(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 113906133 A
(43)申请公布日 2022.01.07

(21)申请号 202080031737.3
(22)申请日 2020.04.08
(30)优先权数据
62/832,622 2019.04.11 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.10.27
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2020/027327 2020.04.08
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/210398 EN 2020.10.15
(71)申请人 菲特治疗公司
地址 美国加利福尼亚州
(72)发明人 B·瓦拉梅尔 T·T·李 A·威蒂 M·普利巴蒂
(74)专利代理机构 北京世峰知识产权代理有限公司 11713
代理人 王建秀 王思琪
(51)Int.Cl.
*C12N 5/074*(2006.01)
*C07K 14/725*(2006.01)
*C12N 15/10*(2006.01)
*A61K 35/545*(2006.01)
*A61K 35/17*(2006.01)
*A61P 37/00*(2006.01)
*A61P 35/00*(2006.01)
*A61P 31/12*(2006.01)

权利要求书10页 说明书94页
序列表35页 附图18页

(54)发明名称

工程改造的iPSC和免疫效应细胞中的CD3重建

(57)摘要

提供用于获得功能增强的衍生效应细胞的方法和组合物,所述效应细胞是由定向分化基因组工程改造的iPSC而获得。本文所提供的所述iPSC衍生细胞具有递送改善或增强的治疗效果的稳定且功能性基因组编辑。还提供治疗组合物和其用途,所述治疗组合物包含单独的所述功能增强的衍生效应细胞,或在组合疗法中包含所述功能增强的衍生效应细胞与抗体或检查点抑制剂。

CN 113906133 A

1.一种细胞或其群体,其中

(i)所述细胞为诱导性多能细胞(iPSC)、克隆iPSC或克隆iPS细胞系细胞或由分化所述iPSC而获得的衍生细胞;且

(ii)所述细胞为$TCR^{neg}$,且包含一种或多种编码一种或多种外源蛋白质的多核苷酸以在表达时提供细胞表面CD3复合物或其一个或多个亚单位或子结构域(cs-CD3)。

2.根据权利要求1所述的细胞或其群体,其中所述细胞表面CD3复合物或其一个或多个亚单位或子结构域(cs-CD3):

(i)与非结合重组TCR(nb-rTCR)缔合;

(ii)与限定重组TCR(d-rTCR)缔合;

(iii)与重组前TCR(p-TCR)缔合;

(iv)锚定于非结合重组TCR(nb-rTCR-CD3);或

(v)为CD3嵌合链(ccCD3)。

3.根据权利要求1所述的细胞或其群体,其中所述一种或多种多核苷酸编码包含以下中的一个或多个的外源性蛋白质:

(i)转基因TCRα恒定区(tgTRAC);

(ii)转基因TCRβ恒定区(tgTRBC);

(iii)转基因TCRα(tgTCRα);

(iv)转基因TCRβ(tgTCRβ);

(v)转基因前TCRα(tgpTCRα);

(vi)包含CD3ε和CD3δ的全部或部分长度的胞外域,和全部或部分TCRα恒定区的转基因融合蛋白(tgCD3(ε-δ)-TRAC);

(vii)包含CD3ε和CD3γ的全部或部分长度的胞外域,和全部或部分TCRβ恒定区的转基因融合蛋白(tgCD3(ε-γ)-TRBC);

(viii)包含CD3ε和CD3γ的全部或部分长度的胞外域,和全部或部分TCRα恒定区的转基因融合蛋白(tgCD3(ε-γ)-TRAC);

(ix)包含CD3ε和CD3δ的全部或部分长度的胞外域,和全部或部分TCRβ恒定区的转基因融合蛋白(tgCD3(ε-δ)-TRBC);

(x)包含CD3ε和CD3γ的全部或部分长度的胞外域,和CD3ζ的全部或部分长度的胞内域的转基因融合蛋白(tgCD3(ε-γ)-ζ);

(xi)包含CD3ε和CD3δ的全部或部分长度的胞外域,和CD3ζ的全部或部分长度的胞内域的转基因融合蛋白(tgCD3(ε-δ)-ζ);

(xii)包含CD3ε的全部或部分长度的胞外域的转基因融合蛋白、包含CD3γ或CD3δ的全部或部分长度的胞外域、CD3ζ的全部或部分长度的胞内域和CD28的信号传导结构域的转基因融合蛋白(tgCD3(ε-γ/δ)-28ζ);

(xiii)包含CD3ε的全部或部分长度的胞外域的转基因融合蛋白、包含CD3γ或CD3δ的全部或部分长度的胞外域、CD3ζ的全部或部分长度的胞内域和41BB的信号传导结构域的转基因融合蛋白(tgCD3(ε-γ/δ)-BBζ);和/或

(xiv)包含以下的转基因融合蛋白(tgCD3(ε-γ/δ)-(28-BB)ζ):CD3γ或CD3δ的全部或部分长度的胞外域、CD3ζ的全部或部分长度的胞内域、CD28的信号传导结构域和41BB的信

号传导结构域。

4.根据权利要求3所述的细胞或其群体，

其中将所述一种或多种编码以下的多核苷酸插入于TRAC基因座中，且任选地在插入后可操作地连接到TRAC的内源启动子：tgTRAC、tgTCRα、tgpTCRα、tgCD3(ε-δ)-TRAC、tgCD3(ε-γ)-TRAC、tgCD3(ε-γ)-ζ、tgCD3(ε-δ)-ζ、tgCD3(ε-γ/δ)-28ζ、tgCD3(ε-γ/δ)-BBζ或tgCD3(ε-γ/δ)-(28-BB)ζ；或

其中将所述一种或多种编码以下的多核苷酸插入于TRBC基因座中，且任选地在插入后可操作地连接到TRBC的内源启动子：tgTRBC、tgTCRβ、tgCD3(ε-γ)-TRBC、tgCD3(ε-δ)-TRBC、tgCD3(ε-γ)-ζ、tgCD3(ε-δ)-ζ、tgCD3(ε-γ/δ)-28ζ、tgCD3(ε-γ/δ)-BBζ和/或tgCD3(ε-γ/δ)-(28-BB)ζ。

5.根据权利要求4所述的细胞或其群体，

其中所述编码tgTRAC的多核苷酸包含编码TCRα的全部或部分长度的恒定区的序列，和任选的N端信号肽；或

其中所述编码tgTRAC的多核苷酸包含编码TCRα的全部长度的恒定区和C端处的聚A尾的序列，和任选的N端信号肽；或

其中所述编码tgTRAC的多核苷酸包含编码TCRα的部分长度的恒定区的序列，和任选的N端信号肽；并且其中所述多核苷酸的所述插入是在所述恒定区的外显子中且在框内；或

其中所述编码tgTRBC的多核苷酸包含编码TCRβ的全部或部分长度的恒定区的序列，和任选的N端信号肽；或

其中所述编码tgTRBC的多核苷酸包含编码TCRβ的全部长度的恒定区和C端处的聚A尾的序列，和任选的N端信号肽；或

其中所述编码tgTRBC的多核苷酸包含编码TCRβ的部分长度的恒定区的序列，和任选的N端信号肽；并且其中所述多核苷酸的所述插入是在所述恒定区的外显子中且在框内。

6.根据权利要求4所述的细胞或其群体，其中所述一种或多种插入于TRAC和/或TRBC基因座中的多核苷酸分别破坏TRAC和TRBC的表达，从而产生$TCR^{neg}$细胞。

7.根据权利要求6所述的细胞或其群体，其中所述一种或多种插入于TRAC和/或TRBC基因座中的多核苷酸是由(i)分别为TRAC和TRBC的内源启动子，或(ii)异源启动子驱动。

8.根据权利要求7所述的细胞或其群体，其中所述异源启动子包含：(i)组成性、诱导性、时间特异性、组织特异性或细胞类型特异性启动子中的至少一种；或(ii)CMV、EF1α、PGK、CAG和UBC中的一种；或(iii)CAG。

9.根据权利要求2所述的细胞或其群体，其中

(i)所述nb-rTCR包含tgTRAC和tgTRBC中的一种或两种；

(ii)所述d-rTCR包含tgTCRα和任选的tgTCRβ，其中所述tgTCRα和所述tgTCRβ中的每一者包含相应的限定可变区；

(iii)所述p-rTCR包含tgpTCRα和任选的tgTRBC或tgTCRβ，其中所述tgTCRβ包含限定可变区；

(iv)所述nb-rTCR-CD3包含以下融合蛋白中的一种或多种：(1)tgCD3(ε-δ)-TRAC；(2)tgCD3(ε-γ)-TRBC；(3)tgCD3(ε-γ)-TRAC；和/或(4)tgCD3(ε-δ)-TRBC，其中所述融合蛋白包含CD3ε、CD3δ、CD3γ的全部或部分长度的胞外域，和/或全部或部分长度的TRAC或TRBC；

或

(v)所述ccCD3包含以下融合蛋白中的至少一种:tgCD3(ε-γ)-ζ、tgCD3(ε-δ)-ζ、tgCD3(ε-γ/δ)-28ζ、tgCD3(ε-γ/δ)-BBζ和tgCD3(ε-γ/δ)-(28-BB)ζ,其中包含CD3ε、CD3δ和/或CD3γ蛋白质的全部或部分长度的胞外域的所述融合蛋白进一步包含:细胞质结构域,其包含CDζ蛋白质的全部或部分长度胞内域;和任选地CD28信号传导结构域和41BB信号传导结构域中的一种或两种。

10.根据权利要求9所述的细胞或其群体,其中所述包含融合蛋白tgCD3(ε-δ)-TRAC的nb-rTCR-CD3进一步包含tgTRBC或tgTCRβ;或其中所述包含融合蛋白tgCD3(ε-γ)-TRBC的nb-rTCR-CD3进一步包含tgTRAC或tgTCRα;或其中所述包含tgTCRα和tgTCRβ的d-rTCR包含恒定NKT细胞的TCRα和TCRβ。

11.根据权利要求9所述的细胞或其群体,其中

(i)所述细胞包含以下所述重组TCR中的一种:nb-rTCR、d-rTCR或p-rTCR,其中所述重组TCR与内源性CD3亚单位复合,由此能够实现内源性CD3亚单位的细胞表面呈递和其信号传导;或其中

(ii)所述细胞包含nb-rTCR-CD3或ccCD3,由此能够实现外源性CD3亚单位的细胞表面呈递和其信号传导。

12.根据权利要求1所述的细胞或其群体,其中所述衍生细胞为造血细胞,并且包含与其从外周血、脐带血或任何其它供体组织获得的天然对应细胞相比更长的端粒。

13.根据权利要求1所述的细胞或其群体,其中所述细胞进一步包含以下中的一种或多种:

(i)B2M阴性或较低;

(ii)CIITA阴性或较低;

(iii)HLA-G或不可裂解的HLA-G的引入表达;

(iv)高亲和力不可裂解的CD16(hnCD16)或其变体;

(v)嵌合抗原受体(CAR),

(vi)细胞表面表达的外源细胞因子或其受体的部分或全长肽;

(vii)表1中所列的基因型中的至少一种;

(viii)以下中的至少一种的缺失或表达减少:CD38、TAP1、TAP2、TAP相关蛋白(Tapasin)、NLRC5、PD1、LAG3、TIM3、RFXANK、CIITA、RFX5、RFXAP、RAG1和染色体6p21区域中的任何基因;和

(ix)以下中的至少一种的表达引入或增加:HLA-E、41BBL、CD4、CD8、CD16、CD47、CD113、CD131、CD137、CD80、PDL1、$A_{2A}R$、CAR、Fc受体、接合体和用于与双特异性或多特异性或通用接合体偶合的表面触发受体。

14.根据权利要求1或13所述的细胞或其群体,其中所述细胞为衍生NK细胞或衍生T细胞,并且与其从外周血、脐带血或任何其它供体组织中获得的天然对应细胞相比,具有以下特征中的至少一种,所述特征包含:

(i)存留和/或存活改善;

(ii)对天然免疫细胞的抗性增加;

(iii)细胞毒性增加;

(iv)肿瘤渗透改善;

(v)ADCC增强或获得;

(vi)将旁观者免疫细胞迁移到肿瘤部位和/或活化或募集到肿瘤部位的能力增强;

(vii)降低肿瘤免疫抑制的能力增强;

(viii)挽救肿瘤抗原逃逸的能力提高;和

(ix)自残减少。

15.根据权利要求13所述的细胞或其群体,其中所述细胞进一步包含高亲和力不可裂解的CD16(hnCD16)或其变体。

16.根据权利要求15所述的细胞或其群体,其中所述高亲和力不可裂解的CD16(hnCD16)或其变体包含以下中的至少一种:

(a)CD16的胞外域中的F176V和S197P;

(b)源自CD64的全部或部分胞外域;

(c)非天然(或非CD16)跨膜结构域;

(d)非天然(或非CD16)胞内结构域;

(e)非天然(或非CD16)信号传导结构域;

(f)非天然刺激结构域;和

(g)并非源自CD16且源自相同或不同多肽的跨膜结构域、信号传导结构域和刺激结构域。

17.根据权利要求16所述的细胞或其群体,其中

(a)所述非天然跨膜结构域衍生自CD3D、CD3E、CD3G、CD3ζ、CD4、CD8、CD8a、CD8b、CD27、CD28、CD40、CD84、CD166、4-1BB、OX40、ICOS、ICAM-1、CTLA-4、PD-1、LAG-3、2B4、BTLA、CD16、IL7、IL12、IL15、KIR2DL4、KIR2DS1、NKp30、NKp44、NKp46、NKG2C、NKG2D或T细胞受体(TCR)多肽;

(b)所述非天然刺激结构域衍生自CD27、CD28、4-1BB、OX40、ICOS、PD-1、LAG-3、2B4、BTLA、DAP10、DAP12、CTLA-4或NKG2D多肽;

(c)所述非天然信号传导结构域衍生自CD3ζ、2B4、DAP10、DAP12、DNAM1、CD137(41BB)、IL21、IL7、IL12、IL15、NKp30、NKp44、NKp46、NKG2C或NKG2D多肽;或

(d)所述非天然跨膜结构域衍生自NKG2D,所述非天然刺激结构域衍生自2B4,并且所述非天然信号传导结构域衍生自CD3ζ。

18.根据权利要求13所述的细胞或其群体,其中所述细胞进一步包含嵌合抗原受体(CAR),并且其中所述CAR为:

(i)T细胞特异性或NK细胞特异性;

(ii)双特异性抗原结合CAR;

(iii)可切换CAR;

(iv)二聚化CAR;

(v)分离CAR;

(vi)多链CAR;

(vii)诱导性CAR;

(viii)与另一CAR共表达;

(ix)任选地在单独构建体中或在双顺反子构建体中,与细胞表面表达的外源细胞因子或其受体的部分或全长肽共表达;

(xi)任选地在单独构建体中或在双顺反子构建体中,与检查点抑制剂共表达;

(xii)对CD19或BCMA具有特异性;和/或

(xiii)对以下中的任一种具有特异性:ADGRE2、碳酸酐酶IX(CAIX)、CCRI、CCR4、癌胚抗原(CEA)、CD3、CD5、CD7、CD8、CD10、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD34、CD38、CD41、CD44、CD44V6、CD49f、CD56、CD70、CD74、CD99、CD123、CD133、CD138、CDS、CLEC12A、巨细胞病毒(CMV)感染细胞的抗原、上皮糖蛋白2(EGP 2)、上皮糖蛋白-40(EGP-40)、上皮细胞粘附分子(EpCAM)、EGFRvIII、受体酪氨酸-蛋白激酶erb-B2,3,4、EGFIR、EGFR-VIII、ERBB叶酸结合蛋白(FBP)、胎儿乙酰胆碱受体(AChR)、叶酸受体-a、神经节苷脂G2(GD2)、神经节苷脂G3(GD3)、人类表皮生长因子受体2(HER-2)、人类端粒酶逆转录酶(hTERT)、ICAM-1、整合素B7、白介素-13受体亚单位α-2(IL-13Rα2)、κ-轻链、激酶插入结构域受体(KDR)、路易斯A(Lewis A)(CA19.9)、路易斯Y(LeY)、L1细胞粘附分子(L1-CAM)、LILRB2、黑色素瘤抗原家族A1(MAGE-A1)、MICA/B、粘蛋白1(Muc-1)、粘蛋白16(Muc-16)、间皮素(MSLN)、NKCSI、NKG2D配体、c-Met、癌症睾丸抗原NY-ESO-1、癌胚抗原(h5T4)、PRAME、前列腺干细胞抗原(PSCA)、PRAME前列腺特异性膜抗原(PSMA)、肿瘤相关糖蛋白72(TAG-72)、TIM-3、TRBC1、TRBC2、血管内皮生长因子R2(VEGF-R2)、威尔姆斯肿瘤蛋白(Wilms tumor protein)(WT-1)和病原体抗原;

其中(i)至(xiii)中的任一项的所述CAR任选地插入于TRAC基因座处,和/或由TCR的内源启动子驱动,和/或所述TCR是通过CAR插入而基因敲除。

19.根据权利要求13所述的细胞或其群体,其中所述细胞包含细胞表面表达的外源细胞因子或其受体的部分或全长肽,所述外源细胞因子或其受体

(a)包含以下中的至少一种:IL2、IL4、IL6、IL7、IL9、IL10、IL11、IL12、IL15、IL18、IL21和其相应受体;或

(b)包含以下中的至少一种:

(i)通过使用自裂解肽进行IL15和IL15Rα的共表达;

(ii)IL15和IL15Rα的融合蛋白;

(iii)具有截短IL15Rα的胞内结构域的IL15/IL15Rα融合蛋白;

(iv)IL15与IL15Rα的膜结合Sushi结构域的融合蛋白;

(v)IL15和IL15Rβ的融合蛋白;

(vi)IL15和共同受体γC的融合蛋白,其中所述共同受体γC为天然或经修饰的;和

(vii)IL15Rβ的均二聚体;

其中(i)至(vii)中的任一者可在单独构建体中或在双顺反子构建体中与CAR共表达;

并且任选地,

(c)瞬时表达。

20.根据权利要求13所述的细胞或其群体,其中所述细胞为衍生NK细胞或衍生T细胞,其中所述衍生NK细胞能够将T细胞募集和/或迁移到肿瘤部位,并且其中所述衍生NK细胞或所述衍生T细胞能够在一种或多种检查点抑制剂的存在下降低肿瘤免疫抑制。

21.根据权利要求18或20所述的细胞或其群体,其中所述检查点抑制剂为针对一种或

多种检查点分子的拮抗剂,所述检查点分子包含PD-1、PDL-1、TIM-3、TIGIT、LAG-3、CTLA-4、2B4、4-1BB、4-1BBL、A2aR、BATE、BTLA、CD39、CD47、CD73、CD94、CD96、CD160、CD200、CD200R、CD274、CEACAM1、CSF-1R、Foxpl、GARP、HVEM、IDO、EDO、TDO、LAIR-1、MICA/B、NR4A2、MAFB、OCT-2、Rara(视黄酸受体α)、TLR3、VISTA、NKG2A/HLA-E或抑制性KIR。

22.根据权利要求21所述的细胞或其群体,其中所述检查点抑制剂包含:

(a)以下中的一种或多种:阿特珠单抗(atezolizumab)、阿维鲁单抗(avelumab)、度伐单抗(durvalumab)、伊匹单抗(ipilimumab)、IPH4102、IPH43、IPH33、利瑞木单抗(lirimumab)、莫那利珠单抗(monalizumab)、纳武单抗(nivolumab)、派立珠单抗(pembrolizumab)和其衍生物或功能等效物;或

(b)阿特珠单抗、纳武单抗和派立珠单抗中的至少一种。

23.根据权利要求1所述的细胞或其群体,其中所述衍生细胞包含衍生CD34细胞、衍生造血干细胞和祖细胞、衍生造血多潜能祖细胞、衍生T细胞祖细胞、衍生NK细胞祖细胞、衍生T细胞、衍生NKT细胞、衍生NK细胞或衍生B细胞。

24.根据权利要求1所述的细胞或其群体,其中所述细胞包含:

(i)一种或多种整合于一个安全港(safe harbor)基因座中的外源多核苷酸;或

(ii)超过两种整合于不同安全港基因座中的外源多核苷酸;或

(iii)编码包含与SEQ ID NO:17、19或21至少75%、80%、85%、90%、95%或99%一致的氨基酸序列的IL15Δ的多核苷酸。

25.根据权利要求24所述的细胞或其群体,其中所述安全港基因座包含以下中的至少一种:AAVS1、CCR5、ROSA26、胶原蛋白、HTRP、H11、β-2微球蛋白、CD38、GAPDH、TCR、CD38、RUNX1或TCR。

26.根据权利要求25所述的细胞或其群体,其中所述安全港基因座TCR为TCRα或TCRβ的恒定区。

27.一种克隆主细胞库,其包含根据权利要求1至26中任一项所述的克隆iPSC细胞系细胞。

28.一种组合物,其包含根据权利要求1至26中任一项所述的细胞或其群体。

29.一种用于治疗用途的组合物,其包含根据权利要求1至26中任一项所述的衍生细胞和一种或多种治疗剂。

30.根据权利要求29所述的组合物,其中所述治疗剂包含肽、细胞因子、检查点抑制剂、丝裂原(mitogen)、生长因子、小RNA、dsRNA(双链RNA)、单核血细胞、饲养细胞、饲养细胞组分或其置换因子、包含一种或多种所关注多核酸的载体、抗体、化学治疗剂或放射性部分,或免疫调节药物(IMiD)。

31.根据权利要求30所述的组合物,其中

(a)所述检查点抑制剂包含:

(i)一种或多种针对检查点分子的拮抗剂,所述检查点分子包含PD-1、PDL-1、TIM-3、TIGIT、LAG-3、CTLA-4、2B4、4-1BB、4-1BBL、A2aR、BATE、BTLA、CD39、CD47、CD73、CD94、CD96、CD160、CD200、CD200R、CD274、CEACAM1、CSF-1R、Foxpl、GARP、HVEM、IDO、EDO、TDO、LAIR-1、MICA/B、NR4A2、MAFB、OCT-2、Rara(视黄酸受体α)、TLR3、VISTA、NKG2A/HLA-E或抑制性KIR;

(ii)以下中的一种或多种:阿特珠单抗、阿维鲁单抗、度伐单抗、伊匹单抗、IPH4102、

IPH43、IPH33、利瑞木单抗、莫那利珠单抗、纳武单抗、派立珠单抗和其衍生物或功能等效物;

(iii)阿特珠单抗、纳武单抗和派立珠单抗中的至少一种;或

(b)所述治疗剂包含维纳妥拉(venetoclax)、阿扎胞苷(azacitidine)和泊马度胺(pomalidomide)中的一种或多种。

32.根据权利要求30所述的组合物,其中所述抗体包含:

(a)抗CD20、抗CD22、抗HER2、抗CD52、抗EGFR、抗CD123、抗GD2、抗PDL1和/或抗CD38抗体;

(b)以下中的一种或多种:利妥昔单抗(rituximab)、维妥珠单抗(veltuzumab)、奥法木单抗(ofatumumab)、乌妥昔单抗(ublituximab)、奥卡拉珠单抗(ocaratuzumab)、奥滨尤妥珠单抗(obinutuzumab)、替伊莫单抗(ibritumomab)、奥克雷珠单抗(ocrelizumab)、伊珠单抗(inotuzumab)、莫昔土莫单抗(moxetumomab)、依帕珠单抗(epratuzumab)、曲妥珠单抗(trastuzumab)、帕妥珠单抗(pertuzumab)、阿仑单抗(alemtuzumab)、西妥昔单抗(certuximab)、迪努妥昔单抗(dinutuximab)、阿维鲁单抗、达雷木单抗(daratumumab)、艾沙妥昔单抗(isatuximab)、MOR202、7G3、CSL362、埃罗妥珠单抗(elotuzumab)和其人类化或Fc修饰的变体或片段以及其功能等效物和生物类似物;或

(c)达雷木单抗,且其中所述衍生造血细胞包含衍生NK细胞或衍生T细胞,所述衍生NK细胞或衍生T细胞包含CD38基因敲除和任选地hnCD16或其变体的表达。

33.一种根据权利要求28至31中任一项所述的组合物的治疗用途,其通过将所述组合物引入到适合于过继性细胞疗法的受试者中进行,其中所述受试者患有自身免疫病症;恶性血液病;实体肿瘤;癌症或病毒感染。

34.一种制造根据权利要求1至26中任一项所述的细胞的方法,其包含分化$TCR^{neg}$ iPSC,其中所述iPSC包含一种或多种编码一种或多种外源蛋白质的多核苷酸以在表达时提供细胞表面CD3复合物或其一个或多个亚单位或子结构域(cs-CD3),并且任选地所述iPSC进一步包含以下中的一种或多种:

(i)B2M阴性或较低;

(ii)CIITA阴性或较低;

(iii)HLA-G或不可裂解的HLA-G的引入表达;

(iv)高亲和力不可裂解的CD16(hnCD16)或其变体;

(v)嵌合抗原受体(CAR);

(vi)细胞表面表达的外源细胞因子或其受体的部分或全长肽;

(vii)表1中所列的基因型中的至少一种;

(viii)以下中的至少一种的缺失或表达减少:CD38、TAP1、TAP2、TAP相关蛋白、NLRC5、PD1、LAG3、TIM3、RFXANK、CIITA、RFX5、RFXAP、RAG1和染色体6p21区域中的任何基因;和

(ix)以下中的至少一种的表达引入或增加:HLA-E、41BBL、CD3、CD4、CD8、CD16、CD47、CD113、CD131、CD137、CD80、PDL1、$A_{2A}R$、CAR、TCR、Fc受体、接合体和用于与双特异性或多特异性或通用接合体偶合的表面触发受体。

35.根据权利要求34所述的制造所述细胞的方法,其进一步包含(a)基因敲除克隆iPSC的TCR以获得基因组工程改造的$TCR^{neg}$ iPSC,且同时或随后基因敲入一种或多种编码一种

或多种外源蛋白质的多核苷酸;或

(b)将恒定NKT细胞重编程到iPSC以提供包含iTCRαβ而非T细胞-TCR的克隆iPSC,

以在表达时提供细胞表面CD3复合物或其一个或多个亚单位或子结构域(cs-CD3);和

(c)任选地通过以下对(a)或(b)的所述iPSC进行基因组工程改造:

(i)基因敲除B2M和CIITA,或

(ii)引入HLA-G或不可裂解的HLA-G、高亲和力不可裂解的CD16或其变体、CAR和/或细胞表面表达的外源细胞因子或其受体的部分或全长肽的表达;

其中所述CAR和所述细胞表面表达的外源细胞因子或其受体的部分或全部肽共表达于单独构建体中或双顺反子构建体中。

36.根据权利要求35所述的制造所述细胞的方法,其中所述步骤(a)基因敲入一种或多种编码一种或多种外源蛋白质的多核苷酸以提供cs-CD3,进一步包含向所述iPSC中引入以下中的一种:

(i)tgTRAC和tgTRBC编码多核苷酸中的一种或两种,以在表达时提供nb-rTCR;

(ii)tgTCRα和任选的tgTCRβ编码多核苷酸,以在表达时提供d-rTCR,其中所述tgTCRα和所述tgTCRβ中的每一者包含相应的限定可变区;

(iii)tgpTCRα和任选的tgTRBC或tgTCRβ编码多核苷酸,以提供p-rTCR,其中所述tgTCRβ包含限定可变区;

(iv)一种或多种编码以下融合蛋白中的一种或多种多核苷酸以提供nb-rTCR-CD3:(1)tgCD3(ε-δ)-TRAC、(2)tgCD3(ε-γ)-TRBC、(3)tgCD3(ε-γ)-TRAC和/或(4)tgCD3(ε-δ)-TRBC;其中所述融合蛋白包含CD3ε、CD3δ、CD3γ的全部或部分长度的胞外域,和/或全部或部分长度的TRAC或TRBC;或

(v)一种或多种编码以下融合蛋白中的一种或多种多核苷酸以提供ccCD3:(1)tgCD3(ε-γ)-ζ、(2)tgCD3(ε-δ)-ζ、(3)tgCD3(ε-γ/δ)-28ζ、(4)tgCD3(ε-γ/δ)-BBζ和(5)tgCD3(ε-γ/δ)-(28-BB)ζ;其中包含CD3ε、CD3δ和/或CD3γ蛋白质的全部或部分长度的胞外域的所述融合蛋白进一步包含:细胞质结构域,其包含CDζ蛋白质的全部或部分长度胞内域;和任选地CD28信号传导结构域和41BB信号传导结构域中的一种或两种。

37.根据权利要求36所述的制造所述细胞的方法,其中向所述iPSC中引入一种或多种编码(iv)的融合蛋白tgCD3(ε-δ)-TRAC的多核苷酸的步骤进一步包含引入编码tgTRBC或tgTCRβ的多核苷酸,以提供所述nb-rTCR-CD3;或

其中向所述iPSC中引入一种或多种编码(iv)的融合蛋白tgCD3(ε-γ)-TRBC的多核苷酸的步骤进一步包含tgTRAC或tgTCRα,以提供所述nb-rTCR-CD3;或

其中在向所述iPSC中引入编码tgTCRα的多核苷酸和任选地编码tgTCRβ的多核苷酸以提供所述d-rTCR的步骤中,所述tgTCRα和所述tgTCRβ分别包含恒定NKT细胞的TCRα和TCRβ。

38.根据权利要求35所述的制造所述细胞的方法,其中所述基因敲除、所述基因敲入或所述基因组工程改造包含靶向编辑。

39.根据权利要求38所述的制造所述细胞的方法,其中所述靶向编辑包含缺失、插入或插入/缺失,并且其中所述靶向编辑是通过CRISPR、ZFN、TALEN、归巢核酸酶、同源重组或这些方法的任何其它功能变化进行。

40.一种根据权利要求1至26中任一项所述的克隆iPSC的CRISPR介导编辑,其中经编辑

iPSC为$TCR^{neg}$并且包含一种或多种编码一种或多种外源蛋白质的多核苷酸以在表达时提供细胞表面CD3复合物或其一个或多个亚单位或子结构域(cs-CD3),其中所述经编辑的克隆iPSC包含表1中所列的基因型中的至少一种。

41.根据权利要求40所述的CRISPR介导编辑,其中所述编辑进一步包含在TRAC或TRBC基因座处插入CAR,和/或其中所述CAR是由TCR的内源启动子驱动,和/或其中所述TCR是通过CAR插入进行基因敲除。

42.一种组合治疗方法,其包含向处于所述治疗下的受试者提供效应细胞,所述效应细胞包含$TCR^{neg}$和一种或多种编码一种或多种外源蛋白质的多核苷酸以在表达时提供细胞表面CD3复合物或其一个或多个亚单位或子结构域(cs-CD3),和所选择的多特异性接合体,其中所述效应细胞包含根据权利要求1至26中任一项所述的衍生细胞。

43.根据权利要求42所述的方法,其中所述所选择的多特异性接合体为以下中的至少一种:(i)T细胞接合体;(ii)NK细胞接合体;(iii)双特异性T细胞接合体(BiTE);(iv)双特异性杀伤细胞接合体(BiKE);(v)三特异性杀伤细胞接合体(TriKE);(vi)CD3接合体;或(vii)CD16接合体。

44.根据权利要求42所述的方法,其中所述所选择的多特异性接合体为CD3接合体,其中所述CD3接合体包含与cs-CD3结合的第一可变区段和与抗原结合的第二可变区段,所述抗原包含以下中的至少一种:

(i)ADGRE2、碳酸酐酶IX(CAIX)、CCRI、CCR4、癌胚抗原(CEA)、CD3、CD5、CD7、CD8、CD10、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD34、CD38、CD41、CD44、CD44V6、CD49f、CD56、CD70、CD74、CD99、CD123、CD133、CD138、CDS、CLEC12A、巨细胞病毒(CMV)感染细胞的抗原、上皮糖蛋白2(EGP 2)、上皮糖蛋白-40(EGP-40)、上皮细胞粘附分子(EpCAM)、EGFRvIII、受体酪氨酸-蛋白激酶erb-B2,3,4、EGFIR、EGFR-VIII、ERBB叶酸结合蛋白(FBP)、胎儿乙酰胆碱受体(AChR)、叶酸受体-a、神经节苷脂G2(GD2)、神经节苷脂G3(GD3)、人类表皮生长因子受体2(HER-2)、人类端粒酶逆转录酶(hTERT)、ICAM-1、整合素B7、白介素-13受体亚单位α-2(IL-13Rα2)、κ-轻链、激酶插入结构域受体(KDR)、路易斯A(CA19.9)、路易斯Y(LeY)、L1细胞粘附分子(L1-CAM)、LILRB2、黑色素瘤抗原家族A1(MAGE-A1)、MICA/B、粘蛋白1(Muc-1)、粘蛋白16(Muc-16)、间皮素(MSLN)、NKCSI、NKG2D配体、c-Met、癌症睾丸抗原NY-ESO-1、癌胚抗原(h5T4)、PRAME、前列腺干细胞抗原(PSCA)、PRAME前列腺特异性膜抗原(PSMA)、肿瘤相关糖蛋白72(TAG-72)、TIM-3、TRBCI、TRBC2、血管内皮生长因子R2(VEGF-R2)、威尔姆斯肿瘤蛋白(WT-1)和/或病原体抗原;或

(ii)BCMA、CD19、CD20、CD33、CD38、CD52、CD123、CEA、EGFR、EpCAM、GD2、GPA33、HER2、MICA/B、PDL1和/或PSMA;或

(iii)CD19、CD33、CD123、CEA、EpCAM、GPA33、HER2和/或PSMA;

或其中所述CD3接合体包含以下中的至少一种:博纳吐单抗(blinatumomab)、卡托莫西单抗(catumaxomab)、厄马索单抗(ertumaxomab)、RO6958688、AFM11、MT110/AMG110、MT111/AMG211/MEDI-565、AMG330、MT112/BAY2010112、MOR209/ES414、MGD006/S80880、MGD007和/或FBTA05。

45.根据权利要求44所述的方法,其中所述CD3接合体是与所述效应细胞同时或相继地给予所述受试者。

46.根据权利要求42所述的方法，其中所述效应细胞包含衍生造血细胞，所述衍生造血细胞包含衍生NK细胞或衍生T细胞，其中所述衍生NK细胞或衍生T细胞包含CD38基因敲除、高亲和力不可裂解的CD16或其变体，并且任选地包含：

(i)B2M和CIITA基因敲除；

(ii)HLA-G或不可裂解的HLA-G、CAR和/或细胞表面表达的外源细胞因子或其受体的部分或全长肽的引入表达；其中所述CAR和细胞表面表达的外源细胞因子或其受体的部分或全长肽共表达于单独构建体中或双顺反子构建体中；和/或

(iii)表1中所列的基因型中的至少一种。

47.一种减少或预防过继性细胞治疗中接受者T细胞对效应细胞的同种排斥的方法，其中所述方法包含向处于所述治疗下的受试者提供(i)抗CD3剂，和(ii)效应细胞，其包含$TCR^{neg}$和预负载有CD3接合体的细胞表面CD3复合物或其一个或多个亚单位或子结构域(cs-CD3)，其中所述效应细胞包含根据权利要求1至26中任一项所述的衍生细胞。

48.根据权利要求47所述的方法，其中所述抗CD3剂为CD3抗体或CD3-CAR，其中所述CD3-CAR包含于NK细胞中；并且其中所述抗CD3剂使接受者T细胞失活，从而减少或预防同种排斥。

49.根据权利要求47所述的方法，其中包含与所述效应细胞的cs-CD3结合的第一可变区段的CD3接合体包含与抗原结合的第二可变区段，所述抗原与自身免疫病症；恶性血液病；实体肿瘤；癌症或病毒感染有关。

50.根据权利要求49所述的方法，其中包含与抗原结合的第二可变区段的所述CD3接合体包含以下中的至少一种：

(i)ADGRE2、碳酸酐酶IX(CAIX)、CCRI、CCR4、癌胚抗原(CEA)、CD3、CD5、CD7、CD8、CD10、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD34、CD38、CD41、CD44、CD44V6、CD49f、CD56、CD70、CD74、CD99、CD123、CD133、CD138、CDS、CLEC12A、巨细胞病毒(CMV)感染细胞的抗原、上皮糖蛋白2(EGP 2)、上皮糖蛋白-40(EGP-40)、上皮细胞粘附分子(EpCAM)、EGFRvIII、受体酪氨酸-蛋白激酶erb-B2,3,4、EGFIR、EGFR-VIII、ERBB叶酸结合蛋白(FBP)、胎儿乙酰胆碱受体(AChR)、叶酸受体-a、神经节苷脂G2(GD2)、神经节苷脂G3(GD3)、人类表皮生长因子受体2(HER-2)、人类端粒酶逆转录酶(hTERT)、ICAM-1、整合素B7、白介素-13受体亚单位α-2(IL-13Rα2)、κ-轻链、激酶插入结构域受体(KDR)、路易斯A(CA19.9)、路易斯Y(LeY)、L1细胞粘附分子(L1-CAM)、LILRB2、黑色素瘤抗原家族A1(MAGE-A1)、MICA/B、粘蛋白1(Muc-1)、粘蛋白16(Muc-16)、间皮素(MSLN)、NKCSI、NKG2D配体、c-Met、癌症睾丸抗原NY-ESO-1、癌胚抗原(h5T4)、PRAME、前列腺干细胞抗原(PSCA)、PRAME前列腺特异性膜抗原(PSMA)、肿瘤相关糖蛋白72(TAG-72)、TIM-3、TRBCI、TRBC2、血管内皮生长因子R2(VEGF-R2)、威尔姆斯肿瘤蛋白(WT-1)和/或病原体抗原；或

(ii)BCMA、CD19、CD20、CD33、CD38、CD52、CD123、CEA、EGFR、EpCAM、GD2、GPA33、HER2、MICA/B、PDL1和/或PSMA；或

(iii)CD19、CD33、CD123、CEA、EpCAM、GPA33、HER2和/或PSMA；

或其中所述CD3接合体包含以下中的至少一种：博纳吐单抗、卡托莫西单抗、厄马索单抗、RO6958688、AFM11、MT110/AMG 110、MT111/AMG211/MEDI-565、AMG330、MT112/BAY2010112、MOR209/ES414、MGD006/S80880、MGD007和/或FBTA05。

# 工程改造的iPSC和免疫效应细胞中的CD3重建

[0001] 相关应用

[0002] 本申请要求2019年4月11日申请的美国临时申请序列号62/832,622的优先权，其以全文引用的方式并入本文中。

## 技术领域

[0003] 本公开广泛涉及现成的免疫细胞产物领域。更确切地说，本公开涉及研发能够活体内递送治疗相关特性的多功能效应细胞的策略。根据本公开研发的细胞产物解决了患者来源的细胞疗法的关键限制。

[0004] 以电子方式提交的序列表的引用

[0005] 本申请以引用的方式并入标题为056932-518001WO_SEQUENCE_LISTING_ST25.TXT的与本申请一起提交的ASCII文本格式的序列表的计算机可读形式(CRF)，创建于2020年4月2日，并且大小为76,442字节。

## 背景技术

[0006] 过继性细胞疗法领域目前的重点是使用患者来源的细胞和供体来源的细胞，这使得实现癌症免疫疗法的持续制造以及向所有可能受益的患者递送疗法尤其困难。还需要改善过继转移的淋巴细胞的功效和存留，以促进有利的患者结果。淋巴细胞(例如T细胞和自然杀伤(NK)细胞)是有效的抗肿瘤效应子，其在先天性和适应性免疫中起重要作用。然而，将这些免疫细胞用于过继性细胞疗法仍然具有挑战性，并且尚未满足改善的需求。因此，在过继性免疫疗法中，仍有大量机会来利用T细胞和NK细胞或其它淋巴细胞的全部潜能。

## 发明内容

[0007] 需要功能改善的效应细胞，其解决以下范围内的问题：从反应速率、细胞耗竭、输血细胞损失(存活和/或存留)、肿瘤通过标靶损失或谱系转换逃逸、肿瘤靶向精确度、脱靶毒性、肿瘤外效应到针对实体肿瘤的功效，即肿瘤微环境和相关免疫抑制、募集、运输和浸润。

[0008] 本发明的一个目的是提供用以产生由单一细胞衍生的诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cell;iPSC)克隆系分化的衍生非多能细胞的方法和组合物，所述iPSC系包含其基因组中的一种或几种基因修饰。所述一种或几种基因修饰包括DNA插入、缺失和取代，并且所述修饰在分化、扩增、传代和/或移植后在后续衍生细胞中保留并且保持功能性。

[0009] 本申请的iPSC衍生的非多能细胞包括(但不限于)CD34细胞、生血内皮细胞、HSC(造血干细胞和祖细胞)、造血多潜能祖细胞、T细胞祖细胞、NK细胞祖细胞、T细胞、NKT细胞、NK细胞和B细胞。本申请的iPSC衍生的非多能细胞通过由包含相同基因修饰的iPSC分化而在其基因组中包含一种或几种基因修饰。用于获得基因工程改造的iPSC衍生细胞的工程改造的克隆iPSC分化策略要求iPSC在定向分化中的发育潜能不会受到iPSC中的工程改造模

式的不利影响，并且也要求工程改造模式如预期一般在衍生细胞中起作用。此外，这种策略克服了工程改造的原代淋巴细胞(例如从外周血、脐带血或任何其它供体组织获得的T细胞或NK细胞)的现有障碍，因此细胞难以工程改造，并且工程改造这类细胞通常缺乏再现性和均匀性，从而使得细胞展现伴随高细胞死亡和低细胞扩增的不良细胞存留。此外，这种策略避免产生使用起始时为异源的原代细胞源另外获得的异源效应细胞群。

[0010] 本发明的一些方面提供使用包含(I)、(II)或(III)的方法获得的基因组工程改造的iPSC，分别反映了在重编程过程之后、同时和之前基因组工程改造的策略：

[0011] (I)：按任何次序利用(i)和(ii)中的一者或两者对iPSC进行基因工程改造：(i)将一个或多个构建体引入iPSC中以允许在所选位点进行靶向整合；(ii)(a)使用一种或多种能够进行所选位点识别的核酸内切酶在所选位点将一个或多个双链断裂引入iPSC中；和(b)培养步骤(I)(ii)(a)中的iPSC以允许进行内源性DNA修复，从而在所选位点同时或依序产生靶向插入/缺失；由此获得能够分化成部分或完全分化细胞的基因组工程改造的iPSC。

[0012] (II)：对重编程非多能细胞进行基因工程改造，以获得基因组工程改造的iPSC，所述基因工程改造包含：(i)使非多能细胞与一种或多种重编程因子和任选的小分子组合物接触，以起始非多能细胞的重编程，所述小分子组合物包含TGFβ受体/ALK抑制剂、MEK抑制剂、GSK3抑制剂和/或ROCK抑制剂；和(ii)按任何次序将(a)和(b)中的一者或两者引入步骤(II)(i)中的重编程非多能细胞中：(a)一个或多个构建体，以允许在所选位点进行靶向整合；(b)在所选位点使用至少一种能够进行所选位点识别的核酸内切酶的一个或多个双链断裂，然后培养步骤(II)(ii)(b)中的细胞以允许进行内源性DNA修复，从而在所选位点产生靶向插入/缺失；因此所获得的基因组工程改造的iPSC包含至少一种功能性靶向基因组编辑，并且所述基因组工程改造的iPSC能够分化成部分或完全分化细胞。

[0013] (III)：对重编程的非多能细胞进行基因工程改造以获得基因组工程改造的iPSC，所述基因工程改造包含(i)和(ii)：(i)按任何次序将(a)和(b)中的一者或两者引入非多能细胞中：(a)一个或多个构建体，以允许在所选位点进行靶向整合；(b)在所选位点使用至少一种能够进行所选位点识别的核酸内切酶的一个或多个双链断裂，其中培养步骤(III)(i)(b)中的细胞以允许进行内源性DNA修复，从而在所选位点产生靶向插入/缺失；和(ii)使步骤(III)(i)中的细胞与一种或多种重编程因子和任选的小分子组合物接触，以获得在所选位点包含靶向编辑的基因组工程改造的iPSC，所述小分子组合物包含TGFβ受体/ALK抑制剂、MEK抑制剂、GSK3抑制剂和/或ROCK抑制剂；由此获得包含至少一种功能性靶向基因组编辑的基因组工程改造的iPSC，并且所述基因组工程改造的iPSC能够分化成部分分化的细胞或完全分化的细胞。

[0014] 在上述方法的一个实施例中，在一个或多个所选位点处的至少一种靶向基因组编辑包含一种或多种外源多核苷酸的插入，所述外源多核苷酸编码安全开关蛋白质、靶向模式、受体、信号传导分子、转录因子、药学活性蛋白质和肽、药物标靶候选物，或促进基因组工程改造的iPSC或其衍生细胞移植、运输、归巢、活力、自我更新、存留和/或存活的蛋白质。在一些实施例中，插入的外源多核苷酸可操作地连接到(1)一种或多种外源启动子，包含CMV、EF1α、PGK、CAG、UBC或其它组成性、诱导性、时间特异性、组织特异性或细胞类型特异性启动子；或(2)包含于所选位点中的一种或多种内源启动子，所述位点包含AAVS1、CCR5、ROSA26、胶原蛋白、HTRP、H11、β-2微球蛋白、CD38、GAPDH、TCR或RUNX1，或满足基因组安全港

准则的其它基因座。在一些实施例中，使用上述方法产生的基因组工程改造的iPSC包含一种或多种不同的外源多核苷酸，所述多核苷酸编码包含以下的蛋白质：胱天蛋白酶、胸苷激酶、胞嘧啶脱氨酶、经修饰EGFR或B细胞CD20，其中当基因组工程改造的iPSC包含两种或更多种自杀基因时，所述自杀基因整合于不同的安全港基因座中，所述安全港基因座包含AAVS1、CCR5、ROSA26、胶原蛋白、HTRP、H11、β-2微球蛋白、CD38、GAPDH、TCR或RUNX1。在一个实施例中，外源多核苷酸编码IL2、IL4、IL6、IL7、IL9、IL10、IL11、IL12、IL15、IL18、IL21和/或其相应受体的部分或全长肽。在一些实施例中，由外源多核苷酸编码的IL2、IL4、IL6、IL7、IL9、IL10、IL11、IL12、IL15、IL18、IL21和/或其相应受体的部分或全部肽呈融合蛋白形式。

[0015] 在一些其它实施例中，使用本文所提供的方法产生的基因组工程改造的iPSC包含位于一种或多种与以下相关的内源基因处的插入/缺失：靶向模式、受体、信号传导分子、转录因子、药物标靶候选物、免疫反应调控和调节或抑制iPSC或其衍生细胞移植、运输、归巢、活力、自我更新、存留和/或存活的蛋白质。在一些实施例中，用于破坏的内源基因包含以下中的至少一种：CD38、B2M、TAP1、TAP2、TAP相关蛋白(Tapasin)、NLRC5、PD1、LAG3、TIM3、RFXANK、CIITA、RFX5、RFXAP、RAG1和染色体6p21区域中的任何基因。

[0016] 在又一些其它实施例中，使用本文所提供的方法产生的基因组工程改造的iPSC包含位于AAVS1基因座的编码胱天蛋白酶的外源多核苷酸和位于H11基因座的编码胸苷激酶的外源多核苷酸。

[0017] 在再一些其它实施例中，方法(I)、(II)和/或(III)进一步包含：使基因组工程改造的iPSC与包含MEK抑制剂、GSK3抑制剂和ROCK抑制剂的小分子组合物接触，以维持基因组工程改造的iPSC的多能性。在一个实施例中，包含至少一种靶向基因组编辑的所得基因组工程改造的iPSC具有功能性，能有效分化并且能够分化成包含相同功能性基因组编辑的非多能细胞。

[0018] 本发明还提供以下内容。

[0019] 本申请的一个方面提供一种细胞或其群体，其中所述细胞为诱导性多能细胞(iPSC)、克隆iPSC或克隆iPS细胞系细胞，或由分化上述任一种所述iPSC获得的衍生细胞；并且其中上述任一种所述细胞至少包含$TCR^{neg}$和一种或多种编码一种或多种外源蛋白质的多核苷酸，以在表达时提供细胞表面CD3复合物或其一个或多个亚单位或子结构域(cs-CD3)。在由iPSC分化获得的衍生细胞的一些实施例中，衍生细胞为造血细胞，包括(但不限于)CD34细胞、生血内皮细胞、HSC(造血干细胞和祖细胞)、造血多潜能祖细胞、T细胞祖细胞、NK细胞祖细胞、T细胞、NKT细胞、NK细胞和B细胞；所述衍生造血细胞(即，衍生CD34细胞、衍生生血内皮细胞、衍生造血干细胞和祖细胞、衍生造血多潜能祖细胞、衍生T细胞祖细胞、衍生NK细胞祖细胞、衍生T细胞、衍生NKT细胞、衍生NK细胞或衍生B细胞)包含与其从外周血、脐带血或任何其它供体组织获得的天然对应细胞相比更长的端粒。在由iPSC分化获得的衍生细胞的一些实施例中，衍生细胞为T细胞祖细胞或T细胞。在由iPSC分化获得的衍生细胞的一些实施例中，衍生细胞为NK细胞祖细胞或NK细胞。

[0020] 在包含$TCR^{neg}$和一种或多种编码一种或多种外源蛋白质的多核苷酸以在表达时提供细胞表面CD3复合物或其一个或多个亚单位或子结构域(cs-CD3)的所述iPSC和其衍生细胞的一些实施例中，细胞进一步包含以下基因组编辑中的一种或多种：(i)B2M阴性或较低；

(ii)CIITA阴性或较低;(iii)HLA-G或不可裂解的HLA-G的引入表达;(iv)高亲和力不可裂解的CD16(hnCD16)或其变体;(v)嵌合抗原受体(CAR);(vi)细胞表面表达的外源细胞因子或其受体的部分或全长肽;(vii)CD38阴性;(viii)表1中所列的基因型中的至少一种;(ix)以下中的至少一种的缺失或表达减少:TAP1、TAP2、TAP相关蛋白、NLRC5、PD1、LAG3、TIM3、RFXANK、CIITA、RFX5、RFXAP、RAG1和染色体6p21区域中的任何基因;和(x)以下中的至少一种的表达引入或增加:HLA-E、41BBL、CD4、CD8、CD16、CD47、CD113、CD131、CD137、CD80、PDL1、$A_{2A}R$、CAR、Fc受体、接合体和用于与双特异性或多特异性或通用接合体偶合的表面触发受体。

[0021] 在至少包含$TCR^{neg}$和一种或多种编码一种或多种外源蛋白质的多核苷酸以在表达时提供细胞表面CD3复合物或其一个或多个亚单位或子结构域(cs-CD3),以及如上文所描述且贯穿本申请的任选的额外基因组编辑的所述iPSC和其衍生细胞的一些实施例中,细胞可包含(i)一种或多种整合于一个安全港(safe harbor)基因座中的外源多核苷酸;或(ii)两种或更多种整合于不同安全港基因座中的外源多核苷酸。在一些实施例中,安全港基因座包含以下中的至少一种:AAVS1、CCR5、ROSA26、胶原蛋白、HTRP、H11、β-2微球蛋白、CD38、GAPDH、TCR或RUNX1。在一个特定实施例中,安全港基因座为H11。在一个特定实施例中,安全港基因座TCR为TCRα或TCRβ的恒定区。在一些实施例中,在安全港基因座处插入一种或多种外源多核苷酸引起安全港处的内源基因的破坏或基因敲除,例如B2M、CD38或TCRα/β处的插入引起B2M、CD38或TCRα/β基因的基因敲除。

[0022] 在细胞或其群体的一些实施例中,包含$TCR^{neg}$和一种或多种编码一种或多种外源蛋白质的多核苷酸以在表达时提供细胞表面CD3复合物或其一个或多个亚单位或子结构域(cs-CD3),以及上述额外基因组编辑中的一种或多种的细胞在一些实施例中为衍生T细胞,且在一些其它实施例中为由包含所述基因组编辑的iPSC获得的衍生NK细胞,并且当与其从外周血、脐带血或任何其它供体组织获得的天然对应物、原代T或NK细胞相比时,衍生T细胞或NK细胞具有以下特征中的至少一种,所述特征包括(但不限于):(i)存留和/或存活改善;(ii)对天然(即,接受者)免疫细胞的抗性增加;(iii)细胞毒性增加;(iv)肿瘤渗透改善;(v)ADCC增强或获得;(vi)将旁观者免疫细胞迁移到肿瘤部位和/或活化或募集到肿瘤部位的能力增强;(vii)降低肿瘤免疫抑制的能力增强;(viii)挽救肿瘤抗原逃逸的能力提高;和(ix)自残减少。当与细胞表面CD3阴性的$TCR^{neg}$ T或NK细胞(原代或衍生物)相比时,包含$TCR^{neg}$和一种或多种实现表面呈递CD3复合物或其亚单位或子结构域的外源蛋白质两者的衍生T或NK细胞进一步具有包括(但不限于)以下的以下表型和功能特征中的至少一种:细胞表面呈递的全部或部分内源性或外源性细胞表面CD3复合物,和对与CD3相关细胞表面触发受体结合的分子有反应的能力,所述分子包括(但不限于)CD3结合抗体或其功能变体、scFv和/或各种CD3接合体。

[0023] 在细胞或其群体的一个实施例中,包含$TCR^{neg}$和一种或多种编码一种或多种外源蛋白质的多核苷酸以在表达时提供细胞表面CD3复合物或其一个或多个亚单位或子结构域(cs-CD3)的细胞进一步包含高亲和力不可裂解的CD16或其变体(hnCD16)。高亲和力不可裂解的CD16或其变体(hnCD16)的一些实施例包含以下中的至少任一种:(a)CD16的胞外域中的F176V和S197P;(b)源自CD64的全部或部分胞外域;(c)非天然(或非CD16)跨膜结构域;(d)非天然(或非CD16)胞内结构域;(e)非天然(或非CD16)信号传导结构域;(f)非天然刺激

结构域;和(g)并非源自CD16且源自相同或不同多肽的跨膜结构域、信号传导结构域和刺激结构域。在一些实施例中,非天然跨膜结构域衍生自CD3D、CD3E、CD3G、CD3ζ、CD4、CD8、CD8a、CD8b、CD27、CD28、CD40、CD84、CD166、4-1BB、OX40、ICOS、ICAM-1、CTLA-4、PD-1、LAG-3、2B4、BTLA、CD16、IL7、IL12、IL15、KIR2DL4、KIR2DS1、NKp30、NKp44、NKp46、NKG2C、NKG2D或T细胞受体(TCR)多肽。在一些实施例中,非天然刺激结构域衍生自CD27、CD28、4-1BB、OX40、ICOS、PD-1、LAG-3、2B4、BTLA、DAP10、DAP12、CTLA-4或NKG2D多肽。在一些其它实施例中,非天然信号传导结构域衍生自CD3ζ、2B4、DAP10、DAP12、DNAM1、CD137(41BB)、IL21、IL7、IL12、IL15、NKp30、NKp44、NKp46、NKG2C或NKG2D多肽。在hnCD16或其变体的一些特定实施例中,非天然跨膜结构域衍生自NKG2D,非天然刺激结构域衍生自2B4,并且非天然信号传导结构域衍生自CD3ζ或DAP10。

[0024] 在细胞或其群体的一个实施例中,包含$TCR^{neg}$和一种或多种编码一种或多种外源蛋白质的多核苷酸以在表达时提供细胞表面CD3复合物或其一个或多个亚单位或子结构域(cs-CD3)的细胞进一步包含至少一个嵌合抗原受体(CAR),且其中CAR可为以下中的任何一种或多种:(i)T细胞特异性或NK细胞特异性;(ii)双特异性抗原结合CAR;(iii)可切换CAR;(iv)二聚化CAR;(v)分离CAR;(vi)多链CAR;(vii)诱导性CAR;(viii)与另一CAR共表达;(ix)任选地在单独构建体中或在双顺反子或多顺反子构建体中与细胞表面表达的外源细胞因子或其受体的部分或全长肽共表达;(xi)任选地在单独构建体中或在双顺反子或多顺反子构建体中与检查点抑制剂共表达;(xii)对CD19或BCMA具有特异性;和/或(xiii)对以下中的任一种具有特异性:ADGRE2、碳酸酐酶IX(CAIX)、CCRI、CCR4、癌胚抗原(CEA)、CD3、CD5、CD7、CD8、CD10、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD34、CD38、CD41、CD44、CD44V6、CD49f、CD56、CD70、CD74、CD99、CD123、CD133、CD138、CDS、CLEC12A、巨细胞病毒(CMV)感染细胞的抗原、上皮糖蛋白2(EGP 2)、上皮糖蛋白-40(EGP-40)、上皮细胞粘附分子(EpCAM)、EGFRvIII、受体酪氨酸-蛋白激酶erb-B2,3,4、EGFIR、EGFR-VIII、ERBB叶酸结合蛋白(FBP)、胎儿乙酰胆碱受体(AChR)、叶酸受体-a、神经节苷脂G2(GD2)、神经节苷脂G3(GD3)、人类表皮生长因子受体2(HER-2)、人类端粒酶逆转录酶(hTERT)、ICAM-1、整合素B7、白介素-13受体亚单位α-2(IL-13Rα2)、κ-轻链、激酶插入结构域受体(KDR)、路易斯A(Lewis A)(CA19.9)、路易斯Y(LeY)、L1细胞粘附分子(L1-CAM)、LILRB2、黑色素瘤抗原家族A 1(MAGE-A1)、MICA/B、粘蛋白1(Muc-1)、粘蛋白16(Muc-16)、间皮素(MSLN)、NKCSI、NKG2D配体、c-Met、癌症睾丸抗原NY-ESO-1、癌胚抗原(h5T4)、PRAME、前列腺干细胞抗原(PSCA)、PRAME前列腺特异性膜抗原(PSMA)、肿瘤相关糖蛋白72(TAG-72)、TIM-3、TRBCI、TRBC2、血管内皮生长因子R2(VEGF-R2)、威尔姆斯肿瘤蛋白质(Wilms tumor protein)(WT-1)和病原体抗原。在一些实施例中,上述CAR中的任一种可插入TCR基因座,例如TCRα或TCRβ的恒定区。在一些实施例中,在TRAC或TRBC基因座处插入的CAR可由TCR的相应内源启动子驱动。在一些实施例中,在TRAC或TRBC基因座处插入CAR导致TCR阴性或基因敲除。在一些实施例中,TCR阴性细胞也是CD3阴性的。

[0025] 在检查点抑制剂与CAR共表达的实施例中的一些中,检查点抑制剂为针对一种或多种检查点分子的拮抗剂,所述检查点分子包含PD-1、PDL-1、TIM-3、TIGIT、LAG-3、CTLA-4、2B4、4-1BB、4-1BBL、A2aR、BATE、BTLA、CD39、CD47、CD73、CD94、CD96、CD160、CD200、CD200R、CD274、CEACAM1、CSF-1R、Foxpl、GARP、HVEM、IDO、EDO、TDO、LAIR-1、MICA/B、NR4A2、MAFB、

OCT-2、Rara(视黄酸受体α)、TLR3、VISTA、NKG2A/HLA-E或抑制性KIR。与CAR共表达的检查点抑制剂可为抗体或人类化或Fc修饰的变体或片段以及其功能等效物和生物类似物,其对上述任一种检查点分子具有特异性。

[0026] 在细胞或其群体的一个实施例中,包含$TCR^{neg}$和一种或多种编码一种或多种外源蛋白质的多核苷酸以在表达时提供细胞表面CD3复合物或其一个或多个亚单位或子结构域(cs-CD3)的细胞进一步包含细胞表面表达的外源细胞因子或其受体的部分或全长肽,且其中外源细胞因子或其受体可包含IL2、IL4、IL6、IL7、IL9、IL10、IL11、IL12、IL15、IL18、IL21和其相应受体中的至少一种;或可包含以下中的至少一种:(i)通过使用自裂解肽进行IL15和IL15Rα的共表达;(ii)IL15和IL15Rα的融合蛋白;(iii)具有截短IL15Rα(IL15Δ)的胞内结构域的IL15/IL15Rα融合蛋白;(iv)IL15与IL15Rα的膜结合Sushi结构域的融合蛋白;(v)IL15和IL15Rβ的融合蛋白;(vi)IL15和共同受体γC的融合蛋白,其中共同受体γC为天然或经修饰的;和(vii)IL15Rβ的均二聚体;其中(i)至(vii)中的任一者可在单独构建体中或在双顺反子或多顺反子构建体中与CAR共表达。在一些实施例中,细胞表面外源细胞因子或受体的部分或全部肽瞬时表达于本文所提供的细胞中。在一个实施例中,细胞或其群体包含编码IL15Δ的多核苷酸,所述IL15Δ包含与SEQ ID NO:17、19或21至少75%、80%、85%、90%、95%或99%一致的氨基酸序列。

[0027] 在细胞或其群体的一个实施例中,包含$TCR^{neg}$、一种或多种编码一种或多种外源蛋白质的多核苷酸以在表达时提供细胞表面CD3复合物或其一个或多个亚单位或子结构域(cs-CD3),和包括如上文所揭露的那些实施例(i)至(vii)的IL15或变体的细胞可进一步包含以下中的一种或多种:B2M阴性或较低;CIITA阴性或较低;HLA-G或不可裂解的HLA-G的引入表达;高亲和力不可裂解的CD16或其变体(hnCD16);嵌合抗原受体(CAR);细胞表面表达的额外外源细胞因子或其受体的部分或全长肽,其中细胞因子不为IL15;表1中所列的基因型中的至少一种;以下中的至少一种的缺失或表达减少:TAP1、TAP2、TAP相关蛋白、NLRC5、PD1、LAG3、TIM3、RFXANK、CIITA、RFX5、RFXAP、RAG1和染色体6p21区域中的任何基因;和以下中的至少一种的表达引入或增加:HLA-E、41BBL、CD4、CD8、CD16、CD47、CD113、CD131、CD137、CD80、PDL1、A2AR、CAR、Fc受体、接合体和用于与双特异性或多特异性或通用接合体偶合的表面触发受体。在包含IL15Δ和CAR两者的细胞或其群体的一实施例中,IL15Δ可在单独构建体中或在双顺反子或多顺反子构建体中与CAR共表达。

[0028] 在细胞或其群体的一个实施例中,包含$TCR^{neg}$和一种或多种编码一种或多种外源蛋白质的多核苷酸以在表达时提供细胞表面CD3复合物或其一个或多个亚单位或子结构域(cs-CD3)的细胞为衍生NK细胞或衍生T细胞,其中衍生NK细胞或衍生T细胞能够在一种或多种检查点抑制剂的存在下降低肿瘤免疫抑制。在一些实施例中,一种或多种检查点抑制剂的存在是通过在接受所述细胞之前、期间或之后向受试者给予抑制剂。在一些其它实施例中,一种或多种检查点抑制剂的存在是通过使用编码所选抑制剂的多核苷酸将检查点抑制剂表达引入所述细胞中而由所述细胞表达抑制剂。在一些实施例中,检查点抑制剂是针对一种或多种检查点分子的拮抗剂,所述检查点分子包含PD-1、PDL-1、TIM-3、TIGIT、LAG-3、CTLA-4、2B4、4-1BB、4-1BBL、A2aR、BATE、BTLA、CD39、CD47、CD73、CD94、CD96、CD160、CD200、CD200R、CD274、CEACAM1、CSF-1R、Foxpl、GARP、HVEM、IDO、EDO、TDO、LAIR-1、MICA/B、NR4A2、MAFB、OCT-2、Rara(视黄酸受体α)、TLR3、VISTA、NKG2A/HLA-E或抑制性KIR。在一些其它实施

例中,检查点抑制剂包含(a)阿特珠单抗(atezolizumab)、阿维鲁单抗(avelumab)、度伐单抗(durvalumab)、伊匹单抗(ipilimumab)、IPH4102、IPH43、IPH33、利瑞木单抗(lirimumab)、莫那利珠单抗(monalizumab)、纳武单抗(nivolumab)、派立珠单抗(pembrolizumab)和其衍生物或功能等效物中的一种或多种;或(b)阿特珠单抗、纳武单抗和派立珠单抗中的至少一种。

[0029] 本申请的另一方面提供一种组合物,其包含如上文所描述且贯穿本申请的任一种细胞或其群体。在一些实施例中,iPSC或iPSC衍生的细胞(在本文中也称为"衍生细胞")可包含本申请的表1中所列的任一种基因型。在一些实施例中,$TCR^{neg}$ iPSC或其衍生细胞包含一种或多种编码一种或多种外源蛋白质的多核苷酸,以在表达时提供细胞表面CD3复合物或其一个或多个亚单位或子结构域(cs-CD3)。在一些实施例中,$TCR^{neg}$ iPSC或其衍生细胞包含一种或多种编码一种或多种外源蛋白质的多核苷酸,以在表达时提供细胞表面CD3复合物或其一个或多个亚单位或子结构域(cs-CD3);和hnCD16。在一些实施例中,$TCR^{neg}$ iPSC或其衍生细胞包含一种或多种编码一种或多种外源蛋白质的多核苷酸,以在表达时提供细胞表面CD3复合物或其一个或多个亚单位或子结构域(cs-CD3);hnCD16;和IL15或其变体。在一些实施例中,$TCR^{neg}$ iPSC或其衍生细胞包含一种或多种编码一种或多种外源蛋白质的多核苷酸,以在表达时提供细胞表面CD3复合物或其一个或多个亚单位或子结构域(cs-CD3);hnCD16;和CAR。在一些实施例中,$TCR^{neg}$ iPSC或其衍生细胞包含一种或多种编码一种或多种外源蛋白质的多核苷酸,以在表达时提供细胞表面CD3复合物或其一个或多个亚单位或子结构域(cs-CD3);hnCD16;IL15或其变体;和CAR。在一些实施例中,$TCR^{neg}$ iPSC或其衍生细胞包含一种或多种编码一种或多种外源蛋白质的多核苷酸,以在表达时提供细胞表面CD3复合物或其一个或多个亚单位或子结构域(cs-CD3);hnCD16;CD38阴性;CAR;和如上文所提供且贯穿本申请的细胞表面表达的外源细胞因子或其受体的部分或全长肽。在一些其它实施例中,CAR对以下中的任一者具有特异性:ADGRE2、碳酸酐酶IX(CAIX)、CCRI、CCR4、癌胚抗原(CEA)、CD3、CD5、CD7、CD8、CD10、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD34、CD38、CD41、CD44、CD44V6、CD49f、CD56、CD70、CD74、CD99、CD123、CD133、CD138、CDS、CLEC12A、巨细胞病毒(CMV)感染细胞的抗原(例如,细胞表面抗原)、上皮糖蛋白2(EGP 2)、上皮糖蛋白-40(EGP-40)、上皮细胞粘附分子(EpCAM)、EGFRvIII、受体酪氨酸-蛋白激酶erb-B2,3,4、EGFIR、EGFR-VIII、ERBB叶酸结合蛋白(FBP)、胎儿乙酰胆碱受体(AChR)、叶酸受体-a、神经节苷脂G2(GD2)、神经节苷脂G3(GD3)、人类表皮生长因子受体2(HER-2)、人类端粒酶逆转录酶(hTERT)、ICAM-1、整合素B7、白介素-13受体亚单位α-2(IL-13Rα2)、κ-轻链、激酶插入结构域受体(KDR)、路易斯A(CA19.9)、路易斯Y(LeY)、L1细胞粘附分子(L1-CAM)、LILRB2、黑色素瘤抗原家族A 1(MAGE-A1)、MICA/B、粘蛋白1(Muc-1)、粘蛋白16(Muc-16)、间皮素(MSLN)、NKCSI、NKG2D配体、c-Met、癌症睾丸抗原NY-ESO-1、癌胚抗原(h5T4)、PRAME、前列腺干细胞抗原(PSCA)、PRAME前列腺特异性膜抗原(PSMA)、肿瘤相关糖蛋白72(TAG-72)、TIM-3、TRBCI、TRBC2、血管内皮生长因子R2(VEGF-R2)、威尔姆斯肿瘤蛋白质(WT-1)和所属领域中已知的各种病原体抗原。在包含$TCR^{neg}$的细胞的又一些实施例中,所述细胞包含一种或多种编码一种或多种外源蛋白质的多核苷酸,以在表达时提供细胞表面CD3复合物或其一个或多个亚单位或子结构域(cs-CD3);hnCD16;和CAR,其中CAR对CD19或CD269(BCMA)具有特异性。在包含$TCR^{neg}$的细胞的一些实施例中,所述细胞包含在所述细胞中表达时的表面CD3复

