL效应物DNA结合结构域与DNA切割结构域(切割DNA链的核酸酶)融合而制成的。上述的FokI限制性酶是适用于基于TALEN的基因调控系统的示例性酶结构域。

[0313] TAL效应物是黄单孢菌属(Xanthomonas)细菌在感染植物时通过其III型分泌系统分泌的蛋白质。DNA结合结构域包含重复的高度保守的33-34个氨基酸的序列,其中第12和第13个氨基酸不同。这两个位置(称为重复可变二残基(RVD))是高度可变的并且与特异性核苷酸识别高度相关。因此,TAL效应物结构域可以被工程化以通过选择包含适当RVD的重复区段的组合来结合特异性靶DNA序列。RVD组合的核酸特异性如下:HD靶向胞嘧啶,NI靶向腺嘌呤,NG靶向胸腺嘧啶,并且NN靶向鸟嘌呤(尽管在一些方面,NN也可以以较低特异性结合腺嘌呤)。

[0314] 在一些方面,TAL效应物结构域结合与选自表1中所列的那些的靶基因的靶DNA序列至少90%同一的靶DNA序列。在一些方面,TAL效应物结构域结合与选自表1中所列的那些的靶基因的靶DNA序列至少95%、96%、97%、98%或99%同一的靶DNA序列。在一些方面,TAL效应物结构域结合与选自表1中所列的那些的靶基因的靶DNA序列100%同一的靶DNA序列。

[0315] 在一些方面,基因调控系统包含各自包含TAL效应物结构域的两个或更多个TAL效应物-融合蛋白,其中TAL效应物结构域中的至少一个结合与选自表1的靶基因的靶DNA序列至少90%同一的靶DNA序列。在一些方面,基因调控系统包含各自包含TAL效应物结构域的两个或更多个TAL效应物-融合蛋白,其中TAL效应物结构域中的至少一个结合与选自表1的靶基因的靶DNA序列至少95%、96%、97%、98%或99%同一的靶DNA序列。在一些方面,基因调控系统包含各自包含TAL效应物结构域的两个或更多个TAL效应物-融合蛋白,其中TAL效应物结构域中的至少一个结合与选自表1的靶基因的靶DNA序列100%同一的靶DNA序列。

[0316] 用于装配TAL-效应物重复序列的方法和组合物是本领域已知的。参见例如Cermak等人,Nucleic Acids Research,39:12,2011,e82。用于构建TAL-效应物重复序列的质粒可从Addgene商购获得。

[0317] 基于核酸/蛋白质的组合基因调控系统

[0318] 组合基因调控系统包含定点修饰多肽和核酸指导分子。本文中,“定点修饰多肽”是指结合核酸指导分子、通过其结合的核酸指导分子靶向靶核酸序列(例如,内源靶DNA或RNA序列)并且修饰靶核酸序列(例如,靶核酸序列的切割、突变或甲基化)的多肽。

[0319] 定点修饰多肽包含两个部分,即结合核酸指导物的部分和活性部分。在一些方面,定点修饰多肽包含表现出定点酶活性(例如,DNA甲基化、DNA或RNA切割、组蛋白乙酰化、组蛋白甲基化等)的活性部分,其中酶活性的位点由指导核酸确定。在一些情况下,定点修饰多肽包含具有修饰内源靶核酸序列的酶活性(例如,核酸酶活性、甲基转移酶活性、脱甲基酶活性、DNA修复活性、DNA损伤活性、脱氨基活性、歧化酶活性、烷基化活性、脱嘌呤活性、氧化活性、嘧啶二聚体形成活性、整合酶活性、转座酶活性、重组酶活性、聚合酶活性、连接酶

活性、解旋酶活性、光解酶活性或糖基化酶活性)的活性部分。在其他情况下,定点修饰多肽包含具有修饰与内源靶核酸序列相关的多肽(例如,组蛋白)的酶活性(例如,甲基转移酶活性、脱甲基酶活性、乙酰转移酶活性、脱乙酰酶活性、激酶活性、磷酸酶活性、泛素连接酶活性、去泛素化活性、腺苷化活性、去腺苷化活性、SUMO化活性、去SUMO化活性、核糖基化活性、去核糖基化活性、豆蔻酰化活性或去豆蔻酰化活性)的活性部分。在一些方面,定点修饰多肽包含调节靶DNA序列的转录(例如,以增加或减少转录)的活性部分。在一些方面,定点修饰多肽包含调节靶RNA序列的表达或翻译(例如,以增加或减少转录)的活性部分。

[0320] 核酸指导物包含两个部分:与内源靶核酸序列互补并能够与其结合的第一部分(在本文中称为“核酸结合区段”),以及能够与定点修饰多肽相互作用的第二部分(在本文中称为“蛋白质结合区段”)。在一些方面,核酸指导物的核酸结合区段和蛋白质结合区段包含在单个多核苷酸分子内。在一些方面,核酸指导物的核酸结合区段和蛋白质结合区段各自包含在单独的多核苷酸分子内,使得核酸指导物包含彼此缔合以形成功能指导物的两个多核苷酸分子。

[0321] 核酸指导物通过与靶核酸序列特异性杂交来介导组合的蛋白质/核酸基因调控系统的靶特异性。在一些方面,靶核酸序列是RNA序列,诸如包含在靶基因的mRNA转录物内的RNA序列。在一些方面,靶核酸序列是包含在靶基因的DNA序列内的DNA序列。本文提及靶基因涵盖该特定基因的包含多个靶遗传基因座(即,特定靶基因序列的部分(例如,外显子或内含子))的全长DNA序列。在每个靶遗传基因座内的是本文中称为“靶DNA序列”的DNA序列的较短片段,其可以通过本文所述的基因调控系统进行修饰。此外,每个靶遗传基因座包含“靶修饰位点”,其是指由基因调控系统诱导的修饰的精确位置(例如,插入、缺失或突变的位置,DNA断裂的位置或表观遗传修饰的位置)。

[0322] 本文所述的基因调控系统可包含单个核酸指导物,或可包含多个核酸指导物(例如,2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个核酸指导物)。

[0323] 在一些方面,组合的蛋白质/核酸基因调控系统包含衍生自Argonaute (Ago) 蛋白(例如,嗜热栖热菌(*T. thermophiles*) Ago或TtAgo)的定点修饰多肽。在一些方面,定点修饰多肽是嗜热栖热菌Ago DNA内切酶,并且核酸指导物是指导DNA (gDNA) (参见Swarts等人, *Nature* 507 (2014), 258-261)。在一些方面,本公开提供了一种编码gDNA的多核苷酸。在一些方面,编码gDNA的核酸包含在表达载体例如重组表达载体中。在一些方面,本公开提供了一种编码TtAgo定点修饰多肽或其变体的多核苷酸。在一些方面,编码TtAgo定点修饰多肽的多核苷酸包含在表达载体例如重组表达载体中。

[0324] 在一些方面,本文所述的基因编辑系统是CRISPR (成簇规则间隔短回文重复序列)/Cas (CRISPR相关) 核酸酶系统。在一些方面,CRISPR/Cas系统是2类系统。2类CRISPR/Cas系统分为三种类型:II型、V型和VI型系统。在一些方面,CRISPR/Cas系统是利用Cas9蛋白的2类II型系统。在一些方面,定点修饰多肽是Cas9 DNA内切酶(或其变体),并且核酸指导分子是指导RNA (gRNA)。在一些方面,CRISPR/Cas系统是利用Cas12蛋白(例如,Cas12a(也称为Cpf1)、Cas12b(也称为C2c1)、Cas12c(也称为C2c3)、Cas12d(也称为CasY)和Cas12e(也称为CasX))的2类V型系统。在一些方面,定点修饰多肽是Cas12 DNA内切酶(或其变体),并且核酸指导分子是gRNA。在一些方面,CRISPR/Cas系统是利用Cas13蛋白(例如,Cas13a(也称为C2c2)、Cas13b和Cas13c)的2类和VI型系统。(参见Pyzocha等人, *ACS Chemical*

Biology, 13(2), 347-356)。在一些方面, 定点修饰多肽是Cas13 RNA核糖内切酶, 并且核酸指导分子是gRNA。

[0325] Cas多肽是指可以与gRNA分子相互作用并且与gRNA分子一起归巢或定位于靶DNA或靶RNA序列的多肽。Cas多肽包括天然存在的Cas蛋白, 以及与天然存在的Cas序列相差一个或多个氨基酸残基的工程化的、改变的或以其他方式修饰的Cas蛋白。

[0326] 指导RNA (gRNA) 包含两个区段, 即DNA结合区段和蛋白质结合区段。在一些方面, gRNA的蛋白质结合区段包含在一个RNA分子中, 并且DNA结合区段包含在另一个单独的RNA分子中。这些方面在本文中称为“双分子gRNA”或“两分子gRNA”或“双重gRNA”。在一些方面, gRNA是单个RNA分子并且在本文中称为“单指导RNA”或“sgRNA”。术语“指导RNA”或“gRNA”是包含性的, 是指两分子指导RNA和sgRNA两者。

[0327] gRNA的蛋白结合区段部分地包含彼此杂交以形成双链RNA双链体 (dsRNA双链体) 的两段互补核苷酸, 该双链体促进与Cas蛋白的结合。gRNA的核酸结合区段(或“核酸结合序列”) 包含与特定靶核酸序列互补并且能够与其结合的核苷酸序列。gRNA的蛋白质结合区段与Cas多肽相互作用, 并且gRNA分子与定点修饰多肽的相互作用导致Cas与内源核酸序列结合, 并在靶核酸序列内或周围产生一个或多个修饰。靶修饰位点的精确位置由以下两者确定: (i) gRNA与靶核酸序列之间的碱基配对互补性; 和(ii) 短基序(称为原型间隔区邻近基序(PAM)) 在靶DNA序列中的位置(在靶RNA序列中称为原型间隔区侧翼序列(PFS))。PAM/PFS序列是Cas与靶核酸序列结合所必需的。多种PAM/PFS序列是本领域已知的并且适合与特定Cas内切酶(例如, Cas9内切酶) 一起使用(参见例如Nat Methods. 2013年11月; 10(11): 1116-1121以及Sci Rep. 2014; 4: 5405)。在一些方面, PAM序列位于靶DNA序列中靶修饰位点的50个碱基对内。在一些方面, PAM序列位于靶DNA序列中靶修饰位点的10个碱基对内。可以通过该方法靶向的DNA序列仅受限于PAM序列与靶修饰位点的相对距离以及介导序列特异性的gRNA介导的Cas结合的独特20个碱基对序列的存在。在一些方面, PFS序列位于靶RNA序列的3'端。在一些方面, 靶修饰位点位于靶基因座的5'末端。在一些方面, 靶修饰位点位于靶基因座的3'端。在一些方面, 靶修饰位点位于靶基因座的内含子或外显子内。

