



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110785489 A

(43)申请公布日 2020.02.11

(21)申请号 201880042161.3

(22)申请日 2018.05.02

(30)优先权数据

62/501,371 2017.05.04 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.12.24

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/030644 2018.05.02

(87)PCT国际申请的公布数据

WO2018/204493 EN 2018.11.08

(71)申请人 宾夕法尼亚大学董事会

地址 美国宾夕法尼亚州

(72)发明人 赵阳兵 任江涛

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 董志勇

(51)Int.Cl.

*C12N 9/00*(2006.01)

*C12N 15/85*(2006.01)

*C12N 15/90*(2006.01)

权利要求书2页 说明书23页

序列表2页 附图11页

(54)发明名称

使用CRISPR/Cpf1在T细胞中进行基因编辑的组合物和方法

(57)摘要

本发明包括用于修饰原代T细胞的组合物和方法。在一个方面,本发明包括向细胞施用茎环成簇的规律间隔短回文重复序列(CRISPR)RNA(st-crRNA)和Cpf1酶。

1. 基因编辑的方法,所述方法包括向细胞施用包括茎环成簇的规律间隔短回文重复序列(CRISPR) RNA (st-crRNA) 的外源核酸和编码Cpf1酶的外源核酸。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述细胞是T细胞。
3. 根据权利要求2所述的方法,其中所述T细胞是原代T细胞。
4. 根据权利要求1所述的方法,其中所述施用包括将所述外源核酸电穿孔入所述细胞。
5. 根据权利要求4所述的方法,其中所述电穿孔进行多次。
6. 根据权利要求1所述的方法,其中所述Cpf1酶包括氨基酸球菌属Cpf1 (AsCpf1)。
7. 根据权利要求1所述的方法,其中所述Cpf1酶包括毛螺菌属Cpf1 (LbCpf1)。
8. 根据权利要求1所述的方法,其中所述st-crRNA包括所述crRNA的3' 端上的茎环结构。
9. 根据权利要求1所述的方法,其中所述st-crRNA包括所述crRNA的5' 端上的茎环结构。
10. 根据权利要求9所述的方法,其中所述茎环结构进一步包括添加至所述茎环的5' 端的三个甘氨酸残基。
11. 根据权利要求10所述的方法,其中所述st-crRNA的原间隔区进一步包括部分磷硫酰化(PMS) 修饰。
12. 根据权利要求1所述的方法,其中所述基因编辑包括使选自以下的基因突变:TCR $\alpha$ 链恒定区(TRAC)、TCR $\beta$ 恒定区(TRBC)和 $\beta$ -2微球蛋白(B2m)。
13. 通过基因编辑生成修饰的T细胞的方法,所述方法包括向细胞施用包括st-crRNA的外源核酸和编码Cpf1酶的外源核酸。
14. 根据权利要求13所述的方法,其中所述T细胞是原代T细胞。
15. 根据权利要求13所述的方法,其中所述施用包括将所述核酸电穿孔入所述T细胞。
16. 根据权利要求15所述的方法,其中所述电穿孔进行多次。
17. 根据权利要求13所述的方法,其中所述Cpf1酶包括氨基酸球菌属Cpf1 (AsCpf1)。
18. 根据权利要求13所述的方法,其中所述Cpf1酶包括毛螺菌属Cpf1 (LbCpf1)。
19. 根据权利要求13所述的方法,其中所述st-crRNA包括所述crRNA的3' 端上的茎环结构。
20. 根据权利要求13所述的方法,其中所述st-crRNA包括所述crRNA的5' 端上的茎环结构。
21. 根据权利要求20所述的方法,其中所述茎环结构进一步包括添加至所述茎环的5' 端的三个甘氨酸残基。
22. 根据权利要求21所述的方法,其中所述茎环结构进一步包括部分磷硫酰化(PMS) 修饰。
23. 根据权利要求13所述的方法,其中所述基因编辑包括使选自以下的基因突变:TCR $\alpha$ 链恒定区(TRAC)、TCR $\beta$ 恒定区(TRBC)和 $\beta$ -2微球蛋白(B2m)。
24. 一种基因修饰的细胞,其包括编码st-crRNA的外源核酸和编码Cpf1酶的外源核酸。
25. 根据权利要求24所述的基因修饰的细胞,其中所述细胞是T细胞。
26. 根据权利要求25所述的基因修饰的细胞,其中所述T细胞是原代T细胞。
27. 根据权利要求24所述的基因修饰的细胞,其中所述Cpf1酶包括氨基酸球菌属Cpf1

(AsCpf1)。

28. 根据权利要求24所述的基因修饰的细胞,其中所述Cpf1酶包括毛螺菌属Cpf1 (LbCpf1)。

29. 根据权利要求24所述的基因修饰的细胞,其中所述st-crRNA包括所述crRNA的5' 端上的茎环结构。

30. 根据权利要求24所述的基因修饰的细胞,其中所述st-crRNA包括所述crRNA的3' 端上的茎环结构。

31. 根据权利要求30所述的基因修饰的细胞,其中所述茎环结构进一步包括添加至所述茎环的5' 端的三个甘氨酸残基。

32. 根据权利要求31所述的基因修饰的细胞,其中所述st-crRNA的原间隔区进一步包括部分磷硫酰化 (PMS) 修饰。

33. 过继性细胞转移疗法的方法,所述方法包括向有需要的对象施用修饰的细胞群,所述修饰的细胞群包括权利要求24-32中任一项所述的修饰的细胞。

34. 治疗对象中疾病或病症的方法,所述方法包括向有需要的对象施用修饰的细胞群,所述修饰的细胞群包括权利要求24-32中任一项所述的修饰的细胞。

35. 根据权利要求34所述的方法,其中所述疾病或病症选自传染性疾病、自身免疫疾病和癌症。

36. 根据权利要求33-34中任一项所述的方法,其中所述对象是人。

37. 根据权利要求33-34中任一项所述的方法,进一步包括对所述疾病或病症施用二次治疗。

## 使用CRISPR/Cpf1在T细胞中进行基因编辑的组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请根据35U.S.C.§119(e) 有权享有在2017年5月4日提交的美国临时专利申请号62/501,371的优先权,其通过引用以其全部并入本文。

[0003] 关于联邦资助的研究或开发的声明

[0004] 本发明在美国国立卫生研究院给予的2R01CA120409下利用政府支持完成。政府拥有本发明中的某些权利。

### 背景技术

[0005] 治疗癌症的早期嵌合抗原受体 (CAR) T细胞临床数据已显示出令人鼓舞的结果,但对癌症和传染性疾病的CAR免疫疗法的进展受到缺乏易于获得的、有效的抗原和患者特异性T淋巴细胞的阻碍。对患者的高度个性化的CAR T细胞免疫疗法治疗可能相当昂贵且耗时。来自患有晚期疾病的患者的自体T细胞可能功能受损并且对所需抗原具有耐受性,从而迫使对同种异体供体来源的T细胞进行修饰。并且,在注入的同种异体T细胞上的内源性 $\alpha\beta$  T细胞受体可识别接受者中的主要和次要组织相容性抗原,从而导致移植物抗宿主疾病 (GVHD)。结果,注入自体CAR T细胞的大多数目前临床试验都依赖免疫耐受来防止正常组织在过继转移后的TCR介导的有害识别。这种方法已经取得了早期的临床成功,但是受到制造患者特异性T细胞产品所需的时间和费用的限制。因此,需要更安全的修饰T细胞,同时将制造患者特异性T细胞产品的时间和费用最小化的方法。

[0006] 尽管一些报道已经声称已经成功产生了通过破坏TCR表达而避免GVHD的通用T细胞,但同种异体T细胞仍然可以通过识别HLA-A分子而被宿主的免疫系统排斥。由于操纵多个基因的复杂靶向策略,以及ZFN和TALEN在T细胞中的低效率,迄今为止,尚无研究可同时实现预防GVHD和宿主对抗移植物反应的目标。为了产生真正的通用CAR T细胞,必须实现完全清除TCR $\alpha$ , $\beta$ 链和 $\beta$ -2微球蛋白。

[0007] T细胞基因组工程化对用于癌症、HIV、原发性免疫缺陷和自身免疫性疾病的基于细胞的疗法具有广阔的前景,但是人T细胞的基因操作一直具有挑战性。CRISPR/Cas9技术正在促进包括T细胞在内的许多细胞类型中的基因组工程化,但是CRISPR/Cpf1在人T细胞中的基因编辑能力仍然不理想。

[0008] 存在对用于原代人T细胞中的治疗基因组工程化的新的组合物和方法的需要。本发明满足了该需要。

### 发明内容

[0009] 如本文所描述,本发明涉及用于基因编辑的组合物和方法。

[0010] 本发明的一个方面包括基因编辑的方法,其包括向细胞施用包括茎环成簇的规律间隔短回文重复序列 (CRISPR) RNA (st-crRNA) 的外源核酸和编码Cpf1酶的外源核酸。

[0011] 本发明的另一个方面包括通过基因编辑产生修饰的T细胞的方法。该方法包括向T细胞施用包括st-crRNA的外源核酸和编码Cpf1酶的外源核酸。

[0012] 本发明的又另一个方面包括基因修饰的细胞,所述基因修饰的细胞包括编码st-crRNA的外源核酸和编码Cpf1酶的外源核酸。

[0013] 本发明的仍另一个方面包括过继性细胞转移疗法的方法。该方法包括向有需要的对象施用包括本发明的修饰细胞的修饰细胞群。

[0014] 在另一方面,本发明包括治疗对象中疾病或病症的方法。该方法包括向有需要的对象施用包括本发明的修饰细胞的修饰细胞群。

[0015] 在以上方面或本文叙述的本发明的任意其他方面的各种实施方式中,细胞是T细胞。在一个实施方式中,T细胞是原代T细胞。

[0016] 在一个实施方式中,施用包括使外源核酸电穿孔进入细胞。在一个实施方式中,进行多次电穿孔。

[0017] 在一个实施方式中,Cpf1酶包括氨基酸球菌属(Acidaminococcus) Cpf1 (AsCpf1)。在一个实施方式中,Cpf1酶包括毛螺菌属(Lachnospiraceae) Cpf1 (LbCpf1)。

[0018] 在一个实施方式中,st-crRNA包括crRNA的3'端上的茎环结构。在一个实施方式中,st-crRNA包括crRNA的5'端上的茎环结构。在一个实施方式中,茎环结构进一步包括添加至茎环的5'端的三个甘氨酸残基。在一个实施方式中,st-crRNA的原间隔区(protospacer region)进一步包括部分磷硫酰化(phosphorothioation) (PMS) 修饰。

[0019] 在一个实施方式中,基因编辑包括使选自如下的基因突变:TCR $\alpha$ 链恒定区(TRAC)、TCR $\beta$ 恒定区(TRBC)和 $\beta$ -2微球蛋白(B2m)。