合物或其亚单位或子结构域;hnCD16;IL15或其变体;和CAR,其中CAR对CD19或CD269(BCMA)具有特异性。在包含$TCR^{neg}$的细胞的一些其它实施例中,所述细胞包含在所述细胞中表达时的表面CD3复合物或其亚单位或子结构域;hnCD16;IL15或其变体;CD38阴性;和CAR,其中CAR对CD 19或CD269(BCMA)具有特异性。

[0030] 因此,本申请的另一方面提供一种用于治疗用途的组合物,除如本文所提供的任一种衍生细胞以外,所述组合物包含一种或多种治疗剂。在用于治疗用途的组合物的一些实施例中,治疗剂包含肽、细胞因子、检查点抑制剂、丝裂原(mitogen)、生长因子、小RNA、dsRNA(双链RNA)、单核血细胞、饲养细胞、饲养细胞组分或其置换因子、包含一种或多种所关注多核酸的载体、抗体、化学治疗剂或放射性部分,或免疫调节药物(IMiD)。在用于治疗用途的组合物的一些实施例中,与所提供细胞一起使用的检查点抑制剂包含一种或多种针对检查点分子的拮抗剂,所述检查点分子包含PD-1、PDL-1、TIM-3、TIGIT、LAG-3、CTLA-4、2B4、4-1BB、4-1BBL、A2aR、BATE、BTLA、CD39、CD47、CD73、CD94、CD96、CD160、CD200、CD200R、CD274、CEACAM1、CSF-1R、Foxpl、GARP、HVEM、IDO、EDO、TDO、LAIR-1、MICA/B、NR4A2、MAFB、OCT-2、Rara(视黄酸受体α)、TLR3、VISTA、NKG2A/HLA-E或抑制性KIR。在用于治疗用途的组合物的一些实施例中,与所提供细胞一起使用的检查点抑制剂包含以下中的一种或多种:阿特珠单抗、阿维鲁单抗、度伐单抗、伊匹单抗、IPH4102、IPH43、IPH33、利瑞木单抗、莫那利珠单抗、纳武单抗、派立珠单抗和其衍生物或功能等效物。在用于治疗用途的组合物的一些其它实施例中,与所提供细胞一起使用的检查点抑制剂包含阿特珠单抗、纳武单抗和派立珠单抗中的至少一种。在用于治疗用途的组合物的一些实施例中,治疗剂包含维纳妥拉(venetoclax)、阿扎胞苷(azacitidine)和泊马度胺(pomalidomide)中的一种或多种。

[0031] 在用于治疗用途的组合物的一些实施例中,与所提供细胞一起使用的抗体包含以下中的任一种:抗CD20、抗CD22、抗HER2、抗CD52、抗EGFR、抗CD123、抗GD2、抗PDL1和/或抗CD38抗体。在用于治疗用途的组合物的一些实施例中,与所提供细胞一起使用的抗体包含以下中的一种或多种:利妥昔单抗(rituximab)、维妥珠单抗(veltuzumab)、奥法木单抗(ofatumumab)、乌妥昔单抗(ublituximab)、奥卡拉珠单抗(ocaratuzumab)、奥滨尤妥珠单抗(obinutuzumab)、替伊莫单抗(ibritumomab)、奥克雷珠单抗(ocrelizumab)、伊珠单抗(inotuzumab)、莫昔土莫单抗(moxetumomab)、依帕珠单抗(epratuzumab)、曲妥珠单抗(trastuzumab)、帕妥珠单抗(pertuzumab)、阿仑单抗(alemtuzumab)、西妥昔单抗(certuximab)、迪努妥昔单抗(dinutuximab)、阿维鲁单抗、达雷木单抗(daratumumab)、艾沙妥昔单抗(isatuximab)、MOR202、7G3、CSL362、埃罗妥珠单抗(elotuzumab)和其人类化或Fc修饰的变体或片段以及其功能等效物和生物类似物。在用于治疗用途的组合物的再一些实施例中,与所提供细胞一起使用的抗体包含达雷木单抗。

[0032] 本申请还通过向适合于过继性细胞疗法的受试者引入组合物提供如本文所描述的细胞或治疗组合物的治疗用途。在一些实施例中,适合于且需要过继性细胞疗法的受试者患有自身免疫病症;恶性血液病;实体肿瘤;癌症或病毒感染。

[0033] 本申请的另一方面提供一种制造如本文所描述的衍生细胞的方法,并且所述方法包含分化$TCR^{neg}$ iPSC,所述iPSC包含一种或多种编码一种或多种外源蛋白质的多核苷酸以在表达时提供细胞表面CD3复合物或其一个或多个亚单位或子结构域(cs-CD3),和任选地以下中的一种或多种:(i)B2M阴性或较低;(ii)CIITA阴性或较低;(iii)HLA-G或不可裂解

的HLA-G的引入表达;(iv)高亲和力不可裂解的CD16(hnCD16)或其变体;(v)嵌合抗原受体(CAR);(vi)细胞表面表达的外源细胞因子或其受体的部分或全长肽;(vii)CD38阴性;(viii)表1中所列的基因型中的至少一种;(ix)以下中的至少一种的缺失或表达减少:TAP1、TAP2、TAP相关蛋白、NLRC5、PD1、LAG3、TIM3、RFXANK、CIITA、RFX5、RFXAP、RAG1和染色体6p21区域中的任何基因;和(x)以下中的至少一种的表达引入或增加:HLA-E、41BBL、CD4、CD8、CD16、CD47、CD113、CD131、CD137、CD80、PDL1、$A_{2A}R$、CAR、Fc受体、接合体和用于与双特异性或多特异性或通用接合体偶合的表面触发受体。

[0034] 在制造方法的一些实施例中,所述方法进一步包含基因组工程改造克隆iPSC(1)以基因敲除内源性TCR;和(2)以向细胞中引入一种或多种编码至少一种外源蛋白质的多核苷酸,所述外源蛋白质包含tgTRAC、tgTRBC、tgTCRα、tgTCRβ、tgpTCRα、tgCD3(ε-δ)-TRAC、tgCD3(ε-γ)-TRBC、tgCD3(ε-γ)-TRAC、tgCD3(ε-δ)-TRBC、tgCD3(ε-γ)-ζ、tgCD3(ε-δ)-ζ、tgCD3(ε-γ/δ)-28ζ、tgCD3(ε-γ/δ)-BBζ和/或tgCD3(ε-γ/δ)-(28-BB)ζ,从而在细胞中表达时提供表面CD3复合物或其一个或多个亚单位或子结构域(cs-CD3),并且任选地以基因敲除B2M和CIITA,或以引入HLA-G或不可裂解的HLA-G、高亲和力不可裂解的CD16或其变体、CAR和/或细胞表面表达的外源细胞因子或其受体的部分或全长肽的表达;并且CAR和细胞表面表达的外源细胞因子或其受体的部分或全部肽是在单独构建体中或在双顺反子或多顺反子构建体中共表达。在制造方法的一些实施例中,iPSC的基因组工程改造包含靶向编辑。在一些实施例中,靶向编辑包含缺失、插入或插入/缺失。在一些实施例中,同时进行靶向缺失/基因敲除和靶向插入,其中插入是处于进行缺失的位置。在一些实施例中,以任何次序连续进行靶向缺失/基因敲除和靶向插入,其中插入和缺失可或可不在相同位置处。在一些实施例中,靶向编辑工具包含CRISPR、ZFN、TALEN、归巢核酸酶、同源重组或这些方法和组合物的任何其它功能变化。

[0035] 本申请进一步提供克隆iPSC的靶向编辑工具介导编辑,由此产生经编辑的克隆iPSC,其缺少内源性TCRα或TCRβ并且包含:所引入的一种或多种编码至少一种外源蛋白质的多核苷酸,所述外源蛋白质包含tgTRAC、tgTRBC、tgTCRα、tgTCRβ、tgpTCRα、tgCD3(ε-δ)-TRAC、tgCD3(ε-γ)-TRBC、tgCD3(ε-γ)-TRAC、tgCD3(ε-δ)-TRBC、tgCD3(ε-γ)-ζ、tgCD3(ε-δ)-ζ、tgCD3(ε-γ/δ)-28ζ、tgCD3(ε-γ/δ)-BBζ和/或tgCD3(ε-γ/δ)-(28-BB)ζ,以在细胞中表达时提供细胞表面CD3复合物或其一个或多个亚单位或子结构域(cs-CD3);或表1中所列的基因型中的至少一种。在基因组靶向工具介导编辑的一些实施例中,所获得的TCR基因敲除是通过靶向破坏内源性TCRα恒定区(TRAC)。在基因组靶向工具介导编辑的一些实施例中,所获得的TCR基因敲除是通过靶向破坏内源性TCRβ恒定区(TRBC)。在上述基因组靶向工具介导编辑的一些实施例中,编辑进一步包含在内源性TRAC或TRBC基因座处插入CAR,和/或其中CAR是由TCRα或TCRβ的内源启动子驱动,和/或其中TCR是通过CAR插入进行基因敲除。在上述基因组靶向工具介导编辑的一些实施例中,编辑进一步包含在内源性TRAC基因座处插入编码包含以下的外源蛋白质的多核苷酸:tgTRAC、tgTCRα、tgpTCRα、tgCD3(ε-δ)-TRAC、tgCD3(ε-γ)-TRAC、tgCD3(ε-γ)-ζ、tgCD3(ε-δ)-ζ、tgCD3(ε-γ/δ)-28ζ、tgCD3(ε-γ/δ)-BBζ或tgCD3(ε-γ/δ)-(28-BB)ζ,以在细胞中表达时提供表面CD3复合物或其一个或多个亚单位或子结构域(cs-CD3)。在上述基因组靶向工具介导编辑的一些实施例中,编辑进一步包含在内源性TRBC基因座处插入编码包含以下的外源蛋白质的多核苷酸:tgTRBC、

tgTCRβ、tgCD3(ε-γ)-TRBC、tgCD3(ε-δ)-TRBC、tgCD3(ε-γ)-ζ、tgCD3(ε-δ)-ζ、tgCD3(ε-γ/δ)-28ζ、tgCD3(ε-γ/δ)-BBζ和/或tgCD3(ε-γ/δ)-(28-BB)ζ,以在细胞中表达时提供细胞表面CD3复合物或其一个或多个亚单位或子结构域(cs-CD3)。

[0036] 在所提供的细胞或其群体的一个实施例中,细胞为诱导性多能细胞(iPSC)、克隆iPSC或克隆iPS细胞系细胞,或由分化所述iPSC而获得的衍生细胞;并且细胞为$TCR^{neg}$,并且包含一种或多种编码一种或多种外源蛋白质的多核苷酸,以在表达时提供细胞表面CD3复合物或其一个或多个亚单位或子结构域(cs-CD3)。在一些实施例中,细胞表面CD3复合物或其一个或多个亚单位或子结构域(cs-CD3)与非结合重组TCR(nb-rTCR);限定重组TCR(d-rTCR);重组前TCR(p-rTCR)缔合;或锚定于非结合重组TCR(nb-rTCR-CD3);或为CD3嵌合链(ccCD3)。在一个实施例中,nb-rTCR包含tgTRAC和tgTRBC中的一种或两种。在一个实施例中,d-rTCR包含tgTCRα和任选的tgTCRβ,其中tgTCRα和tgTCRβ中的每一者包含相应的限定可变区。在一个实施例中,p-rTCR包含tgpTCRα和任选的tgTRBC或tgTCRβ,其中tgTCRβ包含限定可变区。在一个实施例中,nb-rTCR-CD3包含以下融合蛋白中的一种或多种:(1)tgCD3(ε-δ)-TRAC;(2)tgCD3(ε-γ)-TRBC;(3)tgCD3(ε-γ)-TRAC;和/或(4)tgCD3(ε-δ)-TRBC,其中所述融合蛋白包含CD3ε、CD3δ、CD3γ的全部或部分长度的胞外域,和/或全部或部分长度的TRAC或TRBC。在一个实施例中,ccCD3包含以下融合蛋白中的至少一种:tgCD3(ε-γ)-ζ、tgCD3(ε-δ)-ζ、tgCD3(ε-γ/δ)-28ζ、tgCD3(ε-γ/δ)-BBζ和tgCD3(ε-γ/δ)-(28-BB)ζ,其中包含CD3ε、CD3δ和/或CD3γ蛋白质的全部或部分长度的胞外域的融合蛋白进一步包含:细胞质结构域,其包含CDζ蛋白质的全部或部分长度胞内域;和任选地CD28信号传导结构域和41BB信号传导结构域中的一种或两种。在又一实施例中,包含融合蛋白tgCD3(ε-δ)-TRAC的nb-rTCR-CD3进一步包含tgTRBC或tgTCRβ。在又一实施例中,包含融合蛋白tgCD3(ε-γ)-TRBC的nb-rTCR-CD3进一步包含tgTRAC或tgTCRα。或者在又一实施例中,包含tgTCRα和tgTCRβ的d-rTCR包含恒定NKT细胞的TCRα和TCRβ。

[0037] 鉴于上述实施例,在一些方面中,所提供的细胞包含以下重组TCR中的一种:nb-rTCR、d-rTCR或p-rTCR,所述重组TCR与内源性CD3亚单位复合,由此能够实现内源性CD3亚单位的细胞表面和其信号传导。在一些其它实施例中,细胞包含nb-rTCR-CD3或ccCD3,由此能够实现外源性CD3亚单位的细胞表面呈递和其信号传导。

[0038] 本申请的一个方面提供一种克隆主细胞库,其包含如本文所描述的克隆iPSC细胞系细胞。本申请的另一方面提供一种组合物,其包含细胞或其群体,包括如本文所描述的iPSC和由所述iPSC分化的衍生细胞的各种实施例。在一些实施例中,包含所述衍生细胞的组合物适合于治疗用途。在用于治疗用途的组合物的一些实施例中,视需要,组合物进一步包含除衍生细胞以外的一种或多种治疗剂。在一些实施例中,所述治疗剂包含肽、细胞因子、检查点抑制剂、丝裂原、生长因子、小RNA、dsRNA(双链RNA)、单核血细胞、饲养细胞、饲养细胞组分或其置换因子、包含一种或多种所关注多核酸的载体、抗体、化学治疗剂或放射性部分,或免疫调节药物(IMiD)。

[0039] 本申请的另外的方面提供了一种各种实施例中的所述治疗组合物的治疗用途,其通过将所述组合物引入到适合于过继性细胞疗法的受试者中进行,其中所述受试者患有自身免疫性病症;恶性血液病;实体肿瘤;癌症或病毒感染。

[0040] 本申请的另一方面提供一种通过分化$TCR^{neg}$ iPSC制造衍生效应细胞的方法,所述

iPSC包含一种或多种编码一种或多种外源蛋白质的多核苷酸以在表达时提供细胞表面CD3复合物或其一个或多个亚单位或子结构域(cs-CD3),且任选地所述iPSC进一步包含以下中的一种或多种:(i)B2M阴性或低;(ii)CIITA阴性或低;(iii)HLA-G或不可裂解的HLA-G的引入表达;(iv)高亲和力不可裂解的CD16(hnCD16)或其变体;(v)嵌合抗原受体(CAR);(vi)细胞表面表达的外源细胞因子或其受体的部分或全长肽;(vii)表1中所列的基因型中的至少一种;(viii)以下中的至少一种的缺失或表达减少:CD38、TAP1、TAP2、TAP相关蛋白、NLRC5、PD1、LAG3、TIM3、RFXANK、CIITA、RFX5、RFXAP、RAG1和染色体6p21区域中的任何基因;和(ix)以下中的至少一种的表达引入或增加:HLA-E、41BBL、CD3、CD4、CD8、CD16、CD47、CD113、CD131、CD137、CD80、PDL1、$A_{2A}R$、CAR、TCR、Fc受体、接合体和用于与双特异性或多特异性或通用接合体偶合的表面触发受体。在制造本申请的细胞的方法的一些实施例中,所述方法进一步包含以下步骤:通过基因敲除克隆iPSC的TCR以获得基因组工程改造的$TCR^{neg}$ iPSC,且同时或随后基因敲入一种或多种编码一种或多种外源蛋白质的多核苷酸;或通过将恒定NKT细胞重编程到iPSC以提供包含iTCRαβ而非T细胞-TCR的克隆iPSC来提供细胞表面CD3复合物或其一个或多个亚单位或子结构域(cs-CD3);和以下任选步骤:通过基因敲除B2M和CIITA,或引入HLA-G或不可裂解的HLA-G、高亲和力不可裂解的CD16或其变体、CAR和/或细胞表面表达的外源细胞因子或其受体的部分或全长肽的表达来基因组工程改造TCR阴性细胞,并且所述CAR和细胞表面表达的外源细胞因子或其受体的部分或全部肽共表达于单独构建体或双顺反子构建体中。

[0041] 在制造细胞的方法的一个实施例中,基因敲入一种或多种编码一种或多种外源蛋白质的多核苷酸以提供cs-CD3的步骤进一步包含向iPSC中引入以下中的一种:(i)tgTRAC和tgTRBC编码多核苷酸中的一种或两种,以在表达时提供nb-rTCR;(ii)tgTCRα和任选的tgTCRβ编码多核苷酸,以在表达时提供d-rTCR,其中tgTCRα和tgTCRβ中的每一者包含相应的限定可变区;(iii)tgpTCRα和任选的tgTRBC或tgTCRβ编码多核苷酸,以提供p-rTCR,其中tgTCRβ包含限定可变区;(iv)一种或多种编码以下融合蛋白中的一种或多种的多核苷酸:(1)tgCD3(ε-δ)-TRAC、(2)tgCD3(ε-γ)-TRBC、(3)tgCD3(ε-γ)-TRAC和/或(4)tgCD3(ε-δ)-TRBC,以提供nb-rTCR-CD3;其中所述融合蛋白包含CD3ε、CD3δ、CD3γ的全部或部分长度的胞外域和/或全部或部分长度的TRAC或TRBC;或(v)一种或多种编码以下融合蛋白中的一种或多种的多核苷酸:(1)tgCD3(ε-γ)-ζ、(2)tgCD3(ε-δ)-ζ、(3)tgCD3(ε-γ/δ)-28ζ、(4)tgCD3(ε-γ/δ)-BBζ和(5)tgCD3(ε-γ/δ-(28-BB)ζ,以提供ccCD3;其中包含CD3ε、CD3δ和/或CD3γ蛋白质的全部或部分长度的胞外域的融合蛋白进一步包含:细胞质结构域,其包含CDζ蛋白质的全部或部分长度胞内域;和任选地CD28信号传导结构域和41BB信号传导结构域中的一种或两种。在如所描述的细胞的制造方法的一些实施例中,向iPSC中引入一种或多种编码融合蛋白tgCD3(ε-δ)-TRAC的多核苷酸的步骤进一步包含引入编码tgTRBC或tgTCRβ的多核苷酸,以提供nb-rTCR-CD3。在一些实施例中,向iPSC中引入一种或多种编码融合蛋白tgCD3(ε-γ)-TRBC的多核苷酸的步骤进一步包含tgTRAC或tgTCRα,以提供nb-rTCR-CD3。在一些实施例中,向iPSC中引入一种或多种编码融合蛋白tgCD3(ε-γ)-TRBC的多核苷酸的步骤进一步包含tgTRAC或tgTCRα,以提供nb-rTCR-CD3。在一些其它实施例中,向iPSC中引入编码tgTCRα的多核苷酸和任选地编码tgTCRβ的多核苷酸以提供d-rTCR的步骤,tgTCRα和tgTCRβ分别包含恒定NKT细胞的TCRα和TCRβ。

[0042] 在如所提供的细胞的制造方法的各种实施例中，基因组工程改造为包含缺失和/或插入的靶向编辑。这种靶向编辑可通过CRISPR、ZFN、TALEN、归巢核酸酶、同源重组或这些工具的任何其它功能变化来进行。本发明的一个方面提供如本文所提供的各种实施例的克隆iPSC的CRISPR介导编辑，由此获得经编辑iPSC，所述经编辑iPSC为$TCR^{neg}$且包含一种或多种编码一种或多种外源蛋白质的多核苷酸以在表达时提供细胞表面CD3复合物或其一个或多个亚单位或子结构域(cs-CD3)，其中经编辑克隆iPSC包含表1中所列的基因型中的至少一种。在一些实施例中，CRISPR介导编辑进一步包含在TRAC或TRBC基因座处插入CAR，和/或其中所述CAR是由TCR的内源启动子驱动，和/或其中所述TCR是通过CAR插入进行基因敲除。

[0043] 本申请的又一方面提供一种组合治疗方法，并且所述方法包含向处于所述治疗下的受试者提供效应细胞，所述效应细胞包含$TCR^{neg}$和一种或多种编码一种或多种外源蛋白质的多核苷酸以在表达时提供细胞表面CD3复合物或其一个或多个亚单位或子结构域(cs-CD3)，和所选择的多特异性接合体，其中所述效应细胞包含如所提供的衍生细胞。在一些实施例中，所述方法中的所选择的多特异性接合体为以下中的至少一种：(i)T细胞接合体；(ii)NK细胞接合体；(iii)双特异性T细胞接合体(BiTE)；(iv)双特异性杀伤细胞接合体(BiKE)；(v)三特异性杀伤细胞接合体(TriKE)；(vi)CD3接合体；或(vii)CD16接合体。在一些实施例中，所选择的多特异性接合体为CD3接合体，其中CD3接合体包含与cs-CD3结合的第一可变区段和与抗原结合的第二可变区段，所述抗原包含以下中的至少一种：(i)ADGRE2、碳酸酐酶IX(CAIX)、CCRI、CCR4、癌胚抗原(CEA)、CD3、CD5、CD7、CD8、CD10、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD34、CD38、CD41、CD44、CD44V6、CD49f、CD56、CD70、CD74、CD99、CD123、CD133、CD138、CDS、CLEC12A、巨细胞病毒(CMV)感染细胞的抗原、上皮糖蛋白2(EGP2)、上皮糖蛋白-40(EGP-40)、上皮细胞粘附分子(EpCAM)、EGFRvIII、受体酪氨酸-蛋白激酶erb-B2,3,4、EGFIR、EGFR-VIII、ERBB叶酸结合蛋白(FBP)、胎儿乙酰胆碱受体(AChR)、叶酸受体-a、神经节苷脂G2(GD2)、神经节苷脂G3(GD3)、人类表皮生长因子受体2(HER-2)、人类端粒酶逆转录酶(hTERT)、ICAM-1、整合素B7、白介素-13受体亚单位α-2(IL-13Rα2)、κ-轻链、激酶插入结构域受体(KDR)、路易斯A(CA19.9)、路易斯Y(LeY)、L1细胞粘附分子(L1-CAM)、LILRB2、黑色素瘤抗原家族A 1(MAGE-A1)、MICA/B、粘蛋白1(Muc-1)、粘蛋白16(Muc-16)、间皮素(MSLN)、NKCSI、NKG2D配体、c-Met、癌症睾丸抗原NY-ESO-1、癌胚抗原(h5T4)、PRAME、前列腺干细胞抗原(PSCA)、PRAME前列腺特异性膜抗原(PSMA)、肿瘤相关糖蛋白72(TAG-72)、TIM-3、TRBCI、TRBC2、血管内皮生长因子R2(VEGF-R2)、威尔姆斯肿瘤蛋白质(WT-1)和/或病原体抗原；或(ii)BCMA、CD19、CD20、CD33、CD38、CD52、CD123、CEA、EGFR、EpCAM、GD2、GPA33、HER2、MICA/B、PDL1和/或PSMA；或(iii)CD19、CD33、CD123、CEA、EpCAM、GPA33、HER2和/或PSMA。在一些实施例中，CD3接合体包含以下中的至少一种：博纳吐单抗(blinatumomab)、卡托莫西单抗(catumaxomab)、厄马索单抗(ertumaxomab)、RO6958688、AFM11、MT110/AMG 110、MT111/AMG211/MEDI-565、AMG330、MT112/BAY2010112、MOR209/ES414、MGD006/S80880、MGD007和/或FBTA05。在一些实施例中，CD3接合体是与所述效应细胞同时或相继地给予所述受试者。在一些实施例中，效应细胞包含衍生造血细胞，所述衍生造血细胞包含衍生NK细胞或衍生T细胞，其中衍生NK细胞或衍生T细胞包含CD38基因敲除、高亲和力不可裂解的CD16或其变体，并且任选地包含：(i)B2M和CIITA基因敲除；(ii)HLA-G或不可裂解的HLA-G、CAR和/或细胞表面表达的外源细胞因子或其受体的部分或全长肽的

引入表达;其中所述CAR和细胞表面表达的外源细胞因子或其受体的部分或全长肽共表达于单独构建体或双顺反子构建体中;和/或(iii)表1中所列的基因型中的至少一种。

[0044] 本申请的又一方面提供一种减少或预防过继性细胞治疗中接受者T细胞对效应细胞的同种排斥的方法,其中所述方法包含向处于所述治疗下的受试者提供(i)抗CD3剂,和(ii)效应细胞,其包含$TCR^{neg}$和预负载有CD3接合体的细胞表面CD3复合物或其一个或多个亚单位或子结构域(cs-CD3),其中所述效应细胞包含本文所提供的衍生细胞。在一些实施例中,所述抗CD3剂为CD3抗体或CD3-CAR,其中CD3-CAR包含于NK细胞中;并且其中抗CD3剂使接受者T细胞失活,从而减少或预防同种排斥。在一些实施例中,包含与效应细胞的cs-CD3结合的第一可变区段的所述CD3接合体包含与抗原结合的第二可变区段,所述抗原与自身免疫病症;恶性血液病;实体肿瘤;癌症或病毒感染有关。在包含与抗原结合的第二可变区段的CD3接合体的一些实施例中,抗原包含以下中的至少一种:(i)ADGRE2、碳酸酐酶IX(CAIX)、CCRI、CCR4、癌胚抗原(CEA)、CD3、CD5、CD7、CD8、CD10、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD34、CD38、CD41、CD44、CD44V6、CD49f、CD56、CD70、CD74、CD99、CD123、CD133、CD138、CDS、CLEC12A、巨细胞病毒(CMV)感染细胞的抗原、上皮糖蛋白2(EGP 2)、上皮糖蛋白-40(EGP-40)、上皮细胞粘附分子(EpCAM)、EGFRvIII、受体酪氨酸-蛋白激酶erb-B2,3,4、EGFIR、EGFR-VIII、ERBB叶酸结合蛋白(FBP)、胎儿乙酰胆碱受体(AChR)、叶酸受体-a、神经节苷脂G2(GD2)、神经节苷脂G3(GD3)、人类表皮生长因子受体2(HER-2)、人类端粒酶逆转录酶(hTERT)、ICAM-1、整合素B7、白介素-13受体亚单位α-2(IL-13Rα2)、κ-轻链、激酶插入结构域受体(KDR)、路易斯A(CA19.9)、路易斯Y(LeY)、L1细胞粘附分子(L1-CAM)、LILRB2、黑色素瘤抗原家族A1(MAGE-A1)、MICA/B、粘蛋白1(Muc-1)、粘蛋白16(Muc-16)、间皮素(MSLN)、NKCSI、NKG2D配体、c-Met、癌症睾丸抗原NY-ESO-1、癌胚抗原(h5T4)、PRAME、前列腺干细胞抗原(PSCA)、PRAME前列腺特异性膜抗原(PSMA)、肿瘤相关糖蛋白72(TAG-72)、TIM-3、TRBCI、TRBC2、血管内皮生长因子R2(VEGF-R2)、威尔姆斯肿瘤蛋白质(WT-1)和/或病原体抗原;或(ii)BCMA、CD19、CD20、CD33、CD38、CD52、CD123、CEA、EGFR、EpCAM、GD2、GPA33、HER2、MICA/B、PDL1和/或PSMA;或(iii)CD19、CD33、CD123、CEA、EpCAM、GPA33、HER2和/或PSMA。在又一些其它实施例中,CD3接合体包含以下中的至少一种:博纳吐单抗、卡托莫西单抗、厄马索单抗、RO6958688、AFM11、MT110/AMG 110、MT111/AMG211/MEDI-565、AMG330、MT112/BAY2010112、MOR209/ES414、MGD006/S80880、MGD007和/或FBTA05。

[0045] 通过结合附图进行的以下描述,如本文所提供的组合物和方法的各个目的和优势将变得显而易见,在所述附图中借助于说明和实例阐述本发明的某些实施例。

## 附图说明

[0046] 图1A至C显示用于在破坏细胞中的内源性TCR后产生与重组TCR复合物或其亚单位缔合的细胞表面呈递的CD3复合物或其亚单位或子结构域(cs-CD3)的说明性设计:(1)nb-rTCR(非结合重组TCR);(2)d-rTCR(限定重组TCR);(3)p-rTCR(重组前TCRα,具有任选的非结合TCRβ);(4)nb-rTCR-CD3(锚定非结合重组TCR的CD3);和(5)ccCD3(CD3嵌合链)。

[0047] 图2是iPSC衍生的细胞中细胞表面表达的细胞因子的若干构建体设计的图示。IL15用作说明性实例,其可以用其它所期望的细胞因子置换。

[0048] 图3显示了将αβT细胞重编程且工程改造为单细胞衍生的TRAC靶向CAR TiPSC克

隆。A:在如所指示的不同阶段处的培养物的相差图像。B:重编程前的αβT细胞(左图)、分选前的重编程和工程改造的细胞池和克隆TiPSC克隆(右图)的流式细胞测量术概况。

[0049] 图4是成熟$TCR^{neg}$ iPSC衍生的NK细胞的流式细胞测量术的图示,所述成熟$TCR^{neg}$ iPSC衍生的NK细胞证实逐步地工程改造hnCD16表达、B2M基因敲除(指示为"B2M";HLA-A2表达的损失)、HLA-G表达和IL-15/IL-15ra(LNGFR)构建体表达。

[0050] 图5是由流式细胞测量术测定的端粒长度的图示,并且来自iPSC的成熟衍生NK细胞相较于成体外周血NK细胞维持更长的端粒。

[0051] 图6显示用全长IL15/IL15Rα融合构建体转导的iNK细胞(实心圆;阳性对照)或无细胞质信号传导结构域的截短IL15/IL15Rα融合构建体(空心圆)相较于不依赖于外源可溶性IL2的相同培养物中未转导或GFP转导的细胞具有存活优势。A:在外源IL2的存在下;B:在不存在外源IL2的情况下。

[0052] 图7显示用于转导具有或不具有TCRβ的恒定NKT TCRα的示例性构建体。

[0053] 图8A至B显示CD3不由恒定NKT TCR转导的iPSC或iPSC衍生的iCD34祖细胞表达。

[0054] 图9A至C显示恒定NKT TCR支持CD3在TCR缺陷型iPSC衍生的T细胞中的表面表达。图9A至B显示CD3和TCR表达在不同时间点的流式细胞测量术结果。图9C显示在iCD34分化之后第25天的CD3的MFI。

[0055] 图10显示包含具有或不具有NKT TCRβ的NKT TCRα的iPSC衍生的T细胞在使用四聚体刺激细胞表面CD3结合之后聚集。

[0056] 图11显示包含具有或不具有NKT TCRβ的NKT TCRα的iPSC衍生的T细胞在CD3四聚体刺激后具有增加的CD25表达。

[0057] 图12A至B显示包含具有或不具有NKT TCRβ的NKT TCRα的iPSC衍生的T细胞在CD3结合BITE的存在下具有增强的细胞毒性。图12A显示表明在存在10:1效应子与标靶比率的CD19xCD3和CD20xCD3 BITE的情况下靶细胞的杀伤增强的代表性FACS图。图12B显示包含具有或不具有NKT TCRβ的NKT TCRα的iPSC衍生的效应细胞的特异性细胞毒性的百分比。

## 具体实施方式

[0058] iPSC(诱导性多能干细胞)的基因组修饰包括多核苷酸插入、缺失和取代。基因组工程改造的iPSC中的外源基因表达通常遇到问题,例如在初始基因组工程改造的iPSC长期克隆扩增之后、在细胞分化之后和在来自衍生自基因组工程改造的iPSC的细胞的去分化细胞类型中基因沉默或基因表达减少。在另一方面,直接工程改造原代免疫细胞,例如从外周血、脐带血或任何其它供体组织分离的T细胞或NK细胞具有挑战性,并且为制备和递送用于过继性细胞疗法的工程改造的免疫细胞带来了障碍。本发明提供用于将一种或多种外源基因(包括自杀基因和其它功能模式)稳定地整合到由iPSC分化的衍生细胞中的有效的、可靠的和针对性的方法,所述外源基因提供与移植、运输、归巢、迁移、细胞毒性、活力、维持、扩增、寿命、自我更新、存留和/或存活有关的有所改善的治疗特性,所述衍生细胞包括(但不限于)HSC(造血干细胞和祖细胞)、T细胞祖细胞、NK细胞祖细胞、T细胞、NKT细胞、NK细胞。

[0059] 定义

[0060] 除非本文中另外定义,否则结合本申请使用的科学和技术术语应具有所属领域的普通技术人员通常理解的含义。此外,除非上下文另外需要,否则单数术语应包括复数并且

复数术语应包括单数。

[0061] 应理解，本发明不限于本文所描述的特定方法、方案和试剂等，且因此可变化。本文所使用的术语仅仅是出于描述特定实施例的目的，并且并不意欲限制本发明的范围，本发明的范围仅由权利要求书界定。

[0062] 如本文中所使用，冠词“一(a/an)”和“所述(the)”在本文中用于指一个(种)或超过一个(种)(即，至少一个(种))的所述冠词的语法对象。举例来说，“一个要素”意指一个要素或超过一个要素。

[0063] 替代方案(例如“或”)的使用应理解为意指替代方案中的任一个、两个或其任何组合。

[0064] 术语“和/或”应理解为意指替代方案中的一种或两种。

[0065] 如本文中所使用，术语“约”或“大约”是指相较于参考数量、水平、数值、数目、频率、百分比、尺寸、大小、量、重量或长度，数量、水平、数值、数目、频率、百分比、尺寸、大小、量、重量或长度变化多达15％、10％、9％、8％、7％、6％、5％、4％、3％、2％或1％。在一个实施例中，术语“约”或“大约”是指关于参考数量、水平、数值、数目、频率、百分比、尺寸、大小、量、重量或长度，数量、水平、数值、数目、频率、百分比、尺寸、大小、量、重量或长度±15％、±10％、±9％、±8％、±7％、±6％、±5％、±4％、±3％、±2％或±1％的范围。

[0066] 如本文中所使用，术语“大体上”或“基本上”是指相较于参考数量、水平、数值、数目、频率、百分比、尺寸、大小、量、重量或长度，数量、水平、数值、数目、频率、百分比、尺寸、大小、量、重量或长度为约90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％或更高。在一个实施例中，术语“基本上相同”或“大体上相同”是指与参考数量、水平、数值、数目、频率、百分比、尺寸、大小、量、重量或长度大约相同的数量、水平、数值、数目、频率、百分比、尺寸、大小、量、重量或长度的范围。

[0067] 如本文中所使用，术语“大体上不含”和“基本上不含”可互换使用，且当用于描述组合物(例如细胞群或培养基)时，是指不含所指定物质或其来源的组合物，例如95％不含、96％不含、97％不含、98％不含、99％不含所指定物质或其来源，或检测不到，如通过常规方式所测量。术语组合物中“不含”或“基本上不含”某种成分或物质也意指(1)所述组合物中不包括任何浓度的这类成分或物质，或(2)所述组合物中包括功能上呈惰性、但处于低浓度的这类成分或物质。类似含义可以应用于术语“不存在”，其中是指不存在组合物的特定物质或其来源。

[0068] 在整个本说明书中，除非上下文另外要求，否则词语“包含(comprise/comprises/comprising)”应理解成暗指包括所陈述步骤或要素或一组步骤或要素，但不排除任何其它步骤或要素或一组步骤或要素。在特定实施例中，术语“包括”、“具有”、“含有”和“包含”同义地使用。

[0069] “由……组成”意指包括并且限于短语“由……组成”之后的任何事物。因此，短语“由……组成”指示所列要素是需要或必需的，并且不能存在其它要素。

[0070] “基本上由……组成”意指包括短语后所列的任何要素，并且限于不干扰或影响本公开中规定的所列要素的活性或作用的其它要素。因此，短语“基本上由……组成”指示所列要素为需要或必需的，但其它要素不是任选的且可视其是否影响所列要素的活性或作用而存在或不存在。

[0071] 贯穿本说明书提及“一个实施例”、“一实施例”、“特定实施例”、“相关实施例”、“某一实施例”、“额外实施例”或“另一实施例”或其组合意指结合实施例描述的特定特征、结构或特性包括于本发明的至少一个实施例中。因此，贯穿本说明书中的各处出现的前述短语不一定全部指代同一实施例。此外，特定特征、结构或特性可在一个或多个实施例中以任何合适方式组合。

[0072] 术语“离体”一般是指在生物体外部发生的活动，例如在生物体外部的人工环境中的活组织中或活组织上进行的实验或测量，优选其中天然条件的改变最小。在特定实施例中，“离体”程序涉及从生物体中获取活细胞或组织并且通常在无菌条件下在实验室设备中培养，并且通常培养几小时或最多约24小时，但包括最多48小时或72小时或更长，这视情况而定。在某些实施例中，可以收集和冷冻这类组织或细胞，并且随后解冻以进行离体处理。持续时间长于几天的使用活细胞或组织的组织培养实验或程序典型地被视为“活体外”，但在某些实施例中，这个术语可与离体互换使用。

[0073] 术语“活体内”一般是指在生物体内部发生的活动。

[0074] 如本文中所使用，术语“重编程”或“去分化”或“提高细胞效能”或“提高发育效能”是指一种提高细胞效能或使细胞去分化成较低分化状态的方法。举例来说，相较于非重编程状态下的相同细胞，细胞效能增加的细胞具有更大的发育可塑性(即，可分化成更多细胞类型)。换句话说，重编程细胞为与非重编程状态下的相同细胞相比分化状态减少的细胞。

[0075] 如本文中所使用，术语“分化”是未特化(“未专门化”)或弱特化细胞借以获得特化细胞(例如血细胞或肌肉细胞)的特征的过程。分化细胞或分化诱导的细胞是已处在细胞谱系内的更特化(“专门化”)位置的细胞。术语“专门化”在应用于分化过程时是指一种细胞，所述细胞在分化路径中已经行进到在正常情况下其将继续分化成特定细胞类型或细胞类型的亚群并且在正常情况下其不能分化成不同细胞类型或恢复为更弱分化细胞类型的时刻。如本文中所使用，术语“多能”是指细胞形成身体或胞体(即，胚胎本身)的所有谱系的能力。举例来说，胚胎干细胞是一种类型的多能干细胞，其能够从三种胚层：外胚层、中胚层和内胚层中的每一种形成细胞。多能性是一种连续的发育效能，范围为不能产生完整生物体的不完全或部分多能细胞(例如外胚层干细胞或EpiSC)到能够产生完整生物体的更原始、更多能细胞(例如胚胎干细胞)。

[0076] 如本文所使用，术语“诱导性多能干细胞”或iPSC意指使用重编程因子和/或小分子化学驱动方法，从已经诱导或改变(即，重编程为能够分化成所有三种胚层或真皮层：中胚层、内胚层和外胚层的组织的细胞)的分化的成年、新生儿或胚胎细胞中活体外产生干细胞。所产生的iPSC并非指如其在自然界中被发现的那样的细胞。

[0077] 如本文中所使用，术语“胚胎干细胞”是指胚胎囊胚的内部细胞团块中的天然存在的多能干细胞。胚胎干细胞是多能的并且在发育期间产生三种原代胚层：外胚层、内胚层和中胚层的所有衍生细胞。其对胚胎外膜或胎盘没有贡献，即，不是分化全能的。

[0078] 如本文中所使用，术语“多潜能干细胞”是指具有分化成一种或多种胚层(外胚层、中胚层和内胚层)、但非全部三种胚层的细胞的发育潜能的细胞。因此，多潜能细胞也可以称为“部分分化的细胞”。多潜能细胞为所属领域中熟知的，并且多潜能细胞的实例包括成体干细胞，例如造血干细胞和神经干细胞。“多潜能”指示细胞可以形成既定谱系内的许多类型的细胞，而非其它谱系的细胞。举例来说，多潜能造血细胞可形成许多不同类型的血细

胞(红细胞、白细胞、血小板等),但其不能形成神经元。因此,术语“多潜能性”是指一种细胞状态,其发育潜能的程度低于分化全能和多能。

[0079] 可部分地通过评定细胞的多能性特征确定多能性。多能性特征包括(但不限于):(i)多能干细胞形态;(ii)无限自我更新的潜能;(iii)多能干细胞标记物的表达,所述标记物包括(但不限于)SSEA1(仅小鼠)、SSEA3/4、SSEA5、TRA1-60/81、TRA1-85、TRA2-54、GCTM-2、TG343、TG30、CD9、CD29、CD133/凸素(prominin)、CD140a、CD56、CD73、CD90、CD105、OCT4、NANOG、SOX2、CD30和/或CD50;(iv)分化成所有三种体细胞谱系(外胚层、中胚层和内胚层)的能力;(v)由三种体细胞谱系组成的畸胎瘤形成;以及(vi)由来自三种体细胞谱系的细胞组成的类胚胎体的形成。

[0080] 先前已描述两种类型的多能性:“激发”或“亚稳定”的多能性状态等效于后期囊胚的外胚层干细胞(EpiSC),且“初始”或“基础”的多能性状态等效于早期/植入前囊胚的内部细胞团块。尽管两种多能状态都展现如上文所描述的特征,但所述初始或基础状态进一步展现;(i)雌性细胞中的X染色体的预先失活或再激活;(ii)在单一细胞培养期间,克隆性和存活率改善;(iii)DNA甲基化总体减少;(iv)发育调节基因启动子上的H3K27me3抑制性染色质标记沉积减少;以及(v)相对于激发状态的多能细胞,分化标记物的表达减少。通常发现细胞重编程标准方法(其中将外源性多能性基因引入体细胞中,表达,并且然后沉默或从所得多能细胞中去除)具有多能性激发状态的特征。在标准多能细胞培养条件下,除非维持外源性转基因表达(其中观察到基础状态的特征),否则这类细胞保持激发状态。

[0081] 如本文中所使用,术语“多能干细胞形态”是指胚胎干细胞的经典形态特征。正常胚胎干细胞形态的特征是小圆形形状,细胞核与细胞质比率高,明显存在核仁,和典型的细胞间间距。

[0082] 如本文中所使用,术语“受试者”是指任何动物,优选为人类患者、家畜或其它驯养动物。

[0083] “多能性因子”或“重编程因子”是指能够单独或与其它药剂组合增加细胞的发育效能的药剂。多能性因子包括(但不限于)能够增加细胞的发育效能的多核苷酸、多肽和小分子。示例性多能性因子包括例如转录因子和小分子重编程剂。

[0084] “培养”或“细胞培养”是指细胞在活体外环境中的维持、生长和/或分化。“细胞培养基”、“培养基”(在各种情况下为单数“培养基(medium)”)、“补充剂”和“培养基补充剂”是指培养细胞培养物的营养组合物。

[0085] “培养”或“维持”是指细胞在组织或身体外部(例如在无菌塑料(或经涂布的塑料)细胞培养皿或烧瓶中)的维持、繁殖(生长)和/或分化。“培养”或“维持”可以利用培养基作为有助于繁殖和/或维持细胞的营养物、激素和/或其它因子来源。

[0086] 如本文中所使用,术语“中胚层”是指三种胚层中的一种,其出现于早期胚胎发生期间且产生各种特化细胞类型,包括循环系统的血细胞、肌肉、心脏、真皮、骨骼和其它支持和结缔组织。

[0087] 如本文中所使用,术语“永久性生血内皮细胞”(HE)或“多能干细胞衍生的永久性生血内皮细胞”(iHE)是指在称为内皮细胞向造血细胞转变的过程中产生造血干细胞和祖细胞的内皮细胞亚群。胚胎中的造血细胞发育依序进行:从侧板中胚层到成血管细胞到永久性生血内皮细胞和造血祖细胞。

[0088] 术语“造血干细胞和祖细胞”、“造血干细胞”、“造血祖细胞”或“造血前驱细胞”是指定型为造血谱系，但能够进一步造血分化的细胞，且包括多潜能造血干细胞(血胚细胞)、骨髓祖细胞、巨核细胞祖细胞、红细胞祖细胞和淋巴祖细胞。造血干细胞和祖细胞(HSC)是多潜能干细胞，其产生所有血细胞类型，包括骨髓(单核细胞和巨噬细胞、嗜中性粒细胞、嗜碱粒细胞、嗜酸性粒细胞、红细胞、巨核细胞/血小板、树突状细胞)和淋巴谱系(T细胞、B细胞、NK细胞)。如本文中所使用的术语“永久性造血干细胞”是指能够产生成熟骨髓细胞类型和淋巴细胞类型两者，包括T细胞、NK细胞和B细胞的CD34+造血细胞。造血细胞还包括原始造血细胞的多种亚群，其产生原始红细胞、巨核细胞和巨噬细胞。

[0089] 如本文中所使用，术语“T淋巴细胞”和“T细胞”可互换使用并且是指白血细胞的主要类型，其在胸腺中完成成熟并且在免疫系统中具有多种作用，包括鉴别体内的特异性外来抗原和使其它免疫细胞活化和失活。T细胞可以是任何T细胞，例如培养的T细胞，例如原代T细胞，或来自培养的T细胞系的T细胞，例如Jurkat、SupT1等，或获自哺乳动物的T细胞。T细胞可以是CD3+细胞。T细胞可以是任何类型的T细胞并且可以处于任何发育阶段，包括(但不限于)CD4+/CD8+双阳性T细胞、CD4+辅助T细胞(例如Th1和Th2细胞)、CD8+T细胞(例如细胞毒性T细胞)、外周血单核细胞(PBMC)、外周血白细胞(PBL)、肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)、记忆T细胞、初始T细胞、调控T细胞、γδT细胞(gamma delta T cell/γδT cell)等等。其它类型的辅助T细胞包括例如Th3(Treg)、Th17、Th9或Tfh细胞的细胞。其它类型的记忆T细胞包括例如中枢记忆T细胞(Tcm细胞)、效应记忆T细胞(Tem细胞和TEMRA细胞)的细胞。T细胞还可以指基因工程改造的T细胞，例如经修饰以表达T细胞受体(TCR)或嵌合抗原受体(CAR)的T细胞。T细胞也可以由干细胞或祖细胞分化。

[0090] “CD4+T细胞”是指在其表面上表达CD4且与细胞介导的免疫反应相关的T细胞的亚群。其特征在于刺激后的分泌概况，其可包括分泌细胞因子，例如IFN-γ、TNF-α、IL2、IL4和IL10。“CD4”是最初被定义为T淋巴细胞上的分化抗原，但也发现于包括单核细胞/巨噬细胞的其它细胞上的55kD的糖蛋白。CD4抗原为免疫球蛋白超基因家族的成员，且表明为MHC(主要组织相容性复合物)II类限制的免疫反应中的相关识别元件。在T淋巴细胞上，其界定了辅助/诱导因子亚群。

[0091] “CD8+T细胞”是指在其表面上表达CD8，受限于MHC I类，且充当细胞毒性T细胞的T细胞的亚群。“CD8”分子是在胸腺细胞上和细胞毒性和抑制性T淋巴细胞上发现的分化抗原。CD8抗原为免疫球蛋白超基因家族的成员，并且是主要组织相容性复合物I类限制的相互作用中的相关识别元件。

[0092] 如本文中所使用，术语“NK细胞”或“自然杀伤细胞”是指由CD56或CD16的表达和T细胞受体(CD3)的不存在定义的外周血淋巴细胞的亚群。如本文中所使用，术语“适应性NK细胞”和“记忆NK细胞”可互换并且是指NK细胞的亚群，其表型为CD3-和CD56+，表达NKG2C和CD57和任选的CD16中的至少一种，但缺少以下中的一种或多种的表达:PLZF、SYK、FceRγ和EAT-2。在一些实施例中，分离的CD56+NK细胞亚群包含CD16、NKG2C、CD57、NKG2D、NCR配体、NKp30、NKp40、NKp46、活化和抑制性KIR、NKG2A和/或DNAM-1的表达。CD56+可以是较弱或较强的表达。

[0093] 如本文所使用，术语“NKT细胞”或“自然杀伤T细胞”是指受限于CD1d的T细胞，其表达T细胞受体(TCR)。不同于检测由常规主要组织相容性(MHC)分子呈递的肽抗原的常规T细

胞,NKT细胞识别由CD1d(一种非经典MHC分子)呈递的脂质抗原。识别两种类型的NKT细胞。恒定或I型NKT细胞表达非常有限的TCR库:典型α链(在人类中为Vα24-Jα18)与有限光谱的β链(在人类中为Vβ11)的结合。第二NKT细胞群(称为非经典或非恒定II型NKT细胞)显示更不均匀的TCRαβ利用率。I型NKT细胞被视为适合于免疫疗法。适应性或恒定(I型)NKT细胞可以利用以下标记物中的至少一种或多种的表达来鉴别:TCR Va24-Ja18、Vb11、CD1d、CD3、CD4、CD8、aGalCer、CD161和CD56。

[0094] 如本文中所使用,术语“分离”等是指细胞或细胞群,其已从其原始环境中分离,即,所分离细胞的环境大体上不含如存在“未分离”参考细胞的环境中所发现的至少一种组分。所述术语包括从一些或所有组分去除的细胞,如同其在其自然环境中发现,例如从组织或活检样品分离。所述术语还包括从至少一种、一些或所有组分中去除的细胞,如同所述细胞在非天然存在的环境中发现,例如从细胞培养物或细胞悬浮液分离。因此,分离的细胞部分地或完全地与至少一种组分(包括其它物质、细胞或细胞群)分离,如同其在自然界中发现或如同其在非天然存在的环境中生长、储存或生存。所分离细胞的特定实例包括部分纯的细胞组合物、大体上纯的细胞组合物和非天然存在的培养基中培养的细胞。可以通过将所期望的细胞或其群体与环境中的其它物质或细胞分离,或通过从环境中去除一个或多个其它细胞群或亚群来获得分离的细胞。

[0095] 如本文中所使用,术语“纯化”等是指增加的纯度。举例来说,纯度可以增加到至少50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或100%。

[0096] 如本文中所使用,术语“编码”是指多核苷酸(例如基因、cDNA或mRNA)中的核苷酸的特异性序列的固有特性,以充当生物过程中合成其它聚合物和大分子的模板,所述其它聚合物和大分子具有所定义的核苷酸序列(即,rRNA、tRNA和mRNA)或所定义的氨基酸序列和由其产生的生物特性。因此,如果对应于基因的mRNA的转录和转译在细胞或其它生物系统中产生蛋白质,那么所述基因编码所述蛋白质。编码链(其核苷酸序列与mRNA序列一致且通常提供于序列表中)与非编码链(用作基因或cDNA转录的模板)均可以称为编码所述基因或cDNA的蛋白质或其它产物。

[0097] “构建体”是指包含待在活体外或活体内递送到宿主细胞的多核苷酸的大分子或分子复合物。如本文所使用的“载体”是指能够引导外来遗传物质递送或转移到靶细胞的任何核酸构建体,在所述靶细胞中,所述核酸构建体能够复制和/或表达。如本文所使用的术语“载体”包含待递送的构建体。载体可以是线性或环状分子。载体可以是整合的或非整合的。载体的主要类型包括(但不限于)质粒、游离型载体、病毒载体、粘性质粒和人工染色体。病毒载体包括(但不限于)腺病毒载体、腺相关病毒载体、逆转录病毒载体、慢病毒载体、仙台病毒载体(Sendai virus vector)等。

[0098] “整合”意指将构建体的一个或多个核苷酸稳定插入细胞基因组中,即,共价连接到细胞染色体DNA内的核酸序列。“靶向整合”意指将构建体的核苷酸在预选位点或“整合位点”处插入细胞染色体或线粒体DNA中。如本文所使用的术语“整合”进一步是指一种过程,其涉及在内源序列或核苷酸缺失或不缺失的情况下在整合位点处插入构建体的一个或多个外源序列或核苷酸。在插入位点存在缺失的情况下,“整合”可进一步包含用一个或多个所插入核苷酸置换缺失的内源序列或核苷酸。

[0099] 如本文中所使用,术语“外源”欲意指参考分子或参考活性引入宿主细胞中,或对

于宿主细胞是非原生的。可以例如通过将编码核酸引入宿主遗传物质中，例如通过整合到宿主染色体中或作为非染色体遗传物质(例如质粒)来引入所述分子。因此，所述术语在关于编码核酸的表达使用时是指编码核酸以可表达形式引入细胞中。术语“内源”是指存在于宿主细胞中的参考分子或活性。类似地，所述术语在关于编码核酸的表达使用时是指细胞内所含而非外源引入的编码核酸的表达。

[0100] 如本文中所使用，“所关注基因”或“所关注多核苷酸序列”是当放置在适当调控序列的控制下时活体内转录成RNA且在一些情况下转译成多肽的DNA序列。所关注的基因或多核苷酸可包括(但不限于)原核序列、来自真核mRNA的cDNA、来自真核(例如哺乳动物)DNA的基因组DNA序列和合成DNA序列。举例来说，所关注基因可以编码miRNA、shRNA、原生多肽(即，自然界中发现的多肽)或其片段；变异多肽(即，与原生多肽具有小于100％序列一致性的原生多肽突变体)或其片段；经工程改造的多肽或肽片段、治疗肽或多肽、成像标记物、可选标记物等等。

[0101] 如本文中所使用，术语“多核苷酸”是指具有任何长度的核苷酸的聚合物形式，脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸或其类似物。多核苷酸的序列由四种核苷酸碱基构成：腺嘌呤(A)；胞嘧啶(C)；鸟嘌呤(G)；胸腺嘧啶(T)；和尿嘧啶(U)(当多核苷酸是RNA时，尿嘧啶代替胸腺嘧啶)。多核苷酸可以包括基因或基因片段(例如，探针、引物、EST或SAGE标签)、外显子、内含子、信使RNA(mRNA)、转移RNA、核糖体RNA、核糖核酸酶、cDNA、重组多核苷酸、分支链多核苷酸、质粒、载体、任何序列的分离DNA、任何序列的分离RNA、核酸探针和引物。多核苷酸还指双链和单链分子。

[0102] 如本文中所使用，术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”可互换使用，并且是指具有通过肽键共价连接的氨基酸残基的分子。多肽必须含有至少两种氨基酸，且多肽的氨基酸的最大数目不受限制。如本文中所使用，所述术语是指短链(在所属领域中通常也称为例如肽、寡肽和低聚物)和较长链(在所属领域中通常称为多肽或蛋白质)。“多肽”包括例如生物活性片段、大体上同源的多肽、寡肽、同源二聚体、异二聚体、多肽的变体、经修饰多肽、衍生物、类似物、融合蛋白等。多肽包括天然多肽、重组多肽、合成多肽或其组合。

[0103] 如本文中所使用，如本文所使用的术语“亚单位”是指蛋白质复合物的每条单独多肽链，其中每条单独多肽链可以自身形成稳定的折叠结构。许多蛋白质分子由超过一个亚单位构成，其中每一亚单位的氨基酸序列可为相同的或类似的或完全不同的。举例来说，CD3复合物由CD3α、CD3ε、CD3δ、CD3γ和CD3ζ亚单位构成，所述亚单位形成CD3ε/CD3γ、CD3ε/CD3δ和CD3ζ/CD3ζ二聚体。在单个亚单位内，多肽链的相邻部分经常折叠成称作“结构域”的紧密、局部、半独立单元。许多蛋白质结构域可进一步包含独立的“结构亚单位”(也称为子结构域)，有助于结构域的共同功能。因此，如本文所使用的术语“子结构域”是指较大结构域内部的蛋白质结构域，例如细胞表面受体的胞外域内的结合结构域；或细胞表面受体的胞内域的刺激结构域或信号传导结构域。

[0104] “可操作地连接”是指单一核酸片段上的核酸序列的缔合，使得一者的功能受另一者影响。举例来说，当启动子能够影响编码序列或功能RNA表达(即，编码序列或功能RNA处于启动子的转录控制下)时，所述启动子与所述编码序列或功能RNA可操作地连接。编码序列可以在有义或反义定向上可操作地连接到调控序列。

[0105] 如本文中所使用，术语“遗传印记”是指对源细胞或iPSC的优先治疗属性有贡献，

并且可保留于源细胞衍生的iPSC和/或iPSC衍生的造血谱系细胞中的遗传或表观遗传信息。如本文中所使用，“源细胞”是一种可以用于通过重编程来产生iPSC的非多能细胞，并且源细胞衍生的iPSC可以进一步分化成特定细胞类型，包括任何造血谱系细胞。视上下文而定，源细胞衍生的iPSC和其分化细胞有时统称为“衍生的细胞”或“衍生细胞”。举例来说，如在整个本申请中所使用，衍生效应细胞或衍生NK细胞或衍生T细胞与获自天然/原生来源(例如，外周血、脐带血或其它供体组织)的其原代对应物相比是由iPSC分化的细胞。如本文中所使用，赋予优先治疗属性的遗传印记是通过使对供体、疾病或治疗反应具有特异性的所选源细胞重编程或通过使用基因组编辑将基因修饰模式引入iPSC来并入iPSC中。在从专门选择的供体、疾病或治疗背景获得的源细胞的所述方面中，对优先治疗属性有贡献的遗传印记可包括任何背景特有的遗传或表观遗传修饰，其显现可保留表型，即优先治疗属性，所述表型传递到所选源细胞的iPSC衍生的细胞上，无论潜在分子事件得到鉴别或未得到鉴别。对供体、疾病或治疗反应具有特异性的源细胞可包含可保留于iPSC和衍生的造血谱系细胞中的遗传印记，所述遗传印记包括(但不限于)预排列的单特异性TCR，例如来自病毒特异性T细胞或恒定型自然杀伤T(iNKT)细胞；能追踪和所期望的遗传多态性，例如对编码所选供体中的高亲和力CD16受体的点突变来说为同型；和预定的HLA需求，即，所选的HLA匹配供体细胞随着群体增大而展现单倍型。如本文中所使用，优先治疗属性包括衍生细胞的移植、运输、归巢、活力、自我更新、存留、免疫反应调控和调节、存活和细胞毒性改善。优先治疗属性还可以涉及靶向抗原的受体表达；HLA呈递或其缺乏；对肿瘤微环境的抗性；旁观者免疫细胞的诱导和免疫调节；靶上特异性改善，同时肿瘤外效应降低；对例如化学疗法等疗法的抗性。

[0106] 如本文所使用的术语“增强的治疗特性”是指与相同一般细胞类型的典型免疫细胞相比增强的细胞的治疗特性。举例来说，与典型的、未修饰的和/或天然存在的NK细胞相比，具有“增强的治疗特性”的NK细胞将具有增强、改善和/或强化的治疗特性。免疫细胞的治疗特性可包括(但不限于)细胞移植、运输、归巢、活力、自我更新、存留、免疫反应调控和调节、存活和细胞毒性。免疫细胞的治疗特性也通过以下来体现：靶向抗原的受体表达；HLA呈递或其缺乏；对肿瘤微环境的抗性；旁观者免疫细胞的诱导和免疫调节；靶上特异性改善，同时肿瘤外效应降低；对例如化学疗法等治疗的抗性。

[0107] 如本文中所使用，术语“接合体”是指一种分子，例如融合多肽，其能够在免疫细胞(例如，T细胞、NK细胞、NKT细胞、B细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞)与肿瘤细胞之间形成连接；并且活化所述免疫细胞。接合体的实例包括(但不限于)双特异性T细胞接合体(BiTE)、双特异性杀伤细胞接合体(BiKE)、三特异性杀伤细胞接合体或多特异性杀伤细胞接合体，或与多种免疫细胞类型相容的通用接合体。

[0108] 如本文中所使用，术语“表面触发受体”是指能够触发或起始免疫反应(例如细胞毒性反应)的受体。表面触发受体可以加以工程改造，并且可以在效应细胞，例如T细胞、NK细胞、NKT细胞、B细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞上表达。在一些实施例中，表面触发受体促进效应细胞与特定靶细胞(例如肿瘤细胞)之间的双特异性或多特异性抗体接合，不依赖于效应细胞的天然受体和细胞类型。使用这种方法，人们可以产生包含通用表面触发受体的iPSC，并且然后使这类iPSC分化成表达通用表面触发受体的各种效应细胞类型的群体。“通用”意指表面触发受体可表达于任何效应细胞中并且活化任何效应细胞(不论细胞类型)，

并且表达通用受体的所有效应细胞可与表面触发受体可识别的具有相同抗原决定基的接合体偶联或连接(不论接合体的肿瘤结合特异性)。在一些实施例中,具有相同肿瘤靶向特异性的接合体用于与通用表面触发受体偶联。在一些实施例中,具有不同肿瘤靶向特异性的接合体用于与通用表面触发受体偶联。因此,可使一种或多种效应细胞类型接合,以在一些情况下杀死一种特定类型的肿瘤细胞并且在一些其它情况下杀死两种或更多种类型的肿瘤。表面触发受体通常包含用于效应细胞活化的共刺激结构域和对接合体的抗原决定基具有特异性的抗抗原决定基。双特异性接合体对位于一端的表面触发受体的抗抗原决定基具有特异性,并且对位于另一端的肿瘤抗原具有特异性。

[0109] 如本文中所使用,术语"安全开关蛋白质"是指一种工程改造的蛋白质,其经设计以防止细胞疗法的潜在毒性或以其它方式防止副作用。在一些情况下,安全开关蛋白质表达受到有条件的控制,以解决所移植的工程改造的细胞的安全问题,所述细胞已经将编码安全开关蛋白质的基因永久性地并入其基因组中。这种条件性调控可以是可变的并且可能包括通过小分子介导的转译后活化和组织特异性和/或时间转录调控进行控制。安全开关可以介导细胞凋亡的诱导、蛋白质合成的抑制、DNA复制、生长阻滞、转录和转录后基因调控,和/或抗体介导的耗竭。在一些情况下,安全开关蛋白质由外源分子(例如前药)活化,其在活化时,触发治疗细胞的细胞凋亡和/或细胞死亡。安全开关蛋白质的实例包括(但不限于)自杀基因,例如胱天蛋白酶9(或胱天蛋白酶3或7)、胸苷激酶、胞嘧啶脱氨酶、B细胞CD20、经修饰EGFR和其任何组合。在这种策略中,在发生不良事件时给予的前药由自杀基因产物活化并且杀死转导的细胞。

[0110] 如本文中所使用,术语"药学活性蛋白质或肽"是指能够对生物体实现生物学和/或医药作用的蛋白质或肽。药学活性蛋白质具有针对疾病的治愈性或姑息性特性,且可以给予以改善、减轻(relieve)、缓解、逆转或减轻(lessen)疾病的严重程度。药学活性蛋白质还具有防治性特性且用于防止疾病发作或减轻这类疾病或病理性病状在其显现时的严重程度。药学活性蛋白质包括完整蛋白质或肽或其药学活性片段。其还包括所述蛋白质或肽的药学活性类似物或所述蛋白质或肽的片段的类似物。术语药学活性蛋白质还指以协作或协同方式起作用以提供治疗效益的多种蛋白质或肽。药学活性蛋白质或肽的实例包括(但不限于)受体、结合蛋白、转录和转译因子、肿瘤生长抑制蛋白质、抗体或其片段、生长因子和/或细胞因子。

[0111] 如本文中所使用,术语"信号传导分子"是指调节、参与、抑制、活化、减少或增加细胞信号转导的任何分子。信号转导是指通过沿着最终触发细胞中的生物化学事件的路径募集蛋白质复合物来以化学修饰的形式传递分子信号。信号转导路径为所属领域中熟知的,且包括(但不限于)G蛋白偶联受体信号传导、酪氨酸激酶受体信号传导、整合素信号传导、TG点信号传导、配体门控离子通道信号传导、ERK/MAPK信号传导路径、Wnt信号传导路径、cAMP依赖性路径和IP3/DAG信号传导路径。

[0112] 如本文中所使用,术语"靶向模式"是指分子(例如多肽)以遗传方式并入细胞中以促进抗原和/或抗原决定基特异性,其包括但不限于i)抗原特异性(当其涉及独特的嵌合抗原受体(CAR)或T细胞受体(TCR)时);ii)接合体特异性(当其涉及单克隆抗体或双特异性接合体时);iii)靶向转化细胞;iv)靶向癌症干细胞;和v)在不存在特异性抗原或表面分子的情况下的其它靶向策略。

[0113] 如本文中所使用，与非特异性或非选择性结合相比，术语“特异性(specific/specificity)”可以用于指分子(例如受体或接合体)选择性地结合到靶分子的能力。

[0114] 如本文所使用的术语“过继性细胞疗法”是指基于细胞的免疫疗法，其在本文中使用时涉及自体或同种异体淋巴细胞的输注，所述淋巴细胞鉴别为经基因修饰或未经基因修饰的T细胞或B细胞，其在所述输注之前已离体扩增。

[0115] 如本文中所使用，“治疗上足量”在其含义内包括无毒性、但足够和/或有效量的其所提及的特定治疗和/或医药组合物，以提供所期望的治疗效果。所需的精确量将随各受试者而变化，这取决于例如患者的一般健康状况、患者的年龄和病状的阶段和严重程度等因素。在特定实施例中，治疗上足够的量足以和/或有效减轻、减少和/或改善与所治疗的受试者的疾病或病状相关的至少一种症状。

[0116] 多能干细胞的分化需要改变培养系统，例如改变培养基中的刺激剂或细胞的物理状态。大部分常规策略利用类胚胎体(EB)的形成作为共同和关键中间物来起始谱系特异性分化。“类胚胎体”是三维团簇，其已显示模拟胚胎发育，因为其在其三维区域内产生多种谱系。通过分化过程，通常为几小时到几天，简单的EB(例如经诱发以分化的聚集多能干细胞)继续成熟并且发育成囊性EB，此时，通常进一步将其处理数日到几周以继续分化。EB形成是通过使多能干细胞在三维多层细胞团簇中彼此紧密接近来起始的，这典型地是通过若干种方法中的一种来实现，包括允许多能细胞在液滴中沉降、使细胞沉降到“U”形底孔板中或通过机械搅拌。为了促进EB发育，多能干细胞聚集体需要进一步分化提示，因为多能培养维持性培养基中维持的聚集体不形成适当EB。因此，多能干细胞聚集体需要转移到分化培养基中，所述分化培养基向所选谱系提供诱发提示。随着在EB细胞团簇内适度增殖，多能干细胞的基于EB的培养通常会引起分化细胞群(外胚层、中胚层和内胚层胚层)产生。虽然经证实促进细胞分化，但由于三维结构中的细胞不一致地暴露于来自环境的分化提示，EB产生了处于可变分化状态的异质细胞。另外，EB难以形成和维持。此外，通过EB进行的细胞分化伴随适度的细胞扩增，这也导致分化效率降低。

