



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110177869 A

(43)申请公布日 2019.08.27

(21)申请号 201880006714.X

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

(22)申请日 2018.01.14

利商标事务所 11038

(30)优先权数据

代理人 张小勇

62/445,969 2017.01.13 US

(51)Int.Cl.

C12N 5/074(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

A61K 35/545(2006.01)

2019.07.12

C12N 15/113(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/013688 2018.01.14

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/132783 EN 2018.07.19

(71)申请人 加利福尼亚大学董事会

地址 美国加利福尼亚

(72)发明人 S·施雷普菲 T·德乌瑟

权利要求书5页 说明书37页 附图53页

(54)发明名称

免疫改造的多能细胞

(57)摘要

本发明提供了多能细胞，其在治疗上用于再生组织但避免接受它们的受试者的排斥。特别地，本发明提供了避免宿主免疫排斥的低免疫原性多能细胞。该细胞缺乏引发免疫应答的主要免疫抗原，并且经过改造以避免吞噬细胞内吞作用。本发明还提供了普遍可接受的“现成的”多能细胞及其衍生物，其用于产生或再生特定的组织和器官。

1. 一种产生低免疫原性多能干细胞的方法,其包括:

- a. 消除诱导性多能干细胞(iPSC)中B2M基因的两个等位基因的活性;
- b. 消除所述iPSC中CIITA基因的两个等位基因的活性;和
- c. 增加所述iPSC中CD47的表达。

2. 权利要求1的方法,其中所述iPSC是人的,所述B2M基因是人的,所述CIITA基因是人的,并且增加的CD47表达是由于将至少一个拷贝的在启动子控制下的人CD47基因引入所述iPSC细胞中引起的。

3. 权利要求1的方法,其中所述iPSC是鼠的,所述B2M基因是鼠的,所述Ciita基因是鼠的,并且增加的Cd47表达是由于将至少一个拷贝的在启动子控制下的鼠Cd47基因引入所述iPSC细胞中引起的。

4. 权利要求2-3任一项的方法,其中所述启动子是组成型启动子。

5. 权利要求1-3中任一项的方法,其中所述B2M基因的两个等位基因的所述破坏是由破坏所述B2M基因的两个等位基因的成簇规律间隔短回文重复序列/Cas9 (CRISPR) 反应引起的。

6. 权利要求1-3中任一项的方法,其中所述CIITA基因的两个等位基因的所述破坏是由破坏所述CIITA基因的两个等位基因的CRISPR反应引起的。

7. 一种人低免疫原性多能干细胞(hHIP),其包含:

- a. 使内源B2M基因的两个等位基因失活的一个或多个改变;
- b. 使内源CIITA基因的两个等位基因失活的一个或多个改变;和
- c. 在所述hHIP干细胞中引起增加的CD47基因表达的改变;

其中所述hHIP干细胞引发第一天然杀伤(NK)细胞应答,其低于由诱导性多能干细胞(iPSC)引发的第二NK细胞应答,所述iPSC包含所述B2M和CIITA改变但不包含所述增加的CD47基因表达,并且其中所述第一和第二NK细胞应答是通过测定与所述hHIP或iPSC体外孵育的NK细胞的IFN- γ 水平来测量的。

8. 一种人低免疫原性多能干细胞(hHIP),其包含:

- a. 使内源B2M基因的两个等位基因失活的一个或多个改变;
- b. 使内源CIITA基因的两个等位基因失活的一个或多个改变;和
- c. 在所述hHIP干细胞中引起增加的CD47基因表达的一个或多个改变;

其中所述hHIP干细胞在人源化小鼠品系中引发第一T细胞应答,其低于在所述人源化小鼠品系中由iPSC引发的第二T细胞应答,并且其中所述第一和第二T细胞应答是通过在Elispot测定中测定来自所述人源化小鼠的IFN- γ 水平来测量的。

9. 一种方法,其包括将权利要求7或8中任一项的hHIP干细胞移植到人受试者中。

10. 一种低免疫原性多能细胞,其包含:

- a. 与亲本多能细胞相比降低的内源主要组织相容性I类抗原(HLA-I)功能;
- b. 与所述亲本多能细胞相比降低的内源主要组织相容性II类抗原(HLA-II)功能;和
- c. 与所述亲本多能细胞相比降低的对NK细胞杀伤的敏感性;

其中所述低免疫原性多能细胞在移植入受试者时由于所述降低的HLA-I功能、所述降低的HLA-II功能和降低的对NK细胞杀伤的敏感性而对排斥反应较不敏感。

11. 权利要求10的低免疫原性多能细胞,其中所述HLA-I功能通过降低 β -2微球蛋白表

达而降低。

12. 权利要求11的低免疫原性多能细胞,其中敲除编码所述β-2微球蛋白的基因。
13. 权利要求12的低免疫原性多能细胞,其中所述β-2微球蛋白与SEQ ID NO:1具有至少90%的序列同一性。
14. 权利要求13的低免疫原性多能细胞,其中所述β-2微球蛋白具有SEQ ID NO:1的序列。
15. 权利要求10的低免疫原性多能细胞,其中所述HLA-I功能通过降低HLA-A蛋白表达而降低。
16. 权利要求15的低免疫原性多能细胞,其中敲除编码所述HLA-A蛋白的基因。
17. 权利要求10的低免疫原性多能细胞,其中所述HLA-I功能通过降低HLA-B蛋白表达而降低。
18. 权利要求17的低免疫原性多能细胞,其中敲除HLA-B蛋白。
19. 权利要求10的低免疫原性多能细胞,其中所述HLA-I功能通过降低HLA-C蛋白表达而降低。
20. 权利要求19的低免疫原性多能细胞,其中敲除编码所述HLA-C蛋白的基因。
21. 权利要求10-20中任一项的低免疫原性多能细胞,其中所述低免疫原性多能细胞不包含HLA-I功能。
22. 权利要求10-21中任一项的低免疫原性多能细胞,其中所述HLA-II功能通过降低CIITA蛋白表达而降低。
23. 权利要求22的低免疫原性多能细胞,其中敲除编码所述CIITA蛋白的基因。
24. 权利要求23的低免疫原性多能细胞,其中所述CIITA蛋白与SEQ ID NO:2具有至少90%的序列同一性。
25. 权利要求24的低免疫原性多能细胞,其中所述CIITA蛋白具有SEQ ID NO:2的序列。
26. 权利要求10-21中任一项的低免疫原性多能细胞,其中所述HLA-II功能通过降低HLA-DP蛋白表达而降低。
27. 权利要求26的低免疫原性多能细胞,其中敲除编码所述HLA-DP蛋白的基因。
28. 权利要求10-21中任一项的低免疫原性多能细胞,其中所述HLA-II功能通过降低HLA-DR蛋白表达而降低。
29. 权利要求28的低免疫原性多能细胞,其中敲除编码所述HLA-DR蛋白的基因。
30. 权利要求10-21中任一项的低免疫原性多能细胞,其中所述HLA-II功能通过降低HLA-DQ蛋白表达而降低。
31. 权利要求30的低免疫原性多能细胞,其中敲除编码所述HLA-DQ蛋白的基因。
32. 权利要求10-31中任一项的低免疫原性多能细胞,其中所述低免疫原性多能细胞不包含HLA-II功能。
33. 权利要求10-32中任一项的低免疫原性多能细胞,其中所述降低的对NK细胞杀伤的敏感性是由增加的CD47蛋白表达引起的。
34. 权利要求33的低免疫原性多能细胞,其中所述增加的CD47蛋白表达是由对内源CD47基因座的修饰引起的。
35. 权利要求33的低免疫原性多能细胞,其中所述增加的CD47蛋白表达是由CD47转基

因引起的。

36. 权利要求33-35中任一项的低免疫原性多能细胞,其中所述CD47蛋白与SEQ ID NO:3具有至少90%的序列同一性。

37. 权利要求27的低免疫原性多能细胞,其中所述CD47蛋白具有SEQ ID NO:3的序列。

38. 权利要求10-37中任一项的低免疫原性多能细胞,其进一步包含自杀基因,所述自杀基因由引发所述低免疫原性多能细胞死亡的触发因子激活。

39. 权利要求38的低免疫原性多能细胞,其中所述自杀基因是单纯疱疹病毒胸昔激酶基因(HSV-tk),并且所述触发因子是更昔洛韦。

40. 权利要求39的低免疫原性多能细胞,其中所述HSV-tk基因编码与SEQ ID NO:4具有至少90%序列同一性的蛋白质。

41. 权利要求40的低免疫原性多能细胞,其中所述HSV-tk基因编码包含SEQ ID NO:4的序列的蛋白质。

42. 权利要求38的低免疫原性多能细胞,其中所述自杀基因是大肠杆菌胞嘧啶脱氨酶基因(EC-CD),并且所述触发因子是5-氟胞嘧啶(5-FC)。

43. 权利要求42的低免疫原性多能细胞,其中所述EC-CD基因编码与SEQ ID NO:5具有至少90%序列同一性的蛋白质。

44. 权利要求43的低免疫原性多能细胞,其中所述EC-CD基因编码包含SEQ ID NO:5序列的蛋白质。

45. 权利要求38的低免疫原性多能细胞,其中所述自杀基因编码诱导型胱天蛋白酶蛋白,并且所述触发因子是二聚化的化学诱导剂(CID)。

46. 权利要求45的低免疫原性多能细胞,其中所述基因编码诱导型胱天蛋白酶蛋白,其与SEQ ID NO:6具有至少90%的序列同一性。

47. 权利要求46的低免疫原性多能细胞,其中所述基因编码包含SEQ ID NO:6的序列的诱导型胱天蛋白酶蛋白。

48. 权利要求45-47中任一项的低免疫原性多能细胞,其中所述CID是AP1903。

49. 一种产生低免疫原性多能细胞的方法,其包括

- a. 在多能细胞中降低内源主要组织相容性I类抗原(HLA-I)功能;
- b. 在多能细胞中降低内源主要组织相容性II类抗原(HLA-II)功能;和
- c. 增加降低所述多能细胞对NK细胞杀伤的敏感性的蛋白质的表达。

50. 权利要求49的方法,其中所述HLA-I功能通过降低β-2微球蛋白表达而降低。

51. 权利要求50的方法,其中通过敲除编码所述β-2微球蛋白的基因来降低所述β-2微球蛋白表达。

52. 权利要求50的方法,其中所述β-2微球蛋白与SEQ ID NO:1具有至少90%的序列同一性。

53. 权利要求51的方法,其中所述β-2微球蛋白具有SEQ ID NO:1的序列。

54. 权利要求49的方法,其中所述HLA-I功能通过降低HLA-A蛋白表达而降低。

55. 权利要求54的方法,其中通过敲除编码所述HLA-A蛋白的基因来降低所述HLA-A蛋白表达。

56. 权利要求49的方法,其中所述HLA-I功能通过降低HLA-B蛋白表达而降低。

57. 权利要求56的方法,其中通过敲除编码所述HLA-B蛋白的基因来降低所述HLA-B蛋白表达。

58. 权利要求49的方法,其中所述HLA-I功能通过降低HLA-C蛋白表达而降低。

59. 权利要求58的方法,其中通过敲除编码所述HLA-C蛋白的基因来降低所述HLA-C蛋白表达。

60. 权利要求49-59中任一项的方法,其中所述低免疫原性多能细胞不包含HLA-I功能。

61. 权利要求49-60中任一项的方法,其中所述HLA-II功能通过降低CIITA蛋白表达而降低。

62. 权利要求60的方法,其中通过敲除编码所述CIITA蛋白的基因来降低所述CIITA蛋白表达。

63. 权利要求61的方法,其中所述CIITA蛋白与SEQ ID NO:2具有至少90%的序列同一性。

64. 权利要求63的方法,其中所述CIITA蛋白质具有SEQ ID NO:2的序列。

65. 权利要求49-60中任一项的方法,其中所述HLA-II功能通过降低HLA-DP蛋白表达而降低。

66. 权利要求65的方法,其中通过敲除编码所述HLA-DP蛋白的基因来降低所述HLA-DP蛋白表达。

67. 权利要求49-60中任一项的方法,其中所述HLA-II功能通过降低HLA-DR蛋白表达而降低。

68. 权利要求67的方法,其中通过敲除编码所述HLA-DR蛋白的基因来降低所述HLA-DR蛋白表达。

69. 权利要求49-60中任一项的方法,其中所述HLA-II功能通过降低HLA-DQ蛋白表达而降低。

70. 权利要求69的方法,其中通过敲除编码所述HLA-DQ蛋白的基因来降低所述HLA-DQ蛋白表达。

71. 权利要求49-70中任一项的方法,其中所述低免疫原性多能细胞不包含HLA-II功能。

72. 权利要求49-71中任一项的方法,其中所述增加的降低所述多能细胞对巨噬细胞吞噬作用的敏感性的蛋白质的表达是由对内源基因座的修饰引起的。

73. 权利要求72的方法,其中所述内源基因座编码CD47蛋白。

74. 权利要求49-71中任一项的方法,其中所述增加的蛋白质表达是由转基因的表达引起的。

75. 权利要求74的方法,其中所述转基因编码CD47蛋白。

76. 权利要求73或74中任一项的方法,其中所述CD47蛋白与SEQ ID NO:3具有至少90%的序列同一性。

77. 权利要求76的方法,其中所述CD47蛋白质具有SEQ ID NO:3的序列。

78. 权利要求49-77中任一项的方法,其进一步包括表达自杀基因,所述自杀基因由引发所述低免疫原性多能细胞死亡的触发因子激活。

79. 权利要求78的方法,其中所述自杀基因是单纯疱疹病毒胸苷激酶基因(HSV-tk),并

且所述触发因子是更昔洛韦。

80. 权利要求79的方法,其中所述HSV-tk基因编码与SEQ ID NO:4具有至少90%序列同一性的蛋白质。

81. 权利要求80的方法,其中所述HSV-tk基因编码包含SEQ ID NO:4的序列的蛋白质。

82. 权利要求78的方法,其中所述自杀基因是大肠杆菌胞嘧啶脱氨酶基因(EC-CD),并且所述触发因子是5-氟胞嘧啶(5-FC)。

83. 权利要求82的方法,其中所述EC-CD基因编码与SEQ ID NO:5具有至少90%序列同一性的蛋白质。

84. 权利要求83的方法,其中所述EC-CD基因编码包含SEQ ID NO:5的序列的蛋白质。

85. 权利要求78的方法,其中所述自杀基因编码诱导型胱天蛋白酶蛋白,并且所述触发因子是二聚化的特异性化学诱导剂(CID)。

86. 权利要求85的方法,其中所述基因编码诱导型胱天蛋白酶蛋白,其与SEQ ID NO:6具有至少90%的序列同一性。

87. 权利要求86的方法,其中所述基因编码包含SEQ ID NO:6的序列的诱导型胱天蛋白酶蛋白。

88. 权利要求85-87中任一项的方法,其中所述CID是AP1903。

免疫改造的多能细胞

[0001] I. 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2017年1月13日提交的美国临时申请号62/445,969的权益。

[0003] II. 发明领域

[0004] 再生细胞疗法是用于再生受损器官和组织的重要潜在治疗方法。由于用于移植的器官的低可用性和伴随的漫长等待,通过将易于获得的细胞系移植到患者中再生组织的可能性可以理解是吸引人的。再生细胞疗法已经显示出在动物模型(例如心肌梗塞后)中移植后恢复受损组织的有希望的初步结果。然而,移植受体的免疫系统排斥同种异体材料的倾向极大地降低了治疗的潜在功效并且减少了围绕这些治疗的可能的积极效果。

[0005] III. 发明背景

[0006] 再生细胞疗法是用于再生受损器官和组织的重要潜在治疗方法。由于用于移植的器官的低可用性和伴随的漫长等待,通过将易于获得的细胞系移植到患者中再生组织的可能性可以理解是吸引人的。再生细胞疗法已经显示出在动物模型(例如心肌梗塞后)中移植后恢复受损组织的有希望的初步结果。然而,移植受体的免疫系统排斥同种异体材料的倾向极大地降低了治疗的潜在功效并且减少了围绕这些治疗的可能的积极效果。

[0007] 自体诱导性多能干细胞(iPSC)理论上构成用于患者特异性的基于细胞的器官修复策略的无限细胞来源。然而,它们的产生具有技术和制造方面的挑战,并且是一个漫长的过程,其在概念上阻碍任何急性治疗方式。从制造的角度来看,基于同种异体iPSC的疗法更容易,并且允许产生经过良好筛选的、标准化的、高质量的细胞产品。然而,由于它们的同种异体起源,这些细胞产品会遭受排斥。随着细胞抗原性的降低或消除,可以产生普遍可接受的细胞产品。因为多能干细胞可以分化成三种胚层的任何细胞类型,干细胞疗法的潜在应用范围很广。通过移植在植入部位的器官环境中继续分化和成熟的祖细胞,可以离体或体内进行分化。离体分化允许研究人员或临床医生密切监测程序并确保在移植前产生适当的细胞群。

[0008] 然而,在大多数情况下,由于其倾向于形成畸胎瘤,在临床移植疗法中避免了未分化的多能干细胞。相反,这种疗法倾向于使用分化细胞(例如,干细胞衍生的心肌细胞移植到患有心力衰竭的患者的心肌中)。这种多能细胞(pluripotent cell)或组织的临床应用将受益于在移植后控制细胞生长和存活的“安全特征”。

[0009] 本领域寻求能够产生用于再生患病或缺陷细胞的细胞的干细胞。可以使用多能干细胞(PSC),因为它们快速繁殖并分化成许多可能的细胞类型。PSC家族包括通过不同技术产生并具有不同免疫原性特征的几个成员。患者与衍生自PSC的改造细胞或组织的相容性决定了免疫排斥的风险和免疫抑制的要求。

[0010] 从胚泡的内细胞团分离的胚胎干细胞(ESC)表现出与受体不匹配的组织相容性抗原。这种免疫屏障不能通过ESC的人白细胞抗原(HLA)分型的库解决,因为即使HLA匹配的PSC移植物也会因为作为次要抗原起作用的非HLA分子的不匹配而发生排斥。迄今为止,基于PSC的方法的临床前成功仅在免疫抑制或免疫缺陷模型中或者在细胞被包封和保护以逃避宿主免疫系统时实现。然而,如在同种异体器官移植中使用的系统性免疫抑制对于再生

方法是不合理的。免疫抑制药物具有严重的副作用，并显著增加感染和恶性肿瘤的风险。

[0011] 为了避免排斥问题，已经开发了用于产生患者特异性多能干细胞的不同技术。这些技术包括将体细胞核转移到去核卵母细胞中（体细胞核转移（SCNT）干细胞），体细胞与ESC的融合（杂交细胞），以及使用某些转录因子重编程体细胞（诱导的PSC或iPSC）。然而，尽管具有染色体身份，SCNT干细胞和iPSC可能分别与细胞核或细胞供体具有免疫不相容性。SCNT干细胞携带从卵母细胞传递的线粒体DNA（mtDNA）。mtDNA编码的蛋白质可以作为相关的次要抗原并引发排斥反应。与iPSC的重编程和培养扩增相关的遗传不稳定性以及DNA和mtDNA突变也可以产生与免疫排斥相关的次要抗原。这种先前未知的免疫障碍降低了使用SCNT干细胞或iPSC成功地大规模改造相容的患者特异性组织的可能性。

[0012] IV. 发明概述

[0013] 产生了低免疫多能（HIP）细胞，其逃避宿主免疫系统的排斥。利用了胎盘的合体滋养层细胞，其形成母体血液和胎儿组织之间的界面。降低了MHC I或HLA-I和MHC II或HLA-II的表达。增加了CD47。受损的抗原呈递能力和对先天免疫清除的保护的这种模式逃避了宿主免疫排斥。HIP细胞和特定的外胚层、中胚层以及HIP细胞分化成的内胚层衍生的细胞显示了这种模式。

[0014] 因此，本发明提供了产生低免疫原性多能干细胞的方法，其包括：消除诱导性多能干细胞（iPSC）中B2M基因的两个等位基因的活性；消除iPSC中CIITA基因的两个等位基因的活性；并增加iPSC中CD47的表达。

[0015] 在该方法的一个优选实施方案中，iPSC是人的，B2M基因是人的，CIITA基因是人的，并且增加的CD47表达是由于将至少一个拷贝的在启动子控制下的人CD47基因引入所述iPSC细胞中引起的。在方法的另一个优选实施方案中，iPSC是鼠的，B2M基因是鼠的，Ciita基因是鼠的，并且增加的Cd47表达是由于将至少一个拷贝的在启动子控制下的鼠Cd47基因引入所述iPSC细胞中引起的。在更优选的实施方案中，启动子是组成型启动子。

[0016] 在本文公开的方法的一些实施方案中，B2M基因的两个等位基因的破坏是由破坏所述B2M基因的两个等位基因的成簇规律间隔短回文重复序列/Cas9（CRISPR）反应引起的。在该方法的其他实施方案中，CIITA基因的两个等位基因的破坏是由破坏所述CIITA基因的两个等位基因的CRISPR反应引起的。

[0017] 本发明提供了一种人低免疫原性多能干（hHIP）干细胞，其包含：使内源B2M基因的两个等位基因失活的一个或多个改变；使内源CIITA基因的两个等位基因失活的一个或多个改变；和在所述hHIP干细胞中引起增加的CD47基因表达的一个或多个改变；其中hHIP干细胞引发第一天然杀伤（NK）细胞应答，其低于由诱导性多能干细胞（iPSC）引发的第二NK细胞应答，所述iPSC包含所述B2M和CIITA改变但不包含所述增加的CD47基因表达，并且其中所述第一和第二NK细胞应答是通过测定与所述hHIP或iPSC体外孵育的NK细胞的IFN- γ 水平来测量的。

[0018] 本发明提供了一种人低免疫原性多能干（hHIP）干细胞，其包含：使内源B2M基因的两个等位基因失活的一个或多个改变；使内源CIITA基因的两个等位基因失活的一个或多个改变；和在所述hHIP干细胞中引起增加的CD47基因表达的一个或多个改变；其中hHIP干细胞在人源化小鼠品系中引发第一T细胞应答，其低于在人源化小鼠品系中由iPSC引发的第二T细胞应答，并且其中第一和第二T细胞应答是通过在Elispot测定中测定来自人源化

小鼠的IFN- γ 水平来测量的。

[0019] 本发明提供了一种方法,其包括将本文公开的hHIP干细胞移植到人受试者中。本发明进一步提供了本文公开的hHIP干细胞在制备用于治疗需要细胞移植的病症的药物中的用途。

[0020] 本发明提供了一种低免疫原性多能细胞,其包含与亲本多能细胞相比降低的内源主要组织相容性I类抗原(HLA-I)功能;与亲本多能细胞相比降低的内源主要组织相容性II类抗原(HLA-II)功能;与亲本多能细胞相比降低的对NK细胞杀伤的敏感性;其中低免疫原性多能细胞在移植入受试者时由于降低的HLA-I功能、降低的HLA-II功能和的对NK细胞杀伤的敏感性而对排斥反应较不敏感。

[0021] 在一些实施方案中,通过降低 β -2微球蛋白表达来降低免疫原性多能细胞。在优选的实施方案中,敲除编码 β -2微球蛋白的基因。在更优选的实施方案中, β -2微球蛋白与SEQ ID N0:1具有至少90%的序列同一性。在更优选的实施方案中, β -2微球蛋白具有SEQ ID N0:1的序列。

[0022] 在一些实施方案中,通过降低HLA-A蛋白表达来降低HLA-I功能。在优选的实施方案中,敲除编码HLA-A蛋白的基因。在一些实施方案中,通过降低HLA-B蛋白表达来降低HLA-I功能。在优选的实施方案中,敲除编码HLA-B蛋白的基因。在一些实施方案中,通过降低HLA-C蛋白表达来降低HLA-I功能。在优选的实施方案中,敲除编码HLA-C蛋白的基因。

[0023] 在另一个实施方案中,低免疫原性多能细胞不包含HLA-I功能。

[0024] 本发明提供了低免疫原性多能细胞,其中通过降低CIITA蛋白表达来降低HLA-II功能。在优选的实施方案中,敲除编码CIITA蛋白的基因。在更优选的实施方案中,CIITA蛋白与SEQ ID N0:2具有至少90%的序列同一性。在更优选的实施方案中,CIITA蛋白具有SEQ ID N0:2的序列。

[0025] 在一些实施方案中,通过降低HLA-DP蛋白表达来降低HLA-II功能。在优选的实施方案中,敲除编码HLA-DP蛋白的基因。在一些实施方案中,通过降低HLA-DR蛋白表达来降低HLA-II功能。在优选的实施方案中,敲除编码HLA-DR蛋白的基因。在一些实施方案中,通过降低HLA-DQ蛋白表达来降低HLA-II功能。在优选的实施方案中,敲除编码HLA-DQ蛋白的基因。

[0026] 本发明提供了不包含HLA-II功能的低免疫原性多能细胞。

[0027] 本发明提供了低免疫原性多能细胞,其对巨噬细胞吞噬作用或NK细胞杀伤的敏感性降低。敏感性降低是由增加的CD47蛋白表达引起的。在一些实施方案中,增加的CD47表达是由对内源CD47基因座的修饰引起的。在其他实施方案中,增加的CD47表达是由CD47转基因引起的。在优选的实施方案中,CD47蛋白与SEQ ID N0:3具有至少90%的序列同一性。在更优选的实施方案中,CD47蛋白具有SEQ ID N0:3的序列。

[0028] 本发明提供了包含自杀基因的低免疫原性多能细胞,所述自杀基因由引发低免疫原性多能细胞或分化的子代细胞死亡的触发因子激活。在优选的实施方案中,自杀基因是单纯疱疹病毒胸昔激酶基因(HSV-tk),并且触发因子是更昔洛韦。在更优选的实施方案中,HSV-tk基因编码与SEQ ID N0:4具有至少90%序列同一性的蛋白质。在更优选的实施方案中,HSV-tk基因编码具有SEQ ID N0:4的序列的蛋白质。

[0029] 在另一个优选的实施方案中,自杀基因是大肠杆菌胞嘧啶脱氨酶基因(EC-CD),并

且触发因子是5-氟胞嘧啶(5-FC)。在更优选的实施方案中,EC-CD基因编码与SEQ ID NO:5具有至少90%序列同一性的蛋白质。在更优选的实施方案中,EC-CD基因编码具有SEQ ID NO:5的序列的蛋白质。

[0030] 在另一个优选的实施方案中,自杀基因编码诱导型胱天蛋白酶蛋白,并且触发因子是二聚化的化学诱导剂(CID)。在更优选的实施方案中,基因编码诱导型胱天蛋白酶蛋白,其与SEQ ID NO:6具有至少90%的序列同一性。在更优选的实施方案中,该基因编码包含SEQ ID NO:6的序列的诱导型胱天蛋白酶蛋白。在更优选的实施方案中,CID是AP1903。

[0031] 本发明提供了一种产生低免疫原性多能细胞的方法,其包括在多能细胞中降低内源主要组织相容性I类抗原(HLA-I)功能;在多能细胞中降低内源主要组织相容性II类抗原(HLA-II)功能;并且增加降低多能细胞对巨噬细胞吞噬作用或NK细胞杀伤的敏感性的蛋白质的表达。

[0032] 在该方法的一个实施方案中,通过降低β-2微球蛋白的表达来降低HLA-I功能。在优选的实施方案中,通过敲除编码β-2微球蛋白的基因来降低β-2微球蛋白的表达。在更优选的实施方案中,β-2微球蛋白与SEQ ID NO:1具有至少90%的序列同一性。在更优选的实施方案中,β-2微球蛋白具有SEQ ID NO:1的序列。

[0033] 在该方法的另一个实施方案中,通过降低HLA-A蛋白表达的表达来降低HLA-I功能。在优选的实施方案中,通过敲除编码HLA-A蛋白的基因来降低HLA-A蛋白表达。在该方法的另一个实施方案中,通过降低HLA-B蛋白表达的表达来降低HLA-I功能。在优选的实施方案中,通过敲除编码HLA-B蛋白的基因来降低HLA-B蛋白表达。在该方法的另一个实施方案中,通过降低HLA-C蛋白表达的表达来降低HLA-I功能。在优选的实施方案中,通过敲除编码HLA-C蛋白的基因来降低HLA-C蛋白表达。

[0034] 在该方法的另一个实施方案中,低免疫原性多能细胞不包含HLA-I功能。

[0035] 在该方法的另一个实施方案中,通过降低CIITA蛋白的表达来降低HLA-II功能。在优选的实施方案中,通过敲除编码CIITA蛋白的基因来降低CIITA蛋白表达。在更优选的实施方案中,CIITA蛋白质与SEQ ID NO:2具有至少90%的序列同一性。在更优选的实施方案中,CIITA蛋白质具有SEQ ID NO:2的序列。

[0036] 在该方法的另一个实施方案中,通过降低HLA-DP蛋白的表达来降低HLA-II功能。在优选的实施方案中,通过敲除编码HLA-DP蛋白的基因来降低HLA-DP蛋白表达。在该方法的另一个实施方案中,通过降低HLA-DR蛋白的表达来降低HLA-II功能。在优选的实施方案中,通过敲除编码HLA-DR蛋白的基因来降低HLA-DR蛋白表达。在该方法的一些实施方案中,通过降低HLA-DQ蛋白的表达来降低HLA-II功能。在优选的实施方案中,通过敲除编码HLA-DQ蛋白的基因来降低HLA-DQ蛋白表达。

[0037] 在该方法的另一个实施方案中,低免疫原性多能细胞不包含HLA-II功能。

[0038] 在该方法的另一个实施方案中,降低多能细胞对巨噬细胞吞噬作用的敏感性的蛋白质的表达的增加是由对内源基因座位的修饰引起的。在优选的实施方案中,内源基因座编码CD47蛋白。在另一个实施方案中,增加的蛋白质表达由转基因的表达引起。在优选的实施方案中,转基因编码CD47蛋白。在更优选的实施方案中,CD47蛋白与SEQ ID NO:3具有至少90%的序列同一性。在更优选的实施方案中,CD47蛋白质具有SEQ ID NO:3的序列。

[0039] 该方法的另一个实施方案还包括表达自杀基因,所述自杀基因由引发低免疫原性

多能细胞或分化的子代细胞死亡的触发因子激活。在优选的实施方案中，自杀基因是单纯疱疹病毒胸昔激酶基因 (HSV-tk) , 并且触发因子是更昔洛韦。在更优选的实施方案中,HSV-tk基因编码与SEQ ID NO:4具有至少90%序列同一性的蛋白质。在更优选的实施方案中,HSV-tk基因编码具有SEQ ID NO:4序列的蛋白质。

[0040] 在该方法的另一个实施方案中,自杀基因是大肠杆菌胞嘧啶脱氨酶基因 (EC-CD) , 并且触发因子是5-氟胞嘧啶 (5-FC) 。在优选的实施方案中,EC-CD基因编码与SEQ ID NO:5具有至少90%序列同一性的蛋白质。在更优选的实施方案中,EC-CD基因编码具有SEQ ID NO:5序列的蛋白质。

[0041] 在该方法的另一个实施方案中,自杀基因编码诱导型胱天蛋白酶蛋白,并且触发因子是二聚化的特异性化学诱导剂 (CID) 。在该方法的一个优选实施方案中,该基因编码诱导型胱天蛋白酶蛋白,其与SEQ ID NO:6具有至少90%的序列同一性。在更优选的实施方案中,该基因编码包含SEQ ID NO:6的序列的诱导型胱天蛋白酶蛋白。在更优选的实施方案中,CID是AP1903。

[0042] V.附图简要说明

[0043] 图1A显示了本文所述的新型低免疫多能细胞的基本原理。通过胎儿母体耐受在怀孕期间保护胎儿免于“排斥”。这些细胞下调MHC I类表达。它们还下调MHC II类表达。它们还上调CD47。图1B显示胎儿母体耐受由合体滋养层细胞介导。图1C显示合体滋养层细胞不显示MHC I和II以及高的CD47水平。

[0044] 图2显示了由C57BL/6成纤维细胞产生的鼠诱导性多能干细胞 (miPSC) 。通过逆转录酶聚合酶链反应 (rtPCR) 证明了多能性。在miPSC细胞提取物中检测到与多能性相关的多个mRNA,但在未诱导的细胞 (亲本鼠成纤维细胞) 中未检测到。

[0045] 图3证实了miPSC细胞的多能性。C57BL/6miPSC细胞在同基因小鼠以及BALB/c裸鼠和scid米色鼠中形成畸胎瘤。在免疫活性的同种异体BALB/c小鼠中没有形成畸胎瘤。

[0046] 图4显示了当在miPSC细胞中敲除β-2微球蛋白表达时,IFN-γ 刺激不能诱导MHC-I表达 (右图) 。作为对照,用IFN-γ 刺激亲本miPSC细胞 (左图) 并增加其MHC-I表达。

[0047] 图5显示了进一步包含Ciita表达敲除的miPSC/β-2-微球蛋白敲除 (双敲除) 未显示任何基线MHC-II表达并且不能被TNF-α诱导表达MHC-II。

[0048] 图6A显示了来自添加至β-2-微球蛋白/Ciita双敲除 (iPSC^低细胞) 的转基因的增加的Cd47表达。图6B显示C57BL/6iPSC^低细胞在同种异体BALB/c环境中存活,但亲本iPSC细胞不存活。

[0049] 图7显示了本发明的一个实施方案。它显示了iPSC改造的示意图,其产生了本发明的低免疫多能细胞。为了产生低免疫干细胞,第一,使用CRISPR-Cas 9改造来敲除B2m的两个等位基因。第二,使用CRISPR-Cas 9改造来敲除Ciita基因的两个等位基因。第三,使用慢病毒敲入Cd47基因。

[0050] 图8A示意性地描绘了B2m在MHC I复合物中的作用。B2m敲除耗尽小鼠中的MHC I或人中的HLA-I。图8B示意性地显示了Ciita是在小鼠中引起MHC II表达或在人中引起HLA-II表达的转录因子。Ciita敲除耗尽MHC II或HLA-II表达。

[0051] 图9A、9B和9C显示B2m-/-iPSC缺乏MHC-I表达,B2m-/-Ciita-/-iPSC缺乏MHC-I和MHC-II和B2m-/-Ciita-/-Cd47 tg iPSC缺乏MHC-I和MHC-II并过表达Cd47。

[0052] 图10A、10B、10C、10D和10E显示了移植的“野生型iPSC”与低免疫PSC进入同种异体或同基因宿主小鼠的小鼠模型。这里, iPSC从C57BL/6小鼠形成, 同种异体小鼠为BALB/c。图10A, “野生型iPSC”仅在同基因C57BL/6小鼠大腿中形成畸胎瘤。相反, 免疫应答发生在同种异体宿主小鼠(BALB/c)中, 并且没有畸胎瘤生长。图10B, “野生型iPSC”在同基因C57BL/6小鼠中形成畸胎瘤。图10C, 免疫应答阻止同种异体BALB/c中畸胎瘤的形成。图10D使用斑点频测定(释放IFN- γ 和IL-4的细胞的频率)比较同基因和同种异体宿主中对iPSC的T细胞应答(IFN- γ 和IL-4)。在C57BL/6宿主中IFN- γ 和IL-4释放非常低, 但在BALB/c宿主中显著增加。图10E描绘了同基因和同种异体宿主中的B细胞应答。将iPSC与先前已接受iPSC的宿主动物的血清一起孵育。使用流式细胞术测量结合的免疫球蛋白。来自同种异体BALB/c受体宿主的血清的平均荧光强度(MFI)显著更高。

[0053] 图11A、11B、11C、11D和11E显示了敲除上述iPSC中的B2m基因的部分效果。图11A, B2m-/-iPSC在同基因C57BL/6小鼠大腿中生长, 由于缺乏免疫应答而形成畸胎瘤, 而同种异体宿主小鼠(BALB/c)中存在部分免疫应答; 例如一些移植的细胞存活下来。图11B, B2m-/-iPSC在同基因小鼠中形成畸胎瘤。图11C, 在同种异体宿主中实现了部分存活(60%)。图11D, 两种宿主之间T细胞应答(IFN- γ 和IL-4)的差异显示T细胞对B2m-/-iPSC的温和但可检测的应答。图11E显示了不同宿主小鼠中的B细胞应答, 显示与野生型iPSC相比较弱的免疫应答。与同基因移植入C57BL/6相比, 将B2m-/-iPSC同种异体移植到BALB/c后, 仍然有显著更强的免疫球蛋白应答。因此, 在同种异体受体中存在有限的B2m-/-iPSC存活率。