[0328] 在一些方面, 本公开提供了一种编码gRNA的多核苷酸。在一些方面, 编码gRNA的核酸包含在表达载体例如重组表达载体中。在一些方面, 本公开提供了一种编码定点修饰多肽的多核苷酸。在一些方面, 编码定点修饰多肽的多核苷酸包含在表达载体例如重组表达载体中。

[0329] 1. Cas蛋白

[0330] 在一些方面, 定点修饰多肽是Cas蛋白。可以使用任何Cas蛋白, 包括本文提供的那些。多种物种的Cas分子可以用于本文所述的方法和组合物中, 包括衍生自以下项的Cas分子: 酿脓链球菌 (*S. pyogenes*)、金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*)、脑膜炎奈瑟氏菌 (*N. meningitidis*)、嗜热链球菌 (*S. thermophiles*)、燕麦嗜酸菌 (*Acidovorax avenae*)、胸膜肺炎放线杆菌 (*Actinobacillus pleuropneumoniae*)、琥珀酸放线杆菌 (*Actinobacillus succinogenes*)、猪放线杆菌 (*Actinobacillus suis*)、放线菌属物种 (*Actinomyces sp.*)、*Cycliphilus denitrificans*、少食氨基单胞菌 (*Aminomonas paucivorans*)、蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)、史密斯芽孢杆菌 (*Bacillus smithii*)、苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*)、拟杆菌属物种 (*Bacteroides sp.*)、海洋芽小梨形菌 (*Blastopirellula*

marina)、慢生根瘤菌属物种(*Bradyrhizobium* sp.)、侧孢短芽孢杆菌(*Brevibacillus laterosporus*)、大肠弯曲杆菌(*Campylobacter coli*)、空肠弯曲杆菌(*Campylobacter jejuni*)、拉里弯曲杆菌(*Campylobacter lari*)、*Candidatus puniceispirillum*、解纤维菌(*Clostridium cellulolyticum*)、产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)、拥挤棒杆菌(*Corynebacterium accolens*)、白喉棒状杆菌(*Corynebacterium diphtheria*)、马氏棒杆菌(*Corynebacterium matruchotii*)、恒雄芝氏沟鞭藻玫瑰杆菌(*Dinoroseobacter shibae*)、细长真杆菌(*Eubacterium dolichum*)、伽马变形杆菌(*Gammaproteobacterium*)、重氮葡萄糖醋杆菌(*Gluconacetobacter diazotrophicus*)、流感嗜血菌(*Haemophilus parainfluenzae*)、唾液嗜血菌(*Haemophilus sputorum*)、加拿大螺杆菌(*Helicobacter canadensis*)、同性恋螺杆菌(*Helicobacter cinaedi*)、雪貂螺杆菌(*Helicobacter mustelae*)、多养型泥杆菌(*Ilyobacter polytropus*)、金氏金菌(*Kingella kingae*)、卷曲乳酸杆菌(*Lactobacillus crispatus*)、伊氏李斯特氏菌(*Listeria ivanovii*)、单增李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)、李斯特菌科细菌(*Listeriaceae bacterium*)、甲基孢囊菌属物种(*Methylocystis* sp.)、发孢甲基弯曲菌(*Methylosinus trichosporium*)、羞怯动弯杆菌(*Mobiluncus mulieris*)、杆状奈瑟氏菌(*Neisseria bacilliformis*)、灰色奈瑟氏菌(*Neisseria cinerea*)、浅黄奈瑟氏菌(*Neisseria flavescens*)、乳糖奈瑟氏菌(*Neisseria lactamica*)、脑膜炎奈瑟氏菌(*Neisseria meningitidis*)、奈瑟氏菌属物种(*Neisseria* sp.)、沃氏奈瑟氏菌(*Neisseria wadsworthii*)、亚硝化单胞菌属物种(*Nitrosomonas* sp.)、食清洁剂细小棒菌(*Parvibaculum lavamentivorans*)、多杀性巴氏杆菌(*Pasteurella multocida*)、食琥珀酸考拉杆菌(*Phascolarctobacterium succinatutens*)、蒲桃雷尔氏菌(*Ralstonia syzygii*)、沼泽红假单胞菌(*Rhodopseudomonas palustris*)、小红卵菌属物种(*Rhodovulum* sp.)、米氏西蒙斯氏菌(*Simonsiella muelleri*)、鞘氨醇单胞菌属物种(*Sphingomonas* sp.)、葡萄园芽孢乳杆菌(*Sporolactobacillus vineae*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、路邓葡萄球菌(*Staphylococcus lugdunensis*)、链球菌属物种(*Streptococcus* sp.)、罕见小球菌属物种(*Subdoligranulum* sp.)、运动替斯崔纳菌(*Tistrella mobilis*)、密螺旋体属物种(*Treponema* sp.)或艾森蚯蚓肾杆菌(*Verminephrobacter eiseniae*)。

[0331] 在一些方面,Cas蛋白是天然存在的Cas蛋白。在一些方面,Cas内切酶选自自由以下项组成的组:C2C1、C2C3、Cpf1(也称为Cas12a)、Cas12b、Cas12c、Cas12d、Cas12e、Cas13a、Cas13b、Cas13c、Cas13d、Cas1、Cas1B、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、Cas9(也称为Csn1和Csx12)、Cas10、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1、Cse2、Csc1、Csc2、Csa5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csl17、Csl14、Csl10、Csl16、CsaX、Csl3、Csl1、Csl15、Csf1、Csf2、Csf3和Csf4。

[0332] 在一些方面,Cas蛋白是内切核糖核酸酶,诸如Cas13蛋白。在一些方面,Cas13蛋白是Cas13a(Abudayyeh等人,Nature 550(2017),280-284)、Cas13b(Cox等人,Science(2017)358:6336,1019-1027)、Cas13c(Cox等人,Science(2017)358:6336,1019-1027)或Cas13d(Zhang等人,Cell 175(2018),212-223)蛋白。

[0333] 在一些方面,Cas9蛋白是任何Cas9蛋白,包括本文具体提供的任何Cas9蛋白。在一些方面,Cas蛋白是野生型或天然存在的Cas9蛋白或Cas9直向同源物。野生型Cas9是一种多

结构域酶,其使用HNH核酸酶结构域来切割DNA的靶链,并使用RuvC样结构域来切割非靶链。WT Cas9与DNA的基于gRNA特异性的结合导致双链DNA断裂,其可通过非同源末端连接(NHEJ)或同源性定向修复(HDR)进行修复。示例性天然存在的Cas9分子描述于Chylinski等人, RNA Biology 2013 10:5,727-737,并且另外的Cas9直向同源物描述于国际PCT公布号WO 2015/071474。此类Cas9分子包括第1类群细菌科、第2类群细菌科、第3类群细菌科、第4类群细菌科、第5类群细菌科、第6类群细菌科、第7类群细菌科、第8类群细菌科、第9类群细菌科、第10类群细菌科、第11类群细菌科、第12类群细菌科、第13类群细菌科、第14类群细菌科、第15类群细菌科、第16类群细菌科、第17类群细菌科、第18类群细菌科、第19类群细菌科、第20类群细菌科、第21类群细菌科、第22类群细菌科、第23类群细菌科、第24类群细菌科、第25类群细菌科、第26类群细菌科、第27类群细菌科、第28类群细菌科、第29类群细菌科、第30类群细菌科、第31类群细菌科、第32类群细菌科、第33类群细菌科、第34类群细菌科、第35类群细菌科、第36类群细菌科、第37类群细菌科、第38类群细菌科、第39类群细菌科、第40类群细菌科、第41类群细菌科、第42类群细菌科、第43类群细菌科、第44类群细菌科、第45类群细菌科、第46类群细菌科、第47类群细菌科、第48类群细菌科、第49类群细菌科、第50类群细菌科、第51类群细菌科、第52类群细菌科、第53类群细菌科、第54类群细菌科、第55类群细菌科、第56类群细菌科、第57类群细菌科、第58类群细菌科、第59类群细菌科、第60类群细菌科、第61类群细菌科、第62类群细菌科、第63类群细菌科、第64类群细菌科、第65类群细菌科、第66类群细菌科、第67类群细菌科、第68类群细菌科、第69类群细菌科、第70类群细菌科、第71类群细菌科、第72类群细菌科、第73类群细菌科、第74类群细菌科、第75类群细菌科、第76类群细菌科、第77类群细菌科或第78类群细菌科的Cas9分子。

[0334] 在一些方面,天然存在的Cas9多肽选自自由SpCas9、SpCas9-HF1、SpCas9-HF2、SpCas9-HF3、SpCas9-HF4、SaCas9、FnCpf、FnCas9、eSpCas9和NmeCas9组成的组。在一些方面,Cas9蛋白包含与Chylinski等人, RNA Biology 2013 10:5,727-737;Hou等人,PNAS Early Edition 2013,1-6中所述的Cas9氨基酸序列具有至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。

[0335] 在一些方面,Cas多肽包含以下活性中的一种或多种:

[0336] a. 切口酶活性,即切割核酸分子的单链(例如,非互补链或互补链)的能力;

[0337] b. 双链核酸酶活性,即切割双链核酸的两条链并产生双链断裂的能力,这在一个方面是存在两种切口酶活性;

[0338] c. 内切酶活性;

[0339] d. 核酸外切酶活性;以及/或者

[0340] e. 解旋酶活性,即解开双链核酸的螺旋结构的能力。

[0341] 在一些方面,Cas多肽融合到募集DNA损伤信号传导蛋白、核酸外切酶或磷酸酶以通过一种修复机制或另一种机制进一步增加靶序列修复的可能性或速率的异源蛋白。在一些方面,WT Cas多肽与核酸修复模板共表达以促进通过同源性定向修复掺入外源核酸序列。

[0342] 在一些方面,不同的Cas蛋白(即,来自不同物种的Cas9蛋白)可有利地用于各种提供的方法中以便利用不同Cas蛋白的各种酶特性(例如,用于不同PAM序列偏好;用于增加或降低的酶活性;用于增加或降低水平的细胞毒性;为了改变NHEJ、同源性定向修复、单链断

裂、双链断裂之间的平衡等)。

[0343] 在一些方面,Cas蛋白是衍生自酿脓链球菌的Cas9蛋白并且识别PAM序列基序NGG、NAG、NGA(Mali等人,Science 2013;339(6121):823-826)。在一些方面,Cas蛋白是衍生自嗜热链球菌的Cas9蛋白并且识别PAM序列基序NGGNG和/或NNAGAAW(W=A或T)(参见例如Horvath等人,Science,2010;327(5962):167-170,以及Deveau等人,J Bacteriol 2008;190(4):1390-1400)。在一些方面,Cas蛋白是衍生自变形链球菌的Cas9蛋白并且识别PAM序列基序NGG和/或NAAR(R=A或G)(参见例如Deveau等人,J BACTERIOL 2008;190(4):1390-1400)。在一些方面,Cas蛋白是衍生自金黄色葡萄球菌的Cas9蛋白并且识别PAM序列基序NNGRR(R=A或G)。在一些方面,Cas蛋白是衍生自金黄色葡萄球菌的Cas9蛋白并且识别PAM序列基序N GRRT(R=A或G)。在一些方面,Cas蛋白是衍生自金黄色葡萄球菌的Cas9蛋白并且识别PAM序列基序N GRRV(R=A或G)。在一些方面,Cas蛋白是衍生自脑膜炎奈瑟菌的Cas9蛋白并且识别PAM序列基序N GATT或N GCTT(R=A或G,V=A、G或C)(参见例如Hou等人,PNAS2013,1-6)。在上述方面,N可以是任何核苷酸残基,例如A、G、C或T中的任一种。在一些方面,Cas蛋白是衍生自沙氏纤毛菌(*Leptotrichia shahii*)的Cas13a蛋白并且识别单个3' A、U或C的PFS序列基序。

