



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118355111 A

(43) 申请公布日 2024. 07. 16

(21) 申请号 202280073922.8

(22) 申请日 2022.09.08

(30) 优先权数据

63/242,909 2021.09.10 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.05.06

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/042869 2022.09.08

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/039041 EN 2023.03.16

(71) 申请人 凯特制药公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 F·贝多亚 D·巴雷特

V·G·R·佩达雷丁格

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

专利代理师 陈桢

(51) Int.Cl.

C12N 5/078 (2006.01)

C12N 5/0783 (2006.01)

C07K 14/725 (2006.01)

C07K 14/74 (2006.01)

C12N 9/22 (2006.01)

C12N 15/113 (2006.01)

A61K 35/17 (2006.01)

权利要求书15页 说明书87页 附图16页

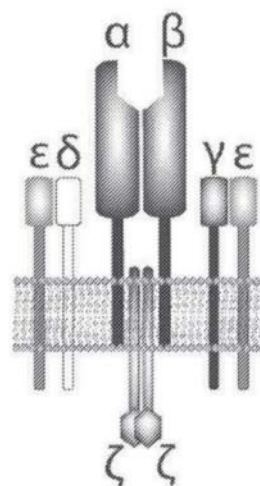
(54) 发明名称

同种异体人T细胞的可替代产生

(57) 摘要

本发明提供了适于过继T细胞疗法的经基因编辑的经修饰的免疫细胞,所述经基因编辑的经修饰的免疫细胞包含能够下调CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、B2M、CIITA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP和恒定链的核酸;并且进一步包含编码嵌合抗原受体(CAR)、工程化T细胞受体(TCR)、杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR)、显性负性受体和/或开关受体的外源性核酸。还提供了用于产生所述经修饰的免疫细胞的组合物和方法,以及使用所述经修饰的免疫细胞进行过继疗法和治疗疾病或病症的方法。

T细胞受体复合物



1. 一种经修饰的免疫细胞,所述经修饰的免疫细胞包含:

(a) 一个或多个基因座中的插入和/或缺失,所述一个或多个基因座各自编码选自CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、B2M、CIITA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP和恒定链(Ii链)的内源性免疫蛋白,其中所述插入和/或缺失能够下调所述一个或多个内源性免疫基因的基因表达;以及

(b) 编码嵌合抗原受体(CAR)、工程化T细胞受体(TCR)、杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR)、抗原结合多肽、细胞表面受体配体或肿瘤抗原的外源性核酸;并且

任选地

(c) 进一步包含显性负性受体、开关受体、趋化因子、趋化因子受体、细胞因子、细胞因子受体、IL-7、IL-7R、IL-15、IL-15R、IL-21、IL-18、CCL21、CCL19或其组合。

2. 根据权利要求1所述的经修饰的免疫细胞,其中所述插入和/或缺失能够下调以下的基因表达:

(a) 选自CD3 δ 、CD3 ϵ 和/或CD3 γ 的T细胞受体亚基;

(b) 选自B2M、TAP1、TAP2、TAPBP和/或NLRC5的HLA I类分子;以及

(c) 选自HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP和/或恒定链(Ii链)的HLA II类分子。

3. 根据权利要求2所述的经修饰的免疫细胞,其中:

(a) 所述插入和/或缺失能够下调:

(i) CD3 δ 的基因表达,以及

(ii) 选自B2M、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP、恒定链(Ii链)及其组合的HLA分子的基因表达;或

(b) 所述插入和/或缺失能够下调:

(i) CD3 ϵ 的基因表达,以及

(ii) 选自B2M、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、CIITA、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP、恒定链(Ii链)及其组合的HLA分子的基因表达;或

(c) 所述插入和/或缺失能够下调:

(i) CD3 γ 的基因表达,以及

(ii) 选自B2M、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、CIITA、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP、恒定链(Ii链)及其组合的HLA分子的基因表达。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的经修饰的免疫细胞,其中所述插入和/或缺失能够下调以下的基因表达:

(I) 以下中的任一项:

(a) CD3 ϵ 、B2M和CIITA;

(b) CD3 ϵ 、B2M和RFX5;

(c) CD3 ϵ 、B2M和RFXAP;

(d) CD3 ϵ 、B2M和RFXANK;

(e) CD3 ϵ 、B2M和HLA-DM;

(f) CD3 ϵ 、B2M和Ii链;

(g) CD3 ϵ 、TAP1和CIITA;

(h) CD3 ϵ 、TAP1和RFX5;

- (i) CD3 ϵ 、TAP1和RFXAP;
- (j) CD3 ϵ 、TAP1和RFXANK;
- (k) CD3 ϵ 、TAP1和HLA-DM;
- (l) CD3 ϵ 、TAP1和Ii链;
- (m) CD3 ϵ 、TAP2和CIITA;
- (n) CD3 ϵ 、TAP2和RFX5;
- (o) CD3 ϵ 、TAP2和RFXAP;
- (p) CD3 ϵ 、TAP2和RFXANK;
- (q) CD3 ϵ 、TAP2和HLA-DM;
- (r) CD3 ϵ 、TAP2和Ii链;
- (s) CD3 ϵ 、NLRC5和CIITA;
- (t) CD3 ϵ 、NLRC5和RFX5;
- (u) CD3 ϵ 、NLRC5和RFXAP;
- (v) CD3 ϵ 、NLRC5和RFXANK;
- (w) CD3 ϵ 、NLRC5和HLA-DM;
- (x) CD3 ϵ 、NLRC5和Ii链;
- (y) CD3 ϵ 、TAPBP和CIITA;
- (z) CD3 ϵ 、TAPBP和RFX5;
- (aa) CD3 ϵ 、TAPBP和RFXAP;
- (bb) CD3 ϵ 、TAPBP和RFXANK;
- (cc) CD3 ϵ 、TAPBP和HLA-DM;或
- (dd) CD3 ϵ 、TAPBP和Ii链;或
- (II) 以下中的任一项:
 - (a) CD3 δ 、B2M和CIITA;
 - (b) CD3 δ 、B2M和RFX5;
 - (c) CD3 δ 、B2M和RFXAP;
 - (d) CD3 δ 、B2M和RFXANK;
 - (e) CD3 δ 、B2M和HLA-DM;
 - (f) CD3 δ 、B2M和Ii链;
 - (g) CD3 δ 、TAP1和CIITA;
 - (h) CD3 δ 、TAP1和RFX5;
 - (i) CD3 δ 、TAP1和RFXAP;
 - (j) CD3 δ 、TAP1和RFXANK;
 - (k) CD3 δ 、TAP1和HLA-DM;
 - (l) CD3 δ 、TAP1和Ii链;
 - (m) CD3 δ 、TAP2和CIITA;
 - (n) CD3 δ 、TAP2和RFX5;
 - (o) CD3 δ 、TAP2和RFXAP;
 - (p) CD3 δ 、TAP2和RFXANK;

- (q) CD3 δ 、TAP2和HLA-DM;
- (r) CD3 δ 、TAP2和Ii链;
- (s) CD3 δ 、NLRC5和CIITA;
- (t) CD3 δ 、NLRC5和RFX5;
- (u) CD3 δ 、NLRC5和RFXAP;
- (v) CD3 δ 、NLRC5和RFXANK;
- (w) CD3 δ 、NLRC5和HLA-DM;
- (x) CD3 δ 、NLRC5和Ii链;
- (y) CD3 δ 、TAPBP和CIITA;
- (z) CD3 δ 、TAPBP和RFX5;
- (aa) CD3 δ 、TAPBP和RFXAP;
- (bb) CD3 δ 、TAPBP和RFXANK;
- (cc) CD3 δ 、TAPBP和HLA-DM;或
- (dd) CD3 δ 、TAPBP和Ii链;或
- (III) 以下中的任一项:
 - (a) CD3 γ 、B2M和CIITA;
 - (b) CD3 γ 、B2M和RFX5;
 - (c) CD3 γ 、B2M和RFXAP;
 - (d) CD3 γ 、B2M和RFXANK;
 - (e) CD3 γ 、B2M和HLA-DM;
 - (f) CD3 γ 、B2M和Ii链;
 - (g) CD3 γ 、TAP1和CIITA;
 - (h) CD3 γ 、TAP1和RFX5;
 - (i) CD3 γ 、TAP1和RFXAP;
 - (j) CD3 γ 、TAP1和RFXANK;
 - (k) CD3 γ 、TAP1和HLA-DM;
 - (l) CD3 γ 、TAP1和Ii链;
 - (m) CD3 γ 、TAP2和CIITA;
 - (n) CD3 γ 、TAP2和RFX5;
 - (o) CD3 γ 、TAP2和RFXAP;
 - (p) CD3 γ 、TAP2和RFXANK;
 - (q) CD3 γ 、TAP2和HLA-DM;
 - (r) CD3 γ 、TAP2和Ii链;
 - (s) CD3 γ 、NLRC5和CIITA;
 - (t) CD3 γ 、NLRC5和RFX5;
 - (u) CD3 γ 、NLRC5和RFXAP;
 - (v) CD3 γ 、NLRC5和RFXANK;
 - (w) CD3 γ 、NLRC5和HLA-DM;
 - (x) CD3 γ 、NLRC5和Ii链;

- (y) CD3 γ 、TAPBP和CIITA;
- (z) CD3 γ 、TAPBP和RFX5;
- (aa) CD3 γ 、TAPBP和RFXAP;
- (bb) CD3 γ 、TAPBP和RFXANK;
- (cc) CD3 γ 、TAPBP和HLA-DM;或
- (dd) CD3 γ 、TAPBP和Ii链。
5. 根据权利要求1-4中任一项所述的经修饰的免疫细胞,其中:
- (a) 所述经修饰的免疫细胞选自T细胞、自然杀伤细胞(NK细胞)、自然杀伤T细胞、淋巴样祖细胞、造血干细胞、干细胞、巨噬细胞和树突细胞;和/或
- (b) 所述经修饰的免疫细胞是CD4⁺T细胞或CD8⁺T细胞;和/或
- (c) 所述经修饰的免疫细胞是同种异体T细胞或自体人T细胞。
6. 根据权利要求1-5中任一项所述的经修饰的免疫细胞,其中所述插入和/或缺失是选自以下的基因编辑的结果:
- (a) CRISPR相关(Cas)(CRISPR-CAs)核酸内切酶系统和指导RNA;
- (b) TALEN基因编辑系统、锌指核酸酶(ZFN)基因编辑系统、兆核酸酶基因编辑系统或兆TALEN基因编辑系统;以及
- (c) 选自反义RNA、antigomer RNA、RNAi、siRNA或shRNA的基因沉默系统。
7. 根据权利要求6所述的经修饰的免疫细胞,其中:
- (a) 所述Cas核酸内切酶包括Cas3、Cas4、Cas8a、Cas8b、Cas9、Cas10、Cas10d、Cas12a、Cas12b、Cas12d、Cas12e、Cas12f、Cas12g、Cas12h、Cas12i、Cas13、Cas14、CasX、Cse1、Csy1、Csn2、Cpf1、C2c1、Csm2、Cmr5、Fok1、酿脓链球菌(*S. pyogenes*) Cas9、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) Cas9、MAD7或其任何组合;或
- (b) 所述CRISPR-Cas系统包括pAd5/F35-CRISPR载体;或
- (c) 所述指导RNA包含与所述一个或多个基因座内的序列互补的指导序列,所述一个或多个基因座各自编码选自CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、B2M、CIITA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP和恒定链(Ii链)的免疫蛋白。
8. 根据权利要求7所述的经修饰的免疫细胞,其中:
- (a) 所述指导RNA与以下项内的序列互补:(1) CD3 δ 、CD3 ϵ 或CD3 γ 的一个或多个外显子,或(2) CD3 δ 、CD3 ϵ 或CD3 γ 的外显子1;或
- (b) 所述序列在所述CD3 δ 基因座内,并且所述指导RNA包含由SEQ ID NO:53编码的核酸序列;或
- (c) 所述序列在所述CD3 ϵ 基因座内,并且所述指导RNA包含由SEQ ID NO:52编码的核酸序列;或
- (d) 所述序列在所述CD3 γ 基因座内,并且所述指导RNA包含由SEQ ID NO:54编码的核酸序列;或
- (e) 所述序列在所述B2M基因座内,并且所述指导RNA包含由SEQ ID NO:55编码的核酸序列;或
- (f) 所述序列在所述CIITA基因座内,并且所述指导RNA包含由SEQ ID NO:61编码的核酸序列;或

(g) 所述序列在所述TAP1基因座内,并且所述指导RNA包含由SEQ ID NO:56编码的核酸序列;或

(h) 所述序列在所述TAP2基因座内,并且所述指导RNA包含由SEQ ID NO:57编码的核酸序列;或

(i) 所述序列在所述TAPBP基因座内,并且所述指导RNA包含由SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:59或其组合编码的核酸序列;或

(j) 所述序列在所述NLRC5基因座内,并且所述指导RNA包含由SEQ ID NO:60编码的核酸序列;或

(k) 所述序列在所述HLA-DM基因座内,并且所述指导RNA包含由SEQ ID NO:62编码的核酸序列;或

(l) 所述序列在所述RFX5基因座内,并且所述指导RNA包含由SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:64或其组合编码的核酸序列;或

(m) 所述序列在所述RFXANK基因座内,并且所述指导RNA包含由SEQ ID NO:65编码的核酸序列;或

(n) 所述序列在所述RFXAP基因座内,并且所述指导RNA包含由SEQ ID NO:66编码的核酸序列;或

(o) 所述序列在所述Ii链基因座内,并且所述指导RNA包含由SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:68或组合编码的核酸序列。

9. 根据权利要求1-8中任一项所述的经修饰的免疫细胞,其中:

(a) 当将所述经修饰的免疫细胞施用于受试者时,与施用于相同受试者的未修饰的免疫细胞所产生的免疫应答相比,所述免疫细胞在所述受试者中产生减少的免疫应答;

(b) 当将所述经修饰的免疫细胞施用于受试者时,与包含能够下调TRAC、B2M和CIITA的基因表达的插入和/或缺失的免疫细胞所产生的免疫应答相比,所述免疫细胞在所述受试者中产生减少的免疫应答,并且任选地其中所述免疫应答是移植物抗宿主病(GvHD)应答,并且进一步任选地其中所述减少的GvHD应答是针对HLA-I错配细胞或针对HLA-II错配细胞引发的。

10. 根据权利要求9所述的经修饰的免疫细胞,其中:

(a) 所述GvHD应答减少约10%或更多、约20%或更多、约30%或更多、约40%或更多、约50%或更多、约60%或更多、约70%或更多、约80%或更多、约90%或更多、或约95%或更多;或

(b) 所述GvHD应答减少约1倍或更多、约2倍或更多、约3倍或更多、约4倍或更多、约5倍或更多、约6倍或更多、约7倍或更多、约8倍或更多、约9倍或更多、约10倍或更多、约20倍或更多、约30倍或更多、约50倍或更多、约100倍或更多、约150倍或更多、或约200倍或更多;和/或

(c) 由所述经修饰的免疫细胞产生的减少的GvHD应答是与在一个或多个基因座中没有所述缺失和/或插入的等效免疫细胞,或在TRAC、B2M和CIITA中包含所述缺失和/或插入的免疫细胞相比。

11. 根据权利要求1-10中任一项所述的经修饰的细胞,其中所述外源性核酸编码嵌合抗原受体(CAR),并且其中所述CAR包含抗原结合结构域、铰链结构域、跨膜结构域、共刺激

信号传导结构域和细胞内信号传导结构域。

12. 根据权利要求11所述的经修饰的免疫细胞,其中:

(a) 所述抗原结合结构域包含全长抗体或其抗原结合片段、Fab、F(ab)₂、单特异性Fab₂、双特异性Fab₂、三特异性Fab₂、单链可变片段(scFv)、双抗体、三抗体、微型抗体、V-NAR或VhH;和/或

(b) 所述跨膜结构域选自人工疏水性序列,I型跨膜蛋白、T细胞受体的 α 、 β 或 ζ 链、CD28、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD2、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、OX40(CD134)、4-1BB(CD137)、ICOS(CD278)、CD154、CD357(GITR)、To11样受体1(TLR1)、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9的跨膜结构域,以及源自杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR)的跨膜结构域;和/或

(c) 所述共刺激结构域包含选自TNFR超家族中的蛋白质CD28、4-1BB(CD137)、OX40(CD134)、PD-1、CD7、LIGHT、CD83L、DAP10、DAP12、CD27、CD2、CD5、ICAM-1、LFA-1、Lck、TNFR-I、TNFR-II、Fas、CD30、CD40、ICOS(CD278)、NKG2C、B7-H3(CD276)的蛋白质的共刺激结构域和源自杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR)的细胞内结构域或其变体中的一个或多个;和/或

(d) 所述细胞内信号传导结构域包含选自以下的细胞内结构域或其变体:人CD2、CD3 ζ 链(CD3 ζ)、Fc γ RIII、Fc γ RI、Fc受体的胞质尾、携带免疫受体酪氨酸激活基序(ITAM)的胞质受体、TCR ζ 、FcR γ 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b和CD66d的胞质信号传导结构域;和/或

(e) 所述抗原结合结构域靶向肿瘤抗原,所述肿瘤抗原:

(i) 与血液恶性肿瘤相关;

(ii) 与实体瘤相关;和/或

(iii) 选自ROR1、间皮素、c-Met、PSMA、PSCA、叶酸受体 α 、叶酸受体 β 、EGFR、EGFRvIII、GPC2、GPC2、粘蛋白1(MUC1)、Tn抗原((Tn Ag)或(GalNAca-Ser/Thr))、TnMUC1、GDNF家族受体 α -4(GFRa4)、成纤维细胞激活蛋白(FAP)和白细胞介素-13受体亚基 α -2(IL-13Ra2或CD213A2);和/或

(f) 所述细胞内信号传导结构域包含人CD3 ζ 链(CD3 ζ);和/或

(g) 所述CAR包含:

(i) PSMA抗原结合结构域、CD2共刺激结构域和CD3 ζ 细胞内信号传导结构域;

(ii) 间皮素抗原结合结构域、4-1BB共刺激结构域和CD3 ζ 信号传导结构域;或

(iii) TnMUC1抗原结合结构域、CD2共刺激结构域和CD3 ζ 信号传导结构域。

13. 根据权利要求1-12中任一项所述的经修饰的免疫细胞,其中:

(a) 所述开关受体包含与负信号相关的信号传导蛋白质的细胞外结构域、跨膜结构域和与正信号相关的信号传导蛋白质的细胞内结构域;和/或

(b) 所述显性负性受体包含:

(i) 与负信号相关的野生型蛋白质的截短变体;

(ii) 与负信号相关的野生型蛋白质的变体,所述变体包含细胞外结构域、跨膜结构域并且基本上缺乏细胞内信号传导结构域;或

(iii) 与负信号相关的信号传导蛋白质的细胞外结构域和跨膜结构域。

14. 根据权利要求13所述的经修饰的免疫细胞,其中:

(a) 与所述负信号相关的所述蛋白质选自CTLA4、PD-1、TGF β R11、BTLA、VSIG3、VSIG8和TIM-3;和/或

(b) 与所述正信号相关的所述蛋白质选自CD28、4-1BB、IL12R β 1、IL12R β 2、CD2、ICOS和CD27;和/或

(c) 所述开关受体选自PD-1-CD28、PD-1^{A132L}-CD28、PD-1-CD27、PD-1^{A132L}-CD27、PD-1-4-1BB、PD-1^{A132L}-4-1BB、PD-1-ICOS、PD-1^{A132L}-ICOS、PD-1-IL12R β 1、PD-1^{A132L}-IL12R β 1、PD-1-IL12R β 2、PD-1^{A132L}-IL12R β 2、VSIG3-CD28、VSIG8-CD28、VSIG3-CD27、VSIG8-CD27、VSIG3-4-1BB、VSIG8-4-1BB、VSIG3-ICOS、VSIG8-ICOS、VSIG3-IL12R β 1、VSIG8-IL12R β 1、VSIG3-IL12R β 2、VSIG8-IL12R β 2、TGF β R11-CD27、TGF β R11-CD28、TGF β R11-4-1BB、TGF β R11-ICOS、TGF β R11-IL12R β 1和TGF β R11-IL12R β 2;和/或

(d) 所述显性负性受体是PD1、VSIG3、VISG8或TGF β R显性负性受体;和/或

(e) 所述跨膜结构域:

(i) 选自如下蛋白质的跨膜结构域,所述蛋白质选自CTLA4、PD-1、VSIG3、VSIG8、TGF β R11、BTLA、TIM-3、CD28、4-1BB、IL12R β 1、IL12R β 2、CD2、ICOS和CD27;或

(ii) 选自与负信号相关的蛋白质的跨膜或与所述负信号相关的蛋白质的跨膜结构域。

15. 一种分离的经修饰的T细胞,所述分离的经修饰的T细胞包含选自CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、B2M、C2TA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP和恒定链(Ii链)的至少一种功能受损多肽;

其中包含所述功能受损多肽的所述经修饰的T细胞展现出以下中的至少一种:

(i) 与未修饰的T细胞相比,T细胞受体表达减少;

(ii) 所述受损多肽的表达减少;

(iii) 完全不存在T细胞受体复合物表面表达;以及

(iv) T细胞受体交联减少或不足。

16. 根据权利要求15所述的分离的经修饰的T细胞,其中:

(a) 当将所述经修饰的T细胞施用于受试者时,与施用于相同受试者的未修饰的T细胞所产生的免疫应答相比,所述经修饰的T细胞在所述受试者中产生减少的免疫应答;和/或

(b) 所述经修饰的T细胞包含两种或更多种功能受损多肽,并且其中所述第二受损多肽是T细胞受体 α 链(TRAC);和/或

(c) 所述经修饰的T细胞包含:

(i) 选自TRAC、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、B2M、C2TA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP或Ii链的三种或更多种功能受损多肽;

(ii) 选自CD3 α 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、B2M、C2TA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP或Ii链的两种功能受损多肽;

(iii) 选自CD3 α 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、B2M、C2TA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP或Ii链的三种功能受损多肽;

(iv) 选自CD3 δ 、CD3 ϵ 和CD3 γ 的功能受损多肽,以及选自TRAC、B2M、C2TA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP或Ii链的至少一种功能受损多肽;或

(v) 选自CD3 δ 、CD3 ϵ 和CD3 γ 的功能受损多肽,以及选自TRAC、B2M、C2TA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP或Ii链的功能受损多肽;和/或

(d) 所述经修饰的T细胞包含:

(i) 功能受损CD3 δ ,以及选自TRAC、B2M、C2TA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP或Ii链的至少一种功能受损多肽;

(ii) 功能受损CD3 ϵ ,以及选自TRAC、B2M、C2TA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP或Ii链的至少一种功能受损多肽;或

(iii) 功能受损CD3 γ ,以及选自TRAC、B2M、C2TA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP或Ii链的至少一种功能受损多肽;和/或

(e) 所述经修饰的T细胞包含选自TRAC、B2M、C2TA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP或Ii链的两种或更多种功能受损多肽;和/或

(f) 所述经修饰的T细胞:

(i) 具有TRAC、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、B2M、C2TA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP、Ii链或其任何组合的减少的表达,或

(ii) 不表达CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、TRAC、B2M、C2TA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP、Ii链或其任何组合;和/或

(g) 所述经修饰的T细胞进一步包含选自TRAC、B2M和C2TA的功能受损多肽;和/或

(h) 所述经修饰的T细胞具有TRAC、B2M或C2TA的减少的表达或不表达TRAC、B2M或C2TA;和/或

(i) CD3 δ 、CD3 ϵ 和/或CD3 γ 的修饰导致TCR/CD3复合物功能受损;和/或

(j) 通过靶向CD3 δ 、CD3 ϵ 或CD3 γ 的一个或多个外显子,任选地CD3 δ 、CD3 ϵ 或CD3 γ 的外显子1,修饰CD3 δ 、CD3 ϵ 或CD3 γ 。

17. 一种用于产生经修饰的免疫细胞的方法,所述方法包括:

(a) 向所述免疫细胞中引入能够下调编码内源性免疫蛋白的一种或多种内源性免疫基因的基因表达的一种或多种核酸,所述内源性免疫蛋白选自CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、B2M、CIITA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP和恒定链(Ii链);

(b) 向所述免疫细胞中引入编码嵌合抗原受体(CAR)、工程化T细胞受体(TCR)、杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR)、抗原结合多肽、细胞表面受体配体或肿瘤抗原的外源性核酸;以及

(c) 扩增所述经修饰的免疫细胞以产生T细胞群;以及任选地

(d) 进一步包括向所述免疫细胞中引入编码显性负性受体、开关受体或其组合的外源性核酸。

18. 根据权利要求17所述的方法,其中:

(a) 其中所述一种或多种核酸能够下调以下的基因表达:

(i) 选自CD3 δ 、CD3 ϵ 或CD3 γ 的T细胞受体亚基;

(ii) 选自B2M、TAP1、TAP2、TAPBP或NLRC5的HLA I类分子;以及

(iii) 选自HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP或恒定链(Ii链)的HLA II类分子;和/或

(b) 其中所述一种或多种核酸能够下调CD3 δ 的基因表达以及选自B2M、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP、恒定链(Ii链)及其组合的HLA分子的基因表达;和/或

(c) 其中所述一种或多种核酸能够下调CD3 ϵ 以及选自B2M、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、

CIITA、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP、恒定链 (Ii链) 及其组合的HLA分子的基因表达;和/或

(d) 其中所述一种或多种核酸能够下调CD3 γ 以及选自B2M、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、CIITA、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP、恒定链 (Ii链) 及其组合的HLA分子的基因表达。

19. 根据权利要求17或18所述的方法, 其中所述一种或多种核酸能够下调以下的基因表达:

(I) 以下中的任一项:

(a) CD3 ϵ 、B2M和CIITA;

(b) CD3 ϵ 、B2M和RFX5;

(c) CD3 ϵ 、B2M和RFXAP;

(d) CD3 ϵ 、B2M和RFXANK;

(e) CD3 ϵ 、B2M和HLA-DM;

(f) CD3 ϵ 、B2M和Ii链;

(g) CD3 ϵ 、TAP1和CIITA;

(h) CD3 ϵ 、TAP1和RFX5;

(i) CD3 ϵ 、TAP1和RFXAP;

(j) CD3 ϵ 、TAP1和RFXANK;

(k) CD3 ϵ 、TAP1和HLA-DM;

(l) CD3 ϵ 、TAP1和Ii链;

(m) CD3 ϵ 、TAP2和CIITA;

(n) CD3 ϵ 、TAP2和RFX5;

(o) CD3 ϵ 、TAP2和RFXAP;

(p) CD3 ϵ 、TAP2和RFXANK;

(q) CD3 ϵ 、TAP2和HLA-DM;

(r) CD3 ϵ 、TAP2和Ii链;

(s) CD3 ϵ 、NLRC5和CIITA;

(t) CD3 ϵ 、NLRC5和RFX5;

(u) CD3 ϵ 、NLRC5和RFXAP;

(v) CD3 ϵ 、NLRC5和RFXANK;

(w) CD3 ϵ 、NLRC5和HLA-DM;

(x) CD3 ϵ 、NLRC5和Ii链;

(y) CD3 ϵ 、TAPBP和CIITA;

(z) CD3 ϵ 、TAPBP和RFX5;

(aa) CD3 ϵ 、TAPBP和RFXAP;

(bb) CD3 ϵ 、TAPBP和RFXANK;

(cc) CD3 ϵ 、TAPBP和HLA-DM; 或

(dd) CD3 ϵ 、TAPBP和Ii链; 或

(II) 以下中的任一项:

(a) CD3 δ 、B2M和CIITA;

(b) CD3 δ 、B2M和RFX5;

- (c) CD3 δ 、B2M和RFXAP;
 - (d) CD3 δ 、B2M和RFXANK;
 - (e) CD3 δ 、B2M和HLA-DM;
 - (f) CD3 δ 、B2M和Ii链;
 - (g) CD3 δ 、TAP1和CIITA;
 - (h) CD3 δ 、TAP1和RFX5;
 - (i) CD3 δ 、TAP1和RFXAP;
 - (j) CD3 δ 、TAP1和RFXANK;
 - (k) CD3 δ 、TAP1和HLA-DM;
 - (l) CD3 δ 、TAP1和Ii链;
 - (m) CD3 δ 、TAP2和CIITA;
 - (n) CD3 δ 、TAP2和RFX5;
 - (o) CD3 δ 、TAP2和RFXAP;
 - (p) CD3 δ 、TAP2和RFXANK;
 - (q) CD3 δ 、TAP2和HLA-DM;
 - (r) CD3 δ 、TAP2和Ii链;
 - (s) CD3 δ 、NLRC5和CIITA;
 - (t) CD3 δ 、NLRC5和RFX5;
 - (u) CD3 δ 、NLRC5和RFXAP;
 - (v) CD3 δ 、NLRC5和RFXANK;
 - (w) CD3 δ 、NLRC5和HLA-DM;
 - (x) CD3 δ 、NLRC5和Ii链;
 - (y) CD3 δ 、TAPBP和CIITA;
 - (z) CD3 δ 、TAPBP和RFX5;
 - (aa) CD3 δ 、TAPBP和RFXAP;
 - (bb) CD3 δ 、TAPBP和RFXANK;
 - (cc) CD3 δ 、TAPBP和HLA-DM;或
 - (dd) CD3 δ 、TAPBP和Ii链;或
- (III) 以下中的任一项:
- (a) CD3 γ 、B2M和CIITA;
 - (b) CD3 γ 、B2M和RFX5;
 - (c) CD3 γ 、B2M和RFXAP;
 - (d) CD3 γ 、B2M和RFXANK;
 - (e) CD3 γ 、B2M和HLA-DM;
 - (f) CD3 γ 、B2M和Ii链;
 - (g) CD3 γ 、TAP1和CIITA;
 - (h) CD3 γ 、TAP1和RFX5;
 - (i) CD3 γ 、TAP1和RFXAP;
 - (j) CD3 γ 、TAP1和RFXANK;

- (k) CD3 γ 、TAP1和HLA-DM;
- (l) CD3 γ 、TAP1和Ii链;
- (m) CD3 γ 、TAP2和CIITA;
- (n) CD3 γ 、TAP2和RFX5;
- (o) CD3 γ 、TAP2和RFXAP;
- (p) CD3 γ 、TAP2和RFXANK;
- (q) CD3 γ 、TAP2和HLA-DM;
- (r) CD3 γ 、TAP2和Ii链;
- (s) CD3 γ 、NLRC5和CIITA;
- (t) CD3 γ 、NLRC5和RFX5;
- (u) CD3 γ 、NLRC5和RFXAP;
- (v) CD3 γ 、NLRC5和RFXANK;
- (w) CD3 γ 、NLRC5和HLA-DM;
- (x) CD3 γ 、NLRC5和Ii链;
- (y) CD3 γ 、TAPBP和CIITA;
- (z) CD3 γ 、TAPBP和RFX5;
- (aa) CD3 γ 、TAPBP和RFXAP;
- (bb) CD3 γ 、TAPBP和RFXANK;
- (cc) CD3 γ 、TAPBP和HLA-DM;或
- (dd) CD3 γ 、TAPBP和Ii链。

20. 根据权利要求17-19中任一项所述的方法,其中:

- (a) 所述免疫细胞选自T细胞、自然杀伤细胞(NK细胞)、自然杀伤T细胞、淋巴样祖细胞、造血干细胞、干细胞、巨噬细胞和树突细胞;和/或
- (b) 所述免疫细胞是CD4+T细胞或CD8+T细胞;和/或
- (c) 所述免疫细胞是同种异体T细胞或自体T细胞。

21. 根据权利要求17-20中任一项所述的方法,其中:

- (a) 通过病毒转导将所述核酸引入所述免疫细胞中,其中所述病毒转导包括使所述免疫细胞与包含所述一种或多种核酸的病毒载体接触;和/或
- (b) 通过病毒转导将所述核酸引入所述免疫细胞中,其中所述病毒转导包括使所述免疫细胞与包含所述一种或多种核酸的病毒载体接触,并且进一步地其中所述病毒载体选自逆转录病毒载体、仙台病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体和慢病毒载体;和/或
- (c) 能够下调表达的所述一种或多种核酸中的每一种包含选自以下的基因编辑系统:
 - (i) CRISPR相关(Cas) (CRISPR-CAs) 核酸内切酶系统和指导RNA;
 - (ii) TALEN基因编辑系统、锌指核酸酶(ZFN) 基因编辑系统、兆核酸酶基因编辑系统或兆TALEN基因编辑系统;以及
 - (iii) 选自反义RNA、antigomer RNA、RNAi、siRNA或shRNA的基因沉默系统。

22. 根据权利要求21所述的方法,其中:

- (a) 所述Cas核酸内切酶包括Cas3、Cas4、Cas8a、Cas8b、Cas9、Cas10、Cas10d、Cas12a、Cas12b、Cas12d、Cas12e、Cas12f、Cas12g、Cas12h、Cas12i、Cas13、Cas14、CasX、Cse1、Csy1、

Csn2、Cpf1、C2c1、Csm2、Cmr5、Fok1、酿脓链球菌Cas9、金黄色葡萄球菌Cas9、MAD7或其任何组合；和/或

(b) 所述CRISPR-Cas系统包括pAd5/F35-CRISPR载体；和/或

(c) 所述指导RNA包含与所述一个或多个基因座内的序列互补的指导序列，所述一个或多个基因座各自编码选自CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、B2M、CIITA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP和恒定链(Ii链)的免疫蛋白；和/或

(d) 所述指导RNA与以下项内的序列互补：(1) CD3 δ 、CD3 ϵ 或CD3 γ 的一个或多个外显子，或(2) CD3 δ 、CD3 ϵ 或CD3 γ 的外显子1；和/或

(e) 所述序列在所述CD3 δ 基因座内，并且所述指导RNA包含由SEQ ID NO:53编码的核酸序列；

(f) 所述序列在所述CD3 ϵ 基因座内，并且所述指导RNA包含由SEQ ID NO:52编码的核酸序列；

(g) 所述序列在所述CD3 γ 基因座内，并且所述指导RNA包含由SEQ ID NO:54编码的核酸序列；

(h) 所述序列在所述B2M基因座内，并且所述指导RNA包含由SEQ ID NO:55编码的核酸序列；

(i) 所述序列在所述CIITA基因座内，并且所述指导RNA包含由SEQ ID NO:61编码的核酸序列；

(j) 所述序列在所述TAP1基因座内，并且所述指导RNA包含由SEQ ID NO:56编码的核酸序列；

(k) 所述序列在所述TAP2基因座内，并且所述指导RNA包含由SEQ ID NO:57编码的核酸序列；

(l) 所述序列在所述TAPBP基因座内，并且所述指导RNA包含由SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:59或其组合编码的核酸序列；

(m) 所述序列在所述NLRC5基因座内，并且所述指导RNA包含由SEQ ID NO:60编码的核酸序列；

(n) 所述序列在所述HLA-DM基因座内，并且所述指导RNA包含由SEQ ID NO:62编码的核酸序列；

(o) 所述序列在所述RFX5基因座内，并且所述指导RNA包含由SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:64或其组合编码的核酸序列；

(p) 所述序列在所述RFXANK基因座内，并且所述指导RNA包含由SEQ ID NO:65编码的核酸序列；

(q) 所述序列在所述RFXAP基因座内，并且所述指导RNA包含由SEQ ID NO:66编码的核酸序列或

(r) 所述序列在所述Ii链基因座内，并且所述指导RNA包含由SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:68或其组合编码的核酸序列。

23. 根据权利要求17-22中任一项所述的方法，其中：

(a) 当将所述免疫细胞施用于受试者时，与施用于相同受试者的未修饰的免疫细胞所产生的免疫应答相比，所述免疫细胞在所述受试者中产生减少的免疫应答；和/或

(b) 当将所述免疫细胞施用于受试者时,与包含能够下调TRAC、B2M和CIITA的基因表达的一种或多种核酸的免疫细胞所产生的免疫应答相比,所述免疫细胞在所述受试者中产生减少的免疫应答;和/或

(c) 当将所述免疫细胞施用于受试者时,所述免疫细胞在所述受试者中产生减少的免疫应答,其中所述免疫应答是移植物抗宿主病(GvHD)应答;和/或

(d) 当将所述免疫细胞施用于受试者时,所述免疫细胞在所述受试者中产生减少的免疫应答,其中所述免疫应答是移植物抗宿主病(GvHD)应答,并且进一步地其中所述减少的GvHD应答是针对HLA-I错配细胞或针对HLA-II错配细胞引发的;和/或

(e) 当将所述免疫细胞施用于受试者时,所述免疫细胞在所述受试者中产生减少的免疫应答,其中所述免疫应答是移植物抗宿主病(GvHD)应答,其中所述GvHD应答:

(i) 减少约10%或更多、约20%或更多、约30%或更多、约40%或更多、约50%或更多、约60%或更多、约70%或更多、约80%或更多、约90%或更多、或约95%或更多;或

(ii) 减少约1倍或更多、约2倍或更多、约3倍或更多、约4倍或更多、约5倍或更多、约6倍或更多、约7倍或更多、约8倍或更多、约9倍或更多、约10倍或更多、约20倍或更多、约30倍或更多、约50倍或更多、约100倍或更多、约150倍或更多、或约200倍或更多;和/或

(f) 当将所述免疫细胞施用于受试者时,所述免疫细胞在所述受试者中产生减少的免疫应答,其中所述免疫应答是移植物抗宿主病(GvHD)应答,并且进一步地其中由所述经修饰的免疫细胞产生的所述减少的GvHD应答是与在一个或多个基因座中没有所述缺失和/或插入的等效免疫细胞或在TRAC、B2M和CIITA中包含所述缺失和/或插入的免疫细胞相比。

24. 根据权利要求17-23中任一项所述的方法,其中:

(a) 所述外源性核酸编码嵌合抗原受体(CAR),并且其中所述CAR包含抗原结合结构域、铰链结构域、跨膜结构域、共刺激信号传导结构域和细胞内信号传导结构域;和/或

(b) 所述外源性核酸编码嵌合抗原受体(CAR),并且其中所述CAR包含抗原结合结构域、铰链结构域、跨膜结构域、共刺激信号传导结构域和细胞内信号传导结构域,并且进一步地其中所述抗原结合结构域靶向肿瘤抗原,所述肿瘤抗原:

(i) 与血液恶性肿瘤相关;

(ii) 与实体瘤相关;和/或

(iii) 选自ROR1、间皮素、c-Met、PSMA、PSCA、叶酸受体 α 、叶酸受体 β 、EGFR、EGFRvIII、GPC2、GPC2、粘蛋白1(MUC1)、Tn抗原((Tn Ag)或(GalNAc-Ser/Thr))、TnMUC1、GDNF家族受体 α -4(GFR α 4)、成纤维细胞激活蛋白(FAP)和白细胞介素-13受体亚基 α -2(IL-13Ra2或CD213A2);和/或

(c) 所述外源性核酸编码嵌合抗原受体(CAR),并且其中所述CAR包含抗原结合结构域、铰链结构域、跨膜结构域、共刺激信号传导结构域和细胞内信号传导结构域,并且进一步地其中所述CAR包含:

(i) PSMA抗原结合结构域、CD2共刺激结构域和CD3 ζ 细胞内信号传导结构域;

(ii) 间皮素抗原结合结构域、4-1BB共刺激结构域和CD3 ζ 信号传导结构域;或

(iii) TnMUC1抗原结合结构域、CD2共刺激结构域和CD3 ζ 信号传导结构;和/或

(d) 所述开关受体包含:

(i) 选自CTLA4、PD-1、VISTA、VSIG8、TGF β RII、BTLA和TIM-3的与负信号相关的信号传导

蛋白质的细胞外结构域,

(ii) 跨膜结构域, 以及

(iii) 选自CD28、4-1BB、IL12R β 1、IL12R β 2、CD2、ICOS和CD27的与正信号相关的信号传导蛋白质的细胞内结构域; 和/或

(e) 所述显性负性受体包含:

(i) 与负信号相关的野生型蛋白质的截短变体,

(ii) 与负信号相关的野生型蛋白质的变体, 所述变体包含细胞外结构域、跨膜结构域并且基本上缺乏细胞内信号传导结构域; 或

(iii) 与负信号相关的信号传导蛋白质的细胞外结构域和跨膜结构域; 和/或

(f) 所述开关受体选自PD-1-CD28、PD-1^{A132L}-CD28、PD-1-CD27、PD-1^{A132L}-CD27、PD-1-4-1BB、PD-1^{A132L}-4-1BB、PD-1-ICOS、PD-1^{A132L}-ICOS、PD-1-IL12R β 1、PD-1^{A132L}-IL12R β 1、PD-1-IL12R β 2、PD-1^{A132L}-IL12R β 2、VSIG3-CD28、VSIG8-CD28、VSIG3-CD27、VSIG8-CD27、VSIG3-4-1BB、VSIG8-4-1BB、VSIG3-ICOS、VSIG8-ICOS、VSIG3-IL12R β 1、VSIG8-IL12R β 1、VSIG3-IL12R β 2、VSIG8-IL12R β 2、TGF β RII-CD27、TGF β RII-CD28、TGF β RII-4-1BB、TGF β RII-ICOS、TGF β RII-IL12R β 1和TGF β RII-IL12R β 2; 和/或

(g) 所述显性负性受体是PD1、VSIG3、VSIG8或TGF β R显性负性受体; 和/或

(h) 所述跨膜结构域:

(i) 选自如下蛋白质的跨膜结构域, 所述蛋白质选自CTLA4、PD-1、BTLA、TGF β RII、BTLA、TIM-3、CD28、4-1BB、IL12R β 1、IL12R β 2、CD2、ICOS和CD27; 或

(ii) 选自与负信号相关的蛋白质的跨膜或与所述负信号相关的蛋白质的跨膜结构域。

25. 根据权利要求17-24中任一项所述的方法:

(a) 其中扩增所述经修饰的免疫细胞包括将所述T细胞与选自f1t3-L、IL-1、IL-3、IL-2、IL-7、IL-15、IL-18、IL-21、TGF β 、IL-10和c-kit配体的因子一起培养; 和/或

(b) 进一步包括在所述免疫细胞中引入多肽Klf4、Oct3/4和Sox2和/或编码所述多肽的核酸以诱导所述免疫细胞的多能性; 和/或

(c) 其中所述免疫细胞获自血液样品、全血样品、外周血单个核细胞(PBMC)样品或单采术样品; 和/或

(d) 其中所述免疫细胞获自单采术样品, 并且进一步地其中所述单采术样品是冷冻保存的样品; 和/或

(e) 其中所述免疫细胞获自单采术样品, 并且进一步地其中所述单采术样品是新鲜样品; 和/或

(f) 其中所述免疫细胞获自人受试者。

26. 一种获自根据权利要求17-25中任一项所述的方法的经修饰的免疫细胞群。

27. 一种组合物, 所述组合物包含根据权利要求1-16中任一项所述的经修饰的免疫细胞或经修饰的T细胞、或根据权利要求26所述的经修饰的免疫细胞群、以及药学上可接受的载体或赋形剂。

28. 一种治疗受试者的与增强的免疫相关的疾病或病症的方法, 所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的根据权利要求27所述的组合物。

29. 根据权利要求28所述的方法, 其中:

(a) 所述病症是癌症;和/或

(b) 所述病症是癌症,并且进一步地其中所述癌症选自乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、宫颈癌、皮肤癌、胰腺癌、结直肠癌、肾癌、肝癌、脑癌、淋巴瘤、白血病、肺癌及其任何组合;和/或

(c) 所述病症是癌症,并且所述癌症是实体瘤或血液恶性肿瘤。

30. 一种治疗癌症的方法,所述方法包括向受试者施用根据权利要求1-16中任一项所述的经修饰的免疫细胞或经修饰的T细胞、根据权利要求26所述的经修饰的免疫细胞群或根据权利要求27所述的组合物。

31. 根据权利要求30所述的方法,其中所述癌症是实体瘤或血液恶性肿瘤。

32. 一种用于在受试者中刺激针对靶细胞或组织的T细胞介导的免疫应答的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的药物组合物,所述药物组合物包含根据权利要求1-16中任一项所述的经修饰的免疫细胞或经修饰的T细胞、根据权利要求26所述的经修饰的免疫细胞群或根据权利要求27所述的组合物。

33. 一种试剂盒,所述试剂盒包含根据权利要求1-16中任一项所述的经修饰的免疫细胞、根据权利要求26所述的经修饰的T细胞群或根据权利要求27所述的组合物,任选地包含使用说明书。

同种异体人T细胞的可替代产生

相关申请的交叉引用

[0001] 本申请要求于2021年9月10日提交的美国临时申请号63/242,909的优先权权益,将其内容通过引用明确并入。

背景技术

[0002] 过继免疫疗法涉及将离体产生的自体抗原特异性T细胞转移回患者体内,并且已显示是治疗癌症、感染和自身免疫性疾病的有前景的策略。用于过继免疫疗法的T细胞是经工程化以表达嵌合抗原受体(CAR)或重组T细胞受体(TCR)的原代细胞,并且离体扩增以将原代免疫细胞针对病理细胞(如癌细胞)重定向。CAR是由与单个融合分子中的一个或多个信号传导结构域缔合的靶向部分组成的合成抗体样分子,并且被设计成将抗原特异性传递给T细胞。CAR已成功地允许T细胞针对在来自各种恶性肿瘤(包括淋巴瘤和实体瘤)的肿瘤细胞的表面表达的抗原重定向。表达CAR的T细胞还展现出治疗某些类型的癌症的长期功效。

[0003] 然而,过继免疫疗法目前基于自体细胞转移。在自体免疫疗法中,患者接受基于患者自身淋巴细胞的个性化治疗,这些淋巴细胞经历从患者分离、离体基因修饰或选择、体外培养并输注回患者体内。尽管自体过继免疫疗法获得批准并取得了普遍成功,但此类疗法的可扩展性和可行性仍存在重大挑战。自体过继免疫疗法仍然相当复杂,需要专业知识和临床管理以及昂贵的专用设施。由于在CAR制造期间疾病的快速进展或在这种治疗之前患者免疫功能的退化,许多患者也无法接受过继免疫疗法。因此,癌症免疫疗法的广泛临床应用受到自体CAR T细胞的个性化制备带来的相当大的经济约束的限制。因此,需要标准化的过继免疫疗法,其中同种异体治疗性细胞被预先制造、详细表征、并且可用于立即施用于广泛的患者。

[0004] 同种异体免疫疗法仍然是一种危险的程序,具有许多可能的并发症,如同种异体T细胞应答,所述应答在临床上表现为移植物抗宿主病(GVHD)和/或宿主抗移植物病(HvGD,移植物排斥)。GvHD是由供体CAR细胞上的同种异体反应性TCR介导的由输注的同种异体CAR-T细胞对接受者组织的攻击引起的。特别地,输注的T细胞上的内源性T细胞受体 α (TCR α ; TRAC)和 β (TCR β ; TRBC)链可以识别接受者中的主要和次要组织相容性抗原,从而导致(GvHD)。相反,输注的同种异体CAR T细胞可能被接受者T淋巴细胞排斥,从而导致HvGD。因此,如果鉴定出控制固有同种异体免疫应答的标准化溶液时并且当这种情况发生时,将改善使用同种异体CAR T细胞的过继免疫疗法的适用性和多功能性。GvHD的特异性抑制将使得能够安全且有效地使用同种异体CAR T细胞。

[0005] 因此,需要不引起宿主免疫应答的CAR-T细胞的改进方法。具体地,需要用于产生具有改进的适应性的同种异体T细胞的新颖和可替代的组合物和方法。

[0006] 本发明提供了解决这些需求的方法和组合物。

发明内容

[0007] 在一方面,本公开文本提供了一种经修饰的免疫细胞,所述经修饰的免疫细胞包含:(a)在一个或多个基因座中的插入和/或缺失,所述一个或多个基因座各自编码选自以下的内源性免疫蛋白:CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、B2M、CIITA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP和恒定链(invariant chain,Ii链)。所述插入和/或缺失能够下调一个或多个内源性免疫基因的基因表达。此外,所述经修饰的免疫细胞包含(b)编码嵌合抗原受体(CAR)、工程化T细胞受体(TCR)、杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR)、抗原结合多肽、细胞表面受体配体或肿瘤抗原的外源性核酸。在一些实施方案中,所述经修饰的免疫细胞进一步包含显性负性受体、开关受体、趋化因子、趋化因子受体、细胞因子、细胞因子受体、IL-7、IL-7R、IL-15、IL-15R、IL-21、IL-18、CCL21、CCL19或其任何组合。

[0008] 在一些实施方案中,所述插入和/或缺失能够下调以下的基因表达:(a)选自CD3 δ 、CD3 ϵ 和/或CD3 γ 的T细胞受体亚基;(b)选自B2M、TAP1、TAP2、TAPBP和/或NLRC5的HLA I类分子;和(c)选自HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP和/或恒定链(Ii链)的HLA II类分子。

[0009] 在一些实施方案中,所述插入和/或缺失能够下调(a)CD3 δ 的基因表达和(b)选自B2M、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP、恒定链(Ii链)及其任何组合的HLA分子的基因表达。

[0010] 在一些实施方案中,所述插入和/或缺失能够下调:(a)CD3 ϵ 的基因表达和(b)选自B2M、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、CIITA、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP、恒定链(Ii链)或其任何组合的HLA分子的基因表达。

[0011] 在一些实施方案中,所述插入和/或缺失能够下调:(a)CD3 γ 的基因表达和(b)选自B2M、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、CIITA、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP、恒定链(Ii链)或其任何组合的HLA分子的基因表达。

[0012] 在一些实施方案中,所述插入和/或缺失能够下调以下的基因表达:(a)CD3 ϵ 、B2M和CIITA;(b)CD3 ϵ 、B2M和RFX5;(c)CD3 ϵ 、B2M和RFXAP;(d)CD3 ϵ 、B2M和RFXANK;(e)CD3 ϵ 、B2M和HLA-DM;(f)CD3 ϵ 、B2M和Ii链;(g)CD3 ϵ 、TAP1和CIITA;(h)CD3 ϵ 、TAP1和RFX5;(i)CD3 ϵ 、TAP1和RFXAP;(j)CD3 ϵ 、TAP1和RFXANK;(k)CD3 ϵ 、TAP1和HLA-DM;(l)CD3 ϵ 、TAP1和Ii链;(m)CD3 ϵ 、TAP2和CIITA;(n)CD3 ϵ 、TAP2和RFX5;(o)CD3 ϵ 、TAP2和RFXAP;(p)CD3 ϵ 、TAP2和RFXANK;(q)CD3 ϵ 、TAP2和HLA-DM;(r)CD3 ϵ 、TAP2和Ii链;(s)CD3 ϵ 、NLRC5和CIITA;(t)CD3 ϵ 、NLRC5和RFX5;(u)CD3 ϵ 、NLRC5和RFXAP;(v)CD3 ϵ 、NLRC5和RFXANK;(w)CD3 ϵ 、NLRC5和HLA-DM;(x)CD3 ϵ 、NLRC5和Ii链;(y)CD3 ϵ 、TAPBP和CIITA;(z)CD3 ϵ 、TAPBP和RFX5;(aa)CD3 ϵ 、TAPBP和RFXAP;(bb)CD3 ϵ 、TAPBP和RFXANK;(cc)CD3 ϵ 、TAPBP和HLA-DM;或(dd)CD3 ϵ 、TAPBP和Ii链。

[0013] 在一些实施方案中,所述插入和/或缺失能够下调以下的基因表达:(a)CD3 δ 、B2M和CIITA;(b)CD3 δ 、B2M和RFX5;(c)CD3 δ 、B2M和RFXAP;(d)CD3 δ 、B2M和RFXANK;(e)CD3 δ 、B2M和HLA-DM;(f)CD3 δ 、B2M和Ii链;(g)CD3 δ 、TAP1和CIITA;(h)CD3 δ 、TAP1和RFX5;(i)CD3 δ 、TAP1和RFXAP;(j)CD3 δ 、TAP1和RFXANK;(k)CD3 δ 、TAP1和HLA-DM;(l)CD3 δ 、TAP1和Ii链;(m)CD3 δ 、TAP2和CIITA;(n)CD3 δ 、TAP2和RFX5;(o)CD3 δ 、TAP2和RFXAP;CD3 δ 、TAP2和RFXANK;CD3 δ 、TAP2和HLA-DM;(r)CD3 δ 、TAP2和Ii链;(s)CD3 δ 、NLRC5和CIITA;(t)CD3 δ 、NLRC5和RFX5;(u)CD3 δ 、NLRC5和RFXAP;(v)CD3 δ 、NLRC5和RFXANK;(w)CD3 δ 、NLRC5和HLA-DM;(x)CD3 δ 、NLRC5和Ii链;(y)CD3 δ 、TAPBP和CIITA;(z)CD3 δ 、TAPBP和RFX5;(aa)CD3 δ 、TAPBP和RFXAP;

(bb) CD3 δ 、TAPBP和RFXANK; (cc) CD3 δ 、TAPBP和HLA-DM; 或 (dd) CD3 δ 、TAPBP和Ii链。

[0014] 在一些实施方案中,所述插入和/或缺失能够下调以下的基因表达:(a) CD3 γ 、B2M和CIITA; (b) CD3 γ 、B2M和RFX5; (c) CD3 γ 、B2M和RFXAP; (d) CD3 γ 、B2M和RFXANK; (e) CD3 γ 、B2M和HLA-DM; (f) CD3 γ 、B2M和Ii链; (g) CD3 γ 、TAP1和CIITA; (h) CD3 γ 、TAP1和RFX5; (i) CD3 γ 、TAP1和RFXAP; (j) CD3 γ 、TAP1和RFXANK; (k) CD3 γ 、TAP1和HLA-DM; (l) CD3 γ 、TAP1和Ii链; (m) CD3 γ 、TAP2和CIITA; (n) CD3 γ 、TAP2和RFX5; (o) CD3 γ 、TAP2和RFXAP; (p) CD3 γ 、TAP2和RFXANK; (q) CD3 γ 、TAP2和HLA-DM; (r) CD3 γ 、TAP2和Ii链; (s) CD3 γ 、NLRC5和CIITA; (t) CD3 γ 、NLRC5和RFX5; (u) CD3 γ 、NLRC5和RFXAP; (v) CD3 γ 、NLRC5和RFXANK; (w) CD3 γ 、NLRC5和HLA-DM; (x) CD3 γ 、NLRC5和Ii链; (y) CD3 γ 、TAPBP和CIITA; (z) CD3 γ 、TAPBP和RFX5; (aa) CD3 γ 、TAPBP和RFXAP; (bb) CD3 γ 、TAPBP和RFXANK; (cc) CD3 γ 、TAPBP和HLA-DM; 或 (dd) CD3 γ 、TAPBP和Ii链。

