



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114836385 B

(45) 授权公告日 2025.04.04

(21) 申请号 202111354276.6

C12N 15/85 (2006.01)

(22) 申请日 2015.10.15

C12N 15/113 (2010.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

A61K 35/26 (2015.01)

申请公布号 CN 114836385 A

A61K 39/00 (2006.01)

(43) 申请公布日 2022.08.02

A61P 35/00 (2006.01)

(30) 优先权数据

A61P 37/06 (2006.01)

62/073,651 2014.10.31 US

(56) 对比文件

WO 2013074916 A1, 2013.05.23

(62) 分案原申请数据

WO 2014059173 A2, 2014.04.17

201580071634.9 2015.10.15

WO 2015136001 A1, 2015.09.17

(73) 专利权人 宾夕法尼亚大学董事会

Michael H Kershaw等. Gene-engineered T cells for cancer therapy.《Nat Rev Cancer》.2013, 第13卷(第8期), 第525-541页.

地址 美国宾夕法尼亚州

Michael H Kershaw等. Gene-engineered T cells for cancer therapy.《Nat Rev Cancer》.2013, 第13卷(第8期), 第525-541页.

(72) 发明人 赵阳兵 J·任 X·刘 C·H·琼

审查员 谢培

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

权利要求书3页 说明书59页

专利代理人 颜芳

序列表16页 附图156页

(51) Int.Cl.

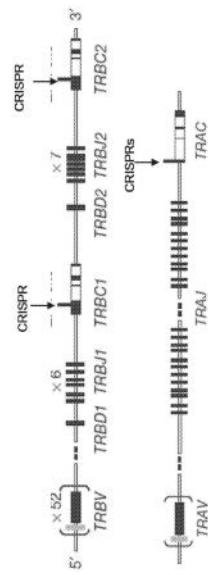
C12N 5/10 (2006.01)

(54) 发明名称

改变CAR T细胞中的基因表达及其用途

(57) 摘要

本发明涉及改变CAR T细胞中的基因表达及其用途。本发明涉及使用能够下调内源基因表达——其选自TCR α链、TCR β链、β-2微球蛋白、HLA分子、CTLA-4、PD1和FAS——的核酸生成修饰的T细胞的组合物和方法，其进一步包括编码修饰的T细胞受体 (TCR) ——其包括对靶细胞上表面抗原的亲和力——的核酸或编码嵌合抗原受体 (CAR) 的电穿孔的核酸。还包括用于过继疗法和治疗病症比如自身免疫性疾病的方法和包含修饰的T细胞的药物组合物。



1. 修饰的嵌合抗原受体 (CAR) T 细胞, 其包括:

能够下调内源 FAS 基因的基因表达的 FAS 基因座中的插入或缺失, 其中所述插入或缺失是用包含 CRISPR/Cas 系统的能够下调 FAS 基因表达的核酸引入的; 和

编码嵌合抗原受体 (CAR) 的核酸, 所述嵌合抗原受体 (CAR) 包括抗原结合结构域、跨膜结构域和第一共刺激分子的胞内结构域;

其中在所述修饰的 CAR T 细胞中内源 FAS 基因的表达减少或消除;

其中所述修饰的 CAR T 细胞的扩展快于野生型 CAR T 细胞的扩展; 并且

其中与野生型 CAR T 细胞相比, 所述修饰的 CAR T 细胞呈现更优的抗肿瘤活性。

2. 权利要求 1 所述的修饰的 CAR T 细胞, 其中所述 CRISPR/Cas 系统包含 pAd5/F35-CRISPR 载体。

3. 权利要求 1 所述的修饰的 CAR T 细胞, 其中

(a) 所述能够下调 FAS 基因表达的核酸在对应于 SEQ ID NO:5 的 FAS 基因序列中引入插入或突变; 和/或

(b) 所述能够下调 FAS 基因表达的核酸包括 CCATGCTGGGCATCTGGACCCCTC 序列。

4. 权利要求 1 所述的修饰的 CAR T 细胞, 其中所述 CAR 的抗原结合结构域包括选自单克隆抗体、多克隆抗体、合成抗体、人抗体、人源化抗体、单结构域抗体、单链可变片段、和其抗原结合片段的抗体。

5. 权利要求 1 所述的修饰的 CAR T 细胞, 其中所述 CAR 的抗原结合结构域特异性地结合靶细胞上的抗原。

6. 权利要求 1 所述的修饰的 CAR T 细胞, 其中所述 CAR 的胞内结构域包括双信号传导结构域。

7. 权利要求 1-6 中任一项所述的修饰的 CAR T 细胞, 进一步包括:

(a) 能够下调内源 TCR α 基因的基因表达的 T 细胞受体 α 链 (TCR α) 基因座中的插入或缺失; 或

(b) 能够下调内源 TCR β 基因的基因表达的 T 细胞受体 β 链 (TCR β) 基因座中的插入或缺失; 以及

(c) 能够下调内源 B2M 基因的基因表达的 β -2 微球蛋白 (B2M) 基因座中的插入或缺失;

其中所述插入或缺失是用编码 CRISPR/Cas 系统的核酸引入的, 以及

其中在所述修饰的 CAR T 细胞中所述内源 TCR α 基因或 TCR β 基因和 B2M 的表达减少或消除。

8. 权利要求 7 所述的修饰的 CAR T 细胞, 其中所述插入或缺失是用包括以下的核酸引入的: 能够下调 FAS、TCR α 或 TCR β 、和 B2M 基因表达的核酸。

9. 离体生成修饰的 CAR T 细胞的方法, 其包括:

将能够下调内源 FAS 基因的基因表达的核酸离体引入 T 细胞, 以生成表达减少或消除的 FAS 基因表达的 T 细胞, 其中能够下调基因表达的所述核酸包括 CRISPR/Cas9 系统;

分离所述表达减少或消除的 FAS 基因表达的 T 细胞; 和

将编码嵌合抗原受体 (CAR) 的核酸引入 T 细胞以生成表达减少或消除的 FAS 基因表达的修饰的 CAR T 细胞, 所述嵌合抗原受体 (CAR) 包括抗原结合结构域、跨膜结构域和胞内结构域;

其中在所述修饰的CAR T细胞中所述内源FAS基因的表达减少或消除。

10. 权利要求9所述的方法,其中所述CRISPR/Cas系统包括pAd5/F35-CRISPR载体。

11. 权利要求9所述的方法,其中所述能够下调基因表达的核酸在对应于SEQ ID NO:5的FAS基因序列中引入插入或突变。

12. 权利要求9所述的方法,其中所述能够下调基因表达的核酸包括CCATGCTGGGCATCTGGACCCTC序列。

13. 权利要求9所述的方法,其中所述CAR的抗原结合结构域包括选自单克隆抗体、多克隆抗体、合成抗体、人抗体、人源化抗体、单结构域抗体、单链可变片段、和其抗原结合片段的抗体。

14. 权利要求9所述的方法,其中所述CAR的抗原结合结构域包括特异性结合CD19的单链可变片段。

15. 权利要求9所述的方法,其中所述CAR的抗原结合结构域特异性地结合靶细胞上的抗原。

16. 权利要求9所述的方法,其中所述CAR的胞内结构域包括双信号传导结构域。

17. 权利要求9所述的方法,其中所述T细胞获得自外周血单核细胞、脐带血细胞、纯化的T细胞群和T细胞系。

18. 权利要求9所述的方法,其中所述方法进一步包括扩展所述T细胞。

19. 权利要求18所述的方法,其中扩展所述T细胞的步骤包括使用选自f1t3-L、IL-1、IL-3和c-kit配体的因子培养所述T细胞。

20. 权利要求9所述的方法,进一步包括冷藏所述T细胞。

21. 权利要求20所述的方法,进一步包括在将所述核酸引入所述T细胞之前解冻冷藏的所述T细胞。

22. 权利要求9所述的方法,其中引入所述核酸选自转导所述T细胞、转染所述T细胞和电穿孔所述T细胞。

23. 权利要求9-21中任一项所述的方法,进一步包括:

(a) 能够下调内源TCR α 基因的基因表达的T细胞受体 α 链(TCR α)基因座中的插入或缺失;或

(b) 能够下调内源TCR β 基因的基因表达的T细胞受体 β 链(TCR β)基因座中的插入或缺失;以及

(c) 能够下调内源B2M基因的基因表达的 β -2微球蛋白(B2M)基因座中的插入或缺失;其中所述插入或缺失是用编码CRISPR/Cas系统的核酸引入的。

24. 权利要求23所述的方法,其中所述插入或缺失是用包括以下的核酸引入的:能够下调FAS、TCR α 或TCR β 、和B2M基因表达的核酸。

25. 权利要求9所述的方法,进一步包括在所述T细胞中表达Klf4、Oct3/4和Sox2以诱导所述T细胞的多能性。

26. 权利要求1-8中任一项所述的修饰的CAR T细胞用于制备用于治疗对象中的癌症的药物的用途。

27. 权利要求26所述的用途,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、结肠直肠癌、肾癌、肝癌、脑癌、淋巴瘤、白血病、肺癌和其任意组合。

28. 权利要求1-8中任一项所述的修饰的CAR T细胞用于制备用于刺激针对对象中的靶细胞或组织的T细胞-介导的抗肿瘤免疫应答的药物的用途。

29. 权利要求1-8中任一项所述的修饰的CAR T细胞用于制备用于有需要的对象中的过继细胞转移疗法以预防或治疗癌症的药物的用途。

30. 组合物,其包括根据权利要求9-24中任一项所述的方法生成的修饰的CAR T细胞。

31. 药物组合物,其包括根据权利要求9-24中任一项所述的方法生成的修饰的CAR T细胞和药学上可接受的载体。

改变CAR T细胞中的基因表达及其用途

[0001] 本申请是分案申请，原申请的申请日为2015年10月15日，申请号为201580071634.9，发明名称为“改变CAR T细胞中的基因表达及其用途”。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请根据35 U.S.C. §119(e) 有权享有在2014年10月31日提交的美国临时专利申请号62/073,651的优先权，所述临时专利申请由此通过引用以其全部并入本文。

[0004] 关于联邦资助的研究或开发的声明

[0005] 本发明在美国国立卫生研究院给予的CA120409下利用政府支持完成。政府拥有本发明中的某些权利。

技术领域

[0006] 本申请涉及改变CAR T细胞中的基因表达及其用途。

背景技术

[0007] 使用嵌合抗原受体 (CAR) 修饰的T细胞的过继细胞转移 (ACT) 已经显示成为用于癌症治疗的有希望的策略 (Louis等, 2011, Blood 118:6050-6056; Kochenderfer等, 2010, Blood 116:3875-3886和Porter等, 2011, N Engl J Med 365:725-733)。

[0008] 使用慢病毒或逆转录病毒载体的整合关联的安全关注是对用于ACT的细胞修饰的主要关注。已经取得一些进步以避免中靶 (on-target) 或脱靶 (off-target) 的有害的副作用，比如使用T细胞受体 (TCR) 或CAR RNA电穿孔进行T细胞的RNA转染 (Zhao, 2006, Mol Ther 13:151-159; Mitchell等, Smits等, 2004, Leukemia 18:1898-1902)。通过使RNA和T细胞二者的剂量最小化，这样的方法高效地允许将多种基因引入细胞。然而，对于CAR瞬时表达的主要约束是RNA转染的T细胞的亚适的效应物活性和功能。多种T细胞输注和/或显著使用低剂量化疗已经用于改进CAR功能 (Barrett等, 2013, Hum Gene Ther 24(8):717-27)。

[0009] 已经做出多种尝试以改进CAR的效应物活性和功能，同时以便避免对联合疗法和额外治疗的需要。在转染过程期间增加RNA对T细胞功能——尤其是体内抗肿瘤活性——形成负面影响 (Barrett等, 2011, Hum Gene Ther 22:1575-1586)。也已经在癌症治疗的临床试验中测试了将抗CD3抗原抗体片段与抗肿瘤抗原抗体片段融合的可选的构建体 (Bargou等, 2008, Science 321:974-977; Klinger等, 2012, Blood 119:6226-6233.)。不幸地，这些构建体由于短的半衰期、差的靶细胞位点的可及性和缺乏适当的长期信号传导功能而在功能上严重地受限。

[0010] 临床TCR研究已经受阻于转导的TCR的低表达水平，以及 α 与 β 链的错配。因为当T细胞转录两种不同的TCR的链 (天然的 α/β 、外源的 α/β 、和天然/外源的“错配的”异二聚体) 时，四种TCR可以潜在地在细胞表面处表达，所以对使用此方法的显著阻碍是显而易见的。在迄今为止进行的研究中，临床前研究已经清楚地展现出TCR错配具有诱导自体抗原的有害识别的潜力。

[0011] 虽然在治疗癌症中获得的早期TCR和CAR T细胞临床数据已经显示了有希望的结

果,但是对患者的风险较高,并且一些患者的T细胞甚至在TCR或CAR重定向后对有效治疗也不是足够有效的,这促使修饰同种异体的供体源T细胞。然而,输注的同种异体T细胞上的内源性 $\alpha\beta$ T细胞受体可以识别接受者中的主要和次要组织相容性抗原,这导致了移植植物抗宿主疾病(GVHD)。结果,使用自体CAR T细胞输注的大多数当前的临床试验依赖于免疫耐受性以在过继细胞转移后防止TCR介导的正常组织的有害识别。此方法已经取得了早期临床成功,但是受限于制造患者特异性T细胞产物的时间和花费。因此,存在对修饰T细胞同时规避制造患者特异性T细胞产物的时间和花费的更安全的方法的需要。

发明内容

[0012] 如本文描述的,本发明涉及用于生成修饰T细胞的组合物和方法,所述修饰的T细胞具有能够改变内源基因——其选自TCR α 链、TCR β 链、 β -2微球蛋白、HLA分子、CTLA-4、PD1和FAS——的基因表达的核酸,并且进一步包含编码嵌合抗原受体(CAR)的核酸。

[0013] 本发明的一个方面包括修饰的T细胞,其包含能够下调内源基因——其选自TCR α 链、TCR β 链、 β -2微球蛋白、HLA分子、CTLA-4、PD1和FAS——的基因表达的核酸;和编码嵌合抗原受体(CAR)的核酸,所述嵌合抗原受体(CAR)包括抗原结合结构域、跨膜结构域和共刺激分子的胞内结构域。

[0014] 在另一方面,本发明包括用于生成修饰的T细胞的方法,其包括将能够下调内源基因——其选自TCR α 链、TCR β 链、 β -2微球蛋白、HLA分子、CTLA-4、PD1和FAS——的基因表达的核酸引入T细胞;和引入编码嵌合抗原受体(CAR)的核酸,所述嵌合抗原受体(CAR)包括抗原结合结构域、跨膜结构域。

[0015] 在又另一方面,本发明包括治疗与对象中增强的免疫性相关联的疾病或病症的方法,其包括施用有效量的药物组合物至需要其的对象,所述药物组合物包括本文描述的修饰的T细胞。

[0016] 在还另一方面,本发明包括治疗对象中的病症的方法,其包括给对象施用治疗有效量的药物组合物,所述药物组合物包括本文描述的修饰的T细胞。

[0017] 在另一方面,本发明包括用于刺激对对象中的靶细胞或组织的T细胞-介导的免疫应答的方法,其包括给对象施用有效量的药物组合物,所述药物组合物包括本文描述的修饰的T细胞。

[0018] 在又另一方面,本发明包括用于过继细胞转移疗法的方法,其包括施用有效量的药物组合物至需要其的对象以预防或治疗不利于对象的免疫反应,所述药物组合物包括本文描述的修饰的T细胞。

[0019] 在还另一方面,本发明包括本文描述的修饰的T细胞在制造用于治疗需要其的对象中的免疫应答的药物中的用途。

[0020] 在另一方面,本发明包括组合物,其包括根据本文描述的方法生成的修饰的T细胞。

[0021] 在又另一方面,本发明包括药物组合物,其包括根据本文描述的方法生成的修饰的T细胞。

[0022] 在本文描绘的本发明的上述方面或任何其它方面的多种实施方式中,能够下调基因表达的核酸选自反义RNA、antigomer RNA、siRNA、shRNA、和CRISPR系统,比如pAd5/F35-

CRISPR载体。

[0023] 在一个实施方式中,CAR的抗原结合结构域包括选自单克隆抗体、多克隆抗体、合成抗体、人抗体、人源化抗体、单结构域抗体、单链可变片段、和其抗原结合片段的抗体。在另一个实施方式中,CAR的抗原结合结构域特异性地结合靶细胞上的抗原。在还另一个实施方式中,CAR的胞内结构域包括双信号传导结构域。

[0024] 在另一个实施方式中,本文描述的修饰的T细胞进一步包括编码共刺激分子比如CD3、CD27、CD28、CD83、CD86、CD127、4-1BB、4-1BBL、PD1和PD1L的外源性核酸。在一个实施方式中,本文描述的生成修饰的T细胞的方法进一步包括将编码共刺激分子的RNA电穿孔入T细胞。在其中共刺激分子是CD3的一些实施方式中,CD3包括至少两条不同的CD3链,比如CD3 ζ 和CD3 ϵ 链。

[0025] 在另一个实施方式中,T细胞获得自外周血单核细胞、脐带血细胞、纯化的T细胞群和T细胞系。

[0026] 在还另一个实施方式中,如本文描述的生成修饰的T细胞的方法进一步包括扩展T细胞。在一个实施方式中,扩展T细胞包括使用选自flt3-L、IL-1、IL-3和c-kit配体的因子培养T细胞。

[0027] 在还另一个实施方式中,如本文描述的生成修饰的T细胞的方法进一步包括冷藏T细胞。在另一个实施方式中,本文描述的方法进一步包括在将核酸引入T细胞之前解冻冷藏的T细胞。

[0028] 在一个实施方式中,引入核酸选自转导扩展的T细胞、转染扩展的T细胞和电穿孔扩展的T细胞。

[0029] 在还另一个实施方式中,本文描述的方法进一步包括在T细胞中表达Klf4、Oct3/4和Sox2以诱导T细胞的多能性。

[0030] 在本文描绘的本发明的上述方面或任何其它方面的多种实施方式中,本发明包括施用修饰的T细胞至对象。在一个实施方式中,对象具有病症,比如自身免疫性疾病。在一些实施方式中,自身免疫性疾病选自获得性免疫缺陷综合征(AIDS)、斑秃、强直性脊柱炎、抗磷脂综合征、自身免疫性阿狄森氏病、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性肝炎、自身免疫性内耳疾病(AIED)、自身免疫性淋巴细胞增生综合征(ALPS)、自身免疫性血小板减少性紫癜(ATP)、贝切特氏病、心肌病、乳糜泻(celiac sprue)-疱疹样皮炎、慢性疲劳免疫功能障碍综合征(CFIDS)、慢性炎性脱髓鞘性多发性神经病(CIPD)、疤痕性类天疱疮、冷凝集素疾病、CREST综合征、克罗恩病、德戈斯氏病、青少年型皮肌炎(dermatomyositis-juvenile)、盘状狼疮、特发性混合型冷沉淀球蛋白血症、纤维肌痛-纤维肌炎、格雷夫斯氏病、格-巴二氏综合征、桥本氏甲状腺炎、特发性肺纤维变性、特发性血小板减少性紫癜(ITP)、IgA肾病、胰岛素依赖型糖尿病、青少年慢性关节炎(斯提耳氏病)、青少年型类风湿性关节炎、美尼尔氏病、混合结缔组织病、多发性硬化、重症肌无力、恶性贫血(pernicious anemia)、结节性多动炎症、多软骨炎、多腺体综合征、风湿性多肌痛、多发性肌炎和皮肌炎、原发性无丙种球蛋白血症、原发性胆汁性肝硬变、牛皮癣、牛皮癣性关节炎、雷诺氏现象、莱特尔综合征、风湿热、类风湿性关节炎、结节病、硬皮病(进行性全身性硬化症(PSS),也称为全身性硬化症(SS))、斯耶格伦氏综合征、僵体综合征、系统性红斑狼疮、高安氏动脉炎、颞动脉炎/巨细胞动脉炎、溃疡性结肠炎、眼葡萄膜炎、白斑病、韦格纳氏肉芽肿病和其任意组合。

[0031] 在另一个实施方式中,病症是癌症,比如选自乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、宫颈癌、皮肤癌、胰腺癌、结肠直肠癌、肾癌、肝癌、脑瘤、淋巴瘤、白血病、肺癌和其任意组合的癌症。
[0032] 在另一个实施方式中,本文描述的方法进一步包括诱导靶细胞或组织的裂解,比如抗体依赖的细胞介导的细胞毒性(ADCC)。

附图说明

[0033] 当结合附图阅读时,将更好地理解本发明的优选实施方式的下列详细描述。出于说明本发明的目的,在附图中显示了当前优选的实施方式。然而,应当理解本发明不限于在附图中显示的实施方式的精确布置和手段。

[0034] 图1,包括图1A-1C,是293T细胞中的TCR $\alpha\beta$ -CD3复合体的CRISPR设计和靶向的图示。图1A显示了TCR- α 与 β 恒定区的基因组基因座内的CRISPR gRNA靶向位点。每个外显子由块显示。黑色块代表编码区。灰色柱代表非编码区。十三种gRNA被设计为靶向TCR α 恒定区(TRAC)的外显子1,10种gRNA靶向TCR β 恒定区1(TRBC1)和2(TRBC2)的外显子1上的保守序列,并且10种gRNA靶向 β -2微珠蛋白基因的外显子1。图1B显示了典型的gRNA支架序列(scaffold sequence)。gRNA PCR产物通过重叠PCR生成并且被克隆入具有T7启动子的MSGV载体。图1C显示了Sanger测序结果,其显示在将CAS9 mRNA和gRNA转染入细胞后,在293T TCR TRAC和TRBC基因组PCR产物中存在多个峰。

[0035] 图2,包括图2A-2E,显示了原代T细胞中TCR $\alpha\beta$ -CD3复合体的破坏。图2A是显示用于利用BTX830将CAS9 mRNA和gRNA电穿孔入原代T细胞的参数的表格。360V 1ms以及2mm小池产生用于电穿孔第3天珠刺激的原代T细胞的最好的平均荧光强度(MFI)和效率。图2B是图组,其显示与正常的37°C 5% CO₂条件相比,在32°C 5% CO₂下培育的T细胞具有高得多的MFI。图2C是CRISPR系统转移入原代T细胞的示意图。在珠刺激原代T细胞后三天,CAS9 mRNA和gRNA被电转移入T细胞。T细胞然后使用100IU/mL的IL-2进行培养,并且一些细胞在32°C 5% CO₂下培育1天并且然后持续另一个7至9天。在电穿孔后第7-9天通过流式细胞术分析CD3表达。图2D是图组,其显示在37°C下的靶向效率比在32°C下高大约2.5倍。图2E是图组,其显示了在电转移不同量和比值的CAS9与靶向TCR β 的gRNA后第6天CD3的下调。通过对CD3染色分析CD3表达。显示了电穿孔后第6天时的代表性流式细胞术(flow)数据。象限代表CD3阴性细胞在T细胞群中的百分数。

[0036] 图3,包括图3A-3D,显示T细胞中的TCR^{neg} α 或 β 敲除可以通过耗减TCR^{pos} T细胞被富集。图3A是图组,其显示了在T细胞中TCR^{neg} α 或 β 敲除的微珠耗减之前和之后的CD3表达。流式细胞术图解了CD3的表达。右下象限中的数字代表CD3阴性细胞在T细胞群中的百分数。图3B是测序图组,其显示在CD3^{neg}富集的T细胞基因组PCR产物中观察到多个峰。图3C是图组,其显示了在使用CRISPR修饰的单个 α 链、 β 链和 $\alpha\beta$ 双敲除T细胞中的CD3微珠富集后CD4和CD8 T细胞所有组成成分分析。数据显示CD8 T细胞群的比值通过CRISPR修饰被富集,这表明CD8 T细胞比CD4 T细胞可能更容易被修饰。图3D显示了在CRISPR修饰后被引入至TCR α 与 β 基因座的缺失和插入的测序结果。

[0037] 图4,包括图4A-4C,显示了多次电转移gRNA极大地提高了CRISPR系统在原代T细胞中的靶向效率。图4A是图组,其显示多次电穿孔gRNA极大地提高了靶向效率。在24小时内电穿孔T细胞多至三次给出最高的靶向效率,几乎80%。在初始实验中,在T细胞中取得仅15%

的TCR靶向效率。在将CAS9 mRNA电转移入T细胞后观察到CAS9的持续表达。低切割效率的可能原因可能是由于gRNA的快速降解。获得了更高的CD3阴性群。图4B是图组,其显示帽化损害gRNA的功能,同时第二轮中gRNA的早期引入产生更高的效率。图4C是图组,其显示在ND221中多次电转移靶向TRAC和TRBC的gRNA分别给出大约64.5%和57.5%的切割率。

[0038] 图5,包括图5A和5B,显示TCR^{neg} T细胞可以在不同的刺激条件下扩展。图5A是图组,其显示在将TCR α 与 β 链再引入TCR^{neg} T细胞后,TCR^{neg} T细胞恢复CD3表达。在将TCR α 与 β 链电穿孔入TCR^{neg} T细胞后检测到CD3和Vb13.1。CD3表达水平比得上TCR^{pos} T细胞。图5B是图组,其显示了不同条件用于刺激TCR^{neg} T细胞后的扩展倍数。PBMC REP产生大约500倍扩展,而CD3/CD28珠,或K562 aAPC再刺激产生大约25-58倍扩展。

[0039] 图6,包括图6A和6B,显示了在不同条件下扩展后的TCR^{neg} T细胞特性。图6A是图组,其显示了在不同条件下扩展后的TCR^{neg} T细胞表型特性。图6B是图组,其显示了在不同条件下扩展后的TCR^{neg} T细胞表型特性。

[0040] 图7,包括图7A-7C,显示了在体外重定向后具有有效的抗肿瘤活性的扩展的TCR^{neg} T细胞。图7A是图组,其显示TCR^{neg} T细胞可以通过在细胞中引入抗NY-ESO 1G4 TCR被重定向。与CAS9空白对照组(MOCK group)比较,当通过1G4 TCR重定向时,TCR^{neg} T细胞显示了由于外源性和内源性TCR α 与 β 链的更少的错配引起的更高水平的Vb13.1表达。图7B是图组,其显示了当与肿瘤(Nalm6-ESO)细胞系共培养时,使用1G4 TCR重定向的TCR^{neg} T细胞具有高的脱粒活性。图7C是显示使用1G4 TCR重定向的TCR^{neg} T细胞具有针对肿瘤细胞系的高的细胞毒性的图。

[0041] 图8是一组图示,其显示了定向的TCR^{neg} T细胞在重定向后控制NSG小鼠中肿瘤的生长。

[0042] 图9,包括图9A-9D,显示通过 β -2微珠蛋白的破坏获得HLA-I类(HLA-CLASS I)消除。图9A显示能够破坏HEK293细胞中的 β -2微珠蛋白基因座的CRISPR的测序数据。图9B是图组,其显示通过 β -2微珠蛋白的破坏生成bHLA-I类阴性T细胞群。图9C是图组,其显示cIFNg提高原代T细胞中 β -2微珠蛋白的靶向效率。图9D是图组,其显示HLA-I类^{neg} T细胞通过微珠耗减被富集。

[0043] 图10是图组,其显示原代T细胞中的HLA-I类和TCR的同时敲除。使用CD3/CD28免疫磁珠(dynabead)刺激CD4和CD8 T细胞。刺激后三天,扩展的T细胞电穿孔有CAS9mRNA连同TCR β 恒定区(TRBC)和靶向 β -2微珠蛋白的gRNA。在电穿孔后六天,使用抗CD3单克隆抗体(mAb)和抗 β -2微珠蛋白mAb评估TCR表达和 β -2微珠蛋白表达二者。数字代表每个象限中群的百分数。

[0044] 图11,包括图11A-11D,显示了原代T细胞中HLA-I类和TCR α 与 β 链的三敲除。图11A是图组,其显示使用CD3/CD28免疫磁珠刺激CD4和CD8 T细胞。刺激后三天,扩展的T细胞电穿孔有CAS9 mRNA,连同TCR α 、 β 恒定区(TRAC、TRBC)和靶向 β -2微珠蛋白的gRNA。在电穿孔后六天,使用抗CD3单克隆抗体(mAb)和抗 β -2微珠蛋白mAb评估TCR表达和HLA-I类表达二者。数字代表每个象限中群的百分数。图11B是图解HLA-I类与TCR α 和 β 链三敲除T细胞的分离的示意图。图11C是图组,其显示了通过GFP表达测试的电穿孔效率。图11D是图组,其显示了通过流式细胞术测量的将TCR α 与 β 链再引入TCR^{neg} T细胞。在总TCR^{neg} T细胞中观察到大约64%的 α 阴性和大约14% β 阴性群。

[0045] 图12,包括图12A-12D,显示了293T细胞中FAS的敲除。图12A是显示当FAS在293T细胞中敲除时多个峰的Sanger测序结果的图像。图12B是图组,其显示了FACS数据,所述数据揭示FAS蛋白的表面表达被CRISPR破坏。图12C是图像组,其显示了在与CRISPR同源重组后FAS蛋白被替换为GFP。图12D是FACS数据的图组,其显示了与CRISPR同源重组的百分数。

[0046] 图13显示了原代T细胞中FAS的敲除。FACS数据图解了表面FAS蛋白表达被CRISPR废除。

[0047] 图14,包括图14A和14B,显示了293T和原代T细胞中PD1的敲除。图14A是显示当PD1在293T细胞中被靶向时多个峰的Sanger测序结果的图像。图14B是图组,其显示了被CRISPR破坏的PD1蛋白的表面表达的FACS数据。

[0048] 图15,包括图15A和15B,显示了293T和原代细胞比如CCD1079-SK中CTLA4的敲除。图15A是显示当CTLA4在293T细胞中被靶向时多个峰的Sanger测序结果的图像。图15B是显示在有限稀释和单细胞扩展后的序列数据的图像。Sanger测序结果确认了在CTLA4基因组基因座处的缺失和插入。

[0049] 图16显示了293T中PPP2r2d的敲除。Sanger测序数据指示PPP2r2d通过CRISPR在293T细胞中被靶向。

[0050] 图17,包括图17A和17B,显示从FAS敲除T细胞生成iPSC。图17A是图像组,其显示了在将FAS^{neg} T细胞重编程至iPSC的过程期间的形态变化。典型的胚胎干细胞形态形成指示FAS^{neg} T细胞可以被诱导至多能状态。图17B是显示FAS^{neg} T细胞以野生型对应体(counterpart)大约5倍的效率被重编程至iPSC的图。p53缺陷细胞系已经被报道为由于凋亡途径的阻碍而易于重编程。FAS敲除可以通过相似的机制促进重编程过程。

[0051] 图18,包括图18A和18B,显示从CD3^{neg} T细胞生成iPSC。图18A是图像组,其显示了在限定的重编程条件下由CD3^{neg} TCR α 或 β 链敲除T细胞形成的ES样形态。形态在数次传代后保持恒定。图18B是一系列图,其显示与野生型对应体相比,重编程CD3^{neg} T细胞高效大约5倍,这表明TCR敲除可以在T细胞重编程的过程中发挥作用或在仙台病毒感染后影响细胞生存力。

[0052] 图19是显示使用siRNA敲除内源性T细胞受体(TCR)并且添加第二二硫键和去-N-糖基化至 β 链的图。

[0053] 图20,包括图20A和20B,显示了通过CAS9 RNA和gRNA的TCR敲除。电穿孔后六天,通过评价CD3分析细胞的TCR表达。

[0054] 图21是显示CD3微珠耗减后的PCR测序结果的图示。

[0055] 图22是图组,其显示了CD3在NY-ESO-1 TCR RNA电穿孔后四小时的重表达。

[0056] 图23,包括图23A-23D,是图组,其显示敲落内源性TCR增强电穿孔TCR RNA的T细胞的转基因表达和功能二者。图23A显示了电穿孔有TCR siRNA(实线空心柱形图)、对照siRNA(虚线空心柱形图)的T细胞和没有任何siRNA的T细胞(实心柱形图)的TCR表达。图23B显示了具有TCR siRNA、对照siRNA或没有siRNA的电穿孔野生型NY-ESO-1 TCR(wt)或修饰的TCR(SD)RNA的T细胞的转基因(TCR vb13.1)表达。图23C显示了具有TCR siRNA、对照siRNA或没有siRNA的电穿孔野生型NY-ESO-1 TCR(wt)或修饰的TCR(SD)RNA的T细胞的NY-ESO-1四聚体染色。图23D显示了HLA-A2/NY-ESO-1阳性肿瘤系通过TCR siRNA敲落的电穿孔野生型NY-ESO-1 TCR RNA的T细胞的特异性裂解。

[0057] 图24是显示在将T细胞注入小鼠模型后肿瘤细胞的荧光的图。表达NY-ESO-1和GFP二者的一千万个Na1m6-CBG-ESO-GFP(吖头虫绿)肿瘤细胞被静脉内注射入NOD/SCID小鼠。在肿瘤接种后五天,如不同组中指示的注射转导CBR和电穿孔RNA的T细胞,并且通过荧光检测肿瘤细胞。

[0058] 图25是图像组,其显示了小鼠模型中注射的肿瘤和杂合TCR T细胞随着时间的荧光。

[0059] 图26是图像组,其显示了通用CAR19 T细胞的生成。图的顶部是生成通用CAR19 T细胞的方案的图示。左侧的图显示了慢病毒-CAR19基因转导后CAR19阳性T细胞的百分数。右图组显示了分选之前和之后TCR单阴性和TCR/HLA-A双阴性T细胞的百分数。

[0060] 图27是图组和表格,其显示了使用照射的CD19呈递K562细胞刺激后CD19阳性细胞的扩展倍数。

[0061] 图28A是图组,其显示了K562-CD19扩展的细胞的内源性基因表达和转基因表达。

[0062] 图28B是图组,其显示在K562-CD19刺激的扩展后,内源性TCR表达在TCR单阴性细胞中保持阴性,同时TCR和HLA-A表达在TCR/HLA-A双阴性T细胞中保持阴性。

[0063] 图29A是图组,其显示大多数扩展的通用CAR19 T细胞是CD45RO阳性的并且表达中等水平的CD28表达。

[0064] 图29B是图组,其显示大多数扩展的通用CAR19 T细胞保留高水平的CD62L表达和低水平的CCR7表达。

[0065] 图30A是显示CRISPR基因编辑不影响通用CAR19 T细胞的体外抗肿瘤活性的图。

[0066] 图30B是图组,其显示当使用Na1m6肿瘤细胞攻击时,TCR单阴性和TCR/HLA-A双阴性CAR19 T细胞显示出强健的裂解能力。

[0067] 图30C是图组,其显示了作为这些细胞的有效抗肿瘤活性的一部分的细胞因子分泌。

[0068] 图30D是图组,其显示了在使用Na1m6肿瘤细胞攻击后展示出类似的增殖动力学的CAR19 T细胞中的TCR单消融(ablation)或TCR与HLA-A双消融。

[0069] 图31是图像组,其显示CRISPR基因编辑在体内不影响通用CAR19 T细胞的抗肿瘤活。所有接受未操纵的T细胞的小鼠和输注有转导慢病毒GFP的野生型T细胞的小鼠在肿瘤细胞输注后3周内死亡。接受CAR19 T细胞的小鼠观察到目标肿瘤消退。CRISPR编辑的TCR单阴性或TCR/HLA-A双阴性通用CAR19 T细胞显示了相同的抗肿瘤活性。

[0070] 图32A是图组,其显示T细胞中的TCR单消融或TCR与HLA-A双消融急剧地降低同种异体反应性。

[0071] 图32B是图组,其显示使用长时期的共培养(5天)消除HLA-A分子活化的NK细胞。

[0072] 图32C是显示当细胞在IFNr Eispot测定中被同种异体全血PBMC攻击24小时时没有观察到脱靶活性的图。

[0073] 图33是图组,其显示了FAS消融增强CAR19 T细胞的抗肿瘤活性。生成了FAS阴性CAR19 T细胞。通过流式细胞术分析确认FAS消融。FASneg T细胞的CAR19基因表达比得上野生型。甚至在使用Na1m6肿瘤细胞培育4小时的短时期后,与野生型对应体相比,CD107a表达在FASneg CAR19 T细胞中被极大地增强。

[0074] 图34A是显示CAR19 T细胞中的FAS消融在体外抗原条件下增强CAR T细胞存活和

增殖的图。当使用高水平的CD19+K562细胞刺激细胞时,FASneg CAR19 T细胞比野生型CAR19 T细胞更快地扩展。

[0075] 图34B是图组,其显示FASneg CAR19 T细胞具有降低的凋亡水平,如通过膜联蛋白V染色测量的。

[0076] 图35A是显示CAR19 T细胞中的FAS消融增强动物模型中的CAR T细胞功能的图。如在体外已经观察到的,与野生型T细胞相比,FASneg T细胞显示了增强的增殖。

[0077] 图35B是图像组,其显示当与野生型组相比时,FASneg CAR19组展现出更优异的抗肿瘤活性。

[0078] 图35C是显示FASneg CAR19组和野生型组之间的生物发光数据中的显著差异的图。

[0079] 图36是图组,其显示了PD1阴性PSCA-CAR T细胞的生成。通过流式细胞术分析确认PD1消融。通过微珠耗减富集PD1阴性细胞。通过使用照射的PSCA抗原呈递PC3肿瘤细胞进行刺激扩展野生型或PD1阴性PSCA-CAR T细胞。PSCA-CAR阳性细胞在扩展后被富集。

[0080] 图37是图组,其显示PSCA-CAR T细胞中的PD1消融和CD137表达在体外抗原条件下增强CAR T细胞活化。

[0081] 图38A是图像组,其显示了体内PC3-PSCA-PDL1 NSG模型中的PD1消融。与野生型组相比,PSCA-CAR T细胞展现了增强的CAR T细胞体内抗肿瘤活性。

[0082] 图38B是显示PD1阴性和野生型组之间的肿瘤负荷中的差异的图。

[0083] 图39是组织学图像组,其显示了T细胞在TCR或TCR/HLA-I被消融的情况下不引起移植植物抗宿主疾病(GVHD)。使用双敲除或三敲除CAR T细胞处理的小鼠不发展出GVHD的任何征兆。相比之下,来自野生型CD19 CAR T组的4只小鼠中的3只到第65天发展出GVHD,其通过不同器官的组织学检查确认。

[0084] 图40A是显示注射有T细胞——TCR或TCR/HLA-I被消融——的动物的存活百分比的图。小鼠被亚致死地照射和注射。在60天研究期间,接受野生型T细胞的5只小鼠中的四只死于GVHD。PBS处理组、TCR单消融和TCR/HLA-I双消融的T细胞处理组不显示GVHD的任何征兆。

[0085] 图40B是图组,其显示了接受野生型T细胞、PBS处理的、TCR单消融或TCR/HLA-I双消融的T细胞的小鼠的体重。

[0086] 图41A是图像组,其显示了在使用CRISPR/Cas9阻断PD1和Fas途径后通用CAR T细胞的提高的抗肿瘤活性。当被注入荷载Na1m6-PDL1的小鼠时,在PD1敲除通用CD19-CAR T细胞中检测到更优异的抗肿瘤活性。

[0087] 图41B是显示接受不同的CRISPR/Cas9编辑的T细胞的小鼠的定量生物发光数据的图。

[0088] 图42是图示组,其显示了生成通用CAR T细胞的一步(one-shot)系统。由于gRNA易于降解,研发简化的一步法以在单个慢病毒载体中组成型地表达gRNA连同CAR。

[0089] 图43是图组,其显示了使用一步系统的高效的基因消融。在电转移Cas9 mRNA后观察到不同量的CD3消融。

[0090] 图44A是图像组,其显示了从Fas敲除T细胞重编程iPSC的过程期间的形态变化。典型的胚胎干细胞形态形成指示FASneg T细胞可以被诱导至多能状态。

[0091] 图44B是显示FASneg T细胞以野生型对应体的大约5倍的效率被重编程至iPSC的图。p53缺陷细胞系已经被报道为由于凋亡途径的阻碍而易于重编程。FAS敲除可以使用相似的机制促进重编程过程。

[0092] 图45A是图像组,其显示了在限定的重编程条件下来自CD3neg TCR α 或 β 链敲除T细胞的iPSC的ES样形态。形态在几次传代后保持恒定。

[0093] 图45B是显示CD3neg T细胞的重编程比野生型对应体大约5倍低效的图,这表明TCR敲除可以在T细胞重编程的过程中发挥作用或在仙台病毒感染后影响细胞生存力。

[0094] 图45C是图像组,其显示了CD3neg iPSC细胞的磷酸酶染色。

[0095] 图46是图组,其显示了不同T-iPSC细胞系中的内源多能干细胞基因的诱导。

[0096] 图47A是图像组,其显示了Tra-1-60和SSEA4表达的免疫染色。

[0097] 图47B是显示通过Sanger测序确认T-iPSC的Fas敲除的图像。

[0098] 图48A是图组,其显示了使用不同版本的Cas9的幼稚T细胞中的基因消融。CD3使用dCas9和FokI-Cas9进行敲除。

[0099] 图48B是图组,其显示dCas9和FokI-Cas9的基因消融需要两种gRNA。

[0100] 图48C是显示使用CRISPR/cas9的基因修饰的T细胞中罕见的脱靶事件的图像。

[0101] 图49是图像组,其显示了将CRISPR/Cas9引入T细胞的策略。在左侧显示了由T7启动子驱动的gRNA的示意图。在右侧显示了使用CRISPR系统生成基因编辑的抗原特异性T细胞的示意图。在CD3/CD28珠刺激后3天,T细胞电穿孔有Cas9 mRNA和靶向特定基因的gRNA,并且然后在存在IL2的情况下在32°C下培养24小时,接着返回至正常的37°C培养条件。在第8天分选特定基因-破坏的T细胞,并且通过慢病毒转导或mRNA电穿孔基因转移使用CAR或TCR进行重定向。

[0102] 图50A是图组,其显示了T细胞中CRISPR/Cas9介导的高效的TCR破坏。显示了在37°C或32°C下培养的CRISPR/Cas9编辑的T细胞的CD3表达。

[0103] 图50B是图组,其显示了在连续的CRISPR RNA电穿孔后培养的CRISPR/Cas9编辑的T细胞的CD3表达。

[0104] 图51A是图组,其显示了在T细胞中发生的高效的CRISPR基因破坏。显示了使用不同的Cas9:gRNA比值(上组和中组)和总CRISPR RNA的量(下组)转移有CRISPR的T细胞的CD3表达。

[0105] 图51B是显示通过流式细胞术和克隆测序二者计算的靶向效率的表格。

[0106] 图52是显示通过对由细胞扩增的DNA进行错配选择性T7 surveyor核酸酶测定测量的TCR-靶向的基因破坏的量的图像。在底部显示了TRAC和TRBC中靶向的基因破坏的计算量。箭头指示期望的条带。

[0107] 图53A是在CRISPR-介导的TCR α 与 β 基因座的重组后通过PCR扩增子的克隆序列分析观察到的插入/缺失(在基因破坏中)的图像。

[0108] 图53B是编码TCR α 与 β 恒定区的基因组基因座内的TCR α 与 β CRISPR gRNA靶向位点的人基因座的图表的图像。每个外显子由块显示。箭头:有义链gRNA靶向位点;蓝色箭头:反义链gRNA靶向位点。Sanger测序结果中的多个峰显示了TRAC和TRBC基因组基因座处的CRISPR-介导的NHEJ的事件。

[0109] 图54是图组,其显示了纯化的TCR neg 细胞中的CD3表达。

- [0110] 图55是图组,其显示经由1G4 TCR(α与β)或CAR19 mRNA的电转移重定向TCR/CD3^{neg}细胞。
- [0111] 图56是显示使用不同的刺激条件10天后的TCR/CD3^{neg}细胞扩展的图。
- [0112] 图57是图组,其显示了CRISPR/Cas9编辑不损害原代T细胞的抗肿瘤功效。显示了TCR/CD3^{neg}细胞在四种不同扩展技术后的表型。
- [0113] 图58是图组,其显示了在将CD19-CAR RNA电转移入Cas9空白对照和TCR/CD3^{neg}细胞后的相对CD19-CAR表达。
- [0114] 图59A是图组,其显示在CD19-CAR重定向的Cas9空白对照和TCR/CD3^{neg}细胞之间没有观察到显著的功能性差异,如在使用Na1m6靶细胞培育后通过CD107释放测定确认的。显示了来自3个独立实验的代表性数据。误差线(Bar),标准误差。
- [0115] 图59B是显示在CD19-CAR重定向的Cas9空白对照和TCR/CD3^{neg}细胞之间没有观察到显著的功能性差异——如在使用Na1m6靶细胞培育后通过细胞毒性测定确认的——的图。显示了来自3个独立实验的代表性数据。误差线,SE=标准误差。
- [0116] 图59C是图组,其显示在CD19-CAR重定向的Cas9空白对照和TCR/CD3^{neg}细胞之间没有观察到显著的功能性差异,如在使用Na1m6靶细胞培育后通过IL2和IFN γ 分泌确认的。显示了来自3个独立实验的代表性数据。误差线,SE=标准误差。
- [0117] 图59D是注射有 1×10^6 个Na1m6肿瘤细胞(i. v.)的NOD/scid/γ c (-/-)小鼠(n=12)的图像组,小鼠被随机地分选为三组。在电穿孔后,每4天静脉内注射表达CD19-CAR的Cas9空白对照和TCR/CD3^{neg} T细胞(10×10^6 个),持续总计三次注射(箭头)。使用未电穿孔有RNA的T细胞处理的小鼠充当对照。如指示的,从存活的动物获得图像。在开始T细胞处理前1天开始成像。误差线,SE=标准误差,EP=电穿孔;E:T=效应物:肿瘤比值;箭头,T细胞输注的时间点;ns,不显著。****P<0.0001,ns通过双因素方差分析加Bonferroni事后检验。
- [0118] 图59E是显示荧光细胞的辐射率的图。
- [0119] 图60是图组,其显示了通过CRISPR/Cas9的双基因消融和三基因消融以生成通用效应细胞。使用靶向B2M的gRNA进行HLA-I破坏。
- [0120] 图61是生成如本文描述的通用效应细胞的方案的流程图。
- [0121] 图62是图组,其显示TCR消融废除了非特异性杀伤活性。使用T细胞——使用或不使用PHA进行预处理——在20:1的效应物:靶比值下培育624me1-CBG和PC3-CBG肿瘤细胞系24小时,并且基于荧光素酶测定计算细胞毒性。数据是平均值±SD;n=3。
- [0122] 图63是图组,其显示了IFN γ Elispot测定以测量TCR和TCR/HLA破坏的同种异体反应性——其通过使用照射的同种异体PBMC攻击基因消融的T细胞(左组)或使用照射的基因消融的T细胞共培养同种异体PBMC进行。具体的点在y轴上显示为在存在刺激物的情况下产生的点减去由单独的效应物产生的点。通过曼-惠特尼检验,**P<0.01。
- [0123] 图64是图组,其显示了通过CRISPR/Cas9的内源性TCR的破坏改进TCR-重定向的T细胞功能。在电穿孔有NY-ESO-1 TCRα(1G4α, 2μg)、β(1G4β, 2μg)或α+βRNA(1G4α+β, 2+2μg)RNA的转染有单独的Cas9 mRNA的T细胞(Cas9空白对照)或CD3^{neg} T细胞——其具有破坏的单独的内源性TCRα(αKO)、单独的β(βKO)、α与β二者(α+βKO)——中显示了Vb13.1和CD3表达。
- [0124] 图65A是图组,其显示了使用HLA-A2/NY-ESO-1-阳性细胞系(Na1m6-ESO)或对照细

胞系Na1m6刺激的电穿孔TCR (1G4) α/β RNA的TCR α 或 β 单敲除或 $\alpha+\beta$ 双敲除T细胞的CD107a上调。

[0125] 图65B是显示电穿孔TCR $\alpha+\beta$ RNA (1G4 TCR) 的TCR α 或 β 单敲除或 $\alpha+\beta$ 双敲除T细胞的裂解能力的图,其在针对Na1m6-ES0的基于荧光素酶的CTL测定显示。

[0126] 图66是图组,其显示了与对照Cas9空白对照T细胞相比,电穿孔有两种不同的NY-ESO-1 TCR RNA (1G4 TCR, 10 μ g或8F TCR, 10 μ g) 的TCR $\alpha+\beta$ 双重破坏的T细胞 (TCR^{neg} T细胞) 中的V β 和CD3表达。

[0127] 图67A是图组,其显示了使用HLA-A2/NY-ESO-1-阳性细胞系Na1m6-ES0、624-me1或U266刺激的电穿孔NY-ESO-1 TCR (1G4 TCR或8F TCR) RNA的TCR双敲除CD8 $^{+}$ T细胞中的CD107a上调.Na1m6被用作阴性对照。

[0128] 图67B是图组,其显示了在使用HLA-A2/NY-ESO-1-阳性细胞系Na1m6-ES0或U266进行刺激后,电穿孔NY-ESO-1 TCR (1G4 TCR或8F TCR) RNA的TCR双敲除T细胞的细胞因子产生 (IL-2和TNF- α) ;888me1黑素瘤细胞被用作阴性对照。*P<0.05,**P<0.01****P<0.0001,通过双因素方差分析加Bonferroni事后检验。

[0129] 图68是图像组,其显示使用慢病毒基因转移和CRISPR/Cas9电穿孔的组合生成通用CAR T细胞。显示了生成通用CD19-CAR T细胞的流程图。T细胞在刺激后第1天转导有慢病毒CD19-CAR,并且Cas9 mRNA以及靶向TCR α 与TCR β 链和B2M的gRNA在2天后电穿孔在T细胞中。TCR和HLA-I双阴性细胞群在再刺激进行扩展前被富集。

[0130] 图69是图组,其显示了在1G4 TCR电穿孔后通过CD3/CD28珠刺激扩展的基因修饰的慢病毒-CD19-CAR T细胞中的CD19-CAR表达。

[0131] 图70是图组,其显示了CD19-CAR T细胞的表型。

[0132] 图71是显示TCR-阴性和TCR/HLA-I双阴性CD19-CAR T细胞中的CD107a释放的图。显示了来自3个独立实验的代表性数据。误差线,SE=标准误差。

[0133] 图72是图组,其显示了TCR-阴性和TCR/HLA-I双阴性CD19-CAR T细胞的细胞因子分泌。显示了来自3个独立实验的代表性数据。误差线,SE=标准误差。

[0134] 图73是显示TCR-阴性和TCR/HLA-I双阴性CD19-CAR T细胞的肿瘤裂解能力的图。显示了来自3个独立实验的代表性数据。误差线,SE=标准误差。

[0135] 图74是图组,其显示了使用1:10的比值下的K562和靶标K562-CD19肿瘤细胞培育72小时的CFSE-标记的CD19-CAR和未转导的T细胞。

[0136] 图75A是显示来自在第7天使用单注射处理的小鼠——其使用慢病毒载体表达CD19-CAR和GFP——的BLI的图.ns,无差异,通过双因素方差分析加Bonferroni事后检验。通过静脉内注射 1×10^6 个Na1m6细胞在NSG小鼠 (n=4/组) 中建立肿瘤。在第7天开始,使用单注射输注表达慢病毒(LV) 转导的CD19-CAR的T细胞 (1×10^7 个) 。表达LV GFP蛋白的T细胞作为对照被注射。

[0137] 图75B是显示接受LV-GFP、LV-CD19-CAR、LV-CD19-CAR-TCR/CD3^{neg}和LV-CD19-CAR-TCR/HLA-I^{neg} T细胞的小鼠的总存活的图.ns,无差异,通过时序Mantel-Cox检验。

[0138] 图76是图像组,其显示基因修饰的CAR T细胞保留抗肿瘤功效并且不诱导GVHD。通过静脉内注射 1×10^6 个Na1m6细胞在NSG小鼠 (n=4/组) 中建立肿瘤。在第7天开始,使用单注射输注表达LV-CD19-CAR的T细胞 (2×10^7 个) 。表达LV GFP蛋白的T细胞作为对照被注射。

在T细胞处理前1天开始成像。在第65天收集来自不同处理组的随机选择的小鼠的器官并且用于CD3免疫组织化学染色。图77是一系列载体的示意图,其显示了靶向PD1、Fas和TCR α 链的pAd5F35-CRISPR的设计。

[0139] 图78是显示具有抗CD3 ScFv的五邻体修饰的pAd5F35-CRISPR的设计,和在体外和体内示意性地递送用于敲入/敲除嵌合抗原受体的pAd5F35-CRISPR进入T细胞的图示。

[0140] 图79A是显示侧接PD1-gRNA靶向位点的PCR产物的Sanger测序的图。腺病毒-pAd5F35-CRISPR-PD1病毒被转导入MD231细胞。3天后,提取基因组DNA并且进行PCR。

[0141] 图79B显示了腺病毒-CRISPR操纵后MDA231细胞中的靶向事件(event)的序列。PD1PCR产物被克隆入TOPO载体并且被测序。

[0142] 图80是显示gRNA使用的减少提高T细胞扩展倍数和仅轻微地降低敲除效率的图表。

[0143] 图81是显示用于优化电穿孔条件以获得高的CD3/B2M敲除效率以及提高的T细胞扩展倍数的参数的图表。与2mm小池(EP#10-13)或4mm小池中标准的电穿孔(EP)条件进行比较。观察到高的CD3/B2M敲除效率,伴随提高的T细胞扩展倍数(EP#1和5)。

[0144] 图82是显示优化EP条件以取得最大扩展倍数以及可容许的敲除效率的图表。

[0145] 图83是显示另外优化EP条件以取得最大扩展倍数以及可容许的敲除效率的图表。

[0146] 图84图示了T细胞刺激、慢病毒转导和CRISPR电穿孔程序。

[0147] 图85是显示电穿孔和培养程序后的T细胞数目(上图表)和扩展倍数(下图表)的图表。

[0148] 图86是图组,其显示了T细胞的平均扩展。显示了转导有单独的CD19 CAR(单独的TD)或转导有CD19 CAR并且使用CRISPR(TD/KO)编辑(左图)的T细胞的扩展倍数。T细胞在第10天的扩展倍数在右图中显示。

[0149] 图87是流式细胞术图组,其显示了扩展的T细胞在第8天时的CD3/B2M/CAR表达。

[0150] 图88是图组,其显示了CD3+ T细胞耗减后的CD3/B2M表达。

[0151] 图89是图组,其显示了在CD19 CAR TD(转导的)/电穿孔CRISPR的、耗减CD3的T细胞;CD19 CAR TD/电穿孔CRISPR的T细胞;和CD19 CAR TD T细胞中第11天的CD3/B2M表达。未转导的ND463(NOTD)被用作阴性对照。图90是图组,其显示了在CD19CAR TD(转导的)/电穿孔CRISPR的、耗减CD3的T细胞;CD19 CAR TD/电穿孔CRISPR的T细胞;和CD19 CAR TD T细胞中第11天的CD19 CAR表达。未转导的ND463(NOTD)被用作阴性对照。

[0152] 图91是图组,其显示了在CD19 CAR TD(转导的)/电穿孔CRISPR的、耗减CD3的T细胞;CD19 CAR TD/电穿孔CRISPR的T细胞;和CD19 CAR TD T细胞中第11天的CD3/B2M/CAR表达。未转导的ND463(NOTD)被用作阴性对照。

[0153] 图92是概述在CD19 CAR TD(转导的)/电穿孔CRISPR的、耗减CD3的T细胞;CD19CAR TD/电穿孔CRISPR的T细胞;和CD19 CAR TD T细胞中的CD3/B2M/CAR表达的图表。

[0154] 图93是图组,其显示了在CD19 CAR TD(转导的)/电穿孔CRISPR的、耗减CD3的T细胞;CD19 CAR TD/电穿孔CRISPR的T细胞;和CD19 CAR TD T细胞中的CD107a上调。

[0155] 图94是图组,其显示了T细胞在第11天的裂解活性。

[0156] 图95是图组,其显示了T细胞在第11天的细胞因子产生。

[0157] 图96是图组,其显示了T细胞扩展。没有观察到异常的T细胞生长。

具体实施方式

[0158] 定义

[0159] 除非另外定义,本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域普通技术人员通常理解的相同的含义。虽然可以在测试本发明的实践中使用与本文描述的那些类似或等价的任何方法和材料,但是本文描述了优选的材料和方法。在描述和要求保护本发明中,将使用下列术语。

[0160] 也理解本文使用的术语仅出于描述具体实施方式的目的,并且不意欲是限制性的。

[0161] 本文使用冠词“一个”和“一种”,指的是一个或多于一个(即,至少一个)该冠词的语法对象。举例而言,“一个要素”意思是一个要素或多于一个要素。

[0162] 如本文使用的“大约”,当指的是可测量的值比如量、时间期间等时,意思是包括从规定值的±20%或±10%、更优选地±5%、甚至更优选地±1%、和还更优选地±0.1%的变化,因为这样的变化适于进行公开的方法。

[0163] 如本文使用的“活化”指的是已经被充分地刺激以诱导可检测的细胞增殖的T细胞的状态。活化也可以与诱导的细胞因子产生和可检测的效应物功能相关联。术语“活化的T细胞”指的是经历细胞分裂的T细胞等。

[0164] 如本文使用的术语“抗体”指的是与抗原特异性地结合的免疫球蛋白分子。抗体可以是源自自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,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(Harlow等,1999,In:Using Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow等,1989 In:Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor, New York; Houston等,1988, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883; Bird等,1988, Science 242:423-426)。

[0165] 术语“抗体片段”指的是完整抗体的一部分,并且指的是完整抗体的抗原决定可变区。抗体片段的实例包括但不限于Fab、Fab'、F(ab')₂、和Fv片段、线性抗体、scFv抗体、和由抗体片段形成的多特异性的抗体。

[0166] 如本文使用的“抗体重链”指的是以它们自然存在的构象存在于所有抗体分子中的两种类型的多肽链中的较大的链。

[0167] 如本文使用的“抗体轻链”指的是以它们自然存在的构象存在于所有抗体分子中的两种类型的多肽链中的较小的链。 α 和 β 轻链指的是两种主要的抗体轻链同种型。

[0168] 如本文使用的术语“合成抗体”的意思是使用重组DNA技术生成的抗体,比如,例如,如本文描述的由噬菌体表达的抗体。该术语也应当解释为意思是已经由DNA分子——其编码抗体并且该DNA分子表达抗体蛋白或规定抗体的氨基酸序列——的合成生成的抗体,其中DNA或氨基酸序列已经使用本领域可获得和熟知的合成DNA或氨基酸序列技术获得。

[0169] 如本文使用的术语“抗原”或“Ag”定义为激发免疫应答的分子。此免疫应答可以包括抗体产生,或特异性免疫活性细胞的活化,或二者。技术人员将理解任何大分子——实际上包括所有蛋白质或肽——可以充当抗原。另外,抗原可以衍生自重组或基因组DNA。技术人员将理解任何DNA——其包括编码引起免疫应答的蛋白质的核苷酸序列或部分核苷酸序

列——因此编码如本文使用的术语“抗原”。另外，本领域技术人员将理解抗原不必仅仅由基因的全长核苷酸序列编码。容易显而易见的是本发明包括但不限于多于一种基因的部分核苷酸序列的用途，并且这些核苷酸序列以不同的组合布置以引起期望的免疫应答。而且，技术人员将理解抗原根本不必由“基因”编码。容易显而易见的是抗原可以被生成、合成或可以衍生自生物学样品。这样的生物学样品可以包括但不限于组织样品、肿瘤样品、细胞或生物学流体。

[0170] 如本文使用的术语“抗肿瘤效应”指的是生物学效应，其可由肿瘤体积的减小、肿瘤细胞数目的减少、转移数目的减少、预期寿命的增加、或与癌性病症相关联的各种生理学症状的改善显现。“抗肿瘤效应”也可以由本发明的肽、多核苷酸、细胞和抗体在预防肿瘤在第一位置发生的能力显现。

[0171] 根据本发明，术语“自身抗原”意思是由免疫系统识别为异物(foreign)的任何自体抗原。自身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，其包括细胞表面受体。

[0172] 如本文使用的，术语“自身免疫疾病”定义为由自身免疫反应导致的障碍。自身免疫疾病是对自体抗原的不适当和过度应答的结果。自身免疫疾病的实例包括但不限于阿狄森氏病、斑秃、强直性脊柱炎、自身免疫性肝炎、自身免疫性腮腺炎、克罗恩病、糖尿病(I型)、营养不良性大疱性表皮松解、附睾炎、肾小球性肾炎、格雷夫斯氏病、格-巴二氏综合征、桥本氏病、溶血性贫血、系统性红斑狼疮、多发性硬化、重症肌无力、寻常天疱疮、牛皮癣、风湿热、类风湿性关节炎、结节病、硬皮病、斯耶格伦氏综合征、脊椎关节病、甲状腺炎、血管炎、白斑病、粘液性水肿、恶性贫血、溃疡性结肠炎等。

[0173] 如本文使用的术语“自体的”意思是指衍生自相同个体的任何物质，其随后被再引入该个体。

[0174] “同种异体的”指的是衍生自相同物种的不同动物的移植物。

[0175] “异种的”指的是衍生自不同物种的动物的移植物。

[0176] 如本文使用的术语“癌症”定义为以畸变细胞的快速和失控生长表征的疾病。癌细胞可以局部地扩散或通过血流和淋巴系统扩散至身体的其它部分。多种癌症的实例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、结肠直肠癌、肾癌、肝癌、脑癌、淋巴瘤、白血病、肺癌等。在某些实施方式中，癌症是甲状腺髓样癌。

[0177] 如本文使用的术语“嵌合抗原受体”或“CAR”指的是被工程化以在免疫效应细胞上表达和特异性地结合抗原的人工T细胞受体。CAR可以被用作使用过继细胞转移的疗法。T细胞从患者移出并且进行修饰，使得它们表达特异于具体形式的抗原的受体。例如，在一些实施方式中，已经以对肿瘤相关抗原的特异性表达CAR。CAR还可以包括胞内活化结构域、跨膜结构域和胞外结构域——其包括肿瘤相关抗原结合区。在一些方面，CAR包括融合单链可变片段(scFv)衍生的单克隆抗体，其被融合至CD3-ζ跨膜和胞内结构域。CAR设计的特异性可以源自受体的配体(例如，肽)。在一些实施方式中，通过重定向表达特异于肿瘤相关抗原的CAR的T细胞的特异性，CAR可以靶向癌症。

[0178] 术语“切割”指的是共价键的断裂，比如在核酸分子的主链中。可以通过各种方法起始切割，其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二者都是可能的。可以由于两个不同的单链切割事件而发生双链切割。DNA切割可以导致产生平头末端。

端或交错末端。在某些实施方式中，融合多肽可以用于靶向切割的双链DNA。

[0179] 如本文使用的，术语“保守序列修饰”意欲指的是如此氨基酸修饰，其不显著地影响或改变包含该氨基酸序列的抗体的结合特性。这样的保守修饰包括氨基酸置换、添加和缺失。修饰可以通过本领域已知的标准技术比如定点诱变和PCR-介导的诱变引入本发明的抗体。保守氨基酸置换是其中氨基酸残基被替换为具有类似侧链的氨基酸残基的置换。本领域已经定义了具有类似侧链的氨基酸残基的家族。这些家族包括具有碱性侧链(例如，赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如，天冬氨酸、谷氨酸)、不带电的极性侧链(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)、非极性侧链(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)、 β -支化侧链(例如，苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳香族侧链(例如，酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)的氨基酸。因而，抗体的CDR区内的一种或多种氨基酸残基可以被替换为来自相同侧链家族的其它氨基酸残基，并且可以使用本文描述的功能性测定测试改变的抗体结合抗原的能力。

[0180] 如本文使用的术语“共刺激配体”包括特异性地结合T细胞上的关联共刺激分子的抗原呈递细胞(例如，aAPC、树突细胞、B细胞等)上的分子，由此除了通过例如将TCR/CD3复合体与负载有肽的MHC分子结合提供的初级信号之外，还提供了介导T细胞应答的信号，所述T细胞应答包括但不限于增殖、活化、分化等。共刺激配体可以包括但不限于CD7、B7-1(CD80)、B7-2(CD86)、PD-L1、PD-L2、4-1BBL、OX40L、可诱导的共刺激配体(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Toll配体受体的激动剂或抗体和与B7-H3特异性地结合的配体。共刺激配体也包括，特别是与存在于T细胞上的共刺激分子特异性地结合的抗体，所述共刺激分子比如，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和与CD83特异性地结合的配体。

[0181] “共刺激分子”指的是T细胞上的关联结合配偶体，其与共刺激配体特异性地结合，由此介导通过T细胞的共刺激应答，比如，但不限于增殖。共刺激分子包括但不限于MHC I类分子、BTLA和Toll配体受体。

[0182] 如本文使用的“共刺激信号”指的是与初级信号比如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。

[0183] 术语“CRISPR/CAS”、“成簇的、规律间隔的短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats)系统”或“CRISPR”指的是包含碱基序列的短重复的DNA基因座。每个重复接着先前暴露于病毒的间隔DNA的短区段。细菌和古细菌已经进化出被称为CRISPR-CRISPR相关(Cas)系统的适应性免疫防御，其使用短RNA指导外源核酸的降解。在细菌中，CRISPR系统经由RNA-引导的DNA切割提供了针对侵入的外源DNA的获得性免疫。

[0184] 在II型CRISPR/Cas系统中，称为“间隔区”的外源DNA的短区段被整合在CRISPR基因组基因座内并且转录和加工为短的CRISPR RNA(crRNA)。使这些crRNA与反式激活的crRNA(tracrRNA)退火并且通过Cas蛋白指导致病DNA的序列特异性切割和沉默。近来的工作已经显示通过Cas9蛋白的靶标识别需要crRNA内的“种子”序列和crRNA-结合区上游的包含保守的二核苷酸的前间区序列邻近基序(PAM)序列。

[0185] 为了指导Cas9切割感兴趣的序列，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“引导RNA”或“gRNA”。CRISPR/CAS介导的基因组编辑和调控突显出其用于基础科学、细胞工程和治疗的变革性潜力。

[0186] 术语“CRISPRi”指的是用于基因表达的序列特异性基因阻遏或抑制的CRISPR系统,比如在转录水平下。

[0187] “疾病”是动物的健康状态,其中动物不能维持稳态,并且其中如果不改善疾病,则动物的健康继续恶化。相比之下,动物中的“障碍”是健康状态,其中动物能够维持稳态,但是其中动物的健康状态与它没有该障碍时相比不太有利。保持不治疗,障碍不必然引起动物健康状态的进一步降低。

[0188] 如本文使用的术语“下调”指的是一种或多种基因的基因表达的降低或消除。

[0189] “有效量”或“治疗有效量”在本文可交换地使用,并且指的是对实现具体的生物学结果或提供治疗或预防益处有效的如本文描述的化合物、制剂、材料或组合物的量。这样的结果可以包括但不限于抗肿瘤活性,如通过本领域适合的任何手段测定的。

[0190] “编码”指的是多核苷酸比如基因、cDNA或mRNA中的核苷酸的特定序列充当模板来合成生物学过程中的其它多聚体和大分子的固有性质,所述多聚体和大分子具有核苷酸(即,rRNA、tRNA和mRNA)的限定序列或氨基酸的限定序列中的任一种和由其产生的生物学性质。因而,如果对应于基因的mRNA的转录和翻译在细胞或其它生物学系统中产生蛋白质,则该基因编码蛋白质。其核苷酸序列与mRNA序列具有同一性并且通常在序列表中提供的编码链,和用作基因或cDNA转录的模板的非编码链两者,都可以被称为编码该基因或cDNA的蛋白质或其它产物。

[0191] 如本文使用的“内源的”指的是来自生物体、细胞、组织或系统的或在生物体、细胞、组织或系统内产生的任何物质。

[0192] 如本文使用的,术语“外源的”指的是从生物体、细胞、组织或系统引入的或在生物体、细胞、组织或系统外产生的任何物质。

[0193] 如本文使用的术语“扩展”指的是数目的增加,如T细胞数目的增加。在一个实施方式中,离体扩展的T细胞的数目相对于培养物中原始存在的数目增加。在另一个实施方式中,离体扩展的T细胞的数目相对于培养物中的其它细胞类型的数目增加。如本文使用的术语“离体”指的是已经从活的生物体(例如,人)移出,并且在生物体外(例如,在培养皿、试管或生物反应器中)繁殖的细胞。

[0194] 如本文使用的术语“表达”定义为由它的启动子驱动的特定核苷酸序列的转录和/或翻译。

[0195] “表达载体”指的是包括重组多核苷酸的载体,所述重组多核苷酸包括可操作地连接至待表达的核苷酸序列的表达控制序列。表达载体包括足够的用于表达的顺式作用元件;用于表达的其它元件可以由宿主细胞供应或在体外表达系统中供应。表达载体包括所有本领域已知的并入重组多核苷酸的那些,比如粘粒、质粒(例如,裸露或包含在脂质体中)和病毒(例如,仙台病毒、慢病毒、逆转录病毒、腺病毒和腺伴随病毒)。

[0196] 如本文使用的,“同源的”指的是两个聚合物分子之间,例如,两个核酸分子——比如两个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。当两个分子的二者中的亚基位置被相同的单体亚基占据时;例如,如果两个DNA分子的每个中的位置被腺嘌呤占据,则它们在该位置处是同源的。两个序列之间的同源性是匹配或同源位置

的数目的直接函数；例如，如果两个序列中的一半位置（例如，长度为十个亚基的聚合物中的五个位置）是同源的，则两个序列是50%同源的；如果90%的位置（例如，10个中的9个）是匹配的或同源的，则两个序列是90%同源的。

[0197] “人源化”形式的非人（例如，鼠）抗体是嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段（比如Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂或抗体的其它抗原-结合子序列），其包含衍生自非人免疫球蛋白的最小序列。就大部分而言，人源化抗体是人免疫球蛋白（接受者抗体），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）比如小鼠、大鼠或兔的CDR的残基——其具有期望的特异性、亲和力和能力——替换。在一些情况下，人免疫球蛋白的Fv框架区（FR）残基被对应的非人残基替换。另外，人源化抗体可以包括既没有在接受者抗体中也没有在输入的CDR或框架序列中发现的残基。做出这些修饰以进一步改进和优化抗体性能。一般而言，人源化抗体将包括基本上所有至少一种和通常两种可变结构域，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。人源化抗体最佳地还将包括免疫球蛋白恒定区（Fc）的至少一部分，通常是人免疫球蛋白的至少一部分。进一步的细节参见Jones等，Nature, 321:522-525, 1986; Reichmann等，Nature, 332:323-329, 1988; Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596, 1992。

[0198] “全人（fully human）”指的是免疫球蛋白，比如抗体，其中整个分子具有人起源或由与人形式的抗体具有同一性的氨基酸序列构成。

[0199] 如本文使用的“同一性”指的是两个聚合物分子之间，特别是两个氨基酸分子之间，比如，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具有相同残基时；例如，如果两个多肽分子中的每个中的位置均被精氨酸占据，则它们在该位置是同一的。在比对中，两个氨基酸序列在相同位置具有相同残基的同一性或程度经常表达为百分数。两个氨基酸序列之间的同一性是匹配或同一位置的数目的直接函数；例如，如果两个序列中的一半位置（例如，十个氨基酸长度的聚合物中的五个位置）是同一的，则两个序列是50%同一的；如果90%的位置（例如，10个中的9个）是匹配的或同一的，则两个氨基酸序列是90%同一的。

[0200] 如本文使用的术语“免疫球蛋白”或“Ig”定义为起抗体作用的一类蛋白质。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。包括在此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，比如唾液、泪液、母乳、胃肠分泌物和呼吸道与生殖泌尿道的粘液分泌物中的初次抗体。IgG是最常见的循环抗体。IgM是在大多数对象中的初次免疫应答中产生的主要免疫球蛋白。它在凝集、补体结合和其它抗体应答中是最有效的免疫球蛋白，并且在抵御细菌和病毒方面是重要的。IgD是不具有已知抗体功能的免疫球蛋白，但是可以充当抗原受体。IgE是在暴露于过敏原之后，通过引起从肥大细胞和嗜碱性粒细胞释放介体，介导速发过敏性的免疫球蛋白。

[0201] 如本文使用的术语“免疫应答”定义为当淋巴细胞将抗原分子识别为异物并诱发形成抗体和/或活化淋巴细胞以移除抗原时发生的对抗原的细胞应答。

[0202] 如本文使用的，“诱导多能干细胞”或“iPS细胞”指的是由成人细胞比如T细胞生成的多能干细胞。成人细胞中重编程因子——比如Klf4、Oct3/4和Sox2——的表达将细胞转化为能够繁殖和分化为多种细胞类型的多能细胞。

[0203] 如本文使用的“指导材料”包括出版物、记录、图表或任何其它可以用于传达本发明的组合物和方法的有用性的表达媒介。本发明的试剂盒的指导材料可以例如被附加至包含本发明的核酸、肽和/或组合物的容器，或与包含核酸、肽和/或组合物的容器一起运送。可选地，指导材料可以与容器分开地运送，目的是指导材料和化合物由接受者配合使用。

[0204] “分离的”意思是从自然状态改变或移出。例如，天然存在于活动物中的核酸或肽不是“分离的”，但是部分或完全与它的自然状态的共存物质分开的相同的核酸或肽是“分离的”。分离的核酸或蛋白质可以以基本上纯化的形式存在，或可以存在于非自然环境，比如，例如，宿主细胞中。

[0205] 如本文使用的术语“敲落”指的是一种或多种基因的基因表达的降低。

[0206] 如本文使用的术语“敲除”指的是一种或多种基因的基因表达的消融。

[0207] 如本文使用的“慢病毒”指的是逆转录病毒科家族的属。在逆转录病毒中慢病毒是唯一能够感染非分裂细胞的；它们可以递送显著量的遗传信息进入宿主细胞的DNA，以便它们是基因递送载体的最有效的方法之一。HIV、SIV和FIV都是慢病毒的实例。衍生自慢病毒的载体提供了实现显著水平的体内基因转移的工具。

[0208] 如本文使用的术语“修饰的”意思是本发明的分子或细胞的改变的状态或结构。分子可以以许多方式被修饰，包括化学地、结构地和功能地。细胞可以通过引入核酸进行修饰。

[0209] 如本文使用的术语“调节”意思是与缺少治疗或化合物的对象中的应答水平相比，和/或与在其它方面相同但未治疗的对象中的应答水平相比，介导对象中的应答水平中的可检测的增加或减少。该术语包括扰乱和/或影响天然信号或应答，从而介导对象——优选地，人——中的有益的治疗性应答。

[0210] 在本发明的背景下，使用常见核酸碱基的下列缩写。“A”指的是腺苷，“C”指的是胞嘧啶，“G”指的是鸟苷，“T”指的是胸苷，和“U”指的是尿苷。

[0211] 除非另外规定，“编码氨基酸序列的核苷酸序列”包括是彼此的简并形式并且编码相同的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，其程度为编码该蛋白质的核苷酸序列可以在一些形式中包含内含子（一个或多个）。

[0212] 术语“可操作地连接”指的是调控序列和异源核酸序列之间的功能连接，其导致异源核酸序列的表达。例如，当第一核酸序列处于与第二核酸序列的功能关系中时，第一核酸序列与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，则启动子可操作地连接至编码序列。通常地，可操作地连接的DNA序列是邻近的，并且在必要时在同一的阅读框中接合两个蛋白编码区。

[0213] 术语“过表达的”肿瘤抗原或肿瘤抗原的“过表达”意欲指示相对于来自组织或器官的正常细胞的表达水平，来自疾病区如患者的特定组织或器官内的实体瘤的细胞中的肿瘤抗原表达的异常水平。患有以肿瘤抗原过表达表征的实体瘤或血液学恶性肿瘤的患者可以由本领域已知的标准测定来确定。

[0214] 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，或注入技术。

[0215] 如本文使用的术语“多核苷酸”定义为核苷酸链。另外，核酸是核苷酸的聚合物。因

而,如本文使用的核酸和多核苷酸是可交换的。本领域技术人员具有核酸是可以被水解为单体“核苷酸”的多核苷酸的一般知识。单体核苷酸可以被水解为核苷。如本文使用的多核苷酸包括但不限于通过本领域可获得的任何手段获得的所有核酸序列,所述手段非限制性地包括重组手段,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。

[0216] 如本文使用的,术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”可交换地使用,并且指的是由肽键共价连接的氨基酸残基组成的化合物。蛋白或肽必须包含至少两个氨基酸,并且对可以构成蛋白质或肽的序列的氨基酸的最大数目没有限制。多肽包括任何肽或蛋白质,所述肽或蛋白质包括通过肽键相互接合的两个或更多个氨基酸。如本文使用的,该术语指的是短链,其在本领域中也通常被称为例如肽、寡肽和寡聚物;和较长链二者,其在本领域中通常被称为蛋白质,其具有许多类型。“多肽”包括例如生物学活性片段、基本上同源的多肽、寡肽、同二聚体、异二聚体、多肽的变体、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。

[0217] 如本文使用的术语“启动子”定义为起始多核苷酸序列的特异性转录需要的,由细胞的合成机器识别,或合成机器(machinery)引入的DNA序列。

[0218] 如本文使用的,术语“启动子/调控序列”意思是对于可操作地连接至启动子/调控序列的基因产物的表达需要的核酸序列。在一些情况下,此序列可以是核心启动子序列,并且在其它情况下,此序列还可以包括对于基因产物的表达需要的增强子序列和其它调控元件。例如,启动子/调控序列可以是以组织特异性方式表达基因产物的序列。

[0219] “组成型”启动子是如下核苷酸序列,当其与编码或规定基因产物的多核苷酸可操作地连接时,引起在细胞的大多数或所有生理学条件下在细胞中产生基因产物。

[0220] “诱导型”启动子是如下核苷酸序列,当其与编码或规定基因产物的多核苷酸可操作地连接时,引起在基本上仅当对应于启动子的诱导物存在于细胞中时,在细胞中产生基因产物。

[0221] “组织-特异性”启动子是如下核苷酸序列,当其与编码基因或由基因规定的多核苷酸可操作地连接时,引起基本上仅如果细胞是对应于启动子的组织类型的细胞,则在细胞中产生基因产物。

[0222] “仙台病毒”指的是副粘病毒科的属。仙台病毒是不整合入宿主基因组或改变宿主细胞的遗传信息的负、单链RNA病毒。仙台病毒具有异常广泛的宿主范围并且对人不具有致病性。作为重组病毒载体使用时,仙台病毒能够瞬时但强烈的基因表达。

[0223] “信号转导途径”指的是多种信号转导分子——其在将信号从细胞的一部分传递至细胞的另一部分中发挥作用——之间的生物化学关系。短语“细胞表面受体”包括分子和分子的复合体,其能够跨越细胞的质膜接收信号和传递信号。

[0224] “单链抗体”指的是通过重组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跨度的氨基酸连接至Fv区。生成单链抗体的多种方法是已知的,包括在美国专利号4,694,778;Bird(1988)Science 242:423-442;Huston等(1988)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883;Ward等(1989)Nature 334:54454;Skerra等(1988)Science 242:1038-1041中描述的那些。

[0225] 如本文使用的关于抗体的术语“特异性地结合”意思是抗体识别特异性抗原但基

本上不识别或结合样品中的其它分子。例如,特异性地结合至来自一个物种的抗原的抗体也可以结合至来自一个或多个物种的抗原。但是,这样的跨物种反应性本身不将抗体的类别改变为特异性的。在另一个实例中,特异性地结合至抗原的抗体也可以结合至不同等位基因形式的抗原。然而,这样的交叉反应性本身不将抗体的类别改变为特异性的。在一些情况下,术语“特异性结合”或“特异性地结合”可以参考抗体、蛋白质或肽与第二化学种类的相互作用使用,意思是该相互作用依赖化学种类上特定结构(例如,抗原决定簇或表位)的存在;例如,抗体识别和结合至特定蛋白结构,而不是一般地识别和结合至蛋白质。如果抗体特异于表位“A”,则在包含标记的“A”和抗体的反应中存在包含表位A(或游离的、未标记的A)的分子将降低结合至抗体的标记的A的量。

[0226] 术语“刺激”意思是通过结合刺激分子(例如,TCR/CD3复合体)与其关联配体,从而介导信号转导事件——比如,但不限于经TCR/CD3复合体的信号转导——诱导的初次应答。刺激可以介导某些分子的改变的表达,比如TGF- β 的下调、和/或细胞骨架结构的重组等。

[0227] “刺激分子”,作为本文使用的术语,意思是与存在于抗原呈递细胞上的关联刺激配体特异性地结合的T细胞上的分子。

[0228] 如本文使用的“刺激配体”意思是如下配体:其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细胞上的关联结合配偶体(在本文称为“刺激分子”)特异性地结合,从而介导T细胞的初次应答,其包括但不限于活化、免疫应答的起始、增殖等。刺激配体在本领域是熟知的,并且包括,特别是MHC I类分子——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。

[0229] 术语“对象”意欲包括其中可以引发免疫应答的活的生物体(例如,哺乳动物)。如其中使用的“对象”或“患者”可以是人或非人哺乳动物。非人哺乳动物包括,例如,家畜和宠物,比如绵羊、牛科动物、猪科动物、犬科动物、猫科动物和鼠科哺乳动物。优选地,对象是人。

[0230] 如本文使用的“基本上纯化的”细胞是大体上不含其它细胞类型的细胞。基本上纯化的细胞也指的是已经与其它细胞类型——在其天然存在状态中与该其它细胞类型正常相关联——分开的细胞。在一些情况下,基本上纯化的细胞群指的是均质细胞群。在其它情况下,此术语简单地指的是已经与在其天然状态中与该细胞正常相关联的细胞分开的细胞。在一些实施方式中,在体外培养细胞。在其它实施方式中,不在体外培养细胞。

[0231] “靶位点”或“靶序列”指的是基因组核酸序列,其限定了在足以发生结合的条件下可以与结合分子特异性地结合的核酸部分。

[0232] 如本文使用的,术语“T细胞受体”或“TCR”指的是响应于抗原的呈递参与T细胞的活化的膜蛋白的复合体。TCR负责识别结合至主要组织相容性复合体分子的抗原。TCR由alpha(α)和beta(β)链的异二聚体组成,但是在一些细胞中,TCR由 γ 和 δ (γ/δ)链构成。TCR可以以 α/β 和 γ/δ 形式存在,其是结构上相似的,但是具有不同的解剖学位置和功能。每个链由两个胞外结构域——可变和恒定结构域——组成。在一些实施方式中,TCR可以在包括TCR的任何细胞上被修饰,包括,例如,辅助性T细胞、细胞毒性T细胞、记忆T细胞、调节性T细胞、天然杀伤T细胞和 $\gamma\delta$ T细胞。

[0233] 如本文使用的术语“治疗性的”意思是治疗和/或预防。治疗性效果通过疾病状态的阻抑、缓解或根除获得。

[0234] 如本文使用的术语“转染的”或“转化的”或“转导的”指的是如下过程：通过该过程外源性核酸被转移或引入宿主细胞。“转染的”或“转化的”或“转导的”细胞是已经被转染、转化或转导有外源性核酸的细胞。细胞包括原代对象细胞和其子代。

[0235] “治疗”疾病，作为本文使用的术语，意思是降低对象经历的疾病或障碍的至少一种迹象或症状的频率或严重度。

[0236] 如本文使用的短语“在转录控制下”或“可操作地连接的”意思是启动子处于与多核苷酸有关的正确的位置和取向，以控制通过RNA聚合酶的转录的起始和多核苷酸的表达。

[0237] “载体”是物质组合物，其包括分离的核酸，并且其可以用于递送分离的核酸至细胞内部。众多载体在本领域是已知的，包括但不限于线性多核苷酸、与离子或两亲性化合物相关联的多核苷酸、质粒和病毒。因而，术语“载体”包括自主复制的质粒或病毒。该术语也应当解释为包括便于将核酸转移入细胞的非质粒和非病毒化合物，比如，例如，聚赖氨酸化合物、脂质体等。病毒载体的实例包括但不限于仙台病毒载体、腺病毒载体、腺伴随病毒载体、逆转录病毒载体、慢病毒载体等。

[0238] 范围：遍及本公开内容，本发明的多个方面可以以范围格式呈现。应当理解范围格式的描述仅仅出于方便和简洁，并且不应当解释为对本发明的范围的僵硬限制。因此，范围的描述应当被考虑已经具体地公开了所有可能的子范围以及该范围内的单个数值。例如，比如1至6的范围的描述应当被考虑已经具体地公开了子范围比如1至3、1至4、1至5、2至4、2至6、3至6等，以及该范围内的单个数字，例如，1、2、2.7、3、4、5、5.3和6。不管范围的宽度如何，这均适用。

[0239] 描述

[0240] 避免移植植物抗宿主疾病 (GVHD) 的通用T细胞在临床环境中是高度期望的。然而，由于通过识别HLA-A分子被宿主免疫系统排斥，同种异体T细胞的使用是有风险的。操纵多种基因的靶向策略是复杂的并且努力已经在T细胞中产生低效率，而没有同时预防GVHD和宿主抗移植物反应。

[0241] FAS受体/FAS配体 (FAS/FASL) 凋亡信号传导途径负调控T细胞功能。PD1和CTLA4是T细胞中两种主要的抑制性信号传导途径。由抗体-介导的CTLA-4、PD-1或PD-L1的阻断造成的增强的抗肿瘤免疫表明通过抑制这些途径提高免疫疗法的效率的可能性。本发明包括生成修饰的T细胞，其中作为一种手段， $\text{TCR}\alpha$ 与 β 链、 β -2微球蛋白、HLA分子、CTLA-4、PD-1和/或FAS被耗减，以生成具有降低的免疫原性的修饰的T细胞。

[0242] 本发明包括通过敲落内源基因表达和表达修饰的T细胞受体或嵌合抗原受体来生成修饰的T细胞的方法和组合物。在一些实施方式中，本发明包括用于生成修饰的T细胞的方法。这样的修饰的T细胞可以包括在治疗组合物中并且被施用至需要其的患者。

[0243] 内源基因表达的敲落

[0244] 本发明包括T细胞中内源基因表达的下调，比如下调T细胞受体 (TCR) 的 α 和/或 β 链、 β -2微球蛋白、CTLA-4、FAS、PD1或主要组织相容性复合体蛋白比如HLA分子。在一个实施方式中，具有下调的基因表达的T细胞在同种异体环境中具有降低的免疫原性。在另一个实施方式中，具有降低的免疫原性的T细胞表达修饰的TCR或CAR用于靶向的效应物活性。

[0245] 在一方面，本发明包括用于生成修饰的T细胞的方法，其包括将核酸引入能够下调内源基因表达的T细胞，其中基因选自 $\text{TCR}\alpha$ 链、 $\text{TCR}\beta$ 链、 β -2微球蛋白、HLA分子、CTLA-4、PD1

和FAS。下调参与对细胞产生免疫应答的内源基因——比如TCR α 链、TCR β 链、 β -2微球蛋白或HLA分子——的表达减少免疫-介导的修饰的T细胞的排斥。例如,下调内源TCR、MHC或 β -2微球蛋白基因的表达移除T细胞上同种异体抗原的表面呈递——其可能引起宿主免疫系统的排斥。而且,当暴露于免疫抑制性微环境时,下调调控T细胞中的抑制性信号传导途径的内源基因,比如CTLA-4、PD1和/或FAS,增强修饰的T细胞的抗肿瘤功效。

[0246] 在一方面,能够下调内源基因表达的核酸,比如通过电穿孔、转染、或慢病毒或其它病毒转导,被引入T细胞。在另一方面,本发明包括修饰的T细胞,其包括能够下调内源基因表达的电穿孔的核酸。在又另一方面,修饰的T细胞包括能够下调内源TCR基因表达的电穿孔的核酸。在另一方面,根据本文描述的方法生成包括修饰的T细胞的组合物。在又另一方面,本发明包括药物组合物,其包括修饰的T细胞或根据本文描述的方法生成的修饰的T细胞和药学上可接受的载体。

[0247] 能够调控内源基因表达的核酸可以下调内源基因表达。在一个实施方式中,能够下调内源基因表达的核酸选自反义RNA、antigomer RNA、siRNA、shRNA和CRISPR系统。内源基因表达可以通过例如反义RNA、antigomer RNA、siRNA、shRNA、CRISPR系统等被下调、敲落、降低和/或抑制。

[0248] CRISPR/Cas

[0249] CRISPR/Cas系统是用于诱导靶向的遗传改变的简便和高效系统。通过Cas9蛋白的靶标识别需要引导RNA(gRNA)内的‘种子’序列和gRNA-结合区上游的包含保守的二核苷酸的前间区序列邻近基序(PAM)序列。从而可以通过重设计细胞系(比如293T细胞)、原代细胞和CAR T细胞中的gRNA,CRISPR/CAS系统被工程化以切割几乎任何DNA序列。CRISPR/CAS系统可以通过共表达单个CAS9蛋白与两种或更多种gRNA同时靶向多个基因组基因座,使得此系统独特地适用于靶基因的多重基因编辑或协同活化。

[0250] 用于抑制基因表达的CRISPR/Cas系统的一个实例——CRISPRi——在美国公布号:2014/0068797中描述。CRISPRi诱导永久性基因破坏,其利用RNA-引导的Cas9核酸内切酶引入DNA双链断裂——其引发易错修复途径以导致移码突变。无催化活性的(catalytically dead)Cas9缺乏核酸内切酶活性。当与引导RNA共表达时,生成特异性地干扰转录延伸、RNA聚合酶结合、或转录因子结合的DNA识别复合体。此CRISPRi系统高效地阻遏靶基因的表达。

[0251] 当特异于靶基因的引导核酸序列和Cas核酸内切酶被引入细胞并且形成复合体——其使得Cas核酸内切酶能够在靶基因处引入双链断裂——时,发生CRISPR/Cas基因破坏。在一个实施方式中,CRISPR系统包括表达载体,比如,但不限于pAd5F35-CRISPR载体。在一个实施方式中,通过将Cas表达载体和特异于基因的引导核酸序列引入T细胞生成修饰的T细胞。在另一个实施方式中,Cas表达载体诱导Cas9核酸内切酶的表达。还可以使用其它核酸内切酶,包括但不限于T7、Cas3、Cas8a、Cas8b、Cas10d、Cse1、Csy1、Csn2、Cas4、Cas10、Csm2、Cmr5、Fok1、本领域已知的其它核酸酶和其任意组合。

[0252] 在一个实施方式中,诱导Cas表达载体包括将T细胞暴露于激活Cas表达载体中的诱导型启动子的试剂。在这样的实施方式中,Cas表达载体包括诱导型启动子,比如通过暴露于抗生素(例如,四环素或四环素的衍生物,例如多西环素)可诱导的启动子。然而,应当领会可以使用其它诱导型启动子。诱导剂可以是导致诱导型启动子的诱导的选择性条件

(例如,暴露于试剂,例如抗生素)。这导致Cas表达载体的表达。

[0253] 引导核酸序列特异于基因并且靶向该基因进行Cas核酸内切酶-诱导的双链断裂。引导核酸序列的序列可以在基因的基因座内。在一个实施方式中,引导核酸序列的长度是至少10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40个或更多个核苷酸。