[0344] 在一些方面,提供了编码Cas蛋白的多核苷酸。在一些方面,多核苷酸编码与国际PCT公布号WO 2015/071474或Chylinski等人,RNA Biology 2013 10:5,727-737中所述的Cas蛋白至少90%同一的Cas蛋白。在一些方面,多核苷酸编码与国际PCT公布号WO 2015/071474或Chylinski等人,RNA Biology 2013 10:5,727-737中所述的Cas蛋白至少95%、96%、97%、98%或99%同一的Cas蛋白。在一些方面,多核苷酸编码与国际PCT公布号WO 2015/071474或Chylinski等人,RNA Biology 2013 10:5,727-737中所述的Cas蛋白100%同一的Cas蛋白。

[0345] 2. Cas突变体

[0346] 在一些方面,Cas多肽被工程化以改变Cas多肽的一种或多种特性。例如,在一些方面,Cas多肽包含改变的酶特性,例如改变的核酸酶活性(与天然存在的或其他参考Cas分子相比)或改变的解旋酶活性。在一些方面,工程化Cas多肽可以具有改变其大小的改变,例如氨基酸序列的减小其大小而不显著影响Cas多肽的另一特性的缺失。在一些方面,工程化Cas多肽包含影响PAM识别的改变。例如,可以改变工程化的Cas多肽以识别除了被对应的野生型Cas蛋白识别的PAM序列以外的PAM序列。

[0347] 具有所需特性的Cas多肽可以通过多种方式制备,包括改变天然存在的Cas多肽或亲本Cas多肽,以提供具有所需特性的突变体或改变的Cas多肽。例如,可以将一个或多个突变引入亲本Cas多肽(例如,天然存在或工程化的Cas多肽)的序列中。此类突变和差异可包括取代(例如,保守取代或非必需氨基酸的取代);插入;或者缺失。在一些方面,相对于亲本Cas多肽,突变Cas多肽包含一个或多个突变(例如,至少1、2、3、4、5、10、15、20、30、40或50个突变)。

[0348] 在一些方面,突变Cas多肽包含与天然存在的Cas多肽不同的切割特性。在一些方面,Cas是失活的Cas(dCas)突变体。在一些方面,Cas多肽不包含任何内在酶活性并且不能介导靶核酸切割。在一些方面,dCas可与能够以基于非切割的方式修饰靶核酸的异源蛋白质融合。例如,在一些方面,dCas蛋白融合到转录激活物或转录阻抑物结构域(例如,

Kruppel相关盒 (KRAB或SKD);Mad mSIN3相互作用结构域 (SID或SID4X);ERF阻抑物结构域 (ERD);MAX-相互作用蛋白1 (MXI1);甲基-CpG结合蛋白2 (MECP2)等)。在一些此类情况下,dCas融合蛋白被gRNA靶向靶核酸中的特定位置(即,序列)并发挥基因座特异性调控,诸如阻断RNA聚合酶与启动子结合(这选择性地抑制转录激活物功能)和/或修饰局部染色质状态(例如,当使用修饰靶DNA或修饰与靶DNA相关的多肽的融合序列时)。在一些情况下,变化是瞬时的(例如,转录阻抑或活化)。在一些情况下,变化是可遗传的(例如,当对靶DNA或与靶DNA相关的蛋白质(例如,核小体组蛋白)进行表观遗传修饰时)。

[0349] 在一些方面,dCas是dCas13突变体(Konermann等人,Cell 173(2018),665-676)。然后可以将这些dCas13突变体融合到修饰RNA的酶,包括腺苷脱氨酶(例如,ADAR1和ADAR2)。腺苷脱氨酶将腺嘌呤转化为肌苷,翻译机制将其视为鸟嘌呤,从而在RNA序列中产生功能性A→G变化。在一些方面,dCas是dCas9突变体。

[0350] 在一些方面,突变体Cas9是Cas9切口酶突变体。Cas9切口酶突变体仅包含一个催化活性结构域(HNH结构域或RuvC结构域)。Cas9切口酶突变体保留基于gRNA特异性的DNA结合,但仅能够切割一条DNA链,从而导致单链断裂(例如,“切口”)。在一些方面,两种互补的Cas9切口酶突变体(例如,一种具有失活的RuvC结构域的Cas9切口酶突变体和一种具有失活的HNH结构域的Cas9切口酶突变体)与对应于两个相应靶序列的两种gRNA在同一细胞中表达;一个靶序列在有义DNA链上,一个在反义DNA链上。这种双切口酶系统导致交错的双链断裂,并且可以增加靶特异性,因为它不太可能产生两个足够近的脱靶切口以产生双链断裂。在一些方面,Cas9切口酶突变体与核酸修复模板共表达以促进通过同源性定向修复掺入外源核酸序列。

[0351] 在一些方面,本文所述的Cas多肽可以被工程化以改变Cas多肽的PAM/PFS特异性。在一些方面,突变Cas多肽具有不同于亲本Cas多肽的PAM/PFS特异性的PAM/PFS特异性。例如,可以修饰天然存在的Cas蛋白,以改变突变体Cas多肽识别的PAM/PFS序列,来减少脱靶位点、提高特异性或消除PAM/PFS识别需求。在一些方面,可以修饰Cas蛋白以增加PAM/PFS识别序列的长度。在一些方面,PAM识别序列的长度为至少4、5、6、7、8、9、10或15个氨基酸。可以使用定向进化生成识别不同PAM/PFS序列和/或具有降低的脱靶活性的Cas多肽。可以用于Cas多肽的定向进化的示例性方法和系统描述于例如Esvelt等人,Nature 2011,472(7344):499-503。

[0352] 示例性Cas突变体描述于国际PCT公布号W0 2015/161276和Konermann等人,Cell 173(2018),665-676,它们以引用方式整体并入本文。

[0353] 3. gRNA

[0354] 本公开提供了将定点修饰多肽引导到特定靶核酸序列的指导RNA(gRNA)。gRNA包含核酸靶向区段和蛋白质结合区段。gRNA的核酸靶向区段包含与靶核酸序列中的序列互补的核苷酸序列。因此,gRNA的核酸靶向区段经由杂交(即,碱基配对)以序列特异性方式与靶核酸相互作用,并且核酸靶向区段的核苷酸序列确定靶核酸内gRNA将结合的位置。可以对gRNA的核酸靶向区段进行修饰(例如,通过基因工程化)以与靶核酸序列内的任何期望序列杂交。

[0355] 指导RNA的蛋白结合区段与定点修饰多肽(例如,Cas蛋白)相互作用以形成复合物。指导RNA经由上述核酸靶向区段将结合的多肽引导到靶核酸内的特定核苷酸序列。指导

RNA的蛋白结合区段包含彼此互补并且形成双链RNA双链体的两段核苷酸。

[0356] 在一些方面,gRNA包含两个单独的RNA分子。在一些方面,两个RNA分子中的每一个包含彼此互补的一段核苷酸,使得两个RNA分子的互补核苷酸杂交以形成蛋白结合区段的双链RNA双链体。在一些方面,gRNA包含单个RNA分子(sgRNA)。

[0357] gRNA对靶基因座的特异性由核酸结合区段的序列介导,该序列包含与靶基因座内的靶核酸序列互补的约20个核苷酸。在一些方面,对应靶核酸序列的长度为大约20个核苷酸。在一些方面,本公开的gRNA序列的核酸结合区段与靶基因座内的靶核酸序列至少90%互补。在一些方面,本公开的gRNA序列的核酸结合区段与靶基因座内的靶核酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%互补。在一些方面,本公开的gRNA序列的核酸结合区段与靶基因座内的靶核酸序列100%互补。

[0358] 在一些方面,靶核酸序列是RNA靶序列。在一些方面,靶核酸序列是DNA靶序列。在一些方面,gRNA序列的核酸结合区段结合与选自表1中所列的那些的靶基因的靶DNA序列至少90%同一的靶DNA序列。在一些方面,gRNA序列的核酸结合区段结合与选自表1中所列的那些的靶基因的靶DNA序列至少95%、96%、97%、98%或99%同一的靶DNA序列。在一些方面,gRNA序列的核酸结合区段结合与选自表1中所列的那些的靶基因的靶DNA序列100%同一的靶DNA序列。

[0359] 在一些方面,基因调控系统包含各自包含DNA结合区段的两个或更多个gRNA分子,其中核酸结合区段中的至少一个结合与选自表1的靶基因的靶DNA序列至少90%同一的靶DNA序列。在一些方面,基因调控系统包含各自包含核酸结合区段的两个或更多个gRNA分子,其中核酸结合区段中的至少一个结合与选自表1的靶基因的靶DNA序列至少95%、96%、97%、98%或99%同一的靶DNA序列。在一些方面,基因调控系统包含各自包含核酸结合区段的两个或更多个gRNA分子,其中核酸结合区段中的至少一个结合与选自表1的靶基因的靶DNA序列100%的靶DNA序列。

[0360] 在一些方面,本文所述的gRNA序列的核酸结合区段被设计成使用本领域已知的算法(例如,Cas-OFF finder)来最小化脱靶结合,以鉴定对特定靶基因座或靶基因独特的靶序列。

[0361] 在一些方面,本文所述的gRNA可以包含一种或多种引入针对核酸酶的稳定性的修饰的核苷或核苷酸。在一些方面,与非修饰的gRNA相比,这些修饰的gRNA可引发降低的先天免疫应答。术语“先天免疫应答”包括对通常病毒或细菌来源的外源核酸(包括单链核酸)的细胞应答,其涉及诱导细胞因子(特别是干扰素)表达和释放以及细胞死亡。

[0362] 在一些方面,本文所述的gRNA在5'端或其附近(例如,在其5'端的1-10、1-5或1-2个核苷酸内)被修饰。在一些方面,通过包含真核mRNA帽结构或帽类似物(例如,G(5')ppp(5')G帽类似物、m7G(5')ppp(5')G帽类似物或3'-O-Me-m7G(5')ppp(5')G抗反向帽类似物(ARCA))来修饰gRNA的5'端。在一些方面,通过用磷酸酶(例如,小牛肠碱性磷酸酶)处理以去除5'三磷酸基团来修饰体外转录的gRNA。在一些方面,gRNA在其3'端或其附近(例如,在其3'端的1-10、1-5或1-2个核苷酸内)包含修饰。例如,在一些方面,gRNA的3'端通过添加一个或多个(例如,25-200个)腺嘌呤(A)残基来修饰。

