



(10) 授权公告号 CN 111630167 B

(45) 授权公告日 2024.08.09

(21) 申请号 201880043866.7

A·贝托莱特

(22) 申请日 2018.06.27

(74) 专利代理机构 上海一平知识产权代理有限公司 31266

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 111630167 A

专利代理师 崔佳佳 徐迅

(43) 申请公布日 2020.09.04

(51) Int.Cl.

(30) 优先权数据  
10201705285S 2017.06.27 SG

C12N 15/113 (2006.01)

A61K 35/17 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2019.12.27

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/SG2018/050313 2018.06.27

C12N 5/0783 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02019/004939 EN 2019.01.03

(56) 对比文件

W0 2016138278 A2, 2016.09.01

W0 2016196388 A1, 2016.12.08

W0 2017093969 A1, 2017.06.08

(73) 专利权人 新加坡科技研究局  
地址 新加坡新加坡市  
专利权人 来恩生物医药有限公司

审查员 陈仕高

(72) 发明人 E·古奇奥尼 韦庆文

权利要求书3页 说明书21页  
序列表(电子公布) 附图20页

(54) 发明名称

用于调节T细胞功能的反义寡核苷酸

(57) 摘要

本发明涉及用于调节T细胞功能的反义寡核苷酸,包括与IFN- $\gamma$ 、颗粒酶、穿孔素1、PD-1、PRDM1、PD-L1、CD40LG、NDFIP1、PDCD1 LG2、REL、BTLA、CD80、CD160、CD244、LAG3、TIGIT、ADORA2A和TIM-3 RNA杂交的反义寡核苷酸。特别地,本发明涉及能够诱导RNA的外显子跳读的反义寡核苷酸。本发明还要求保护通过提供T细胞受体基因进一步修饰所述T细胞特异性的方法。

1. 一种反义寡核苷酸,其特征在於,所述反义寡核苷酸调节:T细胞扩增、T细胞杀伤的能力,或T细胞产生抗病毒细胞因子的能力中的一种或多种;所述反义寡核苷酸通过改变PD-1的同种型表达调节T细胞表达;所述寡核苷酸通过特异性地与免疫相关或免疫调节基因的前体mRNA杂交,从而能够诱导外显子跳读;并且,所述反义寡核苷酸的序列为SEQ ID NO: 6508或SEQ ID NO: 69648。

2. 如权利要求1所述的反义寡核苷酸,其特征在於,所述寡核苷酸与PD-1 RNA的靶标区域特异性杂交,所述靶标区域是外显子2,将膜结合的PD-1表达转变为可溶性同种型PD-1表达。

3. 如权利要求1所述的反义寡核苷酸,其特征在於,所述反义寡核苷酸包含经修饰的多核苷酸骨架。

4. 如权利要求3所述的反义寡核苷酸,其特征在於,所述经修饰的多核苷酸骨架包含取代至少一个多核苷酸的糖的经修饰部分。

5. 如权利要求1-4中任一项所述的反义寡核苷酸,其特征在於,所述反义寡核苷酸包含选自下组的骨架:2'-O-甲基-寡核糖核苷酸。

6. 如权利要求1-4中任一项所述的反义寡核苷酸,其特征在於,所述寡核苷酸与提高所述反义寡核苷酸的活性、细胞分布或细胞摄取的一个或多个偶联物化学连接。

7. 一种药物组合物,其特征在於,包含权利要求1-6中任一项所述的反义寡核苷酸和药学上可接受的载体。

8. 如权利要求7所述的组合物,其特征在於,还包含编码T细胞受体基因的核酸分子。

9. 如权利要求8所述的组合物,其特征在於,所述核酸分子是mRNA。

10. 如权利要求7所述的组合物,其特征在於,所述组合物适合于裸露或与递送剂形成复合物经胃肠外给予患者。

11. 如权利要求10所述的组合物,其特征在於,所述递送剂选自下组:纳米颗粒、脂质体、病毒载体、聚合物和细胞穿透肽。

12. 如权利要求10所述的组合物,其特征在於,所述递送剂为UsnRNA。

13. 如权利要求10所述的组合物,其特征在於,所述递送剂为阳离子脂质。

14. 如权利要求7-13中任一项所述的组合物,其特征在於,所述反义寡核苷酸经口服、或经粘膜、或肠、或肌内、或皮下、或髓内、或鞘内、或直接在脑室内、或静脉内、或腹膜内、或鼻内或眼内给予。

15. 如权利要求7-13中任一项所述的组合物,其特征在於,所述反义寡核苷酸经直肠、或玻璃体内给予。

16. 一种权利要求1-6中任一项所述的反义寡核苷酸或权利要求7-15中任一项所述的药物组合物在制备治疗患者的肝癌的药物中的用途。

17. 如权利要求16所述的用途,其特征在於,给予所述患者其它抗癌剂或治疗药物。

18. 如权利要求16所述的用途,其特征在於,所述反义寡核苷酸转染入T细胞,并且所述用途包括将所述转染的T细胞给予所述患者。

19. 如权利要求18所述的用途,其特征在於,通过选自以下的任一方式将所述反义寡核苷酸转染或引入T细胞:超声处理、电穿孔、渗透压冲击、磷酸钙沉淀、DEAE葡聚糖转染、脂质

介导的递送和被动递送。

20. 如权利要求18所述的用途,其特征在于,通过电脉冲的方式将所述反义寡核苷酸转染或引入T细胞。

21. 如权利要求16-20中任一项所述的用途,其特征在于,所述反义寡核苷酸与递送剂形成复合物,所述递送剂选自下组:纳米颗粒、脂质体、病毒载体、聚合物和细胞穿透肽。

22. 如权利要求16-20中任一项所述的用途,其特征在于,所述反义寡核苷酸与递送剂形成复合物,所述递送剂为阳离子脂质。

23. 如权利要求16-20中任一项所述的用途,其特征在于,所述反义寡核苷酸与递送剂形成复合物,所述递送剂为UsnRNA。

24. 如权利要求21所述的用途,其特征在于,所述纳米颗粒为聚合物纳米颗粒。

25. 如权利要求21所述的用途,其特征在于,所述脂质体为pH敏感脂质体。

26. 如权利要求21所述的用途,其特征在于,所述脂质体为抗体偶联脂质体。

27. 如权利要求23所述的用途,其特征在于,所述UsnRNA为U7 snRNA。

28. 如权利要求16-20或24-27中任一项所述的用途,其特征在于,所述反义寡核苷酸或组合物经口服、或经粘膜、或肠、或肌内、或皮下、或髓内、或鞘内、或直接在脑室内、或静脉内、或腹膜内、或鼻内或眼内给予。

29. 如权利要求16-20或24-27中任一项所述的用途,其特征在于,所述反义寡核苷酸或组合物经直肠、或玻璃体内给予。

30. 如权利要求16-20或24-27中任一项所述的用途,其特征在于,所述肝癌选自下组: HBV诱导的HCC。

31. 如权利要求16-20或24-27中任一项所述的用途,其特征在于,所述T细胞还包含编码T细胞受体基因的外源核酸分子。

32. 一种诱导离体T细胞表达的免疫相关或免疫调节基因前体-mRNA的外显子跳读的方法,其特征在于,所述方法包括将权利要求1-6中任一项所述的反义寡核苷酸或权利要求7-15中任一项所述的组合物递送至所述T细胞。

33. 如权利要求32所述的方法,其特征在于,所述细胞是离体人T细胞。

34. 一种调节离体T-细胞功能的方法,其特征在于,所述方法包括将权利要求1-6中任一项所述的反义寡核苷酸给予所述T细胞。

35. 如权利要求34所述的方法,其特征在于,所述方法还包括通过给予所述T-细胞编码T-细胞受体基因的核酸分子来修饰所述T-细胞的特异性。

36. 如权利要求35所述的方法,其特征在于,通过选自以下的任一方式将所述编码T-细胞受体基因的核酸分子转染或引入T细胞:超声处理、电穿孔、渗透压冲击、磷酸钙沉淀、DEAE葡聚糖转染、脂质介导的递送和被动递送。

37. 如权利要求35所述的方法,其特征在于,通过电脉冲的方式将所述编码T-细胞受体基因的核酸分子转染或引入T细胞。

38. 一种用权利要求1-6中任一项所述的反义寡核苷酸转化或转染的T-细胞。

39. 如权利要求38所述的T细胞,其特征在于,通过电穿孔方法将所述反义寡核苷酸转染或引入T细胞。

40. 如权利要求38或39所述的T细胞,其特征在于,还包含编码T细胞受体基因的核酸分

子。

41. 如权利要求40所述的T细胞,其特征在于,所述核酸分子是mRNA。

42. 一种试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包含权利要求1-6中任一项所述的反义寡核苷酸,和包装插页、说明书或标签。

43. 如权利要求42所述的试剂盒,其特征在于,所述反义寡核苷酸位于容器中。

## 用于调节T细胞功能的反义寡核苷酸

[0001] 本发明涉及反义寡核苷酸。具体地说,本发明涉及能够诱导外显子跳读(exon skipping)的反义寡核苷酸。更具体地,本发明涉及此类反义寡核苷酸在免疫治疗领域,特别是针对肿瘤和/或病毒感染(例如乙型肝炎引起的肝细胞癌、EBV引起的NKT细胞淋巴瘤和其它慢性感染,例如慢性HBV感染和人巨细胞病毒感染)的免疫治疗中的用途。

[0002] 此处显示,T细胞表达的免疫相关或免疫调节基因的直接和选择性下调(例如,通过反义寡核苷酸(ASO)介导的外显子跳读或内含子保留)可导致T细胞功能的调节(例如增强的扩增、杀伤能力或产生抗病毒细胞因子的能力)。

[0003] “科学”杂志已将癌症免疫疗法宣布为“2013年的突破”[1]。一些正在进行的有希望的临床试验和承认新模式转变的希望证明了编辑人员所作的陈述:该疗法现在针对的是免疫系统,而非肿瘤[2]。各种其它方法的失败以及将“免疫逃逸”定义为癌症新标志的新发现都支持这种策略的改变。事实上,该领域的新进展表明免疫系统在监视和消灭肿瘤方面积极发挥作用,由于癌细胞表面经常具有可能被检测得到的修饰分子(肿瘤相关抗原),从而导致它们被消除。然而,癌症通常能够逃避检查或使得免疫反应沉默。因此,恢复功能和及时的免疫抗肿瘤活性可以改善长期未得到解决的抗癌斗争。

[0004] 免疫疗法的第一种方法是给予能够刺激免疫系统的细胞因子(例如IL-2),而如今,过继性T细胞转移和免疫检查点阻断已被广泛采用[3]。过继性T细胞转移是向患者体内施用经工程改造的淋巴细胞,工程改造过程旨在针对肿瘤相关抗原的T细胞活化和/或重定向。各种概念验证研究已经揭示了工程改造的T细胞在过继转移治疗中的潜力,关键的构思在于通过抗原受体基因的转移来重定向T细胞特异性。在过去的几十年中很少开发这样的策略,它们涉及常规T细胞受体(TCR)的重组变体,或与跨膜和激活域连接的抗体样受体链的复合物(CAR)[4]。

[0005] 嵌合抗原受体(CAR)由三个功能单元组成:用于抗原识别的胞外域、跨膜锚定域和胞内信号传导域[5]。第一个是抗体样单链,其主要优点是抗原结合强度(比常规T细胞受体高很多倍),并且识别不受HLA限制或不依赖于抗原呈递细胞(APC)上的抗原呈递途径。相反,信号传导域源自CD3 $\zeta$ 的元件与共刺激域的组合。在过去的几十年中,CAR有了长足的进展,许多研究正在进行中,并给出令人鼓舞的结果;然而,目前仅鉴定了少数特异性靶标,此外,这些受体可能因它们的非生理特性而是免疫原性的。

[0006] 用于过继免疫治疗的T细胞受体(TCR)由生理 $\alpha\beta$ 异源二聚体构成,其经过工程改造以避免与内源性TCR链二聚化,并且与CD3复合物的信号传导元件一起表达[6]。TCR结合与MHC-I(主要组织相容性复合物-I)分子组合并在其表面呈递的抗原。这种方法仅限于这样的环境,其中针对MHC-I/肽复合物的TCR已从抗原特异性T细胞中分离并进行表征,并且它依赖于癌细胞的呈递途径。然而,与CAR相比,TCR具有非免疫原性的生理结构,并且其体内活性在生理条件下是已知的。

[0007] 在慢性乙型肝炎或乙型肝炎病毒(HBV)相关的肝细胞癌(HCC)的情况下,过继性T细胞疗法已显示出积极的成果。具体地说,用表达HLA限制性HBV特异性TCR的病毒载体转导的T细胞能够识别衍生自与MHC-I分子一起呈递的病毒的核心和包膜蛋白的肽[7]。该识别

诱导了HBV特异性T细胞的激活,从而导致HBV感染细胞的裂解。此外,相同的细胞已成功用于HBsAg阳性HCC复发的患者[8]。在患者体内输注的HBV特异性TCR重定向T细胞能够在体内增殖,体外测试证实了它们的特异性和激活状态。治疗4周后,免疫疗法诱导HBsAg水平下降,同时T细胞趋化因子和ALT(丙氨酸转氨酶,肝细胞裂解的标志物)增加。

[0008] 然而,从两个不同的角度来看,用于稳定的逆转录或慢病毒转导的细胞治疗可能会引起这样的关注:首先,永远不能完全排除插入诱变的风险;第二,大量靶向HBV的T细胞的存在会导致肝毒性,因为多达90%的慢性患者的肝脏会被该病毒感染。正在研究的各种策略之一是通过电穿孔转染编码HBV特异性TCR的mRNA;该方法消除了慢病毒系统的使用,而且导致TCR的瞬时表达。与用逆转录或慢病毒系统转染的那些T细胞相比,用编码HBV特异性TCR的 $\alpha/\beta$ 链的mRNA作电穿孔的T细胞表达T细胞受体的频率可以更高[9]。这些电穿孔的细胞能够在体外裂解表达抗原的靶标,并能阻断小鼠PDX模型中的肿瘤生长。该方法的优点是TCR的高转染率和瞬时表达。最后一点可能被视为不利条件,即,需要向患者多次输注转染的T细胞,但从安全角度而言,这种改善是显著的,因为几天后HBV特异性会丧失,从而限制了肝脏损伤。

[0009] 鉴于修饰T细胞特异性的可能性,我们提出是否可能额外修饰其功能的问题。例如,通过阻断导致肿瘤微环境中T细胞被消除或耗尽的免疫检查点分子(例如PD-1和CTLA-4)来增强T细胞抵御癌细胞的能力可能是有益的[10]。或者,使T细胞的杀伤能力降低,从而限制其潜在的毒副作用(例如,通过下调穿孔素或颗粒酶的水平)是重要的。在通常用于修饰细胞表达的不同策略中(CRISPR/Cas9介导、TALEN介导、RNA干扰),我们选择采用经由反义寡核苷酸(ASO)的反义技术[11]。ASO是经过化学修饰的RNA的短寡聚物(长约25/30个碱基),它们能够与靶基因的前体mRNA退火并干扰它们的生理剪接[12]。需要对ASO进行化学修饰以提高其对核酸酶的抵抗力,并提供良好的药代动力学和药效学特性以供体内使用。将ASO设计为在特定位点与前体-mRNA退火,以掩盖正确剪接所需的顺式元件,因而改变靶前体-mRNA与剪接机器之间的相互作用。结果,这会导致经加工mRNA中的实质性缺陷,最终影响其稳定性和翻译。通过诱导从成熟mRNA中排除对蛋白功能或稳定性至关重要的外显子,可以利用该机制来敲除不需要的基因的功能。消除实际上可能导致产生编码非功能蛋白或触发mRNA的无义介导衰变(NMD)的mRNA同种型[13]。

[0010] 在过去的几年中,反义介导的剪接调控稳步发展,并已从临床前模型发展到杜氏肌营养不良症和脊髓性肌萎缩症的临床试验阶段,从而显示出显著的结果,为基因治疗中更激动人心的进展奠定了基础[14][15]。如果需要简单的敲低,也可以使用其它方法,例如RNA干扰或翻译抑制,但已证明ASO具有较低的脱靶效应和较高的体内稳定性,使其对于临床研究更适合并具有吸引力[16]。

[0011] 设计了干扰颗粒酶B和穿孔素前体-mRNA剪接的反义寡核苷酸(ASO),并将其与编码HBV特异性T细胞的V $\alpha/\beta$ 链的mRNA结合引入人淋巴细胞。分析了ASO修饰TCR重定向T细胞的细胞毒性T细胞功能的效率。我们证明,电穿孔后24小时,有50%的淋巴细胞表达HBV特异性TCR,并显示ASO靶向的mRNA有显著改变。在蛋白水平,HBV特异性TCR重定向的T细胞显示穿孔素表达降低40%。因此,穿孔素的敲低导致T细胞裂解HBV感染靶标的能力下降35%。但是,未检测到抗病毒活性有损害以及细胞毒性有降低。

[0012] 总的来说,我们证明了我们能够瞬时重定向T细胞的抗原特异性以便识别特异性

病毒抗原并同时调节它们的功能。在通过少量概念验证实验证明了该方法的有效性之后，我们旨在修饰TCR重定向的T细胞，以提高其在肿瘤微环境中的功效。总而言之，我们的结果很有希望设计更有效的效应分子，这些效应分子可以更安全地应用于肿瘤和慢性病毒感染的靶向和个性化治疗。

[0013] 本发明提供了T细胞功能的直接和选择性调节剂。“直接”是指我们直接调节涉及T细胞功能的关键基因的表达或剪接。“选择性”是指调节是序列特异性的，不调节其它mRNA的表达或剪接。考虑到剪接的异常调节可能与病理学情况（例如癌症）相关，这对于防止不良副作用（即由治疗引起的医源性作用）非常重要。这等于说提供了一种治疗对象癌症的方法，包括给予经离体功能修饰的TCR重定向T细胞（例如杀伤靶细胞或抑制病毒复制的能力）的步骤。可以通过将反义寡核苷酸离体给予T细胞来实现这种功能修饰。

