



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118434844 A

(43) 申请公布日 2024. 08. 02

(21) 申请号 202280067052.3

(22) 申请日 2022.08.11

(30) 优先权数据

63/232,164 2021.08.11 US

63/353,538 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/US2022/074874 2022.08.11

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/019227 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 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 5/074 (2010.01)

C12N 5/071 (2010.01)

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 35/545 (2015.01)

A61K 35/44 (2015.01)

A61P 37/06 (2006.01)

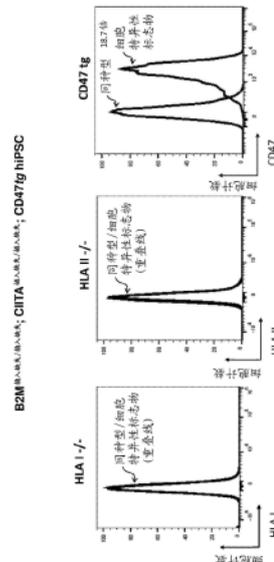
权利要求书28页 说明书177页  
序列表(电子公布) 附图42页

(54) 发明名称

用于减少补体介导的炎症反应的同种异体细胞疗法的基因修饰的细胞

(57) 摘要

提供了用于同种异体细胞疗法中的含有一种或多种修饰诸如基因修饰的工程化细胞。在一些实施方案中,所述工程化细胞是低免疫原性细胞。在一些实施方案中,所述工程化细胞包含增加的CD46和CD59的表达。



1. 一种工程化细胞,所述工程化细胞包含如下修饰:(i) 增加一种或多种致耐受性因子的表达,(ii) 增加CD46的表达,(iii) 增加CD59的表达,以及(iv) 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,其中(i)、(ii)和(iii)的所述增加的表达以及(iv)的所述降低的表达是相对于不包含所述修饰的相同细胞类型的细胞而言的。

2. 如权利要求1所述的工程化细胞,其中(iv)中的所述修饰中的一者或多者降低以下各项的表达:

- 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。

3. 如权利要求1或权利要求2所述的工程化细胞,其中所述一种或多种修饰降低选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以及它们的任何组合。

4. 如权利要求1-3中任一项所述的工程化细胞,其中所述工程化细胞不表达选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、RFX5、RFXANK、RFXAP、NFY-A、NFY-B和/或NFY-C以及它们的组合。

5. 如权利要求1-4中任一项所述的工程化细胞,其中所述一种或多种致耐受性因子包括选自由以下组成的组的一种或多种致耐受性因子: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以及它们的任何组合。

6. 如权利要求5所述的工程化细胞,其中所述一种或多种致耐受性因子选自由以下组成的组:CD47、PD-L1、HLA-E、HLA-G、CCL21、FASL、SERPINB9、CD200、MFGE8以及它们的任何组合。

7. 如权利要求1-6中任一项所述的工程化细胞,其中所述一种或多种致耐受性因子包括选自由以下组成的组的一种或多种致耐受性因子:A20/TNFAIP3、C1抑制剂、CCL21、CCL22、CD16、CD16 Fc受体、CD24、CD27、CD35、CD39、CD46、CD47、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、Serpib9以及它们的任何组合。

8. 如权利要求1-7中任一项所述的工程化细胞,其中所述一种或多种致耐受性因子包括CD47。

9. 如权利要求1-8中任一项所述的工程化细胞,其中所述一种或多种致耐受性因子包括HLA-E。

10. 如权利要求1-9中任一项所述的工程化细胞,其中所述一种或多种致耐受性因子包括CD24。

11. 如权利要求1-10中任一项所述的工程化细胞,其中所述一种或多种致耐受性因子包括PDL1。

12. 如权利要求1-11中任一项所述的工程化细胞,其中所述一种或多种致耐受性因子包括CD55。

13. 如权利要求1-12中任一项所述的工程化细胞,其中所述一种或多种致耐受性因子包括CR1。

14. 如权利要求1-13中任一项所述的工程化细胞,其中所述一种或多种致耐受性因子包括MANF。

15. 如权利要求1-14中任一项所述的工程化细胞,其中所述一种或多种致耐受性因子包括A20/TNFAIP3。

16. 如权利要求1-15中任一项所述的工程化细胞,其中所述一种或多种致耐受性因子包括HLA-E和CD47。

17. 如权利要求1-16中任一项所述的工程化细胞,其中所述一种或多种致耐受性因子包括选自由CD24、CD47和PDL1组成的组的两种或更多种致耐受性因子,任选地其中所述一种或多种致耐受性因子包括CD24、CD47和PDL1。

18. 如权利要求1-17中任一项所述的工程化细胞,其中所述一种或多种致耐受性因子包括选自由HLA-E、CD24、CD47和PDL1组成的组的两种或更多种致耐受性因子,任选地其中所述一种或多种致耐受性因子包括HLA-E、CD24、CD47和PDL1。

19. 如权利要求1-18中任一项所述的工程化细胞,其中所述一种或多种致耐受性因子包括选自由CD46、CD55、CD59和CR1组成的组的两种或更多种致耐受性因子,任选地其中所述一种或多种致耐受性因子包括CD46、CD55、CD59和CR1。

20. 如权利要求1-19中任一项所述的工程化细胞,其中所述一种或多种致耐受性因子包括选自由HLA-E、CD46、CD55、CD59和CR1组成的组的两种或更多种致耐受性因子,任选地其中所述一种或多种致耐受性因子包括HLA-E、CD46、CD55、CD59和CR1。

21. 如权利要求1-20中任一项所述的工程化细胞,其中所述一种或多种致耐受性因子包括选自由HLA-E、CD24、CD47、PDL1、CD46、CD55、CD59和CR1组成的组的两种或更多种致耐受性因子,任选地其中所述一种或多种致耐受性因子包括HLA-E、CD24、CD47、PDL1、CD46、CD55、CD59和CR1。

22. 如权利要求1-21中任一项所述的工程化细胞,其中所述一种或多种致耐受性因子包括HLA-E和PDL1。

23. 如权利要求1-22中任一项所述的工程化细胞,其中所述一种或多种致耐受性因子包括选自由HLA-E、PDL1和A20/TNFAIP组成的组的两种或更多种致耐受性因子,任选地其中所述一种或多种致耐受性因子包括HLA-E、PDL1和A20/TNFAIP。

24. 如权利要求1-23中任一项所述的工程化细胞,其中所述一种或多种致耐受性因子包括选自由HLA-E、PDL1和MANF组成的组的两种或更多种致耐受性因子,任选地其中所述一种或多种致耐受性因子包括HLA-E、PDL1和MANF。

25. 如权利要求1-24中任一项所述的工程化细胞,其中所述一种或多种致耐受性因子包括选自由HLA-E、PDL1、A20/TNFAIP和MANF组成的组的两种或更多种致耐受性因子,任选地其中所述一种或多种致耐受性因子包括HLA-E、PDL1、A20/TNFAIP和MANF。

26. 一种工程化细胞,所述工程化细胞包含如下修饰:(i)增加CCL21、PD-L1、FASL、SERPINB9、HLA-G、CD47、CD200和MFGE8的表达,(ii)增加CD46的表达,以及(iii)增加CD59的表达,其中所述增加的表达是相对于不包含所述修饰的相同细胞类型的细胞而言的。

27. 如权利要求26所述的工程化细胞,其中(i)增加CCL21、PD-L1、FASL、SERPINB9、HLA-

G、CD47、CD200和MFGE8的表达, (ii) 增加CD46的表达, 以及 (iii) 增加CD59的表达的所述修饰中的一者或多者包括增加内源基因的基因活性的一种或多种修饰。

28. 如权利要求27所述的工程化细胞, 其中所述内源基因编码所述CCL21、PD-L1、FASL、SERPINB9、HLA-G、CD47、CD200、MFGE8、CD46或CD59。

29. 如权利要求27或28所述的工程化细胞, 其中所述增加内源基因的基因活性的一种或多种修饰包括所述基因的内源启动子的一种或多种修饰或异源启动子的引入。

30. 如权利要求29所述的工程化细胞, 其中所述异源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, 以及UBC启动子。

31. 如权利要求1-30中任一项所述的工程化细胞, 其中所述工程化细胞还包含增加CD55的表达的修饰, 其中所述增加的CD55的表达是相对于不包含所述修饰的相同细胞类型的细胞而言的。

32. 如权利要求1-31中任一项所述的工程化细胞, 其中所述增加表达的修饰包括增加的表面表达, 并且/或者所述降低表达的修饰包括降低的表面表达, 任选地其中所述降低的表面表达包括没有可检测表面表达。

33. 如权利要求1-32中任一项所述的工程化细胞, 其中所述增加CD46的表达并且增加CD59的表达的一种或多种修饰包括编码CD46的外源多核苷酸和编码CD59的外源多核苷酸。

34. 如权利要求31-33中任一项所述的工程化细胞, 其中所述增加CD55的表达的修饰包括编码CD55的外源多核苷酸。

35. 如权利要求33或权利要求34所述的工程化细胞, 其中所述编码CD46的外源多核苷酸编码与SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少85%同一性的氨基酸序列, 并且表现出补体抑制活性。

36. 如权利要求35所述的工程化细胞, 其中所述编码CD46的外源多核苷酸编码SEQ ID NO:3所示的序列。

37. 如权利要求33-36中任一项所述的工程化细胞, 其中所述编码CD59的外源多核苷酸编码与SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有至少85%同一性的氨基酸序列, 并且表现出补体抑制活性。

38. 如权利要求37所述的工程化细胞, 其中所述编码CD59的外源多核苷酸编码SEQ ID NO:5所示的序列。

39. 如权利要求34-38中任一项所述的工程化细胞, 其中所述编码CD55的外源多核苷酸编码与SEQ ID NO:8的氨基酸序列具有至少85%同一性的氨基酸序列, 并且表现出补体抑制活性。

40. 如权利要求39所述的工程化细胞, 其中所述编码CD55的外源多核苷酸编码SEQ ID NO:8所示的序列。

41. 如权利要求33-40中任一项所述的工程化细胞, 其中所述编码CD46的外源多核苷酸和所述编码CD59的外源多核苷酸各自可操作地连接至启动子。

42. 如权利要求33-41中任一项所述的工程化细胞, 其中所述编码CD55的外源多核苷酸

可操作地连接至启动子。

43. 如权利要求1-42中任一项所述的工程化细胞,其中所述增加CD47的表达的修饰包括编码CD47蛋白的外源多核苷酸。

44. 如权利要求43所述的工程化细胞,其中所述编码CD47的外源多核苷酸编码与SEQ ID NO:1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细胞的先天免疫杀伤。

45. 如权利要求44所述的工程化细胞,其中所述编码CD47的外源多核苷酸编码SEQ ID NO:1所示的序列。

46. 如权利要求43-45中任一项所述的工程化细胞,其中所述编码CD47的外源多核苷酸可操作地连接至启动子。

47. 如权利要求1-46中任一项所述的工程化细胞,其中所述工程化细胞包含多顺反子载体,所述多顺反子载体包含选自以下组成的组的两种或更多种外源多核苷酸:编码所述一种或多种致耐受性因子的一种或多种外源多核苷酸、编码CD46的外源多核苷酸、编码CD59的外源多核苷酸和编码CD55多肽的外源多核苷酸。

48. 如权利要求47所述的工程化细胞,其中所述多核苷酸中的每一者由IRES或自切割肽分隔。

49. 如权利要求47-48中任一项所述的工程化细胞,其中所述一种或多种致耐受性因子是CD47。

50. 如权利要求47-49中任一项所述的工程化细胞,其中所述多顺反子载体的每个多核苷酸可操作地连接至相同的启动子。

51. 如权利要求47-50中任一项所述的工程化细胞,其中所述多顺反子载体包含编码CD46的外源多核苷酸和编码CD59的外源多核苷酸。

52. 如权利要求47-50中任一项所述的工程化细胞,其中所述多顺反子载体包含编码CD46的外源多核苷酸、编码CD59的外源多核苷酸和编码CD55的外源多核苷酸。

53. 如权利要求51或权利要求52所述的工程化细胞,其中所述多顺反子载体还包含编码CD47的外源多核苷酸。

54. 如权利要求51或权利要求52所述的工程化细胞,其中所述多顺反子载体是第一转基因,并且所述工程化细胞包含含有编码CD47的外源多核苷酸的单独的转基因。

55. 如权利要求1-54中任一项所述的工程化细胞,其中所述工程化细胞包含第一转基因和第二转基因,

其中所述第一转基因和所述第二转基因各自包含选自以下组成的组的一种或多种外源多核苷酸:编码CD47的外源多核苷酸、编码CD46的外源多核苷酸、编码CD59的外源多核苷酸和编码CD55多肽的外源多核苷酸,并且

其中所述第一转基因和所述第二转基因是单顺反子或多顺反子载体。

56. 如权利要求41-55中任一项所述的工程化细胞,其中所述启动子是组成型启动子。

57. 如权利要求50-56中任一项所述的工程化细胞,其中所述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)启动子和劳斯肉瘤病毒(RSV)启动

子,以及UBC启动子。

58. 如权利要求33-57中任一项所述的工程化细胞,其中所述编码CD46的外源多核苷酸和/或所述编码CD59的外源多核苷酸整合到所述工程化细胞的基因组中。

59. 如权利要求34-58中任一项所述的工程化细胞,其中所述编码CD55的外源多核苷酸整合到所述工程化细胞的基因组中。

60. 如权利要求43-59中任一项所述的工程化细胞,其中所述编码CD47的外源多核苷酸整合到所述工程化细胞的基因组中。

61. 如权利要求58-60中任一项所述的工程化细胞,其中所述整合是通过非靶向插入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所述细胞中来进行的。

62. 如权利要求59或权利要求60所述的工程化细胞,其中所述整合是通过靶向插入所述细胞的靶基因组基因座中来进行的。

63. 如权利要求62所述的工程化细胞,其中所述靶基因组基因座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。

64. 如权利要求62或权利要求63所述的工程化细胞,其中所述靶基因组基因座是MICA基因座、MICB基因座、TAP1基因座、B2M基因座、CIITA基因座、TRAC基因座、TRBC基因座或安全港基因座。

65. 如权利要求62或权利要求63所述的工程化细胞,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基因座和ROSA26基因座。

66. 如权利要求64所述的工程化细胞,其中所述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。

67. 如权利要求55-66中任一项所述的工程化细胞,其中所述编码CD55的外源多核苷酸整合到第四靶基因组基因座中。

68. 如权利要求55-67所述的工程化细胞,其中第一、第二和第三靶基因组基因座中的至少两者是相同的基因座。

69. 如权利要求67所述的工程化细胞,其中所述第一、第二、第三和第四靶基因组基因座中的至少两者是相同的基因座。

70. 如权利要求55-69中任一项所述的工程化细胞,其中所述第一、第二和第三靶基因组基因座是相同的基因座。

71. 如权利要求69所述的工程化细胞,其中所述第一、第二、第三和第四靶基因组基因座是相同的基因座。

72. 如权利要求55-67所述的工程化细胞,其中所述第一、第二和第三靶基因组基因座中的每一者是不同的基因座。

73. 如权利要求72所述的工程化细胞,其中所述第一、第二、第三和第四靶基因组基因

座是不同的基因座。

74. 如权利要求1-25和27-73中任一项所述的工程化细胞,其中所述降低一种或多种MHC I类分子的表达的修饰降低一种或多种MHC I类分子的蛋白质表达。

75. 如权利要求1-25和27-73中任一项所述的工程化细胞,其中所述降低一种或多种MHC I类分子的表达的修饰包括降低的B2M的表达。

76. 如权利要求75所述的工程化细胞,其中所述降低一种或多种MHC I类分子的表达的修饰包括降低的B2M的蛋白质表达。

77. 如权利要求75或权利要求76所述的工程化细胞,其中所述修饰消除B2M基因活性。

78. 如权利要求75-77中任一项所述的工程化细胞,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。

79. 如权利要求75-78中任一项所述的工程化细胞,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。

80. 如权利要求78或权利要求79所述的工程化细胞,其中所述失活或破坏包括所述B2M基因中的插入缺失。

81. 如权利要求75-80中任一项所述的工程化细胞,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。

82. 如权利要求75-81中任一项所述的工程化细胞,其中所述B2M基因被敲除。

83. 如权利要求75-82中任一项所述的工程化细胞,其中所述修饰是通过基因组修饰蛋白进行的。

84. 如权利要求83中任一项所述的工程化细胞,其中通过基因组修饰蛋白进行的所述修饰是通过CRISPR相关转座酶、先导编辑或经由位点特异性靶向元件的可编程添加(PASTE)进行的修饰。

85. 如权利要求83-84中任一项所述的工程化细胞,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。

86. 如权利要求85所述的工程化细胞,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选自Cas9或Cas12。

87. 如权利要求83-85中任一项所述的工程化细胞,其中通过所述基因组修饰蛋白进行的所述修饰是通过选自由以下组成的组的一种或多种蛋白质进行的: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。

88. 如权利要求86所述的工程化细胞,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)。

89. 如权利要求88所述的工程化细胞,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。

90. 如权利要求1-25和27-89中任一项所述的工程化细胞,其中所述降低一种或多种MHC II类分子的表达的修饰降低一种或多种MHC II类分子的蛋白质表达。

91. 如权利要求1-25和27-89中任一项所述的工程化细胞,其中所述降低一种或多种MHC II类分子的表达的修饰包括降低的CIITA的表达。

92. 如权利要求91所述的工程化细胞,其中所述降低一种或多种MHC II类分子的表达的修饰包括降低的CIITA的蛋白质表达。

93. 如权利要求91或权利要求92所述的工程化细胞,其中所述修饰消除CIITA基因活性。

94. 如权利要求91-93中任一项所述的工程化细胞,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。

95. 如权利要求91-94中任一项所述的工程化细胞,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。

96. 如权利要求94或权利要求95所述的工程化细胞,其中所述失活或破坏包括所述CIITA基因中的插入缺失。

97. 如权利要求91-96中任一项所述的工程化细胞,其中所述修饰是所述CIITA基因的一段连续基因组DNA的移码突变或缺失。

98. 如权利要求91-97中任一项所述的工程化细胞,其中CIITA基因被敲除。

99. 如权利要求1-98中任一项所述的工程化细胞,其中所述工程化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。

100. 如权利要求1-99中任一项所述的工程化细胞,其中所述修饰:

降低NLRC5、TRAC、TRB、CD142、ABO、CD38、CD52、PCDH11Y、NLGN4Y和RHD中任一者或多者的表达。

101. 如权利要求1-100中任一项所述的工程化细胞,其中(i)增加一种或多种致耐受性因子的表达,(ii)增加CD46的表达,以及(iii)增加CD59的表达的所述修饰中的一者或多者包括增加内源基因的基因活性的一种或多种修饰。

102. 如权利要求101所述的工程化细胞,其中所述内源基因编码所述一种或多种致耐受性因子、CD46或CD59。

103. 如权利要求101或102所述的工程化细胞,其中所述增加内源基因的基因活性的一种或多种修饰包括所述基因的内源启动子的一种或多种修饰或异源启动子的引入。

104. 如权利要求103所述的工程化细胞,其中所述异源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,以及UBC启动子。

105. 如权利要求99所述的工程化细胞,其中所述工程化细胞是人细胞。

106. 如权利要求1-105中任一项所述的工程化细胞,其中所述工程化细胞是源自干细胞或祖细胞的分化细胞。

107. 如权利要求106所述的工程化细胞,其中所述干细胞或祖细胞选自由以下组成的组: 诱导性多能干细胞、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、多能干细胞 (PSC) 和多潜能干细胞。

108. 如权利要求1-106中任一项所述的工程化细胞,其中所述工程化细胞是源自多能干细胞或其子代的分化细胞。

109. 如权利要求108所述的工程化细胞,其中所述多能干细胞是诱导性多能干细胞。

110. 如权利要求1-105中任一项所述的工程化细胞,其中所述工程化细胞是从供体受试者分离的原代细胞。

111. 如权利要求110所述的工程化细胞,其中在从单个的供体获得供体样本时,所述供体受试者是健康的或未被怀疑患有疾病或疾患。

112. 如权利要求1-111中任一项所述的工程化细胞,其中所述工程化细胞选自自由以下组成的组:胰岛细胞、 $\beta$ 胰岛细胞、胰腺胰岛细胞、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、视细胞、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、干细胞、造血干细胞、诱导性多能干细胞(iPSC)、间充质干细胞(MSC)、胚胎干细胞(ESC)、多能干细胞(PSC)和血细胞。