[0015] 在一些实施方案中,所述经修饰的免疫细胞选自T细胞、自然杀伤细胞(NK细胞)、自然杀伤T细胞、淋巴样祖细胞、造血干细胞、干细胞、巨噬细胞、树突细胞或其任何组合。在一些实施方案中,所述经修饰的免疫细胞是CD4⁺ T细胞或CD8⁺ T细胞。在一些实施方案中,所述经修饰的免疫细胞是同种异体T细胞或自体人T细胞。

[0016] 在一些实施方案中,所述插入和/或缺失是选自以下的基因编辑的结果:(a) CRISPR相关(Cas) (CRISPR-Cas) 核酸内切酶系统和指导RNA; (b) TALEN基因编辑系统、锌指核酸酶(ZFN) 基因编辑系统、兆核酸酶基因编辑系统或兆TALEN基因编辑系统;和(c) 选自反义RNA、antigomer RNA、RNAi、siRNA或shRNA的基因沉默系统。在一些实施方案中,所述CRISPR-Cas系统包括pAd5/F35-CRISPR载体。在一些实施方案中,所述Cas核酸内切酶包含Cas3、Cas4、Cas8a、Cas8b、Cas9、Cas10、Cas10d、Cas12a、Cas12b、Cas12d、Cas12e、Cas12f、Cas12g、Cas12h、Cas12i、Cas13、Cas14、CasX、Cse1、Csy1、Csn2、Cpf1、C2c1、Csm2、Cmr5、Fok1、酿脓链球菌(*S. pyogenes*) Cas9、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) Cas9、MAD7核酸酶(V型CRISPR核酸酶) 或其任何组合。

[0017] 在一些实施方案中,所述CRISPR-Cas核酸内切酶系统包含指导RNA。在一些实施方案中,所述指导RNA包含与所述一个或多个基因座内的序列互补的指导序列,所述一个或多个基因座各自编码选自CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、B2M、CIITA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP和恒定链(Ii链)的免疫蛋白。在一些实施方案中,所述指导RNA与CD3 δ 、CD3 ϵ 或CD3 γ 的一个或多个外显子内的序列互补。在一些实施方案中,所述指导RNA与CD3 δ 、CD3 ϵ 或CD3 γ 的外显子1内的序列互补。

[0018] 在一些实施方案中,所述指导RNA的互补序列在所述CD3 δ 基因座内,并且所述指导RNA包含由SEQ ID NO:53编码的核酸序列。在一些实施方案中,所述指导RNA的互补序列在所述CD3 ϵ 基因座内,并且所述指导RNA包含由SEQ ID NO:52编码的核酸序列。在一些实施方案中,所述指导RNA的互补序列在所述CD3 γ 基因座内,并且所述指导RNA包含由SEQ ID NO:54编码的核酸序列。在一些实施方案中,所述指导RNA的互补序列在所述B2M基因座内,并且所述指导RNA包含由SEQ ID NO:55编码的核酸序列。在一些实施方案中,所述指导RNA的互补序列在所述CIITA基因座内,并且所述指导RNA包含由SEQ ID NO:61编码的核酸序列。在一些实施方案中,所述指导RNA的互补序列在所述TAP1基因座内,并且所述指导RNA包含由SEQ ID NO:56编码的核酸序列。在一些实施方案中,所述指导RNA的互补序列在所述TAP2基

因座内,并且所述指导RNA包含由SEQ ID NO:57编码的核酸序列。在一些实施方案中,所述指导RNA的互补序列在所述TAPBP基因座内,并且所述指导RNA包含由SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:59或其组合编码的核酸序列。在一些实施方案中,所述指导RNA的互补序列在所述NLRC5基因座内,并且所述指导RNA包含由SEQ ID NO:60编码的核酸序列。在一些实施方案中,所述指导RNA的互补序列在所述HLA-DM基因座内,并且所述指导RNA包含由SEQ ID NO:62编码的核酸序列。在一些实施方案中,所述指导RNA的互补序列在所述RFX5基因座内,并且所述指导RNA包含由SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:64或其组合编码的核酸序列。在一些实施方案中,所述指导RNA的互补序列在所述RFXANK基因座内,并且所述指导RNA包含由SEQ ID NO:65编码的核酸序列。在一些实施方案中,所述指导RNA的互补序列在所述RFXAP基因座内,并且所述指导RNA包含由SEQ ID NO:66编码的核酸序列。在一些实施方案中,所述指导RNA的互补序列在所述Ii链基因座内,并且所述指导RNA包含由SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:68或其任何组合编码的核酸序列。

[0019] 在本公开文本的一方面,当将所述经修饰的免疫细胞施用于受试者时,与施用于相同受试者的未修饰的免疫细胞所产生的免疫应答相比,所述经修饰的免疫细胞在所述受试者中产生减少的免疫应答。

[0020] 在一些实施方案中,当将所述经修饰的免疫细胞施用于受试者时,与包含能够下调TRAC、TRBC、B2M和CIITA的基因表达的插入和/或缺失的免疫细胞所产生的免疫应答相比,所述经修饰的免疫细胞在所述受试者中产生减少的免疫应答。在一些实施方案中,所述免疫应答是移植物抗宿主病(GvHD)应答。在一些实施方案中,由所述经修饰的免疫细胞产生的减少的GvHD应答是与在一个或多个基因座中没有所述缺失和/或插入的等效免疫细胞,或在TRAC、TRBC、B2M和CIITA中包含所述缺失和/或插入的免疫细胞相比。在一些实施方案中,针对HLA-I错配细胞或针对HLA-II错配细胞引发减少的GvHD应答。

[0021] 在一些实施方案中,所述GvHD应答减少约10%或更多、约20%或更多、约30%或更多、约40%或更多、约50%或更多、约60%或更多、约70%或更多、约80%或更多、约90%或更多、或约95%或更多。在一些实施方案中,所述GvHD应答减少约1倍或更多、约2倍或更多、约3倍或更多、约4倍或更多、约5倍或更多、约6倍或更多、约7倍或更多、约8倍或更多、约9倍或更多、约10倍或更多、约20倍或更多、约30倍或更多、约50倍或更多、约100倍或更多、约150倍或更多、或约200倍或更多。

[0022] 在本公开文本的一方面,所述外源性核酸编码嵌合抗原受体(CAR)。在一些实施方案中,所述CAR包含抗原结合结构域、铰链结构域、跨膜结构域、共刺激信号传导结构域和细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,所述抗原结合结构域包含全长抗体或其抗原结合片段、Fab、F(ab)₂、单特异性Fab₂、双特异性Fab₂、三特异性Fab₂、单链可变片段(scFv)、双抗体、三抗体、微型抗体、V-NAR或VhH。

[0023] 在所述经修饰的免疫细胞的一些实施方案中,所述跨膜结构域选自人工疏水性序列,I型跨膜蛋白、T细胞受体的 α 、 β 或 ζ 链、CD28、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD2、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、OX40(CD134)、4-1BB(CD137)、ICOS(CD278)、CD154、CD357(GITR)、To11样受体1(TLR1)、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9的跨膜结构域,以及源自杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR)的跨膜结构域。

[0024] 在所述经修饰的免疫细胞的一些实施方案中,所述共刺激结构域包含选自TNFR超

家族中的蛋白质CD28、4-1BB (CD137)、OX40 (CD134)、PD-1、CD7、LIGHT、CD83L、DAP10、DAP12、CD27、CD2、CD5、ICAM-1、LFA-1、Lck、TNFR-I、TNFR-II、Fas、CD30、CD40、ICOS (CD278)、NKG2C、B7-H3 (CD276) 的蛋白质的共刺激结构域和源自杀伤细胞免疫球蛋白样受体 (KIR) 的细胞内结构域或其变体中的一个或多个。

[0025] 在所述经修饰的免疫细胞的一些实施方案中,所述细胞内信号传导结构域包含选自以下的细胞内结构域或其变体:人CD2、CD3 ζ 链 (CD3 ζ)、Fc γ RIII、Fc γ RI、Fc受体的胞质尾、携带免疫受体酪氨酸激活基序 (ITAM) 的胞质受体、TCR ζ 、FcR γ 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b和CD66d的胞质信号传导结构域。在一些实施方案中,所述细胞内信号传导结构域包含人CD3 ζ 链 (CD3 ζ)。

[0026] 在所述经修饰的免疫细胞的一些实施方案中,所述抗原结合结构域靶向与血液恶性肿瘤相关和/或与实体瘤相关的肿瘤抗原。在一些实施方案中,所述抗原结合结构域靶向选自以下的肿瘤抗原:ROR1、间皮素、c-Met、PSMA、PSCA、叶酸受体 α 、叶酸受体 β 、EGFR、EGFRvIII、GPC2、GPC2、粘蛋白1 (MUC1)、Tn抗原 ((Tn Ag) 或 (GalNAca-Ser/Thr))、TnMUC1、GDNF家族受体 α -4 (GFR α 4)、成纤维细胞激活蛋白 (FAP) 和白细胞介素-13受体亚基 α -2 (IL-13R α 2或CD213A2)。

[0027] 在一些实施方案中,所述CAR包含 (a) PSMA抗原结合结构域、CD2共刺激结构域和CD3 ζ 细胞内信号传导结构域;或 (b) 间皮素抗原结合结构域、4-1BB共刺激结构域和CD3 ζ 信号传导结构域;或 (c) TnMUC1抗原结合结构域、CD2共刺激结构域和CD3 ζ 信号传导结构域。

[0028] 在本公开文本的一方面,所述经修饰的免疫细胞进一步包含开关受体。在一些实施方案中,所述开关受体包含与负信号相关的信号传导蛋白质的细胞外结构域、跨膜结构域和与正信号相关的信号传导蛋白质的细胞内结构域。

[0029] 在一些实施方案中,所述经修饰的免疫细胞进一步包含显性负性受体。在一些实施方案中,所述显性负性受体包含 (a) 与负信号相关的野生型蛋白质的截短变体;或 (b) 与负信号相关的野生型蛋白质的变体,所述变体包含细胞外结构域、跨膜结构域并且基本上缺乏细胞内信号传导结构域;或 (c) 与负信号相关的信号传导蛋白质的细胞外结构域和跨膜结构域。在一些实施方案中,所述显性负性受体是PD1、VSIG3、VISG8或TGF β R显性负性受体。

[0030] 在一些实施方案中,与所述负信号相关的所述蛋白质选自CTLA4、PD-1、TGF β RII、BTLA、VSIG3、VSIG8和TIM-3。在一些实施方案中,与所述正信号相关的所述蛋白质选自CD28、4-1BB、IL12R β 1、IL12R β 2、CD2、ICOS和CD27。

[0031] 在一些实施方案中,所述开关受体选自PD-1-CD28、PD-1^{A132L}-CD28、PD-1-CD27、PD-1^{A132L}-CD27、PD-1-4-1BB、PD-1^{A132L}-4-1BB、PD-1-ICOS、PD-1^{A132L}-ICOS、PD-1-IL12R β 1、PD-1^{A132L}-IL12R β 1、PD-1-IL12R β 2、PD-1^{A132L}-IL12R β 2、VSIG3-CD28、VSIG8-CD28、VSIG3-CD27、VSIG8-CD27、VSIG3-4-1BB、VSIG8-4-1BB、VSIG3-ICOS、VSIG8-ICOS、VSIG3-IL12R β 1、VSIG8-IL12R β 1、VSIG3-IL12R β 2、VSIG8-IL12R β 2、TGF β RII-CD27、TGF β RII-CD28、TGF β RII-4-1BB、TGF β RII-ICOS、TGF β RII-IL12R β 1和TGF β RII-IL12R β 2。

[0032] 在所述经修饰的免疫细胞的一些实施方案中,所述开关受体的跨膜结构域选自如下蛋白质的跨膜结构域,所述蛋白质选自CTLA4、PD-1、VSIG3、VSIG8、TGF β RII、BTLA、TIM-3、CD28、4-1BB、IL12R β 1、IL12R β 2、CD2、ICOS和CD27。在一些实施方案中,所述开关受体的跨膜

结构域选自与负信号相关的蛋白质的跨膜或与所述负信号相关的蛋白质的跨膜结构域。

[0033] 在一方面,本公开文本提供了一种分离的经修饰的T细胞,所述分离的经修饰的T细胞包含选自CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、B2M、C2TA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP和恒定链(Ii链)的至少一种功能受损多肽。在一些实施方案中,与未修饰的T细胞相比,包含所述功能受损多肽的所述经修饰的T细胞展现出以下中的至少一种:(i) T细胞受体表达减少;(ii) 所述受损多肽的表达减少;(iii) 完全不存在T细胞受体复合物表面表达;和/或(iv) T细胞受体交联减少或不足。在一些实施方案中,当将所述经修饰的T细胞施用于所述受试者时,与施用于相同受试者的未修饰的T细胞所产生的免疫应答相比,所述T细胞在受试者中产生减少的免疫应答。

[0034] 在一些实施方案中,所述T细胞包含两种或更多种功能受损多肽,并且其中第二受损多肽是T细胞受体 α 链(TRAC)和/或T细胞受体 β 链(TRBC)。

[0035] 在一些实施方案中,所述经修饰的T细胞包含:(a) 选自TRAC、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、B2M、C2TA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP或Ii链的三种或更多种功能受损多肽;或(b) 选自CD3 α 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、B2M、C2TA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP或Ii链的两种功能受损多肽;或(c) 选自CD3 α 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、B2M、C2TA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP或Ii链的三种功能受损多肽;或(d) 选自CD3 δ 、CD3 ϵ 和CD3 γ 的功能受损多肽和选自TRAC、TRBC、B2M、C2TA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP或Ii链的至少一种功能受损多肽;或(e) 选自CD3 δ 、CD3 ϵ 和CD3 γ 的功能受损多肽和选自TRAC、TRBC、B2M、C2TA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP或Ii链的功能受损多肽。

[0036] 在一些实施方案中,所述经修饰的T细胞包含:(a) 功能受损CD3 δ 和选自TRAC、TRBC、B2M、C2TA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP或Ii链的至少一种功能受损多肽;(b) 功能受损CD3 ϵ 和选自TRAC、TRBC、B2M、C2TA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP或Ii链的至少一种功能受损多肽;或(c) 功能受损CD3 γ 和选自TRAC、B2M、C2TA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP或Ii链的至少一种功能受损多肽。

[0037] 在一些实施方案中,所述经修饰的T细胞包含选自TRAC、TRBC、B2M、C2TA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP或Ii链的两种或更多种功能受损多肽。在一些实施方案中,所述经修饰的T细胞具有TRAC、TRBC、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、B2M、C2TA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP、Ii链或其任何组合的减少的表达。在一些实施方案中,所述经修饰的T细胞不表达CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、TRAC、B2M、C2TA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP、Ii链或其任何组合。

[0038] 在一些实施方案中,所述经修饰的T细胞进一步包含选自TRAC、TRBC、B2M和C2TA的功能受损多肽。在一些实施方案中,所述经修饰的T细胞具有TRAC、TRBC、B2M或C2TA的减少的表达或不表达TRAC、TRBC、B2M或C2TA。在一些实施方案中,CD3 δ 、CD3 ϵ 和/或CD3 γ 的修饰导致TCR/CD3复合物功能受损。在一些实施方案中,通过靶向CD3 δ 、CD3 ϵ 或CD3 γ 的一个或多个外显子,任选地CD3 δ 、CD3 ϵ 或CD3 γ 的外显子1,修饰CD3 δ 、CD3 ϵ 或CD3 γ 中的至少一种。

[0039] 本公开文本的一方面提供了一种用于产生经修饰的免疫细胞的方法,所述方法包括:(a) 向所述免疫细胞中引入能够下调一个或多个内源性免疫基因的基因表达的一种或

多种核酸,所述一个或多个内源性免疫基因编码选自CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、B2M、CIITA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP和恒定链(Ii链)的内源性免疫蛋白; (b) 向所述免疫细胞中引入编码嵌合抗原受体(CAR)、工程化T细胞受体(TCR)、杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR)、抗原结合多肽、细胞表面受体配体或肿瘤抗原的外源性核酸;以及(c) 扩增所述经修饰的免疫细胞以产生T细胞群。在一些实施方案中,用于产生经修饰的免疫细胞的所述方法进一步包括向所述免疫细胞中引入编码显性负性受体、开关受体或其组合的外源性核酸。

[0040] 在一些实施方案中,引入所述经修饰的免疫细胞中的所述一种或多种核酸能够下调以下的基因表达: (a) 选自CD3 δ 、CD3 ϵ 或CD3 γ 的T细胞受体亚基;和/或(b) 选自B2M、TAP1、TAP2、TAPBP或NLRC5的HLA I类分子;和/或(c) 选自HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP或恒定链(Ii链)的HLA II类分子。

[0041] 在一些实施方案中,引入所述经修饰的免疫细胞中的所述一种或多种核酸能够下调CD3 δ 的基因表达以及选自B2M、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP、恒定链(Ii链)及其组合的HLA分子的基因表达。在一些实施方案中,引入所述经修饰的免疫细胞中的所述一种或多种核酸能够下调CD3 ϵ 以及选自B2M、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、CIITA、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP、恒定链(Ii链)及其组合的HLA分子的基因表达。在一些实施方案中,引入所述经修饰的免疫细胞中的所述一种或多种核酸能够下调CD3 γ 以及选自B2M、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、CIITA、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP、恒定链(Ii链)及其组合的HLA分子的基因表达。

[0042] 在一些实施方案中,引入所述经修饰的免疫细胞中的所述一种或多种核酸能够下调以下的基因表达: (a) CD3 ϵ 、B2M和CIITA; (b) CD3 ϵ 、B2M和RFX5; (c) CD3 ϵ 、B2M和RFXAP; (d) CD3 ϵ 、B2M和RFXANK; (e) CD3 ϵ 、B2M和HLA-DM; (f) CD3 ϵ 、B2M和Ii链; (g) CD3 ϵ 、TAP1和CIITA; (h) CD3 ϵ 、TAP1和RFX5; (i) CD3 ϵ 、TAP1和RFXAP; (j) CD3 ϵ 、TAP1和RFXANK; (k) CD3 ϵ 、TAP1和HLA-DM; (l) CD3 ϵ 、TAP1和Ii链; (m) CD3 ϵ 、TAP2和CIITA; (n) CD3 ϵ 、TAP2和RFX5; (o) CD3 ϵ 、TAP2和RFXAP; (p) CD3 ϵ 、TAP2和RFXANK; (q) CD3 ϵ 、TAP2和HLA-DM; (r) CD3 ϵ 、TAP2和Ii链; (s) CD3 ϵ 、NLRC5和CIITA; (t) CD3 ϵ 、NLRC5和RFX5; (u) CD3 ϵ 、NLRC5和RFXAP; (v) CD3 ϵ 、NLRC5和RFXANK; (w) CD3 ϵ 、NLRC5和HLA-DM; (x) CD3 ϵ 、NLRC5和Ii链; (y) CD3 ϵ 、TAPBP和CIITA; (z) CD3 ϵ 、TAPBP和RFX5; (aa) CD3 ϵ 、TAPBP和RFXAP; (bb) CD3 ϵ 、TAPBP和RFXANK; (cc) CD3 ϵ 、TAPBP和HLA-DM;或(dd) CD3 ϵ 、TAPBP和Ii链。

[0043] 在一些实施方案中,引入所述经修饰的免疫细胞中的所述一种或多种核酸能够下调以下的基因表达: (a) CD3 δ 、B2M和CIITA; (b) CD3 δ 、B2M和RFX5; (c) CD3 δ 、B2M和RFXAP; (d) CD3 δ 、B2M和RFXANK; (e) CD3 δ 、B2M和HLA-DM; (f) CD3 δ 、B2M和Ii链; (g) CD3 δ 、TAP1和CIITA; (h) CD3 δ 、TAP1和RFX5; (i) CD3 δ 、TAP1和RFXAP; (j) CD3 δ 、TAP1和RFXANK; (k) CD3 δ 、TAP1和HLA-DM; (l) CD3 δ 、TAP1和Ii链; (m) CD3 δ 、TAP2和CIITA; (n) CD3 δ 、TAP2和RFX5; (o) CD3 δ 、TAP2和RFXAP; (p) CD3 δ 、TAP2和RFXANK; (q) CD3 δ 、TAP2和HLA-DM; (r) CD3 δ 、TAP2和Ii链; (s) CD3 δ 、NLRC5和CIITA; (t) CD3 δ 、NLRC5和RFX5; (u) CD3 δ 、NLRC5和RFXAP; (v) CD3 δ 、NLRC5和RFXANK; (w) CD3 δ 、NLRC5和HLA-DM; (x) CD3 δ 、NLRC5和Ii链; (y) CD3 δ 、TAPBP和CIITA; (z) CD3 δ 、TAPBP和RFX5; (aa) CD3 δ 、TAPBP和RFXAP; (bb) CD3 δ 、TAPBP和RFXANK; (cc) CD3 δ 、TAPBP和HLA-DM;或(dd) CD3 δ 、TAPBP和Ii链。

[0044] 在一些实施方案中,引入所述经修饰的免疫细胞中的所述一种或多种核酸能够下调以下的基因表达:(a)CD3 γ 、B2M和CIITA;(b)CD3 γ 、B2M和RFX5;(c)CD3 γ 、B2M和RFXAP;(d)CD3 γ 、B2M和RFXANK;(e)CD3 γ 、B2M和HLA-DM;(f)CD3 γ 、B2M和Ii链;(g)CD3 γ 、TAP1和CIITA;(h)CD3 γ 、TAP1和RFX5;(i)CD3 γ 、TAP1和RFXAP;(j)CD3 γ 、TAP1和RFXANK;(k)CD3 γ 、TAP1和HLA-DM;(l)CD3 γ 、TAP1和Ii链;(m)CD3 γ 、TAP2和CIITA;(n)CD3 γ 、TAP2和RFX5;(o)CD3 γ 、TAP2和RFXAP;(p)CD3 γ 、TAP2和RFXANK;(q)CD3 γ 、TAP2和HLA-DM;(r)CD3 γ 、TAP2和Ii链;(s)CD3 γ 、NLRC5和CIITA;(t)CD3 γ 、NLRC5和RFX5;(u)CD3 γ 、NLRC5和RFXAP;(v)CD3 γ 、NLRC5和RFXANK;(w)CD3 γ 、NLRC5和HLA-DM;(x)CD3 γ 、NLRC5和Ii链;(y)CD3 γ 、TAPBP和CIITA;(z)CD3 γ 、TAPBP和RFX5;(aa)CD3 γ 、TAPBP和RFXAP;(bb)CD3 γ 、TAPBP和RFXANK;(cc)CD3 γ 、TAPBP和HLA-DM;或(dd)CD3 γ 、TAPBP和Ii链。

[0045] 在一些实施方案中,待修饰的所述免疫细胞选自T细胞、自然杀伤细胞(NK细胞)、自然杀伤T细胞、淋巴样祖细胞、造血干细胞、干细胞、巨噬细胞和树突细胞。在一些实施方案中,待修饰的所述免疫细胞是CD4⁺ T细胞或CD8⁺ T细胞。在一些实施方案中,待修饰的所述免疫细胞是同种异体T细胞或自体T细胞。

[0046] 在一些实施方案中,通过病毒转导将所述核酸引入所述免疫细胞中。在一些实施方案中,所述病毒转导包括使所述免疫细胞与包含所述一种或多种核酸的病毒载体接触。在一些实施方案中,所述病毒载体选自逆转录病毒载体、仙台病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体和慢病毒载体。

[0047] 在一些实施方案中,能够下调一个或多个内源性免疫基因的表达的所述一种或多种核酸中的每一种包含选自以下的基因编辑系统:(a)CRISPR相关(Cas)(CRISPR-CAs)核酸内切酶系统和指导RNA;(b)TALEN基因编辑系统、锌指核酸酶(ZFN)基因编辑系统、兆核酸酶基因编辑系统或兆TALEN基因编辑系统;和(c)选自反义RNA、antigomer RNA、RNAi、siRNA或shRNA的基因沉默系统。

[0048] 在一些实施方案中,所述Cas核酸内切酶包含Cas3、Cas4、Cas8a、Cas8b、Cas9、Cas10、Cas10d、Cas12a、Cas12b、Cas12d、Cas12e、Cas12f、Cas12g、Cas12h、Cas12i、Cas13、Cas14、CasX、Cse1、Csy1、Csn2、Cpf1、C2c1、Csm2、Cmr5、Fok1、酿脓链球菌Cas9、金黄色葡萄球菌Cas9、MAD7核酸酶(V型CRISPR核酸酶)或其任何组合。在一些实施方案中,所述CRISPR-Cas系统包括pAd5/F35-CRISPR载体。

[0049] 在一些实施方案中,所述CRISPR-Cas系统的所述指导RNA包含与所述一个或多个基因座内的序列互补的指导序列,所述一个或多个基因座各自编码选自CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、B2M、CIITA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP和恒定链(Ii链)的免疫蛋白。

[0050] 在一些实施方案中,引入所述经修饰的免疫细胞中的所述指导RNA与CD3 δ 、CD3 ϵ 或CD3 γ 的一个或多个外显子内的序列互补。在一些实施方案中,所述指导RNA与CD3 δ 、CD3 ϵ 或CD3 γ 的外显子1内的序列互补。

[0051] 在一些实施方案中,引入所述经修饰的免疫细胞中的所述指导RNA与所述CD3 δ 基因座内的序列互补,并且所述指导RNA包含由SEQ ID NO:53编码的核酸序列。在一些实施方案中,引入所述经修饰的免疫细胞中的所述指导RNA与所述CD3 ϵ 基因座内的序列互补,并且所述指导RNA包含由SEQ ID NO:52编码的核酸序列。在一些实施方案中,引入所述经修饰的

免疫细胞中的所述指导RNA与所述CD3 γ 基因座内的序列互补,并且所述指导RNA包含由SEQ ID NO:54编码的核酸序列。在一些实施方案中,引入所述经修饰的免疫细胞中的所述指导RNA与所述B2M基因座内的序列互补,并且所述指导RNA包含由SEQ ID NO:55编码的核酸序列。在一些实施方案中,引入所述经修饰的免疫细胞中的所述指导RNA与所述CIITA基因座内的序列互补,并且所述指导RNA包含由SEQ ID NO:61编码的核酸序列。在一些实施方案中,引入所述经修饰的免疫细胞中的所述指导RNA与所述TAP1基因座内的序列互补,并且所述指导RNA包含由SEQ ID NO:56编码的核酸序列。在一些实施方案中,引入所述经修饰的免疫细胞中的所述指导RNA与所述TAP2基因座内的序列互补,并且所述指导RNA包含由SEQ ID NO:57编码的核酸序列。在一些实施方案中,引入所述经修饰的免疫细胞中的所述指导RNA与所述TAPBP基因座内的序列互补,并且所述指导RNA包含由SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:59或其任何组合编码的核酸序列。在一些实施方案中,引入所述经修饰的免疫细胞中的所述指导RNA与所述NLRC5基因座内的序列互补,并且所述指导RNA包含由SEQ ID NO:60编码的核酸序列。在一些实施方案中,引入所述经修饰的免疫细胞中的所述指导RNA与所述HLA-DM基因座内的序列互补,并且所述指导RNA包含由SEQ ID NO:62编码的核酸序列。在一些实施方案中,引入所述经修饰的免疫细胞中的所述指导RNA与所述RFX5基因座内的序列互补,并且所述指导RNA包含由SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:64或其任何组合编码的核酸序列。在一些实施方案中,引入所述经修饰的免疫细胞中的所述指导RNA与所述RFXANK基因座内的序列互补,并且所述指导RNA包含由SEQ ID NO:65编码的核酸序列。在一些实施方案中,引入所述经修饰的免疫细胞中的所述指导RNA与所述RFXAP基因座内的序列互补,并且所述指导RNA包含由SEQ ID NO:66编码的核酸序列。在一些实施方案中,引入所述经修饰的免疫细胞中的所述指导RNA与所述Ii链基因座内的序列互补,并且所述指导RNA包含由SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:68或其任何组合编码的核酸序列。

[0052] 在一些实施方案中,当将所述经修饰的免疫细胞施用于受试者时,与施用于相同受试者的未修饰的免疫细胞所产生的免疫应答相比,通过所公开的方法产生的所述经修饰的免疫细胞在受试者中产生减少的免疫应答。

[0053] 在一些实施方案中,当将所述免疫细胞施用于所述受试者时,与包含能够下调TRAC、TRBC、B2M和CIITA的基因表达的一种或多种核酸的免疫细胞所产生的免疫应答相比,通过所公开的方法产生的所述经修饰的免疫细胞在受试者中产生减少的免疫应答。在一些实施方案中,由通过所公开的方法产生的所述经修饰的免疫细胞产生的减少的GvHD应答是与在一个或多个基因座中没有所述缺失和/或插入的等效免疫细胞,或在TRAC、TRBC、B2M和CIITA中包含所述缺失和/或插入的免疫细胞相比。

[0054] 在一些实施方案中,所述免疫应答是移植物抗宿主病(GvHD)应答。在一些实施方案中,针对HLA-I错配细胞或针对HLA-II错配细胞引发减少的GvHD应答。在一些实施方案中,由通过所公开的方法产生的经修饰的免疫细胞引发的所述GvHD应答减少约10%或更多、约20%或更多、约30%或更多、约40%或更多、约50%或更多、约60%或更多、约70%或更多、约80%或更多、约90%或更多、或约95%或更多。在一些实施方案中,由通过所公开的方法产生的经修饰的免疫细胞引发的所述GvHD应答减少约1倍或更多、约2倍或更多、约3倍或更多、约4倍或更多、约5倍或更多、约6倍或更多、约7倍或更多、约8倍或更多、约9倍或更多、约10倍或更多、约20倍或更多、约30倍或更多、约50倍或更多、约100倍或更多、约150倍

或更多、或约200倍或更多。

[0055] 在一些实施方案中,引入所述免疫细胞中的所述外源性核酸编码嵌合抗原受体(CAR)。在一些实施方案中,所述CAR包含抗原结合结构域、铰链结构域、跨膜结构域、共刺激信号传导结构域和细胞内信号传导结构域。

[0056] 在一些实施方案中,所述抗原结合结构域靶向与血液恶性肿瘤相关和/或与实体瘤相关的肿瘤抗原。在一些实施方案中,所述抗原结合结构域靶向选自以下的肿瘤抗原: ROR1、间皮素、c-Met、PSMA、PSCA、叶酸受体 α 、叶酸受体 β 、EGFR、EGFRvIII、GPC2、GPC2、粘蛋白1(MUC1)、Tn抗原((Tn Ag)或(GalNAca-Ser/Thr))、TnMUC1、GDNF家族受体 α -4(GFR α 4)、成纤维细胞激活蛋白(FAP)和白细胞介素-13受体亚基 α -2(IL-13R α 2或CD213A2)。

[0057] 在一些实施方案中,引入所述经修饰的免疫细胞中的所述CAR包含:(a) PSMA抗原结合结构域(例如,SEQ ID NO:73或74)、CD2共刺激结构域和CD3 ζ 细胞内信号传导结构域;或(b) 间皮素抗原结合结构域(例如,SEQ ID NO:75)、4-1BB共刺激结构域和CD3 ζ 信号传导结构域;或(c) TnMUC1抗原结合结构域、CD2共刺激结构域和CD3 ζ 信号传导结构域。在一些实施方案中,所述TnMUC1 CAR包含SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列,并且所述间皮素CAR包含SEQ ID NO:71或SEQ ID NO:72所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述TnMUC1 CAR由SEQ ID NO:69所示的核酸序列编码。

[0058] 在本公开文本的一方面,引入所述经修饰的免疫细胞中的所述开关受体包含:(a) 选自CTLA4、PD-1、VISTA、VSIG8、TGF β R2、BTLA和TIM-3的与负信号相关的信号传导蛋白质的细胞外结构域,(b) 跨膜结构域,和(c) 选自CD28、4-1BB、IL12R β 1、IL12R β 2、CD2、ICOS和CD27的与正信号相关的信号传导蛋白质的细胞内结构域。

[0059] 在一些实施方案中,所述开关受体选自PD-1-CD28、PD-1^{A132L}-CD28、PD-1-CD27、PD-1^{A132L}-CD27、PD-1-4-1BB、PD-1^{A132L}-4-1BB、PD-1-ICOS、PD-1^{A132L}-ICOS、PD-1-IL12R β 1、PD-1^{A132L}-IL12R β 1、PD-1-IL12R β 2、PD-1^{A132L}-IL12R β 2、VSIG3-CD28、VSIG8-CD28、VSIG3-CD27、VSIG8-CD27、VSIG3-4-1BB、VSIG8-4-1BB、VSIG3-ICOS、VSIG8-ICOS、VSIG3-IL12R β 1、VSIG8-IL12R β 1、VSIG3-IL12R β 2、VSIG8-IL12R β 2、TGF β R2-CD27、TGF β R2-CD28、TGF β R2-4-1BB、TGF β R2-ICOS、TGF β R2-IL12R β 1和TGF β R2-IL12R β 2。

[0060] 在一些实施方案中,引入所述经修饰的免疫细胞中的所述显性负性受体包含(a) 与负信号相关的野生型蛋白质的截短变体,或(b) 与负信号相关的野生型蛋白质的变体,所述变体包含细胞外结构域、跨膜结构域并且基本上缺乏细胞内信号传导结构域;或(c) 与负信号相关的信号传导蛋白质的细胞外结构域和跨膜结构域。在一些实施方案中,所述显性负性受体是PD1、VISTA、VSIG8或TGF β R显性负性受体。

[0061] 在一些实施方案中,所述开关受体的跨膜结构域选自如下蛋白质的跨膜结构域,所述蛋白质选自CTLA4、PD-1、BTLA、TGF β R2、BTLA、TIM-3、CD28、4-1BB、IL12R β 1、IL12R β 2、CD2、ICOS和CD27。在一些实施方案中,所述开关受体的跨膜结构域选自与负信号相关的蛋白质的跨膜或与所述负信号相关的蛋白质的跨膜结构域。

[0062] 本公开文本的一方面提供了扩增所述经修饰的免疫细胞。在一些实施方案中,扩增所述经修饰的免疫细胞包括将所述T细胞与选自f1t3-L、IL-1、IL-3、IL-2、IL-7、IL-15、IL-18、IL-21、TGF β 、IL-10和c-kit配体的因子一起培养。本公开文本的一方面提供了在所述免疫细胞中进一步引入多肽Klf4、Oct3/4和Sox2和/或编码所述多肽的核酸以诱导所述

免疫细胞的多能性。

[0063] 在一些实施方案中,所述免疫细胞获自血液样品、全血样品、外周血单个核细胞(PBMC)样品或单采术样品。在一些实施方案中,所述单采术样品是冷冻保存的样品。在一些实施方案中,所述单采术样品是新鲜样品。在一些实施方案中,所述免疫细胞获自人受试者。

[0064] 本公开文本的一方面提供了一种通过前述实施方案中任一项所述的方法获得的经修饰的免疫细胞群。在一些实施方案中,所述组合物包含前述实施方案中任一项所述的经修饰的免疫细胞。在一些实施方案中,所述组合物包含通过前述实施方案中任一项中所公开的方法产生的经修饰的免疫细胞群和药学上可接受的载体或赋形剂。

[0065] 本公开文本的一方面提供了一种治疗受试者的与增强的免疫相关的疾病或病症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的前述实施方案中任一项中所公开的组合物。在一些实施方案中,所述病症是癌症。在一些实施方案中,所述癌症选自乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、宫颈癌、皮肤癌、胰腺癌、结直肠癌、肾癌、肝癌、脑癌、淋巴瘤、白血病、肺癌及其任何组合。在一些实施方案中,所述癌症是实体瘤或血液恶性肿瘤。在一些实施方案中,治疗癌症的方法包括向受试者施用前述实施方案中任一项所述的经修饰的免疫细胞、前述实施方案中任一项所述的经修饰的T细胞群或前述实施方案中任一项所述的组合物。

[0066] 本公开文本的一方面提供了一种用于在受试者中刺激针对靶细胞或组织的T细胞介导的免疫应答的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的药物组合物,所述药物组合物包含前述实施方案中任一项所述的经修饰的免疫细胞、前述实施方案中任一项所述的经修饰的免疫细胞群或前述实施方案中任一项所述的组合物。

[0067] 本公开文本的一方面提供了一种试剂盒,所述试剂盒包含前述实施方案中任一项所述的经修饰的免疫细胞、前述实施方案中任一项所述的经修饰的T细胞群或前述实施方案中任一项所述的组合物,任选地包含使用说明书。

[0068] 前述发明内容以及以下附图说明和具体实施方式两者都是示例性和说明性的。它们旨在提供本公开文本的进一步细节,但不应解释为是限制性的。从以下具体实施方式中本领域技术人员将清楚本公开文本的其他目的、优点和新颖特征。

附图说明

[0069] 图1示出了人T细胞受体(TCR)-CD3复合物的示意图,所述复合物包含与三个二聚体模块CD3 δ /CD3 ϵ 、CD3 γ /CD3 ϵ 和CD3 ζ /CD3 ζ 偶联的可变TCR α 链(TCR- α , TRAC)和TCR β 链(TCR- β , TRBC)。CD3 δ /CD3 ϵ 和CD3 γ /CD3 ϵ 模块是本公开文本的主题。

[0070] 图2A-图2C示出了条形图,其展示了人T细胞上TCR- α 和TCR- β 链破坏效率,如使用CRISPR/Cas系统靶向破坏CD3 δ (图2A)、CD3 ϵ (图2B)和CD3 γ (图2C)基因后通过流式细胞术所测量的。

[0071] 图3示出了展示使用图1的策略产生的同种异体CAR T细胞的扩增的图并且展示了经十天时间段群体倍增数。测试的同种异体CAR T细胞是工程化T细胞,其包含TRAC敲除(TRAC KO)、CD3 δ 敲除(D1 KO)、CD3 γ 敲除(G4 KO)和CD3 ϵ 敲除(E4 KO)。

[0072] 图4A和图4B示出了比较CRISPR介导的TCR- α 链(TRAC)敲除、CD3 δ 敲除(D1 KO)、CD3 γ 敲除(G4 KO)和CD3 ϵ 敲除(E4 KO)的下调的流式细胞术结果。图4A示出了CD3 ϵ 敲除(E4

KO) 是用于T细胞受体敲除的更好的靶标,如通过TCR- α/β 链的表面表达所测量的。图4B示出了包含CD3 ϵ 敲除 (E4 KO) 的同种异体CAR T细胞具有更高的转导效率并且在功能上优于包含例如CD3 γ 或CD3 δ 敲除的CAR T细胞;展示了PSMACAR T细胞实施方案。

[0073] 图5示出了这样的图,其显示包含TCR- α 链 (TRAC) 敲除、CD3 δ 敲除 (D1)、CD3 ϵ 敲除 (E4) 和CD3 γ 敲除 (G4) 的同种异体PSMACAR T细胞的肿瘤杀伤能力并展示PSMA E4同种异体CAR T细胞具有最佳杀伤能力。靶细胞是PC3细胞。

[0074] 图6A-图6D示出了用T7核酸内切酶错配检测测定 (T7E1) 展示的CRISPR-Cas活性。图6A示出了从使用三种不同gRNA的三种不同CRISPR-Cas C2TA (CIITA) 基因的位点扩增的T7E1处理的PCR产物的代表性凝胶电泳图像。图6B-图6D示出了通过T7E1核酸内切酶测定的Agilent Bioanalyzer电泳图生成的电泳图,其显示了CRISPR-Cas编辑效率。

[0075] 图7A-图7D示出了对照和T7E1处理的PCR的Agilent Bioanalyzer电泳图和凝胶电泳,其展示了C2TA (CIITA) CRISPR编辑效率结果。特别地,图7A示出了样品C2TA-1-PCR的总体结果,图7B示出了样品C2TA-1-T7E1的总体结果,图7C示出了样品C2TA-2-PCR的总体结果,以及图7D示出了样品C2TA-2-T7E1的总体结果。

[0076] 图8示出了这样的图,所述图展示了混合淋巴细胞反应 (MLR) 测定的结果;并显示了对照T细胞 (第2供体)、同种异体PSMACAR T细胞的单独活力或在共培养中的活力;并展示了尽管存在HLA错配,但来自第2 (不相关的) 供体的T细胞不响应于在共培养中的同种异体PSMACAR T细胞而增殖。同种异体CAR T细胞包含PSMACAR和CRISPR编辑的TRAC/B2M/C2TA gRNA。

具体实施方式

I. 概述

[0077] T细胞受体 (TCR) 复合物是由至少八个多肽亚基 (TCR $\alpha\beta$ 、CD3 ϵ γ 、CD3 $\epsilon\delta$ 和CD3 $\zeta\zeta$) 构成的大多亚基复合物。TCR $\alpha\beta$ 异二聚体是负责识别与主要组织相容性复合物I类和II类分子结合的抗原的配体结合亚基。CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 和CD3 ζ 组织成二聚体以形成转导由TCR $\alpha\beta$ 异二聚体生成的信号的三个二聚体模块CD3 δ /CD3 ϵ 、CD3 γ /CD3 ϵ 和CD3 ζ /CD3 ζ 。迄今为止, GvHD和/或HvHD避免策略一直是产生这样的同种异体T细胞,其包含通过靶向破坏TRAC基因座而实现的TCR α 链下调。在本公开文本之前,没有研究过CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 和CD3 ζ 在促进GvHD和HvHD中的调节作用,因为认为CD3 α/β 的破坏对于成功产生同种异体T细胞是至关重要的。本公开文本详述了令人惊讶的发现,即CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 和CD3 ζ 基因座的靶向破坏产生这样的同种异体CAR T细胞,其与包含TRAC基因座的靶向破坏的CAR T细胞一样有效和/或比它更好。在本公开文本中,CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 基因中的至少一种的破坏是优选的。

[0078] 本发明包括用于通过敲低一种或多种内源性T细胞受体复合物的基因表达产生经修饰的T细胞的方法和组合物,所述经修饰的T细胞表达嵌合抗原受体 (CAR)、工程化T细胞受体 (TCR)、杀伤细胞免疫球蛋白样受体 (KIR)、抗原结合多肽、细胞表面受体配体、肿瘤抗原、显性负性受体、开关受体、趋化因子、趋化因子受体、细胞因子或细胞因子受体。

[0079] 因此,本公开文本基于这样的观察,即包含与嵌合抗原受体 (CAR) 和/或开关受体和/或免疫增强因子组合的T细胞受体复合物的基因编辑的CD3 δ 基因、CD3 ϵ 基因、CD3 ζ 基因和/或CD3 γ 基因中的至少一种的经修饰的免疫细胞是具有增强的适应性的改进的同种异

体T细胞,其显示出针对各种癌细胞系的有效体外胞质活性以及当与本领域已知的标准同种异体T细胞比较时显著的体内肿瘤根除。

[0080] 过继免疫疗法为癌症患者提供了令人兴奋的希望。然而,目前存在与CAR-T和TCR细胞的制造有关的若干挑战。这些挑战影响了过继免疫疗法的潜在成功。

[0081] 尽管自体过继免疫疗法获得批准并取得了普遍成功,但此类疗法的可扩展性和可行性仍存在重大挑战。特别地,过继免疫疗法的广泛临床应用受到自体CAR T细胞的个性化制备带来的相当大的经济约束的限制。然而,其中同种异体治疗性细胞被预先制造、详细表征并且可用于立即施用于广泛范围的患者的标准化过继免疫疗法仍然是具有许多可能的并发症(如同种异体T细胞应答)的危险程序。同种异体T细胞应答在临床上表现为移植物抗宿主病(GVHD)和/或宿主抗移植物病(HvGD,移植物排斥)。GvHD是由供体CAR细胞上的同种异体反应性TCR介导的由输注的同种异体CAR-T细胞对接受者组织的攻击引起的。特别地,输注的T细胞上的内源性T细胞受体 α (TCR α ; TRAC)和 β (TCR β ; TRBC)链识别接受者中的主要和次要组织相容性抗原,从而导致(GvHD)。相反,输注的同种异体CAR T细胞可能被接受者T淋巴细胞排斥,从而导致HvGD。

[0082] 在本公开文本之前,解决同种异体T细胞应答的一种方法是使用基因组编辑技术来工程化同种异体T细胞以消除TCR α 、TCR β 和/或一种或多种主要组织相容性(MHC) I类(MHC I)和/或MHC II类复合物在同种异体供体T细胞中的表达。因为TCR $\alpha\beta$ 异二聚体对于整个TCR复合物的组装和活性是必需的,所以敲除TCR α 或 β 链的表达防止供体CAR T细胞识别宿主同种异体抗原,并因此阻止GVHD。此外,编辑掉供体T细胞中的MHC I反过来防止接受者的T细胞识别这些同种异体T细胞,从而防止移植物的排斥。迄今为止,通过靶向破坏TRAC基因座使 α 链缺失已被用作GVHD避免策略,主要是因为 β 链由两个TRBC基因(TRBC1和TRBC2)编码。因此,敲除TRBC基因可能更复杂。

[0083] 仍有待建立以最小毒性将Cas9/sgRNA有效引入T细胞中的最佳方案。此外,目前的技术无法导致在100%的CAR T细胞中的TCR敲除。这是重要的,因为可用于CAR T疗法中的同种异体细胞的成功产生将受益于100%的TCR敲除。

[0084] 为了解决这个问题,本公开文本详述了CD3 ϵ 基因、CD3 γ 基因和/或CD3 δ 基因的破坏(参见图1),所述破坏既可以单独进行,也可以与至少一种其他基因敲除组合进行,详见下表1。(CD3 ζ 基因也可以被破坏。)本公开文本还涵盖其中CD3 ϵ 、CD3 γ 和/或CD3 δ (和任选地CD3 ζ 基因)中的至少一种被破坏的构建体及其用途。CD3 ϵ 、CD3 γ 和/或CD3 δ (和任选地CD3 ζ 基因)中的至少一种的破坏还可以与CD3 α 和CD3 β 中的一种或多种的破坏组合(例如,敲除CD3 ϵ 基因和CD3 γ 基因;敲除CD3 ϵ 基因和CD3 α 基因;敲除CD3 γ 基因和CD3 δ 基因等)。参见例如,实施例2和表1,其展示了本发明的新型同种异体CAR T策略,所述策略涉及敲除(KO)抗原加工和呈递途径中的可替代T细胞受体亚基(CD3 δ 、CD3 γ 和CD3 ϵ)和另外的关键基因。

表1

		T细胞受体				HLA-I					HLA-II					
		TRAC	CD3δ	CD3ε	CD3γ	B2M	TAP1	TAP2	TAPBP	NLRC5	C2TA	HLA-DM	RFX5	RFXANK	RFXAP	ii 链
T细胞受体	TRAC	■				1					1					
	CD3δ		■													
	CD3ε			■												
	CD3γ				■											
HLA-I	B2M	1				■					1					
	TAP1						■									
	TAP2							■								
	TAPBP								■							
	NLRC5									■						
HLA-II	C2TA	1				1					■					
	HLA-DM											■				
	RFX5												■			
	RFXANK													■		
	RFXAP														■	
	ii 链															■

[0085] 令人惊讶地发现,两种或三种(或更多种)破坏干扰T细胞受体表达,并且成功地以最小的毒性导致TCR的下调。

[0086] 此外,TRAC阴性T细胞显示在肿瘤中持续较长时间(Stadtmauer等人,Science,367(6481):eaba7365(2020)),因此令人惊讶的是,专注于CD3ε基因、CD3γ基因、CD3ζ基因和/或CD3δ基因的破坏也产生了在过继免疫疗法中有效的T细胞(尽管如上所述,但本公开文本还涵盖与CD3α和/或CD3β基因的破坏组合的CD3ε、CD3γ、CD3ζ和/或CD3δ基因中的一种或多种的破坏)。

[0087] 本公开文本提供了用于通过可替代地调整和调节与同种异体T细胞应答相关的TCR信号传导来调节T细胞的功能特性的新型和可替代方法。特别地,本公开文本证明了CD3ε基因、CD3γ基因、CD3ζ和/或CD3δ基因中的至少一种单独下调或与一种或多种另外的TCR复合物组分组合下调显著降低同种异体T细胞应答,同时保留CAR T细胞有益的抗肿瘤特性,从而产生安全且有效的CAR T细胞。下面更详细地描述这些新型和可替代方法的优点。

II. 实验结果

[0088] 使用CRISPR/Cas系统靶向破坏CD3δ(图2A)、CD3ε(图2B)和CD3γ(图2C)基因后通过流式细胞术测量人T细胞上TCR-α和TCR-β链破坏效率的百分比(另请参见下面的实施例3)。图2A示出了在使用四种不同的指导RNA:gRNA1、gRNA2、gRNA3和gRNA4破坏CD3δ后的结果。在CRISPR/Cas系统中使用gRNA1和gRNA3指导RNA对CD3δ的靶向破坏导致TCRα/β的100%

KO效率,而在CRISPR/Cas系统中使用gRNA2和gRNA4导致TCR α/β 的大于约90%KO效率。因此,在CRISPR/Cas系统中优选使用gRNA1和gRNA3来破坏CD3 δ 。

[0089] 图2B示出了在使用五种不同的指导RNA:gRNA1、gRNA2、gRNA3、gRNA4和gRNA5靶向破坏CD3 ϵ 后的结果。在CRISPR/Cas系统中使用gRNA4和gRNA5指导RNA对CD3 ϵ 的破坏导致TCR α/β 的100%KO效率,而使用gRNA1导致TCR α/β 的仅约50%KO效率,并且最终在CRISPR/Cas系统中使用指导gRNA2和gRNA3导致TCR α/β 的大于约90%KO效率。因此,在CRISPR/Cas系统中优选使用gRNA4和gRNA5指导RNA来破坏CD3 ϵ 。

[0090] 图2C示出了在使用五种不同的指导RNA:gRNA1、gRNA2、gRNA3、gRNA4和gRNA5靶向破坏CD3 γ 后的结果。在CRISPR/Cas系统中使用gRNA4和指导RNA对CD3 ϵ 的破坏导致TCR α/β 的100%KO效率,而使用gRNA5导致TCR α/β 的大于约95%KO效率,并且最终在CRISPR/Cas系统中使用gRNA1、gRNA2和gRNA3指导RNA导致TCR α/β 的不太有利的KO效率。因此,在CRISPR/Cas系统中优选使用gRNA4指导RNA来破坏CD3 γ 。

[0091] 在具有以下实施例4中提供的细节的另一个实验中,评价了同种异体CAR T细胞的不同构建体经10天时间段的扩增。此数据是重要的,因为如果经修饰的免疫细胞不扩增,那么将不会产生足够数量的细胞以用于成功的治疗。测试的不同构建体包括这样的同种异体CAR T细胞,其包含:(1) TRAC敲除(在图3中的同种异体(TRAC KO)) (例如,在本公开文本之前使用的敲除), (2) CD3 δ 敲除(在图3中的同种异体(D1 KO)), (3) CD3 γ 敲除(在图3中的同种异体(G4 KO)),以及(4) CD3 ϵ 敲除(在图3中的同种异体(E4 KO))。细胞群倍增的百分比显示在Y轴上,而天数显示在X轴上。在图3中详细展示的结果显示经9天时间段产生的约4倍倍增或更多的所有经修饰的细胞,从而证明经修饰的细胞产生有用量的可用于免疫疗法的材料。

[0092] 实施例5评价了几种不同的敲除构建体以评价TCR- α/β 链的表面表达。特别地,图4A和图4B示出了比较CRISPR介导的TCR- α 链(TRAC)敲除(例如,在本公开文本之前使用的构建体)、CD3 δ 敲除(D1 KO)、CD3 γ 敲除(G4 KO)和CD3 ϵ 敲除(E4 KO)的下调的流式细胞术结果。图4A示出了CD3 ϵ 敲除(E4 KO)是用于T细胞受体敲除的更好的靶标,如通过TCR- α/β 链的表面表达所测量的。图4B示出了包含CD3 ϵ 敲除(E4 KO)的同种异体CAR T细胞具有更高的转导效率并且在功能上优于包含例如CD3 γ 或CD3 δ 敲除的CAR T细胞;展示了PSMACAR T细胞实施方案。此外,图4B示出了大多数CAR T细胞是同种异体的(CD3和TCR阴性),这意味着施用本发明的CAR T细胞的患者将被输注较高数量的同种异体CAR T细胞。

[0093] 在下面实施例6中详述的另外的实验中,评价了不同PSMACAR T细胞构建体的肿瘤杀伤能力,如图5所示。特别地,图5示出了显示如下同种异体PSMACAR T细胞的肿瘤杀伤能力的图,所述细胞包含TCR- α 链(TRAC)敲除(例如,在本公开文本之前使用的构建体)、CD3 δ 敲除(D1)、CD3 ϵ 敲除(E4)和CD3 γ 敲除(G4)。结果表明,PSMA E4同种异体CAR T细胞具有最佳的杀伤能力。靶细胞是PC3细胞,其是人前列腺癌细胞系。出乎意料地发现E4比D1和G4更有效。当与所评价的其他同种异体CAR T细胞相比时,通过靶向CD3 ϵ 分子制备的同种异体CAR T细胞更有效(例如,更快地杀伤肿瘤细胞)。当与TCR- α 链(TRAC)敲除CAR T细胞、CD3 δ 敲除(D1)CAR T细胞和/或CD3 γ 敲除(G4)CAR T细胞相比时,CD3 ϵ 敲除(E4)CAR T细胞的更高效意味着由这些CAR T细胞靶向的肿瘤细胞将被更快地根除。时间对于我们的同种异体策略在患者中取得成功是至关重要的。