[0014] 根据特定的实施方式，癌症表达可以被TCR重定向的T细胞靶向的特异性抗原（例如病毒HBV蛋白）。根据特定的实施方式，特异性抗原的表达是指可以通过测序方法检测到。根据特定的实施方式，所述癌症选自病毒诱导或表达病毒的癌症（例如，HBV诱导的HCC、EBV诱导的NKT淋巴瘤）。尽管T细胞功能的任何直接和选择性调节剂都可能适用于本文教导的方法（例如小分子，基于慢病毒或逆转录病毒的shRNA或CRISPR载体），但特别设想T细胞调节剂在RNA水平起作用。更具体地，抑制剂是反义寡核苷酸（ASO）。反义寡核苷酸应影响对T细胞功能重要的基因（例如IFN  $\gamma$ 、穿孔素、颗粒酶、PD-1）的表达或剪接。甚至更特别地设想了诱导外显子跳读的反义寡核苷酸。最特别地，跳读的外显子对于IFN  $\gamma$  是外显子2或3，对于穿孔素是外显子2b，对于颗粒酶是外显子3，对于PD-1是外显子2。因此，本文还提供了在上述转录物中诱导外显子跳读的反义寡核苷酸。还提供了用作药物的此类反义寡核苷酸。特别地，提供它们以供癌症免疫疗法。ASO可用作单一试剂，或同时经电穿孔进入T细胞以修饰其功能。

[0015] 在本说明书中列出或讨论明显在先出版的文件不应视作承认该文件是现有技术的一部分或是公知常识。

[0016] 本文引用的任何文件均通过引用全文纳入本文。

[0017] 本公开涉及一种或多种反义多核苷酸及其在用于抵御肿瘤和/或病毒感染（例如乙型肝炎诱导的肝细胞癌、EBV诱导的NKT细胞淋巴瘤等）的策略的药物组合物中的用途。此处显示，T细胞表达的免疫相关或免疫调节基因的直接和选择性下调（例如通过反义寡核苷酸（ASO）介导的外显子跳读或内含子保留）导致T细胞功能的调节（例如直接抑制病毒复制或选择性杀伤表达所靶向抗原的细胞）。

[0018] 在本发明的第一方面，提供了调节T细胞功能的反义寡核苷酸。

[0019] 术语“调节功能”意在包括任何活性的抑制或活性的增加，包括抑制、降低、调节或增强T细胞功能，例如人中T细胞的应答、T细胞与靶标的相互作用等。在各种实施方式中，反义寡核苷酸调节T细胞扩增、T细胞杀伤的能力或产生抗病毒细胞因子的能力中的一种或多种。

[0020] 相比于相同条件下、相同试验中但没有ASO序列存在下的未转染本发明ASO的T细胞活性，可以采用任何合适的体外、细胞或体内试验测得的T细胞的活性为至少1%，优选至少5%，例如至少10%或至少25%，如至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或90%或更多。本领域技术人员将清楚，“调节”还可涉及对T细胞受体对其一种或多种靶标、配体、受体

或底物的亲和力、亲合力、特异性和/或选择性施加改变(可以是增加或减少)。技术人员将清楚,这可以再次以任何合适的方式和/或使用本身已知的任何合适的测定法来确定,例如本文所述或本文引用的现有技术中的测定法。

[0021] “调节”还可以指对涉及T细胞受体及其靶标的一种或多种生物学或生理学机制、效应、反应、功能、途径或活性施加改变(即分别作为激动剂或作为拮抗剂的活性),例如其信号传导途径或代谢途径及其相关的生物学或生理学效应。再次,本领域技术人员将清楚,可以采用任何合适的方式和/或本身已知的任何合适的(体外,通常是细胞或体内在测定中)测定来确定作为激动剂或拮抗剂的作用。具体地说,作为激动剂或拮抗剂的作用是这样的,即,相比于在相同条件下、相同试验中但没有本发明的ASO存在下的生物学或生理学活性,预期的生物学或生理学活性分别增加或降低至少1%,优选至少5%,例如至少10%或至少25%,如至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或90%或更多。

[0022] 在一些实施方式中,反义寡核苷酸调节由T细胞表达的免疫相关或免疫调节基因的一种或多种活性或表达水平,条件是该基因不是CTLA4基因。表达水平包括调节剪接以改变免疫相关或免疫调节基因的同种型表达。

[0023] 在其它实施方式中,反义寡核苷酸通过阻断免疫检查点分子来调节T细胞的功能。免疫检查点分子可以是PD-1。

[0024] 在其它实施方式中,表达水平是直接或选择性下调免疫相关或免疫调节基因之一。寡核苷酸特异性地与免疫相关或免疫调节基因的前体mRNA或成熟mRNA的靶区域杂交,该基因可以是选自以下的任何一种:IFN- $\gamma$ 、颗粒酶、穿孔素1、PD-1、PRDM1、PD-L1、CD40LG、NDFIP1、PDCD1LG2、REL、BTLA、CD80、CD160、CD244、LAG3、TIGIT和TIM-3。

[0025] “杂交”是指根据Watson-Crick DNA互补性、Hoogsteen结合或本领域已知的其它序列特异性结合的规则,通过氢键在两条或三条核酸链之间的相互作用。杂交可以在本领域已知的不同严格条件下进行。本文所用的“特异性杂交”是允许互补或基本互补的多核苷酸链之间稳定的双链体的杂交。例如,具有21个核苷酸单元的多核苷酸链可以与另一个具有21个核苷酸单元的多核苷酸碱基配对,但是每条链上仅19个碱基是互补的或基本上互补的,从而使得“双链体”具有19个碱基对。其余碱基可以,例如作为5'和/或3'突出端存在。此外,在双链体内,不需要100%的互补性;在双链体中允许实质性互补。实质性互补是指75%或更高的互补性。例如,在由19个碱基对组成的双链体中的错配导致94.7%的互补性,从而使得双链体基本互补。

[0026] 在一个实施方式中,寡核苷酸与IFN- $\gamma$  RNA的外显子、内含子或外显子-内含子边界靶标区域特异性杂交,该靶标区域是选自以下的任一种:外显子1和外显子2。

[0027] 在其它实施方式中,寡核苷酸与穿孔素的外显子、内含子或外显子-内含子边界靶标区域特异性杂交,该靶标区域是外显子2b。

[0028] 在其它实施方式中,寡核苷酸与颗粒酶RNA的外显子、内含子或外显子-内含子边界靶标区域特异性杂交,该靶标区域是外显子3。

[0029] 在其它实施方式中,寡核苷酸与PD-1RNA的外显子、内含子或外显子-内含子边界靶标区域特异性杂交,该靶标区域是外显子2。

[0030] 本发明的反义寡核苷酸可以包含选自SEQ ID NO:1至69575中的任一序列。

[0031] 如稍后讨论的,可以修饰本发明的寡核苷酸(AON)的序列。修改后的序列的示例在

图24中显示。

[0032] 在一个实施方式中,本发明中使用的35个序列示于下表1中。

[0033]

0615_263_20M_E2	IFNG	5' - GUU CCA UUA UCC GCU ACA UCU GAA UGA CCU GC - 3'
0615_264_20M_E3	IFNG	5' - UUU GAA GUJ AAA GGA GAC AAU UUG GCU CUG CAU U - 3'
0615_265_20M_E3	IFNG	5' - UUU UGG AUG CUC UGG UCA UCU UUA AAG UUU UUA - 3'
0615_266_20M_E3	GZMB	5' - UAU UGU GGG CCC CCA AGG UGA CAU UUA UG - 3'
0615_267_20M_E3	GZMB	5' - UAA ACU GCU GGG UCG GCU CCU GUU CUU UGA - 3'
0615_268_20M_E2b	PPP1	5' - UGU AGG GCA UUU UCA CAG AGG GUG CAG GU - 3'
0615_269_20M_E2b	PPP1	5' - AUG CCC AGG AGG AGC AGA CGG GCU GCC AUG - 3'
0915_315_20M_E2	PD-1	5' - GUU CCA GGG CCU GUC UGG GG - 3'
0915_316_20M_E2	PD-1	5' - AGG GCU GGG GAG AAG GUG GGG - 3'
0915_317_20M_E2	PD-1	5' - AGU UUA GCA CGA AGC UCU CCG AUG UGU - 3'
0915_318_20M_E3	PD-L1	5' - CAC AUA UAG GUC CUU GGG AAC CGU GA - 3'
0915_319_20M_E4	PD-L1	5' - CAG UUC AUG UUC AGA GGU GAC UGG AUC C - 3'
0316_442_20M_E4	PFDM1	5' - AGG UUU UGC UCC CGG GGA GAG U - 3'
0316_443_20M_E4	PFDM1	5' - GGU GAA GCU CCC CUC UGG AAU AGA U - 3'
0316_444_20M_E4	PFDM1	5' - AUG GUG UAG AAG UAG AUG UUC AUC CCG UU - 3'
0316_447_20M_E3	CD40LG	5' - UGU UUU CUU UCU UCG UCU CCU CUU UGU UU - 3'
0316_448_20M_E2	CTLA4	5' - AAG GUC AAC UCA UUC CCC AUC AUG UAG GUU G - 3'
0316_449_20M_E2	CTLA4	5' - GUG GCU UUG CCU GGA GAU GCA UA - 3'
0316_450_20M_E2	CTLA4	5' - UUG CCG CAC AGA CUU CAG UCA C - 3'
0316_451_20M_E2	CTLA4	5' - AUG CAU ACU CAC ACA CAA AGC UGG - 3'
0316_452_20M_E3	NDRP1	5' - AUA ACU GGG CAG UGU UGU AGC UAC AUU G - 3'
0316_453_20M_E3	NDRP1	5' - UGG AAA CCC AGA CUC AUC CUU GUA GU - 3'
0316_457_20M_E3	PDCD1LG2	5' - UCC AGU GUC AAA GUU GCA UUC CAG GGU - 3'
0316_458_20M_E4	PDCD1LG2	5' - UCA UCU GUU UCU GGA ACC UUU AGG AUG UGA GU - 3'
0316_462_20M_E2	FEL	5' - GGG UUG UUC AAU UAU CUC UAU AUA CCG GU - 3'
0316_463_20M_E3	FEL	5' - GGU UUA UAU GGG UCA UUC UUU GUU ACU AA - 3'
0316_464_20M_E3	FEL	5' - UAG UAG CCG UCU CUG CAG UCU UUU C - 3'
0616_520_20M_E2	BTLA	5' - UGC UAA GAU GGA GUG UUC AGA UUG UCU CUU UAU A - 3'
0616_521_20M_E4	BTLA	5' - AAU UUC CCU UCC UGC UGU GUC AGA GAG - 3'
0616_522_20M_E2	CD80	5' - UGG GUC UCC AAA GGU UGU GGA UUU AGU UU - 3'
0616_523_20M_E3	CD160	5' - AAC UUG AAG CAA AUG UUG GCU CUG CUG GUA - 3'
0616_524_20M_E5	CD244	5' - UCG UAA AUU GUC AAA AAU UCC UUG GGA CUG GUC U - 3'
0616_525_20M_E2	LAG3	5' - GAG AUC CUG GAG GGG GAU UGU GG - 3'
0616_526_20M_E3	TIGIT	5' - AAU GGA AUC UGG AAC CUG GCA CCG U - 3'
0616_527_20M_E4	TIM-3	5' - AUU UAU AUC AGG GAG GCU CCC CAG UG - 3'

[0034] 表1

[0035] 表2列出了对应于表1的序列的序列表中列出的相应SEQ ID No.



核碱基。术语“核碱基”不仅包括已知的嘌呤和嘧啶杂环,还包括其杂环类似物和互变异构体。其它天然和非天然存在的核碱基包括以下公开的:美国专利第3,687,808号(Merigan等),第15章,Sanghvi,《反义研究和应用》(Antisense Research and Application),S.T.Crooke和B.Lebledu编,CRC出版社,1993,Englisch等,1991,Angewandte Chemie,国际版,30:613-722(特别是参见第622和623页)和《聚合物科学和工程简明百科全书》(Concise Encyclopedia of Polymer Science and Engineering),J.I.Kroschwitz编.,约翰韦利父子公司,1990,第858-859页,Cook,“抗癌药物设计”(Anti-Cancer Drug Design)1991,6,585-607,,各自通过引用全文纳入本文。在各个方面,多核苷酸还包括一个或多个“核苷碱基”或“碱基单元”,其包括可以像核苷碱基那样起作用的化合物,例如杂环化合物,包括从最经典的意义上讲不是核苷碱基但可以用作核苷碱基的某些“通用碱基”。通用碱基包括3-硝基吡咯、任选取代的吡咯(例如5-硝基吡咯)和任选取代的次黄嘌呤。其它理想的通用碱基包括吡咯和二唑或三唑衍生物,包括本领域已知的那些通用碱基。

[0040] 多核苷酸也可以包括修饰的核碱基。“修饰的碱基”在本领域中应理解为可以与天然碱基(例如腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶和/或胸腺嘧啶)配对和/或可以与非天然碱基配对的碱基。EP 1 072679和WO 97/12896中描述了示例性的经修饰碱基,其公开内容通过引用纳入本文。经修饰的核碱基包括但不限于5-甲基胞嘧啶(5-me-C)、5-羟甲基胞嘧啶、黄嘌呤、次黄嘌呤、2-氨基腺嘌呤、腺嘌呤和鸟嘌呤的6-甲基和其它烷基衍生物、腺嘌呤和鸟嘌呤的2-丙基和其它烷基衍生物、2-硫尿嘧啶、2-硫胸腺嘧啶和2-硫胞嘧啶、5-卤尿嘧啶和胞嘧啶、5-丙炔基尿嘧啶和胞嘧啶以及嘧啶碱基、6-偶氮尿嘧啶、胞嘧啶和胸腺嘧啶的其它炔基衍生物、5-尿嘧啶(假尿嘧啶)、4-硫尿嘧啶、8-卤代、8-氨基、8-硫醇、8-烷硫基、8-羟基和其它8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤,5-卤代,特别是5-溴、5-三氟甲基和其它5-取代尿嘧啶和胞嘧啶、7-甲基鸟嘌呤和7-甲基腺嘌呤、2-F-腺嘌呤、2-氨基腺嘌呤、8-氮杂鸟嘌呤和8-氮杂腺嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤和7-脱氮腺嘌呤和3-脱氮鸟嘌呤和3-脱氮腺嘌呤。进一步修饰的碱基包括三环嘧啶,例如吩恶嗪胞苷(1H-嘧啶[5,4-b][1,4]苯并噻嗪-2(3H)-酮)、吩噻嗪胞苷(1H-嘧啶[5,4-b][1,4]苯并噻嗪-2(3H)-酮)、G-夹(G-clamps),例如取代的吩恶嗪胞苷(例如9-(2-氨基乙氧基)-H-嘧啶[5,4-b][1,4]苯并噻嗪-2(3H)-酮)、呋唑胞苷(2H-嘧啶[4,5-b]吡咯-2-酮)、吡啶并吡咯胞苷(H-吡啶基[3',2':4,5]吡咯并[2,3-d]嘧啶-2-酮)。修饰的碱基还可包括其中嘌呤或嘧啶碱基被其它杂环替代的碱基,例如7-脱氮-腺嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤、2-氨基吡啶和2-吡啶酮。其它的核碱基包括美国专利第3,687,808号中公开的那些;《聚合物科学和工程简明百科全书》,第858-859页,Kroschwitz,J.I.编.,约翰·威利父子出版社,1990中公开的那些;Englisch等,1991,Angewandte Chemie,国际版,30:613中公开的那些;和Sanghvi,Y.S.,第15章,《反义研究和应用》,第289-302页,Crooke,S.T.和Lebledu,B.编,CRC出版社,1993中公开的那些。这些碱基中的某些可用于增加多核苷酸的结合亲和力,包括5-取代的嘧啶、6-氮杂嘧啶和N-2,N-6和O-6取代的嘌呤,包括2-氨基丙基腺嘌呤、5-丙炔基尿嘧啶和5-丙炔基胞嘧啶。已显示5-甲基胞嘧啶取代可将核酸双链体稳定性提高0.6-1.2°C,并在某些方面与2'-O-甲氧基乙基糖修饰相结合。参见以下美国专利号:3,687,808;4,845,205;5,130,302;5,134,066;5,175,273;5,367,066;5,432,272;5,457,187;5,459,255;5,484,908;5,502,177;5,525,711;5,552,540;5,587,469;5,594,121;5,596,091;5,614,617;5,645,985;5,830,653;5,763,588;6,005,096;5,750,692和5,681,

941,它们的内容通过引用纳入本文。

[0041] 本领域技术人员不难设计本公开的反义多核苷酸。例如,本领域的一般教导包括但不限于:Aartsma-Rus等,Methods Mol Biol.867:117-29(2012);Aartsma-Rus等,Methods Mol Biol.867:97-116(2012);van Roon-Mom等.,Methods Mol Biol.867:79-96(2012),各自通过引用纳入本文。一般原则还包括尝试避免3个连续的G或C核苷酸,选择有利于自身结构的长度和序列(避免发夹结构),并避免可能形成引物二聚体的序列。在一些实施方式中,本公开的反义多核苷酸是设计成与外显子或内含子或内含子-外显子边界特异性杂交的序列,如此该反义多核苷酸与完全位于T细胞表达的免疫相关或免疫调节基因/核酸的外显子内的序列特异性杂交,或者当该反义多核苷酸与这样的核酸特异性杂交时,该反义多核苷酸的约一个核苷酸跨越所述内含子-外显子边界。在其中反义多核苷酸与完全在外显子内的序列特异性杂交的一些实施方式中,考虑反义多核苷酸的末端离外显子末端约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个核苷酸。