[0254] 引导核酸序列可以特异于任何基因,比如将降低免疫原性或降低对免疫抑制性微环境的敏感性的基因。在一个实施方式中,基因可以包括特异于T细胞受体(TCR)链(比如 α 、 β 、 γ 和/或 δ 链)、 β -2微球蛋白、FAS、PD1、主要组织相容性复合体蛋白(比如HLA I类分子和/或HLA II类分子)、CTLA-4或其任意组合的序列。

[0255] 引导核酸序列包括RNA序列、DNA序列、其组合(RNA-DNA组合序列)、或具有合成核苷酸的序列。引导核酸序列可以是单分子或双分子。在一个实施方式中,引导核酸序列包括单个引导RNA。

[0256] T细胞受体

[0257] 使用聚藏(harbor)抗原特异性TCR的T细胞的过继免疫疗法在癌症和某些慢性病毒感染的治疗中具有治疗潜力。使用特异性TCR基因工程化T细胞具有将T细胞重定向至胞内抗原的优势。考虑到大部分致癌蛋白是胞内的,研发特异于致癌驱动蛋白的一组TCR具有极大的吸引力。

[0258] 本发明还包括修饰的T细胞,其具有如本文描述的下调的基因表达和外源性T细胞受体(TCR)。在一方面,本发明包括用于生成修饰的T细胞的方法,其包括将编码修饰的T细胞受体(TCR)——其包括对靶细胞上的表面抗原的亲和力——的核酸引入T细胞和引入能够调控内源基因表达——其选自TCR α 链、TCR β 链、 β -2微球蛋白、PD1和FAS——的核酸,其中T细胞能够表达修饰的TCR。

[0259] 在另一方面,本发明包括修饰的T细胞,其包括编码修饰的T细胞受体(TCR)——其包括对靶细胞上的表面抗原的亲和力——的外源性核酸和能够下调内源基因表达——其选自TCR α 链、TCR β 链、 β -2微球蛋白、PD1和FAS——的核酸,其中T细胞表达修饰的TCR并且其中内源基因表达在T细胞中被下调。本发明还包括含有本文描述的修饰的T细胞的细胞群。

[0260] T细胞受体是响应于抗原的呈递参与T细胞的活化的膜蛋白的复合体。TCR的刺激由抗原呈递细胞上的主要组织相容性复合体分子(MHC)触发,所述抗原呈递细胞将抗原肽呈递至T细胞并且结合至TCR复合体以诱发一系列胞内信号传导级联。

[0261] TCR通常由六种不同的膜结合链——其形成负责配体识别的TCR异二聚体——组成。TCR以 α/β 和 γ/δ 形式存在,其是结构上相似的,但是具有不同的解剖学位置和功能。在一个实施方式中,TCR包括TCR α 链和TCR β 链,比如编码TCR的核酸包括编码TCR α 链和TCR β 链的核酸。在另一个实施方式中,TCR α 链或TCR β 链或两条链包括至少一个N-去糖基化。

[0262] 每个链由两个胞外结构域——可变和恒定结构域——组成。在一个实施方式中,TCR包括至少一个鼠恒定区。恒定结构域靠近细胞膜,接着是跨膜结构域和短胞质尾。在一个实施方式中,修饰的TCR包括胞质结构域,其包括共刺激信号传导结构域,比如4-1BB共刺激信号传导结构域。可变结构域有助于确定TCR对其具有结合特异性的特定的抗原和MHC分子。转而,T细胞对独特的抗原-MHC复合体的特异性保留在由T细胞表达的特定的TCR中。

[0263] 恒定和可变结构域中的每个可以包括链内二硫键。在一个实施方式中,TCR包括至

少一个二硫键。可变结构域包括类似于抗体的互补决定区 (CDR) 的高度多态性的环。TCR 序列的多样性经由连接的V基因 (V)、D基因 (D)、J基因 (J)、和C基因的体细胞重排生成。

[0264] 功能性 α 和 γ 链多肽由重排的V-J-C区形成,而 β 和 δ 链由V-D-J-C区组成。胞外恒定结构域包括近膜区和免疫球蛋白区。

[0265] 在一个实施方式中,TCR包括野生型TCR、高亲和力TCR和嵌合TCR。当TCR被修饰时,与对野生型TCR相比,它可以具有更高的对靶细胞表面抗原的亲和力。在其中TCR是嵌合TCR的实施方式中,TCR可以包括嵌合结构域,比如TCR在至少一个链的C'端处包括共刺激信号传导结构域。在其它实施方式中,TCR可以包括修饰的链,比如修饰的 α 或 β 链。这样的修饰可以包括但不限于N-去糖基化,改变的结构域(比如工程化的可变区以靶向特异性的抗原或增加亲和力)、添加一个或多个二硫键,源自不同物种的整个链或链的片段、和其任意组合。

[0266] 在一个实施方式中,TCR包括对靶细胞抗原的特异性。靶细胞表面抗原可以包括限定靶细胞的表面的任何类型的配体。例如,靶细胞表面抗原可以被选择以识别充当与具体疾病状态相关联的靶细胞上的细胞表面标志物的配体。因而,可以充当TCR的抗原结合结构域的配体的细胞表面标志物的实例包括与病毒、细菌和寄生虫感染、自身免疫性疾病和癌细胞相关联的那些。在一个实施方式中,靶细胞表面抗原包括任何肿瘤相关抗原 (TAA) 和病毒抗原、疾病细胞相关抗原或其任意片段。

[0267] 靶细胞抗原可以包括可以通过主要组织相容性复合体加工和呈递的任何蛋白质。例如,靶抗原可以与具体疾病状态相关联。因而,可以充当TCR的靶标的细胞标志物的实例包括与病毒、细菌和寄生虫感染、自身免疫性疾病和癌细胞相关联的那些。在一个实施方式中,靶抗原包括任何肿瘤相关抗原 (TAA) 和病毒抗原、或其任意片段。

[0268] 在一方面,本发明包括修饰的T细胞群,其包括编码修饰的T细胞受体 (TCR) ——其包括对靶细胞上的表面抗原的亲和力——的核酸和能够下调内源基因表达——其选自TCR α 链、TCR β 链、 β -2微球蛋白、HLA分子、CTLA-4、PD1和FAS——的核酸,其中T细胞能够表达修饰的TCR。

[0269] 用于工程化和表达T细胞受体的技术包括但不限于产生TCR异二聚体,其包括连接各自的亚基的天然的二硫桥(Garboczi等,(1996),Nature 384(6605):134-41;Garboczi等,(1996),J Immunol 157(12):5403-10;Chang等,(1994),PNAS USA 91:11408-11412;Davodeau等,(1993),J.Biol.Chem.268(21):15455-15460;Golden等,(1997),J.Imm.Meth.206:163-169;美国专利号6,080,840)。

[0270] 嵌合抗原受体 (CAR)

[0271] 本发明还包括修饰的T细胞,其具有如本文描述的下调的基因表达和CAR。因而,本发明涵盖修饰的T细胞,其包括CAR或编码CAR的核酸,其中CAR包括抗原结合结构域、跨膜结构域和胞内结构域。

[0272] 在一方面,本发明包括生成修饰的T细胞的方法,其包括将能够下调内源基因表达——其选自TCR α 链、TCR β 链、 β -2微球蛋白、HLA分子、CTLA-4、PD1和FAS——的核酸引入T细胞,并且将编码嵌合抗原受体 (CAR) 的核酸引入T细胞,其中CAR包括抗原结合结构域、跨膜结构域和共刺激分子的胞内结构域。

[0273] 在另一方面,本发明包括修饰的T细胞,其包括能够下调内源基因表达的核酸和编码嵌合抗原受体 (CAR) 的核酸,其中下调的基因表达选自TCR α 链、TCR β 链、 β -2微球蛋白、HLA

分子、CTLA-4、PD1和FAS，并且其中CAR包括抗原结合结构域、跨膜结构域和共刺激分子的胞内结构域。在一个实施方式中，如本文其它地方描述的，修饰的T细胞进一步包括编码修饰的TCR——其包括对靶细胞上的表面抗原的亲和力——的外源性核酸。本发明还包括含有本文描述的修饰的T细胞的细胞群。

[0274] CAR的一个或多个结构域或结构域的片段可以是人的。在一个实施方式中，本发明包括全人CAR。可以使用本领域已知的重组方法获得编码期望的结构域的核酸序列，比如，例如使用标准技术通过从表达该基因的细胞的文库筛选，通过从已知包括其的载体衍生该基因，或通过从包含其的细胞和组织直接分离。可选地，可以合成地产生感兴趣的基因，而不是作为克隆的分子。

[0275] 在美国专利号：8,911,993、8,906,682、8,975,071、8,916,381、9,102,760、9,101,584和9,102,761中描述了CAR的实例，全部专利通过引用以其全部并入本文。

[0276] 抗原结合结构域

[0277] 在一个实施方式中，CAR包括与靶细胞上的抗原结合的抗原结合结构域。可以充当结合至CAR的抗原结合结构域的抗原的细胞表面标志物的实例包括与病毒、细菌和寄生虫感染、自身免疫性疾病和癌细胞相关联的那些。

[0278] 抗原结合结构域的选择取决于在靶细胞的表面上存在的抗原的类型和数目。例如，可以选择抗原结合结构域以识别充当与具体疾病状态相关联的靶细胞上的细胞表面标志物的抗原。

[0279] 在一个实施方式中，抗原结合结构域结合至肿瘤抗原，比如特异于感兴趣的肿瘤或癌症的抗原。在一个实施方式中，本发明的肿瘤抗原包括一种或多种癌症抗原表位。

[0280] 抗原结合结构域可以包括结合至抗原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、非人抗体和其任意片段。因而，在一个实施方式中，抗原结合结构域部分包括哺乳动物抗体或其片段。

[0281] 抗原结合结构域可以结合一种或多种抗原，比如，但不限于CD19；CD123；CD22；CD30；CD171；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；表皮生长因子受体变体III（EGFRvIII）；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（BCMA）；Tn抗原（（Tn Ag）或（GalNAc α -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）；白介素-13受体亚基 α -2（IL-13Ra2或CD213A2）；间皮素；白介素11受体 α （IL-11Ra）；前列腺干细胞抗原（PSCA）；丝氨酸蛋白酶21（睾蛋白（Testisin）或PRSS21）；血管内皮生长因子受体2（VEGFR2）；Lewis（Y）抗原；CD24；血小板源生长因子受体 β （PDGFR- β ）；阶段特异性胚胎抗原-4（SSEA-4）；CD20；叶酸受体 α ；受体酪氨酸-蛋白激酶ERBB2（Her2/neu）；细胞表面相关粘蛋白1（MUC1）；表皮生长因子受体（EGFR）；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；成纤维细胞活化蛋白 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（Macropain））亚基，B型，9（LMP2）；糖蛋白100（gp100）；由断裂点簇区（BCR）和Abelson鼠白血病病毒癌基因同源物1（Ab1）构成的癌基因融合蛋白（bcr-ab1）；酪氨酸酶；肝配蛋白A型

受体2(EphA2)；岩藻糖基GM1；唾液酸化Lewis粘附分子(sLe)；神经节苷脂GM3(aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-4)bDGlc(1-1)Cer)；转谷氨酰胺酶5(TGS5)；高分子量-黑素瘤-相关抗原(HMWMAA)；邻乙酰基-GD2神经节苷脂(OAcGD2)；叶酸受体β；肿瘤内皮标志物1(TEM1/CD248)；肿瘤内皮标志物7-相关的(TEM7R)；密蛋白6(CLDN6)；促甲状腺激素受体(TSHR)；G蛋白偶联受体C类5组，成员D(GPRC5D)；染色体X开放阅读框61(CXORF61)；CD97；CD179a；退行发育淋巴瘤激酶(ALK)；多聚唾液酸；胎盘特异性1(PLAC1)；globoH glycoceramide的己糖部分(GlobоХ)；乳腺分化抗原(NY-BR-1)；尿路上皮特异蛋白(uropakin)2(UPK2)；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(pannexin)3(PANX3)；G蛋白偶联受体20(GPR20)；淋巴细胞抗原6复合物，基因座K9(LY6K)；嗅觉受体51E2(OR51E2)；TCR γ交替阅读框蛋白(TARP)；维尔姆斯肿瘤蛋白(WT1)；癌症/睾丸抗原1(NY-ESO-1)；癌症/睾丸抗原2(LAGE-1A)；黑素瘤相关抗原1(MAGE-A1)；ETS易位变异基因6，位于染色体12p(ETV6-AML)上；精子蛋白17(SPA17)；X抗原家族，成员1A(XAGE1)；血管生成素结合细胞表面受体2(Tie2)；黑素瘤癌症睾丸抗原-1(MAD-CT-1)；黑素瘤癌症睾丸抗原-2(MAD-CT-2)；FOS相关抗原1；肿瘤蛋白p53(p53)；p53突变体；prostein；存活蛋白(surviving)；端粒酶；前列腺癌肿瘤抗原-1(PCTA-1或半乳凝素8)；由T细胞识别的黑素瘤抗原1(MelanA或MART1)；大鼠肉瘤(Ras)突变体；人端粒酶逆转录酶(hTERT)；肉瘤易位断点；凋亡的黑素瘤抑制剂(ML-IAP)；ERG(跨膜蛋白酶，丝氨酸2(TMPRSS2)ETS融合基因)；N-乙酰葡萄糖胺基转移酶V(NA17)；配对盒蛋白Pax-3(PAX3)；雄激素受体；细胞周期蛋白B1；v-myc鸟髓细胞瘤病病毒癌基因成神经细胞瘤衍生的同源物(MYCN)；Ras同源物家族成员C(RhoC)；酪氨酸酶相关蛋白2(TRP-2)；细胞色素P450 1B1(CYP1B1)；CCCTC结合因子(锌指蛋白)样(BORIS或印记位点调节因子样蛋白(Brother of the Regulator of Imprinted Sites))；由T细胞识别的鳞状细胞癌抗原3(SART3)；配对盒蛋白Pax-5(PAX5)；前顶体素(proacrosin)结合蛋白sp32(OY-TES1)；淋巴细胞特异性蛋白酪氨酸激酶(LCK)；A型激酶锚定蛋白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(renal ubiquitous)1(RU1)；肾遍在蛋白2(RU2)；豆荚蛋白(legumain)；人类乳头瘤病毒E6(HPV E6)；人类乳头瘤病毒E7(HPV E7)；肠羧基酯酶；突变的热休克蛋白70-2(mut hosp 70-2)；CD79a；CD79b；CD72；白细胞相关免疫球蛋白样受体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)；骨髓基质细胞抗原2(BST2)；包含EGF样模块(module)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-3(GPC3)；Fc受体样5(FCRL5)；和免疫球蛋白λ样多肽1(IGLL1)。

[0282] 在一些情况下，抗原结合结构域衍生自CAR将最终用于其中的相同的物种是有利的。例如，对于用于人，可能有利的是，CAR的抗原结合结构域包括人抗体、如本文其它地方描述的人源化抗体、或其片段。

[0283] 还有利的是，抗原结合结构域可操作地连接至CAR的另一个结构域，比如跨膜结构域或胞内结构域——其均在本文其它地方描述，用于在细胞中表达。在一个实施方式中，编码抗原结合结构域的核酸可操作地连接至编码跨膜结构域的核酸和编码胞内结构域的核酸。

[0284] 跨膜结构域

[0285] 对于跨膜结构域,CAR可以被设计以包括将CAR的抗原结合结构域连接至胞内结构域的跨膜结构域。在一个实施方式中,跨膜结构域天然地与CAR中的结构域中的一个或多个相关联。在一些情况下,可以选择跨膜结构域,或通过氨基酸置换修饰跨膜结构域,以避免将这样的结构域结合至相同或不同的表面膜蛋白的跨膜结构域,从而最小化与受体复合体的其它成员的相互作用。

[0286] 跨膜结构域可以衍生自天然来源或合成来源。当来源是天然的时,结构域可以衍生自任何膜结合蛋白或跨膜蛋白。具体用于本发明的跨膜区可以衍生自T细胞受体的 α 、 β 或 ζ 链、CD28、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154(即至少包括上述中的跨膜区(一个或多个))。在一些情况下,也可以采用各种人铰链,其包括人Ig(免疫球蛋白)铰链。

[0287] 在一个实施方式中,跨膜结构域可以是合成的,在该情况下,它将包括占主导的疏水残基比如亮氨酸和缬氨酸。优选地,将在合成跨膜结构域的每个末端处发现苯丙氨酸、色氨酸和缬氨酸的三联体。

[0288] 胞内结构域

[0289] CAR的胞内结构域或另外的胞质结构域负责活化其中表达CAR的细胞。术语“胞内结构域”因而意思是包括足以转导激活信号的胞内结构域的任何部分。在一个实施方式中,胞内结构域包括负责效应物功能的结构域。术语“效应物功能”指的是细胞的专有功能。例如,T细胞的效应物功能可以是包括分泌细胞因子在内的细胞溶解活性或辅助活性。

[0290] 在一个实施方式中,CAR的胞内结构域包括负责信号激活和/或转导的结构域。胞内结构域可以经由蛋白质-蛋白质相互作用、生物化学变化或其它应答发送信号激活以改变细胞的代谢、形状、基因表达或对活化嵌合胞内信号传导分子的其它细胞应答。

[0291] 用于本发明的胞内结构域的实例包括但不限于T细胞受体(TCR)和任何共刺激分子——其一起作用以在抗原受体接合之后起始信号转导——的胞质部分,以及这些元件和具有相同的功能性能力的任何合成序列的任何衍生物或变体。在一个实施方式中,CAR的胞内结构域包括双信号传导结构域。双信号传导结构域可以包括来自本文描述的任何分子的片段或结构域。

[0292] 胞内结构域的实例包括来自一种或多种分子或受体的片段或结构域,其包括但不限于TCR、CD3 ζ 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD86、常见的FcR γ 、FcR β (Fc ϵ R1b)、CD79a、CD79b、Fc γ RIIa、DAP10、DAP12、T细胞受体(TCR)、CD27、CD28、4-1BB(CD137)、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、与CD83特异性结合的配体、CDS、ICAM-1、GITR、BAFFR、HVEM(LIGHTR)、SLAMF7、NKp80(KLRF1)、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、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1(CD226)、SLAMF4(CD244、2B4)、CD84、CD96(触觉的)、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、NKp44、NKp30、NKp46、NKG2D、本文描述的其它共刺激分子、其任何衍生物、变体或片段,具有相同的功能性能力的共刺激分子的任何合成序列,和其任意组合。

[0293] 在一个实施方式中,CAR的胞内结构域包括共刺激分子的任何部分,比如来自CD3、CD27、CD28、ICOS、4-1BB、PD-1、T细胞受体(TCR)、其任何衍生物或变体的至少一个信号传导结构域,具有相同的功能性能力的任何其合成序列,和其任意组合。

[0294] 在CAR的抗原结合结构域和跨膜结构域之间,或在CAR的胞内结构域和跨膜结构域之间,可以并入间隔结构域。如本文使用的,术语“间隔结构域”通常意思是起将跨膜结构域连接至多肽链中的抗原结合结构域或胞内结构域作用的任何寡肽或多肽。在一个实施方式中,间隔结构域可以包括多至300个氨基酸,优选地10至100个氨基酸,和更优选地25至50个氨基酸。在另一个实施方式中,短的寡肽或多肽连接体,优选地长度在2和10个氨基酸之间,可以在CAR的跨膜结构域和胞内结构域之间形成连接。连接体的实例包括甘氨酸-丝氨酸双联体。

[0295] 人抗体

[0296] 当使用双特异性抗体或CAR的抗原结合结构域时,可以优选地使用人抗体或其片段。完全人抗体对于人对象的治疗性处理是特别期望的。人抗体可以通过各种本领域已知的方法制造,所述方法包括使用源自人免疫球蛋白序列的抗体文库的噬菌体展示方法,其包括对这些技术的改进。还参见美国专利号4,444,887和4,716,111;和PCT公布WO 98/46645、WO98/50433、WO 98/24893、WO 98/16654、WO 96/34096、WO 96/33735和WO91/10741;其每篇通过引用以其全部并入本文。双特异性抗体还可以包括其中重链和轻链由源自一种或多种人DNA来源的核苷酸序列编码的抗体。

[0297] 人抗体还可以使用不能表达功能性内源免疫球蛋白但可以表达人免疫球蛋白基因的转基因小鼠来产生。例如,人重链和轻链免疫球蛋白基因复合体可以被随机地或通过同源重组引入小鼠胚胎干细胞。可选地,除人重链和轻链基因之外,人可变区、恒定区和多变区也可以被引入小鼠胚胎干细胞。通过同源重组,可以与引入人免疫球蛋白基因座分开地或同时地,使小鼠重链和轻链免疫球蛋白基因非功能性。例如,已经描述了在嵌合和种系突变小鼠中纯合缺失抗体重链J区(JH)基因导致内源性抗体产生的完全抑制。修饰的胚胎干细胞被扩展并且显微注射入胚泡以产生嵌合小鼠。然后繁殖嵌合小鼠以产生表达人抗体的纯合后代。转基因小鼠以正常的方式使用选择的抗原——例如本发明的多肽的全部或部分——进行免疫。针对选择的靶标的抗体可以使用常规的杂交瘤技术从免疫的转基因小鼠获得。由转基因小鼠聚藏(harbor)的人免疫球蛋白转基因在B细胞分化期间重排,并且随后经历类别转换和体细胞突变。因而,使用这样的技术可能产生治疗上有用的IgG、IgA、IgM和IgE抗体,包括但不限于IgG1(γ 1)和IgG3。对于此技术用于产生人抗体的综述,参见Lonberg和Huszar(Int.Rev.Immunol.,13:65-93(1995))。对于此技术用于产生人抗体和人单克隆抗体以及用于生产这样的抗体的方案的详细讨论,参见,例如,PCT公布号WO 98/24893、WO 96/34096和WO 96/33735;和美国专利号5,413,923;5,625,126;5,633,425;5,569,825;5,661,016;5,545,806;5,814,318;和5,939,598,其每篇通过引用以其全部并入本文。此外,可以与公司比如Abgenix, Inc. (Freemont, Calif.) 和Genpharm (San Jose, Calif.) 签订合同以使用与上面描述的类似的技术提供针对选择的抗原的人抗体。对于在种系突变小鼠中转移人类种系免疫球蛋白基因阵列在抗原攻击之后将导致产生人抗体的具体讨论,参见,例如,Jakobovits等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90:2551(1993);Jakobovits等,Nature,362:255-258(1993);Brugermann等,Year in Immunol.,7:33

(1993) ;和Duchosal等,Nature,355:258(1992)。

[0298] 人抗体也可以源自噬菌体展示文库(Hoogenboom等,J.Mol.Biol.,227:381(1991);Marks等,J.Mol.Biol.,222:581-597(1991);Vaughan等,Nature Biotech.,14:309(1996))。噬菌体展示技术(McCafferty等,Nature,348:552-553(1990))可以用于从来自未免疫供体的免疫球蛋白可变(V)结构域基因所有组成成分在体外产生人抗体和抗体片段。根据此技术,将抗体V结构域基因符合读框地克隆入丝状噬菌体比如M13或fd的主要或次要外壳蛋白基因,并且在噬菌体颗粒的表面上作为功能性抗体片段展示。因为丝状颗粒包含噬菌体基因组的单链DNA拷贝,所以基于抗体的功能性质的选择也导致选择编码展示那些性质的抗体的基因。因而,噬菌体模拟了B细胞的一些性质。噬菌体展示可以以各种形式进行;对于其综述,参见,例如,Johnson,Kevin S,和Chiswell,David J.,Current Opinion in Structural Biology 3:564-571(1993)。数种来源的V基因片段可以用于噬菌体展示。Clackson等,Nature,352:624-628(1991)从源自未免疫小鼠脾脏的V基因的小的随机组合文库分离了抗~~恶~~唑酮抗体的多样化阵列。可以构建来自未免疫人供体的V基因所有组成成分,并且抗原(包括自体抗原)的多样化阵列的抗体可以大体上遵循下列描述的技术进行分离:Marks等,J.Mol.Biol.,222:581-597(1991)或Griffith等,EMBO J.,12:725-734(1993)。还参见美国专利号5,565,332和5,573,905,其每篇通过引用以其全部并入本文。

[0299] 人抗体也可以通过体外活化的B细胞生成(参见,美国专利号5,567,610和5,229,275,其每篇通过引用以其全部并入本文)。人抗体也可以使用杂交瘤技术体外生成,比如,但不限于Roder等(Methods Enzymol.,121:140-167(1986))描述的。

[0300] 人源化抗体

[0301] 可选地,在一些实施方式中,非人抗体可以是人源化的,其中抗体的特异性序列或区域被修饰以增加与人中天然产生的抗体的相似性。例如,在本发明中,抗体或其片段可以包括非人哺乳动物scFv。在一个实施方式中,抗原结合结构域部分是人源化的。

[0302] 人源化抗体可以使用本领域已知的各种技术产生,其包括但不限于CDR-移植(参见,例如,欧洲专利号EP 239,400;国际公布号WO 91/09967;和美国专利号5,225,539、5,530,101和5,585,089,其每篇通过引用以其全部并入本文)、贴面(veneering)或表面重建(resurfacing)(参见,例如,欧洲专利号EP 592,106和EP 519,596;Padlan,1991,Molecular Immunology,28(4/5):489-498;Studnicka等,1994,Protein Engineering,7(6):805-814;和Roguska等,1994,PNAS,91:969-973,其每篇通过引用以其全部并入本文)、链改组(参见,例如,美国专利号5,565,332,其通过引用以其全部并入本文)、和在如下中公开的技术,例如,美国专利申请公布号US2005/0042664、美国专利申请公布号US2005/0048617、美国专利号6,407,213、美国专利号5,766,886、国际公布号WO 9317105、Tan等,J.Immunol.,169:1119-25(2002)、Caldas等,Protein Eng.,13(5):353-60(2000)、Morea等,Methods,20(3):267-79(2000)、Baca等,J.Biol.Chem.,272(16):10678-84(1997)、Roguska等,Protein Eng.,9(10):895-904(1996)、Couto等,Cancer Res.,55(23Supp):5973s-5977s(1995)、Couto等,Cancer Res.,55(8):1717-22(1995)、Sandhu J S,Gene,150(2):409-10(1994)、和Pedersen等,J.Mol.Biol.,235(3):959-73(1994),其每篇通过引用以其全部并入本文。通常,框架区中的框架残基将被置换为来自CDR供体抗体的相应残基以改变,优选地改进,抗原结合。这些框架置换通过本领域熟知的方法鉴定,例如,通过建模

CDR和框架残基的相互作用以鉴定对抗原结合重要的框架残基和通过序列比较鉴定特定位处的不常见的框架残基(参见,例如,Queen等,美国专利号5,585,089;和Riechmann等,1988,Nature,332:323,其通过引用以其全部并入本文)。

[0303] 人源化抗体具有从非人来源引入其的一个或多个氨基酸残基。这些非人氨基酸残基通常被称为“输入”残基,其通常取自“输入”可变结构域。因而,人源化抗体包括来自非人免疫球蛋白分子的一个或多个CDR和来自人的框架区。抗体的人源化是本领域熟知的,并且可以大体上遵循Winter与合作者的方法进行(Jones等,Nature,321:522-525(1986);Riechmann等,Nature,332:323-327(1988);Verhoeyen等,Science,239:1534-1536(1988),其通过将啮齿动物CDR或CDR序列置换为相应的人抗体序列,即CDR-移植(EP 239,400;PCT公布号W0 91/09967;和美国专利号4,816,567;6,331,415;5,225,539;5,530,101;5,585,089;6,548,640,其内容通过引用以其全部并入本文)。在这样的人源化嵌合抗体中,实质上小于完整人可变结构域已经被来自非人物种的相应的序列置换。实际上,人源化抗体通常是其中一些CDR残基和可能的一些框架(FR)残基被来自啮齿动物抗体中的类似位点的残基置换的人抗体。抗体的人源化也可以通过贴面或表面重建(EP 592,106;EP 519,596;Padlan,1991,Molecular Immunology,28 (4/5) :489-498;Studnicka等,Protein Engineering,7 (6) :805-814(1994);和Roguska等,PNAS,91:969-973(1994))或链改组(美国专利号5,565,332)实现,其内容通过引用以其全部并入本文。

[0304] 用于制造人源化抗体的人可变结构域——轻和重二者——的选择是为了降低抗原性。根据所谓的“最佳拟合”方法,啮齿动物抗体的可变结构域的序列针对已知的人可变结构域序列的整个文库进行筛选。最接近于啮齿动物的人序列然后被接受为用于人源化抗体的人框架(FR)(Sims等,J.Immunol.,151:2296(1993);Chothia等,J.Mol.Biol.,196:901(1987),其内容通过引用以其全部并入本文)。另一种方法使用源自特定的轻链或重链亚组的所有人抗体的共有序列的特定框架。相同的框架可以用于数种不同的人源化抗体(Carter等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,89:4285(1992);Presta等,J.Immunol.,151:2623(1993),其内容通过引用以其全部并入本文)。

[0305] 抗体可以被人源化,且保留对靶抗原的高亲和力以及其它有利的生物学性质。根据本发明的一个方面,人源化抗体通过使用亲本和人源化序列的三维模型分析亲本序列和多种概念性人源化产物的方法来制备。三维免疫球蛋白模型是一般可获得的并且是本领域技术人员熟悉的。图解和展示选择的候选免疫球蛋白序列的可能的三维构象结构的计算机程序是可获得的。检查这些展示允许分析残基在候选免疫球蛋白序列的功能中的可能作用,即,分析影响候选免疫球蛋白结合靶抗原的能力的残基。以此方式,FR残基可以从接受者和输入序列选择并组合,使得实现期望的抗体特性,比如对靶抗原的增加的亲和力。一般而言,CDR残基直接地和最实质性地参与影响抗原结合。

[0306] 人源化抗体保留与原始抗体相似的抗原特异性。然而,使用人源化的某些方法,可以使用“定向进化”的方法增加抗体对靶抗原的结合亲和力和/或特异性,如由Wu等,J.Mol.Biol.,294:151(1999)描述的,其内容通过引用以其全部并入本文。

[0307] 其它分子

[0308] 本发明还包括本文描述的修饰的T细胞,其进一步包括共刺激分子或编码共刺激分子的核酸。在一个实施方式中,本发明的修饰的T细胞进一步包括编码共刺激分子的外源

性核酸,以便修饰的T细胞表达共刺激分子。核酸可以通过转导T细胞、转染T细胞或电穿孔T细胞被引入T细胞。在另一个实施方式中,共刺激分子选自CD3、CD27、CD28、CD83、CD86、CD127、4-1BB、4-1BBL、PD1和PD1L。在另一个实施方式中,共刺激分子包括CD3并且包括至少两种不同的CD3链,比如CD3 ζ 链和CD3 ϵ 链。

[0309] 在另一个实施方式中,修饰的T细胞进一步包括Klf4、Oct3/4和/或Sox2或编码Klf4、Oct3/4和/或Sox2的核酸以诱导T细胞的多能性。T细胞可以通过表达Klf4、Oct3/4和Sox2被诱导至多能性。Klf4、Oct3/4和Sox2可以从核酸、病毒载体(一种或多种)或RNA分子(一种或多种)表达。在一个实施方式中,编码Klf4、Oct3/4和Sox2的病毒载体被引入T细胞以诱导多能性。在另一个实施方式中,仙台病毒载体被引入T细胞以诱导多能性,其中仙台病毒载体编码Klf4、Oct3/4和Sox2。

[0310] 引入核酸

[0311] 将核酸引入细胞的方法包括物理、生物和化学方法。用于将多核苷酸比如RNA引入宿主细胞的物理方法包括磷酸钙沉淀、脂质转染、粒子轰击、显微注射、电穿孔等。RNA可以使用商业上可获得的方法被引入靶细胞,所述方法包括电穿孔(Amaxa Nucleofector-II (Amaxa Biosystems, Cologne, Germany))、ECM 830(BTX) (Harvard Instruments, Boston, Mass.) 或Gene Pulser II (BioRad, Denver, Colo.)、Multiporator (Eppendorf, Hamburg Germany)。RNA还可以通过如下方法被引入细胞:使用阳离子脂质体介导的转染、使用脂质转染、使用聚合物封装、使用肽介导的转染、或使用生物射弹粒子递送系统比如“基因枪”(参见,例如,Nishikawa等Hum Gene Ther., 12(8):861-70(2001))。

[0312] 用于将感兴趣的多核苷酸引入宿主细胞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,已经成为最广泛使用的方法,其用于将基因插入哺乳动物,例如,人细胞。其它病毒载体可以衍生自慢病毒、痘病毒、I型单纯疱疹病毒、腺病毒和腺伴随病毒等。参见,例如,美国专利号5,350,674和5,585,362。

[0313] 用于将多核苷酸引入宿主细胞的化学手段包括胶体分散系统,比如大分子复合体、纳米胶囊、微球、珠、和基于脂质的系统——其包括水包油型乳剂、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,人工膜囊泡)。

[0314] 适于使用的脂质可以从商业来源获得。例如,二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(“DMPC”)可以从Sigma, St. Louis, MO获得;磷酸二鲸蜡酯(“DCP”)可以从K&K Laboratories (Plainview, NY)获得;胆固醇(“Choi”)可以从Calbiochem-Behring获得;二肉豆蔻酰磷脂酰甘油(“DMPG”)和其它脂质可以从Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, AL)获得。氯仿或氯仿/甲醇中的脂质的原液可以被保存在大约-20°C下。氯仿被用作唯一的溶剂,因为它比甲醇更容易蒸发。“脂质体”是通用术语,其包括通过生成封闭的脂双层或聚集体而形成的多种单层和多层脂质媒介物。脂质体可以表征为具有囊泡结构,其具有磷脂双层膜和内部水性介质。多层脂质体具有由水性介质分开的多个脂质层。当磷脂悬浮在过量的水性溶液中时,它们自发形成。在形成封闭的结构和使水与溶解的溶质陷入脂双层之前,脂质组分经历自我重排(Ghosh等, 1991Glycobiology 5:505-10)。然而,也包括与正常的囊泡结构相比溶液中具有不同结构的组合物。例如,脂质可以呈现胶束结构或仅仅作为脂质分子的非均一聚集体存在。同样考虑的是脂质转染胺-核酸复合体。

[0315] 不管用于将外源性核酸引入宿主细胞或以其它方式使细胞暴露于本发明的抑制

剂的方法如何,为了确认核酸在宿主细胞中的存在,可以进行多种测定。这样的测定包括,例如,本领域技术人员熟知的“分子生物学”测定,比如DNA印迹和RNA印迹、RT-PCR和PCR;“生物化学”测定,比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)或通过本文描述的鉴定试剂的测定,其落入本发明范围内。

[0316] 在一个实施方式中,编码T细胞受体(TCR)——其包括对靶细胞上的表面抗原的亲和力——的核酸被引入扩展的T细胞。编码TCR的核酸可以是能够下调内源TCR基因表达的相同的或分开的核酸。编码TCR的核酸可以与能够下调内源TCR基因表达的核酸同时或顺序地引入T细胞。在一个实施方式中,在能够下调内源TCR基因表达的核酸之前引入编码TCR的核酸。

[0317] 而且,核酸可以通过任何手段被引入,比如转导扩展的T细胞、转染扩展的T细胞和电穿孔扩展的T细胞。一种核酸可以通过一种方法被引入T细胞并且另一种核酸可以通过不同的方法被引入T细胞。

[0318] RNA

[0319] 在一个实施方式中,被引入T细胞的核酸是RNA。在另一个实施方式中,RNA是包括体外转录的RNA或合成RNA的mRNA。使用聚合酶链式反应(PCR)-生成的模板通过体外转录产生RNA。来自任何来源的感兴趣的DNA可以通过PCR直接转化为使用适当的引物和RNA聚合酶的体外mRNA合成的模板。DNA的来源可以是,例如,基因组DNA、质粒DNA、噬菌体DNA、cDNA、合成的DNA序列或任何其它适当的DNA来源。体外转录的期望的模板是嵌合膜蛋白。举例而言,模板编码抗体、抗体的片段或抗体的一部分。又举例而言,模板包括胞外结构域——其包括抗体比如抗CD3的单链可变结构域;和共刺激分子的胞内结构域。在一个实施方式中,RNA嵌合膜蛋白的模板编码嵌合膜蛋白,其包括胞外结构域——其包括衍生自共刺激分子的抗体的抗原结合结构域;和衍生自CD28和4-1BB的胞内结构域的一部分的胞内结构域。

[0320] PCR可以用于生成体外转录mRNA——其随后被引入细胞——的模板。用于进行PCR的方法是本领域熟知的。用于PCR的引物设计为具有与待用作PCR的模板的DNA的区域基本上互补的区域。如本文使用的“基本上互补”指的是其中引物序列中大部分或所有的碱基是互补的,或一个或多个碱基是非互补的或错配的核苷酸的序列。基本上互补的序列能够与预期DNA靶标在用于PCR的退火条件下退火或杂交。引物可以设计为与DNA模板的任何部分基本上互补。例如,引物可以设计为扩增在细胞中正常转录的基因部分(开放阅读框),其包括5'和3'UTR。引物也可以设计为扩增编码感兴趣的具体结构域的基因部分。在一个实施方式中,引物设计为扩增包括所有或部分的5'和3'UTR的人cDNA的编码区。通过本领域熟知的合成方法生成可用于PCR的引物。“正向引物”是包含与待扩增的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。本文使用的“上游”指的是待扩增的DNA序列相对于编码链的5'位置。“反向引物”是包含与待扩增的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。本文使用的“下游”指的是待扩增的DNA序列相对于编码链的3'位置。

[0321] 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优选地具有5'和3'UTR。在一个实施方式中,5'UTR的长度在零和3000个核苷酸之间。待添加至编码区的5'和3'UTR序列的长度可以通过不同的方法改变,包括但不限于设计用于PCR的引物,其退火至UTR的不同区域。使用此方法,本领域普通技术人员可以修改实现转染转录的RNA

之后最佳翻译效率所需要的5'和3'UTR长度。

[0322] 5'和3'UTR可以是感兴趣的基因的天然存在的内源性5'和3'UTR。可选地,可以通过将UTR序列并入正向和反向引物或通过模板的任何其它修饰添加对感兴趣的基因非内源性的UTR序列。使用对感兴趣的基因非内源性的UTR序列可以有用于修改RNA的稳定性和/或翻译效率。例如,已知3'UTR序列中的富AU元件可以降低mRNA的稳定性。因此,3'UTR可以被选择或设计以基于本领域熟知的UTR的性质增加转录的RNA的稳定性。

[0323] 在一个实施方式中,5'UTR可以包含内源基因的Kozak序列。可选地,当正通过如上面描述的PCR添加对感兴趣的基因非内源性的5'UTR时,可以通过添加5'UTR序列重新设计共有的Kozak序列。Kozak序列可以增加一些RNA转录物的翻译效率,但是似乎不是所有RNA高效翻译所需要的。对于许多mRNA的Kozak序列的要求是本领域已知的。在其它实施方式中,5'UTR可以源自RNA基因组在细胞中稳定的RNA病毒。在其它实施方式中,多种核苷酸类似物可以用于3'或5'UTR以阻碍mRNA的核酸外切酶降解。

[0324] 为了能够实现从DNA模板合成RNA而不需要基因克隆,转录的启动子应当附加至待转录的序列上游的DNA模板。当作为RNA聚合酶的启动子起作用的序列被添加至正向引物的5'末端时,RNA聚合酶启动子并入待转录的开放阅读框上游的PCR产物。在一个实施方式中,启动子是T7聚合酶启动子,如本文其它地方描述的。其它有用的启动子包括但不限于T3和SP6 RNA聚合酶启动子。T7、T3和SP6启动子的共有的核苷酸序列是本领域已知的。

[0325] 在一个实施方式中,mRNA具有5'末端上的帽和3'聚腺苷酸尾,其决定核糖体结合、翻译的起始和mRNA在细胞中的稳定性。在环状DNA模板,例如,质粒DNA上,RNA聚合酶产生不适用于在真核细胞中表达的长的多联体产物(concatameric product)。在3'UTR的末端处线性化的质粒DNA的转录产生正常大小的mRNA,其在真核转染中无效,即使其在转录之后被聚腺苷酸化。

[0326] 在线性DNA模板上,噬菌体T7 RNA聚合酶可以使转录物的3'末端延伸超过模板的最后一个碱基(Schenborn和Mierendorf,Nuc Acids Res.,13:6223-36(1985);Nacheva和Berzal-Herranz,Eur.J.Biochem.,270:1485-65(2003))。

[0327] 将聚A/T一段序列(stretch)整合入DNA模板的常规方法是分子克隆。然而,整合入质粒DNA的聚A/T序列可以引起质粒不稳定,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它畸变高度污染。这使得克隆程序不仅费力且耗时,而且经常不可靠。这就是为什么允许构建具有聚A/T 3'一段序列的DNA模板而没有克隆的方法是高度期望的。

[0328] 转录的DNA模板的聚A/T区段可以在PCR期间通过使用包含聚T尾——比如100个T尾(大小可以是50-5000个T)——的反向引物产生,或在PCR后通过任何其它方法产生,所述方法包括但不限于DNA连接或体外重组。聚腺苷酸尾也为RNA提供稳定性并且减少它们的降解。通常,聚腺苷酸尾的长度与转录的RNA的稳定性正相关。在一个实施方式中,聚腺苷酸尾在100和5000个腺苷之间。

[0329] RNA的聚腺苷酸尾可以在体外转录之后使用聚腺苷酸聚合酶——比如大肠杆菌聚腺苷酸聚合酶(E-PAP)——进一步延伸。在一个实施方式中,使聚腺苷酸尾的长度从100个核苷酸增加至300和400个核苷酸之间导致RNA的翻译效率增加大约两倍。额外地,不同的化学基团附加至3'末端可以增加mRNA稳定性。这样的附加可以包含修饰的/人工的核苷酸、适配体和其它化合物。例如,ATP类似物可以使用聚腺苷酸聚合酶并入聚腺苷酸尾。ATP类似物

可以进一步增加RNA的稳定性。

[0330] 5'帽也为RNA分子提供稳定性。在优选的实施方式中,通过本文公开的方法产生的RNA包括5'帽。使用本领域已知的和本文描述的技术提供5'帽(Cougot,等,Trends in Biochem.Sci.,29:436-444(2001);Stepinski,等,RNA,7:1468-95(2001);Elango,等,Biochim.Biophys.Res.Commun.,330:958-966(2005))。

[0331] 通过本文公开的方法产生的RNA还可以包含内部核糖体进入位点(IRES)序列。IRES序列可以是起始帽-独立性核糖体结合至mRNA并且促进翻译起始的任何病毒序列、染色体序列或人工设计的序列。可以包括适于细胞电穿孔的任何溶质,其可以包含促进细胞通透性和生存力的因子,比如糖、肽、脂质、蛋白质、抗氧化剂和表面活性剂。

[0332] RNA转染

[0333] 在一些实施方式中,编码TCR的RNA被电穿孔入细胞。在一个实施方式中,编码TCR的RNA是体外转录的RNA。

[0334] 公开的方法可以在癌症、干细胞、急性和慢性感染、和自身免疫性疾病领域中的基础研究和疗法中应用于调节T细胞活性,其包括评估基因修饰的T细胞杀伤靶癌细胞的能力。

[0335] 方法还提供了通过改变例如启动子或输入RNA的量在宽的范围内控制表达水平的能力,其使得可能单独地调控表达水平。另外,基于PCR的mRNA生产技术极大地促进具有不同结构和它们的结构域组合的mRNA的设计。

[0336] 本发明的RNA转染方法的一个优势是RNA转染大体上是瞬时和无载体的。RNA转基因可以在简短的体外细胞活化之后被递送至淋巴细胞并且在其中表达,其作为最小的表达盒而不需要任何额外的病毒序列。在这些条件下,转基因整合入宿主细胞基因组是不可能的。由于RNA的转染效率和其均匀修饰整个淋巴细胞群的能力,细胞的克隆不是必需的。

[0337] 使用体外-转录的RNA(IVT-RNA)的T细胞的基因修饰利用均已经成功在多种动物模型中测试的两种不同的策略。借助脂质转染或电穿孔,使用体外-转录的RNA转染细胞。使用各种修饰稳定IVT-RNA是期望的,以便实现转移的IVT-RNA的延长表达。

[0338] 一些IVT载体在文献中是已知的,其以标准化方式用作体外转录的模板并且其已经被基因修饰为使得产生稳定的RNA转录物。用于本领域的目前的方案基于具有下列结构的质粒载体:使得能够RNA转录的5'RNA聚合酶启动子,接着是由非翻译区域(UTR)在3'和/或5'为侧翼的感兴趣的基因,和包含50-70个A核苷酸的3'聚腺嘌呤基盒。体外转录之前,环状质粒在聚腺嘌呤基盒下游通过II型限制酶(对应于切割位点的识别序列)线性化。聚腺嘌呤基盒因而对应于转录物中的后面的聚腺苷酸序列。作为此程序的结果,在线性化后一些核苷酸仍作为部分酶切割位点并且延伸或掩盖3'末端处的聚腺苷酸序列。尚不清楚此非生理学突出端是否影响从这样的构建体细胞内产生的蛋白质的量。

[0339] RNA具有优于更传统的质粒或病毒方法的许多优势。来自RNA来源的基因表达不需要转录并且在转染后快速地产生蛋白质产物。进一步,由于RNA必须仅接近细胞质而不是细胞核,并且因此典型的转染方法导致极高的转染率。此外,基于质粒的方法需要驱动感兴趣的基因表达的启动子在研究的细胞中是活性的。

[0340] 在另一方面,RNA构建体通过电穿孔递送入细胞。参见,例如,如在US 2004/0014645、US 2005/0052630A1、US 2005/0070841A1、US 2004/0059285A1、US 2004/

0092907A1中教导的将核酸构建体电穿孔入哺乳动物细胞的制剂和方法。包括电穿孔任何已知的细胞类型所需要的电场强度在内的多个参数在相关研究文献以及领域中的众多专利和申请中通常是已知的。参见例如,美国专利号6,678,556、美国专利号7,171,264和美国专利号7,173,116。用于电穿孔的治疗性应用的设备是商业上可获得的,例如,MedPulserTM DNA电穿孔治疗系统(Inovio/Genetronics, San Diego, Calif.) ,并且描述在专利比如美国专利号6,567,694;美国专利号6,516,223、美国专利号5,993,434、美国专利号6,181,964、美国专利号6,241,701和美国专利号6,233,482中;电穿孔也可以用于体外细胞转染,例如,如在US20070128708A1中描述的。电穿孔也可以用于将核酸体外递送入细胞。因此,利用本领域技术人员已知的任何的许多可用的装置和电穿孔系统将包括核酸的表达构建体电穿孔-介导施用入细胞提供了令人激动的递送感兴趣的RNA至靶细胞的新手段。

[0341] 在一个实施方式中,方法包括电穿孔编码TCR α 和 β 链的RNA。TCR α 和 β 链可以在相同的或分开的RNA上编码。当 α 和 β 由分开的RNA编码时, RNA可以被共电穿孔。

[0342] 在另一个实施方式中,方法可以进一步包括电穿孔编码共刺激分子的核酸。共刺激分子核酸可以与TCR RNA共电穿孔。

[0343] T细胞的来源

[0344] 在扩展之前,从对象获得T细胞的来源。对象的非限制性实例包括人、狗、猫、小鼠、大鼠和其转基因物种。优选地,对象是人。T细胞可以从大量来源获得,包括外周血单核细胞、骨髓、淋巴结组织、脾脏组织、脐带和肿瘤。在某些实施方式中,可以使用本领域可获得的任意数目的T细胞系。在某些实施方式中,T细胞可以使用技术人员已知的任意数目的技术比如Ficoll分离从自对象收集的血液单位获得。在一个实施方式中,来自个体的循环血的细胞通过单采血液成分术或白细胞提取法获得。单采血液成分术产物通常包含淋巴细胞,其包括T细胞、单核细胞、粒细胞、B细胞、其它成核的白细胞、红细胞和血小板。可以清洗由单采血液成分术收集的细胞以移除血浆级分并将细胞放置在适当的缓冲液或培养基中,用于随后的处理步骤,所述缓冲液或培养基比如磷酸盐缓冲盐水(PBS)或清洗溶液,其缺少钙并且可以缺少镁或可以缺少许多——如果不是全部的话——二价阳离子。在清洗后,细胞可以重悬在各种生物相容性缓冲液中,比如,例如,无Ca、无Mg的PBS。可选地,可以移除单采血液成分术样品的非期望的组分,并且将细胞直接重悬在培养基中。

[0345] 在另一个实施方式中,T细胞通过裂解红细胞和耗减单核细胞,例如,通过经过PERCOLLTM梯度的离心,从外周血分离。可选地,T细胞可以从脐带分离。无论如何,T细胞的特定亚群可以进一步通过阳性或阴性选择技术分离。

[0346] 这样分离的脐带血单核细胞中可以耗减表达某些抗原——其包括但不限于CD34、CD8、CD14、CD19和CD56——的细胞。这些细胞的耗减可以使用分离的抗体、包括抗体的生物学样品比如腹水、结合至物理载体的抗体和细胞结合抗体完成。

[0347] 通过阴性选择富集T细胞群可以使用针对表面标志物——其对阴性选择的细胞独特——的抗体的组合完成。优选的方法是细胞分选和/或选择,其经由阴性磁性免疫粘附或使用针对在阴性选择的细胞上存在的细胞表面标志物的单克隆抗体的混合物的流式细胞术。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对CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR和CD8的抗体。

[0348] 对于通过阳性或阴性选择分离期望的细胞群,可以改变细胞和表面(例如,颗粒比

如珠)的浓度。在某些实施方式中,可以期望显著地减小珠和细胞混合在一起的体积(即,增加细胞的浓度),以确保细胞和珠的最大接触。例如,在一个实施方式中,使用20亿个细胞/ml的浓度。在一个实施方式中,使用10亿个细胞/ml的浓度。在进一步的实施方式中,使用多于1亿个细胞/ml。在进一步的实施方式中,使用10、15、20、25、30、35、40、45或 50×10^6 个细胞/ml的细胞浓度。在又另一个实施方式中,使用75、80、85、90、95或 100×10^6 个细胞/ml的细胞浓度。在进一步的实施方式中,可使用125或 150×10^6 个细胞/ml的浓度。使用高浓度可以导致增加的细胞产量、细胞活化和细胞扩展。

[0349] 在清洗步骤后,T细胞也可以被冷冻,其不需要单核细胞移除步骤。尽管不希望被理论所束缚,但通过移除细胞群中的粒细胞和一定程度的单核细胞,冷冻和随后的解冻步骤提供了更均一的产物。在移除血浆和血小板的清洗步骤后,细胞可以被悬浮在冷冻溶液中。虽然很多冷冻溶液和参数是本领域已知的,并且将在此背景下是有用的,但是在非限制性实例中,一个方法包括使用包含20% DMSO和8%人血清白蛋白的PBS,或其它合适的细胞冷冻培养基。细胞然后以每分钟1°C的速率冷冻至-80°C,并且储存在液氮储罐的蒸汽相中。可以使用受控冷冻的其它方法以及在-20°C下或液氮中即刻不受控的冷冻。

[0350] 在一个实施方式中,T细胞群包含在细胞比如外周血单核细胞、脐带血细胞、纯化的T细胞群和T细胞系内。在另一个实施方式中,外周血单核细胞包括T细胞群。在又另一个实施方式中,纯化的T细胞包括T细胞群。

[0351] 嵌合膜蛋白

[0352] 通常,T细胞通过与表面接触被扩展,所述表面具有附加至其的刺激CD3/TCR复合体相关信号的试剂和刺激T细胞表面上的共刺激分子的配体。本发明包括扩展T细胞群的新方法,其包括使T细胞电穿孔有编码嵌合膜蛋白的RNA,和培养电穿孔的T细胞,其中该群内的电穿孔的T细胞扩展至少10倍。本发明的嵌合膜蛋白包括胞外和胞内结构域。胞外结构域包括靶特异性结合元件,比如抗体。在一个实施方式中,嵌合膜蛋白包括抗CD3的单链可变片段(scFv)和衍生自CD28和4-1BB的胞内结构域的一部分的胞内结构域。

[0353] 嵌合膜蛋白的表达允许与群中的其它细胞——比如表达CD3的细胞——相互作用以刺激和激活电穿孔的T细胞的扩展。不希望固执于任何具体理论,表达CD3的细胞可以与嵌合膜蛋白——其在电穿孔的T细胞的表面上表达——接触和结合。表达嵌合膜蛋白的至少一种T细胞与表达CD3的另一种细胞相互作用。此相互作用刺激电穿孔的T细胞的扩展。

[0354] 在一个实施方式中,T细胞在下调内源基因之前被扩展。在另一个实施方式中,修饰的T细胞被扩展。

[0355] 胞外结构域

[0356] 本发明包括含有抗原结合结构域的胞外结构域,所述抗原结合结构域源自针对共刺激分子的抗体。共刺激分子可以包括共刺激T细胞的任何分子,比如,但不限于CD3、CD28或其组合。在一个实施方式中,胞外结构域可以包括抗原结合结构域,其源自抗CD3、抗CD28或其组合。在另一个实施方式中,胞外结构域包括抗CD3的单链可变片段(scFv)。

[0357] 在另一个实施方式中,胞外结构域可以包括结合至抗原的抗体的任何部分,其包括但不限于合成抗体、人抗体、人源化抗体、单结构域抗体、单链可变片段、和其片段的抗原结合结构域。在一些情况下,胞外结构域源自相同的物种——嵌合膜蛋白将最终用于其中——是有利的。例如,对于用于人,嵌合膜蛋白的胞外结构域包括人抗体或其片段可以是

有利的。因而,在一个实施方式中,胞外结构域部分包括人抗体或其片段,如本文其它地方描述的。可选地,在一些实施方式中,胞外结构域部分包括人源化的非人抗体,如本文其它地方描述的。

[0358] 胞内结构域

[0359] 胞内结构域或胞质结构域包括共刺激信号传导区。共刺激信号传导区指的是共刺激分子的胞内结构域。共刺激分子是除抗原受体或其配体之外的细胞表面分子,其是淋巴细胞对抗原高效应答所需要的。

[0360] 嵌合膜蛋白的胞质结构域或胞内信号传导结构域负责活化T细胞的效应物功能中的至少一种。虽然经常可以采用整个胞内信号传导结构域,但是在很多情况下,不必使用整个链。就使用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替代完整的链,只要它转导效应物功能信号。胞内信号传导结构域包括足以转导效应物功能信号的胞内信号传导结构域的任何截短部分。

[0361] 用于嵌合膜蛋白的胞内信号传导结构域的非限制性实例包括CD28、4-1BB、T细胞受体(TCR)、共刺激分子的胞内结构域的任何部分,这些序列的任何衍生物或变体,具有相同功能性能能力的任何合成序列,和其任意组合。在一个实施方式中,胞内结构域包括CD28和4-1BB的胞内结构域的一部分。

[0362] 嵌合膜蛋白的其它结构域

[0363] 在嵌合膜蛋白的胞外结构域和跨膜结构域之间,或在嵌合膜蛋白的胞质结构域和跨膜结构域之间,可以并入间隔结构域,比如起将跨膜结构域连接至多肽链中的胞外结构域或胞质结构域作用的寡肽或多肽。间隔结构域可以包括多至300个氨基酸,优选地10至100个氨基酸和最优选地25至50个氨基酸。

[0364] 在一些实施方式中,嵌合膜蛋白进一步包括跨膜结构域。在一些实施方式中,嵌合膜蛋白进一步包括铰链结构域。在一个实施方式中,编码嵌合膜蛋白的RNA进一步包括跨膜和铰链结构域,比如CD28跨膜结构域和CD8- α 铰链结构域。

[0365] T细胞的扩展

[0366] 如本文公开的数据所展现的,通过本文公开的方法扩展T细胞可以增加大约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,和其之间的任何和所有全部或部分整数。在一个实施方式中,T细胞扩展大约20倍至大约50倍的范围。

[0367] 在培养之后,在将细胞传代至另一个培养设备前,T细胞可以在培养设备中的细胞培养基中培育一段时间或直到细胞达到用于最佳传代的汇合或高细胞密度。培养设备可以具有一般用于体外培养细胞的任何培养设备。优选地,在将细胞传代至另一个培养设备之前,汇合的水平是70%或更大。更优选地,汇合的水平是90%或更大。一段时间可以是适于细胞体外培养的任何时间。T细胞培养基可以在T细胞培养期间的任何时间被更换。优选地,T细胞培养基大约每2至3天更换一次。然后从培养设备收获T细胞,于是T细胞可以被立即使用或冷藏储存以备后用。在一个实施方式中,本发明包括冷藏扩展的T细胞。冷藏的T细胞在将核酸引入T细胞之前被解冻。

[0368] 在另一个实施方式中,方法包括分离T细胞和扩展T细胞。在另一个实施方式中,本

发明进一步包括在扩展之前冷藏T细胞。在另一个实施方式中，冷藏的T细胞被解冻，以便电穿孔有编码嵌合膜蛋白的RNA。

[0369] 在美国专利号5,199,942(通过引用并入本文)中描述了用于离体扩展细胞的另一种程序。扩展，比如美国专利号5,199,942中描述的，可以是本文描述的其它扩展方法的替代方案或除本文描述的其它扩展方法之外的方法。简言之，T细胞的离体培养和扩展包括添加细胞生长因子，比如在美国专利号5,199,942中描述的那些，或其它因子，比如f1t3-L、IL-1、IL-3和c-kit配体。在一个实施方式中，扩展T细胞包括使用选自f1t3-L、IL-1、IL-3和c-kit配体的因子培养T细胞。

[0370] 如本文描述的培养步骤(与如本文描述的试剂接触或在电穿孔后)可以非常短，例如少于24小时比如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。如本文进一步描述的培养步骤(与如本文描述的试剂接触)可以较长，例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或更多天。

[0371] 多种术语用于描述培养中的细胞。细胞培养物通常指的是取自活的生物体并且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的细胞、组织或器官并且是在第一次传代培养前的培养物。当它们在促进细胞生长和/或分裂的条件下被放置在生长培养基中时，细胞在培养中被扩展，产生更大的细胞群。当细胞在培养中被扩展时，通常通过细胞数目加倍需要的时间量——另外称为倍增时间——测量细胞增殖速率。

[0372] 每一轮传代培养被称为传代。当细胞被传代培养时，它们被称为已经被传代。特异性细胞群或细胞系有时称为或表征为其已经被传代的次数。例如，已经被传代十次的培养的细胞群可以被称为P10培养物。原代培养物，即，从组织分离细胞之后的第一次培养物被指定为P0。在第一次传代培养之后，细胞被描述为继代培养物(P1或第1代)。在第二次传代培养后，细胞成为三级培养物(tertiary culture)(P2或第2代)，以此类推。本领域技术人员将理解在传代的时期期间可以存在许多群倍增；因此培养物的群倍增数大于传代数。在传代之间的时期期间的细胞扩展(即，群倍增数)取决于许多因素，包括但不限于接种密度、基质、培养基、和传代之间的时间。

[0373] 在一个实施方式中，细胞可以被培养数小时(大约3小时)至大约14天或其之间的任何小时的整数值。适于T细胞培养的条件包括适当的培养基(例如，最小必需培养基或RPMI培养基1640或X-vivo 15,(Lonza))，其可以包含增殖和生存必需的因子，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- α 、或技术人员已知的用于细胞生长的任何其它添加剂。用于细胞生长的其它添加剂包括但不限于表面活性剂、人血浆蛋白粉(plasmanate)和还原剂比如N-乙酰半胱氨酸和2-巯基乙醇。培养基可以包括RPMI 1640、AIM-V、DMEM、MEM、 α -MEM、F-12、X-Vivo 15、和X-Vivo 20、Optimizer，具有添加的氨基酸、丙酮酸钠和维生素，无血清或补充有适当量的血清(或血浆)或限定的激素组、和/或足够T细胞生长和扩展的量的细胞因子(一种或多种)。抗生素，例如青霉素和链霉素，仅被包括在实验培养物中，而不在被注入对象的细胞培养物中。靶细胞被维持在支持生长必需的条件下，例如，适当的温度(例如，37°C)和气氛(例如，空气加5%CO₂)。

[0374] 用于培养T细胞的培养基可以包括可以共刺激T细胞的试剂。例如，可以刺激CD3的试剂是CD3的抗体，并且可以刺激CD28的试剂是CD28的抗体。这是因为，如由本文公开的数

据所展现的,通过本文公开的方法分离的细胞可以扩展大约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。在一个实施方式中,通过培养电穿孔的群,T细胞扩展大约20倍至大约50倍或更多的范围。

[0375] 在一个实施方式中,方法包括将编码T细胞受体(TCR)——其包括对靶细胞上的表面抗原的亲和力——的核酸引入扩展的T细胞,和将编码共刺激分子的RNA电穿孔入T细胞,其中电穿孔的T细胞能够表达TCR和共刺激分子。

[0376] 在另一个实施方式中,方法进一步包括使用选自CD3、CD27、CD28、CD83、CD86、CD127、4-1BB、4-1BBL、PD1和PD1L的至少一种共刺激分子刺激扩展的T细胞。刺激可以包括用编码共刺激分子的RNA共电穿孔。在这样的实施方式中,扩展的T细胞进一步用编码CD3的RNA电穿孔或共电穿孔。CD3包括至少两种不同的CD3链,比如CD3 ζ 链和CD3 ϵ 链。

[0377] 在另一个实施方式中,扩展T细胞的方法可以进一步包括分离扩展的T细胞用于进一步的应用。在又另一个实施方式中,扩展的方法可以进一步包括随后电穿孔扩展的T细胞,接着培养。随后的电穿孔可以包括将编码试剂的核酸引入扩展的T细胞群,比如用编码TCR的核酸转导扩展的T细胞、转染扩展的T细胞或电穿孔扩展的T细胞,其中试剂进一步刺激T细胞。试剂可以刺激T细胞,比如通过刺激进一步的扩展、效应物功能、或另一种T细胞功能。在一个实施方式中,试剂核酸与嵌合膜蛋白RNA被共电穿孔。在另一个实施方式中,试剂核酸,比如TCR RNA在培养电穿孔的群后被电穿孔。在进一步的实施方式中,试剂核酸,比如TCR RNA被电穿孔入被冷藏的扩展的T细胞。

[0378] 疗法

[0379] 本文描述的修饰的T细胞可以包括在用于治疗的组合物中。组合物可以包括药物组合物并且进一步包括药学上可接受的载体。可以施用包括修饰的T细胞的治疗有效量的药物组合物。

[0380] 在一方面,本发明包括用于刺激针对对象中的靶细胞或组织的T细胞-介导的免疫应答的方法,其包括给对象施用有效量的修饰的T细胞。在此实施方式中,T细胞是修饰的,如本文其它地方描述的。修饰的T细胞可以被施用以诱导靶细胞或组织的裂解,比如,其中诱导的裂解是抗体依赖的细胞介导的细胞毒性(ADCC)。

[0381] 在另一方面,本发明包括用于过继细胞转移疗法的方法,其包括施用有效量的药物组合物至需要其的对象以预防或治疗不利于对象的免疫反应,所述的药物组合物包括本文描述的修饰的T细胞。

[0382] 在还另一个实施方式中,治疗与对象中增强的免疫性相关联的疾病或病症的方法包括施用有效量的药物组合物至需要其的对象,所述的药物组合物包括本文描述的修饰的T细胞。

[0383] 如本文描述生成的修饰的T细胞可以是一致的并且具备T细胞功能。进一步,修饰的T细胞可以被施用至动物,优选地哺乳动物,甚至更优选地人,以阻抑免疫反应,比如自身免疫性疾病比如糖尿病、牛皮癣、类风湿性关节炎、多发性硬化、GVHD、增强性同种异体移植耐受诱导(enforcing allograft tolerance induction)、移植排斥等共有的那些免疫反应。此外,本发明的细胞可以用于任何病症的治疗,其中减弱的或以其他方式抑制的免疫应

答,尤其是细胞-介导的免疫应答,对于治疗或减轻疾病是期望的。在一方面,本发明包括治疗对象中的病症,比如自身免疫性疾病,其包括给对象施用治疗有效量的包括本文描述的修饰的T细胞的药物组合物。

[0384] 自身免疫性疾病的实例包括但不限于获得性免疫缺陷综合征(AIDS,其是具有自身免疫组分的病毒性疾病)、斑秃、强直性脊柱炎、抗磷脂综合征、自身免疫性阿狄森氏病、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性肝炎、自身免疫性内耳疾病(AIED)、自身免疫性淋巴细胞增生综合征(ALPS)、自身免疫性血小板减少性紫癜(ATP)、贝切特氏病、心肌病、乳糜泻-疱疹样皮炎、慢性疲劳免疫功能障碍综合征(CFIDS)、慢性炎性脱髓鞘性多发性神经病(CIPD)、疤痕性类天疱疮、冷凝集素疾病、CREST综合征、克罗恩病、德戈斯氏病、青少年型皮肌炎、盘状狼疮、特发性混合型冷沉淀球蛋白血症、纤维肌痛-纤维肌炎、格雷夫斯氏病、格-巴二氏综合征、桥本氏甲状腺炎、特发性肺纤维变性、特发性血小板减少性紫癜(ITP)、IgA肾病、胰岛素依赖型糖尿病、青少年慢性关节炎(斯提耳氏病)、青少年型类风湿性关节炎、美尼尔氏病、混合结缔组织病、多发性硬化、重症肌无力、恶性贫血、结节性多动炎症、多软骨炎、多腺体综合征、风湿性多肌痛、多发性肌炎和皮肌炎、原发性无丙种球蛋白血症、原发性胆汁性肝硬变、牛皮癣、牛皮癣性关节炎、雷诺氏现象、莱特尔综合征、风湿热、类风湿性关节炎、结节病、硬皮病(进行性全身性硬化症(PSS),还称为全身性硬化症(SS))、斯耶格伦氏综合征、僵体综合征、系统性红斑狼疮、高安氏动脉炎、颤动脉炎/巨细胞动脉炎、溃疡性结肠炎、眼葡萄膜炎、白斑病和韦格纳氏肉芽肿病。

[0385] 如本文描述生成的T细胞还可以被修饰并且用于治疗炎性障碍。炎性障碍的实例包括但不限于慢性和急性炎性障碍。炎性障碍的实例包括阿尔茨海默病、哮喘、特异性变态反应、变态反应、动脉粥样硬化、支气管哮喘、湿疹、肾小球性肾炎、移植物抗宿主疾病、溶血性贫血、骨关节炎、败血症、中风、组织和器官移植、血管炎、糖尿病性视网膜病和呼吸机所致肺损伤(ventilator induced lung injury)。

[0386] 在另一个实施方式中,本文描述的修饰的T细胞可以用于制造用于治疗需要其的对象中的免疫应答的药物。

[0387] 本发明的细胞可以以剂量和途径施用,并且有时在适当的临床前和临床实验和试验中确定。细胞组合物可以在这些范围内的剂量下被施用多次。本发明的细胞的施用可以与如本领域技术人员确定的可用于治疗期望的疾病或病症的其它方法组合。

[0388] 待施用的本发明的细胞可以对于经历治疗的对象是自体的、同种异体的或异种的。

[0389] 本发明的细胞的施用可以以本领域技术人员已知的任何常规方式实施。本发明的细胞可以通过气溶胶吸入、注射、吞咽、输注、植入或移植施用至对象。本文描述的组合物可以被经动脉地、皮下地、皮内地、瘤内地、结内地、髓内地、肌肉内地、通过静脉内(i.v.)注射、或腹膜内地施用至患者。在其它情况下,本发明的细胞被直接注入对象中的炎症部位、对象中的局部疾病部位、淋巴结、器官、肿瘤等。

[0390] 还可以使用任意数目的基体施用本文描述的细胞。本发明利用这样的基体——在充当人工淋巴器官的新背景内——支持、维持或调节免疫系统,其通常通过T细胞的调节。因此,本发明可以利用那些基体组合物和制剂,其已经展现了在组织工程化中的实用性。因此,可以用于本发明的组合物、装置和方法的基体的类型事实上是无限制的并且可以包括

生物学和合成基体二者。在一个具体的实例中,利用由美国专利号5,980,889;5,913,998;5,902,745;5,843,069;5,787,900;或5,626,561陈述的组合物和装置,如同这些专利通过引用以其全部并入本文一样。基体包括一般与如下相关联的特征:当施用至哺乳动物宿主时是相容性的。基体可以由天然和/或合成材料形成。基体可以是不可生物降解的——在期望在动物的体内留下永久性结构或可移动结构比如植入物的情况下;或可生物降解的。基体可以采用海绵、植入物、管、telfa垫、纤维、中空纤维、冻干组分、凝胶、粉末、多孔组合物、或纳米颗粒的形式。此外,基体可以被设计以允许持续释放接种的细胞或产生的细胞因子或其它活性剂。在某些实施方式中,本发明的基体是柔性的和弹性的,并且可以被描述为半固体支架,其对物质比如无机盐、水性流体和包括氧的溶解的气体试剂(gaseous agent)是可透过的。

[0391] 基体在本文被用作生物相容性物质的实例。然而,本发明不限于基体,并且因而,无论术语基体(一种或多种)在什么地方出现,这些术语应当被解读为包括如下装置和其它物质:其允许细胞滞留或细胞穿越;是生物相容性的;和能够允许大分子穿越直接通过物质,以便物质自身是半透膜或与具体的半透性物质协同使用。

[0392] 药物组合物

[0393] 本发明的药物组合物可以包括如本文描述的修饰的T细胞,与一种或多种药学或生理学上可接受载体、稀释剂或赋形剂组合。这样的组合物可以包括缓冲液比如中性缓冲盐水、磷酸盐缓冲盐水等;碳水化合物比如葡萄糖、甘露糖、蔗糖或葡聚糖、甘露醇;蛋白质;多肽或氨基酸比如甘氨酸;抗氧化剂;螯合剂比如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配制用于静脉内施用。

[0394] 本发明的药物组合物可以以适于待治疗(或预防)的疾病的方式施用。施用的数量和频率将由如下因素确定,比如患者的病症、和患者疾病的类型和严重度,但是可以由临床试验确定适当的剂量。

[0395] 当指示“免疫学有效量”、“抗免疫应答有效量”、“免疫应答-抑制有效量”或“治疗量”时,待施用的本发明的组合物的准确量可以由医师考虑个体在年龄、重量、免疫应答、和患者(对象)的状况中的差异来确定。通常可以规定包括本文描述的修饰的T细胞的药物组合物可以以 10^4 至 10^9 个细胞/kg体重的剂量,优选地 10^5 至 10^6 个细胞/kg体重的剂量——包括在那些范围内的所有整数值——施用。T细胞组合物也可以以这些剂量施用多次。细胞可以通过使用免疫疗法中公知的注入技术(参见,例如Rosenberg等,New Eng.J.of Med.319:1676,1988)施用。具体患者的最佳剂量和治疗方案可以通过监测患者的疾病迹象和相应地调节治疗而由医学领域技术人员容易地确定。

[0396] 在某些实施方式中,可以期望给对象施用活化的T细胞,并且随后重新抽取(redraw)血液(或进行单采血液成分术),根据本发明活化来自其的T细胞,并且将这些活化和扩展的T细胞再注入患者。此过程可以每几周实施多次。在某些实施方式中,来自10ml至400ml的血液抽取物的T细胞可以被活化。在某些实施方式中,来自20ml、30ml、40ml、50ml、60ml、70ml、80ml、90ml或100ml的血液抽取物的T细胞被活化。不被理论所束缚,使用此多重血液抽取/多重再输注方案,可以选择出某些T细胞群。

[0397] 在本发明的某些实施方式中,使用本文描述的方法或本领域已知的将T细胞扩展至治疗性水平的其它方法扩展和修饰的细胞,协同任意数目的相关治疗形式(例如,之前、

同时或之后)被施用至患者,所述治疗形式包括但不限于使用如下药剂的治疗:比如抗病毒疗法、用于MS患者的西多福韦和白细胞介素-2、阿糖胞昔(也称为ARA-C)或那他珠单抗(natalizumab)治疗,或用于牛皮癣患者的依法利珠单抗(efalizumab)治疗,或用于PML患者的其它治疗。在进一步的实施方式中,本发明的T细胞可以与如下组合使用:化疗,辐射,免疫抑制剂,比如,环孢菌素、硫唑嘌呤、甲氨蝶呤、麦考酚酸和FK506,抗体,或其它免疫烧蚀剂(immunoablative agent)比如CAM PATH、抗CD3抗体或其它抗体疗法、细胞毒素、氟达拉滨、环孢菌素、FK506、雷帕霉素、麦考酚酸、类固醇类、FR901228、细胞因子和照射。这些药物抑制钙依赖性磷酸酶——神经钙蛋白(环孢菌素和FK506)或抑制对生长因子诱导的信号传导重要的p70S6激酶(雷帕霉素)。(Liu等,Cell 66:807-815,1991;Henderson等,Immun.73:316-321,1991;Bierer等,Curr.Opin.Immun.5:763-773,1993)。在进一步的实施方式中,本发明的细胞组合物协同(例如,之前、同时或之后)骨髓移植、T细胞烧蚀疗法——使用化疗剂比如氟达拉滨、外部光束放射疗法(XRT)、环磷酰胺,或抗体比如OKT3或CAMPATH——被施用至患者。在另一个实施方式中,本发明的细胞组合物在B细胞烧蚀疗法——比如与CD20反应的药剂,例如,利妥昔单抗——之后被施用。例如,在一个实施方式中,对象可以经历高剂量化疗的标准治疗,接着进行外周血干细胞移植。在某些实施方式中,在移植之后,对象接受本发明的扩展的免疫细胞的注入。在额外的实施方式中,扩展的细胞在外科手术之前或之后施用。

[0398] 施用至患者的上面治疗的剂量将随着正在治疗的病症的精确性质和治疗的接受者而变化。人施用的剂量比例可以根据本领域接受的实践进行。例如,CAMPATH的剂量对于成年患者将一般在1至大约100mg的范围内,通常每天施用,持续1和30天之间的时期。虽然在一些情况下可以使用多至40mg每天的较大的剂量(在美国专利号6,120,766中描述),但是优选的日剂量是1至10mg每天。

[0399] 应当理解将在本发明中有用的方法和组合物不限于在实施例中陈述的具体的制剂。下列实施例被提出以便于为本领域普通技术人员提供如何制造和使用细胞,扩展和培养方法,本发明的治疗方法的完整的公开内容和描述,并且不意图限制本发明人视其发明的范围。

[0400] 除非另外指示,本发明的实践采用分子生物学(包括重组技术)、微生物学、细胞生物学、生物化学和免疫学的常规技术,其充分地在技术人员的见识内。这样的技术在如下文献中充分地说明,比如,“Molecular Cloning:A Laboratory Manual”,第四版(Sambrook,2012);“Oligonucleotide Synthesis”(Gait,1984);“Culture of Animal Cell”(Freshney,2010);“Methods in Enzymology”“Handbook of Experimental Immunology”(Weir,1997);“Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells”(Miller和Calos,1987);“Short Protocols in Molecular Biology”(Ausubel,2002);“Polymerase Chain Reaction:Principles,Applications and Troubleshooting”,(Babar,2011);“Current Protocols in Immunology”(Coligan,2002)。这些技术适用于产生本发明的多核苷酸和多肽,并且因此,可以在进行和实践本发明中考虑。将在下列部分中讨论具体实施方式的特别有用的技术。

[0401] 实验实施例

[0402] 通过参考下列实验实施例进一步详细地描述本发明。除非另外规定,这些实施例

仅出于说明目的提供，并且不意欲是限制性的。因而，本发明决不应当解释为限制于下列实施例，而是应当解释为包括由于本文提供的教导而变得显而易见的任何和所有的变化。

[0403] 在没有进一步描述的情况下，相信使用在先的描述和下列说明性实施例，本领域普通技术人员可以制造和利用本发明的化合物，并且实践要求保护的方法。下列工作实施例因此具体地指出本发明的优选的实施方式，并且不解释为以任何方式限制本公开内容的其余部分。

[0404] 现在描述在这些实验中采用的材料和方法。

[0405] 原代人淋巴细胞。如描述的，使用包被有CD3和CD28刺激抗体的微珠 (Life Technologies, Grand Island, NY, Catalog) 刺激原代淋巴细胞 (Human gene therapy 2011, 22 (12) : 1575-1586)。T细胞在第10天以 1×10^8 细胞/小瓶被冷藏在90%胎牛血清和10%二甲基亚砜(DMSO)的溶液中。

[0406] NALM-6购自德国微生物菌种保藏中心(German DSMZ Cell Collection) (DSMZ目录代码:ACC 128)。K562和PC3购自美国模式培养物保藏中心(American Type Culture Collection)。624me1黑素瘤细胞系(melanoma line)获得自Surgery Branch(NCI/NIH)。所有细胞系如指导的培养并且例行地进行支原体污染的测试，并且确认为是阴性的。

[0407] 用于mRNA电穿孔和慢病毒转导的TCR构建体的生成。基于由相关出版物(The Journal of experimental medicine 2005, 201 (8) : 1243-1255; J Immunol 2008, 180 (9) : 6116-6131)提供的测序信息，通过PCR合成和/或扩增具有不同突变(1G4和8F)的1G4 NY-ESO-1 TCR和CAR(PSCA或CD19)，并且将其克隆入基于pGEM.64A RNA的载体或pTRPE慢病毒载体。

[0408] 人原代T细胞制备。使用RosetteSep试剂盒(Stem Cell Technologies, Vancouver BC, Canada)通过阴性选择在白细胞提取法之后从健康的志愿者供体分离原代人CD4和CD8 T细胞。在University Institutional Review Board批准的方案下收集所有样本，并且从每个供体获得书面的知情同意书。

[0409] CRISPR的设计和构建。Cas9 DNA通过PCR被合成，然后被插入PGEM载体。通过具有NGG PAM位点的GN19选择gRNA，而一些选自具有NGG PAM位点的N20。所有gRNA包含由多于13个碱基对错配构成的互补序列，其中排除潜在的脱靶mRNA位点(表1)。如图1A中显示的设计gRNA，并且通过重叠PCR进行合成。所有gRNA PCR产物被连接入MSGV载体。体外转录的CAS9和gRNA靶向TCR α 、 β 链和 β -2微珠蛋白的恒定区。gRNA被设计以靶向TCR α 恒定区的外显子1内的序列、TCR β 恒定区1和2二者的外显子1共有的共有序列、 β -2微球蛋白或PD1。编码gRNA的序列使用重叠PCR进行组装并且被克隆入包含T7启动子的MSGV载体。使用EcoRI使这些质粒线性化。gRNA被体外转录。使用mMESSAGE mMACHINE T7 ULTRA试剂盒(Life Technologies, Carlsbad, CA)体外转录Cas9 mRNA。mRNA在-80°C下储存在无核酸酶的小瓶中用于单次使用。用于动物研究的gRNA靶向序列如下：

[0410] TRAC-gRNA:TGTGCTAGACATGAGGTCTA, SEQ ID NO:1

[0411] TRBC-gRNA:GCAGTATCTGGAGTCATTGA, SEQ ID NO:2

[0412] B2M-gRNA:CGCGAGCACAGCTAAGGCCA, SEQ ID NO:3

[0413] PD1-gRNA:GGCGCCCTGGCCAGTCGTCT, SEQ ID NO:4

[0414] FAS-gRNA:GAGGGTCCAGATGCCAGCA, SEQ ID NO:5

[0415] 流式细胞术。下列单克隆抗体和试剂与指示的特异性和适当的同种型对照一起使用。来自BD Biosciences (San Jose, CA) : APC-缀合的抗CD3 (555335)、FITC-抗CD8 (555366)、PE-抗CD8 (555635)、FITC-抗CD27 (555440)、PE-抗CD107 (555801)、PE-抗β-2微珠蛋白 (551337)、FITC-抗HLA (555552)；Biolegend (San Diego, CA) : FITC-抗CD45R0 (304204)、APC-抗CD62L (304814)、APC-抗CCR7 (353214)；和Beckman Coulter (Pasadena, CA) : PE-抗Vb13.1 (IM2021U)。使用CellQuest版本3.3 (BD Biosciences, San Jose, CA) 在FACS Accuri (BD Biosciences, San Jose, CA) 上取得数据，并且通过FCS Express版本3.00 (De Novo Software, Los Angeles, CA) 或FlowJo版本7.6.1 (Tree Star, Inc. Ashland, OR) 进行分析。

[0416] 原代T细胞的繁殖。原代人T细胞在补充有10% FCS、100-U/ml 青霉素、100-g/ml 硫酸链霉素、10-mM Hepes的RPMI 1640中培养，并且在1:3的细胞:珠比值下使用涂覆有抗CD3/抗CD28的磁珠进行刺激。每2天进行细胞计数和喂养，并且一旦T细胞似乎休眠 (rest down)——如通过减小的生长动力学和细胞大小二者所测定的，T细胞被用于功能性测定或被冷藏。

[0417] CD3^{neg} T细胞的生成。DNA超螺旋质粒分别通过Spe I和Eco RI被线性化。通过T7mScriptTM标准mRNA生产系统 (Cambio, C-MSC100625, Cambridge, England) 体外转录gRNA。使用mMESSAGE mMACHINE T7 ULTRA试剂盒 (Life Technologies, AM1345, Carlsbad, CA) 体外转录所有mRNA (Cas9、TCRα、TCRβ和CAR)。T细胞在电穿孔之前被CD3/CD28免疫磁珠刺激三天。在通过BTX830使用360V, 1ms参数电转移20μg Cas9, 10μg gRNA种类进入细胞之前，一千万个原代T细胞被去珠 (de-beaded)，接着是第二次和/或第三次电转移10μg gRNA。而且，T细胞使用OPTI-MEM清洗三次并且以1-3 × 10⁸个细胞/ml的终浓度重悬在OPTI-MEM (Invitrogen) 中。随后，0.1ml的细胞与10μg的IVT RNA (或如指示的) 混合，并且在2mm小池中被电穿孔。在使用BTX830 (Harvard Apparatus BTX) 在360V和1ms下电转移20μg的Cas9和10μg的gRNA种类进入细胞之前，一千万个原代T细胞被去珠；此过程接着是12至24小时后第二次和第三次电转移5μg的gRNA。

[0418] 在电穿孔之后，细胞被立即放置在2mL的预热培养基中并且在37°C、5% CO₂下培养或在32°C、5% CO₂下培养1天，然后返回至37°C、5% CO₂。

[0419] TCRα与β双重破坏或TRAC、TRBC和B2M三重破坏。为了生成TCRα与β双敲除T细胞，Cas9 mRNA与靶向TCRα链 (TRAC) 和TCRβ链 (TRBC) 的两种不同的gRNA被共电穿孔。TCRα与β双敲除T细胞可以以2个步骤进行纯化：1) 在电穿孔1G4 TCRα链RNA后使用抗CD3微珠耗减TCR-阳性和α链单敲除细胞，和2) 在电穿孔TCRβ链RNA后使用抗CD3微珠耗减TCRβ链单敲除细胞。对于TRAC、TRBC和B2M三重破坏，T细胞在抗CD3/CD28珠刺激后3天电穿孔有Cas9 mRNA和靶向TCRα与β链和β-2微球蛋白的gRNA。HLA-I-阴性细胞群在第9天被富集并且电穿孔有TCRα链RNA。TCR-阴性群在第10天被富集。五天后，这些细胞电穿孔有TCRβ链RNA，并且TCR-阴性细胞群在次日被分选以获得通用T细胞。在第18天，TCR或CAR RNA被电穿孔入通用T细胞以生成通用效应细胞。在每个步骤确认TCR和HLA-I分子表达。

[0420] 通用CART细胞的生成。通过组合CD19或PSCA CAR的慢病毒转导与CRISPR/gRNA的RNA电穿孔生成通用CART细胞。在抗CD3/CD28珠刺激后1天，T细胞转导有慢病毒-CD19或PSCA CAR。2天后，Cas9和靶向TCRα、β链、B2M、PD1的gRNA通过电穿孔被转移入T细胞。CRISPR

递送后6天,通过微珠耗减分选CD3、HLA-I、PD1阴性的T细胞。

[0421] CD3^{neg} T细胞的富集。使用Auto MACS缓冲液清洗的细胞在4℃下使用CD3微珠(Miltenyi Biotec, 130-050-101, Auburn, CA) 培育30分钟。在清洗两次后,细胞穿过LD柱(Miltenyi Biotec, 130-042-901, Auburn, CA),并且收集流过的(flow-through)级分以备进一步使用。CD3^{neg} T细胞的CD3表达通过共电穿孔1G4TCR α 与 β mRNA被复原,并且使用单个快速扩展方案(REP)、CD3/CD28免疫磁珠或基于K562的aAPC扩展细胞。

[0422] CD3^{neg} T细胞的生成和繁殖。CD3^{neg} T细胞具有通过电转移外源性1G4TCR α 链和TCR β 链体外转录的mRNA(每条链5 μ g)复原的CD3表达。这些细胞使用单个快速扩展方案(REP)进行扩展。来自三种不同的供体ND052 105×10⁶个、ND405 83×10⁶个、ND410 136×10⁶个的PBMC被照射,然后混合在一起以获得总计324×10⁶个PBMC。PBMC被重悬在90ml的终体积中,然后添加R10至300ml,混合,并且分为两个T150 ml烧瓶。OKT被添加至30ng/ml的终浓度。在第2天,IL-2被添加至50CU/ml。从第5天,每2天进行细胞计数和喂养,并且一旦T细胞似乎休眠——如通过减小的生长动力学和细胞大小二者测定的,T细胞被用于功能性测定或被冷藏。

[0423] Sanger测序。通过Surveyor核酸酶测定(Transgenomics, Omaha, NE)确定T细胞中TCR α 链(TRAC)、TCR β 链1(TRBC1)和TCR β 链2(TRBC2)的基因组破坏水平。通过光密度测定法定量靶标破坏百分比。用于靶基因座扩增的PCR引物是:

[0424] TRAC正向,5'-TCATGTCCTAACCCCTGATCCTCTT-3' SEQ ID NO:6

[0425] TRAC反向,5'-TTGGACTTTCCCAGCTGACAGA-3' SEQ ID NO:7

[0426] TRBC总正向,5'-TACCAGGACCAGACAGCTCTAGA-3' SEQ ID NO:8

[0427] TRBC总反向,5'-TCTCACCTAATCTCCTCCAGGCAT-3' SEQ ID NO:9

[0428] PCR产物被纯化并且连接至TOP0克隆载体(Invitrogen),然后在大肠杆菌中转化。挑取并且测序单克隆以计算插入/缺失。

[0429] 用于电穿孔的siRNA和CRISPRi的生成。使用定制RNAi设计工具(Integrated DNA Technologies, Coralville, IA)设计靶向 α (5'-rArGrGrArGrGrArUrUrCrGrGrArArCrCrCrArArUrCrArCrUrGrArC-3' SEQ ID NO:10和5'-rCrArGrUrGrArUrUrGrGrUrUrCrCrGrArArUrCrCrUrCCT-3' SEQ ID NO:11)或 β (5'-rArCrCrUrCrCrUrUrCrCrArUrUrCrArCrCrCrArCrArGrCrUrC-3' SEQ ID NO:12和5'-rGrCrUrGrGrUrGrGrUrGrArArUrGrGrGrArArGrGrArGGT-3' SEQ ID NO:13)的TCR恒定区的RNA双链体,并且合成siRNA(Integrated DNA Technologies, Coralville, IA)。TCR α 与 β 二者的siRNA被混合和电穿孔入刺激的T细胞用于内源性TCR敲落。

[0430] mRNA体外转录和T细胞电穿孔。T7 mscript系统试剂盒(CellScript)被用于生成体外转录的(IVT) RNA。如先前描述的,CD3/CD28珠刺激的T细胞使用BTX EM830(Harvard Apparatus BTX)电穿孔有IVT RNA(Cancer research 2010, 70(22):9053-9061)。简言之,T细胞被清洗三次并且以1-3×10⁸个细胞/ml的终浓度重悬在OPTI-MEM(Invitrogen)中。随后,0.1ml的细胞与10 μ g IVT RNA(或如指示的)混合并且在2mm小池中进行电穿孔。

[0431] ELISA测定。靶细胞,表达CD19的不同的肿瘤细胞系,被清洗和以1×10⁶个细胞/ml悬浮在R10培养基(补充有10%胎牛血清的RPMI 1640; Invitrogen)中。100 μ l的每种靶细胞类型一式两份添加至96孔圆底板(Corning)。清洗效应T细胞,并且以1×10⁶个细胞/ml重悬

CN 114836385 B
在R10培养基中，并且然后 $100\mu\text{l}$ 的T细胞与指示的孔中的靶细胞组合。此外，包含单独的T细胞的孔被准备作为对照。平板在 37°C 下培育18至20小时。在培育后，上清液被收获并且经受ELISA测定(eBioscience)。

[0432] CD107a染色。细胞以1:1的效应细胞:T细胞比值(1×10^5 效应物比 1×10^5 靶标)平板接种在96孔板中的 $160\mu\text{l}$ 的完全RPMI培养基中。添加 $20\mu\text{l}$ 的藻红蛋白-标记的抗CD107a抗体(BD Biosciences, 555801)，并且平板在 37°C 下培育1小时，然后添加Golgi Stop(3ml RPMI培养基中 $2\mu\text{l}$ Golgi Stop, $20\mu\text{l}/\text{孔}$; BD Biosciences, 51-2092KZ)并且培育平板持续另外的2.5小时。然后添加 $5\mu\text{l}$ FITC-抗CD8和 $5\mu\text{l}$ APC-抗CD3并且在 37°C 下培育30min。在培育后，使用FACS缓冲液清洗样品并且通过流式细胞术进行分析。

[0433] 基于荧光素酶的CTL测定。生成Na1m6-CBG肿瘤细胞并且在基于荧光素酶的细胞毒性T淋巴细胞测定的修改版本中采用。简言之，叩头虫绿荧光素酶(CBG)被克隆入pELNS载体，包装入慢病毒，转导入Na1m6肿瘤细胞并且进行CBG表达分选。得到的Na1m6-CBG细胞被清洗并且以 1×10^5 个细胞/ml重悬在R10培养基中，并且 $100\mu\text{l}$ 的CBG-标记的细胞与不同比值的T细胞(例如30:1、15:1等)在 37°C 下过夜培育。 $100\mu\text{l}$ 的混合物被转移至96孔白色酶标板。 $100\mu\text{l}$ 的底物被添加至细胞并且立即测定发光。结果报道为基于具有肿瘤细胞而没有T细胞的孔中的荧光素酶活性的杀伤百分比(%杀伤 = $100 - ((\text{来自具有效应物和靶细胞共培养物的孔的RLU}) / (\text{来自具有靶细胞的孔的RLU}) \times 100)$)。