[0117] 相比之下，与“EB形成”不同的“聚集体形成”可以用于扩增多能干细胞衍生的细胞群。举例来说，在基于聚集体的多能干细胞扩增期间，选择培养基以维持增殖和多能性。细胞增殖通常增加聚集体的大小，从而形成更大聚集体，这些聚集体可用常规的机械或酶方式解离成较小聚集体，以维持培养物内的细胞增殖并且增加细胞数量。不同于EB培养，维持培养中的聚集体内所培养的细胞维持多能性的标记物。多能干细胞聚集体需要进一步分化提示来诱导分化。

[0118] 如本文中所使用，“单层分化”是关于分化方法的术语，其不同于通过三维多层细胞团簇进行的分化，即，“EB形成”。除本文所公开的其它优势之外，单层分化避免了对用于分化起始的EB形成的需要。由于单层培养不模拟胚胎发育，例如EB形成，因此与EB中的所有三种胚层分化相比，朝向特定谱系的分化被认为是最少的。

[0119] 如本文中所使用，“解离”细胞是指已与其它细胞或表面(例如培养板表面)大体上分离或纯化的细胞。举例来说，可通过机械或酶方法从动物或组织中解离细胞。替代地，活体外聚集的细胞可以彼此解离，例如通过以酶或机械方式解离到团簇、单一细胞或单一细胞与团簇的混合物的悬浮液中。在又一替代实施例中，从培养板或其它表面解离粘附细胞。因此，解离可涉及破坏细胞与胞外基质(ECM)和衬底(例如培养表面)的相互作用，或破坏细

胞之间的ECM。

[0120] 如本文中所使用,“饲养细胞”或“饲养层”是描述与第二类型的细胞共培养以提供第二类型的细胞可生长、扩增或分化的环境的一种类型的细胞的术语,因为饲养细胞为支持第二细胞类型提供刺激、生长因子和营养物。饲养细胞任选地来自与其支持的细胞不同的物种。举例来说,某些类型的人类细胞,包括干细胞,可以由小鼠胚胎成纤维细胞和永生化小鼠胚胎成纤维细胞的原代培养物支持。在另一实例中,外周血衍生的细胞或转化的白血病细胞支持自然杀伤细胞的扩增和成熟。饲养细胞在与其它细胞共培养时,可通常通过照射或用抗有丝分裂剂(例如丝裂霉素(mitomycin))处理来失活,以防止其生长超出其所支持的细胞。饲养细胞可以包括内皮细胞、基质细胞(例如上皮细胞或成纤维细胞)和白血病细胞。不限于前述,一种特定的饲养细胞类型可以是人类饲养层,例如人类皮肤成纤维细胞。另一饲养细胞类型可以是小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)。一般来说,多种饲养细胞可部分地用于维持多能性、引导朝向某一谱系的分化,增强增殖能力并且促进向特化细胞类型(例如效应细胞)的成熟。

[0121] 如本文中所使用,“无饲养层”(FF)环境是指一种环境,例如培养条件、细胞培养物或培养基,其基本上不含饲养层或基质细胞,和/或其尚未通过培养饲养细胞进行预调节。“预调节”培养基是指饲养细胞已在培养基内培养一段时间(例如至少一天)之后所收集的培养基。预调节培养基含有许多介体物质,包括由培养基中培养的饲养细胞分泌的生长因子和细胞因子。在一些实施例中,无饲养层环境不含饲养层或基质细胞,并且也不通过培养饲养细胞进行预调节。

[0122] 如在iPSC和由其分化的衍生非多能细胞的基因组编辑或修饰,或非多能细胞和由其重编程的衍生iPSC的基因组编辑或修饰的背景下所使用的“功能”是指(1)在基因水平上--成功的基因敲入、基因敲除、降低基因表达、转基因或受控基因表达,例如在所期望的细胞发育阶段的诱导性或瞬时表达,这是通过直接的基因组编辑或修饰或通过“传递”经由最初进行基因组工程改造的起始细胞的分化或重编程来实现;或(2)在细胞水平上-成功的去除、添加或改变细胞功能/特征,这通过以下实现:(i)在所述细胞中通过直接的基因组编辑而获得的基因表达修饰;(ii)在所述细胞中通过“传递”经由最初进行基因组工程改造的起始细胞的分化或重编程而维持的基因表达修饰;(iii)在所述细胞中作为基因表达修饰的结果的下游基因调控,所述基因表达修饰仅出现于所述细胞的较早发育阶段或仅出现于经由分化或重编程而产生所述细胞的起始细胞中;或(iv)成熟细胞产物内所显示的增强的或新获得的细胞功能或属性,所述成熟细胞产物最初通过对祖细胞或脱分化细胞来源的iPSC进行基因组编辑或修饰而获得。

[0123] “HLA缺陷”,包括HLA-I类缺陷或HLA-II类缺陷,或两者,是指缺少或不再维持包含HLA I类蛋白质异二聚体和/或HLA II类异二聚体的完整MHC复合物的表面表达或所述表面表达的水平降低,使得减弱或降低的水平低于由其它细胞或合成方法可自然检测到的水平的细胞。

[0124] 如本文中所使用,“经修饰的HLA缺陷型iPSC”是指通过引入基因表达蛋白质进行进一步修饰的HLA缺陷型iPSC,所述蛋白质与以下有关但不限于:改善的分化潜能、抗原靶向、抗原呈递、抗体识别、存留、免疫逃避、抑制抗性、增殖、共刺激、细胞因子刺激、细胞因子产生(自分泌或旁分泌)、趋化性和细胞毒性,例如非经典HLA I类蛋白质(例如HLA-E和HLA-

G)、嵌合抗原受体(CAR)、T细胞受体(TCR)、CD16 Fc受体、BCL11b、NOTCH、RUNX1、IL15、41BB、DAP10、DAP12、CD24、CD3z、41BBL、CD47、CD113和PDL1。“经修饰的HLA缺陷型”细胞还包括除iPSC以外的细胞。

[0125] “Fc受体”(缩写为FcR)是基于其识别的抗体类型而分类。举例来说,结合最常见类别的抗体IgG的受体称为Fc-γ受体(FcγR),结合IgA的受体称为Fc-α受体(FcαR)并且结合IgE的受体称为Fc-ε受体(FcεR)。FcR的类别也通过表达其的细胞(巨噬细胞、粒细胞、自然杀伤细胞、T细胞和B细胞)和每种受体的信号传导特性来区分。Fc-γ受体(FcγR)包括若干成员:FcγRI(CD64)、FcγRIIA(CD32)、FcγRIIB(CD32)、FcγRIIIA(CD16a)、FcγRIIIB(CD16b),它们的抗体亲和力因其分子结构不同而不同。

[0126] 「嵌合Fc受体」(缩写为CFcR)是用于描述其天然跨膜和/或胞内信号传导结构域被非天然跨膜和/或胞内信号传导结构域修饰或置换的工程改造的Fc受体的术语。在嵌合Fc受体的一些实施例中,除非天然的跨膜和信号传导结构域中的一者或两者之外,可将一种或多种刺激结构域引入工程改造的Fc受体的胞内部分中以在触发受体后增强细胞活化、扩增和功能。不同于含有与靶抗原的抗原结合结构域的嵌合抗原受体(CAR),嵌合Fc受体结合于Fc片段、或抗体的Fc区、或包含于接合体或结合分子中并且在使靶细胞接近或不接近附近的情况下活化细胞功能的Fc区。举例来说,可工程改造Fcγ受体以将所选择的跨膜、刺激和/或信号传导结构域包含于对在胞外结构域结合IgG有反应的胞内区域中,从而产生CFcR。在一个实例中,CFcR由工程改造CD16、Fcγ受体通过置换其跨膜结构域和/或胞内结构域来产生。为了进一步提高基于CD16的CFcR的结合亲和力,可并入CD64或CD16的高亲和力变体(例如F176V)的胞外结构域。在涉及高亲和力CD16胞外结构域的CFcR的一些实施例中,在位置197处包含丝氨酸的蛋白水解裂解位点被消除或置换,使得受体的胞外结构域不可裂解,即不经历脱落,从而获得基于hnCD16的CFcR。

[0127] CD16(一种FcγR受体)已鉴别为具有两种同功异构物:Fc受体FcγRIIIa(CD16a)和FcγRIIIb(CD16b)。CD16a为由NK细胞表达的跨膜蛋白,其结合附接到靶细胞的单体IgG以活化NK细胞且促进抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)。如本文中所使用,“高亲和力CD16”、“不可裂解的CD16”或“高亲和力不可裂解的CD16(hnCD16)”是指天然或非天然的CD16变体。野生型CD16具有低亲和力并且经历胞外域脱落,这是一种蛋白水解裂解过程,其在NK细胞活化后调控白细胞上的多种细胞表面分子的细胞表面密度。F176V和F158V是具有高亲和力的示例性CD16多态变体。在接近膜的区域(位置189到212)中改变或消除裂解位点(位置195到198)的CD16变体不经历脱落。裂解位点和接近膜的区域详细地描述于WO2015148926中,其完整公开内容以引入的方式并入本文中。CD16 S197P变体是工程改造的CD16的不可裂解型式。包含F158V和S197P两者的CD16变体具有高亲和力,并且不可裂解。另一示例性高亲和力和不可裂解的CD16(hnCD16)变体是包含源自CD64胞外域的3个外显子中的一个或多个的胞外域的工程改造的CD16。

[0128] I.适用于具有增强特性的过继性细胞疗法的细胞和组合物

[0129] 本文提供一种策略,其系统地工程改造克隆iPSC的调控回路而不影响iPSC的分化效能以及iPSC和其衍生细胞的细胞发育生物学,同时增强由iPSC分化的衍生细胞的治疗特性。在通过基因组工程改造将选择性模式的组合引入处于iPSC水平的细胞中之后,iPSC衍生的细胞在功能上得到改善,并且适合于过继性细胞疗法。在本发明之前,尚不清楚包含一

种或多种所提供的基因编辑的改变的iPSC是否仍具有进入细胞发育和/或使功能分化细胞成熟和产生同时保留调节活性的能力。在iPSC的定向细胞分化期间的意外失败归因于包括(但不限于)以下的方面:发育阶段特定基因表达或缺乏基因表达、HLA复合物呈递的需求、所引入表面表达模式的蛋白质脱落和实现细胞中的表型和/或功能变化的分化方案重配置的需要。本申请已显示,如本文所提供的一种或多种所选基因组修饰不会对iPSC分化效能产生负面影响,并且衍生自工程改造的iPSC的功能性效应细胞具有增强的和/或获得的治疗特性,这可归因于在iPSC分化之后保留在效应细胞中的单独的或组合的基因组修饰。

[0130] 1.在不存在内源性TCR的情况下的CD3表面呈递

[0131] α-βT细胞受体(αβTCR)为免疫反应必需的抗原特异性受体并且存在于αβT淋巴细胞的细胞表面上。TCRαβ与肽-主要组织相容性复合物(pMHC)的结合起始TCR-CD3胞内活化、多种信号传导分子的募集以及分支和整合信号传导路径,从而导致对基因表达和T细胞生长和功能获得至关重要的转录因子的动员。虽然NKT细胞为还表达αβTCR的T细胞的亚群,但与常规αβT细胞不同,NKT细胞的TCR由典型恒定TCRα链(在人类中为Vα24-Jα18)和使用有限Vβ区段的TCRβ链(在人类中为Vβ11)构成,其多样性受到限制并且识别有限数目的由CD1d呈递的脂质抗原。

[0132] 通过直接编辑T细胞或通过iPSC编辑作为用于获得经修饰的衍生T细胞的来源来破坏TCRα或TCRβ的恒定区(TRAC或TRBC)是产生$TCR^{neg}$ T细胞的方法之一。举例来说,在TRAC或TRBC中的预选位置处插入可操作地连接到TRAC或TRBC的内源启动子或外源启动子的2A序列可产生TRAC或TRBC破坏(或在这个实例中为截短)和TCR阴性细胞($TCR^{neg}$)。在一特定实施例中,$TCR^{neg}$细胞为iPSC。在另一实施例中,$TCR^{neg}$细胞为NK谱系细胞。如本文中所使用,术语“TCR阴性”或“$TCR^{neg}$”是指缺少内源性TCR表达,此是由于TCR基因表达中断(例如在T谱系细胞中:原代或iPSC衍生的T谱系细胞)或由于TCR基因表达的天然不存在,尽管在基因组中存在TCR基因座(例如iPSC或NK谱系细胞:原代或iPSC衍生的NK谱系细胞)。克隆选择的工程改造iPSC与造血细胞的后续定向分化使得有可能在无TCR表达的情况下产生iPSC衍生的免疫效应细胞和/或其均质群体。

[0133] 在一些实施例中,使用自我裂解肽,例如2A的靶向截短或中断可任选地与一种或多种所关注外源基因在截短或中断的位置处的整合同时进行,并且整合基因的表达可在整合后由可操作连接的外源启动子或由TCRα或TCRβ的内源启动子驱动,这导致TRAC或TRBC基因敲除,且因此在表达在TRAC或TRBC基因座处插入的一种或多种外源基因时导致TCR阴性。

[0134] 使用这种方法获得的iPSC衍生的TCR阴性T细胞(具有或不具有外源性基因整合)不需要HLA匹配,具有降低的同种异体反应性并且当用于同种异体过继性细胞疗法时能够预防GvHD(移植物抗宿主疾病)。然而,已发现TCR破坏还引起从T细胞表面消除CD3信号传导复合物,不管所述细胞中的CD3亚单位基因表达如何。细胞表面CD3的缺乏可改变细胞的扩增和/或存活能力并且降低细胞的功能潜能,此是因为与需要细胞表面CD3识别和结合的技术不相容性,所述技术包括(但不限于):BiTE、BiKE或TRiKE(或统称为接合体)技术;CD3/CD28T细胞活化珠粒技术;和抗CD3抗体或CD3-CAR刺激技术。此外,当$TCR^{neg}$ iPSC用于定向T细胞分化时,还可能对T细胞发育生物学和T细胞功能成熟产生影响。然而,在TCR阴性的细胞中过表达CD3似乎不会恢复CD3复合物和/或CD3信号传导的细胞表面呈递。对于尽管存在TCR基因但不表达TCR的细胞(例如NK或NK祖细胞),$TCR^{neg}$ NK细胞中的如本文所公开的细胞

表面CD3复合物或其一个或多个亚单位或子结构域(cs-CD3)可以充当所获得的CD3相关细胞表面触发受体以用于与分子结合,所述分子包括但不限于抗体或其功能变体,和/或识别CD3受体的双特异性或多特异性接合体。为了解决所属领域中的未解决的问题,除了本文所描述的其它所提供优势之外,以下设计(如图1A至1C中所示)详述于本申请中以在无内源性TCR表达($TCR^{neg}$细胞)时重建和/或提供表面CD3呈递,不论是由于经由基因破坏(例如在衍生T谱系细胞中)的内源性TCR基因表达的损失或是由于TCR基因表达的天然不存在(例如在衍生NK谱系细胞中)。

[0135] 设计1:非结合重组TCR(nb-rTCR)

[0136] 如图1A中所呈现,在此设计1中,虽然使用靶向基因组编辑工具基因敲除细胞中的内源性TCRα($TCR\alpha^{-/-}$),从而产生TCR阴性($TCR^{neg}$),但TCRβ的基因敲除($TCR\beta^{-/-}$)是任选的;或反之亦然,虽然使用靶向基因组编辑工具基因敲除细胞中的内源性TCRβ($TCR\beta^{-/-}$),从而产生TCR阴性($TCR^{neg}$),但TCRα的基因敲除($TCR\alpha^{-/-}$)是任选的。在包含TCRα基因敲除的实施例中,随后将编码TCRα的全部或部分长度的恒定区(转基因TRAC或tgTRAC)的多核苷酸引入细胞中,或在靶向TRAC基因敲除之后在TRAC处进行整合,并且多核苷酸的表达由TCRα的内源启动子驱动或替代地由可操作地连接到多核苷酸的外源启动子驱动。在一些实施例中,编码TCRα的全部或部分长度的恒定区的多核苷酸进一步包含与TCRα的全部或部分长度的恒定区偶联的适当N端信号肽。在基因敲除内源性TCRβ($TCR\beta^{-/-}$)的实施例中,将编码TCRβ的全部或部分长度的恒定区(tgTCRβ或tgTRBC)的多核苷酸引入细胞中;并且tgTCRβ或tgTRBC的表达由TCRβ的内源启动子驱动或替代地由外源启动子驱动。在一些实施例中,编码TCRβ的全部或部分长度的恒定区的多核苷酸进一步包含与TCRβ的全部或部分长度的恒定区偶联的适当N端信号肽。在一些实施例中,外源启动子包含组成性、诱导性、时间特异性、组织特异性或细胞类型特异性启动子。在一些实施例中,外源启动子包含CMV、EF1α、PGK、CAG和UBC中的一种。在一个实施例中,外源启动子至少包含CAG。

[0137] 在一些实施例中,编码全部或部分TCRα恒定区(tgTRAC)的多核苷酸包含在与示例性序列SEQ ID NO.1比较时具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、100%或其间的任何百分比的一致性的序列。在一些实施例中,编码至少包含全部或部分恒定区(tgTRBC)的TCRβ的多核苷酸包含在与示例性序列SEQ ID NO.2或SEQ ID.3比较时具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、100%或其间的任何百分比的一致性的序列。在编码N端信号肽和全部或部分长度的TCRα或TCRβ恒定区的多核苷酸的一些实施例中,多核苷酸进一步包含处于信号肽和与TCR恒定区有关的序列之间的连接肽。在编码N端信号肽和全部长度的TCRα或TCRβ恒定区的多核苷酸的一些实施例中,多核苷酸进一步包含C端处的聚A尾。在编码N端信号肽和部分长度的TCRα或TCRβ恒定区的多核苷酸的一些实施例中,多核苷酸的整合是在内源恒定区(例如,外显子)内的位点处并且为框内的,即,与整合位点的TCRα或TCRβ恒定区下游的其余内源序列同框,使得形成全长转基因/嵌合TRAC或TRBC,其中其序列的一部分为外源/转基因的且另一部分为内源的。在设计1的一些实施例中,内源性TCRα和TCRβ中的至少一种经工程改造以基本上去除相应可变区,同时在表达时向细胞表面呈现相应的转基因恒定区。在一些实施例中,内源性TCRα和TCRβ中仅一个经工程改造以基本上去除相关可变区,同时向细胞表面呈现转基因恒定区和野生型TCR亚单位(TCRα或TCRβ)。在一些实施例中,内源性TCRα和TCRβ两者均如所提

供进行工程改造以去除相应可变区,同时在表达时向细胞表面呈现两个转基因恒定区。示例性N端信号肽包括MALPVTALLLPLALLLHA(SEQ ID NO.4;CD8asp)或MDFQVQIFSFLLISASVIMSR(SEQ ID NO.5;IgKsp),或所属领域中已知的其任何信号肽序列或功能变体。示例性连接肽包括DYKDDDDK(SEQ ID NO.6;FLAG),或所属领域中已知的其任何连接肽序列或功能变体。

[0138] SEQ ID NO.1:

[0139] IQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLSVIGFRILLLKVAGFNLLMTLRLWSS

[0140] (TRAC)

[0141] SEQ ID NO.2:

[0142] DLNKVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRNHFRCRVSATFWQNPQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDF

[0143] (TRBC1)

[0144] SEQ ID NO.3

[0145] DLKNVFPPKVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDSRG

[0146] (TRBC2)

[0147] 在本申请中,发现TCR亚单位tgTRAC或tgTRBC的转基因恒定区,在能够通过与其它TCR亚单位(内源性/野生型或转基因;在转基因的情况下,有或没有其相应可变区)和内源性CD3亚单位缔合而形成重组TCR复合物(rTCR)时,由于缺少参与抗原识别的TCRα或TCRβ可变区而不能够实现肽-MHC结合。所得细胞通过细胞表面呈递的内源性CD3(cs-CD3)复合物而重新获得典型TCR/CD3信号传导,但由于内源性TCR基因敲除和不含TCRα可变区的rTCR而不具有同种异体反应性。因此,鉴于设计1,本文提供一种细胞或其群体,其中所述细胞为iPSC、克隆iPSC、克隆iPS细胞系细胞或由分化所述iPSC而获得的衍生细胞;并且所述细胞包含:在内源性TCRα和TCRβ恒定区中的至少一种处的破坏以使得基因敲除内源性TCR($TCR^{neg}$),和所破坏的编码TCRα(tgTRAC)和/或TCRβ(tgTRBC)的恒定区的一种或两种外源多核苷酸;其中tgTRAC和/或tgTRAB在表达时能够实现内源性CD3(cs-CD3)的细胞表面呈递。包含tgTRAC和tgTRBC中的至少一种的重组TCR复合物因不具有TCR亚单位的两个可变区(Vα和Vβ)而不结合由MHC呈递的抗原肽,且因此称为非结合重组TCR(nb-rTCR)。

[0148] 设计2:限定重组TCR(d-rTCR)

[0149] 如图1A中所呈现,在此设计2中,在细胞中使用基因组编辑工具基因敲除两种内源性TCRα和内源性TCRβ($TCR\alpha^{-/-}$和$TCR\beta^{-/-}$;或$TCR^{neg}$ $TCR\beta^{neg}$),从而产生$TCR^{neg}$细胞。在TCR基因敲除的同时或之后,将编码包含TCRα的限定可变区和全部或部分恒定区(tgTCRα)的TCRα的第一多核苷酸和编码包含TCRβ的限定可变区和全部或部分恒定区(tgTCRβ)的TCRβ的第二多核苷酸引入所述$TCR^{neg}$细胞中。限定的TCRα或TCRβ可变区可具有任何给定特异性以使得已鉴别或可鉴别其序列。在一些实施例中,第一和第二多核苷酸中的一种或两种分别由TCRα和TCRβ的内源启动子驱动。在一些其它实施例中,第一和第二多核苷酸中的一种或两种由

外源启动子驱动。在一些实施例中，第二多核苷酸由TCRβ的内源启动子驱动，而在一些其它实施例中，第二多核苷酸由外源启动子驱动。在一些实施例中，外源启动子包含组成性、诱导性、时间特异性、组织特异性或细胞类型特异性启动子。在一些实施例中，外源启动子包含CMV、EF1α、PGK、CAG和UBC中的一种。在一个实施例中，外源启动子至少包含CAG。在一些实施例中，编码全部或部分长度的TCRα恒定区和给定的限定可变区的多核苷酸至少包含在与示例性序列SEQ ID NO.1比较时具有至少50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、99％、100％或其间的任何百分比的一致性的序列。在一些实施例中，编码全部或部分长度的TCRβ恒定区和给定的限定可变区的多核苷酸至少包含在与示例性序列SEQ ID NO.2或SEQ ID NO.3比较时具有至少50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、99％、100％或其间的任何百分比的一致性的序列。在实施例中，序列一致性为至少80％。在实施例中，序列一致性为至少90％。在实施例中，序列一致性为至少95％。在实施例中，序列一致性为100％。在编码全部长度的TCRα或TCRβ恒定区的多核苷酸的一些实施例中，多核苷酸进一步包含C'端处的聚A尾。在编码部分长度的TCRα或TCRβ恒定区的多核苷酸的一些实施例中，多核苷酸的整合是在内源恒定区内的位点处且与整合位点的TCRα或TCRβ恒定区下游的其余内源序列同框，使得形成全长转基因/嵌合TRAC或TRBC，其中其序列的一部分为外源/转基因的且另一部分为内源的。TCRα或TCRβ可变区的序列可见于例如通用蛋白质资源(UniProt)数据库中，并且一些非限制性限定的TCRα或TCRβ可变区实例分别列于下表A及B中。

[0150] 表A：

[0151]

| UniProt 序列条目号 | 蛋白质名称 | 基因名称 | UniProt 序列条目号 | 蛋白质名称 | 基因名称 |
|---|---|---|---|---|---|
| A0A0B4J248 | TCR α 可变 1-1 | TRAV1-1 | A0A0A6YYK6 | TCR α 可变 16 | TRAV16 |
| A0A0B4J238 | TCR α 可变 1-2 | TRAV1-2 | A0A0B4J275 | TCR α 可变 17 | TRAV17 |
| A0A0B4J234 | TCR α 可变 2 | TRAV2 | A0A075B6X5 | TCR α 可变 18 | TRAV18 |
| A0A0B4J244 | TCR α 可变 3 | TRAV3 | A0A0A6YYK7 | TCR α 可变 19 | TRAV19 |
| A0A0B4J268 | TCR α 可变 4 | TRAV4 | A0A0B4J274 | TCR α 可变 20 | TRAV20 |
| A0A0B4J249 | TCR α 可变 5 | TRAV5 | A0A0B4J279 | TCR α 可变 21 | TRAV21 |
| A0A075B6T7 | TCR α 可变 6 | TRAV6 | A0A0B4J277 | TCR α 可变 22 | TRAV22 |
| A0A075B6U4 | TCR α 可变 7 | TRAV7 | A0A075B6W5 | TCR α 可变 23/δ 可变 6 | TRAV23DV6 |
| A0A0A6YYK1 | TCR α 可变 8-1 | TRAV8-1 | A0A0B4J272 | TCR α 可变 24 | TRAV24 |
| A0A0B4J237 | TCR α 可变 8-2 | TRAV8-2 | A0A0B4J276 | TCR α 可变 25 | TRAV25 |
| A0A0A6YYJ7 | TCR α 可变 8-3 | TRAV8-3 | A0A087WT03 | TCR α 可变 26-1 | TRAV26-1 |
| P01737 | TCR α 可变 8-4 | TRAV8-4 | A0A0B4J265 | TCR α 可变 26-2 | TRAV26-2 |
| A0A0B4J262 | TCR α 可变 8-6 | TRAV8-6 | A0A087WT01 | TCR α 可变 27 | TRAV27 |
| A0A075B6U6 | TCR α 可变 8-7 | TRAV8-7 | P04437 | TCR α 可变 29/δ 可变 5 | TRAV29DV5 |

[0152]

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| A0A075B6T8 | TCR α 可变 9-1 | TRAV9-1 | A0A087WSZ9 | TCR α 可变 30 | TRAV30 |
| A0A087WT02 | TCR α 可变 9-2 | TRAV9-2 | A0A0B4J273 | TCR α 可变 34 | TRAV34 |
| A0A0B4J240 | TCR α 可变 10 | TRAV10 | P0DPF4 | TCR α 可变 35 | TRAV35 |
| A0A0B4J245 | TCR α 可变 12-1 | TRAV12-1 | A0A075B6V5 | TCR α 可变 36/δ 可变 7 | TRAV36DV7 |
| A0A075B6T6 | TCR α 可变 12-2 | TRAV12-2 | A0A0B4J264 | TCR α 可变 38-1 | TRAV38-1 |
| A0A0B4J271 | TCR α 可变 12-3 | TRAV12-3 | A0JD32 | TCR α 可变 38-2/δ 可变 8 | TRAV38-2DV8 |
| A0A0B4J241 | TCR α 可变 13-1 | TRAV13-1 | A0A0B4J263 | TCR α 可变 39 | TRAV39 |
| A0A0B4J235 | TCR α 可变 13-2 | TRAV13-2 | A0A0B4J280 | TCR α 可变 40 | TRAV40 |
| A0A0A6YYC5 | TCR α 可变 14/δ 可变 4 | TRAV14DV4 | A0A0B4J266 | TCR α 可变 41 | TRAV41 |

[0153] 表B：

[0154]

| UniProt序列条目号 | 蛋白质名称 | 基因名称 | UniProt 序列条目号 | 蛋白质名称 | 基因名称 |
|---|---|---|---|---|---|
| A0A1B0GX68 | TCR β 可变 2 | TRBV2 | A0A1B0GX51 | TCR β 可变 7-8 | TRBV7-8 |
| A0A576 | TCR β 可变 3-1 | TRBV3-1 | P04435 | TCR β 可变 7-9 | TRBV7-9 |
| A0A577 | TCR β 可变 4-1 | TRBV4-1 | A0A0B4J1U6 | TCR β 可变 9 | TRBV9 |
| A0A539 | TCR β 可变 4-2 | TRBV4-2 | A0A0K0K1A3 | TCR β 可变 10-1 | TRBV10-1 |
| A0A589 | TCR β 可变 4-3 | TRBV4-3 | A0A0K0K1G8 | TCR β 可变 10-2 | TRBV10-2 |
| A0A578 | TCR β 可变 5-1 | TRBV5-1 | A0A0K0K1G6 | TCR β 可变 10-3 | TRBV10-3 |
| A0A0C4DH59 | TCR β 可变 5-4 | TRBV5-4 | A0A0K0K1C0 | TCR β 可变 11-1 | TRBV11-1 |
| A0A597 | TCR β 可变 5-5 | TRBV5-5 | A0A584 | TCR β 可变 11-2 | TRBV11-2 |
| A0A599 | TCR β 可变 5-6 | TRBV5-6 | A0A5A6 | TCR β 可变 11-3 | TRBV11-3 |
| A0A5A2 | TCR β 可变 5-8 | TRBV5-8 | P01733 | TCR β 可变 12-3 | TRBV12-3 |
| A0A0K0K1D8 | TCR β 可变 6-1 | TRBV6-1 | A0A0B4J2E0 | TCR β 可变 12-4 | TRBV12-4 |
| A0A0J9YXY3 | TCR β 可变 6-2 | TRBV6-2 | A0A1B0GX78 | TCR β 可变 12-5 | TRBV12-5 |
| P0DPF7 | TCR β 可变 6-3 | TRBV6-3 | A0A0A6YYD4 | TCR β 可变 13 | TRBV13 |
| A0A1B0GX49 | TCR β 可变 6-4 | TRBV6-4 | A0A5B0 | TCR β 可变 14 | TRBV14 |
| A0A0K0K1A5 | TCR β 可变 6-5 | TRBV6-5 | A0A087WV62 | TCR β 可变 16 | TRBV16 |
| A0A0A6YYG2 | TCR β 可变 6-6 | TRBV6-6 | A0A087X0M5 | TCR β 可变 18 | TRBV18 |
| A0A0A6YYG3 | TCR β 可变 6-8 | TRBV6-8 | A0A075B6N1 | TCR β 可变 19 | TRBV19 |
| A0A0J9YX75 | TCR β 可变 6-9 | TRBV6-9 | A0A075B6N2 | TCR β 可变 20-1 | TRBV20-1 |
| A0A1B0GXF2 | TCR β 可变 7-2 | TRBV7-2 | A0A075B6N3 | TCR β 可变 24-1 | TRBV24-1 |
| A0A1B0GX95 | TCR β 可变 7-4 | TRBV7-4 | A0A075B6N4 | TCR β 可变 25-1 | TRBV25-1 |
| A0A1B0GX31 | TCR β 可变 7-6 | TRBV7-6 | A0A0K0K1C4 | TCR β 可变 27 | TRBV27 |
| A0A0K0K1E9 | TCR β 可变 7-7 | TRBV7-7 | A0A5B6 | TCR β 可变 28 | TRBV28 |

[0155] 恒定NKT细胞为表达典型恒定TCRα链(在人类中为Vα24-Jα18;或iTCRα)和使用有限Vβ区段的TCRβ链(在人类中为Vβ11;或iTCRβ),从而引起高度保守的TCR和CD1d依赖性抗原呈递的T细胞的独特亚群。为了利用恒定NKT的TCR(iTCR或iTCRαβ)的这种特性,在设计2的一些实施例中,限定TCR包含恒定NKT细胞的TCRα和TCRβ(iTCRα或iTCRαβ)中的任一个或两个,使得编码全部或部分长度的TCRα恒定区和给定的限定可变区的多核苷酸至少包含在与示例性序列SEQ ID NO.44比较时具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、100%或其间的任何百分比的一致性的序列;并且编码全部或部分长度的TCRβ恒定区和给定的限定可变区的多核苷酸至少包含在与示例性序列SEQ ID NO.45比较时具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、

100％或其间的任何百分比的一致性的序列。在实施例中，序列一致性为至少80％。在实施例中，序列一致性为至少90％。在实施例中，序列一致性为至少95％。在实施例中，序列一致性为100％。

[0156] SEQ ID NO.44

[0157] MKKHLTTFLVILWLYFYRGNGKNQVEQSPQSLIILEGKNCTLQCNYTVSPFSNLRWYKQDTGRGPVSLTIMTFSENTKSNGRYTATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVSDRGSTLGRLYFGRGTQLTVWPDIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLSVIGFRILLLKVAGFNLLMTLRLWSS

[0158] (人类Vα24Jα18的iNKT TCRα链;加下划线的部分为可变区)

[0159] SEQ ID NO.45

[0160] MTIRLLCYMGFYFLGAGLMEADIYQTPRYLVIGTGKKITLECSQTMGHDKMYWYQQDPGMELHLIHYSYGVNSTEKGDLSSESTVSRIRTEHFPLTLESARPSHTSQYLCASEDLNKVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDF

[0161] (人类Vβ11的iNKT TCRβ链;加下划线的部分为可变区)

[0162] 在本申请中，发现具有恒定区和限定可变区的转基因TCRα(tgTCRα)，任选地与具有恒定区和限定可变区的转基因TCRβ(tgTCRβ)能够通过与包括CD3ζ链的内源性CD3亚单位缔合而形成重组TCR复合物(rTCR)，同时由于tgTCRα和tgTCRβ的可变区的特异性而具有限定的肽-MHC结合或无肽-MHC结合。除基因工程改造用于限定重组TCR的转基因TCR亚单位以外，利用恒定NKT细胞的TCRα和TCRβ的其它方法包括将经分离的NKT细胞重编程到iPSC，并且将iPSC分化到T细胞，其结果是，使用本文所公开的重编程和分化组合物和方法，衍生的T细胞包含恒定NKT细胞的TCRα和TCRβ(iTCRα，iTCRβ；和iTCR，复合物)。由基因工程改造的iPSC或iNKT重编程的iPSC分化的所得细胞通过细胞表面呈递的内源性CD3(cs-CD3)重新获得典型TCR/CD3信号传导，同时无或具有已知和限定的MHC结合特异性。因此，鉴于设计2，本文提供一种细胞或其群体，其中所述细胞为iPSC、克隆iPSC、克隆iPS细胞系细胞或由分化iPSC而获得的衍生细胞；并且所述细胞包含：在内源性TCRα和内源性TCRβ中的每一个处的破坏、编码具有全部或部分恒定区和限定可变区的tgTCRα的外源多核苷酸以及编码具有全部或部分恒定区和限定可变区的tgTCRβ的外源多核苷酸；其中内源性CD3分子在表达时存在于细胞表面(cs-CD3)。

[0163] 设计3：具有任选的非结合TCRβ的重组前TCRα(p-rTCR)

[0164] 前TCRα为由未成熟胸腺细胞(T细胞发育的早期阶段)中的发育控制基因编码的I型跨膜受体蛋白。前TCRα与TCRβ和CD3亚单位共价缔合以形成前TCR复合物。与TCRα链相比，除其它结构和功能差异以外，前TCRα具有相对较长的细胞质尾区。如图1A中所呈现，在此设计3中，TCR阴性细胞至少具有使用基因组编辑工具的内源性TCRα基因敲除($TCR^{neg}$)，其中内源性TCRβ的基因敲除为任选的。在TCR基因敲除的同时或之后，将编码前TCRα的完全或部分长度(tgpTCRα)的第一多核苷酸引入所述$TCR^{neg}$细胞中。在所述$TCR^{neg}$细胞进一步包含TCRβ基因敲除的一些实施例中，将编码具有或不具有给定的限定可变区的全部或部分TCRβ恒定区(tgTCRβ或tgTRBC)的第二多核苷酸引入$TCR^{neg}$细胞中，其中所述细胞不是早期阶段的不成熟胸腺细胞。在编码全部长度的TCRα或TCRβ恒定区的多核苷酸的一些实施例中，多核苷

酸进一步包含C'端处的聚A尾。在编码部分长度的TCRα或TCRβ恒定区的多核苷酸的一些实施例中，多核苷酸的整合是在内源恒定区内的位点处且与整合位点的TCRα或TCRβ恒定区下游的其余内源序列同框，使得形成全长转基因/嵌合TRAC或TRBC，其中其序列的一部分为外源/转基因的且另一部分为内源的。

[0165] 在一些实施例中，将编码全部或部分长度的前TCRα(tgpTCRα)的第一多核苷酸在整合后可操作地连接到TCRα的内源启动子。在一些实施例中，编码全部或部分长度的前TCRα(tgpTCRα)的第一多核苷酸是由外源启动子驱动。在一些实施例中，将编码具有或不具有给定的限定可变区的全部或部分TCRβ恒定区的第二多核苷酸在整合后可操作地连接到TCRβ的内源启动子。在一些实施例中，编码具有或不具有给定的限定可变区的全部或部分TCRβ恒定区的第二多核苷酸是由外源启动子驱动。在一些实施例中，外源启动子包含组成性、诱导性、时间特异性、组织特异性或细胞类型特异性启动子。在一些实施例中，外源启动子包含CMV、EF1α、PGK、CAG和UBC中的一种。在一个实施例中，外源启动子至少包含CAG。在一些实施例中，编码tgpTCRα的多核苷酸至少包含在与示例性序列SEQ ID NO.23比较时具有至少50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、99％、100％或其间的任何百分比的一致性的序列。在实施例中，序列一致性为至少80％。在实施例中，序列一致性为至少90％。在实施例中，序列一致性为至少95％。在实施例中，序列一致性为100％。在一些实施例中，编码tgpTCRα的多核苷酸包含部分长度的SEQ ID NO.23，其在本文中表示为SEQ ID NO.24。在编码包含全部或部分长度的SEQ ID NO.23或其任何功能变体的tgpTCRα的多核苷酸的一些实施例中，经编码的tgpTCRα进一步包含所属领域中已知的信号肽。一种非限制性示例性信号肽包含由SEQ ID NO.22表示的肽。

[0166] SEQ ID NO.22

[0167] MAGTWLLLLLALGCPALPTGVGG

[0168] SEQ ID NO.23

[0169] TPFPSLAPPIMLLVDGKQQMVVVCLVLDVAPPGLDSPIWFSAGNGSALDAFTYGPSPATDGTWTNLAHLSLPSEELASWEPLVCHTGPGAEGHSRSTQPMHLSGEASTARTCPQEPLRGGCGLLRAPERFLLAGTPGGALWLGVLRLLLFKLLLFDLLLTCSCLCDPAGPLPSPATTTRLRALGSHRLHPATETGGREATSSPRPQPRDRRWGDTPPGRKPGSPVWGEGSYLSSYPTCPAQAWCSRSALRAPSSSLGAFFAGDLPPPLQAGAA

[0170] (tgpTCRα与TM)

[0171] SEQ ID NO.24

[0172] TPFPSLAPPIMLLVDGKQQMVVVCLVLDVAPPGLDSPIWFSAGNGSALDAFTYGPSPATDGTWTNLAHLSLPSEELASWEPLVCHTGPGAEGHSRSTQPMHLSGEASTARTCPQEPLRGGCGLLRAPERFLLAGTPGGALWLGVLRLLLFKLLLFDLLLTCSCLCDPAGPLPSPATTTRLRALGSHRLHPATETGGREATSSPRPQPRDRRWGDTPPGRKPGSPV

[0173] (截短的tgpTCRα与TM)

[0174] 在一些实施例中，编码包含全部或部分恒定区和给定的限定可变区的TCRβ的多核苷酸至少包含在与示例性序列SEQ ID NO.2或SEQ ID NO.3比较时具有至少50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、99％、100％或其间的任何百分比的一致性的序列。在实施例中，序列一致性为至少80％。在实施例中，序列一致性为至少90％。在实施例中，序列一致性为至少95％。在实施例中，序列一致性为100％。限定的TCRβ可变区可具有

任何给定特异性以使得已鉴别或可鉴别其序列。非限制性限定的TCRβ可变区例示于上表B中，并且包含于SEQ ID NO.45(加下划线的部分)中。

[0175] 先前未知的是具有由不同于其天然启动子(即，前TCRα启动子)的启动子(不论外源启动子或内源性TCRα启动子)控制的前TCRα表达的iPSC是否仍具有分化成功能性效应T细胞的能力。此处，我们尝试证明可以维持包含由非天然启动子控制的转基因前TCRα(tgpTCRα)的iPSC的细胞发育生物学达到可以进行定向分化为iPSC衍生的T细胞以产生功能性T细胞的程度。这是出人意料的，因为通常内源性前TCR的表达受到发育调节。此外，衍生自tgpTCRα$TCR^{neg}$ iPSC的T细胞包含通过与包括CD3ζ链的内源性CD3亚单位缔合而表达，但不具有肽-MHC结合能力的表面重组前TCR复合物(rpTCR)。在不受理论限制的情况下，转基因前TCR/CD3复合物可仍然通过典型CD3信号传导经由细胞表面呈递的内源性CD3(cs-CD3)复合物来驱动iPSC衍生的T细胞成熟。鉴于上文，本申请的范围还包括上调内源性前TCRα和/或阻止其下调的各种方法。在不是早期/未成熟胸腺细胞的细胞中过表达的前TCRα将与所表达的内源性TCRβ和CD3亚单位缔合以能够实现CD3细胞表面呈递，同时不具有肽-MHC结合能力。

[0176] 因此，鉴于设计3，本文提供一种细胞或其群体，其中所述细胞为iPSC、克隆iPSC、克隆iPS细胞系细胞或由分化所述iPSC而获得的衍生细胞；并且所述细胞包含：至少具有内源性TCRα或TCRβ的破坏以使得基因敲除内源性TCR($TCR^{neg}$)，以及至少一种编码包含全部或部分长度的前TCRα的肽的外源多核苷酸；其中在不存在TCRα的情况下，前TCRα的表达使得与细胞中内源性或转基因TCRβ相关联的细胞表面CD3复合物(cs-CD3)重建，并且还有助于将iPSC定向分化成包括T细胞的功能性衍生效应细胞。

[0177] 设计4：锚定非结合重组TCR的CD3(nb-rTCR-CD3)

[0178] 如图1B中所呈现，在此设计4中，在细胞中使用基因组编辑工具基因敲除一种或两种内源性TCRα和内源性TCRβ($TCR^{neg}$；$TCR\alpha^{-/-}$和$TCR\beta^{-/-}$)。在TCR基因敲除的同时或之后，将外源多核苷酸引入所述$TCR^{neg}$细胞中，所述$TCR^{neg}$细胞包含：编码重组TCRα的第一多核苷酸，所述重组TCRα包含TCRα恒定区、CD3ε与CD3δ和CD3γ中的一种的全部或部分长度胞外域；和/或编码重组TCRβ的第二多核苷酸，所述重组TCRβ包含TCRβ恒定区、CD3ε与不包含于重组TCRα中的CD3δ和CD3γ中的一种的全部或部分长度的胞外域；使得由一种多核苷酸编码的CD3ε与CD3δ之间的一个异二聚体，和/或由另一多核苷酸编码的CD3ε与CD3γ之间的另一异二聚体可以在细胞表面处形成。

[0179] 在一些实施例中，重组TCRα包含C端处的全部或部分TCRα恒定区，其与N端处的全部或部分长度的CD3ε和CD3δ胞外域(tgCD3(ε-δ)-TRAC)融合。在一些实施例中，重组TCRα包含C端处的全部或部分TCRα恒定区，其与N端处的全部或部分长度的CD3ε和CD3γ胞外域(tgCD3(ε-γ)-TRAC)融合。在一些实施例中，重组TCRβ包含C端处的全部或部分TCRβ恒定区，其与N端处的全部或部分长度的CD3ε和CD3γ胞外域(tgCD3(ε-γ)-TRBC)融合。在一些实施例中，重组TCRβ包含C端处的全部或部分TCRβ恒定区，其与N端处的全部或部分长度的CD3ε和CD3δ胞外域(tgCD3(ε-δ)-TRBC)融合。在编码全部长度的TCRα或TCRβ恒定区的多核苷酸的一些实施例中，多核苷酸进一步包含C端处的聚A尾。在编码部分长度的TCRα或TCRβ恒定区的多核苷酸的一些实施例中，多核苷酸的整合是在相应内源恒定区内的位点处且与整合位点的TCRα或TCRβ恒定区下游的其余内源序列同框，使得形成全长转基因/嵌合TRAC

或TRBC,其中其序列的一部分为外源/转基因的且另一部分为内源的。

[0180] 在一些其它实施例中,当将第一和第二多核苷酸均引入细胞中时,重组TCRα由包含tgCD3(ε-δ)-TRAC的第一多核苷酸编码,并且重组TCRβ由包含tgCD3(ε-γ)-TRBC的第二多核苷酸编码;或重组TCRα由包含tgCD3(ε-γ)-TRAC的第一多核苷酸编码,并且重组TCRβ由包含tgCD3(ε-δ)-TRBC的第二多核苷酸编码。因此,在所述实施例中,由一种多核苷酸编码的CD3ε与CD3δ之间的一个异二聚体以及由另一多核苷酸编码的CD3ε与CD3γ之间的另一异二聚体可以在细胞表面处形成。

[0181] 在一些实施例中,当将第一和第二多核苷酸中仅一个引入细胞中时,另一TCR亚单位为野生型/内源的,或经工程改造以仅包含恒定区,其中其内源可变区在被或不被置换为限定可变区的情况下去除:例如,图1A中设计1的tgTRAC或tgTRBC(不具有可变区),或图1A中设计2的tgTCRα或tgTCRβ(具有限定可变区)。因此,如图1B的设计4中所示,在一个实施例中,当将包含tgCD3(ε-δ)-TRAC的第一多核苷酸引入细胞中以提供重组TCRα亚单位时,还将包含tgTRBC或tgTCRβ的另一多核苷酸引入细胞中以提供重组TCRβ亚单位;使得在这个实施例中,内源性CD3ε与内源性CD3γ之间的一个异二聚体,和由包含tgCD3(ε-δ)-TRAC的多核苷酸编码的CD3ε与CD3δ之间的另一异二聚体可形成于细胞表面处。在图1B的设计4的又一实施例中,当将包含tgCD3(ε-γ)-TRBC的第二多核苷酸引入细胞中以提供重组TCRβ亚单位时,还将包含tgTRAC或tgTCRα的另一多核苷酸引入细胞中以提供重组TCRα亚单位,使得内源性CD3ε与内源性CD3δ之间的一个异二聚体,和由包含tgCD3(ε-γ)-TRBC的多核苷酸编码的CD3ε与CD3γ之间的另一异二聚体可形成于细胞表面处。

[0182] 在一些实施例中,第一多核苷酸由TCRα的内源启动子驱动,而在一些其它实施例中,第一多核苷酸由外源启动子驱动。在一些实施例中,第二多核苷酸由TCRβ的内源启动子驱动,而在一些其它实施例中,第二多核苷酸由外源启动子驱动。在一些实施例中,用于重组TCRα或重组TCRβ的外源启动子包含组成性、诱导性、时间特异性、组织特异性或细胞类型特异性启动子。在一些实施例中,外源启动子包含CMV、EF1α、PGK、CAG和UBC中的一种。在一个实施例中,外源启动子至少包含CAG。在一些实施例中,编码TCRα恒定区的多核苷酸至少包含在与示例性序列SEQ ID NO.1比较时具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、100%或其间的任何百分比的一致性的序列。在一些实施例中,编码TCRβ恒定区的多核苷酸至少包含在与示例性序列SEQ ID NO.2或SEQ ID NO.3比较时具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、100%或其间的任何百分比的一致性的序列。在一些实施例中,编码全部或部分长度的CD3ε胞外域的多核苷酸至少包含在与示例性序列SEQ ID NO.25比较时具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、100%或其间的任何百分比的一致性的序列。在一些实施例中,编码全部或部分长度的CD3δ胞外域的多核苷酸至少包含在与示例性序列SEQ ID NO.26比较时具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、100%或其间的任何百分比的一致性的序列。在一些实施例中,编码全部或部分长度的CD3γ胞外域的多核苷酸至少包含在与示例性序列SEQ ID NO.27比较时具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、100%或其间的任何百分比的一致性的序列。在实施例中,序列一致性为至少80%。在实施例中,序列一致性为至少90%。在实施例中,序列一致性为至少95%。在实施例中,序列一致性为100%。在编码全部或部分长度的

CD3ε、CD3δ或CD3γ胞外域的多核苷酸的一些实施例中，多核苷酸进一步包含编码信号肽的核酸。在一些实施例中，信号肽包含以下中的一种：SEQ ID NO.28、SEQ ID NO.29、SEQ ID NO.30，或所属领域已知的任何其它信号肽。在编码全部或部分长度的CD3ε胞外域的多核苷酸的一些实施例中，多核苷酸进一步包含编码SEQ ID NO.28的信号肽的核酸。在编码全部或部分长度的CD3δ胞外域的多核苷酸的一些实施例中，多核苷酸进一步包含编码SEQ ID NO.29的信号肽的核酸。在编码全部或部分长度的CD3γ胞外域的多核苷酸的一些实施例中，多核苷酸进一步包含编码SEQ ID NO.30的信号肽的核酸。

[0183] SEQ ID NO.25

[0184] DGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMEMD

[0185] (胞外CD3ε)

[0186] SEQ ID NO.26

[0187] FKIPIEELEDRVFVNCNTSITWVEGTVGTLLSDITRLDLGKRILDPRGIYRCNGTDIYKDKESTVQVHYRMCQSCVELDPATVA

[0188] (胞外CD3δ)

[0189] SEQ ID NO.27

[0190] QSIKGNHLVKVYDYQEDGSVLLTCDAEAKNITWFKDGKMIGFLTEDKKKWNLGSNAKDPRGMYQCKGSQNKSKPLQVYYRMCQNCIELNAATIS

[0191] (胞外CD3γ)

[0192] SEQ ID NO.28

[0193] MQSGTHWRVLGLCLLSVGVWGQ

[0194] SEQ ID NO.29

[0195] MEHSTFLSGLVLATLLSQVSP

[0196] SEQ ID NO.30

[0197] MEQGKGLAVLILAIILLQGTLA

[0198] 在编码tgCD3(ε-δ)-TRAC融合蛋白的多核苷酸的一些实施例中，多核苷酸包含在与示例性序列SEQ ID NO.31比较时具有至少50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、99％、100％或其间的任何百分比的一致性的序列，其中两个包含于SEQ ID NO.31中的连接子序列(SEQ ID NO.33和SEQ ID NO.34)中的每一个可以用所属领域中已知的任何序列置换。在编码tgCD3(ε-γ)-TRBC融合蛋白的多核苷酸的一些实施例中，多核苷酸包含在与示例性序列SEQ ID NO.32比较时具有至少50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、99％、100％或其间的任何百分比的一致性的序列，其中两个包含于SEQ ID NO.32中的连接子序列(SEQ ID NO.33和SEQ ID NO.34)中的每一个可以用所属领域中已知的任何序列置换。在实施例中，序列一致性为至少80％。在实施例中，序列一致性为至少90％。在实施例中，序列一致性为至少95％。在实施例中，序列一致性为100％。在如本文所提供的重组TCRα或TCRβ融合蛋白的一些实施例中，融合蛋白进一步包含所属领域中已知的信号肽。一种非限制性示例性信号肽包含由SEQ ID NO.28表示的肽。

[0199] SEQ ID NO.31

[0200] DGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELE

QSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVGSADDAKKDAAKKDDAKKDDAKKDGSFKIPIEELEDRVFVNCNTSITWVE GTVGTLLSDITRLDLGKRILDPRGIYRCNGTDIYKDKESTVQVHYRMGGGGSGGGGSGGGGSIQNPDPAVYQLRDSK SSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPES SCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLSVIGFRILLLKVAGFNLLMTLRLWSS

[0201] (N'-CD3ε-连接子-CD3δ-G4S连接子-TRAC-C')

[0202] SEQ ID NO.32

[0203] DGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELE QSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVGSADDAKKDAAKKDDAKKDDAKKDGSQSIKGNHLVKVYDYQEDGSVLLTC DAEAKNITWFKDGKMIGFLTEDKKKWNLGSNAKDPRGMYQCKGSQNKSKPLQVYYRMGGGGSGGGGSGGGGSDLNKV FPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVS ATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYA VLVSALVLMAMVKRKDF

[0204] (N'-CD3ε-连接子-CD3γ-G4S连接子-TRBC-C')

[0205] SEQ ID NO.33

[0206] GSADDAKKDAAKKDDAKKDDAKKDGS

[0207] SEQ ID NO.34

[0208] GGGGGSGGGGSGGGGS

[0209] 在本申请中,发现与CD3ε的胞外域融合的TCRα或TCRβ恒定区,以及CD3δ和CD3γ中的一种能够与具有或不具有CD3ε的融合胞外域的转基因TCRβ或TCRα恒定区以及CD3δ和CD3γ中的一种缔合,以形成CD3ε/CD3δ和CD3ε/CD3γ异二聚体。所缔合的转基因TCRα和TCRβ亚单位能够进一步与内源性CD3ζ缔合以支持CD3胞外域(cs-CD3)的细胞表面表达和通过内源性CD3ζ的信号传导转导,同时不具有肽-MHC结合潜力。因此,鉴于设计4,本文提供一种细胞或其群体,其中所述细胞为iPSC、克隆iPSC、克隆iPS细胞系细胞或由分化所述iPSC而获得的衍生细胞;并且所述细胞包含:在内源性TCRα恒定区和内源性TCRβ恒定区中的每一个处的破坏,以及以下中的至少一种:编码tgTCRα的第一外源多核苷酸,所述tgTCRα包含融合的全部或部分TCRα恒定区,和CD3ε与CD3δ和CD3γ中的一种的全部或部分胞外域(tgCD3(ε-δ/γ)-TRAC);和编码tgTCRβ的第二外源多核苷酸,所述tgTCRβ包含融合的全部或部分TCRβ恒定区,和CD3ε与CD3δ和CD3γ中的一种的全部或部分胞外域(tgCD3(ε-γ/δ)-TRBC);其中CD3亚单位的胞外域在表达时存在于细胞表面(cs-CD3);在仅所述第一外源多核苷酸包含于细胞中时,细胞进一步包含如本文所提供的tgTRBC或tgTCRβ;并且在仅所述第二外源多核苷酸包含于细胞中时,细胞进一步包含如本文所提供的tgTRAC或tgTCRα。

[0210] 设计5:CD3嵌合链(ccCD3)

[0211] 如图1B中所呈现,在此设计5中,细胞表面呈递的CD3(cs-CD3)呈CD3嵌合链(ccCD3)形式,其经构建以包含全部或部分长度的CD3ε胞外域、CD3γ或CD3δ的全部或部分长度的胞外域,以及包含至少一个ITAM(基于免疫受体酪氨酸的活化基序)的全部或部分长度的CD3ζ胞内域。包含编码所述CD3嵌合链的多核苷酸的细胞可进一步包含在内源性TCRα和TCRβ中的任一者或两者处的破坏。当基因组编辑工具用于通过靶向编辑TRAC和/或TRBC,同时或随后进行靶向TCR基因敲除来产生$TCR^{neg}$细胞时,将至少一种编码所述CD3嵌合链的多核苷酸引入细胞中。在一些实施例中,将所述多核苷酸引入TRAC或TRBC中,并且分别由

TCRα或TCRβ的内源启动子驱动;而在一些其它实施例中,所引入的多核苷酸由外源启动子驱动。在一些实施例中,外源启动子包含组成性、诱导性、时间特异性、组织特异性或细胞类型特异性启动子。在一些实施例中,外源启动子包含CMV、EF1α、PGK、CAG和UBC中的一种。在一个实施例中,外源启动子至少包含CAG。

[0212] 在一些实施例中,CD3嵌合链包含全部或部分长度的CD3ε胞外域、全部或部分长度的CD3γ胞外域,以及包含至少一个ITAM的全部或部分长度的CD3ζ胞内域(tgCD3(ε-γ)-ζ),其中CD3嵌合链为在N端具有任一胞外域的融合蛋白,且其中两个胞外域形成异二聚体。在一些实施例中,CD3嵌合链包含全部或部分长度的CD3ε胞外域、全部或部分长度的CD3δ胞外域,以及包含至少一个ITAM的全部或部分长度的CD3ζ胞内域(tgCD3(ε-δ)-ζ),其中CD3嵌合链为在N端具有任一胞外域的融合蛋白,且其中两个胞外域形成异二聚体。在CD3嵌合链的一些实施例中,CD3ζ的胞内域包含两个ITAM。在CD3嵌合链的一些实施例中,CD3ζ的胞内域包含所有三个ITAM。

[0213] 在一些实施例中,编码全部或部分长度的CD3ε胞外域的多核苷酸至少包含在与示例性序列SEQ ID NO.25比较时具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、100%或其间的任何百分比的一致性的序列。在一些实施例中,编码全部或部分长度的CD3δ胞外域的多核苷酸至少包含在与示例性序列SEQ ID NO.26比较时具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、100%或其间的任何百分比的一致性的序列。在一些实施例中,编码全部或部分长度的CD3γ胞外域的多核苷酸至少包含在与示例性序列SEQ ID NO.27比较时具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、100%或其间的任何百分比的一致性的序列。在编码全部或部分长度的CD3ε、CD3δ或CD3γ胞外域的多核苷酸的一些实施例中,多核苷酸进一步包含编码信号肽的核酸。在一些实施例中,信号肽包含以下中的一种:SEQ ID NO.27、SEQ ID NO.29、SEQ ID NO.30,或所属领域已知的任何其它信号肽。在编码全部或部分长度的CD3ε胞外域的多核苷酸的一些实施例中,多核苷酸进一步包含编码SEQ ID NO.28的信号肽的核酸。在编码全部或部分长度的CD3δ胞外域的多核苷酸的一些实施例中,多核苷酸进一步包含编码SEQ ID NO.29的信号肽的核酸。在编码全部或部分长度的CD3γ胞外域的多核苷酸的一些实施例中,多核苷酸进一步包含编码SEQ ID NO.30的信号肽的核酸。在一些实施例中,编码全部或部分长度的CD3ζ胞内域的多核苷酸至少包含在与示例性序列SEQ ID NO.35比较时具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、100%或其间的任何百分比的一致性的序列,其包含CD3ζITAM1、ITAM2和ITAM3(SEQ ID NO.36至38)。在实施例中,序列一致性为至少80%。在实施例中,序列一致性为至少90%。在实施例中,序列一致性为至少95%。在实施例中,序列一致性为100%。

[0214] SEQ ID NO.35

[0215] MKWKALFTAAILQAQLPITEAQSFGLLDPKLCYLLDGILFIYGVILTALFLRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0216] (…ITAM1…ITAM2…ITAM3…)

[0217] SEQ ID NO.36

[0218] APAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR

[0219] SEQ ID NO.37

[0220] PRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM

[0221] SEQ ID NO.38

[0222] ERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ

[0223] 在CD3嵌合链的一些实施例中，包含至少一个、两个或三个ITAM的CD3ζ的胞内域进一步包含以下的一个或多个信号传导结构域：2B4、4-1BB、CD16、CD2、CD28、CD28H、CD3ζ、DAP10、DAP12、DNAM1、FcERIγIL21R、IL-2Rβ(IL-15Rβ)、IL-2Rγ、IL-7R、KIR2DS2、NKG2D、NKp30、NKp44、NKp46、CD3ζ1XX、CS1或CD8，以用于信号转导和/或共刺激。在CD3嵌合链的一个实施例中，包含至少一个、两个或三个ITAM的CD3ζ的胞内域进一步包含CD28的至少一个信号传导结构域(tgCD3(ε-γ/δ)-28ζ)。在包含CD28的信号传导结构域的CD3ζ胞内域的一些实施例中，编码全部或部分长度的28ζ胞内域的多核苷酸包含在与示例性序列SEQ ID NO.39比较时具有至少50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、99％、100％或其间的任何百分比的一致性的序列，其中可以去除任何一个或两个CD3ζITAM。在CD3嵌合链的一些实施例中，包含至少一个、两个或三个ITAM的CD3ζ的胞内域进一步包含41BB的信号传导结构域(tgCD3(ε-γ/δ)-BBζ)。在包含41BB的信号传导结构域的CD3ζ胞内域的一些实施例中，编码全部或部分长度的BBζ胞内域的多核苷酸包含在与示例性序列SEQ ID NO.40比较时具有至少50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、99％、100％或其间的任何百分比的一致性的序列，其中可以去除任何一个或两个CD3ζITAM。在CD3嵌合链的一些实施例中，包含至少一个、两个或三个ITAM的CD3ζ的胞内域进一步包含CD28的信号传导结构域和41BB的信号传导结构域(tgCD3(ε-γ/δ)-(28-BB)ζ)。在包含28和41BB两者的信号传导结构域的CD3ζ胞内域的一些实施例中，编码全部或部分长度的28BBζ胞内域的多核苷酸包含在与示例性序列SEQ ID NO.41比较时具有至少50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、99％、100％或其间的任何百分比的一致性的序列，其中可以去除任何一个或两个CD3ζITAM。在编码tgCD3(ε-γ)-(28/BB)ζ的多核苷酸的一个实施例中，所编码的多肽包含在与示例性序列SEQ ID NO.42比较时具有至少50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、99％、100％或其间的任何百分比的一致性的序列；其中可以去除任何一个或两个CD3ζITAM，其中连接子序列可以用所属领域中已知的任何其它连接子序列置换，或其中在又一些其它实施例中，CD28信号传导结构域可以用41BB信号传导结构域置换，或通过添加41BB信号传导结构域而增强。在tgCD3(ε-δ)-(28/BB)ζ的一个实施例中，所编码的多肽包含在与示例性序列SEQ ID NO.43比较时具有至少50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、99％、100％或其间的任何百分比的一致性的序列；其中可以去除任何一个或两个CD3ζITAM，其中连接子序列可以用所属领域中已知的任何其它连接子序列置换，或其中在又一些其它实施例中，CD28信号传导结构域可以用41BB信号传导结构域置换，或经由进一步包括41BB信号传导结构域而增强。在所编码的CD3嵌合链tgCD3(ε-γ)-(28/BB)ζ或tgCD3(ε-δ)-(28/BB)ζ的一些其它实施例中，多肽进一步包含SEQ ID NO.28的信号肽，或所属领域中已知的任何其它信号肽。在实施例中，序列一致性为至少80％。在实施例中，序列一致性为至少90％。在实施例中，序列一致性为至少95％。在实施例中，序列一致性为100％。

[0224] SEQ ID NO.39

[0225] RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0226] (…ITAM1…ITAM2…ITAM3…)

[0227] SEQ ID NO.40

[0228] KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0229] (…ITAM1…ITAM2…ITAM3…)

[0230] SEQ ID NO.41

[0231] RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0232] (…ITAM1…ITAM2…ITAM3…)

[0233] SEQ ID NO.42

[0234] DGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVGSADDAKKDAAKKDDAKKDDAKKDGSQSIKGNHLVKVYDYQEDGSVLLTCDAEAKNITWFKDGKMIGFLTEDKKKWNLGSNAKDPRGMYQCKGSQNKSKPLQVYYRMRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0235] (CD3ε-连接子-CD3γ-CD28-CD3ζ(…ITAM1…ITAM2…ITAM3…))

[0236] SEQ ID NO.43

[0237] DGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVGSADDAKKDAAKKDDAKKDDAKKDGSFKIPIEELEDRVFVNCNTSITWVEGTVGTLLSDITRLDLGKRILDPRGIYRCNGTDIYKDKESTVQVHYRMRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0238] (CD3ε-连接子-CD3δ-CD28-CD3ζ(…ITAM1…ITAM2…ITAM3…))

[0239] 在本申请中,发现如本文所提供的CD3嵌合链(其中CD3嵌合链为融合蛋白,其包含全部或部分长度的CD3ε外域、CD3δ和CD3γ全部或部分长度胞外域中的至少一个,以及包含至少一个ITAM和任选的一个或多个信号传导结构域的CD3ζ胞内域)在$TCR^{neg}$的细胞中表达时能够将嵌合CD3胞外域呈递到细胞表面。此外,CD3胞外域的细胞表面表达实现通过融合的CD3ζ胞内域的CD3结合触发的信号传导转导,同时不具有肽-MHC结合潜力。

[0240] 因此,鉴于设计5,本文提供一种细胞或其群体,其中所述细胞为iPSC、克隆iPSC、克隆iPS细胞系细胞或由分化iPSC而获得的衍生细胞;并且所述细胞包含:内源性TCRα恒定区和内源性TCRβ恒定区中的至少一种的破坏,以及至少一种编码CD3嵌合链融合蛋白(ccCD3)的外源多核苷酸,其中融合蛋白包含全部或部分长度的CD3ε胞外域以及CD3δ和CD3

γ中的任一者的全部或部分长度胞外域,以及具有至少一个ITAM和任选的一个或多个信号传导结构域的全部或部分长度的CD3ζ胞内域,其中CD3嵌合链的胞外域在表达时存在于细胞表面(cs-CD3)。

[0241] 如本文在图1A至1C的各种设计中所公开的$TCR^{neg}$细胞($TCR^{neg}$ cs-CD3)中的细胞表面CD3复合物或其一个或多个亚单位或子结构域(cs-CD3)可充当CD3相关细胞表面触发受体以与分子结合,所述分子包括但不限于CD3特异性抗体或其功能变体、CAR和/或接合体,其如下文进一步描述。如进一步所提供,所述$TCR^{neg}$ cs-CD3细胞或其群体可进一步包含以下中的一种或多种:hnCD16基因敲入;CAR;细胞表面表达的外源细胞因子或其受体的部分或全长肽;B2M基因敲除或基因敲减;CIITA基因敲除或基因敲减;HLA-G或不可裂解的HLA-G的引入表达;CD38基因敲除,以及本文所描述的其它工程改造模式。本申请中进一步提供一种主细胞库,其包含具有至少一种如本文所提供的表型的单细胞分选和扩增的克隆工程改造iPSC,所述表型包括(但不限于)$TCR^{neg}$ cs-CD3、CD16、CAR、CD38阴性、IL15(具有受体或截短变体的融合蛋白)、$B2M^{-/-}CIITA^{-/-}$和$B2M^{-/-}CIITA^{-/-}$HLA-G,其中所述细胞库提供用于额外iPSC工程改造的平台和用于制造现成的、工程改造的、均质的细胞治疗产品的可再生来源,所述细胞治疗产品的组成明确限定且均匀,并且可以具有成本效益的方式大规模地批量生产。