[0042] 考虑使用修饰的多核苷酸,其中多核苷酸中核苷酸单元的一个或多个糖和/或一个或多个核苷酸间连接基团分别都被“非天然存在的”糖(即核糖或脱氧核糖以外的糖)或核苷酸间连接基团代替。在一方面,该实施方式考虑了肽核酸(PNA)。在PNA化合物中,多核苷酸的糖骨架被含酰胺的(例如,N-(2-氨基乙基)-甘氨酸单元之间的肽键)骨架取代。参见,例如美国专利号5,539,082;5,714,331;和5,719,262,和Nielsen等,Science,1991,254,1497-1500,它们的内容通过引用纳入本文。修饰的多核苷酸还可包含一个或多个取代的糖基。在一方面,糖的修饰包括锁核酸(LNA),其中2'-羟基与糖环的3'或4'碳原子连接,从而形成双环糖基。在某些方面,该连接基团为桥接2'氧原子和4'碳原子的亚甲基(-CH<sub>[2]</sub>-)<sub>[n]</sub>基团,其中n为1或2。LNA及其制备方法描述于WO 98/39352和WO 99/14226,其内容通过引用纳入本文。在本发明中,反义寡核苷酸优选包含经修饰的多核苷酸骨架。修饰的多核苷酸骨架可包含取代至少一个多核苷酸的糖的经修饰部分。

[0043] 在各种实施方式中,所述反义寡核苷酸包含经修饰的多核苷酸骨架。所述经修饰的多核苷酸骨架可包含取代至少一个多核苷酸的糖的经修饰部分。所述经修饰的部分可以选自下组:磷酸二酰胺吗啉寡聚物(PMO)、肽缀合的磷酸二酰胺吗啉寡聚物(PPMO)和非肽枝状八肽部分标记的吗啉寡聚物。

[0044] 在各种实施方式中,经修饰的多核苷酸骨架可包含至少一个经修饰的核苷酸间连接基团。所述经修饰的核苷酸间连接基团可包含经修饰的磷酸基团。所述经修饰的磷酸基团选自下组:取代硫原子的非桥连氧原子、膦酸酯基、硫代磷酸酯基、磷酸二酯基、吗啉代磷酸酯基、哌嗪磷酸酯基和磷酰胺基(phosphoroamidate)。

[0045] 在各种实施方式中,所述反义寡核苷酸包含选自下组的骨架:核糖核酸、脱氧核糖核酸、DNA硫代磷酸酯、RNA硫代磷酸酯、2'-O-甲基-寡核糖核苷酸、2'-O-甲基-寡脱氧核糖核苷酸、2'-O-羟基核糖核酸、2'-O-羟基DNA、2'-O-羟基RNA硫代磷酸酯、2'-O-羟基DNA硫代磷酸酯、2'-F-硫代磷酸酯、2'-F-磷酸二酯、2'-甲氧基乙基硫代磷酸酯、2-甲氧基乙基磷酸二酯、脱氧亚甲基(甲基亚氨基)(脱氧MMI)、2'-O-羟基MMI、脱氧-甲基膦酸酯、2'-O-羟基甲基膦酸酯、吗啉基、4'-硫代DNA、4'-硫代RNA、肽核酸、3'-酰胺基、脱氧3'-酰胺基、2'-O-羟基3'-酰胺基、锁核酸、环己烷核酸、三环DNA、2'氟-阿拉伯糖核酸、N3'-P5'磷酰胺基、氨基甲酸酯连接键、磷酸三酯连接键、尼龙骨架修饰和上述骨架的混合物。

[0046] 在各种实施方式中,所述寡核苷酸与提高所述反义寡核苷酸的活性、细胞分布或细胞摄取的一个或多个偶联物化学连接。

[0047] 所述寡核苷酸可与提高所述反义寡核苷酸的活性、细胞分布或细胞摄取的一个或多个偶联物化学连接。

[0048] 本公开的化合物还可以用作预防剂或治疗剂,其可以用于治疗遗传疾病的目的。因此,本发明的反义寡核苷酸宜用于治疗患者的癌症或自身免疫疾病。除反义寡核苷酸外,可给予患者其它抗癌药或治疗方法。癌症可以是选自以下的任何一种:HBV诱导的HCC、EBV诱导的非霍奇金淋巴瘤。

[0049] 如此,本发明的反义寡核苷酸可用于制备针对免疫调节分子(例如IFN- $\gamma$ 、颗粒酶、穿孔素等)的高效( $IC_{50} < 2.5nM$ )候选药物的新化学式。在本发明的另一方面,提供了一种药物组合物,其包含本发明的反义寡核苷酸和药学上可接受的载体。

[0050] 药学上可接受的载体通常是指适合给予对象的物质,其中该载体在生物学上无害,或不引起其它不良影响。此类载体通常是药物的惰性成分。通常,将载体与活性成分一起给予对象,而不会引起任何不希望的生物学效应或以有害的方式与其中所包含的药物组合物的任何其它组分相互作用。合适的药物载体描述于Martin,《雷明顿药物科学》(Remington's Pharmaceutical Sciences),第18版.,马克出版社.,伊斯顿,宾夕法尼亚州.,(1990),其内容通过引用纳入本文。

[0051] 本公开的更具体形式提供了药物组合物,其包含治疗有效量的反义多核苷酸以及药学上可接受的稀释剂、防腐剂、增溶剂、乳化剂、佐剂和/或载体。此类组合物包括各种缓冲剂内含物(例如磷酸盐、Tris-HCl、乙酸盐)、pH和离子强度剂以及添加剂,例如去污剂和增溶剂(例如吐温80、聚山梨酯80)、抗氧化剂(例如抗坏血酸、偏亚硫酸氢钠)、防腐剂(如硫柳汞、苯甲醇)和填充剂(如乳糖、甘露醇)。可以将这些物质掺入聚合化合物的颗粒制剂中,例如但不限于聚乳酸或聚乙醇酸,或掺入脂质体中。也可以使用透明质酸。此类组合物可影响所公开的组合物的物理状态、稳定性、体内释放率和体内清除率。所述组合物可以制备成液体形式,或者可以为干燥粉末,例如冻干形式。

[0052] 应当理解,本公开提供的药物组合物可以通过本领域已知的任何方式给予。优选地,用于给药的药物组合物通过注射、口服或通过肺或鼻途径给药。在各种实施方式中,反义多核苷酸通过静脉内、动脉内、腹膜内、肌内或皮下给药途径递送。在各种实施方式中,该组合物适合于裸露或与递送剂形成复合物经胃肠外给予患者。载体可以选自:纳米颗粒,例如聚合物纳米颗粒;脂质体,例如pH敏感脂质体、抗体偶联脂质体;病毒载体、阳离子脂质、聚合物、UsnRNA,例如U7 snRNA和细胞穿透肽。

[0053] 反义寡核苷酸可以口服、或直肠、或经粘膜、或肠、或肌内、或皮下、或髓内、或鞘内、或直接在脑室内、或静脉内、或玻璃体内、或腹膜内、或鼻内或眼内给予。

[0054] 本发明的反义分子包括任何药学上可接受的盐、酯或这些酯的盐,或在给予包括人在内的动物时能够(直接或间接)提供生物活性代谢物或残留物的任何其它化合物。因此,例如,本公开还涉及本发明化合物的前药和药学上可接受的盐,此类前药的药学上可接受的盐以及其它生物等效物。

[0055] 术语“药学上可接受的盐”是指本发明化合物的生理学上和药学上可接受的盐:即,保留母体化合物所需的生物学活性并且不赋予其不希望的毒理学作用的盐。

[0056] 对于多核苷酸,药学上可接受的盐的优选实例包括但不限于:(a)与阳离子,例如钠、钾、铵、镁、钙、聚胺如精胺和亚精胺形成的盐;(b)与无机酸,例如盐酸、氢溴酸、硫酸、磷酸、硝酸形成的酸加成盐;(c)与有机酸,例如乙酸、草酸、酒石酸、琥珀酸、马来酸、延胡索酸、葡萄糖酸、柠檬酸、苹果酸、抗坏血酸、苯甲酸、单宁酸、棕榈酸、藻酸、聚谷氨酸、萘磺酸、甲磺酸、对甲苯磺酸、萘二磺酸、聚半乳糖醛酸形成的盐;和(d)由元素阴离子,例如氯、溴和碘形成的盐。根据是否需要局部或全身治疗以及有待治疗的区域,可以采用多种方式给予本公开的药物组合物。给药可以是局部(包括眼科和粘膜给药,包括直肠递送),经肺,例如通过粉剂或气雾剂的吸入(包括通过雾化器、气管内、鼻内、表皮和透皮给药),口服或胃肠外给药。胃肠外给药包括静脉内、动脉内、皮下、腹膜内或肌内注射或输注;或颅内给药,例如鞘内或脑室内给药。据信具有至少一个2'-O-甲氧基乙基修饰的多核苷酸对于口服给药特别有用。

[0057] 可以根据制药工业中熟知的常规技术来制备本公开的药物制剂,所述药物制剂可以方便地作为单位剂型存在。此类技术包括使活性成分与药物载体或赋形剂结合的步骤。通常,通过将活性成分与液体载体或细分的固体载体或两者均匀地混合,然后(如果需要)使产品成型来制备制剂。

[0058] 本公开还考虑了与其它治疗剂的组合疗法。可以与本公开的组合物一起递送的治疗剂的实例包括但不限于糖皮质激素类固醇(例如但不限于泼尼松和地弗拉考特)、血管紧张素转化酶抑制剂、 $\beta$ 肾上腺素能受体阻滞剂、抗纤维化剂及其组合。

[0059] 在一些实施方式中,本发明可以用于基因治疗中,例如,利用包含本发明的多核苷酸的载体(如表达载体)来指导多核苷酸在合适的宿主细胞中的表达。此类载体可用于,例如在宿主细胞中扩增多核苷酸以产生其有用量,以及采用重组技术表达蛋白。在一些实施方式中,载体是表达载体,其中本发明的多核苷酸与包含表达控制序列的多核苷酸可操作地连接。

[0060] 在各种实施方式中,包含本发明的寡核苷酸的组合物还可包含编码T细胞受体基因的核酸分子。在一实施方式中,核酸分子可以是mRNA分子。

[0061] 将核酸引入T细胞的方法是本领域熟知和常规实践的,包括转化、转染、电穿孔、核注射或与诸如脂质体、胶束、鬼影细胞(ghost cell)和原生质体等载体融合。宿主T细胞可以被分离和/或纯化。T细胞也可以是体内转化的细胞,以便引起多肽在体内瞬时或永久表达。该T细胞也可以是离体转化的分离的细胞,在转化后引入,例如以便在体内产生用于治疗目的的多肽。

[0062] 可通过本领域熟知的转染方法将本发明的ASO引入T细胞。这些方法包括超声处理、电脉冲、电穿孔、渗透压冲击、磷酸钙沉淀和DEAE葡聚糖转染、脂质介导的递送、被动递送等。术语“转染T细胞”旨在包括将核酸分子引入T细胞的任何方式。术语“转染”包括可用于将核酸引入哺乳动物细胞的多种技术,包括电穿孔、磷酸钙沉淀、DEAE-葡聚糖处理、脂质转染、显微注射和病毒感染。用于转染哺乳动物细胞的合适方法可以参见Sambrook等.《分子克隆:实验室手册》(Molecular Cloning:A Laboratory Manual),第2版,冷泉港实验室出版社(1989)和其它实验室教科书。

[0063] 也可以利用病毒载体将ASO引入T细胞。此类病毒载体包括,例如重组逆转录病毒、腺病毒、腺伴随病毒和单纯疱疹病毒-1。通常将逆转录病毒载体和腺伴随病毒载体理解为

体内转移外源性基因,特别是进入人体而选用的重组基因递送系统。或者,它们可以用于将外源基因离体引入T细胞。这些载体将基因有效递送入T细胞,并且转移的核酸被稳定整合到宿主细胞的染色体DNA中。

[0064] 可用于本发明的另一种病毒基因传递系统利用腺病毒衍生的载体。可以操控腺病毒的基因组,使其编码和表达感兴趣的基因产物,但就其在正常裂解的病毒生命周期中复制的能力而言是失活的。可用于递送包含感兴趣基因的核酸分子的另一病毒载体系统是腺伴随病毒。

[0065] 所述ASO可以由细胞递送载体携带并递送至T细胞。此类载体包括,例如阳离子脂质体(Lipofectin™)或衍生的(例如抗体偶联的)聚赖氨酸偶联物、短杆菌肽S、人工病毒包膜。这些载体可以递送被整合入质粒、载体或病毒DNA中的核酸。在一具体的实施方式中,通过与阳离子脂质体形成复合物的腺相关病毒质粒DNA转染原代T淋巴细胞,将核酸分子有效引入原代T淋巴细胞中,如Philip,R.等.(1994)Mol.Cell.Biol.14,2411所述。

[0066] 在本发明的另一实施方式中,可以将ASO以可溶性分子复合物的形式递送。该复合物包含核酸,所述核酸可释放地结合核酸结合剂和细胞特异性结合剂组成的载体,该载体结合特异性T细胞的表面分子,并且其具有可随后被细胞内化的大小。

[0067] 在本发明的另一实施方式中,通过粒子轰击将核酸引入T细胞。

[0068] 在各种实施方式中,可以将ASO被动递送(即,在没有额外的转染试剂的情况下)到T细胞,特别是在T细胞扩增期间。本文所用的扩增包括在容器中并在本领域熟知的条件下,通过转染的神经干细胞产生子代细胞。在有合适的培养基和细胞生长因子存在下,可能发生扩增。可以在减血清条件下,包括0%血清条件下,将ASO被动递送至培养中(例如但不限于培养板、培养皿、多孔板等)的T细胞。此类条件包括在可从包括英杰公司和海克隆公司(HyClone)在内的许多公司市售可得的标准、经测试的减血清培养基中培养的细胞。在一个实例中,首先将细胞接种在血清培养基中,然后用包含本公开的三方寡核苷酸复合物的减血清培养基替代血清培养基,24小时,再用血清培养基替代减血清培养基。

[0069] 在各种实施方式中,转染试剂可以选自:聚合物、脂质、脂质聚合物和/或它们的组合和/或它们的含细胞靶向或胞内靶向部分和/或膜不稳定组分的衍生物以及一种或多种递送促进剂。

[0070] 本发明的另一方面提供了一种治疗患者疾病的方法,该方法包括给予本发明的反义寡核苷酸或药学有效量的本发明组合物。

[0071] 术语“有效量”或“治疗有效量”是指足以治疗、抑制或减轻正在治疗的疾病状态的一种或多种症状或以其它方式提供所需药理和/或生理作用,尤其是增强T细胞对所选抗原的应答的剂量。精确的剂量将根据多种因素,例如取决于对象的变量(如年龄、免疫系统健康等)、疾病和所给予的治疗而有所不同。

[0072] 本文所用的“药学上可接受的载体”包括任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗细菌和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。此类介质和试剂对于药物活性物质的用途是本领域熟知的。除非任何常规介质或试剂与活性化合物不相容,否则考虑其用于治疗组合物中。补充活性化合物也可以掺入组合物中。

[0073] 反义寡核苷酸或组合物可以通过口服、或经直肠、或经粘膜、或经肠、或肌内、或皮下、或髓内、或鞘内、或直接在脑室内、或静脉内、或玻璃体内、或腹膜内、或鼻内或眼内给

予。然而,经证实的全身性给药选择包括静脉内、腹膜内、鼻内和鞘内给药。ASO与递送载体(如纳米颗粒、基于聚合物或脂质体的载体)形成复合物可以进一步提高ASO向特定组织的递送效率。

[0074] 在各种实施方式中,已经将反义寡核苷酸转染入T细胞,该方法包括将转染的T细胞给予患者。可以通过电穿孔方法将反义寡核苷酸转染或引入T细胞。

[0075] 或者,可以通过磷酸钙转染、DEAE-葡聚糖介导的转染、阳离子脂质介导的转染、转导、感染、显微注射、重组病毒和逆转录病毒感染或其它方法将本发明的寡核苷酸引入T细胞。在许多标准实验室手册中描述了此类方法,例如Davis等.,《分子生物学基础方法》(Basic Methods In Molecular Biology) (1986)。特别考虑了本发明的多肽实际上可以由缺乏重组载体的宿主细胞表达。

[0076] 在各种实施方式中,载体选自:纳米颗粒,例如聚合物纳米颗粒;脂质体,例如pH敏感型脂质体、抗体偶联的脂质体;病毒载体、阳离子脂质、聚合物、UsnRNA(如U7 snRNA)和细胞穿透肽。

[0077] 在各种实施方式中,反义寡核苷酸或组合物经口服、或直肠、或经粘膜、或经肠、或肌内、或皮下、或髓内、或鞘内、或直接在脑室内、或静脉内、或玻璃体内、或腹膜内、或鼻内、或眼内给予。

[0078] 该疾病可以是选自以下的癌症:HBV诱导的HCC、EBV诱导的非霍奇金淋巴瘤。

[0079] 因此,本发明的反义寡核苷酸可用于医学中。

[0080] 本发明的另一方面提供了诱导由T细胞表达的免疫相关或免疫调节基因前体-mRNA的外显子跳读的方法,该方法包括将本发明任一上述方面的反义寡核苷酸或组合物递送至细胞。

[0081] 在各种实施方式中,所述细胞是人细胞。

[0082] 本发明的另一方面提供了调节T-细胞功能的方法,所述方法包括将本发明的反义寡核苷酸给予T细胞。

[0083] 所述方法还包括通过给予该T-细胞编码T-细胞受体基因的核酸分子来修饰T-细胞的特异性。通过电穿孔将编码T-细胞受体基因的核酸分子转染或引入T细胞。

[0084] 本发明的另一方面提供了用本发明的寡核苷酸转化或转染的T-细胞。在各种实施方式中,通过电穿孔方法将所述反义寡核苷酸转染或引入T细胞。

[0085] 所述T-细胞还可包含编码T-细胞受体基因的核酸分子,其中所述核酸分子是mRNA。

[0086] 本发明的另一方面提供一试剂盒,所述试剂盒包含任选在容器中的本发明的反义寡核苷酸,和包装插页、包装标签、说明书或其它标签。

[0087] 为了完全理解本发明并方便将其付诸实践,现在借助非限制性实施例(仅是本发明的优选实施方式)描述本发明,该描述参照附图进行。

[0088] 在附图中:

