



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118451178 A

(43) 申请公布日 2024. 08. 06

(21) 申请号 202280067055.7

(22) 申请日 2022.08.11

(30) 优先权数据

63/232,161 2021.08.11 US

63/297,694 2022.01.07 US

63/344,502 2022.05.20 US

63/348,990 2022.06.03 US

63/353,531 2022.06.17 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.04.02

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/074878 2022.08.11

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/019229 EN 2023.02.16

(71) 申请人 萨那生物科技公司

地址 美国华盛顿

(72) 发明人 X·胡 S·施雷弗

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

专利代理师 封新琴

(51) Int.Cl.

C12N 5/071 (2010.01)

C12N 15/90 (2006.01)

C12N 5/0783 (2010.01)

C12N 5/079 (2010.01)

C12N 15/113 (2010.01)

C12N 9/22 (2006.01)

A61K 35/17 (2015.01)

A61K 35/36 (2015.01)

A61K 35/39 (2015.01)

A61K 35/44 (2015.01)

A61K 35/55 (2015.01)

A61K 35/30 (2015.01)

A61K 35/407 (2015.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

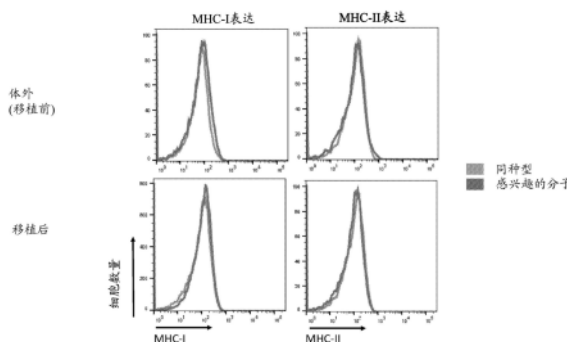
权利要求书24页 说明书184页  
序列表(电子公布) 附图55页

(54) 发明名称

用于同种异体细胞疗法的遗传修饰原代细胞

(57) 摘要

提供了用于同种异体细胞疗法的工程化细胞,诸如工程化原代细胞,其含有一种或多种修饰诸如遗传修饰。在一些实施方案中,所述工程化原代细胞是低免疫原性细胞。



1. 运动以促进细胞群的修饰的用途,其中所述细胞群在经受所述运动之前已经与一种或多种试剂接触以修饰所述群体的细胞中的基因表达。

2. 一种增强细胞群的修饰的方法,所述方法包括:

i) 使细胞群与一种或多种试剂接触以修饰所述群体的细胞中的基因表达;和

ii) 使所述细胞群在与所述一种或多种试剂接触后经受运动。

3. 一种修饰细胞群的方法,所述方法包括:

i) 使细胞群与一种或多种试剂接触以修饰所述群体的细胞中的基因表达;和

ii) 使所述细胞群在与所述一种或多种试剂接触后经受运动。

4. 如权利要求1-3中任一项所述的用途或方法,其中所述细胞群是原代细胞。

5. 如权利要求1-3中任一项所述的用途或方法,其中所述细胞群是来源于干细胞的细胞。

6. 如权利要求5所述的用途和方法,其中所述干细胞选自由以下组成的组:多能干细胞(PSC)、诱导多能干细胞、胚胎干细胞、造血干细胞、间充质干细胞、内皮干细胞、上皮干细胞、脂肪干细胞、生殖干细胞、肺干细胞、脐带血干细胞和多潜能干细胞。

7. 如权利要求5或权利要求6所述的用途或方法,其中所述干细胞是多能干细胞。

8. 如权利要求5-7中任一项所述的用途或方法,其中所述干细胞是诱导多能干细胞、间充质干细胞(MSC)、造血干细胞(HSC)或胚胎干细胞(ESC)。

9. 如权利要求1-8中任一项所述的用途或方法,其中所述细胞群选自由以下组成的组:胰岛细胞、免疫细胞、B细胞、T细胞、自然杀伤(NK)细胞、自然杀伤T(NKT)细胞、巨噬细胞、内皮细胞、肌细胞、心肌细胞、平滑肌细胞、骨骼肌细胞、肝细胞、神经胶质祖细胞、多巴胺能神经元、视网膜色素上皮细胞、甲状腺细胞、皮肤细胞、神经胶质祖细胞、神经细胞、心脏细胞和血细胞。

10. 如权利要求1-9中任一项所述的用途或方法,其中所述细胞群天然存在于3D网络中。

11. 如权利要求1-10中任一项所述的用途或方法,其中所述细胞群在悬浮液中。

12. 如权利要求1-11中任一项所述的用途或方法,其中所述细胞群在具有低吸附表面的容器中。

13. 如权利要求1-12中任一项所述的用途或方法,其中将所述细胞群维持在容器中的足以覆盖所述细胞的最小体积的培养基中。

14. 如权利要求10-13中任一项所述的用途或方法,其中悬浮液中的所述细胞群是通过在所述接触之前从贴壁培养物或细胞簇中解离细胞产生的。

15. 如权利要求1-14中任一项所述的用途或方法,其中所述细胞群是胰岛细胞。

16. 如权利要求1-15中任一项所述的用途或方法,其中所述细胞群包含 $\beta$ 胰岛细胞。

17. 如权利要求16所述的用途或方法,其中包含 $\beta$ 胰岛细胞的细胞群是通过将原代胰岛簇解离成包含原代 $\beta$ 胰岛细胞的细胞悬浮液产生的。

18. 如权利要求1-17中任一项所述的用途或方法,其中在使所述细胞经受运动之前进行所述接触少于两天。

19. 如权利要求1-18中任一项所述的用途或方法,其中在使所述细胞经受运动之前进行所述接触30秒至24小时。

20. 如权利要求1-19中任一项所述的用途或方法,其中在使所述细胞经受运动之前进行所述接触1分钟至60分钟、2分钟至30分钟、5分钟至15分钟。

21. 如权利要求1-20中任一项所述的用途或方法,其中使所述细胞群经受运动促进细胞集合体的形成。

22. 如权利要求1-21中任一项所述的用途或方法,其中使所述细胞群经受运动形成细胞簇。

23. 如权利要求1-21中任一项所述的用途或方法,其还包括在使所述细胞经受运动之后在静态条件下孵育所述细胞。

24. 如权利要求1-23中任一项所述的用途或方法,其还包括在所述接触之后且在使所述细胞经受运动之前在静态条件下孵育所述细胞。

25. 如权利要求1-23中任一项所述的用途或方法,其中所述一种或多种试剂包括至少两种不同的试剂,任选地其中所述至少两种不同的试剂中的每一种用于调节不同基因的表达。

26. 如权利要求1-25中任一项所述的用途或方法,其中重复所述方法的步骤。

27. 如权利要求26所述的用途或方法,其中所述方法的第一次迭代中的所述一种或多种试剂不同于所述方法的重复迭代中的所述一种或多种试剂,任选地其中所述方法的第一次迭代中的所述一种或多种试剂不同于所述方法的重复迭代中的所述一种或多种试剂。

28. 如权利要求1-26中任一项所述的用途或方法,其还包括在与所述一种或多种试剂接触之后在使所述细胞经受运动之前,任选地相对于所述接触之前的所述细胞选择具有修饰的基因表达的细胞。

29. 一种用于修饰原代胰岛细胞的方法,所述方法包括:

i) 将原代胰岛簇解离成原代胰岛细胞的悬浮液;

ii) 使所述原代胰岛细胞的悬浮液与一种或多种试剂接触以修饰基因表达;和

iii) 在所述接触之后,在使所述细胞重新聚集成胰岛的条件下孵育所修饰的胰岛细胞,其中所述孵育的至少一部分在运动中进行。

30. 如权利要求17或权利要求29所述的用途或方法,其中所述原代胰岛簇是人原代尸体胰岛簇。

31. 如权利要求29或权利要求30所述的方法,其中所述孵育还包括至少一部分在静态条件下的孵育。

32. 如权利要求29-31中任一项所述的方法,其中所述孵育包括在静态条件下的第一孵育,然后是在运动中的所述孵育。

33. 如权利要求29-31中任一项所述的方法,其中所述孵育包括在运动中的所述孵育,然后是在静态条件下的第二孵育。

34. 如权利要求29-33中任一项所述的方法,其中重复步骤i) -iii)。

35. 如权利要求34所述的方法,其中所述方法的第一次迭代中的所述一种或多种试剂不同于所述方法的重复迭代中的所述一种或多种试剂。

36. 如权利要求29-35中任一项所述的方法,其中所述一种或多种试剂是一种或多种第一试剂,且所重新聚集的胰岛细胞是第一修饰的原代胰岛簇,并且其中所述方法还包括:

iv) 将所述第一修饰的原代胰岛簇解离成修饰的原代胰岛细胞的悬浮液;

v) 使所述悬浮液的所述修饰的原代胰岛细胞与一种或多种另外的试剂进一步接触以修饰基因表达;和

vi) 在用于重新聚集成第二修饰的原代胰岛簇的条件下孵育所述进一步接触之后的进一步修饰的原代胰岛细胞,其中所述孵育的至少一部分是在运动中进行的。

37. 如权利要求29-36中任一项所述的方法,其中在iii)中的所述孵育之前,所述方法包括选择任选地相对于所述接触之前的原代胰岛细胞具有修饰的基因表达的胰岛细胞。

38. 如权利要求36或权利要求37所述的方法,其中在v)之前,所述方法包括从iv)中的所解离的胰岛细胞中选择任选地相对于所述接触之前的原代胰岛细胞修饰的具有修饰的基因表达的胰岛细胞,并且任选地对所选择的胰岛细胞重复步骤iii)和iv)。

39. 如权利要求36-38中任一项所述的方法,其中在vi)中的所述孵育之后,所述方法包括将所述第二修饰的原代胰岛簇解离成包含修饰的原代胰岛细胞的悬浮液和选择具有修饰的基因表达的胰岛细胞,任选地修饰的基因表达是相对于所述接触或所述进一步接触之前的原代胰岛而言的。

40. 如权利要求28、38和39中任一项所述的用途或方法,其中所述方法包括在用于重新聚集成修饰的原代胰岛簇的条件下孵育所选择的修饰的胰岛细胞,其中所述孵育的至少一部分在运动中进行。

41. 如权利要求29-40中任一项所述的方法,其中所述原代胰岛细胞的悬浮液存在于具有低吸附表面的容器中。

42. 如权利要求41所述的方法,其中所述容器具有足以覆盖所述细胞的最小体积的培养基。

43. 如权利要求1-42中任一项所述的用途或方法,其中所述运动的速度在约20rpm与约180rpm之间、约40rpm与约125rpm之间或约60rpm与约100rpm之间,均包括端值。

44. 如权利要求1-43中任一项所述的用途或方法,其中所述运动的速度在约85rpm与约95rpm之间,包括端值。

45. 如权利要求1-44中任一项所述的用途或方法,其中所述运动是摇动。

46. 如权利要求45所述的用途或方法,其中所述摇动包括轨道运动。

47. 如权利要求1-46中任一项所述的用途或方法,其中所述运动是波动运动。

48. 如权利要求47所述的用途或方法,其中所述波动运动是用结合了轨道移动和摆动移动的摇床装置进行的。

49. 如权利要求1-48中任一项所述的用途或方法,其中所述运动包括双向线性移动。

50. 如权利要求1-49中任一项所述的用途或方法,其中所述运动是用轨道摇床进行的。

51. 如权利要求1-50中任一项所述的用途或方法,其中所述运动具有倾斜角,任选地其中所述倾斜角在1°与8°之间。

52. 如权利要求28和38-51中任一项所述的用途或方法,其中所述选择包括荧光活化细胞分选(FACS)。

53. 如权利要求1-52中任一项所述的用途或方法,其中所述一种或多种试剂降低所述细胞中编码内源蛋白的一种或多种基因的表达或增加所述细胞中一种或多种异源蛋白的表达。

54. 如权利要求36-53中任一项所述的用途或方法,其中所述第一一种或多种试剂中的

至少一种用于降低所述细胞中编码内源蛋白的一种或多种基因的表达,并且所述另外的一种或多种试剂中的至少一种用于增加所述细胞中一种或多种外源蛋白的表达。

55. 如权利要求36-53中任一项所述的用途或方法,其中所述第一一种或多种试剂中的至少一种用于增加所述细胞中一种或多种外源蛋白的表达,并且所述另外的一种或多种试剂中的至少一种用于降低所述细胞中编码内源蛋白的一种或多种基因的表达。

56. 如权利要求36-53中任一项所述的用途或方法,其中所述第一一种或多种试剂用于降低所述细胞中编码内源蛋白的一种或多种基因的表达,并且所述另外的一种或多种试剂用于增加所述细胞中一种或多种外源蛋白的表达。

57. 如权利要求1-56中任一项所述的用途或方法,其中所述一种或多种试剂包括用于基因编辑编码内源蛋白的靶基因的基因组修饰蛋白和/或包含编码外源蛋白的外源多核苷酸的剂。

58. 如权利要求53-57中任一项所述的用途或方法,其中用于降低所述细胞中编码内源蛋白的一种或多种基因的表达的所述一种或多种试剂包括基因组修饰蛋白。

59. 如权利要求57或权利要求58所述的用途或方法,其中所述基因组修饰蛋白与通过序列特异性核酸酶、CRISPR相关转座酶(CAST)、引导编辑或经由位点特异性靶向元件的可编程添加(PASTE)进行的基因编辑相关。

60. 如权利要求57-59中任一项所述的用途或方法,其中所述基因组修饰蛋白是序列特异性核酸酶。

61. 如权利要求59或权利要求60所述的用途或方法,其中所述序列特异性核酸酶选自自由以下组成的组:RNA指导的DNA核酸内切酶、大范围核酸酶、转录活化因子样效应物核酸酶(TALEN)和锌指核酸酶(ZFN)。

62. 如权利要求59-61中任一项所述的用途或方法,其中所述序列特异性核酸酶是RNA指导的核酸酶。

63. 如权利要求61或权利要求62所述的用途或方法,其中所述RNA指导的核酸酶包含Cas核酸酶和指导RNA(CRISPR-Cas组合)。

64. 如权利要求63所述的用途或方法,其中所述CRISPR-Cas组合是包含所述gRNA和所述Cas核酸酶的核糖核蛋白(RNP)复合物。

65. 如权利要求63或权利要求64所述的用途或方法,其中所述Cas核酸酶是II型或V型Cas蛋白。

66. 如权利要求63-65中任一项所述的用途或方法,其中所述基因组修饰蛋白选自自由以下组成的组:Cas3、Cas4、Cas5、Cas8a、Cas8b、Cas8c、Cas9、Cas10、Cas12、Cas12a(Cpf1)、Cas12b(C2c1)、Cas12c(C2c3)、Cas12d(CasY)、Cas12e(CasX)、Cas12f(C2c10)、Cas12g、Cas12h、Cas12i、Cas12k(C2c5)、Cas13、Cas13a(C2c2)、Cas13b、Cas13c、Cas13d、C2c4、C2c8、C2c9、Cmr5、Cse1、Cse2、Csf1、Csm2、Csn2、Csx10、Csx11、Csy1、Csy2、Csy3、Mad7、锌指核酸酶(ZFN)、转录活化因子样效应物核酸酶(TALEN)、大范围核酸酶和CRISPR相关转座酶或前述任一种的同源物。

67. 如权利要求63-65中任一项所述的用途或方法,其中所述Cas是Cas9或Cas12。

68. 如权利要求1-67中任一项所述的用途或方法,其中所述一种或多种试剂用于降低一种或多种主要组织相容性复合物(MHC) I类分子的表达和/或用于降低一种或多种MHC II

类分子的表达。

69. 如权利要求36-67中任一项所述的用途或方法,其中所述一种或多种第一试剂用于降低一种或多种主要组织相容性复合物(MHC) I类分子的表达和/或用于降低一种或多种MHC II类分子的表达。

70. 如权利要求68和权利要求69所述的用途或方法,其中所述一种或多种MHC I类分子是HLA-A蛋白、HLA-B蛋白或HLA-C蛋白。

71. 如权利要求68或权利要求69所述的用途或方法,其中所述一种或多种MHC II类分子是HLA-DP蛋白、HLA-DR蛋白或HLA-DQ蛋白。

72. 如权利要求69-71中任一项所述的用途或方法,其中用于降低一种或多种MHC I类分子或MHC II类分子的表达的所述一种或多种试剂或所述另外的一种或多种试剂中的至少一种降低以下中的一种或多种的表达: B2M、TAP I、NLRC5、CIITA、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DP、HLA-DM、HLA-DOA、HLA-DOB、HLA-DQ、HLA-DR、RFX5、RFXANK、RFXAP、NFY-A、NFY-B和/或NFY-C。

73. 如权利要求69-71中任一项所述的用途或方法,其中:

a. 用于降低一种或多种MHC I类分子的表达的所述一种或多种试剂或所述另外的一种或多种试剂中的至少一种降低B-2微球蛋白(B2M)的表达;和/或

b. 用于降低一种或多种MHC II类分子的表达的一种或多种试剂或所述另外的一种或多种试剂中的至少一种是通过降低CIITA的表达进行的。

74. 如权利要求53-73中任一项所述的用途或方法,其中用于增加所述细胞中一种或多种外源蛋白的表达的所述一种或多种试剂包含有包含外源多核苷酸的剂。

75. 如权利要求74所述的用途或方法,其中所述外源多核苷酸可操作地连接至启动子。

76. 如权利要求75所述的用途或方法,其中所述启动子是组成型启动子。

77. 如权利要求75或权利要求76所述的用途和方法,其中所述启动子选自由以下组成的组: CAG启动子、巨细胞病毒(CMV)启动子、EF1a启动子、PGK启动子、腺病毒晚期启动子、牛痘病毒7.5K启动子、SV40启动子、HSV的tk启动子、小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)启动子、HIV的LTR启动子、莫洛尼病毒的启动子、爱泼斯坦巴尔病毒(EBV)启动子、劳斯肉瘤病毒(RSV)启动子和UBC启动子。

78. 如权利要求74-77中任一项所述的用途或方法,其中所述一种或多种外源蛋白是一种或多种致耐受因子。

79. 如权利要求53-78中任一项所述的用途或方法,其中所述一种或多种试剂包括用于增加一种或多种致耐受因子的表达的剂。

80. 如权利要求54-78中任一项所述的用途或方法,其中所述一种或多种另外的试剂包括用于增加所述细胞中一种或多种致耐受因子的表达的剂。

81. 如权利要求74-80中任一项所述的用途或方法,其中所述剂是脂质颗粒或病毒载体,任选地其中所述病毒载体是慢病毒载体。

82. 如权利要求78-81中任一项所述的用途或方法,其中所述一种或多种致耐受因子选自由以下组成的组: CD47、A20/TNFAIP3、C1-抑制剂、CCL21、CCL22、CD16、CD16 Fc受体、CD24、CD27、CD35、CD39、CD46、CD52、CD55、CD59、CD200、CR1、CTLA4-Ig、DUX4、FasL、H2-M3、HLA-C、HLA-E、HLA-E重链、HLA-G、PD-L1、IDO1、IL-10、IL15-RF、IL-35、MANF、Mfge8、PD-1、

PD-L1或Serpib9及其任何组合。

83. 如权利要求78-82中任一项所述的用途或方法,其中所述一种或多种致耐受因子选自自由以下组成的组:a) CD47;b) HLA-E;c) CD24;d) PD-L1;e) CD46;f) CD55;f) CD59;h) CR1;i) MANF;j) A20/TNFAIP3;k) HLA-E和CD47;l) CD24、CD47、PD-L1及其任何组合;m) HLA-E、CD24、CD47和PD-L1及其任何组合;n) CD46、CD55、CD59和CR1及其任何组合;o) HLA-E、CD46、CD55、CD59和CR1及其任何组合;p) HLA-E、CD24、CD47、PDL1、CD46、CD55、CD59和CR1及其任何组合;q) HLA-E和PDL1;r) HLA-E、PDL1和A20/TNFAIP及其任何组合;s) HLA-E、PDL1和MANF及其任何组合;t) HLA-E、PDL1、A20/TNFAIP和MANF及其任何组合;以及u) CD47、PD-L1、HLA-E、HLA-G、CCL21、FASL、SERPINB9、CD200、MFGES及其任何组合。

84. 如权利要求1-83中任一项所述的用途或方法,其中所述一种或多种试剂用于:

(i)

(a) 降低MHC I和/或MHC II的表达;(b) 降低MIC-A和/或MIC-B的表达;(c) 增加CD47以及任选的CD24和PD-L1的表达;以及(d) 增加CD46、CD55、CD59和CR1的表达;

(ii)

(a) 降低MHC I类分子的表达;(b) 降低MIC-A和/或MIC-B的表达;(c) 降低TXNIP的表达;(d) 增加PD-L1和HLA-E的表达;以及(e) 任选地增加A20/TNFAIP3和MANF的表达;

(iii)

(a) 增加CCL21、PD-L1、FASL、SERPINB9、HLA-G、CD47、CD200和MFGES的表达;以及(b) 降低MICA和/或MICB的表达;

(iv)

(a) 降低MHC I和/或MHC II的表达;以及(b) 增加CD47的表达;或

(v) 上述(i) - (iv)中任一项还包括用于增加或减少一种或多种额外的基因的表达,任选地降低B2M、TAP I、NLRC5、CIITA、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DP、HLA-DM、HLA-DOA、HLA-DOB、HLA-DQ、HLA-DR、RFX5、RFXANK、RFXAP、NFY-A、NFY-B、NFY-C、CTLA-4、PD-1、IRF1、MIC-A、MIC-B、参与氧化或ER应激的蛋白质TRAC、TRB、CD142、ABO、CD38、PCDH11Y、NLGN4Y和/或RHD的表达,进一步任选地其中参与氧化或ER应激的蛋白质包括硫氧还蛋白相互作用蛋白(TXNIP)、PKR样ER激酶(PERK)、肌醇需求酶1 $\alpha$ (IRE1 $\alpha$ )和DJ-1(PARK7)。

85. 如权利要求74-84中任一项所述的用途或方法,其中将所述外源多核苷酸整合到所述细胞的基因组中。

86. 如权利要求85所述的用途或方法,其中所述外源多核苷酸是多顺反子载体。

87. 如权利要求85或权利要求86所述的用途或方法,其中所述整合是通过非靶向插入到所述细胞的基因组中,任选地通过使用慢病毒载体将所述外源多核苷酸引入到所述细胞中进行的。

88. 如权利要求85或权利要求86所述的用途或方法,其中所述整合是通过靶向插入到所述细胞的靶基因组基因座中进行的。

89. 如权利要求9-88中任一项所述的用途或方法,其中所述胰岛细胞是 $\beta$ 胰岛细胞。

90. 如权利要求1-89中任一项所述的用途或方法,其中通过所述方法产生的所述细胞的活力大于约30%、40%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%或更多。

91. 如权利要求1-89中任一项所述的用途或方法,其中所述群体中通过所述方法修饰

的细胞的百分比大于约30%、40%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%或更多。

92. 一种工程化原代细胞,其包含 (i) 增加一种或多种致耐受因子的表达,和(ii)降低一种或多种主要组织相容性复合物(MHC) I类分子和/或一种或多种MHC II类分子的表达的修饰,其中(i)的表达增加和(ii)的表达降低是相对于不包含所述修饰的相同细胞类型的细胞而言的。

93. 如权利要求92所述的工程化原代细胞,其中(ii)中的所述修饰中的一种或多种降低以下的表达:

- a. 一种或多种MHC I类分子;
- b. 一种或多种MHC II类分子;或
- c. 一种或多种MHC I类分子和一种或多种MHC II类分子。

94. 如权利要求92或权利要求93所述的工程化原代细胞,其中所述一种或多种修饰降低选自自由以下组成的组的一种或多种分子的表达: B2M、TAP I、NLRC5、CIITA、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DP、HLA-DM、HLA-DOA、HLA-DOB、HLA-DQ、HLA-DR、RFX5、RFXANK、RFXAP、NFY-A、NFY-B和/或NFY-C及其任何组合。

95. 如权利要求92-94中任一项所述的工程化原代细胞,其中所述工程化细胞不表达选自自由以下组成的组的一种或多种分子: B2M、TAP I、NLRC5、CIITA、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DP、HLA-DM、HLA-DOA、HLA-DOB、HLA-DQ、HLA-DR及其组合。

96. 如权利要求92-95中任一项所述的工程化原代细胞,其中所述一种或多种致耐受因子选自自由以下组成的组: CD47、A20/TNFAIP3、C1-抑制剂、CCL21、CCL22、CD16、CD16 Fc受体、CD24、CD27、CD35、CD39、CD46、CD52、CD55、CD59、CD200、CR1、CTLA4-Ig、DUX4、FasL、H2-M3、HLA-C、HLA-E、HLA-E重链、HLA-G、PD-L1、IDO1、IL-10、IL15-RF、IL-35、MANF、Mfge8、PD-1、PD-L1或Serpib9及其任何组合。

97. 如权利要求92-96中任一项所述的工程化原代细胞,其中所述一种或多种致耐受因子选自自由以下组成的组: a) CD47; b) HLA-E; c) CD24; d) PD-L1; e) CD46; f) CD55; f) CD59; h) CR1; i) MANF; j) A20/TNFAIP3; k) HLA-E和CD47; l) CD24、CD47、PD-L1及其任何组合; m) HLA-E、CD24、CD47和PD-L1及其任何组合; n) CD46、CD55、CD59和CR1及其任何组合; o) HLA-E、CD46、CD55、CD59和CR1及其任何组合; p) HLA-E、CD24、CD47、PDL1、CD46、CD55、CD59和CR1及其任何组合; q) HLA-E和PDL1; r) HLA-E、PDL1和A20/TNFAIP及其任何组合; s) HLA-E、PDL1和MANF及其任何组合; t) HLA-E、PDL1、A20/TNFAIP和MANF及其任何组合; 以及u) CD47、PD-L1、HLA-E、HLA-G、CCL21、FASL、SERPINB9、CD200、MFG8及其任何组合。

98. 如权利要求92-97中任一项所述的工程化原代细胞,其中所述工程化细胞包含根据以下的修饰:

(i)

(a) 降低MHC I和/或MHC II的表达; (b) 降低MIC-A和/或MIC-B的表达; (c) 增加CD47以及任选的CD24和PD-L1的表达; 以及 (d) 增加CD46、CD55、CD59和CR1的表达;

(ii)

(a) 降低MHC I类分子的表达; (b) 降低MIC-A和/或MIC-B的表达; (c) 降低TXNIP的表达; (d) 增加PD-L1和HLA-E的表达; 以及 (e) 任选地增加A20/TNFAIP3和MANF的表达;

(iii)



(a) 增加CCL21、PD-L1、FASL、SERPINB9、HLA-G、CD47、CD200和MFGE8的表达;以及(b)降低MICA和/或MICB的表达;

(iv)

(a) 降低MHC I和/或MHC II的表达;以及(b) 增加CD47的表达;或

(v) 上述(i) - (iv)中任一项还包括用于增加或减少一种或多种额外的基因的表达的修饰,任选地降低B2M、TAP I、NLRC5、CIITA、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DP、HLA-DM、HLA-DOA、HLA-DOB、HLA-DQ、HLA-DR、RFX5、RFXANK、RFXAP、NFY-A、NFY-B、NFY-C、CTLA-4、PD-1、IRF1、MIC-A、MIC-B、参与氧化或ER应激的蛋白质TRAC、TRB、CD142、ABO、CD38、PCDH11Y、NLGN4Y和/或RHD的表达,进一步任选地其中参与氧化或ER应激的蛋白质包括硫氧还蛋白相互作用蛋白(TXNIP)、PKR样ER激酶(PERK)、肌醇需求酶1 $\alpha$ (IRE1 $\alpha$ )和DJ-1(PARK7)。

99. 一种工程化原代细胞,其包含(i) 增加选自CD47、PD-L1、HLA-E、HLA-G、CCL21、FASL、SERPINB9、CD200、MFGE8及其任何组合组成的组的一种或多种致耐受因子的表达,和(ii)降低一种或多种主要组织相容性复合物(MHC) I类分子和/或一种或多种MHC II类分子的表达的修饰,其中(i)的表达增加和(ii)的表达降低是相对于不包含所述修饰的相同细胞类型的细胞而言的。

100. 如权利要求92-99中任一项所述的工程化原代细胞,其中增加表达的所述修饰包括增加的表面表达,且/或降低表达的所述修饰包括降低的表面表达,任选地其中没有可检测的表面表达。

101. 如权利要求92-100中任一项所述的工程化原代细胞,其中增加所述一种或多种致耐受因子的表达的所述修饰包含编码所述一种或多种致耐受因子的外源多核苷酸。

102. 如权利要求92-101中任一项所述的工程化原代细胞,其中所述一种或多种致耐受因子包括CD47。

103. 如权利要求101或权利要求102所述的工程化原代细胞,其中所述一种或多种致耐受因子是CD47,并且所述编码CD47的外源多核苷酸编码与SEQ ID NO:2的氨基酸序列具有至少85%同一性的氨基酸序列,并且降低所述工程化原代细胞的先天免疫杀伤。

104. 如权利要求103所述的工程化原代细胞,其中所述编码CD47的外源多核苷酸编码SEQ ID NO:2中列出的序列。

105. 如权利要求101-104中任一项所述的工程化原代细胞,其中所述编码所述一种或多种致耐受因子的外源多核苷酸可操作地连接至启动子。

106. 如权利要求105所述的工程化原代细胞,其中所述启动子是组成型启动子。

107. 如权利要求105或权利要求106所述的工程化原代细胞,其中所述启动子选自由以下组成的组:CAG启动子、巨细胞病毒(CMV)启动子、EF1a启动子、PGK启动子、腺病毒晚期启动子、牛痘病毒7.5K启动子、SV40启动子、HSV的tk启动子、小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)启动子、HIV的LTR启动子、莫洛尼病毒的启动子、爱泼斯坦巴尔病毒(EBV)启动子、劳斯肉瘤病毒(RSV)启动子和UBC启动子。

108. 如权利要求101-107中任一项所述的工程化原代细胞,其中将所述编码CD47的外源多核苷酸整合到所述工程化原代细胞的基因组中。

109. 如权利要求108所述的工程化原代细胞,其中所述外源多核苷酸是编码所述一种或多种致耐受因子的多顺反子载体和编码第二转基因的额外转基因。

110. 如权利要求108或权利要求109所述的工程化原代细胞,其中所述整合是通过非靶向插入到所述工程化原代细胞的基因组中,任选地通过使用慢病毒载体将所述外源多核苷酸引入到所述细胞中进行的。

111. 如权利要求108或权利要求109所述的工程化原代细胞,其中所述整合是通过靶向插入到所述细胞的靶基因组基因座中进行的。

112. 如权利要求111所述的工程化原代细胞,其中所述靶基因组基因座是B2M基因座、CIITA基因座、MICA基因座、MICB基因座、TRAC基因座或TRBC基因座。

113. 如权利要求111所述的工程化原代细胞,其中所述靶基因组基因座选自由以下组成的组:CCR5基因座、CXCR4基因座、PPP1R12C(也称为AAVS1)基因、白蛋白基因座、SHS231基因座、CLYBL基因座、ROSA26基因座、ABO基因座、F3基因座、FUT1基因座、HMGB1基因座、KDM5D基因座、LRP1基因座、RHD基因座、ROSA26基因座和SHS231基因座。

114. 如权利要求92-113中任一项所述的工程化原代细胞,其中降低一种或多种MHC I类分子的表达的所述修饰降低一种或多种MHC I类分子蛋白质表达。

115. 如权利要求92-114中任一项所述的工程化原代细胞,其中降低一种或多种MHC I类分子的表达的所述修饰是降低B-2微球蛋白(B2M)表达的修饰。

116. 如权利要求115所述的工程化原代细胞,其中降低一种或多种MHC I类分子的表达的所述修饰包括降低的B2M的mRNA表达。

117. 如权利要求115所述的工程化原代细胞,其中降低一种或多种MHC I类分子的表达的所述修饰包括降低的B2M的蛋白质表达。

118. 如权利要求115-117中任一项所述的工程化原代细胞,其中所述修饰消除B2M基因活性。

119. 如权利要求115-118中任一项所述的工程化原代细胞,其中所述修饰包括所述B2M基因的两个等位基因的失活或破坏。

120. 如权利要求115-119中任一项所述的工程化原代细胞,其中所述修饰包括所述细胞中所有B2M编码序列的失活或破坏。

121. 如权利要求119或权利要求120所述的工程化原代细胞,其中所述失活或破坏包括所述B2M基因中的插入缺失。

122. 如权利要求115-121中任一项所述的工程化原代细胞,其中所述修饰是所述B2M基因的一段连续基因组DNA的移码突变或缺失。

123. 如权利要求115-122中任一项所述的工程化原代细胞,其中所述B2M基因被敲除。

124. 如权利要求114-123中任一项所述的工程化原代细胞,其中降低一种或多种MHC I类分子的表达的所述修饰是降低HLA-A蛋白、HLA-B蛋白或HLA-C蛋白的表达的修饰,任选地其中编码所述HLA-A蛋白、HLA-B蛋白或HLA-C蛋白的基因被敲除。

125. 如权利要求92-124中任一项所述的工程化原代细胞,其中降低一种或多种MHC II类分子的表达的所述修饰降低一种或多种MHC II类分子蛋白质表达。

126. 如权利要求92-125中任一项所述的工程化原代细胞,其中降低一种或多种MHC II类分子的表达的所述修饰是降低CIITA的表达的修饰。

127. 如权利要求126所述的工程化原代细胞,其中降低一种或多种MHC II类分子的表达的所述修饰包括降低的CIITA的mRNA表达。

128. 如权利要求126所述的工程化原代细胞,其中降低一种或多种MHC II类分子的表达的所述修饰包括降低的CIITA的蛋白质表达。

129. 如权利要求126-128中任一项所述的工程化原代细胞,其中所述修饰消除CIITA基因活性。

130. 如权利要求126-129中任一项所述的工程化原代细胞,其中所述修饰包括所述CIITA基因的两个等位基因的失活或破坏。

131. 如权利要求126-130中任一项所述的工程化原代细胞,其中所述修饰包括所述细胞中所有CIITA编码序列的失活或破坏。

132. 如权利要求130或权利要求131所述的工程化原代细胞,其中所述失活或破坏包括所述CIITA基因中的插入缺失。

133. 如权利要求126-132中任一项所述的工程化原代细胞,其中所述插入缺失是所述CIITA基因的一段连续基因组DNA的移码突变或缺失。

134. 如权利要求125-133中任一项所述的工程化原代细胞,其中降低一种或多种MHC II类分子的表达的所述修饰是降低HLA-DP蛋白、HLA-DR蛋白或HLA-DQ蛋白的表达的修饰,任选地其中编码所述HLA-DP蛋白、HLA-DR蛋白或HLA-DQ蛋白的基因被敲除。

135. 如权利要求92-134中任一项所述的工程化原代细胞,其中降低所述一种或多种MHC I类分子和/或所述一种或多种MHC II类分子的表达的所述修饰是通过基因组修饰蛋白进行的。

136. 如权利要求135所述的工程化原代细胞,其中所述基因组修饰蛋白与通过序列特异性核酸酶、CRISPR相关转座酶(CAST)、引导编辑或经由位点特异性靶向元件的可编程添加(PASTE)进行的基因编辑相关。

137. 如权利要求135或权利要求136所述的工程化原代细胞,其中通过所述基因组修饰蛋白进行的所述修饰是核酸酶介导的基因编辑。

138. 如权利要求137所述的工程化原代细胞,其中所述核酸酶介导的基因编辑是通过靶向所述B2M基因的锌指核酸酶(ZFN)、TAL效应物核酸酶(TALEN)或CRISPR-Cas组合进行的,任选地其中所述Cas是Cas9。

139. 如权利要求137或权利要求138所述的工程化原代细胞,其中所述核酸酶介导的基因编辑是通过CRISPR-Cas组合进行的,并且所述CRISPR-Cas组合包含具有与内源基因的至少一个靶位点互补的靶向结构域的指导RNA(gRNA),所述内源基因用于降低所述一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子的表达。

140. 如权利要求139所述的工程化原代细胞,其中所述CRISPR-Cas组合是包含所述gRNA和Cas蛋白的核糖核蛋白(RNP)复合物。

141. 如权利要求92-140中任一项所述的工程化原代细胞,其中所述工程化原代细胞是人细胞或动物细胞。

142. 如权利要求141所述的工程化原代细胞,其中所述工程化原代细胞是人细胞。

143. 如权利要求92-142中任一项所述的工程化原代细胞,其中所述原代细胞是暴露于血液的细胞类型。

144. 如权利要求92-143中任一项的所述工程化原代细胞,其中所述工程化原代细胞是从供体受试者分离的原代细胞。

145. 如权利要求144所述的工程化原代细胞,其中在从所述供体受试者获得供体样品时,所述供体受试者是健康的或未被怀疑患有疾病或病状。

146. 如权利要求92-145中任一项所述的工程化原代细胞,其中所述工程化原代细胞选自胰岛细胞、 $\beta$ 胰岛细胞、胰岛细胞、免疫细胞、B细胞、T细胞、自然杀伤(NK)细胞、自然杀伤T(NKT)细胞、巨噬细胞、内皮细胞、肌肉细胞、心肌细胞、平滑肌细胞、骨骼肌细胞、多巴胺能神经元、视网膜色素上皮细胞、肝细胞、甲状腺细胞、皮肤细胞、神经胶质祖细胞、神经细胞、心脏细胞和血细胞。

147. 如权利要求92-146中任一项所述的工程化原代细胞,其中所述工程化原代细胞是内皮细胞。

148. 如权利要求92-146中任一项所述的工程化原代细胞,其中所述工程化原代细胞是上皮细胞。

149. 如权利要求92-146中任一项所述的工程化原代细胞,其中所述工程化原代细胞是视网膜色素上皮细胞。

150. 如权利要求92-146中任一项所述的工程化原代细胞,其中所述工程化原代细胞是T细胞。

151. 如权利要求92-146中任一项所述的工程化原代细胞,其中所述工程化原代细胞是NK细胞。

152. 如权利要求150或权利要求151所述的工程化原代细胞,其中所述工程化原代细胞包含嵌合抗原受体(CAR)。

153. 如权利要求92-146中任一项所述的工程化原代细胞,其中所述工程化原代细胞是胰岛细胞,任选地 $\beta$ 胰岛细胞。

154. 如权利要求92-146中任一项所述的工程化原代细胞,其中所述工程化原代细胞是肝细胞。

155. 如权利要求92-154中任一项所述的工程化原代细胞,其中所述工程化原代细胞是ABO血型O型。

156. 如权利要求92-155中任一项所述的工程化原代细胞,其中所述工程化原代细胞是恒河猴因子阴性(Rh-)。

157. 如权利要求92-156中任一项所述的工程化原代细胞,其中所述工程化原代细胞是通过如权利要求1-91中任一项所述的方法制备的。

158. 一种生成工程化原代细胞的方法,所述方法包括:

- a) 降低原代细胞中一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子的表达;和
- b) 增加所述原代细胞中一种或多种致耐受因子的表达。

159. 如权利要求158所述的方法,其中a) 的表达增加和b) 的表达降低是相对于未经受所述方法的相同细胞类型的细胞而言的。

160. 如权利要求158或权利要求159所述的方法,其中降低所述一种或多种MHC分子的表达选自:

- a. 一种或多种MHC I类分子;
- b. 一种或多种MHC II类分子;或
- c. 一种或多种MHC I类分子和一种或多种MHC II类分子。

161. 如权利要求158-160中任一项所述的方法,其中降低一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子的表达是通过将一种或多种修饰引入所述细胞中进行的,任选地其中所述一种或多种修饰降低选自以下组成的组的一种或多种分子的表达:B2M、TAP I、NLRC5、CIITA、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DP、HLA-DM、HLA-DOA、HLA-DOB、HLA-DQ、HLA-DR、RFX5、RFXANK、RFXAP、NFY-A、NFY-B和/或NFY-C及其任何组合。

162. 如权利要求158-162中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受因子选自以下组成的组:CD47、A20/TNFAIP3、C1-抑制剂、CCL21、CCL22、CD16、CD16 Fc受体、CD24、CD27、CD35、CD39、CD46、CD52、CD55、CD59、CD200、CR1、CTLA4-Ig、DUX4、FasL、H2-M3、HLA-C、HLA-E、HLA-E重链、HLA-G、PD-L1、IDO1、IL-10、IL15-RF、IL-35、MANF、Mfge8、PD-1、PD-L1或Serpib9及任何组合。

163. 如权利要求158-162中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受因子选自以下组成的组:a) CD47; b) HLA-E; c) CD24; d) PD-L1; e) CD46; f) CD55; f) CD59; h) CR1; i) MANF; j) A20/TNFAIP3; k) HLA-E和CD47; l) CD24、CD47、PD-L1及其任何组合; m) HLA-E、CD24、CD47和PD-L1及其任何组合; n) CD46、CD55、CD59和CR1及其任何组合; o) HLA-E、CD46、CD55、CD59和CR1及其任何组合; p) HLA-E、CD24、CD47、PDL1、CD46、CD55、CD59和CR1及其任何组合; q) HLA-E和PDL1; r) HLA-E、PDL1和A20/TNFAIP及其任何组合; s) HLA-E、PDL1和MANF及其任何组合; t) HLA-E、PDL1、A20/TNFAIP和MANF及其任何组合; 以及u) CD47、PD-L1、HLA-E、HLA-G、CCL21、FASL、SERPINB9、CD200、MFGES及其任何组合。

164. 如权利要求158-163中任一项所述的方法,其中将一种或多种修饰引入到所述细胞中,并且所述一种或多种修饰根据以下:

(i)

(a) 降低MHC I和/或MHC II的表达; (b) 降低MIC-A和/或MIC-B的表达; (c) 增加CD47以及任选的CD24和PD-L1的表达; 以及 (d) 增加CD46、CD55、CD59和CR1的表达;

(ii)

(a) 降低MHC I类分子的表达; (b) 降低MIC-A和/或MIC-B的表达; (c) 降低TXNIP的表达; (d) 增加PD-L1和HLA-E的表达; 以及 (e) 任选地增加A20/TNFAIP3和MANF的表达;

(iii)

(a) 增加CCL21、PD-L1、FASL、SERPINB9、HLA-G、CD47、CD200和MFGES的表达; 以及 (b) 降低MICA和/或MICB的表达;

(iv)

(a) 降低MHC I和/或MHC II的表达; 以及 (b) 增加CD47的表达; 或

(v) 上述(i) - (iv)中任一项还包括用于增加或减少一种或多种额外的基因的表达,任选地降低B2M、TAP I、NLRC5、CIITA、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DP、HLA-DM、HLA-DOA、HLA-DOB、HLA-DQ、HLA-DR、RFX5、RFXANK、RFXAP、NFY-A、NFY-B、NFY-C、CTLA-4、PD-1、IRF1、MIC-A、MIC-B、参与氧化或ER应激的蛋白质TRAC、TRB、CD142、ABO、CD38、PCDH11Y、NLGN4Y和/或RHD的表达,进一步任选地其中参与氧化或ER应激的蛋白质包括硫氧还蛋白相互作用蛋白(TXNIP)、PKR样ER激酶(PERK)、肌醇需求酶1 $\alpha$ (IRE1 $\alpha$ )和DJ-1(PARK7)。

165. 一种生成工程化原代细胞的方法,所述方法包括:

a. 降低或消除所述细胞中一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子的

表达;和

b. 增加所述细胞中CD47的表达。

166. 如权利要求157-165中任一项所述的方法,其中所述方法包括降低一种或多种MHC I类分子的表达。

167. 如权利要求157-165中任一项所述的方法,其中所述方法包括降低一种或多种MHC I类分子和一种或多种MHC II类分子的表达。

168. 如权利要求157-167中任一项所述的方法,其中增加表达包括增加所述一种或多种致耐受因子的表面表达,和/或降低表达包括降低所述一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子的表面表达。

169. 如权利要求157-168中任一项所述的方法,其中增加所述一种或多种致耐受因子的表达包括引入编码所述一种或多种致耐受因子的外源多核苷酸。

170. 如权利要求157-169中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受因子是CD47。

171. 如权利要求169或权利要求170所述的方法,其中所述编码CD47的外源多核苷酸编码与SEQ ID NO:2的氨基酸序列具有至少85%同一性的氨基酸序列,并且降低所述工程化原代细胞的先天免疫杀伤。

172. 如权利要求171所述的方法,其中所述编码CD47的外源多核苷酸编码SEQ ID NO:2中列出的序列。

173. 如权利要求169-172中任一项所述的方法,其中所述编码所述一种或多种致耐受因子的外源多核苷酸可操作地连接至启动子。

174. 如权利要求169-173中任一项所述的方法,其中将所述编码所述一种或多种致耐受因子的外源多核苷酸整合到所述工程化原代细胞的基因组中。

175. 如权利要求174所述的方法,其中所述整合是通过非靶向插入到所述工程化原代细胞的基因组中,任选地通过使用慢病毒载体将所述外源多核苷酸引入到所述工程化原代细胞中进行的。

176. 如权利要求175所述的方法,其中所述整合是通过靶向插入到所述细胞的靶基因组基因座中进行的,任选地其中所述靶向插入是通过使用同源定向修复的核酸酶介导的基因编辑进行的。

177. 如权利要求176所述的方法,其中所述靶基因组基因座是B2M基因座、CIITA基因座、MICA基因座、MICB基因座、TRAC基因座或TRBC基因座。

178. 如权利要求176所述的方法,其中所述靶基因组基因座选自以下组成的组:CCR5基因座、CXCR4基因座、PPP1R12C(也称为AAVS1)基因、白蛋白基因座、SHS231基因座、CLYBL基因座、ROSA26基因座、ABO基因座、F3基因座、FUT1基因座、HMGB1基因座、KDM5D基因座、LRP1基因座、RHD基因座、ROSA26基因座和SHS231基因座。

179. 如权利要求157-178中任一项所述的方法,其中降低一种或多种MHC I类分子的表达包括引入降低一种或多种MHC I类分子蛋白质表达的修饰。

180. 如权利要求157-179中任一项所述的方法,其中降低一种或多种MHC I类分子的表达的所述修饰包括降低的B2M的表达。

181. 如权利要求157-180中任一项所述的方法,其中降低一种或多种MHC I类分子的表

达的所述修饰包括降低的B2M的蛋白质表达。

182. 如权利要求180或权利要求181所述的方法,其中降低一种或多种MHC I类分子的表达的所述修饰消除B2M基因活性。

183. 如权利要求160-182中任一项所述的方法,其中降低一种或多种MHC I类分子的表达的所述修饰包括所述B2M基因的两个等位基因的失活或破坏。

184. 如权利要求160-183中任一项所述的方法,其中降低一种或多种MHC I类分子的表达的所述修饰包括所述细胞中所有B2M编码序列的失活或破坏。

185. 如权利要求183或权利要求184所述的方法,其中所述失活或破坏包括所述内源B2M基因中的插入缺失或所述内源B2M基因的一段连续基因组DNA的缺失。

186. 如权利要求185所述的方法,其中所述插入缺失是所述B2M基因的一段连续基因组DNA的移码突变或缺失。

187. 如权利要求180-186中任一项所述的方法,其中所述内源B2M基因被敲除。

188. 如权利要求160-187中任一项所述的方法,其中降低一种或多种MHC I类分子的表达的所述修饰降低HLA-A蛋白表达、HLA-B蛋白表达或HLA-C蛋白表达,任选地其中通过敲除编码所述HLA-A蛋白、HLA-B蛋白或HLA-C蛋白的基因来降低所述蛋白表达。

189. 如权利要求160-188中任一项所述的方法,其中降低一种或多种MHC II类分子的表达包括引入降低一种或多种MHC II类分子表达的修饰。

190. 如权利要求189所述的方法,其中降低一种或多种MHC II类分子的表达的所述修饰包括降低的CIITA的表达。

191. 如权利要求160-190中任一项所述的方法,其中降低一种或多种MHC II类分子的表达的所述修饰包括降低的CIITA的蛋白质表达。

192. 如权利要求160-191中任一项所述的方法,其中降低一种或多种MHC II类分子的表达的所述修饰消除CIITA。

193. 如权利要求160-192中任一项所述的方法,其中降低一种或多种MHC II类分子的表达的所述修饰包括所述CIITA基因的两个等位基因的失活或破坏。

194. 如权利要求160-193中任一项所述的方法,其中所述修饰包括所述细胞中所有CIITA编码序列的失活或破坏。

195. 如权利要求193或权利要求194所述的方法,其中所述失活或破坏包括所述CIITA基因中的插入缺失或所述CIITA基因的一段连续基因组DNA的缺失。

196. 如权利要求195所述的方法,其中所述插入缺失是所述CIITA基因的一段连续基因组DNA的移码突变或缺失。

197. 如权利要求157-196中任一项所述的方法,其中所述CIITA基因被敲除。

198. 如权利要求160-197中任一项所述的方法,降低一种或多种MHC II类分子的表达的所述修饰降低HLA-DP蛋白、HLA-DR蛋白或HLA-DQ蛋白的表达,任选地其中通过敲除编码所述HLA-DP蛋白、所述HLA-DR蛋白或所述HLA-DQ蛋白的基因来降低所述HLA-DP蛋白表达、所述HLA-DR蛋白表达或所述HLA-DQ蛋白表达。

199. 如权利要求160-198中任一项所述的方法,其中降低所述一种或多种MHC I类分子和/或所述一种或多种MHC II类分子的表达的所述修饰是通过基因组修饰蛋白进入所述细胞进行的,任选地其中将所述基因组修饰蛋白或编码所述基因组修饰蛋白的多核苷酸引入

所述细胞中。

200. 如权利要求199所述的方法,其中所述基因组修饰蛋白与通过序列特异性核酸酶、CRISPR相关转座酶(CAST)、引导编辑或经由位点特异性靶向元件的可编程添加(PASTE)进行的基因编辑相关。

201. 如权利要求199或权利要求200所述的方法,其中通过所述基因组修饰蛋白进行的所述修饰是核酸酶介导的基因编辑。

202. 如权利要求201所述的方法,其中所述核酸酶介导的基因编辑是通过靶向所述B2M基因的锌指核酸酶(ZFN)、TAL效应物核酸酶(TALEN)或CRISPR-Cas组合进行的,任选地其中所述Cas是Cas9。

203. 如权利要求201或权利要求202所述的方法,其中所述核酸酶介导的基因编辑是通过CRISPR-Cas组合进行的,并且所述CRISPR-Cas组合包含具有与内源基因的至少一个靶位点互补的靶向结构域的指导RNA(gRNA),所述内源基因用于降低所述一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子的表达。

204. 如权利要求203所述的方法,其中所述CRISPR-Cas组合是包含所述gRNA和Cas蛋白的核糖核蛋白(RNP)复合物。

205. 如权利要求202-204中任一项所述的方法,其中所述Cas核酸酶是II型或V型Cas蛋白。

206. 如权利要求202-205中任一项所述的方法,其中所述基因组修饰蛋白选自自由以下组成的组:Cas3、Cas4、Cas5、Cas8a、Cas8b、Cas8c、Cas9、Cas10、Cas12、Cas12a(Cpf1)、Cas12b(C2c1)、Cas12c(C2c3)、Cas12d(CasY)、Cas12e(CasX)、Cas12f(C2c10)、Cas12g、Cas12h、Cas12i、Cas12k(C2c5)、Cas13、Cas13a(C2c2)、Cas13b、Cas13c、Cas13d、C2c4、C2c8、C2c9、Cmr5、Cse1、Cse2、Csf1、Csm2、Csn2、Csx10、Csx11、Csy1、Csy2、Csy3、Mad7、锌指核酸酶(ZFN)、转录活化因子样效应物核酸酶(TALEN)、大范围核酸酶和CRISPR相关转座酶或前述任一种的同源物。

207. 如权利要求202-206中任一项所述的方法,其中所述Cas是Cas9或Cas12。

208. 如权利要求157-207中任一项所述的方法,其中所述工程化原代细胞是人细胞或动物细胞,任选地其中所述动物细胞是猪细胞、牛细胞或羊细胞。

209. 如权利要求157-208中任一项所述的方法,其中所述工程化原代细胞是人细胞。

210. 如权利要求157-209中任一项所述的方法,其中所述工程化原代细胞是暴露于血液的细胞类型。

211. 如权利要求157-210中任一项所述的方法,其中所述工程化原代细胞是从供体受试者分离的。

212. 如权利要求157-211中任一项所述的方法,其中所述工程化原代细胞选自胰岛细胞、 $\beta$ 胰岛细胞、胰岛细胞、免疫细胞、B细胞、T细胞、自然杀伤(NK)细胞、自然杀伤T(NKT)细胞、巨噬细胞、内皮细胞、肌肉细胞、心肌细胞、平滑肌细胞、骨骼肌细胞、多巴胺能神经元、视网膜色素上皮细胞、肝细胞、甲状腺细胞、皮肤细胞、神经胶质祖细胞、神经细胞、心脏细胞和血细胞。

213. 如权利要求157-212中任一项所述的方法,其中所述工程化原代细胞是胰岛细胞。

214. 如权利要求157-213中任一项所述的方法,其中所述工程化原代细胞是 $\beta$ 胰岛细



胞。

215. 如权利要求157-212中任一项所述的方法,其中所述工程化原代细胞是肝细胞。

216. 如权利要求157-212中任一项所述的方法,其中所述工程化原代细胞是T细胞。

217. 如权利要求157-212中任一项所述的方法,其中所述工程化原代细胞是内皮细胞。

218. 如权利要求157-212中任一项所述的方法,其中所述工程化原代细胞是甲状腺细胞。

219. 如权利要求157-212中任一项所述的方法,其中所述工程化原代细胞是皮肤细胞。

220. 如权利要求157-212中任一项所述的方法,其中所述工程化原代细胞是视网膜色素上皮细胞。

221. 一种根据如权利要求1-91中任一项所述的方法产生的工程化细胞。

222. 如权利要求221所述的工程化细胞,其中所述细胞是原代细胞。

223. 一种根据如权利要求158-220中任一项所述的方法产生的工程化细胞。

224. 如权利要求222或权利要求223所述的工程化细胞,其中所述细胞是原代胰岛细胞。

225. 如权利要求224所述的工程化细胞,其中所述胰岛细胞是 $\beta$ 胰岛细胞。

226. 如权利要求92-156和221-223中任一项所述的工程化细胞,其中:

所述工程化细胞在施用于受体患者后能够逃避NK细胞介导的细胞毒性;且/或

所述工程化细胞在施用于受体患者后受到保护而免于成熟NK细胞的细胞裂解。

227. 如权利要求92-156和221-225中任一项所述的工程化细胞,其中所述工程化细胞在施用于受体患者后不会诱导针对所述细胞的免疫反应。

228. 如权利要求92-156和221-226中任一项所述的工程化细胞,其中:

所述工程化细胞在施用于受体患者后不会诱导针对所述细胞的系统性炎症反应;且/或所述工程化细胞在施用于受体患者后不会诱导针对所述细胞的局部炎症反应。

229. 一种通过如权利要求1-91中任一项所述的方法产生的工程化细胞群。

230. 一种工程化细胞群,其包含多种如权利要求92-157和221-228中任一项所述的工程化细胞。

231. 如权利要求229或权利要求230所述的工程化细胞群,其中所述多种工程化细胞是来源于汇集自多于一个供体受试者的细胞的原代细胞,任选地其中在从所述供体受试者获得所述供体样品时,所述多于一个供体受试者中的每一个都是健康受试者或未被怀疑患有疾病或病状。

232. 如权利要求229-231中任一项所述的群体,其中所述群体中至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%或99.99%的细胞包含所述修饰。

233. 如权利要求229-232中任一项所述的群体,其中所述群体中至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%或99.99%的细胞包含编码CD47的外源多核苷酸。

234. 如权利要求229-233中任一项所述的群体,其中相对于不包含所述修饰的相同细胞类型的细胞,所述群体中至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%或99.99%的细胞包含降低的一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种

MHC II类分子的表达。

235. 如权利要求229-234中任一项所述的群体,其中相对于不包含所述修饰的相同细胞类型的细胞,所述群体中至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%或99.99%的细胞包含降低的B2M和/或CIITA的表达。

236. 如权利要求229-235中任一项所述的群体,其中相对于不包含所述修饰的相同细胞类型的细胞,所述群体中至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%或99.99%的细胞包含降低的B2M的表达。

237. 如权利要求229-236中任一项所述的群体,其中相对于不包含所述修饰的相同细胞类型的细胞,所述群体中至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%或99.99%的细胞包含降低的B2M和CIITA的表达。

238. 如权利要求229-237中任一项所述的群体,其中所述群体中至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%或99.99%的细胞包含一种或多种使内源B2M基因的两个等位基因失活的改变。

239. 如权利要求229-238中任一项所述的群体,其中所述群体中至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%或99.99%的细胞包含一种或多种使内源CIITA基因的两个等位基因失活的改变。

240. 一种组合物,其包含如权利要求229-239中任一项所述的群体。

241. 一种组合物,其包含通过如权利要求15-91中任一项所述的方法产生的工程化原代胰岛簇。

242. 一种组合物,其包含工程化原代胰岛细胞群,其中所述工程化原代胰岛细胞包含:  
(i) 包含编码CD47的外源多核苷酸的转基因和(ii) B2M基因的两个等位基因的失活或破坏。

243. 如权利要求242所述的组合物,其中所述工程化原代胰岛细胞群是原代胰岛细胞簇。

244. 如权利要求242所述的组合物,其中所述工程化原代胰岛细胞群是工程化原代 $\beta$ 胰岛细胞群。

245. 如权利要求242-244中任一项所述的组合物,其中所述群体中至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%或99.99%的细胞包含所述编码CD47的外源多核苷酸和所述B2M基因的两个等位基因的失活或破坏。

246. 一种组合物,其包含工程化原代T细胞群,其中所述工程化原代T细胞包含:(i) 包含编码CD47的外源多核苷酸的转基因和(ii) B2M基因的两个等位基因的失活或破坏。

247. 一种组合物,其包含工程化原代甲状腺细胞群,其中所述工程化原代甲状腺细胞包含:(i) 包含编码CD47的外源多核苷酸的转基因和(ii) B2M基因的两个等位基因的失活或破坏。

248. 一种组合物,其包含工程化原代皮肤细胞群,其中所述工程化原代皮肤细胞包含:  
(i) 包含编码CD47的外源多核苷酸的转基因和(ii) B2M基因的两个等位基因的失活或破坏。

249. 一种组合物,其包含工程化原代内皮细胞群,其中所述工程化原代内皮细胞包含:  
(i) 包含编码CD47的外源多核苷酸的转基因和(ii) B2M基因的两个等位基因的失活或破坏。

250. 一种组合物,其包含工程化原代视网膜色素上皮细胞群,其中所述工程化原代视网膜色素上皮细胞包含:(i) 包含编码CD47的外源多核苷酸的转基因和(ii) B2M基因的两个

等位基因的失活或破坏。

251. 如权利要求240-250中任一项所述的组合物,其中所述工程化原代细胞群中的工程化原代细胞在所述B2M基因的两个等位基因中包含插入缺失。

252. 如权利要求240-251中任一项所述的组合物,其中所述工程化原代细胞群中的所述工程化原代细胞还包含CIITA基因的两个等位基因的失活或破坏,任选地其中所述工程化原代细胞群中的工程化原代细胞包含所述CIITA基因的两个等位基因中的插入缺失。

253. 如权利要求240-252中任一项所述的组合物,其中所述工程化原代细胞群中的所述工程化原代细胞具有表型B2M<sup>插入缺失/插入缺失</sup>;CIITA<sup>插入缺失/插入缺失</sup>;CD47tg。

254. 如权利要求240-253中任一项所述的组合物,其中所述组合物是药物组合物。

255. 如权利要求240-254中任一项所述的组合物,其包含药学上可接受的赋形剂。

256. 如权利要求240-255中任一项所述的组合物,其中所述组合物配制在包含冷冻保护剂的无血清冷冻保存介质中。

257. 如权利要求256所述的组合物,其中所述冷冻保护剂是DMSO并且所述冷冻保存介质是5%至10%DMSO(体积/体积)。

258. 如权利要求256和权利要求257所述的组合物,其中所述冷冻保护剂是或是约10%DMSO(体积/体积)。

259. 如权利要求240-258中任一项所述的组合物,其是无菌的。

260. 一种容器,其包含如权利要求240-259中任一项所述的组合物。

261. 如权利要求260所述的容器,其是无菌袋。

262. 如权利要求261所述的无菌袋,其中所述袋是冷冻保存兼容袋。

263. 一种治疗有需要的患者的疾病、病状或细胞缺陷的方法,其包括向所述患者施用有效量的如权利要求229-239中任一项所述的群体、如权利要求240-253中任一项所述的组合物,或如权利要求254所述的药物组合物。

264. 如263所述的方法,其中将所述群体配制为包含药学上可接受的赋形剂的药物组合物。

265. 如权利要求263或权利要求264所述的方法,其中所述细胞群包含胰岛细胞,包括 $\beta$ 胰岛细胞。

266. 如权利要求263-265中任一项所述的方法,其中所述胰岛细胞群作为胰岛细胞簇施用。

267. 如权利要求263-266中任一项所述的方法,其中所述胰岛细胞群作为 $\beta$ 胰岛细胞簇施用。

268. 如权利要求263-266中任一项所述的方法,其中所述细胞群是肝细胞。

269. 如权利要求263或权利要求264所述的方法,其中所述细胞群包含T细胞。

270. 如权利要求263或权利要求264所述的方法,其中所述细胞群包含甲状腺细胞。

271. 如权利要求263或权利要求264所述的方法,其中所述细胞群包含皮肤细胞。

272. 如权利要求263或权利要求264所述的方法,其中所述细胞群包含内皮细胞。

273. 如权利要求263或权利要求264所述的方法,其中所述细胞群包含视网膜色素上皮细胞。

274. 如权利要求263-273所述的方法,其中所述病状或疾病选自自由以下组成的组:糖尿

病、癌症、血管形成障碍、眼部疾病、甲状腺疾病、皮肤疾病和肝脏疾病。

275. 如权利要求263或权利要求264所述的方法,其中所述细胞缺陷与糖尿病相关,或者所述细胞疗法用于治疗糖尿病,任选地其中所述糖尿病是I型糖尿病。

276. 如权利要求275所述的方法,其中所述细胞群是胰岛细胞群,包括 $\beta$ 胰岛细胞群。

277. 如权利要求276所述的方法,其中所述细胞群作为胰岛细胞簇施用。

278. 一种治疗有需要的患者的糖尿病的方法,所述方法包括向所述患者施用有效量的如权利要求229-239中任一项所述的胰岛细胞群、如权利要求240-253中任一项所述的组合物,或如权利要求254所述的药物组合物,任选地其中所述细胞群作为胰岛细胞簇施用。

279. 如权利要求276-278中任一项所述的方法,其中所述胰岛细胞簇是 $\beta$ 胰岛细胞簇。

280. 如权利要求263或权利要求264所述的方法,其中所述细胞缺陷与血管病状或疾病相关,或者所述细胞疗法用于治疗血管病状或疾病。

281. 如权利要求280所述的方法,其中所述细胞群是内皮细胞群。

282. 如权利要求263或权利要求264所述的方法,其中所述细胞缺陷与自身免疫性甲状腺炎相关,或者所述细胞疗法用于治疗自身免疫性甲状腺炎。

283. 如权利要求263或权利要求264所述的方法,其中所述细胞缺陷与肝脏疾病相关,或者所述细胞疗法用于治疗肝脏疾病。

284. 如权利要求283所述的方法,其中所述肝脏疾病包括肝硬化。

285. 如权利要求283或权利要求284所述的方法,其中所述细胞群是肝细胞群。

286. 如权利要求263或权利要求264所述的方法,其中所述细胞缺陷与角膜疾病相关,或者所述细胞疗法用于治疗角膜疾病。

287. 如权利要求286所述的方法,其中所述角膜疾病是福克斯营养不良或先天性遗传性内皮营养不良。

288. 如权利要求286或权利要求287所述的方法,其中所述细胞群是角膜内皮细胞群。

289. 如权利要求263或权利要求264所述的方法,其中所述细胞缺陷与肾脏疾病相关,或者所述细胞疗法用于治疗肾脏疾病。

290. 如权利要求289所述的方法,其中所述细胞群是肾细胞群。

291. 如权利要求263或权利要求264所述的方法,其中所述细胞疗法用于治疗癌症。

292. 如权利要求291所述的方法,其中所述癌症选自由以下组成的组: B细胞急性淋巴细胞白血病(B-ALL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤、肝癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、结直肠癌、肺癌、非小细胞肺癌、急性髓性淋巴细胞白血病、多发性骨髓瘤、胃癌、胃腺癌、胰腺癌、胶质母细胞瘤、神经母细胞瘤、肺鳞状细胞癌、肝细胞癌和膀胱癌。

293. 如权利要求263或权利要求264所述的方法,其中所述细胞群是T细胞群或NK细胞群。

294. 如权利要求263-293中任一项所述的方法,其中在施用之前扩增并冷冻保存所述细胞。

295. 如权利要求263-294中任一项所述的方法,其中施用所述群体包括静脉内注射、肌内注射、血管内注射或移植所述群体。

296. 如权利要求295所述的方法,其中所述群体经由肾被膜移植或肌内注射进行移植。

297. 如权利要求263-296中任一项所述的方法,其中所述群体来源于供体受试者,其中

所述供体的HLA类型与所述患者的HLA类型不匹配。

298. 如权利要求263-297中任一项所述的方法,其中所述群体是人细胞群并且所述患者是人患者。

299. 如权利要求276-279中任一项所述的方法,其中所述 $\beta$ 胰岛细胞改善所述受试者的葡萄糖耐量。

300. 如权利要求299所述的方法,其中所述受试者是糖尿病患者。

301. 如权利要求300所述的方法,其中所述糖尿病患者患有I型糖尿病或II型糖尿病。

302. 如权利要求276-278和299-301中任一项所述的方法,其中葡萄糖耐量相对于施用所述胰岛细胞之前所述受试者的葡萄糖耐量得到改善。

303. 如权利要求276-278和299-302中任一项所述的方法,其中所述 $\beta$ 胰岛细胞降低所述受试者中的外源胰岛素使用。

304. 如权利要求301-303中任一项所述的方法,其中如通过HbA1c水平测量的,葡萄糖耐量得到改善。

305. 如权利要求301-304中任一项所述的方法,其中所述受试者禁食。

306. 如权利要求276-278和297-305中任一项所述的方法,其中所述胰岛细胞改善所述受试者体内的胰岛素分泌。

307. 如权利要求306所述的方法,其中胰岛素分泌相对于施用所述胰岛细胞之前所述受试者的胰岛素分泌得到改善。

308. 如权利要求263-307中任一项所述的方法,其还包括向所述患者施用一种或多种免疫抑制剂。

309. 如权利要求263-307中任一项所述的方法,其中已向所述患者施用一种或多种免疫抑制剂。

310. 如权利要求308或309所述的方法,其中所述一种或多种免疫抑制剂是小分子或抗体。

311. 如权利要求308-310中任一项所述的方法,其中所述一种或多种免疫抑制剂选自由以下组成的组:环孢菌素、硫唑嘌呤、霉酚酸、霉酚酸酯、皮质类固醇、泼尼松、甲氨蝶呤、金盐、柳氮磺吡啶、抗疟药、布喹那、来氟米特、咪唑立宾、15-脱氧精脒菌素、6-巯基嘌呤、环磷酰胺、雷帕霉素、他克莫司(FK-506)、OKT3、抗胸腺细胞球蛋白、胸腺五肽(胸腺肽- $\alpha$ )和免疫抑制抗体。

312. 如权利要求308-311中任一项所述的方法,其中所述一种或多种免疫抑制剂包括环孢菌素。

313. 如权利要求308-311中任一项所述的方法,其中所述一种或多种免疫抑制剂包括霉酚酸酯。

314. 如权利要求308-311中任一项所述的方法,其中所述一种或多种免疫抑制剂包括皮质类固醇。

315. 如权利要求308-311中任一项所述的方法,其中所述一种或多种免疫抑制剂包括环磷酰胺。

316. 如权利要求308-311中任一项所述的方法,其中所述一种或多种免疫抑制剂包括雷帕霉素。

317. 如权利要求308-311中任一项所述的方法,其中所述一种或多种免疫抑制剂包括他克莫司(FK-506)。

318. 如权利要求308-311中任一项所述的方法,其中所述一种或多种免疫抑制剂包括抗胸腺细胞球蛋白。

319. 如权利要求308-310中任一项所述的方法,其中所述一种或多种免疫抑制剂是一种或多种免疫调节剂。

320. 如权利要求319所述的方法,其中所述一种或多种免疫调节剂是小分子或抗体。

321. 如权利要求310或权利要求320所述的方法,其中所述抗体与选自以下组成的组的一种或多种受体或配体结合:IL-2受体的p75、MHC、CD2、CD3、CD4、CD7、CD28、B7、CD40、CD45、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-4、IL-5、IL-6R、IL-6、IGF、IGFR1、IL-7、IL-8、IL-10、CD11a、CD58,以及与其任何配体结合的抗体。

322. 如权利要求308-321中任一项所述的方法,其中在施用所述工程化细胞之前向所述患者施用或已向所述患者施用所述一种或多种免疫抑制剂。

323. 如权利要求308-322中任一项所述的方法,其中在施用所述工程化细胞之前至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天向所述患者施用或已向所述患者施用所述一种或多种免疫抑制剂。

324. 如权利要求308-322中任一项所述的方法,其中在施用所述工程化细胞之前至少1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周或更多周向所述患者施用或已向所述患者施用所述一种或多种免疫抑制剂。

325. 如权利要求308-322中任一项所述的方法,其中在施用所述工程化细胞之后至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天向所述患者施用或已向所述患者施用所述一种或多种免疫抑制剂。

326. 如权利要求308-322中任一项所述的方法,其中在施用所述工程化细胞之后至少1周向所述患者施用或已向所述患者施用所述一种或多种免疫抑制剂。

327. 如权利要求308-322中任一项所述的方法,其中在施用所述工程化细胞之后至少2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周或更多周向所述患者施用或已向所述患者施用所述一种或多种免疫抑制剂。

328. 如权利要求308-322中任一项所述的方法,其中在第一次施用所述工程化细胞的同一天向所述患者施用或已向所述患者施用所述一种或多种免疫抑制剂。

329. 如权利要求308-322中任一项所述的方法,其中在施用所述工程化细胞之后向所述患者施用或已向所述患者施用所述一种或多种免疫抑制剂。

330. 如权利要求308-322中任一项所述的方法,其中在第一次和/或第二次施用所述工程化细胞的施用之后向所述患者施用或已向所述患者施用所述一种或多种免疫抑制剂。

331. 如权利要求308-322中任一项所述的方法,其中在第一次和/或第二次施用所述工程化细胞的施用之前向所述患者施用或已向所述患者施用所述一种或多种免疫抑制剂。

332. 如权利要求308-322中任一项所述的方法,其中在第一次和/或第二次施用所述工程化细胞的施用之前至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天向所述患者施用或已向所述患者施用所述一种或多种免疫抑制剂。

333. 如权利要求308-322中任一项所述的方法,其中在第一次和/或第二次施用所述工

程化细胞的施用之前至少1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周或更多周向所述患者施用或已向所述患者施用所述一种或多种免疫抑制剂。

334. 如权利要求308-322中任一项所述的方法,其中在第一次和/或第二次施用所述工程化细胞的施用之后至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天向所述患者施用或已向所述患者施用所述一种或多种免疫抑制剂。

335. 如权利要求308-322中任一项所述的方法,其中在第一次和/或第二次施用所述工程化细胞的施用之后至少1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周或更多周向所述患者施用或已向所述患者施用所述一种或多种免疫抑制剂。

336. 如权利要求308-335中任一项所述的方法,其中与施用的一种或多种免疫抑制剂的剂量相比,所述一种或多种免疫抑制剂以较低的剂量施用以降低不包含所述工程化细胞的修饰的免疫原性细胞的免疫排斥。

337. 如权利要求308-336中任一项所述的方法,其中所述工程化细胞能够受控杀伤所述工程化细胞。

338. 如权利要求308-337中任一项所述的方法,其中所述工程化细胞包含自杀基因或自杀开关。

339. 如权利要求338所述的方法,其中所述自杀基因或所述自杀开关在药物或前药的存在下或在被选择性外源化合物活化后诱导受控细胞死亡。

340. 如权利要求338或权利要求339所述的方法,其中所述自杀基因或所述自杀开关是能够诱导所述工程化细胞凋亡的诱导型蛋白。

341. 如权利要求340所述的方法,其中所述能够诱导所述工程化细胞凋亡的诱导型蛋白是半胱氨酸蛋白酶蛋白。

342. 如权利要求341所述的方法,其中所述半胱氨酸蛋白酶蛋白是半胱氨酸蛋白酶9。

343. 如权利要求338-342中任一项所述的方法,其中所述自杀基因或自杀开关选自由以下组成的组:胞嘧啶脱氨酶(CyD)、疱疹病毒胸苷激酶(HSV-Tk)、诱导型半胱氨酸蛋白酶9(iCaspase9)和雷帕霉素活化的半胱氨酸蛋白酶9(rapaCasp9)。

344. 如权利要求338-343中任一项所述的方法,其中在向所述患者施用所述一种或多种免疫抑制剂之后,活化所述自杀基因或所述自杀开关以诱导受控细胞死亡。

345. 如权利要求338-343中任一项所述的方法,其中在向所述患者施用所述一种或多种免疫抑制剂之前,活化所述自杀基因或所述自杀开关以诱导受控细胞死亡。

346. 如权利要求338-345中任一项所述的方法,其中在向所述患者施用所述工程化细胞之后,活化所述自杀基因或所述自杀开关以诱导受控细胞死亡。

347. 如权利要求338-346中任一项所述的方法,其中如果对所述患者具有细胞毒性或其他负面后果,活化所述自杀基因或所述自杀开关以诱导受控细胞死亡。

348. 如权利要求308-347中任一项所述的方法,其包括施用允许所述工程化细胞群中的工程化细胞耗竭的剂。

349. 如权利要求348所述的方法,其中允许所述工程化细胞耗竭的所述剂是识别在所述工程化细胞表面上表达的蛋白质的抗体。

350. 如权利要求349所述的方法,其中所述抗体选自由识别CCR4、CD16、CD19、CD20、CD30、EGFR、GD2、HER1、HER2、MUC1、PSMA和RQR8的抗体组成的组。

351. 如权利要求349或权利要求350所述的方法,其中所述抗体选自由以下组成的组:莫格利珠单抗、AFM13、MOR208、奥妥珠单抗、乌妥昔单抗、奥卡妥珠单抗、利妥昔单抗、利妥昔单抗-R11b、托木妥昔单抗、R05083945 (GA201)、西妥昔单抗、Hu14.18K322A、Hu14.18-IL2、Hu3F8、地妥昔单抗、c.60C3-R11c及其生物类似物。

352. 如权利要求263-307和348-351中任一项所述的方法,其包括施用识别所述工程化细胞表面上的一种或多种致耐受因子的剂。

353. 如权利要求352所述的方法,其中所述工程化细胞被工程化以表达所述一种或多种致耐受因子。

354. 如权利要求352或权利要求353所述的方法,其中所述一种或多种致耐受因子是CD47。

355. 如权利要求263-354中任一项所述的方法,其还包括向所述患者施用一种或多种额外的治疗剂。

356. 如权利要求263-355中任一项所述的方法,其中已向所述患者施用一种或多种额外的治疗剂。

357. 如权利要求263-356中任一项所述的方法,其还包括监测所述方法的治疗功效。

358. 如权利要求263-357中任一项所述的方法,其还包括监测所述方法的预防功效。

359. 如权利要求263-358中任一项所述的方法,其中重复所述方法直至出现一种或多种疾病症状的期望抑制。

360. 如权利要求92-156和221-228中任一项所述的工程化细胞,其中所述工程化细胞包含编码自杀基因或自杀开关的外源多核苷酸。

361. 如权利要求360所述的工程化细胞,其中所述自杀基因或自杀开关选自由以下组成的组:胞嘧啶脱氨酶(CyD)、疱疹病毒胸苷激酶(HSV-Tk)、诱导型半胱氨酸蛋白酶9(iCaspase9)和雷帕霉素活化的半胱氨酸蛋白酶9(rapaCasp9)。

362. 如权利要求360或权利要求361所述的工程化细胞,其中所述自杀基因或自杀开关以及与所述自杀基因或所述安全开关相关的基因由整合到所述工程化细胞基因组中的双顺反子盒表达。

363. 如权利要求360或权利要求361所述的工程化细胞,其中所述自杀基因或自杀开关和所述一种或多种致耐受因子由整合到所述工程化细胞基因组中的双顺反子盒表达。

364. 如权利要求362或权利要求363所述的工程化细胞,其中所述双顺反子盒是通过非靶向插入到所述工程化细胞的基因组中,任选地通过使用慢病毒载体将所述外源多核苷酸引入到所述细胞中进行整合的。

365. 如权利要求364所述的工程化细胞,其中所述双顺反子盒是通过靶向插入到所述细胞的靶基因组基因座中进行整合的,任选地其中所述靶向插入是通过使用同源定向修复的核酸酶介导的基因编辑进行的。

366. 如权利要求359-365中任一项所述的工程化细胞,其中所述一种或多种致耐受因子是CD47。

367. 如权利要求157-220中任一项所述的方法,其中所述工程化细胞包含编码自杀基因或自杀开关的外源多核苷酸。

368. 如权利要求367所述的方法,其中所述自杀基因选自由以下组成的组:胞嘧啶脱氨



酶(CyD)、疱疹病毒胸苷激酶(HSV-Tk)、诱导型半胱氨酸蛋白酶9(iCaspase9)和雷帕霉素活化的半胱氨酸蛋白酶9(rapaCasp9)。

369. 如权利要求367或权利要求368所述的方法,其中所述自杀基因或自杀开关以及与所述自杀基因或所述安全开关相关的基因由整合到所述工程化细胞基因组中的双顺反子盒表达。

370. 如权利要求367或权利要求368中任一项所述的方法,其中所述自杀基因或自杀开关和所述一种或多种致耐受因子由整合到所述工程化细胞基因组中的双顺反子盒表达。

371. 如权利要求369或权利要求370所述的方法,其中所述双顺反子盒是通过非靶向插入到所述工程化细胞的基因组中进行整合的。

372. 如权利要求371所述的方法,其中所述双顺反子盒是通过靶向插入到所述工程化细胞的靶基因组基因座中进行整合的。

373. 如权利要求367-372中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受因子是CD47。

374. 如权利要求240-259中任一项所述的组合物,其中所述工程化细胞群中的工程化细胞包含编码自杀基因或自杀开关的外源多核苷酸。

375. 如权利要求374所述的组合物,其中所述自杀基因或自杀开关选自以下组成的组:胞嘧啶脱氨酶(CyD)、疱疹病毒胸苷激酶(HSV-Tk)、诱导型半胱氨酸蛋白酶9(iCaspase9)和雷帕霉素活化的半胱氨酸蛋白酶9(rapaCasp9)。

376. 如权利要求374或权利要求375所述的组合物,其中所述自杀基因以及与所述自杀基因或所述安全开关相关的基因由整合到所述工程化细胞群中的工程化细胞基因组中的双顺反子盒表达。

377. 如权利要求374或权利要求375所述的组合物,其中所述自杀基因或自杀开关和所述外源CD47由整合到所述工程化细胞基因组中的双顺反子盒表达。

378. 如权利要求376或权利要求377所述的组合物,其中所述双顺反子盒是通过非靶向插入到所述基因组中,任选地通过使用慢病毒载体将所述外源多核苷酸引入到所述工程化细胞群中的工程化细胞中进行整合的。

379. 如权利要求376或权利要求377所述的组合物,其中所述双顺反子盒是通过靶向插入到所述工程化细胞群中的工程化细胞的靶基因组基因座中进行整合的,任选地其中所述靶向插入是通过使用同源定向修复的核酸酶介导的基因编辑进行的。

380. 如前述权利要求中任一项所述的方法或细胞,其中所述细胞是自体细胞。

381. 如前述权利要求中任一项所述的方法或细胞,其中所述细胞是同种异体细胞。

## 用于同种异体细胞疗法的遗传修饰原代细胞

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2021年8月11日提交的美国临时专利申请号63/232,161、2022年1月7日提交的美国临时专利申请号63/297,694、2022年5月20日提交的美国临时专利申请号63/344,502、2022年6月3日提交的美国临时专利申请号63/348,990和2022年6月17日提交的美国临时专利申请号63/353,531的优先权,出于所有目的将其各自的内容通过引用整体并入本文。

[0003] 电子序列表的引用

[0004] 电子序列表的内容(186152005440SEQLIST.xml;大小:32,413字节;以及创建日期:2022年8月11日)通过引用整体并入本文。

### 技术领域

[0005] 在某些方面,本公开涉及用于同种异体细胞疗法的工程化细胞,诸如工程化原代细胞,其含有一种或多种修饰诸如遗传修饰。在一些实施方案中,工程化原代细胞是低免疫原性细胞。

### 发明内容

[0006] 在一些方面,本文提供了一种工程化细胞诸如工程化原代细胞,其包含(i)增加一种或多种致耐受因子的表达,和(ii)降低一种或多种主要组织相容性复合物(MHC) I类分子和/或一种或多种MHC II类分子的表达的修饰,其中(i)的表达增加和(ii)的表达降低是相对于不包含修饰的相同细胞类型的细胞而言的。

[0007] 在一些实施方案中,(ii)中的修饰降低一种或多种MHC I类分子的表达。在一些实施方案中,(ii)中的修饰降低一种或多种MHC I类分子和一种或多种MHC II类分子的表达。在任何提供的实施方案中的一些中,一种或多种致耐受因子是A20/TNFAIP3、C1-抑制剂、CCL21、CCL22、CD16、CD16 Fc受体、CD24、CD27、CD35、CD39、CD46、CD52、CD55、CD59、CD200、CR1、CTLA4-Ig、DUX4、FasL、H2-M3、HLA-C、HLA-E、HLA-E重链、HLA-G、IDO1、IL-10、IL15-RF、IL-35、MANF、Mfge8、PD-1、PD-L1和/或Serpib9。在一些实施方案中,一种或多种致耐受因子选自自由以下组成的组:CD47、CD27、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重链、HLA-G、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1-抑制剂、IL-10、IL-35、FASL、CCL21、MFGE8和SERPINB9及其任何组合。在一些实施方案中,一种或多种致耐受因子选自自由以下组成的组:CD47、PD-L1、HLA-E、HLA-G、CCL21、FASL、SERPINB9、CD200、MFGE8及其任何组合。在一些实施方案中,一种或多种致耐受因子中的至少一种是CD47。

[0008] 在任何实施方案中的一些中,一种或多种致耐受因子选自自由以下组成的组:CD47;HLA-E;CD24;PD-L1;CD46;CD55;CD59;CR1;MANF;A20/TNFAIP3;HLA-E和CD47;CD24、CD47、PD-L1及其任何组合;HLA-E、CD24、CD47和PD-L1及其任何组合;CD46、CD55、CD59和CR1及其任何组合;HLA-E、CD46、CD55、CD59和CR1及其任何组合;HLA-E、CD24、CD47、PDL1、CD46、CD55、CD59和CR1及其任何组合;HLA-E和PDL1;HLA-E、PDL1和A20/TNFAIP及其任何组合;

HLA-E、PDL1和MANF及其任何组合；HLA-E、PDL1、A20/TNFAIP和MANF及其任何组合；以及CD47、PD-L1、HLA-E、HLA-G、CCL21、FASL、SERPINB9、CD200、MFG8及其任何组合。

[0009] 在任何实施方案中的一些中，修饰选自降低MHC I和/或MHC II的表达；降低MIC-A和/或MIC-B的表达；增加CD47以及任选的CD24和PD-L1的表达；以及增加CD46、CD55、CD59和CR1的表达的修饰。

[0010] 在任何实施方案中的一些中，修饰选自降低MHC I类分子的表达；降低MIC-A和/或MIC-B的表达；降低TXNIP的表达；增加PD-L1和HLA-E，以及任选的A20/TNFAIP3和MANF的表达的修饰。

[0011] 在任何实施方案中的一些中，修饰选自增加CCL21、PD-L1、FASL、SERPINB9、HLA-G、CD47、CD200和MFG8的表达；以及降低MICA和/或MICB的表达的修饰。

[0012] 在一些实施方案中，修饰选自降低MHC I和/或MHC II的表达；以及增加CD47的表达的修饰。

[0013] 在一些实施方案中，任何上述修饰与增加或减少细胞中基因的表达的一个或多个额外的编辑一起存在于提供的工程化细胞中。在一些实施方案中，任何一种或多种进一步修饰可以是降低以下的表达，诸如破坏以下的表达、使以下的表达失活或敲除以下的表达的修饰：B2M、TAP I、NLRC5、CIITA、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DP、HLA-DM、HLA-DOA、HLA-DOB、HLA-DQ、HLA-DR、RFX5、RFXANK、RFXAP、NFY-A、NFY-B、NFY-C、CTLA-4、PD-1、IRF1、MIC-A、MIC-B。在一些实施方案中，任何一种或多种进一步修饰可以是降低以下参与氧化应激或ER应激的蛋白质的表达的修饰：TRAC、TRB、CD142、ABO、CD38、PCDH11Y、NLGN4Y和/或RHD。在一些实施方案中，参与氧化应激或ER应激的蛋白质包括硫氧还蛋白相互作用蛋白(TXNIP)、PKR样ER激酶(PERK)、肌醇需求酶1 $\alpha$ (IRE1 $\alpha$ )和DJ-1(PARK7)。

[0014] 在一些实施方案中，对于任何提供的实施方案，其中任何上述靶基因(例如B2M、TAP I、NLRC5、CIITA、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DP、HLA-DM、HLA-DOA、HLA-DOB、HLA-DQ、HLA-DR、RFX5、RFXANK、RFXAP、NFY-A、NFY-B、NFY-C、CTLA-4、PD-1、IRF1、MIC-A、MIC-B)的表达降低，靶基因不是由工程化细胞表达的。在一些实施方案中，靶基因编码的蛋白质不在细胞的表面上表达。在一些实施方案中，MHC I类复合物和/或MHC II类复合物不在细胞的表面上表达。

[0015] 在一些方面，本文提供了一种工程化原代细胞，其包含(i)增加CD47的表达，和(ii)降低一种或多种主要组织相容性复合物(MHC) I类分子和/或一种或多种MHC II类分子的表达的修饰，其中(i)的表达增加和(ii)的表达降低是相对于不包含修饰的相同细胞类型的细胞而言的。

[0016] 在一些实施方案中，增加表达的修饰包括增加的表面表达，且/或降低表达的修饰包括降低的表面表达。在一些实施方案中，增加CD47的表达的修饰包括编码CD47蛋白的外源多核苷酸。在一些实施方案中，编码CD47的外源多核苷酸编码与SEQ ID NO:2的氨基酸序列具有至少85%同一性的氨基酸序列，并且降低工程化原代细胞的先天免疫杀伤。在一些实施方案中，编码CD47的外源多核苷酸编码SEQ ID NO:2中列出的序列。在一些实施方案中，编码CD47的外源多核苷酸可操作地连接至启动子。在一些实施方案中，启动子是组成型启动子。在一些实施方案中，启动子选自以下组成的组：CAG启动子、巨细胞病毒(CMV)启动子、EF1a启动子、PGK启动子、腺病毒晚期启动子、牛痘病毒7.5K启动子、SV40启动子、HSV

的tk启动子、小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)启动子、HIV的LTR启动子、莫洛尼病毒(moloney virus)的启动子、爱泼斯坦巴尔病毒(Epstein barr virus)(EBV)启动子和劳斯肉瘤病毒(Rous sarcoma virus)(RSV)启动子。在一些实施方案中,将编码CD47的外源多核苷酸整合到工程化原代细胞的基因组中。在一些实施方案中,外源多核苷酸是编码CD47的多顺反子载体和编码第二转基因的额外转基因。在一些实施方案中,整合是通过非靶向插入到工程化原代细胞的基因组中,任选地通过使用慢病毒载体将外源多核苷酸引入到细胞中进行的。在一些实施方案中,整合是通过靶向插入到细胞的靶基因组基因座中进行的。在一些实施方案中,靶基因组基因座是安全港基因座、B2M基因座、CIITA基因座、TRAC基因座或TRBC基因座。在一些实施方案中,靶基因组基因座选自自由以下组成的组:CCR5基因座、CXCR4基因座、PPP1R12C(也称为AAVS1)基因、白蛋白基因座、SHS231基因座、CLYBL基因座和ROSA26基因座。

[0017] 在一些实施方案中,降低一种或多种MHC I类分子的表达的修饰降低一种或多种MHC I类分子蛋白质表达。在一些实施方案中,降低一种或多种MHC I类分子的表达的修饰是降低B-2微球蛋白(B2M)的表达的修饰。在一些实施方案中,降低一种或多种MHC I类分子的表达的修饰包括降低的B2M的mRNA表达。在一些实施方案中,降低一种或多种MHC I类分子的表达的修饰包括降低的B2M的蛋白质表达。在一些实施方案中,修饰消除了B2M基因活性。在一些实施方案中,修饰包括B2M基因的两个等位基因的失活或破坏。在一些实施方案中,修饰包括细胞中所有B2M编码序列的失活或破坏。在一些实施方案中,失活或破坏包括B2M基因中的插入缺失。在一些实施方案中,修饰是B2M基因的一段连续基因组DNA的移码突变或缺失。在一些实施方案中,B2M基因被敲除。在一些实施方案中,修饰是通过核酸酶介导的基因编辑进行的。在一些实施方案中,核酸酶介导的基因编辑是通过靶向B2M基因的锌指核酸酶(ZFN)、TAL效应物核酸酶(TALEN)或CRISPR-Cas组合进行的,任选地其中Cas是Cas9。在一些实施方案中,核酸酶介导的基因编辑是通过CRISPR-Cas组合进行的,并且CRISPR-Cas组合包含具有与B2M基因内的至少一个靶位点互补的靶向结构域的引导RNA(gRNA)。在一些实施方案中,CRISPR-Cas组合是包含gRNA和Cas蛋白的核糖核蛋白(RNP)复合物。在一些实施方案中,降低一种或多种MHC I类分子的表达的修饰是降低HLA-A蛋白、HLA-B蛋白或HLA-C蛋白的表达的修饰,任选地其中编码所述HLA-A蛋白、HLA-B蛋白或HLA-C蛋白的基因被敲除。

[0018] 在一些实施方案中,降低一种或多种MHC II类分子的表达的修饰降低一种或多种MHC II类分子蛋白质表达。在一些实施方案中,降低一种或多种MHC II类分子的表达的修饰是降低CIITA的表达的修饰。在一些实施方案中,降低一种或多种MHC II类分子的表达的修饰包括降低的CIITA的mRNA表达。在一些实施方案中,降低一种或多种MHC II类分子的表达的修饰包括降低的CIITA的蛋白质表达。在一些实施方案中,修饰消除了CIITA基因活性。在一些实施方案中,修饰包括CIITA基因的两个等位基因的失活或破坏。在一些实施方案中,修饰包括细胞中所有CIITA编码序列的失活或破坏。在一些实施方案中,失活或破坏包括CIITA基因中的插入缺失。在一些实施方案中,插入缺失是CIITA基因的一段连续基因组DNA的移码突变或缺失。在一些实施方案中,CIITA基因被敲除。在一些实施方案中,修饰是通过核酸酶介导的基因编辑进行的。在一些实施方案中,核酸酶介导的基因编辑是通过靶向CIITA基因的锌指核酸酶(ZFN)、TAL效应物核酸酶(TALEN)或CRISPR-Cas组合进行的,任

选地其中Cas是Cas9。在一些实施方案中,核酸酶介导的基因编辑是通过CRISPR-Cas组合进行的,并且CRISPR-Cas组合包含具有与CIITA基因内的至少一个靶位点互补的靶向结构域的引导RNA(gRNA)。在一些实施方案中,CRISPR-Cas组合是包含gRNA和Cas蛋白的核糖核蛋白(RNP)复合物。在一些实施方案中,降低一种或多种MHC II类分子的表达的修饰是降低HLA-DP蛋白、HLA-DR蛋白或HLA-DQ蛋白的表达的修饰,任选地其中编码所述HLA-DP蛋白、HLA-DR蛋白或HLA-DQ蛋白的基因被敲除。

[0019] 在一些实施方案中,工程化原代细胞是人细胞或动物细胞。在一些实施方案中,动物细胞是猪(pig/porcine)细胞、牛(cow/bovine)细胞或羊(sheep/ovine)细胞。在一些实施方案中,工程化原代细胞是人细胞。在一些实施方案中,原代细胞是暴露于血液的细胞类型。在一些实施方案中,工程化原代细胞是从供体受试者分离的原代细胞。在一些实施方案中,在从供体受试者获得供体样品时,供体受试者是健康的或未怀疑患有疾病或病状。在一些实施方案中,工程化原代细胞选自胰岛细胞、 $\beta$ 胰岛细胞、B细胞、T细胞、NK细胞、视网膜色素上皮细胞、神经胶质祖细胞、内皮细胞、肝细胞、甲状腺细胞、皮肤细胞,和血细胞。在一些实施方案中,工程化原代细胞是内皮细胞。在一些实施方案中,工程化原代细胞是上皮细胞。在一些实施方案中,工程化原代细胞是T细胞。在一些实施方案中,工程化原代细胞是NK细胞。在一些实施方案中,工程化原代细胞包含嵌合抗原受体(CAR)。在一些实施方案中,工程化原代细胞是胰岛细胞。在一些实施方案中,胰岛细胞是 $\beta$ 胰岛细胞。在一些实施方案中,工程化原代细胞是肝细胞。在一些实施方案中,工程化原代细胞是ABO血型O型。在一些实施方案中,工程化原代细胞是恒河猴因子阴性(Rh<sup>-</sup>)。

[0020] 在一些方面,本文提供了一种生成工程化原代细胞的方法,所述方法包括:a)降低或消除原代细胞中一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子的表达;和b)增加原代细胞中一种或多种致耐受因子的表达。在一些实施方案中,一种或多种致耐受因子选自自由以下组成的组:CD47、CD27、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重链、HLA-G、PD-L1、ID01、CTLA4-Ig、C1-抑制剂、IL-10、IL-35、FASL、CCL21、MFG8和SERPINB9及其任何组合。在一些实施方案中,一种或多种致耐受因子选自自由以下组成的组:CD47、PD-L1、HLA-E、HLA-G、CCL21、FASL、SERPINB9、CD200、MFG8及其任何组合。在一些实施方案中,一种或多种致耐受因子中的至少一种是CD47。在一些实施方案中,所述方法包括降低或消除一种或多种MHC I类分子的表达。在一些实施方案中,所述方法包括降低或消除一种或多种MHC I类分子和一种或多种MHC II类分子的表达。

[0021] 在一些方面,本文提供了一种生成工程化原代细胞的方法,所述方法包括:a.降低或消除细胞中一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子的表达;和b.增加细胞中CD47的表达。在一些实施方案中,所述方法包括降低或消除一种或多种MHC I类分子的表达。在一些实施方案中,所述方法包括降低或消除一种或多种MHC I类分子和一种或多种MHC II类分子的表达。

[0022] 在一些实施方案中,增加表达的修饰包括增加的表面表达,且/或降低表达的修饰包括降低的表面表达。在一些实施方案中,增加CD47的表达的修饰包括编码CD47蛋白的外源多核苷酸。在一些实施方案中,编码CD47的外源多核苷酸编码与SEQ ID NO:2的氨基酸序列具有至少85%同一性的氨基酸序列,并且降低工程化原代细胞的先天免疫杀伤。在一些实施方案中,编码CD47的外源多核苷酸编码SEQ ID NO:2中列出的序列。在一些实施方案

中,编码CD47的外源多核苷酸可操作地连接至启动子。在一些实施方案中,将编码CD47的外源多核苷酸整合到工程化原代细胞的基因组中。在一些实施方案中,整合是通过非靶向插入到工程化原代细胞的基因组中,任选地通过使用慢病毒载体将外源多核苷酸引入到工程化原代细胞中进行的。在一些实施方案中,整合是通过靶向插入到细胞的靶基因组基因座中进行的,任选地其中靶向插入是通过使用同源定向修复的核酸酶介导的基因编辑进行的。在一些实施方案中,靶基因组基因座是B2M基因座、CIITA基因座、CD142基因座、TRAC基因座或TRBC基因座。在一些实施方案中,靶基因组基因座选自自由以下组成的组:CCR5基因座、CXCR4基因座、PPP1R12C(也称为AAVS1)基因、白蛋白基因座、SHS231基因座、CLYBL基因座和ROSA26基因座。在一些实施方案中,核酸酶介导的基因编辑是通过靶向靶基因组基因座的锌指核酸酶(ZFN)、TAL效应物核酸酶(TALEN)或CRISPR-Cas组合进行的,任选地其中Cas是Cas9。在一些实施方案中,核酸酶介导的基因编辑是通过CRISPR-Cas组合进行的,并且CRISPR-Cas组合包含具有与靶基因组基因座的靶序列互补的靶向结构域的指导RNA(gRNA)和包含编码CD47的外源多核苷酸的同源定向修复模板。在一些实施方案中,CRISPR-Cas组合是包含gRNA和Cas蛋白的核糖核蛋白(RNP)复合物。在一些实施方案中,工程化原代细胞是低免疫原性原代细胞。

[0023] 在一些实施方案中,降低或消除一种或多种MHC I类分子的表达包括引入降低一种或多种MHC I类分子蛋白质表达的修饰。在一些实施方案中,降低一种或多种MHC I类分子蛋白质表达的修饰包括降低的B2M的表达。在一些实施方案中,降低一种或多种MHC I类分子蛋白质表达的修饰包括降低的B2M的蛋白质表达。在一些实施方案中,降低一种或多种MHC I类分子蛋白质表达的修饰消除B2M基因活性。在一些实施方案中,降低一种或多种MHC I类分子表达的修饰包括所述B2M基因的两个等位基因的失活或破坏。在一些实施方案中,降低一种或多种MHC I类分子蛋白质表达的修饰包括细胞中所有B2M编码序列的失活或破坏。在一些实施方案中,失活或破坏包括内源B2M基因中的插入缺失或内源B2M基因的一段连续基因组DNA的缺失。在一些实施方案中,插入缺失是B2M基因的一段连续基因组DNA的移码突变或缺失。在一些实施方案中,内源B2M基因被敲除。在一些实施方案中,降低一种或多种MHC I类分子蛋白质表达的修饰是通过核酸酶介导的基因编辑进行的。在一些实施方案中,核酸酶介导的基因编辑是通过靶向B2M基因的锌指核酸酶(ZFN)、TAL效应物核酸酶(TALEN)或CRISPR-Cas组合进行的,任选地其中Cas是Cas9。在一些实施方案中,核酸酶介导的基因编辑是通过CRISPR-Cas组合进行的,并且CRISPR-Cas组合包含具有与B2M基因内的至少一个靶位点互补的靶向结构域的指导RNA(gRNA)。在一些实施方案中,CRISPR-Cas组合是包含gRNA和Cas蛋白的核糖核蛋白(RNP)复合物。在一些实施方案中,降低一种或多种MHC I类分子的表达的修饰降低HLA-A蛋白表达、HLA-B蛋白表达或HLA-C蛋白表达,任选地其中通过敲除编码所述HLA-A蛋白、HLA-B蛋白或HLA-C蛋白的基因来降低蛋白质表达。

[0024] 在一些实施方案中,降低或消除一种或多种MHC II类分子的表达包括引入降低一种或多种MHC II类分子蛋白质表达的修饰。在一些实施方案中,降低一种或多种MHC II类分子蛋白质表达的遗传修饰包括降低的CIITA的表达。在一些实施方案中,降低一种或多种MHC II类分子蛋白质表达的遗传修饰包括降低的CIITA的蛋白质表达。在一些实施方案中,降低一种或多种MHC II类分子蛋白质表达的修饰消除CIITA。在一些实施方案中,降低一种或多种MHC II类分子蛋白质表达的修饰包括CIITA基因的两个等位基因的失活或破坏。在

一些实施方案中,修饰包括细胞中所有CIITA编码序列的失活或破坏。在一些实施方案中,失活或破坏包括CIITA基因中的插入缺失或CIITA基因的一段连续基因组DNA的缺失。在一些实施方案中,插入缺失是CIITA基因的一段连续基因组DNA的移码突变或缺失。在一些实施方案中,CIITA基因被敲除。在一些实施方案中,降低一种或多种MHC II类的表达的遗传修饰降低HLA-DP蛋白、HLA-DR蛋白或HLA-DQ蛋白的表达,任选地其中通过敲除编码所述HLA-DP蛋白、所述HLA-DR蛋白或所述HLA-DQ蛋白的基因来降低所述HLA-DP蛋白表达、所述HLA-DR蛋白表达或所述HLA-DQ蛋白表达。

[0025] 在一些实施方案中,工程化原代细胞是人细胞或动物细胞。在一些实施方案中,动物细胞是猪(pig/porcine)细胞、牛(cow/bovine)细胞或羊(sheep/ovine)细胞。在一些实施方案中,工程化原代细胞是人细胞。在一些实施方案中,工程化原代细胞是暴露于血液的细胞类型。在一些实施方案中,工程化原代细胞是从供体受试者分离的。在一些实施方案中,工程化原代细胞选自胰岛细胞、 $\beta$ 胰岛细胞、B细胞、T细胞、NK细胞、视网膜色素上皮细胞、神经胶质祖细胞、内皮细胞、肝细胞、甲状腺细胞、皮肤细胞,和血细胞。在一些实施方案中,工程化原代细胞是胰岛细胞。

[0026] 在一些实施方案中,原代胰岛细胞已从原代胰岛簇解离。在一些实施方案中,原代胰岛簇是人原代尸体胰岛簇。在一些实施方案中,在步骤a)之后和/或在步骤b)之后,原代胰岛细胞在用于重新聚集成修饰的原代胰岛簇的条件下孵育,其中孵育的至少一部分是在运动中进行的。在一些实施方案中,孵育还包括至少一部分在静态条件下的孵育。在一些实施方案中,孵育包括在静态条件下的第一孵育,然后是在运动中的孵育。在一些实施方案中,孵育包括在运动中的孵育,然后是在静态条件下的第二孵育。在一些实施方案中,在用于重新聚集的条件下的孵育之前,所述方法包括选择已经修饰的胰岛细胞。在一些实施方案中,选择是通过荧光活化细胞分选(FACS)进行的。

[0027] 在一些实施方案中,所述方法包括:i)将原代胰岛簇解离成原代 $\beta$ 胰岛细胞的悬浮液;ii)修饰悬浮液的原代 $\beta$ 胰岛细胞以降低或消除原代 $\beta$ 胰岛细胞中一种或多种MHC I类和/或一种或多种MHC II类HLA的表达;iii)在用于重新聚集成第一修饰的原代胰岛簇的条件下孵育修饰的原代 $\beta$ 胰岛细胞,其中孵育的至少一部分是在运动中进行的;iv)将修饰的原代胰岛簇解离成修饰的原代 $\beta$ 胰岛细胞的悬浮液;v)进一步修饰悬浮液的修饰的原代胰岛细胞以增加原代细胞中一种或多种致耐受因子的表达;和vi)在用于重新聚集成第二修饰的原代胰岛簇的条件下孵育进一步修饰的原代 $\beta$ 胰岛细胞,其中孵育的至少一部分是在运动中进行的。

[0028] 在一些实施方案中,一种或多种MHC I类HLA是HLA-A蛋白、HLA-B蛋白或HLA-C蛋白。在一些实施方案中,一种或多种MHC II类HLA是HLA-DP蛋白、HLA-DR蛋白或HLA-DQ蛋白。在一些实施方案中,修饰是通过遗传工程化进行的。在一些实施方案中,运动是摇动。在一些实施方案中,摇动包括轨道运动。在一些实施方案中,摇动包括双向线性移动。在一些实施方案中,用轨道摇床进行摇动。在一些实施方案中,(iii)中的孵育和/或vi)中的孵育还包括至少一部分在静态条件下的孵育。在一些实施方案中,iii)中的孵育和/或vi)中的孵育包括在静态条件下的第一孵育,然后是在运动中的孵育。在一些实施方案中,孵育包括在运动中的孵育,然后是在静态条件下的第二孵育。

[0029] 在一些实施方案中,在v)之前,所述方法包括从iv)中的解离的胰岛细胞中选择已

经修饰的 $\beta$ 胰岛细胞,并且任选地对选择的胰岛细胞重复步骤iii)和iv)。在一些实施方案中,在vi)中的孵育之后,所述方法包括将所述第二修饰的原代胰岛簇解离成修饰的原代 $\beta$ 胰岛细胞的悬浮液和选择已经修饰的胰岛细胞。在一些实施方案中,在用于重新聚集成修饰的原代胰岛簇的条件下孵育选择的修饰的原代 $\beta$ 胰岛细胞,其中孵育的至少一部分是在运动中进行的。

[0030] 在一些实施方案中,本文提供了运动以促进细胞群的修饰的用途,其中细胞群在经受运动之前已经与一种或多种试剂接触以修饰群体的细胞中的基因表达。

[0031] 在一些实施方案中,本文提供了一种增强细胞群的修饰的方法,其中所述方法包括:i)使细胞群与一种或多种试剂接触以修饰群体的细胞中的基因表达;和ii)使细胞群在与一种或多种试剂接触后经受运动。

[0032] 在一些实施方案中,本文提供了一种增强细胞群的活力的方法,其中所述方法包括:i)使细胞群与一种或多种试剂接触以修饰群体的细胞中的基因表达;和ii)使细胞群在与一种或多种试剂接触后经受运动。

[0033] 在一些实施方案中,本文提供了一种修饰细胞群的方法,其中所述方法包括:i)使细胞群与一种或多种试剂接触以修饰群体的细胞中的基因表达;和ii)使细胞群在与一种或多种试剂接触后经受运动。

[0034] 在提供的用途或方法的任何实施方案中的一些中,细胞群是原代细胞。在提供的用途或方法的任何实施方案中的一些中,细胞群是来源于干细胞的细胞。在一些实施方案中,干细胞选自以下组成的组:多能干细胞(PSC)、诱导多能干细胞、胚胎干细胞、造血干细胞、间充质干细胞、内皮干细胞、上皮干细胞、脂肪干细胞、生殖干细胞、肺干细胞、脐带血干细胞和多潜能干细胞(multipotent stem cell)。在一些实施方案中,干细胞是多能干细胞。在一些实施方案中,干细胞是诱导多能干细胞、间充质干细胞(MSC)、造血干细胞(HSC)或胚胎干细胞(ESC)。在一些实施方案中,细胞群选自以下组成的组:胰岛细胞、免疫细胞、B细胞、T细胞、自然杀伤(NK)细胞、自然杀伤T(NKT)细胞、巨噬细胞、内皮细胞、肌细胞、心肌细胞、平滑肌细胞、骨骼肌细胞、肝细胞、神经胶质祖细胞、多巴胺能神经元、视网膜色素上皮细胞、甲状腺细胞、皮肤细胞、神经胶质祖细胞、神经细胞、心脏细胞和血细胞。

[0035] 在提供的用途或方法的任何实施方案中的一些中,细胞群天然存在于3D网络中。

[0036] 在提供的用途或方法的任何实施方案中的一些中,细胞群在悬浮液中。在一些实施方案中,细胞群在具有低吸附表面的容器中。在一些实施方案中,将细胞群维持在容器中的足以覆盖细胞的最小体积的培养基中。在一些实施方案中,悬浮液中的细胞群是通过在接触之前从贴壁培养物或细胞簇中解离细胞产生的。

[0037] 在提供的用途或方法的任何实施方案中的一些中,细胞群是胰岛细胞。在一些实施方案中,细胞群包含 $\beta$ 胰岛细胞。在一些实施方案中,包含 $\beta$ 胰岛细胞的细胞群是通过将原代胰岛簇解离成包含原代 $\beta$ 胰岛细胞的细胞悬浮液产生的。

[0038] 在提供的用途或方法的任何实施方案中的一些中,在使细胞经受运动之前进行接触少于两天。在一些实施方案中,在使细胞经受运动之前进行接触30秒至24小时。在一些实施方案中,在使细胞经受运动之前进行接触1分钟至60分钟、2分钟至30分钟、5分钟至15分钟。

[0039] 在提供的用途或方法的任何实施方案中的一些中,使细胞群经受运动促进细胞集



合体的形成。在一些实施方案中,使细胞群经受运动形成细胞簇。

[0040] 在提供的用途或方法的任何实施方案中的一些中,所述方法或用途还包括在使细胞经受运动之后在静态条件下孵育细胞。在提供的用途或方法的任何实施方案中的一些中,所述方法或用途还包括在接触之后和使细胞经受运动之前在静态条件下孵育细胞。

[0041] 在提供的用途或方法的任何实施方案中的一些中,一种或多种试剂包括至少两种不同的试剂。在一些实施方案中,至少两种不同试剂中的每一种用于调节不同基因的表达。

[0042] 在提供的用途或方法的任何实施方案中的一些中,重复所述方法的步骤。在一些实施方案中,所述方法的第一次迭代中的一种或多种试剂不同于所述方法的重复迭代中的一种或多种试剂。在一些实施方案中,所述方法的第一次迭代中的一种或多种试剂不同于所述方法的第二次迭代中的一种或多种试剂。

[0043] 在提供的用途或方法的任何实施方案中的一些中,这还可以包括在与一种或多种试剂接触之后在使细胞经受运动之前,选择具有修饰的基因表达的细胞。在任何实施方案中的一些中,选择具有修饰的基因表达的细胞可以是相对于接触之前的细胞。在一些实施方案中,修饰的基因表达增加,诸如相对于接触之前细胞中基因的表达。在一些实施方案中,修饰的基因表达减少,诸如相对于接触之前细胞中基因的表达。

[0044] 本文提供了一种用于修饰原代胰岛细胞的方法,所述方法包括:i)将原代胰岛簇解离成原代胰岛细胞的悬浮液;ii)使原代胰岛细胞的悬浮液与一种或多种试剂接触以修饰基因表达;和iii)在接触之后,在用于使细胞重新聚集成胰岛的条件下孵育修饰的胰岛细胞,其中孵育的至少一部分是在运动中进行的。

[0045] 在一些方面,本文提供了一种用于基因编辑原代胰岛细胞的方法,所述方法包括:i)将原代胰岛簇解离成原代 $\beta$ 胰岛细胞的悬浮液;ii)修饰悬浮液的原代 $\beta$ 胰岛细胞;和iii)在用于将修饰的原代 $\beta$ 胰岛细胞重新聚集成胰岛的条件下孵育修饰的原代 $\beta$ 胰岛细胞,其中孵育的至少一部分是在摇动下进行的。在一些实施方案中,原代胰岛簇是人原代尸体胰岛簇。在一些实施方案中,修饰包括将一种或多种修饰引入细胞中以降低细胞中编码内源蛋白的一种或多种基因的表达或增加细胞中一种或多种异源蛋白的表达。

[0046] 在一些实施方案中,(iii)中的孵育和/或vi)中的孵育还包括至少一部分在静态条件下的孵育。在一些实施方案中,孵育包括在静态条件下的第一孵育,然后是在运动中的孵育。在一些实施方案中,孵育包括在运动中的孵育,然后是在静态条件下的第二孵育。在一些实施方案中,重复步骤i)-iii)。在一些实施方案中,所述方法的第一次迭代中的修饰不同于所述方法的重复迭代中的修饰。在一些实施方案中,所述方法的第一次迭代中的一种或多种试剂不同于所述方法的重复迭代中的一种或多种试剂。

[0047] 在一些实施方案中,重新聚集的胰岛细胞是第一修饰的原代胰岛簇,并且其中所述方法还包括:iv)将第一修饰的原代胰岛簇解离成修饰的原代 $\beta$ 胰岛细胞的悬浮液;v)进一步修饰悬浮液中修饰的原代胰岛细胞;和vi)在用于重新聚集成第二修饰的原代胰岛簇的条件下孵育进一步修饰的原代 $\beta$ 胰岛细胞,其中孵育的至少一部分是在运动中进行的。

[0048] 在一些实施方案中,一种或多种试剂是一种或多种第一试剂,并且重新聚集的胰岛细胞是第一修饰的原代胰岛簇,并且其中所述方法还包括:iv)将第一修饰的原代胰岛簇解离成修饰的原代胰岛细胞的悬浮液;v)使悬浮液中修饰的原代胰岛细胞与一种或多种另外的试剂进一步接触以修饰基因表达;和vi)在进一步接触之后,在用于重新聚集成第二修

饰的原代胰岛簇的条件下孵育进一步修饰的原代胰岛细胞,其中孵育的至少一部分是在运动中进行的。

[0049] 在一些实施方案中,在iii)中的孵育之前,所述方法包括选择已经修饰的胰岛细胞。在一些实施方案中,在v)之前,所述方法包括从iv)中的解离的胰岛细胞中选择已经修饰的 $\beta$ 胰岛细胞,并且任选地对选择的胰岛细胞重复步骤iii)和iv)。在一些实施方案中,在vi)中的孵育之后,所述方法包括将所述第二修饰的原代胰岛簇解离成修饰的原代胰岛细胞的悬浮液和选择已经修饰的胰岛细胞。在一些实施方案中,已经修饰的细胞具有修饰的基因表达,诸如相对于接触之前的原代胰岛细胞进行修饰的。

[0050] 在一些实施方案中,在用于重新聚集成修饰的原代胰岛簇的条件下孵育选择的修饰的原代 $\beta$ 胰岛细胞,其中孵育的至少一部分是在运动中进行的。在一些实施方案中,选择包括荧光活化细胞分选(FACS)。

[0051] 在一些实施方案中,悬浮液是单细胞悬浮液。

[0052] 在一些实施方案中,原代胰岛细胞的悬浮液存在于具有低吸附表面的容器中。在一些实施方案中,容器具有足以覆盖细胞的最小体积的培养基。

[0053] 在任何实施方案中的一些中,运动的速度在约20rpm与约180rpm之间、约40rpm与约125rpm之间或约60rpm与约100rpm之间,均包括端值。在一些实施方案中,运动的速度在约85rpm与约95rpm之间,包括端值。

[0054] 在一些实施方案中,运动是摇动。在一些实施方案中,摇动包括轨道运动。在一些实施方案中,运动是波动运动。在一些实施方案中,波动运动是使用结合了轨道移动和摆动移动的摇床装置进行的。在一些实施方案中,摇动包括双向线性移动。在一些实施方案中,用轨道摇床进行摇动。在一些实施方案中,运动具有倾斜角。在一些实施方案中,倾斜角在 $1^\circ$ 与 $8^\circ$ 之间。

[0055] 在一些实施方案中,第一修饰或进一步修饰中的一个包括降低细胞中编码内源蛋白的一种或多种基因的表达,并且第一修饰或进一步修饰中的另一个包括增加细胞中一种或多种外源蛋白的表达。在一些实施方案中,第一修饰包括降低细胞中编码内源蛋白的一种或多种基因的表达,并且进一步修饰包括增加细胞中一种或多种外源蛋白的表达。