[0242] 2.hnCD16基因敲入

[0243] CD16已鉴别为两种同功异构物:Fc受体FcγRIIIa(CD16a;NM_000569.6)和FcγRIIIb(CD16b;NM_000570.4)。CD16a为由NK细胞表达的跨膜蛋白,其结合附接到靶细胞的单体IgG以活化NK细胞且促进抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)。CD16b仅由人类嗜中性粒细胞表达。如本文中所使用,“高亲和力CD16”、“不可裂解的CD16”或“高亲和力不可裂解的CD16”是指各种CD16变体。野生型CD16具有低亲和力并且经历包括胞外域脱落的下调,这是一种蛋白水解裂解过程,其在NK细胞活化后调控白细胞上的多种细胞表面分子的细胞表面密度。F176V(在一些公开案中也称为F158V)是具有高亲和力的示例性CD16多态等位基因/变体;而S197P变体是基因工程改造的CD16的不可裂解型式的一实例。包含F176V和S197P两者的工程改造CD16变体具有高亲和力并且不可裂解,其更详细地描述于WO2015/148926中,并且其完整公开内容以引入的方式并入本文中。另外,CD16的胞外域基本上被至少一部分CD64胞外域置换的嵌合CD16受体也可实现能够进行ADCC的CD16受体的所期望的高亲和力和不可裂解特征。在一些实施例中,嵌合CD16的置换胞外域包含以下中的一种或多种:CD64的EC1、EC2和EC3外显子(UniPRotKB_P12314或其同功异构物或多态变体)。

[0244] 因此,高亲和力不可裂解的CD16受体(hnCD16)在一些实施例中包含F176V和S197P两者;并且在一些实施例中包含F176V,其中消除了裂解区域。在一些其它实施例中,hnCD16包含在与各自包含至少一部分CD64胞外域的示例性序列SEQ ID NO.7、8和9中的任一个比较时,具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、100%或其间的任何百分比的一致性的序列。在实施例中,序列一致性为至少80%。在实施例中,序列一致性为至少90%。在实施例中,序列一致性为至少95%。在实施例中,序列一致性为100%。SEQ ID NO.7、8和9分别由示例性SEQ ID NO.10至12编码。如本文和整个本申请中所使用,考虑需要引入以对两个序列进行最佳比对的间隙数目和每个间隙的长度,两个序列之间的一致性百分比是序列共用的相同位置数目的函数(即,一致性%=相同位置数/位置

总数×100)。序列的比较和两个序列之间的一致性百分比的确定可以使用所属领域中公认的数学算法实现。

[0245] SEQ ID NO.7:

[0246] MWFLTTLLLWVPVDGQVDTTKAVITLQPPWVSVFQEETVTLHCEVLHLPGSSSTQWFLNGTATQTSTPSYRITSASVNDSGEYRCQRGLSGRSDPIQLEIHRGWLLLQVSSRVFTEGEPLALRCHAWKDKLVYNVLYYRNGKAFKFFHWNSNLTILKTNISHNGTYHCSGMGKHRYTSAGISVTVKELFPAPVLNASVTSPLLEGNLVTLSCETKLLLQRPGLQLYFSFYMGSKTLRGRNTSSEYQILTARREDSGLYWCEAATEDGNVLKRSPELELQVLGLQLPTPVWFHYQVSFCLVMVLLFAVDTGLYFSVKTNIRSSTRDWKDHKFKWRKDPQDK

[0247] (340个氨基酸基于CD64结构域的构建;CD16TM;CD16ICD)

[0248] SEQ ID NO.8

[0249] MWFLTTLLLWVPVDGQVDTTKAVITLQPPWVSVFQEETVTLHCEVLHLPGSSSTQWFLNGTATQTSTPSYRITSASVNDSGEYRCQRGLSGRSDPIQLEIHRGWLLLQVSSRVFTEGEPLALRCHAWKDKLVYNVLYYRNGKAFKFFHWNSNLTILKTNISHNGTYHCSGMGKHRYTSAGISVTVKELFPAPVLNASVTSPLLEGNLVTLSCETKLLLQRPGLQLYFSFYMGSKTLRGRNTSSEYQILTARREDSGLYWCEAATEDGNVLKRSPELELQVLGLFFPPGYQVSFCLVMVLLFAVDTGLYFSVKTNIRSSTRDWKDHKFKWRKDPQDK

[0250] (336个氨基酸基于CD64外显子的构建;CD16TM;CD16ICD)

[0251] SEQ ID NO.9

[0252] MWFLTTLLLWVPVDGQVDTTKAVITLQPPWVSVFQEETVTLHCEVLHLPGSSSTQWFLNGTATQTSTPSYRITSASVNDSGEYRCQRGLSGRSDPIQLEIHRGWLLLQVSSRVFTEGEPLALRCHAWKDKLVYNVLYYRNGKAFKFFHWNSNLTILKTNISHNGTYHCSGMGKHRYTSAGISVTVKELFPAPVLNASVTSPLLEGNLVTLSCETKLLLQRPGLQLYFSFYMGSKTLRGRNTSSEYQILTARREDSGLYWCEAATEDGNVLKRSPELELQVLGFFPPGYQVSFCLVMVLLFAVDTGLYFSVKTNIRSSTRDWKDHKFKWRKDPQDK

[0253] (335个氨基酸基于CD64外显子的构建;CD16TM;CD16ICD)

[0254] SEQ ID NO.10

[0255] cttggagaca acatgtggtt cttgacaact ctgctccttt gggttccagt tgatgggcaa gtggacacca caaaggcagt gatcactttg cagcctccat gggtcagcgt gttccaagag gaaaccgtaa ccttgcattg tgaggtgctc catctgcctg ggagcagctc tacacagtgg tttctcaatg gcacagccac tcagacctcg acccccagct acagaatcac ctctgccagt gtcaatgaca gtggtgaata caggtgccag agaggtctct cagggcgaag tgaccccata cagctggaaa tccacagagg ctggctacta ctgcaggtct ccagcagagt cttcacggaa ggagaacctc tggccttgag gtgtcatgcg tggaaggata agctggtgta caatgtgctt tactatcgaa atggcaaagc ctttaagttt ttccactgga attctaacct caccattctg aaaaccaaca taagtcacaa tggcacctac cattgctcag gcatgggaaa gcatcgctac acatcagcag gaatatctgt cactgtgaaa gagctatttc cagctccagt gctgaatgca tctgtgacat ccccactcct ggaggggaat ctggtcaccc tgagctgtga aacaaagttg ctcttgcaga ggcctggttt gcagctttac ttctccttct acatgggcag caagaccctg cgaggcagga acacatcctc tgaataccaa atactaactg ctagaagaga agactctggg ttatactggt gcgaggctgc cacagaggat ggaaatgtcc ttaagcgcag ccctgagttg gagcttcaag tgcttggcct ccagttacca actcctgtct ggtttcatta ccaagtctct ttctgcttgg tgatggtact ccttttgca gtggacacag gactatattt ctctgtgaag acaaacattc gaagctcaac aagagactgg aaggaccata aatttaaatg gagaaaggac cctcaagaca aa

[0256] SEQ ID NO.11

[0257] cttggagaca acatgtggtt cttgacaact ctgctccttt gggttccagt tgatgggcaa gtggacacca caaaggcagt gatcactttg cagcctccat gggtcagcgt gttccaagag gaaaccgtaa ccttgcattg tgaggtgctc catctgcctg ggagcagctc tacacagtgg tttctcaatg gcacagccac tcagacctcg acccccagct acagaatcac ctctgccagt gtcaatgaca gtggtgaata caggtgccag agaggtctct cagggcgaag tgaccccata cagctggaaa tccacagagg ctggctacta ctgcaggtct ccagcagagt cttcacggaa ggagaacctc tggccttgag gtgtcatgcg tggaaggata agctggtgta caatgtgctt tactatcgaa atggcaaagc ctttaagttt ttccactgga attctaacct caccattctg aaaaccaaca taagtcacaa tggcacctac cattgctcag gcatgggaaa gcatcgctac acatcagcag gaatatctgt cactgtgaaa gagctatttc cagctccagt gctgaatgca tctgtgacat ccccactcct ggaggggaat ctggtcaccc tgagctgtga aacaaagttg ctcttgcaga ggcctggttt gcagctttac ttctccttct acatgggcag caagaccctg cgaggcagga acacatcctc tgaataccaa atactaactg ctagaagaga agactctggg ttatactggt gcgaggctgc cacagaggat ggaaatgtcc ttaagcgcag ccctgagttg gagcttcaag tgcttggttt gttctttcca cctgggtacc aagtctcttt ctgcttggtg atggtactcc tttttgcagt ggacacagga ctatatttct ctgtgaagac aaacattcga agctcaacaa gagactggaa ggaccataaa tttaaatgga gaaaggaccc tcaagacaaa

[0258] SEQ ID NO.12

[0259] atgtggttct tgacaactct gctcctttgg gttccagttg atgggcaagt ggacaccaca aaggcagtga tcactttgca gcctccatgg gtcagcgtgt tccaagagga aaccgtaacc ttgcactgtg aggtgctcca tctgcctggg agcagctcta cacagtggtt tctcaatggc acagccactc agacctcgac ccccagctac agaatcacct ctgccagtgt caatgacagt ggtgaataca ggtgccagag aggtctctca gggcgaagtg accccataca gctggaaatc cacagaggct ggctactact gcaggtctcc agcagagtct tcacggaagg agaacctctg gccttgaggt gtcatgcgtg gaaggataag ctggtgtaca atgtgcttta ctatcgaaat ggcaaagcct ttaagttttt ccactggaac tctaacctca ccattctgaa aaccaacata agtcacaatg gcacctacca ttgctcaggc atgggaaagc atcgctacac atcagcagga atatctgtca ctgtgaaaga gctatttcca gctccagtgc tgaatgcatc tgtgacatcc ccactcctgg aggggaatct ggtcaccctg agctgtgaaa caaagttgct cttgcagagg cctggtttgc agctttactt ctccttctac atgggcagca agaccctgcg aggcaggaac acatcctctg aataccaaat actaactgct agaagagaag actctgggtt atactggtgc gaggctgcca cagaggatgg aaatgtcctt aagcgcagcc ctgagttgga gcttcaagtg cttggcttct ttccacctgg gtaccaagtc tctttctgct tggtgatggt actccttttt gcagtggaca caggactata tttctctgtg aagacaaaca ttcgaagctc aacaagagac tggaaggacc ataaatttaa atggagaaag gaccctcaag acaaa

[0260] 因此,本文提供克隆iPSC,其经基因工程改造以在如本文所涵盖和描述的其它编辑中包含高亲和力不可裂解的CD16受体(hnCD16),其中基因工程改造的iPSC能够分化成包含引入iPSC中的hnCD16的效应细胞。在一些实施例中,包含hnCD16的衍生效应细胞为NK细胞。在一些实施例中,包含hnCD16的衍生效应细胞为T细胞。在iPSC或其衍生细胞中表达的外源hnCD16在不仅结合于ADCC抗体或其片段,而且结合于识别所述hnCD16和其变体的CD16或CD64胞外结合结构域的双特异性、三特异性或多特异性接合体或结合子中具有高亲和力。双特异性、三特异性或多特异性接合体或结合子在以下本申请中进一步描述(参见I.7

部分)。因此,本申请的至少一个方面提供一种衍生效应细胞或其细胞群,其通过与在衍生效应细胞上表达的hnCD16的胞外结构域的高亲和力结合,以对于治疗如以下V部分中进一步详述的病状、疾病或感染的治疗用途足够的量预负载有一种或多种预选ADCC抗体,其中所述hnCD16包含CD64的胞外结合结构域或具有F176V和S197P的CD16的胞外结合结构域。

[0261] 在一些其它实施例中,进一步修饰或置换hnCD16的天然CD16跨膜结构域和/或胞内结构域,使得产生嵌合Fc受体(CFcR)以包含非天然跨膜结构域、非天然刺激结构域和/或非天然信号传导结构域。本文所使用的术语"非天然"意指除提供胞外结构域的受体外,跨膜结构域、刺激结构域或信号传导结构域源自不同受体。在本文的说明中,基于CD16或其变体的CFcR不具有源自CD16的跨膜结构域、刺激结构域或信号传导结构域。在一些实施例中,基于外源hnCD16的CFcR包含衍生自以下的非天然跨膜结构域:CD3D、CD3E、CD3G、CD3ζ、CD4、CD8、CD8a、CD8b、CD27、CD28、CD40、CD84、CD166、4-1BB、OX40、ICOS、ICAM-1、CTLA-4、PD-1、LAG-3、2B4、BTLA、CD16、IL7、IL12、IL15、KIR2DL4、KIR2DS1、NKp30、NKp44、NKp46、NKG2C、NKG2D、T细胞受体多肽。在一些实施例中,基于外源hnCD16的CFcR包含衍生自以下的非天然刺激/抑制结构域:CD27、CD28、4-1BB、OX40、ICOS、PD-1、LAG-3、2B4、BTLA、DAP10、DAP12、CTLA-4或NKG2D多肽。在一些实施例中,基于外源hnCD16的CFcR包含衍生自以下的非天然信号传导结构域:CD3ζ、2B4、DAP10、DAP12、DNAM1、CD137(41BB)、IL21、IL7、IL12、IL15、NKp30、NKp44、NKp46、NKG2C或NKG2D多肽。在hnCD16的一个实施例中,所提供的嵌合受体包含均衍生自以下中的一种的跨膜结构域和信号传导结构域:IL7、IL12、IL15、NKp30、NKp44、NKp46、NKG2C和NKG2D多肽。基于hnCD16的嵌合Fc受体的一个特定实施例包含NKG2D的跨膜结构域、2B4的刺激结构域和CD3ζ的信号传导结构域;其中hnCD16的胞外结构域衍生自CD64或CD16的胞外结构域的全长或部分序列,其中CD16的胞外结构域包含F176V和S197P。基于hnCD16的嵌合Fc受体的另一实施例包含CD3ζ的跨膜结构域和信号传导结构域;其中hnCD16的胞外结构域衍生自CD64或CD16的胞外结构域的全长或部分序列,其中CD16的胞外结构域包含F176V和S197P。

[0262] 如上文所描述的基于hnCD16的嵌合Fc受体的各种实施例能够以高亲和力结合到抗体或其片段的Fc区;或结合到双特异性、三特异性或多特异性接合体或结合子的Fc区。结合后,嵌合受体的刺激结构域和/或信号传导结构域实现效应细胞的活化和细胞因子分泌,并且杀死由抗体或具有肿瘤抗原结合组分以及Fc区的所述双特异性、三特异性或多特异性接合体或结合子靶向的肿瘤细胞。在不受理论限制的情况下,通过非天然跨膜结构域、刺激结构域和/或信号传导结构域,或通过与基于hnCD16的嵌合Fc受体的胞外域结合的接合体,CFcR可有助于效应细胞的杀伤能力,同时提高效应细胞的增殖和/或扩增潜能。抗体和接合体可使表达抗原的肿瘤细胞和表达CFcR的效应细胞紧密接近,这也有助于增强肿瘤细胞的杀伤。双特异性、三特异性、多特异性接合体或结合子的示例性肿瘤抗原包括(但不限于)B7H3、BCMA、CD10、CD19、CD20、CD22、CD24、CD30、CD33、CD34、CD38、CD44、CD79a、CD79b、CD123、CD138、CD179b、CEA、CLEC12A、CS-1、DLL3、EGFR、EGFRvIII、EPCAM、FLT-3、FOLR1、FOLR3、GD2、gpA33、HER2、HM1.24、LGR5、MSLN、MCSP、MICA/B、PSMA、PAMA、P-钙粘素和ROR1。适合于在攻击肿瘤细胞时接合表达基于hnCD16的CFcR的效应细胞的一些非限制性示例性双特异性、三特异性、多特异性接合体或结合子包括CD16(或CD64)-CD30、CD16(或CD64)-BCMA、CD16(或CD64)-IL15-EPCAM和CD16(或CD64)-IL15-CD33。

[0263] 不同于由在NK细胞活化之后从细胞表面裂解的原代NK细胞表达的内源CD16受体，衍生NK细胞中CD16的各种不可裂解型式避免CD16脱落，并且维持恒定表达。在衍生NK细胞中，不可裂解的CD16增加TNFα和CD107a的表达，指示细胞功能得到改善。不可裂解的CD16还增强了抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)以及双特异性、三特异性或多特异性接合体的接合。ADCC是通过将CD16结合到抗体涂布的靶细胞的NK细胞介导的裂解的机制。在向需要细胞疗法的受试者给予细胞之前，衍生NK细胞中引入的hnCD16的额外高亲和力特征也允许通过hnCD16将ADCC抗体活体外负载到NK细胞。如所提供，hnCD16可在一些实施例中包含F176V和S197P，或可包含源自如由SEQ ID NO:7、8或9所例示的CD64的全部或部分胞外域，或可进一步包含非天然跨膜结构域、刺激结构域和信号传导结构域中的至少一种。如所公开，本申请还提供一种衍生NK细胞或其细胞群，其以对于治疗如以下V部分中进一步详述的病状、疾病或感染的治疗用途足够的量预负载有一种或多种预选ADCC抗体。

[0264] 不同于原代NK细胞，来自原代来源(即，天然/原生来源，例如外周血、脐带血或其它供体组织)的成熟T细胞不表达CD16。出人意料的是，包含所表达的外源性不可裂解的CD16的iPSC不损害T细胞发育生物学，并且能够分化成功能性衍生T细胞，其不仅表达外源CD16，而且能够通过所获得的ADCC机制执行功能。这种在衍生T细胞中获得的ADCC可另外用作双靶向和/或拯救通常伴随CAR-T细胞疗法出现的抗原逃逸的方法，其中肿瘤随着靶向CAR-T的抗原表达或突变抗原表达减少或损失以避免被CAR(嵌合抗原受体)识别而复发。当所述衍生T细胞通过外源CD16表达包含获得的ADCC时，并且当抗体靶向与CAR靶向的抗原不同的肿瘤抗原时，抗体可用于挽救CAR-T抗原逃逸并且减少或防止CAR-T治疗中常见的靶向肿瘤的复发或再现。减少和/或防止抗原逃逸同时实现双靶向的这种策略同样适用于表达一种或多种CAR的NK细胞。下文进一步叙述可用于这种抗原逃逸减少和防止策略的各种CAR。

[0265] 因此，本发明提供一种包含外源CD16的衍生T细胞。在一些实施例中，衍生T细胞中包含的hnCD16包含F176V和S197P。在一些其它实施例中，衍生T细胞中包含的hnCD16包含源自如由SEQ ID NO:7、8或9所示例的CD64的全部或部分胞外域；或可进一步包含非天然跨膜结构域、刺激结构域和信号传导结构域中的至少一种。如所解释，这类衍生T细胞具有获得性机制以用由ADCC介导的单克隆抗体靶向肿瘤，从而增强抗体的治疗效果。如所公开，本申请还提供一种衍生T细胞或其细胞群，其以对于治疗如以下V部分中进一步详述的病状、疾病或感染的治疗用途足够的量预负载有一种或多种预选ADCC抗体。

[0266] 本申请中另外提供一种主细胞库，其包含具有如本文所提供的至少一种表型(包括但不限于CD16)的单细胞分选和扩增的克隆工程改造iPSC，其中所述细胞库提供用于额外iPSC工程改造的平台和用于制造现成的、工程改造的、均质的细胞治疗产品的可再生来源，包括(但不限于)衍生NK细胞和T细胞，所述细胞治疗产品的组成明确限定且均匀，并且可以具有成本效益的方式大规模地批量生产。

[0267] 3.CAR表达

[0268] 适用于基因工程改造的iPSC和其衍生效应细胞的可以是所属领域中已知的任何CAR设计。CAR(一种嵌合抗原受体)为融合蛋白，其一般包括包含抗原识别区的胞外域、跨膜结构域和胞内域。在一些实施例中，胞外域可进一步包括信号肽或前导序列和/或间隔子。在一些实施例中，胞内域可进一步包含信号传导肽，其活化表达CAR的效应细胞。在一些实

施例中，抗原识别结构域可特异性结合抗原。在一些实施例中，抗原识别结构域可特异性结合与疾病或病原体相关的抗原。在一些实施例中，疾病相关的抗原是肿瘤抗原，其中肿瘤可以是液体或实体肿瘤。在一些实施例中，CAR适合于活化表达所述CAR的T细胞或NK细胞。在一些实施例中，CAR为对包含NK特异性信号传导组分具有特异性的NK细胞。在某些实施例中，所述T细胞衍生自表达CAR的iPSC，并且衍生T细胞可包含T辅助细胞、细胞毒性T细胞、记忆T细胞、调控T细胞、自然杀伤T细胞、αβT细胞、γδT细胞或其组合。在某些实施例中，所述NK细胞源自表达CAR的iPSC。

[0269] 在某些实施例中，所述抗原识别区包含鼠类抗体、人类抗体、人类化抗体、骆驼Ig、只有重链的鲨鱼抗体(VNAR)、Ig NAR、嵌合抗体、重组抗体或其抗体片段。抗体片段的非限制性实例包括Fab、Fab′、F(ab)′2、F(ab)′3、Fv、单链抗原结合片段(scFv)、$(scFv)_2$、二硫键稳定的Fv(dsFv)、微型抗体、双功能抗体、三功能抗体、四功能抗体、单域抗原结合片段(sdAb，纳米抗体(Nanobody))、只有重链的重组抗体(VHH)和维持整个抗体的结合特异性的其它抗体片段。可由CAR靶向的抗原的非限制性实例包括ADGRE2、碳酸酐酶IX(CAIX)、CCRI、CCR4、癌胚抗原(CEA)、CD3、CD5、CD7、CD8、CD10、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD34、CD38、CD41、CD44、CD44V6、CD49f、CD56、CD70、CD74CD99、CD123、CD133、CD138、CD269(BCMA)、CDS、CLEC12A、巨细胞病毒(CMV)感染细胞的抗原(例如，细胞表面抗原)、上皮糖蛋白2(EGP 2)、上皮糖蛋白-40(EGP-40)、上皮细胞粘附分子(EpCAM)、EGFRvIII、受体酪氨酸-蛋白激酶erb-B2,3,4、EGFIR、EGFR-VIII、ERBB叶酸结合蛋白(FBP)、胎儿乙酰胆碱受体(AChR)、叶酸受体-a、神经节苷脂G2(GD2)、神经节苷脂G3(GD3)、人类表皮生长因子受体2(HER-2)、人类端粒酶逆转录酶(hTERT)、ICAM-1、整合素B7、白介素-13受体亚单位α-2(IL-13Rα2)、κ-轻链、激酶插入结构域受体(KDR)、路易斯A(CA19.9)、路易斯Y(LeY)、L1细胞粘附分子(L1-CAM)、LILRB2、黑色素瘤抗原家族A 1(MAGE-A1)、MICA/B、粘蛋白1(Muc-1)、粘蛋白16(Muc-16)、间皮素(MSLN)、NKCSI、NKG2D配体、c-Met、癌症睾丸抗原NY-ESO-1、癌胚抗原(h5T4)、PRAME、前列腺干细胞抗原(PSCA)、PRAME前列腺特异性膜抗原(PSMA)、肿瘤相关糖蛋白72(TAG-72)、TIM-3、TRBCI、TRBC2、血管内皮生长因子R2(VEGF-R2)、威尔姆斯肿瘤蛋白(WT-1)和所属领域中已知的各种病原体抗原。病原体的非限制性实例包括能够引起疾病的病毒、细菌、真菌、寄生虫和原虫。

[0270] 在一些实施例中，CAR的跨膜结构域包含CD3D、CD3E、CD3G、CD3ζ、CD4、CD8、CD8a、CD8b、CD27、CD28、CD40、CD84、CD166、4-1BB、OX40、ICOS、ICAM-1、CTLA-4、PD-1、LAG-3、2B4、BTLA、CD16、IL7、IL12、IL15、KIR2DL4、KIR2DS1、NKp30、NKp44、NKp46、NKG2C、NKG2D、T细胞受体多肽的天然或修饰的跨膜区的全长或至少一部分。

[0271] 在一些实施例中，胞内域(或胞内结构域)的信号传导肽包含全部长度或至少一部分的CD3ζ、2B4、DAP10、DAP12、DNAM1、CD137(41BB)、IL21、IL7、IL12、IL15、NKp30、NKp44、NKp46、NKG2C或NKG2D的多肽。在一个实施例中，CAR的信号传导肽包含与CD3ζ的至少一个ITAM(基于免疫受体酪氨酸的活化基序)至少约85％、约90％、约95％、约96％、约97％、约98％或约99％一致的氨基酸序列。

[0272] 在某些实施例中，所述胞内域进一步包含至少一个共刺激信号传导区。所述共刺激信号传导区可包含全部长度或至少一部分的CD27、CD28、4-1BB、OX40、ICOS、PD-1、LAG-3、2B4、BTLA、DAP10、DAP12、CTLA-4或NKG2D或其任何组合的多肽。

[0273] 在一个实施例中，适用于本申请中提供的细胞的CAR包含衍生自CD28的共刺激结构域和包含CD3ζ的天然或修饰的ITAM1的信号传导结构域，所述CD3ζ由与SEQ ID NO:13至少约85％、约90％、约95％、约96％、约97％、约98％或约99％一致的氨基酸序列表示。在另一实施例中，包含衍生自CD28的共刺激结构域，和CD3ζ的天然或修饰的ITAM1的CAR还包含衍生自CD28的铰链结构域和跨膜结构域，其中scFv可通过铰链连接到跨膜结构域，并且CAR包含与SEQ ID NO:14至少约85％、约90％、约95％、约96％、约97％、约98％或约99％一致的氨基酸序列。在实施例中，序列一致性为至少80％。在实施例中，序列一致性为至少90％。在实施例中，序列一致性为至少95％。在实施例中，序列一致性为100％。

[0274] SEQ ID NO:13

[0275] RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR

[0276] (153个氨基酸CD28共刺激+CD3ζITAM)

[0277] SEQ ID NO:14

[0278] IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR

[0279] (219个氨基酸CD28铰链+CD28 TM+CD28共刺激+CD3ζITAM)

[0280] 在另一实施例中，适用于本申请中提供的细胞的CAR包含衍生自NKG2D的跨膜结构域、衍生自2B4的共刺激结构域和包含天然或修饰的CD3ζ的信号传导结构域，所述CD3ζ由与SEQ ID NO:15至少约85％、约90％、约95％、约96％、约97％、约98％或约99％一致的氨基酸序列表示。包含衍生自NKG2D的跨膜结构域、衍生自2B4的共刺激结构域和包含天然或修饰的CD3ζ的信号传导结构域的所述CAR可进一步包含CD8铰链，其中这种结构的氨基酸序列与SEQ ID NO:16具有至少约85％、约90％、约95％、约96％、约97％、约98％或约99％一致性。在实施例中，序列一致性为至少80％。在实施例中，序列一致性为至少90％。在实施例中，序列一致性为至少95％。在实施例中，序列一致性为100％。

[0281] SEQ ID NO:15

[0282] SNLFVASWIAVMIIFRIGMAVAIFCCFFFPSWRRKRKEKQSETSPKEFLTIYEDVKDLKTRRNHEQEQTFPGGGSTIYSMIQSQSSAPTSQEPAYTLYSLIQPSRKSGSRKRNHSPSFNSTIYEVIGKSQPKAQNPARLSRKELENFDVYSRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0283] (263个氨基酸NKG2D TM+2B4+CD3ζ)

[0284] SEQ ID NO:16

[0285] TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDSNLFVASWIAVMIIFRIGMAVAIFCCFFFPSWRRKRKEKQSETSPKEFLTIYEDVKDLKTRRNHEQEQTFPGGGSTIYSMIQSQSSAPTSQEPAYTLYSLIQPSRKSGSRKRNHSPSFNSTIYEVIGKSQPKAQNPARLSRKELENFDVYSRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0286] (308个氨基酸CD8铰链+NKG2D TM+2B4+CD3ζ)

[0287] 非限制性CAR策略进一步包括:异二聚体,其通过使一对胞内结构域二聚化而有条件地活化CAR(参见例如,美国专利第9587020号);分离CAR,其中同源重组抗原结合、铰链和胞内域以产生CAR(参见例如,美国公开案第20170183407号);多链CAR,其允许分别连接到抗原结合结构域和信号传导结构域的两个跨膜结构域之间的非共价连接(参见例如,美国公开案第20140134142号);CAR,其具有双特异性抗原结合结构域(参见例如,美国专利第9447194号),或具有识别相同或不同抗原或抗原决定基的一对抗原结合结构域(参见例如,美国专利第8409577号),或串联CAR(参见例如,Hegde等人,《临床研究杂志(J Clin Invest.)》2016;126(8):3036-3052);诱导性CAR(参见例如,美国公开案第20160046700号、第20160058857号、第20170166877号);可切换CAR(参见例如,美国公开案编号:20140219975);和所属领域中已知的任何其它设计。

[0288] 因此,本文所提供的包括由分化基因组工程改造的iPSC而获得的衍生细胞,其中iPSC和衍生细胞两者均包含一种或多种CAR以及额外的修饰模式,包括(但不限于)$TCR^{neg}$ cs-CD3和/或hnCD16。本申请中另外提供一种主细胞库,其包含具有如本文所提供的至少一种表型的单细胞分选和扩增的克隆工程改造iPSC,所述表型包括(但不限于)CAR以及$TCR^{neg}$ cs-CD3和hnCD16中的一种或两种,其中所述细胞库提供用于额外iPSC工程改造的平台和用于制造现成的、工程改造的、均质的细胞治疗产品的可再生来源,所述细胞治疗产品的组成明确限定且均匀,并且可以具有成本效益的方式大规模地批量生产。在一个特定实施例中,iPSC和其衍生细胞包含$TCR^{neg}$ cs-CD3、hnCD16和靶向所选肿瘤或病毒抗原的CAR,其中衍生细胞为NK细胞或T细胞,并且其中衍生细胞可通过hnCD16结合与一种或多种ADCC抗体或双特异性、三特异性或多特异性接合体一起使用,所述接合体靶向与CAR靶向的抗原不同的肿瘤抗原以避免或减少肿瘤抗原逃逸,同时实现相同肿瘤的双靶向。

[0289] 在另一实施例中,包含CAR的iPSC和其衍生T细胞具有插入于TCR恒定区中的CAR,从而导致TCR基因敲除并且将CAR表达置于内源性TCR启动子的控制下。额外插入位点包括(但不限于)AAVS1、CCR5、ROSA26、胶原蛋白、HTRP、H11、GAPDH、RUNX1、B2M、TAP1、TAP2、TAP相关蛋白、NLRC5、CIITA、RFXANK、CIITA、RFX5、RFXAP、NKG2A、NKG2D、CD38、CD58、CD54、CD56、CIS、CBL-B、SOCS2、PD1、CTLA4、LAG3、TIM3或TIGIT。在一些实施例中,衍生自工程改造的iPSC的衍生TCR阴性CAR-T细胞进一步包含hnCD16,其具有对于CD16天然的胞外域(F176V和/或S197P)或衍生自CD64的胞外域,以及天然或非天然的跨膜结构域、刺激结构域和信号传导结构域。在另一实施例中,包含CAR的iPSC和其衍生NK细胞具有插入于NKG2A基因座或NKG2D基因座中的CAR,从而导致NKG2A或NKG2D基因敲除并且将CAR表达置于内源性NKG2A或NKG2D启动子的控制下。另外提供一种主细胞库,其包含具有至少一种如本文所提供的表型,包括(但不限于)CAR的单细胞分选和扩增的克隆工程改造iPSC,其中所述细胞库提供用于额外iPSC工程改造的平台和用于制造现成的、工程改造、均质的细胞治疗产品的可再生来源,所述细胞治疗产品的组成明确限定且均匀,并且可以具有成本效益的方式大规模地批量生产。

[0290] 4.外源引入的细胞因子和/或细胞因子信号传导

[0291] 通过避免全身性高剂量给予临床相关的细胞因子,由于这类实践的剂量限制性毒性的风险降低,同时建立细胞因子介导的细胞自主性。为了实现淋巴细胞自主性而不需要另外给予可溶性细胞因子,将IL2、IL4、IL6、IL7、IL9、IL10、IL11、IL12、IL15、IL18、IL21和/

或其相应受体中的一种或多种的部分或全长肽引入细胞中以在表达或不表达细胞因子本身的情况下允许细胞因子信号传导,从而维持或改善细胞生长、增殖、扩增和/或效应功能,并且降低细胞因子毒性的风险。在一些实施例中,在细胞表面上表达用于细胞因子信号传导的所引入细胞因子和/或其相应的天然或修饰受体。在一些实施例中,组成性地激活细胞因子信号传导。在一些实施例中,细胞因子信号传导的激活是可诱导的。在一些实施例中,细胞因子信号传导的激活是瞬时的和/或暂时的。

[0292] 图2呈现使用IL15作为说明性实例的若干构建体设计。图2中的任一种设计的跨膜(TM)结构域对于IL15受体可以是天然的,或可用任何其它膜结合蛋白的跨膜结构域修饰或置换。

[0293] 图2设计1:IL15和IL15Rα通过使用自我裂解肽共表达,模拟IL15的反式呈递而不消除IL15的顺式呈递。

[0294] 图2设计2:IL15Rα通过连接子在C端与IL15融合,模拟反式呈递而不消除IL15的顺式呈递并且确保IL15膜结合。

[0295] 图2设计3:具有截短胞内结构域的IL15Rα通过连接子在C端与IL15融合,模拟IL15的反式呈递,维持IL15膜结合,并且通过其胞内结构域另外消除由正常IL15R介导的顺式呈递和/或任何其它潜在信号转导途径。IL15Rα的胞内结构域已被认为对于在IL15响应细胞中表达的受体和对于扩增和起作用的响应细胞至关重要。这种截短构建体包含与SEQ ID NO:17至少75%、80%、85%、90%、95%或99%一致的氨基酸序列,其可以由SEQ ID NO:18表示的示例性核酸序列编码。在截短IL15/IL15Rα的一个实施例中,构建体不包含SEQ ID NO:17的最后4个氨基酸"KSRQ",并且包含与SEQ ID NO:21至少75%、80%、85%、90%、95%或99%一致的氨基酸序列。在实施例中,序列一致性为至少80%。在实施例中,序列一致性为至少90%。在实施例中,序列一致性为至少95%。在实施例中,序列一致性为100%。

[0296] SEQ ID NO:17

[0297] MDWTWILFLVAAATRVHSGIHVFILGCFSAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRDPALVHQRPAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNNTAATTAAIVPGSQLMPSKSPSTGTTEISSHESSHGTPSQTTAKNWELTASASHQPPGVYPQGHSDTTVAISTSTVLLCGLSAVSLLACYLKSRQ

[0298] (379个氨基酸;信号肽和连接肽加下划线)

[0299] SEQ ID NO:18

[0300] ATGGACTGGACCTGGATTCTGTTCCTGGTCGCGGCTGCAACGCGAGTCCATAGCGGTATCCATGTTTTTATTCTTGGGTGTTTTTCTGCTGGGCTGCCTAAGACCGAGGCCAACTGGGTAAATGTCATCAGTGACCTCAAGAAAATAGAAGACCTTATACAAAGCATGCACATTGATGCTACTCTCTACACTGAGTCAGATGTACATCCCTCATGCAAAGTGACGGCCATGAAATGTTTCCTCCTCGAACTTCAAGTCATATCTCTGGAAAGTGGCGACGCGTCCATCCACGACACGGTCGAAAACCTGATAATACTCGCTAATAATAGTCTCTCTTCAAATGGTAACGTAACCGAGTCAGGTTGCAAAGAGTGCGAAGAGTTGGAAGAAAAAAACATAAAGGAGTTCCTGCAAAGTTTCGTGCACATTGTGCAGATGTTCATTAATACCTCTAGCGGCGGAGGATCAGGTGGCGGTGGAAGCGGAGGTGGAGGCTCCGGTGGAGGAGGTAGTGGCGGAGGTTCTCTTCAAATAACTTGTCCTCCACCGATGTCCGTAGAACATGCGGATATTTGGGTAAAATCCTATAGCTTGTACAGCCGAGAGCG

GTATATCTGCAACAGCGGCTTCAAGCGGAAGGCCGGCACAAGCAGCCTGACCGAGTGCGTGCTGAACAAGGCCACCA
ACGTGGCCCACTGGACCACCCCTAGCCTGAAGTGCATCAGAGATCCCGCCCTGGTGCATCAGCGGCCTGCCCCTCCA
AGCACAGTGACAACAGCTGGCGTGACCCCCCAGCCTGAGAGCCTGAGCCCTTCTGGAAAAGAGCCTGCCGCCAGCAG
CCCCAGCAGCAACAATACTGCCGCCACCACAGCCGCCATCGTGCCTGGATCTCAGCTGATGCCCAGCAAGAGCCCTA
GCACCGGCACCACCGAGATCAGCAGCCACGAGTCTAGCCACGGCACCCCATCTCAGACCACCGCCAAGAACTGGGAG
CTGACAGCCAGCGCCTCTCACCAGCCTCCAGGCGTGTACCCTCAGGGCCACAGCGATACCACAGTGGCCATCAGCAC
CTCCACCGTGCTGCTGTGTGGACTGAGCGCCGTGTCACTGCTGGCCTGCTACCTGAAGTCCAGACAGTGA

[0301] (1140个氨基酸)

[0302] SEQ ID NO:21

[0303] MDWTWILFLVAAATRVHSGIHVFILGCFSAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVH
PSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQM
FINTSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECV
LNKATNVAHWTTPSLKCIRDPALVHQRPAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNNTAATTAAIVPGSQLM
PSKSPSTGTTEISSHESSHGTPSQTTAKNWELTASASHQPPGVYPQGHSDTTVAISTSTVLLCGLSAVSLLACYL

[0304] (375个氨基酸;信号肽和连接肽加下划线)

[0305] 所属领域的普通技术人员将了解,上述信号肽和连接子序列为说明性的,并且绝不限制其适用作信号肽或连接子的变化形式。存在许多所属领域的技术人员已知且可获得的合适信号肽或连接子序列。所属领域的普通技术人员理解,信号肽和/或连接子序列可以取代另一序列而不改变由信号肽引导或由连接子连接的功能肽的活性。

[0306] 图2设计4:由于设计3构建体显示出在促进效应细胞存活和扩增中具有功能,从而表明IL15Rα的细胞质结构域可省略而不会对这个设计中配备有IL15的效应细胞的自主特征产生不利影响,因此设计4是提供设计3的另一起作用的替代方案的构建体,其中除在一端与IL15融合且在另一端与跨膜结构域融合(mb-Sushi)的Sushi结构域以外,去除了基本完整的IL15Rα,任选地具有Sushi结构域与跨膜结构域之间的连接子。融合的IL15/mb-Sushi通过任何膜结合蛋白的跨膜结构域在细胞表面上表达。在例如设计4的构建体的情况下,在只保留所期望的IL15的反式呈递时,消除通过IL15Rα的不必要的信号传导,包括顺式呈递。在一些实施例中,包含与Sushi结构域融合的IL15的组分包含与SEQ ID NO:19至少75%、80%、85%、90%、95%或99%一致的氨基酸序列,其可由SEQ ID NO:20表示的示例性核酸序列编码。在实施例中,序列一致性为至少80%。在实施例中,序列一致性为至少90%。在实施例中,序列一致性为至少95%。在实施例中,序列一致性为100%。

[0307] SEQ ID NO:19

[0308] MDWTWILFLVAAATRVHSGIHVFILGCFSAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVH
PSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQM
FINTSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECV
LNKATNVAHWTTPSLKCIR

[0309] (242个氨基酸;信号肽和连接肽加下划线)

[0310] SEQ ID NO:20

[0311] ATGGACTGGACCTGGATTCTGTTCCTGGTCGCGGCTGCAACGCGAGTCCATAGCGGTATCCATGTTTTT
ATTCTTGGGTGTTTTTCTGCTGGGCTGCCTAAGACCGAGGCCAACTGGGTAAATGTCATCAGTGACCTCAAGAAAAT

AGAAGACCTTATACAAAGCATGCACATTGATGCTACTCTCTACACTGAGTCAGATGTACATCCCTCATGCAAAGTGA
CGGCCATGAAATGTTTCCTCCTCGAACTTCAAGTCATATCTCTGGAAAGTGGCGACGCGTCCATCCACGACACGGTC
GAAAACCTGATAATACTCGCTAATAATAGTCTCTCTTCAAATGGTAACGTAACCGAGTCAGGTTGCAAAGAGTGCGA
AGAGTTGGAAGAAAAAAACATAAAGGAGTTCCTGCAAAGTTTCGTGCACATTGTGCAGATGTTCATTAATACCTCTA
GCGGCGGAGGATCAGGTGGCGGTGGAAGCGGAGGTGGAGGCTCCGGTGGAGGAGGTAGTGGCGGAGGTTCTCTTCAA
ATAACTTGTCCTCCACCGATGTCCGTAGAACATGCGGATATTTGGGTAAAATCCTATAGCTTGTACAGCCGAGAGCG
GTATATCTGCAACAGCGGCTTCAAGCGGAAGGCCGGCACAAGCAGCCTGACCGAGTGCGTGCTGAACAAGGCCACCA
ACGTGGCCCACTGGACCACCCCTAGCCTGAAGTGCATCAGA

[0312] (726个氨基酸)

[0313] 所属领域的普通技术人员将了解,上述信号肽和连接子序列为说明性的,并且绝不限制其适用作信号肽或连接子的变化形式。存在许多所属领域的技术人员已知且可获得的合适信号肽或连接子序列。所属领域的普通技术人员理解,信号肽和/或连接子序列可以取代另一序列而不改变由信号肽引导或由连接子连接的功能肽的活性。

[0314] 图2设计5:天然或修饰的IL15Rβ通过连接子在C端与IL15融合,实现组成性信号传导并且维持IL15膜结合和反式重呈递。

[0315] 图2设计6:天然或修饰的共同受体γC通过连接子在C端与IL15融合以用于细胞因子的组成性信号传导和膜结合的反式呈递。共同受体γC也被称为共同γ链或CD132,也称为IL2受体亚单位γ或IL2RG。γC是细胞因子受体亚单位,其与受体复合物共用以用于许多白介素受体,包括(但不限于)IL2、IL4、IL7、IL9、IL15和IL21受体。

[0316] 图2设计7:在不存在IL15的情况下形成同源二聚体的工程改造IL15Rβ适用于产生细胞因子的组成性信号传导。

[0317] 在一些实施例中,可使用图2中的设计中的一种或多种将细胞因子IL2、IL4、IL6、IL7、IL9、IL10、IL11、IL12、IL15、IL18和IL21和/或其受体中的一种或多种引入iPSC中,并且在iPSC分化后引入其衍生细胞中。在一些实施例中,IL2或IL15细胞表面表达和信号传导是通过设计1至7中的任一种中所说明的构建体。在一些实施例中,IL4、IL7、IL9或IL21细胞表面表达和信号传导是通过设计5、6或7中所说明的构建体,通过使用共同受体或细胞因子特异性受体。在一些实施例中,IL7表面表达和信号传导是通过设计5、6或7中所说明的构建体,通过使用共同受体或细胞因子特异性受体,例如IL4受体。图2中的任一种设计的跨膜(TM)结构域对于相应的细胞因子受体可以是天然的,或可用任何其它膜结合蛋白的跨膜结构域修饰或置换。

[0318] 除包含至少一种如本文所公开的工程改造模式的诱导性多能细胞(iPSC)、克隆iPSC、克隆iPS细胞系细胞或iPSC衍生的细胞以外,还提供一种主细胞库,其包含单细胞分选和扩增的克隆工程改造iPSC,所述iPSC具有至少一种如此部分中所描述的外源引入的细胞因子和/或细胞因子受体信号传导,其中所述细胞库提供用于额外iPSC工程改造的平台和用于制造现成的、工程改造的、均质的细胞治疗产品的可再生来源,所述细胞治疗产品的组成明确限定且均匀,并且可以具有成本效益的方式大规模地批量生产。在包含CAR和外源细胞因子两者和/或细胞因子受体信号传导的iPSC和其衍生细胞中,CAR和IL可在单独构建体中表达,或可在包含CAR和IL两者的双顺反子构建体中共表达。在一些其它实施例中,呈由图2中的任一种构建体设计表示的形式的IL15可通过自我裂解2A编码序列连接到CAR表

达构建体的5'端或3'端,示出为例如CAR-2A-IL15或IL15-2A-CAR。因此,IL15和CAR处于单一开放阅读框(ORF)中。在一个实施例中,CAR-2A-IL15或IL15-2A-CAR构建体包含图2的设计3中的IL15。在另一实施例中,CAR-2A-IL15或IL15-2A-CAR构建体包含图2的设计3中的IL15。在又一实施例中,CAR-2A-IL15或IL15-2A-CAR构建体包含图2的设计7中的IL15。当表达CAR-2A-IL15或IL15-2A-CAR时,自我裂解2A肽允许所表达的CAR和IL15解离,并且然后可在细胞表面呈递解离的IL15。CAR-2A-IL15或IL15-2A-CAR双顺反子设计在时间和数量上以及在可选择以并入例如诱导性启动子以表达单一ORF的相同控制机制下允许配位的CAR和IL15表达。自我裂解肽发现于小核糖核酸病毒科(Picornaviridae virus family)的成员中,包括口疮病毒属(aphthovirus),例如口蹄疫病毒(foot-and-mouth disease virus;FMDV)、马鼻炎A病毒(equine rhinitis A virus;ERAV)、明脉扁刺蛾病毒(Thosea asigna virus;TaV)和猪捷申病毒-1(porcine tescho virus-1;PTV-I)(Donnelly,ML等人,《普通病毒学期刊(J.Gen.Virol)》,82,1027-101(2001);Ryan,MD等人,《普通病毒学期刊》,72,2727-2732(2001));和心病毒属(cardiovirus),例如泰勒病毒(Theilovirus)(例如,泰勒氏鼠类脑脊髓炎(Theiler's murine encephalomyelitis))和脑心肌炎病毒。衍生自FMDV、ERAV、PTV-I和TaV的2A肽有时也分别称为"F2A"、"E2A"、"P2A"和"T2A"。

[0319] 也涵盖用于IL15的如本文所公开的双顺反子CAR-2A-IL15或IL15-2A-CAR实施例以用于表达本文所提供的任何其它细胞因子,例如IL2、IL4、IL6、IL7、IL9、IL10、IL11、IL12、IL18和IL21。在一些实施例中,IL2细胞表面表达和信号传导是通过设计1至7中的任一种中所说明的构建体。在一些其它实施例中,IL4、IL7、IL9或IL21细胞表面表达和信号传导是通过设计5、6或7中所说明的构建体,通过使用共同受体和/或细胞因子特异性受体。

[0320] 在包含CAR和外源细胞因子两者和/或细胞因子受体信号传导(包括但不限于IL15)的iPSC和其衍生细胞中,iPSC和衍生细胞可进一步包含$TCR^{neg}$ cs-CD3和/或CD16。

[0321] 5.HLA-I和HLA-II缺乏

[0322] 必须在同种异体受体中匹配多种HLA I类和II类蛋白质以获得组织相容性,从而避免同种异体排斥反应问题。本文提供一种iPSC细胞系和由其分化的衍生细胞,其中消除或大体上减少HLA I类和HLA II类蛋白质的表达。HLA I类缺乏可以通过使HLA I类基因座(染色体6p21)的任何区域发生功能缺失,或使HLA I类相关基因(包括但不限于β-2微球蛋白(B2M)基因、TAP 1基因、TAP 2基因和TAP相关蛋白)缺失或表达水平降低来实现。举例来说,B2M基因编码所有HLA I类异二聚体的细胞表面表达所必需的共同亚单位。B2M阴性细胞为HLA-I缺陷型。HLA II类缺乏可以通过使HLA-II相关基因(包括但不限于RFXANK、CIITA、RFX5和RFXAP)发生功能缺失或减少来实现。CIITA是通过II类蛋白质表达所需的转录因子RFX5的活化起作用的转录共激活子。CIITA阴性细胞为HLA-II缺陷型。本文提供一种具有HLA-I和HLA-II缺乏两者,例如缺少B2M和CIITA表达两者的iPSC系及其衍生细胞,其中所获得的衍生效应细胞通过消除对MHC(主要组织相容性复合物)匹配的需要实现同种异体细胞疗法,并且避免宿主(同种异体)T细胞的识别和杀伤。

[0323] 对于一些细胞类型,缺少I类表达引起NK细胞的裂解。为克服这种"自我缺失"反应,HLA-G可任选地基因敲入以避免NK细胞识别和杀死衍生自工程改造的iPSC的HLA-I缺陷型效应细胞。在一个实施例中,HLA-I缺陷型iPSC和其衍生细胞进一步包含HLA-G基因敲入。在一些实施例中,所提供的HLA-I缺陷型iPSC和其衍生细胞进一步包含CD58基因敲除和

CD54基因敲除中的一种或两种。CD58(或LFA-3)和CD54(或ICAM-1)为起始信号依赖性细胞相互作用并且有助于细胞(包括免疫细胞)迁移的粘附蛋白。已经表明CD58基因敲除在降低同种异体NK细胞活化中比CD54基因敲除具有更高的效率;而CD58和CD54两者的双基因敲除对NK细胞活化的降低最强。在一些观测中,相比于HLA-I缺陷型细胞在克服"自我缺失"作用中的HLA-G过表达,CD58和CD54双基因敲除甚至更有效。如本文所提供的是一种主细胞库,其包含单细胞分选和扩增的克隆工程改造iPSC,所述iPSC具有$TCR^{neg}$ cs-CD3、HLA-I和HLA-II缺乏以及hnCD16、CAR和IL中的一种或多种,且不会对iPSC的分化潜能和衍生的效应细胞,包括衍生T细胞和NK细胞的功能产生不利影响。如上文所提供,在一些实施例中,HLA-I和HLA-II缺陷型iPSC和其衍生细胞具有编码HLA-G的外源多核苷酸。在一些实施例中,HLA-I和HLA-II缺陷型iPSC和其衍生细胞为CD58剔除型。在一些其它实施例中HLA-I和HLA-II缺陷型iPSC和其衍生细胞为CD54剔除型。在又一些其它实施例中,HLA-I和HLA-II缺陷型iPSC和其衍生细胞为CD58剔除型和CD54剔除型。所述细胞库提供用于额外iPSC工程改造的平台和用于制造现成的、工程改造的、均质的细胞治疗产品的可再生来源,所述细胞治疗产品的组成明确限定且均匀,并且可以具有成本效益的方式大规模地批量生产。

[0324] 6.CD38基因敲除

[0325] 细胞表面分子CD38在多种血液恶性病中高度上调,所述血液恶性病衍生自淋巴和骨髓谱系两者,包括多发性骨髓瘤和CD20阴性B细胞恶性肿瘤,其使用以使癌细胞耗竭的抗体治疗剂成为有吸引力的标靶。抗体介导的癌细胞耗竭通常可归因于免疫效应机制,例如ADCC(抗体依赖性细胞介导的细胞毒性)的直接细胞凋亡诱导和活化的组合。除ADCC以外,与治疗抗体协同作用的免疫效应机制还可以包括吞噬作用(ADCP)和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)。

[0326] 除在恶性细胞上高度表达外,CD38也在浆细胞上以及NK细胞和活化的T细胞和B细胞上表达。在造血期间,CD38在$CD34^{+}$干细胞和淋巴、红细胞系和骨髓的谱系专门化祖细胞上并且在持续到浆细胞阶段的成熟的最终阶段期间表达。作为II型跨膜糖蛋白,CD38既作为受体,又作为参与核苷酸代谢物产生的多功能酶执行细胞功能。作为酶,CD38催化从$NAD^{+}$到ADP-核糖的反应的合成和水解,从而产生二级信使CADPR和NAADP,其刺激钙从内质网和溶酶体中释放,这对于过程是钙依赖性的细胞粘附过程至关重要。作为受体,CD38识别CD31并且调控活化NK细胞中的细胞因子释放和细胞毒性。还报道了CD38与脂筏中的细胞表面蛋白缔合,调控细胞质$Ca^{2+}$通量,并且介导淋巴细胞和骨髓细胞中的信号转导。

[0327] 在恶性肿瘤治疗中,全身性地使用CD38抗原结合受体转导的T细胞已显示裂解CD34+造血祖细胞、单核细胞、NK细胞、T细胞和B细胞的CD38+级分,导致因为接受者免疫效应细胞功能受损而使得治疗反应不完全并且功效降低或消除。另外,在用达雷木单抗、CD38特异性抗体治疗的多发性骨髓瘤患者中,尽管其它免疫细胞类型(例如T细胞和B细胞)不管其CD38表达如何都不受影响,但观测到骨髓和外周血两者中NK细胞减少(Casneuf等人,《血液研究进展(Blood Advances.)》2017;1(23):2105-2114)。在不受理论限制的情况下,本申请提供一种通过经由自残克服CD38特异性抗体和/或CD38抗原结合结构域诱导的效应细胞耗竭或减少来充分利用CD38靶向癌症治疗的全部潜能的策略。另外,因为通过在同种异体效应细胞的接受者中使用CD38特异性抗体(例如达雷木单抗)抑制这些接受者淋巴细胞的活化使CD38在活化的淋巴细胞(例如T细胞或B细胞)上上调,所以将减少和/或防止针对这

些效应细胞的同种排斥，并且由此增加效应细胞存活和存留。因此，本申请还提供一种通过使用针对接受者T细胞和B细胞的活化，即通常在过继性细胞转移之前活化的T细胞和B细胞的淋巴细胞耗竭的CD38特异性抗体、分泌的CD38特异性接合体或CD38 CAR(嵌合抗原受体)减少或防止同种排斥来增强效应细胞存留和/或存活的策略。确切地说，如所提供的策略包括产生CD38基因敲除iPSC系、包含单细胞分选和扩增的克隆CD38阴性iPSC的主细胞库，以及通过定向分化工程改造的iPSC系获得CD38阴性($CD38^{neg}$)衍生效应细胞，其中当CD38靶向治疗部分与效应细胞一起采用时，所述衍生效应细胞受保护免于自残和同种排斥等其它优势。另外，抗CD38单克隆抗体疗法显著地耗尽患者的活化免疫系统而不会对患者的造血干细胞隔室产生不利影响。CD38阴性衍生细胞能够抵抗CD38抗体介导的耗竭，并且可有效地与抗CD38或CD38-CAR组合给药而不使用毒性调节剂且因此减少和/或替换基于化学疗法的淋巴细胞耗竭。包含单细胞分选和扩增的克隆$CD38^{neg}$ iPSC的主细胞库提供用于额外iPSC工程改造的平台，包括(但不限于)以下中的一种或多种：$TCR^{neg}$ cs-CD3、hnCD16、CAR、IL以及HLA I和II缺乏；和用于制造现成的、工程改造的均质的细胞治疗产品的可再生来源，所述细胞治疗产品的组成明确限定且均匀，并且可以具有成本效益的方式大规模地批量生产。

[0328] 在如本文所提供的一个实施例中，iPSC系中的CD38基因敲除是双等位基因基因敲除。如本文所公开，所提供的CD38阴性iPSC系还至少包含$TCR^{neg}$和一种或多种编码一种或多种外源蛋白质的多核苷酸以在表达时提供细胞表面CD3复合物或其一个或多个亚单位或子结构域(cs-CD3)；并且所述iPSC能够定向分化以产生功能性衍生造血细胞，包括(但不限于)具有永久性生血内皮细胞(HE)潜能的中胚层细胞、永久性HE、CD34造血细胞、造血干细胞和祖细胞、造血多潜能祖细胞(MPP)、T细胞祖细胞、NK细胞祖细胞、骨髓细胞、嗜中性粒细胞祖细胞、T细胞、NKT细胞、NK细胞、B细胞、嗜中性粒细胞、树突状细胞和巨噬细胞。在一些实施例中，当抗CD38抗体用于诱导ADCC或抗CD38 CAR用于靶细胞杀伤时，$CD38^{neg}$ iPSC和/或其衍生效应细胞不被抗CD38抗体、抗CD38 CAR或接受者活化T细胞或B细胞消除，从而在这类治疗部分的存在下和/或暴露于这类治疗部分之后增加iPSC和其效应细胞存留和/或存活。在一些实施例中，在这类治疗部分的存在下和/或暴露于这类治疗部分之后，效应细胞在活体内具有增加的存留和/或存活。

[0329] 7.额外修饰

[0330] 在一些实施例中，包含$TCR^{neg}$ cs-CD3以及CD16、CAR、IL、HLA I和II缺乏和CD38-/-中的一种或多种的iPSC和其衍生效应细胞可另外包含：以下中的至少一种的缺失或表达减少：TAP1、TAP2、TAP相关蛋白、NLRC5、PD1、LAG3、TIM3、RFXANK、RFX5、RFXAP、RAG1和染色体6p21区域中的任何基因；或以下中的至少一种的表达引入或增加：HLA-E、41BBL、CD4、CD8、CD47、CD113、CD131、CD137、CD80、PDL1、$A_{2A}R$、TCR、Fc受体、接合体和用于与双特异性、多特异性或通用接合体偶联的表面触发受体。

[0331] 双特异性或多特异性接合体为由不同抗体的两个或更多个单链可变片段(scFv)或其它功能变体组成的融合蛋白，其中至少一个scFv与效应细胞表面分子或“表面触发受体”结合，并且至少另一个scFv经由肿瘤特异性表面分子与肿瘤细胞结合。如本文中所使用，术语“表面触发受体”是指能够触发或起始效应细胞的免疫反应(例如细胞毒性反应)的受体。表面触发受体可以工程改造，并且可为效应细胞，例如T细胞、NK细胞、NKT细胞、B细

胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞上表达的内源性表面蛋白。在一些实施例中，表面触发受体促进效应细胞与特定靶细胞(例如肿瘤细胞)之间的双特异性或多特异性抗体接合，不依赖于效应细胞的天然受体和细胞类型。在一些其它实施例中，可使用本文所提供的方法和组合物将一种或多种外源性表面触发受体引入效应细胞中，即通过工程改造iPSC，任选地产生包含单细胞分选和扩增的克隆工程改造iPSC的主细胞库，且接着引导iPSC分化为T细胞、NK细胞或任何其它效应细胞，其包含与源iPSC相同的基因型。

[0332] 使用这种方法，人们还可以产生包含通用表面触发受体的iPSC，并且然后使这类iPSC分化成表达通用表面触发受体的各种效应细胞类型的群体。“通用”意指表面触发受体可表达于任何效应细胞中并且活化任何效应细胞(不论细胞类型)，并且表达通用受体的所有效应细胞可与表面触发受体可识别的具有相同抗原决定基的接合体偶联或连接(不论接合体的肿瘤结合特异性)。在一些实施例中，具有相同肿瘤靶向特异性的接合体用于与不同的通用表面触发受体偶联。在一些实施例中，具有不同肿瘤靶向特异性的接合体用于与相同的通用表面触发受体偶联。因此，可使一种或多种效应细胞类型接合，以在一些情况下杀死一种特定类型的肿瘤细胞并且在一些其它情况下杀死两种或更多种类型的肿瘤。表面触发受体通常包含用于效应细胞活化的共刺激结构域和对接合体的抗原决定基具有特异性的抗抗原决定基，或反之亦然，表面触发受体包含可识别或对接合体的抗抗原决定基具有特异性的抗原决定基。举例来说，双特异性接合体对位于一端的表面触发受体的抗抗原决定基/抗原决定基具有特异性，并且对位于另一端的肿瘤抗原具有特异性。

[0333] 如本文所提供，除了其它功能外，如所公开的各种形式的细胞表面呈递的CD3分子可用作用于接合体识别的CD3相关细胞表面触发受体，其特别适用于TCR阴性的细胞以使得不管其表达如何，所表达的CD3分子不存在于细胞表面上。在一些实施例中，用于接合体识别的CD3相关表面触发受体包含于在表达时在效应细胞的细胞表面呈递的完整或部分CD3分子(即，CD3复合物的亚单位或子结构域)中。在一些实施例中，在效应细胞表面呈递的完整或部分CD3分子包含(1)至少完整或部分长度的来自一个或多个CD3亚单位的至少一个胞外域，所述CD3亚单位包含CD3ε、CD3δ和/或CD3ε；和任选地(2)完整或部分长度的CD3ζ胞内域。在一些实施例中，包含CD3相关表面触发受体的完整或部分CD3分子的所有亚单位或子结构域为内源性的。在一些实施例中，包含CD3相关表面触发受体的完整或部分CD3分子的至少一个亚单位或子结构域为外源性的。在一些实施例中，接合如本文所公开的CD3相关细胞表面触发受体的双特异性抗体为CD3-CD19。在再一实施例中，双特异性抗体为CD3-CD33。在又一实施例中，双特异性抗体进一步包含效应细胞与肿瘤细胞抗原结合结构域之间的连接子，例如修饰的IL15作为效应NK细胞促进效应细胞扩增的连接子(在一些公开案中称为TriKE，或三特异性杀伤接合体)。

[0334] 除CD3以外，可用于双特异性或多特异性接合体识别或偶联的其它效应细胞表面分子或表面触发受体包括(但不限于)CD28、CD5、CD16、NKG2D、CD64、CD32、CD89、NKG2C和如本文所公开的嵌合Fc受体。在一些实施例中，在效应细胞的表面上表达以用于接合体识别的CD16是hnCD16，其包含如I.2部分中所描述的CD16(含有F176V和任选的S197P)或CD64胞外结构域以及天然或非天然的跨膜结构域、刺激结构域和/或信号传导结构域。在一些实施例中，在效应细胞的表面上表达以用于接合体识别的CD16是基于hnCD16的嵌合Fc受体(CFcR)。在一些实施例中，基于hnCD16的CFcR包含NKG2D的跨膜结构域、2B4的刺激结构域和

CD3ζ的信号传导结构域;其中hnCD16的胞外结构域衍生自CD64或CD16的胞外结构域的全长或部分序列;并且其中CD16的胞外结构域包含F176V和任选的S197P。

[0335] 用于双特异性或多特异性接合体识别的示例性肿瘤细胞表面分子包括(但不限于)B7H3、BCMA、CD10、CD19、CD20、CD22、CD24、CD30、CD33、CD34、CD38、CD44、CD79a、CD79b、CD123、CD138、CD179b、CEA、CLEC12A、CS-1、DLL3、EGFR、EGFRvIII、EPCAM、FLT-3、FOLR1、FOLR3、GD2、gpA33、HER2、HM1.24、LGR5、MSLN、MCSP、MICA/B、PSMA、PAMA、P-钙粘素、ROR1。

[0336] 鉴于上文,为了在效应细胞上接合CD3,在一个实施例中,双特异性抗体为CD3-CD19;并且在另一实施例中,双特异性抗体为CD3-CD33。为了在效应细胞上接合CD16,双特异性抗体为CD16-CD30或CD64-CD30。在另一实施例中,双特异性抗体为CD16-BCMA或CD64-BCMA。在又一实施例中,双特异性抗体进一步包含效应细胞与肿瘤细胞抗原结合结构域之间的连接子,例如修饰的IL15作为效应NK细胞促进效应细胞扩增的连接子(在一些公开案中称为TriKE,或三特异性杀伤接合体)。在一个实施例中,TriKE为CD16-IL15-EPCAM或CD64-IL15-EPCAM。在另一实施例中,TriKE为CD16-IL15-CD33或CD64-IL15-CD33。在又一实施例中,TriKE为NKG2C-IL15-CD33。连接子还可以来源于其它细胞因子,包括(但不限于)IL2、IL4、IL6、IL7、IL9、IL10、IL11、IL12、IL18和IL21。

[0337] 8.本文所提供的基因工程改造的iPSC系和iPSC衍生的细胞

[0338] 鉴于上文,本申请提供一种$TCR^{neg}$细胞或其群体,其在表达时包含细胞表面CD3复合物或其一个或多个亚单位或子结构域(cs-CD3)($TCR^{neg}$ cs-CD3),其中细胞为诱导性多能细胞(iPSC)、克隆iPSC、克隆iPS细胞系细胞或由定向分化$TCR^{neg}$ cs-CD3 iPSC而获得的iPSC衍生的细胞。还提供一种主细胞库,其包含具有如本文所描述的表型的单细胞分选和扩增的克隆工程改造iPSC,其中所述细胞库提供用于制造现成的、工程改造的、均质的细胞治疗产品的可再生来源,所述细胞治疗产品的组成明确限定且均匀,并且可以具有成本效益的方式大规模地批量生产。

[0339] 在一些实施例中,iPSC衍生的细胞是造血细胞,包括(但不限于)具有永久性生血内皮细胞(HE)潜能的中胚层细胞、永久性HE、CD34造血细胞、造血干细胞和祖细胞、造血多潜能祖细胞(MPP)、T细胞祖细胞、NK细胞祖细胞、骨髓细胞、嗜中性粒细胞祖细胞、T细胞、NKT细胞、NK细胞、B细胞、嗜中性粒细胞、树突状细胞和巨噬细胞。在一些实施例中,iPSC衍生的造血细胞包含效应细胞,例如T细胞、NK细胞和调控细胞,其为$TCR^{neg}$并且在表达时包含细胞表面CD3复合物或其一个或多个亚单位或子结构域(cs-CD3)。在另一实施例中,本申请提供一种iPSC衍生的$TCR^{neg}$ T细胞或其群体,其包含细胞表面CD3复合物或其一个或多个亚单位或子结构域(cs-CD3)($TCR^{neg}$ cs-CD3),其中T细胞是由定向分化$TCR^{neg}$ cs-CD3 iPSC而获得。

[0340] 如本文中所使用,$TCR^{neg}$也称为TCR阴性、$TCR^{-/-}$、"TCR剔除型"或TCR基因敲除,其包含通过自然(例如,NK细胞或iPSC衍生的NK细胞)、通过基因表达调控、或通过基因组编辑iPSC细胞(例如,iPSC、由T细胞重编程的iPSC(TiPSC))或T细胞以基因敲除内源性TCR或其一个或多个亚单位、或通过获得由具有TCR基因敲除的iPSC分化的TCR阴性衍生细胞而不具有内源性TCR表达的细胞。因此,如所公开的在细胞中基因敲除的TCR为内源性TCR复合物。在细胞中破坏TCR的TCRα或TCRβ的恒定区的表达是基因敲除细胞的内源性TCR复合物的许多方法中的一种。发现,不管$TCR^{neg}$细胞中所有CD3亚单位的表达如何,$TCR^{neg}$细胞都不能将

CD3复合物呈递到细胞表面，这对需要细胞表面CD3识别、结合和/或信号传导的细胞功能产生不利影响。$TCR^{neg}$细胞中的如本文所公开的细胞表面CD3复合物或其一个或多个亚单位或子结构域(cs-CD3)可充当CD3相关细胞表面触发受体以与分子结合，所述分子包括但不限于抗体或其功能变体和/或如本文所描述的接合体。

[0341] 本文还提供一种iPSC或iPSC衍生的细胞，其包含一种或多种编码一种或多种外源蛋白质的多核苷酸以在表达时提供细胞表面CD3复合物或其一个或多个亚单位或子结构域(cs-CD3)，其中所述细胞任选为TCR阴性。当表达cs-CD3时，其充当CD3相关细胞表面触发受体。在如$TCR^{neg}$细胞中所提供的CD3相关表面触发受体的一些实施例中，受体包含于在表达时在效应细胞表面呈递的完整或部分内源性CD3分子中，其中内源性CD3分子呈递(以其它方式不发生在$TCR^{neg}$细胞中，即使在表达时)是通过其与重组TCR的缔合而实现的，所述重组TCR包含以下中的一种或多种：全部或部分长度的外源TCRα、外源TCRβ和其如本申请中所提供的任何变体。在一些实施例中，$TCR^{neg}$细胞中细胞表面呈递完整或部分内源性CD3分子是通过在所述细胞中另外表达至少一种重组TCR而实现的，所述重组TCR包含非结合重组TCR(nb-rTCR)、限定重组TCR(d-rTCR)和/或重组前TCR。