[0089] 图1.流式细胞仪图显示未转染的T细胞(左)、FAM标记的ASO转染的T细胞(中)和HBV特异性TCR连同FAM标记的ASO转染的T细胞(右)。使用PE(藻红蛋白)-偶联五聚体染色TCR,而ASO用FAM(6-羧基荧光素)标记。

[0090] 图2.A.下部:扩增加扰ASO(左)、500皮摩尔的IFN- $\gamma$ 特异性ASO(中)或1500皮摩尔

的ASO(右)处理的T细胞中IFN- $\gamma$  mRNA的PCR反应。不同泳道显示了未电穿孔T细胞中IFN- $\gamma$  mRNA的扩增。上部:直方图棒代表全长转录物的PSI(拼接指数百分比,Percentage Spliced Index)。PSI提供了所分析外显子的包含水平。B.直方图棒显示了胞内细胞因子染色的IFN- $\gamma$ 和TNF- $\alpha$ 荧光染色的MFI(中值荧光强度),根据加扰ASO处理T细胞的MFI作归一化。

[0091] 图3.A.HuH7 HCV复制子细胞系中萤光素酶表达与培养基中HCV复制或IFN- $\gamma$ 浓度的关系。B.直方图棒表示HuH7 HCV复制子细胞系中IFN- $\gamma$ -ASO处理的T细胞所致的HCV抑制百分数,根据加扰ASO处理的T细胞所致抑制作用作归一化。

[0092] 图4.不同量(1500-2500-5000皮摩尔)的IFN- $\gamma$ 特异性ASO或加扰ASO(2500皮摩尔)作电穿孔后24-48-96小时的IFN- $\gamma$  mRNA的PCR扩增。

[0093] 图5. 2500皮摩尔的颗粒酶B特异ASO(#266或#267)、穿孔素特异ASO(#268或#269)或加扰ASO作电穿孔后24小时的颗粒酶B(GZMB)和穿孔素(PRF1)mRNA的PCR扩增。对于GZMB(左)和PRF1(右),均标注了全长PCR产物和预期的外显子跳读产物长度。上部:直方图棒表示颗粒酶外显子跳读反应的PSI。无法对穿孔素进行相同的测量,因为未在凝胶中检测到特定的条带。

[0094] 图6.直方图棒表示在用ASO靶向颗粒酶B前体mRNA(左)或穿孔素前体mRNA(右)作电穿孔的T细胞中,胞内细胞因子染色实验中的MFI或阳性细胞百分比。该值根据用加扰ASO作电穿孔的T细胞获得的值归一化。

[0095] 图7.A.xCELLigence®RTCA DP孔的示意图。B.细胞指数是与孔中测得的阻抗成比例的无量纲单位(measure-less unit),而阻抗又与细胞融合度成正比。

[0096] 图8.A.xCELLigence®RTCA DP获得的细胞指数对时间的图。将产生HBV的肝癌细胞系接种于传感孔,并在24小时内监测细胞生长。将经处理的HBV特异性TCR重定向的T细胞添加到培养物中(效应物:靶标比率为1:2),并测量其细胞毒性能力。用加扰ASO(红色)、靶向穿孔素的ASO(绿色)、靶向颗粒酶和穿孔素的两种ASO(蓝线和黄线)对T细胞进行预处理。黑色线表示未添加T细胞的孔中记录的细胞指数。所有细胞指数根据培养物中添加T细胞的那一刻作归一化。B.直方图棒代表与产生HBV的肝癌细胞系培养24小时后,HBV特异性TCR重定向的T细胞的细胞毒性能力。

[0097] 图9和10.来自对照实验的数据。

[0098] 图11至15.利用AON#887(SEQ ID NO.6508)、888(SEQ ID NO.69648)和1173(SEQ ID NO.2565)(针对靶PD-1和CTLA-4)的实验获得的数据。

[0099] 图16和17.利用AON#263(SEQ ID NO.7274)(针对靶标IFN- $\gamma$ )的实验获得的数据。

[0100] 图18和19.利用AON#268(SEQ ID NO.15372)(针对靶标穿孔素)的实验获得的数据。

[0101] 图20.利用AON#524(SEQ ID NO.63352)、527(SEQ ID NO.67190)和526(SEQ ID NO.66260)(针对靶标CD244、TIM3(HAVCR2)和TGIT)的实验获得的数据。

[0102] 图21.利用AON#442(SEQ ID NO.25333)、443(SEQ ID NO.25599)、444(SEQ ID NO.25676)、462(SEQ ID NO.43942)、463(SEQ ID NO.45170)和464(SEQ ID NO.45445)(针对靶标PRDM1和REL)的实验获得的数据。

[0103] 图22.利用AON#523(SEQ ID NO.61632)(针对靶标CD160)的实验获得的数据。

[0104] 图23.利用AON 522(SEQ ID NO.53882)(针对靶标CD80)的实验获得的数据。

[0105] 图24示出了本发明实施方式的修饰序列的实例。

[0106] 本申请涉及免疫治疗领域,尤其涉及针对肿瘤和/或病毒感染(例如乙型肝炎诱导的肝细胞癌、EBV诱导的NKT细胞淋巴瘤等)的免疫治疗。此处显示了由T细胞表达的免疫相关或免疫调节基因的直接和选择性下调[例如,反义寡核苷酸(ASO)-介导的外显子跳读或内含子保留]导致对T细胞功能的调节(例如直接抑制病毒复制或选择性杀伤表达靶抗原的细胞)。

[0107] 定义

[0108] 根据具体实施方式以及参考某些附图来描述本发明,但是本发明不限于此,而仅由权利要求书来限定。权利要求中的任何附图标记不应解释为限制范围。所描述的附图仅是示意性而非限制性的。出于说明目的,附图中的一些元素的尺寸可能被放大并且未按比例绘制。在本说明书和权利要求书中如果使用术语“包括”,不排除其他元素或步骤。除非特别说明,如果在提及单数名词时使用不定冠词或定冠词,例如“一”或“一个”、“该”,这包括该名词的复数形式。此外,说明书和权利要求书中的术语第一、第二、第三等用于区分相似的元素,而不一定描述顺序或时间顺序。应当理解,如此使用的术语在适当的情况下是可互换的,并且本文描述的本发明实施方式能够以不同于本文描述或显示的其它顺序来操作。

[0109] 提供以下术语或定义仅为了帮助理解本发明。除非本文有具体定义,否则本文使用的所有术语具有对于本发明领域的技术人员相同的含义。对于本领域的定义和术语,实施者尤其可以参考Sambrook等.,《分子克隆:实验室手册》(Molecular Cloning:A Laboratory Manual),第2版.,冷泉港出版社,普莱恩斯维尤,纽约(1989);和Ausubel等.,《分子生物学最新方案》(Current Protocols in Molecular Biology)(增刊47),约翰·威利父子出版社,纽约(1999)。本文所提供的定义不应解释为具有小于本领域普通技术人员所理解的范围。

[0110] 实施例1

[0111] 可以将ASO有效引入HBV特异性TCR重定向的HBV原代T细胞

[0112] 为了修饰原代T细胞的特异性,我们采用电穿孔方法,利用编码TCR的V $\alpha$ / $\beta$ 链的mRNA转染它们,该TCR识别HBV包膜蛋白中的肽(S183-191),如[9]中所述。该肽通常经由MHC-1呈递到抗原呈递细胞(APC)表面或HBV感染的肝细胞上。因此,在T细胞表面表达S183-191特异性TCR使得它们能够识别HBV的存在并最终经历TCR活化。可以采用MHC多聚体的简单表面染色和流式细胞分析来评估T细胞表面的HBV特异性TCR的表达。MHC多聚体是MHC分子的经标记寡聚形式,其设计用于鉴定抗原特异性T细胞;MHC多聚体可以直接结合具有特定特异性的T细胞受体,并且该特异性由MHC分子和其上呈递的肽的组合确定。

[0113] 类似地,我们采用RNA电穿孔来修饰T细胞的功能,从而引入靶向不需要基因的各种外显子的反义寡核苷酸(ASO)。

[0114] 为了评估在活化的原代T细胞中递送ASO的可能性,我们利用FAM标记的加扰ASO,我们将其单独或与编码TCR的mRNA一起引入T细胞,并采用流式细胞术来找寻它们的存在。如图1的中间图所示,单独用FAM标记的ASO作电穿孔的T细胞中有94%对荧光团呈阳性,表明电穿孔是递送寡聚体的有效方法。类似地,右图显示了用TCR连同FAM-ASO作电穿孔的T细胞对于两种转染子都是阳性。最重要的是,再次有94%的T细胞显示出ASO阳性,这意味着引入两种不同的分子不会降低递送效率。图1的右图还显示,双电穿孔的T细胞被测定中使用

的两种荧光团双重染色,这意味着我们能够在单个反应中同时递送两种转染子,因此我们能够修饰T细胞特异性(引入TCR)和T细胞功能(引入ASO)。

[0115] 此外,在不同的实验中,我们在彼此间隔16小时的两个单独反应中,利用TCR和ASO对同一T细胞作电穿孔。我们对这种不同的时间表感兴趣,因为TCR的表达高峰和ASO的活性高峰可能不重合,并且它们的同时递送可能对T细胞产生不协调的影响。同样,通过这个特定的实验计划,我们设法同时获得TCR的表达和ASO的传递(数据未显示)。因此,我们可以证明我们能够在不同的时间点引入两个分子,从而允许我们在它们的最佳时机调整它们的作用。

[0116] 实施例2

[0117] 原代T细胞中可由ASO调节基因表达

[0118] 证明了在原代活化的T细胞(有或没有HBV特异性TCR)中转染ASO的可行性后,我们继续测试寡核苷酸干扰靶基因剪接的能力。为作概念验证,我们选择设计靶向干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )前体-mRNA外显子2的ASO,因为在实验室中我们可以利用各种工具来评估此类细胞因子的存在和活性。我们设计了围绕(IFN- $\gamma$ )外显子2的引物,以获得扩增全长和短(外显子跳读)同种型的PCR产物,从而对转染细胞的cDNA作简单PCR[11]。用非靶向/加扰序列转染原代细胞作为对照来评估该技术特异性。图2.A显示了PCR的结果:ASO明显以剂量依赖的方式干扰前体mRNA的剪接,从而导致外显子2被排除在最终的mRNA外。当500皮摩尔的IFN- $\gamma$ -靶向ASO转染的T细胞仅有8%在mRNA水平上表现出作用时,经三倍量的相同寡聚物转染的T细胞显示全长转录物减少了92%。用加扰ASO处理的T细胞未显示出IFN- $\gamma$ 转录物有任何修饰。然而,如图2.A所示,我们无法通过无义介导的RNA衰变消除外显子跳读的mRNA,像预期的那样。在对免疫相关蛋白进行生物信息学搜索后,我们意识到生理条件下正常存在许多剪接变体,尽管通常没有在功能上对它们作表征。

[0119] 然后,我们尝试在蛋白水平测量IFN- $\gamma$ 的丰度,以验证剪接的修饰(是否)反映在蛋白的敲除中。图2.B显示,尽管几乎完全消除了转染细胞中的全长mRNA,但仍可以通过胞内细胞因子染色检测到IFN- $\gamma$ 。染色显示IFN- $\gamma$ -特异性ASO处理的T细胞的荧光相比加扰ASO转染的T细胞仅降低25%。

[0120] mRNA和蛋白水平上结果之间的这种差异可以通过PCR检测到存在外显子跳读形式得以解释,而非通过NMD消除:无论如何,该mRNA可以翻译成较短的IFN- $\gamma$ 同种型,该同种型在胞内细胞因子染色中不能由抗体特异性检测。为了在蛋白水平检测T细胞中是否存在这种外显子跳读同种型,我们进行蛋白质印迹分析,但是测定的可行性和结果的质量仍然取决于抗体非特异检测较短蛋白,因此我们同意它与我们的研究目标无关。

[0121] 因此,我们随之测试由ASO转染细胞产生的IFN- $\gamma$ 的功能,以衡量治疗效果。为此,我们使用了一种完善的功能测定,该测定涉及使用HuH7细胞系,该细胞系转染了含有对IFN- $\gamma$ 抗病毒作用非常敏感的HCV复制子的质粒[17](图3.A)。用于转染的质粒还包含萤光素酶作为报告基因,因此在细胞中检测到的萤光素酶活性与HCV的“复制”成比例(图3.A)。

[0122] 在有源自ASO处理T细胞刺激的上清液存在下,我们培养HCV复制子细胞系过夜,并进行了萤光素酶试验以验证产生的IFN- $\gamma$ 是否能够停止复制子的产生。图3.B显示,已经用靶向IFN- $\gamma$ 的ASO转染的经刺激T细胞在控制病毒复制方面的能力较弱(与用加扰ASO作电穿孔的T细胞相比,降低50%)。这证实衍生自外显子跳读同种型的细胞因子无功能。

[0123] 最后,由于所用转染方法的主要目标之一是效果的瞬时性,我们检查了外显子跳读在mRNA水平上维持了多长时间。在图4中,我们看到该处理的效果随时间稀释,并且在电穿孔后96小时完全消失。

[0124] 实施例3

[0125] 原代T细胞中可由ASO调节细胞毒性

[0126] 如引言中所述,采用过继性T细胞转移治疗HCC等恶性肿瘤的一个可能的缺点是肝细胞毒性,因为实际上所有肝脏都可能成为效应T细胞的靶标,从而导致严重后果。限制这种风险并提高治疗安全性而采用一种措施是通过电穿孔诱导T细胞受体的瞬时表达,但我们探究了是否还能够利用反义技术修饰TCR重定向T细胞的毒性功能。采用相同的设置,我们分别引入了靶向颗粒酶B (ASOs#266和#267) 和穿孔素 (ASOs#268和#269) 的前体mRNA外显子3和外显子2的ASO。穿孔素和颗粒酶是在细胞毒性中起作用的两个主要效应物。

[0127] 在图5中,我们显示出在电穿孔后24小时 (以及在处理后6小时,数据未显示),我们可以在mRNA水平检测到两种蛋白的剪接修饰。与加扰ASO相比,颗粒酶特异性ASO可以产生91%的外显子跳读 (#266) 和70%的外显子跳读 (#267)。有趣的是,我们注意到,颗粒酶B自然呈现三种不同的剪接同种型,而ASO仅修饰全长和短转录物之间的比例。不幸的是,在文献中没有关于这些不同同种型在蛋白水平上存在和生理功能 (如果有的话) 的报道。因此,我们不知道这些同种型是否翻译成蛋白,以及它们是否也被我们在胞内细胞因子染色中用于检测的抗体检测到。

[0128] 此外,从同一图中我们注意到,穿孔素特异性ASO转染后无法检测到穿孔素mRNA的全长条带,但同时我们也无法检测到处理后我们认为能够得到的较短同种型。全长转录物的缺乏可以通过靶向穿孔素前体mRNA的ASO的作用来解释。另一方面,剪接改变产生的外显子跳读转录物可能会经历无义介导的RNA衰减,这可能解释了凝胶中条带的缺失。但是,要验证该假设,还需要进行更多实验。

[0129] 随后我们继续检查RNA水平的修饰是否反映在蛋白表达的某些修饰中,因此我们进行了胞内细胞因子染色以测量两种靶蛋白的水平。图6显示了颗粒酶和/或穿孔素阳性细胞的百分比以及中值荧光强度 (MFI),作为电穿孔后24小时细胞中蛋白丰度的量度。从图6中,我们没有发现颗粒酶B水平得到很大修饰。这可以通过上述多种同种型的存在来解释。事实上,那些转录物可以翻译成较短的蛋白,并与测定中使用的抗体结合。为了验证该假设,对于上一段中IFN- $\gamma$  的胞内细胞因子染色,需要进行蛋白质印迹以评估T细胞中这些较短蛋白的存在,但要符合相同的限制条件。

[0130] 在另一方面,与加扰ASO电穿孔的T细胞相比,特异性ASO处理的穿孔素阳性T细胞显示出更低的MFI (即便降低并不显著,仅为80%)。有趣的是,我们发现穿孔素阳性细胞的数量持续且显著降低 (与加扰ASO处理的T细胞相比,降低60%)。对此现象的可能解释是,靶向穿孔素前体mRNA的ASO非常有效,一旦进入细胞,它就能完全停止蛋白的生产。为此原因,阳性细胞的数量降低,而MFI并没有很大改变。

[0131] 该测定还显示,ASO的作用是特异性的,因为用靶向穿孔素的ASO处理的T细胞在颗粒酶B的水平上没有任何改变。

[0132] 然后,我们继续验证ASO处理的T细胞的细胞毒性能力是否由于反义寡核苷酸诱导的外显子跳读而得到修饰。因此,我们利用xCELLigence®RTCA DP (艾森生物科学公司,

Acea Biosciences)建立了细胞毒性测定。xCELLigence®RTCA DP是利用非介入电阻抗,以无标签实时方式监视细胞增殖和附着的仪器[18]。该测定的功能单位是位于板孔底部的一组电极。当处于导电溶液中时,在电极上施加电势会使电子离开负极端子并沉积在正极端子上,从而穿过导电介质(图7A)。这种现象取决于电极与溶液之间的直接相互作用,因此在电极-溶液界面处存在粘附细胞会阻碍电子流动。阻抗的大小取决于细胞的数量、大小和形状,并且可以利用在孔底部测得的阻抗来获得这些变量的测量值(细胞指数)(图7B)。采用这种实验方法,我们能够建立HBV特异性TCR重定向的T细胞和产生HBV细胞的共培养物,以便研究我们的经修饰效应物的杀伤能力。