[0363] 在一些方面,修饰的核苷和修饰的核苷酸可以存在于gRNA中,但也可存在于其他基因调控系统(例如,基于mRNA、RNAi或siRNA的系统)中。在一些方面,修饰的核苷和核苷酸

可以包括以下项中的一种或多种：

[0364] a. 磷酸二酯主链键中非连接的磷酸氧中的一个或两个和/或连接的磷酸氧中的一个或多个的改变,例如替换;

[0365] b. 核糖的组分(例如,核糖上的2'羟基)的改变,例如替换;

[0366] c. 用“脱磷”接头批量替换磷酸部分;

[0367] d. 天然存在的核碱基的修饰或替换;

[0368] e. 核糖磷酸主链的替换或修饰;

[0369] f. 寡核苷酸的3'端或5'端的修饰,例如末端磷酸基团的去除、修饰或替换或者部分的缀合;以及

[0370] g. 糖的修饰。

[0371] 在一些方面,可以组合以上所列的修饰以提供可以具有两种、三种、四种或更多种修饰的修饰的核苷和核苷酸。例如,在一些方面,修饰的核苷或核苷酸可以具有修饰的糖和修饰的核碱基。在一些方面,对gRNA的每个碱基进行修饰。在一些方面,用硫代磷酸酯基团替换gRNA分子的磷酸基团中的每一个。

[0372] 在一些方面,软件工具可以用于优化用户靶序列内gRNA的选择,例如以最小化整个基因组的总脱靶活性。脱靶活性可能与切割不同。例如,对于使用酿脓链球菌Cas9进行的每种可能的gRNA选择,软件工具可以鉴定整个基因组中所有的包含多达一定数量(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)的错配碱基对的潜在脱靶序列(在NAG或NGG PAM之前)。可以例如使用实验得出的加权方案来预测在每个脱靶序列处的切割效率。然后可以根据其总的预测的脱靶切割对每种可能的gRNA进行排序;排序最高的gRNA表示可能具有最大的在靶切割和最小的脱靶切割的那些gRNA。其他功能(例如,用于gRNA载体构建的自动试剂设计、用于在靶Surveyor测定的引物设计以及用于经由下一代测序进行高通量检测和脱靶切割定量的引物设计)也可以包括在该工具中。

[0373] 本文提供的一些方法从基因工程化开始。这种基因工程化之后可以是例如一个或多个静息步骤和/或一个或多个刺激步骤。例如,可以对Treg进行基因工程化、静息,然后刺激。另选地,可以对Treg进行基因工程化、刺激,然后静息。

[0374] 在本文提供的方法的其他方面,可以在一个或多个静息步骤和/或一个或多个刺激步骤后对Treg进行基因工程化。例如,可以在第一刺激步骤、静息步骤和第二刺激步骤之后对Treg进行基因工程化。

[0375] 在一些方面,在即将基因工程化之前存在存在刺激剂的情况下培养Treg。在一些方面,在不存在刺激剂的情况下对Treg进行基因工程化。在一些方面,在基因工程化之后即刻在不存在刺激剂(静息)的情况下培养Treg。在一些方面,在静息步骤期间(例如,在不存在刺激剂的情况下)对Treg进行基因工程化。

[0376] 在一些方面,在即将基因工程化之前不存在刺激剂的情况下培养Treg。

[0377] 在一些方面,在培养约6天至约12天后对Treg进行基因工程化。在一些方面,在培养约6天至约11天后对Treg进行基因工程化。在一些方面,在培养约6天至约10天后对Treg进行基因工程化。在一些方面,在培养约6天至约9天后对Treg进行基因工程化。在一些方面,在培养约6天至约8天后对Treg进行基因工程化。在一些方面,在培养约7天至约12天后对Treg进行基因工程化。在一些方面,在培养约7天至约11天后对Treg进行基因工程化。在

一些方面,在培养约7天至约10天后对Treg进行基因工程化。在一些方面,在培养约7天至约9天后对Treg进行基因工程化。在一些方面,在培养约7天至约8天后对Treg进行基因工程化。

[0378] 在一些方面,在培养至少6天后对Treg进行基因工程化。在一些方面,在培养至少7天后对Treg进行基因工程化。在一些方面,在培养至少8天后对Treg进行基因工程化。

[0379] 在一些方面,在培养约6天后对Treg进行基因工程化。在一些方面,在培养约7天后对Treg进行基因工程化。在一些方面,在培养约8天后对Treg进行基因工程化。在一些方面,在培养约9天后对Treg进行基因工程化。在一些方面,在培养约10天后对Treg进行基因工程化。

[0380] 在一些方面,在暴露于刺激剂总共不超过10天后对Treg进行基因工程化,其中总共10天不包括连续超过5天。在一些方面,在暴露于刺激剂总共不超过9天后对Treg进行基因工程化,其中总共9天不包括连续超过5天。在一些方面,在暴露于刺激剂总共不超过8天后对Treg进行基因工程化,其中总共8天不包括连续超过5天。在一些方面,在暴露于刺激剂总共不超过7天后对Treg进行基因工程化,其中总共7天不包括连续超过5天。在一些方面,在暴露于刺激剂总共不超过6天后对Treg进行基因工程化,其中总共6天不包括连续超过5天。

[0381] 在一些方面,在暴露于刺激剂总共至少4天后对Treg进行基因工程化,其中总共4天不包括连续超过3天。在一些方面,在暴露于刺激剂总共至少5天后对Treg进行基因工程化,其中总共5天不包括连续超过3天。在一些方面,在暴露于刺激剂总共至少6天后对Treg进行基因工程化,其中总共4天不包括连续超过6天。在一些方面,在暴露于刺激剂总共至少7天后对Treg进行基因工程化,其中总共7天不包括连续超过5天。

[0382] 基因工程化之前的培养天数可以包括例如第一刺激步骤、静息步骤和第二刺激步骤。

[0383] 在一些方面,当Treg群体已经扩增到约100倍至约500倍时,对Treg进行基因工程化。在一些方面,当Treg群体已经扩增到约250倍时,对Treg进行基因工程化。

[0384] Treg的分离

[0385] 在扩增之前,可以例如从受试者或从受试者获得的样品中分离Treg。在一些方面,从受试者的外周血、胸腺、淋巴结、脾、骨髓、脐带血或组织样品中获得Treg。在一些方面,从获自受试者的外周血、胸腺、淋巴结、脾、骨髓、脐带血或组织样品的样品中获得Treg。受试者可以是例如哺乳动物受试者,诸如人类受试者。

[0386] 在一些方面,从外周血获得Treg。在一些方面,从人外周血获得Treg。

[0387] 在一些方面,从来自人外周血的PBMC获得Treg,其中经由负免疫磁性选择(例如,使用EasySep人CD4⁺T细胞分离试剂盒)分离CD4⁺T细胞,用CD25、CD4、CD127和hCD45RA的抗体标记CD4⁺T细胞,并且选择CD4⁺CD25^{hi}CD127^{lo}CD45RA⁺Treg。

[0388] 可以通过密度梯度沉降从血液中分离PBMC,并且可以通过磁性细胞分选从PBMC中进行正选择来富集CD4⁺T细胞。然后可以用荧光染料标记的抗体特异性调节性T细胞标记物诸如CD4、CD25和/或CD127来对CD4⁺T细胞进行染色,然后通过荧光活化细胞分选(FACS)来分离以富集CD4⁺CD25⁺CD127^{lo} Treg并将它们与例如CD4⁺CD25⁻CD127⁺常规T细胞分离。

[0389] 一旦分离出含有Treg的样品,就可以富集Treg。例如,可以通过靶向选择对免疫抑

制性Treg特异的细胞表面标记物并使用自动细胞分选(诸如FACS、固相磁珠等)进行分离来富集Treg。例如,在美国专利号7,722,862中提供了富集Treg的方法,该专利以引用方式整体并入本文。富集可以包括正选择和/或负选择。例如,负选择可以用于除去具有对非Treg细胞类型诸如CD8、CD11b、CD16、CD19、CD36和/或CD56特异的表面标记物的细胞。

[0390] 在一些方面,使用CD4⁺T细胞的CD45RA^{hi}CD25^{hi}CD127^{lo}CD4⁺细胞的细胞分选(例如,使用FACS)来分离Treg。在一些方面,使用总CD45RA^{hi}CD25^{hi}CD127^{lo}CD4⁺细胞的细胞分选来分离Treg。

[0391] 在一些方面,通过使用磁珠富集CD25⁺T细胞来分离Treg。在一些方面,通过使用荧光活化细胞分选(FACS)富集CD25⁺T细胞来分离Treg。

[0392] 在一些方面,基于CD4和CD25的存在和IL-7R(CD127)的 α 链的缺乏来分离Treg。

[0393] 在一些方面,在不使用磁珠的情况下分离Treg。在一些方面,在不使用人工抗原呈递细胞的情况下分离Treg。在一些方面,在不使用磁珠或人工抗原呈递细胞的情况下分离Treg。

[0394] 在一些方面,通过使用淋巴细胞密度梯度离心从受试者中分离外周血单核细胞(PBMC)、耗尽CD8⁺细胞、然后使用磁珠富集CD25⁺T细胞来获得Treg。

[0395] 在一些方面,通过珠分离来分离Treg(例如,从受试者中)。

[0396] 扩增的Treg的使用

[0397] 本文还提供了使用已根据本文提供的方法扩增的Treg的方法。例如,可以将扩增的Treg施用于受试者。施用可以例如用于治疗受试者的自身免疫性或炎性疾病、用于治疗或预防受试者的移植物抗宿主病(GVHD)和/或用于降低受试者的免疫应答。受试者可以是哺乳动物受试者,例如人类受试者。

[0398] 在一些方面,自身免疫性或炎性疾病或障碍选自以下项组成的组:银屑病、系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、I型糖尿病、肌萎缩侧索硬化症(ALS)、多发性硬化症、溃疡性结肠炎、克罗恩氏病、HCV相关的血管炎、斑秃、强直性脊柱炎、舍格伦综合征、自身免疫性肝炎、炎性肠病(IBD)、结肠炎、血管炎、颞关节炎、狼疮、乳糜泻、风湿性多肌痛和关节炎。

[0399] 在一些方面,Treg从受试者获得,根据本文提供的任何方法扩增,然后施用于同一受试者。因此,本文提供的扩增的Treg的使用可以是自体的。

[0400] 在一些方面,Treg从受试者获得,根据本文提供的任何方法扩增,然后施用于不同受试者。因此,本文提供的扩增的Treg的使用可以是同种异体的。

[0401] 将有效治疗或预防病症的Treg的量将取决于疾病的性质。待使用的精确剂量还取决于施用途径和病症的严重程度。通常,T细胞疗法的施用由每千克体重的细胞数量来定义。然而,T细胞会在施用后复制和扩增。细胞可以通过本领域已知的输注技术来施用。