113. 如权利要求1-111中任一项所述的工程化细胞,其中所述工程化细胞是内皮细胞。

114. 如权利要求1-111中任一项所述的工程化细胞,其中所述工程化细胞是上皮细胞。

115. 如权利要求112所述的工程化细胞,其中所述工程化细胞是T细胞。

116. 如权利要求112所述的工程化细胞,其中所述工程化细胞是NK细胞。

117. 如权利要求115或权利要求116所述的工程化细胞,其中所述工程化细胞包含嵌合抗原受体(CAR)。

118. 如权利要求1-105中任一项所述的工程化细胞,其中所述工程化细胞是干细胞。

119. 如权利要求1-105中任一项所述的工程化细胞,其中所述工程化细胞是造血干细胞(HSC)。

120. 如权利要求1-105中任一项所述的工程化细胞,其中所述工程化细胞是多能干细胞。

121. 如权利要求1-105中任一项所述的工程化细胞,其中所述工程化细胞是诱导性多能干细胞。

122. 如权利要求1-105中任一项所述的工程化细胞,其中所述工程化细胞是胚胎干细胞。

123. 如权利要求1-122中任一项所述的工程化细胞,其中所述细胞是ABO血型O型。

124. 如权利要求1-122中任一项所述的工程化细胞,其中所述细胞包含功能性ABO A等位基因和/或功能性ABO B等位基因。

125. 如权利要求1-124中任一项所述的工程化细胞,其中所述细胞是恒河猴因子阴性(Rh-)的。

126. 如权利要求1-124中任一项所述的工程化细胞,其中所述细胞是恒河猴因子阳性(Rh+)的。

127. 一种产生工程化细胞的方法,所述方法包括:

- a. 降低或消除所述细胞中MHC I类和/或MHC II类的表达;
- b. 增加所述细胞中一种或多种致耐受性因子的表达;

- c. 增加所述细胞中CD46的表达;以及
- d. 增加所述细胞中CD59的表达。

128. 如权利要求127所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性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以及它们的任何组合。

129. 如权利要求128所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子选自由以下组成的组:CD47、PD-L1、HLA-E、HLA-G、CCL21、FASL、SERPINB9、CD200、MFGE8以及它们的任何组合。

130. 如权利要求127所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子包括选自由以下组成的组的一种或多种致耐受性因子:A20/TNFAIP3、C1抑制剂、CCL21、CCL22、CD16、CD16 Fc受体、CD24、CD27、CD35、CD39、CD46、CD47、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、Serpib9以及它们的任何组合。

131. 如权利要求127-130中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子包括CD47。

132. 如权利要求127-131中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子包括HLA-E。

133. 如权利要求127-132中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子包括CD24。

134. 如权利要求127-133中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子包括PDL1。

135. 如权利要求127-134中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子包括CD55。

136. 如权利要求127-135中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子包括CR1。

137. 如权利要求127-136中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子包括MANF。

138. 如权利要求127-137中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子包括A20/TNFAIP3。

139. 如权利要求127-138中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子包括HLA-E和CD47。

140. 如权利要求127-139中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子包括选自由CD24、CD47和PDL1组成的组的两种或更多种致耐受性因子,任选地其中所述一种或多种致耐受性因子包括CD24、CD47和PDL1。

141. 如权利要求127-140中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子包括选自由HLA-E、CD24、CD47和PDL1组成的组的两种或更多种致耐受性因子,任选地其中所述一种或多种致耐受性因子包括HLA-E、CD24、CD47和PDL1。

142. 如权利要求127-141中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子包括选自由CD46、CD55、CD59和CR1组成的组的两种或更多种致耐受性因子,任选地其中所述

一种或多种致耐受性因子包括CD46、CD55、CD59和CR1。

143. 如权利要求127-142中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子包括选自由HLA-E、CD46、CD55、CD59和CR1组成的组的两种或更多种致耐受性因子,任选地其中所述一种或多种致耐受性因子包括HLA-E、CD46、CD55、CD59和CR1。

144. 如权利要求127-143中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子包括选自由HLA-E、CD24、CD47、PDL1、CD46、CD55、CD59和CR1组成的组的两种或更多种致耐受性因子,任选地其中所述一种或多种致耐受性因子包括HLA-E、CD24、CD47、PDL1、CD46、CD55、CD59和CR1。

145. 如权利要求127-144中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子包括HLA-E和PDL1。

146. 如权利要求127-145中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子包括选自由HLA-E、PDL1和A20/TNFAIP组成的组的两种或更多种致耐受性因子,任选地其中所述一种或多种致耐受性因子包括HLA-E、PDL1和A20/TNFAIP。

147. 如权利要求127-146中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子包括选自由HLA-E、PDL1和MANF组成的组的两种或更多种致耐受性因子,任选地其中所述一种或多种致耐受性因子包括HLA-E、PDL1和MANF。

148. 如权利要求127-147中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子包括选自由HLA-E、PDL1、A20/TNFAIP和MANF组成的组的两种或更多种致耐受性因子,任选地其中所述一种或多种致耐受性因子包括HLA-E、PDL1、A20/TNFAIP和MANF。

149. 如权利要求127-148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。

150. 如权利要求127-149中任一项所述的方法,其中(i)增加一种或多种致耐受性因子的表达,(ii)增加CD46的表达,以及(iii)增加CD59的表达中的一者或多者包括经由启动子增加内源基因的基因活性。

151. 如权利要求150所述的方法,其中所述内源基因编码所述一种或多种致耐受性因子、CD46或CD59。

152. 如权利要求150或151所述的方法,其中经由启动子增加所述内源基因的基因活性包括修饰所述基因的内源启动子或引入异源启动子。

153. 如权利要求152所述的方法,其中所述异源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,以及UBC启动子。

154. 一种产生工程化细胞的方法,所述方法包括:

- a. 增加所述细胞中CCL21、PD-L1、FASL、SERPINB9、HLA-G、CD47、CD200和MFGE8的表达;
- b. 增加所述细胞中CD46的表达;以及
- c. 增加所述细胞中CD59的表达。

155. 如权利要求127-154中任一项所述的方法,所述方法还包括增加所述细胞中CD55的表达。

156. 如权利要求127-155中任一项所述的方法,其中所述降低的表达包括降低的表面表达,并且/或者所述增加的表达包括增加的表面表达,任选地其中所述降低的表面表达包括没有可检测表面表达。

157. 如权利要求127-156中任一项所述的方法,其中增加CD46和CD59的表达包括将编码CD46的外源多核苷酸和编码CD59的外源多核苷酸引入所述细胞中。

158. 如权利要求155-157中任一项所述的方法,其中增加CD55的表达包括将编码CD55的外源多核苷酸引入所述细胞中。

159. 如权利要求154-158中任一项所述的方法,其中(i)增加CCL21、PD-L1、FASL、SERPINB9、HLA-G、CD47、CD200和MFGE8的表达,(ii)增加CD46的表达,以及(iii)增加CD59的表达中的一者或多者包括增加内源基因的基因活性。

160. 如权利要求159所述的方法,其中所述内源基因编码所述CCL21、PD-L1、FASL、SERPINB9、HLA-G、CD47、CD200、MFGE8、CD46或CD59。

161. 如权利要求159或160所述的方法,其中经由启动子增加所述内源基因的基因活性包括修饰所述基因的内源启动子或增强子,或引入异源启动子。

162. 如权利要求161所述的方法,其中所述异源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,以及UBC启动子。

163. 如权利要求157或权利要求158所述的方法,其中所述编码CD46的外源多核苷酸编码与SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少85%同一性的氨基酸序列,并且表现出补体抑制活性。

164. 如权利要求163所述的方法,其中所述编码CD46的外源多核苷酸编码SEQ ID NO:3所示的序列。

165. 如权利要求157-164中任一项所述的方法,其中所述编码CD59的外源多核苷酸编码与SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有至少85%同一性的氨基酸序列,并且表现出补体抑制活性。

166. 如权利要求165所述的方法,其中所述编码CD59的外源多核苷酸编码SEQ ID NO:5所示的序列。

167. 如权利要求158-166中任一项所述的方法,其中所述编码CD55的外源多核苷酸编码与SEQ ID NO:8的氨基酸序列具有至少85%同一性的序列,并且表现出补体抑制活性。

168. 如权利要求167所述的方法,其中所述编码CD55的外源多核苷酸编码SEQ ID NO:8所示的序列。

169. 如权利要求157-168中任一项所述的方法,其中所述编码CD46的外源多核苷酸和所述编码CD59的外源多核苷酸各自可操作地连接至启动子。

170. 如权利要求158-169中任一项所述的方法,其中所述编码CD55的外源多核苷酸可操作地连接至启动子。

171. 如权利要求159-170中任一项所述的方法,其中所述增加CD47的表达的修饰包括编码CD47蛋白的外源多核苷酸。

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与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少85%同一性的序列,并且降低所述工程化细胞的先天免疫杀伤。

173. 如权利要求172所述的方法,其中所述编码CD47的外源多核苷酸编码SEQ ID NO:1所示的序列。

174. 如权利要求171-173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。

175. 如权利要求159-174中任一项所述的方法,其中所述方法包括引入多顺反子载体,所述多顺反子载体包含选自以下组成的组的两种或更多种外源多核苷酸:编码CD47的外源多核苷酸;编码CD46的外源多核苷酸;编码CD59的外源多核苷酸;和编码CD55多肽的外源多核苷酸。

176. 如权利要求175所述的方法,其中所述多核苷酸中的每一者由IRES或自切割肽分隔。

177. 如权利要求175或权利要求176所述的方法,其中所述多顺反子载体的每个多核苷酸可操作地连接至相同的启动子。

178. 如权利要求175-177中任一项所述的方法,其中所述多顺反子载体包含编码CD46的外源多核苷酸和编码CD59的外源多核苷酸。

179. 如权利要求175-177中任一项所述的方法,其中所述多顺反子载体包含编码CD46的外源多核苷酸、编码CD59的外源多核苷酸和编码CD55的外源多核苷酸。

180. 如权利要求178或权利要求179所述的方法,其中所述多顺反子载体还包含编码CD47的外源多核苷酸。

181. 如权利要求178或权利要求179所述的方法,其中所述工程化细胞包含含有编码CD47的多核苷酸的单独的转基因。

182. 如权利要求157-181中任一项所述的方法,其中所述编码CD46的外源多核苷酸和/或所述编码CD59的外源多核苷酸整合到所述工程化细胞的基因组中。

183. 如权利要求157-182中任一项所述的方法,其中所述编码CD55的外源多核苷酸整合到所述工程化细胞的基因组中。

184. 如权利要求171-183中任一项所述的方法,其中所述编码CD47的外源多核苷酸整合到所述工程化细胞的基因组中。

185. 如权利要求182-184中任一项所述的方法,其中所述整合是通过非靶向插入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所述细胞中来进行的。

186. 如权利要求182-184中任一项所述的方法,其中所述整合是通过靶向插入所述细胞的靶基因组基因座中来进行的,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。

187. 如权利要求186所述的方法,其中所述靶基因组基因座选自以下组成的组: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。

188. 如权利要求186所述的方法,其中所述靶基因组基因座是MICA基因座、MICB基因座、TAP1基因座、B2M基因座、CIITA基因座、TRAC基因座、TRBC基因座或安全港基因座。

189. 如权利要求186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。

190. 如权利要求188所述的方法,其中所述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。

191. 如权利要求128-190中任一项所述的方法,其中所述修饰是通过CRISPR相关转座酶、先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。

192. 如权利要求128-191中任一项所述的方法,其中所述修饰是通过基因组修饰蛋白进行的,任选地其中所述修饰是通过CRISPR相关转座酶、先导编辑、经由位点特异性靶向元件的可编程添加(PASTE)或核酸酶介导的基因编辑进行的。

193. 如权利要求191或192所述的方法,其中所述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、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。

194. 如权利要求186-193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选自Cas9或Cas12。

195. 如权利要求194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)以及包含所述编码CD46的外源多核苷酸、所述编码CD59的外源多核苷酸、所述编码CD55的外源多核苷酸和/或所述编码CD47的外源多核苷酸的同源定向修复模板。

196. 如权利要求195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。

197. 如权利要求127-196中任一项所述的方法,其中降低MHC I类的表达包括引入降低一种或多种MHC I类分子的蛋白质表达的修饰。

198. 如权利要求197所述的方法,其中所述降低一种或多种MHC I类分子的蛋白质表达的修饰包括降低的B2M的表达。

199. 如权利要求198所述的方法,其中所述降低一种或多种MHC I类分子的蛋白质表达的修饰包括降低的B2M的蛋白质表达。

200. 如权利要求198或权利要求199所述的方法,其中所述降低一种或多种MHC I类分子的蛋白质表达的修饰降低B2M基因活性。

201. 如权利要求197-200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。

202. 如权利要求197-201中任一项所述的方法,其中所述降低一种或多种MHC I类分子的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。

203. 如权利要求201或权利要求202所述的方法,其中所述失活或破坏包括所述B2M基因中的插入缺失或所述B2M基因的一段连续基因组DNA的缺失。

204. 如权利要求203所述的方法,其中所述插入缺失是移码突变。

205. 如权利要求197-204中任一项所述的方法,其中所述B2M基因被敲除。

206. 如权利要求197-205中任一项所述的方法,其中所述降低一种或多种MHC I类分子的蛋白质表达的修饰是通过基因组修饰蛋白进行的,任选地其中所述降低一种或多种MHC I类分子的蛋白质表达的修饰是通过核酸酶介导的基因编辑进行的。

207. 如权利要求206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选自Cas9或Cas12。

208. 如权利要求207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)。

209. 如权利要求208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。

210. 如权利要求127-209中任一项所述的方法,其中降低MHC II类的表达包括引入降低一种或多种MHC II类分子的蛋白质表达的修饰。

211. 如权利要求210所述的方法,其中所述降低一种或多种MHC II类分子的蛋白质表达的修饰包括降低的CIITA的表达。

212. 如权利要求211所述的方法,其中所述降低一种或多种MHC II类分子的蛋白质表达的修饰包括降低的CIITA的蛋白质表达。

213. 如权利要求211或权利要求212所述的方法,其中所述降低一种或多种MHC II类分子的蛋白质表达的修饰降低CIITA基因活性。

214. 如权利要求211-213中任一项所述的方法,其中所述降低一种或多种MHC II类分子的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。

215. 如权利要求211-214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。

216. 如权利要求214或权利要求215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。

217. 如权利要求216所述的方法,其中所述插入缺失是移码突变。

218. 如权利要求211-217中任一项所述的方法,其中所述CIITA基因被敲除。

219. 如权利要求127-218中任一项所述的方法,其中所述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。

220. 如权利要求127-219中任一项所述的方法,其中所述工程化细胞是人细胞。

221. 如权利要求127-220中任一项所述的方法,其中所述细胞是从供体受试者分离的原代细胞。

222. 如权利要求127-220中任一项所述的方法,其中所述细胞是多能干细胞,其中所述工程化细胞是源自所述多能干细胞的分化细胞,并且所述方法还包括分化所述多能干细胞。

223. 如权利要求222所述的方法,其中所述多能干细胞是诱导性多能干细胞。

224. 如权利要求127-223中任一项所述的方法,其中所述工程化细胞选自由以下组成的组:胰岛细胞、 $\beta$ 胰岛细胞、胰腺胰岛细胞、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、视细胞、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、干细胞、造血干细胞、诱导性多能干细胞(iPSC)、间充质干细胞(MSC)、胚胎干细胞(ESC)、多能干细胞(PSC)和血细胞。

225. 一种工程化细胞,所述工程化细胞是根据权利要求127-224中任一项所述的方法产生的。

226. 如权利要求1-126和225中任一项所述的工程化细胞,其中所述工程化细胞或源自所述工程化细胞的子代或分化细胞在施用于患者后能够逃避NK细胞介导的细胞毒性。

227. 如权利要求1-126和225-226中任一项所述的工程化细胞,其中所述工程化细胞或源自所述工程化细胞的子代或分化细胞在施用于患者后受到保护而免于被成熟NK细胞进行细胞裂解。

228. 如权利要求1-126和225-226中任一项所述的工程化细胞,其中所述工程化细胞或源自所述工程化细胞的子代或分化细胞在施用于患者后不诱导对所述细胞的免疫应答。

229. 如权利要求1-126和225-228中任一项所述的工程化细胞,其中所述工程化细胞或源自所述工程化细胞的子代或分化细胞在施用于患者后不诱导对所述细胞的全身性炎症应答。

230. 如权利要求1-126和225-229中任一项所述的工程化细胞,其中所述工程化细胞或源自所述工程化细胞的子代或分化细胞在施用于患者后不诱导对所述细胞的局部炎症应答。

231. 如权利要求1-126和225-230中任一项所述的工程化细胞,其中所述工程化细胞或源自所述工程化细胞的子代或分化细胞在施用于患者后不诱导补体途径活化。

232. 如权利要求1-126和225-231中任一项所述的工程化细胞,其中所述细胞在施用于患者后保留植入和发挥功能的能力。

233. 一种细胞群体,所述细胞群体包含多个权利要求1-126和225-232中任一项所述的工程化细胞。

234. 如权利要求233所述的群体,其中所述群体中至少约30%的细胞包含如权利要求1-126中任一项所述的工程化细胞。

235. 如权利要求233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。

236. 如权利要求233或235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。

237. 如权利要求233-236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CD46的外源多核苷酸。

238. 如权利要求233-237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%的细胞包含编码CD59的外源多核苷酸。

239. 如权利要求233-238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%的细胞包含编码CD55的外源多核苷酸。

240. 如权利要求233-239中任一项所述的群体,其中相对于不包含所述修饰的细胞,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。

241. 如权利要求233-240中任一项所述的群体,其中相对于不包含所述修饰的细胞,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。

242. 如权利要求233-240中任一项所述的群体,其中相对于不包含所述修饰的细胞,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。

243. 如权利要求233-242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%的细胞包含使B2M基因的两个等位基因失活的一种或多种改变。

244. 如权利要求233-243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%的细胞包含使CIITA基因的两个等位基因失活的一种或多种改变。

245. 一种组合物,所述组合物包含权利要求233-244中任一项所述的群体。

246. 一种包含工程化细胞群体的组合物,其中所述工程化细胞包含:(i) 编码CD47的外源多核苷酸,(ii) 编码CD46的外源多核苷酸,(iii) 编码CD59的外源多核苷酸,和(iv) B2M基因的两个等位基因的失活或破坏。

247. 如权利要求246所述的组合物,其中所述工程化细胞还包含CIITA基因的两个等位基因的失活或破坏。

248. 如权利要求246或247所述的组合物,其中所述工程化细胞还包含编码CD55的外源多核苷酸。

249. 如权利要求246-248中任一项所述的组合物,其中所述工程化细胞包含多顺反子载体,所述多顺反子载体包含所述编码CD47的外源多核苷酸、所述编码CD46的外源多核苷酸和所述编码CD59的外源多核苷酸。

250. 如权利要求246-248中任一项所述的组合物,其中所述工程化细胞包含第一转基因和多顺反子载体,所述第一转基因包含所述编码CD47的外源多核苷酸,所述多顺反子载体包含所述编码CD46的外源多核苷酸和所述编码CD59的外源多核苷酸。

251. 如权利要求246-248中任一项所述的组合物,其中所述工程化细胞包含第一转基

因和多顺反子载体,所述第一转基因包含所述编码CD47的外源多核苷酸,所述多顺反子载体包含所述编码CD46的外源多核苷酸、所述编码CD59的外源多核苷酸和所述编码CD55的外源多核苷酸。

252. 如权利要求248-251中任一项所述的组合物,其中所述多顺反子载体的所述多核苷酸中的每一者由IRES或自切割肽分隔。

253. 如权利要求248-252中任一项所述的组合物,其中通过使用同源定向修复的核酸酶介导的基因编辑将所述转基因引入靶基因组基因座位点处。

254. 如权利要求246-252中任一项所述的组合物,其中所述失活或破坏是通过基因组修饰蛋白进行的,任选地其中所述失活或破坏是通过核酸酶介导的基因编辑进行的。

255. 如权利要求245-254中任一项所述的组合物,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选自Cas9或Cas12。

256. 如权利要求255所述的组合物,其中所述核酸酶介导的基因编辑是通过选自Cas9或Cas12的Cas核酸酶进行的。

257. 如权利要求245-254中任一项所述的组合物,其中所述组合物是药物组合物。

258. 如权利要求257所述的组合物,所述组合物包含药学上可接受的赋形剂。

259. 如权利要求245-254中任一项所述的组合物,其中所述组合物被配制在包含冷冻保护剂的无血清冷冻保存介质中。

260. 如权利要求259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为5%至10%DMSO(v/v)。

261. 如权利要求259或260所述的组合物,其中所述冷冻保护剂为10%DMSO(v/v)或为约10%DMSO(v/v)。

262. 如权利要求245-261中任一项所述的组合物,所述组合物是无菌的。

263. 一种容器,所述容器包括权利要求245-261中任一项所述的组合物。

264. 如权利要求263所述的容器,所述容器是无菌袋。

265. 如权利要求264所述的无菌袋,其中所述袋是冷冻保存相容袋。

266. 一种治疗有需要的患者的疾病、疾患或细胞缺陷的方法,所述方法包括向所述患者施用有效量的权利要求233-244中任一项所述的群体或权利要求245-262中任一项所述的组合物。