[0133] 图8.A显示了HBV特异性T细胞杀伤产生HBV的细胞的能力。显然,ASO敲低T细胞中穿孔素和/或颗粒酶B的产生受损阻止了它们杀伤其靶标的的能力,如加扰ASO转染的TCR重定向T细胞那样。更具体地,我们发现,在培养物中添加效应物后24小时,加扰ASO处理的TCR重定向的T细胞杀伤几乎所有粘附细胞,导致细胞指数降低,因为靶标从孔底(红色)脱离。产生HBV的细胞与颗粒酶敲低T-细胞一起培养(黄色),在孔中观察到了相同的现象。相反,在共培养开始后24小时,用穿孔素特异性ASO处理的HBV特异性T细胞显示其杀伤能力降低20%(蓝色)。有趣的是,当用靶向穿孔素和颗粒酶B转录物的ASO转染TCR重定向的T细胞时,它们的细胞毒性能力甚至进一步降低(最高35%)。该结果表明,这两种转染子的作用是累加的(绿色),即使在T细胞作颗粒酶B敲低时我们没有观察到任何变化。考虑到我们试图破坏的系统的生物学特性,可以简单地解释这种差异。事实上,在生理条件下,细胞毒性淋巴细胞(CTL)将穿孔素用作成孔性溶细胞蛋白。在靶细胞膜上形成的孔允许颗粒酶B被动扩散,颗粒酶B是裂解参与程序性细胞死亡过程的胱冬酶的促凋亡蛋白酶。结果,单独的颗粒酶B敲低不会显著改变CTL的细胞毒性能力,因为单独的穿孔素的作用足以诱导靶细胞裂解。在另一方面,当两种蛋白都被敲低时,促凋亡途径和溶细胞途径均被破坏,并且CTL的杀伤能力被实质性改变。

[0134] 其它实施例和数据

[0135] 图9显示,AON通常不影响转染的T细胞的活力并且不干扰TCR表达。图9(a)显示了与非电穿孔细胞相比,具有HBV特异性TCR,具有AON或两者兼有的T细胞EP的活力。图9(b)显示了在具有TCR或TCR+AON的活化或静息T细胞EP中TCR的表达(在流式细胞术中用MHC-多聚体染色测量)。

[0136] 图10还显示,AON通常不影响转染的TCR重定向T细胞的抗病毒活性和细胞毒性。图10(a)显示了采用胞内细胞因子染色的流式细胞术结果;图10(b)显示了从阻抗细胞毒性试验获得的结果。从图中可以看出,当与表达HBV的靶标一起培养时,用加扰AON转染的HBV特异性TCR重定向的T细胞显示出相当的炎性细胞因子产量(A)和细胞毒性(与未处理的TCR重定向的T细胞相比)。

[0137] 然而,在本发明中,发明人发现本发明的AON可以改变T细胞的功能,特别是本申请中鉴定的那些序列。例如,本发明的AON可以有效地电穿孔进入原代人T细胞中,并且它们能够选择性地改变剪接。参考图11,在电穿孔后24小时,AON#887(SEQ ID NO.6508)和#1173(SEQ ID NO.2565)分别显示出从膜结合的转变成为可溶性PD-1和CTLA4。图像显示了对T细胞cDNA的片段长度分析PCR。各峰的高度与转录物丰度成正比。

[0138] 本发明的AON还能够特异性转变外显子包涵而不改变细胞活力,并且它们的作用

与同时的TCR电穿孔相容。参考图12, AON#887 (SEQ ID NO.6508) 显示了在mRNA水平, 电穿孔后24/48h的PD-1从膜结合同种型转变为可溶性同种型(A和B)。在相伴的TCR mRNA的电穿孔中, 电穿孔后24h的细胞活力也没有受到显著影响(C)。单独的AON或AON+TCR的多次电穿孔显示PD-1外显子3的PSI有持续降低(D)。

[0139] 此外, AON能够特异性降低膜结合蛋白, 而不会影响TCR表达。参考图13, 在蛋白水平上, AON#887电穿孔的T细胞显示出PD-1从膜结合同种型(A, 流式细胞术)转变为可溶性同种型(B, ELISA)。AON不会显著改变电穿孔TCR的流式细胞术数据(C)。

[0140] 相比于单一使用的AON, AON的组合也能更多地特异性减少与膜结合的PD-1。参考图14, AON#887+#888电穿孔的T细胞在mRNA水平显示PD-1从膜结合同种型(在右侧的方框中突出显示, (A))转变为可溶性同种型(在左侧的方框中突出显示, (A))。PD-1的外显子3PSI的定量测定结果示于(B)中。可溶性PD-1的增加反映于蛋白水平, ELISA分数也有提高(C)。

[0141] 具体而言, AON#887+#888 (SEQ ID NO.69648) 能够增强T细胞介导的靶细胞杀伤。图15说明了与AON SCR+TCR电穿孔细胞相比, AON#887/888+TCR电穿孔的T细胞在3D模型中如何表现出HBV<sup>+</sup>肝细胞癌的总杀伤增加。

[0142] 图16和17显示了本发明的AON对靶IFN- $\gamma$ 的作用。IFN- $\gamma$ 特异性AON引起的外显子跳读是剂量依赖性的和瞬时的。图16显示了每个细胞1.5/2.5/5飞摩尔的AON, 其中对不同用量的靶向IFN- $\gamma$ 的AON转染后0-6-12-18-24-48-72小时提取的RNA进行PCR。

[0143] 图17示出了用靶向AON的IFN- $\gamma$ 处理的T细胞的功能变化。假定产生较少IFN- $\gamma$ 的T细胞会在TME中诱导较少的PD-L1表达。图17(a)说明了如何用表达HBV的靶标培养HBV特异性TCR重定向的T细胞(有和没有靶向IFN- $\gamma$ 的AON), 并在5小时后收集上清液。随后, 将上清液添加到THP-1细胞上(单独或稀释), 并通过流式细胞术测量PD-L1在THP-1上的表达。图17(a): THP-1上的PD-L1 MFI。图17(b): 用AON处理的TCR重定向的T细胞的上清液培养的THP-1中PD-L1减少的百分比(与加扰对照相比)。图17(c): 用IFN- $\gamma$  AON转染的活化T细胞的上清液培养后, JFH细胞中的病毒复制情况(用荧光素酶测定法测量)。在此, JFH-荧光素酶HCV复制子是表达与荧光素酶连接的HCV的细胞系。该细胞系对IFN- $\gamma$ 抗病毒活性非常敏感。该AON处理的T细胞的上清液在JFH细胞中控制病毒复制的能力较弱, 因此产生较少的IFN- $\gamma$ 。

[0144] 图18显示了靶向PRF的AON特异性降低蛋白水平, 可用于健康供体或CHB患者的T细胞中。在图18(a)和(b)中, 从健康供体或慢性乙型肝炎患者扩增的靶向PRF的AON处理的T细胞的胞内细胞因子染色(PRF)。实验表明, 在感兴趣的T细胞中也实现了表型。图18(c)显示了TCR重定向的T细胞(灰色), 加扰AON处理的T细胞(中间2条)和靶向PRF的AON处理的T细胞(最右边的2条)的PRF和GZMB的ICS。GZMB的水平不会被AON修饰, 而PRF的水平仅在用PRF AON处理的T细胞中得到修饰。图18(d)显示了对PRF mRNA的qPCR。转染本发明的特异性AON后, PRF mRNA的水平降低。

[0145] 图19说明用靶向PRF的AON处理的TCR重定向的T细胞的细胞毒性较小。图19(a)是在细胞毒性测定中获得的代表性图, 其中将HBV特异性的TCR重定向T细胞(有和没有PRF特异性AON)与表达HBV的靶标一起培养。与对照相比, 用PRF AON处理的T细胞的细胞毒性较小。图19(b)是基于利用4个不同供体的细胞进行的实验平均值得出的结果。

[0146] 图20显示了诱导特异性外显子跳读的本发明AON触发NMD介导的靶mRNA降低, 特别是对于靶标CD244(最左边的2条)、TIM3(最中间的2条)和TGIT(最右边的2条)。在用AON#524

(针对CD244)、#527 (针对TIM3) 和#526 (针对TGIT) 作电穿孔的T细胞获得的RT-qPCR数据显示,在各自的AON存在下,这些基因的mRNA相对丰度大大降低。

[0147] 图21显示了诱导特异性外显子跳读的本发明AON触发NMD介导的靶mRNA的减少,特别是对于靶标PRDM1 (最左边的4条) 和REL (最右边的4条)。参考该图,在用AON#442、#443和#444 (针对PRDM1)、#462、#463、#464 (相对于REL) 作电穿孔的T细胞上获得的RT-qPCR数据显示,在各自的AON存在下,这些基因的mRNA的相对丰度降低。

[0148] 图22显示了AON#523如何有效地诱导CD 160外显子3的跳读,从而导致同种型转变。图22(a) 显示了用AON加扰或AON#523作电穿孔的T细胞的FLA-PCR,显示了从两个野生型同种型(绿色矩形) 转变为排除外显子3的同种型(在最左边的两个方框中)。图22(b) 显示在用AON 523作电穿孔的T细胞上获得的RT-qPCR数据,显示CD 160转录物的相对丰度增加。

[0149] 图23显示了AON#522如何有效地诱导CD80外显子2的跳读,从而导致同种型转变。图23(a) 显示了用AON加扰或AON 522作电穿孔的T细胞的FLA-PCR,诸峰显示了从野生型同种型(最左侧的框) 转变为排除外显子2以外的同种型(最右边的框)。其它峰梯形显示。图23(b) 显示在用AON 522作电穿孔的T细胞上获得的RT-qPCR数据,显示CD80转录物的相对丰度增加。

[0150] 尽管在前面的描述中已经描述了本发明的优选实施方式,但是本领域技术人员将理解,在不脱离本发明的情况下,可以对设计或构造的细节进行许多改变或改进。

[0151] 参考文献

[0152] [1] Jennifer Couzin-Frankel, "癌症免疫治疗 (Cancer Immunotherapy)", *Science* (80-), 第342卷, no.12月, 第1432页, 2013.

[0153] [2] K.C.M. Straathof, C.M. Bollard, U. Popat, M.H. Huls, T. Lopez, M.C. Morriss, M.V. Gresik, A.P. Gee, H.V. Russell, M.K. Brenner, C.M. Rooney 和 H.E. Heslop, "EB病毒特异性T淋巴细胞治疗鼻咽癌 (Treatment of nasopharyngeal carcinoma with Epstein-Barr virus-specific T lymphocytes)", *Therapy*, 第105卷, 第5号, 第1898-1904页, 2005.

[0154] [3] M.H. Geukes Foppen, M. Donia, I.M. Svane 和 J.B. a G. Haanen, "肿瘤浸润淋巴细胞治疗转移性癌症 (Tumor-infiltrating lymphocytes for the treatment of metastatic cancer)", *Mol. Oncol.*, 第9卷, 第10号, 第1918-1935页, 2015.

[0155] [4] W. Qasim 和 A.J. Thrasher, "工程改造T细胞疗法的进展与前景 (Progress and prospects for engineered T cell therapies)", *Br. J. Haematol.*, 第166卷, 第6号, 第818-829页, 2014.

[0156] [5] B. Savoldo, C.A. Ramos, E. Liu, M.P. Mims, M.J. Keating, G. Carrum, R.T. Kamble, C.M. Bollard, A.P. Gee, Z. Mei, H. Liu, B. Grilley, C.M. Rooney, H.E. Heslop, M.K. Brenner 和 G. Dotti, "CD28共刺激改善淋巴瘤患者中嵌合抗原受体修饰的T细胞的扩增和持久性 (CD28 costimulation improves expansion and persistence of chimeric antigen receptor-modified T cells in lymphoma patients)", *J. Clin. Invest.*, 第121卷, 第5号, 第1822-1826页, 2011.

[0157] [6] L. a Johnson, R. a Morgan, M.E. Dudley, L. Cassard, J.C. Yang, M. S, U.S. Kammula, R.E. Royal, R.M. Sherry, J.R. Wunderlich 和 C.R. Lee, "用人和小鼠T细胞受体作基因治疗介导癌症消退并靶向表达同源抗原的正常组织 (regression and targets

normal tissues expressing cognate antigen Gene therapy with human and mouse T cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen)", *Hematology*, 第114卷, 第3号, 第535-547页, 2009.

[0158] [7] A. J. Gehring, S. A. Xue, Z. Z. Ho, D. Teoh, C. Ruedl, A. Chia, S. Koh, S. G. Lim, M. K. Maini, H. Stauss和A. Bertolletti, "靶向HBV感染的肝细胞和肝细胞癌细胞系的工程改造病毒特异性T细胞 (Engineering virus-specific T cells that target HBV infected hepatocytes and hepatocellular carcinoma cell lines)", *J. Hepatol.*, 第55卷, 第1号, 第103-110页, 2011.

[0159] [8] W. Qasim, M. Brunetto, A. J. Gehring, S. -A. Xue, A. Schurich, A. Khakpoor, H. Zhan, P. Ciccorossi, K. Gilmour, D. Cavallone, F. Moriconi, F. Farzhenah, A. Mazzoni, L. Chan, E. Morris, A. Thrasher, M. K. Maini, F. Bonino, H. Stauss和A. Bertolletti, "靶向肝移植患者的HbsAg的自体T细胞受体重定向T细胞对HCC转移的免疫治疗 (Immunotherapy of HCC metastases with autologous T cell receptor redirected T cells, targeting HBsAg in a liver transplant patient)", *J. Hepatol.*, 第62卷, 第2号, 第486-491号, 2015.

[0160] [9] S. Koh, N. Shimasaki, R. Suwanarusk, Z. Z. Ho, A. Chia, N. Banu, S. W. Howland, A. S. M. Ong, A. J. Gehring, H. Stauss, L. Renia, M. Sallberg, D. Campana和A. Bertolletti, "利用针对乙型肝炎病毒的重定向T细胞的肝细胞癌免疫治疗实用方法 (A practical approach to immunotherapy of hepatocellular carcinoma using T cells redirected against hepatitis B virus)", *Mol. Ther. Nucleic Acids*, 第2卷, no. 8月, 第e114页, 2013.

[0161] [10] E. J. Wherry, S. J. Ha, S. M. Kaeck, W. N. Haining, S. Sarkar, V. Kalia, S. Subramaniam, J. N. Blattman, D. L. Barber和R. Ahmed, "慢性病毒感染期间CD8+T细胞耗尽的分子标志 (Molecular Signature of CD8+T Cell Exhaustion during Chronic Viral Infection)", *Immunity*, 第27卷, 第4号, 第670-684页, 2007.

[0162] [11] P. a. Morcos, "利用吗啉基寡聚物实现对mRNA剪接的靶向和定量改变 (Achieving targeted and quantifiable alteration of mRNA splicing with Morpholino oligos)", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 第358卷, 第2号, 第521-527页, 2007.

[0163] [12] G. Schmajuk, H. Sierakowska, 和R. Kole, "具有不同骨架的反义寡核苷酸 (Antisense Oligonucleotides with Different Backbones)", *J. Biol. Chem.*, 第274卷, 第31号, 第21783-21789页, 1999.

[0164] [13] E. M. McNally和E. J. Wyatt, "欢迎来到剪接时代:反义寡核苷酸介导的外显子跳读获得更广泛的适用性 (Welcome to the splice age: Antisense oligonucleotide-mediated exon skipping gains wider applicability)", *J. Clin. Invest.*, 第126卷, 第4号, 第1236-1238页, 2016.

[0165] [14] V. Straub, O. Veldhuizen, M. Bertoli, M. Eagle, J. Walton, G. Campion, I. Ferreira, T. Braakman, A. Labourkas, S. Giannakopoulos, T. Voit, P. Carlier, A. Moraux, L. Servais, I. De Myologie, E. Niks, J. Verschuuren, P. Spitali和L. U. M. Cen-, "采用系统

性递送的吗啉基反义寡聚物跳读外显子53(SKJP-NMD)的杜氏肌营养不良症的I/IIa期临床试验(A Phase I/IIa Clinical Trial in Duchenne Muscular Dystrophy Using Systemically Delivered Morpholino Antisense Oligomer to Skip Exon 53(SKJP-NMD))”,*Hum.Gene Ther.Clin.Dev.*,第26卷,第92-95页,2015.

[0166] [15] J.T.Van Den Akker, D.Ph, B.E.Burm, D.Ph, P.F.Ekhardt, M.Sc, N.Heuvelmans, T.Holling, D.Ph, A.a Janson, G.J.Platenburg, M.Sc, J.a Sipkens, M.Sc, J.M.A.Sitsen, D.Ph, A.Aartsma-rus, D.Ph, G.B.Van Ommen, D.Ph, S.J.De Kimpe, D.Ph, J.C.Van Deutekom和D.Ph, “杜氏肌营养不良症PR0051的系统性给药(Systemic Administration of PR0051 in Duchenne’s Muscular Dystrophy)”,第1513-1522页, 2011.

[0167] [16] N.J.Gogtay和K.Sridharan, “治疗性核酸:最新临床状态(Therapeutic Nucleic Acids:Current clinical status)”,*Br.J.Clin.Pharmacol.*,第1-14页,2016.

[0168] [17] J.Jo, U.Aichele, N.Kersting, R.Klein, P.Aichele, E.Bisse, A.K.Sewell, H.E.Blum, R.Bartenschlager, V.Lohmann和R.Thimme, “利用新型免疫模型分析CD8+T细胞介导的丙型肝炎病毒复制的抑制作用(Analysis of CD8+T-Cell-Mediated Inhibition of Hepatitis C Virus Replication Using a Novel Immunological Model)”,*Gastroenterology*,第136卷,第4号,第1391-1401页,2009.

[0169] [18] A.J.Davenport, M.R.Jenkins, R.S.Cross, C.S.Yong, H.M.Prince, D.S.Ritchie, J.a Trapani, M.H.Kershaw, P.K.Darcy和P.J.Neeson, “CAR-T细胞顺序杀伤多个肿瘤靶细胞(CAR-T Cells Inflict Sequential Killing of Multiple Tumor Target Cells)”,*Cancer Immunol.Res.*,第3卷,第5号,第483-94页,2015.