[0434] 小鼠异种移植研究。如先前描述的，利用某些修改进行研究(Human gene therapy 2011, 22(12):1575-1586; Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2009, 106(9):3360-3365)。简言之，6-10周龄NOD/SCID γ (NSG)小鼠在第0天在右肋上被皮下注射 1×10^6 个PC3-CBG肿瘤细胞，并且相同的小鼠在第5天在左肋上被给予SK-OV3-CBG肿瘤细胞(5×10^6 个细胞/小鼠，皮下地)。在PC3-CBG肿瘤接种之后第23天，小鼠经由尾静脉使用T细胞进行处理，使得两个肿瘤的体积都是大约 200mm^3 。以 1×10^7 个细胞/小鼠(10M)或 3×10^6 个细胞/小鼠(3M)给予慢病毒转导的T细胞。简言之，对于Na1m6肿瘤模型，6至10周龄NOD/SCID γ (NSG)小鼠在第0天通过尾静脉注射 1×10^6 个叩头虫绿(CBG)转导的Na1m6(Na1m6-CBG)细胞。在肿瘤接种后第7天开始T细胞处理。对于PC3-PDL1实体瘤模型，6至10周龄NOD/SCID γ (NSG)小鼠在第0天在右肋中皮下注射 1×10^6 个PSCA、PD-L1和CBG转导的PC3(PC3-PSCA-PDL1-CBG)肿瘤细胞。小鼠在PC3-PDL1-CBG肿瘤接种之后第22天经由尾静脉使用T细胞进行处理，以便肿瘤的体积是大约 200mm^3 。以 2×10^6 个/小鼠(2M)给予T细胞。动物基于基线肿瘤大小被随机化并分组。所有动物包括在实验中，并且对实施的所有动物实验完成不知情的肿瘤评价。

[0435] T细胞刺激、慢病毒转导和CRISPR电穿孔程序。图84显示了用于刺激、慢病毒转导和CRISPR电穿孔T细胞的程序。在第0天，从3个供体获得T细胞(100×10^6 个细胞/供体)。在1:3的T细胞:珠比值下使用抗CD3/抗CD28珠刺激细胞。细胞的浓度被调节至 0.5×10^6 个/ml以及 $100\text{mL}/\text{烧瓶}$ 。在第1天，刺激的T细胞在2的感染复数(MOI)下转导有CD19 CAR慢病毒。 50mL (25×10^6 个细胞)的T细胞被保留为未修饰的T细胞(第9组)。在第3天，移除珠，细胞在Opti-MEM培养基中清洗两次，并且来自每个供体的转导的T细胞被分为两组，CART/空白对照EP(10mL , 50×10^6 个/ml)和CART/CRISPR(10mL , 50×10^6 个/ml)。然后，细胞在 $500\text{V}/1\text{ms}$ 以及 $120\mu\text{g}$ 的CAS9 RNA/ $400\mu\text{L}$ 的T细胞下电穿孔有CAS9 RNA(第一次EP)。在电穿孔后，第1、3、5

和7组细胞然后通过在一半新培养基和一半旧培养基(cultured medium)中培养T细胞而被分割。在第4天,细胞被清洗两次并且以 50×10^6 个/mL重悬在Opti-MEM中。 $20\mu\text{g}$ TRBC4和B2M gRNA被电穿孔入400 μL 的T细胞。在电穿孔后,细胞以 1×10^6 个细胞/mL在一半新培养基和一半旧培养基中培养。在第5和7天,细胞被分割和重悬在一半新培养基和一半旧培养基中。在第8天,经由低密度柱从第2、4和6组移出CD3+细胞。CD3-T细胞以 $0.5 - 1 \times 10^6$ 个细胞/mL重悬在一半新培养基和一半旧培养基中并且被培养以扩展细胞。在第11天,采集T细胞并且来自三个供体的 25×10^5 个细胞被发送用于核型分析。剩余的细胞被等分并冷冻。

[0436] 现在描述实验的结果。

[0437] 实施例1:使用CRISPR破坏T细胞上的TCR-CD3复合体。

[0438] 研发靶向TCR α 链的恒定区的十三种gRNA,靶向TCR β 链的恒定区的10种gRNA,和靶向 β -2微珠蛋白基因的10种gRNA(图1A-1C和图9A-9D)并且在293T细胞中测试。原代人T细胞离体繁殖三天——使用抗CD3/抗CD28免疫磁珠三天。由于CRISPR的瞬时表达足以介导基因敲除,研发了“一打即跑”递送策略以通过利用体外转录的编码CAS9的RNA和gRNA的电转移瞬时地表达CRISPR(图2C)。

[0439] 为了测量TCR表达,使用特异于CD3的mAb,当TCR抗体表达时所述mAb仅存在于细胞表面上。电转移后六天,流式细胞分析揭示了靶向TRBC的CRISPR在供体ND147中在13.7的水平下消除原代T细胞上的CD3表达(图2D)。TCR敲除的效率与电转移的mRNA的量相关联(图2D)。虽然原代T细胞中RNA的电转移是良好耐受的,但观察到与增加量的引入的RNA相关联的细胞生存力的轻微降低。ZFN和TALEN介导的基因破坏已经报道当细胞瞬时地暴露于轻度低温时是更高效的。利用此CRISPR系统也观察到相同的现象。

[0440] T细胞在电转移后在32°C下培养1天。当在32°C对37°C下培养电穿孔的T细胞时,CRISPR-介导的CD3的破坏是高至2.5倍更好的。使用此方法,分别使用靶向TRAC和TRBC的CRISPR,5.43%和16.7%的电穿孔的T-细胞丢失CD3的表达(图2D,下组)。没有观察到CAS9空白对照样品中CD3阴性细胞水平的变化,并且没有观察到生存力的可察知的降低(通过锥虫蓝测量的)。

[0441] 当gRNA被电转移第二次和第三次时,以某些水平消除原代T细胞上的CD3表达的效率被极大的提高。

[0442] • 靶向TRAC:在gRNA的三次电转移后达到77%的水平下(图4A),

[0443] • 靶向TRAC或TRBC:在伴随轻微降低的生存力的gRNA的第二次电转移后,在分别达到64.5%或57.5%的水平下(图4C)。

[0444] 为了确认电穿孔的T细胞已经在预期的gRNA靶位点(TCR α 或 β 基因座)处被遗传修饰,使用侧接TRAC、TRBC1或TRBC2内的靶位点的特异性寡核苷酸引物进行Sanger测序。从靶位点开始的指示的PCR产物处的多个峰仅在CRISPR的电转移后存在,并且破坏百分比与细胞表面CD3表达的损失相关联(图1C和3B)。这些原代T细胞中的实验确认了设计为靶向TRAC或TRBC的CRISPR导致 $\alpha\beta$ TCR表达的永久性破坏,如通过Sanger测序评价和通过CD3的流式细胞分析确认的。

[0445] 实施例2:TCR $\alpha\beta$ 阴性T细胞的富集。

[0446] 对于未来的临床应用,可以利用用于分离TCR破坏的群的来源的快速和稳健的方法。为了开始处理此问题,使用临幊上批准的顺磁珠和耗减柱,通过阴性选择富集TCR/

CD3^{neg}群。利用单一耗减步骤,CD3^{neg}群增强至超过99% (图3A)。CD3^{neg}群不能由未转染的对照细胞富集。背靠背(back-to-back)耗减步骤导致了>99%富集,而没有偏斜CD4或CD8 T细胞子集(图3C)。测序结果还显示了耗减和插入在CRISPR修饰后被引至TCRα与β基因座(图3D)。

[0447] 实施例3:通过CRISPR生成HLA-I类^{neg} T细胞。

[0448] 为了测试CRISPR敲除来自同种异体T细胞的HLA-I类表达的能力,设计了靶向β-2微珠蛋白的gRNA。β-2微珠蛋白基因座可以在293T细胞中被CRISPR操纵(图9A)。证据显示β-2微珠蛋白的破坏废除了T细胞表面HLA-I类表达(图9B)。

[0449] IFN-γ极大地提高——大约10倍——T细胞中β-2微珠蛋白的靶向效率(图9C)。β-2微珠蛋白gRNA的多次电转移给予了66%β-2微珠蛋白阴性群(图11A)。

[0450] 对于未来的同种异体移植临床应用,将需要用于分离HLA-I类无效群(null population)的来源的快速和稳健的方法。为了开始处理此问题,细胞标记有PE-抗β-2微珠蛋白抗体,并且使用临幊上批准的顺磁性抗PE微珠和耗减柱,通过阴性选择富集HLA-I类^{neg}群。利用单一耗减步骤,HLA-I类^{neg}群增强至超过99%。HLA-I类^{neg}群不能由未转染的对照细胞富集。经由流式细胞术的富集的HLA-I类^{neg} T细胞中HLA-I类所有组成成分的分析验证了从细胞表面消除HLA-I类表达(图9D)。

[0451] 实施例4:可以通过不同方法繁殖CD3^{neg} T细胞。

[0452] CD3^{neg} T细胞在电转移外源性1G4-TCRα与β链体外转录的mRNA(每个5μg)后复原CD3表达。这些细胞通过如下被扩展:(1)单个快速扩展方案(REP),然后测试活性和特异性。PBMC获得自三种不同的供体:ND052 105×10⁶个、ND405 83×10⁶个、ND410 136×10⁶个。细胞被照射,然后混合在一起,并且获得总计324×10⁶个PBMC。2×10⁶个细胞电转移有RNA。CD3^{neg} T被重悬在90ml的终体积中,并且添加R10培养基,总体积为300ml。细胞被分至2个T150 ml烧瓶。OKT被添加至30ng/ml的终浓度。在第2天,IL-2被添加至50CU/ml。从第5天,每2天进行细胞计数和喂养,并且一旦T细胞似乎休眠——如通过减小的生长动力学和细胞大小二者测定的,它们被用于功能性测定或被冷藏。

[0453] 在单个REP后,CD3^{neg} T细胞被扩展以便数目增加500倍。这些细胞通过如下被扩展:(2)在1:3细胞:珠比值下使用涂覆有抗CD3/抗CD28的磁珠进行刺激。

[0454] 在单个REP后,CD3^{neg} T细胞被扩展以便数目增加500倍。这些细胞通过如下被扩展:(3)与1×10⁶/ml的浓度下的相等混合物中的照射的K562-CD19和K562/86/64/A2(2D11)共培养。

[0455] 在单个REP后,CD3^{neg} T细胞被扩展以便数目增加500倍。这些细胞通过如下被扩展:(4)与1×10⁶/ml的浓度下的相等混合物中的照射的K562-CD19和K562/86/64/A2(2D11)以及30ng/ml OKT共培养。

[0456] 在单个REP后,CD3^{neg} T细胞被扩展以便数目增加500倍。这些细胞通过如下被扩展:(5)与1×10⁶/ml的浓度下的相等混合物中的照射的K562-CD19和K562/86/64/A2(2D11)以及1mg/ml NY-ESO肽共培养。

[0457] 实施例5:通过TCR的电转移重定向TCR^{neg} T细胞。

[0458] 为了测试TCR^{neg} T细胞的功能,这些细胞通过TCR的电转移被重定向。通过引入TCRα链和TCRβ链,这些细胞表达高水平的TCR。与CAS9空白对照相比,Vb13.1的表达在电转移的

TCR^{neg} T细胞中高得多(图7A)。当细胞与Na1m-6 NY-ESO白血病细胞系——对HLA-A2和NY-ESO二者阳性——共培养时,细胞显示出高水平的107a,其指示升高的脱粒活性(图7B)。杀伤测定还显示了对此细胞系的强有力的毒性(图7C)。这指示这些细胞比使用表达CAR和TCR的T细胞的传统的临床试验潜在地更安全,这是由于这些细胞将不引发GVHD并且与利用TCR处理的正常T细胞相比具有更小的错配毒性。

[0459] 一些报道已经显示T细胞可以通过ZFN或TALEN被遗传编辑以消除内源性αβTCR的表达。选择性地耗减表达非期望的αβTCR的T细胞的本文描述的方法和组合物还包括内源性TCR的不完全敲除以治疗GVHD和抑制内源性TCR免于不利地影响CAR功能(例如,通过竞争转录因子)。因此,使用设计者ZFN设计遗传方法以永久地破坏T细胞中的α与β恒定区序列,从而消除TCR表达。

[0460] ZFN和TALEN是通过将DNA结合结构域融合至DNA切割结构域(cleavage domain)生成的人工限制酶。当ZFN和TALEN不高效地工作时,通常难以确定原因。失败可能反映关于设计、靶序列的可接近性的问题,或递送问题。同时,ZFN靶向效率在T细胞中通常低,使得它难以同时操纵多个基因。

[0461] 与ZFN和TALEN不同,CRISPR/Cas系统近来已经作为用于诱导靶向的遗传改变的ZFN和TALEN的潜在简便和高效的替代方案出现。近来的工作已经显示通过Cas9蛋白的靶标识别需要crRNA内的‘种子’序列和crRNA-结合区上游的包含保守的二核苷酸的前间区序列邻近基序(PAM)序列。从而,可以通过重设计crRNA,将CRISPR/CAS系统重靶向以切割几乎任何DNA序列。本文公开的数据显示了通过293T细胞和原代T细胞中的CRISPR/CAS进行基因编辑的潜力。CRISPR/CAS系统可以通过共表达单个CAS9蛋白与两种或更多种gRNA同时靶向多个基因组基因座,使得此系统独特地适用于靶基因的多重基因编辑或协同活化。通过施用不同的gRNA连同CAS9,多种基因可以在T细胞中被同时破坏。

[0462] 实施例6:通过CRISPR的HLA I类和TCRα、β链三敲除。

[0463] 为了致力于用于恶性肿瘤和感染性疾病的“现成的(off-the-shelf)”同种异体t细胞疗法,通过输注T细胞的细胞疗法被设计以针对病原体和恶性肿瘤重建免疫力。离体制造具有期望性质和足够数目的T细胞需要的时间量通常与患者的治疗窗口不相容。此外,来自患有晚期疾病的患者的自体T细胞可能具有受损的功能并且对期望的抗原是耐受的。

[0464] 为了处理此问题,患者可以输注同种异体T细胞以避免通过识别输注的细胞上不同的主要或次要组织相容性抗原的宿主T细胞引起的免疫-介导的排斥。为了扩大T细胞疗法的应用,并且为了进一步的同种异体移植,可以生成用于分离TCR和HLA-I类破坏的群的来源的快速和稳健的方法。

[0465] ZFN和TALEN包括设计为结合特异性DNA序列——其融合至Fok1核酸内切酶的切割结构域——的锌指DNA-结合结构域。因为基因必须被单独靶向,所以如果存在多于一种待操纵的基因,则ZFN和TALEN的设计和构建非常复杂和耗时。利用在本文描述的CRISPR系统,可以获得基因破坏的功效和缩短的时程。

[0466] 为了处理此问题,CAS9与靶向TRAC、TRBC和β-2微珠蛋白的三种不同gRNA一起电转移。细胞标记有PE-抗β-2微珠蛋白抗体并且使用临幊上批准的顺磁性抗PE微珠和耗減柱,通过阴性选择富集HLA-I类^{neg}群。利用单一耗減步骤,HLA-I类^{neg}群增强至超过99% (图9D)。然后,细胞重引入有TCRα链,并且HLA-I类^{neg} CD3^{neg}群通过微珠被富集(图11)。五天后,TCRβ

链被重引入细胞，并且HLA-I类^{neg} CD3^{neg}群通过微珠被再次富集。两天后，TCR被电转移入这些三敲除细胞。在电转化后一天，细胞使用CD3/CD28免疫磁珠进行刺激。然后，细胞次日经历抗原特异性TCR的慢病毒递送和培养物扩展。

[0467] 实施例7：通过CRISPR的FAS、PD1、CTLA4、PPP2R2D敲除。

[0468] FAS受体/FAS配体(FAS/FASL)凋亡信号传导途径已经被广泛地研究并且在T细胞中良好地表征。PD1和CTLA4是也已经被普遍研究的T细胞中的两个主要的抑制性信号传导途径。靶向这些途径的潜在治疗影响的直接证据来自临床前鼠肿瘤模型中的研究，其展现了抗体-介导的CTLA-4、PD-1或PD-L1的阻断后增强的抗肿瘤免疫力。已经研发了用于人的类似抗体，并且早期临床数据显示了有希望的结果。Ppp2r2d敲落还可以抑制T细胞凋亡和增强T细胞增殖，以及细胞因子产生。Ppp2r2d具有作为靶标改进人T细胞功能的潜力。

[0469] 为了处理此问题，CAS9和靶向FAS、PD1、CTLA4、PPP2r2d的三种不同gRNA被电转移入T细胞。Sanger测序数据显示FAS、PD1、CTLA4、PPP2r2d的指示的基因座已经通过CRISPR被修饰。FAS还使用通过CRISPR引发的同源重组被GFP替换。FACS数据显示FAS和PD1的表面表达被废除。

[0470] 实施例8：使用基因修饰的原代细胞和T细胞生成iPS细胞。

[0471] 用于癌症和感染性疾病的过继T细胞疗法的进展被缺乏可容易获得的和抗原-特异性人T淋巴细胞所阻碍。多能干细胞可以提供T淋巴细胞的无限制的来源。为了处理此问题，在原代细胞和T细胞中破坏FAS、PD1、CTLA4、PPP2r2d的表达。

[0472] 仙台病毒被用于重编程原代细胞和T细胞。存在多种方法生成iPSC，包括病毒-介导的基因转导和化学诱导。虽然慢病毒和逆转录病毒载体需要整合入宿主染色体以表达重编程基因，但是基于DNA的载体——比如腺病毒、腺伴随病毒和质粒载体——游离地(episomally)存在并且不需要整合。然而，它们仍可以以某些频率被整合入宿主染色体，并且重编程效率相对低。同样，基于mRNA的重编程复杂并且显示是极度低效的。

[0473] 与这些方法不同，仙台病毒不整合入宿主基因组或改变宿主细胞的遗传信息。仙台病毒也具有比得上基于慢病毒和逆转录病毒的基因转导的重编程潜力。

[0474] 24孔板中的每个孔接种十万个野生型、FAS^{neg}、CD3^{neg} TCR α 链和TCR β 链敲除T细胞。细胞使用CD3/CD28珠进行刺激。在刺激之后第3天，移除珠，细胞重悬在1mL的预热的T细胞完全培养基中，并且然后使用计算体积的CytoTune仙台病毒——其包括用于在细胞中表达hKlf4、hOct3/4和hSox2的多顺反子载体(Lifetechnologies, Carlsbad, CA)——进行培育。处理的T细胞被接种在24孔板中，并且在室温下、在2250rpm下离心90分钟。另外的1mL的完全T细胞培养基被添加至每个孔，并且平板在5%CO₂的潮湿气氛中在37°C下培育过夜。

[0475] 在转导后次日，通过使用新鲜的完全培养基清洗T细胞和培养细胞2天来移除仙台病毒。每天更换一半培养基。在感染后第3天，细胞被转移至MEF饲养平板(feeder plate)并且在不含任何细胞因子的T细胞培养基中培养。感染后四天，细胞在标准hES培养基中进行培养。每天更换培养基。在第7天前后观察到ES样集落。细胞从第15天在条件性hES培养基中进行培养并且培养持续另外的10天。在转导后25至30天前后挑取集落。

[0476] 在第4天前后，在饲养细胞上形成细胞团(cell clump)，其指示重编程过程的起始。T细胞在重编程至iPSC的过程期间经历剧烈的形态变化。在第12天前后，开始出现具有松散边缘的大的细胞团。在第18天前后，T细胞被转化至具有良好限定边缘的典型的ES样集

落。观察到典型的胚胎干细胞形态，其指示FAS^{neg}、CD3^{neg} TCR α 链和TCR β 链敲除T细胞在限定的重编程条件下被诱导至多能状态(图17A和18A)。

[0477] FAS^{neg} T细胞以其野生型对应体的大约5倍的效率更易于重编程至iPSC(图17B)。同样，重编程CD3^{neg} T细胞比野生型对应体大约高效5倍(图18B)。p53缺陷细胞系已经被报道由于凋亡途径被阻碍而更易于重编程。FAS敲除进一步诱导凋亡抗性。虽然损失TCR表达使得T细胞较不健康，但是指示凋亡在重编程的过程中发挥重要作用。

[0478] 实施例9：使用siRNA敲落T细胞中的TCR。

[0479] 图19是显示野生型NY-ESO-1 TCR(wt)或具有第二二硫键和对 β 链去-N-糖基化(S/SD)的修饰的NY-ESO-1 TCR的IFN- γ 产生的图。RNA被电穿孔入具有使用siRNA敲落的内源性T细胞受体(TCR)的T细胞。在使用HLA-A2阳性细胞系——其使用NY-ESO-1特异性肽p156-165进行脉冲处理——刺激T细胞18h后通过ELISA检测IFN- γ 。

[0480] 图20，包括图20A和20B，显示了通过CAS9 RNA和gRNA共电穿孔的TCR α 敲落。电穿孔后六天，通过评价CD3分析细胞的TCR表达。

[0481] 图21显示了Sanger测序。结果显示了CD3阴性富集的T细胞中的多个峰，其中CAS9mRNA和gRNA被电穿孔以敲落TCR α (TRAC-5)或TCR β (TRBC-7)。

[0482] 图22是图组，其显示了具有内源性TCR β (TRB-7)敲落的CD3阴性T细胞在NY-ESO-1TCR α 与 β (1G4LY95 TCR)RNA电穿孔后四小时重表达CD3。正常的T细胞(ND424珠)被用作对照，其显示了几乎100%CD3阳性与5.25%内源性TCR vb13.1表达。

[0483] 图23，包括图23A-23D，是图组，其显示敲落内源性TCR增强电穿孔TCR RNA的T细胞的转基因表达和功能二者。图23A显示了电穿孔有TCR siRNA(实线空心柱形图)、对照siRNA(虚线空心柱形图)的T细胞和没有任何siRNA的T细胞(实心柱形图)的TCR表达。图23B显示了具有TCR siRNA、对照siRNA或没有siRNA的电穿孔野生型NY-ESO-1 TCR(wt)或修饰的TCR(SD)RNA的T细胞的转基因(TCR vb13.1)表达。图23C显示了具有TCR siRNA、对照siRNA或没有siRNA的电穿孔野生型NY-ESO-1 TCR(wt)或修饰的TCR(SD)RNA的T细胞的NY-ESO-1四聚体染色。图23D显示了HLA-A2/NY-ESO-1阳性肿瘤系通过TCR siRNA敲落的电穿孔野生型NY-ESO-1 TCR RNA的T细胞的特异性裂解。

[0484] 图24是显示在将T细胞注入小鼠模型后肿瘤细胞的荧光的图。表达NY-ESO-1和GFP二者的一千万个Na1m6-CBG-ESO-GFP(吖啶绿)肿瘤细胞被静脉内注射入NOD/SCID小鼠。在肿瘤接种后五天，如不同组中指示的注射转导CBR(吖啶绿)和电穿孔RNA的T细胞，并且通过生物发光图像(BLI)监测肿瘤生长。

[0485] 图25显示了来自两个组的小鼠在不同时间点的生物发光图像，所述两个组已经通过CD19BBZ CAR RNA T细胞或修饰的NY-ESO-1 TCR RNA处理。

[0486] 实施例10：使用CRISPR通过慢病毒转导和T细胞上TCR-CD3复合体的破坏的组合生成的通用CAR19 T细胞。

[0487] 如图26中显示的，原代T细胞在第0天使用抗CD3/抗CD28珠进行刺激，并且然后转导有慢病毒-CAR19。如通过流式细胞术检测的，超过70%的细胞是CAR19阳性的。由于CRISPR的瞬时表达足以介导基因敲除，研发了“一打即跑”递送策略以在第3天通过利用体外转录的编码CAS9的RNA和靶向TCR α 链、TCR β 链和 β -2微球蛋白基因的恒定区的gRNA的电转移瞬时地表达CRISPR(图2C)。T细胞在电转移后在32℃下培养24小时，然后返回正常条件。

[0488] 为了测量TCR表达,使用特异于CD3的单克隆抗体。因为当表达TCR时仅在细胞表面上存在CD3,所以CD3被选择。CRISPR构建体被电穿孔入原代T细胞(图26)。TCR单阴性和TCR/HLA-A双阴性细胞通过暴露于CD19呈递K562细胞被扩展,其导致>100倍的扩展(图27)。

[0489] 在扩展后,细胞保持TCR单阴性或TCR/HLA-A双阴性,并且CAR19阳性群被富集。在K562-CD19刺激的扩展后,内源性TCR表达在TCR单阴性细胞中保持阴性,同时TCR和HLA-A表达在TCR/HLA-A双阴性T细胞中保持阴性(图28A)。CAR19阳性细胞通过K562-CD19刺激的扩展被富集(图28B)。

[0490] 大多数扩展的通用T细胞是CD45R0阳性的(图29A)并且保留高水平的CD62L表达(图29B),中等水平的CD28表达(图29A)和低水平的CCR7表达(图29B)。

[0491] CRISPR基因编辑不影响通用CAR19 T细胞的体外抗肿瘤活性(图30A)。TCR或TCR/HLA-A的耗减对CAR19表达和抗肿瘤活性具有最低影响(图30B和30C)。当使用Na1m6肿瘤细胞攻击时,TCR单阴性和TCR/HLA-A双阴性CAR19 T显示出强健的裂解能力(图30B)。CD107a释放和细胞因子分泌还显示了通用细胞中有效的抗肿瘤活性(图30C)。在使用表达CD19的细胞攻击后,TCR单消融或TCR与HLA-A双消融CAR19 T细胞展示出类似的增殖动力学(图30D)。

[0492] 为了测试CRISPR/CAS9编辑的CAR19 T细胞的抗肿瘤活性,TCR单阴性、TCR与HLA-A双阴性CAR19 T被输注入荷载Na1m6肿瘤细胞的NSG小鼠。所有接受未操纵的T细胞的小鼠和输注有转导慢病毒GFP的野生型T细胞的小鼠在肿瘤细胞输注后3周内死亡。对于接受CAR19 T细胞的小鼠,观察到目标肿瘤消退(图6)。发现CRISPR/CAS9不影响CAR19 T细胞的体内肿瘤杀伤活性,因而,确认了组合慢病毒基因转移与CRISPR/CAS9用于T细胞治疗的优势。

[0493] 当使用HLA不匹配的肿瘤细胞系攻击细胞时,T细胞上TCR α 与 β 链和HLA-A分子的完全消融完全地废除非特异性杀伤(图32A)。在长时期的共培养(5天)后,消除HLA-A分子活化的NK细胞。当这些细胞在IFNr Elispot测定中被同种异体全血PBMC攻击24小时时没有观察到脱靶活性。缺少脱靶活性表明T细胞可以在遭遇同种异体细胞后在急性免疫应答中发挥主要作用。所有结果表明CRISPR/CAS9编辑的TCR α 与 β 链和HLA-A分子(三阴性)T细胞可以充当通用效应供体细胞的来源。

[0494] CAS9和靶向FAS的不同gRNA被电转移入T细胞。FASneg细胞被分选并且然后转导有慢病毒CAR19。流式细胞术和Sanger测序数据显示FAS已经被CRISPR修饰(图33)。FASneg T细胞的CAR19基因表达比得上野生型。甚至在使用Na1m6肿瘤细胞培育短时期后,与野生型对应体细胞相比,CD107a表达甚至在4小时的共培养内在FASneg CAR19 T细胞中被极大地增强。

[0495] 一些报道显示甚至弱的抗原刺激可以引发FAS活化以促进T细胞增殖(Rethi,等,Blood,vol.112(4):1195-1204,2008)。有趣地,当通过高水平的CD19+K562细胞刺激细胞时,FASneg CAR19 T细胞比野生型CAR19 T细胞快得多地扩展。这表明FAS/FASL在高水平抗原条件下引发凋亡而不是活化(图34A)。FASneg CAR19 T细胞进一步显示了降低的凋亡水平,如通过膜联蛋白V染色测量的(图34B)。

[0496] 如在体外已经观察到的,FASneg T细胞显示了与野生型T细胞相比增强的增殖。当在将细胞输注入荷载Na1m6的小鼠后进行CAR19 T细胞的真实计数测定(True Count assay)时,观察到类似的增殖结果。当与野生型组相比时,FASneg CAR19组展现出更优异的

抗肿瘤活性(图35B)。此差异图解在图35C的图中,其显示了那两组之间的生物发光数据。这些数据指示CAR T细胞中的FAS消融增强其抗肿瘤活性。

[0497] CAS9和靶向PD1的不同gRNA在慢病毒转导有PSCA-CAR后被电转移入T细胞。通过CD3/CD28珠刺激后的表面PD1表达确认了PD1敲除细胞(图36)。通过微珠耗减富集PD1阴性细胞,并且然后使用PSCA抗原呈递PC3肿瘤细胞进行刺激。在野生型和PD1阴性组二者中都富集PSCA-CAR阳性细胞。在使用PC3-PSCA-PDL1肿瘤细胞培育后,PD1表达在野生型PSCA-CAR T细胞的表面上被快速地上调,而且在PD1阴性PSCA-CAR T细胞上检测到非常低水平的PD1表达(图37)。PD1阴性PSCA-CAR T细胞还显示了极大增强的和持续的高水平的CD137表达(图37)——T细胞活化的标记物,其指示PD1/PDL1抑制性信号传导途径被阻断。

[0498] 当在体内PC3-PSCA-PDL1 NSG模型中测试时,与野生型组相比,在PD1阴性PSCA-CAR T细胞组中检测到显著增强的抗肿瘤活性(图38A和38B),这表明PD1消融用于CAR T细胞疗法的治疗价值。

[0499] 为了测试CRISPR工程化通用CAR T细胞的移植物抗宿主疾病(GVHD)影响,高的T细胞剂量被给予至患有Na1m6白血病的NSG小鼠。小鼠使用双敲除或三敲除CAR T细胞进行处理,并且不显示发展GVHD的任何征兆。相比之下,来自野生型CD19 CAR T组的4只小鼠中的3只到第65天发展出GVHD,其通过不同器官的组织学检查确认(图39)。

[0500] 在另一个实验中,细胞重悬在FBS中并且在亚致死照射后静脉内地输注入小鼠。临床GVHD每周监测2至3次。在60天研究期间,接受野生型T细胞的5只小鼠中的四只死亡,而PBS处理组、TCR单消融和TCR/HLA-I双消融的T细胞处理组不显示GVHD的任何征兆。接受野生型T细胞的小鼠经历重量减轻。然而,PBS处理组、TCR单消融或TCR/HLA-I双消融的T细胞处理组在研究期间轻微地增加重量(图40A和40B)。

[0501] 在慢病毒CD19-CAR转导后,使用Cas9和靶向CD3、B2M和PD1或Fas的gRNA处理T细胞。三敲除通用CAR T细胞被注入荷载Na1m6-PDL1肿瘤的小鼠。与CD3/HLA-I双敲除细胞相比,在接受PD1/CD3/HLA-I三敲除细胞的小鼠中观察到更优异的抗肿瘤活性,这进一步指示了阻断PD1信号传导途径的治疗价值(图41A和41B)。这些数据提供了使用CRISPR/Cas9增强通用CAR T细胞的治疗的方法。

[0502] 由于gRNA易于降解,研发简化一步法以生成通用CAR T细胞。gRNA连同CAR在单个慢病毒载体中组成型地表达。在使用CD3/CD28免疫磁珠进行刺激后一天,通过编码gRNA和CAR的慢病毒转导幼稚T细胞。细胞在第3天电穿孔有Cas9 mRNA(图42)。此系统允许使用一个载体操纵多个基因(图42)。在第6天通过流式细胞术确认CD3表达。使用一步系统处理的T细胞在不同的Cas9 mRNA组中的每个中显示了高达90%的一致的基因消融(图43)。

[0503] 用于癌症和感染性疾病的过继T细胞疗法的进展已经被缺乏可容易获得的抗原-特异性人T淋巴细胞所阻碍。多能干细胞可以提供T淋巴细胞的无限制的来源。为了处理此问题,在原代细胞和T细胞中破坏FAS、PD1、CTLA4和PPP2r2d的表达。

[0504] 仙台病毒被用于重编程原代细胞和T细胞。存在可用于生成iPSC的多种方法,包括病毒-介导的基因转导和化学诱导。虽然慢病毒和逆转录病毒载体需要整合入宿主染色体以表达重编程基因,但是基于DNA的载体——比如腺病毒、腺伴随病毒和质粒载体——游离地存在并且不需要整合,然而,它们仍可以以某些频率被整合入宿主染色体,并且重编程效率相对低。同样,基于mRNA的重编程复杂并且已经证明是极度低效的。

[0505] 相比之下,仙台病毒不整合入宿主基因组或改变宿主细胞的遗传信息。仙台病毒也具有比得上基于慢病毒和逆转录病毒的基因转导的重编程潜力。

[0506] 24孔板中的每个孔接种十万个野生型、FASneg、CD3neg TCR α 与 β 链敲除T细胞。细胞使用CD3/CD28珠进行刺激。在刺激之后第3天,移除珠,细胞重悬在1mL的预热的T细胞完全培养基中,并且然后使用计算体积的CytoTune仙台病毒——其包括用于在细胞中表达hKlf4、hOct3/4和hSox2的多顺反子载体(Lifetechnologies,Carlsbad,CA)——进行培育。处理的T细胞被接种在24孔板中,并且在室温下、在2250rpm下离心90分钟。另外的1mL的完全T细胞培养基被添加至每个孔,并且平板在5%CO₂的潮湿气氛中在37℃下培育过夜。

[0507] 在转导后次日,通过使用新鲜的完全培养基清洗T细胞和培养细胞2天来移除仙台病毒。每天更换一半培养基。在感染后第3天,细胞被转移至MEF饲养平板并且在不含任何细胞因子的T细胞培养基中培养。感染后四天,细胞在标准hES培养基中进行培养。每天更换培养基。在第7天前后观察到ES样集落。细胞从第15天在条件性hES培养基中进行培养并且培养持续另外的10天。在转导后25至30天前后挑取集落。

[0508] 在第4天前后,在饲养细胞上形成细胞团,其指示重编程过程的起始。T细胞在至iPSC的重编程过程期间经历剧烈的形态变化(图44A)。在第12天前后,开始出现具有松散边缘的大的细胞团。在第18天前后,T细胞被转化至具有良好限定边缘的典型的ES样集落。FASneg T细胞以大约5倍的野生型对应体的效率被重编程至iPSC(图44B)。p53缺陷细胞系已经被报道为由于凋亡途径的阻碍而更易于重编程。FAS敲除可以使用相似的机制促进重编程过程。

[0509] 观察到由CD3neg TCR α 或 β 链敲除T细胞重编程的iPSC的ES样形态(图45A)。该形态在数次传代后保持恒定。CD3neg T细胞的重编程比野生型对应体大约5倍低效(图45B),这表明TCR敲除可以在T细胞重编程的过程中发挥作用或在仙台病毒感染后影响细胞生存力。图45C是图像组,其显示了CD3neg iPSC细胞的磷酸酶染色。

[0510] 观察到了典型的胚胎干细胞形态,其指示FASneg、CD3neg TCR α 与 β 链敲除T细胞在限定的重编程条件下被诱导至多能状态。虽然损失TCR表达使得T细胞较不健康,但是本文描述的数据表明凋亡在重编程的过程中发挥重要作用。

[0511] 还在不同的T-iPSC细胞系中检测到内源多能干细胞基因的诱导(图46)。Tra-1-60和SSEA4表达的免疫染色进一步指示了T-iPSC细胞的干细胞表型(图47A)。通过Sanger测序确认了T-iPSC中的Fas敲除(图47B)。

[0512] dCas9和FokI-Cas9被报道具有较小的脱靶活性。如果T细胞可以通过改进版本的CRISPR/dCas9和CRISPR/FokI-CAS9系统编辑,则对T细胞进行评估(图48A)。流式细胞术数据显示了原代T细胞通过CRISPR/dCas9和CRISPR/FokI-CAS9二者被编辑(图48B)。CRISPR/dCas9基因敲除系统展示了使用至少一对gRNA的增强的特异性,其致使敲除事件更精确和更特异性。

[0513] 为了测试T细胞中CRISPR/CAS9的脱靶事件,在脱靶位点处进行surveyor测定。对于测试的基因,在基因组基因座处没有观察到明显的切割(图48C)。

[0514] 实施例11:多重基因组编辑。

[0515] 通过使用CRISPR/Cas9系统同时地破坏多个基因组基因座来生成CAR T细胞。CAR T细胞缺乏内源性TCR和HLA I类(HLA-I)分子的表达,以便用作同种异体通用CAR T细胞。通

过共电穿孔编码Cas9的mRNA与靶向这些基因的gRNA,以高效率破坏T细胞受体 (TCR) α链、TCRβ链和β-2微球蛋白 (B2M) 基因。通过组合慢病毒 (LV) 递送CAR与CRISPR RNA电穿孔以同时地破坏内源TCR和B2M基因来生成通用TCR或CAR T细胞。此外,内源性PD1的破坏增强CAR疗法在实体瘤模型中的功效。

[0516] gRNA的多重递送以高效率破坏人原代T细胞中的基因而不损害效应物功能

[0517] 生成缺乏TCR、HLA和其它基因的通用T细胞需要高效的多重基因组编辑。CRISPR/gRNA RNA电穿孔被优化以在T细胞中实现高效的基因破坏。首先,以使用体外转录系统生成的RNA共电穿孔Cas9和gRNA(图49,左),并且研发了“一打即跑”递送策略以通过电穿孔瞬时地递送CAS9 mRNA和gRNA至T细胞(图49,右)。

[0518] 使用单电穿孔的靶向TCRα恒定区 (TRAC) 或β恒定区 (TRBC) 的初始实验分别导致1%至3%CD3-阴性 (CD3^{neg}) T细胞(图50A,上图)。为了测定瞬时暴露于轻度低温是否导致更高效的基因破坏,在37°C或32°C下编辑细胞。当T细胞在Cas9/gRNA共电穿孔后在32°C下培养24h时,CRISPR-介导的TRAC和TRB的破坏增加上至4倍(图50A,下图)。用于最大破坏效率的Cas9:gRNA的最佳分子比是1:1至2:1,并且基因破坏效率与电转移的mRNA的量相关联(图51A)。

[0519] 与mRNA相比,gRNA更易于快速降解,其潜在地限制靶向效率。因而,在初次Cas9/gRNA电穿孔后测试gRNA的多次连续电穿孔。在蛋白质水平下的破坏频率中存在显著增加,这是由于82.4%的细胞在第三次gRNA电穿孔后是CD3^{neg}(图50B)。克隆测序显示基因组靶向效率在第三次gRNA电穿孔后达到89.4%(图51B)。在gRNA的第三次电穿孔后,surveyor测定确认了在TRAC和TRBC的基因组基因座处分别81.7%和49.3%的切割率(图52)。侧接TRAC和TRBC靶位点的Sanger测序数据中的多个峰确认了基因组阅读框在靶位点的下游移位(图53A)。通过克隆测序确认了通过由CRISPR/Cas9介导的NHEJ引起的插入或缺失(插入/缺失)的发生(图53B)。TCR破坏的TCR/CD3^{neg}群通过单个步骤的CD3阴性选择被富集至超过99%(99.70±0.20%)(图54)。

[0520] 为了研发扩展TCR/CD3^{neg} T细胞的方法,TCR/CD3^{neg} T细胞共电穿孔有HLA-A2限制的1G4 NY-ESO-1 TCR (α+β) RNA以复原CD3表达(图55,左图)。在T细胞刺激/扩展方法之后,对下列进行比较:1) 使用PBMC作为饲养细胞的快速T细胞扩展方案 (REP),2) 抗CD3/CD28免疫磁珠(珠),或3) 表达CD28和4-1BB的配体的荷载OKT3的基于K562的人工抗原-呈递细胞 (K562 aAPC)。TCR/CD3^{neg} T细胞还电穿孔有CD19 CAR RNA(图55,右图)并且然后通过表达CD19 (K562-CD19) 的照射的K562 aAPC进行刺激。在单个刺激10天后,对于REP、珠、K562 aAPC和K562-CD19分别取得751.0±217.1、35.7±9.3、46.3±8.5和57.5±5.0的扩展倍数值(图56)。

[0521] 为了测试CRISPR/Cas9基因编辑是否将影响T细胞的表型和功能,检查通过不同方法扩展的TCR/CD3^{neg} T细胞的表型,并且显示所有扩展的细胞保持CD3阴性并且大部分保留高水平的CD27(79.8%至93.4%),其与中央记忆细胞表型一致(图57)。扩展的TCR/CD3^{neg} T细胞第二次电穿孔有CD19 CAR mRNA以测试它们的抗肿瘤活性.TCR/CD3^{neg} T细胞的表面CAR表达与对照组的表面CAR表达相等(图58)。当TCR/CD3^{neg} CD19 CAR T细胞使用CD19⁺ Na1m6白血病细胞进行刺激时,CD19 CAR⁺TCR/CD3^{neg} T细胞的CD107a上调(图59A)、细胞因子分泌(图59C)和杀伤活性(图59B)等同于野生型对照细胞的那些.CD19CAR TCR/CD3^{neg} T

细胞被输注入荷载Na1m6的NSG小鼠以测试它们的体内抗肿瘤活性。肿瘤消退是明显的,其功效等同于CART19野生型对应体细胞(图59D和59E)。该结果指示内源性TCR的CRISPR/Cas9编辑没有不利地影响原代T细胞用于过继免疫疗法的功能。

[0522] TCR α 、 β 和B2M三重破坏的T细胞的降低的同种异体反应性。

[0523] 需要破坏TCR α 与 β 链二者以防止TCR-重定向的T细胞过继免疫疗法的TCR错配相关毒性,并且B2M对HLA-I复合体的装配和表达是必不可少的。鉴于此,研发了TCR α 与 β 链和B2M三重破坏以生成通用T细胞。首先,测试了通过破坏B2M消除T细胞上的HLA-I表达的能力。T细胞电穿孔有靶向B2M的Cas9/gRNA RNA。这导致79.9%的B2M和HLA-I双-阴性群。HLA-I^{neg}群可以通过阴性选择被进一步富集(图60)。

[0524] 为了生成缺少TCR α 、 β 链和B2M的三敲除T细胞,Cas9 mRNA与靶向TRAC、TRBC和B2M的三种不同gRNA被共电穿孔。结果,CD3和HLA-I双-阴性细胞群是65.4%(图61)。在富集双敲除和三敲除细胞后,TCR α 与 β 链和B2M三敲除T细胞废除HLA不匹配的肿瘤细胞系的非特异性杀伤(图62)。当这些细胞在IFN γ Elispot测定中被同种异体全血照射的PBMC攻击时没有观察到应答(图63,左组)。HLA-I分子的消融还急剧地降低同种异体反应性,如通过共培养同种异体PBMC与照射的B2M-破坏的细胞确认的(图63,右组)。上面的结果表明缺少TCR α 与 β 链和B2M的三-阴性T细胞可以潜在地充当用于过继免疫疗法的通用T细胞的来源,其抵抗宿主免疫系统的排斥同时不会引起移植物抗宿主疾病。

[0525] TCR重定向的内源性TCR-破坏的T细胞的提高的抗肿瘤活性。

[0526] 在使用NY-ESO-1 TCR(1G4)重定向后,具有CRISPR/Cas9-破坏的TCR α 与 β 链的T细胞在细胞表面上显示了升高的转基因TCR表达。与野生型T细胞的46.8%相比,对于TCR α 或 β 链单敲除或 α / β 双敲除,转基因TCR表达分别是67.6%、78.8%或94.3%。提高的转基因TCR表达导致增强的T细胞功能,如通过增加的抗原-特异性CD107a表达(图65A)和增强的细胞毒性(图65B)证明的——尤其是对于 α / β 双敲除T细胞。

[0527] 在分开的实验中, α / β 双敲除T细胞转染有不同的NY-ESO-1 TCR(8F)。相对于1G4 TCR,此8F TCR展示了在转基因TCR表达(图66;TCR/CD3^{neg}的60.1%对野生型T细胞(Cas9空白对照T细胞)的44.7%(具有~5%内源性TCR V β 8背景))和功能(图67A中的CD107a表达,和图67B中的细胞因子产生)二者中更高的显著改进。这些结果突出了内源性TCR对转基因TCR表达和功能的差别影响。

[0528] 通用CAR T细胞保留抗肿瘤功效并且不引起GVHD。

[0529] 通过组合LV转导CD19 CAR与RNA电穿孔Cas9/gRNA生成通用CD19 CAR T细胞(图68)。细胞被扩展并且剩余的CD3^{neg}细胞具有高水平的CD19 CAR表达(图69)。大多数扩展的T细胞是CD45RO阳性的并且保留高水平的CD62L表达和中等水平的CD28表达,其与中央记忆细胞情形一致(图70)。扩展的TCR/HLA-I双-阴性CD19 CAR T显示了稳健的体外抗肿瘤活性,比如CD107a释放(图71)、细胞因子分泌(图72)、裂解能力(图73)和增殖(图74),其与野生型CD19 CAR T细胞一样有效。

[0530] T细胞被输注入荷载播散性Na1m6白血病的NSG小鼠。使用CAR T细胞——其具有破坏的内源性TCR(LV-CD19 CAR TCR^{neg})或具有同时破坏的TCR和HLA-I(LV-CD19CAR TCR/HLA-I^{neg})——处理的小鼠展示出与使用野生型CD19 CAR T细胞(LV-CD19 CAR)处理的小鼠类似的肿瘤消退(图75A和75B),这表明破坏单独的TCR或连同B2M不影响CAR T细胞抗肿瘤

活性。

[0531] 为了测试工程化T细胞的GVHD影响,高的T细胞剂量(20×10^6 个/小鼠)被给予至患有Nalm6白血病的NSG小鼠。如图76中显示的,使用CD19 CAR T细胞——其具有单独的TCR破坏(LV-CD19 CAR TCR/CD3^{neg})或同时破坏的TCR和B2M(LV-CD19 CAR TCR/HLA-I^{neg})——处理的小鼠展示出与野生型CD19 CAR T细胞(LV-CD19 CAR)相比类似的肿瘤消退。使用双敲除或三敲除CAR T细胞处理的小鼠不发展GVHD的任何征兆。相比之下,来自野生型CD19 CAR T(LV-CD19 CAR)组的4只小鼠中的3只在第65天发展出GVHD,其通过不同器官的组织学检查确认。因而,破坏单独的TCR或TCR连同HLA-I不影响CAR T细胞的体内抗肿瘤活性,同时消除同种异体反应性。

[0532] 腺病毒CRISPR递送入原代T细胞。

[0533] CRISPR/Cas9系统正被快速地利用,用于模式生物和细胞系中的基因调控和基因编辑目的。病毒载体可以特别适应于扩大CRISPR的适用性至其它细胞类型,包括分裂细胞和休眠原代细胞。腺病毒,即编码Cas9和单个引导RNA(gRNA)分子的第二代纤维-修饰的腺病毒,被用于将Cas9核酸酶携带至PD1、Fas和TRAC基因座(图77)。腺病毒-介导的CRISPR转导入肿瘤细胞(图78)产生高至大约71%的靶向诱变的高比率(图79A和79B)。腺病毒似乎构成用于将CRISPR引入人T细胞——不管它们的休眠情形——的有价值的平台。此方法将帮助调查CRISPR基因调控和在众多实验情况中编辑的潜力。

[0534] 电穿孔优化。

[0535] 在4mm小池和2mm小池中的Cas9和gRNA电穿孔(EP)后评价CD3和B2M敲除效率和T细胞扩展。利用2mm小池的标准EP条件(360v/1ms,第一次EP-20 μ g Cas9 RNA+10 μ g gRNA/100 μ l T细胞,第二次EP 5 μ g gRNA/100 μ l T细胞)显示了分别最高的CD3和B2M敲除百分数81.8%和88.6%,以及大约2.7倍的T细胞扩展(EP#1),与之相比,对照EP T细胞的大约18.8倍扩展(EP#12)。降低gRNA剂量(EP#2-5)剧烈地增加T细胞扩展,但是仅轻微地影响CD3和B2M敲除效率。参见图80。利用4mm小池的标准EP条件导致剧烈降低的CD3和B2M敲除效率(EP#8),这表明EP条件(电压或/和脉冲长度)需要被进一步优化以便用于4mm小池。

[0536] 与2mm小池(EP#10-13)或4mm小池中的标准电穿孔(EP)条件相比较。观察到高的CD3/B2M敲除效率(EP#1和5),伴随提高的T细胞扩展倍数。参见图81。

[0537] 为了进一步优化EP条件以实现最大T细胞扩展倍数以及超过60%的CD3/B2M敲除效率,测试了不同的EP条件和RNA量。结果显示对于EP#4、对于EP#1(400v/2ms/120 μ g CAS9 RNA)和对于EP#2(500v/1ms/20 μ g gRNA),扩展倍数被提高,具有相对高的CD3/B2M敲除效率(CD3的63.5%和B2M的84.8%)。参见图82。

[0538] 进行另外的实验优化EP条件。结果显示与测试的最有利的调节相比(图82中的EP#1),使用500v/1ms/120 μ g CAS9 RNA(EP#1)和500v/1ms/20 μ g gRNA(EP#2)产生增加的CD3/B2M敲除效率和T细胞扩展(EP#3)。参见图83。

[0539] 大规模电穿孔和扩展。

[0540] 进行实验以测定大规模电穿孔是否可以产生高的敲除和扩展效率。在第0天,抗CD3/抗CD28珠被用于刺激从3个供体获得的T细胞(100×10^6 个细胞/供体,浓缩至 0.5×10^6 个/ml)。在第1天,刺激的T细胞被转导有CD19 CAR慢病毒。50mL(25×10^6 个细胞)的T细胞被保留为未修饰的T细胞(第9组)。在第3天,移除珠并且将来自每个供体的转导的T细胞分为

两组,CART/空白对照EP(10mL,50×10⁶个/mL)和CART/CRISPR(10mL,50×10⁶个/mL)。细胞然后电穿孔有CAS9 RNA(第一次EP),并且第1、3、5和7组细胞被分割。在第4天,gRNA被电穿孔入T细胞,并且细胞以1×10⁶个细胞/mL被培养。在第5和7天,细胞被分割。在第8天,从第2、4和6组移除CD3+细胞。在第11天,采集T细胞并且来自三个供体的25×10⁵个细胞被发送用于核型分析。

[0541] 表1:实验组。

[0542]	组#	供体	T 细胞
[0543]	1	ND391	CAR T/空白对照 EP
	2	ND391	CAR T/CRISPR
	3	ND463	CAR T/空白对照 EP
	4	ND463	CAR T/CRISPR
	5	ND463	未修饰的(UNMOD)
	6	ND469	CAR T/空白对照 EP
	7	ND469	CAR T/CRISPR

[0544] 在电穿孔和培养程序后评价T细胞数目(图85的上图表)和扩展倍数(图85的下图表)。转导有单独的CD19 CAR(单独的TD)或转导有CD19 CAR并且使用CRISPR编辑(TD/KO)的T细胞的扩展倍数显示在图86的左图中,并且T细胞在第10天的扩展倍数显示在图86的右图中。通过优化电穿孔条件和CAS9/gRNA剂量,在10天后观察到大约60-70%CD3/B2M敲落效率和大约30倍T细胞扩展(图87显示了第10天时的CD3/B2M/CAR表达)。

[0545] 在CD3/CD28珠刺激和CRISPR RNA电穿孔后八天,移出CD3阳性T细胞。图88显示了第8天时三个供体群中的CD3/B2M表达。在第11天,T细胞经受FACS染色以检测CD3、B2M和CAR表达。未转导的ND463(NOTD)被用作阴性对照。图89显示了CD19CAR TD(转导的)/电穿孔CRISPR的、耗减CD3的T细胞;CD19 CAR TD/电穿孔CRISPR的T细胞;和CD19 CAR TD T细胞中的CD3和B2M表达。图90显示了CD19 CAR TD/电穿孔CRISPR的、耗减CD3的T细胞;CD19 CAR TD/电穿孔CRISPR的T细胞;和CD19CAR TD T细胞中的CAR表达。图91显示了在CD19 CAR TD(转导的)/电穿孔CRISPR的、耗减CD3的T细胞;CD19 CAR TD/电穿孔CRISPR的T细胞;和CD19 CAR TD T细胞中第11天的CD3/B2M/CAR表达。图92概述了在不同的T细胞组中的CD3/B2M/CAR表达。

[0546] 在第11天,不同的T细胞组——如图93中指示的,被CD19阳性细胞系Raji或Nalm6刺激。K562被用作CD19阴性对照。在4h的共培养后,除阴性对照之外,在T细胞组的每个中均检测到CD107a上调。

[0547] 在第11天,T细胞的杀伤能力——如图94中指示的——在共培养T细胞与CD19阳性靶细胞Nalm6-CBG后使用发光细胞毒性淋巴细胞(CTL)测定进行测试。也在第11天,通过使用Nalm6靶细胞刺激T细胞组来分析T细胞的细胞因子产生,参见图95。

[0548] T细胞在包含100U/ml的IL-2的培养基中培养多至26天。图96中显示的结果指示对于来自三个供体的CRISPR编辑的T细胞,没有观察到异常的T细胞生长。

[0549] 作为CRISPR/Cas9系统的最吸引人的应用之一,多重基因组编辑对推进基于T细胞的过继免疫疗法持有极大希望。然而,DNA转染的低的靶向效率限制了多重基因组工程在原代T细胞中的使用。研发“一打即跑”递送策略以经由共电穿孔Cas9 mRNA和gRNA将CRISPR引入T细胞。通过多至三轮的gRNA电穿孔与瞬时暴露于轻度低温的组合,对于单基因破坏,常规地取得蛋白质水平下>80%的靶向效率。更鼓舞地,TRAC、TRBC和B2M的三重基因破坏产生大约65%的双阴性CD3和HLA-I,而不需要任何纯化和选择。结果还展现了基因破坏的T细胞富集至>99%纯度是使用临幊上批准的顺磁珠容易取得的,并且纯化的T细胞在10天内被扩幊高至500倍。扩幊的T细胞维持它们的基因破坏表型并且展示与中央记忆T细胞一致的特征。破坏的T细胞不引起GVHD,这表明它们可以被用作同种异体CAR T细胞。重要地是,基因-编辑的T细胞在体外和不同的肿瘤小鼠模型二者中都显示了抗肿瘤活性,其与未编辑的T细胞相比一样有效或更有效。因而,本文描述的生成合成细胞的过程可以容易地转化为当前的符合GMP的制造程序。

[0550] 本文描述的数据展现了CRISPR/Cas9是原代人T细胞中强大的多重基因组编辑工具。先前的报道已经显示T细胞可以被ZFN或TALEN遗传编辑以消除内源性TCR α 与 β 链的表达,从而避免GVHD。由于在T细胞中通过锌指核酸酶(ZFN)和TAL效应物核酸酶TALEN操纵多个基因的靶向策略的复杂性,先前的研究不能在临床前动物模型中同时防止GVHD和宿主抗移植物反应。通过CRISPR/Cas9消融刺激性NK配体或通过表达非典型的HLA I类分子比如HLA-E,NK细胞活化可以被中止,其可以潜在地防止通用T细胞免受NK细胞-介导的排斥。

[0551] 总之,使用多重CRISPR技术可以高效地生成具有有效的抗肿瘤活性和降低的同种异体反应性的临幊规模的通用CAR T细胞。考虑到成功转化使用ZFN的过继转移疗法用于HIV/AIDS,此方法可以并入当前的符合GMP的制造程序并且具有高的转化潜力。可能的是,通用CAR和TCR T细胞将提供自体T细胞的替代方案。事实上,可以想到的是,与使用自体T细胞抵抗癌症和感染性疾病的当前的CART疗法相比,具有无效的限制点分子的通用CAR和TCR T细胞可以是更有效的并且具有更广的用途。

[0552] 其它实施方式

[0553] 本文对变量的任何定义中一系列要素的叙述包括将该变量定义为任何单个要素或列举的要素的组合(或子组合)。本文对实施方式的叙述包括该实施方式作为任何单个实施方式或与任何其它实施方式或其部分组合。

[0554] 本文引用的每个和每种专利、专利申请和出版物的公开内容由此通过引用以其全部并入本文。虽然已经参照具体的实施方式公开了本发明,但是明显的是,本领域技术人员可以设计本发明的其它实施方式和变型而不背离本发明的真实精神和范围。所附权利要求意欲解释为包括所有这样的实施方式和等价变型。

[0001]	序列表	
[0002]	<110> 宾夕法尼亚大学董事会	
[0003]	<120> 改变CAR T细胞中的基因表达及其用途	
[0004]	<130> 046483-7100CN2	
[0005]	<140> CN 2021113542766	
[0006]	<141> 2015-10-15	
[0007]	<150> 62/073,651	
[0008]	<151> 2014-10-31	
[0009]	<160> 97	
[0010]	<170> PatentIn version 3.5	
[0011]	<210> 1	
[0012]	<211> 20	
[0013]	<212> DNA	
[0014]	<213> 人工序列	
[0015]	<220>	
[0016]	<223> 合成序列	
[0017]	<400> 1	
[0018]	tgtgctagac atgaggctca	20
[0019]	<210> 2	
[0020]	<211> 20	
[0021]	<212> DNA	
[0022]	<213> 人工序列	
[0023]	<220>	
[0024]	<223> 合成序列	
[0025]	<400> 2	
[0026]	gcagtatctg gagtcattga	20
[0027]	<210> 3	
[0028]	<211> 20	
[0029]	<212> DNA	
[0030]	<213> 人工序列	
[0031]	<220>	
[0032]	<223> 合成序列	
[0033]	<400> 3	
[0034]	cgcgagcaca gctaaggcca	20
[0035]	<210> 4	
[0036]	<211> 20	
[0037]	<212> DNA	
[0038]	<213> 人工序列	

[0039]	<220>	
[0040]	<223>	合成序列
[0041]	<400>	4
[0042]	ggcgccctgg ccagtcgtct	20
[0043]	<210>	5
[0044]	<211>	20
[0045]	<212>	DNA
[0046]	<213>	人工序列
[0047]	<220>	
[0048]	<223>	合成序列
[0049]	<400>	5
[0050]	gagggtccag atgccagca	20
[0051]	<210>	6
[0052]	<211>	24
[0053]	<212>	DNA
[0054]	<213>	人工序列
[0055]	<220>	
[0056]	<223>	合成序列
[0057]	<400>	6
[0058]	tcatgtccta accctgatcc tctt	24
[0059]	<210>	7
[0060]	<211>	23
[0061]	<212>	DNA
[0062]	<213>	人工序列
[0063]	<220>	
[0064]	<223>	合成序列
[0065]	<400>	7
[0066]	ttggactttt cccagctgac aga	23
[0067]	<210>	8
[0068]	<211>	24
[0069]	<212>	DNA
[0070]	<213>	人工序列
[0071]	<220>	
[0072]	<223>	合成序列
[0073]	<400>	8
[0074]	taccaggacc agacagctct taga	24
[0075]	<210>	9
[0076]	<211>	24
[0077]	<212>	DNA

[0078]	<213>	人工序列	
[0079]	<220>		
[0080]	<223>	合成序列	
[0081]	<400>	9	
[0082]	tctcaccta a ttcctccag gcat		24
[0083]	<210>	10	
[0084]	<211>	27	
[0085]	<212>	RNA	
[0086]	<213>	人工序列	
[0087]	<220>		
[0088]	<223>	合成序列	
[0089]	<400>	10	
[0090]	aggaggauuc ggaacccaau cacugac		27
[0091]	<210>	11	
[0092]	<211>	25	
[0093]	<212>	DNA	
[0094]	<213>	人工序列	
[0095]	<220>		
[0096]	<223>	合成序列	
[0097]	<220>		
[0098]	<221>	misc_RNA	
[0099]	<222>	(1) .. (23)	
[0100]	<400>	11	
[0101]	cagugauugg guuccgaauc cucct		25
[0102]	<210>	12	
[0103]	<211>	27	
[0104]	<212>	RNA	
[0105]	<213>	人工序列	
[0106]	<220>		
[0107]	<223>	合成序列	
[0108]	<400>	12	
[0109]	accuccuucc cauucaccca ccagcuc		27
[0110]	<210>	13	
[0111]	<211>	25	
[0112]	<212>	DNA	
[0113]	<213>	人工序列	
[0114]	<220>		
[0115]	<223>	合成序列	
[0116]	<220>		

[0117]	<221>	misc_RNA	
[0118]	<222>	(1) .. (23)	
[0119]	<400>	13	
[0120]	gcuggugggu	gaaugggaag gaggt	25
[0121]	<210>	14	
[0122]	<211>	122	
[0123]	<212>	DNA	
[0124]	<213>	人工序列	
[0125]	<220>		
[0126]	<223>	合成序列；图1B	
[0127]	<400>	14	
[0128]	ttaatacgac	tcactatagg caccaaagct gcccttaccg ttttagagct agaaatagca	60
[0129]	agttaaaata	aggctagtcc gttatcaact tgaaaaagtgc acccgagtc ggtgctttt	120
[0130]	tt		122
[0131]	<210>	15	
[0132]	<211>	23	
[0133]	<212>	DNA	
[0134]	<213>	人工序列	
[0135]	<220>		
[0136]	<223>	合成序列；图1C	
[0137]	<400>	15	
[0138]	tgtgctagac	atgaggctca tgg	23
[0139]	<210>	16	
[0140]	<211>	23	
[0141]	<212>	DNA	
[0142]	<213>	人工序列	
[0143]	<220>		
[0144]	<223>	合成序列；图1C	
[0145]	<400>	16	
[0146]	ccctcaatga	ctccagatac tgc	23
[0147]	<210>	17	
[0148]	<211>	38	
[0149]	<212>	DNA	
[0150]	<213>	人工序列	
[0151]	<220>		
[0152]	<223>	合成序列；图79B，13	
[0153]	<400>	17	
[0154]	tgggctggcg	gccaggatgg ttcttggtag gtaggtgg	38
[0155]	<210>	18	

[0156]	<211>	38	
[0157]	<212>	DNA	
[0158]	<213>	人工序列	
[0159]	<220>		
[0160]	<223>	合成序列；图79B，19	
[0161]	<400>	18	
[0162]	tgggctggcg	gccaggatgg ttcttagggg taggtggg	38
[0163]	<210>	19	
[0164]	<211>	67	
[0165]	<212>	DNA	
[0166]	<213>	人工序列	
[0167]	<220>		
[0168]	<223>	合成序列；图3D	
[0169]	<400>	19	
[0170]	tatatcacag	acaaaactgt gctagacatg aggtctatgg acttcaagag caacagtgc	60
[0171]	tgccct		67
[0172]	<210>	20	
[0173]	<211>	66	
[0174]	<212>	DNA	
[0175]	<213>	人工序列	
[0176]	<220>		
[0177]	<223>	合成序列；图3D	
[0178]	<400>	20	
[0179]	tatatcacag	acaaaactgt gctagacatg agtctatgga cttcaagagc aacagtgc	60
[0180]	tgccct		66
[0181]	<210>	21	
[0182]	<211>	65	
[0183]	<212>	DNA	
[0184]	<213>	人工序列	
[0185]	<220>		
[0186]	<223>	合成序列；图3D	
[0187]	<400>	21	
[0188]	tatatcacag	acaaaactgt gctagacatg gtctatggac ttcaagagca acagtgcgt	60
[0189]	ggcct		65
[0190]	<210>	22	
[0191]	<211>	66	
[0192]	<212>	DNA	
[0193]	<213>	人工序列	
[0194]	<220>		

[0195]	<223>	合成序列；图3D	
[0196]	<400>	22	
[0197]	tatatcacag	acaaaactgt gctagacatg agtctatgga cttcaagagc aacagtgc	60
[0198]	tggcct		66
[0199]	<210>	23	
[0200]	<211>	64	
[0201]	<212>	DNA	
[0202]	<213>	人工序列	
[0203]	<220>		
[0204]	<223>	合成序列；图3D	
[0205]	<400>	23	
[0206]	tatatcacag	acaaaactgt gctagacatg tctatggact tcaagagcaa cagtgcgt	60
[0207]	gcct		64
[0208]	<210>	24	
[0209]	<211>	66	
[0210]	<212>	DNA	
[0211]	<213>	人工序列	
[0212]	<220>		
[0213]	<223>	合成序列；图3D	
[0214]	<400>	24	
[0215]	tatatcacag	acaaaactgt gctagactga ggtctatgga cttcaagagc aacagtgc	60
[0216]	tggcct		66
[0217]	<210>	25	
[0218]	<211>	64	
[0219]	<212>	DNA	
[0220]	<213>	人工序列	
[0221]	<220>		
[0222]	<223>	合成序列；图3D	
[0223]	<400>	25	
[0224]	tatatcacag	acaaaactgt gctagtgagg tctatggact tcaagagcaa cagtgcgt	60
[0225]	gcct		64
[0226]	<210>	26	
[0227]	<211>	62	
[0228]	<212>	DNA	
[0229]	<213>	人工序列	
[0230]	<220>		
[0231]	<223>	合成序列；图3D	
[0232]	<400>	26	
[0233]	tatatcacag	acaaaactgt gcttgaggc tatggacttc aagagcaaca gtgctgtggc	60

[0234]	ct	62
[0235]	<210> 27	
[0236]	<211> 67	
[0237]	<212> DNA	
[0238]	<213> 人工序列	
[0239]	<220>	
[0240]	<223> 合成序列；图3D	
[0241]	<400> 27	
[0242]	tatatacacag acaaaaactgt gctagacatg aggttctatg gacttcaaga gcaacagtgc	60
[0243]	tgtggcc	67
[0244]	<210> 28	
[0245]	<211> 67	
[0246]	<212> DNA	
[0247]	<213> 人工序列	
[0248]	<220>	
[0249]	<223> 合成序列；图3D	
[0250]	<400> 28	
[0251]	tatatacacag acaaaaactgt gctagacatg agggtctatg gacttcaaga gcaacagtgc	60
[0252]	tgtggcc	67
[0253]	<210> 29	
[0254]	<211> 67	
[0255]	<212> DNA	
[0256]	<213> 人工序列	
[0257]	<220>	
[0258]	<223> 合成序列；图3D	
[0259]	<400> 29	
[0260]	agcagccccgc cctcaatgac tccagatact gcctgagcag ccgcctgagg gtctcgccca	60
[0261]	ccttctg	67
[0262]	<210> 30	
[0263]	<211> 66	
[0264]	<212> DNA	
[0265]	<213> 人工序列	
[0266]	<220>	
[0267]	<223> 合成序列；图3D	
[0268]	<400> 30	
[0269]	agcagccccgc cctcatgact ccagatactg cctgagcagc cgccctgaggg tctcgccac	60
[0270]	cttctg	66
[0271]	<210> 31	
[0272]	<211> 66	

[0273]	<212>	DNA	
[0274]	<213>	人工序列	
[0275]	<220>		
[0276]	<223>	合成序列；图3D	
[0277]	<400>	31	
[0278]	agcagccgc	ctcaatgact ccagatactg cctgaggcagc cgccctgaggg tctcgccac	60
[0279]	cttctg		66
[0280]	<210>	32	
[0281]	<211>	66	
[0282]	<212>	DNA	
[0283]	<213>	人工序列	
[0284]	<220>		
[0285]	<223>	合成序列；图3D	
[0286]	<400>	32	
[0287]	agcagccgc	cctcaatgac tcagatactg cctgaggcagc cgccctgaggg tctcgccac	60
[0288]	cttctg		66
[0289]	<210>	33	
[0290]	<211>	65	
[0291]	<212>	DNA	
[0292]	<213>	人工序列	
[0293]	<220>		
[0294]	<223>	合成序列；图3D	
[0295]	<400>	33	
[0296]	agcagccgc	cctcaatgac tagatactgc ctgaggcagcc gcctgagggt ctcggccacc	60
[0297]	ttctg		65
[0298]	<210>	34	
[0299]	<211>	62	
[0300]	<212>	DNA	
[0301]	<213>	人工序列	
[0302]	<220>		
[0303]	<223>	合成序列；图3D	
[0304]	<400>	34	
[0305]	agcagccgc	ccgactccag atactgcctg agcagccgcc tgagggtctc ggccaccc	60
[0306]	tg		62
[0307]	<210>	35	
[0308]	<211>	67	
[0309]	<212>	DNA	
[0310]	<213>	人工序列	
[0311]	<220>		

[0312]	<223>	合成序列；图3D		
[0313]	<400>	35		
[0314]	agcagccgc	cctcaaatac	tgcctgagca	60
[0315]	actttct			67
[0316]	<210>	36		
[0317]	<211>	67		
[0318]	<212>	DNA		
[0319]	<213>	人工序列		
[0320]	<220>			
[0321]	<223>	合成序列；图3D		
[0322]	<400>	36		
[0323]	agcagccgc	cctcaatgac	tcccagatac	60
[0324]	actttct			67
[0325]	<210>	37		
[0326]	<211>	67		
[0327]	<212>	DNA		
[0328]	<213>	人工序列		
[0329]	<220>			
[0330]	<223>	合成序列；图3D		
[0331]	<400>	37		
[0332]	agcagccgc	cctcaatgac	tccagatact	60
[0333]	ccttctg			67
[0334]	<210>	38		
[0335]	<211>	64		
[0336]	<212>	DNA		
[0337]	<213>	人工序列		
[0338]	<220>			
[0339]	<223>	合成序列；图3D		
[0340]	<400>	38		
[0341]	agcagccgc	cctcaatgac	agataactgcc	60
[0342]	tctg			64
[0343]	<210>	39		
[0344]	<211>	66		
[0345]	<212>	DNA		
[0346]	<213>	人工序列		
[0347]	<220>			
[0348]	<223>	合成序列；图3D		
[0349]	<400>	39		
[0350]	agcagccgc	cctcaatgac	tcaagatactg	60
		cctgaggcagc	cgcctgaggg	
			tctcgccac	

[0351]	cttctg	66
[0352]	<210> 40	
[0353]	<211> 55	
[0354]	<212> DNA	
[0355]	<213> 人工序列	
[0356]	<220>	
[0357]	<223> 合成序列；图3D	
[0358]	<400> 40	
[0359]	agcagccccgc cctcaactgc ctgagcagcc gcctgagggt ctggccacc ttctg	55
[0360]	<210> 41	
[0361]	<211> 62	
[0362]	<212> DNA	
[0363]	<213> 人工序列	
[0364]	<220>	
[0365]	<223> 合成序列；图3D	
[0366]	<400> 41	
[0367]	agcagccccgc ctcatgactc agatactgct gagcagccgc ctgagggtct cgccacatt	60
[0368]	ct	62
[0369]	<210> 42	
[0370]	<211> 46	
[0371]	<212> DNA	
[0372]	<213> 人工序列	
[0373]	<220>	
[0374]	<223> 合成序列；图3D	
[0375]	<400> 42	
[0376]	agcagccact gcgtgagcag ccgcgtgagg gtctcgcca ccttct	46
[0377]	<210> 43	
[0378]	<211> 67	
[0379]	<212> DNA	
[0380]	<213> 人工序列	
[0381]	<220>	
[0382]	<223> 合成序列；图3D	
[0383]	<400> 43	
[0384]	agcagccccgc cctcaatgac tccgagatac tgcctgagca gccgcctgag ggtctcgccc	60
[0385]	acttct	67
[0386]	<210> 44	
[0387]	<211> 23	
[0388]	<212> DNA	
[0389]	<213> 人工序列	

[0390]	<220>	
[0391]	<223> 合成序列；图9A	
[0392]	<400> 44	
[0393]	ccgtggcctt agctgtgctc gcg	23
[0394]	<210> 45	
[0395]	<211> 23	
[0396]	<212> DNA	
[0397]	<213> 人工序列	
[0398]	<220>	
[0399]	<223> 合成序列；图12A	
[0400]	<400> 45	
[0401]	ccatgctggg catctggacc ctc	23
[0402]	<210> 46	
[0403]	<211> 23	
[0404]	<212> DNA	
[0405]	<213> 人工序列	
[0406]	<220>	
[0407]	<223> 合成序列；图14A	
[0408]	<400> 46	
[0409]	ggcggtgct acaactgggc tgg	23
[0410]	<210> 47	
[0411]	<211> 23	
[0412]	<212> DNA	
[0413]	<213> 人工序列	
[0414]	<220>	
[0415]	<223> 合成序列；图15A	
[0416]	<400> 47	
[0417]	cataaagcca tggcttgct tgg	23
[0418]	<210> 48	
[0419]	<211> 64	
[0420]	<212> DNA	
[0421]	<213> 人工序列	
[0422]	<220>	
[0423]	<223> 合成序列；图15B	
[0424]	<400> 48	
[0425]	aacaccgctc ccataaagcc atggcttgcc ttggatttca gcggcacaag gctcagctga	60
[0426]	acct	64
[0427]	<210> 49	
[0428]	<211> 59	

[0429]	<212>	DNA	
[0430]	<213>	人工序列	
[0431]	<220>		
[0432]	<223>	合成序列；图15B	
[0433]	<400>	49	
[0434]	aacaccgctc ccataatggc ttgccttgga tttcagcggc acaaggctca gctgaacct		59
[0435]	<210>	50	
[0436]	<211>	62	
[0437]	<212>	DNA	
[0438]	<213>	人工序列	
[0439]	<220>		
[0440]	<223>	合成序列；图15B	
[0441]	<400>	50	
[0442]	aacaccgctc ccataaccat ggcttgcctt ggatttcagc ggcacaaggc tcagctgaac		60
[0443]	ct		62
[0444]	<210>	51	
[0445]	<211>	62	
[0446]	<212>	DNA	
[0447]	<213>	人工序列	
[0448]	<220>		
[0449]	<223>	合成序列；图15B	
[0450]	<400>	51	
[0451]	aacaccgctc ccataaccat ggcttgcctt ggatttcagc ggcacaaggc tcagctgaac		60
[0452]	ct		62
[0453]	<210>	52	
[0454]	<211>	64	
[0455]	<212>	DNA	
[0456]	<213>	人工序列	
[0457]	<220>		
[0458]	<223>	合成序列；图15B	
[0459]	<400>	52	
[0460]	aacaccgctc ccataaaagtc catggcttgc cttggatttc agcggcacaa ggctcagctg		60
[0461]	aacc		64
[0462]	<210>	53	
[0463]	<211>	63	
[0464]	<212>	DNA	
[0465]	<213>	人工序列	
[0466]	<220>		
[0467]	<223>	合成序列；图15B	

[0468]	<400>	53	
[0469]	aacaccgctc ccataaacca tggcttgct tggatttcag cggcacaagg ctcagctcaa	60	
[0470]	cct		63
[0471]	<210>	54	
[0472]	<211>	50	
[0473]	<212>	DNA	
[0474]	<213>	人工序列	
[0475]	<220>		
[0476]	<223>	合成序列；图15B	
[0477]	<400>	54	
[0478]	aacaccgctc ccataaaggg atttcagcgg cacaaggctc agctgaacct		50
[0479]	<210>	55	
[0480]	<211>	59	
[0481]	<212>	DNA	
[0482]	<213>	人工序列	
[0483]	<220>		
[0484]	<223>	合成序列；图15B	
[0485]	<400>	55	
[0486]	aacaccgctc ccataatggc ttgccttgaa tttcagcggc acaaggctca gctgaacct		59
[0487]	<210>	56	
[0488]	<211>	59	
[0489]	<212>	DNA	
[0490]	<213>	人工序列	
[0491]	<220>		
[0492]	<223>	合成序列；图15B	
[0493]	<400>	56	
[0494]	aacaccgctc ccataatggc ttgccttgaa tttcagcggc acaaggctca gctgaacct		59
[0495]	<210>	57	
[0496]	<211>	63	
[0497]	<212>	DNA	
[0498]	<213>	人工序列	
[0499]	<220>		
[0500]	<223>	合成序列；图15B	
[0501]	<400>	57	
[0502]	aacaccgctc ccataaacca tggcttgct tggatttcag cggcacaagg ctcagctcaa	60	
[0503]	cct		63
[0504]	<210>	58	
[0505]	<211>	61	
[0506]	<212>	DNA	

[0507]	<213>	人工序列	
[0508]	<220>		
[0509]	<223>	合成序列；图15B	
[0510]	<400>	58	
[0511]	aacaccgctc ccataccatg gcttgccttg gatttcagcg gcacaaggct cagctgaacc	60	
[0512]	t		61
[0513]	<210>	59	
[0514]	<211>	59	
[0515]	<212>	DNA	
[0516]	<213>	人工序列	
[0517]	<220>		
[0518]	<223>	合成序列；图15B	
[0519]	<400>	59	
[0520]	aacaccgctc ccataatggc ttgccttgaa tttcagcggc acaaggctca gctgaacct	59	
[0521]	<210>	60	
[0522]	<211>	64	
[0523]	<212>	DNA	
[0524]	<213>	人工序列	
[0525]	<220>		
[0526]	<223>	合成序列；图15B	
[0527]	<400>	60	
[0528]	aacaccgctc ccataaaagcc atggcttgcc ttggatttca gcggcacaag gctcagctga	60	
[0529]	acct		64
[0530]	<210>	61	
[0531]	<211>	23	
[0532]	<212>	DNA	
[0533]	<213>	人工序列	
[0534]	<220>		
[0535]	<223>	合成序列；图16	
[0536]	<400>	61	
[0537]	ggacatcaag cctgctaaca tgg		23
[0538]	<210>	62	
[0539]	<211>	23	
[0540]	<212>	DNA	
[0541]	<213>	人工序列	
[0542]	<220>		
[0543]	<223>	合成序列；图16	
[0544]	<400>	62	
[0545]	catcaaggct gctaacatgg agg		23

[0546]	<210>	63	
[0547]	<211>	122	
[0548]	<212>	DNA	
[0549]	<213>	人工序列	
[0550]	<220>		
[0551]	<223>	合成序列；图49	
[0552]	<220>		
[0553]	<221>	misc_特征	
[0554]	<222>	(19) .. (39)	
[0555]	<223>	n是a, c, g或t	
[0556]	<400>	63	
[0557]	taatacgact cactatagnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnng ttttagagct agaaatagca	60	
[0558]	agttaaaata aggctagtcc gttatcaact tgaaaaagtgc accggagtc ggtgctttt	120	
[0559]	tt		122
[0560]	<210>	64	
[0561]	<211>	20	
[0562]	<212>	DNA	
[0563]	<213>	人工序列	
[0564]	<220>		
[0565]	<223>	合成序列；图79A	
[0566]	<400>	64	
[0567]	ggccaggatg gttcttaggt		20
[0568]	<210>	65	
[0569]	<211>	38	
[0570]	<212>	DNA	
[0571]	<213>	人工序列	
[0572]	<220>		
[0573]	<223>	合成序列；图79B；WT	
[0574]	<400>	65	
[0575]	tggcgtggcg gccaggatgg ttcttaggtt ggtgggtt		38
[0576]	<210>	66	
[0577]	<211>	34	
[0578]	<212>	DNA	
[0579]	<213>	人工序列	
[0580]	<220>		
[0581]	<223>	合成序列；图79B	
[0582]	<400>	66	
[0583]	tggcgtggcg gccaggatgg tagtaggtt gggt		34
[0584]	<210>	67	

[0585]	<211>	37	
[0586]	<212>	DNA	
[0587]	<213>	人工序列	
[0588]	<220>		
[0589]	<223>	合成序列；图79B	
[0590]	<400>	67	
[0591]	tgggctggcg	gccaggatgg ttttaggtag gtggggt	37
[0592]	<210>	68	
[0593]	<211>	34	
[0594]	<212>	DNA	
[0595]	<213>	人工序列	
[0596]	<220>		
[0597]	<223>	合成序列；图79B	
[0598]	<400>	68	
[0599]	tgggctggcg	gccaggatgg tagtaggtg gggt	34

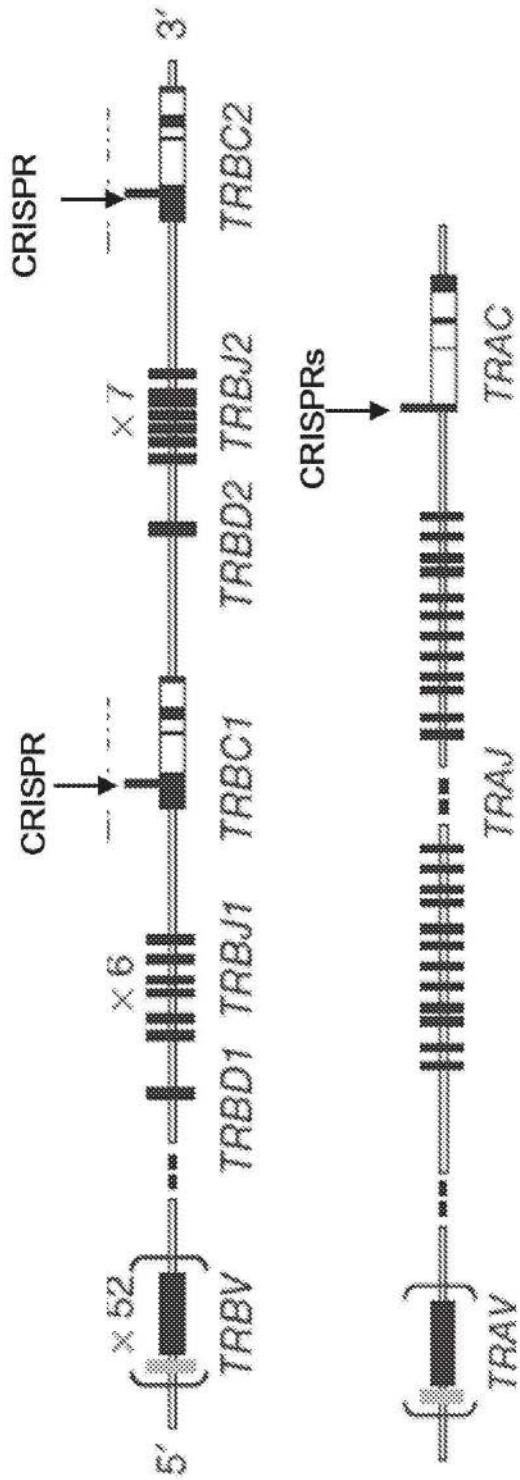


图1A

T7 启动子 * 帽 RNA + 引导RNA 支架

TTAATACGACTCACTATAGCCACCAAAAGCTGCCCTTACCG
TTTTAGAGCTAGAAATAAGCAAGTTAAATAAGGCTAGT
CCGTTATCAACTTCAAATAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCCTT
TTTTT

图1B

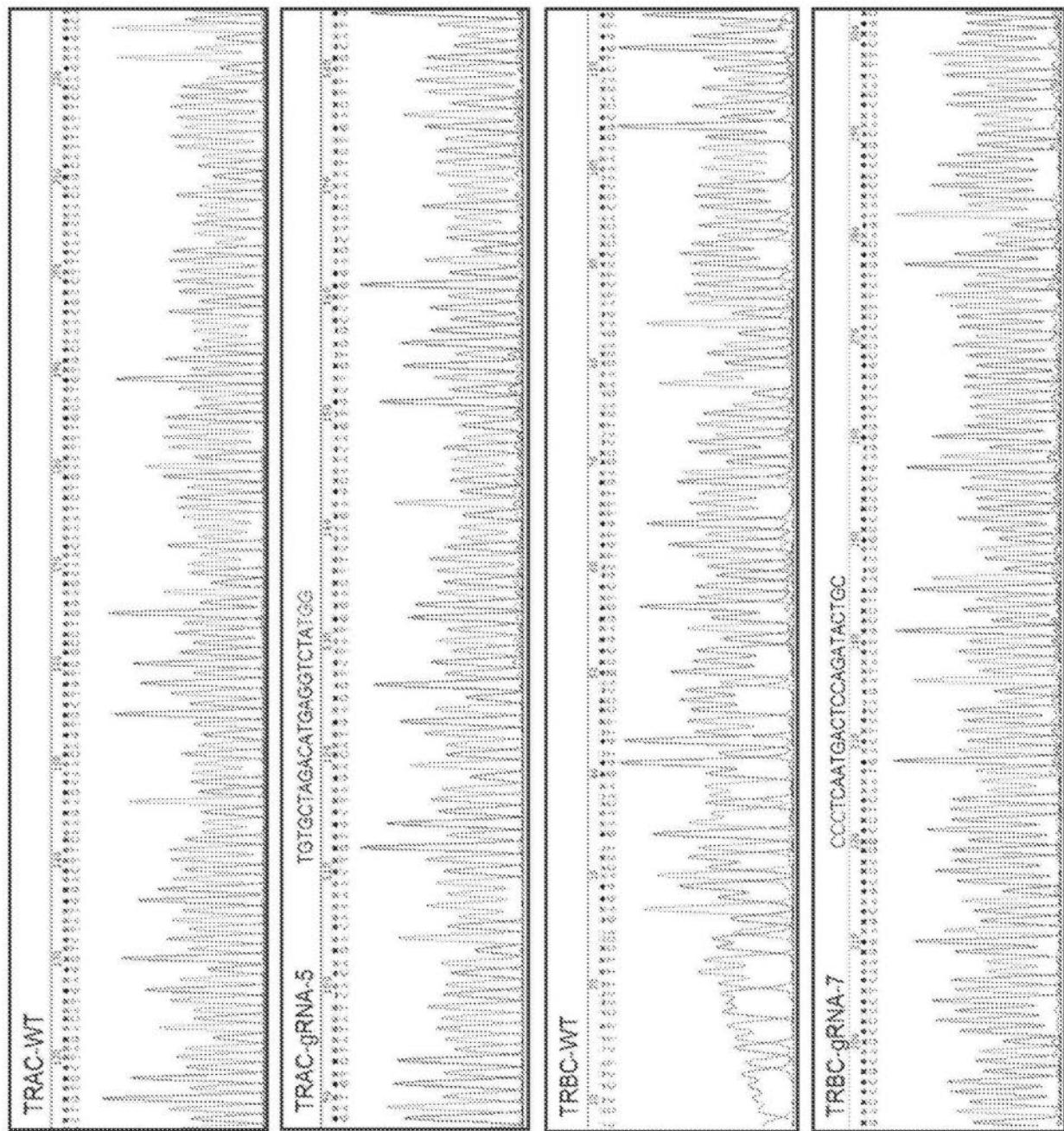


图1C

	% GFP	MFI	% 生存力	μm ³
200V/20ms	61.4	151806	31	300
200V/10ms	87.7	165419	37	280
300V/10ms	95.4	168023	23	250
360V/5ms	65.5	76453	40	320
360V/1ms	98.3	100755	82	600
400V/0.7ms	97.5	81368	87	610
500V/0.7ms	97.8	89314	80	600