[0020] 在一个实施方式中,疾病或病症选自传染性疾病、自身免疫疾病和癌症。在一个实施方式中,本发明的方法进一步包括对疾病或病症施用二次治疗。

[0021] 在一个实施方式中,对象是人。

## 附图说明

[0022] 当结合附图阅读时,将更好地理解本发明的具体实施方式的以下详细描述。为了说明本发明,在附图中显示了示例性实施方式。然而,应当理解,本发明不限于附图中所示实施方式的精确排布和手段。

[0023] 图1A-1E是图解crRNA的化学修饰和茎环结构能够实现利用Cpf1的有效基因靶向的一系列图和图像。图1A图解了crRNA、sgRNA的结构以及茎环和化学修饰位点的示意性设计。灰色字母:茎环;星号:修饰。图1B描绘了具有不同茎环的crRNA的基因靶向效率。No:无crRNA;Un:未修饰的crRNA;Lst:左侧茎环;Mst:中间茎环;Rst:右侧茎环。通过经由流式细胞术测量T细胞上CD3表达来确定TRAC和TRBC破坏。通过经由流式细胞术测量T细胞上B2m或HLA-I表达来确定B2m破坏。图1C是化学修饰的PMS-crRNA的图解。MS-crRNA:2'-O-甲基3'磷硫酰化crRNA;PMS-crRNA:磷硫酰化MS-crRNA。图1D显示了单次电穿孔的化学修饰的crRNA的基因靶向效率。FPMS-crRNA:完全磷硫酰化PMS-crRNA。图1E显示了多次电穿孔的化学修饰的crRNA的基因靶向效率。

[0024] 图2A-2B是图解原代T细胞中Cpf1的严格指导选择性的一系列图。图2A显示了偏向不同RGEN的指导。使用Cpf1和野生型且高保真性Cas9-eSpCas9在原代T细胞中编辑三种基因TRAC、TRBC和B2m。对每个基因测试十种不同的指导RNA。经由流式细胞术在蛋白质表达的基础上测量基因破坏。图2B显示了不同RGEN的指导长度需求。通过具有截短的指导RNA的不

同RGEN靶向TRAC、TRBC和B2m。使用流式细胞术在蛋白质表达的基础上测量基因破坏。

[0025] 图3A-3C是图解原代T细胞中利用Cpf1的增强的基因靶向特异性的一系列图。进行TRAC、TRBC、B2m基因消融(ablation),从而测量不同RGEN的脱靶(off-target)事件。经由T7E1试验测量突变发生的频率。利用20mer指导RNA(图3A)或18mer指导RNA(图3B)进行基因靶向,并使用突变的指导RNA测试不同RGEN的脱靶作用。经由T7E1试验计算中靶和脱靶位点处突变发生的频率。图3C显示了如通过利用突变的指导RNA进行基因靶向所确认的Cpf1的降低的脱靶可能性。使用单碱基对突变的指导RNA测试Cpf1或Cas9的非特异性指导。虽然邻近PAM位点的10个碱基对内的单突变降低Cas9的靶向效率,但是在PAM位点近端的单突变不显著影响基因靶向效率。指导RNA的单碱基对突变大大地消除了Cpf1的基因破坏能力,这表明Cpf1比Cas9更特异性靶标识别。

[0026] 图4是图解原代T细胞中利用茎环crRNA的增强的基因破坏的一系列图。图4A显示了利用多次电穿孔方案,原代T细胞中Cas9、AsCpf1和LbCpf1的基因破坏效率的比较。图4B显示了利用茎环crRNA的Cpf1的增强的基因消融。在多次电穿孔方案中,与野生型crRNA相比,使用茎环crRNA观察到几乎2倍的基因破坏。

[0027] 图5是图解crRNA的柄(handle)结构上的化学修饰消除了其功能的图。展示了利用单次和多次电穿孔方案使用柄“AA”化学修饰的crRNA的TRAC破坏。

## 具体实施方式

### [0028] 定义

[0029] 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。

[0030] 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。

[0031] 本文使用冠词“一个”和“一种”,指的是一个或多个(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个要素。

[0032] 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 $\pm 20\%$ 或 $\pm 10\%$ 、更优选地 $\pm 5\%$ 、甚至更优选地 $\pm 1\%$ 、和还更优选地 $\pm 0.1\%$ 的变化,因为这样的变化适于进行公开的方法。

[0033] 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”指的是正经历细胞分裂的T细胞等。

[0034] 如本文使用的术语“抗体”指的是与抗原特异性结合的免疫球蛋白分子。抗体可以是源自天然来源或重组来源的完整免疫球蛋白,并且可以是完整免疫球蛋白的免疫反应性部分。抗体通常是免疫球蛋白分子的四聚体。本发明中的抗体可以以多种形式存在,其包括,例如,多克隆抗体、单克隆抗体、Fv、Fab和F(ab)<sub>2</sub>,以及单链抗体(scFv)和人源化抗体(Harlow et al.,1999,In:Using Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,NY:Harlow et al.,1989,In:Antibodies:A Laboratory

Manual, Cold Spring Harbor, New York; Houston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; Bird et al., 1988, Science 242:423-426)。

[0035] 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')<sub>2</sub>和Fv片段、线性抗体、scFv抗体、和由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0036] 如本文使用的“抗体重链”指的是以它们天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。

[0037] 如本文使用的“抗体轻链”指的是以它们天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。 $\alpha$ 和 $\beta$ 轻链指的是两种主要的抗体轻链同种型。

[0038] 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。

[0039] 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,或特定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。

[0040] 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。

[0041] “同种异体的”指的是衍生自相同物种的不同动物的任何物质。

[0042] “异种的”指的是衍生自不同物种的动物的任何物质。

[0043] 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性细胞转移的疗法。T细胞从患者移出并且进行修饰,使得它们表达对具体形式的抗原特异性的受体。在一些实施方式中,CAR对选择的靶标——例如B细胞表面受体——具有特异性。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包括融合至CD3- $\zeta$ 跨膜和胞内结构域的包括抗-B细胞结合结构域的细胞外结构域。

[0044] 术语“切割”指的是共价键的断裂——比如在核酸分子的主链中,或者肽键的水解。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。可以作为两个不同的单链切割事件的结果发生双链切割。DNA切割可以导致产生平头末端或交错末端。在某些实施方式中,融合多肽可以用于靶向切割的双链DNA。

[0045] “疾病”是动物的如此健康状态,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”是如此健康状态,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。

[0046] 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。

[0047] “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。

[0048] “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限定的核苷酸序列(即,rRNA、tRNA和mRNA)或限定的氨基酸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。

[0049] 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。

[0050] 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。

[0051] 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。

[0052] 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。

[0053] “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,裸露的或包含在脂质体中的)和病毒(例如,仙台病毒、慢病毒、逆转录病毒、腺病毒和腺伴随病毒)。

[0054] 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鉴定为异物并诱发抗体形成和/或活化淋巴细胞以移除该抗原时发生的对抗原的细胞应答。

[0055] 当指示“免疫学有效量”、“自身免疫疾病抑制有效量”或“治疗量”时,医师或研究人员可以考虑患者(对象)的年龄、体重、肿瘤大小、感染或转移程度以及病症的个体差异确定待施用的本发明组合物的精确量。

[0056] 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。

[0057] “分离的”意思是从天然状态改变或移出。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天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。

[0058] 如本文使用的术语“敲低”指的是一种或多种基因的基因表达的降低。

[0059] 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。

[0060] 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。

[0061] 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。

[0062] 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。

[0063] 除非另外规定，“编码氨基酸序列的核苷酸序列”包括彼此是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）。

[0064] 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。

[0065] 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PCR<sup>TM</sup>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。

[0066] 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。蛋白质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彼此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，其在本领域中也通常被称为蛋白质，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。

[0067] 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，但不限于经由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- $\beta$ 的下调、和/或细胞骨架结构的重组等。

[0068] “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。

[0069] 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。

[0070] 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。

[0071] 如本文使用的“基本上纯化的”细胞是实质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天然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。

[0072] “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。

[0073] 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，所述细胞包括，例如，辅助性T细胞、细胞毒性T细胞、记忆T细胞、调节T细胞、天然杀伤T细胞和γδT细胞。

[0074] 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。

[0075] 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。

[0076] “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病症的频率或严重程度。

[0077] “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。

[0078] 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。

#### [0079] 描述

[0080] 本发明提供了制备和使用基因修饰的细胞的组合物和方法。基因修饰的细胞包括编码茎环成簇的规则间隔短回文重复序列 (CRISPR) RNA (st-crRNA) 的外源核酸和编码Cpf1酶的外源核酸。本发明的某些方面包括细胞中进行基因编辑的方法和产生修饰的细胞的方法。还包括包含修饰的细胞用于过继性疗法和治疗疾病或病症的方法和药物组合物。

[0081] 本文公开的数据证明了使用Cpf1和crRNA在人T细胞中的有效基因组工程化。CRISPR/Cpf1基因编辑消融了TCR $\alpha$ 链——TCR/CD3复合体的主要组分。Cpf1基因编辑导致高达80%的细胞失去TCR的高水平细胞表面表达。这些结果确立了CRISPR/Cpf1用于原代人T细胞的各种实验和治疗基因组工程化应用。

#### [0082] CRISPR/Cpf1

[0083] 成簇的规律间隔短回文重复序列 (CRISPR) 和CRISPR-相关 (Cas) 蛋白——其为细菌提供对外来核酸的适应性免疫——已被重新用于人细胞和其他类型细胞以及动植物的靶向基因组编辑。CRISPR/Cas9技术源自II型CRISPR/Cas系统，该系统由一种DNA内切核酸酶蛋白、Cas9、和两个小RNA (CRISPR RNA (crRNA) 和反式活化crRNA (tracrRNA)) 组成。小RNA或嵌合单指导RNA (sgRNA) 结合Cas9，从而形成RNA指导的DNA内切核酸酶 (RGEN) 复合物，并切割特定的DNA靶标。然后经由同源重组 (HR) 或非同源端连接 (NHEJ) 修复染色体双链平端断裂 (DSB)，并产生基因修饰。

[0084] Cpf1是衍生自V型CRISPR系统的另一种RGEN。Cpf1在几个方面与Cas9不同。首先，Cpf1的功能仅需要crRNA，而不需要crRNA/tracrRNA对。其次，Cas9切割产生平的DSB，而Cpf1切割产生内聚端。第三，Cpf1识别富胸苷的DNA序列，诸如靶序列 (例如5'-TTN-3') 5'端处的原间隔区相邻基序 (PAM)。Cpf1的这些功能扩展了CRISPR-内切核酸酶可编辑的基因组位点的范围，超出了各种Cas9酶识别的富含鸟苷的序列。Cpf1仅需要crRNA，而不利用tracrRNA，并且Cpf1 crRNA显著短于Cas9所需的~100个核苷酸sgRNA，从而提供了更便宜和更简单的指导RNA生产。当使用化学修饰的指导时，此性质特别有用。化学修饰的sgRNA最近被显示增强人类原代细胞中的基因靶向效率；但是，直到本研究，仍在研究化学修饰的crRNA可以帮助Cpf1的基因靶向的程度。