[0054] 图12A、12B、12C、12D和12E显示了敲除iPSC中的B2m基因和Ciita基因对同基因和同种异体宿主小鼠中细胞存活的增加的部分效应。图12A, B2m-/-Ciita-/-iPSC由于缺乏免疫应答而在同基因C57BL/6小鼠体内形成畸胎瘤, 而部分(但与B2m-/-iPSC相比减少)免疫应答发生在同种异体宿主小鼠(BALB/c)中。图12B, B2m-/-Ciita-/-iPSC在同基因小鼠中形成畸胎瘤。图12C显示了一些细胞移植物(91.7%)在同种异体宿主中存活。图12D, 两种宿主之间的T细胞应答(IFN- γ 和IL-4)差异显示在同种异体相对于同基因受体中的轻度更高的IFN- γ 应答。图12E描绘了不同宿主小鼠中的B细胞应答。将较弱的免疫应答与wt iPSC和B2m-/-iPSC进行比较。未观察到同种异体和同基因受体之间的显著差异。总体而言, B2m-/-Ciita-/-iPSC在同种异体受体中的存活率有限, 这可归因于可测量的免疫应答。

[0055] 图13A、13B、13C、13D和13E显示了在iPSC中敲除B2m基因和Ciita基因并敲入Cd47转基因对同基因和同种异体宿主小鼠中细胞存活的完全效应。图13A, B2m-/-Ciita-/-Cd47tg iPSC畸胎瘤在同基因C57BL/6和同种异体宿主大腿中均生长。所有移植的细胞移植物都存活下来。图13B, B2m-/-Ciita-/-Cd47tg iPSC在C57BL/6中形成畸胎瘤。图13C, 100%的细胞移植物在同种异体宿主中存活。图13D显示同种异体受体中缺乏T细胞应答(IFN- γ 和IL-4)。没有观察到两种宿主之间的差异。图13E描绘了同种异体受体中B细胞应答的缺乏。没有观察到两种宿主之间的差异。因此, 在同种异体受体中存在完全存活的B2m-/-Ciita-/-Cd47tg iPSC。它们没有免疫原性, 因为它们没有引发T细胞或B细胞应答。

[0056] 图14A、14B和14C显示B2m-/-Ciita-/-Cd47tg iPSC(称为非免疫原性多能细胞(HIP)细胞)逃避宿主免疫系统。图14A, 刺激性NK细胞配体表达在HIP细胞中没有增加。识别NK细胞跨膜蛋白NKG2D的各种配体的融合蛋白用于评估活化配体(其可激活细胞溶解性NK细胞活性)的水平。因此, 融合蛋白与iPSC的结合是其活化NKG2D配体的表达的总体参数。图

14B, HIP细胞未使NK细胞增加其CD107a表达(其是功能性NK细胞活性的标志物)。相比之下, B2m^{-/-}Ciita^{-/-}iPSC诱导NK细胞上的CD107a表达,从而触发其细胞溶解功能。图14C,使用来自C57BL/6小鼠脾的纯化的同基因NK细胞的IFN- γ Elispot测定显示没有由HIP细胞引发的NK细胞应答。因此, NK细胞未被激活以释放IFN- γ 。HIP细胞的斑点频率与未刺激的NK细胞(阴性对照)的斑点频率没有差异。只有B2m^{-/-}Ciita^{-/-}iPSC导致IFN- γ 斑点频率显著增加。

[0057] 图15A和15B显示了另外的数据,其显示了HIP细胞由于Cd47转基因而逃避先天免疫系统的排斥或杀伤。体内NK细胞测定具有50% iPSC和50% HIP的混合物,其被注射到同基因C57BL/6(同基因)小鼠的富含NK的腹膜中。这里,细胞毒性是由NK细胞引起的。24和48小时后,回收并分选腹膜细胞。图15A比较了iPSC与B2m^{-/-}Ciita^{-/-}iPSC(无Cd47转基因)。B2m^{-/-}Ciita^{-/-}iPSC被NK细胞选择性杀死。图15B比较了iPSC与B2m^{-/-}Ciita^{-/-}Cd47 tg iPSC(HIP细胞)。HIP细胞未被NK细胞选择性杀死。腹膜iPSC中50%的HIP细胞比例得到维持,表明没有NK细胞刺激。因此,尽管MHC-I和MHC-II敲除使得细胞对NK细胞杀伤高度敏感,但Cd47过表达去除了刺激性NK细胞相互作用。

[0058] 图16显示了本发明的鼠HIP细胞显示正常的鼠核型。

[0059] 图17A、17B和17C显示了本发明的鼠HIP细胞在改造过程中保持多能性。显示了通常接受的标志物的Rt-PCR分析以指示多能性(Nanog、Oct4、Sox2、Esrrb、Tbx3、Tcl11和作为上样对照的肌动蛋白)。多能标志物在整个三步改造过程中表达。图17A比较了iPSC、B2m^{-/-}iPSC和鼠成纤维细胞(阴性对照)。B2m^{-/-}iPSC细胞保留了多能性基因。图17B显示了相同的分析,但使用B2m^{-/-}Ciita^{-/-}iPSC。它们保留了相同的多能性基因。图17C显示了相同的分析但使用B2m^{-/-}Ciita^{-/-}Cd47 tg iPSC(HIP细胞)。这些细胞保留了相同的多能性基因。此外,在将HIP细胞移植到SCID米色鼠后形成的畸胎瘤的组织学图像显示,鉴定了与外胚层、中胚层和内胚层相关的细胞类型。检测所有三个胚层的免疫荧光标志物(数据未显示)。细胞形态对于神经外胚层、中胚层和内胚层是正确的。DAPI、GFAP、细胞角蛋白8和brachyury的免疫荧光染色证实了HIP细胞的多能性。

[0060] 图18A、18B和18C显示了分化成中胚层谱系细胞并丧失其多能性标志物的HIP细胞。图18A显示HIP细胞中的多能标志物(标记为“mHIP”)在分化的鼠内皮细胞(标记为“miEC”)中丢失。图18B显示了多能标志物保留在HIP细胞中但不保留在分化的鼠平滑肌细胞(标记为“miSMC”)中。图18C显示多能标志物保留在HIP细胞中但不保留在分化的鼠心肌细胞(标记为“miCM”)中。通过免疫组织化学证实这些结果(数据未显示)。使用抗-CD31和抗-VE-钙粘蛋白检测内皮细胞,使用抗-SMA和抗-SM22抗体检测平滑肌细胞,并使用抗肌钙蛋白I和抗肌节 α 肌动蛋白抗体检测心肌细胞。

[0061] 图19A和19B显示了HIP细胞分化成内胚层谱系胰岛细胞(iIC),其产生C肽和胰岛素。图19A,在HIP细胞中未检测到分化标志物,但是在诱导的胰岛细胞中检测到了。图19B,诱导的胰岛细胞产生胰岛素。C肽的免疫组织化学染色证实了这些结果(数据未显示)。

[0062] 图20A和20B显示了分化成外胚层谱系的HIP细胞。图20A显示了体外HIP细胞,图20B显示了分化的神经元细胞。用神经外胚层干细胞标志物巢蛋白和Tuj-1进行的免疫组织化学染色证实了这些结果(数据未显示)。

[0063] 图21A、21B和21C显示了从HIP细胞分化的细胞保留了耗尽的MHC I和II表型和

Cd47过表达。图21A比较了小鼠诱导的内皮细胞(“miEC”)和B2m^{-/-}Ciita^{-/-}Cd47^{tg} miEC细胞之间的MHC-I、MHC-II和Cd47表达。图21B比较了小鼠诱导的平滑肌细胞(“miSMC”)和B2m^{-/-}Ciita^{-/-}Cd47^{tg} miSMC细胞之间的MHC-I、MHC-II和Cd47表达。图21C比较了小鼠诱导的心肌细胞(“miCM”)和B2m^{-/-}Ciita^{-/-}Cd47^{tg} miCM细胞之间的MHC-I、MHC-II和Cd47表达。

[0064] 图22A、22B和22C显示了从HIP细胞分化的内皮细胞是非免疫原性的。图22A, C56BL/6miEC同基因和同种异体小鼠的移植。同种异体BALB/c受体小鼠中但不是在同基因小鼠中的miEC产生明显的免疫应答。这通过BALB/c受体中的强IFN- γ Elispot和免疫球蛋白应答(FACS分析)得到证明(图22B)。图22C,HIP和miEC细胞均未在同基因或同种异体受体中产生免疫应答。

[0065] 图23A、23B和23C显示了从HIP细胞分化的小鼠诱导的平滑肌细胞是非免疫原性的。图23A,C56BL/6miSMC同基因和同种异体小鼠的移植。同种异体BALB/c受体小鼠中但不是在同基因小鼠中的miSMC产生明显的免疫应答。这通过BALB/c受体中的强IFN- γ Elispot和免疫球蛋白应答(FACS分析)得到证明。图23C,HIP和miSMC细胞均未在同基因或同种异体受体中产生免疫应答。

[0066] 图24A、B和C显示了从HIP细胞分化的小鼠诱导的心肌细胞是非免疫原性的。图25A,C56BL/6miCM同基因和同种异体小鼠的移植。图中同种异体BALB/c受体小鼠中但不是在同基因小鼠中的miCMC产生明显的免疫应答。这通过BALB/c受体中的强IFN- γ Elispot和免疫球蛋白应答(FACS分析)得到证明(图24B)。图24C,HIP和miCMC细胞均未在同基因或同种异体受体中产生免疫应答。

[0067] 图25显示了衍生自HIP细胞的分化细胞(miECS、miSMC、miCM)逃避经由先天免疫系统的排斥。NK融合蛋白测定显示,与衍生自miPSC的分化细胞相比,三种分化细胞中没有一种具有增加的刺激性NK细胞配体的表达。

[0068] 图26A和26B显示了衍生自本发明的HIP细胞的miEC逃避免疫应答并在同种异体宿主中实现长期存活。图26A,衍生自miPSC的miEC移植物显示在同基因受体(C57BL/6)中的长期存活,但在同种异体受体(BALB/c)中被排斥。图26B,衍生自HIP的miEC在同基因和同种异体受体中移植后实现长期存活。

[0069] 图27:衍生自HIP细胞的miECS组织以在同种异体宿主中形成血管结构。在基质胶基质内移植超过六周后,miEC以三维方式组织以形成血管结构。通过荧光素酶和VE-钙粘蛋白的免疫荧光染色证实了这些结果;在移植前转导miEC以表达荧光素酶。通过生物发光成像监测存活,并用针对荧光素酶的免疫荧光染色鉴定移植的细胞(数据未显示)。

[0070] 图28显示了人HIP细胞显示正常的人核型。

[0071] 图29显示了人HIP细胞在改造过程中保持多能性。使用PCR测定,hiPSC(例如,在本发明改变之前的起始细胞)和本发明的HIP细胞都具有多能性基因的表达(NANOG、OCT4、SOX2、DPPA4、hTERT、ZFP42和DEMT3B;用作上样对照的G3PDH)。免疫荧光染色证实了这一发现,因为细胞表达TRA-1-60、TRA-1-81、Sox2、Oct4、SSEA-4标志物和碱性磷酸酶(数据未显示)。

[0072] 图30A和30B显示了移植的人HIP细胞进入人源化同种异体小鼠不会引起免疫应答。图30A显示了在Elispot测定中,通过IFN- γ 或IL-5产生测量,T细胞对移植的HIP细胞没

有应答。相比之下,移植的iPSC有应答。图30B显示了只有iPSC在流式细胞术中引起强烈的抗体反应。HIP细胞没有引起强烈的抗体反应。

[0073] 图31A、31B、31C和31D显示了人HIP细胞分化成中胚层谱系。图31A显示人HIP细胞的形态。图31B显示了用CD31、VE-钙粘蛋白和DAPI染色的HIP衍生的内皮细胞作为对照。图31C显示了用 α -肌节肌动蛋白、肌钙蛋白I和DAPI染色的HIP衍生的心肌细胞作为对照。图31D显示了由HIP衍生的内皮细胞形成的成熟前血管。观察到HIP衍生的心肌细胞搏动(数据未显示)。

[0074] 图32A和32B显示了移植的衍生自人HIP细胞的人内皮细胞在同种异体人源化小鼠中不引起免疫应答。图32A,hiEC在IFN- γ 和IL-5Elispot测定中产生显著的T细胞应答,而衍生自人HIP细胞的hiEC没有这样。图32B显示了流式细胞术中的B细胞反应。通过平均荧光强度(MFI)测量,仅hiEC产生显著的免疫球蛋白应答。

[0075] 图33A和33B显示了衍生自人HIP细胞的人心肌细胞的移植在同种异体人源化小鼠中不导致免疫应答。图33A显示了IFN- γ 和IL-5Elispot中“野生型”hiCM与B2M-/-CIITA-/-CD47tg HIP细胞的T细胞应答的差异。图33B显示了流式细胞术中的B细胞应答。通过平均荧光强度(MFI)测量,仅“野生型hiCM”产生显著的hiEC免疫球蛋白负载。

[0076] 图34A、34B、34C和34D显示了本发明的人HIP细胞逃避先天免疫系统的排斥。使用磁激活细胞分选(MACS)从BALB/c小鼠分离NK细胞。将 5×10^6 个刺激细胞(C57BL/6iPSC衍生物,iEC、iSMC或iCM,和B2M-/-CIITA-/-或B2M-/-CIITA-/-CD47 tg)与 5×10^6 个MACS分选的NK细胞一起在IFN- γ Elispot板中孵育。24小时后,用Elispot读数器测定斑点频率。所有三种B2M-/-CIITA-/-衍生物均诱导出强烈的NK应答。然而,所有三种B2M-/-CIITA-/-CD47 tg衍生物均未诱导任何NK细胞应答,并且它们的斑点频率与阴性对照(未与刺激细胞一起孵育的分离的NK细胞)在统计学上不同。图34A显示了内皮细胞。图34B显示了平滑肌细胞。图34C显示了心肌细胞。图34D显示了YAC-1小鼠淋巴瘤阳性对照。

[0077] 图35A、35B和35C显示了先天免疫应答(或其缺乏)。制备50%wt衍生物(5×10^6 个细胞)和50%C57BL/6B2m-/-Ciita-/-或B2m-/-Ciita-/-Cd47 tg衍生物(5×10^6 个细胞)的混合物。用10 μ M CFSE染色将细胞染色10分钟,并重悬于500 μ l盐水中。然后将细胞混合物注射到C57BL/6(同基因)小鼠的富含NK的腹膜中。在该同基因模型中,所有细胞毒性均由NK细胞引起。48小时后,回收并分选腹膜细胞并计算它们的比例。在FACS中通过MHCI染色鉴定野生型(wt)和改造的细胞。图35A显示了内皮细胞。图35B显示了平滑肌细胞。图35C显示了心肌细胞。

[0078] 图36A、36B和36C显示了通过FACS验证的人iPSC的遗传改造。在B2M-/-CIITA-/-hiPSC中证实缺乏HLA I和HLA II。另外,B2M-/-CIITA-/-CD47 tg显示出高CD47表达。图36A显示了HLA I结果。图36B显示了HLA II结果。图36C显示了CD47结果。

[0079] 图37A和B显示了在B2M-/-CIITA-/-CD47 tg iPSC分化后维持免疫表型。与未修饰的野生型衍生物相比,FACS分析显示了B2M-/-CIITA-/-CD47 tg衍生物缺乏HLA I和HLA II以及CD47的过表达。图37A显示了内皮细胞,图37B显示了心肌细胞。

[0080] VI.发明详述

[0081] A.简介

[0082] 本发明提供了低免疫原性多能(HypoImmunogenic Pluripotent,“HIP”)细胞,其

由于本文概述的几种遗传操作而避免宿主免疫应答。细胞缺乏引发免疫应答的主要免疫抗原，并且经过改造以避免吞噬作用。这允许衍生用于产生特定的组织和器官的“现成的”细胞产品。能够在人患者中使用人同种异体HIP细胞衍生物的益处产生显著益处，包括避免通常在异基因移植中看到的长期辅助免疫抑制治疗和药物使用的能力。它还可以显著节省成本，因为可以使用细胞疗法而无需为每位患者进行单独治疗。最近，显示由自体细胞来源产生的细胞产品可能变得具有很少或甚至一个单一的抗原突变而经历免疫排斥。因此，自体细胞产品本身不具有非免疫原性。此外，细胞改造和质量控制是非常费力和耗成本的，并且自体细胞不适用于急性治疗选择。只有同种异体细胞产品能用于更大的患者群体，只要可以克服免疫障碍。HIP细胞将作为产生普遍接受的衍生物的通用细胞来源。

[0083] 本发明涉及利用孕妇中存在的胎儿母体耐受性。尽管胎儿的一部分人白细胞抗原(HLA)是父系遗传的并且胎儿表达主要HLA不匹配抗原，但母体免疫系统不会将胎儿识别为同种异体实体并且不会引发免疫应答，例如如在“宿主对移植植物”类型的免疫应答中所见的。胎儿母体耐受性主要由胎儿-母体界面中的合体滋养层细胞介导。如图7所示，合体滋养层细胞显示很少或没有主要组织相容性复合物I和II(MHC-I和MHC-II)的蛋白质以及增加的CD47(已知为抑制HLA缺乏细胞的消除和吞噬性先天免疫监视的“不要吃我”蛋白质)表达。令人惊讶的是，在妊娠期间防止胎儿排斥的相同致耐受机制也允许本发明的HIP细胞逃避排斥并促进同种异体移植后这些细胞的长期存活和植入。

[0084] 另外，这些结果令人惊讶的是可以用少至三个遗传修饰(与起始iPSC例如hiPSC相比)、两个活性降低(如本文进一步描述的“敲除”)和一个活性增加(如本文所述的“敲入”)引入该胎儿母体耐受性。通常，本领域其他技术人员已尝试抑制iPSC的免疫原性，但仅部分成功；参见Rong等人，Cell Stem Cell 14:121-130 (2014) 和Gornalusse等人，Nature Biotech doi:10.1038/nbt.3860。

[0085] 因此，本发明提供了从多能干细胞产生HIP细胞，然后维持、分化并最终将其衍生物移植到需要其的患者中。

[0086] B. 定义

[0087] 术语“多能细胞”是指能够在保持未分化状态的同时自我更新和增殖并且可以在适当条件下被诱导分化成特化细胞类型的细胞。如本文所用，术语“多能细胞”包括胚胎干细胞和其他类型的干细胞，包括胎儿、羊膜或体干细胞。示例性人干细胞系包括H9人胚胎干细胞系。另外的示例性干细胞系包括可通过National Institutes of Health Human Embryonic Stem Cell Registry和Howard Hughes Medical Institute HUES集合获得的那些(如Cowan, C.A.等人，New England J. Med. 350:13. (2004) 所述，其通过引用以其全文并入本文。)

[0088] 如本文所用的“多能干细胞”具有分化成如下三个胚层中任何一个的潜力：内胚层(例如胃连接、胃肠道、肺等)、中胚层(例如肌肉、骨骼、血液、泌尿生殖组织等)或外胚层(例如表皮组织和神经系统组织)。如本文所用的术语“多能干细胞”还包括“诱导性多能干细胞”或“iPSC”，一种衍生自非多能细胞的多能干细胞。亲本细胞的实例包括已通过各种方式重编程以诱导性多能性、未分化表型的体细胞。这种“iPS”或“iPSC”细胞可以通过诱导某些调节基因的表达或通过某些蛋白质的外源应用来产生。诱导iPS细胞的方法是本领域已知的，并在下面进一步描述。(参见，例如，Zhou等人，Stem Cells 27 (11) :2667-74 (2009)；

Huangfu等人,Nature Biotechnol.26 (7) :795 (2008) ;Woltjen等人,Nature 458 (7239) :766-770 (2009) ;和Zhou等人,Cell Stem Cell 8:381-384 (2009) ;其各自通过引用以其全文并入本文) 诱导性多能干细胞(iPSC)的产生概述如下。如本文所用,“hiPSC”是人诱导性多能干细胞,“miPSC”是鼠诱导性多能干细胞。

[0089] “多能干细胞特征”是指将多能干细胞与其他细胞区分开的细胞特征。产生能够在适当条件下分化成共同显示与来自所有三个生发层(内胚层、中胚层和外胚层)的细胞谱系相关的特征的细胞类型的后代的能力是多能干细胞特征。分子标志物的某些组合的表达或非表达也是多能干细胞特征。例如,人多能干细胞表达来自以下非限制性列表的至少几种和在一些实施方案中所有标志物:SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81、TRA-2-49/6E、ALP、Sox2、E-钙粘蛋白、UTF-1、Oct4、Rex1和Nanog。与多能干细胞相关的细胞形态也是多能干细胞特征。如本文所述,细胞不需要通过多能性以被重编程为内胚层祖细胞和/或肝细胞。

[0090] 如本文所用,“多能(multipotent)”或“多能细胞(multipotent cell)”是指可以产生有限数量的其他特定细胞类型的细胞类型。例如,诱导性多能细胞能够形成内胚层细胞。此外,多能血液干细胞可以将自身分化为几种类型的血细胞,包括淋巴细胞、单核细胞、中性粒细胞等。

[0091] 如本文所用,术语“寡能”是指成体干细胞分化成仅少数不同细胞类型的能力。例如,淋巴或骨髓干细胞能够分别形成淋巴或骨髓谱系的细胞。

[0092] 如本文所用,术语“单能”是指细胞形成单细胞类型的能力。例如,精原干细胞只能形成精子细胞。

[0093] 如本文所用,术语“全能”是指细胞形成完整生物体的能力。例如,在哺乳动物中,只有受精卵和第一卵裂期卵裂球是全能的。

[0094] 如本文所用,“非多能细胞”是指不是多能细胞的哺乳动物细胞。此类细胞的实例包括分化细胞以及祖细胞。分化细胞的实例包括但不限于来自选自骨髓、皮肤、骨骼肌、脂肪组织和外周血的组织的细胞。示例性细胞类型包括但不限于成纤维细胞、肝细胞、成肌细胞、神经元、成骨细胞、破骨细胞和T细胞。用于产生诱导性多能细胞、内胚层祖细胞和肝细胞的起始细胞可以是非多能细胞。

[0095] 分化的细胞包括但不限于多能细胞、寡能细胞、单能细胞、祖细胞和终末分化细胞。在特定的实施方案中,相对于更多能的细胞,较低能的细胞被认为是“分化的”。

[0096] “体细胞”是形成生物体的细胞。体细胞包括构成生物体内器官、皮肤、血液、骨骼和结缔组织的细胞,但不包括生殖细胞。

[0097] 细胞可以来自例如人或非人哺乳动物。示例性的非人哺乳动物包括但不限于小鼠、大鼠、猫、狗、兔、豚鼠、仓鼠、羊、猪、马、牛和非人灵长类动物。在一些实施方案中,细胞来自成年人或非人哺乳动物。在一些实施方案中,细胞来自新生儿人、成年人或非人哺乳动物。

[0098] 如本文所用,术语“受试者”或“患者”是指任何动物,例如驯养动物、动物园动物或人。“受试者”或“患者”可以是哺乳动物,如狗、猫、鸟、牲畜或人。“受试者”和“患者”的具体实例包括但不限于具有与肝脏、心脏、肺、肾、胰腺、脑、神经组织、血液、骨骼、骨髓等相关的疾病或病症的个体(特别是人)。

[0099] 哺乳动物细胞可以来自人或非人哺乳动物。示例性的非人哺乳动物包括但不限于

小鼠、大鼠、猫、狗、兔、豚鼠、仓鼠、羊、猪、马、牛和非人灵长类动物(例如,黑猩猩、猕猴和猿类)。

[0100] 本文的“低免疫原性多能细胞”或“HIP细胞”是指多能细胞,其保留其多能特征,并且当转移到同种异体宿主中时产生降低的免疫排斥反应。在优选的实施方案中,HIP细胞不产生免疫应答。因此,“低免疫原性”是指与本文所述的免疫改造之前的亲本(即“wt”)细胞的免疫应答相比,显著降低或消除的免疫应答。在许多情况下,HIP细胞是免疫沉默的并且仍具有多能性。HIP特征的测定在下文中概述。

[0101] “HLA”或“人白细胞抗原”复合物是编码人主要组织相容性复合物(MHC)蛋白质的基因复合物。构成HLA复合物的这些细胞表面蛋白质负责调节对抗原的免疫应答。在人中,存在两种MHC:I类和II类,“HLA-I”和“HLA-II”。HLA-I包括三种蛋白,HLA-A、HLA-B和HLA-C,它们从细胞内部呈递肽,并且HLA-I复合物呈递的抗原吸引杀伤T细胞(也称为CD8+T细胞或细胞毒性T细胞)。HLA-I蛋白与β-2微球蛋白(B2M)相关。HLA-II包括五种蛋白,HLA-DP、HLA-DM、HLA-DOB、HLA-DQ和HLA-DR,其将来自细胞外的抗原呈递给T淋巴细胞。这刺激CD4+细胞(也称为T辅助细胞)。应当理解,“MHC”或“HLA”的使用并不意味着限制,因为它取决于基因是来自人(HLA)还是鼠(MHC)。因此,当涉及哺乳动物细胞时,这些术语在本文中可互换使用。

[0102] 本文的“基因敲除”是指使特定基因在其所在的宿主细胞中无活性的过程,其导致不产生目的蛋白质或无活性形式。如本领域技术人员所理解和下文进一步描述的,这可以通过多种不同方式实现,包括从基因中去除核酸序列,或用其他序列中断序列,改变阅读框,或改变核酸的调节成分。例如,可以去除或用“无义”序列替换目的基因的全部或部分编码区,可以去除或替换全部或部分调节序列(例如启动子),可以去除或替换翻译起始序列等。

[0103] 本文的“基因敲入”是指向宿主细胞添加遗传功能的过程。这导致编码蛋白质水平增加。如本领域技术人员所理解的,这可以通过几种方式实现,包括将一种或多种额外的基因拷贝添加到宿主细胞中或改变内源基因的调节组分,从而增加蛋白质的表达。这可以通过修饰启动子、添加不同的启动子、添加增强子或修饰其他基因表达序列来实现。

[0104] “β-2微球蛋白”或“β2M”或“B2M”蛋白是指具有下文所示的氨基酸和核酸序列的人β2M蛋白;人基因的登录号为NC_000015.10:44711487-44718159。

[0105] “CD47蛋白”蛋白是指人CD47蛋白,其具有下文所示的氨基酸和核酸序列;人基因的登录号为NC_000016.10:10866208-10941562。

[0106] “CIITA蛋白”蛋白质是指具有下文所示的氨基酸和核酸序列的人CIITA蛋白质;人基因的登录号为NC_000003.12:108043094-108094200。

[0107] 在细胞的上下文中,“野生型”是指在自然界中发现的细胞。然而,在多能干细胞的背景下,如本文所用,它还意指可能含有导致多能性的核酸变化但不经历本发明的基因编辑程序以实现低免疫原性的iPSC。

[0108] 本文中的“同基因”是指宿主生物和细胞移植植物的遗传相似性或同一性,其中具有免疫相容性;例如不产生免疫应答。

[0109] 本文的“同种异体”是指宿主生物和细胞移植的遗传差异,其中产生免疫应答。

[0110] 本文中的“B2M-/-”是指二倍体细胞在两条染色体中都具有失活的B2M基因。如本

文所述,这可以以各种方式完成。

[0111] 本文中的“CIITA-/-”是指二倍体细胞在两条染色体中都具有失活的CIITA基因。如本文所述,这可以以各种方式完成。

[0112] 本文中“CD47 tg”(代表“转基因”)或“CD47+”)是指宿主细胞表达CD47,在一些情况下通过具有至少一个另外的CD47基因拷贝。

[0113] “Oct多肽”是指转录因子的八聚体家族的任何天然存在的成员,或其维持与最接近的相关天然存在的家族成员相比相似(在至少50%、80%或90%活性内)的转录因子活性的变体,或至少包含天然存在的家族成员的DNA结合结构域并且可以进一步包含转录激活结构域的多肽。示例性的Oct多肽包括Oct-1、Oct-2、Oct-3/4、Oct-6、Oct-7、Oct-8、Oct-9和Oct-11。Oct3/4(本文称为“Oct4”)含有POU结构域,其是Pit-1、Oct-1、Oct-2和uric-86之间保守的150个氨基酸序列。(参见Ryan, A.K. & Rosenfeld, M.G., *Genes Dev.* 11:1207-1225 (1997), 其通过引用以其全文并入本文)在一些实施方案中,与天然存在的Oct多肽家族成员(例如上面列出的那些或如Genbank登录号NP-002692.2(人Oct4)或NP-038661.1(小鼠Oct4)中所列的那些)相比,变体在其整个序列上具有至少85%、90%或95%的氨基酸序列同一性。Oct多肽(例如,Oct3/4或Oct4)可以来自人、小鼠、大鼠、牛、猪或其他动物。通常,相同物种的蛋白质将与被操作的细胞物种一起使用。Oct多肽可以是多能性因子,其可以帮助在非多能细胞中诱导多能性。

[0114] “Klf多肽”是指Krüppel样因子(Klf)家族(含有与果蝇胚胎模式调节因子Krüppel相似的氨基酸序列的锌指蛋白)中任何天然存在的成员,或者其维持与最接近的相关天然存在的家族成员相比相似(在至少50%、80%或90%活性内)的转录因子活性的天然存在成员的变体,或至少包含天然存在的家族成员的DNA结合结构域并且可以进一步包含转录激活域的多肽。(参见Dang, D.T., Pevsner, J. & Yang, V.W., *Cell Biol.* 32:1103-1121 (2000), 其通过引用以其全文并入本文)。示例性Klf家族成员包括Klf1、Klf2、Klf3、Klf-4、Klf5、Klf6、Klf7、Klf8、Klf9、Klf10、Klf11、Klf12、Klf13、Klf14、Klf15、Klf16和Klf17。发现Klf2和Klf-4是能够在小鼠中产生iPS细胞的因子,并且相关基因Klf1和Klf5也起作用,但是效率降低。(参见Nakagawa, 等人, *Nature Biotechnology* 26:101-106 (2007), 其通过引用以其全文并入本文)。在一些实施方案中,与天然存在的Klf多肽家族成员(例如上文列出的那些或例如Genbank登录号CAX16088(小鼠Klf4)或CAX14962(人Klf4)中列出的那些)相比,变体在其整个序列上具有至少85%、90%或95%的氨基酸序列同一性。Klf多肽(例如,Klf1、Klf4和Klf5)可以来自人、小鼠、大鼠、牛、猪或其他动物。通常,相同物种的蛋白质将与被操作的细胞物种一起使用。Klf多肽可以是多能性因子。Klf4基因或多肽的表达可以帮助在起始细胞或起始细胞群中诱导性多能性。

[0115] “Myc多肽”是指Myc家族的任何天然存在的成员。(参见,例如,Adhikary, S. & Eilers, M., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6:635-645 (2005), 其通过引用以其全文并入本文)。它还包括维持与最接近的相关天然存在的家族成员相比相似(在至少50%、80%或90%活性内)的转录因子活性的变体。它还包括至少包含天然存在的家族成员的DNA结合结构域并且还可以包含转录激活结构域的多肽。示例性的Myc多肽包括例如c-Myc、N-Myc和L-Myc。在一些实施方案中,与天然存在的Myc多肽家族成员(例如上文列出的或如Genbank登录号CAA25015(人Myc)中列出的那些)相比,变体在其整个序列上具有至少85%、90%或95%的

氨基酸序列同一性。Myc多肽(例如,c-Myc)可以来自人、小鼠、大鼠、牛、猪或其他动物。通常,相同物种的蛋白质将与被操作的细胞物种一起使用。Myc多肽可以是多能性因子。

[0116] “Sox多肽”是指SRY相关HMG-盒(Sox)转录因子的任何天然存在的成员(其特征在于存在高迁移率基团(HMG)结构域)或其维持与最接近的相关天然存在的家族成员相比相似(在至少50%、80%或90%活性内)的转录因子活性的变体。它还包括至少包含天然存在的家族成员的DNA结合结构域并且还可以包含转录激活结构域的多肽。(参见,例如,Dang, D.T.等人,Int.J.Biochem.Cell Biol.32:1103-1121(2000),其通过引用以其全文并入本文)。示例性Sox多肽包括例如Sox1、Sox-2、Sox3、Sox4、Sox5、Sox6、Sox7、Sox8、Sox9、Sox10、Sox11、Sox12、Sox13、Sox14、Sox15、Sox17、Sox18、Sox-21和Sox30。已证明Sox1以与Sox2相似的效率产生iPS细胞,并且基因Sox3、Sox15和Sox18也已显示产生iPS细胞,尽管效率略低于Sox2。(参见Nakagawa,等人,Nature Biotechnology 26:101-106(2007),其通过引用以其全文并入本文)。在一些实施方案中,与天然存在的Sox多肽家族成员(例如上文列出的那些或如Genbank登录号CAA83435(人Sox2)中列出的那些)相比,变体在其整个序列上具有至少85%、90%或95%的氨基酸序列同一性。Sox多肽(例如,Sox1、Sox2、Sox3、Sox15或Sox18)可以来自人、小鼠、大鼠、牛、猪或其他动物。通常,相同物种的蛋白质将与被操作的细胞物种一起使用。Sox多肽可以是多能性因子。如本文所讨论的,SOX2蛋白特别适用于iPSC的产生。

[0117] 本文中“分化的低免疫原性多能细胞”或“分化的HIP细胞”或“dHIP细胞”是指已被改造以具有低免疫原性(例如通过敲除B2M和CIITA以及敲入CD47)然后被分化成细胞类型以最终移植到受试者中的iPS细胞。因此,例如HIP细胞可以分化成肝细胞(“dHIP肝细胞”),分化成 β 样胰腺细胞或胰岛类器官(“dHIP β 细胞”),分化成内皮细胞(“dHIP内皮细胞”)等。

[0118] 在两个或更多个核酸或多肽序列的上下文中,术语百分比“同一性”是指当针对最大对应性进行比较和比对时,具有相同的核苷酸或氨基酸残基的特定百分比的两个或更多个序列或子序列,如使用下面描述的序列比较算法之一(例如,BLASTP和BLASTN或本领域技术人员可用的其他算法)或通过视觉检查来测量的。取决于应用,“同一性”百分比可以存在于被比较的序列的区域上,例如,在功能结构域上,或者,存在于待比较的两个序列的全长上。对于序列比较,通常一个序列充当与测试序列进行比较的参考序列。当使用序列比较算法时,将测试和参考序列输入计算机,如果需要,指定子序列坐标,并指定序列算法程序参数。然后,序列比较算法基于指定的程序参数计算测试序列相对于参考序列的序列同一性百分比。

[0119] 用于比较的序列的最佳比对可以例如通过Smith&Waterman,Adv.Appl.Math.2:482(1981)的局部同源性算法,通过Needleman&Wunsch,J.Mol.Biol.48:443(1970)的同源性比对算法,通过Pearson&Lipman,Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA 85:2444(1988)的相似性方法,通过这些算法的计算机化实现(Wisconsin Genetics Software Package,Genetics Computer Group,575 Science Dr.,Madison,Wis.中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA),或通过视觉检查(通常参见Ausubel等人,下文)进行。

[0120] 适用于测定序列同一性百分比和序列相似性的算法的一个实例是BLAST算法,其在Altschul等人,J.Mol.Biol.215:403-410(1990)中描述。用于进行BLAST分析的软件可通过美国国家生物技术信息中心(www.ncbi.nlm.nih.gov/)公开获得。

[0121] “抑制剂”、“激活剂”和“调节剂”影响生物相关分子的功能或表达。术语“调节剂”包括抑制剂和激活剂。可以使用体外和体内测定法就靶分子的表达或活性鉴定它们。

[0122] “抑制剂”是例如抑制表达或与靶分子或蛋白质结合的药剂。它们可能部分或完全阻断刺激或具有蛋白酶抑制剂活性。它们可以减少、降低、预防或延迟激活，包括失活、脱敏或下调所述靶蛋白的活性。调节剂可以是靶分子或蛋白质的拮抗剂。

[0123] “激活剂”是例如诱导或激活靶分子或蛋白质的功能或表达的药剂。它们可以结合、刺激、增加、打开、激活或促进靶分子活性。激活剂可以是靶分子或蛋白质的激动剂。

[0124] “同源物”是生物活性分子，其在核苷酸序列、肽序列、功能或结构水平上类似于参考分子。同源物可包括与参考序列具有一定百分比同一性的序列衍生物。因此，在一个实施方案中，同源或衍生序列共享至少70%的序列同一性。在具体实施方案中，同源或衍生序列共享至少80%或85%的序列同一性。在具体实施方案中，同源或衍生序列共享至少90%的序列同一性。在具体实施方案中，同源或衍生序列共享至少95%的序列同一性。在更具体的实施方案中，同源或衍生序列共享至少50、55、60、65、70、75、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%的序列同一性。同源或衍生核酸序列还可以通过它们在高度严格杂交条件下保持与参考核酸序列结合的能力来定义。与参考分子具有结构或功能相似性的同源物可以是参考分子的化学衍生物。检测、产生和筛选结构和功能同源物以及衍生物的方法是本领域已知的。