图2A

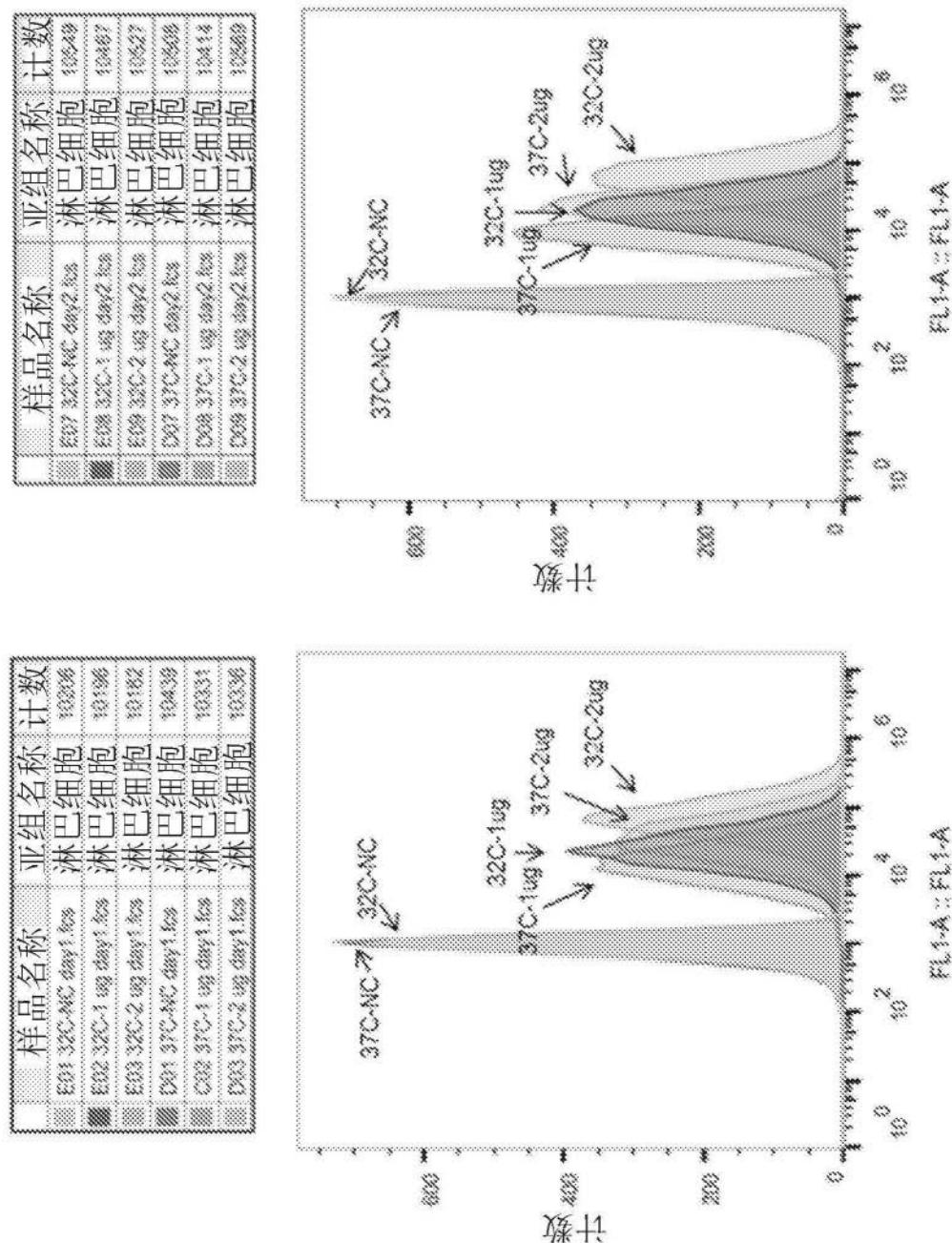


图2B

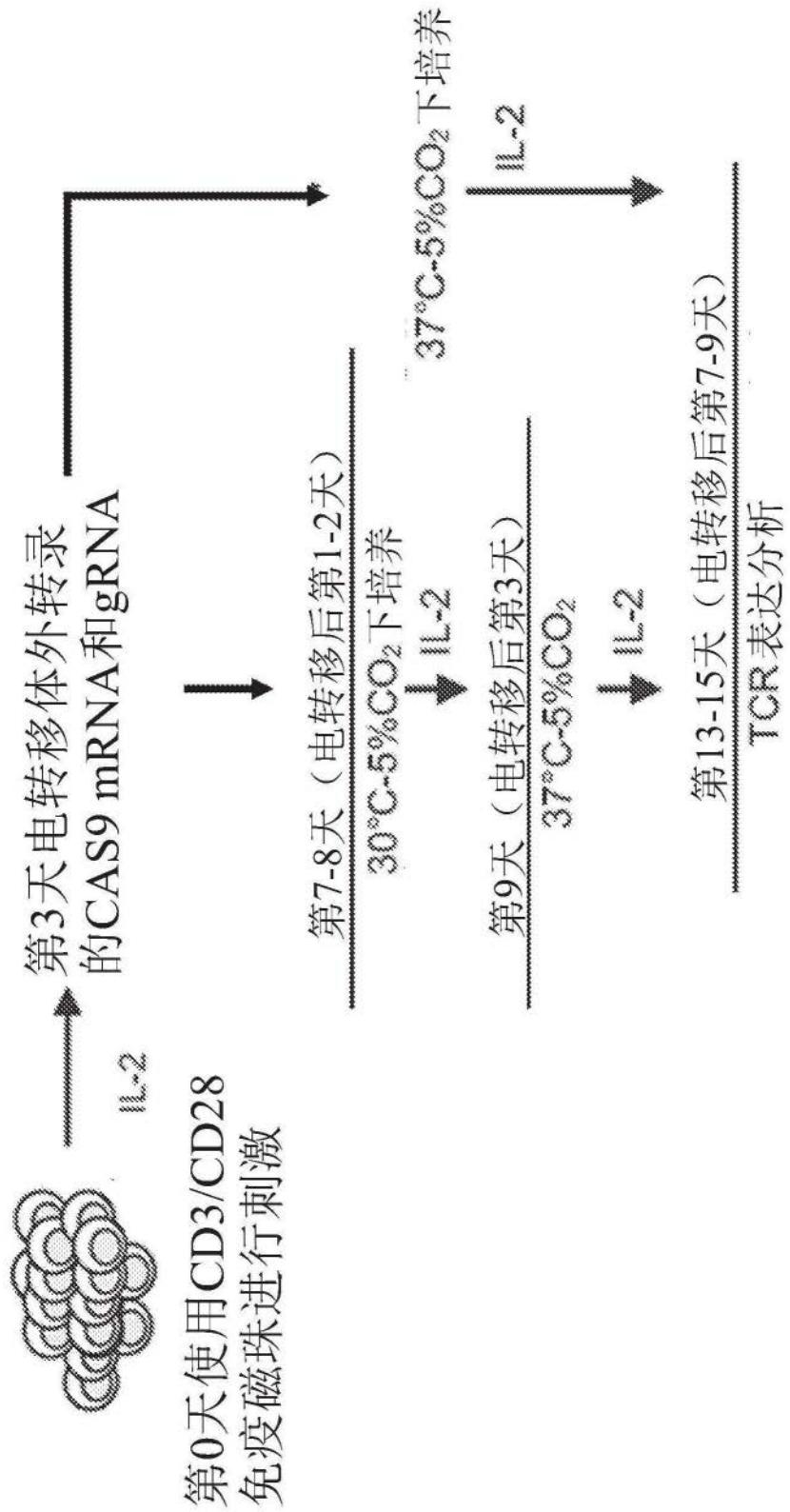


图2C

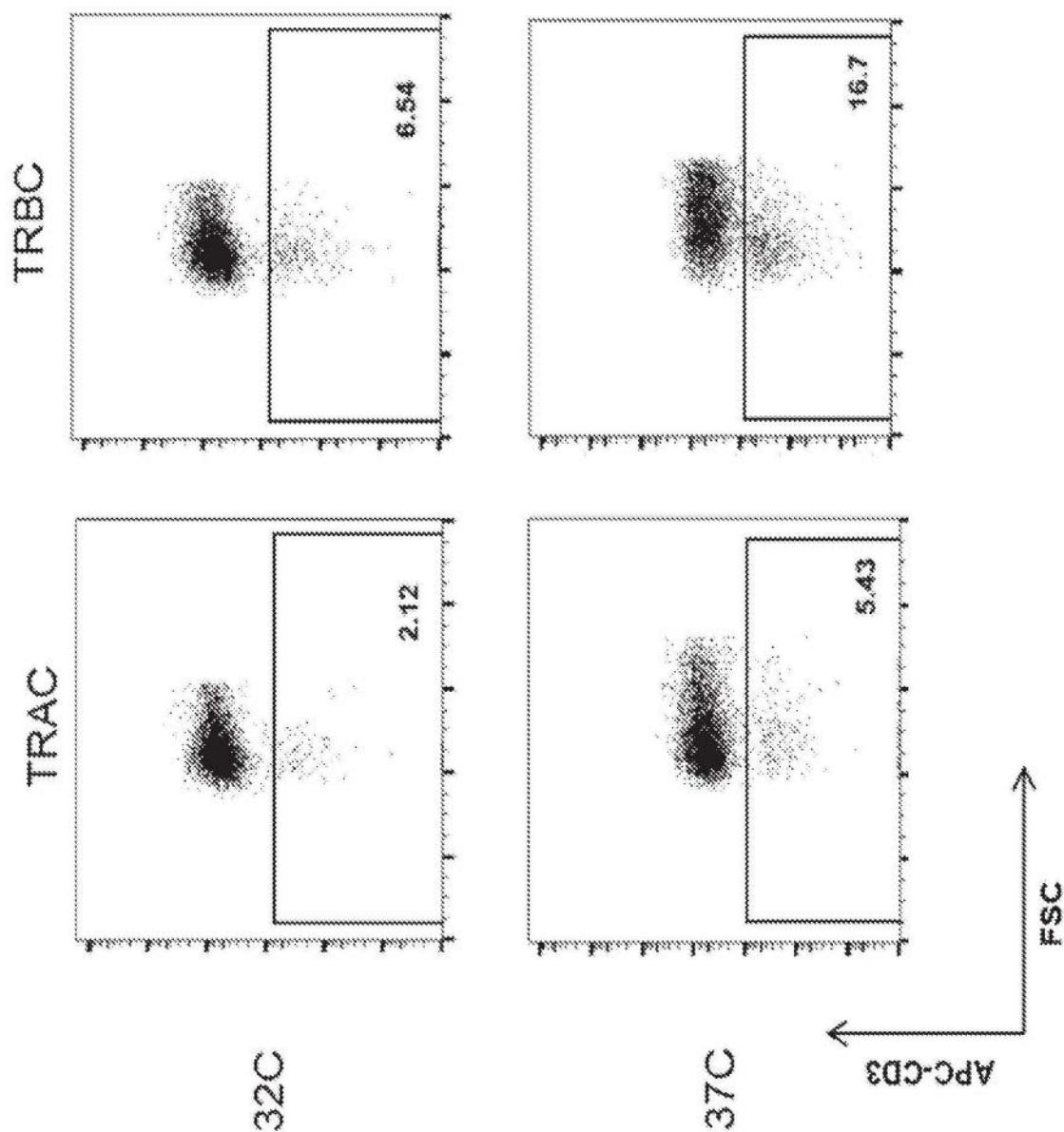


图2D

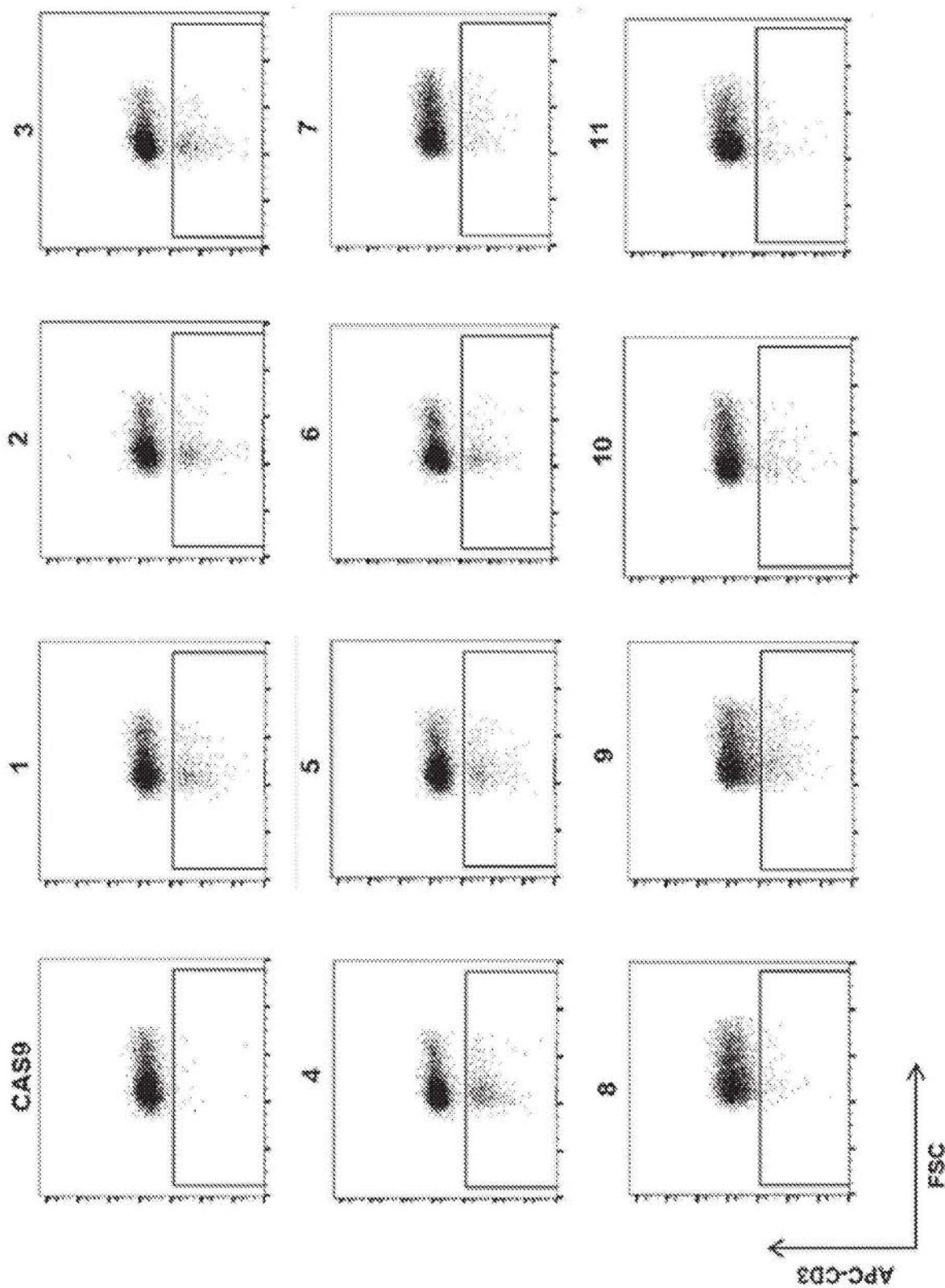


图2E

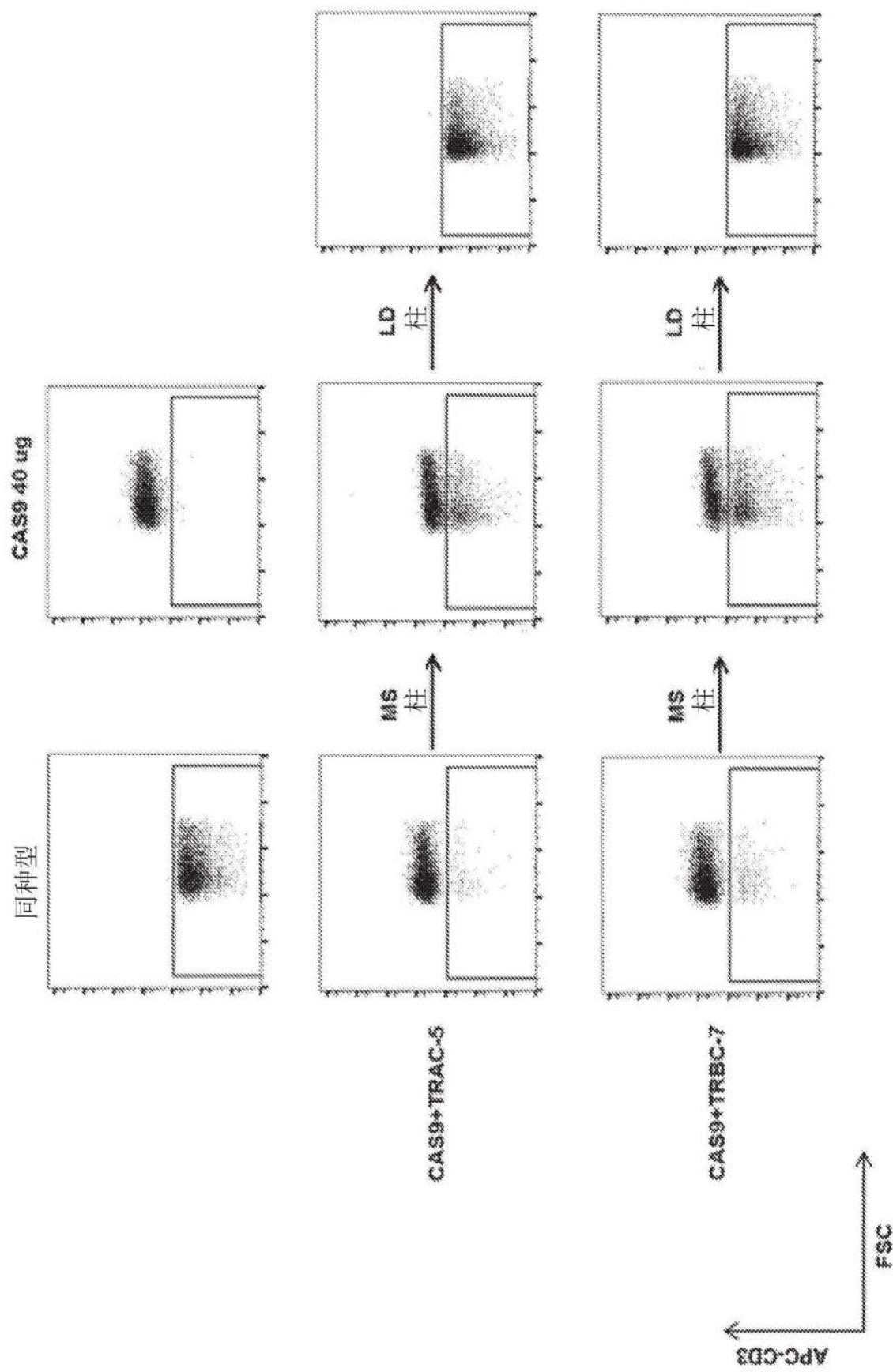


图3A

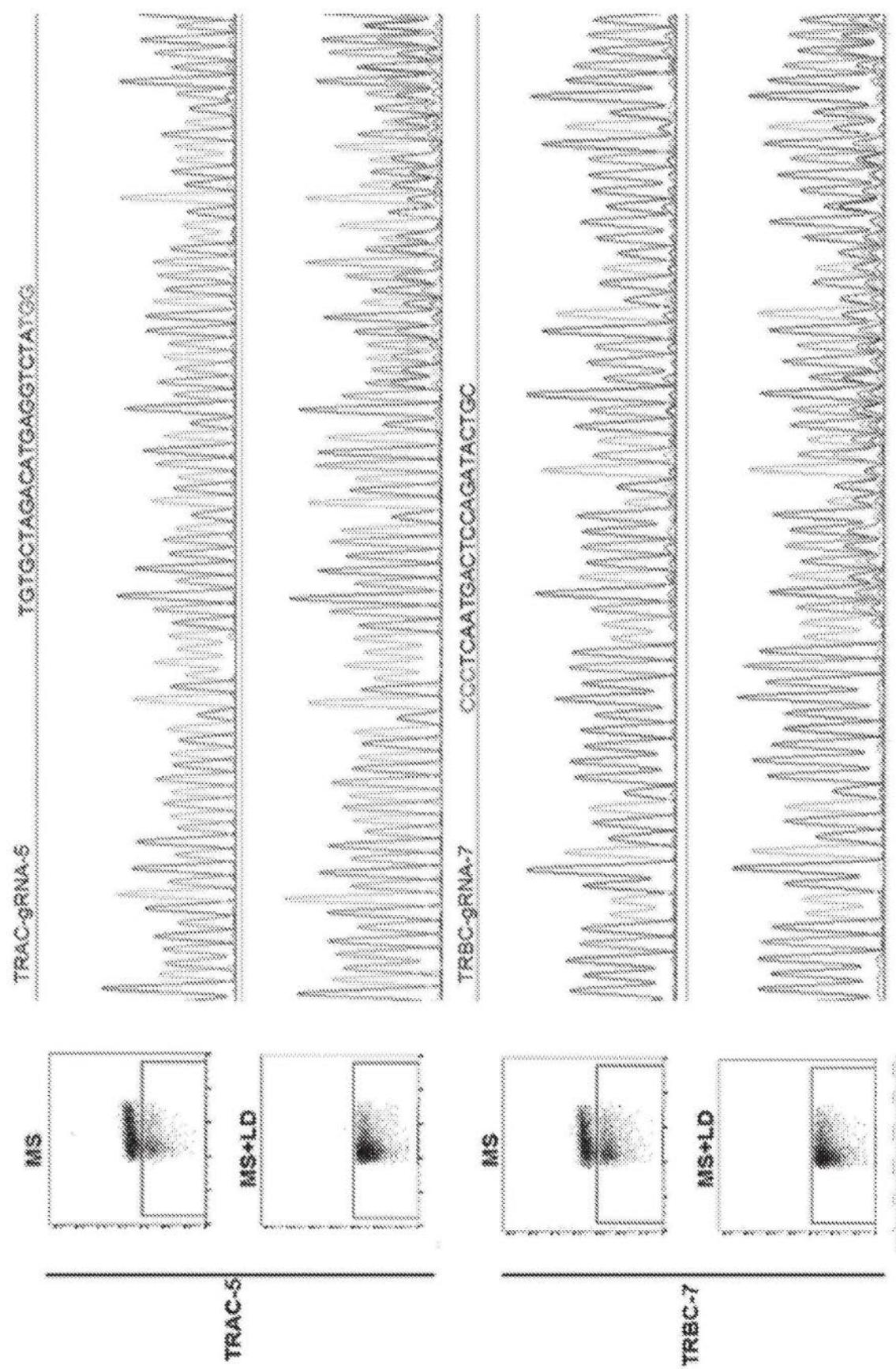


图3B

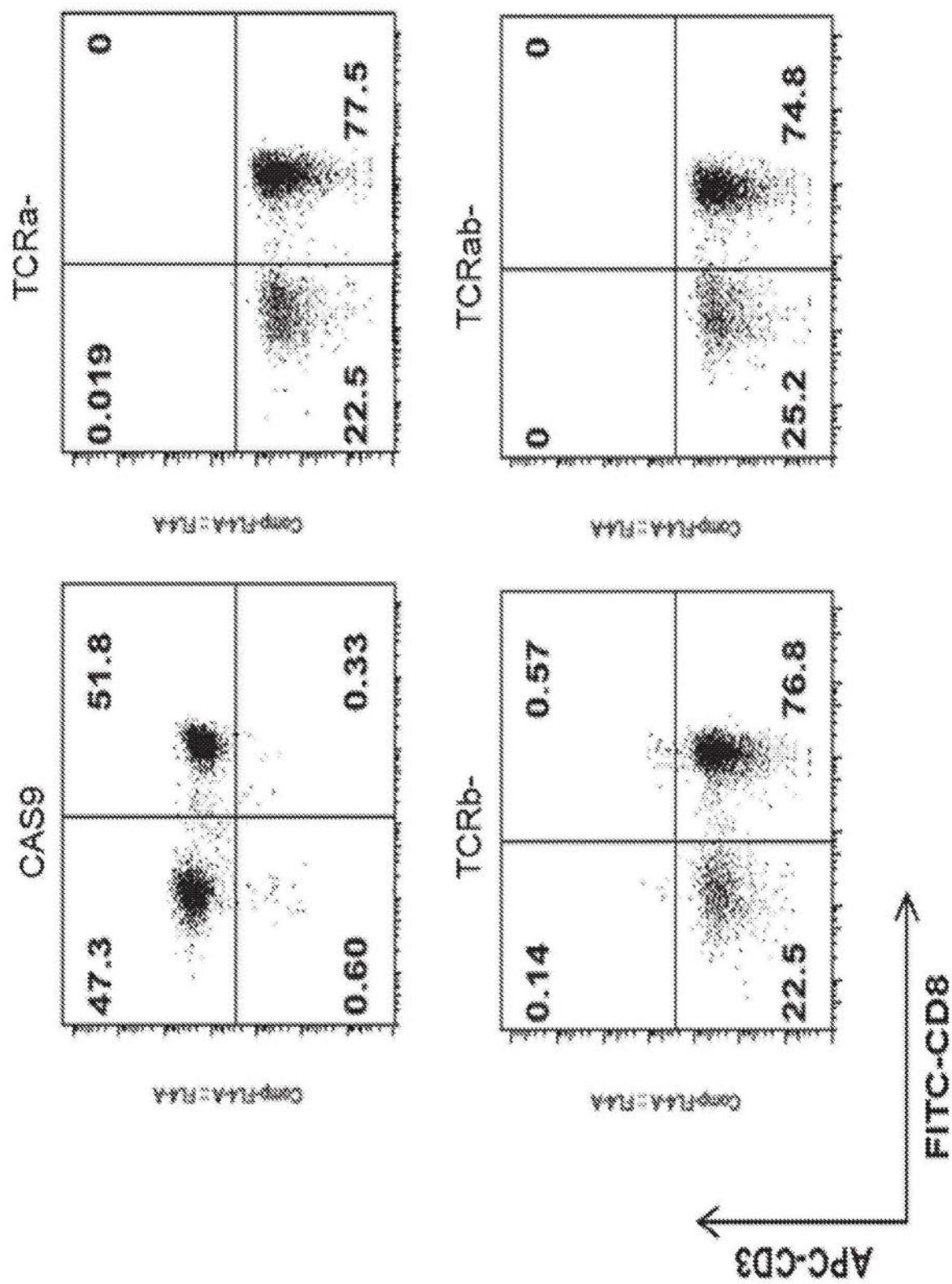


图3C

图3D

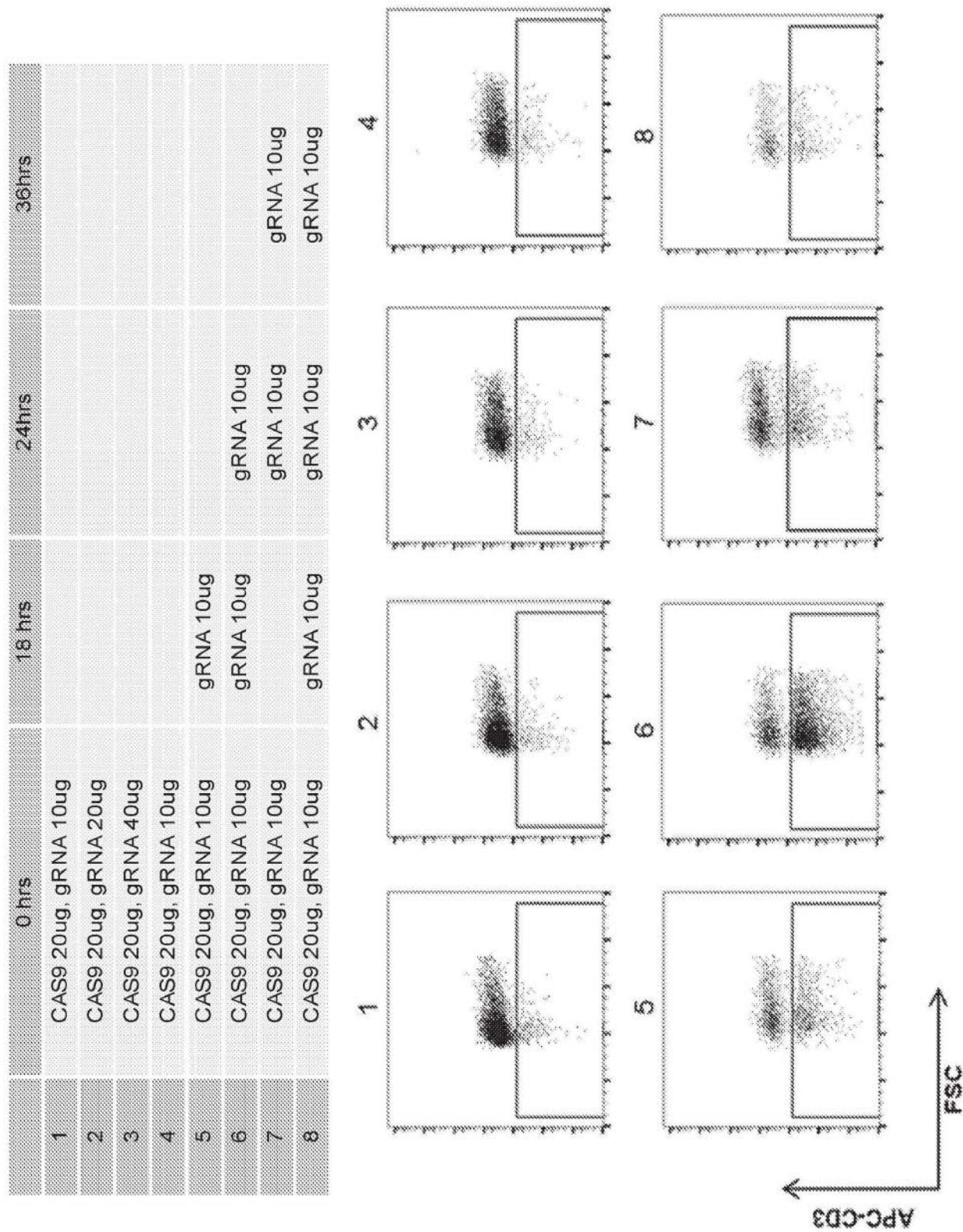


图4A

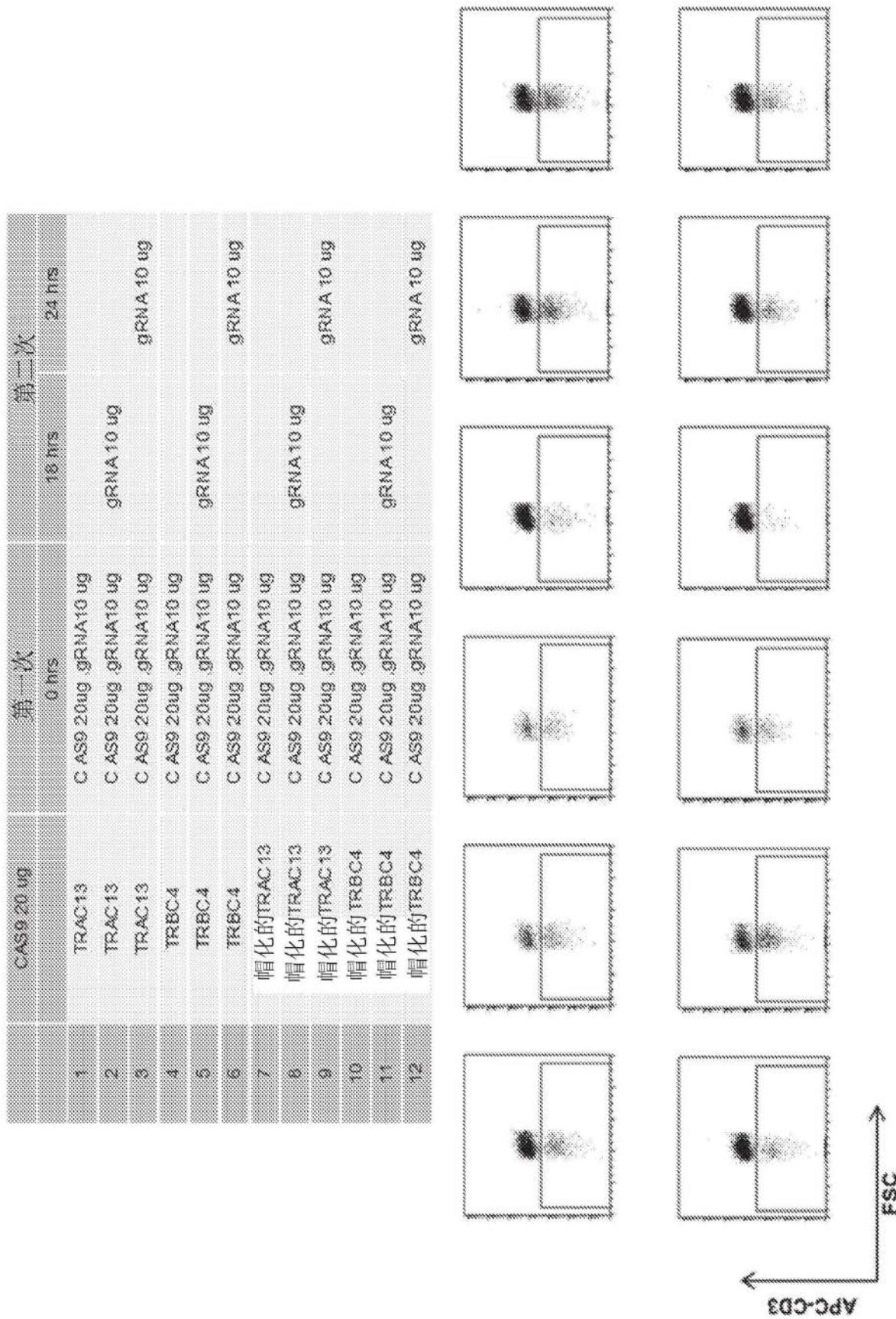


图4B

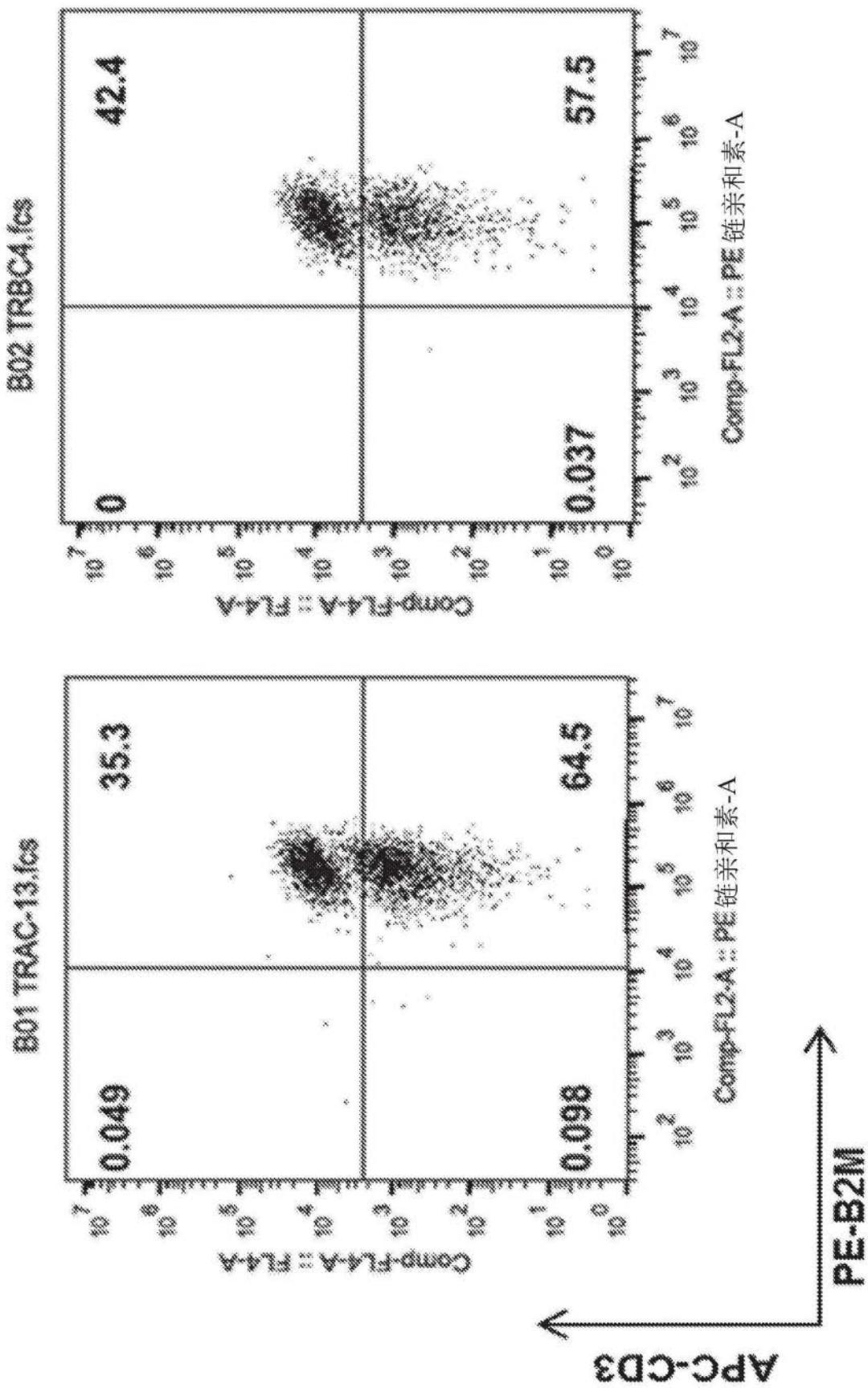


图4C

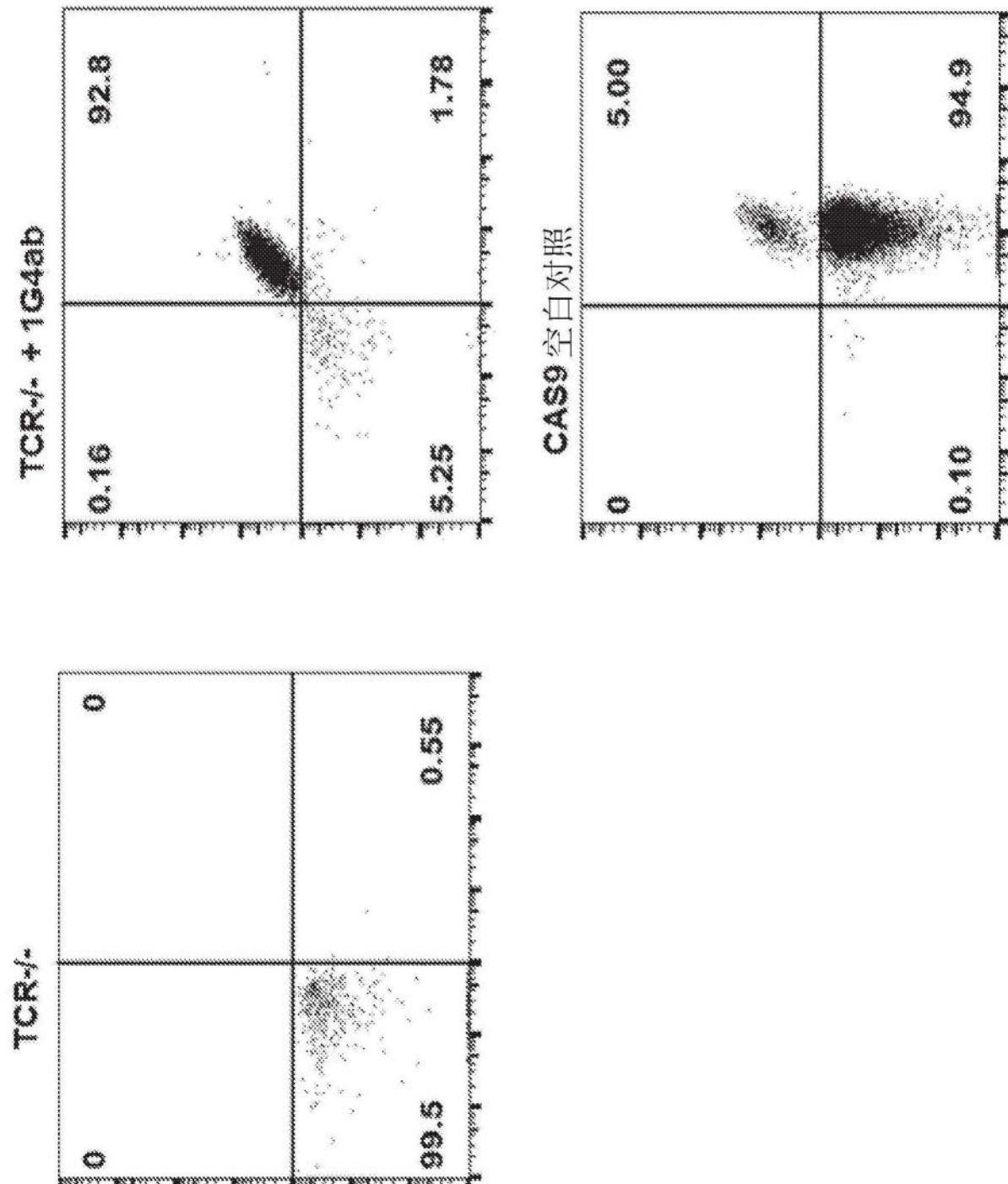


图5A

扩展倍数 组	第0天	第3天	第5天	第7天	第9天	第11天
REP		15	100	198	325	507
CD3/CD28 珠	1	2	7	14	17	25
KT/OKT3	1	2	5	18	23	40
KT/K19	2	3	7	24	36	52
KT/K19/TCR-CLEAR	3	3	8	25	42	58