[0342] 在一些实施例中，包含CD3相关表面触发受体的$TCR^{neg}$细胞包含非结合重组TCR(nb-rTCR)，其中nb-rTCR包含tgTRAC(转基因TCRα恒定区)和tgTRBC(转基因TCRβ恒定区)中的一个或两个；因此，$TCR^{neg}$ iPSC或iPSC衍生的细胞包含一种或多种编码tgTRAC和/或tgTRBC的多核苷酸。在包含编码tgTRAC的多核苷酸的$TCR^{neg}$细胞的一些实施例中，将所述多核苷酸插入TRAC基因座中，其中所插入的多核苷酸破坏内源性TRAC的表达，从而导致内源性TCR基因敲除，并且任选地其中所插入的多核苷酸是由TRAC的内源启动子或异源启动子驱动。在包含编码tgTRBC的多核苷酸的$TCR^{neg}$细胞的一些实施例中，将所述多核苷酸插入TRBC基因座中，其中所插入的多核苷酸破坏内源性TRBC的表达，从而导致内源性TCR基因敲除，并且任选地其中所插入的多核苷酸是由TRBC的内源启动子或异源启动子驱动。

[0343] 在一些实施例中，包含CD3相关表面触发受体的$TCR^{neg}$细胞包含限定重组TCR(d-rTCR)，其中d-rTCR包含tgTCRα(转基因TCRα)和tgTCRβ(转基因TCRβ)，其中除相应恒定区(即，TRAC和TRBC)以外，每一tgTCRα和tgTCRβ包含相应的限定可变区；因此，$TCR^{neg}$ iPSC或iPSC衍生的细胞包含一种或多种编码tgTCRα和/或tgTCRβ的多核苷酸。在一些实施例中，限定可变区源自具有已知的TCR特异性的T细胞的TCRα和β。在一些实施例中，限定可变区源自恒定NKT细胞的TCRα和β。在包含编码tgTCRα的多核苷酸的$TCR^{neg}$细胞的一些实施例中，将所述多核苷酸插入TRAC基因座中，其中所插入的多核苷酸破坏内源性TRAC的表达，从而导致内源性TCR基因敲除，并且任选地其中所插入的多核苷酸是由TRAC的内源启动子或异源启动子驱动。在包含编码tgTCRβ的多核苷酸的$TCR^{neg}$细胞的一些实施例中，将所述多核苷酸插入TRBC基因座中，其中所插入的多核苷酸破坏内源性TRBC的表达，从而导致内源性TCR基因敲除，并且任选地其中所插入的多核苷酸是由TRBC的内源启动子或异源启动子驱动。

[0344] 在一些实施例中，包含CD3相关表面触发受体的$TCR^{neg}$细胞包含重组前TCR(p-rTCR)，其中p-rTCR包含tgpTCRα(转基因前TCRα)和任选的tgTRBC或tgTCRβ，其中tgTCRβ包含限定可变区；因此，$TCR^{neg}$ iPSC或iPSC衍生的细胞包含至少一种编码tgpTCRα的多核苷酸。在包含编码tgpTCRα的多核苷酸的$TCR^{neg}$细胞的一些实施例中，将所述多核苷酸插入TRAC基因座中，其中所插入的多核苷酸破坏内源性TRAC的表达，从而导致内源性TCR基因敲

除，并且任选地其中所插入的多核苷酸是由TRAC的内源启动子或异源启动子驱动。在包含编码除tgpTCRα以外的tgTRBC或tgTCRβ的多核苷酸的TCR$^{neg}$细胞的一些实施例中，将所述tgTRBC或tgTCRβ编码多核苷酸插入TRBC基因座中，其中所插入的多核苷酸破坏内源性TRBC的表达，从而导致内源性TCR基因敲除，并且任选地其中所插入的tgTRBC或tgTCRβ编码多核苷酸是由TRBC的内源启动子或异源启动子驱动。相应的限定可变区。

[0345] 在TCR$^{neg}$细胞中的CD3相关表面触发受体的一些实施例中，受体包含于完整或部分CD3分子中，所述CD3分子包含来自CD3ε、CD3δ和CD3γ中的一种或多种的至少一个外源亚单位或子结构域。在一个实施例中，TCR$^{neg}$细胞中的用于接合体识别的CD3相关表面触发受体包含于部分CD3分子中，所述CD3分子至少包含CD3ε的全部或部分长度胞外域。在一个实施例中，TCR$^{neg}$细胞中的用于接合体识别的CD3相关表面触发受体包含于部分CD3分子中，所述CD3分子至少包含CD3ε的全部或部分长度胞外域，和另外的CD3γ或CD3δ的全部或部分长度胞外域。在一个实施例中，所述CD3分子至少包含全部或部分长度的CD3ε、CD3γ和/或CD3δ胞外域，其中全部或部分长度的胞外域与TCRα或TCRβ的恒定区融合，并且其中各自包含TRAC或TRBC的部分融合蛋白能够与内源性CD3ζ形成异二聚体。因此，在具有CD3相关表面触发受体的TCR$^{neg}$ iPSC或iPSC衍生的细胞的一个实施例中，细胞包含以下中的至少一种：(i)包含CD3ε和CD3δ的全部或部分长度的胞外域，和TCRα恒定区的转基因融合蛋白(tgCD3(ε-δ)-TRAC)；(ii)包含CD3ε和CD3γ的全部或部分长度的胞外域，和TCRβ恒定区的转基因融合蛋白(tgCD3(ε-γ)-TRBC)；(iii)包含CD3ε和CD3γ的全部或部分长度的胞外域，和TCRα恒定区的转基因融合蛋白(tgCD3(ε-γ)-TRAC)；和/或(iv)包含CD3ε和CD3δ的全部或部分长度的胞外域，和TCRβ恒定区的转基因融合蛋白(tgCD3(ε-δ)-TRBC)。在具有CD3相关表面触发受体的TCR$^{neg}$细胞的一些实施例中，细胞包含异二聚体，所述异二聚体包含包括与至少CD3ε的全部或部分长度的胞外域融合的TCRα恒定区的转基因融合蛋白以及包括与至少CD3ε的全部或部分长度的胞外域融合的TCRβ恒定区的转基因融合蛋白。

[0346] 在TCR$^{neg}$细胞中的CD3相关表面触发受体的一些实施例中，受体包含于完整或部分CD3分子中，所述CD3分子包含来自CD3ε、CD3δ、CD3γ和/或CD3ζ中的一种或多种的至少一个外源亚单位或子结构域，和任选的以下的一个或多个信号传导结构域：2B4、4-1BB、CD16、CD2、CD28、CD28H、CD3ζ、DAP10、DAP12、DNAM1、FcERIγ IL21R、IL-2Rβ(IL-15Rβ)、IL-2Rγ、IL-7R、KIR2DS2、NKG2D、NKp30、NKp44、NKp46、CD3ζ1XX、CS1或CD8，以用于信号转导和/或共刺激，其中融合所有亚单位或子结构域，包括信号传导结构域以形成嵌合链。在一个实施例中，TCR$^{neg}$细胞中的用于接合体识别的CD3相关表面触发受体包含于CD3嵌合链中，所述CD3嵌合链至少包含CD3ε的全部或部分长度胞外域；CD3δ和CD3γ中的一个或两个的全部或部分长度胞外域；和CDζ的全部或部分长度胞内域。在一个实施例中，TCR$^{neg}$细胞中的用于接合体识别的CD3相关表面触发受体包含于CD3嵌合链中，所述CD3嵌合链包含CD3ε的全部或部分长度胞外域；CD3δ和CD3γ中的一个或两个的全部或部分长度胞外域；CDζ的全部或部分长度的胞内域，进一步包含CD28和41BBL中的一个或两个的细胞质信号传导结构域。因此，在具有CD3相关表面触发受体的TCR$^{neg}$ iPSC或iPSC衍生的细胞的一个实施例中，细胞包含以下中的至少一种：(i)包含CD3ε和CD3γ的全部或部分长度的胞外域，和CD3ζ的全部或部分长度的胞内域的转基因融合蛋白[tgCD3(ε-γ)-ζ]；(ii)包含CD3ε和CD3δ的全部或部分长度的胞外域，和CD3ζ的全部或部分长度的胞内域的转基因融合蛋白[tgCD3(ε-δ)-ζ]；

(iii)包含CD3ε的全部或部分长度的胞外域的转基因融合蛋白、包含CD3γ或CD3δ的全部或部分长度的胞外域、CD3ζ的全部或部分长度的胞内域和CD28的信号传导结构域的转基因融合蛋白[tgCD3(ε-γ/δ)-28ζ];(iv)包含CD3ε的全部或部分长度的胞外域的转基因融合蛋白、包含CD3γ或CD3δ的全部或部分长度的胞外域、CD3ζ的全部或部分长度的胞内域和41BB的信号传导结构域的转基因融合蛋白[tgCD3(ε-γ/δ)-BBζ];和/或(v)包含以下的转基因融合蛋白[tgCD3(ε-γ/δ)-(28-BB)ζ]:CD3γ或CD3δ的全部或部分长度的胞外域、CD3ζ的全部或部分长度的胞内域、CD28的信号传导结构域和41BB的信号传导结构域。

[0347] 本文进一步提供一种iPSC,其包含一种或多种编码一种或多种外源蛋白质的多核苷酸以在表达时提供细胞表面CD3复合物或其一个或多个亚单位或子结构域(cs-CD3),和编码高亲和力不可裂解CD16(hnCD16)的多核苷酸,其中iPSC能够定向分化以产生功能性衍生造血细胞。在一些实施例中,效应细胞包含T细胞。在一些实施例中,效应细胞包含NK细胞。

[0348] 本文提供一种iPSC,其包含一种或多种编码一种或多种外源蛋白质的多核苷酸以在表达时提供细胞表面CD3复合物或其一个或多个亚单位或子结构域(cs-CD3),和编码标靶特异性嵌合抗原受体(CAR)的多核苷酸,其中iPSC能够定向分化以产生功能性衍生效应细胞。

[0349] 另外提供一种iPSC,其包含一种或多种编码一种或多种外源蛋白质的多核苷酸以在表达时提供细胞表面CD3复合物或其一个或多个亚单位或子结构域(cs-CD3),和编码至少一种外源细胞因子和/或其受体(IL)的多核苷酸以使得细胞因子信号传导能够有助于细胞存活、存留和/或扩增,其中iPSC系能够定向分化以产生具有改善的存活、存留、扩增和效应细胞功能的功能性衍生造血细胞。在一些实施例中,包含cs-CD3的iPSC为TCR阴性($TCR^{neg}$ cs-CD3)。外源引入的细胞因子信号传导包含以下中的任何一种或两种或更多种的信号传导:IL2、IL4、IL6、IL7、IL9、IL10、IL11、IL12、IL15、IL18和IL21。在一些实施例中,用于细胞因子信号传导的细胞因子和/或其相应受体的所引入部分或全部肽在细胞表面上表达。在一些实施例中,组成性地激活细胞因子信号传导。在一些实施例中,细胞因子信号传导的激活是可诱导的。在一些实施例中,细胞因子信号传导的激活是瞬时的和/或暂时的。在一些实施例中,细胞表面细胞因子/细胞因子受体的瞬时/暂时表达是通过逆转录病毒、仙台病毒、腺病毒、游离基因体、小环或包括mRNA的RNA。在一些实施例中,包含于$TCR^{neg}$ cs-CD3 iPSC或其衍生细胞中的外源细胞表面细胞因子和/或受体允许IL7信号传导。在一些实施例中,包含于$TCR^{neg}$ cs-CD3 iPSC或其衍生细胞中的外源细胞表面细胞因子和/或受体允许IL10信号传导。在一些实施例中,包含于$TCR^{neg}$ cs-CD3 iPSC或其衍生细胞中的外源细胞表面细胞因子和/或受体允许IL15信号传导。在所述$TCR^{neg}$ cs-CD3 IL iPSC的一些实施例中,IL15表达是通过图2的构建体3。在所述$TCR^{neg}$ cs-CD3 IL iPSC的一些实施例中,IL15表达是通过图2的构建体4。上述实施例的所述$TCR^{neg}$ cs-CD3 IL iPSC和其衍生细胞能够自主地维持或改善细胞生长、增殖、扩增和/或效应功能而不另外活体外或活体内接触所供应的可溶性细胞因子。在一些实施例中,$TCR^{neg}$ cs-CD3 IL iPSC和其衍生效应细胞可以与抗CD38抗体一起使用以诱导ADCC而不会引起效应细胞消除,从而协同增加iPSC和其效应细胞存留和/或存活。

[0350] 进一步提供一种iPSC,其包含一种或多种编码一种或多种外源蛋白质的多核苷酸

以在表达时提供细胞表面CD3复合物或其一个或多个亚单位或子结构域(cs-CD3)，和CD38基因敲除，其中iPSC能够定向分化以产生具有改善的存活、存留、扩增和效应细胞功能的功能性衍生造血细胞。在一些实施例中，包含cs-CD3的iPSC为TCR阴性(TCR$^{neg}$ cs-CD3)。细胞表面分子CD38在多种血液恶性病中高度上调，所述血液恶性病衍生自淋巴和骨髓谱系两者，包括多发性骨髓瘤和CD20阴性B细胞恶性肿瘤，其使用以使癌细胞耗竭的抗体治疗剂成为有吸引力的标靶。除在恶性细胞上高度表达外，CD38也在浆细胞上以及NK细胞和活化的T细胞和B细胞上表达。在一些实施例中，当抗CD38抗体、CD38结合CAR或包含抗CD38 scFV的CD3接合体用于诱导ADCC和/或肿瘤细胞靶向时，TCR$^{neg}$ cs-CD3 CD38-/-iPSC和/或其衍生效应细胞可靶向表达CD38的(肿瘤)细胞而不引起效应细胞消除，即减少或耗竭表达CD38的效应细胞，从而增加iPSC和其效应细胞存留和/或存活。

[0351] 还提供一种iPSC，其包含一种或多种编码一种或多种外源蛋白质的多核苷酸以在表达时提供细胞表面CD3复合物或其一个或多个亚单位或子结构域(cs-CD3)、B2M基因敲除和CIITA基因敲除以及任选的编码HLA-G的多核苷酸，其中iPSC能够定向分化以产生功能性衍生造血细胞。在一些实施例中，包含cs-CD3的iPSC为TCR阴性(TCR$^{neg}$ cs-CD3)。在一些实施例中，所述TCR$^{neg}$ cs-CD3 B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$iPSC和其衍生效应细胞均为HLA-I和HLA-II缺陷型。

[0352] 鉴于上文，本文所提供的包括一种iPSC，其包含一种或多种编码一种或多种外源蛋白质的多核苷酸以在表达时提供细胞表面CD3复合物或其一个或多个亚单位或子结构域(cs-CD3)，以及任选的以下中的一种、两种、三种或所有四种：hnCD16、CAR、外源细胞因子/受体和B2M/CIITA基因敲除；其中当基因敲除B2M时，任选地引入编码HLA-G的多核苷酸，或替代地CD58和CD54基因敲除中的一种或两种，并且其中iPSC能够定向分化以产生功能性衍生造血细胞。在一些实施例中，包含cs-CD3的iPSC为TCR阴性(TCR$^{neg}$ cs-CD3)。本申请中还包括功能性iPSC衍生造血细胞，其包含TCR$^{neg}$、cs-CD3以及任选的以下中的一种、两种、三种或所有四种：hnCD16、B2M/CIITA基因敲除、CAR和外源细胞因子/受体；其中当基因敲除B2M时，任选地引入编码HLA-G的多核苷酸，或替代地CD58和CD54基因敲除中的一种或两种，并且其中衍生造血细胞包括(但不限于)具有永久性生血内皮细胞(HE)潜能的中胚层细胞、永久性HE、CD34造血细胞、造血干细胞和祖细胞、造血多潜能祖细胞(MPP)、T细胞祖细胞、NK细胞祖细胞、骨髓细胞、嗜中性粒细胞祖细胞、T细胞、NKT细胞、NK细胞、B细胞、嗜中性粒细胞、树突状细胞和巨噬细胞。

[0353] 本文所提供的另一方面包括包含TCR$^{neg}$、cs-CD3以及IL15和IL15Rα的截短融合蛋白的iPSC或iPSC衍生的细胞，其中所述融合蛋白不包含胞内结构域。在图2中显示为“IL15Rα(ΔICD)融合”和“IL5/mb-Sushi”，这些实施例在整个本申请中进一步统称为IL15Δ。在一些实施例中，缺少胞内结构域的截短IL15/IL15Rα融合蛋白包含与SEQ ID NO:17、19或21至少75％、80％、85％、90％、95％或99％一致的氨基酸序列。在一些实施例中，缺少胞内结构域的截短IL15/IL15Rα融合蛋白包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列。在一些实施例中，缺少胞内结构域的截短IL15/IL15Rα融合蛋白包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列。在一些实施例中，缺少胞内结构域的截短IL15/IL15Rα融合蛋白包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列。在又一些其它实施例中，包含TCR$^{neg}$、cs-CD3、缺少胞内结构域(IL15Δ)的截短IL15/IL15Rα融合蛋白的iPSC或iPSC衍生的细胞进一步包含以下中的一种或多种：CD38基因敲除、hnCD16、CAR、外

源细胞因子/受体和B2M/CIITA基因敲除;其中当基因敲除B2M时,任选地引入编码HLA-G的多核苷酸,并且其中iPSC能够定向分化以产生功能性衍生造血细胞,并且其中衍生造血细胞包括(但不限于)具有永久性生血内皮细胞(HE)潜能的中胚层细胞、永久性HE、CD34造血细胞、造血干细胞和祖细胞、造血多潜能祖细胞(MPP)、T细胞祖细胞、NK细胞祖细胞、骨髓细胞、嗜中性粒细胞祖细胞、T细胞、NKT细胞、NK细胞、B细胞、嗜中性粒细胞、树突状细胞和巨噬细胞。

[0354] 因此,本申请提供iPSC和其功能性衍生造血细胞,其包含表1中的任一种以下基因型。视选择哪种特异性细胞因子/受体表达而定,如表1中所提供的"IL"表示以下中的一种:IL2、IL4、IL6、IL7、IL9、IL10、IL11、IL12、IL15、IL18和IL21;并且当IL表示IL15时,其还包含IL15Δ,其在上文详述为IL15和IL15Rα的截短融合蛋白,但无胞内结构域。此外,当iPSC和其功能性衍生造血细胞具有包含CAR和IL两者的基因型时,CAR和IL任选地包含于包含2A序列的双顺反子表达盒中。相比而言,在一些其它实施例中,CAR和IL在包含于iPSC和其功能性衍生造血细胞中的单独表达盒中。在一个特定实施例中,包含于表达CAR和IL两者的iPSC和其功能性衍生效应细胞中,IL为图2的构建体3或4中的IL15,其中IL15构建体包含于具有CAR或与CAR分开的表达盒中。

[0355] 表1:所提供的细胞的适用基因型:

[0356]

| cs-CD3 | $TCR^{neg}$ | hnCD16 | CAR | IL | CD38-/- | $B2M^{-/-}CIITA^{-/-}$ | HLA-G或(具有或不具有$CD54^{-/-}$的$CD58^{-/-}$) | 基因型 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| √ | | | | | | | | 1. cs-CD3 |
| √ | √ | | | | | | | 2. cs-CD3 $TCR^{neg}$ |
| √ | | √ | | | | | | 3. cs-CD3 hnCD16 |
| √ | | | √ | | | | | 4. cs-CD3 CAR |

[0357]

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| √ | | | | √ | | | | [5]. cs-CD3 IL |
| √ | | | | | √ | | | [6]. cs-CD3 CD38-/- |
| √ | | | | | | √ | | [7]. cs-CD3 B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ |
| √ | | | | | | √ | √ | [8]. cs-CD3 B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ CD58$^{-/-}$<br>[9]. cs-CD3 B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ CD54$^{-/-}$<br>[10]. cs-CD3 B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ CD58$^{-/-}$ CD54$^{-/-}$<br>[11]. cs-CD3 B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ HLA-G |
| √ | √ | √ | | | | | | [12]. cs-CD3 TCR$^{neg}$ hnCD16 |
| √ | √ | | √ | | | | | [13]. cs-CD3 TCR$^{neg}$ CAR |
| √ | √ | | | √ | | | | [14]. cs-CD3 TCR$^{neg}$ IL |
| √ | √ | | | | √ | | | [15]. cs-CD3 TCR$^{neg}$ CD38-/- |
| √ | √ | | | | | √ | | [16]. cs-CD3 TCR$^{neg}$ B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ |
| √ | √ | | | | | √ | √ | [17]. cs-CD3 TCR$^{neg}$ B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ CD58$^{-/-}$<br>[18]. cs-CD3 TCR$^{neg}$ B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ CD54$^{-/-}$<br>[19]. cs-CD3 TCR$^{neg}$ B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ CD58$^{-/-}$ CD54$^{-/-}$<br>[20]. cs-CD3 TCR$^{neg}$ B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ HLA-G |
| √ | | √ | √ | | | | | [21]. cs-CD3 hnCD16 CAR |
| √ | | √ | | √ | | | | [22]. cs-CD3 hnCD16 IL |
| √ | | √ | | | √ | | | [23]. cs-CD3 hnCD16 CD38-/- |
| √ | | √ | | | | √ | | [24]. cs-CD3 hnCD16 B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ |
| √ | | √ | | | | √ | √ | [25]. cs-CD3 hnCD16 B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ CD58$^{-/-}$<br>[26]. cs-CD3 hnCD16 B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ CD54$^{-/-}$<br>[27]. cs-CD3 hnCD16 B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ CD58$^{-/-}$ CD54$^{-/-}$<br>[28]. cs-CD3 hnCD16 B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ HLA-G |
| √ | | | √ | √ | | | | [29]. cs-CD3 CAR IL |
| √ | | | √ | | √ | | | [30]. cs-CD3 CAR CD38-/- |
| √ | | | √ | | | √ | | [31]. cs-CD3 CAR B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ |
| √ | | | √ | | | √ | √ | [32]. cs-CD3 CAR B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ CD58$^{-/-}$<br>[33]. cs-CD3 CAR B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ CD54$^{-/-}$<br>[34]. cs-CD3 CAR B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ CD58$^{-/-}$ CD54$^{-/-}$<br>[35]. cs-CD3 CAR B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ HLA-G |
| √ | | | | √ | √ | | | [36]. cs-CD3 IL CD38-/- |
| √ | | | | √ | | √ | | [37]. cs-CD3 IL B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ |
| √ | | | | √ | | √ | √ | [38]. cs-CD3 IL B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ CD58$^{-/-}$<br>[39]. cs-CD3 IL B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ CD54$^{-/-}$<br>[40]. cs-CD3 IL B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ CD58$^{-/-}$ CD54$^{-/-}$ |

[0358]

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | | | [41]. cs-CD3 IL B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ HLA-G |
| √ | | | | | √ | √ | | [42]. cs-CD3 CD38-/- B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ |
| √ | | | | | √ | √ | √ | [43]. cs-CD3 CD38-/- B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ CD58$^{-/-}$<br>[44]. cs-CD3 CD38-/- B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ CD54$^{-/-}$<br>[45]. cs-CD3 CD38-/- B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ CD58$^{-/-}$ CD54$^{-/-}$<br>[46]. cs-CD3 CD38-/- B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ HLA-G |
| √ | √ | √ | √ | | | | | [47]. cs-CD3 TCR$^{neg}$ hnCD16 CAR |
| √ | √ | √ | | √ | | | | [48]. cs-CD3 TCR$^{neg}$ hnCD16 IL |
| √ | √ | √ | | | √ | | | [49]. cs-CD3 TCR$^{neg}$ hnCD16 CD38-/- |
| √ | √ | √ | | | | √ | | [50]. cs-CD3 TCR$^{neg}$ hnCD16 B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ |
| √ | √ | √ | | | | √ | √ | [51]. cs-CD3 TCR$^{neg}$ B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ CD58$^{-/-}$<br>[52]. cs-CD3 TCR$^{neg}$ B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ CD54$^{-/-}$<br>[53]. cs-CD3 TCR$^{neg}$ B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ CD58$^{-/-}$ CD54$^{-/-}$<br>[54]. cs-CD3 TCR$^{neg}$ B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ HLA-G |
| √ | √ | | √ | √ | | | | [55]. cs-CD3 TCR$^{neg}$ CAR IL |
| √ | √ | | √ | | √ | | | [56]. cs-CD3 TCR$^{neg}$ CAR CD38-/- |
| √ | √ | | √ | | | √ | | [57]. cs-CD3 TCR$^{neg}$ CAR B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ |
| √ | √ | | √ | | | √ | √ | [58]. cs-CD3 TCR$^{neg}$ CAR B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ CD58$^{-/-}$<br>[59]. cs-CD3 TCR$^{neg}$ CAR B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ CD54$^{-/-}$<br>[60]. cs-CD3 TCR$^{neg}$ CAR B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ CD58$^{-/-}$ CD54$^{-/-}$<br>[61]. cs-CD3 TCR$^{neg}$ CAR B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ HLA-G |
| √ | √ | | | √ | √ | | | [62]. cs-CD3 TCR$^{neg}$ IL CD38-/- |
| √ | √ | | | √ | | √ | | [63]. cs-CD3 TCR$^{neg}$ IL B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ |
| √ | √ | | | √ | | √ | √ | [64]. cs-CD3 TCR$^{neg}$ IL B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ CD58$^{-/-}$<br>[65]. cs-CD3 TCR$^{neg}$ IL B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ CD54$^{-/-}$<br>[66]. cs-CD3 TCR$^{neg}$ IL B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ CD58$^{-/-}$ CD54$^{-/-}$<br>[67]. cs-CD3 TCR$^{neg}$ IL B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ HLA-G |
| √ | √ | | | | √ | √ | | [68]. cs-CD3 TCR$^{neg}$ CD38-/- B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ |
| √ | √ | | | | √ | √ | √ | [69]. cs-CD3 TCR$^{neg}$ CD38-/- B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ CD58$^{-/-}$<br>[70]. cs-CD3 TCR$^{neg}$ CD38-/- |

[0359]

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | | | B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ CD54$^{-/-}$<br>71. cs-CD3 TCR$^{neg}$ CD38-/-<br>B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ CD58$^{-/-}$ CD54$^{-/-}$<br>72. cs-CD3 TCR$^{neg}$ CD38-/-<br>B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ HLA-G |
| √ | | √ | √ | √ | | | | 73. cs-CD3 hnCD16 CAR IL |
| √ | | √ | √ | | √ | | | 74. cs-CD3 hnCD16 CAR CD38-/- |
| √ | | √ | √ | | | √ | | 75. cs-CD3 hnCD16 CAR<br>B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ |
| √ | | √ | √ | | | √ | √ | 76. cs-CD3 hnCD16 CAR<br>B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ CD58$^{-/-}$<br>77. cs-CD3 hnCD16 CAR<br>B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ CD54$^{-/-}$<br>78. cs-CD3 hnCD16 CAR<br>B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ CD58$^{-/-}$ CD54$^{-/-}$<br>79. cs-CD3 hnCD16 CAR<br>B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ HLA-G |
| √ | | √ | | √ | √ | | | 80. cs-CD3 hnCD16 IL CD38-/- |
| √ | | √ | | √ | | √ | | 81. cs-CD3 hnCD16 IL<br>B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ |
| √ | | √ | | √ | | √ | √ | 82. cs-CD3 B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ CD58$^{-/-}$<br>83. cs-CD3 B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ CD54$^{-/-}$<br>84. cs-CD3 B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ CD58$^{-/-}$<br>CD54$^{-/-}$<br>85. cs-CD3 B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ HLA-G |
| √ | | √ | | | √ | √ | | 86. cs-CD3 hnCD16 CD38-/-<br>B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ |
| √ | | √ | | | √ | √ | √ | 87. cs-CD3 hnCD16 CD38-/-<br>B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ CD58$^{-/-}$<br>88. cs-CD3 hnCD16 CD38-/-<br>B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ CD54$^{-/-}$<br>89. cs-CD3 hnCD16 CD38-/-<br>B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ CD58$^{-/-}$ CD54$^{-/-}$<br>90. cs-CD3 hnCD16 CD38-/-<br>B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ HLA-G |
| √ | | | √ | √ | √ | | | 91. cs-CD3 CAR IL CD38-/- |
| √ | | | √ | √ | | √ | | 92. cs-CD3 CAR IL B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ |
| √ | | | √ | √ | | √ | √ | 93. cs-CD3 CAR IL B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$<br>CD58$^{-/-}$<br>94. cs-CD3 CAR IL B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$<br>CD54$^{-/-}$<br>95. cs-CD3 CAR IL B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$<br>CD58$^{-/-}$ CD54$^{-/-}$<br>96. cs-CD3 CAR IL B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$<br>HLA-G |
| √ | | | √ | | √ | √ | | 97. cs-CD3 CAR CD38-/-<br>B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ |
| √ | | | √ | | √ | √ | √ | 98. cs-CD3 CAR CD38-/-<br>B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ CD58$^{-/-}$<br>99. cs-CD3 CAR CD38-/- |

[0360]

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | | | $B2M^{-/-}CIITA^{-/-}CD54^{-/-}$ |
| | | | | | | | | [100]. cs-CD3 CAR CD38-/- $B2M^{-/-}CIITA^{-/-}CD58^{-/-}CD54^{-/-}$ |
| | | | | | | | | [101]. cs-CD3 CAR CD38-/- $B2M^{-/-}CIITA^{-/-}$ HLA-G |
| √ | | | | √ | √ | √ | | [102]. cs-CD3 IL CD38-/- $B2M^{-/-}CIITA^{-/-}$ |
| √ | | | | √ | √ | √ | √ | [103]. cs-CD3 IL CD38-/- $B2M^{-/-}CIITA^{-/-}CD58^{-/-}$ |
| | | | | | | | | [104]. cs-CD3 IL CD38-/- $B2M^{-/-}CIITA^{-/-}CD54^{-/-}$ |
| | | | | | | | | [105]. cs-CD3 IL CD38-/- $B2M^{-/-}CIITA^{-/-}CD58^{-/-}CD54^{-/-}$ |
| | | | | | | | | [106]. cs-CD3 IL CD38-/- $B2M^{-/-}CIITA^{-/-}$ HLA-G |
| √ | √ | √ | √ | √ | | | | [107]. cs-CD3 $TCR^{neg}$ hnCD16 CAR IL |
| √ | √ | √ | √ | | √ | | | [108]. cs-CD3 $TCR^{neg}$ hnCD16 CAR CD38-/- |
| √ | √ | √ | √ | | | √ | | [109]. cs-CD3 $TCR^{neg}$ hnCD16 CAR $B2M^{-/-}CIITA^{-/-}$ |
| √ | √ | √ | √ | | | √ | √ | [110]. cs-CD3 $TCR^{neg}$ hnCD16 $B2M^{-/-}CIITA^{-/-}CD58^{-/-}$ |
| | | | | | | | | [111]. cs-CD3 $TCR^{neg}$ hnCD16 $B2M^{-/-}CIITA^{-/-}CD54^{-/-}$ |
| | | | | | | | | [112]. cs-CD3 $TCR^{neg}$ hnCD16 $B2M^{-/-}CIITA^{-/-}CD58^{-/-}CD54^{-/-}$ |
| | | | | | | | | [113]. cs-CD3 $TCR^{neg}$ hnCD16 $B2M^{-/-}CIITA^{-/-}$ HLA-G |
| √ | | √ | √ | √ | √ | | | [114]. cs-CD3 hnCD16 CAR IL CD38-/- |
| √ | | √ | √ | √ | | √ | | [115]. cs-CD3 hnCD16 CAR IL $B2M^{-/-}CIITA^{-/-}$ |
| √ | | √ | √ | √ | | √ | √ | [116]. cs-CD3 hnCD16 CAR IL $B2M^{-/-}CIITA^{-/-}CD58^{-/-}$ |
| | | | | | | | | [117]. cs-CD3 hnCD16 CAR IL $B2M^{-/-}CIITA^{-/-}CD54^{-/-}$ |
| | | | | | | | | [118]. cs-CD3 hnCD16 CAR IL $B2M^{-/-}CIITA^{-/-}CD58^{-/-}CD54^{-/-}$ |
| | | | | | | | | [119]. cs-CD3 hnCD16 CAR IL $B2M^{-/-}CIITA^{-/-}$ HLA-G |
| √ | | √ | | √ | √ | √ | | [120]. cs-CD3 hnCD16 IL CD38-/- $B2M^{-/-}CIITA^{-/-}$ |
| √ | | √ | | √ | √ | √ | √ | [121]. cs-CD3 hnCD16 IL CD38-/- $B2M^{-/-}CIITA^{-/-}CD58^{-/-}$ |
| | | | | | | | | [122]. cs-CD3 hnCD16 IL CD38-/- $B2M^{-/-}CIITA^{-/-}CD54^{-/-}$ |
| | | | | | | | | [123]. cs-CD3 hnCD16 IL CD38-/- $B2M^{-/-}CIITA^{-/-}CD58^{-/-}CD54^{-/-}$ |
| | | | | | | | | [124]. cs-CD3 hnCD16 IL CD38-/- $B2M^{-/-}CIITA^{-/-}$ HLA-G |

[0361]

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| √ | | | √ | √ | √ | √ | | 125. cs-CD3 CAR IL CD38-/- B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ |
| √ | | | √ | √ | √ | √ | √ | 126. cs-CD3 CAR IL CD38-/- B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ CD58$^{-/-}$<br>127. cs-CD3 CAR IL CD38-/- B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ CD54$^{-/-}$<br>128. cs-CD3 CAR IL CD38-/- B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ CD58$^{-/-}$ CD54$^{-/-}$<br>129. cs-CD3 CAR IL CD38-/- B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ HLA-G |
| √ | √ | √ | √ | √ | √ | | | 130. cs-CD3 TCR$^{neg}$ hnCD16 CAR IL CD38-/- |
| √ | √ | √ | √ | √ | | √ | | 131. cs-CD3 TCR$^{neg}$ hnCD16 CAR IL B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ |
| √ | √ | √ | √ | √ | | √ | √ | 132. cs-CD3 TCR$^{neg}$ hnCD16 CAR IL B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ CD58$^{-/-}$<br>133. cs-CD3 TCR$^{neg}$ hnCD16 CAR IL B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ CD54$^{-/-}$<br>134. cs-CD3 TCR$^{neg}$ hnCD16 CAR IL B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ CD58$^{-/-}$ CD54$^{-/-}$<br>135. cs-CD3 TCR$^{neg}$ hnCD16 CAR IL B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ HLA-G |
| √ | | √ | √ | √ | √ | √ | | 136. cs-CD3 hnCD16 CAR IL CD38-/- B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ |
| √ | | √ | √ | √ | √ | √ | √ | 137. cs-CD3 hnCD16 CAR IL CD38-/- B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ CD58$^{-/-}$<br>138. cs-CD3 hnCD16 CAR IL CD38-/- B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ CD54$^{-/-}$<br>139. cs-CD3 hnCD16 CAR IL CD38-/-B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ CD58$^{-/-}$ CD54$^{-/-}$<br>140. cs-CD3 hnCD16 CAR IL CD38-/-B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ HLA-G |
| √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ | | 141. cs-CD3 TCR$^{neg}$ hnCD16 CAR IL CD38-/- B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ |
| √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ | 142. cs-CD3 TCR$^{neg}$ hnCD16 CAR IL CD38-/- B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ CD58$^{-/-}$<br>143. cs-CD3 TCR$^{neg}$ hnCD16 CAR IL CD38-/- B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ CD54$^{-/-}$<br>144. cs-CD3 TCR$^{neg}$ hnCD16 CAR IL CD38-/- B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ CD58$^{-/-}$ CD54$^{-/-}$<br>145. cs-CD3 TCR$^{neg}$ hnCD16 CAR IL CD38-/- B2M$^{-/-}$CIITA$^{-/-}$ HLA-G |

[0362] 9.用于免疫疗法的抗体

[0363] 在一些实施例中,除如本文所提供的基因组工程改造的效应细胞以外,包含靶向与病状、疾病或适应症相关的抗原的抗体或抗体片段的额外治疗剂可在组合疗法中与这些效应细胞一起使用。在一些实施例中,抗体是单克隆抗体。在一些实施例中,抗体是人类化抗体、人类化单克隆抗体或嵌合抗体。在一些实施例中,抗体或抗体片段与病毒抗原特异性结合。在其它实施例中,抗体或抗体片段与肿瘤抗原特异性结合。在一些实施例中,肿瘤或病毒特异性抗原活化所给予的iPSC衍生的效应细胞以增强其杀伤能力。在一些实施例中,适合于作为所给予的iPSC衍生的效应细胞的额外治疗剂的组合治疗的抗体包括(但不限于)抗CD20(利妥昔单抗、维妥珠单抗、奥法木单抗、乌妥昔单抗、奥卡拉珠单抗、奥滨尤妥珠单抗、替伊莫单抗、奥克雷珠单抗)、抗CD22(伊珠单抗、莫昔土莫单抗、依帕珠单抗)、抗HER2

(曲妥珠单抗、帕妥珠单抗)、抗CD52(阿仑单抗)、抗EGFR(西妥昔单抗)、抗GD2(迪努妥昔单抗)、抗PDL1(阿维鲁单抗)、抗CD38(达雷木单抗、艾沙妥昔单抗、MOR202)、抗CD123(7G3、CSL362)、抗SLAMF7(埃罗妥珠单抗)和其人类化或Fc修饰的变体或片段或其功能等效物和生物类似物。在一些实施例中,适合于作为所给予的iPSC衍生的效应细胞的额外治疗剂的组合治疗的抗体进一步包括双特异性或多特异性抗体,其靶向超过一个靶细胞上的抗原或抗原决定基或使效应细胞(T细胞、NK细胞或巨噬细胞)募集到靶细胞,同时靶向靶细胞。这类双特异性或多特异性抗体充当能够将效应细胞,例如T细胞、NK细胞、NKT细胞、B细胞、巨噬细胞和/或嗜中性粒细胞引导到肿瘤细胞并且活化免疫效应细胞的接合体,并且已显示出使抗体疗法的益处最大化的巨大潜能。接合体对至少一种肿瘤抗原具有特异性,并且对免疫效应细胞的至少一种表面触发受体具有特异性。接合体的实例包括(但不限于)双特异性T细胞接合体(BiTE)、双特异性杀伤细胞接合体(BiKE)、三特异性杀伤细胞接合体(TriKE)或多特异性杀伤细胞接合体,或与多种免疫细胞类型相容的通用接合体。

[0364] 在一些实施例中,iPSC衍生的效应细胞包含造血谱系细胞,其包含表1中所列的基因型。在一些实施例中,iPSC衍生的效应细胞包含NK细胞,其包含表1中所列的基因型。在一些实施例中,iPSC衍生的效应细胞包含T细胞,其包含表1中所列的基因型。在适用于治疗液体或实体肿瘤的组合的一些实施例中,组合包含至少包含$TCR^{neg}$ cs-CD3的iPSC衍生的NK细胞或T细胞,和接合具有细胞表面CD3的细胞的双特异性或多特异性抗体。CD3接合体至少包含与cs-CD3结合的第一可变区段和与抗原结合的第二可变区段,所述抗原包含以下中的至少一种:ADGRE2、碳酸酐酶IX(CAIX)、CCRI、CCR4、癌胚抗原(CEA)、CD3、CD5、CD7、CD8、CD10、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD34、CD38、CD41、CD44、CD44V6、CD49f、CD56、CD70、CD74、CD99、CD123、CD133、CD138、CDS、CLEC12A、巨细胞病毒(CMV)感染细胞的抗原、上皮糖蛋白2(EGP 2)、上皮糖蛋白-40(EGP-40)、上皮细胞粘附分子(EpCAM)、EGFRvIII、受体酪氨酸-蛋白激酶erb-B2,3,4、EGFIR、EGFR-VIII、ERBB叶酸结合蛋白(FBP)、胎儿乙酰胆碱受体(AChR)、叶酸受体-a、神经节苷脂G2(GD2)、神经节苷脂G3(GD3)、人类表皮生长因子受体2(HER-2)、人类端粒酶逆转录酶(hTERT)、ICAM-1、整合素B7、白介素-13受体亚单位α-2(IL-13Rα2)、κ-轻链、激酶插入结构域受体(KDR)、路易斯A(CA19.9)、路易斯Y(LeY)、L1细胞粘附分子(L1-CAM)、LILRB2、黑色素瘤抗原家族A 1(MAGE-A1)、MICA/B、粘蛋白1(Muc-1)、粘蛋白16(Muc-16)、间皮素(MSLN)、NKCSI、NKG2D配体、c-Met、癌症睾丸抗原NY-ESO-1、癌胚抗原(h5T4)、PRAME、前列腺干细胞抗原(PSCA)、PRAME前列腺特异性膜抗原(PSMA)、肿瘤相关糖蛋白72(TAG-72)、TIM-3、TRBCI、TRBC2、血管内皮生长因子R2(VEGF-R2)、威尔姆斯肿瘤蛋白(WT-1)和/或病原体抗原。

[0365] 在CD3接合体的一些实施例中,接合体至少包含与cs-CD3结合的第一可变区段和与抗原结合的第二可变区段,所述抗原包含以下中的至少一种:BCMA、CD19、CD20、CD33、CD38、CD52、CD123、CEA、EGFR、EpCAM、GD2、GPA33、HER2、MICA/B、PDL1和/或PSMA。在CD3接合体的又一些其它实施例中,接合体包含与抗原结合的第二可变区段,所述抗原包含以下中的至少一种:CD19、CD33、CD123、CEA、EpCAM、GPA33、HER2和/或PSMA。在CD3接合体的再一些其它实施例中,接合体为以下中的至少一种:博纳吐单抗、卡托莫西单抗、厄马索单抗、RO6958688、AFM11、MT110/AMG 110、MT111/AMG211/MEDI-565、AMG330、MT112/BAY2010112、MOR209/ES414、MGD006/S80880、MGD007和/或FBTA05。在一个实施例中,组合包含CD3接合体

以及包含$TCR^{neg}$ cs-CD3和hnCD16的iPSC衍生的NK细胞。在一个实施例中，组合包含CD3接合体以及包含$TCR^{neg}$ cs-CD3和hnCD16的iPSC衍生的NK细胞。在一些其它实施例中，包含于与CD3接合体的组合中的iPSC衍生的NK细胞包含$TCR^{neg}$ cs-CD3、hnCD16、IL15和靶向以下中的一种的CAR：CD19、BCMA、CD20、CD22、CD38、CD123、HER2、CD52、EGFR、GD2和PDL1；其中IL15与CAR共表达或分开表达；并且IL15呈图2的构建体1到7中所呈现的任一种形式。在一些特定实施例中，当IL15与CAR共表达或分开表达时，其呈构建体3、4或7的形式。

[0366] 10.检查点抑制剂

[0367] 检查点为在不受抑制时能够抑制或下调免疫反应的细胞分子，通常为细胞表面分子。现在清楚的是，肿瘤选择某些免疫检查点路径作为免疫抗性的主要机制，特别是针对对肿瘤抗原具有特异性的T细胞。检查点抑制剂(CI)是能够减少检查点基因表达或基因产物，或降低检查点分子的活性，从而阻断抑制性检查点，恢复免疫系统功能的拮抗剂。靶向PD1/PDL1或CTLA4的检查点抑制剂的研发转变了肿瘤学前景，其中这些试剂提供多种适应症的长期缓解。然而，许多肿瘤亚型对检查点阻断疗法具有抗性，并且复发仍然是一个大问题。本申请的一个方面提供了一种通过包括如在与CI的组合疗法中所提供的基因组工程改造的功能性iPSC衍生的细胞来克服CI抗性的治疗方法。在组合疗法的一个实施例中，iPSC衍生的细胞是NK细胞。在组合疗法的另一实施例中，iPSC衍生的细胞是T细胞。除了展现直接的抗肿瘤能力外，本文所提供的衍生NK细胞已显示出抵抗PDL1-PD1介导的抑制作用，并且具有增强T细胞迁移、将T细胞募集到肿瘤微环境并且增强肿瘤部位处的T细胞活化的能力。因此，由功能有效的基因组工程改造的衍生NK细胞促进的T细胞的肿瘤浸润指示，所述NK细胞能够与靶向T细胞的免疫疗法(包括检查点抑制剂)协同作用，以缓解局部免疫抑制并且减少肿瘤负荷。

[0368] 在一个实施例中，用于检查点抑制剂组合疗法的衍生的$TCR^{neg}$ NK细胞包含cs-CD3以及任选的以下中的一种、两种、三种或所有四种：hnCD16表达、B2M/CIITA基因敲除、CAR表达、CD38基因敲除和外源细胞表面细胞因子和/或受体表达；其中当基因敲除B2M时，任选地包括编码HLA-G的多核苷酸或CD58和CD54中的一种或两种的基因敲除。在一些实施例中，衍生NK细胞包含表1中所列的任一种基因型。在一些实施例中，上述衍生NK细胞另外包含：以下中的至少一种的缺失或表达减少：TAP1、TAP2、TAP相关蛋白、NLRC5、PD1、LAG3、TIM3、RFXANK、RFX5、RFXAP、RAG1和染色体6p21区域中的任何基因；或以下中的至少一种的表达引入或增加：HLA-E、41BBL、CD3、CD4、CD8、CD47、CD113、CD131、CD137、CD80、PDL1、$A_{2A}R$、CAR、Fc受体、接合体和用于与双特异性、多特异性或通用接合体偶联的表面触发性受体。

[0369] 在另一实施例中，用于检查点抑制剂组合疗法的衍生的$TCR^{neg}$ T细胞包含cs-CD3以及任选的以下中的一种、两种、三种或所有四种：hnCD16表达、B2M/CIITA基因敲除、CAR表达、CD38基因敲除和外源细胞表面细胞因子和/或受体表达；其中当基因敲除B2M时，任选地包括编码HLA-G的多核苷酸或CD58和CD54中的一种或两种的基因敲除。在一些实施例中，衍生T细胞包含表1中所列的任一种基因型。在一些实施例中，上述衍生T细胞另外包含：以下中的至少一种的缺失或表达减少：TAP1、TAP2、TAP相关蛋白、NLRC5、PD1、LAG3、TIM3、RFXANK、RFX5、RFXAP、RAG1和染色体6p21区域中的任何基因；或以下中的至少一种的表达引入或增加：HLA-E、41BBL、CD3、CD4、CD8、CD47、CD113、CD131、CD137、CD80、PDL1、$A_{2A}R$、CAR、Fc受体、接合体和用于与双特异性、多特异性或通用接合体偶联的表面触发性受体。

[0370] 上述所述衍生NK细胞或T细胞是由分化iPSC克隆系获得，所述iPSC克隆系包含$TCR^{neg}$ cs-CD3以及任选的以下中的一种、两种、三种或所有四种：hnCD16表达、B2M/CIITA基因敲除、CAR表达、CD38基因敲除和外源细胞表面细胞因子表达；其中当基因敲除B2M时，任选地引入编码HLA-G的多核苷酸或CD58和CD54中的一种或两种的基因敲除。在一些实施例中，上述所述iPSC克隆系进一步包含：以下中的至少一种的缺失或表达减少：TAP1、TAP2、TAP相关蛋白、NLRC5、PD1、LAG3、TIM3、RFXANK、RFX5、RFXAP、RAG1和染色体6p21区域中的任何基因；或以下中的至少一种的表达引入或增加：HLA-E、41BBL、CD3、CD4、CD8、CD47、CD113、CD131、CD137、CD80、PDL1、$A_{2A}R$、CAR、Fc受体、接合体和用于与双特异性、多特异性或通用接合体偶联的表面触发性受体。

[0371] 适用于与如本文所提供的衍生NK细胞或T细胞的组合疗法的检查点抑制剂包括(但不限于)以下的拮抗剂：PD-1(Pdcd1、CD279)、PDL-1(CD274)、TIM-3(Havcr2)、TIGIT(WUCAM和Vstm3)、LAG-3(Lag3、CD223)、CTLA-4(Ctla4、CD152)、2B4(CD244)、4-1BB(CD137)、4-1BBL(CD137L)、A2aR、BATE、BTLA、CD39(Entpdl)、CD47、CD73(NT5E)、CD94、CD96、CD160、CD200、CD200R、CD274、CEACAM1、CSF-1R、Foxpl、GARP、HVEM、IDO、EDO、TDO、LAIR-1、MICA/B、NR4A2、MAFB、OCT-2(Pou2f2)、视黄酸受体α(Rara)、TLR3、VISTA、NKG2A/HLA-E和抑制性KIR(例如，2DL1、2DL2、2DL3、3DL1和3DL2)。

[0372] 在一些实施例中，抑制上述任一种检查点分子的拮抗剂是抗体。在一些实施例中，检查点抑制性抗体可以是鼠类抗体、人类抗体、人类化抗体、骆驼Ig、只有重链的鲨鱼抗体(VNAR)、Ig NAR、嵌合抗体、重组抗体或其抗体片段。抗体片段的非限制性实例包括Fab、Fab′、F(ab)′2、F(ab)′3、Fv、单链抗原结合片段(scFv)、(scFv)2、二硫键稳定的Fv(dsFv)、微型抗体、双功能抗体、三功能抗体、四功能抗体、单域抗原结合片段(sdAb，纳米抗体)、只有重链的重组抗体(VHH)和维持整个抗体的结合特异性的其它抗体片段，其相比于整个抗体可以更有成本效益地产生、更易于使用或更敏感。在一些实施例中，一种、或两种、或三种、或更多种检查点抑制剂包含以下中的至少一种：阿特珠单抗(抗PDL1 mAb)、阿维鲁单抗(抗PDL1 mAb)、度伐单抗(抗PDL1 mAb)、曲美木单抗(tremelimumab)(抗CTLA4mAb)、伊匹单抗(抗CTLA4 mAb)、IPH4102(抗KIR)、IPH43(抗MICA)、IPH33(抗TLR3)、利瑞木单抗(抗KIR)、莫那利珠单抗(抗NKG2A)、纳武单抗(抗PD1 mAb)、派立珠单抗(抗PD1 mAb)和其任何衍生物、功能等效物或生物类似物。

[0373] 在一些实施例中，抑制上述任一种检查点分子的拮抗剂是基于微RNA的，因为发现许多miRNA作为控制免疫检查点的表达的调控因子(Dragomir等人，《癌症生物医学(Cancer Biol Med.)》2018,15(2):103-115)。在一些实施例中，检查点拮抗性miRNA包括(但不限于)miR-28、miR-15/16、miR-138、miR-342、miR-20b、miR-21、miR-130b、miR-34a、miR-197、miR-200c、miR-200、miR-17-5p、miR-570、miR-424、miR-155、miR-574-3p、miR-513和miR-29c。

[0374] 与所提供的iPSC衍生的NK细胞或T细胞的组合疗法的一些实施例包含至少一种检查点抑制剂以靶向至少一种检查点分子；其中iPSC衍生的细胞具有表1中所列的基因型。与所提供的衍生NK细胞或T细胞的组合疗法的一些其它实施例包含两种、三种或更多种检查点抑制剂，使得靶向两种、三种或更多种检查点分子。在包含至少一种检查点抑制剂和具有表1中所列的基因型的iPSC衍生的细胞的组合疗法的一些实施例中，所述检查点抑制剂为抗体、或人类化或Fc修饰的变体或片段、或其功能等效物或生物类似物，并且所述检查点抑

制剂通过表达编码所述抗体或其片段或变体的外源多核苷酸序列由iPSC衍生的细胞产生。在一些实施例中,编码抑制检查点的抗体或其片段或变体的外源多核苷酸序列在单独构建体中或在双顺反子构建体中与CAR共表达,所述双顺反子构建体包含CAR和编码抗体或其片段的序列两者。在一些其它实施例中,编码抗体或其片段的序列可通过自我裂解2A编码序列连接到CAR表达构建体的5'端或3'端,示出为例如CAR-2A-CI或CI-2A-CAR。因此,检查点抑制剂和CAR的编码序列在单一开放阅读框(ORF)中。当通过能够浸润肿瘤微环境(TME)的衍生效应细胞将检查点抑制剂以有效负载递送、表达和分泌时,其在接合TME后抵消抑制性检查点分子,从而允许利用例如CAR或活化受体的活化模式活化效应细胞。在一些实施例中,与CAR共表达的检查点抑制剂抑制以下检查点分子中的至少一种:PD-1、PDL-1、TIM-3、TIGIT、LAG-3、CTLA-4、2B4、4-1BB、4-1BBL、A2aR、BATE、BTLA、CD39(Entpdl)、CD47、CD73(NT5E)、CD94、CD96、CD160、CD200、CD200R、CD274、CEACAM1、CSF-1R、Foxpl、GARP、HVEM、IDO、EDO、TDO、LAIR-1、MICA/B、NR4A2、MAFB、OCT-2(Pou2f2)、视黄酸受体α(Rara)、TLR3、VISTA、NKG2A/HLA-E和抑制性KIR。在一些实施例中,在具有表1中所列的基因型的衍生细胞中与CAR共表达的检查点抑制剂选自包含以下的群组:阿特珠单抗、阿维鲁单抗、度伐单抗、曲美木单抗、伊匹单抗、IPH4102、IPH43、IPH33、利瑞木单抗、莫那利珠单抗、纳武单抗、派立珠单抗和其人类化或Fc修饰的变体、片段和其功能等效物或生物类似物。在一些实施例中,与CAR共表达的检查点抑制剂是阿特珠单抗或其人类化或Fc修饰的变体、片段或其功能等效物或生物类似物。在一些其它实施例中,与CAR共表达的检查点抑制剂是纳武单抗或其人类化或Fc修饰的变体、片段或其功能等效物或生物类似物。在一些其它实施例中,与CAR共表达的检查点抑制剂是派立珠单抗或其人类化或Fc修饰的变体、片段或其功能等效物或生物类似物。

[0375] 在包含本文所提供的iPSC衍生的细胞和至少一种抑制检查点分子的抗体的组合疗法的一些其它实施例中,所述抗体不由iPSC衍生的细胞或在iPSC衍生的细胞中产生,并且在给予具有表1中所列的基因型的iPSC衍生的细胞之前、同时或之后另外给予。在一些实施例中,在与所提供的衍生NK细胞或T细胞的组合疗法中给予一种、两种、三种或更多种检查点抑制剂是同时或依序的。在包含具有表1中所列的基因型的衍生NK细胞或T细胞的组合治疗的一个实施例中,治疗中包括的检查点抑制剂为以下中的一种或多种:阿特珠单抗、阿维鲁单抗、度伐单抗、曲美木单抗、伊匹单抗、IPH4102、IPH43、IPH33、利瑞木单抗、莫那利珠单抗、纳武单抗、派立珠单抗和其人类化或Fc修饰的变体、片段和其功能等效物或生物类似物。在包含具有表1中所列的基因型的衍生NK细胞或T细胞的组合治疗的一些实施例中,治疗中包括的检查点抑制剂是阿特珠单抗或其人类化或Fc修饰的变体、片段和其功能等效物或生物类似药。在包含具有表1中所列的基因型的衍生NK细胞或T细胞的组合治疗的一些实施例中,治疗中包括的检查点抑制剂是纳武单抗或其人类化或Fc修饰的变体、片段或其功能等效物或生物类似物。在包含具有表1中所列的基因型的衍生NK细胞或T细胞的组合治疗的一些实施例中,治疗中包括的检查点抑制剂是派立珠单抗或其人类化或Fc修饰的变体、片段和其功能等效物或生物类似物。

[0376] II.在iPSC中所选基因座处进行靶向基因组编辑的方法

[0377] 如本文中可互换使用的基因组编辑(Genome editing/genomic editing)是一种类型的基因工程改造,其中在靶细胞的基因组中插入、缺失和/或置换DNA。靶向基因组编辑

(可与“靶向基因组编辑”或“靶向基因编辑”互换)能够在基因组中的预选位点实现插入、缺失和/或取代。当在靶向编辑期间使内源序列在插入位点缺失时,可因序列缺失而基因敲除或基因敲减包含受影响序列的内源基因。因此,靶向编辑还可以用于精确地破坏内源基因表达。本文中类似地使用术语“靶向整合”,其是指一种涉及在使内源序列在插入位点缺失或不缺失的情况下插入一个或多个外源序列的过程。相比之下,随机整合的基因经历位置效应和沉默,使其表达不可靠且不可预测。举例来说,着丝点和亚端粒区域特别容易发生转基因沉默。相反,新整合的基因可影响周围的内源基因和染色质,从而潜在地改变细胞行为或有利于细胞转化。因此,将外源DNA插入预选基因座(例如安全港基因座或基因组安全港(GSH))对于安全、效率、拷贝数控制以及可靠的基因反应控制非常重要。

[0378] 可以通过核酸酶非依赖性方法或通过核酸酶依赖性方法实现靶向编辑。在核酸酶非依赖性靶向编辑方法中,同源重组是通过宿主细胞的酶机制,由侧接所插入的外源多核苷酸的同源序列引导。

[0379] 替代地,可以通过利用特异性稀有切割核酸内切酶,特异性引入双链断裂(DSB)来以更高的频率实现靶向编辑。这类核酸酶依赖性靶向编辑是利用DNA修复机制,包括非同源末端连接(NHEJ),其响应于DSB而发生。在不具有含有外源遗传物质的供体载体的情况下,NHEJ通常引起少量的内源核苷酸的随机插入或缺失(插入/缺失)。相比之下,当存在含有位于一对同源臂两侧的外源遗传物质的供体载体时,可以在同源定向修复(HDR)期间通过同源重组将外源遗传物质引入基因组中,从而导致“靶向整合”。在一些情况下,靶向的整合位点旨在位于所选基因的编码区内,并且因此靶向整合可能破坏基因表达,从而在一个单一编辑步骤中同时基因敲入和基因敲除(KI/KO)。

[0380] 可以实现在基因的所关注基因座(GOI)的选定位置处插入一个或多个转基因以同时基因敲除基因。适合于同时基因敲入和基因敲除(KI/KO)的基因座包括(但不限于)B2M、TAP1、TAP2、TAP相关蛋白、NLRC5、CIITA、RFXANK、CIITA、RFX5、RFXAP、TCRα或β恒定区、NKG2A、NKG2D、CD38、CD58、CD54、CD56、CIS、CBL-B、SOCS2、PD1、CTLA4、LAG3、TIM3和TIGIT。在具有用于位置选择性插入的相应的位点特异性靶向同源臂的情况下,其允许转基因在内源启动子下在所述位点处表达,或在包含于构建体中的外源启动子下表达。当将两个或更多个转基因插入选定位置处(例如,于CD38基因座中)时,将连接子序列,例如2A连接子或IRES置于任何两个转基因之间。2A连接子编码衍生自FMDV、ERAV、PTV-I或TaV的自我裂解肽(分别称为“F2A”、“E2A”、“P2A”和“T2A”),使得可由单次转译产生单独的蛋白质。在一些实施例中,构建体中包括绝缘体以降低转基因和/或外源启动子沉默的风险。外源启动子可以是CAG,或其它组成性、诱导性、时间特异性、组织特异性和/或细胞类型特异性的启动子,包括但不限于CMV、EF1α、PGK和UBC。

[0381] 能够引入特定和靶向DSB的可用核酸内切酶包括(但不限于)锌指核酸酶(ZFN)、转录活化因子样效应物核酸酶(TALEN)、RNA引导的CRISPR(簇聚的规则间隔的短回文重复序列)系统。另外,利用phiC31和Bxb1整合酶的DICE(双整合酶盒交换)系统也是一种用于靶向整合的有前景的工具。

[0382] ZFN是靶向核酸酶,其包含与锌指DNA结合结构域融合的核酸酶。“锌指DNA结合结构域”或“ZFBD”意指通过一个或多个锌指,以序列特异性方式结合DNA的多肽结构域。锌指是锌指结合结构域内具有约30个氨基酸的结构域,其结构通过锌离子的配位而稳定。锌指

的实例包括(但不限于)$C_2H_2$锌指、$C_3H$锌指和$C_4$锌指。“设计”的锌指结构域是一种不存在于自然界中的结构域,其设计/组成主要来源于合理准则,例如应用取代规则和计算机化算法来处理储存现有ZFP设计和结合数据的信息的数据库中的信息。参见例如美国专利第6,140,081号;第6,453,242号;和第6,534,261号;还参见WO 98/53058;WO 98/53059;WO98/53060;WO 02/016536和WO 03/016496。“所选择的”锌指结构域是一种在自然界中未发现的结构域,其产生主要来源于经验方法,例如噬菌体呈现、相互作用截留或杂交选择。ZFN更详细地描述于美国专利第7,888,121号和美国专利第7,972,854号中,其完整公开内容以引入的方式并入本文中。ZFN在所属领域中的最公认实例是FokI核酸酶与锌指DNA结合结构域的融合物。

[0383] TALEN为靶向核酸酶,其包含与TAL效应物DNA结合结构域融合的核酸酶。“转录活化因子样效应物DNA结合结构域”、“TAL效应物DNA结合结构域”或“TALE DNA结合结构域”意指负责TAL效应蛋白与DNA结合的TAL效应蛋白的多肽结构域。TAL效应蛋白是由黄单胞菌属(Xanthomonas)植物病原体在感染期间分泌。这些蛋白质进入植物细胞的核,经由其DNA结合结构域结合效应子特异性DNA序列,并且经由其转录活化结构域在这些序列处激活基因转录。TAL效应物DNA结合结构域特异性取决于不完全的34个氨基酸重复序列的效应子可变数目,其包含所选重复位置处的多态性,称为重复可变双残基(RVD)。TALEN更详细地描述于美国专利申请第2011/0145940号,所述申请以引用的方式并入本文中。TALEN在所属领域中的最公认实例是FokI核酸酶与TAL效应物DNA结合结构域的融合多肽。

[0384] 用于本发明方法中的靶向核酸酶的另一实例为靶向Spo11核酸酶,其为一种包含Spo11多肽的多肽,所述多肽具有与DNA结合结构域,例如对所关注DNA序列具有特异性的锌指DNA结合结构域、TAL效应物DNA结合结构域等融合的核酸酶活性。参见例如美国申请第61/555,857号,其公开内容以引入的方式并入本文中。

[0385] 适合于本发明的靶向核酸酶的其它实例包括(但不限于)Bxb1、phiC31、R4、PhiBT1和Wβ/SPBc/TP901-1,不论单独地或组合地使用。

[0386] 靶向核酸酶的其它非限制性实例包括天然存在的核酸酶和重组核酸酶;来自包括以下的家族的CRISPR相关核酸酶:cas、cpf、cse、csy、csn、csd、cst、csh、csa、csm和cmr;限制性核酸内切酶;大范围核酸酶;归巢核酸内切酶等。

[0387] 作为一示例性实例,CRISPR/Cas9需要两种主要组分:(1)Cas9核酸内切酶和(2)crRNA-tracrRNA复合物。当共表达时,所述两种组分形成募集到标靶DNA序列的复合物,所述序列包含PAM和靠近PAM的接种区域。crRNA和tracrRNA可以组合形成嵌合向导RNA(gRNA)以引导Cas9靶向所选序列。这两种组分然后可以经由转染或转导递送到哺乳动物细胞。当使用CRISPR/Cpf系统时,其需要Cpf核酸内切酶(Cpf1、MAD7和所属领域中已知的许多)和(2)通常不需要tracrRNA以引导Cpf核酸内切酶靶向所选序列的gNA。

[0388] DICE介导的插入是利用一对重组酶(例如phiC31和Bxb1)来提供外源DNA的单向整合,其严格局限于每种酶自身的小attB和attP识别位点。由于这些att靶点并非天然存在于哺乳动物基因组中,因此必须首先将其引入基因组中的所期望整合位点。参见例如美国申请公开案第2015/0140665号,其公开内容以引入的方式并入本文中。

[0389] 本发明的一个方面提供一种构建体,其包含一种或多种用于靶向基因组整合的外源多核苷酸。在一个实施例中,所述构建体进一步包含对所期望的整合位点具有特异性的

一对同源臂，并且靶向整合的方法包含向细胞中引入所述构建体以允许细胞宿主酶机制实现定点同源重组。在另一实施例中，细胞中的靶向整合的方法包含向细胞中引入包含一种或多种外源多核苷酸的构建体，以及向细胞中引入包含对所期望的整合位点具有特异性的DNA结合结构域的ZFN表达盒以实现ZFN介导的插入。在又一实施例中，细胞中的靶向整合的方法包含向细胞中引入包含一种或多种外源多核苷酸的构建体，以及向细胞中引入包含对所期望的整合位点具有特异性的DNA结合结构域的TALEN表达盒以实现TALEN介导的插入。在另一实施例中，细胞中的靶向整合的方法包含向细胞中引入包含一种或多种外源多核苷酸的构建体，向细胞中引入Cas9表达盒和包含对所期望的整合位点具有特异性的向导序列的gRNA以实现Cas9介导的插入。在再一实施例中，细胞中的靶向整合的方法包含将包含一对DICE重组酶的一个或多个att位点的构建体引入细胞中的所期望的整合位点、向细胞中引入包含一种或多种外源多核苷酸的构建体，和引入DICE重组酶的表达盒以实现DICE介导的靶向整合。

[0390] 有望用于靶向整合的位点包括(但不限于)安全港基因座或基因组安全港(GSH)，其是人类基因组的基因内或基因外区域，在理论上，所述区域能够容纳新整合的DNA的可预测表达而不会对宿主细胞或生物体产生副作用。适用的安全港必须准许足够的转基因表达以产生所期望水平的载体编码的蛋白质或非编码RNA。安全港还不得使细胞容易发生恶性转化，也不得改变细胞功能。如果整合位点是潜在的安全港基因座，那么理想的是需要满足包括(但不限于)以下的准则：如通过序列注释所判断，调控元件或基因没有中断；是基因密集区域中的基因间区域，或沿相反方向转录的两种基因之间的汇聚位置；保持距离以使载体编码的转录活化因子与相邻基因(特别是癌症相关基因和微RNA基因)的启动子之间的长程相互作用的可能性最小化；并且具有明显普遍存在的转录活性，如通过按较宽空间和时间表达的序列标签(EST)表达谱所反映，其指示普遍存在的转录活性。这个后一特征在干细胞中尤其重要，其中在分化期间，染色质重塑通常引起一些基因座的沉默和其它基因座的潜在激活。在适合于外源插入的区域内，选择用于插入的确切基因座应该不含重复元件和保守序列且可以针对其容易地设计出用于扩增同源臂的引物。

[0391] 适用于人类基因组编辑或具体地说靶向整合的位点包括(但不限于)腺相关病毒位点1(AAVS1)、趋化因子(CC基序)受体5(CCR5)基因座和小鼠ROSA26基因座的人类直系同源物。另外，小鼠H11基因座的人类直系同源物也可以是使用本文所公开的靶向整合组合物和方法进行插入的合适位点。另外，也可以使用胶原蛋白和HTRP基因座作为靶向整合的安全港。然而，每个所选位点的验证已显示为必需的，特别是在特异性整合事件的干细胞中，并且通常需要优化插入策略，包括启动子选择、外源基因序列和排列，以及构建体设计。

[0392] 对于靶向插入/缺失，编辑位点通常包含于旨在破坏其表达和/或功能的内源基因中。在一个实施例中，包含靶向插入/缺失的内源基因与免疫反应调控和调节相关。在一些其它实施例中，包含靶向插入/缺失的内源基因与以下相关：靶向模式、受体、信号传导分子、转录因子、药物标靶候选物、免疫反应调控和调节，或抑制干细胞和/或祖细胞和其衍生细胞的移植、运输、归巢、活力、自我更新、存留和/或存活的蛋白质。