[0056] 在一些实施方案中,一种或多种试剂降低细胞中编码内源蛋白的一种或多种基因的表达或增加细胞中一种或多种外源蛋白的表达。在一些实施方案中,第一一种或多种试剂中的至少一种用于降低细胞中编码内源蛋白的一种或多种基因的表达,并且另外的一种或多种试剂中的至少一种用于增加细胞中一种或多种外源蛋白的表达。在一些实施方案中,第一一种或多种试剂中的至少一种用于增加细胞中一种或多种外源蛋白的表达,并且另外的一种或多种试剂中的至少一种用于降低细胞中编码内源蛋白的一种或多种基因的表达。在一些实施方案中,第一一种或多种试剂用于降低细胞中编码内源蛋白的一种或多种基因的表达,并且另外的一种或多种试剂用于增加细胞中一种或多种外源蛋白的表达。在一些实施方案中,一种或多种试剂包括用于基因编辑编码内源蛋白的靶基因的基因组修饰蛋白和/或包含编码外源蛋白的外源多核苷酸的剂。

[0057] 在一些实施方案中,降低细胞中编码内源蛋白的一种或多种基因的表达是通过将基因编辑系统引入细胞中进行的。在一些实施方案中,基因编辑系统包含序列特异性核酸酶。在任何实施方案中的一些中,用于降低细胞中编码内源蛋白的一种或多种基因的表达

的一种或多种试剂包括基因组修饰蛋白。基因组修饰蛋白与通过序列特异性核酸酶、CRISPR相关转座酶 (CAST)、引导编辑 (prime editing) 或经由位点特异性靶向元件进行的可编程添加 (PASTE) 进行的基因编辑相关。在一些实施方案中,基因组修饰蛋白是序列特异性核酸酶。在一些实施方案中,序列特异性核酸酶是RNA指导的核酸酶。

[0058] 在一些实施方案中,序列特异性核酸酶选自由以下组成的组:RNA指导的DNA核酸内切酶、大范围核酸酶、转录活化因子样效应物核酸酶 (TALEN) 和锌指核酸酶 (ZFN)。在一些实施方案中,基因编辑系统包含RNA指导的核酸酶。在一些实施方案中,RNA指导的核酸酶包含Cas核酸酶和指导RNA。在一些实施方案中,RNA指导的核酸酶是II型或V型Cas蛋白。在一些实施方案中,RNA指导的核酸酶是Cas9同源物或Cpf1同源物。在一些实施方案中,基因组修饰蛋白选自由以下组成的组:Cas3、Cas4、Cas5、Cas8a、Cas8b、Cas8c、Cas9、Cas10、Cas12、Cas12a (Cpf1)、Cas12b (C2c1)、Cas12c (C2c3)、Cas12d (CasY)、Cas12e (CasX)、Cas12f (C2c10)、Cas12g、Cas12h、Cas12i、Cas12k (C2c5)、Cas13、Cas13a (C2c2)、Cas13b、Cas13c、Cas13d、C2c4、C2c8、C2c9、Cmr5、Cse1、Cse2、Csf1、Csm2、Csn2、Csx10、Csx11、Csy1、Csy2、Csy3和Mad7。在一些实施方案中,Cas是Cas9。在一些实施方案中,Cas是Cas12。

[0059] 在一些实施方案中,一种或多种试剂用于降低一种或多种主要组织相容性复合物 (MHC) I类分子的表达和/或用于降低一种或多种MHC II类分子的表达。在一些实施方案中,第一修饰包括降低一种或多种主要组织相容性复合物 (MHC) I类分子和/或一种或多种MHC II类分子的表达。在一些实施方案中,修饰是遗传工程化。在一些实施方案中,一种或多种MHC I类HLA是HLA-A蛋白、HLA-B蛋白或HLA-C蛋白。在一些实施方案中,一种或多种MHC II类HLA是HLA-DP蛋白、HLA-DR蛋白或HLA-DQ蛋白。

[0060] 在一些实施方案中,用于降低一种或多种MHC I类分子或MHC II类分子的表达的一种或多种试剂降低以下中的一种或多种的表达:B2M、TAP I、NLRC5、CIITA、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DP、HLA-DM、HLA-DOA、HLA-DOB、HLA-DQ、HLA-DR、RFX5、RFXANK、RFXAP、NFY-A、NFY-B和/或NFY-C。在一些实施方案中,降低一种或多种MHC I类的表达是通过降低B-2微球蛋白 (B2M) 的表达进行的。在一些实施方案中,降低一种或多种MHC II类的表达是通过降低CIITA的表达进行的。

[0061] 在一些实施方案中,进一步修饰包括增加细胞中一种或多种致耐受因子的表达。在一些实施方案中,一种或多种外源蛋白是一种或多种致耐受因子。在一些实施方案中,一种或多种试剂包括用于增加一种或多种致耐受因子的表达的剂。在一些实施方案中,剂是脂质颗粒或病毒载体。在一些实施方案中,病毒载体是慢病毒载体。

[0062] 在一些实施方案中,一种或多种致耐受因子是CD47、A20/TNFAIP3、C1-抑制剂、CCL21、CCL22、CD16、CD16 Fc受体、CD24、CD27、CD35、CD39、CD46、CD52、CD55、CD59、CD200、CR1、CTLA4-Ig、DUX4、FasL、H2-M3、HLA-C、HLA-E、HLA-E重链、HLA-G、PD-L1、IDO1、IL-10、IL15-RF、IL-35、MANF、Mfge8、PD-1、PD-L1或Serpib9。在一些实施方案中,一种或多种致耐受因子选自由以下组成的组:CD47、CD27、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重链、HLA-G、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1-抑制剂、IL-10、IL-35、FASL、CCL21、MFGE8和SERPINB9及其任何组合。在一些实施方案中,一种或多种致耐受因子选自由以下组成的组:CD47、PD-L1、HLA-E、HLA-G、CCL21、FASL、SERPINB9、CD200、MFGE8及其任何组合。在一些实施方案中,一种或多种致耐受因子中的至少一种是CD47。

[0063] 在一些实施方案中,增加细胞中一种或多种外源蛋白的表达是通过引入外源多核苷酸进行的。在一些实施方案中,外源多核苷酸可操作地连接至启动子。在一些实施方案中,启动子是组成型启动子。在一些实施方案中,启动子选自以下组成的组:CAG启动子、巨细胞病毒(CMV)启动子、EF1a启动子、PGK启动子、腺病毒晚期启动子、牛痘病毒7.5K启动子、SV40启动子、HSV的tk启动子、小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)启动子、HIV的LTR启动子、莫洛尼病毒的启动子、爱泼斯坦巴尔病毒(EBV)启动子、劳斯肉瘤病毒(RSV)启动子和UBC启动子。在一些实施方案中,将外源多核苷酸整合到细胞的基因组中。在一些实施方案中,外源多核苷酸是多顺反子载体。在一些实施方案中,整合是通过非靶向插入到细胞的基因组中,任选地通过使用慢病毒载体将外源多核苷酸引入到细胞中进行的。在一些实施方案中,整合是通过靶向插入到细胞的靶基因组基因座中进行的。在一些实施方案中,胰岛细胞是 $\beta$ 胰岛细胞。

[0064] 在一些实施方案中,工程化原代细胞是肝细胞。在一些实施方案中,工程化原代细胞是T细胞。在一些实施方案中,工程化原代细胞是内皮细胞。在一些实施方案中,工程化原代细胞是甲状腺细胞。在一些实施方案中,工程化原代细胞是皮肤细胞。在一些实施方案中,工程化原代细胞是视网膜色素上皮细胞。

[0065] 在一些方面,本文提供了一种根据本文所述的方法产生的工程化细胞。在一些实施方案中,工程化细胞是如本文所述的任何细胞。在一些实施方案中,工程化细胞是原代细胞。在任何实施方案中的一些中,工程化原代细胞选自胰岛细胞、 $\beta$ 胰岛细胞、B细胞、T细胞、NK细胞、视网膜色素上皮细胞、神经胶质祖细胞、内皮细胞、肝细胞、甲状腺细胞、皮肤细胞,和血细胞。在一些实施方案中,原代细胞是胰岛细胞。在一些实施方案中,胰岛细胞是 $\beta$ 胰岛细胞。

[0066] 在一些实施方案中,通过所述方法产生的细胞的活力大于约30%、40%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%或更多。在一些实施方案中,群体中通过所述方法修饰的细胞的百分比大于约30%、40%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%或更多。

[0067] 在任何实施方案中的一些中,任何提供的工程化细胞中描述的修饰降低了工程化细胞的先天免疫杀伤。

[0068] 在一些实施方案中,工程化原代细胞在施用于受体患者后能够逃避NK细胞介导的细胞毒性。在一些实施方案中,工程化原代细胞在施用于受体患者后受到保护而免于成熟NK细胞的细胞裂解。在一些实施方案中,工程化原代细胞在施用于受体患者后不会诱导针对所述细胞的免疫反应。在一些实施方案中,工程化原代细胞在施用于受体患者后不会诱导针对所述细胞的系统性炎性反应。在一些实施方案中,工程化原代细胞在施用于受体患者后不会诱导针对所述细胞的局部炎性反应。

[0069] 在一些方面,本文提供了一种工程化原代细胞群,其包含多种本文所述的任何工程化原代细胞。在一些实施方案中,多种工程化原代细胞来源于汇集自多于一个供体受试者的细胞。在一些实施方案中,在从所述供体受试者获得供体样品时,多于一个供体受试者中的每一个都是健康受试者或未被怀疑患有疾病或病状。在一些实施方案中,群体中至少50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%或99.99%的细胞包含修饰。在一些实施方案中,群体中至少50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、

99%、99.9%或99.99%的细胞包含编码CD47的外源多核苷酸。在一些实施方案中,相对于不包含修饰的相同细胞类型的细胞,群体中至少50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%或99.99%的细胞包含降低的一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子的表达。在一些实施方案中,相对于不包含修饰的相同细胞类型的细胞,群体中至少50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%或99.99%的细胞包含降低的B2M和/或CIITA的表达。在一些实施方案中,相对于不包含修饰的相同细胞类型的细胞,群体中至少50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%或99.99%的细胞包含降低的B2M的表达。在一些实施方案中,相对于不包含修饰的相同细胞类型的细胞,群体中至少50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%或99.99%的细胞包含降低的B2M和CIITA的表达。在一些实施方案中,群体中至少50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%或99.99%的细胞包含一种或多种使内源B2M基因的两个等位基因失活的改变。在一些实施方案中,群体中至少50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%或99.99%的细胞包含一种或多种使内源CIITA基因的两个等位基因失活的改变。

[0070] 在一些方面,本文提供了一种组合物,其包含本文所述的群体中的任一种。

[0071] 在一些方面,本文提供了一种组合物,其包含通过本文所述的方法中的任一种产生的工程化原代胰岛簇。

[0072] 在一些方面,本文提供了一种组合物,其包含工程化原代胰岛细胞群,其中所述工程化原代胰岛细胞包含:(i)包含编码CD47的外源多核苷酸的转基因和(ii)B2M基因的两个等位基因的失活或破坏。在一些实施方案中,工程化原代胰岛细胞群是原代胰岛细胞簇。在一些实施方案中,工程化原代胰岛细胞群是工程化原代 $\beta$ 胰岛细胞群。

[0073] 在一些方面,本文提供了一种组合物,其包含工程化原代T细胞群,其中所述工程化原代T细胞包含:(i)包含编码CD47的外源多核苷酸的转基因和(ii)B2M基因的两个等位基因的失活或破坏。

[0074] 在一些方面,本文提供了一种组合物,其包含工程化原代甲状腺细胞群,其中所述工程化原代甲状腺细胞包含:(i)包含编码CD47的外源多核苷酸的转基因和(ii)B2M基因的两个等位基因的失活或破坏。

[0075] 在一些方面,本文提供了一种组合物,其包含工程化原代皮肤细胞群,其中所述工程化原代皮肤细胞包含:(i)包含编码CD47的外源多核苷酸的转基因和(ii)B2M基因的两个等位基因的失活或破坏。

[0076] 在一些方面,本文提供了一种组合物,其包含工程化原代内皮细胞群,其中所述工程化原代内皮细胞包含:(i)包含编码CD47的外源多核苷酸的转基因和(ii)B2M基因的两个等位基因的失活或破坏。

[0077] 在一些方面,本文提供了一种组合物,其包含工程化原代视网膜色素上皮细胞群,其中所述工程化原代视网膜色素上皮细胞包含:(i)包含编码CD47的外源多核苷酸的转基因和(ii)B2M基因的两个等位基因的失活或破坏。

[0078] 在一些实施方案中,工程化原代细胞群中的工程化原代细胞在B2M基因的两个等位基因中包含插入缺失。在一些实施方案中,工程化原代细胞群中的工程化原代细胞还包含CIITA基因的两个等位基因的失活和破坏。在一些实施方案中,工程化原代细胞群中的工

程化原代细胞在CIITA基因的两个等位基因中包含插入缺失。在一些实施方案中,工程化原代细胞群中的工程化原代细胞具有表型B2M<sup>插入缺失/插入缺失</sup>;CIITA<sup>插入缺失/插入缺失</sup>;CD47tg。

[0079] 在一些实施方案中,组合物是药物组合物。在一些实施方案中,组合物包含药学上可接受的赋形剂。在一些实施方案中,药学上可接受的赋形剂是缓冲溶液,诸如盐水。在一些实施方案中,组合物配制在包含冷冻保护剂的无血清冷冻保存介质中。在一些实施方案中,冷冻保护剂是DMSO并且冷冻保存介质是5%至10% DMSO(体积/体积)。在一些实施方案中,冷冻保护剂是或是约10% DMSO(体积/体积)。在一些实施方案中,组合物是无菌的。在一些实施方案中,本文提供了一种包含本文所述的任何组合物的容器。在一些实施方案中,容器是无菌袋。在一些实施方案中,袋是冷冻保存兼容袋。

[0080] 在一些方面,本文提供了一种治疗有需要的患者的疾病、病状或细胞缺陷的方法,所述方法包括向患者施用有效量的本文所述的任何群体、组合物或药物组合物。在一些实施方案中,将群体配制为包含药学上可接受的赋形剂的药物组合物。在一些实施方案中,细胞群包含胰岛细胞,包括 $\beta$ 胰岛细胞。在一些实施方案中,胰岛细胞群作为胰岛细胞簇施用。在一些实施方案中,胰岛细胞群作为 $\beta$ 胰岛细胞簇施用。在一些实施方案中,细胞群是肝细胞。在一些实施方案中,细胞群包含T细胞。在一些实施方案中,细胞群包含甲状腺细胞。在一些实施方案中,细胞群包含皮肤细胞。在一些实施方案中,细胞群包含内皮细胞。在一些实施方案中,细胞群包含视网膜色素上皮细胞。

[0081] 在一些实施方案中,病状或疾病选自自由以下组成的组:糖尿病、癌症、血管形成障碍、眼部疾病、甲状腺疾病、皮肤疾病和肝脏疾病。在一些实施方案中,细胞缺陷与糖尿病相关,或者细胞疗法用于治疗糖尿病,任选地其中糖尿病是I型糖尿病。

[0082] 在一些实施方案中,细胞群是胰岛细胞(包括 $\beta$ 胰岛细胞)群。在一些实施方案中,细胞群作为胰岛细胞簇施用。

[0083] 在一些方面,本文提供了一种治疗有需要的患者的糖尿病的方法,所述方法包括向患者施用有效量的本文所述的任何胰岛细胞群、组合物或药物组合物。在一些实施方案中,胰岛细胞簇是 $\beta$ 胰岛细胞簇。在一些实施方案中,细胞缺陷与血管病状或疾病相关,或者细胞疗法用于治疗血管病状或疾病。在一些实施方案中,细胞群是内皮细胞群。在一些实施方案中,细胞缺陷与自身免疫性甲状腺炎相关,或者细胞疗法用于治疗自身免疫性甲状腺炎。在一些实施方案中,细胞缺陷与肝脏疾病相关,或者细胞疗法用于治疗肝脏疾病。在一些实施方案中,肝脏疾病包括肝硬化。在一些实施方案中,细胞群是肝细胞群。在一些实施方案中,细胞缺陷与角膜疾病相关,或者细胞疗法用于治疗角膜疾病。在一些实施方案中,角膜疾病是福克斯营养不良(Fuchs dystrophy)或先天性遗传性内皮营养不良。在一些实施方案中,细胞群是角膜内皮细胞群。在一些实施方案中,细胞缺陷与肾脏疾病相关,或者细胞疗法用于治疗肾脏疾病。在一些实施方案中,细胞群是肾细胞群。在一些实施方案中,细胞疗法用于治疗癌症。在一些实施方案中,癌症选自自由以下组成的组:B细胞急性淋巴细胞白血病(B-ALL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤、肝癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、结直肠癌、肺癌、非小细胞肺癌、急性髓性淋巴细胞白血病、多发性骨髓瘤、胃癌、胃腺癌、胰腺癌、胶质母细胞瘤、神经母细胞瘤、肺鳞状细胞癌、肝细胞癌和膀胱癌。在一些实施方案中,细胞群是T细胞群或NK细胞群。在一些实施方案中,在施用之前扩增并冷冻保存细胞。

[0084] 在一些实施方案中,施用群体包括静脉内注射、肌内注射、血管内注射或移植群

体。在一些实施方案中,群体经由肾被膜移植或肌肉注射进行移植。在一些实施方案中,群体来源于供体受试者,其中供体的HLA类型与患者的HLA类型不匹配。在一些实施方案中,群体是人细胞群并且患者是人患者。在一些实施方案中, $\beta$ 胰岛细胞改善受试者的葡萄糖耐量。在一些实施方案中,受试者是糖尿病患者。在一些实施方案中,糖尿病患者患有I型糖尿病或II型糖尿病。在一些实施方案中,葡萄糖耐量相对于施用胰岛细胞之前受试者的葡萄糖耐量得到改善。在一些实施方案中, $\beta$ 胰岛细胞降低受试者中的外源胰岛素使用。在一些实施方案中,如通过HbA1c水平测量的,葡萄糖耐量得到改善。在一些实施方案中,受试者禁食。在一些实施方案中,胰岛细胞改善受试者的胰岛素分泌。在一些实施方案中,胰岛素分泌相对于施用胰岛细胞之前受试者的胰岛素分泌得到改善。

[0085] 在治疗疾病的方法的一些实施方案中,所述方法还包括向患者施用一种或多种免疫抑制剂。在一些实施方案中,已向患者施用一种或多种免疫抑制剂。在一些实施方案中,一种或多种免疫抑制剂是小分子或抗体。在一些实施方案中,一种或多种免疫抑制剂选自自由以下组成的组:环孢菌素(cyclosporine)、硫唑嘌呤(azathioprine)、霉酚酸(mycophenolic acid)、霉酚酸酯(mycophenolate mofetil)、皮质类固醇、泼尼松(prednisone)、甲氨蝶呤、金盐、柳氮磺吡啶(sulfasalazine)、抗疟药、布喹那(brequinar)、来氟米特(leflunomide)、咪唑立宾(mizoribine)、15-脱氧精脒菌素(15-deoxyspergualine)、6-巯基嘌呤、环磷酰胺、雷帕霉素(rapamycin)、他克莫司(tacrolimus)(FK-506)、OKT3、抗胸腺细胞球蛋白、胸腺五肽(thymopentin)(胸腺肽- $\alpha$ )和免疫抑制抗体。在一些实施方案中,一种或多种免疫抑制剂包括环孢菌素。在一些实施方案中,一种或多种免疫抑制剂包括霉酚酸酯。在一些实施方案中,一种或多种免疫抑制剂包括皮质类固醇。在一些实施方案中,一种或多种免疫抑制剂包括环磷酰胺。在一些实施方案中,一种或多种免疫抑制剂包括雷帕霉素。在一些实施方案中,一种或多种免疫抑制剂包括他克莫司(FK-506)。在一些实施方案中,一种或多种免疫抑制剂包括抗胸腺细胞球蛋白。在一些实施方案中,一种或多种免疫抑制剂是一种或多种免疫调节剂。

[0086] 在治疗疾病的方法的一些实施方案中,一种或多种免疫调节剂是小分子或抗体。在一些实施方案中,抗体与选自自由以下组成的组的一种或多种受体或配体结合:IL-2受体的p75、MHC、CD2、CD3、CD4、CD7、CD28、B7、CD40、CD45、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-4、IL-5、IL-6R、IL-6、IGF、IGFR1、IL-7、IL-8、IL-10、CD11a、CD58,以及与其任何配体结合的抗体。

[0087] 在治疗疾病的方法的一些实施方案中,在施用工程化细胞之前向患者施用或已向患者施用一种或多种免疫抑制剂。在一些实施方案中,在施用工程化细胞之前至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天向患者施用或已向患者施用一种或多种免疫抑制剂。在一些实施方案中,在施用工程化细胞之前至少1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周或更多周向患者施用或已向患者施用一种或多种免疫抑制剂。在一些实施方案中,在施用工程化细胞之后至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天向患者施用或已向患者施用一种或多种免疫抑制剂。在一些实施方案中,在施用工程化细胞之后至少1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周或更多周向患者施用或已向患者施用一种或多种免疫抑制剂。在一些实施方案中,在第一次施用工程化细胞的同一天向患者施用或已向患者施用一种或多种免疫抑制剂。在一些实施方案中,在施用工程化细胞之后向患者施用或已向患者施用一种或多种免疫抑制剂。在一些实施方案中,在第一次和/或第二次施用工程化细胞的

施用之后向患者施用或已向患者施用一种或多种免疫抑制剂。在一些实施方案中,在第一次和/或第二次施用工程化细胞的施用之前向患者施用或已向患者施用一种或多种免疫抑制剂。在一些实施方案中,在第一次和/或第二次施用工程化细胞的施用之前至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天向患者施用或已向患者施用一种或多种免疫抑制剂。在一些实施方案中,在第一次和/或第二次施用工程化细胞的施用之前至少1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周或更多周向患者施用或已向患者施用一种或多种免疫抑制剂。在一些实施方案中,在第一次和/或第二次施用工程化细胞的施用之后至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天向患者施用或已向患者施用一种或多种免疫抑制剂。在一些实施方案中,在第一次和/或第二次施用工程化细胞的施用之后至少1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周或更多周向患者施用或已向患者施用一种或多种免疫抑制剂。在一些实施方案中,与施用的一种或多种免疫抑制剂的剂量相比,一种或多种免疫抑制剂以较低的剂量施用以降低不包含工程化细胞的修饰的免疫原性细胞的免疫排斥。

[0088] 在治疗疾病的方法的一些实施方案中,工程化细胞能够受控杀伤工程化细胞。在一些实施方案中,工程化细胞包含自杀基因或自杀开关。在一些实施方案中,自杀基因或自杀开关在药物或前药的存在下或在被选择性外源化合物活化后诱导受控细胞死亡。在一些实施方案中,自杀基因或自杀开关是能够诱导工程化细胞凋亡的诱导型蛋白。在一些实施方案中,能够诱导工程化细胞凋亡的诱导型蛋白是半胱氨酸蛋白酶蛋白。在一些实施方案中,半胱氨酸蛋白酶蛋白是半胱氨酸蛋白酶9。在一些实施方案中,自杀基因或自杀开关选自以下组成的组:胞嘧啶脱氨酶(CyD)、疱疹病毒胸苷激酶(HSV-Tk)、诱导型半胱氨酸蛋白酶9(iCaspase9)和雷帕霉素活化的半胱氨酸蛋白酶9(rapaCasp9)。在一些实施方案中,在向患者施用一种或多种免疫抑制剂之后,活化自杀基因或自杀开关以诱导受控细胞死亡。在一些实施方案中,在向患者施用一种或多种免疫抑制剂之前,活化自杀基因或自杀开关以诱导受控细胞死亡。在一些实施方案中,在向患者施用工程化细胞之后,活化自杀基因或自杀开关以诱导受控细胞死亡。在一些实施方案中,如果对患者具有细胞毒性或其他负面后果,活化自杀基因或自杀开关以诱导受控细胞死亡。

[0089] 在治疗疾病的方法的一些实施方案中,所述方法包括施用允许工程化细胞群中的工程化细胞耗竭的剂。在一些实施方案中,允许工程化细胞耗竭的剂是识别在工程化细胞表面上表达的蛋白质的抗体。在一些实施方案中,抗体选自由识别CCR4、CD16、CD19、CD20、CD30、EGFR、GD2、HER1、HER2、MUC1、PSMA和RQR8的抗体组成的组。在一些实施方案中,抗体选自由以下组成的组:莫格利珠单抗、AFM13、MOR208、奥妥珠单抗、乌妥昔单抗、奥卡妥珠单抗、利妥昔单抗、利妥昔单抗-R11b、托木妥昔单抗、R05083945(GA201)、西妥昔单抗、Hu14.18K322A、Hu14.18-IL2、Hu3F8、地妥昔单抗、c.60C3-R11c及其生物类似物。

[0090] 在治疗疾病的方法的一些实施方案中,所述方法包括施用识别工程化细胞表面上的一种或多种致耐受因子的剂。在一些实施方案中,工程化细胞被工程化以表达一种或多种致耐受因子。在一些实施方案中,一种或多种致耐受因子是CD47。

[0091] 在治疗疾病的方法的一些实施方案中,所述方法还包括向患者施用一种或多种额外的治疗剂。在一些实施方案中,已向患者施用一种或多种额外的治疗剂。

[0092] 在治疗疾病的方法的一些实施方案中,所述方法还包括监测所述方法的治疗功效。在一些实施方案中,所述方法还包括监测所述方法的预防功效。在一些实施方案中,重



复所述方法直至出现一种或多种疾病症状的期望抑制。

[0093] 在工程化细胞的一些实施方案中,工程化细胞包含编码自杀基因或自杀开关的外源多核苷酸。在一些实施方案中,自杀基因或自杀开关选自自由以下组成的组:胞嘧啶脱氨酶(CyD)、疱疹病毒胸苷激酶(HSV-Tk)、诱导型半胱氨酸蛋白酶9(iCaspase9)和雷帕霉素活化的半胱氨酸蛋白酶9(rapaCasp9)。在一些实施方案中,自杀基因或自杀开关以及与自杀基因或安全开关相关的基因由整合到工程化细胞基因组中的双顺反子盒表达。在一些实施方案中,自杀基因或自杀开关和一种或多种致耐受因子由整合到工程化细胞基因组中的双顺反子盒表达。在一些实施方案中,双顺反子盒是通过非靶向插入到工程化细胞的基因组中,任选地通过使用慢病毒载体将外源多核苷酸引入到细胞中进行整合的。在一些实施方案中,双顺反子盒是通过靶向插入到工程化细胞的靶基因组基因座中进行整合的,任选地其中靶向插入是通过使用同源定向修复的核酸酶介导的基因编辑进行的。在一些实施方案中,一种或多种致耐受因子是CD47。

[0094] 在生成工程化细胞的方法的一些实施方案中,工程化细胞包含编码自杀基因或自杀开关的外源多核苷酸。在一些实施方案中,自杀基因选自自由以下组成的组:胞嘧啶脱氨酶(CyD)、疱疹病毒胸苷激酶(HSV-Tk)、诱导型半胱氨酸蛋白酶9(iCaspase9)和雷帕霉素活化的半胱氨酸蛋白酶9(rapaCasp9)。在一些实施方案中,自杀基因或自杀开关以及与自杀基因或安全开关相关的基因由整合到工程化细胞基因组中的双顺反子盒表达。在一些实施方案中,自杀基因或自杀开关和一种或多种致耐受因子由整合到工程化细胞基因组中的双顺反子盒表达。在一些实施方案中,双顺反子盒是通过非靶向插入到工程化细胞的基因组中进行整合的。在一些实施方案中,双顺反子盒是通过靶向插入到工程化细胞的靶基因组基因座中进行整合的。在一些实施方案中,一种或多种致耐受因子是CD47。

[0095] 在工程化细胞的组合物的一些实施方案中,工程化细胞群中的工程化细胞包含编码自杀基因或自杀开关的外源多核苷酸。在一些实施方案中,自杀基因或自杀开关选自自由以下组成的组:胞嘧啶脱氨酶(CyD)、疱疹病毒胸苷激酶(HSV-Tk)、诱导型半胱氨酸蛋白酶9(iCaspase9)和雷帕霉素活化的半胱氨酸蛋白酶9(rapaCasp9)。在一些实施方案中,自杀基因和与自杀基因或安全开关相关的基因由整合到工程化细胞群中的工程化细胞的基因组中的双顺反子盒表达。在一些实施方案中,自杀基因或自杀开关和外源CD47由整合到工程化细胞的基因组中的双顺反子盒表达。在一些实施方案中,双顺反子盒是通过非靶向插入到基因组中,任选地通过使用慢病毒载体将外源多核苷酸引入到工程化细胞群中的工程化细胞中进行整合的。在一些实施方案中,双顺反子盒是通过靶向插入到工程化细胞群中的工程化细胞的靶基因组基因座中进行整合的,任选地其中靶向插入是通过使用同源定向修复的核酸酶介导的基因编辑进行的。

[0096] 在任何提供的方法或细胞中的一些中,细胞是自体细胞。

[0097] 在任何提供的方法或细胞中的一些中,细胞是同种异体细胞。

## 附图说明

[0098] 图1示出了从C57BL/6(B6)小鼠分离的B2M<sup>-/-</sup>原代β胰岛细胞不表达主要组织相容性复合物I类(MHC-I)或II类(MHC-II)分子。在移植前和在移植后分离的细胞中分析表达。

[0099] 图2A至2B示出了小鼠B2M<sup>-/-</sup>原代β胰岛细胞(图2A)或用慢病毒载体转导以过表达

CD47的B2M<sup>-/-</sup>原代β胰岛细胞(图2B)中的CD47表达。

[0100] 图3A至3F提供了工程化和野生型(WT)原代β胰岛细胞的肌内(i.m.)注射移植研究的结果。提供了移植的小鼠WT原代β胰岛细胞(图3A定量;图3B对应的BLI图像)和移植的小鼠B2M<sup>-/-</sup>;CD47<sup>tg</sup>原代β胰岛细胞(图3C定量;图3D对应的BLI图像)的荧光素酶表达的生物发光成像(BLI)的定量。提供了移植有小鼠WT原代β胰岛细胞的糖尿病小鼠(图3E)和移植有小鼠B2M<sup>-/-</sup>;CD47<sup>tg</sup>原代β胰岛细胞的糖尿病小鼠(图3F)的血糖测量结果。

[0101] 图4A至4F提供了注射到肾被膜中的工程化和小鼠WT原代β胰岛细胞的研究结果。提供了移植的小鼠WT原代β胰岛细胞(图4A定量;图4B对应的BLI图像)和移植的小鼠B2M<sup>-/-</sup>;CD47<sup>tg</sup>原代β胰岛细胞(图4C定量;图4D对应的BLI图像)的荧光素酶表达的BLI的定量。提供了移植有小鼠WT原代β胰岛细胞的糖尿病小鼠(图4E)和移植有小鼠B2M<sup>-/-</sup>;CD47<sup>tg</sup>原代β胰岛细胞的糖尿病小鼠(图4F)的血糖测量结果。

[0102] 图5A至5C提供了评价免疫反应的肌内注射同种异体移植研究的结果。提供了移植有同种异体小鼠WT原代β胰岛细胞的糖尿病小鼠和移植有同种异体小鼠B2M<sup>-/-</sup>;CD47<sup>tg</sup>原代β胰岛细胞的糖尿病小鼠(图5A)的血糖测量结果。提供了移植有同种异体小鼠WT原代β胰岛细胞的糖尿病小鼠和移植有同种异体小鼠B2M<sup>-/-</sup>;CD47<sup>tg</sup>原代β胰岛细胞的糖尿病小鼠(图5B)的干扰素γ(IFNγ)水平。提供了移植有同种异体小鼠WT原代β胰岛细胞的糖尿病小鼠和移植有同种异体小鼠B2M<sup>-/-</sup>;CD47<sup>tg</sup>原代β胰岛细胞的糖尿病小鼠(图5C)的供体特异性抗体(DSA)IgG水平。

[0103] 图6A至6F提供了工程化和小鼠WT原代β胰岛细胞的自然杀伤(NK)细胞介导的体外细胞杀伤的结果。提供了小鼠WT原代β胰岛细胞(图6A)、小鼠B2M<sup>-/-</sup>原代β胰岛细胞(图6B)和小鼠B2M<sup>-/-</sup>;CD47<sup>tg</sup>原代β胰岛细胞(图6C)的NK细胞介导的细胞杀伤。还提供了小鼠WT原代β胰岛细胞(图6D)、小鼠B2M<sup>-/-</sup>原代β胰岛细胞(图6E)和小鼠B2M<sup>-/-</sup>;CD47<sup>tg</sup>原代β胰岛细胞(图6F)在抗CD47抗体存在下的NK细胞介导的细胞杀伤。

[0104] 图7A至7F提供了工程化小鼠和小鼠WT原代β胰岛细胞的巨噬细胞介导的体外细胞杀伤的结果。提供了小鼠WT原代β胰岛细胞(图7A)、小鼠B2M<sup>-/-</sup>原代β胰岛细胞(图7B)和小鼠B2M<sup>-/-</sup>;CD47<sup>tg</sup>原代β胰岛细胞(图7C)的巨噬细胞介导的细胞杀伤。还提供了小鼠WT原代β胰岛细胞(图7D)、小鼠B2M<sup>-/-</sup>原代β胰岛细胞(图7E)和小鼠B2M<sup>-/-</sup>;CD47<sup>tg</sup>原代β胰岛细胞(图7F)在抗CD47抗体存在下的巨噬细胞介导的细胞杀伤。

[0105] 图8A至8N示出了用慢病毒载体转导以过表达CD47的小鼠B2M<sup>-/-</sup>(B2M<sup>-/-</sup>;CD47<sup>tg</sup>)原代β胰岛细胞中的CD47表达(图8A、8C、8E、8G、8I、8K、8M),并且提供了针对各种感染复数(MOI)的工程化小鼠原代β胰岛细胞的NK细胞介导的体外细胞杀伤的对应结果(图8B、8D、8F、8H、8J、8L、8N)。

[0106] 图9A描绘了移植有WT原代人β胰岛细胞和B2M<sup>-/-</sup>;CD47<sup>tg</sup>原代人β胰岛细胞的代表性小鼠的细胞组成。

[0107] 图9B至9G描绘了来自代表性供体的WT原代人β胰岛细胞和由WT原代人β胰岛细胞生成的B2M<sup>-/-</sup>;CD47<sup>tg</sup>工程化人β胰岛细胞的人白细胞抗原(HLA)I类(图9B至9C)、HLA II类(图9D至9E)表面表达和CD47表达(图9F至9G)的流式细胞术染色。

[0108] 图9H描绘了WT原代人β胰岛细胞和B2M<sup>-/-</sup>;CD47<sup>tg</sup>工程化人β胰岛细胞的胰岛素分泌。

[0109] 图9I至9K描绘了来自代表性供体的WT原代人 $\beta$ 胰岛细胞(图9I)、 $B2M^{-/-}$ 原代人 $\beta$ 胰岛细胞(图9J)和 $B2M^{-/-};CD47^{tg}$ 原代人 $\beta$ 胰岛细胞(图9K)的NK细胞介导的体外细胞杀伤。

[0110] 图9L至9N描绘了来自代表性供体的WT原代人 $\beta$ 胰岛细胞(图9L)、 $B2M^{-/-}$ 原代人 $\beta$ 胰岛细胞(图9M)和 $B2M^{-/-};CD47^{tg}$ 原代人 $\beta$ 胰岛细胞(图9N)的巨噬细胞介导的体外细胞杀伤。

[0111] 图10A至10D提供了同种异体移植研究的研究结果,所述研究评价受体对同种异体人原代胰岛细胞的免疫反应。提供了来自代表性供体的移植的 $B2M^{-/-};CD47^{tg}$ 人原代胰岛细胞(图10A定量;图10B对应的BLI图像)和移植的WT人原代胰岛细胞(图10C定量;图10D对应的BLI图像)的荧光素酶表达的BLI的定量。

[0112] 图10E和10F描绘了移植有从代表性供体收获的同种异体 $B2M^{-/-};CD47^{tg}$ 人原代胰岛细胞(图10E)的糖尿病小鼠和移植有从代表性供体收获的同种异体WT人原代胰岛细胞(图10F)的糖尿病小鼠的血糖测量结果。

[0113] 图10G提供了移植有来自代表性供体的同种异体 $B2M^{-/-}$ 人原代胰岛细胞的糖尿病小鼠的荧光素酶表达的BLI。

[0114] 图10H描绘了移植有从代表性供体收获的同种异体 $B2M^{-/-}$ 人原代胰岛细胞的糖尿病小鼠的血糖测量结果。

[0115] 图10I至10J提供了评价免疫反应的肌肉注射同种异体移植研究的结果。提供了移植有WT人原代胰岛细胞、 $B2M^{-/-}$ 人原代胰岛细胞和 $B2M^{-/-};CD47^{tg}$ 人原代胰岛细胞的糖尿病小鼠的干扰素 $\gamma$ (IFN $\gamma$ )水平(图10I)。提供了移植有WT人原代胰岛细胞、 $B2M^{-/-}$ 人原代胰岛细胞和 $B2M^{-/-};CD47^{tg}$ 人原代胰岛细胞的糖尿病小鼠的供体特异性抗体(DSA) IgG水平(图10J)。

[0116] 图11A至11C描绘了移植有从代表性供体收获的同种异体 $B2M^{-/-};CD47^{tg}$ 人原代胰岛细胞(图11A)、WT人原代胰岛细胞(图11B)和 $B2M^{-/-}$ 人原代胰岛细胞(图11C)的糖尿病小鼠的c-蛋白测量结果。

[0117] 图12A提供了移植的WT原代人胰岛细胞、移植的 $B2M^{-/-}$ 人原代胰岛细胞和移植的 $B2M^{-/-};CD47^{tg}$ 原代人胰岛细胞的体外脾细胞介导的细胞杀伤的结果。

[0118] 图12B提供了移植的WT原代人胰岛细胞、移植的 $B2M^{-/-}$ 人原代胰岛细胞和移植的 $B2M^{-/-};CD47^{tg}$ 原代人胰岛细胞的体外补体依赖性细胞毒性(CDC)测定的结果。

[0119] 图13A至13D提供了使用糖尿病患者外周血单核细胞(PBMC)的PBMC杀伤测定的结果。示出了WT人原代胰岛细胞(图13A)和 $B2M^{-/-};CD47^{tg}$ 人原代胰岛细胞(图13C)的使用糖尿病PBMC的杀伤测定结果。作为对照,还示出了WT人原代胰岛细胞(图13B)和 $B2M^{-/-};CD47^{tg}$ 人原代胰岛细胞(图13D)仅在不存在PBMC时靶向细胞的杀伤。

[0120] 图13E至13H提供了使用健康供体PBMC的PBMC杀伤测定的结果。示出了来自代表性的WT人原代胰岛细胞(图13E)和 $B2M^{-/-};CD47^{tg}$ 人原代胰岛细胞(图13G)的使用健康PBMC的杀伤测定结果。作为对照,还示出了WT人原代胰岛细胞(图13F)和 $B2M^{-/-};CD47^{tg}$ 人原代胰岛细胞(图13H)仅在不存在PBMC时靶向细胞的杀伤。

[0121] 图13I至13J描绘了通过死细胞的流式细胞术分析来评估细胞杀伤。来自代表性供体的WT人原代胰岛细胞与糖尿病患者PBMC或健康供体PBMC体外孵育后的死细胞百分比示于图13I。来自代表性供体的 $B2M^{-/-};CD47^{tg}$ 人原代胰岛细胞与糖尿病患者PBMC或健康供体PBMC体外孵育后的死细胞百分比示于图13J。

[0122] 图14A至14F提供了工程化原代人 $\beta$ 胰岛细胞和工程化原代人 $\beta$ 胰岛细胞的自然杀伤(NK)细胞和巨噬细胞介导的体外细胞杀伤的结果。提供了 $B2M^{-/-}$ ;CD47tg人原代胰岛细胞(图14A)、在抗CD47IgG1Fc存在下的 $B2M^{-/-}$ ;CD47tg人原代胰岛细胞(图14B)和在抗CD47IgG4Fc存在下的 $B2M^{-/-}$ ;CD47tg人原代胰岛细胞(图14C)的NK细胞介导的细胞杀伤。还提供了 $B2M^{-/-}$ ;CD47tg人原代胰岛细胞(图14D)、在抗CD47 IgG1Fc存在下的 $B2M^{-/-}$ ;CD47tg人原代胰岛细胞(图14E)和在抗CD47 IgG4Fc存在下的 $B2M^{-/-}$ ;CD47tg人原代胰岛细胞(图14F)的巨噬细胞介导的细胞杀伤。

[0123] 图15A至15C描绘了 $B2M^{-/-}$ ;CD47tg人原代胰岛细胞、表达抗CD47 IgG1Fc的 $B2M^{-/-}$ ;CD47tg人原代胰岛细胞和在抗CD47 IgG4Fc存在下的 $B2M^{-/-}$ ;CD47tg人原代胰岛细胞的体外颗粒酶B(图15A)、穿孔素(图15B)和活性氧(ROS)(图15C)测量结果。

[0124] 图16示出了WT人原代胰岛细胞、 $B2M^{-/-}$ 人原代胰岛细胞和 $B2M^{-/-}$ ;CD47tg人原代胰岛细胞中的CD47表达。

[0125] 图17提供了WT人原代胰岛细胞(完整的、凋亡的和坏死的)、 $B2M^{-/-}$ 人原代胰岛细胞(完整的、凋亡的和坏死的)、 $B2M^{-/-}$ ;CD47tg人原代胰岛细胞(完整的、凋亡的和坏死的)和抗CD47  $B2M^{-/-}$ ;CD47tg人原代胰岛细胞(完整的、凋亡的和坏死的)的体外巨噬细胞吞噬的结果。

[0126] 图18提供了 $B2M^{-/-}$ ;CD47tg人原代胰岛细胞、在抗CD47 IgG1Fc存在下的 $B2M^{-/-}$ ;CD47tg原代人 $\beta$ 胰岛细胞和在抗CD47 IgG4Fc存在下的 $B2M^{-/-}$ ;CD47tg原代人 $\beta$ 胰岛细胞的体外巨噬细胞吞噬的结果。

[0127] 图19A至19F提供了同种异体移植研究的结果,所述研究评价糖尿病NSG小鼠对同种异体人原代胰岛细胞的免疫反应。提供了来自代表性供体的移植的 $B2M^{-/-}$ ;CD47<sup>tg</sup>人原代胰岛细胞(图19A)和WT原代人胰岛细胞(图19D)的荧光素酶表达图像的BLI。描绘了移植有从代表性供体收获的同种异体 $B2M^{-/-}$ ;CD47tg人原代胰岛细胞的糖尿病NSG小鼠(图19B)和移植有从代表性供体收获的同种异体WT人原代胰岛细胞的糖尿病小鼠(图19E)的血糖测量结果。还提供了移植有从代表性供体收获的同种异体 $B2M^{-/-}$ ;CD47tg人原代胰岛细胞的糖尿病NSG小鼠(图19C)和移植有从代表性供体收获的同种异体WT人原代胰岛细胞的糖尿病小鼠(图19F)的C-蛋白测量结果。

[0128] 图20A至20D提供了同种异体移植研究的结果,所述研究评价在局部施用的抗CD47和同种型对照存在下,糖尿病人源化小鼠对同种异体人原代胰岛细胞的免疫反应或缺乏免疫反应。提供了移植有来自代表性供体的 $B2M^{-/-}$ ;CIITA<sup>-/-</sup>;CD47<sup>tg</sup>人原代胰岛细胞的糖尿病人源化小鼠的荧光素酶表达图像的BLI,在移植后第8天进一步向所述小鼠局部施用同种型对照抗体(图20A)或局部施用抗CD47(图20C)。描绘了移植有来自代表性供体的 $B2M^{-/-}$ ;CIITA<sup>-/-</sup>;CD47<sup>tg</sup>人原代胰岛细胞的糖尿病人源化小鼠的血糖测量结果,在移植后第8天进一步向所述小鼠局部施用同种型对照抗体(图20B)或局部施用抗CD47(图20D)。

[0129] 图21A至21D提供了同种异体移植研究的结果,所述研究评价在系统性施用的抗CD47或同种型对照存在下,糖尿病人源化小鼠对同种异体人原代胰岛细胞的免疫反应或缺乏免疫反应。提供了移植有来自代表性供体的 $B2M^{-/-}$ ;CIITA<sup>-/-</sup>;CD47<sup>tg</sup>人原代胰岛细胞的糖尿病人源化小鼠的荧光素酶表达图像的BLI,在移植后第8天进一步向所述小鼠系统性施用同种型对照抗体(图21A)或系统性施用抗CD47(图21C)。描绘了移植有来自代表性供体的

B2M<sup>-/-</sup>;CIITA<sup>-/-</sup>;CD47<sup>tg</sup>人原代胰岛细胞的糖尿病人源化小鼠的血糖测量结果,在移植后第8天进一步向所述小鼠系统性施用同种型对照抗体(图21B)或系统性施用抗CD47(图21D)。

[0130] 图22A至22B提供了同种异体移植研究的研究结果,所述研究评价非人灵长类动物(NHP)受体对同种异体NHP原代胰岛细胞的免疫反应。提供了移植的B2M<sup>-/-</sup>;CIITA<sup>-/-</sup>;CD47<sup>tg</sup>NHP原代胰岛细胞(图22A定量;图22B对应的BLI图像)的荧光素酶表达的BLI的定量。

[0131] 图23A至23D提供了评价免疫反应的NHP中肌内注射同种异体移植研究的结果。提供了移植有B2M<sup>-/-</sup>;CIITA<sup>-/-</sup>;CD47<sup>tg</sup>NHP原代胰岛细胞的NHP的干扰素 $\gamma$ (IFN $\gamma$ )水平(图23A)。提供了移植有B2M<sup>-/-</sup>;CIITA<sup>-/-</sup>;CD47<sup>tg</sup>NHP原代胰岛细胞的NHP的供体特异性抗体(DSA)IgM水平(图23B)和IgG水平(图23C)。还提供了移植有B2M<sup>-/-</sup>;CIITA<sup>-/-</sup>;CD47<sup>tg</sup>NHP原代胰岛细胞的敏化NHP的DSA IgG水平,所述NHP原代胰岛细胞在移植前具有升高的IgG水平(图23D)。

[0132] 图24提供了B2M<sup>-/-</sup>;CIITA<sup>-/-</sup>;CD47<sup>tg</sup>NHP原代胰岛细胞的自然杀伤(NK)细胞介导的体外细胞杀伤的结果。

[0133] 图25示出了MHC-I或MHC-II分子和CD47在WT人原代RPE细胞(上图)、双敲除(B2M<sup>-/-</sup>CIITA<sup>-/-</sup>)原代RPE细胞(中图)和B2M<sup>-/-</sup>;CIITA<sup>-/-</sup>;CD47<sup>tg</sup>原代RPE细胞(下图)上的表达。

[0134] 图26A至26I提供了WT人原代RPE细胞(上图)、人双敲除(B2M<sup>-/-</sup>CIITA<sup>-/-</sup>)原代RPE细胞(中图)和人B2M<sup>-/-</sup>;CIITA<sup>-/-</sup>;CD47<sup>tg</sup>原代RPE细胞(下图)的体外自然杀伤(NK)细胞介导的细胞杀伤(图26A至26C)和巨噬细胞介导的细胞杀伤(图26D至26F)的结果。提供了每个细胞系仅靶细胞介导的细胞杀伤作为对照(图26G至26I)。

## 具体实施方式

[0135] 在一些方面,本文提供了用于减轻和/或逃避针对同种异体移植(诸如同种异体细胞疗法)的免疫系统反应的影响的方法和组合物。为了克服细胞疗法的免疫排斥问题,本文公开了一种具有逃避免疫系统能力的工程化细胞(本文也称为工程化免疫逃避细胞或工程化低免疫原性细胞)或其群体,或其药物组合物,所述细胞或其群体或其药物组合物代表任何可移植细胞类型的可行来源。在本文提供的工程化细胞的方面,受体受试者的免疫系统对细胞的排斥被减少,并且工程化细胞在施用后能够植入并在宿主中发挥作用,而不管受试者的遗传组成或任何现有的受试者体内对一种或多种先前的同种异体移植、先前的自体嵌合抗原受体(CAR)T排斥,和/或其中表达转基因的其他自体或同种异体疗法的反应。因此,在一些方面,工程化细胞是指工程化免疫逃避细胞。本文所述的工程化细胞可以来源于任何细胞,包括但不限于胰岛细胞、 $\beta$ 胰岛细胞、B细胞、T细胞、NK细胞、视网膜色素上皮细胞、神经胶质祖细胞、内皮细胞、肝细胞、甲状腺细胞、皮肤细胞和血细胞(例如,浆细胞或血小板)。在一些实施方案中,提供的工程化原代细胞是工程化细胞(例如,直接取自活组织诸如活检的细胞)。

[0136] 在一些实施方案中,细胞诸如原代细胞经工程化以相对于未改变或未修饰的野生型细胞具有降低或增加的一个或多个靶标的表达。在一些实施方案中,细胞经工程化以相对于未改变或未修饰的野生型细胞具有组成型的降低或增加的一个或多个靶标的表达。在一些实施方案中,细胞经工程化以相对于未改变或未修饰的野生型细胞具有可调控的降低或增加的一个或多个靶标的表达。在一些实施方案中,细胞相对于野生型细胞或相同细胞

类型的对照细胞包含增加的CD47的表达。在细胞的上下文中,“野生型”或“wt”或“对照”意指任何天然存在的细胞。野生型或对照细胞的实例包括天然存在的原代细胞,诸如原代胰岛细胞。然而,举例来说,在工程化细胞的上下文中,如本文所用,“野生型”或“对照”还可意指工程化细胞,所述工程化细胞可能含有导致一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子的表达降低的核酸变化,但未经历导致CD47蛋白过表达的基因编辑程序。在一些实施方案中,野生型细胞或对照细胞是起始材料。在一些实施方案中,原代细胞系起始材料是如本文设想的被认为是野生型或对照细胞的起始材料。在一些实施方案中,起始材料以其他方式修饰或工程化以具有改变的一种或多种基因的表达以生成工程化细胞。在一些实施方案中,野生型细胞或对照细胞是来自供体的细胞形式的起始材料。在某些实施方案中,野生型细胞或对照细胞是起始材料,所述起始材料可以是来自活的受试者或从已故受试者捐赠的器官或细胞获得的细胞,例如尸体胰腺细胞或肾细胞。

[0137] 在一些实施方案中,本文所述的技术适用于胰岛细胞。

[0138] 在一些实施方案中,本文所述的技术适用于原代胰腺 $\beta$ 胰岛细胞,无论是分离自原代胰岛、来源于原代胰岛内的原代胰腺 $\beta$ 胰岛细胞,还是作为原代胰岛的组分。例如,原代胰腺 $\beta$ 胰岛细胞可以被编辑为单个 $\beta$ 胰岛细胞、 $\beta$ 胰岛细胞群或原代胰岛的组分(例如,与其他细胞类型一起存在于原代胰岛内的原代胰腺 $\beta$ 胰岛细胞)。作为另一个实例,原代胰腺 $\beta$ 胰岛细胞可以作为单个 $\beta$ 胰岛细胞、 $\beta$ 胰岛细胞群或原代胰岛的组分(例如,与其他细胞类型一起存在于原代胰岛内的原代胰腺 $\beta$ 胰岛细胞)施用于患者。在其中胰腺 $\beta$ 胰岛细胞与其他细胞类型一起存在于胰岛内的实施方案中,其他细胞类型也可以通过本文所述的方法进行编辑。

[0139] 在一些实施方案中,本文所述的技术还适用于在工程化(诸如遗传工程化)之前或之后从原代胰岛解离的原代胰岛细胞。这种解离的胰岛细胞可以在施用于患者之前聚集,并且簇可以包含胰岛细胞(包括 $\beta$ 胰岛细胞),以及其他细胞类型(包括但不限于来自原代胰岛的细胞)。簇中胰岛细胞的数量可以变化,诸如约50、约100、约250、约500、约750、约1000、约1250、约1500、约1750、约2000、约2250、约2500、约2750、约3000、约3500、约4000、约4500或约5000个细胞。可以向患者施用约10、约20、约30、约40、约50、约75、约100、约125、约150、约200、约250、约300、约325、约350、约375、约400、约425、约450、约475、约500、约600、约700、约800、约900或约1000个簇。

[0140] 本文提供的工程化原代细胞含有导致一种或多种致耐受因子(例如,CD47)的表达改变(例如,过表达或表达增加)和一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子的表达改变(例如,表达降低或消除)的修饰(例如,基因修饰)。在一些实施方案中,工程化细胞中存在的修饰提供了一种或多种致耐受因子的改变的(例如增加的或过表达的)细胞表面表达,以及一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子的改变的(例如降低的或消除的)细胞表面表达,诸如细胞表面上一种或多种致耐受因子的增加或过表达,以及细胞表面上一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子的降低或在一些情况下消除的表达。在提供的方面,改变的表达是相对于不含有修饰的类似细胞而言的,所述类似细胞诸如相同细胞类型的野生型或未修饰的细胞或其他方面相同但缺乏本文中改变一种或多种致耐受因子和一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子的表达的修饰的细胞。本文描述了向细胞引入修饰以改变表达的示例性方法。例如,可以使用用于

过表达基因或蛋白质或增加基因或蛋白质的表达的多种方法中的任何一种,诸如通过引入或递送编码蛋白质的外源多核苷酸(即转基因)或引入或递送DNA靶向结构域和靶向基因的转录活化因子的融合蛋白。还可以使用用于降低或消除基因或蛋白质的表达的多种方法中的任何一种,包括非基因编辑方法诸如通过引入或递送抑制性核酸(例如RNAi)或涉及引入或递送靶向核酸酶系统(例如CRISPR/Cas)的基因编辑方法。在一些实施方案中,用于降低或消除表达的方法是经由基于核酸酶的基因编辑技术进行的。

[0141] 在一些实施方案中,利用罕见切割核酸内切酶(rare-cutting endonuclease)(例如,CRISPR/Cas、TALEN、锌指核酸酶、大范围核酸酶和归巢核酸内切酶系统)的基因组编辑技术用于降低或消除人细胞中免疫基因的表达(例如,通过缺失关键免疫基因的基因组DNA)。在一些实施方案中,基因组编辑技术包括使用切口酶、碱基编辑、引导编辑和基因写入。在某些实施方案中,基因组编辑技术或其他基因调节技术用于在人细胞中插入耐受诱导(致耐受)因子(例如,CD47),从而产生在植入受体受试者后可以逃避免疫识别的工程化细胞。因此,本文提供的工程化细胞(诸如工程化原代细胞)表现出影响一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子的一种或多种基因和因子的调节的表达(例如,降低或消除的表达),以及致耐受因子(诸如CD47)的调节的表达(例如,增加的表达或过表达)。在一些实施方案中,工程化细胞(诸如工程化原代细胞)逃避受体受试者的免疫系统。

[0142] 在一些方面,本文提供的工程化细胞不经受先天免疫细胞排斥或适应性免疫细胞排斥(例如,低免疫原性细胞)。例如,在一些实施方案中,工程化细胞不易受到NK细胞介导的裂解和巨噬细胞吞噬的影响。在一些实施方案中,工程化细胞可用作普遍相容的细胞或组织(例如,通用供体细胞或组织)的来源,所述细胞或组织被移植到受体受试者中而几乎不需要免疫抑制剂。此类低免疫原性细胞在移植后保留细胞特异性特征和特性。

[0143] 本公开至少部分基于发明人的发现和关于细胞的工程化的独特观点,所述细胞可用于向具有预先存在的针对工程化细胞上一种或多种细胞表面抗原的抗体(和/或在已经施用工程化细胞的个体中的工程化细胞的循环寿命期间产生的抗体)的个体施用。此类工程化有助于避免触发个体中针对工程化细胞的免疫反应。此外,这些发现支持本文提供的额外公开,诸如患者和/或治疗选择。

[0144] 本文提供的工程化细胞可以进一步利用致耐受因子的过表达并调节(例如,降低或消除)一种或多种主要组织相容性复合物(MHC) I类分子(MHC I类分子)或其组分,和/或一种或多种MHC II类分子(MHC II类分子)的表达(例如,表面表达)。在一些实施方案中,利用罕见切割核酸内切酶(例如,CRISPR/Cas、TALEN、锌指核酸酶、大范围核酸酶和归巢核酸内切酶系统)的基因组编辑技术用于降低或消除人细胞中免疫基因的表达(例如,通过缺失关键免疫基因的基因组DNA)。在某些实施方案中,基因组编辑技术或其他基因调节技术用于在人细胞中插入耐受诱导(致耐受)因子(例如,CD47),从而产生在植入受体受试者后可以逃避免疫识别的工程化细胞。因此,本文提供的工程化细胞表现出影响一种或多种MHC I类分子、一种或多种MHC II类分子的一种或多种基因和因子的调节的表达,并逃避受体受试者的免疫系统。在一些情况下,细胞是T细胞并且细胞也被工程化以调节(例如,降低或消除)内源TCR表达。

[0145] 在一些实施方案中,工程化细胞表现出允许它们逃避免疫识别的特性。在一些实施方案中,提供的工程化细胞是低免疫原性的。在一些方面,本文提供的工程化细胞不经受

先天免疫细胞排斥。例如,在一些实施方案中,工程化细胞不易受到NK细胞介导的裂解和巨噬细胞吞噬的影响。在一些实施方案中,工程化细胞诸如工程化原代细胞可用作普遍相容的细胞或组织(例如,通用供体细胞或组织)的来源,所述细胞或组织被移植到受体受试者中而几乎不需要免疫抑制剂。此类低免疫原性细胞在移植后保留细胞特异性特征和特性。

[0146] 在一些方面,本文提供了一种工程化原代细胞,其包含(i)增加一种或多种致耐受因子的表达,和(ii)降低一种或多种主要组织相容性复合物(MHC) I类分子和/或一种或多种MHC II类分子的表达的修饰,其中(i)的表达增加和(ii)的表达降低是相对于不包含修饰的相同细胞类型的细胞而言的。在一些实施方案中,一种或多种致耐受因子中的至少一种是CD47。在一些实施方案中,降低一种或多种MHC I类分子的表达的修饰是降低b-2微球蛋白(B2M)的表达的修饰。在一些实施方案中,降低一种或多种MHC II类表达的修饰是降低CIITA的表达的修饰。在一些实施方案中,增加表达的修饰包括增加的表面表达,且/或降低表达的修饰包括降低的表面表达。在一些实施方案中,工程化原代细胞选自胰岛细胞、 $\beta$ 胰岛细胞、B细胞、T细胞、NK细胞、视网膜色素上皮细胞、神经胶质祖细胞、内皮细胞、肝细胞、甲状腺细胞、皮肤细胞,和血细胞(例如,浆细胞或血小板)。

[0147] 在一些方面,本文提供了一种生成工程化细胞诸如工程化原代细胞的方法,所述方法包括:a.降低或消除细胞中一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子的表达;和b.增加细胞中一种或多种致耐受因子的表达。在一些实施方案中,一种或多种致耐受因子中的至少一种是CD47。在一些实施方案中,降低一种或多种MHC I类分子的表达的修饰是降低b-2微球蛋白(B2M)的表达的修饰。在一些实施方案中,降低一种或多种MHC II类分子的表达的修饰是降低CIITA的表达的修饰。在一些实施方案中,增加表达的修饰包括增加的表面表达,且/或降低表达的修饰包括降低的表面表达。在一些实施方案中,工程化原代细胞选自胰岛细胞、 $\beta$ 胰岛细胞、B细胞、T细胞、NK细胞、视网膜色素上皮细胞、神经胶质祖细胞、内皮细胞、肝细胞、甲状腺细胞、皮肤细胞,和血细胞(例如,浆细胞或血小板)。

[0148] 在一些方面,本文提供了一种工程化细胞(诸如工程化原代细胞)群,其包含多种本文所述的任何工程化细胞诸如工程化原代细胞。在一些实施方案中,群体中至少50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%或99.99%的细胞包含编码CD47的外源多核苷酸。在一些实施方案中,相对于未改变或未修饰的野生型细胞,群体中至少50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%或99.99%的细胞包含降低的B2M和/或CIITA的表达。在一些实施方案中,本文提供了组合物(例如,本文描述的任何工程化细胞群的药物组合物。在一些实施方案中,本文提供了组合物(例如,本文描述的任何工程化原代细胞群的药物组合物。在一些实施方案中,工程化原代细胞群包括选自由以下组成的组的工程化原代细胞群:工程化原代胰岛细胞、工程化原代 $\beta$ 胰岛细胞、工程化原代T细胞、工程化原代甲状腺细胞、工程化原代皮肤细胞、工程化原代内皮细胞和工程化原代视网膜色素上皮细胞。

[0149] 本文还提供了用于治疗病症的方法,所述方法包括施用在MHC错配同种异体受体中逃避免疫排斥的工程化细胞(例如,工程化原代细胞)。在一些实施方案中,当向MHC错配的同种异体受体重复施用(例如,移植(transplanted/grafted))时,由任一种本文所述的方法产生的工程化细胞逃避免疫排斥。

[0150] 在一些方面,本文提供了一种治疗有需要的患者的疾病、病状或细胞缺陷的方法,



所述方法包括向患者施用有效量的本文所述的任何工程化细胞(诸如工程化原代细胞)群的群体。在一些方面,本文提供了一种治疗有需要的患者的疾病、病状或细胞缺陷的方法,所述方法包括向患者施用有效量的本文所述的工程化细胞(诸如工程化原代细胞)的任何组合物。在一些方面,本文提供了一种治疗有需要的患者的疾病、病状或细胞缺陷的方法,所述方法包括向患者施用有效量的本文所述的工程化细胞(诸如工程化原代细胞)的任何药物组合物。

[0151] 除非有明确相反的指示,否则特定实施方案的实践将采用化学、生物化学、有机化学、分子生物学、微生物学、重组DNA技术、遗传学、免疫学和细胞生物学的常规方法,所述方法在本领域的技术范围内,其中许多方法出于说明目的在下文中描述。此类技术在文献中充分解释。参见例如,Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual(第3版,2001);Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual(第2版,1989);Maniatis等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual(1982);Ausubel等人,Current Protocols in Molecular Biology(John Wiley and Sons,2008年7月更新);Short Protocols in Molecular Biology:A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology,Greenhouse Associates and Wiley-Interscience;Glover,DNA Cloning:A Practical Approach,第I卷和第II卷(IRL Press,Oxford,1985);和Techniques for the Analysis of Complex Genomes,(Academic Press,New York,1992);Transcription and Translation(B.Hames和S.Higgins编,1984);Perbal,A Practical Guide to Molecular Cloning(1984);Harlow和Lane,Antibodies,(Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.,1998)Current Protocols in Immunology Q.E.Coligan,A.M.Kruisbeek,D.H.Margulies,E.M.Shevach和W.Strober编,1991);Annual Review of Immunology;以及诸如Advances in Immunology的期刊上的专题论文。

[0152] 本申请中提及的所有出版物(包括专利文献、科学文章和数据库)出于所有目的通过引用整体并入,其程度如同每篇单独的出版物单独地通过引用并入一样。如果本文列出的定义与通过引用并入本文的专利、申请、公开的申请和其他出版物中列出的定义相反或在其他方面不一致,则本文列出的定义优先于通过引用并入本文的定义。

[0153] 本文所使用的章节标题仅用于组织目的,而不应被解释为限制所描述的主题。本领域技术人员将认识到,在本公开的范围和精神内,若干实施方案是可能的。以下描述说明了本公开当然不应被解释为以任何方式限制本文所述的发明的范围。

[0154] I. 定义

[0155] 除非另外定义,否则本文所使用的所有技术术语、符号和其他技术和科学术语或术语学旨在具有与所要求保护的主体所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。在一些情况下,为了清楚和/或为了便于参考,本文定义了具有通常理解的含义的术语,并且本文包括此类定义不应解释为表示与本领域通常理解的含义的显著差异。

[0156] 如本文所用的术语“约”当指可测量值诸如量或浓度等时,意在涵盖指定量的20%、10%、5%、1%、0.5%或甚至0.1%的变化。

[0157] 如本文(包括所附权利要求中)所用,除非上下文另有明确规定,否则单数形式“一个(a)”、“或”和“所述”包括复数个指示物。例如,“一个(a)”或“一个(an)”意指“至少一个”

或“一个或多个”。应当理解,本文所述的方面和变型包括“由此类方面和变型组成”和/或“基本上由此类方面和变型组成”的实施方案。

[0158] 如本文使用,术语“和/或”包括一个或多个相关联列出项目的任何和所有组合。

[0159] 如本文所用,关于多肽或多核苷酸的术语“外源”旨在意指将提及的分子引入感兴趣的细胞中。可以例如通过将外源编码核酸引入到细胞的遗传物质中(诸如通过整合到染色体中)或者作为非染色体遗传物质(诸如质粒或表达载体)来引入外源分子,诸如外源多核苷酸。因此,当用于提及编码核酸的表达时,所述术语是指将编码核酸以可表达的形式引入到细胞中。在一些情况下,“外源”分子是细胞中通常不存在,但可以通过一种或多种遗传、生化或其他方法引入到细胞中的分子、构建体、因子等。

[0160] 术语“内源”是指存在于天然或未修饰的细胞中的参考分子(诸如多核苷酸(例如基因))或多肽。例如,当用于提及内源基因的表达时,所述术语是指由包含在细胞内并且不是外源引入的内源核酸编码的基因的表达。

[0161] “基因”包括编码基因产物的DNA区域,以及调控基因产物的产生的所有DNA区域,无论此类调控序列是否与编码和/或转录序列相邻。因此,基因包括但不一定限于启动子序列、终止子、翻译调控序列诸如核糖体结合位点和内部核糖体进入位点、增强子、沉默子、绝缘子、边界元件、复制起点、基质附着位点和基因座控制区。基因的序列通常存在于细胞中染色体上的固定染色体位置或基因座处。

[0162] 术语“基因座”是指染色体上特定基因或遗传标志物所在的固定位置。提及“靶基因座”是指期望基因的特定基因座,其中期望其靶向遗传修饰,诸如外源多核苷酸的基因编辑或整合。

[0163] 关于基因或“基因表达”的术语“表达”是指将包含在基因中的信息转化为基因产物。基因产物可以是基因的直接转录产物(例如,mRNA、tRNA、rRNA、反义RNA、核酶、结构RNA或任何其他类型的RNA)或可以是通过mRNA翻译产生的蛋白质。基因产物还包括通过诸如加帽、聚腺苷酸化、甲基化和编辑的过程修饰的RNA,以及通过例如甲基化、乙酰化、磷酸化、泛素化、ADP-核糖基化、豆蔻酰化和糖基化修饰的蛋白质。因此,提及表达或基因表达包括蛋白质(或多肽)表达或基因的可转录产物(诸如mRNA)的表达。蛋白质表达可以包括蛋白质的胞内表达或表面表达。通常,基因产物(诸如mRNA或蛋白质)的表达处于细胞中可检测到的水平。

[0164] 如本文所用,“可检测的”表达水平意指通过标准技术可检测的水平,所述标准技术是技术人员已知的并且包括例如差异展示、RT(逆转录酶)偶联聚合酶链反应(PCR)、Northern印迹和/或RNA酶保护分析以及基于免疫亲和力的蛋白质检测方法,诸如流式细胞术、ELISA或蛋白质印迹。表达水平的程度仅需要足够大,以便经由标准表征技术可视化或测量。

[0165] 如本文所用,术语“增加的表达”、“增强的表达”或“过表达”意指除了不含用于调节特定基因表达的修饰的原始或源细胞中的表达(例如野生型表达水平(也可以是不表达或表达不可测量))之外的任何形式的表达。本文提及的“增加的表达”、“增强的表达”或“过表达”意指基因表达的增加和/或就指多肽而言,相对于不含修饰的细胞(诸如在工程化以引入修饰之前的原始源细胞,诸如未修饰的细胞或野生型细胞)中的水平而言多肽水平的增加和/或多肽活性的增加。表达、多肽水平或多肽活性的增加可以是至少5%、10%、20%、

30%、40%或50%、60%、70%、80%、85%、90%或100%甚至更多。在一些情况下,表达、多肽水平或多肽活性的增加可以是至少2倍、5倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、200倍或更多。

[0166] 术语“低免疫原性”是指不太容易被移植此类细胞的受试者免疫排斥的细胞。例如,相对于不含修饰的相同细胞类型的类似细胞,诸如未改变或未修饰的野生型细胞,此类低免疫原性细胞可以是约2.5%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、97.5%、99%或更不容易被移植此类细胞的受试者免疫排斥。通常,低免疫原性细胞与受试者是同种异体的,并且低免疫原性细胞在MHC不匹配的同种异体受体中逃避免疫排斥。在一些实施方案中,低免疫原性细胞受到保护而免于T细胞介导的适应性免疫排斥和/或先天免疫细胞排斥。

[0167] 细胞的低免疫原性可以通过评价细胞的免疫原性(诸如细胞引发适应性和先天免疫反应的能力)来确定。这种免疫反应可以使用本领域技术人员认可的测定来测量。

[0168] 如本文所用的术语“致耐受因子”包括免疫抑制因子或免疫调控因子,其在施用、移植或植入后调节或影响细胞被宿主或受体受试者的免疫系统识别的能力。通常,致耐受因子是诱导对工程化细胞(诸如工程化原代细胞)的免疫耐受性的因子,使得工程化细胞(诸如工程化原代细胞)不被受体的宿主免疫系统靶向(诸如排斥)。因此,致耐受因子可以是低免疫因子。致耐受因子的实例包括免疫细胞抑制性受体(例如CD47)、与免疫细胞抑制性受体接合的蛋白质、检查点抑制剂和降低先天或适应性免疫识别的其他分子。

[0169] 术语“减少(decrease)”、“降低(reduced)”、“降低(reduction)”和“减少(decrease)”在本文中均一般用于意指减少统计上显著的量。然而,为避免疑问,减少(decrease)”、“降低(reduced)”、“降低(reduction)”、“减少(decrease)”意指与参考水平相比减少至少10%,例如与参考水平相比减少至少约20%,或至少约30%,或至少约40%,或至少约50%,或至少约60%,或至少约70%,或至少约80%,或至少约90%或至多并包括100%减少(即,与参考样品相比不存在的水平)或在10-100%之间的任何减少。

[0170] 术语“增加(increased)”、“增加(increase)”或“增强(enhance)”或“活化(activate)”在本文中均用于一般意指增加统计上显著的量;为避免任何疑问,术语“增加(increased)”、“增加(increase)”或“增强(enhance)”或“活化(activate)”意指与参考水平相比增加至少10%,例如与参考水平相比增加至少约20%,或至少约30%,或至少约40%,或至少约50%,或至少约60%,或至少约70%,或至少约80%,或至少约90%或至多并包括100%增加或在10%-100%之间的任何增加,或者与参考水平相比至少约2倍,或至少约3倍,或至少约4倍,或至少约5倍或至少约10倍增加,或在2倍与10倍之间的任何增加,或更多增加。

[0171] 如本文所用,术语“修饰”是指影响细胞中基因表达的细胞中的任何变化或改变。在一些实施方案中,修饰是直接改变细胞中编码蛋白质产物的基因或其调控元件(诸如通过基因编辑、诱变或通过外源多核苷酸或转基因的遗传工程化)的遗传修饰。

[0172] 如本文所用,“插入缺失”是指由基因组中的核苷酸碱基的插入、缺失或其组合产生的突变。因此,插入缺失通常从序列中插入或缺失核苷酸。如本领域技术人员将理解的,除非插入缺失的长度是三的倍数,否则基因组序列的编码区中的插入缺失将导致移码突变。本公开的CRISPR/Cas系统可以用于在靶多核苷酸序列中诱导任何长度的插入缺失。

[0173] 在一些实施方案中,改变是点突变。如本文所用,“点突变”是指替换核苷酸中的一者的取代。本公开的CRISPR/Cas系统可以用于在靶多核苷酸序列中诱导任何长度的插入缺失或点突变。

[0174] 如本文所用,“敲除”包括以干扰靶多核苷酸序列功能的方式缺失全部或部分靶多核苷酸序列。例如,可以通过在靶多核苷酸序列的功能结构域(例如,DNA结合结构域)中的靶多核苷酸序列中诱导插入缺失来改变靶多核苷酸序列,从而实现敲除。基于本文所述的细节,本领域技术人员将容易理解如何使用本公开的CRISPR/Cas系统来敲除靶多核苷酸序列或其部分。

[0175] 在一些实施方案中,改变导致靶多核苷酸序列或其部分的敲除。使用本公开的CRISPR/Cas系统敲除靶多核苷酸序列或其部分可以用于多种应用。例如,出于研究目的,敲除细胞中的靶多核苷酸序列可以在体外进行。对于离体目的,敲除细胞中的靶多核苷酸序列可以用于治疗或预防与靶多核苷酸序列的表达相关的病症(例如,通过离体敲除细胞中的突变等位基因并将那些包含敲除突变等位基因的细胞引入受试者体内)。

[0176] 本文中的“敲入”意指向宿主细胞中添加遗传功能的过程。这会导致敲入的基因产物(例如,RNA或编码的蛋白质)的水平增加。如本领域技术人员将理解的,这可以以多种方式实现,包括将基因的一个或多个额外拷贝添加到宿主细胞中或改变内源基因的调控组分以增加蛋白质的表达。这可通过修饰启动子、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。

[0177] 在一些实施方案中,本文所述的改变或修饰导致靶标或选择的多核苷酸序列的表达降低。在一些实施方案中,本文所述的改变或修饰导致靶标或选择的多肽序列的表达降低。

[0178] 在一些实施方案中,本文所述的改变或修饰导致靶标或选择的多核苷酸序列的表达增加。在一些实施方案中,本文所述的改变或修饰导致靶标或选择的多肽序列的表达增加。

[0179] 基因表达的“调节”是指基因表达水平的变化。表达的调节可以包括但不限于基因活化和基因阻遏。调节也可以是完全的,即其中基因表达完全失活或活化至野生型水平或更高;或者它可以是部分的,其中基因表达部分降低或部分活化至野生型水平的一部分。

[0180] 术语“有效地连接(operatively linked)”或“可操作地连接(operably linked)”关于两个或更多个组件(诸如序列元件)的并置可互换使用,其中组件被排列成使得两个组件都正常运行并且允许至少一个组件可以介导施加在至少一个其他组件上的功能的可能性。举例来说,如果转录调控序列(诸如启动子)响应于一种或多种转录调控因子的存在或不存在而控制编码序列的转录水平,则所述转录调控序列有效地连接至编码序列。转录调控序列通常以顺式方式与编码序列有效地连接,但不必与其直接相邻。例如,增强子是有效地连接至编码序列的转录调控序列,即使它们不连续。

[0181] 如本文所用,术语“多肽”和“蛋白质”可以互换使用以指通过肽键连接的一系列氨基酸残基(即氨基酸残基的聚合物),并且不限于最小长度。此类聚合物可以含有天然或非天然氨基酸残基或其组合,并且包括但不限于氨基酸残基的肽、多肽、寡肽、二聚体、三聚体和多聚体。因此,蛋白质或多肽包括具有修饰的氨基酸(例如磷酸化、糖化、糖基化等)和氨基酸类似物的那些。此定义涵盖全长多肽或蛋白质及其片段。所述术语还包括其修饰的物

质,例如一个或多个残基的翻译后修饰,例如甲基化、磷酸化、糖基化、唾液酸化或乙酰化。

[0182] 贯穿本公开,要求保护的主题的各个方面以范围格式呈现。应当理解,范围格式的描述仅仅是为了方便和简洁,而不应当被解释为对所要求保护的主题的范围的死板限制。因此,范围的描述应当被认为已经具体公开了所有可能的子范围以及所述范围内的各个数值。例如,在提供值的范围的情况下,应当理解,在所述范围的上限与下限之间的每个中间值(除非上下文另外清楚地指出,否则所述中间值达到下限单位的十分之一)和规定范围中的任何其他规定值或中间值都涵盖在本公开内,受规定范围内任何特别排除的限制。在范围包括限值中的一个或两个的情况下,排除这些所包括的限值中的一个或两个的范围也包括在本公开中。在一些实施方案中,提供了特性的两个相反且末端开放的范围,并且在此类描述中,设想本文提供这两个范围的组合。例如,在一些实施方案中,描述了特性大于约10个单位,并且描述了(诸如在另一句话中)特性小于约20个单位,因此,本文描述了约10个单位至约20个单位的范围。

[0183] 如本文所用,“受试者”或“个体”是可互换使用的术语,是哺乳动物。在一些实施方案中,“哺乳动物”包括人、非人灵长类动物、家养动物和农场动物以及动物园动物、运动动物或宠物动物,诸如狗、马、兔、牛、猪、仓鼠、沙鼠、小鼠、雪貂、大鼠、猫、猴子等。在一些实施方案中,受试者或个体是人。在一些实施方案中,受试者是已知或怀疑患有疾病、病症或病状的患者。

[0184] 如本文所用,术语“治疗(treating)”和“治疗(treatment)”包括向受试者施用有效量的本文所述的细胞,使得受试者的疾病的至少一种症状得到减轻或疾病得到改善,例如,有益的或期望的临床结果。出于此技术的目的,有益的或期望的临床结果包括但不限于一种或多种症状的减轻、疾病程度的减轻、稳定(即,不恶化)的疾病状态、疾病进展的延迟或减缓、疾病状态的改善或缓和以及缓解(无论是部分的还是全部的),无论是可检测的还是不可检测的。“治疗”可以指与未接受治疗的预期存活相比延长存活。因此,本领域技术人员认识到,治疗可以改善疾病状况,但可能不是疾病的完全治愈。在一些实施方案中,在治疗疾病之后,疾病或病症的一种或多种症状减轻至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%或至少50%。

[0185] 出于此技术的目的,疾病治疗的有益的或期望的临床结果包括但不限于一种或多种症状的减轻、疾病程度的减轻、稳定(即,不恶化)的疾病状态、疾病进展的延迟或减缓、疾病状态的改善或缓和以及缓解(无论是部分的还是全部的),无论是可检测的还是不可检测的。

[0186] “载体”或“构建体”能够将基因序列转移至靶细胞。通常,“载体构建体”、“表达载体”和“基因转移载体”意指能够指导感兴趣基因的表达并且可以将基因序列转移至靶细胞的任何核酸构建体。因此,所述术语包括克隆和表达媒介物以及整合载体。用于将载体或构建体引入到细胞中的方法是本领域技术人员已知的并且包括但不限于脂质介导的转移(即,脂质体,包括中性和阳离子脂质)、电穿孔、直接注射、细胞融合、粒子轰击、磷酸钙共沉淀、DEAE-葡聚糖介导的转移和/或病毒载体介导的转移。

[0187] II. 工程化细胞和工程化细胞的方法

[0188] 本文提供了工程化细胞,诸如工程化原代细胞,其包含调控一种或多种靶多核苷酸序列的表达,诸如调控一种或多种MHC I类分子、一种或多种MHC II类分子或一种或多种

MHC I类分子和一种或多种MHC II类分子的表达的修饰。

[0189] 在一些实施方案中,所提供的工程化细胞(诸如工程化原代细胞)还包含调节(例如,增加)一种或多种致耐受因子的表达的修饰。在一些实施方案中,致耐受因子的表达的调节(例如,表达增加),以及一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子的表达的调节(例如,表达降低或消除)是相对于不包含修饰的细胞中所述分子的表达量而言的。在一些实施方案中,表达的调节是相对于野生型细胞中所述分子的表达量而言的。在一些实施方案中,未修饰的或野生型细胞是与所提供的工程化原代细胞的细胞类型相同的细胞。在一些实施方案中,未修饰的细胞或野生型细胞表达致耐受因子、一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子。在一些实施方案中,未修饰的细胞或野生型细胞不表达一种或多种致耐受因子、一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子。在一些实施方案中,其中不表达致耐受因子的未修饰的细胞或野生型细胞用于生成工程化原代细胞,提供的工程化原代细胞包含过表达一种或多种致耐受因子或从0%起增加一种或多种致耐受因子的表达的修饰。应当理解,如果工程化之前的细胞不表达可检测量的致耐受因子,则与不含修饰的类似细胞相比,导致任何可检测量的致耐受因子的表达的修饰使表达增加。

[0190] 在一些实施方案中,致耐受因子的表达的调节(例如,表达增加),以及一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子的表达的调节(例如,表达降低或消除)是相对于不包含修饰的相同细胞类型的细胞中所述分子的表达量而言的。在一些实施方案中,其中不表达一种或多种致耐受因子的相同细胞类型的细胞用于生成工程化原代细胞,提供的工程化原代细胞包含过表达一种或多种致耐受因子或从0%起增加一种或多种致耐受因子的表达的修饰。应当理解,如果工程化之前的细胞不表达可检测量的致耐受因子,则与不含修饰的类似细胞相比,导致任何可检测量的致耐受因子的表达的修饰使表达增加。

[0191] 在一些实施方案中,提供的工程化细胞(诸如工程化原代细胞)包含增加一种或多种致耐受因子的表达的修饰。在一些实施方案中,致耐受因子是以下中的一种或多种: DUX4、B2M-HLA-E、CD35、CD52、CD16、CD52、CD47、CD46、CD55、CD59、CD27、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重链、HLA-G、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1-抑制剂、IL-10、IL-35、FASL、CCL21、MFGES、SERPINB9、CD35、IL-39、CD16 Fc受体、IL15-RF和H2-M3(包括其任何组合)。在一些实施方案中,致耐受因子是以下中的一种或多种: CD47、PD-L1、HLA-E或HLA-G、CCL21、FasL、Serpib9、CD200和Mfge8(包括其任何组合)。在一些实施方案中,增加一种或多种致耐受因子的表达的修饰是或包括CD47的表达增加。在一些实施方案中,增加一种或多种致耐受因子的表达的修饰是或包括PD-L1的表达增加。在一些实施方案中,增加一种或多种致耐受因子的表达的修饰是或包括HLA-E的表达增加。在一些实施方案中,增加一种或多种致耐受因子的表达的修饰是或包括HLA-G的表达增加。在一些实施方案中,增加一种或多种致耐受因子的表达的修饰是或包括CCL21、PD-L1、FasL、Serpib9、H2-M3(HLA-G)、CD47、CD200和Mfge8的表达增加。

[0192] 在一些实施方案中,细胞包含降低一种或多种MHC I类分子的表达的一种或多种修饰,诸如基因组修饰,和增加CD47的表达的修饰。换句话说,工程化细胞(诸如工程化原代细胞)包含外源CD47蛋白并表现出降低或沉默的一种或多种MHC I类分子的表面表达。在一些实施方案中,细胞包含降低一种或多种MHC II类分子的表达的一种或多种基因组修饰和

增加CD47的表达的修饰。在一些情况下,工程化细胞(诸如工程化原代细胞)包含外源CD47核酸和蛋白并表现出降低或沉默的一种或多种MHC I类分子的表面表达。在一些实施方案中,细胞包含降低或消除一种或多种MHC II类分子的表达的一种或多种基因组修饰、降低或消除一种或多种MHC II类分子的表达的一种或多种基因组修饰,以及增加CD47的表达的修饰。在一些实施方案中,工程化细胞(诸如工程化原代细胞)包含外源CD47蛋白,表现出降低或沉默的一种或多种MHC I类分子的表面表达,并表现出降低的或缺乏一种或多种MHC II类分子的表面表达。在许多实施方案中,细胞是B2M<sup>插入缺失/插入缺失</sup>、CIITA<sup>插入缺失/插入缺失</sup>、CD47tg细胞。

[0193] 在一些实施方案中,所述工程化细胞(诸如工程化原代细胞)群在施用于受体受试者后引发降低水平的免疫活化或不引发免疫活化。在一些实施方案中,细胞在受体受试者中引发降低水平的系统性TH1活化或不引发系统性TH1活化。在一些实施方案中,细胞在受体受试者中引发降低水平的外周血单核细胞(PBMC)的免疫活化或不引发PBMC的免疫活化。在一些实施方案中,细胞在施用于受体受试者后引发降低水平的针对细胞的供体特异性IgG抗体或不引发所述供体特异性IgG抗体。在一些实施方案中,细胞在受体受试者中引发降低水平的针对细胞的IgM和IgG抗体产生或不引发所述IgM和IgG抗体产生。在一些实施方案中,细胞在施用于受体受试者后引发降低水平的细胞的细胞毒性T细胞杀伤。

[0194] 在一些实施方案中,本文提供的工程化细胞诸如工程化原代细胞包含“自杀基因”或“自杀开关”。可以掺入自杀基因或自杀开关以充当“安全开关”,诸如在将工程化细胞(诸如工程化原代细胞)施用于受试者之后和在细胞以不期望的方式生长和分裂时,所述安全开关可以导致工程化细胞(例如,原代工程化细胞)死亡。“自杀基因”消融途径包括基因转移载体中的自杀基因,所述自杀基因编码仅在被特定化合物活化时才会导致细胞杀伤的蛋白质。自杀基因可以编码选择性地无毒化合物转化成高毒性代谢物的酶。结果是特异性消除表达所述酶的细胞。在一些实施方案中,自杀基因是单纯疱疹病毒胸苷激酶(HSV-tk)基因并且触发子是更昔洛韦(ganciclovir)。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)基因并且触发子是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),两者均通过引用整体并入本文)。

[0195] 在其他实施方案中,自杀基因是诱导型半胱氨酸蛋白酶蛋白。诱导型半胱氨酸蛋白酶蛋白包括能够诱导细胞凋亡的半胱氨酸蛋白酶蛋白的至少一部分。在优选实施方案中,诱导型半胱氨酸蛋白酶蛋白是iCasp9。其包含具有F36V突变的人FK506结合蛋白FKBP12的序列,它通过一系列氨基酸连接到编码人半胱氨酸蛋白酶9的基因。FKBP12-F36V以高亲和力和与小分子二聚剂API 903结合。因此,iCasp9在本发明中的自杀功能是通过施用二聚化化学诱导剂(CID)触发的。在一些实施方案中,CID是小分子药物API 903。二聚化引起细胞凋亡的快速诱导。(参见W02011146862;Stasi等人,N.Engl. J. Med 365;18(2011);Tey等人,Biol. Blood Marrow Transplant. 13:913-924(2007),这些文献中的每一个都通过引用整体并入本文。)

[0196] 在对受体具有细胞毒性或其他负面后果的情况下,包含安全开关或自杀基因允许受控细胞杀伤,从而增加基于细胞的疗法(包括使用致耐受因子的疗法)的安全性。

[0197] 在一些实施方案中,可以将安全开关掺入(诸如引入)本文提供的工程化细胞(诸如工程化原代细胞)中,以例如在细胞以不期望的方式生长和分裂或对宿主造成过度毒性

时,提供诱导含有安全开关的工程化细胞(诸如工程化原代细胞)死亡或凋亡的能力。因此,安全开关的使用使得人们能够有条件地消除体内异常细胞,并且可能是细胞疗法在临床应用中的关键步骤。安全开关及其用途描述于例如Duzgune§,Origins of Suicide Gene Therapy(2019);Duzgune§(编),Suicide Gene Therapy.Methods in Molecular Biology,vol.1895(Humana Press,New York,NY)(对于HSV-tk、胞嘧啶脱氨酶、硝基还原酶、嘌呤核苷磷酸化酶和辣根过氧化物酶);Zhou和Brenner,Exp Hematol 44(11):1013-1019(2016)(对于iCaspase9);Wang等人,Blood 18(5):1255-1263(2001)(对于huEGFR);美国专利申请公开号20180002397(对于HER1);以及Philip等人,Blood124(8):1277-1287(2014)(对于RQR8)。

[0198] 在一些实施方案中,安全开关可以以受控方式引起细胞死亡,例如在药物或前药存在下或在被选择性外源化合物活化后。在一些实施方案中,安全开关选自自由以下组成的组:单纯疱疹病毒胸苷激酶(HSV-tk)、胞嘧啶脱氨酶(CyD)、硝基还原酶(NTR)、嘌呤核苷磷酸化酶(PNP)、辣根过氧化物酶、诱导型半胱氨酸蛋白酶9(iCasp9)、雷帕霉素活化的半胱氨酸蛋白酶9(ropaCasp9)、CCR4、CD16、CD19、CD20、CD30、EGFR、GD2、HER1、HER2、MUC1、PSMA和RQR8。

[0199] 在一些实施方案中,安全开关可以是编码当被药物或前药活化时,例如通过在细胞内将无毒前药转变成毒性代谢物而具有细胞杀伤能力的产物的转基因。在这些实施方案中,通过使工程化细胞(诸如工程化原代细胞)与药物或前药接触来活化细胞杀伤。在一些情况下,安全开关是HSV-tk,它将更昔洛韦(GCV)转化为GCV-三磷酸,从而干扰DNA合成并杀伤分裂细胞。在一些情况下,安全开关是CyD或其变体,其通过催化胞嘧啶水解脱氨为尿嘧啶将抗真菌药物5-氟胞嘧啶(5-FC)转化为细胞毒性5-氟尿嘧啶(5-FU)。5-FU通过细胞酶进一步转化为有效的抗代谢物(5-FdUMP、5-FdUTP、5-FUTP)。这些化合物抑制胸苷酸合成酶以及RNA和DNA的产生,导致细胞死亡。在一些情况下,安全开关是NTR或其变体,其可以经由将硝基还原为在增殖和非增殖细胞中有毒性的反应性N-羟胺中间体来作用于前药CB 1954。在一些情况下,安全开关是PNP或其变体,其可以将前药6-甲基嘌呤脱氧核苷或氟达拉滨转变为对增殖和非增殖细胞均有毒性的代谢物。在一些情况下,安全开关是辣根过氧化物酶或其变体,其可以催化吲哚-3-乙酸(IAA)为有效的细胞毒素,从而实现细胞杀伤。

[0200] 在一些实施方案中,安全开关可以是iCasp9。半胱氨酸蛋白酶9是内在线粒体凋亡途径的组分,其在生理条件下,因细胞色素C从受损线粒体释放而活化。活化的半胱氨酸蛋白酶9随后活化半胱氨酸蛋白酶3,所述半胱氨酸蛋白酶3触发末端效应分子导致细胞凋亡。可以通过将截短的半胱氨酸蛋白酶9(没有其生理二聚化结构域或半胱氨酸蛋白酶活化结构域)经由肽接头融合到FK506结合蛋白(FKBP)FKBP12-F36V来生成iCasp9。iCasp9具有低二聚体依赖性基础活性,并且可以在宿主细胞(例如,人T细胞)中稳定表达而不损害其表型、功能或抗原特异性。然而,在二聚化化学诱导剂(CID)诸如利米杜西(rimiducid)(AP1903)、AP20187和雷帕霉素存在下,iCasp9可以经历诱导二聚化并活化下游半胱氨酸蛋白酶分子,导致表达iCasp9的细胞凋亡。参见例如,PCT申请公开号W02011/146862;Stasi等人,N.Engl.J.Med.365;18(2011);Tey等人,Biol.Blood Marrow Transplant 13:913-924(2007)。特别地,雷帕霉素诱导型半胱氨酸蛋白酶9变体被称为ropaCasp9。参见Stavrou等人,Mal.Ther.26(5):1266-1276(2018)。因此,iCasp9可以用作安全开关来实现宿主细胞的



受控杀伤。

[0201] 在一些实施方案中,安全开关可以是膜表达的蛋白质,其允许在施用针对此蛋白质的特异性抗体之后的细胞耗竭。这种类别的安全开关可以包括例如编码用于其表面表达的CCR4、CD16、CD19、CD20、CD30、EGFR、GD2、HER1、HER2、MUC1、PSMA或RQR8的一种或多种转基因。这些蛋白质可能具有可以被特定抗体靶向的表面表位。在一些实施方案中,安全开关包含CCR4,其可以被抗CCR4抗体识别。合适的抗CCR4抗体的非限制性实例包括莫格利珠单抗及其生物类似物。在一些实施方案中,安全开关包含CD16或CD30,其可以被抗CD16或抗CD30抗体识别。此类抗CD16或抗CD30抗体的非限制性实例包括AFM13及其生物类似物。在一些实施方案中,安全开关包含CD19,其可以被抗CD19抗体识别。此类抗CD19抗体的非限制性实例包括MOR208及其生物类似物。在一些实施方案中,安全开关包含CD20,其可以被抗CD20抗体识别。此类抗CD20抗体的非限制性实例包括奥妥珠单抗、乌妥昔单抗、奥卡妥珠单抗、利妥昔单抗、利妥昔单抗-R1Ib及其生物类似物。因此,表达安全开关的细胞是CD20阳性的,并且可以通过施用所述的抗CD20抗体来靶向杀伤。在一些实施方案中,安全开关包含EGFR,其可以被抗EGFR抗体识别。此类抗EGFR抗体的非限制性实例包括托木妥昔单抗、R05083945 (GA201)、西妥昔单抗及其生物类似物。在一些实施方案中,安全开关包含GD2,其可以被抗GD2抗体识别。此类抗GD2抗体的非限制性实例包括Hu14.18K322A、Hu14.18-IL2、Hu3F8、地妥昔单抗、c.60C3-R11c及其生物类似物。

[0202] 在一些实施方案中,安全开关可以是识别工程化细胞(诸如工程化原代细胞)表面上的一种或多种致耐受因子的外源施用的剂。在一些实施方案中,外源施用的剂是针对致耐受剂或对其具有特异性的抗体,例如抗CD47抗体。通过识别和阻断工程化细胞(诸如工程化原代细胞)上的致耐受因子,外源施用的抗体可以阻断致耐受因子的免疫抑制功能,从而使免疫系统对工程化细胞(诸如工程化原代细胞)重新敏感。例如,对于过表达CD47的工程化细胞(诸如工程化原代细胞),可以将外源施用的抗CD47抗体施用于受试者,导致工程化细胞(诸如工程化原代细胞)上CD47的掩蔽,并触发对工程化原代细胞的免疫反应。

[0203] 在一些实施方案中,所述方法还包括将包含诱导型自杀开关的表达载体引入细胞中。

[0204] 在一些实施方案中,致耐受因子是CD47并且细胞包含编码CD47蛋白的外源多核苷酸。在一些实施方案中,细胞表达外源CD47多肽。

[0205] 在一些实施方案中,本文公开的方法包括向有需要的受试者施用CD47-SIRP $\alpha$ 阻断剂,其中先前向受试者施用了工程化以表达外源CD47多肽的细胞群。在一些实施方案中,CD47-SIRP $\alpha$ 阻断剂包含CD47结合结构域。在一些实施方案中,CD47结合结构域包含信号调控蛋白 $\alpha$  (SIRP $\alpha$ )或其片段。在一些实施方案中,CD47-SIRP $\alpha$ 阻断剂包含免疫球蛋白G (IgG) Fc结构域。在一些实施方案中,IgG Fc结构域包括IgG1 Fc结构域。在一些实施方案中,IgG1 Fc结构域包含人抗体的片段。在一些实施方案中,CD47-SIRP $\alpha$ 阻断剂选自由TTI-621、TTI-622和ALX148组成的组。在一些实施方案中,CD47-SIRP $\alpha$ 阻断剂是TTI-621、TTI-622和ALX148。在一些实施方案中,CD47-SIRP $\alpha$ 阻断剂是TTI-622。在一些实施方案中,CD47-SIRP $\alpha$ 阻断剂是ALX148。在一些实施方案中,IgG Fc结构域包括IgG4 Fc结构域。在一些实施方案中,CD47-SIRP $\alpha$ 阻断剂是抗体。在一些实施方案中,抗体选自由MIAP410、B6H12和莫洛利单抗(Magrolimab)组成的组。在一些实施方案中,抗体是MIAP410。在一些实施方案中,抗体是

B6H12。在一些实施方案中,抗体是莫洛利单抗。在一些实施方案中,抗体选自由A0-176、IBI188(莱特利单抗(letaplimab))、STI-6643和ZL-1201组成的组。在一些实施方案中,抗体是A0-176(Arch)。在一些实施方案中,抗体是IBI188(莱特利单抗)(Innovent)。在一些实施方案中,抗体是STI-6643(Sorrento)。在一些实施方案中,抗体是ZL-1201(Zai)。

[0206] 在一些实施方案中,结合CD47的有用抗体或其片段可以选自包括以下的组:莫洛利单抗((Hu5F9-G4)(Forty Seven, Inc.; Gilead Sciences, Inc.))、厄比瑞利单抗(urabrelimab)、CC-90002(Celgene; Bristol-Myers Squibb)、IBI-188(Innovent Biologics)、IBI-322(Innovent Biologics)、TG-1801(TG Therapeutics; 也称为NI-1701, Novimmune SA)、ALX148(ALX Oncology)、TJ011133(也称为TJC4, I-Mab Biopharma)、FA3M3、ZL-1201(Zai Lab Co., Ltd)、AK117(Akesbio Australia Pty, Ltd.)、A0-176(Arch Oncology)、SRF231(Surface Oncology)、GenSci-059(GeneScience)、C47B157(Janssen Research and Development)、C47B161(Janssen Research and Development)、C47B167(Janssen Research and Development)、C47B222(Janssen Research and Development)、C47B227(Janssen Research and Development)、Vx-1004(Corvus Pharmaceuticals)、HMBD004(Hummingbird Bioscience Pte Ltd)、SHR-1603(Hengrui)、AMMS4-G4(Beijing Institute of Biotechnology)、RTX-CD47(University of Groningen)和IMC-002(Samsung Biologics; ImmuneOncia Therapeutics)。在一些实施方案中,抗体或其片段不与选自包括以下的组的抗体竞争CD47结合:莫洛利单抗、厄比瑞利单抗、CC-90002、IBI-188、IBI-322、TG-1801(NI-1701)、ALX148、TJ011133、FA3M3、ZL1201、AK117、A0-176、SRF231、GenSci-059、C47B157、C47B161、C47B167、C47B222、C47B227、Vx-1004、HMBD004、SHR-1603、AMMS4-G4、RTX-CD47和IMC-002。在一些实施方案中,抗体或其片段与选自以下的抗体竞争CD47结合:莫洛利单抗、厄比瑞利单抗、CC-90002、IBI-188、IBI-322、TG-1801(NI-1701)、ALX148、TJ011133、FA3M3、ZL1201、AK117、A0-176、SRF231、GenSci-059、C47B157、C47B161、C47B167、C47B222、C47B227、Vx-1004、HMBD004、SHR-1603、AMMS4-G4、RTX-CD47和IMC-002。在一些实施方案中,结合CD47的抗体或其片段选自包括以下的组:针对CD47的单链Fv片段(scFv)、针对CD47的Fab、针对CD47的VHH纳米抗体、针对CD47的DARPin及其变体。在一些实施方案中,针对CD47的scFv、针对CD47的Fab及其变体基于选自包括以下的组的任何抗体的抗原结合结构域:莫洛利单抗、厄比瑞利单抗、CC-90002、IBI-188、IBI-322、TG-1801(NI-1701)、ALX148、TJ011133、FA3M3、ZL1201、AK117、A0-176、SRF231、GenSci-059、C47B157、C47B161、C47B167、C47B222、C47B227、Vx-1004、HMBD004、SHR-1603、AMMS4-G4、RTX-CD47和IMC-002。

[0207] 在一些实施方案中,CD47拮抗剂提供CD47阻断。用于CD47阻断的方法和剂描述于PCT/US2021/054326中,其通过引用整体并入。

[0208] 在一些实施方案中,工程化细胞诸如工程化原代细胞来源于已经包含一种或多种所需修饰的源细胞。在一些实施方案中,鉴于本文提供的教导,本领域普通技术人员将容易地理解如何评估需要哪些修饰来达到工程化细胞(诸如工程化原代细胞)的所需最终形式,并且并不是所有靶组分水平降低或增加都经由活性工程化实现。在一些实施方案中,工程化原代细胞的修饰可以是任何顺序,并且不一定是本文提供的描述性语言中列出的顺序。

[0209] 一旦改变,本文所述的任何分子的表达的存在可以使用已知技术来测定,诸如蛋

白质印迹、ELISA测定、FACS测定、流式细胞术等。

[0210] A. 具有降低的基因表达的靶标

[0211] 在一些实施方案中,工程化细胞诸如工程化原代细胞包含一种或多种靶多核苷酸或蛋白质序列(也可互换地称为靶基因)的修饰(例如遗传修饰),所述一种或多种靶多核苷酸或蛋白质序列调控(例如降低或消除)以下一种或多种的表达:一种或多种MHC I类分子、一种或多种MHC II类分子、MIC-A、MIC-B、TXIP、CTLA-4和/或PD-1。在一些实施方案中,工程化细胞诸如工程化原代细胞包含一种或多种基因的修饰,其调控(例如降低或消除)一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子。在一些实施方案中,一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子是以下中的任何一种或多种:HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DP、HLA-DM、HLA-DOA、HLA-DOB、HLA-DQ和/或HLA-DR。在一些实施方案中,对靶基因的修饰是降低或消除以下中的任何一种或多种的修饰:B2M、TAP I、NLRC5、CIITA、RFX5、RFXANK、RFXAP、NFY-A、NFY-B或NFY-C。在一些实施方案中,工程化细胞诸如工程化原代细胞具有降低或消除以下中的一种或多种的修饰:B2M、TAP I、NLRC5、CIITA、RFX5、RFXANK、RFXAP、NFY-A、NFY-B、NFY-C、MIC-A、MIC-B、TXIP、CTLA-4和/或PD-1。技术人员已知的多种方法中的任一种可以用于降低或消除任何此类靶基因的表达,包括多种已知的基因编辑技术中的任一种。

[0212] 在一些实施方案中,提供的工程化细胞诸如工程化原代细胞包含一种或多种靶多核苷酸或蛋白质序列(也可互换地称为靶基因)的修饰(例如遗传修饰),所述一种或多种靶多核苷酸或蛋白质序列调控(例如降低或消除)一种或多种MHC I类分子、一种或多种MHC II类分子或一种或多种MHC I类分子和一种或多种MHC II类分子的表达。在一些实施方案中,待修饰或工程化的原代细胞是未修饰细胞或非工程化细胞,诸如先前未引入一种或多种修饰的非工程化原代细胞。在一些实施方案中,基因编辑系统用于修饰一种或多种靶多核苷酸序列,所述一种或多种靶多核苷酸序列调控(例如降低或消除)一种或多种MHC I类分子、一种或多种MHC II类分子或一种或多种MHC I类分子和一种或多种MHC II类分子的表达。在某些实施方案中,细胞的基因组已被改变以减少或缺失促进HLA表达(诸如细胞表面上一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子的表达)所需或涉及的组分。例如,在一些实施方案中,细胞中 $\beta$ -2-微球蛋白(B2M)(一种或多种MHC I类分子的组分)的表达降低或消除,从而降低或消除工程化细胞的一种或多种MHC I类分子的蛋白质表达(例如细胞表面表达)。因此,在一些实施方案中,可以经由基因和/或其功能、RNA表达和功能、蛋白质表达和功能、定位(诸如细胞表面表达)和寿命来降低表达。

[0213] 在一些实施方案中,人体内的MHC也称为人白细胞抗原(HLA)。例如,人MHC I类也称为HLA I类,并且人MHC II类也称为HLA II类。因此,除非另有说明,否则提及MHC旨在包括对应人HLA分子。

[0214] 在一些实施方案中,靶标的表达降低使得工程化细胞中的表达降低至为在被工程化以降低靶标表达之前的源细胞中靶标的对应表达(例如,与蛋白质表达相比的蛋白质表达)水平的约60%或更低(诸如约55%或更低、50%或更低、45%或更低、40%或更低、35%或更低、30%或更低、25%或更低、20%或更低、15%或更低、10%或更低、5%或更低、4%或更低、3%或更低、2%或更低或1%或更低中的任一个)的水平。在一些实施方案中,靶标的表达降低使得工程化细胞中的表达降低至为参考细胞或参考细胞群(诸如相同细胞类型的

细胞或群体,或具有降低或消除的免疫原性反应的细胞)中靶标的对应表达(例如,与蛋白质表达相比的蛋白质表达)水平的约60%或更低(诸如约55%或更低、50%或更低、45%或更低、40%或更低、35%或更低、30%或更低、25%或更低、20%或更低、15%或更低、10%或更低、5%或更低、4%或更低、3%或更低、2%或更低或1%或更低中的任一个)的水平。在一些实施方案中,靶标的表达降低使得工程化细胞中的表达降低至为或低于测量的表达水平(诸如已知由于存在靶标而表现出降低或消除的免疫原性反应的水平)的水平。在一些实施方案中,评估受刺激或未受刺激状态下的工程化细胞、参考细胞或参考细胞群中的靶标的水平。在一些实施方案中,评估使得靶标被表达(或如果细胞有响应于刺激的能力使得靶标将被表达)的受刺激状态下的工程化细胞、参考细胞或参考细胞群中的靶标的水平。在一些实施方案中,刺激代表体内刺激。

[0215] 在一些实施方案中,提供的工程化细胞包含一种或多种靶多核苷酸序列(也可互换地称为靶基因)的修饰(诸如遗传修饰),所述一种或多种靶多核苷酸序列调控(例如,降低或消除)一种或多种MHC I类分子、一种或多种MHC II类分子或一种或多种MHC I类分子和一种或多种MHC II类分子的表达。在一些实施方案中,人体内的MHC也称为人白细胞抗原。例如,人MHC I类分子也称为HLA I类分子,并且人MHC II类分子也称为HLA II类分子。在一些实施方案中,待修饰或工程化的细胞是先前未引入一种或多种修饰的未修饰细胞或非工程化细胞。在一些实施方案中,基因编辑系统用于修饰一种或多种靶多核苷酸序列,所述一种或多种靶多核苷酸序列调控一种或多种MHC I类分子、一种或多种MHC II类分子或一种或多种MHC I类分子和一种或多种MHC II类分子的表达。在某些实施方案中,细胞的基因组已被改变以减少或缺失促进HLA表达(诸如细胞表面上一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子的表达)所需或涉及的组分。例如,在一些实施方案中,细胞中 $\beta$ -2-微球蛋白(B2M)(一种或多种MHC I类分子的组分)的表达降低或消除,从而降低或消除工程化细胞的一种或多种MHC I类分子的蛋白质表达(例如细胞表面表达)。

[0216] 在一些实施方案中,工程化细胞中调控(例如降低或消除)工程化细胞中一种或多种靶多核苷酸或蛋白质的表达的任何所述修饰可以与一种或多种修饰组合在一起以过表达第I.B章节中所述的多核苷酸(例如致耐受因子,诸如CD47)。

[0217] 在一些实施方案中,降低一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子表达可以例如通过以下方式中的一种或多种来实现:(1)直接靶向多态HLA等位基因(HLA-A、HLA-B、HLA-C)和一种或多种MHC II类分子基因;(2)去除B2M,这将降低所有MHC I类分子的表面运输;和/或(3)缺失对HLA表达至关重要的一种或多种MHC增强体组分,诸如LRC5、RFX-5、RFXANK、RFXAP、IRF1、NF-Y(包括NFY-A、NFY-B、NFY-C)和CIITA。

[0218] 在某些实施方案中,HLA表达受到干扰。在一些实施方案中,HLA表达受以下干扰:靶向个别HLA(例如,敲除HLA-A、HLA-B和/或HLA-C的表达)、靶向HLA表达的转录调控子(例如,敲除NLRC5、CIITA、RFX5、RFXAP、RFXANK、NFY-A、NFY-B、NFY-C和/或IRF-1的表达)、阻断一种或多种MHC I类分子的表面运输(例如,敲除B2M和/或TAP1的表达)和/或用HLA-Razor靶向(参见,例如W02016183041)。

[0219] 人白细胞抗原(HLA)复合物与人MHC同义。在一些实施方案中,本文公开的工程化细胞是人细胞。在某些方面,本文公开的工程化细胞不表达对应于一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子的一种或多种人白细胞抗原(例如,HLA-A、HLA-B和/或HLA-

C),因此表征为低免疫原性。例如,在某些方面,本文公开的工程化细胞已经被修饰,使得细胞不表达以下MHC I类分子中的一种或多种或者表现出以下MHC I类分子中的一种或多种的降低的表达:HLA-A、HLA-B和HLA-C。在一些实施方案中,HLA-A、HLA-B和HLA-C中的一种或多种可以从细胞“敲除”。具有敲除HLA-A基因、HLA-B基因和/或HLA-C基因的细胞可能表现出每个敲除基因的降低或消除的表达。

[0220] 在某些实施方案中,通过靶向和缺失一段连续的基因组DNA来调节一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子的表达,从而降低或消除选自B2M、CIITA和NLRC5组成的组的靶基因的表达。

[0221] 在一些实施方案中,提供的工程化细胞包含调控一种或多种MHC I类的一种或多种靶多核苷酸序列的修饰,诸如遗传修饰。用于降低一种或多种MHC I类分子的表达的示例性方法描述于下面的章节中。在一些实施方案中,靶多核苷酸序列是B2M和NLRC5中的一者或两者。在一些实施方案中,细胞包含对B2M基因的遗传编辑修饰。在一些实施方案中,细胞包含对NLRC5基因的遗传编辑修饰。在一些实施方案中,细胞包含对B2M和CIITA基因的遗传编辑修饰。

[0222] 在一些实施方案中,提供的工程化细胞包含调控一种或多种MHC II类分子的一种或多种靶多核苷酸序列的修饰,诸如遗传修饰。用于降低一种或多种MHC II类分子的表达的示例性方法在下面的章节中描述。在一些实施方案中,细胞包含对CIITA基因的遗传编辑修饰。

[0223] 在一些实施方案中,提供的工程化细胞包含调控一种或多种MHC I类分子和一种或多种MHC II类分子的一种或多种靶多核苷酸序列的修饰,诸如遗传修饰。用于降低一种或多种MHC I类分子和一种或多种MHC II类分子的表达的示例性方法在下面的章节中描述。在一些实施方案中,细胞包含对B2M和NLRC5基因的遗传编辑修饰。在一些实施方案中,细胞包含对CIITA和NLRC5基因的遗传编辑修饰。在特定实施方案中,细胞包含对B2M、CIITA和NLRC5基因的遗传编辑修饰。

[0224] 在一些实施方案中,降低B2M、CIITA和/或NLRC5表达的修饰降低B2M、CIITA和/或NLRC5 mRNA表达。在一些实施方案中,B2M、CIITA和/或NLRC5的mRNA表达降低是相对于不包含修饰的相同细胞类型的未修饰或野生型细胞而言的。在一些实施方案中,B2M的mRNA表达降低超过约5%,诸如降低超过约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多中的任一个。在一些实施方案中,B2M、CIITA和/或NLRC5的mRNA表达降低多至约100%,诸如降低多至约90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%或更少中的任一个。在一些实施方案中,B2M、CIITA和/或NLRC5的mRNA表达降低约5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%中的任一个。在一些实施方案中,B2M、CIITA和/或NLRC5的mRNA表达被消除(例如,0%的B2M、CIITA和/或NLRC5 mRNA的表达)。在一些实施方案中,降低B2M、CIITA和/或NLRC5 mRNA表达的修饰消除了B2M、CIITA和/或NLRC5基因活性。

[0225] 在一些实施方案中,降低B2M、CIITA和/或NLRC5表达的修饰降低了B2M、CIITA和/或NLRC5蛋白表达。在一些实施方案中,B2M、CIITA和/或NLRC5的蛋白质表达降低是相对于不包含修饰的相同细胞类型的未修饰或野生型细胞而言的。在一些实施方案中,B2M、CIITA和/或NLRC5的蛋白质表达降低超过约5%,诸如降低超过约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多中的任一个。在一些实施方案中,B2M、CIITA和/或NLRC5的蛋

白质表达降低多至约100%，诸如降低多至约90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%或更少中的任一个。在一些实施方案中，B2M、CIITA和/或NLRC5的蛋白质表达降低约5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%中的任一个。在一些实施方案中，B2M、CIITA和/或NLRC5的蛋白质表达被消除(例如，0%的B2M、CIITA和/或NLRC5蛋白的表达)。在一些实施方案中，降低B2M、CIITA和/或NLRC5蛋白表达的修饰消除了B2M、CIITA和/或NLRC5基因活性。

[0226] 在一些实施方案中，降低B2M、CIITA和/或NLRC5表达的修饰包括B2M、CIITA和/或NLRC5基因的失活或破坏。在一些实施方案中，降低B2M、CIITA和/或NLRC5表达的修饰包括B2M、CIITA和/或NLRC5基因的一个等位基因的失活或破坏。在一些实施方案中，降低B2M、CIITA和/或NLRC5表达的修饰包括B2M、CIITA和/或NLRC5基因的两个等位基因的失活或破坏。

[0227] 在一些实施方案中，修饰包括细胞中一种或多种B2M、CIITA和/或NLRC5编码序列的失活或破坏。在一些实施方案中，修饰包括细胞中所有B2M、CIITA和/或NLRC5编码序列的失活或破坏。在一些实施方案中，修饰包括失活或破坏，包括B2M、CIITA和/或NLRC5基因中的插入缺失。在一些实施方案中，修饰是B2M、CIITA和/或NLRC5基因的基因组DNA的移码突变。在一些实施方案中，修饰是B2M、CIITA和/或NLRC5基因的基因组DNA的缺失。在一些实施方案中，修饰是B2M、CIITA和/或NLRC5基因的一段连续基因组DNA的缺失。在一些实施方案中，B2M、CIITA和/或NLRC5基因被敲除。

[0228] 在一些实施方案中，工程化细胞包含降低的一种或多种MHC I类或其组分的表达，其中降低是如本文所述的，诸如相对于工程化以降低一种或多种MHC I类分子或其组分的表达之前、参考细胞或参考细胞群(诸如期望的缺乏免疫原性反应的细胞)或测量值而言。在一些实施方案中，工程化细胞被工程化以降低一种或多种MHC I类多肽或其组分(诸如B2M)的细胞表面表达。在一些实施方案中，工程化细胞上的一种或多种MHC I类多肽或其组分(诸如B2M)的细胞表面表达降低至为在被工程化以降低一种或多种MHC I类多肽或其组分(诸如B2M)的细胞表面呈递之前的一种或多种MHC I类多肽或其组分(诸如B2M)细胞表面表达的水平约60%或更低(诸如约55%或更低、50%或更低、45%或更低、40%或更低、35%或更低、30%或更低、25%或更低、20%或更低、15%或更低、10%或更低、5%或更低、4%或更低、3%或更低、2%或更低或1%或更低中的任一个)的水平。在一些实施方案中，工程化细胞上的一种或多种MHC I类多肽或其组分(诸如B2M)的细胞表面表达降低至为参考细胞或参考细胞群上的一种或多种MHC I类多肽或其组分(诸如B2M)细胞表面表达的水平(诸如一种或多种MHC I类多肽或其组分(诸如B2M)细胞表面表达的平均量)的约60%或更低(诸如约55%或更低、50%或更低、45%或更低、40%或更低、35%或更低、30%或更低、25%或更低、20%或更低、15%或更低、10%或更低、5%或更低、4%或更低、3%或更低、2%或更低或1%或更低中的任一个)的水平。在一些实施方案中，工程化细胞上没有一种或多种MHC I类多肽或其组分(诸如B2M)的细胞表面呈递(包括没有可检测的细胞表面表达，包括如使用已知技术(例如，流式细胞术)测量的)。在一些实施方案中，工程化细胞表现出降低的一种或多种MHC I类多肽或其组分(诸如B2M)的蛋白质表达。在一些实施方案中，工程化细胞的一种或多种MHC I类多肽或其组分(诸如B2M)的蛋白质表达降低至为在被工程化以降低一种或多种MHC I类多肽或其组分(诸如B2M)的蛋白质表达之前的一种或多种MHC I