[0085] 研究人员已经报道了在全基因组脱靶分析的基础上，在某些细胞类型中Cpf1的基因靶向特异性比Cas9更好。Cpf1在T细胞中的特异性尚没有被理解。

[0086] T细胞靶向的基因组编辑在促进基于T细胞的癌症免疫治疗方面具有巨大潜力。已经对利用Cas9-sgRNA在原代T细胞中进行基因编辑进行了广泛研究。然而，Cpf1在T细胞中的基因编辑潜力仍有待探索。在本研究中，检查了结构和化学修饰对crRNA的影响以及在T细胞中使用Cpf1-crRNA进行基因编辑的效率和特异性。

#### [0087] 组合物

[0088] 本发明的某些方面包括基因修饰的细胞。在一个方面中，本发明包括基因修饰的细胞，其包含编码st-crRNA的外源核酸和编码Cpf1酶的外源核酸。基因修饰的细胞可以是

任何类型的细胞,其包括但不限于T淋巴细胞、B淋巴细胞、NK细胞、单核细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、上皮细胞、造血干细胞和诱导性多能干细胞(iPS)。

[0089] 在一个实施方式中,基因修饰的细胞是人细胞。在另一个实施方式中,基因修饰的细胞是自体细胞。

[0090] 在某些实施方式中,基因修饰的细胞是T细胞。T细胞可以是本领域内已知的任何类型的T细胞,其包括但不限于CD3<sup>+</sup>细胞、CD4<sup>+</sup>细胞、CD8<sup>+</sup>细胞、T调节细胞(Treg)、T辅助细胞(Th1和Th2)、细胞毒性T细胞(CTL)、天然杀伤T细胞(NKT细胞)、 $\gamma\delta$ T细胞、效应T细胞、记忆T细胞和稚T细胞。在一个实施方式中,基因修饰的T细胞是原代T细胞。在另一个实施方式中,基因修饰的细胞是自体T细胞。

[0091] 本发明的基因修饰的细胞包括编码Cpf1酶的外源核酸。Cpf1酶可以源自任何微生物属,其包括但不限于俭菌总门(Parcubacteria)、毛螺菌属(Lachnospiraceae)、丁酸弧菌属(Butyrivibrio)、异域菌门(Peregrinibacteria)、氨基酸球菌属、卟啉单胞菌属、毛螺菌属、卟啉单胞菌属(Porphromonas)、普雷沃菌属(Prevotella)、莫拉菌属(Moraxela)、史密斯氏菌属(Smithella)、钩端螺旋体(Leptospira)、毛螺菌属、弗朗西丝菌属(Francisella)、念珠菌属(Candidatus)和真细菌属(Eubacterium)。在一个实施方式中,Cpf1源自来自氨基酸球菌属(AsCpf1)的物种。在另一个实施方式中,Cpf1源自来自毛螺菌属(LbCpf1)的物种。

[0092] 本发明的基因修饰的细胞包括编码具有附加至其的至少一个额外茎环结构的CRISPR RNA的外源核酸(st-crRNA)。幼稚crRNA通常由约42-44个核苷酸(一个19个核苷酸长的重复序列和一个23-15个核苷酸间隔序列)和单个茎环结构(也称为“柄”结构)组成。本发明的crRNA还包括至少一个额外的茎环结构(除了柄以外),并且在本文中被称为茎环crRNA(st-crRNA)。额外的茎环结构(一个或多个)可以附加至crRNA的5'端和/或crRNA的3'端。st-RNA可以包含一个额外的茎环结构或多于一个额外的茎环结构。在一个实施方式中,st-crRNA包括在crRNA的邻近柄的5'端上的茎环结构。在另一个实施方式中,st-crRNA包括在crRNA的3'端上的茎环结构。st-RNA可以进一步包括修饰。在一个实施方式中,st-RNA还包括添加至茎环的5'端的三个甘氨酸残基。在另一个实施方式中,st-crRNA的原间隔区进一步包括部分磷酰化(PMS)修饰。在又一个实施方式中,st-RNA还包括添加至茎环的5'端的三个甘氨酸残基和原间隔区中的部分磷酰化(PMS)修饰。

[0093] 可以设计本发明的st-crRNA以靶向感兴趣的任何基因。例如,在某些实施方式中,设计crRNA以靶向TCR $\alpha$ 链恒定区(TRAC)和/或TCR $\beta$ 恒定区(TRBC),和/或 $\beta$ -2微球蛋白(B2m)基因。

[0094] 方法

[0095] 在一个方面,本发明包括基因编辑的方法。该方法包括向细胞施用包括茎环成簇的规律间隔短回文重复序列(CRISPR) RNA(st-crRNA)的外源核酸和包括Cpf1酶的外源核酸。在一个实施方式中,待编辑的细胞是T细胞。在另一个实施方式中,细胞是原代T细胞。

[0096] 本发明的另一方面包括生成修饰的T细胞的方法。该方法包括向细胞施用包括st-crRNA的外源核酸和包括Cpf1酶的外源核酸。

[0097] 在本发明的某些实施方式中,通过将外源核酸电穿孔入细胞施用外源核酸。在某些实施方式中,对细胞进行多次电穿孔。例如,可以利用第一st-crRNA第一次电穿孔细胞,

然后利用第二st-crRNA第二次电穿孔细胞。

[0098] Cpf1酶可以源自任何微生物属,其包括但不限于俭菌总门、毛螺菌属、丁酸弧菌属、异域菌门、氨基酸球菌属、卟啉单胞菌属、毛螺菌属、卟啉单胞菌属、普雷沃菌属、莫拉菌属、史密斯氏菌属、钩端螺旋体、毛螺菌属、弗朗西丝菌属、念珠菌属和真细菌属。在一个实施方式中,Cpf1源自氨基酸球菌属(AsCpf1)。在另一个实施方式中,Cpf1源自毛螺菌属(LbCpf1)。

[0099] 本发明的某些方面包括CRISPR-RNA(crRNA),其附加有茎环(st-crCRNA)。茎环结构可以附加至crRNA的3'端和/或crRNA的5'端。茎环可以进一步包括附加至茎环的5'端的额外三个甘氨酸残基。st-crRNA的原间隔区可以进一步包括部分磷硫酰化(PMS)修饰。在一个实施方式中,st-RNA进一步包括附加至茎环的5'端的三个甘氨酸残基和原间隔区中的部分磷硫酰化(PMS)修饰。

[0100] 本发明的基因编辑方法可以被用于突变任何感兴趣的基因。例如,方法可以突变TCR $\alpha$ 链恒定区(TRAC)和/或TCR $\beta$ 恒定区(TRBC)和/或 $\beta$ -2微球蛋白(B2m)。方法可以与其他CRISPR系统联合使用,例如与I型或II型CRISPR系统联合使用。在一个非限制性实例中,Cpf1/st-crRNA基因编辑系统可以与CRISPR/Cas 9系统联合使用。以多重方式使用两个系统将允许更广泛的筛选和靶标选择性。

#### [0101] 核酸的引入

[0102] 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))。

[0103] 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。

[0104] 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,比如大分子复合物、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)。

[0105] 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间前,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在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。

[0106] 不管用于将外源性核酸引入宿主细胞的方法如何,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。

[0107] 而且,核酸可以通过任何手段被引入,比如转导细胞、转染细胞和电穿孔细胞。一种核酸可以通过一种方法被引入细胞并且另一种核酸可以通过不同的方法被引入细胞。

[0108] RNA

[0109] 在一个实施方式中,被引入细胞的核酸是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。

[0110] 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“上游”指待扩增的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“下游”指待扩增的DNA序列相对于编码链的3'位置。

[0111] 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。

[0112] 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。

[0113] 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,当如上面描述的通过PCR正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能够实现高效翻译所必需的。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。

[0114] 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'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启动子的共有核苷酸序列是本领域已知的。

[0115] 在一个实施方式中,mRNA具有5'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聚合酶产生不适于在真核细胞中表达的长的多联体产物(concatameric product)。在3'UTR的端处线性化的质粒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。

[0116] 在线性DNA模板上,噬菌体T7 RNA聚合酶可以使转录物的3'端延伸超过模板的最后碱基(Schenborn and Mierendorf, *Nuc Acids Res.*, 13:6223-36 (1985); Nacheva and Berzal-Herranz, *Eur. J. Biochem.*, 270:1485-65 (2003)。

[0117] 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。

[0118] 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。

[0119] 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'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。

[0120] 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, et al., Trends in Biochem.Sci., 29:436-444 (2001); Stepinski, et al., RNA, 7:1468-95 (2001); Elango, et al., Biochim.Biophys.Res.Commun., 330:958-966 (2005))。

[0121] 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。

[0122] 在一些实施方式中, RNA被电穿孔入细胞, 诸如体外转录的RNA。

[0123] 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。

[0124] 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。

[0125] 本发明的RNA转染方法的一个优势是RNA转染基本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。

[0126] 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。

[0127] 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(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。

[0128] 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。

[0129] 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该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,MedPulserTMDNA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。

#### [0130] 疗法

[0131] 本文描述的修饰的细胞可以包括在用于疗法的组合物中。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。可以施用治疗有效量的包括修饰的细胞的药物组合物。

[0132] 在一个方面,本发明包括进行过继性细胞转移疗法的方法,其包括向有需要的对象施用本发明的修饰的细胞。在另一方面,本发明包括治疗对象中疾病或病症的方法,其包括向有需要的对象施用修饰的细胞群。

[0133] 在某些实施方式中,修饰的细胞是T细胞。T细胞可以是原代T细胞。如本文描述所生成的修饰的T细胞拥有T细胞功能。

[0134] 修饰的细胞可以被施用至哺乳动物,优选人,以抑制免疫反应,诸如常见于自身免疫疾病的那些,自身免疫疾病诸如糖尿病、牛皮癣、类风湿性关节炎、多发性硬化、GVHD、增强同种异体移植耐受性诱导、植入物排斥等等。另外,本发明的细胞可用于治疗任何期望减轻或以其他方式抑制的免疫应答——特别是细胞介导的免疫应答——的病症,以治疗或减轻疾病。在一个方面,本发明包括在对象中治疗病症,诸如自身免疫疾病,其包括向对象施用治疗有效量的包含修饰的细胞群的药物组合物。自身免疫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(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、以及韦格纳氏肉芽肿病。

[0135] 如本文描述所生成的修饰的细胞还可以被扩展并用于治疗炎性障碍。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)。

[0136] 在另一个实施方式中,本文描述的细胞可被用于制造用于治疗有需要的对象中免疫应答的药物。在另一个实施方式中,本发明包括本文描述的修饰的细胞用于治疗有需要的对象中免疫应答的方法。

[0137] 本发明的细胞可以施用至动物,优选哺乳动物,甚至更优选人,以治疗癌症。另外,本发明的细胞可用于治疗与癌症有关的任何病症,尤其是期望治疗或减轻疾病的针对肿瘤细胞(一种或多种)的细胞介导的免疫应答。癌症的例子包括但不限于乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、子宫颈癌、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、甲状腺癌等等。

[0138] 在某些实施方式中,为对象提供二级治疗。二级治疗包括但不限于化学疗法、辐射、手术和药物。

[0139] 本发明的细胞可以在适当的临床前和临床实验和试验中确定的剂量和途径以及时间下施用。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。