[0393] 因此，本发明的一个方面提供一种在所选基因座中进行靶向整合的方法，所述基因座包括基因组安全港或已知或证实安全并且经充分调控以用于连续或暂时基因表达的预选基因座，例如如本文所提供的B2M、TAP1、TAP2、TAP相关蛋白、TRAC或CD38基因座。在一

个实施例中，用于靶向整合方法的基因组安全港包含一个或多个所期望的整合位点，包含AAVS1、CCR5、ROSA26、胶原蛋白、HTRP、H11、β-2微球蛋白、CD38、GAPDH、TCR或RUNX1，或满足基因组安全港准则的其它基因座。在一些实施例中，靶向整合是在期望作为整合的结果的基因敲减或基因敲除的一个或多个基因座中，其中这类基因座包括(但不限于)B2M、TAP1、TAP2、TAP相关蛋白、NLRC5、CIITA、RFXANK、CIITA、RFX5、RFXAP、TCRα或β恒定区、NKG2A、NKG2D、CD38、CD58、CD54、CD56、CIS、CBL-B、SOCS2、PD1、CTLA4、LAG3、TIM3和TIGIT。

[0394] 在一个实施例中，细胞中靶向整合的方法包含向细胞中引入包含一种或多种外源多核苷酸的构建体，以及引入包含对所期望的整合位点具有特异性的一对同源臂和一个或多个外源序列的构建体，以通过细胞宿主酶机制实现位点特异性同源重组，其中所期望的整合位点包含AAVS1、CCR5、ROSA26、胶原蛋白、HTRP、H11、GAPDH、RUNX1、B2M、TAP1、TAP2、TAP相关蛋白、NLRC5、CIITA、RFXANK、CIITA、RFX5、RFXAP、TCRα或β恒定区、NKG2A、NKG2D、CD38、CD58、CD54、CD56、CIS、CBL-B、SOCS2、PD1、CTLA4、LAG3、TIM3或TIGIT。

[0395] 在另一实施例中，细胞中的靶向整合的方法包含向细胞中引入包含一种或多种外源多核苷酸的构建体，以及向细胞中引入包含对所期望的整合位点具有特异性的DNA结合结构域的ZFN表达盒，以实现ZFN介导的插入，其中所期望的整合位点包含AAVS1、CCR5、ROSA26、胶原蛋白、HTRP、H11、GAPDH、RUNX1、B2M、TAP1、TAP2、TAP相关蛋白、NLRC5、CIITA、RFXANK、CIITA、RFX5、RFXAP、TCRα或β恒定区、NKG2A、NKG2D、CD38、CD58、CD54、CD56、CIS、CBL-B、SOCS2、PD1、CTLA4、LAG3、TIM3或TIGIT。在又一实施例中，细胞中的靶向整合的方法包含向细胞中引入包含一种或多种外源多核苷酸的构建体，以及向细胞中引入包含对所期望的整合位点具有特异性的DNA结合结构域的TALEN表达盒，以实现TALEN介导的插入，其中所期望的整合位点包含AAVS1、CCR5、ROSA26、胶原蛋白、HTRP、H11、GAPDH、RUNX1、B2M、TAP1、TAP2、TAP相关蛋白、NLRC5、CIITA、RFXANK、CIITA、RFX5、RFXAP、TCRα或β恒定区、NKG2A、NKG2D、CD38、CD58、CD54、CD56、CIS、CBL-B、SOCS2、PD1、CTLA4、LAG3、TIM3或TIGIT。在另一实施例中，细胞中的靶向整合的方法包含向细胞中引入包含一种或多种外源多核苷酸的构建体，向细胞中引入Cas9表达盒以及包含对所期望的整合位点具有特异性的向导序列的gRNA，以实现Cas9介导的插入，其中所期望的整合位点包含AAVS1、CCR5、ROSA26、胶原蛋白、HTRP、H11、GAPDH、RUNX1、B2M、TAP1、TAP2、TAP相关蛋白、NLRC5、CIITA、RFXANK、CIITA、RFX5、RFXAP、TCRα或β恒定区、NKG2A、NKG2D、CD38、CD58、CD54、CD56、CIS、CBL-B、SOCS2、PD1、CTLA4、LAG3、TIM3或TIGIT。在再一实施例中，细胞中的靶向整合的方法包含将包含一对DICE重组酶的一个或多个att位点引入细胞中的所期望的整合位点，向细胞中引入包含一种或多种外源多核苷酸的构建体，以及引入DICE重组酶的表达盒，以实现DICE介导的靶向整合，其中所期望的整合位点包含AAVS1、CCR5、ROSA26、胶原蛋白、HTRP、H11、GAPDH、RUNX1、B2M、TAP1、TAP2、TAP相关蛋白、NLRC5、CIITA、RFXANK、CIITA、RFX5、RFXAP、TCRα或β恒定区、NKG2A、NKG2D、CD38、CD58、CD54、CD56、CIS、CBL-B、SOCS2、PD1、CTLA4、LAG3、TIM3或TIGIT。

[0396] 此外，如本文所提供，用于在安全港中进行靶向整合的上述方法用于插入所关注的任何多核苷酸，例如编码以下的多核苷酸：安全开关蛋白质、靶向模式、受体、信号传导分子、转录因子、药学活性蛋白质和肽、药物标靶候选物，和促进干细胞和/或祖细胞的移植、运输、归巢、活力、自我更新、存留和/或存活的蛋白质。在一些其它实施例中，包含一种或多种外源多核苷酸的构建体进一步包含一个或多个标记物基因。在一个实施例中，本发明的

构建体中的外源多核苷酸是编码安全开关蛋白质的自杀基因。适用于诱导细胞死亡的自杀基因系统包括(但不限于)胱天蛋白酶9(或胱天蛋白酶3或7)和AP1903;胸苷激酶(TK)和苷昔洛韦(ganciclovir)(GCV);胞嘧啶脱氨酶(CD)和5-氟胞嘧啶(5-FC)。另外,一些自杀基因系统对细胞类型具有特异性,例如使用B细胞分子CD20对T淋巴细胞进行基因修饰允许其在给予mAb利妥昔单抗后消除。此外,当基因工程改造的细胞暴露于西妥昔单抗时,含有由西妥昔单抗识别的抗原决定基的经修饰EGFR可以用于耗尽所述细胞。因此,本发明的一个方面提供一种靶向整合一个或多个编码安全开关蛋白质的自杀基因的方法,所述安全开关蛋白质选自胱天蛋白酶9(胱天蛋白酶3或7)、胸苷激酶、胞嘧啶脱氨酶、经修饰EGFR和B细胞CD20。

[0397] 在一些实施例中,通过本文中的方法整合的一种或多种外源多核苷酸是由包含于用于靶向整合的构建体中的可操作连接的外源启动子驱动。所述启动子可以是诱导性的或构造性的,且可以是时间特异性、组织特异性或细胞类型特异性的。适用于本发明方法的构建性启动子包括(但不限于)巨细胞病毒(CMV)、延伸因子1α(EF1α)、磷酸甘油酸激酶(PGK)、杂交CMV增强子/鸡β-肌动蛋白(CAG)和泛素C(UBC)启动子。在一个实施例中,外源启动子是CAG。

[0398] 通过本文中的方法整合的外源多核苷酸可以由宿主基因组中的内源启动子在整合位点处驱动。在一个实施例中,本发明的方法是用于使一种或多种外源多核苷酸靶向整合于细胞基因组中的AAVS1基因座。在一个实施例中,至少一种整合的多核苷酸是由内源性AAVS1启动子驱动。在另一实施例中,本发明的方法是用于靶向整合于细胞基因组中的ROSA26基因座。在一个实施例中,至少一种整合的多核苷酸是由内源性ROSA26启动子驱动。在再一实施例中,本发明的方法是用于靶向整合于细胞基因组中的H11基因座。在一个实施例中,至少一种整合的多核苷酸是由内源性H11启动子驱动。在另一实施例中,本发明的方法是用于靶向整合于细胞基因组中的胶原蛋白基因座。在一个实施例中,至少一种整合的多核苷酸是由内源性胶原蛋白启动子驱动。在再一实施例中,本发明的方法是用于靶向整合于细胞基因组中的HTRP基因座。在一个实施例中,至少一种整合的多核苷酸是由内源性HTRP启动子驱动。理论上,只有正确插入所期望位置才能实现由内源性启动子驱动的外源基因的基因表达。

[0399] 在一些实施例中,用于靶向整合方法的包含于构建体中的一种或多种外源多核苷酸是由一个启动子驱动。在一些实施例中,构建体包含一个或多个位于由相同启动子驱动的两个相邻多核苷酸之间的连接子序列,以使得各部分之间的物理间距更大并且使酶机制的可行性最大化。连接子序列的连接肽可以由为了使各部分(外源多核苷酸,和/或由其编码的蛋白质或肽)之间产生物理间距而选择的氨基酸组成,视相关功能而定,其较柔软或较硬。连接子序列可以通过蛋白酶裂解或以化学方式裂解以产生单独的部分。连接子中的酶裂解位点的实例包括蛋白水解酶,例如肠激酶、因子Xa、胰蛋白酶、胶原蛋白酶和凝血酶的裂解位点。在一些实施例中,所述蛋白酶为由宿主天然产生的蛋白酶或其通过外源引入。替代地,连接子中的裂解位点可以是在暴露于所选化学物质(例如溴化氰、羟胺或低pH)后能够裂解的位点。任选的连接子序列可以服务于除提供裂解位点以外的目的。连接子序列应允许所述部分相对于另一相邻部分的有效定位,以便所述部分正确地发挥作用。连接子还可以是长度足以防止部分之间的任何空间位阻的简单氨基酸序列。另外,连接子序列可以

实现转译后修饰,包括(但不限于)例如磷酸化位点、生物素化位点、硫酸化位点、γ-羧基化位点等。在一些实施例中,连接子序列是柔软的,以便使生物活性肽不能保持单一非所要的构形。连接子可以主要包含具有小侧链的氨基酸,例如甘氨酸、丙氨酸和丝氨酸,以提供柔性。在一些实施例中,约80%或90%或更多的连接子序列包含甘氨酸、丙氨酸或丝氨酸残基,特别是甘氨酸和丝氨酸残基。在若干实施例中,G4S连接肽将融合蛋白的末端处理结构域和核酸内切酶结构域分开。在其它实施例中,2A连接子序列允许单次转译产生两种单独的蛋白质。可以容易地凭经验鉴别合适的连接子序列。另外,连接子序列的合适大小和序列也可以通过常规计算机建模技术确定。在一个实施例中,连接子序列编码自我裂解肽。在一个实施例中,自我裂解肽为2A。在一些其它实施例中,连接子序列提供内部核糖体入口序列(IRES)。在一些实施例中,任何两个相邻的连接子序列是不同的。

[0400] 将包含用于靶向整合的外源多核苷酸的构建体引入细胞中的方法可以使用本身已知的将基因转移到细胞的方法实现。在一个实施例中,构建体包含病毒载体的骨架,所述病毒载体例如腺病毒载体、腺相关病毒载体、逆转录病毒载体、慢病毒载体、仙台病毒载体。在一些实施例中,质粒载体用于将外源多核苷酸递送到靶细胞和/或使外源多核苷酸在靶细胞(例如pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pcDNAI/Neo)等等中表达。在一些其它实施例中,游离型载体用于将外源多核苷酸递送到靶细胞。在一些实施例中,重组腺相关病毒(rAAV)可用于基因工程改造以通过同源重组来引入插入、缺失或取代。不同于慢病毒,rAAV不会整合到宿主基因组中。另外,相较于常规靶向质粒的转染,游离型rAAV载体以高得多的速率介导同源定向的基因靶向。在一些实施例中,AAV6或AAV2载体用于在iPSC的基因组中的标靶位点处引入插入、缺失或取代。在一些实施例中,使用本文中的方法和组合物获得的基因组修饰的iPSC和其衍生细胞包含表1中所列的至少一种基因型。

[0401] III.获得和维持基因组工程改造的iPSC的方法

[0402] 本发明提供一种获得和维持基因组工程改造的iPSC的方法,其包含在一个或多个所期望的位点处的一个或多个靶向编辑,其中所述靶向编辑在扩增的基因组工程改造的iPSC或iPSC衍生的非多能细胞中在相应的所选编辑位点处保持完整和功能。所述靶向编辑将插入、缺失和/或取代引入基因组iPSC和其衍生细胞中,即,在所选位点引入靶向整合和/或插入/缺失。与直接工程改造患者源的外周血起源的原代效应细胞相比,通过编辑和分化如本文所提供的iPSC获得基因组工程改造的iPSC衍生的许多益处包括(但不限于):工程改造的效应细胞的来源不受限制;无需重复操纵效应细胞,尤其在涉及多种工程改造的模式时;所获得的效应细胞因具有伸长端粒和经历较少耗竭而再生;效应细胞群关于编辑位点、拷贝数和缺乏等位基因变化形式、随机突变和表达多样化是均匀的,这主要是由于在如本文所提供的工程改造的iPSC中能够进行克隆选择。

[0403] 在特定实施例中,包含在一个或多个所选位点处的一个或多个靶向编辑的基因组工程改造的iPSC作为单一细胞在表2中所示的作为命运维持培养基(Fate Maintenance Medium;FMM)的细胞培养基中维持、传代和扩增持续延长的时段,其中所述iPSC在所选位点处保留靶向编辑和功能修饰。培养基的组分可以表2中所示的最优范围内的量存在于培养基中。FMM中培养的iPSC已显示继续维持其未分化和基础或初始概况;基因组稳定性,而不需要培养物清洗或选择;并且通过活体外类胚胎体或单层分化(不形成类胚胎体);和活体内畸胎瘤形成的分化容易产生所有三种体细胞谱系。参见例如美国申请第61/947,979号,

其公开内容以引入的方式并入本文中。

[0404] 表2:用于iPSC重编程和维持的示例性培养基

[0405]

| 常规 hESC 培养基（Conv.） | 命运重编程培养基（FRM） | 命运维持培养基（FMM） |
|---|---|---|
| DMEM/F12 | DMEM/F12 | DMEM/F12 |
| 基因敲除血清替代物（20%） | 基因敲除血清替代物（20%） | 基因敲除血清替代物（20%） |
| | N2 | |
| | B27 | |
| 谷氨酰胺 | 谷氨酰胺 | 谷氨酰胺（1×） |
| 非必需氨基酸（1×） | 非必需氨基酸（1×） | 非必需氨基酸（1×） |
| β-巯基乙醇（100 μM） | β-巯基乙醇（100 μM） | β-巯基乙醇（100 μM） |
| bFGF（0.2-50 ng/mL） | bFGF（2-500 ng/mL） | bFGF（2-500 ng/mL） |
| | LIF（0.2-50 ng/mL） | LIF（0.2-50 ng/mL） |
| | 噻唑维(Thiazovivin)(0.1-25 μM) | 噻唑维（0.1-25 μM） |
| | PD0325901（0.005-2 μM） | PD0325901（0.005-2 μM） |
| | CHIR99021（0.02-5 μM） | CHIR99021（0.02-5 μM） |
| | SB431542（0.04-10 μM） | |
| 与 MEF 饲养细胞组合 | 无饲养层，与 Matrigel™或玻璃连结蛋白组合 | |

[0406] 在一些实施例中,包含一种或多种靶向整合和/或插入/缺失的基因组工程改造的iPSC在包含MEK抑制剂、GSK3抑制剂和ROCK抑制剂并且不含或基本上不含TGFβ受体/ALK5抑制剂的培养基中维持、传代和扩增,其中所述iPSC在所选位点保留完整和功能性靶向编辑。

[0407] 本发明的另一方面提供一种产生基因组工程改造的iPSC的方法,其通过iPSC的靶向编辑;或通过首先利用靶向编辑产生基因组工程改造的非多能细胞,并且然后将所选/分离的基因组工程改造的非多能细胞重编程,以获得包含与非多能细胞相同的靶向编辑的iPSC。本发明的另一方面提供基因组工程改造的非多能细胞,其通过将靶向整合和/或靶向插入/缺失引入细胞中而同时经历重编程,其中所接触的非多能细胞处于足以用于重编程的条件下,并且其中重编程的条件包含使非多能细胞与一种或多种重编程因子和小分子接触。在同时进行基因组工程改造和重编程的方法的各种实施例中,可以在起始重编程之前或基本上同时,通过使非多能细胞与一种或多种重编程因子和小分子接触而将靶向整合和/或靶向插入/缺失引入非多能细胞中。

[0408] 在一些实施例中,为了对非多能细胞同时进行基因组工程改造和重编程,还可以在通过使非多能细胞与一种或多种重编程因子和小分子接触而起始多日重编程工艺之后,将靶向整合和/或插入/缺失引入非多能细胞中,并且其中携带构建体的载体是在重编程细胞呈现一种或多种内源多能基因(包括但不限于SSEA4、Tra181和CD30)的稳定表达之前引入。

[0409] 在一些实施例中,通过使非多能细胞与至少一种重编程因子和任选的TGFβ受体/ALK抑制剂、MEK抑制剂、GSK3抑制剂与ROCK抑制剂的组合(FRM;表2)接触来起始重编程。在一些实施例中,通过上述任何方法进行的基因组工程改造的iPSC进一步使用包含MEK抑制剂、GSK3抑制剂与ROCK抑制剂的组合(FMM;表2)的混合物来维持和扩增。

[0410] 在产生基因组工程改造的iPSC的方法的一些实施例中,所述方法包含:通过将一种或多种靶向整合和/或插入/缺失引入iPSC中来基因组工程改造iPSC,以获得具有至少一种表1中所列的基因型的基因组工程改造的iPSC。替代地,产生基因组工程改造的iPSC的方法包含:(a)将一个或多个靶向编辑引入非多能细胞中,以获得包含位于所选位点的靶向整

合和/或插入/缺失的基因组工程改造的非多能细胞，和(b)使基因组工程改造的非多能细胞与一种或多种重编程因子和任选的小分子组合物接触，以获得包含位于所选位点的靶向整合和/或插入/缺失的基因组工程改造的iPSC，所述小分子组合物包含TGFβ受体/ALK抑制剂、MEK抑制剂、GSK3抑制剂和/或ROCK抑制剂。替代地，产生基因组工程改造的iPSC的方法包含：(a)使非多能细胞与一种或多种重编程因子和任选的小分子组合物接触，以起始非多能细胞的重编程，所述小分子组合物包含TGFβ受体/ALK抑制剂、MEK抑制剂、GSK3抑制剂和/或ROCK抑制剂；(b)将一种或多种靶向整合和/或插入/缺失引入用于基因组工程改造的重编程非多能细胞中；和(c)获得包含位于所选位点的靶向整合和/或插入/缺失的基因组工程改造的iPSC。上述任一种方法可进一步包含单细胞分选基因组工程改造的iPSC以获得克隆iPSC。通过克隆扩增这种基因组工程改造的iPSC，产生一种包含单细胞分选和扩增的克隆工程改造iPSC的主细胞库，所述iPSC具有至少一种如本文表1中所提供的表型。所述主细胞库随后冷冻保存，提供用于额外iPSC工程改造的平台和用于制造现成的、工程改造的、均质的细胞治疗产品的可再生来源，所述细胞治疗产品的组成明确限定且均匀，并且可以具有成本效益的方式大规模地批量生产。

[0411] 重编程因子选自由以下组成的群组：OCT4、SOX2、NANOG、KLF4、LIN28、C-MYC、ECAT1、UTF1、ESRRB、SV40LT、HESRG、CDH1、TDGF1、DPPA4、DNMT3B、ZIC3、L1TD1和其任何组合，如PCT/US2015/018801和PCT/US16/57136中所公开，其公开内容以引入的方式并入本文中。一种或多种重编程因子可以呈多肽形式。重编程因子也可以呈多核苷酸形式，并且因此通过载体(例如，逆转录病毒、仙台病毒、腺病毒、游离基因体、质粒和小环)引入非多能细胞中。在特定实施例中，通过慢病毒载体引入编码至少一种重编程因子的一种或多种多核苷酸。在一些实施例中，通过游离型载体引入一种或多种多核苷酸。在各种其它实施例中，通过仙台病毒载体引入一种或多种多核苷酸。在一些实施例中，通过质粒的组合引入一种或多种多核苷酸。参见例如美国申请第62/571,105号，其公开内容以引入的方式并入本文中。

[0412] 在一些实施例中，非多能细胞是利用包含不同外源多核苷酸和/或不同启动子的多个构建体，通过用于在相同或不同的所选位点进行靶向整合的多种载体转移。这些外源多核苷酸可以包含自杀基因，或编码靶向模式、受体、信号传导分子、转录因子、药学活性蛋白质和肽、药物标靶候选物的基因，或编码蛋白质的基因，所述蛋白质促进iPSC或其衍生细胞的移植、运输、归巢、活力、自我更新、存留和/或存活。在一些实施例中，外源多核苷酸编码RNA，包括但不限于siRNA、shRNA、miRNA和反义核酸。这些外源多核苷酸可以由一个或多个启动子驱动，所述启动子选自由以下组成的群组：组成性启动子、诱导性启动子、时间特异性启动子和组织或细胞类型特异性启动子。因此，当在例如在诱导剂的存在下或在特定分化细胞类型中激活启动子的条件下时，多核苷酸是可表达的。在一些实施例中，多核苷酸在iPSC和/或在由iPSC分化的细胞中表达。在一个实施例中，一个或多个自杀基因是由组成性启动子驱动，例如胱天蛋白酶-9由CAG驱动。可以同时或连续将包含不同外源多核苷酸和/或不同启动子的这些构建体转移到非多能细胞中。经历多个构建体的靶向整合的非多能细胞可同时接触一种或多种重编程因子以与基因工程改造同时起始重编程，从而获得在同一细胞池中包含多个靶向整合的基因组工程改造的iPSC。因此，这种稳固方法实现同时重编程和工程改造策略，以衍生具有整合到一个或多个所选的标靶位点的多种模式的克隆的基因组工程改造的hiPSC。在一些实施例中，使用本文中的方法和组合物获得的基因组修

饰的iPSC和其衍生细胞包含表1中所列的至少一种基因型。

[0413] IV.通过分化基因组工程改造的iPSC获得基因工程改造的效应细胞的方法

[0414] 本发明的另一方面提供一种通过畸胎瘤形成活体内分化基因组工程改造的iPSC的方法,其中由基因组工程改造的iPSC活体内衍生的分化细胞保留完整和功能性靶向编辑,包括在所期望的位点处的靶向整合和/或插入/缺失。在一些实施例中,基因组工程改造的iPSC经由畸胎瘤活体内衍生的分化细胞包含在一个或多个所期望的位点处整合的一个或多个诱导性自杀基因,所述位点包含AAVS1、CCR5、ROSA26、胶原蛋白、HTRP、H11、β-2微球蛋白、CD38、GAPDH、TCR或RUNX1,或满足基因组安全港准则的其它基因座。在一些其它实施例中,基因组工程改造的iPSC经由畸胎瘤体内衍生的分化细胞包含编码靶向模式或编码促进干细胞和/或祖细胞的运输、归巢、活力、自我更新、存留和/或存活的蛋白质的多核苷酸。在一些实施例中,包含一个或多个诱导性自杀基因的基因组工程改造的iPSC经由畸胎瘤体内衍生的分化细胞,在与免疫反应调控和介导相关的内源基因中进一步包含一个或多个插入/缺失。在一些实施例中,插入/缺失包含于一个或多个内源检查点基因中。在一些实施例中,插入/缺失包含于一个或多个内源T细胞受体基因中。在一些实施例中,插入/缺失包含于一个或多个内源MHC I类抑制基因中。在一些实施例中,插入/缺失包含于与主要组织相容性复合物相关的一个或多个内源基因中。在一些实施例中,插入/缺失包含于一个或多个内源基因中,所述内源基因包括(但不限于)AAVS1、CCR5、ROSA26、胶原蛋白、HTRP、H11、GAPDH、RUNX1、B2M、TAP1、TAP2、TAP相关蛋白、NLRC5、CIITA、RFXANK、CIITA、RFX5、RFXAP、TCRα或β恒定区、NKG2A、NKG2D、CD38、CD58、CD54、CD56、CIS、CBL-B、SOCS2PD1、CTLA4、LAG3、TIM3或TIGIT。在一个实施例中,在所选位点处包含一种或多种外源多核苷酸的基因组工程改造的iPSC在B2M(β-2微球蛋白)编码基因中进一步包含靶向编辑。

[0415] 在特定实施例中,包含如本文所提供的一种或多种基因修饰的基因组工程改造的iPSC用于活体外衍生造血细胞谱系或任何其它特定细胞类型,其中衍生的非多能细胞保留功能性基因修饰,包括在所选位点处的靶向编辑。在一些实施例中,用于活体外衍生造血细胞谱系或任何其它特定细胞类型的基因组工程改造的iPSC为冷冻保存且在其使用前立刻解冻的主细胞库细胞。在一个实施例中,基因组工程改造的iPSC衍生细胞包括(但不限于)具有永久性生血内皮细胞(HE)潜能的中胚层细胞、永久性HE、CD34造血细胞、造血干细胞和祖细胞、造血多潜能祖细胞(MPP)、T细胞祖细胞、NK细胞祖细胞、骨髓细胞、嗜中性粒细胞祖细胞、T细胞、NKT细胞、NK细胞、B细胞、嗜中性粒细胞、树突状细胞和巨噬细胞,其中衍生自基因组工程改造的iPSC的这些细胞保留功能性基因修饰,包括在所期望的位点处的靶向编辑。

[0416] 用于获得iPSC衍生的造血细胞谱系的适用分化方法和组合物包括例如国际申请第PCT/US2016/044122号中描绘的那些分化方法和组合物,所述申请的公开内容以引入的方式并入本文中。如所提供,用于产生造血细胞谱系的方法和组合物是在无血清、无饲养层和/或无基质的条件下并且在可扩展和单层培养平台中在无需EB形成的情况下通过衍生自多能干细胞(包括hiPSC)的永久性生血内皮细胞(HE)。可以根据所提供的方法分化的细胞的范围是从多能干细胞到专门化为特定末端分化细胞和转分化细胞的祖细胞、和到直接转向造血命运而不经历多能中间体的多种谱系细胞。类似地,通过分化干细胞而产生的细胞的范围是从多潜能干细胞或祖细胞到末端分化细胞,以及到所有中间造血细胞谱系。

[0417] 用于在单层培养中分化和扩增来自多能干细胞的造血谱系细胞的方法包含使多能干细胞与BMP路径活化剂和任选的bFGF接触。如所提供，无需由多能干细胞形成类胚胎体便获得并且扩增多能干细胞衍生的中胚层细胞。然后使中胚层细胞与BMP路径活化剂、bFGF和WNT路径活化剂接触，以获得具有永久性生血内皮细胞(HE)潜能的扩增中胚层细胞，而不会由多能干细胞形成类胚胎体。通过随后与bFGF和任选的ROCK抑制剂和/或WNT路径活化剂接触，将具有永久性HE潜能的中胚层细胞分化成永久性HE细胞，其在分化期间还得到扩增。

[0418] 本文所提供的用于获得造血谱系细胞的方法优于EB介导的多能干细胞分化，原因在于：EB形成产生了适度到最低限度的细胞扩增；不允许单层培养，而单层培养对于需要所述细胞在群体中均匀扩增和均匀分化的许多应用至关重要；并且费力且效率低。

[0419] 所提供的单层分化平台促进向永久性生血内皮细胞分化，从而使得衍生造血干细胞和分化后代，例如T细胞、B细胞、NKT细胞和NK细胞。单层分化策略将增强的分化效率与大规模扩增组合，实现了在不同治疗应用中递送治疗相关数目个多能干细胞衍生的造血细胞。此外，使用本文所提供的方法进行的单层培养产生功能性造血谱系细胞，其实现了全范围的活体外分化、离体调节，和活体内长期造血自我更新、重建和移植。如所提供，iPSC衍生的造血谱系细胞包括(但不限于)永久性生血内皮细胞、造血多潜能祖细胞、造血干细胞和祖细胞、T细胞祖细胞、NK细胞祖细胞、T细胞、NK细胞、NKT细胞、B细胞、巨噬细胞和嗜中性粒细胞。

[0420] 用于引导多能干细胞分化成永久性造血谱系细胞的方法，其中所述方法包含：(i)使多能干细胞与包含BMP活化剂和任选的bFGF的组合物接触，以起始多能干细胞分化成和扩增中胚层细胞；(ii)使所述中胚层细胞与包含BMP活化剂、bFGF和GSK3抑制剂的组合物接触，以起始中胚层细胞分化成和扩增具有永久性HE潜能的中胚层细胞，其中所述组合物任选地不含TGFβ受体/ALK抑制剂；(iii)使具有永久性HE潜能的中胚层细胞与组合物接触，以起始具有永久性生血内皮细胞潜能的多能干细胞衍生的中胚层细胞分化成和扩增永久性生血内皮细胞，所述组合物包含ROCK抑制剂；一种或多种选自由以下组成的群组的生长因子和细胞因子：bFGF、VEGF、SCF、IGF、EPO、IL6和IL11；和任选的Wnt路径活化剂，其中所述组合物任选地不含TGFβ受体/ALK抑制剂。

[0421] 在一些实施例中，所述方法进一步包含使多能干细胞与包含MEK抑制剂、GSK3抑制剂和ROCK抑制剂的组合物接触，以接种和扩增多能干细胞，其中所述组合物不含TGFβ受体/ALK抑制剂。在一些实施例中，多能干细胞为iPSC、或初始iPSC、或包含一种或多种遗传印记的iPSC；并且iPSC中所包含的一种或多种遗传印记保留于由其分化的造血细胞中。在用于引导多能干细胞分化成造血谱系细胞的方法的一些实施例中，多能干细胞分化成造血谱系细胞缺乏产生类胚胎体，并且呈单层培养形式。

[0422] 在上述方法的一些实施例中，所获得的多能干细胞衍生的永久性生血内皮细胞是CD34+。在一些实施例中，所获得的永久性生血内皮细胞为CD34+CD43-。在一些实施例中，永久性生血内皮细胞为CD34+CD43-CXCR4-CD73-。在一些实施例中，永久性生血内皮细胞为CD34+CXCR4-CD73-。在一些实施例中，永久性生血内皮细胞为CD34+CD43-CD93-。在一些实施例中，永久性生血内皮细胞为CD34+CD93-。

[0423] 在上述方法的一些实施例中，所述方法进一步包含(i)使多能干细胞衍生的永久性生血内皮细胞与组合物接触，以起始永久性生血内皮细胞分化成前T细胞祖细胞，所述组

合物包含ROCK抑制剂;一种或多种选自由以下组成的群组的生长因子和细胞因子:VEGF、bFGF、SCF、Flt3L、TPO和IL7;和任选的BMP活化剂;和任选地,(ii)使前T细胞祖细胞与组合物接触,以起始前T细胞祖细胞分化成T细胞祖细胞或T细胞,所述组合物包含一种或多种选自由SCF、Flt3L和IL7组成的群组的生长因子和细胞因子,但不含VEGF、bFGF、TPO、BMP活化剂和ROCK抑制剂中的一种或多种。在所述方法的一些实施例中,多能干细胞衍生的T细胞祖细胞为CD34+CD45+CD7+。在所述方法的一些实施例中,多能干细胞衍生的T细胞祖细胞为CD45+CD7+。

[0424] 在用于引导多能干细胞分化成造血谱系细胞的上述方法的又一些实施例中,所述方法进一步包含:(i)使多能干细胞衍生的永久性生血内皮细胞与组合物接触,以起始永久性生血内皮细胞分化成前NK细胞祖细胞,所述组合物包含ROCK抑制剂;一种或多种选自由以下组成的群组的生长因子和细胞因子:VEGF、bFGF、SCF、Flt3L、TPO、IL3、IL7和IL15;和任选的BMP活化剂;和任选地,(ii)使多能干细胞衍生的前NK细胞祖细胞与组合物接触,以起始前NK祖细胞分化成NK细胞祖细胞或NK细胞,所述组合物包含一种或多种选自由以下组成的群组的生长因子和细胞因子:SCF、Flt3L、IL3、IL7和IL15,其中培养基不含以下中的一种或多种:VEGF、bFGF、TPO、BMP活化剂和ROCK抑制剂。在一些实施例中,多能干细胞衍生的NK祖细胞为CD3-CD45+CD56+CD7+。在一些实施例中,多能干细胞衍生的NK细胞为CD3-CD45+CD56+,并且任选地进一步由NKp46+、CD57+和CD16+定义。

[0425] 因此,使用上述分化方法,人们可以获得一种或多种iPSC衍生的造血细胞群:(i)CD34+HE细胞(iCD34),使用一种或多种选自iMPP-A、iTC-A2、iTC-B2、iNK-A2和iNK-B2的培养基;(ii)永久性生血内皮细胞(iHE),使用一种或多种选自iMPP-A、iTC-A2、iTC-B2、iNK-A2和iNK-B2的培养基;(iii)永久性HSC,使用一种或多种选自iMPP-A、iTC-A2、iTC-B2、iNK-A2和iNK-B2的培养基;(iv)多潜能祖细胞(iMPP),使用iMPP-A;(v)T细胞祖细胞(ipro-T),使用一种或多种选自iTC-A2和iTC-B2的培养基;(vi)T细胞(iTC),使用iTC-B2;(vii)NK细胞祖细胞(ipro-NK),使用一种或多种选自iNK-A2和iNK-B2的培养基;和/或(viii)NK细胞(iNK),和iNK-B2。在一些实施例中,培养基:

[0426] a.iCD34-C包含ROCK抑制剂、一种或多种选自由以下组成的群组的生长因子和细胞因子:bFGF、VEGF、SCF、IL6、IL11、IGF和EPO,和任选的Wnt路径活化剂;并且不含TGFβ受体/ALK抑制剂;

[0427] b.iMPP-A包含BMP活化剂、ROCK抑制剂以及一种或多种选自由以下组成的群组的生长因子和细胞因子:TPO、IL3、GMCSF、EPO、bFGF、VEGF、SCF、IL6、Flt3L和IL11;

[0428] c.iTC-A2包含ROCK抑制剂;一种或多种选自由以下组成的群组的生长因子和细胞因子:SCF、Flt3L、TPO和IL7;和任选的BMP活化剂;

[0429] d.iTC-B2包含一种或多种选自由SCF、Flt3L和IL7组成的群组的生长因子和细胞因子;

[0430] e.iNK-A2包含ROCK抑制剂和一种或多种选自由以下组成的群组的生长因子和细胞因子:SCF、Flt3L、TPO、IL3、IL7和IL15;以及任选的BMP活化剂,且

[0431] f.iTC-B2包含一种或多种选自由以下组成的群组的生长因子和细胞因子:SCF、Flt3L、IL7和IL15。

[0432] 在一些实施例中,由上述方法获得的基因组工程改造的iPSC衍生细胞包含在一个

或多个所期望的整合位点处整合的一个或多个诱导性自杀基因，所述整合位点包含AAVS1、CCR5、ROSA26、胶原蛋白、HTRP、H11、GAPDH、RUNX1、B2M、TAP1、TAP2、TAP相关蛋白、NLRC5、CIITA、RFXANK、CIITA、RFX5、RFXAP、TCRα或β恒定区、NKG2A、NKG2D、CD38、CD58、CD54、CD56、CIS、CBL-B、SOCS2、PD1、CTLA4、LAG3、TIM3或TIGIT，或满足基因组安全港准则的其它基因座。在一些其它实施例中，基因组工程改造的iPSC衍生细胞包含编码以下的多核苷酸：安全开关蛋白质、靶向模式、受体、信号传导分子、转录因子、药学活性蛋白质和肽、药物标靶候选物或促进干细胞和/或祖细胞的运输、归巢、活力、自我更新、存留和/或存活的蛋白质。在一些实施例中，包含一个或多个自杀基因的基因组工程改造的iPSC衍生细胞进一步包含一个或多个内源基因中所包含的一种或多种插入/缺失，所述内源基因与免疫反应调控和介导相关，包括(但不限于)检查点基因、内源T细胞受体基因和MHC I类抑制基因。在一个实施例中，包含一个或多个自杀基因的基因组工程改造的iPSC衍生细胞进一步包含B2M基因中的插入/缺失，其中基因敲除B2M。

[0433] 另外，用于获得第一命运的基因组工程改造的造血细胞到第二命运的基因组工程改造的造血细胞的适用去分化方法和组合物包括例如国际公开案第WO2011/159726号中所描绘的那些方法和组合物，所述申请的公开内容以引入的方式并入本文中。其中提供的方法和组合物允许部分地将初始非多能细胞重编程为非多能中间细胞，这是通过在重编程期间限制内源Nanog基因的表达；并且使所述非多能中间细胞经历用于使中间细胞分化成所期望的细胞类型的条件来进行。在一些实施例中，使用本文中的方法和组合物获得的基因组修饰的iPSC和其衍生细胞包含表1中所列的至少一种基因型。

[0434] V.具有由基因工程改造的iPSC分化的功能模式的衍生免疫细胞的治疗用途

[0435] 在一些实施例中，本发明提供一种组合物，其包含功能增强的衍生免疫细胞的分离群体或亚群，所述免疫细胞使用如所公开的方法和组合物由基因组工程改造的iPSC分化。在一些实施例中，iPSC包含一种或多种靶向基因编辑，其可保留于iPSC衍生的免疫细胞中，其中基因工程改造的iPSC和其衍生细胞适合于基于细胞的过继性疗法。在一个实施例中，基因工程改造的免疫细胞的分离群体或亚群包含iPSC衍生的CD34细胞。在一个实施例中，基因工程改造的免疫细胞的分离群体或亚群包含iPSC衍生的HSC细胞。在一个实施例中，基因工程改造的免疫细胞的分离群体或亚群包含iPSC衍生的proT细胞或T细胞。在一个实施例中，基因工程改造的免疫细胞的分离群体或亚群包含iPSC衍生的proNK细胞或NK细胞。在一个实施例中，基因工程改造的免疫细胞的分离群体或亚群包含iPSC衍生的免疫调控细胞或骨髓衍生的抑制细胞(MDSC)。在一些实施例中，进一步离体调节iPSC衍生的基因工程改造的免疫细胞以改善治疗潜能。在一个实施例中，已衍生自iPSC的基因工程改造的免疫细胞的分离群体或亚群包含数目或比例增加的初始T细胞、干细胞记忆T细胞和/或中枢记忆T细胞。在一个实施例中，已衍生自iPSC的基因工程改造的免疫细胞的分离群体或亚群包含数目或比例增加的I型NKT细胞。在另一实施例中，已衍生自iPSC的基因工程改造的免疫细胞的分离群体或亚群包含数目或比例增加的适应性NK细胞。在一些实施例中，衍生自iPSC的基因工程改造的CD34细胞、HSC细胞、T细胞、NK细胞或骨髓衍生的抑制细胞的分离群体或亚群是同种异体的。在一些其它实施例中，衍生自iPSC的基因工程改造的CD34细胞、HSC细胞、T细胞、NK细胞或MDSC的分离群体或亚群是自体的。

[0436] 在一些实施例中，用于分化的iPSC包含经选择以在效应细胞中传达所期望的治疗

属性的遗传印记，其限制条件为不破坏分化期间的细胞发育生物学，并且其限制条件为遗传印记在衍生自所述iPSC的分化的造血细胞中保留并且起作用。

[0437] 在一些实施例中，多能干细胞中的遗传印记包含(i)在将非多能细胞重编程为iPSC期间或之后通过在多能细胞的基因组中进行基因组插入、缺失或取代而获得的一种或多种基因修饰模式；或(ii)对供者、疾病或治疗反应具有特异性的来源特异性免疫细胞的一种或多种可保留治疗属性，且其中多能细胞是由来源特异性免疫细胞重编程，其中iPSC保留来源治疗属性，iPSC衍生的造血谱系细胞中也包含所述来源治疗属性。

[0438] 在一些实施例中，基因修饰模式包含以下中的一种或多种：安全开关蛋白质、靶向模式、受体、信号传导分子、转录因子、药学活性蛋白质和肽、药物标靶候选物；或促进iPSC或其衍生细胞的移植、运输、归巢、活力、自我更新、存留、免疫反应调控和调节和/或存活的蛋白质。在一些实施例中，基因修饰的iPSC和其衍生细胞包含表1中所列的基因型。在一些其它实施例中，包含表1中所列的基因型的基因修饰的iPSC和其衍生细胞进一步包含额外的基因修饰模式，包含：(1)TAP1、TAP2、TAP相关蛋白、NLRC5、PD1、LAG3、TIM3、RFXANK、CIITA、RFX5或RFXAP、RAG1以及染色体6p21区域中的任何基因的缺失或表达减少中的一种或多种；和(2)HLA-E、41BBL、CD3、CD4、CD8、CD47、CD113、CD131、CD137、CD80、PDL1、A2AR、CAR、Fc受体或用于与双特异性或多特异性或通用接合体偶联的表面触发受体的表达引入或增加。

[0439] 在再一些其它实施例中，造血谱系细胞包含与以下中的至少两种的组合有关的来源特异性免疫细胞的治疗属性：(i)一种或多种靶向抗原的受体表达；(ii)经修饰HLA；(iii)对肿瘤微环境的抗性；(iv)旁观者免疫细胞的募集和免疫调节；(iv)靶上特异性改善，同时肿瘤外效应降低；和(v)归巢、存留、细胞毒性或抗原逃逸拯救改善。

[0440] 在一些实施例中，iPSC衍生造血细胞包含表1中所列的基因型，并且所述细胞表达至少一种包含以下的细胞因子和/或其受体：IL2、IL4、IL6、IL7、IL9、IL10、IL11、IL12、IL15、IL18或IL21或其任何修饰蛋白质，并且至少表达CAR。在一些实施例中，细胞因子和CAR的工程改造表达具有NK细胞特异性。在一些其它实施例中，细胞因子和CAR的工程改造表达具有T细胞特异性。在一个实施例中，CAR包含CD38结合结构域。在一些实施例中，iPSC衍生造血效应细胞具有抗原特异性。在一些实施例中，抗原特异性衍生效应细胞靶向液体肿瘤。在一些实施例中，抗原特异性衍生效应细胞靶向实体肿瘤。在一些实施例中，抗原特异性iPSC衍生造血效应细胞能够挽救肿瘤抗原逃逸。

[0441] 多种疾病可以通过向适合于过继性细胞疗法的受试者引入本发明的免疫细胞而得到改善。在一些实施例中，如所提供的iPSC衍生造血细胞用于同种异体过继性细胞疗法。另外，在一些实施例中，本发明提供上述治疗性组合物的治疗用途，其通过将所述组合物引入到适合于过继性细胞疗法的受试者中进行，其中所述受试者患有自身免疫病症；恶性血液病；实体肿瘤；或与HIV、RSV、EBV、CMV、腺病毒或BK多瘤病毒相关的感染。恶性血液病的实例包括(但不限于)急性和慢性白血病(急性骨髓白血病(AML)、急性成淋巴细胞性白血病(ALL)、慢性骨髓性白血病(CML))、淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin lymphoma；NHL)、霍奇金氏病(Hodgkin's disease)、多发性骨髓瘤和骨髓增生异常综合症。实体癌症的实例包括(但不限于)脑癌、前列腺癌、乳腺癌、肺癌、结肠癌、子宫癌、皮肤癌、肝癌、骨癌、胰腺癌、卵巢癌、睾丸癌、膀胱癌、肾癌、头癌、颈癌、胃癌、子宫颈癌、直肠癌、喉癌和食道癌。多种

自身免疫病症的实例包括(但不限于)斑秃、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性肝炎、皮肌炎、糖尿病(1型)、幼年型特发性关节炎的一些形式、肾小球肾炎、格雷夫斯病(Graves'disease)、吉兰-巴雷综合症(Guillain-Barrésyndrome)、特发性血小板减少性紫癜、重症肌无力、心肌炎的一些形式、多发性硬化症、天疱疮/类天疱疮、恶性贫血、结节性多动脉炎、多发性肌炎、原发性胆汁性肝硬化、牛皮癣、类风湿性关节炎、硬皮病/全身性硬化症、休格连氏综合症(Sjögren'ssyndrome)、全身性红斑狼疮、甲状腺炎的一些形式、葡萄膜炎的一些形式、白癜风、肉芽肿性多血管炎(韦格纳氏病(Wegener's))。病毒感染的实例包括(但不限于)HIV(人类免疫缺陷病毒)、HSV(单纯疱疹病毒)、KSHV(卡波西氏肉瘤(Kaposi'ssarcoma)相关疱疹病毒)、RSV(呼吸道合胞病毒(Respiratory Syncytial Virus))、EBV(埃-巴二氏病毒(Epstein-Barr virus))、CMV(巨细胞病毒)、VZV(水痘带状疱疹病毒)、腺病毒、慢病毒、BK多瘤病毒相关病症。

[0442] 使用本文所公开的实施例的衍生造血谱系细胞的治疗可在症状后进行,或用于复发预防。术语“治疗(treatment/treating)”等在本文中一般用于意指获得所期望的药理学和/或生理学作用。对于疾病和/或可归因于所述疾病的不良作用,所述作用就完全或部分预防疾病来说,可以是防治性的,和/或就部分或完全治愈来说,可以是治疗性的。如本文所使用的“治疗”涵盖对受试者的疾病的任何干预,并且包括:防止在可能易患所述疾病但尚未诊断为患有所述疾病的受试者中出现所述疾病;抑制所述疾病,即,遏制其发展;或缓解所述疾病,即,引起所述疾病消退。可以在疾病或损伤发作之前、期间或之后给予治疗剂或组合物。发展中的疾病的治疗也是备受关注的,其中治疗稳定或减少患者的非所要临床症状。在特定实施例中,需要治疗的受试者患有可以通过细胞疗法使至少一种相关症状得以含有、缓解和/或改善的疾病、病状和/或损伤。某些实施例预期需要细胞疗法的受试者包括(但不限于)骨髓或干细胞移植的候选者、已接受化学疗法或照射疗法的受试者、患有过度增殖病症或癌症(例如过度增殖病症或造血系统癌症)或处于患有其的风险下的受试者、患有肿瘤(例如实体肿瘤)或处于罹患所述肿瘤的风险下的受试者、患有病毒感染或与病毒感染相关的疾病或处于患有病毒感染或与病毒感染相关的疾病的风险下的受试者。

[0443] 在评估对包含本文所公开的实施例的衍生造血谱系细胞的治疗的反应性时,可由包含以下中的至少一种的准则测量反应:临床效益率、直到死亡的存活期、病理性完全反应、病理性反应的半定量测量、临床完全缓解、临床部分缓解、临床稳定疾病、无复发存活、无转移存活、无疾病存活、循环肿瘤细胞减少、循环标记物反应和实体肿瘤的反应评估准则(Response Evaluation Criteria In Solid Tumors;RECIST)。

[0444] 可以在其它治疗之前、期间和/或之后在受试者中给予包含如所公开的衍生造血谱系细胞的治疗组合物。因此,组合疗法的方法可涉及在使用额外治疗剂之前、期间和/或之后给予或制备iPSC衍生的免疫细胞。如上文所提供,一种或多种额外治疗剂包含肽、细胞因子、检查点抑制剂、丝裂原、生长因子、小RNA、dsRNA(双链RNA)、单核血细胞、饲养细胞、饲养细胞组分或其置换因子、包含一种或多种所关注多核酸的载体、抗体、化学治疗剂或放射性部分,或免疫调节药物(IMiD)。给予iPSC衍生的免疫细胞与给予额外治疗剂可以在时间上间隔几小时、几天或甚至几周。另外地或可替代地,给予可与其它生物活性剂或模式组合,所述生物活性剂或模式例如但不限于抗肿瘤剂、非药物疗法,例如手术。

[0445] 在组合细胞疗法的一些实施例中,治疗组合包含本文所提供的iPSC衍生的造血谱

系细胞和额外治疗剂，所述额外治疗剂是抗体或抗体片段。在一些实施例中，抗体是单克隆抗体。在一些实施例中，抗体可以是人类化抗体、人类化单克隆抗体或嵌合抗体。在一些实施例中，抗体或抗体片段与病毒抗原特异性结合。在其它实施例中，抗体或抗体片段与肿瘤抗原特异性结合。在一些实施例中，肿瘤或病毒特异性抗原活化所给予的iPSC衍生的造血谱系细胞以增强其杀伤能力。在一些实施例中，适合于作为所给予的iPSC衍生的造血谱系细胞的额外治疗剂的组合治疗的抗体包括(但不限于)抗CD20(例如，利妥昔单抗、维妥珠单抗、奥法木单抗、乌妥昔单抗、奥卡拉珠单抗、奥滨尤妥珠单抗、替伊莫单抗、奥克雷珠单抗)、抗CD22(伊珠单抗、莫昔土莫单抗、依帕珠单抗)、抗HER2(例如，曲妥珠单抗、帕妥珠单抗)、抗CD52(例如，阿仑单抗)、抗EGFR(例如，西妥昔单抗)、抗GD2(例如，迪努妥昔单抗)、抗PDL1(例如，阿维鲁单抗)、抗CD38(例如，达雷木单抗、艾沙妥昔单抗、MOR202)、抗CD123(例如，7G3、CSL362)、抗SLAMF7(埃罗妥珠单抗)和其人类化或Fc修饰的变体或片段或其功能等效物或生物类似物。

[0446] 在一些实施例中，额外治疗剂包含一种或多种检查点抑制剂。检查点是指在不受抑制时能够抑制或下调免疫反应的细胞分子，通常为细胞表面分子。检查点抑制剂是能够减少检查点基因表达或基因产物，或降低检查点分子活性的拮抗剂。适用于与如本文所提供的衍生效应细胞(包括NK细胞或T细胞)的组合疗法的检查点抑制剂包括(但不限于)以下的拮抗剂:PD-1(Pdcd1、CD279)、PDL-1(CD274)、TIM-3(Havcr2)、TIGIT(WUCAM和Vstm3)、LAG-3(Lag3、CD223)、CTLA-4(Ctla4、CD152)、2B4(CD244)、4-1BB(CD137)、4-1BBL(CD137L)、A2aR、BATE、BTLA、CD39(Entpdl)、CD47、CD73(NT5E)、CD94、CD96、CD160、CD200、CD200R、CD274、CEACAM1、CSF-1R、Foxpl、GARP、HVEM、IDO、EDO、TDO、LAIR-1、MICA/B、NR4A2、MAFB、OCT-2(Pou2f2)、视黄酸受体α(Rara)、TLR3、VISTA、NKG2A/HLA-E和抑制性KIR(例如，2DL1、2DL2、2DL3、3DL1和3DL2)。

[0447] 包含所提供的衍生效应细胞的组合疗法的一些实施例进一步包含至少一种靶向检查点分子的抑制剂。与所提供的衍生效应细胞的组合疗法的一些其它实施例包含两种、三种或更多种检查点抑制剂，使得靶向两种、三种或更多种检查点分子。在一些实施例中，用于如本文所描述的组合疗法的效应细胞为如所提供的衍生NK细胞。在一些实施例中，用于如本文所描述的组合疗法的效应细胞为衍生T细胞。在一些实施例中，如本文所提供，用于组合疗法的衍生NK细胞或T细胞在功能上得到增强。在一些实施例中，两种、三种或更多种检查点抑制剂可以在组合疗法中在给予衍生效应细胞同时、之前或之后给予。在一些实施例中，两种或更多种检查点抑制剂是同时或一次一个地(依序)给予。

[0448] 在一些实施例中，抑制上述任一种检查点分子的拮抗剂是抗体。在一些实施例中，检查点抑制性抗体可以是鼠类抗体、人类抗体、人类化抗体、骆驼Ig、只有重链的鲨鱼抗体(VNAR)、Ig NAR、嵌合抗体、重组抗体或其抗体片段。抗体片段的非限制性实例包括Fab、Fab′、F(ab)′2、F(ab)′3、Fv、单链抗原结合片段(scFv)、(scFv)2、二硫键稳定的Fv(dsFv)、微型抗体、双功能抗体、三功能抗体、四功能抗体、单域抗原结合片段(sdAb，纳米抗体)、只有重链的重组抗体(VHH)和维持整个抗体的结合特异性的其它抗体片段，其相比于整个抗体可以更有成本效益地产生、更易于使用或更敏感。在一些实施例中，一种、或两种、或三种、或更多种检查点抑制剂包含以下中的至少一种:阿特珠单抗、阿维鲁单抗、度伐单抗、伊匹单抗、IPH4102、IPH43、IPH33、利瑞木单抗、莫那利珠单抗、纳武单抗、派立珠单抗和其衍

生物或功能等效物。

[0449] 包含衍生效应细胞和一种或多种检查抑制剂的组合疗法适用于治疗液体和实体癌症，包括(但不限于)皮肤T细胞淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、蕈样真菌病(Mycosis fungoide)、佩吉特样网状细胞增生症(Pagetoid reticulosis)、塞氏综合症(Sezary syndrome)、肉芽肿性皮肤松弛、淋巴瘤样丘疹病、慢性苔癣样糠疹(Pityriasis lichenoides chronica)、急性苔癣痘疹样糠疹(Pityriasis lichenoides et varioliformis acuta)、CD30+皮肤T细胞淋巴瘤、继发性皮肤CD30+大细胞淋巴瘤、非蕈样真菌病CD30皮肤大T细胞淋巴瘤、多形性T细胞淋巴瘤、伦纳特淋巴瘤(Lennert lymphoma)、皮下T细胞淋巴瘤、血管中心性淋巴瘤(angiocentric lymphoma)、母细胞性NK细胞淋巴瘤(blastic NK-cell lymphoma)、B细胞淋巴瘤、霍奇金氏淋巴瘤(HL)、头颈部肿瘤、鳞状细胞癌、横纹肌肉瘤(rhabdomyocarcoma)、路易斯肺癌(Lewis lung carcinoma;LLC)、非小细胞肺癌、食管鳞状细胞癌、食道腺癌、肾细胞癌(RCC)、结肠直肠癌(CRC)、急性骨髓白血病(AML)、乳腺癌、胃癌、前列腺小细胞神经内分泌癌瘤(SCNC)、肝癌、神经胶母细胞瘤、肝癌、口腔鳞状细胞癌、胰腺癌、甲状腺乳头状癌、肝内胆管细胞癌、肝细胞癌瘤、骨癌、癌转移和鼻咽癌。

[0450] 在一些实施例中，除如本文所提供的衍生效应细胞以外，用于治疗用途的组合包含一种或多种额外治疗剂，其包含化学治疗剂或放射性部分。化学治疗剂是指细胞毒性抗肿瘤剂，即优先杀死赘生性细胞或中断快速增殖细胞的细胞循环，或发现其根除癌症干细胞并且在治疗上用于防止或减少赘生性细胞生长的化学试剂。化学治疗剂有时也被称作抗瘤形成或细胞毒性药物或药剂，并且为所属领域中熟知的。

[0451] 在一些实施例中，化学治疗剂包含蒽环霉素(anthracycline)、烷基化剂、烷基磺酸盐、氮丙啶、乙烯亚胺、甲基三聚氰胺、氮芥(nitrogen mustard)、亚硝基脲、抗生素、抗代谢物、叶酸类似物、嘌呤类似物、嘧啶类似物、酶、鬼臼毒素(podophyllotoxin)、含铂剂、干扰素和白介素。示例性化学治疗剂包括(但不限于)烷基化剂(环磷酰胺、二氯甲二乙胺(mechlorethamine)、马法兰(mephalin)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、六甲基三聚氰胺(heamethylmelamine)、噻替派(thiotepa)、白消安(busulfan)、卡莫司汀(carmustine)、洛莫司汀(lomustine)、司莫司汀(semustine))、抗代谢物(甲氨蝶呤(methotrexate)、氟尿嘧啶、氟尿苷、阿糖胞苷(cytarabine)、6-巯基嘌呤、硫鸟嘌呤、喷司他汀(pentostatin))、长春花生物碱(vinca alkaloid)(长春新碱(vincristine)、长春碱(vinblastine)、长春地辛(vindesine))、表鬼臼毒素(epipodophyllotoxin)(依托泊苷(etoposide)、依托泊苷邻苯醌(etoposide orthoquinone)和替尼泊苷(teniposide))、抗生素(道诺霉素(daunorubicin)、小红莓(doxorubicin)、米托蒽醌(mitoxantrone)、双蒽(bisanthrene)、放线菌素D、普卡霉素(plicamycin)、嘌呤霉素(puromycin)和短杆菌肽D(gramicidine D))、太平洋紫杉醇(paclitaxel)、秋水仙碱(colchicine)、细胞松弛素B(cytochalasin B)、吐根素(emetine)、美登素(maytansine)和安吖啶(amsacrine)。额外药剂包括氨苯乙哌啶酮(gminoglutethimide)、顺铂(cisplatin)、卡铂(carboplatin)、丝裂霉素、六甲蜜胺(altretamine)、环磷酰胺、洛莫司汀(CCNU)、卡莫司汀(BCNU)、伊立替康(irinotecan)(CPT-11)、阿仑单抗、六甲蜜胺、阿那曲唑(anastrozole)、L-天冬酰胺酶、阿扎胞苷(azacitidine)、贝伐单抗(bevacizumab)、贝瑟罗汀(bexarotene)、博莱霉素(bleomycin)、

硼替佐米(bortezomib)、白消安、二甲睾酮calusterone)、卡培他滨(capecitabine)、塞内昔布(celecoxib)、西妥昔单抗、克拉屈滨(cladribine)、氯呋拉滨(clofurabine)、阿糖胞苷、达卡巴嗪(dacarbazine)、地尼白介素(denileukin diftitox)、己烯雌酚(diethlstilbestrol)、多西他赛(docetaxel)、甲雄烷醇酮(dromostanolone)、表柔比星(epirubicin)、埃罗替尼(erlotinib)、雌莫司汀(estramustine)、依托泊苷、乙炔基雌二醇、依西美坦(exemestane)、氟尿苷、5-氟尿嘧啶、氟达拉滨(fludarabine)、氟他胺(flutamide)、氟维司群(fulvestrant)、吉非替尼(gefitinib)、吉西他滨(gemcitabine)、戈舍瑞林(goserelin)、羟基脲、替伊莫单抗、艾达霉素(idarubicin)、异环磷酰胺(ifosfamide)、伊马替尼(imatinib)、干扰素α(2a、2b)、伊立替康、来曲唑(letrozole)、甲酰四氢叶酸(leucovorin)、亮丙立德(leuprolide)、左旋咪唑(levamisole)、氮芥(meclorethamine)、甲地孕酮(megestrol)、美法仑(melphalin)、巯基嘌呤、甲氨蝶呤、甲氧呋豆素(methoxsalen)、丝裂霉素C、米托坦(mitotane)、米托蒽醌、诺龙(nandrolone)、诺非单抗(nofetumomab)、奥沙利铂(oxaliplatin)、太平洋紫杉醇、帕米膦酸盐(pamidronate)、培美曲塞(pemetrexed)、培加酶(pegademase)、培门冬酶(pegasparagase)、喷司他汀、哌泊溴烷(pipobroman)、普卡霉素(plicamycin)、聚苯丙生(polifeprosan)、卟吩姆(porfimer)、丙卡巴肼(procarbazine)、奎纳克林(quinacrine)、利妥昔单抗、沙格司亭(sargramostim)、链脲菌素(streptozocin)、他莫昔芬(tamoxifen)、替莫唑胺(temozolomide)、替尼泊苷、睾内酯(testolactone)、硫鸟嘌呤、噻替派、拓扑替康(topetecan)、托瑞米芬(toremifene)、托西莫单抗(tositumomab)、曲妥珠单抗、维甲酸(tretinoin)、尿嘧啶芥(uracil mustard)、伐柔比星(valrubicin)、长春瑞宾(vinorelbine)和唑来膦酸盐(zoledronate)。其它合适药剂是批准用于人类用途的那些药剂,包括将批准作为化学治疗剂或放射治疗剂并且所属领域中已知的那些药剂。这类药剂可由多个标准医师和肿瘤学家的参考文献(例如《古德曼和吉尔曼治疗学的药理学基础(Goodman&Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics)》,第九版,McGraw-Hill,N.Y.,1995)中的任一种或由国家癌症研究所网站(fda.gov/cder/cancer/druglistfrarne.htm)引用,两者都会不时更新。

[0452] 例如沙立度胺(thalidomide)、来那度胺(lenalidomide)和泊马度胺(pomalidomide)的免疫调节药物(IMiD)刺激NK细胞和T细胞两者。如本文所提供,IMiD可与iPSC衍生的治疗性免疫细胞一起使用以供癌症治疗。

[0453] 除治疗性组合物中包括的iPSC衍生的造血谱系细胞的分离群体以外,适合于向患者给予的组合物还可包括一种或多种药学上可接受的载剂(添加剂)和/或稀释剂(例如,药学上可接受的培养基,例如细胞培养基)或其它药学上可接受的组分。药学上可接受的载剂和/或稀释剂部分地由所给予的特定组合物以及用于给予治疗组合物的特定方法决定。因此,本发明的治疗组合物存在多种合适的调配物(参见例如《雷明顿氏医药科学(Remington'sPharmaceutical Sciences)》,第17版1985,其公开内容以全文引用的方式并入本文中)。

[0454] 在一个实施例中,治疗组合物包含利用本文所公开的方法和组合物制造的多能细胞衍生的T细胞。在一个实施例中,治疗组合物包含利用本文所公开的方法和组合物制造的多能细胞衍生的NK细胞。在一个实施例中,治疗组合物包含利用本文所公开的方法和组合

物制造的多能细胞衍生的CD34+HE细胞。在一个实施例中，治疗组合物包含利用本文所公开的方法和组合物制造的多能细胞衍生的HSC。在一个实施例中，治疗组合物包含利用本文所公开的方法和组合物制造的多能细胞衍生的MDSC。可以通过静脉内、腹膜内、经肠或气管给药方法分开给予或与其它合适的化合物组合给予包含如本文所公开的iPSC衍生的造血谱系细胞的群体的治疗组合物，以实现所期望的治疗目标。

[0455] 这些药学上可接受的载剂和/或稀释剂可以足以使治疗组合物的pH维持在约3与约10之间的量存在。因此，基于总组合物的重量比(weight to weight)，缓冲剂可以高达约5％。治疗组合物中还可以包括电解质，例如(但不限于)氯化钠和氯化钾。在一个方面中，治疗组合物的pH在约4到约10的范围内。替代地，治疗组合物的pH在约5到约9、约6到约9或约6.5到约8的范围内。在另一实施例中，治疗组合物包括pH在所述pH范围中的一种的缓冲液。在另一实施例中，治疗组合物的pH为约7。替代地，治疗组合物的pH在约6.8到约7.4的范围内。在再一实施例中，治疗组合物的pH为约7.4。

[0456] 本发明还部分地提供药学上可接受的细胞培养基在本发明的特定组合物和/或培养物中的用途。这类组合物适合于向人类受试者给予。一般来说，支持根据本发明的实施例的iPSC衍生的免疫细胞的维持、生长和/或健康的任何培养基适用作药学细胞培养基。在特定实施例中，药学上可接受的细胞培养基是无血清和/或无饲养层的培养基。在各种实施例中，无血清培养基是无动物成分(animal-free)的，且可任选为无蛋白质的。任选地，所述培养基可以含有生物药学上可接受的重组蛋白。无动物成分培养基是指其中所述组分衍生自非动物来源的培养基。重组蛋白置换无动物成分培养基中的天然动物蛋白，且营养物是从合成、植物或微生物来源获得。相比之下，无蛋白质培养基定义为大体上不含蛋白质。所属领域的普通技术人员将了解，上述培养基实例为说明性的并且决不限制适用于本发明的培养基调配物，并且存在所属领域的技术人员已知且可使用的许多合适培养基。

[0457] 分离的多能干细胞衍生的造血谱系细胞可具有至少50％、60％、70％、80％、90％、95％、98％或99％的T细胞、NK细胞、NKT细胞、proT细胞、proNK细胞、CD34+HE细胞、HSC、B细胞、骨髓衍生的抑制细胞(MDSC)、调控巨噬细胞、调控树突状细胞或间充质基质细胞。在一些实施例中，分离的多能干细胞衍生的造血谱系细胞具有约95％到约100％的T细胞、NK细胞、proT细胞、proNK细胞、CD34+HE细胞或骨髓衍生的抑制细胞(MDSC)。在一些实施例中，本发明提供具有纯化的T细胞或NK细胞的治疗组合物，例如具有约95％的T细胞、NK细胞、proT细胞、proNK细胞、CD34+HE细胞或骨髓衍生的抑制细胞(MDSC)的分离群体的组合物，以治疗需要细胞疗法的受试者。

[0458] 在一个实施例中，组合细胞疗法包含CD3接合体的治疗蛋白或肽，和衍生自包含表1中所列的基因型的基因组工程改造的iPSC的NK细胞群，其中衍生NK细胞包含$TCR^{neg}$ cs-CD3。在另一实施例中，组合细胞疗法包含CD3接合体的治疗蛋白或肽和衍生自包含表1中所列的基因型的基因组工程改造的iPSC的T细胞群，其中衍生T细胞包含$TCR^{neg}$ cs-CD3。在一些实施例中，组合细胞疗法包含博纳吐单抗、卡托莫西单抗、厄马索单抗、RO6958688、AFM11、MT110/AMG 110、MT111/AMG211/MEDI-565、AMG330、MT112/BAY2010112、MOR209/ES414、MGD006/S80880、MGD007和/或FBTA05中的一种，以及衍生自包含表1中所列的基因型的基因组工程改造的iPSC的NK细胞群或T细胞群，其中衍生的NK细胞或T细胞包含$TCR^{neg}$ cs-CD3和任选的hnCD16。在又一些其它实施例中，组合细胞疗法包含博纳吐单抗、卡托莫西

单抗和厄马索单抗中的一种，以及衍生自包含表1中所列的基因型的基因组工程改造的iPSC的NK细胞群或T细胞群，其中衍生的NK细胞或T细胞包含$TCR^{neg}$ cs-CD3、hnCD16和靶向CD19、BCMA、CD38、CD20、CD22或CD123的CAR。在再一些其它实施例中，组合细胞疗法包含博纳吐单抗、卡托莫西单抗和厄马索单抗中的一种，以及衍生自包含表1中所列的基因型的基因组工程改造的iPSC的NK细胞群或T细胞群，其中衍生的NK细胞或T细胞包含$TCR^{neg}$ cs-CD3、hnCD16、CAR和一种或多种外源细胞因子。

[0459] 如所属领域的普通技术人员将理解，基于本文中的方法和组合物的衍生自iPSC的自体和同种异体造血谱系细胞两者均可用于如上文所描述的细胞疗法中。对于自体移植，衍生的造血谱系细胞的分离群体相对于患者是完全或部分HLA匹配的。在另一实施例中，衍生的造血谱系细胞不与受试者进行HLA匹配，其中衍生的造血谱系细胞为HLA I和HLA II剔除型的NK细胞或T细胞。

[0460] 在一些实施例中，治疗组合物中的衍生造血谱系细胞的数目是每剂量至少$0.1\times10^5$个细胞、至少$1\times10^5$个细胞、至少$5\times10^5$个细胞、至少$1\times10^6$个细胞、至少$5\times10^6$个细胞、至少$1\times10^7$个细胞、至少$5\times10^7$个细胞、至少$1\times10^8$个细胞、至少$5\times10^8$个细胞、至少$1\times10^9$个细胞或至少$5\times10^9$个细胞。在一些实施例中，治疗组合物中的衍生造血谱系细胞的数目是每剂量约$0.1\times10^5$个细胞到约$1\times10^6$个细胞；每剂量约$0.5\times10^6$个细胞到约$1\times10^7$个细胞；每剂量约$0.5\times10^7$个细胞到约$1\times10^8$个细胞；每剂量约$0.5\times10^8$个细胞到约$1\times10^9$个细胞；每剂量约$1\times10^9$个细胞到约$5\times10^9$个细胞；每剂量约$0.5\times10^9$个细胞到约$8\times10^9$个细胞；每剂量约$3\times10^9$个细胞到约$3\times10^{10}$个细胞，或其间的任何范围。一般来说，对于60kg患者，$1\times10^8$个细胞/剂量转化为$1.67\times10^6$个细胞/千克。