267. 如权利要求266所述的方法,其中所述群体包含内皮细胞。

268. 如权利要求266或权利要求267所述的方法,其中所述疾患或疾病选自由以下组成的组:糖尿病、癌症、血管化病症、眼部疾病、甲状腺疾病、皮肤疾病和肝脏疾病。

269. 如权利要求266所述的方法,其中所述细胞缺陷与糖尿病相关,或者所述疾病或疾患是糖尿病,任选地其中所述糖尿病是I型糖尿病。

270. 如权利要求269所述的方法,其中所述细胞群体是胰岛细胞群体,包括 $\beta$ 胰岛细胞群体。

271. 如权利要求270所述的方法,其中所述胰岛细胞选自由胰岛祖细胞、未成熟胰岛细胞和成熟胰岛细胞组成的组。

272. 如权利要求266所述的方法,其中所述细胞缺陷与血管疾患或疾病相关,或者所述

疾病或疾患是血管疾患或疾病。

273. 如权利要求272所述的方法,其中所述细胞群体是内皮细胞群体。

274. 如权利要求266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,或者所述疾病或疾患是自身免疫性甲状腺炎。

275. 如权利要求274所述的方法,其中所述细胞群体是甲状腺祖细胞群体。

276. 如权利要求266所述的方法,其中所述细胞缺陷与肝脏疾病相关,或者所述疾病是肝脏疾病。

277. 如权利要求276所述的方法,其中所述肝脏疾病包括肝硬化。

278. 如权利要求276或277所述的方法,其中所述细胞群体是肝细胞或肝祖细胞群体。

279. 如权利要求266所述的方法,其中所述细胞缺陷与角膜疾病相关,或者所述疾病是角膜疾病。

280. 如权利要求279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。

281. 如权利要求279或280所述的方法,其中所述细胞群体是角膜内皮祖细胞或角膜内皮细胞群体。

282. 如权利要求266所述的方法,其中所述细胞缺陷与肾脏疾病相关,或者所述疾病是肾脏疾病。

283. 如权利要求282所述的方法,其中所述细胞群体是肾前体细胞或肾细胞群体。

284. 如权利要求266所述的方法,其中所述细胞缺陷与癌症相关,或者所述疾病是癌症。

285. 如权利要求284所述的方法,其中所述癌症选自由以下组成的组: B细胞急性成淋巴细胞白血病(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、急性髓淋巴细胞样白血病、多发性骨髓瘤、胃癌、胃腺癌、胰腺腺癌、成胶质细胞瘤、成神经细胞瘤、肺鳞状细胞癌、肝细胞癌和膀胱癌。

286. 如权利要求284或285所述的方法,其中所述细胞群体是T细胞、NK细胞或NKT细胞群体。

287. 如权利要求266所述的方法,其中所述细胞缺陷与造血系统疾病或病症相关,或者所述疾病或疾患是造血系统疾病或病症。

288. 如权利要求287所述的方法,其中所述造血系统疾病或病症是脊髓发育不良、再生障碍性贫血、范科尼贫血、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、施瓦赫曼-戴蒙德病、柯士文综合征、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、诸如急性淋巴细胞白血病(ALL)、急性髓性(髓细胞)白血病(AML)、成人成淋巴细胞白血病、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白血病(JMML)等白血病、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(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、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤(NHL)或AIDS。

289. 如权利要求266所述的方法,其中所述细胞缺陷与白血病或骨髓瘤相关,或者其中所述疾病或疾患是白血病或骨髓瘤。

290. 如权利要求266所述的方法,其中所述细胞缺陷与自身免疫性疾病或疾患相关,或者所述疾病或疾患是自身免疫性疾病或疾患。

291. 如权利要求290所述的方法,其中所述自身免疫性疾病或疾患是急性播散性脑脊髓炎、急性出血性白质脑炎、阿狄森病、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、巴洛同心性硬化、贝赫切特综合征、伯格病、比克斯塔夫脑炎、布劳综合征、大疱性类天疱疮、癌症、卡斯尔曼病、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、瘢痕性类天疱疮、科干综合征、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、皮肤白细胞破碎性血管炎、德戈病、德库姆病、疱疹样皮炎、皮炎、1型糖尿病、弥漫性皮肤系统性硬化症、德雷斯勒综合征、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、埃文综合征、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、古德帕斯彻综合征、格雷夫氏病、吉兰-巴雷综合征(GBS)、桥本脑炎、桥本甲状腺炎、溶血性贫血、肯诺克-肖林紫癜、妊娠疱疹、低丙种球蛋白血症、特发性炎症性脱髓鞘病、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、炎症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、兰伯特-伊顿肌无力综合征、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、狼疮性肝炎、红斑狼疮、马吉德综合征、梅尼埃病、显微镜下多血管炎、米勒-费雪综合征、混合性结缔组织病、硬斑病、穆-哈二氏病、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、奥德甲状腺炎、回纹型风湿症、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、帕森斯-特纳综合征、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、进行性炎症性神经病、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、雷诺现象、复发性多软骨炎、赖特综合征、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、施尼茨勒综合征、巩膜炎、硬皮病、干燥综合征、脊柱关节病、斯蒂尔病、僵人综合征、亚急性细菌性心内膜炎、苏萨克综合征、斯维特综合征、西德纳姆舞蹈病、交感性眼炎、大动脉炎、颞动脉炎、痛性眼肌麻痹综合征、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。

292. 如权利要求287-291中任一项所述的方法,其中所述细胞群体是包含造血干细胞(HSC)和/或其衍生物群体。

293. 如权利要求266所述的方法,其中所述细胞缺陷与帕金森病、亨廷顿病、多发性硬化症、神经变性疾病或疾患、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、神经精神障碍性中风或肌萎缩侧索硬化症(ALS)相关,或者其中所述疾

病或疾患是帕金森病、亨廷顿病、多发性硬化症、神经变性疾病或疾患、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、神经精神障碍性中风或肌萎缩侧索硬化症(ALS)。

294. 如权利要求293所述的方法,其中所述细胞群体是包含神经细胞和/或神经胶质细胞的群体。

295. 如权利要求266-294中任一项所述的方法,其中在施用之前将所述细胞扩增并冷冻保存。

296. 如权利要求266-295中任一项所述的方法,其中施用所述群体包括静脉内注射、肌肉注射、血管内注射或移植所述群体。

297. 如权利要求296所述的方法,其中经由血管内注射或肌肉注射移植所述群体。

298. 如权利要求226-297中任一项所述的方法,其中所述群体源自供体受试者,其中所述供体的HLA类型与所述患者的HLA类型不匹配。

299. 如权利要求226-298中任一项所述的方法,其中所述群体源自供体,其中所述供体的血型与所述患者的血型不匹配,并且所述供体的血型不是O型。

300. 如权利要求226-299中任一项所述的方法,其中所述群体源自供体,其中所述供体的血型是恒河猴因子(Rh)阳性的,并且所述患者的血型是Rh阴性的。

301. 如权利要求226-300中任一项所述的方法,其中所述患者的血清包含针对Rh的抗体。

302. 如权利要求226-301中任一项所述的方法,其中所述群体是人细胞群体,并且所述患者是人患者。

303. 如权利要求226-302中任一项所述的方法,其中所述细胞群体包含功能性ABO A等位基因和/或功能性ABO B等位基因。

304. 如权利要求303所述的方法,其中所述细胞群体呈递ABO A型抗原,并且所述患者的血清包含抗A抗体。

305. 如权利要求303所述的方法,其中所述细胞群体呈递ABO B型抗原,并且所述患者的血清包含抗B抗体。

306. 如权利要求303所述的方法,其中所述细胞群体呈递ABO A型和B型抗原,并且所述患者的血清包含抗A和/或抗B抗体。

307. 如权利要求266-306中任一项所述的方法,其中细胞群体表达Rh因子,并且所述患者的血清包含抗Rh抗体。

308. 一种选择包含工程化细胞群体的细胞疗法用于施用于患者以治疗疾病、疾患或细胞缺陷的方法,所述方法包括,

确定所述患者的血液是否与一组工程化细胞群体的ABO血型和/或Rh因子类型具有ABO血型不相容性或恒河猴(Rh)因子不相容性,其中所述群体组包括(i)第一工程化细胞群体,所述第一工程化细胞群体包含低免疫原性修饰基本组但不包含增加CD46和CD59的表达的修饰,和(ii)第二工程化细胞群体,所述第二工程化细胞群体包含所述低免疫原性修饰基本组并且还包含增加CD46和CD59的表达的修饰,其中所述增加的表达是相对于不包含所述修饰的相同细胞类型的细胞而言的;其中:

如果所述患者的血型与所述群体组的ABO血型和Rh因子类型不具有ABO血型不相容性

或Rh因子不相容性,则所述方法包括选择所述第一工程化细胞群体用于施用于所述患者;以及

如果所述患者的血型与所述群体组的ABO血型和/或Rh因子类型具有ABO血型不相容性或Rh因子不相容性,则所述方法包括选择所述第二工程化细胞群体用于施用于所述患者。

309. 一种治疗有需要的患者的疾病、疾患或细胞缺陷的方法,所述方法包括向所述患者施用有效量的工程化细胞群体,其中通过包括以下的方法选择所述患者进行治疗:

确定所述患者的血液是否与一组工程化细胞群体的ABO血型和/或Rh因子类型具有ABO血型不相容性或恒河猴(Rh)因子不相容性,其中所述工程化细胞群体组包括(i)第一工程化细胞群体,所述第一工程化细胞群体包含低免疫原性修饰基本组但不包含增加CD46和CD59的表达的修饰,和(ii)第二工程化细胞群体,所述第二工程化细胞群体包含所述低免疫原性修饰基本组以及增加的CD46和CD59的表达,其中所述增加的表达是相对于不包含所述修饰的相同细胞类型的细胞而言的,其中:

如果所述患者的血型与所述群体组的ABO血型和Rh因子类型不具有ABO血型不相容性或Rh因子不相容性,则所述方法包括向所述患者施用所述第一工程化细胞群体;以及

如果所述患者的血型与所述群体组的ABO血型和/或Rh因子类型具有ABO血型不相容性或Rh因子不相容性,则所述方法包括向所述患者施用所述第二工程化细胞群体。

310. 如权利要求308或权利要求309所述的方法,其中所述低免疫原性修饰基本组包括如下修饰:

(i) 增加一种或多种致耐受性因子的表达,以及(ii)降低一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子的表达,其中(i)的所述增加的表达以及(ii)的所述降低的表达是相对于不包含所述修饰的相同细胞类型的细胞而言的。

311. 如权利要求310所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性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以及它们的任何组合。

312. 如权利要求311所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子选自由以下组成的组:CD47、PD-L1、HLA-E或HLA-G、CCL21、FASL、SERPINB9、CD200、MFGE8以及它们的任何组合。

313. 如权利要求308或权利要求309所述的方法,其中所述低免疫原性修饰基本组包括增加CCL21、PD-L1、FASL、SERPINB9、HLA-G、CD47、CD200和MFGE8的表达的修饰,其中所述增加的表达是相对于不包含所述修饰的相同细胞类型的细胞而言的。

314. 如权利要求308-313中任一项所述的方法,其中所述第二工程化细胞群体是包含权利要求1-126和225-232中任一项所述的工程化细胞的群体,或者是权利要求233-244中任一项所述的工程化细胞群体。

315. 如权利要求308-314中任一项所述的方法,其中所述细胞群体组的所述第一工程化细胞群体和所述第二工程化细胞群体源自同一供体或源自从多于一个供体汇集的细胞,所述多于一个供体是相同供体。

316. 如权利要求308-315中任一项所述的方法,其中所述细胞群体组的所述第一工程化细胞群体和所述第二工程化细胞群体具有相同的ABO血型和Rh因子类型。

317. 如权利要求308-316中任一项所述的方法,其中所述确定所述患者的血型是否与

一组工程化细胞群体的ABO血型 and/or Rh因子类型具有ABO血型不相容性或恒河猴 (Rh) 因子不相容性包括:

确定所述患者的血清是否包含针对ABO血型A抗原的抗体,

确定所述患者的血清是否包含针对ABO血型B抗原的抗体,以及/或者

确定所述患者的血型是恒河猴 (Rh) 因子阳性的还是阴性的。

318. 如权利要求308-317中任一项所述的方法,其中确定所述患者的血型与所述工程化细胞群体组的ABO血型和Rh因子类型具有血型不相容性,其中:

(a) 如果(1)所述患者的血清包含针对ABO血型A抗原的抗体并且不包含针对ABO血型B抗原的抗体,并且如果所述患者的血型是恒河猴 (Rh) 因子阴性的,并且(2)所述群体组的细胞是ABO血型O或ABO血型B并且是Rh因子阴性的,所述方法包括选择所述第一工程化细胞群体用于施用于所述患者;或者

(b) 如果(1)所述患者的血清包含针对ABO血型B抗原的抗体并且不包含针对ABO血型A抗原的抗体,并且所述患者的血型是Rh因子阴性的,并且(2)所述细胞群体组的细胞是ABO血型O或ABO血型A并且所述细胞是Rh因子阴性的,所述方法包括选择所述第一工程化细胞群体用于施用于所述患者;或者

(c) 如果(1)所述患者的血清包含针对ABO血型A抗原的抗体和针对ABO血型B抗原的抗体,并且(2)所述细胞群体组的细胞是ABO血型O细胞,所述方法包括选择所述第一工程化细胞群体用于施用于所述患者;或者

(d) 如果(1)所述患者的血清不包含针对ABO血型A抗原或ABO血型B抗原的抗体并且所述患者的血型是Rh因子阳性的,并且(2)所述细胞群体组的细胞是ABO血型A、ABO血型B、ABO血型AB或ABO血型O细胞并且是Rh因子阴性或Rh因子阳性的,所述方法包括选择所述第一工程化细胞群体用于施用于所述患者;或者

(e) 如果(1)所述患者的血清不包含针对ABO血型A抗原或ABO血型B抗原的抗体并且所述患者的血型是Rh因子阴性的,并且(2)所述细胞群体组的细胞是ABO血型A、ABO血型B、ABO血型AB或ABO血型O并且是Rh因子阴性的,所述方法包括选择所述第一工程化细胞群体用于施用于所述患者。

319. 如权利要求308-317中任一项所述的方法,其中所述患者的血型与所述工程化细胞群体组的ABO血型和Rh因子类型具有ABO血型和/或Rh因子不相容性,其中

(a) 如果(1)所述患者的血清包含针对ABO血型A抗原的抗体并且不包含针对ABO血型B抗原的抗体,并且所述患者的血型是Rh因子阳性或Rh因子阴性的,并且(2)所述群体组的细胞是ABO血型A或ABO血型AB细胞并且所述群体的细胞是Rh因子阳性或Rh因子阴性的,所述方法包括选择所述第二工程化细胞群体用于施用于所述患者;或者

(b) 如果(1)所述患者的血清包含针对ABO血型B抗原的抗体并且不包含针对ABO血型A抗原的抗体,并且所述患者的血型是Rh因子阳性或Rh因子阴性的,并且(2)所述细胞群体组的细胞是ABO血型B或ABO血型AB细胞并且所述群体的细胞是Rh因子阳性或Rh因子阴性的,所述方法包括选择所述第二工程化细胞群体用于施用于所述患者;或者

(c) 如果(1)所述患者的血清包含针对ABO血型A抗原的抗体和针对ABO血型B抗原的抗体,并且所述患者的血型是Rh因子阳性或Rh因子阴性的,并且(2)所述细胞群体组的细胞是ABO血型A、ABO血型B或ABO血型AB并且所述群体的细胞是Rh因子阳性或Rh因子阴性的,所述

方法包括选择所述第二工程化细胞群体用于施用于所述患者;或者

(d) 如果(1)所述患者的血清不包含针对ABO血型A抗原或ABO血型B抗原的抗体并且所述患者的血型是Rh因子阴性的,并且(2)所述细胞群体组的细胞是ABO血型A、ABO血型B、ABO血型AB或ABO血型O并且是Rh因子阳性的,所述方法包括选择所述第二工程化细胞群体用于施用于所述患者。

320. 如权利要求226-307和309-319中任一项的方法,所述方法还包括向所述患者施用一种或多种免疫抑制剂。

321. 如权利要求226-307和309-319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。

322. 如权利要求320或321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。

323. 如权利要求320-322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、柳氮磺胺吡啶、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。

324. 如权利要求320-323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。

325. 如权利要求320-322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。

326. 如权利要求320-323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。

327. 如权利要求320-323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。

328. 如权利要求320-323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。

329. 如权利要求320-323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)。

330. 如权利要求320-323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。

331. 如权利要求320-323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。

332. 如权利要求331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。

333. 如权利要求322或权利要求332所述的方法,其中所述抗体与选自由以下组成的组的受体或配体中的一者或多者结合: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,以及与它们的任何配体结合的抗体。

334. 如权利要求320-333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施用所述一种或多种免疫抑制剂。

335. 如权利要求320-334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施用所述一种或多种免疫抑制剂。

336. 如权利要求320-334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周或更长时间向所述患者施用或已施用所述一种或多种免疫抑制剂。

337. 如权利要求320-334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施用所述一种或多种免疫抑制剂。

338. 如权利要求320-334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周或更长时间向所述患者施用或已施用所述一种或多种免疫抑制剂。

339. 如权利要求320-334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施用所述一种或多种免疫抑制剂。

340. 如权利要求320-334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施用所述一种或多种免疫抑制剂。

341. 如权利要求320-334中任一项所述的方法,其中在施用所述工程化细胞的第一次和/或第二次施用之后向所述患者施用或已施用所述一种或多种免疫抑制剂。

342. 如权利要求320-334中任一项所述的方法,其中在施用所述工程化细胞的第一次和/或第二次施用之前向所述患者施用或已施用所述一种或多种免疫抑制剂。

343. 如权利要求320-334中任一项所述的方法,其中在施用所述工程化细胞的第一次和/或第二次施用之前至少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施用所述一种或多种免疫抑制剂。

344. 如权利要求320-334中任一项所述的方法,其中在施用所述工程化细胞的第一次和/或第二次施用之前至少1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周或更长时间向所述患者施用或已施用所述一种或多种免疫抑制剂。

345. 如权利要求320-334中任一项所述的方法,其中在施用所述工程化细胞的第一次和/或第二次施用之后至少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施用所述一种或多种免疫抑制剂。

346. 如权利要求320-334中任一项所述的方法,其中在施用所述工程化细胞的第一次和/或第二次施用之后至少1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周或更长时间向所述患者施用或已施用所述一种或多种免疫抑制剂。

347. 如权利要求320-346中任一项所述的方法,其中与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。

348. 如权利要求226-307和309-347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。

349. 如权利要求226-307和309-348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。

350. 如权利要求349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。

351. 如权利要求349或权利要求350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。

352. 如权利要求351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天冬酶蛋白。

353. 如权利要求352所述的方法,其中所述半胱天冬酶蛋白是半胱天冬酶9。

354. 如权利要求349-353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)、诱导型半胱天冬酶9(iCaspase9)和雷帕霉素活化的半胱天冬酶9(rapaCasp9)。

355. 如权利要求349-354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。

356. 如权利要求349-354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。

357. 如权利要求349-356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。

358. 如权利要求349-357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,则活化所述自杀基因或所述自杀开关以诱导受控细胞死亡。

359. 如权利要求226-307和309-349中任一项所述的方法,所述方法包括施用允许消耗所述工程化细胞群体的工程化细胞的剂。

360. 如权利要求359所述的方法,其中所述允许消耗所述工程化细胞的剂是识别在所述工程化细胞的表面上表达的蛋白质的抗体。

361. 如权利要求360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。

362. 如权利要求360或权利要求361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、奥滨尤妥珠单抗、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以及它们的生物类似物。

363. 如权利要求226-307、309-349和359-362中任一项所述的方法,所述方法包括施用识别所述工程化细胞的表面上的所述一种或多种致耐受性因子的剂。

364. 如权利要求363所述的方法,其中所述工程化细胞经工程化以表达所述一种或多种致耐受性因子。

365. 如权利要求310-364中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子包括选自由以下组成的组的一种或多种致耐受性因子:A20/TNFAIP3、C1抑制剂、CCL21、CCL22、CD16、CD16 Fc受体、CD24、CD27、CD35、CD39、CD46、CD47、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、Serpina9以及它们的任何组合。

366. 如权利要求365所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子包括CD47。

367. 如权利要求310-366中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子包

括HLA-E。

368. 如权利要求310-367中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子包括CD24。

369. 如权利要求310-368中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子包括PDL1。

370. 如权利要求310-369中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子包括CD55。

371. 如权利要求310-370中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子包括CR1。

372. 如权利要求310-371中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子包括MANF。

373. 如权利要求310-372中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子包括A20/TNFAIP3。

374. 如权利要求310-373中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子包括HLA-E和CD47。

375. 如权利要求310-374中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子包括选自由CD24、CD47和PDL1组成的组的两种或更多种致耐受性因子,任选地其中所述一种或多种致耐受性因子包括CD24、CD47和PDL1。