[0125] “杂交”通常取决于当互补链存在于低于其解链温度的环境中时变性DNA再退火的能力。探针和可杂交序列之间所需的同源性程度越高，可使用的相对温度越高。结果是，较高的相对温度倾向于使反应条件更严格，而较低的温度则不那么严格。关于杂交反应严格性的其他细节和解释，参见Ausubel等人，*Current Protocols in Molecular Biology*，Wiley Interscience Publishers (1995)，其通过引用以其全文并入本文。

[0126] 杂交反应的“严格性”可由本领域普通技术人员容易地确定，并且通常是取决于探针长度、洗涤温度和盐浓度的经验计算。通常，较长的探针需要较高的温度以进行适当的退火，而较短的探针需要较低的温度。

[0127] 如本文所定义的“严格条件”或“高严格条件”可以通过以下那些来鉴定：(1) 使用低离子强度和高温用于洗涤，例如0.015M氯化钠/0.0015M柠檬酸钠/0.1%十二烷基硫酸钠，50°C；(2) 在杂交过程中使用变性剂，例如甲酰胺，例如50% (v/v) 甲酰胺与0.1%牛血清白蛋白/0.1%Ficoll/0.1%聚乙烯吡咯烷酮/50Mm磷酸钠缓冲液，pH6.5，以及750Mm氯化钠，75Mm柠檬酸钠，42°C；或(3) 在使用50%甲酰胺、5×SSC (0.75M NaCl, 0.075M柠檬酸钠)、50mM磷酸钠 (Ph6.8)、0.1%焦磷酸钠、5×Denhardt溶液、超声处理的鲑鱼精DNA (50μl/ml)、0.1%SDS和10%硫酸葡聚糖的溶液中在42°C下过夜杂交，在42°C下在0.2×SSC (氯化钠/柠檬酸钠) 中洗涤10分钟，然后在55°C下进行由含EDTA的0.1%SSC组成的10分钟高严格洗涤。

[0128] 本说明书中给出的每个最大数值限制都包括每个较低的数值限制，如同这些较低的数值限制在本文中明确写出一样。在整个说明书中给出的每个最小数值限制将包括每个更高的数值限制，如同在此明确写出这样的更高数值限制一样。本说明书中给出的每个数值范围将包括落入这样更宽的数值范围内的每个较窄的数值范围，如同这些较窄的数值范围都在本文中明确写出。

[0129] 如本文所用，术语“修饰”是指将修饰分子与亲本分子物理区分开的改变。在一个

实施方案中,根据本文所述方法制备的CD47、HSVtk、EC-CD或iCasp9变体多肽中的氨基酸变化将其与未根据本文所述方法修饰的相应亲本(例如野生型蛋白质,天然存在的突变蛋白质或不包括这种变体多肽的修饰的另一种改造蛋白质)区分开。在另一个实施方案中,变体多肽包括一个或多个修饰,其区分变体多肽的功能与未修饰多肽的功能。例如,变体多肽中的氨基酸变化影响其受体结合特征。在其他实施方案中,变体多肽包含取代、缺失或插入修饰,或其组合。在另一个实施方案中,变体多肽包括与未修饰多肽的亲和力相比增加其对受体的亲和力的一个或多个修饰。

[0130] 在一个实施方案中,变体多肽相对于相应的天然或亲本序列包括一个或多个取代、插入或缺失。在某些实施方案中,变体多肽包括1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31-40、41至50或51个或更多个修饰。

[0131] 本文中的“附加型载体”是指可以在细胞的细胞质中自主存在和复制的遗传载体;例如它没有整合到宿主细胞的基因组DNA中。许多附加型载体是本领域已知的并在下面描述。

[0132] 在基因的背景下“敲除”意味着携带敲除的宿主细胞不产生该基因的功能性蛋白质产物。如本文所述,敲除可以以多种方式由去除全部或部分编码序列、引入移码突变使得不产生功能性蛋白质(截短的或无义的序列)、去除或改变调节组分(例如启动子)使得基因不被转录、通过与mRNA的结合阻止翻译等来产生。通常,敲除在基因组DNA水平上进行,使得细胞的后代也永久地携带敲除。

[0133] 在基因的背景下“敲入”意味着携带敲入的宿主细胞在细胞中具有更多的功能性蛋白质活性。如本文所述,敲入可以以多种方式进行,通常通过将编码蛋白质的转基因(tg)的至少一个拷贝引入细胞中,尽管这也可以通过替换调节组分来完成,例如通过向内源基因添加组成型启动子。通常,敲入技术导致转基因的额外拷贝整合到宿主细胞中。

[0134] VII. 本发明的细胞

[0135] 本发明提供了用于产生HIP细胞的组合物和方法,其从野生型细胞开始,使它们成为多能的(例如制备诱导性多能干细胞或iPSC),然后从iPSC群体产生HIP细胞。

[0136] A. 遗传改变的方法

[0137] 本发明包括修饰细胞内或无细胞条件下的核酸序列以产生多能细胞和HIP细胞的方法。示例性技术包括同源重组、敲入、ZFN(锌指核酸酶)、TALEN(转录激活因子样效应核酸酶)、CRISPR(成簇规律间隔短回文重复序列)/Cas9以及其他位点特异性核酸酶技术。这些技术使得能够在所需的基因座位点处进行双链DNA断裂。这些受控的双链断裂促进特定基因座位点的同源重组。该过程集中于用核酸内切酶靶向核酸分子的特定序列,例如染色体,所述核酸内切酶识别并结合序列并在核酸分子中诱导双链断裂。通过易错的非同源末端连接(NHEJ)或通过同源重组(HR)修复双链断裂。

[0138] 如本领域技术人员所理解的,可以使用许多不同的技术来改造本发明的多能细胞,以及如本文所述的使iPSC变得低免疫原性的改造。

[0139] 通常,这些技术可以单独使用或组合使用。例如,在HIP细胞的产生中,CRISPR可用于降低改造细胞中活性B2M和/或CIITA蛋白的表达,并用病毒技术(例如慢病毒)敲入CD47功能。此外,如本领域技术人员所理解的,尽管一个实施方案顺序地利用CRISPR步骤敲除

B2M,然后通过CRISPR步骤敲除CIITA并用慢病毒的最后步骤敲入CD47功能,但这些基因可以使用不同的技术以不同的顺序操作。

[0140] 如下文更充分讨论的,通常进行重编程基因的瞬时表达以产生/诱导多能干细胞。

[0141] a.CRISPR技术

[0142] 在一个实施方案中,使用本领域已知的成簇规律间隔短回文重复序列/Cas (“CRISPR”)技术操作细胞。CRISPR可用于产生起始iPSC或从iPSC产生HIP细胞。存在大量基于CRISPR的技术,参见例如Doudna and Charpentier, *Science* doi:10.1126/science.1258096,其通过引用并入本文。CRISPR技术和试剂盒是商业销售的。

[0143] b.TALEN技术

[0144] 在一些实施方案中,使用转录激活因子样效应核酸酶(TALEN)方法制备本发明的HIP细胞。TALEN是与核酸酶结合的限制酶,其可以被改造以结合并切割几乎任何所需的DNA序列。TALEN试剂盒是商业销售的。

[0145] c.锌指技术

[0146] 在一个实施方案中,使用锌指核酸酶技术操作细胞。锌指核酸酶是通过将锌指DNA结合结构域与DNA切割结构域融合而产生的人工限制酶。可以设计锌指结构域以靶向特定的所需DNA序列,这使得锌指核酸酶能够靶向复杂基因组内的独特序列。通过利用内源DNA修复机制,这些试剂可用于精确改变高等生物的基因组,类似于CRISPR和TALEN。

[0147] d.基于病毒的技术

[0148] 有多种病毒技术可用于产生本发明的HIP细胞(以及iPCS的原始产生),包括但不限于逆转录病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体和仙台病毒载体的使用。用于产生iPSC的附加型载体如下文所述。

[0149] e.使用干扰RNA下调基因

[0150] 在其他实施方案中,编码HLA分子中使用的蛋白质的基因通过RNAi技术下调。RNA干扰(RNAi)是RNA分子通常通过使特定mRNA分子降解来抑制基因表达的过程。两种类型的RNA分子(微RNA(miRNA)和小干扰RNA(siRNA))是RNA干扰的核心。它们与靶mRNA分子结合并增加或降低其活性。RNAi有助于细胞抵御寄生核酸,例如来自病毒和转座子的那些。RNAi还影响发育。

[0151] sdRNA分子是一类不对称siRNA,其包含19-21个碱基的指导(反义)链。它们含有5'磷酸、2' Ome或2' F修饰的嘧啶,以及3'位的6个磷酸酯。它们还含有具有3'缀合的甾醇部分、3'位置的2个磷酸酯和2' Ome修饰的嘧啶的有义链。两条链均含有2' Ome嘌呤,其中未修饰嘌呤的连续区段的长度不超过3。在美国专利号8,796,443中公开了sdRNA,其通过引用以其全文并入本文。

[0152] 对于所有这些技术,使用公知的重组技术来产生如本文所述的重组核酸。在某些实施方案中,重组核酸(编码所需多肽例如CD47或破坏序列)可以与表达构建体中的一个或多个调节核苷酸序列可操作地连接。调节核苷酸序列通常适合宿主细胞和待治疗的受试者。本领域已知多种类型的合适表达载体和合适的调节序列用于多种宿主细胞。通常,一种或多种调节核苷酸序列可包括但不限于启动子序列、前导序列或信号序列、核糖体结合位点、转录起始和终止序列、翻译起始和终止序列、以及增强子或激活子序列。还考虑了本领域已知的组成型或诱导型启动子。启动子可以是天然存在的启动子,或组合多于一种启动

子的元件的杂合启动子。表达构建体可以在细胞中存在于附加体(例如质粒)上,或者表达构建体可以插入染色体中。在一个具体实施方案中,表达载体包括选择标记基因以允许选择转化的宿主细胞。某些实施方案包括表达载体,其包含与至少一种调节序列可操作地连接的编码变体多肽的核苷酸序列。用于本文的调节序列包括启动子、增强子和其他表达控制元件。在某些实施方案中,设计表达载体用于选择待转化的宿主细胞、期望表达的特定变体多肽、载体的拷贝数、控制该拷贝数的能力或由载体编码的任何其他蛋白质如抗生素标志物的表达。

[0153] 合适的哺乳动物启动子的实例包括,例如,来自以下基因的启动子:仓鼠的泛素/S27a启动子(WO 97/15664),猿猴空泡病毒40(SV40)早期启动子,腺病毒主要晚期启动子,小鼠金属硫蛋白-I启动子,劳氏肉瘤病毒(RSV)的长末端重复区,小鼠乳腺肿瘤病毒启动子(MMTV),莫洛尼鼠白血病病毒长末端重复区和人巨细胞病毒(CMV)的早期启动子。其他异源哺乳动物启动子的实例是肌动蛋白、免疫球蛋白或热休克启动子。

[0154] 在另外的实施方案中,用于哺乳动物宿主细胞的启动子可以从病毒的基因组中获得,例如多瘤病毒、禽痘病毒(1989年7月5日公布的UK 2,211,504)、牛乳头瘤病毒、禽肉瘤病毒、巨细胞病毒、逆转录病毒、乙型肝炎病毒和猿猴病毒40(SV40)。在进一步的实施方案中,使用异源哺乳动物启动子。实例包括肌动蛋白启动子、免疫球蛋白启动子和热休克启动子。SV40的早期和晚期启动子可方便地作为SV40限制性片段获得,其还含有SV40病毒复制起点。Fiers等人,Nature 273:113-120(1978)。人巨细胞病毒的立即早期启动子可方便地作为HindIII E限制性片段获得。Greenaway, P. J. 等人, Gene 18:355-360(1982)。前述参考文献通过引用以其全文并入本文。

[0155] B. 多能细胞的产生

[0156] 本发明提供了由多能细胞产生非免疫原性多能细胞的方法。因此,第一步是提供多能干细胞。

[0157] 小鼠和人多能干细胞(通常称为iPSC;鼠细胞为miPSC或人细胞为hiPSC)的产生通常是本领域已知的。如本领域技术人员所理解的,存在多种用于生成iPSC的不同方法。使用病毒引入四种转录因子Oct3/4、Sox2、c-Myc和Klf4,从小鼠胚胎或成体成纤维细胞进行原始诱导;参见Takahashi and Yamanaka Cell 126:663-676(2006),其并且特别是其中概述的技术通过引用以其全文并入本文。从那时起,已经开发了许多方法;对于综述参见Seki等人,World J. Stem Cells 7(1):116-125(2015),以及Lakshmipathy and Vermuri, editors, Methods in Molecular Biology: Pluripotent Stem Cells, Methods and Protocols, Springer 2013,两者并且特别是用于产生hiPSC的方法(参见例如后一参考文献的第3章)通过引用明确以其全文并入本文。

[0158] 通常,iPSC通过在宿主细胞中瞬时表达一种或多种“重编程因子”(通常使用附加型载体引入)而产生。在这些条件下,诱导少量细胞变成iPSC(通常,该步骤的效率低,因为没有使用选择标记)。一旦细胞被“重新编程”并变成多能细胞,它们就会失去附加型载体并使用内源基因产生这些因子。附加型载体的这种损失导致细胞被称为“零足迹(zero footprint)”细胞。这是期望的,因为遗传修饰(特别是在宿主细胞的基因组中)越少越好。因此,优选所得的hiPSC没有永久性遗传修饰。

[0159] 如本领域技术人员还理解的,可以使用或被使用的重编程因子的数量可以变化。

通常,当使用较少的重编程因子时,细胞向多能状态转化的效率以及“多能性”下降,例如较少的重编程因子可能导致细胞不是完全多能的,但可能只能分化成较少的细胞类型。

[0160] 在一些实施方案中,使用单一重编程因子OCT4。在其他实施方案中,使用两种重编程因子OCT4和KLF4。在其他实施方案中,使用三种重编程因子OCT4、KLF4和SOX2。在其他实施方案中,使用四种重编程因子OCT4、KLF4、SOX2和c-Myc。在其他实施方案中,可以使用选自SOKMNL;SOX2、OCT4 (POU5F1)、KLF4、MYC、NANOG、LIN28和SV40L T抗原的5、6或7个重编程因子。

[0161] 通常,这些重编程因子基因在附加型载体上提供,例如本领域已知的和可商购的。例如,ThermoFisher/Invitrogen销售仙台病毒重编程试剂盒用于hiPSC的零足迹产生,参见目录号A34546。ThermoFisher还销售基于EBNA的系统,参见目录号A14703。

[0162] 此外,有许多可商购的hiPSC系可用;参见例如**Gibco®** Episomal hiPSC系K18945(其是零足迹的)、无病毒整合的人iPSC细胞系(也参见Burridge等人,2011,同上)。

[0163] 通常,如本领域已知的,通过瞬时表达如本文所述的重编程因子,从非多能细胞如CD34+脐带血细胞、成纤维细胞等制成iPSC。

[0164] 例如,还仅使用Oct3/4、Sox2和Klf4同时省略C-Myc产生成功的iPSC,尽管具有降低的重编程效率。

[0165] 通常, iPSC的特征在于某些因子的表达,包括KLF4、Nanog、OCT4、SOX2、ESRRB、TBX3、c-Myc和TCL1。出于本发明的目的,这些因子的新的或增加的表达可以通过内源基因座的诱导或调节或来自转基因的表达。

[0166] 例如,可以使用Diecke等人,Sci Rep.2015,Jan.28;5:8081 (doi:10.1038/srep08081) (其并且特别是用于产生miPSC的方法和试剂通过引用以其全文并入本文)的方法产生鼠iPSC。还参见例如Burridge等人,PLoS One,2011 6 (4) :18293,其并且特别是其中概述的方法通过引用以其全文并入本文。

[0167] 在一些情况下,如本文所概述地测量或确认细胞的多能性,例如如图17中一般所示的通过测定重编程因子,或通过进行本文和实施例中概述的分化反应。

[0168] C.产生低免疫原性多能细胞

[0169] 本发明涉及如本文所定义的低免疫原性细胞的产生、操作、生长和移植到患者体内。从多能细胞产生HIP细胞仅进行三次遗传改变,导致细胞活性的破坏最小,但赋予细胞免疫沉默。

[0170] 如本文所讨论的,一个实施方案利用MHC I和II(当细胞是人时为HLA I和II)的蛋白质活性的降低或消除。这可以通过改变编码其组分的基因来完成。在一个实施方案中,使用CRISPR破坏基因的编码区或调节序列。在另一个实施方案中,使用干扰RNA技术减少基因翻译。第三个变化是调节对巨噬细胞吞噬作用的敏感性的基因例如CD47的变化,这通常是使用病毒技术“敲入”基因。

[0171] 在某些情况下,当CRISPR用于遗传修饰时,可以使用含有使得能够高效编辑细胞系的Cas9构建体的hiPSC细胞;参见,例如,Life Technologies的人附加型Cas9iPSC细胞系A33124。

[0172] 1.HLA-I减少

[0173] 本发明的HIP细胞包括MHC I(当细胞来源于人细胞时HLA I)功能的降低。

[0174] 如本领域技术人员所理解的,功能的降低可以通过多种方式实现,包括从基因中去除核酸序列、用其他序列中断序列、或改变核酸的调节组分。例如,可以去除或用“无义”序列替换目的基因的全部或部分编码区,可以进行移码突变,可以去除或替换调节序列例如启动子的全部或部分,可以删除或替换翻译启动序列等。

[0175] 如本领域技术人员所理解的,可以使用本领域已知的和如下所述的技术测量多能细胞中MHC I(当细胞来源于人细胞时HLA I)功能的成功降低;例如,使用结合HLA复合物的标记抗体的FACS技术;例如,使用市售的HLA-A、B、C抗体,其结合人主要组织相容性HLA I类抗原的 α 链。

[0176] a. B 2m改变

[0177] 在一个实施方案中,通过破坏多能干细胞中 β -2微球蛋白基因的表达来完成HLA-I活性的降低,所述 β -2微球蛋白基因的人序列在本文中公开。这种改变在本文中通常称为基因“敲除”,并且在本发明的HIP细胞中,其在宿主细胞中的两个等位基因上进行。通常,完成两个破坏的技术是相同的。

[0178] 特别有用实施方案使用CRISPR技术破坏基因。在一些情况下,CRISPR技术用于将小的缺失/插入引入基因的编码区,使得不产生功能性蛋白,通常是移码突变的结果,其导致终止密码子的产生,使得产生截短的、非功能性蛋白质。

[0179] 因此,有用的技术是使用设计用于靶向小鼠中B2M基因或人中B2M基因的编码序列的CRISPR序列。基因编辑后,将转染的iPSC培养物解离成单细胞。将单细胞扩增成全尺寸集落,并通过筛选来自CRISPR切割位点的异常序列的存在来测试CRISPR编辑。挑选在两个等位基因中均具有缺失的克隆。如通过PCR所证明的,此类克隆不表达B2M/B2M,并且如通过FACS分析所证明的那样不表达HLA-I(例如,参见实施例1和6)。

[0180] 测试B2M基因是否已经失活的测定法是已知的并在本文中描述。在一个实施方案中,该测定是用针对B2M蛋白的抗体探测的细胞裂解物的蛋白质印迹。在另一个实施方案中,逆转录酶聚合酶链反应(rt-PCR)证实存在失活改变。

[0181] 另外,可以测试细胞以确认HLA I复合物不在细胞表面上表达。如上所述,这可以通过使用针对一种或多种HLA细胞表面组分的抗体的FACS分析来测定。

[0182] 值得注意的是,当试图在两个等位基因上沉默B2M基因时,其他人的结果很差。参见,例如,Gornalusse等人,Nature Biotech.Doi/10.1038/nbt.3860)。

[0183] 2.HLA-II减少

[0184] 除了HLA I的减少之外,本发明的HIP细胞还缺乏MHC II(当细胞来源于人细胞时为HLA II)功能。

[0185] 如本领域技术人员所理解的,功能的降低可以通过多种方式实现,包括从基因中去除核酸序列、向基因添加核酸序列、破坏阅读框、用其他序列中断序列、或改变核酸的调节组分。在一个实施方案中,可以去除或用“无义”序列替换目的基因的全部或部分编码区。在另一个实施方案中,可以去除或替换调节序列如启动子,可以去除或替换翻译起始序列等。

[0186] 可以使用本领域已知的技术测量多能细胞或其衍生物中MHC II(当细胞来源于人细胞时为HLA II)功能的成功降低,例如使用蛋白质抗体的蛋白质印迹、FACS技术、rt-PCR技术等。

[0187] a.CIITA改变

[0188] 在一个实施方案中,通过破坏多能干细胞中CIITA基因的表达来完成HLA-II活性的降低,所述CIITA基因的人序列在本文中显示。这种改变在本文中通常称为基因“敲除”,并且在本发明的HIP细胞中,其在宿主细胞中的两个等位基因上进行。

[0189] 测试CIITA基因是否已经失活的测定法是已知的并在本文中描述。在一个实施方案中,该测定是用针对CIITA蛋白的抗体探测的细胞裂解物的蛋白质印迹。在另一个实施方案中,逆转录酶聚合酶链反应(rt-PCR)证实存在失活改变。

[0190] 此外,可以测试细胞以确认HLA II复合物不在细胞表面上表达。同样,该测定是如本领域已知的那样进行的(例如参见图21)并且通常使用如下文所述的基于结合人HLA II类HLA-DR、DP和大多数DQ抗原的商业抗体的蛋白质印迹或的FACS分析来完成。

[0191] 特别有用的实施方案使用CRISPR技术破坏CIITA基因。设计CRISPR以靶向小鼠中的Ciita基因或人的CIITA基因(所有MHC II分子的必需转录因子)的编码序列。基因编辑后,将转染的iPSC培养物解离成单细胞。将它们扩增成全尺寸集落,并通过筛选来自CRISPR切割位点的异常序列的存在来测试成功的CRISPR编辑。如通过PCR测定的,具有缺失的克隆不表达Ciita/CIITA,并且如通过FACS分析所确定的那样不表达MHC II/HLA-II。

[0192] 3. 吞噬作用减少

[0193] 除了HLA I和II(或MHC I和II)的减少(通常使用B2M和CIITA敲除)之外,本发明的HIP细胞对巨噬细胞吞噬作用和NK细胞杀伤的敏感性降低。由于一种或多种CD47转基因,所得的HIP细胞“逃避”免疫巨噬细胞和先天性途径。

[0194] a. CD47增加

[0195] 在一些实施方案中,降低的巨噬细胞吞噬作用和NK细胞杀伤敏感性是由HIP细胞表面上的CD47增加引起的。这通过几种方式完成,如本领域技术人员使用“敲入”或转基因技术所理解的。在一些情况下,CD47表达增加是由一种或多种CD47转基因引起的。

[0196] 因此,在一些实施方案中,在诱导型或组成型启动子(后者是优选的)的控制下将CD47基因的一个或多个拷贝添加至HIP细胞。在一些实施方案中,如本文所述或本领域已知的使用慢病毒构建体。如本领域已知的,CD47基因可以在合适的启动子的控制下整合到宿主细胞的基因组中。

[0197] HIP细胞系由B2M-/-CIITA-/-iPSC产生。使用杀稻瘟素标记选择含有表达CD47的慢病毒载体的细胞。合成CD47基因序列,将DNA克隆到具有杀稻瘟素抗性的质粒慢病毒pLenti6/V5中(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)

[0198] 在一些实施方案中,可以通过改变内源CD47基因的调节序列来增加CD47基因的表达,例如,通过将内源启动子更换为组成型启动子或不同的诱导型启动子。这通常可以使用诸如CRISPR的已知技术来完成。

[0199] 一旦改变,可以使用已知技术测定足够的CD47表达的存在,例如实施例中描述的那些,例如使用抗CD47抗体的蛋白质印迹、ELISA测定或FACS测定。通常,在此上下文中的“足够”意指HIP细胞表面上CD47表达的增加,其沉默NK细胞杀伤。一旦移除MHC I,细胞上的天然表达水平太低而不能保护它们免受NK细胞裂解。

[0200] 4. 自杀基因

[0201] 在一些实施方案中,本发明提供了包含“自杀基因”或“自杀开关”的低免疫原性多

能细胞。这些被整合以用作“安全开关”，如果低免疫原性多能细胞以不希望的方式生长和分裂，其可导致低免疫原性多能细胞的死亡。“自杀基因”消融方法包括基因转移载体中编码蛋白质的自杀基因，该蛋白质仅在被特定化合物激活时导致细胞杀伤。自杀基因可编码选择性地将无毒化合物转化为高毒性代谢物的酶。结果是特异性地消除了表达酶的细胞。在一些实施方案中，自杀基因是疱疹病毒胸苷激酶 (HSV-tk) 基因，并且触发因子是更昔洛韦。在其他实施方案中，自杀基因是大肠杆菌胞嘧啶脱氨酶 (EC-CD) 基因，触发因子是5-氟胞嘧啶 (5-FC) (Barese等人, Mol. Therap. 20 (10) :1932-1943 (2012) , Xu等人, Cell Res. 8: 73-8 (1998) ,两者均通过引用以其全文并入本文)

[0202] 在其他实施方案中，自杀基因是诱导型胱天蛋白酶蛋白。诱导型胱天蛋白酶蛋白包含能够诱导细胞凋亡的至少一部分胱天蛋白酶蛋白。在一个实施方案中，胱天蛋白酶蛋白的部分在SEQ ID N0:6中举例说明。在优选的实施方案中，诱导型胱天蛋白酶蛋白是iCasp9。它包含具有F36V突变的人FK506结合蛋白FKBP12的序列，其通过一系列氨基酸与编码人胱天蛋白酶9的基因连接。FKBP12-F36V以高亲和力结合小分子二聚化剂AP1903。因此，本发明中iCasp9的自杀功能是通过施用二聚化的化学诱导剂 (CID) 触发的。在一些实施方案中，CID是小分子药物AP1903。二聚化导致细胞凋亡的快速诱导。(参见WO2011146862; Stasi等人, N. Engl. J. Med. 365;18 (2011) ; Tey等人, Biol. Blood Marrow Transplant. 13: 913-924 (2007) ,其各自通过引用以其全文并入本文)

[0203] 5. HIP表型和多能性的保留的测定法

[0204] 如本文和实施例中一般描述的，一旦产生了HIP细胞，就可以测定它们的低免疫原性和/或多能性的保留。

[0205] 例如，使用如图13和图15中举例说明的许多技术测定低免疫原性。这些技术包括移植到同种异体宿主中并监测逃避宿主免疫系统的HIP细胞生长(例如畸胎瘤)。转导HIP衍生物以表达荧光素酶，然后可以使用生物发光成像。类似地，测试宿主动物对HIP细胞的T细胞和/或B细胞应答，以确认HIP细胞不会在宿主动物中引起免疫应答。通过Elispot、Elisa、FACS、PCR或质量细胞计数 (CYTOF) 评估T细胞功能。使用FACS或luminex评估B细胞应答或抗体应答。另外或可替代地，可以测定细胞避免先天免疫应答例如NK细胞杀伤的能力，如图14中一般所示。体外或体内评估NK细胞溶解活性(如图15所示)。

[0206] 类似地，以多种方式测试多能性的保留。在一个实施方案中，多能性通过本文一般描述的和如图29所示的某些多能性特异性因子的表达来测定。另外或可选地，HIP细胞分化成一种或多种细胞类型作为多能性的指示。

[0207] D. 本发明的优选实施方案

[0208] 本文提供了低免疫原性多能干细胞(“HIP细胞”)，其表现出多能性，但当移植到同种异体宿主例如人患者中时不会导致宿主免疫应答，无论是作为HIP细胞还是作为HIP细胞的分化产物。

[0209] 在一个实施方案中，通过以下方式使人多能干细胞(hiPSC)具有低免疫原性：a) 每个等位基因处的B2M基因的破坏(例如B2M-/-) , b) 每个等位基因处的CIITA基因的破坏(例如CIITA-/-) , 和c) 通过CD47基因的过表达 (CD47+，例如通过引入一个或多个额外的CD47基因拷贝或激活基因组基因)。这使得hiPSC群体是B2M-/-CIITA-/-CD47tg。在优选的实施方案中，细胞是非免疫原性的。在另一个实施方案中，HIP细胞呈现如上所述的非免疫原性

B2MCIITA,但通过包括诱导型自杀基因进行进一步修饰,所述诱导型自杀基因在需要时被诱导以体内杀死细胞。

[0210] E.HIP细胞的维持

[0211] 一旦产生,HIP细胞可以维持未分化状态,如维持iPSC所知的。例如,使用培养基在基质胶上培养HIP细胞,所述培养基防止分化并维持多能性。

[0212] F.HIP细胞的分化

[0213] 本发明提供了分化成不同细胞类型的HIP细胞,用于随后移植入受试者。如本领域技术人员所理解的,分化方法取决于使用已知技术的所需细胞类型。将细胞悬浮分化,然后制成凝胶基质形式,例如基质胶、明胶或纤维蛋白/凝血酶形式,以促进细胞存活。通常通过评估细胞特异性标志物的存在来如本领域已知的那样测定分化。

[0214] 在一些实施方案中,HIP细胞分化成肝细胞以解决肝细胞功能丧失或肝硬化。有许多技术可用于将HIP细胞分化为肝细胞;参见例如Pettinato等人,doi:10.1038/spre32888,Snykers等人,Methods Mol Biol 698:305-314(2011),Si-Tayeb等人,Hepatology 51:297-305(2010)和Asgari等人,Stem Cell Rev (:493-504(2013),其全部特别是用于分化的方法和试剂通过引用以其全文明确地并入本文。如本领域已知的,通常通过评估肝细胞相关和/或特异性标志物(包括但不限于白蛋白、甲胎蛋白和纤维蛋白原)的存在来测定分化。分化也可以在功能上测量,例如氨的代谢、LDL储存和摄取、ICG摄取和释放以及糖原存储。

[0215] 在一些实施方案中,HIP细胞分化成 β 样细胞或胰岛类器官用于移植以解决I型糖尿病(T1DM)。细胞系统是解决T1DM的有前景的方法,参见例如Ellis等人,doi/10.1038/nrgastro.2017.93,在此引入作为参考。此外,Pagliuca等人报道了来自hiPSC的 β 细胞的成功分化(参见doi/10.106/j.cell.2014.09.040,其并且特别是用于从人多能干细胞大规模生产功能性人 β 细胞的方法和试剂通过引用以其全文并入本文)。此外,Vegas等人显示了从人多能干细胞产生人 β 细胞,然后进行包封以避免宿主免疫排斥;(doi:10.1038/nm.430,其并且特别是用于从人多能干细胞大规模生产功能性人 β 细胞的方法和试剂通过引用以其全文并入本文)。

[0216] 如本领域已知的,通常通过评估 β 细胞相关或特异性标志物(包括但不限于胰岛素)的存在来测定分化。还可以在功能上测量分化,例如测量葡萄糖代谢,通常参见Muraro等人,doi:10.1016/j.cels.2016.09.002,其并且特别是其中概述的生物标志物通过引用以其全文并入本文。

[0217] 一旦产生dHIP β 细胞,它们可以被移植(作为细胞悬浮液或如本文所讨论的凝胶基质内)进入门静脉/肝脏、网膜、胃肠粘膜、骨髓、肌肉或皮下袋。

[0218] 在一些实施方案中,HIP细胞分化成视网膜色素上皮(RPE)以解决威胁眼睛视力的疾病。使用Kamao等人,Stem Cell Reports 2014:2:205-18中概述的技术将人多能干细胞分化成RPE细胞,该文献特别是其中概述的用于分化技术和试剂的方法和试剂通过引用以其全文并入本文;还参见Mandai等人,doi:10.1056/NEJMoa1608368,其对于用于产生RPE细胞片和移植到患者体内的技术也以其全文并入本文。

[0219] 通常通过评估RPE相关和/或特异性标志物的存在或通过功能测量,可以如本领域已知的那样测定分化。参见例如Kamao等人,doi:10.1016/j.stemcr.2013.12.007,其并且

特别是结果部分第一段中概述的标志物通过引用以其全文并入本文。

[0220] 在一些实施方案中, HIP细胞分化成心肌细胞以解决心血管疾病。本领域已知用于将hiPSC分化为心肌细胞的技术并且在实施例中进行了讨论。如本领域已知的, 通常通过评估心肌细胞相关或特异性标志物的存在或通过功能测量来鉴定分化; 参见例如Loh等人, doi:10.1016/j.cell.2016.06.001, 其并且特别是用于分化干细胞包括心肌细胞的方法通过引用以其全文并入本文。

[0221] 在一些实施方案中, HIP细胞分化成内皮集落形成细胞 (ECFC) 以形成新血管以解决外周动脉疾病。已知分化内皮细胞的技术。参见, 例如, Prasain等人, doi:10.1038/nbt.3048, 其并且特别是用于从人多能干细胞产生内皮细胞的方法和试剂以及移植技术通过引用以其全文并入本文。如本领域已知的, 通常通过评估内皮细胞相关或特异性标志物的存在或通过功能测量来鉴定分化。

[0222] 在一些实施方案中, HIP细胞分化成甲状腺祖细胞和甲状腺滤泡类器官 (其可以分泌甲状腺激素) 以解决自身免疫性甲状腺炎。分化甲状腺细胞的技术是本领域已知的。参见, 例如, Kurmann等人, doi:10.106/j.stem.2015.09.004, 其并且特别是用于从人多能干细胞产生甲状腺细胞的方法和试剂以及移植技术通过引用明确以其全文并入本文。如本领域已知的, 通常通过评估甲状腺细胞相关或特异性标志物的存在或通过功能测量来鉴定分化。

[0223] G. 分化的HIP细胞的移植

[0224] 如本领域技术人员所理解的, 使用本领域已知的技术移植分化的HIP衍生物, 所述技术取决于细胞类型和这些细胞的最终用途。通常, 本发明的dHIP细胞静脉内或通过注射在患者的具体位置移植。当移植到特定位置时, 细胞可以悬浮在凝胶基质中以防止在它们保持时分散。

[0225] 为了可以更全面地理解本文所述的发明, 阐述了以下实施例。应该理解的是, 这些实施例仅用于举例说明目的, 不应被解释为以任何方式限制本发明。

[0226] VIII. 实施例

[0227] A. 一般技术

[0228] 1. 小鼠iPSC的产生

[0229] 使用Diecke等人, Sci Rep. 2015, Jan. 28; 5: 8081 (doi:10.1038/srep08081) 的方法产生这些细胞, 其并且特别是用于产生miPSC的方法和试剂以其全文并入本文。

[0230] 将小鼠的鼠尾尖成纤维细胞解离并用IV型胶原酶 (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) 分离, 并用含有10% 胎牛血清 (FBS)、L-谷氨酰胺、4.5g/L葡萄糖、100U/mL青霉素和100μg/mL链霉素的Dulbecco改良的Eagle培养基 (DMEM) 在37°C、20% O₂和5% CO₂的潮湿培养箱中维持。然后使用表达4种重编程因子Oct4、KLF4、Sox2和c-Myc的新型的密码子优化的微型内含子质粒 (co-MIP) (10–12μm的DNA) 使用Neon转染系统重编程1×10⁶个鼠成纤维细胞。转染后, 将成纤维细胞铺板在MEF饲养层上并保持在成纤维细胞培养基中, 其中加入丁酸钠 (0.2mM) 和50μg/mL抗坏血酸。当出现ESC样集落时, 将培养基更换为含有DMEM、20% FBS、L-谷氨酰胺、非必需氨基酸 (NEAA)、β-巯基乙醇和10ng/mL白血病抑制因子 (LIF) 的鼠iPSC培养基。传代2次后, 将鼠iPSC转移到0.2% 明胶包被的平板上并进一步扩增。对于每次传代, 使用磁性激活细胞分选 (MACS) 对iPSC就鼠多能性标志物SSEA-1进行分选。

[0231] 2. 人iPSC的产生

[0232] 如在Burridge等人, PLoS One, 2011 6 (4) :18293中概述的那样进行hiPSC的产生, 其并且特别是其中概述的方法通过引用以其全文并入本文。

[0233] 使用基于三质粒、七因子(SOKMNLT; SOX2, OCT4 (POU5F1), KLF4, MYC, NANOG, LIN28 和SV40L T抗原) EBNA的附加型系统从CD34+脐带血(目录号A33124, Thermo Fisher Scientific) 衍生**Gibco®**人附加型iPSC系。该iPSC系被认为是零足迹的, 因为没有从重编程事件整合到基因组中。已经证明它不含所有重编程基因。