[0094] 实施例7描述了对CRISPR-Cas方法在实现靶基因敲除中的有效性的评价。特别地,图6A-图6D示出了用T7核酸内切酶错配检测测定(T7E1)展示的CRISPR-Cas活性。图6A示出了从使用三种不同gRNA的三种不同CRISPR-Cas C2TA(CIITA)基因的位点扩增的T7E1处理的PCR产物的代表性凝胶电泳图像。图6B-图6D示出了通过T7E1核酸内切酶测定的Agilent Bioanalyzer电泳图生成的电泳图,其显示了CRISPR-Cas编辑效率。

[0095] 此外,图7A-图7D示出了对照和T7E1处理的PCR的Agilent Bioanalyzer电泳图和凝胶电泳,其展示了C2TA(CIITA)CRISPR编辑效率结果。图7A示出了样品C2TA-1-PCR的总体结果,图7B示出了样品C2TA-1-T7E1的总体结果,图7C示出了样品C2TA-2-PCR的总体结果,以及图7D示出了样品C2TA-2-T7E1的总体结果。

[0096] 最后,进行混合淋巴细胞测定(MLA)。图8示出了这样的图,所述图展示了使用单独的同种异体细胞、单独的T细胞(第2供体;来自不同供体的T细胞)、共培养中的同种异体细胞和共培养中的T细胞(第2供体)的混合淋巴细胞反应(MLR)测定的结果。特别地,将接受者的T细胞(来自不同供体的T细胞)与同种异体CAR T细胞共培养14天,并分析T细胞的增殖。结果显示单独或在共培养中的对照T细胞(第2供体)、同种异体PSMACAR T细胞的活力,并显示“接受者的”T细胞对同种异体细胞的存在没有反应(无增殖)。因此,图8显示尽管存在HLA错配,但来自第2(不相关)供体的T细胞不响应于在共培养中的同种异体PSMACAR T细胞而增殖。同种异体CAR T包含PSMACAR T和CRISPR编辑的TRAC/B2M/C2TA gRNA。因此,本发明的同种异体CAR T细胞将具有杀伤肿瘤细胞的机会窗口,同时不被接受者的免疫系统(即T细胞)检测到。

III. 同种异体T细胞

A. 内源性免疫蛋白的下调

[0097] 本公开文本的一方面提供了一种经修饰的免疫细胞,所述经修饰的免疫细胞包含(1)在各自编码内源性免疫蛋白的一个或多个基因座中的插入和/或缺失;(2)编码嵌合抗原受体(CAR)、工程化T细胞受体(TCR)、杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR)、抗原结合多肽、细胞表面受体配体或肿瘤抗原的外源性核酸。因此,对本发明的经修饰的细胞进行基因编辑以破坏本文所述的任何内源基因的表达。在一些实施方案中,对包含本发明的工程化TCR或CAR表达系统的经修饰的细胞进行基因编辑以破坏本文所述的内源基因中的一种或多种的表达。在一些实施方案中,在CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、B2M、CIITA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP和恒定链(I α 链)中的一种或多种被破坏的情况下,产生同种异体T细胞(即通用免疫细胞)。如本文所用,术语“通用免疫细胞”或“通用T细胞”是指预先修饰/预先制造以用于施用于任何患者中的同种异体免疫细胞或T细胞。在一些实施方案中,本发明的经修饰的免疫细胞是具有降低或抑制的同种异体T细胞应答的同种异体T细胞产物。在一些实施方案中,内源性免疫蛋白的一个或多个基因座的下调减少和/或消除GvHD和/或HvHD。

[0098] 在一些实施方案中,当将经修饰的免疫细胞施用于受试者时,与施用于相同受试者的未修饰的免疫细胞所产生的免疫应答相比,免疫细胞在受试者中产生减少的免疫应答。在一些实施方案中,当将经修饰的免疫细胞施用于受试者时,与包含能够下调TRAC、TRBC、B2M和CIITA的基因表达的插入和/或缺失的免疫细胞所产生的免疫应答相比,本公开文本的免疫细胞在受试者中产生减少的免疫应答。在一些实施方案中,免疫应答是移植物

抗宿主病 (GvHD) 或宿主抗移植物病 (HvHD; 移植物排斥) 应答。在一些实施方案中, 针对HLA-I 错配细胞或针对HLA-II 错配细胞引发减少的GvHD应答。在一些实施方案中, 所述GvHD应答减少约10%或更多、约20%或更多、约30%或更多、约40%或更多、约50%或更多、约60%或更多、约70%或更多、约80%或更多、约90%或更多、或约95%或更多。在一些实施方案中, 所述GvHD应答减少约1倍或更多、约2倍或更多、约3倍或更多、约4倍或更多、约5倍或更多、约6倍或更多、约7倍或更多、约8倍或更多、约9倍或更多、约10倍或更多、约20倍或更多、约30倍或更多、约50倍或更多、约100倍或更多、约150倍或更多、或约200倍或更多。在一些实施方案中, 由经修饰的免疫细胞产生的减少的GvHD应答是与在一个或多个基因座中没有缺失和/或插入的等效免疫细胞, 或在TRAC、TCR β 、B2M和CIITA中包含缺失和/或插入的免疫细胞相比。

[0099] 在一些实施方案中, 在一个或多个基因座中的插入和/或缺失能够下调一个或多个内源性免疫蛋白基因座的基因表达。在一些实施方案中, 内源性免疫蛋白是TCR复合物的组分之一。在一些实施方案中, 内源性免疫蛋白是CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 和CD3 ζ 中的一种或多种, 它们以异二聚体形式组织并形成转导通过配体与TCR $\alpha\beta$ 异二聚体结合产生的信号的三个二聚体模块CD3 δ /CD3 ϵ 、CD3 γ /CD3 ϵ 和CD3 ζ /CD3 ζ 。在一些实施方案中, 配体是由TCR $\alpha\beta$ 异二聚体识别的与主要组织相容性复合物I类和II类 (MHC-I; MHC-II) 分子结合的抗原。

[0100] 在一些实施方案中, 内源性免疫蛋白是MHC I类 (MHC-I) 和/或MHC II类 (MHC-II) 分子。在一些实施方案中, 内源性免疫蛋白是B2M (β -2-微球蛋白)、CIITA (II类转录激活因子)、TAP1 (与抗原加工相关的ABC转运蛋白1; 转运蛋白1, ATP结合盒亚家族B成员)、TAP2 (与抗原加工相关的ABC转运蛋白2; 转运蛋白2, ATP结合盒亚家族B成员)、TAPBP (TAP结合蛋白; Tapasin; TAP相关蛋白)、NLRC5 (含NLR家族CARD结构域蛋白5)、HLA-DM、RFX5 (调节因子X5)、RFXANK (含调节因子X相关锚蛋白的蛋白质)、RFXAP (调节因子X相关蛋白) 和恒定链 (Ii链)。

[0101] 与TCR一样, MHC-I和MHC-II通过将抗原呈递给T淋巴细胞而在适应性免疫应答的激活中起重要作用。人具有三个主要的MHC-I基因座 (HLA-A、HLA-B和HLA-C), 它们对于检测和消除病毒、癌细胞和移植的细胞至关重要。此外, 还有三种非经典的MHC-I分子 (HLA-E、HLA-F和HLA-G), 它们具有免疫调节功能。人MHC-II分子也包含三个基因座 (HLA-DP、HLA-DQ和HLA-DR)。MHC I类和II类中的每一种还包含几种调节蛋白。MHC-I调节蛋白包括 β -2-微球蛋白 (B2M)、抗原加工分子 (如TAP1、TAP2、TAPBP) 和转录调节因子 (如NLRC5)。Tap1、Tap2和TAPBP是TAP转运蛋白复合物的部分, 所述复合物是将肽抗原装载到I类HLA复合物上必需的。B2M、NLRC5、Tap1、Tap2和TAPBP中任一者的表达的下调导致MHC I类蛋白的细胞表面表达减少和免疫应答受损。在一些实施方案中, 本公开文本考虑的内源性免疫蛋白是选自B2M、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5及其组合的MHC-I基因。

[0102] MHC-II调节蛋白包括转录调节因子CIITA、RFX5、RFXANK、RFXAP; 以及参与MHC II类肽、恒定链 (Ii链) 和人白细胞抗原DM (HLA-DM; HLA-DMA)、HLA-DOA和HLA-DOB的形成和转运的分子伴侣蛋白。RFX5、RFXANK、RFXAP是三聚体RFX DNA结合复合物的亚基, 所述复合物特异性结合所有MHC II类基因启动子以调节其转录。恒定链 (Ii) 作为MHC II类分子伴侣起作用, 其防止肽在ER中装载, 刺激从ER离开, 并调节抗原肽装载。类似于TAPBP, HLA-DM (例如, HLA-DMA) 协助在细胞内运输过程中MHC-II分子的肽装载。HLA-DM通过指导T细胞对抗原的“免疫显性”区域的应答来消除/防止弱结合肽展示给MHC-II蛋白。在一些实施方案中,

HLA-DM(例如,HLA-DMA)促进在自身蛋白的加工中潜在自身反应性T细胞的消除。在一些实施方案中,本公开文本考虑的内源性免疫蛋白是选自CIITA、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP、恒定链(Ii链)及其组合的MHC-II基因。

[0103] 因此,有效去除HLA屏障以减少HvHD或GvHD可以通过下调以下中的一种或多种来实现:(1)靶向多态性MHC-I基因(HLA-A、-B、-C)和/或MHC-II基因(HLA-DP、-DQ、-DR);(2)靶向调节所有MHC-I分子向细胞表面运输的分子(如B2M)、或MHC-I抗原加工分子(如TAP1、TAP2或TAPBP);(3)靶向调节MHC-II分子运输的分子(如恒定链(Ii;或CD74)或HLA-DM);和/或(4)靶向MHC-I表达的转录调节因子(NLRC5)或靶向MHC-II表达的转录调节因子(CIITA、RFX-5、RFXANK、RFX-AP)。

[0104] 在一些实施方案中,通过插入和/或缺失而下调其基因表达的内源性免疫蛋白选自CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、B2M、CIITA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP、恒定链(Ii链;CD74)或其任何组合。在一些实施方案中,具有选自以下的内源性免疫蛋白的下调的基因表达的经修饰的免疫细胞(即T细胞)在同种异体环境中具有降低的免疫原性:CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、B2M、CIITA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP、恒定链(Ii链;CD74)及其组合。在一些实施方案中,下调CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、B2M、CIITA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP、恒定链(Ii链;CD74)或其任何组合的基因表达去除T细胞上可能引起HvHD和/或GvHD的同种异体抗原的表面呈递和/或防止T细胞受体的膜表达。

[0105] 在一些实施方案中,用于产生同种异体T细胞产物的经修饰的免疫细胞包含三重敲除,其包括下调一个T细胞受体亚基、一个HLA I类分子和一个HLA II类分子。在一些实施方案中,T细胞受体亚基选自CD3 δ 、CD3 ϵ 或CD3 γ ;HLA I类分子选自B2M、TAP1、TAP2、TAPBP或NLRC5;并且HLA II类分子选自HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP或恒定链(Ii链)。在一些实施方案中,同种异体T细胞产物包含多于三种内源性免疫蛋白敲除。在这种实施方案中,T细胞受体亚基选自CD3 δ 、CD3 ϵ 和/或CD3 γ ;HLA I类分子选自B2M、TAP1、TAP2、TAPBP和/或NLRC5;并且HLA II类分子选自HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP和/或恒定链(Ii链)。在一些实施方案中,用于产生同种异体T细胞产物的经修饰的免疫细胞包含一种或多种内源性免疫蛋白敲除,其包括下调至少两种T细胞受体亚基、至少两种HLA I类分子和至少两种HLA II类分子。在一些实施方案中,T细胞受体亚基选自CD3 δ 、CD3 ϵ 和CD3 γ 中的至少两种;HLA I类分子选自B2M、TAP1、TAP2、TAPBP和NLRC5中的至少两种;并且HLA II类分子选自HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP和恒定链(Ii链)中的至少两种。

[0106] 在一些实施方案中,经修饰的免疫细胞包含下调CD3 δ 基因表达和选自以下的HLA分子的基因表达的插入和/或缺失:B2M、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP、恒定链(Ii链)及其组合。在一些实施方案中,经修饰的免疫细胞包含下调CD3 ϵ 基因表达和选自以下的HLA分子的基因表达的插入和/或缺失:B2M、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP、恒定链(Ii链)及其组合。在一些实施方案中,经修饰的免疫细胞包含下调CD3 γ 基因表达和选自以下的HLA分子的基因表达的插入和/或缺失:B2M、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP、恒定链(Ii链)及其组合。

[0107] 在一些实施方案中,当CD3 δ 、CD3 ϵ 和/或CD3 γ 的基因表达下调时,T细胞受体 α 和 β 的表面表达下调至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约

95%、至少约99%、或至少约100%。在一些实施方案中,当与CD3 γ 和/或CD3 δ 的下调相比时,CD3 ϵ 的下调产生更高的T细胞受体敲除效率。在一些实施方案中,由CD3 ϵ 下调诱导的T细胞受体敲除效率高于或等于TRAC的下调。

[0108] 在一些实施方案中,用于产生同种异体T细胞产物的经修饰的免疫细胞包含三重敲除。在一些实施方案中,经修饰的免疫细胞包含减少或消除的以下的基因表达:(1) CD3 ϵ 、B2M和CIITA;(2) CD3 ϵ 、B2M和RFX5;(3) CD3 ϵ 、B2M和RFXAP;(4) CD3 ϵ 、B2M和RFXANK;(5) CD3 ϵ 、B2M和HLA-DM;(6) CD3 ϵ 、B2M和Ii链;(7) CD3 ϵ 、TAP1和CIITA;(8) CD3 ϵ 、TAP1和RFX5;(9) CD3 ϵ 、TAP1和RFXAP;(10) CD3 ϵ 、TAP1和RFXANK;(11) CD3 ϵ 、TAP1和HLA-DM;(12) CD3 ϵ 、TAP1和Ii链;(13) CD3 ϵ 、TAP2和CIITA;(14) CD3 ϵ 、TAP2和RFX5;(15) CD3 ϵ 、TAP2和RFXAP;(16) CD3 ϵ 、TAP2和RFXANK;(17) CD3 ϵ 、TAP2和HLA-DM;(18) CD3 ϵ 、TAP2和Ii链;(19) CD3 ϵ 、NLRC5和CIITA;(20) CD3 ϵ 、NLRC5和RFX5;(21) CD3 ϵ 、NLRC5和RFXAP;(22) CD3 ϵ 、NLRC5和RFXANK;(23) CD3 ϵ 、NLRC5和HLA-DM;(24) CD3 ϵ 、NLRC5和Ii链;(25) CD3 ϵ 、TAPBP和CIITA;(26) CD3 ϵ 、TAPBP和RFX5;(27) CD3 ϵ 、TAPBP和RFXAP;(28) CD3 ϵ 、TAPBP和RFXANK;(29) CD3 ϵ 、TAPBP和HLA-DM;或(30) CD3 ϵ 、TAPBP和Ii链。

[0109] 在一些实施方案中,经修饰的免疫细胞包含减少或消除的以下的基因表达:(1) CD3 δ 、B2M和CIITA;(2) CD3 δ 、B2M和RFX5;(3) CD3 δ 、B2M和RFXAP;(4) CD3 δ 、B2M和RFXANK;(5) CD3 δ 、B2M和HLA-DM;(6) CD3 δ 、B2M和Ii链;(7) CD3 δ 、TAP1和CIITA;(8) CD3 δ 、TAP1和RFX5;(9) CD3 δ 、TAP1和RFXAP;(10) CD3 δ 、TAP1和RFXANK;(11) CD3 δ 、TAP1和HLA-DM;(12) CD3 δ 、TAP1和Ii链;(13) CD3 δ 、TAP2和CIITA;(14) CD3 δ 、TAP2和RFX5;(15) CD3 δ 、TAP2和RFXAP;(16) CD3 δ 、TAP2和RFXANK;(17) CD3 δ 、TAP2和HLA-DM;(18) CD3 δ 、TAP2和Ii链;(19) CD3 δ 、NLRC5和CIITA;(20) CD3 δ 、NLRC5和RFX5;(21) CD3 δ 、NLRC5和RFXAP;(22) CD3 δ 、NLRC5和RFXANK;(23) CD3 δ 、NLRC5和HLA-DM;(24) CD3 δ 、NLRC5和Ii链;(25) CD3 δ 、TAPBP和CIITA;(26) CD3 δ 、TAPBP和RFX5;(27) CD3 δ 、TAPBP和RFXAP;(28) CD3 δ 、TAPBP和RFXANK;(29) CD3 δ 、TAPBP和HLA-DM;或(30) CD3 δ 、TAPBP和Ii链。

[0110] 在一些实施方案中,经修饰的免疫细胞包含减少或消除的以下的基因表达:(1) CD3 γ 、B2M和CIITA;(2) CD3 γ 、B2M和RFX5;(3) CD3 γ 、B2M和RFXAP;(4) CD3 γ 、B2M和RFXANK;(5) CD3 γ 、B2M和HLA-DM;(6) CD3 γ 、B2M和Ii链;(7) CD3 γ 、TAP1和CIITA;(8) CD3 γ 、TAP1和RFX5;(9) CD3 γ 、TAP1和RFXAP;(10) CD3 γ 、TAP1和RFXANK;(11) CD3 γ 、TAP1和HLA-DM;(12) CD3 γ 、TAP1和Ii链;(13) CD3 γ 、TAP2和CIITA;(14) CD3 γ 、TAP2和RFX5;(15) CD3 γ 、TAP2和RFXAP;(16) CD3 γ 、TAP2和RFXANK;(17) CD3 γ 、TAP2和HLA-DM;(18) CD3 γ 、TAP2和Ii链;(19) CD3 γ 、NLRC5和CIITA;(20) CD3 γ 、NLRC5和RFX5;(21) CD3 γ 、NLRC5和RFXAP;(22) CD3 γ 、NLRC5和RFXANK;(23) CD3 γ 、NLRC5和HLA-DM;(24) CD3 γ 、NLRC5和Ii链;(25) CD3 γ 、TAPBP和CIITA;(26) CD3 γ 、TAPBP和RFX5;(27) CD3 γ 、TAPBP和RFXAP;(28) CD3 γ 、TAPBP和RFXANK;(29) CD3 γ 、TAPBP和HLA-DM;或(30) CD3 γ 、TAPBP和Ii链。

[0111] 在一些实施方案中,本公开文本的经修饰的免疫细胞是T细胞、自然杀伤细胞(NK细胞)、自然杀伤T细胞(NKT)、淋巴样祖细胞、造血干细胞、干细胞、巨噬细胞或树突细胞。在一些实施方案中,经修饰的免疫细胞是经修饰的未刺激的免疫细胞或其前体细胞。在一些实施方案中,经修饰的免疫细胞是经修饰的未刺激的T细胞、经修饰的未刺激的NK细胞或经修饰的未刺激的NKT细胞。在一些实施方案中,经修饰的免疫细胞是CD4⁺ T细胞或CD8⁺ T细

胞。在一些实施方案中,经修饰的免疫细胞是同种异体T细胞或自体人T细胞。在一些实施方案中,经修饰的免疫细胞是人细胞或哺乳动物细胞。

B. 经修饰的免疫细胞

[0112] 本公开文本的一方面提供了一种分离的经修饰的T细胞,所述分离的经修饰的T细胞包含选自CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、B2M、C2TA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP和恒定链(Ii链)的至少一种功能受损多肽。如本文所用,术语“功能受损多肽”意指多肽经历突变(例如,包含缺失、插入或是截短变体),使得其不能容易地结合TCR复合物的其他组分或使得其不被掺入TCR复合物中。在一些实施方案中,功能受损多肽导致功能受损TCR或抑制功能性TCR在细胞表面上的表达。在一些实施方案中,受损多肽可以是显著抑制TCR复合物活性的显性负性多肽。包含所述功能受损多肽的经修饰的T细胞是不产生功能性TCR或在细胞表面表达非常少的功能性TCR的TCR缺陷T细胞。在一些实施方案中,受损多肽是TCR信号传导复合物的组分。在一些实施方案中,受损多肽调节功能性TCR的形成。在一些实施方案中,受损多肽包含影响功能性蛋白的功能或表达的突变。在一些实施方案中,突变是缺失、插入、取代或其组合。在一些实施方案中,受损多肽由缺陷基因产物的表达或不存在于所需基因或基因产物的表达引起。

[0113] TCR的适当功能需要构成TCR复合物的蛋白质的适当化学计量比。如图1所示,TCR复合物包含可变TCR α 链(TCR- α , TRAC)和TCR β 链(TCR- β , TRBC),它们与三个二聚体模块CD3 δ /CD3 ϵ 、CD3 γ /CD3 ϵ 和CD3 ζ /CD3 ζ 偶联。这三个二聚体模块是TCR信号传导的组成部分。每个CD3受体都包含信号传导基序,这些基序在TCR- α / β 异二聚体与MHC-肽配体接合后传播并扩大TCR受体激活。配体与TCR $\alpha\beta$ 结合后,CD3亚基发生构象变化并且CD3胞质尾内的信号传导基序(例如,ITAM)通过细胞内蛋白酪氨酸激酶磷酸化。随后,含有SH2结构域的细胞内信号传导和衔接分子被募集到质膜,在那里它们通过与CD3信号传导基序直接相互作用来扩大TCR激活信号。因此,TCR $\alpha\beta$ 异二聚体负责抗原的结合,而CD3亚基充当信号转导元件。因此,如果必需的CD3受体之一缺失或受损,则TCR复合物在功能上失去稳定,或至少TCR的信号传导功能减弱。不希望受理论束缚,TCR复合物的表面表达和/或功能需要所有六种蛋白质的协调表达。

[0114] TCR复合物在细胞表面组装需要TCR复合物的每个组分。TCR复合物的一种组分的损失可以导致细胞表面TCR表达的损失。在一些实施方案中,一种组分的损失可能不会消除TCR复合物的表面表达。在此类实施方案中,虽然一些或甚至所有TCR表达可以保留,但决定TCR受体是否诱导免疫应答的是TCR受体功能。本发明考虑了功能缺陷,而不是在细胞表面不存在完整的TCR复合物。不希望受理论束缚,TCR表达越低,可发生足够的TCR交联以导致经由TCR复合物的T细胞激活的可能性越小。

[0115] 在一些实施方案中,分离的经修饰的T细胞包含两种或更多种功能受损多肽。在这样的实施方案中,一种受损多肽可以是T细胞受体 α 链(TRAC)。在不存在TRAC的情况下,TCR复合物将保留在细胞内并且不会转位至质膜。此外,缺乏TRAC的TCR受体将是不稳定的并且可能被快速降解。在一些实施方案中,经修饰的T细胞包含选自TRAC、TRBC、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、B2M、C2TA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP或恒定(Ii)链的三种或更多种功能受损多肽。在一些实施方案中,经修饰的T细胞包含选自CD3 α 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、B2M、C2TA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP或Ii链的两种功能受

损多肽。在一些实施方案中,经修饰的T细胞包含选自CD3 α 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、B2M、C2TA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP或Ii链的三种功能受损多肽。在一些实施方案中,经修饰的T细胞包含选自CD3 δ 、CD3 ϵ 和CD3 γ 的功能受损多肽,以及选自TRAC、TRBC、B2M、C2TA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP或Ii链的至少一种功能受损多肽。在一些实施方案中,经修饰的T细胞包含选自CD3 δ 、CD3 ϵ 和CD3 γ 的至少一种功能受损多肽,以及选自TRAC、TRBC、B2M、C2TA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP或Ii链的至少一种功能受损多肽。

[0116] 在一些实施方案中,经修饰的T细胞包含(a)功能受损CD3 δ 、CD3 ϵ 和/或CD3 γ 中的至少一种以及(b)选自TRAC、TRBC、B2M、C2TA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP或Ii链的至少一种功能受损多肽。在一些实施方案中,经修饰的T细胞包含选自TRAC、TRBC、B2M、C2TA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP或Ii链的两种或更多种功能受损多肽。

[0117] 在一些实施方案中,功能受损多肽减少蛋白质表达。在此类实施方案中,经修饰的T细胞具有TRAC、TRBC、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、B2M、C2TA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP、Ii链或其任何组合的减少的表达。在一些实施方案中,功能受损多肽不存在经编码的基因表达。在这种实施方案中,经修饰的T细胞不表达CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、TRAC、TRBC、B2M、C2TA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP、Ii链或其任何组合。

[0118] 在一些实施方案中,含有选自以下的多肽的减少的表达和/或缺乏选自以下的多肽的表达的经修饰的T细胞进一步包含选自TRAC、TRBC、B2M和C2TA的功能受损多肽:CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、TRAC、TRBC、B2M、C2TA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP、Ii链。在这种实施方案中,经修饰的T细胞具有TRAC、TRBC、B2M或C2TA的减少的表达和/或不表达TRAC、TRBC、B2M或C2TA。

[0119] 在一些实施方案中,CD3 δ 、CD3 ϵ 和/或CD3 γ 的修饰导致TCR/CD3受体复合物功能受损。在一些实施方案中,使用基因编辑技术产生本发明所考虑的功能受损多肽。在一些实施方案中,基因编辑选自CRISPR相关(Cas)(CRISPR-Cas)核酸内切酶系统、TALEN基因编辑系统、锌指核酸酶(ZFN)基因编辑系统、兆核酸酶基因编辑系统或兆TALEN基因编辑系统、反义RNA、antigomer RNA、RNAi、siRNA和shRNA。在一些实施方案中,通过靶向CD3 δ 、CD3 ϵ 或CD3 γ 的一个或多个外显子,任选地CD3 δ 、CD3 ϵ 或CD3 γ 的外显子1,修饰CD3 δ 、CD3 ϵ 或CD3 γ 。

[0120] 可以使用如本领域已知的或本文所述的已知测定方法来确定T细胞是否表达功能性TCR。在一些实施方案中,可以通过流式细胞术和定量实时PCR(QRT-PCR)评价TCR $\alpha\beta$ 和CD3的表达。可以使用类似于Sentman等人,J. Immunol. 173:6760-6766(2004)中使用的方法,使用ABI7300实时PCR仪器和基因特异性TAQMAN®引物,通过QRT-PCR分析TCR- α 、TCR- β 、CD3 ϵ 、CD3 δ 、CD3 γ 和CD3- ζ mRNA的表达。可以使用对TCR- α 、TCR- β 、CD3 ϵ 、CD8、CD4、CD5和CD45具有特异性的抗体来确定细胞表面表达的变化。为了使用流式细胞术测试TCR/CD3表达,使用针对TCR复合物的特定亚基的荧光染料标记的抗体。在一些实施方案中,将活细胞用例如针对CD5、CD8和CD4的抗体与针对CD3 ϵ 、CD3 δ 、CD3 γ 、TCR α 、TCR β 、TCR γ 或TCR δ 的抗体的组合染色。如果使用CD3或TCR基因的表达,则当与未修饰的T细胞或表达对照载体的T细胞相比时,经修饰的T细胞中TCR蛋白和CD3蛋白二者的表达应严重减少。将同种型对照抗

体用于背景荧光的对照。

[0121] 为了确定经修饰的T细胞中功能受损多肽的表达是否足以改变TCR功能和/或经修饰的T细胞功能,测试经修饰的T细胞的:(1)体外细胞存活期;(2)在丝裂霉素C处理的同种异体PBMC的存在下的增殖;和/或(3)响应于同种异体PBMC、抗CD3 mAb或抗TCR mAb的细胞因子产生。

[0122] 为了测试TCR复合物的功能缺陷,可以确定驱动T细胞扩增的关键效应细胞因子的产生的缺乏。例如,可以使用抗CD3刺激对经修饰的T细胞的作用来确定白细胞介素-2(IL-2)的产生和/或干扰素(IFN) - γ 的产生。

[0123] 在一些实施方案中,与未修饰的T细胞相比,包含功能受损多肽的经修饰的T细胞展现出减少的T细胞受体表达。在一些实施方案中,包含功能受损多肽的经修饰的T细胞展现出减少的受损多肽的表达。在一些实施方案中,包含功能受损多肽的经修饰的T细胞展现出T细胞受体复合物表面表达的完全不存在。在一些实施方案中,包含功能受损多肽的经修饰的T细胞展现出减少或不足的T细胞受体交联。在一些实施方案中,经修饰的T细胞可以在细胞表面上表达一些或所有TCR亚基。在表面上没有功能性TCR的情况下,经修饰的T细胞不能被完全激活。因此,本发明考虑的经修饰的T细胞在被引入宿主中时不会引起不期望的反应。因此,经修饰的T细胞不会引起GvHD或HvHD,因为经修饰的T细胞不能转导来自宿主MHC分子的信号。

[0124] 在一些实施方案中,当将经修饰的T细胞施用于受试者时,与施用于相同受试者的未修饰的T细胞所产生的免疫应答相比,经修饰的T细胞在受试者中产生减少的免疫应答。本发明的经修饰的T细胞可以用于T细胞疗法的所有应用。在一些实施方案中,将经修饰的T细胞用于需要T细胞疗法的任何方法或组合物中。在一些实施方案中,可以将本发明的经修饰的T细胞用于减少或改善或者预防或治疗癌症、GVHD、移植排斥、感染、一种或多种自身免疫性障碍、辐射病或其他疾病或病症。

IV. 基因编辑系统

A. CRISPR

[0125] 在一些实施方案中,本公开文本的经修饰的免疫细胞是经基因编辑的经修饰的免疫细胞。在一些实施方案中,各自编码本公开文本的内源性免疫蛋白的一个或多个基因座中的插入和/或缺失是基因编辑的结果。在某些实施方案中,通过基因编辑系统修饰编码CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、TRAC、B2M、CIITA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP或Ii链的基因。在一些情形下,基因编辑系统包含RNA指导的核酸酶,如规律间隔成簇短回文核酸重复序列(CRISPR)-Cas系统。CRISPR系统(在本文中也称为CRISPR-Cas系统、Cas系统或CRISPR/Cas系统)包含对靶基因具有特异性的Cas核酸内切酶和指导核酸序列,所述指导核酸序列在引入细胞中后形成复合物,所述复合物使Cas核酸内切酶能够在靶基因处引入断裂(例如,双链断裂)。在一些实施方案中,经修饰的免疫细胞是使用CRISPR/Cas9进行编辑以破坏一种或多种内源性免疫蛋白。

[0126] 在一些实施方案中,将CRISPR-Cas系统用于破坏内源性CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、TRAC、B2M、CIITA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP或Ii链中的一种或多种,从而导致CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、TRAC、B2M、CIITA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP或Ii链的基因表达的下调。在一些实施方案中,能够下调一种或多种内源性

免疫蛋白的基因表达的插入和/或缺失下调选自CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、TRAC、B2M、CIITA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP或Ii链的一种或多种内源性蛋白的表达。在一些实施方案中,能够下调基因表达的插入和/或缺失中的每一个包括CRISPR相关系统。在一些实施方案中,CRISPR相关系统是CRISPR相关Cas核酸内切酶和指导RNA。

[0127] 在一些实施方案中,Cas核酸内切酶包括Cas9核酸内切酶。在一些情形下,Cas9核酸内切酶源自或基于例如酿脓链球菌 (*S. pyogenes*) (例如,SpCas9)、嗜热链球菌 (*S. thermophiles*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) (例如,SaCas9)或脑膜炎奈瑟氏菌 (*Neisseria meningitides*)的Cas9分子。在一些情形下,Cas9核酸内切酶源自或基于例如以下的Cas9分子:燕麦食酸菌 (*Acidovorax avenae*)、胸膜肺炎放线杆菌 (*Actinobacillus pleuropneumoniae*)、产琥珀酸放线杆菌 (*Actinobacillus succinogenes*)、猪放线杆菌 (*Actinobacillus suis*)、放线杆菌属物种 (*Actinomyces* sp.)、反硝化嗜环菌 (*Cyclophilus denitrificans*)、氨基单胞菌 (*Aminomonas paucivorans*)、蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)、史密斯芽孢杆菌 (*Bacillus smithii*)、苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*)、类杆菌属物种 (*Bacteroides* sp.)、滨海芽生螺旋菌 (*Blastopirellula marina*)、慢生根瘤菌属物种 (*Bradyrhizobium* sp.)、侧孢短芽孢杆菌 (*Brevibacillus latemsporus*)、大肠弯曲杆菌 (*Campylobacter coli*)、空肠弯曲杆菌 (*Campylobacter jejuni*)、红嘴鸥弯曲杆菌 (*Campylobacter lad*)、*Candidatus Puniceispirillum*、解纤维梭菌 (*Clostridium cellulolyticum*)、产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*)、拥挤棒杆菌 (*Corynebacterium accolens*)、白喉棒状杆菌 (*Corynebacterium diphtheria*)、马氏棒状杆菌 (*Corynebacterium matruchotii*)、*Dinoroseobacter sliibae*、直肠真杆菌 (*Eubacterium rectale*)、细长真杆菌 (*Eubacterium dolichum*)、伽马变形菌 (*gamma proteobacterium*)、固氮葡萄糖乙酸杆菌 (*Gluconacetobacter diazotrophicus*)、副流感嗜血杆菌 (*Haemophilus parainfluenzae*)、痰嗜血杆菌 (*Haemophilus sputorum*)、加拿大幽门螺杆菌 (*Helicobacter canadensis*)、同性恋螺杆菌 (*Helicobacter cinaedi*)、雪貂螺杆菌 (*Helicobacter mustelae*)、营养泥杆菌 (*Ilyobacter polytropus*)、金格杆菌 (*Kingella kingae*)、卷曲乳杆菌 (*Lactobacillus crispatus*)、依氏利斯特菌 (*Listeria ivanovii*)、单核细胞增多性李斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*)、李斯特氏菌科 (*Listeriaceae*) 细菌、甲基孢子菌属物种 (*Methylocystis* sp.)、甲基弯曲菌 (*Methylosinus trichosporium*)、羞怯动弯杆菌 (*Mobiluncus mulieris*)、杆菌状奈瑟菌 (*Neisseria bacilliformis*)、灰色奈瑟球菌 (*Neisseria cinerea*)、金黄奈瑟氏球菌 (*Neisseria flavescens*)、乳糖奈瑟氏球菌 (*Neisseria lactamica*)、奈瑟氏菌属物种 (*Neisseria* sp.)、瓦兹沃氏奈瑟菌 (*Neisseria wadsworthii*)、亚硝化单胞菌属物种 (*Nitrosomonas* sp.)、*Parvibaculum lavamentivorans*、多杀性巴氏杆菌 (*Pasteurella multocida*)、琥珀酸嗜酸杆菌 (*Phascolarctobacterium succinatutens*)、梅毒雷氏菌 (*Ralstonia syzygii*)、沼泽红假单胞菌 (*Rhodopseudomonas palustris*)、小红卵菌属物种 (*Rhodovulum* sp.)、米氏西蒙斯氏菌 (*Simonsiella muelleri*)、鞘氨醇单胞菌属物种 (*Sphingomonas* sp.)、葡萄芽孢杆菌 (*Sporolactobacillus vineae*)、表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus lugdunensis*)、链球菌属物种 (*Streptococcus* sp.)、*Subdoligranulum* sp.、运动替斯崔纳

菌 (*Tisliella mobilis*)、密螺旋体属物种 (*Treponema sp.*)、或艾森氏蠕形杆菌 (*Verminephrobacter eiseniae*)。

[0128] 在一些实施方案中,Cas9核酸内切酶源自以下的Cas9分子:酿脓链球菌(例如,菌株SF370、MGAS10270、MGAS10750、MGAS2096、MGAS315、MGAS5005、MGAS6180、MGAS9429、NZ131和SSI-1)、嗜热链球菌(例如,菌株LMD-9)、假猪链球菌 (*S. pseudoporcinus*) (例如,菌株SPIN 20026)、变形链球菌 (*S. mutans*) (例如,菌株UA 159, NN2025)、猕猴链球菌 (*S. macacae*) (例如,菌株NCTC1 1558)、解没食子酸链球菌 (*S. gallolyticus*) (例如,菌株UCN34, ATCC BAA-2069)、马链球菌 (*S. equines*) (例如,菌株ATCC 9812, MGCS124)、停乳链球菌 (*S. dysdalactiae*) (例如,菌株GGS124)、牛链球菌 (*S. bovis*) (例如,菌株ATCC 700338)、*S. cmginosus* (例如;菌株F021 1)、无乳链球菌 (*S. agalactia*) (例如,菌株NEM316, A909)、单核细胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*) (例如,菌株F6854)、英诺克李斯特菌 (*Listeria innocua*) (*L. innocua*), 例如菌株Clip 11262)、意大利肠球菌 (*Enterococcus italicus*) (例如,菌株DSM 15952)或屎肠球菌 (*Enterococcus faecium*) (例如,菌株1,23,408)。

[0129] 在一些情形下,核酸内切酶包括Cas3、Cas4、Cas8a、Cas8b、Cas9、Cas10、Cas10d、Cas12a、Cas12b、Cas12d、Cas12e、Cas12f、Cas12g、Cas12h、Cas12i、Cas13、Cas14、CasX、Cse1、Csy1、Csn2、Cpf1、C2c1、Csm2、Cmr5、Fok1、酿脓链球菌Cas9、金黄色葡萄球菌Cas9、MAD7核酸酶(V型CRISPR核酸酶)或其任何组合。

B. 指导RNA

[0130] 在一些实施方案中,指导核酸是指导Cas-RNA复合物至靶序列的指导RNA(gRNA)分子。在一些情形下,指导是通过使一部分gRNA与DNA杂交(例如,通过gRNA靶向结构域),并且通过使一部分gRNA分子(例如,至少通过gRNA tracr)与RNA指导的核酸酶或其他效应分子结合完成的。在一些实施方案中,gRNA分子由单个连续多核苷酸分子组成,在本文中称为“单指导RNA”(“sgRNA”)。在其他实施方案中,gRNA分子由多个(通常为两个)多核苷酸分子组成,所述多核苷酸分子本身能够缔合(通常通过杂交),在本文中称为“双指导RNA”(“dgRNA”)。

[0131] 在一些情况下,gRNA分子包含crRNA和tracr,其可以任选地在单个多核苷酸上或在单独的多核苷酸上。在一些情形下,crRNA包含靶向结构域和与tracr相互作用以形成旗杆区域的区域。tracr包含与核酸酶或其他效应分子结合的gRNA分子的部分。在一些实施方案中,tracr包含与Cas核酸内切酶(例如,Cas9)特异性结合的核酸序列。在一些实施方案中,tracr包含形成旗杆的一部分的核酸序列。在一些实施方案中,靶向结构域是gRNA分子的识别靶DNA内的原型间隔子序列(例如与其互补)的部分。

[0132] 原型间隔子邻近基序(PAM)是位于原型间隔子3'末端附近并被Cas核酸内切酶识别的2-6个碱基对DNA序列。在一些情形下,每个Cas核酸内切酶识别特定的PAM序列。示例性PAM序列包括由酿脓链球菌Cas9核酸内切酶识别的NGG序列;或由嗜热链球菌Cas9核酸内切酶识别的NGGNG或NNAGAAW序列,其中N是任何核苷酸。本领域技术人员将理解如何基于与Cas核酸内切酶将识别的PAM序列一起使用的特定的Cas核酸内切酶来设计gRNA分子。

[0133] 在一些实施方案中,指导RNA包含与内源性免疫蛋白基因座的靶序列足够互补的指导序列,所述内源性免疫蛋白基因座选自CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、B2M、CIITA、TAP1、TAP2、

TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP和恒定链 (Ii链)。在一些实施方案中,指导RNA包含与所述一个或多个基因座内的序列互补的指导序列,所述一个或多个基因座各自编码选自CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、B2M、CIITA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP和恒定链 (Ii链)的免疫蛋白。在一些实施方案中,指导RNA与CD3 δ 、CD3 ϵ 或CD3 γ 的一个或多个外显子内的序列互补。在一些实施方案中,指导RNA与CD3 δ 、CD3 ϵ 或CD3 γ 的外显子1内的序列互补。在一些实施方案中,CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、B2M、CIITA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP或恒定链 (Ii链)的gRNA核酸序列具有表4中公开的核酸序列。

[0134] 在一些实施方案中,指导RNA包含与CD3 δ 基因座内的序列互补的指导序列,并且指导RNA包含SEQ ID NO:53所示的核酸序列。在一些实施方案中,指导RNA包含与CD3 ϵ 基因座内的序列互补的指导序列,并且指导RNA包含SEQ ID NO:52所示的核酸序列。在一些实施方案中,指导RNA包含与CD3 γ 基因座内的序列互补的指导序列,并且指导RNA包含SEQ ID NO:54所示的核酸序列。在一些实施方案中,指导RNA包含与B2M基因座内的序列互补的指导序列,并且指导RNA包含SEQ ID NO:55所示的核酸序列。在一些实施方案中,指导RNA包含与CIITA (C2TA)基因座内的序列互补的指导序列,并且指导RNA包含SEQ ID NO:61所示的核酸序列。在一些实施方案中,指导RNA包含与TAP1基因座内的序列互补的指导序列,并且指导RNA包含SEQ ID NO:56所示的核酸序列。在一些实施方案中,指导RNA包含与TAP2基因座内的序列互补的指导序列,并且指导RNA包含SEQ ID NO:57所示的核酸序列。在一些实施方案中,指导RNA包含与TAPBP基因座内的序列互补的指导序列,并且指导RNA包含SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:59或其任何组合所示的核酸序列。在一些实施方案中,指导RNA包含与NLRC5基因座内的序列互补的指导序列,并且指导RNA包含SEQ ID NO:60所示的核酸序列。在一些实施方案中,指导RNA包含与HLA-DM基因座内的序列互补的指导序列,并且指导RNA包含SEQ ID NO:62所示的核酸序列。在一些实施方案中,指导RNA包含与RFX5基因座内的序列互补的指导序列,并且指导RNA包含SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:64或其组合所示的核酸序列。在一些实施方案中,指导RNA包含与RFXANK基因座内的序列互补的指导序列,并且指导RNA包含SEQ ID NO:65所示的核酸序列。在一些实施方案中,指导RNA包含与RFXAP基因座内的序列互补的指导序列,并且指导RNA包含SEQ ID NO:66所示的核酸序列。在一些实施方案中,指导RNA包含与Ii链基因座内的序列互补的指导序列,并且指导RNA包含SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:68或其任何组合所示的核酸序列。

[0135] 在一些实施方案中,将一种或多种、两种或更多种、三种或更多种、或者四种或更多种指导核酸(例如,指导RNA分子)与Cas核酸内切酶一起转染到免疫细胞中。在一些情况下,将大约一种、两种或三种指导核酸(例如,指导RNA分子)与Cas核酸内切酶一起转染到免疫细胞中。在一些情况下,将大约三种指导核酸(例如,指导RNA分子)与Cas核酸内切酶一起转染到免疫细胞中。在一些情况下,将大约两种指导核酸(例如,指导RNA分子)与Cas核酸内切酶一起转染到免疫细胞中。在一些情况下,将大约一种指导核酸(例如,指导RNA分子)与Cas核酸内切酶一起转染到免疫细胞中。

[0136] 在一些实施方案中,载体驱动CRISPR系统的表达。本领域充满了可用于本发明的合适载体。待使用的载体适于在真核细胞中复制和任选地整合。典型的载体含有转录和翻译终止子、起始序列和可用于调节所希望的核酸序列的表达的启动子。本发明的载体也可以用于核酸标准基因递送方案。用于基因递送的方法是本领域已知的。此外,载体可以以病

毒载体的形式提供给细胞。病毒载体技术是本领域中是熟知的,并且描述于例如Sambrook等人,第4版,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,New York,2012;和其他病毒学和分子生物学手册中。可用作载体的病毒包括但不限于逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒、辛德比斯病毒、 γ 逆转录病毒和慢病毒。不希望受理论束缚,合适的载体含有在至少一种生物体中有功能的复制起点、启动子序列、方便的限制性核酸内切酶位点和一个或多个选择性标记物。在一些实施方案中,CRISPR/Cas系统包含表达载体。在一些实施方案中,CRISPR/Cas系统包括pAd5/F35-CRISPR载体。

C. TALEN

[0137] 在一些实施方案中,所述基因编辑系统是TALEN基因编辑系统。TALEN是通过将TAL效应子DNA结合结构域与DNA切割结构域融合而人工产生的。转录激活因子样效应子(TALE)可以被工程化为与靶DNA结合。通过将工程化TALE与DNA切割结构域组合,可以产生对任何靶DNA序列具有特异性的限制酶。

[0138] TALE是黄单胞菌属细菌分泌的蛋白质。DNA结合结构域含有重复的、高度保守的33-34个氨基酸序列,其中第12和第13个氨基酸除外。这两个位置是高度可变的,显示出与特异性核苷酸识别的强相关性,因此可以被工程化为与靶DNA序列结合。

[0139] 为了产生TALEN,将TALE蛋白与核酸酶(N)融合,所述核酸酶包括例如野生型或突变的Fok1核酸内切酶。Fok1结构域作为二聚体起作用,需要两个具有独特DNA结合结构域的构建体,以使靶基因组中的位点具有合适的取向和间距。特异性和脱靶效应可以通过改变TALE DNA结合结构域与Fok1切割结构域之间的氨基酸残基数量以及两个单独的TALEN结合位点之间的碱基数量来调节。

D. 锌指核酸酶

[0140] 在一些实施方案中,所述基因编辑系统是锌指核酸酶(ZFN)基因编辑系统。锌指核酸酶是一种人工核酸酶,其可用于修饰靶核酸序列的一个或多个核酸位点。与TALEN编辑系统类似,ZFN包含与DNA结合结构域融合的Fok1核酸酶结构域(或其衍生物)。在ZFN的情况下,DNA结合结构域包含一个或多个锌指。锌指是由一个或多个锌离子稳定的小蛋白质结构基序。锌指可以包括例如Cys2His2,并且可以识别大约3bp的序列。可以将各种已知特异性的锌指组合以产生识别约6、9、12、15或18bp序列的多指多肽。

[0141] ZFN识别非回文DNA位点。为了切割靶位点,将一对ZFN二聚化并且组装到靶位点的相对链上。各种选择和模块化组装技术可用于产生识别特定序列(包括噬菌体展示、酵母单杂交系统、细菌单杂交和双杂交系统以及哺乳动物细胞)的锌指(及其组合)。

E. 兆核酸酶

[0142] 在一些实施方案中,基因编辑系统是兆核酸酶基因编辑系统。兆核酸酶是一种人工核酸酶,其识别15-40个碱基对的切割位点。在一些情形下,兆核酸酶根据其影响核酸酶活性和/或DNA识别的结构基序而分为几个家族。LAGLIDADG家族的成员的特征在于具有保守LAGLIDADG基序的一个或两个拷贝。在一些情形下,具有LAGLIDADG基序的单个拷贝的LAGLIDADG兆核酸酶形成同二聚体,而具有LAGLIDADG基序的两个拷贝的成员被发现为单体。GIY-YIG家族成员具有GP-YIG模块,该模块的长度为70-100个残基并且包括具有四个不变残基的四个或五个保守序列基序,其中两个是活性所必需的。His-Cys盒兆核酸酶的特征

在于在包含数百个氨基酸残基的区域内一系列高度保守的组氨酸和半胱氨酸。NHN家族的成员由含有两对被天冬酰胺残基包围的保守组氨酸的基序定义。用于工程化具有改变的DNA结合特异性(例如,结合预先确定的核酸序列)的兆核酸酶的策略是本领域已知的。

[0143] 在一些情形下,兆核酸酶是称为megaTAL的杂合核酸酶,其包含与兆核酸酶的N末端融合的TALE结构域。在一些情况下,兆核酸酶是LAGLIDADG家族的成员。

[0144] 在一些实施方案中,基因编辑系统是基因沉默系统。示例性基因沉默系统包括RNAi、siRNA或shRNA介导的基因沉默系统。

V. 外源性核酸

[0145] 本发明提供了经修饰的免疫细胞或其前体细胞,这些细胞包含在编码内源性免疫蛋白的一个或多个基因座中的能够下调内源性免疫蛋白的基因表达的插入和/或缺失和外源性核酸。在一些实施方案中,外源性核酸编码嵌合抗原受体(CAR)、工程化T细胞受体(TCR)、杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR)、抗原结合多肽、细胞表面受体配体或肿瘤抗原。在一些实施方案中,本文公开了表达外源性多肽的经修饰的免疫细胞。在一些情形下,外源性核酸编码嵌合抗原受体(CAR)。在一些情形下,外源性核酸编码抗原结合多肽。在一些情形下,外源性核酸编码杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR)。在另外的情形下,外源性核酸编码细胞表面受体配体或肿瘤抗原。

A. 嵌合抗原受体

[0146] 本发明还包括具有如本文所述的下调的基因表达和嵌合抗原受体(CAR)的经修饰的T细胞。在一些实施方案中,本发明涵盖包含CAR或编码CAR的核酸的经修饰的T细胞,其中CAR包含抗原结合结构域、铰链结构域、跨膜结构域、共刺激结构域和细胞内信号传导结构域。任何包含含有本文所述的任何抗原结合结构域、任何铰链、任何跨膜结构域、任何共刺激结构域和任何细胞内信号传导结构域的CAR的经修饰的细胞是可设想的,并且可以由本领域技术人员根据本文的公开内容容易地理解和制备。

[0147] 抗原结合结构域可以与CAR的另一个结构域(如跨膜结构域或细胞内结构域,这两者均在本文描述)可操作地连接以用于在免疫细胞中表达。在一个实施方案中,编码抗原结合结构域的第一核酸序列与编码跨膜结构域的第二核酸可操作地连接,并且进一步与编码细胞内结构域第三核酸序列可操作地连接。

[0148] 本文所述的抗原结合结构域可以与本文所述的任何跨膜结构域、本文所述的任何细胞内结构域或胞质结构域、或本文所述的可以包含在本发明的CAR中的任何其他结构域组合。本发明的主题CAR还可以包含如本文所述的间隔子结构域。在一些实施方案中,抗原结合结构域、跨膜结构域和细胞内结构域中的每一个均通过接头隔开。

1. 抗原结合结构域

[0149] CAR的抗原结合结构域是CAR的细胞外区域以用于结合特定的靶抗原,包括蛋白质、碳水化合物和糖脂。在一些实施方案中,CAR包括对靶细胞(例如,癌细胞)上的靶抗原(例如,肿瘤相关抗原)的亲和力。靶抗原可以包括与靶细胞缔合的任何类型的蛋白质或其表位。例如,CAR可以包括对靶细胞上的靶抗原的亲和力,所述靶抗原指示靶细胞的特定状态。

[0150] 如本文所述,本公开文本的对靶细胞上的特异性靶抗原具有亲和力的CAR可以包含靶特异性结合结构域。在一些实施方案中,靶特异性结合结构域是鼠靶特异性结合结构

域,例如,靶特异性结合结构域是鼠来源的。在一些实施方案中,靶特异性结合结构域是人靶特异性结合结构域,例如,靶特异性结合结构域是人来源的。

[0151] 抗原结合结构域可以包括与抗原结合的任何结构域,并且可以包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、合成抗体、人抗体、人源化抗体、非人抗体及其任何片段。因此,在一个实施方案中,抗原结合结构域部分包括哺乳动物抗体或其片段。在一些实施方案中,抗原结合结构域包括全长抗体。在一些实施方案中,抗原结合结构域包括抗原结合片段(Fab),例如Fab、Fab'、F(ab')₂、单特异性Fab₂、双特异性Fab₂、三特异性Fab₂、单链可变片段(scFv)、dAb、串联scFv、VhH、V-NAR、骆驼抗体(camelid)、双抗体、微型抗体、三抗体或四抗体。

[0152] 在一些实施方案中,本公开文本的CAR可以对一个或多个靶细胞上的一种或多种靶抗原具有亲和力。在一些实施方案中,CAR可以对单个靶细胞上的一种或多种靶抗原具有亲和力。在这此类实施方案中,CAR是双特异性CAR或多特异性CAR。在一些实施方案中,CAR包含赋予对一种或多种靶抗原的亲和力的一个或多个靶特异性结合结构域。在一些实施方案中,CAR包含赋予对相同靶抗原的亲和力的一个或多个靶特异性结合结构域。例如,包含对相同靶抗原具有亲和力的一个或多个靶特异性结合结构域的CAR可以结合靶抗原的不同表位。当CAR中存在多个靶特异性结合结构域时,所述结合结构域可以串联排列并且可以通过接头肽隔开。例如,在包含两个靶特异性结合结构域的CAR中,所述结合结构域通过多肽接头、Fc铰链区或膜铰链区在单条多肽链上彼此共价连接。

[0153] 如本文所用,术语“单链可变片段”或“scFv”是免疫球蛋白(例如,小鼠或人)的共价连接以形成VH:VL异二聚体的重链(VH)和轻链(VL)的可变区的融合蛋白。重链(VH)和轻链(VL)直接连接或通过肽编码接头或间隔子连接,该肽编码接头或间隔子将VH的N末端与VL的C末端连接,或将VH的C末端与VL的N末端连接。术语“接头”和“间隔子”在本文中可互换使用。在一些实施方案中,抗原结合结构域(例如,Tn-MUC1结合结构域、PSMA结合结构域或间皮素结合结构域)包含具有从N末端到C末端为VH-接头-VL构型的scFv。在一些实施方案中,抗原结合结构域(例如,Tn-MUC1结合结构域、PSMA结合结构域或间皮素结合结构域)包含具有从N末端到C末端为VL-接头-VH构型的scFv。本领域技术人员将能够选择用于本发明的适当构型。

[0154] 接头通常富含甘氨酸以具有柔性,以及富含丝氨酸或苏氨酸以具有溶解性。接头可以连接细胞外抗原结合结构域的重链可变区和轻链可变区。接头的非限制性例子披露于Shen等人,Anal.Chem.80(6):1910-1917(2008)和WO 2014/087010。各种接头序列是本领域已知的,包括而不仅限于甘氨酸丝氨酸(GS)接头,如(GS)_n、(GSGGS)_n(SEQ ID NO:47)、(GGGS)_n(SEQ ID NO:48)和(GGGGS)_n(SEQ ID NO:49),其中n表示至少1的整数。示例性接头序列可以包含氨基酸序列,包括而不仅限于GGSG(SEQ ID NO:29)、GSGGG(SEQ ID NO:30)、GSGSG(SEQ ID NO:31)、GSGGG(SEQ ID NO:32)、GGGSG(SEQ ID NO:33)、GSSSG(SEQ ID NO:34)、GGGGS(SEQ ID NO:49)或GGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:50)等。本领域技术人员将能够选择用于本发明的合适的接头序列。在一个实施方案中,本发明的抗原结合结构域(例如,Tn-MUC1结合结构域、PSMA结合结构域或间皮素结合结构域)包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中VH和VL通过具有氨基酸序列GGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:50)的接头序列隔开。在一些实施方案中,接头核酸序列包含核苷酸序列GGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTCGGGTGGCGCGGATCT(SEQ ID NO:51)。