376. 如权利要求310-375中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子包括选自由HLA-E、CD24、CD47和PDL1组成的组的两种或更多种致耐受性因子,任选地其中所述一种或多种致耐受性因子包括HLA-E、CD24、CD47和PDL1。

377. 如权利要求310-376中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子包括选自由CD46、CD55、CD59和CR1组成的组的两种或更多种致耐受性因子,任选地其中所述一种或多种致耐受性因子包括CD46、CD55、CD59和CR1。

378. 如权利要求310-377中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子包括选自由HLA-E、CD46、CD55、CD59和CR1组成的组的两种或更多种致耐受性因子,任选地其中所述一种或多种致耐受性因子包括HLA-E、CD46、CD55、CD59和CR1。

379. 如权利要求310-378中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子包括选自由HLA-E、CD24、CD47、PDL1、CD46、CD55、CD59和CR1组成的组的两种或更多种致耐受性因子,任选地其中所述一种或多种致耐受性因子包括HLA-E、CD24、CD47、PDL1、CD46、CD55、CD59和CR1。

380. 如权利要求310-379中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子包括HLA-E和PDL1。

381. 如权利要求310-380中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子包括选自由HLA-E、PDL1和A20/TNFAIP组成的组的两种或更多种致耐受性因子,任选地其中所述一种或多种致耐受性因子包括HLA-E、PDL1和A20/TNFAIP。

382. 如权利要求310-381中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子包括选自由HLA-E、PDL1和MANF组成的组的两种或更多种致耐受性因子,任选地其中所述一种或多种致耐受性因子包括HLA-E、PDL1和MANF。

383. 如权利要求310-382中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子包括选自自由HLA-E、PDL1、A20/TNFAIP和MANF组成的组的两种或更多种致耐受性因子,任选地其中所述一种或多种致耐受性因子包括HLA-E、PDL1、A20/TNFAIP和MANF。

384. 如权利要求226-307和309-383中任一项所述的方法,所述方法还包括向所述患者施用一种或多种另外的治疗剂。

385. 如权利要求226-307和309-384中任一项所述的方法,其中已向所述患者施用一种或多种另外的治疗剂。

386. 如权利要求226-307和309-385中任一项所述的方法,所述方法还包括监测所述方法的治疗功效。

387. 如权利要求226-307和309-385中任一项所述的方法,所述方法还包括监测所述方法的预防功效。

388. 如权利要求386或权利要求387所述的方法,其中重复所述方法直至出现对一种或多种疾病症状的期望抑制。

389. 如权利要求1-126和225-232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的外源多核苷酸。

390. 如权利要求1-126和225-232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开关的外源多核苷酸。

391. 如权利要求389或权利要求390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)、诱导型半胱天冬酶9(iCaspase9)和雷帕霉素活化的半胱天冬酶9(rapaCasp9)。

392. 如权利要求389-391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的基因组中的双顺反子盒表达。

393. 如权利要求389-392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性因子由整合到所述工程化细胞的基因组中的双顺反子盒表达。

394. 如权利要求392或权利要求393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所述工程化细胞的基因组中而整合的,任选地是通过使用慢病毒载体将所述外源多核苷酸引入所述细胞中而整合的。

395. 如权利要求394所述的工程化细胞,其中所述双顺反子盒是通过靶向插入所述细胞的靶基因组基因座中而整合的,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。

396. 如权利要求389-395中任一项所述的工程化细胞,其中所述一种或多种致耐受性因子是CD47。

397. 如权利要求127-224和266-388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。

398. 如权利要求397所述的方法,其中所述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)、诱导型半胱天冬酶9(iCaspase9)和雷帕霉素活化的半胱天冬酶9(rapaCasp9)。

399. 如权利要求397或权利要求398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的基因组中的双顺反子盒表达。

400. 如权利要求397-399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性因子由整合到所述工程化细胞的基因组中的双顺反子盒表达。

401. 如权利要求399或权利要求400所述的方法,其中所述双顺反子盒是通过非靶向插入所述工程化细胞的基因组中而整合的。

402. 如权利要求399或权利要求400所述的方法,其中所述双顺反子盒是通过靶向插入所述工程化细胞的靶基因组基因座中而整合的。

403. 如权利要求397-402中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子是CD47。

404. 如权利要求245-262中任一项所述的组合物,其中所述工程化细胞群体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。

405. 如权利要求404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)、诱导型半胱天冬酶9(iCaspase9)和雷帕霉素活化的半胱天冬酶9(rapaCasp9)。

406. 如权利要求404或权利要求405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体的工程化细胞的基因组中的双顺反子盒表达。

407. 如权利要求404-406中任一项所述的组合物,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的基因组中的双顺反子盒表达。

408. 如权利要求406或权利要求407所述的组合物,其中所述双顺反子盒是通过非靶向插入所述基因组中而整合的,任选地是通过使用慢病毒载体将所述外源多核苷酸引入所述工程化细胞群体的工程化细胞中而整合的。

409. 如权利要求406或权利要求407所述的组合物,其中所述双顺反子盒是通过靶向插入所述工程化细胞群体的工程化细胞的靶基因组基因座中而整合的,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。

## 用于减少补体介导的炎症反应的同种异体细胞疗法的基因修饰的细胞

[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第63/232164号和2022年6月17日提交的美国临时专利申请第63/353538号的优先权,其中每项申请的内容出于所有目的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(186152005240SEQLIST.xml;大小:41,567字节;以及创建日期:2022年8月8日)的内容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中的含有一种或多种修饰诸如基因修饰的工程化细胞。在一些实施方案中,工程化细胞是低免疫原性细胞。

### 发明内容

[0006] 受者对供体同种异体抗原敏感是临床移植疗法(包括细胞疗法)所面临的问题。例如,移植物受者的免疫系统排斥同种异体物质的倾向大大降低了移植疗法的潜在功效,并削弱了此类治疗可能产生的积极效果。仍然需要改进的同种异体细胞来治疗多种疾病和疾患。因此,仍然需要用于产生避免被受者免疫系统检测到的基于同种异体细胞的疗法的新途径、组合物和方法。

[0007] 在一些方面,本文提供了一种工程化细胞,所述工程化细胞包含如下修饰:(i)增加一种或多种致耐受性因子的表达,(ii)增加CD46的表达,(iii)增加CD59的表达,以及(iv)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,其中(i)、(ii)和(iii)的所述增加的表达以及(iv)的所述降低的表达是相对于不包含所述修饰的相同细胞类型的细胞而言的。

[0008] 在一些实施方案中,(iv)中的所述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,(iv)中的所述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。

[0009] 在一些实施方案中,所述一种或多种致耐受性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以及它们的任何组合。

[0010] 在一些实施方案中,所述一种或多种致耐受性因子选自由以下组成的组:CD47、PD-L1、HLA-E、HLA-G、CCL21、FASL、SERPINB9、CD200、MFGE8以及它们的任何组合。在一些实施方案中,所述一种或多种致耐受性因子中的至少一者是CD47。在一些实施方案中,所述一种或多种致耐受性因子中的至少一者是PD-L1。在一些实施方案中,所述一种或多种致耐受性因子中的至少一者是HLA-E。在一些实施方案中,所述一种或多种致耐受性因子中的至少一者是HLA-G。

[0011] 在任何实施方案的一些中,所述一种或多种致耐受性因子选自由以下组成的组:CD47;HLA-E;CD24;PD-L1;CD55;CR1;MANF;A20/TNFAIP3;HLA-E和CD47;CD24、CD47、PD-L1以及它们的任何组合;HLA-E、CD24、CD47和PD-L1以及它们的任何组合;CD55和CR1以及它们的任何组合;HLA-E、CD55和CR1以及它们的任何组合;HLA-E、CD24、CD47、PDL1、CD55和CR1以及它们的任何组合;HLA-E和PDL1;HLA-E、PDL1和A20/TNFAIP以及它们的任何组合;HLA-E、PDL1和MANF以及它们的任何组合;HLA-E、PDL1、A20/TNFAIP和MANF以及它们的任何组合;以及CD47、PD-L1、HLA-E、HLA-G、CCL21、FASL、SERPINB9、CD200、MFGE8以及它们的任何组合。

[0012] 在任何实施方案的一些中,所述修饰选自如下修饰:降低MHC I和/或MHC II的表达;增加CD47以及任选的CD24和PD-L1的表达;并且增加CD46、CD55、CD59和CR1的表达。

[0013] 在任何实施方案的一些中,所述修饰选自如下修饰:降低MHC I类分子的表达;增加CD46和CD59的表达;增加PD-L1和HLA-E的表达;以及任选地增加A20/TNFAIP3、TXNIP和MANF中的一者或多者的表达。

[0014] 在任何实施方案的一些中,所述修饰选自如下修饰:增加CCL21、PD-L1、FASL、SERPINB9、HLA-G、CD47、CD200和MFGE8的表达;并且增加CD46和CD59的表达。

[0015] 在一些实施方案中,所述修饰选自如下修饰:降低MHC I和/或MHC II的表达;并且增加CD47的表达。

[0016] 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表达的一种或多种另外的编辑一起存在于所提供的工程化细胞中。在一些实施方案中,任何一种或多种所述进一步修饰中的任一者或多者可以是降低以下各项的表达,诸如破坏以下各项的表达、使以下各项的表达失活或敲除以下各项的表达的修饰: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)。

[0017] 在一些方面,本文提供了一种工程化细胞,所述工程化细胞包含如下修饰:(i)增加CCL21、PD-L1、FASL、SERPINB9、HLA-G、CD47、CD200和MFGE8的表达,(ii)增加CD46的表达,以及(iii)增加CD59的表达,其中所述增加的表达是相对于不包含所述修饰的相同细胞类型的细胞而言的。在一些实施方案中,所述工程化细胞还包含增加CD55的表达的修饰,其中所述增加的CD55的表达是相对于不包含所述修饰的相同细胞类型的细胞而言的。

[0018] 在一些实施方案中,所述增加表达的修饰包括增加的表面表达,并且/或者所述降低表达的修饰包括降低的表面表达。在一些情况下,所述降低的表面表达包括没有可检测表面表达。

[0019] 在一些实施方案中,所述增加CD46的表达并且增加CD59的表达的一种或多种修饰包括编码CD46的外源多核苷酸和编码CD59的外源多核苷酸。

[0020] 在一些实施方案中,所述增加CD55的表达的修饰包括编码CD55的外源多核苷酸。

[0021] 在一些实施方案中,所述编码CD46的外源多核苷酸编码与SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少85%同一性的氨基酸序列,并且表现出补体抑制活性。在一些实施方案中,所

述编码CD46的外源多核苷酸编码SEQ ID NO:3所示的序列。

[0022] 在一些实施方案中,所述编码CD59的外源多核苷酸编码与SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有至少85%同一性的氨基酸序列,并且表现出补体抑制活性。在一些实施方案中,所述编码CD59的外源多核苷酸编码SEQ ID NO:5所示的序列。

[0023] 在一些实施方案中,所述编码CD55的外源多核苷酸编码与SEQ ID NO:8的氨基酸序列具有至少85%同一性的氨基酸序列,并且表现出补体抑制活性。在一些实施方案中,所述编码CD55的外源多核苷酸编码SEQ ID NO:8所示的序列。

[0024] 在一些实施方案中,所述编码CD46的外源多核苷酸和所述编码CD59的外源多核苷酸各自可操作地连接至启动子。

[0025] 在一些实施方案中,所述编码CD55的外源多核苷酸可操作地连接至启动子。

[0026] 在一些实施方案中,所述增加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,所述编码CD47的外源多核苷酸编码与SEQ ID NO:1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细胞的先天免疫杀伤。在一些实施方案中,所述编码CD47的外源多核苷酸编码SEQ ID NO:1所示的序列。在一些实施方案中,所述编码CD47的外源多核苷酸可操作地连接至启动子。

[0027] 在一些实施方案中,所述工程化细胞包含多顺反子载体,所述多顺反子载体包含选自自由以下组成的组的两种或更多种外源多核苷酸:编码所述一种或多种致耐受性因子的一种或多种外源多核苷酸、编码CD46的外源多核苷酸、编码CD59的外源多核苷酸和编码CD55多肽的外源多核苷酸。

[0028] 在一些实施方案中,所述多核苷酸中的每一者由IRES或自切割肽分隔。

[0029] 在一些实施方案中,一种或多种致耐受性因子是CD47。

[0030] 在一些实施方案中,所述多顺反子载体的每个多核苷酸可操作地连接至相同的启动子。

[0031] 在一些实施方案中,所述多顺反子载体包含编码CD46的外源多核苷酸和编码CD59的外源多核苷酸。在一些实施方案中,所述多顺反子载体包含编码CD46的外源多核苷酸、编码CD59的外源多核苷酸和编码CD55的外源多核苷酸。

[0032] 在一些实施方案中,所述多顺反子载体还包含编码CD47的外源多核苷酸。在一些实施方案中,所述多顺反子载体是第一转基因,并且所述工程化细胞包含含有编码CD47的外源多核苷酸的单独的转基因。

[0033] 在一些实施方案中,所述工程化细胞包含第一转基因和第二转基因,

[0034] 其中所述第一转基因和所述第二转基因各自包含选自自由以下组成的组的一种或多种外源多核苷酸:编码CD47的外源多核苷酸、编码CD46的外源多核苷酸、编码CD59的外源多核苷酸和编码CD55多肽的外源多核苷酸,并且其中所述第一转基因和所述第二转基因是单顺反子或多顺反子载体。

[0035] 在一些实施方案中,所述启动子是组成型启动子。

[0036] 在一些实施方案中,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。

[0037] 在一些实施方案中,所述编码CD46的外源多核苷酸和/或所述编码CD59的外源多核苷酸整合到所述工程化细胞的基因组中。

[0038] 在一些实施方案中,所述编码CD55的外源多核苷酸整合到所述工程化细胞的基因组中。

[0039] 在一些实施方案中,所述编码CD47的外源多核苷酸整合到所述工程化细胞的基因组中。

[0040] 在一些实施方案中,所述整合是通过非靶向插入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所述细胞中来进行的。在一些实施方案中,所述整合是通过靶向插入所述细胞的靶基因组基因座中来进行的。

[0041] 在一些实施方案中,所述靶基因组基因座是B2M基因座、CIITA基因座、TRAC基因座或TRBC基因座。

[0042] 在一些实施方案中,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。

[0043] 在一些实施方案中,所述编码CD47的外源多核苷酸整合到第一靶基因组基因座中,所述编码CD46的外源多核苷酸整合到第二靶基因组基因座中,并且所述编码CD59的多核苷酸整合到第三靶基因组基因座中。

[0044] 在一些实施方案中,所述编码CD55的外源多核苷酸整合到第四靶基因组基因座中。

[0045] 在一些实施方案中,所述第一、第二和第三靶基因组基因座中的至少两者是相同的基因座。在一些实施方案中,所述第一、第二、第三和第四靶基因组基因座中的至少两者是相同的基因座。在一些实施方案中,所述第一、第二和第三靶基因组基因座是相同的基因座。在一些实施方案中,所述第一、第二、第三和第四靶基因组基因座是相同的基因座。

[0046] 在一些实施方案中,所述第一、第二和第三靶基因组基因座中的每一者是不同的基因座。在一些实施方案中,所述第一、第二、第三和第四靶基因组基因座是不同的基因座。

[0047] 在一些实施方案中,所述降低一种或多种MHC I类分子的表达的修饰降低一种或多种MHC I类分子的蛋白质表达。在一些实施方案中,所述降低一种或多种MHC I类分子的表达的修饰包括降低的B2M的表达。在一些实施方案中,所述降低一种或多种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,所述修饰消除B2M基因活性。在一些实施方案中,所述修饰包括所述B2M基因的两个等位基因的失活或破坏。在一些实施方案中,所述修饰包括所述细胞中所有B2M编码序列的失活或破坏。在一些实施方案中,所述失活或破坏包括所述B2M基因中的插入缺失。在一些实施方案中,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。在一些实施方案中,所述B2M基因被敲除。

[0048] 在一些实施方案中,所述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,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选自Cas9或Cas12。在一些实施方案中,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引导RNA

(gRNA)。在一些实施方案中,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。

[0049] 在一些实施方案中,所述降低一种或多种MHC II类分子的表达的修饰降低一种或多种MHC II类分子的蛋白质表达。在一些实施方案中,所述降低一种或多种MHC II类分子的表达的修饰包括降低的CIITA的表达。在一些实施方案中,所述降低一种或多种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,所述修饰消除CIITA基因活性。在一些实施方案中,所述修饰包括所述CIITA基因的两个等位基因的失活或破坏。

[0050] 在一些实施方案中,所述修饰包括所述细胞中所有CIITA编码序列的失活或破坏。在一些实施方案中,所述失活或破坏包括所述CIITA基因中的插入缺失。在一些实施方案中,所述修饰是所述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。

[0051] 在一些实施方案中,所述工程化细胞是人细胞或动物细胞。在一些实施方案中,所述工程化细胞是人细胞。在一些实施方案中,所述工程化细胞是猪(pig/porcine)细胞、牛(cow/bovine)细胞或羊(sheep/ovine)细胞。在一些实施方案中,所述工程化细胞是源自多能干细胞或其子代的分化细胞。在一些实施方案中,所述多能干细胞是诱导性多能干细胞。

[0052] 在一些实施方案中,所述工程化细胞是从供体受试者分离的原代细胞。在一些实施方案中,在从单个的供体获得供体样本时,所述供体受试者是健康的或未被怀疑患有疾病或疾患。

[0053] 在一些实施方案中,所述工程化细胞选自 $\beta$ 胰岛细胞、B细胞、T细胞、NK细胞、视网膜色素上皮细胞、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。

[0054] 在一些实施方案中,所述工程化细胞是内皮细胞。在一些实施方案中,所述工程化细胞是上皮细胞。在一些实施方案中,所述工程化细胞是T细胞。在一些实施方案中,所述工程化细胞是NK细胞。在一些实施方案中,所述工程化细胞包含嵌合抗原受体(CAR)。

[0055] 在一些实施方案中,所述工程化细胞是多能干细胞。在一些实施方案中,所述工程化细胞是诱导性多能干细胞。在一些实施方案中,所述工程化细胞是胚胎干细胞。

[0056] 在一些实施方案中,所述细胞是ABO血型O型。在一些实施方案中,所述细胞包含功能性ABO A等位基因和/或功能性ABO B等位基因。在一些实施方案中,所述细胞是恒河猴因子阴性(Rh-)的。在一些实施方案中,所述细胞是恒河猴因子阳性(Rh+)的。

[0057] 在一些方面,本文提供了一种产生工程化细胞的方法,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;b.增加所述细胞中致耐受性因子的表达;c.增加所述细胞中CD46的表达;以及d.增加所述细胞中CD59的表达。

[0058] 在一些实施方案中,所述一种或多种致耐受性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以及它们的任何组合。

[0059] 在一些实施方案中,所述一种或多种致耐受性因子选自由以下组成的组:CD47、PD-L1、HLA-E、HLA-G、CCL21、FASL、SERPINB9、CD200、MFGE8以及它们的任何组合。在一些实

实施方案中,所述一种或多种致耐受性因子中的至少一者是CD47。在一些实施方案中,所述一种或多种致耐受性因子中的至少一者是PD-L1。在一些实施方案中,所述一种或多种致耐受性因子中的至少一者是HLA-E。在一些实施方案中,所述一种或多种致耐受性因子中的至少一者是HLA-G。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。

[0060] 在一些方面,本文提供了一种产生工程化细胞的方法,所述方法包括:a.增加所述细胞中CCL21、PD-L1、FASL、SERPINB9、HLA-G、CD47、CD200和MFGE8的表达;b.增加所述细胞中CD46的表达;以及c.增加所述细胞中CD59的表达。

[0061] 在一些实施方案中,所述方法还包括增加所述细胞中CD55的表达。

[0062] 在产生工程化细胞的方法的一些实施方案中,降低的表达包括降低的表面表达,并且/或者所述增加的表达包括增加的表面表达。在一些实施方案中,所述降低的表面表达包括没有可检测表面表达。

[0063] 在产生工程化细胞的方法的一些实施方案中,增加CD46和CD59的表达包括将编码CD46的外源多核苷酸和编码CD59的外源多核苷酸引入所述细胞中。

[0064] 在产生工程化细胞的方法的一些实施方案中,增加CD55的表达包括将编码CD55的外源多核苷酸引入所述细胞中。

[0065] 在产生工程化细胞的方法的一些实施方案中,所述编码CD46的外源多核苷酸编码与SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少85%同一性的氨基酸序列,并且表现出补体抑制活性。在一些实施方案中,所述编码CD46的外源多核苷酸编码SEQ ID NO:3所示的序列。

[0066] 在产生工程化细胞的方法的一些实施方案中,所述编码CD59的外源多核苷酸编码与SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有至少85%同一性的氨基酸序列,并且表现出补体抑制活性。在一些实施方案中,所述编码CD59的外源多核苷酸编码SEQ ID NO:5所示的序列。