[0234] **Gibco®**人附加型iPSC系具有正常核型和多能标志物如Oct4、Sox2和Nanog(如RT-PCR所示) 和Oct4、SSEA4、TRA-1-60和TRA-1-81(如ICC所示) 的内源表达。全基因组表达和表观遗传学分析表明, 这种附加型hiPSC系在分子上与人胚胎干细胞系无法区分(Burridge等人, 2011)。在定向分化和畸胎瘤分析中, 这些hiPSC保留了其对外胚层、内胚层和中胚层谱系的分化潜能(Burridge等人, 2011)。此外, 以稳健的效率衍生血管、造血、神经和心脏谱系(Burridge等人, 2011)。

[0235] 3. 表面分子的FACS分析

[0236] a. 检测人HLA I表面分子

[0237] 将人iPSC、iCM和iEC铺板在6孔板中, 并用100ng/ml人IFNg (Peprotech, Rocket Hill, NJ) 刺激。收获细胞并用APC缀合的HLA-A、B、C抗体(克隆G46_2.6, 目录号562006, BD BioSciences, San Jose, CA) 或APC缀合的IgG1同种型对照抗体(克隆MOPC-21目录号555751, BD BioSciences) 标记。HLA-A、B、C抗体特异性结合人主要组织相容性HLA I类抗原的 α 链。通过流式细胞术(BD Bioscience) 进行数据分析, 结果表示为同种型对照的倍数变化。

[0238] 4. 检测人HLA II表面分子

[0239] 将人iPSC、iCM和iEC铺板在6孔板中, 并用100ng/ml人TNF α (Peprotech, Rocket Hill, NJ) 刺激。收获细胞并用Alexa-flour647标记的HLA-DR, DP, DQ抗体(克隆Tu3a, 目录号563591, BD BioSciences, San Jose, CA) 或Alexa-flour647标记的IgG2a同种型对照抗体(克隆G155-178, 目录号557715, BD BioSciences) 标记。HLA-DR、DP、DQ抗体特异性结合人HLA II类HLA-DR、DP和大多数DQ抗原。通过流式细胞术(BD Bioscience) 进行数据分析, 结果表示为同种型对照的倍数变化。

[0240] 5. 检测人CD47表面分子

[0241] 将人iPSC、iCM和iEC铺板在6孔板中, 并用100ng/ml人IFNg (Peprotech, Rocket Hill, NJ) 刺激。收获细胞并用PerCP-Cy5-缀合的CD47(克隆B6H12, 目录号561261, BD BioSciences, San Jose, CA) 或PerCP-Cy5-缀合的IgG1同种型对照抗体(克隆MOPC-21, 目录号550795, BD BioSciences) 标记。B6H12CD47单克隆抗体特异性结合CD47, 一种42-52kDa的N-连接聚糖蛋白。通过流式细胞术(BD Bioscience) 进行数据分析, 结果表示为同种型对照的倍数变化。

[0242] 6. 检测小鼠MHC I表面分子

[0243] 为了检测miPSC、miEC、miSMC和miCM上的MHC I表面分子, 将细胞铺板在明胶包被的6孔板上, 并用100ng/ml小鼠IFNg (Peprotech, Rocket Hill, NJ) 刺激。收获后, 用PerCP-eFlour710标记的MHCI抗体(克隆AF6-88.5.5.3, 目录号46-5958-82, eBioscience, Santa

Clara, CA) 或 PerCP-eFlour710 标记的 IgG2b 同种型对照抗体 (克隆 eB149/10H5, 目录号 46-4031-80, eBioscience) 标记细胞。MHC I 抗体与 H-2K^b MHC I 类异体抗原反应。通过流式细胞术 (BD Bioscience) 进行数据分析, 结果表示为同种型对照的倍数变化。

[0244] 7. 检测小鼠 MHC II 表面分子

[0245] 为了检测 miPSC、miEC、miSMC 和 miCM 上的 MHC II 表面分子, 将细胞铺板在明胶包被的 6 孔板上, 并用 100ng/ml 小鼠 TNF α (Peprotech, Rocker Hill, NJ) 刺激。收获后, 用 PerCP-eFlour710 标记的 MHC II 抗体 (克隆 M5/114.15.2, 目录号 46-5321-82, eBioscience, Santa Clara, CA) 或 PerCP-eFlour710 标记的 IgG2a/K 同种型对照抗体 (克隆 eBM2a, 目录号 46-4724-80, eBioscience) 标记细胞。MHC II 抗体与小鼠主要组织相容性复合物 II 类 (I-A 和 I-E 亚区域编码的糖蛋白) 反应。通过流式细胞术 (BD Bioscience) 进行数据分析, 结果表示为同种型对照的倍数变化。

[0246] 8. 检测小鼠 Cd47 表面分子

[0247] 为了检测 miPSC、miEC、miSMC 和 miCM 上的 Cd47 表面分子, 将细胞铺板在明胶包被的 6 孔板上, 并用 100ng/ml 小鼠 IFNg (Peprotech, Rocker Hill, NJ) 刺激。收获后, 用 Alexa Fluor 647 标记的 Cd47 抗体 (克隆 miap301, 目录号 563584, BD BioSciences, San Jose, CA) 或 Alexa Fluor 647 标记的 IgG2a/K 同种型对照抗体 (克隆 R35-95, 目录号 557690, BD BioSciences) 标记细胞。Cd47 抗体特异性结合 CD47 (也称为整联蛋白相关蛋白 (IAP)) 的细胞外结构域。通过流式细胞术 (BD Bioscience) 进行数据分析, 结果表示为同种型对照的倍数变化。

[0248] 9. 同种异体移植后体内测定小鼠细胞形态

[0249] 将同种异体小鼠置于诱导室中, 并用 2% 异氟烷 (Isothesia, Butler Schein) 诱导麻醉。将 250 μ l 0.9% 生理盐水中的 1mio 细胞 (miPSC 衍生的心肌细胞 (miCM)、miPSC 衍生的平滑肌细胞 (miSMC) 或 miPSC 衍生的内皮细胞 (miEC)) 与 250 μ l BD 基质胶高浓度 (1:1; BD Biosciences) 混合并使用 23-G 注射器皮下注射到小鼠的下背部。在植入后 1、2、3、4、5、6、8、10 和 12 周取出基质胶塞, 并用 4% 多聚甲醛和 1% 谷氨醛固定 24 小时, 然后脱水并包埋在石蜡中。切割 5 μ m 厚的切片并用苏木精和曙红 (HE) 染色。

[0250] 10. 同种异体移植后体内测定人细胞形态

[0251] 将人源化 NSG-SGM3 小鼠置于诱导室中, 并用 2% 异氟烷 (Isothesia, Butler Schein) 诱导麻醉。将含有 ZVAD (100mM, 苯氧基羰基-Val-Ala-Asp (O-甲基)-氟甲基酮, Calbiochem)、Bcl-XL BH4 (细胞渗透性 TAT 肽, 50nM, Calbiochem)、环孢菌素 A (200nM, Sigma)、IGF-1 (100ng/ml, Peprotech) 和 吡那地尔 (50mM, Sigma) 的 250 μ l 0.9% 生理盐水中的 1mio 细胞 (hiPSC 衍生的心肌细胞 (hiCM) 或 hiPSC 衍生的内皮细胞 (hiEC)) 与 250 μ l BD 基质胶高浓度 (1:1; BD Biosciences) 混合并使用 23-G 注射器皮下注射到小鼠的下背部。植入后 2、4、6、8、10 和 12 周取出基质胶塞, 并用 4% 多聚甲醛和 1% 甲醛固定 24 小时, 然后脱水并包埋在石蜡中。切割 5 μ m 厚的切片并用苏木精和曙红 (HE) 染色。

[0252] B. 实施例 1: 在小鼠模型中产生 β -2 微球蛋白敲除多能细胞

[0253] 诱导性多能细胞产生: 在小鼠实施方案中产生低免疫多能细胞。人低免疫多能细胞是使用本文描述的策略产生的另一个实施方案。

[0254] 从 C57BL/6 成纤维细胞产生小鼠诱导性多能干细胞 (miPSC)。将丝裂霉素抑制的

CF1小鼠胚胎成纤维细胞 (MEF, Applied Stemcell, CA) 解冻并维持在具有10%热灭活的胎牛血清 (FCS hi)、1%MEM-NEAA和1%Pen Strep (Thermo Fisher Scientific-Gibco, Waltham, MA) 的DMEM+GlutaMax 31966 (Gibco, Grand Island, NY) 中。在MEF饲养细胞形成100%汇合的单层后,miPSC在含有15%K0血清替代物、1%MEM-NEAA、1%Pen Strep (Thermo Fisher-Gibco)、1×β-巯基乙醇和100单位LIF (Millipore, Billerica, MA) 的K0 DMEM 10829中的MEF上生长。将细胞维持在10cm培养皿中,每天更换培养基,并使用0.05%胰蛋白酶-EDTA (Thermo Fisher-Gibco) 每2-3天传代细胞。使用标准培养基在不含饲养细胞的明胶 (Millipore) 上培养miPSC。使用MycoAlert试剂盒 (Lonza, Cologne, Germany) 定期筛选细胞培养物的支原体感染。

[0255] 小鼠: BALB/c (BALB/cAnNCr1, H2d)、C57BL/6 (C57BL/6J, B6, H2b)、裸BALB/c (BALB/c NU/NU, CAnN.CgFoxn1<nu>/Cr1, H2d) 和米色Scid (CBySkm.CB17-Prkdcscid/J) (均为6-12周) 用作不同测定的受体 (均为6-12周龄)。小鼠购自Charles River Laboratories (Sulzfeld, Germany) 并按照实验动物原理指南接受人道护理。动物实验经Hamburg “Amt für Gesundheit und Verbraucherschutz” 批准,并根据当地和欧盟指南进行。

[0256] 多能性确认:通过rtPCR显示多能性。使用PureLink RNA Mini试剂盒 (Thermo Fisher Scientific) 提取RNA。包括DNA酶I步骤以去除污染性基因组DNA。使用Applied Biosystems® High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit产生cDNA。还从所有RNA样品中产生无逆转录酶 (无-RT) 对照。使用AmpliTaq Gold 360Master Mix (Thermo Fisher Scientific-Applied Biosystems, Waltham, MA) 使用基因特异性引物扩增靶序列。在2%琼脂糖凝胶上观察PCR反应。包括扩增编码细胞骨架蛋白的组成型表达的管家基因 (Actb) 的阳性对照引物组。结果显示在图2中。miPSC细胞而非亲本成纤维细胞的多能性标志物Nanog、Oct4、Sox2、Esrrb、Tbx3、Tcl1通过rtPCR检测到。

[0257] 还通过免疫荧光测试多能性。将miPSC铺板在24孔培养皿中,并在铺板后48小时进行RT-PCR和免疫细胞化学 (ICC) 分析。对于ICC, 使用Image-iT Fixation/Permeabilization Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) 将细胞固定、透化并封闭。将细胞在4°C下用针对Sox2和Oct4的一抗染色过夜。几次洗涤后,将细胞与AlexaFluor 488二抗和NucBlue Fixed Cell ReadyProbes Reagent (Thermo Fisher Scientific) 一起孵育。使用荧光显微镜对染色的细胞成像,并且其对Sox2和Oct4呈阳性。数据未显示。

[0258] 图3显示通过功能测定进一步证实多能性。将 2×10^6 个miPSC细胞注射到受体 C57BL/6 (同基因)、BALB/c (同种异体)、裸BALB/c (同种异体但T细胞缺陷) 和米色scid (免疫缺陷) 小鼠的大腿肌肉中。除了免疫活性的同种异体BALB/c小鼠外,在所有小鼠中形成畸胎瘤。

[0259] β-2微球蛋白敲除:CRISPR技术用于敲除B2m基因。为了靶向小鼠β-2-微球蛋白 (B2m) 基因的编码序列,根据试剂盒的说明书 (GeneArt CRISPR Nuclease Vector Kit, Thermo Fischer, Waltham, MA) 将CRISPR序列5' -TTCGGCTCCCATCTCCGG (TGG) -3' 退火并连接到含有Cas9表达盒的A11-In-One (AIO) 载体中。(另一种有效但效果较差的CRISPR是5' -GTATACTCACGCCACCCAC (CGG) -3' 和5' -GGCGTATGTATCAGTCTCAG (TGG) -3')。使用具有20ms持续时间的两个1200V脉冲的Neon电穿孔用AIO载体转染miPSC。使用0.05%胰蛋白酶 (Gibco) 将转染的iPSC培养物解离成单细胞,然后用FACSAria™细胞分选仪 (BD Bioscience,

Franklin Lakes, NJ) 分选以通过在前向和侧向散射发射上选择性门控来去除双联体和碎片。将单细胞扩增成全尺寸集落，并通过筛选来自CRISPR切割位点的异常序列的存在来测试CRISPR编辑。简言之，使用AmpliTaq Gold Mastermix (Thermo Fisher-Applied Biosystems, Waltham, MA) 和如下引物B2m gDNA通过PCR扩增靶序列：

[0260] F: 5' -CTGGATCAGACATATGTGTTGGGA-3' ,

[0261] R: 5' -GCAAAGCAGTTAACGACACAG-3'

[0262] 在获得的PCR产物的净化 (**PureLink**® Pro 96PCR Purification Kit, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) 后，使用Ion Personal Genome Machine (PGM™, Thermo Fisher Scientific) 进行Sanger测序。使用如下引物B2m gDNA PGM PCR扩增用于鉴定同源性的测序 (B2m基因的250bp区域)：

[0263] F: 5' -TTTCAAAATGTGGTAGACTTGG-3' 和

[0264] R: 5' -GGATTCAATGTGAGGCGGGT-3' 。

[0265] 如前所述纯化PCR产物，并使用Ion PGM Hi-Q Template Kit (Thermo Fisher Scientific) 进行制备。使用Ion 318™Chip Kit v2 (Thermo Fisher Scientific) 在Ion PGM™System上进行实验。再次进行多能性分析。

[0266] 如图4所示，在miPSC细胞中敲除β-2-微球蛋白表达。IFN-γ 刺激未诱导MHC-I表达 (右图)。作为对照，用IFN-γ 刺激亲本miPSC细胞 (左图)。

[0267] C. 实施例2:产生β-2微球蛋白/Ciita双敲除多能细胞

[0268] CRISPR技术用于Ciita基因的额外敲除。为了靶向小鼠Ciita基因的编码序列，根据试剂盒的说明书 (GeneArt CRISPR Nuclease Vector Kit, Thermo Fisher, Waltham, MA) 将CRISPR序列5' -GGTCCATCTGGTCATAGAGG (CGG) -3' 退火并连接到含有Cas9表达盒的A11-In-One (A1O) 载体中。使用与B2m-KO相同的条件，用A1O载体转染miPSC。使用0.05%胰蛋白酶 (Thermo Fisher-Gibco) 将转染的iPSC培养物解离成单细胞，然后用FACSAria™细胞分选仪 (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ) 分选以通过在前向和侧向散射发射上选择性门控来去除双联体和碎片。将单细胞扩增成全尺寸集落，并通过筛选来自CRISPR切割位点的异常序列的存在来测试CRISPR编辑。简言之，使用AmpliTaq Gold Mastermix (Thermo Fisher Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) 和引物Ciita gDNA F: 5' -CCCCCAGAACGATGAGCTT-3' , R: 5' -TGCAGAAGTCCTGAGAAGGCC-3' 通过PCR扩增靶序列。在获得的PCR产物的净化 (**PureLink**® Pro 96PCR Purification Kit, Thermo Fisher, Waltham, MA) 后，进行Sanger测序。通过使用DNA序列色谱图，然后通过来自CRISPR切割位点的异常序列的存在鉴定编辑的克隆。使用TIDE工具计算Indel大小。再次进行PCR和ICC以验证细胞的多能性状态。

[0269] 图5证实了miPSC/β-2-微球蛋白/Ciita双敲除。TNF-α不能诱导MHC-II表达MHC-II。

[0270] D. 实施例3:产生β-2微球蛋白/Ciita双敲除-CD47+多能细胞

[0271] 将Cd47表达载体引入上文产生的B2m/Ciita双敲除miPSC中。使用含有抗生素抗性盒式杀稻瘟素的慢病毒递送载体。合成Cd47基因序列，并将DNA克隆到含有杀稻瘟素抗性标记的质粒慢病毒pLenti6/V5 (ThermoFisher, Waltham, MA) 中。进行Sanger测序以验证没有发生突变。以 1×10^7 TU/ml的原液滴度进行慢病毒生成。将重组载体转导到 2×10^5 个B2m-KO/

Ciita双敲除mIPSC中,在杀稻瘟素抗性MEF细胞上生长72小时,MOI比为1:10,然后用12.5 μ g/ml杀稻瘟素进行抗生素选择7天。通过Cd47 mRNA的RT-qPCR扩增和Cd47的流式细胞术检测来测试抗生素选择的库。确认Cd47表达后,扩增细胞并进行多能性测定。

[0272] 图6A显示了来自添加至 β -2-微球蛋白/Ciita双敲除(iPS^低细胞)的转基因的增加的Cd47表达。图6B显示C57BL/6iPS^低细胞在同种异体BALB/c环境中存活,但亲本iPS细胞不存活。这一新颖的结果证实,当移植到本来不相容的宿主中时,低免疫多能细胞存活。

[0273] E. 小鼠细胞从mHIP细胞的分化

[0274] 胰岛细胞:使用改编自Liu等人,Exp. Diabetes Res 2012:201295 (doi:10.1155/2012/201295) (其并且特别是其中概述的分化技术通过引用并入本文) 的技术将mHIP细胞分化成胰岛细胞。将iPS细胞转移到涂有明胶的培养瓶上30分钟以除去饲养层,并以每孔1 \times 10⁶个细胞铺板到补充有2mM谷氨酰胺、100 μ M非必需氨基酸、10ng/mL活化素A、10mM烟酰胺和1 μ g/mL层粘连蛋白以及10%FBS的DMEM/F-12培养基中的胶原蛋白I包被的平板上过夜。接着将ES-D3细胞暴露于补充有2mM L-谷氨酰胺、100 μ M非必需氨基酸、10ng/mL活化素A、10mM烟酰胺、25 μ g/mL胰岛素和1 μ g/mL层粘连蛋白以及2%FBS的DMEM/F-12培养基中6天。

[0275] 神经干细胞:使用改编自Abrachés等人,doi:10.1371/journal.pone.0006286 (其并且特别是其中概述的分化技术通过引用并入本文) 的技术将mHIP细胞分化成神经细胞。为了开始单层方案,将ES细胞以高密度(1.5 \times 10⁵个细胞/cm²)铺板在无血清培养基ESGRO完全克隆级培养基(Millipore)中。24小时后,将ES细胞轻轻解离,并在RHB-A或N2B27培养基(StemCell Science Inc.)中以1 \times 10⁴个细胞/cm²涂布在0.1% (v/v) 明胶包被的组织培养塑料上,每隔一天更换培养基。为了在第4天重新铺板,将细胞解离并以2 \times 10⁴个细胞/cm²铺板到补充有5ng/ml鼠bFGF (Peprotech) 的RHB-A培养基中的层粘连蛋白包被的组织培养塑料上。从这一点开始,每4天在相同条件下重新铺板细胞,并且每2天更换培养基,培养总共20天。为了量化每个时间点的分化神经元的数量,将细胞铺板到24孔Nunc板中的层粘连蛋白包被的玻璃盖玻片上,并且在铺板后2天,将培养基更换为RHB-A:Neurobasal:B27混合物(1:1:0.02),以允许分化神经元的更好存活。

[0276] 平滑肌细胞:使用改编自Huang等人,Biochem Biophys Res Commun 2006:351 (2) 321-7 (其并且特别是其中概述的分化技术通过引用并入本文) 的技术将mHIP细胞分化成SM细胞。将重悬浮的iPSC分别在6孔、明胶包被的塑料培养皿(Falcon,Becton-Dickinson)上以每孔2mio细胞在37°C、5%CO₂下在2ml分化培养基中在10 μ M aTRA的存在下培养。分化培养基由DMEM、15%胎牛血清、2mM L-谷氨酰胺、1mM MTG (Sigma)、1%非必需氨基酸、青霉素和链霉素制成。继续培养10天,每天更换新鲜培养基。

[0277] 从第11天开始,用无血清培养基(其由敲除DMEM、15%敲除血清替代物、2mM L-谷氨酰胺、1mM MTG、1%非必需氨基酸、青霉素和链霉素组成)替换分化培养基。继续培养另外10天,每天更换无血清培养基。

[0278] 心肌细胞:使用改编自Kattman等人,Cell Stem Cell 8:228-240 (2011) (其并且特别是其中概述的分化技术通过引用并入本文) 的技术将mHIP细胞分化成CM细胞。

[0279] 内皮细胞:如已知的,将mHIP细胞分化成内皮细胞。

[0280] F. 实施例4:HIP细胞衍生物的同种异体移植显示在完全免疫活性受体中的长期存活

[0281] a. 小鼠：

[0282] BALB/c (BALB/cAnNCr1, H2d)、C57BL/6 (C57BL/6J, B6, H2b)、裸BALB/c (BALB/c NU/NU, CAnN.CgFoxn1<nu>/Cr1, H2d) 和米色Scid (CBySmm.CB17-Prkdcscid/J) (均为6-12周) 用作不同测定的受体 (均为6-12周龄)。每个实验组的动物数量显示在每个图中。小鼠购自 Charles River Laboratories (Sulzfeld, Germany) 并按照实验动物原理指南接受人道护理。动物实验经Hamburg “Amt für Gesundheit und Verbraucherschutz” 批准，并根据当地和欧盟指南进行。

[0283] b. 通过RT-PCR和IF进行多能性分析：

[0284] 将miPSC铺板在24孔板中，并在铺板后48小时进行RT-PCR和免疫荧光 (IF) 分析。对于ICC，使用Image-iTTM Fixation/Permeabilization Kit (Thermo Fisher目录号，R37602) 将细胞固定、透化并封闭。将细胞在4°C下用针对Sox2、SSEA-1、Oct4和碱性磷酸酶的一抗染色过夜。几次洗涤后，将细胞与AlexaFluor 488二抗和NucBlue Fixed Cell ReadyProbes Reagent (均为Thermo Fisher Scientific) 一起孵育。使用荧光显微镜对染色的细胞成像。

[0285] 对于RT-PCR，使用PureLinkTM RNA Mini Kit (Thermo Fisher目录号12183018A) 提取RNA。包括DNA酶I步骤以去除污染性基因组DNA。使用Applied **Biosystems**[®] High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit产生cDNA。还从所有RNA样品中产生无逆转录酶 (无-RT) 对照。使用AmpliTaq **Gol®** 360Master Mix (Thermo Fisher目录号4398876) 使用基因特异性引物扩增靶序列。在2%琼脂糖凝胶上观察PCR反应。包括扩增编码细胞骨架蛋白的组成型表达的管家基因 (Actb) 的阳性对照引物组。

[0286] c. 小鼠iPSC的基因编辑：

[0287] miPSC经历3个基因编辑步骤。第一，将靶向小鼠B2m基因的编码序列的CRISPR退火并连接到含有Cas9表达盒的载体中。将转染的miPSC解离成单个细胞，扩增成集落，测序并测试同源性。第二，用含有靶向Ciita (MHC II分子的主要调节因子) 的CRISPR的载体转染这些B2m-/-miPSC。对扩增的单细胞集落进行测序，并通过来自CRISPR切割位点的异常序列的存在鉴定B2m-/-Ciita-/-克隆。第三，合成Cd47基因序列，将DNA克隆到具有杀稻瘟素抗性的质粒慢病毒中。将B2m-/-Ciita-/-miPSC转染并在杀稻瘟素存在下生长。测试经抗生素选择的池的Cd47过表达，并扩增B2m-/-Ciita-/-Cd47 tg miPSC。FACS分析显示wt miPSC中的高MHC I表达、适度但可检测的MHC II表达以及可忽略的Cd47表达。证实了在相关产生的miPSC系中缺乏MHC I表达、MHC II表达和Cd47过表达。测试所有改造的miPSC系的多能性。这在3个改造步骤后在B2m-/-Ciita-/-Cd47 tg miPSC中得到证实，并且它们具有形成来自所有3个胚层的细胞的潜力。

[0288] d. 生成B2m-/-miPSC：

[0289] CRISPR技术用于敲除B2m基因。为了靶向小鼠β-2-微球蛋白 (B2m) 基因的编码序列，根据试剂盒的说明书 (GeneArt CRISPR Nuclease Vector Kit, Thermo Fischer, Waltham, MA) 将CRISPR序列5' -TTCGGCTTCCCATTCTCCGG (TGG) -3' 退火并连接到含有Cas9表达盒的A11-In-One (A10) 载体中。使用具有20ms持续时间的两个1200V脉冲的Neon电穿孔用A10载体转染miPSC。使用0.05%胰蛋白酶 (Gibco) 将转染的iPSC培养物解离成单细胞，然后用FACSAria细胞分选仪 (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ) 分选以通过在前向和侧向散

射发射上选择性门控来去除双联体和碎片。将单细胞扩增成全尺寸集落，并通过筛选来自CRISPR切割位点的异常序列的存在来测试CRISPR编辑。简言之，使用AmpliTaq Gold Mastermix (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) 和引物B2m gDNA F: 5' - CTGGATCAGACATATGTGTTGGGA-3' , R: 5' -GCAAAGCAGTTAACAGACAG-3' 通过PCR扩增靶序列。在获得的PCR产物的净化 (**PureLink® Pro 96PCR Purification Kit**, Thermo Fisher) 后，进行Sanger测序。使用Ion Personal Genome Machine (PGM) 测序鉴定同源性，使用引物B2m gDNA PGM F: 5' -TTTCAAAATGTGGTAGACTTG-3' 和 R: 5' -GGATTCATGTGAGGCGGGT-3' 通过PCR扩增B2m基因的250bp区域。如前所述纯化PCR产物，并使用Ion PGM Hi-Q Template Kit (Thermo Fisher) 进行制备。使用Ion 318™ Chip Kit v2 (Thermo Fisher) 在Ion PGM™ System上进行实验。再次进行多能性分析。

[0290] 如先前在本领域中报道的，未观察到B2m-/-iPSC的生长速率或分化能力降低。

[0291] e. 生成B2m-/-和Ciita-/-miPSC:

[0292] CRISPR技术用于Ciita基因的额外敲除。为了靶向小鼠Ciita基因的编码序列，根据试剂盒的说明书 (GeneArt CRISPR Nuclease Vector Kit, Thermo Fischer, Waltham, MA) 将CRISPR序列5' -GGTCCATCTGGTCATAGAGG (CGG) -3' 退火并连接到含有Cas9表达盒的All-In-One (AIO) 载体中。使用与B2m-KO相同的条件，用AIO载体转染miPSC。使用0.05%胰蛋白酶 (Gibco) 将转染的miPSC培养物解离成单细胞，然后用FACSAria细胞分选仪 (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ) 分选以通过在前向和侧向散射发射上选择性门控来去除双联体和碎片。将单细胞扩增成全尺寸集落，并通过筛选来自CRISPR切割位点的异常序列的存在来测试CRISPR编辑。简言之，使用AmpliTaq Gold Mastermix (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) 和引物Ciita gDNA F: 5' -CCCCCAGAACGATGAGCTT-3' , R: 5' -TGCAGAAGTCCTGAGAAGGCC-3' 通过PCR扩增靶序列。在获得的PCR产物的净化 (**PureLink® Pro 96PCR Purification Kit**, Thermo Fisher) 后，进行Sanger测序。通过使用DNA序列色谱图，然后通过来自CRISPR切割位点的异常序列的存在鉴定编辑的克隆。使用TIDE工具计算Indel大小。再次进行PCR和ICC以验证细胞的多能性状态。

[0293] f. 生成B2m-/-Ciita-/-Cd47 tg miPSC:

[0294] 在含有抗生素抗性盒式杀稻瘟素的Cd47表达载体的慢病毒介导的递送后，通过抗生素抗性选择产生细胞系B2m-KO、Ciita-KO和Cd47-tg iPSC。合成Cd47基因序列，并将DNA克隆到含有杀稻瘟素抗性标记的质粒慢病毒pLenti6/V5 (ThermoFisher) 中。进行Sanger测序以验证没有发生突变。以 1×10^7 TU/ml的原液滴度进行慢病毒生成。将重组载体转导到 2×10^5 个B2m-/-Ciita-/-miPSC中，在杀稻瘟素抗性MEF细胞上生长72小时，MOI比为1:10，然后用12.5 μ g/ml杀稻瘟素抗生素选择7天。通过Cd47 mRNA的RT-qPCR扩增和Cd47的流式细胞术检测来测试抗生素选择的库。确认Cd47后，扩增细胞并通过进行多能性测定确认。

[0295] g. iPSC衍生的内皮细胞 (iEC) 的衍生和表征:

[0296] 使用三维方法衍生iEC。简言之，为了起始分化，在缺乏白血病抑制因子 (LIF) 的情况下，在超低、非粘性培养皿中培养iPSC以在EBM2培养基 (Lonza) 中形成胚状体 (EB) 聚集体。悬浮培养4天后，将EB重新附着在0.2%明胶包被的培养皿上，并在补充有VEGF-A165 (50ng/mL; PeproTech) 的EBM2培养基中培养。分化3周后，使用细胞解离缓冲液 (Life Technologies) 获得单细胞悬浮液，并用APC-缀合的CD31 (eBiosciences) 和PE-缀合的

CD144 (BD Biosciences) 抗小鼠抗体标记。通过CD31+CD144+群体的荧光激活细胞分选 (FACS) 纯化iEC。将iEC维持在补充有重组鼠血管内皮生长因子 (50ng/ml) 的EBM2培养基中。

[0297] 通过CD31和VE钙粘蛋白的免疫荧光以及通过PCR和管形成测定来证实它们的表型,以证明内皮功能形成成熟前血管结构。注:在0.1%明胶或基质胶上使用汇合的iPSC单层细胞的分化方案也是成功的。注:其他内皮细胞培养基也已成功使用。

[0298] h. iPSC衍生的平滑肌细胞 (iSMC) 的衍生和表征:

[0299] 将重悬的iPSC在6孔、0.1%明胶包被的塑料培养皿 (Falcon, Becton-Dickinson) 上以每孔2mio细胞在37°C、5%CO₂下在10μM的存在下在2ml分化培养基中培养。分化培养基由DMEM、15%胎牛血清、2mM L-谷氨酰胺、1mM MTG (Sigma)、1%非必需氨基酸、青霉素和链霉素制成。继续培养10天,每天更换培养基。

[0300] 从第11天开始,用敲除DMEM的无血清培养基 (15%敲除血清替代物,2mM L-谷氨酰胺,1mM MTG,1%非必需氨基酸,青霉素和链霉素) 替换分化培养基。继续培养另外10天,每天更换无血清培养基。通过免疫荧光和PCR确认SMA和SM22的表型。

[0301] i. iPSC衍生的心肌细胞 (iCM) 的衍生和表征:

[0302] 在分化之前,将iPSC在明胶包被的培养皿上传代两次以除去饲养细胞。简言之,将iPSC用TrypLE (Invitrogen) 解离,并以75,000-100,000个细胞/ml在无任何额外的生长因子的情况下培养48小时。将3日大的EB解离,并将细胞在“心脏条件”下分化。简言之,将6×10⁴-10×10⁴个细胞在补充有2mM L-谷氨酰胺、1mM抗坏血酸 (Sigma)、人-VEGF (5ng/ml)、人-DKK1 (150ng/ml)、人bFGF (10ng/ml) 和人FGF10 (12.5ng/ml) (R&D Systems) 的StemPro-34SF 培养基 (Invitrogen) 中铺板到明胶包被的96孔平底板 (Becton Dickenson, Franklin Lakes, NJ) 的各个孔中。4或5天后收获培养物 (总共7或8天)。

[0303] 通过IF就肌钙蛋白I和肌节α肌动蛋白以及通过PCR就Gata4和Mhy6证实了它们的表型。细胞在8-10天之间开始跳动。这证明了它们的功能分化。

[0304] j. iPSC衍生的胰岛细胞 (iIC) 的衍生和表征

[0305] 将iPS细胞转移到明胶包被的培养瓶上30分钟以除去饲养层,并以每孔1×10⁶个细胞在补充有2mM谷氨酰胺、100μM非必需氨基酸、10ng/mL活化素A、10mM烟酰胺和1μg/mL层粘连蛋白以及10%FBS的DMEM/F-12培养基中铺板到胶原蛋白I包被的平板上过夜。接着将ES-D3细胞暴露于补充有2mM L-谷氨酰胺、100μM非必需氨基酸、10ng/mL活化素A、10mM烟酰胺、25μg/mL胰岛素和1μg/mL层粘连蛋白以及2%FBS的DMEM/F-12培养基中6天。它们的表型通过针对c肽的免疫荧光,针对胰高血糖素、Ngn3、淀粉酶、胰岛素2、生长抑素和胰岛素产生的PCR来证实。

[0306] k. iPSC衍生神经细胞 (iNC) 的衍生和表征

[0307] 为了开始单层方案,将iPSC轻轻解离并在RHB-A或N2B27培养基 (StemCell Science Inc.) 中以1×10⁴个细胞/cm²铺板到0.1%明胶包被的组织培养塑料上,每隔一天更换培养基。为了在第4天重新铺板,将细胞解离并在补充有5ng/ml鼠bFGF (Peprotech) 的RHB-A培养基中以2×10⁴个细胞/cm²铺板到层粘连蛋白包被的组织培养塑料上。从这一点开始,每4天在相同条件下重新铺板细胞,并且每2天更换培养基,培养总共20天。为了量化每个时间点的分化神经元的数量,将细胞铺板到24孔Nunc板上的层粘连蛋白包被的玻璃盖玻片上,并且在铺板后2天,将培养基更换为RHB-A:Neurobasal:B27混合物 (1:1:0.02),以允

许多分化神经元的更好存活。它们的表型通过IF对Tuj-1和巢蛋白进行确认。

[0308] 1. Elispot测定

[0309] 对于单向酶联免疫斑点(Elispot)测定,在细胞注射后5天从新鲜脾中分离受体脾细胞(miPSC,miPSC B2m-/-或miPSC B2m-/-Ciita-/-或miPSC B2m-/-Ciita-/-Cd47 tg)并用作应答细胞。供体细胞(miPSC,miPSC B2m-/-或miPSC B2m-/-Ciita-/-或miPSC B2m-/-Ciita-/-Cd47 tg)被丝裂霉素抑制并用作刺激细胞。将10⁶个刺激细胞与5×10⁵个受体应答脾细胞一起孵育24小时,并使用Elispot平板读数器自动计数IFN γ 和IL-4斑点频率。在所有测定中进行一式四份。

[0310] m. 用于研究体内iPSC存活的畸胎瘤测定

[0311] 将6周龄的同基因或同种异体小鼠用于移植wt iPSC或非免疫原性iPSC。将1×10⁶个细胞以100μl注射到小鼠的右大腿肌肉中。每隔一天常规观察移植的动物,并用卡尺测量肿瘤生长。在发展成大于1.5cm³的肿瘤后或在100天的观察期后将它们处死。

[0312] n. 体外NK细胞测定

[0313] 通过流式细胞术测量与wt iPSC或HIP细胞共培养后NK细胞上的CD107表达作为NK细胞活化标志物。使用Elispot原理,将NK细胞与wt iPSC或HIP细胞共培养,并测量它们的IFN- γ 释放。

[0314] 根据“缺失的自我理论”,已经证明MHC I缺陷的干细胞对NK杀伤敏感,因为鼠和人PSC均表达激活NK受体的配体。尽管据报道活化受体的表达随着分化而减少,但已观察到NK杀死B2m-/-衍生物。尽管已经使用人多能干细胞中HLA-E或HLA-G的分离表达来减轻HLA I-/-细胞中预期的先天免疫应答,但其中存在非常有效的额外抑制性非MHC配体。本发明提供了发现Cd47是一种令人惊讶的有效的先天免疫清除抑制剂。

[0315] o. 小鼠数据概述

[0316] 将所有改造的miPSC系移植到同基因C57BL/6和同种异体BALB/c受体中而没有任何免疫抑制。虽然所有改造细胞在同基因受体中类似地发展畸胎瘤,但它们的存活依赖于它们在同种异体受体中的低免疫原性水平。观察到在BALB/c中B2m-/-miPSC的60%畸胎瘤形成、轻微的Elispot反应以及可测量的IgM抗体反应。在B2m-/-Ciita-/-miPSC中,看到同种异体BALB/c中91.7%的畸胎瘤形成、较少的Elispot反应以及没有抗体反应。最终的B2m-/-Ciita-/-Cd47 tg miPSC系显示了100%畸胎瘤形成,并且没有Elispot或抗体反应。通过比较B2m-/-Ciita-/-miPSC与B2m-/-Ciita-/-Cd47 tg miPSC,在先天免疫测定中另外评估了Cd47过表达的贡献。Cd47过表达显著降低NK细胞CD107表达和NK细胞IFN- γ 释放,从而减轻先天免疫清除。总之,每个改造步骤已使miPSC具有更低的免疫原性。