类多肽或其组分(诸如B2M)蛋白质表达的水平的约60%或更低(诸如约55%或更低、50%或更低、45%或更低、40%或更低、35%或更低、30%或更低、25%或更低、20%或更低、15%或更低、10%或更低、5%或更低、4%或更低、3%或更低、2%或更低或1%或更低中的任一个)的水平。在一些实施方案中,工程化细胞的一种或多种MHC I类多肽或其组分(诸如B2M)的蛋白质表达降低至为在被工程化以降低一种或多种MHC I类多肽或其组分(诸如B2M)的蛋白质表达之前的一种或多种MHC I类多肽或其组分(诸如B2M)的水平的约60%或更低(诸如约55%或更低、50%或更低、45%或更低、40%或更低、35%或更低、30%或更低、25%或更低、20%或更低、15%或更低、10%或更低、5%或更低、4%或更低、3%或更低、2%或更低或1%或更低中的任一个)的水平。在一些实施方案中,工程化细胞不表现出一种或多种MHC I类多肽或其组分(诸如B2M)的蛋白质表达(包括没有可检测的蛋白质表达,包括如使用已知技术(例如,蛋白质印迹或质谱法)测量的)。在一些实施方案中,工程化细胞不包含一种或多种MHC I类多肽或其组分(诸如B2M)(包括没有可检测的蛋白质,包括如使用已知技术(例如,蛋白质印迹或质谱法)测量的)。在一些实施方案中,工程化细胞表现出降低的编码一种或多种MHC I类多肽或其组分(诸如B2M)的mRNA表达。在一些实施方案中,工程化细胞的编码一种或多种MHC I类多肽或其组分(诸如B2M)的mRNA表达降低至为在被工程化以降低一种或多种MHC I类多肽或其组分(诸如B2M)的mRNA表达之前的编码一种或多种MHC I类多肽或其组分(诸如B2M)的mRNA表达的水平的约60%或更低(诸如约55%或更低、50%或更低、45%或更低、40%或更低、35%或更低、30%或更低、25%或更低、20%或更低、15%或更低、10%或更低、5%或更低、4%或更低、3%或更低、2%或更低或1%或更低中的任一个)的水平。在一些实施方案中,工程化细胞的编码一种或多种MHC I类多肽或其组分(诸如B2M)的mRNA表达降低至为参考细胞或参考细胞群的mRNA表达的水平的约60%或更低(诸如约55%或更低、50%或更低、45%或更低、40%或更低、35%或更低、30%或更低、25%或更低、20%或更低、15%或更低、10%或更低、5%或更低、4%或更低、3%或更低、2%或更低或1%或更低中的任一个)的水平。在一些实施方案中,工程化细胞不表达编码一种或多种MHC I类多肽或其组分的mRNA(包括没有可检测的mRNA表达,包括如使用已知技术(例如,测序技术或PCR)测量的)。在一些实施方案中,工程化细胞不包含编码一种或多种MHC I类多肽或其组分的mRNA(包括没有可检测的mRNA,包括如使用已知技术(例如,测序技术或PCR)测量的)。在一些实施方案中,工程化细胞包含一种或多种MHC I类分子基因的基因失活或破坏。在一些实施方案中,工程化细胞包含两个等位基因中一种或多种MHC I类分子基因的基因失活或破坏。在一些实施方案中,工程化细胞包含所有等位基因中一种或多种MHC I类分子基因的基因失活或破坏。在一些实施方案中,工程化细胞是一种或多种MHC I类分子敲除或一种或多种MHC I类分子组分(诸如B2M)敲除。

[0229] 在一些实施方案中,工程化细胞包含降低的一种或多种MHC II类分子的表达,其中降低是如本文所述的,诸如相对于工程化以降低一种或多种MHC II类分子表达之前、参考细胞或参考细胞群(诸如期望的缺乏免疫原性反应的细胞)或测量值而言。在一些实施方案中,工程化细胞被工程化以降低一种或多种MHC II类多肽的细胞表面表达。在一些实施方案中,工程化细胞上的一种或多种MHC II类多肽的细胞表面表达降低至为在被工程化以降低一种或多种MHC II类多肽的细胞表面呈递之前的一种或多种MHC II类多肽细胞表面表达的水平的约60%或更低(诸如约55%或更低、50%或更低、45%或更低、40%或更低、

35%或更低、30%或更低、25%或更低、20%或更低、15%或更低、10%或更低、5%或更低、4%或更低、3%或更低、2%或更低或1%或更低中的任一个)的水平。在一些实施方案中,工程化细胞上的一种或多种MHC II类多肽的细胞表面表达降低至为参考细胞或参考细胞群上的一种或多种MHC II类多肽细胞表面表达的水平(诸如一种或多种MHC II类多肽细胞表面表达的平均量)的约60%或更低(诸如约55%或更低、50%或更低、45%或更低、40%或更低、35%或更低、30%或更低、25%或更低、20%或更低、15%或更低、10%或更低、5%或更低、4%或更低、3%或更低、2%或更低或1%或更低中的任一个)的水平。在一些实施方案中,工程化细胞上没有一种或多种MHC II类多肽的细胞表面呈递(包括没有可检测的细胞表面表达,包括如使用已知技术(例如,流式细胞术)测量的)。在一些实施方案中,工程化细胞表现出降低的一种或多种MHC II类多肽的蛋白质表达。在一些实施方案中,工程化细胞的一种或多种MHC II类多肽的蛋白质表达降低至为在被工程化以降低一种或多种MHC II类多肽的蛋白质表达之前的一种或多种MHC II类多肽蛋白质表达的水平约60%或更低(诸如约55%或更低、50%或更低、45%或更低、40%或更低、35%或更低、30%或更低、25%或更低、20%或更低、15%或更低、10%或更低、5%或更低、4%或更低、3%或更低、2%或更低或1%或更低中的任一个)的水平。在一些实施方案中,工程化细胞的MHC II类多肽的蛋白质表达降低至为在被工程化以降低一种或多种MHC II类多肽的蛋白质表达之前的一种或多种MHC II类多肽的水平约60%或更低(诸如约55%或更低、50%或更低、45%或更低、40%或更低、35%或更低、30%或更低、25%或更低、20%或更低、15%或更低、10%或更低、5%或更低、4%或更低、3%或更低、2%或更低或1%或更低中的任一个)的水平。在一些实施方案中,工程化细胞不表现出一种或多种MHC II类多肽的蛋白质表达(包括没有可检测的蛋白质表达,包括如使用已知技术(例如,蛋白质印迹或质谱法)测量的)。在一些实施方案中,工程化细胞不包含一种或多种MHC II类多肽(包括没有可检测的蛋白质,包括如使用已知技术(例如,蛋白质印迹或质谱法)测量的)。在一些实施方案中,工程化细胞表现出降低的编码一种或多种MHC II类多肽的mRNA表达。在一些实施方案中,工程化细胞的编码一种或多种MHC II类多肽的mRNA表达降低至为在被工程化以降低一种或多种MHC II类多肽的mRNA表达之前的编码一种或多种MHC II类多肽的mRNA表达的水平约60%或更低(诸如约55%或更低、50%或更低、45%或更低、40%或更低、35%或更低、30%或更低、25%或更低、20%或更低、15%或更低、10%或更低、5%或更低、4%或更低、3%或更低、2%或更低或1%或更低中的任一个)的水平。在一些实施方案中,工程化细胞的编码一种或多种MHC II类多肽的mRNA表达降低至为参考细胞或参考细胞群的mRNA表达的水平约60%或更低(诸如约55%或更低、50%或更低、45%或更低、40%或更低、35%或更低、30%或更低、25%或更低、20%或更低、15%或更低、10%或更低、5%或更低、4%或更低、3%或更低、2%或更低或1%或更低中的任一个)的水平。在一些实施方案中,工程化细胞不表达编码一种或多种MHC II类多肽的mRNA(包括没有可检测的mRNA表达,包括如使用已知技术(例如,测序技术或PCR)测量的)。在一些实施方案中,工程化细胞不包含编码一种或多种MHC II类多肽的mRNA(包括没有可检测的mRNA,包括如使用已知技术(例如,测序技术或PCR)测量的)。在一些实施方案中,工程化细胞包含一种或多种MHC II类分子基因的基因失活或破坏。在一些实施方案中,工程化细胞包含两个等位基因中一种或多种MHC II类分子基因的基因失活或破坏。在一些实施方案中,工程化细胞包含所有等位基因中一种或多种MHC II类分子的基



因失活或破坏。在一些实施方案中,工程化细胞是一种或多种MHC II类分子敲除。

#### [0230] 1.降低表达的方法

[0231] 在一些实施方案中,本文提供的细胞被修饰(诸如遗传修饰)以降低所述的一种或多种靶多核苷酸的表达。在一些实施方案中,用一种或多种修饰工程化以降低(例如消除)多核苷酸或蛋白质的表达的细胞是如本文所述的任何源细胞。在一些实施方案中,源细胞是本文所述的任何细胞。在某些实施方案中,本文公开的细胞(例如,原代细胞)包含一种或多种修饰(诸如遗传修饰)以降低一种或多种靶多核苷酸的表达。一种或多种靶多核苷酸的非限制性实例包括如上所述的任何一种,诸如一种或多种MHC I类分子或其组分、一种或多种MHC II类分子、CIITA、B2M、NLRC5、HLA-A、HLA-B、HLA-C、LRC5、RFX-ANK、RFX5、RFX-AP、NFY-A、NFY-B、NFY-C、IRF1和TAP1。在一些实施方案中,将降低一种或多种靶多核苷酸表达的一种或多种修饰(诸如遗传修饰)与增加所需转基因(诸如本文所述的任何一种)的表达的一种或多种修饰组合。在一些实施方案中,一种或多种修饰(诸如遗传修饰)产生为免疫豁免细胞或低免疫原性细胞的工程化细胞。通过调节(例如,降低或缺失)一个或多个靶多核苷酸的表达,此类细胞在植入到受体受试者中时表现出减少的免疫活化。在一些实施方案中,细胞被认为是低免疫原性的,例如,在施用后在受体受试者或患者中。

[0232] 可以使用用于降低靶多核苷酸表达的任何方法。在一些实施方案中,修饰(例如,遗传修饰)导致靶多核苷酸的表达永久消除或降低。例如,在一些实施方案中,通过在靶多核苷酸中引入DNA断裂(诸如通过使用靶向核酸内切酶)来破坏靶多核苷酸或基因。在其他实施方案中,修饰(例如,遗传修饰)导致靶多核苷酸的表达瞬时降低。例如,在一些实施方案中,使用与靶多核苷酸互补的抑制性核酸以选择性抑制或阻遏基因的表达(例如使用反义技术,诸如通过RNA干扰(RNAi)、短干扰RNA(siRNA)、短发夹(shRNA)和/或核酶)来实现基因阻遏。

[0233] 在一些实施方案中,靶多核苷酸序列是基因组序列。在一些实施方案中,靶多核苷酸序列是人基因组序列。在一些实施方案中,靶多核苷酸序列是哺乳动物基因组序列。在一些实施方案中,靶多核苷酸序列是脊椎动物基因组序列。

[0234] 在一些实施方案中,任何基因编辑技术都可以用于降低所述的一种或多种靶多核苷酸或靶蛋白的表达。在一些实施方案中,基因编辑技术可以包括涉及核酸酶、整合酶、转座酶、重组酶的系统。在一些实施方案中,基因编辑技术可以用于基因的敲除或敲低。在一些实施方案中,基因编辑技术可以用于将DNA敲入或整合到基因组的区域中。在一些实施方案中,基因编辑技术介导单链断裂(SSB)。在一些实施方案中,基因编辑技术介导双链断裂(DSB),包括与非同源末端连接(NHEJ)或同源定向修复(HDR)结合。在一些实施方案中,基因编辑技术可以包括基于DNA的编辑或引导编辑。在一些实施方案中,基因编辑技术可以包括经由位点特异性靶向元件的可编程添加(PASTE)。

[0235] 在一些实施方案中,通常以靶向方式通过诱导基因中的一个或多个双链断裂和/或一个或多个单链断裂来进行基因破坏。在一些实施方案中,双链或单链断裂由核酸酶(例如核酸内切酶,诸如基因靶向核酸酶)产生。在一些实施方案中,靶向核酸酶选自锌指核酸酶(ZFN)、转录活化因子样效应物核酸酶(TALEN)和RNA指导的核酸酶诸如CRISPR相关核酸酶(Cas),其是针对基因或其部分的序列专门设计的。在一些实施方案中,靶向核酸酶产生双链或单链断裂,然后通过易错非同源末端连接(NHEJ)进行修复,或者在一些情况下,通过

使用模板的精确同源定向修复 (HDR) 进行修复。在一些实施方案中,靶向核酸酶产生DNA双链断裂 (DSB)。在一些实施方案中,产生和修复断裂的过程通常容易出错并导致来自NHEJ修复的DNA碱基的插入和缺失(插入缺失)。在一些实施方案中,遗传修饰可以诱导靶基因的核苷酸序列的缺失、插入或突变。在一些情况下,遗传修饰可能导致移码突变,其可以导致提前终止密码子。在核酸酶介导的基因编辑的实例中,靶向编辑发生在基因的两个等位基因上,导致基因的双等位基因破坏或编辑。在一些实施方案中,基因编辑靶向基因的所有等位基因。在一些实施方案中,用靶向核酸酶进行遗传修饰(诸如使用CRISPR/Cas系统)导致基因的完全敲除。

[0236] 在一些实施方案中,将核酸酶(诸如罕见切割核酸内切酶)引入到含有靶多核苷酸序列的细胞中。核酸酶可以以编码核酸酶的核酸的形式引入细胞中。将核酸引入细胞中的过程可以通过任何合适的技术来实现。合适的技术包括磷酸钙或脂质介导的转染、电穿孔和使用病毒载体进行的转导或感染。在一些实施方案中,引入到细胞中的核酸是DNA。在一些实施方案中,核酸酶以蛋白质的形式引入细胞中。例如,在CRISPR/Cas系统的情况下,可以将核糖核蛋白(RNP)引入细胞中。

[0237] 在一些实施方案中,使用CRISPR/Cas系统进行修饰(例如,遗传修饰)。可以使用能够改变细胞中的靶多核苷酸序列的任何CRISPR/Cas系统。此类CRISPR-Cas系统可以采用多种Cas蛋白(Haft等人,PLoS Comput Biol.2005;1(6)e60)。此类Cas蛋白的允许CRISPR/Cas系统改变细胞中的靶多核苷酸序列的分子机制包括RNA结合蛋白、核酸内切酶和外切酶、解旋酶和聚合酶。在一些实施方案中,CRISPR/Cas系统是I型CRISPR系统。在一些实施方案中,CRISPR/Cas系统是II型CRISPR系统。在一些实施方案中,CRISPR/Cas系统是V型CRISPR系统。

[0238] CRISPR/Cas系统包括可以用于改变细胞中的任何靶多核苷酸序列的靶向系统。在一些实施方案中,本文提供的CRISPR/Cas系统包括Cas蛋白和能够将Cas蛋白引导到靶多核苷酸序列的靶基序并与其杂交的一种或多种(诸如至少一种至两种)核糖核酸(例如,指导RNA(gRNA))。

[0239] 在一些实施方案中,Cas蛋白包含一个或多个氨基酸取代或修饰。在一些实施方案中,一个或多个氨基酸取代包括保守氨基酸取代。在一些情况下,取代和/或修饰可以防止或减少蛋白水解降解和/或延长多肽在细胞中的半衰期。在一些实施方案中,Cas蛋白可以包含肽键替换(例如,脲、硫脲、氨基甲酸酯、磺酰脲等)。在一些实施方案中,Cas蛋白可以包含天然存在的氨基酸。在一些实施方案中,Cas蛋白可以包含替代氨基酸(例如,D-氨基酸、 $\beta$ -氨基酸、同型半胱氨酸、磷酸丝氨酸等)。在一些实施方案中,Cas蛋白可以包含修饰以包括部分(例如,聚乙二醇化、糖基化、脂化、乙酰化、封端等)。

[0240] 在一些实施方案中,Cas蛋白包含核心Cas蛋白。示例性Cas核心蛋白包括但不限于Cas1、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、Cas9、Cas12a和Cas13。在一些实施方案中,Cas蛋白包含大肠杆菌亚型的Cas蛋白(也称为CASS2)。大肠杆菌亚型的示例性Cas蛋白包括但不限于Cse1、Cse2、Cse3、Cse4和Cas5e。在一些实施方案中,Cas蛋白包含Ypest亚型的Cas蛋白(也称为CASS3)。Ypest亚型的示例性Cas蛋白包括但不限于Csy1、Csy2、Csy3和Csy4。在一些实施方案中,Cas蛋白包含Nmeni亚型的Cas蛋白(也称为CASS4)。Nmeni亚型的示例性Cas蛋白包括但不限于Csn1和Csn2。在一些实施方案中,Cas蛋白包含Dvulg亚型的Cas蛋白

(也称为CASS1)。Dvu1g亚型的示例性Cas蛋白包括Csd1、Csd2和Cas5d。在一些实施方案中,Cas蛋白包含Tneap亚型的Cas蛋白(也称为CASS7)。Tneap亚型的示例性Cas蛋白包括但不限于Cst1、Cst2、Cas5t。在一些实施方案中,Cas蛋白包含Hmari亚型的Cas蛋白。Hmari亚型的示例性Cas蛋白包括但不限于Csh1、Csh2和Cas5h。在一些实施方案中,Cas蛋白包含Apern亚型的Cas蛋白(也称为CASS5)。Apern亚型的示例性Cas蛋白包括但不限于Csa1、Csa2、Csa3、Csa4、Csa5和Cas5a。在一些实施方案中,Cas蛋白包含Mtube亚型的Cas蛋白(也称为CASS6)。Mtube亚型的示例性Cas蛋白包括但不限于Csm1、Csm2、Csm3、Csm4和Csm5。在一些实施方案中,Cas蛋白包括RAMP模块Cas蛋白。示例性RAMP模块Cas蛋白包括但不限于Cmr1、Cmr2、Cmr3、Cmr4、Cmr5和Cmr6。参见,例如,Klompe等人,Nature 571,219-225(2019);Strecker等人,Science365,48-53(2019)。

[0241] 在一些实施方案中,用于遗传修饰细胞以敲除、敲低或以其他方式修饰一个或多个基因的方法包括使用定点核酸酶,包括例如锌指核酸酶(ZFN)、转录活化因子样效应物核酸酶(TALEN)、大范围核酸酶、转座酶和成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)/Cas系统。

[0242] ZFN是包含一系列位点特异性DNA结合结构域的融合蛋白,所述结构域改编自附接至细菌FokI限制酶的核酸内切酶结构域的含锌指转录因子。ZFN可具有一个或多个(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个)DNA结合结构域或锌指结构域。参见,例如,Carroll等人,Genetics Society of America(2011)188:773-782;Kim等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA(1996)93:1156-1160。每个锌指结构域都是被一个或多个锌离子稳定的小蛋白质结构基序,并且通常识别3至4bp的DNA序列。因此,串联结构域可以潜在地与细胞基因组中独特的延伸核苷酸序列结合。

[0243] 可以组合特异性已知的各种锌指以产生识别约6、9、12、15或18bp序列的多指多肽。各种选择和模块化组装技术可用于生成识别特定序列的锌指(及其组合),包括噬菌体展示、酵母单杂交系统、细菌单杂交和双杂交系统以及哺乳动物细胞。可以对锌指进行工程化以结合预定的核酸序列。工程化锌指以结合预定核酸序列的标准是本领域已知的。参见,例如,Sera等人,Biochemistry(2002)41:7074-7081;Liu等人,Bioinformatics(2008)24:1850-1857。

[0244] 含有FokI核酸酶结构域或其他二聚核酸酶结构域的ZFN用作二聚体。因此,需要一对ZFN来靶向非回文DNA位点。两个单独的ZFN必须通过适当间隔开的核酸酶结合DNA的相反链。参见Bitinaite等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA(1998)95:10570-10575。为了切割基因组中的指定位点,设计了一对ZFN以识别侧接所述位点的两个序列,一个在正向链上,而另一个在反向链上。当ZFN在所述位点的任一侧结合后,核酸酶结构域二聚化并且切割所述位点处的DNA,从而生成具有5'突出端的DSB。然后可以借助含有被同源臂侧接的期望突变的修复模板,利用HDR来引入特定突变。修复模板通常是引入到细胞中的外源双链DNA载体。参见Miller等人,Nat.Biotechnol.(2011)29:143-148;Hockemeyer等人,Nat.Biotechnol.(2011)29:731-734。

[0245] TALEN是可以用于编辑靶基因的人工核酸酶的另一个实例。TALEN来源于被称为TALE重复序列的DNA结合结构域,它通常包含具有10至30个重复序列的串联阵列,所述重复序列结合并识别延伸的DNA序列。每个重复序列长度为33至35个氨基酸,两个相邻的氨基酸(称为重复可变双残基或RVD)赋予四个DNA碱基对之一的特异性。因此,重复序列与靶DNA序

列中的碱基对之间存在一一对应关系。

[0246] 通过将一个或多个TALE DNA结合结构域(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个)融合至核酸酶结构域(例如FokI核酸内切酶结构域)而人工产生TALEN。参见Zhang, *Nature Biotech.* (2011) 29:149-153。为了在TALEN中使用,已经对FokI进行了若干种突变;例如,这些改善了切割特异性或活性。参见Cermak等人, *Nucl. Acids Res.* (2011) 39:e82; Miller等人, *Nature Biotech.* (2011) 29:143-148; Hockemeyer等人, *Nature Biotech.* (2011) 29:731-734; Wood等人, *Science* (2011) 333:307; Doyon等人, *Nature Methods* (2010) 8:74-79; Szczepek等人, *Nature Biotech* (2007) 25:786-793; Guo等人, *J. Mol. Biol.* (2010) 200:96。FokI结构域用作二聚体,需要具有独特的DNA结合结构域的两个构建体,用于靶基因组中的具有正确的方向和间距的位点。TALE DNA结合结构域与FokI核酸酶结构域之间的氨基酸残基数量以及两个单独的TALEN结合位点之间的碱基数量似乎都是实现高水平活性的重要参数。Miller等人, *Nature Biotech.* (2011) 29:143-148。

[0247] 通过将工程化TALE重复序列与核酸酶结构域相组合,可以产生对任何期望的DNA序列具有特异性的位点特异性核酸酶。与ZFN类似,可以将TALEN引入到细胞中以在基因组中的期望靶位点生成DSB,因此TALEN可以用于以类似的HDR介导的途径敲除基因或敲入突变。参见Boch, *Nature Biotech.* (2011) 29:135-136; Boch等人, *Science* (2009) 326:1509-1512; Moscou等人, *Science* (2009) 326:3501。

[0248] 大范围核酸酶是内切核酸酶家族中的酶,其特征不在于它们识别并切割大DNA序列(14至40个碱基对)的能力。基于大范围核酸酶的影响核酸酶活性和/或DNA识别的结构基序,将大范围核酸酶分为多个家族。最广泛和最有名的大范围核酸酶是LAGLIDADG家族中的蛋白质,其名称来源于保守的氨基酸序列。参见Chevalier等人, *Nucleic Acids Res.* (2001) 29(18):3757-3774。另一方面,GIY-YIG家族成员具有GIY-YIG模块,其长度为70-100个残基,并且包括具有四个不变残基的四个或五个保守序列基序,其中两个是活性所需的。参见Van Roey等人, *Nature Struct. Biol.* (2002) 9:806-811。His-Cys家族大范围核酸酶的特征在于在涵盖数百个氨基酸残基的区域中的一系列高度保守的组氨酸和半胱氨酸。参见Chevalier等人, *Nucleic Acids Res.* (2001) 29(18):3757-3774。NHN家族的成员由含有被天冬酰胺残基包围的两对保守组氨酸的基序定义。参见Chevalier等人, *Nucleic Acids Res.* (2001) 29(18):3757-3774。

[0249] 由于高特异性要求,鉴定特定靶DNA序列的天然大范围核酸酶的机会较低,因此已使用各种方法(包括诱变和高通量筛选方法)来创建识别独特序列的大范围核酸酶变体。用于对具有改变的DNA结合特异性的大范围核酸酶进行工程化(例如,以结合预定核酸序列)的策略是本领域已知的。参见,例如,Chevalier等人, *Mol. Cell.* (2002) 10:895-905; Epinat等人, *Nucleic Acids Res* (2003) 31:2952-2962; Silva等人, *J Mol. Biol.* (2006) 361:744-754; Seligman等人, *Nucleic Acids Res* (2002) 30:3870-3879; Sussman等人, *J Mol Biol* (2004) 342:31-41; Doyon等人, *J Am Chem Soc* (2006) 128:2477-2484; Chen等人, *Protein Eng Des Sel* (2009) 22:249-256; Arnould等人, *J Mol Biol.* (2006) 355:443-458; Smith等人, *Nucleic Acids Res.* (2006) 363(2):283-294。

[0250] 与ZFN和TALEN一样,大范围核酸酶可以在基因组DNA中产生DSB,如果修复不当(例如,经由NHEJ),它可以产生移码突变,从而导致靶基因在细胞中的表达降低。或者,可以将

外来DNA与大范围核酸酶一起引入到细胞中。根据外来DNA的序列和染色体序列,此过程可用于修饰靶基因。参见Silva等人,Current Gene Therapy (2011) 11:11-27。

[0251] 转座酶是结合转座子的末端并且通过剪切和粘贴机制或复制性转座机制催化其移动到基因组另一部分的酶。通过将转座酶连接至其他系统(诸如CRISPER/Cas系统),可以开发新的基因编辑工具以实现基因组DNA的位点特异性插入或操作。有两种已知的使用转座子的DNA整合方法,其使用催化无活性的Cas效应蛋白和Tn7样转座子。转座酶依赖性DNA整合不在基因组中引发DSB,这可以保证更安全和更具特异性的DNA整合。

[0252] CRISPR系统作为提供一种获得性免疫的参与防御入侵噬菌体和质粒的系统最初在原核生物(例如,细菌和古细菌)中发现。现在它已被改编并用作研究和临床应用中流行的基因编辑工具。

[0253] CRISPR/Cas系统通常包含至少两种组件:一个或多个指导RNA(gRNA)和Cas蛋白。Cas蛋白是一种将DSB引入到靶位点中的核酸酶。CRISPR-Cas系统有两大类:1类系统使用多种Cas蛋白的复合物来降解核酸;2类系统使用单一Cas蛋白来达到相同目的。1类分为I、III和IV型;2类分为II、V和VI型。适用于基因编辑应用的不同Cas蛋白包括但不限于Cas3、Cas4、Cas5、Cas8a、Cas8b、Cas8c、Cas9、Cas10、Cas12、Cas12a(Cpf1)、Cas12b(C2c1)、Cas12c(C2c3)、Cas12d(CasY)、Cas12e(CasX)、Cas12f(C2c10)、Cas12g、Cas12h、Cas12i、Cas12k(C2c5)、Cas13、Cas13a(C2c2)、Cas13b、Cas13c、Cas13d、C2c4、C2c8、C2c9、Cmr5、Cse1、Cse2、Csf1、Csm2、Csn2、Csx10、Csx11、Csy1、Csy2、Csy3和Mad7。最广泛使用的Cas9是II型Cas蛋白,并且在本文中被描述为说明性的。这些Cas蛋白可以来源于不同的来源物种。例如,Cas9可以来源于化脓性链球菌(*S. pyogenes*)或金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)。

[0254] 在原始微生物基因组中,II型CRISPR系统将来自入侵DNA的序列掺入到宿主基因组内编码为阵列的CRISPR重复序列之间。来自CRISPR重复序列阵列的转录物被加工成CRISPR RNA(crRNA),每个都具有从入侵DNA转录的可变序列(称为“原型间隔区”序列),以及CRISPR重复序列的一部分。每个crRNA与第二反式活化CRISPR RNA(tracrRNA)杂交,并且这两个RNA与Cas9核酸酶形成复合物。crRNA的原型间隔区编码部分指导Cas9复合物切割互补的靶DNA序列,前提条件是它们与被称作“原型间隔区相邻基序”(PAM)的短序列相邻。

[0255] 自发现以来,CRISPR系统已被改编用于在从细菌到真核细胞(包括人类细胞)的广泛细胞和生物体中诱导序列特异性DSB和靶向基因组编辑。在基因编辑应用的用途中,人工设计的合成gRNA已经替代了原始的crRNA:tracrRNA复合物。例如,gRNA可以是由crRNA、四环和tracrRNA构成的单一指导RNA(sgRNA)。crRNA通常包含互补区域(也称为间隔区,长度通常为约20个核苷酸),其经过用户设计以识别感兴趣的靶DNA。tracrRNA序列包含用于Cas核酸酶结合的支架区域。crRNA序列和tracrRNA序列通过四环连接,每个都具有用于彼此杂交的短重复序列,因此生成嵌合sgRNA。可以通过简单地改变gRNA中存在的间隔区或互补区域序列来改变Cas核酸酶的基因组靶标。互补区域将通过标准的RNA-DNA互补碱基配对规则将Cas核酸酶引导至靶DNA位点。

[0256] 为了使Cas核酸酶发挥作用,紧邻基因组DNA中的靶序列的下游必须有PAM的存在。Cas蛋白对PAM的识别被认为会破坏相邻基因组序列的稳定性,从而允许gRNA询问序列并且在存在匹配序列时导致gRNA-DNA配对。PAM的特定序列因Cas基因的种类而异。例如,最常用的来源于化脓性链球菌的Cas9核酸酶识别5'-NGG-3'的PAM序列,或者以较低的效率识别

5'-NAG-3',其中“N”可以是任何核苷酸。具有替代PAM的其他Cas核酸酶变体也已经表征并成功用于基因组编辑,所述变体总结在下表1a中。

[0257] 表1a. 示例性Cas核酸酶变体及其PAM序列

CRISPR 核酸酶	来源生物体	PAM 序列(5'→3')
SpCas9	化脓性链球菌	NGG 或 NAG
SaCas9	金黄色葡萄球菌	NGRRT 或 NGRRN
NmeCas9	脑膜炎奈瑟氏菌( <i>Neisseria meningitidis</i> )	NNNNGATT
CjCas9	空肠弯曲杆菌( <i>Campylobacter jejuni</i> )	NNNNRYAC
StCas9	嗜热链球菌( <i>Streptococcus thermophilus</i> )	NNAGAAW
[0258] TdCas9	齿垢密螺旋体( <i>Treponema denticola</i> )	NAAAAC
LbCas12a (Cpf1)	毛螺菌科细菌 ( <i>Lachnospiraceae bacterium</i> )	TTTV
AsCas12a (Cpf1)	氨基酸球菌属某种 ( <i>Acidaminococcus sp.</i> )	TTTV
AacCas12b	嗜热脂环酸芽胞杆菌 ( <i>Alicyclobacillus acidiphilus</i> )	TTN
BhCas12b v4	外村尚芽胞杆菌( <i>Bacillus hisashii</i> )	ATTN、TTTN 或 GTTN

[0259] R=A或G;Y=C或T;W=A或T;V=A或C或G;N=任何碱基

[0260] 在一些实施方案中,Cas核酸酶可包含一个或多个突变以改变它们的活性、特异性、识别和/或其他特征。例如,Cas核酸酶可具有一个或多个突变,所述突变改变其保真度以减轻脱靶效应(例如,SpCas9的eSpCas9、SpCas9-HF1、HypaSpCas9、HeFSpCas9和evoSpCas9高保真变体)。再例如,Cas核酸酶可以具有一个或多个改变其PAM特异性的突变。

[0261] 在一些实施方案中,Cas蛋白包括本文所述的Cas蛋白中的任一种或其功能部分。如本文所用,“功能部分”是指肽的一部分,其保留其与至少一种核糖核酸(例如,指导RNA(gRNA))复合并且切割靶多核苷酸序列的能力。在一些实施方案中,功能部分包含可操作地连接的Cas9蛋白功能结构域的组合,所述Cas9蛋白功能结构域选自由DNA结合结构域、至少一个RNA结合结构域、解旋酶结构域和核酸内切酶结构域组成的组。在一些实施方案中,功能部分包含可操作地连接的Cas12a(也称为Cpf1)蛋白功能结构域的组合,所述Cas12a蛋白功能结构域选自由DNA结合结构域、至少一个RNA结合结构域、解旋酶结构域和核酸内切酶结构域组成的组。在一些实施方案中,功能结构域形成复合物。在一些实施方案中,Cas9蛋白的功能部分包含RuvC样结构域的功能部分。在一些实施方案中,Cas9蛋白的功能部分包含HNH核酸酶结构域的功能部分。在一些实施方案中,Cas12a蛋白的功能部分包含RuvC样结构域的功能部分。

[0262] 在一些实施方案中,合适的Cas蛋白包括但不限于Cas0、Cas12a(即Cpf1)、Cas12b、Cas12i、CasX和Mad7。

[0263] 在一些实施方案中,可以将外源Cas蛋白以多肽形式引入到细胞中。在某些实施方

案中,可以将Cas蛋白缀合或融合至细胞穿透多肽或细胞穿透肽。如本文所用,“细胞穿透多肽”和“细胞穿透肽”分别指代促进分子摄取到细胞中的多肽或肽。细胞穿透多肽可以含有可检测标记。

[0264] 在某些实施方案中,可以将Cas蛋白缀合或融合至带电蛋白(例如,其携带正电荷、负电荷或整体中性电荷)。此类连接可以是共价的。在一些实施方案中,可以将Cas蛋白融合至超正电荷GFP以显著增加Cas蛋白穿透细胞的能力(Cronican等人ACS Chem Biol.2010;5(8):747-52)。在某些实施方案中,可以将Cas蛋白融合至蛋白转导结构域(PTD)以促进其进入细胞。示例性PTD包括Tat、寡精氨酸和穿透肽。在一些实施方案中,Cas9蛋白包含融合至细胞穿透肽的Cas9多肽。在一些实施方案中,Cas9蛋白包含融合至PTD的Cas9多肽。在一些实施方案中,Cas9蛋白包含融合至tat结构域的Cas9多肽。在一些实施方案中,Cas9蛋白包含与寡精氨酸结构域融合的Cas9多肽。在一些实施方案中,Cas9蛋白包含与穿透肽结构域融合的Cas9多肽。在一些实施方案中,Cas9蛋白包含融合至超正电荷GFP的Cas9多肽。在一些实施方案中,Cas12a蛋白包含融合至细胞穿透肽的Cas12a多肽。在一些实施方案中,Cas12a蛋白包含融合至PTD的Cas12a多肽。在一些实施方案中,Cas12a蛋白包含融合至tat结构域的Cas12a多肽。在一些实施方案中,Cas12a蛋白包含与寡精氨酸结构域融合的Cas12a多肽。在一些实施方案中,Cas12a蛋白包含与穿透肽结构域融合的Cas12a多肽。在一些实施方案中,Cas12a蛋白包含融合至超正电荷GFP的Cas12a多肽。

[0265] 在一些实施方案中,可以将Cas蛋白以编码Cas蛋白的核酸的形式引入含有靶多核苷酸序列的细胞中。将核酸引入细胞中的过程可以通过任何合适的技术来实现。合适的技术包括磷酸钙或脂质介导的转染、电穿孔和使用病毒载体进行的转导或感染。在一些实施方案中,核酸包含DNA。在一些实施方案中,核酸包含如本文所述的修饰的DNA。在一些实施方案中,核酸包含mRNA。在一些实施方案中,核酸包含如本文所述的修饰的mRNA(例如,合成的修饰mRNA)。

[0266] 在一些实施方案中,Cas蛋白与一种至两种核糖核酸(例如,指导RNA(gRNA))复合。在一些实施方案中,Cas蛋白与两种核糖核酸复合。在一些实施方案中,Cas蛋白与一种核糖核酸复合。在一些实施方案中,Cas蛋白由如本文所述的修饰的核酸(例如,合成的修饰mRNA)编码。

[0267] 在提供的实施方案中,CRISPR/Cas系统通常包括两种组分:一种或多种指导RNA(gRNA)和Cas蛋白。在一些实施方案中,Cas蛋白与一种或多种(诸如一种至两种)核糖核酸(例如,指导RNA(gRNA))复合。在一些实施方案中,Cas蛋白与两种核糖核酸复合。在一些实施方案中,Cas蛋白与一种核糖核酸复合。在一些实施方案中,Cas蛋白由如本文所述的修饰的核酸(例如,合成的修饰mRNA)编码。

[0268] 在一些实施方案中,gRNA是由用于Cas结合的支架序列和用户设计的间隔区或指定为crRNA的互补部分组成的短合成RNA。crRNA由限定待修饰的基因组靶标的crRNA靶向序列(下文也称为gRNA靶向序列;长度通常为约20个核苷酸)和crRNA重复序列的区域(例如GUUUUAGAGCUA;SEQ ID NO:23)组成。可以通过简单地改变gRNA中存在的互补部分序列(例如gRNA靶向序列)来改变Cas蛋白的基因组靶标。在一些实施方案中,用于Cas结合的支架序列由通过其抗重复序列与crRNA杂交的tracrRNA序列(例如UAGCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAA AGUGGCACCGAGUCGGUGCUUU;SEQ ID NO:24)组成。crRNA:tracrRNA之间的

复合物募集Cas核酸酶(例如Cas9)并切割原型间隔区相邻基序(PAM)的上游。为了使Cas蛋白发挥作用,紧邻基因组DNA中的靶序列的下游必须有PAM。Cas蛋白对PAM的识别被认为会使相邻基因组序列不稳定,从而允许gRNA询问序列并且在存在匹配序列时导致gRNA-DNA配对。PAM的特定序列因Cas基因的种类而异。例如,最常用的来源于化脓性链球菌的Cas9核酸酶识别NGG的PAM序列。具有替代PAM的其他Cas9变体和其他核酸酶也已经表征并成功用于基因组编辑。因此,CRISPR/Cas系统可以用于在指定基因组基因座创建靶向DSB,其与为靶基因座设计的gRNA互补。crRNA和tracrRNA可以用环序列(例如四环;GAAA,SEQ ID NO:25)连接在一起用于生成作为嵌合单指导RNA的gRNA(sgRNA;Hsu等人2013)。sgRNA可以生成用于基于DNA的表达或通过化学合成来生成。

[0269] 在一些实施方案中,gRNA的互补部分序列(例如gRNA靶向序列)将根据感兴趣的靶位点而变化。在一些实施方案中,gRNA包含对表1b中列出的基因序列具有特异性的互补部分。在一些实施方案中,gRNA靶向的基因组基因座位于所述的任何基因座的4000bp内、3500bp内、3000bp内、2500bp内、2000bp内、1500bp内、1000bp内或500bp内。

[0270] 本文公开的方法考虑使用能够将Cas蛋白引导至靶多核苷酸序列的靶基序并与其杂交的任何核糖核酸。在一些实施方案中,至少一种核糖核酸包含tracrRNA。在一些实施方案中,至少一种核糖核酸包含CRISPR RNA(crRNA)。在一些实施方案中,单个核糖核酸包含将Cas蛋白引导到细胞中的靶多核苷酸序列的靶基序并与其杂交的指导RNA。在一些实施方案中,至少一种核糖核酸包含将Cas蛋白引导到细胞中的靶多核苷酸序列的靶基序并与其杂交的指导RNA。在一些实施方案中,一种至两种核糖核酸均包含将Cas蛋白引导至细胞中的靶多核苷酸序列的靶基序并与其杂交的指导RNA。如本领域技术人员将理解的,可以选择本文提供的核糖核酸与多种不同的靶基序杂交,这取决于采用的特定CRISPR/Cas系统和靶多核苷酸的序列。还可以选择一种至两种核糖核酸以最大程度的减少与除靶多核苷酸序列之外的核酸序列的杂交。在一些实施方案中,当与细胞中的所有其他基因组核苷酸序列相比时,一种至两种核糖核酸与含有至少两个错配的靶基序杂交。在一些实施方案中,当与细胞中的所有其他基因组核苷酸序列相比时,一种至两种核糖核酸与含有至少一个错配的靶基序杂交。在一些实施方案中,一种至两种核糖核酸被设计成与紧邻被Cas蛋白识别的脱氧核糖核酸基序的靶基序杂交。在一些实施方案中,一种至两种核糖核酸中的每一种被设计为与紧邻由Cas蛋白识别的脱氧核糖核酸基序的靶基序杂交,所述脱氧核糖核酸基序侧接位于靶基序之间的突变等位基因。在一些实施方案中,一种至两种核糖核酸中的每一种包含将Cas蛋白引导到细胞中的靶多核苷酸序列的靶基序并与其杂交的指导RNA。

[0271] 在一些实施方案中,一种或两种核糖核酸(例如,指导RNA)与靶多核苷酸序列的相同链上的序列互补和/或杂交。在一些实施方案中,一种或两种核糖核酸(例如,指导RNA)与靶多核苷酸序列的相反链上的序列互补和/或杂交。在一些实施方案中,一种或两种核糖核酸(例如,指导RNA)不与靶多核苷酸序列的相反链上的序列互补和/或杂交。在一些实施方案中,一种或两种核糖核酸(例如,指导RNA)与靶多核苷酸序列的重叠靶基序互补和/或杂交。在一些实施方案中,一种或两种核糖核酸(例如,指导RNA)与靶多核苷酸序列的补偿靶基序互补和/或杂交。

[0272] 在一些实施方案中,经由病毒转导(例如,慢病毒转导)将编码Cas蛋白的核酸和编码至少一种至两种核糖核酸的核酸引入细胞中。在一些实施方案中,Cas蛋白与1-2种核糖



核酸复合。在一些实施方案中,Cas蛋白与两种核糖核酸复合。在一些实施方案中,Cas蛋白与一种核糖核酸复合。在一些实施方案中,Cas蛋白由如本文所述的修饰的核酸(例如,合成的修饰mRNA)编码。

[0273] 可用于本文所述的基于CRISPR/Cas的基因靶向的示例性gRNA靶向序列在表1b中提供。所述序列可见于2016年5月9日提交的W02016183041,包括表、附录和序列表的公开内容通过引用整体并入本文。

[0274] 表1b. 可用于靶向基因的示例性gRNA靶向序列

基因名称	SEQ ID NO:	WO2016183041
HLA-A	SEQ ID NO: 2-1418	表 8, 附录 1
HLA-B	SEQ ID NO: 1419-3277	表 9, 附录 2
HLA-C	SEQ ID NO:3278-5183	表 10, 附录 3
RFX-ANK	SEQ ID NO: 95636-102318	表 11, 附录 4
NFY-A	SEQ ID NO: 102319-121796	表 13, 附录 6
RFX5	SEQ ID NO: 85645-90115	表 16, 附录 9
RFX-AP	SEQ ID NO: 90116-95635	表 17, 附录 10
[0275] NFY-B	SEQ ID NO: 121797-135112	表 20, 附录 13
NFY-C	SEQ ID NO: 135113-176601	表 22, 附录 15
IRF1	SEQ ID NO: 176602-182813	表 23, 附录 16
TAP1	SEQ ID NO: 182814-188371	表 24, 附录 17
CIITA	SEQ ID NO:5184-36352	表 12, 附录 5
B2M	SEQ ID NO:81240-85644	表 15, 附录 8
NLRC5	SEQ ID NO:36353-81239	表 14, 附录 7
CD47	SEQ ID NO:200784-231885	表 29, 附录 22
HLA-E	SEQ ID NO:189859-193183	表 19, 附录 12
HLA-F	SEQ ID NO:688808-699754	表 45, 附录 38
[0276] HLA-G	SEQ ID NO:188372-189858	表 18, 附录 11
PD-L1	SEQ ID NO:193184-200783	表 21, 附录 14

[0277] 在一些实施方案中,鉴定用于遗传破坏方法以降低或消除所述的基因表达的新基因座和/或gRNA靶向序列在技术人员的水平之内。例如,对于CRISPR/Cas系统,当已知针对特定基因座(例如,在靶基因(例如表1b中列出)内)的现有gRNA靶向序列时,可以使用“一寸蠕虫(inch worming)”方法通过针对PAM序列扫描基因座任一侧上的侧翼区域来鉴定靶向插入转基因的额外基因座,通常在基因组中约每100个碱基对(bp)出现一次。PAM序列将取决于使用的特定Cas核酸酶,因为不同的核酸酶通常具有不同的对应PAM序列。基因座任一侧上的侧翼区域可以是约500至4000bp长,例如约500bp、约1000bp、约1500bp、约2000bp、约2500bp、约3000bp、约3500bp、或约4000bp长。当在搜索范围内鉴定出PAM序列时,可以根据此基因座的序列设计新的指导物,用于遗传破坏方法。尽管CRISPR/Cas系统被描述为说明性的,但所述的任何基因编辑方法都可以用于这种鉴定新基因座的方法,包括使用ZFN、TALEN、大范围核酸酶和转座酶的方法。

[0278] 可用于本文所述的基于CRISPR/Cas的基因靶向的额外的示例性Cas9指导RNA序列在表2中提供。

[0279] 表2.可用于靶向基因的额外示例性Cas9指导RNA序列

基因	指导序列	PAM	靶位点	gRNA 切割位置	SEQ ID NO
ABO	UCUCUCCAUGU GCAGUAGGA	AGG	外显子 7	chr9:133,257,541	29
FUT1	CUGGAUGUCGG AGGAGUACG	CGG	外显子 4	chr19:48,750,822	30
RHD	GUCUCCGAAA CUCGAGGUG	AGG	外显子 2	chr1:25,284,622	31
F3 (CD142)	ACAGUGUAGAC UUGAUUGAC	GGG	外显子 2	chr1:94,540,281	32
B2M	CGUGAGUAAAC CUGAAUCUU	TGG	外显子 2	chr15:44,715,434	33
CIITA	GAUUAUUGGCAU AAGCCUCCC	TGG	外显子 3	chr16:10,895,747	34
TRAC	AGAGUCUCUCA GCUGGUACA	CGG	外显子 1	chr14:22,5547,533	35

[0282] 在一些实施方案中,使用转录活化因子样效应物核酸酶 (TALEN) 方法来制备本文所述的细胞。“TALE核酸酶” (TALEN) 意指由通常来源于转录活化因子样效应物 (TALE) 的核酸结合结构域和一个核酸酶催化结构域组成的用以切割核酸靶序列的融合蛋白。催化结构域优选地是核酸酶结构域,并且更优选地是具有核酸内切酶活性的结构域,例如I-TevI、ColE7、NucA和Fok-I。在一个特定实施方案中,可以将TALE结构域与大范围核酸酶例如I-CreI和I-OnuI或其功能变体融合。在更优选的实施方案中,所述核酸酶是单体TALE核酸酶。单体TALE核酸酶是不需要二聚化来进行特异性识别和切割的TALE核酸酶,诸如在W02012138927中描述的工程化的TAL重复序列与I-TevI的催化结构域的融合物。转录活化因子样效应物 (TALE) 是来自细菌物种黄单胞菌属 (*Xanthomonas*) 的蛋白质,其包含多个重复序列,每个重复序列包含对核酸靶向序列的每个核苷酸碱基具有特异性的位置12和13中的二残基 (RVD)。具有相似模块化逐碱基核酸结合性质 (MBBBD) 的结合结构域也可以来源于申请人最近在不同细菌物种中发现的新模块化蛋白。新模块化蛋白具有比TAL重复序列显示更多序列可变性的优势。优选地,与识别不同核苷酸相关的RVD是用于识别C的HD;用于识别T的NG;用于识别A的NI;用于识别G或A的NN;用于识别A、C、G或T的NS;用于识别T的HG;用于识别T的IG;用于识别G的NK;用于识别C的HA;用于识别C的ND;用于识别C的HI;用于识别G的HN;用于识别G的NA;用于识别G或A的SN;和用于识别T的YG;用于识别A的TL;用于识别A或G的VT;以及用于识别A的SW。在另一个实施方案中,关键氨基酸12和13可以向其他氨基酸残基突变,以便调节其对核苷酸A、T、C和G的特异性,特别是增强这种特异性。TALEN套件在商业上出售。

[0283] 在一些实施方案中,使用锌指核酸酶 (ZFN) 对细胞进行操作。“锌指结合蛋白”是一种由于通过锌离子的配位稳定蛋白质结构而优选地以序列特异性方式结合DNA、RNA和/或蛋白质的蛋白质或多肽。术语锌指结合蛋白通常缩写为锌指蛋白或ZFP。单个DNA结合结构域通常被称为“指”。ZFP具有至少一个指,通常具有两个指、三个指或六个指。每个指结合两个至四个DNA碱基对,通常是三个或四个DNA碱基对。ZFP与被称为靶位点或靶区段的核酸序

列结合。每个指通常包含大约30个氨基酸的锌螯合DNA结合亚结构域。研究表明,这类单个锌指由含有与锌配位的两个不变组氨酸残基的 $\alpha$ 螺旋以及单个 $\beta$ 转角两个半胱氨酸残基组成(参见,例如,Berg和Shi, *Science* 271:1081-1085 (1996))。

[0284] 在一些实施方案中,使用归巢核酸内切酶来制备本文所述的细胞。此类归巢核酸内切酶是本领域众所周知的(Stoddard 2005)。归巢核酸内切酶识别DNA靶序列并产生单链或双链断裂。归巢核酸内切酶具有高度特异性,识别长度范围为12至45个碱基对(bp),通常长度范围为14bp至40bp的DNA靶位点。归巢核酸内切酶可以例如对应于LAGLIDADG核酸内切酶、HNH核酸内切酶或GIY-YIG核酸内切酶。在一些实施方案中,归巢核酸内切酶可以是I-CreI变体。

[0285] 在一些实施方案中,使用大范围核酸酶制备本文所述的细胞。按照定义,大范围核酸酶是识别大序列的序列特异性核酸内切酶(Chevalier, B. S. 和 B. L. Stoddard, *Nucleic Acids Res.*, 2001, 29, 3757-3774)。它们可以切割活细胞中的独特位点,从而将切割位点附近的基因靶向增强1000倍或更多(Puchta等人, *Nucleic Acids Res.*, 1993, 21, 5034-5040; Rouet等人, *Mol. Cell. Biol.*, 1994, 14, 8096-8106; Choulika等人, *Mol. Cell. Biol.*, 1995, 15, 1968-1973; Puchta等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93, 5055-5060; Sargent等人, *Mol. Cell. Biol.*, 1997, 17, 267-77; Donoho等人, *Mol. Cell. Biol.*, 1998, 18, 4070-4078; Elliott等人, *Mol. Cell. Biol.*, 1998, 18, 93-101; Cohen-Tannoudji等人, *Mol. Cell. Biol.*, 1998, 18, 1444-1448)。

[0286] 在一些实施方案中,基因编辑技术与碱基编辑相关。碱基编辑器(BE)通常是Cas (“CRISPR相关”)结构域和核碱基修饰结构域(例如,天然或进化的脱氨酶,诸如胞苷脱氨酶,其包括APOBEC1 (“载脂蛋白B mRNA编辑酶,催化多肽1”)、CDA (“胞苷脱氨酶”)和AID (“活化诱导胞苷脱氨酶”)结构域)的融合物。在一些情况下,碱基编辑器还可以包含改变细胞DNA修复过程的蛋白质或结构域,以提高所得单核苷酸变化的效率和/或稳定性。

[0287] 在一些方面,当前可用的碱基编辑器包括将靶C·G转化为T·A的胞苷碱基编辑器(例如, BE4)和将A·T转化为G·C的腺嘌呤碱基编辑器(例如, ABE7.10)。在一些方面,首次证实Cas9靶向脱氨作用与碱基编辑器(BE)系统有关,所述系统被设计以诱导碱基变化而不引入双链DNA断裂。此外,使用与失活的Cas9 (dCas9)融合的大鼠脱氨酶APOBEC1 (rAPOBEC1)成功地将sgRNA的PAM上游的胞苷转化为胸苷。在一些方面,通过将dCas9改变为“切口酶”Cas9 D10A来优化此第一BE系统,所述切口酶在脱氨基胞苷相对的链上切口。不受理论的束缚,这预计将启动长补丁碱基切除修复(BER),其中优先使用脱氨基链来模板修复以产生U:A碱基对,然后在DNA复制期间将其转化为T:A。

[0288] 在一些实施方案中,碱基编辑器是核碱基编辑器,其含有催化失活的第一DNA结合蛋白结构域、具有碱基编辑活性的结构域和具有切口酶活性的第二DNA结合蛋白结构域,其中DNA结合蛋白结构域在单一融合蛋白上表达或单独表达(例如,在单独的表达载体上)。在一些实施方案中,碱基编辑器是融合蛋白,其包含具有碱基编辑活性的结构域(例如,胞苷脱氨酶或腺苷脱氨酶)和两个核酸可编程DNA结合蛋白结构域(napDNAbp),第一napDNAbp包含切口酶活性,并且第二napDNAbp是催化失活的,其中至少两个napDNAbp通过接头连接。在一些实施方案中,碱基编辑器是融合蛋白,其包含具有切口酶活性的CRISPR-Cas (例如Cas9) (nCas; nCas9)的DNA结构域、具有核酸可编程DNA结合活性的CRISPR-Cas蛋白(例如

Cas9) (dCas;例如dCas9)的催化失活结构域,以及脱氨酶结构域,其中dCas通过接头连接至nCas,并且dCas紧邻脱氨酶结构域。在一些实施方案中,碱基编辑器是腺嘌呤至胸腺嘧啶或“ATBE”(或胸腺嘧啶至腺嘌呤或“TABE”)颠换碱基编辑器。示例性碱基编辑器和碱基编辑器系统包括如专利公开号US20220127622、US20210079366、US20200248169、US20210093667、US20210071163、W02020181202、W02021158921、W02019126709、W02020181178、W02020181195、W02020214842、W02020181193中所述的任何碱基编辑器和碱基编辑器系统,所述专利据此整体并入。

[0289] 在一些实施方案中,基因编辑技术是靶启动逆转录(TPRT)或“引导编辑”。在一些实施方案中,引导编辑介导人细胞中的靶向插入、缺失、所有12种可能的碱基到碱基转化及其组合,而不需要DSB或供体DNA模板。

[0290] 引导编辑是一种基因组编辑方法,其使用与聚合酶联合工作(即,与napDNAbp反式提供的融合蛋白形式或其他方式)的核酸可编程DNA结合蛋白(“napDNAbp”)将新的遗传信息直接写入指定的DNA位点,其中用引导编辑(PE)指导RNA(“PEgRNA”)对引导编辑系统进行编程,所述引导编辑(PE)指导RNA既指定靶位点,又以替换DNA链的形式通过工程化到指导RNA上(例如,在5′或3′末端,或在指导RNA的内部部分)的延伸(DNA或RNA)模板化所需编辑的合成。含有所需编辑(例如,单个核碱基取代)的替换链与待编辑的靶位点的内源链(除了其包含所需编辑)共享相同的序列。通过DNA修复和/或复制机制,靶位点的内源链被新合成的含有所需编辑的替换链替换。在一些情况下,引导编辑可以被认为是一种“搜索和替换”基因组编辑技术,因为引导编辑器搜索并定位待编辑的所需靶位点,并编码含有所需编辑的替换链,所述替换链同时安装替代对应靶位点内源DNA链。例如,引导编辑可以适用于进行精确的基于CRISPR/Cas的基因组编辑,以避免双链断裂。在一些实施方案中,同源蛋白是Cas蛋白-逆转录酶融合物或相关系统,或编码Cas蛋白-逆转录酶融合物或相关系统,以用指导RNA靶向特定DNA序列,在靶位点处产生单链切口,并使用切口DNA作为引物用于与指导RNA整合的工程化逆转录酶模板的逆转录。在一些实施方案中,引导编辑器蛋白与两个引导编辑指导RNA(pegRNA)配对,所述两个引导编辑指导RNA模板化基因组DNA的相反链上的互补DNA瓣的合成,导致PE诱导的切口位点之间的内源DNA序列被替换为pegRNA编码的序列。

[0291] 在一些实施方案中,基因编辑技术与引导编辑器相关,所述引导编辑器是逆转录酶或本领域已知的任何DNA聚合酶。因此,在一方面,引导编辑器可以包含Cas9(或等效的napDNAbp),其被编程为通过将DNA序列与含有与靶DNA中的互补原型间隔区退火的间隔区序列的专门指导RNA(即,PEgRNA)相关联来靶向DNA序列。此类方法包括Anzalone等人([doi.org/10.1038/s41586-019-1711-4](https://doi.org/10.1038/s41586-019-1711-4))或PCT公开号W02020191248、W02021226558或W02022067130中公开的任何方法,所述文献据此整体并入。

[0292] 在一些实施方案中,基因编辑技术是经由位点特异性靶向元件的可编程添加(PASTE)。在一些方面,PASTE是其中经由与逆转录酶和丝氨酸整合酶两者融合的CRISPR-Cas9切口酶引导基因组插入的平台。如Ioannidi等人([doi.org/10.1101/2021.11.01.466786](https://doi.org/10.1101/2021.11.01.466786))所述,PASTE不会产生双链断裂,但允许整合大至约36kb的序列。在一些实施方案中,丝氨酸整合酶可以是本领域已知的任何丝氨酸整合酶。在一些实施方案中,丝氨酸整合酶具有足够的正交性,使得PASTE可以用于多重基因整合,在至少两个基因组基

因座处同时整合至少两个不同的基因。在一些实施方案中,PASTE具有与基于同源定向修复或非同源末端连接的整合相当或比其更优的编辑效率,在非分裂细胞中具有活性且具有较少的可检测脱靶事件。

[0293] 在一些实施方案中,使用RNA沉默或RNA干扰(RNAi)敲低(例如,降低、消除或抑制)多肽的表达以制备本文提供的细胞。可用的RNAi方法包括利用合成RNAi分子、短干扰RNA(siRNA)、PIWI相互作用RNA(piRNA)、短发夹RNA(shRNA)、微小RNA(miRNA)的方法以及本领域技术人员认可的其他瞬时敲低方法。包括序列特异性shRNA、siRNA、miRNA等的用于RNAi的试剂是可商购获得的。例如,可以通过RNA干扰敲低细胞中的靶多核苷酸(诸如上述的任一种,例如CIITA、B2M或NLRC5),所述RNA干扰通过将靶多核苷酸的靶基序互补的抑制性核酸(诸如siRNA)引入到细胞中进行。在一些实施方案中,可以通过将shRNA表达病毒转导到细胞中来敲低细胞中的靶多核苷酸(诸如上述的任一种,例如CIITA、B2M或NLRC5)。在一些实施方案中,采用RNA干扰来降低或抑制选自CIITA、B2M和NLRC5组成的组的至少一种的表达。

[0294] 在一些实施方案中,修饰(诸如遗传修饰)通过靶向辅助链B2M来降低或消除(诸如敲除)一种或多种MHC I类分子基因和/或一种或多种MHC II类分子基因的表达。B2M、TAP I、NLRC5、CIITA、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DP、HLA-DM、HLA-DOA、HLA-DOB、HLA-DQ、HLA-DR、RFX5、RFXANK、RFXAP、NFY-A、NFY-B和/或NFY-C及其任何组合。在一些实施方案中,一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子的表达减少或消除是降低(诸如敲除)一种或多种以下B2M的表达的修饰。B2M、TAP I、NLRC5、CIITA、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DP、HLA-DM、HLA-DOA、HLA-DOB、HLA-DQ、HLA-DR、RFX5、RFXANK、RFXAP、NFY-A、NFY-B和/或NFY-C。

[0295] 2. 示例性靶多核苷酸和用于降低表达的方法

[0296] a. MHC I类分子

[0297] 在某些实施方案中,修饰(诸如遗传修饰)通过靶向辅助链B2M来降低或消除(诸如敲除)一种或多种MHC I类分子基因的表达。在一些实施方案中,使用CRISPR/Cas系统进行遗传修饰。通过降低或消除(诸如敲除)B2M的表达,阻断了一种或多种MHC I类分子的表面运输,并且此类细胞在植入到受体受试者体内时表现出免疫耐受性。在一些实施方案中,细胞被认为是低免疫原性的,例如,在施用后在受体受试者或患者中。

[0298] 在一些实施方案中,本文提供的靶多核苷酸序列是B2M的变体。在一些实施方案中,靶多核苷酸序列是B2M的同源物。在一些实施方案中,靶多核苷酸序列是B2M的直向同源物。

[0299] 在一些实施方案中,降低或消除的一种或多种MHC I类分子的表达是降低以下MHC I类分子中的一种或多种的表达的修饰:HLA-A、HLA-B和HLA-C。在一些实施方案中,降低或消除的B2M的表达降低或消除了以下MHC I类分子中的一种或多种的表达:HLA-A、HLA-B和HLA-C。在一些实施方案中,降低或消除的B2M的表达降低或消除了HLA-A蛋白的表达。在一些实施方案中,降低或消除的B2M的表达降低或消除了HLA-B蛋白的表达。在一些实施方案中,降低或消除的B2M的表达降低或消除了HLA-C蛋白的表达。在一些实施方案中,降低或消除的B2M的表达降低或消除了以下MHC I类分子中的一种或多种的表达:HLA-A、HLA-B和HLA-C,其是通过敲除编码所述分子的基因来进行。在一些实施方案中,编码HLA-A蛋白的基因被敲除以降低或消除所述HLA-A蛋白的表达。在一些实施方案中,编码HLA-B蛋白的基因

被敲除以降低或消除所述HLA-B蛋白的表达。在一些实施方案中,编码HLA-C蛋白的基因被敲除以降低或消除所述HLA-C蛋白的表达。

[0300] 在一些实施方案中,工程化细胞(诸如工程化原代细胞)包含靶向B2M基因的修饰(例如,遗传修饰)。在一些实施方案中,通过使用靶向核酸酶系统进行靶向B2M基因的修饰(例如,遗传修饰),所述靶向核酸酶系统包括Cas蛋白或编码Cas蛋白的多核苷酸,以及用于特异性靶向B2M基因的至少一个指导核糖核酸序列。在一些实施方案中,用于特异性靶向B2M基因的至少一个指导核糖核酸序列(例如,gRNA靶向序列)选自WO2016/183041的附录2或表15的SEQ ID NO:81240-85644组成的组,其公开内容通过引用整体并入本文。在一些实施方案中,用于特异性靶向B2M基因的gRNA靶向序列是CGUGAGUAAACCUGAAUCUU (SEQ ID NO:33)。

[0301] 在一些实施方案中,将编码如本文所公开的多肽(例如,嵌合抗原受体、CD47或本文公开的另一种致耐受因子)的外源核酸或转基因插入在B2M基因处。用于在B2M基因座处靶向插入的示例性转基因包括如本文所述的任何转基因。

[0302] 测试B2M基因是否已失活的测定是已知的并且在本文中描述。在一个实施方案中,通过PCR评估所得B2M基因的遗传修饰。在一些实施方案中,一种或多种MHC I类(诸如HLA-I)表达的降低可以通过流式细胞术(诸如通过FACS分析)测定。在另一个实施方案中,使用细胞裂解物的蛋白质印迹来检测B2M蛋白表达,所述裂解物用针对B2M蛋白的抗体进行探测。在另一个实施方案中,逆转录酶聚合酶链反应(RT-PCR)用于确认失活修饰(诸如遗传修饰)的存在。在一些实施方案中,使用免疫亲和技术(诸如免疫组织化学或免疫细胞化学)评估一种或多种MHC I类分子表达的降低。

[0303] 在一些实施方案中,可以使用本领域已知的技术(例如,使用结合HLA复合物的标记抗体(例如,使用与人主要组织相容性HLA I类抗原的 $\alpha$ 链结合的可商购获得的HLA-A、B、C抗体)的FACS技术)测量工程化细胞中一种或多种MHC I类分子表达或功能(当细胞来源于人细胞时为HLA I)的降低。另外,可以对细胞进行测试,以确认HLA I复合物不在细胞表面上表达。这可以通过使用如上文所讨论的针对一种或多种HLA细胞表面组分的抗体的FACS分析来测定。除了降低HLA I(或MHC I类)外,本文提供的工程化细胞对巨噬细胞吞噬和NK细胞杀伤的敏感性也降低。下文进一步描述了测定工程化细胞的低免疫原性表型的方法。

[0304] 在一些实施方案中,降低B2M表达的修饰(例如,遗传修饰)降低B2M mRNA表达。在一些实施方案中,B2M的mRNA表达降低是相对于不包含修饰的相同细胞类型的未修饰或野生型细胞而言的。在一些实施方案中,B2M的mRNA表达降低超过约5%,诸如降低超过约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多中的任一个。在一些实施方案中,B2M的mRNA表达降低多至约100%,诸如降低多至约90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%或更少中的任一个。在一些实施方案中,B2M的mRNA表达降低约5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%中的任一个。在一些实施方案中,B2M的mRNA表达被消除(例如,0%的B2M mRNA的表达)。在一些实施方案中,降低B2M mRNA表达的修饰消除了B2M基因活性。

[0305] 在一些实施方案中,降低B2M表达的修饰(例如,遗传修饰)降低B2M蛋白表达。在一些实施方案中,B2M的蛋白质表达降低是相对于不包含修饰的相同细胞类型的未修饰或野生型细胞而言的。在一些实施方案中,B2M的蛋白质表达降低超过约5%,诸如降低超过约

10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多中的任一个。在一些实施方案中,B2M的蛋白质表达降低多至约100%,诸如降低多至约90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%或更少中的任一个。在一些实施方案中,B2M的蛋白质表达降低约5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%中的任一个。在一些实施方案中,B2M的蛋白质表达被消除(例如,0%的B2M蛋白的表达)。在一些实施方案中,降低B2M蛋白表达的修饰消除了B2M基因活性。

[0306] 在一些实施方案中,降低B2M表达的修饰(例如,遗传修饰)包括B2M基因的失活或破坏。在一些实施方案中,降低B2M表达的修饰包括B2M基因的一个等位基因的失活或破坏。在一些实施方案中,降低B2M表达的修饰包括B2M基因的两个等位基因的失活或破坏。

[0307] 在一些实施方案中,修饰(例如,遗传修饰)包括细胞中一种或多种B2M编码序列的失活或破坏。在一些实施方案中,修饰包括细胞中所有B2M编码序列的失活或破坏。在一些实施方案中,修饰包括失活或破坏,包括B2M基因中的插入缺失。在一些实施方案中,修饰是B2M基因的基因组DNA的移码突变。在一些实施方案中,修饰是B2M基因的基因组DNA的缺失。在一些实施方案中,修饰是B2M基因的一段连续基因组DNA的缺失。在一些实施方案中,B2M基因被敲除。

[0308] b.MHC II类分子

[0309] 在某些方面,修饰(诸如遗传修饰)通过靶向II类分子反式活化因子(CIITA)表达来降低或消除(诸如敲除)一种或多种MHC II类分子基因的表达。在一些实施方案中,使用CRISPR/Cas系统进行遗传修饰。CIITA是LR或核苷酸结合结构域(NBD)富亮氨酸重复序列(LRR)蛋白家族的成员,并且通过与MHC增强体缔合来调控一种或多种MHC II类分子的转录。通过降低或消除(诸如敲除)CIITA的表达,一种或多种MHC II类分子的表达降低,从而也降低表面表达。在一些情况下,此类细胞在植入到受体受试者中时表现出免疫耐受性。在一些实施方案中,细胞被认为是低免疫原性的,例如,在施用后在受体受试者或患者中。

[0310] 在一些实施方案中,靶多核苷酸序列是CIITA的变体。在一些实施方案中,靶多核苷酸序列是CIITA的同源物。在一些实施方案中,靶多核苷酸序列是CIITA的直向同源物。

[0311] 在一些实施方案中,降低或消除的一种或多种MHC II类分子的表达是降低以下MHC II类分子中的一种或多种的表达的修饰:HLA-DP、HLA-DM、HLA-DOA、HLA-DOB、HLA-DQ和HLA-DR。在一些实施方案中,降低或消除的CIITA的表达降低或消除了以下MHC II类分子中的一种或多种的表达:HLA-DP、HLA-DM、HLA-DOA、HLA-DOB、HLA-DQ和HLA-DR。在一些实施方案中,降低或消除的CIITA的表达降低或消除了HLA-DP蛋白的表达。在一些实施方案中,降低或消除的CIITA的表达降低或消除了HLA-DM蛋白的表达。在一些实施方案中,降低或消除的CIITA的表达降低或消除了HLA-DOA蛋白的表达。在一些实施方案中,降低或消除的CIITA的表达降低或消除了HLA-DOB蛋白的表达。在一些实施方案中,降低或消除的CIITA的表达降低或消除了HLA-DQ蛋白的表达。在一些实施方案中,降低或消除的CIITA的表达降低或消除了HLA-DR蛋白的表达。在一些实施方案中,降低或消除的CIITA的表达降低或消除了以下MHC II类分子中的一种或多种的表达:HLA-DP、HLA-DM、HLA-DOA、HLA-DOB、HLA-DQ和HLA-DR,其是通过敲除编码所述分子的基因来进行。在一些实施方案中,编码HLA-DP蛋白的基因被敲除以降低或消除所述HLA-DP蛋白的表达。在一些实施方案中,编码HLA-DM蛋白的基因被敲除以降低或消除所述HLA-DM蛋白的表达。在一些实施方案中,编码HLA-DOA蛋白的基因

被敲除以降低或消除所述HLA-DOA蛋白的表达。在一些实施方案中,编码HLA-DOB蛋白的基因被敲除以降低或消除所述HLA-DOB蛋白的表达。在一些实施方案中,编码HLA-DQ蛋白的基因被敲除以降低或消除所述HLA-DQ蛋白的表达。在一些实施方案中,编码HLA-DR蛋白的基因被敲除以降低或消除所述HLA-DR蛋白的表达。

[0312] 在一些实施方案中,工程化细胞(诸如工程化原代细胞)包含靶向CIITA基因的修饰(例如,遗传修饰)。在一些实施方案中,通过靶向核酸酶系统进行靶向CIITA基因的修饰,所述靶向核酸酶系统包括Cas蛋白或编码Cas蛋白的多核苷酸,以及用于特异性靶向CIITA基因的至少一个指导核糖核酸序列。在一些实施方案中,用于特异性靶向CIITA基因的至少一个指导核糖核酸序列(例如,gRNA靶向序列)选自WO2016183041的附录1或表12的SEQ ID NO:5184-36352组成的组,其公开内容通过引用整体并入本文。在一些实施方案中,用于特异性靶向CIITA基因的gRNA靶向序列是GAUUAUUGGCAUAAGCCUCCC (SEQ ID NO:34)。

[0313] 在一些实施方案中,将编码如本文所公开的多肽(例如,嵌合抗原受体、CD47或本文公开的另一种致耐受因子)的外源核酸或转基因插入在CIITA基因处。用于在B2M基因座处靶向插入的示例性转基因包括如本文中所述的任何转基因。

[0314] 测试CIITA基因是否已失活的测定是已知的并且在本文中描述。在一个实施方案中,通过PCR评估所得CIITA基因的遗传修饰。在一些实施方案中,一种或多种MHC II类分子(诸如HLA-II)表达的降低可以通过流式细胞术(诸如通过FACS分析)测定。在另一个实施方案中,使用细胞裂解物的蛋白质印迹来检测CIITA蛋白表达,所述裂解物用针对CIITA蛋白的抗体进行探测。在另一个实施方案中,逆转录酶聚合酶链反应(RT-PCR)用于确认失活修饰(诸如遗传修饰)的存在。在一些实施方案中,使用免疫亲和技术(诸如免疫组织化学或免疫细胞化学)评估一种或多种MHC II类分子表达的降低。

[0315] 在一些实施方案中,工程化细胞中一种或多种MHC II类分子表达或功能(当细胞来源于人细胞时为HLA II)的降低可以使用本领域已知的技术来测量,诸如使用针对蛋白质的抗体的蛋白质印迹、FACS技术、RT-PCR技术等。在一些实施方案中,可以测试工程化细胞以确认HLA II复合物不在细胞表面上表达。评估表面表达的方法包括本领域已知的方法(例如参见WO2018132783的图21)并且通常使用基于与人HLA II类HLA-DR、DP和大多数DQ抗原结合的商业抗体的蛋白质印迹或FACS分析进行。除了降低一种或多种HLA II类分子(或一种或多种MHC II类分子)外,本文提供的工程化细胞对巨噬细胞吞噬和NK细胞杀伤的敏感性也降低。下文进一步描述了测定工程化细胞的低免疫原性表型的方法。

[0316] 在一些实施方案中,降低CIITA表达的修饰(例如,遗传修饰)降低CIITA mRNA表达。在一些实施方案中,CIITA的mRNA表达降低是相对于不包含修饰的相同细胞类型的未修饰或野生型细胞而言的。在一些实施方案中,CIITA的mRNA表达降低超过约5%,诸如降低超过约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多中的任一个。在一些实施方案中,CIITA的mRNA表达降低多至约100%,诸如降低多至约90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%或更少中的任一个。在一些实施方案中,CIITA的mRNA表达降低约5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%中的任一个。在一些实施方案中,CIITA的mRNA表达被消除(例如,0%的CIITA mRNA的表达)。在一些实施方案中,降低CIITA mRNA表达的修饰消除了CIITA基因活性。

[0317] 在一些实施方案中,降低CIITA表达的修饰(例如,遗传修饰)降低CIITA蛋白表达。



在一些实施方案中,CIITA的蛋白质表达降低是相对于不包含修饰的相同细胞类型的未修饰或野生型细胞而言的。在一些实施方案中,CIITA的蛋白质表达降低超过约5%,诸如降低超过约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多中的任一个。在一些实施方案中,CIITA的蛋白质表达降低多至约100%,诸如降低多至约90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%或更少中的任一个。在一些实施方案中,CIITA的蛋白质表达降低约5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%中的任一个。在一些实施方案中,CIITA的蛋白质表达被消除(例如,0%的CIITA蛋白的表达)。在一些实施方案中,降低CIITA蛋白表达的修饰消除了CIITA基因活性。

[0318] 在一些实施方案中,降低CIITA表达的修饰(例如,遗传修饰)包括CIITA基因的失活或破坏。在一些实施方案中,降低CIITA表达的修饰包括CIITA基因的一个等位基因的失活或破坏。在一些实施方案中,降低CIITA表达的修饰包括CIITA基因的两个等位基因的失活或破坏。

[0319] 在一些实施方案中,修饰(例如,遗传修饰)包括细胞中一种或多种CIITA编码序列的失活或破坏。在一些实施方案中,修饰包括细胞中所有CIITA编码序列的失活或破坏。在一些实施方案中,修饰包括失活或破坏,包括CIITA基因中的插入缺失。在一些实施方案中,修饰是CIITA基因的基因组DNA的移码突变。在一些实施方案中,修饰是CIITA基因的基因组DNA的缺失。在一些实施方案中,修饰是CIITA基因的一段连续基因组DNA的缺失。在一些实施方案中,CIITA基因被敲除。

[0320] 在一些实施方案中,工程化细胞(诸如工程化原代细胞)包含靶向T细胞受体 $\alpha$ 恒定(TRAC)基因的修饰(例如,遗传修饰)。在一些实施方案中,通过靶向核酸酶系统进行靶向TRAC基因的修饰,所述靶向核酸酶系统包括Cas蛋白或编码Cas蛋白的多核苷酸,以及用于特异性靶向TRAC基因的至少一个指导核糖核酸序列。在一些实施方案中,用于特异性靶向TRAC基因的至少一个指导核糖核酸序列选自US20160348073的SEQ ID NO:532-609和9102-9797组成的组,其公开内容通过引用整体并入本文。在一些实施方案中,用于特异性靶向TRAC基因的gRNA靶向序列是AGAGUCUCUCAGCUGGUACA(SEQ ID NO:35)。

[0321] 在一些实施方案中,将编码如本文所公开的多肽(例如,嵌合抗原受体、CD47或本文公开的另一种致耐受因子)的外源核酸或转基因插入在TRAC基因处。用于在TRAC基因座处靶向插入的示例性转基因包括如第II.B章节中所述的任何转基因。

[0322] 测试TRAC基因是否已失活的测定是已知的并且在本文中描述。在一个实施方案中,通过PCR得到的TRAC基因修饰和HLA-II表达的降低可以通过流式细胞术(诸如通过FACS分析)进行测定。在另一个实施方案中,使用细胞裂解物的蛋白质印迹来检测TRAC蛋白表达,所述裂解物用针对TRAC蛋白的抗体进行探测。在另一个实施方案中,逆转录酶聚合酶链反应(RT-PCR)用于确认失活修饰的存在。

[0323] 在一些实施方案中,降低TRAC表达的修饰(例如,遗传修饰)降低TRAC mRNA表达。在一些实施方案中,TRAC的mRNA表达降低是相对于不包含修饰的相同细胞类型的未修饰或野生型细胞而言的。在一些实施方案中,TRAC的mRNA表达降低超过约5%,诸如降低超过约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多中的任一个。在一些实施方案中,TRAC的mRNA表达降低多至约100%,诸如降低多至约90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%或更少中的任一个。在一些实施方案中,TRAC的mRNA表达降低约5%、

10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%中的任一个。在一些实施方案中,TRAC的mRNA表达被消除(例如,0%的TRAC mRNA的表达)。在一些实施方案中,降低TRAC mRNA表达的修饰消除了TRAC基因活性。

[0324] 在一些实施方案中,降低TRAC表达的修饰(例如,遗传修饰)降低TRAC蛋白表达。在一些实施方案中,TRAC的蛋白质表达降低是相对于不包含修饰的相同细胞类型的未修饰或野生型细胞而言的。在一些实施方案中,TRAC的蛋白质表达降低超过约5%,诸如降低超过约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多中的任一个。在一些实施方案中,TRAC的蛋白质表达降低多至约100%,诸如降低多至约90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%或更少中的任一个。在一些实施方案中,TRAC的蛋白质表达降低约5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%中的任一个。在一些实施方案中,TRAC的蛋白质表达被消除(例如,0%的TRAC蛋白的表达)。在一些实施方案中,降低TRAC蛋白表达的修饰消除了TRAC基因活性。

[0325] 在一些实施方案中,降低TRAC表达的修饰(例如,遗传修饰)包括TRAC基因的失活或破坏。在一些实施方案中,降低TRAC表达的修饰包括TRAC基因的一个等位基因的失活或破坏。在一些实施方案中,降低TRAC表达的修饰包括TRAC基因的两个等位基因的失活或破坏。

[0326] 在一些实施方案中,修饰(例如,遗传修饰)包括细胞中一种或多种TRAC编码序列的失活或破坏。在一些实施方案中,修饰包括细胞中所有TRAC编码序列的失活或破坏。在一些实施方案中,修饰包括失活或破坏,包括TRAC基因中的插入缺失。在一些实施方案中,修饰是TRAC基因的基因组DNA的移码突变。在一些实施方案中,修饰是TRAC基因的基因组DNA的缺失。在一些实施方案中,修饰是TRAC基因的一段连续基因组DNA的缺失。在一些实施方案中,TRAC基因被敲除。

[0327] 在一些实施方案中,工程化细胞(诸如工程化原代细胞)包含靶向T细胞受体 $\beta$ 恒定(TRBC)基因的修饰(例如,遗传修饰)。在一些实施方案中,通过靶向核酸酶系统进行靶向TRBC基因的修饰,所述靶向核酸酶系统包括Cas蛋白或编码Cas蛋白的多核苷酸,以及用于特异性靶向TRBC基因的至少一个指导核糖核酸序列。

[0328] 在一些实施方案中,将编码如本文所公开的多肽(例如,嵌合抗原受体、CD47或本文公开的另一种致耐受因子)的外源核酸或转基因插入在TRBC基因处。用于在TRAB基因座处靶向插入的示例性转基因包括如第II.B章节中所述的任何转基因。在一些实施方案中,用于特异性靶向TRBC基因的至少一个指导核糖核酸序列选自由US20160348073的SEQ ID NO:610-765和9798-10532组成的组,其公开内容通过引用整体并入本文。

[0329] 测试TRBC基因是否已失活的测定是已知的并且在本文中描述。在一个实施方案中,通过PCR得到的TRBC基因修饰和HLA-II表达的降低可以通过流式细胞术(诸如通过FACS分析)进行测定。在另一个实施方案中,使用细胞裂解物的蛋白质印迹来检测TRBC蛋白表达,所述裂解物用针对TRAC蛋白的抗体进行探测。在另一个实施方案中,逆转录酶聚合酶链反应(RT-PCR)用于确认失活修饰的存在。

[0330] 在一些实施方案中,降低TRBC表达的修饰(例如,遗传修饰)降低TRBC mRNA表达。在一些实施方案中,TRAC的mRNA表达降低是相对于不包含修饰的相同细胞类型的未修饰或野生型细胞而言的。在一些实施方案中,TRBC的mRNA表达降低超过约5%,诸如降低超过约

10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多中的任一个。在一些实施方案中,TRBC的mRNA表达降低多至约100%,诸如降低多至约90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%或更少中的任一个。在一些实施方案中,TRBC的mRNA表达降低约5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%中的任一个。在一些实施方案中,TRBC的mRNA表达被消除(例如,0%的TRBC mRNA的表达)。在一些实施方案中,降低TRBC mRNA表达的修饰消除了TRBC基因活性。

[0331] 在一些实施方案中,降低TRBC表达的修饰(例如,遗传修饰)降低TRBC蛋白表达。在一些实施方案中,TRAC的蛋白质表达降低是相对于不包含修饰的相同细胞类型的未修饰或野生型细胞而言的。在一些实施方案中,TRBC的蛋白质表达降低超过约5%,诸如降低超过约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多中的任一个。在一些实施方案中,TRBC的蛋白质表达降低多至约100%,诸如降低多至约90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%或更少中的任一个。在一些实施方案中,TRBC的蛋白质表达降低约5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%中的任一个。在一些实施方案中,TRBC的蛋白质表达被消除(例如,0%的TRBC蛋白的表达)。在一些实施方案中,降低TRBC蛋白表达的修饰消除了TRBC基因活性。

[0332] 在一些实施方案中,降低TRBC表达的修饰(例如,遗传修饰)包括TRBC基因的失活或破坏。在一些实施方案中,降低TRBC表达的修饰包括TRBC基因的一个等位基因的失活或破坏。在一些实施方案中,降低TRBC表达的修饰包括TRBC基因的两个等位基因的失活或破坏。

[0333] 在一些实施方案中,修饰(例如,遗传修饰)包括细胞中一种或多种TRBC编码序列的失活或破坏。在一些实施方案中,修饰包括细胞中所有TRBC编码序列的失活或破坏。在一些实施方案中,修饰包括失活或破坏,包括TRBC基因中的插入缺失。在一些实施方案中,修饰是TRBC基因的基因组DNA的移码突变。在一些实施方案中,修饰是TRBC基因的基因组DNA的缺失。在一些实施方案中,修饰是TRBC基因的一段连续基因组DNA的缺失。在一些实施方案中,TRBC基因被敲除。

[0334] B. 多核苷酸的过表达

[0335] 在一些实施方案中,本文提供的工程化细胞(诸如工程化原代细胞)是遗传修饰的或工程化的,诸如通过将一种或多种修饰引入到细胞(诸如原代细胞)中以在细胞中过表达所需多核苷酸。在一些实施方案中,待修饰或工程化的细胞(诸如原代细胞)是先前未引入一种或多种修饰的未修饰细胞或非工程化细胞(例如未修饰原代细胞或非工程化原代细胞)。在一些实施方案中,本文提供的工程化细胞(诸如工程化原代细胞)被遗传修饰以包含编码外源蛋白的一种或多种外源多核苷酸(也可与术语“转基因”互换使用)。如所描述的,在一些实施方案中,修饰细胞(诸如原代细胞)以增加某些基因的表达,所述基因是影响受体中的免疫识别和耐受性的致耐受(例如,免疫)因子。在一些实施方案中,提供的工程化原代细胞(诸如T细胞或NK细胞)也表达嵌合抗原受体(CAR)。一种或多种多核苷酸(例如外源多核苷酸)可以与一种或多种遗传修饰一起在工程化细胞中表达(例如过表达),以降低上文第I.A章节中描述的靶多核苷酸(诸如一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子)的表达。在一些实施方案中,提供的工程化细胞(诸如工程化原代细胞)在施用于受体受试者后不会触发或活化免疫反应。

[0336] 在一些实施方案中,工程化细胞(诸如工程化原代细胞)包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个不同的过表达的多核苷酸。在一些实施方案中,工程化细胞(诸如工程化原代细胞)包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个不同的过表达的多核苷酸。在一些实施方案中,过表达的多核苷酸是外源多核苷酸。在一些实施方案中,工程化细胞(诸如工程化原代细胞)包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个不同的外源多核苷酸。在一些实施方案中,工程化原代细胞包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个不同的外源多核苷酸。在一些实施方案中,过表达的多核苷酸是在原代细胞中游离表达的外源多核苷酸。在一些实施方案中,过表达的多核苷酸是插入或整合到工程化原代细胞的一个或多个基因组基因座中的外源多核苷酸。

[0337] 在一些实施方案中,使用含有DNA靶向结构域和转录活化因子的融合蛋白来增加多核苷酸的表达,即使多核苷酸过表达。使用反式活化因子结构域增加表达的靶向方法是技术人员已知的。

[0338] 在一些实施方案中,工程化细胞(诸如工程化原代细胞)含有一种或多种外源多核苷酸,其中所述一种或多种外源多核苷酸通过非靶向插入方法(诸如通过使用慢病毒载体的转导)插入或整合到细胞的基因组基因座中。在一些实施方案中,慢病毒载体包含piggyBac转座子。在转座过程中,背负式转座子(piggyback transposon)识别慢病毒载体中的转座子特异性反向末端重复序列(ITR),以允许载体内容物有效移动和整合到TTAA染色体位点中。在一些实施方案中,通过靶向插入方法(诸如通过使用同源定向修复(HDR)),将一种或多种外源多核苷酸插入或整合到细胞(诸如原代细胞)的基因组中。可以使用任何合适的方法通过HDR将外源多核苷酸插入到工程化细胞(诸如原代细胞)的基因组基因座中,所述方法包括本文所述的基因编辑方法(例如,CRISPR/Cas系统)。在一些实施方案中,将一种或多种外源多核苷酸插入一个或多个基因组基因座中,诸如本文所述的任何基因组基因座(例如表4)。在一些实施方案中,将外源多核苷酸插入相同的基因组基因座中。在一些实施方案中,将外源多核苷酸插入不同的基因组基因座中。在一些实施方案中,将两种或更多种外源多核苷酸插入相同基因组基因座中,诸如本文所述的任何基因组基因座(例如表4)。一些实施方案中,将两种或更多种外源多核苷酸插入不同基因组基因座中,诸如本文所述的两种或更多种基因组基因座(例如,表4)。

[0339] 示例性多核苷酸或过表达以及用于过表达其的方法在以下小节中描述。

[0340] 1. 致耐受因子

[0341] 在一些实施方案中,致耐受因子的表达在细胞(例如原代细胞)中过表达或增加。在一些实施方案中,工程化细胞包含至少一种致耐受因子的增加的表达,即过表达。在一些实施方案中,致耐受因子是促进或有助于促进或诱导免疫系统(例如先天或适应性免疫系统)对工程化细胞的耐受性的任何因子。

[0342] 在一些实施方案中,一种或多种致耐受因子选自以下组成的组:CD47、A20/TNFAIP3、C1-抑制剂、CCL21、CCL22、CD16、CD16 Fc受体、CD24、CD27、CD35、CD39、CD46、CD52、CD55、CD59、CD200、CR1、CTLA4-Ig、DUX4、FasL、H2-M3、HLA-C、HLA-E、HLA-E重链、HLA-G、PD-L1、ID01、IL-10、IL15-RF、IL-35、MANF、Mfge8、PD-1、PD-L1或Serpib9。在一些实施方案中,致耐受因子是DUX4、B2M-HLA-E、CD35、CD52、CD16、CD52、CD47、CD46、CD55、CD59、CD27、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重链、HLA-G、PD-L1、ID01、CTLA4-Ig、C1-抑制剂、IL-10、IL-35、FASL、CCL21、MFGE8、SERPINB9、CD35、IL-39、CD16 Fc受体、IL15-RF和H2-M3。在一些实施方

案中,致耐受因子是CD47、PD-L1、HLA-E或HLA-G、CCL21、FasL、Serpina9、CD200或Mfge8或其任何组合。在一些实施方案中,细胞(诸如原代细胞)包含至少一种外源多核苷酸,所述外源多核苷酸包括编码致耐受因子的多核苷酸。例如,在一些实施方案中,至少一种外源多核苷酸是编码CD47的多核苷酸。本文提供了在施用于受体受试者后不触发或活化免疫反应的细胞。如上所述,在一些实施方案中,对细胞(诸如原代细胞)进行修饰以增加影响受体中的免疫识别和耐受性的基因和致耐受(例如,免疫)因子的表达。

[0343] 在一些实施方案中,与不包含修饰的相同细胞类型的细胞相比,致耐受因子的表达(例如,表面表达)增加约10%或更高,诸如与不包含修饰的相同细胞类型的细胞相比增加约15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或更高中的任一个。在一些实施方案中,与不包含修饰的相同细胞类型的细胞相比,致耐受因子的表达增加约99%或更低,诸如与不包含修饰的相同细胞类型的细胞相比增加约95%、90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%或更低中的任一个。在一些实施方案中,与不包含修饰的相同细胞类型的细胞相比,致耐受因子的表达增加约10%与约100%之间,诸如与不包含修饰的相同细胞类型的细胞相比增加约10%与约40%之间、约20%与约60%之间、约50%与约80%之间和约70%与约100%之间的任一个。

[0344] 在一些实施方案中,与不包含修饰的相同细胞类型的细胞相比,致耐受因子的表达(例如,表面表达)增加约2倍或更高,诸如与不包含修饰的相同细胞类型的细胞相比增加约4倍或更高、6倍或更高、8倍或更高、10倍或更高、15倍或更高、20倍或更高、30倍或更高、40倍或更高、50倍或更高、60倍或更高、70倍或更高、80倍或更高、90倍或更高、100倍或更高、150倍或更高和200倍或更高中的任一个。在一些实施方案中,与不包含修饰的相同细胞类型的细胞相比,致耐受因子的表达增加约200倍或更低,诸如与不包含修饰的相同细胞类型的细胞相比增加约150倍或更低、100倍或更低、90倍或更低、80倍或更低、70倍或更低、60倍或更低、50倍或更低、40倍或更低、30倍或更低、15倍或更低、10倍或更低、8倍或更低、6倍或更低、100倍或更低、4倍或更低和2倍或更低中的任一个。在一些实施方案中,与不包含修饰的相同细胞类型的细胞相比,致耐受因子的表达增加约2倍与约200倍之间,诸如与不包含修饰的相同细胞类型的细胞相比增加约2倍与约20倍之间、约10倍与约50倍之间、约30倍与约70倍之间、约50倍与约100倍之间、约80倍与约150倍之间和约120倍与约200倍之间的任一个。

[0345] 在一些实施方案中,本公开提供了一种细胞(诸如原代细胞)或其群体,其已经被修饰以表达致耐受因子(例如,免疫调节多肽),诸如CD47。在一些实施方案中,本公开提供了一种用于改变细胞基因组以表达致耐受因子(例如,免疫调节多肽)诸如CD47的方法。在一些实施方案中,工程化细胞(诸如工程化原代细胞)表达外源致耐受因子(例如免疫调节多肽),诸如外源CD47。在一些情况下,通过将包含编码人CD47多肽的核苷酸序列的表达载体引入到原代细胞中(例如用所述表达载体转导细胞)来实现过表达或增加表达外源多核苷酸。在一些实施方案中,表达载体可以是病毒载体(诸如慢病毒载体),或者可以是非病毒载体。在一些实施方案中,细胞诸如原代细胞被工程化以含有一种或多种外源多核苷酸,其中至少一种外源多核苷酸包括编码致耐受因子的多核苷酸。在一些实施方案中,DUX4、B2M-HLA-E、CD35、CD52、CD16、CD52、CD47、CD46、CD55、CD59、CD27、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重

链、HLA-G、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1-抑制剂、IL-10、IL-35、FASL、CCL21、MFGE8、SERPINB9、CD35、IL-39、CD16 Fc受体、IL15-RF和H2-M3(包括其任何组合)。在一些实施方案中,致耐受因子是以下中的一种或多种:CD47、PD-L1、HLA-E或HLA-G、CCL21、FasL、Serpib9、CD200和Mfge8(包括其任何组合)。例如,在一些实施方案中,至少一种外源多核苷酸是编码CD47的多核苷酸。

[0346] 在一些实施方案中,致耐受因子是CD47。在一些实施方案中,工程化细胞(诸如原代细胞)含有编码CD47(诸如人CD47)的外源多核苷酸。在一些实施方案中,CD47在细胞(诸如原代细胞)中过表达。在一些实施方案中,与未用修饰工程化的相同细胞类型的类似细胞(诸如参考或未修饰细胞(例如未用编码CD47的外源多核苷酸工程化的原代细胞))相比,CD47的表达在工程化细胞(诸如工程化原代细胞)中过表达或增加。CD47是白细胞表面抗原,并且在细胞粘附和整联蛋白调节中发挥作用。它通常在细胞表面上表达,并且向循环巨噬细胞发出不要吞噬细胞的信号。关于人CD47的可用基因组、多核苷酸和多肽信息提供于例如NP\_001768.1、NP\_942088.1、NM\_001777.3和NM\_198793.2中。

[0347] 在一些实施方案中,与不包含修饰的相同细胞类型的细胞相比,CD47的表达(例如,表面表达)增加约10%或更高,诸如与不包含修饰的相同细胞类型的细胞相比增加约15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或更高中的任一个。在一些实施方案中,与不包含修饰的相同细胞类型的细胞相比,CD47的表达增加约99%或更低,诸如与不包含修饰的相同细胞类型的细胞相比增加约95%、90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%或更低中的任一个。在一些实施方案中,与不包含修饰的相同细胞类型的细胞相比,CD47的表达增加约10%与约100%之间,诸如与不包含修饰的相同细胞类型的细胞相比增加约10%与约40%之间、约20%与约60%之间、约50%与约80%之间和约70%与约100%之间的任一个。

[0348] 在一些实施方案中,与不包含修饰的相同细胞类型的细胞相比,CD47的表达(例如,表面表达)增加约2倍或更高,诸如与不包含修饰的相同细胞类型的细胞相比增加约4倍或更高、6倍或更高、8倍或更高、10倍或更高、15倍或更高、20倍或更高、30倍或更高、40倍或更高、50倍或更高、60倍或更高、70倍或更高、80倍或更高、90倍或更高、100倍或更高、150倍或更高和200倍或更高中的任一个。在一些实施方案中,与不包含修饰的相同细胞类型的细胞相比,CD47的表达增加约200倍或更低,诸如与不包含修饰的相同细胞类型的细胞相比增加约150倍或更低、100倍或更低、90倍或更低、80倍或更低、70倍或更低、60倍或更低、50倍或更低、40倍或更低、30倍或更低、15倍或更低、10倍或更低、8倍或更低、6倍或更低、100倍或更低、4倍或更低和2倍或更低中的任一个。在一些实施方案中,与不包含修饰的相同细胞类型的细胞相比,CD47的表达增加约2倍与约200倍之间,诸如与不包含修饰的相同细胞类型的细胞相比增加约2倍与约20倍之间、约10倍与约50倍之间、约30倍与约70倍之间、约50倍与约100倍之间、约80倍与约150倍之间和约120倍与约200倍之间中的任一个。

[0349] 在一些实施方案中,本文概述的细胞包含编码与NCBI Ref.Sequence No.NP\_001768.1和NP\_942088.1中列出的氨基酸序列具有至少95%序列同一性(例如,95%、96%、97%、98%、99%或更多)的CD47多肽的核苷酸序列。在一些实施方案中,本文概述的细胞包含编码具有NCBI Ref.Sequence No.NP\_001768.1和NP\_942088.1中列出的氨基酸序列的

CD47多肽的核苷酸序列。在一些实施方案中,细胞包含与NCBI Ref.No.NM\_001777.3和NM\_198793.2中列出的序列具有至少85%序列同一性(例如,85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多)的CD47核苷酸序列。在一些实施方案中,细胞包含NCBI Ref.Sequence No.NM\_001777.3和NM\_198793.2中列出的CD47核苷酸序列。

[0350] 在一些实施方案中,细胞包含与NCBI Ref.Sequence No.NP\_001768.1和NP\_942088.1中列出的氨基酸序列具有至少95%序列同一性(例如,95%、96%、97%、98%、99%或更多)的CD47多肽。在一些实施方案中,本文概述的细胞包含具有NCBI Ref.Sequence No.NP\_001768.1和NP\_942088.1中列出的氨基酸序列的CD47多肽。

[0351] 在一些实施方案中,细胞包含与SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列具有至少95%序列同一性(例如,95%、96%、97%、98%、99%或更高)的CD47多肽。在一些实施方案中,细胞包含具有如SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列的CD47多肽。在一些实施方案中,细胞包含与SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列具有至少95%序列同一性(例如,95%、96%、97%、98%、99%或更高)的CD47多肽。在一些实施方案中,细胞包含具有如SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的CD47多肽。

[0352] 在某些实施方案中,编码CD47的多核苷酸可操作地连接至启动子。

[0353] 在一些实施方案中,编码CD47的外源多核苷酸通过靶向或非靶向插入方法(诸如下文进一步描述的)整合到细胞基因组中。在一些实施方案中,靶向插入是通过同源依赖性插入到靶基因座中,诸如通过插入到任何一个基因组(基因)基因座中进行的。在一些实施方案中,一个或多个基因组基因座中的每一个选自由以下组成的组:MICA基因座、MICB基因座、B2M基因座、CIITA基因座、TRAC基因座或TRBC基因座、CD142基因座、CCR5基因座、CXCR4基因座、PPP1R12C(也称为AAVS1)基因座、白蛋白基因座、SHS231基因座、CLYBL基因座、ROSA26基因座、LRP1基因座、HMGB1基因座、ABO基因座、RHD基因座、FUT1基因座和KDM5D基因座。在一些实施方案中,一个或多个基因组基因座中的每一个选自由以下组成的组:B2M基因座、TAP1基因座、CIITA基因座、TRAC基因座、TRBC基因座、MIC-A基因座、MIC-B基因座和安全港基因座。在一些实施方案中,安全港基因座选自由以下组成的组:AAVS1、ABO、CCR5、CLYBL、CXCR4、F3、FUT1、HMGB1、KDM5D、LRP1、MICA、MICB、RHD、ROSA26和SHS231基因座。

[0354] 在一些实施方案中,靶向插入是通过同源依赖性插入到靶基因座中,诸如通过插入到表1b、2或4中描绘的任何一个基因座(例如B2M基因、CIITA基因、TRAC基因、TRBC基因)中进行的。在一些实施方案中,靶向插入是通过同源非依赖性插入,诸如通过插入到安全港基因座中进行的。在一些情况下,将编码CD47的多核苷酸插入到安全港基因座中,诸如但不限于选自AAVS1、CCR5、CLYBL、ROSA26和SHS231的基因座。在特定实施方案中,将编码CD47的多核苷酸插入到CCR5基因座、PPP1R12C(也称为AAVS1)基因座或CLYBL基因座中。在一些实施方案中,将编码CD47的多核苷酸插入到表4中描绘的任一个基因座中。在一些情况下,将编码CD47的多核苷酸插入到安全港基因座中。

[0355] 在特定实施方案中,将编码CD47的多核苷酸插入到CCR5基因座、PPP1R12C(也称为AAVS1)基因座或CLYBL基因座中。在一些实施方案中,将编码CD47的多核苷酸插入到B2M基因座或CIITA基因座中。在一些实施方案中,工程化细胞(诸如工程化原代细胞)是T细胞并且将编码CD47的多核苷酸插入到TRAC基因座或TRBC基因座中。在一些实施方案中,使用合

适的基因编辑系统(例如,CRISPR/Cas系统或本文所述的任何基因编辑系统)来促进将编码CD47的多核苷酸插入到细胞的基因组基因座中。在一些实施方案中,工程化细胞是T细胞,并且将编码CD47的多核苷酸插入到TRAC基因座或TRBC基因座中。在一些实施方案中,使用合适的基因编辑系统(例如,CRISPR/Cas系统或本文所述的任何基因编辑系统)来促进将编码CD47的多核苷酸插入到细胞的基因组基因座中。

[0356] 在一些实施方案中,使用细胞裂解物的蛋白质印迹来检测CD47蛋白表达,所述裂解物用针对CD47蛋白的抗体进行探测。在另一个实施方案中,逆转录酶聚合酶链反应(RT-PCR)用于确认外源CD47mRNA的存在。

[0357] 在一些实施方案中,工程化细胞(诸如工程化原代细胞)含有编码CD200(诸如人CD200)的外源多核苷酸。在一些实施方案中,CD200在细胞中过表达。在一些实施方案中,除了参考或未修饰细胞不包含编码CD200的外源多核苷酸,与类似的参考或未修饰细胞(包括具有任何其他修饰,诸如遗传修饰)相比,工程化细胞(诸如工程化原代细胞)中CD200的表达增加。关于人CD200的可用基因组、多核苷酸和多肽信息提供于例如GeneCard标识符GC03P112332、HGNC No.7203、NCBI Gene ID 4345、Uniprot No.P41217以及NCBI RefSeq No.NP\_001004196.2、NM\_001004196.3、NP\_001305757.1、NM\_001318828.1、NP\_005935.4、NM\_005944.6、XP\_005247539.1和XM\_005247482.2。在某些实施方案中,编码CD200的多核苷酸可操作地连接至启动子。

[0358] 在一些实施方案中,将编码CD200的多核苷酸插入到表1B、2或4中描绘的任一个基因座中。在一些情况下,将编码CD200的多核苷酸插入到安全港基因座中,诸如但不限于选自AAVS1、CCR5、CLYBL、ROSA26和SHS231的基因座。在特定实施方案中,将编码CD200的多核苷酸插入到CCR5基因座、PPP1R12C(也称为AAVS1)基因座或CLYBL基因座中。在一些实施方案中,将编码CD200的多核苷酸插入到B2M基因座或CIITA基因座中。在一些实施方案中,工程化原代细胞是T细胞,并且将编码CD200的多核苷酸插入到TRAC基因座或TRBC基因座中。在一些实施方案中,使用合适的基因编辑系统(例如,CRISPR/Cas系统或本文所述的任何基因编辑系统)来促进将编码CD200的多核苷酸插入到细胞的基因组基因座中。

[0359] 在一些实施方案中,使用细胞裂解物的蛋白质印迹来检测CD200蛋白表达,所述裂解物用针对CD200蛋白的抗体进行探测。在另一个实施方案中,逆转录酶聚合酶链反应(RT-PCR)用于确认外源CD200mRNA的存在。

[0360] 在一些实施方案中,工程化细胞(诸如工程化原代细胞)含有编码HLA-E(诸如人HLA-E)的外源多核苷酸。在一些实施方案中,HLA-E在细胞中过表达。在一些实施方案中,除了参考或未修饰细胞不包含编码HLA-E的外源多核苷酸,与类似的参考或未修饰细胞(包括具有任何其他修饰)相比,工程化细胞(诸如工程化原代细胞)中HLA-E的表达增加。关于人HLA-E的可用基因组、多核苷酸和多肽信息提供于例如GeneCard标识符GC06P047281、HGNC No.4962、NCBI Gene ID 3133、Uniprot No.P13747以及NCBI RefSeq No.NP\_005507.3和NM\_005516.5。在某些实施方案中,编码HLA-E的多核苷酸可操作地连接至启动子。

[0361] 在一些实施方案中,将编码HLA-E的多核苷酸插入到表1B、2或4中描绘的任一个基因座中。在一些情况下,将编码HLA-E的多核苷酸插入到安全港基因座中,诸如但不限于选自AAVS1、CCR5、CLYBL、ROSA26、SHS231的基因座。在特定实施方案中,将编码HLA-E的多核苷酸插入到CCR5基因座、PPP1R12C(也称为AAVS1)基因座或CLYBL基因座中。在一些实施方案



中,将编码HLA-E的多核苷酸插入到B2M基因座、CIITA基因座中。在一些实施方案中,工程化原代细胞是T细胞,并且将编码HLA-E的多核苷酸插入到TRAC基因座或TRBC基因座中。在一些实施方案中,使用合适的基因编辑系统(例如,CRISPR/Cas系统或本文所述的任何基因编辑系统)来促进将编码HLA-E的多核苷酸插入到细胞的基因组基因座中。

[0362] 在一些实施方案中,使用细胞裂解物的蛋白质印迹来检测HLA-E蛋白表达,所述裂解物用针对HLA-E蛋白的抗体进行探测。在另一个实施方案中,逆转录酶聚合酶链反应(RT-PCR)用于确认外源HLA-E mRNA的存在。

[0363] 在一些实施方案中,工程化细胞(诸如工程化原代细胞)含有编码HLA-G(诸如人HLA-G)的外源多核苷酸。在一些实施方案中,HLA-G在细胞中过表达。在一些实施方案中,除了参考或未修饰细胞不包含编码HLA-G的外源多核苷酸,与类似的参考或未修饰细胞(包括具有任何其他修饰,诸如遗传修饰)相比,工程化细胞(诸如工程化原代细胞)中HLA-G的表达增加。关于人HLA-G的可用基因组、多核苷酸和多肽信息提供于例如GeneCard标识符GC06P047256、HGNC No.4964、NCBI Gene ID 3135、Uniprot No.P17693以及NCBI RefSeq No.NP\_002118.1和NM\_002127.5。在某些实施方案中,编码HLA-G的多核苷酸可操作地连接至启动子。

[0364] 在一些实施方案中,将编码HLA-G的多核苷酸插入到表1b、2或4中描绘的任一个基因座中。在一些情况下,将编码HLA-G的多核苷酸插入到安全港基因座中,诸如但不限于选自AAVS1、CCR5、CLYBL、ROSA26、SHS231的基因座。在特定实施方案中,将编码HLA-G的多核苷酸插入到CCR5基因座、PPP1R12C(也称为AAVS1)基因座或CLYBL基因座中。在一些实施方案中,将编码HLA-G的多核苷酸插入到B2M基因座或CIITA基因座中。在一些实施方案中,工程化原代细胞是T细胞,并且将编码HLA-G的多核苷酸插入到TRAC基因座或TRBC基因座中。在一些实施方案中,使用合适的基因编辑系统(例如,CRISPR/Cas系统或本文所述的任何基因编辑系统)来促进将编码HLA-G的多核苷酸插入到细胞的基因组基因座中。

[0365] 在一些实施方案中,使用细胞裂解物的蛋白质印迹来检测HLA-G蛋白表达,所述裂解物用针对HLA-G蛋白的抗体进行探测。在另一个实施方案中,逆转录酶聚合酶链反应(RT-PCR)用于确认外源HLA-G mRNA的存在。

[0366] 在一些实施方案中,工程化细胞(诸如工程化原代细胞)含有编码PD-L1(诸如人PD-L1)的外源多核苷酸。在一些实施方案中,PD-L1在细胞中过表达。在一些实施方案中,除了参考或未修饰细胞不包含编码PD-L1的外源多核苷酸,与类似的参考或未修饰细胞(包括具有任何其他修饰)相比,工程化细胞(诸如工程化原代细胞)中PD-L1的表达增加。关于人PD-L1或CD274的可用基因组、多核苷酸和多肽信息提供于例如GeneCard标识符GC09P005450、HGNC No.17635、NCBI Gene ID 29126、Uniprot No.Q9NZQ7以及NCBI RefSeq No.NP\_001254635.1、NM\_001267706.1、NP\_054862.1和NM\_014143.3。在某些实施方案中,编码PD-L1的多核苷酸可操作地连接至启动子。

[0367] 在一些实施方案中,将编码PD-L1的多核苷酸插入到表1B、2或4中描绘的任一个基因座中。在一些情况下,将编码PD-L1的多核苷酸插入到安全港基因座中,诸如但不限于选自AAVS1、CCR5、CLYBL、ROSA26和SHS231的基因座。在特定实施方案中,将编码PD-L1的多核苷酸插入到CCR5基因座、PPP1R12C(也称为AAVS1)基因座或CLYBL基因座中。在一些实施方案中,将编码PD-L1的多核苷酸插入到B2M基因座、CIITA基因座中。在一些实施方案中,工程

化原代细胞是T细胞,并且将编码PD-L1的多核苷酸插入到TRAC基因座或TRBC基因座中。在一些实施方案中,使用合适的基因编辑系统(例如,CRISPR/Cas系统或本文所述的任何基因编辑系统)来促进将编码PD-L1的多核苷酸插入到细胞的基因组基因座中。

[0368] 在一些实施方案中,使用细胞裂解物的蛋白质印迹来检测PD-L1蛋白表达,所述裂解物用针对PD-L1蛋白的抗体进行探测。在另一个实施方案中,逆转录酶聚合酶链反应(RT-PCR)用于确认外源PD-L1mRNA的存在。

[0369] 在一些实施方案中,工程化细胞(诸如工程化原代细胞)含有编码FasL(诸如人FasL)的外源多核苷酸。在一些实施方案中,FasL在细胞中过表达。在一些实施方案中,除了参考或未修饰细胞不包含编码FasL的外源多核苷酸,与类似的参考或未修饰细胞(包括具有任何其他修饰,诸如遗传修饰)相比,工程化原代细胞中FasL的表达增加。关于人Fas配体(其也被称为FasL、FASLG、CD178、TNFSF6等)的可用基因组、多核苷酸和多肽信息提供于例如GeneCard标识符GC01P172628、HGNC No.11936、NCBI Gene ID 356、Uniprot No.P48023以及NCBI RefSeq No.NP\_000630.1、NM\_000639.2、NP\_001289675.1和NM\_001302746.1。在某些实施方案中,编码Fas-L的多核苷酸可操作地连接至启动子。

[0370] 在一些实施方案中,将编码Fas-L的多核苷酸插入到表1B、2或4中描绘的任一个基因座中。在一些情况下,将编码Fas-L的多核苷酸插入到安全港基因座中,诸如但不限于选自AAVS1、CCR5、CLYBL、ROSA26和SHS231的基因座。在特定实施方案中,将编码Fas-L的多核苷酸插入到CCR5基因座、PPP1R12C(也称为AAVS1)基因座或CLYBL基因座中。在一些实施方案中,将编码Fas-L的多核苷酸插入到B2M基因座或CIITA基因座中。在一些实施方案中,工程化原代细胞是T细胞,并且将编码Fas-L的多核苷酸插入到TRAC基因座或TRBC基因座中。在一些实施方案中,使用合适的基因编辑系统(例如,CRISPR/Cas系统或本文所述的任何基因编辑系统)来促进将编码Fas-L的多核苷酸插入到细胞的基因组基因座中。

[0371] 在一些实施方案中,使用细胞裂解物的蛋白质印迹来检测Fas-L蛋白表达,所述裂解物用针对Fas-L蛋白的抗体进行探测。在另一个实施方案中,逆转录酶聚合酶链反应(RT-PCR)用于确认外源Fas-L mRNA的存在。

[0372] 在一些实施方案中,工程化细胞(诸如工程化原代细胞)含有编码CCL21(诸如人CCL21)的外源多核苷酸。在一些实施方案中,CCL21在细胞中过表达。在一些实施方案中,除了参考或未修饰细胞不包含编码CCL21的外源多核苷酸,与类似的参考或未修饰细胞(包括具有任何其他修饰,诸如遗传修饰)相比,工程化细胞(诸如工程化原代细胞)中CCL21的表达增加。关于人CCL21的可用基因组、多核苷酸和多肽信息提供于例如GeneCard标识符GC09M034709、HGNC No.10620、NCBI Gene ID 6366、Uniprot No.000585以及NCBI RefSeq No.NP\_002980.1和NM\_002989.3。在某些实施方案中,编码CCL21的多核苷酸可操作地连接至启动子。

[0373] 在一些实施方案中,将编码CCL21的多核苷酸插入到表1B、2或4中描绘的任一个基因座中。在一些情况下,将编码CCL21的多核苷酸插入到安全港基因座中,诸如但不限于选自AAVS1、CCR5、CLYBL、ROSA26和SHS231的基因座。在特定实施方案中,将编码CCL21的多核苷酸插入到CCR5基因座、PPP1R12C(也称为AAVS1)基因座或CLYBL基因座中。在一些实施方案中,将编码CCL21的多核苷酸插入到B2M基因座、CIITA基因座中。在一些实施方案中,工程化原代细胞是T细胞,并且将编码CCL21的多核苷酸插入到TRAC基因座或TRBC基因座中。在

一些实施方案中,使用合适的基因编辑系统(例如,CRISPR/Cas系统或本文所述的任何基因编辑系统)来促进将编码CCL21的多核苷酸插入到细胞的基因组基因座中。

[0374] 在一些实施方案中,使用细胞裂解物的蛋白质印迹来检测CCL21蛋白表达,所述裂解物用针对CCL21蛋白的抗体进行探测。在另一个实施方案中,逆转录酶聚合酶链反应(RT-PCR)用于确认外源CCL21 mRNA的存在。

[0375] 在一些实施方案中,工程化细胞(诸如工程化原代细胞)含有编码CCL22(诸如人CCL22)的外源多核苷酸。在一些实施方案中,CCL22在细胞中过表达。在一些实施方案中,除了参考或未修饰细胞不包含编码CCL22的外源多核苷酸,与类似的参考或未修饰细胞(包括具有任何其他修饰,诸如遗传修饰)相比,工程化细胞(诸如工程化原代细胞)中CCL22的表达增加。关于人CCL22的可用基因组、多核苷酸和多肽信息提供于例如GeneCard标识符GC16P057359、HGNC No.10621、NCBI Gene ID 6367、Uniprot No.000626以及NCBI RefSeq No.NP\_002981.2、NM\_002990.4、XP\_016879020.1和XM\_017023531.1。在某些实施方案中,编码CCL22的多核苷酸可操作地连接至启动子。

[0376] 在一些实施方案中,将编码CCL22的多核苷酸插入到表1B、2或4中描绘的任一个基因座中。在一些情况下,将编码CCL22的多核苷酸插入到安全港基因座中,诸如但不限于选自AAVS1、CCR5、CLYBL、ROSA26和SHS231的基因座。在特定实施方案中,将编码CCL22的多核苷酸插入到CCR5基因座、PPP1R12C(也称为AAVS1)基因座或CLYBL基因座中。在一些实施方案中,将编码CCL22的多核苷酸插入到B2M基因座、CIITA基因座中。在一些实施方案中,工程化原代细胞是T细胞,并且将编码CCL22的多核苷酸插入到TRAC基因座或TRBC基因座中。在一些实施方案中,使用合适的基因编辑系统(例如,CRISPR/Cas系统或本文所述的任何基因编辑系统)来促进将编码CCL22的多核苷酸插入到细胞的基因组基因座中。

[0377] 在一些实施方案中,使用细胞裂解物的蛋白质印迹来检测CCL22蛋白表达,所述裂解物用针对CCL22蛋白的抗体进行探测。在另一个实施方案中,逆转录酶聚合酶链反应(RT-PCR)用于确认外源CCL22 mRNA的存在。

[0378] 在一些实施方案中,工程化细胞(诸如工程化原代细胞)含有编码Mfge8(诸如人Mfge8)的外源多核苷酸。在一些实施方案中,Mfge8在细胞中过表达。在一些实施方案中,除了参考或未修饰细胞不包含编码Mfge8的外源多核苷酸,与类似的参考或未修饰细胞(包括具有任何其他修饰,诸如遗传修饰)相比,工程化细胞(诸如工程化原代细胞)中Mfge8的表达增加。关于人Mfge8的可用基因组、多核苷酸和多肽信息提供于例如GeneCard标识符GC15M088898、HGNC No.7036、NCBI Gene ID 4240、Uniprot No.Q08431以及NCBI RefSeq No.NP\_001108086.1、NM\_001114614.2、NP\_001297248.1、NM\_001310319.1、NP\_001297249.1、NM\_001310320.1、NP\_001297250.1、NM\_001310321.1、NP\_005919.2和NM\_005928.3。在某些实施方案中,编码Mfge8的多核苷酸可操作地连接至启动子。