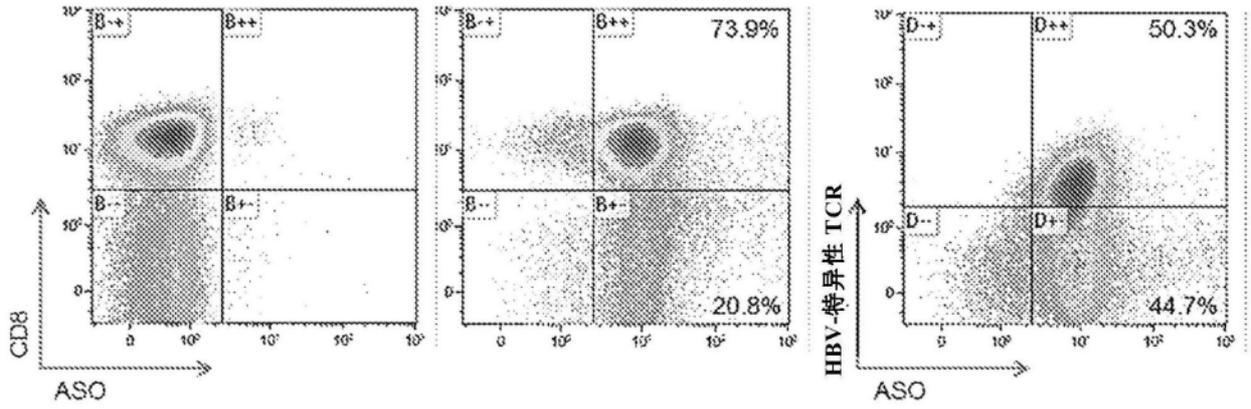


图1

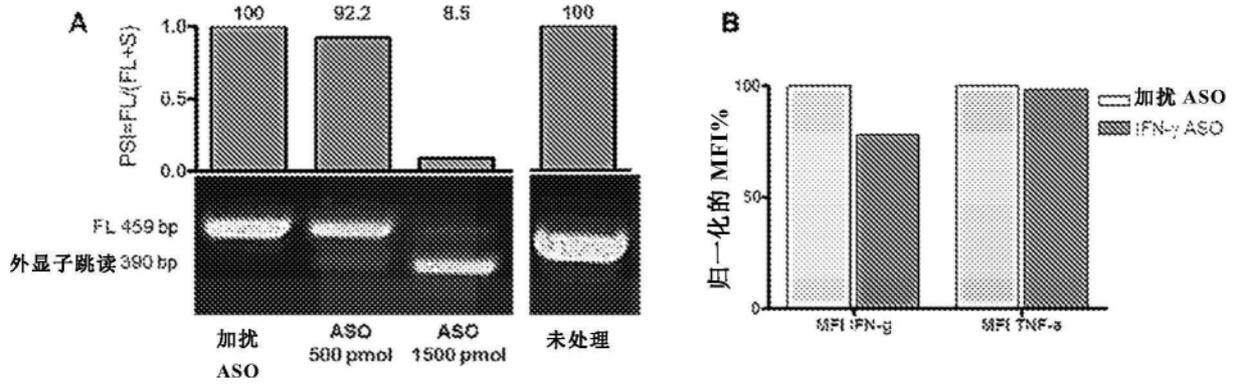


图2

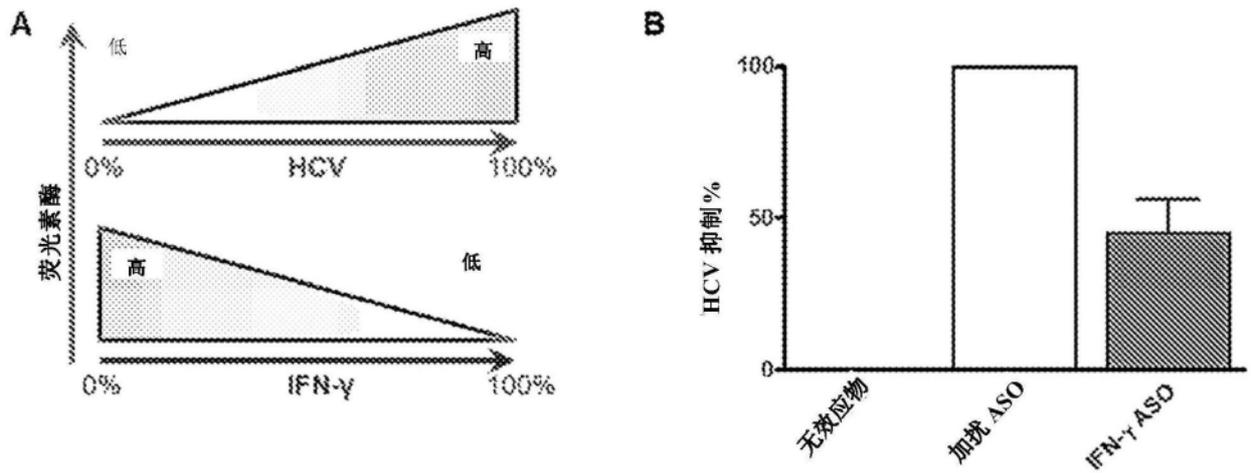


图3

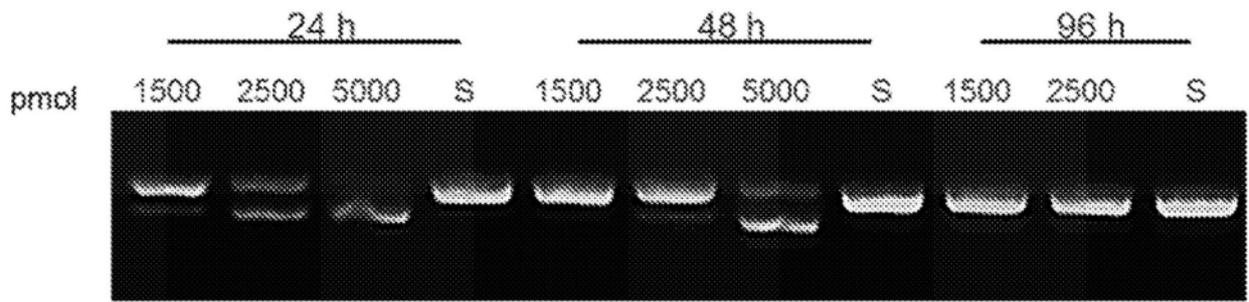


图4

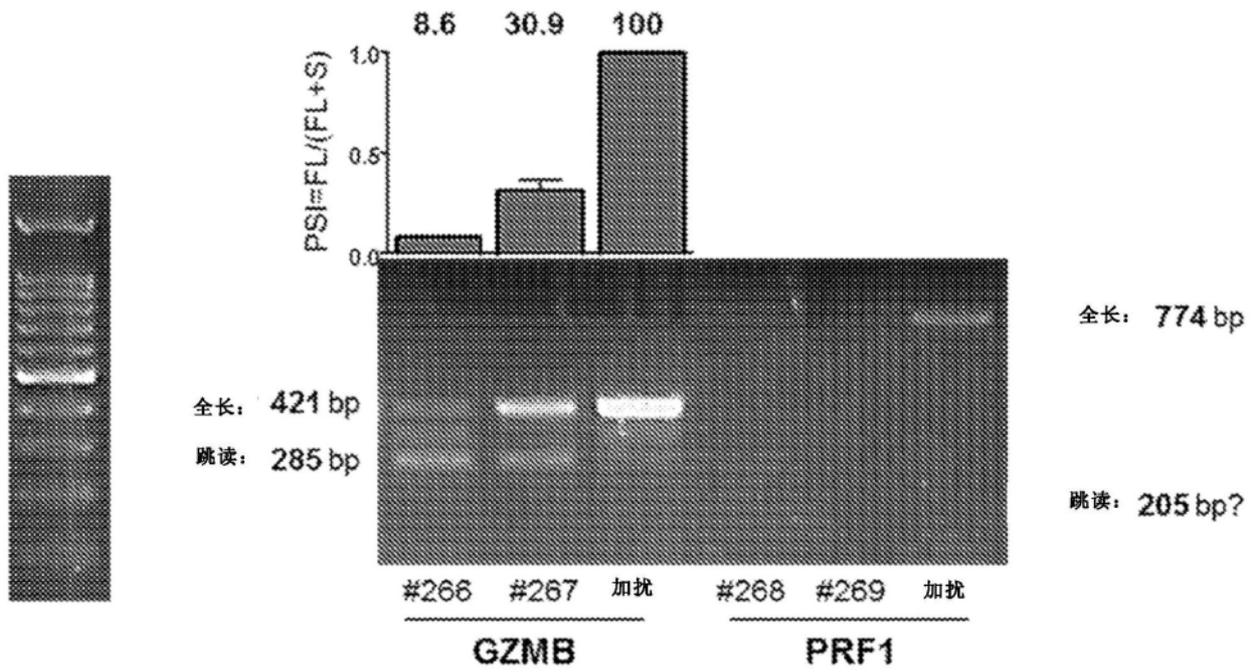


图5

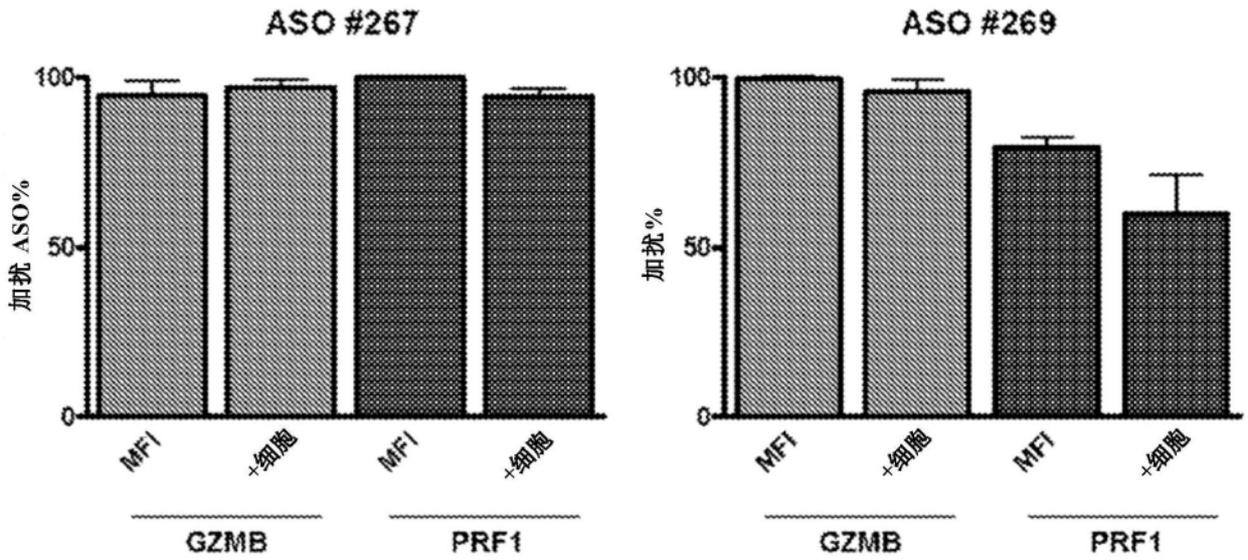


图6

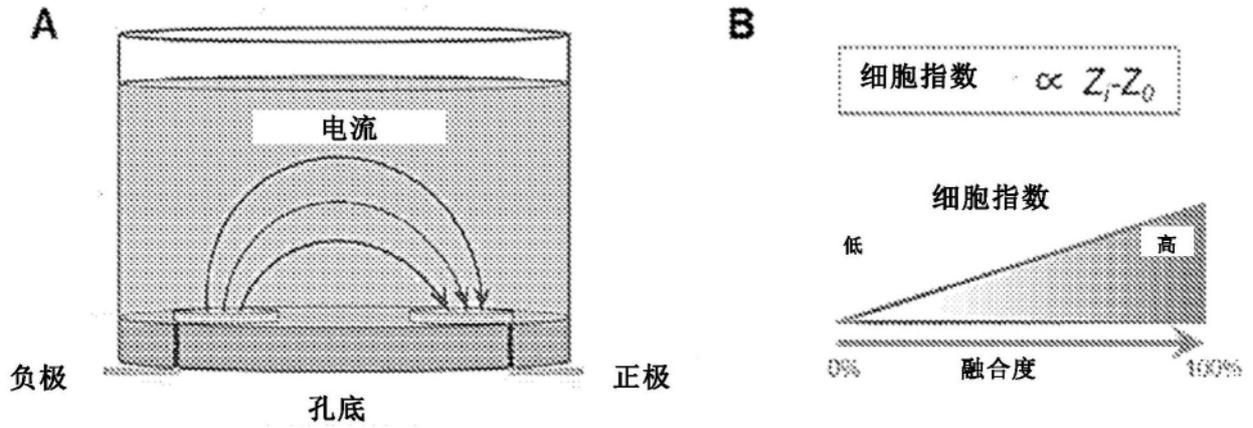


图7

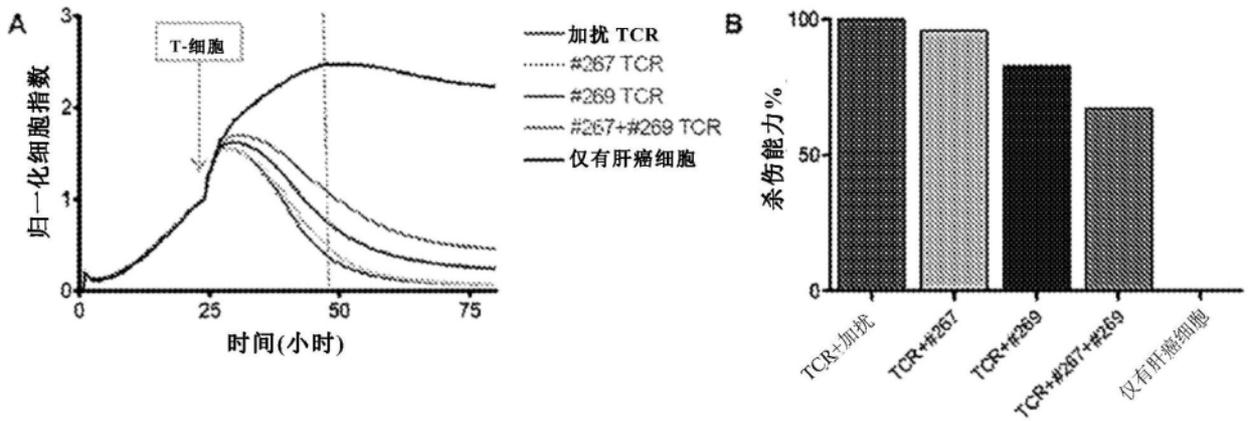


图8

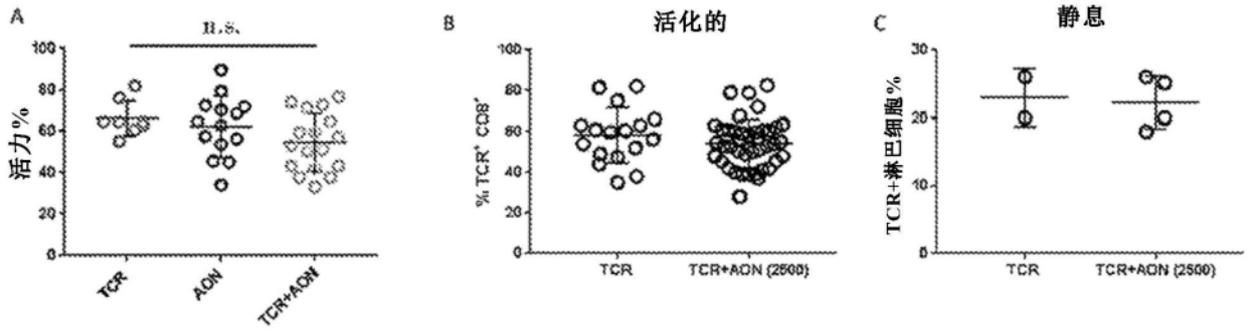


图9

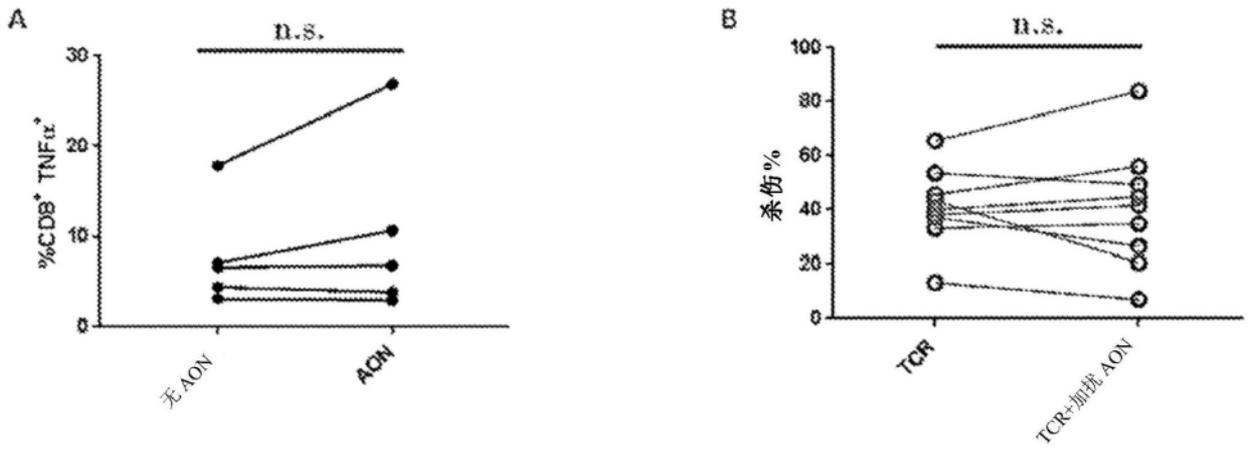


图10

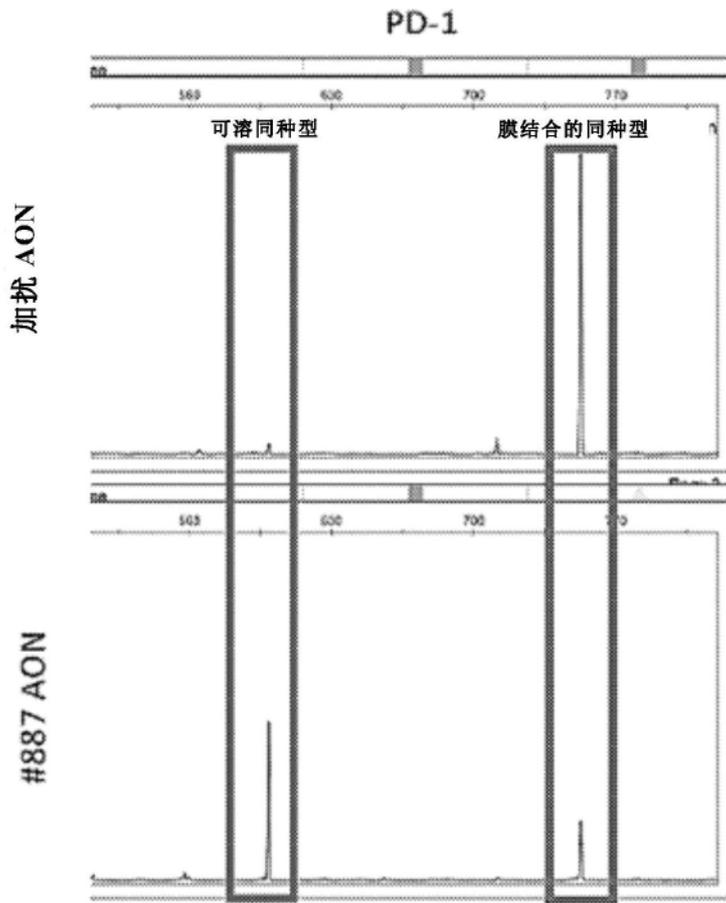


图11a

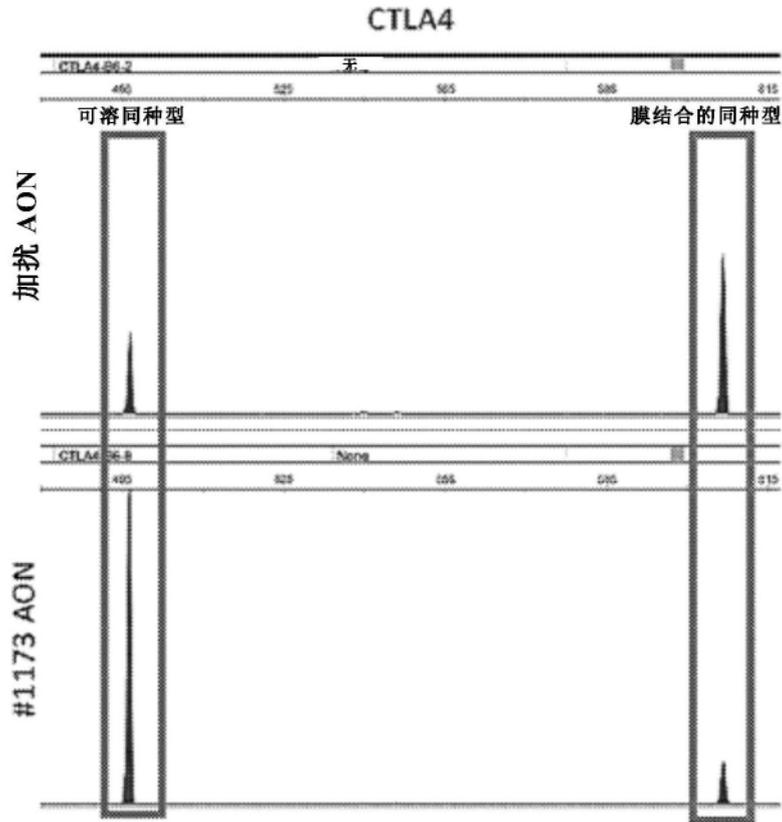


图11b

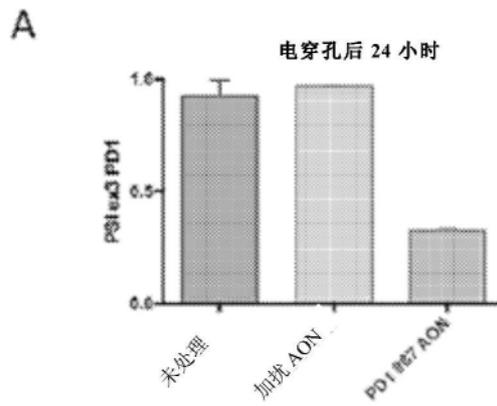


图12a

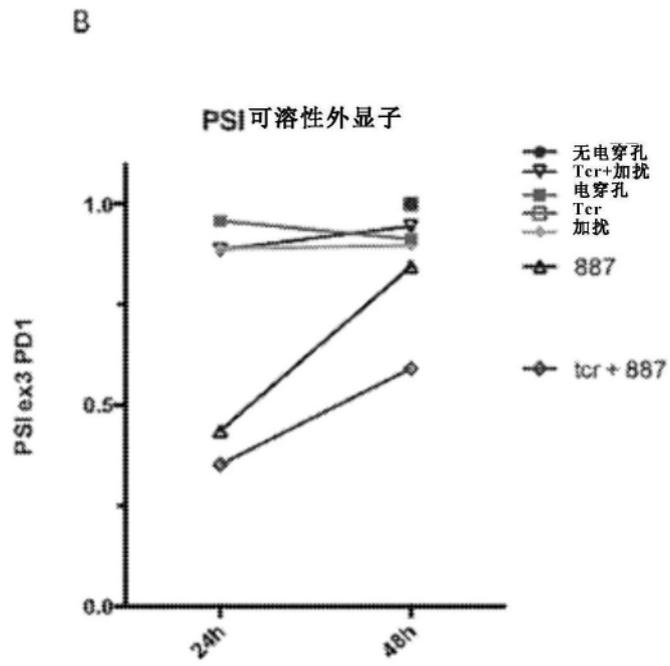


图12b

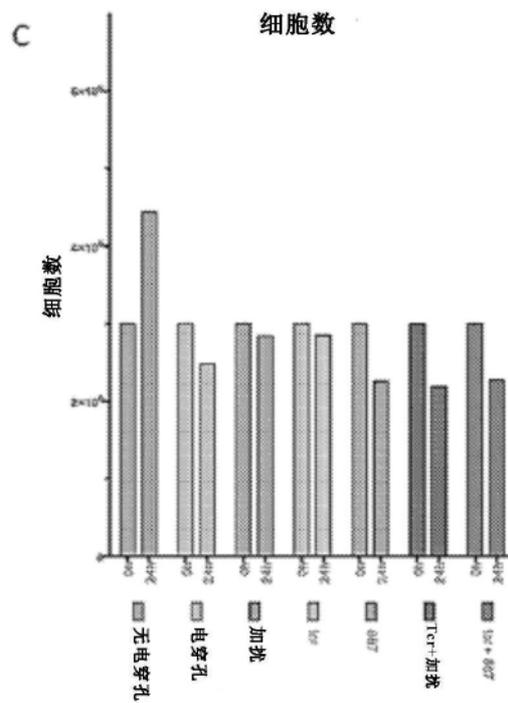


图12c

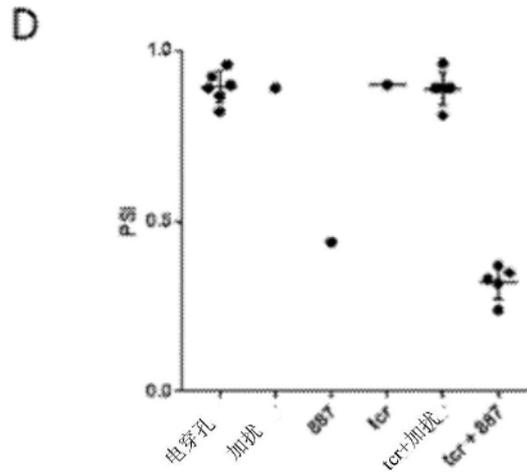


图12d

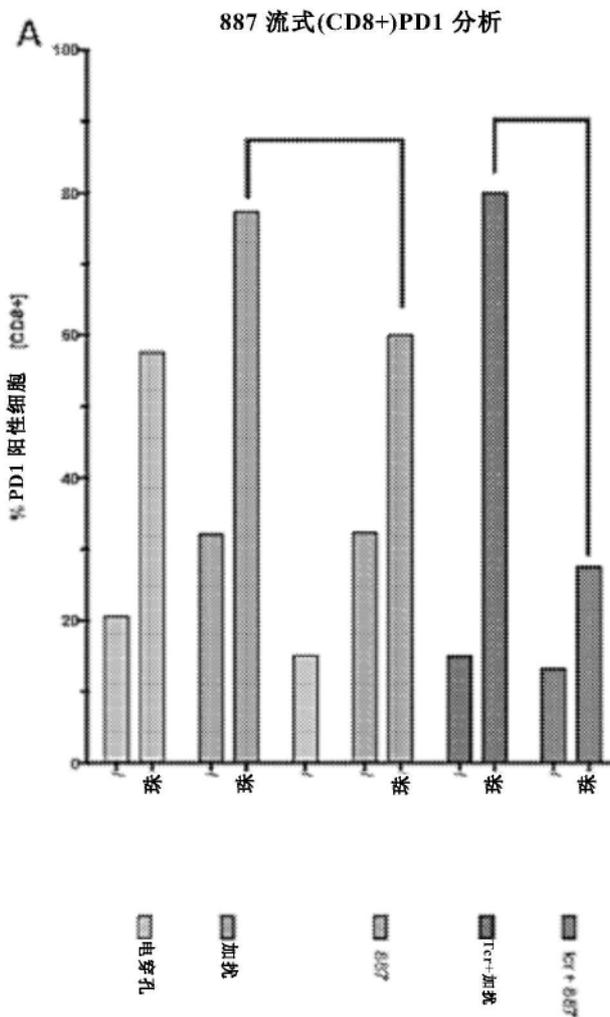


图13a

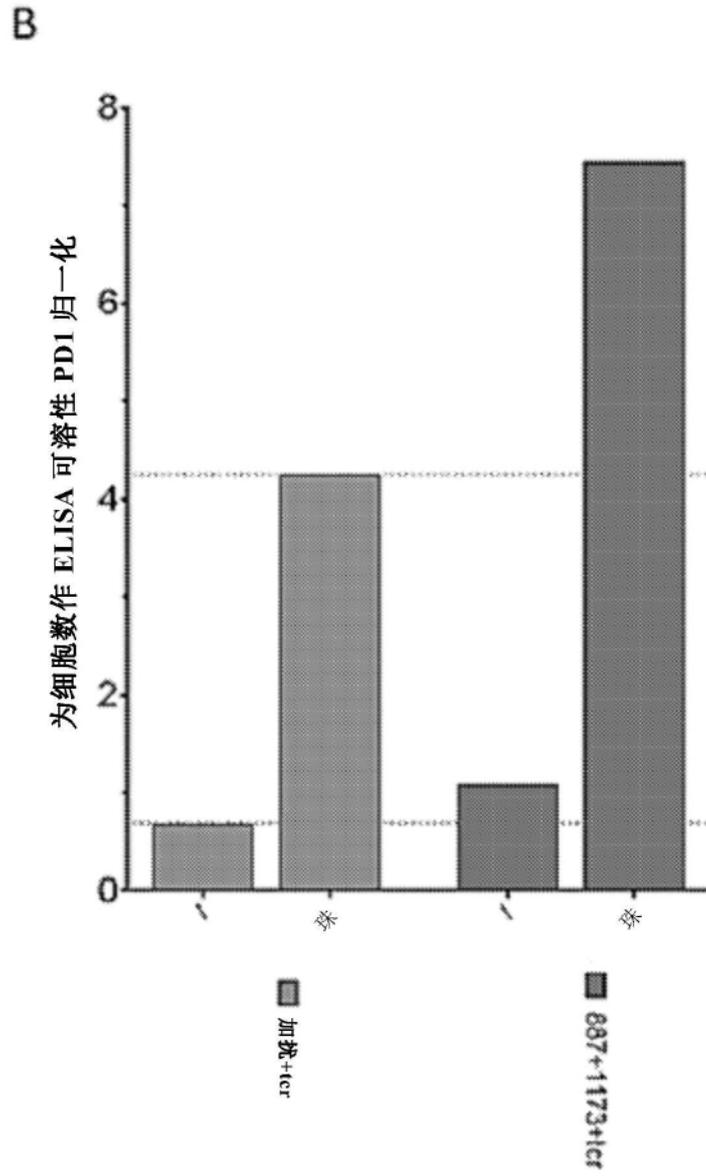