[0402] 实施例

[0403] 本文所述的实验使用循环体外方法来最大化人类调节性T细胞(Treg)的生长,以用于其作为治疗自身免疫性疾病的免疫疗法的临床用途。

[0404] 实施例1:材料和方法

[0405] 材料

[0406] gRNA:在指示的情况下,所有实验均使用单分子gRNA(sgRNA A)。通过将200 μ M tracrRNA(IDT,目录号1072534)与200 μ M靶特异性crRNA(IDT)在无核酸酶的双链体缓冲液

(IDT, 目录号11-01-03-01) 中在95℃下双链化5分钟以形成100μM tracrRNA:crRNA双链体来形成双重gRNA分子, 其中tracrRNA和crRNA以1:1的比率存在。

[0407] Cas9: 通过引入衍生自酿脓链球菌的Cas9蛋白 (IDT, 目录号1074182) 在靶细胞中表达Cas9。

[0408] RNP: 通过将1.2μL 100μM tracrRNA:crRNA双连体与1μL 20μM Cas9蛋白和0.8μL PBS组合在一起来形成gRNA-Cas9核糖核蛋白 (RNP)。将混合物在室温下温育20分钟以形成RNP复合物。

[0409] 方法

[0410] 人Treg细胞分离: 以逐步的方式从来自健康志愿者献血供体的新鲜白细胞单采术样品或全血中分离外周血Treg细胞。首先, 使用EasySep直接人PBMC分离试剂盒 (StemCell Technologies, 目录号19654) 分离外周血单核细胞 (PBMC)。接着, 使用EasySep人CD4⁺T细胞分离试剂盒 (StemCell Technologies, 目录号17952) 经由负免疫磁性选择分离CD4⁺T细胞。将分离的CD4⁺T细胞用hCD25 (PE, BioLegend)、hCD4 (APC, BD Pharmingen)、hCD127 (BV421, BD Pharmingen) 和hCD45RA (APC-Cy7, BD Pharmingen) 的抗体标记, 然后基于以下参数进行分选: CD4⁺CD25^{hi}CD127^{lo}CD45RA⁺。

[0411] 离体人Treg细胞扩增: 将分离的Treg以 1.25×10^5 个细胞/mL (0.2mL/孔) 铺板在96孔u型底板 (Falcon, BD Pharmingen) 中的补充有10%人灭活血清 (在下文称为Treg培养基)、人IL-2 (800单位/mL)、N-乙酰基-L-半胱氨酸 (5mM) 和10μl/mL ImmunoCult CD3/28/2四聚体 (StemCell Technologies, 目录号10970) 的X-VIVO 15T细胞扩增培养基 (Lonza, 目录号04-418Q) 中。在培养的第3天, 洗涤细胞, 将其以原始浓度重新铺板在含有IL-2的Treg培养基中, 然后使其扩增3天。在此扩增阶段期间, 每天分离细胞以维持 1.25×10^5 个细胞/mL的浓度。在培养的第6天, 用CD3/28/2四聚体 (10μl/mL) 再刺激细胞, 并将浓度调节至 5×10^5 个细胞/mL (在培养期的剩余时间内维持该细胞密度)。在培养的前7天将IL-2的浓度维持在800单位/mL, 此后降低至300单位/mL。仅在每个刺激周期的第一天将四聚体添加到培养物中, 并不是每天补充。在培养期的剩余时间内, 每3-4天重复刺激和扩增周期。如下概述通过流式细胞术定期检查培养的Treg细胞的纯度。

[0412] Treg细胞的RNP转染: 在指示的情况下, 如下使用Cas9-RNP编辑Treg: 在培养的第8天, 洗涤Treg细胞并将其以 5×10^7 个细胞/mL重悬于PBS中。将靶向Treg细胞无关基因OR1A1的单指导RNA (sgRNA) (SEQ ID NO: 7GCTGACCAGTAACTCCCAGG) 与反式激活CRISPR RNA (tracrRNA) 在95℃下体外复合5分钟。如Materials (前文) 中所述将新产生的双链体分子与Cas9蛋白混合, 并在室温下温育20分钟以形成核糖核蛋白 (RNP)。在即将电穿孔之前, 将细胞以 8×10^7 个细胞/mL的浓度重悬于核转染缓冲液 (18% 补充物1、82% 来自Amaxa P3原代细胞4D-Nucleofector X试剂盒S (目录号V4XP-3032) 的P3缓冲液) 中。将该细胞悬液与来自上述步骤的RNP溶液和惰性单链DNA寡核苷酸 (Alt-R Cas9电穿孔增强物) 以20:5:1的比率组合。按照“T cell, Human, Stim”程序 (E0-115) 对细胞进行电穿孔。电穿孔后, 将80μL温热X-VIVO 15培养基添加到每个孔中, 并将细胞以 2×10^6 个细胞/mL的密度汇集到培养瓶中含有IL-2 (300单位/mL) 的X-VIVO 15培养基中。

[0413] 编辑效率的评估。对于该方法, 使用Qiagen血液和细胞培养物DNA微型试剂盒 (目录号: 13323) 按照供应商推荐的方案从编辑的T细胞中分离基因组DNA (gDNA) 并进行定量。

gDNA分离之后,使用基因座特异性PCR引物进行PCR以扩增编辑的基因组DNA的区域,所述引物包含添加Illumina下一代测序衔接子所需的突出端。将所得的PCR产物在1%琼脂糖凝胶上电泳,以确保发生了基因组基因座的特异性和充分扩增,然后根据供应商推荐的方案使用Monarch PCR&DNA清除试剂盒(目录号:T1030S)进行PCR清除。然后对纯化的PCR产物进行定量,并进行第二次PCR,以退火Illumina测序衔接子和多重测序所需的样品特异性索引序列。此后,将PCR产物在1%琼脂糖凝胶上电泳以评估大小,然后使用AMPure XP珠(内部生产)进行纯化。然后使用Kapa Illumina Library定量试剂盒(目录号:KK4923)和Kapa Illumina Library定量DNA标准品(目录号:KK4903)经由qPCR定量纯化的PCR产物。然后使用Illumina NextSeq 500/550Mid输出试剂盒v2(目录号:FC-404-2003)将定量的产品加载到Illumina NextSeq 500系统上。对产生的测序数据进行分析以评估编辑的T细胞池的DNA中预期切割位点处的插入和缺失(插入缺失)。

[0414] OR1A1介导的Treg细胞的免疫分型和TSDR分析:在扩增期间通过以下过程定期检查培养的Treg细胞的纯度:对CD4进行表面染色(克隆SK3,在室温下进行10分钟),然后用活力染料染色(LIVE/DEAD Fixable Near-IR染色,ThermoFisher Scientific,目录号L34975,在室温下进行5分钟),固定/透化(eBioscience Foxp3/转录因子染色缓冲液套装,目录号:00-5523-00,在室温下进行45分钟),最后对Helios(克隆22F6)和Foxp3(克隆259D/C7)进行细胞内染色(在室温下进行30分钟)。使用LSRFortessa(BD Biosciences)进行数据收集,并使用FlowJo软件(TreeStar)进行分析。对于TSDR分析,在针对OR1A1编辑Treg细胞后12天,如上所述用抗hCD4和活力染料对细胞进行染色,然后在室温下用0.5%多聚甲醛(BioLegend,目录号420801)固定10分钟。将固定的细胞用含有1%BSA的PBS洗涤两次,在冰上在冰冷的甲醇(100%)中温育30分钟以便使细胞膜透化,然后如上所述对Helios和Foxp3进行细胞内染色。染色后,洗涤细胞,重悬于含1%BSA的PBS中,并在BD FACSAria II细胞分选仪上分选为Foxp3⁻、Foxp3⁺Helios⁻、Foxp3⁺Helios^{lo}和Foxp3⁺Helios^{hi}(1x10⁶个细胞/亚群)。使用Qiagen血液和细胞培养物DNA微型试剂盒(目录号:13323)按照供应商推荐的方案从每个分选群体中分离基因组DNA。通过EpigenDx(测定ID ADS783-FS2)对基因组DNA进行亚硫酸氢盐转化和焦磷酸测序,以定量FOXP3基因区域的甲基化状态。

[0415] Treg对同种异体或自体T效应细胞的体外抑制:使用Canavan等人(“A rapid diagnostic test for human regulatory T-cell function to enable regulatory T-cell therapy”Blood.2012年2月23日;119(8))开发的FastImmune方法的改良版本以及内部开发的常规体外抑制测定法来确定新鲜或冷冻Treg的抑制功能。如果是冷冻Treg,则在测定开始前4天解冻细胞,并在含有IL-2(300单位/mL)的Treg培养基中静息过夜。在含有10 μl/mL ImmunoCult CD3/28/2四聚体(StemCell Technologies,目录号10970)和IL-2(300单位/mL)的Treg培养基中再刺激过夜静息的Treg。在开始测定前一天,将冷冻的同种异体或自体PBMC解冻并用细胞示踪紫(CTV)如下标记:在用含有0.1%BSA的PBS洗涤PBMC两次后,将细胞以2.5x10⁷个细胞/mL重悬于相同缓冲液中。将等体积的CTV(12.5 μM)缓慢添加到细胞悬液中,然后在室温下在黑暗中温育8分钟。将标记的细胞用10倍体积的Treg培养基洗涤三次,并以1x10⁶个细胞/mL重悬于含有IL-2(100单位/mL)的相同培养基中。第二天,将标记的PBMCs洗涤一次以除去残留的IL-2,并以5x10⁵个细胞/mL重悬于Treg培养基中。然后将每孔五十微升的这种细胞悬液添加到两个96孔u型底板中(每个测定一个)。将预活化的

Treg细胞洗涤两次以除去IL-2和四聚体,并以 5×10^5 个细胞/mL重悬于Treg培养基中。在单独的板上一式两份制备Treg细胞的5步2倍连续稀释液,将50 μ l从该板转移到两个测定板中的每一个,使得Treg:PBMC比率为1/1-1/16,最后一行仅含有PBMC。将Dynabeads人Treg扩增物(ThermoFisher Scientific,目录号11129D,7'500个珠/孔)和APC缀合的抗人CD40L mAb(克隆24-31,BioLegend目录号310805,1:50稀释)添加到FastImmune测定的每个孔中,最终体积为0.2mL/孔。向体外抑制测定板中每孔添加0.1mL ImmunoCult CD3/28/2四聚体(3 μ l/mL)。在37°C下温育7-12小时后,停止FastImmune测定并用CD3(克隆HIT3a)、CD4(克隆SK3)、CD8(克隆SK1)和CD69(克隆FN50)的mAb(所有mAb均购自BioLegend)对细胞进行染色。通过流式细胞术比较在不存在和存在Treg的情况下培养的T效应细胞上CD40L和CD69的表达(平均荧光强度)来确定Treg抑制水平。在温育4天后终止常规抑制测定,并对细胞进行CD3、CD4和CD8染色(参见上文的克隆和供应商)。通过流式细胞术捕获CTV稀释液的CD4和CD8 T效应细胞,并使用FlowJo(TreeStar Inc)中的分裂指数计算原始群体中的细胞经历的平均细胞分裂次数。