[0140] 待施用的本发明的细胞可以对于经历疗法的对象是自体的、同种异体的或异种的。

[0141] 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。

[0142] 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。

[0143] 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(traversal);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。

#### [0144] T细胞的来源

[0145] 在某些实施方式中,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。

[0146] 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PERCOLL™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。

[0147] 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。

[0148] 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<sup>+</sup>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。

[0149] 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<sup>6</sup>个细胞/ml的细胞浓度。在又一个实施方式中,使用75、80、85、90、95或100×10<sup>6</sup>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<sup>6</sup>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。

[0150] 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。虽然许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℃的速率冷冻至-80℃，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℃下或液氮中即刻不受控的冷冻。

[0151] 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。在又一个实施方式中，纯化的T细胞包括T细胞群。

#### [0152] T细胞的扩展

[0153] 在某些实施方式中，可以扩展T细胞。通过扩展，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。

[0154] 在培养之后，在将细胞传递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，在将细胞传递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。

[0155] 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。在还另一个实施方式中，冷藏的T细胞被解冻，以便电穿孔有编码嵌合膜蛋白的RNA。

[0156] 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。

[0157] 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。

[0158] 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——另外称为翻倍时间——测量细胞增殖速率。

[0159] 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。特定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翻倍;因此培养物的群翻倍数大于传代数。在传代之期间的细胞扩展(即,群翻倍数)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。

[0160] 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- $\gamma$ 、IL-4、IL-7、GM-CSF、IL-10、IL-12、IL-15、TGF $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 、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、 $\alpha$ -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 $^{\circ}$ C)和气氛(例如,空气加5%CO<sub>2</sub>)。

[0161] 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。

[0162] 在一个实施方式中,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。

#### [0163] 药物组合物

[0164] 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。

[0165] 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程度,但是可以由临床试验确定适当的剂量。

[0166] 待施用的本发明的细胞可以对于经历疗法的对象是自体的、同种异体的或异种的。

[0167] 本发明的细胞可以在适当的临床前和临床实验和试验中确定的剂量和途径以及时间施用。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。

[0168] 通常可以规定包括本文描述的修饰的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,在一些情况中 $10^5$ 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。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。针对特定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。

[0169] 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。

[0170] 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,以及本发明的治疗方法的完整的公开内容和描述,并且不意欲限制本发明人视为其发明的范围。

[0171] 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,其充分地和技术人员的见识内。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。

[0172] 实验实施例

[0173] 现在通过参考下列实施例描述本发明。这些实施例仅出于说明目的提供,并且本发明不限于下列实施例,而是涵盖由本文提供的教导而显而易见的所有变化。

[0174] 现在描述在这些实验中采用的材料和方法。

[0175] 原代人淋巴细胞。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。如先前所描述(Barrett et al.(2011)Human Gene Therapy22(12):1575-1586),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。T细胞在第10天以 $1 \times 10^8$ 细胞/小瓶被冷藏于90%胎牛血清和10%二甲基亚砜(DMSO)的溶液中。

[0176] 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:珠比值下使用包被有抗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。

[0177] CRISPR的设计和构建。通过具有NTTT PAM位点的NTTTN20选择crRNA。Cpf1和crRNA靶向的TCR $\alpha$ , $\beta$ 链的恒定区和 $\beta$ -2微球蛋白被体外转录。设计crRNA以靶向TCR $\alpha$ 恒定区的外显子1内的序列或TCR $\beta$ 恒定区1、2的外显子1共用的共有序列和B2m.mRNA在-80°C下储存在无核酸酶的小瓶中用于单次使用。

[0178] 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)、PE-抗 $\beta$ -2微珠蛋白 (551337)、FITC-抗HLA (555552)。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。

[0179] 利用CRISPR进行基因破坏。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20 $\mu$ g Cpf1 (Cas9或eSpCas9)、10 $\mu$ g crRNA (或sgRNA) 种类进入细胞之前,一千万个原代T细胞被去珠(de-beaded),接着是第二次电转移5 $\mu$ g crRNA (或sgRNA)。或者,同时用20 $\mu$ g Cpf1 mRNA加10 $\mu$ g化学修饰的crRNA电穿孔T细胞。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%CO<sub>2</sub>下培养或在32°C、5%CO<sub>2</sub>下培养1天,然后返回至37°C、5%CO<sub>2</sub>。

[0180] TRAC的sgRNA序列:AGAGTCTCTCAGCTGGTACA (SEQ ID NO:1)

[0181] TRBC的sgRNA序列:TGGGAGATCTCTGCTTCTGA (SEQ ID NO:2)

[0182] B2m的sgRNA序列:CGCGAGCACAGCTAAGGCCA (SEQ ID NO:3)

[0183] TRAC的crRNA序列:GAGTCTCTCAGCTGGTACACGGC (SEQ ID NO:4)

[0184] TRBC的crRNA序列:AGCCATCAGAAGCAGAGATCTCC (SEQ ID NO:5)

[0185] B2m的crRNA序列:ATCCATCCGACATTGAAGTTGAC (SEQ ID NO:6)

[0186] 用CRISPR进行基因编辑。使用mMESSAGE mMACHINE T7 ULTRA试剂盒 (Life Technologies, AM1345, Carlsbad, CA) 在体外转录Cpf1和Cas9 mRNA。使用MEGAscript T7转录试剂盒在体外转录SgRNA和crRNA。化学修饰的crRNA购自Integrated DNA Technologies。用CD3/CD28免疫磁珠刺激T细胞。在第3天,用Cas9或Cpf1 mRNA电穿孔T细胞。简而言之,将T细胞用OPTI-MEM洗涤3次,并以 $1-3 \times 10^8$ 个细胞/ml的终浓度重悬在OPTI-MEM (Invitrogen) 中。随后,将0.1ml细胞悬浮液与IVT RNA混合并在2mm比色皿中电穿孔。然后使用BTX830系统 (Harvard Apparatus BTX) 在360V下持续1ms,将20 $\mu$ g Cas9或Cpf1 mRNA和5 $\mu$ g指导RNA电穿孔到细胞中。电穿孔后,细胞被立即放置在2mL的预热培养基中并且在37°C下,在存在IL-2 (100IU/ml) 的条件下在5%CO<sub>2</sub>下培养。在第4天,将另外5 $\mu$ g指导RNA电穿孔到T细胞中。

[0187] 使用T7E1试验测量等位基因修饰频率。使用T7E1核酸酶试验 (NEB) 确定T细胞中TRAC、TRBC和B2m的基因组破坏水平。通过光密度法定量靶标破坏百分比。

[0188] 现在描述实验的结果。

[0189] 实施例1:在原代T细胞中使用茎环crRNA增强靶向突变发生

[0190] 先前,已经测试了来自不同属的Cpf1蛋白在哺乳动物细胞中的基因组编辑效率 (Zetsche et al. Cell. 2015; 163 (3) : 759-771)。在测试的八种不同的Cpf1蛋白中,仅发现分别来自氨基酸球菌属 (As) 和毛螺菌属 (Lb) 的两种蛋白AsCpf1和LbCpf1在哺乳动物细胞中产生可检测的突变。因此,本文在T细胞中评估了AsCpf1和LbCpf1的基因靶向效率。使用先前开发的有效T细胞基因消融方案,比较了AsCpf1、LbCpf1或Cas9之间在原代T细胞中CRISPR介导的基因组编辑的效率 (Ren et al. (2016) Clinical Cancer Research (2016) : clincanres-1300)。Cas9或Cpf1以及指导RNA以单次电穿孔被递送至原代T细胞。在三个内源性靶位点,TCR $\alpha$ 链恒定区 (TRAC)、TCR $\beta$ 恒定区 (TRBC) 和 $\beta$ -2微球蛋白 (B2m),测量了靶向的突变发生。使用Cas9观察到了10%至20%靶向的突变发生,而利用AsCpf1或LbCpf1均未观察到可检测的突变发生。通过多次递送指导RNA,使用Cas9在所有三个基因座处均实现了80~90%的基因破坏。使用AsCpf1实现了50%以上的基因破坏,和使用LbCpf1实现了大约30%的基因破坏 (图4)。Cas9和Cpf1电穿孔后,基因破坏效率的提高与指导RNA的第二次递送延迟有关。这一发现表明,包括sgRNA和crRNA在内的小指导RNA比Cas9和Cpf1 mRNA更易于降解。由于AsCpf1的基因破坏效率比LbCpf1高得多,因此在后续实验中重点研究AsCpf1。

[0191] 尽管用Cpf1-crRNA的基因靶向在T细胞中实现了实质的基因消融,但效率却低于Cas9-sgRNA。sgRNA和crRNA之间的结构差异可能是稳定性差异的原因。有趣的是,发现在与Cas9相互作用的各种茎环结构方面,sgRNA与crRNA不同,由此保护sgRNA免于RNA酶。据报道,茎环通过降低RNA酶的活性增强RNA的稳定性。已显示,A-U翻转和茎环延伸增加了sgRNA的稳定性。并且,已显示,通过优化sgRNA的结构提高基因破坏的效率。在本文中,测试了是否可以通过向crRNA添加茎环以生成茎环crRNA (st-crRNA) 增加基因破坏效率 (图1A)。在crRNA的5' (Lst) 或3' (Rst) 末端引入不同的sgRNA的茎环结构后,所有三个靶向基因均观察到大约2倍的增加。5'-末端茎环结构3 (Lst-3) 导致基因破坏的增加最大,其中TRAC达到85% (83.6%  $\pm$  7.3, n=5), TRBC为83% (81.7  $\pm$  5.7, n=4), B2m为81% (78.7  $\pm$  8.4, n=4) (图1B)。然而,crRNA (Mst-crRNA) 中原始柄茎环的延长消除了其功能,并且在5'和3'末端两者处添加茎环降低了靶向效率,从而阐明了crRNA对Cpf1结合的结构要求和长度限制 (图1B)。

[0192] 实施例2:利用化学修饰的茎环crRNA的增强的靶向突变发生

[0193] 已显示化学修饰以增加sgRNA的稳定性,从而增强基因破坏效率。为了进一步增加crRNA的稳定性,本文生成了靶向TRAC的化学修饰的crRNA。还确定了利用单次电穿孔是否可以实现有效的基因破坏,从而降低由第二次电穿孔引起的毒性。为了确认化学修饰不会消除crRNA的功能,使用两个电穿孔方案对修饰的crRNA进行测试。crRNA柄中尾“AA”核苷酸的修饰消除了其功能,因此表明“AA”对于适当的柄结构形成必不可少 (图5)。为了避免这种影响,将三个“G”残基添加到柄尾部,然后对三个“G”和三个尾原间隔核苷酸进行2'-O-甲基3'磷酰化 (MS) (图1C)。在这种情况下,修饰并没有消除crRNA的功能,尽管在单次电穿孔Cpf1和MS-crRNA后仍未观察到基因破坏。使用部分磷酰化原间隔MS-crRNA (PMS-crRNA),