图13b

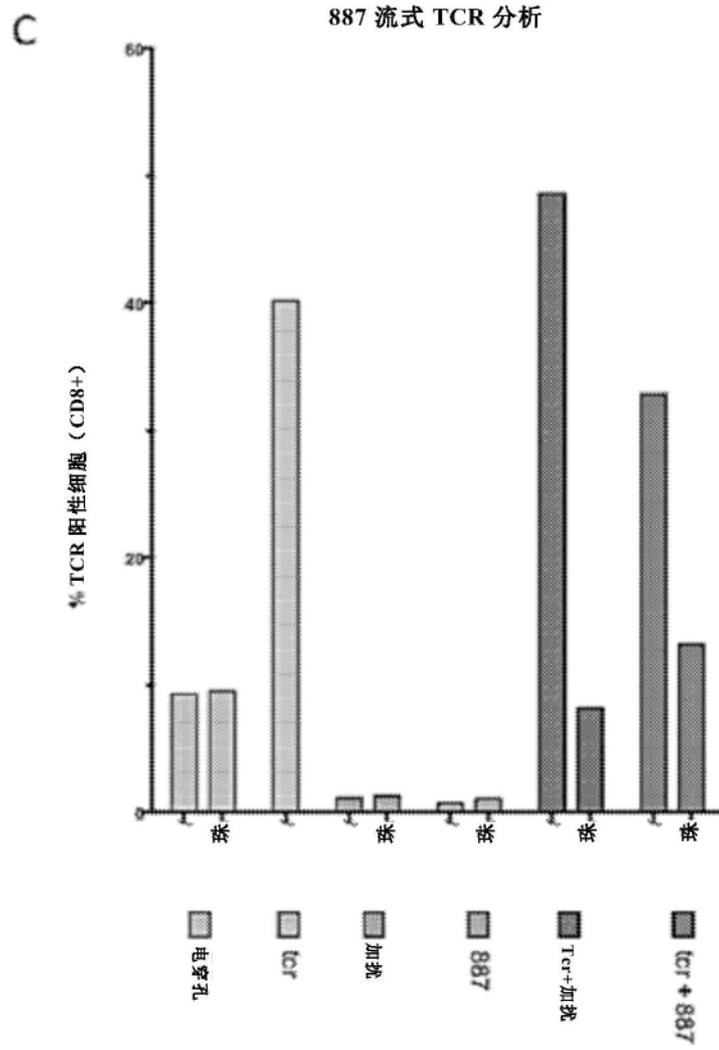


图13c

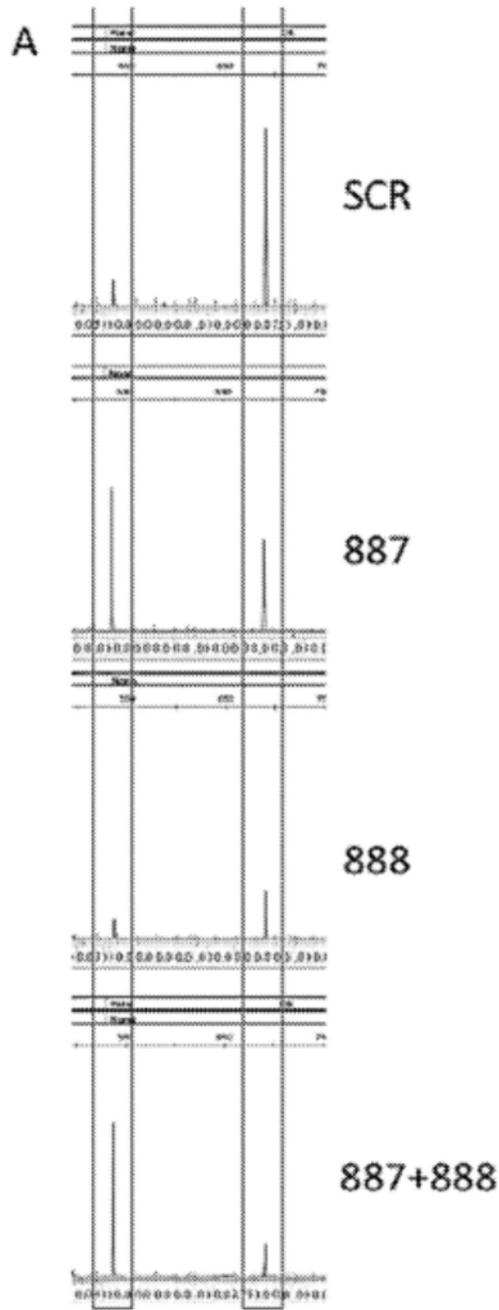


图14a

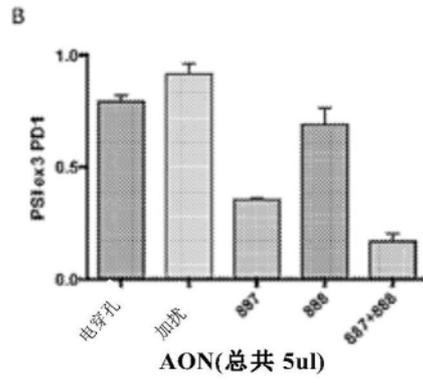


图14b

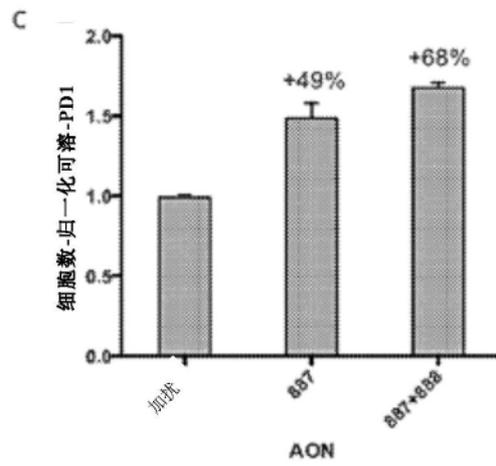


图14c

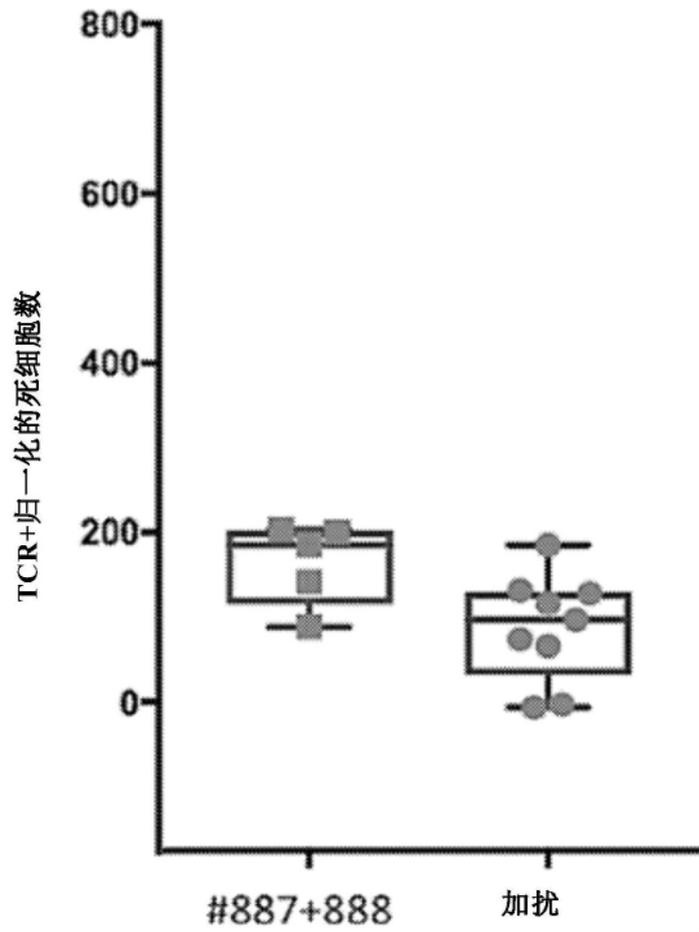


图15

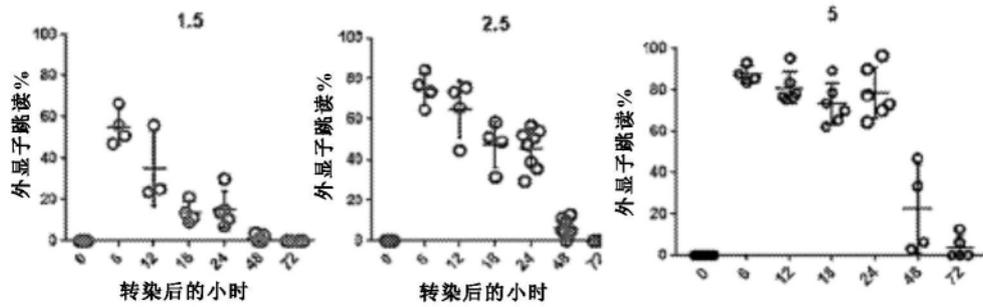


图16

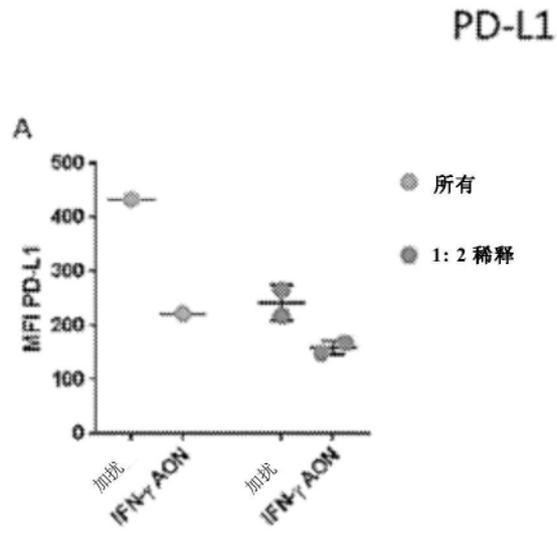


图17a

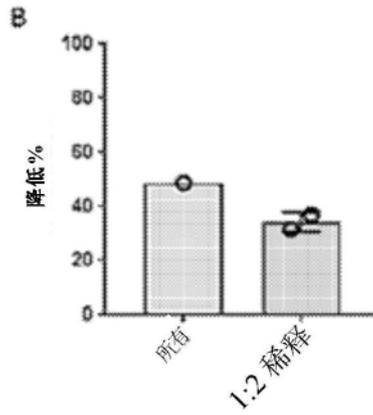


图17b

病毒抑制作用

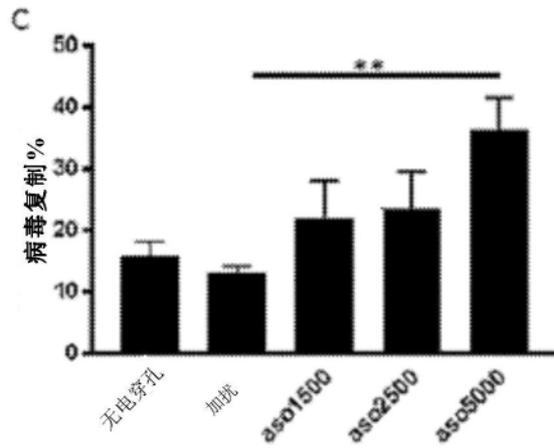


图17c

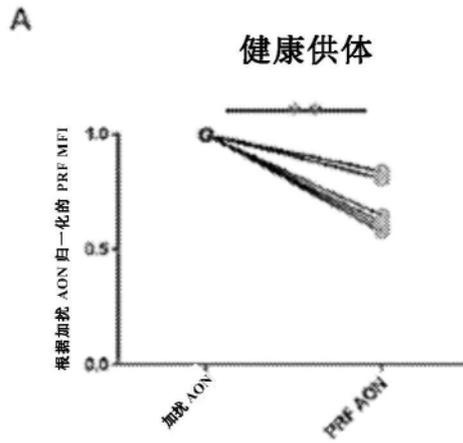


图18a

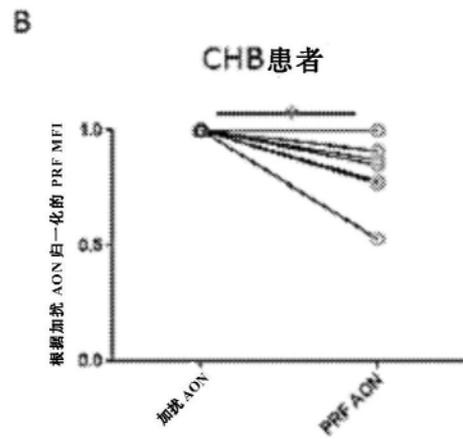


图18b

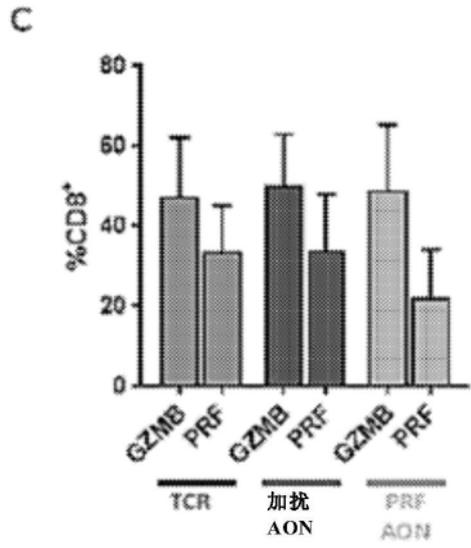


图18c

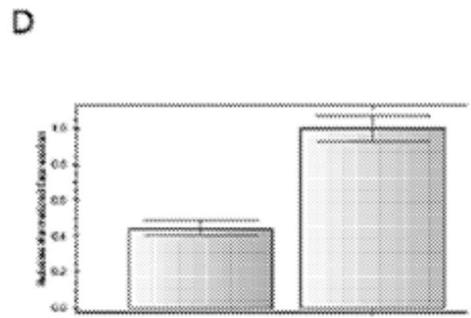


图18d

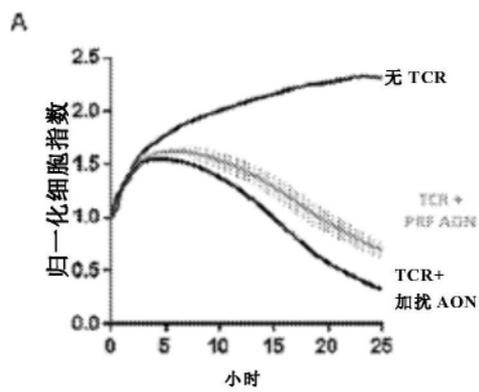


图19a



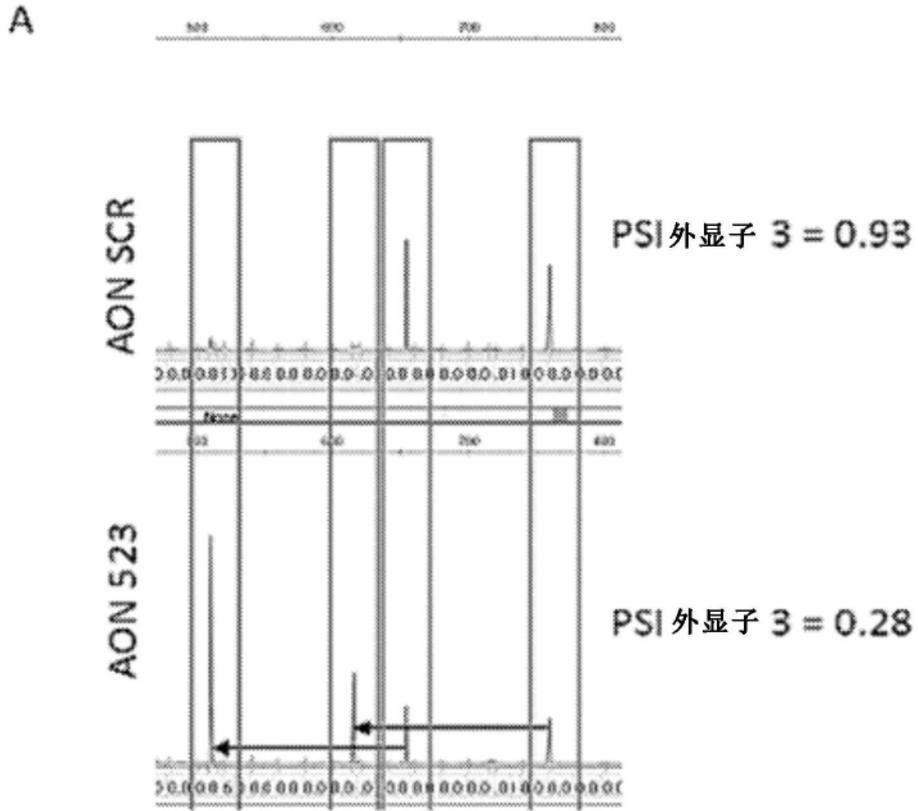


图22a

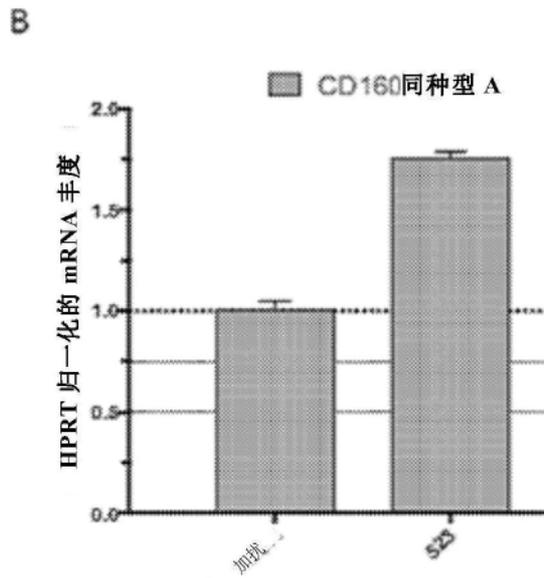


图22b

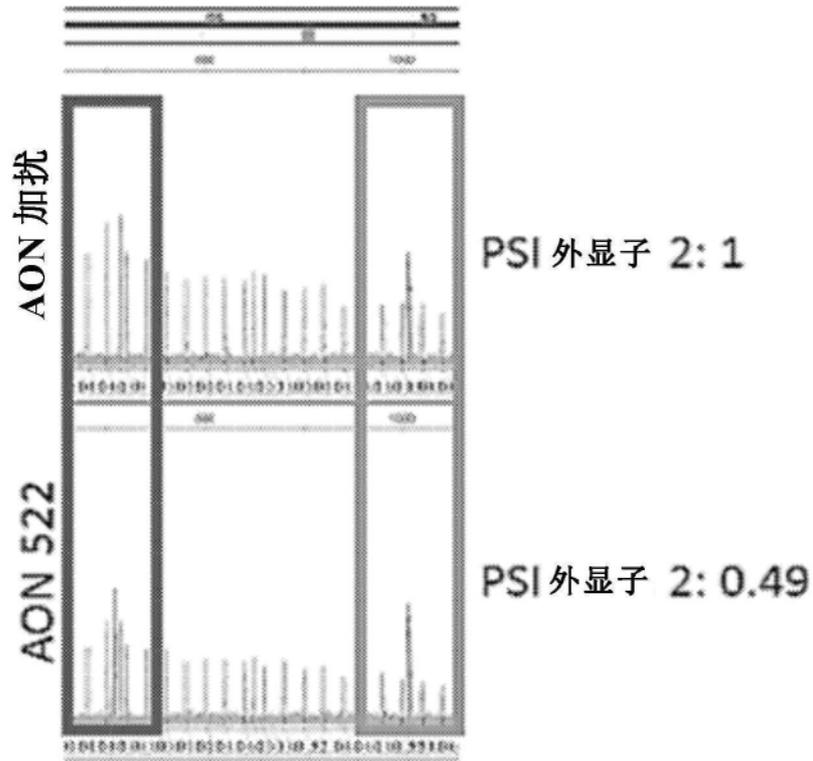