[0416] 实施例2:连续刺激与不连续刺激对Treg扩增的影响

[0417] 进行测定以测试是否可以通过实施不连续刺激方案(其中刺激期(即,当存在刺激时)之后是非刺激条件期(即,当不存在刺激时))来加速Treg的生长。将人Treg从分离自外周血的CD4+T细胞中FACS分选为CD45RA⁺CD25^{hi}CD127^{lo},然后在存在IL-2和NAC的情况下用CD3/28/2四聚抗体(空心符号)或CD3/28包被的磁性Dynabeads刺激。在培养3天后,洗涤细胞,对其进行计数,然后分成具有或不具有四聚抗体(Ab)/Dynabeads的含有培养基和IL-2的两个单独的孔。在培养的第6天,再次对细胞进行计数,此时与连续刺激的Treg仅生长到约20倍相比,不连续刺激的Treg已生长到约40倍。(参见图1。)无论是否用四聚Ab或Dynabeads刺激细胞,都观察到两种条件之间的生长差异。(参见同上。)

[0418] 实施例3:连续刺激与不连续刺激对Treg活化的影响

[0419] 进行测定以评估3天的非刺激条件对Treg活化状态的影响。与细胞前向散射(FSC)分布成比例的相对细胞大小是体外培养的T细胞的活化状态的常用指标:相对于已接受T细胞受体(TCR)连接的活化细胞,原始细胞具有较小的表面积,因此具有较低的FSC值。本实验的结果表明,已刺激3天然后是3天的非刺激条件的Treg比已连续刺激6天的Treg具有显著更小的表面积。(参见图2。)

[0420] 实施例4:延长非刺激对Treg生长的影响

[0421] 进行测定以证明Treg生长如何受到延长的非刺激条件时段的影响。如图1所示,当刺激之后是3天的非刺激条件时段时,Treg生长加速。当非刺激条件的时段延长至7天时,与标准条件(连续刺激)相比,被确定为第0天与第11天之间的倍数扩增的生长降低,即使在第10天再刺激Treg时也是如此。(参见图3。)

[0422] 实施例5:连续刺激与不连续刺激对工程化Treg的生长的影响

[0423] 进行测定以比较经受不连续刺激(DSORTTM)或连续刺激(标准)的Treg的CRISPR工程化后的细胞恢复。当细胞已扩增到约250倍时进行工程化。DSORTTM Treg在第8天已扩增到约250倍;标准Treg在第11天已扩增到约250倍。使用与Cas9蛋白一起转染(电穿孔)到细胞中的针对Treg无关基因Or1a1的单指导RNA(sgRNA)进行工程化。

[0424] 在转染当天、转染后一天、然后在研究的剩余时间内每1-2天测定活Treg的数量。

虽然DSORT™ Treg (空心正方形)在工程化后继续生长另外3倍,但标准Treg (实心圆形)在转染后未能恢复到工程化前的水平。(参见图4。)

[0425] 实施例6:DSORT™扩增与其他扩增方案的比较

[0426] 将DSORT™ Treg的生长速率与使用可公开获得的离体扩增方案产生的Treg的生长速率进行比较。结果在图5中示出。上图示出了从3个不同供体分离并在扩增的第8天针对对照基因 (Or1a1) 工程化的Treg的离体DSORT™扩增的11天内的细胞数量 (左侧y轴) 和倍数扩增 (右侧y轴)。下表示出了来自2015至2019年发表的各种研究的Treg的对应倍数扩增。在这些发表的研究中,将Treg培养超过11天并且不进行工程化。表中包括来自上图的DSORT™ Treg的平均倍数扩增 (标记为“KSQ Tx 2020”) 以供参考。该表中的结果证明,工程化DSORT™ Treg的倍数扩增几乎是在经受其他扩增方案的非工程化Treg中观察到的甚至最高扩增倍数的两倍。

[0427] 实施例7:连续刺激与不连续刺激对Treg的稳定性的影响

[0428] 进行测定以说明Treg在经受不连续刺激时如何在体外保持谱系稳定性。

[0429] Helios是一种增强Treg中Foxp3的表达的转录因子。从一代细胞到下一代细胞保持稳定性的Treg具有完全去甲基化的Treg特异性去甲基化区域 (TSDR, Foxp3基因内的一个基因座), 而已在体外从效应T细胞转化的Treg (所谓的诱导Treg) 或在炎性条件下易于失去稳定的Treg的TSDR是部分甲基化的。基于Foxp3和Helios的表达将本实验中的Treg分选为四个亚群。然后使用DNA甲基化测定 (焦磷酸测序) 分析分选的细胞以确定TSDR基因座处的甲基化水平。图6A中所示的结果证明,仅Helios+Treg具有完全去甲基化的TSDR。

[0430] 使具有不同比例的Helios+细胞的Treg经受测量Treg抑制T效应细胞增殖的能力的常规体外抑制测定。在图6B中,相对于Helios+Treg的比例 (y轴) 对抑制水平 (x轴, 描绘为倍数变化, FC) 作图。具有高比例的Helios+细胞的Treg在抑制T效应细胞增殖方面优于具有低比例的Helios+细胞的Treg。该数据支持Helios作为Treg功能标记物的重要性。

[0431] 在培养的第12天,将使用DSORT™方案产生的Helios+Treg的比例与使用标准 (连续刺激的) Treg产生的Helios+Treg的比例进行比较。图6C中所示的结果证明,使用DSORT™方案产生的较大比例的Treg是Helios+。

[0432] 实施例8:连续刺激与不连续刺激对Treg抑制活性的影响

[0433] 进行测定以比较DSORT™ (实心正方形) 和标准 (连续刺激的) Treg (空心正方形) 的抑制功能 (图7)。图7中呈现的图表示出了在各种Treg与PBMC比率 (x轴) 下CD4+效应T细胞的增殖 (描绘为y轴上最大增殖的%)。图表中的水平虚线表示IC50 (50%抑制时的Treg:PBMC比率)。图7中呈现的表格示出了来自多个供体的DSORT™和标准Treg的IC50值。基于这些数据,DSORT™ Treg的抑制活性是标准Treg的至少8倍。

[0434] ***

[0435] 本文引用的所有专利和出版物均以引用方式整体充分并入本文。

序列表

- <110> KSQ治疗剂公司
 <120> 用于扩增调节性T细胞的方法
 <130> 4195.022PC01
 <150> US 63/152,787
 <151> 2021-02-23
 <160> 7
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 莫罗单抗重链
 <400> 1

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr
 20 25 30
 Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly Gly Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser

1	5	10	15
His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr			
	20	25	30
Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro			
	35	40	45
Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu			
	50	55	60
Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His			
65	70	75	80
Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu			
	85	90	95
Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr			
	100	105	110
Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser			
	115	120	125
Ile Ile Ser Thr Leu Thr			
130			
<210> 4			
<211> 132			
<212> PRT			
<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
<220>			
<223> 阿地白介素			
<400> 4			
Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu			
1	5	10	15
Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn			
	20	25	30
Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys			
	35	40	45
Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro			
	50	55	60
Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg			
65	70	75	80
Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys			
	85	90	95
Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr			
	100	105	110
Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile			