[0155] 尽管去除了恒定区并引入了接头,但scFv蛋白仍保留了原始免疫球蛋白的特异性。单链Fv多肽抗体可以由包含VH和VL编码序列的核酸表达,如Huston等人, Proc.Nat.Acad.Sci.USA 85:5879-5883(1988)所描述。已经描述了具有抑制活性的拮抗scFv。参见例如,Zhao等人,Hybridoma(Larchmt),27(6):455-51(2008)。已经描述了具有刺激活性的激动scFv。参见例如,Peter等人,J.Biol.Chem.,25278(38):36740-7(2003)。

[0156] 如本文所用,“Fab”是指与抗原结合但为单价且不具有Fc部分的抗体结构的片段,例如,由木瓜蛋白酶消化的抗体产生两个Fab片段和一个Fc片段(例如,重(H)链恒定区;不与抗原结合的Fc区)。

[0157] 在一些情形下,抗原结合结构域可以源自最终将使用CAR的相同物种。例如,为了在人类中使用,CAR的抗原结合结构域可以包含如本文其他地方所述的人抗体或其片段。

[0158] 因此,例如通过本文所述的方法获得的免疫细胞可以被工程化以表达靶向以下癌症相关抗原(肿瘤抗原)中的一种的CAR:CD19;CD20;CD22(唾液酸凝集素2);CD37;CD 123;CD22;CD30;CD 171;CS-1(也称为CD2子集1,CRACC,SLAMF7,CD319和19A24);C型凝集素样分子-1(CLL-1或CLECL1);CD33;CD133;表皮生长因子受体(EGFR);表皮生长因子受体变体III(EGFRvIII);人表皮生长因子受体(HER1);神经节苷脂G2(GD2);神经节苷脂GD3(aNeu5Ac(2-8)aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-4)bDGlcp(1-1)Cer);TNF受体家族成员B细胞成熟抗原(BCMA);Tn抗原((Tn Ag)或(GalNAcα-Ser/Thr));前列腺特异性膜抗原(PSMA);受体酪氨酸激酶样孤儿受体1(ROR1);Fms样酪氨酸激酶3(FLT3);肿瘤相关糖蛋白72(TAG72);CD38;CD44v6;癌胚抗原(CEA);上皮细胞粘附分子(EPCAM);B7H3(CD276);KIT(CD117);白细胞介素-13受体亚基α-2(IL-13Ra2或CD213A2);间皮素;白细胞介素11受体α(IL-11Ra);前列腺干细胞抗原(PSCA);蛋白酶丝氨酸21(睾蛋白(Testisin)或PRSS21);血管内皮生长因子受体2(VEGFR2);Lewis(Y)抗原;CD24;血小板源性生长因子受体β(PDGFR-β);阶段特异性胚胎抗原-4(SSEA-4);叶酸受体α;受体酪氨酸蛋白激酶ERBB2(Her2/neu);粘蛋白1,细胞表面相关(MUC 1);GalNAcα1-0-Ser/Thr(Tn)MUC 1(TnMUC1);神经细胞粘附分子(NCAM);前列腺酶;前列腺酸性磷酸酶(PAP);突变的延伸因子2(ELF2M);肝配蛋白B2;成纤维细胞激活蛋白α(FAP);胰岛素样生长因子1受体(IGF-I受体)、碳酸酐酶IX(CAIX);蛋白酶体(前体,巨蛋白因子)亚基,β型,9(LMP2);糖蛋白100(gp100);由断点簇区(BCR)组成的癌基因融合蛋白和艾贝尔森鼠白血病毒致癌基因同系物1(Ab1)(bcr-ab1);酪氨酸酶;肝配蛋白A型受体2(EphA2);岩藻糖基GM1;唾液酸Lewis粘附分子(sLe);神经节苷脂GM3(aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-4)bDGlcp(1-1)Cer);转谷氨酰胺酶5(TGS5);高分子量黑色素瘤相关抗原(HMWMAA);o-乙酰基-GD2神经节苷脂(OAcGD2);叶酸受体β;肿瘤内皮标记物1(TEM1/CD248);相关的肿瘤内皮标记物7(TEM7R);紧密连接蛋白6(CLDN6);甲状腺刺激激素受体(TSHR);G蛋白偶联受体C类5组,D成员(GPRC5D);染色体X开放阅读框61(CXORF61);CD97;CD179a;间变性淋巴瘤激酶(ALK);多唾液酸;胎盘特异性蛋白1(PLAC1);globoH糖神经酰胺的己糖部分(GloboH);乳腺分化抗原(NY-BR-1);尿溶蛋白(uroplakin)2(UPK2);酪氨酸蛋白激酶Met(c-Met);甲型肝炎病毒细胞受体1(HAVCR1);肾上腺素受体β3(ADRB3);泛连接蛋白3(PANX3);G蛋白偶联受体20(GPR20);淋巴细胞抗原6复合物,基因座K 9(LY6K);嗅觉受体51E2(OR51E2);TCR γ 交替读码框蛋白(TARP);肾母细胞瘤蛋白(WT1);癌症/睾丸抗原1(NY-ESO-1);癌症/睾丸抗原2(LAGE-1a);黑色素瘤相关抗原1(MAGE-A1);位于12p染色体上的ETS易位变体基因6

(ETV6-AML);精子蛋白17(SPA17);X抗原家族成员1A(XAGE1);结合血管生成素的细胞表面受体2(Tie 2);黑色素瘤癌症睾丸抗原-1(MAD-CT-1);黑色素瘤癌症睾丸抗原-2(MAD-CT-2);Fos相关抗原1;肿瘤抗原p53(p53);p53突变体;prostelin;存活素(surviving);端粒末端转移酶;前列腺癌肿瘤抗原-1(PCTA-1或半乳糖凝集素8),被T细胞识别的黑素瘤抗原1(MelanA或MART1);大鼠肉瘤(Ras)突变体;人端粒末端转移酶逆转录酶(hTERT);肉瘤易位断点;细胞凋亡的黑素瘤抑制剂(ML-IAP);ERG(跨膜蛋白酶,丝氨酸2(TMPS2)ETS融合基因);N-乙酰基葡萄糖胺基-转移酶V(NA17);成对的盒蛋白Pax-3(PAX3);雄激素受体;细胞周期蛋白B 1;v-myc禽髓细胞瘤病毒癌基因神经母细胞瘤衍生的同系物(MYCN);Ras同系物家族成员C(RhoC);酪氨酸酶相关蛋白2(TRP-2);细胞色素P450 1B 1(CYP1B 1);CCCTC-结合因子(锌指蛋白)样蛋白(BORIS或印迹位点的调节剂的同系物)、被T细胞识别的鳞状细胞癌抗原3(SART3);成对的盒蛋白Pax-5(PAX5);顶体蛋白原结合蛋白sp32(OY-TES 1);淋巴细胞特异性的蛋白酪氨酸激酶(LCK);A激酶锚蛋白4(AKAP-4);滑膜肉瘤X断点2(SSX2);高级糖化终产物的受体(RAGE-1);肾遍在蛋白1(RU1);肾遍在蛋白2(RU2);豆荚蛋白;人乳头瘤病毒E6(HPV E6);人乳头瘤病毒E7(HPV E7);肠羧基酯酶;突变的热激蛋白70-2(mut hsp70-2);CD79a;CD79b;CD72;白细胞相关的免疫球蛋白样受体1(LAIR1);IgA受体的Fc片段(FCAR或CD89);白细胞免疫球蛋白样受体亚家族A成员2(LILRA2);CD300分子样家族成员f(CD300LF);C型凝集素结构域家族12成员A(CLEC12A);骨髓间质细胞抗原2(BST2);含有EGF样模块的粘蛋白样激素受体样2(EMR2);淋巴细胞抗原75(LY75);磷脂酰肌醇蛋白聚糖-2(GPC2);磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3(GPC3);NKG2D;KRAS;GDNF家族受体 α -4(GFR α 4);IL13Ra2;Fc受体样蛋白5(FCRL5);和免疫球蛋白 λ 样多肽1(IGLL1)。

[0159] 在一些实施方案中,将免疫细胞工程化以表达靶向CD19、CD20、CD22、BCMA、CD37、间皮素、PSMA、PSCA、Tn-MUC1、EGFR、EGFRvIII、c-Met、HER1、HER2、CD33、CD133、GD2、GPC2、GPC3、NKG2D、KRAS或WT1的CAR。

2. 跨膜结构域

[0160] 关于跨膜结构域,可以将CAR设计成包含将CAR的抗原结合结构域与细胞内结构域连接的跨膜结构域。主题CAR的跨膜结构域是能够跨越细胞(例如,免疫细胞或其前体)的质膜的区域。跨膜结构域用于插入细胞膜,例如真核细胞膜。在一些实施方案中,跨膜结构域介于CAR的抗原结合结构域与细胞内结构域之间。

[0161] 在一个实施方案中,跨膜结构域天然地与所述CAR中的一个或多个结构域缔合。在一些情形下,可以通过氨基酸取代选择或修饰所述跨膜结构域以避免此类结构域与相同或不同表面膜蛋白的跨膜结构域结合,以最小化与所述受体复合物的其他成员的相互作用。

[0162] 在一些实施方案中,跨膜结构域可以源自天然来源或源自合成来源。在来源是天然的情况下,结构域可以源自任何膜结合蛋白或跨膜蛋白,例如I型跨膜蛋白。在来源是合成的情况下,跨膜结构域可以是任何促进所述CAR插入到细胞膜中的人工序列,例如人工疏水性序列。在一些实施方案中,在本发明中特别使用的跨膜结构域包括而限于源自以下的跨膜结构域:T细胞受体的 α 、 β 或 ζ 链、CD28、CD2、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CD7、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134(OX-40)、CD137(4-1BB)、CD154(CD40L)、CD278(ICOS)、CD357(GITR)、Toll样受体1(TLR1)、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9和杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR)。在一些实施方案中,跨膜结构域至少包括选自以下的

蛋白质的跨膜区：T细胞受体的 α 、 β 或 ζ 链、CD28、CD2、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CD7、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134 (OX-40)、CD137 (4-1BB)、CD154 (CD40L)、CD278 (ICOS)、CD357 (GITR)、To11样受体1 (TLR1)、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9和杀伤细胞免疫球蛋白样受体 (KIR)。在一些实施方案中，跨膜结构域可以是合成的。在一些实施方案中，合成的跨膜结构域主要包含疏水残基，如亮氨酸和缬氨酸。在某些示例性实施方案中，在合成跨膜结构域的每个末端会发现苯丙氨酸、色氨酸和缬氨酸的三联体。

[0163] 本文所述的跨膜结构域可以与本文所述的任何抗原结合结构域、本文所述的任何共刺激信号传导结构域、本文所述的任何细胞内信号传导结构域或本文所述的可以包含在受试者CAR中的任何其他结构域组合。

[0164] 在一个实施方案中，跨膜结构域包括CD8 α 跨膜结构域。在一些实施方案中，跨膜结构域包括包含SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列的CD8 α 跨膜结构域。在一些实施方案中，跨膜结构域包含SEQ ID NO:24所示的核苷酸序列。

[0165] 在一些实施方案中，跨膜结构域包括CD28跨膜结构域。在一些实施方案中，CAR包括包含SEQ ID NO:27所示的氨基酸序列的CD28跨膜结构域。在一些实施方案中，CD28跨膜结构域包含SEQ ID NO:28所示的核苷酸序列。

[0166] 跨膜结构域和/或铰链结构域的可容许的变化对于本领域技术人员来将是已知的，同时保留其预期功能。在一些实施方案中，跨膜结构域包含与SEQ ID NO:23和/或27所示的任何氨基酸序列具有至少约80%、至少约81%、至少约82%、至少约83%、至少约84%、至少约85%、至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中，跨膜结构域由包含如下核苷酸序列的核酸序列编码，所述核苷酸序列与SEQ ID NO:24和/或28所示的任何核苷酸序列具有至少约80%、至少约81%、至少约82%、至少约83%、至少约84%、至少约85%、至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%序列同一性。跨膜结构域可以与任何铰链结构域组合和/或可以包含一个或多个本文所述的跨膜结构域。

[0167] 在一些实施方案中，CAR包含：任何抗原结合结构域；选自T细胞受体的 α 、 β 或 ζ 链、CD28、CD2、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CD7、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134 (OX-40)、CD137 (4-1BB)、CD154 (CD40L)、CD278 (ICOS)、CD357 (GITR)、To11样受体1 (TLR1)、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9和杀伤细胞免疫球蛋白样受体 (KIR)的跨膜结构域的跨膜结构域；任何共刺激信号传导结构域；和本文所述的任何细胞内结构域或胞质结构域；或可以包含在CAR中的本文所述的任何其他结构域；以及任选地铰链结构域。

[0168] 在一些实施方案中，CAR在CAR的细胞外结构域与跨膜结构域之间或在CAR的细胞内结构域与跨膜结构域之间进一步包含间隔子结构域。如本文所用，术语“间隔子结构域”通常意指任何寡肽或多肽，其功能是将跨膜结构域连接至多肽链中的细胞外结构域或细胞内结构域。间隔子结构域可以包含长达约300个氨基酸，例如约10至约100个氨基酸或约25至约50个氨基酸。在一些实施方案中，间隔子结构域可以是短寡肽接头或多肽接头，例如长

度在约2与约10个氨基酸之间。例如,甘氨酸-丝氨酸双联体在主题CAR的跨膜结构域与细胞内信号传导结构域之间提供了特别合适的接头。

[0169] 因此,本公开文本的CAR可以包含本文所述的跨膜结构域、铰链结构域或间隔子结构域中的任一个。

3. 铰链结构域

[0170] 在一些实施方案中,本发明的主题CAR包含铰链区。CAR的铰链区是位于抗原结合结构域与跨膜结构域之间的亲水性区域。在一些实施方案中,铰链结构域促进CAR的适当蛋白质折叠。在一些实施方案中,铰链结构域是CAR的任选组分。在一些实施方案中,铰链结构域包括选自抗体的Fc片段、抗体的铰链区、抗体的CH2区、抗体的CH3区、人工铰链序列或其组合的结构域。在一些实施方案中,铰链结构域选自但不限于CD8a铰链、由多肽制成的人工铰链,这些多肽可以小至三个甘氨酸(Gly)。在一些实施方案中,铰链区是源自受体的铰链区多肽。在一些实施方案中,铰链区是CD8来源的铰链区。在一个实施方案中,铰链结构域包含源自人CD8的氨基酸序列或其变体。在一些实施方案中,主题CAR包含CD8 α 铰链结构域和CD8 α 跨膜结构域。在一些实施方案中,CD8 α 铰链结构域包含SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,CD8 α 铰链结构域包含SEQ ID NO:26所示的核苷酸序列。

[0171] 在一些实施方案中,铰链结构域包含与SEQ ID NO:25所示的任何氨基酸序列具有至少约80%、至少约81%、至少约82%、至少约83%、至少约84%、至少约85%、至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,铰链结构域由包含如下核苷酸序列的核酸序列编码,所述核苷酸序列与SEQ ID NO:26所示的任何核苷酸序列具有至少约80%、至少约81%、至少约82%、至少约83%、至少约84%、至少约85%、至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%序列同一性。

[0172] 在一些实施方案中,铰链结构域将抗原结合结构域连接至与细胞内结构域连接的跨膜结构域。在示例性实施方案中,铰链区能够支持抗原结合结构域识别且结合靶细胞上的靶抗原。参见例如,Hudecek等人,Cancer Immunol. Res., 3(2):125-135(2015)。在一些实施方案中,铰链区是柔性结构域,因此允许所述抗原结合结构域具有用于最佳地识别细胞(如肿瘤细胞)上的靶抗原的特定结构和密度的结构。铰链区的柔性允许铰链区采用许多不同的构象。

[0173] 在一些实施方案中,铰链结构域的长度选自约4至约50、约4至约10、约10至约15、约15至约20、约20至约25、约25至约30、约30至约40或约40至约50个氨基酸。

[0174] 可以容易地选择合适的铰链区,并且合适的铰链区可以具有任何合适的长度数,如从约1个氨基酸(例如,甘氨酸(Gly))至约20个氨基酸、从约2至约15、从约3个氨基酸至约12个氨基酸,包括约4至约10、约5至约9、约6至约8或约7至约8个氨基酸,并且可以是约1、约2、约3、约4、约5、约6或约7个氨基酸。

[0175] 在一些实施方案中,氨基酸是甘氨酸(Gly)。可以使用甘氨酸和甘氨酸-丝氨酸聚合物;Gly和Ser两者均是相对非结构化的,因此可以充当组分之间的中性系链。可以使用甘氨酸聚合物;因为甘氨酸接近的 Φ - Ψ 空间甚至比丙氨酸显著更大,并且比侧链较长的残基受

到的限制小得多(参见例如,Scheraga,Rev.Computational.Chem.(1992)2:73-142)。在一些实施方案中,铰链区包含甘氨酸聚合物(G)_n、甘氨酸-丝氨酸聚合物。在一些实施方案中,铰链区包含选自(GS)_n、(GSGGS)_n(SEQ ID NO:47)和(GGGG)_n(SEQ ID NO:48)的甘氨酸-丝氨酸聚合物,其中n是至少一的整数。在一些实施方案中,铰链结构域包含包括但不限于GGSG(SEQ ID NO:29)、GGSGG(SEQ ID NO:30)、GSGSG(SEQ ID NO:31)、GSGGG(SEQ ID NO:32)、GGGSG(SEQ ID NO:33)、GSSSG(SEQ ID NO:34)的氨基酸序列。在一些实施方案中,铰链区包含甘氨酸-丙氨酸聚合物、丙氨酸-丝氨酸聚合物或本领域已知的其他柔性接头。

[0176] 在一些实施方案中,铰链区是免疫球蛋白重链铰链区。免疫球蛋白铰链区氨基酸序列是本领域已知的。在一些实施方案中,免疫球蛋白铰链结构域包含选自以下的氨基酸序列:DKTHT(SEQ ID NO:35);CPPC(SEQ ID NO:36);CPEPKSCDTPPPCPR(SEQ ID NO:37)(参见例如,Glaser等人,J.Biol.Chem.(2005)280:41494-41503);ELKTPLGDTTHT(SEQ ID NO:38);KSCDKTHTCP(SEQ ID NO:39);KCCVDCP(SEQ ID NO:40);KYGPPCP(SEQ ID NO:41);EPKSCDKTHTCPPCP(SEQ ID NO:42)(人IgG1铰链);ERKCCVECPPCP(SEQ ID NO:43)(人IgG2铰链);ELKTPLGDTTHTCPRCP(SEQ ID NO:44)(人IgG3铰链);SPNMVPHAHHAQ(SEQ ID NO:45)(人IgG4铰链);等。

[0177] 在一些实施方案中,铰链区是免疫球蛋白重链铰链区。在一些实施方案中,铰链选自IgG(如人IgG4)的CH1和CH3结构域。在一些实施方案中,铰链结构域包含人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4铰链结构域的氨基酸序列。在一些实施方案中,与野生型(天然存在的)铰链区相比,铰链区可以包含一个或多个氨基酸取代和/或插入和/或缺失。在一些实施方案中,人IgG1铰链的位置229处的组氨酸(His229)被酪氨酸(Tyr)取代。在一些实施方案中,铰链结构域包含氨基酸序列EPKSCDKTYTTPPCP(SEQ ID NO:46)。

4. 共刺激结构域

[0178] 本发明的CAR还包含细胞内结构域。CAR的细胞内结构域或其他胞质结构域负责激活其中表达CAR的细胞。因此,术语“细胞内结构域”意在包括细胞内结构域的足以转导激活信号的任何部分。在一个实施方案中,细胞内结构域包括负责效应子功能的结构域。术语“效应子功能”是指细胞的特定功能。T细胞的效应子功能例如可以是细胞溶解活性或辅助活性,包括细胞因子的分泌。在一个实施方案中,CAR的细胞内结构域包括负责信号激活和/或转导的结构域。细胞内结构域可以经由蛋白质间相互作用、生物化学变化或其他应答来传送信号激活,以改变细胞的代谢、形状、基因表达或对嵌合细胞内信号传导分子的激活的其他细胞应答。

[0179] 用于本发明的细胞内结构域的例子包括但不限于T细胞受体(TCR)的胞质部分和任何共刺激分子或在抗原受体接合之后与TCR协作以启动T细胞中的信号转导的任何分子,以及这些元件的任何衍生物或变体和具有相同功能能力的任何合成序列。

[0180] 在一些实施方案中,细胞内结构域包含共刺激信号传导结构域和细胞内信号传导结构域。在某些实施方案中,细胞内结构域包含共刺激信号传导结构域。在一个实施方案中,CAR的细胞内结构域包含共刺激信号传导结构域,所述共刺激信号传导结构域选自来自TNFR超家族中的蛋白质、CD27、CD28、4-1BB(CD137)、OX40(CD134)、PD-1、CD7、LIGHT、CD83L、DAP10、DAP12、CD27、CD2、CD5、ICAM-1、LFA-1、Lck、TNFR-I、TNFR-II、Fas、CD30、CD40、ICOS(CD278)、NKG2C、B7-H3(CD276)的信号传导结构域的部分;以及源自杀伤细胞免疫球蛋白样

受体 (KIR) 的细胞内结构域、其任何衍生物或变体、其具有相同功能能力的任何合成序列、及它们的任何组合。

[0181] 在一些实施方案中,共刺激结构域包含选自TNFR超家族中的蛋白质、CD28、4-1BB (CD137)、OX40 (CD134)、PD-1、CD7、LIGHT、CD83L、DAP10、DAP12、CD27、CD2、CD5、ICAM-1、LFA-1、Lck、TNFR-I、TNFR-II、Fas、CD30、CD40、ICOS (CD278)、NKG2C、B7-H3 (CD276) 的蛋白质的共刺激结构域和源自杀伤细胞免疫球蛋白样受体 (KIR) 的细胞内结构域或其变体中的一个或多个。在一些实施方案中,共刺激结构域包含选自CD28、4-1BB (CD137)、OX40 (CD134)、CD27、CD2或其组合中的蛋白质的蛋白质的一个或多个共刺激结构域。在一些实施方案中,共刺激信号传导结构域包含4-1BB共刺激结构域。在一些实施方案中,共刺激信号传导结构域包含CD2共刺激结构域。在一些实施方案中,共刺激信号传导结构域包含CD28共刺激结构域。

[0182] 在一个实施方案中,CAR的共刺激结构域包含含有SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列的4-1BB共刺激结构域。在一些实施方案中,4-1BB共刺激结构域由包含SEQ ID NO:2或3所示的核苷酸序列的核酸序列编码。在一些实施方案中,CAR的共刺激结构域包含含有SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列的CD28共刺激结构域。在一些实施方案中,CD28共刺激结构域由包含SEQ ID NO:5所示的核苷酸序列的核酸序列编码。在一些实施方案中,CAR的共刺激结构域包含含有SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的CD28 (YFMF) 共刺激结构域。在一些实施方案中,CD28 (YFMF) 共刺激结构域由包含SEQ ID NO:7所示的核苷酸序列的核酸序列编码。在一个实施方案中,CAR的细胞内结构域包含含有SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列的ICOS共刺激结构域。在一些实施方案中,ICOS共刺激结构域由包含SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10所示的核苷酸序列的核酸序列编码。在一些实施方案中,CAR的细胞内结构域包含含有SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列的ICOS (YMNM) 共刺激结构域。在一些实施方案中,ICOS (YMNM) 共刺激结构域由包含SEQ ID NO:12所示的核苷酸序列的核酸序列编码。在一些实施方案中,主题CAR的细胞内结构域包含含有SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列的CD2共刺激结构域。在一些实施方案中,CD2共刺激结构域由包含SEQ ID NO:14所示的核苷酸序列的核酸序列编码。在一个实施方案中,CAR的细胞内结构域包含含有SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列的CD27共刺激结构域。在一些实施方案中,CD27共刺激结构域由包含SEQ ID NO:16所示的核苷酸序列的核酸序列编码。在一个实施方案中,CAR的细胞内结构域包含含有SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列的OX40共刺激结构域。在一些实施方案中,OX40共刺激结构域由包含SEQ ID NO:18所示的核苷酸序列的核酸序列编码。

5. 细胞内结构域

[0183] 在某些实施方案中,细胞内结构域包含细胞内信号传导结构域。细胞内结构域的例子包括来自一种或多种分子或受体的片段或结构域,所述一种或多种分子或受体包括但不限于TCR、CD3 ζ 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD86、共同FcR γ 、FcR β (Fc ϵ Rib)、CD79a、CD79b、Fc γ R11a、DAP10、DAP12、T细胞受体 (TCR)、CD2、CD8、CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX9、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、KIR家族蛋白、淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、与CD83特异性结合的配体、CD5、ICAM-1、GITR、BAFFR、HVEM (LIGHTR)、SLAMF7、NKp80 (KLRP1)、CD127、CD160、CD19、CD4、CD8 α 、CD8 β 、IL2R β 、IL2R γ 、IL7R α 、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD 11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、TNFR2、TRANCE/

RANKL、DNAM1 (CD226)、SLAMF4 (CD244、2B4)、CD84、CD96 (Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9 (CD229)、CD160 (BY55)、PSGL1、CD100 (SEMA4D)、CD69、SLAMF6 (NTB-A、Ly108)、SLAM (SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME (SLAMF8)、SELPLG (CD 162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、NKp44、NKp30、NKp46、NKG2D、Toll样受体1 (TLR1)、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、syk家族酪氨酸激酶 (Syk、ZAP 70等)、src家族酪氨酸激酶 (Lck、Fyn、Lyn等), 本文所述的其他共刺激分子, 其任何衍生物、变体或片段, 具有相同功能能力的共刺激分子的任何合成序列, 以及它们的任何组合。

[0184] 在一些实施方案中, 细胞内信号传导结构域包含选自以下的细胞内结构域或其变体: 人CD2、CD3 ζ 链 (CD3 ζ)、Fc γ RIII、Fc γ RI、Fc受体的胞质尾、携带免疫受体酪氨酸激活基序 (ITAM) 的胞质受体、TCR ζ 、FcR γ 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b和CD66d的胞质信号传导结构域。在一些实施方案中, 细胞内信号传导结构域包括CD3 ζ 细胞内信号传导结构域。

[0185] 细胞内结构域的其他例子包括但不限于几种类型的各种其他免疫信号传导受体的细胞内信号传导结构域, 所述免疫信号传导受体包括但不限于第一、第二和第三代T细胞信号传导蛋白质, 包括CD3、B7家族共刺激受体和肿瘤坏死因子受体 (TNFR) 超家族受体。另外, 细胞内信号传导结构域可以包括NK和NKT细胞使用的信号传导结构域, 如NKp30 (B7-H6)、和DAP 12、NKG2D、NKp44、NKp46、DAP10、和CD3z的信号传导结构域。

[0186] 适用于本发明的CAR的细胞内信号传导结构域包括任何期望的信号传导结构域, 这些信号传导结构域转导响应于CAR的激活 (即, 由抗原和二聚化试剂激活) 的信号。在一些实施方案中, 独特且可检测的信号例如包括由细胞产生的一种或多种细胞因子的增加; 靶基因转录的变化; 蛋白质活性的变化; 细胞行为的变化 (例如, 细胞死亡); 细胞增殖; 细胞分化; 细胞存活; 和/或细胞信号传导应答的调节。例如, 在一些实施方案中, 细胞内信号传导结构域包括DAP10/CD28型信号传导链。在一些实施方案中, 细胞内信号传导结构域不与膜结合的CAR共价附接, 而是在细胞质内扩散。

[0187] 适用于本发明的CAR的细胞内信号传导结构域包括包含免疫受体酪氨酸激活基序 (ITAM) 的细胞内信号传导多肽。在一些实施方案中, 细胞内信号传导结构域包含至少一个、至少两个、至少三个、至少四个、至少五个或至少六个如下所述的ITAM基序。在一些实施方案中, ITAM基序在细胞内信号传导结构域中重复两次, 其中第一和第二ITAM基序实例彼此间隔6至8个氨基酸。在一个实施方案中, 主题CAR的细胞内信号传导结构域包含3个ITAM基序。在一些实施方案中, 细胞内信号传导结构域包括含有免疫受体酪氨酸激活基序 (ITAM) 的人免疫球蛋白受体的信号传导结构域, 这些人免疫球蛋白受体如但不限于Fc γ RI、Fc γ RIIA、Fc γ RIIC、Fc γ RIIIA、FcRL5。

[0188] 合适的细胞内信号传导结构域可以是源自含有ITAM基序的多肽的含ITAM基序的部分。例如, 合适的细胞内信号传导结构域可以是来自任何含ITAM基序的蛋白质的含ITAM基序的结构域。因此, 合适的细胞内信号传导结构域不需要包含其从中衍生的整个蛋白质的整个序列。合适的含ITAM基序多肽的例子包括但不限于: DAP12、FCER1G (Fc ϵ 受体I γ 链)、CD3D (CD3 δ)、CD3E (CD3 ϵ)、CD3G (CD3 γ)、CD3Z (CD3 ζ) 和CD79A (抗原受体复合物相关蛋白 α 链)。

[0189] 在一个实施方案中, 细胞内信号传导结构域源自DAP12 (也称为TYROBP; TYRO蛋白

酪氨酸激酶结合蛋白;KARAP;PLOSL;DNAX激活蛋白12;KAR相关蛋白;TYRO蛋白酪氨酸激酶结合蛋白;杀伤激活受体相关蛋白;杀伤激活受体相关蛋白等)。在一个实施方案中,细胞内信号传导结构域源自FCER1G(也称为FCRG;Fc ϵ 受体I γ 链;Fc受体 γ 链;fc- ϵ RI- γ ;fcR γ ;fceR1 γ ;高亲和力免疫球蛋白 ϵ 受体亚基 γ ;免疫球蛋白E受体高亲和力 γ 链;等)。在一个实施方案中,细胞内信号传导结构域源自T细胞表面糖蛋白CD3 δ 链(也称为CD3D;CD3- δ ;T3D;CD3抗原, δ 亚基;CD3 δ ;CD3d抗原, δ 多肽(TiT3复合物);OKT3, δ 链;T细胞受体T3 δ 链;T细胞表面糖蛋白CD3 δ 链等)。在一个实施方案中,细胞内信号传导结构域源自T细胞表面糖蛋白CD3 ϵ 链(也称为CD3e、T细胞表面抗原T3/Leu-4 ϵ 链、T细胞表面糖蛋白CD3 ϵ 链、AI504783、CD3、CD3 ϵ 、T3e等)。在一个实施方案中,细胞内信号传导结构域源自T细胞表面糖蛋白CD3 γ 链(也称为CD3G;T细胞受体T3 γ 链;CD3-GAMMA;T3G, γ 多肽(TiT3复合物)等)。在一个实施方案中,细胞内信号传导结构域源自T细胞表面糖蛋白CD3 ζ 链(也称为CD3Z、T细胞受体T3 ζ 链、CD247、CD3- ζ 、CD3H、CD3Q、T3Z、TCRZ等)。在一个实施方案中,细胞内信号传导结构域源自CD79A(也称为B细胞抗原受体复合物相关蛋白 α 链;CD79a抗原(免疫球蛋白相关 α);MB-1膜糖蛋白;Ig- α ;膜结合免疫球蛋白相关蛋白;表面IgM相关蛋白;等)。在一个实施方案中,适用于本公开文本的CAR的细胞内信号传导结构域包括DAP10/CD28型信号传导链。在一个实施方案中,适用于本发明的主题CAR的细胞内信号传导结构域包括ZAP70多肽。在一些实施方案中,细胞内信号传导结构域包括TCR ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b或CD66d的胞质信号传导结构域。在一个实施方案中,CAR中的细胞内信号传导结构域包括人CD3 ζ 的胞质信号传导结构域。

[0190] 虽然通常可以采用完整的细胞内信号传导结构域,但是在多种情况下不需要使用整条链。就使用细胞内信号传导结构域的截短部分而言,这样的截短部分可以用于代替整条链,只要它转导效应子功能信号即可。细胞内信号传导结构域包括细胞内信号传导结构域的足以转导效应子功能信号的任何截短部分。

[0191] 本文所述的细胞内信号传导结构域可以与本文所述的任何共刺激信号传导结构域、本文所述的任何抗原结合结构域、本文所述的任何跨膜结构域或本文所述的可包含在CAR中的任何其他结构域组合。在一些实施方案中,CAR的细胞内结构域包括双重信号传导结构域。双重信号传导结构域可以包括来自本文所述的任何分子的片段或结构域。在一些实施方案中,细胞内结构域包含4-1BB共刺激结构域和CD3 ζ 信号传导结构域;CD28共刺激结构域和CD3 ζ 信号传导结构域;CD2共刺激结构域和CD3 ζ 信号传导结构域。在一些实施方案中,CAR的细胞内结构域包含共刺激分子的任何部分,如来自CD3、CD27、CD28、ICOS、4-1BB、PD-1、T细胞受体(TCR)的至少一个信号传导结构域、其任何衍生物或变体、其具有相同功能能力的任何合成序列、及其任何组合。

[0192] 此外,适用于主题CAR的变体细胞内信号传导结构域是本领域已知的。YFMF基序在ICOS中发现并且是招募PI3K的p85和p50 α 亚基两者从而增强AKT信号传导的SH2结合基序。在一个实施方案中,可以产生CD28细胞内结构域变体以包含YFMF基序。

[0193] 在一个实施方案中,主题CAR的细胞内结构域包含含有SEQ ID NO:19或SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列的CD3 ζ 细胞内信号传导结构域,所述氨基酸序列可以分别由包含SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:22所示的核苷酸序列的核酸序列编码。

[0194] 细胞内结构域的可容许的变化对于本领域技术人员来将是已知的,同时保留其比

活性。在一些实施方案中,细胞内结构域包含与SEQ ID NO:19或21所示的任何氨基酸序列具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,细胞内结构域由包含如下核苷酸序列的核酸序列编码,所述核苷酸序列与SEQ ID NO:20或22所示的任何核苷酸序列具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%序列同一性。

[0195] 在一个实施方案中,主题CAR的细胞内结构域包含ICOS共刺激结构域和CD3 ζ 细胞内信号传导结构域。在一个实施方案中,主题CAR的细胞内结构域包含CD28共刺激结构域和CD3 ζ 细胞内信号传导结构域。在一个实施方案中,主题CAR的细胞内结构域包含CD28 YMFM变体共刺激结构域和CD3 ζ 细胞内信号传导结构域。在一个实施方案中,主题CAR的细胞内结构域包含CD27共刺激结构域和CD3 ζ 细胞内信号传导结构域。在一个实施方案中,主题CAR的细胞内结构域包含OX40共刺激结构域和CD3 ζ 细胞内信号传导结构域。在一个示例性实施方案中,主题CAR的细胞内结构域包含4-1BB共刺激结构域和CD3 ζ 细胞内信号传导结构域。在一个示例性实施方案中,主题CAR的细胞内结构域包含CD2共刺激结构域和CD3 ζ 细胞内信号传导结构域。

[0196] 表2展示了本文所述的CAR的结构域的示例性序列。

表2		
SEQ ID NO:	描述	序列
1	4-1BB共刺激结	KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

表2		
SEQ ID NO:	描述	序列
	构域氨基酸序列	
2	4-1BB共刺激结构域核酸序列#1	AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACC ATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGACGGCTG TAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAAC TG
3	4-1BB共刺激结构域核酸序列#2	AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACC ATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTG TAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAAC TG
4	CD28共刺激结构域氨基酸序列	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS
5	CD28共刺激结构域核酸序列	AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTACTACATGAA CATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCACCCGCAAGCATTACCA GCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCC
6	CD28 (YMF)共刺激结构域氨基酸序列	RSKRSRLLHSDYMFMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS
7	CD28 (YMF)共刺激结构域核酸序列	AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTACTACATGTT ATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCACCCGCAAGCATTACCAG CCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCC
8	ICOS共刺激结构域氨基酸序列	TKKKYSSSVHDPNGEYMFMRVNTAKKSRLTDVTL
9	ICOS共刺激结构域核酸序列#1	ACAAAAAGAAGTATTCATCCAGTGTGCACGACCCTAACGGT GAATACATGTTTCATGAGAGCAGTGAACACAGCCAAAAAATC CAGACTCACAGATGTGACCCTA
10	ICOS共刺激结构域核酸序列#2	ACAAAAAGAAGTATTCATCCAGTGTGCACGACCCTAACGGT GAATACATGTTTCATGAGAGCAGTGAACACAGCCAAAAAATCT AGACTCACAGATGTGACCCTA
11	ICOS (YMN)共刺激结构域氨基酸序列	TKKKYSSSVHDPNGEYMNMRVNTAKKSRLTDVTL
12	ICOS (YMN)共刺激结构域核酸序列	ACAAAAAGAAGTATTCATCCAGTGTGCACGACCCTAACGGT GAATACATGAACATGAGAGCAGTGAACACAGCCAAAAAATC CAGACTCACAGATGTGACCCTA
13	CD2共刺激结构域氨基酸序列	TKRKKQRSRRNDEELETRAHRVATEERGRKPHQIPASTPQNPAT SQHPPPPGHRSPHRPPPPGHRVQHQPQKRPPAPSGTQVHQ QKGPPLPRPVQPKPPHGAENSLSPSSN
14	CD2共刺激结构域核酸序列	ACAAAAAGGAAAAACAGAGGAGTCGGAGAAATGATGAGG AGCTGGAGACAAGAGCCCACAGAGTAGCTACTGAAGAAAGG GGCCGGAAGCCCCACCAAATTCAGCTTCAACCCCTCAGAAT CCAGCAACTCCCAACATCCTCCTCCACCACCTGGTCATCGTT CCCAGGCACCTAGTCATCGTCCCCCGCCTCCTGGACACCGTG TTCAGCACCAGCCTCAGAAGAGGCCTCCTGCTCCGTCGGGCA CACAAGTTCACCAGCAGAAAGGCCCGCCCTCCCCAGACCTC GAGTTCAGCCAAAACCTCCCCATGGGGCAGCAGAAAACCTCAT TGTCCTTCTCTAAT
15	CD27共刺激结构域氨基酸序列	QRRKYRSNKGESVPEAEPARYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPA CSP
16	CD27共刺激结构域核酸序列	CAACGAAGGAAATATAGATCAAACAAGGAGAAAGTCCTGT GGAGCCTGCAGAGCCTTGTCGTTACAGCTGCCCCAGGGAGGA GGAGGGCAGCACCATCCCCATCCAGGAGGATTACCGAAAAC CGGAGCCTGCCTGCTCCCC
17	OX40共刺激结构域氨基酸序列	ALYLLRRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI

表2		
SEQ ID NO:	描述	序列
18	OX40共刺激结构域核酸序列	GCCCTGTACCTGCTCCGCAGGGACCAGAGGCTGCCCCCGAT GCCCACAAGCCCCCTGGGGGAGGCAGTTTCAGGACCCCCATC CAAGAGGAGCAGGCCGACGCCCACTCCACCCTGGCCAAGAT C
19	CD3 ζ 细胞内信号传导结构域氨基酸序列	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRD PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQQLSTATKDTYDALHMQALPPR
20	CD3 ζ 细胞内信号传导结构域核酸序列	AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCA GCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACG AAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGG ACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAG GAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGA GGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGG GCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCA CCAAGGACACCTACGACGCCCTTACATGCAGGCCCTGCCCC CTCGC
21	CD3 ζ (Q14K) 细胞内信号传导结构域氨基酸序列	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRD PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQQLSTATKDTYDALHMQALPPR
22	CD3 ζ (Q14K) 细胞内信号传导结构域核酸序列	AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACAA GCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACG AAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGG ACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAG GAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGA GGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGG GCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCA CCAAGGACACCTACGACGCCCTTACATGCAGGCCCTGCCCC CTCGC
23	CD8阿尔法 (CD8 α) 跨膜结构域氨基酸序列	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC
24	CD8阿尔法 (CD8 α) 跨膜结构域核酸序列	ATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCTCTC TCCTGTCACTGGTTATCACCCCTTACTGC
25	CD8阿尔法 (CD8 α) 铰链结构域氨基酸序列	TTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD
26	CD8阿尔法 (CD8 α) 铰链结构域核酸序列	ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCAC CATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCAGAGGCGTGCCG GCCAGCGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACT TCGCCTGTGAT
27	CD28跨膜结构域氨基酸序列	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV
28	CD28跨膜结构域核酸序列	TTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATA GCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTCTGGGTG
29	铰链/接头	GGSG
30	铰链/接头	GGSGG
31	铰链/接头	GSGSG
32	铰链/接头	GSGGG
33	铰链/接头	GSSSG
34	铰链/接头	GGGSG
35	Ig铰链区	DKTHT
36	Ig铰链区	CPPC

表2		
SEQ ID NO:	描述	序列
37	Ig铰链区	CPEPKSCDTPPPCPR
38	Ig铰链区	ELKTPLGDTTHT
39	Ig铰链区	KSCDKTHTCP
40	Ig铰链区	KCCVDCP
41	Ig铰链区	KYGPPCP
42	人IgG1铰链	EPKSCDKTHTCPPCP
43	人IgG2铰链	ERKCCVECP
44	人IgG3铰链	ELKTPLGDTTHTCPRCP
45	人IgG4铰链	SPNMVPHAHHAQ
46	人IgG1 ^{H229Y} 铰链	EPKSCDKTYTCPPCP
47	铰链/接头	(GSGGS)n
48	铰链/接头	(GGGS)n
49	铰链/接头	(GGGS)n
50	铰链/接头	GGGSGGGSGGGGS
51	铰链/接头	GGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTGGGTGGCGGCGG ATCT
52	CD3ε	AGATCCAGGATACTGAGGGCA
53	CD3δ	TCTCTGGCCTGGTACTGGCTA
54	CD3γ	GCTTCTGCATCACAAGTCAGA
55	B2M	TATCTCTTGTACTACACTGA
56	TAP1	GCTCTTGGAGCCAACCGTTG
57	TAP2	CTTCTCAAGGGCTGCCAGGA
58	TAPBP gRNA1	CCTACATGCCCCCACCTCC
59	TAPBP gRNA2	CGCTCGCATCCTCCACGAAC
60	NLRC5	GTGAGCAGCCTCACAAGACAG
61	C2TA	CCTTGGGGCTCTGACAGGTA
62	HLA-DMA	CCAGAACACTCGGGTGCCTCG
63	RFX5 gRNA1	CAAGGCCGTGCAGAACAAAGT
64	RFX5 gRNA2	TTCTGCACGGCCTTGAAATG
65	RFXANK	CCTGCACCCCTGAGCCTGTGA
66	RFXAP	GAGGATCTAGAGGACGAGGAG
67	Ii铰链 gRNA1	CATCCTGGTGA CTCTGCTCCT
68	Ii铰链 gRNA2	TCCAGCCGGCCCTGCTGCTGG
69	Tn-MUC1 CAR 核酸序列	ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGC TGCTCCACGCCGCCAGGCCGGGATCCCAGGTGCAGCTGCAGC AGTCTGATGCCGAGCTCGTGAAGCCTGGCAGCAGCGTGAAGA TCAGCTGCAAGCCAGCCGCTACACCTTACCAGCCAGCCCA TCCACTGGGTCAAGCAGAAGCCTGAGCAGGGCCTGGAGTGG ATCGGCCACTTCAGCCCCGGCAACACCGACATCAAGTACAAC GACAAGTTCAAGGGCAAGGCCACCCTGACCGTGGACAGAAG CAGCAGCACCGCCTACATGCAGCTGAACAGCCTGACCAGCGA GGACAGCGCCGTGACTTCTGCAAGACCAGCACCTTCTTTTC GACTACTGGGGCCAGGGCACAACCCTGACAGTGTCTAGCGGA GGCGGAGGATCTGGCGCGGAGGAAGTGGCGGAGGGGGATC TGA ACTCGTGATGACCCAGAGCCCCAGCTCTCTGACAGTGAC AGCCGCGAGAAAAGTGACCATGATCTGCAAGTCCCTCCCAGAG CCTGCTGAACTCCGGCGACCAGAAGA ACTACCTGACCTGGTA TCAGCAGAAACCCGGCCAGCCCCCAAGCTGCTGATCTTTTG GGCCAGCACCCGGGAAAGCGGCGTGCCCGATAGATTACAG GCAGCGGCTCCGGCACCGACTTTACCCTGACCATCAGCTCCG TGCAGGCCGAGGACCTGGCCGTGTATTACTGCCAGAACGACT ACAGTACCCCTGACCTTCGGAGCCGGCACCAAGCTGGAAC TGAAGTCCGGAACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACA CCGGCGCCACCATCGCGTCGAGCCCCCTGTCCCTGCGCCCA

表2		
SEQ ID NO:	描述	序列
		GAGGCGTGCCGGCCAGCGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAG GGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTT GGCCGGGACTTGTGGGGTCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACC CTTTACTGCACAAAAGGAAAAACAGAGGAGTCGGAGAAA TGATGAGGAGCTGGAGACAAGAGCCACAGAGTAGCTACTG AAGAAAGGGGCCGGAAGCCCCACAAATTCCAGCTTCAACC CCTCAGAATCCAGCAACTTCCCAACATCCTCCTCCACCACCTG GTCATCGTTCCAGGCACCTAGTCATCGTCCCCCGCCTCTGG ACACCGTGTTACAGCACCAGCCTCAGAAGAGGCCCTCCTGCTG GTCGGGCACACAAGTTCACCAGCAGAAAGGCCCGCCCTCCC CAGACCTCGAGTTCAGCCAAAACCTCCCCATGGGGCAGCAGA AAACTCATTGTCCCCTTCTCTAATATCGATAGAGTGAAGTTC AGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGGTACAAGCAGGGCCAGAA CCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGT ACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGG GGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCTCAGGAAGGCCTGTAC AATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGA GATTGGGATGAAAGGCGAGCGCGGAGGGGCAAGGGGCACG ATGGCCTTTACCAGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCT ACGACGCCCTTACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC
70	Tn-MUC1 CAR 氨基酸序列	MALPVTALLPLALLLHAARPGSQVQLQQSDAELVKPGSSVKIS CKASGYTFTDHAHWVVKQKPEQGLEWIGHFSPGNTDIKYNDKF KGKATLTVDRSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYFCKTSTFFFDYWG QGTTLVSSGGGGSGGGSGGGGSELVMTOSPSLTVTAGEKV TMICKSSQLNSGDQKNYLTWYOQKPGQPPLKLLIFWASTRESG VPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVVYCONDYSYPLTFGAG TKLELKSQTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCTKRKKQRSRRND EELETRAHRVATEERGRKPHQIPASTPONPATSQHPPPPGHRISQ APSHRPPPPGHRVQHQPQRPPAPSGTQVHQKGPPLPRPRVQP KPPHGAENSLSPSSNIDRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNL GRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMA EAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALP PR
71	间皮素CAR 氨基酸序列 (M5)	MALPVTALLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVEKPGASVKVSC KASGYTFTDYMHWRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQK FQGRVTMTRDTSISTAYMELRRLSDDTAVYYCASGWDYFDYW GQGTLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIVMTQSPSSLAS VGDRVITCRASQSIRYYLSWYQQKPGKAPKLLIYTASILQNGVP SRFSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQTYTTPDFGPGTKVEI KTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFAC DIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQ TTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLY NELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQ KDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALH MQALPPR
72	间皮素CAR 氨基酸序列 (M11)	MALPVTALLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTGYMHWRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQN FQGRVTMTRDTSISTAYMELRRLSDDTAVYYCASGWDYFDYW GQGTLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIRMTQSPSSLAS VGDRVITCRASQSIRYYLSWYQQKPGKAPKLLIYTASILQNGVP SRFSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQTYTTPDFGPGTKVEI KTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFAC DIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQ TTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLY NELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQ KDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALH

表2		
SEQ ID NO:	描述	序列
		MQALPPR
73	人源化PSMA特异性结合结构域氨基酸序列	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTEYTIHWVRQAPGK GLEWIGNINPNNGGTTYNQKFEDRVITITVDKSTSTAYMELSSLR SEDTAVYYCAAGWNFDYWGQGTITVTVSSGGGGSSGGSSGGG SDIQMTQSPSTLSASVGDRTITCKASQDVGTAVDWYQQKPGQ APKLLIYWASTRHTGVPDRFSGSGSGTDFLTITISRLQPEDFAVYY CQQYNSYPLTFGQGTKVDIK
74	人源化PSMA特异性结合结构域核酸序列	GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCT GGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACA TTCCTGAATACACCATCCACTGGGTGAGGCAGGCCCTGGA AAGGGCCTTGAGTGGATTGAAAACATTAATCCTAACAAATGGT GGTACTACCTACAACCAGAAGTTCGAGGACAGAGTCACAATC ACTGTAGACAAGTCCACCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGC AGCCTGAGATCTGAGGATACTGCAGTCTATTACTGTGCAGCT GGTTGGAACCTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACGGTCACC GTCTCCTCAGGAGGCGGAGGATCTGGCGGCGGAGGAAGTCT GGCGGAGGCAGCGACATTCAGATGACCCAGTCTCCCAGCACC CTGTCCGCATCAGTAGGAGACAGGGTCAACATCACTTGCAAG GCCAGTCAGGATGTGGTACTGCTGTAGACTGGTATCAACAG AAACCAGGGCAAGCTCCTAAACTACTGATTTACTGGGCATCC ACCCGGCACACTGGAGTCCCTGATCGCTTCAGCGGCAGTGGA TCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGCAGCCT GAAGACTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAATATAACAGCTAT CCTCTCACGTTTCGGCCAGGGGACCAAGGTGGATATCAAA
75	间皮素特异性结合结构域氨基酸序列	QVQLQQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYMHVVRQ APGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQNFGQGRVTMTRDTSISTAYM ELRRLRSDDTAVYYCASGWDFDYWGQGLVTVSSGGGGSSGGG GSGGGSSGGGSDIRMTQSPSSLASVGDRTITCRASQSIRYYL SWYQQKPGKAPKLLIYTASILQNGVPSRFSGSGSGTDFLTISL QPEDFATYYCLQTYTTPDFGPGTKVEIK
76	TGFPRII显性负性受体氨基酸序列 (TGFbRII-DN)	MGRGLLRGLWPLHIVLWTRIASTIPPHVOKSVNNDMIVTDNNG AVKFPQLCKFCDFRSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPEVCVAV WRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCMKEKKKPGE TFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDLLLIVIFQVTGISLLPPLGV AISVIIIICYRVNRQQKLSGG
77	TGFPRII显性负性受体核酸序列 (TGFbRII-DN)	ATGGGTCGGGGGCTGCTCAGGGGCTGTGGCCGCTGCACATC GTCCTGTGGACGCGTATCGCCAGCACGATCCCACCGCACGTT CAGAAGTCGGTAAATAACGACATGATAGTCACTGACAACAAC GGTGCAGTCAAGTTTCCACAACCTGTGTAATTTTGTGATGTG AGATTTTCCACCTGTGACAACCAGAAATCCTGCATGAGCAAC TGCAGCATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCACAGGAAGTCTGT GTGGCTGTATGGAGAAAAGAATGACGAGAACATAACACTAGA GACAGTTTGCCATGACCCCAAGCTCCCCTACCATGACTTTATT CTGGAAGATGCTGCTTCTCAAAGTGCATTATGAAGGAAAAA AAAAAGCCTGGTGAGACTTCTTCATGTGTTCTGTAGCTCTG ATGAGTGCAATGACAACATCATCTTCTCAGAAGAATATAACA CCAGCAATCCTGACTTGTGCTAGTCATATTTCAAGTGACAG GCATCAGCCTCCTGCCACCACTGGGAGTTGCCATATCTGTCAT CATCATCTTCTACTGCTACCGCGTTAACCGGCAGCAGAAGCT GAGTTCATCCGGA
78	PD1-CTM-CD28受体氨基酸序列	MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPTFSPALLV VTEGDNAFTCSFSNTSEFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPEDRS QPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGYLCAISLAP KAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRAGQFQTLVFWVL VVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMN TPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS
79	PD1-CTM-CD28	ATGCAGATCCCACAGGCGCCCTGGCCAGTCGTCTGGGCGGTG