[0317] B2m-/-Ciita-/-HIP细胞分化为低免疫原性内皮样细胞(miEC)、平滑肌样细胞(miSMC)和心肌样细胞(miCM)。“野生型”miPSC衍生物(即来自未改造的miPSC)用作对照。所有衍生物均显示其预期的成熟组织细胞系的典型形态外观、细胞标志物免疫荧光和基因表达。与其亲本miPSC系相比,wt衍生物中MHC I和II分子的表达通常大大上调,但是细胞类型显著不同。如所预期的,miEC具有MHC I和MHC II的目前为止最高的表达,miSMC具有中等MHC I和MHC II表达,而miCM具有中等MHC I但非常低的MHC II表达。所有wt衍生物具有相当低的Cd47表达,但是与miPSC相比也略微上升。所有B2m-/-Ciita-/-Cd47 tg衍生物适当地显示完全缺乏MHC I和MHC II以及比它们的wt对应物显著更高的Cd47。

[0318] 将含有 5×10^5 个wt miEC、miSMC和miCM的基质胶塞移植到同基因C57BL/6或同种异体BALB/c小鼠的皮下小袋中。5天后,所有同种异体受体均对这些分化的wt细胞移植植物产生强烈的细胞免疫应答以及强IgM抗体反应。形成鲜明对比的是,相应的B2m^{-/-}Ciita^{-/-}Cd47^{tg} (HIP) 衍生物均未显示IFN- γ Elispot频率或IgM抗体产生的可检测的增加。

[0319] 还证实了移植细胞的形态。将同种异体小鼠置于诱导室中并用2%异氟烷 (Isothesia, Butler Schein) 诱导麻醉。将250 μ l 0.9%生理盐水中的1mio细胞 (HIP miPSC衍生的心肌细胞 (miCM)、HIP miPSC衍生的平滑肌细胞 (miSMC) 或HIP miPSC衍生的内皮细胞 (miEC)) 与250 μ l BD基质胶高浓度 (1:1; BD Biosciences) 混合并使用23-G注射器皮下注射到小鼠的下背部。在植入后1、2、3、4、5、6、8、10和12周取出基质胶塞,并用4%多聚甲醛和1%谷氨醛固定24小时,然后脱水并包埋在石蜡中。切割5 μ m厚的切片并用苏木精和曙红 (HE) 染色。组织学证实形态学充分的miCM、miSMC和miEC。

[0320] G. 实施例5:人iPSC的产生

[0321] 使用基于三质粒、七因子 (SOKMNLT; SOX2, OCT4 (POU5F1), KLF4, MYC, NANOG, LIN28 和SV40L T抗原) EBNA的附加型系统从CD34+脐带血 (目录号A33124, Thermo Fisher Scientific) 衍生人附加型iPSC系。该iPSC系被认为是零足迹的,因为没有从重编程事件整合到基因组中。已经证明它不含所有重编程基因。iPSC具有正常的XX核型和多能标志物如Oct4、Sox2和Nanog (如RT-PCR所示) 和Oct4、SSEA4、TRA-1-60和TRA-1-81 (如ICC所示) 的内源表达。在定向分化和畸胎瘤分析中,这些hiPSC保留了其对外胚层、内胚层和中胚层谱系的分化潜能。此外,以稳健的效率衍生血管、内皮和心脏谱系。

[0322] 注:成功使用了几种用于iPSC生成的基因递送载体,包括逆转录病毒载体、腺病毒载体、仙台病毒以及无病毒重编程方法 (使用附加型载体、piggyBac转座子、合成mRNA、微RNA、重组蛋白和小分子药物等)。

[0323] 注:不同因子成功用于重编程,例如第一次报道的OCT3/4、SOX2、KLF4和C-MYC的组合,称为Yamanaka因子。在一个实施方案中,尽管具有降低的重编程效率,但是这些因子中的仅三个成功地组合并且省略了C-MYC。

[0324] 在一个实施方案中,L-MYC或GLIS1代替C-MYC显示出改善的重编程效率。在另一个实施方案中,重编程因子不限于与多能性相关的基因。

[0325] a. 统计学

[0326] 所有数据表示为平均值 \pm SD或显示中值和最小至最大范围的箱形图。通过非配对学生t检验或单因素方差分析 (ANOVA) 与Bonferroni的postHoc检验适当评估组间差异。 $*p < 0.05, **p < 0.01$ 。

[0327] H. 实施例6:人HIP细胞的产生

[0328] 人Cas9 iPSC经历了双基因编辑步骤。在第一步中,通过使用CRISPR序列5' - CGTGAGTAAACCTGAATCTT-3' 的人 β -2-微球蛋白 (B2M) 基因的编码序列和使用CRISPR序列5' - GATATTGCCATAAGCCTCCC-3' 的人CIITA基因的编码序列的组合靶向进行CRISPR技术。使用具有T7启动子的线性化CRISPR序列根据试剂盒的说明书 (MEGashortscript T7Transcription Kit, Thermo Fisher) 合成gRNA。然后通过MEGAclear Transcription Clean-Up Kit纯化收集的体外转录 (IVT) gRNA。对于IVT gRNA递送,使用Neon电穿孔系统用300ng IVT gRNA电穿孔单细胞。电穿孔后,编辑的Cas9 iPSC被扩增用于单细胞接种: 使用

TrypLE (Gibco) 将iPSC培养物解离成单细胞, 并用Tra1-60 Alexa Fluor® 488和碘化丙啶(PI)染色。使用FACS Aria细胞分选仪(BD Biosciences)进行分选, 并通过对前向和侧向散射发射的选择性门控将双联体和碎片排除在接种之外。在不存在PI和存在Tra1-60 Alexa Fluor 488染色的情况下选择存活的多能细胞。然后将单细胞扩增成全尺寸集落, 之后测试集落的CRISPR编辑。使用GeneArt Genomic Cleavage Detection Kit (Thermo Fisher) 评估CRISPR介导的切割。从 1×10^6 个hiPSC分离基因组DNA, 并使用AmpliTaq Gold 360Master Mix 和用于B2M的引物组F: 5' - TGGGGGCCAATCATGTAGACTC-3' 和R: 5' - TCAGTGGGGTGAATTCACTGT-3' 以及用于CIITA的F: 5' -CTAACACAGCGATGCTGACCCC-3' 和R: 5' - TGGCCTCCATCTCCCCTCTCTT-3' 对B2M和CIITA基因组DNA区域进行PCR扩增。对于TIDE分析, 净化获得的PCR产物(PureLink PCR Purification Kit, Thermo Fisher)并进行Sanger测序以预测indel频率。确认B2M/CIITA敲除后, 通过核型分析和TaqMan hPSC Scorecard Panel (Thermo Fisher)进一步表征细胞。发现PSC是多能的并且在基因组编辑过程中维持正常的(46,XX)核型。

[0329] 在第二步中, 合成CD47基因, 并将DNA克隆到具有EF1a启动子和嘌呤霉素抗性的质粒慢病毒中。用 1×10^7 TU/mL的慢病毒原液和6 μ g/mL的Polybrene (Thermo Fisher) 转导细胞。转导后每天更换培养基。转导三天后, 扩增细胞并用0.5 μ g/mL嘌呤霉素选择。在抗生素选择5天后, 出现抗生素抗性集落并进一步扩增以产生稳定的库。CD47的水平由qPCR确认。再次进行多能性测定(TaqMan hPSC Scorecard Panel, Thermo Fisher)核型分析以验证细胞的多能状态。

[0330] I. 实施例7: 人HIP细胞的分化

[0331] 1.hHIP细胞向人心肌细胞的分化

[0332] 使用改编自Sharma等人, J.Vis Exp. 2015 doi:10.3791/52628 (其并且特别是用于分化细胞的技术通过引用以其全文并入本文)的方案进行此操作。将hiPSC铺板在6孔板中的稀释的基质胶(356231, Corning)上, 并维持在Essential 8Flex培养基(Thermo Fisher)中。在细胞达到90%汇合后, 开始分化并将培养基更换为含有2%B-27-胰岛素(Gibco)和6 μ M CHIR-99021(Selleck Chem)的5mL RPMI1640(Gibco)。2天后, 将培养基更换为含有2%B-27-胰岛素而不含CHIR的RPMI1640。在第3天, 将5 μ L IWR1加入培养基中进行另外两天。在第5天, 将培养基更换回含有2%B-27-胰岛素培养基的RPMI 1640并孵育48小时。在第7天, 将培养基更换为含有B27+胰岛素(Gibco)的RPMI 1640, 然后每隔3天用相同的培养基更换。在第10天至第12天首次可见心肌细胞的自发搏动。在分化后第10天进行心肌细胞的纯化。简言之, 将培养基更换为低葡萄糖培养基并保持3天。在第13天, 将培养基更换回含有B27-胰岛素的RPMI 1640。在第14天重复该过程。剩余的细胞是高度纯化的心肌细胞。

[0333] 2.hHIP细胞向人内皮细胞的分化

[0334] 将hiPSC铺板在6孔板中的稀释的基质胶(356231, Corning)上, 并维持在Essential 8Flex培养基(Thermo Fisher)中。在细胞达到60%汇合后, 开始分化并将培养基更换为含有2%B-27-胰岛素(Gibco)和5 μ M CHIR-99021(Selleck Chem)的RPMI1640。在第2天, 将培养基更换为还原培养基:含有2%B-27-胰岛素(Gibco)和2 μ M CHIR-99021(Selleck Chem)的RPMI1640。从第4天到第7天, 将细胞暴露于RPMI EC培养基, 含有2%B-27-胰岛素加50ng/mL血管内皮生长因子(VEGF; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)、10ng/

mL碱性成纤维细胞生长因子 (FGFb; R&D Systems)、10μM Y-27632 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) 和 1μM SB 431542 (Sigma-Aldrich) 的 RPMI1640。从第7天开始可见内皮细胞簇，并将细胞维持在EGM-2 SingleQuots培养基 (Lonza, Basel, Switzerland) 加10%FCS hi (Gibco)、25ng/mL血管内皮生长因子 (VEGF; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)、2ng/mL碱性成纤维细胞生长因子 (FGFb; R&D Systems)、10μM Y-27632 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) 和 1μM SB 431542 (Sigma-Aldrich) 中。分化过程在14天后完成，未分化的细胞在分化过程中脱离。对于纯化，细胞使用CD31微珠 (Miltenyi, Auburn, CA) 根据制造商的方案进行MACS过程。高度纯化的EC细胞在EGM-2 SingleQuots培养基 (Lonza, Basel, Switzerland) 加上补充物和10%FCS hi (Gibco) 中培养。使用TrypLE每3至4天以1:3传代细胞。

[0335] J. 人源化小鼠的移植

[0336] 将人源化NSG-SGM3小鼠置于诱导室中，并用2%异氟烷 (Isothesia, Butler Schein) 诱导麻醉。将含有ZVAD (100mM, 苯氧基羰基-Va1-Ala-Asp (0-甲基)-氟甲基酮, Calbiochem)、Bcl-XL BH4 (细胞渗透性TAT肽, 50nM, Calbiochem)、环孢菌素A (200nM, Sigma)、IGF-1 (100ng/ml, Peprotech) 和毗那地尔 (50mM, Sigma) 的250μl 0.9%生理盐水中的1mio细胞 (hiPSC衍生的心肌细胞 (hiCM) 或hiPSC衍生的内皮细胞 (hiEC) 与250μl BD基质胶高浓度 (1:1; BD Biosciences) 混合并使用23-G注射器皮下注射到小鼠的下背部。植入后2、4、6、8、10和12周取出基质胶塞，并用4%多聚甲醛和1%谷氨醛处理24h，然后脱水并包埋在石蜡中，切下5μm厚的切片并用苏木精和伊红 (HE) 染色，并确认形态。

[0337] IX. 示例性序列：

[0338] SEQ ID NO:1-人β-2-微球蛋白

[0339] MSRSVALAVLALLSLSGLEAIQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLKNGERIEKV
EHSDLFSKDWFSFYLLYYTEFTPTEKDEYACRVNHVTLSQPKIVKWDRDI

[0340] SEQ ID NO:2-人CIITA蛋白, 160个氨基酸N-末端

[0341] MRCLAPRPAGSYLSEPQGSSQCATMELGPLEGGYLELLNSDADPLCLYHFYDQMDLAGEEEIELYSEPD
TDTINCDQFSRLLCDMEGDEETREAYANIAELDQYVFQDSQLEGLSKDFKHIGPDEVIGESMEMPAEVGQKSQKRP
FPEELPADLKHWKP

[0342] SEQ ID NO:3-人CD47

[0343] MWPLVAALLGSACCGSAQLLFNKTVEFTFCNDTVVIPCFTVNMEAQNTEVYVWKFKGRDIYTFD
GALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDAKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTRGETIIELKYRVVSWFSPNENILIV
IFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIVTSTGILILL
HYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVE

[0344] SEQ ID NO:4-单纯疱疹病毒胸昔激酶 (HSV-tk)

[0345] MASYPCHQHASAFDQAARSRGHSNRRTALRPRRQQEATEVRLEQKMPTRLRVYIDGPHGMGKTTTQLL
VALGSRDDIVVPEPMTYWQVLGASETIANIYTTQHRLDQGEISAGDAAVVMTSAQITMGMPYAVTDAVLAPHVGGE
AGSSHAPPALTLIFDRHPIAALLCYPARYLMGSMTPQAVLAFVALIPPTLPGTNIVLGLPEDRHDRLAKRQRP
GERLDLAMLAIRRVYGLLANTVRYLQGGGSWWEDWGQLSGTAVPPQGAEPQSNAGPRPHIGDTLFTLRAPELLAP
NGDLYNVFAWALDVLAKRRLRPMHVFILDYDQSPAGCRDALLQLTSGMVQTHVTPGSIPTICDLARTFAREMGEAN

[0346] SEQ ID NO:5-大肠杆菌胞嘧啶脱氨酶 (EC-CD)

[0347] MSNNALQTIIARLPGEGLWQIHLQDGKISAIDAQSGVMPITENSLDAEQGLVIPPFFVEPHIHLDTTQ
TAGQPWNQSGTLLFEGIERWAERKALLTHDDVKQRAWQTLKWQIANGIQHVRTHVDVSDATLTALKAMLEVQEVAP
WIDLQIVAFPQEGILSYPNGEALLEEARLGADVGAIPHFEFTREYGVESLHKTFALAQKYDRLIDVHCDEIDDEQ
SRFVETVAALAHHEGMGARVTASHTTAMHSYNGAYTSRLFRLKMSGINFVANPLVNIHLQGRFDYPKRRGIRVK
EMLESGINVCFGHDDVFDPWYPLGTANMLQVLHMLHVCQLMGYQINDGLNLITHHSARTLNLQDYGIAAGNSANL
IILPAENGFDALRRQVPVRYSVRGGKVIASTQPAQTTVYLEQPEAIDYKR

[0348] SEQ ID NO:6-截短的人胱天蛋白酶9

[0349] GFGDVGAESLRGNADLAYILSMEPCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNIDCEKLRRRFSSLHFMVEV
KGDLTAKKMVLALLELAQQDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQFPGAVYGTGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPK
LFFIQACGGEQKDHGFEVASTSPEDESPGSNPEPDATPFQEGLRTFDQLDAISSLPTPSDIFVSYSTFPGFVSWRDP
KSGSWYVETLDDIFEQWAHSEDLQSLLRVANAVSVKGIIYKQMPGCFNFLRKKLFFKTS

[0350] 本文公开或提及的所有出版物和专利文献均通过引用以其全文并入。已经出于举例说明和描述的目的呈现了前面的描述。该描述并非旨在将本发明限制于所公开的精确形式。本发明的范围旨在由所附权利要求书限定。