[0379] 在一些实施方案中,将编码Mfge8的多核苷酸插入到表1B、2或4中描绘的任一个基因座中。在一些情况下,将编码Mfge8的多核苷酸插入到安全港基因座中,诸如但不限于选自AAVS1、CCR5、CLYBL、ROSA26和SHS231的基因座。在特定实施方案中,将编码Mfge8的多核苷酸插入到CCR5基因座、PPP1R12C(也称为AAVS1)基因座或CLYBL基因座中。在一些实施方案中,将编码Mfge8的多核苷酸插入到B2M基因座、CIITA基因座中。在一些实施方案中,工程化原代细胞是T细胞,并且将编码Mfge8的多核苷酸插入到TRAC基因座或TRBC基因座中。在

一些实施方案中,使用合适的基因编辑系统(例如,CRISPR/Cas系统或本文所述的任何基因编辑系统)来促进将编码Mfge8的多核苷酸插入到细胞的基因组基因座中。

[0380] 在一些实施方案中,使用细胞裂解物的蛋白质印迹来检测Mfge8蛋白表达,所述裂解物用针对Mfge8蛋白的抗体进行探测。在另一个实施方案中,逆转录酶聚合酶链反应(RT-PCR)用于确认外源Mfge8mRNA的存在。

[0381] 在一些实施方案中,工程化细胞(诸如工程化原代细胞)含有编码Serp1nB9(诸如人Serp1nB9)的外源多核苷酸。在一些实施方案中,Serp1nB9在细胞中过表达。在一些实施方案中,除了参考或未修饰细胞不包含编码Serp1nB9的外源多核苷酸,与类似的参考或未修饰细胞(包括具有任何其他修饰,诸如遗传修饰)相比,工程化细胞(诸如工程化原代细胞)中Serp1nB9的表达增加。关于人Serp1nB9的可用基因组、多核苷酸和多肽信息提供于例如GeneCard标识符GC06M002887、HGNC No.8955、NCBI Gene ID 5272、Uniprot No.P50453以及NCBI RefSeq No.NP\_004146.1、NM\_004155.5、XP\_005249241.1和XM\_005249184.4。在某些实施方案中,编码Serp1nB9的多核苷酸可操作地连接至启动子。

[0382] 在一些实施方案中,将编码Serp1nB9的多核苷酸插入到表1B、2或4中描绘的任一个基因座中。在一些情况下,将编码Serp1nB9的多核苷酸插入到安全港基因座中,诸如但不限于选自AAVS1、CCR5、CLYBL、ROSA26和SHS231的基因座。在特定实施方案中,将编码Serp1nB9的多核苷酸插入到CCR5基因座、PPP1R12C(也称为AAVS1)基因座或CLYBL基因座中。在一些实施方案中,将编码Serp1nB9的多核苷酸插入到B2M基因座、CIITA基因座中。在一些实施方案中,工程化原代细胞是T细胞,并且将编码Serp1nB9的多核苷酸插入到TRAC基因座或TRBC基因座中。在一些实施方案中,使用合适的基因编辑系统(例如,CRISPR/Cas系统或本文所述的任何基因编辑系统)来促进将编码Serp1nB9的多核苷酸插入到细胞的基因组基因座中。

[0383] 在一些实施方案中,使用细胞裂解物的蛋白质印迹来检测Serp1nB9蛋白表达,所述裂解物用针对Serp1nB9蛋白的抗体进行探测。在另一个实施方案中,逆转录酶聚合酶链反应(RT-PCR)用于确认外源Serp1nB9 mRNA的存在。

[0384] 在一些实施方案中,提供的工程化细胞(诸如工程化原代细胞)被进一步修饰以表达嵌合抗原受体(CAR)。在一些实施方案中,将编码CAR的多核苷酸引入细胞中。在一些实施方案中,细胞是T细胞,诸如原代T细胞。在一些实施方案中,细胞是自然杀伤(NK)细胞,诸如原代NK细胞。

[0385] 在一些实施方案中,CAR选自由第一代CAR、第二代CAR、第三代CAR和第四代CAR组成的组。在一些实施方案中,CAR是或包含含有抗原结合结构域、跨膜结构域和至少一个信号传导结构域(例如,一个、两个或三个信号传导结构域)的第一代CAR。在一些实施方案中,CAR包含含有抗原结合结构域、跨膜结构域和至少两个信号传导结构域的第二代CAR。在一些实施方案中,CAR包含含有抗原结合结构域、跨膜结构域和至少三个信号传导结构域第三代CAR。在一些实施方案中,第四代CAR包含抗原结合结构域、跨膜结构域、三个或四个信号传导结构域和在CAR成功信号传导时诱导细胞因子基因表达的结构域。在一些实施方案中,抗原结合结构域是或包含抗体、抗体片段、scFv或Fab。

[0386] 在一些实施方案中,本文所述的任一种细胞包含编码CAR或第一代CAR的核酸。在一些实施方案中,第一代CAR包含一个抗原结合结构域、一个跨膜结构域和一个信号传导结

构域。在一些实施方案中,信号传导结构域在T细胞活化过程中介导下游信号传导。

[0387] 在一些实施方案中,本文所述的任一种细胞包含编码CAR或第二代CAR的核酸。在一些实施方案中,第二代CAR包含一个抗原结合结构域、一个跨膜结构域和两个信号传导结构域。在一些实施方案中,信号传导结构域在T细胞活化过程中介导下游信号传导。在一些实施方案中,信号传导结构域是共刺激结构域。在一些实施方案中,共刺激结构域增强T细胞活化过程中的细胞因子产生、CAR-T细胞增殖和/或CAR-T细胞持久性。

[0388] 在一些实施方案中,本文所述的任一种细胞包含编码CAR或第三代CAR的核酸。在一些实施方案中,第三代CAR包含一个抗原结合结构域、一个跨膜结构域和至少三个信号传导结构域。在一些实施方案中,信号传导结构域在T细胞活化过程中介导下游信号传导。在一些实施方案中,信号传导结构域是共刺激结构域。在一些实施方案中,共刺激结构域增强T细胞活化过程中的细胞因子产生、CAR-T细胞增殖和或CAR-T细胞持久性。在一些实施方案中,第三代CAR包含至少两个共刺激结构域。在一些实施方案中,至少两个共刺激结构域不同。

[0389] 在一些实施方案中,本文所述的任一种细胞包含编码CAR或第四代CAR的核酸。在一些实施方案中,第四代CAR包含一个抗原结合结构域、一个跨膜结构域和至少两个、三个或四个信号传导结构域。在一些实施方案中,信号传导结构域在T细胞活化过程中介导下游信号传导。在一些实施方案中,信号传导结构域是共刺激结构域。在一些实施方案中,共刺激结构域增强T细胞活化过程中的细胞因子产生、CAR-T细胞增殖和或CAR-T细胞持久性。

[0390] 在一些实施方案中,第一、第二、第三或第四代CAR还包含在CAR成功信号传导后诱导细胞因子基因表达的结构域。在一些实施方案中,细胞因子基因对于包含CAR的靶细胞是内源性或外源性的,该CAR包含在CAR成功信号传导后诱导细胞因子基因表达的结构域。在一些实施方案中,细胞因子基因编码促炎细胞因子。在一些实施方案中,细胞因子基因编码IL-1、IL-2、IL-9、IL-12、IL-18、TNF或IFN- $\gamma$ 或其功能片段。在一些实施方案中,在CAR成功信号传导后诱导细胞因子基因表达的结构域是或包含转录因子或其功能结构域或片段。在一些实施方案中,在CAR成功信号传导后诱导细胞因子基因表达的结构域是或包含转录因子或其功能结构域或片段。在一些实施方案中,转录因子或其功能结构域或片段是或包含活化T细胞的核因子(NFAT)、NF- $\kappa$ B或其功能结构域或片段。参见例如Zhang.C.等人,Engineering CAR-T cells.Biomarker Research.5:22(2017);WO 2016126608;Sha,H.等人Chimaeric antigen receptor T-cell therapy for tumour immunotherapy.Bioscience Reports 2017年1月27日,37(1)。

[0391] 技术人员熟悉CAR以及CAR的不同组分和配置。任何已知的CAR都可以与提供的实施方案结合使用。除了本文所述的CAR之外,各种CAR和编码其的核苷酸序列是本领域已知的,并且将适用于如本文所述的工程化细胞。参见,例如,W02013040557;W02012079000;W02016030414;Smith T等人,Nature Nanotechnology.2017.DOI:10.1038/NNANO.2017.57,它们的公开内容通过引用并入本文。CAR的示例性特性和组分在以下小节中描述。

[0392] 2.嵌合抗原受体

[0393] 在一些实施方案中,提供的工程化细胞(诸如工程化原代细胞)被进一步修饰以表达嵌合抗原受体(CAR)。在一些实施方案中,提供的细胞(诸如原代细胞)含有一种或多种靶

多核苷酸序列的遗传修饰、过表达如本文所述的致耐受因子(例如CD47),并且表达CAR,所述一种或多种靶多核苷酸序列调控一种或多种MHC I类分子、一种或多种MHC II类分子或一种或多种MHC I类和一种或多种MHC II类分子的表达。在一些实施方案中,细胞(诸如原代细胞)是一种细胞,其中:B2M降低或消除(例如敲除),CIITA降低或消除(例如敲除),CD47过表达,并且CAR被表达。在一些实施方案中,细胞为B2M<sup>-/-</sup>、CIITA<sup>-/-</sup>、CD47<sup>tg</sup>、CAR<sup>+</sup>。在一些实施方案中,原代细胞(例如T细胞)还可以是其中TRAC降低或消除(例如敲除)的细胞。在一些实施方案中,细胞为B2<sup>-/-</sup>、CIITA<sup>-/-</sup>、CD47<sup>tg</sup>、TRAC<sup>-/-</sup>、CAR<sup>+</sup>。

[0394] 在一些实施方案中,将编码CAR的多核苷酸引入原代细胞中。在一些实施方案中,细胞是T细胞,诸如原代T细胞。在一些实施方案中,细胞是自然杀伤(NK)细胞,诸如原代NK细胞。

[0395] 在一些实施方案中,CAR选自第一代CAR、第二代CAR、第三代CAR和第四代CAR组成的组。在一些实施方案中,CAR是或包含含有抗原结合结构域、跨膜结构域和至少一个信号传导结构域(例如,一个、两个或三个信号传导结构域)的第一代CAR。在一些实施方案中,CAR包含含有抗原结合结构域、跨膜结构域和至少两个信号传导结构域的第二代CAR。在一些实施方案中,CAR包含含有抗原结合结构域、跨膜结构域和至少三个信号传导结构域第三代CAR。在一些实施方案中,第四代CAR包含抗原结合结构域、跨膜结构域、三个或四个信号传导结构域和在CAR成功信号传导时诱导细胞因子基因表达的结构域。在一些实施方案中,抗原结合结构域是或包含抗体、抗体片段、scFv或Fab。

[0396] 在一些实施方案中,本文所述的任一种原代细胞包含编码CAR或第一代CAR的核酸。在一些实施方案中,第一代CAR包含一个抗原结合结构域、一个跨膜结构域和一个信号传导结构域。在一些实施方案中,信号传导结构域在T细胞活化过程中介导下游信号传导。

[0397] 在一些实施方案中,本文所述的任一种原代细胞包含编码CAR或第二代CAR的核酸。在一些实施方案中,第二代CAR包含一个抗原结合结构域、一个跨膜结构域和两个信号传导结构域。在一些实施方案中,信号传导结构域在T细胞活化过程中介导下游信号传导。在一些实施方案中,信号传导结构域是共刺激结构域。在一些实施方案中,共刺激结构域增强T细胞活化过程中的细胞因子产生、CAR-T细胞增殖和/或CAR-T细胞持久性。

[0398] 在一些实施方案中,本文所述的任一种原代细胞包含编码CAR或第三代CAR的核酸。在一些实施方案中,第三代CAR包含一个抗原结合结构域、一个跨膜结构域和至少三个信号传导结构域。在一些实施方案中,信号传导结构域在T细胞活化过程中介导下游信号传导。在一些实施方案中,信号传导结构域是共刺激结构域。在一些实施方案中,共刺激结构域增强T细胞活化过程中的细胞因子产生、CAR-T细胞增殖和或CAR-T细胞持久性。在一些实施方案中,第三代CAR包含至少两个共刺激结构域。在一些实施方案中,至少两个共刺激结构域不同。

[0399] 在一些实施方案中,本文所述的任一种原代细胞包含编码CAR或第四代CAR的核酸。在一些实施方案中,第四代CAR包含一个抗原结合结构域、一个跨膜结构域和至少两个、三个或四个信号传导结构域。在一些实施方案中,信号传导结构域在T细胞活化过程中介导下游信号传导。在一些实施方案中,信号传导结构域是共刺激结构域。在一些实施方案中,共刺激结构域增强T细胞活化过程中的细胞因子产生、CAR-T细胞增殖和或CAR-T细胞持久性。

[0400] 在一些实施方案中,本文提供的工程化原代细胞(例如原代T细胞或原代NK细胞)包含编码CAR的多核苷酸,其中将所述多核苷酸插入到基因组基因座中。在一些实施方案中,将多核苷酸插入到安全港基因座中,诸如但不限于AAVS1、CCR5、CLYBL、ROSA26、SHS231、F3(也称为CD142)、MICA、MICB、LRP1(也称为CD91)、HMGB1、ABO、RHD、FUT1或KDM5D基因座。在一些实施方案中,将多核苷酸插入到B2M、CIITA、TRAC、TRB、PD1或CTLA4基因中。可以使用任何合适的方法将CAR插入到低免疫原性细胞的基因组基因座中,所述方法包括本文所述的基因编辑方法(例如,CRISPR/Cas系统)。

[0401] 在一些实施方案中,第一、第二、第三或第四代CAR还包含在CAR成功信号传导后诱导细胞因子基因表达的结构域。在一些实施方案中,细胞因子基因对于包含CAR的靶细胞是内源性或外源性的,该CAR包含在CAR成功信号传导后诱导细胞因子基因表达的结构域。在一些实施方案中,细胞因子基因编码促炎细胞因子。在一些实施方案中,细胞因子基因编码IL-1、IL-2、IL-9、IL-12、IL-18、TNF或IFN- $\gamma$ 或其功能片段。在一些实施方案中,在CAR成功信号传导后诱导细胞因子基因表达的结构域是或包含转录因子或其功能结构域或片段。在一些实施方案中,在CAR成功信号传导后诱导细胞因子基因表达的结构域是或包含转录因子或其功能结构域或片段。在一些实施方案中,转录因子或其功能结构域或片段是或包含活化T细胞的核因子(NFAT)、NF- $\kappa$ B或其功能结构域或片段。参见例如Zhang.C.等人,Engineering CAR-T cells.Biomarker Research.5:22(2017);WO 2016126608;Sha,H.等人Chimaeric antigen receptor T-cell therapy for tumour immunotherapy.Bioscience Reports,2017年1月27日,37(1)。

[0402] 技术人员熟悉CAR以及CAR的不同组分和配置。任何已知的CAR都可以与提供的实施方案结合使用。除了本文所述的CAR之外,各种CAR和编码其的核苷酸序列是本领域已知的,并且将适用于如本文所述的工程化细胞。参见,例如,W02013040557;W02012079000;W02016030414;Smith T等人,Nature Nanotechnology.2017.DOI:10.1038/NNANO.2017.57,它们的公开内容通过引用并入本文。CAR的示例性特性和组分在以下小节中描述。

[0403] a. 抗原结合结构域

[0404] 在一些实施方案中,CAR抗原结合结构域(ABD)是或包含抗体或其抗原结合部分。在一些实施方案中,CAR抗原结合结构域是或包含scFv或Fab。

[0405] 在一些实施方案中,抗原结合结构域与细胞的细胞表面抗原结合。在一些实施方案中,细胞表面抗原是具体或特定细胞类型的特征(例如,由其表达)。在一些实施方案中,细胞表面抗原是多于一种类型的细胞的特征。

[0406] 在一些实施方案中,抗原可以是仅在肿瘤细胞上或优先在肿瘤细胞上表达的抗原,或是自身免疫或炎症疾病的特征性抗原。在一些实施方案中,抗原结合结构域(ABD)靶向肿瘤细胞特征性抗原。例如,抗原结合结构域靶向肿瘤细胞或癌细胞表达的抗原。在一些实施方案中,ABD结合肿瘤相关抗原。在一些实施方案中,肿瘤细胞特征性抗原(例如,与肿瘤细胞或癌细胞相关的抗原)或肿瘤相关抗原选自细胞表面受体、离子通道连接的受体、酶连接的受体、G蛋白偶联受体、受体酪氨酸激酶、酪氨酸激酶相关受体、受体样酪氨酸磷酸酶、受体丝氨酸/苏氨酸激酶、受体鸟苷酸环化酶、组氨酸激酶相关受体。

[0407] 在一些实施方案中,靶抗原是包括但不限于以下的抗原:表皮生长因子受体

(EGFR) (包括ErbB1/EGFR、ErbB2/HER2、ErbB3/HER3和ErbB4/HER4)、成纤维细胞生长因子受体(FGFR) (包括FGF1、FGF2、FGF3、FGF4、FGF5、FGF6、FGF7、FGF18和FGF21)、血管内皮生长因子受体(VEGFR) (包括VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D和PIGF)、RET受体和Eph受体家族(包括EphA1、EphA2、EphA3、EphA4、EphA5、EphA6、EphA7、EphA8、EphA9、EphA10、EphB1、EphB2、EphB3、EphB4和EphB6)、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR6、CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR8、CFTR、CIC-1、CIC-2、CIC-4、CIC-5、CIC-7、CIC-Ka、CIC-Kb、黄斑病蛋白(Bestrophin)、TMEM16A、GABA受体、甘氨酸受体、ABC转运蛋白、NAV1.1、NAV1.2、NAV1.3、NAV1.4、NAV1.5、NAV1.6、NAV1.7、NAV1.8、NAV1.9、鞘氨醇-1-磷酸受体(S1P1R)、NMDA通道、跨膜蛋白、多次跨膜蛋白、T细胞受体基序; T细胞 $\alpha$ 链; T细胞 $\beta$ 链; T细胞 $\gamma$ 链; T细胞 $\delta$ 链、CCR7、CD3、CD4、CD5、CD7、CD8、CD11b、CD11c、CD16、CD19、CD20、CD21、CD22、CD25、CD28、CD34、CD35、CD40、CD45RA、CD45RO、CD52、CD56、CD62L、CD68、CD80、CD95、CD117、CD127、CD133、CD137(4-1BB)、CD163、F4/80、IL-4Ra、Sca-1、CTLA-4、GITR、GARP、LAP、颗粒酶B、LFA-1、转铁蛋白受体、NKp46、穿孔素、CD4+、Th1、Th2、Th17、Th40、Th22、Th9、Tfh、规范Treg、FoxP3+、Tr1、Th3、Treg17、T<sub>RE</sub>G、CDCP、NT5E、EpCAM、CEA、gpA33、黏蛋白、TAG-72、碳酸酐酶IX、PSMA、叶酸结合蛋白、神经节苷脂(例如, CD2、CD3、GM2)、Lewis- $\gamma^2$ 、VEGF、VEGFR 1/2/3、 $\alpha$ V $\beta$ 3、 $\alpha$ 5 $\beta$ 1、ErbB1/EGFR、ErbB1/HER2、ErB3、c-MET、IGF1R、EphA3、TRAIL-R1、TRAIL-R2、RANKL、FAP、肌腱蛋白、PDL-1、BAFF、HDAC、ABL、FLT3、KIT、MET、RET、IL-1 $\beta$ 、ALK、RANKL、mTOR、CTLA-4、IL-6、IL-6R、JAK3、BRAF、PTCH、Smoothened、PIGF、ANPEP、TIMP1、PLAUR、PTPRJ、LTBR或ANTXR1、叶酸受体 $\alpha$ (Fr $\alpha$ )、ERBB2(Her2/neu)、EphA2、IL-13Ra2、表皮生长因子受体(EGFR)、间皮素、TSHR、CD19、CD123、CD22、CD30、CD171、CS-1、CLL-1、CD33、EGFRvIII、GD2、GD3、BCMA、MUC16(CA125)、L1CAM、LeY、MSLN、IL13R $\alpha$ 1、L1-CAM、Tn Ag、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、ROR1、FLT3、FAP、TAG72、CD38、CD44v6、CEA、EPCAM、B7H3、KIT、白介素-11受体a(IL-11Ra)、PSCA、PRSS21、VEGFR2、LewisY、CD24、血小板衍生生长因子受体- $\beta$ (PDGFR- $\beta$ )、SSEA-4、CD20、MUC1、NCAM、前列腺酶、PAP、ELF2M、肝配蛋白B2、IGF-1受体、CAIX、LMP2、gp100、bcr-abl、酪氨酸酶、岩藻糖基GM1、sLe、GM3、TGS5、HMWMAA、o-乙酰基-GD2、叶酸受体 $\beta$ 、TEM1/CD248、TEM7R、CLDN6、GPCR5D、CXORF61、CD97、CD179a、ALK、聚唾液酸、PLAC1、GloboH、NY-BR-1、UPK2、HAVCR1、ADRB3、PANX3、GPR20、LY6K、OR51E2、TARP、WT1、NY-ESO-1、LAGE-1a、MAGE-A1、天冬酰胺内肽酶(legumain)、HPV E6、E7、ETV6-AML、精子蛋白17、XAGE1、Tie 2、MAD-CT-1、MAD-CT-2、主要组织相容性复合物I类相关基因蛋白(MR1)、尿激酶型纤溶酶原活化因子受体(uPAR)、Fos-相关抗原1、p53、p53突变体、prostest、生存素、端粒酶、PCTA-1/半乳糖凝集素8、MelanA/MART1、Ras突变体、hTERT、肉瘤易位断点、ML-IAP、ERG(TMPRSS2 ETS融合基因)、NA17、PAX3、雄激素受体、细胞周期蛋白B1、MYCN、RhoC、TRP-2、CYPIB I、BORIS、SART3、PAX5、OY-TEST1、LCK、AKAP-4、SSX2、RAGE-1、人端粒酶逆转录酶、RU1、RU2、肠羧基酯酶、mut hsp70-2、CD79a、CD79b、CD72、LAIR1、FCAR、LILRA2、CD300LF、CLEC12A、BST2、EMR2、LY75、GPC3、FCRL5、IGLL1、新抗原、CD133、CD15、CD184、CD24、CD56、CD26、CD29、CD44、HLA-A、HLA-B、HLA-C、(HLA-A、B、C)、H2-M3、CD49f、CD151、CD340、CD200、tkrA、tkrB或tkrC或其抗原片段或抗原部分。

[0408] 在一些实施方案中, 示例性靶抗原包括但不限于CDS、CD19、CD20、CD22、CD23、CD30、CD70、 $\kappa$ 、 $\lambda$ 和B细胞成熟剂(BCMA)(与白血病相关); CS1/SLAMF7、CD38、CD138、GPCR5D、



TACI和BCMA(与骨髓瘤相关);GD2、HER2、EGFR、EGFRv111、B7H3、PSMA、PSCA、CAIX、CD171、CEA、CSPG4、EPHA2、FAP、FR $\alpha$ 、IL-13R $\alpha$ 、间皮素、MUC1、MUC16和ROR1(与实体瘤相关)。

[0409] 在一些实施方案中,CAR是CD19 CAR。在一些实施方案中,CD19 CAR的胞外结合结构域包含特异性结合CD19(例如,人CD19)的抗体。在一些实施方案中,CD19 CAR的胞外结合结构域包含来源于FMC63单克隆抗体(FMC63)的scFv抗体片段,其包含通过接头肽连接的FMC63的重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)。在一些实施方案中,接头肽是“Whitlow”接头肽。FMC63和衍生的scFv已在Nicholson等人, *Mal. Immun.* 34(16-17):1157-1165(1997)和PCT申请公开号W02018/213337A1中进行了描述,这些文献中每一篇的全部内容都通过引用并入本文。

[0410] 在一些实施方案中,CD19 CAR的胞外结合结构域包含来源于CD19特异性抗体之一的抗体,包括例如SJ25C1(Bejcek等人, *Cancer Res.* 55:2346-2351(1995))、HD37(Pezutto等人, *J. Immunol.* 138(9):2793-2799(1987))、4G7(Meeker等人, *Hybridoma* 3:305-320(1984))、B43(Bejcek(1995))、BLY3(Bejcek(1995))、B4(Freedman等人, 70:418-427(1987))、B4 HB12b(Kansas和Tedder, *J. Immunol.* 147:4094-4102(1991));Yazawa等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:15178-15183(2005);Herbst等人, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 335:213-222(2010)、BU12(Gallard等人, *J. Immunology*, 148(10):2983-2987(1992))和CLB-CD19(De Rie *Cell. Immunol.* 118:368-381(1989))。

[0411] 在一些实施方案中,CAR是CD22 CAR。CD22是一种跨膜蛋白,主要存在于成熟B细胞的表面,充当B细胞受体(BCR)信号传导的抑制性受体。CD22在60-70%的B细胞淋巴瘤和白血病(例如,慢性B淋巴细胞白血病、毛细胞白血病、急性淋巴细胞白血病(ALL)和伯基特淋巴瘤(Burkitt's lymphoma))中表达,并且在B细胞发育早期阶段的细胞表面或干细胞上不存在。在一些实施方案中,CD22 CAR包含特异性结合CD22的胞外结合结构域、跨膜结构域、胞内信号传导结构域和/或胞内共刺激结构域。在一些实施方案中,CD22 CAR的胞外结合结构域包含来源于m971单克隆抗体(m971)的scFv抗体片段,其包含通过接头连接的m971的重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)。在一些实施方案中,CD22 CAR的胞外结合结构域包含来源于m971-L7的scFv抗体片段,其是与亲本抗体m971相比CD22结合亲和力显著提高(从约2nM提高至小于50pM)的m971的亲和力成熟变体。在一些实施方案中,来源于m971-L7的scFv抗体片段包含通过3xG4S接头连接的m971-L7的VH和VL。在一些实施方案中,CD22 CAR的胞外结合结构域包含免疫毒素HA22或BL22。免疫毒素BL22和HA22是包含与细菌毒素融合的对CD22具有特异性的scFv的治疗剂,因此可以与表达CD22的癌细胞的表面结合并杀伤癌细胞。BL22包含抗CD22抗体RFB4的dsFv,其与38-kDa截短形式的假单胞菌外毒素A融合(Bang等人, *Clin. Cancer Res.*, 11:1545-50(2005))。HA22(CAT8015,莫塞妥单抗(moxetumomab pasudotox))是BL22的突变的、较高亲和力形式(Ho等人, *J. Biol. Chem.*, 280(1):607-17(2005))。对CD22具有特异性的HA22和BL22的抗原结合结构域的合适序列公开于例如美国专利号7,541,034;7,355,012;和7,982,011中,这些专利据此通过引用整体并入。

[0412] 在一些实施方案中,CAR是BCMACAR。BCMA是在B细胞谱系的细胞上表达的肿瘤坏死家族受体(TNFR)成员,在终末分化的B细胞或成熟的B淋巴细胞上表达最高。BCMA参与介导浆细胞的存活以维持长期体液免疫。最近发现,BCMA的表达与多种癌症有关,诸如多发性骨髓瘤、霍奇金和非霍奇金淋巴瘤、各种白血病和胶质母细胞瘤。在一些实施方案中,BCMACAR

包含特异性结合BCMA的胞外结合结构域、跨膜结构域、胞内信号传导结构域和/或胞内共刺激结构域。在一些实施方案中,BCMACAR的胞外结合结构域包含特异性结合BCMA(例如,人BCMA)的抗体。针对BCMA的CAR已在PCT申请公开号WO2016/014789、WO2016/014565、WO2013/154760和WO 2015/128653中描述。PCT申请公开号WO2015/166073和WO2014/068079中还公开了BCMA结合抗体。在一些实施方案中,BCMACAR的胞外结合结构域包含来源于鼠单克隆抗体的scFv抗体片段,所述鼠单克隆抗体如Carpenter等人,Clin.Cancer Res.19(8):2048-2060(2013)中所述。在一些实施方案中,scFv抗体片段是鼠单克隆抗体的人源化形式(Sommermeier等人,Leukemia 31:2191-2199(2017))。在一些实施方案中,BCMACAR的胞外结合结构域包含两条重链(VHH)的单个可变片段,其可以结合BCMA的两个表位,如Zhao等人,J.Hematol.Oncol.11(1):141(2018)中所述。在一些实施方案中,BCMACAR的胞外结合结构域包含完全人重链可变结构域(FHvH),如Lam等人,Nat.Comm.11(1):283(2020)中所述。

[0413] 在一些实施方案中,抗原结合结构域靶向自身免疫或炎症病症特征性抗原。在一些实施方案中,ABD结合与自身免疫或炎症病症相关的抗原。在一些情况下,抗原由与自身免疫或炎症病症相关的细胞表达。在一些实施方案中,自身免疫或炎症病症选自慢性移植抗宿主病(GVHD)、狼疮、关节炎、免疫复合物肾小球肾炎、古德帕斯丘病(goodpasture)、葡萄膜炎、肝炎、系统性硬化症或硬皮病、I型糖尿病、多发性硬化、冷凝集素病、寻常型天疱疮、格雷夫氏病、自身免疫性溶血性贫血、A型血友病、原发性干燥综合征、血栓性血小板减少性紫癜、视神经脊髓炎、埃文氏综合征、IgM介导的神经病、冷球蛋白血症、皮炎、特发性血小板减少症、强直性脊柱炎、大疱性类天疱疮、获得性血管性水肿、慢性荨麻疹、抗磷脂脱髓鞘性多发性神经病和自身免疫性血小板减少症或中性粒细胞减少症或纯红细胞再生障碍,虽然同种免疫疾病的示例性非限制性实例包括同种异体致敏(参见例如Blazar等人,2015,Am.J.Transplant,15(4):931-41)或来自造血或实体器官移植、输血、妊娠与胎儿的异种致敏、新生儿同种免疫血小板减少症、新生儿溶血性疾病、对外来抗原的致敏,诸如用酶或蛋白质替代治疗的遗传性或获得性缺陷病症的替代、血液制品和基因疗法可发生。在一些情况下,同种致敏是指针对MHC分子(例如,人白细胞抗原)的免疫反应(诸如循环抗体)的发生,受体受试者或怀孕受试者的免疫系统认为所述MHC分子是非自身抗原。在一些实施方案中,自身免疫或炎症病症特征性抗原选自细胞表面受体、离子通道连接的受体、酶连接的受体、G蛋白偶联受体、受体酪氨酸激酶、酪氨酸激酶相关受体、受体样酪氨酸磷酸酶、受体丝氨酸/苏氨酸激酶、受体鸟苷酸环化酶或组氨酸激酶相关受体。

[0414] 在一些实施方案中,CAR的抗原结合结构域结合B细胞、浆细胞或成浆细胞上表达的配体。在一些实施方案中,CAR的抗原结合结构域结合CD10、CD19、CD20、CD22、CD24、CD27、CD38、CD45R、CD138、CD319、BCMA、CD28、TNF、干扰素受体、GM-CSF、ZAP-70、LFA-1、CD3 $\gamma$ 、CD5或CD2。参见US2003/0077249;WO 2017/058753;WO 2017/058850,其内容通过引用并入本文。在一些实施方案中,CAR是抗CD19 CAR。在一些实施方案中,CAR是抗BCMACAR。

[0415] 在一些实施方案中,抗原结合结构域靶向衰老细胞特征性抗原,例如尿激酶型纤溶酶原活化因子受体(uPAR)。在一些实施方案中,ABD结合与衰老细胞相关的抗原。在一些情况下,抗原由衰老细胞表达。在一些实施方案中,CAR可以用于治疗或预防以衰老细胞的异常积累为特征的病症,例如肝和肺纤维化、动脉粥样硬化、糖尿病和骨关节炎。

[0416] 在一些实施方案中,抗原结合结构域靶向感染性疾病特征性抗原。在一些实施方案中,ABD结合与感染性疾病相关的抗原。在一些情况下,抗原由感染性疾病的细胞表达。在一些实施方案中,其中感染性疾病选自HIV、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、人疱疹病毒、人疱疹病毒8型(HHV-8、卡波西肉瘤相关疱疹病毒(KSHV))、人T-淋巴细胞病毒-1性(HTLV-1)、默克尔细胞多瘤病毒(MCV)、猿猴病毒40(SV40)、爱泼斯坦-巴尔病毒、CMV、人乳头瘤病毒。在一些实施方案中,感染性疾病特征性抗原选自细胞表面受体、离子通道连接的受体、酶连接的受体、G蛋白偶联受体、受体酪氨酸激酶、酪氨酸激酶相关受体、受体样酪氨酸磷酸酶、受体丝氨酸/苏氨酸激酶、受体鸟苷酸环化酶、组氨酸激酶相关受体、HIV Env、gp120或HIV-1Env上的CD4诱导的表位。

[0417] 在这些实施方案中的任一个中,CAR的胞外结合结构域可以针对在宿主细胞中的表达进行密码子优化,或具有变体序列以增加胞外结合结构域的功能。

[0418] 在一些实施方案中,CAR对两种靶抗原具有双特异性。在一些实施方案中,靶抗原是不同的靶抗原。在任何此类实施方案中的一些中,两种不同的靶抗原是上述的任何两种不同的抗原。在一些实施方案中,胞外结合结构域是不同的并且结合来自以下的两种不同抗原:(i)CD19和CD20,(ii)CD20和L1-CAM,(iii)L1-CAM和GD2,(iv)EGFR和L1-CAM,(v)CD19和CD22,(vi)EGFR和C-MET,(vii)EGFR和HER2,(viii)C-MET和HER2,或(ix)EGFR和ROR1。在一些实施方案中,两种不同的抗原结合结构域中的每一种是scFv。在一些实施方案中,第一scFv的一个可变结构域(VH或VL)的C端经由多肽接头连接至第二scFv(分别为VL或VH)的N端。在一些实施方案中,接头连接VH的N端与VL的C端或连接VH的C端与VL的N端。这些scFv缺乏天然抗体重链和轻链中存在的恒定区(Fc)。对至少两种不同抗原具有特异性的scFv串联排列并经由跨膜结构域连接到共刺激结构域和胞内信号传导结构域。在一个实施方案中,胞外间隔区结构域可以连接在抗原特异性结合区和跨膜结构域之间。

[0419] 在进一步的实施方案中,CAR的每个抗原特异性靶向区域包含二价(divalent或bivalent)单链可变片段(di-scFv、bi-scFv)。在包含di-scFv的CAR中,通过产生具有两个VH和两个VL区的单肽链,将对每种抗原具有特异性的两种scFv连接在一起,从而产生串联scFv。(Xiong,Cheng-Yi;Natarajan,A;Shi,X B;Denardo,G L;Denardo,S J(2006).“Development of tumor targeting anti-MUC-1multimer:effects of di-scFv unpaired cysteine location on PEGylation and tumor binding”.Protein Engineering Design and Selection 19(8):359-367;Kufer,Peter;Lutterbüse,Ralf;Baeuerle,Patrick A.(2004).“A revival of bispecific antibodies”.Trends in Biotechnology 22(5):238-244)。包含至少两种抗原特异性靶向区的CAR将表达对两种抗原中的每一种具有特异性的两种scFv。对至少两种不同的抗原具有特异性的所得抗原特异性靶向区经由跨膜结构域与共刺激结构域和胞内信号传导结构域连接。在一个实施方案中,胞外间隔区结构域可以连接在抗原特异性结合结构域和跨膜结构域之间。

[0420] 在另一个实施方案中,CAR的每个抗原特异性靶向区域包含双抗体。在双抗体中,scFv是用接头肽产生的,所述接头肽太短使得两个可变区不能折叠在一起,从而驱动scFv二聚化。更短的接头(一个或两个氨基酸)导致三聚体的形成,即所谓的三链抗体(triobody)或三体(tribody)。也可以使用四链抗体(Tetrabody)。

[0421] 在一些实施方案中,细胞被工程化以表达多于一种CAR,诸如两种不同的CAR,其中

每种CAR具有针对不同靶抗原的抗原结合结构域。在任何此类实施方案中的一些中,两种不同的靶抗原是上述的任何两种不同的抗原。在一些实施方案中,胞外结合结构域是不同的并且结合来自以下的两种不同抗原:(i) CD19和CD20, (ii) CD20和L1-CAM, (iii) L1-CAM和GD2, (iv) EGFR和L1-CAM, (v) CD19和CD22, (vi) EGFR和C-MET, (vii) EGFR和HER2, (viii) C-MET和HER2, 或 (ix) EGFR和ROR1。

[0422] 在一些实施方案中,制备两种不同的工程化细胞,其含有提供的修饰,并且每种细胞用不同的CAR工程化。在一些实施方案中,两种不同CAR中的每一种均具有针对不同靶抗原的抗原结合结构域。在任何此类实施方案中的一些中,两种不同的靶抗原是上述的任何两种不同的抗原。在一些实施方案中,胞外结合结构域是不同的并且结合来自以下的两种不同抗原:(i) CD19和CD20, (ii) CD20和L1-CAM, (iii) L1-CAM和GD2, (iv) EGFR和L1-CAM, (v) CD19和CD22, (vi) EGFR和C-MET, (vii) EGFR和HER2, (viii) C-MET和HER2, 或 (ix) EGFR和ROR1。在一些实施方案中,将表达针对第一靶抗原的第一CAR的工程化细胞群(例如低免疫原性)和表达针对第二靶抗原的第二CAR的工程化细胞群(例如低免疫原性)分别施用于受试者。在一些实施方案中,第一和第二细胞群以任何顺序连续施用。例如,在施用表达第一CAR的细胞群之后施用表达第二CAR的细胞群。

[0423] b. 间隔区

[0424] 在一些实施方案中,CAR还包含一个或多个间隔区,例如,其中所述间隔区是抗原结合结构域与跨膜结构域之间的第一间隔区。在一些实施方案中,第一间隔区包括免疫球蛋白恒定区或其变体或修饰形式的至少一部分。在一些实施方案中,间隔区是跨膜结构域与信号传导结构域之间的第二间隔区。在一些实施方案中,第二间隔区是寡肽,例如,其中寡肽包含甘氨酸和丝氨酸残基,例如但不限于甘氨酸-丝氨酸双联体。在一些实施方案中,CAR包含两个或更多个间隔区,例如,抗原结合结构域与跨膜结构域之间的间隔区以及跨膜结构域与信号传导结构域之间的间隔区。

[0425] c. 跨膜结构域

[0426] 在一些实施方案中,CAR跨膜结构域至少包含以下的跨膜区:T细胞受体的 $\alpha$ 、 $\beta$ 或 $\zeta$ 链、CD28、CD3 $\epsilon$ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD28、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154或其功能变体。在一些实施方案中,跨膜结构域至少包含以下的跨膜区:CD8 $\alpha$ 、CD8 $\beta$ 、4-1BB/CD137、CD28、CD34、CD4、Fc $\epsilon$ RI  $\gamma$ 、CD16、OX40/CD134、CD3 $\zeta$ 、CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 、TCR $\alpha$ 、TCR $\beta$ 、TCR $\zeta$ 、CD32、CD64、CD64、CD45、CD5、CD9、CD22、CD37、CD80、CD86、CD40、CD40L/CD154、VEGFR2、FAS和FGFR2B或其功能变体。

[0427] d. 信号传导结构域

[0428] 在一些实施方案中,本文所述的CAR包含选自以下中的一种或多种的一个或至少一个信号传导结构域:B7-1/CD80;B7-2/CD86;B7-H1/PD-L1;B7-H2;B7-H3;B7-H4;B7-H6;B7-H7;BTLA/CD272;CD28;CTLA-4;Gi24/VISTA/B7-H5;ICOS/CD278;PD-1;PD-L2/B7-DC;PDCD6);4-1BB/TNFSF9/CD137;4-1BB配体/TNFSF9;BAFF/BL $\gamma$ S/TNFSF13B;BAFF R/TNFRSF13C;CD27/TNFRSF7;CD27配体/TNFSF7;CD30/TNFRSF8;CD30配体/TNFSF8;CD40/TNFRSF5;CD40/TNFSF5;CD40配体/TNFSF5;DR3/TNFRSF25;GITR/TNFRSF18;GITR配体/TNFSF18;HVEM/TNFRSF14;LIGHT/TNFSF14;淋巴毒素- $\alpha$ /TNF- $\beta$ ;OX40/TNFRSF4;OX40配体/TNFSF4;RELT/TNFRSF19L;TACI/TNFRSF13B;TL1A/TNFSF15;TNF- $\alpha$ ;TNF RII/TNFRSF1B);

2B4/CD244/SLAMF4;BLAME/SLAMF8;CD2;CD2F-10/SLAMF9;CD48/SLAMF2;CD58/LFA-3;CD84/SLAMF5;CD229/SLAMF3;CRACC/SLAMF7;NTB-A/SLAMF6;SLAM/CD150);CD2;CD7;CD53;CD82/Kai-1;CD90/Thy1;CD96;CD160;CD200;CD300a/LMIR1;HLA I类;HLA-DR;Ikaros;整联蛋白 $\alpha$ 4/CD49d;整联蛋白 $\alpha$ 4 $\beta$ 1;整联蛋白 $\alpha$ 4 $\beta$ 7/LPAM-1;LAG-3;TCL1A;TCL1B;CRTAM;DAP12;Dectin-1/CLEC7A;DPPIV/CD26;EphB6;TIM-1/KIM-1/HAVCR;TIM-4;TSLP;TSLP R;淋巴细胞功能相关抗原1(LFA-1);NKG2C、CD3 $\zeta$ 结构域、基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM)、CD27、CD28、4-1BB、CD134/OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、特异性地结合CD83的配体,或其功能片段。

[0429] 在一些实施方案中,至少一个信号传导结构域包含CD3 $\zeta$ 结构域或基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM)或其功能变体。

[0430] 在一些实施方案中,CAR包含作为共刺激结构域的信号传导结构域。在一些实施方案中,CAR包含第二共刺激结构域。在一些实施方案中,CAR包含至少两个共刺激结构域。在一些实施方案中,CAR包含至少三个共刺激结构域。在一些实施方案中,CAR包含共刺激结构域,该共刺激结构域选自CD27、CD28、4-1BB、CD134/OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、与CD83特异性结合的配体中的一种或多种。在一些实施方案中,如果CAR包含两个或更多个共刺激结构域,则两个共刺激结构域是不同的。在一些实施方案中,如果CAR包含两个或更多个共刺激结构域,则两个共刺激结构域是相同的。

[0431] 在其他实施方案中,至少一个信号传导结构域包含(i)CD3 $\zeta$ 结构域,或基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM),或其功能变体;以及(ii)CD28结构域,或4-1BB结构域,或其功能变体。在其他实施方案中,至少一个信号传导结构域包含(i)CD3 $\zeta$ 结构域,或基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM),或其功能变体;以及(ii)CD28结构域或其功能变体;以及(iii)4-1BB结构域,或CD134结构域,或其功能变体。在一些实施方案中,至少一个信号传导结构域包含(i)CD3 $\zeta$ 结构域,或基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM),或其功能变体;以及(ii)CD28结构域或其功能变体;以及(iii)4-1BB结构域,或CD134结构域,或其功能变体;以及(iv)细胞因子或共刺激配体转基因。

[0432] 在一些实施方案中,至少两个信号传导结构域包含CD3 $\zeta$ 结构域或基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM)或其功能变体。在其他实施方案中,至少两个信号传导结构域包含(i)CD3 $\zeta$ 结构域,或基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM),或其功能变体;以及(ii)CD28结构域,或4-1BB结构域,或其功能变体。在其他实施方案中,至少一个信号传导结构域包含(i)CD3 $\zeta$ 结构域,或基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM),或其功能变体;以及(ii)CD28结构域或其功能变体;以及(iii)4-1BB结构域,或CD134结构域,或其功能变体。在一些实施方案中,至少两个信号传导结构域包含(i)CD3 $\zeta$ 结构域,或基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM),或其功能变体;以及(ii)CD28结构域或其功能变体;以及(iii)4-1BB结构域,或CD134结构域,或其功能变体;以及(iv)细胞因子或共刺激配体转基因。

[0433] 在一些实施方案中,至少三个信号传导结构域包含CD3 $\zeta$ 结构域或基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM)或其功能变体。在其他实施方案中,至少三个信号传导结构域包含(i)CD3 $\zeta$ 结构域,或基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM),或其功能变体;以及(ii)CD28结构域,或4-1BB结构域,或其功能变体。在其他实施方案中,至少三个信号传导结构域包含

(i) CD3 $\zeta$ 结构域,或基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM),或其功能变体;(ii) CD28结构域或其功能变体;以及(iii) 4-1BB结构域,或CD134结构域,或其功能变体。在一些实施方案中,至少三个信号传导结构域包含(i) CD3 $\zeta$ 结构域,或基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM),或其功能变体;(ii) CD28结构域或其功能变体;(iii) 4-1BB结构域,或CD134结构域,或其功能变体;以及(iv) 细胞因子或共刺激配体转基因。

[0434] 在一些实施方案中,CAR包含CD3 $\zeta$ 结构域或基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM)或其功能变体。在一些实施方案中,CAR包含(i) CD3 $\zeta$ 结构域,或基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM),或其功能变体;和(ii) CD28结构域,或4-1BB结构域,或其功能变体。

[0435] 在一些实施方案中,CAR包含(i) CD3 $\zeta$ 结构域,或基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM),或其功能变体;(ii) CD28结构域或其功能变体;和(iii) 4-1BB结构域,或CD134结构域,或其功能变体。

[0436] 在一些实施方案中,CAR包含(i) CD3 $\zeta$ 结构域,或基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM),或其功能变体;(ii) CD28结构域,或4-1BB结构域,或其功能变体,和/或(iii) 4-1BB结构域,或CD134结构域,或其功能变体。

[0437] 在一些实施方案中,CAR包含(i) CD3 $\zeta$ 结构域,或基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM),或其功能变体;(ii) CD28结构域或其功能变体;(iii) 4-1BB结构域,或CD134结构域,或其功能变体;和(iv) 细胞因子或共刺激配体转基因。

[0438] e. 示例性CAR

[0439] 在一些实施方案中,CAR包含与抗原(例如肿瘤抗原)结合的胞外抗原结合结构域(例如抗体或抗体片段,诸如scFv)、间隔区(例如含有铰链结构域,诸如本文所述的任何一种)、跨膜结构域(例如本文所述的任何一种)和胞内信号传导结构域(例如本文所述的任何一种胞内信号传导结构域,诸如初级信号传导结构域或共刺激信号传导结构域)。在一些实施方案中,胞内信号传导结构域是或包括初级胞质信号传导结构域。在一些实施方案中,胞内信号传导结构域额外包括共刺激分子的胞内信号传导结构域(例如,共刺激结构域)。任何此类组分可以是如上所述的任何组分。

[0440] CAR的示例性组分的实例描述于表3中。在提供的方面,CAR中的每个组分的序列可以包括表3中列出的任何组合。

组分	序列	SEQ ID NO
胞外结合结构域		
[0441] 抗 CD19 scFv (FMC63)	DIQMTQTTSSLASLGDRVTISCRASQ DISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSR LHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQE DIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITG STSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPG	3

	LVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWI RQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSAL KSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDT AIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTS VTVSS	
抗 CD19 scFv (FMC63)	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQ DISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSR LHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQE DIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITG GGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLV APSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQ PPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKS RLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAI YYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSV TVSS	4
间隔区(例如铰链)		
IgG4 铰链	ESKYGPPCPPCP	5
CD8 铰链	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPE	6
CD28	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHL CPSPLFPGPSKP	7
跨膜		
CD8	ACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAP LAGTCGVLLLSLVITLYC	8
CD28	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFW V	9
CD28	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFW V	10
共刺激结构域		
CD28	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKH YQPYAPPRDFAAYRS	11
4-1BB	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEED GCSCRFPEEEEEGGCEL	12
初级信号传导结构域		
CD3 $\zeta$	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNL GRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRR KNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM KGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTY DALHMQALPPR	13
CD3 $\zeta$	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNL GRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRR KNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM KGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTY DALHMQALPPR	14

[0443] 3. 增加多核苷酸表达(例如,过表达)的方法

[0444] 在一些实施方案中,多核苷酸的表达增加可以通过多种技术中的任一种来进行。例如,用于调节基因和因子(蛋白质)的表达的方法包括基因组编辑技术和RNA或蛋白质表达技术等。对于所有这些技术,使用众所周知的重组技术来产生如本文所概述的重组核酸。

在一些实施方案中,用一种或多种修饰工程化以过表达多核苷酸或增加多核苷酸的表达的细胞是如本文所述的任何源细胞。在一些实施方案中,源细胞是第II.C章节中描述的任何细胞。

[0445] 在一些实施方案中,通过增加内源基因活性(例如,增加外源基因的转录)来增加基因的表达。在一些情况下,通过增加与内源基因可操作连接的启动子或增强子的活性来增加内源基因活性。在一些实施方案中,增加启动子或增强子的活性包括对内源启动子或增强子进行一种或多种修饰,所述修饰增加内源启动子或增强子的活性。在一些情况下,增加内源基因的基因活性包括修饰所述基因的内源启动子。在一些实施方案中,增加内源基因的基因活性包括引入异源启动子。在一些实施方案中,异源启动子选自以下组成的组: CAG启动子、巨细胞病毒(CMV)启动子、EF1a启动子、PGK启动子、腺病毒晚期启动子、牛痘病毒7.5K启动子、SV40启动子、HSV的tk启动子、小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)启动子、HIV的LTR启动子、莫洛尼病毒的启动子、爱泼斯坦巴尔病毒(EBV)启动子、劳斯肉瘤病毒(RSV)启动子和UBC启动子。

[0446] a. DNA结合融合蛋白

[0447] 在一些实施方案中,通过表达含有以下的融合蛋白或蛋白质复合物来增加靶基因(例如,CD47或另一种致耐受因子)的表达:(1)对内源CD47或其他基因具有特异性的位点特异性结合结构域和(2)转录活化因子。

[0448] 在一些实施方案中,调控因子由位点特异性DNA结合核酸分子(诸如指导RNA(gRNA))组成。在一些实施方案中,方法通过位点特异性DNA结合靶蛋白来实现,诸如通过锌指蛋白(ZFP)或含有ZFP的融合蛋白(其也被称为锌指核酸酶(ZFN))来实现。

[0449] 在一些实施方案中,调控因子包含位点特异性结合结构域,诸如使用DNA结合蛋白或DNA结合核酸,其与靶向区域的基因特异性结合或杂交。在一些实施方案中,所提供的多核苷酸或多肽与位点特异性核酸酶(诸如修饰的核酸酶)偶联或复合。例如,在一些实施方案中,使用包含修饰的核酸酶的DNA靶向蛋白的融合物来实现施用,诸如使用大范围核酸酶或RNA指导的核酸酶,诸如成簇规律间隔短回文核酸(CRISPR)-Cas系统,诸如CRISPR-Cas9系统。在一些实施方案中,核酸酶经修饰以缺乏核酸酶活性。在一些实施方案中,修饰的核酸酶是催化死亡的dCas9。

[0450] 在一些实施方案中,位点特异性结合结构域可来源于核酸酶。例如,归巢核酸内切酶和大范围核酸酶的识别序列,诸如I-SceI、I-CeuI、PI-PspI、PI-Sce、I-SceIV、I-CsmI、I-PanI、I-SceII、I-PpoI、I-SceIII、I-CreI、I-TevI、I-TevII和I-TevIII。另见美国专利号5,420,032;美国专利号6,833,252;Belfort等人,(1997)Nucleic Acids Res.25:3379-3388;Dujon等人,(1989)Gene 82:115-118;Perler等人,(1994)Nucleic Acids Res.22,1125-1127;Jasin(1996)Trends Genet.12:224-228;Gimble等人,(1996)J.Mol.Biol.263:163-180;Argast等人,(1998)J.Mol.Biol.280:345-353和New England Biolabs目录。此外,可以对归巢核酸内切酶和大范围核酸酶的DNA结合特异性进行工程化以结合非天然靶位点。参见例如,Chevalier等人,(2002)Molec.Cell 10:895-905;Epinat等人,(2003)Nucleic Acids Res.31:2952-2962;Ashworth等人,(2006)Nature 441:656-659;Paques等人,(2007)Current Gene Therapy 7:49-66;美国专利公开号2007/0117128。

[0451] 锌指、TALE和CRISPR系统结合结构域可以被“工程化”以结合预定的核苷酸序列,



例如经由天然存在的锌指或TALE蛋白的识别螺旋区域的工程化(改变一个或多个氨基酸)。工程化DNA结合蛋白(锌指或TALE)是非天然存在的蛋白质。合理的设计标准包括应用取代规则和计算机化算法来处理存储现有ZFP和/或TALE设计和结合数据的信息的数据库中的信息。参见例如美国专利号6,140,081;6,453,242;和6,534,261;另见WO 98/53058;WO 98/53059;WO 98/53060;WO 02/016536和WO 03/016496和美国公开号20110301073。

[0452] 在一些实施方案中,位点特异性结合结构域包含一种或多种以序列特异性方式结合DNA的锌指蛋白(ZFP)或其结构域。ZFP或其结构域是通过一种或多种锌指以序列特异性方式结合DNA的较大蛋白质内的蛋白质或结构域,所述一种或多种锌指是其结构通过锌离子配位而稳定的结合结构域内的氨基酸序列区域。

[0453] 在ZFP中,有靶向特定DNA序列的人工ZFP结构域,长度通常为9-18个核苷酸,由个别指组装生成。ZFP包括其中单一指结构域的长度为大约30个氨基酸并且含有 $\alpha$ 螺旋,并且具有两个、三个、四个、五个或六个指的ZFP,所述 $\alpha$ 螺旋含有两个不变的组氨酸残基,所述组氨酸残基通过锌与单一 $\beta$ 转角两个半胱氨酸配位。通常,ZFP的序列特异性可以通过在锌指识别螺旋上的四个螺旋位置(-1、2、3和6)处进行氨基酸取代来改变。因此,在一些实施方案中,ZFP或含有ZFP的分子是非天然存在的,例如,被工程化以与选择的靶位点结合。参见例如,Beerli等人(2002) *Nature Biotechnol.* 20:135-141;Pabo等人(2001) *Ann.Rev.Biochem.* 70:313-340;Isalan等人(2001) *Nature Biotechnol.* 19:656-660;Segal等人(2001) *Curr.Opin.Biotechnol.* 12:632-637;Choo等人(2000) *Curr.Opin.Struct.Biol.* 10:411-416;美国公开号6,453,242;6,534,261;6,599,692;6,503,717;6,689,558;7,030,215;6,794,136;7,067,317;7,262,054;7,070,934;7,361,635;7,253,273;和美国专利公开号2005/0064474;2007/0218528;2005/0267061,所述文献通过引用整体并入本文。

[0454] 许多基因特异性工程化锌指是可商购获得的。例如,Sangamo Biosciences (Richmond,CA,USA) 与Sigma-Aldrich (St.Louis,MO,USA) 合作开发了用于锌指构建的平台(CompoZr),其允许研究人员绕过锌指构建与验证,并且为数千种蛋白质提供特异性靶向的锌指(Gaj等人, *Trends in Biotechnology*, 2013, 31 (7), 397-405)。在一些实施方案中,使用或定制设计可商购获得的锌指。

[0455] 在一些实施方案中,位点特异性结合结构域包含天然存在的或工程化的(非天然存在的)转录活化因子样蛋白(TAL) DNA结合结构域,诸如转录活化因子样蛋白效应物(TALE)蛋白中的所述结构域,参见例如美国专利公开号20110301073,其通过引用整体并入本文。

[0456] 在一些实施方案中,位点特异性结合结构域来源于CRISPR/Cas系统。一般来讲,“CRISPR系统”统指参与表达CRISPR相关(“Cas”)基因或指导其活性的转录物和其他元件,包括编码Cas基因的序列、tracr(反式活化CRISPR)序列(例如, tracrRNA或活性部分 tracrRNA)、tracr伴侣序列(在内源CRISPR系统的上下文中涵盖“直接重复序列”和 tracrRNA加工的部分直接重复序列)、指导序列(在内源CRISPR系统的上下文中也被称为“间隔区”,或“靶向序列”)和/或来自CRISPR基因座的其他序列和转录物。

[0457] 一般来讲,指导序列包括靶向结构域(例如靶向序列),所述靶向结构域包含与靶多核苷酸序列具有足够互补性以与靶序列杂交并且指导CRISPR复合物与靶序列的序列特

异性结合的多核苷酸序列。在一些实施方案中,当使用合适的比对算法进行最佳比对时,指导序列与其对应靶序列之间的互补程度为约或大于约50%、60%、75%、80%、85%、90%、95%、97.5%、99%或更多。在一些实例中,gRNA的靶向结构域与靶核酸上的靶序列互补,例如至少80%、85%、90%、95%、98%或99%互补,例如完全互补。

[0458] 在一些实施方案中,gRNA可以是如本文所述的任何gRNA。在特定实施方案中,gRNA具有与以下的靶位点互补的靶向序列:CD47,诸如SEQ ID NO:200784-231885(W02016183041的表29,附录22)中任一个所示;HLA-E,诸如SEQ ID NO:189859-193183(W02016183041的表19,附录12)中任一个所示;HLA-F,诸如SEQ ID NO:688808-699754(W02016183041的表45,附录38)中任一个所示;HLA-G,诸如SEQ ID NO:188372-189858(W02016183041的表18,附录11)中任一个所示;或PD-L1,诸如SEQ ID NO:193184-200783(W02016183041的表21,附录14)中任一个所示。

[0459] 在一些实施方案中,靶位点在靶基因的转录起始位点的上游。在一些实施方案中,靶位点与基因的转录起始位点相邻。在一些实施方案中,靶位点与基因转录起始位点下游的RNA聚合酶暂停位点相邻。

[0460] 在一些实施方案中,靶向结构域被配置为靶向靶基因的启动子区域以促进转录起始、一种或多种转录增强子或活化因子和/或RNA聚合酶的结合。一种或多种gRNA可用于靶向基因的启动子区域。在一些实施方案中,可以靶向基因的一个或多个区域。在某些方面,靶位点位于基因转录起始位点(TSS)任一侧的600个碱基对内。

[0461] 设计或鉴定作为或包含靶向基因的序列(包括外显子序列和调控区(包括启动子和活化因子)的序列)的gRNA序列(即,gRNA靶向序列)在技术人员的水平内。用于CRISPR基因组编辑的全基因组gRNA数据库是公开可用的,其含有人基因组或小鼠基因组中的基因的组成型外显子中的示例性单一指导RNA(sgRNA)靶序列(参见,例如,genescript.com/gRNA-database.html;另见Sanjana等人(2014)Nat.Methods,11:783-4;www.e-crisp.org/E-CRISP/;crispr.mit.edu/)。在一些实施方案中,gRNA序列是或包含与非靶基因具有最小脱靶结合的靶向序列。

[0462] 在一些实施方案中,调控因子还包含功能结构域,例如转录活化因子。

[0463] 在一些实施方案中,转录活化因子是或含有一种或多种调控元件,诸如靶基因的一种或多种转录控制元件,由此识别如上文所提供的位点特异性结构域以驱动这种基因的表达。在一些实施方案中,转录活化因子驱动靶基因的表达。在一些情况下,转录活化因子可以是或含有异源反式活化结构域的全部或一部分。例如,在一些实施方案中,转录活化因子选自单纯疱疹衍生的反式活化结构域、Dnmt3a甲基转移酶结构域、p65、VP16和VP64。

[0464] 在一些实施方案中,调控因子是锌指转录因子(ZF-TF)。在一些实施方案中,调控因子是VP64-p65-Rta(VPR)。

[0465] 在某些实施方案中,调控因子还包含转录调控结构域。常见结构域包括,例如,转录因子结构域(活化因子、阻遏因子、共活化因子、共阻遏因子)、沉默子、癌基因(例如,myc、jun、fos、myb、max、mad、rel、ets、bcl、myb、mos家族成员等);DNA修复酶及其相关因子和修饰因子;DNA重排酶及其相关因子和修饰因子;染色质相关蛋白及其修饰因子(例如,激酶、乙酰化酶和去乙酰化酶);和DNA修饰酶(例如,甲基转移酶,诸如DNMT家族成员(例如, DNMT1、DNMT3A、DNMT3B、DNMT3L等、拓扑异构酶、解旋酶、连接酶、激酶、磷酸酶、聚合酶、核酸

内切酶)及其相关因子和修饰因子。参见,例如,美国公开号2013/0253040,其通过引用整体并入本文。

[0466] 用于实现活化的合适结构域包括HSV VP 16活化结构域(参见,例如,Hagmann等人, *J. Virol.* 71, 5952-5962 (1977))核激素受体(参见,例如,Torchia等人, *Curr. Opin. Cell. Biol.* 10:373-383 (1998));核因子 $\kappa$ B的p65亚基(Bitko和Bank, *J. Virol.* 72:5610-5618 (1998)和Doyle和Hunt, *Neuroreport* 8:2937-2942 (1997));Liu等人, *Cancer Gene Ther.* 5:3-28 (1998))或人工嵌合功能结构域,诸如VP64(Beerli等人, (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:14623-33)、和降解决定子(Molinari等人, (1999) *EMBO J.* 18, 6439-6447)。额外的示例性活化结构域包括Oct 1、Oct-2A、Sp1、AP-2和CTF1 (Seipel等人, *EMBO J.* 11, 4961-4968 (1992)以及p300、CBP、PCAF、SRC1、PvALF、AtHD2A和ERF-2。参见,例如,Robyr等人, (2000) *Mol. Endocrinol.* 14:329-347;Collingwood等人, (1999) *J. Mol. Endocrinol.* 23:255-275;Leo等人, (2000) *Gene* 245:1-11;Manteuffel-Cymborowska (1999) *Acta Biochim. Pol.* 46:77-89;McKenna等人, (1999) *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 69:3-12;Malik等人, (2000) *Trends Biochem. Sci.* 25:277-283;和Lemon等人, (1999) *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9:499-504。额外的示例性活化结构域包括但不限于OsGAI、HALF-1、C1、AP1、ARF-5、-6、-1和-8、CPRF1、CPRF4、MYC-RP/GP和TRAB1,参见,例如,Ogawa等人, (2000) *Gene* 245:21-29;Okanami等人, (1996) *Genes Cells* 1:87-99;Goff等人, (1991) *Genes Dev.* 5:298-309;Cho等人, (1999) *Plant Mol Biol* 40:419-429;Ulmason等人, (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:5844-5849;Sprenger-Haussels等人, (2000) *Plant J.* 22:1-8;Gong等人, (1999) *Plant Mol. Biol.* 41:33-44;和Hobo等人, (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:15,348-15,353。

[0467] 可用于制备遗传阻遏因子的示例性阻遏结构域包括但不限于KRAB A/B、KOX、TGF- $\beta$ -诱导型早期基因(TIEG)、v-erbA、SID、MBD2、MBD3、DNMT家族成员(例如, DNMT1、DNMT3A、DNMT3B、DNMT3L等)、Rb和MeCP2。参见,例如, Bird等人, (1999) *Cell* 99:451-454;Tyler等人, (1999) *Cell* 99:443-446;Knoepfler等人, (1999) *Cell* 99:447-450;和Robertson等人, (2000) *Nature Genet.* 25:338-342。额外的示例性阻遏结构域包括但不限于ROM2和AtHD2A。参见,例如, Chem等人, (1996) *Plant Cell* 8:305-321;和Wu等人, (2000) *Plant J.* 22:19-27。

[0468] 在一些情况下,所述结构域参与染色体的表观遗传调控。在一些实施方案中,所述结构域是组蛋白乙酰转移酶(HAT),例如A型、核定位的,诸如MYST家族成员MOZ、Ybf2/Sas3、MOF和Tip60、GNAT家族成员Gen5或pCAF、p300家族成员CBP、p300或Rtt109 (Bemdsen和Denu (2008) *Curr Opin Struct Biol* 18(6):682-689)。在其他情况下,所述结构域是组蛋白去乙酰化酶(HDAC),诸如I类(HDAC-1、2、3和8)、II类分子(HDAC IIA(HDAC-4、5、7和9)、HDAC IIB(HDAC 6和10))、IV类(HDAC-11)、III类(也称为sirtuin(SIRT);SIRT1-7)(参见Mottamal等人, (2015) *Molecules* 20(3):3898-3941)。在一些实施方案中使用的另一个结构域是组蛋白磷酸化酶或激酶,其中实例包括MSK1、MSK2、ATR、ATM、DNA-PK、Bub1、VprBP、IKK- $\alpha$ 、PKC $\pi$ 、Dik/Zip、JAK2、PKC $\zeta$ 、WSTF和CK2。在一些实施方案中,使用甲基化结构域并且其可以选自诸如Ezh2、PRMT1/6、PRMT5/7、PRMT 2/6、CARM1、set7/9、MLL、ALL-1、Suv 39h、G9a、SETDB1、Ezh2、Set2、Dot1、PRMT 1/6、PRMT 5/7、PR-Set7和Suv4-20h的组。参与苏木化和生

物素化的结构域(Lys9、13、4、18和12)也可用于一些实施方案中(综述参见Kousarides (2007)Cell 128:693-705)。

[0469] 融合分子通过本领域技术人员众所周知的克隆和生化缀合方法构建。融合分子包含DNA结合结构域和功能结构域(例如,转录活化或阻遏结构域)。融合分子还任选地包含核定位信号(例如,来自SV40培养基T抗原的信号)和表位标签(诸如,例如,FLAG和血凝素)。设计融合蛋白(和编码它们的核酸),使得翻译阅读框保留在融合组分中。

[0470] 一个方面的功能结构域(或其功能片段)的多肽组分与另一方面的非蛋白质DNA结合结构域(例如,抗生素、嵌入剂、小沟结合物、核酸)之间的融合物通过本领域技术人员已知的生化缀合方法来构建。参见,例如Pierce Chemical Company(Rockford, IL)目录。已经描述了用于进行小沟结合物与多肽之间的融合的方法和组合物。Mapp等人,(2000)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 97:3930-3935。同样,CRISPR/Cas TF以及包含与多肽组分功能结构域缔合的sgRNA核酸组分的核酸酶也是本领域技术人员已知的并在本文中详细描述。

[0471] b. 外源多肽

[0472] 在一些实施方案中,通过将编码待过表达的多核苷酸的外源多核苷酸引入原代细胞来介导多核苷酸的表达增加(即过表达)。在一些实施方案中,外源多核苷酸是重组核酸。可以使用众所周知的重组技术来产生如本文所概述的重组核酸。

[0473] 在某些实施方案中,编码外源多核苷酸(诸如致耐受因子或嵌合抗原受体)的重组核酸可以与表达构建体中的一个或多个调控核苷酸序列可操作地连接。调控核苷酸序列通常适用于待治疗的宿主细胞和受体受试者。对于多种宿主细胞,多种类型的适当的表达载体和合适的调控序列是本领域已知的。通常,一种或多种调控核苷酸序列可包括但不限于启动子序列、前导或信号序列、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活化因子序列。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结合多于一个启动子的元件的杂合启动子。表达构建体可以存在于细胞中的附加体(诸如质粒)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,表达载体包含可选择标志物基因以允许选择转化的宿主细胞。某些实施方案包括包含编码变体多肽的核苷酸序列的表达载体,所述核苷酸序列可操作地连接到至少一个调控序列。本文使用的调控序列包括启动子、增强子和其他表达控制元件。在某些实施方案中,表达载体被设计用于选择待转化的宿主细胞、期待表达的特定变体多肽、载体的拷贝数、控制所述拷贝数的能力和/或载体编码的任何其他蛋白质(诸如抗生素标志物)的表达。

[0474] 在一些实施方案中,外源多核苷酸可操作地连接至用于在工程化细胞中表达外源多核苷酸的启动子。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:延伸因子1 $\alpha$ (EF1 $\alpha$ )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、劳斯肉瘤病毒(RSV)的长末端重复区、小鼠乳腺肿瘤病毒启动子(MMTV)、莫洛尼氏鼠白血病毒长末端重复区和人巨细胞病毒(CMV)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。在额外的实施方案中,用于哺乳动物宿主细胞的启动子可以从病毒的基因组获得,所述病毒诸如多瘤病毒、禽痘病毒(1989年7月5日公开的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)。在其他实施方案中,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以SV40限制性片段方便地获得,所述限制性片段还含有SV40病毒复制起点(Fiers等人,Nature 273:113-120(1978))。人类巨细胞病毒的即刻早期启动子以HindIII限制酶片段方便地获得(Greenaway等人,Gene 18:355-360(1982))。前述参考文献通过引用整体并入。

[0475] 在一些实施方案中,表达载体是双顺反子或多顺反子表达载体。双顺反子或多顺反子表达载体可以包括(1)与每个开放阅读框融合的多个启动子;(2)基因之间的剪接信号的插入;(3)表达受单一启动子驱动的基因的融合;和(4)基因之间的蛋白水解切割位点(自切割肽)的插入或基因之间的内部核糖体进入位点(IRES)的插入。

[0476] 在一些实施方案中,本文的表达载体或构建体是多顺反子构建体。术语“多顺反子构建体”和“多顺反子载体”在本文中可互换使用,并且指待转录成单个mRNA分子的重组DNA构建体,其中所述单个mRNA分子编码两个或更多个基因(例如,两个或更多个转基因)。如果多顺反子构建体编码两个基因,则其被称为双顺反子构建体;如果多顺反子构建体编码三个基因,则其被称为三顺反子构建体;如果多顺反子构建体编码四个基因,则其被称为四顺反子构建体,以此类推。

[0477] 在一些实施方案中,载体或构建体包含的两种或更多种外源多核苷酸(例如,转基因)各自被多顺反子分离元件分离。在一些实施方案中,多顺反子分离元件是IRES或编码可切割肽或核糖体跳跃元件的序列。在一些实施方案中,多顺反子分离元件是IRES,诸如脑心肌炎(EMCV)病毒IRES。在一些实施方案中,多顺反子分离元件是可切割肽,诸如2A肽。示例性2A肽包括P2A肽、T2A肽、E2A肽和F2A肽。在一些实施方案中,可切割肽是T2A。在一些实施方案中,两种或更多种外源多核苷酸(例如第一外源多核苷酸和第二外源多核苷酸)可操作地连接至启动子。在一些实施方案中,第一外源多核苷酸和第二外源多核苷酸各自可操作地连接至启动子。在一些实施方案中,启动子是相同的启动子。在一些实施方案中,启动子是EF1启动子。

[0478] 在一些情况下,编码外源多肽的外源多核苷酸(例如,编码本文所述的致耐受因子或补体抑制剂的外源多核苷酸)编码可切割肽或核糖体跳跃元件(诸如在由多顺反子载体编码的外源多肽的N端或C端的T2A)。在一些实施方案中,包含可切割肽或核糖体跳跃元件允许从单个翻译起始位点表达两个或更多个多肽。在一些实施方案中,可切割肽是T2A。在一些实施方案中,T2A是或包含SEQ ID NO:15列出的氨基酸序列。在一些实施方案中,T2A是或包含SEQ ID NO:16列出的氨基酸序列。在一些实施方案中,T2A是或包含SEQ ID NO:21列出的氨基酸序列。在一些实施方案中,T2A是或包含SEQ ID NO:22列出的氨基酸序列。

[0479] 在一些实施方案中,载体或构建体包含驱动外源多核苷酸的一个或多个转录单位表达的单个启动子。在一些实施方案中,此类载体或构建体可以是多顺反子的(双顺反子或三顺反子,参见例如美国专利号6,060,273)。例如,在一些实施方案中,转录单位可以被工程化为含有IRES(内部核糖体进入位点)的双顺反子单位,其允许来自从单个启动子转录的RNA的基因产物(例如一种或多种致耐受因子,诸如CD47)的共表达。在一些实施方案中,本文提供的载体或构建体是双顺反子的,允许载体或构建体表达两种单独的多肽。在一些情况下,由载体或构建体编码的两种独立的多肽是致耐受因子(例如,两种因子选自DUX4、B2M-HLA-E、CD35、CD52、CD16、CD52、CD47、CD46、CD55、CD59、CD27、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重链、HLA-G、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1-抑制剂、IL-10、IL-35、FASL、CCL21、MFGE8、

SERPINB9、CD35、IL-39、CD16 Fc受体、IL15-RF和H2-M3(包括其任何组合)。在一些实施方案中,致耐受因子是以下中的两种或更多种:CD47、PD-L1、HLA-E或HLA-G、CCL21、FasL、Serpib9、CD200和Mfge8(包括其任何组合)。在一些实施方案中,由载体或构建体编码的两种独立的多肽是致耐受因子(例如,CD47)。在一些实施方案中,本文提供的载体或构建体是三顺反子的,允许载体或构建体表达三种单独的多肽。在一些情况下,三顺反子载体或构建体的三个核酸序列是致耐受因子诸如CD47。在一些情况下,三顺反子载体或构建体的三个核酸序列是选自以下的三种致耐受因子:DUX4、B2M-HLA-E、CD35、CD52、CD16、CD52、CD47、CD46、CD55、CD59、CD27、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重链、HLA-G、PD-L1、ID01、CTLA4-Ig、C1-抑制剂、IL-10、IL-35、FASL、CCL21、MFGE8、SERPINB9、CD35、IL-39、CD16 Fc受体、IL15-RF和H2-M3(包括其任何组合)。在一些实施方案中,三种致耐受因子选自CD47、PD-L1、HLA-E或HLA-G、CCL21、FasL、Serpib9、CD200和Mfge8(包括其任何组合)。在一些实施方案中,本文提供的载体或构建体是四顺反子的,允许载体或构建体表达四种单独的多肽。在一些情况下,四顺反子载体或构建体的四个独立的多肽是选自以下的四种致耐受因子:DUX4、B2M-HLA-E、CD35、CD52、CD16、CD52、CD47、CD46、CD55、CD59、CD27、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重链、HLA-G、PD-L1、ID01、CTLA4-Ig、C1-抑制剂、IL-10、IL-35、FASL、CCL21、MFGE8、SERPINB9、CD35、IL-39、CD16 Fc受体、IL15-RF和H2-M3(包括其任何组合)。在一些实施方案中,四种致耐受因子选自CD47、PD-L1、HLA-E或HLA-G、CCL21、FasL、Serpib9、CD200和Mfge8(包括其任何组合)。在一些实施方案中,细胞包含一种或多种载体或构建体,其中每种载体或构建体是如上所述的单顺反子或多顺反子构建体,并且单顺反子或多顺反子构建体以任何组合或顺序编码一种或多种致耐受因子。

[0480] 在一些实施方案中,细胞包含一种或多种载体或构建体,其中每种载体或构建体是如上所述的单顺反子或多顺反子构建体,并且单顺反子或多顺反子构建体以任何组合或顺序编码一种或多种致耐受因子。

[0481] 在一些实施方案中,单个启动子引导RNA的表达,所述RNA在单个开放阅读框(ORF)中含有通过编码自切割肽(例如,2A序列)或蛋白酶识别位点(例如,弗林蛋白酶)的序列彼此分离的两个、三个或四个基因(例如编码致耐受因子(例如CD47))。因此,ORF编码单个多肽,所述多肽在翻译期间(在2A的情况下)或翻译后被加工成单独的蛋白质。在一些情况下,肽(诸如T2A)可以导致核糖体跳过(核糖体跳跃)合成2A元件C端处的肽键,导致2A序列末端与下一个肽下游之间的分离(例如,参见de Felipe.Genetic Vaccines and Ther.2:13(2004)和deFelipe等人Traffic 5:616-626(2004))。许多2A元件是本领域已知的。可以用于本文公开的方法和核酸的2A序列的实例包括但不限于来自口蹄疫病毒(F2A,例如SEQ ID NO:20)、马甲型鼻炎病毒(E2A,例如SEQ ID NO:19)、明脉扁刺蛾(thosea asigna)病毒(T2A,例如SEQ ID NO:15、16、21或22)和猪捷申病毒-1(P2A,例如SEQ ID NO:17或18)的2A序列,如美国专利公开号20070116690中所述。

[0482] 在载体或构建体(例如转基因)含有多于一个编码蛋白质的核酸序列(例如编码CD47的第一外源多核苷酸和编码第二转基因的第二外源多核苷酸)的情况下,载体或构建体(例如转基因)还可以包含编码第一和第二外源多核苷酸序列之间的肽的核酸序列。在一些情况下,位于第一和第二外源多核苷酸之间的核酸序列编码在翻译期间或翻译后分离第一和第二外源多核苷酸的翻译产物的肽。在一些实施方案中,肽含有自切割肽或引起核糖

体跳跃的肽(核糖体跳跃元件),诸如T2A肽。在一些实施方案中,包含可切割肽或核糖体跳跃元件允许从单个翻译起始位点表达两个或更多个多肽。在一些实施方案中,肽是自切割肽,其是T2A肽。在一些实施方案中,T2A是或包含SEQ ID NO:15列出的氨基酸序列。在一些实施方案中,T2A是或包含SEQ ID NO:16列出的氨基酸序列。在一些实施方案中,T2A是或包含SEQ ID NO:21列出的氨基酸序列。在一些实施方案中,T2A是或包含SEQ ID NO:22列出的氨基酸序列。

[0483] 将本文所述的多核苷酸引入到原代细胞中的过程可以通过任何合适的技术来实现。合适的技术包括磷酸钙或脂质介导的转染、电穿孔、转座酶介导的递送和使用病毒载体进行的转导或感染。在一些实施方案中,经由病毒转导(例如,慢病毒转导)或者以其他方式在病毒载体上递送(例如,融合原介导的递送),将多核苷酸引入到细胞中。在一些实施方案中,包装编码外源多核苷酸的多核苷酸的载体可以用于将包装的多核苷酸递送至细胞或细胞群。这些载体可以是任何类型,包括DNA载体、RNA载体、质粒、病毒载体和颗粒。在一些实施方案中,脂质纳米颗粒可以用于将外源多核苷酸递送至细胞。在一些实施方案中,病毒载体可以用于将外源多核苷酸递送至细胞。病毒载体技术是众所周知的并且在Sambrook等人(2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)中进行了描述。可用作载体的病毒包括但不限于慢病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒(AAV)载体、单纯疱疹病毒载体、逆转录病毒载体、溶瘤病毒等。在一些实施方案中,将外源多核苷酸引入细胞中可以是特异性的(靶向的)或非特异性的(例如非靶向的)。在一些实施方案中,将外源多核苷酸引入细胞中可以导致整合或插入到细胞的基因组中。在其他实施方案中,引入的外源多核苷酸在细胞中可以是非整合的或游离的。技术人员熟悉将核酸转基因引入细胞的方法,包括本文描述的任何示例性方法,并且可以选择合适的方法。

#### [0484] 1) 非靶向递送

[0485] 在一些实施方案中,通过多种非靶向方法中的任一种将外源多核苷酸引入原代细胞(例如源细胞)中。在一些实施方案中,将外源多核苷酸插入宿主细胞的随机基因组基因座中。如本领域技术人员已知的,病毒载体(包括例如逆转录病毒载体和慢病毒载体)通常用于将遗传物质递送至宿主细胞中并将外来或外源基因随机插入宿主细胞基因组中以促进基因的 stable 表达和复制。在一些实施方案中,将外源多核苷酸非靶向引入细胞中是在外源多核苷酸在细胞中 stable 表达的条件下进行的。在一些实施方案中,用于引入核酸以在细胞中 stable 表达的方法涉及导致核酸 stable 整合到细胞基因组中的任何方法,使得如果其整合到的细胞分裂,则其可以繁殖。

[0486] 在一些实施方案中,病毒载体是慢病毒载体。慢病毒载体是成功病毒转导的特别有用的方式,因为它们允许递送的核酸转录物中含有的基因 stable 表达。慢病毒载体表达逆转录酶和整合酶,这是 stable 表达递送的核酸转录物中所含基因所需的两种酶。逆转录酶将RNA转录物转化为DNA,而整合酶则将DNA插入并整合到靶细胞的基因组中。一旦DNA stable 整合到基因组中,它就会与宿主一起分裂。整合DNA中含有的感兴趣的基因可以组成型表达,或其可以是诱导型的。作为宿主细胞基因组的一部分,它可以经受细胞调控,包括活化或阻遏,取决于靶细胞中的许多因素。

[0487] 慢病毒是病毒的逆转录病毒科的一个亚群,因其在整合到宿主基因组之前需要将病毒RNA基因组逆转录为DNA而得名。因此,慢病毒媒介物/颗粒最重要的特性是其遗传物质

整合到靶/宿主细胞的基因组中。慢病毒的一些实例包括人免疫缺陷病毒:HIV-1和HIV-2、猴免疫缺陷病毒(SIV)、猫免疫缺陷病毒(FIV)、牛免疫缺陷病毒(BIV)、杰姆布拉纳病毒(Jembrana Disease Virus)(JDV)、马传染性贫血病毒(EIAV)、马传染性贫血病毒、维斯纳-梅迪病毒和山羊关节炎脑炎病毒(CAEV)。

[0488] 通常,构成基因递送媒介物的慢病毒颗粒本身存在复制缺陷(也称为“自失活”)。慢病毒能够凭借通过完整宿主核包膜的进入机制来感染分裂细胞和非分裂细胞(Naldini L等人,Curr.Opin.Bioiecknol,1998,9:457-463)。重组慢病毒媒介物/颗粒是通过多重减弱HIV毒力基因产生的,例如基因Env、Vif、Vpr、Vpu、Nef和Tat缺失,从而使载体具有生物安全性。对应地,例如来源于HIV-1/HIV-2的慢病毒媒介物可以介导转基因向非分裂细胞的有效递送、整合和长期表达。

[0489] 慢病毒颗粒可以通过在生产细胞(诸如人HEK293T细胞)中共表达病毒包装元件和载体基因组本身来产生。这些元件通常以三个(在第二代慢病毒系统中)或四个单独的质粒(在第三代慢病毒系统中)提供。生产细胞与编码慢病毒组分的质粒共转染,所述慢病毒组分包括病毒的核心(即结构蛋白)和酶组分,和包膜蛋白(称为包装系统),以及待转移到靶细胞中的编码包含外来转基因的基因组的质粒、媒介物本身(也称为转移载体)。一般来讲,质粒或载体包含在生产细胞系中。经由转染、转导或感染将质粒/载体引入生产细胞系中。转染、转导或感染的方法是本领域技术人员众所周知的。作为非限制性实例,可以通过磷酸钙转染、脂转染或电穿孔将包装和转移构建体通常与显性可选择标志物一起引入生产细胞系中,所述显性可选择标志物诸如新霉素(neo)、二氢叶酸还原酶(DHFR)、谷氨酰胺合成酶或腺苷脱氨酶(ADA),然后在适当的药物存在下进行选择并分离克隆。

[0490] 生产细胞产生含有外来基因的重组病毒颗粒,例如编码外源多核苷酸的多核苷酸。从培养基中回收重组病毒颗粒并通过本领域技术人员使用的标准方法进行滴定。重组慢病毒媒介物可以用于感染靶细胞,此类源细胞包括第II.C章节中描述的任何细胞。

[0491] 可以用于产生高滴度慢病毒颗粒的细胞可以包括但不限于HEK293T细胞、293G细胞、STAR细胞(Relander等人,Mol Ther.2005,11:452-459)、FreeStyle™293表达系统(ThermoFisher,Waltham,MA)和其他基于HEK293T的生产细胞系(例如Stewart等人,Hum Gene Ther.\_2011,2,2.(3):357~369;Lee等人,Biotechnol Bioeng,2012,10996):1551-1560;Throm等人Blood.2009,113(21):5104-5110)。

[0492] 慢病毒颗粒中提供的额外的元件可以包括5'或3'端的逆转录病毒LTR(长末端重复序列)、逆转录病毒输出元件、任选的慢病毒反向反应元件(RRE)、启动子或其活性部分,以及基因座控制区(LCR)或其活性部分。其他元件包括提高非分裂细胞中的转导效率的中央多嘌呤束(cPPT)序列、增强转基因的表达并增加滴度的土拨鼠肝炎病毒(WHP)转录后调控元件(WPRE)。

[0493] 用于产生重组慢病毒颗粒的方法是技术人员已知的,例如,美国专利号:8,846,385;7,745,179;7,629,153;7,575,924;7,179,903;和6,808,905。使用的慢病毒载体可以选自但不限于pLVX、pLenti、pLenti6、pLJM1、FUGW、pWPXL、pWPI、pLenti CMV puro DEST、pLJM1-EGFP、pULTRA、pInducer2Q、pHIV-EGFP、pCW57.1、pTRPE、pELPS、pRRL和pLionII,也可以使用任何已知的慢病毒媒介物(参见美国专利号9,260,725;9,068,199;9,023,646;8,900,858;8,748,169;8,709,799;8,420,104;8,329,462;8,076,106;6,013,516;和5,994,



136;国际专利公开号:W02012079000)。

[0494] 在一些实施方案中,在细胞瞬时表达的条件下将外源多核苷酸引入细胞中,诸如通过导致外源多核苷酸游离递送的方法。

[0495] 在一些实施方案中,编码外源多核苷酸的多核苷酸可以包装到重组腺相关病毒(rAAV)载体中。此类载体或病毒颗粒可以被设计为利用任何已知的血清型衣壳或血清型衣壳的组合。血清型衣壳可以包括来自任何已鉴定的AAV血清型及其变体的衣壳,例如AAV1、AAV2、AAV2G9、AAV3、AAV4、AAV4-4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12和AAVrh10。在一些实施方案中,AAV血清型可以是或具有如以下中所述的序列:美国公开号US20030138772;Pulicherla等人Molecular Therapy, 2011, 19(6):1070-1078;美国专利号:6,156,303;7,198,951;美国专利公开号:US2015/0159173和US2014/0359799;以及国际专利公开号:W01998/011244、W02005/033321和W02014/14422。

[0496] AAV载体不仅包括单链载体,还包括自互补AAV载体(scAAV)。scAAV载体含有一起退火以形成双链载体基因组的DNA。通过跳过第二链合成,scAAV可以在细胞中快速表达。rAAV载体可以通过本领域的标准方法制备,诸如在sf9昆虫细胞中或在人细胞(诸如HEK293细胞)的悬浮细胞培养物中通过三重转染制备。

[0497] 在一些实施方案中,可以使用基于非病毒的方法。例如,在一些方面,包含多核苷酸的载体可以通过非病毒方法(通过物理方法诸如针、电穿孔、声穿孔(sonoporation)、水穿孔(hyrdoporation);化学载剂诸如无机颗粒(例如磷酸钙、二氧化硅、金)和/或化学方法)转移至细胞。在其他方面,合成或天然可生物降解剂可以用于递送,诸如阳离子脂质、脂质纳米乳液、纳米颗粒、基于肽的载体或基于聚合物的载体。

[0498] 2) 靶向递送

[0499] 可以将外源多核苷酸插入原代细胞的任何合适的靶基因组基因座中。在一些实施方案中,通过靶向整合到靶基因座中将外源多核苷酸引入细胞中。在一些实施方案中,可以通过在涉及同源依赖性或非依赖性重组的过程中使用一种或多种核酸酶和/或切口酶以及供体模板进行基因编辑来实现靶向整合。

[0500] 许多基因编辑方法可以用于将外源多核苷酸插入所选的特定基因组基因座中,所述方法包括例如同源定向修复(HOR)、同源介导的末端连接(HMEJ)、同源非依赖性靶向整合(HITI)、专性连结门控重组(ObliGaRe)或精确整合到靶染色体(PITCh)。

[0501] 在一些实施方案中,核酸酶在基因组中的期望位置(例如靶位点)处产生特异性双链断裂(DSB),并利用细胞的内源机制来修复诱导的断裂。切口酶在基因组中的期望位置产生特异性单链断裂。在一个非限制性实例中,两个切口酶可以用于在靶DNA的相对链上产生两个单链断裂,从而产生平端或粘端。可以将任何合适的核酸酶引入细胞中以诱导靶DNA序列的基因组编辑,所述核酸酶包括但不限于CRISPR相关蛋白(Cas)核酸酶、锌指核酸酶(ZFN)、转录活化因子样效应物核酸酶(TALEN)、大范围核酸酶、其他内切核酸酶或外切核酸酶、其变体、其片段及其组合。在一些实施方案中,当核酸酶或切口酶与含有侧接同源序列(例如同源臂)的外源多核苷酸序列(也称为转基因)的供体模板一起引入时,DNA损伤修复途径可以导致转基因序列整合在细胞中的靶位点,所述同源序列与内源基因组靶基因座(例如安全港基因座)处或附近的序列同源。这可以通过同源依赖性过程发生。在一些实施方案中,供体模板是环状双链质粒DNA、单链供体寡核苷酸(ssODN)、线性双链聚合酶链反应

(PCR)片段或完整姐妹染色单体的同源序列。根据供体模板的形式,同源介导的基因插入和替换可以经由特定的DNA修复途径进行,诸如同源定向修复(HDR)、合成依赖性链退火(SDSA)、微同源介导的末端连接(MMEJ)和同源介导的末端连接(HMEJ)途径。

[0502] 例如,DNA修复机制可以在以下之后由核酸酶诱导:(i)两个SSB,其中每条链上都有一个SSB,从而诱导单链悬突;(ii)出现在两条链上的相同切割位点的DSB,从而诱导平端断裂。在被这些剂中的一种切割后,具有SSB或DSB的靶基因座经历DNA损伤修复的两种主要途径之一:(1)易错非同源末端连接(NHEJ),或(2)高保真同源定向修复(HDR)途径。在一些实施方案中,引入其中存在SSB或DSB的细胞中的供体模板(例如环状质粒DNA或线性DNA片段,诸如ssODN)可以导致HDR和将供体模板整合到靶基因座中。一般来讲,在不存在供体模板的情况下,NHEJ过程重新连结切割的DNA链的末端,这通常会导致切割位点处的核苷酸缺失和插入。

[0503] 在一些实施方案中,将外源多核苷酸定点插入细胞中可以通过基于HDR的方法实现。HDR是细胞修复DNA中双链断裂(DSB)的机制,并且可以用于使用各种基因编辑系统(包括成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)/Cas系统、锌指核酸酶(ZFN)、转录活化因子样效应物核酸酶(TALEN)、大范围核酸酶和转座酶)修饰许多生物体中的基因组。

[0504] 在一些实施方案中,通过引入一种或多种序列特异性或靶向核酸酶来进行靶向整合,所述核酸酶包括DNA结合靶向核酸酶和基因编辑核酸酶诸如锌指核酸酶(ZFN)和转录活化因子样效应物核酸酶(TALEN),以及RNA指导的核酸酶诸如CRISPR相关核酸酶(Cas)系统,专门设计为靶向靶基因的至少一个靶位点序列。示例性的ZFN、TALE和TALEN描述于例如Lloyd等人,Frontiers in Immunology,4(221):1-7(2013)中。在特定实施方案中,使用成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)和CRISPR相关(Cas)蛋白在靶位点处或靶位点附近进行靶向遗传破坏。参见Sander和Joung,(2014)Nature Biotechnology,32(4):347-355。

[0505] 可以使用描述于第II A.1章节中的任何用于基因破坏的系统,并且当还引入具有外源多核苷酸(例如转基因序列)的适当供体模板时,所述系统可以导致外源多核苷酸在遗传破坏的靶位点处或附近的靶向整合。在特定实施方案中,使用含有一种或多种指导RNA(gRNA)和Cas蛋白的CRISPR/Cas系统介导遗传破坏。示例性Cas蛋白和gRNA描述于上文第II.A章节,其中任何一种都可以用于HDR介导的外源多核苷酸整合到Crispr/Cas系统特异的靶基因座中。选择适当的Cas核酸酶和gRNA(诸如根据用于通过HDR切割和整合外源多核苷酸的特定靶基因座和靶位点)在技术人员的水平之内。此外,根据靶基因座,技术人员可以容易地制备适当的供体模板,诸如下面进一步描述的。

[0506] 在一些实施方案中,DNA编辑系统是RNA指导的CRISPR/Cas系统(诸如基于RNA的CRISPR/Cas系统),其中CRISPR/Cas系统能够在靶基因座(例如安全港基因座)中产生双链断裂以诱导转基因插入靶基因座。在一些实施方案中,核酸酶系统是CRISPR/Cas9系统。在一些实施方案中,CRISPR/Cas9系统包含基于质粒的Cas9。在一些实施方案中,CRISPR/Cas9系统包含基于RNA的Cas9。在一些实施方案中,CRISPR/Cas9系统包含Cas9 mRNA和gRNA。在一些实施方案中,CRISPR/Cas9系统包含蛋白质/RNA复合物,或质粒/RNA复合物,或蛋白质/质粒复合物。在一些实施方案中,提供了用于生成工程化细胞的方法,所述方法包括将含有转基因或外源多核苷酸序列的供体模板和包括DNA核酸酶系统(例如Cas9)的DNA核酸酶系统以及基因座特异性gRNA引入源细胞(例如原代细胞)中。在一些实施方案中,Cas9作为

mRNA引入。在一些实施方案中,Cas9作为与gRNA的核糖核蛋白复合物引入。

[0507] 一般而言,待插入的供体模板将至少包含含有感兴趣的外源多核苷酸(例如,致耐受因子或CAR)的转基因盒,并且任选地还包含启动子。在这些实施方案的某些中,含有待插入的外源多核苷酸和/或启动子的转基因盒将在供体模板中侧接具有与紧邻靶切割位点上游和下游的序列同源的序列的同源臂,即左同源臂(LHA)和右同源臂(RHA)。通常,供体模板的同源臂是专门为靶基因组基因座设计的,以用作HDR的模板。每个同源臂的长度通常取决于引入的插入物的大小,较大的插入物需要较长的同源臂。

[0508] 在一些实施方案中,供体模板(例如,重组供体修复模板)包含:(i)包含外源多核苷酸序列(例如,可操作地连接至启动子(例如异源启动子)的转基因)的转基因盒;和(ii)侧接转基因盒且与DNA核酸酶(例如,Cas核酸酶,诸如Cas9或Cas12)切割位点任一侧的靶基因座(例如安全港基因座)的部分同源的两个同源臂。供体模板还可以包含可选择标志物、可检测标志物和/或纯化标志物。

[0509] 在一些实施方案中,同源臂长度相同。在其他实施方案中,同源臂长度不同。同源臂可以是至少约10个碱基对(bp),例如至少约10bp、15bp、20bp、25bp、30bp、35bp、45bp、55bp、65bp、75bp、85bp、95bp、100bp、150bp、200bp、250bp、300bp、350bp、400bp、450bp、500bp、550bp、600bp、650bp、700bp、750bp、800bp、850bp、900bp、950bp、1000bp、1.1千碱基(kb)、1.2kb、1.3kb、1.4kb、1.5kb、1.6kb、1.7kb、1.8kb、1.9kb、2.0kb、2.1kb、2.2kb、2.3kb、2.4kb、2.5kb、2.6kb、2.7kb、2.8kb、2.9kb、3.0kb、3.1kb、3.2kb、3.3kb、3.4kb、3.5kb、3.6kb、3.7kb、3.8kb、3.9kb、4.0kb或更长。同源臂可以是约10bp至约4kb,例如约10bp至约20bp、约10bp至约50bp、约10bp至约100bp、约10bp至约200bp、约10bp至约500bp、约10bp至约1 kb、约10bp至约2kb、约10bp至约4kb、约100bp至约200bp、约100bp至约500bp、约100bp至约1kb、约100bp至约2kb、约100bp至约4kb、约500bp至约1 kb、约500bp至约2kb、约500bp至约4kb、约1kb至约2kb、约1kb至约2kb、约1kb至约4kb或约2kb至约4kb。

[0510] 在一些实施方案中,供体模板可以被克隆到表达载体中。可以使用本领域普通技术人员已知的基于常规病毒和非病毒的表达载体。

[0511] 在一些实施方案中,靶向整合的靶基因座可以是任何基因座,其中靶向整合外源多核苷酸或转基因是可接受或期望的。靶基因座的非限制性实例包括但不限于CXCR4基因、白蛋白基因、SHS231基因座、F3基因(也称为CD142)、MICA基因、MICB基因、LRP1基因(也称为CD91)、HMGB1基因、ABO基因、RHD基因、FUT1基因、KDM5D基因(也称为HY)、B2M基因、CIITA基因、TRAC基因、TRBC基因、CCR5基因、F3(即,CD142)基因、LRP1基因、HMGB1基因、ABO基因、RHD基因、FUT1基因、KDM5D(即,HY)基因、PDGFR $\alpha$ 基因、OLIG2基因和/或GFAP基因。在一些实施方案中,外源多核苷酸可以插入靶基因座(例如安全港基因座)的合适区域,包括例如内含子、外显子和/或基因编码区(也称为编码序列,或“CDS”)。在一些实施方案中,插入发生在靶基因组基因座的一个等位基因中。在一些实施方案中,插入发生在靶基因组基因座的两个等位基因中。在这些实施方案的任一个中,插入靶基因组基因座中的转基因的方向可以与此基因座中基因的方向相同或相反。

[0512] 在一些实施方案中,将外源多核苷酸插入到安全港基因座的内含子、外显子或编码序列区域中。在一些实施方案中,将外源多核苷酸插入到内源基因中,其中插入导致内源基因的沉默或表达降低。用于插入外源多核苷酸的示例性基因组基因座在表4中描述。



基因座、PPP1R12C(也称为AAVS1)基因座、CLYBL基因座和/或Rosa基因座(例如,ROSA26基因座)具有特异性的互补部分(例如,gRNA靶向序列)。在一些实施方案中,gRNA靶向的基因组基因座位于所述的任何基因座的4000bp内、3500bp内、3000bp内、2500bp内、2000bp内、1500bp内、1000bp内或500bp内。

[0518] 在一些实施方案中,本文用于HDR介导的转基因插入的gRNA包含识别AAVS1中的靶序列的互补部分(例如gRNA靶向序列)。在这些实施方案的某些中,靶序列位于AAVS1的内含子1中。AAVS1位于染色体19:55,090,918-55,117,637反向链,并且AAVS1内含子1(基于转录本ENSG00000125503)位于染色体19:55,117,222-55,112,796反向链。在某些实施方案中,gRNA靶向染色体19:55,117,222-55,112,796的4000bp内、3500bp内、3000bp内、2500bp内、2000bp内、1500bp内、1000bp内或500bp内的基因组基因座。在某些实施方案中,gRNA靶向染色体19:55,115,674的4000bp内、3500bp内、3000bp内、2500bp内、2000bp内、1500bp内、1000bp内或500bp内的基因组基因座。在某些实施方案中,gRNA被配置成在染色体19:55,115,674处或在染色体19:55,115,674的5、10、15、20、30、40或50个核苷酸内的位置处产生切割位点。在某些实施方案中,gRNA是GET000046,也称为“sgAAVS1-1”,描述于Li等人,Nat.Methods 16:866-869(2019)。此gRNA包含具有SEQ ID NO:26(例如表5)中列出的核酸序列的互补部分(例如gRNA靶向序列)并且靶向AAVS1(也称为PPP1R12C)的内含子1。

[0519] 在一些实施方案中,本文用于HDR介导的转基因插入的gRNA包含识别CLYBL中的靶序列的互补部分(例如gRNA靶向序列)。在这些实施方案的某些中,靶序列位于CLYBL的内含子2中。CLYBL位于染色体13:99,606,669-99,897,134正向链,并且CLYBL内含子2(基于转录本ENST00000376355.7)位于染色体13:99,773,011-99,858,860正向链。在某些实施方案中,gRNA靶向染色体13:99,773,011-99,858,860的4000bp内、3500bp内、3000bp内、2500bp内、2000bp内、1500bp内、1000bp内或500bp内的基因组基因座。在某些实施方案中,gRNA靶向染色体13:99,822,980的4000bp内、3500bp内、3000bp内、2500bp内、2000bp内、1500bp内、1000bp内或500bp内的基因组基因座。在某些实施方案中,gRNA被配置成在染色体13:99,822,980处或在染色体13:99,822,980的5、10、15、20、30、40或50个核苷酸内的位置处产生切割位点。在某些实施方案中,gRNA是GET000047,其包含具有SEQ ID NO:27(例如表5)中列出的核酸序列的互补部分(例如gRNA靶向序列)并且靶向CLYBL的内含子2。靶位点与如Cerbini等人,PLoS One,10(1):e0116032(2015)中所述的TALEN的靶位点类似。

[0520] 在一些实施方案中,本文用于HDR介导的转基因插入的gRNA包含识别CCR5中的靶序列的互补部分(例如gRNA靶向序列)。在这些实施方案的某些中,靶序列位于CCR5的外显子3中。CCR5位于染色体3:46,370,854-46,376,206正向链,并且CCR5外显子3(基于转录本ENST00000292303.4)位于染色体3:46,372,892-46,376,206正向链。在某些实施方案中,gRNA靶向染色体3:46,372,892-46,376,206的4000bp内、3500bp内、3000bp内、2500bp内、2000bp内、1500bp内、1000bp内或500bp内的基因组基因座。在某些实施方案中,gRNA靶向染色体3:46,373,180的4000bp内、3500bp内、3000bp内、2500bp内、2000bp内、1500bp内、1000bp内或500bp内的基因组基因座。在某些实施方案中,gRNA被配置成在染色体3:46,373,180处或在染色体3:46,373,180的5、10、15、20、30、40或50个核苷酸内的位置处产生切割位点。在某些实施方案中,gRNA是GET000048,也称为“crCCR5\_D”,描述于Mandal等人,Cell Stem Cell 15:643-652(2014)。此gRNA包含具有SEQ ID NO:28(例如表5)中列出的核

酸序列的互补部分并且靶向CCR5的外显子3(在Ensembl基因组数据库中替代地注解为外显子2)。参见Gomez-Ospina等人,Nat.Comm.10(1):4045(2019)。

[0521] 表5列出了示例性gRNA靶向序列。在一些实施方案中,gRNA靶向序列可以含有表5中列出的互补部分序列中的一个或多个胸腺嘧啶,其被尿嘧啶取代。本领域普通技术人员应当理解,尿嘧啶和胸腺嘧啶均可以用“t”表示,而不是尿嘧啶用“u”表示且胸腺嘧啶用“t”表示;在核糖核酸的上下文中,应当理解除非另有说明,“t”用于表示尿嘧啶。

[0522] 表5.CCR5的示例性gRNA靶向序列

描述	核酸序列	SEQ ID NO
GET000046指导物	(5'→3')accccacagtggggccacta	26
GET000047指导物	(5'→3')tggttgaaggatgaggaaat	27
GET000048指导物	(5'→3')tcactatgctgccgcccagt	28

[0524] 在一些实施方案中,靶基因座是细胞中需要被敲除的基因座。在此类实施方案中,此种靶基因座是细胞中需要其破坏或消除的任何靶基因座,诸如以调节细胞的表型或功能。例如,第II.A章节中描述的降低靶基因的表达的任何基因修饰可以是用于靶向整合外源多核苷酸的所需靶基因座,其中靶基因的遗传破坏或敲除以及通过靶向插入外源多核苷酸的过表达可以在细胞中的相同靶位点或基因座处实现。例如,HDR过程可以用于导致遗传破坏,以消除或降低(例如,敲除)表1b中列出的任何靶基因的表达,同时还通过使用具有侧接同源臂的供体模板将外源多核苷酸整合(例如,敲入)到靶基因中,所述同源臂与遗传破坏的靶位点处或附近的核酸序列同源。

[0525] 在一些实施方案中,提供了用于生成工程化原代细胞的方法,所述方法包括将含有转基因或外源多核苷酸序列的供体模板和包括DNA核酸酶系统(例如Cas9)的DNA核酸酶系统以及基因座特异性gRNA引入源细胞(例如原代细胞)中,所述基因座特异性gRNA包含对B2M基因座、CIITA基因座、TRAC基因座、TRBC基因座具有特异性的互补部分。在一些实施方案中,gRNA靶向的基因组基因座位于所述的任何基因座的4000bp内、3500bp内、3000bp内、2500bp内、2000bp内、1500bp内、1000bp内或500bp内。

[0526] 在特定实施方案中,靶基因座是B2M。在一些实施方案中,工程化原代细胞包含靶向B2M基因的遗传修饰。在一些实施方案中,通过使用靶向核酸酶系统进行靶向B2M基因的遗传修饰,所述靶向核酸酶系统包括Cas蛋白或编码Cas蛋白的多核苷酸,以及用于特异性靶向B2M基因的至少一个指导核糖核酸序列。在一些实施方案中,用于特异性靶向B2M基因的至少一个指导核糖核酸(gRNA)序列选自由W02016/183041的附录2或表15的SEQ ID NO: 81240-85644组成的组,其公开内容通过引用整体并入。在一些实施方案中,通过引入含有外源多核苷酸序列的供体模板,通过HDR将外源多核苷酸整合到破坏的B2M基因座中,所述外源多核苷酸序列具有与邻近gRNA靶向的靶位点的序列同源的侧翼同源臂。

[0527] 在特定实施方案中,靶基因座是CIITA。在一些实施方案中,工程化原代细胞包含靶向CIITA基因的遗传修饰。在一些实施方案中,通过靶向核酸酶系统进行靶向CIITA基因的遗传修饰,所述靶向核酸酶系统包括Cas蛋白或编码Cas蛋白的多核苷酸,以及用于特异性靶向CIITA基因的至少一个指导核糖核酸序列。在一些实施方案中,用于特异性靶向CIITA基因的至少一个指导核糖核酸序列选自由W02016183041的附录1或表12的SEQ ID NO: 5184-36352组成的组,其公开内容通过引用整体并入。在一些实施方案中,通过引入含

有外源多核苷酸序列的供体模板,通过HDR将外源多核苷酸整合到破坏的CIITA基因座中,所述外源多核苷酸序列具有与邻近gRNA靶向的靶位点的序列同源的侧翼同源臂。

[0528] 在一些实施方案中,原代细胞是T细胞并且通过基因编辑方法降低或消除细胞中内源TRAC或TRBC基因座的表达。例如,HDR过程可以用于导致遗传破坏,以消除或降低(例如,敲除)TRAC或TRBC基因的表达,同时还通过使用具有侧接同源臂的供体模板将外源多核苷酸整合(例如,敲入)到相同基因座中,所述同源臂与遗传破坏的靶位点处或附近的核酸序列同源。可用于本文所述基因的基于CRISPR/Cas的靶向的示例性gRNA序列提供于表6。序列可以在US20160348073中找到,包括序列表的公开内容通过引用整体并入本文。

[0529] 表6. 可用于靶向基因的示例性gRNA靶向序列

[0530]	基因名称	US20160348073的SEQ ID NO
	TRAC	SEQ ID NO:532-609和9102-9797
	TRB(也称为TCRB和TRBC)	SEQ ID NO:610-765和9798-10532

[0531] 在一些实施方案中,工程化原代细胞包含靶向TRAC基因的遗传修饰。在一些实施方案中,通过靶向核酸酶系统进行靶向TRAC基因的遗传修饰,所述靶向核酸酶系统包括Cas蛋白或编码Cas蛋白的多核苷酸,以及用于特异性靶向TRAC基因的至少一个指导核糖核酸序列。在一些实施方案中,用于特异性靶向TRAC基因的至少一个指导核糖核酸序列(例如gRNA靶向序列)选自由US20160348073的SEQ ID NO:532-609和9102-9797组成的组,其公开内容通过引用整体并入。在一些实施方案中,通过引入含有外源多核苷酸序列的供体模板,通过HDR将外源多核苷酸整合到破坏的TRAC基因座中,所述外源多核苷酸序列具有与邻近gRNA靶向的靶位点的序列同源的侧翼同源臂。

[0532] 在一些实施方案中,工程化原代细胞包含靶向TRBC基因的遗传修饰。在一些实施方案中,通过靶向核酸酶系统进行靶向TRBC基因的遗传修饰,所述靶向核酸酶系统包括Cas蛋白或编码Cas蛋白的多核苷酸,以及用于特异性靶向TRBC基因的至少一个指导核糖核酸序列。在一些实施方案中,用于特异性靶向TRBC基因的至少一个指导核糖核酸序列(例如gRNA靶向序列)选自由US20160348073的SEQ ID NO:610-765和9798-10532组成的组,其公开内容通过引用整体并入。在一些实施方案中,通过引入含有外源多核苷酸序列的供体模板,通过HDR将外源多核苷酸整合到破坏的TRBC基因座中,所述外源多核苷酸序列具有与邻近gRNA靶向的靶位点的序列同源的侧翼同源臂。

[0533] 在一些实施方案中,鉴定用于所述HDR介导的整合方法的新基因座和/或gRNA序列在技术人员的水平之内。例如,对于CRISPR/Cas系统,当已知针对特定基因座(例如,在靶基因(例如表1b中列出)内)的现有gRNA时,可以使用“一寸寸蠕虫(inch worming)”方法通过针对PAM序列扫描基因座任一侧上的侧翼区域来鉴定靶向插入转基因的额外基因座,通常在基因组中约每100个碱基对(bp)出现一次。PAM序列将取决于使用的特定Cas核酸酶,因为不同的核酸酶通常具有不同的对应PAM序列。基因座任一侧上的侧翼区域可以是约500至4000bp长,例如约500bp、约1000bp、约1500bp、约2000bp、约2500bp、约3000bp、约3500bp、或约4000bp长。当在搜索范围内鉴定出PAM序列时,可以根据此基因座的序列设计新的指导物,用于遗传破坏方法。尽管CRISPR/Cas系统被描述为说明性的,但所述的任何HDR介导的方法都可以用于这种鉴定新基因座的方法,包括使用ZFN、TALEN、大范围核酸酶和转座酶的方法。

[0534] 在一些实施方案中,外源多核苷酸编码外源CD47多肽(例如,人CD47多肽),并且将外源多肽插入到如本文所公开的安全港基因座或安全港位点中,或插入到引起内源基因的沉默或表达降低的基因组基因座中。在一些实施方案中,将编码CD47的外源多核苷酸插入到CCR5基因座、PPP1R12C(也称为AAVS1)基因座、CLYBL基因座和/或Rosa基因座(例如,ROSA26基因座)中。在一些实施方案中,将多核苷酸插入到B2M、CIITA、TRAC、TRBC、PD1或CTLA4基因座中。

[0535] C. 细胞

[0536] 在一些实施方案中,本公开提供了已被工程化(或修饰)的细胞(例如,原代细胞)或其群体,其中细胞的基因组已被修饰,使得如本文所述的一种或多种基因的表达降低或缺失(例如调控一种或多种MHC I类分子或一种或多种MHC II类分子的表达的一种或多种基因),或者其中基因或多核苷酸过表达或表达增加(例如编码致耐受因子(诸如CD47)的多核苷酸)。在一些实施方案中,工程化原代细胞包含(i)包含编码CD47的外源多核苷酸的转基因,(ii)B2M基因的两个等位基因的失活或破坏,和(iii)CIITA基因的两个等位基因的失活或破坏。

[0537] 在一些实施方案中,如本文所提供的工程化或修饰的细胞是原代细胞。

[0538] 细胞可以是脊椎动物细胞,例如哺乳动物细胞,诸如人细胞或小鼠细胞。优选地,细胞易于修饰。优选地,细胞具有或被认为具有治疗价值,使得细胞可以用于治疗需要其的治疗的受试者的疾病、病症、缺陷或损伤。

[0539] 在一些实施方案中,细胞分离自胚胎或新生儿组织。在一些实施方案中,细胞是单核前体成纤维细胞、B细胞、外分泌细胞、胰腺祖细胞、内分泌祖细胞、成肝细胞、成肌细胞、前脂肪细胞、祖细胞、肝细胞、软骨细胞、平滑肌细胞、K562人红系白血病细胞系、骨细胞、滑膜细胞、肌腱细胞、韧带细胞、半月板细胞、脂肪细胞、树突状细胞或自然杀伤细胞。在一些实施方案中,细胞是肌肉细胞、红系巨核细胞、嗜酸性粒细胞、iPS细胞、巨噬细胞、T细胞、胰岛簇、胰岛细胞、胰岛 $\beta$ 细胞、神经元、心肌细胞、血细胞、内分泌祖细胞、外分泌祖细胞、导管细胞、腺泡细胞、 $\alpha$ 细胞、 $\beta$ 胰岛细胞、 $\delta$ 细胞、PP细胞、肝细胞、胆管细胞或棕色脂肪细胞。在一些实施方案中,细胞是肌肉细胞(例如,骨骼肌细胞、平滑肌细胞或心肌细胞)、红系巨核细胞、嗜酸性粒细胞、iPS细胞、巨噬细胞、T细胞、胰岛簇、胰岛细胞、 $\beta$ 细胞、神经元、心肌细胞、血细胞(例如,红细胞、白细胞或血小板)、内分泌祖细胞、外分泌祖细胞、导管细胞、腺泡细胞、 $\alpha$ 细胞、 $\beta$ 胰岛细胞、 $\delta$ 细胞、PP细胞、肝细胞、胆管细胞或白色或棕色脂肪细胞。在一些实施方案中,细胞是激素分泌细胞(例如,分泌胰岛素、催产素、内啡肽、加压素、血清素、生长抑素、胃泌素、分泌素、胰高血糖素、甲状腺激素、铃蟾肽、胆囊收缩素、睾酮、雌激素或黄体酮、肾素、生长激素释放肽、胰淀素或胰多肽的细胞)、表皮角质形成细胞、上皮细胞(例如,外分泌分泌上皮细胞、甲状腺上皮细胞、角化上皮细胞、胆囊上皮细胞或角膜、舌头、口腔、食道、肛管、远端尿道或阴道的表面上皮细胞)、肾细胞、生殖细胞、骨关节滑膜细胞、骨膜细胞、骨细胞(例如,破骨细胞或成骨细胞)、软骨膜细胞(例如,成软骨细胞或软骨细胞(chondrocyte))、软骨细胞(cartilage cell)(例如,软骨细胞(chondrocyte))、成纤维细胞、内皮细胞、心包细胞、脑膜细胞、角质形成细胞前体细胞、角朊干细胞、周细胞、神经胶质细胞、室管膜细胞、从羊膜或胎盘膜分离的细胞或浆膜细胞(例如,衬在体腔内的浆膜细胞)。



[0540] 在一些实施方案中,细胞是体细胞。在一些实施方案中,细胞来源于皮肤或其他器官,例如心脏、脑或脊髓、肝、肺、肾、胰腺、膀胱、骨髓、脾、肠或胃。细胞可以来自人或其他哺乳动物(例如,啮齿动物、非人灵长类动物、牛或猪细胞)。

[0541] 在一些实施方案中,细胞是T细胞、NK细胞、胰岛细胞、 $\beta$ 胰岛细胞、内皮细胞、上皮细胞诸如RPE、甲状腺细胞、皮肤细胞或肝细胞。在一些实施方案中,细胞是由原代细胞修饰的工程化原代细胞。在一些实施方案中,细胞是工程化原代细胞(例如,工程化原代T细胞、NK细胞、胰岛细胞、 $\beta$ 胰岛细胞、内皮细胞、上皮细胞诸如RPE、甲状腺细胞、皮肤细胞或肝细胞)。在一些实施方案中,工程化原代细胞包含(i)包含编码CD47的外源多核苷酸的转基因,(ii)B2M基因的两个等位基因的失活或破坏,和(iii)CIITA基因的两个等位基因的失活或破坏,其中工程化原代T细胞、NK细胞、胰岛细胞、 $\beta$ 胰岛细胞、内皮细胞、上皮细胞诸如RPE、甲状腺细胞、皮肤细胞或肝细胞。