[0461] 在一个实施例中，治疗组合物中的衍生造血谱系细胞的数目是部分或单一脐带血中的免疫细胞数目，或为至少$0.1\times10^5$个细胞/千克体重、至少$0.5\times10^5$个细胞/千克体重、至少$1\times10^5$个细胞/千克体重、至少$5\times10^5$个细胞/千克体重、至少$10\times10^5$个细胞/千克体重、至少$0.75\times10^6$个细胞/千克体重、至少$1.25\times10^6$个细胞/千克体重、至少$1.5\times10^6$个细胞/千克体重、至少$1.75\times10^6$个细胞/千克体重、至少$2\times10^6$个细胞/千克体重、至少$2.5\times10^6$个细胞/千克体重、至少$3\times10^6$个细胞/千克体重、至少$4\times10^6$个细胞/千克体重、至少$5\times10^6$个细胞/千克体重、至少$10\times10^6$个细胞/千克体重、至少$15\times10^6$个细胞/千克体重、至少$20\times10^6$个细胞/千克体重、至少$25\times10^6$个细胞/千克体重、至少$30\times10^6$个细胞/千克体重、$1\times10^8$个细胞/千克体重、$5\times10^8$个细胞/千克体重或$1\times10^9$个细胞/千克体重。

[0462] 在一个实施例中，向受试者递送一定剂量的衍生造血谱系细胞。在一个说明性实施例中，向受试者提供的细胞的有效量为至少$2\times10^6$个细胞/千克、至少$3\times10^6$个细胞/千克、至少$4\times10^6$个细胞/千克、至少$5\times10^6$个细胞/千克、至少$6\times10^6$个细胞/千克、至少$7\times10^6$个细胞/千克、至少$8\times10^6$个细胞/千克、至少$9\times10^6$个细胞/千克或至少$10\times10^6$个细胞/千克，或更多个细胞/千克，包括所有介于中间的细胞剂量。

[0463] 在另一说明性实施例中，向受试者提供的细胞的有效量为约$2\times10^6$个细胞/千克、约$3\times10^6$个细胞/千克、约$4\times10^6$个细胞/千克、约$5\times10^6$个细胞/千克、约$6\times10^6$个细胞/千克、约$7\times10^6$个细胞/千克、约$8\times10^6$个细胞/千克、约$9\times10^6$个细胞/千克或约$10\times10^6$个细胞/千克，或更多个细胞/千克，包括所有介于中间的细胞剂量。

[0464] 在另一说明性实施例中，向受试者提供的细胞的有效量为约$2\times10^6$个细胞/千克

到约10×$10^6$个细胞/千克、约3×$10^6$个细胞/千克到约10×$10^6$个细胞/千克、约4×$10^6$个细胞/千克到约10×$10^6$个细胞/千克、约5×$10^6$个细胞/千克到约10×$10^6$个细胞/千克、2×$10^6$个细胞/千克到约6×$10^6$个细胞/千克、2×$10^6$个细胞/千克到约7×$10^6$个细胞/千克、2×$10^6$个细胞/千克到约8×$10^6$个细胞/千克、3×$10^6$个细胞/千克到约6×$10^6$个细胞/千克、3×$10^6$个细胞/千克到约7×$10^6$个细胞/千克、3×$10^6$个细胞/千克到约8×$10^6$个细胞/千克、4×$10^6$个细胞/千克到约6×$10^6$个细胞/千克、4×$10^6$个细胞/千克到约7×$10^6$个细胞/千克、4×$10^6$个细胞/千克到约8×$10^6$个细胞/千克、5×$10^6$个细胞/千克到约6×$10^6$个细胞/千克、5×$10^6$个细胞/千克到约7×$10^6$个细胞/千克、5×$10^6$个细胞/千克到约8×$10^6$个细胞/千克或6×$10^6$个细胞/千克到约8×$10^6$个细胞/千克，包括所有介于中间的细胞剂量。

[0465] 在一些实施例中，衍生的造血谱系细胞的治疗用途是单剂量治疗。在一些实施例中，衍生的造血谱系细胞的治疗用途是多剂量治疗。在一些实施例中，多剂量治疗是每天、每3天、每7天、每10天、每15天、每20天、每25天、每30天、每35天、每40天、每45天或每50天或其间的任何天数一次剂量。在一些实施例中，多剂量治疗包含三次、或四次、或五次每周一次剂量。在包含三次、或四次、或五次每周一次剂量的多剂量治疗的一些实施例中，进一步包含用于确定是否需要额外单次或多次剂量的观测周期。

[0466] 包含本发明的衍生造血谱系细胞群的组合物可以是无菌的，且可以适合于和准备好向人类患者给予(即，可以在不进行任何进一步处理的情况下给予)。准备好给予的基于细胞的组合物意指所述组合物在移植或给予给受试者之前不需要任何进一步处理或操纵。在其它实施例中，本发明提供在与一种或多种药剂一起给予之前扩增和/或调节的衍生造血谱系细胞的分离群体。对于经基因工程改造以表达重组TCR或CAR的衍生造血谱系细胞，可使用如例如美国专利6,352,694中所描述的方法活化和扩增细胞。

[0467] 在某些实施例中，可以利用不同方案向衍生的造血谱系细胞提供初级刺激信号和共刺激信号。举例来说，提供每种信号的试剂可以处于溶液中或与表面偶联。当与表面偶联时，所述试剂可与相同表面(即，“顺式”形式)或个别表面(即，“反式”形式)偶联。替代地，一种试剂可以与表面偶联并且另一种试剂处于溶液中。在一个实施例中，提供共刺激信号的试剂可以结合到细胞表面并且提供初级活化信号的试剂处于溶液中或与表面偶联。在某些实施例中，两种试剂都可以在溶液中。在另一实施例中，试剂可呈可溶形式，并且然后交联到表面，例如表达Fc受体的细胞或抗体或其它结合剂，其将结合于例如美国专利申请公开案第20040101519号和第20060034810号中所公开的试剂以用于人工抗原呈递细胞(aAPC)，所述人工抗原呈递细胞预期在本发明的实施例中用于活化和扩增T淋巴细胞。

[0468] 视所治疗的受试者的病状而定，将必然会出现剂量、频率和方案的一些变化。负责给药的人员将在任何情况下确定个别受试者的适当剂量、频率和方案。

[0469] 实例

[0470] 以下实例是以说明性方式而不是以限制性方式提供。

[0471] 实例1-材料和方法

[0472] 为了在与不同安全港基因座整合策略组合的各种启动子的控制下有效选择和测试自杀系统，使用本申请人的一种专有hiPSC平台，其能够实现单细胞传代和高通量的基于96孔板的流式细胞测量术分选，以允许衍生具有单一或多种基因调节的克隆hiPSC。

[0473] hiPSC在小分子培养物中的维持：一旦培养的融合度达到75％-90％，hiPSC就作为

单一细胞常规地传代。对于单一细胞解离，hiPSC用PBS(Mediatech)洗涤一次且在37℃用阿库酶(Accutase)(密理博(Millipore))处理3到5分钟(min)，随后移液以确保单一细胞解离。然后将单一细胞悬浮液与常规培养基等体积混合，在225×g下离心4min，再悬浮于FMM中且接种于经基质胶涂布的表面上。传代数典型为1:6-1:8，在37℃下转移预先涂布有基质胶的组织培养板持续2-4小时且每2-3天用FMM饲养。将细胞培养物在设定为37℃和5％CO2的含湿气培育箱中维持。

[0474] 用ZFN、CRISPR进行人类iPSC工程改造以靶向编辑所关注模式：使用ROSA26靶向插入作为一实例，对于ZFN介导的基因组编辑，用2.5μg ZFN-L(FTV893)、2.5μg ZFN-R(FTV894)和5μg供体构建体的混合物转染两百万个iPSC，以进行AAVS1靶向插入。对于CRISPR介导的基因组编辑，用5μg ROSA26-gRNA/Cas9(FTV922)和5μg供体构建体的混合物转染两百万个iPSC，以进行ROSA26靶向插入。使用Neon转染系统(生命技术公司(Life Technologies))，使用参数1500V、10ms、3个脉冲进行转染。在转染后第2天或第3天，如果质粒含有人工启动子驱动GFP和/或RFP表达盒，那么使用流式细胞测量术测量转染效率。在转染后第4天，将嘌呤霉素以开始7天0.1μg/ml和随后7天0.2μg/ml的浓度添加到培养基中以选择靶向细胞。在嘌呤霉素选择期间，在第10天将细胞传代到新鲜基质胶涂布的孔上。在嘌呤霉素选择的第16天或更晚，通过流式细胞测量术分析存活细胞的GFP+iPS细胞百分比。

[0475] 基因组编辑的iPSC的批量分选和克隆分选：在嘌呤霉素选择20天后，对使用ZFN或CRISPR-Cas9进行基因组靶向编辑的iPSC进行GFP+SSEA4+TRA181+iPSC的批量分选和克隆分选。将单一细胞解离的靶向iPSC池再悬浮于冷却的染色缓冲液中，所述缓冲液含有汉克氏平衡盐溶液(Hanks'Balanced Salt Solution)(MediaTech)、4％胎牛血清(Invitrogen)、1×青霉素/链霉素(Mediatech)和10mM Hepes(Mediatech)；新鲜制备以达到最优效能。将所结合的一级抗体，包括SSEA4-PE、TRA181-Alexa Fluor-647(BD Biosciences)添加到细胞溶液中，并且在冰上培育15分钟。所有抗体均以每百万细胞7μL/100μL染色缓冲液使用。将所述溶液在染色缓冲液中洗涤一次，在225g下离心4分钟并且再悬浮于含有10μM噻唑维(Thiazovivn)的染色缓冲液中且在冰上维持以用于流式细胞测量术分选。在FACS Aria II(BD Biosciences)上进行流式细胞测量术分选。对于批量分选，将GFP+SSEA4+TRA181+细胞门控且分选到填充有7ml FMM的15ml标准管中。对于克隆分选，使用100μM喷嘴，以每孔3个事件的浓度，将分选出的细胞直接喷射到96孔板中。每个孔预填充有200μL FMM，所述FMM补充有5μg/mL纤维结合蛋白和1×青霉素/链霉素(Mediatech)且预先用5×基质胶涂布过夜。5×基质胶预涂布包括将一个基质胶等分试样添加到5mL DMEM/F12中，然后在4℃下培育过夜以允许适当再悬浮并且最终以每孔50μL添加到96孔板中，随后在37℃下培育过夜。在将培养基添加到各孔之前立即抽吸5×基质胶。在完成分选后，在培育之前，将96孔板在225g下离心1-2min。将各板保持不受干扰七天。在第七天，从每个孔中去除150μL培养基并且用100μL FMM置换。在分选后第10天，向孔中再馈送另外100μL FMM。早在第2天就检测出群落形成且大部分群落在分选后第7天到第10天之间扩增。在第一次传代中，各孔用PBS洗涤且在37℃下用30μL阿库酶解离大约10min。需要延长阿库酶处理反映了已在培养物中闲置较长时间的群落的紧密性。在发现细胞解离之后，将200μL FMM添加到每个孔中且移液若干次以使群落破碎。将解离的菌落转移到预先涂布有5×基质胶的96孔板的另一孔，并且然后在培育之前在225g下离心2min。在扩增之前，进行这种1:1传代

以扩展早期群落。后续传代常规地用阿库酶处理3-5min且在达到75-90％融合度后按1:4-1:8扩增到FMM中的预先涂布有1×基质胶的较大孔中。分析每种克隆细胞系的GFP荧光水平和TRA1-81表达量。选择具有接近100％GFP+和TRA1-81+的克隆系以用于进一步PCR筛选和分析，并且冷冻保存为主细胞库。在Guava EasyCyte 8HT(密理博)上进行流式细胞测量术分析并且使用Flowjo(FlowJo,LLC)进行分析。

[0476] 实例2-用于生产利用多种模式工程改造以得到增强功能的主克隆iPSC系的iPSC平台的应用

[0477] 使用本申请中所提供的方法重编程之后2-3周起始αβT细胞的基因工程改造。然后其之后为单细胞分选到96孔板中并且筛选用于特定工程改造的克隆。在这个特定实例中，使用CD3ζ1XX CD19 CAR作为说明，工程改造是针对靶向TRAC基因座的转基因整合。同源重组导致CD3ζ1XX CD19 CAR特异性整合到TRAC基因座中。图3的A部分表明不同阶段的培养物的相差图像。图3的B部分显示了重编程前的αβT细胞(左图)、分选前的重编程和工程改造的细胞池和克隆TiPSC克隆(右图)的流式细胞测量术概况。

[0478] 将转基因(例如CAR)特异性双等位基因整合到TRAC基因座中是进一步通过包括PCR分析、SNP相位获取分析的方法确认，且进一步通过数字液滴PCR确认以分析整合转基因的拷贝数。还使用SITE-Seq分析了靶向TRAC的CAR TiPSC克隆中的脱靶编辑，以确保具有靶向双等位基因TRAC的转基因整合的所选克隆TiPSC没有任何脱靶编辑并且维持基因组完整性。在确认和验证之后，几个所选克隆TiPSC系各自扩增并且冷冻保存为个别主细胞库。

[0479] 接着，制备用于实现图1A至1C中的cs-CD3设计的构建体并且使用类似方法和程序将其引入T细胞中。

[0480] 实例3--逐步基因组工程改造iPSC和iPSC衍生的效应细胞

[0481] 除TCR阴性以外，还连续地工程改造诱导性多能干细胞以获得高亲和力不可裂解的CD16表达，通过基因敲除B2M基因损失HLA-I，通过基因敲除CIITA损失HLA-II，过表达非经典HLA分子HLA-G，并且表达连接的IL15/IL15受体α构建体。在每个工程改造步骤之后，在下一个工程改造步骤之前对iPSC进行分选以获得所期望的表型。工程改造的iPSC然后可以维持在活体外或用于衍生细胞产生。图4显示了iPSC衍生的NK细胞中的hnCD16表达、B2M基因敲除、HLA-G表达和IL15/IL15Rα表达。这些数据表明，在造血分化期间维持这些基因工程改造模式，而不会干扰细胞活体外定向发育为所期望的细胞命运。

[0482] 将其中CD19-CAR已靶向TRAC基因座从而引起TCR基因敲除(TCRαKO)的T细胞衍生的iPSC用慢病毒转导以组成性地表达恒定NKT(iTCRα)或恒定NKT TCRα和恒定NKT TCRβ(iTCRβ)两者(如图7中所示)，产生具有限定TCR的重组TCR复合物(参见图1A和1C，随附关于I.1部分中的设计2的文本，以及SEQ ID NO:44和45以供进一步参考)。出于通过细胞分选对转导效率和富集进行分析的目的，所转导的构建体包括Thy1.1作为示例性报道子。然后将所得iPSC系与野生型(WT)和靶向TRAC的CD19-CAR对照系一起分化为iPSC衍生的CD34+造血祖细胞(iCD34)并且随后分化为衍生T细胞(iT)。

[0483] 然后通过胞外流式细胞测量术分析来自对照系和转导系的iPSC的(i)多能性标记物SSEA4和TRA181、(ii)使用泛TCRαβ探针(pan-TCRαβprobe)(检测内源性和外源性TCR)用表达的TCRα和/或TCRβ运输到细胞表面的T细胞共受体CD3和(iii)构建体报道子Thy1.1。如图8A中所见，用iTCRα或iTCRαβ进行转导并不影响如由多能性标记物所示的iPSC标识。尽管

观测到两种转导的iPSC系中的Thy1.1表达,但与WT iPSC中的观察结果相同,在转导的iPSC的细胞表面上未检测到CD3,这与TCR在iPSC阶段不表达的事实一致。

[0484] 然后使用本文所描述的组合物和方法将对照和转导iPSC分化为iCD34造血祖细胞,并且分别使用泛TCRαβ探针通过流式细胞测量术分析CD3、Thy1.1和TCRαβ。如图8B中所见,用iTCRα或iTCRαβ转导的品系维持Thy1.1表达,但无可检测的细胞表面CD3。在WT iPSC衍生的iCD34中也未观测到CD3和TCRab,表明iTCRα或iTCRαβ转导在iCD34细胞阶段不表达或导致细胞表面上的CD3表达。

[0485] 使用本文所描述的组合物和方法将iCD34进一步分化成衍生T细胞(iT),并且在不同时间点(细胞发育阶段),在CD3和TCRαβ表达的分化过程期间通过流式细胞测量术进行分析(内源性TCR针对对照细胞,外源TCR针对已转导细胞)。如图9A至9B中所示,在WT、iTCRα和iTCRαβ系中的iT细胞分化的过程中上调CD3和TCRαβ表达。如所预期,在TCR KO系中不存在CD3和TCRαβ表达。另外,WT与iTCRα和iTCRαβ转导系之间的CD3平均荧光强度(MFI)类似。此数据表明iTCRα单独或与iTCRβ一起表达足以在iT细胞分化过程中诱导或运输细胞表面上的CD3表达,并且超出iCD34细胞阶段。图9C进一步表明了在iCD34阶段后第25天,所指示细胞系中的CD3和TCRαβ表达。

[0486] 端粒缩短随着细胞老化而出现,并且与干细胞功能障碍和细胞衰老相关。本文显示出,成熟iNK细胞维持相较于成体外周血NK细胞更长的端粒。在针对$G_{0/1}$细胞的DNA指数进行校正的情况下,使用1301T细胞白血病系作为对照(100%),通过流式细胞测量术测定iPSC、成体外周血NK细胞和iPSC衍生的NK细胞的端粒长度。如图5中所示,iPSC衍生的NK细胞在与成体外周血NK细胞比较时维持显著更长的端粒长度(p=.105,ANOVA),表示iPSC衍生的NK细胞中增殖、存活和存留潜能更大。与从外周血获得的原代T细胞相比,在iPSC衍生的T细胞中得到类似的观测结果。

[0487] 实例4-衍生T细胞的CD3刺激和细胞反应

[0488] 为了评定iTCR诱导的细胞表面表达CD3的iT是否响应于CD3/CD2/CD28四聚体刺激,将衍生自如上文所描述每一iPSC细胞系的iT细胞冷冻保存,解冻,且接着在细胞因子的存在下与或不与CD3/CD2/CD28四聚体一起培养,并且分析活化的标记物。在四聚体刺激后72小时,在由WT、iTCRα和iTCRαβ转导的iPSC系分化的衍生T细胞中通过亮场显微检查显而易见iT细胞聚集,但在TCR KO iT细胞中基本上不存在(图10)。T细胞聚集为活化的标志,并且数据表明由用单独或与iTCRβ一起的iTCRα转导的iPSC分化的衍生T细胞能够通过iTCR诱导的细胞表面CD3表达进行刺激和活化。

[0489] 在72小时之后,通过流式细胞测量术分析四聚体刺激的iT细胞的T细胞活化标记物CD25。相较于未经处理的对照培养物,用四聚体刺激的WT、iTCRα和iTCRαβ转导系上调了CD25表达。这种反应在TCR KO iT细胞中不存在。CD25流式细胞测量术数据表明,iTCR转导系能够通过iTCR诱导的细胞表面CD3表达进行刺激和活化。

[0490] 已知,在活化后,T细胞将从表达CD45RA转换为表达CD45RO。对于进一步的功能验证,在这个标志表型变化72小时之后,通过流式细胞测量术分析四聚体刺激的iT细胞。如图11中所示,在用四聚体刺激之后,与相应的未经处理的iT细胞对照培养物相比,衍生自WT、iTCRα和iTCRαβ转导的iPSC系的iT细胞表明CD45RO的表达上调和CD45RA的表达下调。这种反应在衍生自TCR KO iPSC的iT中不存在。此数据表明衍生自用单独或与iTCRβ一起的iTCR

α转导的iPSC的iT细胞能够通过所表达CD3进行刺激和活化，所述CD3由人们所示例的限定重组TCR(d-rTCR)运输到细胞表面，如本文所示例，所述限定重组TCR包含限定的转基因TCRα(tgTCRα)，具有或不具有源自恒定NKT细胞的限定的转基因TCRβ(tgTCRα)。

[0491] 实例5-通过重建的细胞表面CD3的BiTE介导的细胞毒性

[0492] 通过将衍生自iTCRα和iTCRαβ转导的iPSC系的iT效应细胞与50:50靶细胞混合物共培养来评定效应细胞细胞毒性，所述混合物由用细胞增殖染料eFluor™ 450标记的Nalm6CD19WT细胞和用细胞增殖染料eFluor™ 670标记的Nalm6-CD19KO细胞组成。将混合的靶细胞涂覆于96孔U形底板中，并且将不同浓度的效应细胞与或不与CD19xCD3 BiTE(Invivogen,San Diego,CA)或CD20xCD3 BiTE(G&P Biosciences,Santa Clara,CA)一起添加到每个孔中以得到0:1、1:1、3.16:1和10:1的所期望的效应子:标靶(E:T)范围，持续约4小时并且随后通过流式细胞测量术进行分析。凋亡靶细胞的百分比是基于eFluor™ 450+Nalm6 CD19WT细胞中的胱天蛋白酶3/7+细胞的百分比，或eFluor™ 670+Nalm6-CD19KO细胞中的胱天蛋白酶3/7+细胞的百分比而确定。

[0493] 如图12A中所示，表达iTCRα和iTCRαβ的iT细胞在BITE的存在下展现出增强的特异性细胞毒性。观测到，BiTE本身(CD19xCD3或CD20xCD3)并不触发增强的细胞凋亡，而添加表达细胞表面CD3的效应iT细胞增加肿瘤细胞凋亡。因此，iPSC衍生的效应细胞的细胞毒性随着BiTE与重建CD3结合而进一步增强。通过与两种品系中单独的效应iT细胞相比，在BiTE的存在下效应iT细胞的EC50降低进一步表明了效应细胞功能性改善(图12B)。

[0494] 实例6-具有改善的存留的衍生NK细胞的功能分析

[0495] 另外，显示缺少IL15Rα的胞内结构域的外源截短IL15/IL15Rα融合蛋白的表达支持iPSC衍生的NK细胞的活体外存活，与添加可溶性外源IL2无关。不具有其胞内结构域的IL15Rα通过连接子在C端与IL15融合，以产生无信号传导结构域(或在本申请中称为“IL15Δ”)的截短IL15/IL15Ra融合构建体。如本文所提供的示例性IL15Δ包括具有例如图2的设计3或4的结构的那些。如图5中所示，iNK细胞用慢病毒过表达载体转导，所述载体表达GFP(方块;阴性对照)、全长IL15/IL15Ra融合构建体(实心圆;阳性对照;图2的设计2)或截短IL15/IL15Ra融合构建体(空心圆;图2的设计3)。IL15构建体或GFP在外源IL2的存在下都不显示富集(图6，左边)，指示已转导细胞的存活率与未转导细胞相当。在不存在外源IL2的情况下，用IL15/IL15Ra融合构建体转导的细胞随时间富集，而GFP转导的细胞并非如此，指示在不具有IL2的情况下，用IL15/IL15Ra构建体转导的细胞相较于相同培养物中的未转导细胞具有存活优势(图6，右边)。此外，由于IL15Rα的胞内结构域已被认为对于在IL15响应细胞中表达的受体和对于响应地扩增和起作用的细胞至关重要，出人意料的是，如图6的右图中所示，胞内结构域截短的IL15/IL15Ra融合构建体不仅在转导的iNK细胞中稳定地表达，而且以比全长IL15/IL15Ra融合构建体更高的扩增比例支持iNK细胞。因此，如本文所提供的IL15Δ能够表达和维持呈膜结合形式的IL15，并且可置换全长IL15/IL15Ra融合蛋白以提供细胞中IL15的反式呈递。在未完全理解基础机制的情况下，去除IL15R的胞内结构域似乎有可能通过完全消除顺式呈递和/或由正常IL15R通过其胞内结构域介导的任何其它潜在信号转导路径，在存活、扩增和存留方面给出响应细胞额外的活力、适应性或某些优势。

[0496] 所属领域的技术人员将容易地了解，本文所描述的方法、组合物和产物代表示例性实施例，且不意欲为对本发明的范围的限制。所属领域的技术人员显而易见的是，可在不

脱离本发明的范围和精神的情况下,对本文所公开的本公开进行各种取代和修改。

[0497] 本说明书中提及的所有专利和公开案均指示本公开涉及的所属领域的技术人员的水平。所有专利和公开案均以引用的方式并入本文中,其程度如同每一个别公开案专门地且单独地指示为以引用的方式并入。

[0498] 本文说明性描述的本公开可以在不存在本文未专门公开的任何一个或多个要素、一个或多个限制的情况下适当地实施。因此,举例来说,在本文中的每一种情况下,任一个术语“包含”、“基本上由……组成”和“由……组成”可以用其它两个术语中的任一个置换。已采用的术语和表述是作为描述而非限制的术语使用,且使用这类术语和表述时,不希望排除所示和所描述的特征的任何等效物或其部分,但应认识到,在所要求的本公开的范围内可以存在各种修改。因此,应理解,虽然已通过优选实施例和任选的特征具体地公开了本公开,但所属领域的技术人员可以对本文中所公开的概念进行修饰和变化,且这类修饰和变化被视为属于如所附权利要求书限定的本发明范围内。

序列表

<110> 菲特治疗公司

<120> 工程改造的iPSC和免疫效应细胞中的CD3重建

<130> 056932-518001WO

<150> US 62/832,622

<151> 2019-04-11

<160> 45

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 140

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 表达TCR-β的恒定区(TRBC)的构建体

<400> 1

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

<210> 2

<211> 176

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 表达TCR-β的恒定区的构建体(TRBC1)

<400> 2

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

<210> 3

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> TRBC2

<400> 3

Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Lys Val Ala Val Phe Glu Pro Ser
1 5 10 15
Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala
20 25 30
Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly
35 40 45
Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys Glu
50 55 60

Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg
65 70 75 80
Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln
85 90 95
Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp Arg
100 105 110
Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala
115 120 125
Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala
130 135 140
Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val
145 150 155 160
Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asp Ser
165 170 175
Arg Gly

<210> 4
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 编码TCR-β恒定区的构建体的示例性信号肽(tgTRBC)-CD8asp
<400> 4
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15
His Ala

<210> 5
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 编码TCR-β恒定区的构建体的示例性信号肽(tgTRBC)-IgKsp
<400> 5
Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1 5 10 15
Val Ile Met Ser Arg
20

<210> 6
<211> 8
<212> PRT

<213> 人工序列
<220>
<223> 编码TCR-β恒定区的构建体的示例性连接肽(tgTRBC)-FLAG
<400> 6

```
Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1               5
```

<210> 7
<211> 340
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 340个氨基酸基于CD64结构域的构建
<400> 7

```
Met Trp Phe Leu Thr Thr Leu Leu Leu Trp Val Pro Val Asp Gly Gln
1               5                  10                  15
Val Asp Thr Thr Lys Ala Val Ile Thr Leu Gln Pro Pro Trp Val Ser
            20                  25                  30
Val Phe Gln Glu Glu Thr Val Thr Leu His Cys Glu Val Leu His Leu
        35                  40                  45
Pro Gly Ser Ser Ser Thr Gln Trp Phe Leu Asn Gly Thr Ala Thr Gln
    50                  55                  60
Thr Ser Thr Pro Ser Tyr Arg Ile Thr Ser Ala Ser Val Asn Asp Ser
65                  70                  75                  80
Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Arg Gly Leu Ser Gly Arg Ser Asp Pro Ile
                85                  90                  95
Gln Leu Glu Ile His Arg Gly Trp Leu Leu Leu Gln Val Ser Ser Arg
            100                 105                 110
Val Phe Thr Glu Gly Glu Pro Leu Ala Leu Arg Cys His Ala Trp Lys
        115                 120                 125
Asp Lys Leu Val Tyr Asn Val Leu Tyr Tyr Arg Asn Gly Lys Ala Phe
    130                 135                 140
Lys Phe Phe His Trp Asn Ser Asn Leu Thr Ile Leu Lys Thr Asn Ile
145                 150                 155                 160
Ser His Asn Gly Thr Tyr His Cys Ser Gly Met Gly Lys His Arg Tyr
                165                 170                 175
Thr Ser Ala Gly Ile Ser Val Thr Val Lys Glu Leu Phe Pro Ala Pro
            180                 185                 190
Val Leu Asn Ala Ser Val Thr Ser Pro Leu Leu Glu Gly Asn Leu Val
        195                 200                 205
```

Thr Leu Ser Cys Glu Thr Lys Leu Leu Leu Gln Arg Pro Gly Leu Gln
210 215 220
Leu Tyr Phe Ser Phe Tyr Met Gly Ser Lys Thr Leu Arg Gly Arg Asn
225 230 235 240
Thr Ser Ser Glu Tyr Gln Ile Leu Thr Ala Arg Arg Glu Asp Ser Gly
245 250 255
Leu Tyr Trp Cys Glu Ala Ala Thr Glu Asp Gly Asn Val Leu Lys Arg
260 265 270
Ser Pro Glu Leu Glu Leu Gln Val Leu Gly Leu Gln Leu Pro Thr Pro
275 280 285
Val Trp Phe His Tyr Gln Val Ser Phe Cys Leu Val Met Val Leu Leu
290 295 300
Phe Ala Val Asp Thr Gly Leu Tyr Phe Ser Val Lys Thr Asn Ile Arg
305 310 315 320
Ser Ser Thr Arg Asp Trp Lys Asp His Lys Phe Lys Trp Arg Lys Asp
325 330 335
Pro Gln Asp Lys
340

<210> 8
<211> 336
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 336个氨基酸基于CD64外显子的构建
<400> 8
Met Trp Phe Leu Thr Thr Leu Leu Leu Trp Val Pro Val Asp Gly Gln
1 5 10 15
Val Asp Thr Thr Lys Ala Val Ile Thr Leu Gln Pro Pro Trp Val Ser
20 25 30
Val Phe Gln Glu Glu Thr Val Thr Leu His Cys Glu Val Leu His Leu
35 40 45
Pro Gly Ser Ser Ser Thr Gln Trp Phe Leu Asn Gly Thr Ala Thr Gln
50 55 60
Thr Ser Thr Pro Ser Tyr Arg Ile Thr Ser Ala Ser Val Asn Asp Ser
65 70 75 80
Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Arg Gly Leu Ser Gly Arg Ser Asp Pro Ile
85 90 95
Gln Leu Glu Ile His Arg Gly Trp Leu Leu Leu Gln Val Ser Ser Arg
100 105 110

Val Phe Thr Glu Gly Glu Pro Leu Ala Leu Arg Cys His Ala Trp Lys
115 120 125
Asp Lys Leu Val Tyr Asn Val Leu Tyr Tyr Arg Asn Gly Lys Ala Phe
130 135 140
Lys Phe Phe His Trp Asn Ser Asn Leu Thr Ile Leu Lys Thr Asn Ile
145 150 155 160
Ser His Asn Gly Thr Tyr His Cys Ser Gly Met Gly Lys His Arg Tyr
165 170 175
Thr Ser Ala Gly Ile Ser Val Thr Val Lys Glu Leu Phe Pro Ala Pro
180 185 190
Val Leu Asn Ala Ser Val Thr Ser Pro Leu Leu Glu Gly Asn Leu Val
195 200 205
Thr Leu Ser Cys Glu Thr Lys Leu Leu Leu Gln Arg Pro Gly Leu Gln
210 215 220
Leu Tyr Phe Ser Phe Tyr Met Gly Ser Lys Thr Leu Arg Gly Arg Asn
225 230 235 240
Thr Ser Ser Glu Tyr Gln Ile Leu Thr Ala Arg Arg Glu Asp Ser Gly
245 250 255
Leu Tyr Trp Cys Glu Ala Ala Thr Glu Asp Gly Asn Val Leu Lys Arg
260 265 270
Ser Pro Glu Leu Glu Leu Gln Val Leu Gly Leu Phe Phe Pro Pro Gly
275 280 285
Tyr Gln Val Ser Phe Cys Leu Val Met Val Leu Leu Phe Ala Val Asp
290 295 300
Thr Gly Leu Tyr Phe Ser Val Lys Thr Asn Ile Arg Ser Ser Thr Arg
305 310 315 320
Asp Trp Lys Asp His Lys Phe Lys Trp Arg Lys Asp Pro Gln Asp Lys
325 330 335

<210> 9
<211> 335
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 335个氨基酸基于CD64外显子的构建
<400> 9

Met Trp Phe Leu Thr Thr Leu Leu Leu Trp Val Pro Val Asp Gly Gln
1 5 10 15
Val Asp Thr Thr Lys Ala Val Ile Thr Leu Gln Pro Pro Trp Val Ser
20 25 30

Val Phe Gln Glu Glu Thr Val Thr Leu His Cys Glu Val Leu His Leu
35 40 45
Pro Gly Ser Ser Ser Thr Gln Trp Phe Leu Asn Gly Thr Ala Thr Gln
50 55 60
Thr Ser Thr Pro Ser Tyr Arg Ile Thr Ser Ala Ser Val Asn Asp Ser
65 70 75 80
Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Arg Gly Leu Ser Gly Arg Ser Asp Pro Ile
85 90 95
Gln Leu Glu Ile His Arg Gly Trp Leu Leu Leu Gln Val Ser Ser Arg
100 105 110
Val Phe Thr Glu Gly Glu Pro Leu Ala Leu Arg Cys His Ala Trp Lys
115 120 125
Asp Lys Leu Val Tyr Asn Val Leu Tyr Tyr Arg Asn Gly Lys Ala Phe
130 135 140
Lys Phe Phe His Trp Asn Ser Asn Leu Thr Ile Leu Lys Thr Asn Ile
145 150 155 160
Ser His Asn Gly Thr Tyr His Cys Ser Gly Met Gly Lys His Arg Tyr
165 170 175
Thr Ser Ala Gly Ile Ser Val Thr Val Lys Glu Leu Phe Pro Ala Pro
180 185 190
Val Leu Asn Ala Ser Val Thr Ser Pro Leu Leu Glu Gly Asn Leu Val
195 200 205
Thr Leu Ser Cys Glu Thr Lys Leu Leu Leu Gln Arg Pro Gly Leu Gln
210 215 220
Leu Tyr Phe Ser Phe Tyr Met Gly Ser Lys Thr Leu Arg Gly Arg Asn
225 230 235 240
Thr Ser Ser Glu Tyr Gln Ile Leu Thr Ala Arg Arg Glu Asp Ser Gly
245 250 255
Leu Tyr Trp Cys Glu Ala Ala Thr Glu Asp Gly Asn Val Leu Lys Arg
260 265 270
Ser Pro Glu Leu Glu Leu Gln Val Leu Gly Phe Phe Pro Pro Gly Tyr
275 280 285
Gln Val Ser Phe Cys Leu Val Met Val Leu Leu Phe Ala Val Asp Thr
290 295 300
Gly Leu Tyr Phe Ser Val Lys Thr Asn Ile Arg Ser Ser Thr Arg Asp
305 310 315 320
Trp Lys Asp His Lys Phe Lys Trp Arg Lys Asp Pro Gln Asp Lys
325 330 335

<210> 10

<211> 1032
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 示例编码340个氨基酸基于CD64结构域的构建的序列
<400> 10
cttggagaca acatgtggtt cttgacaact ctgctccttt gggttccagt tgatgggcaa 60
gtggacacca caaaggcagt gatcactttg cagcctccat gggtcagcgt gttccaagag 120
gaaaccgtaa ccttgcattg tgaggtgctc catctgcctg ggagcagctc tacacagtgg 180
tttctcaatg gcacagccac tcagacctcg acccccagct acagaatcac ctctgccagt 240
gtcaatgaca gtggtgaata caggtgccag agaggtctct cagggcgaag tgaccccata 300
cagctggaaa tccacagagg ctggctacta ctgcaggtct ccagcagagt cttcacggaa 360
ggagaacctc tggccttgag gtgtcatgcg tggaaggata agctggtgta caatgtgctt 420
tactatcgaa atggcaaagc ctttaagttt ttccactgga attctaacct caccattctg 480
aaaaccaaca taagtcacaa tggcacctac cattgctcag gcatgggaaa gcatcgctac 540
acatcagcag gaatatctgt cactgtgaaa gagctatttc cagctccagt gctgaatgca 600
tctgtgacat ccccactcct ggaggggaat ctggtcaccc tgagctgtga aacaaagttg 660
ctcttgcaga ggcctggttt gcagctttac ttctccttct acatgggcag caagaccctg 720
cgaggcagga acacatcctc tgaataccaa atactaactg ctagaagaga agactctggg 780
ttatactggt gcgaggctgc cacagaggat ggaaatgtcc ttaagcgcag ccctgagttg 840
gagcttcaag tgcttggcct ccagttacca actcctgtct ggtttcatta ccaagtctct 900
ttctgcttgg tgatggtact ccttttgca gtggacacag gactatattt ctctgtgaag 960
acaaacattc gaagctcaac aagagactgg aaggaccata aatttaaatg gagaaaggac 1020
cctcaagaca aa 1032
<210> 11
<211> 1020
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 示例编码336个氨基酸基于CD64外显子的构建的序列
<400> 11
cttggagaca acatgtggtt cttgacaact ctgctccttt gggttccagt tgatgggcaa 60
gtggacacca caaaggcagt gatcactttg cagcctccat gggtcagcgt gttccaagag 120
gaaaccgtaa ccttgcattg tgaggtgctc catctgcctg ggagcagctc tacacagtgg 180
tttctcaatg gcacagccac tcagacctcg acccccagct acagaatcac ctctgccagt 240
gtcaatgaca gtggtgaata caggtgccag agaggtctct cagggcgaag tgaccccata 300
cagctggaaa tccacagagg ctggctacta ctgcaggtct ccagcagagt cttcacggaa 360
ggagaacctc tggccttgag gtgtcatgcg tggaaggata agctggtgta caatgtgctt 420
tactatcgaa atggcaaagc ctttaagttt ttccactgga attctaacct caccattctg 480

aaaaccaaca taagtcacaa tggcacctac cattgctcag gcatgggaaa gcatcgctac 540
acatcagcag gaatatctgt cactgtgaaa gagctatttc cagctccagt gctgaatgca 600
tctgtgacat ccccactcct ggaggggaat ctggtcaccc tgagctgtga aacaaagttg 660
ctcttgcaga ggcctggttt gcagctttac ttctccttct acatgggcag caagaccctg 720
cgaggcagga acacatcctc tgaataccaa atactaactg ctagaagaga agactctggg 780
ttatactggt gcgaggctgc cacagaggat ggaaatgtcc ttaagcgcag ccctgagttg 840
gagcttcaag tgcttggttt gttctttcca cctgggtacc aagtctcttt ctgcttggtg 900
atggtactcc tttttgcagt ggacacagga ctatatttct ctgtgaagac aaacattcga 960
agctcaacaa gagactggaa ggaccataaa tttaaatgga gaaaggaccc tcaagacaaa 1020

<210> 12
<211> 1005
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 示例编码335个氨基酸基于CD64外显子的构建的序列
<400> 12

atgtggttct tgacaactct gctcctttgg gttccagttg atgggcaagt ggacaccaca 60
aaggcagtga tcactttgca gcctccatgg gtcagcgtgt tccaagagga aaccgtaacc 120
ttgcactgtg aggtgctcca tctgcctggg agcagctcta cacagtggtt tctcaatggc 180
acagccactc agacctcgac ccccagctac agaatcacct ctgccagtgt caatgacagt 240
ggtgaataca ggtgccagag aggtctctca gggcgaagtg accccataca gctggaaatc 300
cacagaggct ggctactact gcaggtctcc agcagagtct tcacggaagg agaacctctg 360
gccttgaggt gtcatgcgtg gaaggataag ctggtgtaca atgtgcttta ctatcgaaat 420
ggcaaagcct ttaagttttt ccactggaac tctaacctca ccattctgaa aaccaacata 480
agtcacaatg gcacctacca ttgctcaggc atgggaaagc atcgctacac atcagcagga 540
atatctgtca ctgtgaaaga gctatttcca gctccagtgc tgaatgcatc tgtgacatcc 600
ccactcctgg aggggaatct ggtcaccctg agctgtgaaa caaagttgct cttgcagagg 660
cctggtttgc agctttactt ctccttctac atgggcagca agaccctgcg aggcaggaac 720
acatcctctg aataccaaat actaactgct agaagagaag actctgggtt atactggtgc 780
gaggctgcca cagaggatgg aaatgtcctt aagcgcagcc ctgagttgga gcttcaagtg 840
cttggcttct ttccacctgg gtaccaagtc tctttctgct tggtgatggt actccttttt 900
gcagtggaca caggactata tttctctgtg aagacaaaca ttcgaagctc aacaagagac 960
tggaaggacc ataaatttaa atggagaaag gaccctcaag acaaa 1005

<210> 13
<211> 153
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 153个氨基酸CD28共刺激+ CD3-ζ-ITAM

<400> 13

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

<210> 14

<211> 219

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 219个氨基酸CD28铰链+ CD28 TM + CD28共刺激+ CD3-ζ-ITAM

<400> 14

Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn
1 5 10 15
Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu
20 25 30
Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly
35 40 45
Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe
50 55 60
Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn
65 70 75 80
Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr

85 90 95
Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser
100 105 110
Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr
115 120 125
Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys
130 135 140
Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn
145 150 155 160
Pro Gln Glu Gly Leu Phe Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu
165 170 175
Ala Phe Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly
180 185 190
His Asp Gly Leu Phe Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Phe
195 200 205
Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
210 215

<210> 15
<211> 263
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 263个氨基酸NKG2D TM + 2B4 + CD3-ζ
<400> 15
Ser Asn Leu Phe Val Ala Ser Trp Ile Ala Val Met Ile Ile Phe Arg
1 5 10 15
Ile Gly Met Ala Val Ala Ile Phe Cys Cys Phe Phe Phe Pro Ser Trp
20 25 30
Arg Arg Lys Arg Lys Glu Lys Gln Ser Glu Thr Ser Pro Lys Glu Phe
35 40 45
Leu Thr Ile Tyr Glu Asp Val Lys Asp Leu Lys Thr Arg Arg Asn His
50 55 60
Glu Gln Glu Gln Thr Phe Pro Gly Gly Gly Ser Thr Ile Tyr Ser Met
65 70 75 80
Ile Gln Ser Gln Ser Ser Ala Pro Thr Ser Gln Glu Pro Ala Tyr Thr
85 90 95
Leu Tyr Ser Leu Ile Gln Pro Ser Arg Lys Ser Gly Ser Arg Lys Arg
100 105 110
Asn His Ser Pro Ser Phe Asn Ser Thr Ile Tyr Glu Val Ile Gly Lys

115 120 125
Ser Gln Pro Lys Ala Gln Asn Pro Ala Arg Leu Ser Arg Lys Glu Leu
130 135 140
Glu Asn Phe Asp Val Tyr Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp
145 150 155 160
Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn
165 170 175
Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg
180 185 190
Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly
195 200 205
Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu
210 215 220
Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu
225 230 235 240
Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His
245 250 255
Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
260

<210> 16
<211> 308
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 308个氨基酸CD8铰链+ NKG2D TM + 2B4 + CD3-ζ
<400> 16
Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala
1 5 10 15
Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly
20 25 30
Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ser Asn Leu
35 40 45
Phe Val Ala Ser Trp Ile Ala Val Met Ile Ile Phe Arg Ile Gly Met
50 55 60
Ala Val Ala Ile Phe Cys Cys Phe Phe Phe Pro Ser Trp Arg Arg Lys
65 70 75 80
Arg Lys Glu Lys Gln Ser Glu Thr Ser Pro Lys Glu Phe Leu Thr Ile
85 90 95
Tyr Glu Asp Val Lys Asp Leu Lys Thr Arg Arg Asn His Glu Gln Glu

100 105 110
Gln Thr Phe Pro Gly Gly Gly Ser Thr Ile Tyr Ser Met Ile Gln Ser
115 120 125
Gln Ser Ser Ala Pro Thr Ser Gln Glu Pro Ala Tyr Thr Leu Tyr Ser
130 135 140
Leu Ile Gln Pro Ser Arg Lys Ser Gly Ser Arg Lys Arg Asn His Ser
145 150 155 160
Pro Ser Phe Asn Ser Thr Ile Tyr Glu Val Ile Gly Lys Ser Gln Pro
165 170 175
Lys Ala Gln Asn Pro Ala Arg Leu Ser Arg Lys Glu Leu Glu Asn Phe
180 185 190
Asp Val Tyr Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala
195 200 205
Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg
210 215 220
Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu
225 230 235 240
Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn
245 250 255
Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met
260 265 270
Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly
275 280 285
Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala
290 295 300
Leu Pro Pro Arg
305

<210> 17
<211> 379
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 模拟IL15的反式呈递的构建体(设计3)
<400> 17
Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val
1 5 10 15
His Ser Gly Ile His Val Phe Ile Leu Gly Cys Phe Ser Ala Gly Leu
20 25 30
Pro Lys Thr Glu Ala Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys

35 40 45

Ile Glu Asp Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr
50 55 60

Glu Ser Asp Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe
65 70 75 80

Leu Leu Glu Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile
85 90 95

His Asp Thr Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser
100 105 110

Ser Asn Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu
115 120 125

Glu Glu Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val
130 135 140

Gln Met Phe Ile Asn Thr Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
145 150 155 160

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Leu
165 170 175

Gln Ile Thr Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp Ile Trp
180 185 190

Val Lys Ser Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser
195 200 205

Gly Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu
210 215 220

Asn Lys Ala Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys
225 230 235 240

Ile Arg Asp Pro Ala Leu Val His Gln Arg Pro Ala Pro Pro Ser Thr
245 250 255

Val Thr Thr Ala Gly Val Thr Pro Gln Pro Glu Ser Leu Ser Pro Ser
260 265 270

Gly Lys Glu Pro Ala Ala Ser Ser Pro Ser Ser Asn Asn Thr Ala Ala
275 280 285

Thr Thr Ala Ala Ile Val Pro Gly Ser Gln Leu Met Pro Ser Lys Ser
290 295 300

Pro Ser Thr Gly Thr Thr Glu Ile Ser Ser His Glu Ser Ser His Gly
305 310 315 320

Thr Pro Ser Gln Thr Thr Ala Lys Asn Trp Glu Leu Thr Ala Ser Ala
325 330 335

Ser His Gln Pro Pro Gly Val Tyr Pro Gln Gly His Ser Asp Thr Thr
340 345 350

Val Ala Ile Ser Thr Ser Thr Val Leu Leu Cys Gly Leu Ser Ala Val
355 360 365
Ser Leu Leu Ala Cys Tyr Leu Lys Ser Arg Gln
370 375

<210> 18
<211> 1140
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 编码模拟IL15的反式呈递的构建体(设计3)的示例性核酸序列
<400> 18

atggactgga cctggattct gttcctggtc gcggctgcaa cgcgagtcca tagcggtatc 60
catgttttta ttcttgggtg tttttctgct gggctgccta agaccgaggc caactgggta 120
aatgtcatca gtgacctcaa gaaaatagaa gaccttatac aaagcatgca cattgatgct 180
actctctaca ctgagtcaga tgtacatccc tcatgcaaag tgacggccat gaaatgtttc 240
ctcctcgaac ttcaagtcat atctctggaa agtggcgacg cgtccatcca cgacacggtc 300
gaaaacctga taatactcgc taataatagt ctctcttcaa atggtaacgt aaccgagtca 360
ggttgcaaag agtgcgaaga gttggaagaa aaaaacataa aggagttcct gcaaagtttc 420
gtgcacattg tgcagatgtt cattaatacc tctagcggcg gaggatcagg tggcggtgga 480
agcggaggtg gaggctccgg tggaggaggt agtggcggag gttctcttca aataacttgt 540
cctccaccga tgtccgtaga acatgcggat atttgggtaa aatcctatag cttgtacagc 600
cgagagcggt atatctgcaa cagcggcttc aagcggaagg ccggcacaag cagcctgacc 660
gagtgcgtgc tgaacaaggc caccaacgtg gcccactgga ccacccctag cctgaagtgc 720
atcagagatc ccgccctggt gcatcagcgg cctgcccctc caagcacagt gacaacagct 780
ggcgtgaccc cccagcctga gagcctgagc ccttctggaa aagagcctgc cgccagcagc 840
cccagcagca acaatactgc cgccaccaca gccgccatcg tgcctggatc tcagctgatg 900
cccagcaaga gccctagcac cggcaccacc gagatcagca gccacgagtc tagccacggc 960
accccatctc agaccaccgc caagaactgg gagctgacag ccagcgcctc tcaccagcct 1020
ccaggcgtgt accctcaggg ccacagcgat accacagtgg ccatcagcac ctccaccgtg 1080
ctgctgtgtg gactgagcgc cgtgtcactg ctggcctgct acctgaagtc cagacagtga 1140

<210> 19
<211> 242
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 融合的IL15/mb-Sushi构建体(设计4)
<400> 19

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val
1 5 10 15

His Ser Gly Ile His Val Phe Ile Leu Gly Cys Phe Ser Ala Gly Leu
20 25 30
Pro Lys Thr Glu Ala Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys
35 40 45
Ile Glu Asp Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr
50 55 60
Glu Ser Asp Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe
65 70 75 80
Leu Leu Glu Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile
85 90 95
His Asp Thr Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser
100 105 110
Ser Asn Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu
115 120 125
Glu Glu Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val
130 135 140
Gln Met Phe Ile Asn Thr Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
145 150 155 160
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Leu
165 170 175
Gln Ile Thr Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp Ile Trp
180 185 190
Val Lys Ser Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser
195 200 205
Gly Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu
210 215 220
Asn Lys Ala Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys
225 230 235 240
Ile Arg

<210> 20
<211> 726
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 编码融合的IL15/mb-Sushi构建体(设计4)的示例性核酸序列
<400> 20

atggactgga cctggattct gttcctggtc gcggctgcaa cgcgagtcca tagcggtatc 60
catgttttta ttcttgggtg tttttctgct gggctgccta agaccgaggc caactgggta 120
aatgtcatca gtgacctcaa gaaaatagaa gaccttatac aaagcatgca cattgatgct 180

actctctaca ctgagtcaga tgtacatccc tcatgcaaag tgacggccat gaaatgtttc 240
ctcctcgaac ttcaagtcat atctctggaa agtggcgacg cgtccatcca cgacacggtc 300
gaaaacctga taatactcgc taataatagt ctctcttcaa atggtaacgt aaccgagtca 360
ggttgcaaag agtgcgaaga gttggaagaa aaaaacataa aggagttcct gcaaagtttc 420
gtgcacattg tgcagatgtt cattaatacc tctagcggcg gaggatcagg tggcggtgga 480
agcggaggtg gaggctccgg tggaggaggt agtggcggag gttctcttca aataacttgt 540
cctccaccga tgtccgtaga acatgcggat atttgggtaa aatcctatag cttgtacagc 600
cgagagcggt atatctgcaa cagcggcttc aagcggaagg ccggcacaag cagcctgacc 660
gagtgcgtgc tgaacaaggc caccaacgtg gcccactgga ccacccctag cctgaagtgc 720
atcaga 726

<210> 21
<211> 375
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 由SEQ ID NO.17进一步修饰的蛋白质构建体
<400> 21

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

Gln Ile Thr Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp Ile Trp
180 185 190
Val Lys Ser Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser
195 200 205
Gly Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu
210 215 220
Asn Lys Ala Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys
225 230 235 240
Ile Arg Asp Pro Ala Leu Val His Gln Arg Pro Ala Pro Pro Ser Thr
245 250 255
Val Thr Thr Ala Gly Val Thr Pro Gln Pro Glu Ser Leu Ser Pro Ser
260 265 270
Gly Lys Glu Pro Ala Ala Ser Ser Pro Ser Ser Asn Asn Thr Ala Ala
275 280 285
Thr Thr Ala Ala Ile Val Pro Gly Ser Gln Leu Met Pro Ser Lys Ser
290 295 300
Pro Ser Thr Gly Thr Thr Glu Ile Ser Ser His Glu Ser Ser His Gly
305 310 315 320
Thr Pro Ser Gln Thr Thr Ala Lys Asn Trp Glu Leu Thr Ala Ser Ala
325 330 335
Ser His Gln Pro Pro Gly Val Tyr Pro Gln Gly His Ser Asp Thr Thr
340 345 350
Val Ala Ile Ser Thr Ser Thr Val Leu Leu Cys Gly Leu Ser Ala Val
355 360 365
Ser Leu Leu Ala Cys Tyr Leu
370 375

<210> 22
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 编码tgpTCR-α的构建体的非限制性示例性信号肽
<400> 22
Met Ala Gly Thr Trp Leu Leu Leu Leu Leu Ala Leu Gly Cys Pro Ala
1 5 10 15
Leu Pro Thr Gly Val Gly Gly
20

<210> 23
<211> 273

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 编码tgpTCR-α(具有TM的tgpTCR-α)的构建体的示例性序列
<400> 23

Thr Pro Phe Pro Ser Leu Ala Pro Pro Ile Met Leu Leu Val Asp Gly
1 5 10 15
Lys Gln Gln Met Val Val Val Cys Leu Val Leu Asp Val Ala Pro Pro
20 25 30
Gly Leu Asp Ser Pro Ile Trp Phe Ser Ala Gly Asn Gly Ser Ala Leu
35 40 45
Asp Ala Phe Thr Tyr Gly Pro Ser Pro Ala Thr Asp Gly Thr Trp Thr
50 55 60
Asn Leu Ala His Leu Ser Leu Pro Ser Glu Glu Leu Ala Ser Trp Glu
65 70 75 80
Pro Leu Val Cys His Thr Gly Pro Gly Ala Glu Gly His Ser Arg Ser
85 90 95
Thr Gln Pro Met His Leu Ser Gly Glu Ala Ser Thr Ala Arg Thr Cys
100 105 110
Pro Gln Glu Pro Leu Arg Gly Gly Cys Gly Leu Leu Arg Ala Pro Glu
115 120 125
Arg Phe Leu Leu Ala Gly Thr Pro Gly Gly Ala Leu Trp Leu Gly Val
130 135 140
Leu Arg Leu Leu Leu Phe Lys Leu Leu Leu Phe Asp Leu Leu Leu Thr
145 150 155 160
Cys Ser Cys Leu Cys Asp Pro Ala Gly Pro Leu Pro Ser Pro Ala Thr
165 170 175
Thr Thr Arg Leu Arg Ala Leu Gly Ser His Arg Leu His Pro Ala Thr
180 185 190
Glu Thr Gly Gly Arg Glu Ala Thr Ser Ser Pro Arg Pro Gln Pro Arg
195 200 205
Asp Arg Arg Trp Gly Asp Thr Pro Pro Gly Arg Lys Pro Gly Ser Pro
210 215 220
Val Trp Gly Glu Gly Ser Tyr Leu Ser Ser Tyr Pro Thr Cys Pro Ala
225 230 235 240
Gln Ala Trp Cys Ser Arg Ser Ala Leu Arg Ala Pro Ser Ser Ser Leu
245 250 255
Gly Ala Phe Phe Ala Gly Asp Leu Pro Pro Pro Leu Gln Ala Gly Ala
260 265 270

Ala

<210> 24

<211> 225

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 部分长度的编码tgpTCR-α(具有TM的截短tgpTCR-α)的构建体

<400> 24

Thr Pro Phe Pro Ser Leu Ala Pro Pro Ile Met Leu Leu Val Asp Gly
1 5 10 15

Lys Gln Gln Met Val Val Val Cys Leu Val Leu Asp Val Ala Pro Pro
20 25 30

Gly Leu Asp Ser Pro Ile Trp Phe Ser Ala Gly Asn Gly Ser Ala Leu
35 40 45

Asp Ala Phe Thr Tyr Gly Pro Ser Pro Ala Thr Asp Gly Thr Trp Thr
50 55 60

Asn Leu Ala His Leu Ser Leu Pro Ser Glu Glu Leu Ala Ser Trp Glu
65 70 75 80

Pro Leu Val Cys His Thr Gly Pro Gly Ala Glu Gly His Ser Arg Ser
85 90 95

Thr Gln Pro Met His Leu Ser Gly Glu Ala Ser Thr Ala Arg Thr Cys
100 105 110

Pro Gln Glu Pro Leu Arg Gly Gly Cys Gly Leu Leu Arg Ala Pro Glu
115 120 125

Arg Phe Leu Leu Ala Gly Thr Pro Gly Gly Ala Leu Trp Leu Gly Val
130 135 140

Leu Arg Leu Leu Leu Phe Lys Leu Leu Leu Phe Asp Leu Leu Leu Thr
145 150 155 160

Cys Ser Cys Leu Cys Asp Pro Ala Gly Pro Leu Pro Ser Pro Ala Thr
165 170 175

Thr Thr Arg Leu Arg Ala Leu Gly Ser His Arg Leu His Pro Ala Thr
180 185 190

Glu Thr Gly Gly Arg Glu Ala Thr Ser Ser Pro Arg Pro Gln Pro Arg
195 200 205

Asp Arg Arg Trp Gly Asp Thr Pro Pro Gly Arg Lys Pro Gly Ser Pro
210 215 220

Val
225

<210> 25

<211> 104
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 编码全部或部分长度的CD3-ε胞外域的构建体的示例性序列
<400> 25

Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr Gln Thr Pro Tyr Lys Val
1 5 10 15
Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr Cys Pro Gln Tyr Pro Gly
20 25 30
Ser Glu Ile Leu Trp Gln His Asn Asp Lys Asn Ile Gly Gly Asp Glu
35 40 45
Asp Asp Lys Asn Ile Gly Ser Asp Glu Asp His Leu Ser Leu Lys Glu
50 55 60
Phe Ser Glu Leu Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr Val Cys Tyr Pro Arg Gly
65 70 75 80
Ser Lys Pro Glu Asp Ala Asn Phe Tyr Leu Tyr Leu Arg Ala Arg Val
85 90 95
Cys Glu Asn Cys Met Glu Met Asp
100

<210> 26
<211> 84
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 编码全部或部分长度的CD3-δ胞外域的构建体的示例性序列
<400> 26

Phe Lys Ile Pro Ile Glu Glu Leu Glu Asp Arg Val Phe Val Asn Cys
1 5 10 15
Asn Thr Ser Ile Thr Trp Val Glu Gly Thr Val Gly Thr Leu Leu Ser
20 25 30
Asp Ile Thr Arg Leu Asp Leu Gly Lys Arg Ile Leu Asp Pro Arg Gly
35 40 45
Ile Tyr Arg Cys Asn Gly Thr Asp Ile Tyr Lys Asp Lys Glu Ser Thr
50 55 60
Val Gln Val His Tyr Arg Met Cys Gln Ser Cys Val Glu Leu Asp Pro
65 70 75 80
Ala Thr Val Ala

<210> 27

<211> 94
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 编码全部或部分长度的CD3-γ胞外域的构建体的示例性序列
<400> 27

Gln Ser Ile Lys Gly Asn His Leu Val Lys Val Tyr Asp Tyr Gln Glu
1 5 10 15
Asp Gly Ser Val Leu Leu Thr Cys Asp Ala Glu Ala Lys Asn Ile Thr
20 25 30
Trp Phe Lys Asp Gly Lys Met Ile Gly Phe Leu Thr Glu Asp Lys Lys
35 40 45
Lys Trp Asn Leu Gly Ser Asn Ala Lys Asp Pro Arg Gly Met Tyr Gln
50 55 60
Cys Lys Gly Ser Gln Asn Lys Ser Lys Pro Leu Gln Val Tyr Tyr Arg
65 70 75 80
Met Cys Gln Asn Cys Ile Glu Leu Asn Ala Ala Thr Ile Ser
85 90

<210> 28
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 编码全部或部分长度的CD3-ε胞外域的构建体的信号肽
<400> 28

Met Gln Ser Gly Thr His Trp Arg Val Leu Gly Leu Cys Leu Leu Ser
1 5 10 15
Val Gly Val Trp Gly Gln
20

<210> 29
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 编码全部或部分长度的CD3-δ胞外域的构建体的信号肽
<400> 29

Met Glu His Ser Thr Phe Leu Ser Gly Leu Val Leu Ala Thr Leu Leu
1 5 10 15
Ser Gln Val Ser Pro

20

<210> 30
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 编码全部或部分长度的CD3-γ胞外域的构建体的信号肽
<400> 30

Met Glu Gln Gly Lys Gly Leu Ala Val Leu Ile Leu Ala Ile Ile Leu
1 5 10 15
Leu Gln Gly Thr Leu Ala
20

<210> 31
<211> 348
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 编码tgCD3(ε-δ)-TRAC融合蛋白的示例性序列多核苷酸
<400> 31

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

Leu Gly Lys Arg Ile Leu Asp Pro Arg Gly Ile Tyr Arg Cys Asn Gly
165 170 175
Thr Asp Ile Tyr Lys Asp Lys Glu Ser Thr Val Gln Val His Tyr Arg
180 185 190
Met Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
195 200 205
Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser
210 215 220
Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn
225 230 235 240
Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr Val
245 250 255
Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp
260 265 270
Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile
275 280 285
Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp Val
290 295 300
Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn Phe Gln
305 310 315 320
Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly
325 330 335
Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
340 345

<210> 32
<211> 394
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 编码tgCD3(ε-δ)-TRAC融合蛋白的示例性序列多核苷酸
<400> 32
Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr Gln Thr Pro Tyr Lys Val
1 5 10 15
Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr Cys Pro Gln Tyr Pro Gly
20 25 30
Ser Glu Ile Leu Trp Gln His Asn Asp Lys Asn Ile Gly Gly Asp Glu
35 40 45
Asp Asp Lys Asn Ile Gly Ser Asp Glu Asp His Leu Ser Leu Lys Glu
50 55 60

Phe Ser Glu Leu Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr Val Cys Tyr Pro Arg Gly
65 70 75 80
Ser Lys Pro Glu Asp Ala Asn Phe Tyr Leu Tyr Leu Arg Ala Arg Val
85 90 95
Gly Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Asp Ala
100 105 110
Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Gly Ser Gln Ser Ile Lys Gly Asn
115 120 125
His Leu Val Lys Val Tyr Asp Tyr Gln Glu Asp Gly Ser Val Leu Leu
130 135 140
Thr Cys Asp Ala Glu Ala Lys Asn Ile Thr Trp Phe Lys Asp Gly Lys
145 150 155 160
Met Ile Gly Phe Leu Thr Glu Asp Lys Lys Lys Trp Asn Leu Gly Ser
165 170 175
Asn Ala Lys Asp Pro Arg Gly Met Tyr Gln Cys Lys Gly Ser Gln Asn
180 185 190
Lys Ser Lys Pro Leu Gln Val Tyr Tyr Arg Met Gly Gly Gly Gly Ser
195 200 205
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Leu Asn Lys Val Phe
210 215 220
Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His
225 230 235 240
Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Phe Pro Asp
245 250 255
His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly
260 265 270
Val Ser Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp
275 280 285
Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp
290 295 300
Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu
305 310 315 320
Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln
325 330 335
Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser
340 345 350
Val Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile
355 360 365
Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val

370 375 380

Leu Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asp Phe
385 390

<210> 33
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 编码tgCD3(ε-δ)-TRAC融合蛋白的多核苷酸的连接子序列(G4S连接子)
<400> 33
Gly Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Asp Ala
1 5 10 15
Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Gly Ser
20 25
<210> 34
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 编码tgCD3(ε-δ)-TRAC融合蛋白的多核苷酸的连接子序列(G4S连接子)
<400> 34
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15
<210> 35
<211> 163
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 编码全部或部分长度的CD3-ζ胞内域的示例性序列
<400> 35
Met Lys Trp Lys Ala Leu Phe Thr Ala Ala Ile Leu Gln Ala Gln Leu
1 5 10 15
Pro Ile Thr Glu Ala Gln Ser Phe Gly Leu Leu Asp Pro Lys Leu Cys
20 25 30
Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile Leu Thr Ala
35 40 45
Leu Phe Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr

50 55 60

Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg
65 70 75 80

Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met
85 90 95

Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu
100 105 110

Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys
115 120 125

Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu
130 135 140

Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu
145 150 155 160

Pro Pro Arg

<210> 36

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> ITAM1序列

<400> 36

Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn
1 5 10 15

Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg
20 25

<210> 37

<211> 28

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> ITAM2序列

<400> 37

Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
1 5 10 15

Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met
20 25

<210> 38

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列
<220>
<223> ITAM3序列
<400> 38

```
Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser
1               5                  10                  15
Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln
            20                  25
```

<210> 39
<211> 153
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 其中可以去除任何一个或两个CD3-ζ ITAM的示例性序列
<400> 39

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

<210> 40
<211> 154
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 其中可以去除任何一个或两个CD3-ζ ITAM的具有41BB信号传导结构域的示例性序列CD3嵌合链

<400> 40

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

<210> 41

<211> 195

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码全部或部分长度的28BB-ζ胞内域的多核苷酸的示例性序列

<400> 41

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
1 5 10 15
Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro
20 25 30
Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu
35 40 45
Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln
50 55 60

Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly
65 70 75 80
Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr
85 90 95
Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg
100 105 110
Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met
115 120 125
Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu
130 135 140
Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys
145 150 155 160
Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu
165 170 175
Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu
180 185 190
Pro Pro Arg
195

<210> 42
<211> 426
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 编码全部或部分长度的28BB-ζ胞内域的多核苷酸的示例性序列
<400> 42
Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr Gln Thr Pro Tyr Lys Val
1 5 10 15
Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr Cys Pro Gln Tyr Pro Gly
20 25 30
Ser Glu Ile Leu Trp Gln His Asn Asp Lys Asn Ile Gly Gly Asp Glu
35 40 45
Asp Asp Lys Asn Ile Gly Ser Asp Glu Asp His Leu Ser Leu Lys Glu
50 55 60
Phe Ser Glu Leu Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr Val Cys Tyr Pro Arg Gly
65 70 75 80
Ser Lys Pro Glu Asp Ala Asn Phe Tyr Leu Tyr Leu Arg Ala Arg Val
85 90 95
Gly Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Asp Ala
100 105 110

Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Gly Ser Gln Ser Ile Lys Gly Asn
115 120 125
His Leu Val Lys Val Tyr Asp Tyr Gln Glu Asp Gly Ser Val Leu Leu
130 135 140
Thr Cys Asp Ala Glu Ala Lys Asn Ile Thr Trp Phe Lys Asp Gly Lys
145 150 155 160
Met Ile Gly Phe Leu Thr Glu Asp Lys Lys Lys Trp Asn Leu Gly Ser
165 170 175
Asn Ala Lys Asp Pro Arg Gly Met Tyr Gln Cys Lys Gly Ser Gln Asn
180 185 190
Lys Ser Lys Pro Leu Gln Val Tyr Tyr Arg Met Arg Ala Ala Ala Ile
195 200 205
Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly
210 215 220
Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe
225 230 235 240
Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val
245 250 255
Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp
260 265 270
Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met
275 280 285
Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala
290 295 300
Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg
305 310 315 320
Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn
325 330 335
Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg
340 345 350
Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro
355 360 365
Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala
370 375 380
Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His
385 390 395 400
Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp
405 410 415
Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