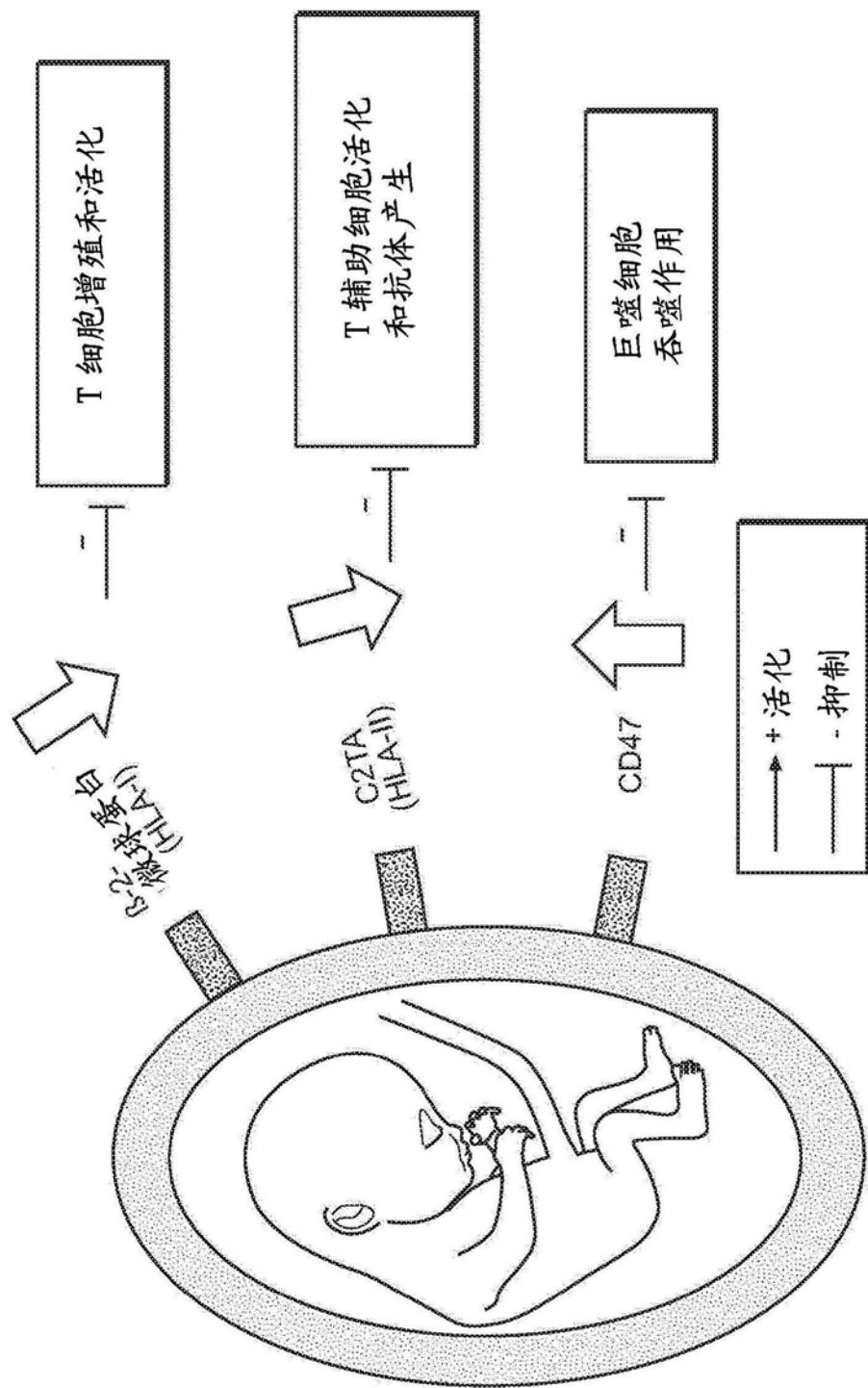


图1A

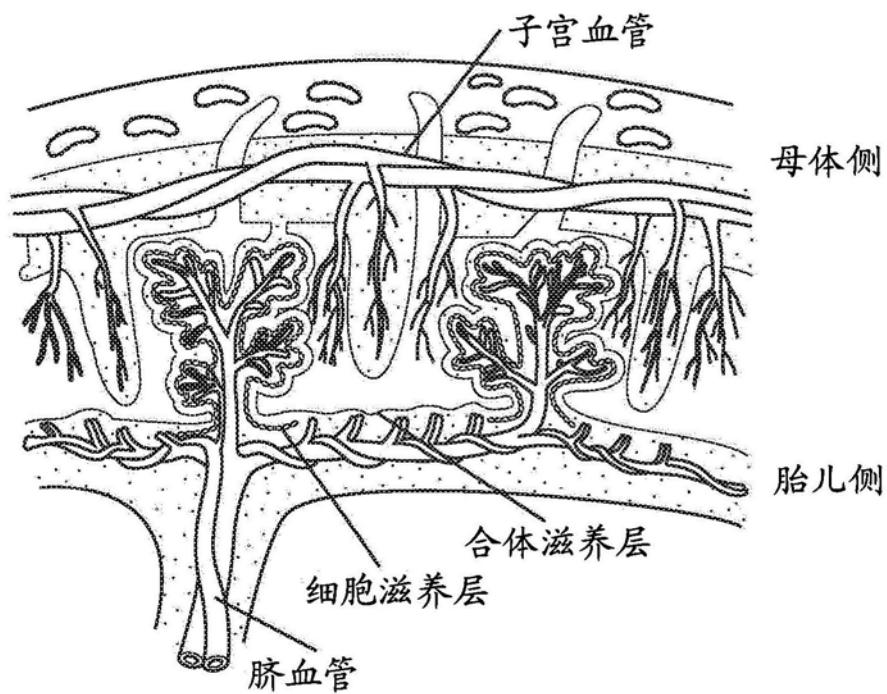


图1B

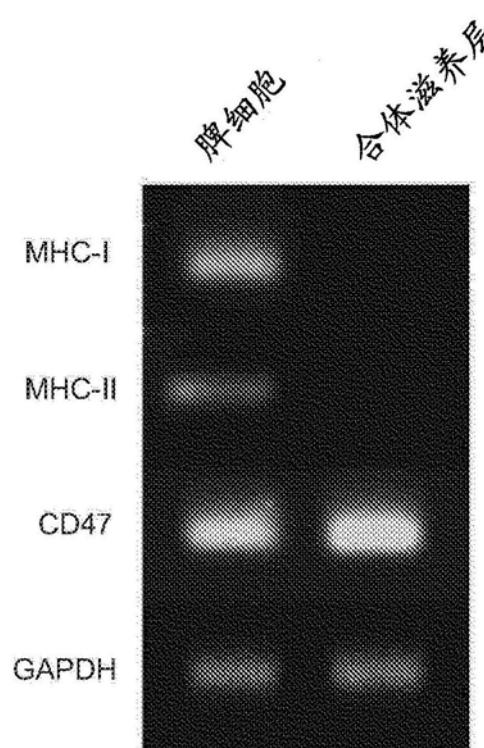


图1C

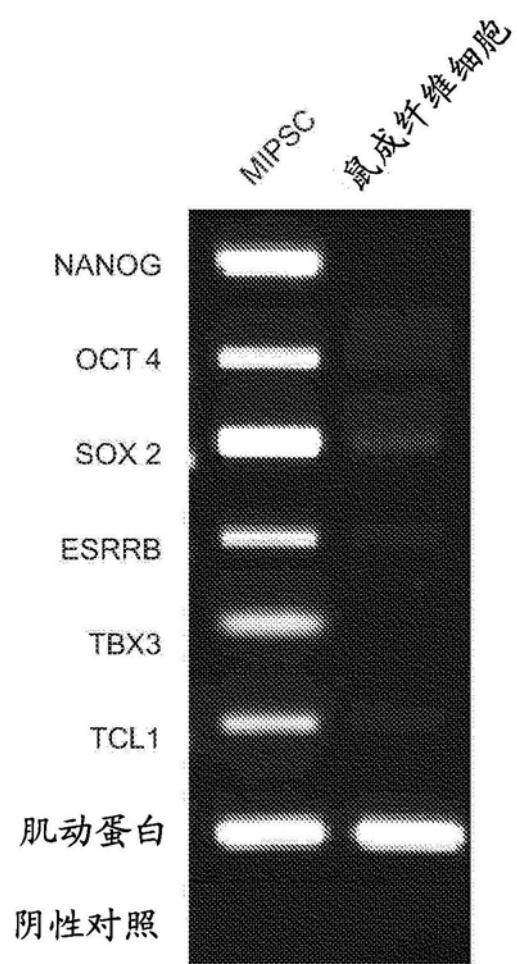


图2

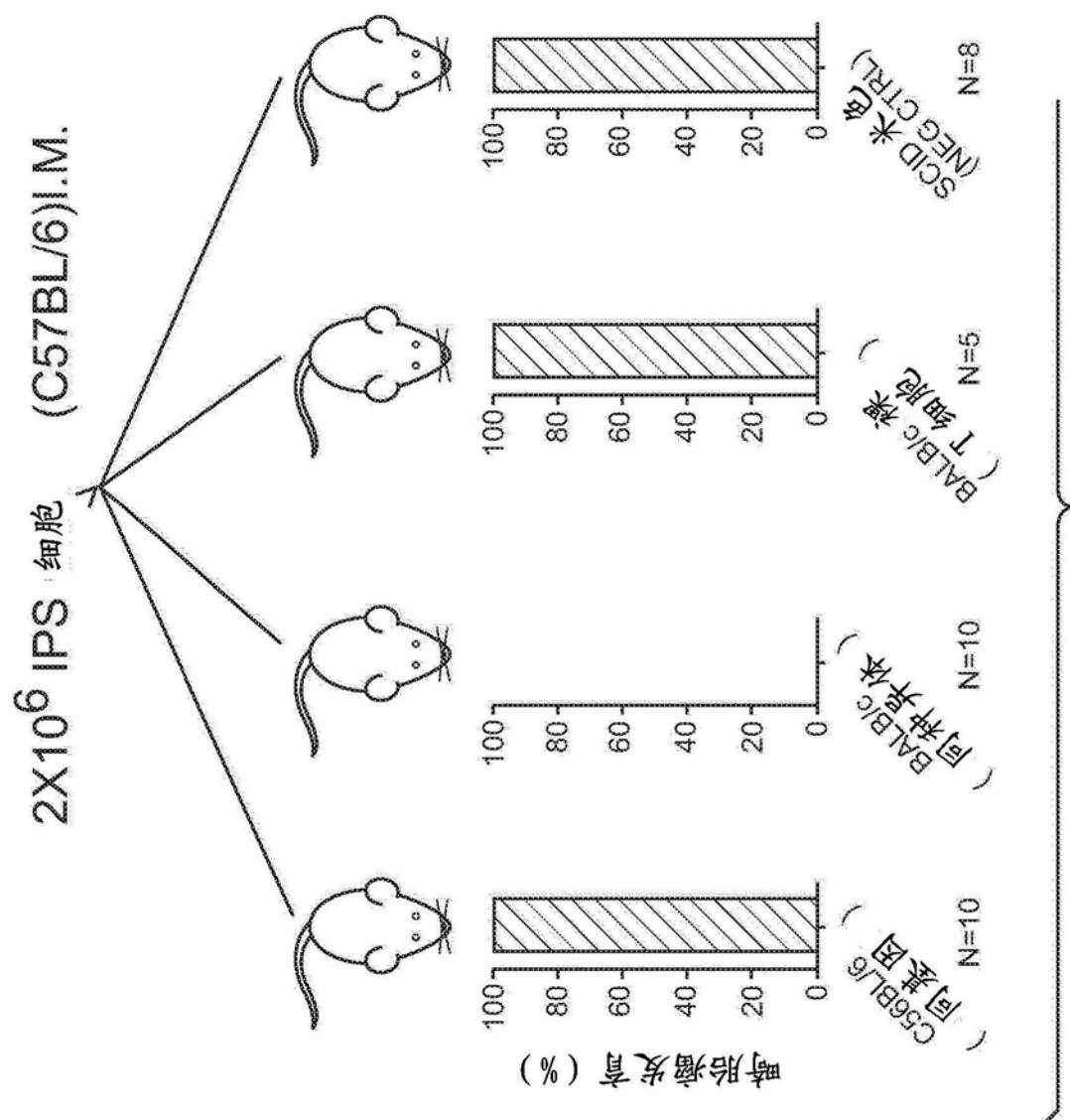


图3

图3

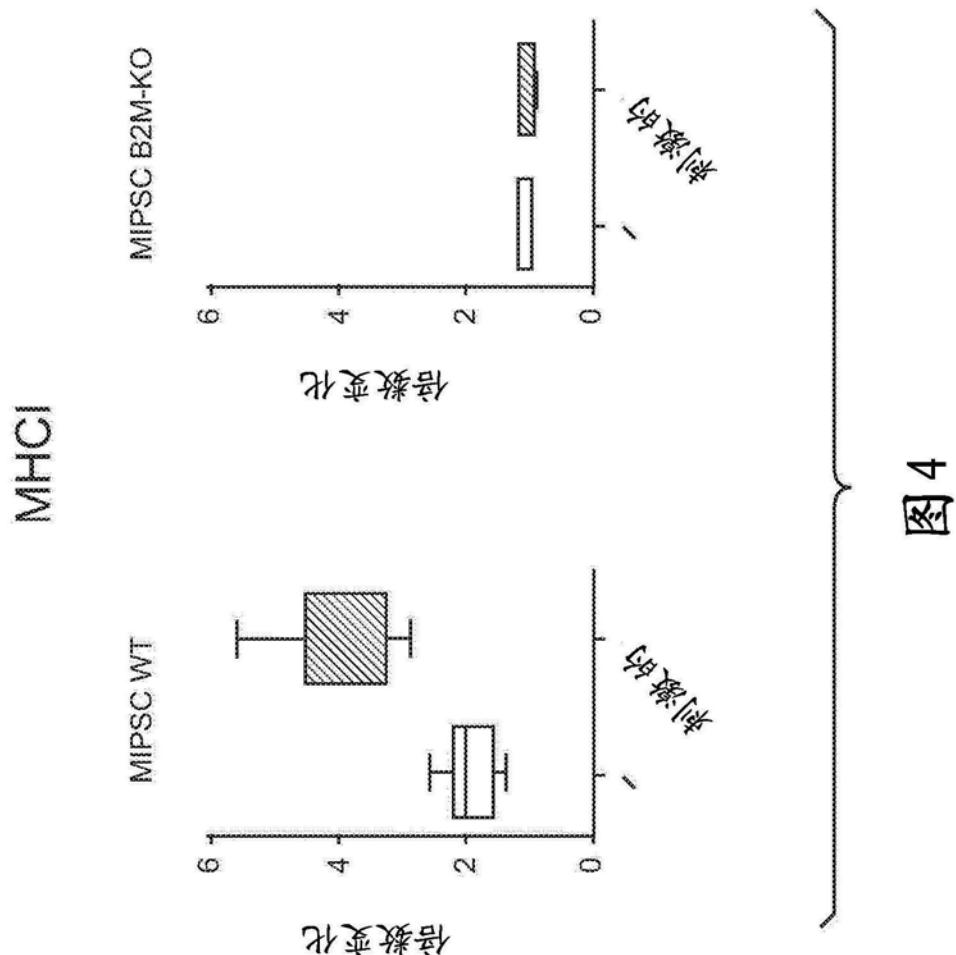


图4

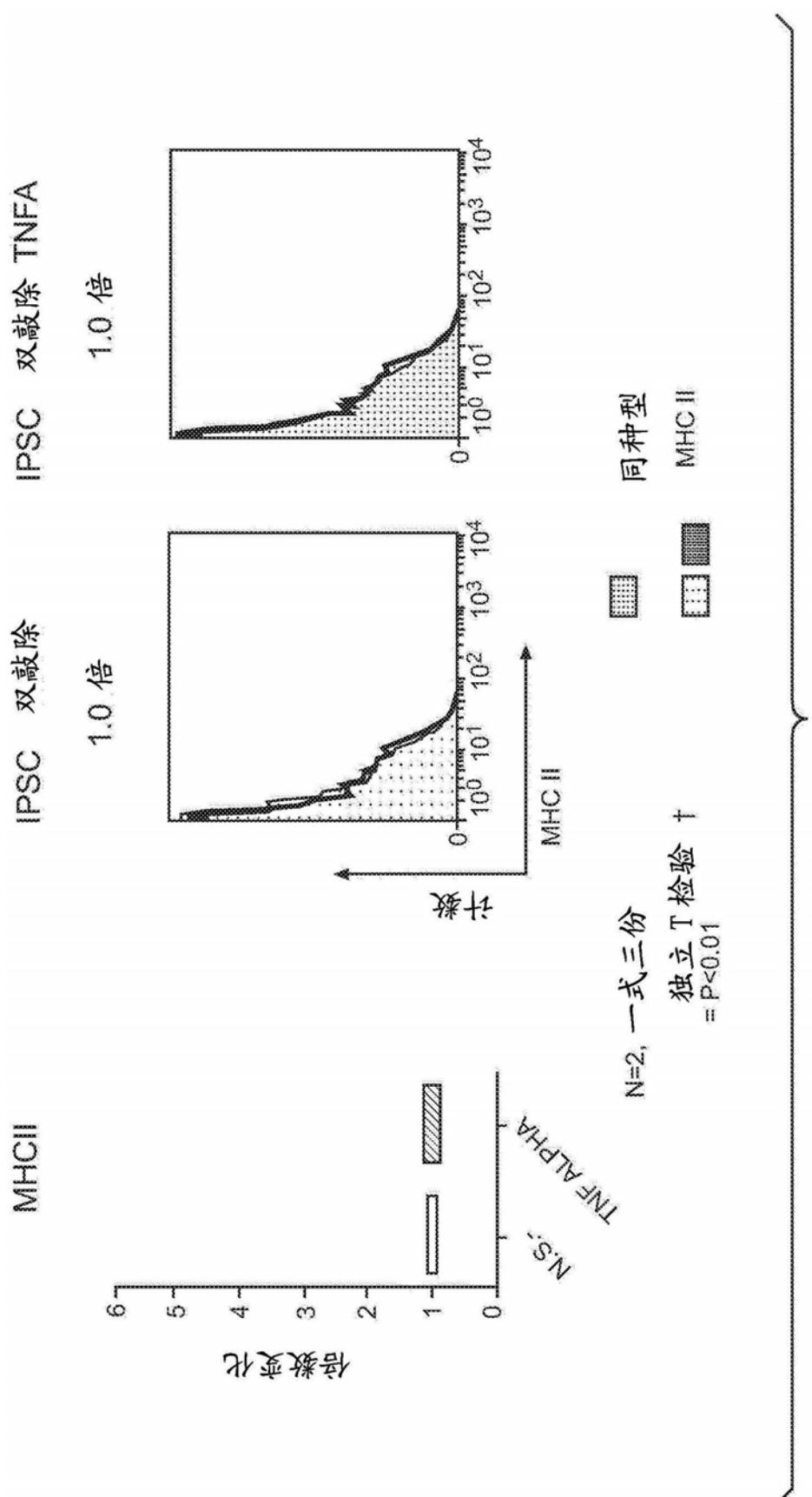


图 5

图5

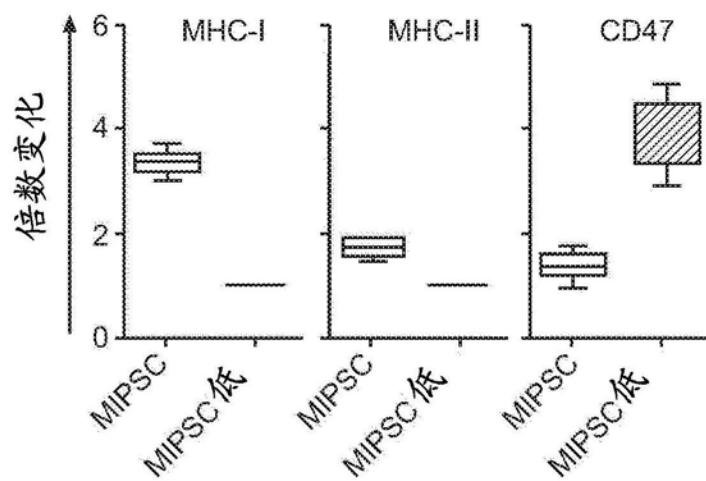


图6A

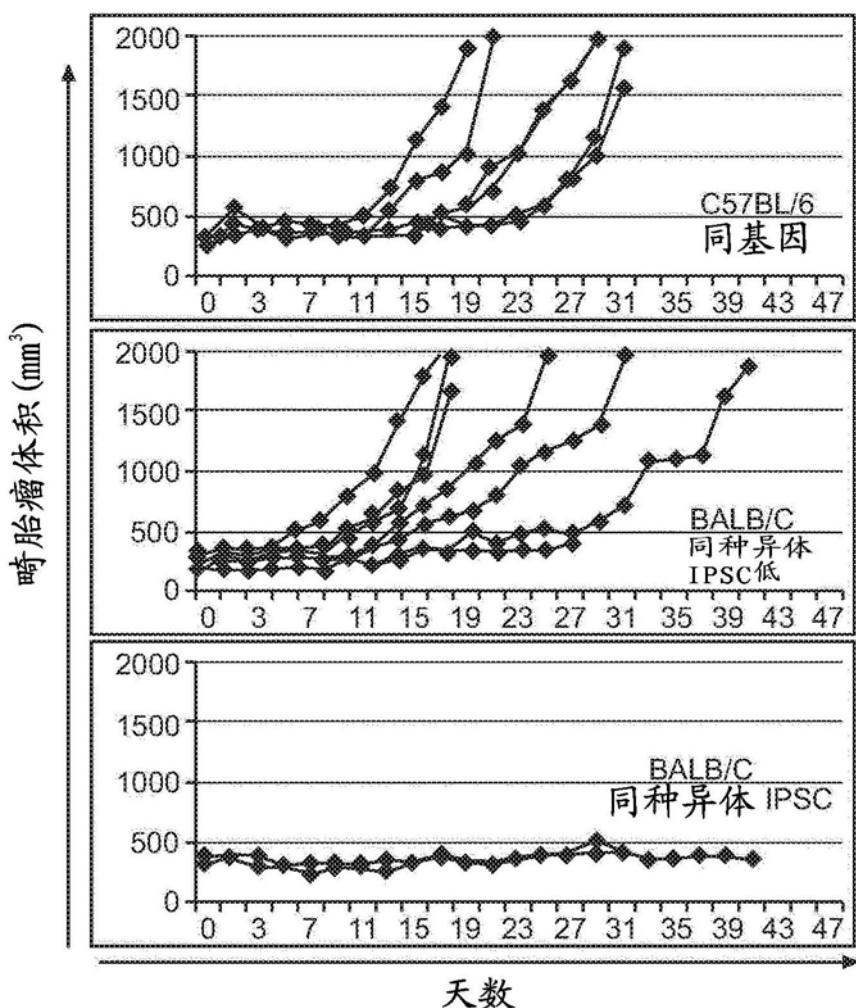


图6B

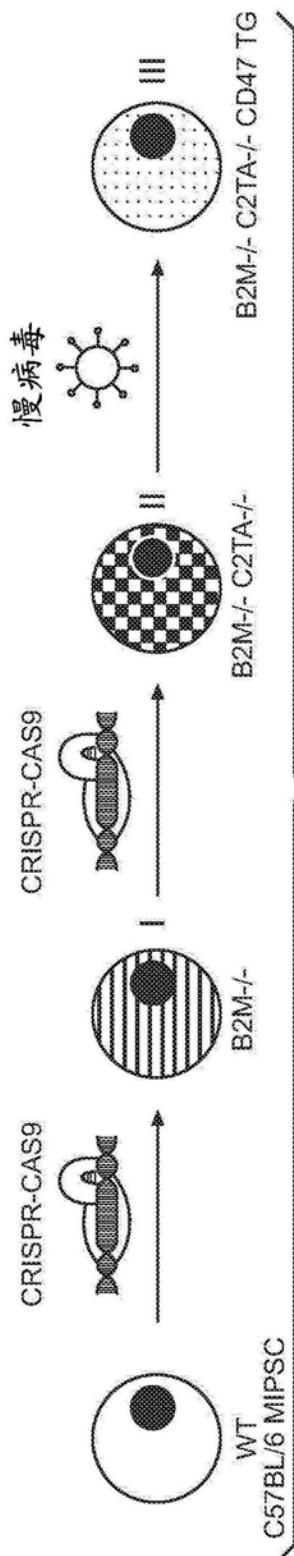


图 7

通过 C2TA 敲除耗尽 MHC II

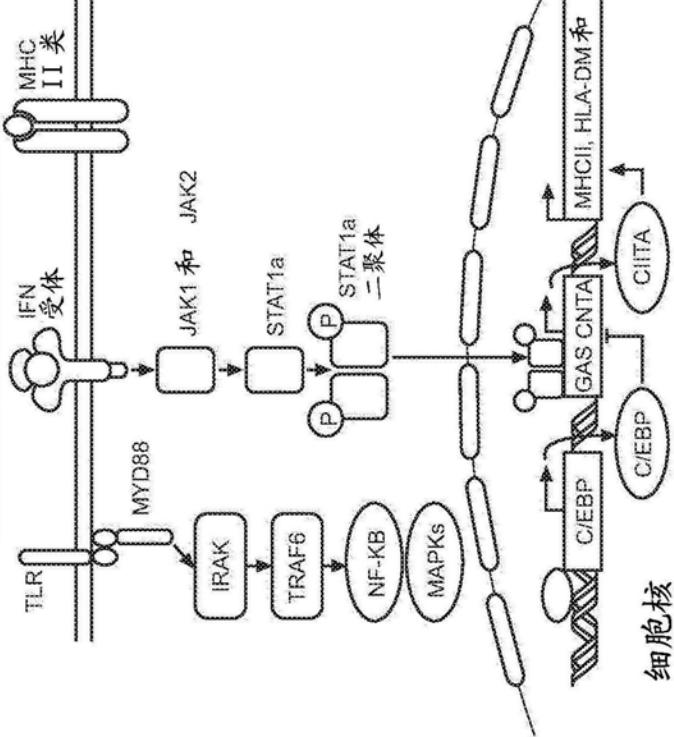


图 8B

通过 B2M 敲除耗尽 MHC I

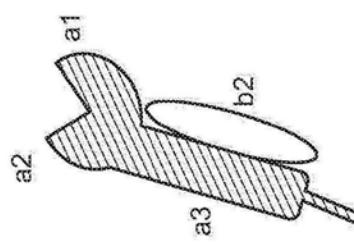
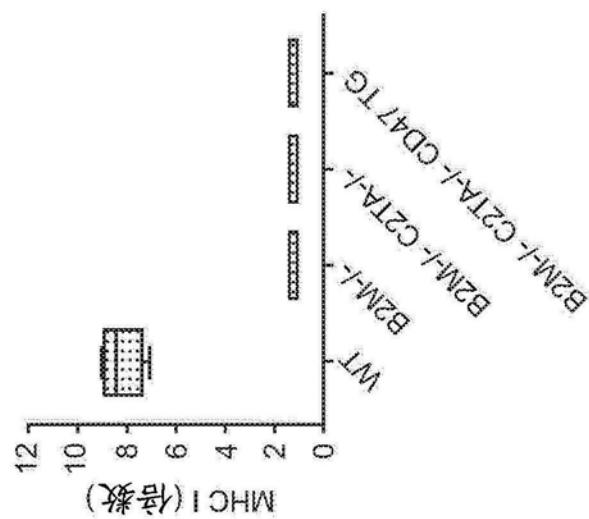
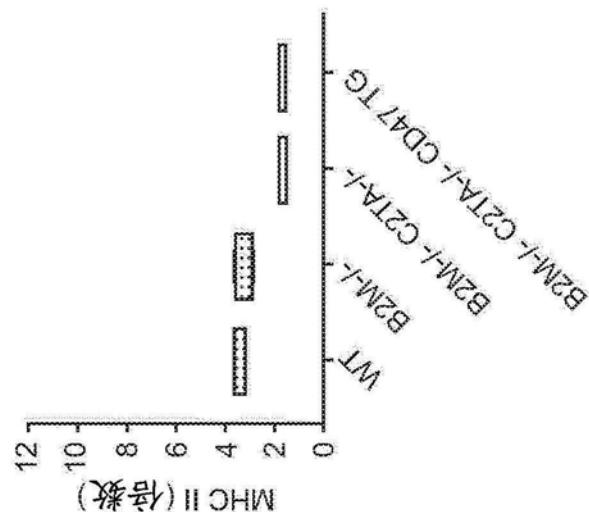


图 8A



图A6



图B6

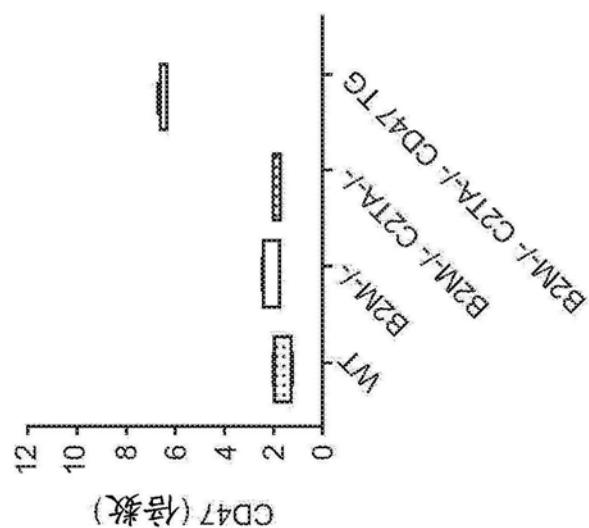
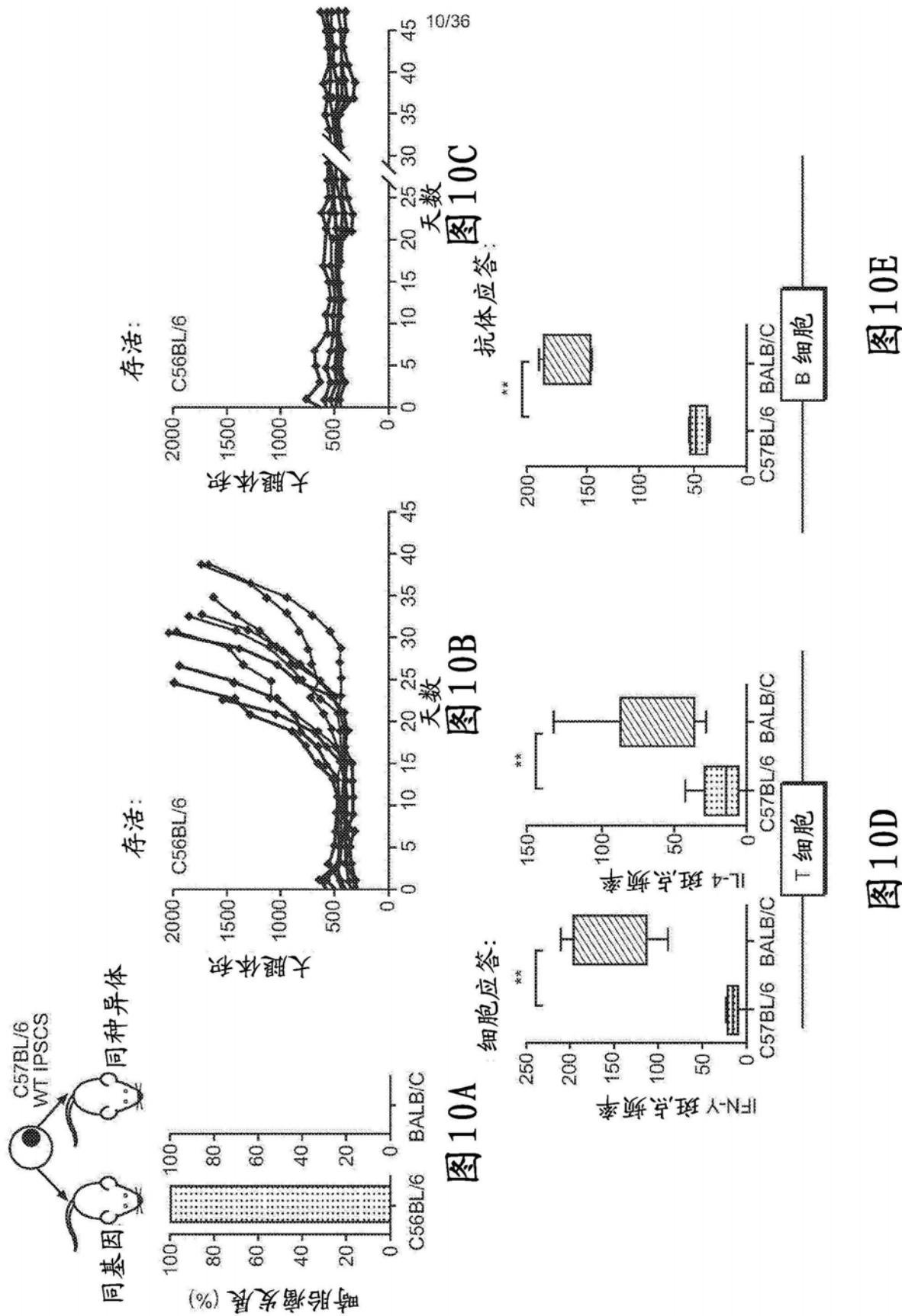


图9C



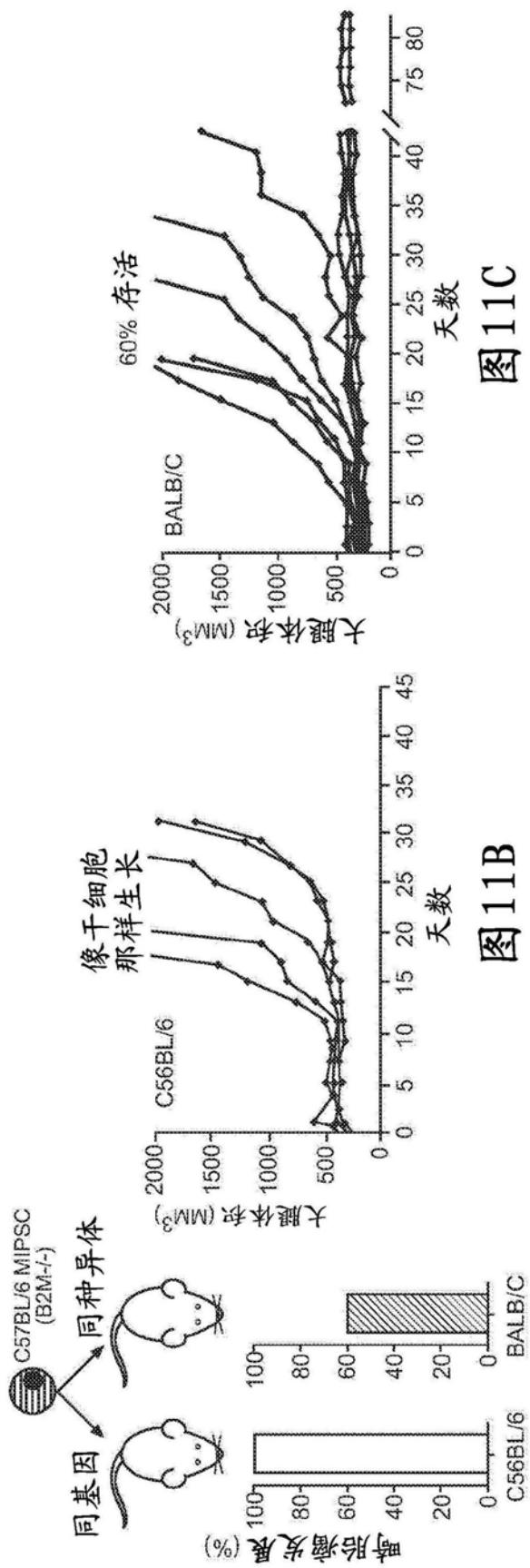


图 11A

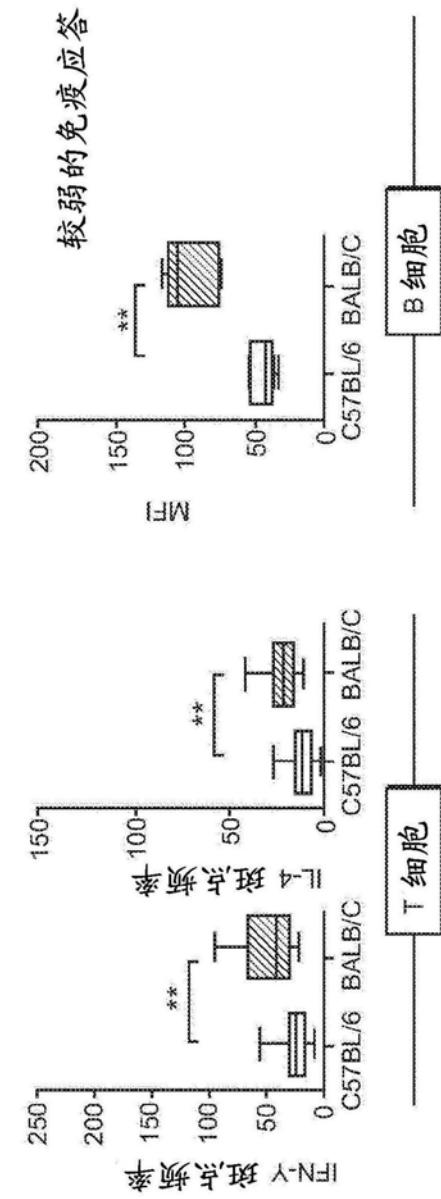


图 11B

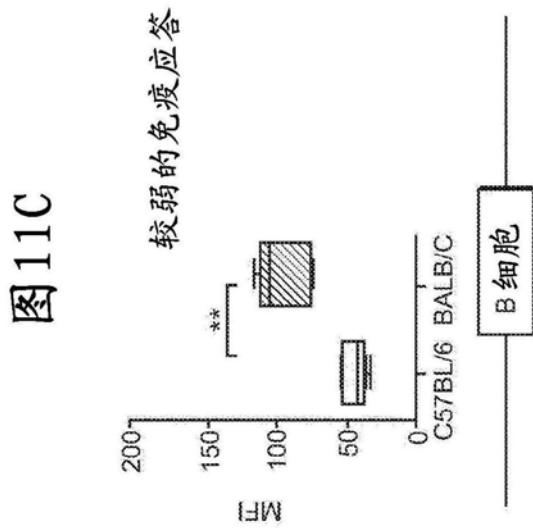


图 11C

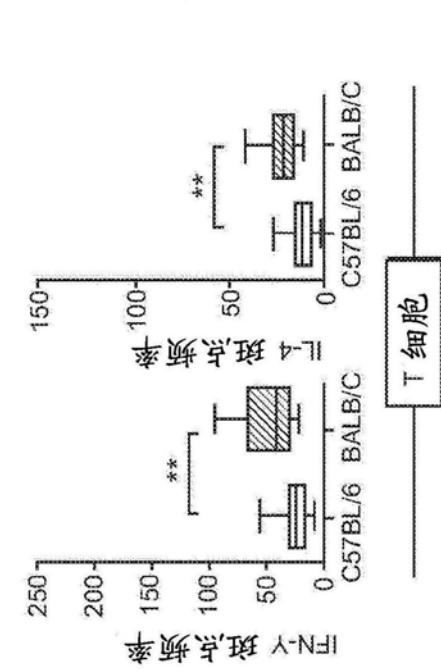


图 11D

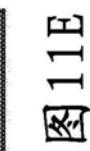


图 11E

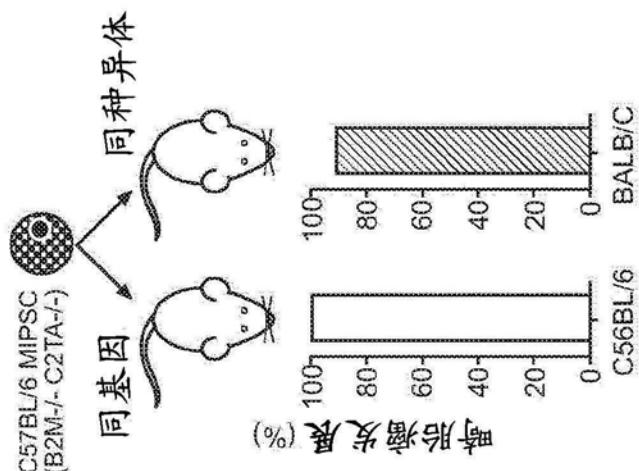


图12A

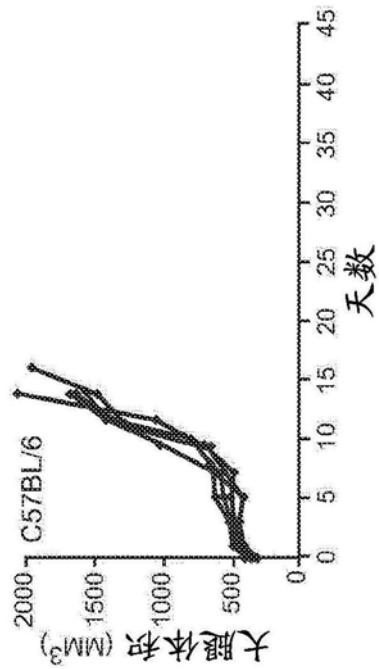


图12B

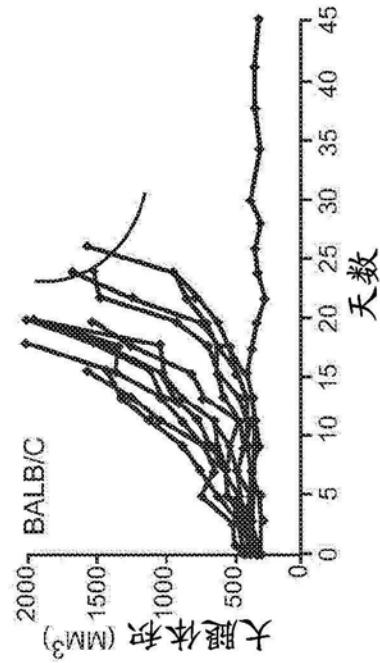


图12C

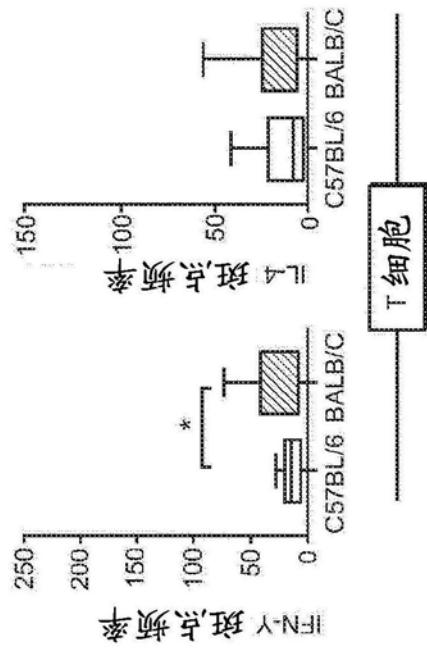


图12D

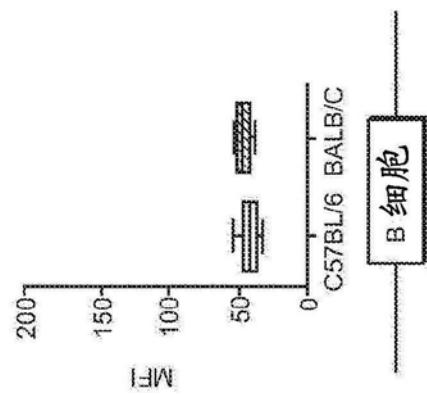


图12E

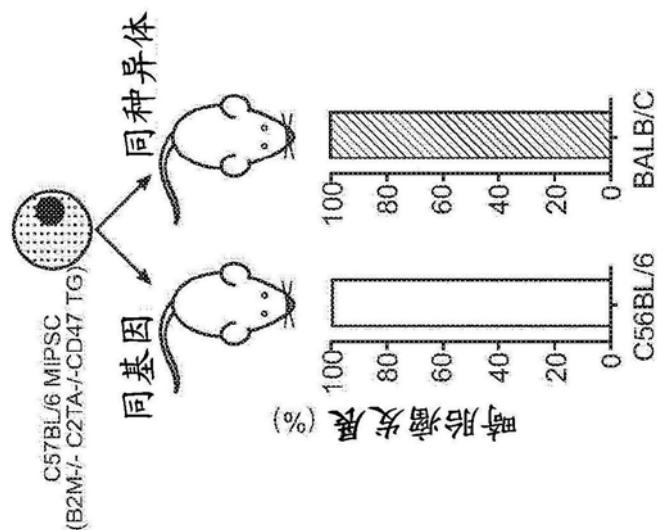


图13A

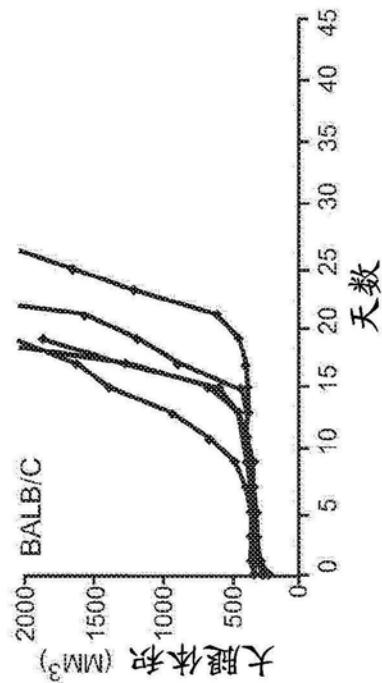


图13B

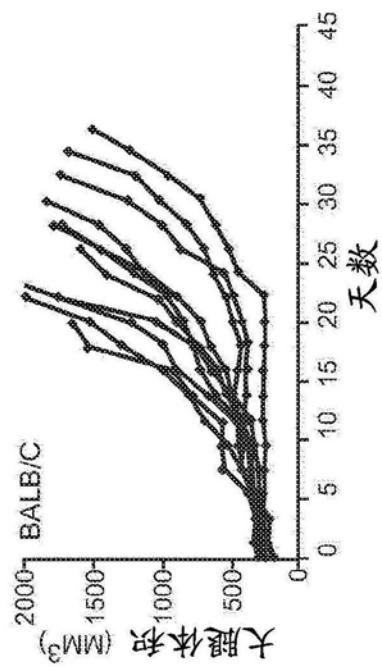


图13C

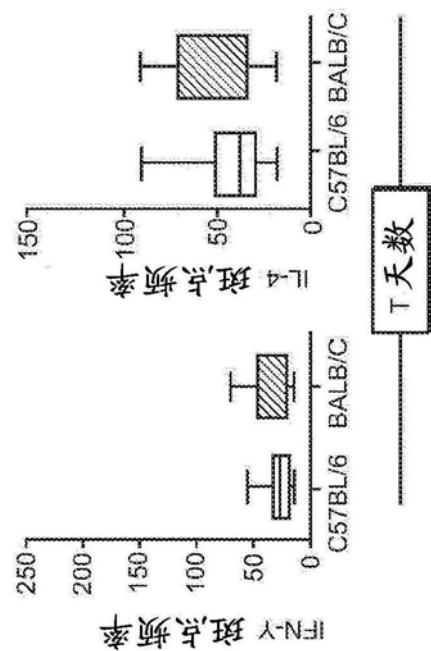


图13D

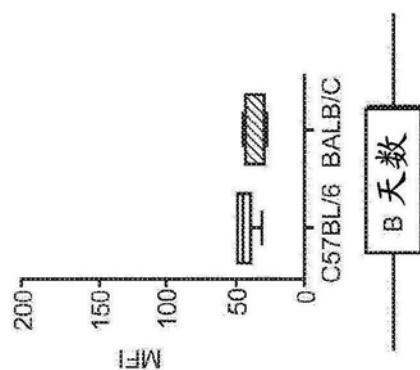


图13E

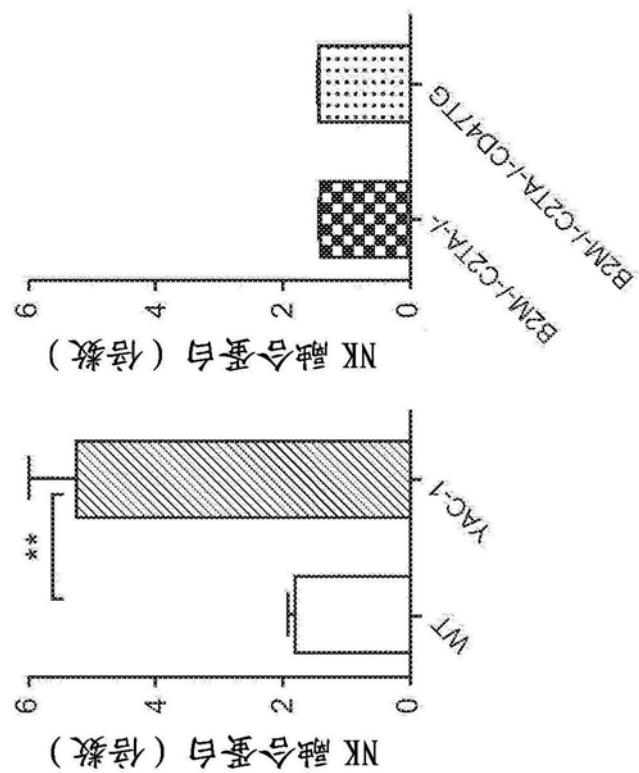


图14A

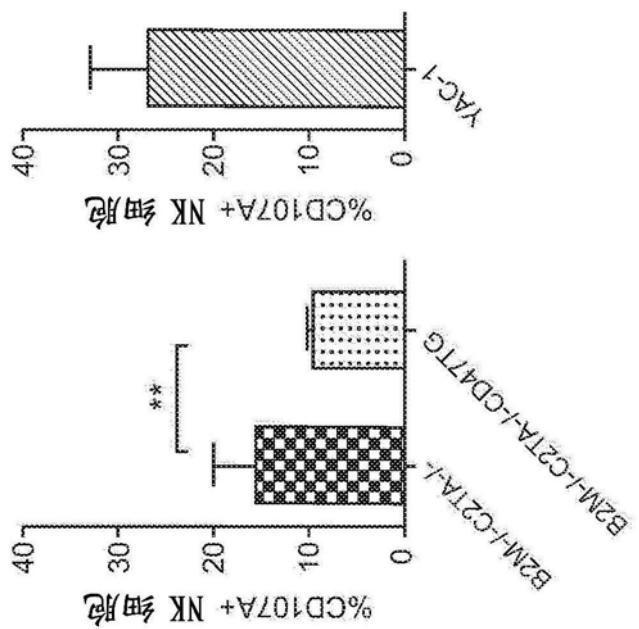


图14B

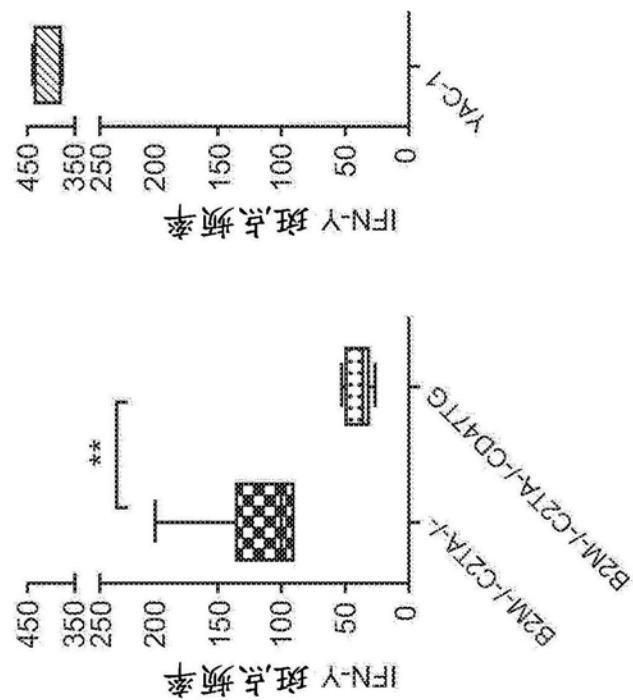


图14C

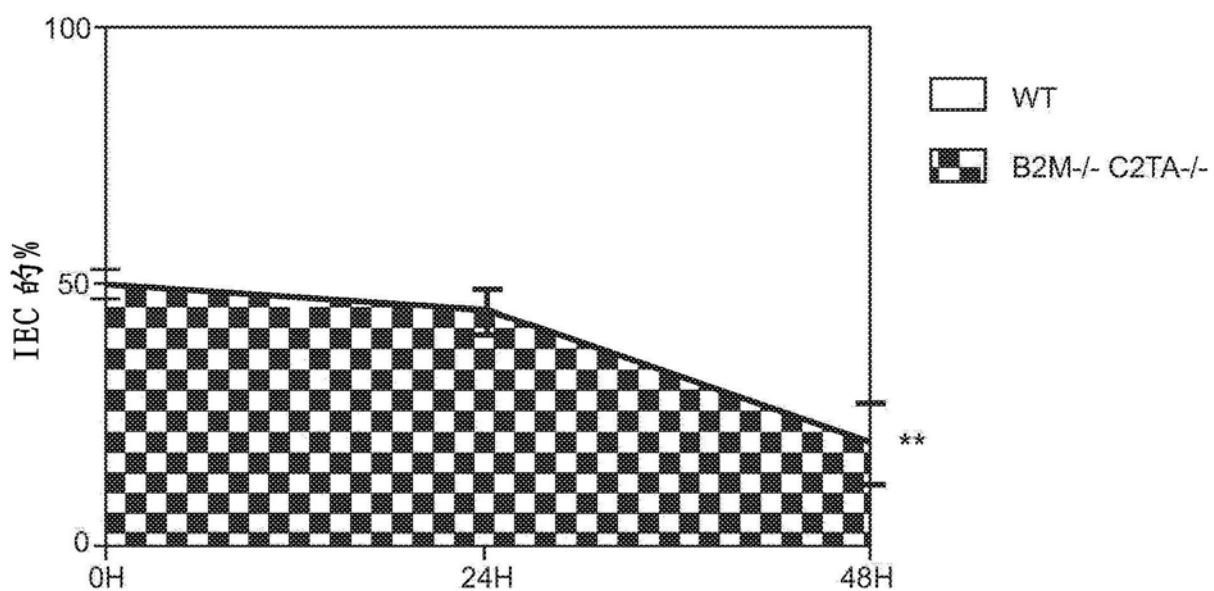


图15A

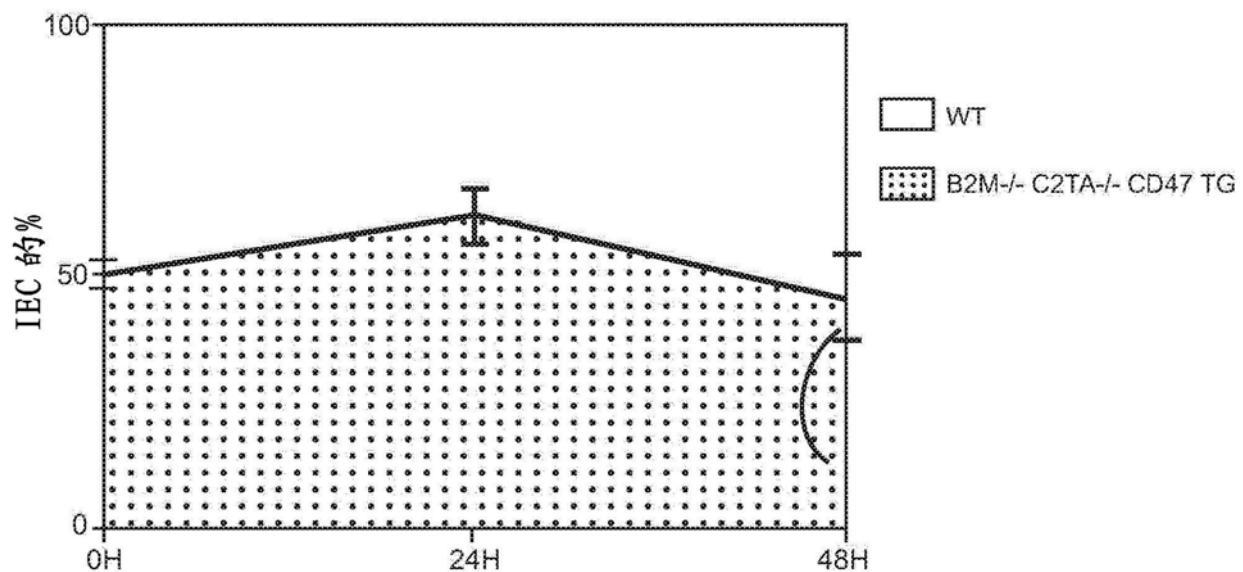


图15B

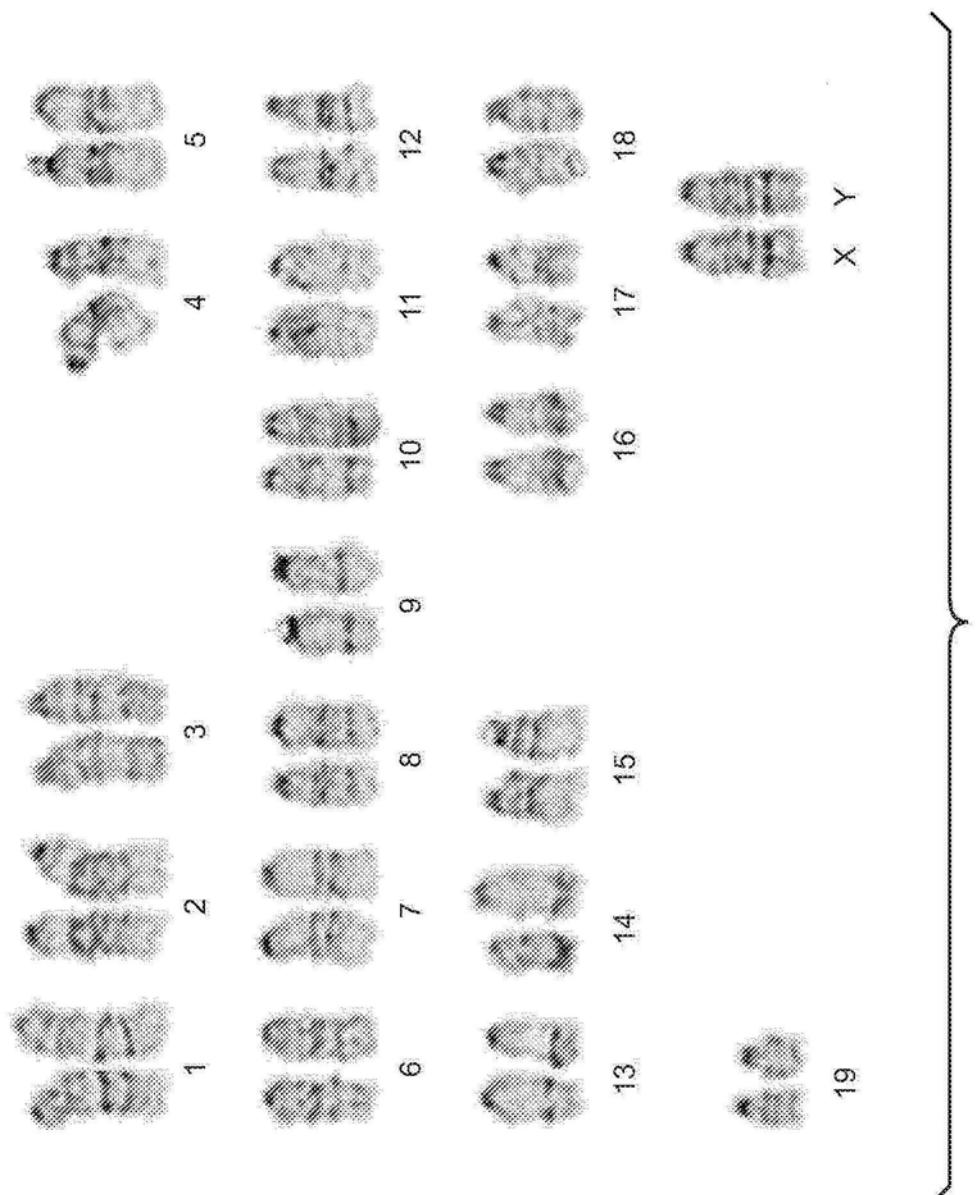
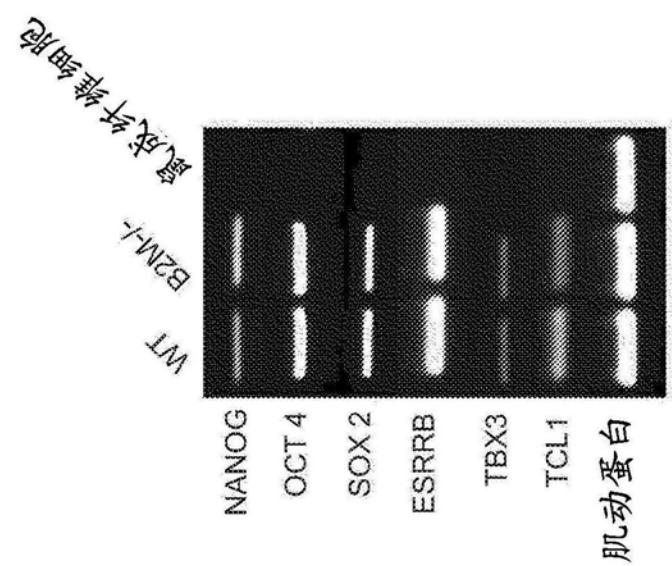
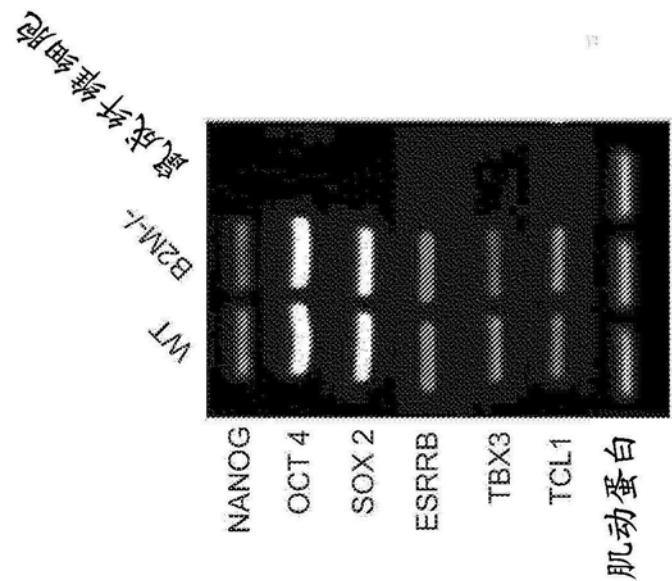