表2		
SEQ ID NO:	描述	序列
	受体核酸序列	CTACAAC TGGGCTGGCGGCCAGGATGGTTCTTAGACTCCCCA GACAGGCCCTGGAACCCCCACCTTCTCCCCAGCCCTGCTC GTGGTGACCGAAGGGGACAACGCCACCTTCACCTGCAGCTTC TCCAACACATCGGAGAGCTTCGTGCTAAACTGGTACCG CATGAGCCCCAGCAACCAGACGGACAAGCTGGCCGCCTTCCC CGAGGACCGCAGCCAGCCGGCCAGGACTGCCGCTTCCGTGT CACAACTGCCAACGGGCGTGACTTCCACATGAGCGTGGT CAGGGCCCGCGCAATGACAGCGGCACCTACCTCTGTGGGGC CATCTCCCTGGCCCCAAGGCGCAGATCAAAGAGAGCCTGCG GGCAGAGCTCAGGGTGACAGAGAGAAGGGCAGAAGTGCCCCA CAGCCACCCCAGCCCCTACCCAGGCCAGCCGGCCAGTTCC AAACCCTGGTGT TTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCC TGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTATTATTTT CTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACT ACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCACCCGCAAGC ATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGGACTTCGCAGCCTATC GCTCC
80	PD1-PTM-CD28 受体氨基酸序列	MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPTFSPALLV VTEGDNATFTCSFSNTSEFVLNWYRMSPSNQTKLAAPEDRS QPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTVLCGAISLAP KLQIKESLRAELRV TERRAEVPTAHPSPSPRAGQFQTLVVG VV GLLGSLVLLVWVLA VIRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKH YQPYAPPRDFAAVRS
81	PD1-PTM-CD28 受体核酸序列	ATGCAGATCCCACAGGCGCCCTGGCCAGTCGTCTGGGCGGTG CTACAAC TGGGCTGGCGGCCAGGATGGTTCTTAGACTCCCCA GACAGGCCCTGGAACCCCCACCTTCTCCCCAGCCCTGCTC GTGGTGACCGAAGGGGACAACGCCACCTTCACCTGCAGCTTC TCCAACACATCGGAGAGCTTCGTGCTAAACTGGTACCGCATG AGCCCCAGCAACCAGACGGACAAGCTGGCCGCCTTCCCCGAG GACCGCAGCCAGCCCGGCCAGGACTGCCGCTTCCGTGT CACA CAACTGCCAACGGGCGTGACTTCCACATGAGCGTGGTCAGG GCCCCGGCGAATGACAGCGGCACCTACCTCTGTGGGGCCATC TCCCTGGCCCCAAGGCGCAGATCAAAGAGAGCCTGCGGGC AGAGCTCAGGGTGACAGAGAGAAGGGCAGAAGTGCCACAG CCCACCCCAGCCCCTACCCAGGCCAGCCGGCCAGTTCCAAA CCCTGGTGGTGGTGTCTGGGCGGCCTGTGGGCGAGCCTGG TGCTGCTAGTCTGGGTCCTGGCCGTCATCAGGAGTAAGAGGA GCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCC GCCCCGGGCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCAC CACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCC
82	PD1 ^{A132L} -PTM-C D28受体 氨基酸序列	MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPTFSPALLV VTEGDNATFTCSFSNTSEFVLNWYRMSPSNQTKLAAPEDRS QPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTVLCGAISLAP KLQIKESLRAELRV TERRAEVPTAHPSPSPRAGQFQTLVVG VV GLLGSLVLLVWVLA VIRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKH YQPYAPPRDFAAVRS
83	PD1 ^{A132L} -PTM-C D28受体 核酸序列	ATGCAGATCCCACAGGCGCCCTGGCCAGTCGTCTGGGCGGTG CTACAAC TGGGCTGGCGGCCAGGATGGTTCTTAGACTCCCCA GACAGGCCCTGGAACCCCCACCTTCTCCCCAGCCCTGCTC GTGGTGACCGAAGGGGACAACGCCACCTTCACCTGCAGCTTC TCCAACACATCGGAGAGCTTCGTGCTAAACTGGTACCGCATG AGCCCCAGCAACCAGACGGACAAGCTGGCCGCCTTCCCCGAG GACCGCAGCCAGCCCGGCCAGGACTGCCGCTTCCGTGT CACA CAACTGCCAACGGGCGTGACTTCCACATGAGCGTGGTCAGG GCCCCGGCGAATGACAGCGGCACCTACCTCTGTGGGGCCATC TCCCTGGCCCCAAGCTGCAGATCAAAGAGAGCCTGCGGGCA GAGCTCAGGGTGACAGAGAGAAGGGCAGAAGTGCCACAGC

表2		
SEQ ID NO:	描述	序列
		CCACCCCAGCCCCTCACCCAGGCCAGCCGGCCAGTTCCAAAC CCTGGTGGTTGGTGTCTGGGGCGGCCTGCTGGGCAGCCTGGT GCTGCTAGTCTGGGTCCTGGCCGTCATCAGGAGTAAGAGGAG CAGGCTCCTGCACAGTACTACATGAACATGACTCCCCGCCG CCCCGGGCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACC ACGCGACTTCGCAGCCTATCGC
84	PD-1-4-1BB受体 氨基酸序列 (PD1-BB)	MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPTFSPALLV VTEGDNATFTCSFSNTSEFVLNWYRMSPSNQDKLAAFPEDRS QPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGYLTCGAI SLAP KAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLVIYIWA PLAGTCGVLLLSLVITLYCKKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQE EDGCSCRFPEEEEGGCEL
85	PD-1-4-1BB受体 核酸序列 (PD1-BB)	ATGCAGATCCCACAGGCGCCCTGGCCAGTCGCTGGGCGGTG CTACAAC TGGGCTGGCGGCCAGGATGGTTCTTAGACTCCCCA GACAGGCCCTGGAACCCCCACCTTCTCCCCAGCCCTGCTC GTGGTGACCGAAGGGGACAACGCCACCTCACCTGCAGCTTC TCCAACACATCGGAGAGCTTCGTGCTAAACTGGTACCGCATG AGCCCCAGCAACCAGACGGACAAGCTGGCCGCCTTCCCCGAG GACCGCAGCCAGCCCGGCCAGGACTGCCGCTCCGTGTCA CAACTGCCCAACGGGCGTGACTTCCACATGAGCGTGGTCAGG GCCCCGCGCAATGACAGCGGCACCTACCTCTGTGGGGCCATC TCCCTGGCCCCAAGGCGCAGATCAAAGAGAGCCTGCGGGC AGAGCTCAGGGTGACAGAGAGAAGGGCAGAAGTGCCCCACAG CCCACCCAGCCCCTCACCCAGGCCAGCCGGCCAGTTCCAAA CCCTGGTTATCTACATCTGGGCGCCCTTGCCGGGACTTGTGG GGTCCTTCTCCTGCTCACTGGTTATCACCTTTACTGCAAAAA CGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTT ATGAGACCAGTACAAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAG CTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTG
86	PD1 ^{A132L} -4-1BB 受体氨基酸序列 (PD1*BB)	MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPTFSPALLV VTEGDNATFTCSFSNTSEFVLNWYRMSPSNQDKLAAFPEDRS QPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGYLTCGAI SLAP KLQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLVIYIWA PLAGTCGVLLLSLVITLVCKKRGRKLLYIFKQPFMRPV QTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL
87	PD1 ^{A132L} -4-1BB 受体核酸序列 (PD1*BB)	ATGCAGATCCCACAGGCGCCCTGGCCAGTCGCTGGGCGGTG CTACAAC TGGGCTGGCGGCCAGGATGGTTCTTAGACTCCCCA GACAGGCCCTGGAACCCCCACCTTCTCCCCAGCCCTGCTC GTGGTGACCGAAGGGGACAACGCCACCTCACCTGCAGCTTC TCCAACACATCGGAGAGCTTCGTGCTAAACTGGTACCGCATG AGCCCCAGCAACCAGACGGACAAGCTGGCCGCCTTCCCCGAG GACCGCAGCCAGCCCGGCCAGGACTGCCGCTCCGTGTCA CAACTGCCCAACGGGCGTGACTTCCACATGAGCGTGGTCAGG GCCCCGCGCAATGACAGCGGCACCTACCTCTGTGGGGCCATC TCCCTGGCCCCAAGCTGCAGATCAAAGAGAGCCTGCGGGCA GAGCTCAGGGTGACAGAGAGAAGGGCAGAAGTGCCCCACAGC CCACCCAGCCCCTCACCCAGGCCAGCCGGCCAGTTCCAAAC CCTGGTTATCTACATCTGGGCGCCCTTGCCCGGGACTTGTGG GGTCCTTCTCCTGCTCACTGGTTATCACCTTTACTGCAAAAA CGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTT ATGAGACCAGTACAAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAG CTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTG
88	TGFβR-IL12Rβ1 受体氨基酸序列	MEAAVAAPRPRLLLLVLA AAAAAAAAAALLPGATALQCFCHLCTK DNFTCVTDGLCFVSVTETTDKVIHNSMCIAEIDLIPDRPFVFCAPS SKTGSVTTTTYCCNQDHCNKIELPTTVKSSPGLGPVELAAVIAGPV CFVCISLMLMVYIRAARHLCPPLPTPCASSAIEFPGGKETWOWIN PVDFQEEASLQEALVVEMSWDKGERTEPLEKTELPEGAPELALD

表2		
SEQ ID NO:	描述	序列
		TELSLEDGDRCKAKM
89	TGFβR-IL12Rβ1 受体核酸序列	ATGGAGGCGGCGGTCTGCTCCGCGTCCCCGGCTGCTCCTC CTCGTGTGGCGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCTGCTC CCGGGGGCGACGGCGTTACAGTGTCTTCTGCCACCTCTGTACA AAAGACAATTTTACTTGTGTGACAGATGGGCTCTGCTTTGTCT CTGTCACAGAGACCACAGACAAAGTTATACACAACAGCATGT GTATAGCTGAAATTGACTTAATTCCTCGAGATAGGCCGTTTGT ATGTGCACCCTCTTCAAAAAGCTGGGCTCTGTGACTACAACATA TTGCTGCAATCAGGACCATTGCAATAAAAATAGAAGTTCCAAC TACTGTAAGTCATCACCTGGCCTTGGTCTGTGGAAGTGGC AGCTGTCATTGCTGGACCAGTGTGCTTCGTCTGCATCTCACTC ATGTTGATGGTCTATATCAGGGCCGCACGGCACCTGTGCCCG CCGCTGCCACACCCTGTGCCAGCTCCGCCATTGAGTTCCCTG GAGGAAGGAGACTTGGCAGTGGATCAACCCAGTGGACTTC CAGGAAGAGGCATCCCTGCAGGAGGCCCTGGTGGTAGAGAT GTCCTGGGACAAAGGCGAGAGGACTGAGCCTCTCGAGAAGA CAGAGCTACCTGAGGGTGGCCCTGAGCTGGCCCTGGATACAG AGTTGTCCTTGGAGGATGGAGACAGGTGCAAGGCCAAGATG
90	TGFβR-IL12Rβ2 受体氨基酸序列	MGRGLLRGLWPLHIVLWTRIASTIPPHVOKSVNNDMIVTDNNG AVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAV WRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPK CIMKEKKKPGE TFFMCSSSDECDNIIFSEEYNTSNPDLLL VIFQVTGISLLPPLGV AISVIIIYQQKVFVLLAALRPOWCSREIPDPANSTCAKKYPIAEE KTOLPLDRLLIDWPTPEDPEPLVISEVLHQVTPVFRHPPCSNWPQ REKGIQGHQASEKDMMHSASSPPPPRALQAESRQLVDLYKVL ES RGSDPKPENPACPWTVLPAGDLPTHGDLPSNIDDLPSHEAPLA DSLEELPQHISLSVFPSSSLHPLTFSCGDKLTL DQLKMRCDSL M
91	TGFβR-IL12Rβ2 受体核酸序列	ATGGGTCGGGGGCTGCTCAGGGGCCTGTGGCCGCTGCACATC GTCCTGTGGACGCGTATCGCCAGCACGATCCCACCGCACGTT CAGAAGTCGGTTAATAACGACATGATAGTCACTGACAACAAC GGTGCAGTCAAGTTCCACAACACTGTGTAATTTTGTGATGTG AGATTTCCACCTGTGACAACCAGAAATCCTGCATGAGCAAC TGCAGCATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCACAGGAAGTCTGT GTGGCTGTATGGAGAAAGAATGACGAGAACATAACACTAGA GACAGTTTGCCATGACCCCAAGCTCCCTACCATGACTTTATT CTGGAAGATGCTGCTTCTCCAAAAGTGCATTATGAAGGAAAAA AAAAAGCCTGGTGAGACTTCTTTCATGTGTTCCCTGTAAGTCTG ATGAGTGCAATGACAACATCATCTTCTCAGAAGAATATAACA CCAGCAATCCTGACTTGTGCTAGTCATATTTCAAGTGACAG GCATCAGCCTCCTGCCACCACTGGGAGTTGCCATATCTGTCAT CATCATTTCTACCAGCAAAGGTGTTGTCTCCTAGCAGCC CTCAGACCTCAGTGGTGTAGCAGAGAAATTCAGATCCAGCA AATAGCACTTGCCTAAGAAATATCCCATTGCAGAGGAGAAG ACACAGCTGCCCTGGACAGGCTCCTGATAGACTGGCCACG CCTGAAGATCCTGAACCGCTGGTCATCAGTGAAGTCTTCAT CAAGTGACCCAGTTTTTCAGACATCCCCCTGTCCAAGTGG CCACAAAAGGAAAAAAGGAATCCAAGGTCATCAGGCCTCTGA GAAAGACATGATGCACAGTGCCTCAAGCCACCACCTCCAAG AGCTCTCCAAGCTGAGAGCAGACAACCTGGTGGATCTGTACAA GGTGTGGAGAGCAGGGGCTCCGACCCAAAGCCAGAAAACC CAGCCTGTCCCTGGACGGTGTCCCAGCAGGTGACCTTCCCA CCCATGATGGCTACTTACCCTCCAACATAGATGACCTCCCCTC ACATGAGGCACCTCTCGCTGACTCTCTGGAAGAACTGGAGCC TCAGCACATCTCCCTTCTGTTTTCCCTCAAGTCTCTTCAAC CACTCACCTTCTCCTGTGGTGATAAGCTGACTCTGGATCAGTT AAAGATGAGGTGTGACTCCCTCATGCTC

B. 另外的抗原结合多肽

[0197] 在一些实施方案中,经修饰的T细胞表达抗原结合多肽、细胞表面受体配体或结合

肿瘤抗原的多肽。在一些情形下,抗原结合结构域包含这样的抗体,所述抗体识别在肿瘤细胞上表达的细胞表面蛋白或受体。在一些情形下,抗原结合结构域包含识别肿瘤抗原的抗体。在一些情形下,抗原结合结构域包含全长抗体或其抗原结合片段、Fab、F(ab)₂、单特异性Fab₂、双特异性Fab₂、三特异性Fab₂、单链可变片段(scFv)、双抗体、三抗体、微型抗体、V-NAR或VhH。

C. 细胞表面受体配体

[0198] 在一些实施方案中,经修饰的T细胞表达细胞表面受体配体。在一些情形下,配体与在肿瘤细胞上表达的细胞表面受体结合。在一些情况下,配体包含与细胞表面受体结合的野生型蛋白质或其变体。在一些情形下,配体包含与所述细胞表面受体结合的全长蛋白或其功能片段。在一些情况下,与全长形式的蛋白质相比,功能片段包含约90%、约80%、约70%、约60%、约50%或约40%的长度,但是保留与细胞表面受体的结合。在一些情况下,配体是与细胞表面受体结合的从头工程化蛋白质。示例性配体包括但不限于表皮生长因子(EGF)、血小板衍生的生长因子(PDGF)或Wnt3A。

D. 肿瘤抗原

[0199] 在一些实施方案中,经修饰的T细胞表达结合肿瘤抗原的多肽。在一些情形下,肿瘤抗原与血液恶性肿瘤相关。示例性肿瘤抗原包括但不限于CD19、CD20、CD22、CD33/IL3Ra、ROR1、间皮素、c-Met、PSMA、PSCA、叶酸受体 α 、叶酸受体 β 、EGFRvIII、GPC2、Tn-MUC1、GDNF家族受体 α -4(GFRa4)、成纤维细胞激活蛋白(FAP)和IL13Ra2。在一些情形下,肿瘤抗原包括CD19、CD20、CD22、BCMA、CD37、间皮素、PSMA、PSCA、Tn-MUC1、EGFR、EGFRvIII、c-Met、HER1、HER2、CD33、CD133、GD2、GPC2、GPC3、NKG2D、KRAS或WT1。在一些情形下,多肽是肿瘤抗原的配体,例如与肿瘤抗原结合的全长蛋白、其功能片段或与肿瘤抗原结合的从头工程化配体。在一些情形下,多肽是与肿瘤抗原结合的抗体。

E. 开关受体和显性负性受体

[0200] 在一方面,本公开文本还包括如本文所述的具有下调的基因表达的经修饰的免疫细胞,所述经修饰的免疫细胞进一步包含编码显性负性受体、开关受体或其组合的外源性核酸。在一些实施方案中,如本文所述的具有下调的基因表达的经修饰的免疫细胞进一步包含嵌合抗原受体(CAR)和/或显性负性受体。在一些实施方案中,如本文所述的具有下调的基因表达的经修饰的免疫细胞进一步包含CAR和开关受体。在一些实施方案中,如本文所述的具有下调的基因表达的经修饰的免疫细胞进一步包含工程化TCR和开关受体。在一些实施方案中,如本文所述的具有下调的基因表达的经修饰的免疫细胞进一步包含工程化TCR和显性负性受体。在一些实施方案中,如本文所述的具有下调的基因表达的经修饰的免疫细胞进一步包含KIR和开关受体。在一些实施方案中,如本文所述的具有下调的基因表达的经修饰的免疫细胞进一步包含KIR和显性负性受体。

1. 开关受体

[0201] 本发明提供了用于具有下调的基因表达的经修饰的免疫细胞或其前体的组合物和方法,所述经修饰的免疫细胞或其前体包含CAR和开关受体。肿瘤细胞产生用于保护它们免受免疫识别和消除的免疫抑制微环境。这种免疫抑制微环境可以限制免疫抑制疗法如CAR-T或TCR-T细胞疗法的有效性。例如,分泌的细胞因子转化生长因子 β (TGF β)直接抑制细胞毒性T细胞的功能,并且另外诱导调节性T细胞形成以进一步抑制免疫应答。在前列腺癌

的背景下,由于TGF β 所致的T细胞免疫抑制先前已由Donkor等人(2011)和Shalapour等人(2015)证明。为了减少TGF对免疫细胞的免疫抑制作用,可以修饰免疫细胞以表达工程化TGF β R,其包含TGF β R的与例如白细胞介素-12受体(IL12R;TGF β R-IL12R)的细胞内信号传导结构域融合的细胞外配体结合结构域。因此,包含开关受体的经修饰的免疫细胞可以结合经修饰的免疫细胞的微环境中的负信号转导分子,并将经修饰的免疫细胞上的抑制性分子的负信号转导信号转换为刺激经修饰的免疫细胞的正信号。本发明的开关受体可以被设计成通过包含与正信号相关的细胞内结构域来减少负信号转导分子的作用,或将负信号转换成正信号。

[0202] 因此,在一些实施方案中,在编码内源性免疫蛋白的一个或多个基因座中包含插入和/或缺失的经修饰的免疫细胞已被进一步基因修饰以表达开关受体。如本文所用,术语“开关受体”是指被设计成减少负信号转导分子对本发明的经修饰的免疫细胞的作用的分子。开关受体包含:源自与负信号(压制或抑制细胞或T细胞激活的信号转导)相关的第一多肽的第一结构域;和源自与正信号(刺激细胞或T细胞的信号转导信号)相关的第二多肽的第二结构域。在一些实施方案中,与负信号相关的蛋白质选自CTLA4、PD-1、TGF β R II、BTLA、VSIG3、VSIG8和TIM-3。在一些实施方案中,与正信号相关的蛋白质选自CD28、4-1BB、IL12R β 1、IL12R β 2、CD2、ICOS和CD27。

[0203] 在一个实施方案中,第一结构域包含与负信号相关的第一多肽的细胞外结构域的至少一部分,并且第二结构域包含与正信号相关的第二多肽的细胞内结构域的至少一部分。因此,开关受体包含融合至与正信号相关的细胞内结构域的与负信号相关的细胞外结构域。在一些实施方案中,开关受体包含与负信号相关的信号传导蛋白质的细胞外结构域、跨膜结构域和与正信号相关的信号传导蛋白质的细胞内结构域。在一些实施方案中,开关受体的跨膜结构域选自与负信号相关的蛋白质的跨膜或与负信号相关的蛋白质的跨膜结构域。在一些实施方案中,开关受体的跨膜结构域选自如下蛋白质的跨膜结构域,所述蛋白质选自CTLA4、PD-1、VSIG3、VSIG8、TGF β R II、BTLA、TIM-3、CD28、4-1BB、IL12R β 1、IL12R β 2、CD2、ICOS和CD27。

[0204] 在一些实施方案中,开关受体选自PD-1-CD28、PD-1^{A132L}-CD28、PD-1-CD27、PD-1^{A132L}-CD27、PD-1-4-1BB、PD-1^{A132L}-4-1BB、PD-1-ICOS、PD-1^{A132L}-ICOS、PD-1-IL12R β 1、PD-1A132L-IL12R β 1、PD-1-IL12R β 2、PD-1^{A132L}-IL12R β 2、VSIG3-CD28、VSIG8-CD28、VSIG3-CD27、VSIG8-CD27、VSIG3-4-1BB、VSIG8-4-1BB、VSIG3-ICOS、VSIG8-ICOS、VSIG3-IL12R β 1、VSIG8-IL12R β 1、VSIG3-IL12R β 2、VSIG8-IL12R β 2、TGF β R II-CD27、TGF β R II-CD28、TGF β R II-4-1BB、TGF β R II-ICOS、TGF β R II-IL12R β 1和TGF β R II-IL12R β 2。

[0205] 在一些实施方案中,开关受体是PD-1-CD28并且包含SEQ ID NO:78所示的氨基酸序列。在一个实施方案中,开关受体是PD-1^{A132L}-CD28并且包含SEQ ID NO:82所示的氨基酸序列。在一个实施方案中,开关受体是PD-1-4-1BB并且包含SEQ ID NO:84所示的氨基酸序列。在一个实施方案中,开关受体是PD-1^{A132L}-4-1BB并且包含SEQ ID NO:86所示的氨基酸序列。在一个实施方案中,开关受体是TGF β R II-IL12R β 1并且包含SEQ ID NO:88所示的氨基酸序列。在一个实施方案中,开关受体是TGF β R II-IL12R β 2并且包含SEQ ID NO:90所示的氨基酸序列。在一个实施方案中,开关受体由SEQ ID NO:79、81、83、85、87、89或91所示的核酸序列编码。

[0206] 开关受体的可容许的变化将是本领域技术人员已知的,同时保持其预期的生物活性(例如,当在细胞中表达时,将负信号转换成正信号)。因此,在一些实施方案中,本发明的开关受体可以由与SEQ ID NO:79、81、83、85、87、89或91所示的核酸序列具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%序列同一性的核酸序列编码。在一些实施方案中,本发明的开关受体可以包含与SEQ ID NO:78、80、82、84、86、88或90具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%序列同一性的氨基酸序列。

[0207] 在一些实施方案中,经修饰的免疫细胞包含能够下调CD3、B2M和CIITA的插入和/或缺失、CAR和开关受体,所述开关受体选自PD-1-CD28、PD-1^{A132L}-CD28、PD-1-CD27、PD-1^{A132L}-CD27、PD-1-4-1BB、PD-1^{A132L}-4-1BB、PD-1-ICOS、PD-1^{A132L}-ICOS、PD-1-IL12Rβ1、PD-1A132L-IL12Rβ1、PD-1-IL12Rβ2、PD-1^{A132L}-IL12Rβ2、VSIG3-CD28、VSIG8-CD28、VSIG3-CD27、VSIG8-CD27、VSIG3-4-1BB、VSIG8-4-1BB、VSIG3-ICOS、VSIG8-ICOS、VSIG3-IL12Rβ1、VSIG8-IL12Rβ1、VSIG3-IL12Rβ2、VSIG8-IL12Rβ2、TGFβRII-CD27、TGFβRII-CD28、TGFβRII-4-1BB、TGFβRII-ICOS、TGFβRII-IL12Rβ1和TGFβRII-IL12Rβ2。在一些实施方案中,经修饰的免疫细胞包含在一个或多个基因座中的插入和/或缺失、CAR和开关受体,所述基因座各自编码选自CD3δ、CD3ε、CD3γ、B2M、CIITA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP、恒定链(Ii链)及其组合的内源性免疫蛋白,所述开关受体选自PD-1-CD28、PD-1^{A132L}-CD28、PD-1-CD27、PD-1^{A132L}-CD27、PD-1-4-1BB、PD-1^{A132L}-4-1BB、PD-1-ICOS、PD-1^{A132L}-ICOS、PD-1-IL12Rβ1、PD-1A132L-IL12Rβ1、PD-1-IL12Rβ2、PD-1^{A132L}-IL12Rβ2、VSIG3-CD28、VSIG8-CD28、VSIG3-CD27、VSIG8-CD27、VSIG3-4-1BB、VSIG8-4-1BB、VSIG3-ICOS、VSIG8-ICOS、VSIG3-IL12Rβ1、VSIG8-IL12Rβ1、VSIG3-IL12Rβ2、VSIG8-IL12Rβ2、TGFβRII-CD27、TGFβRII-CD28、TGFβRII-4-1BB、TGFβRII-ICOS、TGFβRII-IL12Rβ1和TGFβRII-IL12Rβ2。

2. 显性负性受体

[0208] 本发明提供了用于具有下调的基因表达的经修饰的免疫细胞或其前体的组合物和方法,所述经修饰的免疫细胞或其前体包含CAR和显性负性受体。因此,在一些实施方案中,在编码内源性免疫蛋白的一个或多个基因座中包含插入和/或缺失的经修饰的免疫细胞已被进一步基因修饰以表达显性负性受体。如本文所用,术语“显性负性受体”是指被设计成减少负信号转导分子的作用(例如,负信号转导分子对本发明的经修饰的免疫细胞的作用)的分子。显性负性受体是与负信号相关的野生型蛋白质的截短变体。在一些实施方案中,与负信号相关的蛋白质选自CTLA4、PD-1、BTLA、TGFβRII、VSIG3、VSIG8和TIM-3。

[0209] 本发明的显性负性受体可以通过与负信号相关的细胞外结构域结合负信号转导分子(例如,CTLA4、PD-1、BTLA、TGFβRII、VSIG3、VSIG8和TIM-3),可以减少负信号转导分子的作用。例如,包含显性负性受体的经修饰的免疫细胞可以结合经修饰的免疫细胞的微环境中的负信号转导分子,但是这种结合不会在细胞内转导此信号以改变经修饰的T细胞的活性。相反,结合隔离负信号转导分子并阻止其与内源性受体/配体的结合,从而减少负信号转导分子可能对经修饰的免疫细胞的作用。因此,为了减少某些分子的免疫抑制作用,可

以修饰免疫细胞以表达作为显性负性受体的显性负性受体。

[0210] 在一些实施方案中,显性负性受体包括与负信号相关的野生型蛋白质的截短变体。在一些实施方案中,显性负性受体包括与负信号相关的野生型蛋白质的变体,所述变体包含细胞外结构域、跨膜结构域并且基本上缺乏细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,显性负性受体包含与负信号相关的信号传导蛋白质的细胞外结构域和跨膜结构域。在一些实施方案中,显性负性受体是PD-1、CTLA4、BTLA、TGF β R11、VSIG3、VSIG8或TIM-3显性负性受体。在一些实施方案中,显性负性受体是PD-1或TGF β R11。在一些实施方案中,TGF β R11包含SEQ ID NO:76所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,TGF β R11由SEQ ID NO:77所示的核酸序列编码。

[0211] 显性负性受体的可容许的变化将是本领域技术人员已知的,同时保持其预期的生物活性(例如,当在细胞中表达时,阻断负信号和/或隔离具有负信号的分子)。因此,在一些实施方案中,本发明的显性负性受体可以由与SEQ ID NO:77所示的核酸序列具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%序列同一性的核酸序列编码。在一些实施方案中,本发明的显性负性受体可以包含与SEQ ID NO:76具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%序列同一性的氨基酸序列。

F. 作为用于改进适应性的免疫增强因子的趋化因子和细胞因子

[0212] 本发明提供了用于具有下调的免疫基因表达的经修饰的免疫细胞的组合物和方法,所述经修饰的免疫细胞包含CAR并且进一步包含显性负性受体、开关受体、趋化因子、趋化因子受体、细胞因子、细胞因子受体、白细胞介素-7(IL-7)、白细胞介素-7受体(IL-7R)、白细胞介素-15(IL-15)、白细胞介素-15受体(IL-15R)、白细胞介素-21(IL-21)、白细胞介素-18(IL-18)、CCL21、CCL19或其组合。在一些实施方案中,趋化因子、趋化因子受体、细胞因子、细胞因子受体、IL-7、IL-7R、IL-15、IL-15R、IL-21、IL-18、C-C基序趋化因子配体21(CCL21)、或C-C基序趋化因子配体19(CCL19)是改进所要求保护的经修饰的免疫细胞的适应性的免疫功能增强因子。不希望受理论束缚,将趋化因子、趋化因子受体、细胞因子、细胞因子受体、IL-7、IL-7R、IL-15、IL-15R、IL-21、IL-18、CCL21、或CCL19添加至经修饰的免疫细胞增强经修饰的免疫细胞的免疫诱导作用和抗肿瘤活性。

[0213] 不希望受理论束缚,白细胞介素和趋化因子可以促进增加实体瘤中的T细胞引发和/或T细胞浸润。例如,在具有低T细胞浸润的微卫星稳定的结直肠癌(CRC)中,IL-15促进T细胞引发。在一些实施方案中,CAR与趋化因子/白细胞介素受体复合物的组合促进T细胞引发。此外,IL-15可以诱导NK细胞浸润。在一些实施方案中,对IL-15/IL-15RA复合物的应答可以导致NK细胞浸润。在某些实施方案中,本文所述的经修饰的免疫细胞进一步包含IL-15/IL-15Ra复合物。在一些实施方案中,IL-15/IL-15Ra复合物选自NIZ985(Novartis)、ATL-803(Altor)或CYP0150(Cytune)。在一些实施方案中,IL-15/IL-15RA复合物是NIZ985。在一些实施方案中,IL-15刺激自然杀伤细胞消除(例如,杀伤)胰腺癌细胞。在一些实施方案中,对进一步包含IL-15/IL15Ra的本文所述的经修饰的免疫细胞的治疗反应与结直肠癌

动物模型中的自然杀伤细胞浸润相关。在一些实施方案中,IL-15/IL-15Ra复合物包含与可溶形式的人IL-15Ra复合的人IL-15。复合物可以包含与可溶性形式的IL-15Ra共价或非共价结合的IL-15。在特定的实施方案中,人IL-15与可溶形式的IL-15Ra非共价键合。

[0214] CAR T细胞疗法对实体瘤的无效性部分由实体瘤中免疫细胞和CAR T细胞的有限募集和累积引起。解决此问题的一种方法是使模拟T区成纤维细胞网状细胞(FRC)功能的CAR T细胞工程化。淋巴结负责检测病原体和免疫原。T区含有三种类型的细胞:(1)先天免疫细胞,如树突细胞、单核细胞、巨噬细胞和粒细胞;(2)适应性免疫细胞,如CD4和CD8淋巴细胞,以及(3)基质细胞(FRC)。这些细胞通过促进CD4 T细胞的激活、分化和成熟而协作产生针对病原体的有效免疫应答。FRC特别重要,因为它们形成了允许树突细胞和T细胞在整个淋巴结中传播并吸引B细胞的网络。特别地,FRC提供了网络,所述网络用于:(i)通过释放两种趋化因子(CCL21和CCL19)将幼稚T细胞、B细胞和树突细胞募集到淋巴结;(ii)通过分泌特别对于幼稚T细胞而言是一种存活因子的IL-7使T细胞存活;(iii)将CD4 T细胞运输至生发中心(GC;淋巴结的不同部分)。因此,具有外源性CCL21或CCL19和IL-7的CAR将增强T细胞、B细胞和树突细胞向实体瘤的募集。在一些实施方案中,经修饰的T细胞包含编码免疫功能增强因子的核酸,其中编码免疫功能增强因子的核酸是编码白细胞介素-7的核酸和编码CCL19或CCL21的核酸。

[0215] 在一些实施方案中,免疫功能增强因子(即趋化因子、趋化因子受体、细胞因子、细胞因子受体、IL-7、IL-7R、IL-15、IL-15R、IL-21、IL-18、CCL21或CCL19)的核酸与CAR融合。在一些实施方案中,趋化因子、趋化因子受体、细胞因子、细胞因子受体、IL-7、IL-7R、IL-15、IL-15R、IL-21、IL-18、CCL21或CCL19经由自切割肽(如P2A、T2A、E2A或F2A)与CAR融合。

VI.产生经修饰的T细胞的方法

[0216] 本发明的一方面提供了一种产生经修饰的免疫细胞(例如,同种异体T细胞、NK细胞或NKT细胞)的方法。通常通过以下方式将本发明的经修饰的免疫细胞工程化:(1)向免疫细胞中引入能够下调编码内源性免疫蛋白的一个或多个内源性免疫基因的基因表达的一种或多种核酸;(2)向免疫细胞中引入编码工程化受体的外源性核酸;以及(3)扩增经修饰的免疫细胞以产生经修饰的免疫T细胞。这种经修饰的免疫细胞可以包含在治疗性组合物中并施用于有需要的患者。

[0217] 在一些实施方案中,用于产生本发明的经修饰的免疫细胞的方法包括向免疫细胞中引入能够下调一个或多个内源性免疫基因的基因表达的一种或多种核酸。一种或多种免疫基因编码选自CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、B2M、CIITA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP和恒定链(I α 链)的内源性免疫蛋白。此外,还向免疫细胞中引入编码嵌合抗原受体(CAR)、工程化T细胞受体(TCR)、杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR)、抗原结合多肽、细胞表面受体配体或肿瘤抗原的外源性核酸。在一些实施方案中,方法进一步包括向免疫细胞中引入编码显性负性受体、开关受体或其组合的外源性核酸。

A.将核酸引入细胞中的方法

[0218] 将核酸引入细胞中的方法包括物理、生物和化学方法。用于将多核苷酸(如RNA)引入宿主细胞中的物理方法包括磷酸钙沉淀、脂质体转染、粒子轰击、显微注射、电穿孔等。可以使用可商购的方法将RNA引入靶细胞中,这些方法包括电穿孔(Amaxa Nucleofector-II (Amaxa Biosystems,德国科隆))、ECM 830(BTX) (Harvard Instruments,马萨诸塞州波士

顿)或Gene Pulser II(BioRad,科罗拉多州丹佛)、Multiporator(Eppendorf,德国汉堡)。还可以使用脂质体转染使用阳离子脂质体介导的转染、使用聚合物包封、使用肽介导的转染或使用生物弹道(biolistic)颗粒递送系统(如“基因枪”)将RNA引入细胞中。

1.生物学方法

[0219] 用于将目的多核苷酸引入宿主细胞(例如,免疫细胞)中的生物学方法包括使用DNA和RNA载体。病毒载体、尤其是逆转录病毒载体已经成为将基因插入哺乳动物(例如,人细胞)中的最广泛使用的方法。其他病毒载体可以源自慢病毒、痘病毒、单纯疱疹病毒I、腺病毒和腺相关病毒等。参见例如,美国专利号5,350,674和5,585,362。

[0220] 在一些实施方案中,将编码本发明的主题CAR、主题工程化TCR、主题KIR、主题抗原结合多肽、主题细胞表面受体配体、主题肿瘤抗原、主题开关受体、和/或主题显性负性受体的核酸通过表达载体引入细胞中。在一些实施方案中,本文提供了包含编码主题CAR、主题工程化TCR、主题KIR、主题抗原结合多肽、主题细胞表面受体配体、主题肿瘤抗原、主题开关受体、和/或主题显性负性受体的核酸的表达载体。合适的表达载体包括慢病毒载体、 γ 逆转录病毒载体、泡沫病毒载体、腺相关病毒(AAV)载体、腺病毒载体、工程化杂合病毒、裸DNA,包括但不限于转座子介导的载体,如Sleeping Beauty、Piggyback和整合酶(如Phi31)。一些其他合适的表达载体包括单纯疱疹病毒(HSV)和逆转录病毒表达载体。

[0221] 腺病毒表达载体基于腺病毒,其整合到基因组DNA中的能力低,但转染宿主细胞的效率高。腺病毒表达载体含有腺病毒序列,其足以:(a)支持表达载体的包装和(b)在宿主细胞中最终表达主题CAR、主题工程化TCR、主题KIR、主题抗原结合多肽、主题细胞表面受体配体、主题肿瘤抗原、主题开关受体和/或主题显性负性受体。在一些实施方案中,腺病毒基因组是36kb的线性双链DNA,其中有外来DNA序列。例如,可以插入编码主题CAR、主题工程化TCR、主题KIR、主题抗原结合多肽、主题细胞表面受体配体、主题肿瘤抗原、主题开关受体、和/或主题显性负性受体的核酸以取代大段腺病毒DNA,从而制备本发明的表达载体。

[0222] 另一种表达载体基于腺相关病毒,其利用腺病毒偶联系统。此AAV表达载体整合到宿主基因组中的频率很高。它可以感染非分裂细胞,因此可用于将基因递送到哺乳动物细胞中,例如,在组织培养物中或在体内。AAV载体对于广泛范围的宿主具有感染性。关于AAV载体的产生和使用的细节描述于美国专利号5,139,941和4,797,368。

[0223] 逆转录病毒表达载体能够整合到宿主基因组中,递送大量外来遗传物质,感染广泛的物种和细胞类型,并包装在特殊的细胞系中。通过将核酸(例如,编码主题CAR、主题工程化TCR、主题KIR、主题抗原结合多肽、主题细胞表面受体配体、主题肿瘤抗原、主题开关受体、和/或主题显性负性受体的核酸)插入病毒基因组的某些位置以产生有复制缺陷的病毒来构建逆转录病毒载体。尽管逆转录病毒载体能够感染多种细胞类型,但主题CAR、主题工程化TCR、主题KIR、主题抗原结合多肽、主题细胞表面受体配体、主题肿瘤抗原、主题开关受体、和/或主题显性负性受体的整合和稳定表达需要宿主细胞的分裂。

[0224] 慢病毒载体源自慢病毒,所述慢病毒是复杂的逆转录病毒,它除了含有常见的逆转录病毒基因gag、pol和env外,还含有具有调节或结构功能的其他基因。参见例如,美国专利号6,013,516和5,994,136。慢病毒的一些例子包括人类免疫缺陷病毒(HTV-1、HTV-2)和猿猴免疫缺陷病毒(SIV)。已经通过多次减弱HIV毒力基因产生慢病毒载体,例如使基因env、vif、vpr、vpu和nef缺失,使得载体在生物学上是安全的。慢病毒载体能够感染非分裂

细胞,并且可以用于编码主题CAR、主题工程化TCR、主题KIR、主题抗原结合多肽、主题细胞表面受体配体、主题肿瘤抗原、主题开关受体和/或主题显性负性受体的核酸的体内和离体基因转移和表达。参见例如,美国专利号5,994,136。

[0225] 可以通过本领域技术人员已知的任何方式将包含本公开文本的核酸的表达载体引入宿主细胞中。如果需要,表达载体可以包含用于转染的病毒序列。可替代地,可以通过融合、电穿孔、生物弹道(biolistics)、转染、脂质体转染等引入表达载体。在引入表达载体之前,宿主细胞(例如,免疫细胞)可以在培养物中生长和扩增,随后进行适当处理以引入和整合载体。然后将宿主细胞(例如,免疫细胞)扩增,并且可以借助于载体中存在的标记物筛选。在一些实施方案中,将编码主题CAR、主题工程化TCR、主题KIR、主题抗原结合多肽、主题细胞表面受体配体、主题肿瘤抗原、主题开关受体、和/或主题显性负性受体的核酸通过病毒转导引入免疫细胞中。在一些实施方案中,病毒转导包括使免疫细胞与包含一种或多种核酸的病毒载体接触。在一些实施方案中,病毒载体选自逆转录病毒载体、仙台病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体和慢病毒载体。可以使用的各种标记物是本领域已知的,并且可以包括hprt、新霉素抗性、胸苷激酶、潮霉素抗性等。如本文所用,术语“细胞”、“细胞系”和“细胞培养物”可以互换使用。在一些实施方案中,宿主细胞是免疫细胞或其前体。在一些实施方案中,基因工程化细胞是能够产生治疗相关后代的基因工程化T淋巴细胞(T细胞)、幼稚T细胞(TN)、记忆T细胞(例如,中枢记忆T细胞(TCM)、效应记忆细胞(TEM))、自然杀伤细胞(NK细胞)和巨噬细胞。在一些实施方案中,宿主细胞是T细胞、NK细胞或NKT细胞。在一些实施方案中,免疫细胞选自T细胞、自然杀伤细胞(NK细胞)、自然杀伤T细胞、淋巴样祖细胞、造血干细胞、干细胞、巨噬细胞和树突细胞。在一些实施方案中,免疫细胞是CD4⁺ T细胞或CD8⁺ T细胞。在一些实施方案中,免疫细胞是同种异体T细胞或自体T细胞。在一些实施方案中,同种异体T细胞或自体T细胞是人的。

[0226] 本发明的经修饰的免疫细胞(例如,包含能够下调基因的核酸、CAR、KIR、TCR、显性负性受体和/或开关受体)可以通过用包含本公开文本的核酸的表达载体稳定转染宿主细胞(例如,免疫细胞)产生。产生本公开文本的经修饰的细胞的另外的方法包括而限于化学转化方法(例如,使用磷酸钙、树状聚合物、脂质体和/或阳离子聚合物)、非化学转化方法(例如,电穿孔、光学转化、基因电转移和/或流体动力学递送)和/或基于颗粒的方法(例如,穿刺转染、使用基因枪和/或磁转染)。可以离体扩增表达能够下调本公开文本的基因的核酸、CAR、KIR、TCR、显性负性受体和/或开关受体的转染细胞(即免疫细胞)。

2. 物理方法

[0227] 用于将表达载体引入宿主细胞中的物理方法包括磷酸钙沉淀、脂质体转染、粒子轰击、显微注射、电穿孔等。用于产生包含载体和/或外源性核酸的细胞的方法是本领域熟知的。参见例如,Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,New York(2001)。

3. 化学方法

[0228] 用于将表达载体引入宿主细胞中的化学方法包括胶体分散系统,如大分子复合物、纳米胶囊、微球、珠和基于脂质的系统(包括水包油乳剂、胶束、混合胶束和脂质体)。用于将多核苷酸引入宿主细胞中的化学手段包括胶体分散系统,如大分子复合物、纳米胶囊、微球、珠和基于脂质的系统(包括水包油乳剂、胶束、混合胶束和脂质体)。用作体外和体内

递送媒介物的示例性胶体系统是脂质体(例如,人造膜囊)。

[0229] 不管使用何种方法将外源性核酸引入宿主细胞中或以其他方式将细胞暴露于本发明的抑制剂,为了证实宿主细胞中核酸的存在,可以进行多种测定。此类测定包括例如本领域技术人员熟知的分子生物学测定,如DNA印迹法和RNA印迹法、RT-PCR和PCR;生物化学测定,如检测特定肽的存在或不存在,例如通过免疫学手段(ELISA和蛋白质印迹法)或通过本文所述的测定以鉴定落入本发明范围内的药剂。

[0230] 此外,可以通过任何方式引入核酸,如转导扩增的宿主细胞(例如,免疫细胞)、转染扩增的宿主细胞(例如,免疫细胞)、以及将扩增的宿主细胞(例如,免疫细胞)电穿孔。可以通过一种方法引入一种核酸,并且可以通过不同的方法将另一种核酸引入宿主细胞(例如,免疫细胞)中。

4. RNA

[0231] 在一个实施方案中,引入宿主细胞(例如,免疫细胞)中的核酸是RNA。在另一个实施方案中, RNA是包含体外转录的RNA或合成RNA的mRNA。使用聚合酶链式反应(PCR)产生的模板通过体外转录产生RNA。可以将来自任何来源的目的DNA通过PCR使用合适的引物和RNA聚合酶直接转化为模板,以用于体外mRNA合成。DNA的来源可以是基因组DNA、质粒DNA、噬菌体DNA、cDNA、合成DNA序列或任何其他合适的DNA来源。

[0232] 可以使用PCR来产生模板以用于体外转录mRNA,然后将其引入细胞中。用于进行PCR的方法是本领域熟知的。用于PCR的引物被设计成具有与待用作PCR模板的DNA区域基本上互补的区域。如本文所用,“基本上互补”是指核苷酸序列,其中引物序列中的大多数或所有碱基是互补的,或者一个或多个碱基是非互补的或错配的。基本上互补的序列能够在用于PCR的退火条件下退火或与预期的DNA靶标杂交。引物可以被设计成与DNA模板的任何部分基本上互补。例如,引物可以被设计成扩增在细胞中正常转录的基因的部分(开放阅读框),包括5'和3'UTR。引物还可以被设计成扩增编码特定目的结构域的基因的部分。在一个实施方案中,引物被设计成扩增人cDNA的编码区,包括5'和3'UTR的全部或部分。通过本领域熟知的合成方法产生可用于PCR的引物。“正向引物”是含有与待扩增的DNA序列上游的DNA模板上的核苷酸基本上互补的核苷酸区域的引物。“上游”在本文中用于指待扩增的DNA序列关于编码链的5'位置。“反向引物”是含有与待扩增的DNA序列下游的双链DNA模板基本上互补的核苷酸区域的引物。“下游”在本文中用于指待扩增的DNA序列关于编码链的3'位置。

[0233] 还可以使用具有促进RNA的稳定性和/或翻译效率的能力的化学结构。RNA优选具有5'和3'UTR。在一个实施方案中,5'UTR的长度在零与3000个核苷酸之间。待添加到编码区的5'和3'UTR序列的长度可以通过不同的方法改变,这些方法包括但不限于设计用于PCR的退火到UTR的不同区域的引物。使用此方法,本领域普通技术人员可以修改在转染转录的RNA后实现最佳翻译效率所需的5'和3'UTR长度。

[0234] 5'和3'UTR可以是目的基因的天然存在的内源5'和3'UTR。可替代地,可以通过将UTR序列掺入正向和反向引物中或通过模板的任何其他修饰来添加对目的基因而言不是内源的UTR序列。对目的基因而言不是内源的UTR序列的使用可用于修饰RNA的稳定性和/或翻译效率。例如,已知3'UTR序列中的富含AU的元件可以降低mRNA的稳定性。因此,可以基于本领域熟知的UTR的特性来选择或设计3'UTR以增加转录的RNA的稳定性。

[0235] 在一个实施方案中,5'UTR可以含有内源基因的科扎克序列。可替代地,当如上所述通过PCR添加对目的基因而言不是内源的5'UTR时,可以通过添加5'UTR序列来重新设计共有科扎克序列。科扎克序列可以增加一些RNA转录物的翻译效率,但未显现出所有RNA都需要科扎克序列才能够进行有效翻译。许多mRNA对科扎克序列的需求是本领域已知的。在其他实施方案中,5'UTR可以源自其RNA基因组在细胞中稳定的RNA病毒。在其他实施方案中,可以在3'或5'UTR中使用各种核苷酸类似物以阻止外切核酸酶对mRNA的降解。

[0236] 为了能够在不需要基因克隆的情况下从DNA模板合成RNA,转录启动子应在待转录序列的上游附接至DNA模板。当作为RNA聚合酶的启动子起作用的序列被添加到正向引物的5'端时,RNA聚合酶启动子被整合到待转录的开放阅读框上游的PCR产物中。在一个实施方案中,启动子是T7聚合酶启动子,如本文其他地方所述。其他有用的启动子包括但不限于T3和SP6 RNA聚合酶启动子。用于T7、T3和SP6启动子的共有核苷酸序列是本领域已知的。

[0237] 在一个实施方案中,mRNA具有5'端的帽和3'多(A)尾二者,这二者决定核糖体结合、翻译起始和mRNA在细胞中的稳定性。在环状DNA模板(例如,质粒DNA)上,RNA聚合酶产生不适于在真核细胞中表达的长多联体产物。在3'UTR端线性化的质粒DNA的转录导致正常大小的mRNA,即使其在转录后被多腺苷酸化,其在真核转染中也无效。在线性DNA模板上,噬菌体T7 RNA聚合酶可以将转录物的3'端延伸到模板的最后一个碱基之外(Schenborn和Mierendorf, *Nuc Acids Res.*, 13:6223-36 (1985); Nacheva和Berzal-Herranz, *Eur. J. Biochem.*, 270:1485-65 (2003))。

[0238] 将多A/T延伸段整合到DNA模板中的常规方法是分子克隆。然而,整合到质粒DNA中的多A/T序列可以引起质粒不稳定性,这就是为什么从细菌细胞获得的质粒DNA模板经常被缺失和其他异常高度污染的原因。这使得克隆程序不仅费力且耗时,而且常常不可靠。这就是为什么非常需要一种允许在不克隆的情况下构建具有多A/T 3'延伸段的DNA模板的方法。可以在PCR期间通过使用含有多T尾(如100T尾(大小可以是50-5000T))的反向引物,或在PCR之后通过任何其他方法(包括但不限于DNA连接或体外重组)产生转录DNA模板的多A/T区段。多(A)尾还为RNA提供稳定性并减少其降解。通常,多(A)尾的长度与转录的RNA的稳定性正相关。在一个实施方案中,多(A)尾在100与5000个腺苷之间。

[0239] 可以在体外转录后使用多(A)聚合酶(如大肠杆菌多A聚合酶(E-PAP))进一步延伸RNA的多(A)尾。在一个实施方案中,将多(A)尾的长度从100个核苷酸增加到300与400个核苷酸之间导致RNA的翻译效率增加约两倍。另外,不同化学基团与3'端的附接可以增加mRNA稳定性。这种附接可以含有经修饰的/人工的核苷酸、适配体和其他化合物。例如,可以使用多(A)聚合酶将ATP类似物掺入多(A)尾中。ATP类似物可以进一步增加RNA的稳定性。5'帽还为RNA分子提供稳定性。在优选的实施方案中,通过本文所公开的方法产生的RNA包含5'帽。使用本领域已知和本文所述的技术提供5'帽。Cougot等人, *Trends in Biochem. Sci.* 29: 436-444 (2001); Stepinski等人, *RNA* 7:1468-95 (2001); Elango等人, *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 330:958-966 (2005)。

[0240] 通过本文所公开的方法产生的RNA还可以含有内部核糖体进入位点(IRES)序列。IRES序列可以是任何病毒、染色体或人工设计的序列,所述序列启动不依赖帽的核糖体与mRNA的结合并促进翻译的启动。可以包括适用于细胞电穿孔的任何溶质,这些溶质可以含有促进细胞渗透性和活力的因子,如糖、肽、脂质、蛋白质、抗氧化物和表面活性剂。在一些

实施方案中,将RNA电穿孔到细胞中,如体外转录的RNA。

[0241] 可以将所公开的方法在癌症、干细胞、急性和慢性感染以及自身免疫性疾病领域中应用于基础研究和疗法中对宿主细胞活性的调节,包括评估基因修饰的宿主细胞杀伤靶癌细胞的能力。

[0242] 这些方法还提供了通过改变例如启动子或输入RNA的量在广泛范围内控制表达水平的能力,使得可以单独调节表达水平。此外,基于PCR的mRNA生产技术极大地促进了对具有不同结构及其结构域的组合的mRNA的设计。本发明的RNA转染方法的一个优点是RNA转染基本上是瞬时的且不含载体。可以在短暂的体外细胞激活后将RNA转基因作为最小表达盒而不需要任何另外的病毒序列递送至淋巴细胞并在其中表达。在这些条件下,转基因不太可能整合到宿主细胞基因组中。由于RNA的转染效率及其均匀修饰整个淋巴细胞群的能力,因此细胞的克隆不是必需的。

[0243] 因此,本发明提供了一种用于产生经修饰的免疫细胞或其前体细胞的方法,所述方法包括使用本文所述或本领域技术人员已知的任何基因编辑技术向免疫细胞中引入能够下调如本文所述的一个或多个内源性免疫基因的基因表达的一种或多种核酸。下调参与产生对细胞的免疫应答的内源基因(如TCR α 链、TCR β 链、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、HLA-I分子(例如, β -2微球蛋白、TAP1、TAP2、TAPBP或NLRC5)或HLA-II分子(例如,CIITA、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP或恒定链))的表达减少免疫介导的对经修饰的T细胞的排斥。例如,下调内源性TCR受体组分、MHC-I或MHC-II、 β -2微球蛋白、CIITA基因的表达去除T细胞上可能引起宿主免疫系统的排斥的同种异体抗原的表面呈递。在一些实施方案中,如通过电穿孔、转染或慢病毒或其他病毒转导将能够下调内源基因表达的核酸引入T细胞中。在一些实施方案中,本发明包括经修饰的T细胞,所述经修饰的T细胞包含能够下调内源基因表达的电穿孔的核酸。在一些实施方案中,通过病毒转导将核酸引入免疫细胞中。在一些实施方案中,病毒转导包括使免疫细胞与包含一种或多种核酸的病毒载体接触。在一个实施方案中,病毒载体选自逆转录病毒载体、仙台病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体和慢病毒载体。

B. 基因编辑免疫细胞的方法

[0244] 在一方面,本公开文本提供了一种基因编辑免疫细胞的方法,所述方法包括向免疫细胞中引入能够下调编码内源性免疫蛋白的一个或多个内源性免疫基因的基因表达的一种或多种核酸,所述内源性免疫蛋白选自CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、B2M、CIITA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP和恒定链(I α 链)。在一个实施方案中,基因编辑经修饰的免疫细胞的方法包括向免疫细胞中引入能够下调选自CD3 δ 、CD3 ϵ 或CD3 γ 的T细胞受体亚基的基因表达的核酸。在一个实施方案中,基因编辑经修饰的免疫细胞的方法包括向免疫细胞中引入能够下调选自B2M、TAP1、TAP2、TAPBP或NLRC5的HLA I类分子的基因表达的核酸。在一个实施方案中,基因编辑经修饰的免疫细胞的方法包括向免疫细胞中引入能够下调选自HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP或恒定链(I α 链)的HLA II类分子的基因表达的核酸。

[0245] 在一些实施方案中,基因编辑免疫细胞的方法包括向免疫细胞中引入能够下调CD3 δ 的基因表达以及选自B2M、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP、恒定链(I α 链)及其组合的HLA分子的基因表达的核酸。在一些实施方案中,基因编辑免疫细胞的方法包括向免疫细胞中引入能够下调CD3 ϵ 的基因表达以及选自B2M、TAP1、TAP2、TAPBP、

NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP、恒定链(Ii链)及其组合的HLA分子的基因表达的核酸。在一些实施方案中,基因编辑免疫细胞的方法包括向免疫细胞中引入能够下调CD3 γ 的基因表达以及选自B2M、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP、恒定链(Ii链)及其组合的HLA分子的基因表达的核酸。在一些实施方案中,基因编辑免疫细胞的方法包括向免疫细胞中引入能够下调CD3 γ 的基因表达以及CD3 ϵ 、B2M和CIITA的基因表达的核酸。