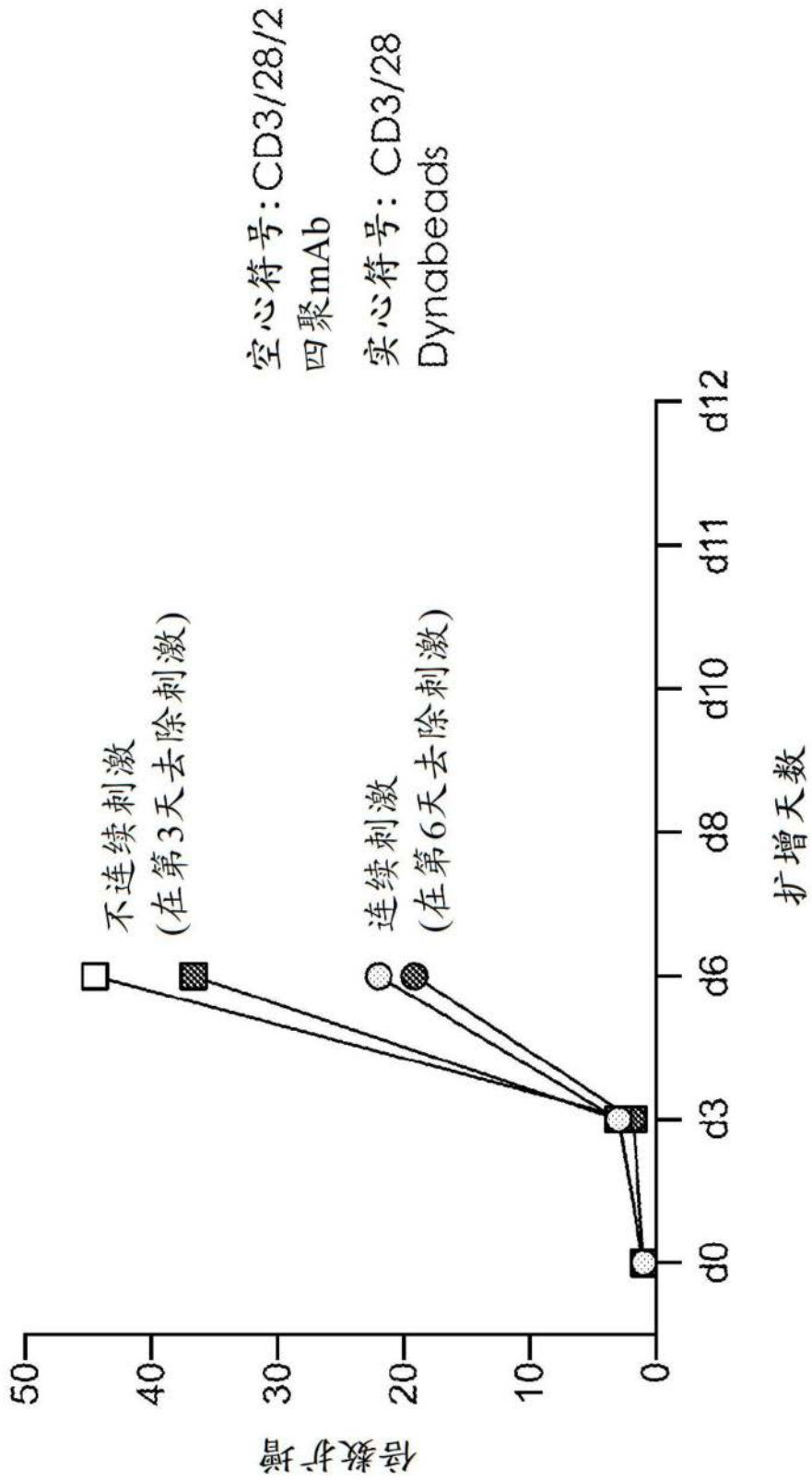


图1

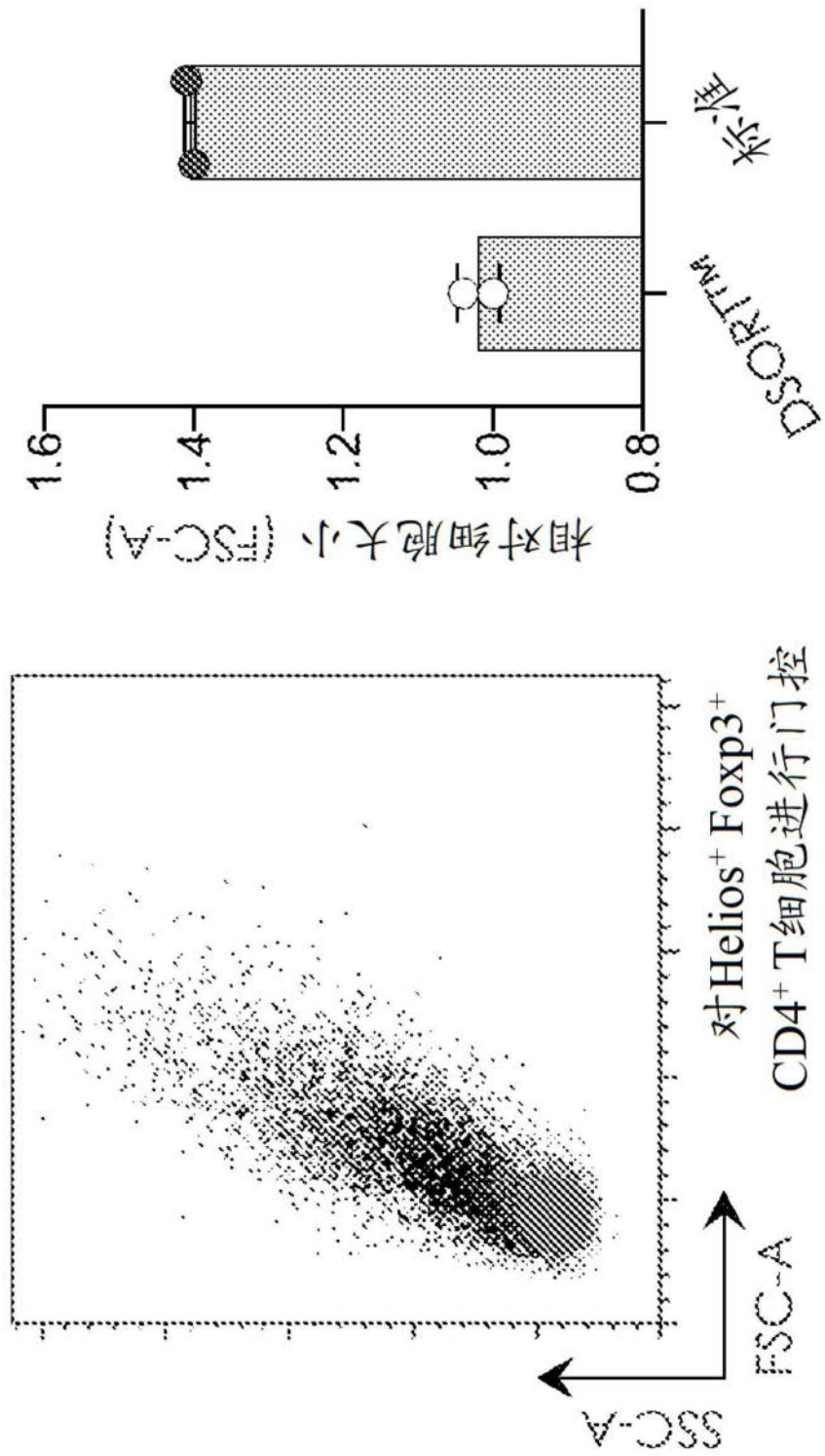


图2

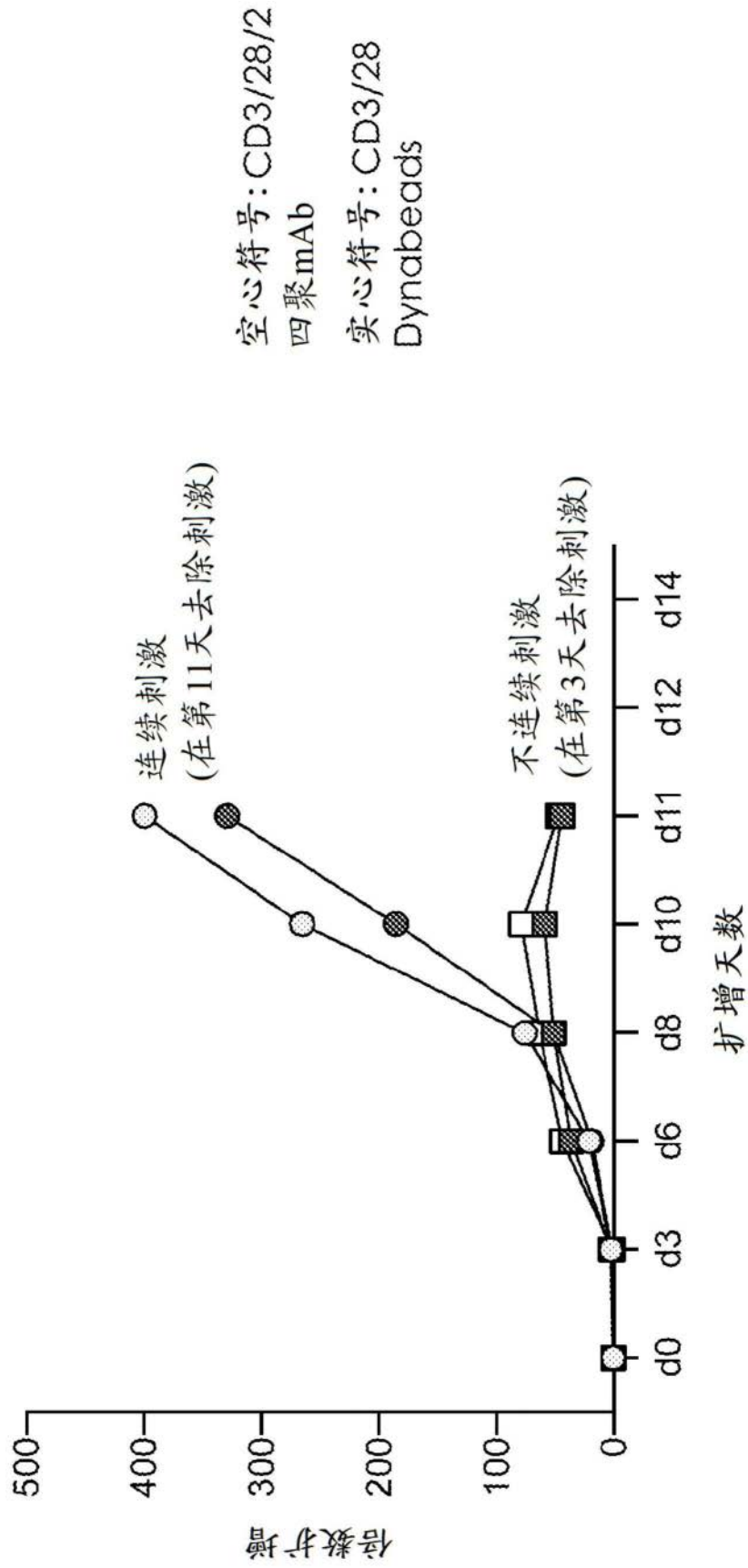


图3

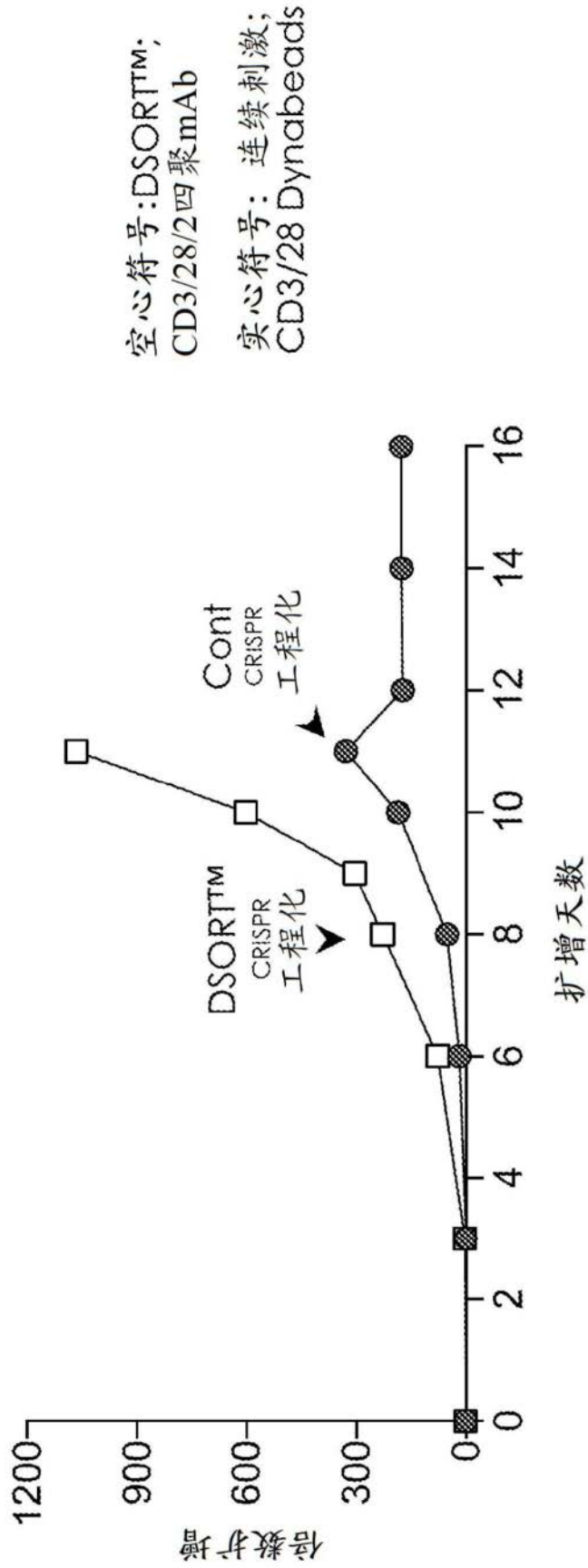


图4

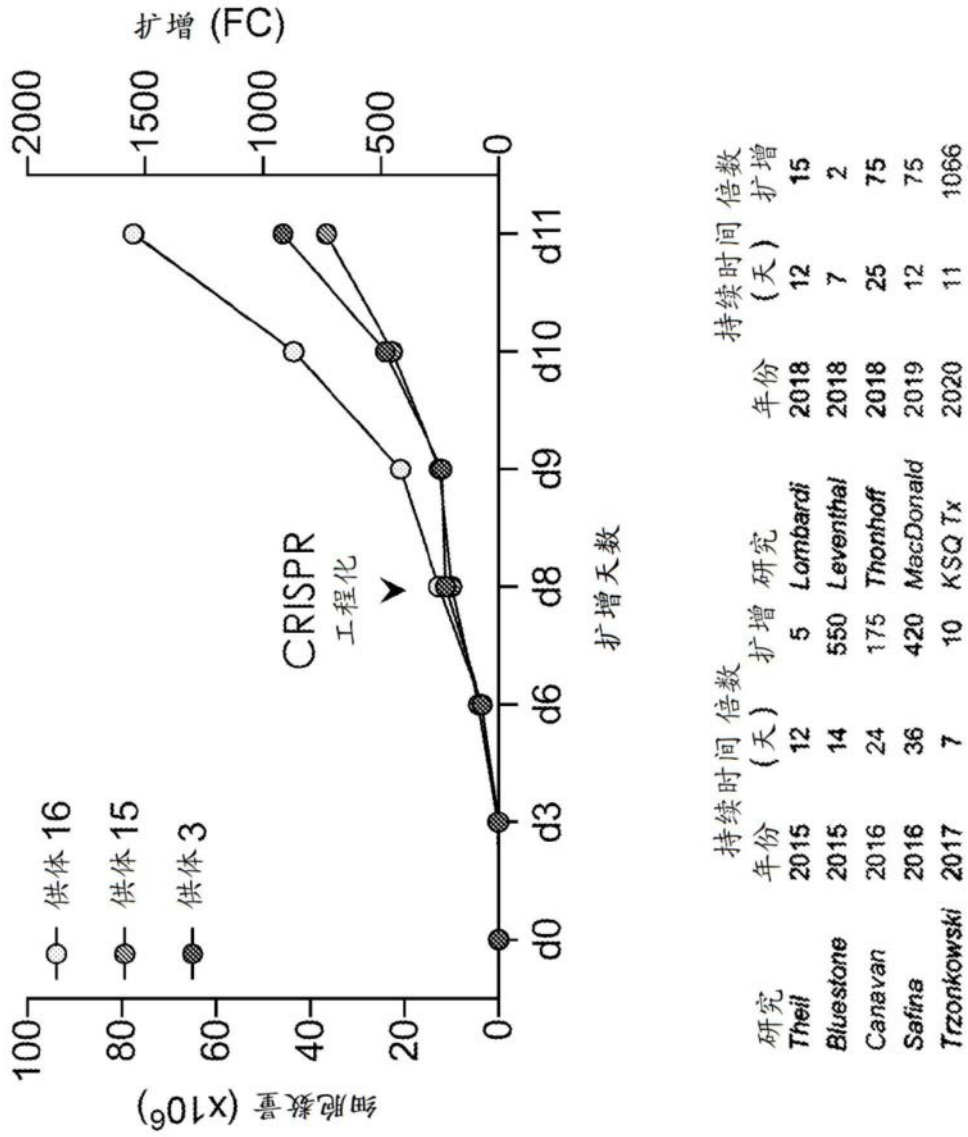


图5

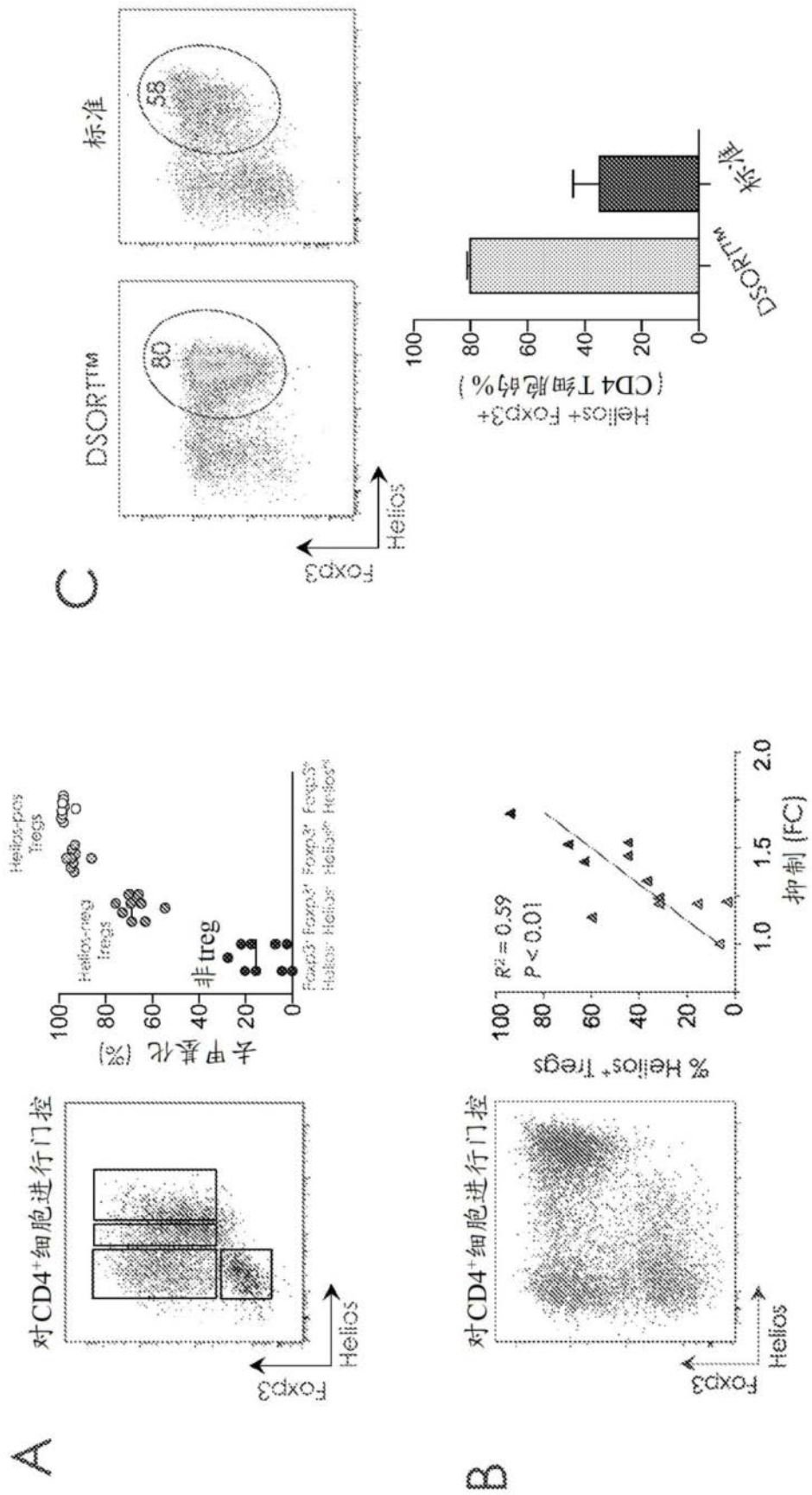