[0542] 在一些实施方案中,细胞是原代T细胞,其被工程化以含有本文所述的修饰(例如,遗传修饰)。在一些实施方案中,工程化原代T细胞包含(i)包含编码CD47的外源多核苷酸的转基因,(ii)B2M基因的两个等位基因的失活或破坏,和(iii)CIITA基因的两个等位基因的失活或破坏。在一些实施方案中,T细胞可以用嵌合抗原受体(CAR)工程化,包括如本文所述的任何嵌合抗原受体。在一些实施方案中,工程化(例如,低免疫原性)T细胞可以用于使用同种异体细胞疗法治疗多种适应症,包括如本文(例如,第V章节)所述的任何适应症。在一些实施方案中,工程化(例如,低免疫原性)T细胞可以用于治疗癌症。

[0543] 在一些实施方案中,细胞是原代NK细胞,其被工程化以含有本文所述的修饰(例如,遗传修饰)。在一些实施方案中,工程化原代NK细胞包含(i)包含编码CD47的外源多核苷酸的转基因,(ii)B2M基因的两个等位基因的失活或破坏,和(iii)CIITA基因的两个等位基因的失活或破坏。在一些实施方案中,NK细胞可以用嵌合抗原受体(CAR)工程化,包括如本文所述的任何嵌合抗原受体。在一些实施方案中,工程化(例如低免疫原性)NK细胞可以用于使用同种异体细胞疗法治疗多种适应症,包括如本文(例如,第V章节)所述的任何适应症。在一些实施方案中,工程化(例如低免疫原性)NK细胞可以用于治疗癌症。

[0544] 在一些实施方案中,细胞是原代胰岛细胞,其被工程化以含有本文所述的修饰(例如,遗传修饰)。在一些实施方案中,工程化原代胰岛细胞包含(i)包含编码CD47的外源多核苷酸的转基因,(ii)B2M基因的两个等位基因的失活或破坏,和(iii)CIITA基因的两个等位基因的失活或破坏。在一些实施方案中,工程化(例如低免疫原性)胰岛细胞可以用于使用同种异体细胞疗法治疗多种适应症,包括如本文(例如,第IV章节)所述的任何适应症。在一些实施方案中,工程化(例如低免疫原性)胰岛细胞可以用于治疗糖尿病,诸如I型糖尿病。在一些实施方案中,细胞是原代胰岛细胞簇,包括原代 $\beta$ 胰岛细胞。

[0545] 在一些实施方案中,细胞是原代 $\beta$ 胰岛细胞,其被工程化以含有本文所述的修饰(例如,遗传修饰)。在一些实施方案中,工程化原代 $\beta$ 胰岛细胞包含(i)包含编码CD47的外源多核苷酸的转基因,(ii)B2M基因的两个等位基因的失活或破坏,和(iii)CIITA基因的两个等位基因的失活或破坏。在一些实施方案中,工程化(例如低免疫原性) $\beta$ 胰岛细胞可以用于使用同种异体细胞疗法治疗多种适应症,包括如本文(例如,第V章节)所述的任何适应症。在一些实施方案中,工程化(例如低免疫原性) $\beta$ 胰岛细胞可以用于治疗糖尿病,诸如I型糖尿病。

[0546] 在一些实施方案中,细胞是原代内皮细胞,其被工程化以含有本文所述的修饰(例如,遗传修饰)。在一些实施方案中,工程化原代内皮细胞包含(i)包含编码CD47的外源多核苷酸的转基因,(ii)B2M基因的两个等位基因的失活或破坏,和(iii)CIITA基因的两个等位基因的失活或破坏。在一些实施方案中,工程化(例如低免疫原性)内皮细胞可以用于使用同种异体细胞疗法治疗多种适应症,包括如本文(例如,第V章节)所述的任何适应症。在一些实施方案中,工程化(例如低免疫原性)内皮细胞可以用于治疗血管形成或眼部疾病。

[0547] 在一些实施方案中,细胞是原代上皮细胞,其被工程化以含有本文所述的修饰(例如,遗传修饰)。在一些实施方案中,上皮细胞是RPE。在一些实施方案中,上皮细胞是甲状腺细胞。在一些实施方案中,上皮细胞是皮肤细胞。在一些实施方案中,工程化原代上皮细胞包含(i)包含编码CD47的外源多核苷酸的转基因,(ii)B2M基因的两个等位基因的失活或破坏,和(iii)CIITA基因的两个等位基因的失活或破坏。在一些实施方案中,工程化(例如低免疫原性)上皮细胞可以用于使用同种异体细胞疗法治疗多种适应症,包括如本文(例如,第V章节)所述的任何适应症。在一些实施方案中,工程化(例如低免疫原性)上皮细胞可以用于治疗甲状腺疾病或皮肤疾病。

[0548] 在一些实施方案中,细胞是原代肝细胞,其被工程化以含有本文所述的修饰(例如,遗传修饰)。在一些实施方案中,工程化原代肝细胞包含(i)包含编码CD47的外源多核苷酸的转基因,(ii)B2M基因的两个等位基因的失活或破坏,和(iii)CIITA基因的两个等位基因的失活或破坏。在一些实施方案中,工程化(例如低免疫原性)上皮细胞可以用于使用同种异体细胞疗法治疗多种适应症,包括如本文(例如,第IV章节)所述的任何适应症。在一些实施方案中,工程化(例如低免疫原性)肝细胞可以用于治疗肝病。

[0549] 在一些实施方案中,如本文所提供的工程化或修饰的细胞是来自健康受试者(诸如未知或未怀疑患有待治疗的特定疾病或病状的受试者)的细胞。例如,如果原代 $\beta$ 胰岛细胞分离或获得自供体受试者,诸如用于治疗糖尿病,则如果受试者未知或未怀疑患有糖尿病或另一种疾病或病状,供体受试者是健康受试者。

[0550] 对于治疗应用,根据公开的方法制备的细胞通常可以以包含等渗赋形剂的药物组合物的形式提供,并且在对人体施用足够无菌的条件下制备。可以将细胞包装在适合分配或临床使用的装置或容器中。

#### [0551] 1. 原代细胞

[0552] 在一些实施方案中,如本文所提供的工程化的细胞包含来源于从一个或多个个体受试者或供体获得或分离的原代细胞的细胞。在一些实施方案中,细胞来源于分离的原代细胞库,所述分离的原代细胞获得自一个或多个(例如,两个或更多个、三个或更多个、四个或更多个、五个或更多个、十个或更多个、二十个或更多个、五十个或更多个或一百个或更多个)不同的供体受试者。在一些实施方案中,从多个不同的供体受试者(例如两个或更多个、三个或更多个、四个或更多个、五个或更多个、十个或更多个、二十个或更多个、五十个或更多个或一百个或更多个)分离或获得的原代细胞汇集为一批,并根据提供的方法进行工程化。

[0553] 在一些实施方案中,原代细胞来自一个或多个供体受试者的原代细胞库,所述供体受试者不同于受体受试者(例如,被施用细胞的患者)。原代细胞可以获得自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、50、100个或更多个供体受试者并汇集在一起。原代细胞可以获得自1个或

多个、2个或更多个、3个或更多个、4个或更多个、5个或更多个、6个或更多个、7个或更多个、8个或更多个、9个或更多个、10个或更多个、20个或更多个、50个或更多或100个或更多个供体受试者并汇集在一起。在一些实施方案中,从一个或多个个体收获原代细胞,并且在一些情况下,原代细胞或原代T细胞库在体外培养。在一些实施方案中,根据本文提供的方法工程化或修饰原代细胞或原代T细胞库。

[0554] 在一些实施方案中,所述方法包括从个体供体受试者获得或分离所需类型的原代细胞(例如T细胞、NK细胞、内皮细胞、胰岛细胞、 $\beta$ 胰岛细胞、肝细胞或如本文所述的其他原代细胞)、汇集细胞以获得一批原代细胞类型,以及通过本文提供的方法工程化所述细胞。在一些实施方案中,所述方法包括获得或分离所需类型的原代细胞(例如T细胞、NK细胞、内皮细胞、胰岛细胞、 $\beta$ 胰岛细胞、肝细胞或如本文所述的其他原代细胞)、通过本文提供的方法工程化每个个体供体的细胞,以及汇集至少两个个体样品的工程化(修饰的)细胞以获得一批原代细胞类型的工程化原代细胞。

[0555] 在一些实施方案中,原代细胞分离或获得自个体或原代细胞库,所述原代细胞库分离或获得自多于一个个体供体。原代细胞可以是本文所述的任何类型的原代细胞,包括第II.C.3章节中描述的任何类型。在一些实施方案中,原代细胞选自T细胞、NK细胞、胰岛细胞、 $\beta$ 胰岛细胞、内皮细胞、上皮细胞诸如RPE、甲状腺细胞、皮肤细胞或肝细胞。在一些实施方案中,来自个体供体或个体供体库的原代细胞被工程化以含有本文所述的修饰(例如遗传修饰)。

[0556] 在一些实施方案中,工程化细胞是肌肉细胞(例如,骨骼肌细胞、平滑肌细胞或心肌细胞)、红系巨核细胞、嗜酸性粒细胞、iPS细胞、巨噬细胞、T细胞、胰岛簇、胰岛细胞、 $\beta$ 细胞、神经元、心肌细胞、血细胞(例如,红细胞、白细胞或血小板)、内分泌祖细胞、外分泌祖细胞、导管细胞、腺泡细胞、 $\alpha$ 细胞、 $\beta$ 胰岛细胞、 $\delta$ 细胞、PP细胞、肝细胞、胆管细胞或白色或棕色脂肪细胞。在一些实施方案中,细胞是激素分泌细胞(例如,分泌胰岛素、催产素、内啡肽、加压素、血清素、生长抑素、胃泌素、分泌素、胰高血糖素、甲状腺激素、铃蟾肽、胆囊收缩素、睾酮、雌激素或黄体酮、肾素、生长激素释放肽、胰淀素或胰多肽的细胞)、表皮角质形成细胞、上皮细胞(例如,外分泌分泌上皮细胞、甲状腺上皮细胞、角化上皮细胞、胆囊上皮细胞或角膜、舌头、口腔、食道、肛管、远端尿道或阴道的表面上皮细胞)、肾细胞、生殖细胞、骨关节滑膜细胞、骨膜细胞、骨细胞(例如,破骨细胞或成骨细胞)、软骨膜细胞(例如,成软骨细胞或软骨细胞(chondrocyte))、软骨细胞(cartilage cell)(例如,软骨细胞(chondrocyte))、成纤维细胞、内皮细胞、心包细胞、脑膜细胞、角质形成细胞前体细胞、角朊干细胞、周细胞、神经胶质细胞、室管膜细胞、从羊膜或胎盘膜分离的细胞或浆膜细胞(例如,衬在体腔内的浆膜细胞)。

[0557] 示例性细胞在以下小节中描述。

[0558] a. T细胞

[0559] 在一些实施方案中,如本文所提供的工程化或修饰的细胞是原代T淋巴细胞(也称为T细胞)。在一些实施方案中,原代T淋巴细胞分离或获得自一个或多个个体供体受试者,诸如一个或多个个体健康供体(例如,未知或未怀疑患有(例如未表现出疾病或感染的临床体征)的受试者)。在一些情况下,T细胞是来自一个或多个个体的原代T细胞群或亚群。如本领域技术人员将理解的,从个体分离或获得T淋巴细胞的方法可以使用已知技术来实现。本

文提供了工程化原代T淋巴细胞,其含有本文所述的修饰(例如遗传修饰),用于随后移植或植入到受试者(例如,受体)中。例如,通过输注工程化T细胞将工程化T细胞施用于受试者(例如受体,诸如患者)。

[0560] 在一些实施方案中,从受试者或个体获得(例如,收获、提取、去除或取得)原代T细胞。在一些实施方案中,由T细胞库产生原代T细胞,使得T细胞来自一个或多个受试者(例如,一个或多个人,包括一个或多个健康人)。在一些实施方案中,原代T细胞库来自1-100个、1-50个、1-20个、1-10个、1或更多个、2或更多个、3或更多个、4或更多个、5或更多个、10或更多个、20或更多个、30或更多个、40或更多个、50或更多个,或100或更多个受试者。在一些实施方案中,供体受试者与患者(例如,施用治疗性细胞的受体)不同。在一些实施方案中,T细胞库不包括来自患者的细胞。在一些实施方案中,从中获得T细胞库的一个或多个供体受试者与患者不同。

[0561] 原代T细胞的非限制性实例包括CD3<sup>+</sup> T细胞、CD4<sup>+</sup> T细胞、CD8<sup>+</sup> T细胞、未致敏T细胞、调控性T(Treg)细胞、非调控性T细胞、Th1细胞、Th2细胞、Th9细胞、Th17细胞、T滤泡辅助(Tfh)细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、效应T(Teff)细胞、中央记忆T(Tcm)细胞、效应记忆T(Tem)细胞、表达CD45RA的效应记忆T细胞(TEMRA细胞)、组织驻留记忆(Trm)细胞、虚拟记忆T细胞、先天记忆T细胞、 $\gamma$   $\delta$ T细胞和T细胞的任何其他亚型。在一些实施方案中,原代T细胞选自包括细胞毒性T细胞、辅助T细胞、记忆T细胞、调控性T细胞、肿瘤浸润淋巴细胞及其组合的组。

[0562] 本公开的示例性T细胞选自由以下组成的组:细胞毒性T细胞、辅助T细胞、记忆T细胞、中央记忆T细胞、效应记忆T细胞、效应记忆RA T细胞、调控性T细胞、组织浸润淋巴细胞及其组合。在许多实施方案中,T细胞表达CCR7、CD27、CD28和CD45RA。在一些实施方案中,中央T细胞表达CCR7、CD27、CD28和CD45R0。在其他实施方案中,效应记忆T细胞表达PD-1、CD27、CD28和CD45R0。在其他实施方案中,效应记忆RA T细胞表达PD-1、CD57和CD45RA。

[0563] 在一些实施方案中,在如本文所述的工程化之前,T细胞(诸如分离的原代T细胞或分化的T细胞)可以经受一个或多个扩增或活化步骤。在一些实施方案中,通过与抗CD3和抗CD28抗体试剂一起孵育来刺激或活化待工程化的T细胞群。抗CD3和抗CD28可以适当地以涂覆有这些试剂的混合物的珠粒的形式提供。抗CD3和抗CD28珠粒可以适当地以1:1的比率提供给待工程化的T细胞群。在一些实施方案中,孵育期间的培养基还可以含有一种或多种重组细胞因子,诸如重组IL-2或重组IL-15。

[0564] 在一些实施方案中,本文所述的工程化T细胞(诸如分离自一个或多个个体供体(例如健康供体)的原代T细胞)包含被工程化(例如,修饰)以表达嵌合抗原受体的T细胞,所述嵌合抗原受体包括但不限于本文所述的嵌合抗原受体。任何合适的CAR都可以包含在T细胞中,包括本文所述的CAR。在一些实施方案中,工程化T细胞表达至少一种嵌合抗原受体,所述嵌合抗原受体与以下细胞中的至少一种的表面上表达的感兴趣的抗原或表位结合:受损细胞、发育异常细胞、感染细胞、免疫原性细胞、发炎细胞、恶性细胞、化生细胞、突变细胞及其组合。在其他情况下,工程化T细胞包含引起细胞表达至少一种蛋白质的修饰,当细胞接近相邻细胞、组织或器官时,所述蛋白质在相邻细胞、组织或器官中调节感兴趣的生物学效应。对T细胞(包括原代T细胞)有用的修饰在US2016/0348073和WO2020/018620中详细描述,所述文献的公开内容整体并入本文。

[0565] 在一些实施方案中,T细胞包含编码CAR的多核苷酸,其中将所述多核苷酸插入到基因组基因座中。可以使用任何合适的方法将CAR插入到T细胞的基因组基因座中,所述方法包括基于慢病毒的转导方法或本文所述的基因编辑方法(例如,CRISPR/Cas系统)。在一些实施方案中,将多核苷酸插入到安全港基因座中,诸如但不限于AAVS1、CCR5、CLYBL、ROSA26、SHS231、F3(也称为CD142)、MICA、MICB、LRP1(也称为CD91)、HMGB1、ABO、RHD、FUT1或KDM5D基因座。在一些实施方案中,将多核苷酸插入到B2M、CIITA、TRAC、TRBC、PD1或CTLA4基因中。

[0566] 在一些实施方案中,本文所述的T细胞诸如工程化或修饰的T细胞包含降低的内源性T细胞受体的表达。在一些实施方案中,TRAC或TRBC基因座在细胞中被破坏或消除,诸如通过本文描述的基因编辑方法(例如,CRISPR/Cas系统)。在一些实施方案中,将外源多核苷酸或转基因(诸如编码CAR的多核苷酸或所述的其他多核苷酸)插入到破坏的TRAC或TRBC基因座中。

[0567] 在一些实施方案中,本文所述的T细胞诸如工程化或修饰的T细胞包含降低的细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(CTLA4)的表达。在一些实施方案中,CTLA-4基因座在细胞中被破坏或消除,诸如通过本文描述的基因编辑方法(例如,CRISPR/Cas系统)。在一些实施方案中,将外源多核苷酸或转基因(诸如编码CAR的多核苷酸或所述的其他外源多核苷酸)插入到破坏的CTLA-4基因座中。

[0568] 在其他实施方案中,本文所述的T细胞诸如工程化或修饰的T细胞包含降低的程序性细胞死亡(PD1)的表达。在一些实施方案中,PD1基因座在细胞中被破坏或消除,诸如通过本文描述的基因编辑方法(例如,CRISPR/Cas系统)。在一些实施方案中,将外源多核苷酸或转基因(诸如编码CAR的多核苷酸或所述的其他外源多核苷酸)插入到破坏的PD1基因座中。在某些实施方案中,本文所述的T细胞诸如工程化或修饰的T细胞包含降低的CTLA4和PD1的表达。

[0569] 在某些实施方案中,本文所述的T细胞诸如工程化或修饰的T细胞包含增强的PD-L1的表达。在一些实施方案中,PD-L1基因座在细胞中被破坏或消除,诸如通过本文描述的基因编辑方法(例如,CRISPR/Cas系统)。在一些实施方案中,将外源多核苷酸或转基因(诸如编码CAR的多核苷酸或所述的其他外源多核苷酸)插入到破坏的PD-L1基因座中。

[0570] 在一些实施方案中,本技术涉及工程化T细胞,诸如分离自一个或多个个体供体(例如健康供体)的原代T细胞,其过表达致耐受因子(例如CD47),并且具有降低的一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子(例如,一种或多种MHC I类人白细胞抗原分子和一种或多种MHC II类人白细胞抗原分子)的表达或缺乏所述表达。在某些实施方案中,工程化T细胞过表达致耐受因子(例如CD47),并且在B2M基因中具有基因组修饰。在一些实施方案中,工程化T细胞过表达致耐受因子(例如CD47),并且在CIITA基因中具有基因组修饰。在一些实施方案中,工程化T细胞还被工程化以表达CAR。在一些实施方案中,工程化T细胞具有降低的TCR复合物分子的表达或缺乏所述表达,诸如通过TRAC基因或TRBC基因中的基因组修饰(例如基因破坏)。在一些实施方案中,T细胞过表达致耐受因子(例如CD47)和CAR,并且具有破坏以下基因中的一种或多种的基因组修饰:B2M、CIITA、TRAC和TRBC基因。

[0571] 在一些实施方案中,提供的工程化T细胞逃避免疫识别。在一些实施方案中,本文所述的工程化T细胞(诸如从一个或多个个体供体(例如健康供体)分离的原代T细胞)不活

化患者(例如,施用后的受体)中的免疫反应。提供了通过向有需要的受试者(例如,受体)或患者施用本文所述的工程化T细胞群来治疗疾病的方法。

[0572] 本文提供的T细胞可用于治疗合适的癌症,包括但不限于B细胞急性淋巴细胞白血病(B-ALL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤、肝癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、结直肠癌、肺癌、非小细胞肺癌、急性髓性淋巴细胞白血病、多发性骨髓瘤、胃癌、胃腺癌、胰腺癌、胶质母细胞瘤、神经母细胞瘤、肺鳞状细胞癌、肝细胞癌和膀胱癌。

[0573] b. 自然杀伤细胞

[0574] 在一些实施方案中,如本文所提供的工程化或修饰的细胞是原代自然杀伤(NK)细胞。在一些实施方案中,原代NK细胞分离或获得自一个或多个个体供体受试者,诸如一个或多个个体健康供体(例如,未知或未怀疑患有(例如未表现出疾病或感染的临床体征)的受试者)。在一些情况下,NK细胞是来自一个或多个个体的原代NK细胞群或亚群。如本领域技术人员将理解的,从个体分离或获得NK细胞的方法可以使用已知技术来实现。本文提供了工程化原代NK细胞,其含有本文所述的修饰(例如遗传修饰),用于随后移植或植入到受试者(例如,受体)中。例如,通过将工程化NK细胞输注到受试者中,将工程化T细胞施用于受试者(例如受体,诸如患者)。

[0575] 在一些实施方案中,从受试者或个体获得(例如,收获、提取、去除或取得)原代NK细胞。在一些实施方案中,由NK细胞库产生原代NK细胞,使得NK细胞来自一个或多个受试者(例如,一个或多个人,包括一个或多个健康人)。在一些实施方案中,原代NK细胞库来自1-100个、1-50个、1-20个、1-10个、1或更多个、2或更多个、3或更多个、4或更多个、5或更多个、10或更多个、20或更多个、30或更多个、40或更多个、50或更多个,或100或更多个受试者。在一些实施方案中,供体受试者与患者(例如,施用工程化NK细胞的受体)不同。在一些实施方案中,NK细胞库不包括来自患者的细胞。在一些实施方案中,从中获得NK细胞库的一个或多个供体受试者与患者不同。

[0576] 在一些实施方案中,NK细胞(包括分离自一个或多个个体供体(例如健康供体)的原代NK细胞)表达CD56(例如CD56<sup>dim</sup>或CD56<sup>bright</sup>)并且缺乏CD3(例如CD3<sup>neg</sup>)。在一些实施方案中,如本文所述的NK细胞还可以表达介导ADCC的低亲和力Fc $\gamma$ 受体CD16。在一些实施方案中,NK细胞还表达一种或多种自然杀伤细胞受体NKG2A和NKG2D或一种或多种自然细胞毒性受体Nkp46、Nkp44、Nkp30。例如,对于原代NK细胞的情况,在特定情况下可以通过耗竭CD3、CD14和/或CD19阳性细胞从NK细胞的起始来源(诸如含有外周血单核细胞(PBMC)的样品)分离原代细胞。例如,可以使用其上附着分别针对CD3、CD14和/或CD19的抗体的免疫磁珠来耗竭细胞,从而产生富集的NK细胞群。在其他情况下,可以通过选择细胞是否存在NK细胞上的一种或多种标志物(诸如CD56、CD16、Nkp46和/或NKG2D)从混合群体(例如PBMC)的起始来源分离原代NK细胞。

[0577] 在一些实施方案中,在如本文所述的工程化之前,NK细胞(诸如分离的原代NK细胞)可以经受一个或多个扩增或活化步骤。在一些实施方案中,扩增可以通过将NK细胞与饲养细胞(诸如可以被照射或可以不被照射的抗原呈递细胞)一起培养来实现。扩增步骤中NK细胞与抗原呈递细胞(APC)的比率可以是某个数,例如像1:1、1:1.5、1:2或1:3。在某些方面,APC被工程化以表达膜结合的IL-21(mbIL-21)。在特定方面,APC可替代地或额外地被工程化以表达IL-21、IL-15和/或IL-2。在特定实施方案中,其中发生扩增步骤的培养基包含

一种或多种促进扩增的剂,诸如一种或多种重组细胞因子。在具体实施方案中,培养基包含一种或多种来自IL-2、IL-15、IL-18和/或IL-21的重组细胞因子。在一些实施方案中,通过引入如本文所述的修饰工程化NK细胞的步骤在扩增开始后2-12天进行,诸如在第2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12天或约第2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12天进行。

[0578] 在一些实施方案中,本文所述的工程化NK细胞(诸如分离自一个或多个个体供体(例如健康供体)的原代NK细胞)包含被工程化(例如,修饰)以表达嵌合抗原受体的NK细胞,所述嵌合抗原受体包括但不限于本文所述的嵌合抗原受体。任何合适的CAR都可以包含在NK细胞中,包括本文所述的CAR。在一些实施方案中,工程化NK细胞表达至少一种嵌合抗原受体,所述嵌合抗原受体与以下细胞中的至少一种的表面上表达的感兴趣的抗原或表位结合:受损细胞、发育异常细胞、感染细胞、免疫原性细胞、发炎细胞、恶性细胞、化生细胞、突变细胞及其组合。在其他情况下,工程化NK细胞包含引起细胞表达至少一种蛋白质的修饰,当细胞接近相邻细胞、组织或器官时,所述蛋白质在相邻细胞、组织或器官中调节感兴趣的生物学效应。

[0579] 在一些实施方案中,NK细胞包含编码CAR的多核苷酸,其中将所述多核苷酸插入到基因组基因座中。可以使用任何合适的方法将CAR插入到NK细胞的基因组基因座中,所述方法包括基于慢病毒的转导方法或本文所述的基因编辑方法(例如,CRISPR/Cas系统)。在一些实施方案中,将多核苷酸插入到安全港基因座中,诸如但不限于AAVS1、CCR5、CLYBL、ROSA26、SHS231、F3(也称为CD142)、MICA、MICB、LRP1(也称为CD91)、HMGB1、ABO、RHD、FUT1或KDM5D基因座。

[0580] 在一些实施方案中,本技术涉及工程化NK细胞,诸如分离自一个或多个个体供体(例如健康供体)的原代NK细胞,其过表达致耐受因子(例如CD47),并且具有降低的一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子(例如,一种或多种MHC I类人白细胞抗原分子和一种或多种MHC II类人白细胞抗原分子)的表达或缺乏所述表达。在某些实施方案中,工程化NK细胞过表达致耐受因子(例如CD47),并且在B2M基因中具有基因组修饰。在一些实施方案中,工程化NK细胞过表达致耐受因子(例如CD47),并且在CIITA基因中具有基因组修饰。在一些实施方案中,工程化NK细胞还被工程化以表达CAR。

[0581] 在一些实施方案中,提供的工程化NK细胞逃避免疫识别。在一些实施方案中,本文所述的工程化NK细胞(诸如从一个或多个个体供体(例如健康供体)分离的原代NK细胞)不活化患者(例如,施用后的受体)中的免疫反应。提供了通过向有需要的受试者(例如,受体)或患者施用本文所述的工程化NK细胞群来治疗疾病的方法。

[0582] 本文提供的NK细胞可用于治疗合适的癌症,包括但不限于B细胞急性淋巴细胞白血病(B-ALL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤、肝癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、结直肠癌、肺癌、非小细胞肺癌、急性髓性淋巴细胞白血病、多发性骨髓瘤、胃癌、胃腺癌、胰腺癌、胶质母细胞瘤、神经母细胞瘤、肺鳞状细胞癌、肝细胞癌和膀胱癌。

[0583] c.  $\beta$ 胰岛细胞

[0584] 在一些实施方案中,如本文所提供的工程化或修饰的细胞是原代胰岛细胞。在一些实施方案中,原代胰岛细胞是原代胰岛细胞簇。在一些实施方案中,如本文所提供的工程化或修饰的细胞是原代 $\beta$ 胰岛细胞(也称为胰岛细胞或胰腺 $\beta$ 胰岛细胞)。在一些实施方案中,原代 $\beta$ 胰岛细胞分离或获得自一个或多个个体供体受试者,诸如一个或多个个体健康供

体(例如,未知或未怀疑患有(例如未表现出疾病或感染的临床体征)的受试者)。如本领域技术人员将理解的,从个体分离或获得 $\beta$ 胰岛细胞的方法可以使用已知技术来实现。本文提供了工程化原代 $\beta$ 胰岛细胞,其含有本文所述的修饰(例如遗传修饰),用于随后移植或植入到受试者(例如,受体)中。

[0585] 在一些实施方案中,从受试者或个体获得(例如,收获、提取、去除或取得) $\beta$ 胰岛细胞。在一些实施方案中,由 $\beta$ 胰岛细胞库产生原代 $\beta$ 胰岛细胞,使得 $\beta$ 胰岛细胞来自一个或多个受试者(例如,一个或多个个人,包括一个或多个健康人)。在一些实施方案中,原代 $\beta$ 胰岛细胞库来自1-100个、1-50个、1-20个、1-10个、1或更多个、2或更多个、3或更多个、4或更多个、5或更多个、10或更多个、20或更多个、30或更多个、40或更多个、50或更多个,或100或更多个受试者。在一些实施方案中,供体受试者与患者(例如,施用治疗性细胞的受体)不同。在一些实施方案中, $\beta$ 胰岛细胞库不包括来自患者的细胞。在一些实施方案中,从中获得 $\beta$ 胰岛细胞库的一个或多个供体受试者与患者不同。

[0586] 包括用于本技术的胰岛细胞的额外描述可见于W02020/018615,其公开内容通过引用整体并入本文。

[0587] 在一些实施方案中,工程化 $\beta$ 胰岛细胞(诸如分离自一个或多个个体供体(例如健康供体)群的原代 $\beta$ 胰岛细胞或分离自一个或多个个体供体(例如健康供体)的内皮细胞)维持在培养基中,在一些情况下在施用之前扩增。在某些实施方案中,工程化 $\beta$ 胰岛细胞群在施用之前冷冻保存。

[0588] 示例性胰岛细胞类型包括但不限于胰岛祖细胞、未成熟胰岛细胞、成熟胰岛细胞等。在一些实施方案中,将本文所述的胰腺细胞施用于受试者以治疗糖尿病。

[0589] 在一些实施方案中,如本文所公开的工程化的胰岛细胞(诸如分离自一个或多个个体供体(例如健康供体)的原代 $\beta$ 胰岛细胞)分泌胰岛素。在一些实施方案中,胰岛细胞表现出内源胰岛细胞的至少两个特征,例如但不限于响应于葡萄糖而分泌胰岛素和 $\beta$ 胰岛细胞标志物的表达。

[0590] 示例性 $\beta$ 胰岛细胞标志物或 $\beta$ 胰岛细胞祖细胞标志物包括但不限于c肽、Pdx1、葡萄糖转运蛋白2(Glut2)、HNF6、VEGF、葡萄糖激酶(GCK)、激素原转化酶(PC 1/3)、Cdcpl、NeuroD、Ngn3、Nkx2.2、Nkx6.1、Nkx6.2、Pax4、Pax6、Ptfla、Isl1、Sox9、Sox17和FoxA2。

[0591] 在一些实施方案中,原代胰腺 $\beta$ 胰岛细胞可以分离自原代胰岛、来源于原代胰岛内的原代胰腺 $\beta$ 胰岛细胞,或作为原代胰岛的组分。例如,原代胰腺 $\beta$ 胰岛细胞可以被编辑为单个 $\beta$ 胰岛细胞、 $\beta$ 胰岛细胞群或原代胰岛的组分(例如,与其他细胞类型一起存在于原代胰岛内的原代胰腺 $\beta$ 胰岛细胞)。作为另一个实例,原代胰腺 $\beta$ 胰岛细胞可以作为单个 $\beta$ 胰岛细胞、 $\beta$ 胰岛细胞群或原代胰岛的组分(例如,与其他细胞类型一起存在于原代胰岛内的原代胰腺 $\beta$ 胰岛细胞)施用于患者。在其中胰腺 $\beta$ 胰岛细胞与其他细胞类型一起存在于胰岛内的实施方案中,其他细胞类型也可以通过本文所述的方法进行编辑。

[0592] 在一些实施方案中,原代胰岛细胞在工程化(诸如遗传工程化)之前或之后从原代胰岛解离。这种解离的胰岛细胞可以在施用于患者之前聚集。并且簇可以包含 $\beta$ 胰岛细胞以及其他细胞类型(包括但不限于来自原代胰岛的细胞)。簇中胰岛细胞的数量可以变化,诸如约50、约100、约250、约500、约750、约1000、约1250、约1500、约1750、约2000、约2250、约2500、约2750、约3000、约3500、约4000、约4500或约5000个细胞。可以向患者施用药用约10、约



20、约30、约40、约50、约75、约100、约125、约150、约200、约250、约300、约325、约350、约375、约400、约425、约450、约475、约500、约600、约700、约800、约900或约1000个簇。

[0593] 在一些实施方案中,分离自一个或多个个体供体(例如,健康供体)的原代胰岛细胞响应于葡萄糖的增加而产生胰岛素。在一些实施方案中,胰岛细胞是 $\beta$ 胰岛细胞。在一些实施方案中,监测 $\beta$ 胰岛细胞以评估葡萄糖控制能力。监测血糖控制的测定可以包括但不限于连续血糖水平监测、禁食一段时间后监测血糖水平、葡萄糖耐量(例如,葡萄糖激发)测试、葡萄糖利用和氧化、胰岛素分泌,诸如通过 **U-PLEX®** Meso Scale Discovery (MSD) 测定和/或葡萄糖刺激的胰岛素分泌 (GSIS) 测定、测量特定转录因子和通路(例如同源盒转录因子SIX2、NKX6-1和PDX1)的存在、测量线粒体呼吸,以及测量胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 钙通量的变化,诸如葡萄糖诱导的 $\text{Ca}^{2+}$ 升高、 $\text{Ca}^{2+}$ 活化的胞吐作用。测量葡萄糖控制的各种方法是本领域已知的,诸如描述于Velazco-Cruz等人,Cell Reports,2020,31,107687;Pagliuca等人,Cell,2014,159(2):428-439;Davis等人,Cell Reports,2020,31(6):107623;以及Alcazar等人,Cell Transplantation,2020,29中的那些,包括附图、图例和方法描述的公开内容通过引用整体并入本文。在一些实施方案中, $\beta$ 胰岛细胞(例如,工程化 $\beta$ 胰岛细胞)可以表现出GSIS。在一些实施方案中,GSIS在灌注GSIS测定中测量。在一些实施方案中,GSIS是包括第一相和第二相动态胰岛素分泌的动态GSIS。在一些实施方案中,GSIS是静态GSIS。例如,静态孵育指数可以大于1或约1、大于2或约2、大于5或约5、大于10或约10或大于20或约20。在各种实施方案中,胰岛细胞响应于葡萄糖的增加而分泌胰岛素。在一些实施方案中,细胞具有独特的形态,诸如鹅卵石细胞形态和/或约17 $\mu\text{m}$ 至约25 $\mu\text{m}$ 的直径。

[0594] 在一些实施方案中,本技术涉及工程化 $\beta$ 胰岛细胞,诸如分离自一个或多个个体供体(例如健康供体)的原代 $\beta$ 胰岛细胞,其过表达致耐受因子(例如CD47),并且具有降低的一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子(例如,一种或多种MHC I类人白细胞抗原分子和一种或多种MHC II类人白细胞抗原分子)的表达或缺乏所述表达。在某些实施方案中,工程化 $\beta$ 胰岛细胞过表达致耐受因子(例如CD47),并且在B2M基因中具有基因组修饰。在一些实施方案中,工程化 $\beta$ 胰岛细胞过表达致耐受因子(例如CD47),并且在CIITA基因中具有基因组修饰。在一些实施方案中,工程化 $\beta$ 胰岛细胞过表达致耐受因子(例如CD47),并且具有破坏以下基因中的一种或多种的基因组修饰:B2M和CIITA基因。

[0595] 在一些实施方案中,提供的工程化 $\beta$ 胰岛细胞逃避免疫识别。例如,工程化 $\beta$ 胰岛细胞可以逃避NK细胞介导的细胞杀伤、巨噬细胞介导的细胞杀伤和/或PBMC介导的细胞杀伤。在一些实施方案中,本文所述的工程化 $\beta$ 胰岛细胞(诸如从一个或多个个体供体(例如健康供体)分离的原代 $\beta$ 胰岛细胞)不活化患者(例如,施用后的受体)中的免疫反应。例如,移植后,与接受野生型 $\beta$ 胰岛细胞的受试者相比,接受工程化 $\beta$ 胰岛细胞的受试者可以表现出较低水平的干扰素 $\gamma$  (IFN $\gamma$ )。类似地,移植后,与接受野生型 $\beta$ 胰岛细胞的受试者相比,接受工程化 $\beta$ 胰岛细胞的受试者可以表现出较低水平的供体特异性抗体(DSA)结合(例如,IgG或IgM)。提供了通过向有需要的受试者(例如,受体)或患者施用本文所述的工程化 $\beta$ 胰岛细胞群来治疗疾病的方法。在一些实施方案中,疾病是糖尿病,诸如I型糖尿病或II型糖尿病。

[0596] d. 内皮细胞

[0597] 在一些实施方案中,如本文所提供的工程化或修饰的细胞是原代内皮细胞。在一些实施方案中,原代内皮细胞分离或获得自一个或多个个体供体受试者,诸如一个或多个

个体健康供体(例如,未知或未怀疑患有(例如未表现出疾病或感染的临床体征)的受试者)。如本领域技术人员将理解的,从个体分离或获得内皮细胞的方法可以使用已知技术来实现。本文提供了工程化原代内皮细胞类型,其含有本文所述的修饰(例如遗传修饰),用于随后移植或植入到受试者(例如,受体)中。

[0598] 在一些实施方案中,从受试者或个体获得(例如,收获、提取、去除或取得)原代内皮细胞。在一些实施方案中,由内皮细胞库产生原代内皮细胞,使得内皮细胞来自一个或多个受试者(例如,一个或多个个人,包括一个或多个健康人)。在一些实施方案中,原代内皮细胞库来自1-100个、1-50个、1-20个、1-10个、1或更多个、2或更多个、3或更多个、4或更多个、5或更多个、10或更多个、20或更多个、30或更多个、40或更多个、50或更多个,或100或更多个受试者。在一些实施方案中,供体受试者与患者(例如,施用治疗性细胞的受体)不同。在一些实施方案中,内皮细胞库不包括来自患者的细胞。在一些实施方案中,从中获得内皮细胞库的一个或多个供体受试者与患者不同。

[0599] 用于本文提供的方法中的内皮细胞的额外描述可见于W02020/018615,其公开内容通过引用整体并入本文。

[0600] 在一些实施方案中,工程化内皮细胞(诸如分离自一个或多个个体供体(例如健康供体)的原代内皮细胞)群维持在培养基中,在一些情况下在施用之前扩增。在某些实施方案中,内皮细胞群在施用之前冷冻保存。

[0601] 在一些实施方案中,本技术涉及工程化内皮细胞,诸如分离自一个或多个个体供体(例如健康供体)的原代内皮细胞,其过表达致耐受因子(例如CD47),并且具有降低的一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子(例如,一种或多种MHC I类人白细胞抗原分子和一种或多种MHC II类人白细胞抗原分子)的表达或缺乏所述表达。在某些实施方案中,工程化内皮细胞过表达致耐受因子(例如CD47),并且在B2M基因中具有基因组修饰。在一些实施方案中,工程化内皮细胞过表达致耐受因子(例如CD47),并且在CIITA基因中具有基因组修饰。在一些实施方案中,工程化内皮细胞过表达致耐受因子(例如CD47),并且具有破坏以下基因中的一种或多种的基因组修饰:B2M和CIITA基因。

[0602] 在一些实施方案中,提供的工程化内皮细胞逃避免疫识别。在一些实施方案中,本文所述的工程化内皮细胞(诸如从一个或多个个体供体(例如健康供体)分离的原代内皮细胞)不活化患者(例如,施用后的受体)中的免疫反应。提供了通过向有需要的受试者(例如,受体)或患者施用本文所述的工程化内皮细胞群来治疗疾病的方法。

[0603] 在一些实施方案中,将工程化内皮细胞(诸如分离自一个或多个个体供体(例如健康供体)的原代内皮细胞)施用于患者,例如有需要的人患者。工程化内皮细胞可以施用于患有疾病或病状的患者,所述疾病或病状诸如但不限于心血管疾病、血管疾病、外周血管疾病、缺血性疾病、心肌梗塞、充血性心力衰竭、外周血管阻塞性疾病、中风、再灌注损伤、肢体缺血、神经病变(例如,周围神经病变或糖尿病性神经病变)、器官衰竭(例如,肝衰竭、肾衰竭等)、糖尿病、类风湿性关节炎、骨质疏松、血管损伤、组织损伤、高血压、心绞痛以及冠状动脉疾病引起的心肌梗塞、肾血管性高血压、肾动脉狭窄引起的肾功能衰竭、下肢跛行等。在某些实施方案中,患者已经患有或正患有短暂性脑缺血发作或中风,在一些情况下,这可能是由于脑血管疾病引起的。在一些实施方案中,施用工程化内皮细胞以治疗组织缺血(例如在动脉粥样硬化、心肌梗塞和肢体缺血中发生的组织缺血),并且修复损伤的血管。在一

些情况下,细胞用于移植物的生物工程。

[0604] 例如,工程化内皮细胞可以用于细胞疗法以修复缺血组织、形成血管和心脏瓣膜、工程化人工血管、修复受损血管以及诱导工程化组织中血管的形成(例如,移植前)。此外,内皮细胞可以被进一步修饰以递送剂来靶向和治疗肿瘤。

[0605] 在许多实施方案中,本文提供了一种修复或替换需要血管细胞或血管化的组织的方法。所述方法涉及向需要此类治疗的人患者施用含有工程化内皮细胞(诸如分离的原代内皮细胞或分化的内皮细胞)的组合物以促进此类组织中的血管形成。需要血管细胞或血管化的组织可以是心脏组织、肝脏组织、胰腺组织、肾组织、肌肉组织、神经组织、骨组织等,其可以是受损的并且以过度细胞死亡为特征的组织、有受损风险的组织或人工工程化组织。

[0606] 在一些实施方案中,可通过施用内皮细胞来治疗可能与心脏疾病或病症相关的血管疾病,所述内皮细胞诸如但不限于如本文所述衍生的定形血管内皮细胞和心内膜内皮细胞。此类血管疾病包括但不限于冠状动脉疾病、脑血管疾病、主动脉狭窄、主动脉瘤、外周动脉疾病、动脉粥样硬化、静脉曲张、血管病、缺乏冠状动脉灌注的心脏梗塞区域、不愈合的伤口、糖尿病或非糖尿病性溃疡,或希望诱导血管形成的任何其他疾病或病症。

[0607] 在某些实施方案中,内皮细胞用于改进在血管重建手术中使用的假体植入物(例如,由诸如Dacron和Gortex的合成材料制成的血管)。例如,假体动脉移植物通常用于替代灌注重要器官或肢体的患病动脉。在其他实施方案中,工程化内皮细胞用于覆盖假体心脏瓣膜的表面,以通过使瓣膜表面不易形成血栓来降低栓塞形成的风险。

[0608] 可使用众所周知的外科技术将所概述的内皮细胞移植到患者体内,以将组织和/或分离的细胞移植到血管中。在一些实施方案中,通过注射(例如,心肌内注射、冠状动脉内注射、经心内膜注射、经心外膜注射、经皮注射)、输注、移植和植入将细胞引入患者的心脏组织中。

[0609] 内皮细胞的施用(递送)包括但不限于皮下或胃肠外施用,包括静脉内、动脉内(例如,冠状动脉内)、肌内、腹膜内、心肌内、经心内膜、经心外膜、鼻内施用以及鞘内施用,和输注技术。

[0610] 如本领域技术人员将理解的,使用本领域已知的技术移植细胞,这取决于细胞类型和这些细胞的最终用途。在一些实施方案中,静脉内或通过注射将本文提供的细胞移植到患者体内的特定位置。当移植到特定位置时,可以将细胞悬浮在凝胶基质中以防止它们在固定时分散。

[0611] 示例性内皮细胞类型包括但不限于毛细血管内皮细胞、血管内皮细胞、主动脉内皮细胞、动脉内皮细胞、静脉内皮细胞、肾内皮细胞、脑内皮细胞、肝内皮细胞等。

[0612] 本文概述的内皮细胞(诸如分离的原代内皮细胞)可以表达一种或多种内皮细胞标志物。此类标志物的非限制性实例包括VE-钙粘蛋白(CD 144)、ACE(血管紧张素转化酶)(CD 143)、BNH9/BNF13、CD31、CD34、CD54(ICAM-1)、CD62E(E-选择素)、CD105(Endoglin)、CD146、Endocan(ESM-1)、Endoglyx-1、内皮粘蛋白(Endomucin)、Eotaxin-3、EPAS1(内皮PAS结构域蛋白1)、因子VIII相关抗原、FLI-1、Flk-1(KDR、VEGFR-2)、FLT-1(VEGFR-1)、GATA2、GBP-1(鸟苷酸结合蛋白-1)、GRO- $\alpha$ 、HEX、ICAM-2(细胞间粘附分子2)、LMO2、LYVE-1、MRB(神奇迂回(magic roundabout))、核仁素、PAL-E(病理解剖学Leiden-内皮(pathologische

anatomie Leiden-endothelium))、RTK、sVCAM-1、TALI、TEM1 (肿瘤内皮标志物1)、TEM5 (肿瘤内皮标志物5)、TEM7 (肿瘤内皮标志物7)、血栓调节蛋白(TM、CD141)、VCAM-1 (血管细胞粘附分子-1) (CD106)、VEGF、vWF (血管性血友病因子)、ZO-1、内皮细胞选择性粘附分子(ESAM)、CD102、CD93、CD184、CD304和DLL4。

[0613] 在一些实施方案中,内皮细胞被进一步遗传修饰以表达编码可用于治疗病症/病状或改善所述病症/病状的症状的感兴趣的蛋白质(诸如但不限于酶、激素、受体、配体或药物)的外源基因。用于遗传修饰内皮细胞的标准方法描述于例如US5,674,722中。

[0614] 此类内皮细胞可用于提供可用于预防或治疗疾病的多肽或蛋白质的组成型合成和递送。以此方式,多肽被直接分泌到个体的血流或身体其他区域(例如,中枢神经系统)中。在一些实施方案中,内皮细胞可被修饰以分泌胰岛素、凝血因子(例如,因子VIII或血管性血友病因子)、 $\alpha$ -1抗胰蛋白酶、腺苷脱氨酶、组织纤溶酶原活化剂、白细胞介素(例如,IL-1、IL-2、IL-3)等。

[0615] 在某些实施方案中,可以以改善内皮细胞在植入的移植物的情况下的性能的方式修饰内皮细胞。非限制性说明性实例包括分泌或表达血栓溶解剂以防止管腔内凝块形成、分泌平滑肌增殖抑制剂以防止由于平滑肌肥大导致的管腔狭窄,以及表达和/或分泌内皮细胞有丝分裂原或自分泌因子以刺激内皮细胞增殖并改善移植血管腔内皮细胞衬里的程度或持续时间。

[0616] 在一些实施方案中,工程化内皮细胞用于将治疗水平的分泌产物递送至特定器官或肢体。例如,可将体外工程化(转导)的内皮细胞内衬的血管植入物移植到特定的器官或肢体中。转导的内皮细胞的分泌产物将以高浓度递送至灌注组织,从而达到靶向解剖位置的预期效果。

[0617] 在其他实施方案中,内皮细胞被进一步遗传修饰以含有当由血管化肿瘤中的内皮细胞表达时破坏或抑制血管生成的基因。在一些情况下,还可以对内皮细胞进行遗传修饰以表达本文所述的任何一种可选择自杀基因,其允许在完成肿瘤治疗后对移植的内皮细胞进行阴性选择。

[0618] 在一些实施方案中,将本文所述的内皮细胞(诸如分离的原代内皮细胞)施用于受体受试者以治疗选自以下组成的组的血管病症:血管损伤、心血管疾病、血管疾病、外周血管疾病、缺血性疾病、心肌梗塞、充血性心力衰竭、外周血管阻塞性疾病、高血压、缺血性组织损伤、再灌注损伤、肢体缺血、中风、神经病变(例如,周围神经病变或糖尿病性神经病变)、器官衰竭(例如,肝衰竭、肾衰竭等)、糖尿病、类风湿性关节炎、骨质疏松、脑血管疾病、高血压、心绞痛以及冠状动脉疾病引起的心肌梗塞、肾血管性高血压、肾动脉狭窄引起的肾功能衰竭、其他血管病状或疾病。

[0619] e. 上皮细胞

[0620] 1) 视网膜色素上皮(RPE)细胞

[0621] 在一些实施方案中,如本文所提供的工程化或修饰的细胞是原代视网膜色素上皮(RPE)细胞。在一些实施方案中,原代RPE细胞分离或获得自一个或多个个体供体受试者,诸如一个或多个个体健康供体(例如,未知或未怀疑患有(例如未表现出疾病或感染的临床体征)的受试者)。如本领域技术人员将理解的,从个体分离或获得RPE细胞的方法可以使用已知技术来实现。本文提供了工程化原代RPE细胞,其含有本文所述的修饰(例如遗传修饰),

用于随后移植或植入到受试者(例如,受体)中。

[0622] 在一些实施方案中,从受试者或个体获得(例如,收获、提取、去除或取得)原代RPE细胞。在一些实施方案中,由RPE细胞库产生原代RPE细胞,使得RPE细胞来自一个或多个受试者(例如,一个或多个人,包括一个或多个健康人)。在一些实施方案中,原代RPE细胞库来自1-100个、1-50个、1-20个、1-10个、1或更多个、2或更多个、3或更多个、4或更多个、5或更多个、10或更多个、20或更多个、30或更多个、40或更多个、50或更多个,或100或更多个受试者。在一些实施方案中,供体受试者与患者(例如,施用治疗性细胞的受体)不同。在一些实施方案中,RPE细胞库不包括来自患者的细胞。在一些实施方案中,从中获得RPE细胞库的一个或多个供体受试者与患者不同。

[0623] RPE细胞的额外描述(包括它们在本技术中使用的方法)可见于W02020/018615,其公开内容通过引用整体并入本文。

[0624] 在一些实施方案中,工程化RPE细胞(诸如分离自一个或多个个体供体(例如健康供体)的原代RPE细胞)群维持在培养基中,在一些情况下在施用之前扩增。在某些实施方案中,RPE细胞群在施用之前冷冻保存。

[0625] 示例性RPE细胞类型包括但不限于视网膜色素上皮(RPE)细胞、RPE祖细胞、未成熟RPE细胞、成熟RPE细胞、功能性RPE细胞等。

[0626] 在一些实施方案中,RPE细胞(诸如分离自一个或多个个体供体(例如健康供体)的原代RPE细胞)具有与天然RPE细胞类似或基本类似的基因表达谱。当在平面基底上生长至汇合时,此类RPE细胞可以具有天然RPE细胞的多边形、平面片状形态。

[0627] 在一些实施方案中,本技术涉及工程化RPE细胞,诸如分离自一个或多个个体供体(例如健康供体)的原代RPE细胞,其过表达致耐受因子(例如CD47),并且具有降低的一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子(例如,一种或多种MHC I类人白细胞抗原分子和一种或多种MHC II类人白细胞抗原分子)的表达或缺乏所述表达。在某些实施方案中,工程化RPE细胞过表达致耐受因子(例如CD47),并且在B2M基因中具有基因组修饰。在一些实施方案中,工程化RPE细胞过表达致耐受因子(例如CD47),并且在CIITA基因中具有基因组修饰。在一些实施方案中,工程化RPE细胞过表达致耐受因子(例如CD47),并且具有破坏以下基因中的一种或多种的基因组修饰:B2M和CIITA基因。

[0628] 在一些实施方案中,提供的工程化RPE细胞逃避免疫识别。在一些实施方案中,本文所述的工程化RPE细胞(诸如从一个或多个个体供体(例如健康供体)分离的原代RPE细胞)不活化患者(例如,施用后的受体)中的免疫反应。提供了通过向有需要的受试者(例如,受体)或患者施用本文所述的工程化RPE细胞群来治疗疾病的方法。

[0629] 可以将RPE细胞植入患有黄斑变性的患者或具有受损RPE细胞的患者体内。在一些实施方案中,患者患有年龄相关性黄斑变性(AMD)、早期AMD、中期AMD、晚期AMD、非新生血管性年龄相关性黄斑变性、干性黄斑变性(干性年龄相关性黄斑变性)、湿性黄斑变性(湿性年龄相关性黄斑变性)、青少年黄斑变性(JMD)(例如,斯塔加特病(Stargardt disease)、贝斯特病(Best disease)和青少年视网膜劈裂)、莱伯氏先天性黑蒙(Leber's Congenital Ameurosis)或色素性视网膜炎。在其他实施方案中,患者患有视网膜脱离。

[0630] 2) 甲状腺细胞

[0631] 在一些实施方案中,如本文所提供的工程化或修饰的细胞是原代甲状腺细胞。在

一些实施方案中,原代甲状腺细胞分离或获得自一个或多个个体供体受试者,诸如一个或多个个体健康供体(例如,未知或未怀疑患有(例如未表现出疾病或感染的临床体征)的受试者)。如本领域技术人员将理解的,从个体分离或获得甲状腺细胞的方法可以使用已知技术来实现。本文提供了工程化原代甲状腺细胞,其含有本文所述的修饰(例如遗传修饰),用于随后移植或植入到受试者(例如,受体)中。

[0632] 在一些实施方案中,从受试者或个体获得(例如,收获、提取、去除或取得)原代甲状腺细胞。在一些实施方案中,由甲状腺细胞库产生原代甲状腺细胞,使得甲状腺细胞来自一个或多个受试者(例如,一个或多个人,包括一个或多个健康人)。在一些实施方案中,原代甲状腺细胞库来自1-100个、1-50个、1-20个、1-10个、1或更多个、2或更多个、3或更多个、4或更多个、5或更多个、10或更多个、20或更多个、30或更多个、40或更多个、50或更多个,或100或更多个受试者。在一些实施方案中,供体受试者与患者(例如,施用治疗性细胞的受体)不同。在一些实施方案中,甲状腺细胞库不包括来自患者的细胞。在一些实施方案中,从中获得甲状腺细胞库的一个或多个供体受试者与患者不同。

[0633] 在一些实施方案中,本技术涉及工程化甲状腺细胞,诸如分离自一个或多个个体供体(例如健康供体)的原代甲状腺细胞,其过表达致耐受因子(例如CD47),并且具有降低的一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子(例如,一种或多种MHC I类人白细胞抗原分子和一种或多种MHC II类人白细胞抗原分子)的表达或缺乏所述表达。在某些实施方案中,工程化甲状腺细胞过表达致耐受因子(例如CD47),并且在B2M基因中具有基因组修饰。在一些实施方案中,工程化甲状腺细胞过表达致耐受因子(例如CD47),并且在CIITA基因中具有基因组修饰。在一些实施方案中,工程化甲状腺细胞过表达致耐受因子(例如CD47),并且具有破坏以下基因中的一种或多种的基因组修饰:B2M和CIITA基因。

[0634] 在一些实施方案中,提供的工程化甲状腺细胞逃避免疫识别。在一些实施方案中,本文所述的工程化甲状腺细胞(诸如从一个或多个个体供体(例如健康供体)分离的原代甲状腺细胞)不活化患者(例如,施用后的受体)中的免疫反应。提供了通过向有需要的受试者(例如,受体)或患者施用本文所述的工程化内皮细胞群来治疗疾病的方法。f f. 肝细胞

[0635] 在一些实施方案中,如本文所提供的工程化或修饰的细胞是原代肝细胞。在一些实施方案中,原代肝细胞分离或获得自一个或多个个体供体受试者,诸如一个或多个个体健康供体(例如,未知或未怀疑患有(例如未表现出疾病或感染的临床体征)的受试者)。如本领域技术人员将理解的,从个体分离或获得肝细胞的方法可以使用已知技术来实现。本文提供了工程化原代肝细胞,其含有本文所述的修饰(例如遗传修饰),用于随后移植或植入到受试者(例如,受体)中。在一些实施方案中,工程化原代肝细胞可以作为细胞疗法施用以解决肝细胞功能丧失或肝硬化。

[0636] 在一些实施方案中,从受试者或个体获得(例如,收获、提取、去除或取得)原代肝细胞。在一些实施方案中,由肝细胞库产生原代肝细胞,使得肝细胞来自一个或多个受试者(例如,一个或多个人,包括一个或多个健康人)。在一些实施方案中,原代肝细胞库来自1-100个、1-50个、1-20个、1-10个、1或更多个、2或更多个、3或更多个、4或更多个、5或更多个、10或更多个、20或更多个、30或更多个、40或更多个、50或更多个,或100或更多个受试者。在一些实施方案中,供体受试者与患者(例如,施用治疗性细胞的受体)不同。在一些实施方案中,肝细胞库不包括来自患者的细胞。在一些实施方案中,从中获得肝细胞库的一个或多个

供体受试者与患者不同。

[0637] 在一些实施方案中,工程化肝细胞(诸如分离自一个或多个个体供体(例如健康供体)的原代肝细胞)群维持在培养基中,在一些情况下在施用之前扩增。在某些实施方案中,肝细胞群在施用之前冷冻保存。

[0638] 在一些实施方案中,本技术涉及工程化肝细胞,诸如分离自一个或多个个体供体(例如健康供体)的原代肝细胞,其过表达致耐受因子(例如CD47),并且具有降低的一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子(例如,一种或多种MHC I类人白细胞抗原分子和一种或多种MHC II类人白细胞抗原分子)的表达或缺乏所述表达。在某些实施方案中,工程化肝细胞过表达致耐受因子(例如CD47),并且在B2M基因中具有基因组修饰。在一些实施方案中,工程化肝细胞过表达致耐受因子(例如CD47),并且在CIITA基因中具有基因组修饰。在一些实施方案中,工程化肝细胞过表达致耐受因子(例如CD47),并且具有破坏以下基因中的一种或多种的基因组修饰:B2M和CIITA基因。

[0639] 在一些实施方案中,提供的工程化肝细胞逃避免疫识别。在一些实施方案中,本文所述的工程化肝细胞(诸如从一个或多个个体供体(例如健康供体)分离的原代肝细胞)不活化患者(例如,施用后的受体)中的免疫反应。提供了通过向有需要的受试者(例如,受体)或患者施用本文所述的工程化肝细胞群来治疗疾病的方法。

[0640] g.心脏细胞

[0641] 本文提供了用于随后移植或植入到受试者(例如,受体)中的心脏细胞类型。

[0642] 在一些实施方案中,将本文所述的心脏细胞施用于受体受试者以治疗选自自由以下组成的组的心脏病症:小儿心肌病、年龄相关性心肌病、扩张性心肌病、肥厚性心肌病、限制性心肌病、慢性缺血性心肌病、围产期心肌病、炎症性心肌病、特发性心肌病、其他心肌病、心肌缺血再灌注损伤、心室功能障碍、心力衰竭、充血性心力衰竭、冠心病、终末期心脏病、动脉粥样硬化、缺血、高血压、再狭窄、心绞痛、风湿性心脏病、动脉炎症、心血管疾病、心肌梗塞、心肌缺血、充血性心力衰竭、心肌梗塞、心脏缺血、心脏损伤、心肌缺血、血管疾病、后天性心脏病、先天性心脏病、动脉粥样硬化、冠状动脉疾病、传导系统功能障碍、冠状动脉功能障碍、肺动脉高压、心律失常、肌营养不良、肌肉质量异常、肌肉变性、心肌炎、感染性心肌炎、药物或毒素引起的肌肉异常、过敏性心肌炎和自身免疫性心内膜炎。

[0643] 因此,本文提供了用于在有需要的受试者中治疗和预防心脏损伤或心脏病或心脏病症的方法。本文所述的方法可用于治疗、改善、预防多种心脏病或其症状(诸如导致心脏结构和/或功能病理性损伤的那些疾病或其症状)或减缓其进展。术语“心脏病”、“心脏病症”和“心脏损伤”在本文中可互换使用,并且是指与心脏(包括瓣膜、内皮、梗塞区或心脏的其他组件或结构)相关的病状和/或病症。此类心脏疾病或心脏相关疾病包括但不限于心肌梗塞、心力衰竭、心肌病、先天性心脏缺陷、心脏瓣膜疾病或功能障碍、心内膜炎、风湿热、二尖瓣脱垂、感染性心内膜炎、肥厚性心肌病、扩张性心肌病、心肌炎、心脏扩大和/或二尖瓣关闭不全等。

[0644] 在一些实施方案中,工程化心脏细胞群维持在培养基中,在一些情况下在施用之前扩增。在某些实施方案中,心脏细胞群在施用之前冷冻保存。

[0645] 在一些实施方案中,本技术涉及工程化心脏细胞,其过表达致耐受因子(例如CD47)并且具有降低的一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子(例如,一种

或多种MHC I类人白细胞抗原分子和一种或多种MHC II类人白细胞抗原分子)的表达或缺乏所述表达。在某些实施方案中,工程化心脏细胞过表达致耐受因子(例如CD47),并且在B2M基因中具有基因组修饰。在一些实施方案中,工程化心脏细胞过表达致耐受因子(例如CD47),并且在CIITA基因中具有基因组修饰。在一些实施方案中,工程化心脏细胞过表达致耐受因子(例如CD47),并且具有破坏以下基因中的一种或多种的基因组修饰:B2M和CIITA基因。

[0646] 在一些实施方案中,提供的工程化心脏细胞逃避免疫识别。在一些实施方案中,本文所述的工程化心脏细胞不活化患者(例如,施用后的受体)中的免疫反应。提供了通过向有需要的受试者(例如,受体)或患者施用本文所述的工程化心脏细胞群来治疗疾病的方法。

[0647] 在一些实施方案中,施用包括植入受试者的心脏组织、静脉内注射、动脉内注射、冠状动脉内注射、肌内注射、腹膜内注射、心肌内注射、经心内膜注射、经心外膜注射或输注。

[0648] 在一些实施方案中,施用了工程化心脏细胞的患者还施用了心脏药物。适用于联合疗法的心脏药物的说明性实例包括但不限于生长因子、编码生长因子的多核苷酸、血管生成剂、钙通道阻断剂、抗高血压剂、抗有丝分裂剂、正性肌力剂、抗动脉粥样硬化剂、抗凝血剂、 $\beta$ -受体阻滞剂、抗心律失常剂、抗炎剂、血管扩张剂、溶栓剂、强心苷、抗生素、抗病毒剂、抗真菌剂、原生动物抑制剂、硝酸盐、血管紧张素转化酶(ACE)抑制剂、血管紧张素II受体拮抗剂、脑钠肽(BNP);抗肿瘤剂、类固醇等。

[0649] 可以多种方式监测根据本文提供的方法的治疗效果。例如,可以利用心电图(ECG)或霍特监测器(holier monitor)来确定治疗功效。ECG是心律和电脉冲的量度,并且是一种用于确定治疗是否改善或维持、预防或减缓受试者心脏电传导的退化的非常有效且非侵入性方式。使用可以长时间佩戴的便携式ECG霍特监测器来监测心脏异常、心律失常病症等也是评估治疗有效性的可靠方法。ECG或核研究可用于确定心室功能的改善。

[0650] h. 神经细胞

[0651] 本文提供了可用于随后移植或植入到受体受试者中的不同神经细胞类型。示例性神经细胞类型包括但不限于脑内皮细胞、神经元(例如,多巴胺能神经元)、神经胶质细胞等。

[0652] 在一些实施方案中,工程化神经细胞群维持在培养基中,在一些情况下在施用之前扩增。在某些实施方案中,神经细胞群在施用之前冷冻保存。

[0653] 在一些实施方案中,本技术涉及工程化神经细胞,其过表达致耐受因子(例如CD47)并且具有降低的一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子(例如,一种或多种MHC I类人白细胞抗原分子和一种或多种MHC II类人白细胞抗原分子)的表达或缺乏所述表达。在某些实施方案中,工程化神经细胞过表达致耐受因子(例如CD47),并且在B2M基因中具有基因组修饰。在一些实施方案中,工程化神经细胞过表达致耐受因子(例如CD47),并且在CIITA基因中具有基因组修饰。在一些实施方案中,工程化神经细胞过表达致耐受因子(例如CD47),并且具有破坏以下基因中的一种或多种的基因组修饰:B2M和CIITA基因。

[0654] 在一些实施方案中,提供的工程化神经细胞逃避免疫识别。在一些实施方案中,本



文所述的工程化神经细胞不活化患者(例如,施用后的受体)中的免疫反应。提供了通过向有需要的受试者(例如,受体)或患者施用本文所述的工程化神经细胞群来治疗疾病的方法。

[0655] 在一些实施方案中,向受试者施用神经细胞以治疗帕金森病、亨廷顿病(Huntington disease)、多发性硬化症、其他神经变性疾病或病状、注意力缺陷多动障碍(ADHD)、抽动秽语综合征(TS)、精神分裂症、精神病、抑郁症、其他神经精神病症。在一些实施方案中,将本文所述的神经细胞施用于受试者以治疗或改善中风。在一些实施方案中,将神经元和神经胶质细胞施用于患有肌萎缩侧索硬化症(ALS)的受试者。

[0656] 1) 脑内皮细胞

[0657] 在一些实施方案中,施用脑内皮细胞以减轻脑出血的症状或影响。在一些实施方案中,将多巴胺能神经元施用于患有帕金森病的患者。在一些实施方案中,将去甲肾上腺素能神经元、GABA能中间神经元施用于经历过癫痫发作的患者。在一些实施方案中,将运动神经元、中间神经元、雪旺氏细胞、少突胶质细胞和小胶质细胞施用于经历过脊髓损伤的患者。

[0658] 2) 多巴胺能神经元

[0659] 在一些实施方案中,本文所述的HIP细胞是多巴胺能神经元。

[0660] 在一些情况下,术语“多巴胺能神经元”包括表达酪氨酸羟化酶(TH)的神经元细胞,所述酪氨酸羟化酶是多巴胺合成的限速酶。在一些实施方案中,多巴胺能神经元分泌神经递质多巴胺,并且很少或不表达多巴胺羟化酶。多巴胺能(DA)神经元可以表达以下标志物中的一种或多种:神经元特异性烯醇化酶(NSE)、1-芳香族氨基酸脱羧酶、囊泡单胺转运蛋白2、多巴胺转运蛋白、Nurr-1和多巴胺2受体(D2受体)。

[0661] 在一些实施方案中,将DA神经元施用于患者,例如人患者,以治疗神经变性疾病或病状。在一些情况下,神经变性疾病或病状选自自由帕金森病、亨廷顿病和多发性硬化症组成的组。在其他实施方案中,DA神经元用于治疗或改善神经精神障碍的一种或多种症状,诸如注意力缺陷多动障碍(ADHD)、抽动秽语综合征(TS)、精神分裂症、精神病和抑郁症。在又其他实施方案中,DA神经元用于治疗DA神经元受损的患者。

[0662] 在一些实施方案中,静脉内或通过注射将分化的DA神经元移植到患者体内的特定位置。在一些实施方案中,将DA细胞移植到大脑的黑质(特别是致密区中或附近)、腹侧被盖区(VTA)、尾状核、壳核、伏隔核、丘脑底核或其任何组合中,以替代其变性导致帕金森病的DA神经元。DA细胞可以作为细胞悬浮液注射到靶区域中。或者,当包含在此种递送装置中时,可以将DA细胞嵌入支持基质或支架中。在一些实施方案中,支架是可生物降解的。在其他实施方案中,支架是不可生物降解的。支架可包含天然或合成(人工)材料。

[0663] DA神经元的递送可以通过使用合适的媒介物来实现,所述媒介物诸如但不限于脂质体、微粒或微胶囊。在其他实施方案中,DA神经元以包含等渗赋形剂的药物组合物的形式施用。所述药物组合物是在对于人施用而言足够无菌的条件下制备的。在一些实施方案中,DA以药物组合物的形式提供。

[0664] 3) 神经胶质细胞

[0665] 在一些实施方案中,所述神经细胞包括神经胶质细胞,诸如但不限于小神经胶质细胞、星形胶质细胞、少突胶质细胞、室管膜细胞和雪旺氏细胞、神经胶质前体及神经胶质

祖细胞。

[0666] 神经细胞移植对于脊髓损伤的功效可以在例如急性脊髓损伤的大鼠模型中进行评估,如McDonald等人,Nat. Med.,1999,5:1410)和Kim等人,Nature,2002,418:50所述。例如,成功的移植可能会显示2-5周后病灶处存在移植源细胞,分化成星形胶质细胞、少突胶质细胞和/或神经元,并从病灶端沿着脊髓迁移,步态、协调性和负重能力改善。基于神经细胞类型和待治疗的神经疾病或病状选择特定的动物模型。

[0667] 神经细胞可以允许它们植入到预期组织部位并重建或再生功能缺陷区域的方式施用。例如,根据所治疗的疾病,神经细胞可以直接移植到中枢神经系统的实质或鞘内部位。在一些实施方案中,通过静脉内、脊柱内、脑室内、鞘内、动脉内、肌内、腹膜内、皮下、肌内、腹内、眼内、球后及其组合将本文所述的任何神经细胞(包括脑内皮细胞、神经元、多巴胺能神经元、室管膜细胞、星形胶质细胞、小胶质细胞、少突胶质细胞和雪旺氏细胞)注射到患者体内。在一些实施方案中,细胞以推注或连续输注的形式注射或沉积。在某些实施方案中,神经细胞通过注射到脑内、脑部附近及其组合来施用。例如,可通过在受试者的头骨中开的钻孔来进行注射。向脑施用神经细胞的合适位点包括但不限于脑室、侧脑室、大池、壳核、基底核、海马皮层、纹状体、脑尾状区及其组合。

[0668] 用于本技术的包括多巴胺能神经元的神经细胞的额外描述可见于W02020/018615,其公开内容通过引用整体并入本文。

[0669] 2. 干细胞

[0670] 在一些实施方案中,细胞是干细胞或祖细胞(例如,iPSC、胚胎干细胞、造血干细胞、间充质干细胞、内皮干细胞、上皮干细胞、脂肪干细胞或祖细胞、生殖干细胞、肺干细胞或祖细胞、乳腺干细胞、嗅觉成体干细胞、毛囊干细胞、多潜能干细胞、羊膜干细胞、脐带血干细胞或神经干细胞或祖细胞)。在一些实施方案中,干细胞是成体干细胞(例如,体干细胞或组织特异性干细胞)。在一些实施方案中,干细胞或祖细胞能够分化(例如,干细胞是全能的、多能的或多潜能的)。在一些实施方案中,细胞被操作(例如转化或分化)为肌肉细胞、红系巨核细胞、嗜酸性粒细胞、iPS细胞、巨噬细胞、T细胞、胰岛 $\beta$ 细胞、神经元、心肌细胞、血细胞、内分泌祖细胞、外分泌祖细胞、导管细胞、腺泡细胞、 $\alpha$ 细胞、 $\beta$ 细胞、 $\delta$ 细胞、PP细胞、肝细胞、胆管细胞或棕色脂肪细胞。

[0671] 在一些实施方案中,如本文提供的工程化的细胞是诱导多能干细胞或者是来源于诱导多能干细胞或从诱导多能干细胞分化的工程化细胞。小鼠和人多能干细胞(通常称为iPSC;对于鼠细胞为miPSC或对于人细胞为hiPSC)的生成在本领域中通常是已知的。如本领域技术人员将理解的,有多种不同的方法用于生成iPSC。最初的诱导是使用四种转录因子Oct3/4、Sox2、c-Myc和Klf4的病毒引入在小鼠胚胎或成年成纤维细胞中进行的;参见Takahashi和Yamanaka Cell126:663-676(2006),所述文献特此通过引用整体并入,特别是其中概述的技术。从那时起,已经开发了许多方法;参见Seki等人,World J. Stem Cells 7(1):116-125(2015)进行回顾,以及Lakshmipathy和Vermuri编辑,Methods in Molecular Biology:Pluripotent Stem Cells,Methods and Protocols,Springer 2013,所述文献特此通过引用明确地整体并入,特别是用于生成hiPSC的方法(参见例如后一篇参考文献的第3章)。

[0672] 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来生成,所述重编

程因子通常使用附加型载体引入。在这些条件下,少量的细胞被诱导成为iPSC(一般来讲,这一步的效率很低,因为没有使用选择标志物)。一旦细胞被“重编程”并成为多能细胞,它们就会失去附加型载体并使用内源基因产生因子。

[0673] 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,细胞转化为多能状态的效率下降,“多能性”也下降,例如,较少的重编程因子可能导致细胞不是完全多能的,而是可能只能够分化成较少的细胞类型。

[0674] 在一些实施方案中,使用单个重编程因子OCT4。在其他实施方案中,使用两个重编程因子OCT4和KLF4。在其他实施方案中,使用三个重编程因子OCT4、KLF4和SOX2。在其他实施方案中,使用四个重编程因子OCT4、KLF4、SOX2和c-Myc。在其他实施方案中,可以使用选自SOKMNL1;SOX2、OCT4(POU5F1)、KLF4、MYC、NANOG、LIN28和SV40L T抗原的5、6或7个重编程因子。一般来讲,这些重编程因子基因是在附加型载体上提供的,诸如是本领域已知的和可商购获得的。

[0675] 在一些实施方案中,用于转染一种或多种重编程因子的宿主细胞是非多能干细胞。一般来讲,如本领域已知的,iPSC通过瞬时表达如本文所述的重编程因子由非多能细胞(诸如但不限于血细胞、成纤维细胞等)制备。在一些实施方案中,在重编程细胞之前,非多能细胞(诸如成纤维细胞)获得或分离自一个或多个个体受试者或供体。在一些实施方案中,iPSC由分离的非多能干细胞(例如成纤维细胞,获得自一个或多个(例如,两个或更多个、三个或更多个、四个或更多个、五个或更多个、十个或更多个、二十个或更多个、五十个或更多个或一百个或更多个)不同的供体受试者)库制备。在一些实施方案中,非多能细胞(诸如成纤维细胞)分离或获得自多个不同的供体受试者(例如两个或更多个、三个或更多个、四个或更多个、五个或更多个、十个或更多个、二十个或更多个、五十个或更多个或一百个或更多个),汇集为一批,重编程为iPSC并根据提供的方法进行工程化。

[0676] 在一些实施方案中,iPSC来源于诸如通过将一种或多种重编程因子瞬时转染到来自非多能细胞(例如成纤维细胞)库的细胞中,所述非多能细胞来自不同于受体受试者(例如,施用细胞的患者)的一个或多个供体受试者。待诱导为iPSC的非多能细胞(例如成纤维细胞)可以获得自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、50、100个或更多个供体受试者并汇集在一起。非多能细胞(例如成纤维细胞)可以获得自1个或多个、2个或多个、3个或多个、4个或多个、5个或多个、6个或多个、7个或多个、8个或多个、9个或多个、10个或多个、20个或多个、50个或多个或100个或多个供体受试者并汇集在一起。在一些实施方案中,从一个或多个个体收获非多能细胞(例如成纤维细胞),并且在一些情况下,非多能细胞(例如成纤维细胞)或非多能细胞(例如成纤维细胞)库是体外培养的,并用一种或多种重编程因子转染以诱导生成iPSC。在一些实施方案中,根据本文提供的方法工程化或修饰非多能细胞(例如成纤维细胞)或非多能细胞(例如成纤维细胞)库。在一些实施方案中,工程化iPSC或工程化iPSC库随后经受分化过程以分化成生物体和组织的任何细胞。

[0677] 一旦已经生成工程化iPSC细胞,就可如W02016183041和W02018132783中所述测定它们的低免疫原性和/或多能性保留。在一些实施方案中,使用如W02018132783的图13和图15中例示的多种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和监测逃脱宿主免疫系统的低免疫原性多能细胞生长(例如畸胎瘤)。在一些情况下,低免疫原性多能细

胞衍生物被转导以表达荧光素酶,然后可以使用生物发光成像进行跟踪。类似地,测试宿主动物对此类细胞的T细胞和/或B细胞反应,以确认所述细胞不在宿主动物中引起免疫反应。通过Elispot、ELISA、FACS、PCR或质谱流式细胞术(CYTof)评估T细胞反应。使用FACS或Luminex来评估B细胞反应或抗体反应。另外或另选地,可以测定细胞避免先天免疫反应(例如,NK细胞杀伤)的能力,如W02018132783的图14和图15中通常所示。

[0678] 在一些实施方案中,使用本领域技术人员认可的T细胞免疫测定(诸如T细胞增殖测定、T细胞活化测定和T细胞杀伤测定)来评价细胞的免疫原性。在一些情况下,T细胞增殖测定包括用干扰素- $\gamma$ 预处理细胞并将细胞与标记的T细胞共培养,并且在预先选择的时间量后测定T细胞群(或增殖的T细胞群)的存在。在一些情况下,T细胞活化测定包括将T细胞与本文概述的细胞共培养,并且确定T细胞中T细胞活化标志物的表达水平。

[0679] 可以进行体内测定以评估本文概述的细胞的免疫原性。在一些实施方案中,使用同种异体人源化免疫缺陷小鼠模型来确定工程化或修饰的iPSC细胞的存活率和免疫原性。在一些情况下,将工程化或修饰的iPSC移植到同种异体人源化NSG-SGM3小鼠中并测定细胞排斥、细胞存活和畸胎瘤形成。在一些情况下,移植的工程化iPSC或其分化细胞在小鼠模型中展现出长期存活。

[0680] 用于确定免疫原性(包括细胞的低免疫原性)的额外技术描述于例如Deuse等人,Nature Biotechnology,2019,37,252-258和Han等人,Proc Natl Acad Sci USA,2019,116(21),10441-10446,包括附图、图例和方法描述的公开内容通过引用整体并入本文。

[0681] 类似地,以多种方式测试多能性保留。在一个实施方案中,多能性是通过某些多能性特异性因子的表达来测定的,如本文通常所述和在W02018132783的图29中所示。另外或替代地,将多能细胞分化成一种或多种细胞类型作为多能性的指示。

[0682] 一旦已经生成工程化多能干细胞(工程化iPSC),就可以将它们维持在未分化状态,这对于维持iPSC是已知的。例如,可以使用防止分化和维持多能性的培养基在基质胶上培养细胞。此外,它们可以在培养基中处于维持多能性的条件下。

[0683] 本文所述的任何多能干细胞都可以分化成生物体和组织的任何细胞。在一方面,本文提供了从iPSC分化成不同细胞类型的工程化细胞,用于随后移植到受体受试者中。可以如本领域已知的通常通过评价细胞特异性标志物的存在来测定分化。如本领域技术人员将理解的,可以使用本领域已知的技术移植分化的工程化(例如低免疫原性)多能细胞衍生物,这取决于细胞类型和这些细胞的最终用途。在一些实施方案中,iPSC可以分化成本文所述的任何类型的细胞。在一些实施方案中,iPSC分化成选自T细胞、NK细胞、 $\beta$ 胰岛细胞、内皮细胞、上皮细胞诸如RPE、甲状腺细胞、皮肤细胞或肝细胞的细胞类型。在一些实施方案中,分离或获得宿主细胞(诸如来自个体供体或个体供体库的非多能细胞(例如成纤维细胞)),生成iPSC,其中iPSC随后被工程化以含有本文所述的修饰(例如遗传修饰)然后分化成所需的细胞类型。

[0684] 3.ABO血型 and Rh 抗原表达

[0685] 根据人体内每个红细胞表面存在或不存在抗原(ABO血型),血液制品可以分成不同的组。A、B、AB和A1抗原是通过红细胞糖蛋白上的寡糖序列来确定的。血型抗原组中的基因提供了制造抗原蛋白的指令。血型抗原蛋白在红细胞的细胞膜内发挥多种功能。这些蛋白质功能包括将其他蛋白质和分子转运进出细胞、维持细胞结构、附着到其他细胞和分子

以及参与化学反应。

[0686] 恒河猴因子 (Rh) 血型是仅次于ABO血型系统的第二重要血型系统。Rh血型系统由49种确定的血型抗原组成,其中五种抗原D、C、c、E和e是最重要的。个体的Rh (D) 状态通常在ABO型后用阳性或阴性后缀描述。术语“Rh因子”、“Rh阳性”和“Rh阴性”仅指Rh (D) 抗原。Rh抗原的抗体可能参与溶血性输血反应,抗Rh (D) 和Rh (c) 抗原的抗体会给胎儿和新生儿带来重大的溶血病风险。ABO抗体在每个人的生命早期都会产生。然而,Rh- 人体内的恒河猴抗体通常仅在人敏感时才会产生。举例来说,通过生下Rh+婴儿或通过接受Rh+输血可能会发生这种情况。

[0687] A、B、H和Rh抗原是血液、组织和细胞移植供体与受体之间组织相容性的主要决定因素。ABO基因编码的糖基转移酶活性负责产生A、B、AB、O组织血型抗原,这些抗原显示在细胞表面上。A型个体编码ABO基因产物,具有产生a (1, 3) N-乙酰半乳糖氨基转移酶活性的特异性,并且B型个体具有产生a (1, 3) 半乳糖基转移酶活性的特异性。O型个体根本不产生功能性半乳糖基转移酶,因此不产生任何修饰。AB型个体各自拥有一个拷贝,并产生两种类型的修饰。ABO基因的酶产物作为底物作用于H抗原,因此缺乏ABO活性的O型个体呈现未修饰的H抗原,并因此通常称为O (H) 型。

[0688] H抗原本身是由FUT1基因编码的a (1, 2) 岩藻糖基转移酶的产物。在非常罕见的个体中,由于FUT1基因的破坏而完全丧失了H抗原,并且不存在ABO产生A或B组织血型的底物。据说这些个体属于孟买 (Bombay) 组织血型。Rh抗原是由RHD基因编码的,并且Rh阴性的个体携带RHD基因的缺失或破坏。

[0689] 在一些实施方案中,本文提供的细胞或细胞群是ABO O型Rh因子阴性的。在一些实施方案中,本文所述的ABO O型Rh因子阴性细胞来源于ABO O型Rh因子阴性供体。在一些实施方案中,本文所述的ABO O型Rh因子阴性细胞被工程化以缺乏ABO A型、ABO B型或Rh因子抗原的呈递。在一些实施方案中,ABO O型和/或Rh阴性细胞包含ABO基因的部分或完全失活(例如,通过ABO基因的有害变型或通过插入ABO基因的外显子6 258de1G变型),且/或RHD基因的表达通过RHD基因的有害变型而部分或完全失活。在一些实施方案中,ABO O型Rh阴性细胞包含FUT1基因的部分或完全失活,且/或RHD基因的表达通过RHD基因的有害变型而部分或完全失活。在一些实施方案中,工程化ABO O型和/或Rh因子阴性细胞是使用基因编辑生成的,以例如将A型细胞修饰成O型细胞、B型细胞修饰成O型细胞、AB型细胞修饰成O型细胞、A+型细胞修饰成O-型细胞、A-型细胞修饰成O-型细胞、AB+型细胞修饰成O-型细胞、AB-型细胞修饰成O-型细胞、B+型细胞修饰成O-型细胞和B-型细胞修饰成O-型细胞。示例性工程化ABO O型Rh因子阴性细胞及生成其的方法描述于W02021/146222,其内容通过引用整体并入本文。

[0690] 4. 性染色体

[0691] 在某些方面,具有性染色体的细胞可以表达某些抗原(例如,Y抗原),并且受体可以对此类抗原具有预先存在的敏感性。例如,在一些实施方案中,怀有男性胎儿的女性可能会排斥来自男性供体的细胞。因此,在一些实施方案中,供体是男性并且受体是男性。在一些实施方案中,供体是女性并且受体是女性。在一些实施方案中,工程化细胞包含降低抗原(诸如原钙粘蛋白Y和/或神经胶质蛋白Y)的表达的修饰。在一些实施方案中,编码原钙粘蛋白Y的基因(PCDH11Y;Ensembl ID ENSG00000099715)在工程化细胞中被降低或消除,例如

敲除。在一些实施方案中,编码神经胶质蛋白Y的基因(NLGN4Y;Ensembl ID ENSG00000165246)在工程化细胞中被降低或消除,例如敲除。可以使用用于降低或消除基因表达的任何方法,诸如本文所述的任何方法。在一些实施方案中,通过核酸酶介导的基因编辑方法(诸如使用CRISPR/Cas系统)降低或消除工程化细胞中的PCDH11Y和/或NLGN4Y。

[0692] D. 工程化原代细胞的示例性实施方案

[0693] 在一些实施方案中,工程化原代细胞及其群体是工程化原代细胞。在一些实施方案中,工程化原代细胞是人细胞或动物细胞。在一些实施方案中,工程化原代细胞是分离自供体受试者(例如,在从个体供体受试者获得供体样品时未怀疑患有疾病或病状的健康供体受试者)的原代细胞。在一些实施方案中,工程化原代细胞选自 $\beta$ 胰岛细胞、B细胞、T细胞、NK细胞、视网膜色素上皮细胞、神经胶质祖细胞、内皮细胞、肝细胞、甲状腺细胞、皮肤细胞,和血细胞(例如,浆细胞或血小板)。在一些实施方案中,工程化原代细胞选自T细胞和NK细胞,并且还包含嵌合抗原受体(CAR)。在一些实施方案中,工程化原代细胞是ABO血型O型。在一些实施方案中,工程化原代细胞是恒河猴因子阴性(Rh<sup>-</sup>)。

[0694] 在一些实施方案中,工程化原代细胞及其群体表现出CD47的表达增加和一种或多种MHC I类复合物和/或一种或多种MHC II类复合物的一种或多种分子的表达降低。在一些实施方案中,工程化原代细胞及其群体表现出CD47的表达增加和一种或多种MHC I类复合物的一种或多种分子的表达降低。在一些实施方案中,工程化原代细胞及其群体表现出CD47的表达增加和一种或多种MHC II类复合物的一种或多种分子的表达降低。在一些实施方案中,工程化原代细胞及其群体表现出CD47的表达增加和一种或多种MHC I类复合物和一种或多种MHC II类复合物的一种或多种分子的表达降低。在一些实施方案中,赋予过表达的修饰包括增加的表面表达,且/或降低表达的修饰包括降低的表面表达。在一些实施方案中,工程化原代细胞选自胰岛细胞、 $\beta$ 胰岛细胞、B细胞、T细胞、NK细胞、视网膜色素上皮细胞、神经胶质祖细胞、内皮细胞、肝细胞、甲状腺细胞、皮肤细胞,和血细胞(例如,浆细胞或血小板)。在一些实施方案中,工程化原代细胞选自T细胞和NK细胞,并且还包含嵌合抗原受体(CAR)。在一些实施方案中,工程化原代细胞是ABO血型O型。在一些实施方案中,工程化原代细胞是恒河猴因子阴性(Rh<sup>-</sup>)。

[0695] 在一些实施方案中,工程化原代细胞及其群体表现出CD47的表达增加和B2M的表达降低。在一些实施方案中,细胞及其群体表现出CD47的表达增加和CIITA的表达降低。在一些实施方案中,细胞及其群体表现出CD47的表达增加和NLRC5的表达降低。在一些实施方案中,细胞及其群体表现出CD47的表达增加和B2M和CIITA的一种或多种分子的表达降低。在一些实施方案中,细胞及其群体表现出CD47的表达增加和B2M和NLRC5的一种或多种分子的表达降低。在一些实施方案中,细胞及其群体表现出CD47的表达增加和CIITA和NLRC5的一种或多种分子的表达降低。在一些实施方案中,细胞及其群体表现出CD47的表达增加和B2M、CIITA和NLRC5的一种或多种分子的表达降低。本文所述的任何工程化原代细胞还可以表现出增加的选自包括但不限于以下的组的一种或多种因子的表达:CD47、A20/TNFAIP3、C1-抑制剂、CCL21、CCL22、CD16、CD16 Fc受体、CD24、CD27、CD35、CD39、CD46、CD52、CD55、CD59、CD200、CR1、CTLA4-Ig、DUX4、FasL、H2-M3、HLA-C、HLA-E、HLA-E重链、HLA-G、PD-L1、IDO1、IL-10、IL15-RF、IL-35、MANF、Mfge8、PD-1、PD-L1或Serpib9。例如,本文所述的任何工程化原代细胞还可以表现出增加的选自包括但不限于以下的组的一种或多种因子的表

达:CD47、CD35、CD16 Fc受体、CD16、CD52、IL15-RF、H2-M3、DUX4、CD24、CD27、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重链、HLA-G、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1-抑制剂、IL-10、IL-35、IL-39、FasL、CCL21、CCL22、Mfge8和Serpib9。在一些实施方案中,增加表达的修饰包括增加的表面表达,且/或降低表达的修饰包括降低的表面表达。在一些实施方案中,工程化原代细胞选自胰岛细胞、 $\beta$ 胰岛细胞、B细胞、T细胞、NK细胞、视网膜色素上皮细胞、神经胶质祖细胞、内皮细胞、肝细胞、甲状腺细胞、皮肤细胞,和血细胞(例如,浆细胞或血小板)。在一些实施方案中,工程化原代细胞选自T细胞和NK细胞,并且还包含嵌合抗原受体(CAR)。在一些实施方案中,工程化原代细胞是ABO血型O型。在一些实施方案中,工程化原代细胞是恒河猴因子阴性(Rh-)。

[0696] 在一些实施方案中,工程化原代细胞及其群体表现出CD47、任选至少一种其他致耐受因子的表达增加,和MHC I类复合物的一种或多种分子的表达降低。在一些实施方案中,工程化原代细胞及其群体表现出CD47、任选至少一种其他致耐受因子的表达增加,和MHC II类复合物的一种或多种分子的表达降低。在一些实施方案中,工程化原代细胞及其群体表现出CD47、任选至少一种其他致耐受因子的表达增加,和MHC II类的一种或多种分子和MHC II类复合物的一种或多种分子的表达降低。在一些实施方案中,工程化原代细胞及其群体表现出CD47、任选至少一种其他致耐受因子的表达增加,和B2M的表达降低。在一些实施方案中,工程化原代细胞及其群体表现出CD47、任选至少一种其他致耐受因子的表达增加,和CIITA的表达降低。在一些实施方案中,工程化原代细胞及其群体表现出CD47、任选至少一种其他致耐受因子的表达增加,和B2M和CIITA的一种或多种分子的表达降低。在一些实施方案中,细胞及其群体表现出CD47和至少一种其他致耐受因子的表达增加,和B2M和NLRC5的一种或多种分子的表达降低。在一些实施方案中,细胞及其群体表现出CD47和至少一种其他致耐受因子的表达增加,和CIITA和NLRC5的一种或多种分子的表达降低。在一些实施方案中,细胞及其群体表现出CD47和至少一种其他致耐受因子的表达增加,和B2M、CIITA和NLRC5的一种或多种分子的表达降低。在一些实施方案中,致耐受因子包括来自包括但不限于以下的组的任何一种:CD47、CD35、CD16 Fc受体、CD16、CD52、IL15-RF、H2-M3、DUX4、CD24、CD27、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重链、HLA-G、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1-抑制剂、IL-10、IL-35、IL-39、FasL、CCL21、CCL22、Mfge8和Serpib9。在一些实施方案中,赋予过表达的修饰包括增加的表面表达,且/或降低表达的修饰包括降低的表面表达。在一些实施方案中,工程化原代细胞选自胰岛细胞、 $\beta$ 胰岛细胞、B细胞、T细胞、NK细胞、视网膜色素上皮细胞、神经胶质祖细胞、内皮细胞、肝细胞、甲状腺细胞、皮肤细胞,和血细胞(例如,浆细胞或血小板)。在一些实施方案中,工程化原代细胞选自T细胞和NK细胞,并且还包含嵌合抗原受体(CAR)。在一些实施方案中,工程化原代细胞是ABO血型O型。在一些实施方案中,工程化原代细胞是恒河猴因子阴性(Rh-)。

[0697] 在一些实施方案中,工程化原代细胞及其群体表现出CD47的过表达、B2M的表达降低和CIITA的表达降低。在一些实施方案中,B2M的表达降低包括B2M的蛋白质表达降低。在一些实施方案中,B2M的表达降低包括B2M的蛋白质表达降低。在一些实施方案中,B2M的表达降低包括B2M的蛋白质表达消除。在一些实施方案中,B2M的表达降低包括B2M基因的两个等位基因的失活或破坏。在一些实施方案中,B2M的表达降低包括细胞中所有B2M编码序列的失活或破坏。在一些实施方案中,B2M的失活或破坏包括B2M基因中的插入缺失或B2M基因

的一段连续基因组DNA的缺失。在一些实施方案中,B2M基因被敲除。在一些实施方案中,CIITA的表达降低包括CIITA的蛋白质表达降低。在一些实施方案中,CIITA的表达降低包括CIITA的蛋白质表达消除。在一些实施方案中,CIITA的表达降低包括CIITA基因的两个等位基因的失活或破坏。在一些实施方案中,CIITA的表达降低包括细胞中所有CIITA编码序列的失活或破坏。在一些实施方案中,CIITA的失活或破坏包括CIITA基因中的插入缺失或CIITA基因的一段连续基因组DNA的缺失。在一些实施方案中,CIITA基因被敲除。

[0698] 在一些实施方案中,增加表达的修饰包括增加的表面表达,且/或降低表达的修饰包括降低的表面表达。

[0699] 在一些实施方案中,工程化原代细胞选自胰岛细胞、 $\beta$ 胰岛细胞、B细胞、T细胞、NK细胞、视网膜色素上皮细胞、神经胶质祖细胞、内皮细胞、肝细胞、甲状腺细胞、皮肤细胞,和血细胞(例如,浆细胞或血小板)。在一些实施方案中,工程化原代细胞选自T细胞和NK细胞,并且还包含嵌合抗原受体(CAR)。在一些实施方案中,工程化原代细胞是ABO血型O型。在一些实施方案中,工程化原代细胞是恒河猴因子阴性(Rh<sup>-</sup>)。

[0700] 本领域技术人员将理解,表达水平(诸如基因、蛋白质或分子表达增加(例如,过表达)或降低)可以参考可比细胞或与可比细胞进行比较。在一些实施方案中,具有增加的CD47表达的工程化原代细胞是指与未修饰的原代细胞相比具有更高水平的CD47蛋白的修饰的原代细胞。在一些实施方案中,具有降低的B2M表达的工程化原代细胞是指与未修饰的原代细胞相比具有更低水平的B2M蛋白的修饰的原代细胞。在一些实施方案中,具有降低的CIITA表达的工程化原代细胞是指与未修饰的原代细胞相比具有更低水平的CIITA蛋白的修饰的原代细胞。

[0701] 在一个实施方案中,本文提供了工程化原代细胞(例如,原代细胞),其表达外源CD47多肽并具有降低的一种或多种MHC I类复合蛋白、一种或多种MHC II类复合蛋白,或MHC I类和II类复合蛋白的任何组合的表达。在另一个实施方案中,工程化原代细胞表达外源CD47多肽并表达降低水平的B2M和CIITA多肽。在一些实施方案中,工程化原代细胞表达外源CD47多肽并具有B2M和CIITA基因的修饰(例如,遗传修饰)。在一些情况下,修饰(例如,遗传修饰)使B2M和CIITA基因失活。在一些实施方案中,工程化原代细胞选自胰岛细胞、 $\beta$ 胰岛细胞、B细胞、T细胞、NK细胞、视网膜色素上皮细胞、神经胶质祖细胞、内皮细胞、肝细胞、甲状腺细胞、皮肤细胞,和血细胞(例如,浆细胞或血小板)。在一些实施方案中,工程化原代细胞选自T细胞和NK细胞,并且还包含嵌合抗原受体(CAR)。在一些实施方案中,工程化原代细胞是ABO血型O型。在一些实施方案中,工程化原代细胞是恒河猴因子阴性(Rh<sup>-</sup>)。

[0702] 在一些实施方案中,本文提供了生成工程化原代细胞(例如,原代细胞)的方法,其中所述方法包括降低或消除细胞中一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子的表达;和增加细胞中CD47的表达(例如,过表达)。在一些实施方案中,所述方法包括降低或消除一种或多种MHC I类分子的表达。在一些实施方案中,所述方法包括降低或消除一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子的表达。在一些实施方案中,增加表达的修饰包括增加的表面表达,且/或降低表达的修饰包括降低的表面表达。在一些实施方案中,增加CD47的表达的修饰包含编码连接至启动子的CD47蛋白的外源多核苷酸。在一些实施方案中,将编码CD47的外源多核苷酸整合到工程化原代细胞的基因组中。在一些实施方案中,整合是通过靶向插入到细胞的靶基因组基因座中进行的,任选地其中靶向插入是



通过使用同源定向修复的核酸酶介导的基因编辑进行的。在一些实施方案中,降低一种或多种MHC I类分子蛋白质表达和/或一种或多种MHC II类分子蛋白质表达的修饰是通过核酸酶介导的基因编辑进行的。在一些实施方案中,核酸酶介导的基因编辑是通过靶向靶基因组基因座的锌指核酸酶(ZFN)、TAL效应物核酸酶(TALEN)或CRISPR-Cas组合进行的,任选地其中Cas是Cas9。在一些实施方案中,工程化原代细胞是低免疫原性原代细胞。在一些实施方案中,工程化原代细胞选自胰岛细胞、 $\beta$ 胰岛细胞、B细胞、T细胞、NK细胞、视网膜色素上皮细胞、神经胶质祖细胞、内皮细胞、肝细胞、甲状腺细胞、皮肤细胞,和血细胞(例如,浆细胞或血小板)。在一些实施方案中,工程化原代细胞选自T细胞和NK细胞,并且还包含嵌合抗原受体(CAR)。在一些实施方案中,工程化原代细胞是ABO血型O型。在一些实施方案中,工程化原代细胞是恒河猴因子阴性(Rh<sup>-</sup>)。

[0703] 在一些实施方案中,本文提供了生成工程化原代细胞(例如,原代细胞)的方法,其中所述方法包括降低或消除B2M的表达;和增加细胞中CD47的表达(例如,过表达)。在一些实施方案中,所述方法包括引入降低或消除B2M的表达的修饰。在一些实施方案中,降低或消除B2M表达的修饰包括B2M基因的两个等位基因的失活或破坏。在一些实施方案中,降低或消除B2M的修饰包括细胞中所有B2M编码序列的失活或破坏。在一些实施方案中,失活或破坏包括B2M基因中的插入缺失或B2M基因的一段连续基因组DNA的缺失。在一些实施方案中,插入缺失是移码突变。在一些实施方案中,B2M基因被敲除。在一些实施方案中,降低或消除B2M表达的修饰包括通过核酸酶介导的基因编辑来降低或消除B2M蛋白表达。在一些实施方案中,核酸酶介导的基因编辑是通过靶向B2M基因的锌指核酸酶(ZFN)、TAL效应物核酸酶(TALEN)或CRISPR-Cas组合进行的,任选地其中Cas是Cas9。在一些实施方案中,核酸酶介导的基因编辑是通过CRISPR-Cas组合进行的,并且CRISPR-Cas组合包含具有与B2M基因内的至少一个靶位点互补的靶向结构域的指导RNA(gRNA)。在一些实施方案中,CRISPR-Cas组合是包含gRNA和Cas蛋白的核糖核蛋白(RNP)复合物。在一些实施方案中,所述方法还包括降低或消除细胞中CIITA的表达。在一些实施方案中,所述方法包括引入降低或消除CIITA的表达的修饰。在一些实施方案中,降低或消除CIITA表达的修饰包括CIITA基因的两个等位基因的失活或破坏。在一些实施方案中,降低或消除CIITA的修饰包括细胞中所有CIITA编码序列的失活或破坏。在一些实施方案中,失活或破坏包括CIITA基因中的插入缺失或CIITA基因的一段连续基因组DNA的缺失。在一些实施方案中,插入缺失是移码突变。在一些实施方案中,CIITA基因被敲除。在一些实施方案中,增加CD47表达的修饰包含编码连接至启动子的CD47蛋白的外源多核苷酸。在一些实施方案中,将编码CD47的外源多核苷酸整合到工程化原代细胞的基因组中。在一些实施方案中,整合是通过靶向插入到细胞的靶基因组基因座中进行的,任选地其中靶向插入是通过使用同源定向修复的核酸酶介导的基因编辑进行的。在一些实施方案中,降低一种或多种MHC I类分子蛋白质表达和/或一种或多种MHC II类分子蛋白质表达的修饰是通过核酸酶介导的基因编辑进行的。在一些实施方案中,核酸酶介导的基因编辑是通过靶向靶基因组基因座的锌指核酸酶(ZFN)、TAL效应物核酸酶(TALEN)或CRISPR-Cas组合进行的,任选地其中Cas是Cas9。在一些实施方案中,增加表达的修饰包括增加的表面表达,且/或降低表达的修饰包括降低的表面表达。在一些实施方案中,工程化原代细胞是低免疫原性原代细胞。在一些实施方案中,工程化原代细胞选自胰岛细胞、 $\beta$ 胰岛细胞、B细胞、T细胞、NK细胞、视网膜色素上皮细胞、神经胶质祖细胞、内皮细

胞、肝细胞、甲状腺细胞、皮肤细胞,和血细胞(例如,浆细胞或血小板)。在一些实施方案中,工程化原代细胞选自T细胞和NK细胞,并且还包含嵌合抗原受体(CAR)。在一些实施方案中,工程化原代细胞是ABO血型O型。在一些实施方案中,工程化原代细胞是恒河猴因子阴性(Rh-)。

[0704] 在一些方面,本文提供了一种组合物,其包含工程化原代细胞(诸如本文所述的任何工程化原代细胞)群。在一些实施方案中,提供了一种组合物,其包含工程化原代胰岛细胞群,其中所述工程化原代胰岛细胞包含:(i)包含编码CD47的外源多核苷酸的转基因和(ii)B2M的两个等位基因的失活或破坏。在一些实施方案中,提供了一种组合物,其包含工程化原代 $\beta$ 胰岛细胞群,其中所述工程化原代 $\beta$ 胰岛细胞包含:(i)包含编码CD47的外源多核苷酸的转基因和(ii)B2M基因的两个等位基因的失活或破坏。在一些实施方案中,提供了一种组合物,其包含工程化原代T细胞群,其中所述工程化原代T细胞包含:(i)包含编码CD47的外源多核苷酸的转基因和(ii)B2M基因的两个等位基因的失活或破坏。在一些实施方案中,提供了一种组合物,其包含工程化原代甲状腺细胞群,其中所述工程化原代甲状腺细胞包含:(i)包含编码CD47的外源多核苷酸的转基因和(ii)B2M基因的两个等位基因的失活或破坏。在一些实施方案中,提供了一种组合物,其包含工程化原代皮肤细胞群,其中所述工程化原代皮肤细胞包含:(i)包含编码CD47的外源多核苷酸的转基因和(ii)B2M基因的两个等位基因的失活或破坏。在一些实施方案中,提供了一种组合物,其包含工程化原代内皮细胞群,其中所述工程化原代内皮细胞包含:(i)包含编码CD47的外源多核苷酸的转基因和(ii)B2M基因的两个等位基因的失活或破坏。在一些实施方案中,提供了一种组合物,其包含工程化原代视网膜色素上皮细胞群,其中所述工程化原代视网膜色素上皮细胞包含:(i)包含编码CD47的外源多核苷酸的转基因和(ii)B2M基因的两个等位基因的失活或破坏。在工程化原代细胞的任何前述实施方案中,细胞还可以包含CIITA基因的两个等位基因的失活或破坏。

#### [0705] E. 低免疫原性表型的测定

[0706] 在一些实施方案中,可以评估本文提供的工程化原代细胞或评估其低免疫原性。在一些实施方案中,细胞的低免疫原性可以通过评价细胞的免疫原性(诸如细胞引发适应性和先天免疫反应的能力)来确定。此类免疫反应可以使用本领域技术人员认可的测定来测量。在一些实施方案中,免疫反应测定测量低免疫原性细胞对T细胞增殖、T细胞活化、T细胞杀伤、NK细胞增殖、NK细胞活化和巨噬细胞活性的影响。在一些情况下,低免疫原性细胞及其衍生物在向受试者施用后经历被T细胞和/或NK细胞杀伤的降低。在一些情况下,低免疫原性细胞及其衍生物在向受试者施用后经历被巨噬细胞杀伤的降低。在一些情况下,低免疫原性细胞及其衍生物在向受试者施用后经历被外周血单核细胞(PBMC)杀伤的降低。在一些情况下,与未修饰或野生型细胞相比,细胞及其衍生物显示出降低的巨噬细胞吞噬。在一些实施方案中,与对应的未修饰的野生型细胞相比,低免疫原性细胞在受体受试者中引发降低或减弱的免疫反应。在一些实施方案中,低免疫原性细胞是非免疫原性的或不能在受体受试者中引发免疫反应。

[0707] 一旦已经生成低免疫原性细胞,就可以如W02016183041和W02018132783中所述测定它们的低免疫原性、植入和功能。

[0708] 低免疫原性细胞以允许它们植入到预期组织部位并重建或再生功能缺陷区域的

方式施用。在一些实施方案中,测定低免疫原性细胞的植入(例如,成功植入)。在一些实施方案中,在预选的时间量之后评价低免疫原性细胞的植入。在一些实施方案中,监测植入细胞的细胞存活。例如,可以经由生物发光成像(BLI)监测细胞存活,其中用荧光素酶表达构建体转导细胞以监测细胞存活。在一些实施方案中,通过本领域已知的免疫染色和成像方法使植入细胞可视化。在一些实施方案中,植入的细胞表达已知的生物标志物,可以检测所述生物标志物以确定成功植入。例如,流式细胞术可以用于确定特定生物标志物的表面表达。在一些实施方案中,低免疫原性细胞按预期被植入到期望组织部位(例如,低免疫原性细胞的成功植入)。在一些实施方案中,低免疫原性细胞按需要被植入到期望组织部位,诸如细胞缺陷部位。在一些实施方案中,低免疫原性细胞以与将非工程化原代细胞(例如,不包含修饰的原代细胞)植入到预期组织部位相同的方式植入到期望组织部位。在一些实施方案中,测定低免疫原性细胞的功能。在一些实施方案中,在低免疫原性细胞植入到期望组织部位之前测定其功能。在一些实施方案中,在低免疫原性细胞植入到期望组织部位之后测定其功能。在一些实施方案中,在预选量之后评价低免疫原性细胞的功能。在一些实施方案中,通过细胞产生可检测表型的能力来评价植入的细胞的功能。例如,可以基于由于糖尿病而失去的葡萄糖控制的恢复来评价植入的胰岛细胞和/或 $\beta$ 胰岛细胞功能。在一些实施方案中,低免疫原性细胞的功能如预期一样(例如,低免疫原性细胞成功发挥功能,同时避免抗体介导的排斥)。在一些实施方案中,低免疫原性细胞的功能如需要的一样,诸如在细胞缺陷位点具有足够的功能,同时避免抗体介导的排斥。在一些实施方案中,低免疫原性细胞以与非工程化原代细胞(例如,不包含修饰的原代细胞)发挥功能相同的方式发挥功能,同时避免抗体介导的排斥。

[0709] 在一些实施方案中,使用如W02018132783的图13和图15中例示的多种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和监测逃脱宿主免疫系统的低免疫原性细胞生长(例如畸胎瘤)。在一些情况下,低免疫原性细胞衍生物被转导以表达荧光素酶,然后可以使用生物发光成像进行跟踪。类似地,测试宿主动物对此类细胞的T细胞和/或B细胞反应,以确认所述细胞不在宿主动物中引起免疫反应。通过ELISPOT、ELISA、FACS、PCR或质谱流式细胞术(CYTOF)评估T细胞反应。使用FACS或Luminex来评估B细胞反应或抗体反应。另外或另选地,可测定细胞避免先天免疫反应(例如,NK细胞杀伤)的能力,如W02018132783的图14和图15中通常所示。

[0710] 在一些实施方案中,使用本领域技术人员认可的T细胞免疫测定(诸如T细胞增殖测定、T细胞活化测定和T细胞杀伤测定)来评价细胞的免疫原性。在一些情况下,T细胞增殖测定包括用干扰素- $\gamma$ 预处理细胞并将细胞与标记的T细胞共培养,并且在预先选择的时间量后测定T细胞群(或增殖的T细胞群)的存在。在一些情况下,T细胞活化测定包括将T细胞与本文概述的细胞共培养,并且确定T细胞中T细胞活化标志物的表达水平。

[0711] 可以进行体内测定以评估本文概述的细胞的免疫原性。在一些实施方案中,使用同种异体人源化免疫缺陷小鼠模型来确定低免疫原性细胞的存活和免疫原性。在一些情况下,将低免疫原性细胞移植到同种异体人源化NSG-SGM3小鼠中并测定细胞排斥、细胞存活和畸胎瘤形成。在一些情况下,移植的低免疫原性细胞在小鼠模型中展现出长期存活。

[0712] 用于确定免疫原性(包括细胞的低免疫原性)的额外技术描述于例如Deuse等人,Nature Biotechnology,2019,37,252-258和Han等人,Proc Natl Acad Sci USA,2019,116

(21), 10441-10446, 包括附图、图例和方法描述的公开内容通过引用整体并入本文。

[0713] 如本领域技术人员将理解的, 可以使用本领域已知并且如下文所述的技术(例如, 使用结合HLA复合物的标记抗体(例如, 使用与人主要组织相容性HLA I类抗原的 $\alpha$ 链结合的可商购获得的HLA-A、B、C抗体)的FACS技术)来测量多能细胞中一种或多种MHC I类分子功能(当细胞来源于人细胞时为HLA I)的成功降低。

[0714] 另外, 可以对细胞进行测试, 以确认HLA I复合物不在细胞表面上表达。这可以通过使用如上文所讨论的针对一种或多种HLA细胞表面组分的抗体的FACS分析来测定。

[0715] 可以使用本领域已知的技术(诸如使用针对蛋白质的抗体的蛋白质印迹、FACS技术、RT-PCR技术等)来测量多能细胞或其衍生物中一种或多种MHC II类分子功能(当细胞来源于人细胞时为HLA II)的成功降低。

[0716] 另外, 可以对细胞进行测试, 以确认HLA II复合物不在细胞表面上表达。再次, 这种测定如本领域已知的那样进行(例如参见W02018132783的图21), 并且通常使用基于与人HLA II类分子HLA-DR、DP和大多数DQ抗原结合的商业抗体的蛋白质印迹或FACS分析进行。

[0717] 除了降低HLA I和II(或MHC I类分子和II类分子)外, 本文提供的低免疫原性细胞对巨噬细胞吞噬作用和NK细胞杀伤的敏感性也降低。由于一种或多种CD24转基因的表达, 所得低免疫原性细胞“逃避”免疫巨噬细胞和先天途径。

[0718] F. 用于生成工程化原代细胞的方法

[0719] 本文提供了用于通过基因编辑修饰细胞中基因的表达来修饰细胞的方法。在一些实施方案中, 所述方法包括在与修饰细胞有关的在运动中孵育细胞的步骤。在一些实施方案中, 使细胞与一种或多种用于修饰细胞中基因表达的试剂接触, 随后使细胞经受运动(例如摇动或波动运动)可以增强或促进细胞的修饰效率。在一些实施方案中, 所述方法可以用于促进或增强细胞的修饰。在一些实施方案中, 所述方法可以降低基因的表达(诸如通过使内源基因失活或缺失的遗传破坏)和/或可以用于增加基因的表达(诸如在细胞中过表达基因)。在一些方面, 所述方法可以用于降低如本文所述的一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子的表达。在一些方面, 所述方法可以用于增加一种或多种如本文所述的致耐受因子(诸如CD47)的表达。

[0720] 在一些实施方案中, 本文提供了一种修饰细胞群的方法, 其中所述方法包括:i)使细胞群与一种或多种试剂接触以修饰群体的细胞中的基因表达;和ii)与其中细胞未经受运动(例如其中细胞在静态条件下孵育)的类似方法相比, 使细胞群在与一种或多种试剂接触后经受运动。在一些实施方案中, 所述方法增强或促进群体中细胞的修饰。在一些实施方案中, 与其中细胞未经受运动(例如其中细胞在静态条件下孵育)的类似方法相比, 所述方法增加群体中细胞的活力。

[0721] 在一些实施方案中, 待工程化的细胞可以是如本文所述的细胞, 诸如第II章节C中所述的细胞。

[0722] 在一些实施方案中, 细胞群是原代细胞。在一些实施方案中, 细胞群是选自由以下组成的组的原代细胞: 胰岛细胞、免疫细胞、B细胞、T细胞、自然杀伤(NK)细胞、自然杀伤T(NKT)细胞、巨噬细胞、内皮细胞、肌细胞、心肌细胞、平滑肌细胞、骨骼肌细胞、肝细胞、神经胶质祖细胞、多巴胺能神经元、视网膜色素上皮细胞、甲状腺细胞、皮肤细胞、神经胶质祖细胞、神经细胞、心脏细胞和血细胞。

[0723] 在一些实施方案中,细胞群是来源于干细胞的细胞。在一些实施方案中,干细胞选自自由以下组成的组:多能干细胞(PSC)、诱导多能干细胞、胚胎干细胞、造血干细胞、间充质干细胞、内皮干细胞、上皮干细胞、脂肪干细胞、生殖干细胞、肺干细胞、脐带血干细胞和多潜能干细胞。在一些实施方案中,干细胞是多能干细胞。在一些实施方案中,干细胞是诱导多能干细胞、间充质干细胞(MSC)、造血干细胞(HSC)或胚胎干细胞(ESC)。在一些实施方案中,细胞群是分化自干细胞或其祖细胞的细胞,其中分化的细胞是胰岛细胞、免疫细胞、B细胞、T细胞、自然杀伤(NK)细胞、自然杀伤T(NKT)细胞、巨噬细胞、内皮细胞、肌细胞、心肌细胞、平滑肌细胞、骨骼肌细胞、肝细胞、神经胶质祖细胞、多巴胺能神经元、视网膜色素上皮细胞、甲状腺细胞、皮肤细胞、神经胶质祖细胞、神经细胞、心脏细胞或血细胞。

[0724] 在一些实施方案中,许多现有的基因编辑和细胞工程方法完全在静态培养中进行,这在一些方面被认为降低了对细胞的进一步应激。然而,观察表明此类方法可能并不总是理想的。在一些方面,以更接近地匹配细胞如何在体内存在的方式孵育或培养细胞可以提高修饰细胞的效率,诸如通过基因编辑方法。例如,细胞活力和/或修饰或基因编辑效率的改善可以通过在悬浮(例如非贴壁)条件下培养或孵育细胞同时使细胞经受运动来实现。在一些实施方案中,使细胞接触运动可以产生细胞集合体,其提供细胞与细胞接触和3-D簇的形成,从而增强细胞的活力和适应性以及细胞的遗传修饰效率的总体增加。

[0725] 在一些实施方案中,细胞群是天然存在于体内3D网络中的原代细胞。在一些实施方案中,进行提供的方法使得细胞群在悬浮液中。在一些实施方案中,如果细胞天然存在于培养物或集合体中,则可以通过在接触之前从贴壁培养物或细胞簇中解离细胞来产生细胞悬浮液。

[0726] 在一些实施方案中,细胞群在具有低吸附表面的容器中。在一些实施方案中,细胞群在非贴壁培养容器中。在一些实施方案中,容器(诸如具有低附着表面的容器(例如非贴壁培养容器))包括细胞附着被降低或限制(诸如一段时间)的培养容器。非贴壁培养容器可以含有低附着或超低附着表面(诸如可以通过用物质处理表面来实现)以防止细胞附着,所述物质诸如水凝胶(例如,中性电荷和/或亲水性水凝胶)和/或表面活性剂(例如普鲁康酸(pluronic acid))。非贴壁培养容器可以含有圆形或凹形孔和/或微孔(例如Aggrewells™)。在一些实施方案中,非贴壁培养容器是Aggrewell™板。对于非贴壁培养容器,可能不需要使用酶从培养容器中去除细胞。

[0727] 在一些实施方案中,非贴壁培养容器是具有低或超低附着表面的培养容器,诸如以抑制或降低细胞附着。在一些实施方案中,在非贴壁培养容器中培养细胞不能防止培养物的所有细胞附着于培养容器的表面。