实现TRAC的9.1% ( $9.7 \pm 1.7$ ,  $n=3$ ) 基因破坏。但是, crRNA (FPMS-crRNA) 的完全磷硫酰化消除其功能, 因此表明crRNA容易受到其柄结构修饰的影响(图1D)。

[0194] 为了验证crRNA上茎环结构的功能, 生成了靶向TRAC的PMS-Lst-3crRNA。在对Cpf1和未修饰的Lst-3-crRNA进行单次电穿孔后, 未观察到基因破坏; 但是, 对Lst-3crRNA进行PMS修饰导致超过61% ( $58.3 \pm 6.5$ ,  $n=3$ ) 的TRAC破坏, 这是利用没有茎环的PMS-crRNA获得的破坏的几乎7倍(图1D)。

[0195] 尽管PMS修饰连同茎环的存在大大提高了单次电穿孔方案中Cpf1-crRNA基因靶向效率, 但在两次电穿孔方案中并没有进一步提高茎环crRNA的基因破坏效率。这暗示茎环结构在仅需要瞬时crRNA暴露的实验中提供了对crRNA的足够保护(图1E)。

[0196] 实施例3: Cpf1在原代T细胞中的严格指导选择性

[0197] 为了测试T细胞中Cpf1的特征, 在原代T细胞中使用Cpf1和st-crRNA进行基因破坏。Cpf1与Cas9的不同之处不仅在于使用crRNA而不是sgRNA, 而且它还识别更严格的TTN的PAM序列, 而Cas9识别NGG的PAM序列。Cpf1以与Cas9相比同等有效但更严格的方式破坏靶基因。靶向TRAC、TRBC和B2m基因座的十种不同crRNA或sgRNA用于测试Cpf1、Cas9和eSpCas9(一种高保真性Cas9)在T细胞中的性能。超过一半的sgRNA介导利用Cas9的有效基因破坏, 而Cpf1仅用10个crRNA中的1-2个实现等效的基因破坏。这些结果表明Cpf1对crRNA的选择比Cas9的选择更为严格。有趣的是, Cpf1的这一特征类似于eSpCas9(一种高保真性Cas9)的特征, 它也表现出同等的基因破坏, 但更为严格的sgRNA选择(图2A)。已经报道, 通过使用较短的截短的sgRNA增强了特异性。因此, 测试了Cpf1-crRNA是否可以使用类似的策略来增加基因靶向特异性。与Cas9——其可以使用短至16bp的sgRNA, 仅稍稍降低基因破坏效率——相比, 截短至17bp的crRNA导致Cpf1的功能完全消除, 这一结果与eSpCas9观察到的结果相似(图2B)。因此, 在指导选择性和截短RNA两者方面, Cpf1的行为与eSpCas9相似, 这说明Cpf1可以用作Cas9的替代物, 作为高保真性基因编辑工具。

[0198] 实施例4: 在原代T细胞中与Cas9相比, Cpf1的基因靶向特异性增强

[0199] 为了进一步测试Cpf1的安全性, 使用在靶向TRAC、TRBC和B2m中基因破坏效率最高的3种crRNA测量脱靶事件。对每个基因测量十个脱靶位点。与严格的指导选择性一致, 使用野生型20bp或截短的18bp指导RNA, 与Cas9相比, Cpf1和eSpCas9观察到更低水平的并且更少的脱靶事件(图3A)。

[0200] 为了测试Cpf1和Cas9对其指导RNA的忠诚程度, 对靶向TRAC和TRBC的sgRNA或crRNA的每个核苷酸进行突变。与Cas9 sgRNA的PAM位点相邻的单点突变对其功能有严重影响, 而如果突变位点距离PAM位点10个碱基对, 则观察到很少或没有影响。但是, 无论突变位点位于何处, 即使crRNA中的单个突变也能够完全消除Cpf1的功能。有趣的是, 靶向TRBC的sgRNA的突变消除了eSpCas9的功能, 而靶向TRAC的sgRNA的突变导致保留eSpCas9的大部分功能(图3B)。这一发现表明, Cpf1可能比eSpCas9更忠诚于其指导RNA。

[0201] 所有这些数据指明Cpf1和Cas9的靶DNA识别机制不同。此外, 与NGG(其主要分布在外显子的编码序列之中)相反, 许多TTN序列位于未翻译区内, 因此导致Cpf1的脱靶相关功能效应不如Cas9严重。

[0202] 实施例5: 讨论

[0203] 作为CRISPR系统最吸引人的应用之一, 高效的基因编辑对推进基于T细胞的过继

性免疫疗法具有广阔的前景。然而,关于Cas9同系物Cpf1及其指导crRNA的特征知之甚少。迄今为止,尚未探索使用Cpf1在T细胞中进行靶向的基因组编辑的潜力。研究表明,使用Cpf1-crRNA可以实现有效而特异性的基因破坏。

[0204] 可以通过多次递送crRNA来完成40%至50%以上的基因消融,但是这种高效率也会导致对T细胞的毒性。为了使与多次电穿孔相关的毒性最小化,对crRNA进行结构和化学修饰。通过使用多次递送茎环-crRNA实现了超过80%的基因破坏。然而,单次电穿孔后未观察到实质性的基因破坏。报道了通过使用2'-O-甲基3'磷硫酰化的(MS)化学修饰的sgRNA增强基因破坏,但是本文对crRNA的MS修饰在单次电穿孔后未导致可检测的基因破坏。尽管使用crRNA的部分磷硫酰化进行基因编辑仅导致9%的基因破坏,但通过将保护性茎环并入crRNA中,实现了几乎7倍的基因靶向增加,达到60%以上。

[0205] 发现crRNA对其柄结构的修饰非常敏感,这是因为对尾部AA或内部核苷酸的修饰消除了其功能。该发现表明crRNA的结构对其形成至关重要,并因此,修饰柄结构可能会破坏其与Cpf1的相互作用。crRNA的柄茎环的延长也消除了其功能,因此表明Cpf1结合口袋的空间限制,该Cpf1结合口袋先前已在Cpf1与crRNA复合的晶体结构中阐明。

[0206] 与Cas9相比,使用Cpf1进行基因编辑导致全部三个测试的内源基因的较少脱靶突变发生。根据对crRNA和sgRNA中突变的耐受性评估,对指导RNA的保真性也证明Cpf1在T细胞中比Cas9更精确。尽管Cas9和Cpf1二者都生成DSB,但Cas9使用其RuvC和HNH样结构域以在种子序列内产生平头末端切割,而Cpf1使用RuvC样结构域以在种子序列外产生交错切割。如晶体结构所指示的,靶向的切割需要由Cas9与PAM序列相互作用引起的双链靶DNA的解离。该结果可表明,Cas9通过种子区内的裂解解离双链DNA所需的能量少于Cpf1切割种子区外的位点所需的能量。此性质可进而导致Cas9的脱靶可能比Cpf1更高。

[0207] 总而言之,本文证明了CRISPR/Cpf1系统是T细胞中有效且高保真性基因编辑工具。

[0208] 其它实施方式

[0209] 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。

[0210] 本文引用的每一篇和每篇专利、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。

## 序列表

<110> 宾夕法尼亚大学董事会

赵阳兵

任江涛

<120> 使用CRISPR/Cpf1在T细胞中进行基因编辑的组合物和方法

<130> 046483-7163W01 (01639)

<150> US 62/501,371

<151> 2017-05-04

<160> 6

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> sgRNA TRAC

<400> 1

agagtctctc agctggtaca 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> sgRNA TRBC

<400> 2

tgggagatct ctgcttctga 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> sgRNA B2m