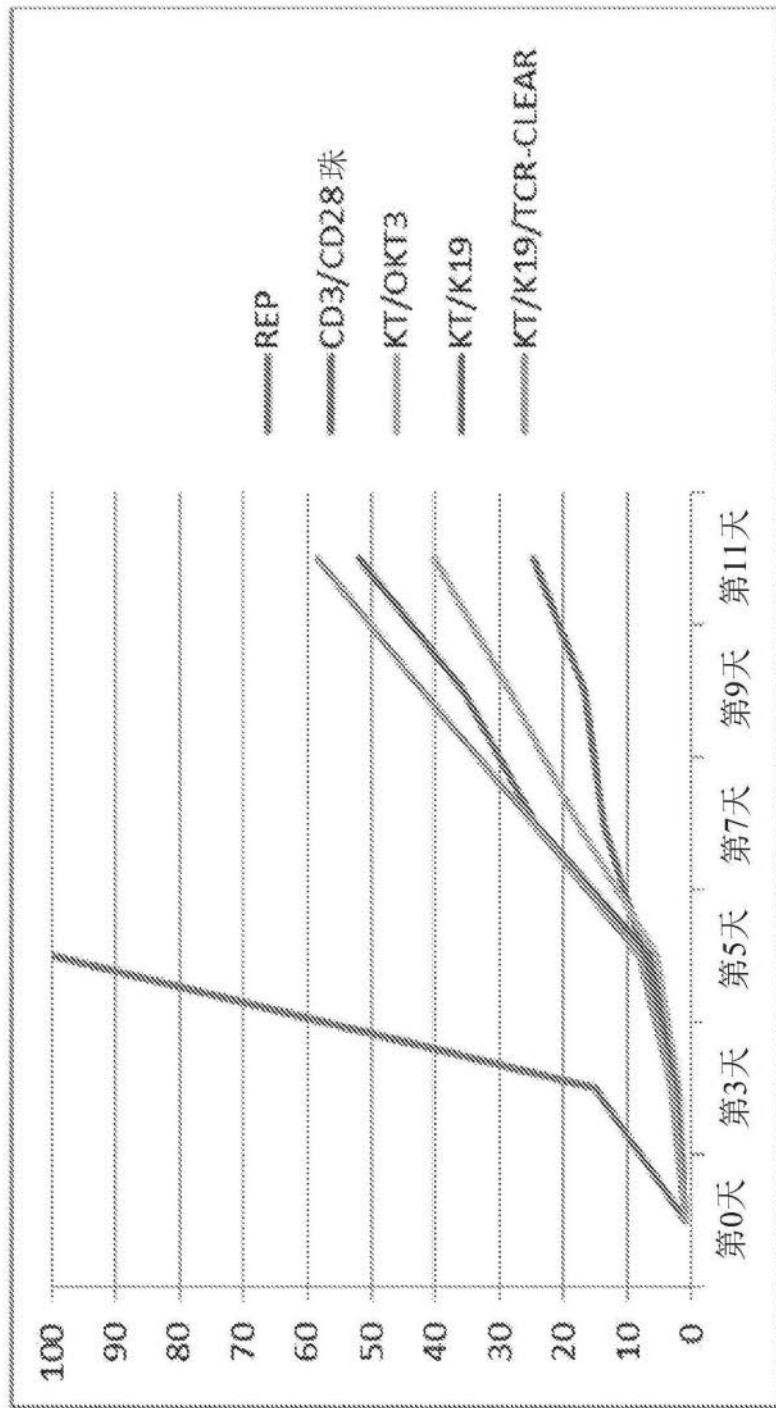


图5B

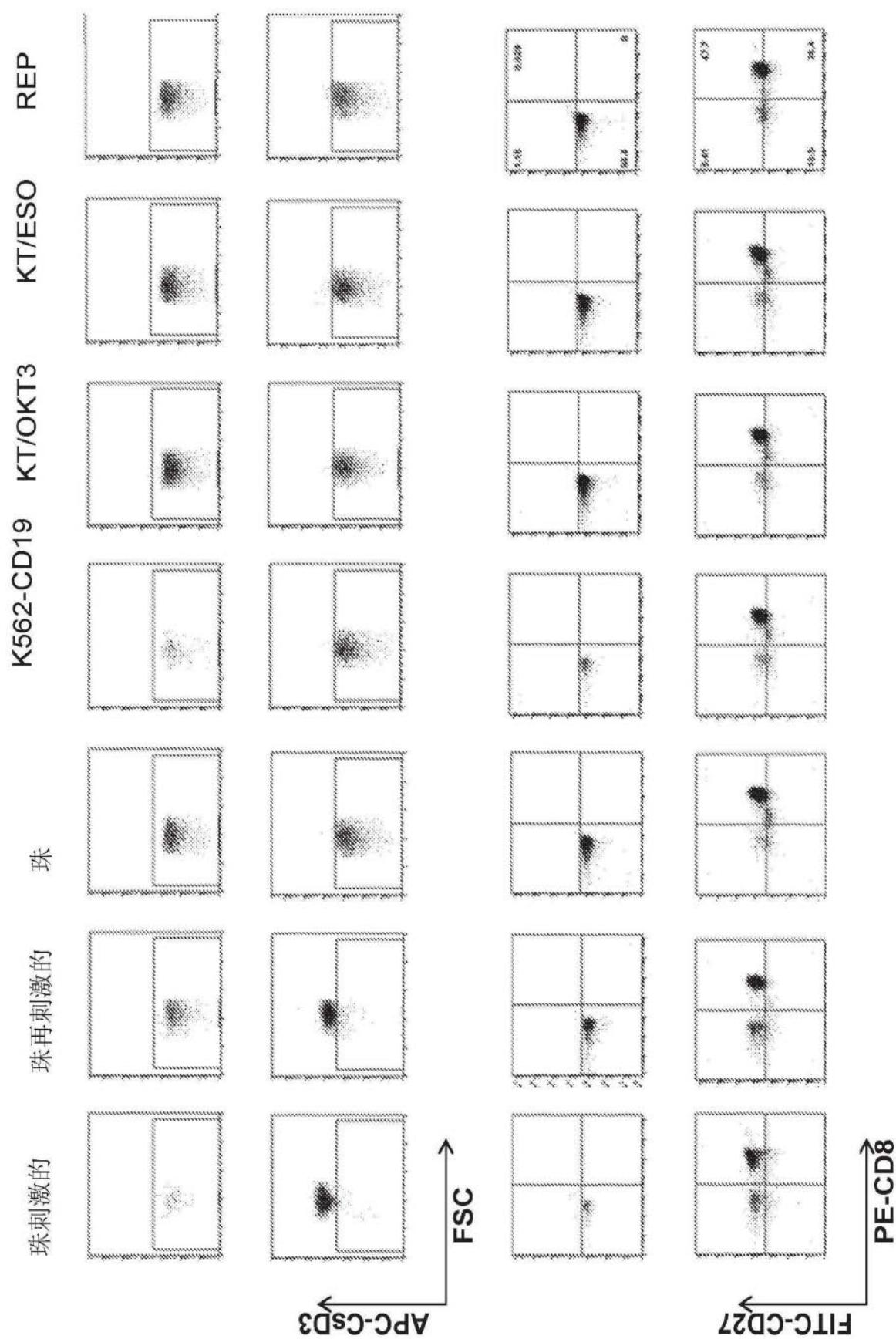


图6A

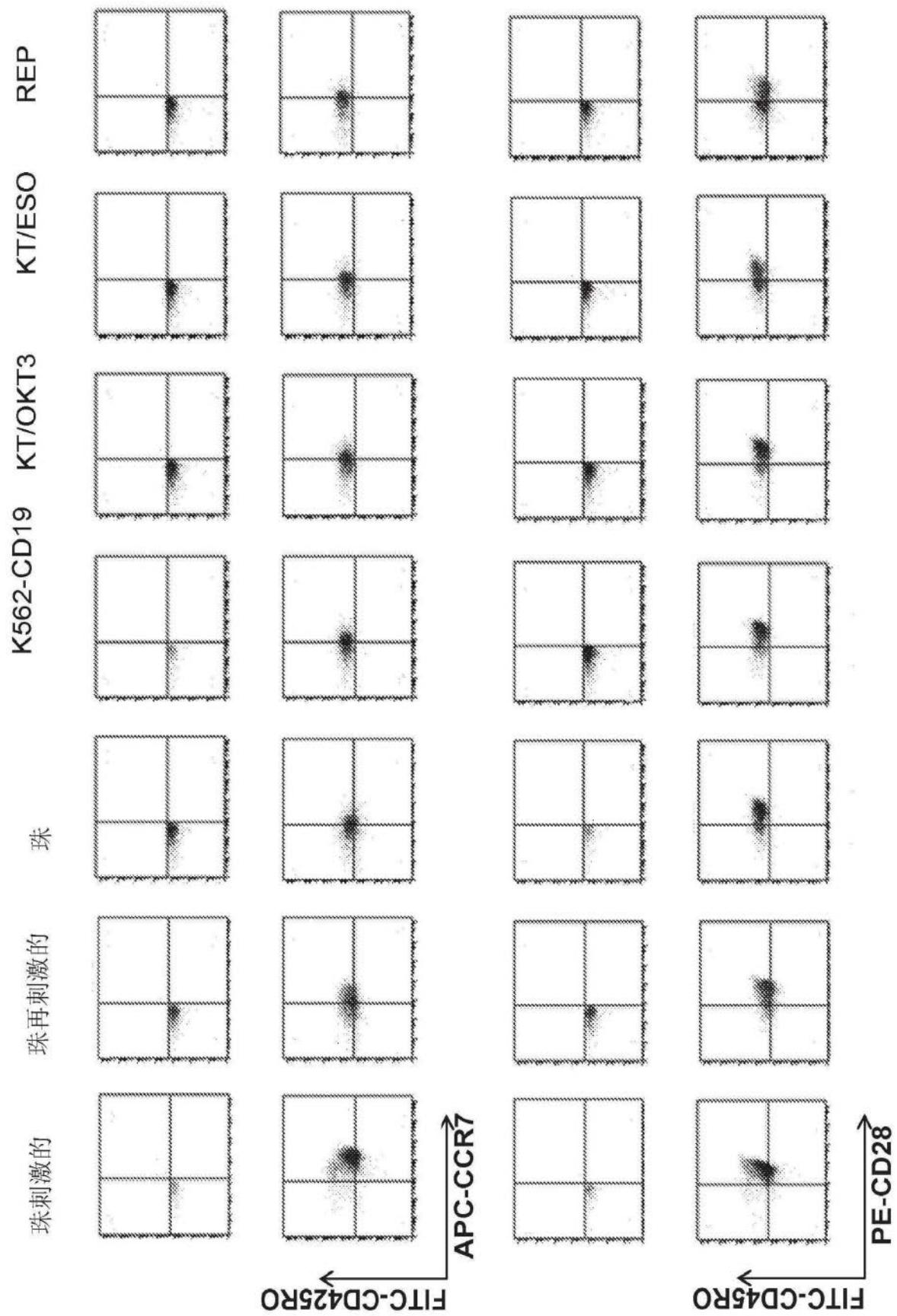


图6B

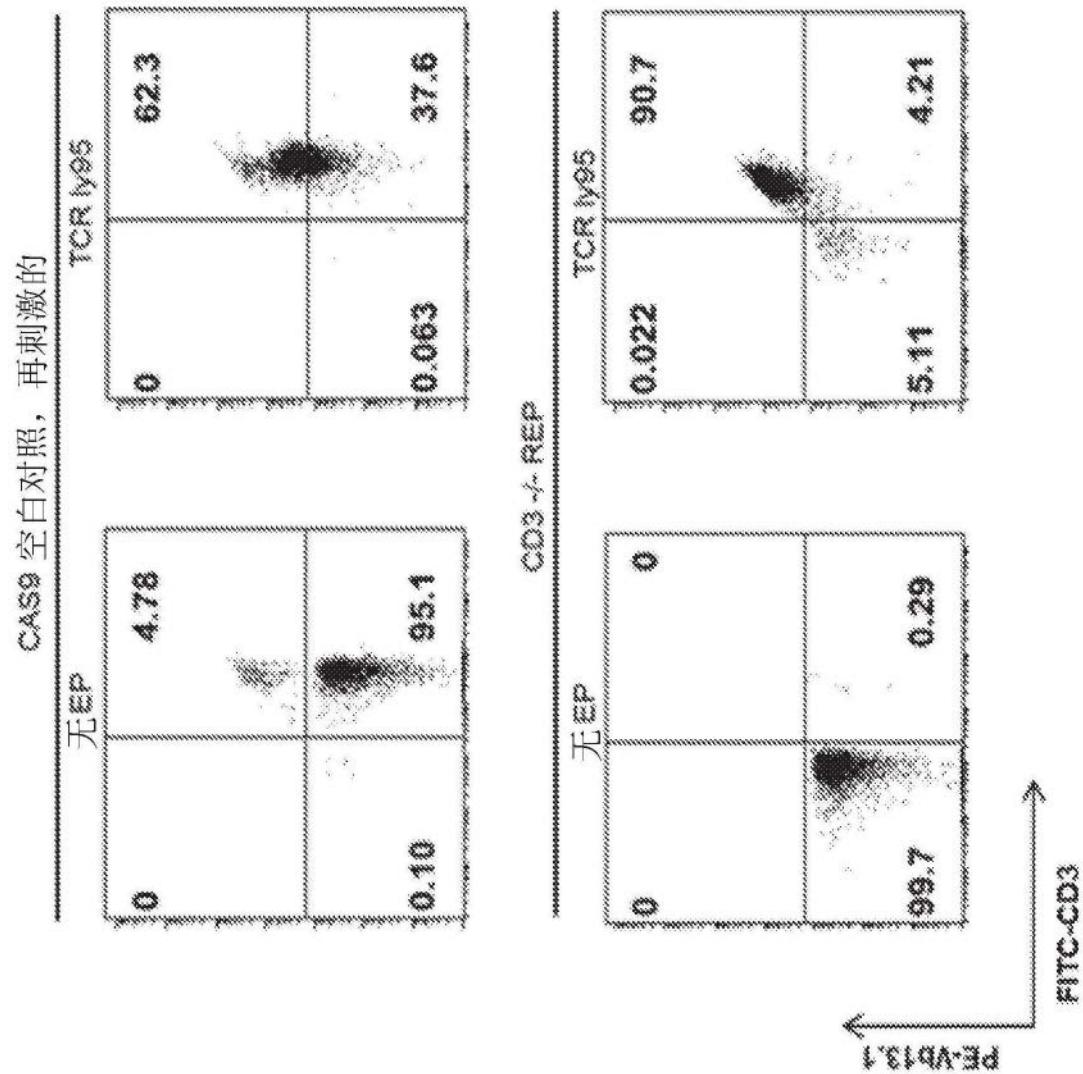


图7A

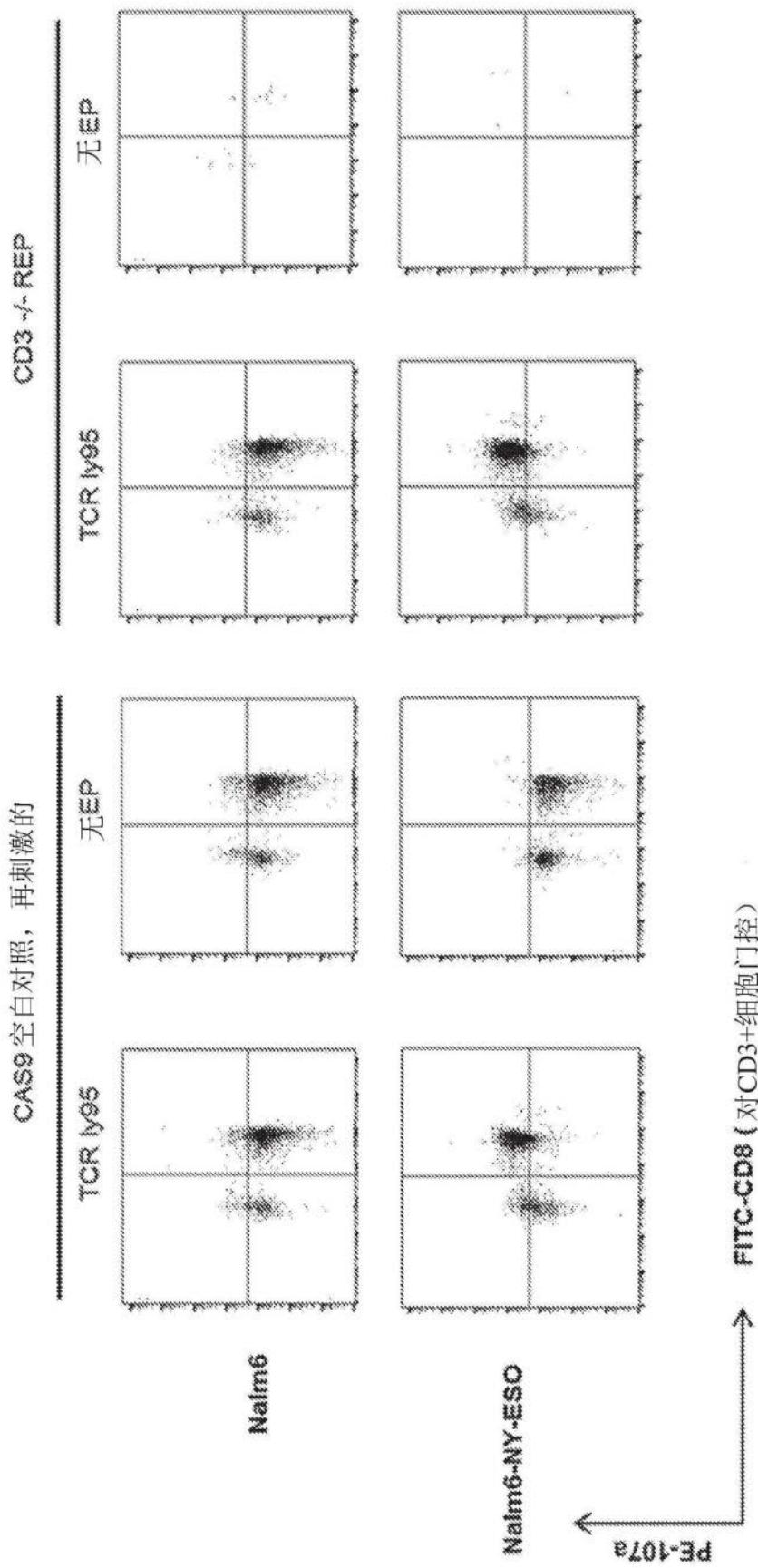


图7B

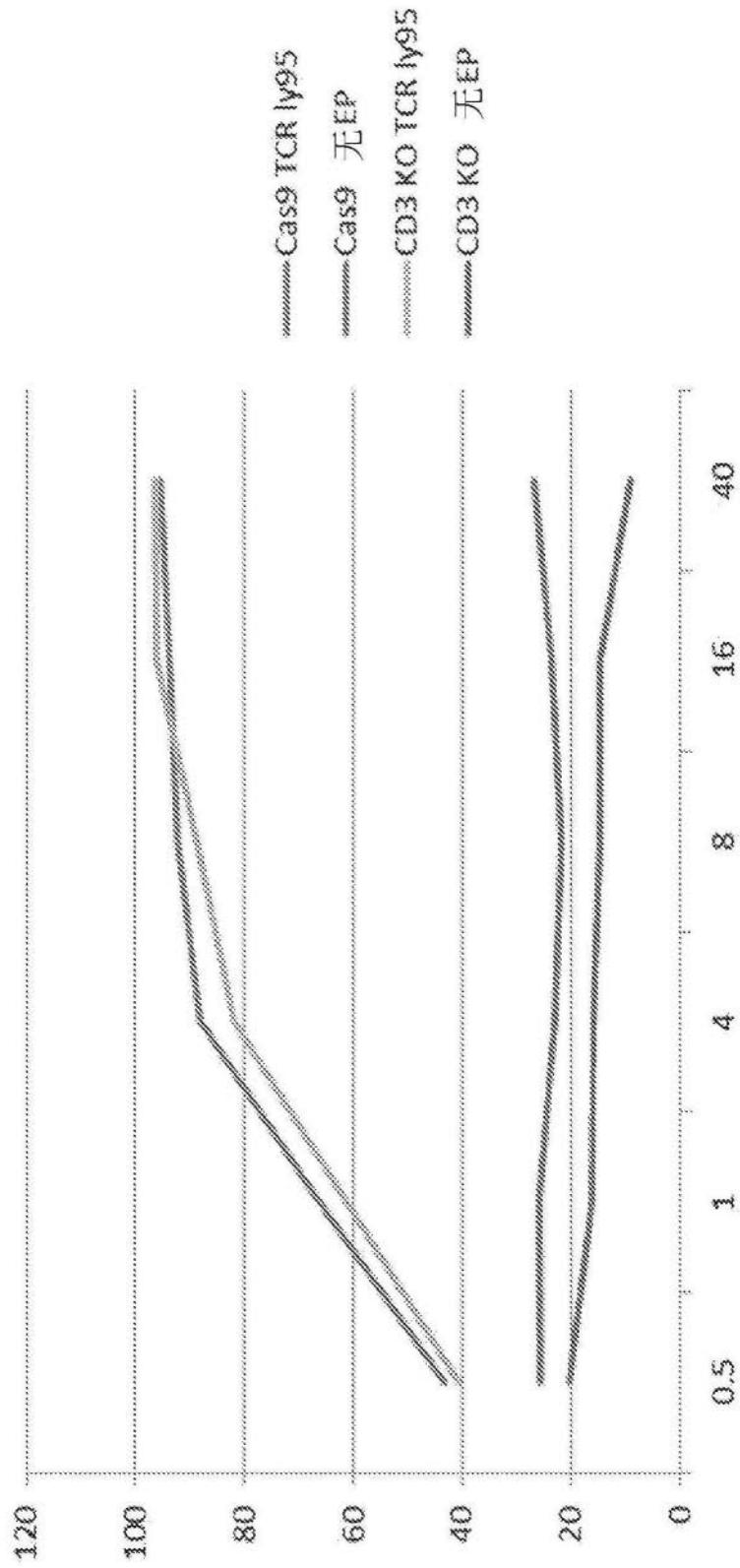


图7C

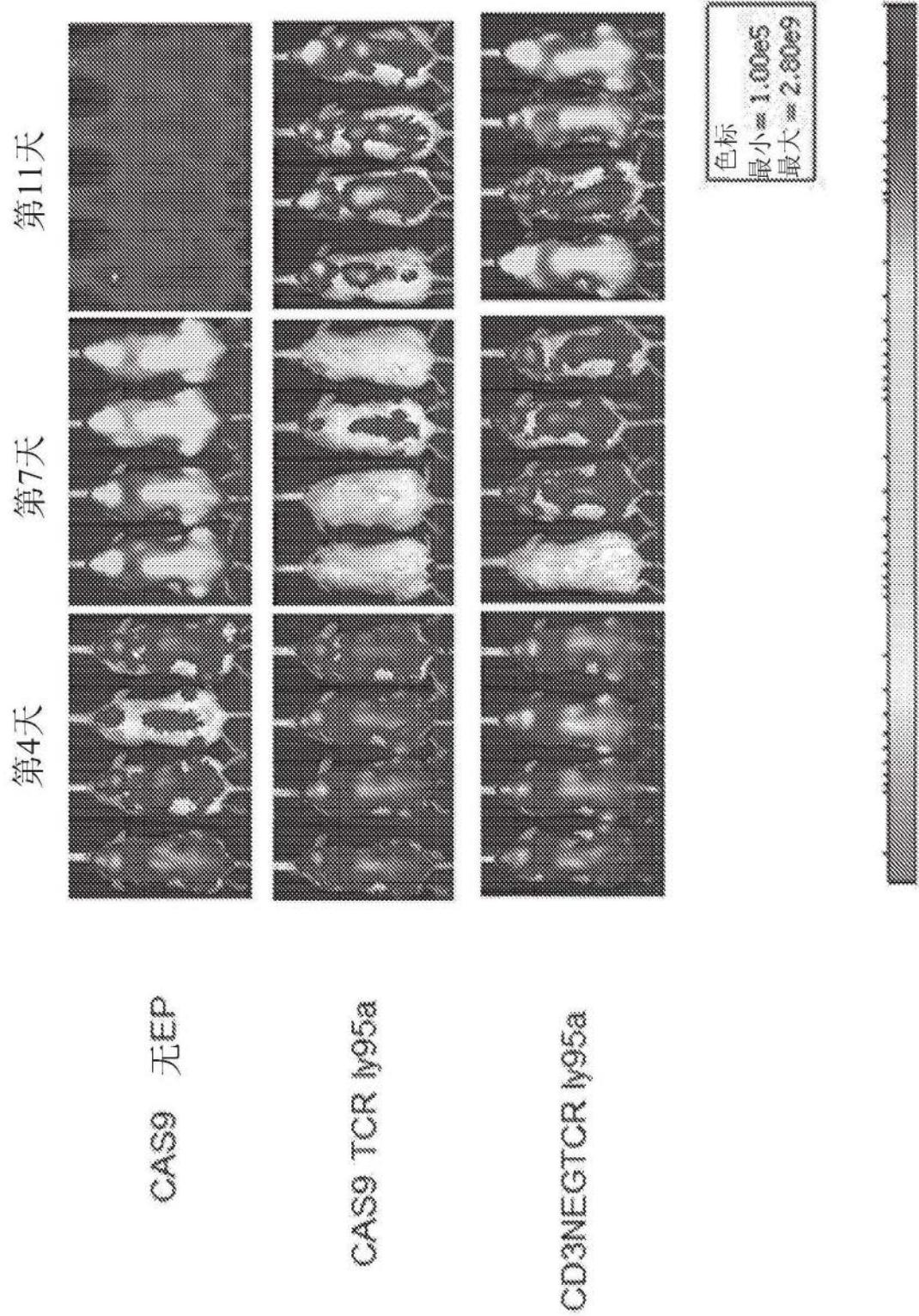


图8

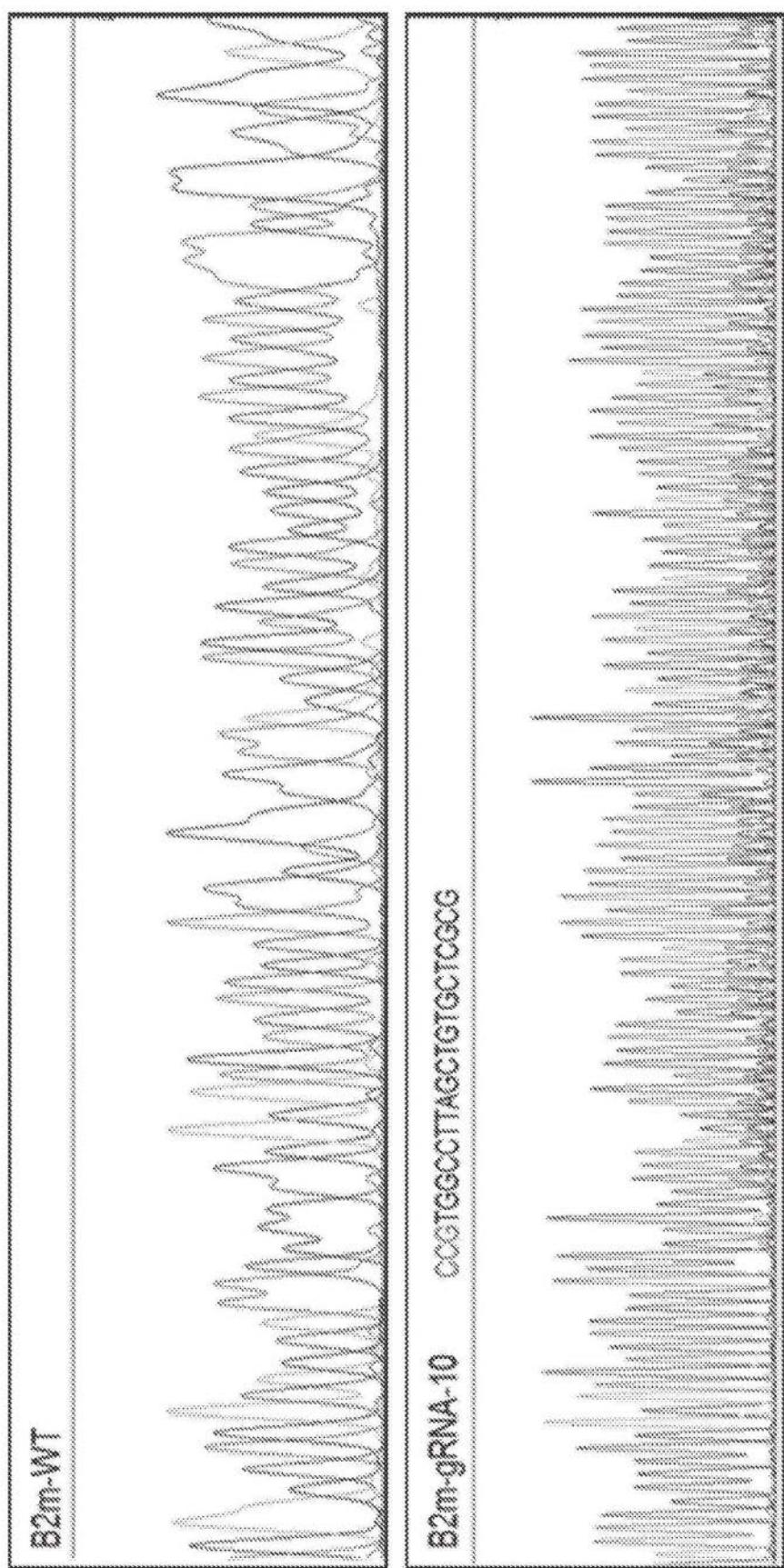


图9A

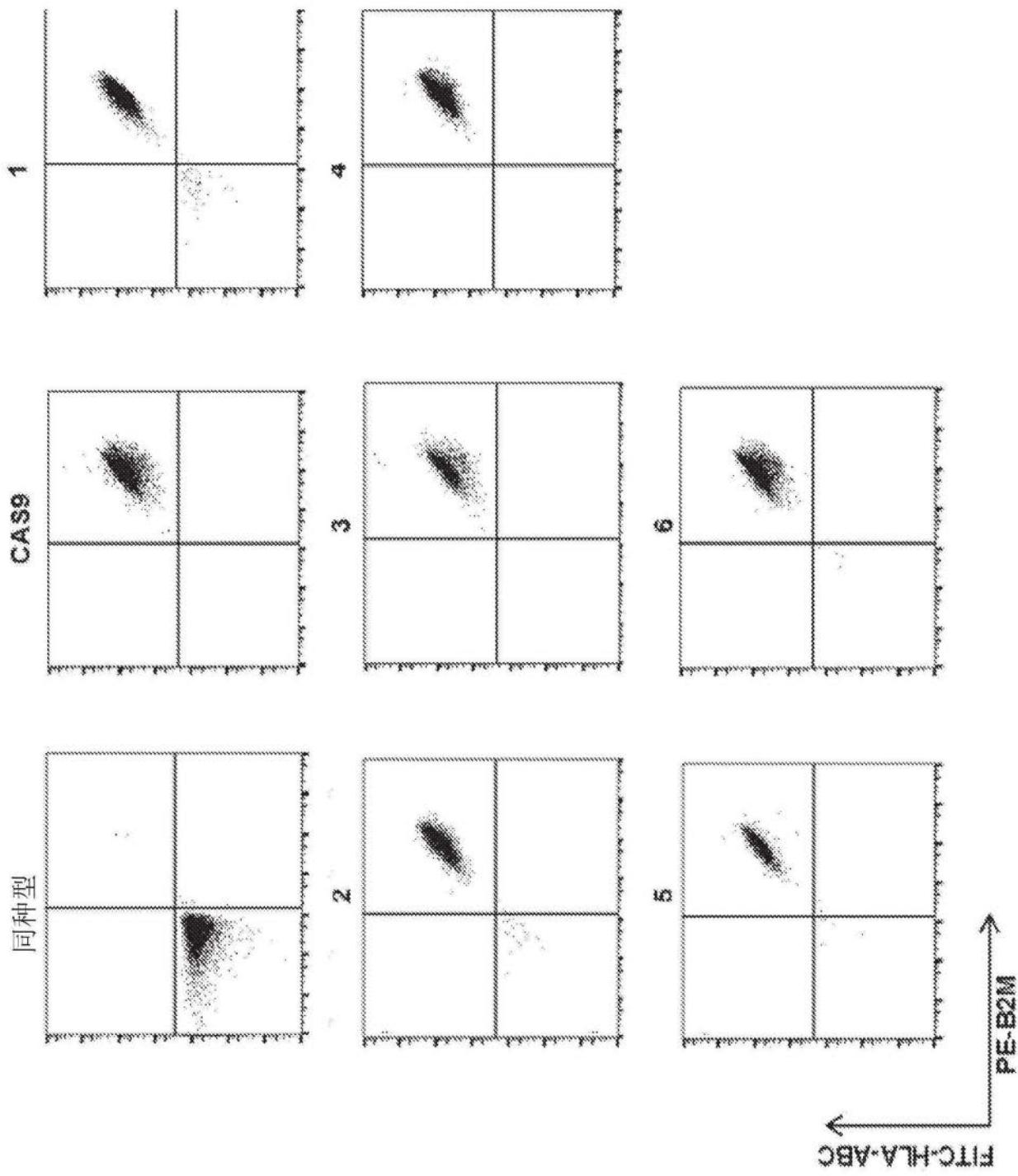


图9B

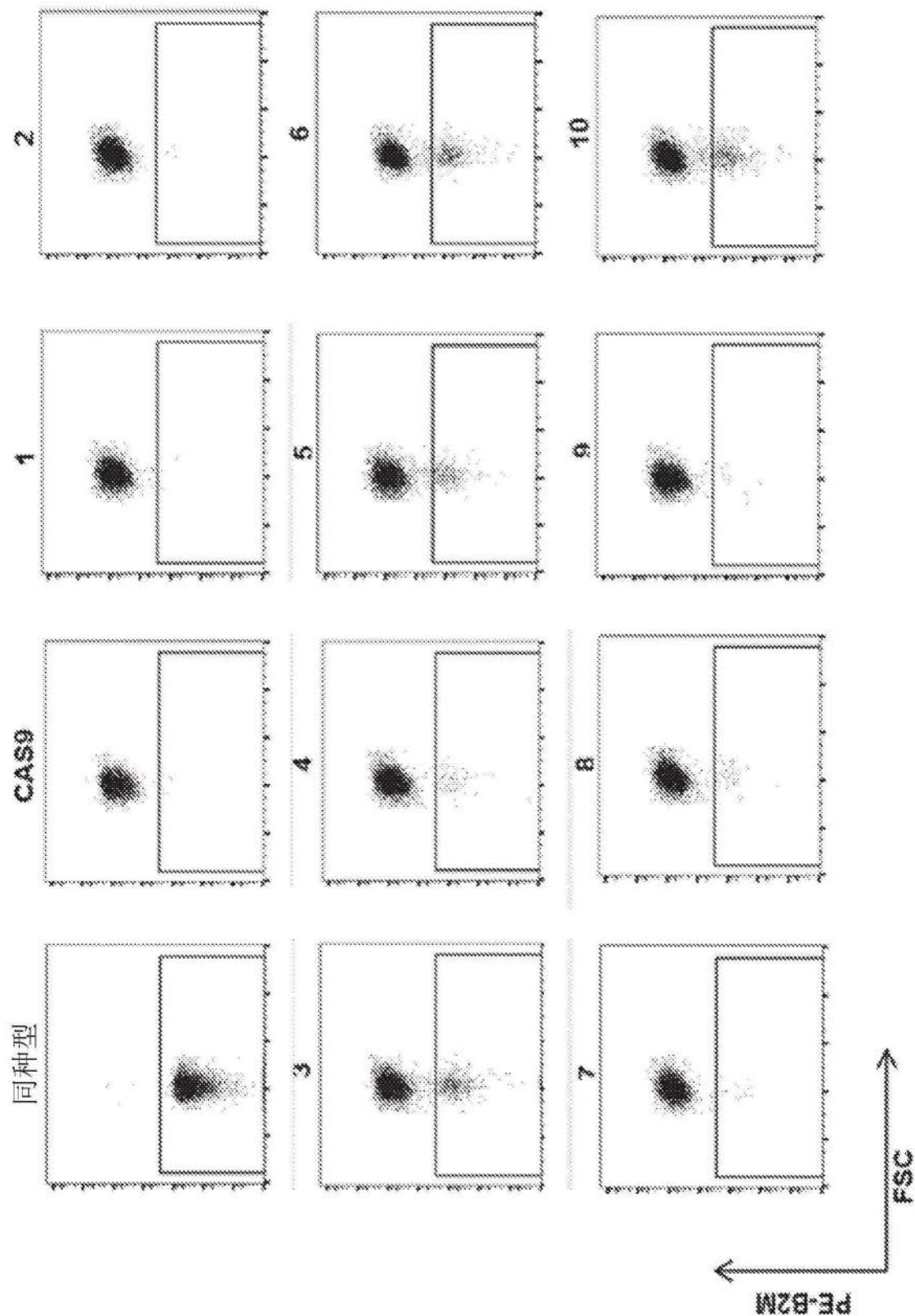


图9C

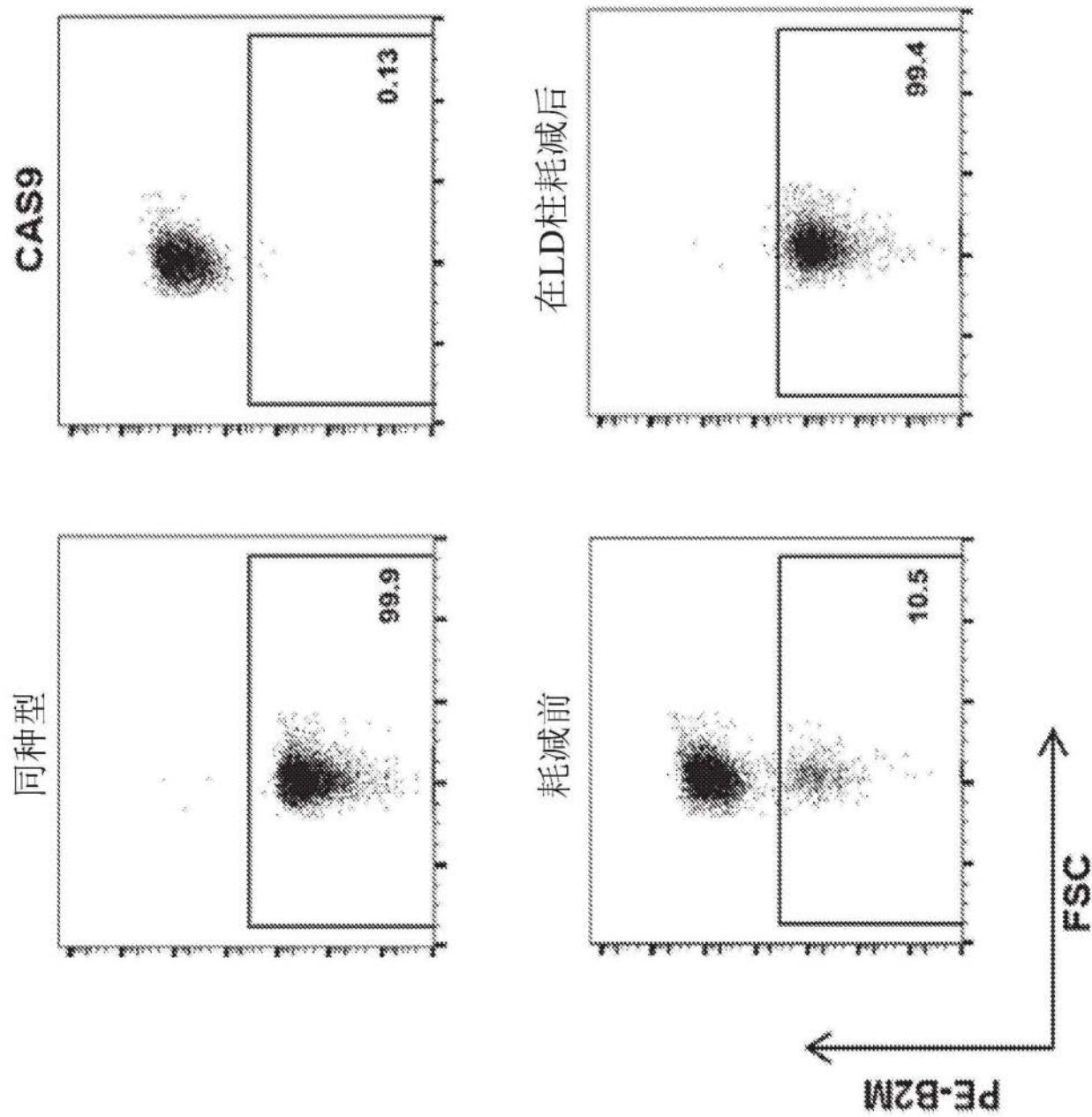


图9D

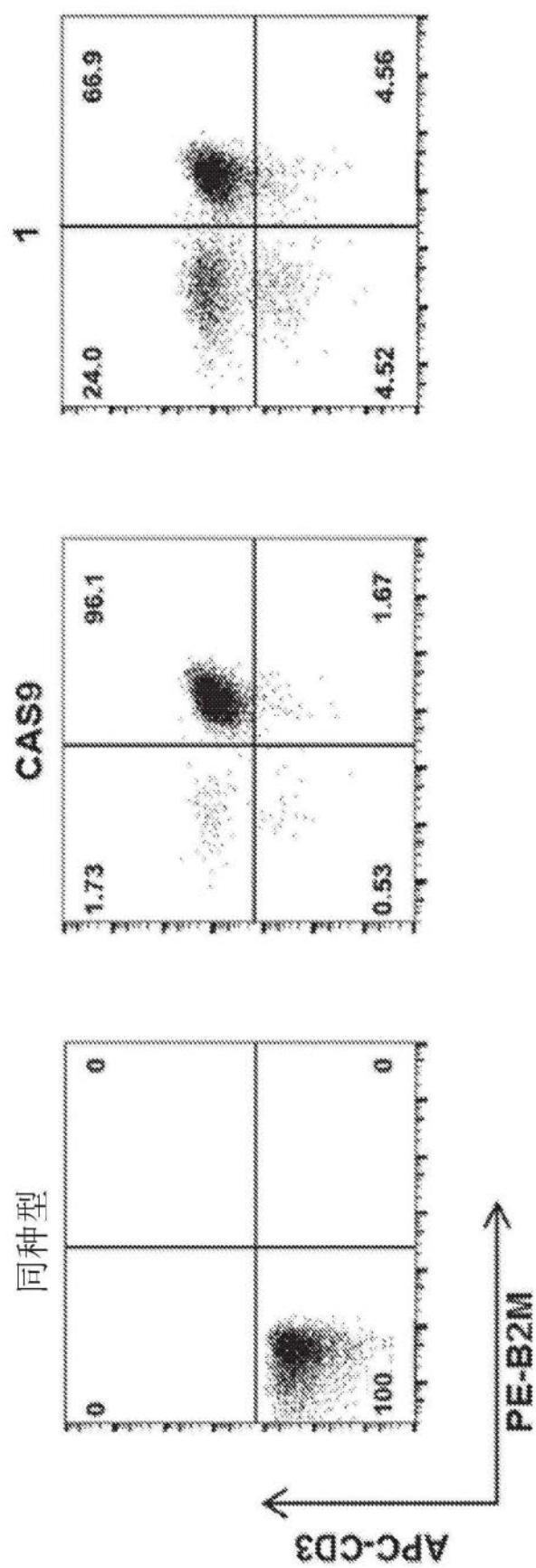


图10

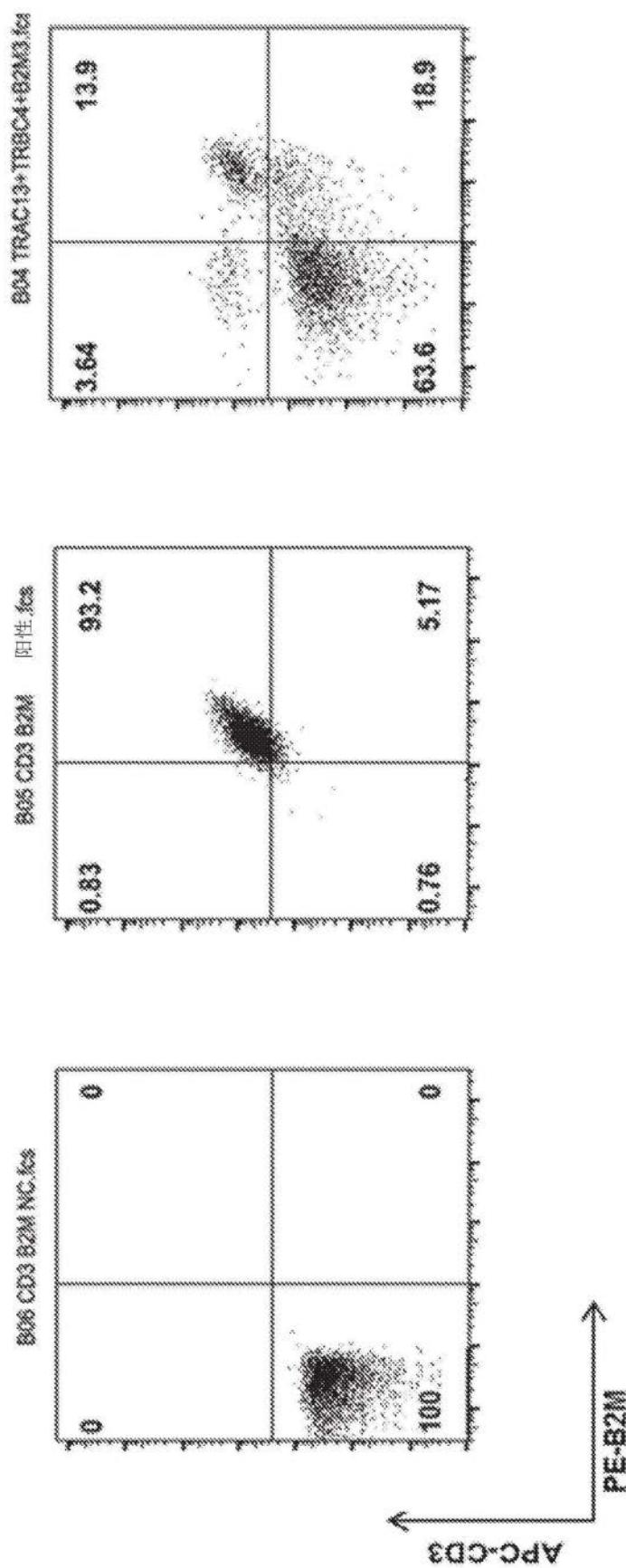


图11A

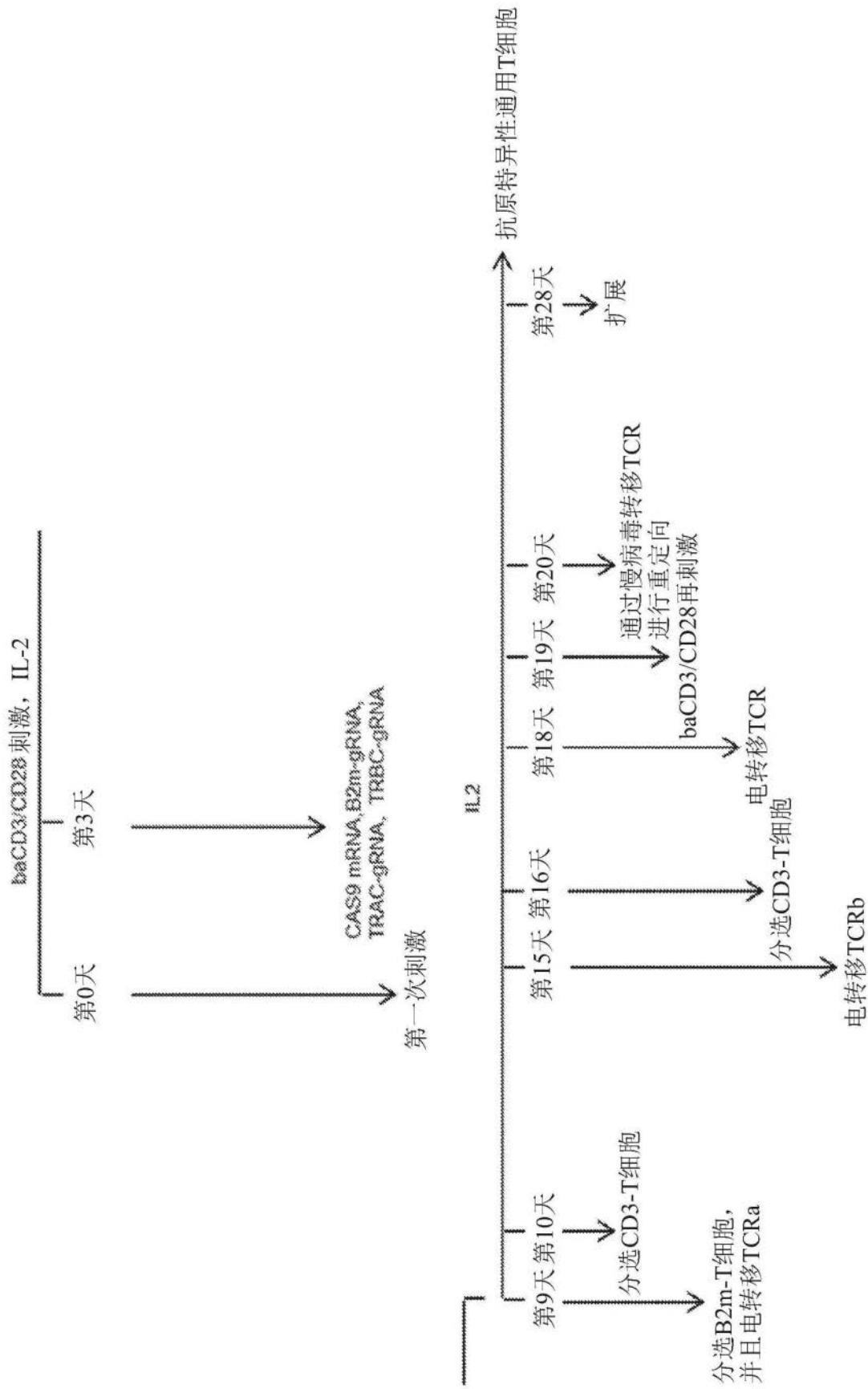


图11B

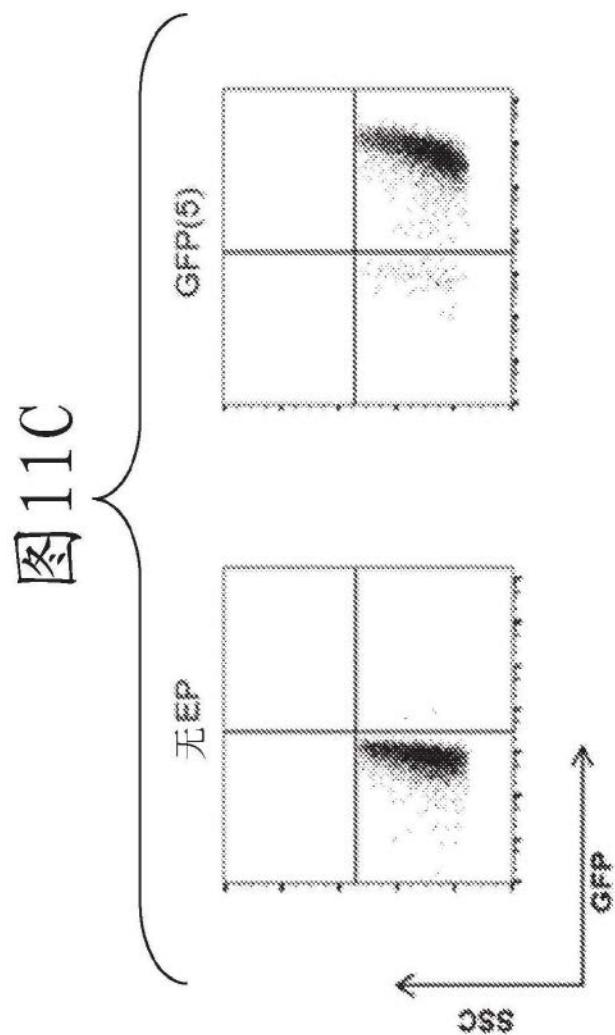


图11C

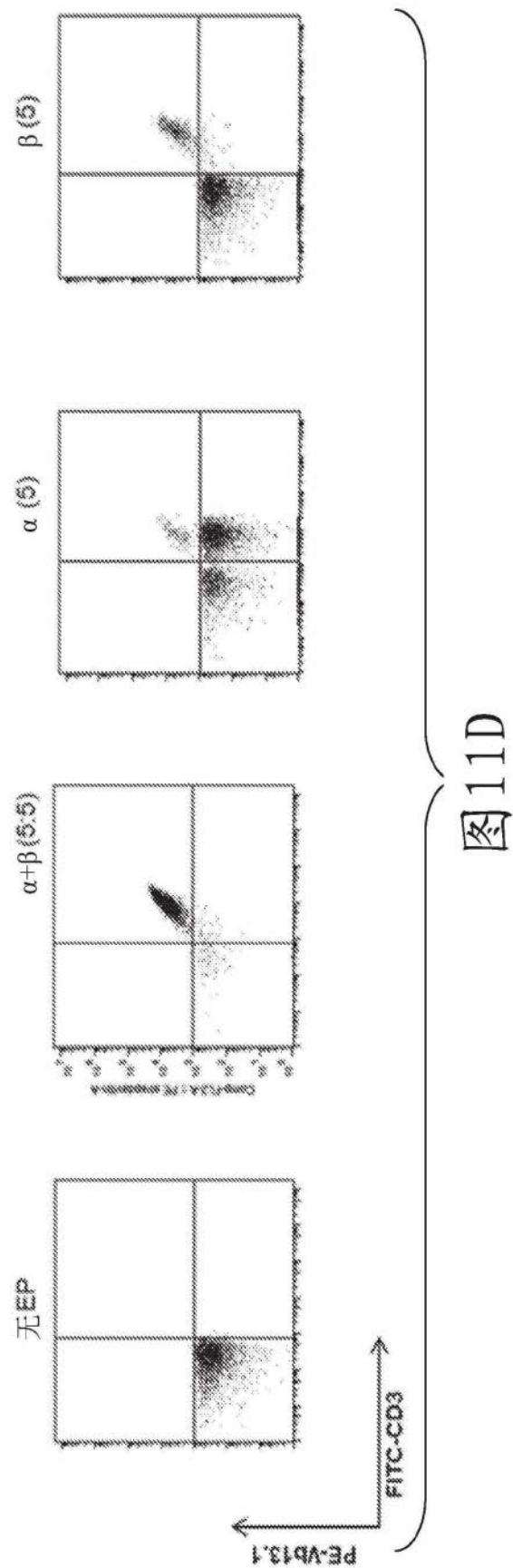


图11D

图11D

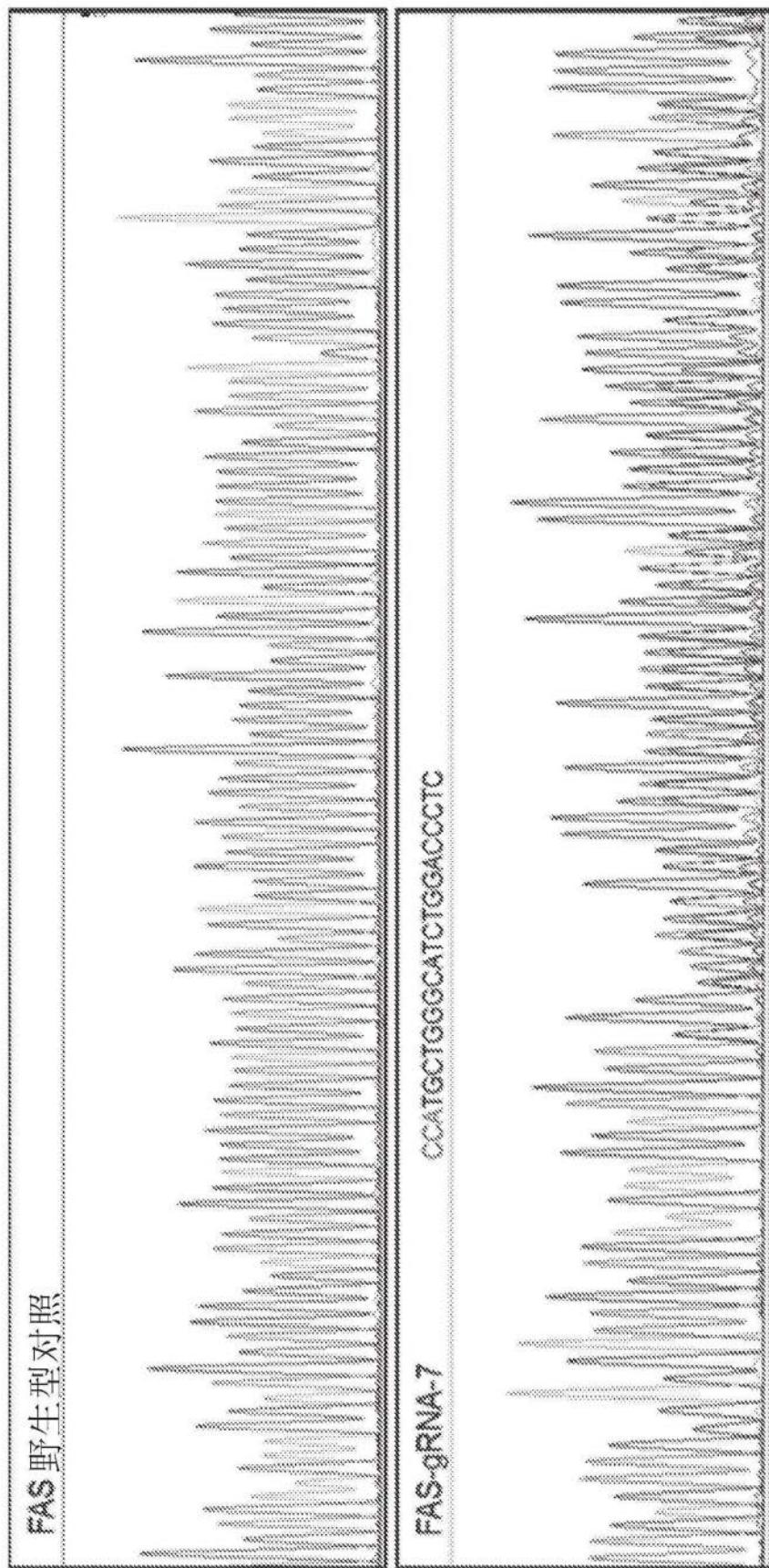


图12A

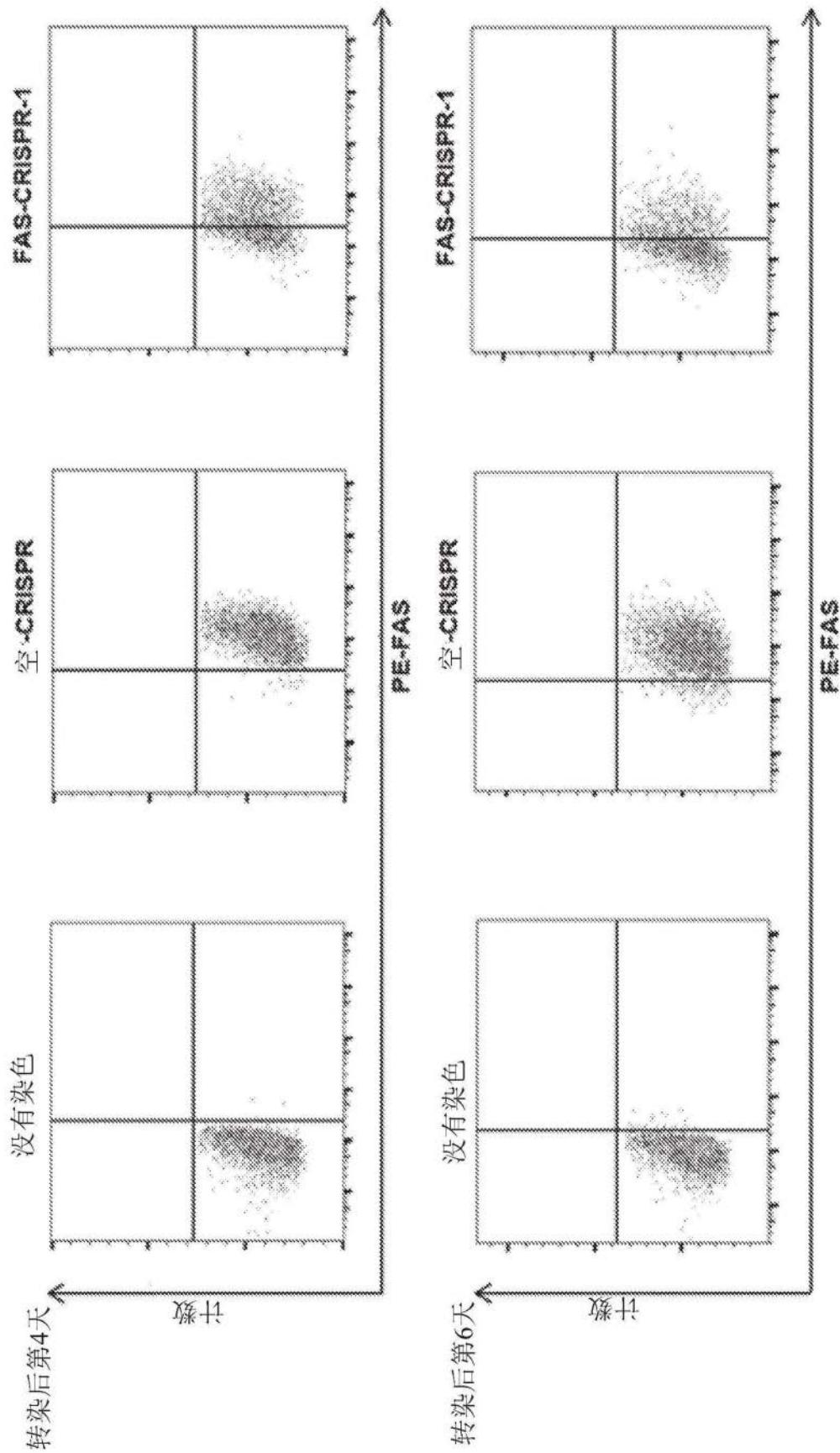


图12B

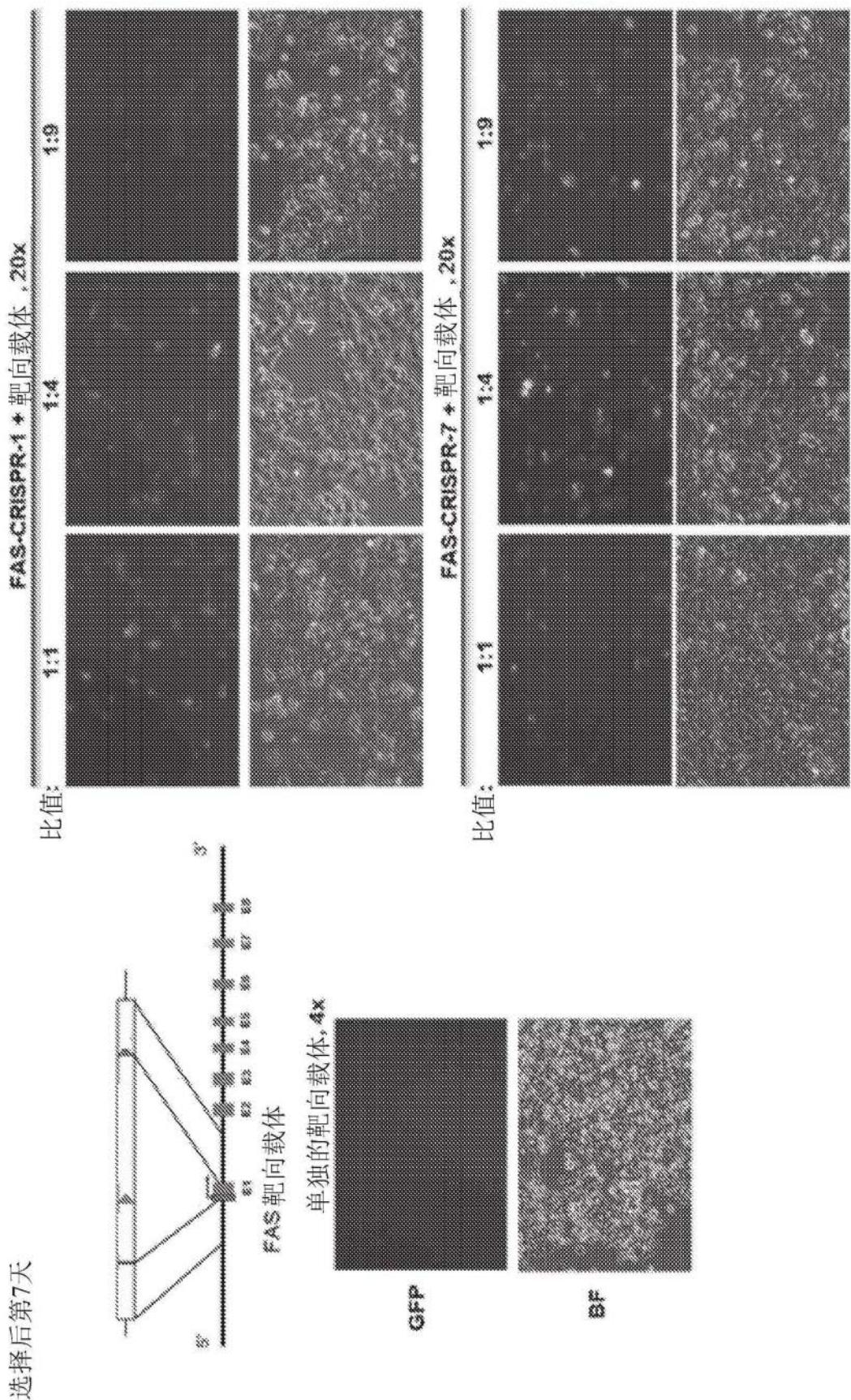


图12C

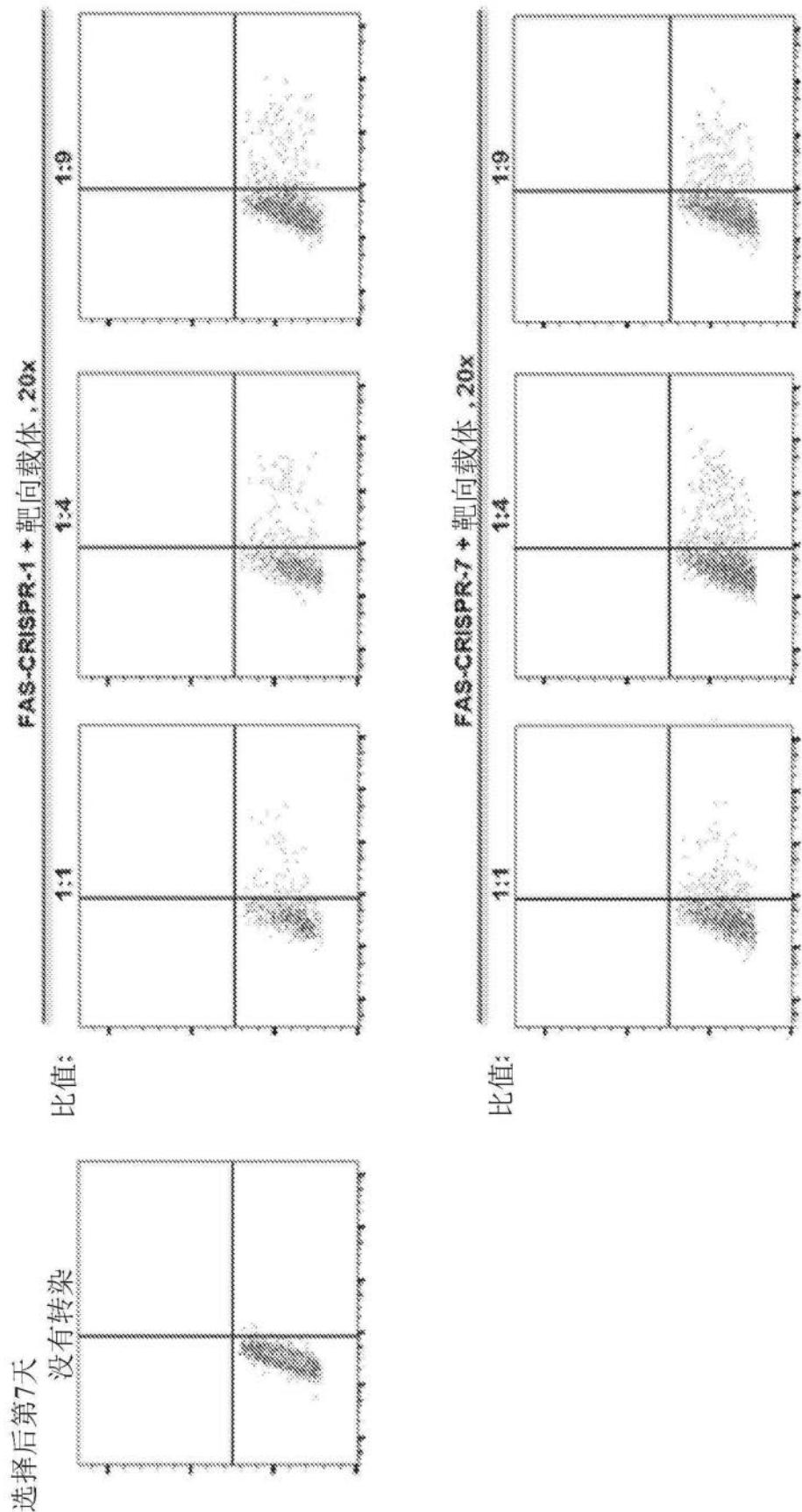


图12D

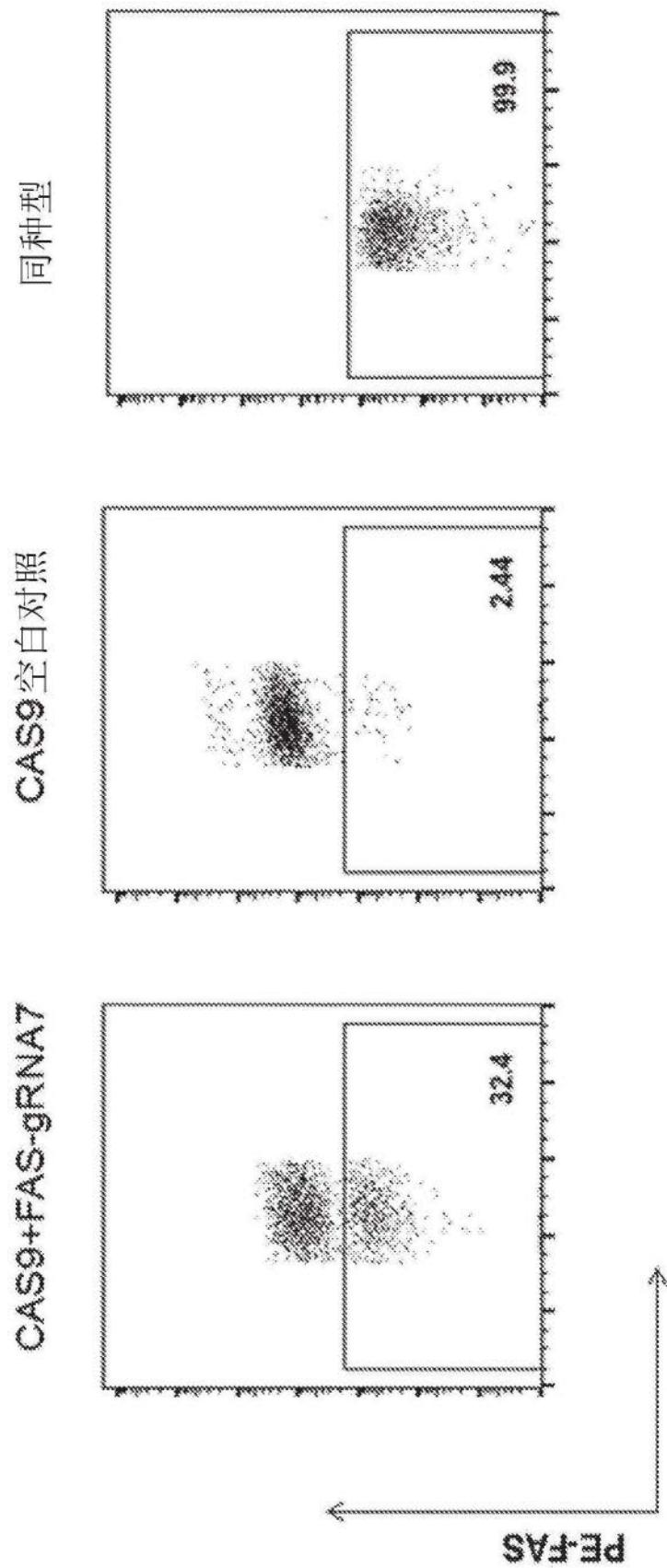


图13

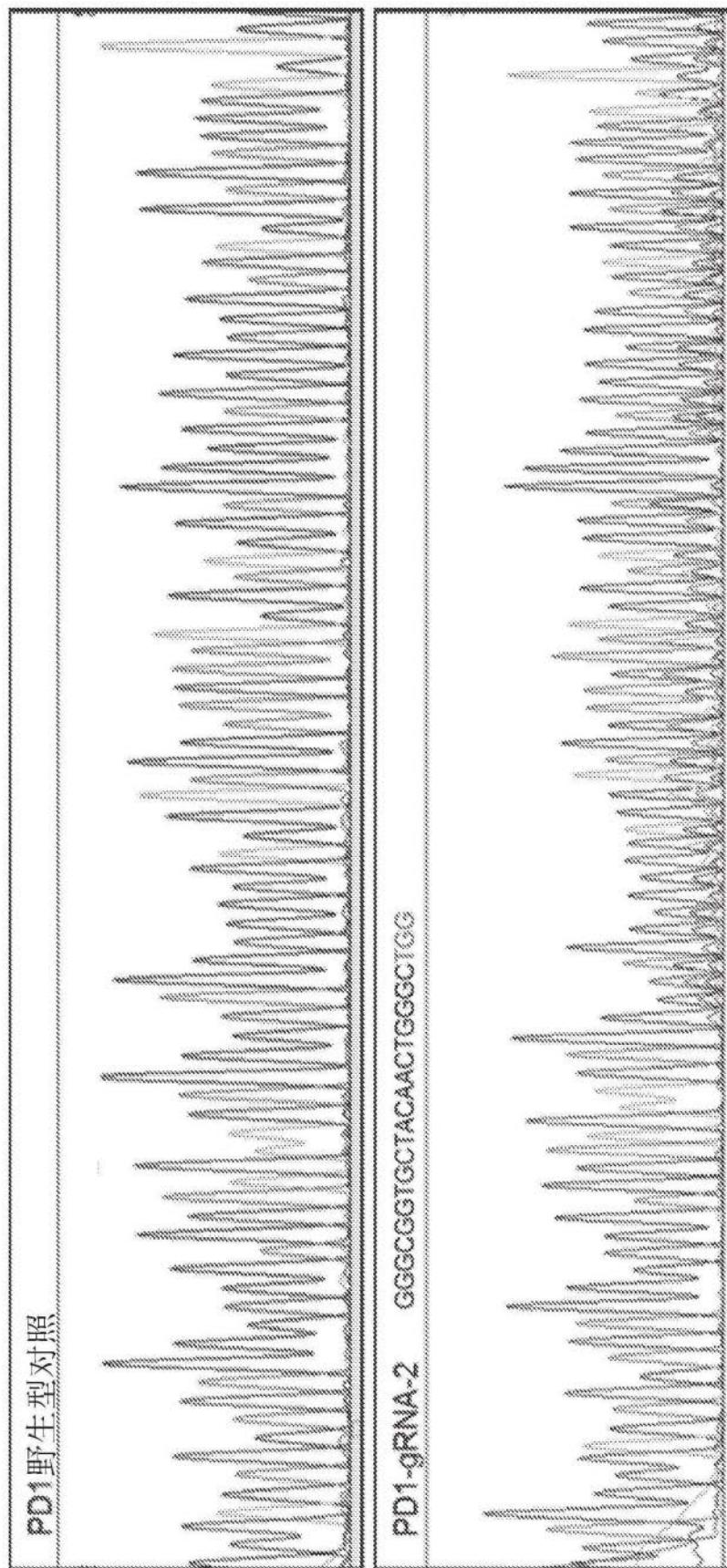


图14A

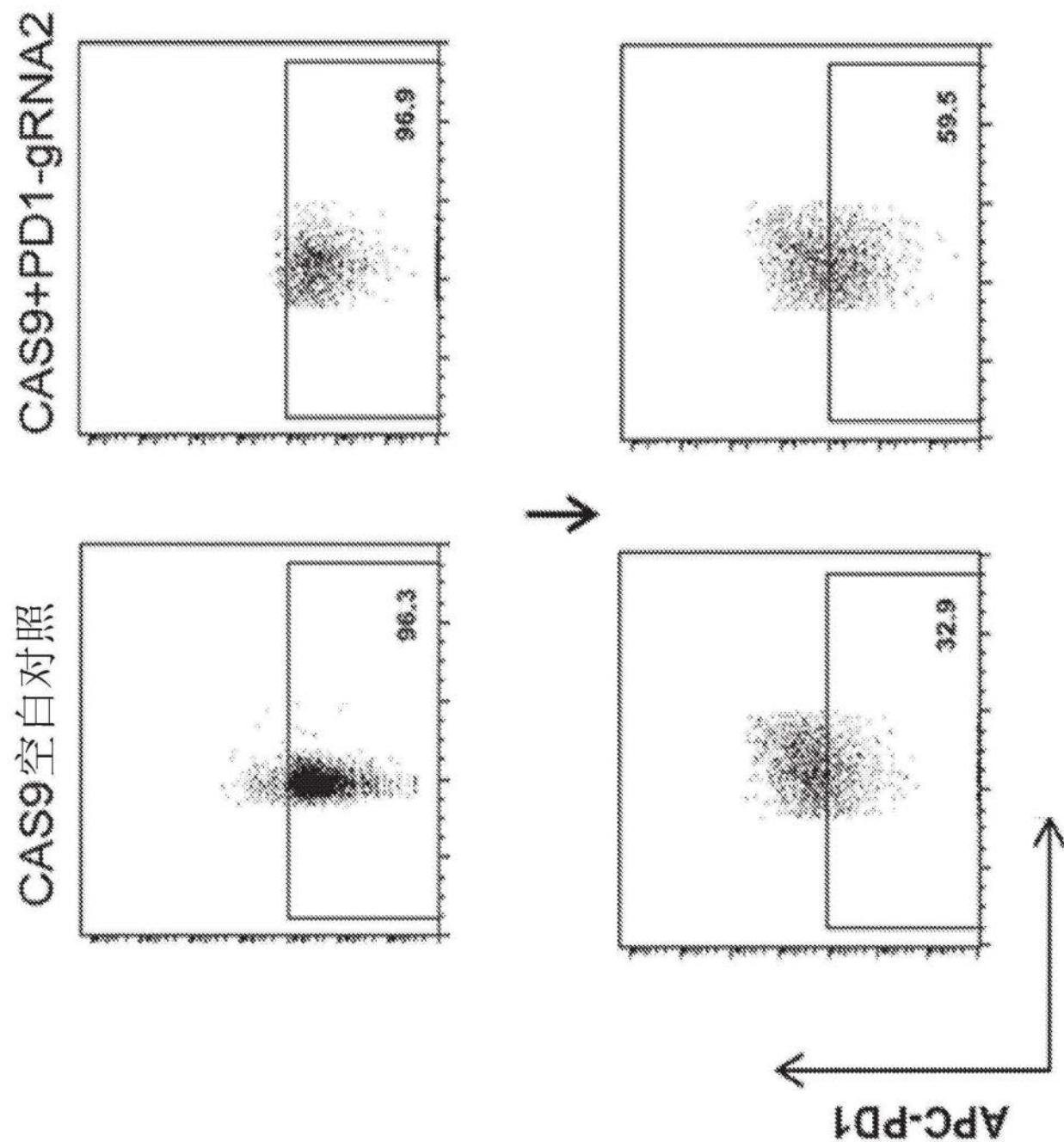


图14B

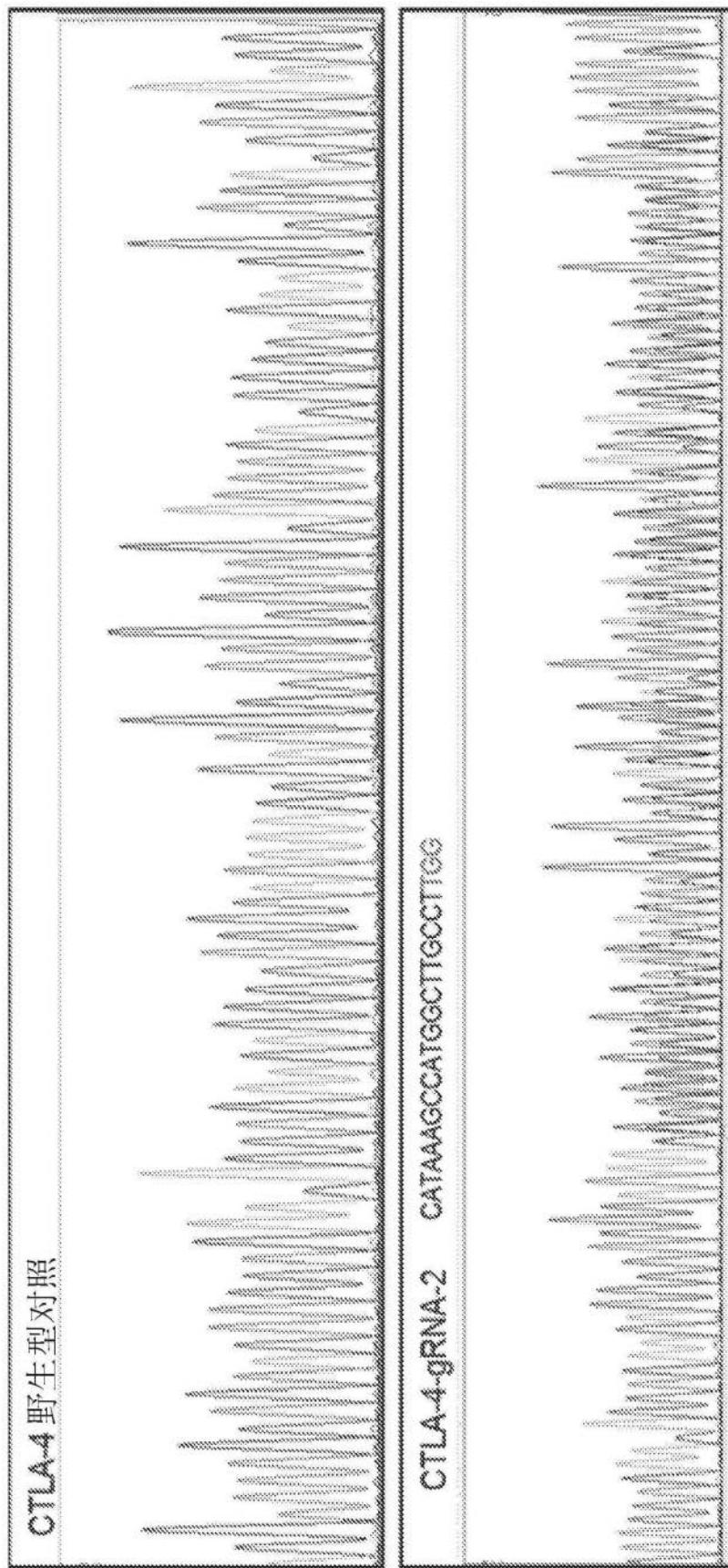


图15A

WII AACACCCGCTCCATAA-
 1 -5 AACACCCGCTCCATAA-
 1 -2 AACACCCGCTCCATAA-
 2 -2 AACACCCGCTCCATAA-
 2 +1 AACACCCGCTCCATAA-
 3 -1 AACACCCGCTCCATAA-
 3 -14 AACACCCGCTCCATAA-
 -7 -5 AACACCCGCTCCATAA-
 -7 -5 AACACCCGCTCCATAA-
 10 -1 AACACCCGCTCCATAA-
 10 -3 AACACCCGCTCCATAA-
 11 -5 AACACCCGCTCCATAA-
 11 -0 AACACCCGCTCCATAA-

GGGATTTCAGGGCACAGGTCAAGCTGAACCT
 CCATGGCTTGCCTTGCGATTTCAGGGCACAGGTCAAGCTGAACCT
 CCATGGCTTGCCTTGCGATTTCAGGGCACAGGTCAAGCTGAACCT
 CCATGGCTTGCCTTGCGATTTCAGGGCACAGGTCAAGCTGAACCT
 CCATGGCTTGCCTTGCGATTTCAGGGCACAGGTCAAGCTGAACCT
 CCATGGCTTGCCTTGCGATTTCAGGGCACAGGTCAAGCTGAACCT
 CCATGGCTTGCCTTGCGATTTCAGGGCACAGGTCAAGCTGAACCT
 CCATGGCTTGCCTTGCGATTTCAGGGCACAGGTCAAGCTGAACCT
 CCATGGCTTGCCTTGCGATTTCAGGGCACAGGTCAAGCTGAACCT
 CCATGGCTTGCCTTGCGATTTCAGGGCACAGGTCAAGCTGAACCT
 CCATGGCTTGCCTTGCGATTTCAGGGCACAGGTCAAGCTGAACCT

图15B

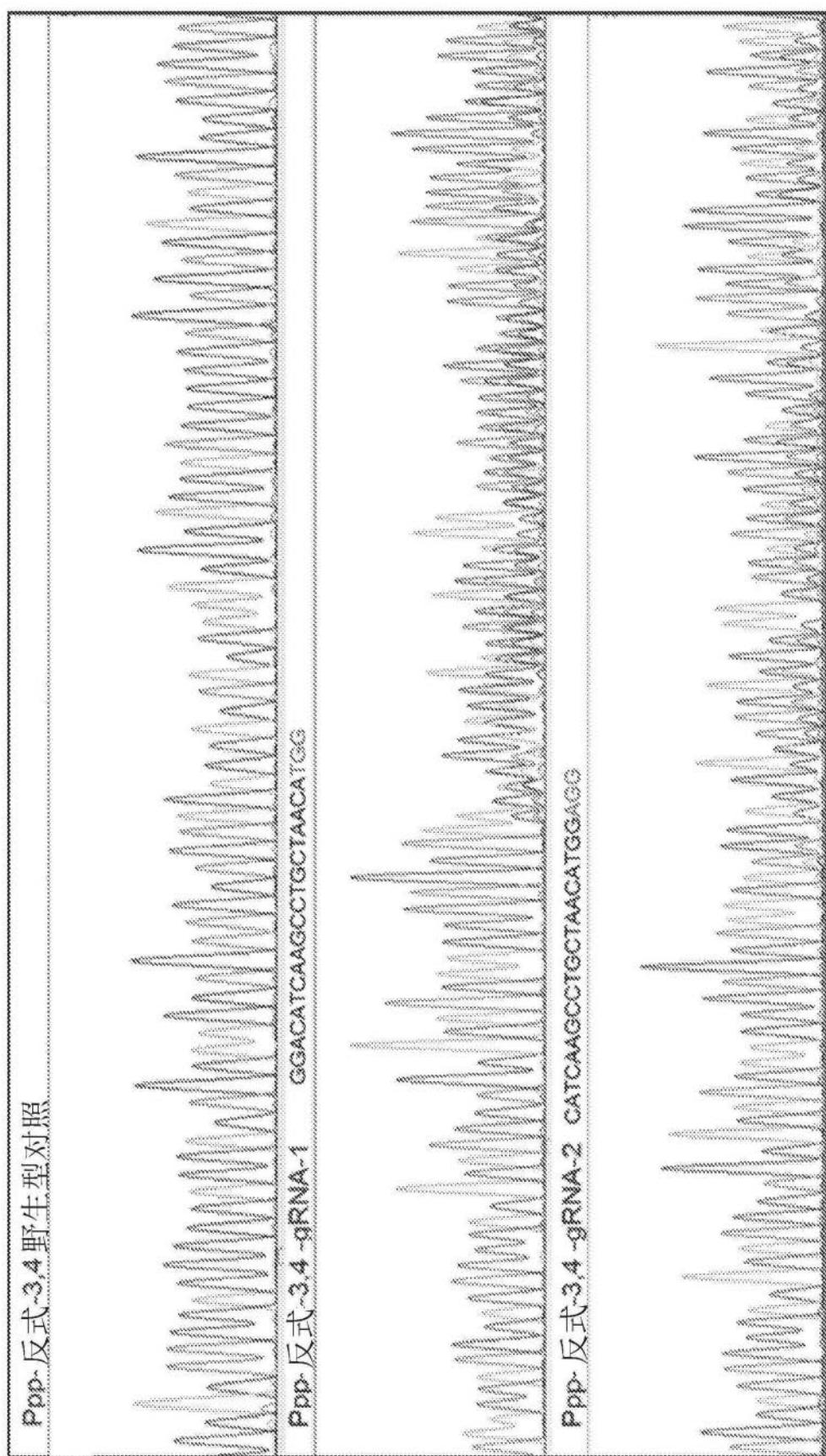
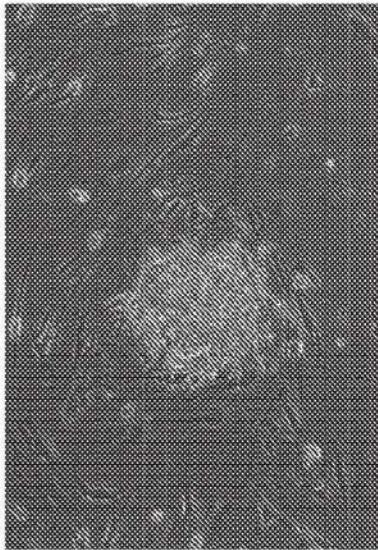


图16

第12天



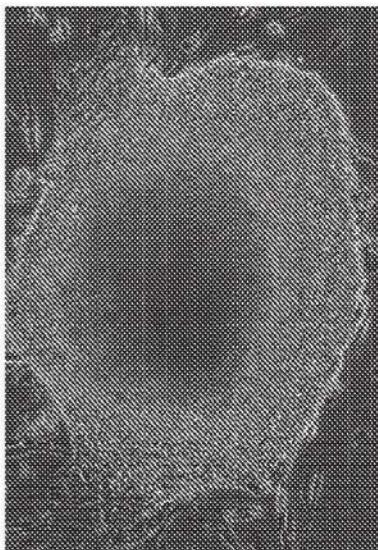
第18天，部分重编程的iPSC



第4天



第18天



第0代

图17A

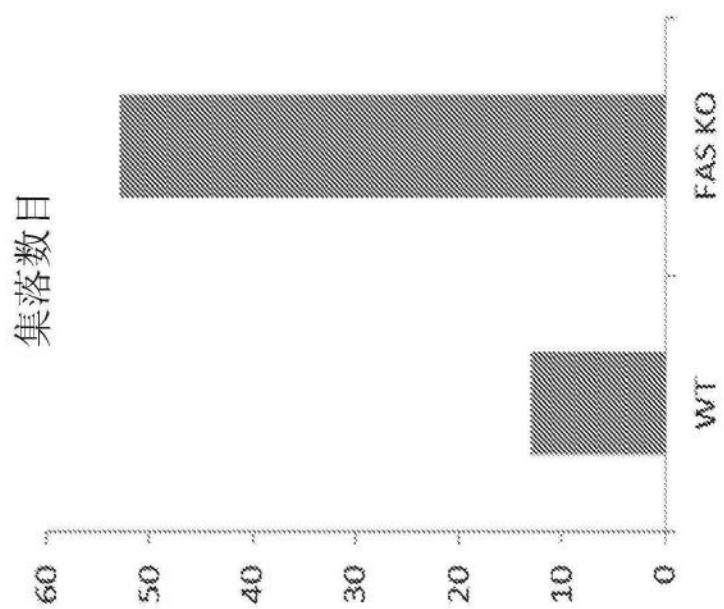


图17B

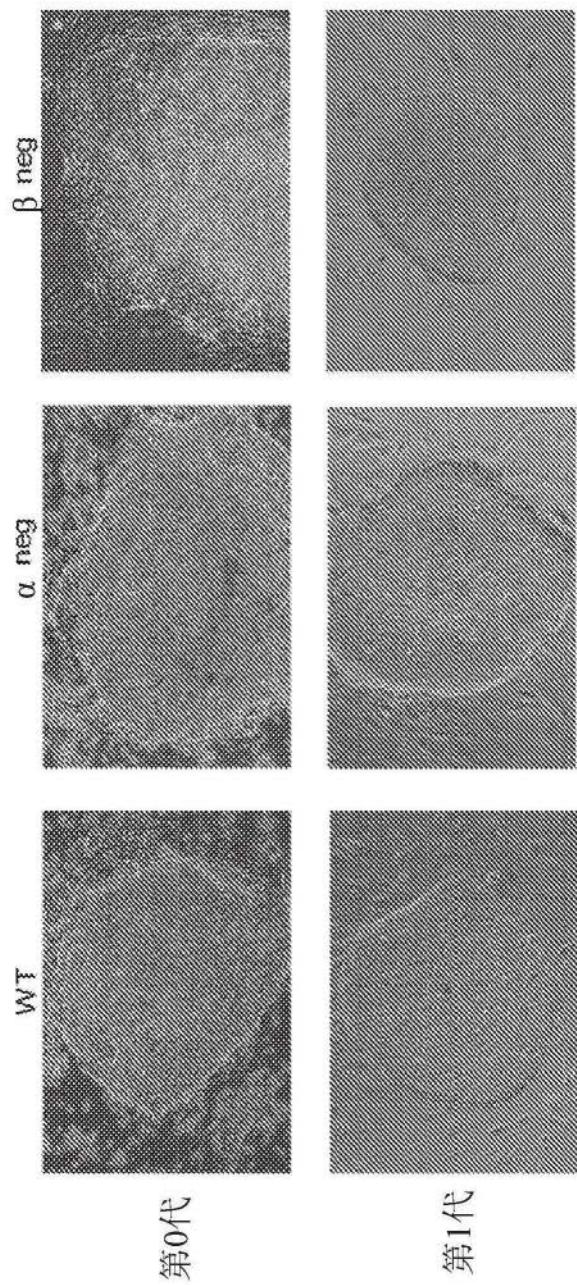


图18A

集落数目

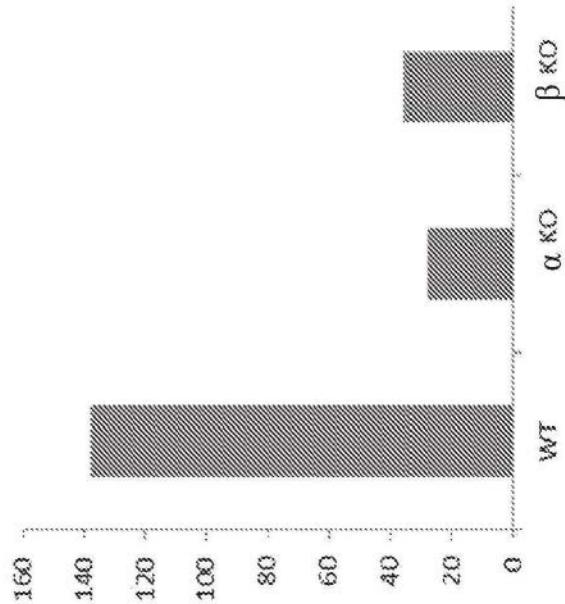


图18B

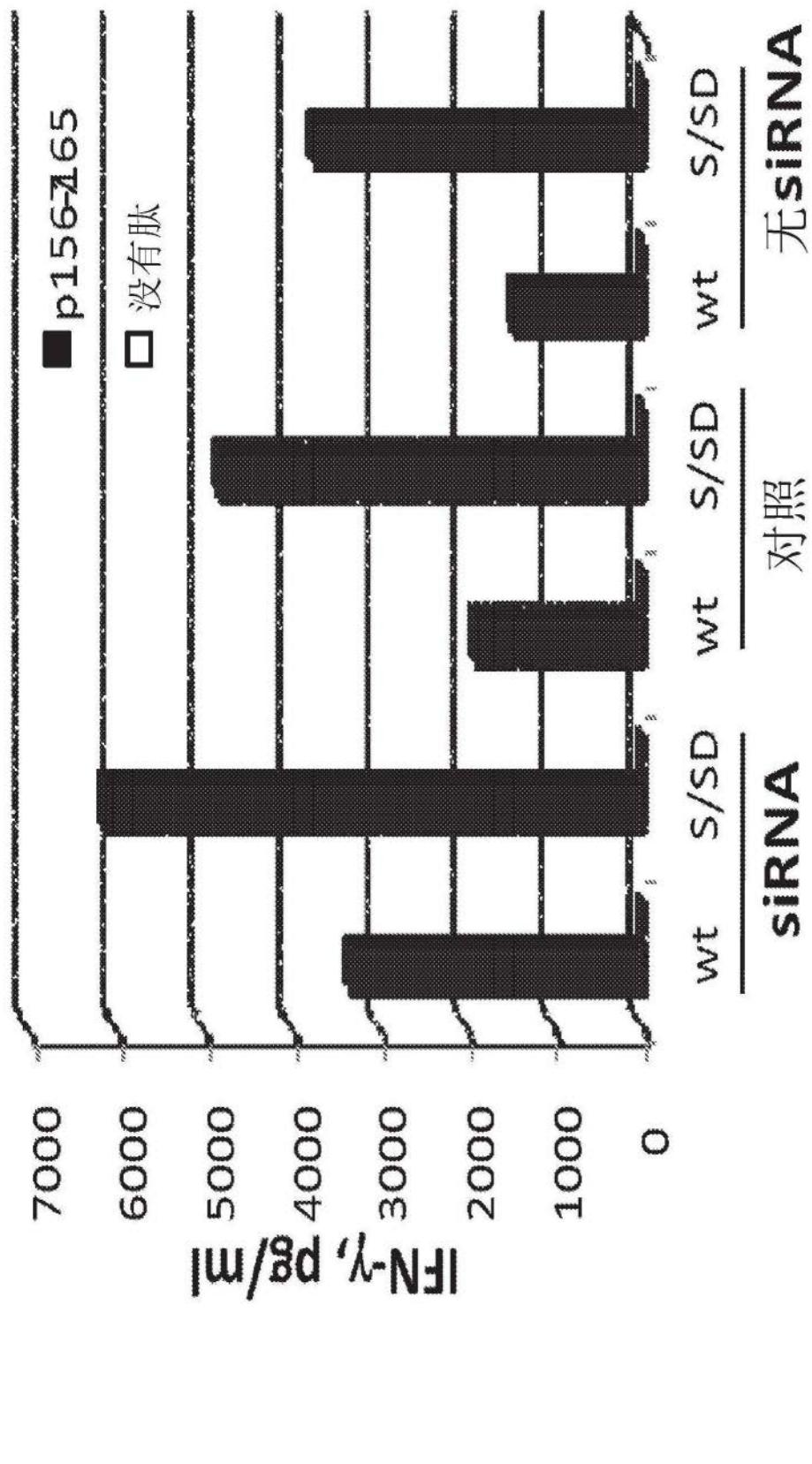
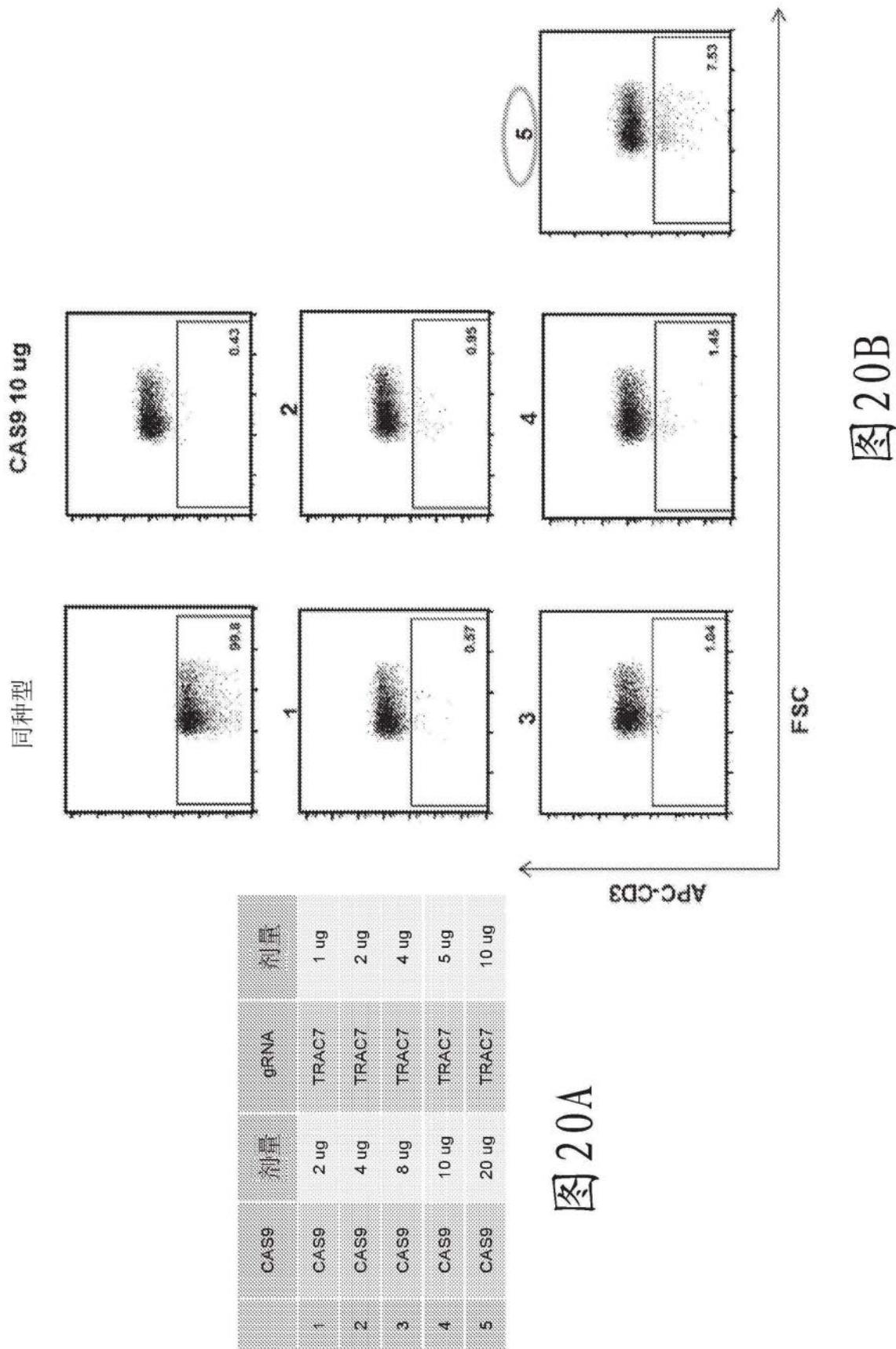


图19

Wt: 野生型 TCR

S/SD: 第二二硫键 α /第二二硫键+去-N-糖基化 β



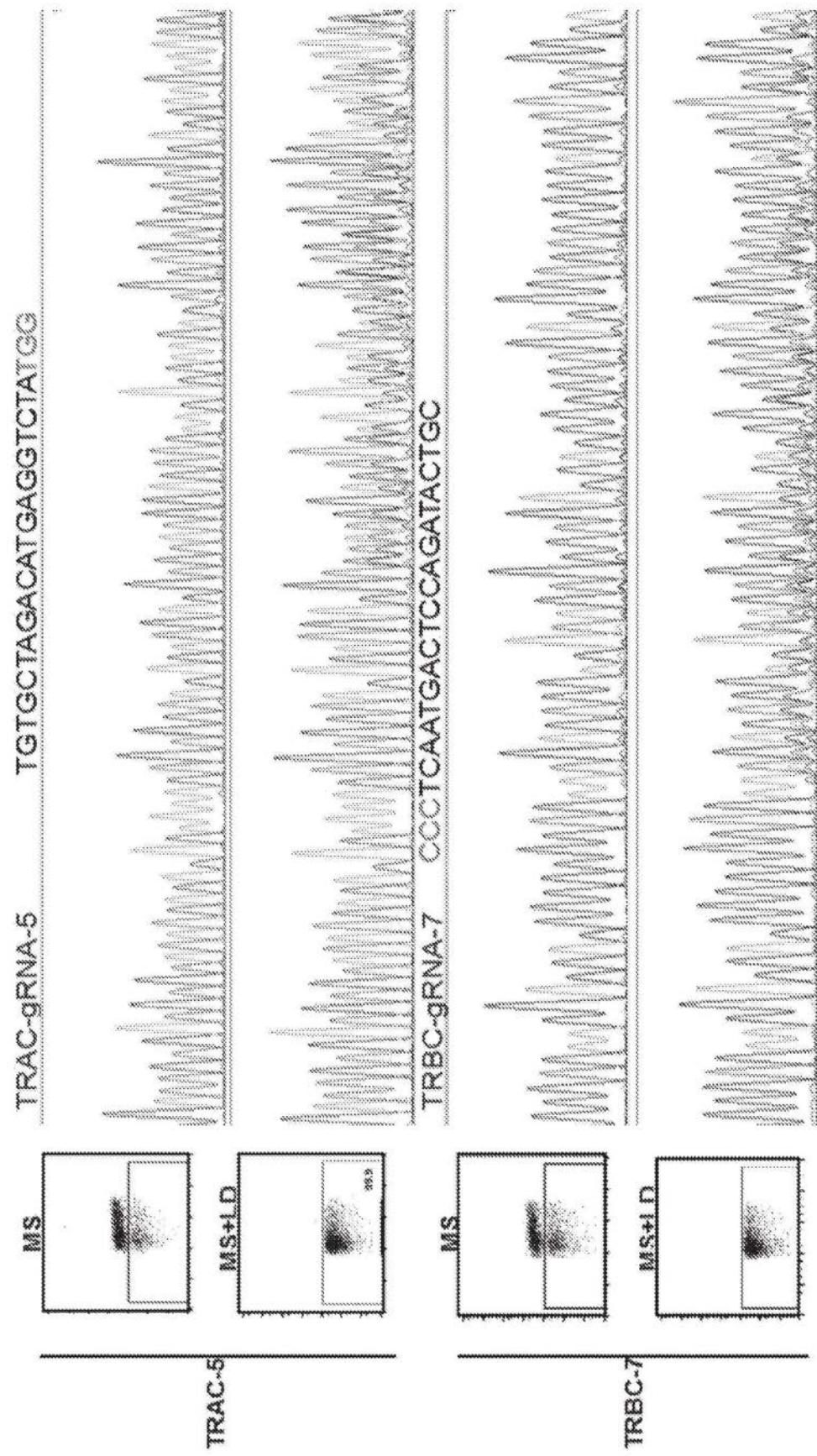


图21

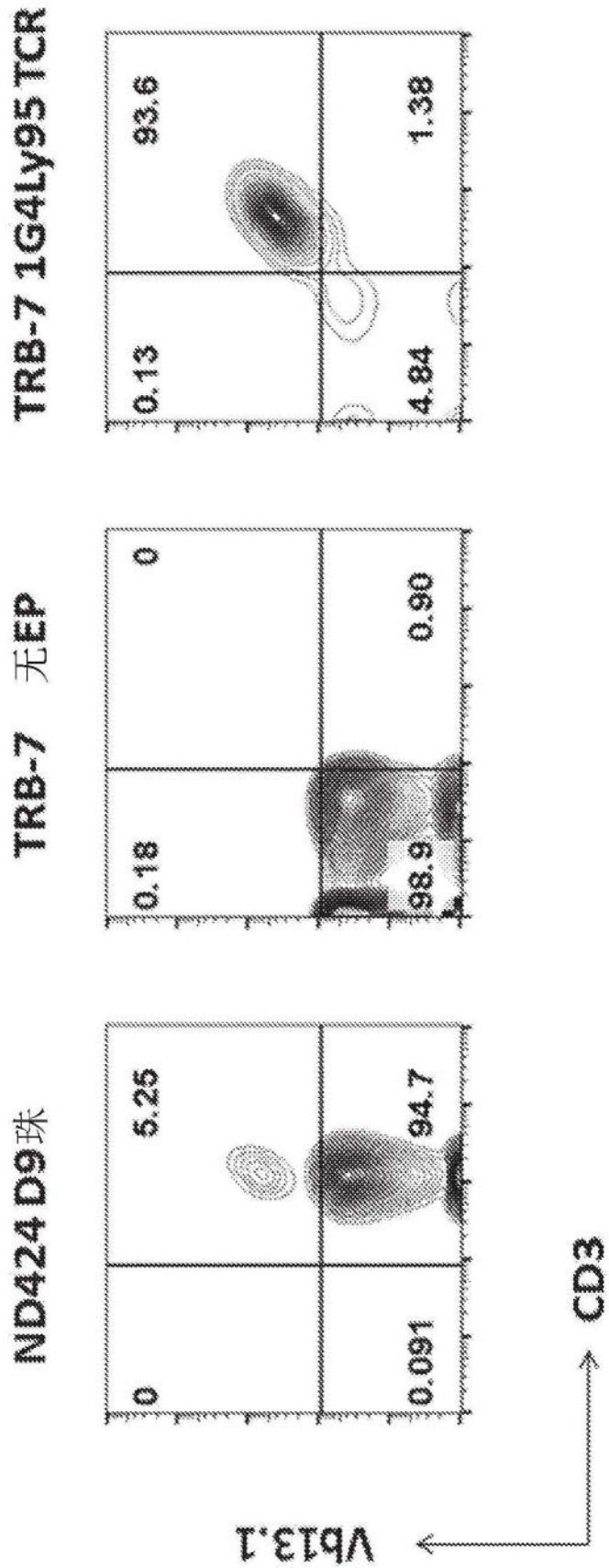


图22

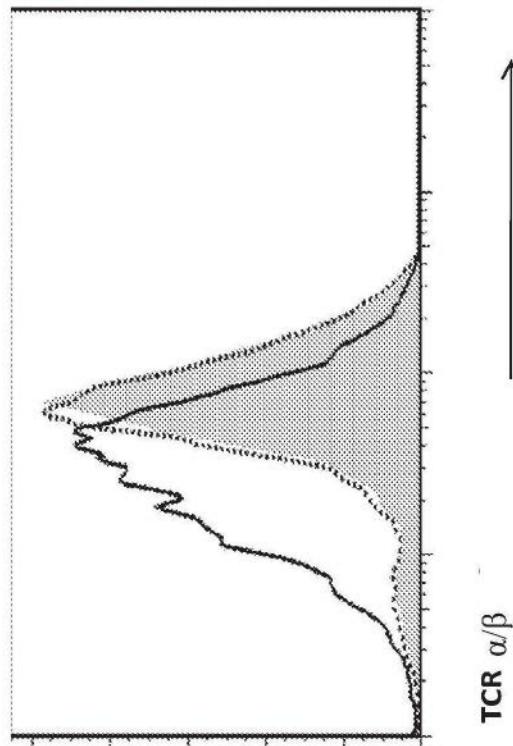


图23A

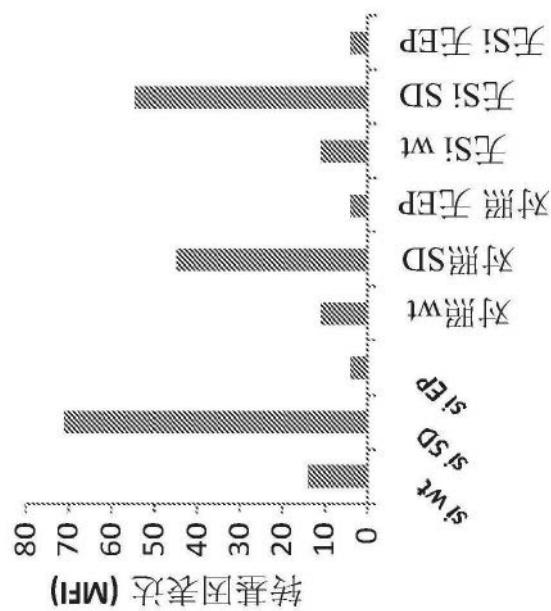
NY-ESO-1 四聚体

图23B

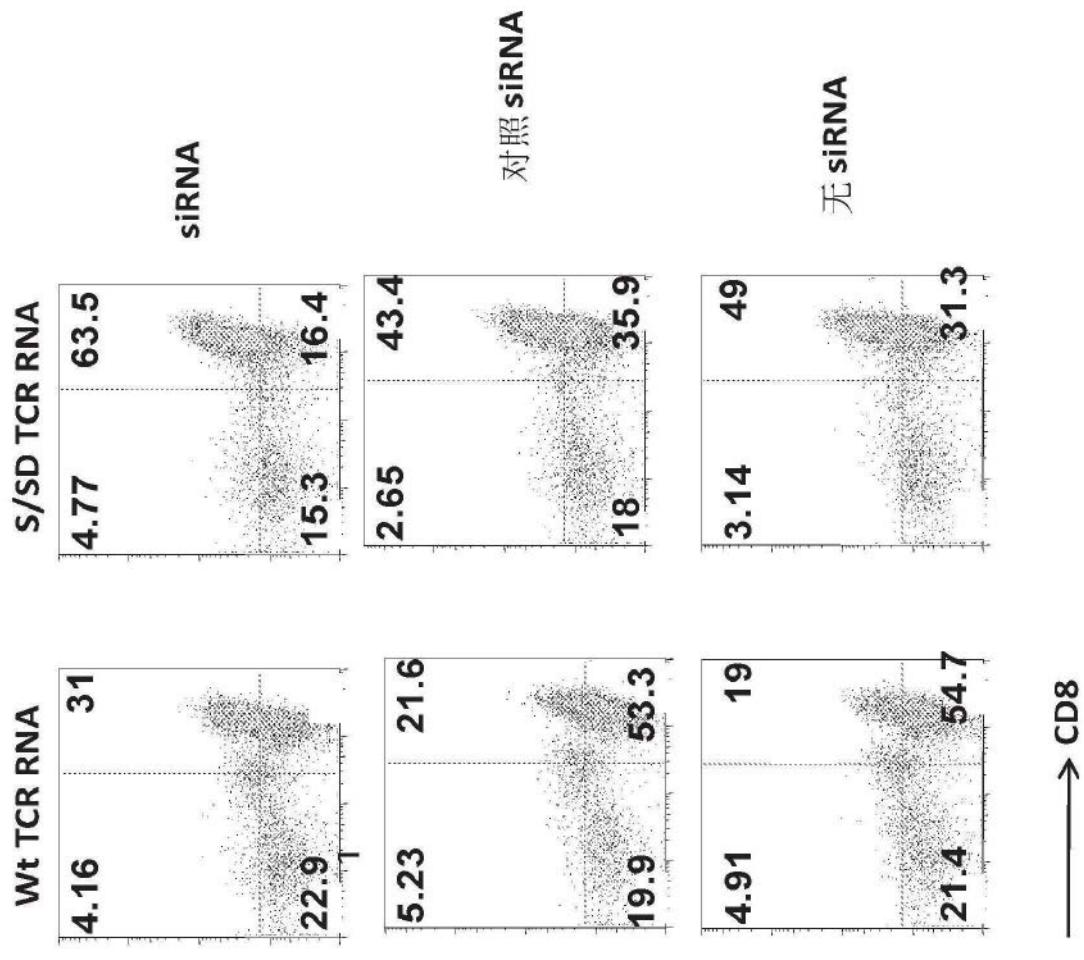


图23C

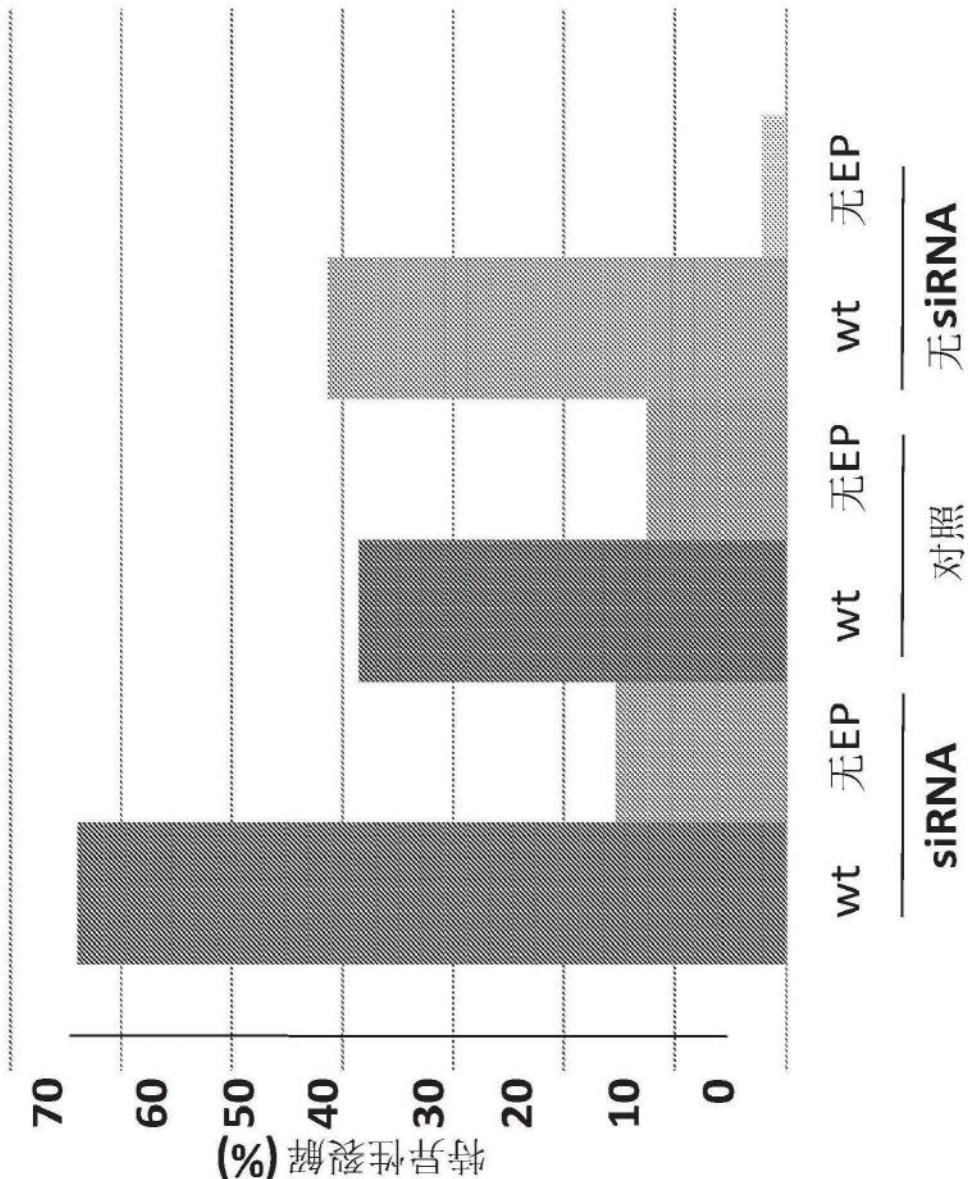


图23D

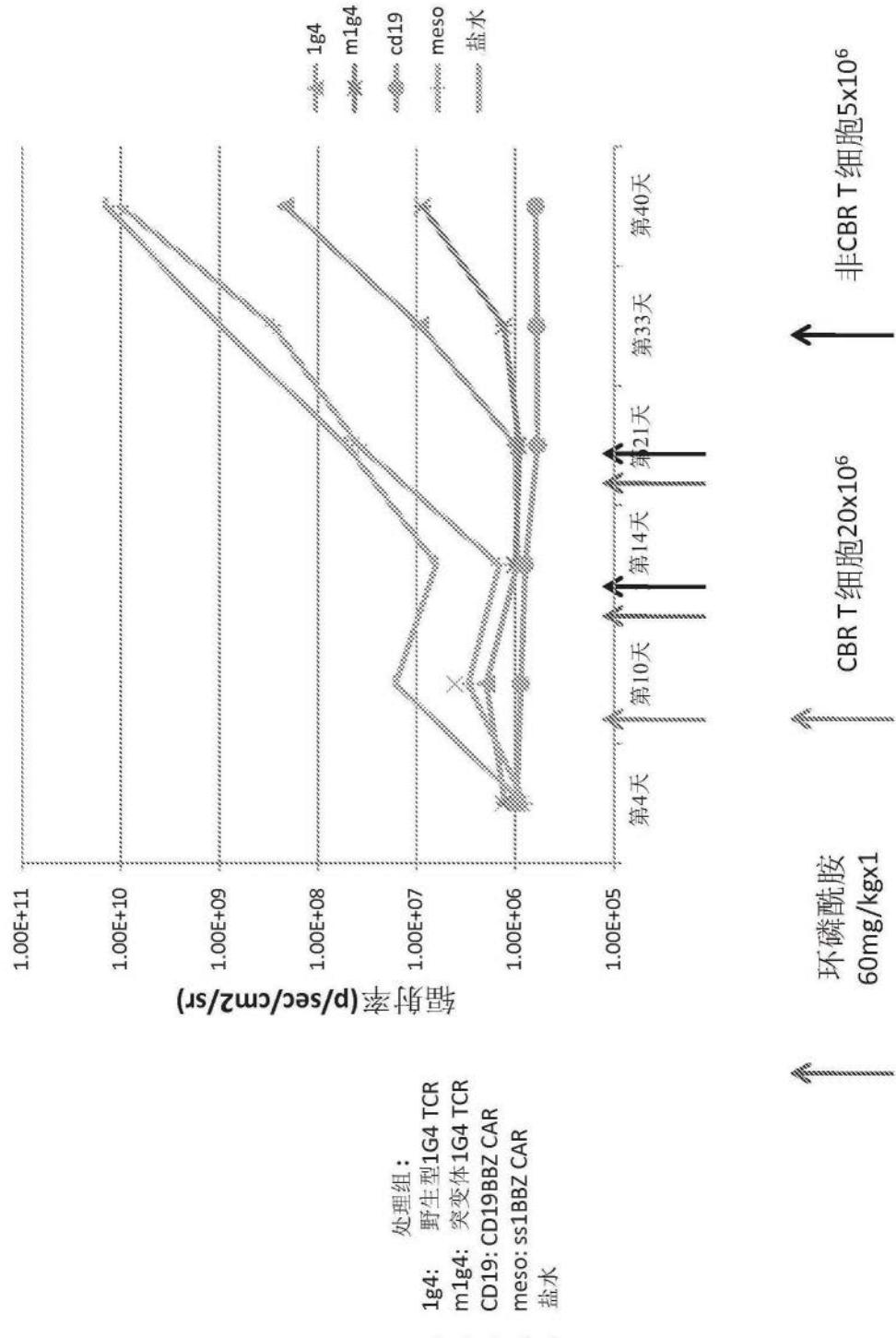


图24

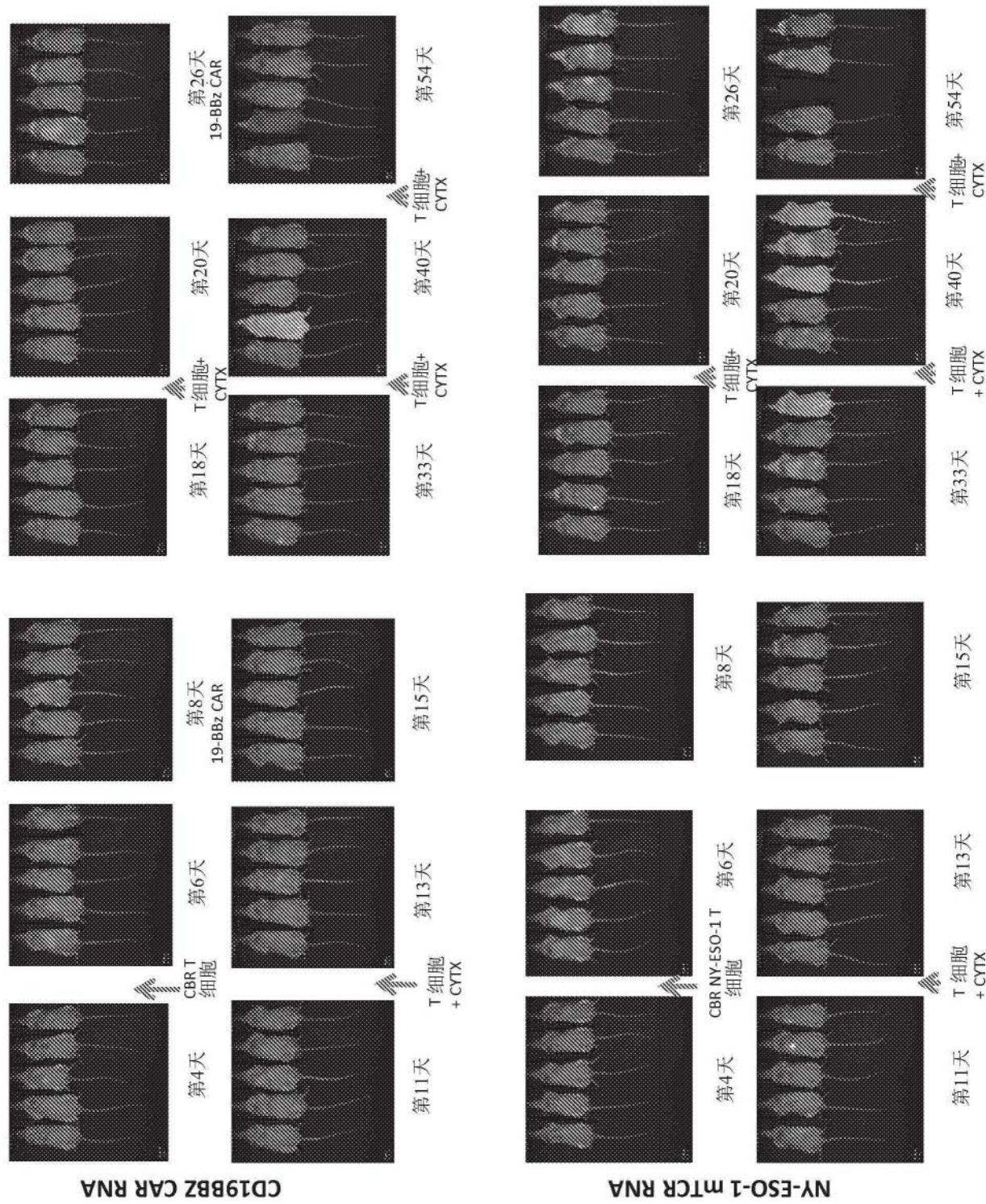


图25

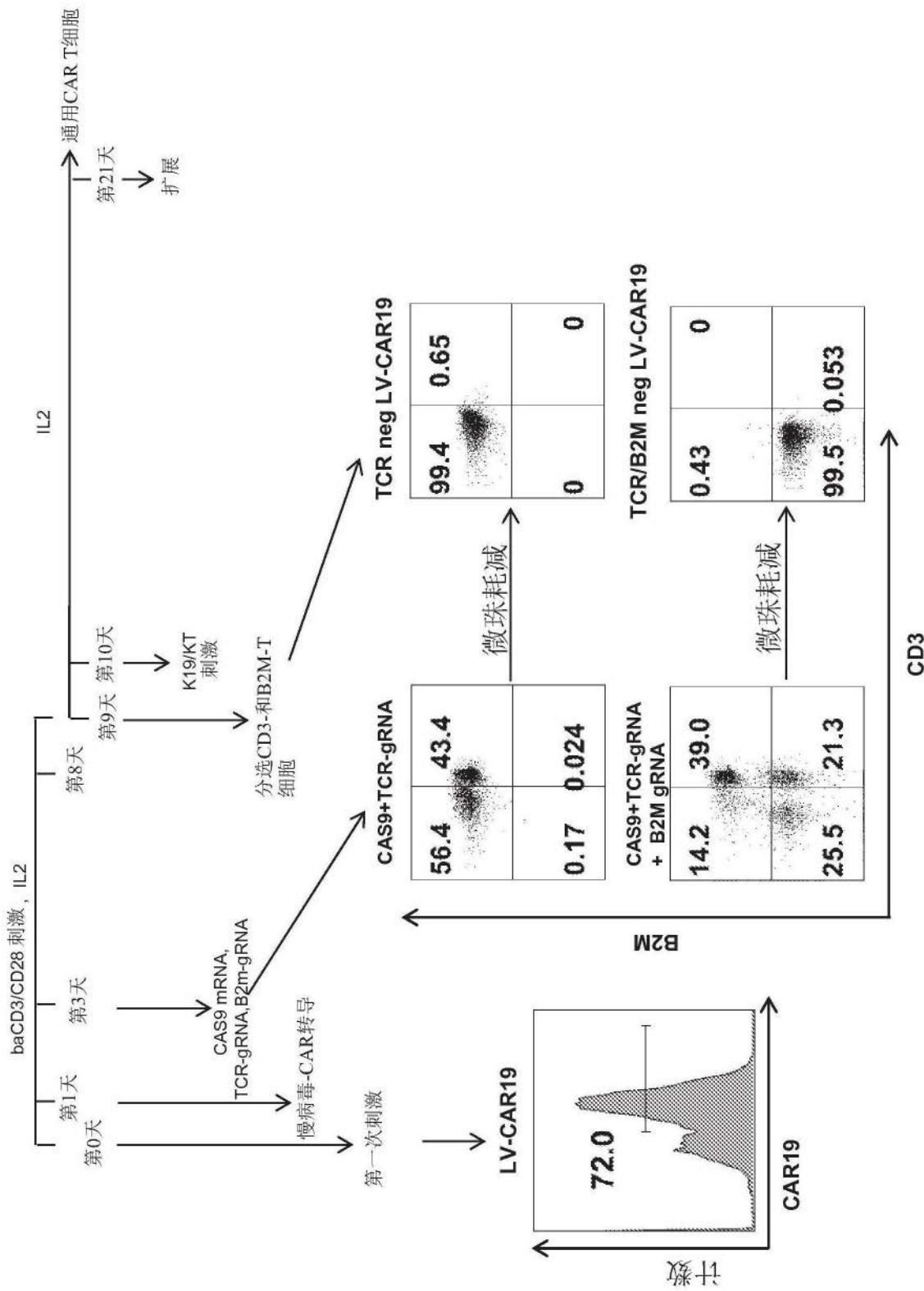


图26

	增加倍数	第0天	第3天	第5天	第7天	第9天	第11天	最终数目
NT	1	2	6	17	38	64	320	
LV-GFP	1	3	6	16	38	66	330	
LV-CAR19	1	3	8	23	45	113	1700	
TCR neg LV-CAR19	1	4	6	16	38	77	2300	
TCR/B2M LV-CAR19	1	3	6	19	39	99	1680	

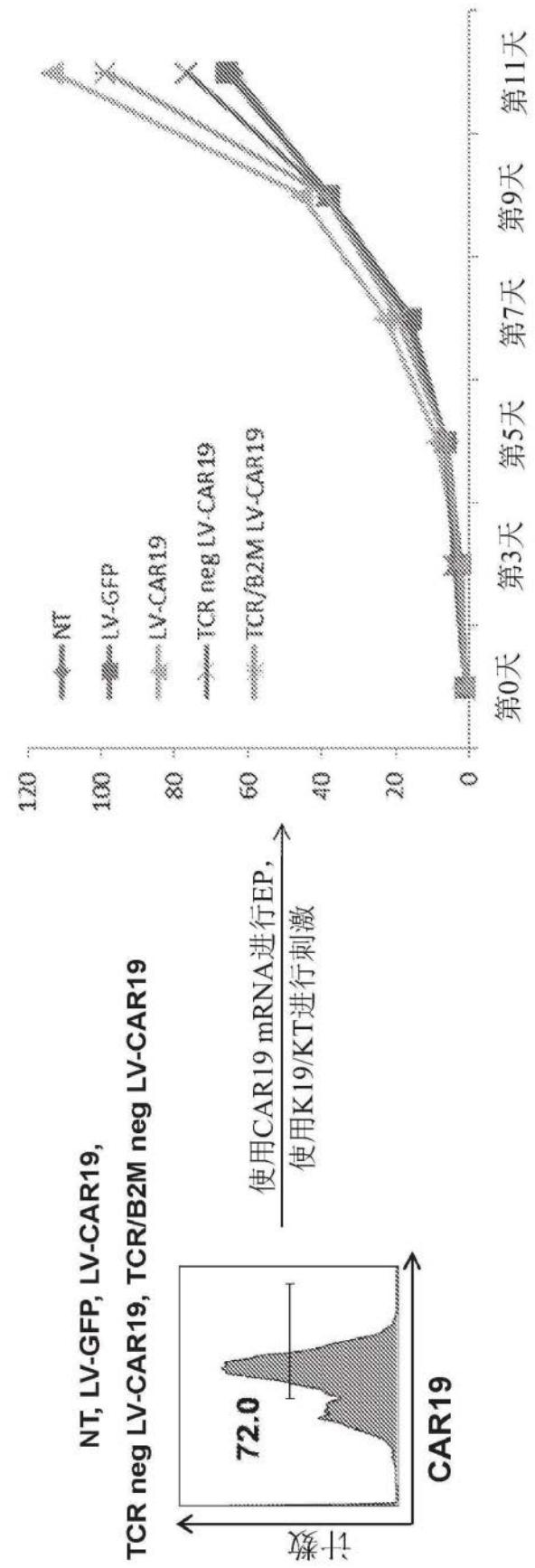


图27

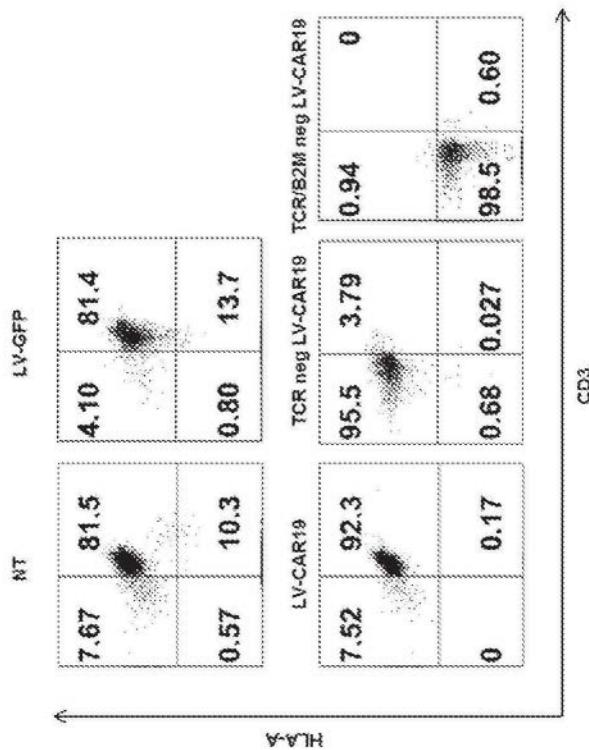
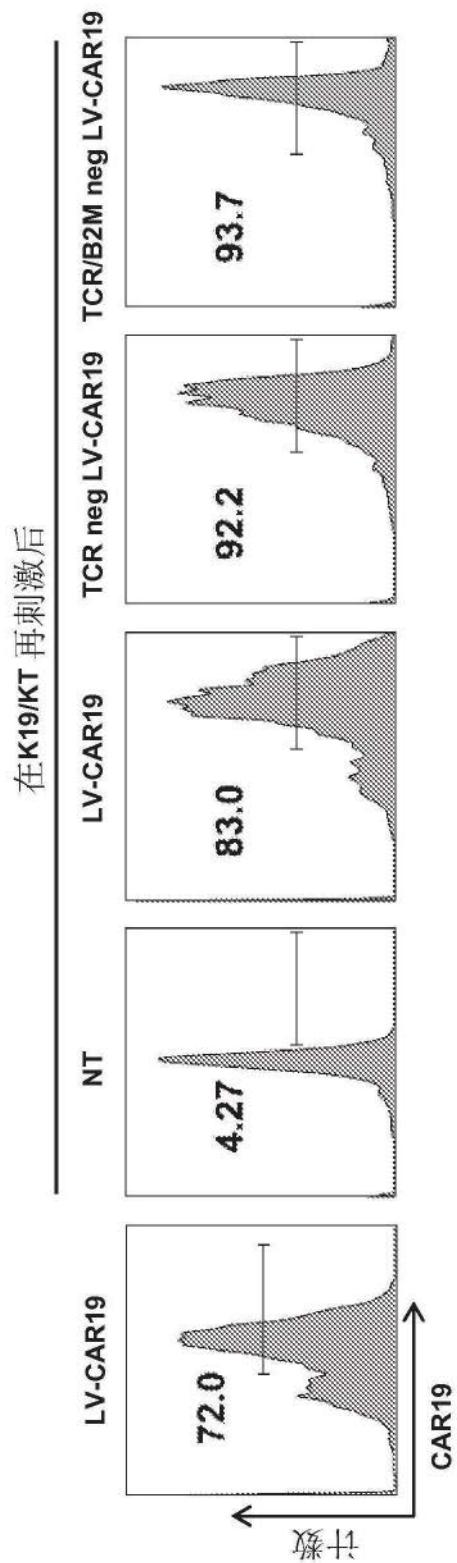


图28A



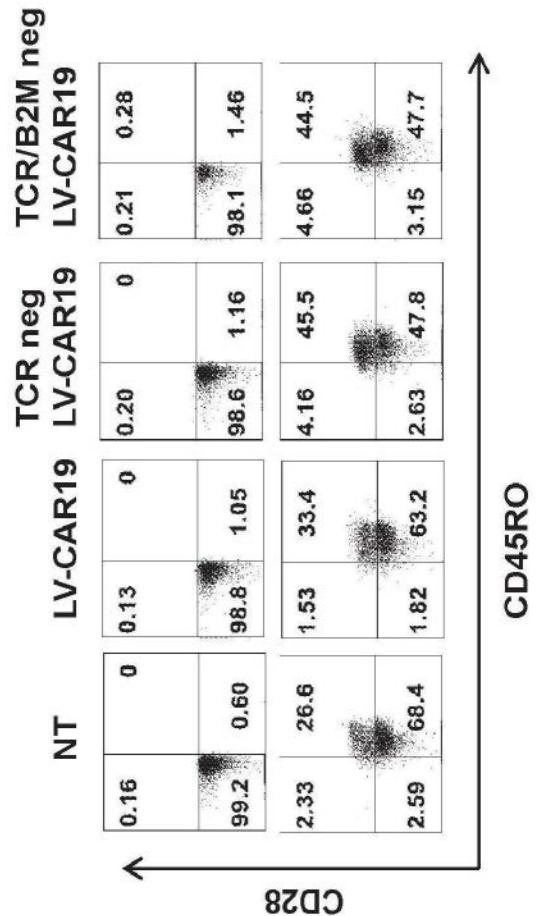


图29A

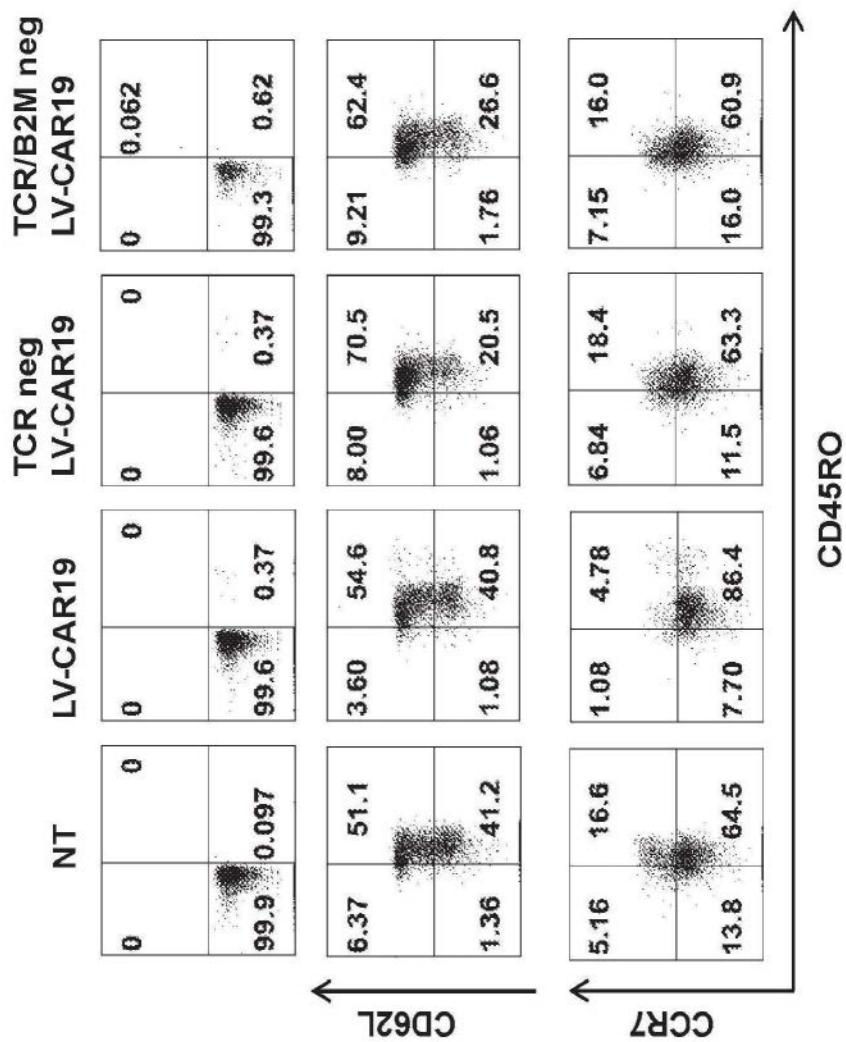
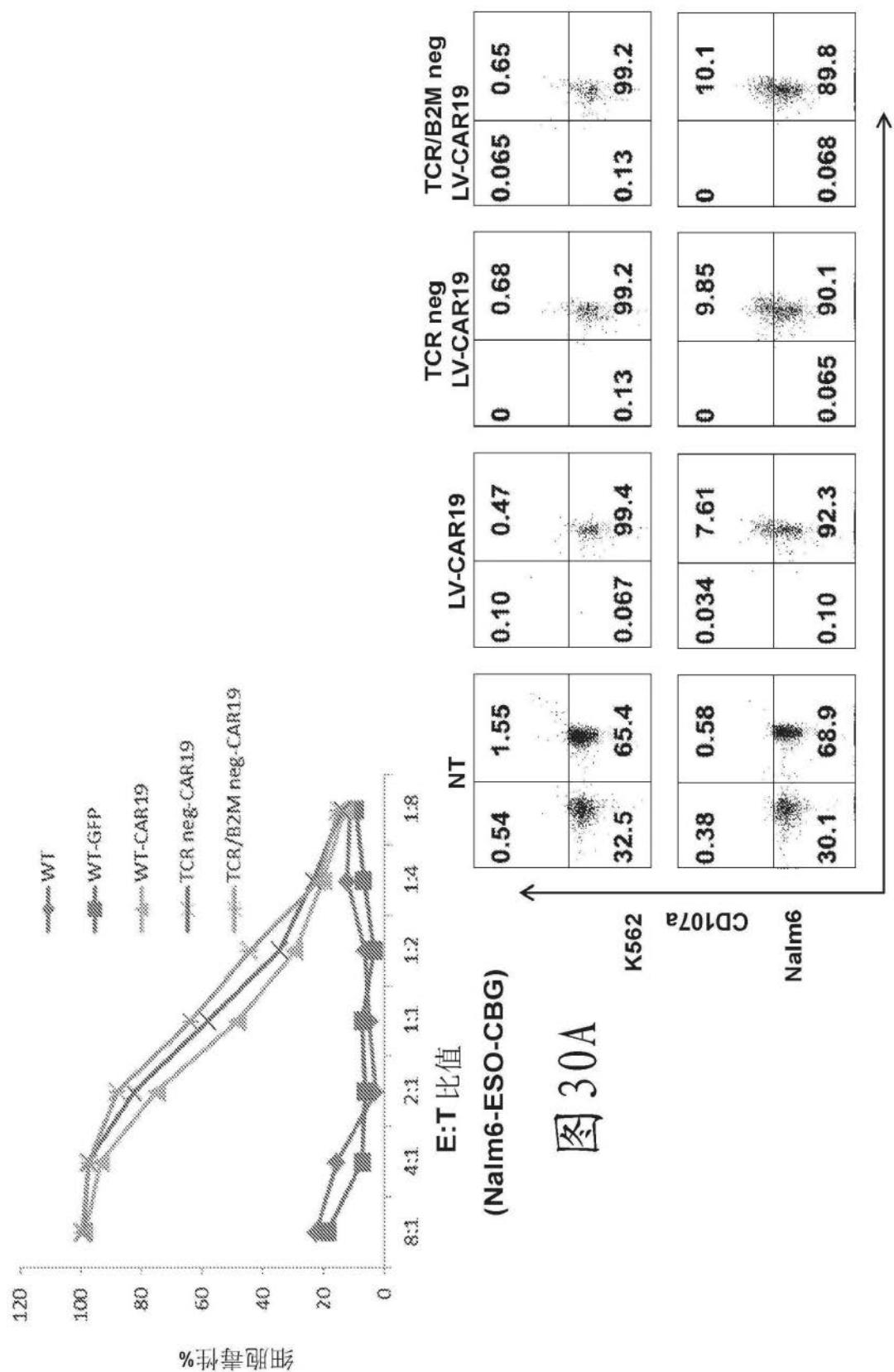