[0067] 在产生工程化细胞的方法的一些实施方案中,所述编码CD55的外源多核苷酸编码与SEQ ID NO:8的氨基酸序列具有至少85%同一性的序列,并且表现出补体抑制活性。在一些实施方案中,所述编码CD55的外源多核苷酸编码SEQ ID NO:8所示的序列。

[0068] 在产生工程化细胞的方法的一些实施方案中,所述编码CD46的外源多核苷酸和所述编码CD59的外源多核苷酸各自可操作地连接至启动子。

[0069] 在产生工程化细胞的方法的一些实施方案中,所述编码CD55的外源多核苷酸可操作地连接至启动子。

[0070] 在产生工程化细胞的方法的一些实施方案中,所述增加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,所述编码CD47的外源多核苷酸编码与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少85%同一性的序列,并且降低所述工程化细胞的先天免疫杀伤。在一些实施方案中,所述编码CD47的外源多核苷酸编码SEQ ID NO:1所示的序列。在一些实施方案中,所述编码CD47的外源多核苷酸可操作地连接至启动子。

[0071] 在产生工程化细胞的方法的一些实施方案中,所述方法包括引入多顺反子载体,所述多顺反子载体包含选自由以下组成的组的两种或更多种外源多核苷酸:编码CD47的外源多核苷酸;编码CD46的外源多核苷酸;编码CD59的外源多核苷酸;和编码CD55多肽的外源多核苷酸。在一些实施方案中,所述多核苷酸中的每一者由IRES或自切割肽分隔。

[0072] 在产生工程化细胞的方法的一些实施方案中,所述多顺反子载体的每个多核苷酸

可操作地连接至相同的启动子。

[0073] 在产生工程化细胞的方法的一些实施方案中,所述多顺反子载体包含编码CD46的外源多核苷酸和编码CD59的外源多核苷酸。在一些实施方案中,所述多顺反子载体包含编码CD46的外源多核苷酸、编码CD59的外源多核苷酸和编码CD55的外源多核苷酸。

[0074] 在产生工程化细胞的方法的一些实施方案中,所述多顺反子载体还包含编码CD47的外源多核苷酸。在产生工程化细胞的方法的一些实施方案中,所述工程化细胞包含含有编码CD47的多核苷酸的单独的转基因。

[0075] 在产生工程化细胞的方法的一些实施方案中,所述编码CD46的外源多核苷酸和/或所述编码CD59的外源多核苷酸整合到所述工程化细胞的基因组中。

[0076] 在产生工程化细胞的方法的一些实施方案中,所述编码CD55的外源多核苷酸整合到所述工程化细胞的基因组中。

[0077] 在产生工程化细胞的方法的一些实施方案中,所述编码CD47的外源多核苷酸整合到所述工程化细胞的基因组中。

[0078] 在产生工程化细胞的方法的一些实施方案中,所述整合是通过非靶向插入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所述细胞中来进行的。在一些实施方案中,所述整合是通过靶向插入所述细胞的靶基因组基因座中来进行的,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。

[0079] 在产生工程化细胞的方法的一些实施方案中,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。

[0080] 在产生工程化细胞的方法的一些实施方案中,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。

[0081] 在产生工程化细胞的方法的一些实施方案中,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选自Cas9或Cas12。在一些实施方案中,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)以及包含所述编码CD46的外源多核苷酸、所述编码CD59的外源多核苷酸、所述编码CD55的外源多核苷酸和/或所述编码CD47的外源多核苷酸的同源定向修复模板。

[0082] 在产生工程化细胞的方法的一些实施方案中,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。

[0083] 在产生工程化细胞的方法的一些实施方案中,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类分子的蛋白质表达的修饰。在一些实施方案中,所述降低一种或多种MHC I类分子的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,所述降低一种或多种MHC I类分子的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,所述降低一种或多种MHC I类分子的蛋白质表达的修饰降低B2M基因活性。在一些实施方案中,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。在一些实施方案中,所述降低一种或多种MHC I类分子的蛋白

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。在一些实施方案中,所述失活或破坏包括所述B2M基因中的插入缺失或所述B2M基因的一段连续基因组DNA的缺失。在一些实施方案中,所述插入缺失是移码突变。在一些实施方案中,所述B2M基因被敲除。

[0084] 在产生工程化细胞的方法的一些实施方案中,所述降低一种或多种MHC I类分子的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,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选自Cas9或Cas12。在产生工程化细胞的方法的一些实施方案中,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引导RNA(gRNA)。在一些实施方案中,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。

[0085] 在产生工程化细胞的方法的一些实施方案中,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类分子的蛋白质表达的修饰。

[0086] 在产生工程化细胞的方法的一些实施方案中,所述降低一种或多种MHC II类分子的蛋白质表达的修饰包括降低的CIITA的表达。在一些实施方案中,所述降低一种或多种MHC II类分子的蛋白质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,所述降低一种或多种MHC II类分子的蛋白质表达的修饰降低CIITA基因活性。在一些实施方案中,所述降低一种或多种MHC II类分子的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。在一些实施方案中,所述修饰包括所述细胞中所有CIITA编码序列的失活或破坏。在一些实施方案中,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。在一些实施方案中,所述插入缺失是移码突变。在一些实施方案中,所述CIITA基因被敲除。

[0087] 在产生工程化细胞的方法的一些实施方案中,所述细胞是人细胞或动物细胞。在一些实施方案中,所述工程化细胞是人细胞。在一些实施方案中,所述细胞是从供体受试者分离的原代细胞。在一些实施方案中,所述细胞是多能干细胞,其中所述工程化细胞是源自所述多能干细胞的分化细胞,并且所述方法还包括分化所述多能干细胞。在一些实施方案中,所述多能干细胞是诱导性多能干细胞。在一些实施方案中,所述工程化细胞选自 $\beta$ 胰岛细胞、B细胞、T细胞、NK细胞、神经胶质祖细胞、神经细胞、心脏细胞、视网膜色素上皮细胞、视细胞、肝细胞、甲状腺细胞、皮肤细胞和血细胞。

[0088] 在一些方面,本文提供了一种根据本文所述的任何方法产生的工程化细胞。

[0089] 在一些实施方案中,所述工程化细胞或源自所述工程化细胞的子代或分化细胞在施用于患者后能够逃避NK细胞介导的细胞毒性。在一些实施方案中,所述工程化细胞或源自所述工程化细胞的子代或分化细胞在施用于患者后受到保护而免于被成熟NK细胞进行细胞裂解。

[0090] 在一些实施方案中,所述工程化细胞或源自所述工程化细胞的子代或分化细胞在施用于患者后不诱导对所述细胞的免疫应答。在一些实施方案中,所述工程化细胞或源自所述工程化细胞的子代或分化细胞在施用于患者后不诱导对所述细胞的全身性炎症应答。在一些实施方案中,所述工程化细胞或源自所述工程化细胞的子代或分化细胞在施用于患者后不诱导对所述细胞的局部炎症应答。

[0091] 在一些实施方案中,所述工程化细胞或源自所述工程化细胞的子代或分化细胞在施用于患者后不诱导补体途径活化。

[0092] 在一些实施方案中,所述细胞在施用于患者后保留植入和发挥功能的能力。

[0093] 在一些方面,本文提供了一种工程化细胞群体,所述工程化细胞群体包含多个本文所述的任何工程化细胞。

[0094] 在一些实施方案中,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。在一些实施方案中,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。

[0095] 在一些实施方案中,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CD46的外源多核苷酸。

[0096] 在一些实施方案中,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CD59的外源多核苷酸。

[0097] 在一些实施方案中,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CD55的外源多核苷酸。

[0098] 在一些实施方案中,相对于不包含所述修饰的细胞,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。

[0099] 在一些实施方案中,相对于不包含所述修饰的细胞,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。在一些实施方案中,相对于不包含所述修饰的细胞,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。在一些实施方案中,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,所述群体中至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%或99.99%的细胞包含使CIITA基因的两个等位基因失活的一种或多种改变。

[0100] 在一些方面,本文提供了一种包含本文所述的任何工程化细胞群体的组合物。

[0101] 在包含工程化细胞群体的组合物的一些实施方案中,所述工程化细胞包含:(i) 编码CD47的外源多核苷酸,(ii) 编码CD46的外源多核苷酸,(iii) 编码CD59的外源多核苷酸,和(iv) B2M基因的两个等位基因的失活或破坏。

[0102] 在所述组合物的一些实施方案中,所述工程化细胞还包含CIITA基因的两个等位基因的失活或破坏。

[0103] 在所述组合物的一些实施方案中,所述工程化细胞还包含编码CD55的外源多核苷酸。

[0104] 在所述组合物的一些实施方案中,所述工程化细胞包含多顺反子载体,所述多顺反子载体包含所述编码CD47的外源多核苷酸、所述编码CD46的外源多核苷酸和所述编码CD59的外源多核苷酸。在一些实施方案中,所述工程化细胞包含第一转基因和多顺反子载体,所述第一转基因包含所述编码CD47的外源多核苷酸,所述多顺反子载体包含所述编码

CD46的外源多核苷酸和所述编码CD59的外源多核苷酸。在一些实施方案中,所述工程化细胞包含第一转基因和多顺反子载体,所述第一转基因包含所述编码CD47的外源多核苷酸,所述多顺反子载体包含所述编码CD46的外源多核苷酸、所述编码CD59的外源多核苷酸和所述编码CD55的外源多核苷酸。

[0105] 在所述组合物的一些实施方案中,所述多顺反子载体的所述多核苷酸中的每一者由IRES或自切割肽分隔。在所述组合物的一些实施方案中,通过使用同源定向修复的核酸酶介导的基因编辑将所述转基因引入靶基因组基因座位点处。在一些实施方案中,所述失活或破坏是通过核酸酶介导的基因编辑进行的。在一些实施方案中,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选自Cas9或Cas12。

[0106] 在所述组合物的一些实施方案中,所述组合物是药物组合物。在一些实施方案中,所述组合物包含药学上可接受的赋形剂。在一些实施方案中,所述药学上可接受的赋形剂是缓冲溶液,诸如盐水。

[0107] 在所述组合物的一些实施方案中,所述组合物被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,所述冷冻保护剂是DMSO并且所述冷冻保存介质为5%至10% DMSO(v/v)。在一些实施方案中,所述冷冻保护剂为10% DMSO(v/v)或为约10% DMSO(v/v)。

[0108] 在本文提供的任何组合物的一些实施方案中,所述组合物是无菌组合物。

[0109] 在本文提供的任何组合物的一些实施方案中,所述组合物包含在容器中。

[0110] 在一些实施方案中,所述容器包括本文所述的任何组合物。在一些实施方案中,所述容器是无菌袋。在一些实施方案中,所述袋是冷冻保存相容袋。

[0111] 在一些方面,本文提供了一种治疗有需要的患者的疾病、疾患或细胞缺陷的方法,所述方法包括向所述患者施用有效量的本文所述的群体或组合物。

[0112] 在治疗疾病的方法的一些实施方案中,所述群体包含内皮细胞。

[0113] 在治疗疾病的方法的一些实施方案中,所述疾患或疾病选自由以下组成的组:糖尿病、癌症、血管化病症、眼部疾病、甲状腺疾病、皮肤疾病和肝脏疾病。

[0114] 在治疗疾病的方法的一些实施方案中,所述细胞缺陷与糖尿病相关,或者所述细胞疗法是用于治疗糖尿病,任选地其中所述糖尿病是I型糖尿病。

[0115] 在治疗疾病的方法的一些实施方案中,所述细胞群体是胰岛细胞群体,包括 $\beta$ 胰岛细胞群体。在一些实施方案中,所述胰岛细胞选自由胰岛祖细胞、未成熟胰岛细胞和成熟胰岛细胞组成的组。

[0116] 在治疗疾病的方法的一些实施方案中,所述细胞缺陷与血管疾患或疾病相关,或者所述细胞疗法是用于治疗血管疾患或疾病。在一些实施方案中,所述细胞群体是内皮细胞群体。

[0117] 在治疗疾病的方法的一些实施方案中,所述细胞缺陷与自身免疫性甲状腺炎相关,或者所述细胞疗法是用于治疗自身免疫性甲状腺炎。在一些实施方案中,所述细胞群体是甲状腺祖细胞群体。

[0118] 在治疗疾病的方法的一些实施方案中,所述细胞缺陷与肝脏疾病相关,或者所述细胞疗法是用于治疗肝脏疾病。在一些实施方案中,所述肝脏疾病包括肝硬化。在一些实施

方案中,所述细胞群体是肝细胞或肝祖细胞群体。

[0119] 在治疗疾病的方法的一些实施方案中,所述细胞缺陷与角膜疾病相关,或者所述细胞疗法是用于治疗角膜疾病。在一些实施方案中,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。在一些实施方案中,所述细胞群体是角膜内皮祖细胞或角膜内皮细胞群体。

[0120] 在治疗疾病的方法的一些实施方案中,所述细胞缺陷与肾脏疾病相关,或者所述细胞疗法是用于治疗肾脏疾病。在一些实施方案中,所述细胞群体是肾前体细胞或肾细胞群体。

[0121] 在治疗疾病的方法的一些实施方案中,所述细胞疗法是用于治疗癌症。在一些实施方案中,所述癌症选自由以下组成的组: B细胞急性成淋巴细胞白血病(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、急性髓样淋巴细胞白血病、多发性骨髓瘤、胃癌、胃腺癌、胰腺腺癌、成胶质细胞瘤、成神经细胞瘤、肺鳞状细胞癌、肝细胞癌和膀胱癌。

[0122] 在治疗疾病的方法的一些实施方案中,所述细胞群体是T细胞或NK细胞群体。

[0123] 在治疗疾病的方法的一些实施方案中,在施用之前将所述细胞扩增并冷冻保存。

[0124] 在治疗疾病的方法的一些实施方案中,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。在治疗疾病的方法的一些实施方案中,经由血管内注射或肌内注射移植所述群体。

[0125] 在治疗疾病的方法的一些实施方案中,所述群体源自供体受试者,其中所述供体的HLA类型与所述患者的HLA类型不匹配。

[0126] 在治疗疾病的方法的一些实施方案中,所述群体源自供体,其中所述供体的血型与所述患者的血型不匹配,并且所述供体的血型不是O型。在一些实施方案中,所述群体源自供体,其中所述供体的血型是恒河猴因子(Rh)阳性的,并且所述患者的血型是Rh阴性的。在一些实施方案中,所述患者的血清包含针对Rh的抗体。

[0127] 在治疗疾病的方法的一些实施方案中,所述群体是人细胞群体,并且所述患者是人患者。

[0128] 在治疗疾病的方法的一些实施方案中,所述细胞群体包含功能性ABO A等位基因和/或功能性ABO B等位基因。在一些实施方案中,所述细胞群体呈递ABO A型抗原,并且所述患者的血清包含抗A抗体。在一些实施方案中,所述细胞群体呈递ABO B型抗原,并且所述患者的血清包含抗B抗体。在一些实施方案中,所述细胞群体呈递ABO A型和B型抗原,并且所述患者的血清包含抗A和/或抗B抗体。在一些实施方案中,细胞群体表达Rh因子,并且所述患者的血清包含抗Rh抗体。

[0129] 在治疗疾病的方法的一些实施方案中,所述方法还包括向所述患者施用一种或多种免疫抑制剂。在一些实施方案中,已向所述患者施用一种或多种免疫抑制剂。在一些实施方案中,所述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,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、柳氮磺胺吡啶、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。在一些实施方案中,所述一种或多种免疫抑制剂包括环孢菌

素。在一些实施方案中,所述一种或多种免疫抑制剂包括霉酚酸酯。在一些实施方案中,所述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,所述一种或多种免疫抑制剂包括环磷酰胺。在一些实施方案中,所述一种或多种免疫抑制剂包括雷帕霉素。在一些实施方案中,所述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,所述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,所述一种或多种免疫抑制剂是一种或多种免疫调节剂。

[0130] 在治疗疾病的方法的一些实施方案中,所述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,所述抗体与选自由以下组成的组的受体或配体中的一者或多者结合: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,以及与它们的任何配体结合的抗体。

[0131] 在治疗疾病的方法的一些实施方案中,在施用所述工程化细胞之前向所述患者施用或已施用所述一种或多种免疫抑制剂。在一些实施方案中,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施用所述一种或多种免疫抑制剂。在一些实施方案中,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周或更长时间向所述患者施用或已施用所述一种或多种免疫抑制剂。在一些实施方案中,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施用所述一种或多种免疫抑制剂。在一些实施方案中,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周或更长时间向所述患者施用或已施用所述一种或多种免疫抑制剂。在一些实施方案中,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施用所述一种或多种免疫抑制剂。在一些实施方案中,在施用所述工程化细胞之后向所述患者施用或已施用所述一种或多种免疫抑制剂。在一些实施方案中,在施用所述工程化细胞的第一次和/或第二次施用之后向所述患者施用或已施用所述一种或多种免疫抑制剂。在一些实施方案中,在施用所述工程化细胞的第一次和/或第二次施用之前向所述患者施用或已施用所述一种或多种免疫抑制剂。在一些实施方案中,在施用所述工程化细胞的第一次和/或第二次施用之前至少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施用所述一种或多种免疫抑制剂。在一些实施方案中,在施用所述工程化细胞的第一次和/或第二次施用之前至少1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周或更长时间向所述患者施用或已施用所述一种或多种免疫抑制剂。在一些实施方案中,在施用所述工程化细胞的第一次和/或第二次施用之后至少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施用所述一种或多种免疫抑制剂。在一些实施方案中,在施用所述工程化细胞的第一次和/或第二次施用之后至少1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周或更长时间向所述患者施用或已施用所述一种或多种免疫抑制剂。在一些实施方案中,与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。

[0132] 在治疗疾病的方法的一些实施方案中,所述工程化细胞能够受控杀伤所述工程化细胞。在一些实施方案中,所述工程化细胞包含自杀基因或自杀开关。在一些实施方案中,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。在一些实施方案中,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。在一些实施方案中,所述能够诱导所述工程化细胞凋亡的诱导型蛋白是半胱天冬酶蛋白。在一些实施方案中,所述半胱天冬酶蛋白是半胱天冬酶9。在一些实施方案中,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)、诱导型半胱天冬酶9(iCaspase9)和雷帕霉素活化的半胱天冬酶9(rapaCasp9)。在一些实施方案中,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。在一些实施方案中,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。在一些实施方案中,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。在一些实施方案中,如果对所述患者具有细胞毒性或其他负面后果,则活化所述自杀基因或所述自杀开关以诱导受控细胞死亡。

[0133] 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消耗所述工程化细胞群体的工程化细胞的剂。在一些实施方案中,所述允许消耗所述工程化细胞的剂是识别在所述工程化细胞的表面上表达的蛋白质的抗体。在一些实施方案中,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。在一些实施方案中,所述抗体选自自由以下组成的组:莫格利珠单抗、AFM13、MOR208、奥滨尤妥珠单抗、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以及它们的生物类似物。

[0134] 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所述工程化细胞的表面上的所述一种或多种致耐受性因子的剂。在一些实施方案中,所述工程化细胞经工程化以表达所述一种或多种致耐受性因子。在一些实施方案中,所述一种或多种致耐受性因子是CD47。

[0135] 在治疗疾病的方法的一些实施方案中,所述方法还包括向所述患者施用一种或多种另外的治疗剂。在一些实施方案中,已向所述患者施用一种或多种另外的治疗剂。

[0136] 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对一种或多种疾病症状的期望抑制。

[0137] 在工程化细胞的一些实施方案中,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。在一些实施方案中,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)、诱导型半胱天冬酶9(iCaspase9)和雷帕霉素活化的半胱天冬酶9(rapaCasp9)。在一些实施方案中,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的基因组中的双顺反子盒表达。在一些实施方案中,所述自杀基因或自杀开关和所述一种或多种致耐受性因子由整合到所述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,所述双顺反子盒是通过非靶向插入所述工程化细胞的基因组中而整合的,任选地是通过使用慢病毒载体将所述外源多核苷酸引入所述细胞中而整合的。在一些实施方案中,所述双顺反子盒是通过靶向插入所述工程化细胞的靶基因组基因座中而整合的,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。在一些实施方案中,所述一种或多

种致耐受性因子是CD47。

[0138] 在产生工程化细胞的方法的一些实施方案中,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。在一些实施方案中,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)、诱导型半胱天冬酶9(iCaspase9)和雷帕霉素活化的半胱天冬酶9(rapaCasp9)。在一些实施方案中,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的基因组中的双顺反子盒表达。在一些实施方案中,所述自杀基因或自杀开关和所述一种或多种致耐受性因子由整合到所述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,所述双顺反子盒是通过非靶向插入所述工程化细胞的基因组中而整合的。在一些实施方案中,所述双顺反子盒是通过靶向插入所述工程化细胞的靶基因组基因座中而整合的。在一些实施方案中,所述一种或多种致耐受性因子是CD47。