<400> 3

cgcgagcaca gctaaggcca 20

<210> 4

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> crRNA TRAC

<400> 4

gagtctctca gctggtacac ggc 23

<210> 5

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> crRNA TRBC

<400> 5

agccatcaga agcagagatc tcc 23

<210> 6

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> crRNA B2m

<400> 6

atccatccga cattgaagtt gac 23

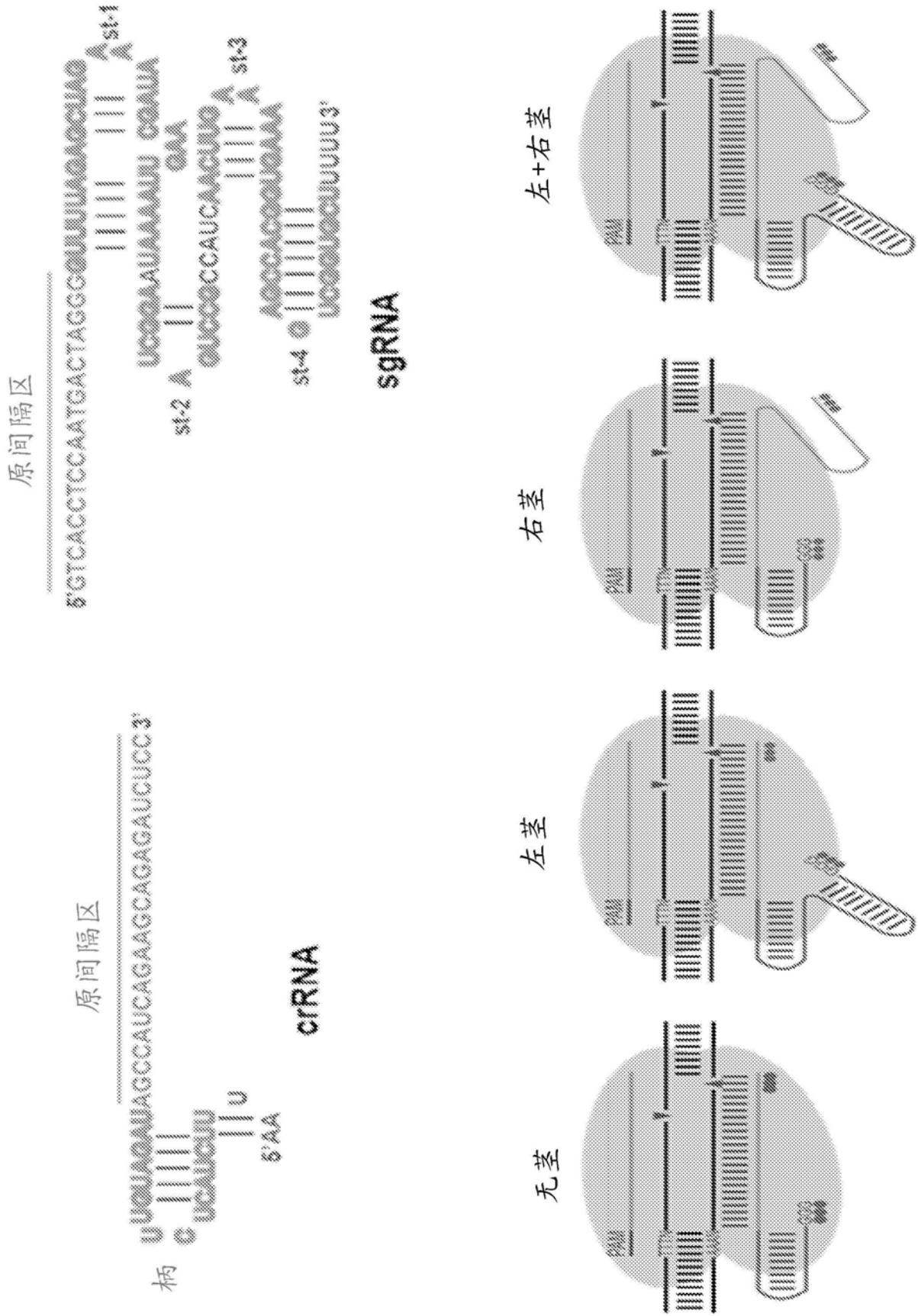


图1A

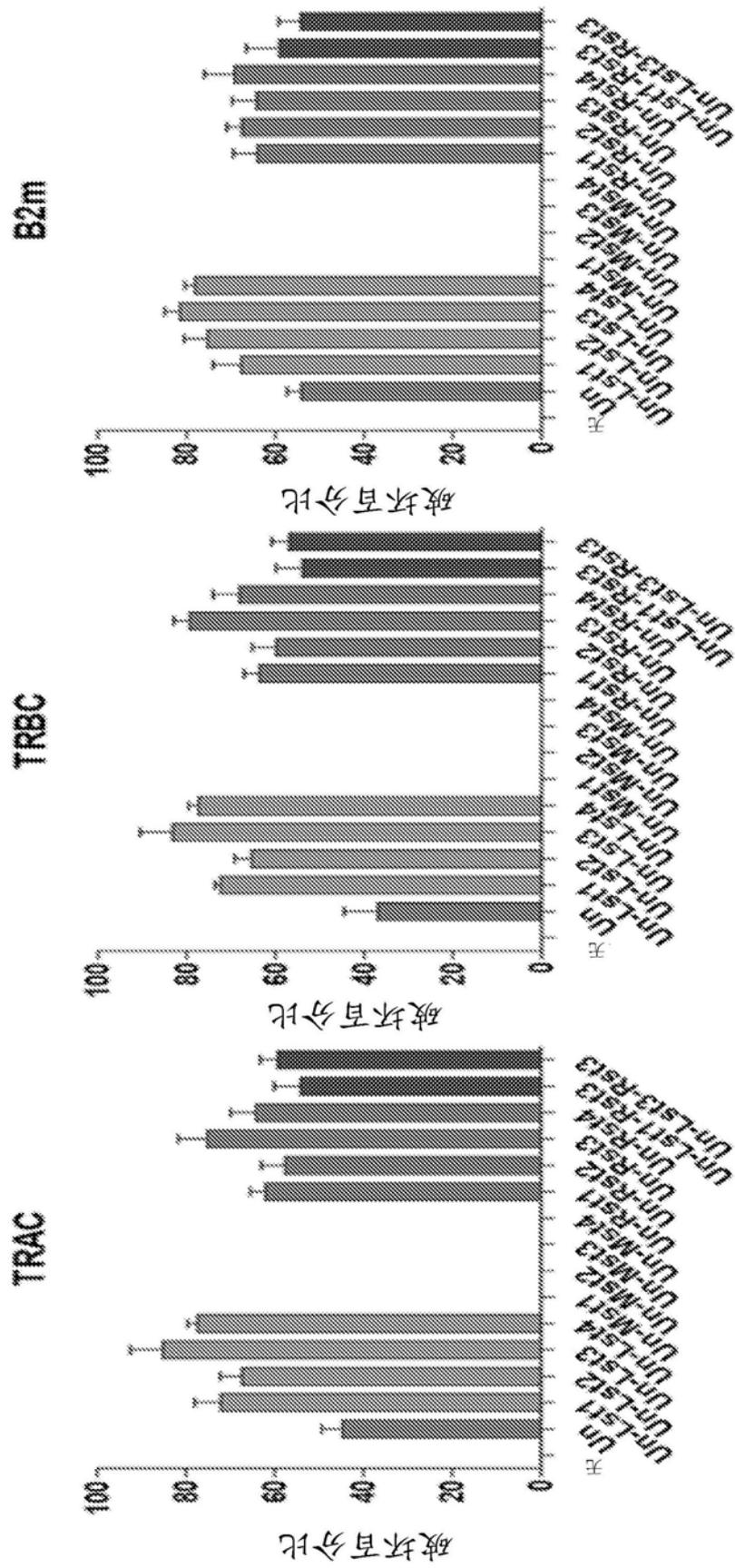


图1B



PMS-crRNA

TRAC

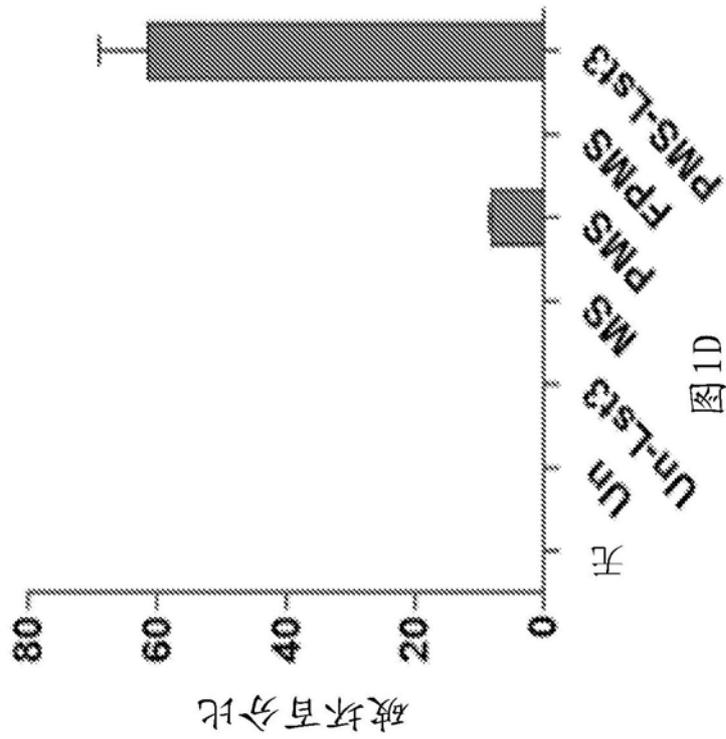


图1D

TRAC

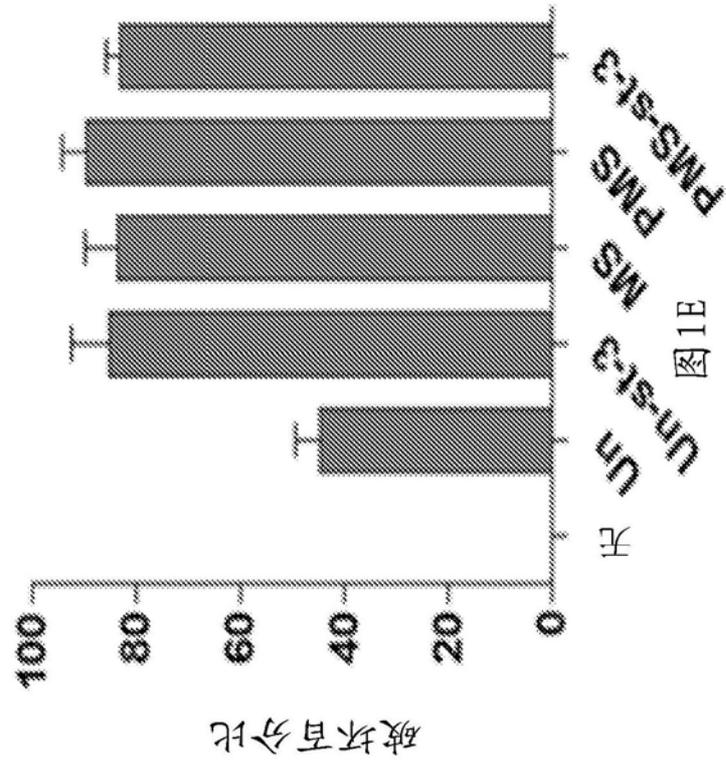


图1E

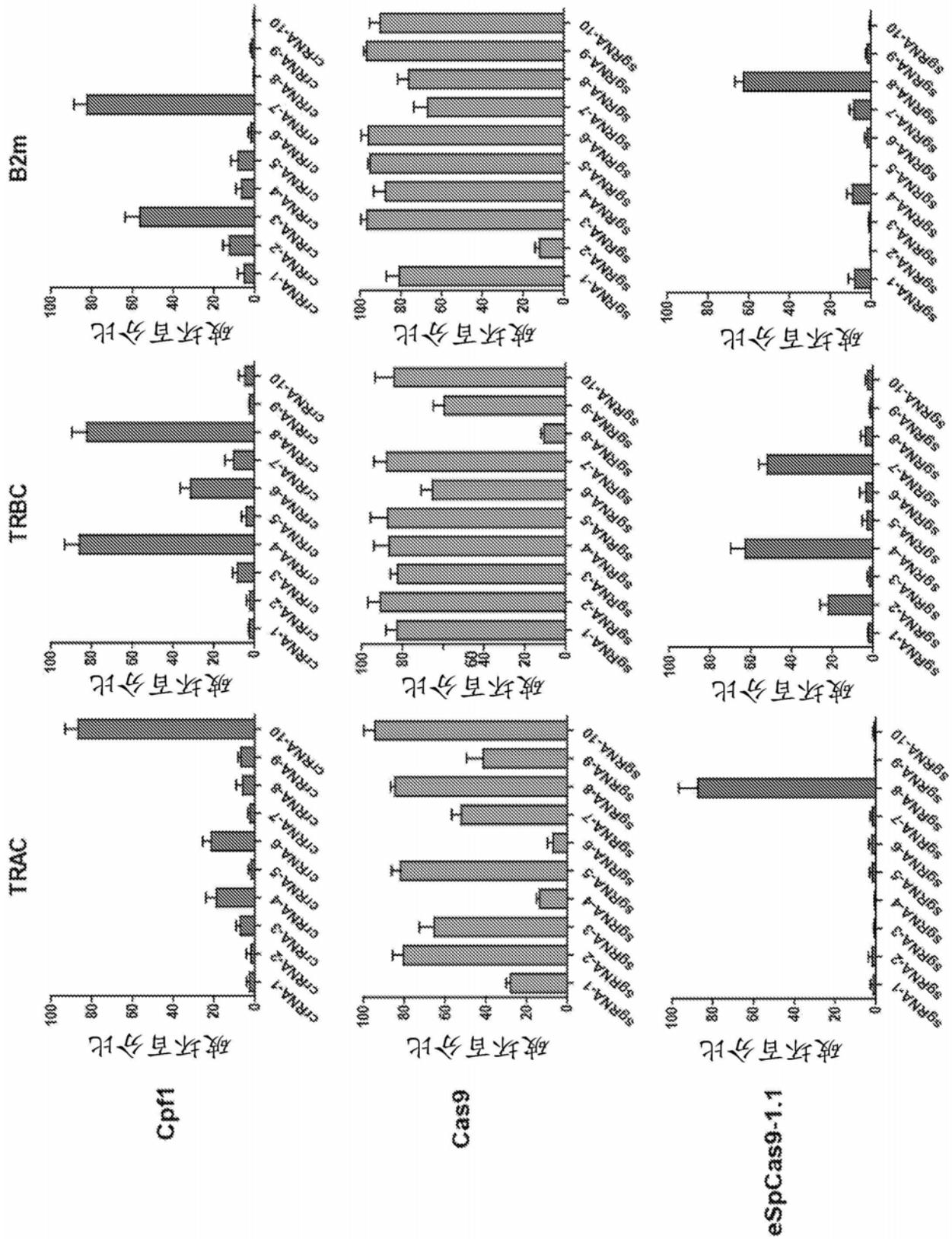