420 425

<210> 43

<211> 416

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码构建体tgCD3(ε-δ)-(28/BB)-ζ的多肽

<400> 43

Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr Gln Thr Pro Tyr Lys Val
1 5 10 15
Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr Cys Pro Gln Tyr Pro Gly
20 25 30
Ser Glu Ile Leu Trp Gln His Asn Asp Lys Asn Ile Gly Gly Asp Glu
35 40 45
Asp Asp Lys Asn Ile Gly Ser Asp Glu Asp His Leu Ser Leu Lys Glu
50 55 60
Phe Ser Glu Leu Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr Val Cys Tyr Pro Arg Gly
65 70 75 80
Ser Lys Pro Glu Asp Ala Asn Phe Tyr Leu Tyr Leu Arg Ala Arg Val
85 90 95
Gly Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Asp Ala
100 105 110
Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Gly Ser Phe Lys Ile Pro Ile Glu
115 120 125
Glu Leu Glu Asp Arg Val Phe Val Asn Cys Asn Thr Ser Ile Thr Trp
130 135 140
Val Glu Gly Thr Val Gly Thr Leu Leu Ser Asp Ile Thr Arg Leu Asp
145 150 155 160
Leu Gly Lys Arg Ile Leu Asp Pro Arg Gly Ile Tyr Arg Cys Asn Gly
165 170 175
Thr Asp Ile Tyr Lys Asp Lys Glu Ser Thr Val Gln Val His Tyr Arg
180 185 190
Met Arg Ala Ala Ala Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp
195 200 205
Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu
210 215 220
Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu
225 230 235 240
Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val

245 250 255
Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His
260 265 270
Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys
275 280 285
His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
290 295 300
Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
305 310 315 320
Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
325 330 335
Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
340 345 350
Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
355 360 365
Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
370 375 380
Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
385 390 395 400
Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
405 410 415

<210> 44
<211> 276
<212> PRT
<213> 智人
<400> 44
Met Lys Lys His Leu Thr Thr Phe Leu Val Ile Leu Trp Leu Tyr Phe
1 5 10 15
Tyr Arg Gly Asn Gly Lys Asn Gln Val Glu Gln Ser Pro Gln Ser Leu
20 25 30
Ile Ile Leu Glu Gly Lys Asn Cys Thr Leu Gln Cys Asn Tyr Thr Val
35 40 45
Ser Pro Phe Ser Asn Leu Arg Trp Tyr Lys Gln Asp Thr Gly Arg Gly
50 55 60
Pro Val Ser Leu Thr Ile Met Thr Phe Ser Glu Asn Thr Lys Ser Asn
65 70 75 80
Gly Arg Tyr Thr Ala Thr Leu Asp Ala Asp Thr Lys Gln Ser Ser Leu
85 90 95
His Ile Thr Ala Ser Gln Leu Ser Asp Ser Ala Ser Tyr Ile Cys Val

100 105 110
Val Ser Asp Arg Gly Ser Thr Leu Gly Arg Leu Tyr Phe Gly Arg Gly
115 120 125
Thr Gln Leu Thr Val Trp Pro Asp Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val
130 135 140
Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe
145 150 155 160
Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp
165 170 175
Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe
180 185 190
Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys
195 200 205
Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro
210 215 220
Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu
225 230 235 240
Thr Asp Thr Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg
245 250 255
Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg
260 265 270
Leu Trp Ser Ser
275

<210> 45
<211> 289
<212> PRT
<213> 智人
<400> 45
Met Thr Ile Arg Leu Leu Cys Tyr Met Gly Phe Tyr Phe Leu Gly Ala
1 5 10 15
Gly Leu Met Glu Ala Asp Ile Tyr Gln Thr Pro Arg Tyr Leu Val Ile
20 25 30
Gly Thr Gly Lys Lys Ile Thr Leu Glu Cys Ser Gln Thr Met Gly His
35 40 45
Asp Lys Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Asp Pro Gly Met Glu Leu His Leu
50 55 60
Ile His Tyr Ser Tyr Gly Val Asn Ser Thr Glu Lys Gly Asp Leu Ser
65 70 75 80
Ser Glu Ser Thr Val Ser Arg Ile Arg Thr Glu His Phe Pro Leu Thr

85 90 95

Leu Glu Ser Ala Arg Pro Ser His Thr Ser Gln Tyr Leu Cys Ala Ser

100 105 110

Glu Asp Leu Asn Lys Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro

115 120 125

Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu

130 135 140

Ala Thr Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn

145 150 155 160

Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys

165 170 175

Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu

180 185 190

Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys

195 200 205

Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp

210 215 220

Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg

225 230 235 240

Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Val Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser

245 250 255

Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala

260 265 270

Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asp

275 280 285

Phe

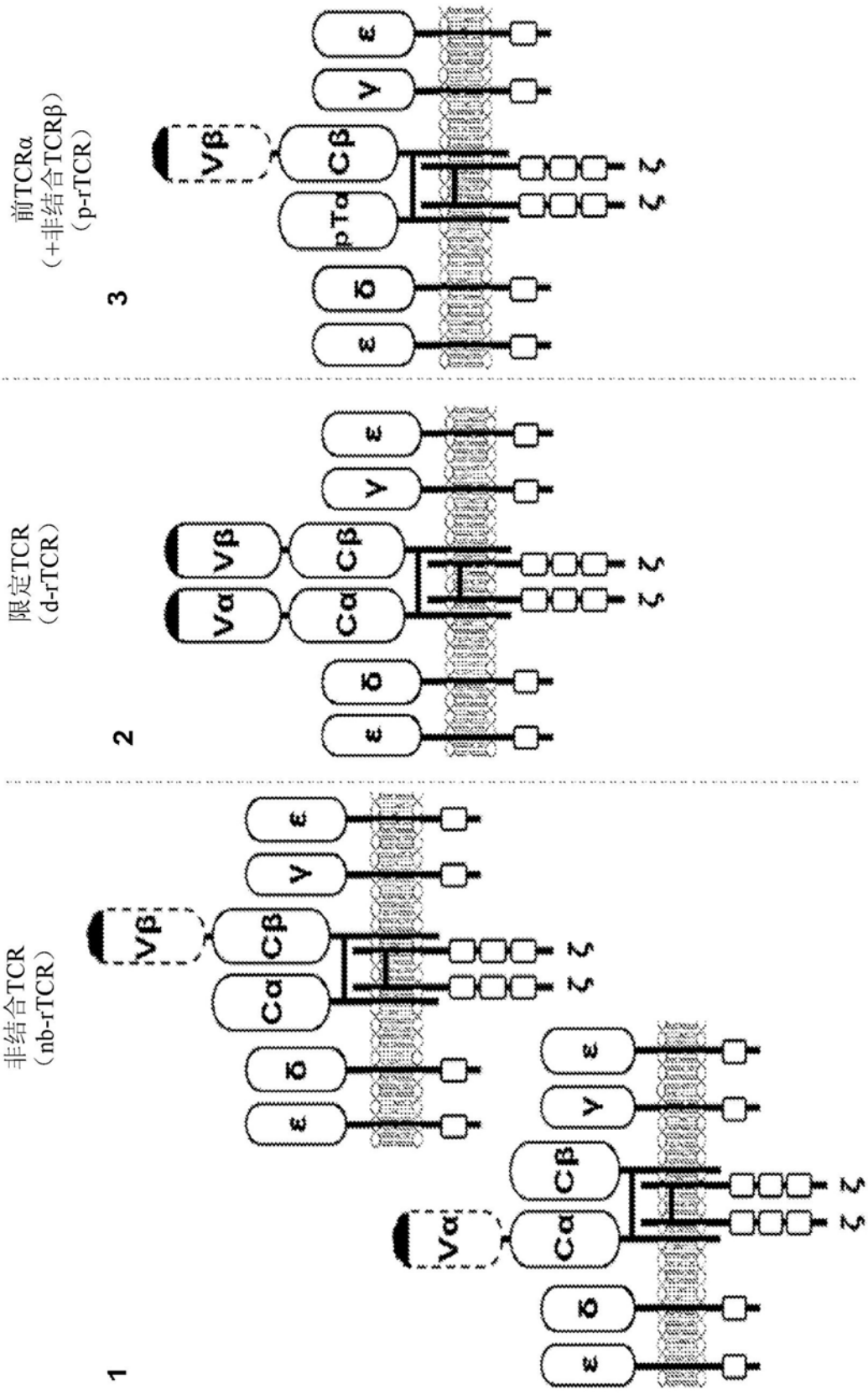

非结合TCR
（nb-rTCR）
限定TCR
（d-rTCR）
前TCRα
（+非结合TCRβ）
（p-rTCR）
1
2
3
Vβ
Cβ
Vα
Cα
pTα
γ
δ
ε
ζ ζ

图1A

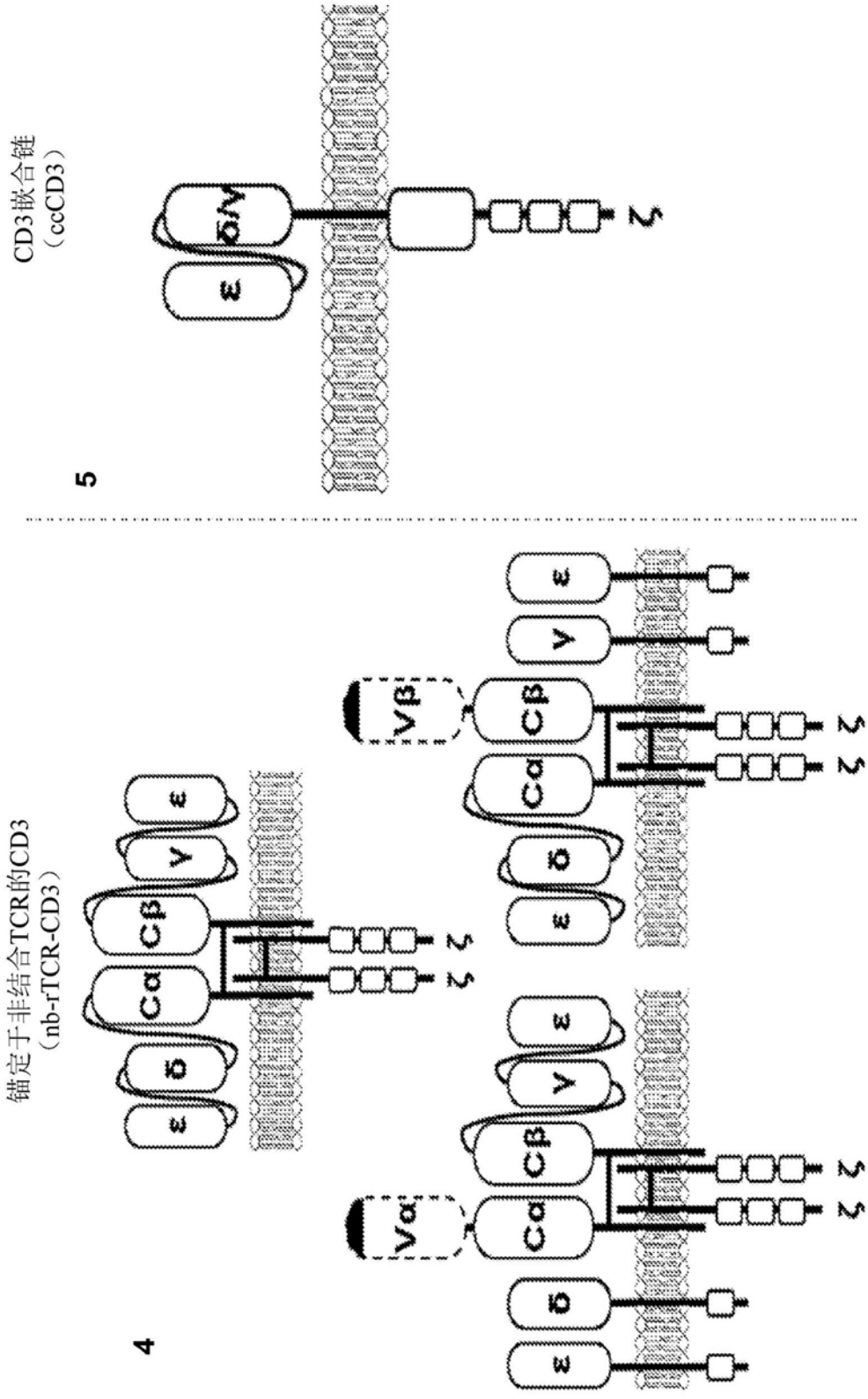

CD3嵌合链
（ccCD3）
5
ε
δ/γ
ζ
锚定于非结合TCR的CD3
（nb-rTCR-CD3）
4
ε
δ
Cα
Cβ
γ
ε
ζ
ζ
Vα
Vβ

图1B

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---|---|---|---|---|---|
| | 非结合TCR<br>{nb-rTCR} | 限定TCR<br>{d-rTCR} | 前TCRα<br>(+非结合TCRβ)<br>{p-rTCR} | 锚定于非结合TCR的CD3<br>{nb-rTCR-CD3} | CD3嵌合链<br>{ccCD3} |
| 内源性TCR KO | TCR(α或β) KO<br>(+任选的其它物) | TCRα KO+ TCRβ KO | TCRα KO<br>(+ TCRβ KO) | TCRα KO+ TCRβ KO | TCRα KO |
| 转基因/修饰的蛋白质表达 | tgTRAC<br>(+tgTRBC);<br>或tgTRBC<br>(+tgTRAC) | 限定的<br>tgTCRα+tgTCRβ | tgpTCRα<br>(+ tgTRBC);<br>或上调<br>(阻止下调)<br>内源性前TCRα | tgCD3(ε-δ)-TRAC<br>融合物和/或<br>tgCD3(ε-γ)-TRBC<br>融合物 | tgCD3{ε- γ/δ}-{28z/BBζ} |
| 基因座/启动子 | TCRα (+ TCRβ)<br>或组成性的 | TCRα + TCRβ<br>或组成性的 | 组成性的 | TCRα + TCRβ<br>或组成性的 | 组成性的 |
| 肽-MHC结合 | 无结合 | 限定的/无结合 | 无结合 | 无结合 | 无结合 |
| 信号传导 | 典型TCR/CD3 | 典型TCR/CD3 | 典型TCR/CD3 | 仅CDζ | z/28z/BBz 特异性 |

图1C

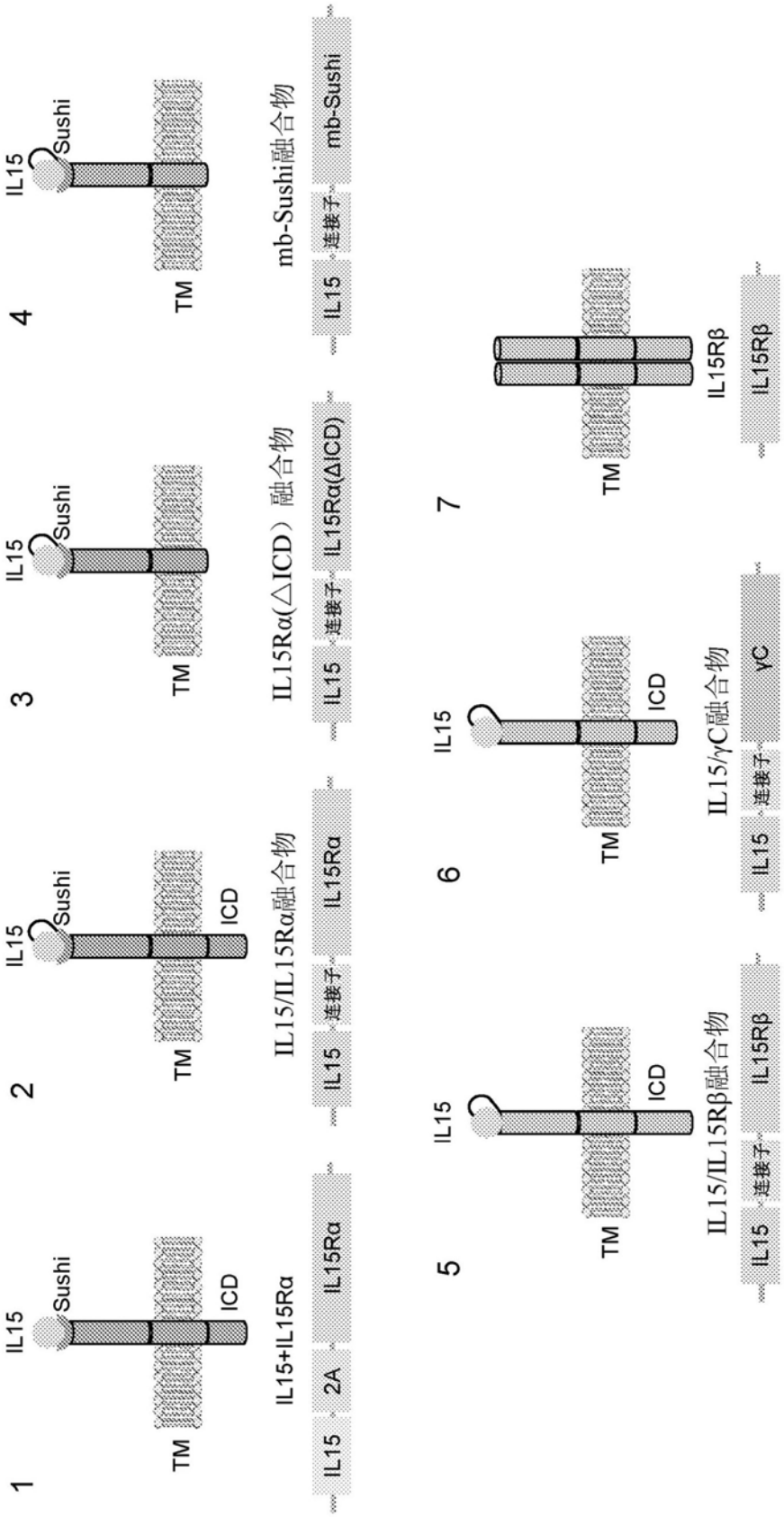

1
IL15
Sushi
TM
ICD
IL15+IL15Rα
IL15
2A
IL15Rα
2
IL15
Sushi
TM
ICD
IL15/IL15Rα融合物
IL15
连接子
IL15Rα
3
IL15
Sushi
TM
IL15Rα(△ICD）融合物
IL15
连接子
IL15Rα(ΔICD)
4
IL15
Sushi
TM
mb-Sushi融合物
IL15
连接子
mb-Sushi
5
IL15
TM
ICD
IL15/IL15Rβ融合物
IL15
连接子
IL15Rβ
6
IL15
TM
ICD
IL15/γC融合物
IL15
连接子
γC
7
TM
IL15Rβ
IL15Rβ

图2

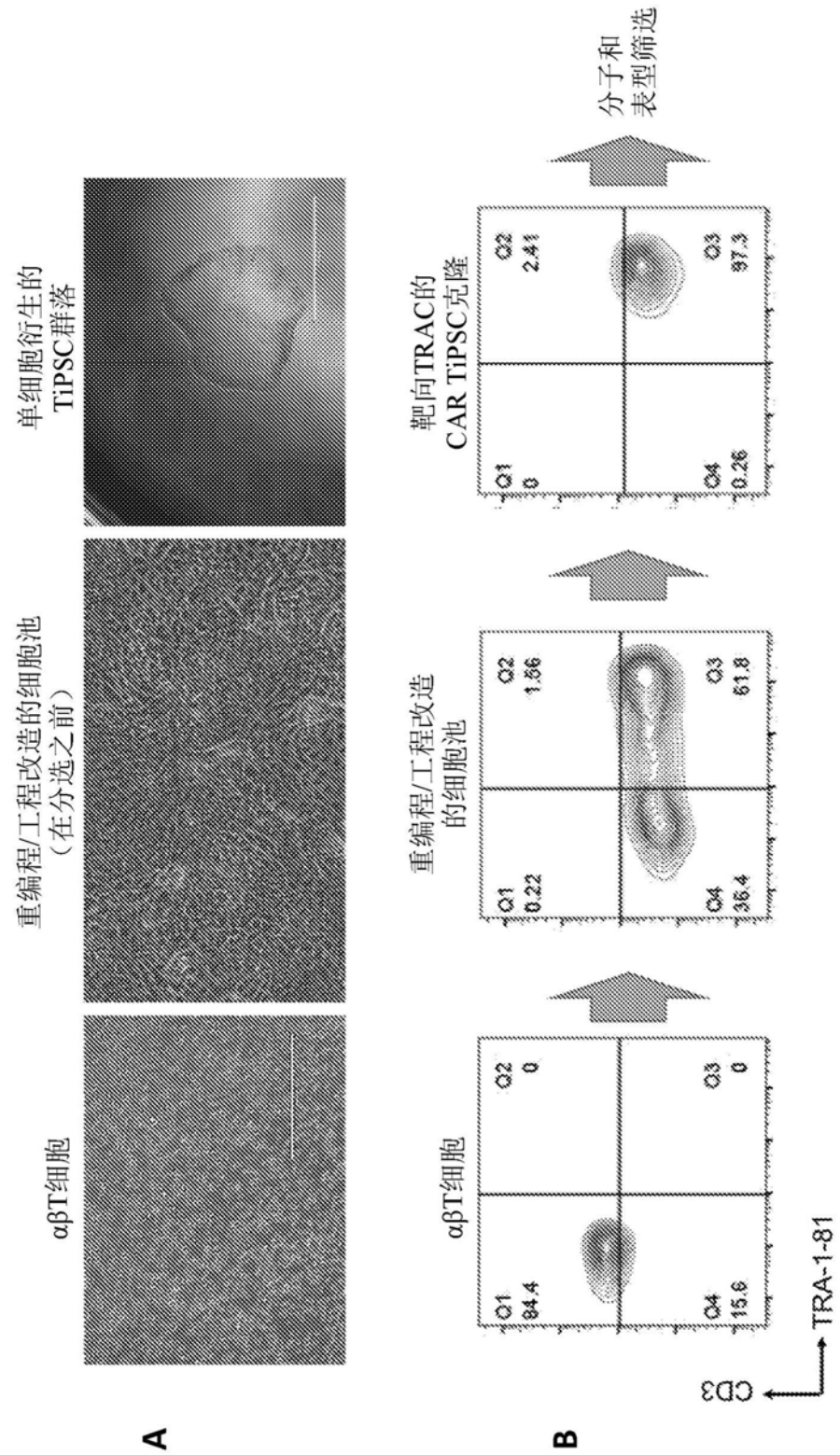
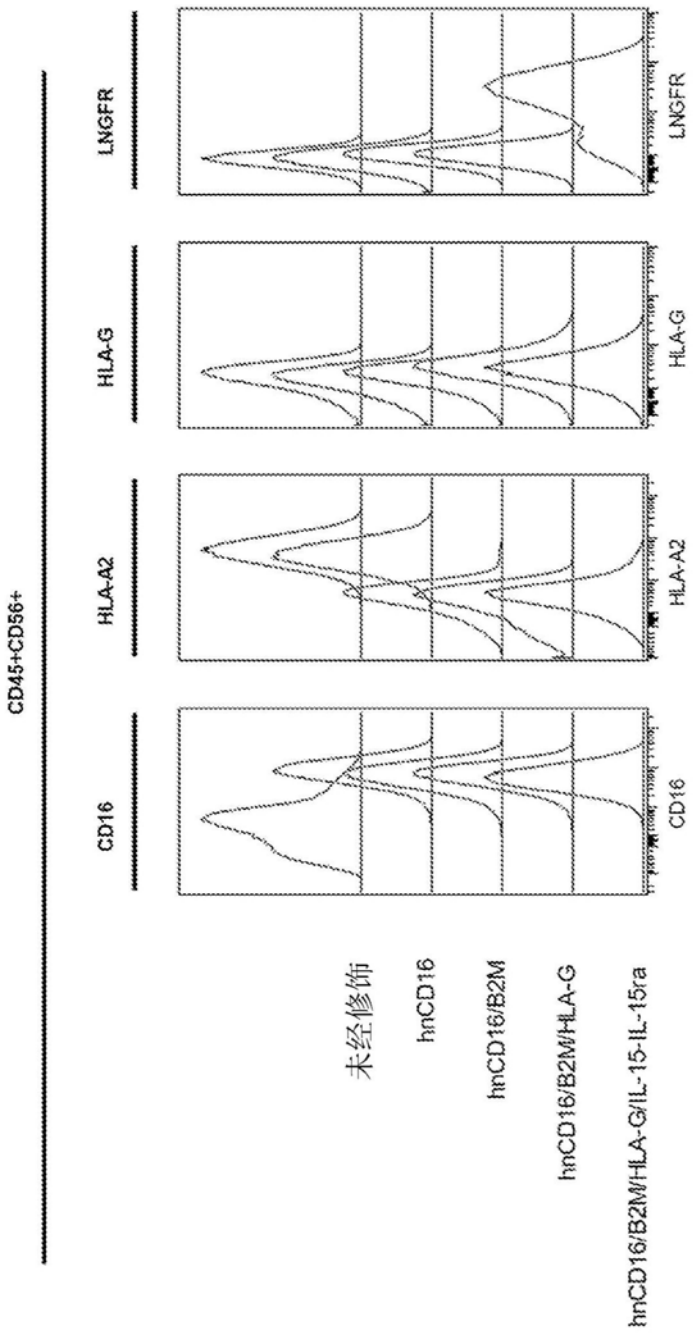

A
αβT细胞
重编程/工程改造的细胞池
（在分选之前）
单细胞衍生的
TiPSC群落
B
αβT细胞
Q1
84.4
Q2
0
Q4
15.6
Q3
0
重编程/工程改造
的细胞池
Q1
0.22
Q2
1.56
Q4
36.4
Q3
61.8
靶向TRAC的
CAR TiPSC克隆
Q1
0
Q2
2.41
Q4
0.26
Q3
97.3
分子和
表型筛选
CD3
TRA-1-81

图3




| | CD16 | HLA-A2 | HLA-G | LNGFR |
|---|---|---|---|---|
| 未经修饰 | 1 | 19.41 | 1.17 | 1 |
| hnCD16 | 12.14 | 15.63 | 1 | 1.11 |
| hnCD16/B2M | 9.41 | 1.52 | 1.25 | 1.64 |
| hnCD16/B2M/HLA-G | 9.34 | 1 | 2.33 | 1.58 |
| hnCD16/B2M/HLA-G/IL-15-IL-15ra | 8.66 | 1.9 | 2.13 | 48.13 |

使用X轴通道以列的最小值计算平均值的倍数：面板/通道值

图4

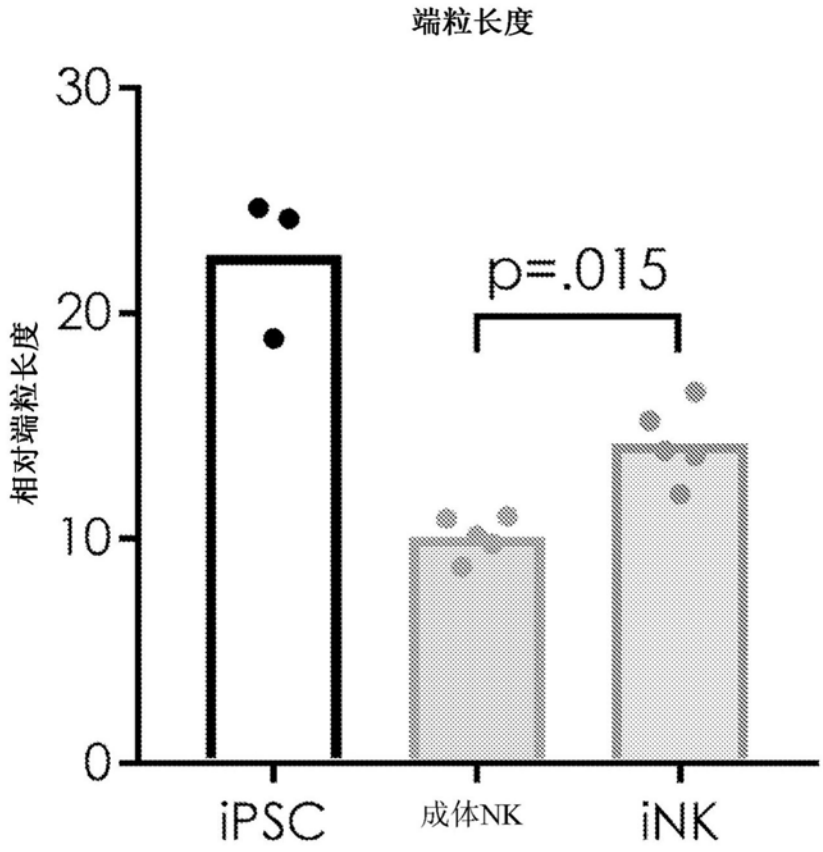



图5

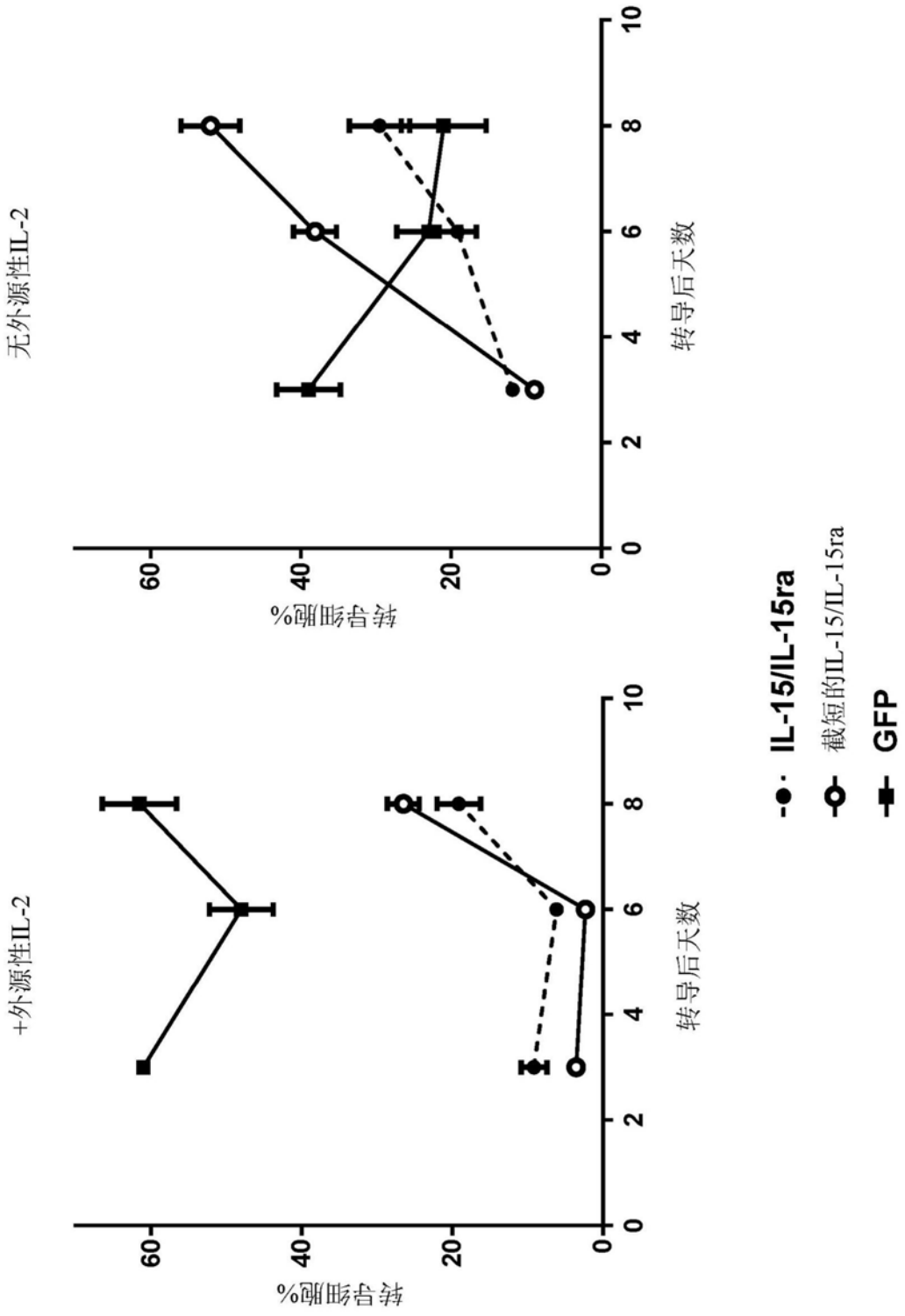

无外源性IL-2
+外源性IL-2
转导细胞%
转导后天数
0
20
40
60
0
2
4
6
8
10
IL-15/IL-15ra
截短的IL-15/IL-15ra
GFP

图6

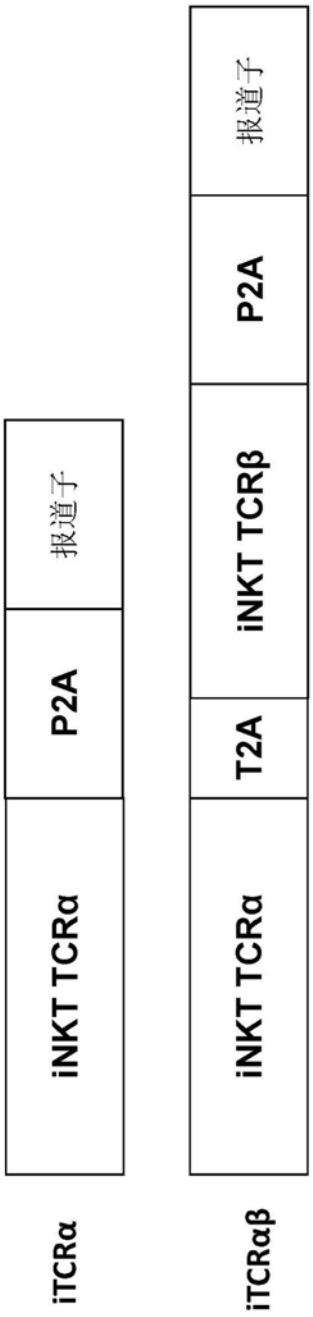

iTCRα
iNKT TCRα
P2A
报道子
iTCRαβ
iNKT TCRα
T2A
iNKT TCRβ
P2A
报道子

图7

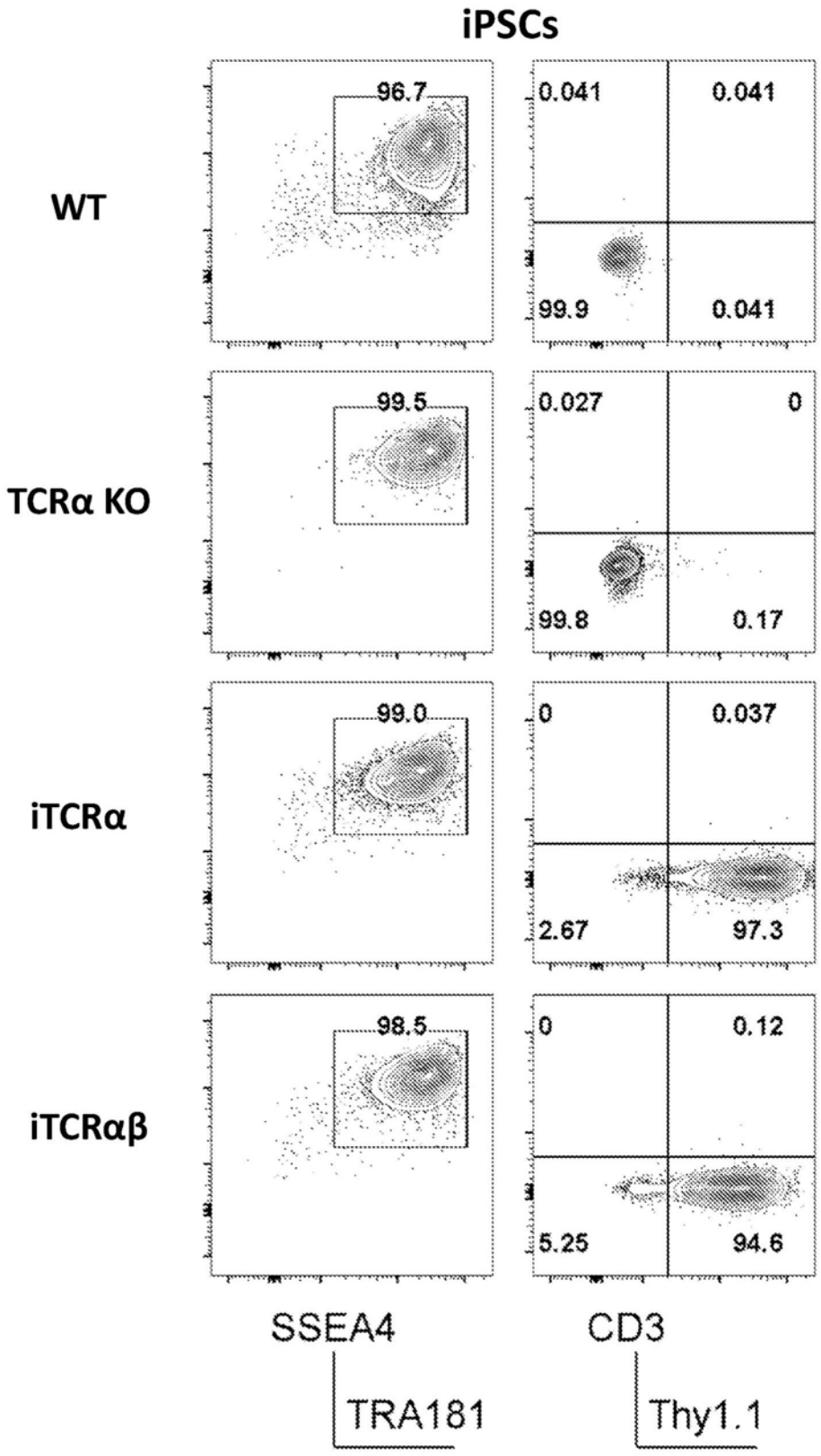

iPSCs
WT
TCRα KO
iTCRα
iTCRαβ
96.7
0.041
0.041
99.9
0.041
99.5
0.027
0
99.8
0.17
99.0
0
0.037
2.67
97.3
98.5
0
0.12
5.25
94.6
SSEA4
TRA181
CD3
Thy1.1

图8A

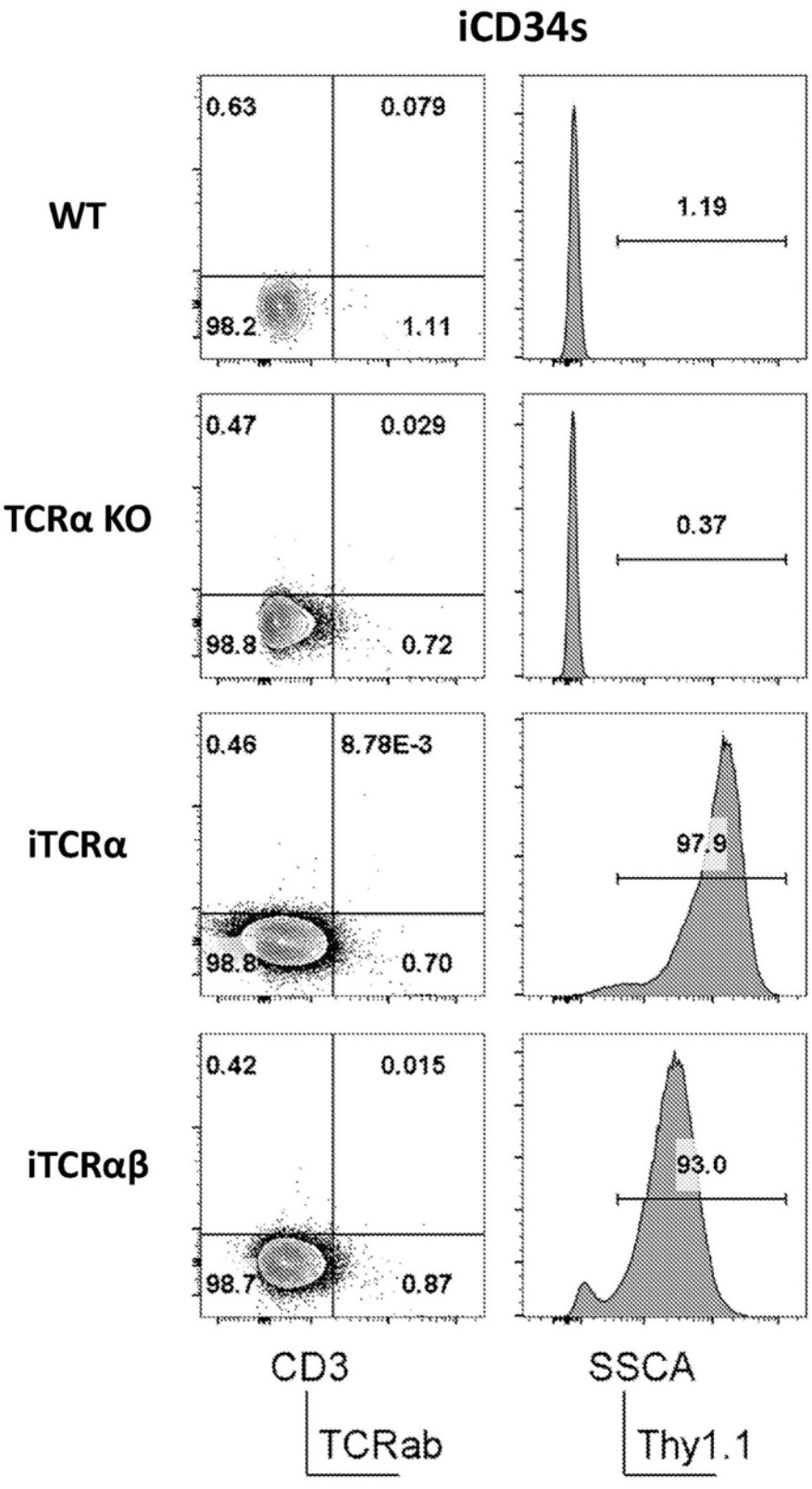

iCD34s
WT
0.63
0.079
98.2
1.11
1.19
TCRα KO
0.47
0.029
98.8
0.72
0.37
iTCRα
0.46
8.78E-3
98.8
0.70
97.9
iTCRαβ
0.42
0.015
98.7
0.87
93.0
CD3
TCRab
SSCA
Thy1.1

图8B

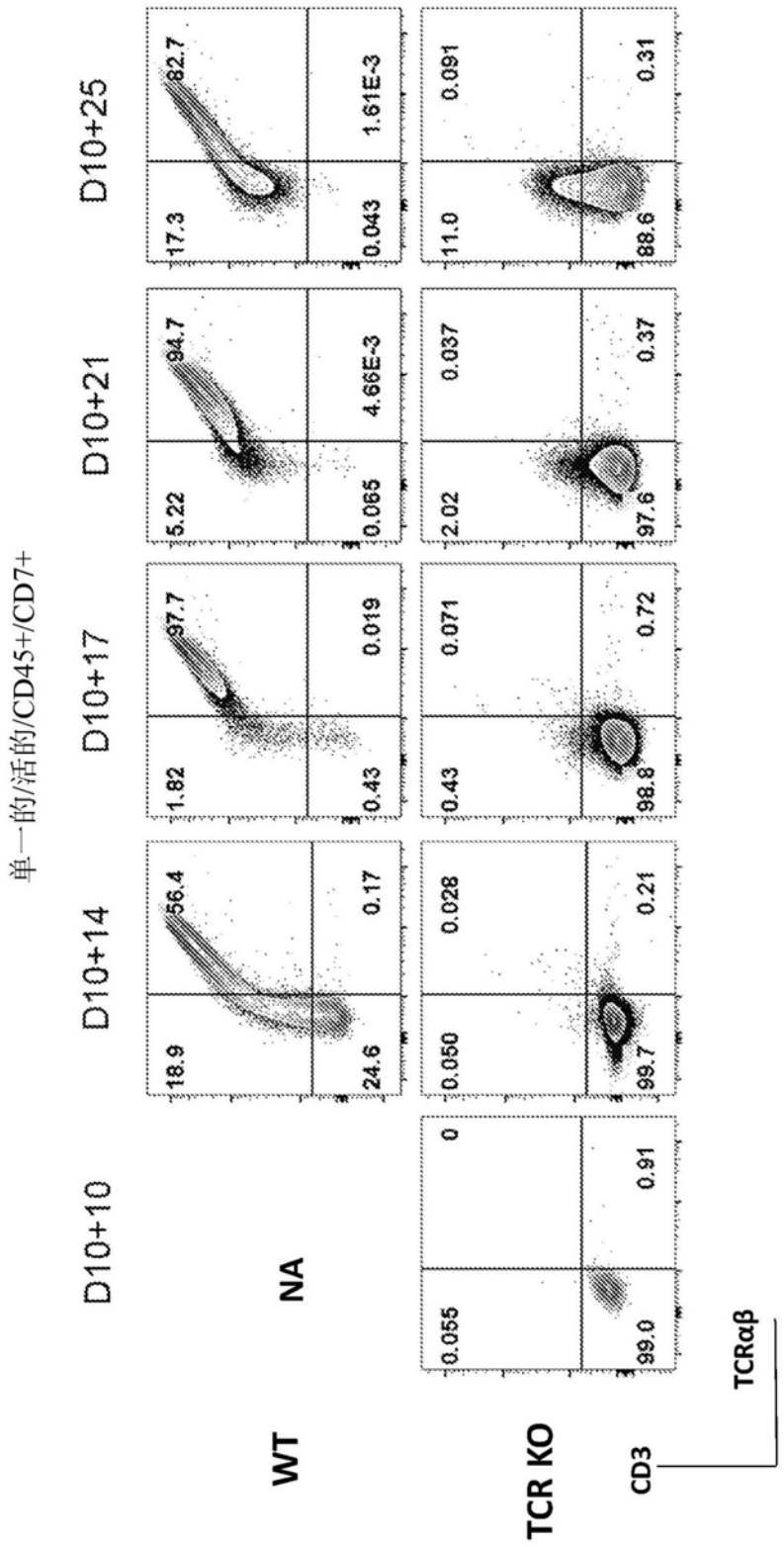

单一的/活的/CD45+/CD7+
D10+10
D10+14
D10+17
D10+21
D10+25
WT
NA
TCR KO
CD3
TCRαβ
0.055
99.0
0
0.91
18.9
24.6
56.4
0.17
1.82
0.43
97.7
0.019
5.22
0.065
94.7
4.66E-3
17.3
0.043
82.7
1.61E-3
0.050
99.7
0.028
0.21
0.43
98.8
0.071
0.72
2.02
97.6
0.037
0.37
11.0
88.6
0.091
0.31

图9A

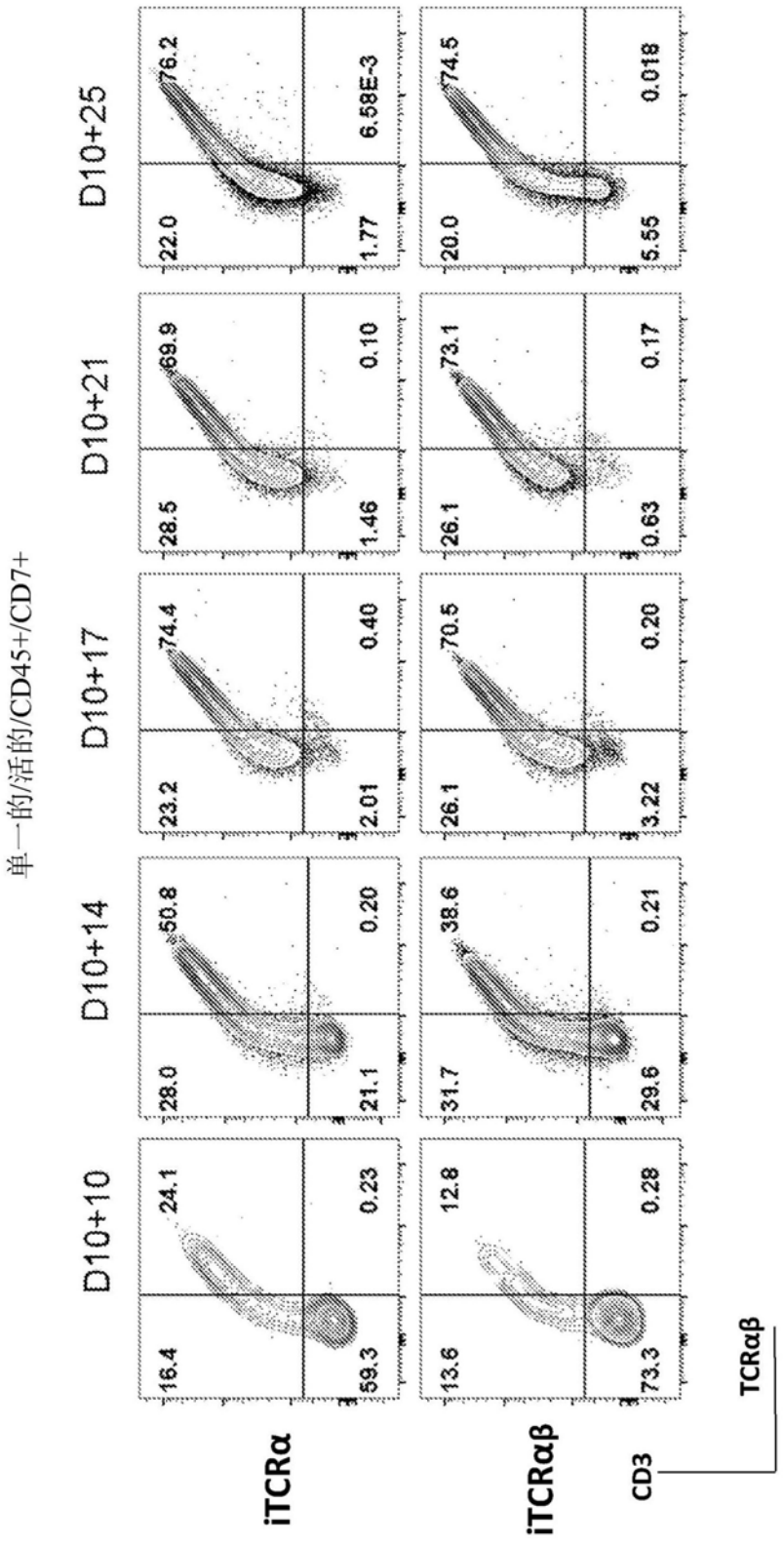

单一的/活的/CD45+/CD7+
D10+10
D10+14
D10+17
D10+21
D10+25
iTCRα
iTCRαβ
CD3
TCRαβ
16.4
24.1
59.3
0.23
28.0
50.8
21.1
0.20
23.2
74.4
2.01
0.40
28.5
69.9
1.46
0.10
22.0
76.2
1.77
6.58E-3
13.6
12.8
73.3
0.28
31.7
38.6
29.6
0.21
26.1
70.5
3.22
0.20
26.1
73.1
0.63
0.17
20.0
74.5
5.55
0.018

图9B

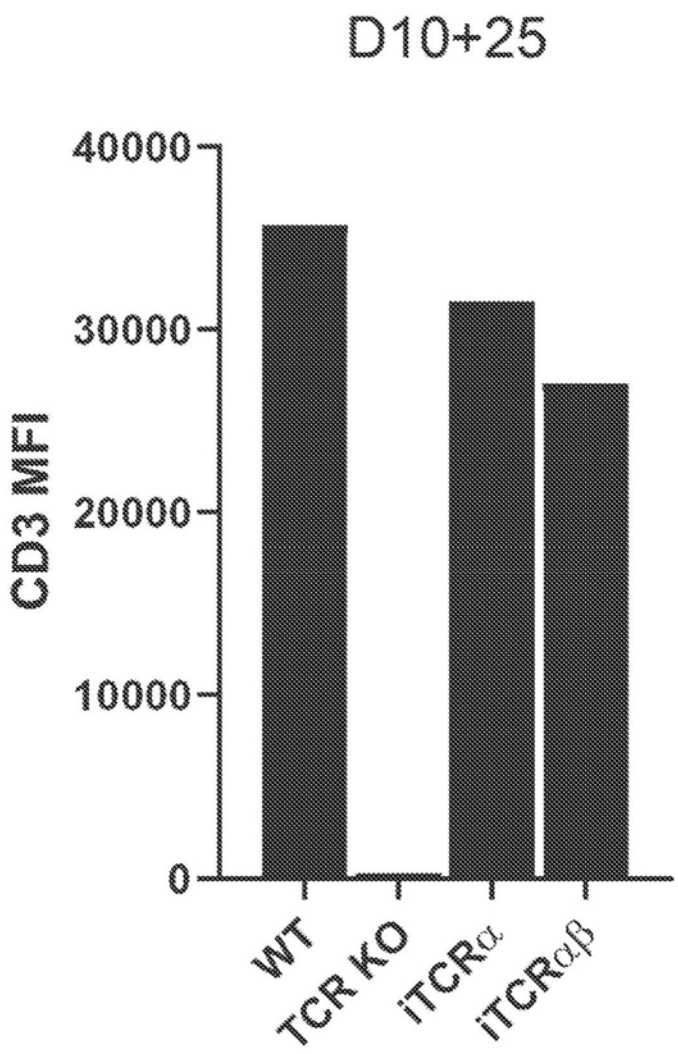

D10+25
40000
30000
20000
10000
0
CD3 MFI
WT
TCR KO
iTCRα
iTCRαβ

图9C

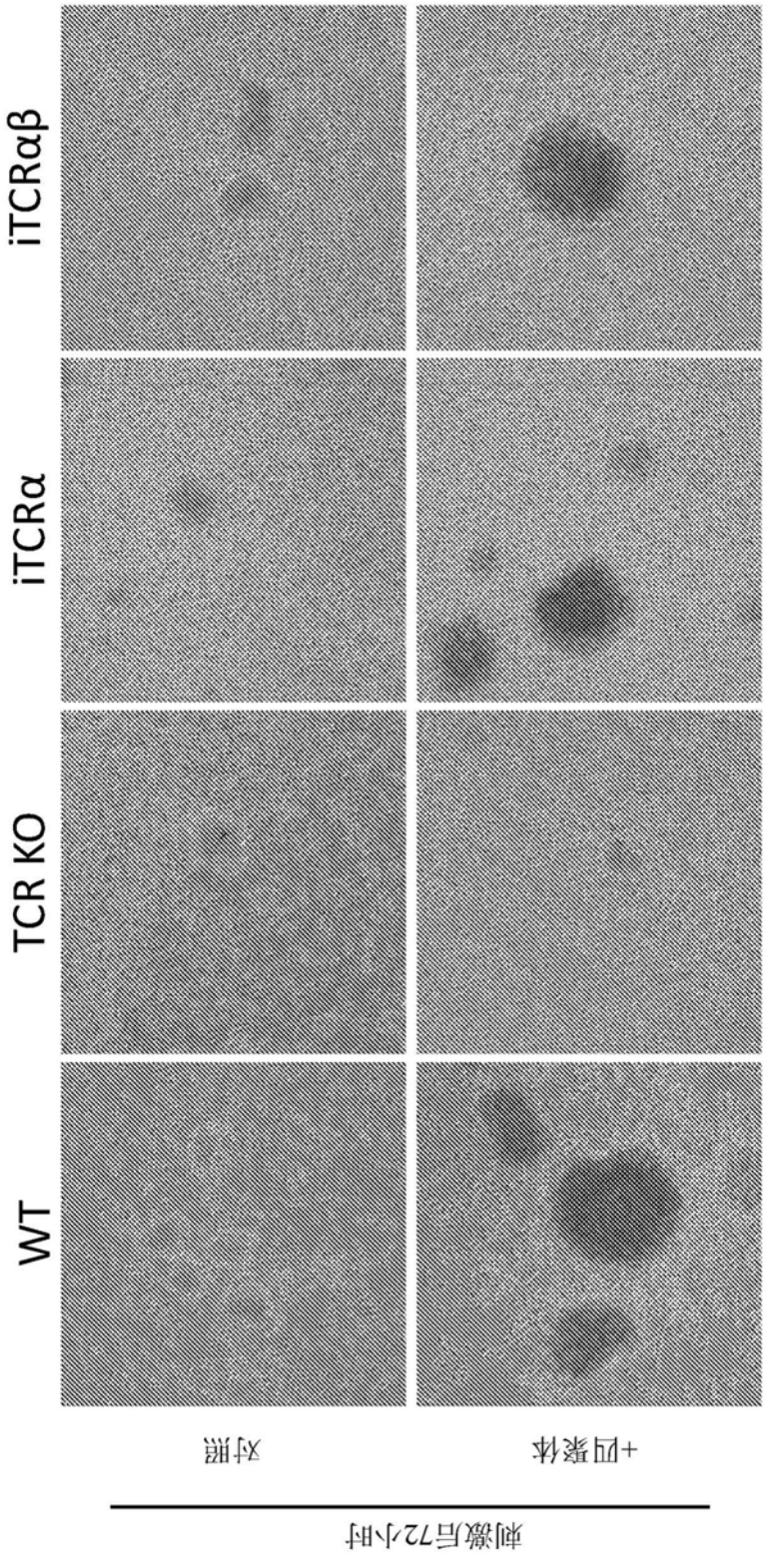



图10

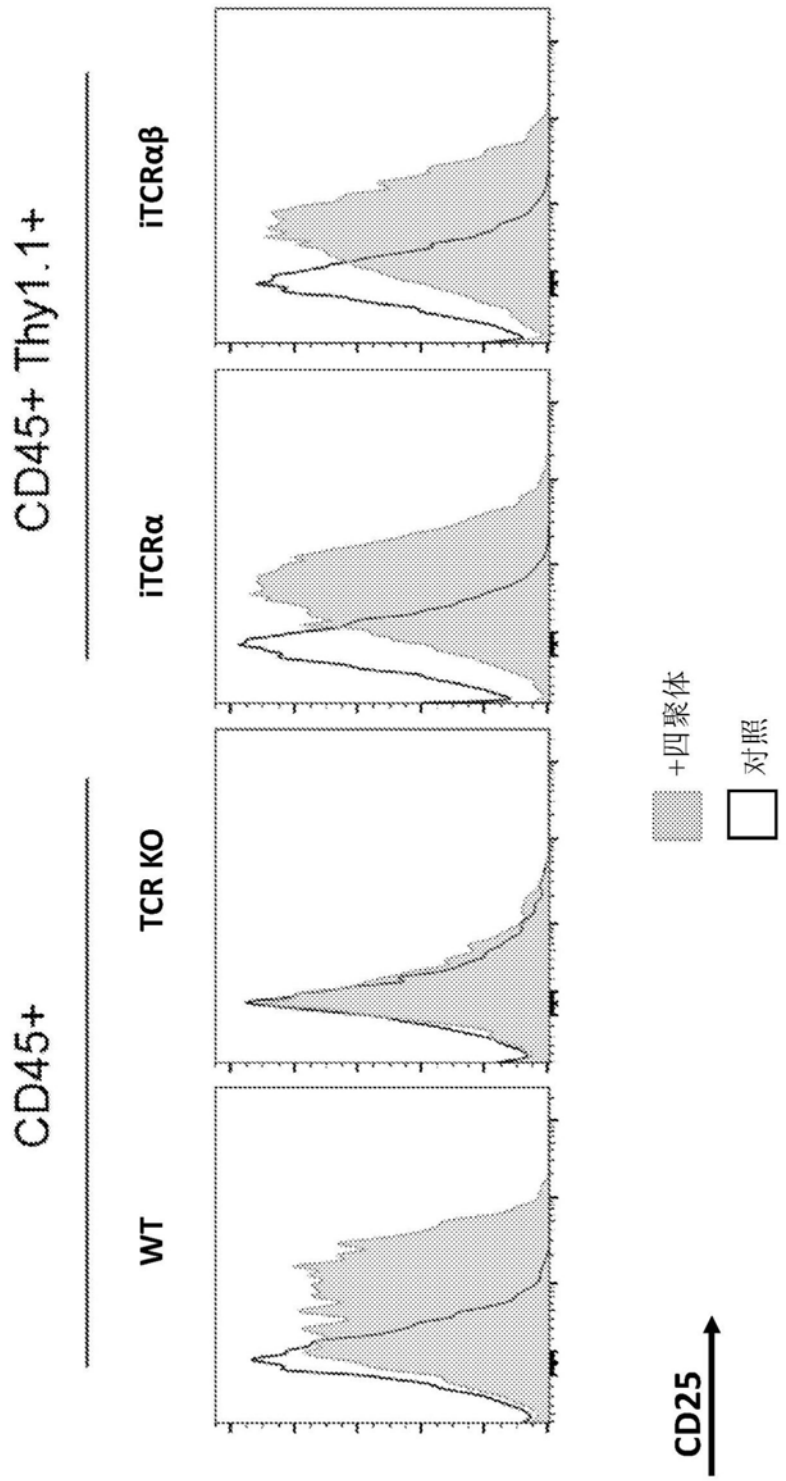



图11

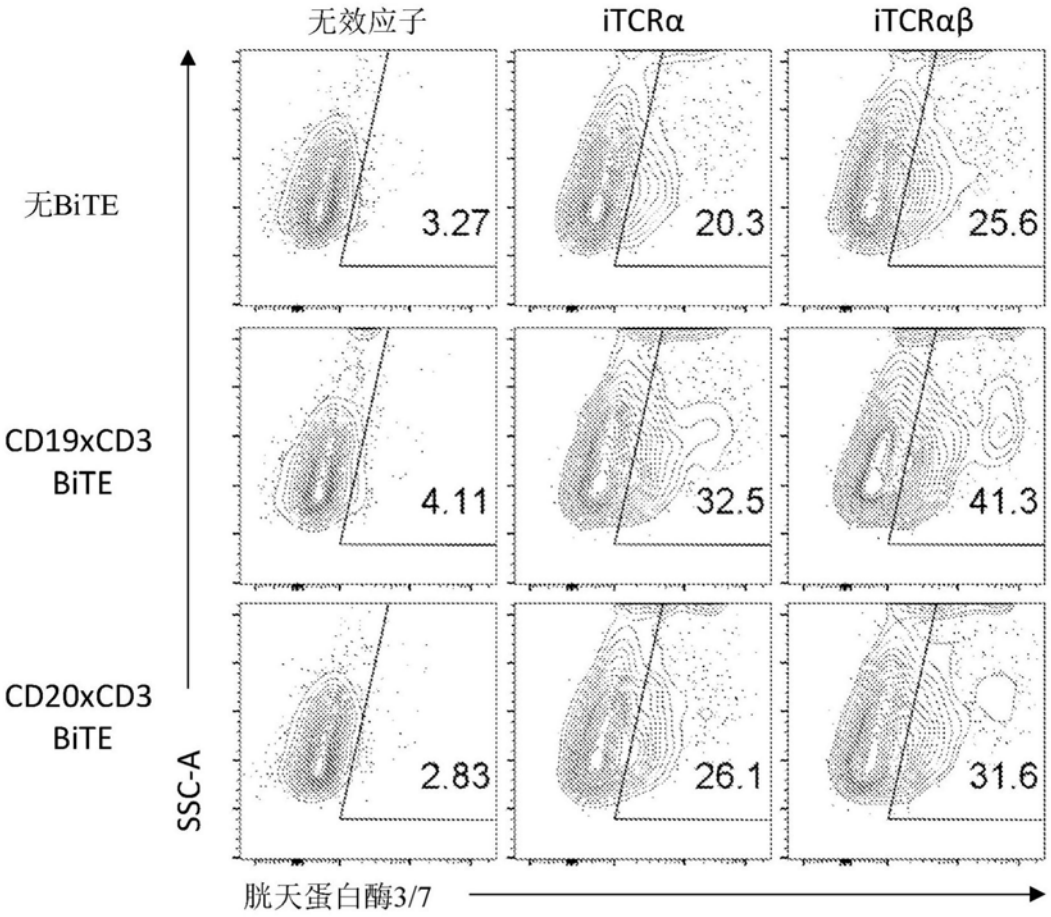
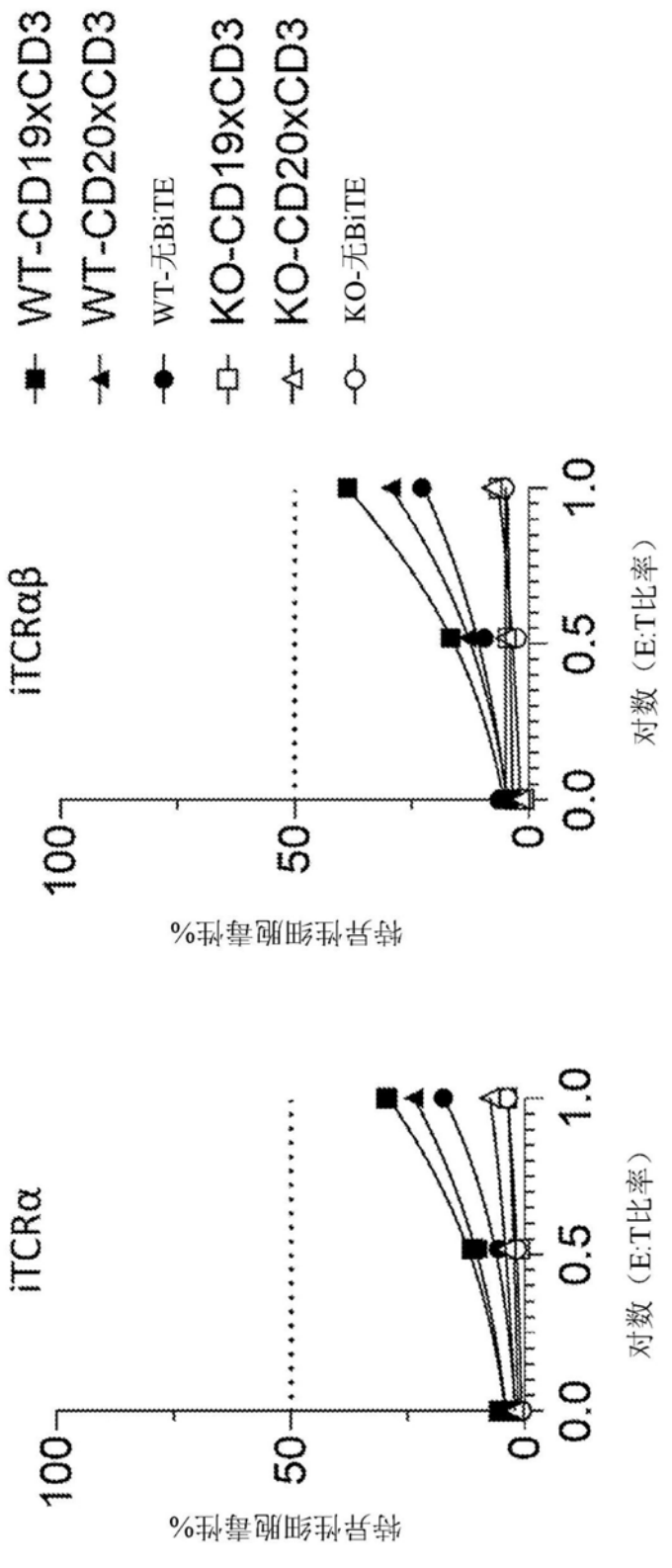

无效应子
iTCRα
iTCRαβ
无BiTE
CD19xCD3 BiTE
CD20xCD3 BiTE
3.27
20.3
25.6
4.11
32.5
41.3
2.83
26.1
31.6
SSC-A
胱天蛋白酶3/7

图12A




| EC50 | 无BiTE | CD19xCD3 BiTE | CD20xCD3 BiTE |
|---|---|---|---|
| iTCRα | 46.59 | 24.68 | 38.80 |
| iTCRαβ | 51.44 | 15.52 | 25.24 |

图12B