图29B



CD8 (对CD3或CAR19阳性细胞进行门控)

图 30B

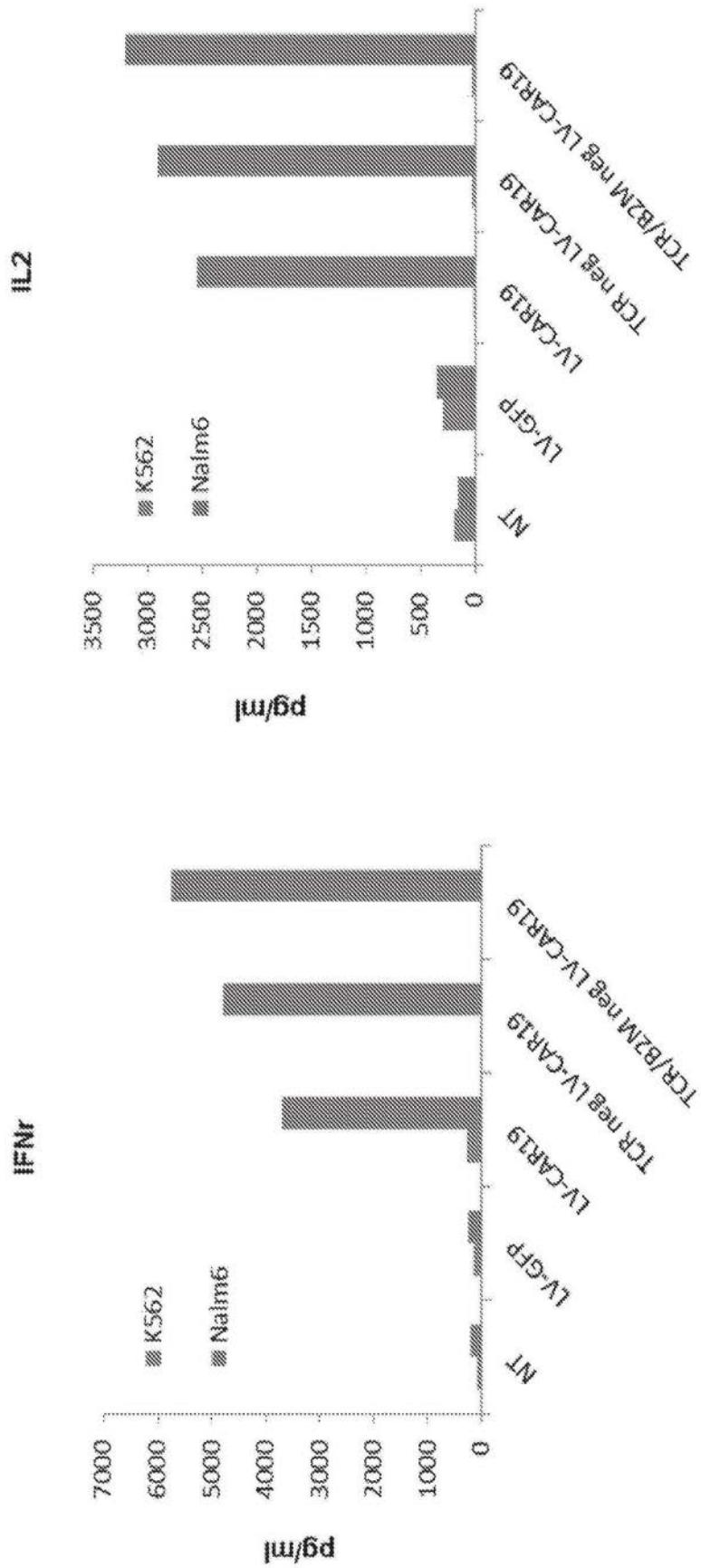


图30C

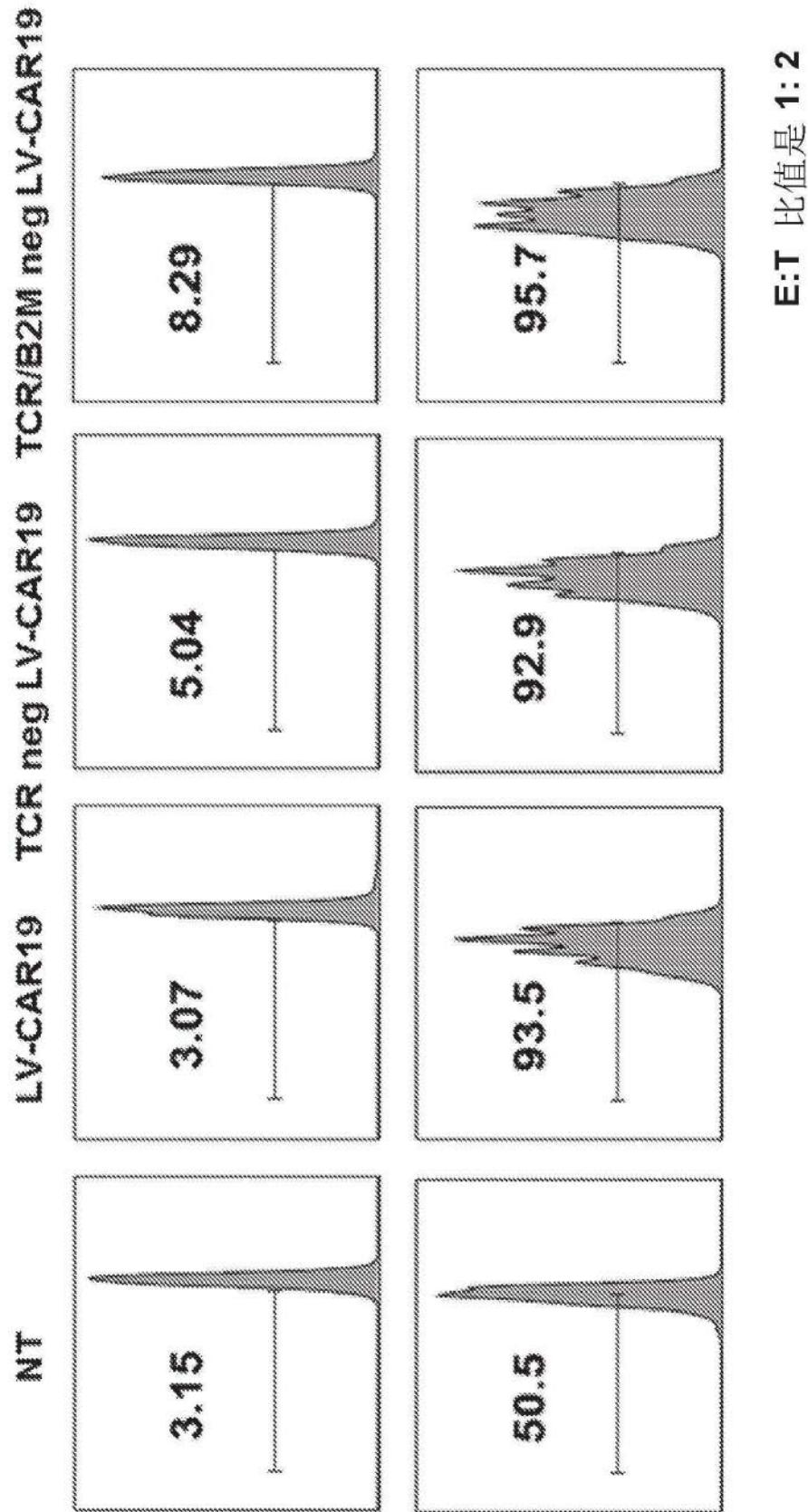


图30D

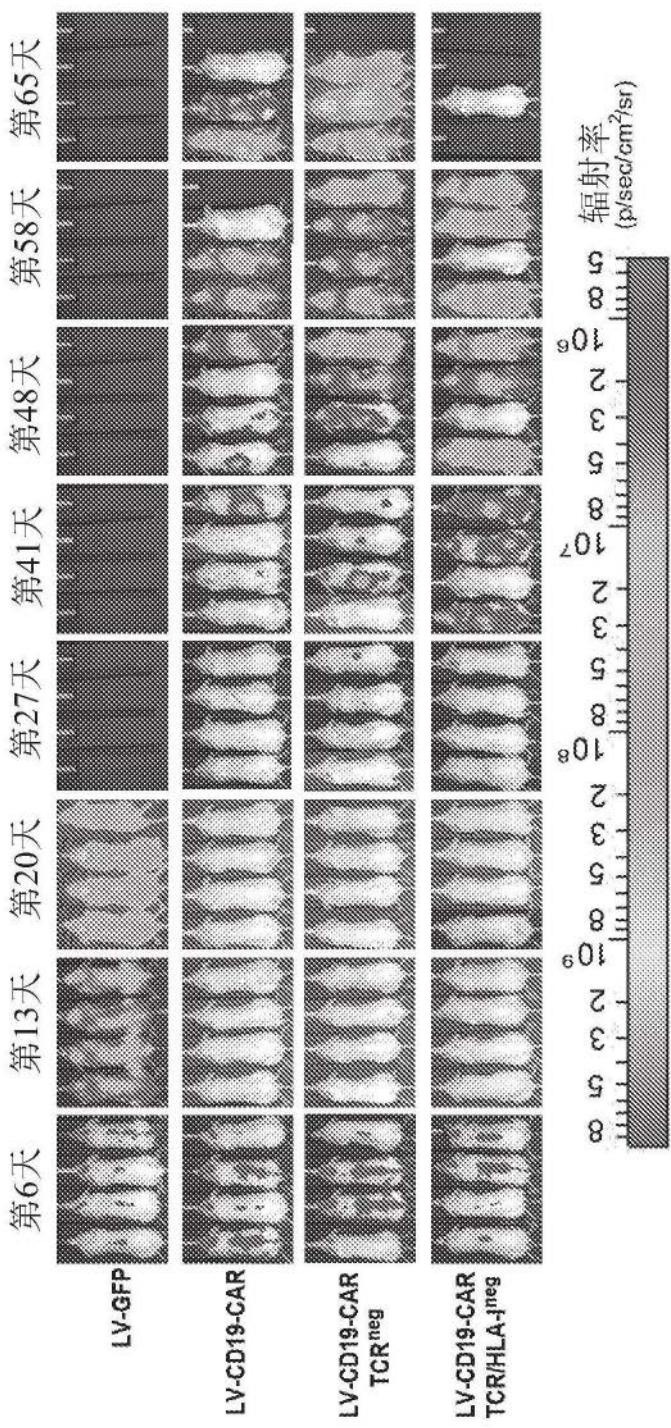


图31

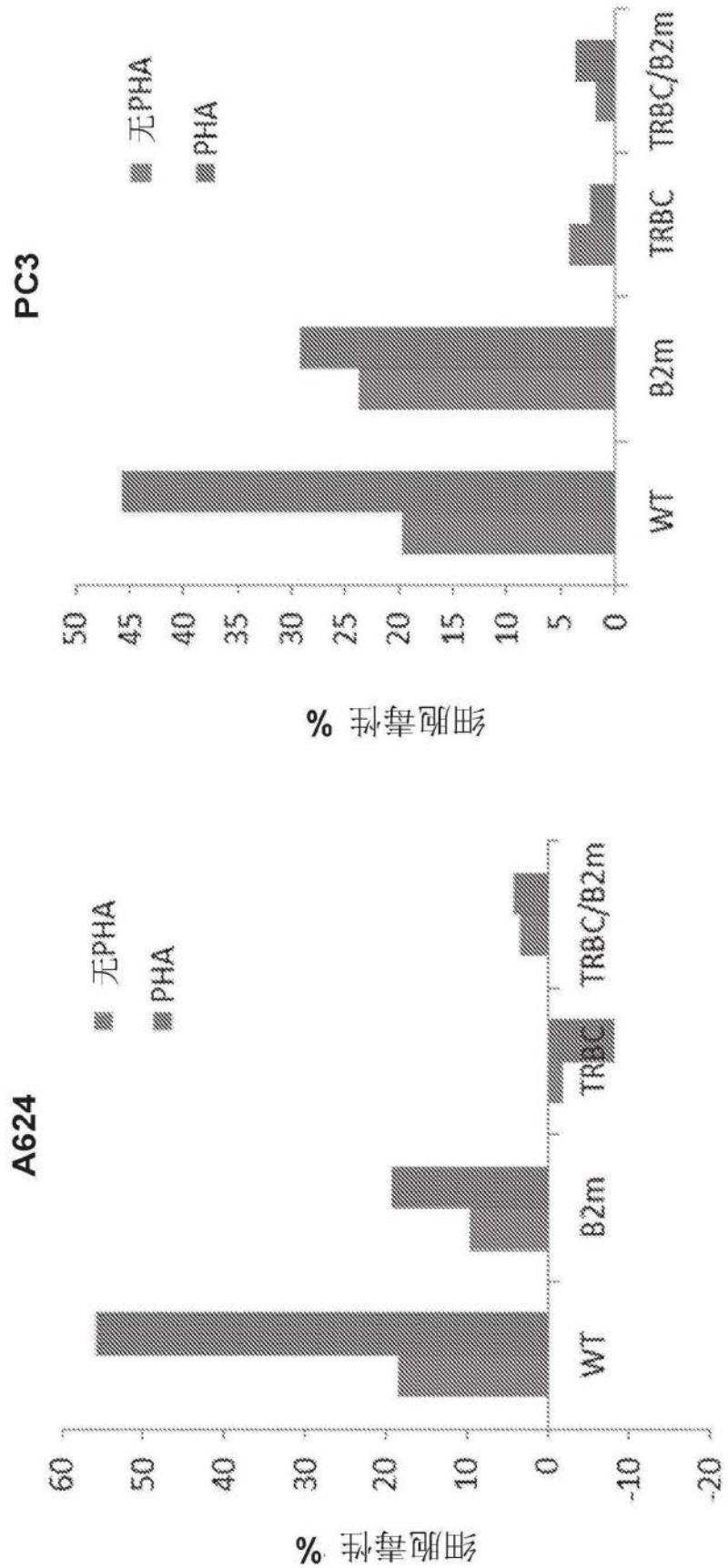


图32A

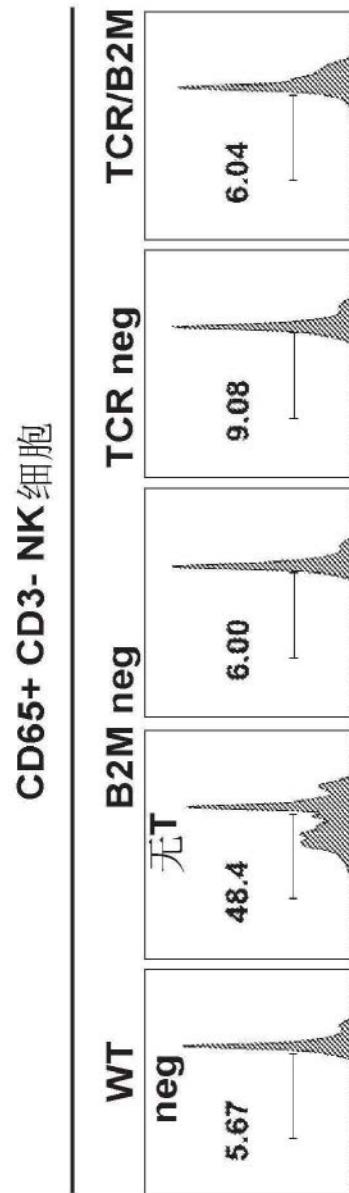


图32B

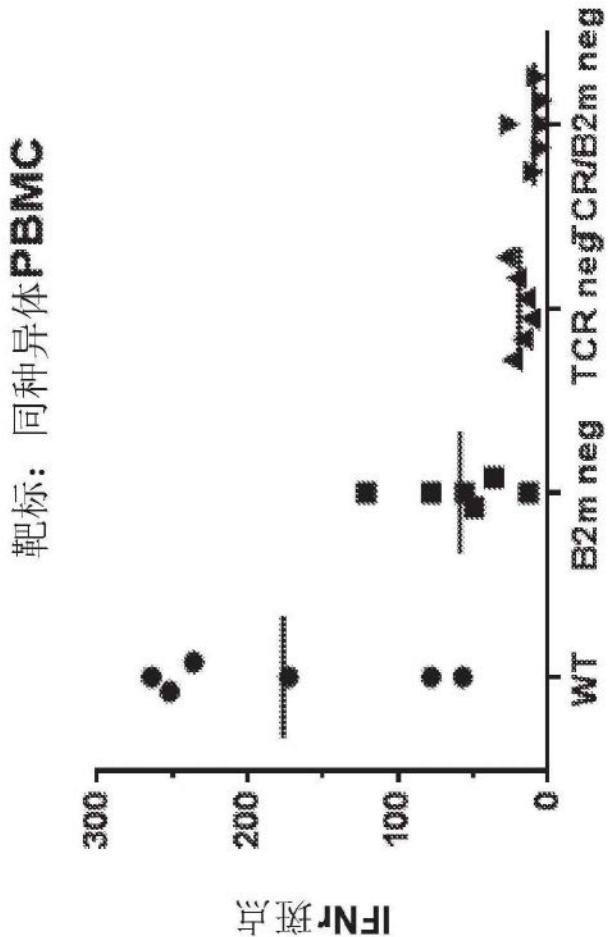


图32C

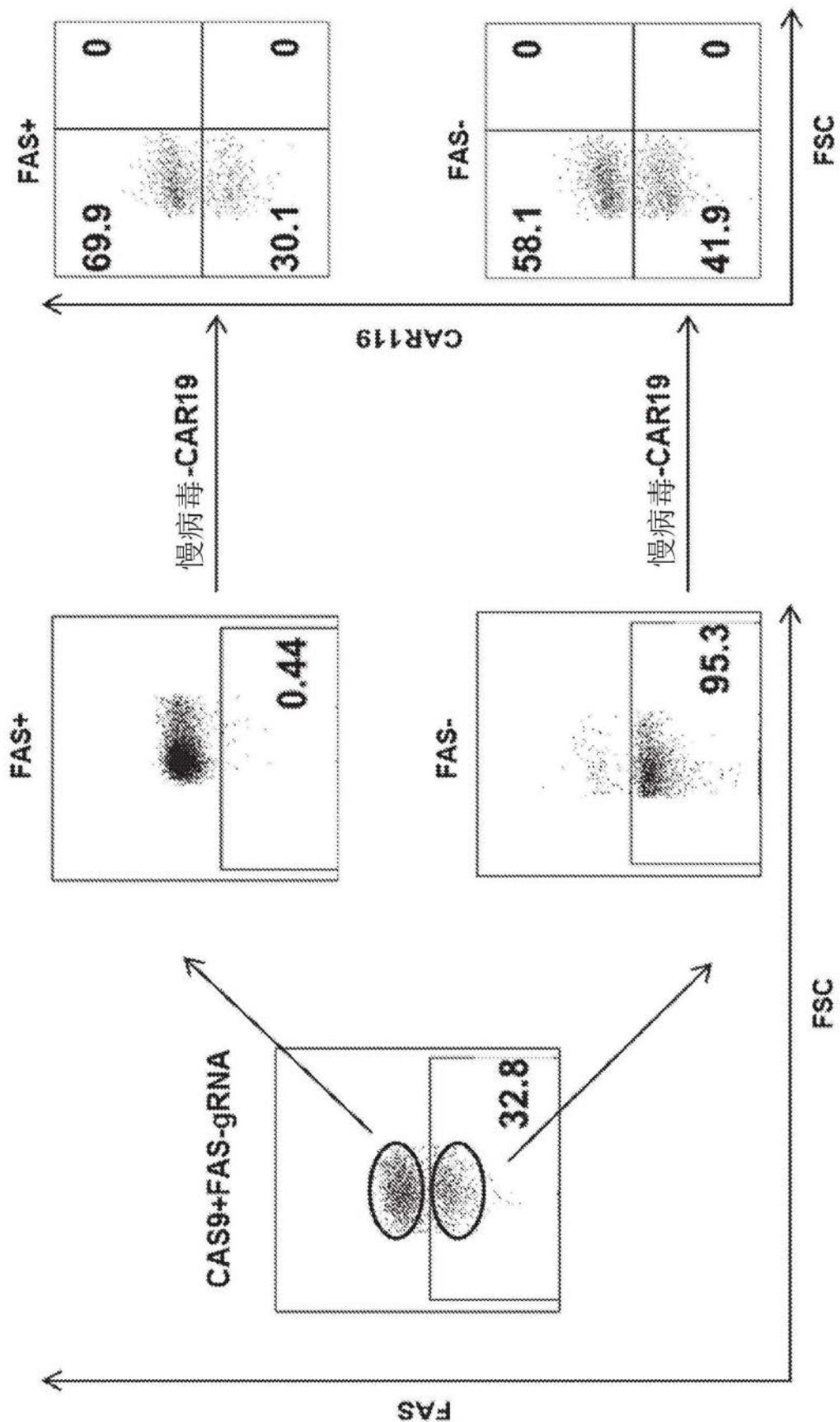


图33

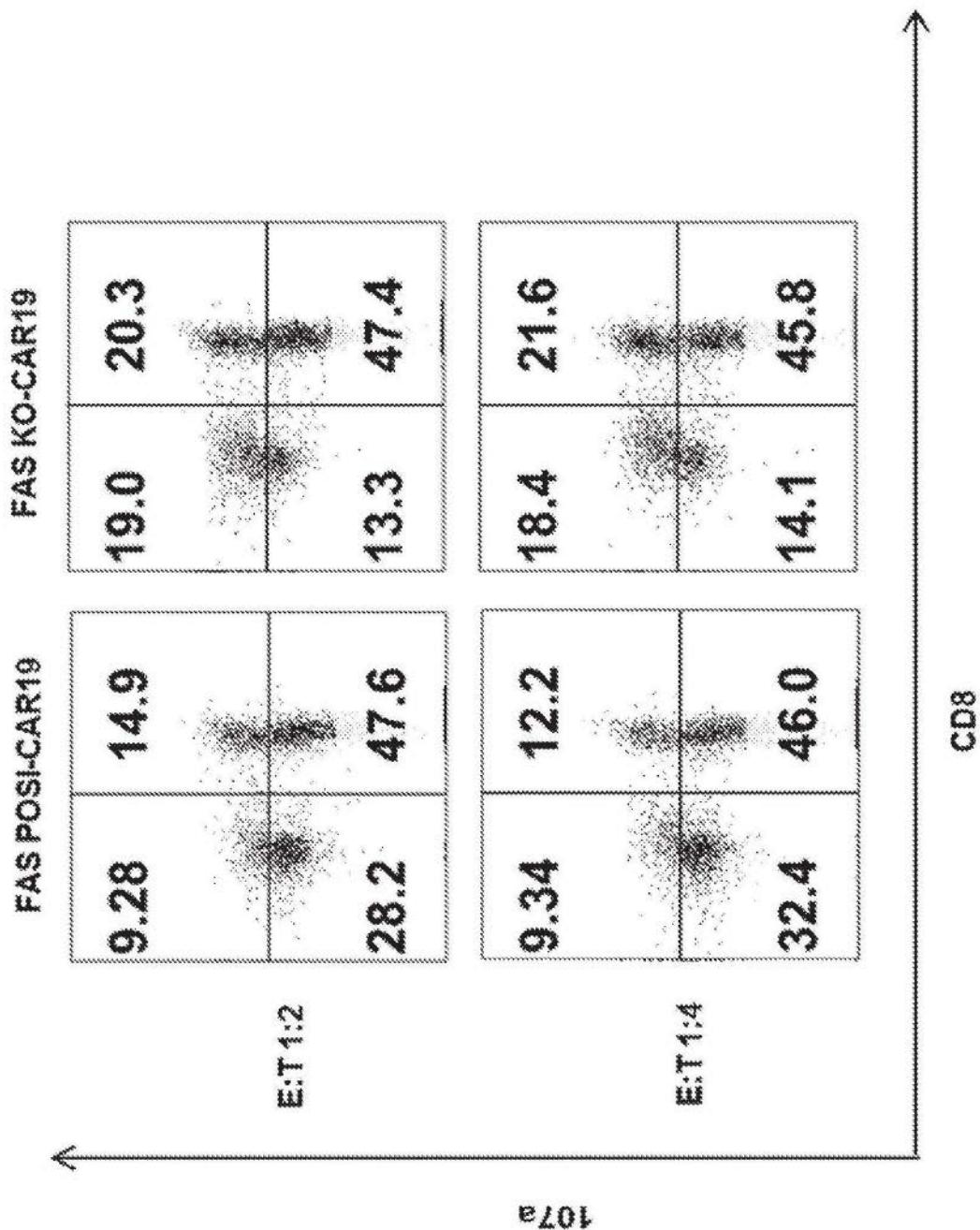


图33继续

与K562-CD19共培养

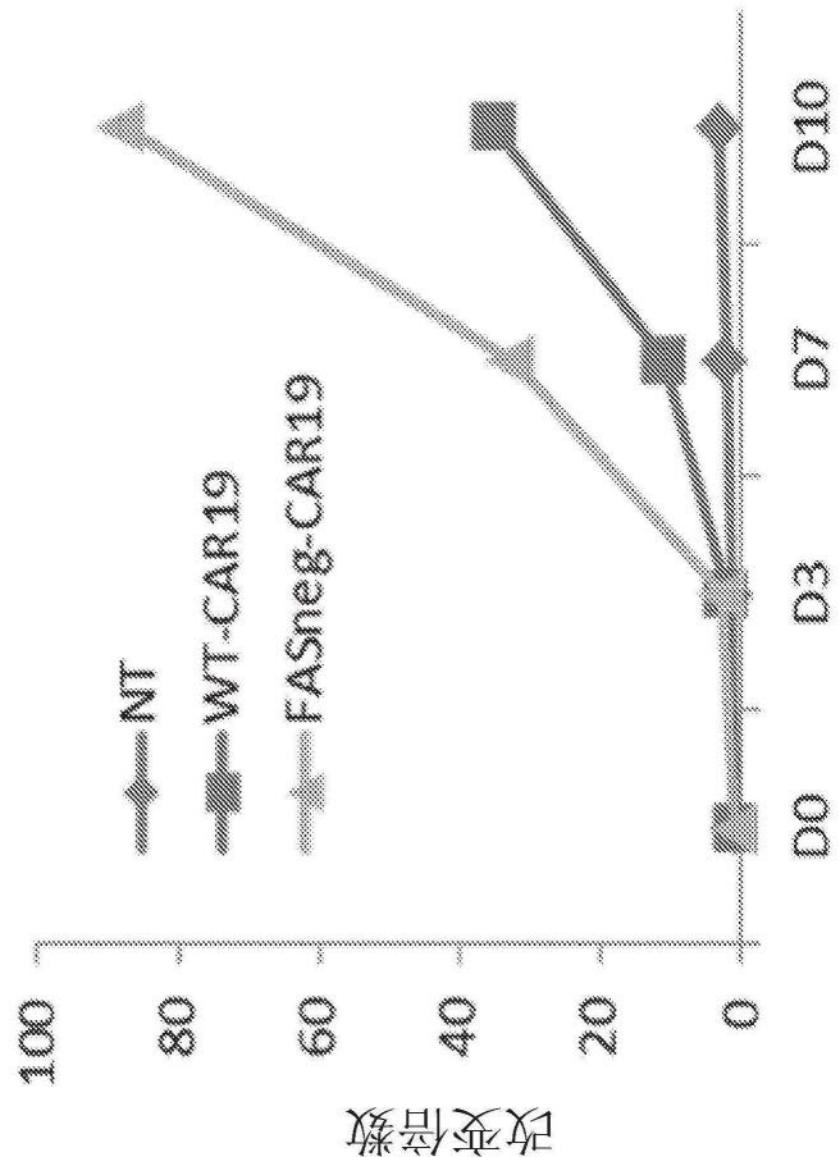
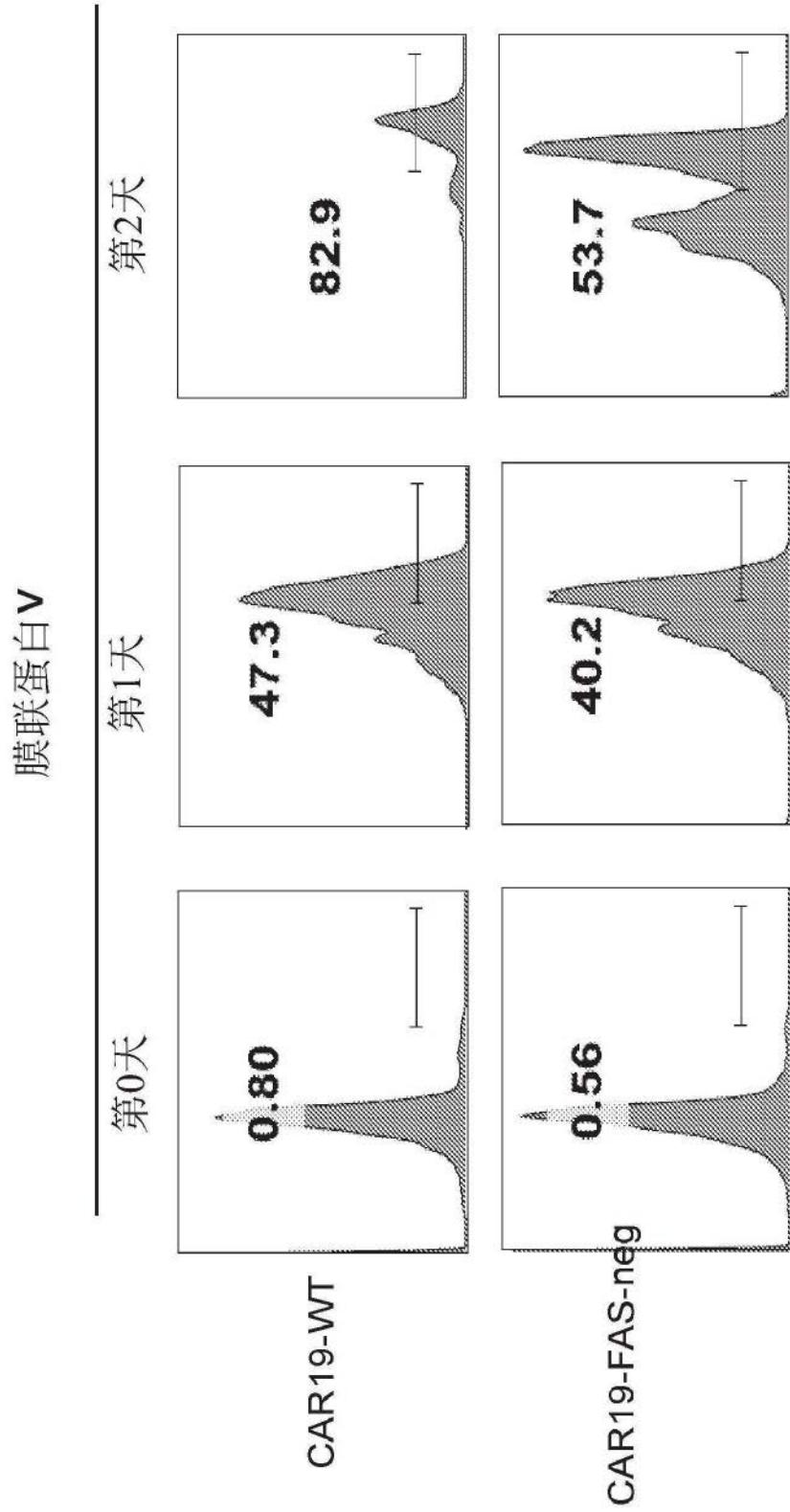


图34A



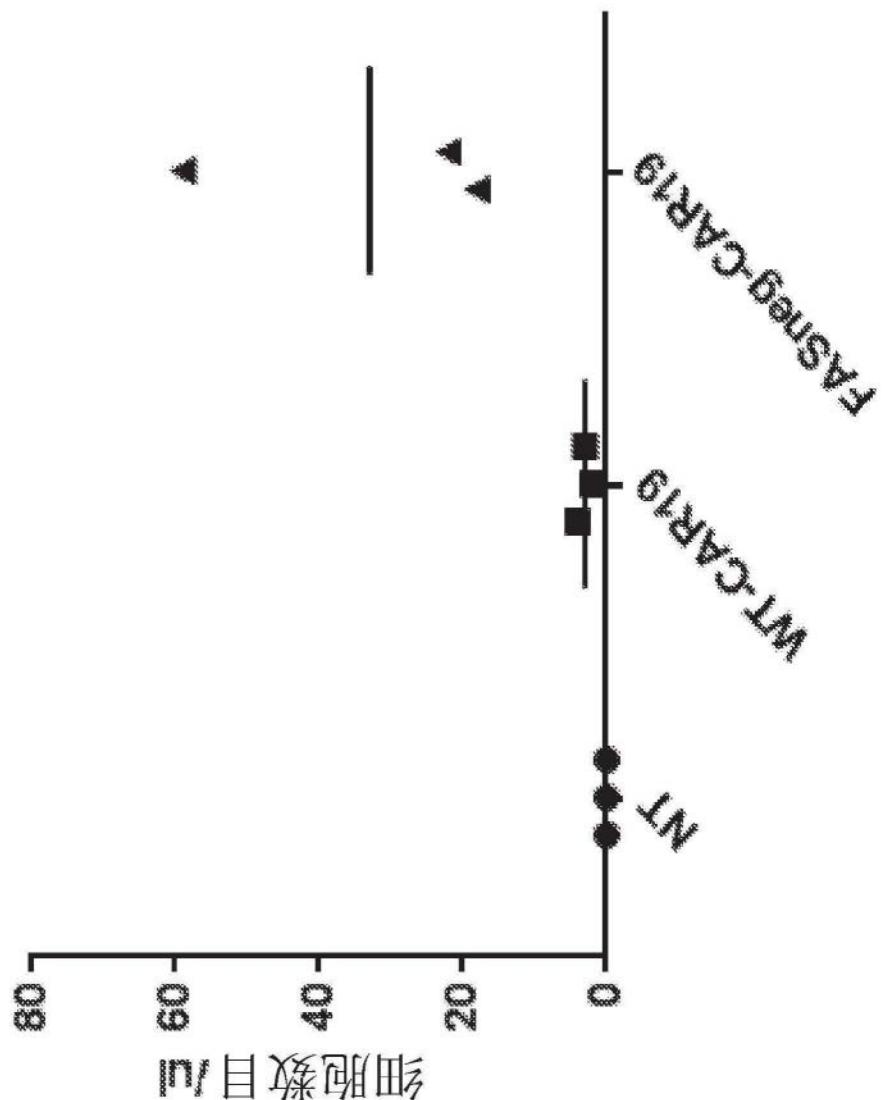
CD3 真实计数测定

图35A

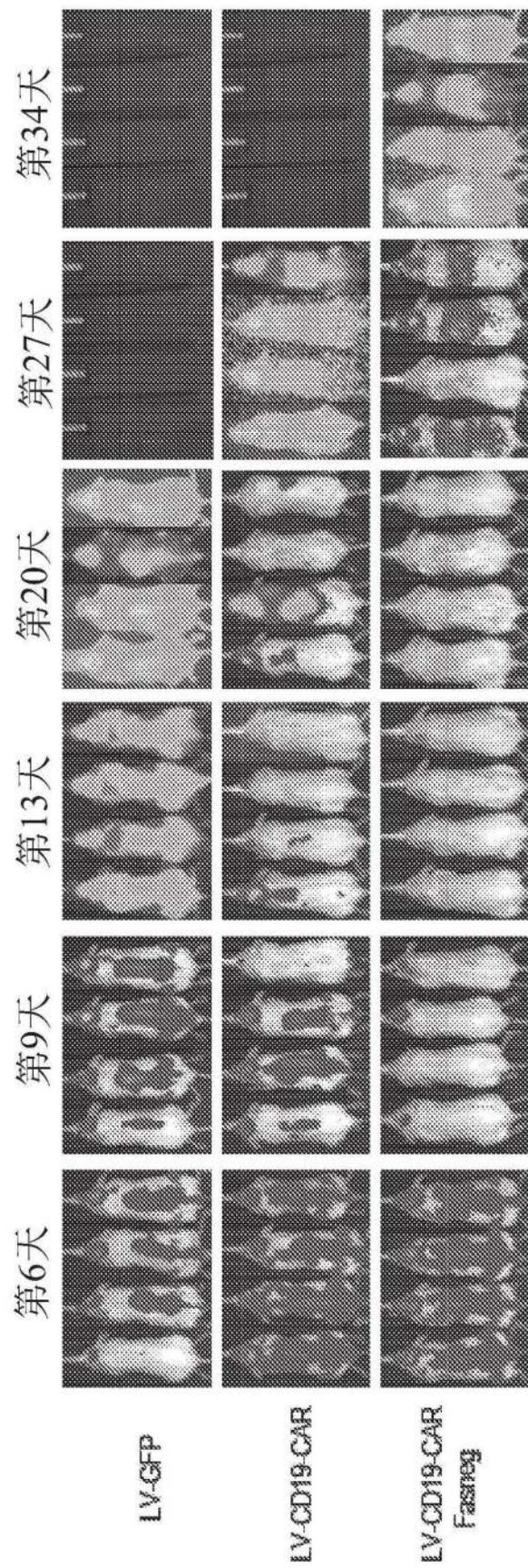


图35B

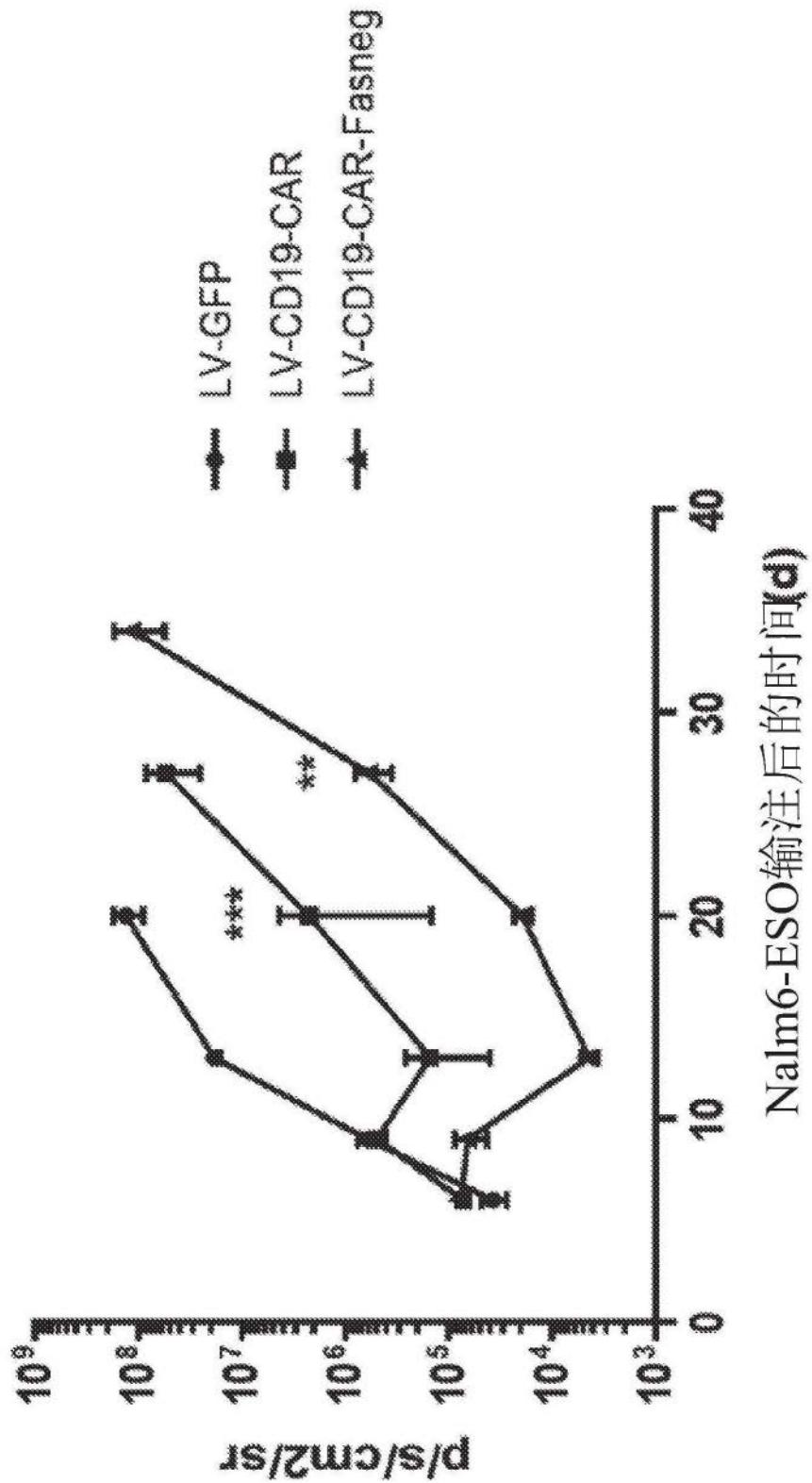


图35C

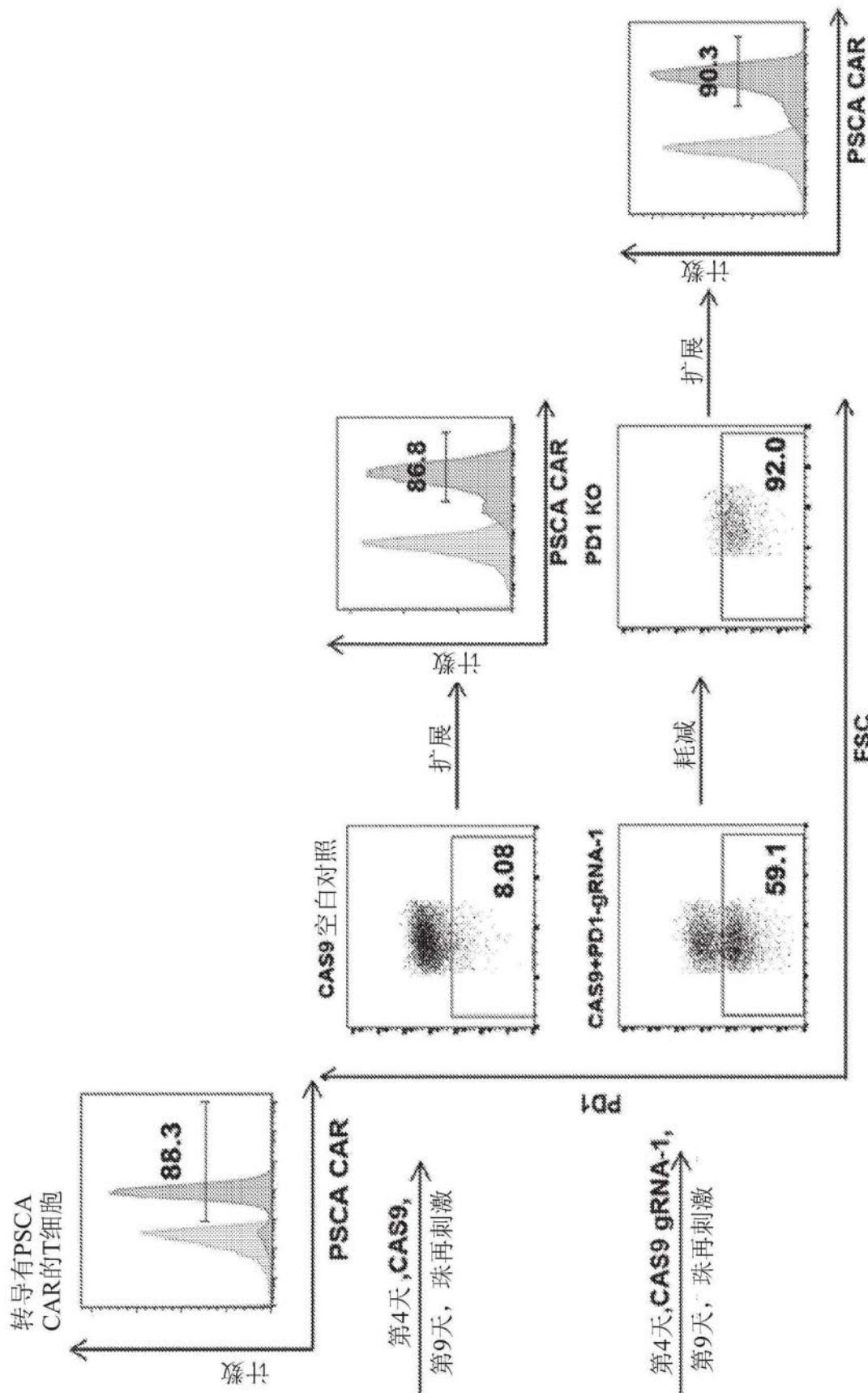


图36

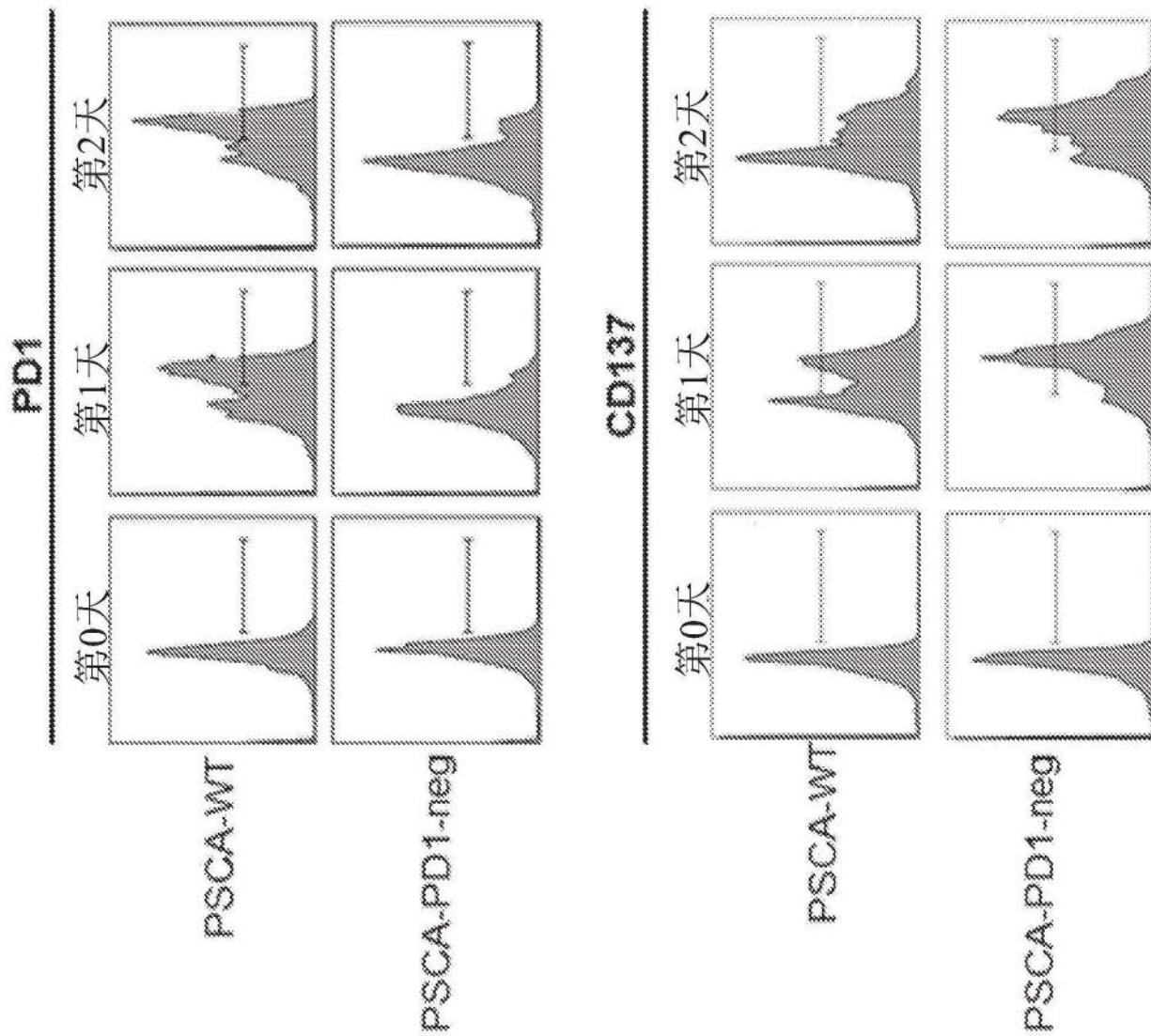


图37

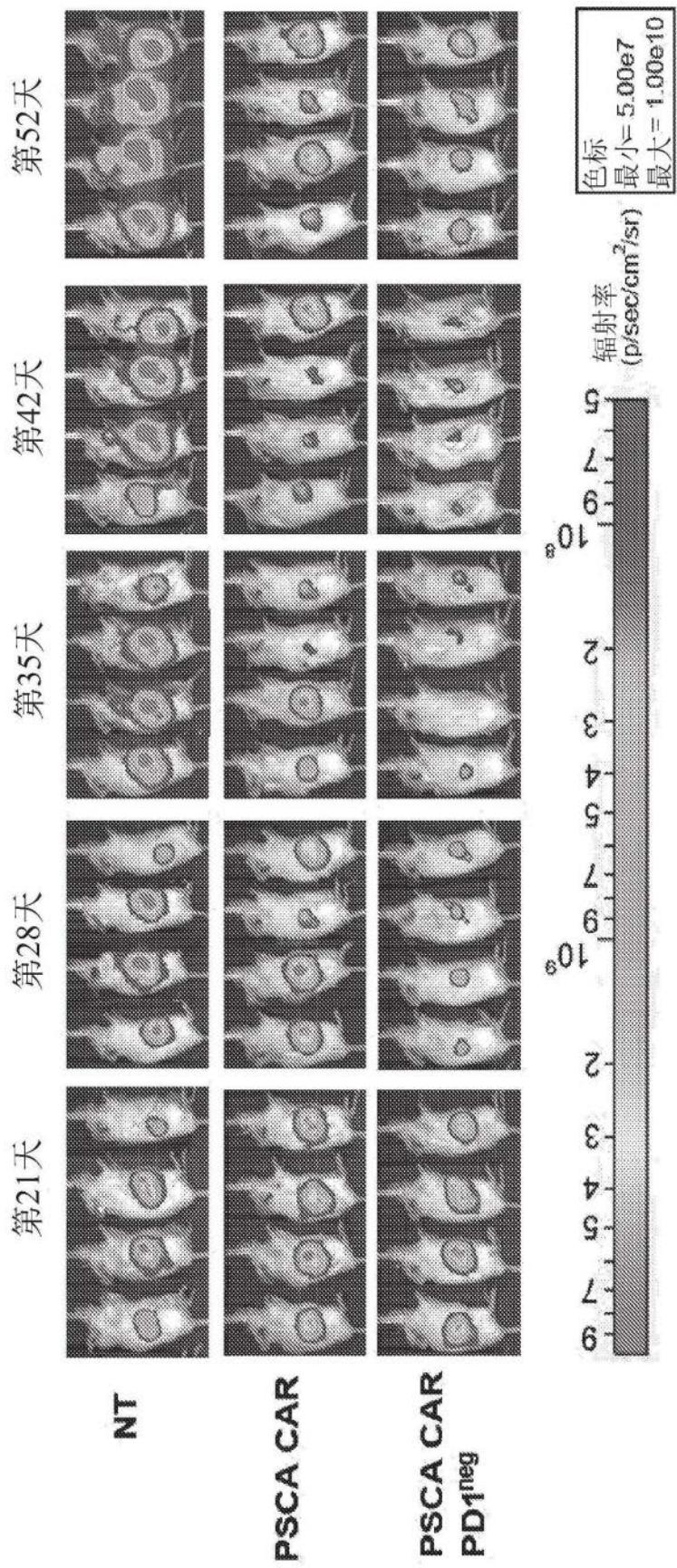


图38A

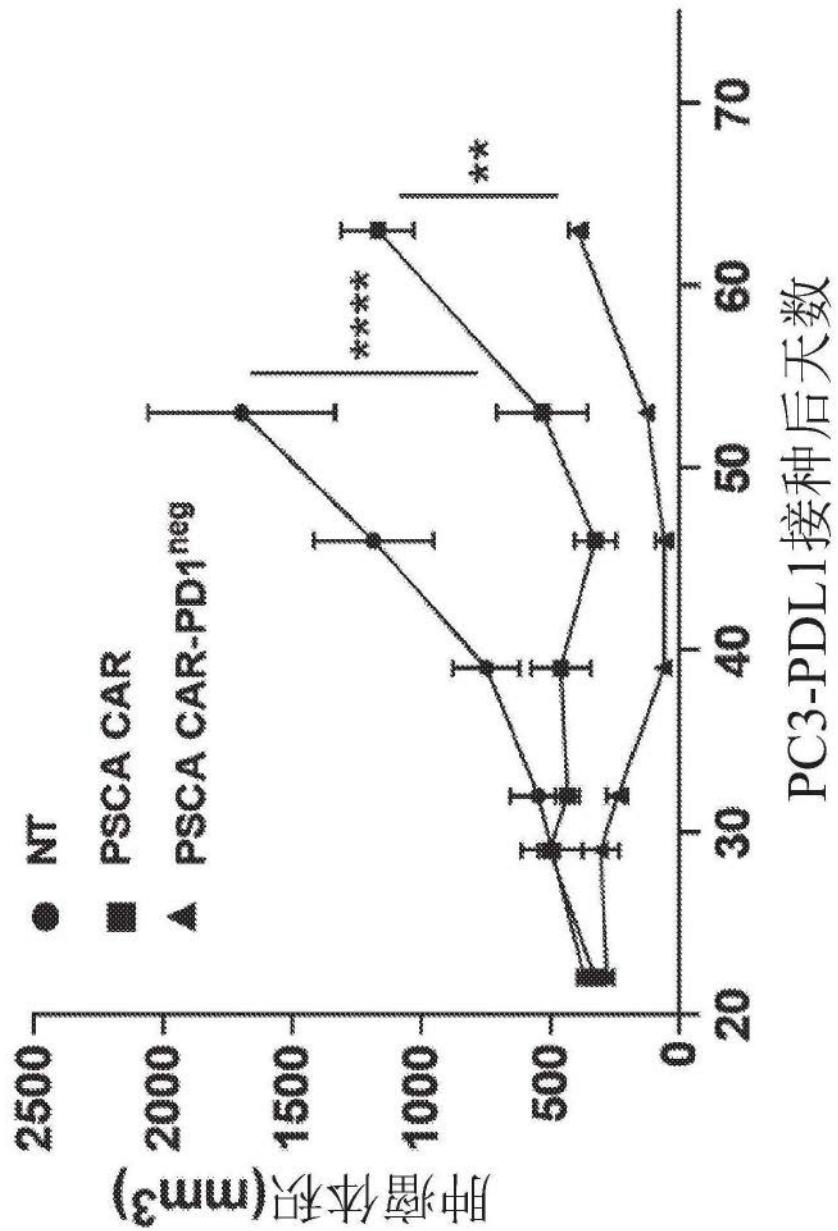


图38B

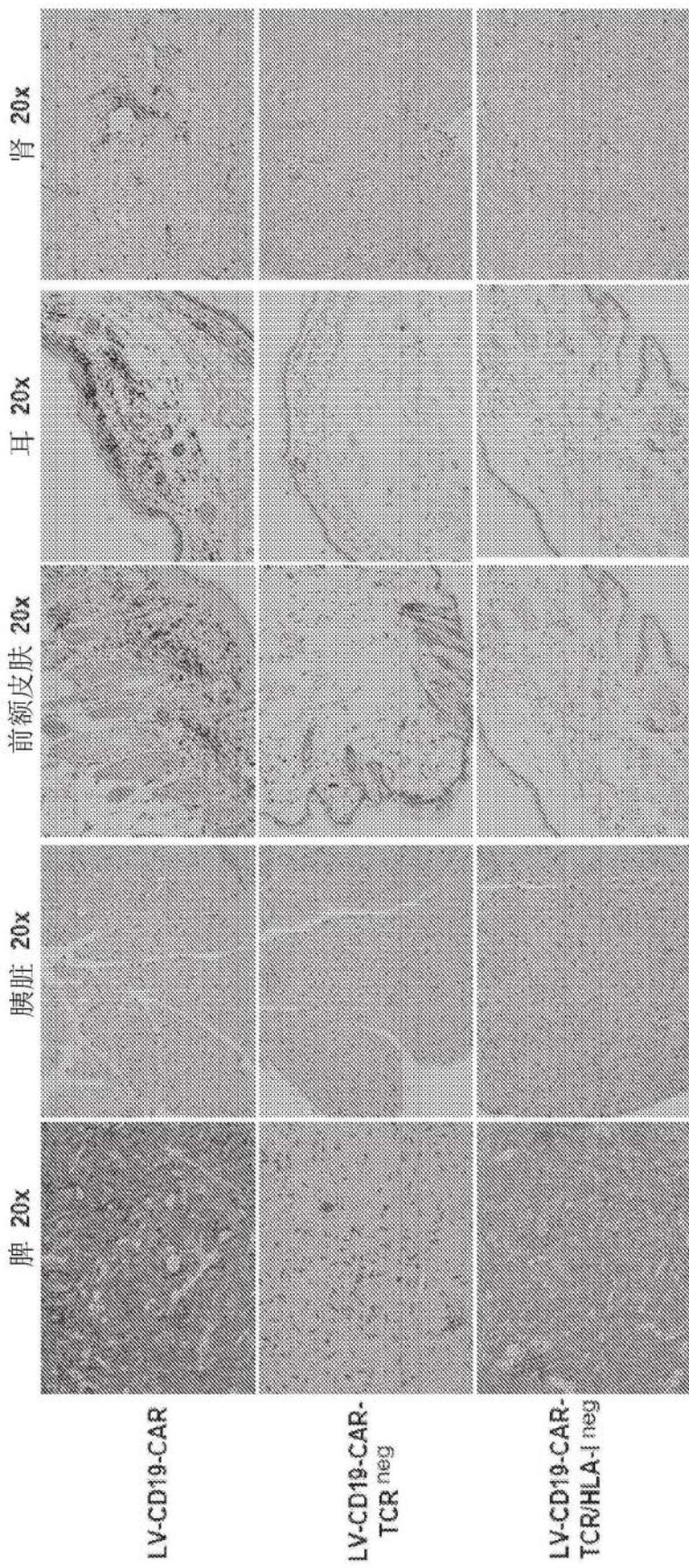


图39

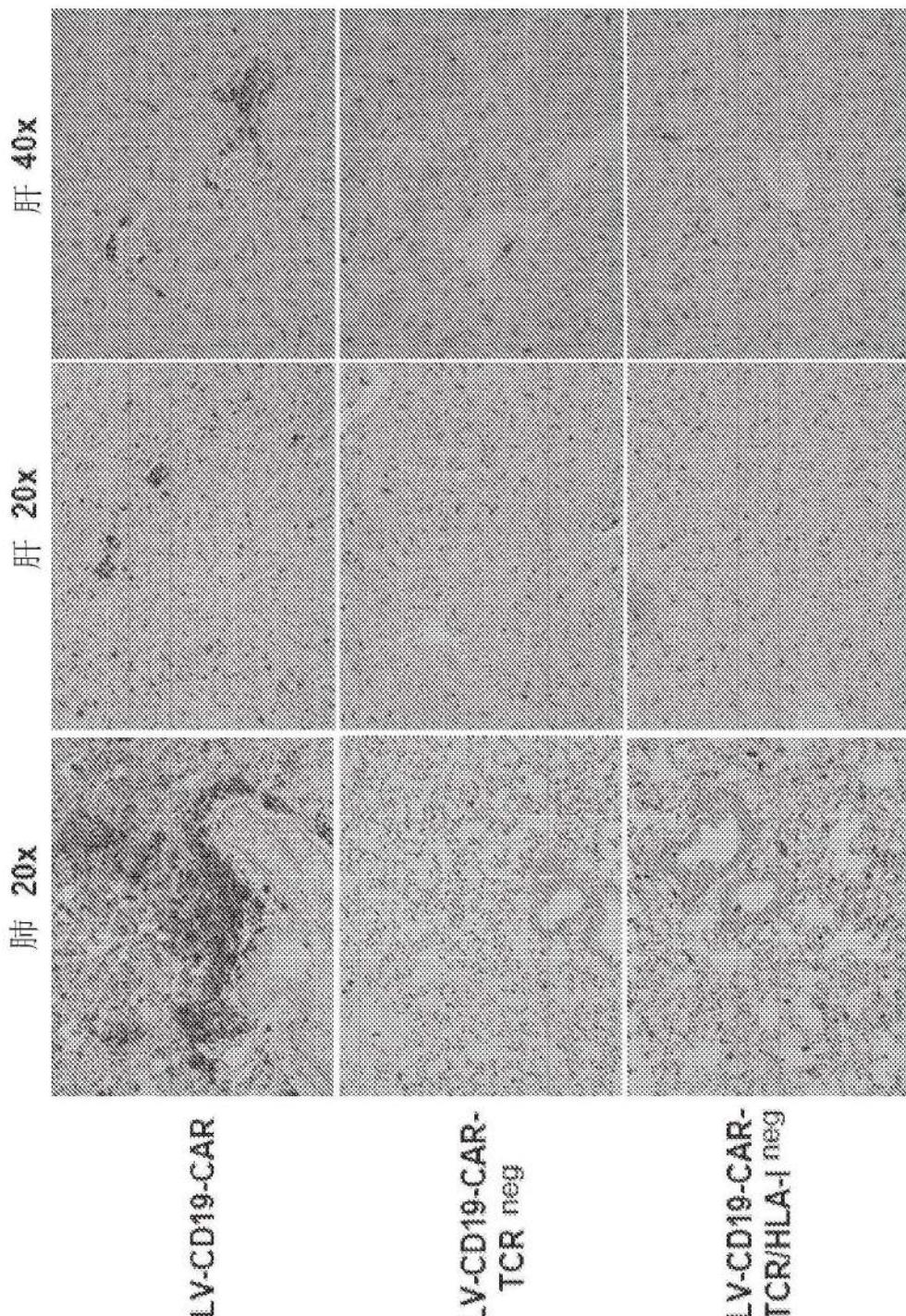


图39继续

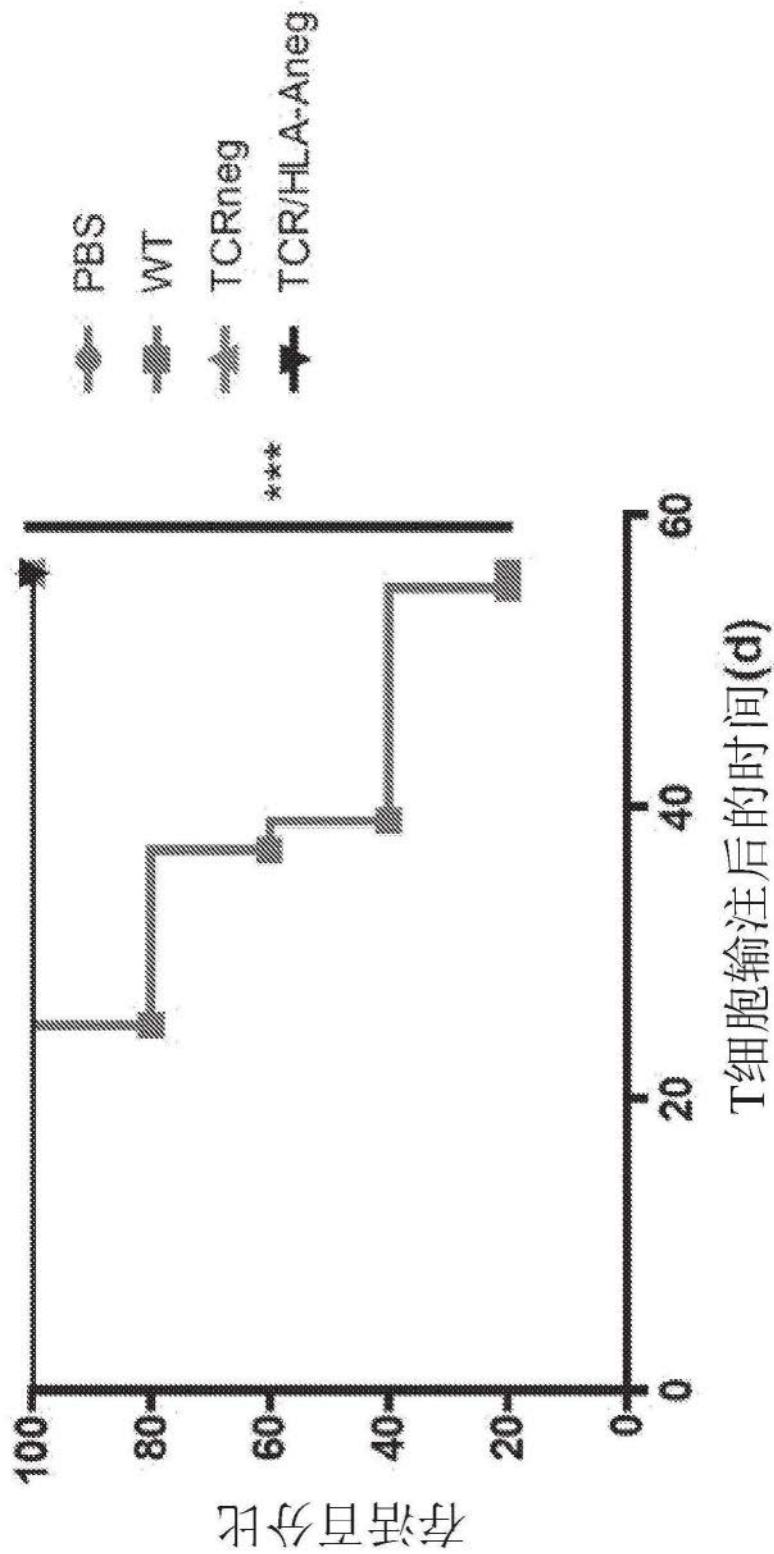


图40A

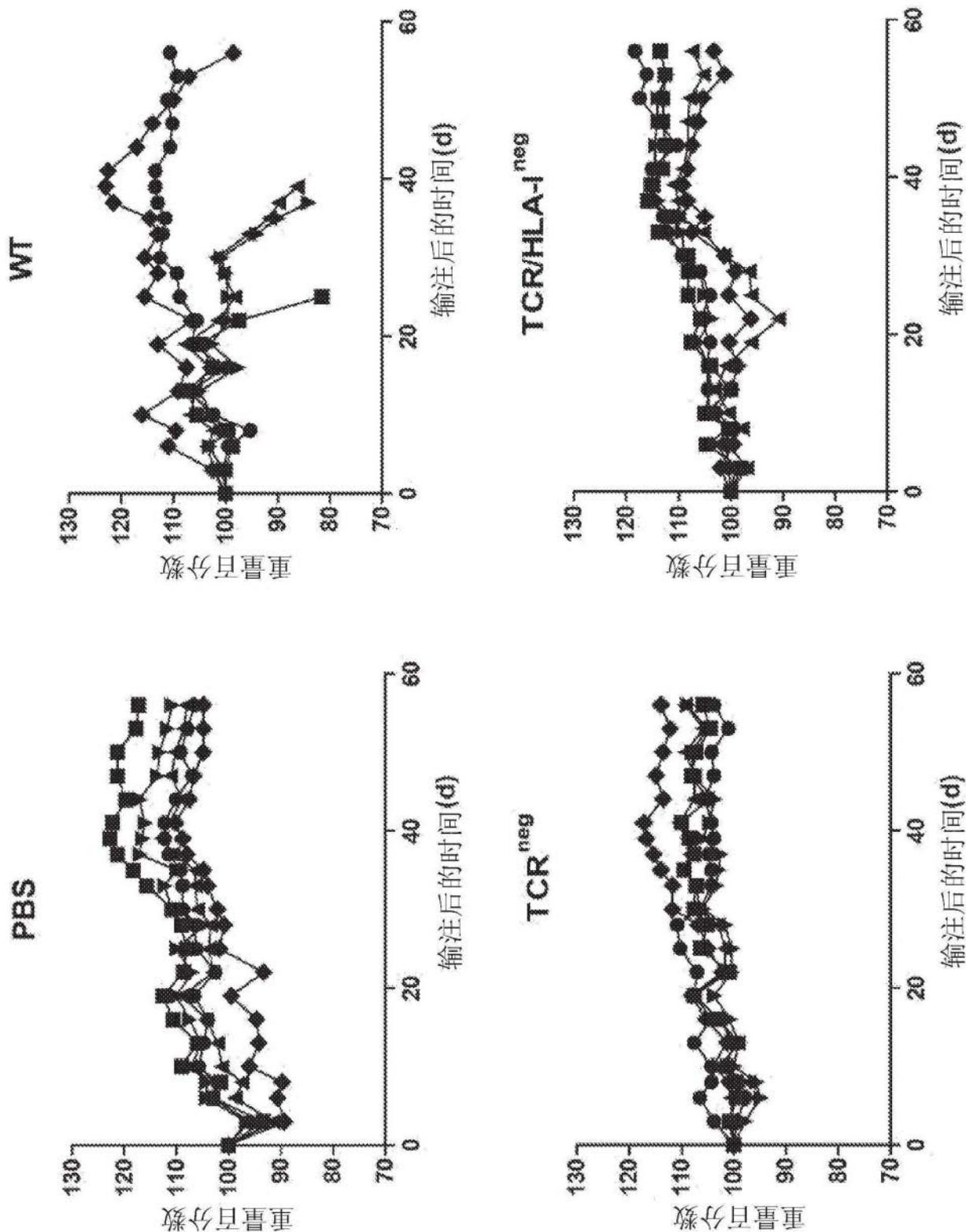


图40B

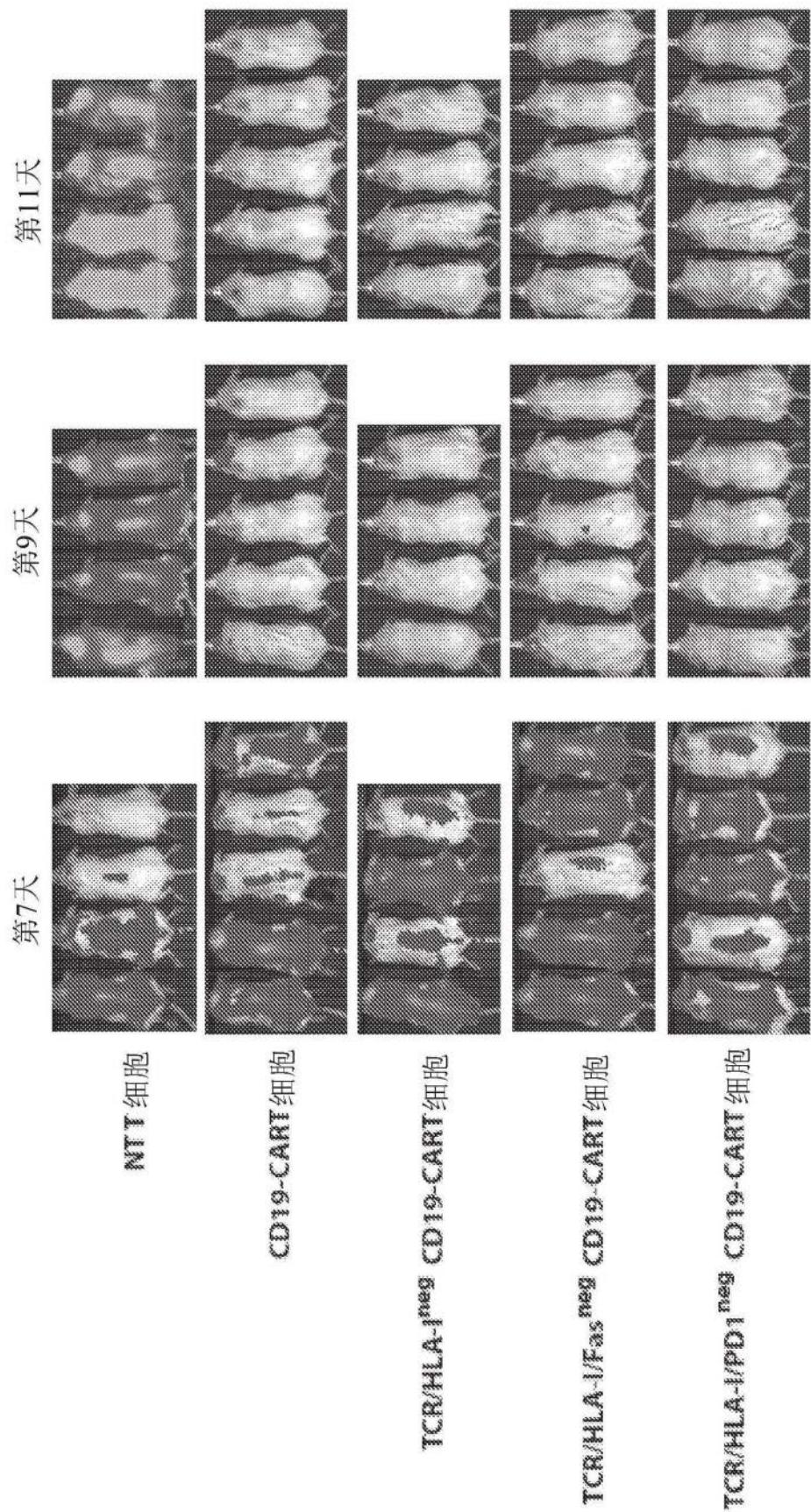


图41A

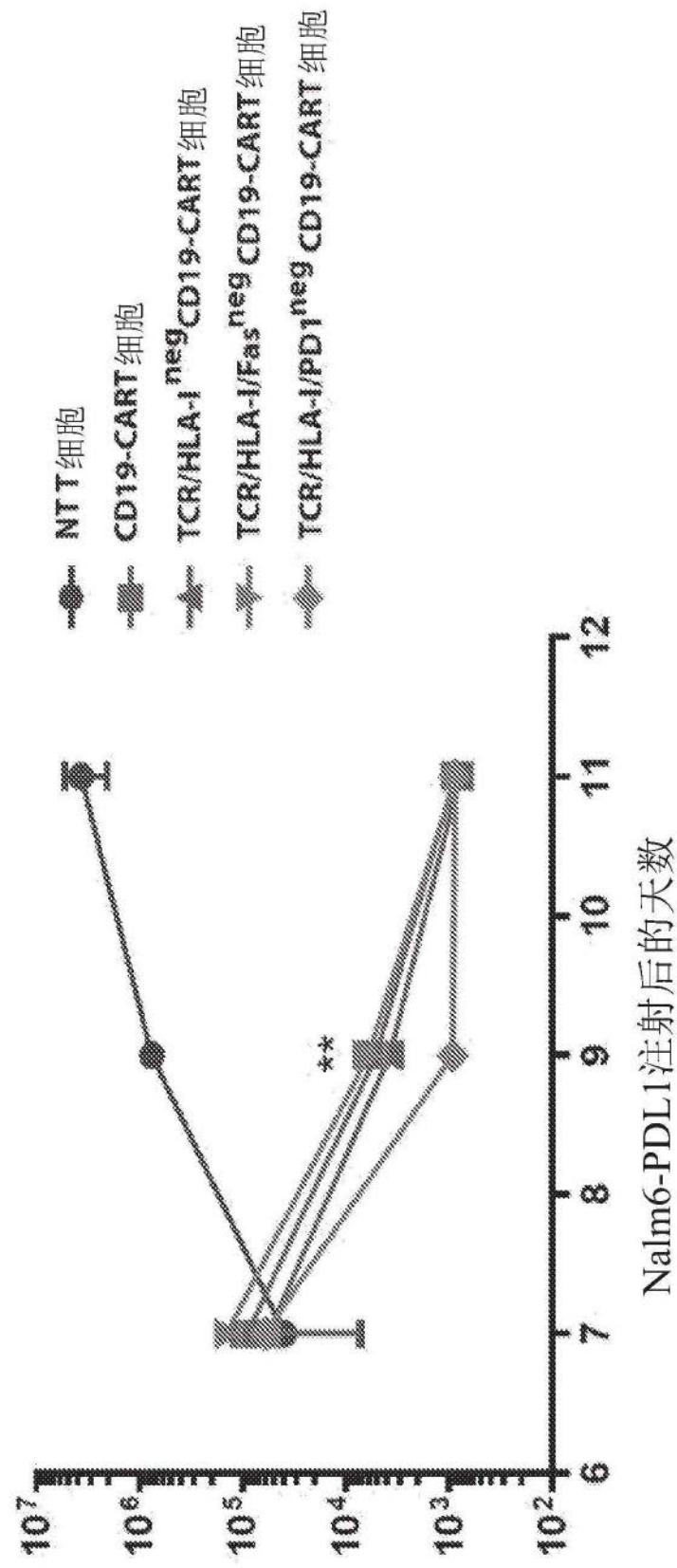


图41B

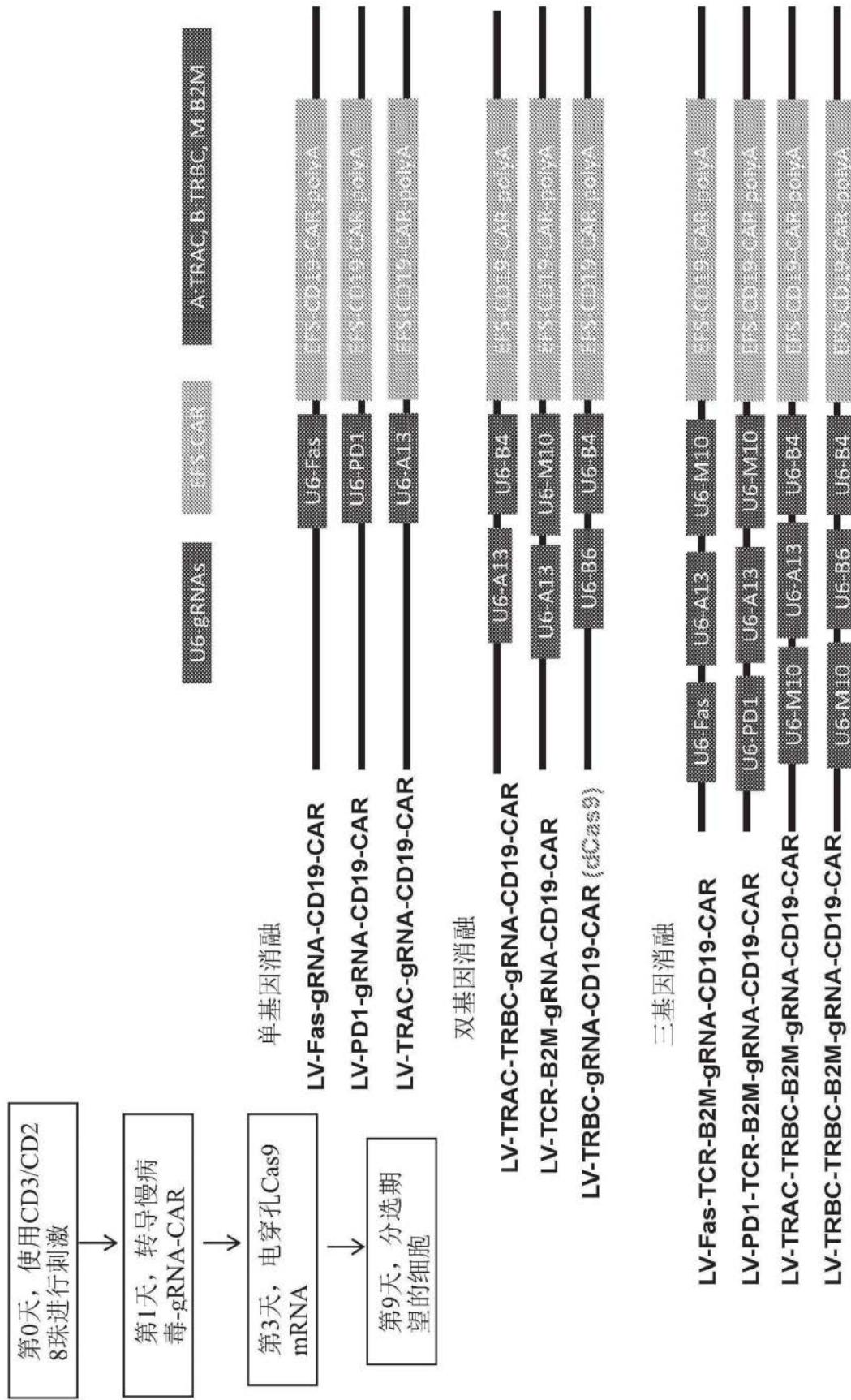


图42

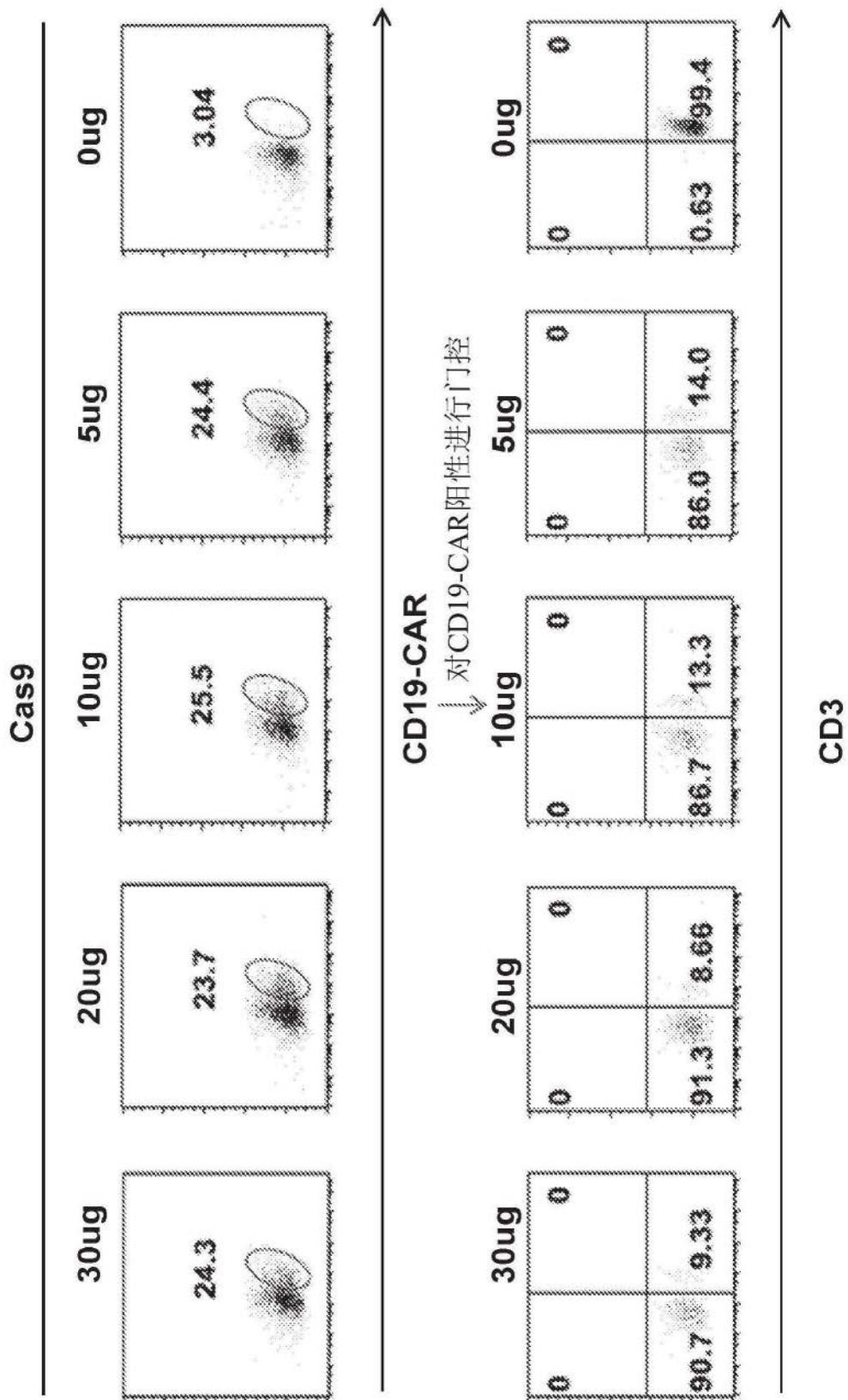
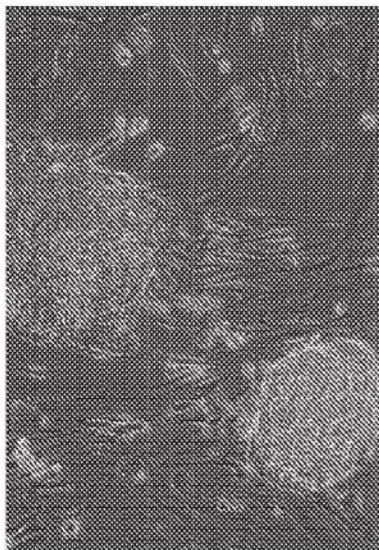
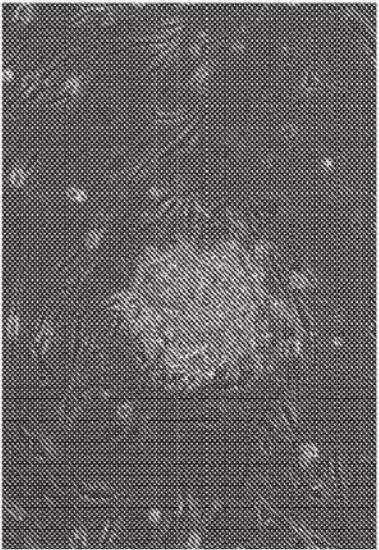