[0139] 在工程化细胞的组合物的一些实施方案中,所述工程化细胞群体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,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)、诱导型半胱天冬酶9(iCaspase9)和雷帕霉素活化的半胱天冬酶9(rapaCasp9)。在一些实施方案中,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体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,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的基因组中的双顺反子盒表达。在一些实施方案中,所述双顺反子盒是通过非靶向插入所述基因组中而整合的,任选地是通过使用慢病毒载体将所述外源多核苷酸引入所述工程化细胞群体的工程化细胞中而整合的。在一些实施方案中,所述双顺反子盒是通过靶向插入所述工程化细胞群体的工程化细胞的靶基因组基因座中而整合的,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。

## 附图说明

[0140] 图1A至图1B示出了如通过流式细胞术测量的B2M<sup>插入缺失/插入缺失</sup>;CIITA<sup>插入缺失/插入缺失</sup>;CD47tg人诱导性多能干细胞(hiPSC)(图1A)和从B2M<sup>插入缺失/插入缺失</sup>;CIITA<sup>插入缺失/插入缺失</sup>;CD47tg hiPSC分化的内皮细胞(hiEC)(图1B)的HLA I类(HLA-I)、HLA II类(HLA-II)和CD47的表达水平,证明细胞缺乏HLA-I和HLA-II的表达,并且具有增加的CD47的表达。

[0141] 图2A至图2B示出了B2M<sup>插入缺失/插入缺失</sup>;CIITA<sup>插入缺失/插入缺失</sup>;CD47tg hiPSC(图2A)和B2M<sup>插入缺失/插入缺失</sup>;CIITA<sup>插入缺失/插入缺失</sup>;CD47tg hiEC(图2B)中CD46、CD55和CD59的表面表达水平。

[0142] 图3A至图3B示出了ABO不相容补体依赖性细胞毒性(CDC)测定中B2M<sup>插入缺失/插入缺失</sup>;CIITA<sup>插入缺失/插入缺失</sup>;CD47tg hiPSC(图3A)和B2M<sup>插入缺失/插入缺失</sup>;CIITA<sup>插入缺失/插入缺失</sup>;CD47tg hiEC(图3B)的杀伤。

[0143] 图4A至图4D示出了ABO不相容CDC测定中B2M<sup>插入缺失/插入缺失</sup>;CIITA<sup>插入缺失/插入缺失</sup>;CD47tg hiPSC的CD46++库中CD46的表面表达水平(图4A)和CD46+++库(图4B)或具有CD46++表达(图4C)或CD46+++表达(图4D)的单个的hiPSC克隆的杀伤。

[0144] 图5A至图5D示出了ABO不相容CDC测定中B2M<sup>插入缺失/插入缺失</sup>;CIITA<sup>插入缺失/插入缺失</sup>;CD47tg hiEC的CD46++库中CD46的表面表达水平(图5A)和CD46++库(图5B)或具有CD46+++表达的单

个的hiEC克隆(图5C至图5D)的杀伤。

[0145] 图6A至图6E示出了ABO不相容CDC测定中B2M<sup>插入缺失/插入缺失</sup>;CIITA<sup>插入缺失/插入缺失</sup>;CD47tg hiPSC的CD55+库中CD55的表面表达水平(图6A)和CD55+库(图6B)或具有CD55++表达的单个的hiPSC克隆(图6C至图6E)的杀伤。

[0146] 图7A至图7E示出了ABO不相容CDC测定中B2M<sup>插入缺失/插入缺失</sup>;CIITA<sup>插入缺失/插入缺失</sup>;CD47tg hiEC的CD55++库中CD55的表面表达水平(图7A)和CD55+库(图7B)或具有CD55+++表达的单个的hiEC克隆(图7C至图7E)的杀伤。

[0147] 图8A至图8E示出了ABO不相容CDC测定中B2M<sup>插入缺失/插入缺失</sup>;CIITA<sup>插入缺失/插入缺失</sup>;CD47tg hiPSC的CD59+库中CD59的表面表达水平(图8A)和CD59+库(图8B)或具有CD59++表达(图8C至图8D)或CD59+++表达(图8E)的单个的hiPSC克隆的杀伤。

[0148] 图9A至图9C示出了ABO不相容CDC测定中B2M<sup>插入缺失/插入缺失</sup>;CIITA<sup>插入缺失/插入缺失</sup>;CD47tg hiEC的CD59+++库中CD59的表面表达水平(图9A)和CD59+++库(图9B)或具有CD59++表达的单个的hiEC克隆(图9C)的杀伤。

[0149] 图10A至图10E示出了ABO不相容CDC测定中B2M<sup>插入缺失/插入缺失</sup>;CIITA<sup>插入缺失/插入缺失</sup>;CD47tg hiPSC的CD46+++ /CD55++库中CD46和CD55的表面表达水平(图10A)和CD46+++ /CD55++库(图10B)或具有CD46++ /CD55++表达的单个的hiPSC克隆(图10C至图10E)的杀伤。

[0150] 图11A至图11E示出了ABO不相容CDC测定中B2M<sup>插入缺失/插入缺失</sup>;CIITA<sup>插入缺失/插入缺失</sup>;CD47tg hiEC的CD46++ /CD55++库中CD46和CD55的表面表达水平(图11A)和CD46++ /CD55++库(图11B)或具有CD46++ /CD55++表达的单个的hiEC克隆(图11C至图11E)的杀伤。

[0151] 图12A至图12E示出了ABO不相容CDC测定中B2M<sup>插入缺失/插入缺失</sup>;CIITA<sup>插入缺失/插入缺失</sup>;CD47tg hiPSC的CD55++ /CD59++库中CD55和CD59的表面表达水平(图12A)和CD55++ /CD59++库(图12B)或具有CD55++ /CD59++表达(图12C至图12D)或CD55++ /CD59+++表达(图12E)的单个的hiPSC克隆的杀伤。

[0152] 图13A至图13E示出了ABO不相容CDC测定中B2M<sup>插入缺失/插入缺失</sup>;CIITA<sup>插入缺失/插入缺失</sup>;CD47tg hiEC的CD55++ /CD59+++库中CD55和CD59的表面表达水平(图13A)和CD55++ /CD59+++库(图13B)或具有CD55++ /CD59++表达(图13C至图13D)或CD55++ /CD59+++表达(图13E)的单个的hiEC克隆的杀伤。

[0153] 图14A至图14E示出了ABO不相容CDC测定中B2M<sup>插入缺失/插入缺失</sup>;CIITA<sup>插入缺失/插入缺失</sup>;CD47tg hiPSC的CD46+++ /CD59++库中CD46和CD59的表面表达水平(图14A)和CD46+++ /CD59++库(图14B)或具有CD46++ /CD59++表达的单个的hiPSC克隆(图14C至图14D)或CD46++ /CD59+++克隆(图14E)的存活。

[0154] 图15A至图15E示出了ABO不相容CDC测定中B2M<sup>插入缺失/插入缺失</sup>;CIITA<sup>插入缺失/插入缺失</sup>;CD47tg hiEC的CD46超++ /CD59++库中CD46和CD59的表达水平(图15A)和CD46++ /CD59++库(图15B)或具有CD46++ /CD59++表达的单个的hiEC克隆(图15C至图15E)的存活。

[0155] 图16A至图16E示出了ABO不相容CDC测定中B2M<sup>插入缺失/插入缺失</sup>;CIITA<sup>插入缺失/插入缺失</sup>;CD47tg hiPSC的CD46++ /CD55++ /CD59+库中CD46、CD55和CD59的表面表达水平(图16A)和CD46++ /CD55++ /CD59+库的存活(图16B)。还示出了CDC测定中具有CD46++ /CD55++ /CD59++表达(图16C和图16D)或CD46++ /CD55++ /CD59++表达(图16E)的单个的hiPSC克隆的存活。

[0156] 图17A至图17C示出了ABO不相容CDC测定中B2M<sup>插入缺失/插入缺失</sup>;CIITA<sup>插入缺失/插入缺失</sup>;CD47tg

hiEC的CD46<sup>++</sup>/CD55<sup>++</sup>/CD59<sup>++</sup>库中CD46、CD55和CD59的表面表达水平(图17A)和CD46<sup>++</sup>/CD55<sup>++</sup>/CD59<sup>++</sup>库的存活(图17B)。还示出了CDC测定中具有CD46<sup>++</sup>/CD55<sup>++</sup>/CD59<sup>++</sup>表达的单个的hiEC克隆的存活(图17C)。

[0157] 图18示出了在不存在ABO不相容血清的情况下,源自人iPSC的内皮细胞的CDC测定结果(存活对照)。

[0158] 图19A至图19C示出了CDC测定中B2M<sup>插入缺失/插入缺失</sup>、CIITA<sup>插入缺失/插入缺失</sup>、CD47tg小鼠诱导性多能干细胞(miPSC;图19A)的杀伤和经CD46和CD59(CD46<sup>+</sup>/CD59<sup>+</sup>库;图19B)或CD46、CD55和CD59(CD46<sup>+</sup>/CD59<sup>+</sup>/CD55<sup>+</sup>库;图19C)转导的B2M<sup>插入缺失/插入缺失</sup>、CIITA<sup>插入缺失/插入缺失</sup>、CD47tg miPSC的存活。

[0159] 图20A至图20D示出了结果,证明人CD46和CD59或人CD46、CD55和CD59针对由人ABO不相容血清触发的CDC的保护作用防止由ABO不相容恒河猴血清引发的CDC。

### 具体实施方式

[0160] 本文提供了用于减轻和/或逃避针对同种异体移植的免疫系统反应的影响的方法和组合物。为了克服细胞源性和/或组织移植物的免疫排斥问题,本文公开了工程化的免疫逃避细胞(例如,工程化的原代低免疫原性细胞)或其群体或药物组合物,其代表了任何可移植细胞类型的可行来源。本文公开的工程化细胞实现减少受者受试者免疫系统的识别,而不管受试者的基因组成,或受试者体内对一种或多种先前同种异体移植物的任何现有应答、先前自体嵌合抗原受体(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。工程化细胞可包括但不限于β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)。

[0161] 在一些方面,本文提供了进一步受到保护而免于补体依赖性细胞毒性(CDC)的工程化细胞及其群体。补体系统由血清中存在的几种可溶性因子组成,这些因子可以经由不同的途径活化。补体由与细胞表面上存在的抗原结合的IgM/IgG抗体诸如ABO不相容血清的抗A和/或抗B抗体活化。一旦活化,级联会导致膜攻击复合物(MAC)的形成,该膜攻击复合物在细胞膜上引入孔隙并引起细胞杀伤(NesargikarPN.Eur J Microbiol Immunol (Bp).2012;2:103-11)。在一些实施方案中,本文提供的工程化细胞表现出降低的补体级联活化,包括在存在针对HLA非依赖性抗体的抗体的情况下(例如,在存在IgG或IgM抗体,诸如针对患者的ABO血型抗原A和/或在ABO血型不相容血清中发现的ABO血型抗原的抗体的情况下)。

[0162] 包括hiPSC和hEC在内的细胞内源性地表达补体介导的细胞毒性的抑制剂,包括膜结合补体抑制剂CD46、CD55和CD59。然而,本申请的实例证明,内源CD46、CD55和CD59表达不能保护细胞免于CDC,即使在具有增加的致耐受性因子的表达以及降低的一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子的表达的细胞的情形下也是如此。在一些实施方案中,本申请提供补体抑制剂(CD46和CD59)的组合,这些补体抑制剂可以在某些工程化细胞中过表达以避免或降低补体依赖性细胞毒性的影响。在一些实施方案中,本文提供的工程化细胞具有增加的CD46和CD59的表达。在一些实施方案中,本文提供的工程化细胞具有增加的CD46、CD59和CD55的表达。在一些实施方案中,本文提供的工程化细胞具有增加的本文

所述的任何一种或多种致耐受性因子的表达,和/或降低的一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子的表达。

[0163] 在一些实施方案中,本文所述的工程化细胞还包含一种或多种补体抑制剂的增加的表达和/或过表达。在一些实施方案中,一种或多种补体抑制剂选自CD46、CD59和CD55。在一些实施方案中,工程化细胞包含增加的两种或更多种补体抑制剂的组合的表达,诸如增加的CD46和CD59的表达或增加的CD46、CD59和CD55的表达。

[0164] 本文提供的工程化细胞利用致耐受性因子的表达,并且还可以调节(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)的基因组编辑技术也用于降低或消除人细胞中关键免疫基因的表达(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(致耐受性)因子(例如,CD47),由此产生能够在植入到受者受试者后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,降低的或和消除的表达)、致耐受性因子(诸如CD47)的调节的表达(例如,降低的或和调节的表达(例如,过表达),并且提供降低的受者受试者免疫系统识别。在一些实施方案中,本文提供的工程化细胞表现出CD142的调节的表达(例如,降低的表达)。在一些实施方案中,本文提供的工程化细胞表现出选自CD46、CD59和CD55的一种或多种补体抑制剂的调节的表达(例如,增加的表达)。

[0165] 在一些方面,本文提供的工程化细胞表现出降低的先天免疫细胞排斥和/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,工程化细胞表现出对NK细胞介导的裂解和/或巨噬细胞吞噬的易感性降低。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者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征。

[0166] 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错配同种异体受者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,由本文所述的任何一种方法产生的工程化细胞在重复施用(例如,移植或植入)至MHC错配的同种异体受者时逃避免疫排斥。

[0167] 除非有明确相反的指示,否则具体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,这些方法在本发明的技术内,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,Greenlee Pub.Associates and Wiley-Interscience;Glover,DNA Cloning:A Practical Approach,第I和II卷(IRL Press,Oxford,1985);Anand,Techniques for the

Analysis of Complex Genomes, (Academic Press, New York, 1992); Transcription and Translation (B. Hames和S. Higgins编辑, 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编辑, 1991); Annual Review of Immunology; 以及诸如Advances in Immunology的期刊上的专题论文。

[0168] 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。如果本文阐述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阐述的定义相反或在其他方面不一致,则本文阐述的定义优先于通过引用并入本文的定义。

[0169] 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,并且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。

[0170] I. 定义

[0171] 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。

[0172] 如本文所用,术语“约”当指可测量值(诸如量或浓度等)时,意在涵盖该指定量的20%、10%、5%、1%、0.5%或甚至0.1%的变化。除非上下文另有明确规定,否则在本文包括所附权利要求中使用的单数形式“一个/种”、“或”和“所述”包括复数个指示物。例如,“一个/种”意指“至少一个/种”或“一个/种或多个/种”。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。

[0173] 如本文所用,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。

[0174] 如本文所用,提及多肽或多核苷酸的术语“外源”旨在意指将所提及的分子引入目标细胞中。可以例如通过将外源编码核酸引入细胞的遗传物质中(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细胞中的分子、构建体、因子等。

[0175] 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。

[0176] “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。

[0177] 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”是指期望基因中,期望靶向基因修饰,诸如外源多核苷酸的基因编辑或整合的特定基因座。

[0178] 提及基因的术语“表达”或“基因表达”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),或者可以通过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)的表达处于在细胞中可检测的水平。

[0179] 如本文所用,“可检测”表达水平意指通过本领域技术人员已知的标准技术可检测到的水平,所述标准技术包括例如差异显示、RT(逆转录酶)偶联聚合酶链式反应(PCR)、RNA印迹和/或RNase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。

[0180] 如本文所用,术语“增加的表达”、“增强的表达”或“过表达”意指除了不包含用于调节特定基因表达的修饰的原始细胞或源细胞中的表达,例如野生型表达水平(也可以是无表达或不可剂量的表达)以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,相对于不包含修饰的细胞,诸如在工程化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增加的多肽水平和/或增加的多肽活性。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。

[0181] 术语“低免疫原性”是指细胞不太容易受到移植此类细胞的受试者的免疫排斥。例如,相对于同一细胞类型的但不包含修饰的类似细胞,诸如未改变或未修饰的野生型细胞,这种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%不容易或更不容易受到移植此类细胞的受试者的免疫排斥。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错配的同种异体受者中逃避免疫排斥。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。

[0182] 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应答的能力)来确定。这种免疫应答可以使用本领域技术人员认可的测定来测量。

[0183] 如本文所用的术语“致耐受性因子”包括在施用、移植或植入后调节或影响细胞被宿主或受者受试者的免疫系统识别的能力的免疫抑制因子或免疫调控因子。通常,致耐受性因子是诱导对工程化原代细胞的免疫耐受性的因子,使得工程化原代细胞不被受者的宿主免疫系统靶向,诸如排斥。因此,致耐受性因子可能是低免疫性因子。致耐受性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、检查点抑制剂和其他减少先天或适应性免疫识别的分子。

[0184] 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,与参考样本相比不存在的水平)或在10-100%之间的任何减少。

[0185] 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。

[0186] 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,修饰是诸如通过基因编辑、诱变,或通过外源多核苷酸或转基因的基因工程,直接改变细胞中编码蛋白质产物的基因或其调控元件的基因修饰。

[0187] 如本文所用,“插入缺失”是指由基因组中核苷酸碱基的插入、缺失或它们的组合产生的突变。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系统可用于在靶多核苷酸序列中诱导任意长度的插入缺失。

[0188] 在一些实施方案中,改变是点突变。如本文所用,“点突变”是指替换一个核苷酸的取代。本公开的CRISPR/Cas系统可用于在靶多核苷酸序列中诱导任意长度的插入缺失或点突变。

[0189] 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。

[0190] 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执行。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障碍(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)。

[0191] 所谓“敲入”,在本文中则表示向宿主细胞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,这可以通过多种方式实现,包括将基因的一个或多个另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。

[0192] 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。

[0193] 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。

[0194] 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抑制。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。

[0195] 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。

[0196] 如本文所用,术语“多肽”和“蛋白质”可互换使用,是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。此类聚合物可含有天然或非天然氨基酸残基或它们的组合,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。该术语还包括其修饰种类,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。

[0197] 贯穿本公开,所要求保护的主题的各个方面以范围的格式呈现。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不可改变的限制。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该范围内的单个数值。例如,在提供值的范围的情况下,应当理解,在该范围的上限与下限之间的每个中介值(intervening value)(除非上下文另外清楚地指出,否则直到下限的单位的十分之一)以及该所述范围内的任何其他所述值或中介值都涵盖在本公开内,受所述范围内任何具体排除的限制的约束。在所述范围包括极限值中的一个或两个的情况下,不包括那些被包括的极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,为特征提供两个相反且开放式的范围,并且在这样的描述中,设想本文提供这两个范围的组合。例如,在一些实施方案中,描述特征大于约10个单位,并且描述(诸如在另一句话中)特征小于约20个单位,由此本文描述了约10个单位至约20个单位的范围。

[0198] 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、病症或疾患的患者。

[0199] 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。出于该技术的目的,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、疾病状态的稳定(即,不恶化)、疾病进展的延迟或减慢、疾病状态的改善或缓和以及缓解(无论是部分还是全部),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,在治疗疾病或病症后,所述疾病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%。

[0200] 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。

[0201] “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”意指能够指导目标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。

[0202] II. 工程化细胞和将细胞工程化的方法

[0203] 本文提供了包含增加CD46和CD59的表达的一种或多种修饰的工程化细胞。在一些实施方案中,所述一个或多个修饰还增加CD55的表达。在一些实施方案中,所述一个或多个增加CD46、CD59和/或CD55的表达的修饰增加CD46、CD59和/或CD55的蛋白质表达。在一些实施方案中,所述增加表达的修饰包括增加的表面表达,并且/或者所述降低表达的修饰包括降低的表面表达。在一些实施方案中,增加一种或多种补体抑制剂的表达的修饰包含编码CD46的外源多核苷酸、编码CD59的外源多核苷酸和/或编码CD55的外源多核苷酸。

[0204] 在一些实施方案中,一种或多种补体抑制剂是CD46和CD59,任选地其中修饰包含编码CD46的外源多核苷酸和编码CD59的外源多核苷酸。在一些实施方案中,一种或多种补体抑制剂是CD46、CD59和CD55,其中修饰包含编码CD46的外源多核苷酸、编码CD59的外源多核苷酸和编码CD55的外源多核苷酸。在一些实施方案中,工程化细胞包含多顺反子载体,所述多顺反子载体包含选自由以下组成的组的两种或更多种外源多肽:编码一种或多种致耐受性因子的一种或多种外源多核苷酸、编码CD46的外源多核苷酸、编码CD59的外源多核苷酸和编码CD55多肽的外源多核苷酸。在一些实施方案中,所述多核苷酸中的每一者由IRES或自切割肽分隔。

[0205] 在一些实施方案中,所提供的工程化细胞还含有一种或多种靶多核苷酸序列的修饰,所述修饰调控一种或多种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。

[0206] 在一些实施方案中,所提供的工程化细胞还包括修饰以增加一种或多种致耐受性因子的表达。在一些实施方案中,致耐受性因子是以下一者或多者:DUX4、B2M-HLA-E、CD16、CD52、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、SERPINB9、CD35、IL-39、CD16 Fc受体、IL15-RF和H2-