[0728] 在一些实施方案中,非贴壁培养容器是具有超低附着表面的培养容器。在一些方面,超低附着表面可以抑制细胞附着一段时间。在一些实施方案中,超低附着表面可以在贴壁表面上获得相同细胞类型的汇合生长所需的时间段内抑制细胞附着。在一些实施方案中,超低附着表面用物质涂覆或处理以防止细胞附着,所述物质诸如水凝胶层(例如,中性电荷和/或亲水性水凝胶层)。在一些实施方案中,在第一次孵育之前用表面活性剂涂覆或处理非贴壁培养容器。在一些实施方案中,表面活性剂是普鲁康酸。

[0729] 在一些实施方案中,容器是板、皿、烧瓶、生物反应器或袋子。在一些实施方案中,容器是板,诸如多孔板。在一些实施方案中,容器是6孔板、24孔板、48孔板或96孔板。在一些

实施方案中,培养容器是6孔板。在一些实施方案中,多孔板的孔还包括微孔。在一些任何提供的实施方案中,容器(诸如多孔板)具有圆形或凹形孔和/或微孔。在任何提供的实施方案中,容器(诸如多孔板)没有角或接缝。

[0730] 在一些实施方案中,容器允许细胞集合体的三维形成。在一些实施方案中,细胞在容器(诸如多孔板)中培养,并经受运动以产生细胞集合体或簇。在一些实施方案中,使细胞经受运动促进集合体的形成。在一些实施方案中,使细胞经受运动形成细胞簇。

[0731] 在一些实施方案中,细胞群在维持其活力的条件下培养。选择适当的温度、CO<sub>2</sub>和氧气条件以便为细胞培养物和活力提供必要的环境是在技术人员的水平之内的。在一些实施方案中,可以最小化或降低培养基的体积以减少氧气递送至细胞的扩散障碍。在一些实施方案中,将细胞群维持在容器中的足以覆盖细胞的最小体积的培养基中。确定支持细胞培养和活力的适当的培养基体积在技术人员的水平之内。作为实例,6孔板的标准工作体积为3.0mL至5.0mL,然而体积可以降低至1mL与2mL之间或约1mL与2mL之间以充分覆盖细胞并提供适当的培养物以支持细胞生长。在一些情况下,使用更多的培养基可以增加培养基深度和环境的静态性质,并且可以减慢氧气向细胞的扩散,这可能并不理想。

[0732] 在一些实施方案中,所述方法还可以包括在静态条件下进行的至少一段或一部分培养。在此类实施方案中,细胞不经受运动而是保持不动或固定。在一些实施方案中,在与用于修饰或基因编辑的一种或多种试剂接触期间并且在细胞经受运动之前,可以在静态条件下孵育细胞。在一些实施方案中,可以在使细胞经受运动后在静态条件下孵育细胞。

[0733] 在一些实施方案中,一种或多种试剂可以包括至少两种不同的试剂。在一些实施方案中,至少两种不同试剂中的每一种用于调节不同基因的表达。在一些情况下,至少第一一种或多种试剂可以是用于降低一种或多种MHC I类分子和/或MHC II类分子的表达的试剂,诸如所描述的,并且至少第二一种或多种试剂可以是用于增加一种或多种致耐受因子(例如CD47)的表达的试剂。在一些实施方案中,可以重复所述方法的步骤。在一些实施方案中,所述方法的第一次迭代中的一种或多种试剂不同于所述方法的重复迭代中的一种或多种试剂。

[0734] 在一些实施方案中,本文提供的方法还可以包括选择具有所需修饰(诸如基因编辑)的细胞。在一些实施方案中,选择具有修饰的细胞的方法可以通过流式细胞术,诸如通过期望细胞的正选择或负选择。

[0735] 在一些方面,本文提供了一种用于基因编辑原代胰岛细胞的方法。基因编辑原代胰岛细胞的方法包括将原代胰岛簇解离成原代 $\beta$ 胰岛细胞的悬浮液,其中原代胰岛簇包含原代 $\beta$ 胰岛细胞。然后对悬浮液的原代 $\beta$ 胰岛细胞进行修饰(例如,通过将一种或多种修饰引入细胞中以降低细胞中编码内源蛋白的一种或多种基因的表达和/或引入一种或多种修饰以增加细胞中异源蛋白的表达)。修饰的原代 $\beta$ 胰岛细胞可以在用于将修饰的原代 $\beta$ 胰岛细胞重新聚集成胰岛的条件下孵育,其中孵育的至少一部分是在运动中进行的。

[0736] 如本文所用的术语“运动”是指移动细胞(例如,修饰的原代 $\beta$ 胰岛细胞)。例如,细胞可以以圆周运动移动、左右移动、上下移动和/或反转。在一些实施方案中,运动是摇动。在一些实施方案中,摇动包括轨道摇动。在一些实施方案中,摇动包括双向线性移动。在一些实施方案中,摇动包括线性移动。所述运动可以通过本领域已知的各种方法来完成,诸如但不限于轨道摇床、往复摇床、回转摇床(gyratory rocker)、微板摇床、台式摇床和/或涡

旋仪。在一些实施方案中,使用轨道摇床来完成运动。在一些实施方案中,轨道摇床是Belly Dancer轨道摇床(ABI Scientific)。在一些实施方案中,与在生成工程化原代细胞的方法中不采用运动的方法相比,所述运动提高了基因编辑效率。例如,所述运动可以导致更佳的基因靶向、改善的表达和/或改善的基因表达降低,和/或增加所述方法靶向的细胞的数量。在一些实施方案中,与不采用运动生成工程化原代细胞的方法相比,所述运动将生成工程化原代细胞的方法中的基因编辑效率提高超过约0.1倍,诸如超过约0.2倍、0.3倍、0.4倍、0.5倍、1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍或更多倍中的任一个。在一些实施方案中,所述运动将生成工程化原代细胞的方法中的基因编辑效率提高约0.1倍与约100倍之间,诸如约0.1倍与约10倍、约0.5倍与约50倍和约10倍与约100倍之间。

[0737] 在一些实施方案中,通过使细胞经受运动,可以降低使细胞与一种或多种用于基因编辑的试剂接触所需的时间量。在一些实施方案中,在使细胞经受运动之前,与一种或多种用于修饰或基因编辑的试剂接触少于两天。在一些实施方案中,在使细胞经受运动之前进行接触30秒至24小时。在一些实施方案中,进行接触为或约1分钟、5分钟、10分钟、20分钟、30分钟、40分钟、50分钟、1小时、2小时、4小时、6小时、12小时、24小时,或上述任何值之间的任何值。在一些实施方案中,在使细胞经受运动之前进行接触1分钟至60分钟。在一些实施方案中,在使细胞经受运动之前进行接触2分钟至30分钟。在一些实施方案中,在使细胞经受运动之前进行接触5分钟至15分钟。

[0738] 在一些实施方案中,本文提供了一种用于基因编辑原代胰岛细胞的方法,所述方法包括:i)将原代胰岛簇解离成原代 $\beta$ 胰岛细胞的悬浮液;ii)修饰悬浮液的原代 $\beta$ 胰岛细胞;和iii)在用于将修饰的原代 $\beta$ 胰岛细胞重新聚集成胰岛的条件下孵育修饰的原代 $\beta$ 胰岛细胞,其中孵育的至少一部分是在运动中进行的。在一些实施方案中,原代胰岛簇是人原代胰岛簇。在一些实施方案中,原代胰岛簇是人原代尸体胰岛簇。在一些实施方案中,原代细胞是原代 $\beta$ 胰岛细胞。在一些实施方案中,悬浮液是单细胞悬浮液。

[0739] 本文提供的用于基因编辑原代胰岛细胞的方法可以包括一个或多个解离步骤(例如,将原代胰岛簇解离成原代细胞的悬浮液)和一个或多个重新聚集步骤(例如,在用于将原代细胞重新聚集成胰岛的条件下孵育修饰的原代细胞)。在一些实施方案中,基因编辑原代胰岛细胞的方法包括约一个、两个、三个、四个、五个或更多个解离步骤。在一些实施方案中,基因编辑原代胰岛细胞的方法包括约一个、两个、三个、四个、五个或更多个重新聚集步骤。在一些实施方案中,一个或多个重新聚集步骤中的每一个在一个或多个解离步骤中的每一个之后进行。在一些实施方案中,基因编辑原代胰岛细胞的方法包括进行解离步骤和重新聚集步骤之间的一段时间。在一些实施方案中,进行解离步骤和重新聚集步骤之间的时间段在约1min与约10天之间,诸如约1分钟(min)与约10小时(h)之间、约5h与约24h之间和约24h与约10天之间。在一些实施方案中,进行解离步骤和重新聚集步骤之间的时间段大于约1min,诸如大于约5min、10min、30min、1h、2h、3h、4h、5h、10h、24h、48h、5天、10天或更长时间中的任一个。在一些实施方案中,进行解离步骤和重新聚集步骤之间的时间小于约10天,诸如小于约5天、48h、24h、10h、5h、4h、3h、2h、1h、30min、10min、5min或更短时间中的任一个。

[0740] 在一些实施方案中,在用于将修饰的原代 $\beta$ 胰岛细胞重新聚集成胰岛的条件下孵育修饰的原代 $\beta$ 胰岛细胞进行至少一次。在一些实施方案中,在用于将修饰的原代 $\beta$ 胰岛细

胞重新聚集成胰岛的条件下孵育修饰的原代 $\beta$ 胰岛细胞是间歇进行的,其中每个孵育步骤在修饰悬浮液的原代 $\beta$ 胰岛细胞之后进行。在一些实施方案中,在用于将修饰的原代 $\beta$ 胰岛细胞重新聚集成胰岛的条件下孵育修饰的原代 $\beta$ 胰岛细胞进行两次,其中在修饰悬浮液的原代 $\beta$ 胰岛细胞之后进行第一孵育步骤以降低细胞中编码内源蛋白的一种或多种基因的表达,并且其中在修饰悬浮液的原代 $\beta$ 胰岛细胞之后进行第二孵育步骤以增加细胞中一种或多种异源蛋白的表达。在一些实施方案中,在用于将修饰的原代 $\beta$ 胰岛细胞重新聚集成胰岛的条件下孵育修饰的原代 $\beta$ 胰岛细胞进行两次,其中在修饰悬浮液的原代 $\beta$ 胰岛细胞之后进行第一孵育步骤以降低细胞中人B2M基因和人CIITA基因的表达,并且其中在修饰悬浮液的原代 $\beta$ 胰岛细胞之后进行第二孵育步骤以增加细胞中CD47的表达。

[0741] 在一些实施方案中,将原代胰岛簇解离成原代 $\beta$ 胰岛细胞的悬浮液是通过细胞解离溶液进行的。在一些实施方案中,将细胞解离溶液应用于原代胰岛簇。在一些实施方案中,将细胞解离溶液应用于原代胰岛簇约1分钟(min)与约20min之间,诸如约1min与约5min、约3min与约10min、约8min与约15min和约12min与约20min之间。在一些实施方案中,将细胞解离溶液应用于原代胰岛簇大于约1min,诸如大于约2min、3min、4min、5min、6min、7min、8min、9min、10min、15min、20min或更长时间中的任一个。在一些实施方案中,将细胞解离溶液应用于原代胰岛簇小于约20min,诸如小于约15min、10min、9min、8min、7min、6min、5min、4min、3min、2min、1min或更短时间中的任一个。在一些实施方案中,将细胞解离溶液应用于原代胰岛簇约10min。在一些实施方案中,将细胞解离溶液在约30°C与约40°C之间(诸如约30°C与约35°C、约33°C与约38°C和约35°C和约40°C之间)的温度下应用于原代胰岛簇。在一些实施方案中,将细胞解离溶液在高于约30°C(诸如高于约31°C、32°C、33°C、34°C、35°C、36°C、37°C、38°C、39°C、40°C或更高中的任一个)的温度下应用于原代胰岛簇。在一些实施方案中,将细胞解离溶液在低于约40°C(诸如低于约39°C、38°C、37°C、36°C、35°C、34°C、33°C、32°C、31°C、30°C或更低中的任一个)的温度下应用于原代胰岛簇。在一些实施方案中,将细胞解离溶液在约37°C的温度下应用于原代胰岛簇。在一些实施方案中,将细胞解离溶液在约37°C的温度下应用于原代胰岛簇约10min。细胞解离溶液可以包括蛋白水解酶和胶原溶解酶的溶液。在一些实施方案中,细胞解离溶液是ACCUMAX™细胞分离溶液。

[0742] 在一些实施方案中,对原代 $\beta$ 胰岛细胞的解离悬浮液进行修饰。在一些实施方案中,修饰包括遗传工程化。在一些实施方案中,悬浮原代 $\beta$ 胰岛细胞在从原代胰岛簇解离后被修饰。在一些实施方案中,修饰包括将一种或多种修饰引入细胞中以降低细胞中编码内源蛋白的一种或多种基因的表达。在一些实施方案中,修饰包括将一种或多种修饰引入细胞中以降低一种或多种MHC I类分子的表达。在一些实施方案中,修饰包括将一种或多种修饰引入细胞中以降低一种或多种MHC II类分子的表达。在一些实施方案中,修饰包括将一种或多种修饰引入细胞中以降低一种或多种MHC I类分子和一种或多种MHC II类分子的表达。在一些实施方案中,降低一种或多种MHC I类分子的表达的修饰是降低B2M的表达的修饰。在一些实施方案中,降低一种或多种MHC II类分子的表达的修饰是降低CIITA的表达的修饰。

[0743] 在一些实施方案中,降低细胞中编码内源蛋白的一种或多种基因的表达是通过将基因编辑系统引入细胞中进行的。在一些实施方案中,基因编辑系统包含序列特异性核酸酶。在一些实施方案中,基因编辑系统包含RNA指导的核酸酶。在一些实施方案中,序列特异



性核酸酶选自自由以下组成的组:RNA指导的DNA核酸内切酶、大范围核酸酶、转录活化因子样效应物核酸酶 (TALEN) 和锌指核酸酶 (ZFN)。在一些实施方案中, RNA指导的核酸酶包含Cas核酸酶和指导RNA。在一些实施方案中, RNA指导的核酸酶是II型或V型Cas蛋白。在一些实施方案中, RNA指导的核酸酶是Cas9同源物或Cpf1同源物。

[0744] 在一些实施方案中, RNA指导的核酸酶包含Cas9核酸酶和靶向人B2M基因的单一gRNA。在一些实施方案中, 靶向人B2M基因的单一gRNA包含CGUGAGUAAACCUGAAUCUU (SEQ ID NO:33) 的核酸序列。在一些实施方案中, RNA指导的核酸酶包含Cas9核酸酶和靶向人CIITA基因的单一gRNA。在一些实施方案中, 靶向人CIITA基因的单一gRNA包含CGAUUAUUGGCAUAAGCCUCCC (SEQ ID NO:34) 的核酸序列。在一些实施方案中, 在单一gRNA靶向人CIITA基因之前将靶向人B2M基因的单一gRNA引入细胞。在一些实施方案中, 在单一gRNA靶向人B2M基因之前将靶向人CIITA基因的单一gRNA引入细胞。在一些实施方案中, 在单一gRNA靶向人CIITA基因的同时将靶向人B2M基因的单一gRNA引入细胞。在一些实施方案中, 通过电穿孔将降低细胞中编码内源蛋白的一种或多种基因的表达的一种或多种修饰引入细胞中。在一些实施方案中, 用含有Cas9酶和靶向人B2M基因的单一gRNA的核糖核蛋白复合物对细胞进行电穿孔。在一些实施方案中, 用含有Cas9酶和靶向人CIITA基因的单一gRNA的核糖核蛋白复合物对细胞进行电穿孔。

[0745] 在一些实施方案中, 修饰包括将一种或多种修饰引入细胞中以增加细胞中一种或多种异源蛋白的表达。在一些实施方案中, 修饰包括引入一种或多种修饰以增加一种或多种致耐受因子的表达。在一些实施方案中, 一种或多种致耐受因子选自自由以下组成的组: CD47、CD27、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重链、HLA-G、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1-抑制剂、IL-10、IL-35、FASL、CCL21、MFGES8和SERPINB9及其任何组合。在一些实施方案中, 一种或多种致耐受因子选自自由以下组成的组: CD47、PD-L1、HLA-E、HLA-G、CCL21、FASL、SERPINB9、CD200、MFGES8及其任何组合。在一些实施方案中, 一种或多种致耐受因子中的至少一种是CD47。

[0746] 在一些实施方案中, 增加细胞中一种或多种异源蛋白的表达是通过外源多核苷酸进行的。在一些实施方案中, 外源多核苷酸可操作地连接至启动子。在一些实施方案中, 启动子是组成型启动子。在一些实施方案中, 启动子选自自由以下组成的组: CAG启动子、巨细胞病毒 (CMV) 启动子、EF1a启动子、PGK启动子、腺病毒晚期启动子、牛痘病毒7.5K启动子、SV40启动子、HSV的tk启动子、小鼠乳腺肿瘤病毒 (MMTV) 启动子、HIV的LTR启动子、莫洛尼病毒的启动子、爱泼斯坦巴尔病毒 (EBV) 启动子和劳斯肉瘤病毒 (RSV) 启动子。在一些实施方案中, 将外源多核苷酸整合到细胞的基因组中。在一些实施方案中, 外源多核苷酸是多顺反子载体。在一些实施方案中, 整合是通过非靶向插入到细胞的基因组中, 任选地通过使用慢病毒载体将外源多核苷酸引入到细胞中进行的。在一些实施方案中, 整合是通过靶向插入到细胞的靶基因组基因座中进行的。

[0747] 在一些实施方案中, 增加细胞中一种或多种异源蛋白的表达是通过用在CAG启动子控制下的编码CD47和荧光素酶的慢病毒载体转导细胞进行的。在一些实施方案中, 在硫酸鱼精蛋白存在下用慢病毒载体转导细胞。在一些实施方案中, 使用离心 (例如, “离心感染 (spinfection)”) 进行使用慢病毒载体的转导。在一些实施方案中, 在慢病毒载体存在下在硫酸鱼精蛋白存在下, 以约300x g离心细胞约15min。

[0748] 在一些实施方案中, 本文提供的用于基因编辑原代细胞的方法还包括选择修饰的

胰岛。在一些实施方案中,选择的修饰的胰岛已被修饰以降低细胞中编码内源蛋白的一种或多种基因(例如,人B2M基因和/或人CIITA基因)的表达。在一些实施方案中,选择的修饰的胰岛已被修饰以增加细胞中一种或多种异源蛋白(例如CD47)的表达。在一些实施方案中,选择的修饰的胰岛已被修饰以降低细胞中编码内源蛋白的一种或多种基因的表达并增加细胞中一种或多种异源蛋白的表达。在一些实施方案中,选择包括荧光活化细胞分选(FACS)。在一些实施方案中,FACS包括使用BD FACSAria™III细胞分选仪。

[0749] 在一些实施方案中,使用细胞解离溶液(诸如本文所述的任何细胞解离溶液)将修饰的胰岛解离成用于FACS的单个原代胰岛细胞。在一些实施方案中,细胞解离溶液是ACCUMAX™细胞分离溶液。在一些实施方案中,原代β胰岛细胞已被修饰以降低细胞中编码内源蛋白的一种或多种基因的表达,所述细胞被选择以使用具有抗HLA-A、B、C抗体或IgG1同种型匹配的对照抗体,以及抗HLA-DR、DP、DQ抗体或IgG2a同种型匹配的对照抗体的细胞解离溶液。在一些实施方案中,使用FACS分选双阴性原代胰岛细胞。在一些实施方案中,将分选的双阴性原代胰岛细胞重新铺板以使用孵育进行重新聚集。在一些实施方案中,原代β胰岛细胞已被修饰以降低细胞中编码内源蛋白的一种或多种基因(例如,人B2M基因和人CIITA基因)的表达并增加细胞中一种或多种异源蛋白的表达,所述细胞被选择以使用具有抗CD47抗体或IgG1同种型匹配的对照抗体的细胞解离溶液。在一些实施方案中,如果修饰的胰岛细胞与同种型对照相比具有至少约20倍的细胞中一种或多种异源蛋白(例如,CD47)的表达的增加(诸如至少约21倍、22倍、23倍、24倍、25倍或更高的表达的增加),则选择修饰的胰岛细胞。在一些实施方案中,将分选的对CD47呈阳性的双阴性原代胰岛细胞重新铺板以使用孵育进行重新聚集。

[0750] 在一些实施方案中,在用于将修饰的原代β胰岛细胞重新聚集成胰岛的条件下孵育修饰的原代β胰岛细胞。在一些实施方案中,在修饰原代β胰岛细胞后进行孵育。在一些实施方案中,孵育包括在人胰岛细胞培养基中孵育修饰的原代β胰岛细胞。在一些实施方案中,人胰岛细胞培养基是PIM(S)培养基(Prodo)。在一些实施方案中,孵育包括在静态条件下的第一孵育,然后是在运动中的孵育。在一些实施方案中,孵育包括在运动中的孵育,然后是在静态条件下的第二孵育。在一些实施方案中,孵育包括在运动中的孵育和在静态条件下的孵育。

[0751] 在一些实施方案中,修饰的原代β胰岛细胞静态孵育约30min与约2小时(h)之间,诸如约30min与约1h、约45min与约1.5h以及约1h与约2h之间。在一些实施方案中,修饰的原代β胰岛细胞静态孵育大于约30min,诸如大于约35min、40min、45min、50min、55min、1h、1.25h、1.5h、1.75小时、2h或更长时间中的任一个。在一些实施方案中,修饰的原代β胰岛细胞静态孵育小于约2h,诸如小于约1.75h、1.5h、1.25h、1h、55min、50min、45min、40min、35min、30min或更短时间中的任一个。在一些实施方案中,修饰的原代β胰岛细胞静态孵育约1h。在一些实施方案中,修饰的原代β胰岛细胞在约30℃与约40℃之间(诸如约30℃与约35℃、约33℃与约38℃和约35℃与约40℃之间)的温度下静态孵育。在一些实施方案中,修饰的原代β胰岛细胞在高于约30℃(诸如高于约31℃、32℃、33℃、34℃、35℃、36℃、37℃、38℃、39℃、40℃或更高中的任一个)的温度下静态孵育。在一些实施方案中,修饰的原代β胰岛细胞在低于约40℃(诸如低于约39℃、38℃、37℃、36℃、35℃、34℃、33℃、32℃、31℃、30℃或更低中的任一个)的温度下静态孵育。在一些实施方案中,将修饰的原代β胰岛细胞在

约37°C的温度下静态孵育约1h。在一些实施方案中,静态孵育在约2%与约8%之间的CO<sub>2</sub> (诸如约2%与约4%之间的CO<sub>2</sub>、约3%与约6%之间的CO<sub>2</sub>以及约5%与约8%之间的CO<sub>2</sub>) 中进行。在一些实施方案中,静态孵育在大于约2%CO<sub>2</sub> (诸如大于约3%CO<sub>2</sub>、4%CO<sub>2</sub>、5%CO<sub>2</sub>、6%CO<sub>2</sub>、7%CO<sub>2</sub>、8%CO<sub>2</sub>或更高中的任一个) 中进行。在一些实施方案中,静态孵育在小于约8%CO<sub>2</sub> (诸如小于约7%CO<sub>2</sub>、6%CO<sub>2</sub>、5%CO<sub>2</sub>、4%CO<sub>2</sub>、3%CO<sub>2</sub>、2%CO<sub>2</sub>或更低中的任一个) 中进行。在一些实施方案中,静态孵育在约5%CO<sub>2</sub>中进行。在一些实施方案中,修饰的原代β胰岛细胞在约37°C下在约5%CO<sub>2</sub>中静态孵育约1h。

[0752] 在一些实施方案中,修饰的原代β胰岛细胞在静态孵育(例如,在约37°C下在约5%CO<sub>2</sub>中静态孵育约1h)后在运动中孵育。在一些实施方案中,运动孵育允许将修饰的原代β胰岛细胞重新聚集成胰岛。在一些实施方案中,运动孵育进行约24h与约96h之间,诸如约24h与约48h、约48h与约72h以及约28h与约96h之间。在一些实施方案中,运动孵育进行大于约24h,诸如大于约36h、48h、60h、72h、84h、96h或更长时间中的任一个。在一些实施方案中,运动孵育进行小于约96h,诸如小于约84h、72h、60h、28h、36h、24h或更短时间中的任一个。在一些实施方案中,运动孵育进行约72h。在一些实施方案中,运动孵育进行约48h,随后完全更换培养基,其后进行额外24h的运动孵育。在一些实施方案中,修饰的原代β胰岛细胞在Belly Dancer轨道摇床(ABI Scientific, Dubuque, IA)上运动孵育以进行人原代胰岛细胞重新聚集。

[0753] 在一些实施方案中,运动孵育以约1转每分钟(RPM)至约200RPM之间(诸如约1RPM至约25RPM、约15RPM至约50RPM、约30RPM至约75RPM和约50RPM至约200RPM以及约85RPM至约95RPM之间)的速度进行。在一些实施方案中,运动孵育以大于约1RPM(诸如大于约5RPM、10RPM、20RPM、30RPM、40RPM、50RPM、60RPM、70RPM、80RPM、90RPM、100RPM、125RPM、150RPM、175RPM、200RPM或更高中的任一个)的速度进行。在一些实施方案中,运动孵育以小于约200RPM(诸如小于约175RPM、150RPM、125RPM、100RPM、90RPM、80RPM、70RPM、60RPM、50RPM、40RPM、30RPM、20RPM、10RPM、5RPM、1RPM或更低中的任一个)的速度进行。在一些实施方案中,运动孵育以约85RPM与约95RPM之间的速度进行。在一些实施方案中,运动孵育以约0°与约8°之间(诸如约0°与约4°、约2°与约5°以及约4°与约8°之间)的节距进行。在一些实施方案中,运动孵育以大于约0°(诸如大于约1°、2°、3°、4°、5°、6°、7°、8°或更大中的任一个)的节距进行。在一些实施方案中,运动孵育以小于约8°(诸如大于约7°、6°、5°、4°、3°、2°、1°或更小中的任一个)的节距进行。

[0754] 在一些实施方案中,重复本文提供的用于基因编辑原代胰岛细胞的方法的步骤i) -iii)。在一些实施方案中,所述方法的第一次迭代中的修饰不同于所述方法的重复迭代中的修饰。在一些实施方案中,所述方法的第一次迭代中的修饰包括将一种或多种修饰引入到细胞中以降低细胞中编码内源蛋白的一种或多种基因的表达(例如,将一种或多种修饰引入到细胞中以降低一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子的表达,例如将一种或多种修饰引入到细胞中以降低人B2M基因和/或人CIITA基因的表达)。在一些实施方案中,所述方法的重复迭代中的修饰包括将一种或多种修饰引入到细胞中以增加细胞中一种或多种异源蛋白(例如,一种或多种致耐受因子,例如CD47)的表达。

[0755] 在一些实施方案中,修饰是第一修饰,其中重新聚集的胰岛细胞是用第一修饰工程化的第一修饰的胰岛,并且其中所述方法还包括:iv) 将第一修饰的胰岛解离成修饰的原

代 $\beta$ 胰岛细胞的悬浮液;v)用第二修饰进一步修饰悬浮液的修饰的原代胰岛细胞;和vi)在用于重新聚集成包含第二修饰的第二修饰的胰岛的条件下孵育进一步修饰的原代 $\beta$ 胰岛细胞,其中孵育的至少一部分是在运动中进行的。在一些实施方案中,第一修饰中的修饰包括将一种或多种修饰引入到细胞中以降低细胞中编码内源蛋白的一种或多种基因的表达(例如,将一种或多种修饰引入到细胞中以降低一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子的表达,例如将一种或多种修饰引入到细胞中以降低人B2M基因和/或人CIITA基因的表达)。在一些实施方案中,进一步修饰包括将一种或多种修饰引入到细胞中以增加细胞中一种或多种异源蛋白(例如,一种或多种致耐受因子,例如CD47)的表达。在一些实施方案中,本文提供的用于基因编辑原代细胞的方法还包括选择第一修饰的胰岛。在一些实施方案中,选择包括FACS。

[0756] 在一些实施方案中,第二修饰的胰岛用于移植。在一些实施方案中,第二修饰的胰岛用于治疗受试者的疾病或病状,诸如本文所述的任何疾病或病状。

[0757] III. 工程化细胞群和药物组合物

[0758] 本文提供了工程化细胞(诸如工程化原代细胞)群,其含有多种提供的工程化细胞,诸如工程化原代细胞。在一些情况下,细胞群包含细胞的混合物。在一些情况下,群体中至少约30%的细胞包含本文所述的一组修饰。在一些情况下,细胞群包含一种或多种不同的细胞类型。

[0759] 在一些实施方案中,群体包含胰岛细胞的混合物。在一些实施方案中,群体包含胰岛细胞(包括选自由胰腺 $\beta$ 细胞、胰腺 $\alpha$ 细胞和胰腺 $\gamma$ 细胞组成的组的两种或更多种不同的细胞类型)的混合物。在一些情况下,群体包含胰腺 $\alpha$ 、 $\beta$ 和 $\gamma$ 细胞。在一些情况下,群体包含原代细胞。在一些实施方案中,群体包含从干细胞或祖细胞分化的细胞(例如,从诱导多能干细胞、胚胎干细胞、造血干细胞、间充质干细胞、内皮干细胞、上皮干细胞、脂肪干细胞、生殖系干细胞、肺干细胞、脐带血干细胞、多能干细胞(PSC)和多潜能干细胞分化的细胞)。

[0760] 在一些实施方案中,工程化原代细胞群来源于汇集自多于一个供体受试者的细胞。在一些实施方案中,在从所述供体受试者获得供体样品时,多于一个供体受试者中的每一个都是健康受试者或未被怀疑患有疾病或病状。在一些实施方案中,群体中至少50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%或99.99%的细胞包含修饰。在一些实施方案中,工程化原代细胞群选自 $\beta$ 胰岛细胞、B细胞、T细胞、NK细胞、视网膜色素上皮细胞、神经胶质祖细胞、内皮细胞、肝细胞、甲状腺细胞、皮肤细胞,和血细胞(例如,浆细胞或血小板)。

[0761] 在一些实施方案中,相对于不包含一种或多种修饰的相同细胞类型的未修饰或未改变的细胞,群体中至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%或99.99%中的任一个的细胞包含降低的一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子的表达。在一些实施方案中,相对于不包含一种或多种修饰的相同细胞类型的未修饰或未改变的细胞,群体中至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%或99.99%中的任一个的细胞包含降低的B2M和/或CIITA的表达。在一些实施方案中,相对于不包含一种或多种修饰的相同细胞类型的未修饰或未改变的细胞,群体中至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%或99.99%中的任一个的细胞包含降低的B2M和CIITA的表达。在一些实施方案中,相对于不包含一种或

多种修饰的相同细胞类型的未修饰或未改变的细胞,群体中至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%或99.99%中的任一个的细胞包含使B2M基因的两个等位基因失活的一种或多种改变。在一些实施方案中,相对于不包含一种或多种修饰的相同细胞类型的未修饰或未改变的细胞,群体中至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%或99.99%中的任一个的细胞包含使CIITA基因的两个等位基因失活的一种或多种改变。

[0762] 在一些实施方案中,群体中至少50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%或99.99%的细胞包含一种或多种使内源B2M基因的两个等位基因失活的改变。在一些实施方案中,群体中至少50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%或99.99%的细胞包含一种或多种使内源CIITA基因的两个等位基因失活的改变。

[0763] 本文还提供了包含工程化细胞(诸如工程化原代细胞)的组合物。本文还提供了包含工程化细胞(诸如工程化原代细胞)群的组合物。在一些实施方案中,组合物是药物组合物。在一些实施方案中,本文提供的药物组合物还包含药学上可接受的赋形剂或载剂。可接受的载剂、赋形剂或稳定剂在采用的剂量和浓度下对受体是无毒的,并且包括缓冲剂,诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸;抗氧化剂(包括抗坏血酸和甲硫氨酸);防腐剂(诸如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯化六羟季铵;氯化苄甲羟铵、氯化苄乙氧铵;苯酚、丁醇或苄醇;对羟基苯甲酸烷基酯,诸如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;及间甲酚);低分子量(小于约10个残基)的多肽;蛋白质,诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,诸如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖及其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,诸如EDTA;糖,诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖醇;成盐抗衡离子,诸如钠;金属络合物(例如,Zn-蛋白络合物);和/或非离子表面活性剂,诸如聚山梨醇酯(TWEEN™)、泊洛沙姆(PLURONICS™)或聚乙二醇(PEG)。在一些实施方案中,药物组合物包含药学上可接受的缓冲剂(例如,中性缓冲盐水或磷酸盐缓冲盐水)。在一些实施方案中,药物组合物可以含有一种或多种赋形剂,用于改变、维持或保持例如组合物的pH、渗透压、粘度、透明度、颜色、等渗性、气味、无菌性、稳定性、溶解或释放速率、吸附或渗透。在一些方面,技术人员理解含有细胞的药物组合物可以不同于含有蛋白质的药物组合物。

[0764] 术语“药物制剂”是指以允许包含在其中的活性成分的生物活性有效的形式的制剂,并且其不含有对将施用制剂的受试者具有不可接受的毒性的额外组分。

[0765] “药学上可接受的载剂”是指对受试者无毒的药物制剂中活性成分以外的成分。药学上可接受的载剂包括但不限于:缓冲剂、赋形剂、稳定剂或防腐剂。

[0766] 在一些实施方案中,药物组合物含有有效治疗或预防疾病或病状的量(诸如治疗有效量或预防有效量)的如本文所述的工程化细胞(诸如原代细胞)。在一些实施方案中,药物组合物含有有效治疗或预防疾病或病状的量(诸如治疗有效量或预防有效量)的如本文所述的工程化原代细胞。在一些实施方案中,通过对治疗的受试者进行定期评估来监测治疗或预防功效。对于几天或更长时间的重复施用,根据病状,重复治疗,直到出现所需的疾病症状抑制。然而,其他剂量方案可能是有用的,并且可以被确定。可以通过组合物的单次推注施用、通过组合物的多次推注施用或通过组合物的连续输注施用来递送所需剂量。

[0767] 在一些实施方案中,使用标准施用技术、制剂和/或装置来施用如本文所述的工程化原代细胞。在一些实施方案中,使用标准施用技术、制剂和/或装置来施用如本文所述的工程化原代细胞。提供了用于储存和施用组合物的制剂和装置,诸如注射器和小瓶。工程化原代细胞可以经由局部注射施用,包括导管施用、系统性注射、局部注射、静脉内注射或胃肠外施用。当施用治疗组合物(例如,含有工程化原代细胞的药物组合物)时,通常将其配制成单位剂量可注射形式(溶液、悬浮液、乳液)。

[0768] 制剂包括用于静脉内、腹膜内或皮下施用的制剂。在一些实施方案中,细胞群是胃肠外施用的。如本文所用,术语“胃肠外”包括静脉内、肌内、皮下、直肠、阴道和腹膜内施用。在一些实施方案中,通过静脉内、腹膜内或皮下注射使用外周系统性递送将细胞群施用于受试者。

[0769] 在一些实施方案中,组合物提供为无菌液体制剂,例如等渗水溶液、悬浮液、乳液或分散体,其在一些方面可以被缓冲至选定的pH。液体组合物在某种程度上更便于施用,特别是通过注射。液体组合物可以包含载剂,其可以是含有例如水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、多元醇(例如甘油、丙二醇、液体聚乙二醇)及其合适混合物的溶剂或分散介质。无菌注射溶液可以通过将细胞掺入溶剂中来制备,诸如与合适的载剂、稀释剂或赋形剂(诸如无菌水、生理盐水、葡萄糖、右旋糖等)混合。

[0770] 在一些实施方案中,药学上可接受的载剂可以包括与药物施用相容的所有溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等(Gennaro, 2000, Remington: The science and practice of pharmacy, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, PA)。此类载剂或稀释剂的实例包括但不限于水、盐水、林格氏溶液(Ringer's solution)、右旋糖溶液和5%人血清白蛋白。也可以使用脂质体和非水性媒介物诸如固定油。补充性活性化合物也可以并入组合物中。药物载剂应该是适合于工程化原代细胞的药物载剂,诸如盐水溶液、右旋糖溶液或包含人血清白蛋白的溶液。在一些实施方案中,此类组合物的药学上可接受的载剂或媒介物是任何无毒的水性溶液,其中工程化原代细胞可以维持或保持存活足以允许施用活细胞的时间。例如,药学上可接受的载剂或媒介物可以是盐水溶液或缓冲盐水溶液。

[0771] 在一些实施方案中,组合物(包括药物组合物)是无菌的。在一些实施方案中,细胞的分离、富集或培养在封闭或无菌环境中(例如在无菌培养袋中)进行,以最小化错误、用户处理和/或污染。在一些实施方案中,例如通过经过无菌过滤膜过滤可以容易地实现无菌。在一些实施方案中,使用透气培养容器进行培养。在一些实施方案中,使用生物反应器进行培养。

[0772] 本文还提供了适合于冷冻保存提供的工程化原代细胞的组合物。在一些实施方案中,将提供的工程化原代细胞冷冻保存在冷冻保存介质中。在一些实施方案中,冷冻保存介质是无血清冷冻保存介质。在一些实施方案中,组合物包含冷冻保护剂。在一些实施方案中,冷冻保护剂是或包含DMSO和/或甘油。在一些实施方案中,冷冻保存介质是在5%或约5%与10%或约10%之间的DMSO(体积/体积)。在一些实施方案中,冷冻保存介质是或是约5% DMSO(体积/体积)。在一些实施方案中,冷冻保存介质是或是约6% DMSO(体积/体积)。在一些实施方案中,冷冻保存介质是或是约7% DMSO(体积/体积)。在一些实施方案中,冷冻保存介质是或是约7.5% DMSO(体积/体积)。在一些实施方案中,冷冻保存介质是或是约

8% DMSO(体积/体积)。在一些实施方案中,冷冻保存介质是或是约9% DMSO(体积/体积)。在一些实施方案中,冷冻保存介质是或是约10% DMSO(体积/体积)。在一些实施方案中,冷冻保存介质含有可商购获得的冷冻保存溶液(CryoStor™CS10)。CryoStor™CS10是含有10%二甲基亚砜(DMSO)的冷冻保存介质。在一些实施方案中,配制用于冷冻保存的组合物可以在低温下储存,诸如超低温,例如在-40℃至-150℃的温度范围(诸如或约80℃±6.0℃)下储存。

[0773] 在一些实施方案中,药物组合物包含本文所述的工程化原代细胞和药学上可接受的载剂,所述载剂包含31.25%(体积/体积)Plasma-Lyte A、31.25%(体积/体积)的5%右旋糖/0.45%氯化钠、10%葡聚糖40(LMD)/5%右旋糖、20%(体积/体积)的25%人血清白蛋白(HSA)和7.5%(体积/体积)二甲基亚砜(DMSO)。

[0774] 在一些实施方案中,制备冷冻保存的工程化原代细胞用于解冻施用。在一些情况下,工程化原代细胞可以在解冻后立即施用于受试者。在此类实施方案中,组合物无需任何进一步加工即可使用。在其他情况下,工程化原代细胞在解冻后进一步加工(诸如通过用药学上可接受的载剂重悬、与活化剂或刺激剂一起孵育),或者在施用于受试者之前活化洗涤并重悬于药学上可接受的缓冲液中。

[0775] IV. 试剂盒、组分和制品

[0776] 在一些方面,本文提供了本文所述的方法、装置和系统的试剂盒、组分和组合物(诸如消耗品)。在一些实施方案中,试剂盒包括根据本文公开内容的使用说明书。

[0777] 在一些实施方案中,本文提供了包含本文所述的工程化原代细胞群的试剂盒或组合物。在一些实施方案中,本文提供了试剂盒或组合,其包含:包含多个工程化原代细胞的细胞群,其中所述工程化原代细胞包含修饰,所述修饰(i)增加CD47的表达,和(ii)降低一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子(例如,一种或多种MHC I类人白细胞抗原分子和一种或多种MHC II类人白细胞抗原分子)的表达,其中(i)的表达增加和(ii)的表达降低是相对于不包含修饰的相同细胞类型的细胞而言的。在一些实施方案中,试剂盒的组分可以同时施用。在一些实施方案中,试剂盒的组分可以连续施用。

[0778] 在本发明的一些实施方案中,提供了含有可用于临床移植疗法(包括细胞疗法)的材料的制品。在一些实施方案中,制品含有可用于治疗细胞缺陷的材料,所述细胞缺陷诸如但不限于糖尿病(例如,I型糖尿病)、血管病状或疾病、自身免疫性甲状腺炎、肝脏疾病(例如,肝硬化)、角膜疾病(例如,Fuchs营养不良或先天性遗传性内皮营养不良)、肾脏疾病和癌症(例如,B细胞急性淋巴细胞白血病(B-ALL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤、肝癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、结直肠癌、肺癌、非小细胞肺癌、急性髓性淋巴细胞白血病、多发性骨髓瘤、胃癌、胃腺癌、胰腺腺癌、胶质母细胞瘤、神经母细胞瘤、肺鳞状细胞癌、肝细胞癌和膀胱癌)。所述制品可以包括容器和在所述容器上或与所述容器相关的标签或包装说明书。合适的容器包括例如瓶子、小瓶、注射器等(例如玻璃或塑料容器)。通常,容器容纳对同种异体细胞疗法有效的组合物,并且可以具有无菌进入端口(例如容器可以是静脉注射液袋(intravenous solution bag)或具有可被皮下注射针刺穿的塞子的小瓶)。药物组合物中至少有组分是工程化原代细胞(诸如本文提供的任何工程化原代细胞)群。标签或包装说明书指示组合物用于治疗特定病状。标签或包装说明书还将包括向患者施用药物组合物的说明。在一些实施方案中,制品包含组合治疗。

[0779] 制品和/或试剂盒还可以包括包装说明书。说明书是指通常包括在治疗产品的商业包装中的说明,其含有关于使用此类治疗产品的适应症、用法、剂量、施用、禁忌症和/或警告的信息。

#### [0780] V. 治疗方法

[0781] 本文提供了与所提供的细胞组合物有关的组合物和方法,所述细胞组合物包含本文所述的工程化细胞群,其用于治疗受试者的疾病或病状。本文提供了通过施用本文所述的工程化细胞群来治疗患者的方法。在一些实施方案中,工程化细胞是工程化原代细胞。在一些实施方案中,细胞群被配制用于在药物组合物中施用,诸如本文所述的任何药物组合物。此类方法和用途包括治疗方法和用途,例如涉及将工程化细胞(诸如工程化原代细胞)群或含有其的组合物施用于患有疾病、病状或病症的受试者。选择如本文所提供的用于特定疾病适应症的适当工程化原代细胞在技术人员的水平之内。在一些实施方案中,以有效量施用细胞或其药物组合物以实现疾病或病症的治疗。用途包括工程化原代细胞或其药物组合物在此类方法和治疗中的用途,以及在制备药物以进行此类治疗方法中的用途。在一些实施方案中,所述方法由此治疗受试者的疾病或病状或病症。

[0782] 本文提供的工程化细胞(诸如工程化原代细胞)可以施用于任何合适的患者,包括例如用于治疗疾病或病症的细胞疗法的候选者。细胞疗法的候选者包括有可能受益于本文提供的主题工程化原代细胞的治疗效果的疾病或病状的任何患者。在一些实施方案中,患者是施用的细胞的同种异体受体。在一些实施方案中,提供的工程化细胞(诸如工程化原代细胞)有效用于同种异体细胞疗法。受益于本文提供的主题工程化细胞(诸如工程化原代细胞)的治疗效果的候选者表现出疾病或病状的消除、减少或改善。

[0783] 在一些实施方案中,如本文所提供的工程化原代细胞(包括通过本文提供的任何方法产生的那些)可以用于细胞疗法。本文概述的治疗细胞可用于治疗病症,诸如但不限于癌症、遗传病症、慢性感染性疾病、自身免疫性疾病、神经病症等。

[0784] 在一些实施方案中,患者患有细胞缺陷。如本文所用,“细胞缺陷”是指导致患者体内细胞群的功能障碍或丧失的任何疾病或病状,其中患者不能自然替换或再生细胞群。示例性细胞缺陷包括但不限于自身免疫性疾病(例如,多发性硬化症、重症肌无力、类风湿性关节炎、糖尿病、系统性红斑狼疮)、神经变性疾病(例如,亨廷顿病和帕金森病)、心血管病状和疾病、血管病状和疾病、角膜病状和疾病、肝脏病状和疾病、甲状腺病状和疾病以及肾脏病状和疾病。在一些实施方案中,施用工程化原代细胞的患者患有癌症。可以通过本文提供的工程化原代细胞治疗的示例性癌症包括但不限于B细胞急性淋巴细胞白血病(B-ALL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤、肝癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、结直肠癌、肺癌、非小细胞肺癌、急性髓性淋巴细胞白血病、多发性骨髓瘤、胃癌、胃腺癌、胰腺癌、胶质母细胞瘤、神经母细胞瘤、肺鳞状细胞癌、肝细胞癌和膀胱癌。在某些实施方案中,通过施用本文提供的工程化CAR T细胞来治疗癌症患者。

[0785] 在一些实施方案中,细胞缺陷与糖尿病相关,或者细胞疗法用于治疗糖尿病,任选地其中糖尿病是I型糖尿病。在一些实施方案中,工程化原代细胞群是胰岛细胞(包括 $\beta$ 胰岛细胞)群。在一些实施方案中,胰岛细胞选自自由胰岛祖细胞、未成熟胰岛细胞和成熟胰岛细胞组成的组。在一些实施方案中,所述方法包括向患者施用包含工程化原代 $\beta$ 胰岛细胞群的组合物,其中所述工程化 $\beta$ 胰岛细胞包含:(i) 包含编码CD47的外源多核苷酸的转基因和



(ii) B2M基因的两个等位基因的失活或破坏。在一些实施方案中,工程化原代 $\beta$ 胰岛细胞包含CIITA基因的两个等位基因的失活或破坏。

[0786] 本文所述的工程化原代 $\beta$ 胰岛细胞可以改善受试者的葡萄糖耐量。葡萄糖耐量可以通过任何合适的方法来测量,诸如本文所述的那些方法(例如,胰岛素分泌测定)。在一些实施方案中,工程化原代 $\beta$ 胰岛细胞表现出葡萄糖刺激的胰岛素分泌(GSIS)。因此,在一些实施方案中,在GSIS灌注测定中测量改善的葡萄糖耐量。葡萄糖不耐受与胰岛素抵抗有关,并且可以导致糖尿病(例如,1型糖尿病和II型糖尿病)。因此,在一些实施方案中,提供了治疗糖尿病的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用工程化原代 $\beta$ 胰岛细胞或包含工程化原代 $\beta$ 胰岛细胞群的组合物。在一些实施方案中,受试者是糖尿病患者。在一些实施方案中,受试者患有I型糖尿病。在一些实施方案中,受试者患有II型糖尿病。具体地,在一些实施方案中,提供了改善受试者的葡萄糖耐量的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用工程化原代 $\beta$ 胰岛细胞或包含工程化原代 $\beta$ 胰岛细胞群的组合物。在一些实施方案中,葡萄糖耐量相对于施用胰岛细胞之前受试者的葡萄糖耐量得到改善。在一些实施方案中, $\beta$ 胰岛细胞降低受试者中的外源胰岛素使用。在一些实施方案中,如通过HbA1c水平测量的,葡萄糖耐量得到改善。在一些实施方案中,受试者禁食。在一些实施方案中,胰岛细胞改善受试者的胰岛素分泌。在一些实施方案中,胰岛素分泌相对于施用胰岛细胞之前受试者的胰岛素分泌得到改善。

[0787] 工程化原代 $\beta$ 胰岛细胞可能不在受试者中诱导适应性免疫反应。在一些实施方案中,使用ELISPOT评估适应性免疫反应。例如,可以通过测量CD8<sup>+</sup> T细胞分泌的IFN $\gamma$ 细胞因子的水平来评估适应性免疫反应。在一些实施方案中,与野生型原代 $\beta$ 胰岛细胞相比,工程化原代 $\beta$ 胰岛细胞表现出较低水平的IFN $\gamma$ ,诸如与野生型原代 $\beta$ 胰岛细胞相比,低约400倍、300倍、200倍、100倍、50倍、25倍和10倍中的任一个的IFN $\gamma$ 水平。在一些实施方案中,使用流式细胞术评估适应性免疫反应。例如,在一些实施方案中,通过测量供体特异性抗体(DSA) IgG或IgM的水平来评估适应性免疫反应。在一些实施方案中,与野生型原代 $\beta$ 胰岛细胞相比,工程化原代 $\beta$ 胰岛细胞表现出较低水平的DSA水平,诸如与野生型原代 $\beta$ 胰岛细胞相比,低约2倍、1.5倍和1倍中的任一个的DSA水平。

[0788] 在一些实施方案中,细胞缺陷是糖尿病、癌症、血管形成障碍、眼部疾病、甲状腺疾病、皮肤疾病和肝脏疾病。

[0789] 在一些实施方案中,细胞缺陷与血管病状或疾病相关,或者细胞疗法用于治疗血管病状或疾病。在一些实施方案中,细胞群是内皮细胞群。在一些实施方案中,所述方法包括向患者施用包含工程化原代内皮细胞群的组合物,其中所述工程化原代内皮细胞包含:(i) 包含编码CD47的外源多核苷酸的转基因和(ii) B2M基因的两个等位基因的失活或破坏。在一些实施方案中,工程化原代肝细胞包含CIITA基因的两个等位基因的失活或破坏。

[0790] 在一些实施方案中,细胞缺陷与自身免疫性甲状腺炎相关,或者细胞疗法用于治疗自身免疫性甲状腺炎。在一些实施方案中,细胞群是甲状腺祖细胞群。在一些实施方案中,所述方法包括向患者施用包含工程化原代甲状腺祖细胞群的组合物,其中所述工程化原代甲状腺祖细胞包含:(i) 包含编码CD47的外源多核苷酸的转基因和(ii) B2M基因的两个等位基因的失活或破坏。在一些实施方案中,工程化原代肝细胞包含CIITA基因的两个等位基因的失活或破坏。

[0791] 在一些实施方案中,细胞缺陷与肝脏疾病相关,或者细胞疗法用于治疗肝脏疾病。在一些实施方案中,肝脏疾病包括肝硬化。在一些实施方案中,细胞群是肝细胞群。在一些实施方案中,细胞群是肝祖细胞群。在一些实施方案中,所述方法包括向患者施用包含工程化原代肝细胞群的组合物,其中所述工程化原代肝细胞包含:(i)包含编码CD47的外源多核苷酸的转基因和(ii)B2M基因的两个等位基因的失活或破坏。在一些实施方案中,工程化原代肝细胞包含CIITA基因的两个等位基因的失活或破坏。在一些实施方案中,所述方法包括向患者施用包含工程化原代肝祖细胞群的组合物,其中所述工程化原代肝祖细胞包含:(i)包含编码CD47的外源多核苷酸的转基因和(ii)B2M基因的两个等位基因的失活或破坏。在一些实施方案中,工程化原代肝细胞包含CIITA基因的两个等位基因的失活或破坏。

[0792] 在一些实施方案中,细胞缺陷与角膜疾病相关,或者细胞疗法用于治疗角膜疾病。在一些实施方案中,角膜疾病是福克斯营养不良或先天性遗传性内皮营养不良。在一些实施方案中,细胞群是原代角膜内皮祖细胞群或原代角膜内皮细胞群。在一些实施方案中,细胞群是原代视细胞。在一些实施方案中,所述方法包括向患者施用包含工程化原代角膜内皮祖细胞群或工程化原代角膜内皮细胞群的组合物,其中所述工程化原代角膜内皮祖细胞或工程化原代角膜内皮细胞包含:(i)包含编码CD47的外源多核苷酸的转基因和(ii)B2M基因的两个等位基因的失活或破坏。在一些实施方案中,工程化原代肝细胞包含CIITA基因的两个等位基因的失活或破坏。在一些实施方案中,所述方法包括向患者施用包含工程化原代视细胞群的组合物,其中所述工程化原代视细胞包含:(i)包含编码CD47的外源多核苷酸的转基因和(ii)B2M基因的两个等位基因的失活或破坏。在一些实施方案中,工程化原代肝细胞包含CIITA基因的两个等位基因的失活或破坏。

[0793] 在一些实施方案中,细胞缺陷与肾脏疾病相关,或者细胞疗法用于治疗肾脏疾病。在一些实施方案中,细胞群是原代肾前体细胞群或原代肾细胞群。在一些实施方案中,所述方法包括向患者施用包含工程化原代肾前体细胞群或工程化原代肾细胞群的组合物,其中所述工程化原代肾前体细胞或工程化原代肾细胞包含:(i)包含编码CD47的外源多核苷酸的转基因和(ii)B2M基因的两个等位基因的失活或破坏。在一些实施方案中,工程化原代肝细胞包含CIITA基因的两个等位基因的失活或破坏。

[0794] 在一些实施方案中,细胞疗法用于治疗癌症。在一些实施方案中,癌症选自由以下组成的组:B细胞急性淋巴细胞白血病(B-ALL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤、肝癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、结直肠癌、肺癌、非小细胞肺癌、急性髓性淋巴细胞白血病、多发性骨髓瘤、胃癌、胃腺癌、胰腺癌、胶质母细胞瘤、神经母细胞瘤、肺鳞状细胞癌、肝细胞癌和膀胱癌。在一些实施方案中,细胞群是原代T细胞群或原代NK细胞群。在一些实施方案中,所述方法包括向患者施用包含工程化原代T细胞群或原代NK细胞群的组合物,其中所述工程化原代T细胞或原代NK细胞包含:(i)包含编码CD47的外源多核苷酸的转基因和(ii)B2M基因的两个等位基因的失活或破坏。在一些实施方案中,工程化原代肝细胞包含CIITA基因的两个等位基因的失活或破坏。

[0795] 在一些实施方案中,细胞疗法用于治疗造血疾病或病症。在一些实施方案中,细胞群是造血干细胞(HSC)。HSC是补充所有血细胞类型并自我更新的干细胞。造血干细胞可以被特别定义为当注射到造血系统耗竭的受体小鼠的循环中时,将骨髓T细胞和B细胞的水平保持在稳健可检测水平(通常超过外周血细胞的1%)达16周的细胞(Schroeder(2010)Cell

Stem Cell 6:203-207)。在一些实施方案中,造血功能障碍可能是由于血液疾病,特别是涉及造血细胞的疾病。在一些实施方案中,造血功能障碍是单基因造血疾病,诸如由于单个基因的突变。在一些实施方案中,造血功能障碍是脊髓发育不良、再生障碍性贫血、范科尼贫血(Fanconi anemia)、阵发性睡眠性血红蛋白尿、镰状细胞病、先天性纯红细胞再生障碍性贫血(Diamond Blackfan anemia)、施瓦赫曼-戴蒙德病(Schachman Diamond disorder)、柯士文综合征(Kostmann's syndrome)、慢性肉芽肿病、肾上腺脑白质营养不良、白细胞粘附缺陷、血友病、地中海贫血、 $\beta$ -地中海贫血、白血病(诸如急性淋巴细胞白血病(ALL)、急性髓性(髓细胞)白血病(AML)、成人淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、B细胞慢性淋巴细胞白血病(B-CLL)、慢性髓细胞白血病(CML)、幼年型慢性髓性白血病(CML)和幼年型髓单核细胞性白血病(JMML))、严重联合免疫缺陷病(SCID)、X连锁严重联合免疫缺陷、威斯科特-奥尔德里奇综合征(Wiskott-Aldrich syndrome)(WAS)、腺苷脱氨酶(ADA)缺乏症、慢性肉芽肿病、谢迪埃克-赫加希综合征(Chediak-Higashi syndrome)、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤(NHL)或艾滋病。在一些实施方案中,受试者患有自身免疫疾病。在一些实施方案中,自身免疫性疾病是急性播散性脑脊髓炎、急性出血性白质脑炎、阿狄森病(Addison's disease)、无丙种球蛋白血症、斑秃、肌萎缩侧索硬化症、强直性脊柱炎、抗磷脂综合征、抗合成酶综合征、特应性过敏、自身免疫性再生障碍性贫血、自身免疫性心肌病、自身免疫性肠病、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、自身免疫性淋巴细胞增生综合征、自身免疫性周围神经病变、自身免疫性胰腺炎、自身免疫性多内分泌腺病综合征、自身免疫性黄体酮皮炎、自身免疫性血小板减少性紫癜、自身免疫性荨麻疹、自身免疫性葡萄膜炎、巴洛病(Balo disease)、巴洛同心性硬化(Balo concentric sclerosis)、贝赫切特综合征(Bechets syndrome)、伯格病(Berger's disease)、比克斯塔夫脑炎(Bickerstaff's encephalitis)、布劳综合征(Blau syndrome)、大疱性类天疱疮、癌症、卡斯尔曼病(Castleman's disease)、乳糜泻、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病、慢性复发性多灶性骨髓炎、查格-施特劳斯综合征(Churg-Strauss syndrome)、瘢痕性类天疱疮、科干综合征(Cogan syndrome)、冷凝集素病、补体成分2缺乏症、颅动脉炎、CREST综合征、克罗恩病、库欣综合征(Cushing's syndrome)、皮肤白细胞破碎性血管炎、德戈病(Dego's disease)、德库姆病(Dercum's disease)、疱疹样皮炎、皮肤炎、1型糖尿病、弥漫性皮肤系统性硬化症、德雷斯勒综合征(Dressler's syndrome)、盘状红斑狼疮、湿疹、附着点炎相关性关节炎、嗜酸性筋膜炎、嗜酸性细胞性胃肠炎、获得性大疱性表皮松解症、结节性红斑、原发性混合性冷凝球蛋白血症、埃文斯综合征(Evan's syndrome)、进行性骨化性纤维发育不良、纤维性肺泡炎、胃炎、胃肠道类天疱疮、巨细胞动脉炎、肾小球肾炎、肾炎综合征(goodpasture's syndrome)、葛瑞夫兹氏病(Grave's disease)、吉兰-巴雷综合征(Guillain-Barre syndrome)(GBS)、桥本脑炎(Hashimoto's encephalitis)、桥本甲状腺炎(Hashimoto's thyroiditis)、溶血性贫血、过敏性紫癜、妊娠疱疹、低丙种球蛋白血症、特发性炎性脱髓鞘疾病、特发性肺纤维化、特发性血小板减少性紫癜、IgA肾病、包涵体肌炎、炎性脱髓鞘性多发性神经病、间质性膀胱炎、幼年型特发性关节炎、幼年型类风湿性关节炎、川崎病(Kawasaki's disease)、兰伯特-伊顿肌无力综合征(Lambert-Eaton myasthenic syndrome)、白细胞破碎性血管炎、扁平苔藓、硬化性苔藓、线性IgA病(LAD)、葛雷克氏病(Lou Gehrig's disease)、狼疮性肝炎、红斑狼疮、马吉德综合征(Majeed

syndrome)、梅尼埃病(Meniere's disease)、显微镜下多血管炎、米勒-费雪综合征(Miller-Fisher syndrome)、混合性结缔组织病、硬斑病、急性痘疮样苔藓样糠疹(Mucha-Habermann disease)、多发性硬化症、重症肌无力、肌炎、视神经脊髓炎、神经性肌强直、眼瘢痕性类天疱疮、斜视性眼阵挛肌阵挛综合征、甲状腺炎、复发性风湿病、副肿瘤性小脑变性、阵发性睡眠性血红蛋白尿(PNH)、帕罗综合征(Parry Romberg syndrome)、帕森斯-特纳综合征(Parsonnage-Turner syndrome)、扁平部炎、天疱疮、寻常型天疱疮、恶性贫血、静脉周围脑脊髓炎、POEMS综合征、结节性多动脉炎、风湿性多发性肌痛症、多发性肌炎、原发性胆汁性肝硬化、原发性硬化性胆管炎、进行性炎性神经病、银屑病、银屑病关节炎、坏疽性脓皮病、纯红细胞再生障碍、拉斯穆森脑炎(Rasmussen's encephalitis)、雷诺现象(Raynaud phenomenon)、复发性多软骨炎、赖特综合征(Reiter's syndrome)、不宁腿综合征、腹膜后纤维化、类风湿性关节炎、类风湿热、结节病、施密特综合征(Schmidt syndrome)、施尼茨勒综合征(Schnitzler syndrome)、巩膜炎、硬皮病、干燥综合征、脊柱关节病、斯蒂尔病(Still's disease)、僵人综合征、亚急性细菌性心内膜炎、苏萨克综合征(Susac's syndrome)、斯维特综合征(Sweet's syndrome)、西德纳姆舞蹈病(Sydenham chorea)、交感性眼炎、大动脉炎(Takayasu's arteritis)、颞动脉炎、痛性眼肌麻痹综合征(Tolosa-Hunt syndrome)、横贯性脊髓炎、溃疡性结肠炎、未分化结缔组织病、未分化脊柱关节病、血管炎、白癜风或韦格纳肉芽肿病(Wegener's granulomatosis)。在一些实施方案中,靶细胞来自患有癌症的受试者。在一些实施方案中,癌症是白血病。在一些实施方案中,白血病是B-CLL、CML或基于T细胞的白血病诸如ALT。在一些实施方案中,癌症是骨髓瘤。在一些实施方案中,所述方法包括向患者施用包含工程化HSC群的组合物,其中所述工程化HSC包含:(i)包含编码CD47的外源多核苷酸的转基因和(ii)B2M基因的两个等位基因的失活或破坏。在一些实施方案中,工程化原代肝细胞包含CIITA基因的两个等位基因的失活或破坏。

[0796] 在一些实施方案中,本文提供的工程化原代细胞或含有其的组合可用于治疗被先前的移植(例如像细胞移植、输血、组织移植或器官移植)中存在的一种或多种抗原致敏的患者。在某些实施方案中,先前的移植是同种异体移植并且患者对来自同种异体移植的一种或多种自体抗原敏感。同种异体移植包括但不限于同种异体细胞移植、同种异体输血、同种异体组织移植或同种异体器官移植。在一些实施方案中,患者是怀孕或已经怀孕的致敏患者(例如,在怀孕期间进行或已经进行过同种异体免疫)。在某些实施方案中,患者被先前的移植中包含的一种或多种抗原致敏,其中先前的移植是修饰的人细胞、组织或器官。在一些实施方案中,修饰的人细胞、组织或器官是修饰的自体人细胞、组织或器官。在一些实施方案中,先前的移植是非人细胞、组织或器官。在示例性实施方案中,先前的移植是修饰的非人细胞、组织或器官。在某些实施方案中,先前的移植是包含人组分的嵌合体。在某些实施方案中,先前的移植是CAR T细胞。在某些实施方案中,先前的移植是自体移植并且患者对来自自体移植的一种或多种自体抗原敏感。在某些实施方案中,先前的移植是自体细胞、组织或器官。在某些实施方案中,致敏患者患有过敏并且对一种或多种过敏原敏感。在示例性实施方案中,患者患有花粉热、食物过敏、昆虫过敏、药物过敏或特应性皮炎。

[0797] 在一些实施方案中,经历使用提供的工程化原代细胞或含有其的组合物的治疗的患者接受了先前的治疗。在一些实施方案中,工程化原代细胞或含有其的组合用于与先前的治疗相同的病状。在某些实施方案中,工程化原代细胞或含有其的组合用于治

疗与先前的治疗不同的病状。在一些实施方案中,施用于患者的工程化原代细胞或含有其的组合物对于治疗通过先前的治疗进行治疗的相同病状或疾病表现出增强的治疗效果。在某些实施方案中,与先前的治疗相比,施用的工程化原代细胞或含有其的组合物对于治疗患者的病状或疾病表现出更长的治疗效果。在示例性实施方案中,与先前的治疗相比,施用的细胞表现出针对癌细胞的增强的效力、功效和/或特异性。在特定实施方案中,工程化原代细胞是用于治疗癌症的CAR T细胞。

[0798] 本文提供的方法可以用作一线治疗失败后特定病状或疾病的二线治疗。在一些实施方案中,先前的治疗是治疗无效的治疗。如本文所用,“治疗无效”的治疗是指在患者中产生小于期望的临床结果的治疗。例如,就细胞缺陷的治疗而言,治疗无效的治疗可以指未达到替换患者体内缺陷细胞的期望的功能性细胞和/或细胞活性水平,和/或缺乏治疗持久性的治疗。对于癌症治疗,治疗无效的治疗是指未达到期望水平的效力、功效和/或特异性的治疗。可以使用本领域已知的任何合适的技术来测量治疗效果。在一些实施方案中,患者对先前的治疗产生免疫反应。在一些实施方案中,先前的治疗是被患者排斥的细胞、组织或器官移植。在一些实施方案中,先前的治疗包括机械辅助治疗。在一些实施方案中,机械辅助治疗包括血液透析或心室辅助装置。在一些实施方案中,患者对机械辅助治疗产生免疫反应。在一些实施方案中,先前的治疗包括包含安全开关的治疗细胞群,如果治疗细胞以不期望的方式生长和分裂,则所述安全开关可以导致治疗细胞死亡。在某些实施方案中,由于安全开关诱导治疗细胞死亡,患者产生免疫反应。在某些实施方案中,患者被先前的治疗致敏。在示例性实施方案中,患者不会被施用的如本文所提供的工程化原代细胞致敏。

[0799] 在一些实施方案中,提供的工程化原代细胞或含有其的组合物在向有需要的患者提供组织、器官或部分器官移植之前施用。在特定实施方案中,患者不表现出对工程化原代细胞的免疫反应。在某些实施方案中,将工程化原代细胞施用于患者以治疗特定组织或器官中的细胞缺陷,并且患者随后接受相同特定组织或器官的组织或器官移植。在此类实施方案中,工程化原代细胞治疗作为最终组织或器官替换的过渡治疗发挥作用。例如,在一些实施方案中,患者患有肝脏病症并且在接受肝脏移植之前接受如本文所提供的工程化肝细胞治疗。在某些实施方案中,将工程化原代细胞施用于患者以治疗特定组织或器官中的细胞缺陷,并且患者随后接受不同组织或器官的组织或器官移植。例如,在一些实施方案中,患者是在接受肾移植之前用如本文所提供的工程化胰腺 $\beta$ 胰岛细胞治疗的糖尿病患者。在一些实施方案中,所述方法用于治疗细胞缺陷。在示例性实施方案中,组织或器官移植是心脏移植、肺移植、肾移植、肝移植、胰腺移植、肠移植、胃移植、角膜移植、骨髓移植、血管移植、心脏瓣膜移植或骨移植。

[0800] 治疗患者的方法通常是通过施用如本文所提供的工程化原代细胞或含有其的组合物。应当理解,对于本文所述的与疗法的细胞和/或时间安排有关的所有多个实施方案,细胞的施用是通过导致引入的细胞至少部分定位于期望部位的方法或途径来完成的。可以将细胞直接植入期望部位,或通过任何适当的途径施用,所述途径导致递送至受试者的期望部位,植入的细胞或细胞组分的至少一部分在所述部位保持存活。在一些实施方案中,施用细胞以治疗疾病或病症,诸如可以通过细胞疗法缓解的任何疾病、病症、病状或其症状。

[0801] 在一些实施方案中,在患者致敏后施用工程化原代细胞群或含有其的组合物至少1天、至少2天、至少3天、至少4天、至少5天、至少6天、至少1周或至少1个月或更长时间。在一

些实施方案中,在患者被致敏或表现出致敏的特征或特性后,施用工程化原代细胞群或含有其的组合物至少1周(例如,1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周、11周、12周、13周、14周、15周、16周、17周、18周、19周、20周或更多周)或更长时间。在一些实施方案中,在患者已经接受移植(例如,同种异体移植)、已经怀孕(例如,在怀孕期间进行或已经进行过同种异体免疫)或被致敏或表现出致敏的特征或特性后,施用工程化原代细胞群或含有其的组合物至少1个月(例如,1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、12个月、13个月、14个月、15个月、16个月、17个月、18个月、19个月、20个月或更多个月)或更长时间。

[0802] 在一些实施方案中,向已经接受移植、已经怀孕(例如,在怀孕期间进行或已经进行过同种异体免疫)和/或对抗原(例如,同种异体抗原)敏感的患者施用给药方案,其包括本文所述的工程化原代细胞群的第一剂量施用、第一剂量后的恢复期,以及所述工程化原代细胞群的第二剂量施用。在一些实施方案中,存在于第一细胞群和第二细胞群中的细胞类型的复合物是不同的。在某些实施方案中,存在于第一工程化原代细胞群和第二工程化原代细胞群中的细胞类型的复合物是相同或基本上等同的。在许多实施方案中,第一工程化原代细胞群和第二工程化原代细胞群包含相同的细胞类型。在一些实施方案中,第一工程化原代细胞群和第二工程化原代细胞群包含不同的细胞类型。在一些实施方案中,第一工程化原代细胞群和第二工程化原代细胞群包含相同百分比的细胞类型。在其他实施方案中,第一工程化原代细胞群和第二细胞群包含不同百分比的细胞类型。

[0803] 在一些实施方案中,恢复期在第一次施用工程化原代细胞群或含有其的组合物后开始,并在患者体内不再存在或检测到此类细胞时结束。在一些实施方案中,在初次施用细胞后,恢复期的持续时间为至少1周(例如,1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周、11周、12周、13周、14周、15周、16周、17周、18周、19周、20周或更多周)或更长时间。在一些实施方案中,在初次施用细胞后,恢复期的持续时间为至少1个月(例如,1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、12个月、13个月、14个月、15个月、16个月、17个月、18个月、19个月、20个月或更多个月)或更长时间。

[0804] 在一些实施方案中,在施用于受试者时,施用的工程化细胞群或含有其的组合物是低免疫原性的。在一些实施方案中,工程化细胞是低免疫的。在一些实施方案中,与通过施用免疫原性细胞(例如,工程化细胞的相同或类似细胞类型或表型但不含修饰(例如遗传修饰)的细胞群)产生的免疫反应的水平相比,针对工程化细胞的免疫反应减少或降低至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。在一些实施方案中,施用的工程化细胞群或含有其的组合物不能在患者中引发针对工程化细胞的免疫反应。

[0805] 在一些实施方案中,施用的工程化原代细胞群或含有其的组合物在患者中引发降低或较低水平的系统性TH1活化。在一些情况下,与施用免疫原性细胞(例如,工程化原代细胞的相同或类似细胞类型或表型但不含修饰(例如遗传修饰)的细胞群)产生的系统性TH1活化水平相比,所述工程化原代细胞引发的系统性TH1活化水平低至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。在一些实施方案中,施用的工程化原

代细胞群或含有其的组合物不能在患者中引发系统性TH1活化。

[0806] 在一些实施方案中,施用的工程化原代细胞群或含有其的组合物在患者中引发降低或较低水平的外周血单核细胞(PBMC)的免疫活化。在一些情况下,与施用免疫原性细胞(例如,工程化原代细胞的相同或类似细胞类型或表型但不含修饰(例如遗传修饰)的细胞群)产生的PBMC的免疫活化水平相比,所述工程化原代细胞引发的PBMC的免疫活化水平低至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。在一些实施方案中,施用的工程化原代细胞群或含有其的组合物不能在患者中引发PBMC的免疫活化。

[0807] 在一些实施方案中,施用的工程化原代细胞群或含有其的组合物在患者中引发降低或较低水平的供体特异性IgG抗体。在一些情况下,与施用免疫原性细胞(例如,工程化原代细胞的相同或类似细胞类型或表型但不含修饰(例如遗传修饰)的细胞群)产生的供体特异性IgG抗体水平相比,所述工程化原代细胞引发的供体特异性IgG抗体水平低至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。在一些实施方案中,施用的工程化原代细胞群不能在患者中引发供体特异性IgG抗体。

[0808] 在一些实施方案中,施用的工程化原代细胞群或含有其的组合物在患者中引发降低或较低水平的IgM和IgG抗体产生。在一些情况下,与施用免疫原性细胞(例如,工程化原代细胞的相同或类似细胞类型或表型但不含修饰(例如遗传修饰)的细胞群)产生的IgM和IgG抗体产生水平相比,所述工程化原代细胞引发的IgM和IgG抗体产生水平低至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。在一些实施方案中,施用的工程化原代细胞群或含有其的组合物不能在患者中引发IgM和IgG抗体产生。

[0809] 在一些实施方案中,施用的工程化原代细胞群或含有其的组合物在患者中引发降低或较低水平的细胞毒性T细胞杀伤。在一些情况下,与施用免疫原性细胞(例如,工程化原代细胞的相同或类似细胞类型或表型但不含修饰(例如遗传修饰)的细胞群)产生的细胞毒性T细胞杀伤水平相比,所述工程化原代细胞引发的细胞毒性T细胞杀伤水平低至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。在一些实施方案中,施用的工程化原代细胞群或含有其的组合物不能在患者中引发细胞毒性T细胞杀伤。

[0810] 如上所述,本文提供了在某些实施方案中可以施用于对同种异体抗原(诸如MHC分子(例如,人白细胞抗原))敏感的患者细胞。在一些实施方案中,患者正在或已经怀孕,例如在怀孕期间具有同种异体免疫(例如胎儿和新生儿溶血病(HDFN)、新生儿同种异体免疫性中性粒细胞减少症(NAN)或胎儿和新生儿同种异体免疫性血小板减少症(FNAIT))。换句话说,患者患有或已经患有与妊娠期间同种异体免疫相关的病症或病状,诸如但不限于胎儿和新生儿溶血病(HDFN)、新生儿同种异体免疫性中性粒细胞减少症(NAN)以及胎儿和新生儿同种异体免疫性血小板减少症(FNAIT)。在一些实施方案中,患者已经接受了同种异体移植,诸如但不限于同种异体细胞移植、同种异体输血、同种异体组织移植或同种异体器官移植。在一些实施方案中,患者表现出针对同种异体抗原的记忆B细胞。在一些实施方案中,患者表现出针对同种异体抗原的记忆T细胞。此类患者可以表现出针对同种异体抗原的记

忆B细胞和记忆T细胞。

[0811] 在施用所述细胞后,与对非低免疫原性的细胞的反应相比,患者不表现出系统性免疫反应或系统性免疫反应水平降低。在一些实施方案中,与对非低免疫原性的细胞的反应相比,患者不表现出适应性免疫反应或适应性免疫反应水平降低。在一些实施方案中,与对非低免疫原性的细胞的反应相比,患者不表现出先天免疫反应或先天免疫反应水平降低。在一些实施方案中,与对非低免疫原性的细胞的反应相比,患者不表现出T细胞反应或T细胞反应水平降低。在一些实施方案中,与对非低免疫原性的细胞的反应相比,患者不表现出B细胞反应或B细胞反应水平降低。

[0812] A. 剂量和剂量方案

[0813] 任何治疗有效量的本文所述的细胞都可以包括在药物组合物中,这取决于所治疗的适应症。细胞的非限制性实例包括如所描述的原代细胞(例如原代T细胞)。在一些实施方案中,药物组合物包括至少约 $1 \times 10^2$ 、 $5 \times 10^2$ 、 $1 \times 10^3$ 、 $5 \times 10^3$ 、 $1 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$ 、 $5 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^{10}$ 或 $5 \times 10^{10}$ 个细胞。在一些实施方案中,药物组合物包括至多约 $1 \times 10^2$ 、 $5 \times 10^2$ 、 $1 \times 10^3$ 、 $5 \times 10^3$ 、 $1 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$ 、 $5 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^{10}$ 或 $5 \times 10^{10}$ 个细胞。在一些实施方案中,药物组合物包括至多约 $6.0 \times 10^8$ 个细胞。在一些实施方案中,药物组合物包括至多约 $8.0 \times 10^8$ 个细胞。在一些实施方案中,药物组合物包括至少约 $1 \times 10^2$ - $5 \times 10^2$ 、 $5 \times 10^2$ - $1 \times 10^3$ 、 $1 \times 10^3$ - $5 \times 10^3$ 、 $5 \times 10^3$ - $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^4$ - $5 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4$ - $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^5$ - $5 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ - $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^6$ - $5 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ - $1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^7$ - $5 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ - $1 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^8$ - $5 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ - $1 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^9$ - $5 \times 10^9$ 、 $5 \times 10^9$ - $1 \times 10^{10}$ 或 $1 \times 10^{10}$ - $5 \times 10^{10}$ 个细胞。在示例性实施方案中,药物组合物包括约 $1.0 \times 10^6$ 至约 $2.5 \times 10^8$ 个细胞。

[0814] 在一些实施方案中,药物组合物具有至少5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、250、300、350、400或500ml的体积。在示例性实施方案中,药物组合物具有至多约5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、250、300、350、400或500ml的体积。在示例性实施方案中,药物组合物具有约5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、250、300、350、400或500ml的体积。在一些实施方案中,药物组合物具有约1-50ml、50-100ml、100-150ml、150-200ml、200-250ml、250-300ml、300-350ml、350-400ml、400-450ml或450-500ml的体积。在一些实施方案中,药物组合物具有约1-50ml、50-100ml、100-150ml、150-200ml、200-250ml、250-300ml、300-350ml、350-400ml、400-450ml或450-500ml的体积。在一些实施方案中,药物组合物具有约1-10ml、10-20ml、20-30ml、30-40ml、40-50ml、50-60ml、60-70ml、70-80ml、70-80ml、80-90ml或90-100ml的体积。在一些实施方案中,药物组合物具有范围为约5ml至约80ml的体积。在示例性实施方案中,药物组合物具有范围为约10ml至约70ml的体积。在许多实施方案中,药物组合物具有范围为约10ml至约50ml的体积。

[0815] 具体的量/剂量方案将因以下因素而异:个体的体重、性别、年龄和健康状况;制剂、生化性质、生物活性、生物利用度和细胞的副作用以及完整治疗方案中细胞的数量和特性。



[0816] 在一些实施方案中,药物组合物的剂量包括体积为约10mL至50mL的约 $1.0 \times 10^5$ 至约 $2.5 \times 10^8$ 个细胞,并且药物组合物作为单一剂量施用。

[0817] 在许多实施方案中,细胞是T细胞,并且药物组合物包含约 $2.0 \times 10^6$ 至约 $2.0 \times 10^8$ 个细胞,诸如但不限于原代T细胞。在一些情况下,剂量包括体积为约10ml至50ml的约 $1.0 \times 10^5$ 至约 $2.5 \times 10^8$ 个本文所述的原代T细胞。在若干情况下,剂量包括体积为约10ml至50ml的约 $1.0 \times 10^5$ 至约 $2.5 \times 10^8$ 个上文已经描述的原代T细胞。在其他情况下,剂量为低于约 $1.0 \times 10^5$ 至约 $2.5 \times 10^8$ 个T细胞(包括原代T细胞)的范围。在又其他情况下,剂量为高于约 $1.0 \times 10^5$ 至约 $2.5 \times 10^8$ 个T细胞(包括原代T细胞)的范围。

[0818] 在一些实施方案中,药物组合物作为单一剂量施用,所述剂量对于50kg或更轻的受试者为约 $1.0 \times 10^5$ 至约 $1.0 \times 10^7$ 个工程化原代细胞(诸如原代细胞)/kg体重。在一些实施方案中,药物组合物作为单一剂量施用,所述剂量对于50kg或更轻的受试者为约 $0.5 \times 10^5$ 至约 $1.0 \times 10^7$ 、约 $1.0 \times 10^5$ 至约 $1.0 \times 10^7$ 、约 $1.0 \times 10^5$ 至约 $1.0 \times 10^7$ 、约 $5.0 \times 10^5$ 至约 $1 \times 10^7$ 、约 $1.0 \times 10^6$ 至约 $1 \times 10^7$ 、约 $5.0 \times 10^6$ 至约 $1.0 \times 10^7$ 、约 $1.0 \times 10^5$ 至约 $5.0 \times 10^6$ 、约 $1.0 \times 10^5$ 至约 $1.0 \times 10^6$ 、约 $1.0 \times 10^5$ 至约 $5.0 \times 10^5$ 、约 $1.0 \times 10^5$ 至约 $5.0 \times 10^6$ 、约 $2.0 \times 10^5$ 至约 $5.0 \times 10^6$ 、约 $3.0 \times 10^5$ 至约 $5.0 \times 10^6$ 、约 $4.0 \times 10^5$ 至约 $5.0 \times 10^6$ 、约 $5.0 \times 10^5$ 至约 $5.0 \times 10^6$ 、约 $6.0 \times 10^5$ 至约 $5.0 \times 10^6$ 、约 $7.0 \times 10^5$ 至约 $5.0 \times 10^6$ 、约 $8.0 \times 10^5$ 至约 $5.0 \times 10^6$ 或约 $9.0 \times 10^5$ 至约 $5.0 \times 10^6$ 个细胞/kg体重。在一些实施方案中,所述剂量对于50kg或更轻的受试者为约 $0.2 \times 10^6$ 至约 $5.0 \times 10^6$ 个细胞/kg体重。在许多实施方案中,所述剂量对于50kg或更轻的受试者在小于约 $0.2 \times 10^6$ 至约 $5.0 \times 10^6$ 个细胞/kg体重的范围内。在许多实施方案中,所述剂量对于50kg或更轻的受试者在高于约 $0.2 \times 10^6$ 至约 $5.0 \times 10^6$ 个细胞/kg体重的范围内。在示例性实施方案中,单一剂量的体积为约10ml至50ml。在一些实施方案中,剂量静脉内施用。

[0819] 在示例性实施方案中,细胞以单一剂量施用,所述剂量对于超过50kg的受试者为约 $1.0 \times 10^6$ 至约 $5.0 \times 10^8$ 个细胞(诸如原代细胞)。在一些实施方案中,药物组合物作为单一剂量施用,所述剂量对于50kg或更轻的受试者为约 $0.5 \times 10^6$ 至约 $1.0 \times 10^9$ 、约 $1.0 \times 10^6$ 至约 $1.0 \times 10^9$ 、约 $1.0 \times 10^6$ 至约 $1.0 \times 10^9$ 、约 $5.0 \times 10^6$ 至约 $1.0 \times 10^9$ 、约 $1.0 \times 10^7$ 至约 $1.0 \times 10^9$ 、约 $5.0 \times 10^7$ 至约 $1.0 \times 10^9$ 、约 $1.0 \times 10^6$ 至约 $5.0 \times 10^7$ 、约 $1.0 \times 10^6$ 至约 $1.0 \times 10^7$ 、约 $1.0 \times 10^6$ 至约 $5.0 \times 10^7$ 、约 $1.0 \times 10^7$ 至约 $5.0 \times 10^8$ 、约 $2.0 \times 10^7$ 至约 $5.0 \times 10^8$ 、约 $3.0 \times 10^7$ 至约 $5.0 \times 10^8$ 、约 $4.0 \times 10^7$ 至约 $5.0 \times 10^8$ 、约 $5.0 \times 10^7$ 至约 $5.0 \times 10^8$ 、约 $6.0 \times 10^7$ 至约 $5.0 \times 10^8$ 、约 $7.0 \times 10^7$ 至约 $5.0 \times 10^8$ 、约 $8.0 \times 10^7$ 至约 $5.0 \times 10^8$ 或约 $9.0 \times 10^7$ 至约 $5.0 \times 10^8$ 个细胞/kg体重。在许多实施方案中,细胞以单一剂量施用,所述剂量对于超过50kg的受试者为约 $1.0 \times 10^7$ 至约 $2.5 \times 10^8$ 个细胞。在一些实施方案中,细胞以单一剂量施用,所述剂量的范围对于超过50kg的受试者小于约 $1.0 \times 10^7$ 至约 $2.5 \times 10^8$ 个细胞。在一些实施方案中,细胞以单一剂量施用,所述剂量的范围对于超过50kg的受试者高于约 $1.0 \times 10^7$ 至约 $2.5 \times 10^8$ 个细胞。在一些实施方案中,剂量静脉内施用。在示例性实施方案中,单一剂量的体积为约10ml至50ml。在一些实施方案中,剂量静脉内施用。

[0820] 在示例性实施方案中,所述剂量以约每分钟1至50ml、每分钟1至40ml、每分钟1至30ml、每分钟1至20ml、每分钟10至20ml、每分钟10至30ml、每分钟10至40ml、每分钟10至50ml、每分钟20至50ml、每分钟30至50ml、每分钟40至50ml的速率静脉内施用。在多个实施方案中,药物组合物储存在一个或多个输液袋中用于静脉内施用。在一些实施方案中,剂量

以不超过10分钟、15分钟、20分钟、25分钟、30分钟、35分钟、40分钟、45分钟、50分钟、55分钟、60分钟、70分钟、80分钟、90分钟、120分钟、150分钟、180分钟、240分钟或300分钟完全施用。

[0821] 在一些实施方案中,单一剂量的药物组合物存在于单个输液袋中。在其他实施方案中,将单一剂量的药物组合物分成2、3、4或5个单独的输液袋。

[0822] 在一些实施方案中,本文所述的细胞以多个剂量(诸如2、3、4、5、6或更多个剂量)施用。在一些实施方案中,多个剂量中的每个剂量以间隔1至24小时的范围施用于受试者。在一些情况下,后续剂量在初始剂量或先前剂量后约1小时至约24小时(例如,约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23或约24小时)施用。在一些实施方案中,多个剂量中的每个剂量以间隔约1天至28天的范围施用于受试者。在一些情况下,后续剂量在初始剂量或先前剂量后约1天至约28天(例如,约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或约28天)施用。在许多实施方案中,多个剂量中的每个剂量以间隔1周至约6周的范围施用于受试者。在某些情况下,后续剂量在初始剂量或先前剂量后约1周至约6周(例如,约1、2、3、4、5或6周)施用。在若干实施方案中,多个剂量中的每个剂量以间隔约1个月至约12个月的范围施用于受试者。在若干种情况下,后续剂量在初始剂量或先前剂量后约1个月至约12个月(例如,约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个月)施用。

[0823] 在一些实施方案中,在第一时间点向受试者施用第一剂量方案,然后随后在第二时间点向受试者施用第二剂量方案。在一些实施方案中,第一剂量方案与第二剂量方案相同。在其他实施方案中,第一剂量方案与第二剂量方案不同。在一些情况下,第一剂量方案和第二剂量方案中的细胞数量相同。在一些情况下,第一剂量方案和第二剂量方案中的细胞数量不同。在一些情况下,第一剂量方案和第二剂量方案的剂量数相同。在一些情况下,第一剂量方案和第二剂量方案的剂量数不同。

[0824] 在一些实施方案中,细胞是工程化T细胞(例如原代T细胞),并且第一剂量方案包括表达第一CAR的工程化T细胞,且第二剂量方案包括表达第二CAR的工程化T细胞,使得第一CAR和第二CAR不同。例如,第一CAR和第二CAR结合不同的靶抗原。在一些情况下,第一CAR包含结合抗原的scFv,而第二CAR包含结合不同抗原的scFv。在一些实施方案中,第一剂量方案包括表达第一CAR的工程化T细胞,并且第二剂量方案包括表达第二CAR的工程化T细胞,使得第一CAR和第二CAR相同。第一剂量方案可以与第二剂量方案间隔至少1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、12个月、1-3个月、1-6个月、4-6个月、3-9个月、3-12个月或更多个月施用于受试者。在一些实施方案中,在疾病(例如,癌症)过程期间向受试者施用多个剂量方案,并且所述剂量方案中的至少两个包括相同类型的本文所述的工程化T细胞。在其他实施方案中,多个剂量方案中的至少两个包括不同类型的本文所述的工程化T细胞。

#### [0825] B. 免疫抑制剂

[0826] 在一些实施方案中,在第一次施用工程化原代细胞群或含有其的组合物之前,不向患者施用免疫抑制剂和/或免疫调节剂。

[0827] 在一些实施方案中,可以向接受工程化原代细胞施用的患者施用免疫抑制剂和/或免疫调节剂。在一些实施方案中,在施用工程化原代细胞之前施用免疫抑制剂和/或免疫

调节剂。在一些实施方案中,在第一次和/或第二次施用工程化原代细胞的施用之前,施用免疫抑制剂和/或免疫调节剂。

[0828] 免疫抑制剂和/或免疫调节剂的非限制性实例包括环孢菌素、硫唑嘌呤、霉酚酸、霉酚酸酯、皮质类固醇诸如泼尼松、甲氨蝶呤、金盐、柳氮磺吡啶、抗疟药、布喹那、来氟米特、咪唑立宾、15-脱氧精脒菌素、6-巯基嘌呤、环磷酰胺、雷帕霉素、他克莫司(FK-506)、OKT3、抗胸腺细胞球蛋白、胸腺五肽、胸腺肽- $\alpha$ 和类似剂。在一些实施方案中,免疫抑制剂和/或免疫调节剂选自由以下组成的免疫抑制抗体组:与IL-2受体的p75结合的抗体、与例如MHC、CD2、CD3、CD4、CD7、CD28、B7、CD40、CD45、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-4、IL-5、IL-6R、IL-6、IGF、IGFR1、IL-7、IL-8、IL-10、CD11a或CD58结合的抗体,以及与其任何配体结合的抗体。在一些实施方案中,其中在第一次施用细胞之前或之后向患者施用免疫抑制剂和/或免疫调节剂,施用的剂量低于具有一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子表达且无外源CD47表达的细胞所需的剂量。

[0829] 在一个实施方案中,这种免疫抑制剂和/或免疫调节剂可选自可溶性IL-15R、IL-10、B7分子(例如,B7-1、B7-2、其变体及其片段)、ICOS和OX40、负性T细胞调控子的抑制剂(诸如针对CTLA-4的抗体)和类似的剂。

[0830] 在一些实施方案中,在第一次施用工程化原代细胞群之前,可以向患者施用免疫抑制剂和/或免疫调节剂。在一些实施方案中,在第一次施用细胞前至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14天或更多天施用免疫抑制剂和/或免疫调节剂。在一些实施方案中,在第一次施用细胞前至少1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周或更多周施用免疫抑制剂和/或免疫调节剂。

[0831] 在特定实施方案中,在第一次施用细胞后不向患者施用免疫抑制剂和/或免疫调节剂,或者在第一次施用细胞后至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14天或更多天施用免疫抑制剂和/或免疫调节剂。在一些实施方案中,在第一次施用细胞后至少1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周或更多周施用免疫抑制剂和/或免疫调节剂。

[0832] 在一些实施方案中,在施用工程化细胞群之前,不向患者施用免疫抑制剂和/或免疫调节剂。在许多实施方案中,在第一次和/或第二次施用工程化原代细胞群之前,向患者施用免疫抑制剂和/或免疫调节剂。在一些实施方案中,在施用细胞前至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14天或更多天施用免疫抑制剂和/或免疫调节剂。在一些实施方案中,在第一次和/或第二次施用细胞前至少1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周或更多周施用免疫抑制剂和/或免疫调节剂。在特定实施方案中,在施用细胞后至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14天或更多天施用免疫抑制剂和/或免疫调节剂。在一些实施方案中,在第一次和/或第二次施用细胞后至少1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周或更多周施用免疫抑制剂和/或免疫调节剂。

[0833] 在一些实施方案中,其中在施用细胞之前或之后向患者施用免疫抑制剂和/或免疫调节剂,施用的剂量低于免疫原性细胞(例如,工程化原代细胞的相同或类似细胞类型或表型但不含修饰(例如遗传修饰)的细胞群,例如具有一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子表达且无外源CD47表达)所需的剂量。

[0834] VI. 示例性实施方案

[0835] 本文提供了以下示例性实施方案:

[0836] 实施方案1.一种工程化原代细胞,其包含(i)增加一种或多种致耐受因子的表达,和(ii)降低一种或多种主要组织相容性复合物(MHC)I类分子和/或一种或多种MHC II类分子的表达的修饰,其中(i)的表达增加和(ii)的表达降低是相对于不包含所述修饰的相同细胞类型的细胞而言的。

[0837] 实施方案2.如实施方案1所述的工程化原代细胞,其中(ii)中的所述修饰降低一种或多种MHC I类分子的表达。

[0838] 实施方案3.如实施方案1所述的工程化原代细胞,其中(ii)中的所述修饰降低一种或多种MHC I类和一种或多种MHC II类分子的表达。

[0839] 实施方案4.如实施方案1-3中任一项所述的工程化原代细胞,其中所述一种或多种致耐受因子选自由以下组成的组:CD47、CD27、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重链、HLA-G、PD-L1、ID01、CTLA4-Ig、C1-抑制剂、IL-10、IL-35、FASL、CCL21、MFGE8和SERPINB9及其任何组合。

[0840] 实施方案5.如实施方案4所述的工程化原代细胞,其中所述一种或多种致耐受因子选自由以下组成的组:CD47、PD-L1、HLA-E、HLA-G、CCL21、FASL、SERPINB9、CD200、MFGE8及其任何组合。

[0841] 实施方案6.如实施方案4所述的工程化原代细胞,其中所述一种或多种致耐受因子中的至少一种是CD47。

[0842] 实施方案7.一种工程化原代细胞,其包含(i)增加CD47的表达,和(ii)降低一种或多种主要组织相容性复合物(MHC)I类分子和/或一种或多种MHC II类分子的表达的修饰,其中(i)的表达增加和(ii)的表达降低是相对于不包含所述修饰的相同细胞类型的细胞而言的。

[0843] 实施方案8.如实施方案1-7中任一项所述的工程化原代细胞,其中增加表达的所述修饰包括增加的表面表达,且/或降低表达的所述修饰包括降低的表面表达。

[0844] 实施方案9.如实施方案6-8中任一项所述的工程化原代细胞,其中增加CD47的表达的所述修饰包括编码CD47蛋白的外源多核苷酸。

[0845] 实施方案10.如实施方案9所述的工程化原代细胞,其中所述编码CD47的外源多核苷酸编码与SEQ ID NO:2的氨基酸序列具有至少85%同一性的氨基酸序列,并且降低所述工程化原代细胞的先天免疫杀伤。

[0846] 实施方案11.如实施方案10所述的工程化原代细胞,其中所述编码CD47的外源多核苷酸编码SEQ ID NO:2中列出的序列。

[0847] 实施方案12.如实施方案7-11中任一项所述的工程化原代细胞,其中所述编码CD47的外源多核苷酸可操作地连接至启动子。

[0848] 实施方案13.如实施方案12所述的工程化原代细胞,其中所述启动子是组成型启动子。

[0849] 实施方案14.如实施方案12或13所述的工程化原代细胞,其中所述启动子选自由以下组成的组:CAG启动子、巨细胞病毒(CMV)启动子、EF1a启动子、PGK启动子、腺病毒晚期启动子、牛痘病毒7.5K启动子、SV40启动子、HSV的tk启动子、小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)启动子、HIV的LTR启动子、莫洛尼病毒的启动子、爱泼斯坦巴尔病毒(EBV)启动子和劳斯肉瘤病毒(RSV)启动子。

[0850] 实施方案15.如实施方案4-14中任一项所述的工程化原代细胞,其中将所述编码CD47的外源多核苷酸整合到所述工程化原代细胞的基因组中。

[0851] 实施方案16.如实施方案15所述的方法,其中所述外源多核苷酸是编码CD47的多顺反子载体和编码第二转基因的额外转基因。

[0852] 实施方案17.如实施方案15所述的工程化原代细胞,其中所述整合是通过非靶向插入到所述工程化原代细胞的基因组中,任选地通过使用慢病毒载体将所述外源多核苷酸引入到所述细胞中进行的。

[0853] 实施方案18.如实施方案15所述的工程化原代细胞,其中所述整合是通过靶向插入到所述细胞的靶基因组基因座中进行的。

[0854] 实施方案19.如实施方案18所述的方法,其中所述靶基因组基因座是安全港基因座、B2M基因座、CIITA基因座、TRAC基因座或TRBC基因座。

[0855] 实施方案20.如实施方案19所述的方法,其中所述靶基因组基因座选自由以下组成的组:CCR5基因座、CXCR4基因座、PPP1R12C(也称为AAVS1)基因、白蛋白基因座、SHS231基因座、CLYBL基因座和ROSA26基因座。

[0856] 实施方案21.如实施方案1-20中任一项所述的工程化原代细胞,其中降低一种或多种MHC I类分子的表达的所述修饰降低一种或多种MHC I类分子蛋白质表达。

[0857] 实施方案22.如实施方案1-21中任一项所述的工程化原代细胞,其中降低一种或多种MHC I类分子的表达的所述修饰是降低B-2微球蛋白(B2M)的表达的修饰。

[0858] 实施方案23.如实施方案22所述的工程化原代细胞,其中降低一种或多种MHC I类分子的表达的所述修饰包括降低的B2M的mRNA表达。

[0859] 实施方案24.如实施方案22所述的工程化原代细胞,其中降低一种或多种MHC I类分子的表达的所述修饰包括降低的B2M的蛋白质表达。

[0860] 实施方案25.如实施方案22-24中任一项所述的工程化原代细胞,其中所述修饰消除B2M基因活性。

[0861] 实施方案26.如实施方案22-25中任一项所述的工程化原代细胞,其中所述修饰包括所述B2M基因的两个等位基因的失活或破坏。

[0862] 实施方案27.如实施方案22-26中任一项所述的工程化原代细胞,其中所述修饰包括所述细胞中所有B2M编码序列的失活或破坏。

[0863] 实施方案28.如实施方案26或实施方案27所述的工程化原代细胞,其中所述失活或破坏包括所述B2M基因中的插入缺失。

[0864] 实施方案29.如实施方案22-28中任一项所述的工程化原代细胞,其中所述修饰是所述B2M基因的一段连续基因组DNA的移码突变或缺失。

[0865] 实施方案30.如实施方案22-29中任一项所述的工程化原代细胞,其中所述B2M基因被敲除。

[0866] 实施方案31.如实施方案22-30中任一项所述的工程化原代细胞,其中所述修饰是通过核酸酶介导的基因编辑进行的。

[0867] 实施方案32.如实施方案31所述的工程化原代细胞,其中所述核酸酶介导的基因编辑是通过靶向所述B2M基因的锌指核酸酶(ZFN)、TAL效应物核酸酶(TALEN)或CRISPR-Cas组合进行的,任选地其中所述Cas是Cas9。

[0868] 实施方案33.如实施方案32所述的工程化原代细胞,其中所述核酸酶介导的基因编辑是通过CRISPR-Cas组合进行的,并且所述CRISPR-Cas组合包含具有与所述B2M基因内的至少一个靶位点互补的靶向结构域的指导RNA(gRNA)。

[0869] 实施方案34.如实施方案33所述的工程化原代细胞,其中所述CRISPR-Cas组合是包含所述gRNA和Cas蛋白的核糖核蛋白(RNP)复合物。

[0870] 实施方案35.如实施方案21所述的工程化原代细胞,其中降低一种或多种MHC I类分子的表达的所述修饰是降低HLA-A蛋白、HLA-B蛋白或HLA-C蛋白的表达的修饰,任选地其中编码所述HLA-A蛋白、HLA-B蛋白或HLA-C蛋白的基因被敲除。

[0871] 实施方案36.如实施方案1-35中任一项所述的工程化原代细胞,其中降低一种或多种MHC II类分子的表达的所述修饰降低一种或多种MHC II类分子蛋白质表达。

[0872] 实施方案37.如实施方案1-36中任一项所述的工程化原代细胞,其中降低一种或多种MHC II类分子的表达的所述修饰是降低CIITA的表达的修饰。

[0873] 实施方案38.如实施方案37所述的工程化原代细胞,其中降低一种或多种MHC II类分子的表达的所述修饰包括降低的CIITA的mRNA表达。

[0874] 实施方案39.如实施方案37所述的工程化原代细胞,其中降低一种或多种MHC II类分子的表达的所述修饰包括降低的CIITA的蛋白质表达。

[0875] 实施方案40.如实施方案37-39中任一项所述的工程化原代细胞,其中所述修饰消除CIITA基因活性。

[0876] 实施方案41.如实施方案37-40中任一项所述的工程化原代细胞,其中所述修饰包括所述CIITA基因的两个等位基因的失活或破坏。

[0877] 实施方案42.如实施方案37-41中任一项所述的工程化原代细胞,其中所述修饰包括所述细胞中所有CIITA编码序列的失活或破坏。

[0878] 实施方案43.如实施方案41或实施方案42所述的工程化原代细胞,其中所述失活或破坏包括所述CIITA基因中的插入缺失。

[0879] 实施方案44.如实施方案37-43中任一项所述的工程化原代细胞,其中所述插入缺失是所述CIITA基因的一段连续基因组DNA的移码突变或缺失。

[0880] 实施方案45.如实施方案37-44中任一项所述的工程化原代细胞,其中CIITA基因被敲除。

[0881] 实施方案46.如实施方案37-45中任一项所述的工程化原代细胞,其中所述修饰是通过核酸酶介导的基因编辑进行的。

[0882] 实施方案47.如实施方案46所述的工程化原代细胞,其中所述核酸酶介导的基因编辑是通过靶向所述CIITA基因的锌指核酸酶(ZFN)、TAL效应物核酸酶(TALEN)或CRISPR-Cas组合进行的,任选地其中所述Cas是Cas9。

[0883] 实施方案48.如实施方案46或实施方案47所述的工程化原代细胞,其中所述核酸酶介导的基因编辑是通过CRISPR-Cas组合进行的,并且所述CRISPR-Cas组合包含具有与所述CIITA基因内的至少一个靶位点互补的靶向结构域的指导RNA(gRNA)。

[0884] 实施方案49.如实施方案48所述的工程化原代细胞,其中所述CRISPR-Cas组合是包含所述gRNA和Cas蛋白的核糖核蛋白(RNP)复合物。

[0885] 实施方案50.如实施方案36所述的工程化原代细胞,其中降低一种或多种MHC II

类分子的表达的所述修饰是降低HLA-DP蛋白、HLA-DR蛋白或HLA-DQ蛋白的表达的修饰,任选地其中编码所述HLA-DP蛋白、HLA-DR蛋白或HLA-DQ蛋白的基因被敲除。

[0886] 实施方案51.如实施方案1-50中任一项所述的工程化原代细胞,其中所述工程化原代细胞是人细胞或动物细胞。

[0887] 实施方案52.如实施方案51所述的工程化原代细胞,其中所述工程化原代细胞是人细胞。

[0888] 实施方案53.如实施方案1-52中任一项所述的工程化原代细胞,其中所述原代细胞是暴露于血液的细胞类型。

[0889] 实施方案54.如实施方案1-53中任一项所述的工程化原代细胞,其中所述工程化原代细胞是从供体受试者分离的原代细胞。

[0890] 实施方案55.如实施方案54所述的工程化原代细胞,其中在从所述供体受试者获得供体样品时,所述供体受试者是健康的或未被怀疑患有疾病或病状。

[0891] 实施方案56.如实施方案1-55中任一项所述的工程化原代细胞,其中所述工程化原代细胞选自胰岛细胞、 $\beta$ 胰岛细胞、B细胞、T细胞、NK细胞、视网膜色素上皮细胞、神经胶质祖细胞、内皮细胞、肝细胞、甲状腺细胞、皮肤细胞和血细胞。

[0892] 实施方案57.如实施方案1-56中任一项所述的工程化原代细胞,其中所述工程化原代细胞是内皮细胞。

[0893] 实施方案58.如实施方案1-56中任一项所述的工程化原代细胞,其中所述工程化原代细胞是上皮细胞。

[0894] 实施方案59.如实施方案1-56中任一项所述的工程化原代细胞,其中所述工程化原代细胞是T细胞。

[0895] 实施方案60.如实施方案1-56中任一项所述的工程化原代细胞,其中所述工程化原代细胞是NK细胞。

[0896] 实施方案61.如实施方案59或实施方案60所述的工程化原代细胞,其中所述工程化原代细胞包含嵌合抗原受体(CAR)。

[0897] 实施方案62.如实施方案1-52中任一项所述的工程化原代细胞,其中所述工程化原代细胞是胰岛细胞。

[0898] 实施方案63.如实施方案62所述的工程化原代细胞,其中所述胰岛细胞是 $\beta$ 胰岛细胞。

[0899] 实施方案64.如实施方案1-52中任一项所述的工程化原代细胞,其中所述工程化原代细胞是肝细胞。

[0900] 实施方案65.如实施方案1-64中任一项所述的工程化原代细胞,其中所述工程化原代细胞是ABO血型O型。

[0901] 实施方案66.如实施方案1-65中任一项所述的工程化原代细胞,其中所述工程化原代细胞是恒河猴因子阴性(Rh<sup>-</sup>)。

[0902] 实施方案67.一种生成工程化原代细胞的方法,所述方法包括:

[0903] a) 降低或消除原代细胞中一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子的表达;和

[0904] b) 增加所述原代细胞中一种或多种致耐受因子的表达。

[0905] 实施方案68.如实施方案67所述的方法,其中所述一种或多种致耐受因子选自由以下组成的组:CD47、CD27、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重链、HLA-G、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1-抑制剂、IL-10、IL-35、FASL、CCL21、MFGE8和SERPINB9及其任何组合。

[0906] 实施方案69.如实施方案68所述的方法,其中所述一种或多种致耐受因子选自由以下组成的组:CD47、PD-L1、HLA-E、HLA-G、CCL21、FASL、SERPINB9、CD200、MFGE8及其任何组合。

[0907] 实施方案70.如实施方案69所述的方法,其中所述一种或多种致耐受因子中的至少一种是CD47。

[0908] 实施方案71.如实施方案67-70中任一项所述的方法,其中所述方法包括降低或消除一种或多种MHC I类分子的表达。

[0909] 实施方案72.如实施方案67-71中任一项所述的方法,其中所述方法包括降低或消除一种或多种MHC I类分子和一种或多种MHC II类分子的表达。

[0910] 实施方案73.一种生成工程化原代细胞的方法,所述方法包括:

[0911] a.降低或消除所述细胞中一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子的表达;和

[0912] b.增加所述细胞中CD47的表达。

[0913] 实施方案74.如实施方案73所述的方法,其中所述方法包括降低或消除一种或多种MHC I类分子的表达。

[0914] 实施方案75.如实施方案73所述的方法,其中所述方法包括降低或消除一种或多种MHC I类分子和一种或多种MHC II类分子的表达。

[0915] 实施方案76.如实施方案67-75中任一项所述的方法,其中增加表达的所述修饰包括增加的表面表达,且/或降低表达的所述修饰包括降低的表面表达。

[0916] 实施方案77.如实施方案70-75中任一项所述的方法,其中增加CD47的表达的所述修饰包括编码CD47蛋白的外源多核苷酸。

[0917] 实施方案78.如实施方案77所述的方法,其中所述编码CD47的外源多核苷酸编码与SEQ ID NO:2的氨基酸序列具有至少85%同一性的氨基酸序列,并且降低所述工程化原代细胞的先天免疫杀伤。

[0918] 实施方案79.如实施方案78所述的方法,其中所述编码CD47的外源多核苷酸编码SEQ ID NO:2中列出的序列。

[0919] 实施方案80.如实施方案77-79中任一项所述的方法,其中所述编码CD47的外源多核苷酸可操作地连接至启动子。

[0920] 实施方案81.如实施方案77-80中任一项所述的方法,其中将所述编码CD47的外源多核苷酸整合到所述工程化原代细胞的基因组中。

[0921] 实施方案82.如实施方案81所述的方法,其中所述整合是通过非靶向插入到所述工程化原代细胞的基因组中,任选地通过使用慢病毒载体将所述外源多核苷酸引入到所述工程化原代细胞中进行的。

[0922] 实施方案83.如实施方案81所述的方法,其中所述整合是通过靶向插入到所述细胞的靶基因组基因座中进行的,任选地其中所述靶向插入是通过使用同源定向修复的核酸酶介导的基因编辑进行的。



[0923] 实施方案84.如实施方案83所述的方法,其中所述靶基因组基因座是B2M基因座、CIITA基因座、CD142基因座、TRAC基因座或TRBC基因座。

[0924] 实施方案85.如实施方案84所述的方法,其中所述靶基因组基因座选自自由以下组成的组:CCR5基因座、CXCR4基因座、PPP1R12C(也称为AAVS1)基因、白蛋白基因座、SHS231基因座、CLYBL基因座和ROSA26基因座。

[0925] 实施方案86.如实施方案83-85中任一项所述的方法,其中所述核酸酶介导的基因编辑是通过靶向所述靶基因组基因座的锌指核酸酶(ZFN)、TAL效应物核酸酶(TALEN)或CRISPR-Cas组合进行的,任选地其中所述Cas是Cas9。

[0926] 实施方案87.如实施方案86所述的方法,其中所述核酸酶介导的基因编辑是通过CRISPR-Cas组合进行的,并且所述CRISPR-Cas组合包含具有与所述靶基因组基因座的靶序列互补的靶向结构域的引导RNA(gRNA)和包含所述编码CD47的外源多核苷酸的同源定向修复模板。

[0927] 实施方案88.如实施方案87所述的方法,其中所述CRISPR-Cas组合是包含所述gRNA和Cas蛋白的核糖核蛋白(RNP)复合物。

[0928] 实施方案89.如实施方案67-88中任一项所述的方法,其中所述工程化原代细胞是低免疫原性原代细胞。

[0929] 实施方案90.如实施方案67-89中任一项所述的方法,其中降低或消除一种或多种MHC I类分子的表达包括引入降低一种或多种MHC I类分子蛋白质表达的修饰。

[0930] 实施方案91.如实施方案67-90中任一项所述的方法,其中所述降低一种或多种MHC I类分子蛋白质表达的修饰包括降低的B2M的表达。

[0931] 实施方案92.如实施方案67-91中任一项所述的方法,其中所述降低一种或多种MHC I类分子蛋白质表达的修饰包括降低的B2M的蛋白质表达。

[0932] 实施方案93.如实施方案91或实施方案92所述的方法,其中所述降低一种或多种MHC I类分子蛋白质表达的修饰消除B2M基因活性。

[0933] 实施方案94.如实施方案67-93中任一项所述的方法,其中所述降低一种或多种MHC I类分子表达的修饰包括所述B2M基因的两个等位基因的失活或破坏。

[0934] 实施方案95.如实施方案67-94中任一项所述的方法,其中所述降低一种或多种MHC I类分子蛋白质表达的修饰包括所述细胞中所有B2M编码序列的失活或破坏。

[0935] 实施方案96.如实施方案87或实施方案88所述的方法,其中所述失活或破坏包括内源B2M基因中的插入缺失或内源B2M基因的一段连续基因组DNA的缺失。

[0936] 实施方案97.如实施方案89所述的方法,其中所述插入缺失是所述B2M基因的一段连续基因组DNA的移码突变或缺失。

[0937] 实施方案98.如实施方案84-90中任一项所述的方法,其中所述内源B2M基因被敲除。

[0938] 实施方案99.如实施方案84-91中任一项所述的方法,其中所述降低一种或多种MHC I类分子蛋白质表达的修饰是通过核酸酶介导的基因编辑进行的。

[0939] 实施方案100.如实施方案92所述的方法,其中所述核酸酶介导的基因编辑是通过靶向所述B2M基因的锌指核酸酶(ZFN)、TAL效应物核酸酶(TALEN)或CRISPR-Cas组合进行的,任选地其中所述Cas是Cas9。

[0940] 实施方案101.如实施方案100所述的方法,其中所述核酸酶介导的基因编辑是通过CRISPR-Cas组合进行的,并且所述CRISPR-Cas组合包含具有与所述B2M基因内的至少一个靶位点互补的靶向结构域的指导RNA(gRNA)。

[0941] 实施方案102.如实施方案101所述的方法,其中所述CRISPR-Cas组合是包含所述gRNA和Cas蛋白的核糖核蛋白(RNP)复合物。

[0942] 实施方案103.如实施方案66-102所述的方法,其中降低一种或多种MHC I类的表达的所述修饰降低HLA-A蛋白表达、HLA-B蛋白表达或HLA-C蛋白表达,任选地其中通过敲除编码所述HLA-A蛋白、HLA-B蛋白或HLA-C蛋白的基因来降低所述蛋白表达。

[0943] 实施方案104.如实施方案67-103中任一项所述的方法,其中降低或消除一种或多种MHC II类分子的表达包括引入降低一种或多种MHC II类分子蛋白质表达的修饰。

[0944] 实施方案105.如实施方案67-104中任一项所述的方法,其中降低一种或多种MHC II类分子蛋白质表达的遗传修饰包括降低的CIITA的表达。

[0945] 实施方案106.如实施方案67-105中任一项所述的方法,其中降低一种或多种MHC II类分子蛋白质表达的遗传修饰包括降低的CIITA的蛋白质表达。

[0946] 实施方案107.如实施方案104或实施方案105所述的方法,其中所述降低一种或多种MHC II类分子蛋白质表达的修饰消除CIITA。

[0947] 实施方案108.如实施方案67-107中任一项所述的方法,其中所述降低一种或多种MHC II类分子蛋白质表达的修饰包括所述CIITA基因的两个等位基因的失活或破坏。

[0948] 实施方案109.如实施方案67-108中任一项所述的方法,其中所述修饰包括所述细胞中所有CIITA编码序列的失活或破坏。

[0949] 实施方案110.如实施方案108或实施方案109所述的方法,其中所述失活或破坏包括所述CIITA基因中的插入缺失或所述CIITA基因的一段连续基因组DNA的缺失。

[0950] 实施方案111.如实施方案110所述的方法,其中所述插入缺失是所述CIITA基因的一段连续基因组DNA的移码突变或缺失。

[0951] 实施方案112.如实施方案67-111中任一项所述的方法,其中所述CIITA基因被敲除。

[0952] 实施方案113.如实施方案67所述的方法,降低一种或多种MHC II类分子的表达的遗传修饰降低HLA-DP蛋白、HLA-DR蛋白或HLA-DQ蛋白的表达,任选地其中通过敲除编码所述HLA-DP蛋白、所述HLA-DR蛋白或所述HLA-DQ蛋白的基因来降低所述HLA-DP蛋白表达、所述HLA-DR蛋白表达或所述HLA-DQ蛋白表达。

[0953] 实施方案114.如实施方案67-113中任一项所述的方法,其中所述工程化原代细胞是人细胞或动物细胞。

[0954] 实施方案115.如实施方案67-114中任一项所述的方法,其中所述工程化原代细胞是人细胞。

[0955] 实施方案116.如实施方案67-115中任一项所述的方法,其中所述工程化原代细胞是暴露于血液的细胞类型。

[0956] 实施方案117.如实施方案67-115中任一项所述的方法,其中所述工程化原代细胞是从供体受试者分离的。

[0957] 实施方案118.如实施方案67-115中任一项所述的方法,其中所述工程化原代细胞

选自胰岛细胞、 $\beta$ 胰岛细胞、B细胞、T细胞、NK细胞、视网膜色素上皮细胞、神经胶质祖细胞、内皮细胞、肝细胞、甲状腺细胞、皮肤细胞和血细胞。

[0958] 实施方案119.如实施方案67-115中任一项所述的方法,其中所述工程化原代细胞是胰岛细胞。

[0959] 实施方案200.如实施方案119所述的方法,其中,在步骤a)之前,所述原代胰岛细胞已从原代胰岛簇解离。

[0960] 实施方案201.如实施方案200所述的方法,其中所述原代胰岛簇是人原代尸体胰岛簇。

[0961] 实施方案202.如实施方案200或实施方案201所述的方法,其中在步骤a)之后和/或在步骤b)之后,所述原代胰岛细胞在用于重新聚集成修饰的原代胰岛簇的条件下孵育,其中所述孵育的至少一部分是在运动中进行的。