[0246] 在一些实施方案中,基因编辑免疫细胞的方法包括向免疫细胞中引入能够下调以下的基因表达的核酸:(1) CD3 ϵ 、B2M和RFX5;(2) CD3 ϵ 、B2M和RFXAP;(3) CD3 ϵ 、B2M和RFXANK;(4) CD3 ϵ 、B2M和HLA-DM;(5) CD3 ϵ 、B2M和Ii链;(6) CD3 ϵ 、TAP1和CIITA;(7) CD3 ϵ 、TAP1和RFX5;(8) CD3 ϵ 、TAP1和RFXAP;(9) CD3 ϵ 、TAP1和RFXANK;(10) CD3 ϵ 、TAP1和HLA-DM;(11) CD3 ϵ 、TAP1和Ii链;(12) CD3 ϵ 、TAP2和CIITA;(13) CD3 ϵ 、TAP2和RFX5;(14) CD3 ϵ 、TAP2和RFXAP;(15) CD3 ϵ 、TAP2和RFXANK;(16) CD3 ϵ 、TAP2和HLA-DM;(17) CD3 ϵ 、TAP2和Ii链;(18) CD3 ϵ 、NLRC5和CIITA;(19) CD3 ϵ 、NLRC5和RFX5;(20) CD3 ϵ 、NLRC5和RFXAP;(21) CD3 ϵ 、NLRC5和RFXANK;(22) CD3 ϵ 、NLRC5和HLA-DM;(23) CD3 ϵ 、NLRC5和Ii链;(24) CD3 ϵ 、TAPBP和CIITA;(25) CD3 ϵ 、TAPBP和RFX5;(26) CD3 ϵ 、TAPBP和RFXAP;(27) CD3 ϵ 、TAPBP和RFXANK;(28) CD3 ϵ 、TAPBP和HLA-DM;或(29) CD3 ϵ 、TAPBP和Ii链。

[0247] 在一些实施方案中,基因编辑免疫细胞的方法包括向免疫细胞中引入能够下调以下的基因表达的核酸:(1) CD3 δ 、B2M和RFX5;(2) CD3 δ 、B2M和RFXAP;(3) CD3 δ 、B2M和RFXANK;(4) CD3 δ 、B2M和HLA-DM;(5) CD3 δ 、B2M和Ii链;(6) CD3 δ 、TAP1和CIITA;(7) CD3 δ 、TAP1和RFX5;(8) CD3 δ 、TAP1和RFXAP;(9) CD3 δ 、TAP1和RFXANK;(10) CD3 δ 、TAP1和HLA-DM;(11) CD3 δ 、TAP1和Ii链;(12) CD3 δ 、TAP2和CIITA;(13) CD3 δ 、TAP2和RFX5;(14) CD3 δ 、TAP2和RFXAP;(15) CD3 δ 、TAP2和RFXANK;(16) CD3 δ 、TAP2和HLA-DM;(17) CD3 δ 、TAP2和Ii链;(18) CD3 δ 、NLRC5和CIITA;(19) CD3 δ 、NLRC5和RFX5;(20) CD3 δ 、NLRC5和RFXAP;(21) CD3 δ 、NLRC5和RFXANK;(22) CD3 δ 、NLRC5和HLA-DM;(23) CD3 δ 、NLRC5和Ii链;(24) CD3 δ 、TAPBP和CIITA;(25) CD3 δ 、TAPBP和RFX5;(26) CD3 δ 、TAPBP和RFXAP;(27) CD3 δ 、TAPBP和RFXANK;(28) CD3 δ 、TAPBP和HLA-DM;或(29) CD3 δ 、TAPBP和Ii链。

[0248] 在一些实施方案中,基因编辑免疫细胞的方法包括向免疫细胞中引入能够下调以下的基因表达的核酸:(1) CD3 γ 、B2M和RFX5;(2) CD3 γ 、B2M和RFXAP;(3) CD3 γ 、B2M和RFXANK;(4) CD3 γ 、B2M和HLA-DM;(5) CD3 γ 、B2M和Ii链;(6) CD3 γ 、TAP1和CIITA;(7) CD3 γ 、TAP1和RFX5;(8) CD3 γ 、TAP1和RFXAP;(9) CD3 γ 、TAP1和RFXANK;(10) CD3 γ 、TAP1和HLA-DM;(11) CD3 γ 、TAP1和Ii链;(12) CD3 γ 、TAP2和CIITA;(13) CD3 γ 、TAP2和RFX5;(14) CD3 γ 、TAP2和RFXAP;(15) CD3 γ 、TAP2和RFXANK;(16) CD3 γ 、TAP2和HLA-DM;(17) CD3 γ 、TAP2和Ii链;(18) CD3 γ 、NLRC5和CIITA;(19) CD3 γ 、NLRC5和RFX5;(20) CD3 γ 、NLRC5和RFXAP;(21) CD3 γ 、NLRC5和RFXANK;(22) CD3 γ 、NLRC5和HLA-DM;(23) CD3 γ 、NLRC5和Ii链;(24) CD3 γ 、TAPBP和CIITA;(25) CD3 γ 、TAPBP和RFX5;(26) CD3 γ 、TAPBP和RFXAP;(27) CD3 γ 、TAPBP和RFXANK;(28) CD3 γ 、TAPBP和HLA-DM或(29) CD3 γ 、TAPBP和Ii链。

[0249] 在一些实施方案中,基因编辑免疫细胞的方法包括向免疫细胞中引入能够下调基因表达的核酸,所述核酸包含选自反义RNA、antigomer RNA、siRNA、shRNA和CRISPR系统的基因编辑系统。可以通过例如反义RNA、antigomer RNA、siRNA、shRNA、CRISPR系统等下调、敲低、降低和/或抑制内源性免疫基因表达。在一个实施方案中,基因编辑免疫细胞的方法

包括向免疫细胞中引入能够下调基因表达的核酸,所述核酸包含CRISPR相关(Cas)(CRISPR-Cas)核酸内切酶系统和指导RNA。在一些实施方案中,能够下调基因表达的核酸包含选自Cas3、Cas4、Cas8a、Cas8b、Cas9、Cas10、Cas10d、Cas12a、Cas12b、Cas12d、Cas12e、Cas12f、Cas12g、Cas12h、Cas12i、Cas13、Cas14、CasX、Cse1、Csy1、Csn2、Cpf1、C2c1、Csm2、Cmr5、Fok1、酿脓链球菌Cas9(spCas9)、金黄色葡萄球菌Cas9(saCas9)、MAD7核酸酶(V型CRISPR核酸酶)及其任何组合的Cas核酸内切酶。基因编辑细胞的方法是本领域熟知的并且在本文中描述。

[0250] 在一些实施方案中,基因编辑免疫细胞的方法包括向免疫细胞中引入CRISPR/Cas,以破坏经修饰的细胞(例如,经修饰的T细胞)中的一个或多个内源性免疫基因。在一些实施方案中,使用CRISPR/Cas9破坏选自CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、B2M、CIITA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP和恒定链(Ii链)的一种或多种内源性免疫蛋白。在某些示例性实施方案中,使用CRISPR/Cas9破坏内源性CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、B2M、CIITA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP和恒定链(Ii链)中的一种或多种,从而导致CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、B2M、CIITA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP和恒定链(Ii链)的下调。用于破坏内源性TRAC、TRBC、B2M、CIITA和/或PD1中的一种或多种的合适的gRNA在图26和图27中列出。在一些实施方案中,基因编辑免疫细胞的方法包括向免疫细胞中引入CRISPR/Cas和指导RNA,以破坏经修饰的细胞(例如,经修饰的T细胞)中的一个或多个内源性免疫基因。在一个实施方案中,基因编辑免疫细胞的方法包括向免疫细胞中引入CRISPR/Cas和指导RNA,并且指导RNA包含与一个或多个基因座内的序列互补的指导序列,所述一个或多个基因座选自CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、B2M、CIITA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP和恒定链(Ii链)。用于破坏内源性CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、B2M、CIITA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP、恒定链(Ii链)中的一种或多种的合适的指导RNA(gRNA)在表4中列出。

[0251] 在一个实施方案中,基因编辑免疫细胞的方法包括向免疫细胞中引入能够下调基因表达的核酸,所述核酸包含TALEN基因编辑系统。在一个实施方案中,基因编辑免疫细胞的方法包括向免疫细胞中引入能够下调基因表达的核酸,所述核酸包含锌指核酸酶(ZFN)基因编辑系统。在一个实施方案中,基因编辑免疫细胞的方法包括向免疫细胞中引入能够下调基因表达的核酸,所述核酸包含兆核酸酶基因编辑系统。在一个实施方案中,基因编辑免疫细胞的方法包括向免疫细胞中引入能够下调基因表达的核酸,所述核酸包含兆TALEN基因编辑系统。在一个实施方案中,基因编辑经修饰的免疫细胞的方法包括向免疫细胞中引入能够下调基因表达的核酸,所述核酸包含选自反义RNA、antigomer RNA、RNAi、siRNA或shRNA的基因沉默系统。

C. 经修饰的免疫细胞的扩增

[0252] 在又一个实施方案中,产生如本文所述的经修饰的T细胞的方法进一步包括扩增经修饰的免疫细胞以产生经修饰的T细胞群。无论是在修饰免疫细胞以表达CAR、TCR、显性负性受体和/或开关受体之前还是之后,都可以使用本领域已知的方法激活和在数量上扩增经修饰的细胞。例如,通过与表面接触来扩增本发明的免疫细胞,所述表面附接有刺激CD3/TCR复合物相关信号的试剂和刺激经修饰的免疫细胞表面上的共刺激分子的配体。特别地,可以通过与固定在表面上的抗CD3抗体或其抗原结合片段或抗CD2抗体接触,或者通

过与蛋白激酶C激活剂(例如, 苔藓抑素)结合钙离子载体接触来刺激经修饰的免疫细胞群。对于经修饰的免疫细胞表面上的辅助分子的共刺激, 使用结合辅助分子的配体。例如, 经修饰的免疫细胞可以在适于刺激免疫细胞增殖的条件下与抗CD3抗体和抗CD28抗体接触。抗CD28抗体的例子包括9.3、B-T3、XR-CD28(Diaclone, 法国贝桑松), 并且这些可以用于本发明, 本领域已知的其他方法和试剂也可以用于本发明。

[0253] 通过本文所公开的方法扩增经修饰的免疫细胞可以倍增约10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、200倍、300倍、400倍、500倍、600倍、700倍、800倍、900倍、1000倍、2000倍、3000倍、4000倍、5000倍、6000倍、7000倍、8000倍、9000倍、10,000倍、100,000倍、1,000,000倍、10,000,000倍或更大、以及之间的任何和所有整数或部分整数。在一个实施方案中, 经修饰的免疫细胞在约20倍至约50倍的范围内扩增。

[0254] 在培养后, 可以将经修饰的免疫细胞在培养装置中的细胞培养基中孵育一段时间或直至细胞达到用于最佳传代的汇合度或高细胞密度, 然后将细胞传递至另一培养装置。培养装置可以是通常用于体外培养细胞的任何培养装置。优选地, 在将细胞传递至另一培养装置之前, 汇合水平为70%或更高。更优选地, 汇合水平为90%或更高。一段时间可以是适合细胞体外培养的任何时间。免疫细胞培养基可以在免疫细胞培养期间的任何时间更换。优选地, 约每2至3天更换免疫细胞培养基。然后从培养装置中收获免疫细胞, 由此经修饰的免疫细胞可以立即使用或冷冻保存以储存以备后用。在一个实施方案中, 本发明包括冷冻保存扩增的经修饰的免疫细胞。在将核酸引入免疫细胞之前, 将冷冻保存的免疫细胞解冻。

[0255] 在另一个实施方案中, 方法包括分离免疫细胞和扩增免疫细胞。在另一个实施方案中, 本发明进一步包括在扩增前冷冻保存免疫细胞。在又一个实施方案中, 将冷冻保存的免疫细胞解冻以用于用编码嵌合膜蛋白的RNA进行电穿孔。

[0256] 在又一个实施方案中, 产生如本文所述的经修饰的T细胞的方法进一步包括离体扩增经修饰的免疫细胞。在一些实施方案中, 经修饰的免疫细胞的离体培养和扩增包括添加细胞生长因子。然而, 也可以添加其他因子, 如f1t3-L、IL-1、IL-3和c-kit配体。在一些实施方案中, 扩增经修饰的T细胞包括将经修饰的T细胞与选自f1t3-L、IL-1、IL-3、IL-2、IL-7、IL-15、IL-18、IL-21、TGF β 、IL-10和c-kit配体的因子一起培养。如本文所述的培养步骤(与如本文所述的试剂接触或在电穿孔后)可以非常短, 例如小于24小时, 如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22或23小时。培养步骤可以更长, 例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14天或更多天。

[0257] 各种术语用于描述培养中的细胞。细胞培养物通常是指取自活生物体并在受控条件下生长的细胞。原代细胞培养物是直接取自生物体且在第一次传代培养之前的细胞、组织或器官的培养物。当将细胞置于在促进细胞生长和/或分裂的条件下的生长培养基中时, 细胞在培养物中扩增, 从而产生更大的细胞群。当细胞在培养物中扩增时, 细胞增殖速率通常通过细胞数量倍增所需的时间(也称为倍增时间)量来测量。

[0258] 适合用于免疫细胞培养的条件包括适当的培养基(例如, 极限必需培养基或RPMI培养基1640或X-vivo 15(Lonza)), 其可以含有增殖和活力所需的因子, 包括血清(例如, 胎牛血清或人血清)、白细胞介素-2(IL-2)、胰岛素、IFN- γ 、IL-4、IL-7、GM-CSF、IL-10、IL-12、IL-15、TGF- β 和TNF-a或熟练技术人员已知的用于细胞生长的任何其他添加剂。用于细

胞生长的其他添加剂包括但不限于表面活性剂、人血浆蛋白粉 (plasmanate) 和还原剂 (如 N-乙酰基-半胱氨酸和 2-巯基乙醇)。

[0259] 培养基可以包括 RPMI 1640、AIM-V、DMEM、MEM、 α -MEM、F-12、X-Vivo 15 和 X-Vivo 20、Optimizier, 其添加有氨基酸、丙酮酸钠和维生素, 无血清或补充有适当量的血清 (或血浆) 或一组限定的激素和/或足够用于免疫细胞生长和扩增的量的一种或多种细胞因子。抗生素 (例如, 青霉素和链霉素) 仅包括于实验培养物中, 而不包括在要输注到受试者体内的细胞培养物中。将靶细胞维持在支持生长所需的条件下, 例如, 适当温度 (例如, 37°C) 和气氛 (例如, 空气加 5% CO₂)。

[0260] 用于培养免疫细胞的培养基可以包含可共刺激免疫细胞的试剂。例如, 可刺激 CD3 的试剂是针对 CD3 的抗体, 并且可刺激 CD28 的试剂是针对 CD28 的抗体。如本文所公开的数据所展示的, 这是因为通过本文所公开的方法分离的细胞可以扩增大约 10 倍、20 倍、30 倍、40 倍、50 倍、60 倍、70 倍、80 倍、90 倍、100 倍、200 倍、300 倍、400 倍、500 倍、600 倍、700 倍、800 倍、900 倍、1000 倍、2000 倍、3000 倍、4000 倍、5000 倍、6000 倍、7000 倍、8000 倍、9000 倍、10,000 倍、100,000 倍、1,000,000 倍、10,000,000 倍或更大。在一个实施方案中, 通过培养电穿孔的群体, 免疫细胞在约 20 倍至约 50 倍或更多的范围内扩增。在一个实施方案中, 经由抗 CD3 抗体包被的 KT64.86 人工抗原呈递细胞 (aAPC) 扩增人调节性 T 细胞。用于扩增和激活免疫细胞的方法可以见于美国专利号: 7,754,482、8,722,400 和 9,555,105, 将文献内容以其整体并入本文。

D. 免疫细胞的来源

[0261] 在扩增之前, 从受试者获得免疫细胞的来源以用于离体操作。用于离体操作的靶细胞的来源还可以包括例如自体或异源供体血液、脐带血或骨髓。例如, 免疫细胞的来源可以来自有待于用本发明的经修饰的免疫细胞治疗的受试者, 例如受试者的血液、受试者的脐带血或受试者的骨髓。受试者的非限制性例子包括人、狗、猫、小鼠、大鼠及其转基因物种。优选地, 受试者是人。

[0262] 免疫细胞可以获自多种来源, 包括血液、外周血单个核细胞、骨髓、淋巴组织、脾组织、脐带、淋巴或淋巴样器官。免疫细胞是免疫系统的细胞, 如先天或适应性免疫的细胞, 例如髓样或淋巴样细胞, 包括淋巴细胞, 通常是 T 细胞和/或 NK 细胞。其他示例性细胞包括干细胞, 如多潜能干细胞和多能干细胞, 包括诱导多能干细胞 (iPSC)。在一些方面, 细胞是人细胞。关于待治疗的受试者, 细胞可以是同种异体的和/或自体的。细胞通常是原代细胞, 如直接从受试者分离和/或从受试者分离并冷冻的那些。

[0263] 在某些实施方案中, 免疫细胞是 T 细胞, 例如 CD8⁺ T 细胞 (例如, CD8⁺ 幼稚 T 细胞、中枢记忆 T 细胞或效应记忆 T 细胞)、CD4⁺ T 细胞、自然杀伤 T 细胞 (NKT 细胞)、调节性 T 细胞 (Treg)、干细胞记忆 T 细胞、淋巴样祖细胞、造血干细胞、自然杀伤细胞 (NK 细胞) 或树突细胞。在一些实施方案中, 细胞是单核细胞或粒细胞, 例如骨髓细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、树突细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞和/或嗜碱性粒细胞。在一个实施方案中, 靶细胞是诱导多能干 (iPS) 细胞或源自 iPS 细胞的细胞, 例如从受试者产生的 iPS 细胞, 其被操纵以改变 (例如, 诱导突变) 或操纵一个或多个靶基因的表达并分化成例如 T 细胞, 例如 CD8⁺ T 细胞 (例如, CD8⁺ 幼稚 T 细胞、中枢记忆 T 细胞或效应记忆 T 细胞)、CD4⁺ T 细胞、干细胞记忆 T 细胞、淋巴样祖细胞或造血干细胞。

[0264] 在一些实施方案中,细胞包括T细胞或其他细胞类型的一个或多个亚组,如整个T细胞群、CD4+细胞、CD8+细胞及其亚群,如由以下各项所定义的那些亚群:功能、激活状态、成熟度、分化的可能性、扩增、再循环、定位和/或持久能力、抗原特异性、抗原受体类型、在特定器官或区室中的存在、标记物或细胞因子分泌谱和/或分化程度。

[0265] T细胞和/或CD4+和/或CD8+ T细胞的亚型和亚群包括幼稚T (TN) 细胞、效应T细胞 (TEFF)、记忆T细胞及其亚型(如干细胞记忆T (TSCM)、中枢记忆T (TCM)、效应记忆T (TEM) 或终末分化效应记忆T细胞)、肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL)、未成熟T细胞、成熟T细胞、辅助T细胞、细胞毒性T细胞、粘膜相关不变T (MAIT) 细胞、天然存在和适应性调节T (Treg) 细胞、辅助T细胞(如TH1细胞、TH2细胞、TH3细胞、TH17细胞、TH9细胞、TH22细胞、滤泡辅助细胞T细胞)、 α/β T细胞和 δ/γ T细胞。在某些实施方案中,可以使用任何数量的本领域中可获得的T细胞系。

[0266] 在一些实施方案中,方法包括从受试者分离免疫细胞,制备、加工、培养免疫细胞和/或使免疫细胞工程化。在一些实施方案中,工程化细胞的制备包括一个或多个培养和/或制备步骤。如所述用于工程化的细胞可以从样品(如生物样品,例如获自或源自受试者的一种)中分离。在一些实施方案中,分离出细胞的受试者是患有疾病或病症或需要细胞疗法或将被施用细胞疗法的受试者。在一些实施方案中,受试者是需要特定治疗性干预(如过继细胞疗法,分离、处理和/或工程化细胞以用于所述过继细胞疗法)的人。因此,在一些实施方案中,细胞是原代细胞,例如原代人细胞。样品包括直接取自受试者的组织、流体和其他样品,以及来自一个或多个加工步骤(如分离、离心、基因工程化(例如用病毒载体转导)、洗涤和/或孵育)的样品。生物样品可以是直接从生物来源获得的样品或经过加工的样品。生物样品包括但不限于体液(如血液、血浆、血清、脑脊液、滑液、尿液和汗液)、组织和器官样品,包括由其获得的加工样品。

[0267] 在某些方面,免疫细胞从其中来源或分离的样品是血液或血液来源的样品,或者是或源自单采术或白细胞单采术产物。示例性样品包括全血、外周血单个核细胞 (PBMC)、白细胞、骨髓、胸腺、组织活检、肿瘤、白血病、淋巴瘤、淋巴结、肠相关淋巴组织、粘膜相关淋巴组织、脾脏、其他淋巴组织、肝脏、肺、胃、肠、结肠、肾脏、胰腺、乳房、骨、前列腺、宫颈、睾丸、卵巢、扁桃体或其他器官和/或源自它们的细胞。在细胞疗法(例如过继细胞疗法)的背景下,样品包括来自自体 and 同种异体来源的样品。

[0268] 在一些实施方案中,细胞源自细胞系,例如T细胞系。在一些实施方案中,细胞获自异种来源,例如获自小鼠、大鼠、非人灵长类动物和猪。在一些实施方案中,细胞的分离包括一个或多个制备和/或基于非亲和力的细胞分离步骤。在一些例子中,将细胞在存在一种或多种试剂的情况下洗涤、离心和/或孵育,例如以去除不需要的组分、针对所需组分进行富集、裂解或去除对特定试剂敏感的细胞。在一些例子中,基于一种或多种特性(如密度、粘附特性、尺寸、对特定组分的敏感性和/或抗性)分离细胞。

[0269] 在一些例子中,来自受试者的循环血液的细胞例如通过单采术或白细胞单采术获得。在某些方面,样品含有淋巴细胞,包括T细胞、单核细胞、粒细胞、B细胞、其他有核白细胞、红细胞和/或血小板,并且在某些方面含有除红细胞和血小板之外的细胞。在一些实施方案中,洗涤从受试者收集的血细胞,例如以去除血浆级分并将细胞置于适当的缓冲液或介质中以用于随后的加工步骤。在一些实施方案中,用磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 洗涤所述细胞。在某些方面,根据制造商的说明书,通过切向流过滤 (TFF) 完成洗涤步骤。在某些实施方

案中,在洗涤后将细胞重悬于多种生物相容的缓冲液中。在某些实施方案中,去除血细胞样品的组分并将所述细胞直接重悬于培养基中。在一些实施方案中,方法包括基于密度的细胞分离方法,如通过裂解红细胞并通过Percoll或Ficoll梯度离心而从外周血制备白细胞。

[0270] 在一个实施方案中,从个体的循环血液获得的免疫细胞是通过单采术或白细胞单采术获得的。单采术产物通常含有淋巴细胞,包括T细胞、单核细胞、粒细胞、B细胞、其他有核白细胞、红细胞和血小板。可以洗涤通过单采术收集的细胞以去除血浆级分并将细胞置于适当的缓冲液或培养基(如磷酸盐缓冲盐水(PBS)或洗涤溶液,其缺乏钙并且可能缺乏镁或可能缺乏许多(如果不是全部)二价阳离子)中,以用于随后的加工步骤。如本领域普通技术人员应容易地了解的,洗涤步骤可以通过本领域技术人员已知的方法来完成,如通过根据制造商的说明书使用半自动化“流通式”离心机(例如,Cobe2991细胞处理器、Baxter CytoMate或Haemonetics Cell Saver 5)来完成。洗涤后,可以将细胞重悬于多种生物相容的缓冲液中,如例如无Ca²⁺、无Mg²⁺的PBS、PlasmaLyte A或者具有或没有缓冲液的另一盐溶液。在一些实施方案中,可以去除单采术样品的不希望组分,并将细胞直接重悬于培养基中。

[0271] 在一些实施方案中,分离方法包括基于一种或多种特定分子(如表面标记物(例如表面蛋白)、细胞内标记物或核酸)在细胞中的表达或存在来分开不同的细胞类型。在一些实施方案中,可以使用任何已知的基于此类标记物的用于分离的方法。在一些实施方案中,分离是基于亲和力或免疫亲和力的分离。例如,在某些方面,分离包括基于细胞的一种或多种标记物(通常为细胞表面标记物)的表达或表达水平来分离细胞和细胞群体,例如,通过与特异性结合至这样的标记物的抗体或结合配偶体一起孵育,之后通常进行洗涤步骤并将已经结合所述抗体或结合配偶体的细胞与尚未结合至所述抗体或结合配偶体的那些细胞分离。此类分离步骤可以基于阳性选择,其中保留已经结合试剂的细胞以供进一步使用,和/或基于阴性选择,其中保留上未结合至抗体或结合配偶体的细胞。在一些例子中,保留两种级分以供进一步使用。在某些方面,在没有可用于特异性鉴定异质群体中的细胞类型的抗体的情况下,阴性选择可能特别有用,使得最好基于由除所需群体之外的细胞表达的标记物进行分离。分离不需要导致100%富集或去除特定细胞群或表达特定标记物的细胞。例如,针对特定类型的细胞(如表达标记物的那些)的阳性选择或富集是指增加此类细胞的数量或百分比,但不需要导致不表达所述标记物的细胞的完全不存在。同样地,特定类型的细胞(如表达标记物的那些)的阴性选择、去除或耗尽是指减少此类细胞的数量或百分比,但不需要导致所有此类细胞的完全去除。在某些示例性实施方案中,进行多轮分离步骤,其中来自一个步骤的阳性或阴性选择的级分经受另一个分离步骤,如随后的阳性或阴性选择。在某些示例性实施方案中,单个分离步骤可以同时耗尽表达多种标记物的细胞,如通过将细胞与多种抗体或结合配偶体(每种抗体或结合配偶体对被靶向用于阴性选择的标记物具特异性)一起孵育。同样地,通过将细胞与在各种细胞类型上表达的多种抗体或结合配偶体一起孵育,可以同时阳性选择多种细胞类型。

[0272] 在一些实施方案中,一个或多个T细胞群富集或耗尽对于一种或多种特定标记物(如表面标记物)呈阳性(标记物+)或表达高水平的一种或多种特定标记物(如表面标记物)(标记物高)的细胞、或对于一种或多种标记物呈阴性(标记物-)或表达相对低水平的一种或多种标记物(标记物低)的细胞。例如,在某些方面,将T细胞的特定亚群,如对一种或多种

表面标记物呈阳性或高水平表达的细胞(例如CD28⁺、CD62L⁺、CCR7⁺、CD27⁺、CD127⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD45RA⁺和/或CD45RO⁺ T细胞)通过阳性或阴性选择技术来分离。在一些情况下,此类标记物是在某些T细胞群(如非记忆细胞)上不存在或以相对较低的水平表达,但在某些其他T细胞群(如记忆细胞)上存在或以相对较高的水平表达的那些标记物。在一个实施方案中,针对对CD45RO、CCR7、CD28、CD27、CD44、CD127和/或CD62L呈阳性或表达高表面水平的CD45RO、CCR7、CD28、CD27、CD44、CD127和/或CD62L的细胞,对细胞(如CD8⁺细胞或T细胞,例如CD3⁺细胞)进行富集(即,阳性选择),和/或针对对CD45RA呈阳性或表达高水平的CD45RA的细胞,对细胞(如CD8⁺细胞或T细胞,例如CD3⁺细胞)进行耗尽(例如,阴性选择)。在一些实施方案中,针对对CD122、CD95、CD25、CD27和/或IL7-Ra (CD 127)呈阳性或表达高表面水平的CD122、CD95、CD25、CD27和/或IL7-Ra (CD 127)的细胞,对细胞进行富集或耗尽。在某些示例性实施方案中,针对对CD45RO呈阳性(或对CD45RA呈阴性)并且对CD62L呈阳性的细胞,对CD8⁺ T细胞进行富集。例如,CD3⁺、CD28⁺ T细胞可以使用CD3/CD28缀合的磁珠(例如, DYNABEADS[®]M-450CD3/CD28 T细胞扩增器)进行阳性选择。

[0273] 在一些实施方案中,通过对非T细胞(如B细胞、单核细胞或其他白细胞)上表达的标记物(如CD14)进行阴性选择,将T细胞从PBMC样品分离。在某些方面,CD4⁺或CD8⁺选择步骤用于分离CD4⁺辅助细胞和CD8⁺细胞毒性T细胞。通过对在一种或多种幼稚、记忆和/或效应T细胞亚群上表达或以相对较高程度表达的标记物的阳性或阴性选择,可以将此类CD4⁺和CD8⁺群体进一步分类成亚群。在一些实施方案中,如通过基于与相应亚群相关的表面抗原进行阳性或阴性选择,将CD8⁺细胞针对幼稚、中枢记忆、效应子记忆和/或中枢记忆干细胞进一步富集或耗尽。在一些实施方案中,针对中枢记忆T(TCM)细胞进行富集以增加功效,如以改善给予后的长期存活、扩增和/或移植,这在某些方面在此类亚群中特别稳健。

[0274] 在一些实施方案中,组合富含TCM的CD8⁺ T细胞与CD4⁺ T细胞进一步增强功效。在一些实施方案中,记忆T细胞存在于CD8⁺外周血淋巴细胞的CD62L⁺和CD62L⁻亚组中。可以例如使用抗CD8和抗CD62L抗体将PBMC针对CD62L⁻CD8⁺和/或CD62L⁺CD8⁺级分进行富集或耗尽。在一些实施方案中,CD4⁺ T细胞群和/或CD8⁺ T细胞群富含中枢记忆(TCM)细胞。在一些实施方案中,中枢记忆T(TCM)细胞的富集是基于CD45RO、CD62L、CCR7、CD28、CD5和/或CD127的阳性或高表面表达;在某些方面,它是基于对表达或高度表达CD45RA和/或颗粒酶B的细胞的阴性选择。在某些方面,通过表达CD4、CD 14、CD45RA的细胞的耗尽和表达CD62L的细胞的阳性选择或富集来进行富含TCM细胞的CD8⁺群体的分离。在一个方面,中枢记忆T(TCM)细胞的富集从基于CD4表达所选择的阴性细胞级分开始进行,对阴性细胞级分基于CD 14和CD45RA的表达进行阴性选择且基于CD62L进行阳性选择。此类选择在某些方面是同时进行的,而在其他方面按任何顺序依序进行。在一些方面,用于制备CD8⁺细胞群或亚群的相同的基于CD4表达的选择步骤也用于生成CD4⁺细胞群或亚群,使得来自基于CD4的分离的阳性和阴性级分被保留并用于所述方法的后续步骤中,任选地在—个或多个其他阳性或阴性选择步骤之后。

[0275] 通过鉴定具有细胞表面抗原的细胞群,将CD4⁺ T辅助细胞分类为幼稚、中枢记忆和效应细胞。CD4⁺淋巴细胞可通过标准方法获得。在一些实施方案中,幼稚CD4⁺ T淋巴细胞是CD45RO⁻、CD45RA⁺、CD62L⁺、CD4⁺ T细胞。在一些实施方案中,中枢记忆CD4⁺细胞是CD62L⁺和CD45RO⁺。在一些实施方案中,效应CD4⁺细胞是CD62L⁻和CD45RO⁻。在一个例子中,为了通过

阴性选择富集CD4⁺细胞,单克隆抗体混合剂通常包括针对CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR和CDS的抗体。在一些实施方案中,抗体或结合配偶体与固体支持物或基质(如磁珠或顺磁珠)结合,以允许细胞分离以用于阳性和/或阴性选择。

[0276] 在一些实施方案中,在基因工程化之前或与基因工程化结合孵育和/或培养细胞。孵育步骤可以包括培养、培育、刺激、激活和/或繁殖。在一些实施方案中,在存在刺激条件或刺激剂的情况下孵育组合物或细胞。此类条件包括针对以下而设计的那些条件:在群体中诱导细胞的增殖、扩增、激活和/或存活以模拟抗原暴露和/或引发细胞用于遗传工程化(如用于引入重组抗原受体)。条件可以包括以下中的一种或多种:特定培养基、温度、氧含量、二氧化碳含量、时间、药剂(例如,营养素、氨基酸、抗生素、离子和/或刺激因子(如细胞因子、趋化因子、抗原、结合配偶体、融合蛋白、重组可溶性受体和任何其他旨在激活细胞的药剂))。在一些实施方案中,刺激条件或药剂包括一种或多种药剂(例如配体),其能够激活TCR复合物的细胞内信号传导结构域。在某些方面,试剂在T细胞中开启或启动TCR/CD3细胞内信号传导级联。此类药剂可以包括例如结合至固体支持物(如珠)的抗体,如对TCR组分和/或共刺激受体具有特异性的抗体(例如抗CD3、抗CD28);和/或一种或多种细胞因子。任选地,扩增方法还可以包括向培养基中添加抗CD3和/或抗CD28抗体(例如,以至少约0.5ng/ml的浓度)的步骤。在一些实施方案中,刺激剂包括IL-2和/或IL-15,例如,浓度为至少约10单位/ml的IL-2。

[0277] 在另一个实施方案中,通过裂解红细胞并且耗尽单核细胞(例如通过经由PERCOLL™梯度离心)从外周血中分离T细胞。可替代地,可以从脐带分离T细胞。在任何情况下,可以通过阳性或阴性选择技术进一步分离特定的T细胞亚群。

[0278] 可以耗尽如此分离的脐带血单个核细胞中表达某些抗原的细胞,所述抗原包括但不限于CD34、CDS、CD14、CD19和CD56。可以使用分离的抗体、包含抗体的生物样品(如腹水)、与物理支持物结合的抗体和细胞结合的抗体来完成这些细胞的耗尽。

[0279] 通过阴性选择富集T细胞群可以使用针对阴性选择的细胞独有的表面标记物的抗体的组合来完成。示例性方法是经由使用针对阴性选择的细胞上存在的细胞表面标记物的单克隆抗体混合物(cocktail)的阴性磁性免疫粘附或流式细胞术进行细胞分选和/或选择。例如,为了通过阴性选择富集CD4⁺细胞,单克隆抗体混合物通常包括针对CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR和CDS的抗体。

[0280] 对于通过阳性或阴性选择分离所需细胞群体,可以改变细胞和表面(例如颗粒,如珠)的浓度。在某些实施方案中,可能希望显著减小将珠与细胞混合在一起的体积(即,增加细胞浓度),以确保细胞与珠的最大接触。例如,在一个实施方案中,使用20亿个细胞/ml的浓度。在一个实施方案中,使用10亿个细胞/ml的浓度。在另一实施方案中,使用大于1亿个细胞/ml的浓度。在另一实施方案中,使用1000万、1500万、2000万、2500万、3000万、3500万、4000万、4500万或5000万个细胞/ml的细胞浓度。在又一个实施方案中,使用7500万、8000万、8500万、9000万、9500万或1亿个细胞/ml的细胞浓度。在另外的实施方案中,可以使用1.25或1.5亿个细胞/ml的浓度。使用高浓度可以导致增加的细胞产量、细胞激活和细胞扩增。

[0281] T细胞也可以在洗涤步骤后冷冻,这不需要单核细胞去除步骤。不希望受到理论束缚,冷冻和后续解冻步骤通过去除细胞群体中的粒细胞和在一定程度上去除单核细胞来提

供更均匀的产物。在去除血浆和血小板的洗涤步骤之后,可以将细胞悬浮于冷冻溶液中。尽管许多冷冻溶液和参数在本领域中是已知的并且将在此背景下有用,但是在非限制性例子中一种方法涉及使用含有20%DMSO和8%人血清白蛋白的PBS或其他合适的细胞冷冻介质。然后将细胞以1℃/分钟的速率冷冻至-80℃并储存在液氮储罐的气相中。可以使用其他受控冷冻方法,以及在-20℃下或在液氮中立即不受控冷冻。

[0282] 在一个实施方案中,T细胞群包含在细胞内,所述细胞如外周血单个核细胞、脐带血细胞、纯化的T细胞群和T细胞系。在另一个实施方案中,外周血单个核细胞包含T细胞群。在又一个实施方案中,纯化的T细胞包含T细胞群。

[0283] 在一些实施方案中,免疫细胞获自血液样品、全血样品、外周血单个核细胞(PBMC)样品或单采术样品。在一些例子中,来自受试者的循环血液的细胞例如通过单采术或白细胞单采术获得。在一个实施方案中,从个体的循环血液获得的免疫细胞是通过单采术或白细胞单采术获得的。单采术产物通常含有淋巴细胞,包括T细胞、单核细胞、粒细胞、B细胞、其他有核白细胞、红细胞和血小板。在一些实施方案中,单采术样品是冷冻保存的样品。在一些实施方案中,单采术样品是新鲜样品。在一些实施方案中,免疫细胞获自人受试者。

VII. 组合物

[0284] 在一方面,本发明提供了一种包含本文所述的经修饰的免疫细胞或从本文所述的任何方法获得的经修饰的免疫细胞群的组合物。在一些实施方案中,本发明的组合物可以包含如本文所述的经修饰的未刺激的T细胞或经修饰的刺激的T细胞。在一些实施方案中,组合物可以包含药物组合物。在一些实施方案中,组合物可以包含药物组合物,并且进一步包含一种或多种药学上或生理学上可接受的载体、稀释剂、佐剂或赋形剂。此类组合物可以包含缓冲液,如中性缓冲盐水、磷酸盐缓冲盐水等;碳水化合物,如葡萄糖、甘露糖、蔗糖或葡聚糖、甘露醇;蛋白质;多肽或氨基酸,如甘氨酸;抗氧化剂;螯合剂,如EDTA或谷胱甘肽;佐剂(例如,氢氧化铝);和防腐剂。本发明的组合物优选地被配制用于肠胃外施用(例如,静脉内施用)。在一些实施方案中,可向有需要的受试者施用治疗有效量的包含经修饰的T细胞的药物组合物。

VIII. 治疗方法

[0285] 在一方面,本公开文本提供了一种用于过继细胞转移疗法的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用本发明的经修饰的免疫细胞。在一些实施方案中,本公开了一种治疗受试者的疾病或病症的方法,所述方法包括向受试者施用本文所述的经修饰的T细胞群,例如,本文所述的经修饰的未刺激的T细胞群或经修饰的刺激的T细胞群。在一些实施方案中,本发明包括一种治疗受试者的疾病或病症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用包含本文所述的经修饰的免疫细胞的组合物。在一些实施方案中,治疗受试者的疾病或病症的方法包括向有需要的受试者施用经修饰的免疫细胞(例如,T细胞),所述经修饰的免疫细胞包含在一个或多个基因座中的插入和/或缺失,所述一个或多个基因座各自编码选自CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、B2M、CIITA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP和恒定链(I α 链)的内源性免疫蛋白;以及编码嵌合抗原受体(CAR)、工程化T细胞受体(TCR)、杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR)、抗原结合多肽、细胞表面受体配体或肿瘤抗原的外源性核酸。在一些实施方案中,插入和/或缺失能够下调一个或多个内源性免疫基因的基因表达。

[0286] 在一些实施方案中,经修饰的免疫细胞进一步包含显性负性受体、开关受体、趋化因子、趋化因子受体、细胞因子、细胞因子受体、IL-7、IL-7R、IL-15、IL-15R、IL-21、IL-18、CCL21、CCL19或其组合。在一些情形下,疾病是癌症,任选地实体瘤或血液恶性肿瘤。在一些情形下,经修饰的未刺激的T细胞或经修饰的刺激的T细胞各自表达抗原结合结构域,该抗原结合结构域对由癌症表达的抗原具有特异性。在一些实施方案中,方法包括向有需要的受试者施用经修饰的免疫细胞(例如,T细胞),所述经修饰的免疫细胞包含如本文其他地方所述的能够下调基因表达的核酸、TCR、KIR、CAR、显性负性受体和/或开关受体。在一些实施方案中,经修饰的免疫细胞是通用TCR重定向的T细胞(例如,同种异体T细胞)。

[0287] 在一些实施方案中,癌症是实体瘤。示例性实体瘤包括但不限于膀胱癌、骨癌、脑癌(例如,神经胶质瘤、胶质母细胞瘤、神经母细胞瘤)、乳腺癌、结直肠癌、食管癌、眼癌、头颈癌、肾癌、肺癌、黑色素瘤、间皮瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌或胃癌。在一些情形下,实体瘤是脑癌(例如,神经胶质瘤、胶质母细胞瘤、神经母细胞瘤)、乳腺癌、肺癌、黑色素瘤、间皮瘤、卵巢癌、胰腺癌或前列腺癌。在一些情形下,实体瘤是转移性癌症。在一些情况下,实体瘤是复发性或难治性实体瘤。

[0288] 在一些实施方案中,癌症是恶性血液病。在一些实施方案中,血液恶性肿瘤是B细胞恶性肿瘤或T细胞恶性肿瘤。在一些实施方案中,血液恶性肿瘤是淋巴瘤、白血病或骨髓瘤。在一些实施方案中,血液恶性肿瘤是霍奇金淋巴瘤或非霍奇金淋巴瘤。示例性血液恶性肿瘤包括但不限于慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、小淋巴细胞性淋巴瘤(SLL)、滤泡性淋巴瘤(FL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、华氏巨球蛋白血症、多发性骨髓瘤、结外边缘区B细胞淋巴瘤、淋巴结边缘区B细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、非伯基特高级B细胞淋巴瘤、原发性纵隔B细胞淋巴瘤(PMBL)、免疫母细胞性大细胞淋巴瘤、前体B淋巴母细胞淋巴瘤、B细胞前淋巴细胞性白血病、淋巴浆细胞性淋巴瘤、脾边缘区淋巴瘤、浆细胞骨髓瘤、浆细胞瘤、纵隔(胸腺)大B细胞淋巴瘤、血管内大B细胞淋巴瘤、原发性渗出性淋巴瘤或淋巴瘤样肉芽肿病。在一些情形下,血液恶性肿瘤是转移性血液恶性肿瘤。在一些情况下,血液恶性肿瘤是复发性或难治性血液恶性肿瘤。

[0289] 在一些实施方案中,治疗疾病的方法进一步包括向所述受试者施用另外的治疗剂或另外的疗法。在一些情况下,本文公开的另外的治疗剂包括化学治疗剂、免疫治疗剂、靶向疗法、放射疗法或其组合。说明性的另外的治疗剂包括但不限于烷基化剂,如六甲蜜胺、白消安、卡铂、卡莫司汀、苯丁酸氮芥、顺铂、环磷酰胺、达卡巴嗪、洛莫司汀、美法仑、奥沙利铂、替莫唑胺或噻替帕;抗代谢物,如5-氟尿嘧啶(5-FU)、6-巯基嘌呤(6-MP)、卡培他滨、阿糖胞苷、氟尿苷、氟达拉滨、吉西他滨、羟基脲、甲氨蝶呤或培美曲塞;蒽环类药物,如柔红霉素、阿霉素、表柔比星或伊达比星;拓扑异构酶I抑制剂,如拓扑替康或伊立替康(CPT-11);拓扑异构酶II抑制剂,如依托泊苷(VP-16)、替尼泊苷或米托蒽醌;有丝分裂抑制剂,如多西他赛、雌莫司汀、伊沙匹隆、紫杉醇、长春碱、长春新碱或长春瑞滨;或皮质类固醇,如泼尼松、甲基泼尼松龙或地塞米松。在一些情况下,另外的治疗剂包括一线疗法。如本文所用,“一线疗法”包括用于患有癌症的受试者的主要治疗。在一些情形下,癌症是原发性癌症。在其他情形下,癌症是转移性或复发性癌症。在一些情形中,一线疗法包括化学疗法。在其他情况下,一线治疗包括放射疗法。技术人员将容易理解,不同的一线治疗可以适用于不同类型的癌症。在一些情况下,另外的治疗剂包括免疫检查点抑制剂。在一些情形下,免疫检查

点抑制剂包括针对以下的抑制剂,如抗体或其片段(例如,单克隆抗体、人抗体、人源化抗体或嵌合抗体)、RNAi分子或小分子:PD-1、PD-L1、CTLA4、PD-L2、LAG3、B7-H3、KIR、CD137、PS、TFM3、CD52、CD30、CD20、CD33、CD27、OX40、GITR、ICOS、BTLA (CD272)、CD160、2B4、LAIR1、TIGHT、LIGHT、DR3、CD226、CD2或SLAM。示例性检查点抑制剂包括派姆单抗、纳武单抗、曲美木单抗或伊匹单抗。在一些实施方案中,另外的疗法包括放射疗法。

[0290] 在一些实施方案中,另外的疗法包括手术。

IX. 试剂盒和制品

[0291] 在一些实施方案中,本文所述的试剂盒或制品包含一个或多个经修饰的T细胞(例如,经修饰的未刺激的T细胞或经修饰的刺激的T细胞)群。在一些情形下,本文所述的试剂盒或制品进一步包含载体、包装或容器,其被分隔以容纳一个或多个容器如小瓶、管等,所述一个或多个容器中的每一个包含有待于在本文所述的方法中使用的单独要素之一。合适的容器包括例如瓶、小瓶、注射器和试管。在一个实施方案中,容器由各种材料(如玻璃或塑料)形成。

[0292] 本文提供的制品含有包装材料。药物包装材料的例子包括但不限于泡罩包装、瓶、管、袋、容器、瓶、以及适用于所选配制品以及预期给予方式和治疗的任何包装材料。

[0293] 试剂盒通常包括列出内容物和/或使用说明的标签以及包含使用说明的包装插页。通常还将包括一组指令。

IX. 定义

[0294] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语都具有与本公开文本所属领域的普通技术人员通常所理解的相同的含义。尽管与本文所述的方法和材料类似或等同的方法和材料可以用于本公开文本的实践或测试,但本文描述了合适的方法和材料。

[0295] 还应理解,本文所用的术语仅用于描述特定实施方案的目的,并不旨在是限制性的。

[0296] 除非另有指示,本公开文本将采用组织培养、免疫学、分子生物学、微生物学、细胞生物学和重组DNA的常规技术,这些在本领域的技能之内。参见例如,Green和Sambrook编辑(2012)Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第4版;系列Ausubel等人编辑(2015)Current Protocols in Molecular Biology;系列Methods in Enzymology(Academic Press, Inc., N.Y.);MacPherson等人(2015)PCR 1:A Practical Approach(IRL Press at Oxford University Press);MacPherson等人(1995)PCR 2:A Practical Approach;McPherson等人(2006)PCR:The Basics(Garland Science);Harlow和Lane编辑(1999)Antibodies,A Laboratory Manual;Greenfield编辑(2014)Antibodies,A Laboratory Manual;Freshney(2010)Culture of Animal Cells:A Manual of Basic Technique,第6版;Gait编辑(1984)Oligonucleotide Synthesis;Hames和Higgins编辑(1984)Nucleic Acid Hybridization;Anderson(1999)Nucleic Acid Hybridization;Herdewijn编辑(2005)Oligonucleotide Synthesis:Methods and Applications;Hames和Higgins编辑(1984)Transcription and Translation;Buzdin和Lukyanov编辑(2007)Nucleic Acids Hybridization:Modern Applications;Immobilized Cells and Enzymes(IRL Press(1986));Grandi编辑(2007)In Vitro Transcription and Translation Protocols,第2版;Guisan编辑(2006)Immobilization of Enzymes and Cells;Perbal(1988)A

Practical Guide to Molecular Cloning, 第2版; Miller和Calos编辑, (1987) Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (Cold Spring Harbor Laboratory); Makrides编辑 (2003) Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells; Mayer和Walker编辑 (1987) Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology (Academic Press, London); Lundblad和Macdonald编辑 (2010) Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, 第4版; 以及Herzenberg等人编辑 (1996) Weir's Handbook of Experimental Immunology, 第5版。

[0297] 除非上下文明确指示其他含义, 否则如本文所用的单数形式“一个/一种(a)”、“一个/一种(an)”和“所述”包括复数指示物。例如, 术语“一个细胞”包括多个细胞, 包括其混合物, 并且意指一个细胞或多于一个细胞。

[0298] 如本文所用, 使用术语“约”指某一数值包括用于测定所述数值的装置或方法的误差的标准偏差。当在数字指定(例如, 温度、时间、量和浓度, 包括范围)之前使用时, 术语“约”指示可以变化(+)或(-)(\pm)20%、15%、10%、5%、3%、2%或1%的近似值。优选地, 从指定值 \pm 5%, 更优选地 \pm 1%, 并且还更优选地 \pm 0.1%, 因为此类变化适合于执行所公开的方法。

[0299] 如本文所用, 术语“激活”是指已经被充分刺激以诱导可检测的细胞增殖的T细胞的状态。激活还可以与诱导的细胞因子产生和可检测的效应子功能相关。术语“激活的T细胞”尤其是指正在进行细胞分裂的T细胞。

[0300] “同种异体的”是指源自与引入了材料的个体相同物种的不同动物的任何材料。当一个或多个基因座处的基因不不同时, 两个或更多个体被认为是彼此同种异体的。在一些方面, 来自相同物种的个体的同种异体材料可以在遗传上充分不同以抗原性地相互作用。

[0301] 如本文所用, 术语“同种异体T细胞靶标”或“同种异体T细胞”是指介导或促成宿主抗移植物应答、介导或促成移植物抗宿主应答、或者作为免疫抑制剂的靶标的蛋白质; 以及编码所述分子的基因及其相关调节元件(例如, 启动子)。应当理解, 术语同种异体T细胞靶标当与靶序列或gRNA分子联合使用时是指编码同种异体T细胞靶蛋白的基因(及其相关的调节元件)。不受理论束缚, 抑制或消除一种或多种同种异体T细胞靶标(例如, 通过本文所公开的方法和组合物)可以改善同种异体细胞的功效、存活、功能和/或活力。在一些实施方案中, 通过降低或消除不期望的免疫原性(如宿主抗移植物应答或移植物抗宿主应答)来改善同种异体细胞的功效、存活、功能和/或活力。在一些实施方案中, 介导或促成移植物抗宿主应答或宿主抗移植物应答的蛋白质是T细胞受体复合物的一种或多种组分。在一些实施方案中, T细胞受体复合物的组分是T细胞受体 α 、TCR α 的恒定结构域(TRAC; TCR α)。在一些实施方案中, T细胞受体的组分是T细胞受体 β 链(TRBC; TCR- β), 例如TCR β 的恒定结构域1(TRBC1)或恒定结构域2(TRBC2)。在一些实施方案中, T细胞受体的组分是T细胞受体 δ 链(CD3 δ)、T细胞受体 ϵ 链(CD3 ϵ)、T细胞受体 ζ 链(CD3 ζ ; CD247)和/或T细胞受体 γ 链(CD3 γ)。在一些实施方案中, 在由同种异体T细胞靶标编码的蛋白质是TCR信号传导复合物的组分的情况下, 编码同种异体T细胞靶标的基因可以是例如TRAC、TRBC1、TRBC2、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 或CD3 ζ (CD247)或其任何组合。

[0302] 如本文所用, 术语“抗体”是指与抗原特异性结合的免疫球蛋白分子。抗体可以是

源自天然来源或重组来源的完整免疫球蛋白,并且可以是完整免疫球蛋白的免疫反应性部分。抗体通常是免疫球蛋白分子的四聚体。本发明中的抗体可以以多种形式存在,这些形式包括例如多克隆抗体、单克隆抗体、Fv、Fab和F(ab)₂以及单链抗体(scFv)和人源化抗体。在一些实施方案中,抗体是指这样的组装体(例如,完整抗体分子、免疫粘附素或其变体),其对目的抗原(例如肿瘤相关抗原)具有显著已知的特异性免疫反应活性。抗体和免疫球蛋白包含轻链和重链,其间具有或不具有链间共价连接。脊椎动物系统中的基础免疫球蛋白结构已被相对充分地理解。

[0303] 术语“抗体片段”是指完整抗体的一部分,并且是指完整抗体的抗原确定可变区。抗体片段的例子包括但不限于Fab、Fab'、F(ab')₂、和Fv片段、线性抗体、scFv抗体和从抗体片段形成的多特异性抗体。

[0304] 如本文所用,术语“抗体重链”是指在所有抗体分子中以其天然存在的构象存在的两种类型的多肽链中的较大者。

[0305] 如本文所用,“抗体轻链”是指在所有抗体分子中以其天然存在的构象存在的两种类型的多肽链中的较小者。 α 和 β 轻链是指两种主要的抗体轻链同种型。

[0306] 如本文所用,术语“合成抗体”意指使用重组DNA技术产生的抗体,例如像由如本文所述的噬菌体表达的抗体。所述术语还应当被解释为意指通过合成编码抗体的DNA分子(并且所述DNA分子表达抗体蛋白)或指定抗体的氨基酸序列产生的抗体,其中所述DNA或氨基酸序列已经使用本领域可用且熟知的合成DNA或氨基酸序列技术获得。

[0307] (例如,嵌合抗原受体)的抗原结合结构域包括抗体变体。如本文所用,术语“抗体变体”包括抗体的合成和工程化形式,所述抗体被改变使得它们不是天然存在的,例如包含至少两个重链部分但不是两个完整重链的抗体(如结构域缺失的抗体或微型抗体);多特异性形式的抗体(例如,双特异性、三特异性等),其被改变以结合两种或更多种不同抗原或结合单一抗原上的不同表位;与scFv分子连接的重链分子等。另外,术语“抗体变体”包括多价形式的抗体(例如,三价、四价等),结合相同抗原的三个、四个或更多个拷贝的抗体。

[0308] 如本文所用,术语“抗原”或“Ag”被定义为引发免疫应答的分子。这种免疫应答可能涉及抗体产生或特异性免疫活性细胞的激活,或两者。本领域技术人员将理解,任何大分子(包括几乎所有的蛋白质或肽)都可以用作抗原。此外,抗原可以源自重组或基因组DNA。本领域技术人员将理解,包含编码引发免疫应答的蛋白质的核苷酸序列或部分核苷酸序列的任何DNA因此编码作为本文所用的术语的“抗原”。此外,本领域技术人员将理解,抗原不需要仅由基因的全长核苷酸序列编码。容易地看出,本发明包括但不限于使用多于一个基因的部分核苷酸序列,并且这些核苷酸序列以各种组合排列以引发所希望的免疫应答。此外,技术人员将理解抗原根本不需要由“基因”编码。容易地看出,抗原可以合成产生,或者可以源自生物样品。这种生物样品可以包括但不限于组织样品、肿瘤样品、细胞或生物流体。