图16



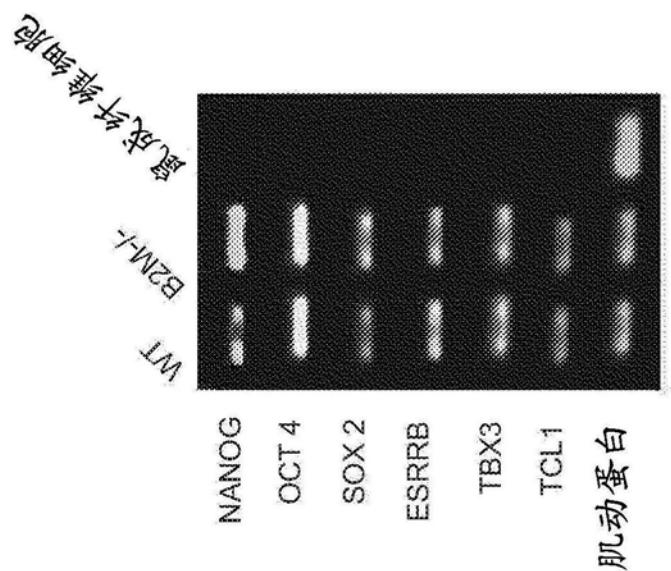


图17C

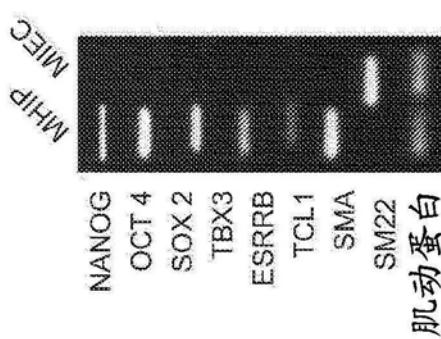


图18A

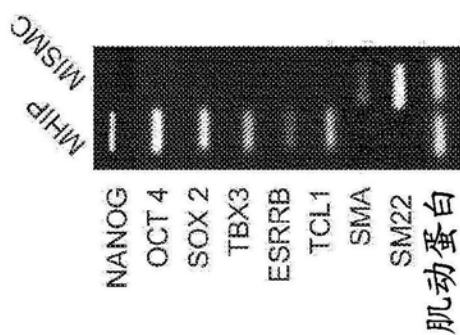


图18B

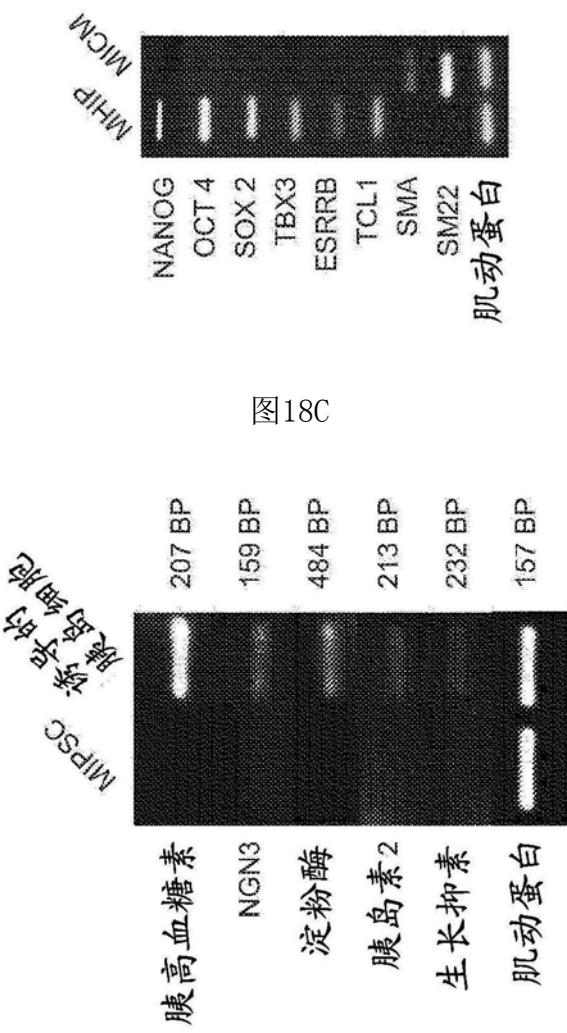


图18C

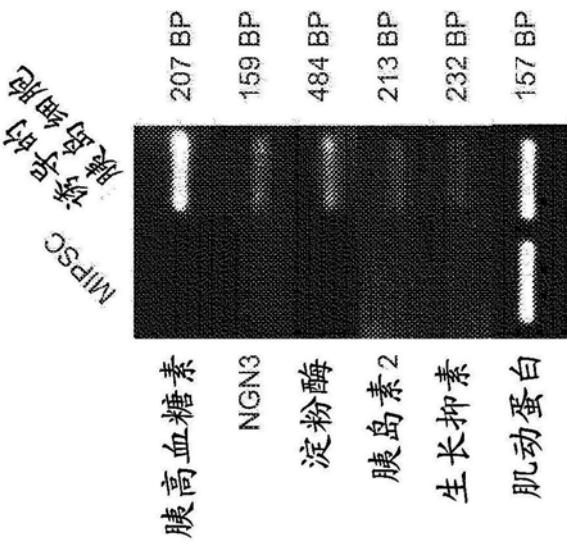


图19A

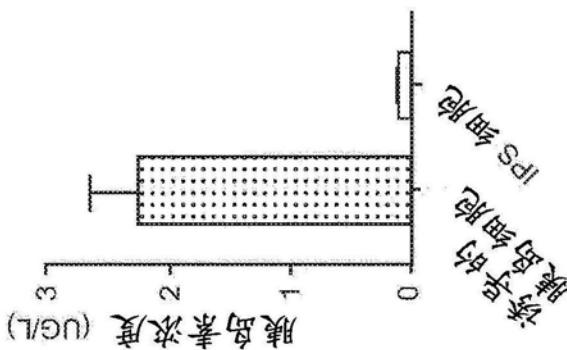


图19B

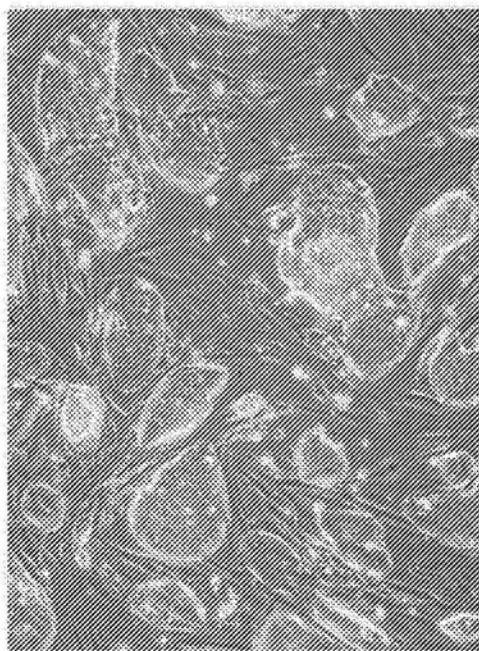


图20A

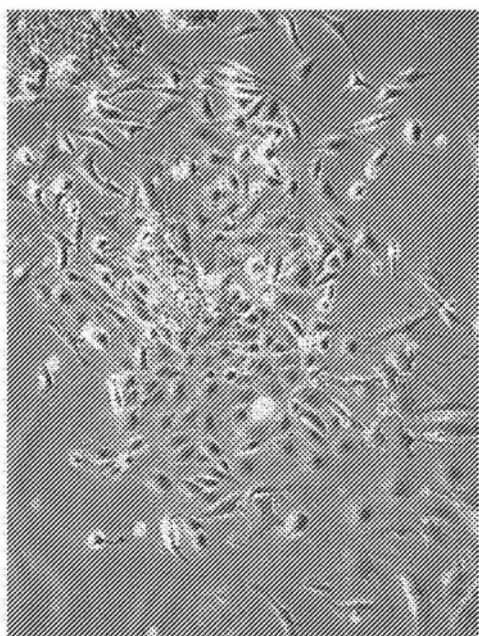


图20B

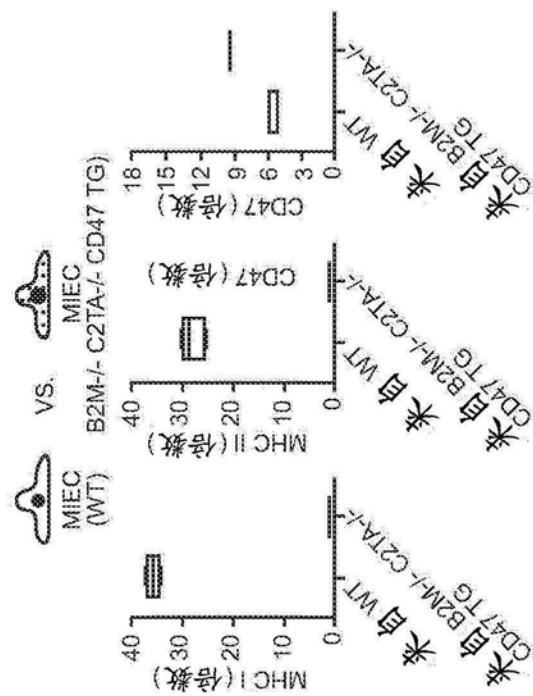


图21A

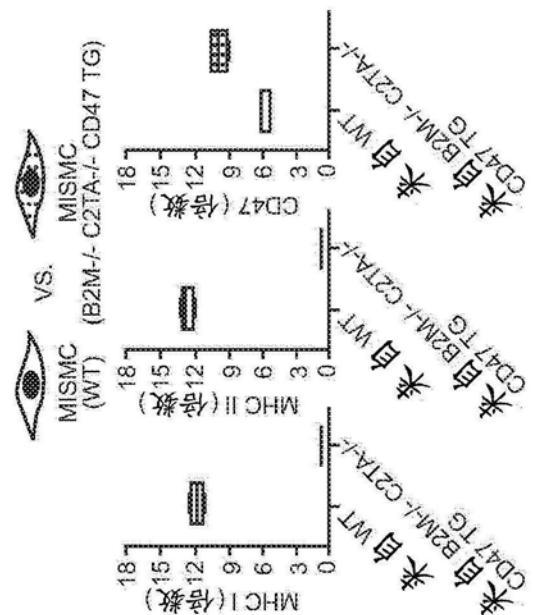


图21B

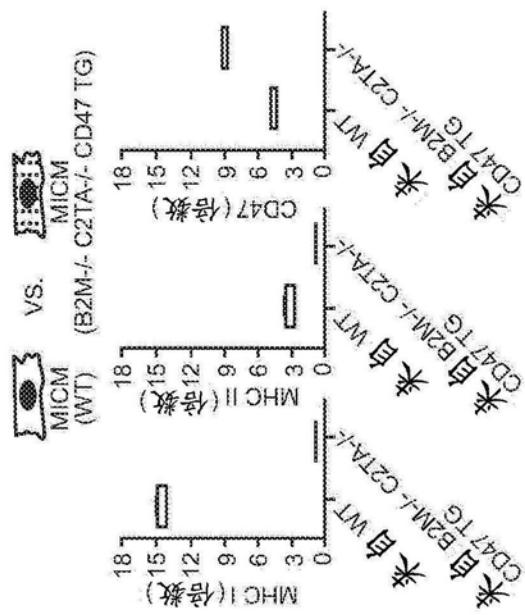


图21C

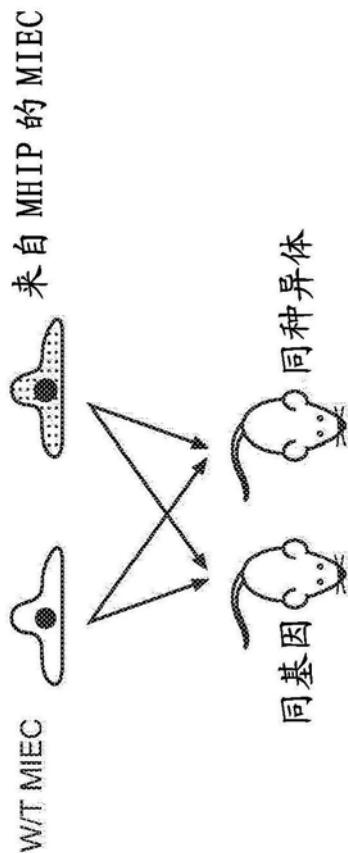
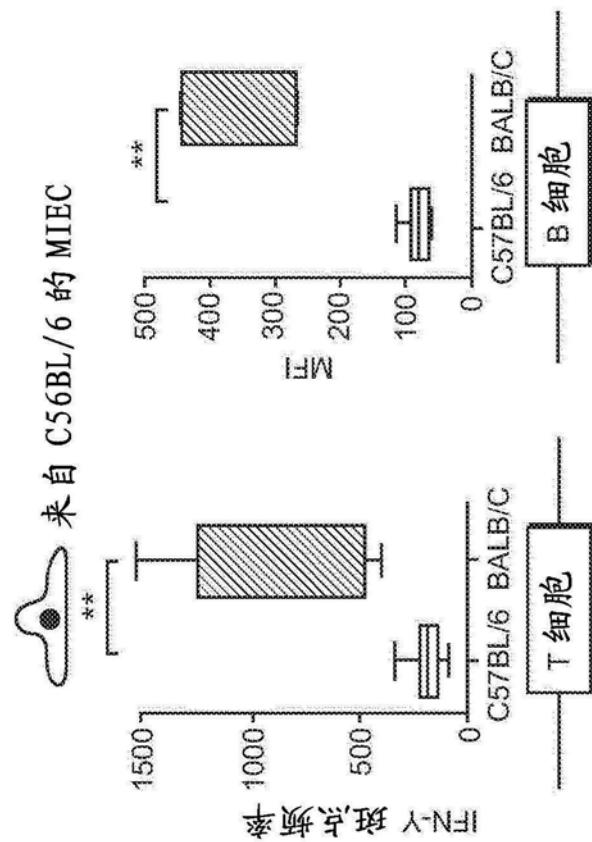