M3,或它们的任何组合。在一些实施方案中,增加一种或多种致耐受性因子的表达的修饰是或包括增加的CD47的表达。在一些实施方案中,增加一种或多种致耐受性因子的表达的修饰是或包括增加的PD-L1的表达。在一些实施方案中,增加一种或多种致耐受性因子的表达的修饰是或包括增加的HLA-E的表达。在一些实施方案中,增加一种或多种致耐受性因子的表达的修饰是或包括增加的HLA-G的表达。在一些实施方案中,增加一种或多种致耐受性因子的表达的修饰是或包括增加的CCL21、PD-L1、FasL、Serpina9、H2-M3 (HLA-G)、CD47、CD200和Mfge8的表达。

[0207] 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基因组修饰和增加CD47的表达的修饰。换句话说,工程化细胞包含外源CD47蛋白,并且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。在一些实例中,工程化细胞包含外源CD47核酸和蛋白,并且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,并且表现出降低或缺乏一种或多种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。

[0208] 在一些实施方案中,任何基因编辑技术可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的编辑或先导编辑。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)。

[0209] 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相关的”)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 (“活化诱导的胞苷脱氨酶”)的胞苷脱氨酶)的融合物。在一些情况下,碱基编辑器还可以包括改变细胞DNA修复过程以提高所产生的单核苷酸变化的效率和/或稳定性的蛋白质或结构域。

[0210] 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)和将靶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,Cas9靶向脱氨作用结合旨在诱导碱基变化而不引入双链DNA断裂的碱基编辑器(BE)系统首次得到证明。另外,使用融合至失活的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来优化该第一BE系统,该切口酶在脱氨基胞苷相对的链上切口。不受理论约束,预期这引发长补丁碱基切除修复(BER),其中脱氨基链优先用于模板修复以产生U:A碱基对,然后在DNA复制期间将其转化为T:A。

[0211] 在一些实施方案中,碱基编辑器是核碱基编辑器,其含有无催化活性的第一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是无催化活性的,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)的DNA结构域(nCas;nCas9)、具有核酸可编程DNA结合活性的CRISPR-Cas蛋白(例如,Cas9)的无催化活性结构域(dCas;例如,dCas9)和脱氨酶结构域,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专利公布号US20220127622、US20210079366、US20200248169、US20210093667、US20210071163、W02020181202、W02021158921、W02019126709、W02020181178、W02020181195、W02020214842、W02020181193中描述的任一种,这些专利特此通过引用整体并入。

[0212] 在一些实施方案中,基因编辑技术是靶标启动逆转录(TPRT)或“先导编辑(prime editing)”。在一些实施方案中,先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以及它们的组合,而不需要DSB或供体DNA模板。

[0213] 先导编辑是一种基因组编辑方法,其使用与聚合酶联合工作的核酸可编程DNA结合蛋白(“napDNAbp”) (即,以融合蛋白的形式或以其他方式与napDNAbp反式提供)将新的遗传信息直接写入指定的DNA位点,其中先导编辑系统用先导编辑(PE)指导RNA(“PEgRNA”)编程,该先导编辑指导RNA既指定靶位点,又通过工程化到指导RNA上(例如,在指导RNA的5'或3'端处,或在指导RNA的内部部分处)的延伸(DNA或RNA)以替换DNA链的形式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共享相同的序列(除了它包括所需编辑)。通过DNA修复和/或复制机制,靶位点的内源链被含有所需编辑的新合成的替换链替换。在一些情况下,先导编辑可被认为是一种“搜索和替换”基因组编辑技术,因为先导编辑器搜索并定位待编辑的所需靶位点,并且编码含有所需编辑的替换链,该替换链被同时安装以替代相应的靶位点内源DNA链。例如,先导编辑可适用于进行基于CRISPR/Cas的精确基因组编辑以绕过双链断裂。在一些实施方案中,同源蛋白是或编码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,并且使用切口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,先导编辑器蛋白与两个先导编辑指导RNA(pegRNA)配对,所述两个先导编辑指导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pegRNA编码序列替换。

[0214] 在一些实施方案中,基因编辑技术与先导编辑器相关,所述先导编辑器是逆转录酶或本领域已知的任何DNA聚合酶。因此,在一个方面,先导编辑器可包含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特异性指导RNA(即,PEgRNA)相缔合以靶向DNA序列。此类方法包括Anzalone等人,(doi.org/10.1038/s41586-019-1711-4),或PCT公布号W02020191248、W02021226558或

W02022067130中公开的任何方法,这些文献特此通过引用整体并入。

[0215] 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是其中经由融合至逆转录酶和丝氨酸整合酶两者的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))中所述,PASTE不产生双链断裂,但允许大至约36kb的序列整合。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更好的编辑效率,在非分裂细胞中具有活性,并且具有更少的可检测脱靶事件。

[0216] 在一些实施方案中,所述工程化细胞群体在施用于受者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,细胞在受者受试者中引发降低水平的全身性TH1活化或不引发全身性TH1活化。在一些实施方案中,细胞在受者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,细胞在施用于受者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,细胞在受者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,细胞在施用于受者受试者后引发降低水平的细胞的细胞毒性T细胞杀伤。

[0217] 在一些实施方案中,本文提供的工程化细胞包含“自杀基因”或“自杀开关”。可以掺入自杀基因或自杀开关以用作“安全开关”,其可以诸如在工程化细胞施用于受试者之后并且这些细胞以不希望的方式生长和分裂时,导致工程化细胞(例如,原代工程化细胞或从工程化多能干细胞分化的细胞)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指定化合物活化时才会导致细胞杀伤的蛋白质。自杀基因可编码选择性地将无毒化合物转化成高毒性代谢物的酶。结果是特异性地消除表达该酶的细胞。在一些实施方案中,自杀基因是疱疹病毒胸苷激酶(HSV-tk)基因并且触发子是更昔洛韦(ganciclovir)。在其他实施方案中,自杀基因是大肠杆菌(*Escherichia coli*)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)。

[0218] 在其他实施方案中,自杀基因是诱导型半胱天冬酶蛋白。诱导型半胱天冬酶蛋白包括能够诱导细胞凋亡的半胱天冬酶蛋白的至少一部分。在一些实施方案中,诱导型半胱天冬酶蛋白是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天冬酶9的基因。FKBP12-F36V以高亲和力与小分子二聚剂API 903结合。因此,本发明中的iCasp9的自杀功能是通过二聚化化学诱导剂(CID)的施用触发的。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),这些文献中的每一项通过引用整体并入本文。

[0219] 包含安全开关或自杀基因可以在对受者产生细胞毒性或其他负面后果的情况下控制细胞的杀伤,从而提高基于细胞的治疗(包括使用致耐受性因子的治疗)的安全性。

[0220] 在一些实施方案中,可以将安全开关掺入(诸如引入)到本文提供的工程化细胞

中,以提供诱导含有安全开关的工程化细胞的死亡或凋亡的能力,例如如果细胞以不希望的方式生长和分裂或者对宿主造成过度毒性的话。因此,使用安全开关使得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§ (eds),Suicide Gene Therapy.Methods in Molecular Biology,第1895卷(Humana Press,New York,NY)(关于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)(关于iCaspase9);Wang等人,Blood 18(5):1255-1263(2001)(关于huEGFR);美国专利申请公布第20180002397号(关于HER1);以及Philip等人,Blood124(8):1277-1287(2014)(关于RQR8)。

[0221] 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时。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、诱导型半胱天冬酶9(iCasp9)、雷帕霉素活化的半胱天冬酶9(rapaCasp9)、CCR4、CD16、CD19、CD20、CD30、EGFR、GD2、HER1、HER2、MUC1、PSMA和RQR8。

[0222] 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,其将更昔洛韦(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基为尿嘧啶,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,其可以通过将硝基还原成对增殖和非增殖细胞有毒性的反应性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成对增殖和非增殖细胞都有毒性的代谢物。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)产生有效的细胞毒素,由此实现细胞杀伤。

[0223] 在一些实施方案中,安全开关可以是iCasp9。半胱天冬酶9是线粒体内在凋亡途径的组成部分,在生理条件下,细胞色素C从受损线粒体释放可活化该线粒体内在凋亡途径。活化的半胱天冬酶9随后活化半胱天冬酶3,后者触发末端效应分子,导致细胞凋亡。iCasp9可通过将截短的半胱天冬酶9(没有其生理二聚化结构域或半胱天冬酶活化结构域)经由肽接头融合至FK506结合蛋白(FKBP)即FKBP12-F36V来产生。iCasp9具有低二聚体非依赖性基础活性,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),诸如利米多赛(rimiducid)(AP1903)、AP20187和雷帕霉素存在下,iCasp9可以经历诱导型二聚化并活化下游半胱天冬酶分子,导致表达iCasp9的细胞凋亡。参见,例如,PCT申请公布第W02011/146862号;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天冬酶9变体称为rapaCasp9。参见Stavrou等人,Mol.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。

[0224] 在一些实施方案中,安全开关可以是膜表达的蛋白质,其允许在施用针对该蛋白质的特异性抗体之后消耗细胞。这种类别的安全开关可包括例如编码CCR4、CD16、CD19、CD20、CD30、EGFR、GD2、HER1、HER2、MUC1、PSMA或RQR8的一种或多种转基因,用于其表面表达。这些蛋白质可具有可以被特定抗体靶向的表面表位。在一些实施方案中,安全开关包含可以被抗CCR4抗体识别的CCR4。合适的抗CCR4抗体的非限制性实例包括莫格利珠单抗(mogamulizumab)及其生物类似物。在一些实施方案中,安全开关包含可以被抗CD16或抗CD30抗体识别的CD16或CD30。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,安全开关包含可以被抗CD19抗体识别的CD19。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,安全开关包含可以被抗CD20抗体识别的CD20。此类抗CD20抗体的非限制性实例包括奥妥珠单抗(obinutuzumab)、乌妥昔单抗(ublrituximab)、奥卡妥珠单抗(ocaratuzumab)、利妥昔单抗(rituximab)、利妥昔单抗(rituximab)-R11b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抗体被靶向进行杀伤。在一些实施方案中,安全开关包含可以被抗EGFR抗体识别的EGFR。此类抗EGFR抗体的非限制性实例包括托木妥昔单抗(tomuzotuximab)、R05083945 (GA201)、西妥昔单抗(cetuximab)及其生物类似物。在一些实施方案中,安全开关包含可以被抗GD2抗体识别的GD2。此类抗GD2抗体的非限制性实例包括Hu14.18K322A、Hu14.18-IL2、Hu3F8、达妥昔单抗(dinituximab)、c.60C3-R11c及其生物类似物。

[0225] 在一些实施方案中,安全开关可以是识别工程化细胞表面上的一种或多种致耐受性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性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上的致耐受性因子,外源施用的抗体可阻断致耐受性因子的免疫抑制功能,从而使免疫系统对工程化细胞重新敏感。例如,对于过表达CD47的工程化细胞,可将外源施用的抗CD47抗体施用于受试者,导致工程化细胞上的CD47的掩蔽并触发针对工程化细胞的免疫应答。

[0226] 在一些实施方案中,本文提供了一种产生工程化细胞的方法,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;(b)增加所述细胞中CD46和CD59的表达;以及(c)增加所述细胞中致耐受性因子的表达。在一些实施方案中,一种或多种致耐受性因子选自DUX4、B2M-HLA-E、CD16、CD52、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、SERPINB9、CD35、IL-39、CD16 Fc受体、IL15-RF和H2-M3。在一些实施方案中,一种或多种致耐受性因子是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类分子和一种或多种MHC II类分子的表达。在一些实施方案中,降低或增加表达包括使用指导核酸酶(例如,CRISPR/Cas系统)对细胞进行一种或多种修饰。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。在一些实施方案中,所述方法还包括增加所述细胞中CD55的表达。

[0227] 在一些实施方案中,本文提供了一种产生工程化细胞的方法,所述方法包括:(a)增加所述细胞中CCL21、PD-L1、FASL、SERPINB9、HLA-G、CD47、CD200和MFGE8的表达,以及(b)增加所述细胞中CD46和CD59的表达。在一些实施方案中,降低或增加表达包括使用指导核酸酶(例如,CRISPR/Cas系统)对细胞进行一种或多种修饰。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。在一些实施方案中,所述方法还包括增加所述细胞中CD55的表达。

[0228] 在一些实施方案中,致耐受性因子是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。

[0229] 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 $\alpha$ 阻滞剂,其中先前向受试者施用经工程化以表达外源CD47多肽的细胞群体。在一些实施方案中,CD47-SIRP $\alpha$ 阻滞剂包含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 $\alpha$ 阻滞剂包含免疫球蛋白G (IgG) Fc结构域。在一些实施方案中,IgG Fc结构域包含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 $\alpha$ 阻滞剂选自由TTI-621、TTI-622和ALX148组成的组。在一些实施方案中,CD47-SIRP $\alpha$ 阻滞剂是TTI-621、TTI-622和ALX148。在一些实施方案中,CD47-SIRP $\alpha$ 阻滞剂是TTI-622。在一些实施方案中,CD47-SIRP $\alpha$ 阻滞剂是ALX148。在一些实施方案中,IgG Fc结构域包含IgG4 Fc结构域。在一些实施方案中,CD47-SIRP $\alpha$ 阻滞剂是抗体。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(信迪利单抗(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(信迪利单抗)(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)。

[0230] 在一些实施方案中,结合CD47的可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.)、乌拉利单抗(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、乌拉利单抗、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、乌拉利单抗、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、乌拉利单抗、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。

[0231] 在一些实施方案中,CD47拮抗剂提供CD47阻滞。用于CD47阻滞的方法和剂描述于PCT/US2021/054326中,所述专利通过引用整体并入本文。

[0232] 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测定等。

[0233] A.降低的靶基因表达

[0234] 1.靶基因

[0235] A.MHC I类分子和/或MHC II类分子

[0236] 在一些实施方案中,所提供的工程化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,基因修饰),所述修饰调控(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,以调控(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降低或缺失促进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,降低或消除细胞中MHC I类分子的组分 $\beta$ -2-微球蛋白(B2M)的表达,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)。

[0237] 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过表达第II.B节中描述的多核苷酸(例如致耐受性因子,诸如CD47)的一种或多种修饰组合。

[0238] 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者或多者来实现:(1)直接靶向多态HLA等位基因(HLA-A、HLA-B、HLA-C)和MHC II类基因;(2)去除B2M,这将降低所有MHC I类分子的表面运输;以及/或者(3)缺失对HLA表达至关重要的MHC增强体的一种或多种组分,诸如LRC5、RFX-5、RFXANK、RFXAP、IRF1、NF-Y(包括NFY-A、NFY-B、NFY-C)和CIITA。

[0239] 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:靶向单个的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MHC I类分子的表面运输(例如,敲除B2M和/或TAP1的表达)以及/或者用HLA-Razor靶向(参见,例如,W02016183041)。

[0240] 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类分子的人白细胞抗原(例如,HLA-A、HLA-B和/或HLA-C),并且因此被表征为低免疫原性的。例如,在某些方面,本文公开的工程化细胞已经被修饰,使得所述细胞,包括任何干细胞或由其制备的分化干细胞,不表达以下MHC I类分子中的一者或多者或者表现出降低的以下MHC I类分子中的一者或多者的表达:HLA-A、HLA-B和HLA-C。在一些实施方案中,HLA-A、HLA-B和HLA-C中的一者或多者可以从细胞“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降低的或消除的每一敲除基因的表达。

[0241] 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。

[0242] 在一些实施方案中,所提供的工程化细胞包含调控一种或多种MHC I类分子的一种或多种靶多核苷酸序列的修饰。用于降低一种或多种MHC I类分子的表达的示例性方法在以下部分中描述。在一些实施方案中,靶向多核苷酸序列是B2M和NLRC5中的一者或两者。在一些实施方案中,细胞包含对B2M基因的基因编辑修饰(例如,插入缺失)。在一些实施方案中,细胞包含对NLRC5基因的基因编辑修饰(例如,插入缺失)。在一些实施方案中,细胞包含对B2M和CIITA基因的基因编辑修饰(例如,插入缺失)。

[0243] 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B2M表达的修饰降低B2M mRNA表达。在一些实施方案中,降低的B2M的mRNA表达是相对于不包含修饰的同一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%或更多中的任一者。在一些实施方案中,B2M的mRNA表达降低高达约100%,诸如降低高达约90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%或更少中的任一者。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%中的任一者。在一些实施方案中,B2M的mRNA表达被消除(例如,0%的B2M mRNA表达)。在一些实施方案中,降低B2M mRNA表达的修饰消除B2M基因活性。

[0244] 在一些实施方案中,降低B2M表达的修饰降低B2M蛋白质表达。在一些实施方案中,降低的B2M的蛋白质表达是相对于不包含修饰的同一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%或更多中的任一者。在一些实施方案中,B2M的蛋白质表达降低高达约100%,诸如降低高达约90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%或更少中的任一者。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%中的任一者。在一些实施方案中,B2M的蛋白质表达被消除(例如,0%的B2M蛋白质表达)。在一些实施方案中,降低B2M蛋白质表达的修饰消除B2M基因活性。

[0245] 在一些实施方案中,降低B2M表达的修饰包括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表达的修饰包括失活或破坏,包括B2M基因的两个等位基因的失活或破坏。

[0246] 在一些实施方案中,修饰包括细胞中一个或多个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。

[0247] 在一些实施方案中,所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。用于降低一种或多种MHC II类分子的表达的示例性方法在以下部分中描述。在一些实施方案中,细胞包含对CIITA基因的基因编辑修饰。

[0248] 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CIITA表达的修饰降低CIITA mRNA表达。在一些实施方案中,降低的CIITA的mRNA表达是相对于不包含修饰的同一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%或更多中的任一者。在一些实施方案中,CIITA的mRNA表达降低高达约100%,诸如降低高达约90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%或更少中的任一者。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%中的任一者。在一些实施方案中,CIITA的mRNA表达被消除(例如,0%的CIITA mRNA表达)。在一些实施方案中,降低CIITA mRNA表达的修饰消除CIITA基因活性。

[0249] 在一些实施方案中,降低CIITA表达的修饰降低CIITA蛋白质表达。在一些实施方案中,降低的CIITA的蛋白质表达是相对于不包含修饰的同一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%或更多中的任一者。在一些实施方案中,CIITA的蛋白质表达降低高达约100%,诸如降低高达约90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%或更少中的任一者。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%中的任一者。在一些实施方案中,CIITA的蛋白质表达被消除(例如,0%的CIITA蛋白质表达)。在一些实施方案中,降低CIITA蛋白质表达的修饰消除CIITA基因活性。

[0250] 在一些实施方案中,降低CIITA表达的修饰包括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表达的修饰包括失活或破坏,包括CIITA基因的两个等位基因的失活或破坏。

[0251] 在一些实施方案中,修饰包括细胞中一个或多个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,CIITA基因被敲除。

[0252] 在一些实施方案中,所提供的工程化细胞包含调控一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子的一种或多种靶多核苷酸序列的修饰。用于降低一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子的表达的示例性方法在以下部分中描述。在一些实施方案中,细胞包含对B2M和NLRC5基因的基因编辑修饰。在一些实施方案中,细胞包含对

CIITA和NLRC5基因的基因编辑修饰。在特定实施方案中,细胞包含对B2M、CIITA和NLRC5基因的基因编辑修饰。

[0253] 在一些实施方案中,细胞包含的修饰降低

[0254] 2.降低表达的方法

[0255] 在一些实施方案中,本文提供的细胞经修饰(例如基因修饰)以降低所述的一种或多种靶多核苷酸或蛋白质的表达。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,源细胞是第II.C节中描述的任何细胞。在某些实施方案中,本文公开的细胞(例如,干细胞、诱导性多能干细胞、分化细胞,诸如 $\beta$ 胰岛细胞或肝细胞,或原代细胞)包含一种或多种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上述任一者,诸如CIITA、B2M、NLRC5、HLA-A、HLA-B、HLA-C、LRC5、RFX-ANK、RFX5、RFX-AP、NFY-A、NFY-B、NFY-C、IRF1和TAP1中的一者或多者。在一些实施方案中,降低一种或多种靶多核苷酸的表达的修饰与增加所需转基因(诸如第II.B节中描述的任何转基因)的表达的一种或多种修饰组合。在一些实施方案中,修饰产生了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)一种或多种靶多核苷酸的表达,此类细胞在植入到受者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,在施用时在受者受试者或患者中。

[0256] 可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来选择性地阻抑或阻遏基因的表达,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。

[0257] 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。

[0258] 在一些实施方案中,通过通常以靶向方式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)),其被专门设计用于靶向基因或其一部分的序列。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)对断裂进行修复,或者在一些情况下,通过使用模板的精确同源定向修复(HDR)对断裂进行修复。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,并且导致NHEJ修复所致的DNA碱基的插入和缺失(插入缺失)。在一些实施方案中,修饰可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,修饰可导致移码突变,这会产生提前终止密码子。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,基因的所有等位基因被基因编辑靶向。在一些实施方案中,用靶向核酸酶修饰,诸如使用CRISPR/Cas系统,导致基因

的完全敲除。

[0259] 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含有靶多核苷酸序列的细胞中。可将核酸酶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,可将核糖核蛋白(RNP)引入细胞中。