图43

第12天



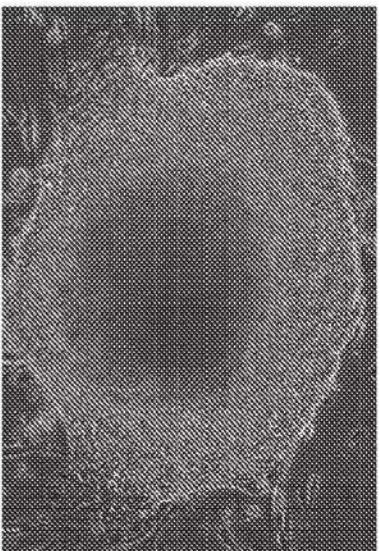
第18天，部分重编程iPSC



第4天



第18天



第0代

图44A

集落数目

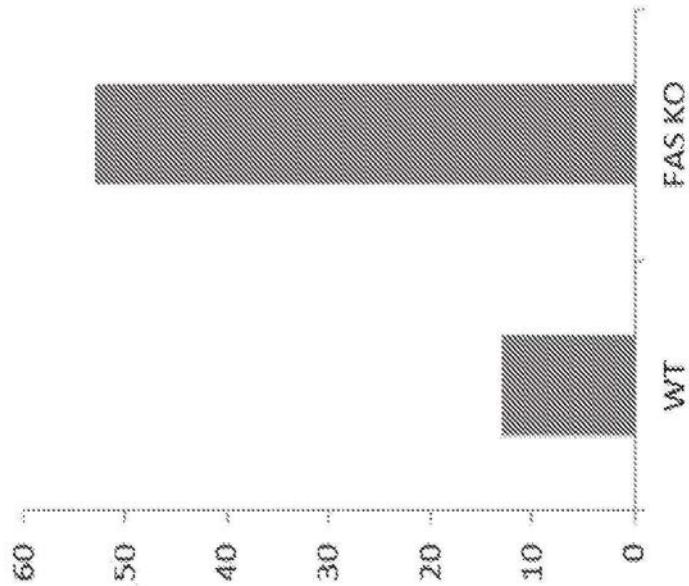


图44B

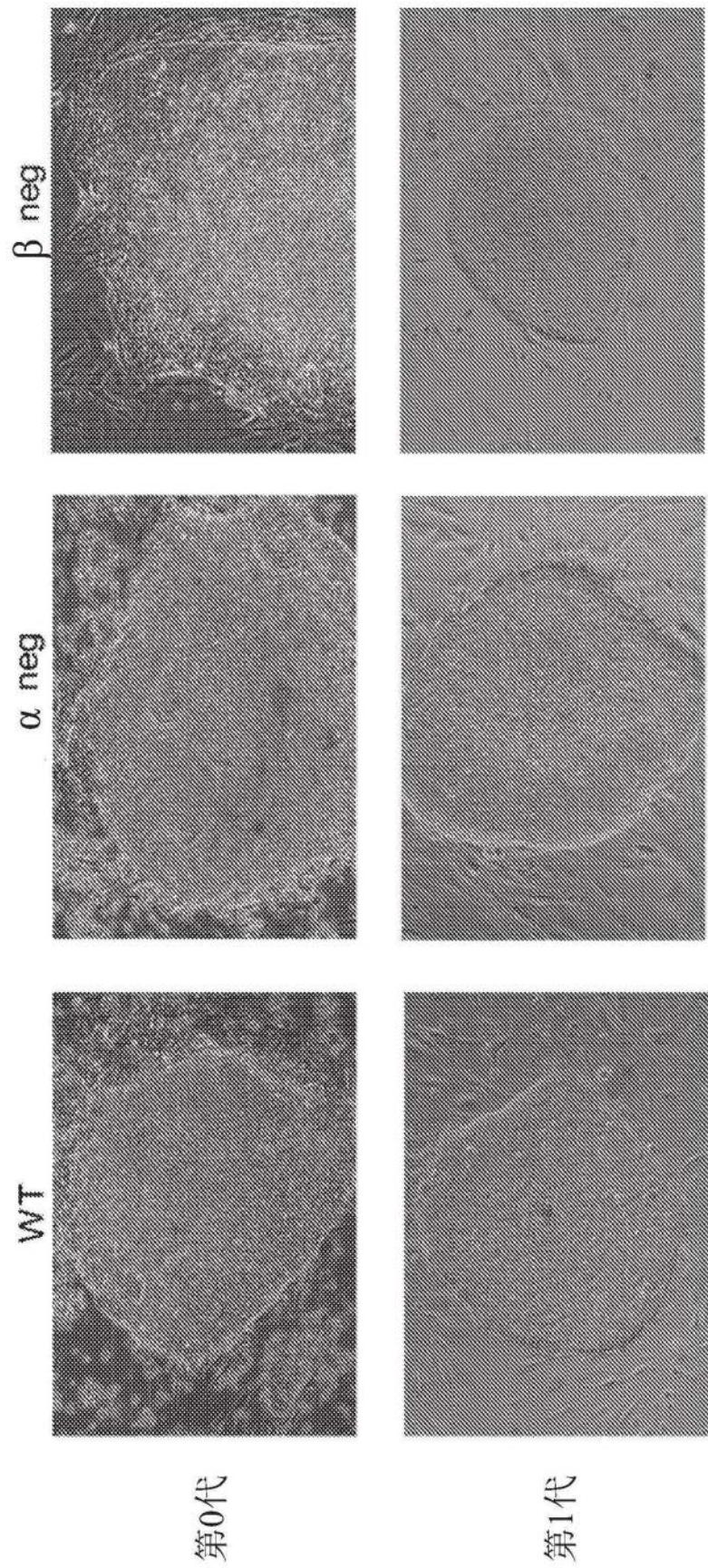


图45A

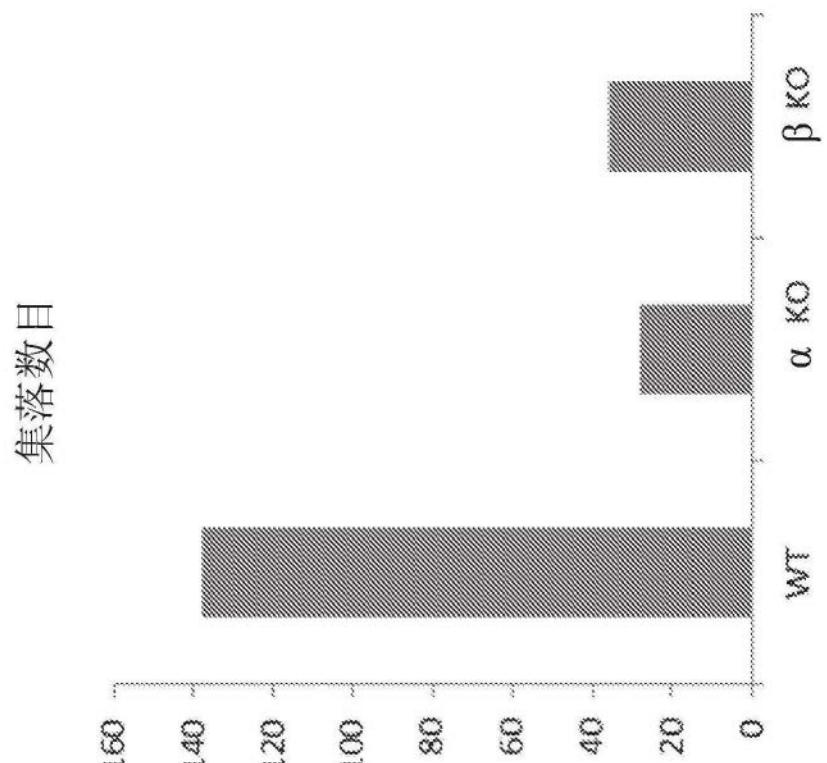


图45B

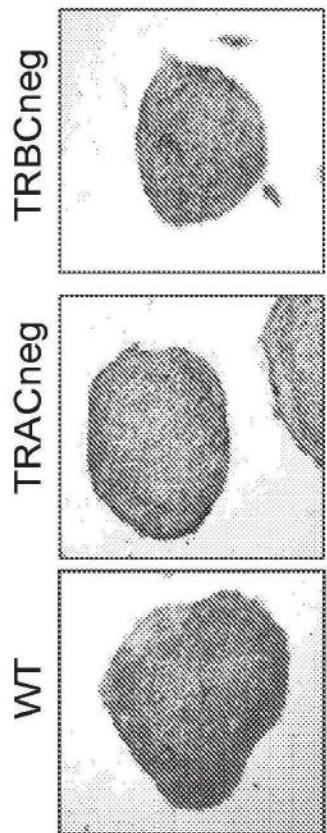


图45C

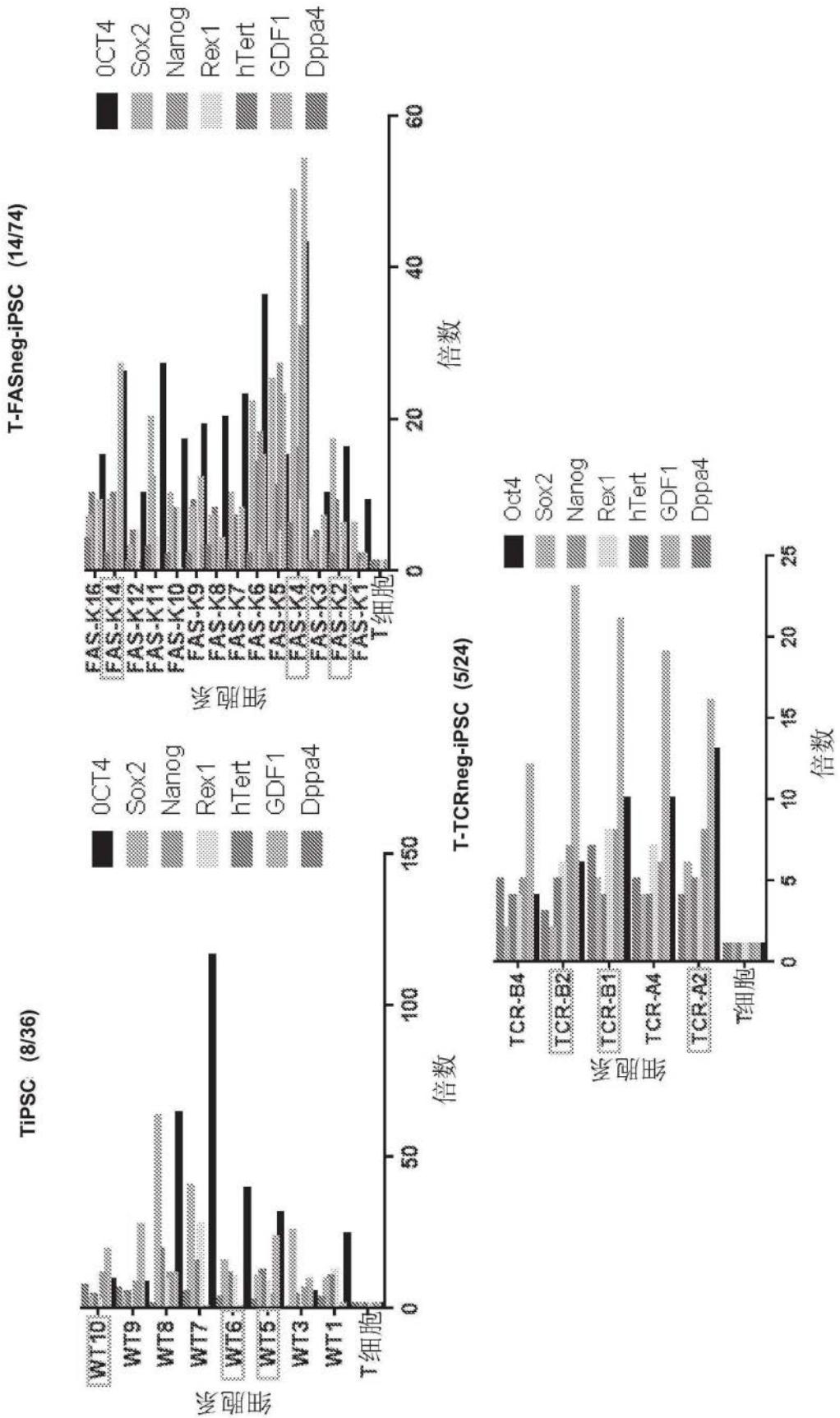


图46

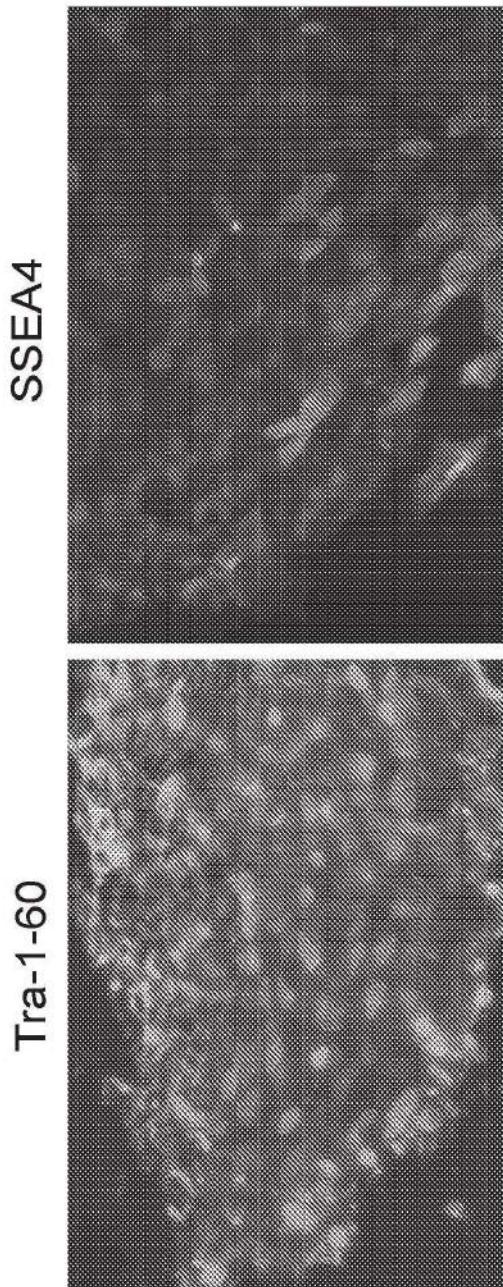


图47A

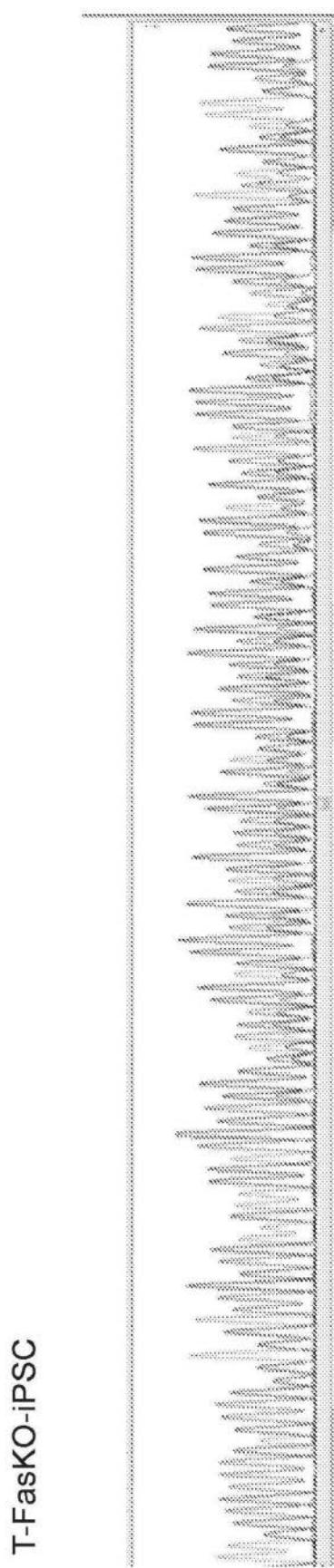


图47B

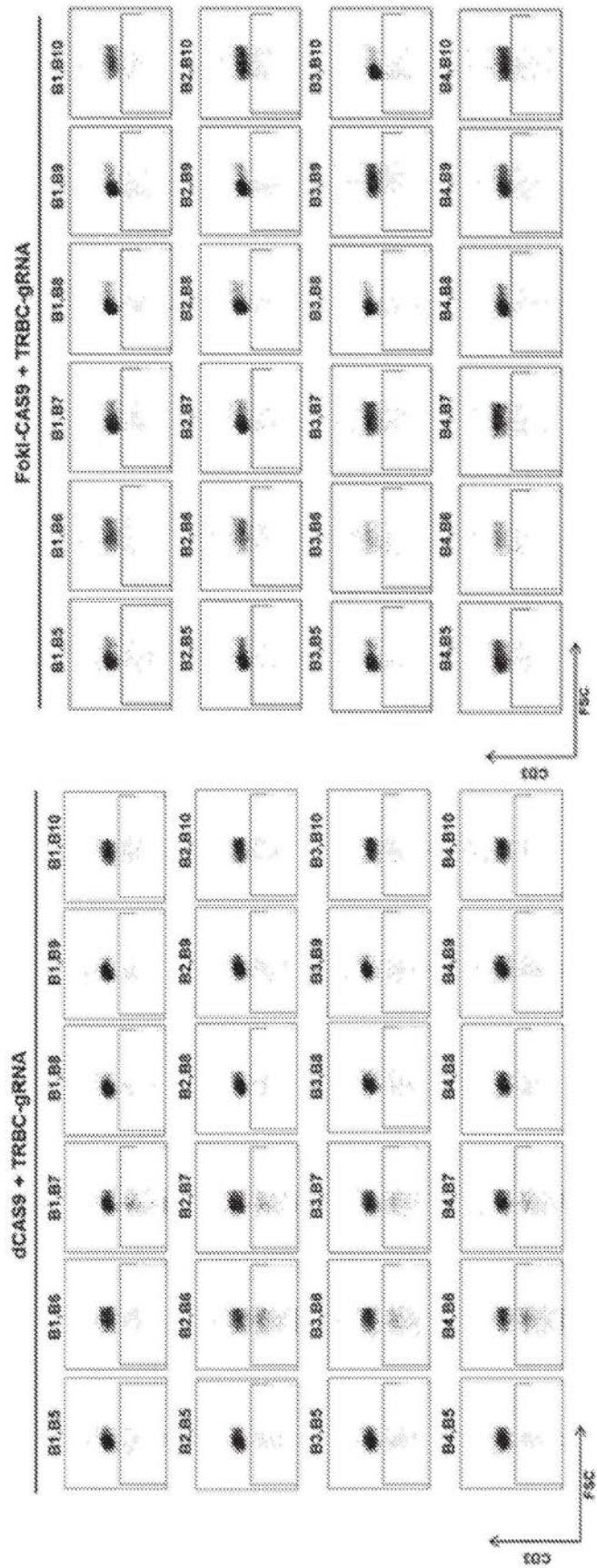


图48A

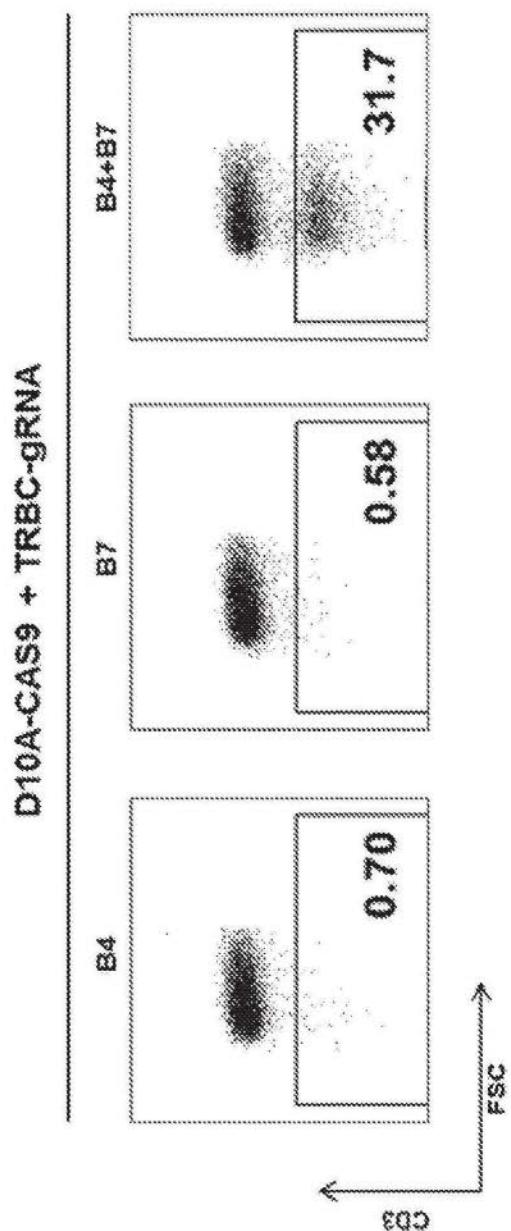


图48B

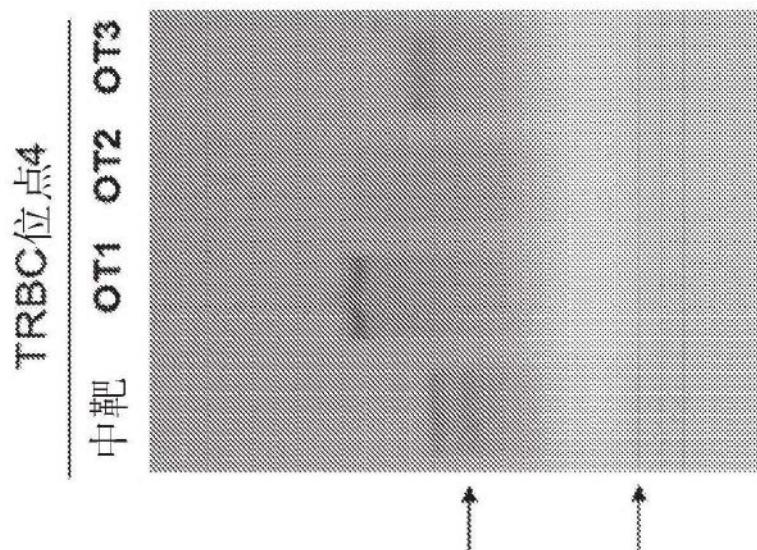


图48C

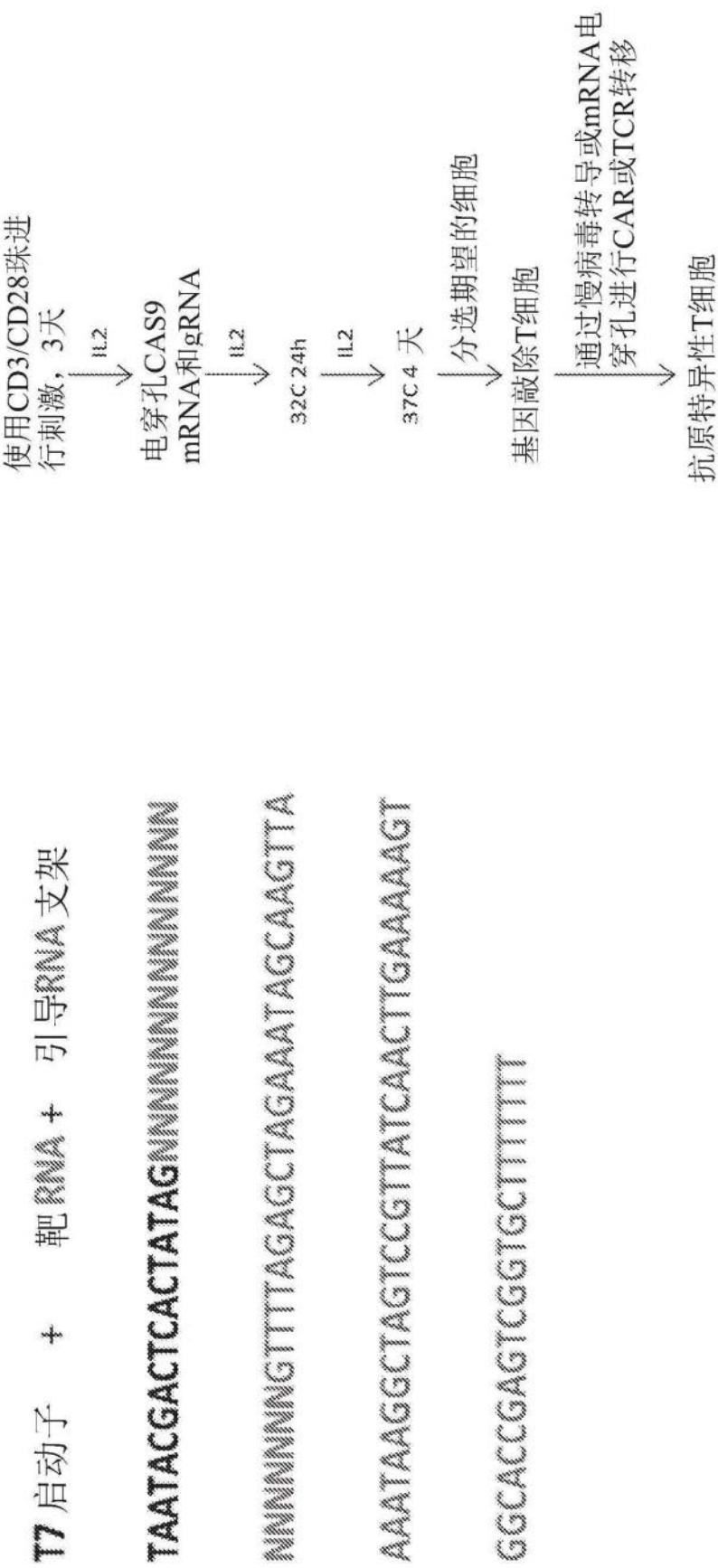


图49

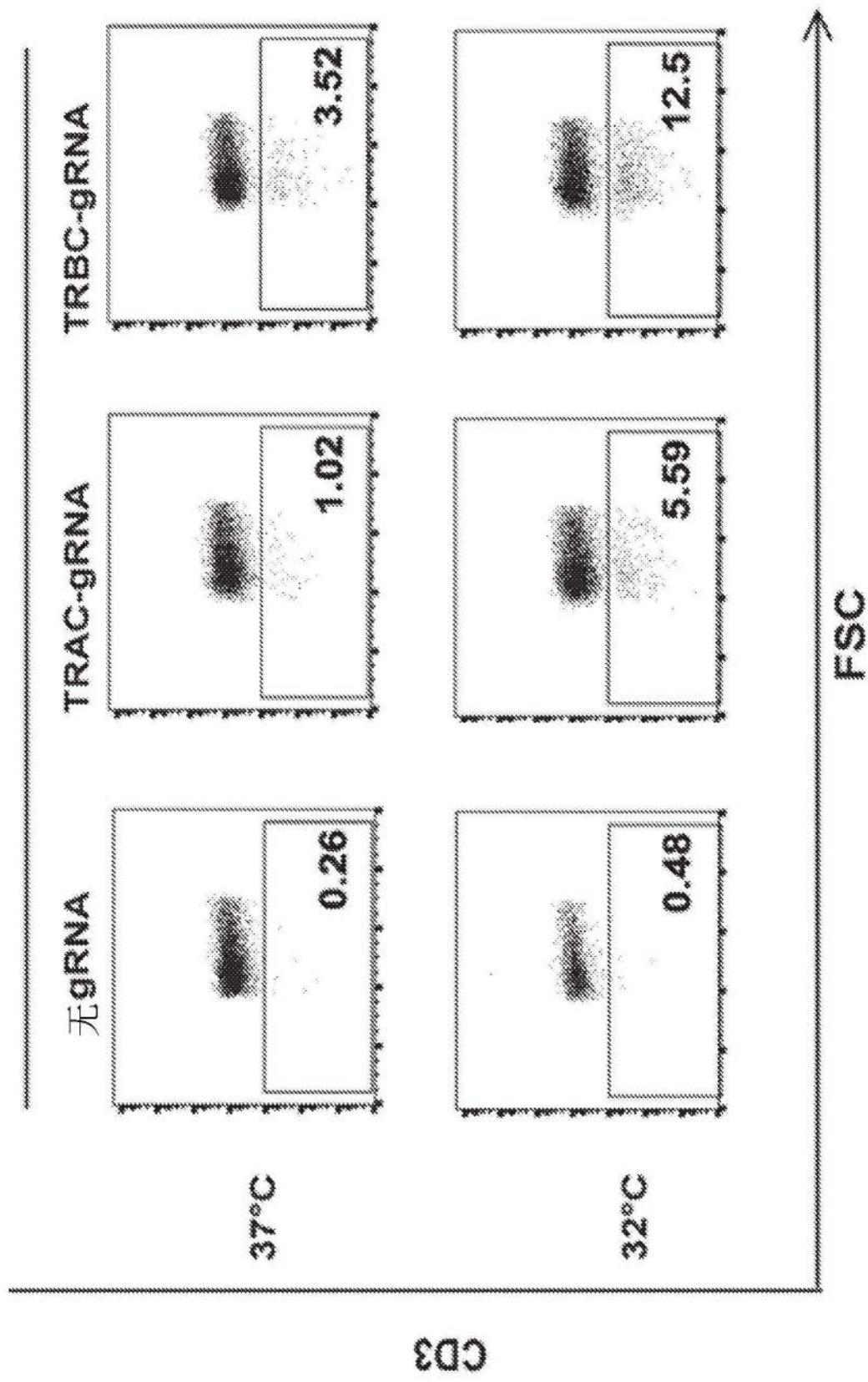


图50A

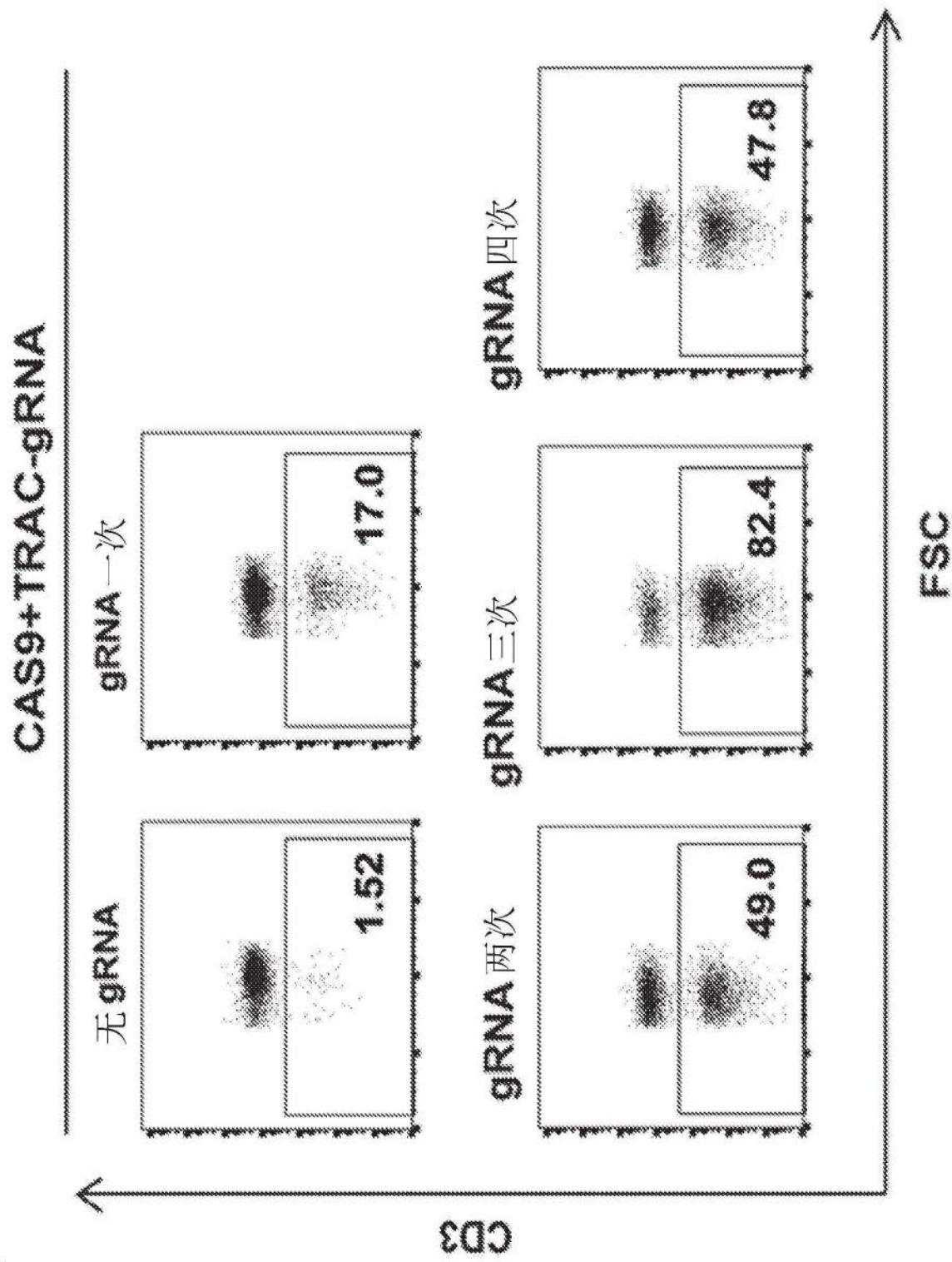


图50B

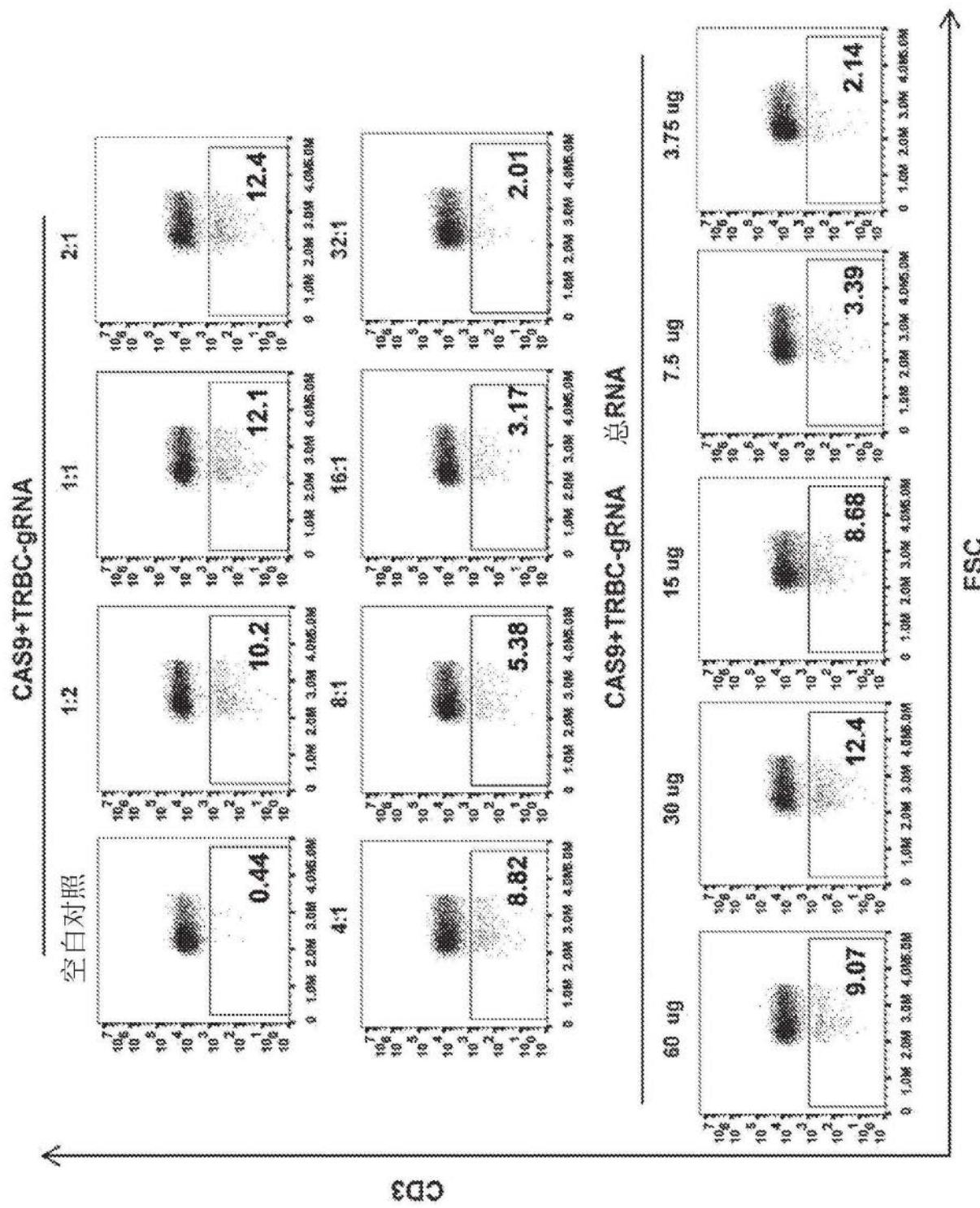


图51A

CAS9/ gRNA/ 次数	蛋白 %	基因组 %
1	0	0
1	17	27.7 (5/18)
1	2	49
1	3	82.4
1	4	47.8
		89.4(17/19)
		55 (11/20)

图51B

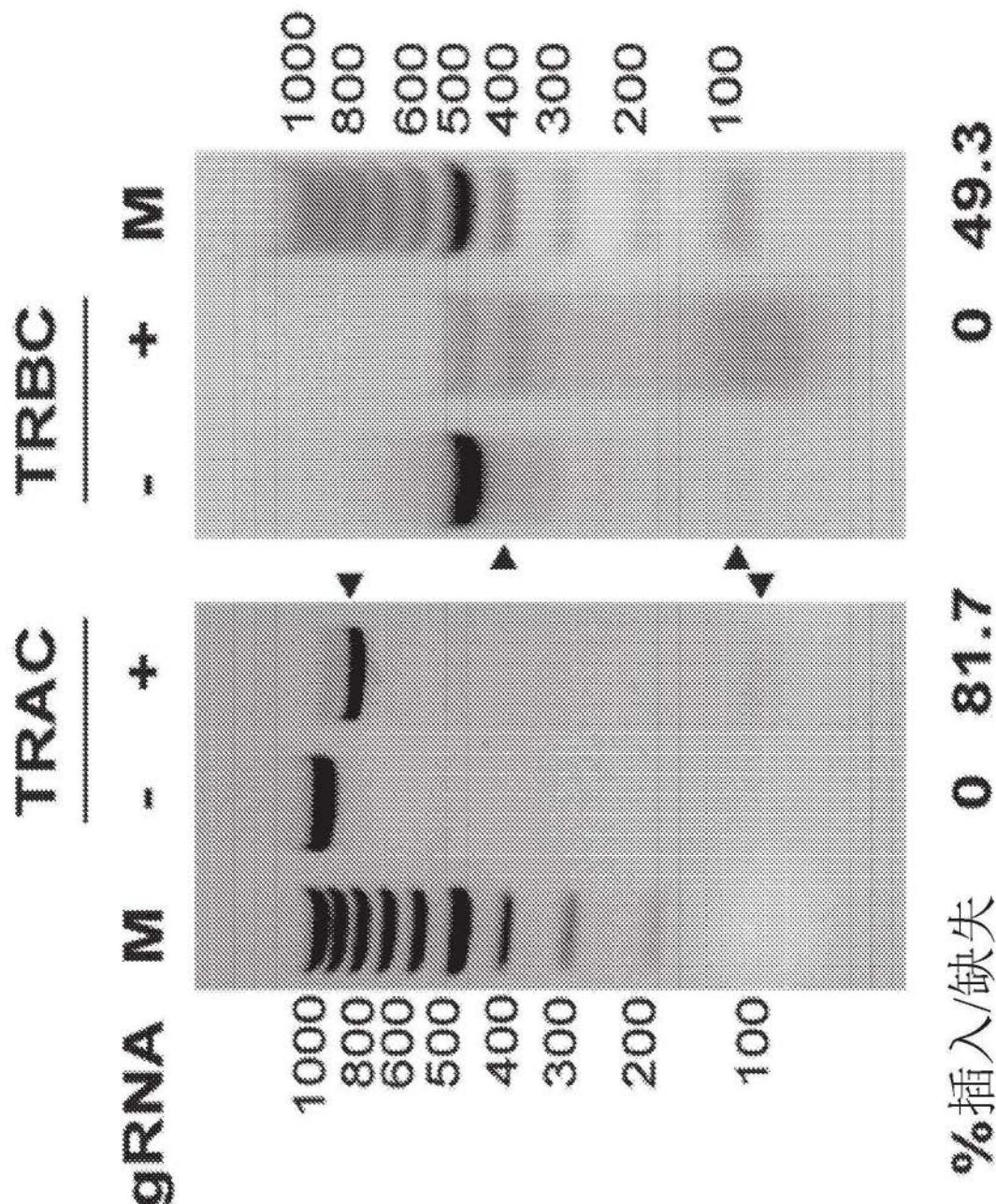


图52

图53A

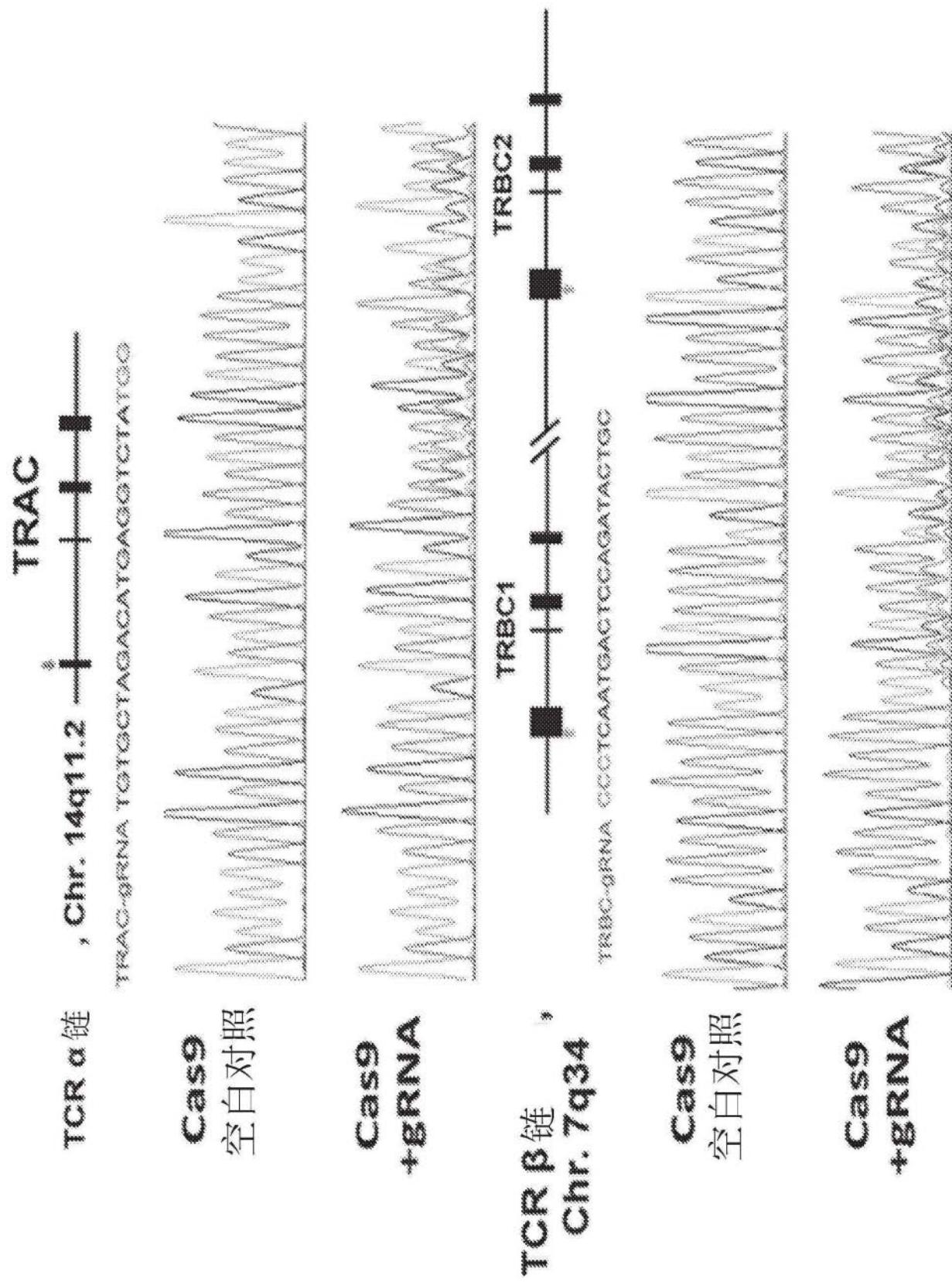


图53B

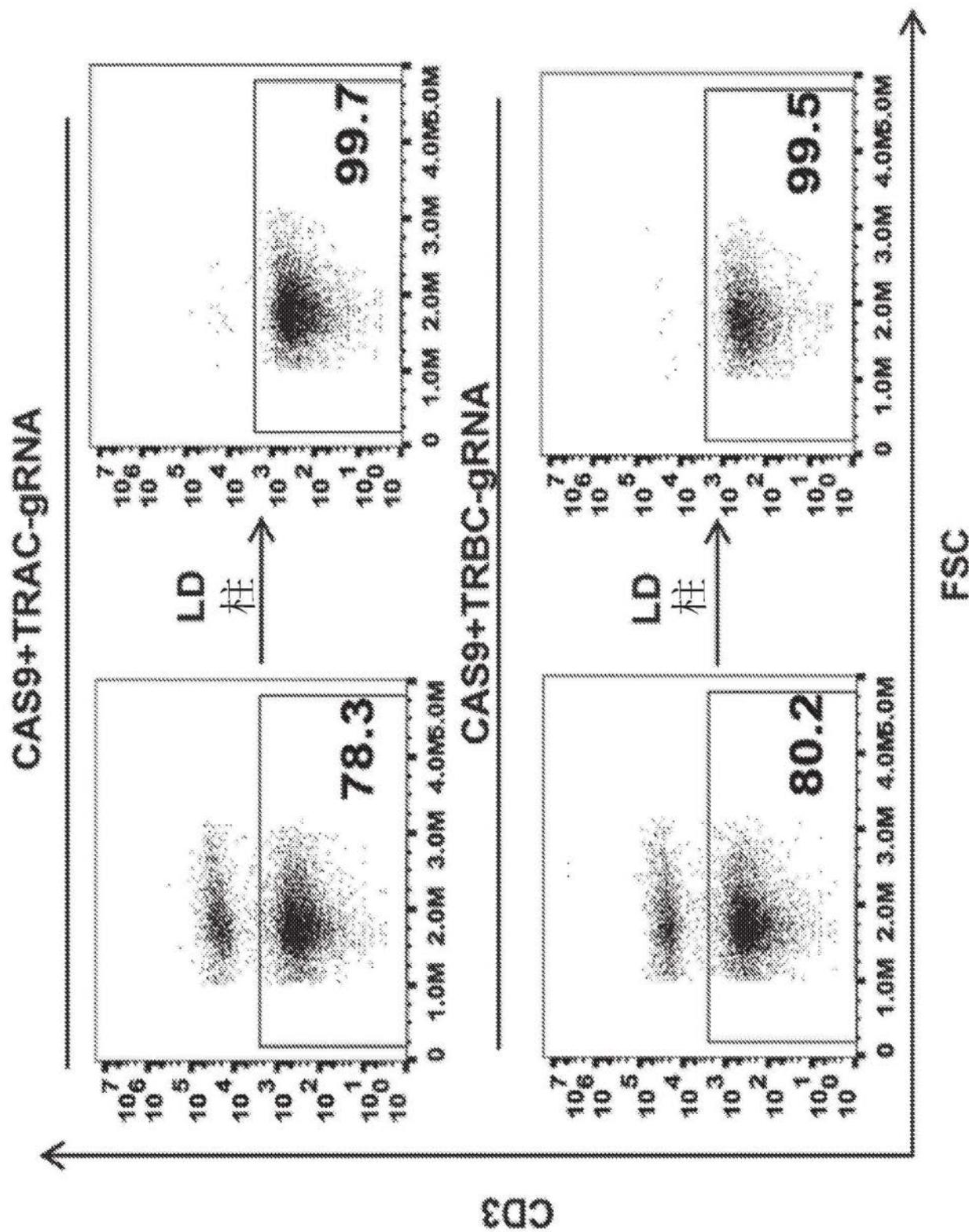


图54

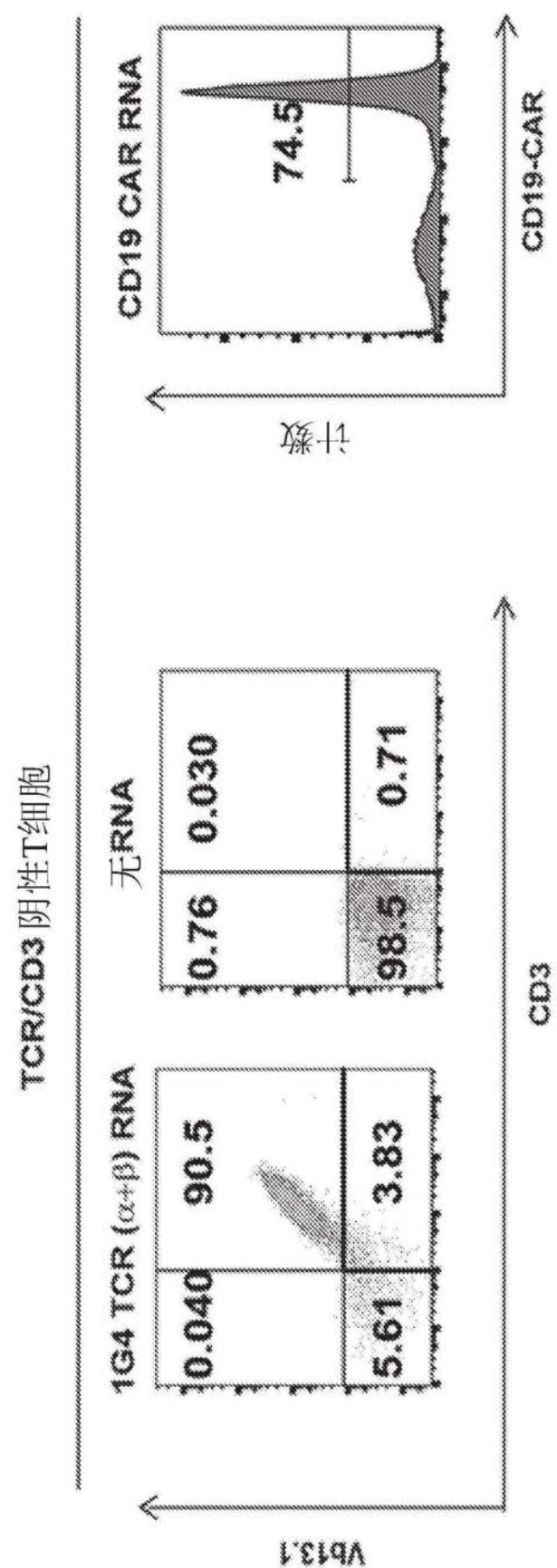


图55

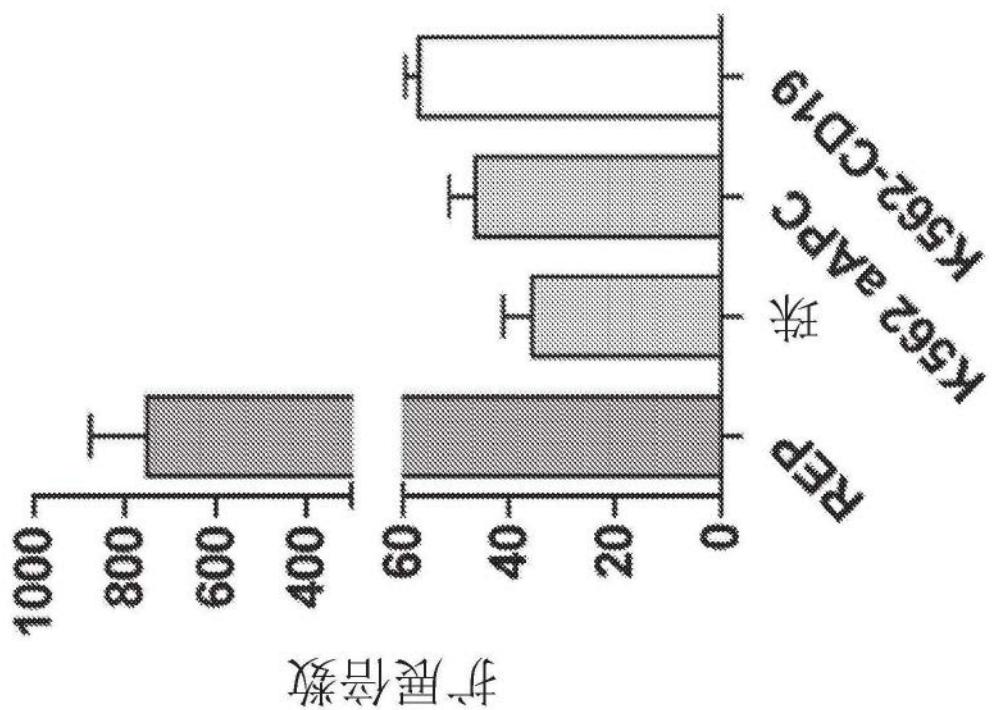


图56

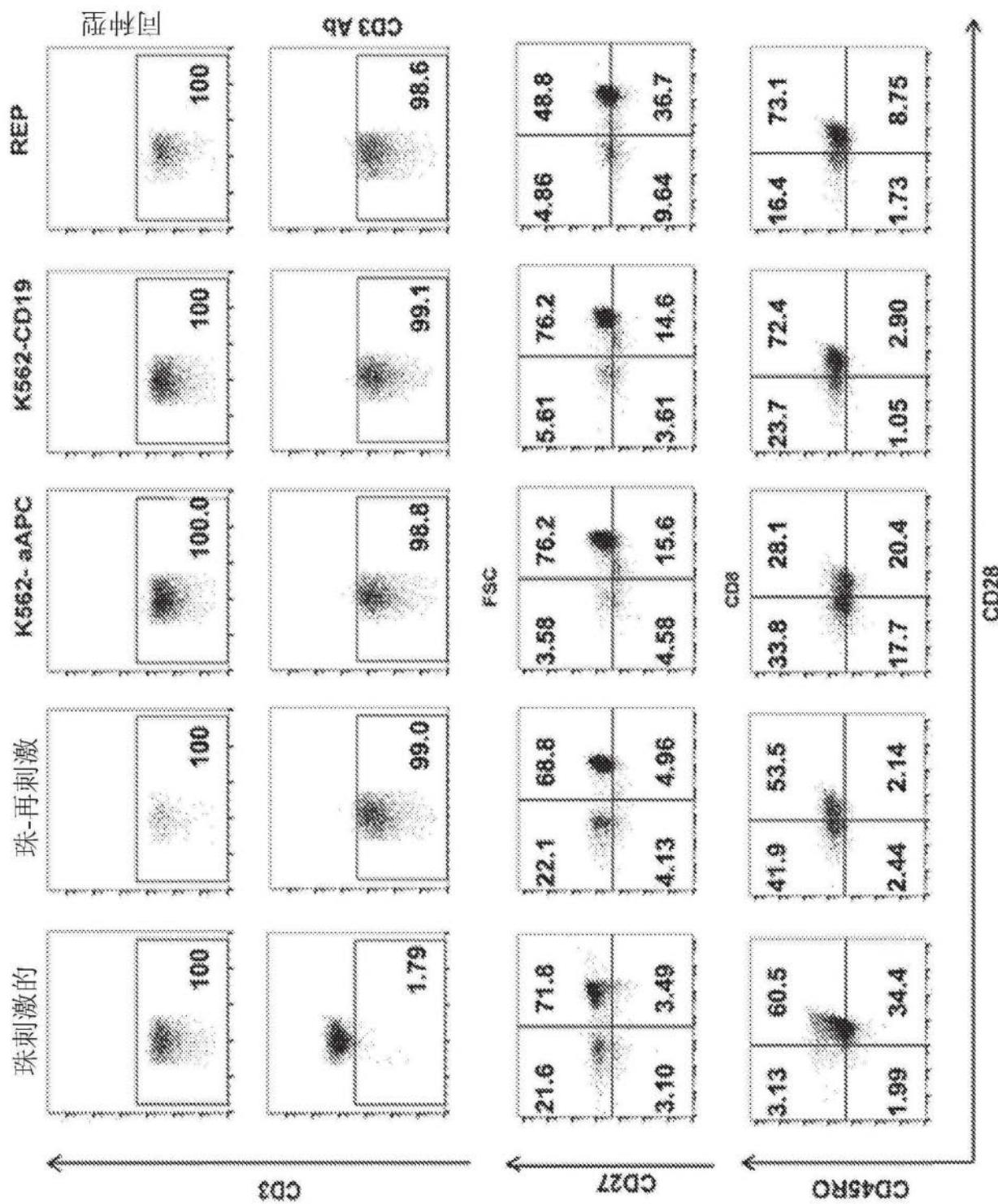


图57

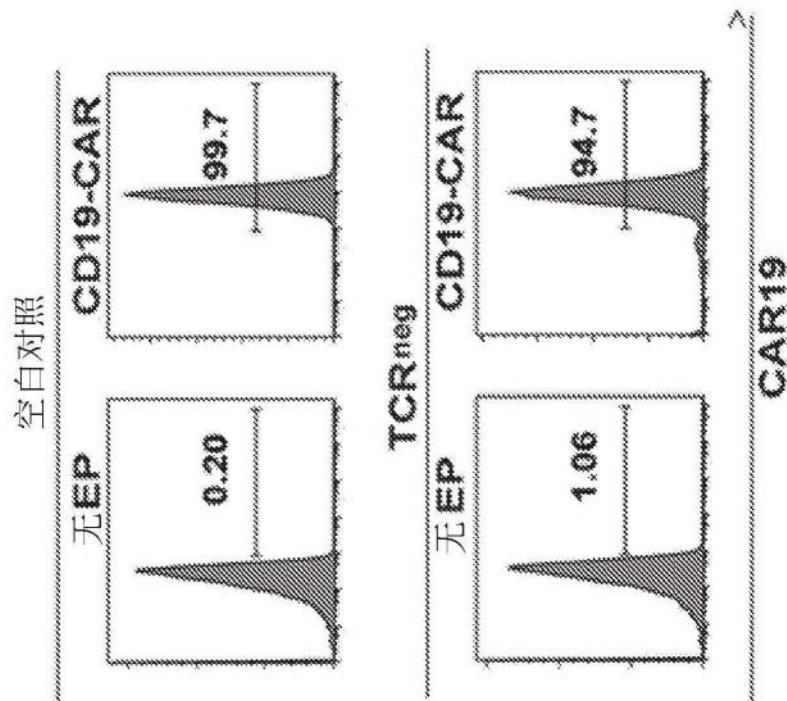


图58

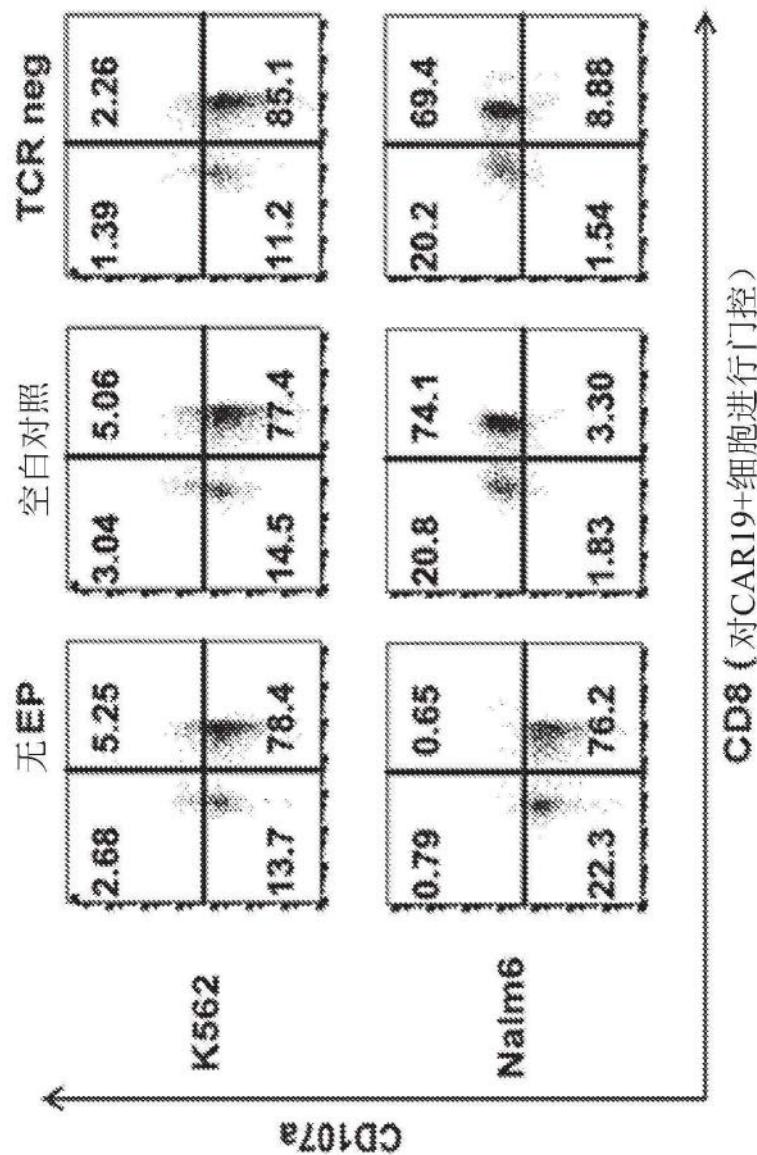


图59A

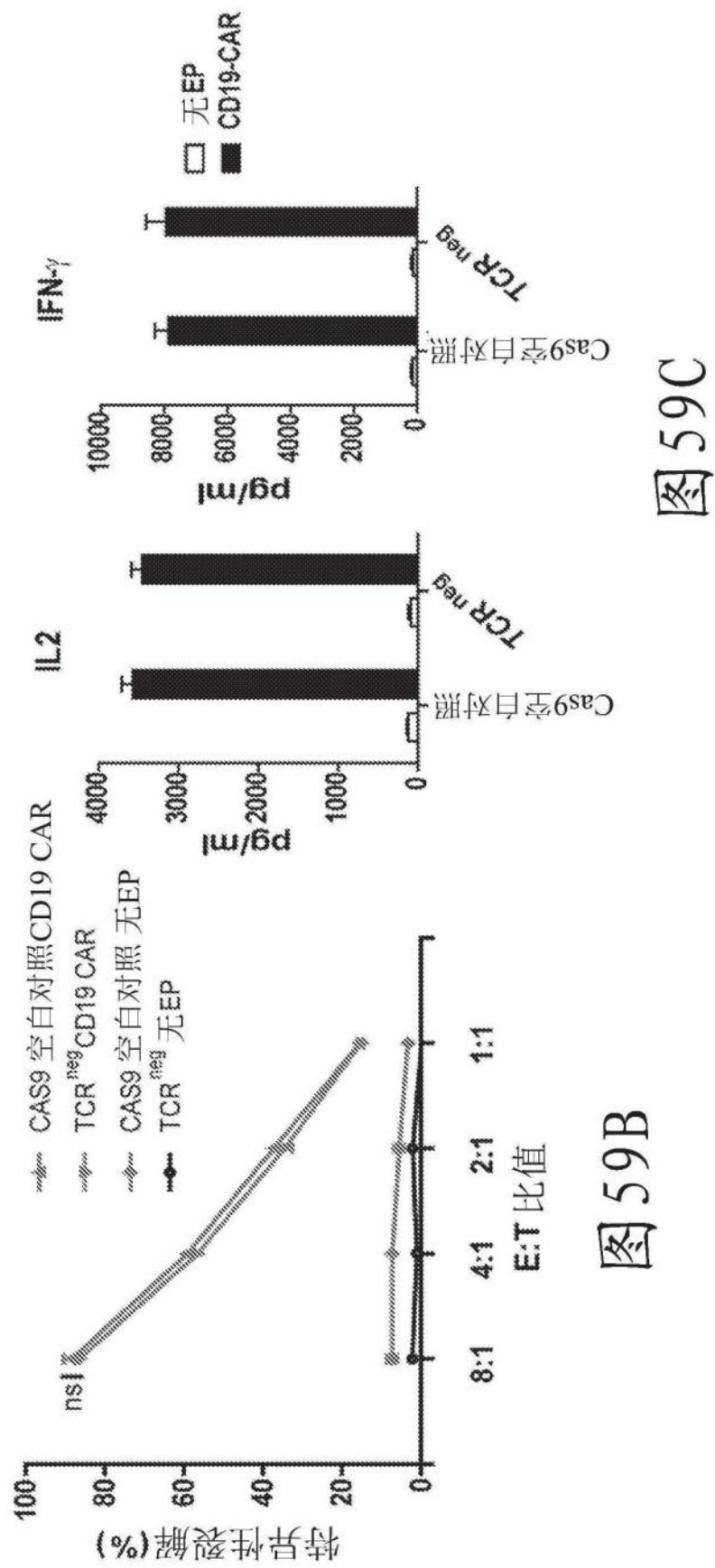


图 59B

图 59C

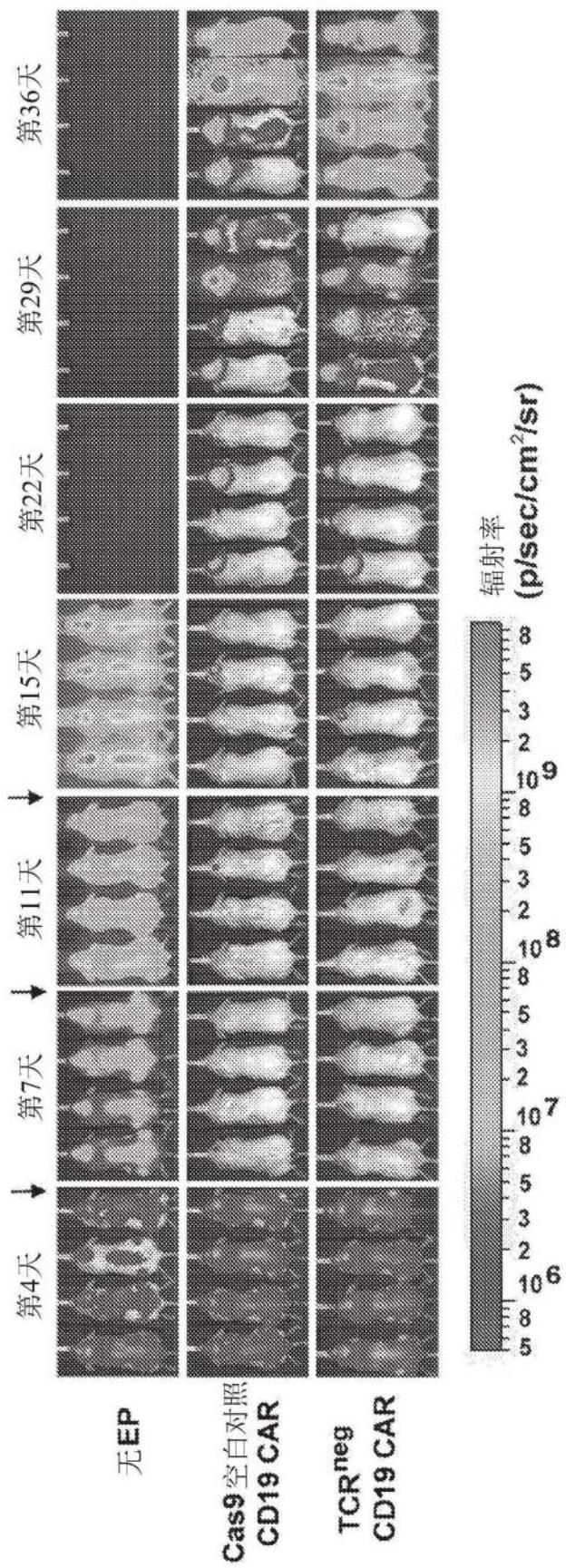


图59D

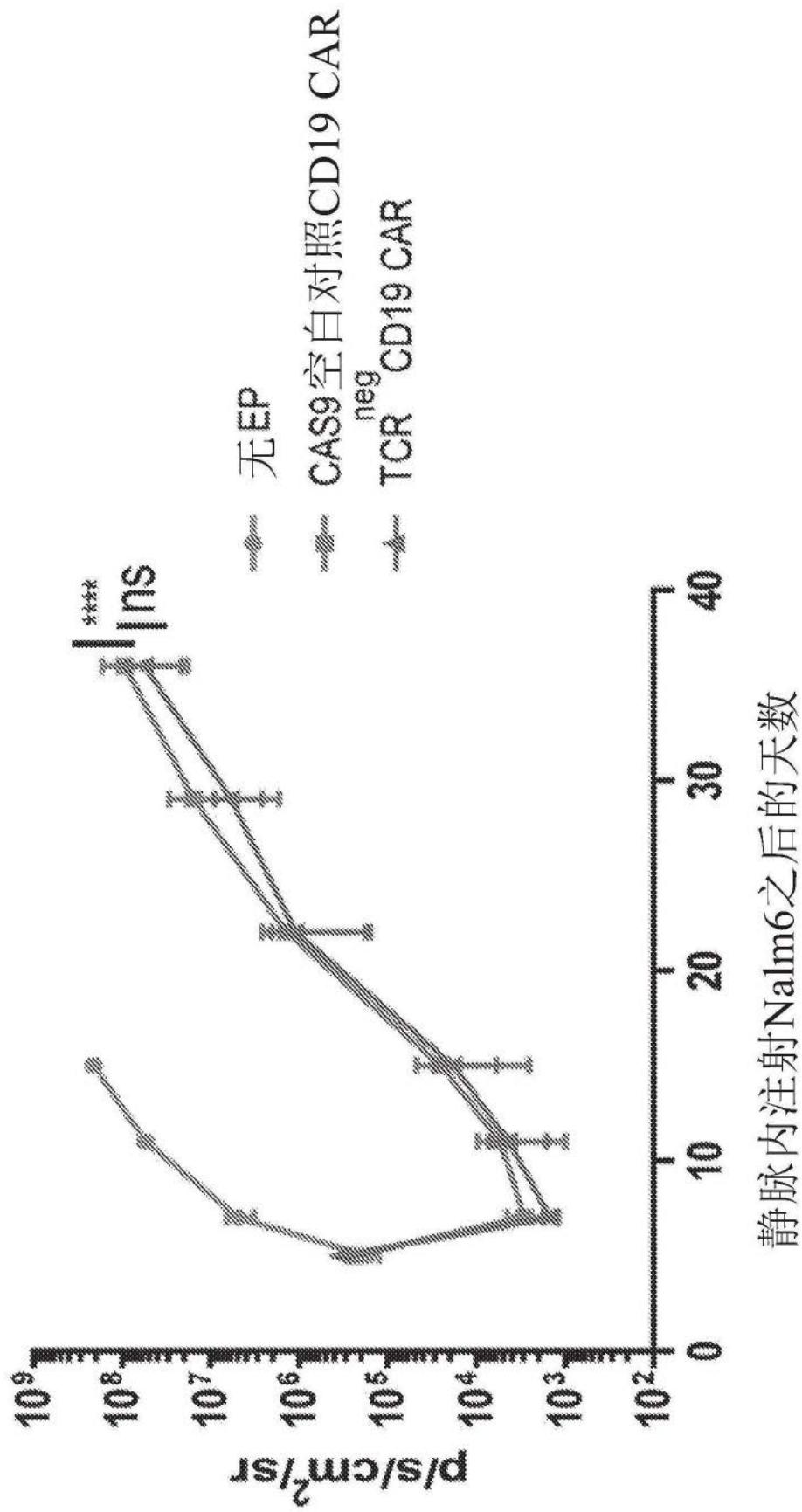


图59E

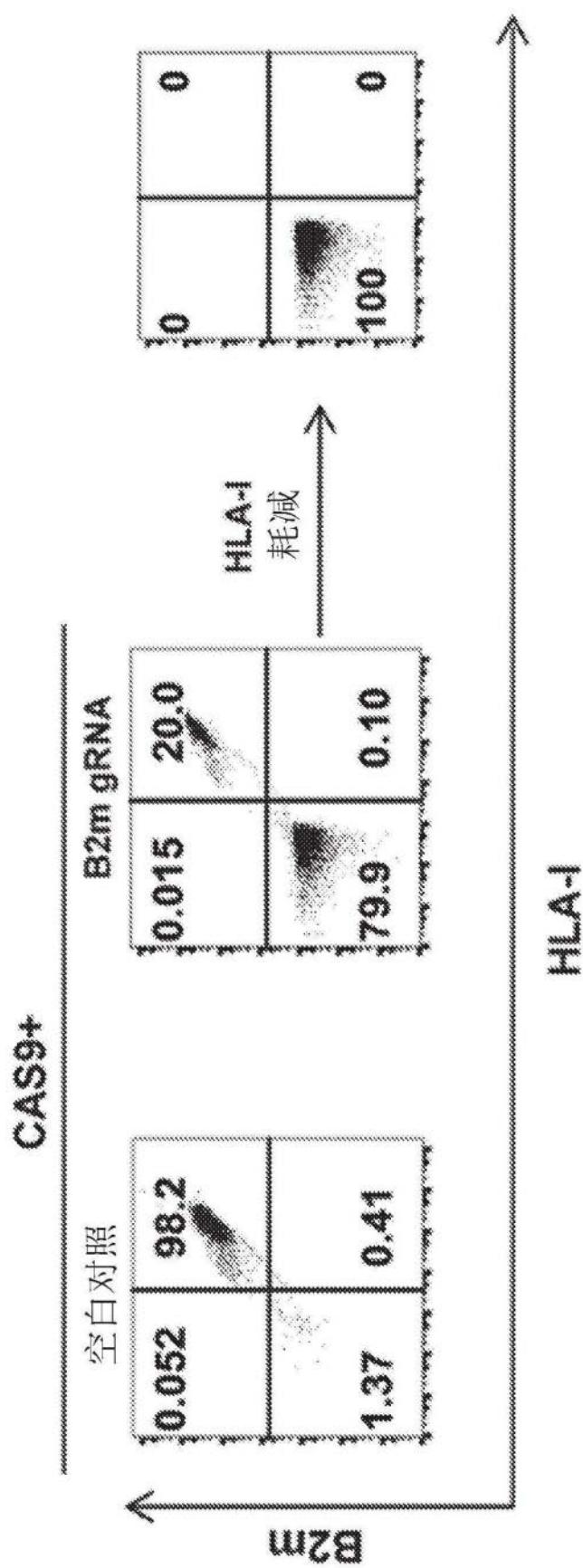
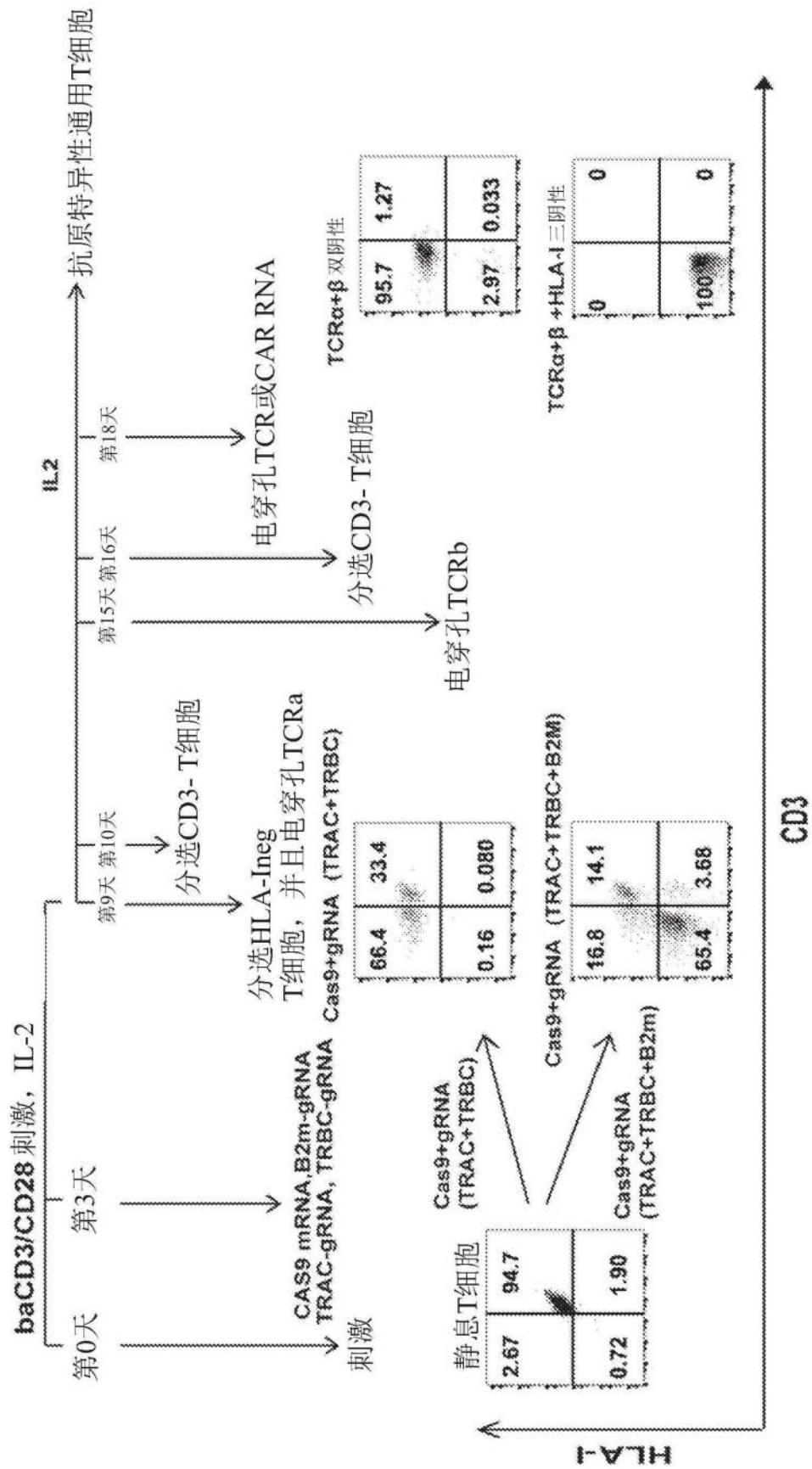


图60



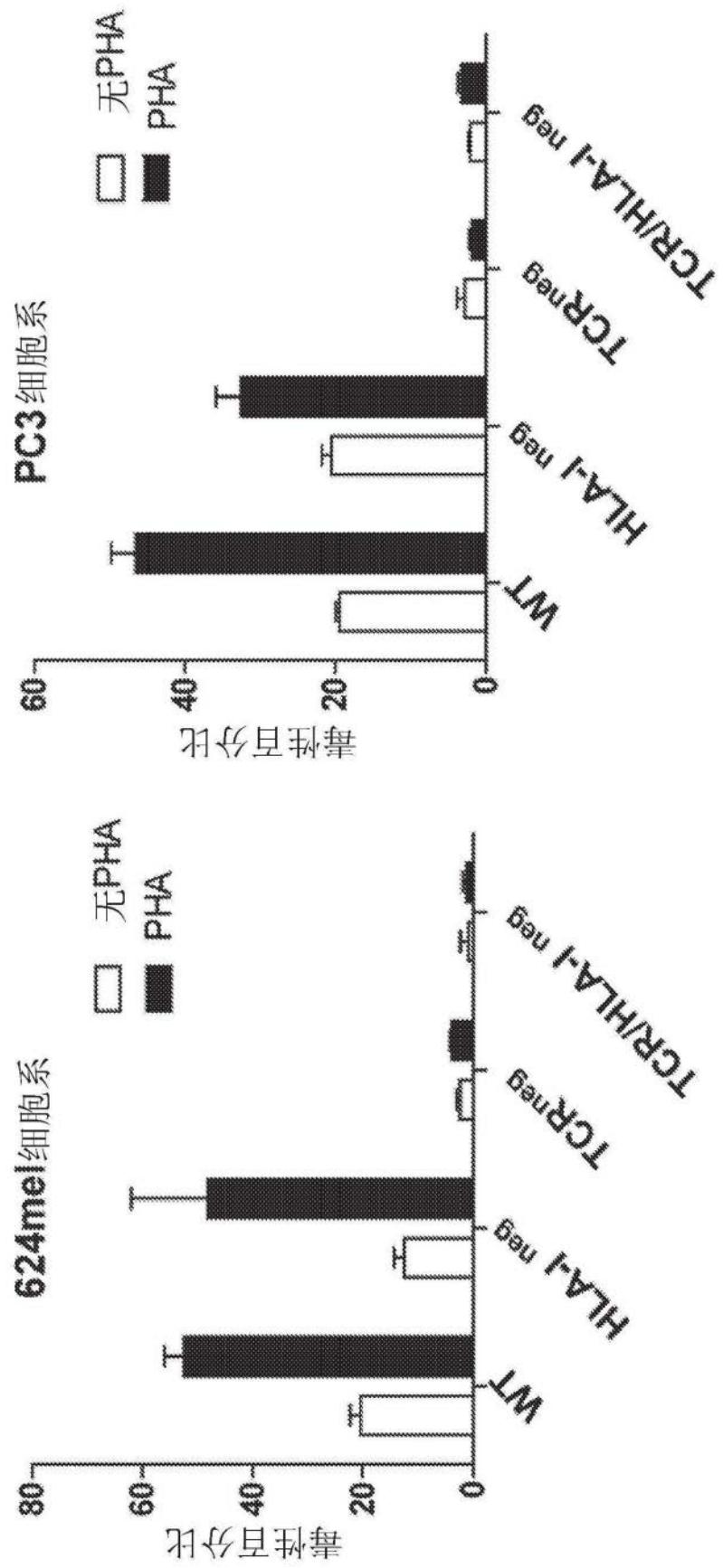


图62

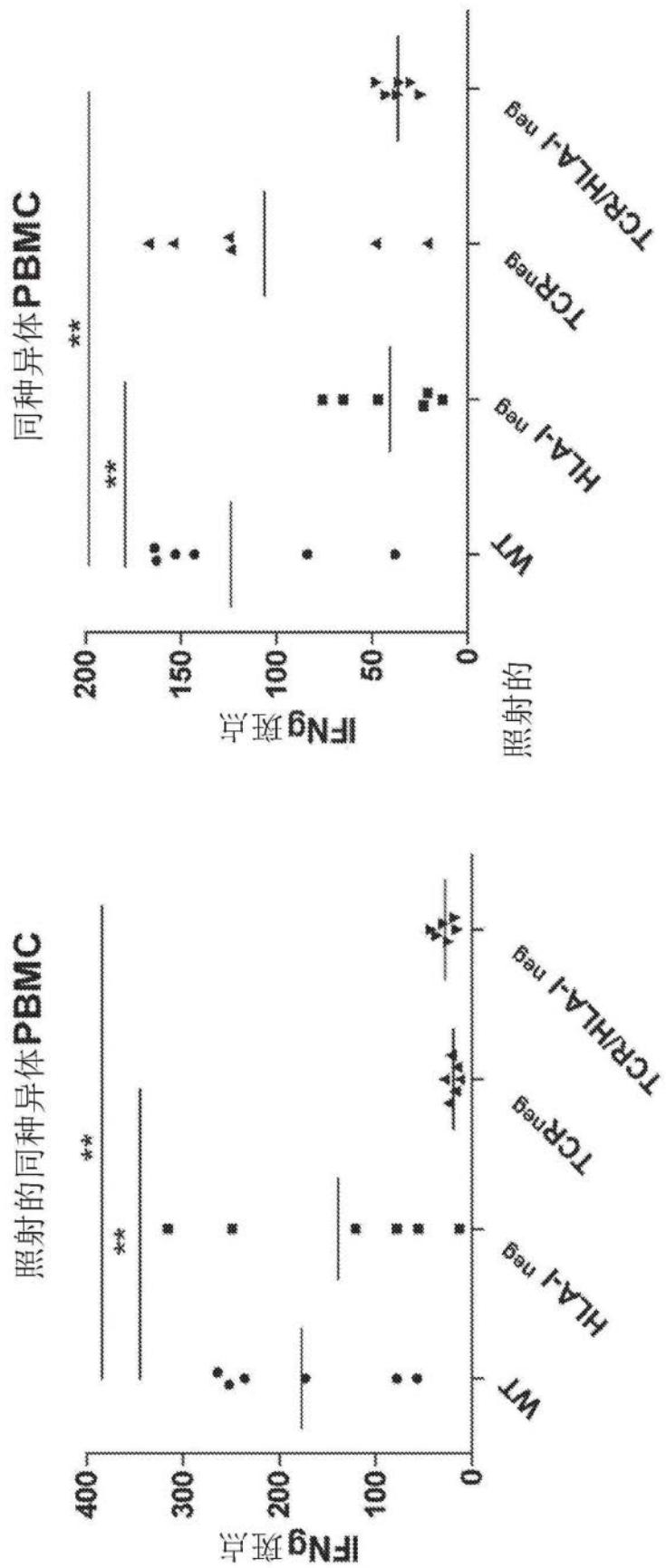


图63



图64

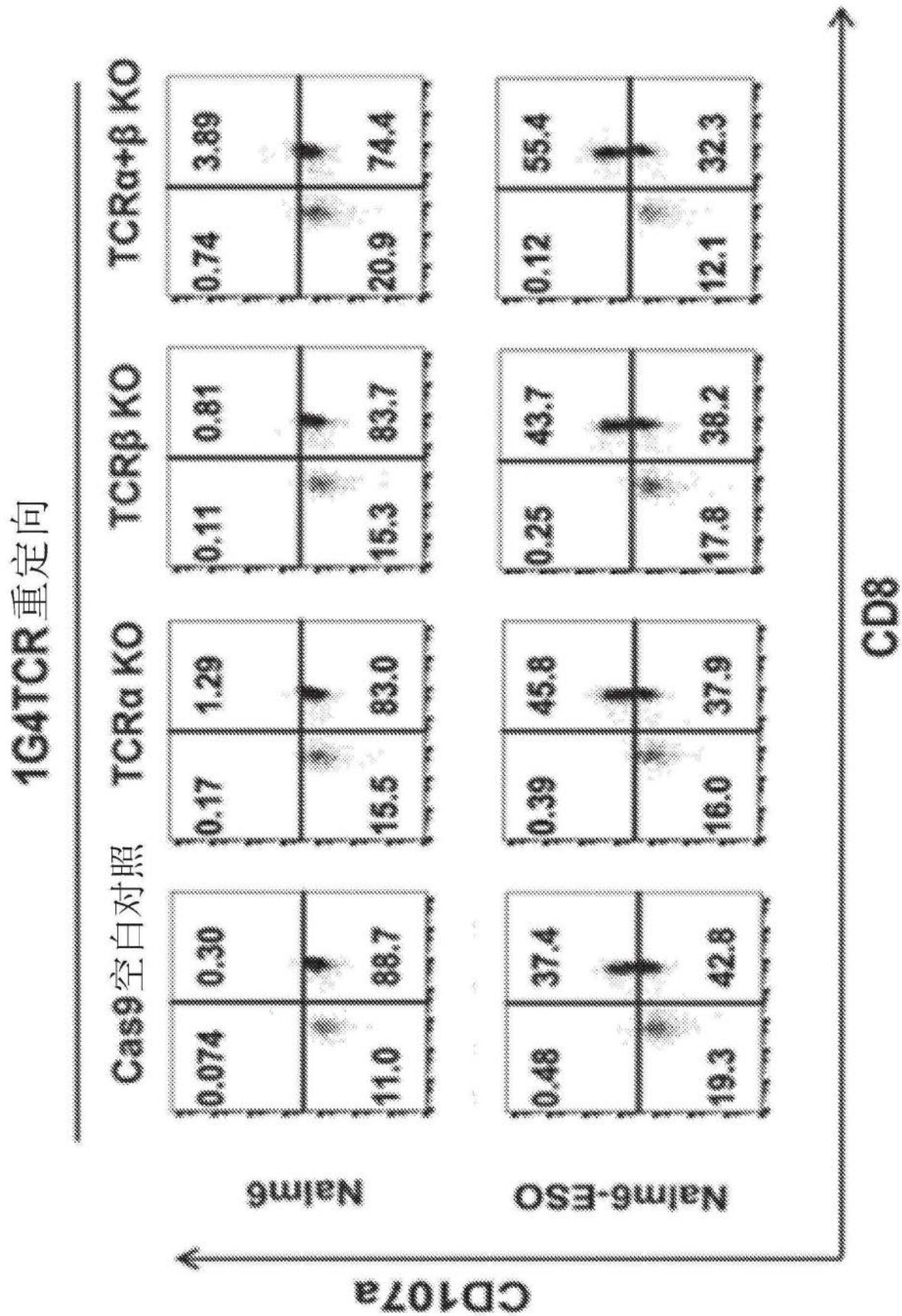


图65A

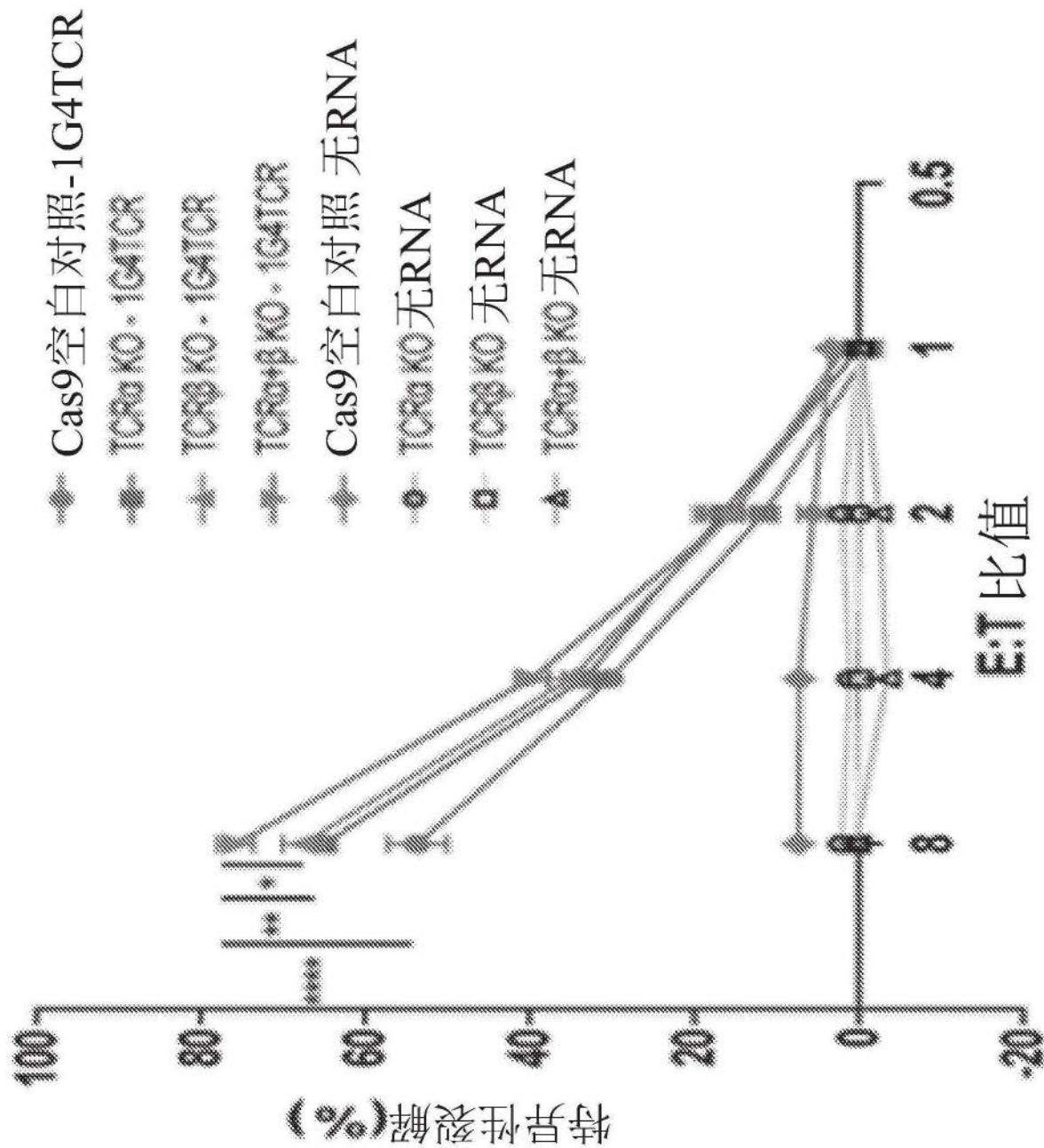


图65B

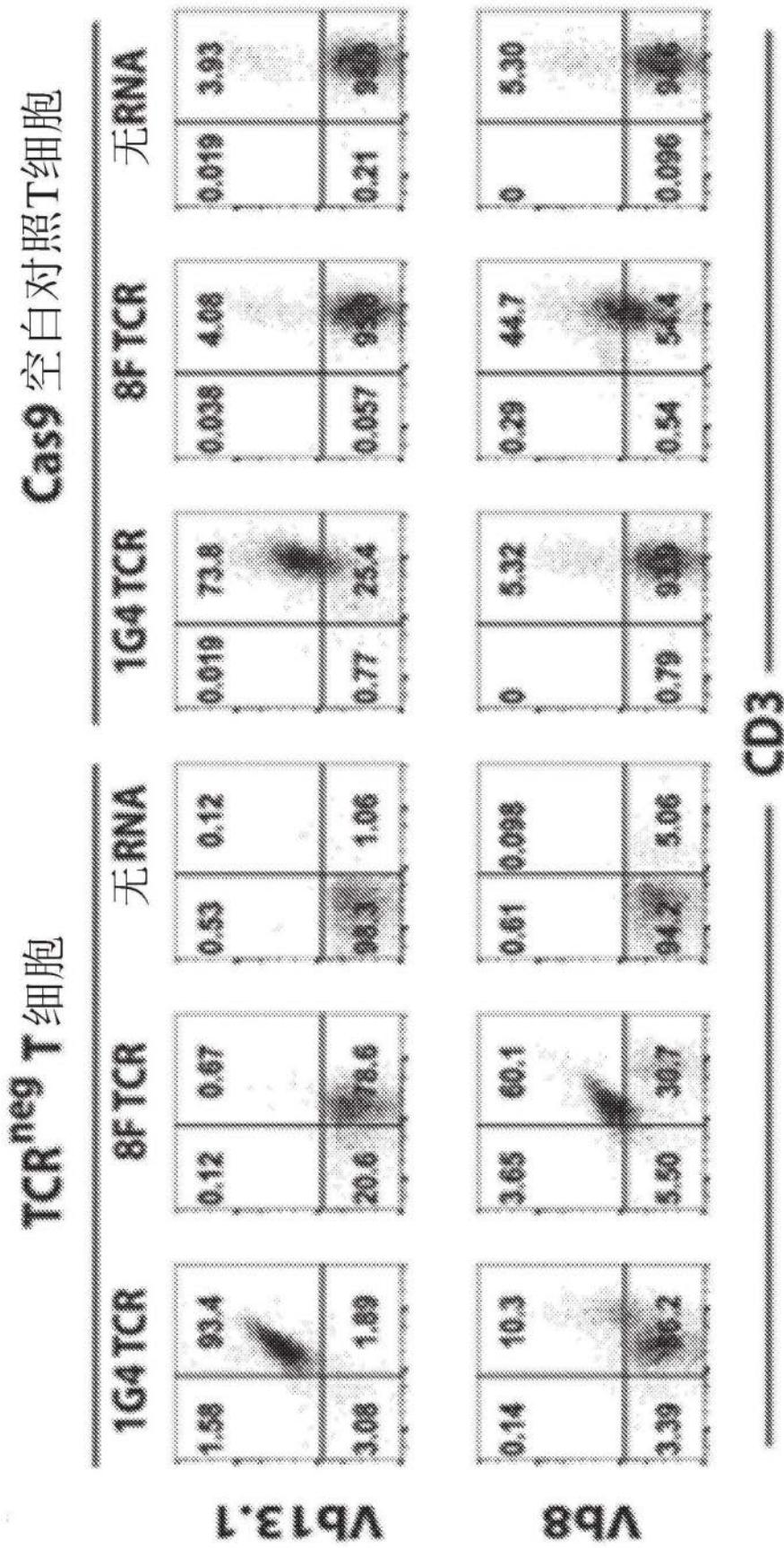


图66

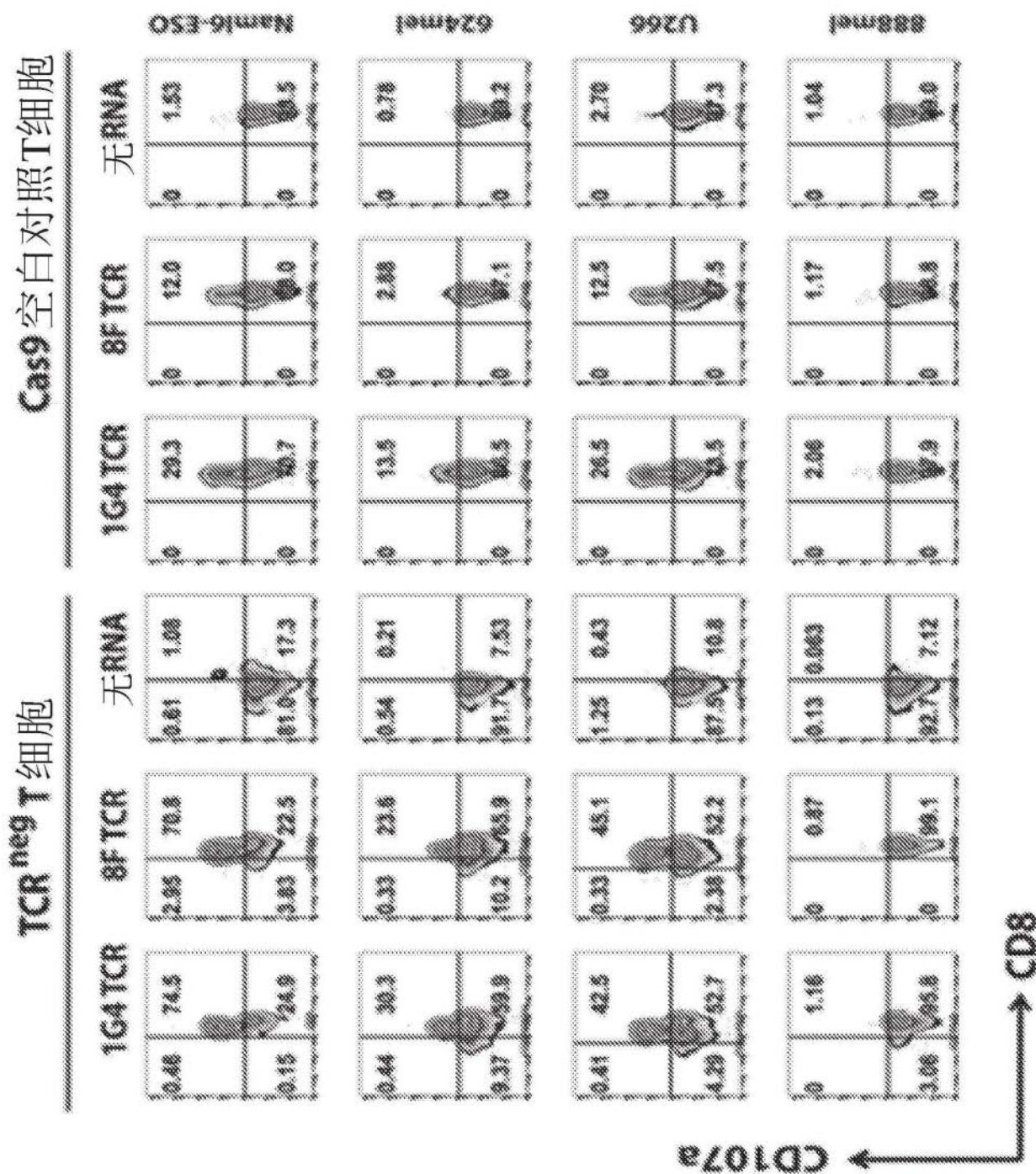
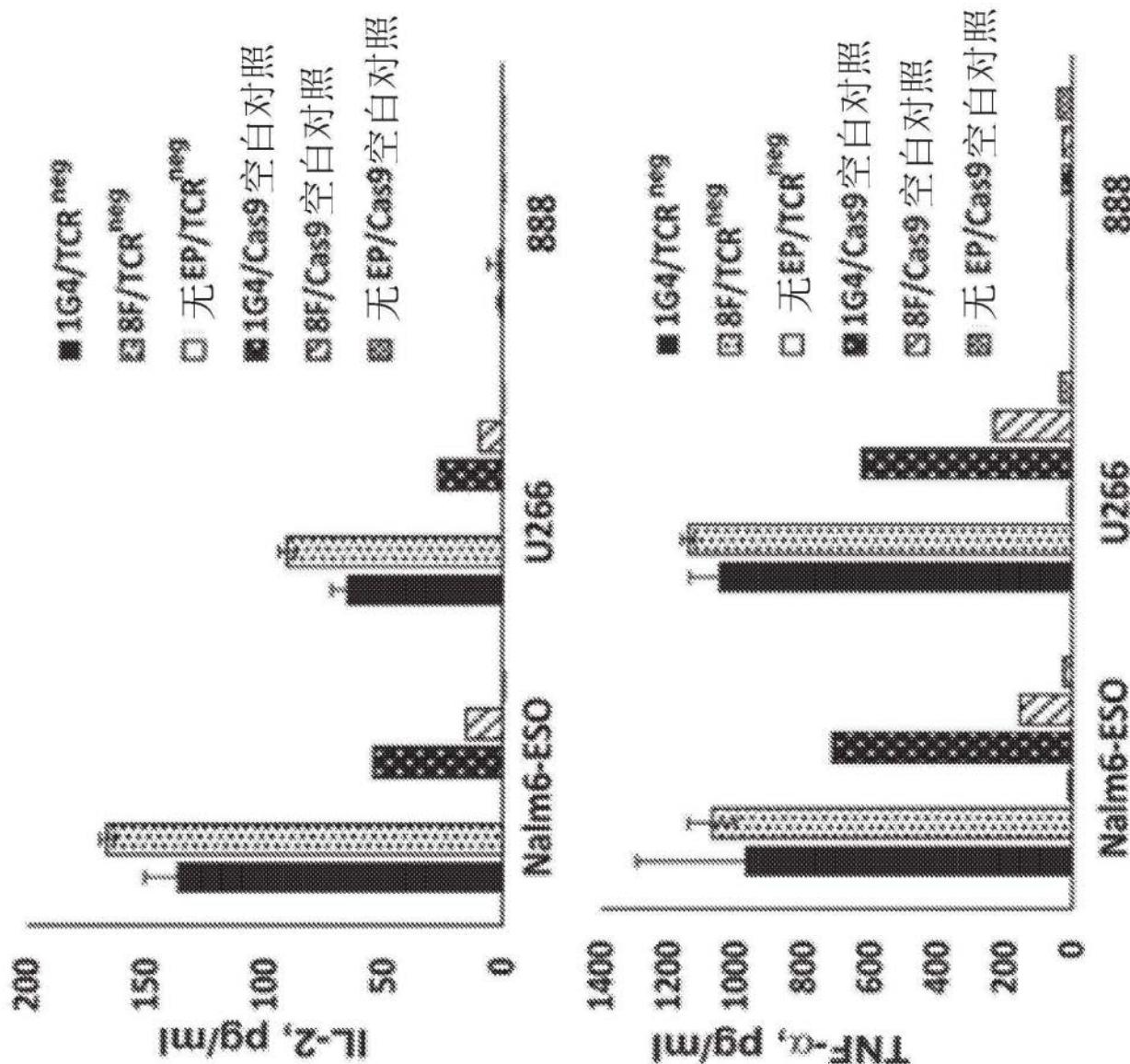