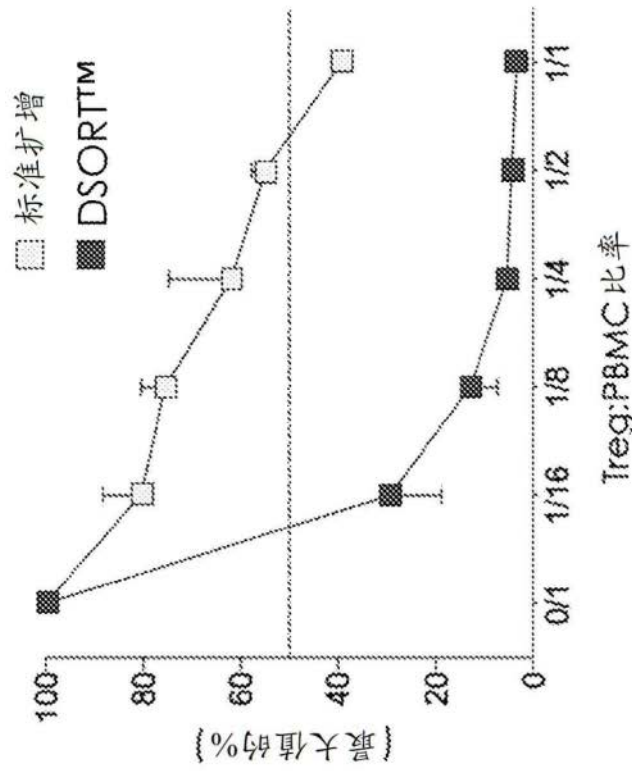


图6



方案	供体	扩增(d)	IC50
标准	D12	16	1/2
DSORT™	D3	10	1/16
DSORT™	D15	10	1/20
DSORT™	D16	10	1/20

8-10倍

表: 标准与DSORT™ Treg的IC50
(抑制50% Teff 增殖所需的
Treg:PBMC比率)

图7

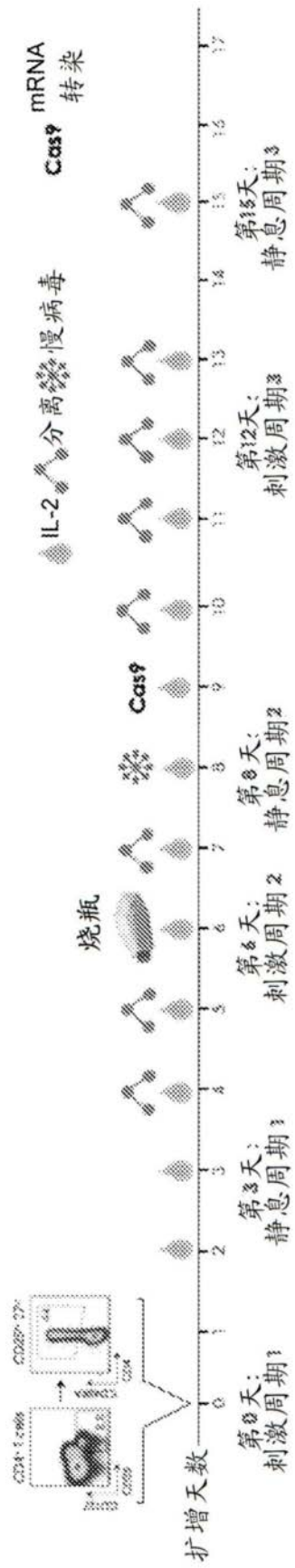


图8