[0309] 如本文所用,术语“抗肿瘤作用”是指可以表现为肿瘤体积减少、肿瘤细胞数量减少、转移瘤数量减少、预期寿命延长、或与癌性病症相关的各种生理症状的改善的生物学作用。在一些实施方案中,“抗肿瘤作用”也可以表现为本发明的肽、多核苷酸、细胞和抗体首先预防肿瘤发生的能力。

[0310] 如本文所用,根据本发明,术语“自体抗原”意指被免疫系统识别为外来的任何自

身抗原。在一些实施方案中,自体抗原包括但不限于细胞蛋白、磷蛋白、细胞表面蛋白、细胞脂质、核酸、糖蛋白(包括细胞表面受体)。

[0311] 如本文所用,术语“自身免疫性疾病”定义为由自身免疫应答引起的障碍。自身免疫性疾病是对自身抗原的不适当和过度应答的结果。自身免疫性疾病的例子包括但不限于艾迪生病、斑秃、强直性脊柱炎、自身免疫性肝炎、自身免疫性腮腺炎、癌症、克罗恩病、糖尿病(I型)、营养不良型大疱性表皮松解症、附睾炎、肾小球肾炎、格雷夫斯病、吉兰-巴雷综合征、桥本病、溶血性贫血、系统性红斑狼疮、多发性硬化、重症肌无力、寻常型天疱疮、银屑病、风湿热、类风湿性关节炎、结节病、硬皮病、舍格伦综合征、脊柱关节病、甲状腺炎、血管炎、白癜风、粘液水肿、恶性贫血、溃疡性结肠炎等。

[0312] 如本文所用,术语“自体的”意在指源自随后可被重新引入材料的相同个体的任何材料。

[0313] 如本文所用,术语“癌症”是指以异常细胞的快速且不受控制的生长为特征的疾病。癌细胞可以局部扩散或通过血流和淋巴系统扩散到身体的其他部分。各种癌症的例子包括但不限于乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、宫颈癌、皮肤癌、胰腺癌、结直肠癌、肾癌、肝癌、脑癌、淋巴瘤、白血病、肺癌、转移性去势抵抗性前列腺癌、黑色素瘤、滑膜肉瘤、晚期TnMuc1阳性实体瘤、神经母细胞瘤、神经内分泌肿瘤等。在某些实施方案中,癌症是甲状腺髓样癌。在某些实施方案中,癌症是前列腺癌。在某些实施方案中,癌症是间皮瘤或表达间皮素的癌症。在一些实施方案中,癌症是转移性去势抵抗性前列腺癌。术语“癌症”和“肿瘤”在本文中可互换使用,并且这两个术语涵盖实体瘤和液体瘤、弥漫性或循环性肿瘤。在一些实施方案中,癌症或肿瘤包括恶变前以及恶性癌症和肿瘤。

[0314] 如本文所用,术语“癌症相关抗原”或“肿瘤抗原”可互换地指在癌细胞表面上完全表达或作为片段表达(例如,MHC/肽)并且可用于将药剂优先靶向癌细胞的分子(通常是蛋白质、碳水化合物或脂质)。在一些实施方案中,肿瘤抗原是由正常细胞和癌细胞二者表达的标记物(例如,谱系标记物,如B细胞上的CD19)。在一些实施方案中,肿瘤抗原是与正常细胞相比在癌细胞中过表达(例如,与正常细胞相比1倍过表达、2倍过表达、3倍过表达或更多)的细胞表面分子。在一些实施方案中,肿瘤抗原是在癌细胞中不适当地合成的细胞表面分子,例如,与在正常细胞上表达的分子相比含有缺失、添加或突变的分子。在一些实施方案中,肿瘤抗原将完全或作为片段仅在癌细胞的细胞表面上表达(例如,MHC/肽),并且不在正常细胞的表面上合成或表达。在一些实施方案中,本发明的CAR包括包含与MHC呈递的肽结合的抗原结合结构域(例如,抗体或抗体片段)的CAR。通常,源自内源性蛋白质的肽填充主要组织相容性复合物(MHC) I类分子的局部,并被CD8⁺ T淋巴细胞上的T细胞受体(TCR)识别。MHC I类复合物由所有有核细胞组成型表达。在癌症中,病毒特异性和/或肿瘤特异性肽/MHC复合物代表用于免疫疗法的一类独特的细胞表面靶标。已经描述了在人白细胞抗原(HLA) -A1或HLA -A2的情况下靶向源自病毒或肿瘤抗原的肽的TCR样抗体。例如,TCR样抗体可以通过筛选文库(如人scFv噬菌体展示文库)来鉴定。

[0315] 如本文所用,术语“癌症支持抗原”或“肿瘤支持抗原”可互换地指在细胞表面上表达的分子(通常是蛋白质、碳水化合物或脂质),所述细胞本身不是癌性的,但是通过促进癌细胞的生长或存活(例如,对免疫细胞的抗性)来支持癌细胞。这种类型的示例性细胞包括基质细胞和髓源性抑制细胞(MDSC)。肿瘤支持抗原本身不需要在支持肿瘤细胞中起作用,

只要抗原存在于支持癌细胞的细胞上。

[0316] 如本文所用,术语“Cas”、“Cas分子”或“Cas分子”是指来自细菌II型CRISPR/Cas系统的负责DNA切割的酶。Cas包括野生型蛋白质及其功能性和非功能性突变体。

[0317] 如本文所用,术语“嵌合抗原受体”或“CAR”是指经工程化以在免疫效应细胞或其前体细胞上表达并特异性结合抗原的人工T细胞受体。CAR可用于过继细胞疗法和过继细胞转移。在一些实施方案中,过继细胞转移(或疗法)包括从患者取出T细胞,并且修饰T细胞以表达对特定抗原具有特异性的受体。在一些实施方案中,CAR对选定的靶标具有特异性,所述靶标例如:ROR1、间皮素、c-Met、PSMA、PSCA、叶酸受体 α 、叶酸受体 β 、EGFR、EGFRvIII、GPC2、GPC2、粘蛋白1(MUC1)、Tn抗原((Tn Ag)或(GalNAca-Ser/Thr))、TnMUC1、GDNF家族受体 α -4(GFR α 4)、成纤维细胞激活蛋白(FAP)或白细胞介素-13受体亚基 α -2(IL-13Ra2或CD213A2)。在一些实施方案中,CAR还可以包含细胞内激活结构域、跨膜结构域和包含肿瘤相关抗原结合区的细胞外结构域。在一些方面,CAR包含融合至CD3 ζ 跨膜结构域和细胞内结构域的单链可变片段(scFv)来源的单克隆抗体的融合物。CAR设计的特异性可以源自受体的配体(例如,肽)。在一些实施方案中,CAR可以通过将表达对肿瘤相关抗原具有特异性的CAR的T细胞的特异性的重定向来靶向癌症。

[0318] 如本文所用,术语“切割”是指共价键的断裂,如在核酸分子的骨架中。裂解可以通过多种方法来引发,所述多种方法包括但不限于磷酸二酯键的酶促或化学水解。单链切割和双链切割两者都是可能的。双链切割可能是两个不同的单链切割事件的结果。DNA裂解可导致产生平头末端或交错末端。在某些实施方案中,融合多肽可用于靶向切割的双链DNA。

[0319] 如本文所用,与核酸结合使用的术语“互补”是指碱基A与T或U以及G与C的配对。术语互补是指完全互补(即在整体参考序列中形成A对T或U对和G对和C对)的核酸分子,以及至少80%、85%、90%、95%、99%互补的分子。

[0320] 如本文所用,术语“保守序列修饰”意指不显著影响或改变含有氨基酸序列的抗体的结合特征的氨基酸修饰。此类保守修饰包括氨基酸取代、添加和缺失。可以通过本领域已知的标准技术(如定点诱变和PCR介导的诱变)向本发明的抗体中引入修饰。保守氨基酸取代是其中氨基酸残基被具有相似侧链的氨基酸残基替代的氨基酸取代。本领域已经定义了具有类似侧链的氨基酸残基家族。这些家族包括具有碱性侧链的氨基酸(例如,赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、具有酸性侧链的氨基酸(例如,天冬氨酸、谷氨酸)、具有不带电的极性侧链的氨基酸(例如,甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸)、具有非极性侧链的氨基酸(例如,丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸)、具有 β -支链侧链的氨基酸(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和具有芳香族侧链的氨基酸(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。因此,抗体的CDR区内的一个或多个氨基酸残基可以用来自相同侧链家族的其他氨基酸残基替代,并且可以使用本文所述的功能测定来测试改变的抗体结合抗原的能力。

[0321] 如本文所用,术语“共刺激配体”包括抗原呈递细胞(例如,aAPC、树突细胞、B细胞等)上的分子,其与T细胞上的同源共刺激分子特异性地结合,从而提供信号,除了通过例如TCR/CD3复合物与装载肽的MHC分子的结合提供的初级信号之外,所述信号还介导T细胞应答,包括但不限于增殖、激活、分化等。共刺激配体可以包括但不限于CD2、CD7、B7-1(CD80)、B7-2(CD86)、PD-L1、PD-L2、4-1BBL、OX40L、诱导型共刺激配体(ICOS-L)、细胞间粘附分子

(ICAM)、CD30L、CD40、CD70、CD83、HLA-G、MICA、MICB、HVEM、淋巴毒素 β 受体、3/TR6、ILT3、ILT4、HVEM、结合To11配体受体的激动剂或抗体以及与B7-H3特异性结合的配体。共刺激配体还尤其涵盖与T细胞上存在的共刺激分子(如但不限于CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3)特异性结合的抗体以及与CD83特异性结合的配体。

[0322] 如本文所用,“共刺激分子”是指T细胞上的同源结合配偶体,其与共刺激配体特异性地结合,从而介导T细胞的共刺激应答(如但不限于增殖)。共刺激分子是有助于高效免疫应答的除抗原受体或其配体以外的细胞表面分子。共刺激分子包括但不限于MHC I类分子、BTLA、To11配体受体、CD28、4-1BB(CD137)、OX40(CD134)、PD-1、CD7、LIGHT、CD83L、DAP10、DAP12、CD27、CD2、CD5、ICAM-1、LFA-1、Lck、TNFR-I、TNFR-II、Fas、CD30、CD40、ICOS(CD278)、NKG2C、B7-H3(CD276)以及源自杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR)的细胞内结构域。在一些实施方案中,共刺激分子包括OX40、CD27、CD2、CD28、ICOS(CD278)和4-1BB(CD137)。此类共刺激分子的其他例子包括CDS、ICAM-1、GITR、BAFFR、HVEM(LIGHTR)、SLAMF7、NKp80(KLRP1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD160、CD19、CD4、CD8 α 、CD8 β 、IL2R β 、IL2R γ 、IL7R α 、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、NKG2C、TNFR2、TRANCE RANKL、DNAM1(CD226)、SLAMF4(CD244、2B4)、CD84、CD96(Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9(CD229)、CD160(BY55)、PSGL1、CD100(SEMA4D)、CD69、SLAMF6(NTB-A、Ly108)、SLAM(SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME(SLAMF8)、SELPLG(CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19a和与CD83特异性结合的配体。

[0323] 如本文所用,术语“共刺激信号”是指与初级信号(如TCR/CD3连接)组合导致T细胞增殖和/或关键分子的上调或下调的信号。共刺激细胞内信号传导结构域可以是共刺激分子的细胞内部分。共刺激分子可以在以下蛋白质家族中表示:TNF受体蛋白、免疫球蛋白样蛋白、细胞因子受体、整合素、信号传导淋巴细胞激活分子(SLAM蛋白)和激活NK细胞受体。此类分子的例子包括CD27、CD28、4-1BB(CD137)、OX40、GITR、CD30、CD40、ICOS、BAFFR、HVEM、ICAM-1、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD2、CDS、CD7、CD287、LIGHT、NKG2C、NKG2D、SLAMF7、NKp80、NKp30、NKp44、NKp46、CD160、B7-H3和与CD83特异性结合的配体等。

[0324] 如本文所用,术语“CRISPR”是指规律间隔成簇短回文重复序列系统。术语“CRISPR系统”、“CRISPR/Cas”、“CRISPR/Cas系统”或“CRISPR”是指含有碱基序列的短重复的DNA基因座。在每次重复之后接着是来自先前暴露于病毒的间隔子DNA的短区段。细菌和古生菌已经进化出称为CRISPR-CRISPR相关(Cas)系统的适应性免疫防御,其使用短RNA来指导对外来核酸的降解。在细菌中,CRISPR系统经由RNA指导的DNA切割提供针对入侵外来DNA的获得性免疫。在II型CRISPR/Cas系统中,称为“间隔子”的外来DNA的短区段被整合在CRISPR基因组基因座内,并被转录和加工成短CRISPR RNA(crRNA)。这些crRNA退火至反式激活crRNA(tracrRNA),并通过Cas蛋白指导对致病性DNA的序列特异性切割和沉默。最近的工作表明,Cas9蛋白的靶标识别需要crRNA内的“种子”序列和crRNA结合区上游的含有保守的二核苷酸的原型间隔子邻近基序(PAM)序列。

[0325] 在一些实施方案中,术语“CRISPR系统”、“CRISPR/Cas”、“CRISPR/Cas系统”或“CRISPR”是指包含RNA指导的核酸酶或其他效应分子和gRNA分子的一组分子,它们共同地

对于指导和实现通过RNA指导的核酸酶或其他效应分子在靶序列处的核酸修饰是必要的和足够的。在一些实施方案中,CRISPR系统包含gRNA和Cas蛋白,例如Cas3、Cas4、Cas8a、Cas8b、Cas9、Cas10、Cas10d、Cas12a、Cas12b、Cas12d、Cas12e、Cas12f、Cas12g、Cas12h、Cas12i、Cas13、Cas14、CasX、Cse1、Csy1、Csn2、Cpf1、C2c1、Csm2、Cmr5、Fok1、酿脓链球菌(*S. pyogenes*) Cas9 (spCas9)、或金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) Cas9 (saCas9) 蛋白。包含Cas或经修饰的Cas分子的此类系统在本文中称为“Cas系统”或“CRISPR/Cas系统”。在一些实施方案中,gRNA分子和Cas分子可以复合,以形成核糖核蛋白(RNP)复合物。

[0326] 为了指导Cas9切割目的序列,可以从人U6聚合酶III启动子设计crRNA-tracrRNA融合转录物(下文称为“指导RNA”或“gRNA”)。CRISPR/CAS介导的基因组编辑和调节突出了其在基础科学、细胞工程和治疗学方面的变革潜力。

[0327] 如本文所用,术语“crRNA”作为与gRNA分子联合使用的术语是gRNA分子的一部分,其包含靶向结构域和与tracr相互作用以形成旗杆区域的区域。

[0328] 如本文所用,术语“CRISPRi”是指用于如在转录水平上的序列特异性基因阻遏或基因表达抑制的CRISPR系统。

[0329] 如本文所用,术语“源自”是指第一分子与第二分子之间的关系。它定义了第一分子与第二分子之间的结构相似性,并且不意味着或不包括对源自第二分子的第一分子的过程或来源限制。例如,在源自CD3 ζ 分子的细胞内信号传导结构域的情况下,细胞内信号传导结构域保留足够的CD3 ζ 结构,使得其具有所需的功能,即在适当条件下产生信号的能力。它不意味着或不包括对产生细胞内信号传导结构域的特定过程的限制。它不意味着为了提供细胞内信号传导结构域,必须从CD3 ζ 序列开始并删除不需要的序列或施加突变,以获得细胞内信号传导结构域。

[0330] 如本文所用,术语“疾病”是指动物的健康状态,其中动物无法维持体内平衡,并且其中如果疾病没有得到改善,则动物的健康将持续恶化。相比之下,术语动物的“障碍”是指一种健康状态,在这种状态中动物能够维持体内稳态的,但与不存在所述障碍的情况相比,动物的健康状态不太有利。如果不及时治疗,障碍不一定导致动物健康状态进一步下降。

[0331] 如本文所用,“与肿瘤抗原表达相关的疾病”包括但不限于与肿瘤抗原表达相关的疾病或与表达肿瘤抗原的细胞相关的病症,所述疾病或单独病症包括但不限于增殖性疾病(如癌症或恶性肿瘤)或癌前病症(如脊髓发育不良、骨髓增生异常综合征或白血病前期);或与表达肿瘤抗原的细胞相关的非癌症相关适应证。在一些实施方案中,与肿瘤抗原的表达相关的癌症是血液癌症。在一些实施方案中,与肿瘤抗原的表达相关的癌症是实体癌症。与肿瘤抗原表达相关的另外的疾病包括但不限于与肿瘤抗原表达相关的非典型和/或非经典癌症、恶性肿瘤、癌前病症或增殖性疾病。与肿瘤抗原表达相关的非癌症相关适应证包括但不限于自身免疫性疾病(例如,狼疮)、炎性障碍(变态反应和哮喘)和移植。在一些实施方案中,肿瘤抗原表达细胞表达或在任何时间表达编码肿瘤抗原的mRNA。在一些实施方案中,肿瘤抗原表达细胞产生肿瘤抗原蛋白(例如,野生型或突变体),并且肿瘤抗原蛋白可以以正常水平或降低的水平存在。在一些实施方案中,肿瘤抗原表达细胞在一个点产生可检测水平的肿瘤抗原蛋白,并且随后基本上不产生可检测的肿瘤抗原蛋白。

[0332] 如本文所用,术语“下调”是指一个或多个基因的基因表达的减少或消除。

[0333] 如本文所用,术语“编码”是指多核苷酸(如基因,cDNA或mRNA)中特定核苷酸序列

用作在具有确定的核苷酸序列(例如,rRNA、tRNA和mRNA)或确定的氨基酸序列的生物过程中合成其他聚合物和大分子的模板的固有特性以及由此产生的生物学特性。因此,如果与基因相对应的mRNA的转录和翻译在细胞或其他生物系统中产生了蛋白质,则该基因、cDNA或RNA编码所述蛋白质。编码链(其核苷酸序列与mRNA序列相同,通常在序列表中提供)和非编码链(用作基因或cDNA转录的模板)两者均可以称为编码该基因或cDNA的蛋白质或其他产物。除非另有规定,否则“编码氨基酸序列的核苷酸序列”包括互为简并形式并且编码相同氨基酸序列的所有核苷酸序列。短语编码蛋白质或RNA的核苷酸序列还可以包括内含子,其程度使得编码蛋白质的核苷酸序列在一些形式中可以含有一个或多个内含子。

[0334] 如本文可互换使用的“有效量”或“治疗有效量”是指如本文所述的化合物、配制品、材料、药剂或组合物在有需要的受试者中有效地实现所希望的生理、治疗或预防结局的量。此类结果可以包括但不限于当施用于哺乳动物时引起与在不存在本发明的组合物的情况下检测到的免疫应答相比的可检测水平的免疫应答的量。可以通过多种本领域承认的方法轻松评估免疫应答。本领域技术人员将理解,本文施用的组合物的量是变化的,并且可以基于许多因素(如正在治疗的疾病或病症、正在治疗的哺乳动物的年龄和健康以及身体状况、疾病的严重程度、正在施用的特定化合物等)容易地确定。根据待治疗受试者的健康和身体状况、待治疗受试者的分类组、组合物的配制、受试者医疗状况的评估和其他相关因素,有效量可以在受试者之间有所不同。

[0335] 如本文所用,术语“内源”是指来自生物体、细胞、组织或系统,或者生物体、细胞、组织或系统内部产生的任何材料。

[0336] 如本文所用,术语“扩增”是指数量的增加,如免疫细胞(例如,T细胞)数量的增加。在一些实施方案中,离体扩增的免疫细胞(例如,T细胞)的数量相对于最初存在于培养物中的数量增加。在另一个实施方案中,离体扩增的免疫细胞(例如,T细胞)的数量相对于培养物中的其他细胞类型增加。

[0337] 如本文所用,术语“表达”是指由启动子驱动的特定核苷酸序列的转录和/或翻译。

[0338] 如本文所用,术语“外源”是指从生物体、细胞、组织或系统引入或在生物体、细胞、组织或系统外部产生的任何材料。

[0339] 如本文所用,术语“表达载体”是指包含重组多核苷酸的载体,所述重组多核苷酸包含与待表达的核苷酸序列可操作地连接的表达控制序列。表达载体包含足够的用于表达的顺式作用元件;用于表达的其他元件可以由宿主细胞或在体外表达系统中提供。表达载体包括所有本领域已知的那些,如掺入重组多核苷酸的粘粒、质粒(例如,裸露的或包含在脂质体中的)和病毒(例如,仙台病毒、慢病毒、逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒)。

[0340] 如本文所用,术语“离体”是指已经从活生物体(例如,人)中取出并且在生物体外部(例如,在培养皿、试管或生物反应器中)繁殖的细胞。

[0341] 如本文所用,与gRNA分子结合使用的术语“旗杆”是指gRNA的一部分,其中crRNA和tracr彼此结合或杂交。

[0342] 如本文所用,术语“指导RNA”、“指导RNA分子”、“gRNA分子”或“gRNA”可互换使用,并且是指促进将RNA指导的核酸酶或其他效应分子(通常与gRNA分子复合)特异性引导至靶序列的一组核酸分子。在一些实施方案中,所述指导是通过使一部分gRNA与DNA杂交(例如,通过gRNA靶向结构域),并且通过使一部分gRNA分子(例如,至少通过gRNA tracr)与RNA指

导的核酸酶或其他效应分子结合完成的。在一些实施方案中，gRNA分子由单个连续多核苷酸分子组成，在本文中称为“单指导RNA”或“sgRNA”等。在一些实施方案中，gRNA分子由多个（通常两个）多核苷酸分子组成，这些多核苷酸分子本身通常能够通过杂交缔合，在本文中称为“双指导RNA”或“dgRNA”等。gRNA分子在下文更详细地描述，但通常包含靶向结构域和tracr。在一些实施方案中，靶向结构域和tracr被设置在单个多核苷酸上。在其他实施方案中，靶向结构域和tracr被设置在分开的多核苷酸上。

[0343] 如本文所用，术语“同源”是指两个聚合分子之间（例如，两个核酸分子（如两个DNA分子或两个RNA分子）之间）或两个多肽分子之间的亚基序列同一性。当两个序列中的两者中的亚基位置都被相同的单体亚基占据时，这些分子在该位置处是同源的。例如，如果两个DNA分子中的每一个中的位置被腺嘌呤占据，则这两个DNA分子是同源的。两个序列之间的同源性是匹配位置或同源位置的数量直接函数。例如，如果两个序列中的位置的一半（例如，在长度上的聚合物十个亚基中的五个位置）是同源的，则这两个序列50%同源；如果90%的位置（例如，10分之9）匹配或同源，则这两个序列90%同源。

[0344] 如本文所用，术语“人源化抗体”是指非人（例如，鼠）抗体的人形式，并且是含有源自非人免疫球蛋白的最小序列的嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段（如Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂或抗体的其他抗原结合子序列）。在大多数情况下，人源化抗体是这样的人免疫球蛋白（受体抗体），其中来自接受者的互补决定区（CDR）的残基被来自非人物种（供体抗体）（如小鼠、大鼠或兔）的CDR的具有所需的特异性、亲和力和能力的残基替代。在一些情形下，人免疫球蛋白的Fv框架区（FR）残基被相应的非人残基替代。此外，人源化抗体可以包含既不在受体抗体中也不在导入的CDR或框架序列中发现的残基。进行这些修饰以进一步改进和优化抗体性能。通常，人源化抗体将基本上包含至少一个（并且通常是两个）可变结构域的全部，其中所有或基本上所有CDR区对应于非人免疫球蛋白的那些，并且所有或基本上所有FR区是人免疫球蛋白序列的那些。人源化抗体还最佳地包含免疫球蛋白恒定区（Fc）的至少一部分，通常是人免疫球蛋白的恒定区的至少一部分。关于进一步的细节，参见Jones等人，*Nature* 321:522-525(1986)；Reichmann等人，*Nature* 332:323-329(1988)；Presta，*Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596(1992)。

[0345] 如本文所用，术语“全人”是指免疫球蛋白，如抗体，其中整个分子是人来源的或由与抗体的人形式相同的氨基酸序列组成。

[0346] 如本文所用，术语“同一性”是指两个聚合物分子之间，特别是两个氨基酸分子之间，如两个多肽分子之间的亚基序列同一性。当两个氨基酸序列在相同位置处具有相同的残基时，它们在该位置是相同的。例如，如果两个多肽分子中的每一个中的位置被精氨酸占据，则这两个多肽是相同的。两个氨基酸序列在比对中在相同位置处具有相同残基的同一性或程度通常以百分比表示。两个氨基酸序列之间的同一性是匹配位置或相同位置的数量直接函数。例如，如果两个序列中的位置的一半（例如，在长度上的聚合物十个氨基酸中的五个位置）是相同的，则这两个序列50%相同；如果90%的位置（例如，10分之9）匹配或相同，则这两个氨基酸序列90%相同。

[0347] 如本文所用，术语“免疫球蛋白”或“Ig”定义了一类起抗体作用的蛋白质。由B细胞表达的抗体有时被称为BCR（B细胞受体）或抗原受体。包括在这类蛋白质中的五个成员是IgA、IgG、IgM、IgD和IgE。IgA是存在于身体分泌物（如唾液、泪液、母乳、胃肠道分泌物和呼

吸道和泌尿生殖道的粘液分泌物)中的一抗。IgG是最常见的循环抗体。IgM是在大多数受试者的初次免疫应答中产生的主要免疫球蛋白。它是凝集、补体结合和其他抗体应答中最有效的免疫球蛋白,并且在防御细菌和病毒方面很重要。IgD是不具有已知抗体功能但可充当抗原受体的免疫球蛋白。IgE是免疫球蛋白,其通过在暴露于过敏原时引起从肥大细胞和嗜碱性粒细胞释放介导体来介导速发型超敏反应。

[0348] 如本文所用,术语“免疫应答”定义为当淋巴细胞将抗原分子鉴定为外来的并诱导抗体形成和/或激活淋巴细胞以去除抗原时发生的对抗原的细胞应答。

[0349] 如本文所用,术语“免疫效应细胞”是指参与免疫应答(例如,参与促进免疫效应子应答)的细胞。免疫效应细胞的例子包括T细胞(例如, α/β T细胞和 γ/δ T细胞)、B细胞、自然杀伤(NK)细胞、自然杀伤T(NKT)细胞、肥大细胞和髓系来源的吞噬细胞。

[0350] 如本文所用,术语“免疫效应子功能或免疫效应子应答”是指增强或促进对靶细胞的免疫攻击的功能或应答。在一些实施方案中,免疫效应子功能或应答是指T细胞或NK细胞促进靶细胞的杀伤或抑制其生长或增殖的特性。在T细胞的情况下,初级刺激和共刺激是免疫效应子功能或应答的例子。

[0351] 如本文所用,术语“抑制性分子”是指当被激活时引起或促成对细胞存活、激活、增殖和/或功能的抑制的分子;以及编码所述分子的基因及其相关调节元件(例如,启动子)。在一些实施方案中,抑制性分子是在免疫效应细胞上(例如,在T细胞上)表达的分子。抑制性分子的非限制性例子是PD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、LAG3、CEACAM(例如,CEACAM-1、CEACAM-3和/或CEACAM-5)、VISTA、TGF β IIR、VSIG3、VSIG 8、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3(CD276)、B7-H4(VTCN1)、HVEM(TNFRSF14或CD107)、KIR、A2aR、MHC I类、MHC II类、GAL9、腺苷和TGF β 。应当理解,术语抑制性分子当与靶序列或gRNA分子联合使用时是指编码抑制性分子蛋白的基因(及其相关的调节元件)。在一些实施方案中,编码抑制性分子的基因是BTLA、PD-1、TIM-3、VSIG3、VSIG8、CTLA4或TGF β IIR。在一些实施方案中,编码抑制性分子的基因是VSIG3。在一些实施方案中,编码抑制性分子的基因是PD-1。在一些实施方案中,编码抑制性分子的基因是TGF β IIR。

[0352] 如本文所用,术语“诱导多能干细胞”或“iPS细胞”是指从诸如免疫细胞(即T细胞)的成体细胞产生的多能干细胞。重编程因子(如Klf4、Oct3/4和Sox2)在成体细胞中的表达将细胞转化成能够繁殖和分化成多种细胞类型的多能细胞。

[0353] 如本文所用,术语“说明材料”包括可用于传达本发明的组合物和方法的有用性的出版物、记录、图表或任何其他表达媒介。本发明的试剂盒的说明材料可以被例如粘贴在含有本发明的核酸、肽和/或组合物的容器上,或者与含有核酸、肽和/或组合物的容器一起运输。可替代地,说明材料可以与容器分开运输,目的是说明材料和化合物由接受者配合使用。

[0354] 如本文所用,术语“分离的”意指从天然状态改变或移出。例如,天然存在于活体动物中的核酸或肽不是“分离的”,而是从其天然状态的共存物质中部分或完全分离的相同核酸或肽是“分离的”。分离的核酸或蛋白质可以基本上纯的形式存在,或者可以存在于非天然环境(例如像宿主细胞)中。

[0355] 如本文所用,术语“敲除”是指一个或多个基因的基因表达的消除。

[0356] 如本文所用,术语“慢病毒”是指逆转录病毒科的属。慢病毒在逆转录病毒中的独

特之处在于能够感染非分裂细胞；它们可以将大量的遗传信息传递到宿主细胞的DNA中，因此它们是基因传递载体的最有效方法之一。HIV、SIV和FIV都是慢病毒的例子。源自慢病毒的载体提供了在体内实现显著水平的基因转移的手段。

[0357] 如本文所用，在scFv的上下文中使用的术语“柔性多肽接头”或“接头”是指由单独或组合使用以将可变重链区和可变轻链区连接在一起的氨基酸（如甘氨酸和/或丝氨酸）残基组成的肽接头。在一个实施方案中，柔性多肽接头是Gly/Ser接头并且包含氨基酸序列(Gly-Gly-Gly-Ser)_n，其中n是等于或大于1的正整数。例如，n=1，n=2，n=3，n=4，n=5和n=6，n=7，n=8，n=9和n=10(SEQ ID NO:6592)。在一个实施方案中，柔性多肽接头包括但不限于(Gly₄ Ser)₄或(Gly₄ Ser)₃。在另一个实施方案中，接头包括(Gly₂Ser)、(GlySer)或(Gly₃Ser)的多个重复。

[0358] 如本文所用，术语“经修饰的”意指本发明的分子或细胞的改变的状态或结构。分子可以通过多种方式进行修饰，包括化学、结构和功能上的修饰。细胞可以通过引入核酸来修饰。

[0359] 如本文所用，术语“调节”意指与不存在治疗或化合物的情况下受试者的反应水平相比和/或与在其他方面相同但是未治疗的受试者的反应水平相比，介导受试者的反应水平的可检测的增加或减少。术语涵盖干扰和/或影响天然信号或反应，从而介导受试者（优选地，人）中的有益治疗反应。

[0360] 在本发明的上下文中，使用以下常用的核酸碱基的缩写。“A”指腺苷，“C”指胞嘧啶，“G”指鸟苷，“T”指胸苷，“U”指尿苷。

[0361] 除非另有规定，否则“编码氨基酸序列的核苷酸序列”包括互为简并形式并且编码相同氨基酸序列的所有核苷酸序列。短语编码蛋白质或RNA的核苷酸序列还可以包括内含子，至编码蛋白质的核苷酸序列在一些形式中可以含有一个或多个内含子的程度。

[0362] 如本文所用，术语“可操作地连接”是指调节序列与异源核酸序列之间的功能连接，从而导致后者的表达。例如，当第一核酸序列被放置地与第二核酸序列有功能关系时，所述第一核酸序列与所述第二核酸序列可操作地连接。例如，如果启动子影响编码序列的转录或表达，则该启动子与该编码序列可操作地连接。通常，可操作地连接的DNA序列是连续的，并且在需要连接两个蛋白质编码区时，在同一阅读框内。

[0363] 如本文所用，术语“过表达的”肿瘤抗原或肿瘤抗原的“过表达”旨在表示来自患者的特定组织或器官内疾病区域（如实体瘤）的细胞中的肿瘤抗原相对于来自该组织或器官的正常细胞中的肿瘤抗原表达水平的异常表达水平。可以通过本领域已知的标准测定来确定患有以肿瘤抗原的过表达为特征的实体瘤或血液恶性肿瘤的患者。

[0364] 如本文所用，术语免疫原性组合物的“肠胃外”施用包括例如皮下(s.c.)、静脉内(i.v.)、肌肉内(i.m.)或胸骨内注射或输注技术。

[0365] 如本文所用，术语“多核苷酸”定义为核苷酸的链。此外，核酸是核苷酸的聚合物。因此，如本文所用的核酸和多核苷酸是可互换的。本领域技术人员具有如下常识，即核酸是多核苷酸，多核苷酸可以水解成单体“核苷酸”。单体核苷酸可以水解成核苷。如本文所用，多核苷酸包括但不限于通过本领域可用的任何手段获得的所有核酸序列，所述手段包括但不限于重组手段（即，使用普通克隆技术和PCRTM等从重组文库或细胞基因组克隆核酸序列）和通过合成手段。

[0366] 如本文所用,术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”可互换使用,并且是指由通过肽键共价连接的氨基酸残基组成的化合物。蛋白质或肽必须含有至少两个氨基酸,并且对可以构成蛋白质或肽序列的氨基酸的最大数量没有限制。多肽包括包含通过肽键彼此连接的两个或更多个氨基酸的任何肽或蛋白质。如本文所用,所述术语是指在本领域中通常也称为例如肽、寡肽和寡聚体的短链以及在本领域中通常称为蛋白质的有许多类型的长链。“多肽”包括例如生物活性片段、基本上同源的多肽、寡肽、同源二聚体、异源二聚体、多肽的变体、经修饰的多肽、衍生物、类似物、融合蛋白等。多肽包括天然肽、重组肽、合成肽或其组合。

[0367] 如本文所用,术语“启动子”定义为由细胞的合成机构或引入的合成机构识别,启动多核苷酸序列的特异性转录所需的DNA序列。

[0368] 如本文所用,术语“启动子/调节序列”意指表达可操作地连接至启动子/调节序列的基因产物所需的核酸序列。在一些情形下,此序列可以是核心启动子序列,并且在其他情形下,此序列还可以包括增强子序列和表达基因产物所需的其他调节元件。启动子/调节序列可以是例如以组织特异性方式表达基因产物的序列。

[0369] 如本文所用,术语“组成型启动子”是这样的核苷酸序列,当与编码或指定基因产物的多核苷酸可操作地连接时,所述核苷酸序列导致在细胞的大部分或全部生理条件下在细胞中产生基因产物。

[0370] 如本文所用,术语“诱导型启动子”是这样的核苷酸序列,当与编码或指定基因产物的多核苷酸可操作地连接时,基本上仅当在细胞中存在对应于启动子的诱导物时,所述核苷酸序列才导致在细胞中产生基因产物。

[0371] 如本文所用,术语“组织特异性启动子”是这样的核苷酸序列,当与编码基因或由基因指定的多核苷酸可操作地连接时,基本上仅当细胞是对应于启动子的组织类型的细胞时,所述核苷酸序列才导致在细胞中产生基因产物。

[0372] 如本文所用,术语“仙台病毒”是指副粘病毒科的属。仙台病毒是阴性的单链RNA病毒,其不会整合到宿主基因组中或改变宿主细胞的遗传信息。仙台病毒具有异常广泛的宿主范围,并且对人没有致病性。用作重组病毒载体的仙台病毒能够实现瞬时但强的基因表达。

[0373] 如本文所用,术语“信号转导途径”是指在信号从细胞的一部分传递到细胞的另一部分中起作用的多种信号转导分子之间的生物化学关系。短语“细胞表面受体”包括能够接收信号并将信号传递穿过细胞质膜的分子和分子复合物。

[0374] 如本文所用,术语“单链抗体”是指通过重组DNA技术形成的抗体,其中免疫球蛋白重链和轻链片段经由工程化氨基酸跨越物与Fv区连接。产生单链抗体的各种方法是已知的,包括描述于美国专利号4,694,778;Bird,Science 242:423-442(1988);Huston等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883(1988);Ward等人,Nature 334:54454(1989);Skerra等人,Science 242:1038-1041(1988)中的那些方法。

[0375] 如本文所用,术语“特异性”是指与给定靶抗原(例如,人靶抗原)特异性地结合(例如,与……免疫反应)的能力。嵌合抗原受体可以是单特异性的并且含有特异性结合靶标的一个或多个结合位点,或者嵌合抗原受体可以是多特异性的并且含有特异性结合相同或不同靶标的两个或更多个结合位点。在某些实施方案中,嵌合抗原受体对相同靶标的两个不同(例如,非重叠)部分具有特异性。在某些实施方案中,嵌合抗原受体对多于一种靶标具有

特异性。

[0376] 如本文所用,关于抗体的术语“特异性结合”意指识别特定抗原但基本上不识别或结合样品中的其他分子的抗体或其结合片段(例如,scFv)。例如,与来自一个物种的抗原特异性结合的抗体也可以与来自一个或多个物种的该抗原结合。但是,这种跨物种反应性本身并不会改变抗体的特异性分类。在另一个例子中,与抗原特异性结合的抗体也可以与抗原的不同等位基因形式结合。然而,这种交叉反应性本身并不会改变抗体的特异性分类。在一些情形下,术语“特异性结合(specific binding)”或“特异性结合(specifically binding)”可以用于指代抗体、蛋白质、嵌合抗原受体或肽与第二化学物质的相互作用,以意味着所述相互作用取决于化学物质上特定结构(例如,抗原决定簇或表位)的存在;例如,嵌合抗原受体识别并结合至特定蛋白质结构,而不是一般的蛋白质。如果抗体对表位“A”具有特异性,则在含有标记的“A”和抗体的反应中,含有表位A(或游离的未标记的A)的分子的存在将减少与所述抗体结合的标记的A的量。

[0377] 如本文所用,术语“刺激”意指通过刺激分子(例如,TCR/CD3复合物)与其同源配体结合从而介导信号转导事件(如但不限于经由TCR/CD3复合物的信号转导)而诱导的初级应答。刺激可以介导某些分子表达的改变,如TGF- β 的下调和/或细胞骨架结构的重组、克隆扩增和分化为不同的亚群。

[0378] 如本文所用,术语“刺激分子”意指T细胞上的与存在于抗原呈递细胞上的同源刺激配体特异性地结合的分子。

[0379] 如本文所用,术语“刺激配体”意指当存在于抗原呈递细胞(例如,aAPC、树突细胞、B细胞等)上时可以与T细胞上的同源结合配偶体(本文称为“刺激分子”)特异性地结合,从而介导T细胞的初级应答(包括但不限于激活、启动免疫应答、增殖等)的配体。刺激配体在本领域中是熟知的,并且尤其涵盖负载有肽、抗CD3抗体、超激动剂抗CD28抗体和超激动剂抗CD2抗体的MHC I类分子。

[0380] 如本文所用,术语“受试者”和“患者”可互换地使用。如本文所用,受试者可以是哺乳动物,如非灵长类动物(例如,牛、猪、马、猫、狗、大鼠等)或灵长类动物(例如,猴和人)。在某些实施方案中,如本文所用,术语“受试者”是指脊椎动物,如哺乳动物。哺乳动物包括但不限于人、非人灵长类动物、野生动物、未驯服的动物、农场动物、运动动物和宠物。可以引发免疫应答的任何活生物体都可能是受试者或患者。在某些示例性实施方案中,受试者是人。

[0381] 如本文所用,术语“基本上经纯化的”细胞是基本上不含其他细胞类型的细胞。基本上经纯化的细胞还指已经与其他细胞类型分离的细胞,所述细胞通常在其天然存在的状态下与所述其他细胞类型缔合。在一些情形下,基本上经纯化的细胞群是指同质的细胞群。在其他情形下,此术语仅指这样的细胞,所述细胞已经与在其天然状态下与所述细胞缔合的细胞分离。在一些实施方案中,细胞在体外培养。在其他实施方案中,细胞不在体外培养。

[0382] 如本文所用,术语“靶位点”或“靶序列”是指如下基因组核酸序列,其定义结合分子可在足以发生结合的条件下所特异性地结合的核酸的一部分。

[0383] 如本文所用,与gRNA联合使用的术语“靶向结构域”是指识别靶序列或与靶序列互补的gRNA分子的一部分。例如,靶序列在细胞的核酸内(例如,基因内)。

[0384] 如本文所用,术语“靶序列”是指与gRNA靶向结构域互补(例如完全互补)的核酸序

列。在一些实施方案中,靶序列被设置在基因组DNA上。在一些实施方案中,靶序列与由具有核酸酶或其他效应子活性的蛋白质识别的原型间隔子邻近基序(PAM)序列(例如,由Cas9识别的PAM序列)相邻(在DNA的相同链或互补链上)。在一些实施方案中,靶序列是同种异体T细胞靶标的靶序列。在一些实施方案中,靶序列是抑制性分子的靶序列。在一些实施方案中,靶序列是抑制性分子的下游效应子的靶序列。

[0385] 如本文所用,术语“T细胞受体”或“TCR”是指膜蛋白的复合物,其响应于抗原的呈递而参与T细胞的激活。TCR负责识别与主要组织相容性复合体分子结合的抗原。TCR由与三个二聚体模块CD3 δ /CD3 ϵ 、CD3 γ /CD3 ϵ 和CD3 ζ /CD3 ζ 偶联的阿尔法(α)和贝塔(β)链的异二聚体构成。在一些细胞中,TCR由伽马和德尔塔(γ / δ)链(CD3 γ /CD3 ϵ)组成。在一些实施方案中,TCR可以以 α / β 和 γ / δ 形式存在,它们在结构上类似但具有不同的解剖学位置和功能。每条链由两个细胞外结构域(可变结构域和恒定结构域)组成。在一些实施方案中,TCR可以在任何包含TCR的细胞上被修饰,所述细胞包括例如辅助T细胞、细胞毒性T细胞、记忆T细胞、调节性T细胞、自然杀伤T细胞和 γ δ T细胞。

[0386] 如本文所用的术语“治疗”意指治疗和/或预防。通过抑制、缓解或根除疾病状态获得治疗效果。

[0387] 如本文所用,术语“疗法”是指可以用于预防、管理、治疗和/或改善疾病或与其相关的症状的任何方案、方法和/或药剂(例如,CAR-T)。在一些实施方案中,术语“多个疗法”和“疗法”是指本领域技术人员(如医务人员)已知的可用于预防、管理、治疗和/或改善疾病或与其相关的症状的生物疗法(例如,过继细胞疗法)、支持疗法(例如,淋巴细胞耗尽疗法(lymphodepleting therapy))和/或其他疗法。

[0388] 如本文所用,与gRNA分子联合使用的术语“tracr”是指结合核酸酶或其他效应分子的gRNA的一部分。在一些实施方案中,tracr包含与Cas9特异性结合的核酸序列。在一些实施方案中,tracr包含形成旗杆的一部分的核酸序列。如本文所用,术语“转染”或“转化”或“转导”是指借之将外源性核酸转移至或引入宿主细胞中的过程。“转染的”或“转化的”或“转导的”细胞是已经用外源性核酸转染、转化或转导的细胞。细胞包括原代受试者细胞及其后代。

[0389] 如本文所用,术语“治疗(treat)”、“治疗(treatment)”和“治疗(treating)”是指由一种或多种疗法(包括但不限于针对实体瘤的治疗的CAR-T疗法)的施用引起的疾病或与其相关的症状的进展、严重程度、频率和/或持续时间的降低或改善。如本文所用,术语“治疗”还可以指代改变被治疗受试者的病程。治疗的治疗性作用包括但不限于预防疾病的发生或复发、缓和一种或多种症状、减少疾病的直接或间接病理后果、降低疾病进展的速度、改善或减缓疾病状态以及缓解或改善预后。

[0390] 如本文所用,术语“在转录控制下”或“可操作地连接”意指启动子相对于多核苷酸处于正确的位置和取向上,以控制通过RNA聚合酶的转录的起始和多核苷酸的表达。

[0391] 如本文所用,术语“载体”是包含分离的核酸并且可以用于将所述分离的核酸递送至细胞内部的物质组合物。多种载体是本领域已知的,包括但不限于线性多核苷酸、与离子或两亲性化合物缔和的多核苷酸、质粒和病毒。因此,术语“载体”包括自主复制的质粒或病毒。术语还应被解释为包括促进核酸转移到细胞中的非质粒和非病毒化合物,如例如聚赖氨酸化合物、脂质体等。病毒载体的例子包括但不限于仙台病毒载体、腺病毒载体、腺相关

病毒载体、逆病毒载体、慢病毒载体等。

[0392] 如本文所用,术语“异种”是指源自不同物种的动物的移植物。

[0393] 如本文所用,术语“多种完全培养基”和“完全培养基”是指针对免疫细胞生长(例如,T细胞生长)进行优化的细胞培养基。在一些情形下,完全培养基包含蛋白质、无机盐、微量元素、维生素、氨基酸、脂质、碳水化合物、细胞因子和/或生长因子,其中每种组分的比率已针对细胞生长进行了优化。示例性蛋白质包括白蛋白、转铁蛋白、纤连蛋白和胰岛素。示例性碳水化合物包括葡萄糖。示例性无机盐包括钠、钾和钙离子。示例性微量元素包括锌、铜、硒和三羧酸。示例性氨基酸包括必需氨基酸,如L-谷氨酰胺(例如丙氨酰-1-谷氨酰胺或甘氨酰-1-谷氨酰胺);或非必需氨基酸(NEAA),如甘氨酸、L-丙氨酸、L-天冬酰胺、L-天冬氨酸、L-谷氨酸、L-脯氨酸和/或L-丝氨酸。在一些实施方案中,完全培养基还包含碳酸氢钠(NaHCO_3)、HEPES(4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸)、酚红、抗生素和/或 β -巯基乙醇中的一种或多种。在一些情形下,完全培养基是无血清培养基。在一些情形下,完全培养基是无异种培养基。

[0394] 如本文所用,术语“化学成分确定的培养基”是指其中所有组分的组成和浓度是已知的细胞培养基。它与完全培养基的不同之处在于,完全培养基可以含有其中组成和/或浓度是未知的组分,例如,动物来源的组分。

[0395] 在一些情形下,“无外源物质”培养基不含有任何动物来源的(非人)组分。在一些情形下,无外源物质培养基含有一种或多种人来源的组分,如人血清、生长因子和胰岛素。

[0396] 在一些实施方案中,“无血清”培养基不含血清或血浆,但是可以含有源自血清或血浆的组分。在一些情形下,“无血清”培养基含有动物来源的组分,如牛血清白蛋白(BSA)。

[0397] 在一些实施方案中,“基础”培养基包含用于靶细胞生长的基础必需物。在一些情形下,基础培养基含有无机盐、碳源和水。在一些情形下,将补充剂、细胞因子和/或蛋白质(如白蛋白(例如,HSA))添加到基础培养基中。如本文所用,补充剂包括微量元素、维生素、氨基酸、脂质、碳水化合物、细胞因子、生长因子或其组合。

[0398] 范围:贯穿本公开文本,本发明的各方面可以以范围形式呈现。应当理解,范围格式的描述仅仅是为了方便和简洁,并且不应被解释为对本发明的范围的僵硬限制。因此,应当认为范围的描述具体地公开了所有可能的子范围以及所述范围内的单独数值。例如,对范围(如从1至6)的描述应该被认为已经具体地公开了子范围(如从1至3、从1至4、从1至5、从2至4、从2至6、从3至6等)以及该范围内的单独数字,例如1、2、2.7、3、4、5、5.3和6。无论范围的宽度如何,这都适用。

实施例

[0399] 这些实施例仅仅出于说明性目的提供,并且不限制本文提供的权利要求的范围。

实施例1

[0400] 本实施例提供了用于制备本公开文本的新型同种异体CAR T细胞的材料和方法。

[0401] 原代人T细胞扩增和细胞冷冻保存。将T细胞以 1×10^6 个细胞/mL在培养基中孵育,并在培养开始时使用Dynabeads®(ThermoFisher)激活。使用NC200™自动化细胞计数器(Chemometec)每隔一天对细胞计数。此外,每隔一天测定细胞活力和细胞大小。将细胞用新鲜的T细胞培养基喂养,并以 5×10^5 个细胞/mL重悬。在第9-11天,将细胞收获并在含有5% DMSO的冷冻培养基中冷冻保存。

[0402] 多色流式细胞术分析。将细胞洗涤并重悬于FACS缓冲液(含有5%胎牛血清的磷酸盐缓冲液)中。将与特定荧光团缀合的抗体的预混液添加到细胞中。将细胞洗涤并重悬于FACS缓冲液中,并使用MACSQuant®细胞仪(Miltenyi)进行分析。使用的抗体组包括抗CD3-VioBlue、抗TCR α -APC、抗B2M-PE-Vio770、抗HLA-DR-VioGreen、抗HLA-I-ABC-FITC、抗CAR-PE和7AAD,以用于活力评估。将FlowJo®软件(BD Biosciences)用于数据分析。

[0403] 原代人T细胞的基因编辑。将核糖核蛋白(RNP)以与用于每个靶标的相应指导RNA缀合的核酸酶形式转染到人T细胞中。将细胞在含有5%人血清、IL-7、IL-15和谷氨酰胺的特殊T细胞培养基中培养5-8天。在培养结束时,进行多色流式细胞术以同时确定对于每种基因靶标的基因编辑效率水平。

[0404] 实时肿瘤细胞毒性测定。使用xCelligence™实时细胞分析仪器(Agilent)评估CAR T细胞的细胞毒性能力。简言之,将CAR T细胞在微量滴定板中与肿瘤靶细胞以不同的效应子与靶标比(例如,1:10、1:5、1:2.5、1:1)共培养数天。连续测定肿瘤细胞死亡,测定为每种条件下测量的细胞阻抗的变化。使用RTCA®软件(Agilent)捕获数据。

[0405] 通过T7E1核酸内切酶测定测得的基因编辑效率。为了确定分子水平上的基因编辑效率,使用针对每个特定基因靶标定制的T7E1核酸内切酶测定。将总基因组DNA从T细胞中分离并储存在-80°C下或直接用于测定。使用跨越每个靶标的切割位点的引物进行PCR反应。通过凝胶电泳分析PCR产物以验证扩增子大小和数量。然后将PCR扩增子使用T7E1核酸内切酶消化,并使用2100高分辨率自动化电泳BioAnalyzer®仪器(Agilent)进行分析。使用2100 Expert®软件来确定基因编辑效率。

[0406] 混合白细胞反应。将同种异体CAR T细胞与来自无关供体(标记为“第2供体”)的T细胞的共培养以不同的比率启动,并跟踪16天。使用特定标记物通过流式细胞术测定细胞死亡,以区分和追踪每种特定的细胞类型(即同种异体CAR T细胞相比于“第2供体的”T细胞)。在流式细胞术之前添加123count™eBead以确定细胞的绝对数量,并使用7AAD染料来评估细胞活力。

实施例2

[0407] 本实施例的目的是详述三重敲除策略。

[0408] 下表3展示了包含本公开文本的三重敲除策略(3基因敲除组合)的新型同种异体CAR T细胞平台。独特的方法涉及靶向TCR模块(CD3 δ 、CD3 ϵ 和CD3 γ)的一个或多个基因、HLA-I的一个或多个基因和HLA-II的一个或多个基因。

表3: CRISPR组合			
	TCR	HLA-I	HLA-II
1	TRAC	B2M	C2TA
2	CD3 ϵ	B2M	C2TA
3	CD3 ϵ	B2M	RFX5
4	CD3 ϵ	B2M	RFXAP
5	CD3 ϵ	B2M	RFXANK
6	CD3 ϵ	B2M	HLA-DM
7	CD3 ϵ	TAP1	RFX5
8	CD3 ϵ	TAP1	RFXANK
9	CD3 ϵ	TAP1	RFXAP
10	CD3 ϵ	TAP1	HLA-DM
11	CD3 ϵ	NLRC5	RFX5
12	CD3 ϵ	NLRC5	RFXANK
13	CD3 ϵ	NLRC5	RFXAP
14	CD3 ϵ	NLRC5	HLA-DM
15	CD3 ϵ	TAP2	RFX5
16	CD3 ϵ	TAP2	RFXANK
17	CD3 ϵ	TAP2	RFXAP
18	CD3 ϵ	TAP2	HLA-DM
19	CD3 δ	B2M	C2TA
20	CD3 δ	B2M	RFX5
21	CD3 δ	B2M	RFXAP
22	CD3 δ	B2M	RFXANK
23	CD3 δ	B2M	HLA-DM
24	CD3 δ	TAP1	RFX5
25	CD3 δ	TAP1	RFXANK
26	CD3 δ	TAP1	RFXAP
27	CD3 δ	TAP1	HLA-DM
28	CD3 δ	NLRC5	RFX5
29	CD3 δ	NLRC5	RFXANK

	TCR	HLA-I	HLA-II
30	CD3 δ	NLRC5	RFXAP
31	CD3 δ	NLRC5	HLA-DM
32	CD3 δ	TAP2	RFX5
33	CD3 δ	TAP2	RFXANK
34	CD3 δ	TAP2	RFXAP
35	CD3 δ	TAP2	HLA-DM
36	CD3 γ	B2M	C2TA
37	CD3 γ	B2M	RFX5
38	CD3 γ	B2M	RFXAP
39	CD3 γ	B2M	RFXANK
40	CD3 γ	B2M	HLA-DM
41	CD3 γ	TAP1	RFX5
42	CD3 γ	TAP1	RFXANK
43	CD3 γ	TAP1	RFXAP
44	CD3 γ	TAP1	HLA-DM
45	CD3 γ	NLRC5	RFX5
46	CD3 γ	NLRC5	RFXANK
47	CD3 γ	NLRC5	RFXAP
48	CD3 γ	NLRC5	HLA-DM
49	CD3 γ	TAP2	RFX5
50	CD3 γ	TAP2	RFXANK
51	CD3 γ	TAP2	RFXAP
52	CD3 γ	TAP2	HLA-DM

[0409] 期望敲除多个基因的策略产生改进的同种异体T细胞产物。

实施例3

[0410] 本实施例的目的是制备如本文所述的具有至少一个敲除基因的各种构建体。

[0411] 表1展示了本公开文本的新型同种异体CAR T策略,所述策略涉及敲除(KO)可替代T细胞受体亚基(CD3 δ 、CD3 γ 和CD3 ϵ)和抗原加工和呈递途径中的其他关键基因。特别地,选择15个基因靶标,并且使用CRISPR相关(Cas)(CRISPR-Cas)核酸内切酶系统用多个指导RNA(gRNA)测试每个基因靶标。用于靶向15个基因的示例性gRNA公开于表4中。