[0962] 实施方案203.如实施方案202所述的方法,其中所述孵育还包括至少一部分在静态条件下的孵育。

[0963] 实施方案204.如实施方案202或实施方案203所述的方法,其中所述孵育包括在静态条件下的第一孵育,然后是在运动中的所述孵育。

[0964] 实施方案205.如实施方案202或实施方案203所述的方法,其中所述孵育包括在运动中的所述孵育,然后是在静态条件下的第二孵育。

[0965] 实施方案206.如实施方案202-205中任一项所述的方法,其中在用于重新聚集的条件下的所述孵育之前,所述方法包括选择已经修饰的胰岛细胞。

[0966] 实施方案207.如实施方案206所述的方法,其中所述选择是通过荧光活化细胞分选(FACS)进行的。

[0967] 实施方案208.如实施方案119-207中任一项所述的方法,其中所述方法包括:

[0968] i) 将原代胰岛簇解离成原代 $\beta$ 胰岛细胞的悬浮液;

[0969] ii) 修饰所述悬浮液的原代 $\beta$ 胰岛细胞以降低或消除原代 $\beta$ 胰岛细胞中一种或多种MHC I类和/或一种或多种MHC II类HLA的表达;

[0970] iii) 在用于重新聚集成第一修饰的原代胰岛簇的条件下孵育修饰的原代 $\beta$ 胰岛细胞,其中所述孵育的至少一部分是在运动中进行的;

[0971] iv) 将修饰的原代胰岛簇解离成修饰的原代 $\beta$ 胰岛细胞的悬浮液;

[0972] v) 进一步修饰所述悬浮液的修饰的原代胰岛细胞以增加所述原代细胞中一种或多种致耐受因子的表达;和

[0973] vi) 在用于重新聚集成第二修饰的原代胰岛簇的条件下孵育进一步修饰的原代 $\beta$ 胰岛细胞,其中所述孵育的至少一部分是在运动中进行的。

[0974] 实施方案209.如实施方案66或208所述的方法,其中所述一种或多种MHC I类HLA是HLA-A蛋白、HLA-B蛋白或HLA-C蛋白。

[0975] 实施方案210.如实施方案66、208或209所述的方法,其中所述一种或多种MHC II类HLA是HLA-DP蛋白、HLA-DR蛋白或HLA-DQ蛋白。

[0976] 实施方案211.如实施方案208-210中任一项所述的方法,其中所述修饰是通过遗传工程化进行的。

[0977] 实施方案212.如实施方案208-211中任一项所述的方法,其中所述运动是摇动。

- [0978] 实施方案213.如实施方案212所述的方法,其中所述摇动包括轨道运动。
- [0979] 实施方案214.如实施方案212所述的方法,其中所述摇动包括双向线性移动。
- [0980] 实施方案215.如实施方案212或实施方案213所述的方法,其中用轨道摇床进行所述摇动。
- [0981] 实施方案216.如实施方案202-215所述的方法,其中(iii)中的所述孵育和/或vi)中的所述孵育还包括至少一部分在静态条件下的孵育。
- [0982] 实施方案217.如实施方案202-216中任一项所述的方法,其中iii)中的所述孵育和/或vi)中的所述孵育包括在静态条件下的第一孵育,然后是在运动中的所述孵育。
- [0983] 实施方案218.如实施方案202-216中任一项所述的方法,其中所述孵育包括在运动中的所述孵育,然后是在静态条件下的第二孵育。
- [0984] 实施方案219.如实施方案208-218中任一项所述的方法,其中在v)之前,所述方法包括从iv)中的解离的胰岛细胞中选择已经修饰的 $\beta$ 胰岛细胞,并且任选地对选择的胰岛细胞重复步骤iii)和iv)。
- [0985] 实施方案220.如实施方案208-218中任一项所述的方法,其中在vi)中的所述孵育之后,所述方法包括将所述第二修饰的原代胰岛簇解离成修饰的原代 $\beta$ 胰岛细胞的悬浮液和选择已经修饰的胰岛细胞。
- [0986] 实施方案221.如实施方案220所述的方法,其中在用于重新聚集成修饰的原代胰岛簇的条件下孵育选择的修饰的原代 $\beta$ 胰岛细胞,其中所述孵育的至少一部分是在运动中进行的。
- [0987] 实施方案222.一种用于基因编辑原代胰岛细胞的方法,所述方法包括:
- [0988] i) 将原代胰岛簇解离成原代 $\beta$ 胰岛细胞的悬浮液;
- [0989] ii) 修饰所述悬浮液的原代 $\beta$ 胰岛细胞;和
- [0990] iii) 在用于将修饰的原代 $\beta$ 胰岛细胞重新聚集成胰岛的条件下孵育修饰的原代 $\beta$ 胰岛细胞,其中所述孵育的至少一部分是在摇动下进行的。
- [0991] 实施方案223.如实施方案222所述的方法,其中所述原代胰岛簇是人原代尸体胰岛簇。
- [0992] 实施方案224.如实施方案222或实施方案223所述的方法,其中所述修饰包括将一种或多种修饰引入所述细胞中以降低所述细胞中编码内源蛋白的一种或多种基因的表达或增加所述细胞中一种或多种异源蛋白的表达。
- [0993] 实施方案225.如实施方案222-224所述的方法,其中(iii)中的所述孵育和/或vi)中的所述孵育还包括至少一部分在静态条件下的孵育。
- [0994] 实施方案226.如实施方案222-225中任一项所述的方法,其中所述孵育包括在静态条件下的第一孵育,然后是在运动中的所述孵育。
- [0995] 实施方案227.如实施方案222-225中任一项所述的方法,其中所述孵育包括在运动中的所述孵育,然后是在静态条件下的第二孵育。
- [0996] 实施方案228.如实施方案222-227中任一项所述的方法,其中重复步骤i) - iii)。
- [0997] 实施方案229.如实施方案228所述的方法,其中所述方法的第一次迭代中的所述修饰不同于所述方法的重复迭代中的所述修饰。
- [0998] 实施方案230.如实施方案222-224中任一项所述的方法,其中重新聚集的胰岛细

胞是第一修饰的原代胰岛簇,并且其中所述方法还包括:

[0999] iv) 将所述第一修饰的原代胰岛簇解离成修饰的原代 $\beta$ 胰岛细胞的悬浮液;

[1000] v) 进一步修饰所述悬浮液的修饰的原代胰岛细胞;和

[1001] vi) 在用于重新聚集成第二修饰的原代胰岛簇的条件下孵育进一步修饰的原代 $\beta$ 胰岛细胞,其中所述孵育的至少一部分是在运动中进行的。

[1002] 实施方案231.如实施方案222-230中任一项所述的方法,其中在iii)中的所述孵育之前,所述方法包括选择已经修饰的胰岛细胞。

[1003] 实施方案232.如实施方案230或实施方案231所述的方法,其中在v)之前,所述方法包括从iv)中的解离的胰岛细胞中选择已经修饰的 $\beta$ 胰岛细胞,并且任选地对选择的胰岛细胞重复步骤iii)和iv)。

[1004] 实施方案233.如实施方案222、226或227所述的方法,其中在vi)中的所述孵育之后,所述方法包括将所述第二修饰的原代胰岛簇解离成修饰的原代胰岛细胞的悬浮液和选择已经修饰的胰岛细胞。

[1005] 实施方案234.如实施方案208-233中任一项所述的方法,其中所述悬浮液是单细胞悬浮液。

[1006] 实施方案235.如实施方案232-234中任一项所述的方法,其中在用于重新聚集成修饰的原代胰岛簇的条件下孵育选择的修饰的原代 $\beta$ 胰岛细胞,其中所述孵育的至少一部分是在运动中进行的。

[1007] 实施方案236.如实施方案222-235中任一项所述的方法,其中所述运动是摇动。

[1008] 实施方案237.如实施方案236所述的方法,其中所述摇动包括轨道运动。

[1009] 实施方案238.如实施方案236所述的方法,其中所述摇动包括双向线性移动。

[1010] 实施方案239.如实施方案236或实施方案237所述的方法,其中用轨道摇床进行所述摇动。

[1011] 实施方案240.如实施方案231-239中任一项所述的方法,其中所述选择包括荧光活化细胞分选(FACS)。

[1012] 实施方案241.如实施方案230-240中任一项所述的方法,其中所述第一修饰或所述进一步修饰中的一个包括降低所述细胞中编码内源蛋白的一种或多种基因的表达,并且所述第一修饰或所述进一步修饰中的另一个包括增加所述细胞中一种或多种外源蛋白的表达。

[1013] 实施方案242.如实施方案230-240中任一项所述的方法,其中所述第一修饰包括降低所述细胞中编码内源蛋白的一种或多种基因的表达,并且所述进一步修饰包括增加所述细胞中一种或多种外源蛋白的表达。

[1014] 实施方案243.如实施方案230-242中任一项所述的方法,其中所述第一修饰包括降低一种或多种主要组织相容性复合物(MHC) I类分子和/或一种或多种MHC II类分子的表达。

[1015] 实施方案244.如实施方案208-243中任一项所述的方法,其中所述修饰是遗传工程化。

[1016] 实施方案245.如实施方案230-244中任一项所述的方法,其中所述一种或多种MHC I类HLA是HLA-A蛋白、HLA-B蛋白或HLA-C蛋白。

[1017] 实施方案246.如实施方案230-245中任一项所述的方法,其中所述一种或多种MHC II类HLA是HLA-DP蛋白、HLA-DR蛋白或HLA-DQ蛋白。

[1018] 实施方案247.如实施方案243-246中任一项所述的方法,其中降低一种或多种MHC I类分子的表达是通过降低B-2微球蛋白(B2M)的表达进行的。

[1019] 实施方案248.如实施方案243-247中任一项所述的方法,其中降低一种或多种MHC II类分子的表达是通过降低CIITA的表达进行的。

[1020] 实施方案249.如实施方案230-248中任一项所述的方法,其中所述进一步修饰包括增加所述细胞中一种或多种致耐受因子的表达。

[1021] 实施方案250.如实施方案249所述的方法,其中所述一种或多种致耐受因子选自自由以下组成的组:CD47、CD27、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重链、HLA-G、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1-抑制剂、IL-10、IL-35、FASL、CCL21、MFG8和SERPINB9及其任何组合。

[1022] 实施方案251.如实施方案250所述的方法,其中所述一种或多种致耐受因子选自自由以下组成的组:CD47、PD-L1、HLA-E、HLA-G、CCL21、FASL、SERPINB9、CD200、MFG8及其任何组合。

[1023] 实施方案252.如实施方案251所述的方法,其中所述一种或多种致耐受因子中的至少一种是CD47。

[1024] 实施方案253.如实施方案224-252中任一项所述的方法,其中降低所述细胞中编码内源蛋白的一种或多种基因的表达是通过将基因编辑系统引入所述细胞中进行的。

[1025] 实施方案254.如实施方案253所述的方法,其中所述基因编辑系统包含序列特异性核酸酶。

[1026] 实施方案255.如实施方案254所述的方法,其中所述序列特异性核酸酶选自自由以下组成的组:RNA指导的DNA核酸内切酶、大范围核酸酶、转录活化因子样效应物核酸酶(TALEN)和锌指核酸酶(ZFN)。

[1027] 实施方案256.如实施方案255所述的方法,其中所述基因编辑系统包含RNA指导的核酸酶。

[1028] 实施方案257.如实施方案255所述的方法,其中所述RNA指导的核酸酶包含Cas核酸酶和指导RNA。

[1029] 实施方案258.如实施方案256或实施方案257所述的方法,其中所述RNA指导的核酸酶是II型或V型Cas蛋白。

[1030] 实施方案259.如实施方案256、257或258所述的方法,其中所述RNA指导的核酸酶是Cas9同源物或Cpf1同源物。

[1031] 实施方案260.如实施方案224-259中任一项所述的方法,其中增加所述细胞中一种或多种外源蛋白的表达是通过引入外源多核苷酸进行的。

[1032] 实施方案261.如实施方案260所述的方法,其中所述外源多核苷酸可操作地连接至启动子。

[1033] 实施方案262.如实施方案261所述的方法,其中所述启动子是组成型启动子。

[1034] 实施方案263.如实施方案261或实施方案262所述的方法,其中所述启动子选自自由以下组成的组:CAG启动子、巨细胞病毒(CMV)启动子、EF1a启动子、PGK启动子、腺病毒晚期启动子、牛痘病毒7.5K启动子、SV40启动子、HSV的tk启动子、小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)启动

子、HIV的LTR启动子、莫洛尼病毒的启动子、爱泼斯坦巴尔病毒 (EBV) 启动子和劳斯肉瘤病毒 (RSV) 启动子。

[1035] 实施方案264. 如实施方案224-259中任一项所述的方法, 其中将所述外源多核苷酸整合到所述细胞的基因组中。

[1036] 实施方案265. 如实施方案264所述的方法, 其中所述外源多核苷酸是多顺反子载体。

[1037] 实施方案266. 如实施方案264所述的方法, 其中所述整合是通过非靶向插入到所述细胞的基因组中, 任选地通过使用慢病毒载体将所述外源多核苷酸引入到所述细胞中进行的。

[1038] 实施方案267. 如实施方案264所述的方法, 其中所述整合是通过靶向插入到所述细胞的靶基因组基因座中进行的。

[1039] 实施方案268. 如实施方案119-267中任一项所述的方法, 其中所述胰岛细胞是 $\beta$ 胰岛细胞。

[1040] 实施方案269. 如实施方案67-115中任一项所述的方法, 其中所述工程化原代细胞是肝细胞。

[1041] 实施方案270. 如实施方案67-115中任一项所述的方法, 其中所述工程化原代细胞是T细胞。

[1042] 实施方案271. 如实施方案67-115中任一项所述的方法, 其中所述工程化原代细胞是内皮细胞。

[1043] 实施方案272. 如实施方案67-115中任一项所述的方法, 其中所述工程化原代细胞是甲状腺细胞。

[1044] 实施方案273. 如实施方案67-115中任一项所述的方法, 其中所述工程化原代细胞是皮肤细胞。

[1045] 实施方案274. 如实施方案67-115中任一项所述的方法, 其中所述工程化原代细胞是视网膜色素上皮细胞。

[1046] 实施方案275. 一种根据如实施方案67-274中任一项所述的方法产生的工程化原代细胞。

[1047] 实施方案276. 如实施方案275所述的工程化原代细胞, 其中所述原代细胞是胰岛细胞。

[1048] 实施方案277. 如实施方案276所述的工程化原代细胞, 其中所述胰岛细胞是 $\beta$ 胰岛细胞。

[1049] 实施方案278. 如实施方案1-66和275-277中任一项所述的工程化原代细胞, 其中所述工程化原代细胞在施用于受体患者后能够逃避NK细胞介导的细胞毒性。

[1050] 实施方案279. 如实施方案1-66和275-278中任一项所述的工程化原代细胞, 其中所述工程化原代细胞在施用于受体患者后受到保护而免于成熟NK细胞的细胞裂解。

[1051] 实施方案280. 如实施方案1-66和275-279中任一项所述的工程化原代细胞, 其中所述工程化原代细胞在施用于受体患者后不会诱导针对所述细胞的免疫反应。

[1052] 实施方案281. 如实施方案1-66和275-280中任一项所述的工程化原代细胞, 其中所述工程化原代细胞在施用于受体患者后不会诱导针对所述细胞的系统性炎症反应。

[1053] 实施方案282.如实施方案1-66和275-281中任一项所述的工程化原代细胞,其中所述工程化原代细胞在施用于受体患者后不会诱导针对所述细胞的局部炎症反应。

[1054] 实施方案283.一种工程化原代细胞群,其包含多种如实施方案1-66和275-282中任一项所述的工程化原代细胞。

[1055] 实施方案284.如实施方案283所述的工程化原代细胞群,其中所述多种工程化原代细胞来源于汇集自多于一个供体受试者的细胞。

[1056] 实施方案285.如实施方案284所述的工程化原代细胞群,其中在从所述供体受试者获得供体样品时,所述多于一个供体受试者中的每一个都是健康受试者或未被怀疑患有疾病或病状。

[1057] 实施方案286.如实施方案283-285中任一项所述的群体,其中所述群体中至少50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%或99.99%的细胞包含所述修饰。

[1058] 实施方案287.如实施方案283-286中任一项所述的群体,其中所述群体中至少50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%或99.99%的细胞包含编码CD47的外源多核苷酸。

[1059] 实施方案288.如实施方案136或实施方案137所述的群体,其中相对于不包含所述修饰的相同细胞类型的细胞,所述群体中至少50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%或99.99%的细胞包含降低的一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子的表达。

[1060] 实施方案289.如实施方案283-288中任一项所述的群体,其中相对于不包含所述修饰的相同细胞类型的细胞,所述群体中至少50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%或99.99%的细胞包含降低的B2M和/或CIITA的表达。

[1061] 实施方案290.如实施方案283-289中任一项所述的群体,其中相对于不包含所述修饰的相同细胞类型的细胞,所述群体中至少50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%或99.99%的细胞包含降低的B2M的表达。

[1062] 实施方案291.如实施方案283-290中任一项所述的群体,其中相对于不包含所述修饰的相同细胞类型的细胞,所述群体中至少50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%或99.99%的细胞包含降低的B2M和CIITA的表达。

[1063] 实施方案292.如实施方案283-291中任一项所述的群体,其中所述群体中至少50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%或99.99%的细胞包含一种或多种使内源B2M基因的两个等位基因失活的改变。

[1064] 实施方案293.如实施方案283-292中任一项所述的群体,其中所述群体中至少50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%或99.99%的细胞包含一种或多种使内源CIITA基因的两个等位基因失活的改变。

[1065] 实施方案294.一种组合物,其包含如实施方案283-293中任一项所述的群体。

[1066] 实施方案295.一种组合物,其包含通过如实施方案119-268中任一项所述的方法产生的工程化原代胰岛簇。

[1067] 实施方案296.一种组合物,其包含工程化原代胰岛细胞群,其中所述工程化原代胰岛细胞包含:(i)包含编码CD47的外源多核苷酸的转基因和(ii)B2M基因的两个等位基因



的失活或破坏。

[1068] 实施方案297.如实施方案296所述的组合物,其中所述工程化原代胰岛细胞群是原代胰岛细胞簇。

[1069] 实施方案298.如实施方案296所述的组合物,其中所述工程化原代胰岛细胞群是工程化原代 $\beta$ 胰岛细胞群。

[1070] 实施方案299.一种组合物,其包含工程化原代T细胞群,其中所述工程化原代T细胞包含:(i)包含编码CD47的外源多核苷酸的转基因和(ii)B2M基因的两个等位基因的失活或破坏。

[1071] 实施方案300.一种组合物,其包含工程化原代甲状腺细胞群,其中所述工程化原代甲状腺细胞包含:(i)包含编码CD47的外源多核苷酸的转基因和(ii)B2M基因的两个等位基因的失活或破坏。

[1072] 实施方案301.一种组合物,其包含工程化原代皮肤细胞群,其中所述工程化原代皮肤细胞包含:(i)包含编码CD47的外源多核苷酸的转基因和(ii)B2M基因的两个等位基因的失活或破坏。

[1073] 实施方案302.一种组合物,其包含工程化原代内皮细胞群,其中所述工程化原代内皮细胞包含:(i)包含编码CD47的外源多核苷酸的转基因和(ii)B2M基因的两个等位基因的失活或破坏。

[1074] 实施方案303.一种组合物,其包含工程化原代视网膜色素上皮细胞群,其中所述工程化原代视网膜色素上皮细胞包含:(i)包含编码CD47的外源多核苷酸的转基因和(ii)B2M基因的两个等位基因的失活或破坏。

[1075] 实施方案304.如实施方案294-303中任一项所述的组合物,其中所述工程化原代细胞群中的工程化原代细胞在B2M基因的两个等位基因中包含插入缺失。

[1076] 实施方案305.如实施方案294-304中任一项所述的组合物,其中所述工程化原代细胞群中的工程化原代细胞还包含CIITA基因的两个等位基因的失活和破坏。

[1077] 实施方案306.如实施方案294-305中任一项所述的组合物,其中所述工程化原代细胞群中的工程化原代细胞在CIITA基因的两个等位基因中包含插入缺失。

[1078] 实施方案307.如实施方案294-306中任一项所述的组合物,其中所述工程化原代细胞群中的工程化原代细胞具有表型B2M<sup>插入缺失/插入缺失</sup>;CIITA<sup>插入缺失/插入缺失</sup>;CD47tg。

[1079] 实施方案308.如实施方案294-307中任一项所述的组合物,其中所述组合物是药物组合物。

[1080] 实施方案309.如实施方案294-308中任一项所述的组合物,其包含药学上可接受的赋形剂。

[1081] 实施方案310.如实施方案294-309中任一项所述的组合物,其中所述组合物配制在包含冷冻保护剂的无血清冷冻保存介质中。

[1082] 实施方案311.如实施方案309所述的组合物,其中所述冷冻保护剂是DMSO并且所述冷冻保存介质是5%至10% DMSO(体积/体积)。

[1083] 实施方案312.如实施方案308和实施方案309所述的组合物,其中所述冷冻保护剂是或是约10% DMSO(体积/体积)。

[1084] 实施方案313.如实施方案294-312中任一项所述的组合物,其是无菌的。

- [1085] 实施方案314.一种容器,其包含如实施方案294-313中任一项所述的组合物。
- [1086] 实施方案315.如实施方案314所述的容器,其是无菌袋。
- [1087] 实施方案316.如实施方案315所述的无菌袋,其中所述袋是冷冻保存兼容袋。
- [1088] 实施方案317.一种治疗有需要的患者的疾病、病状或细胞缺陷的方法,其包括向所述患者施用有效量的如实施方案283-293中任一项所述的群体、如实施方案294-307中任一项所述的组合物,或如实施方案308所述的药物组合物。
- [1089] 实施方案318.如317所述的方法,其中将所述群体配制为包含药学上可接受的赋形剂的药物组合物。
- [1090] 实施方案319.如实施方案317或实施方案318所述的方法,其中所述细胞群包含胰岛细胞,包括 $\beta$ 胰岛细胞。
- [1091] 实施方案320.如实施方案317-319中任一项所述的方法,其中所述胰岛细胞群作为胰岛细胞簇施用。
- [1092] 实施方案321.如实施方案317-320中任一项所述的方法,其中所述胰岛细胞群作为 $\beta$ 胰岛细胞簇施用。
- [1093] 实施方案322.如实施方案317-320中任一项所述的方法,其中所述细胞群是肝细胞。
- [1094] 实施方案323.如实施方案317或实施方案318所述的方法,其中所述细胞群包含T细胞。
- [1095] 实施方案324.如实施方案317或实施方案318所述的方法,其中所述细胞群包含甲状腺细胞。
- [1096] 实施方案325.如实施方案317或实施方案318所述的方法,其中所述细胞群包含皮肤细胞。
- [1097] 实施方案326.如实施方案317或实施方案318所述的方法,其中所述细胞群包含内皮细胞。
- [1098] 实施方案327.如实施方案317或实施方案318所述的方法,其中所述细胞群包含视网膜色素上皮细胞。
- [1099] 实施方案328.如实施方案317-327所述的方法,其中所述病状或疾病选自由以下组成的组:糖尿病、癌症、血管形成障碍、眼部疾病、甲状腺疾病、皮肤疾病和肝脏疾病。
- [1100] 实施方案329.如实施方案317或实施方案318所述的方法,其中所述细胞缺陷与糖尿病相关,或者所述细胞疗法用于治疗糖尿病,任选地其中所述糖尿病是I型糖尿病。
- [1101] 实施方案330.如实施方案329所述的方法,其中所述细胞群是胰岛细胞群,包括 $\beta$ 胰岛细胞群。
- [1102] 实施方案331.如实施方案330所述的方法,其中所述细胞群作为胰岛细胞簇施用。
- [1103] 实施方案332.一种治疗有需要的患者的糖尿病的方法,所述方法包括向所述患者施用有效量的如实施方案283-293中任一项所述的胰岛细胞群、如实施方案294-307中任一项所述的组合物,或如实施方案308所述的药物组合物。
- [1104] 实施方案333.如实施方案330-331中任一项所述的方法,其中所述胰岛细胞簇是 $\beta$ 胰岛细胞簇。
- [1105] 实施方案334.如实施方案317或实施方案318所述的方法,其中所述细胞缺陷与血

管病状或疾病相关,或者所述细胞疗法用于治疗血管病状或疾病。

[1106] 实施方案335.如实施方案334所述的方法,其中所述细胞群是内皮细胞群。

[1107] 实施方案336.如实施方案317或实施方案318所述的方法,其中所述细胞缺陷与自身免疫性甲状腺炎相关,或者所述细胞疗法用于治疗自身免疫性甲状腺炎。

[1108] 实施方案337.如实施方案317或实施方案318所述的方法,其中所述细胞缺陷与肝脏疾病相关,或者所述细胞疗法用于治疗肝脏疾病。

[1109] 实施方案338.如实施方案337所述的方法,其中所述肝脏疾病包括肝硬化。

[1110] 实施方案339.如实施方案337或实施方案338所述的方法,其中所述细胞群是肝细胞群。

[1111] 实施方案340.如实施方案317或实施方案318所述的方法,其中所述细胞缺陷与角膜疾病相关,或者所述细胞疗法用于治疗角膜疾病。

[1112] 实施方案341.如实施方案340所述的方法,其中所述角膜疾病是福克斯营养不良或先天性遗传性内皮营养不良。

[1113] 实施方案342.如实施方案340或实施方案341所述的方法,其中所述细胞群是角膜内皮细胞群。

[1114] 实施方案343.如实施方案317或实施方案318所述的方法,其中所述细胞缺陷与肾脏疾病相关,或者所述细胞疗法用于治疗肾脏疾病。

[1115] 实施方案344.如实施方案343所述的方法,其中所述细胞群是肾细胞群。

[1116] 实施方案345.如实施方案317或实施方案318所述的方法,其中所述细胞疗法用于治疗癌症。

[1117] 实施方案346.如实施方案345所述的方法,其中所述癌症选自由以下组成的组: B细胞急性淋巴细胞白血病(B-ALL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤、肝癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、结直肠癌、肺癌、非小细胞肺癌、急性髓性淋巴细胞白血病、多发性骨髓瘤、胃癌、胃腺癌、胰腺癌、胶质母细胞瘤、神经母细胞瘤、肺鳞状细胞癌、肝细胞癌和膀胱癌。

[1118] 实施方案347.如实施方案317或实施方案318所述的方法,其中所述细胞群是T细胞群或NK细胞群。

[1119] 实施方案348.如实施方案317-347中任一项所述的方法,其中在施用之前扩增并冷冻保存所述细胞。

[1120] 实施方案349.如实施方案317-348中任一项所述的方法,其中施用所述群体包括静脉内注射、肌内注射、血管内注射或移植所述群体。

[1121] 实施方案350.如实施方案349所述的方法,其中所述群体经由肾被膜移植或肌内注射进行移植。

[1122] 实施方案351.如实施方案317-350中任一项所述的方法,其中所述群体来源于供体受试者,其中所述供体的HLA类型与所述患者的HLA类型不匹配。

[1123] 实施方案352.如实施方案317-351中任一项所述的方法,其中所述群体是人细胞群并且所述患者是人患者。

[1124] 实施方案353.如实施方案330-333中任一项所述的方法,其中所述 $\beta$ 胰岛细胞改善所述受试者的葡萄糖耐量。

[1125] 实施方案354.如实施方案353所述的方法,其中所述受试者是糖尿病患者。

- [1126] 实施方案355.如实施方案354所述的方法,其中所述糖尿病患者患有I型糖尿病或II型糖尿病。
- [1127] 实施方案356.如实施方案330-332和353-55中任一项所述的方法,其中葡萄糖耐量相对于施用所述胰岛细胞之前所述受试者的葡萄糖耐量得到改善。
- [1128] 实施方案357.如实施方案330-332和353-356中任一项所述的方法,其中所述 $\beta$ 胰岛细胞降低所述受试者中的外源胰岛素使用。
- [1129] 实施方案358.如实施方案353-357中任一项所述的方法,其中如通过HbA1c水平测量的,葡萄糖耐量得到改善。
- [1130] 实施方案359.如实施方案353-358中任一项所述的方法,其中所述受试者禁食。
- [1131] 实施方案360.如实施方案330-332和351-360中任一项所述的方法,其中所述胰岛细胞改善所述受试者体内的胰岛素分泌。
- [1132] 实施方案361.如实施方案360所述的方法,其中胰岛素分泌相对于施用所述胰岛细胞之前所述受试者的胰岛素分泌得到改善。
- [1133] 实施方案362.如实施方案317-361中任一项所述的方法,其还包括向所述患者施用一种或多种免疫抑制剂。
- [1134] 实施方案363.如实施方案317-361中任一项所述的方法,其中已向所述患者施用一种或多种免疫抑制剂。
- [1135] 实施方案364.如实施方案362或363所述的方法,其中所述一种或多种免疫抑制剂是小分子或抗体。
- [1136] 实施方案365.如实施方案362-364中任一项所述的方法,其中所述一种或多种免疫抑制剂选自自由以下组成的组:环孢菌素、硫唑嘌呤、霉酚酸、霉酚酸酯、皮质类固醇、泼尼松、甲氨蝶呤、金盐、柳氮磺吡啶、抗疟药、布喹那、来氟米特、咪唑立宾、15-脱氧精脒菌素、6-巯基嘌呤、环磷酰胺、雷帕霉素、他克莫司(FK-506)、OKT3、抗胸腺细胞球蛋白、胸腺五肽(胸腺肽- $\alpha$ )和免疫抑制抗体。
- [1137] 实施方案366.如实施方案362-364中任一项所述的方法,其中所述一种或多种免疫抑制剂包括环孢菌素。
- [1138] 实施方案367.如实施方案362-364中任一项所述的方法,其中所述一种或多种免疫抑制剂包括霉酚酸酯。
- [1139] 实施方案368.如实施方案362-364中任一项所述的方法,其中所述一种或多种免疫抑制剂包括皮质类固醇。
- [1140] 实施方案369.如实施方案362-364中任一项所述的方法,其中所述一种或多种免疫抑制剂包括环磷酰胺。
- [1141] 实施方案370.如实施方案362-364中任一项所述的方法,其中所述一种或多种免疫抑制剂包括雷帕霉素。
- [1142] 实施方案371.如实施方案362-364中任一项所述的方法,其中所述一种或多种免疫抑制剂包括他克莫司(FK-506)。
- [1143] 实施方案372.如实施方案362-364中任一项所述的方法,其中所述一种或多种免疫抑制剂包括抗胸腺细胞球蛋白。
- [1144] 实施方案373.如实施方案362-364中任一项所述的方法,其中所述一种或多种免

疫抑制剂是一种或多种免疫调节剂。

[1145] 实施方案374.如实施方案373所述的方法,其中所述一种或多种免疫调节剂是小分子或抗体。

[1146] 实施方案375.如实施方案364或实施方案374所述的方法,其中所述抗体与选自由以下组成的组的一种或多种受体或配体结合:IL-2受体的p75、MHC、CD2、CD3、CD4、CD7、CD28、B7、CD40、CD45、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-4、IL-5、IL-6R、IL-6、IGF、IGFR1、IL-7、IL-8、IL-10、CD11a、CD58,以及与其任何配体结合的抗体。

[1147] 实施方案376.如实施方案362-375中任一项所述的方法,其中在施用所述工程化细胞之前向所述患者施用或已向所述患者施用所述一种或多种免疫抑制剂。

[1148] 实施方案377.如实施方案362-376中任一项所述的方法,其中在施用所述工程化细胞之前至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天向所述患者施用或已向所述患者施用所述一种或多种免疫抑制剂。

[1149] 实施方案378.如实施方案362-376中任一项所述的方法,其中在施用所述工程化细胞之前至少1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周或更多周向所述患者施用或已向所述患者施用所述一种或多种免疫抑制剂。

[1150] 实施方案379.如实施方案362-376中任一项所述的方法,其中在施用所述工程化细胞之后至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天向所述患者施用或已向所述患者施用所述一种或多种免疫抑制剂。

[1151] 实施方案380.如实施方案362-376中任一项所述的方法,其中在施用所述工程化细胞之后至少1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周或更多周向所述患者施用或已向所述患者施用所述一种或多种免疫抑制剂。

[1152] 实施方案381.如实施方案362-376中任一项所述的方法,其中在第一次施用所述工程化细胞的同一天向所述患者施用或已向所述患者施用所述一种或多种免疫抑制剂。

[1153] 实施方案382.如实施方案362-376中任一项所述的方法,其中在施用所述工程化细胞之后向所述患者施用或已向所述患者施用所述一种或多种免疫抑制剂。

[1154] 实施方案383.如实施方案362-376中任一项所述的方法,其中在第一次和/或第二次施用所述工程化细胞的施用之后向所述患者施用或已向所述患者施用所述一种或多种免疫抑制剂。

[1155] 实施方案384.如实施方案362-376中任一项所述的方法,其中在第一次和/或第二次施用所述工程化细胞的施用之前向所述患者施用或已向所述患者施用所述一种或多种免疫抑制剂。

[1156] 实施方案385.如实施方案362-376中任一项所述的方法,其中在第一次和/或第二次施用所述工程化细胞的施用之前至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天向所述患者施用或已向所述患者施用所述一种或多种免疫抑制剂。

[1157] 实施方案386.如实施方案362-376中任一项所述的方法,其中在第一次和/或第二次施用所述工程化细胞的施用之前至少1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周或更多周向所述患者施用或已向所述患者施用所述一种或多种免疫抑制剂。

[1158] 实施方案387.如实施方案362-376中任一项所述的方法,其中在第一次和/或第二次施用所述工程化细胞的施用之后至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天向所述患

者施用或已向所述患者施用所述一种或多种免疫抑制剂。

[1159] 实施方案388.如实施方案362-376中任一项所述的方法,其中在第一次和/或第二次施用所述工程化细胞的施用之后至少1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周或更多周向所述患者施用或已向所述患者施用所述一种或多种免疫抑制剂。

[1160] 实施方案389.如实施方案362-388中任一项所述的方法,其中与施用的一种或多种免疫抑制剂的剂量相比,所述一种或多种免疫抑制剂以较低的剂量施用以降低不包含所述工程化细胞的修饰的免疫原性细胞的免疫排斥。

[1161] 实施方案390.如实施方案361-389中任一项所述的方法,其中所述工程化细胞能够受控杀伤所述工程化细胞。

[1162] 实施方案391.如实施方案361-390中任一项所述的方法,其中所述工程化细胞包含自杀基因或自杀开关。

[1163] 实施方案392.如实施方案391所述的方法,其中所述自杀基因或所述自杀开关在药物或前药的存在下或在被选择性外源化合物活化后诱导受控细胞死亡。

[1164] 实施方案393.如实施方案391或实施方案392所述的方法,其中所述自杀基因或所述自杀开关是能够诱导所述工程化细胞凋亡的诱导型蛋白。

[1165] 实施方案394.如实施方案393所述的方法,其中所述能够诱导所述工程化细胞凋亡的诱导型蛋白是半胱氨酸蛋白酶蛋白。

[1166] 实施方案395.如实施方案394所述的方法,其中所述半胱氨酸蛋白酶蛋白是半胱氨酸蛋白酶9。

[1167] 实施方案396.如实施方案393或实施方案394所述的方法,其中所述自杀基因或自杀开关选自自由以下组成的组:胞嘧啶脱氨酶(CyD)、疱疹病毒胸苷激酶(HSV-Tk)、诱导型半胱氨酸蛋白酶9(iCaspase9)和雷帕霉素活化的半胱氨酸蛋白酶9(rapaCasp9)。

[1168] 实施方案397.如实施方案391-396中任一项所述的方法,其中在向所述患者施用所述一种或多种免疫抑制剂之后,活化所述自杀基因或所述自杀开关以诱导受控细胞死亡。

[1169] 实施方案398.如实施方案391-396中任一项所述的方法,其中在向所述患者施用所述一种或多种免疫抑制剂之前,活化所述自杀基因或所述自杀开关以诱导受控细胞死亡。

[1170] 实施方案399.如实施方案391-398中任一项所述的方法,其中在向所述患者施用所述工程化细胞之后,活化所述自杀基因或所述自杀开关以诱导受控细胞死亡。

[1171] 实施方案400.如实施方案391-399中任一项所述的方法,其中如果对所述患者具有细胞毒性或其他负面后果,活化所述自杀基因或所述自杀开关以诱导受控细胞死亡。

[1172] 实施方案401.如实施方案361-391中任一项所述的方法,其包括施用允许所述工程化细胞群中的工程化细胞耗竭的剂。

[1173] 实施方案402.如实施方案401所述的方法,其中允许所述工程化细胞耗竭的所述剂是识别在所述工程化细胞表面上表达的蛋白质的抗体。

[1174] 实施方案403.如实施方案402所述的方法,其中所述抗体选自自由识别CCR4、CD16、CD19、CD20、CD30、EGFR、GD2、HER1、HER2、MUC1、PSMA和RQR8的抗体组成的组。

[1175] 实施方案404.如实施方案401或实施方案402所述的方法,其中所述抗体选自自由以

下组成的组：莫格利珠单抗、AFM13、MOR208、奥妥珠单抗、乌妥昔单抗、奥卡妥珠单抗、利妥昔单抗、利妥昔单抗-R11b、托木妥昔单抗、R05083945 (GA201)、西妥昔单抗、Hu14.18K322A、Hu14.18-IL2、Hu3F8、地妥昔单抗、c.60C3-R11c及其生物类似物。

[1176] 实施方案405.如实施方案317-361和401-404中任一项所述的方法,其包括施用识别所述工程化细胞表面上的一种或多种致耐受因子的剂。

[1177] 实施方案406.如实施方案405所述的方法,其中所述工程化细胞被工程化以表达所述一种或多种致耐受因子。

[1178] 实施方案407.如实施方案405或实施方案406所述的方法,其中所述一种或多种致耐受因子是CD47。

[1179] 实施方案408.如实施方案317-407中任一项所述的方法,其还包括向所述患者施用一种或多种额外的治疗剂。

[1180] 实施方案409.如实施方案317-408中任一项所述的方法,其中已向所述患者施用一种或多种额外的治疗剂。

[1181] 实施方案410.如实施方案317-409中任一项所述的方法,其还包括监测所述方法的治疗功效。

[1182] 实施方案411.如实施方案317-410中任一项所述的方法,其还包括监测所述方法的预防功效。

[1183] 实施方案412.如实施方案410或实施方案411所述的方法,其中重复所述方法直至出现一种或多种疾病症状的期望抑制。

[1184] 实施方案413.如实施方案1-66和275-282中任一项所述的工程化细胞,其中所述工程化细胞包含编码自杀基因或自杀开关的外源多核苷酸。

[1185] 实施方案414.如实施方案413所述的工程化细胞,其中所述自杀基因或自杀开关选自自由以下组成的组:胞嘧啶脱氨酶(CyD)、疱疹病毒胸苷激酶(HSV-Tk)、诱导型半胱氨酸蛋白酶9(iCaspase9)和雷帕霉素活化的半胱氨酸蛋白酶9(rapaCasp9)。

[1186] 实施方案415.如实施方案413或实施方案414所述的工程化细胞,其中所述自杀基因或自杀开关以及与所述自杀基因或所述安全开关相关的基因由整合到所述工程化细胞基因组中的双顺反子盒表达。

[1187] 实施方案416.如实施方案413-415中任一项所述的工程化细胞,其中所述自杀基因或自杀开关和所述一种或多种致耐受因子由整合到所述工程化细胞基因组中的双顺反子盒表达。

[1188] 实施方案417.如实施方案415或实施方案416所述的工程化细胞,其中所述双顺反子盒是通过非靶向插入到所述工程化细胞的基因组中,任选地通过使用慢病毒载体将所述外源多核苷酸引入到所述细胞中进行整合的。

[1189] 实施方案418.如实施方案417所述的工程化细胞,其中所述双顺反子盒是通过靶向插入到所述细胞的靶基因组基因座中进行整合的,任选地其中所述靶向插入是通过使用同源定向修复的核酸酶介导的基因编辑进行的。

[1190] 实施方案419.如实施方案412-418中任一项所述的工程化细胞,其中所述一种或多种致耐受因子是CD47。

[1191] 实施方案420.如实施方案67-274中任一项所述的方法,其中所述工程化细胞包含

编码自杀基因或自杀开关的外源多核苷酸。

[1192] 实施方案421.如实施方案420所述的方法,其中所述自杀基因选自由以下组成的组:胞嘧啶脱氨酶(CyD)、疱疹病毒胸苷激酶(HSV-Tk)、诱导型半胱氨酸蛋白酶9(iCaspase9)和雷帕霉素活化的半胱氨酸蛋白酶9(rapaCasp9)。

[1193] 实施方案422.如实施方案420或实施方案421所述的方法,其中所述自杀基因或自杀开关以及与所述自杀基因或所述安全开关相关的基因由整合到所述工程化细胞基因组中的双顺反子盒表达。

[1194] 实施方案423.如实施方案420-422中任一项所述的方法,其中所述自杀基因或自杀开关和所述一种或多种致耐受因子由整合到所述工程化细胞基因组中的双顺反子盒表达。

[1195] 实施方案424.如实施方案422或实施方案423所述的方法,其中所述双顺反子盒是通过非靶向插入到所述工程化细胞的基因组中进行整合的。

[1196] 实施方案425.如实施方案424所述的方法,其中所述双顺反子盒是通过靶向插入到所述工程化细胞的靶基因组基因座中进行整合的。

[1197] 实施方案426.如实施方案420-425中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受因子是CD47。

[1198] 实施方案427.如实施方案294-313中任一项所述的组合物,其中所述工程化细胞群中的工程化细胞包含编码自杀基因或自杀开关的外源多核苷酸。

[1199] 实施方案428.如实施方案427所述的组合物,其中所述自杀基因或自杀开关选自由以下组成的组:胞嘧啶脱氨酶(CyD)、疱疹病毒胸苷激酶(HSV-Tk)、诱导型半胱氨酸蛋白酶9(iCaspase9)和雷帕霉素活化的半胱氨酸蛋白酶9(rapaCasp9)。

[1200] 实施方案429.如实施方案427或实施方案428所述的组合物,其中所述自杀基因以及与所述自杀基因或所述安全开关相关的基因由整合到所述工程化细胞群中的工程化细胞基因组中的双顺反子盒表达。

[1201] 实施方案430.如实施方案427-429中任一项所述的方法,其中所述自杀基因或自杀开关和所述外源CD47由整合到所述工程化细胞基因组中的双顺反子盒表达。

[1202] 实施方案431.如实施方案429或实施方案430所述的组合物,其中所述双顺反子盒是通过非靶向插入到所述基因组中,任选地通过使用慢病毒载体将所述外源多核苷酸引入到所述工程化细胞群中的工程化细胞中进行整合的。

[1203] 实施方案432.如实施方案429或实施方案430所述的组合物,其中所述双顺反子盒是通过靶向插入到所述工程化细胞群中的工程化细胞的靶基因组基因座中进行整合的,任选地其中所述靶向插入是通过使用同源定向修复的核酸酶介导的基因编辑进行的。

[1204] VII. 实施例

[1205] 包括以下实施例仅用于说明目的,并不旨在限制本发明的范围。

[1206] 实施例1: B2M<sup>-/-</sup>; CD47tg原代β胰岛细胞的在移植研究中的生存和功能

[1207] 为了研究降低MHC I类和MHC II类表达并增加CD47表达对同种异体受体中原代β胰岛细胞移植的影响,用编码CD47的慢病毒载体转导来自B2M敲除C57BL/6(B6)小鼠(MHC单倍型H2<sup>b</sup>)的原代β胰岛细胞以生成小鼠B2M<sup>-/-</sup>; CD47tg原代β胰岛细胞。从C57BL/6(B6)小鼠分离的B2M<sup>-/-</sup>原代β胰岛细胞不天然表达MHC-II分子(图1),MHC-II分子在刺激后也不上调。将



小鼠 $B2M^{-/-};CD47tg$ 工程化原代 $\beta$ 胰岛细胞移植到BALB/c糖尿病小鼠模型受体(MHC单倍型 $H2^d$ )中。随着时间的推移监测移植的小鼠 $B2M^{-/-};CD47tg$  B6原代 $\beta$ 胰岛细胞与移植的小鼠野生型B6胰岛细胞相比的存活和功能。

#### [1208] A. 方法

[1209] 糖尿病小鼠模型。每天给二十五只BALB/c (MHC单倍型 $H2^d$ ) 小鼠注射低剂量链脲佐菌素(STZ) (60mg/kg腹腔注射),持续5天(第-5天至第0天)。将STZ溶解在柠檬酸盐缓冲液(10mg/ml储备液)中并稀释至150 $\mu$ L的注射体积,用于腹腔内(i.p.)注射。第二天早上,将磷酸盐缓冲盐水(PBS) (1mL)腹腔注射施用于小鼠以保持肾脏健康。

[1210] 血糖测量。根据标准方案,在停食后4小时进行血糖测量。

[1211] 小鼠原代 $\beta$ 胰岛细胞的生成。从B2M敲除C57BL/6 (B6) 小鼠(MHC单倍型 $H2^b$ )分离 $B2M^{-/-}$ 原代 $\beta$ 胰岛细胞。用编码小鼠CD47转基因的慢病毒载体转导分离的小鼠 $B2M^{-/-}$ 原代 $\beta$ 胰岛细胞。从野生型B6小鼠中分离的原代 $\beta$ 胰岛细胞用作对照(野生型胰岛)。小鼠野生型和小鼠 $B2M^{-/-};CD47tg$ 原代 $\beta$ 胰岛细胞均用荧光素酶表达构建体转导,以经由生物发光成像(BLI)监测细胞存活。

[1212] 流式细胞术。使用抗体特异性试剂通过流式细胞术评估原代 $\beta$ 胰岛细胞上MHC I类、MHC II类和CD47的表面表达。使用同种型抗体作为对照。

[1213] 移植研究设计和施用。在施用STZ诱导糖尿病后,将二十五只BALB/c MHC单倍型 $H2^d$ 小鼠(小鼠体重18-20g)随机分为5个研究组(每个研究组 $n=5$ ),其中各组基于施用的细胞(小鼠野生型与小鼠 $B2M^{-/-};CD47tg$  B6原代 $\beta$ 胰岛细胞)和/或施用途径(直接注射到肾被膜内与肌内(i.m.)施用)而有所不同。研究组如下:小鼠野生型B6原代 $\beta$ 胰岛(luc+)肾被膜移植;小鼠野生型B6原代 $\beta$ 胰岛(luc+)肌内移植;无移植糖尿病对照;小鼠 $B2M^{-/-};CD47tg$  B6原代 $\beta$ 胰岛(luc+)肾被膜移植;和小鼠 $B2M^{-/-};CD47tg$  B6原代 $\beta$ 胰岛(luc+)肌内移植。

[1214] 通过肾被膜注射或肌内注射将每簇约1500个细胞的胰岛簇移植到小鼠体内。对于肾被膜注射,每只小鼠移植300个簇(约450,000个细胞)。对于肌内注射,每只小鼠注射600个簇(约900,000个细胞)。将第0天(d0)定义为移植日。

[1215] 通过生物发光成像(BLI)在第0天、第3天、第5天、第7天、第9天、第11天、第13天、第17天、第21天、第25天和第29天测量小鼠 $B2M^{-/-};CD47tg$  B6原代 $\beta$ 胰岛的细胞存活率(对于野生型B6原代 $\beta$ 胰岛,第5天后停止BLI成像,因为第5天后未检测到信号)。在胰岛植入前(STZ前、第-3天、第-2天和第-1天)以及第0天、第3天、第14天、第21天、第28天、第30天、第31天、第32天、第36天,禁食4小时后测量血糖。在第29天,从植入肾被膜的群组中取出肾脏进行组织病理学分析。原代 $\beta$ 胰岛细胞分离如以下中所述进行:Li等人“A protocol for islet isolation from mouse pancreas.”Nat Protoc.第4卷,11(2009):1649-52,其内容通过引用整体并入本文。肾脏分离如以下中所述进行:Mathews等人“New mouse model to study islet transplantation in insulin-dependent diabetes mellitus.”Transplantation.第73卷,8(2006):1333-6。

#### [1216] B. 结果

[1217] 小鼠 $B2M^{-/-};CD47tg$  B6原代 $\beta$ 胰岛细胞不表达MHC-I或MHC-II,但具有增加的CD47表达。为了评价小鼠 $B2M^{-/-};CD47tg$ 原代 $\beta$ 胰岛细胞中MHC-I和MHC-II以及CD47的表达,进行流式细胞术。分离的小鼠 $B2M^{-/-};CD47tg$ 原代 $\beta$ 胰岛细胞在移植之前和之后对于MHC-I和MHC-II

呈阴性(图1)。未工程化以过表达CD47的小鼠 $B2M^{-/-}$ 原代 $\beta$ 胰岛细胞表现出低水平的CD47表面表达(比同种型对照高3.3倍,如图2A中所示)。小鼠 $B2M^{-/-};CD47tg$ 原代 $\beta$ 胰岛细胞示出了增加的CD47的表达(比同种型对照高48倍,如图2B所示)。

[1218] 小鼠 $B2M^{-/-};CD47tg$ 原代 $\beta$ 胰岛细胞在同种异体移植后存活。肌肉注射后小鼠原代 $\beta$ 胰岛细胞的BLI成像定量结果示于图3A(小鼠野生型B6原代 $\beta$ 胰岛细胞)和图3C(小鼠 $B2M^{-/-};CD47tg$  B6原代 $\beta$ 胰岛细胞),并且肾被膜注射后小鼠原代 $\beta$ 胰岛细胞的BLI成像定量结果示于图4A(小鼠野生型B6原代 $\beta$ 胰岛细胞)和图4C(小鼠 $B2M^{-/-};CD47tg$  B6原代 $\beta$ 胰岛细胞)。肌肉注射后小鼠原代 $\beta$ 胰岛细胞的对应BLI图像示于图3B(小鼠野生型B6原代 $\beta$ 胰岛细胞)和图3D(小鼠 $B2M^{-/-};CD47tg$  B6原代 $\beta$ 胰岛细胞),并且肾被膜注射后小鼠原代 $\beta$ 胰岛细胞的对应BLI图像示于图4B(小鼠野生型B6原代 $\beta$ 胰岛细胞)和图4D(小鼠 $B2M^{-/-};CD47tg$  B6原代 $\beta$ 胰岛细胞)。在施用小鼠原代 $\beta$ 胰岛细胞后,最初在所有组的肌肉注射部位观察到生物发光。然而,对于移植的小鼠野生型B6原代 $\beta$ 胰岛细胞检测到的光子数量在移植后的前5天内迅速下降(图3A和图4A),表明小鼠野生型B6原代 $\beta$ 胰岛细胞可能由于免疫反应死亡。相比之下,从移植的小鼠 $B2M^{-/-};CD47tg$  B6原代 $\beta$ 胰岛细胞中检测到的光子数量在移植后29天期间增加,表明小鼠 $B2M^{-/-};CD47tg$  B6原代 $\beta$ 胰岛细胞的存活和生长(图3C和图4C)。

[1219] 小鼠 $B2M^{-/-};CD47tg$ 原代 $\beta$ 胰岛细胞在同种异体移植后发挥功能。为了分析移植的小鼠原代 $\beta$ 胰岛细胞的功能,在移植后指定的时间点测量血糖水平。首次接受试验(未处理)的小鼠的血糖水平在80与120mg/dL之间,并且糖尿病(STZ处理)小鼠的血糖水平 $>200$ mg/dL。在整个研究期间,接受肌肉注射或肾被膜注射野生型B6胰岛的糖尿病(STZ处理)小鼠的血糖水平仍然很高( $>400$ mg/dL),分别如图3E和图4E所示。相比之下,接受肌肉注射或肾被膜注射小鼠 $B2M^{-/-};CD47tg$  B6原代 $\beta$ 胰岛细胞的糖尿病(STZ处理)小鼠的血糖水平在移植后很快下降至非糖尿病水平(80与120mg/dL之间),分别如图3F和图4F所示。在肾被膜注射模型中,在第29天去除肾脏后血糖水平开始升高(图4F)。

[1220] 总之,这些数据表明小鼠 $B2M^{-/-};CD47tg$ 原代 $\beta$ 胰岛细胞在糖尿病模型中进行同种异体移植后能够存活并发挥功能(例如,恢复由于糖尿病而失去的血糖控制)。

[1221] 实施例2:小鼠 $B2M^{-/-};CD47tg$ 原代 $\beta$ 胰岛细胞在移植研究中的免疫功能

[1222] 为了研究降低MHC I类和MHC II类表达和增加CD47表达对小鼠原代 $\beta$ 胰岛细胞的免疫逃避作用,对如实施例1中所述生成的被移植到BALB/c糖尿病小鼠模型受体(MHC单倍型 $H2^d$ )中的小鼠 $B2M^{-/-};CD47tg$ 原代 $\beta$ 胰岛细胞进行了免疫功能测定。评价了与小鼠野生型B6原代 $\beta$ 胰岛细胞和小鼠 $B2M^{-/-}$  B6原代 $\beta$ 胰岛细胞相比,小鼠 $B2M^{-/-};CD47tg$ 原代 $\beta$ 胰岛细胞移植引起的存活和免疫反应。

[1223] A. 方法

[1224] 移植研究设计和施用。在肌肉(i.m.)施用STZ诱导糖尿病后,将十五只BALB/c MHC单倍型 $H2^d$ 小鼠(小鼠体重18-20g)随机分为5个研究组(每个研究组 $n=5$ ),其中各组基于施用的细胞(野生型与 $B2M^{-/-}CD47tg$  B6胰岛细胞)而有所不同。研究组如下:小鼠野生型B6原代 $\beta$ 胰岛细胞(luc+)肌肉移植;小鼠 $B2M^{-/-};CD47tg$  B6原代 $\beta$ 胰岛细胞(luc+)肌肉移植和无移植糖尿病对照。

[1225] 通过肌肉注射将每簇约600个细胞的胰岛簇移植到小鼠体内。对于肌肉注射,每只小鼠注射600个簇(约900,000个细胞)。将第0天(d0)定义为移植日。在胰岛植入前(STZ前、

第-3天、第-2天和第-1天)以及第6天,禁食4小时后测量血糖。在第6天,处死小鼠以进行免疫测定分析。

[1226] T细胞酶联免疫吸收斑点 (ELISPOT) 测定。通过ELISPOT检测小鼠原代 $\beta$ 胰岛细胞中干扰素  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) 分泌CD8(+) T细胞。

[1227] 流式细胞术。通过流式细胞术评估原代 $\beta$ 胰岛细胞中供体特异性抗体 (DSA) 的表达。

[1228] B. 结果

[1229] 在同种异体移植后,小鼠 $B2M^{-/-};CD47^{tg}$ 原代 $\beta$ 胰岛细胞发挥功能。为了分析移植的 $\beta$ 胰岛细胞的功能,在移植后6天测量血糖水平。在整个研究期间,接受肌内注射小鼠野生型B6原代 $\beta$ 胰岛细胞的糖尿病 (STZ处理) 小鼠的血糖水平仍然很高 (>400mg/dL),如图5A所示。相比之下,接受肌内注射小鼠 $B2M^{-/-};CD47^{tg}$  B6原代 $\beta$ 胰岛细胞的糖尿病 (STZ处理) 小鼠的血糖水平在移植后很快下降,如图5A所示。这些数据表明小鼠 $B2M^{-/-};CD47^{tg}$  B6原代 $\beta$ 胰岛细胞在同种异体移植后能够发挥功能(例如,恢复由于糖尿病而失去的血糖控制)。

[1230] 同种异体移植后的小鼠 $B2M^{-/-};CD47^{tg}$ 原代 $\beta$ 胰岛细胞免疫反应。为了分析对移植的 $\beta$ 胰岛细胞的免疫反应,使用ELISPOT测定来评价CD8+ T细胞分泌IFN $\gamma$ 细胞因子的水平。如图5B所示,与移植的小鼠野生型原代 $\beta$ 胰岛细胞相比,移植的小鼠 $B2M^{-/-};CD47^{tg}$  B6原代 $\beta$ 胰岛细胞表现出较低水平的IFN $\gamma$ 。与移植的小鼠野生型原代 $\beta$ 胰岛细胞相比,通过流式细胞术测量的移植的小鼠 $B2M^{-/-};CD47^{tg}$  B6原代 $\beta$ 胰岛细胞中的DSA IgG水平也较低(图5C)。

[1231] 这些数据表明小鼠 $B2M^{-/-};CD47^{tg}$  B6原代 $\beta$ 胰岛细胞在移植后不会诱导对细胞的免疫反应,在施用后能够逃避NK细胞介导的细胞毒性,并受到保护而免于抗体介导的排斥。

[1232] 实施例3:体外小鼠 $B2M^{-/-};CD47^{tg}$ 原代 $\beta$ 胰岛细胞的免疫逃避

[1233] 为了研究降低MHC I类和MHC II类表达和增加CD47表达对原代 $\beta$ 胰岛细胞的免疫逃避作用,对如实施例1中所述生成的小鼠 $B2M^{-/-};CD47^{tg}$  B6原代 $\beta$ 胰岛细胞进行了自然杀伤(NK)和巨噬细胞杀伤测定。随着时间的推移监测小鼠 $B2M^{-/-};CD47^{tg}$  B6原代 $\beta$ 胰岛细胞与小鼠野生型B6原代 $\beta$ 胰岛细胞和小鼠 $B2M^{-/-}$  B6原代 $\beta$ 胰岛细胞相比的通过NK和巨噬细胞的体外杀伤。

[1234] A. 方法

[1235] NK细胞培养。在进行测定之前,将人原代NK细胞 (StemCell Technologies) 在RPMI-1640加10%血清青霉素-链霉素 (pen/strep) 中培养。

[1236] 巨噬细胞从外周血单核细胞 (PBMC) 分化而来。通过Ficoll分离法从新鲜血液分离PBMC,并将PBMC重悬于具有10%血清pen/strep的RPMI-1640中。在10ng/mL人巨噬细胞集落刺激因子 (M-CSF) 的存在下将细胞铺板。从第六天开始,在进行测定之前,将人IL-2添加到培养基中24小时。

[1237] NK细胞和巨噬细胞杀伤测定。NK细胞杀伤测定和巨噬细胞杀伤测定在XCelligence SP平台和MP平台 (ACEA Biosciences) 上进行,以提供对细胞增殖和细胞活力的无标记监测。将 $4 \times 10^5$ 个小鼠野生型B6原代 $\beta$ 胰岛细胞、小鼠 $B2M^{-/-}$  B6原代 $\beta$ 胰岛细胞或小鼠 $B2M^{-/-};CD47^{tg}$  B6原代 $\beta$ 胰岛细胞(混合或单克隆)铺板于96孔胶原蛋白涂层E板。XCelligence软件用于测量细胞指数 (CI),作为粘附和细胞杀伤的量度(细胞指数的降低表明细胞杀伤的增加)。CI值达到0.7后,以0.5:1、0.8:1或1:1的效应细胞与靶标 (E:T) 比添加

人NK细胞或人巨噬细胞,并添加或不添加1ng/mL人IL-2或人IL-15。在一些情况下,在添加靶细胞之前,用人Fc受体(FcR)阻断剂(浓度1:5)预处理NK细胞。一些孔用抗MIAP410封闭抗体(10 $\mu$ g/mL,克隆B6.H12,小鼠IgG1, $\kappa$ )进行预处理。

[1238] 流式细胞术。使用抗体特异性试剂通过流式细胞术评估原代 $\beta$ 胰岛细胞上CD47的表面表达。使用同种型抗体作为对照。

[1239] B. 结果

[1240] 小鼠B2M<sup>-/-</sup>;CD47tg原代 $\beta$ 胰岛细胞逃避NK细胞和巨噬细胞杀伤。在存在或不存在抗MIAP410抗体的情况下,没有观察到NK和巨噬细胞介导的对从野生型B6小鼠分离的原代 $\beta$ 胰岛细胞(小鼠WT B6原代 $\beta$ 胰岛细胞)的细胞杀伤(图6A和6D,NK细胞;以及图7A和7D,巨噬细胞)。相比之下,小鼠B2M<sup>-/-</sup>B6原代 $\beta$ 胰岛细胞被NK细胞(图6B)和巨噬细胞(图7B)杀伤,表明小鼠B2M<sup>-/-</sup>B6原代 $\beta$ 胰岛细胞被NK细胞和巨噬细胞识别为外来细胞,从而导致细胞杀伤。将抗MIAP410抗体添加到小鼠B2M<sup>-/-</sup>B6原代 $\beta$ 胰岛细胞和NK细胞或巨噬细胞的共培养物中没有进一步影响细胞杀伤(图6E和7E)。

[1241] 相比之下,小鼠B2M<sup>-/-</sup>CD47tg B6原代 $\beta$ 胰岛细胞不表现出NK介导的细胞杀伤(图6C)或巨噬细胞介导的细胞杀伤(图7C)。然而,在抗MIAP410抗体的存在下,CD47保护作用降低,并且观察到NK细胞(图6F)和巨噬细胞(图7F)的细胞杀伤,类似于在未用CD47转基因工程化的小鼠B2M<sup>-/-</sup>B6原代 $\beta$ 胰岛细胞中观察到的结果(图6B和6E,NK细胞;以及图7B和7E,巨噬细胞)。这些数据表明小鼠B2M<sup>-/-</sup>;CD47tg B6原代 $\beta$ 胰岛细胞有效逃避NK细胞和巨噬细胞的免疫反应。

[1242] 小鼠B2M<sup>-/-</sup>;CD47tg原代 $\beta$ 胰岛细胞逃避NK细胞杀伤的CD47表达。观察到从野生型B6小鼠(小鼠WT B6原代 $\beta$ 胰岛细胞)分离的各种B2M<sup>-/-</sup>;CD47tg原代 $\beta$ 胰岛细胞的NK介导的细胞杀伤作为不同CD47转基因表达的函数。具有较低CD47转基因过表达的小鼠B2M<sup>-/-</sup>;CD47tg B6原代 $\beta$ 胰岛细胞表现出NK介导的细胞杀伤(图8A至8H)。相比之下,具有较高CD47转基因过表达的小鼠B2M<sup>-/-</sup>;CD47tg B6原代 $\beta$ 胰岛细胞不表现出NK介导的细胞杀伤(图8I至8N)。这些结果证实,原代 $\beta$ 胰岛细胞中的CD47过表达有效逃避NK细胞的免疫反应。

[1243] 实施例4: B2M<sup>-/-</sup>;CD47tg人原代胰岛细胞的体外表征

[1244] 此实施例描述了表征低免疫原代人 $\beta$ 胰岛细胞的研究,所述细胞被工程化以(1)敲除B2M(B2M<sup>-/-</sup>)以降低HLA I类表达和(2)过表达外源CD47(CD47tg)。与野生型(WT)原代人 $\beta$ 胰岛细胞或B2M<sup>-/-</sup>原代人 $\beta$ 胰岛细胞相比,监测低免疫(B2M<sup>-/-</sup>;CD47tg)原代 $\beta$ 胰岛细胞的胰岛素分泌并保护其免受自然杀伤(NK)细胞和巨噬细胞的细胞杀伤。WT人原代胰岛细胞不表达HLA II类(图9C),因此未进行工程化以改变HLA II类分子的表达。低免疫细胞和B2M<sup>-/-</sup>细胞是从WT细胞工程化而来,因此来自同一供体。

[1245] A. 方法

[1246] 人原代胰岛细胞的生成和细胞工程化。使用标准技术从两个尸体供体(供体1和供体2)分离原代 $\beta$ 胰岛细胞。此类技术是本领域已知的,包括如J. Kerr-Conte等人, Transplantation, 89, 2010中所述。为了生成低免疫细胞,使用标准CRISPR/Cas9基因编辑技术工程化分离的细胞以敲除B2M,并使用含有编码CD47的多核苷酸的慢病毒载体用编码外源CD47蛋白的转基因(tg)进行转导。通过流式细胞术对低免疫胰岛进行分类,以得到HLA I/II类阴性和CD47过表达细胞。

[1247] 胰岛素分泌。使用标准葡萄糖刺激胰岛素分泌 (GSIS) 测定来测量体外胰岛素分泌。U-PLEX® Meso Scale Discovery (MSD) 测定用于检测胰岛素分泌。简而言之,在2mL培养基中使用100,000个细胞,并测量24小时内的总胰岛素分泌。

[1248] 流式细胞术。使用抗体特异性试剂通过流式细胞术评估人原代胰岛细胞上HLA I类、HLA II类和CD47的表面表达。使用同种型抗体作为对照。

[1249] NK细胞和巨噬细胞杀伤测定。NK细胞杀伤测定和巨噬细胞杀伤测定在XCelligence SP平台和MP平台(ACEA Biosciences)上进行以提供对细胞增殖和细胞活力的无标记监测。将 $4 \times 10^5$ 个野生型人原代胰岛细胞、 $B2M^{-/-}$ 人原代胰岛细胞或 $B2M^{-/-}$ ,CD47tg人原代胰岛细胞(混合或单克隆)铺板于96孔胶原蛋白涂层E板。XCelligence软件用于测量细胞指数(CI),作为粘附和细胞杀伤的量度(细胞指数的降低表明细胞杀伤的增加)。CI值达到0.7后,以1:1的效应细胞与靶标(E:T)比添加人原代NK细胞或从外周血单核细胞分化的具有巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)的人巨噬细胞。

[1250] B. 结果

[1251] 研究结果总结如下。示出了一个供体的代表性结果,但在至少两个额外的供体中观察到了类似结果。

[1252]  $B2M^{-/-}$ CD47tg编辑不影响人原代胰岛细胞的细胞形态或组成。为了评价细胞形态,对WT人原代胰岛细胞和 $B2M^{-/-}$ ;CD47tg人原代胰岛细胞进行了4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)、胰岛素和胰高血糖素的免疫组织化学(IHC)染色。结果证明,形态学上没有差异表明对人原代胰岛的 $B2M^{-/-}$ ;CD47tg编辑似乎不会影响人原代胰岛形态。此外,与WT人原代胰岛细胞组成相比, $B2M^{-/-}$ ;CD47tg编辑不影响人原代胰岛细胞组成(图9A)。

[1253]  $B2M^{-/-}$ CD47tg人原代胰岛细胞不表达HLA-I或HLA-II,但具有增加的CD47表达。为了评价 $B2M^{-/-}$ ;CD47tg人原代胰岛细胞中HLA-I和HLA-II以及CD47的表达,进行流式细胞术。 $B2M^{-/-}$ ;CD47tg人原代胰岛细胞对于HLA-I(图9C)和HLA-II(图9E)呈阴性,而WT人原代胰岛细胞以高水平表达HLA I类(图9B)并且不表达HLA II类(图9D)。与WT人原代胰岛细胞相比(图9F), $B2M^{-/-}$ ;CD47tg人原代胰岛细胞示出了增加的CD47的表达(比同种型对照高48倍和51倍,如图9G所示)。

[1254]  $B2M^{-/-}$ CD47tg人原代胰岛细胞保留胰岛素分泌能力。代表性供体的 $B2M^{-/-}$ CD47tg人原代胰岛细胞在体外保留了与WT人原代胰岛细胞类似的胰岛素分泌能力,如图9H所示。这些数据表明对 $\beta$ 胰岛细胞的低免疫修饰不影响胰岛素分泌。

[1255]  $B2M^{-/-}$ ;CD47tg人原代胰岛细胞逃避NK细胞和巨噬细胞杀伤。WT人原代胰岛细胞不被NK细胞(图9I)或巨噬细胞(图9L)杀伤。相比之下,具有降低的HLA I类和HLA II类的表达的 $B2M^{-/-}$ 人原代胰岛细胞被NK细胞(图9J)和巨噬细胞(图9M)杀伤,表明 $B2M^{-/-}$ 人原代胰岛细胞被NK细胞和巨噬细胞识别为外来细胞,从而导致细胞杀伤。

[1256] 相比之下, $B2M^{-/-}$ CD47tg人原代胰岛细胞不表现出NK介导的细胞杀伤(图9K)或巨噬细胞介导的细胞杀伤(图9N)。这些数据表明,低免疫( $B2M^{-/-}$ ;CD47tg)人原代胰岛细胞受到CD47过表达保护,并且能够有效逃避NK细胞和巨噬细胞的免疫反应。

[1257] 实施例5:糖尿病人源化小鼠移植研究中的 $B2M^{-/-}$ 和 $B2M^{-/-}$ ;CD47tg人原代胰岛细胞的生存和功能

[1258] 如实施例4中所述产生低免疫( $B2M^{-/-}$ ;CD47tg)和双敲除( $B2M^{-/-}$ )人原代胰岛细胞,

并将其移植到同种异体糖尿病人源化NSG-SGM3受体小鼠中。随着时间的推移监测小鼠糖尿病的发病率以及移植的B2M<sup>-/-</sup>和B2M<sup>-/-</sup>;CD47tg人原代胰岛细胞与移植的野生型人原代胰岛细胞相比的存活和功能。

#### [1259] A. 方法

[1260] 移植研究设计和施用。在施用STZ诱导糖尿病后,将二十五只人源化NSG-SGM3小鼠(小鼠体重18-20g)随机分到研究组中,其中各组基于施用的细胞(野生型、B2M<sup>-/-</sup>CD47tg,和B2M<sup>-/-</sup>人 $\beta$ 胰岛细胞)而有所不同。研究组如下:野生型人胰岛(luc+)肌内移植;无移植糖尿病对照;B2M<sup>-/-</sup>人胰岛(luc+)肌内移植;和B2M<sup>-/-</sup>CD47tg人胰岛(luc+)肌内移植。

[1261] 通过肌内注射将每簇约1,500个细胞的300个人胰岛簇移植到小鼠体内。将第0天(d0)定义为移植日。监测小鼠的生物发光(BLI),作为 $\beta$ 胰岛细胞存活的指标,并监测禁食4小时后的血糖水平以监测糖尿病。在研究的第29天进行了葡萄糖激发。

[1262] T细胞酶联免疫吸收斑点(ELISPOT)测定。通过ELISPOT检测人原代胰岛细胞中干扰素 $\gamma$ (IFN $\gamma$ )分泌CD8(+)T细胞。

[1263] C肽测定。使用标准测定测量人原代胰岛细胞中的C肽水平。

[1264] 脾细胞杀伤测定。脾细胞杀伤测定在XCelligence SP平台和MP平台(ACEA Biosciences)上进行以提供对细胞增殖和细胞活力的无标记监测。将 $4 \times 10^5$ 个野生型人原代胰岛细胞、B2M<sup>-/-</sup>人原代胰岛细胞或B2M<sup>-/-</sup>,CD47tg人原代胰岛细胞(混合或单克隆)铺板于96孔胶原蛋白涂层E板。XCelligence软件用于测量细胞指数(CI),作为粘附和细胞杀伤的量度(细胞指数的降低表明细胞杀伤的增加)。CI值达到0.7后,以1:1的效应细胞与靶标(E:T)比添加人脾细胞。

[1265] 补体依赖性细胞毒性(CDC)测定。将B2M<sup>-/-</sup>,CD47tg人原代胰岛细胞与血清一起孵育,并通过在XCelligence MP平台(ACEA Biosciences)上测量随孵育时间的细胞裂解来分析CDC,以提供对细胞增殖和细胞活力的无标记监测。阻抗的变化被报告为细胞指数(CI)(细胞指数的降低表明细胞裂解或杀伤的增加)。

#### [1266] B. 结果

[1267] 研究结果总结如下。示出了代表性供体结果,但对不同的供体观察到了类似的结果。

[1268] B2M<sup>-/-</sup>;CD47tg人原代胰岛细胞在同种异体移植后存活。肌内注射后人原代胰岛细胞的BLI成像结果的定量示于图10A(B2M<sup>-/-</sup>;CD47tg人原代胰岛细胞)和图10C(WT人原代胰岛细胞)。肌内注射后人原代胰岛细胞的对应BLI图像示于图10B(WT人原代胰岛细胞)和图10D(B2M<sup>-/-</sup>;CD47tg人原代胰岛细胞),并且B2M<sup>-/-</sup>人原代胰岛细胞的BLI图像示于图20A。在施用细胞后,最初在所有组的肌内注射部位观察到生物发光。然而,对于移植的WT人原代胰岛细胞检测到的光子数量在移植后的前5天内迅速下降(图10C和10D),表明WT人原代胰岛细胞可能由于免疫反应死亡。与WT人原代胰岛细胞类似,B2M<sup>-/-</sup>人原代胰岛细胞的数量在移植后的前5天内迅速下降(图10G)。相比之下,从移植的B2M<sup>-/-</sup>;CD47tg人原代胰岛细胞中检测到的光子数量在移植后29天期间增加,表明B2M<sup>-/-</sup>;CD47tg人原代胰岛细胞的存活和生长(图10A和10B)。B2M<sup>-/-</sup>CD47tg人原代胰岛细胞能够存活一个月而不诱导局部免疫反应(数据未显示)。

[1269] 在同种异体移植后,B2M<sup>-/-</sup>;CD47tg人原代胰岛细胞发挥功能。为了分析移植的人

原代胰岛细胞的某些功能,在移植后6天测量血糖水平。在整个研究期间,接受肌内注射WT人原代胰岛细胞和 $B2M^{-/-}$ 人原代胰岛细胞的糖尿病(STZ处理)小鼠禁食后约4小时测量的血糖水平仍然很高( $>400\text{mg/dL}$ ),分别如图10F和图10H所示。相比之下,接受肌内注射 $B2M^{-/-}$ ;CD47tg人原代胰岛细胞的糖尿病(STZ处理)小鼠的空腹血糖水平在移植后很快下降,如图10E所示。此外,接受肌内注射 $B2M^{-/-}$ ;CD47tg人原代胰岛细胞的小鼠在第29天成功耐受葡萄糖激发(图10E)。

[1270] 为了进一步分析移植的人原代胰岛细胞的功能,在移植后测量了C肽水平。接受肌内注射WT人原代胰岛细胞和 $B2M^{-/-}$ 人原代胰岛细胞的糖尿病(STZ处理)小鼠中的C肽水平较低,分别如图11B和图11C所示。相比之下,接受肌内注射 $B2M^{-/-}$ ;CD47tg人原代胰岛细胞的小鼠具有高水平的C蛋白(图11A)。

[1271] 这些数据表明 $B2M^{-/-}$ ;CD47tg人原代胰岛细胞在同种异体移植后能够发挥功能(例如,恢复由于糖尿病而失去的血糖控制)。

[1272] 同种异体移植后的 $B2M^{-/-}$ ;CD47tg人原代胰岛细胞免疫反应。为了分析对移植的人原代胰岛细胞的免疫反应,使用ELISPOT测定来评价 $CD8^{+}$  T细胞分泌IFN $\gamma$ 细胞因子的水平。如图10I所示,与移植的野生型人原代胰岛细胞相比,移植的 $B2M^{-/-}$ 人原代胰岛细胞和 $B2M^{-/-}$ ;CD47tg人原代胰岛细胞表现出较低水平的IFN $\gamma$ 。这些结果与如通过ELISPOT测定的野生型 $\beta$ 胰岛在移植后显示TH1活化的观察一致。与移植的野生型原代 $\beta$ 胰岛细胞相比,移植的 $B2M^{-/-}$ 人原代胰岛细胞和移植的 $B2M^{-/-}$ ;CD47tg人原代胰岛细胞中通过流式细胞术测量的DSA IgM水平也较低,表明野生型 $\beta$ 胰岛显示供体特异性抗体结合(IgM)(图10J)。

[1273] 此数据表明,移植的野生型人原代胰岛细胞表现出适应性免疫反应,而移植的 $B2M^{-/-}$ 人原代胰岛细胞和移植的 $B2M^{-/-}$ ;CD47tg人原代胰岛细胞不表现出适应性免疫反应。

[1274] 同种异体移植后, $B2M^{-/-}$ ;CD47tg和 $B2M^{-/-}$ 人原代胰岛细胞逃避脾细胞杀伤。移植的WT人原代胰岛细胞被脾细胞杀伤,如图12A的上图所示,表明移植的WT人原代胰岛细胞被脾细胞识别为外来细胞,从而导致细胞杀伤。相比之下,移植的 $B2M^{-/-}$ ;CD47tg人原代胰岛细胞和移植的 $B2M^{-/-}$ 人原代胰岛细胞未表现出脾细胞介导的细胞杀伤(图12A,中图和上图)。这些数据表明,移植的低免疫( $B2M^{-/-}$ ;CD47tg)和移植的双敲除( $B2M^{-/-}$ )人原代胰岛细胞能够有效逃避脾细胞的免疫反应。

[1275] 同种异体移植后, $B2M^{-/-}$ ;CD47tg和 $B2M^{-/-}$ 人原代胰岛细胞未经受CDC。为了进一步分析对移植的人原代胰岛细胞的免疫反应,使用了CDC测定。如图12B的上图所示,WT人原代胰岛细胞在CDC测定中被杀伤,表明WT人原代胰岛细胞被识别,从而导致细胞杀伤。相比之下, $B2M^{-/-}$ ;CD47tg和 $B2M^{-/-}$ 人原代胰岛细胞未表现出CDC细胞杀伤(图12B,中图和上图)。这些数据表明,低免疫( $B2M^{-/-}$ ;CD47tg)和双敲除( $B2M^{-/-}$ )人原代胰岛细胞能够有效逃避CDC。

[1276] 实施例6:体外 $B2M^{-/-}$ ;CD47tg人原代胰岛细胞的免疫逃避

[1277] 为了研究降低HLA I类和HLA II类表达以及增加CD47表达对人原代胰岛细胞的免疫逃避作用,对如实施例4中所述生成的 $B2M^{-/-}$ ;CD47tg人原代胰岛细胞进行了外周血单核细胞(PBMC)杀伤测定。将来自I型糖尿病患者的PBMC或来自健康供体的PBMC与WT人原代胰岛细胞或 $B2M^{-/-}$ ;CD47tg人原代胰岛细胞一起体外孵育,随着时间的推移监测杀伤。

[1278] A. 方法

[1279] PBMC分离和培养。通过从新鲜血液中Ficoll分离,从五(5)名I型糖尿病人患者或

三(3)名健康供体中分离PBMC,并重悬于具有10%血清pen/strep的RPMI-1640中。

[1280] PBMC杀伤测定。PBMC细胞杀伤测定在XCelligence SP平台和MP平台(ACEA Biosciences)上进行,以提供对细胞增殖和细胞活力的无标记监测。将 $4 \times 10^5$ 个WT人原代胰岛细胞或 $B2M^{-/-}$ ,CD47tg人原代胰岛细胞铺板于96孔胶原蛋白涂层E板。XCelligence软件用于测量细胞指数(CI),作为粘附和细胞杀伤的度量(细胞指数的降低表明细胞杀伤的增加)。CI值达到0.7后,以1:1的效应细胞与靶标(E:T)比添加人PBMC细胞。

[1281] 流式细胞术。通过流式细胞术评估PBMC对人原代胰岛细胞的杀伤,以使用PerCP-Cy5量化死细胞的百分比。

[1282] B. 结果

[1283] 研究结果总结如下。示出了一个供体的代表性结果,但在两个供体中观察到了类似结果。

[1284]  $B2M^{-/-}$ ;CD47tg人原代胰岛细胞逃避糖尿病PBMC杀伤。从每名I型糖尿病患者分离的糖尿病PBMC介导对WT人原代胰岛细胞的细胞杀伤;来自分离自一名I型糖尿病患者的PBMC的代表性结果示于图13A。来自健康供体的PBMC不杀伤WT人原代胰岛细胞,如图13E中代表性健康供体PBMC所示。在不存在与PBMC一起孵育的情况下,未观察到WT人原代胰岛细胞的杀伤(图13B和图13F)。当通过流式细胞术评估死细胞的杀伤时观察到类似的结果(图13I)。这些结果表明,WT人原代胰岛细胞被糖尿病PBMC识别为外来细胞,从而导致细胞杀伤。

[1285] 相比之下, $B2M^{-/-}$ CD47tg人原代胰岛细胞不被糖尿病PBMC(图13C,来自一名患者的糖尿病PBMC的代表性结果)或健康PBMC(图13G,来自一名健康供体的PBMC的代表性结果)杀伤。在不存在与PBMC一起孵育的情况下,未观察到 $B2M^{-/-}$ CD47tg人原代胰岛细胞的杀伤(图13D和图13H)。当通过流式细胞术评估死细胞的杀伤时观察到类似的结果(图13J)。这些数据表明 $B2M^{-/-}$ ;CD47tg人原代胰岛细胞有效逃避糖尿病PBMC的免疫反应。

[1286] 实施例7:在抗CD47融合蛋白的存在下体外 $B2M^{-/-}$ ;CD47tg人原代胰岛细胞中CD47信号传导的评估

[1287] 此实施例描述了表征通过低免疫原代人 $\beta$ 胰岛细胞进行的CD47阻断的研究,所述细胞被工程化以(1)敲除 $B2M$ ( $B2M^{-/-}$ )以降低HLA I类表达和(2)过表达外源CD47(CD47tg)。低免疫( $B2M^{-/-}$ ;CD47tg)人原代胰岛细胞如实施例4中所述产生。与 $B2M^{-/-}$ ;CD47tg人原代胰岛细胞相比,评估在抗CD47 Fc融合蛋白(即,抗CD47 IgG1Fc和抗CD47 IgG4Fc)的存在下自然杀伤细胞(NK)和巨噬细胞对 $B2M^{-/-}$ ;CD47tg人原代胰岛细胞的细胞杀伤。还评价了由于CD47结合而产生的细胞毒性产物和巨噬细胞的吞噬作用。

[1288] A. 方法

[1289] NK细胞和巨噬细胞杀伤测定。NK细胞杀伤测定和巨噬细胞杀伤测定基本上如以上实施例中所述进行。

[1290] 细胞毒性产物的检测。根据制造商的说明书,使用来自Invitrogen(人颗粒酶B ELISA试剂盒和人穿孔素ELISA试剂盒)和Biosource(人活性氧ELISA试剂盒)的可商购获得的试剂盒通过ELISA检测颗粒酶、穿孔素和活性氧(ROS)。

[1291] 吞噬作用测定。抗CD47抗体(100 $\mu$ g/ml)与 $B2M^{-/-}$ ,CD47tg人原代胰岛细胞和巨噬细胞一起孵育。对于一些情况,还添加抗CD47 IgG1Fc或抗CD47 IgG4Fc。孵育1h后,使用



pHrodo™吞噬作用测定通过流式细胞术评估β胰岛细胞的吞噬作用。

[1292] B. 结果

[1293] 研究结果总结如下。示出了一个供体的代表性结果,但在两个供体中观察到了类似结果。

[1294] 表达抗CD47 Fc融合蛋白的B2M<sup>-/-</sup>;CD47tg人原代胰岛细胞被NK细胞和巨噬细胞杀伤。B2M<sup>-/-</sup>CD47tg人原代胰岛细胞不表现出NK介导的细胞杀伤(图14A)或巨噬细胞介导的细胞杀伤(图14D),表明低免疫(B2M<sup>-/-</sup>;CD47tg)人原代胰岛细胞受到CD47过表达的保护,并且能够有效逃避NK细胞和巨噬细胞的免疫反应。免于细胞杀伤的保护被抗CD47 IgG1Fc或抗CD47 IgG4Fc融合蛋白阻断,如对于NK介导的细胞杀伤(分别为图14B和14C)或巨噬细胞介导的细胞杀伤(分别为图14E和14F)所示。这些数据表明,B2M<sup>-/-</sup>CD47tg人原代胰岛细胞中CD47-SIRP信号传导的阻断导致其被NK细胞和巨噬细胞识别为外来细胞,从而导致细胞杀伤,并且进一步证实CD47的过表达有助于修饰细胞的免疫逃避。

[1295] 当添加抗CD47 Fc融合蛋白时,B2M<sup>-/-</sup>;CD47tg人原代胰岛细胞产生细胞毒性产物。如图15A至15C所示,B2M<sup>-/-</sup>;CD47tg人原代胰岛细胞表现出较低水平的颗粒酶B(图15A)、穿孔素(图15B)和ROS(图15C),但在抗CD47 IgG1Fc或抗CD47 IgG4Fc融合蛋白的存在下,这些细胞毒性产物的水平显著较高。由于杀伤是通过这些细胞毒性产物的释放介导的,因此这些数据表明,融合蛋白IgG1和IgG4阻断CD47-SIRP信号传导诱导修饰的原代β胰岛细胞的杀伤。

[1296] 实施例8:来自一个示例性供体的体外B2M<sup>-/-</sup>;CD47tg人原代胰岛细胞的适应性免疫反应

[1297] 为了研究B2M<sup>-/-</sup>;CD47tg人原代胰岛细胞的巨噬细胞杀伤机制,以及为了理解CD47的过表达如何影响杀伤作用,进行了吞噬作用测定。具体地,因为HLA-I/II KO细胞由于其“自我缺失”而诱导巨噬细胞杀伤,所以进行了研究以揭示观察到的细胞杀伤机制是否是由于吞噬作用与细胞毒性产物的释放。此外,还对完整细胞、凋亡细胞和坏死细胞进行了研究,以评估CD47的过表达是否影响巨噬细胞对濒死/死亡细胞的清除机制。

[1298] A. 方法

[1299] 流式细胞术。通过流式细胞术评估人原代胰岛细胞中CD47的表达。

[1300] 吞噬作用测定。野生型人原代胰岛细胞(完整的、凋亡的和坏死的)、B2M<sup>-/-</sup>人原代胰岛细胞(完整的、凋亡的和坏死的)、B2M<sup>-/-</sup>;CD47tg人原代胰岛细胞(完整的、凋亡的和坏死的)与巨噬细胞一起孵育。在一些情况下,添加了抗CD47 IgG1抗体,所述抗体与FcR结合并介导吞噬作用。孵育1h后,使用pHrodo™吞噬作用测定通过流式细胞术评估β胰岛细胞的吞噬作用。

[1301] B. 结果

[1302] 研究结果总结如下。示出了代表性供体结果。

[1303] 与先前的结果一致,流式细胞术证实了未工程化以过表达CD47的B2M<sup>-/-</sup>人原代胰岛细胞表现出低水平的CD47表面表达(2倍于同种型对照,如图16左图所示),而B2M<sup>-/-</sup>;CD47tg原代β胰岛细胞显示出增加的CD47表达(28倍于同种型对照,如图16右图所示)。

[1304] 如图17所示,完整野生型人原代胰岛细胞、完整B2M<sup>-/-</sup>人原代胰岛细胞和完整B2M<sup>-/-</sup>;CD47tg人原代胰岛细胞逃避巨噬细胞的吞噬作用。相比之下,每种细胞类型的坏死

和凋亡的人原代胰岛细胞被巨噬细胞吞噬。因此,CD47过表达不会阻止凋亡或坏死的B2M<sup>-/-</sup>;CD47tg人原代胰岛细胞的吞噬作用,这在胰岛排斥后可能很重要。此外,抗CD47 IgG1融合蛋白诱导B2M<sup>-/-</sup>;CD47tg人原代胰岛细胞(完整的、凋亡的和坏死的)的吞噬作用。

[1305] 实施例9: B2M<sup>-/-</sup>;CD47tg人原代胰岛细胞的Ig介导的吞噬作用的评估

[1306] 将抗CD47抗体(100μg/ml)(IgG1 Fc或IgG4 Fc)与B2M<sup>-/-</sup>;CD47tg人原代胰岛细胞和非人灵长类(NHP)巨噬细胞一起孵育。孵育1h后,使用pHrodo<sup>TM</sup>吞噬作用测定通过流式细胞术评估β胰岛细胞的吞噬作用。

[1307] 如图18所示,B2M<sup>-/-</sup>;CD47tg人原代胰岛细胞和仅巨噬细胞(Mac)对照不被巨噬细胞吞噬。相比之下,与抗CD47 IgG1 Fc而非抗CD47-IgG4 Fc一起孵育的B2M<sup>-/-</sup>;CD47tg人原代胰岛细胞被吞噬。观察到的吞噬作用是由于经由抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)的IgG1 Fc结合。IgG4结合不会导致与IgG1一样强的FcR结合,这与IgG4 Fc的较低水平的吞噬作用一致。

[1308] 实施例10:免疫功能不全的糖尿病小鼠移植研究中的B2M<sup>-/-</sup>;CD47tg人原代胰岛细胞的生存和功能

[1309] 如实施例4中所述产生低免疫(B2M<sup>-/-</sup>;CD47tg)人原代胰岛细胞,并将其移植到免疫功能不全的糖尿病NSG受体小鼠中。随着时间的推移监测小鼠糖尿病的发病率以及移植的B2M<sup>-/-</sup>;CD47tg人原代胰岛细胞与移植的野生型人原代胰岛细胞相比的存活和功能。

[1310] A. 方法

[1311] 移植研究设计和施用。在施用STZ诱导糖尿病后,将二十五只NSG小鼠(小鼠体重18-20g)随机分到研究组中,其中各组基于施用的细胞(野生型、B2M<sup>-/-</sup>CD47tg,和B2M<sup>-/-</sup>人胰岛细胞)而有所不同。研究组如下:野生型人胰岛(luc+)肌内移植;无移植糖尿病对照;和B2M<sup>-/-</sup>CD47tg人胰岛(luc+)肌内移植。

[1312] 通过肌内注射将每簇约1,500个细胞的300个人胰岛簇移植到小鼠体内。将第0天(d0)定义为移植日。监测小鼠的生物发光(BLI),作为胰岛细胞存活的指标,并监测禁食4小时后的血糖水平,作为糖尿病病的指标。在研究的第29天进行了葡萄糖激发。

[1313] C肽测定。检测了人原代胰岛细胞中的C肽水平。

[1314] B. 结果

[1315] 研究结果总结如下。示出了代表性供体结果,但对不同的供体观察到了类似的结果。

[1316] 在移植后,B2M<sup>-/-</sup>;CD47tg人原代胰岛细胞存活。肌内注射后人原代胰岛细胞的BLI图像示于图19A(B2M<sup>-/-</sup>;CD47tg人原代胰岛细胞)和图19D(WT人原代胰岛细胞)。在施用细胞后,最初在两组的肌内注射部位观察到生物发光。在研究期间持续检测移植的WT人原代胰岛细胞的生物发光,表明WT胰岛在免疫功能不全的糖尿病小鼠中存活并发挥功能(图19D)。类似地,从移植的B2M<sup>-/-</sup>;CD47tg人原代胰岛细胞中检测到的生物发光还在移植后29天期间持续,表明B2M<sup>-/-</sup>;CD47tg人原代胰岛细胞的存活和生长(图19A)。这些结果进一步证明HIP编辑不会损害胰岛细胞的存活和功能。

[1317] 在同种异体移植后,B2M<sup>-/-</sup>;CD47tg人原代胰岛细胞发挥功能。为了分析移植的人原代胰岛细胞的某些功能,在移植后6天测量血糖水平。在此研究中,对于两组小鼠来说,接受肌内注射的糖尿病(STZ处理的)小鼠的空腹血糖水平在移植后很快下降,如图19B

(B2M<sup>-/-</sup>;CD47tg人原代胰岛细胞)和图19E(WT人原代胰岛细胞)所示。此外,小鼠成功地耐受了葡萄糖激发(图19B和图19E)。

[1318] 为了进一步分析移植的人原代胰岛细胞的功能,在移植后测量了C肽水平。接受肌内注射WT人原代胰岛细胞或B2M<sup>-/-</sup>;CD47tg人原代胰岛细胞的糖尿病(STZ处理)小鼠中的C肽水平较高,分别如图19F(图19C)所示。

[1319] 这些数据表明对B2M<sup>-/-</sup>;CD47tg人原代胰岛细胞的编辑对没有免疫系统的糖尿病NSG小鼠的胰岛存活或功能没有影响。

[1320] 实施例11:移植研究中具有抗CD47和同种型对照的B2M<sup>-/-</sup>;CIITA<sup>-/-</sup>;CD47tg人原代胰岛细胞中的CD47信号传导的评估

[1321] 如实施例4中所述产生低免疫(B2M<sup>-/-</sup>;CIITA<sup>-/-</sup>;CD47tg)人原代胰岛细胞,其中使用实施例4中所述的技术额外敲除CIITA,并将所述低免疫人原代胰岛细胞以及抗CD47和同种型对照移植到同种异体糖尿病人源化NSG-SGM3受体小鼠中。随着时间的推移监测小鼠糖尿病的发病率以及移植的B2M<sup>-/-</sup>;CIITA<sup>-/-</sup>;CD47tg人原代胰岛细胞与移植的野生型人原代胰岛细胞相比的存活和功能。

[1322] A. 方法

[1323] 移植研究设计和施用。在施用STZ诱导糖尿病后,将二十五只人源化NSG-SGM3小鼠(小鼠体重18-20g)随机分到研究组中,并施用B2M<sup>-/-</sup>;CIITA<sup>-/-</sup>;CD47tg人胰岛细胞。研究组如下:B2M<sup>-/-</sup>;CIITA<sup>-/-</sup>;CD47tg人胰岛细胞(luc+)肌内移植加抗CD47肌内移植,局部施用;B2M<sup>-/-</sup>;CIITA<sup>-/-</sup>;CD47tg人胰岛细胞(luc+)肌内移植加抗CD47肌内移植,系统性施用;B2M<sup>-/-</sup>;CIITA<sup>-/-</sup>;CD47tg人胰岛细胞(luc+)肌内移植加同种型对照肌内移植,局部施用;以及B2M<sup>-/-</sup>;CIITA<sup>-/-</sup>;CD47tg人胰岛细胞(luc+)肌内移植加同种型对照肌内移植,系统性施用。

[1324] 通过肌内注射将每簇约1,500个细胞的300个人胰岛簇移植到小鼠体内。将第0天(d0)定义为移植日。在第8天(d8)通过局部施用或系统性施用将抗CD47或同种型对照通过肌内注射移植到小鼠体内。

[1325] 监测小鼠的生物发光(BLI),作为胰岛细胞存活的指标,并监测禁食4小时后的血糖水平以监测糖尿病。在研究的第29天进行了葡萄糖激发。

[1326] B. 结果

[1327] 当添加抗CD47时,B2M<sup>-/-</sup>;CIITA<sup>-/-</sup>;CD47tg人原代胰岛细胞在同种异体移植后无法存活。在局部和系统性肌内注射同种型对照后,肌内移植的B2M<sup>-/-</sup>;CIITA<sup>-/-</sup>;CD47tg人原代胰岛细胞的BLI图像分别示于图20A和21A,并且在局部和系统性肌内注射抗CD47后,肌内移植的B2M<sup>-/-</sup>;CIITA<sup>-/-</sup>;CD47tg人原代胰岛细胞的BLI图像分别示于图20C和21C。在不存在抗CD47的情况下(即,在局部或系统性添加同种型对照后),移植的B2M<sup>-/-</sup>;CIITA<sup>-/-</sup>;CD47tg人原代胰岛细胞继续存活和生长(图20A和21A)。相比之下,在移植后第8天开始局部或系统性施用抗CD47后,移植的B2M<sup>-/-</sup>;CIITA<sup>-/-</sup>;CD47tg人原代胰岛细胞迅速下降(图20C和21C),表明先天免疫细胞导致的B2M<sup>-/-</sup>;CIITA<sup>-/-</sup>;CD47tg人原代胰岛细胞死亡是通过阻断CD47来实现的。

[1328] 这些数据表明,B2M<sup>-/-</sup>;CIITA<sup>-/-</sup>;CD47tg人原代胰岛细胞中CD47-SIRP信号传导的阻断导致其被免疫系统识别为外来细胞,从而导致细胞杀伤,并且进一步证实CD47的过表

达有助于修饰细胞的免疫逃避。

[1329] 当添加抗CD47时,  $B2M^{-/-}; CIITA^{-/-}; CD47tg$  人原代胰岛细胞在同种异体移植后不发挥功能。为了分析移植的人原代胰岛细胞的某些功能, 在移植后6天测量血糖水平。接受肌肉注射  $B2M^{-/-}; CIITA^{-/-}; CD47tg$  人原代胰岛细胞的糖尿病 (STZ处理) 小鼠禁食后约4小时测量的血糖水平在移植后很快下降 (如图20B、20D、21B和21D所示), 并且在局部和系统性施用同种型对照后保持较低 (分别为图20B和21B)。然而, 接受肌肉注射  $B2M^{-/-}; CIITA^{-/-}; CD47tg$  人原代胰岛细胞的小鼠随后局部或系统性施用抗CD47, 表现出血糖水平升高 (分别为图20D和21D)。

[1330] 实施例12: 移植研究中  $B2M^{-/-}; CIITA^{-/-}; CD47tg$  非人灵长类原代  $\beta$  胰岛细胞的评估

[1331] 产生低免疫 ( $B2M^{-/-}; CIITA^{-/-}; CD47tg$ ) 非人灵长类 (NHP) 原代  $\beta$  胰岛细胞并移植到同种异体受体NHP中。随着时间的推移监测移植的  $B2M^{-/-}; CIITA^{-/-}; CD47tg$  NHP原代胰岛细胞与移植的野生型人原代  $\beta$  胰岛细胞相比的存活和功能。

[1332] A. 方法

[1333] NHP原代  $\beta$  胰岛细胞的生成和细胞工程化。使用标准技术从NHP胰腺分离原代  $\beta$  胰岛细胞。此类技术是本领域已知的, 使用标准CRISPR/Cas9基因编辑技术工程化分离的细胞以敲除  $B2M$  和  $CIITA$ , 并使用含有编码CD47的多核苷酸的慢病毒载体用编码外源CD47蛋白的转基因 (tg) 进行转导。通过流式细胞术对低免疫胰岛进行分类, 以得到HLA I/II类阴性和CD47过表达细胞。

[1334] 移植研究设计和施用。通过肌肉注射将每簇约1,500个细胞的300个NHP胰岛簇移植到NHP体内。将第0天 (d0) 定义为移植日。

[1335] T细胞酶联免疫吸收斑点 (ELISPOT) 测定。通过ELISPOT检测NHP原代  $\beta$  胰岛细胞中干扰素  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) 分泌CD8(+) T细胞。

[1336] 流式细胞术。通过流式细胞术评估原代  $\beta$  胰岛细胞中供体特异性抗体 (DSA) 的表达。

[1337] NK细胞术杀伤测定。NK细胞杀伤测定基本上如以上实施例中所述进行。

[1338] B. 结果

[1339]  $B2M^{-/-}; CIITA^{-/-}; CD47tg$  NHP胰岛细胞在移植后存活。肌肉注射后NHP  $B2M^{-/-}; CIITA^{-/-}; CD47tg$  原代胰岛细胞的BLI成像结果的定量示于图22A。肌肉注射后NHP  $B2M^{-/-}; CIITA^{-/-}; CD47tg$  原代胰岛细胞的对应BLI图像示于图22B。在施用NHP原代胰岛细胞后, 最初在所有组的肌肉注射部位观察到生物发光。从移植的NHP  $B2M^{-/-}; CIITA^{-/-}; CD47tg$  原代胰岛细胞检测到的光子数量在移植后最初略有减少, 但随后在移植后42天的过程中保持一致, 表明NHP  $B2M^{-/-}; CIITA^{-/-}; CD47tg$  原代胰岛细胞存活 (图22A)。

[1340] 同种异体移植后的NHP  $B2M^{-/-}; CIITA^{-/-}; CD47tg$  原代胰岛细胞免疫反应。为了分析对移植的NHP原代  $\beta$  胰岛细胞的免疫反应, 使用ELISPOT测定来评价CD8+ T细胞分泌IFN $\gamma$  细胞因子的水平。如图23A所示, 移植的NHP  $B2M^{-/-}; CIITA^{-/-}; CD47tg$  原代胰岛细胞表现出低水平的IFN $\gamma$ 。通过流式细胞术测量的移植的NHP  $B2M^{-/-}; CIITA^{-/-}; CD47tg$  原代胰岛细胞中的DSA IgM和IgG水平也较低 (分别为图23B和23C)。此外, 在移植NHP  $B2M^{-/-}; CIITA^{-/-}; CD47tg$  原代胰岛细胞之前, 在具有高IgG抗体浓度的致敏NHP受体中, DSA IgG的水平在移植后42天的过程中减少 (图23D)。

[1341] 这些数据表明NHP B2M<sup>-/-</sup>;CIITA<sup>-/-</sup>;CD47tg原代胰岛细胞在移植后不会诱导对胰岛的免疫反应,并受到保护而免于抗体介导的排斥。

[1342] B2M<sup>-/-</sup>;CIITA<sup>-/-</sup>;CD47tg NHP原代胰岛细胞逃避NK细胞的杀伤。B2M<sup>-/-</sup>;CIITA<sup>-/-</sup>;CD47tg NHP原代胰岛细胞不表现出NK介导的细胞杀伤(图24),表明低免疫(B2M<sup>-/-</sup>;CIITA<sup>-/-</sup>;CD47tg)NHP原代胰岛细胞能够有效逃避NK细胞的免疫反应。这些数据表明移植的B2M<sup>-/-</sup>;CIITA<sup>-/-</sup>;CD47tg NHP原代胰岛细胞不被识别为外来的。

[1343] 实施例13:人原代胰岛细胞的基因编辑

[1344] 使用标准技术从人尸体供体分离原代胰岛细胞,并使用ACCUMAX<sup>TM</sup>(StemCell Technologies)细胞解离溶液在37°C下持续10分钟将细胞解离成含有单细胞的悬浮液。用含有Cas9酶和靶向人B2M基因和人CIITA基因的单一gRNA的核糖核蛋白复合物对解离的细胞悬浮液进行电穿孔。

[1345] 使用SEQ ID NO:33指导RNA(gRNA)序列破坏人B2M基因,并且使用SEQ ID NO:34gRNA序列破坏人CII2A基因。将人原代胰岛细胞转移至含有50,000个细胞/孔的U形底96孔板的PIM(S)培养基(Prodo)中,并在37°C和5% CO<sub>2</sub>下静置1h,然后将板移至用于人原代胰岛细胞重新聚集的Belly Dancer轨道摇床(ABI Scientific,Dubuque,IA)。48h后进行完全培养基更换,并将人原代胰岛细胞簇在Belly Dancer轨道摇床上再孵育24h。

[1346] 为了富集经编辑的胰岛,使用ACCUMAX<sup>TM</sup>和抗HLA-A、B、C抗体(克隆G46\_2.6,BD Biosciences)或IgG1同种型匹配的对照抗体(克隆MOPC-21,BD Biosciences)以及抗HLA-DR、DP、DQ抗体(克隆Tu3a,BD Biosciences)或IgG2a同种型匹配的对照抗体(克隆G155-178,BD Biosciences),将重新聚集的人原代胰岛簇解离以将细胞分选为单细胞。双阴性人原代胰岛细胞在BD FACSAria<sup>TM</sup>II中分选,并重新铺板到如上所述的U形底96孔板中以在Belly Dancer轨道摇床上重新聚集。

[1347] 24h后,将人原代胰岛细胞解离成单细胞,并用编码CD47的慢病毒载体转导。将转导的人原代胰岛细胞重新铺板到如上所述的U形底96孔板中以在Belly Dancer轨道摇床上重新聚集。48h后,使用ACCUMAX<sup>TM</sup>将人原代胰岛细胞解离成单细胞,并用抗CD47抗体(克隆B6H12,BD Biosciences)或IgG1同种型匹配的对照抗体(克隆MOPC-21,BD Biosciences)对人CD47进行细胞分选以选择过表达CD47的转导细胞。将人原代胰岛细胞重新铺板到如上所述的U形底96孔板中以在Belly Dancer轨道摇床上重新聚集。

[1348] 进行了类似的过程,不同的是胰岛细胞不是在运动中孵育,而是在37°C和5% CO<sub>2</sub>的静态条件(不运动)下孵育。在此过程中,静态条件导致重新聚集受损,并且活力低至仅约35%。不受理论的束缚,提供的结果支持在基因编辑过程中使细胞经受运动提高了它们的活力和基因编辑的效率。

[1349] 实施例14:B2M<sup>-/-</sup>;CIITA<sup>-/-</sup>;CD47tg人原代视网膜色素上皮细胞的评估

[1350] 此实施例描述了表征低免疫人原代视网膜色素上皮(RPE)细胞的研究,所述细胞被工程化以(1)敲除B2M(B2M<sup>-/-</sup>)以降低HLA I类表达,(2)敲除CIITA(CIITA<sup>-/-</sup>)以降低HLA II类表达和(3)过表达外源CD47(CD47tg)。与野生型(WT)人原代RPE细胞或双敲除(B2M<sup>-/-</sup>CIITA<sup>-/-</sup>)人原代RPE细胞相比,监测低免疫(B2M<sup>-/-</sup>;CIITA<sup>-/-</sup>;CD47tg)人原代RPE细胞以保护其免受自然杀伤(NK)细胞和巨噬细胞的细胞杀伤。

[1351] A.方法

[1352] 人原代RPE的生成和细胞工程化。原代RPE细胞分离自人尸体眼球并冷冻保存。将分离的RPE细胞解冻,然后铺在涂有Synthemax (3535Corning, Corning NY)的板上。为了生成低免疫细胞,使用标准CRISPR/Cas9基因编辑技术对铺板细胞进行工程化以敲除B2M和CIITA,并且约两天后更换铺板细胞上的培养基,然后细胞要么不受影响,要么被使用含有编码CD47的多核苷酸的慢病毒载体,通过用编码外源CD47蛋白的转基因(tg)进行转导来进一步工程化。两天后,再次更换培养基,然后在鹅卵石形态形成时(例如第6天)收集细胞,并通过流式细胞术分选HLA I/II类阴性(B2M<sup>-/-</sup>、CIITA<sup>-/-</sup>双敲除,dKO)和在一些情况下CD47过表达(B2M<sup>-/-</sup>、CIITA<sup>-/-</sup>、CD47tg)的细胞。

[1353] NK细胞和巨噬细胞杀伤测定。NK细胞杀伤测定和巨噬细胞杀伤测定在XCelligence MP平台(ACEA Biosciences)上进行以提供对细胞增殖和细胞活力的无标记监测。将未修饰的(野生型)人原代RPE、B2M<sup>-/-</sup>、CIITA<sup>-/-</sup>工程化人原代RPE,或B2M<sup>-/-</sup>、CIITA<sup>-/-</sup>、CD47tg工程化人原代RPE铺板到涂有层粘连蛋白、胶原蛋白和纤连蛋白的96孔E板中。XCelligence软件用于测量细胞指数(CI),作为粘附和细胞杀伤的量度(细胞指数的降低表明细胞杀伤的增加)。CI值达到0.7后,以1:1的效应细胞与靶标(E:T)比添加分化的人原代NK细胞或人巨噬细胞(均为Stemcell Technologies)。

[1354] B. 结果

[1355] 人B2M<sup>-/-</sup>、CIITA<sup>-/-</sup>、CD47tg原代RPE细胞不表达MHC-I或MHC-II,但具有增加的CD47表达。通过流式细胞术评估MHC-I和MHC-II以及CD47的表达。分离的人原代RPE细胞对MHC-I呈阳性,不表达MHC-II,并且具有低表达的CD47(图25,上图)。人B2M<sup>-/-</sup>/CIITA<sup>-/-</sup>dKO原代RPE细胞和B2M<sup>-/-</sup>、CIITA<sup>-/-</sup>、CD47tg原代RPE细胞对MHC-I和MHC-II呈阴性(图25,中图和下图)。仅B2M<sup>-/-</sup>、CIITA<sup>-/-</sup>、CD47tg原代RPE细胞示出了增加的CD47表达(比同种型对照高20倍,如图25下图所示)。

[1356] 人B2M<sup>-/-</sup>、CIITA<sup>-/-</sup>、CD47tg原代RPE细胞逃避NK细胞和巨噬细胞杀伤。未修饰的(野生型)原代RPE细胞不被NK细胞(图26A)或巨噬细胞(图26D)杀伤,这与野生型细胞对先天免疫杀伤的抵抗一致。人B2M<sup>-/-</sup>、CIITA<sup>-/-</sup>原代RPE细胞被NK细胞(图26B)和巨噬细胞(图26E)杀伤,表明人B2M<sup>-/-</sup>、CIITA<sup>-/-</sup>原代RPE细胞缺乏细胞表面上的HLA分子并引发NK细胞和巨噬细胞的自我缺失杀伤。相比之下,进一步过表达表面分子CD47的人B2M<sup>-/-</sup>、CIITA<sup>-/-</sup>、CD47tg原代RPE细胞不表现出NK介导的细胞杀伤(图26C)或巨噬细胞介导的细胞杀伤(图26F)。在不存在先天NK细胞或巨噬细胞(仅靶细胞)的情况下,没有观察到任何RPE细胞的杀伤(图26G至26I)。

[1357] 这些数据表明人B2M<sup>-/-</sup>、CIITA<sup>-/-</sup>、CD47tg原代RPE细胞是低免疫的,并且有效逃避NK细胞和巨噬细胞的免疫反应。

[1358] 本发明不旨在限制特定公开的实施方案的范围,所述实施方案被提供以例如说明本发明的各个方面。根据本文的描述和教导,对所描述的组合物和方法的各种修改将变得显而易见。可以在不脱离本公开的真实范围和精神的情况下实施此类变型,并且这些变型预期落入本公开的范围。

[1359] 序列

编号	序列	注释
[1360] 1	QLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFTVNMEAQNTTEV YVKWKFGRDIYTFDGALNKSTVPTDFSSAKIEVSQ LLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETI IELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTL KYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEY	人 CD47 (不 具有信号序 列); aa 19-323

[1361]

	SLKNATGLGLIVTSTGILILLHYVVFSTAIGLTSFVIAI LVIQVIAYILAVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILAL AQLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRKAVEEPLNAFKES KGMMNDE	
2	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCND TVVIPCFTNMEAQNTTEVYVKWFKGRDIYTFDG ALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAV SHTGNYTCEVTELTREGETIIEKRYVVSWFSPNENI LIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGGMDEKTIALLV AGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIVTSTGI LILLHYVVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVVGLSL CIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVASN QKTIQPPRKAVEEPLNAFKESKGMMNDE	人 CD47 (具 有信号序列); aa 1-323
3	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLWYQ QKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLT ISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGSTS GSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTC TVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVWVWSETTY YNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDETAIYYC AKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS	抗 CD19 scFv (FMC63)
4	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLWYQ QKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLT ISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGGGG SGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVS GVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVWVWSETTYNS ALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDETAIYYCAK HYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS	抗 CD19 scFv (FMC63)
5	ESKYGPPCPPCP	IgG4 铰链
6	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPE	CD8 铰链
7	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPS KP	CD28
8	ACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLL LSLVITLYC	CD8
9	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIHFWV	CD28
10	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIHFWV	CD28
11	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDF AAYRS	CD28
12	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEE EGGCEL	4-1BB
13	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE AYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDAL HMQUALPPR	CD3 $\zeta$
14	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE AYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDAL HMQUALPPR	CD3 $\zeta$
15	EGRGSLTTCGDVEENPGP	T2A
16	LEGGGEGRGSLLTCGDVEENPGPR	T2A



[1362]

17	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
18	ATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
19	QCTNYALLKLAGDVESNPGP	E2A
20	VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP	F2A
21	GSGEGRGSLTTCGDVEENPGP	T2A
22	AAGSGEGRGSLTTCGDVEENPGP	T2A
23	GUUUUAGAGCUA	crRNA 重复 序列
24	UAGCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA CUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUU	tracrRNA
25	GAAA	四环
26	acccacagtggggcca	GET000046 指导物
27	tgttgaaggatgaggaaat	GET000047 指导物
28	tcactatgctgccgccagt	GET000048 指导物
29	UCUCUCCAUGUGCAGUAGGA	ABO gRNA
30	CUGGAUGUCGGAGGAGUACG	FUT1 gRNA
31	GUCUCCGGAACUCGAGGUG	RHD gRNA
32	ACAGUGUAGACUUGAUUGAC	F3 (CD142) gRNA
33	CGUGAGUAAACCGAAUCUU	B2M gRNA
34	GAUAUUGGCAUAAGCCUCCC	CIITA gRNA
35	AGAGUCUCUCAGCUGGUACA	TRAC gRNA