图2A

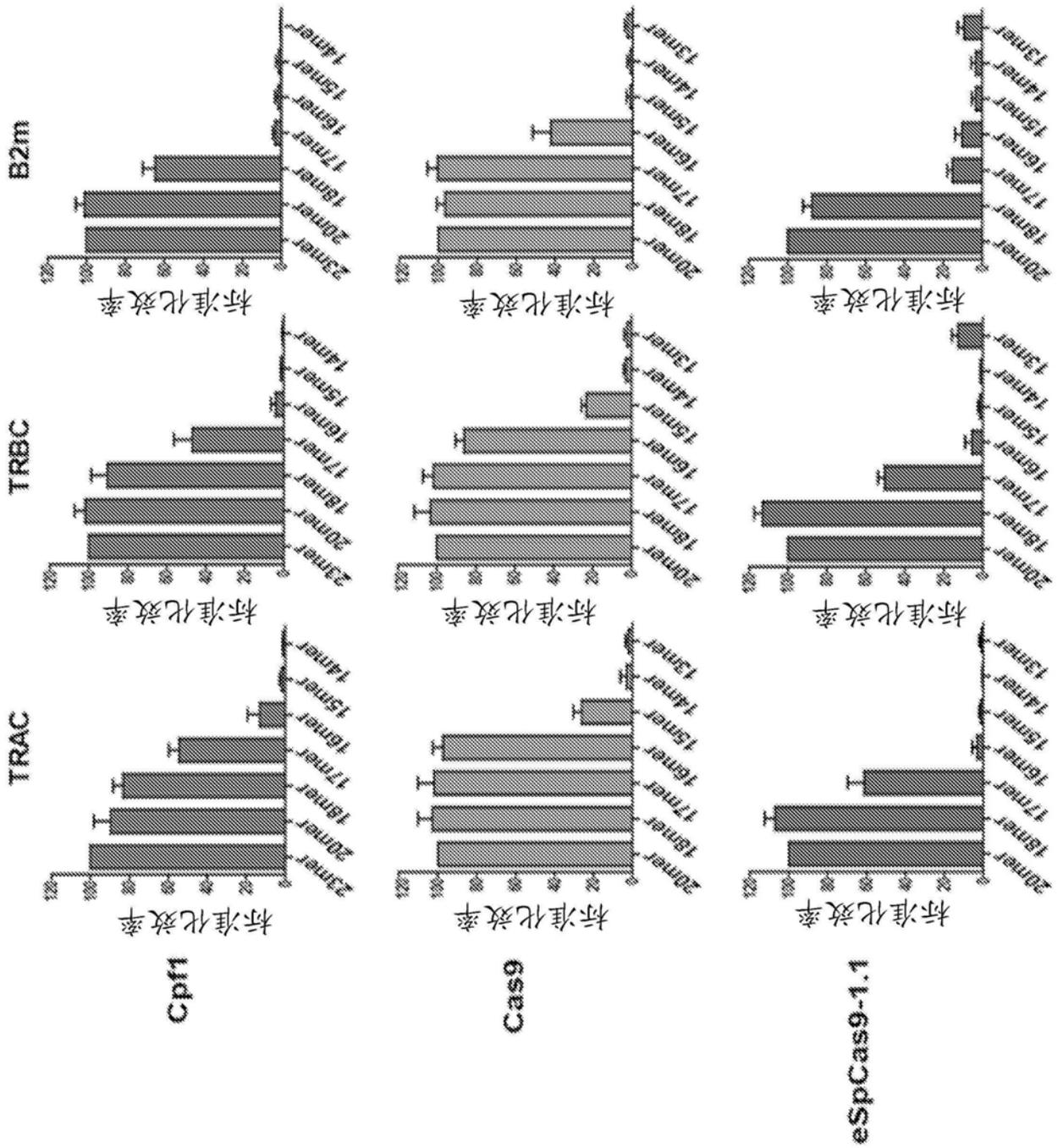


图2B

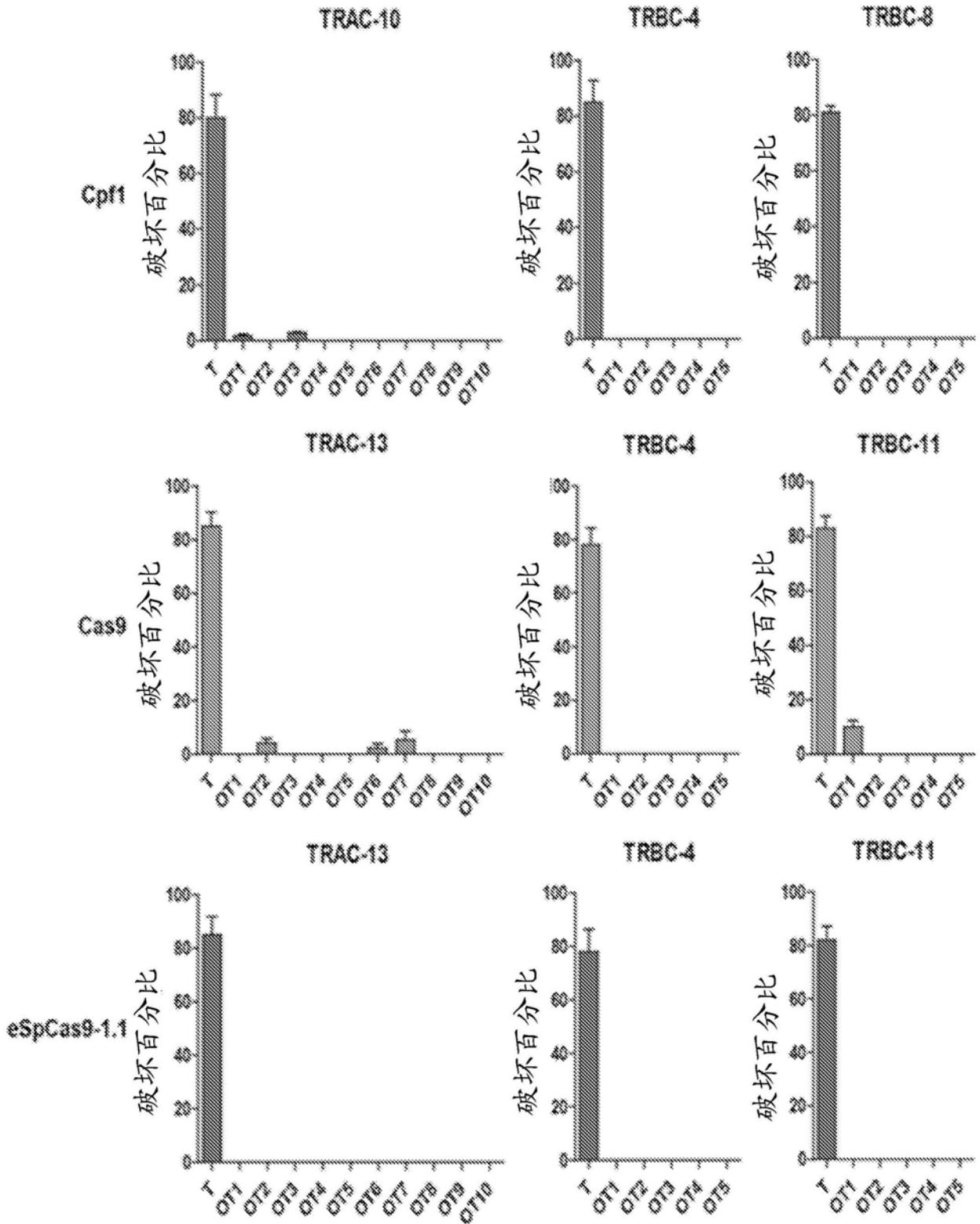


图3A

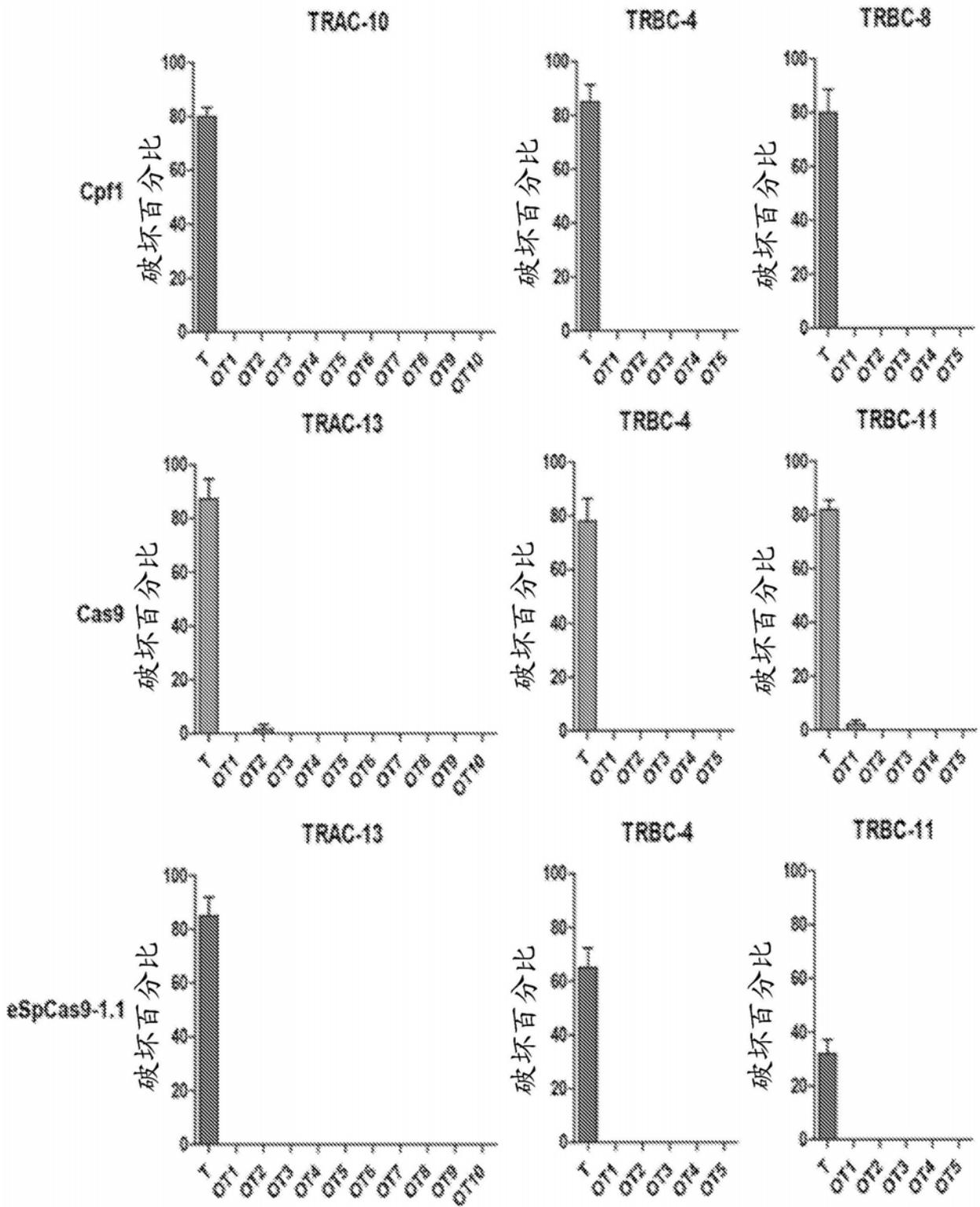


图3B

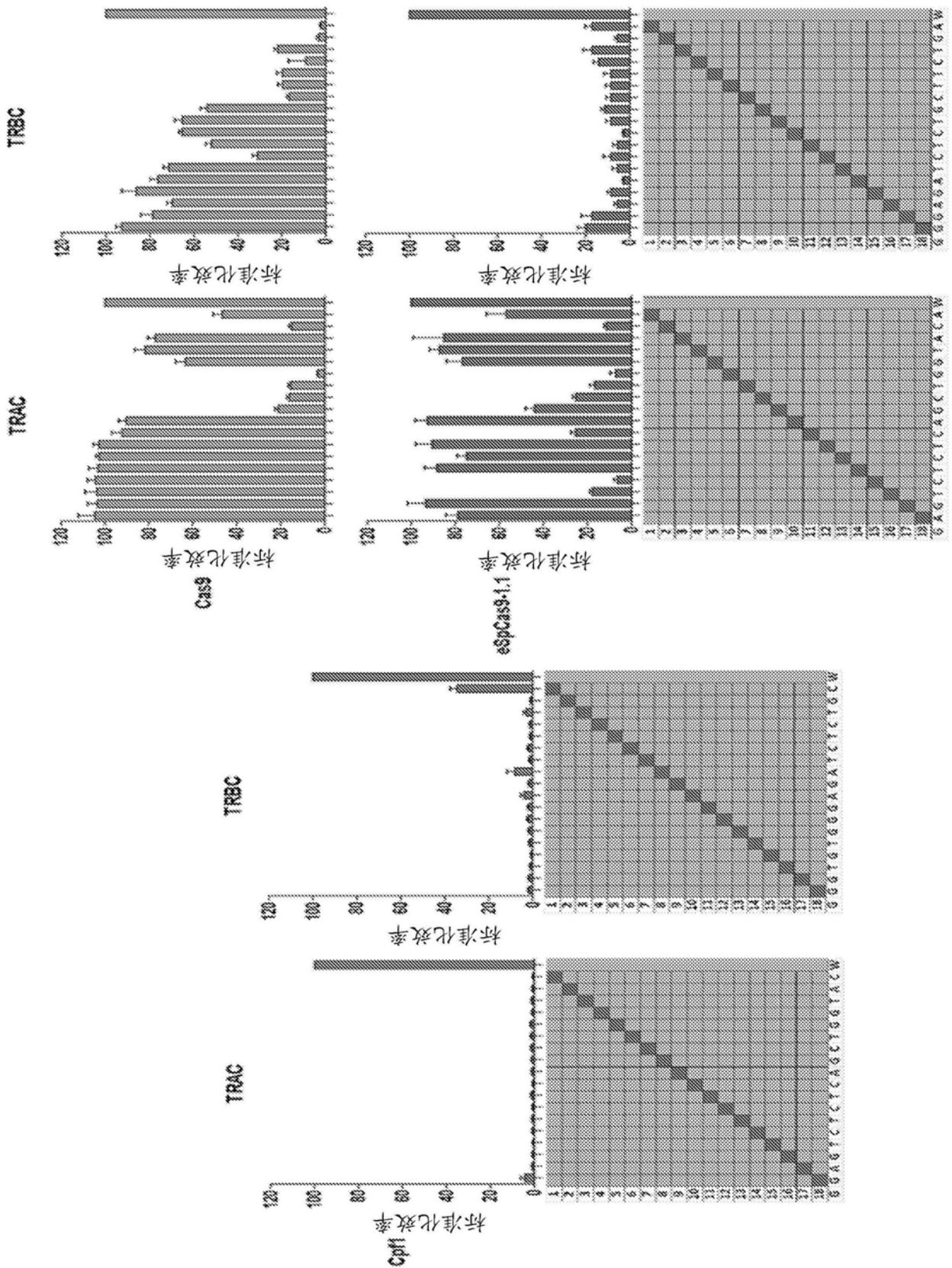


图3C

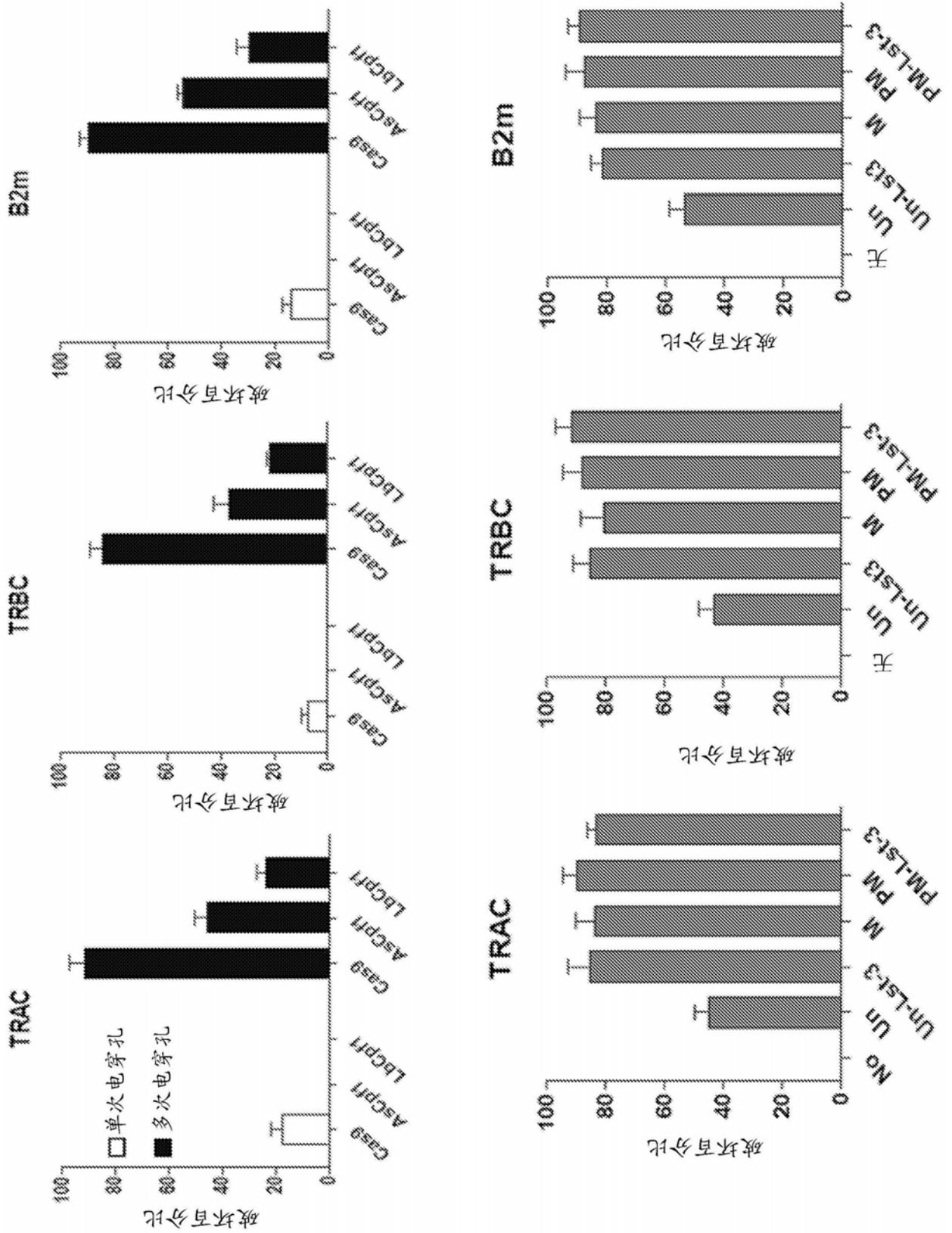


图4

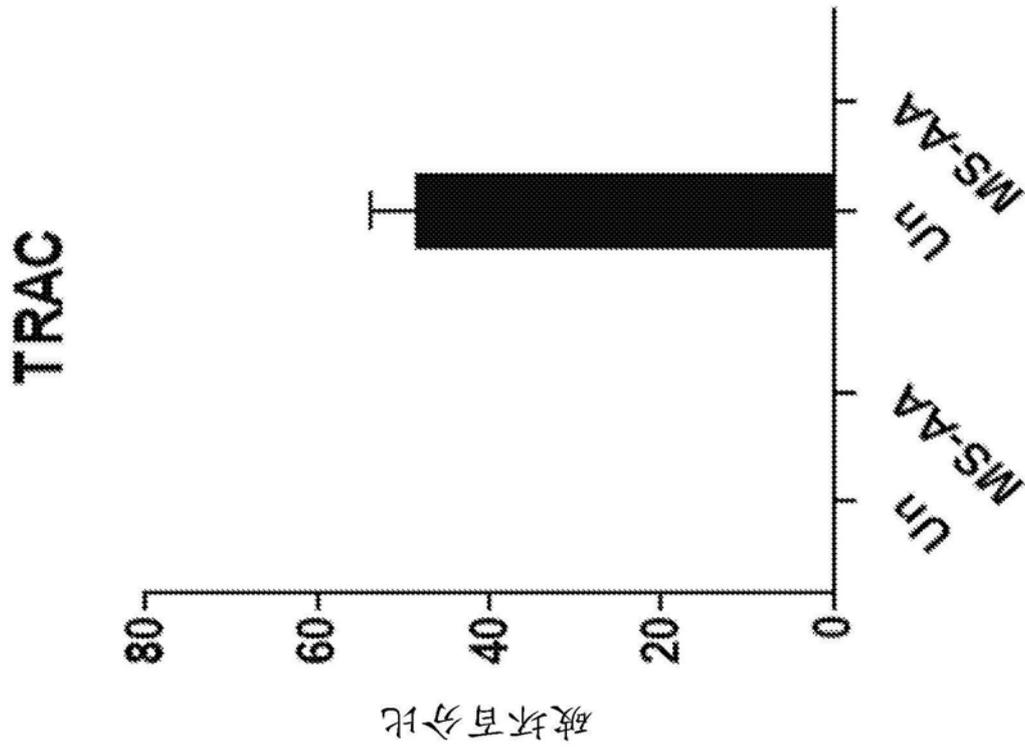


图5