表4: 示例性gRNA

SEQ ID NO	基因靶标	gRNA序列 (间隔子)
52	CD3 ϵ	AGATCCAGGATACTGAGGGCA
53	CD3 δ	TCTCTGGCCTGGTACTGGCTA
54	CD3 γ	GCTTCTGCATCACAAGTCAGA
55	B2M	TATCTCTGTACTACTACTGA
56	TAP1	GCTCTTGAGCCAACCGTTG
57	TAP2	CTTCCTCAAGGGCTGCCAGGA
58	TAPBP_gRNA1	CCTACATGCCCCCACCTCC
59	TAPBP_gRNA2	CGCTCGCATCCTCCACGAAC
60	NLRC5	GTGAGCAGCCTCACAAGACAG
61	C2TA	CCTTGGGGCTCTGACAGGTA
62	HLA-DMA	CCAGAACACTCGGGTGCCTCG
63	RFX5_gRNA1	CAAGGCCGTGCAGAACAAAGT
64	RFX5_gRNA2	TTCTGCACGGCCTTGAAATG
65	RFXANK	CCTGCACCCCTGAGCCTGTGA
66	RFXAP	GAGGATCTAGAGGACGAGGAG
67	Ii链_gRNA1	CATCCTGGTGACTCTGCTCCT
68	Ii链_gRNA2	TCCAGCCGGCCCTGCTGCTGG

实施例4

[0412] 本实施例的目的是评价使用聚焦于CD3 δ (图2A)、CD3 ϵ (图2B) 和CD3 γ (图2C) 的靶向破坏的不同构建体敲除TCR α/β 的效率。

[0413] 使用CRISPR/Cas系统靶向破坏CD3 δ (图2A)、CD3 ϵ (图2B) 和CD3 γ (图2C) 基因后通过流式细胞术测量人T细胞上TCR- α 和TCR- β 链破坏效率的百分比。图2A示出了在使用四种不同的指导RNA:gRNA1、gRNA2、gRNA3和gRNA4破坏CD3 δ 后的结果。在CRISPR/Cas系统中使用gRNA1和gRNA3指导RNA对CD3 δ 的破坏导致TCR α/β 的100% KO效率,而在CRISPR/Cas系统中使用gRNA2和gRNA4导致TCR α/β 的大于约90% KO效率。因此,在CRISPR/Cas系统中优选使用gRNA1和gRNA3来破坏CD3 δ 。

[0414] 图2B示出了在使用五种不同的指导RNA:gRNA1、gRNA2、gRNA3、gRNA4和gRNA5靶向破坏CD3 ϵ 后的结果。在CRISPR/Cas系统中使用gRNA4和gRNA5指导RNA对CD3 ϵ 的破坏导致TCR α/β 的100%KO效率,而使用gRNA1导致TCR α/β 的仅约50%KO效率,并且最终在CRISPR/Cas系统中使用指导gRNA2和gRNA3导致TCR α/β 的大于约90%KO效率。因此,在CRISPR/Cas系统中优选使用gRNA4和gRNA5指导RNA来破坏CD3 ϵ 。

[0415] 图2C示出了在使用五种不同的指导RNA:gRNA1、gRNA2、gRNA3、gRNA4和gRNA5靶向破坏CD3 γ 后的结果。在CRISPR/Cas系统中使用gRNA4和指导RNA对CD3 ϵ 的破坏导致TCR α/β 的100%KO效率,而使用gRNA5导致TCR α/β 的大于约95%KO效率,并且最终在CRISPR/Cas系统中使用gRNA1、gRNA2和gRNA3指导RNA导致TCR α/β 的不太有利的KO效率。因此,在CRISPR/Cas系统中优选使用gRNA4指导RNA来破坏CD3 γ 。

实施例5

[0416] 本实施例的目的是评价同种异体CAR T细胞的不同构建体经10天时间段的扩增。

[0417] 测试的不同构建体包括这样的同种异体CAR T细胞,其包含:(1) TRAC敲除(在图3中的同种异体(TRAC KO)) (例如,在本公开文本之前使用的敲除), (2) CD3 δ 敲除(在图3中的同种异体(D1 KO)), (3) CD3 γ 敲除(在图3中的同种异体(G4 KO)), 以及(4) CD3 ϵ 敲除(在图3中的同种异体(E4 KO))。细胞群倍增的百分比显示在Y轴上,而天数显示在X轴上。结果详述在图3中。

[0418] 图3示出了展示使用图1的策略产生的同种异体CAR T细胞的扩增的图并且展示了经十天时间段群体倍增数。测试的同种异体CAR T细胞是工程化T细胞,其包含TRAC敲除(TRAC KO)、CD3 δ 敲除(D1 KO)、CD3 γ 敲除(G4 KO)和CD3 ϵ 敲除(E4 KO)。

实施例6

[0419] 本实施例评价几种不同的敲除构建体以比较TCR- α/β 链的表面表达。

[0420] 图4A和图4B示出了比较CRISPR介导的TCR- α 链(TRAC)敲除(例如,在本公开文本之前使用的构建体)、CD3 δ 敲除(D1 KO)、CD3 γ 敲除(G4 KO)和CD3 ϵ 敲除(E4KO)的下调的流式细胞术结果。图4A示出了CD3 ϵ 敲除(E4 KO)是用于T细胞受体敲除的更好的靶标,如通过TCR- α/β 链的表面表达所测量的。图4B示出了包含CD3 ϵ 敲除(E4KO)的同种异体CAR T细胞具有更高的转导效率并且在功能上优于包含例如CD3 γ 或CD3 δ 敲除的CAR T细胞;展示了PSMACAR T细胞实施方案。

实施例7

[0421] 本实施例的目的是评价不同PSMACAR T细胞构建体的肿瘤杀伤能力。

[0422] 图5示出了显示同种异体PSMACAR T细胞的肿瘤杀伤能力的图,所述细胞包含TCR- α 链(TRAC)敲除(例如,在本公开文本之前使用的构建体)、CD3 δ 敲除(D1)、CD3 ϵ 敲除(E4)和CD3 γ 敲除(G4)。结果表明,PSMA E4同种异体CAR T细胞具有最佳的杀伤能力。靶细胞是PC3细胞,其是人前列腺癌细胞系。

[0423] 这些结果是令人惊讶和出乎意料的,因为当与其他CD3亚基的靶向破坏相比时,没有预料到一个CD3亚基的靶向破坏将导致更有效的同种异体CAR T细胞。图5显示了出乎意料的发现,即当与同种异体TCR- α 链(TRAC)敲除CAR T细胞、同种异体CD3 δ 敲除(D1)CAR T细胞或同种异体CD3 γ 敲除(G4)CAR T细胞相比时,靶向CD3 ϵ (例如,CD3 ϵ 敲除(E4))的同种异体CAR T细胞更有效(即更快地杀伤肿瘤细胞)。

实施例8

[0424] 本实施例的目的是评价CRISPR-Cas方法在实现靶基因敲除中的有效性。特别地，

[0425] 图6A-图6D示出了用T7核酸内切酶错配检测测定(T7E1)展示的CRISPR-Cas活性。图6A示出了从使用三种不同gRNA的三种不同CRISPR-Cas C2TA(CIITA)基因的位点扩增的T7E1处理的PCR产物的代表性凝胶电泳图像。图6B-图6D示出了通过T7E1核酸内切酶测定的Agilent Bioanalyzer电泳图生成的电泳图，其显示了CRISPR-Cas编辑效率。

[0426] 此外，图7A-图7D示出了对照和T7E1处理的PCR的Agilent Bioanalyzer电泳图和凝胶电泳，其展示了C2TA(CIITA)CRISPR编辑效率结果。

实施例9

[0427] 本实施例的目的是测定不同细胞类型的活力。

[0428] 进行混合淋巴细胞测定(MLA)。图8示出了这样的图，所述图展示了使用单独的同种异体细胞、单独的T细胞(第二供体)、在共培养中的同种异体细胞和在共培养中的T细胞(第二供体)的混合淋巴细胞反应(MLR)测定的结果。特别地，将接受者的T细胞(来自不同供体的T细胞)与同种异体CAR T细胞共培养14天，并分析T细胞的增殖。

[0429] 结果显示单独或在共培养中的对照T细胞(第2供体)、同种异体PSMACAR T细胞的活力，并显示“接受者的”T细胞对同种异体细胞的存在没有反应(无增殖)。因此，图8显示尽管存在HLA错配，但来自第2(不相关)供体的T细胞不响应于在共培养中的同种异体PSMACAR T细胞而增殖。同种异体CAR T包含PSMACAR T和CRISPR编辑的TRAC/B2M/C2TA gRNA。因此，本发明的同种异体CAR T细胞将具有杀伤肿瘤细胞的机会窗口，同时不被接受者的免疫系统(即T细胞)检测到。

[0430] 尽管已经说明和描述了某些实施方案，但是应当理解，可以根据本领域的普通技术在其中进行改变和修改，而不背离在如以下权利要求中所限定的其更宽的范围内的技术。

[0431] 本文说明性描述的实施方案可以在不存在本文未具体公开的任何一个或多个要素、一个或多个限制的情况下进行合适的实践。因此，例如，术语“包含”、“包括”、“含有”等应被扩展地且无限制地解读。另外，短语“基本上由……组成”将被理解为包括具体列举的那些要素和不实质上影响所要求保护的技術的基本和新颖特征的那些附加要素。短语“由……组成”不包括任何未指定的要素。

[0432] 另外，在本公开文本的特征或方面按马库什群组(Markush group)来描述的情况下，本领域技术人员应认识到，本公开文本因此也按马库什群组的任何单独成员或成员亚组来描述。

[0433] 如本领域技术人员将理解的，出于任何和所有目的，特别是就提供书面描述而言，本文所公开的所有范围还涵盖其任何和所有可能的子范围和子范围的组合，包含端值。任何列出的范围都可以被容易地识别为充分描述相同的范围并使相同的范围能够分解成至少相等的两等份、三等份、四等份、五等份、十等份等。作为非限制性例子，本文讨论的每个范围都可以容易地分解成下三分之一、中三分之一和上三分之一等。如本领域技术人员还将理解的，如“至多”、“至少”、“大于”、“小于”等所有语言包括所列举的数字，并且是指可以随后分解成如上讨论的子范围的范围。最后，如本领域技术人员应理解，范围包括每个单独

的成员。

[0434] 将本说明书中提及的所有出版物、专利申请、授权专利和其他可公开获得的文件均通过引用并入本文,如同具体且单独地指示将每个单独的出版物、专利申请、授权专利或其他文件通过引用以其整体并入一样。在通过引用并入的文本中包含的定义与本公开文本中的定义相抵触的程度上,将前者排除。

[0435] 其他实施方案陈述于以下权利要求中。

T细胞受体复合物

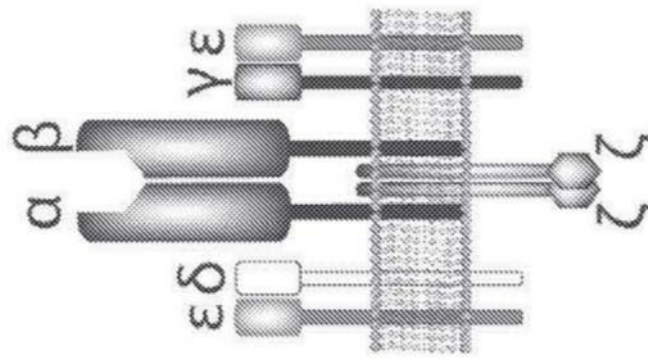


图1

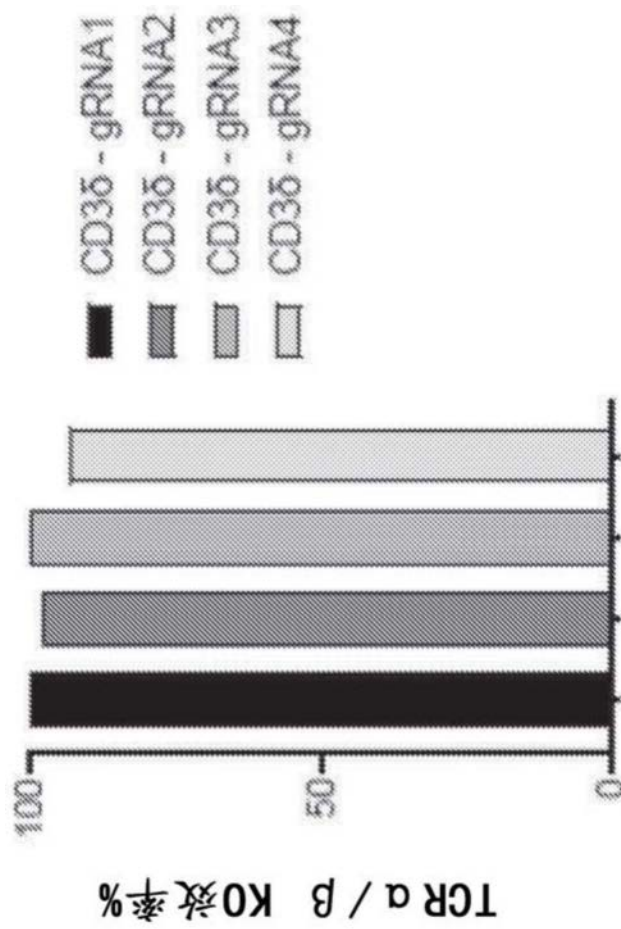


图2A

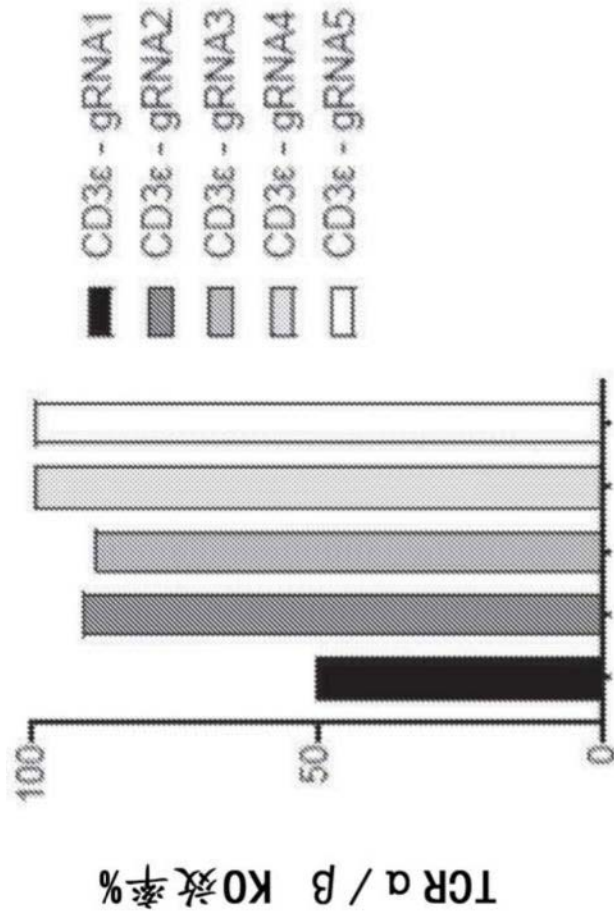


图2B

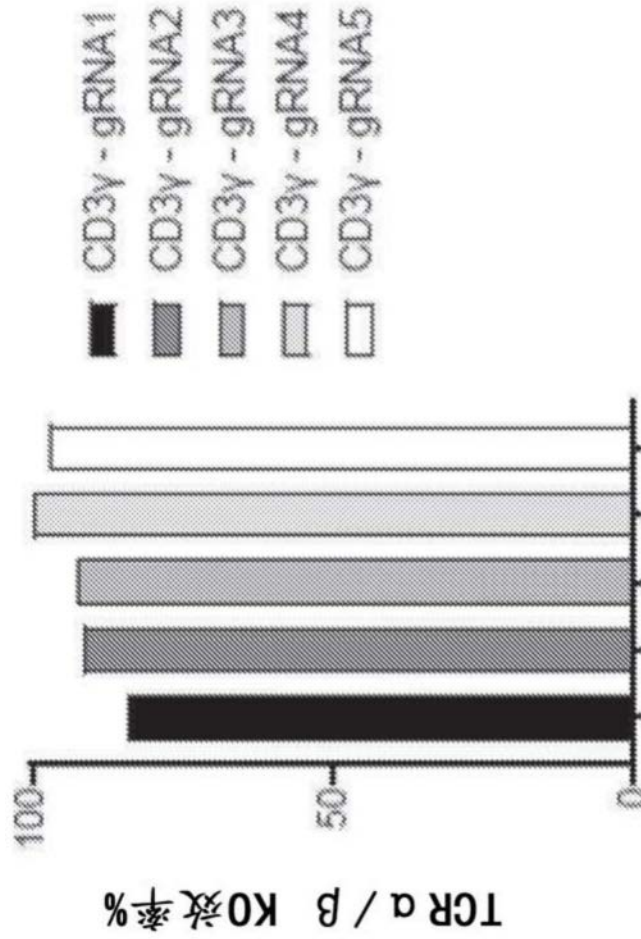


图2C

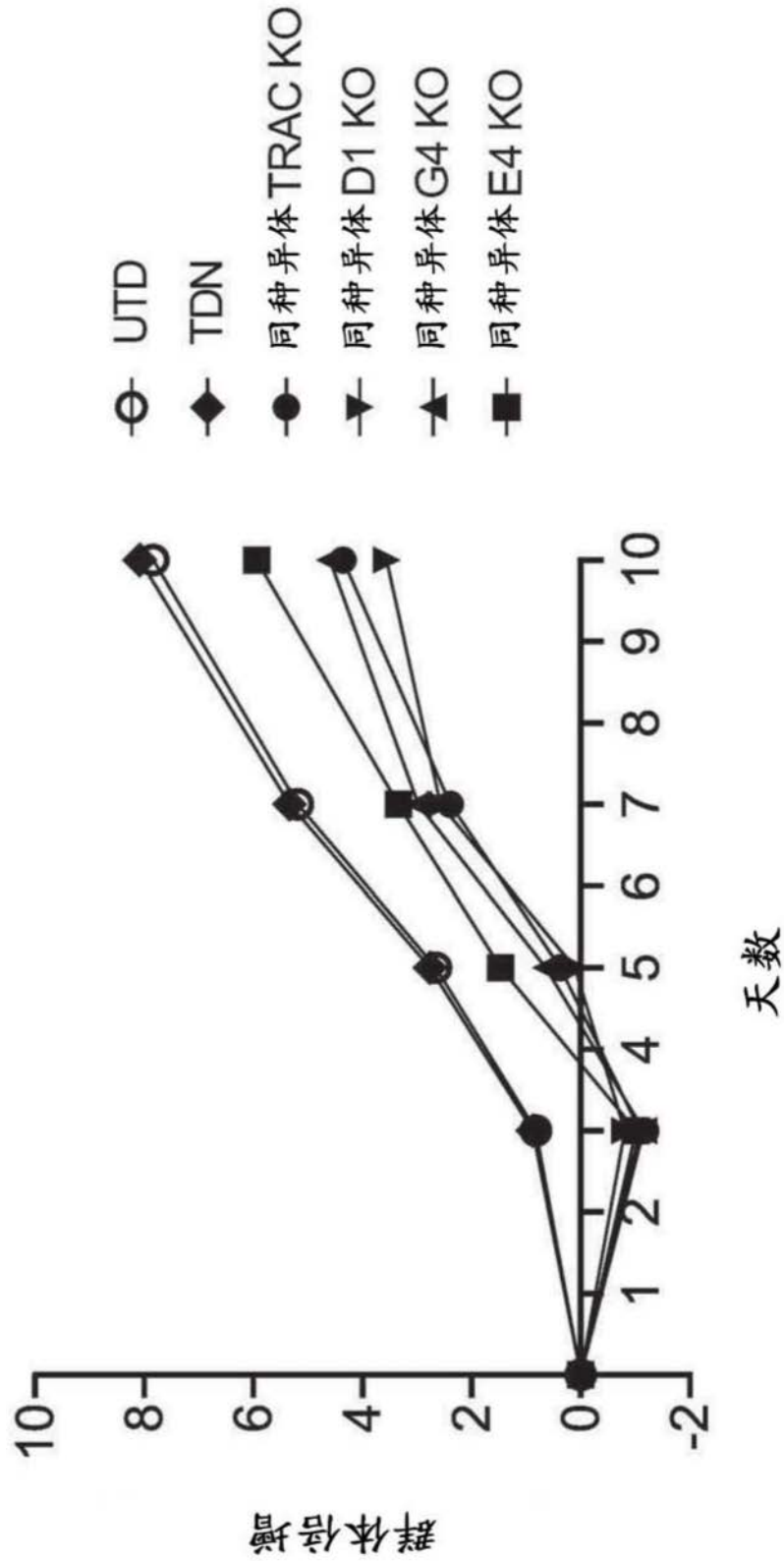


图3

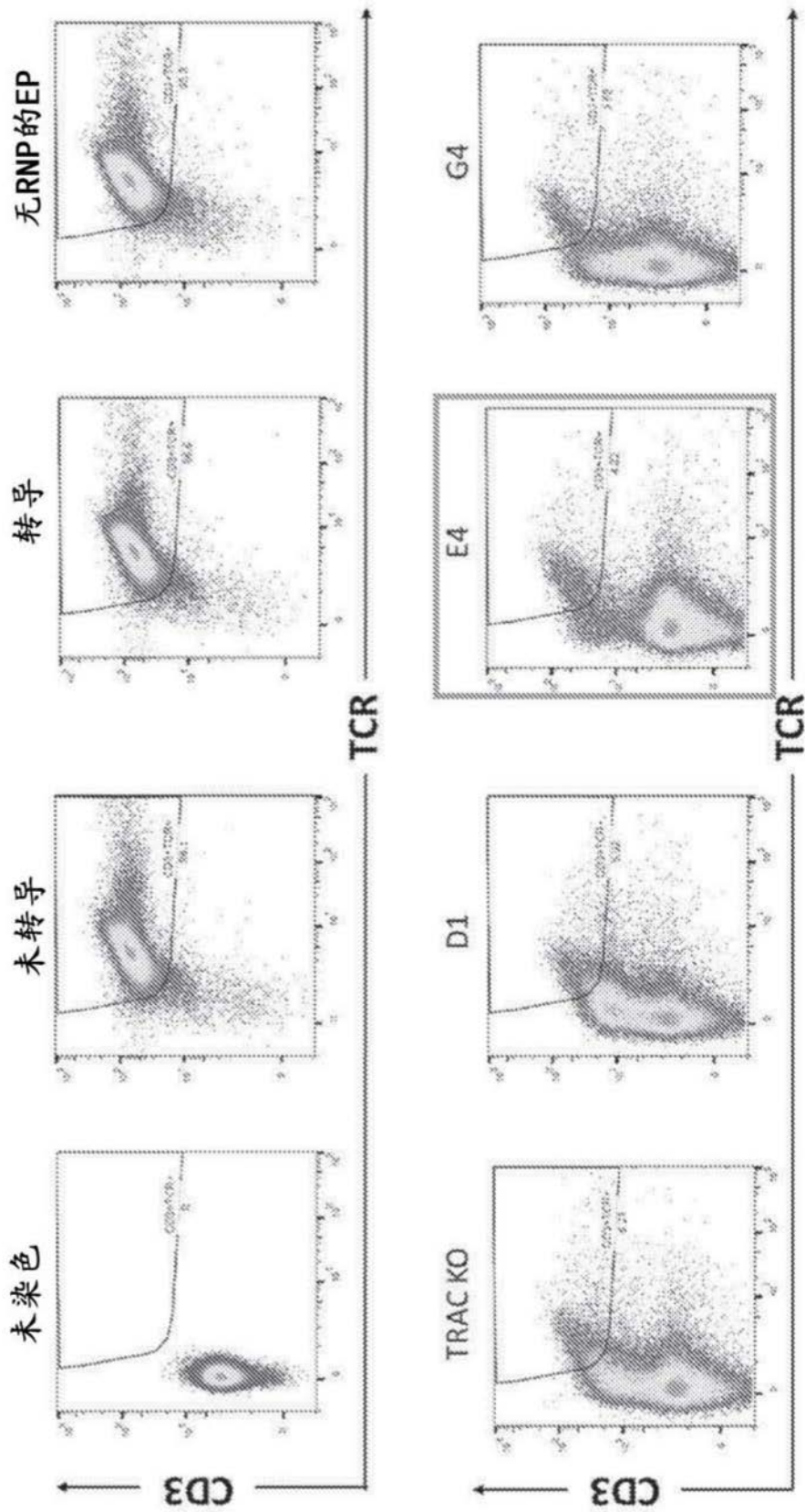


图4A

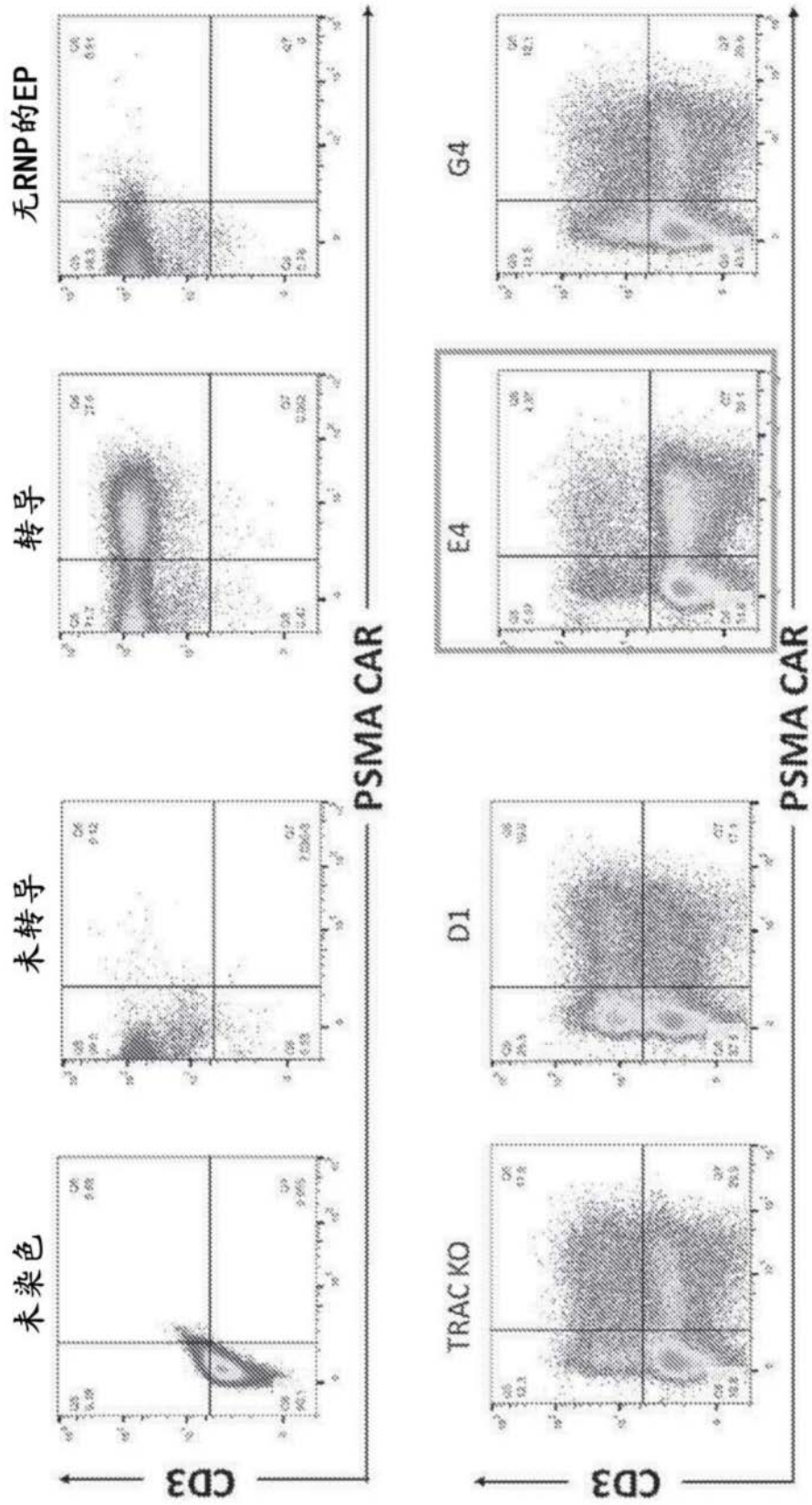


图4B

2:1效应子靶标比

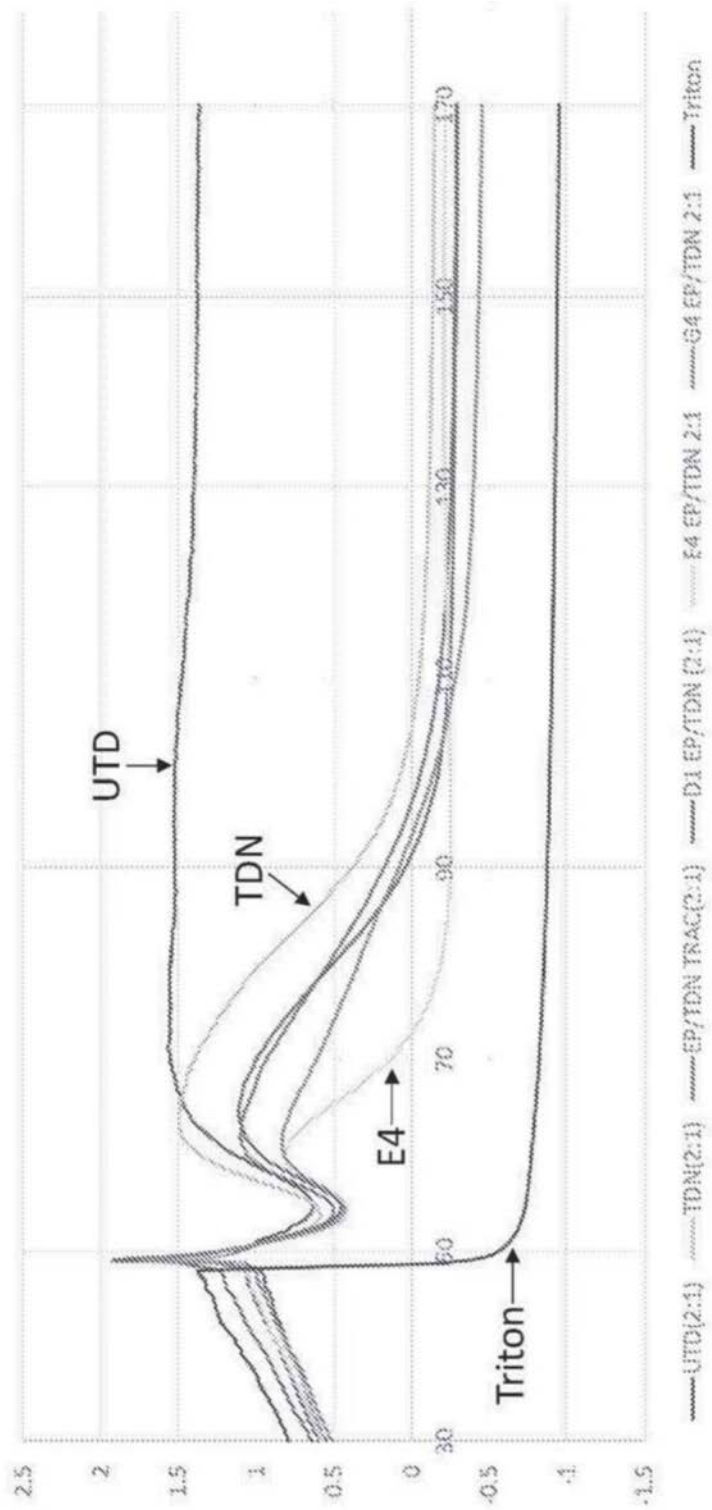


图5

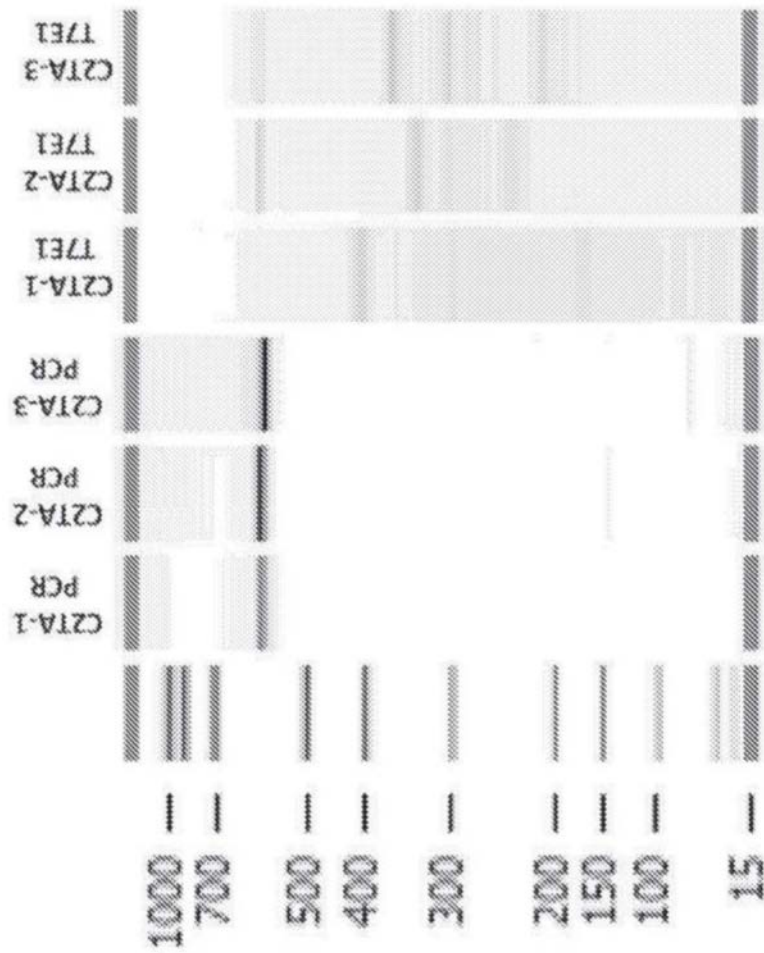


图6A

CZIA-1-17E1

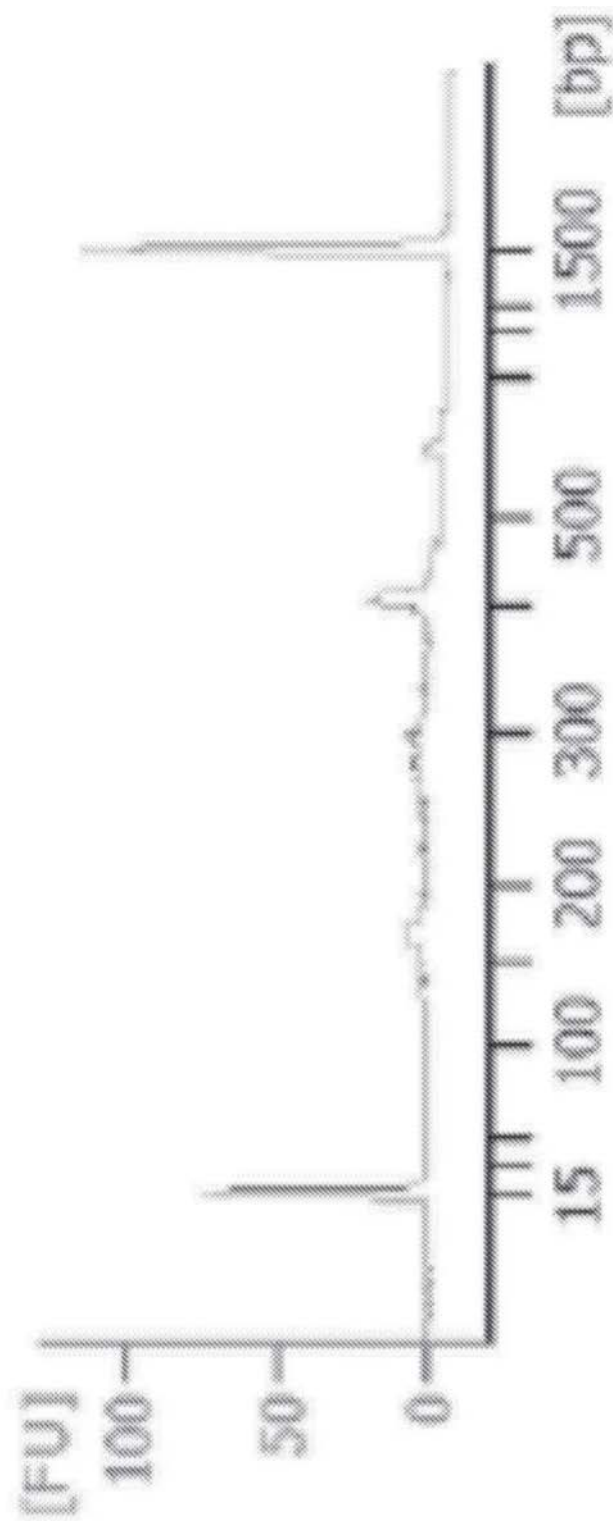


图6B

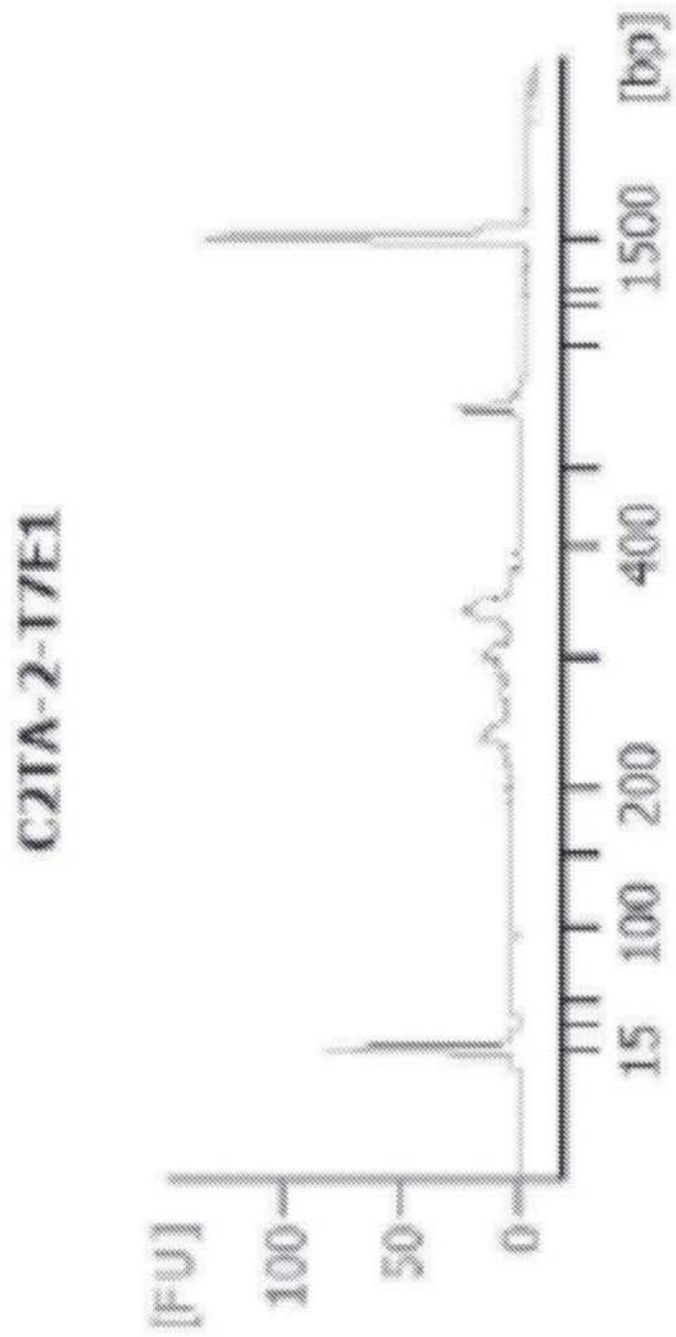


图6C

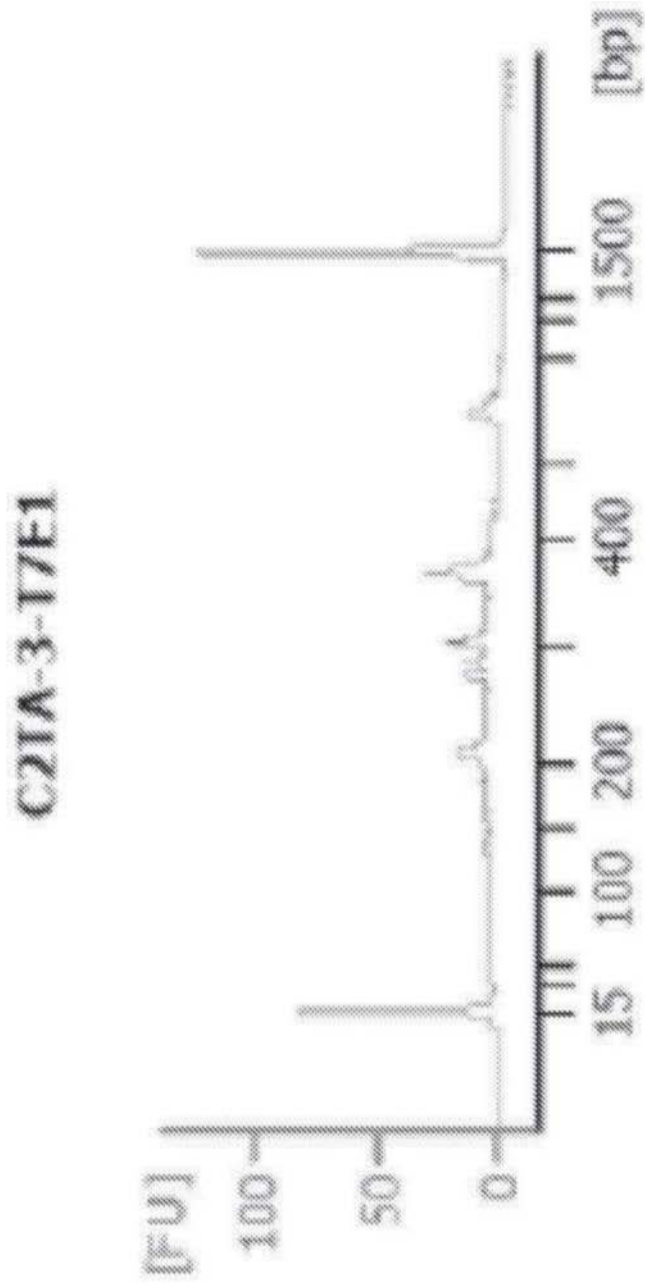


图6D

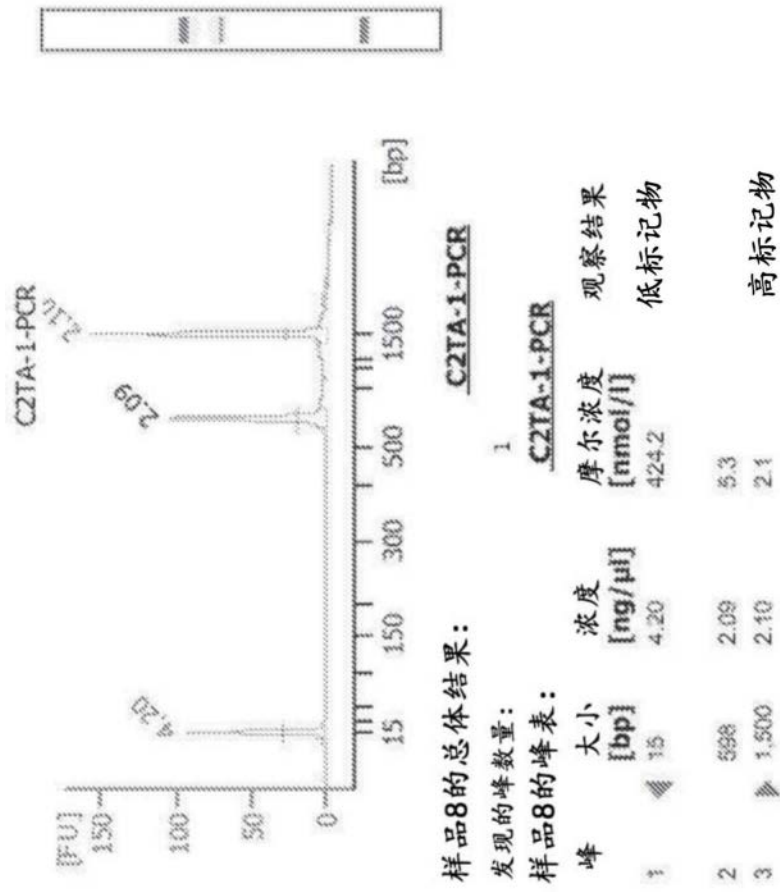


图7A

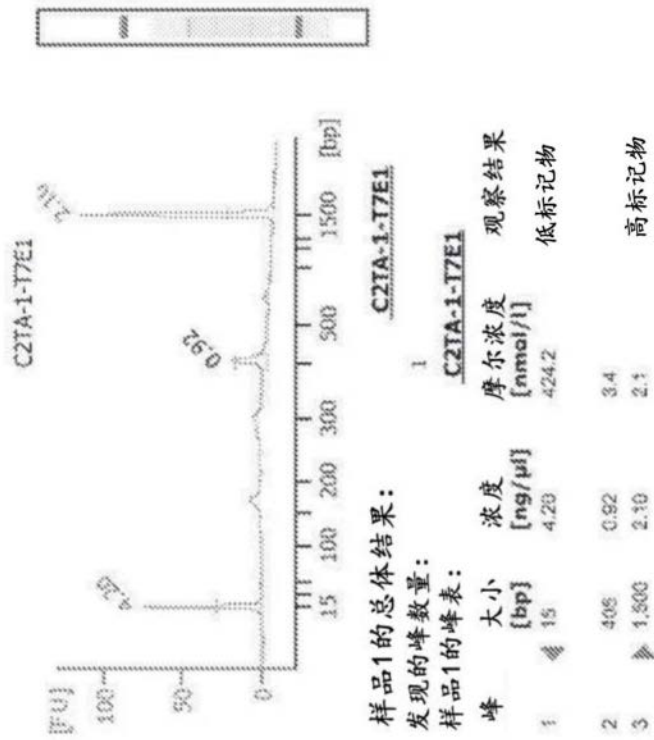


图7B

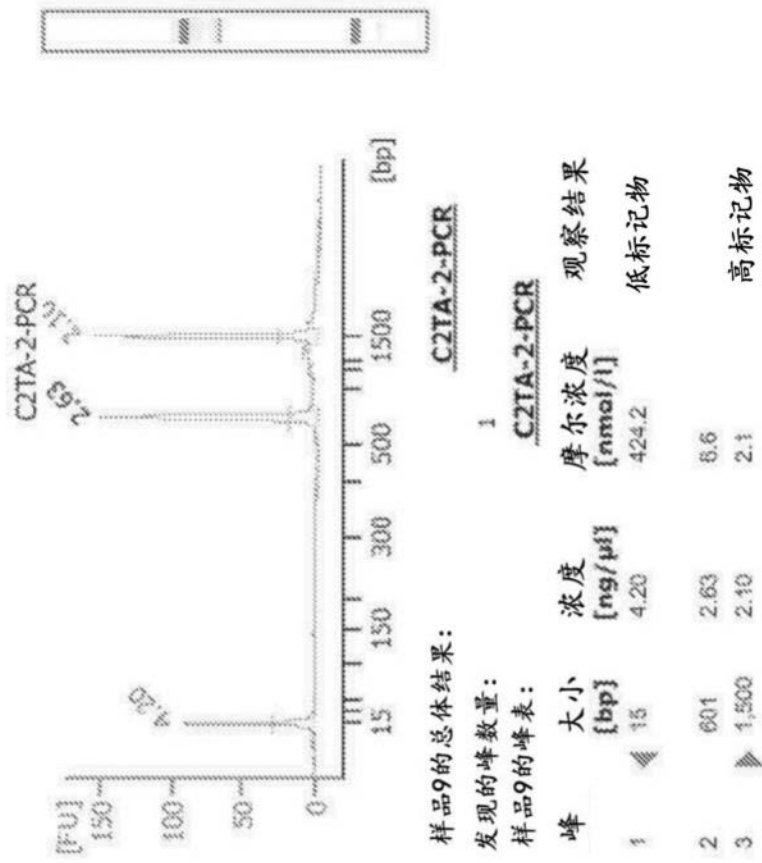


图7C

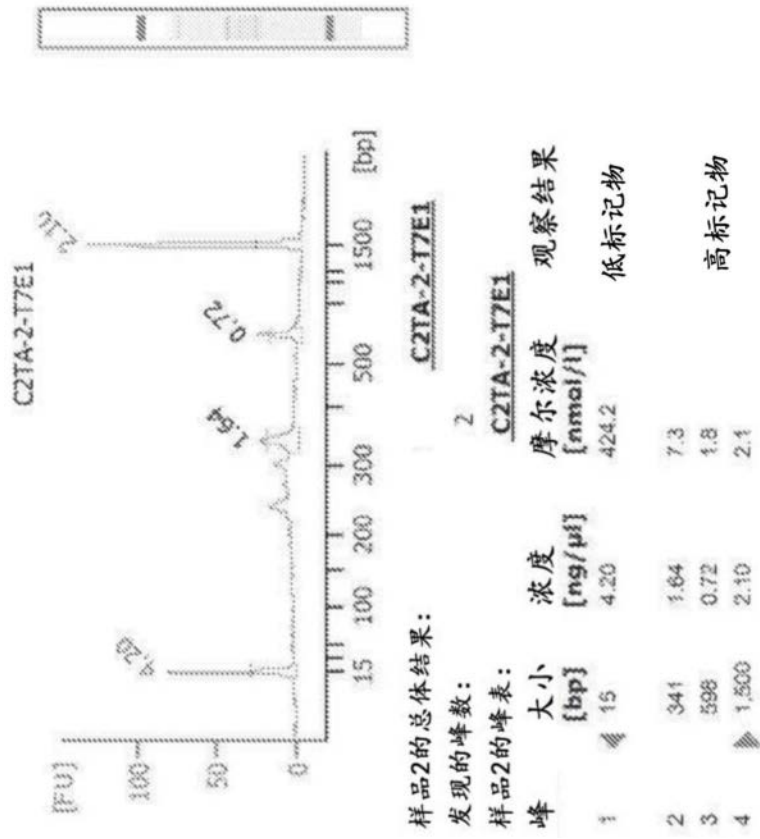


图7D

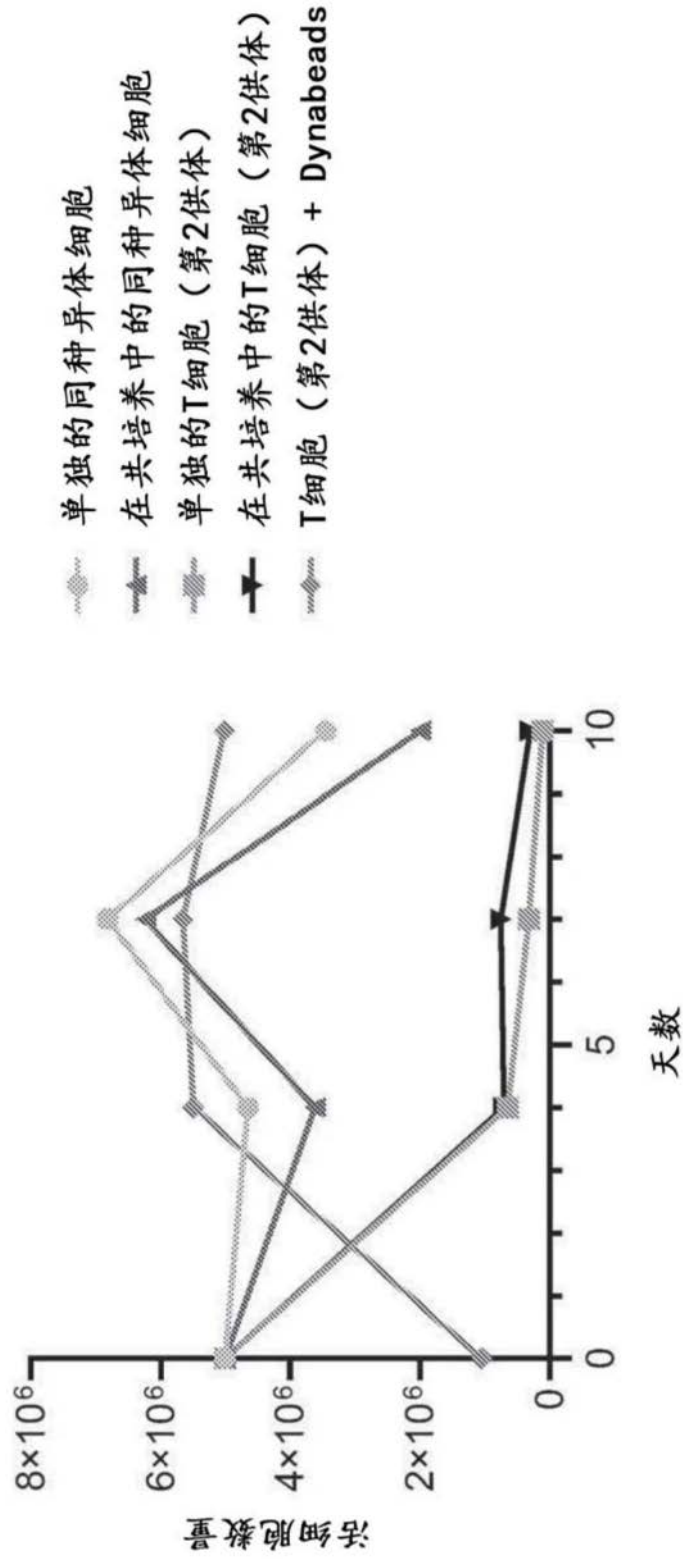


图8