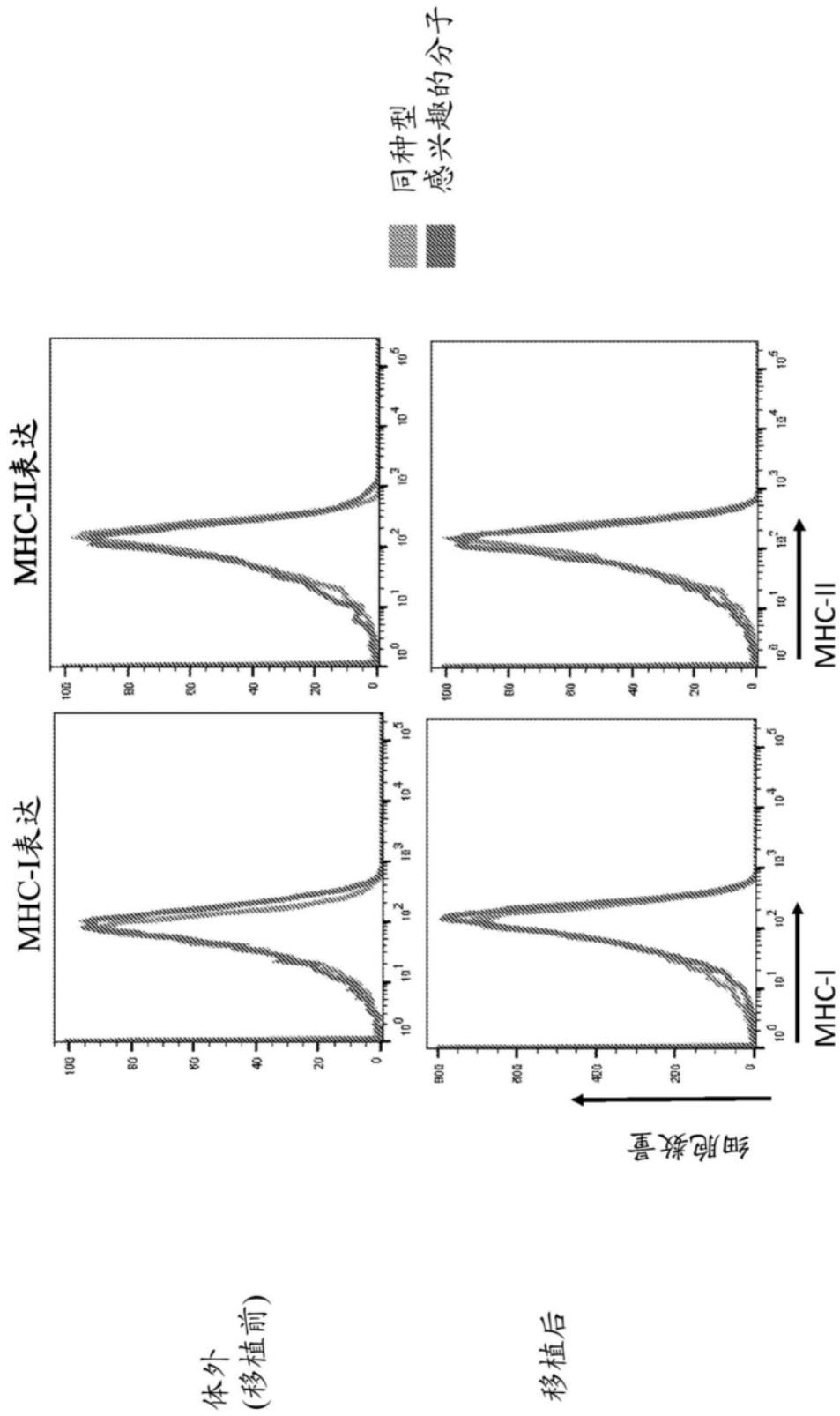


图1

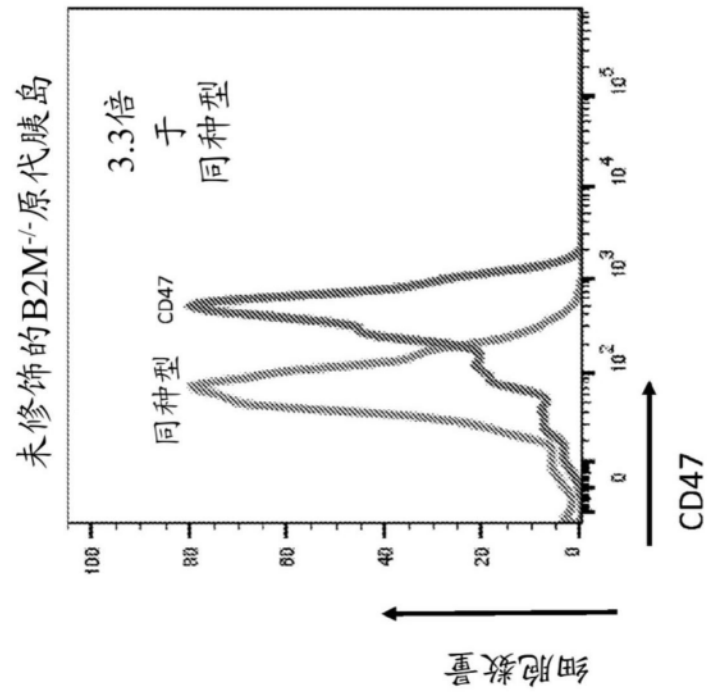


图2A

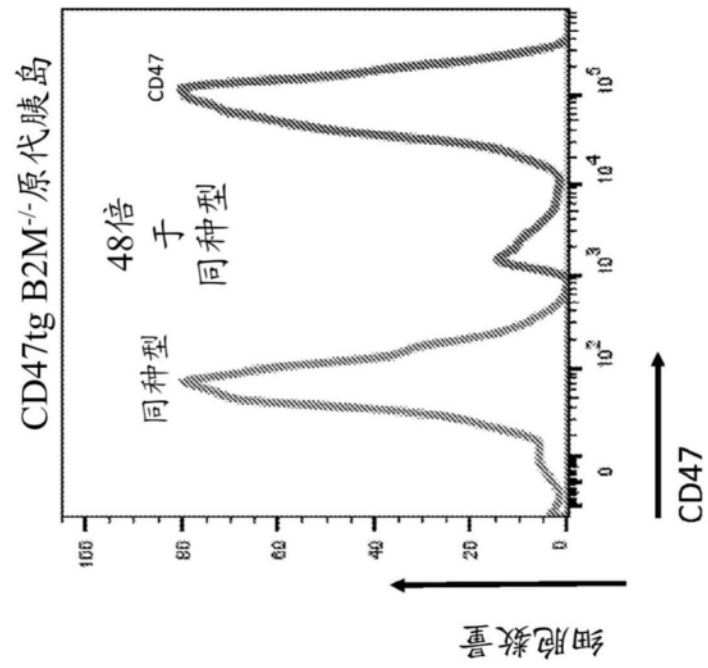


图2B

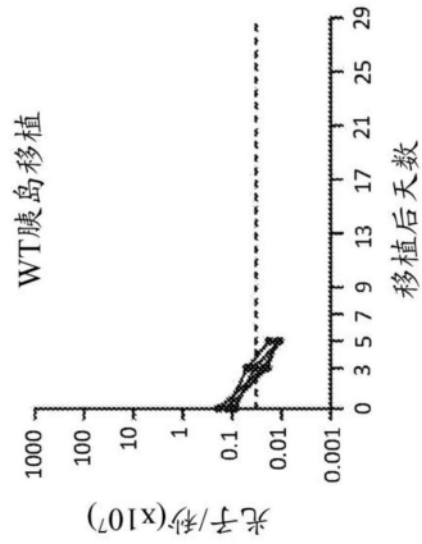


图3A

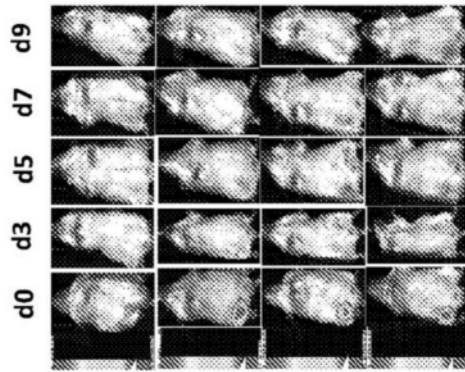


图3B

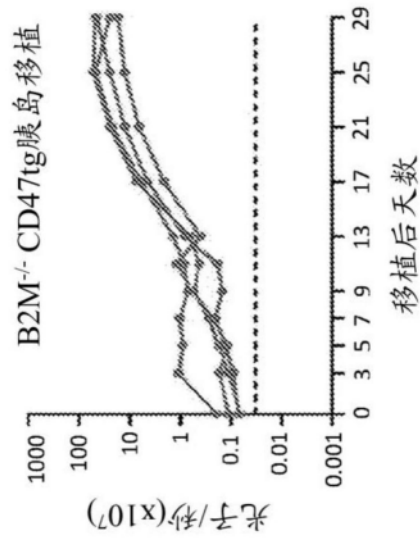


图3C

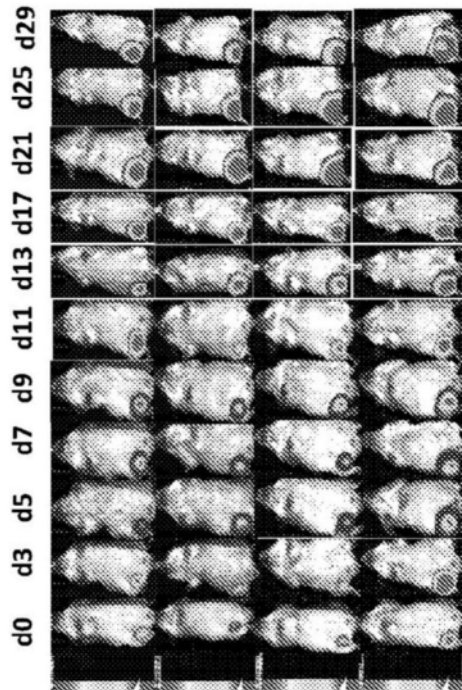


图3D

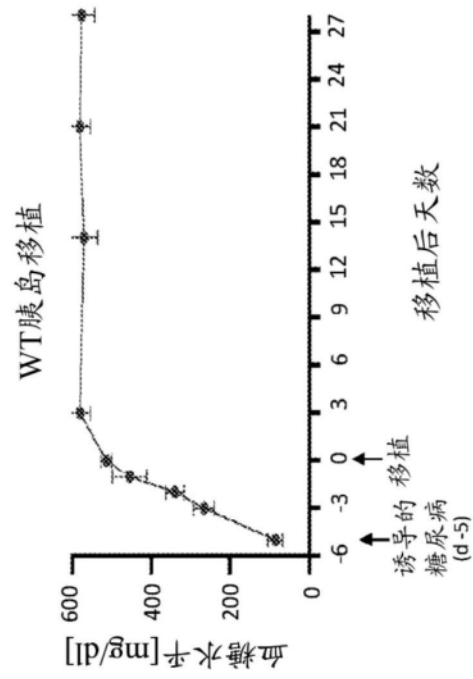


图3E

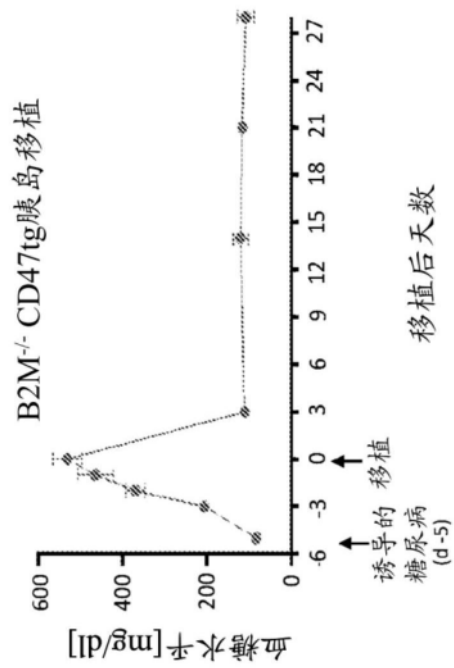


图3F

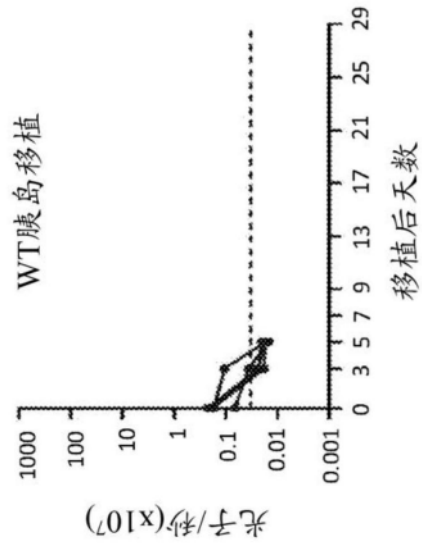


图4A

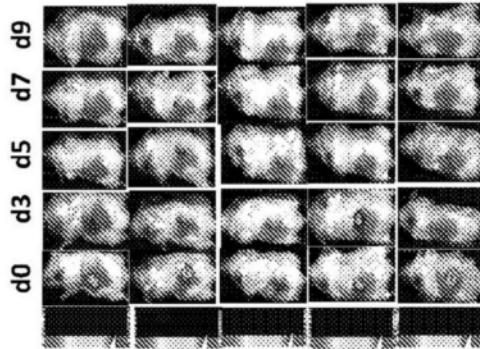


图4B

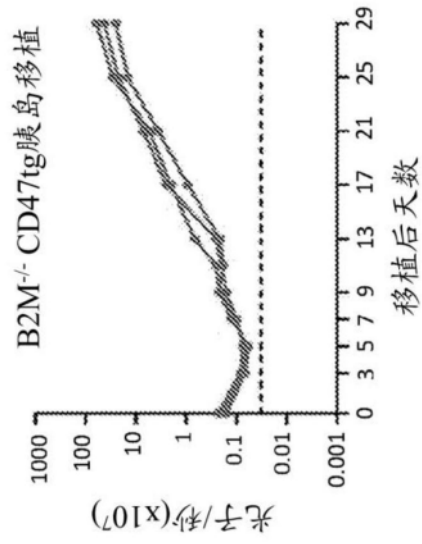


图4C

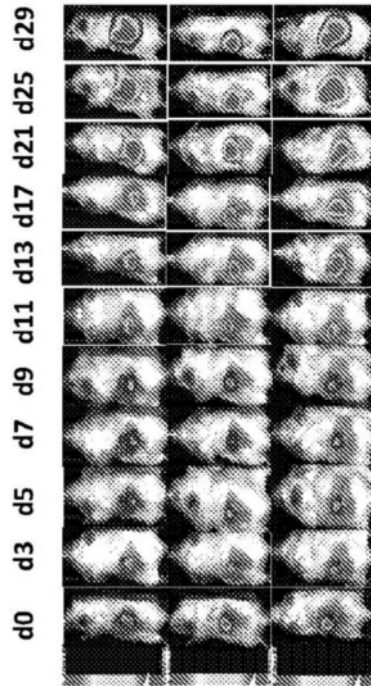


图4D



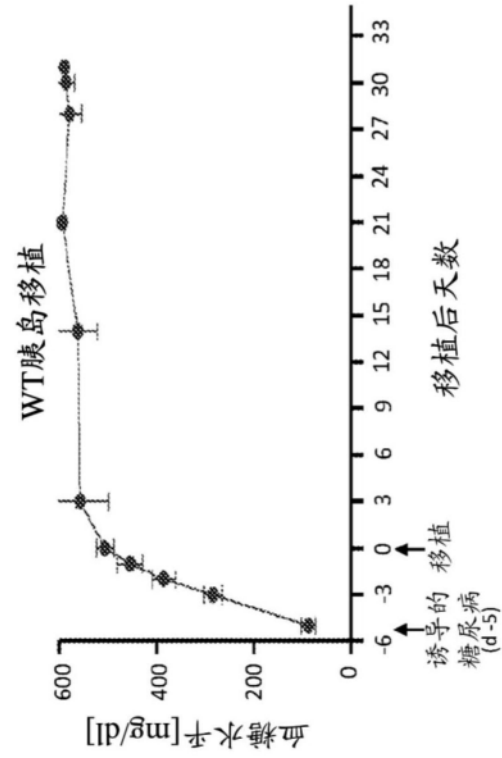


图4E

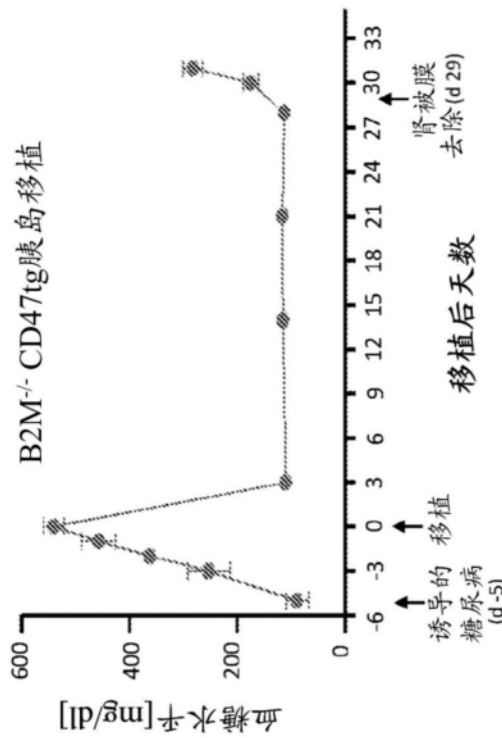


图4F

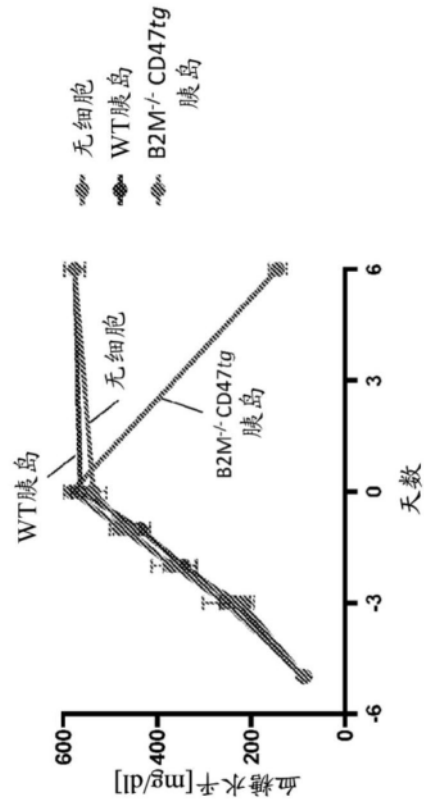


图5A

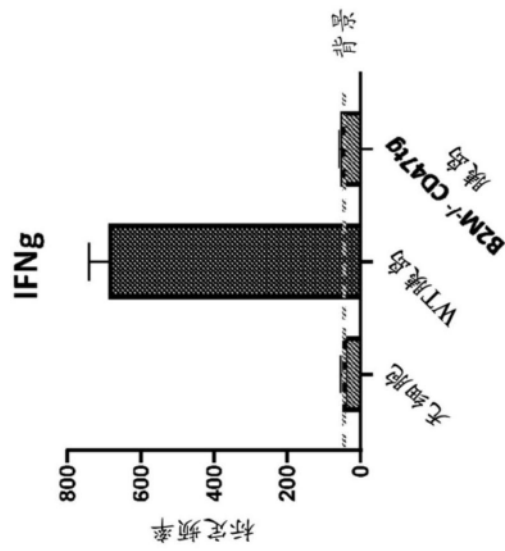


图5B

NK 细胞

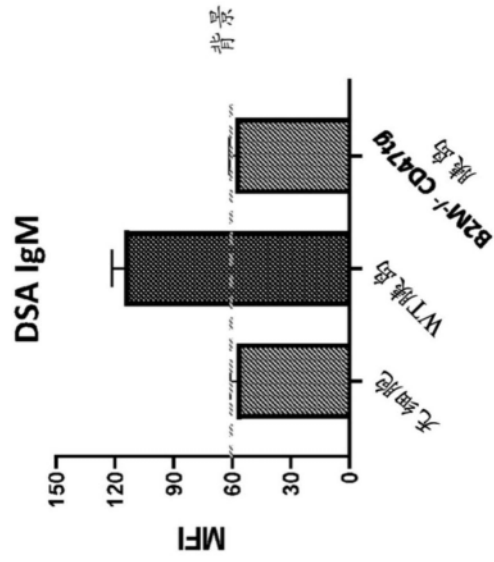
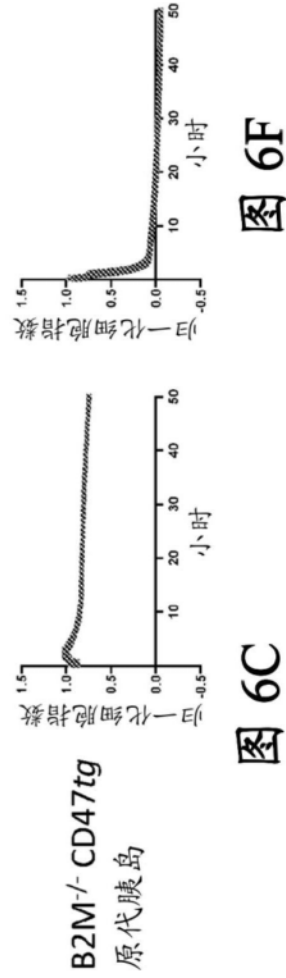
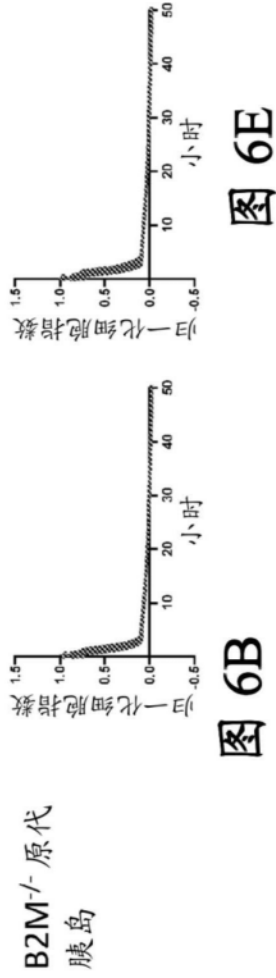
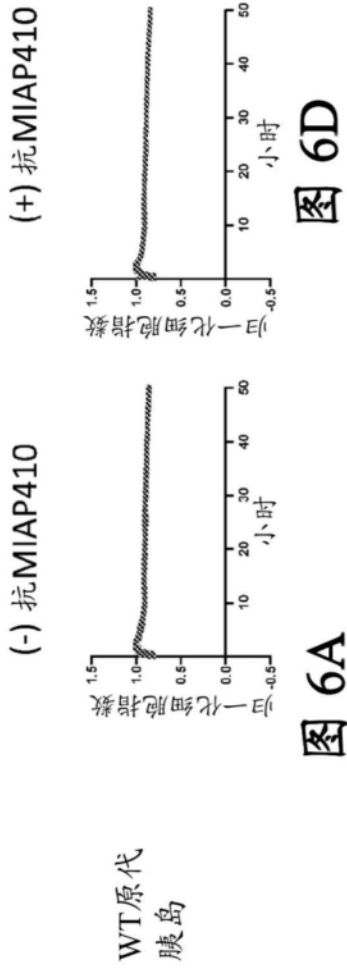


图5C

巨噬细胞

(+) 抗MIAP410

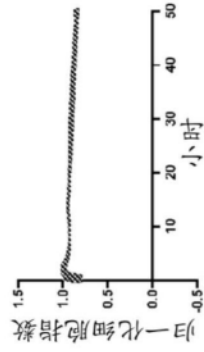


图 7D

(-) 抗MIAP410

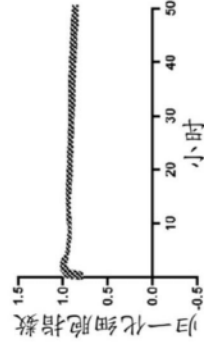


图 7A

WT原代  
胰岛

B2M<sup>-/-</sup>原代  
胰岛

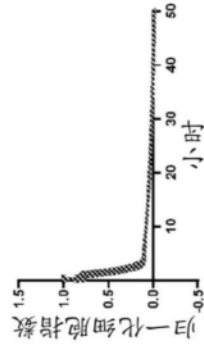


图 7E

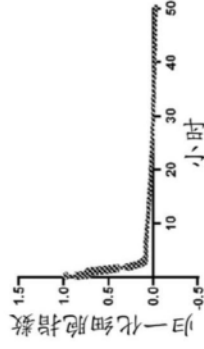


图 7B

B2M<sup>-/-</sup> CD47tg  
原代胰岛

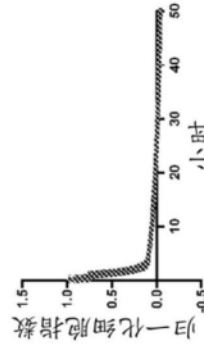


图 7F

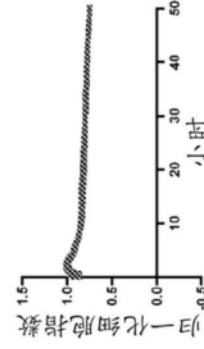
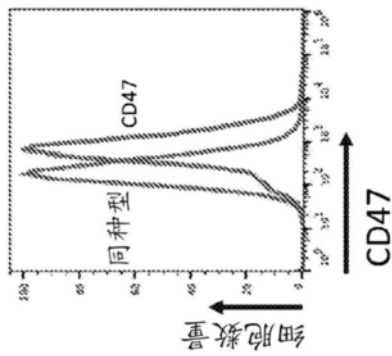


图 7C



MOI 0 (DKO)

图8A

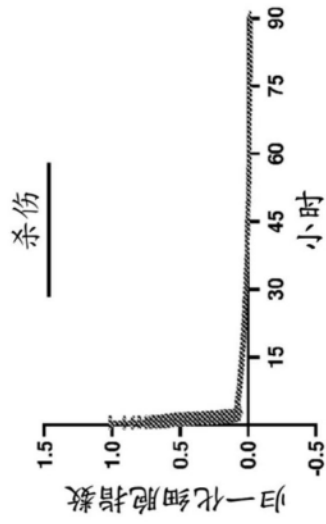


图8B

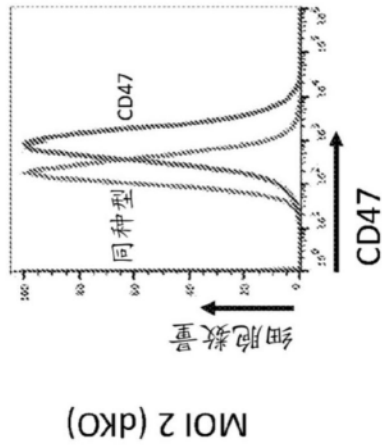


图8C

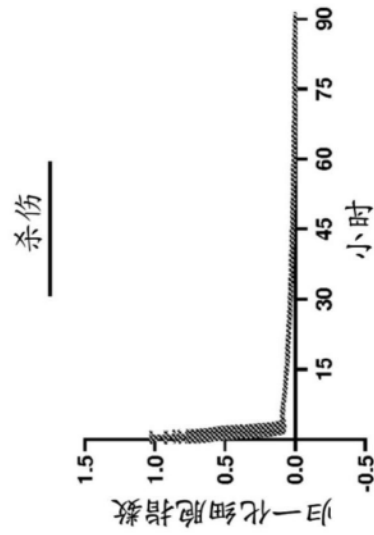
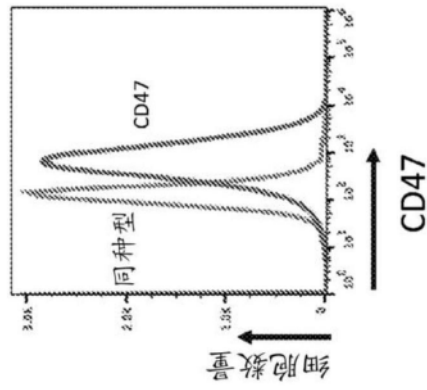


图8D



MOI 5 (dKO)

图8E

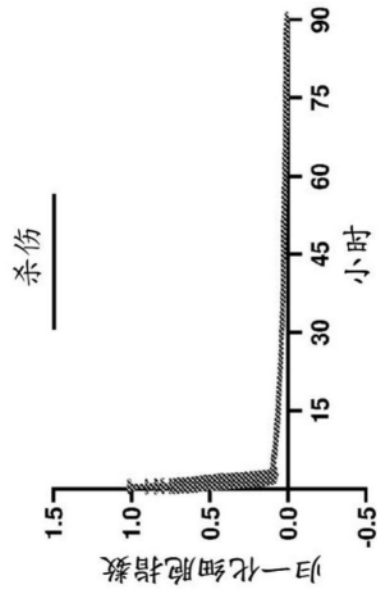
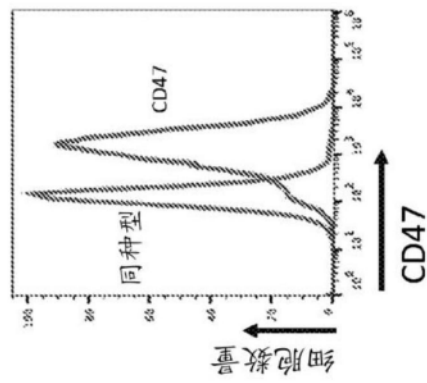


图8F



MOI 10 (dKO)

图8G

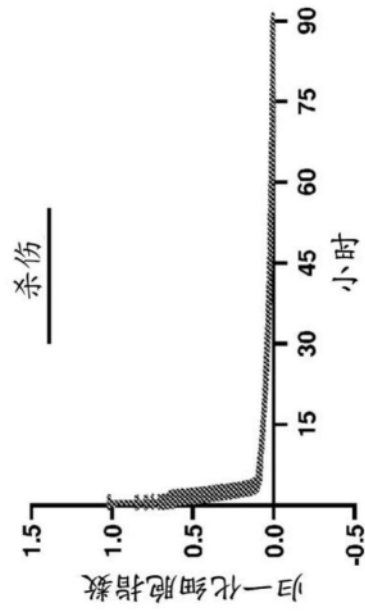


图8H

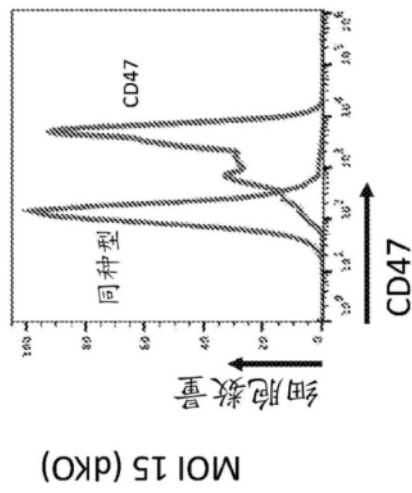


图8I



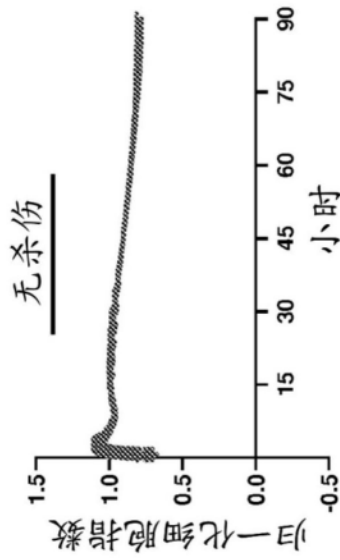


图8J

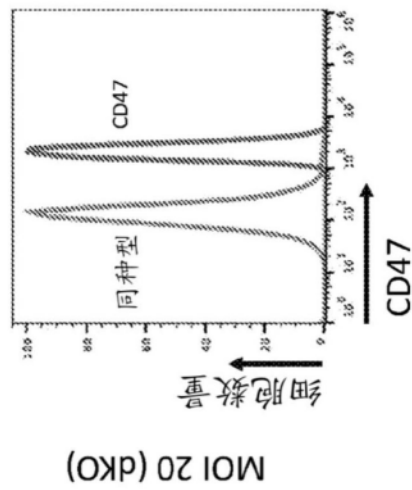


图8K

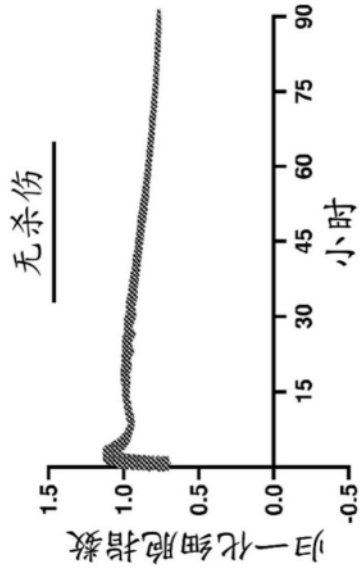


图8L

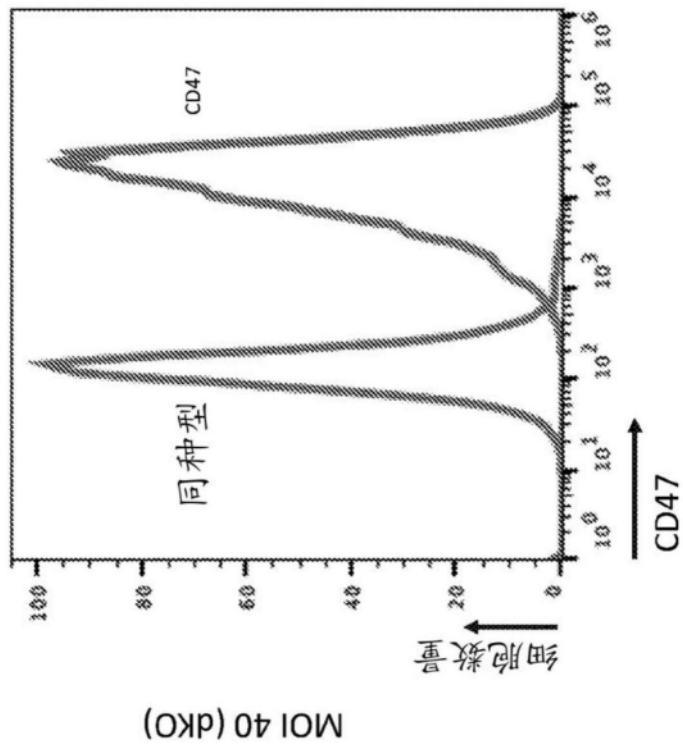


图8M

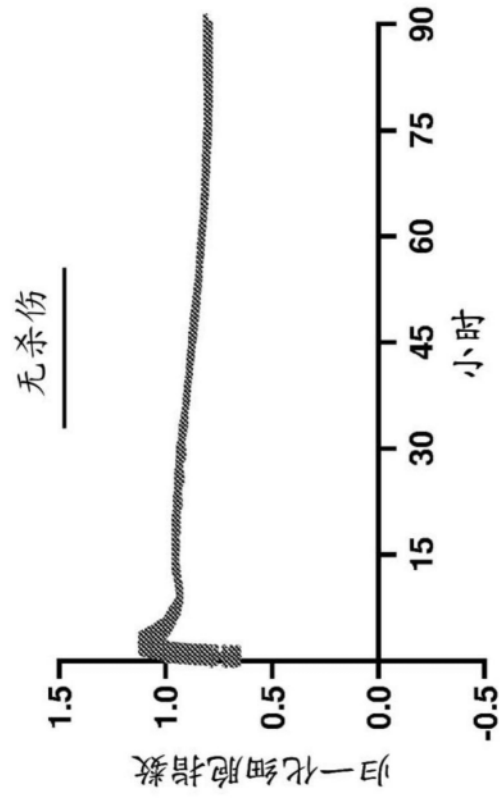


图8N

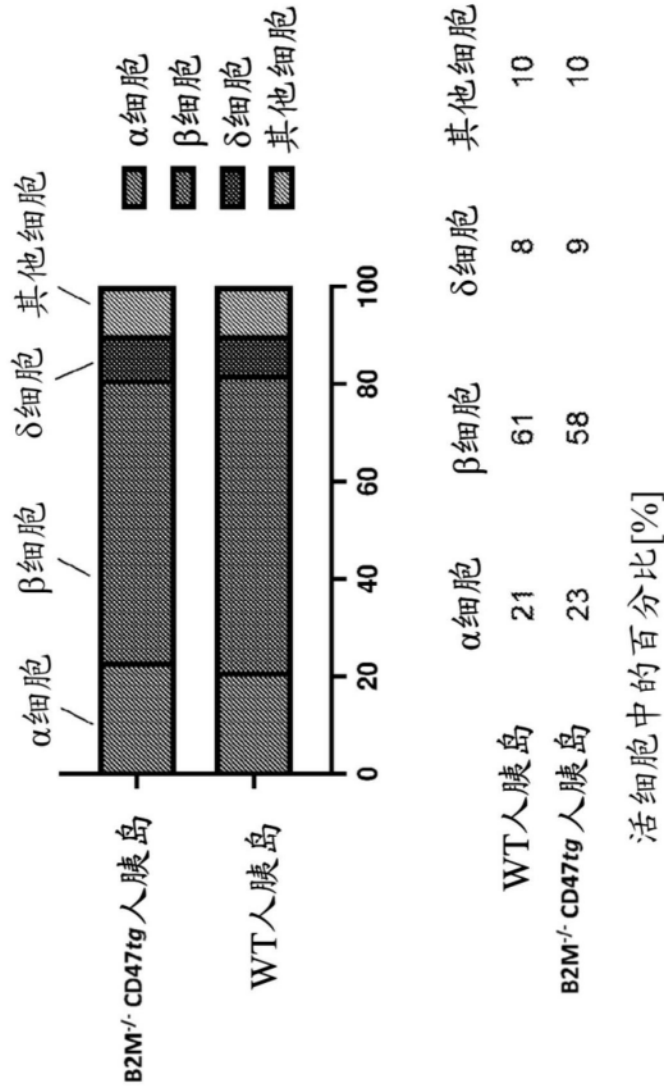
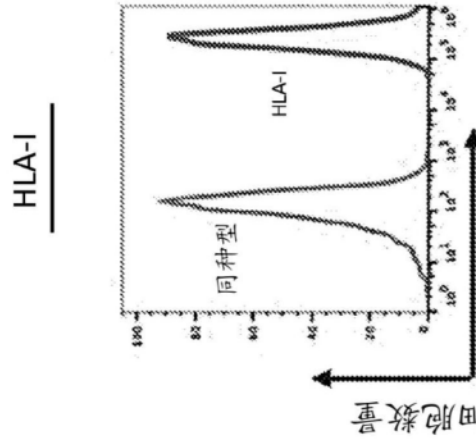
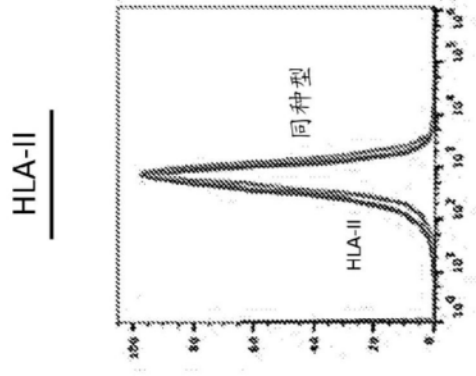
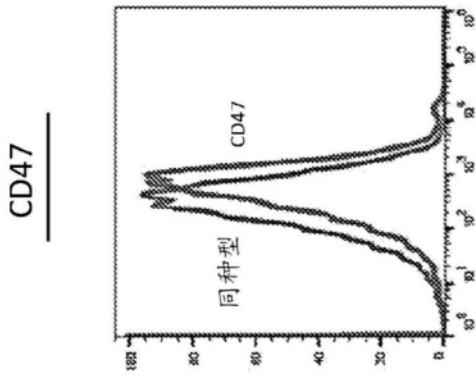


图9A

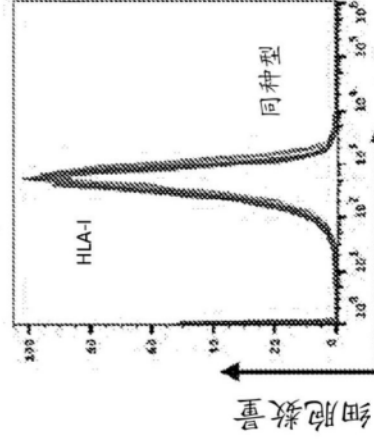
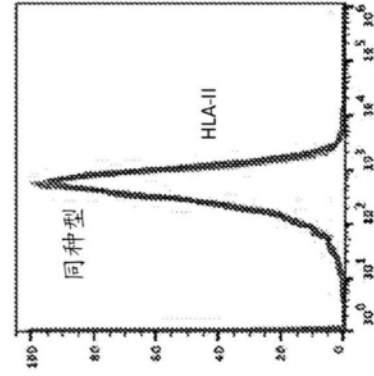
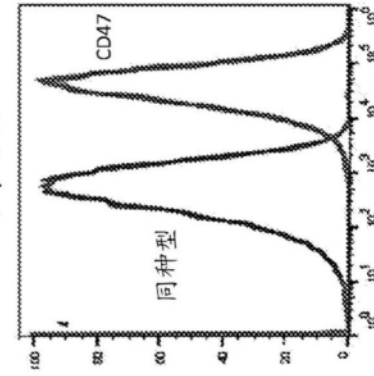


WT人  
原代  
胰岛

图 9B

图 9D

图 9F



B2M<sup>-/-</sup>  
CD47tg  
人原代  
胰岛

感兴趣的分子

图 9C

图 9E

图 9G

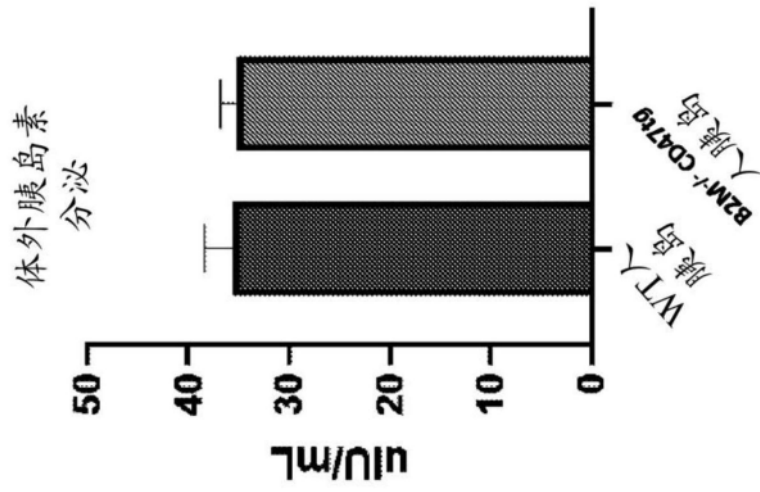
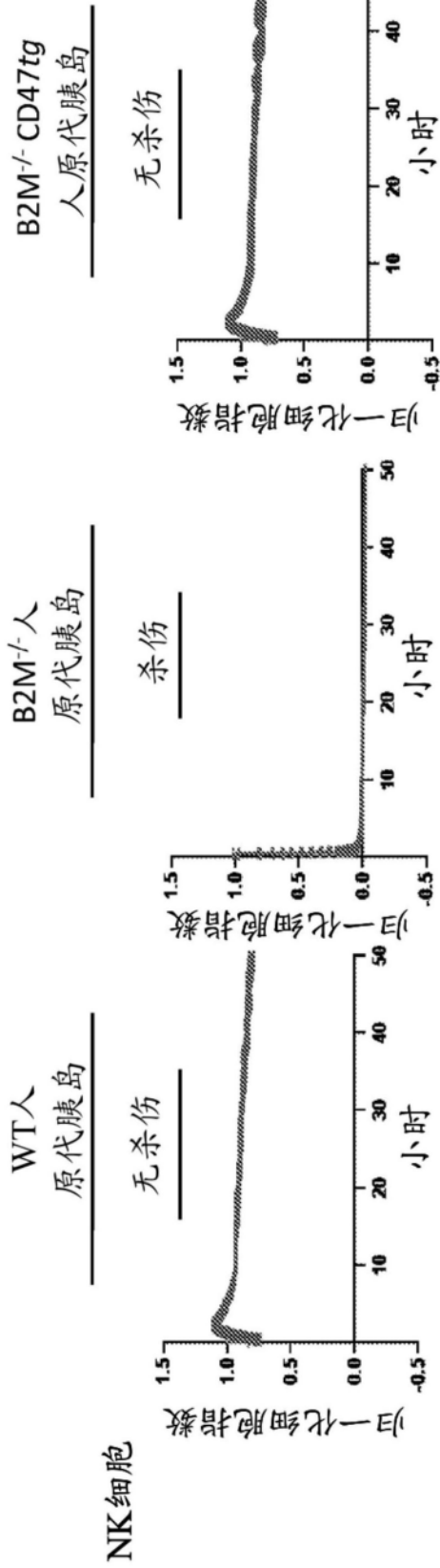
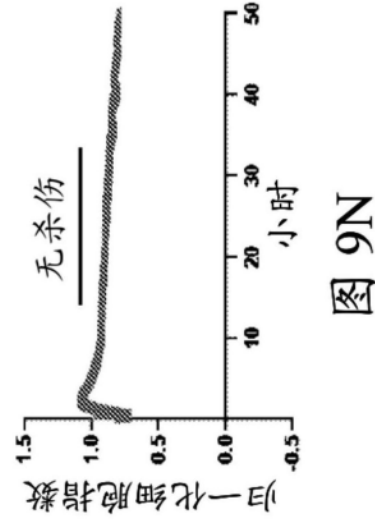
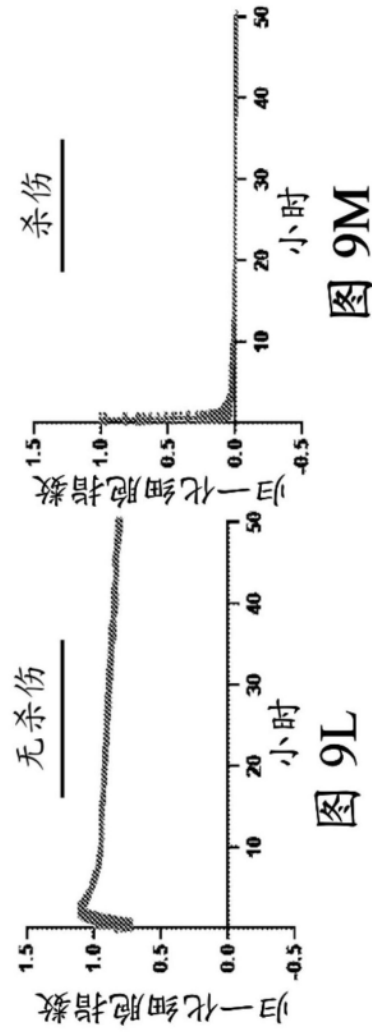


图9H



巨噬细胞



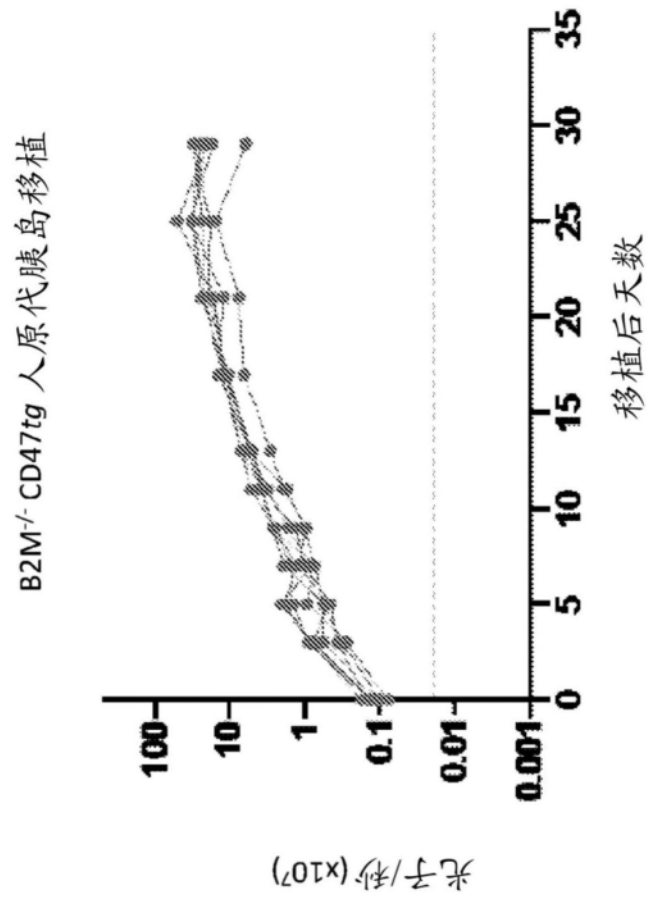


图10A





图10B

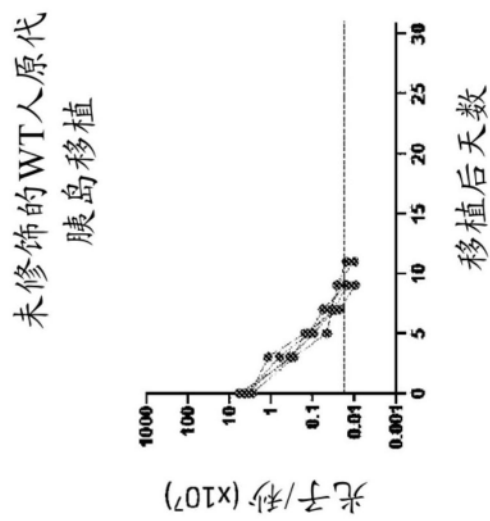


图10C

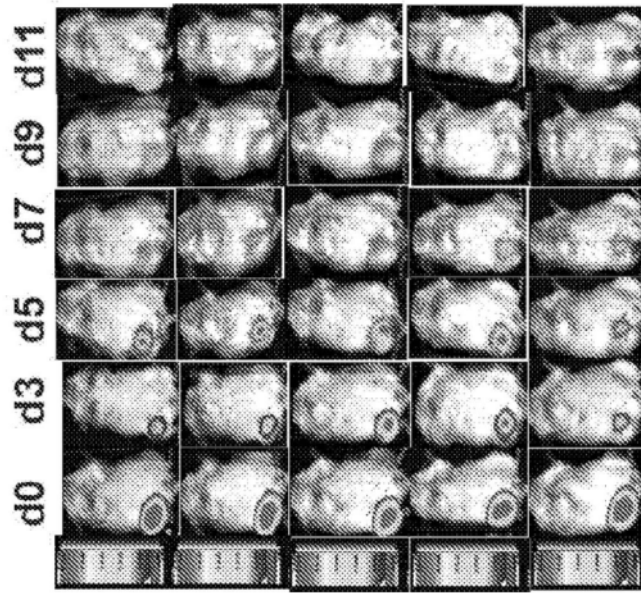


图10D

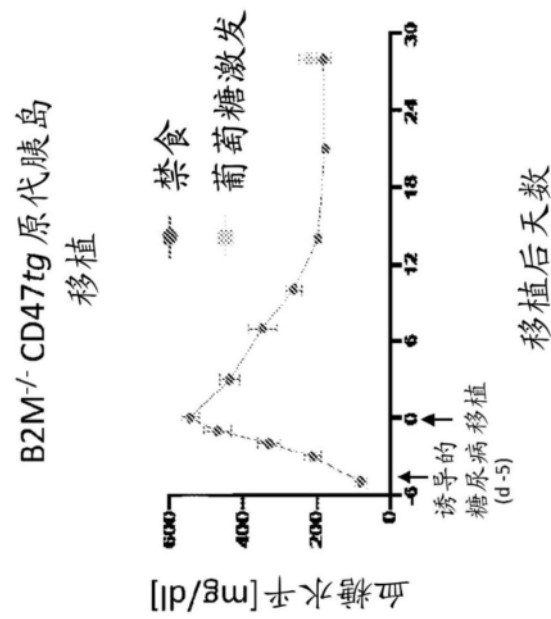


图10E

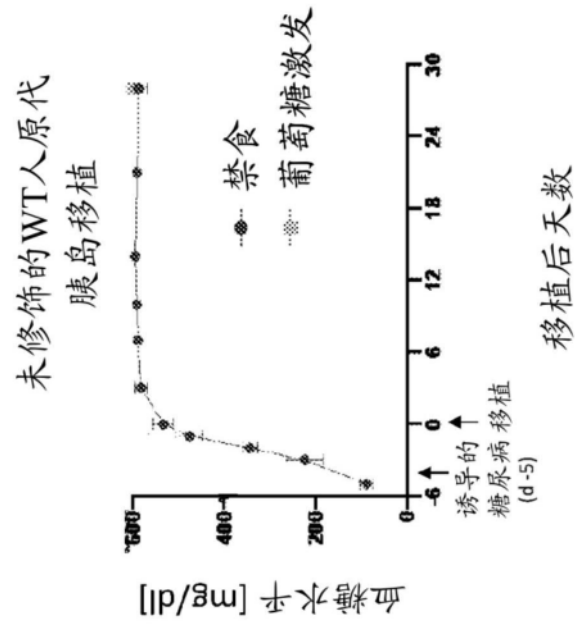


图10F

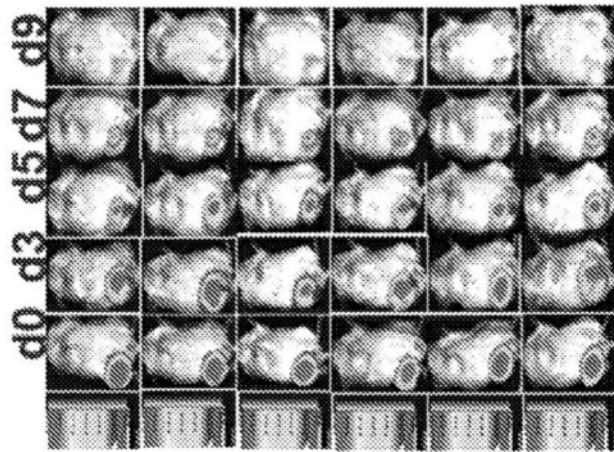


图10G

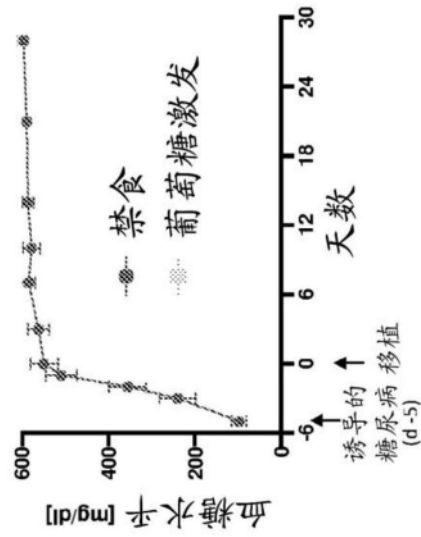


图10H

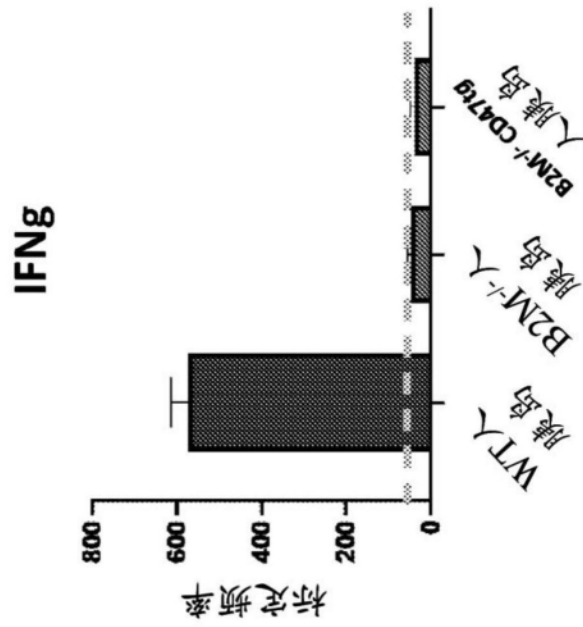


图10I

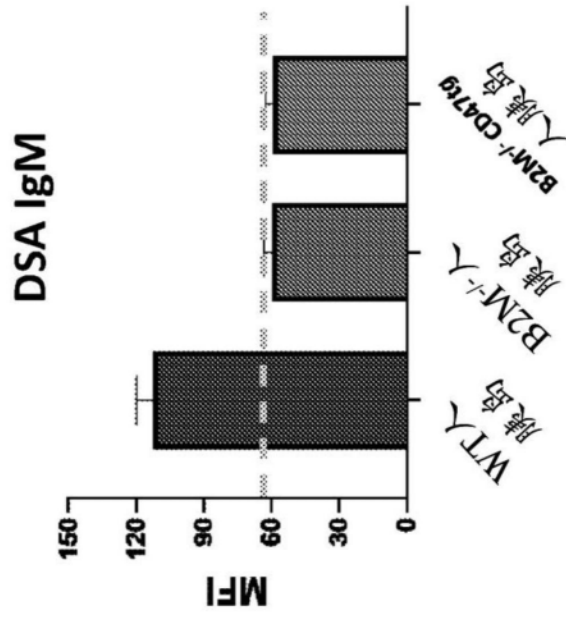


图10J

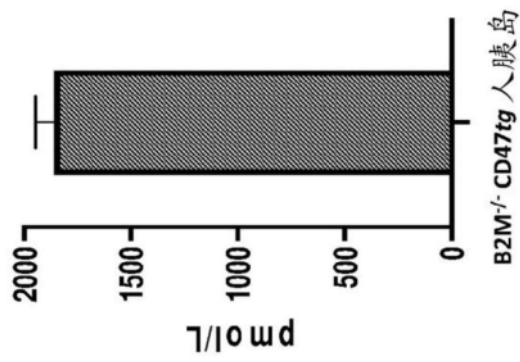


图11A

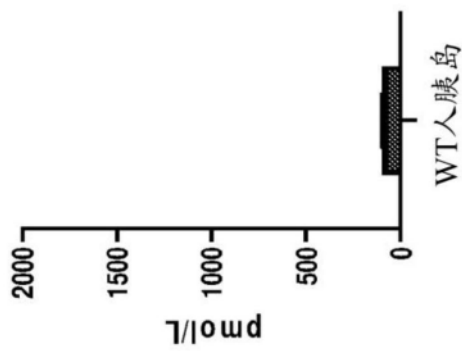


图11B

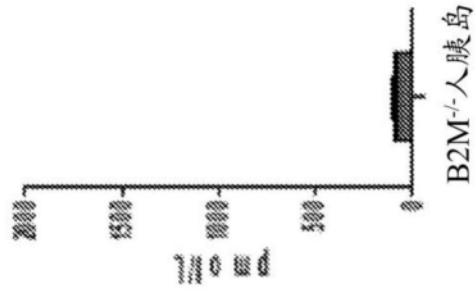


图11C

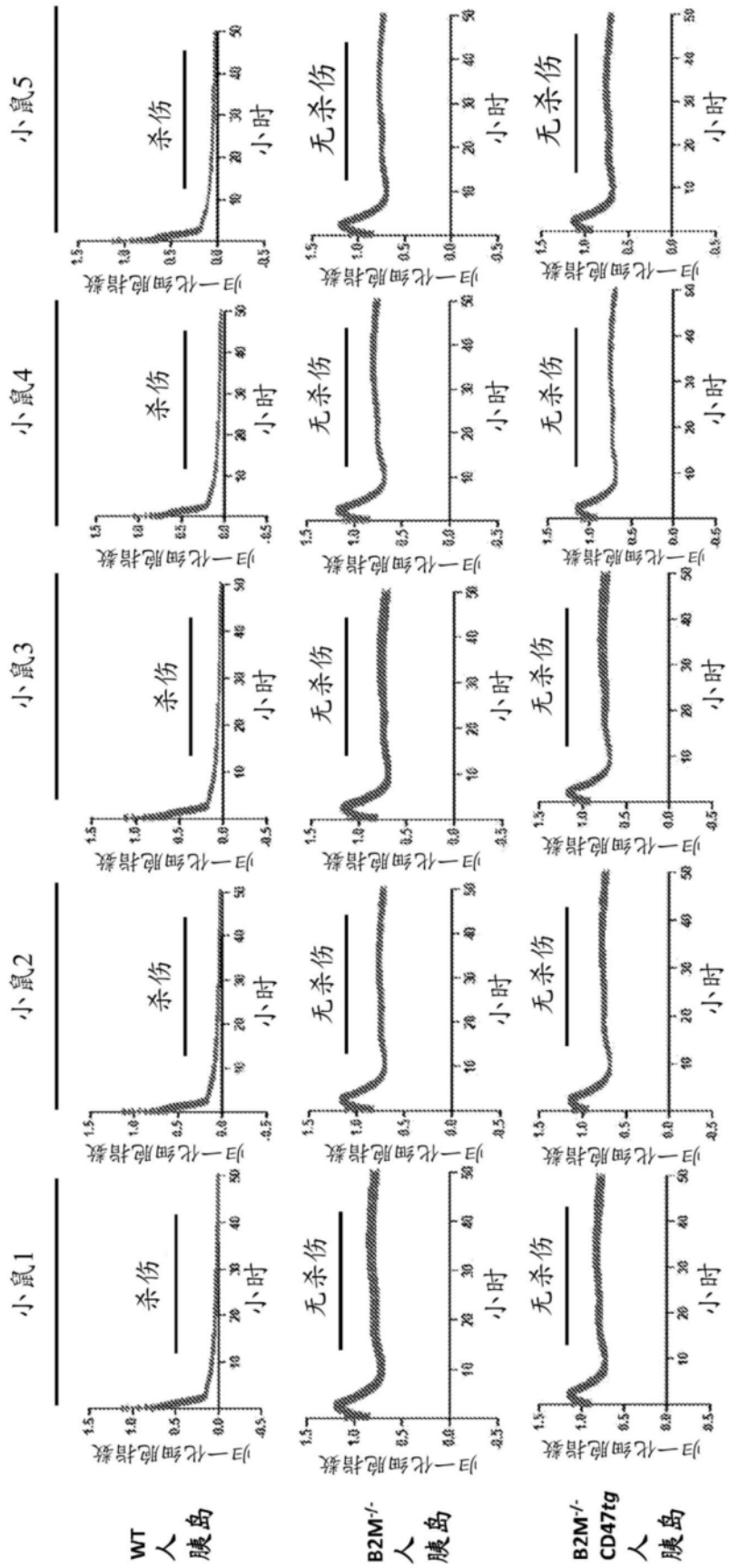


图12A

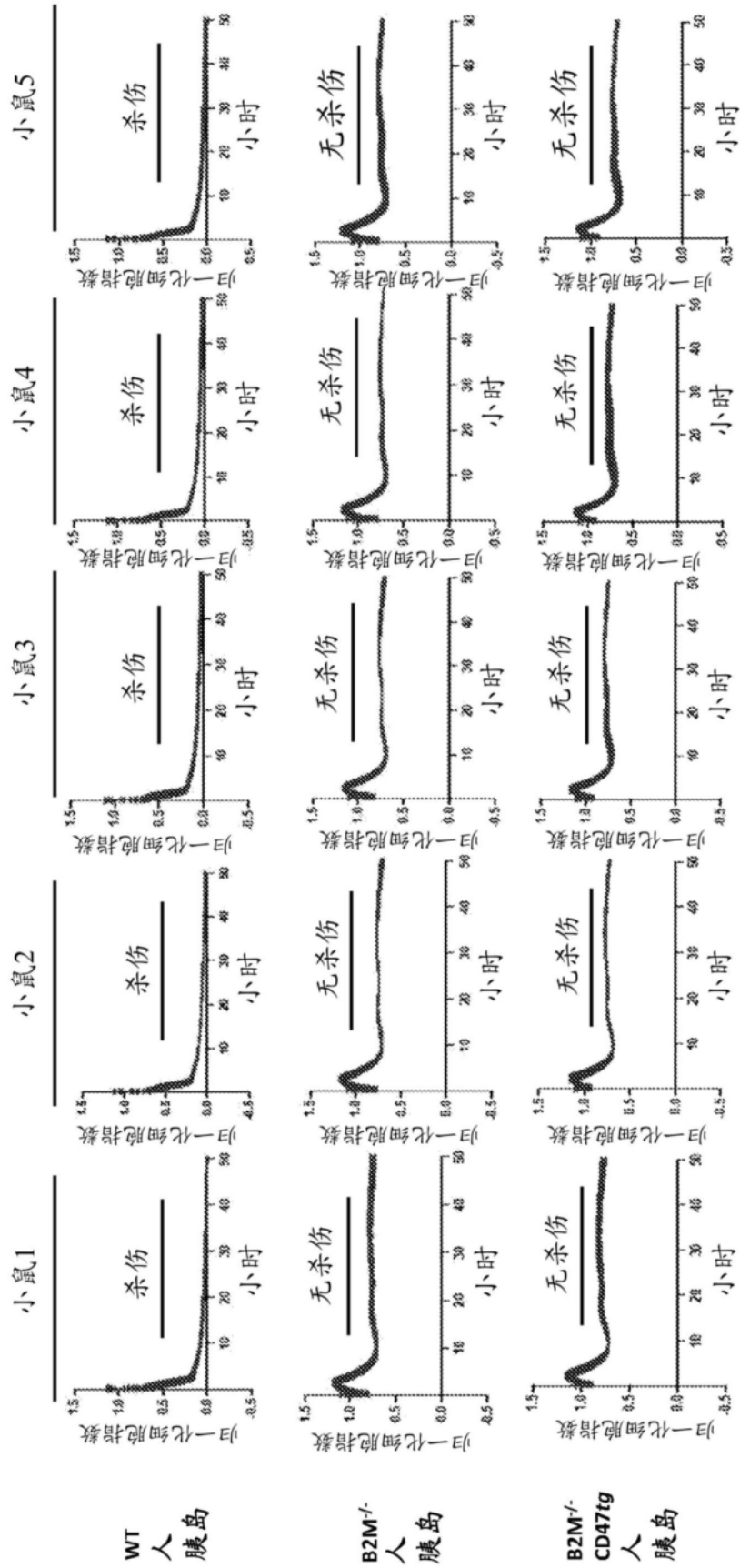


图12B



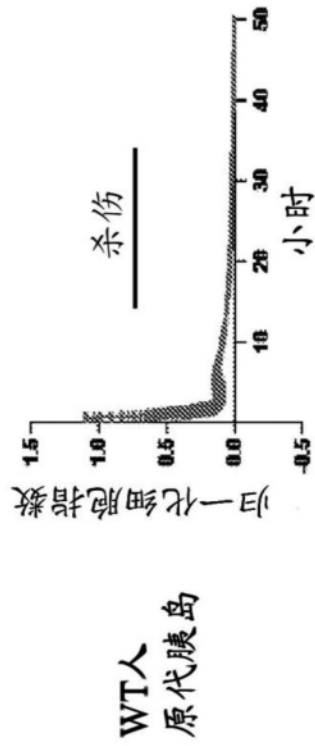


图13A

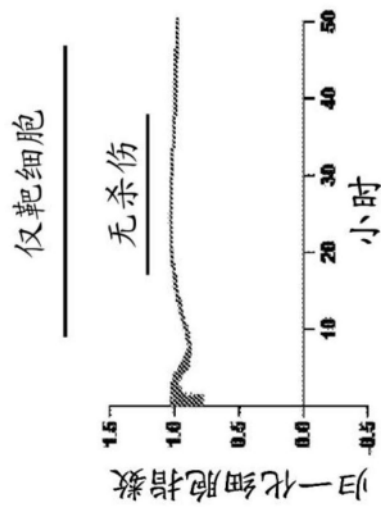


图13B

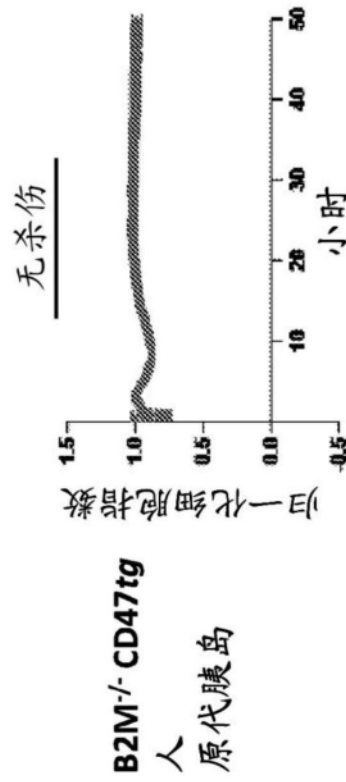


图13C

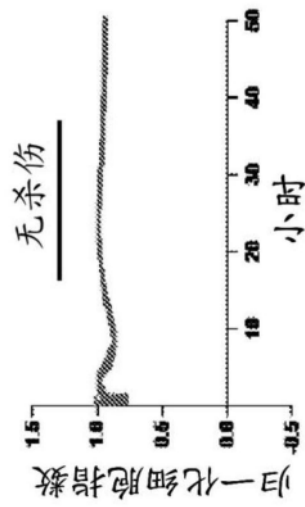


图13D

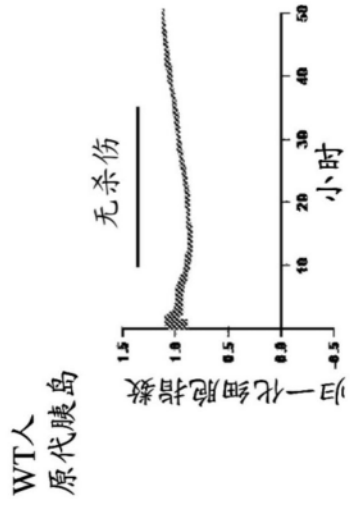


图13E

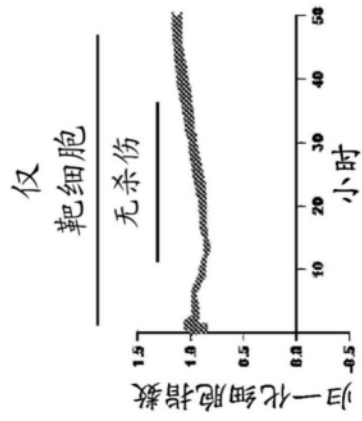


图13F

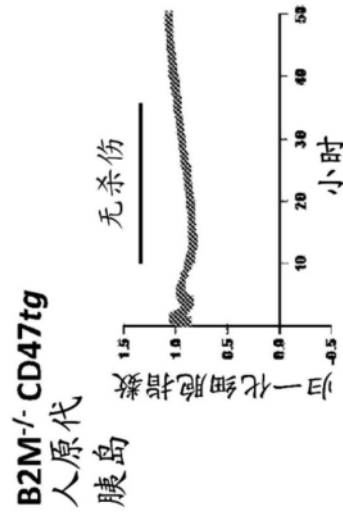


图13G

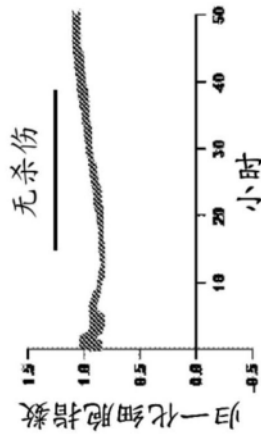


图13H

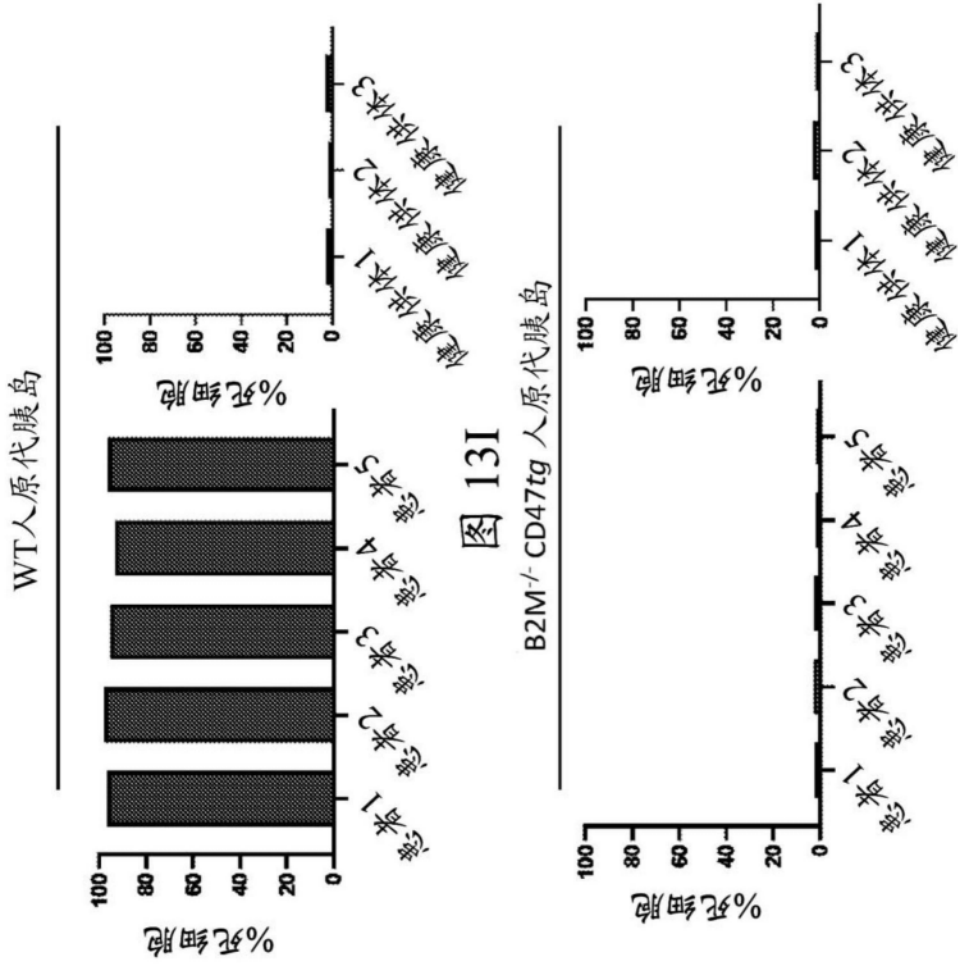


图 13I

图 13J

B2M<sup>-/-</sup> CD47tg 人  
原代胰岛

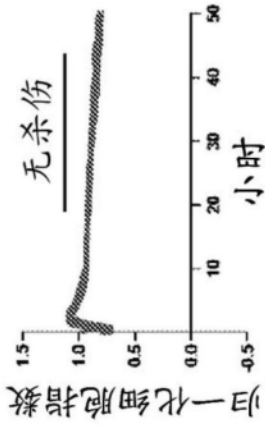


图 14A

B2M<sup>-/-</sup> CD47tg 人  
原代胰岛+抗 CD47 IgG1Fc

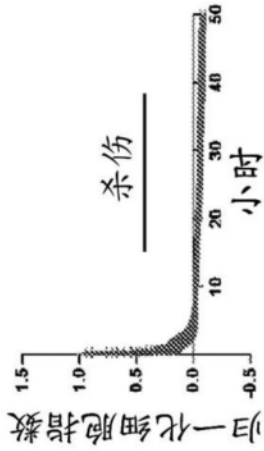


图 14B

B2M<sup>-/-</sup> CD47tg 人  
原代胰岛+抗 CD47 IgG4Fc

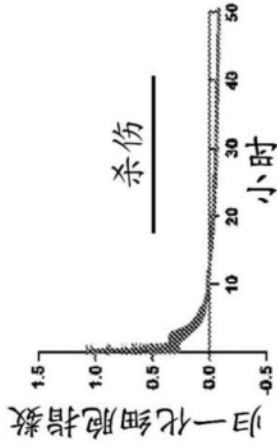


图 14C

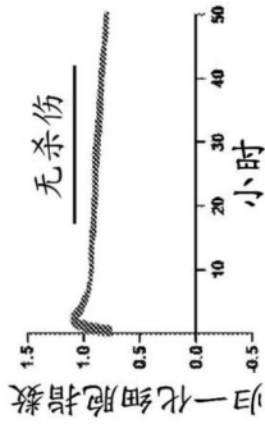


图 14D

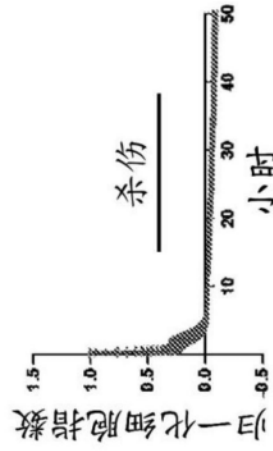


图 14E

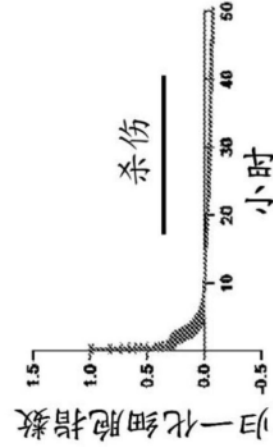


图 14F

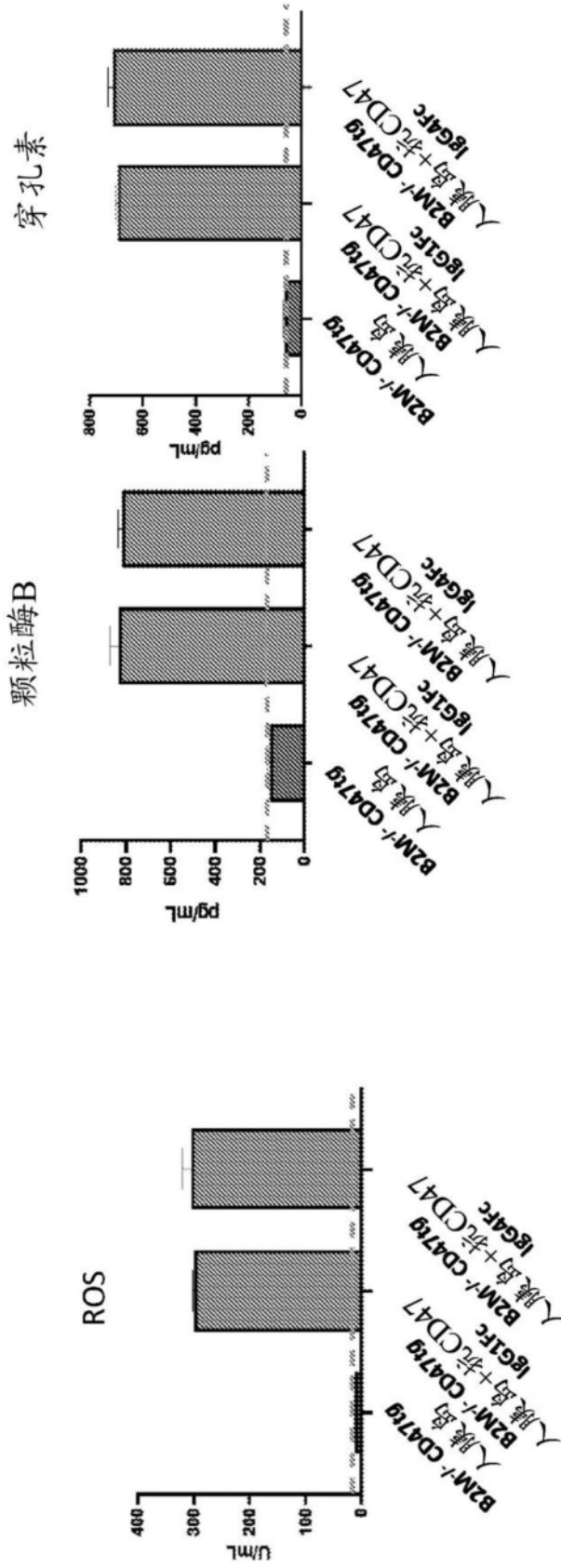


图15C

图 15A

图 15B

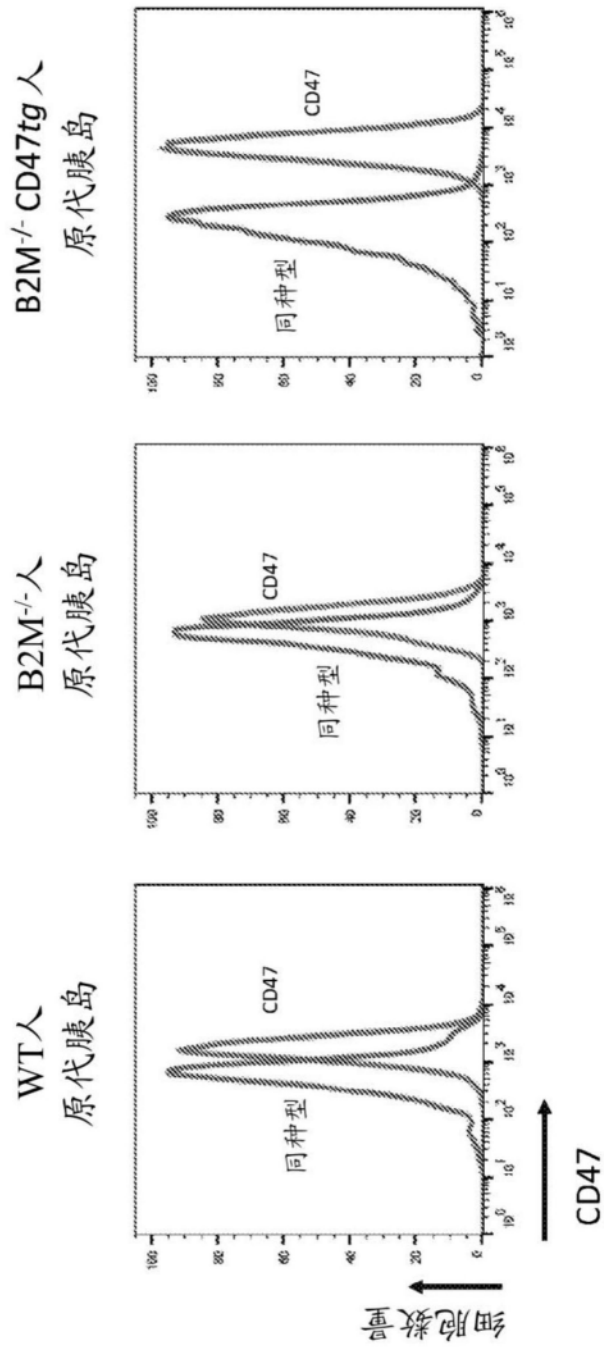


图16



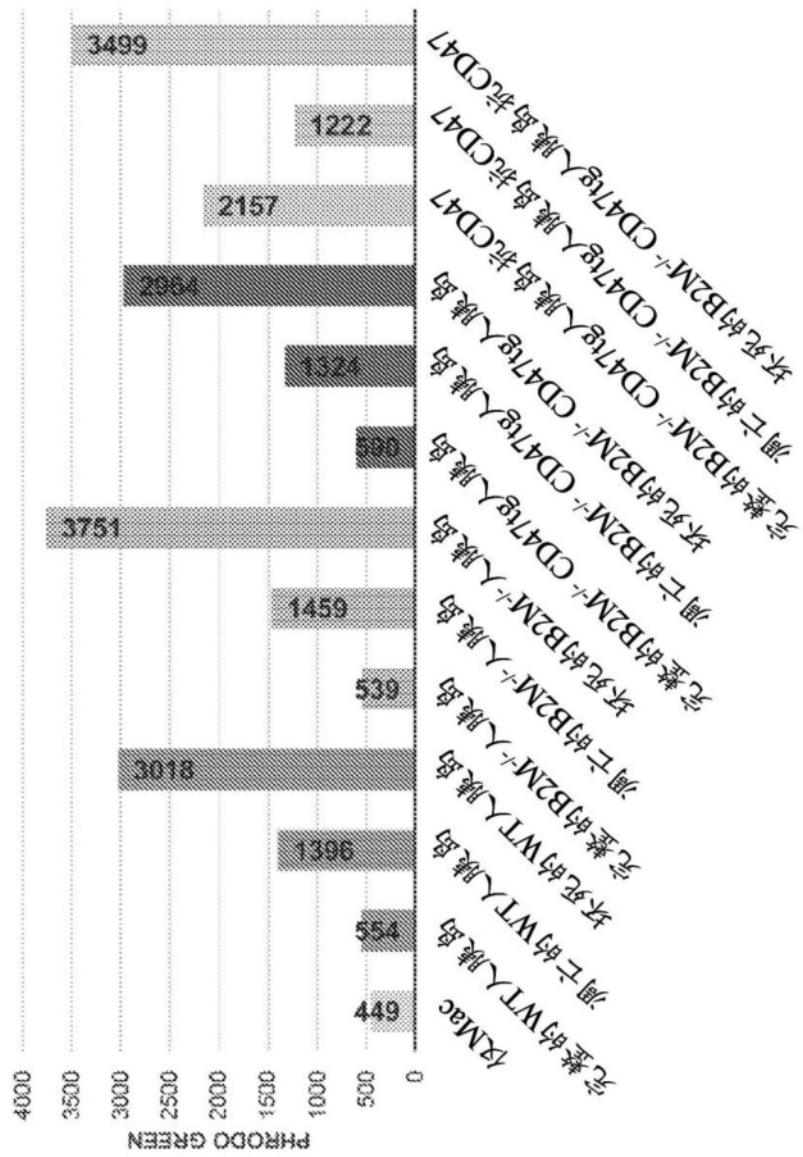


图17

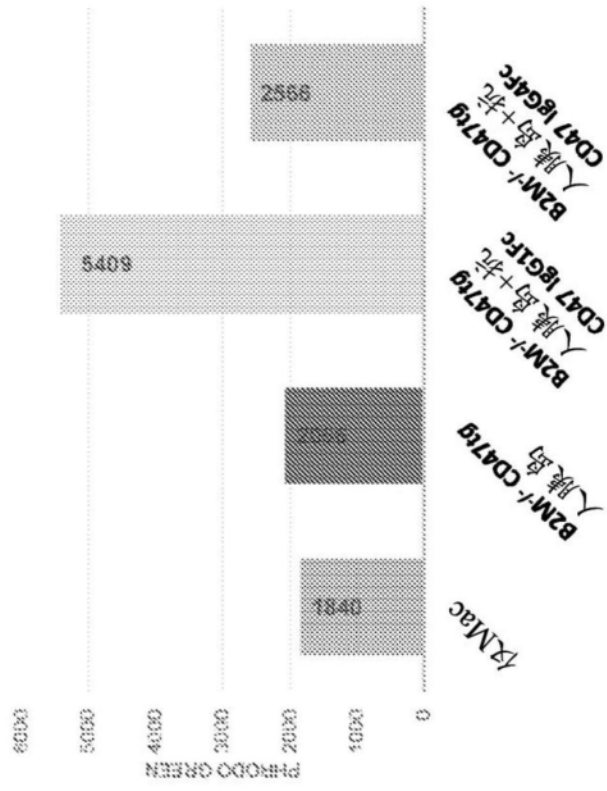


图18

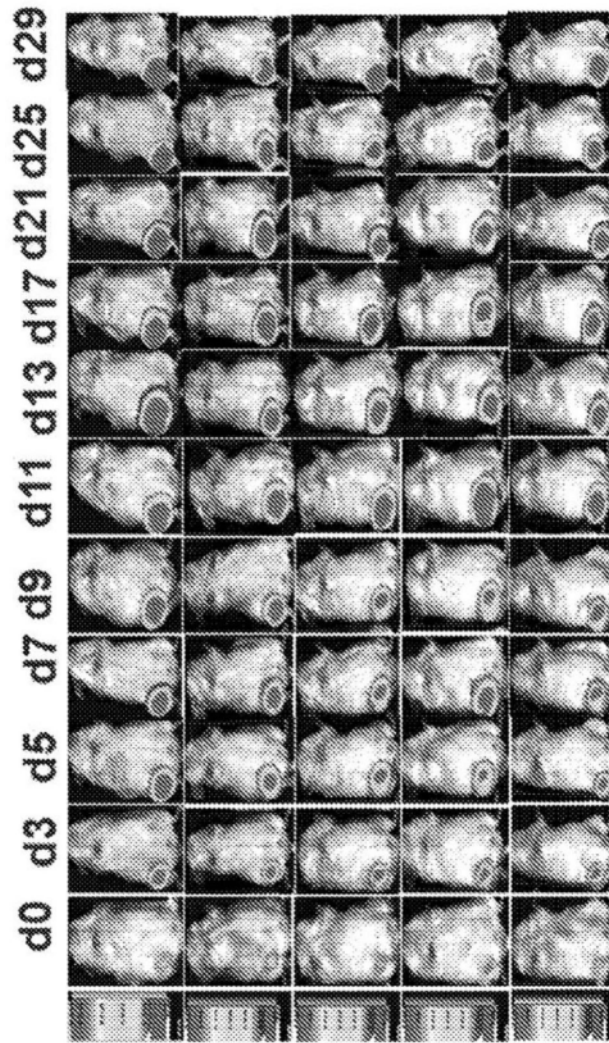


图19A

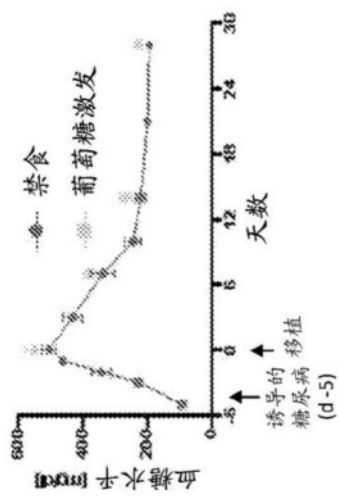


图19B

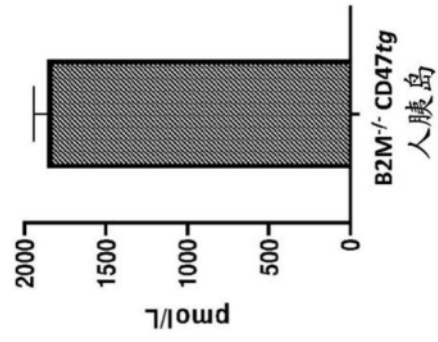


图19C

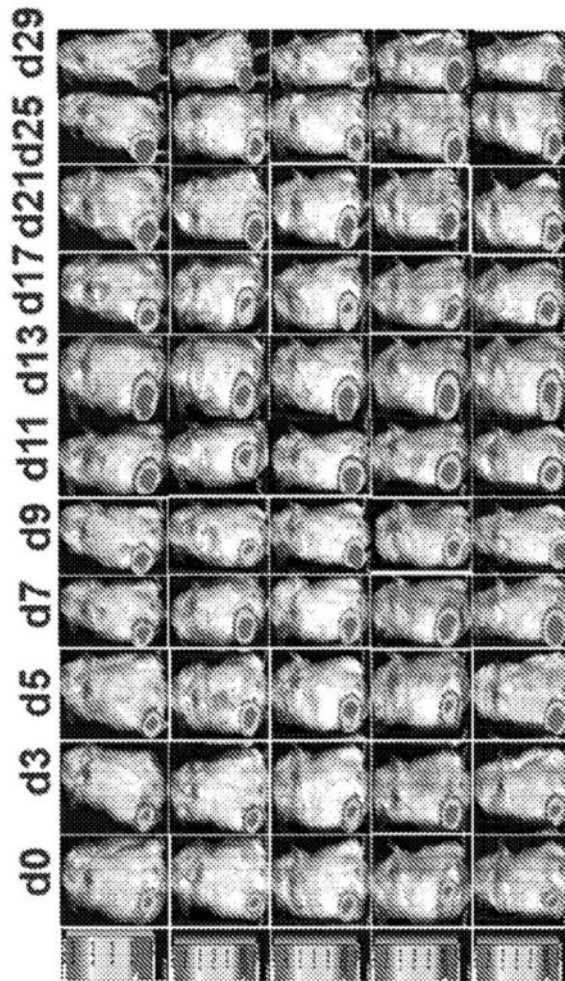


图19D

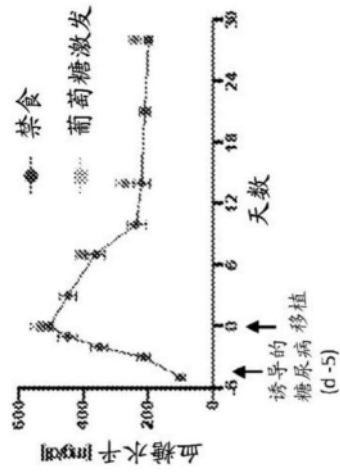


图19E

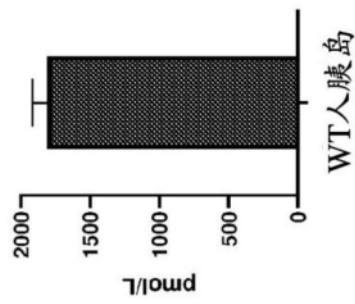


图19F

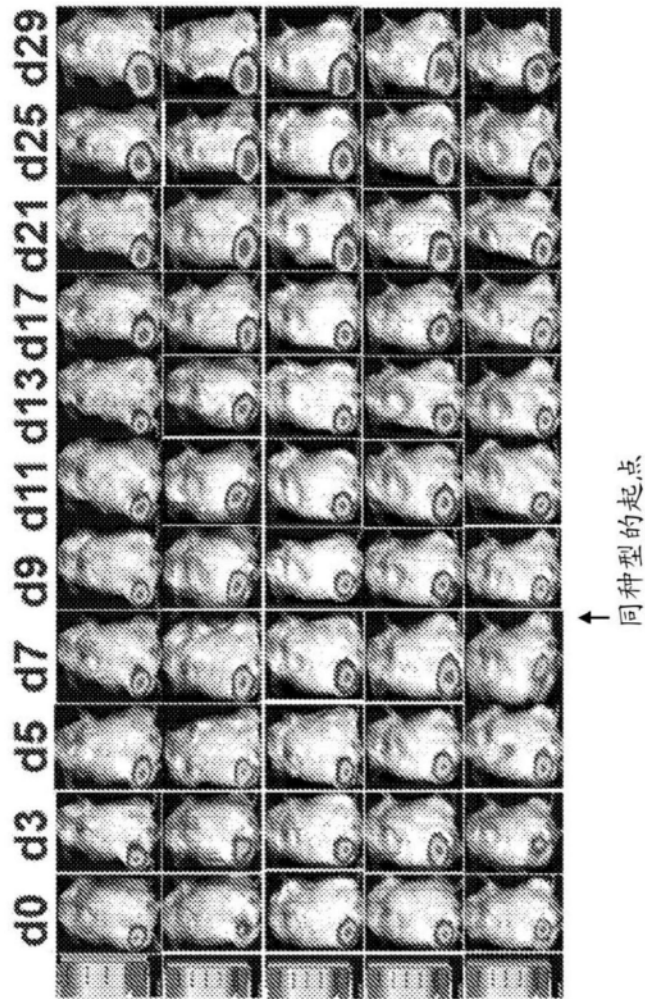


图20A

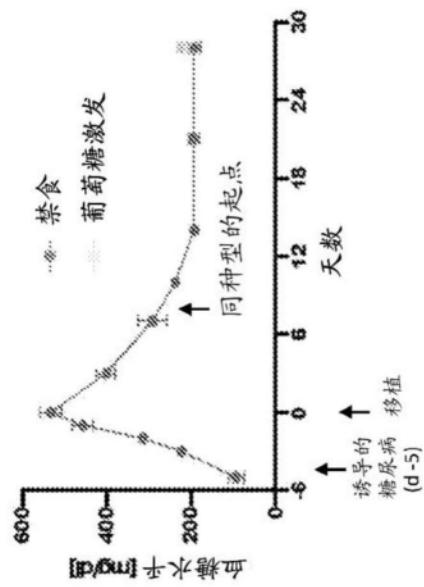


图20B

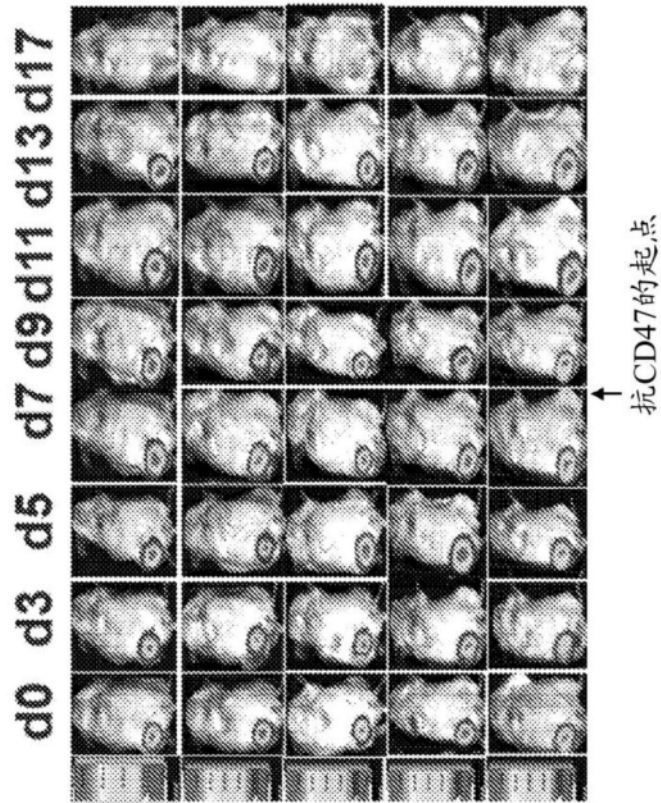


图20C

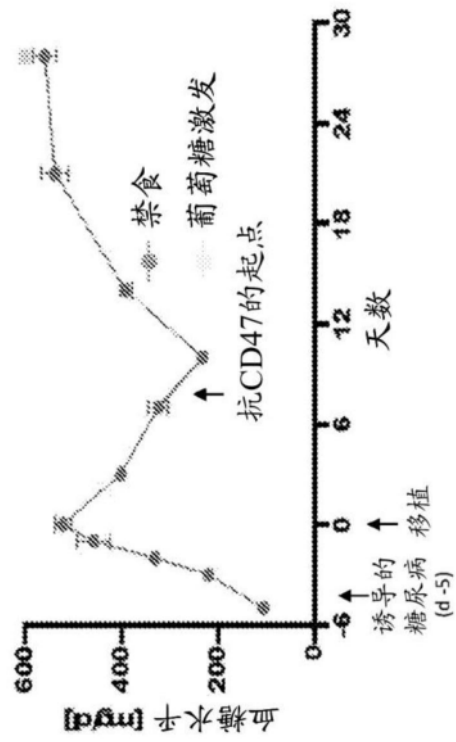


图20D

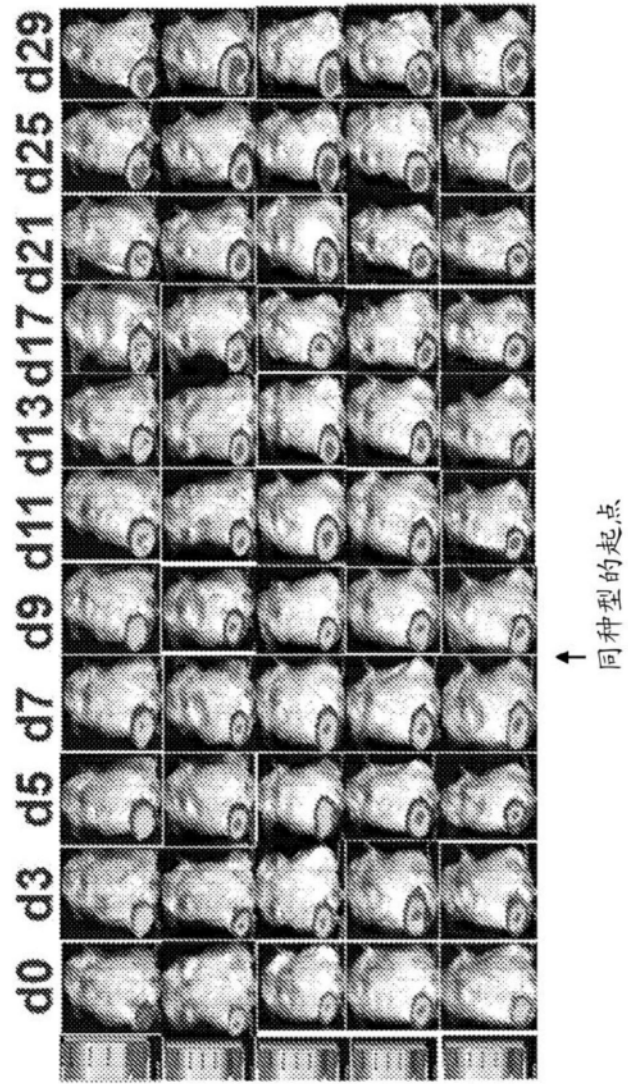


图21A



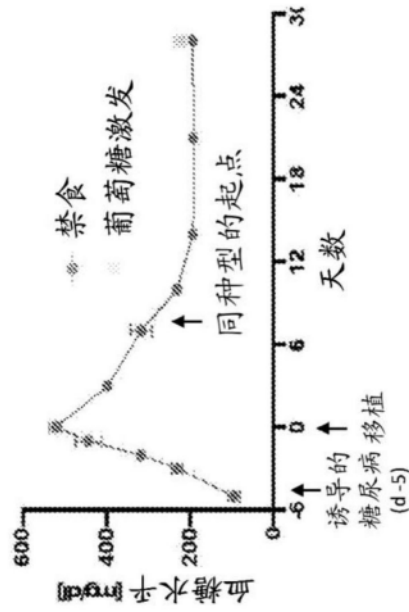


图21B

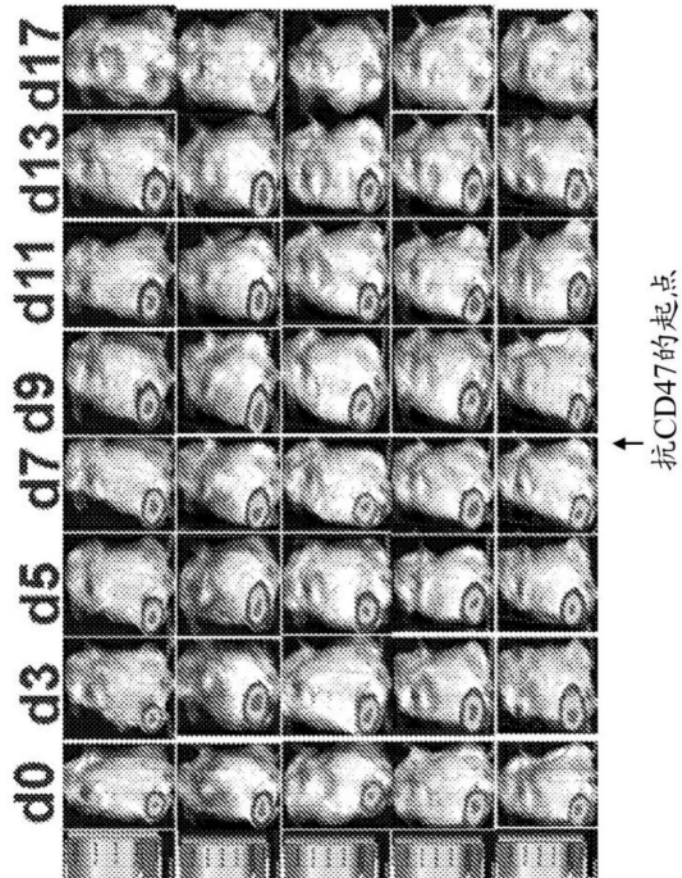


图21C

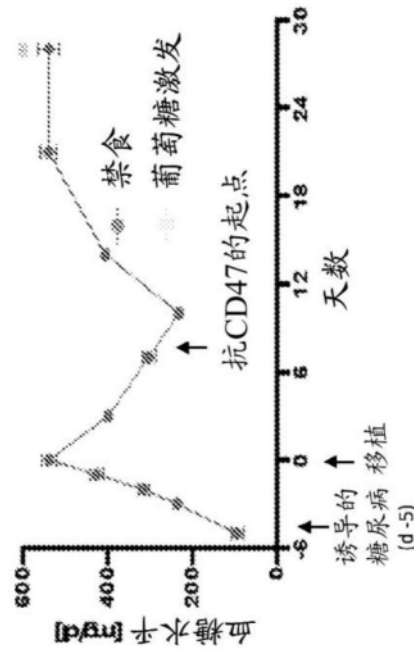


图21D

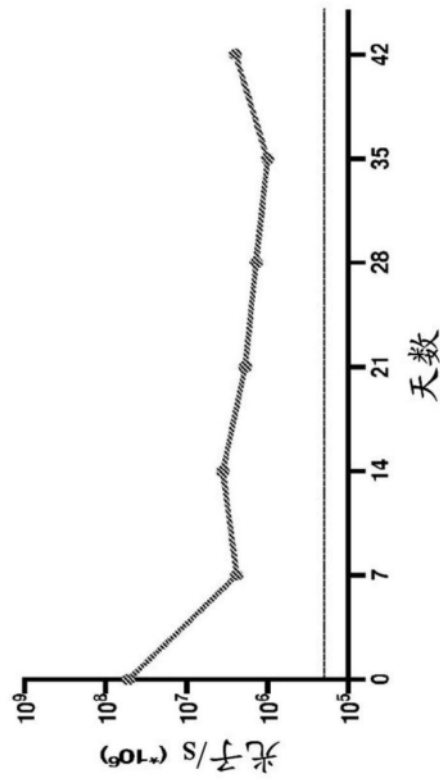


图22A

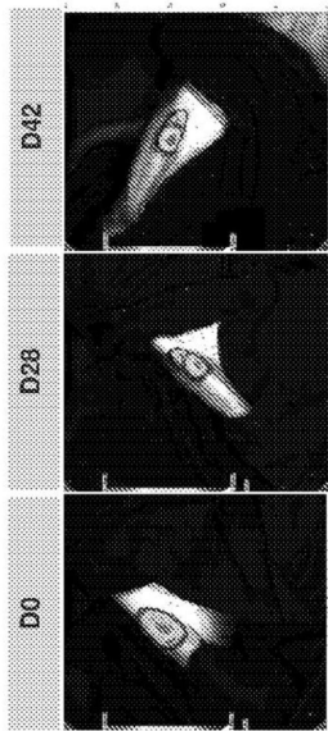


图22B

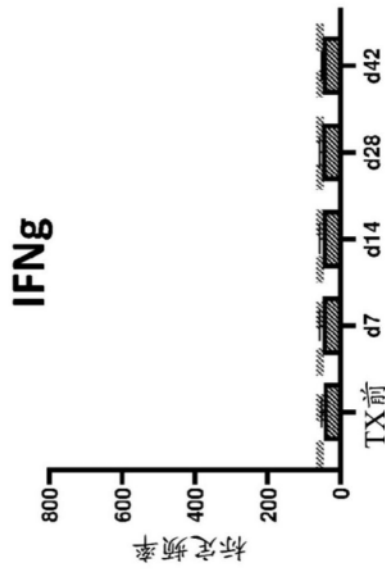


图23A

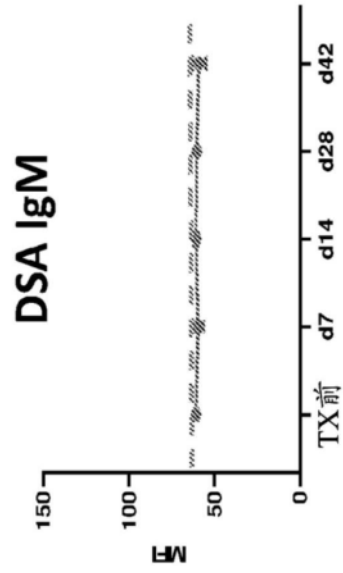


图23B

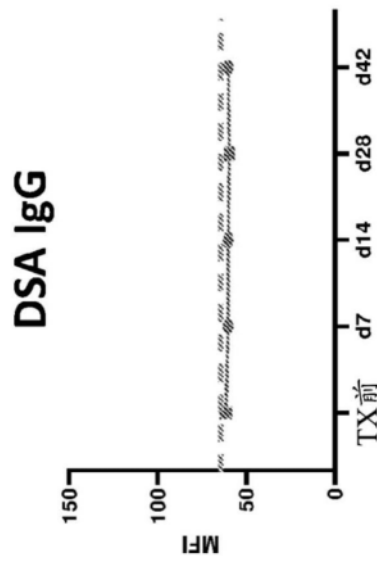


图23C

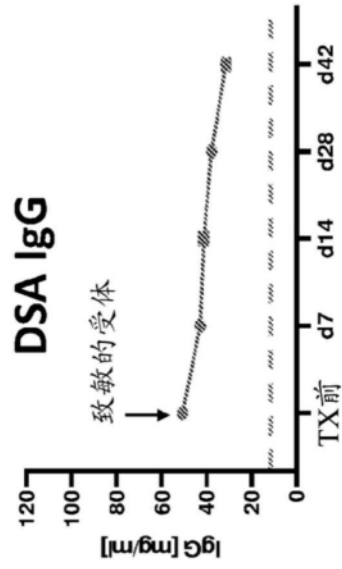


图23D

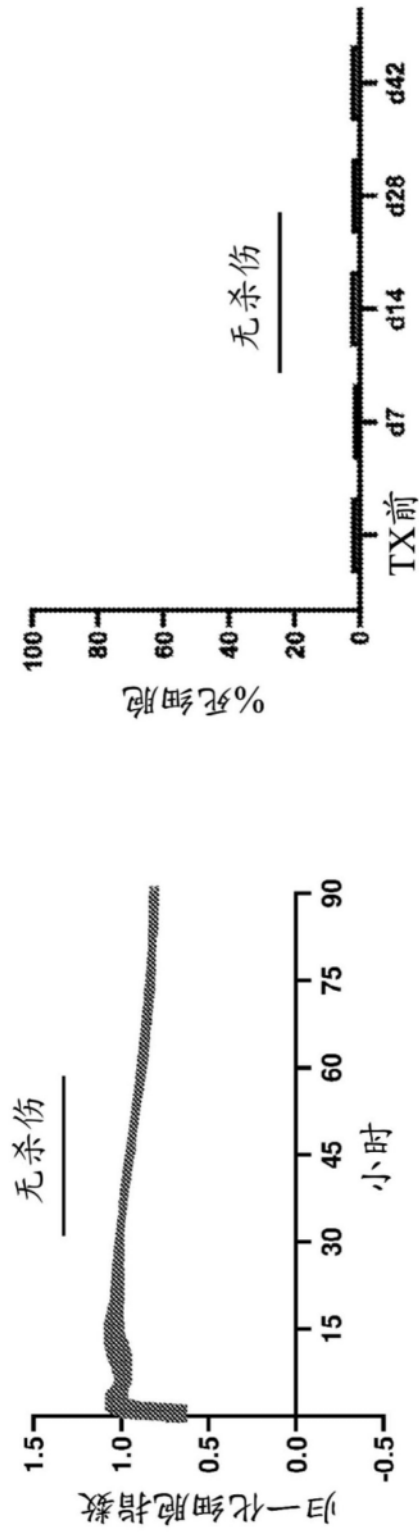


图24

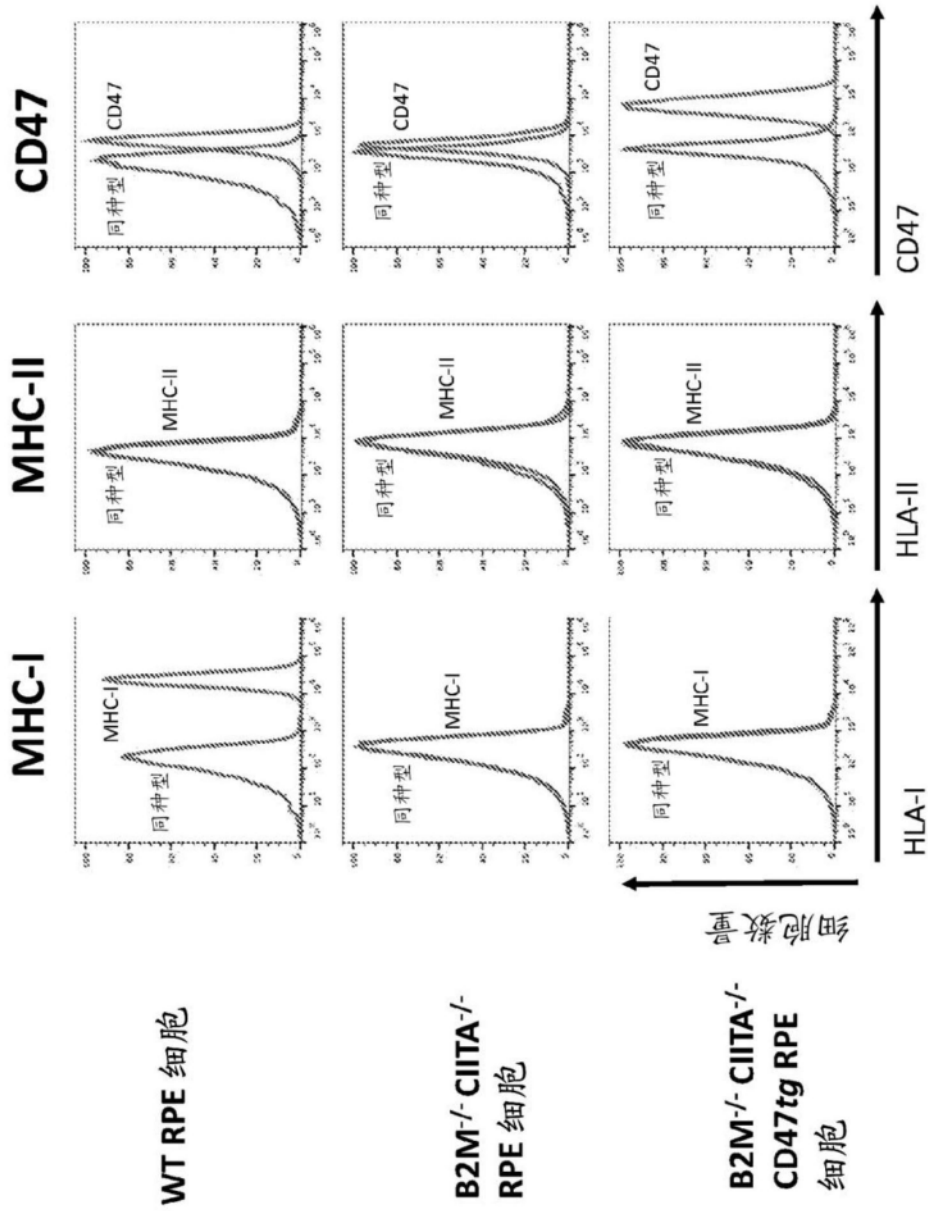
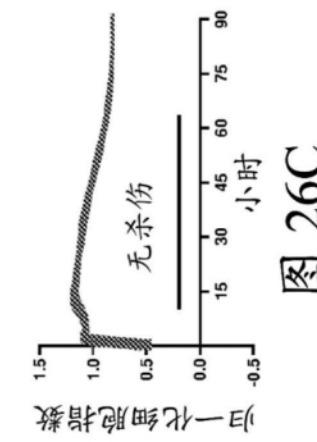
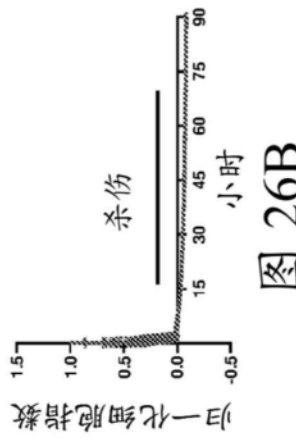
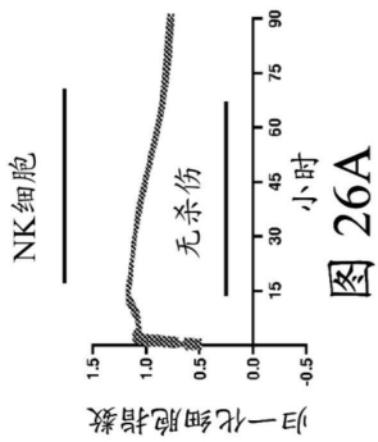
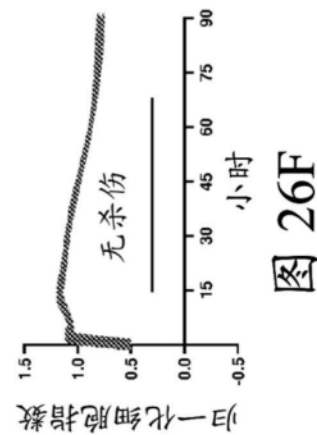
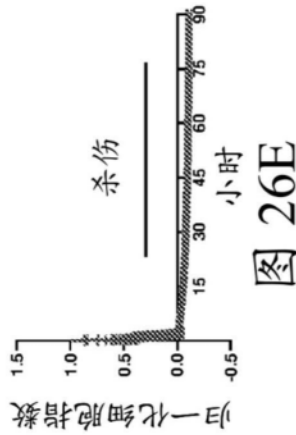
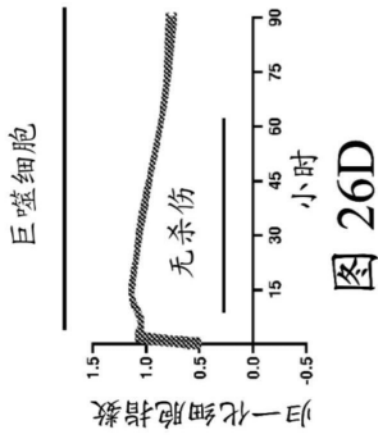
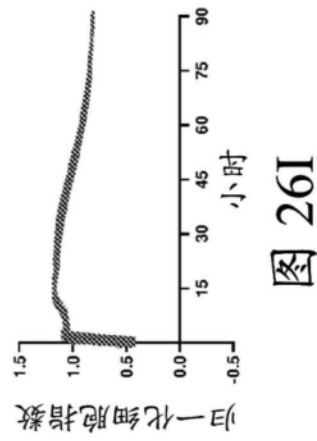
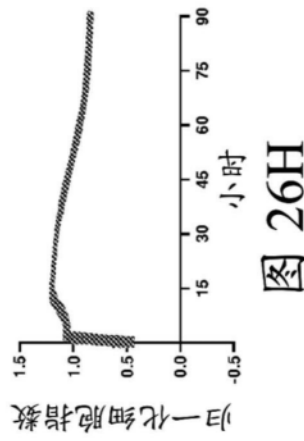
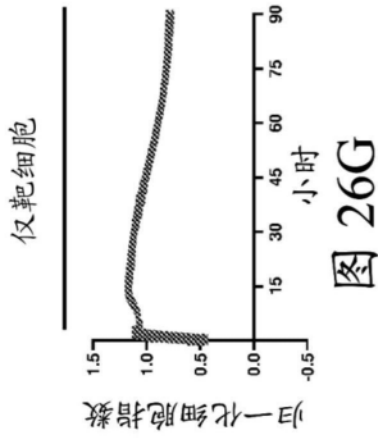


图25



WT RPE 细胞

B2M<sup>-/-</sup> CIITA<sup>-/-</sup> RPE 细胞

B2M<sup>-/-</sup> CIITA<sup>-/-</sup> CD47tg RPE 细胞