图23a

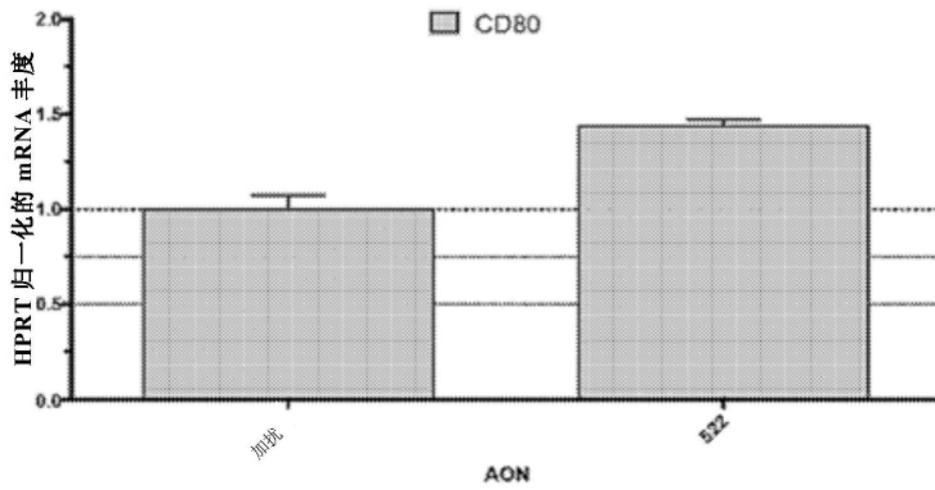


图23b

0218_1173_20M_E 3	CTLA4	5' - mG'mA'mA'mG'mU'mC'mA'mG'mA'mA'mU'mC'mU'mG'mG'mC'mA'mC'mG'mG'mU - 3'
0218_1174_20M_E 3	CTLA4	5' - mU'mA'mA'mC'mU'mG'mC'mU'mG'mA'mA'mG'mG'mA'mU'mC'mC'mA'mG'mG'mA'mG'mG - 3'
1117_930_20M_E2	ADORA2 A	5' - mG'mG'mC'mG'mC'mU'mC'mU'mC'mA'mA'mG'mG'mC'mU'mU'mU'mU'mC - 3'
1117_931_20M_E2	ADORA2 A	5' - mG'mC'mA'mU'mC'mA'mU'mG'mG'mC'mU'mC'mA'mG'mC'mC'mC'mU'mU'mC'mA'mG'mG'mG - 3'
0817_887_20M_E3	PD-1	5' - mG'mA'mC'mA'mC'mC'mA'mA'mC'mC'mA'mC'mC'mA'mG'mG'mU'mU'mG'mG - 3'
0817_888_20M_E3	PD-1	5' - mC'mU'mG'mG'mG'mU'mG'mA'mG'mG'mC'mU'mG'mG'mG'mG'mG - 3'
0817_889_20M_E4	PD-1	5' - mA'mU'mU'mG'mU'mC'mC'mU'mG'mC'mA'mG'mA'mA'mA'mC'mA'mC'mU'mU'mG'mG - 3'
0817_890_20M_E4	PD-1	5' - mA'mG'mU'mG'mA'mG'mA'mC'mU'mC'mA'mC'mC'mA'mG'mG'mG'mC'mU'mG - 3'

图24