图67A



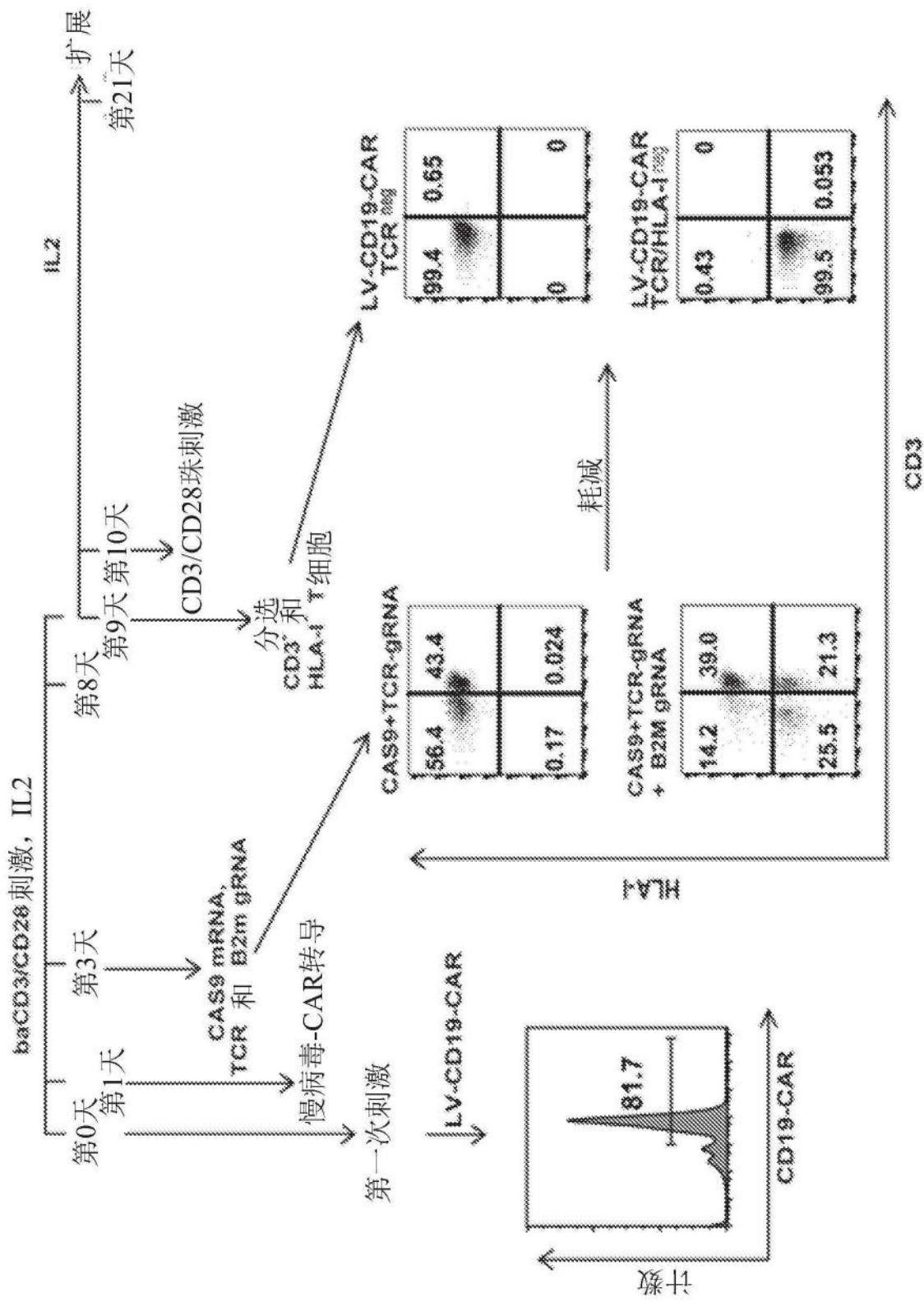


图68

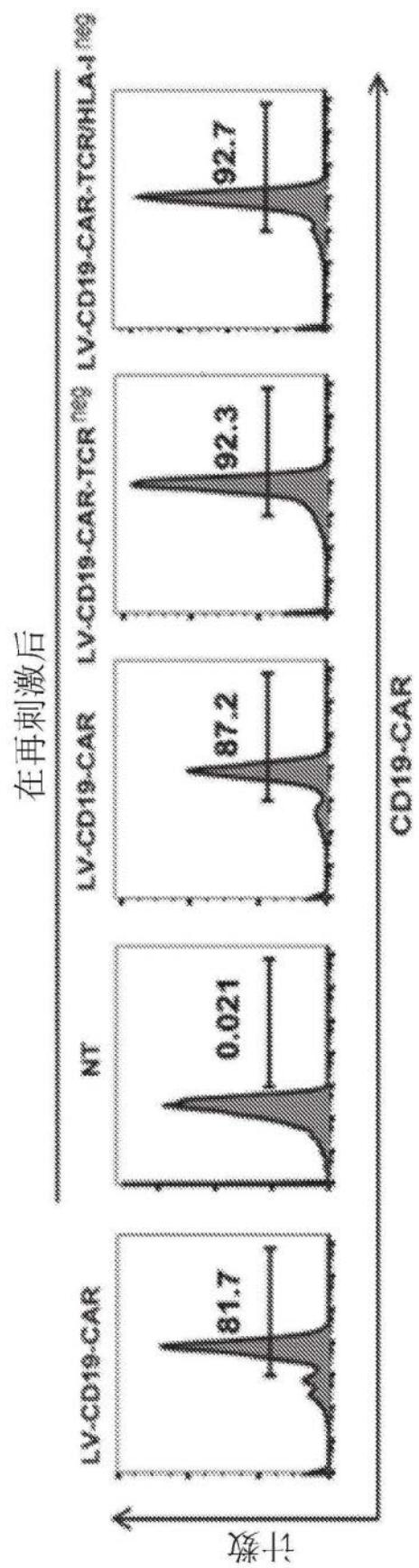


图69

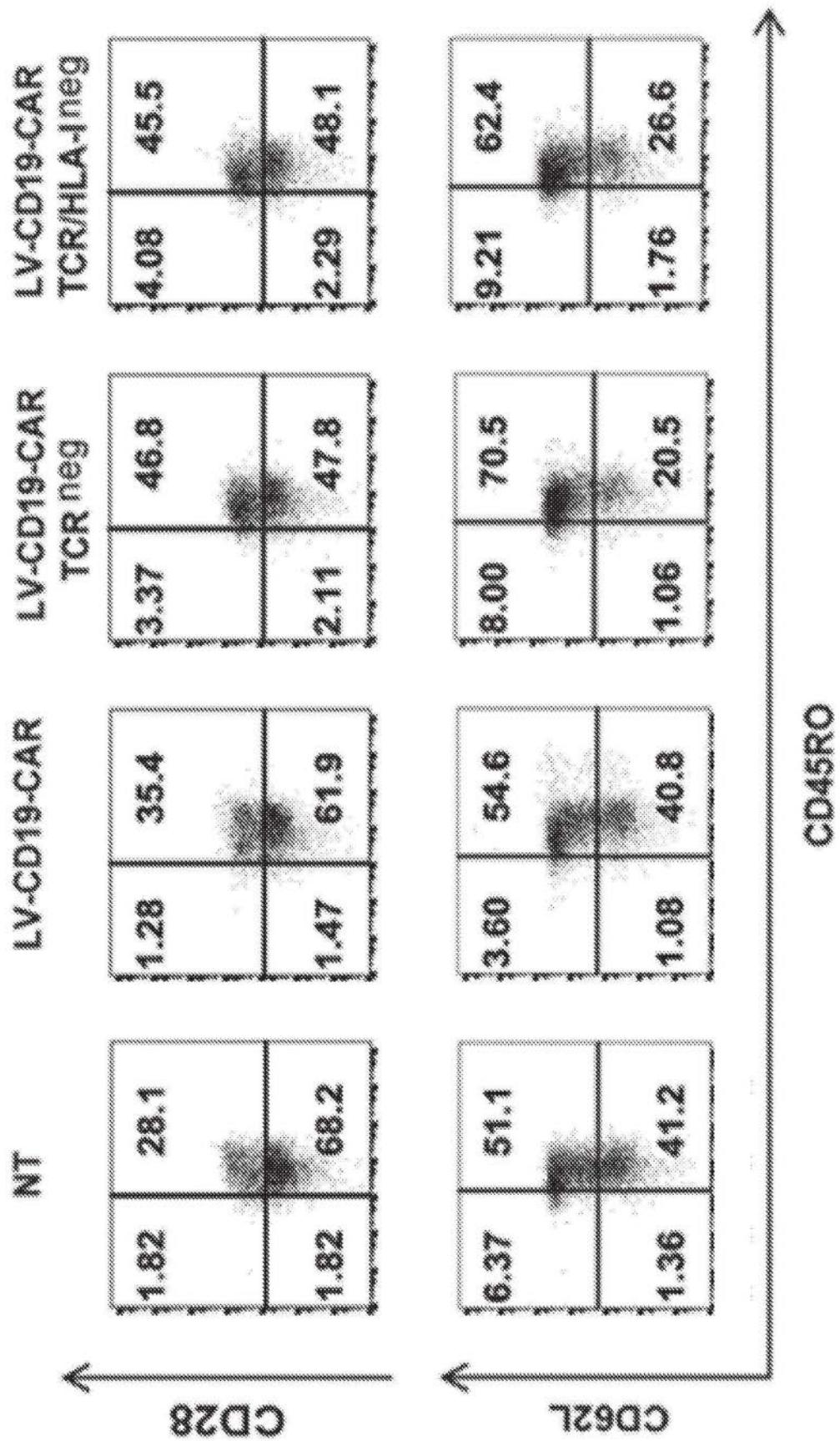


图70

	NT		LV-CD19-CAR TCR neg		LV-CD19-CAR TCR/HLA-I neg	
	K562	CD107a	Nalm6	CD107a	Nalm6	CD107a
2.69	3.42	0.89	0.71	0.069	0.10	0.032
32.7	61.2	30.1	68.3	34.2	65.3	23.3
3.67	3.57	17.9	21.8	21.9	20.5	15.9
32.1	60.7	11.0	49.3	13.2	44.4	31.5

图71

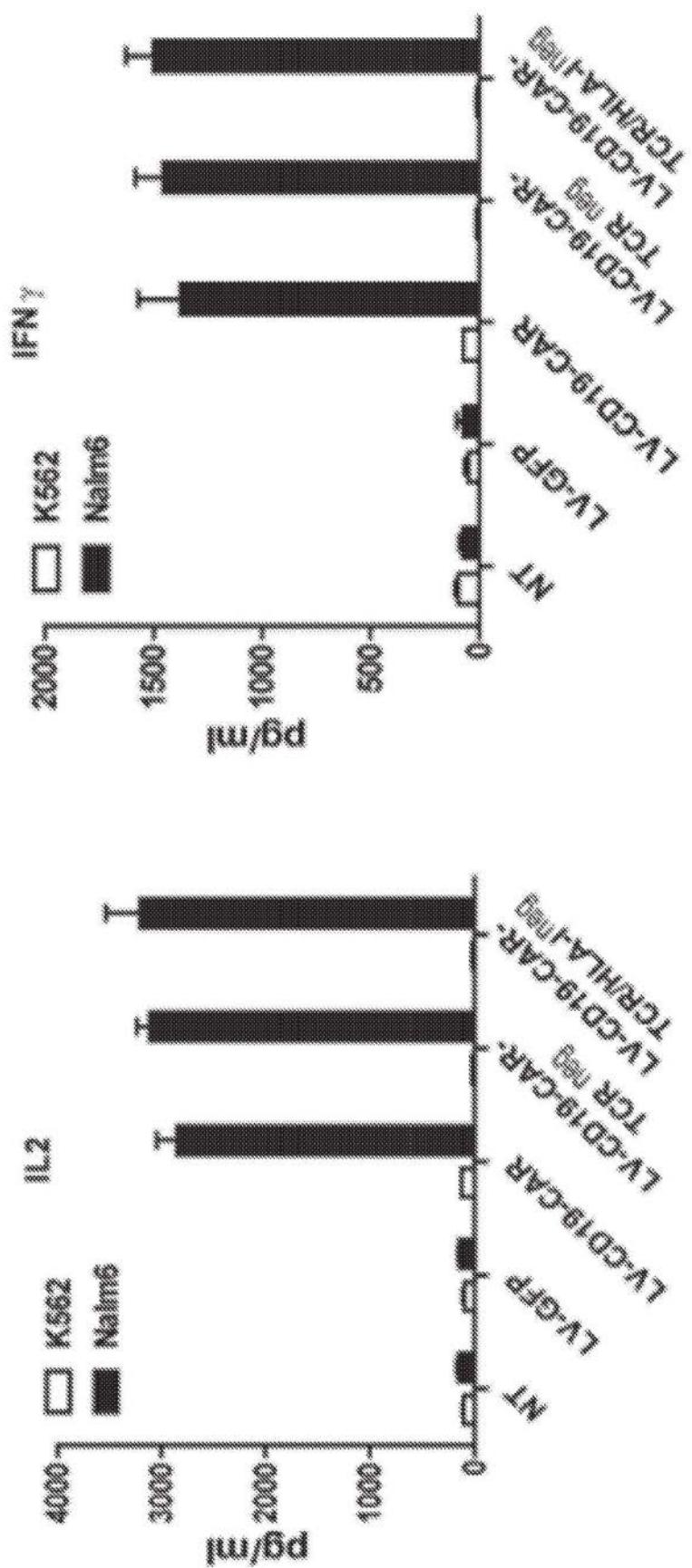


图72

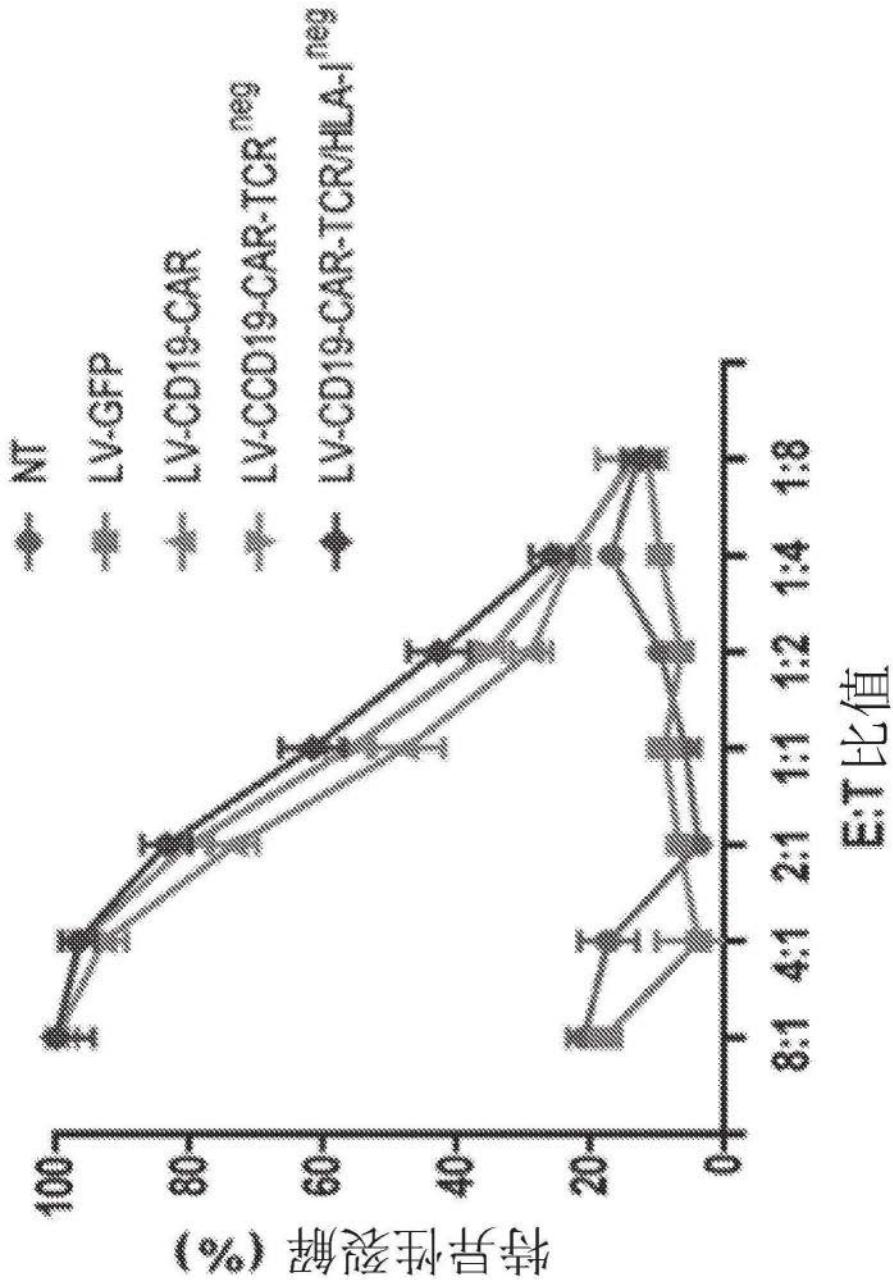


图73

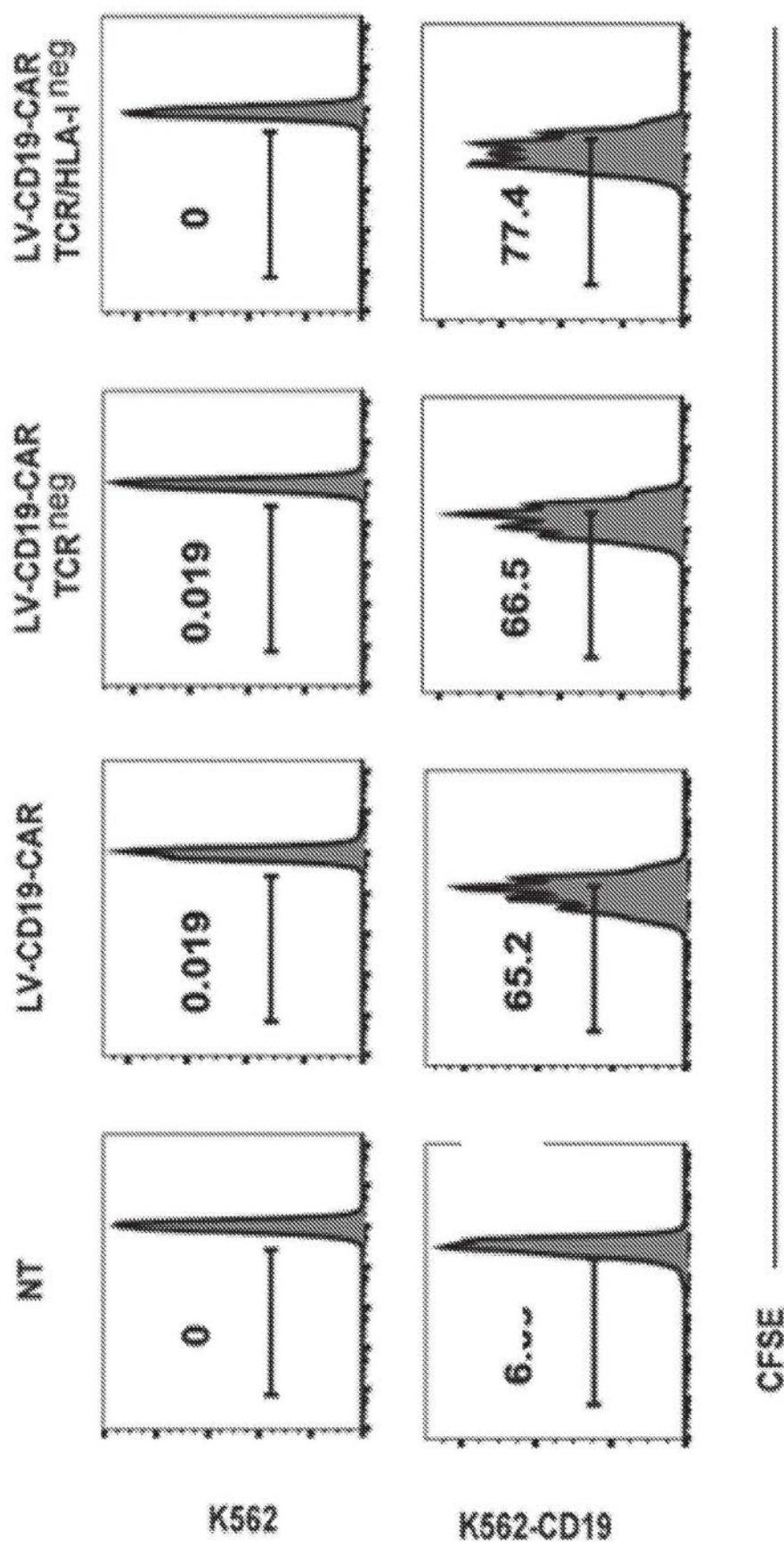


图74

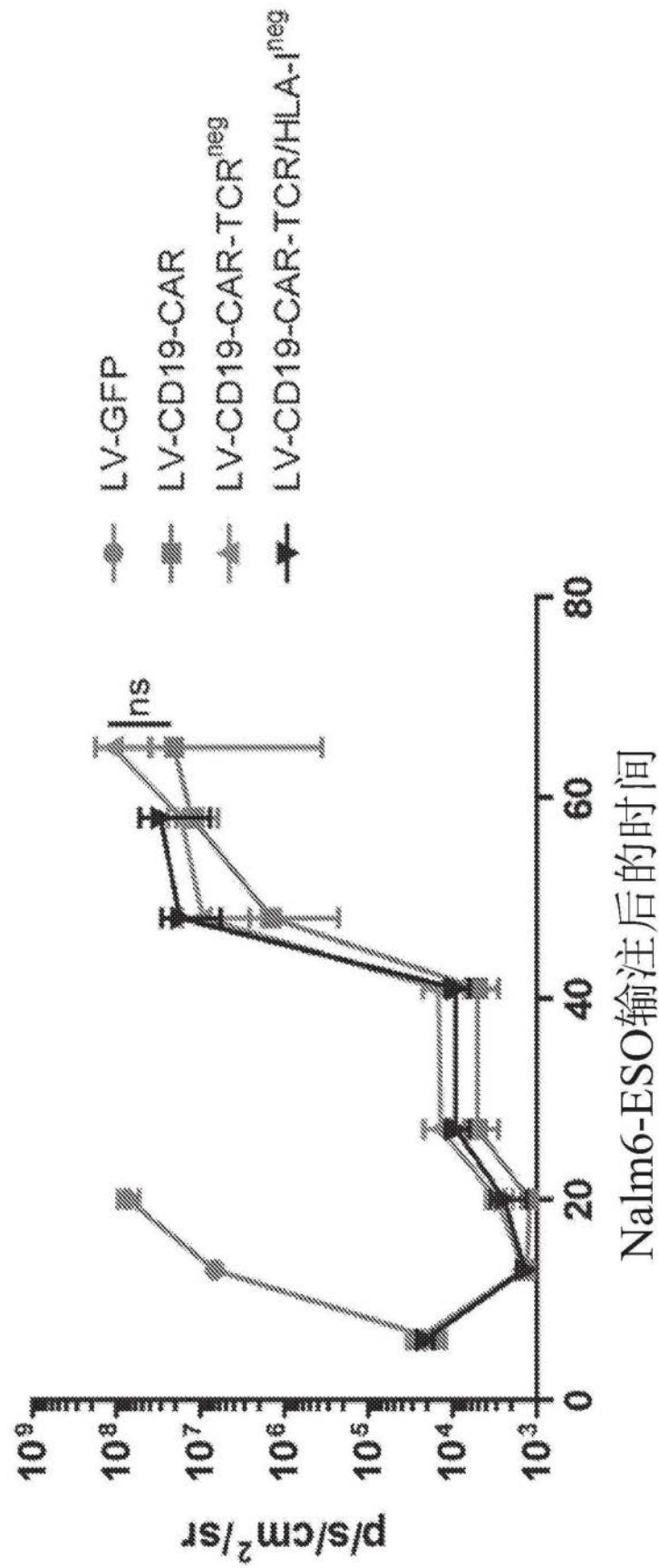


图75A

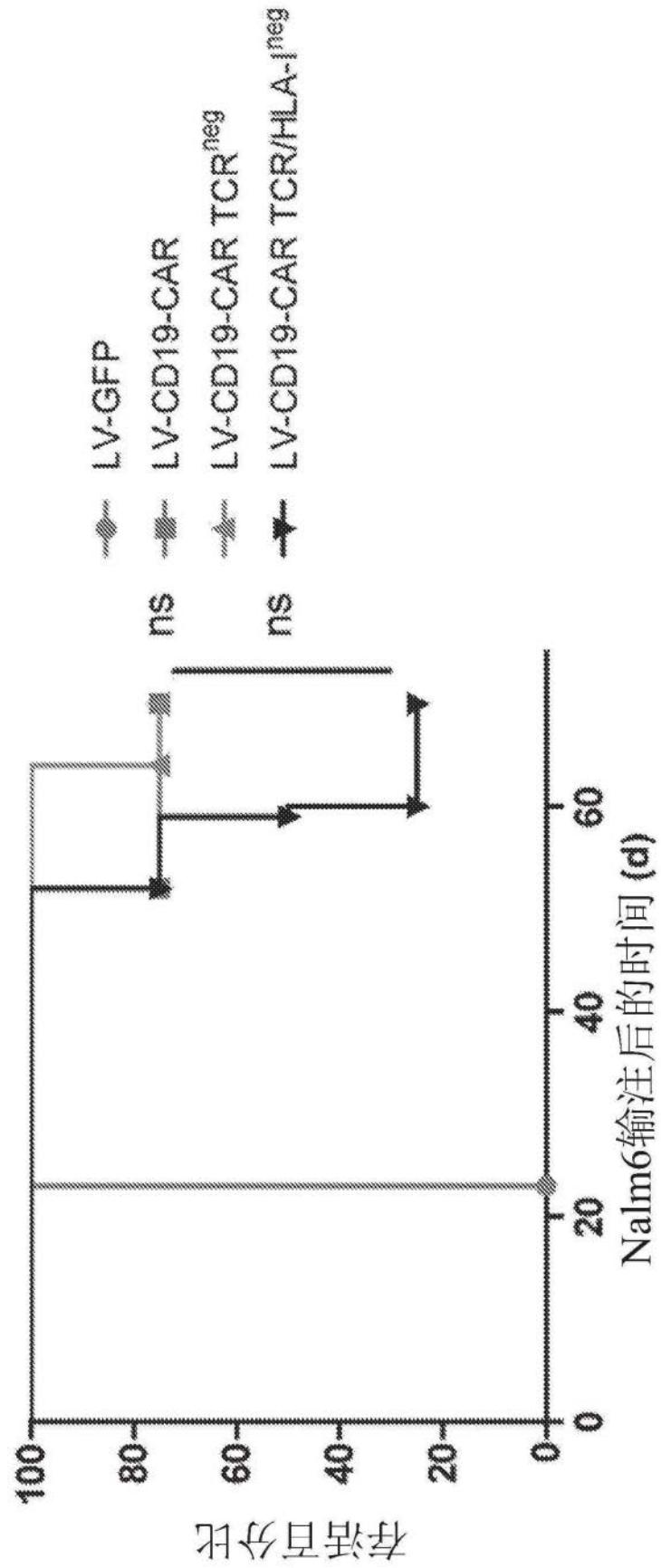


图75B

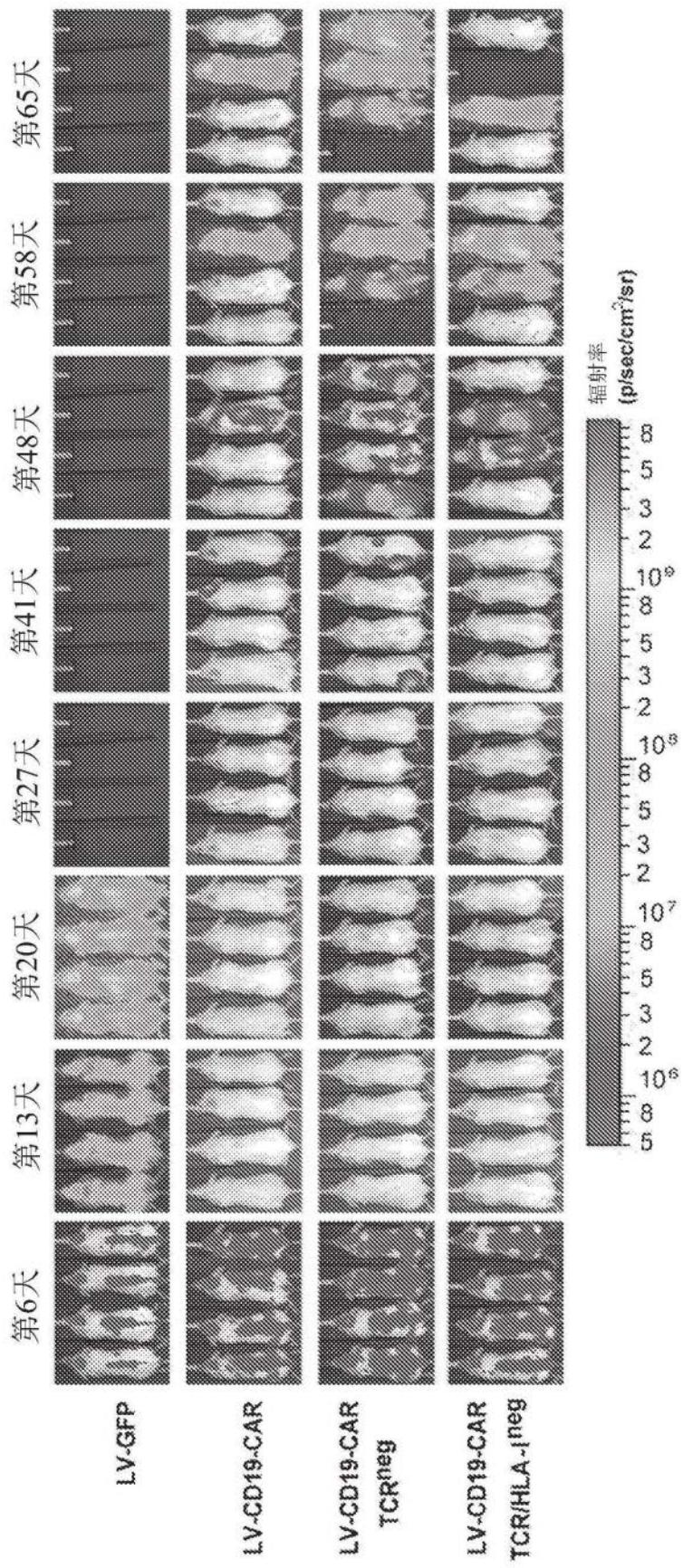


图76

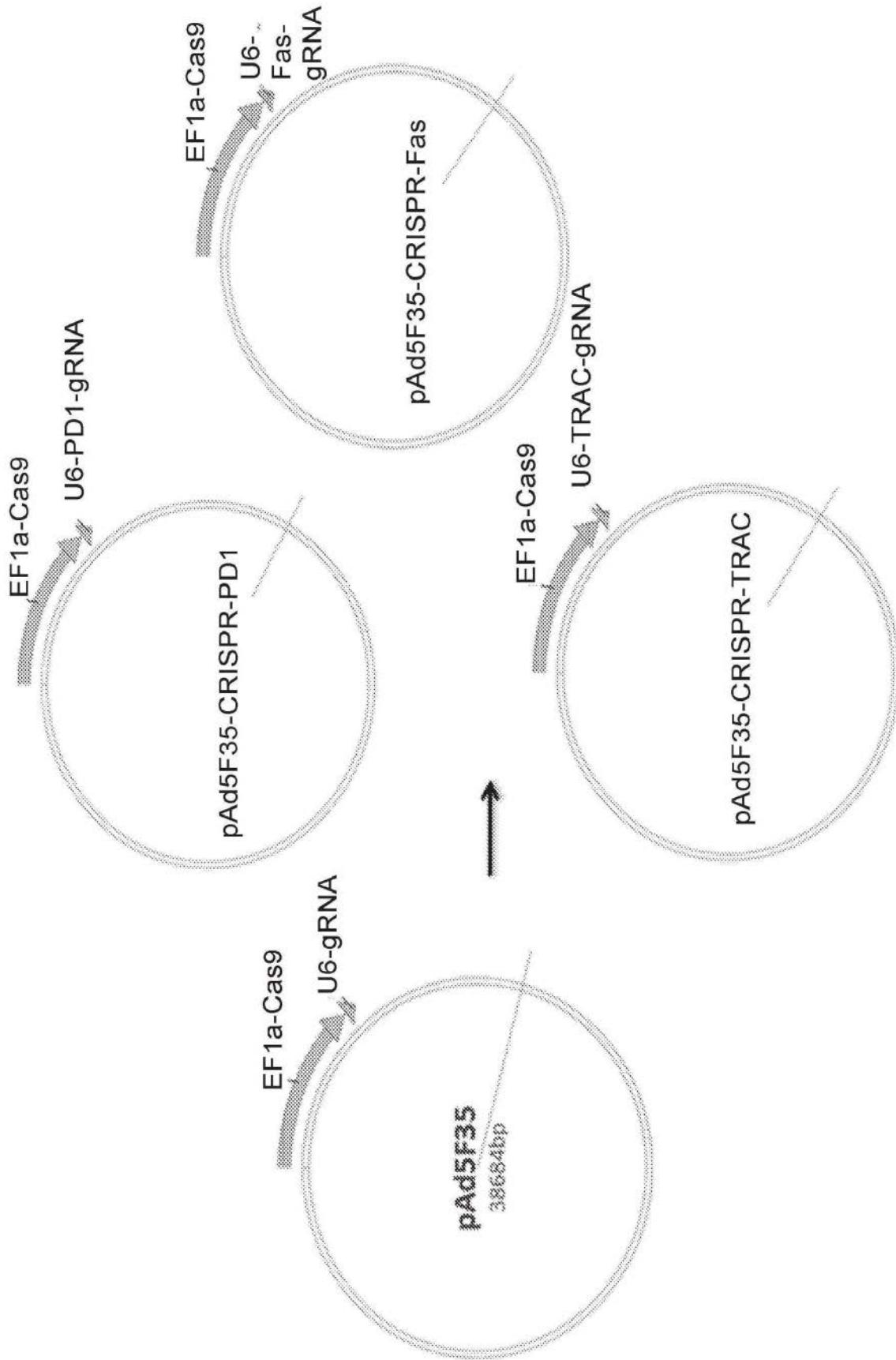


图77

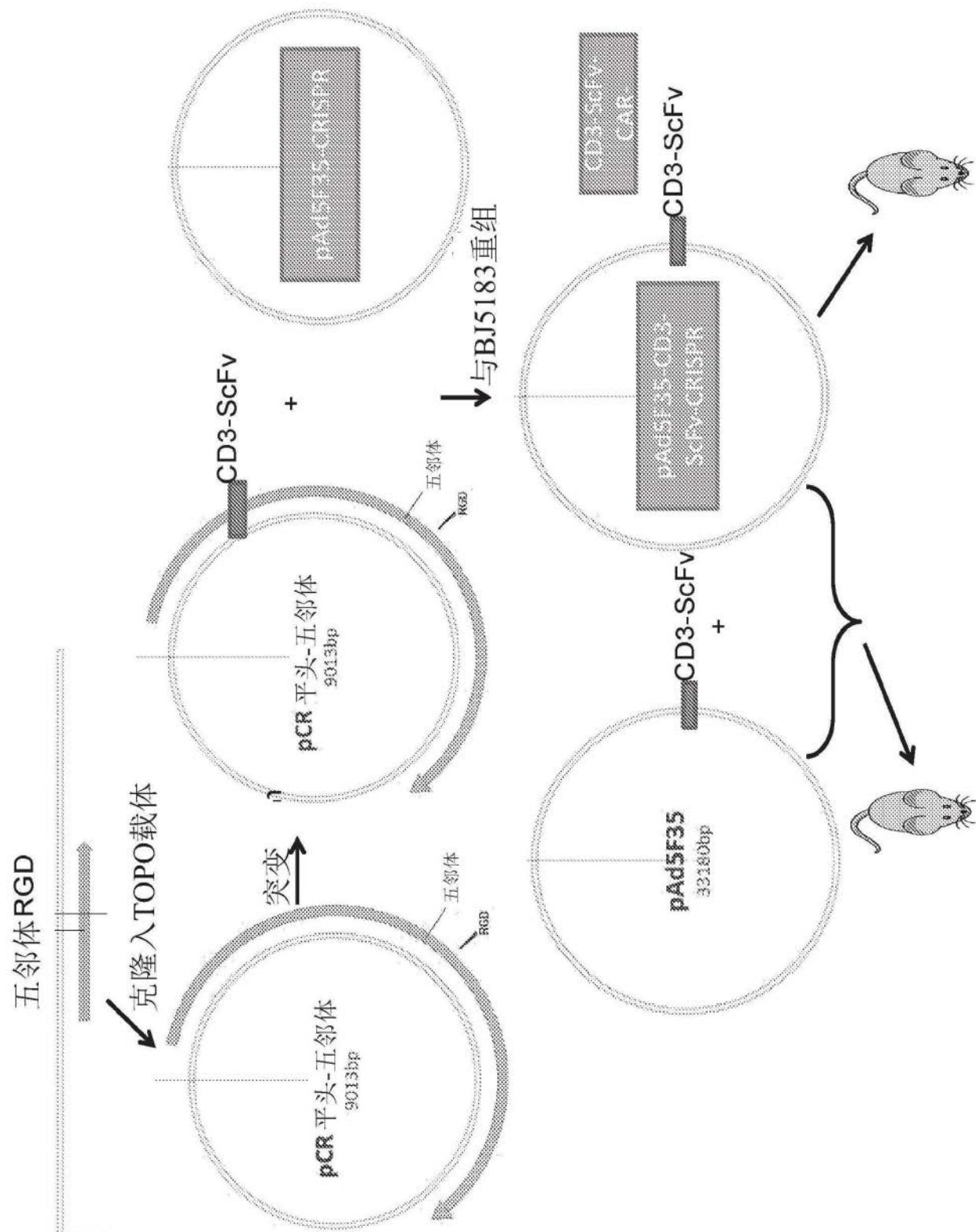


图78

PD1-gRNA: GGCCAGGATGGTTCTTAGGT

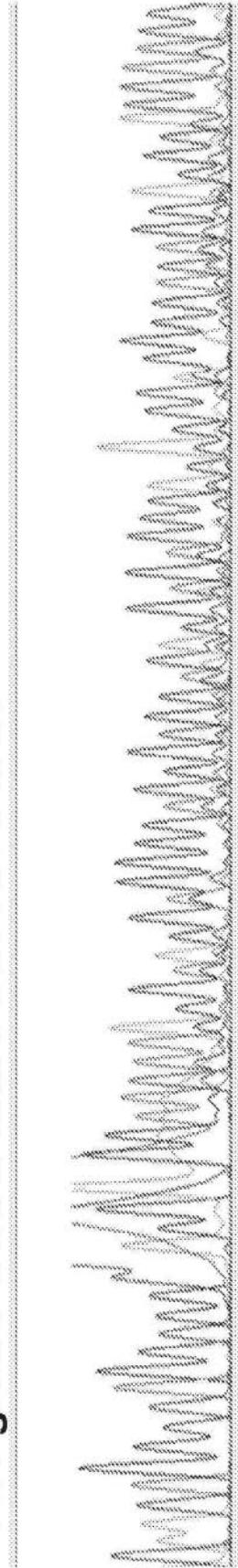


图79A

WT: tgggctggcccccaggaaatccatggatgggtggct
1: tgggctggcccccaggaaatccatggatgggtggct
6: tgggctggcccccaggaaatccatggatgggtggct
7: tgggctggcccccaggaaatccatggatgggtggct
8: tgggctggcccccaggaaatccatggatgggtggct
13: tgggctggcccccaggaaatccatggatgggtggct
16: tgggctggcccccaggaaatccatggatgggtggct
19: tgggctggcccccaggaaatccatggatgggtggct

图79B

EP#	EP1条件	EP2条件	EP1 RNA (ug)			EP2 RNA (ug)			小池	体积(ul)	CD3-%	82M-%	扩增倍数
			CAS9	gRNA	gRNA	CAS9	gRNA	gRNA					
1	360V	1ms	360v	1ms	40	20	10	2mm	200	81.8	88.6	2.7	
2	360V	1ms	360v	1ms	40	10	5	2mm	200	71.6	77.5	4.7	
3	360V	1ms	360v	1ms	40	2	5	2mm	200	66.2	59.5	7.3	
4	360V	1ms	360v	1ms	40	0	10	2mm	200	76.9	75.4	8.5	
5	360V	1ms	360v	1ms	20	10	5	2mm	200	68.2	56.2	5.5	
6	360V	1ms	360v	1ms	40	20	10	4mm	200	35.6	17.8	16.8	
7	360V	1ms	360v	1ms	20	10	5	4mm	200	15.8	3.8	19.1	
8	360V	1ms	360v	1ms	80	40	20	4mm	400	3.8	33.8	9.7	
9	500V	500us	500v	500us	40	20	10	4mm	200	37.4	17.8	17.2	
10	500V	1ms	500v	500us	20	10	5	4mm	200	22.8	9.3	18.5	
11	500V	700us	500v	500us	20	10	5	4mm	200	18.3	5	16.7	
12	无EP	仅清洗							200	1.8	1.5	18.8	

图80

EP #	EP1 条件	EP2 条件	EP1 RNA (ug)		EP2 RNA (ug)		小池	EP 体积 (ul)	CD3- B2M- D7 扩展
			CAS9 RNA	ERNA	EP1 RNA (ug)	EP2 RNA (ug)			
1	50KV	1ms	80	20	4mm	400	78.8	80.8	3.4
2	500V	1ms	80	0	4mm	400	58.4	69.9	5.6
3	50KV	1ms	80	0	4mm	400	37.6	47.6	7.0
4	500V	2ms	50%	2ms	10	4mm	400	74.2	83.7
5	50KV	2ms	50%	2ms	20	4mm	400	80.5	83.4
6	40KV	2ms	50%	1ms	10	4mm	400	40.5	51.0
7	400V	2ms	50%	1ms	80	4mm	400	55.7	64.1
8	40KV	2ms	50%	10us	10	4mm	400	50.0	64.0
9	40KV	3ms	50%	1ms	80	20	4mm	61.8	74.1
10	360V	1ms	360v	1ms	40	10	2mm	200	82.8
11	360V	1ms	360v	1ms	40	10	2mm	200	84.8
12	360V	1ms	360v	1ms	40	10	2mm	200	85.9
13	360V	1ms	360v	1ms	40	10	2mm	200	67.8
14	500V	1ms	50%	800us	80	0	4mm	400	51.3
15	无EP						200	4.1	6.3

图81



		EP1 条件	EP2 条件	CAS9	gRNA	CD3-	B2M-	D7 扩展
1	400V	3ms	500V	1ms	80	20	62.2	84.4
2	400V	3ms	500V	1ms	120	20	59.6	76.5
3	400V	3ms	500V	1ms	120	30	72.6	85.1
4	400V	2ms	500V	1ms	120	20	63.5	84.8
5	400V	2ms	500V	1ms	120	30	67.3	86.7
6	400V	2ms	500V	800us	120	20	54.8	79.3
7	400V	2ms	500V	800us	120	30	69.7	87.1
8	500V	2ms	500V	800us	80	20	63.6	85.2
9	500V	2ms	500V	800us	120	20	64.2	83.0
10	500V	2ms	500V	800us	120	30	76.5	84.1
11	500V	2ms	500V	800us	120	30	75.9	87.6
12	500V	2ms	500V	1ms	120	30	81.4	89.8
13	450V	2ms	500V	1ms	80	20	66.3	88.1
14	450V	2ms	500V	1ms	120	20	71.0	88.2
15	450V	3ms	500V	1ms	120	20	74.8	88.2
16	400V	3ms	500V	1ms	80	20	60.6	72.0
17	无 EP					0.5	0.7	9.9

图82

EP#	1 条件	EP2 条件	CAS9	gRNA	CD3-	B2m-	第8天扩展
1	400V	2ms	500v	1ms	120	20	68.8 78.9 7.8
2	400V	2ms	500v	1ms	120	10	51.5 60.3 9.7
3	500V	1ms	500v	1ms	120	20	70.6 79 8.3
4	500V	1ms	500v	1ms	120	10	52.1 62.9 10.1
5	500V	1ms	500v	1ms	120	5	30.6 31.4 11.4
6	500V	1ms	500v	1ms	120	1	8.91 5.51 12.4
7	500V	1ms	400v	1ms	120	20	55.9 67 10.3
8	400V	2ms	500v	800us	120	20	61.6 73.4 8.6
9	400V	2ms	500v	800us	120	10	42.9 49.9 10.4
10	400V	2ms	500v	800us	80	10	41.8 49.3 10.0
11	400V	2ms	500v	1ms	120	20	59.1 68.1 6.8
12	无EP						3.73 2.79 17.0

图83

第0天	CD3/CD28 珠刺激	1.计数/计算T细胞，在T:珠=1:3下使用T细胞清洗CD3/CD28珠混合物 2.使用MM调节至0.5e6-1e6/ml, T150中100ml/烧瓶
第1天	CD19 CAR 慢病毒转导	1.解冻hCD19 LVV, 在MOI 2下添加至T细胞
第3天	去珠	1.在去珠后，旋转和使用OPTI-MEM清洗细胞2次 2.将细胞以50e6/ml重悬在OPTI-MEM中
第3天	Cas9 RNA EP	3.在500V和1ms下使用BTX830电穿孔 $120\mu\text{g}$ Cas9/400 μl T细胞 4.在EP后，将T细胞添加至原始培养体积的一半新鲜和一半条件培养基
第4天	TRBC&B2m gRNA EP	1.旋转和使用OPTI-MEM清洗细胞2次 2.将细胞以50e6/ml重悬在OPTI-MEM中 3.在500V和1ms下使用BTX830电穿孔 $20\mu\text{g}$ TRBC4和B2M gRNA/400 μl T细胞 4.在EP后，将T细胞添加至原始培养体积的一半新鲜和一半条件培养基
第8天	CD3 阳性T细胞耗减	1.采集细胞，旋转，并且接着使用LD柱进行CD3阴性选择 2.将CD3阳性T细胞以 $0.5-1\text{e}6/\text{ml}$ 重悬在MM中，100ml/T150，以进一步扩增T细胞
第10天	采集T细胞	1.采集细胞，等分和冰冻T细胞

细胞#	组#	供体	T 细胞	扩增倍数						
				第0天	第3天	第5天	第6天	第7天	第8天	第10天
1	ND391	CART/ 空白对照EP	10.0	19.8	63.4	127.9	310.2	556.8	1090.8	
2	ND391	CART/CRISPR	100.0	178.2	175.4	350.4	571.6	1036.8	2985.6	
3	ND463	CART/ 空白对照EP	10.0	17.1	57.0	115.1	301.9	648.6	1282.5	
4	ND463	CART/CRISPR	90.0	153.5	150.8	309.6	522.8	861.6	2839.2	
5	ND463	未修饰	30.0	43.5	173.8	305.2	733.2	1503.2	2935.2	
6	ND469	CART/ 空白对照EP	10.0	12.0	66.6	99.3	301.9	577.2	1017.9	
7	ND469	CART/CRISPR	60.0	108.2	74.1	147.0	252.0	521.6	1190.4	

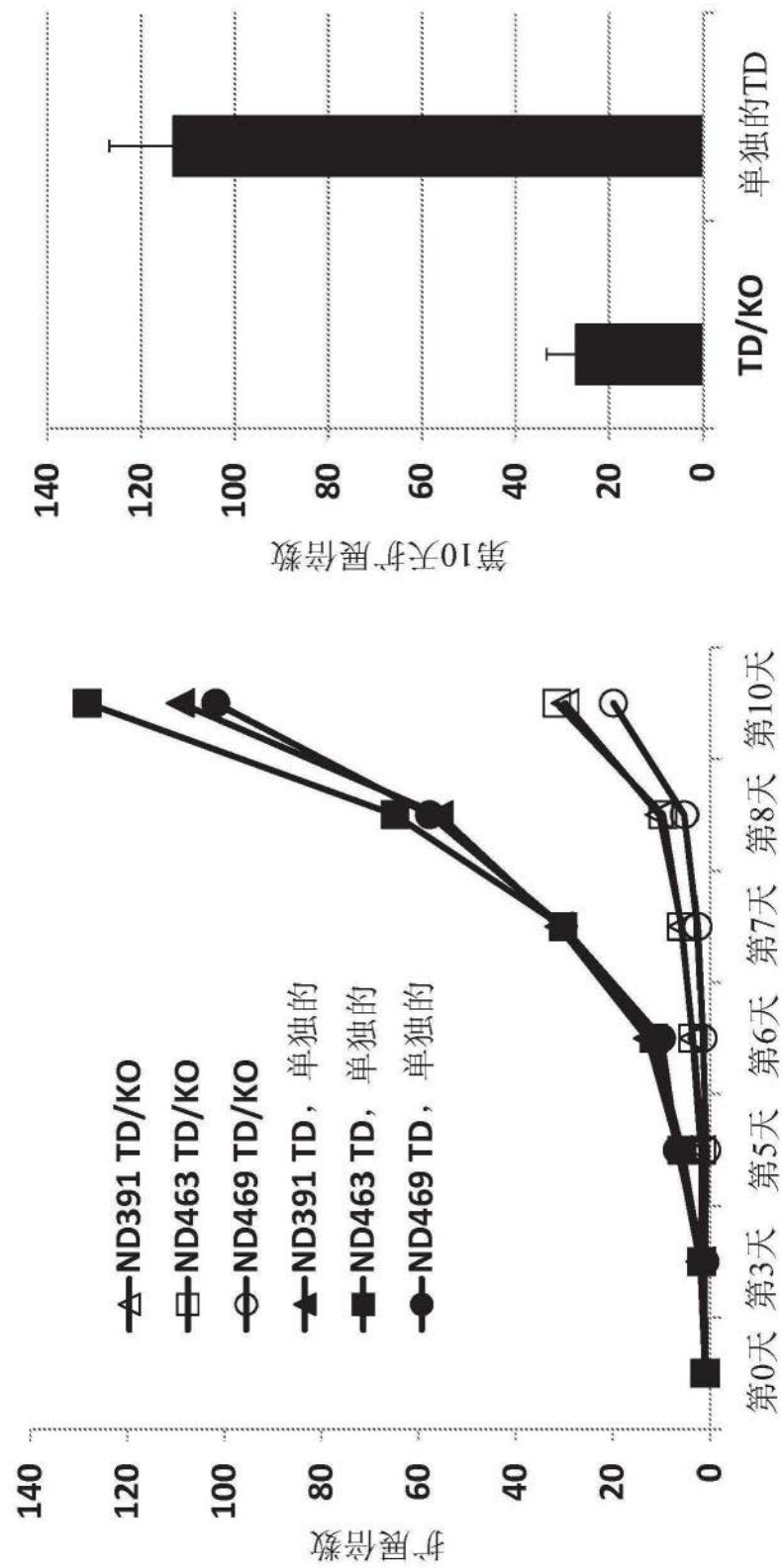


图86

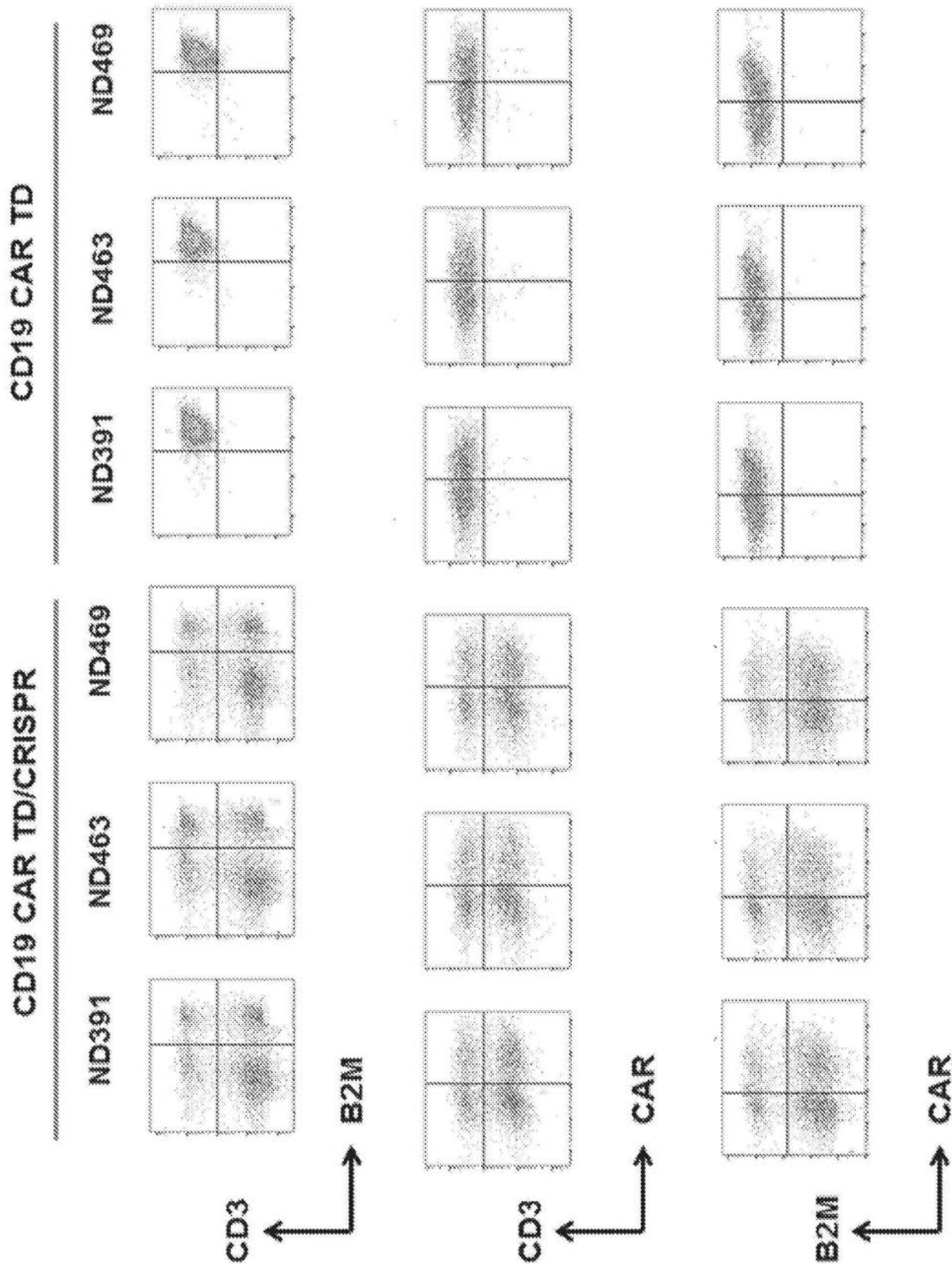
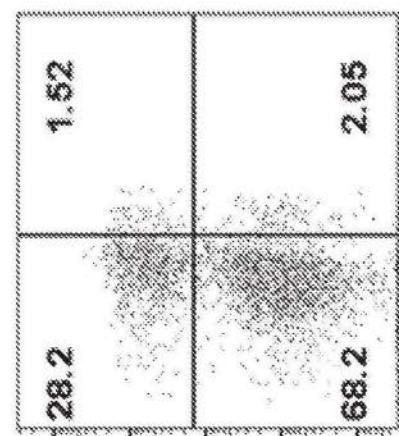
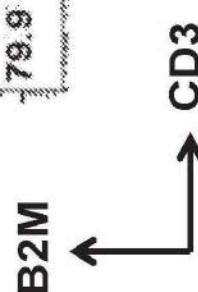
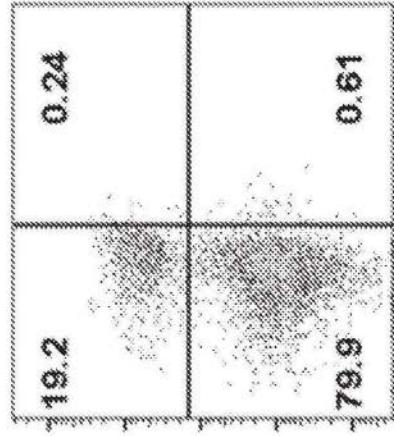


图87

ND391**ND463****ND469**

CD3耗减后第8天T细胞

图88

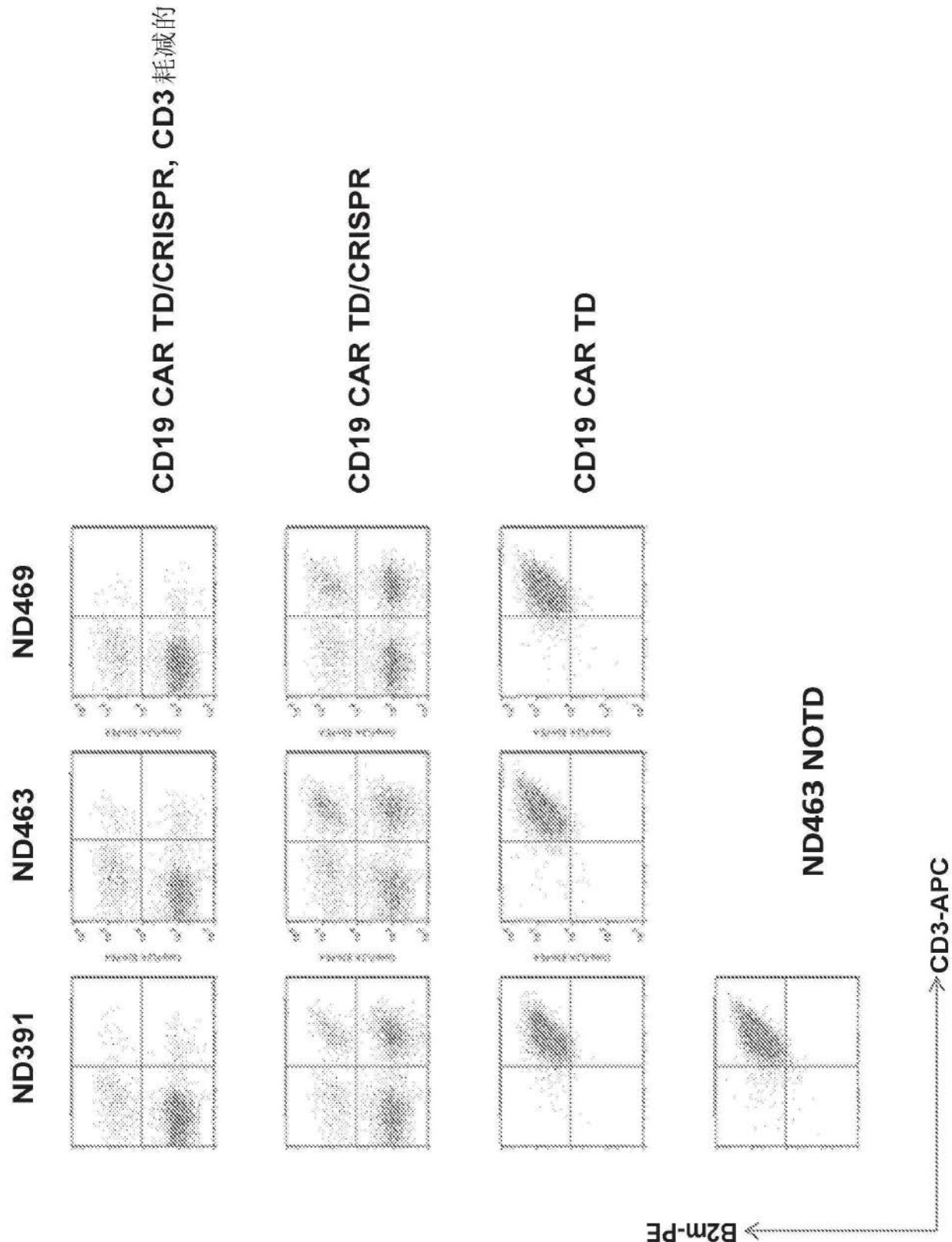


图89

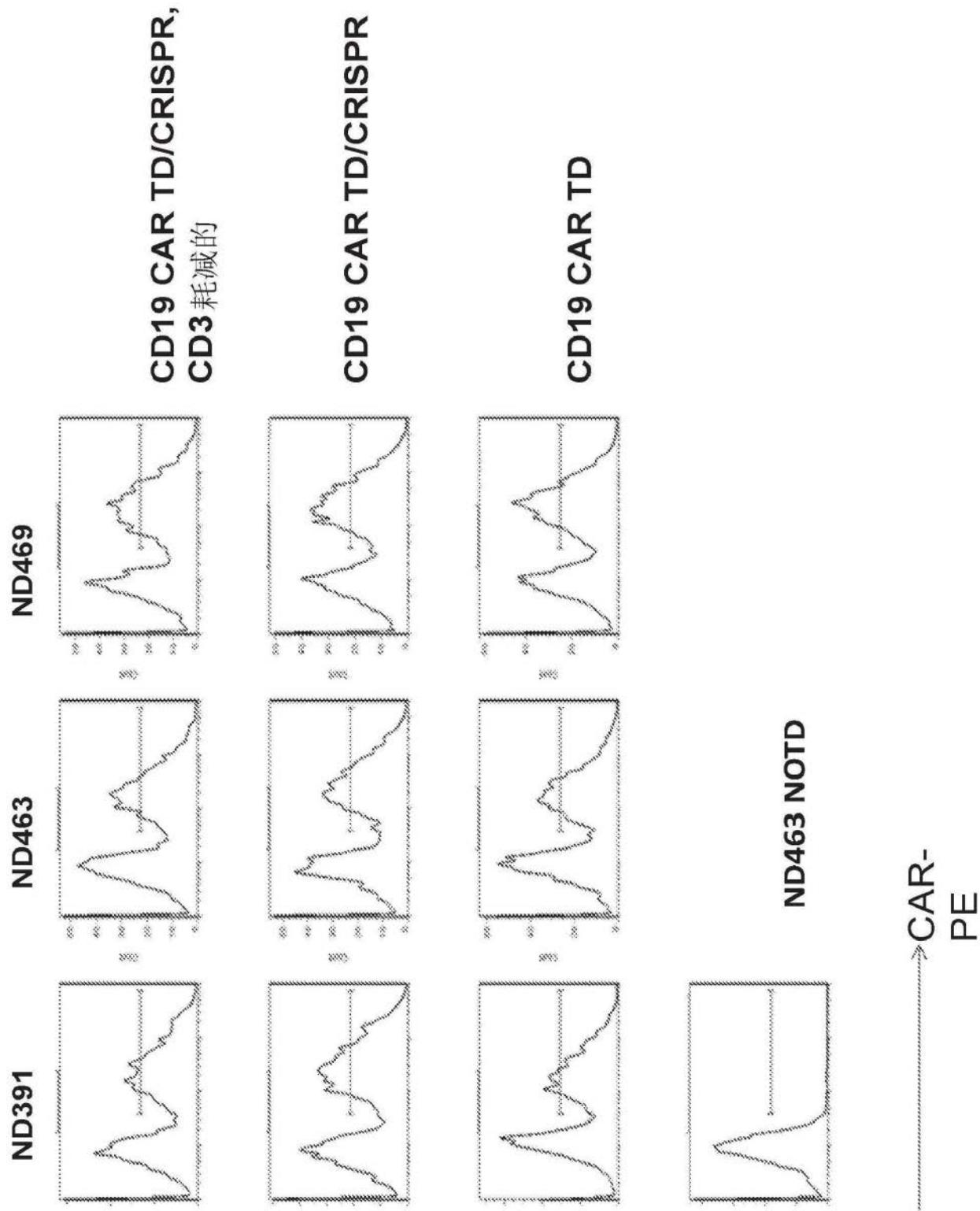


图90

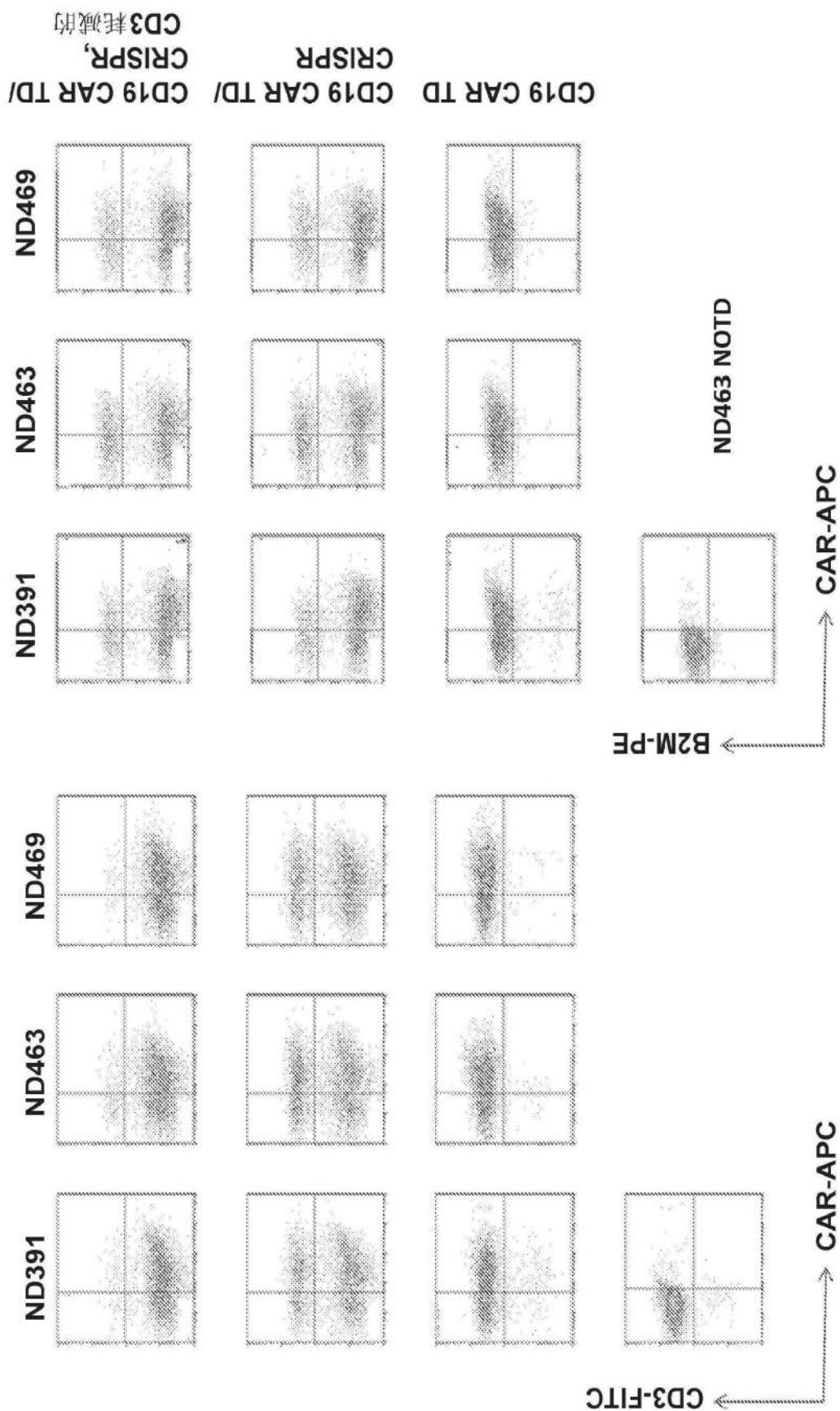


图91

载体细胞 ID	% CAR19+		% CAR19+		% CAR19+	
	CD3-	B2M-	CD3+	B2M+	CD3+	B2M+
ND391	51.4	85.2	12.8	1.6	0.4	
ND463	48.5	73.4	22.9	1.8	1.9	
ND469	55.8	82.1	16.5	0.8	0.6	

图92

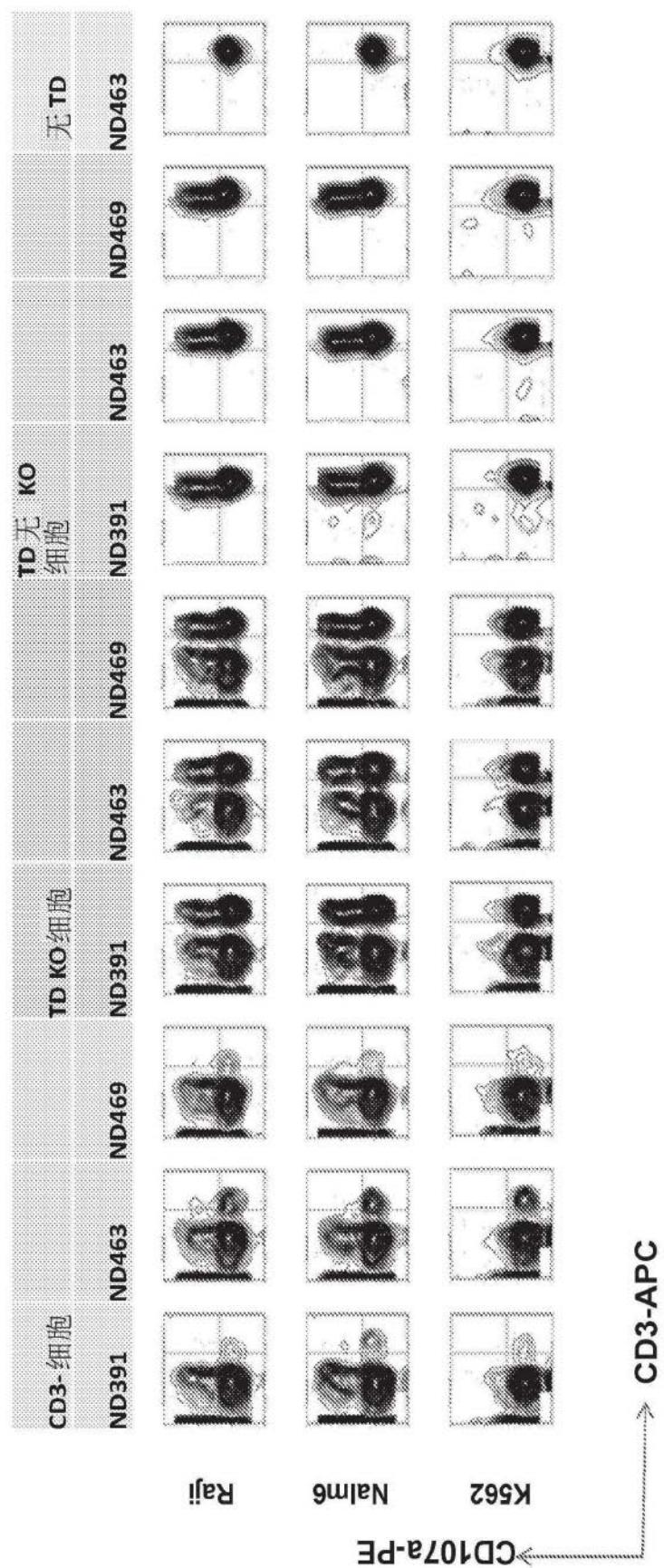


图93

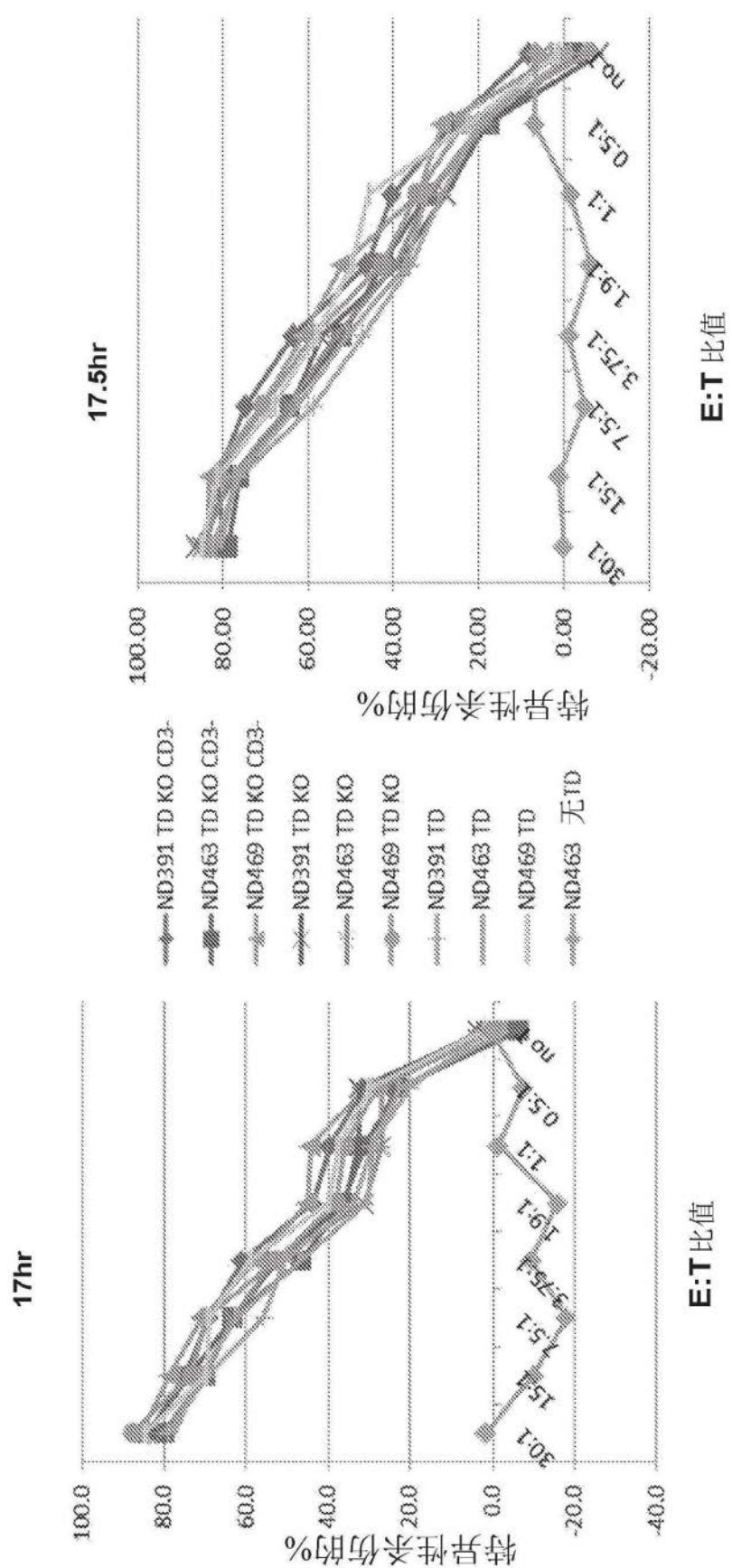


图94

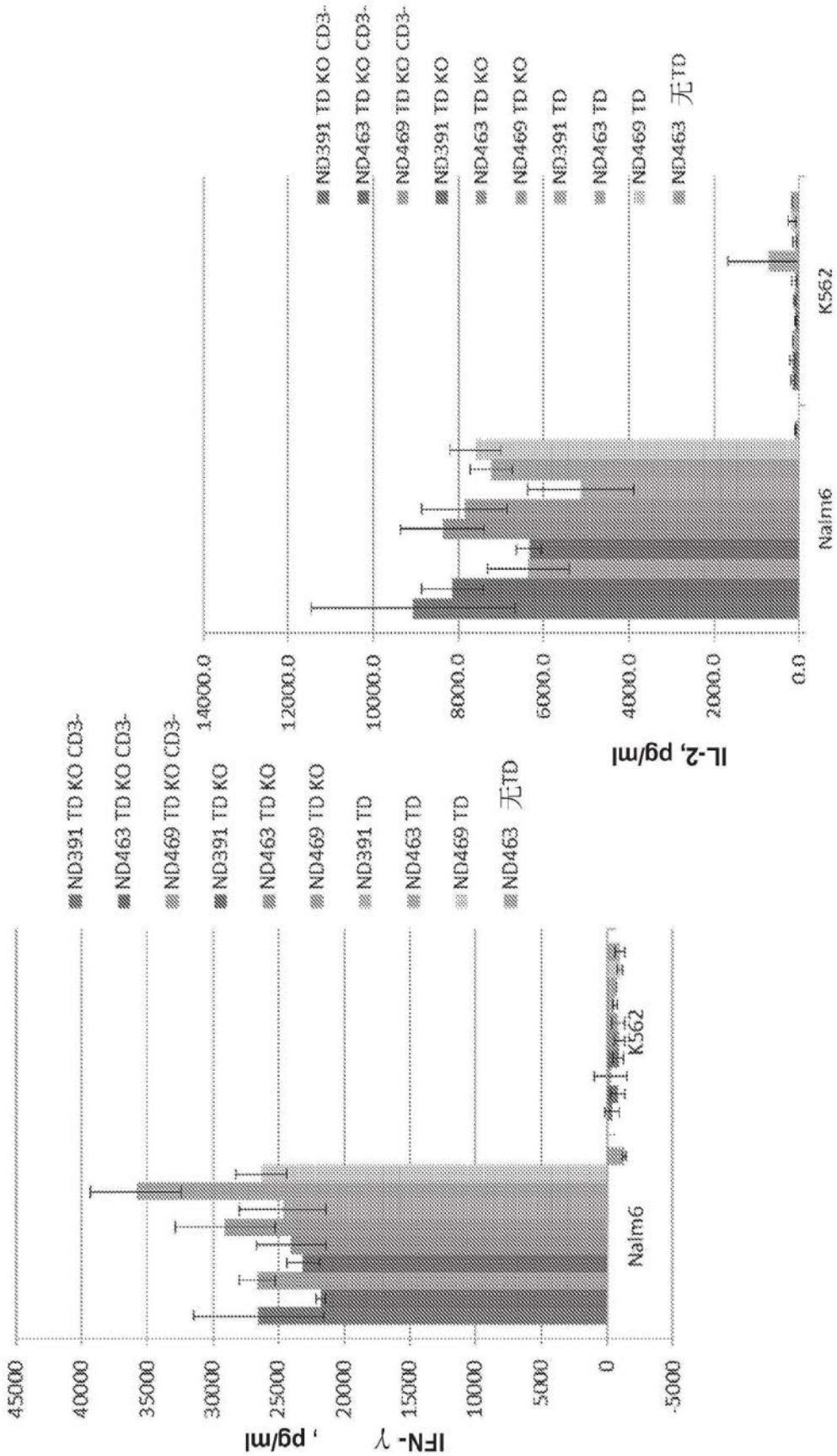


图95

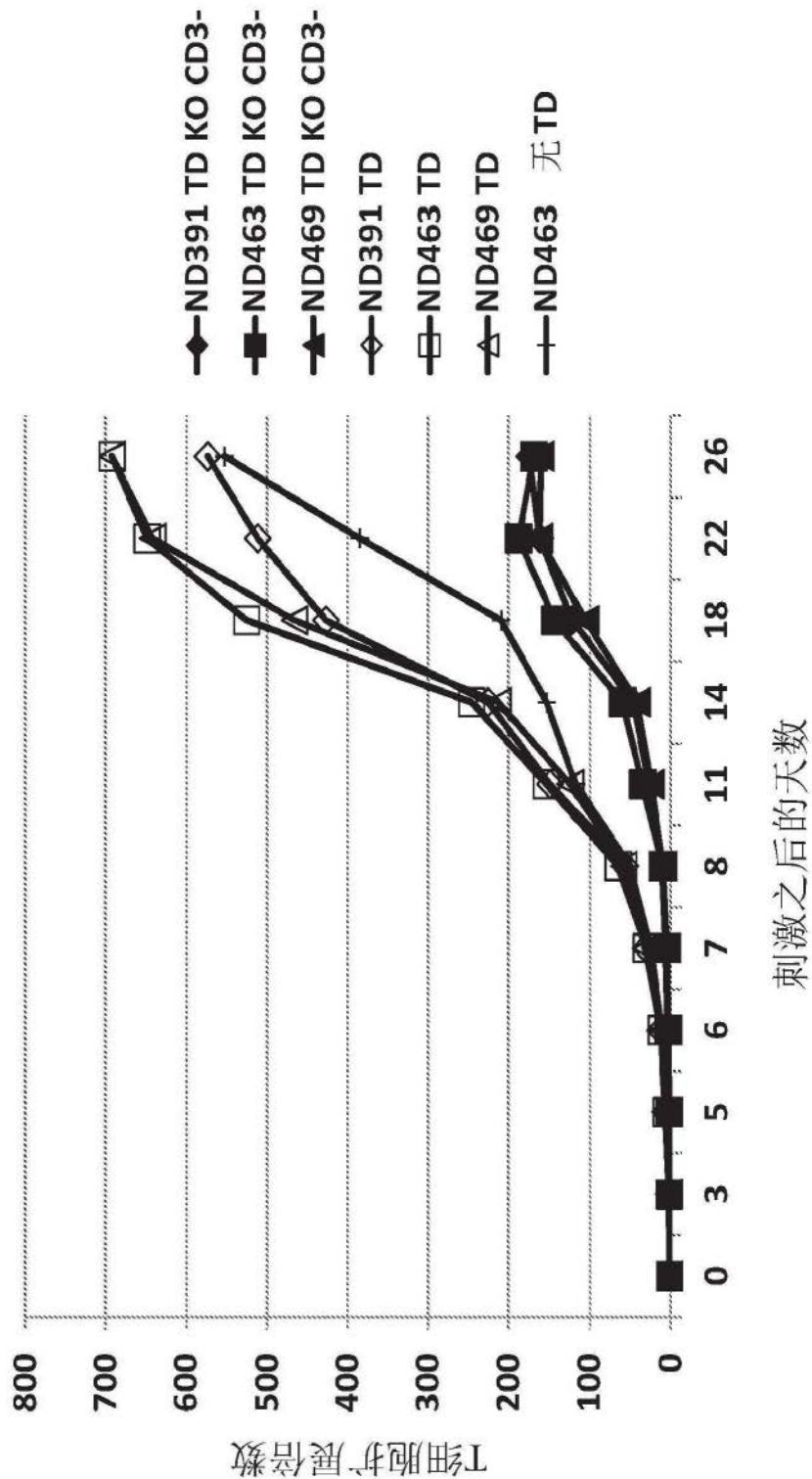


图96