图22A



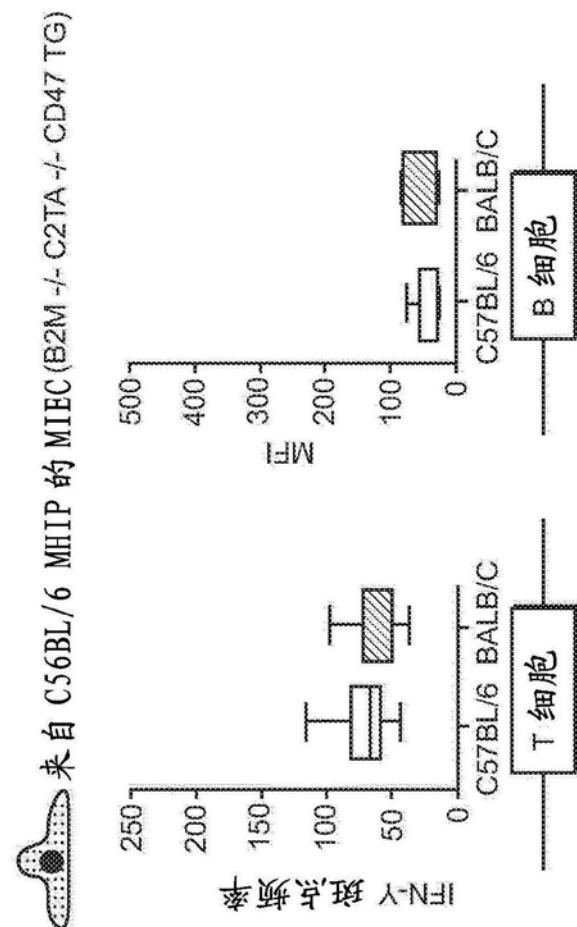


图22C

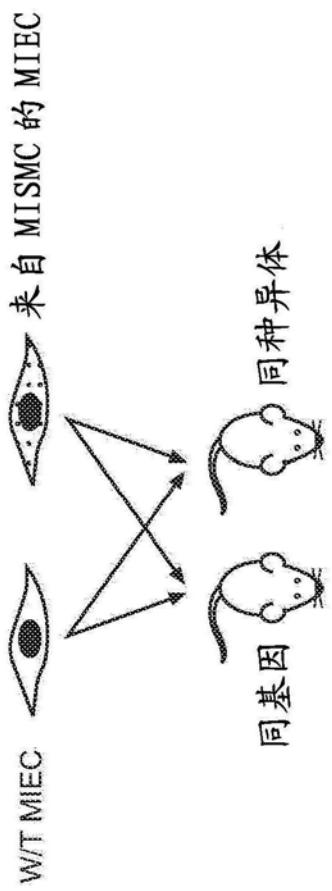


图23A

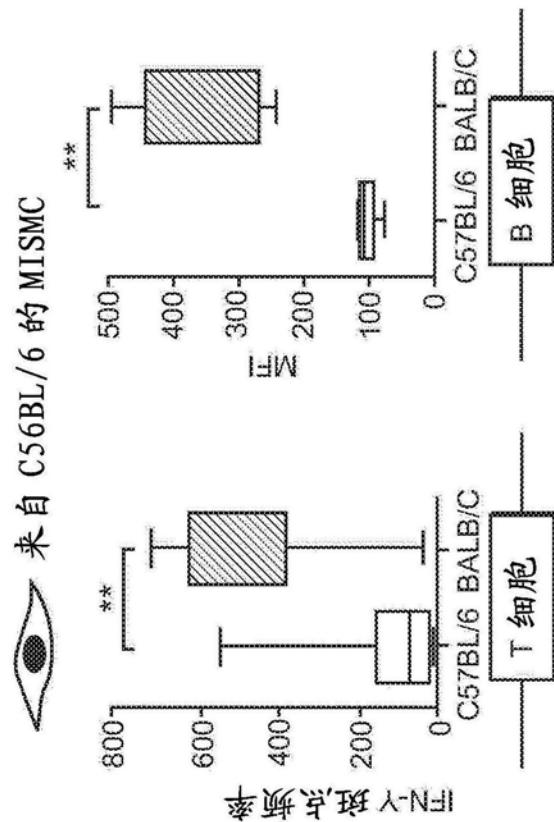


图23B

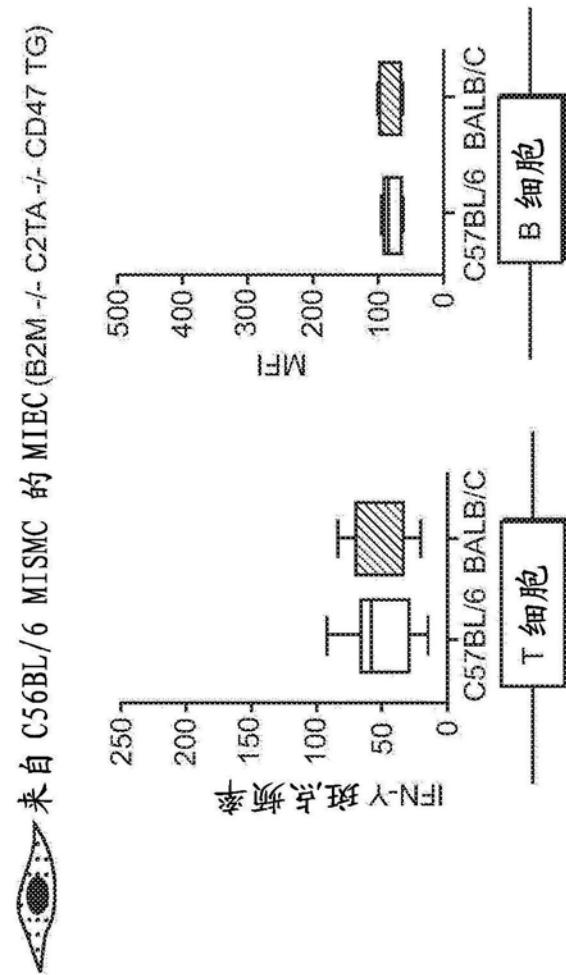


图23C

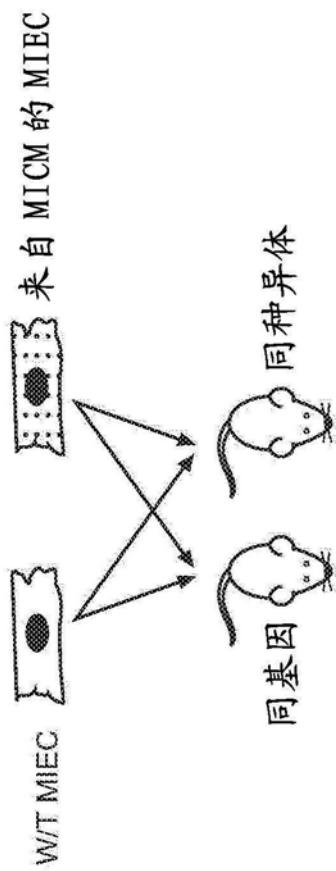


图24A

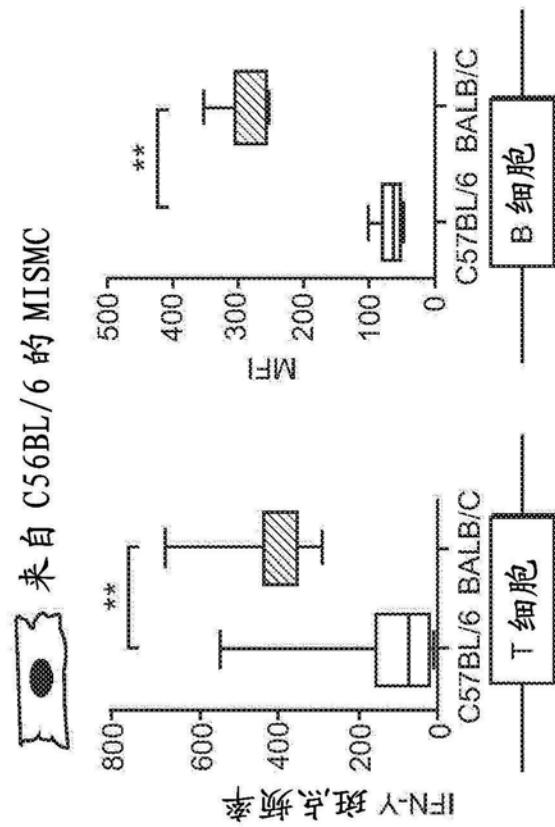


图24B

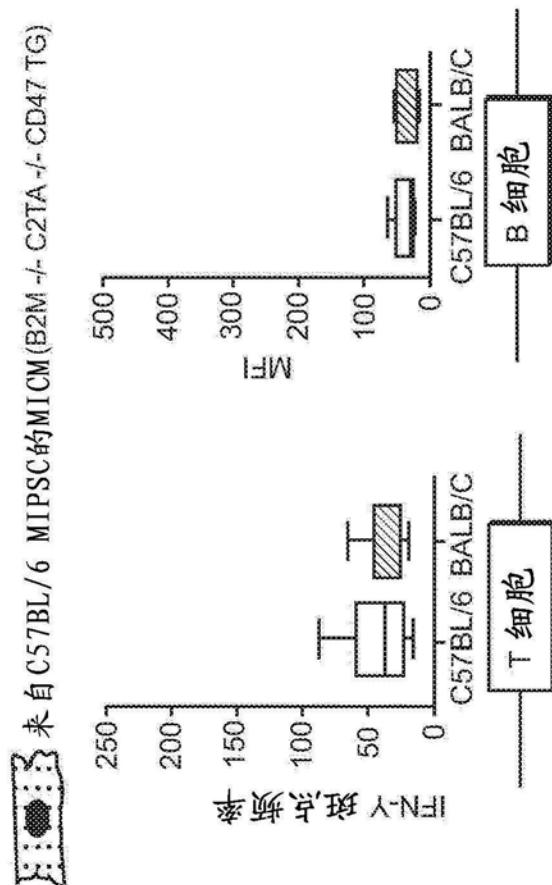


图24C

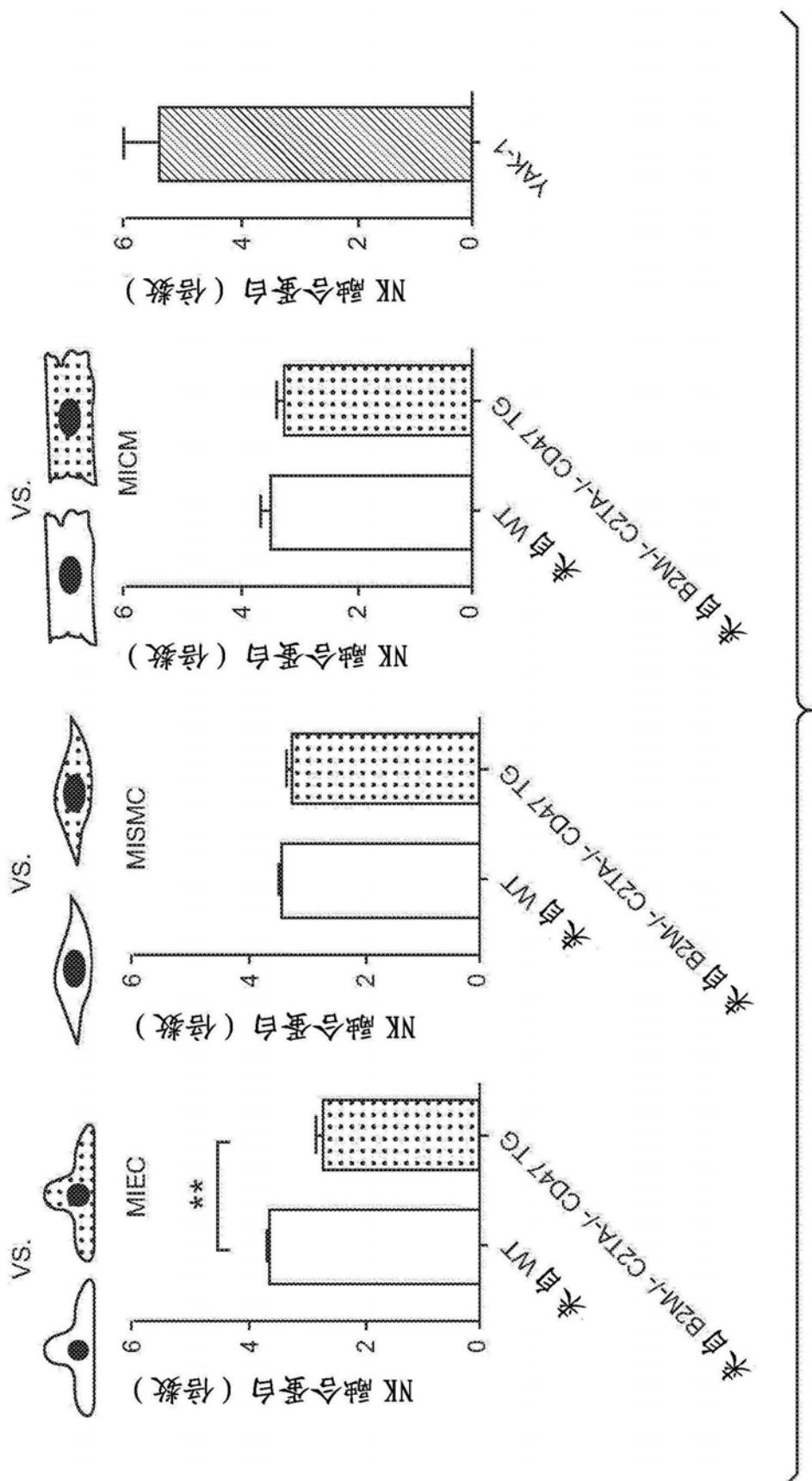


图 25

图25

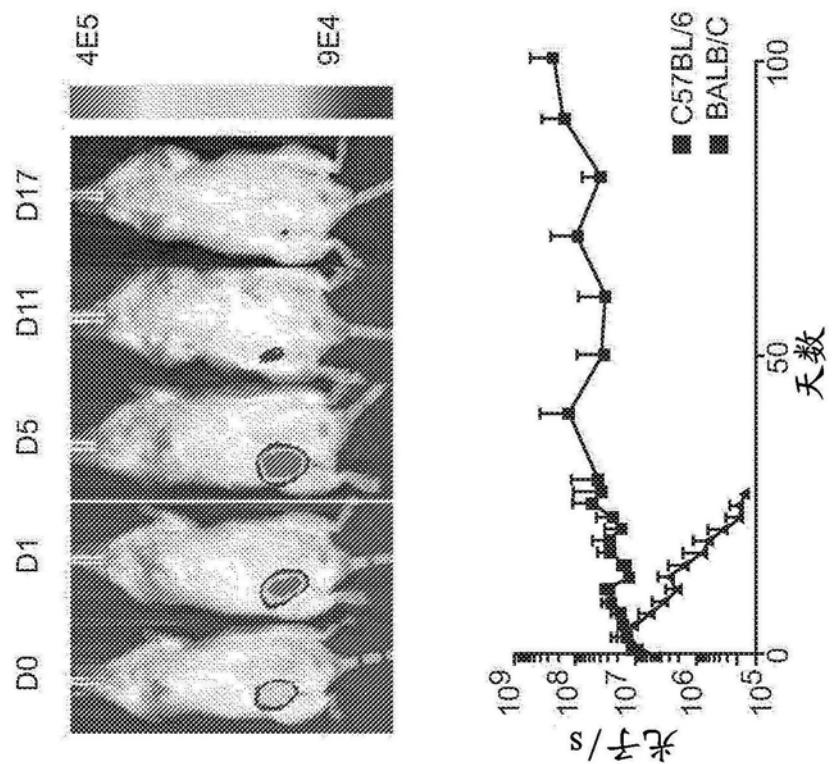


图26A

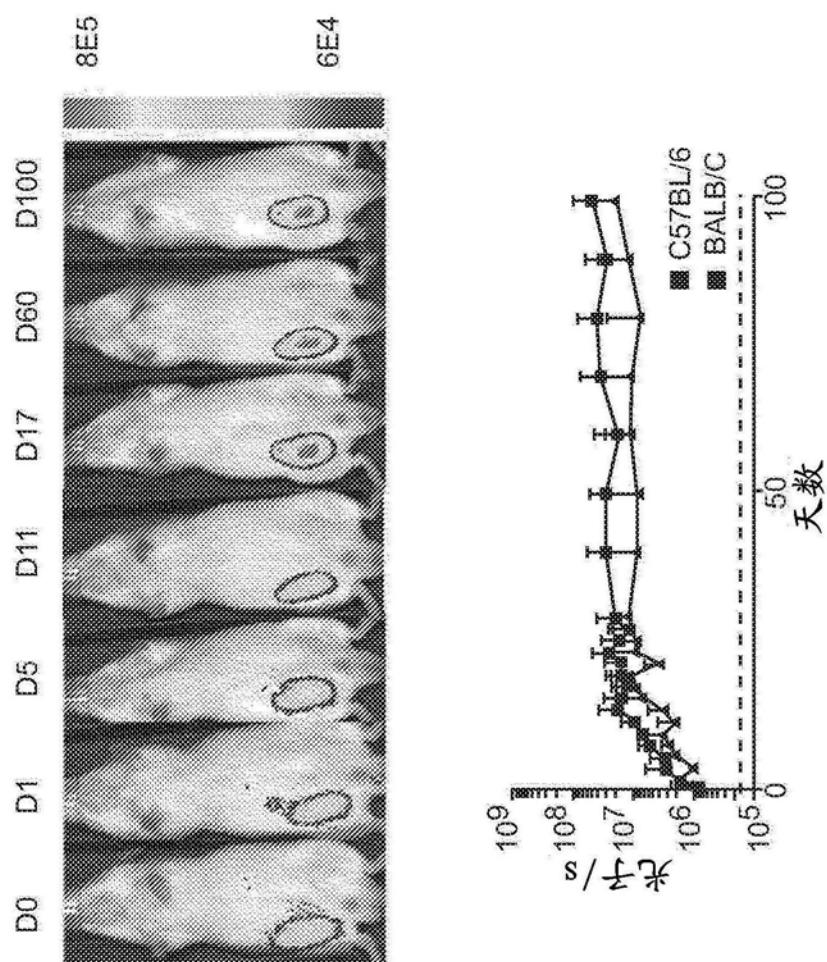


图26B

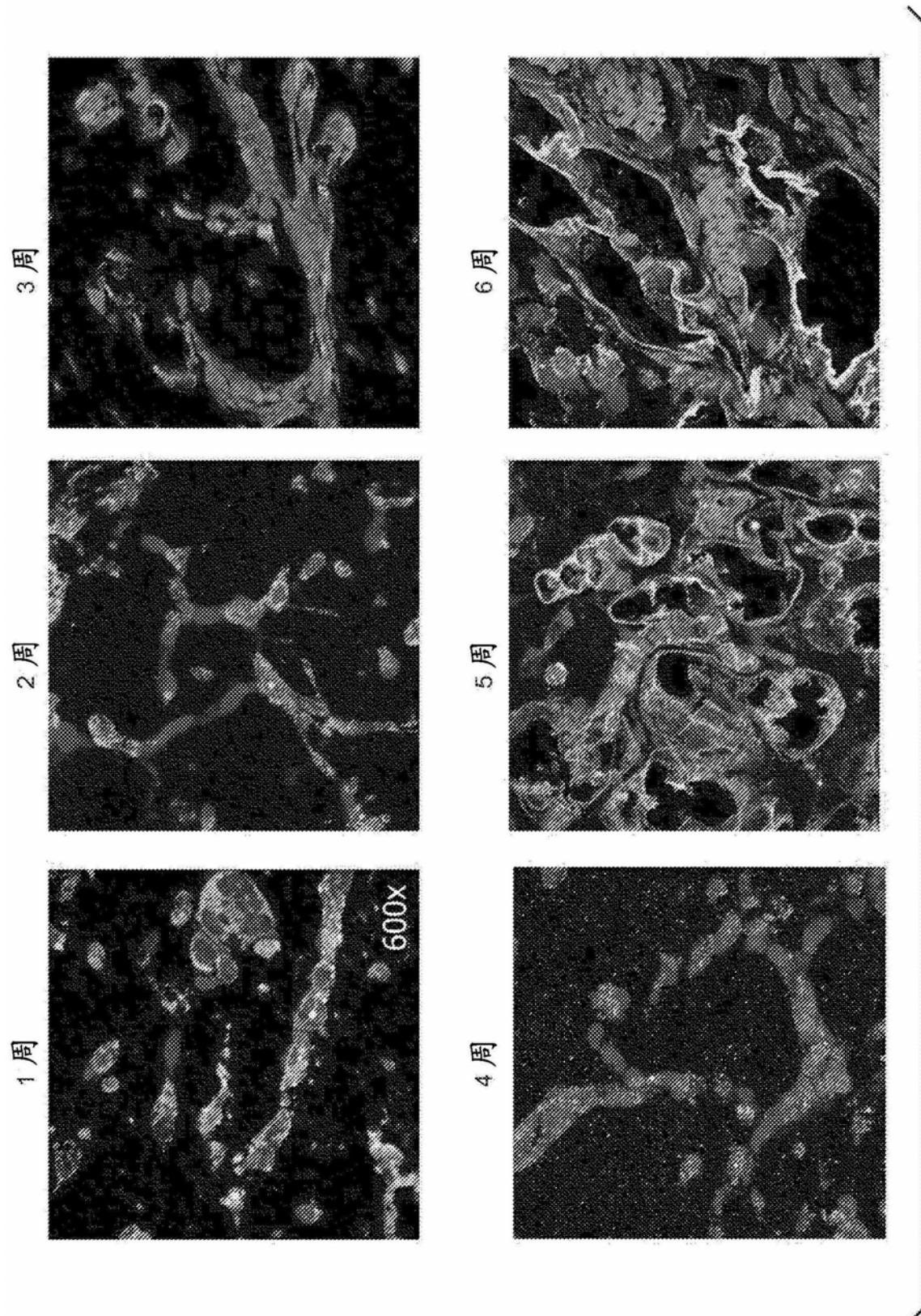


图27

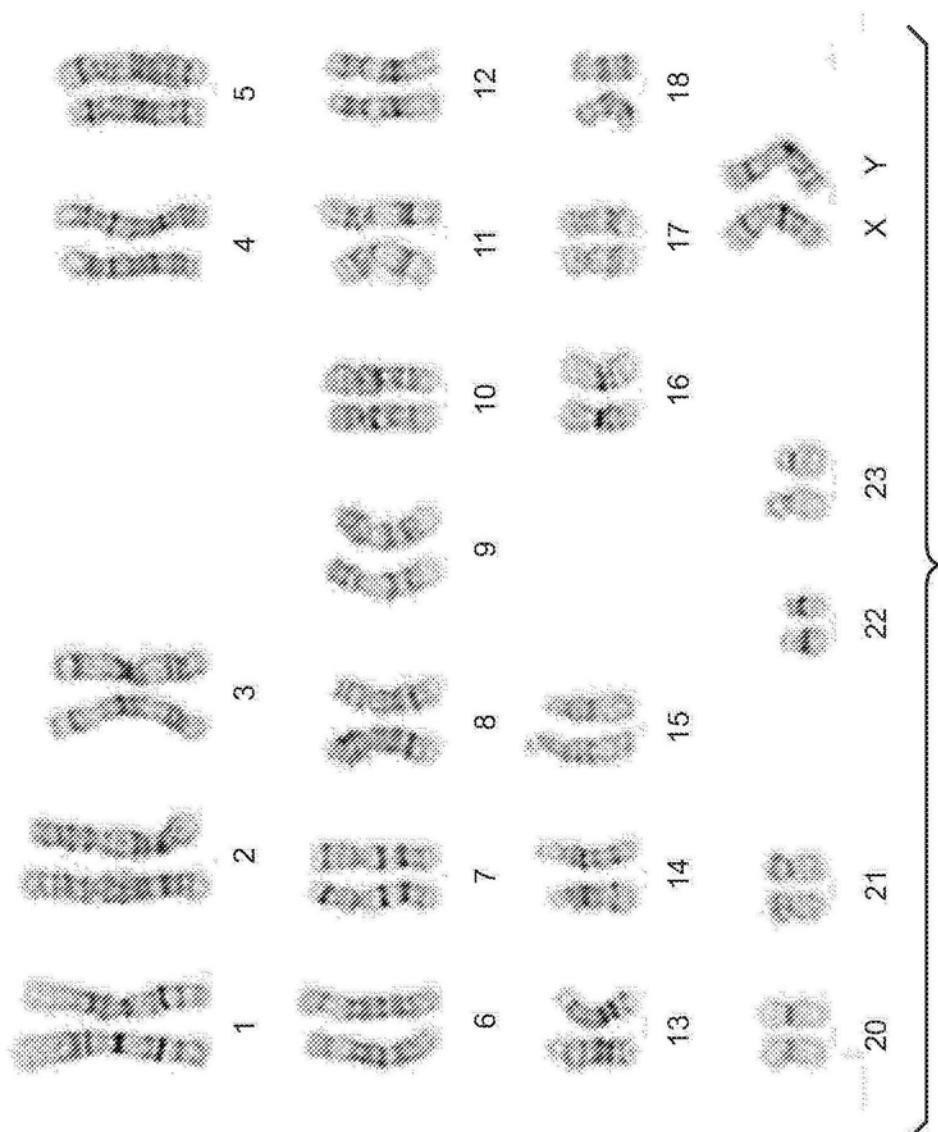


图 28

图28

针对多能性基因的 PCR :

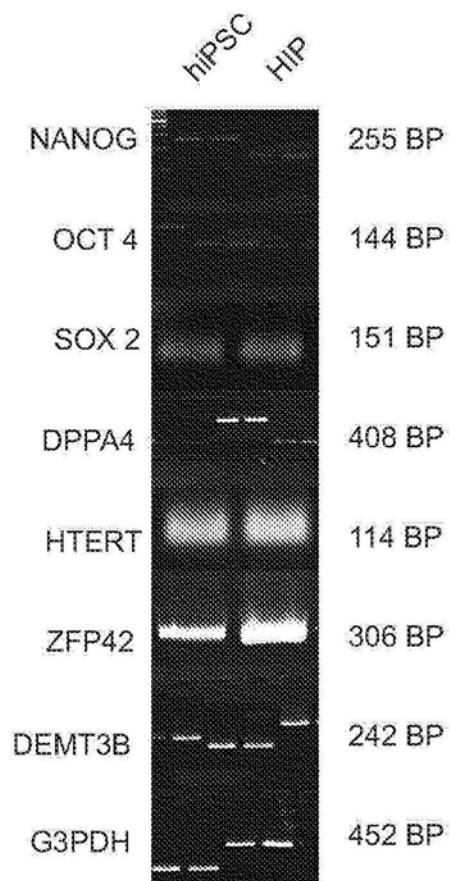


图29

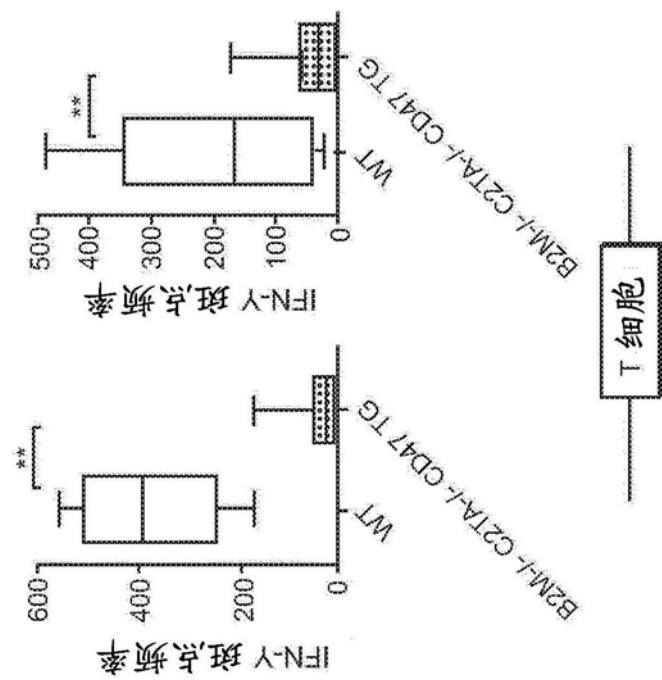


图30A

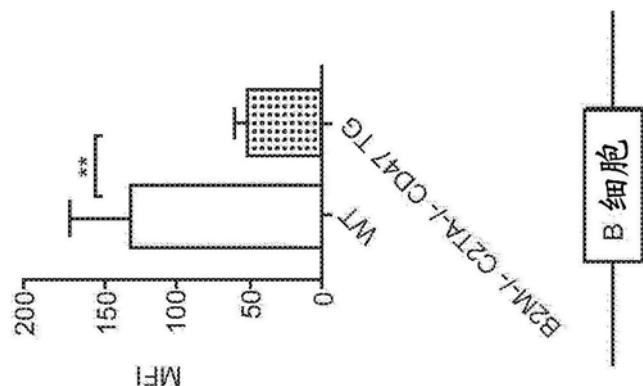


图30B

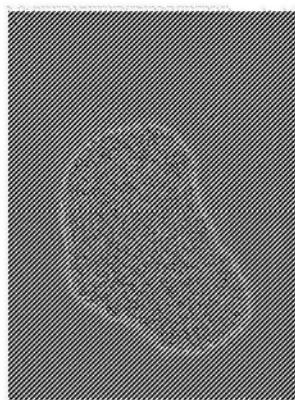


图31A

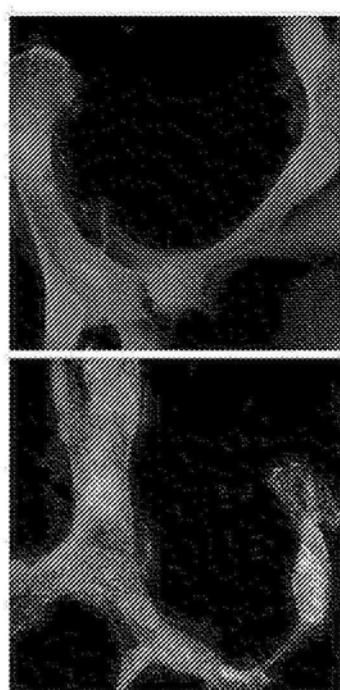


图31B

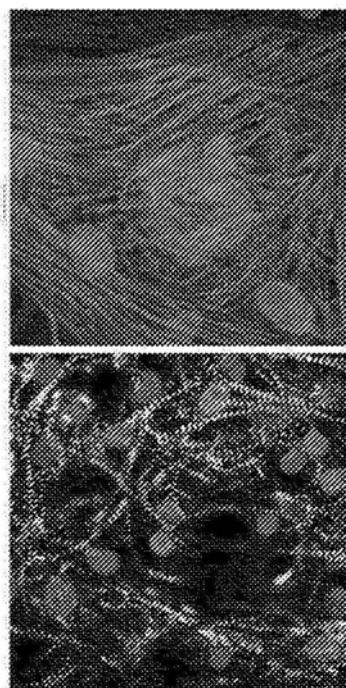


图31C

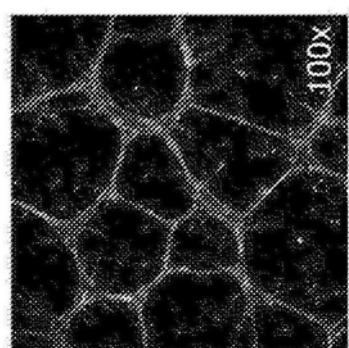


图31D

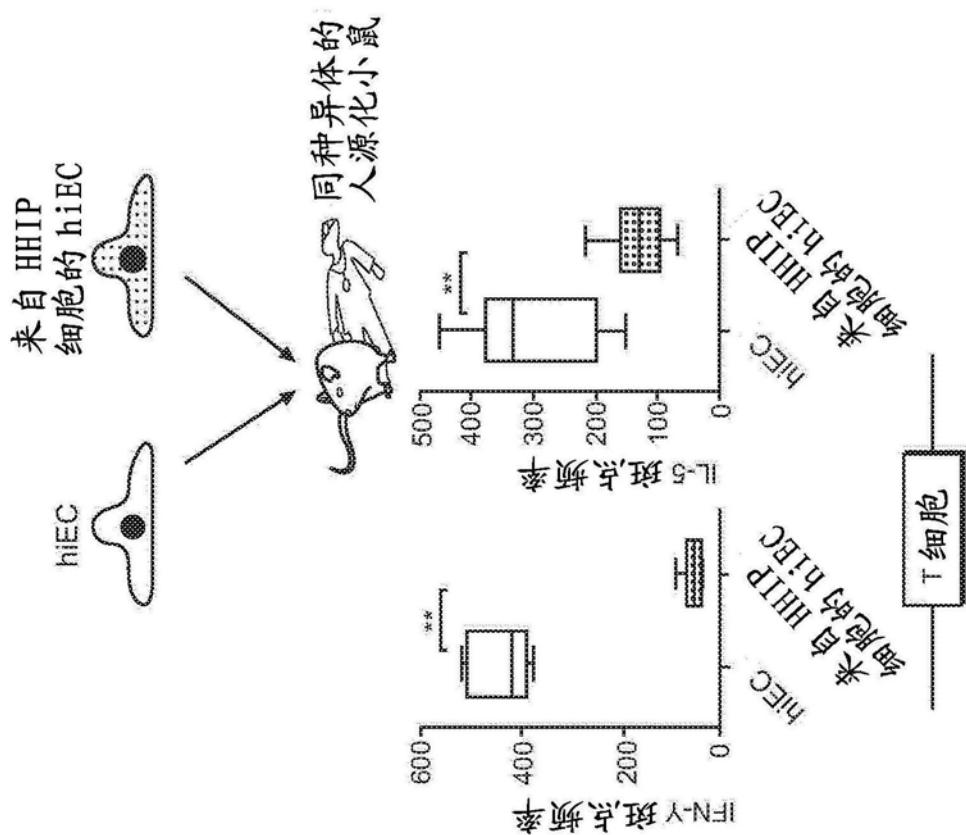


图32A

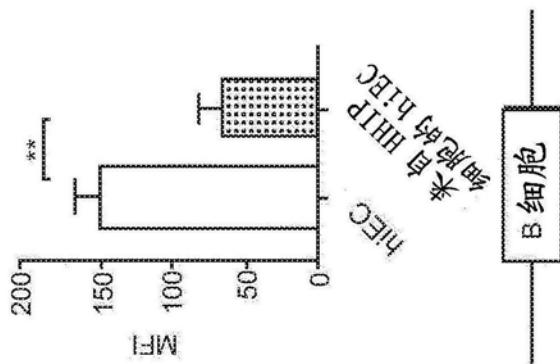


图32B

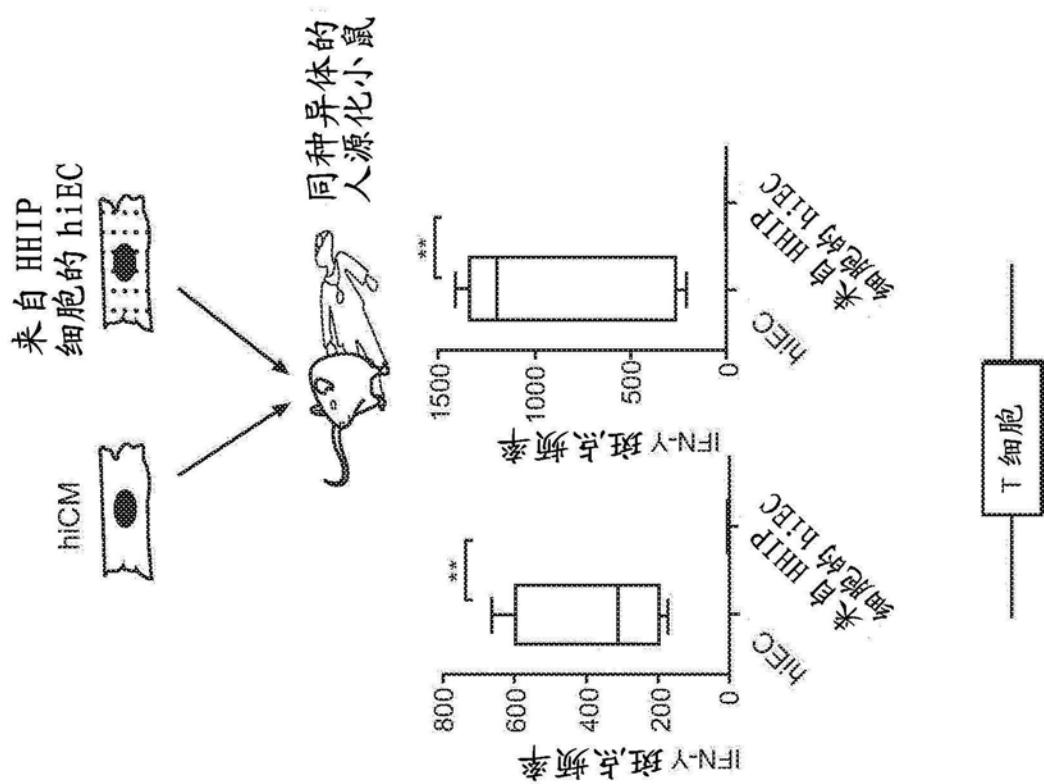


图33A

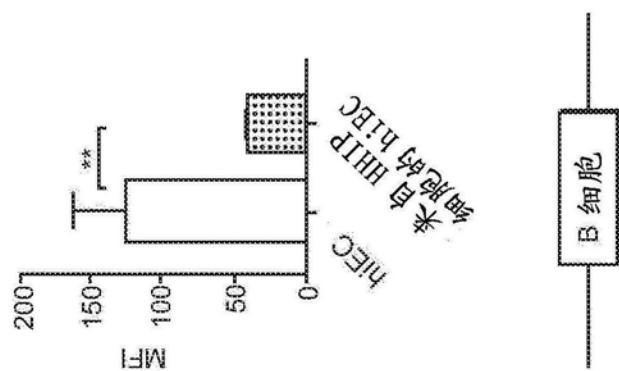


图33B

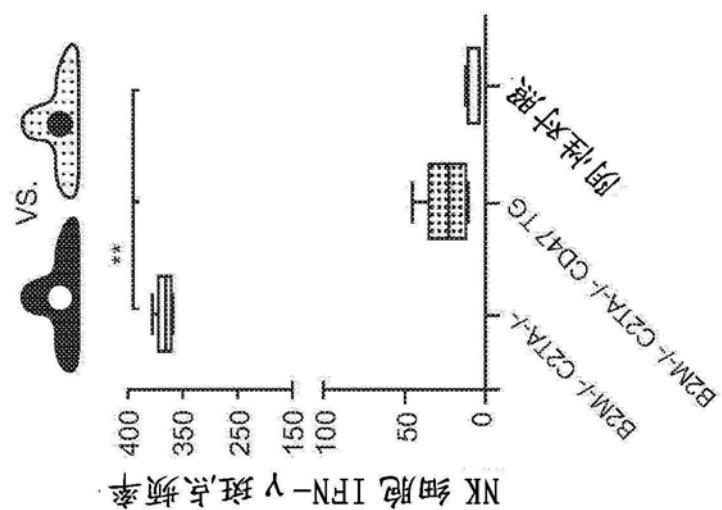


图34A

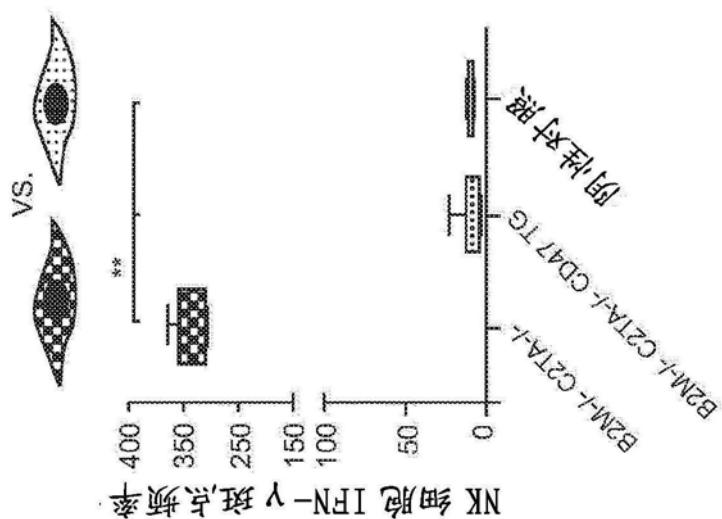


图34B

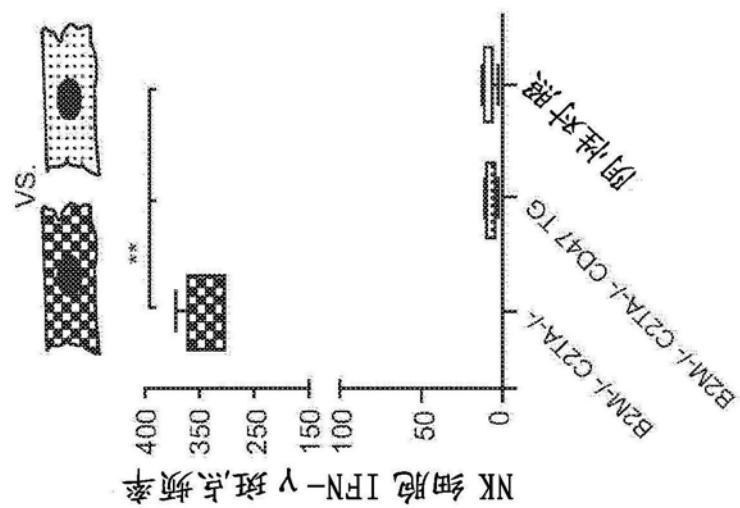


图34C

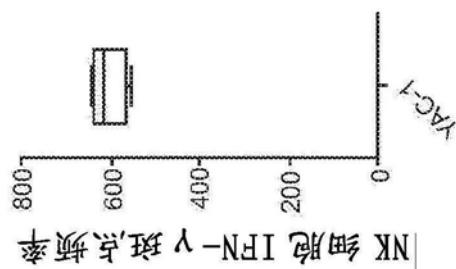


图34

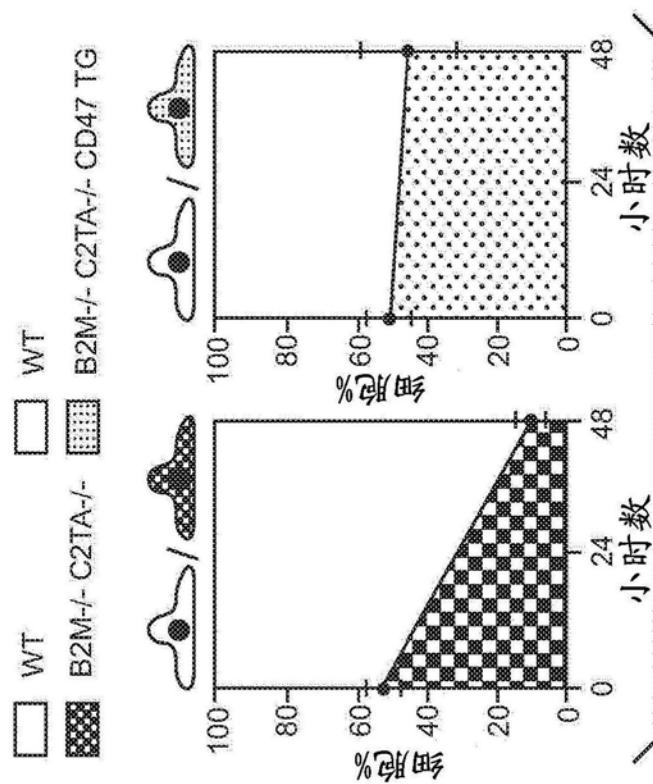


图 35A

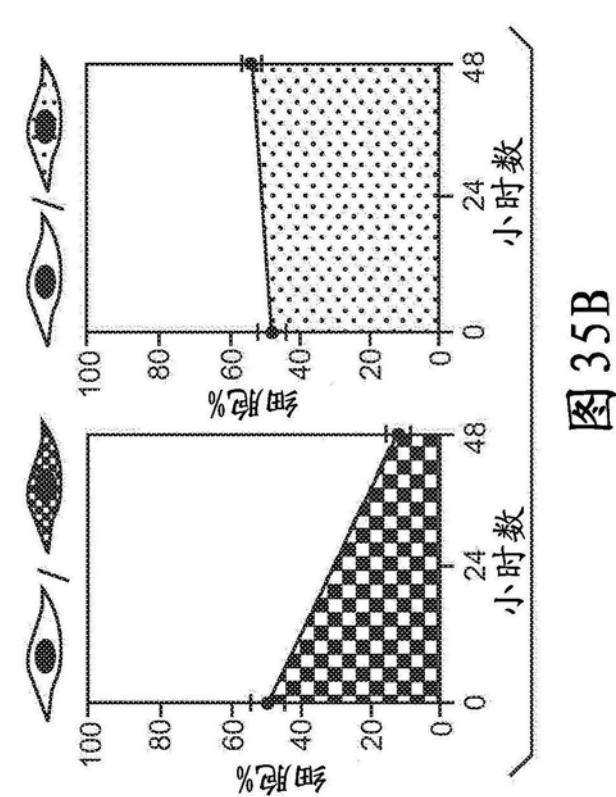


图 35B

图 35B

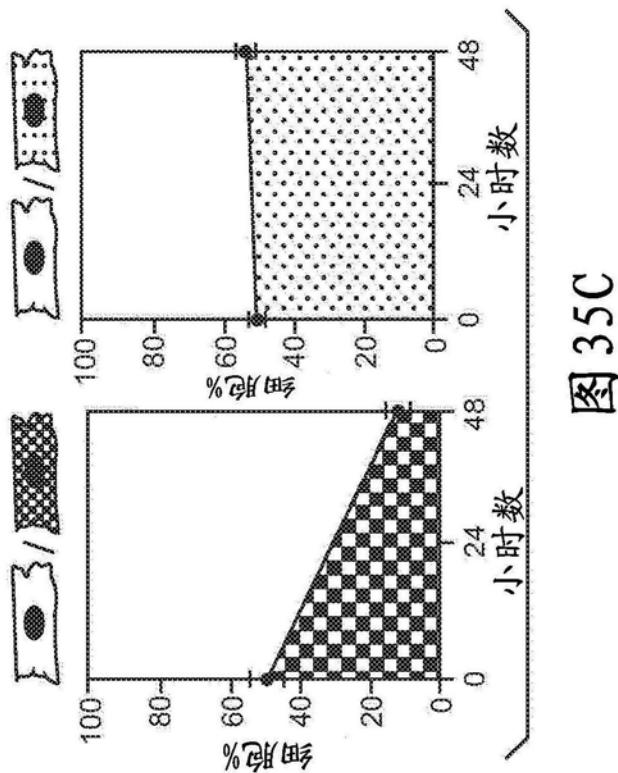


图35C

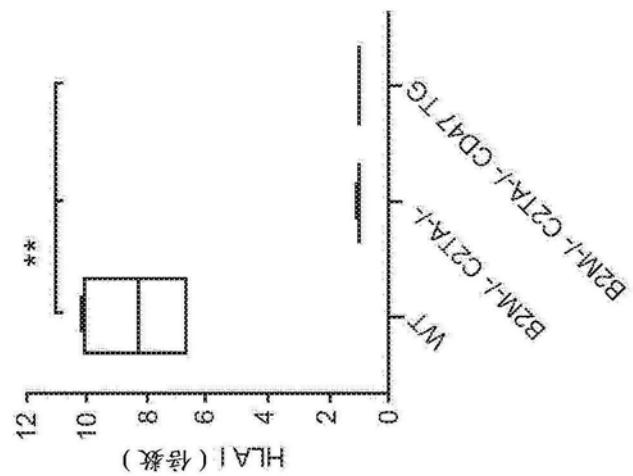


图36A

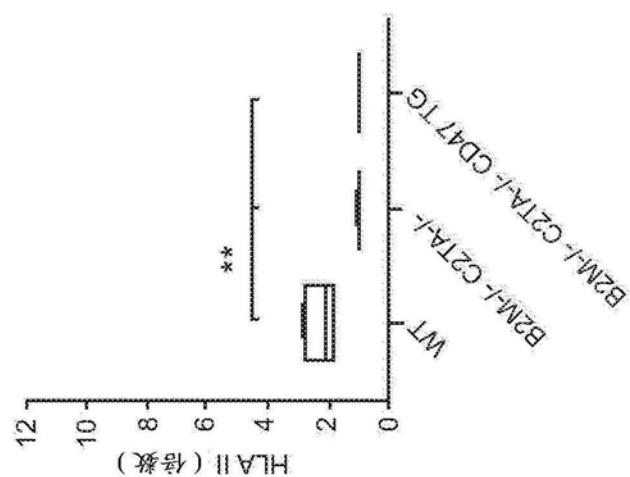


图36B

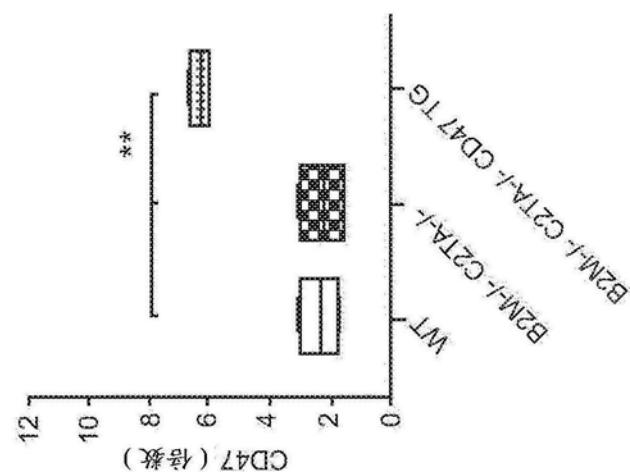


图36C

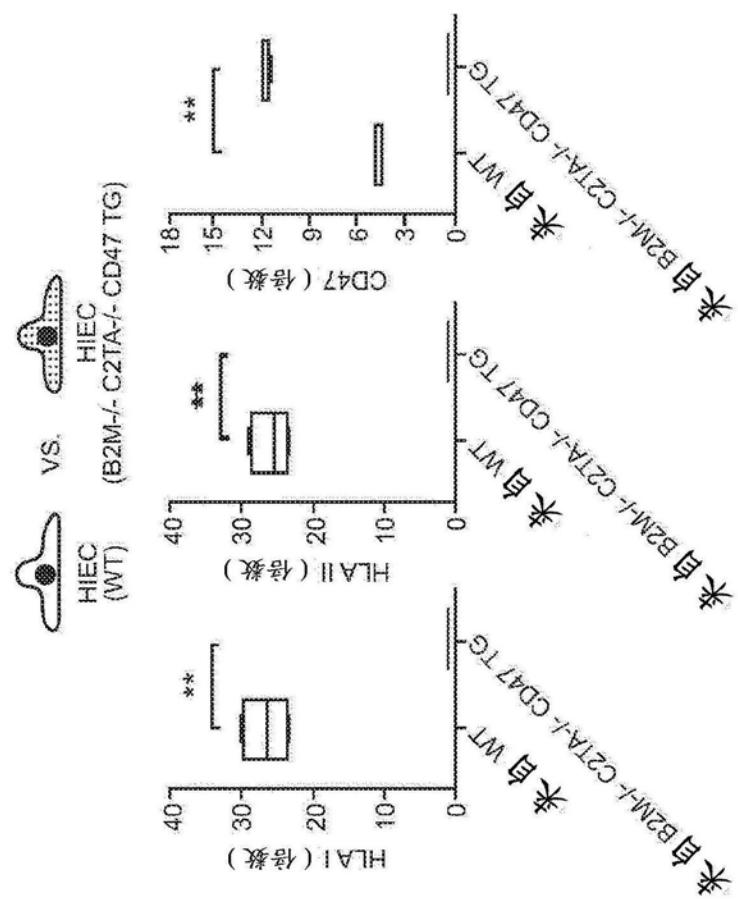


图37A

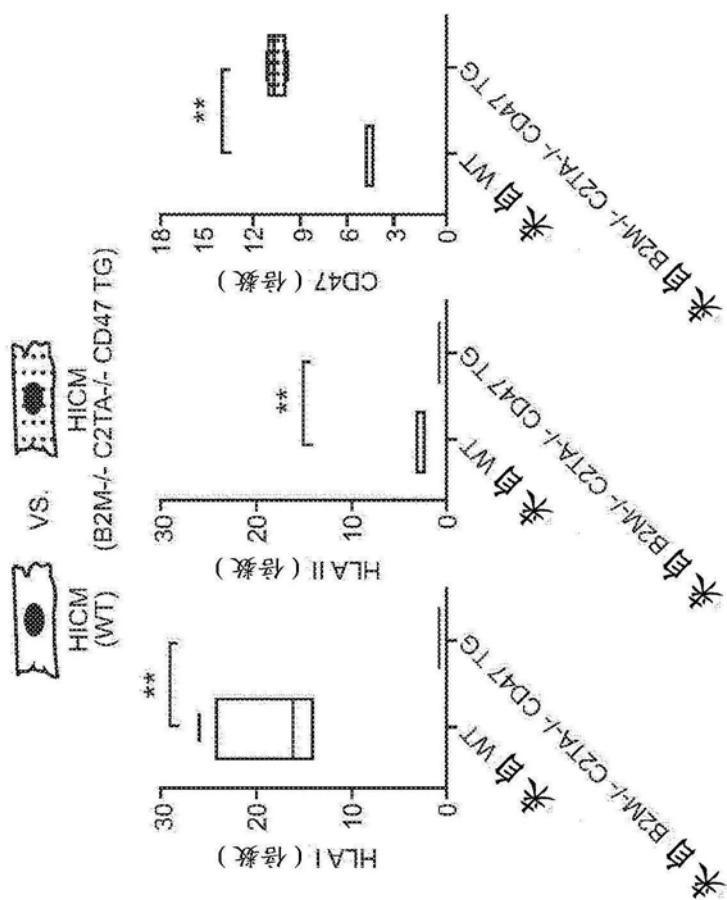


图37B