[0260] 在一些实施方案中,使用CRISPR/Cas系统进行修饰。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。

[0261] CRISPR/Cas系统包括可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蛋白引导至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))。

[0262] 在一些实施方案中,Cas蛋白包含一种或多种氨基酸取代或修饰。在一些实施方案中,一种或多种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)。

[0263] 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和Cas9。在一些实施方案中,Cas蛋白包含大肠杆菌亚型(也称为CASS2)的Cas蛋白。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)。Dvulg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,Klomp等人,Nature 571,219-225(2019);Strecker等人,Science 365,48-53(2019)。

[0264] 在一些实施方案中,用于基因修饰细胞以敲除、敲低或以其他方式修饰一种或多种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。

[0265] 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。

[0266] 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产生识别特定序列的锌指(以及它们的组合),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。

[0267] 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,从而产生具有5'突出端的DSB。然后可以借助含有被同源臂侧接的所需突变的修复模板,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。

[0268] TALEN是可以用于编辑靶基因的人工核酸酶的另一个实例。TALEN源自被称为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。

[0269] 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。

[0270] 通过将工程化TALE重复序列与核酸酶结构域相组合,可以产生对任何所需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引入细胞中以在基因组中的所需靶位点产生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。

[0271] 大范围核酸酶是核酸内切酶家族中的酶,其特征不在于它们能够识别并切割大DNA序列(14至40个碱基对)。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。

[0272] 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。

[0273] 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减少。或者,可以将外来DNA与大范围核酸酶一起引入细胞中。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。

[0274] 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,其使用无催化活性的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。

[0275] 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。

[0276] CRISPR/Cas系统通常包含至少两种组分:一种或多种指导RNA(gRNA)和Cas蛋白。Cas蛋白是一种将DSB引入靶位点中的核酸酶。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类系统使用单一大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蛋白并且在本文中描述为说明性的。这些Cas蛋白可来源于不同的来源物种。例如,Cas9可以源自化脓性链球菌(*S. pyogenes*)或金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)。

[0277] 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引导Cas9复合物切割互补的靶DNA序列,前提条件是它们与被称为“原型间隔区相邻基序”(PAM)的短序列相邻。

[0278] 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目标靶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,因此产生嵌合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。

[0279] 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,最常用的源自化脓性链球菌的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。

[0280] 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
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

[0282] R=A或G;Y=C或T;W=A或T;V=A或C或G;N=任何碱基

[0283] 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核酸酶可具有一个或多个改变其PAM特异性的突变。

[0284] 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。

[0285] 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。

[0286] 在一些实施方案中,可以将外源Cas蛋白以多肽形式引入细胞中。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。

[0287] 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)。这种连接可以是共价的。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蛋白包含融合至寡精氨酸结构域的Cas9多肽。在一些实施方案中,Cas9蛋白包含融合至穿透肽结构域的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蛋白包含融合至寡精氨酸结构域的Cas12a多肽。在一些实施方案中,Cas12a蛋白包含融合至穿透肽结构域的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。

[0288] 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)。

[0289] 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。

[0290] 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的互补部分构成的短合成RNA。crRNA由定义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;长度通常约20个核苷酸)和crRNA重复区域(例如GUUUUAGAGCUA;SEQ ID NO:19)构成。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UAGCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCC GUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCG AGUCGGUGCUUU;SEQ ID NO:20)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,最常用的源自化脓性链球菌的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系统可用于在与靶基因座设计的gRNA互补的指定基因组基因座处产生靶向DSB。crRNA和tracrRNA可以用环序列(例如四环;GAAA)连接在一起以产生作为嵌合单指导RNA的gRNA(sgRNA;Hsu等人2013)。可以产生sgRNA用于基于DNA的表达或者可以通过化学合成来产生sgRNA。

[0291] 在一些实施方案中,gRNA的互补部分序列(例如gRNA靶向序列)将根据目标靶位点而变化。在一些实施方案中,gRNA包含对表1a中列出的基因序列特异的互补部分。在一些实施方案中,gRNA靶向的基因组基因座位于所述任何基因座的4000bp内、3500bp内、3000bp内、2500bp内、2000bp内、1500bp内、1000bp内或500bp内。

[0292] 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

[0293] 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。

[0294] 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,单个核糖核酸包含指导RNA,所述指导RNA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。在一些实施方案中,至少一种核糖核酸包含将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。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,所述脱氧核糖核酸基序在位于靶基序之间的突变等位基因的两侧。

[0295] 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。

[0296] 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同一链上的序列互补和/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偏移靶基序互补和/或杂交。

[0297] 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。

[0298] 可用于本文所述基因的基于CRISPR/Cas的靶向的示例性gRNA靶向序列在表1中提供。序列可见于2016年5月9日提交的WO2016183041,包括表、附录和序列表的公开内容通过引用整体并入本文。

[0299] 表1. 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
[0300]	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
	NFY-B	SEQ ID NO: 121797-135112	表 20, 附录 13
	NFY-C	SEQ ID NO: 135113-176601	表 22, 附录 15
[0301]	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

[0302] 可用于本文所述的基于CRISPR/Cas的基因靶向的另外的示例性Cas9指导RNA序列在表2A中提供。

[0303] 表2A. 可用于靶向基因的另外的示例性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	38
FUT1	CUGGAUGUCGG AGGAGUACG	CGG	外显子4	chr19:48,750,822	39
RHD	GUCUCCGAAA CUCGAGGUG	AGG	外显子2	chr1:25,284,622	40
[0304] F3 (CD142)	ACAGUGUAGAC UUGAUUGAC	GGG	外显子2	chr1:94,540,281	41
B2M	CGUGAGUAAAC CUGAAUCUU	TGG	外显子2	chr15:44,715,434	42
CHTA	GAUUAUGGCAU AAGCCUCCC	TGG	外显子3	chr16:10,895,747	43
TRAC	AGAGUCUCUCA GCUGGUACA	CGG	外显子1	chr14:22,5547,533	44

[0305] 在一些实施方案中,鉴定用于基因破坏方法中以降低或消除所述基因的表达的新基因座和/或gRNA靶向序列在本领域技术人员的水平之内。例如,对于CRISPR/Cas系统,当特定基因座(例如,靶基因,例如表1中列出的靶基因内)的现有gRNA靶向序列已知时,可以使用“英寸蠕虫(inch worming)”方法通过针对PAM序列扫描基因座任一侧上的侧翼区来鉴定靶向插入转基因的另外的基因座,通常在基因组中大约每100个碱基对(bp)进行一次。PAM序列将取决于所使用的特定Cas核酸酶,因为不同的核酸酶通常具有不同的相应PAM序列。基因座任一侧上的侧翼区可以是约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,可以根据该基因座的序列设计新的指导物,用于基因破坏方法中。尽管CRISPR/Cas系统被描述为例示性的,但是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那些基因编辑方法。

[0306] 在一些实施方案中,本文所述的细胞使用转录活化因子样效应物核酸酶(TALEN)方法来制备。“TALE核酸酶”(TALEN)意指由通常源自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。在特定实施方案中,可以将TALE结构域融合至大范围核酸酶,例如I-CreI和I-OnuI或其功能变体。在一些实施方案中,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重复与I-TevI的催化结构域的融合。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源自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。

[0307] 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))。

[0308] 在一些实施方案中,本文所述的细胞使用归巢核酸内切酶来制备。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个至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。

[0309] 在一些实施方案中,本文所述的细胞使用大范围核酸酶来制备。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)。

[0310] 在一些实施方案中,使用RNA沉默或RNA干扰(RNAi)敲低(例如,减少、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干扰方法通过将靶多核苷酸的靶基序互补的抑制性核酸(诸如siRNA)引入细胞中来敲低细胞中的靶多核苷酸,诸如上述任何靶多核苷酸,例如CIITA、B2M或NLRC5。在一些实施方案中,可以通过将表达shRNA的病毒转导至细胞中来敲低细胞中的靶多核苷酸,诸如上述任何靶多核苷酸,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。

[0311] 3. 示例性靶多核苷酸和用于降低表达的方法

[0312] A. MHC I类分子

[0313] 在某些实施方案中,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(例如,编码一种或多种MHC I类分子的一种或多种MHC I类基因)的表达。在一些实施方案中,使用CRISPR/Cas系统进行修饰。通过降低或消除(诸如敲除)B2M的表达,一种或多种MHC I类分子的表面运输被阻断,并且此类细胞在植入到受者受试者中时表现出免疫耐受。在一些实施方案中,细胞被认为是低免疫原性的,例如,在施用时在受者受试者或患者中。

[0314] 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。

[0315] 在一些实施方案中,减少或消除的B2M的表达降低或消除以下MHC I类分子中的一者或多者的表达:HLA-A、HLA-B和HLA-C。

[0316] 在一些实施方案中,工程化细胞包含靶向B2M基因的修饰。在一些实施方案中,靶向B2M基因的修饰是通过使用靶向核酸酶系统来进行的,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W02016/183041(其公开内容通过引用整体并入本文)的附录2或表15的SEQ ID NO:81240-85644组成的组。

[0317] 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性因子)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第II.B节中描述的任何转基因。

[0318] 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进行的B2M基因的所得修饰和HLA-I表达的降低可以通过流式细胞术诸如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,逆转录酶聚合酶链式反应(RT-PCR)用于确认失活修饰的存在。

[0319] 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)来测量工程化细胞中一种或多种MHC I类分子表达或功能(当细胞源自人细胞时,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。这可使用如上文所讨论的一种或多种HLA细胞表面组分的抗体通过FACS分析来测定。除了降低HLA I(或MHC I类)以外,本文提供的工程化细胞对巨噬细胞吞噬作用和NK细胞杀伤的易感性也降低。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。

[0320] B. MHC II类分子

[0321] 在某些方面,修饰通过靶向II类反式活化因子(CIITA)表达来降低或消除(诸如敲除)一种或多种MHC II类分子的表达。在一些实施方案中,使用CRISPR/Cas系统进行修饰。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类基因的转录。通过降低或消除(诸如敲除)CIITA的表达,一种或多种MHC II类分子的表达得以降低,从而也降低了表面表达。在一些

情况下,此类细胞在植入到受者受试者中时表现出免疫耐受。在一些实施方案中,细胞被认为是低免疫原性的,例如,在施用时在受者受试者或患者中。

[0322] 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。

[0323] 在一些实施方案中,降低或消除的CIITA的表达降低或消除以下MHC II类分子中的一者或多者的表达:HLA-DP、HLA-DM、HLA-DOA、HLA-DOB、HLA-DQ和HLA-DR。

[0324] 在一些实施方案中,工程化细胞包含靶向CIITA基因的修饰。在一些实施方案中,靶向CIITA基因的修饰是通过靶向核酸酶系统进行的,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)选自由W02016183041(其公开内容通过引用整体并入本文)的附录1或表12的SEQ ID NO:5184-36352组成的组。

[0325] 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性因子)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第II.B节中描述的任何转基因。

[0326] 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进行的CIITA基因的所得修饰和HLA-II表达的降低可以通过流式细胞术诸如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,逆转录酶聚合酶链式反应(RT-PCR)用于确认失活修饰的存在。

[0327] 在一些实施方案中,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)来测量工程化细胞中一种或多种MHC II类分子表达或功能(当细胞源自人细胞时,为HLA II)的降低。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W02018132783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HLA II(或MHC II类)以外,本文提供的工程化细胞对巨噬细胞吞噬作用和NK细胞杀伤的易感性也降低。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。

[0328] B. 多核苷酸的过表达

[0329] 在一些实施方案中,本文提供的工程化细胞是诸如通过将一种或多种修饰引入细胞中以在细胞中过表达所需多核苷酸而经基因修饰或工程化的。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,本文提供的工程化细胞经基因修饰以包括编码外源蛋白质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,对细胞进行修饰以增加某些基因的表达,这些基因是影响受者中的免疫识别和耐受的致耐受性(例如,免疫)因子。在一些实施方案中,所提供的工程化细胞,诸如T细胞或NK细胞,还表达嵌合抗原受体(CAR)。一种或多种多核苷酸,例如外源多核苷酸,可与一种或多种基因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节中描述的靶多核苷酸(诸如MHC I类和/或MHC II类分子)的表达。在一些实施方案中,所提供的工程化细胞在施用于受者受试者时

不触发或活化免疫应答。

[0330] 在一些实施方案中,工程化细胞包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多种不同的过表达多核苷酸。在一些实施方案中,工程化细胞包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多种不同的过表达多核苷酸。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,工程化细胞包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多种不同的外源多核苷酸。在一些实施方案中,工程化细胞包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多种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细胞中附加型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细胞的一个或多个基因组基因座中的外源多核苷酸。

[0331] 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来增加表达的靶向方法是本领域技术人员已知的。

[0332] 在一些实施方案中,工程化细胞含有一种或多种外源多核苷酸,其中通过非靶向插入方法,诸如通过用慢病毒载体进行转导,将所述一种或多种外源多核苷酸插入或整合到细胞的基因组基因座中。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工程化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,诸如本文所述的任何基因组基因座(例如表2)中。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的基因组基因座,诸如本文所述的任何基因组基因座(例如表2)中。在一些实施方案中,将两种或更多种外源多核苷酸插入不同的基因组基因座,诸如本文所述的两个或更多个基因组基因座(例如表2)中。

[0333] 在一些实施方案中,任何基因编辑技术可用于增加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,基因编辑技术可用于进行修饰以增加内源基因活性(例如,通过修饰或活化可操作地连接至基因的启动子或增强子)。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(例如,以引入编码靶多核苷酸或靶蛋白的构建体,诸如编码致耐受性因子、CD55、CD46、CD59或本文所述的用于增加工程化细胞中表达的任何其他分子中的任一者的构建体)。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的编辑或先导编辑。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)。示例性多核苷酸或过表达以及其过表达方法在以下小节中描述。

#### [0334] 1. 补体抑制剂

[0335] 在一些实施方案中,增加细胞中一种或多种补体抑制剂的表达。在一些实施方案中,一种或多种补体抑制剂是一种或多种膜结合补体抑制剂。在一些实施方案中,至少一种外源多核苷酸包括编码补体抑制剂的多核苷酸。在一些实施方案中,一种或多种补体抑制

剂是CD46、CD59、CD55或它们的任何组合。例如,在一些实施方案中,至少一种外源多核苷酸是编码一种或多种补体抑制剂诸如CD46的多核苷酸。在一些实施方案中,一种或多种补体抑制剂是CD46和CD59,或CD46、CD59和CD55。在一些实施方案中,CD46和CD59或CD46、CD59和CD55的表达保护细胞或其群体免于补体依赖性细胞毒性,包括在存在针对由所述细胞表达的细胞表面抗原的抗体的情况下。

[0336] 在一些实施方案中,本公开提供了细胞或其群体,其已经修饰以表达一种或多种补体抑制剂,诸如CD46、CD59、CD55或它们的任何组合。在一些实施方案中,一种或多种补体抑制剂是CD46和CD59。在一些实施方案中,一种或多种补体抑制剂是CD46、CD59和CD55。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一种或多种补体抑制剂的方法。在一些实施方案中,工程化细胞表达一种或多种外源补体抑制剂,诸如外源CD46和CD59,或CD46、CD59和CD55。在一些情况下,细胞表达表达载体,所述表达载体包含编码人CD46多肽的核苷酸序列。在一些情况下,细胞表达表达载体,所述表达载体包含编码人CD59多肽的核苷酸序列。在一些情况下,细胞表达表达载体,所述表达载体包含编码人CD55多肽的核苷酸序列。在一些实施方案中,表达载体包含编码任意组合的两种或更多种补体抑制剂的核苷酸序列。在一些实施方案中,表达载体包含编码CD46和CD59的核苷酸序列。在一些实施方案中,表达载体包含编码CD46、CD59和CD55的核苷酸序列。

[0337] C. CD46

[0338] 在一些实施方案中,工程化细胞含有编码CD46(诸如人CD46)的过表达多核苷酸。在一些实施方案中,工程化细胞含有编码CD46(诸如人CD46)的外源多核苷酸。在一些实施方案中,在细胞中过表达CD46。在一些实施方案中,与类似的参考细胞或未修饰细胞(包括具有任何其他修饰)(只是参考细胞或未修饰细胞不包含编码CD46的外源多核苷酸)相比,工程化细胞中CD46的表达增加。CD46是一种膜结合补体抑制剂。其充当补体因子I的辅助因子,补体因子I是一种丝氨酸蛋白酶,通过切割C3b和C4b来保护自体细胞免于补体介导的损伤。关于人CD46的可用基因组、多核苷酸和多肽信息提供于例如GeneCard标识符GC01P207752、HGNC No.6953、NCBI Gene ID 4179、Uniprot No.P15529以及NCBI Ref Seq No.NM\_002389.4、NM\_153826.3、NM\_172350.2、NM\_172351.2、NM\_172352.2、NP\_758860.1、NP\_172353.2、NP\_172359.2、NP\_172361.2、NP\_002380.3、NP\_722548.1、NP\_758860.1、NP\_758861.1、NP\_758862.1、NP\_758863.1、NP\_758869.1和NP\_758871.1。

[0339] 在一些实施方案中,本文概述的细胞包含编码与如NCBI Ref.Sequence No.NP\_002380.3、NP\_722548.1、NP\_758860.1、NP\_758861.1、NP\_758862.1、NP\_758863.1、NP\_758869.1和NP\_758871.1所示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CD46多肽的过表达的核苷酸序列。在一些实施方案中,本文概述的细胞包含编码具有如NCBI Ref.Sequence No.NP\_002380.3、NP\_722548.1、NP\_758860.1、NP\_758861.1、NP\_758862.1、NP\_758863.1、NP\_758869.1和NP\_758871.1所示的氨基酸序列的CD46多肽的过表达的核苷酸序列。在一些实施方案中,细胞包含与NCBI Ref.No.NM\_002389.4、NM\_153826.3、NM\_172350.2、NM\_172351.2、NM\_172352.2、NP\_758860.1、NP\_172353.2、NP\_172359.2和NM\_172361.2所示的序列具有至少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CD46的过表达的核苷酸序列。在一些实施方案中,细胞包含如NCBI Ref.Sequence

No.NM\_001777.3和NM\_002389.4、NM\_153826.3、NM\_172350.2、NM\_172351.2、NM\_172352.2、NP\_758860.1、NM\_172353.2、NM\_172359.2和NM\_172361.2所示的CD46的过表达的核苷酸序列。

[0340] 在一些实施方案中,本文概述的细胞包含编码与如NCBI Ref.Sequence No.NP\_002380.3、NP\_722548.1、NP\_758860.1、NP\_758861.1、NP\_758862.1、NP\_758863.1、NP\_758869.1和NP\_758871.1所示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CD46多肽的外源核苷酸序列。在一些实施方案中,本文概述的细胞包含编码具有如NCBI Ref.Sequence No.NP\_002380.3、NP\_722548.1、NP\_758860.1、NP\_758861.1、NP\_758862.1、NP\_758863.1、NP\_758869.1和NP\_758871.1所示的氨基酸序列的CD46多肽的外源核苷酸序列。在一些实施方案中,细胞包含与NCBI Ref.No.NM\_002389.4、NM\_153826.3、NM\_172350.2、NM\_172351.2、NM\_172352.2、NP\_758860.1、NM\_172353.2、NM\_172359.2和NM\_172361.2所示的序列具有至少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CD46的外源核苷酸序列。在一些实施方案中,细胞包含如NCBI Ref.Sequence No.NM\_001777.3和NM\_002389.4、NM\_153826.3、NM\_172350.2、NM\_172351.2、NM\_172352.2、NP\_758860.1、NM\_172353.2、NM\_172359.2和NM\_172361.2所示的CD46的外源核苷酸序列。

[0341] 在一些实施方案中,细胞包含与如NCBI Ref.Sequence No.NP\_722548.1、NP\_758860.1、NP\_758861.1、NP\_758862.1、NP\_758863.1、NP\_758869.1和NP\_758871.1所示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)的过表达的CD46多肽。在一些实施方案中,细胞包含与如NCBI Ref.Sequence No.NP\_722548.1、NP\_758860.1、NP\_758861.1、NP\_758862.1、NP\_758863.1、NP\_758869.1和NP\_758871.1所示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)的外源CD46多肽。在一些实施方案中,本文概述的细胞包含具有如NCBI Ref.Sequence No.NP\_722548.1、NP\_758860.1、NP\_758861.1、NP\_758862.1、NP\_758863.1、NP\_758869.1和NP\_758871.1所示的氨基酸序列的过表达的CD46多肽。在一些实施方案中,本文概述的细胞包含具有如NCBI Ref.Sequence No.NP\_722548.1、NP\_758860.1、NP\_758861.1、NP\_758862.1、NP\_758863.1、NP\_758869.1和NP\_758871.1所示的氨基酸序列的外源CD46多肽。

[0342] 在一些实施方案中,本文概述的细胞包含编码与如SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列具有至少85%序列同一性(例如,85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更多)的CD46多肽的过表达的核苷酸序列。在一些实施方案中,本文概述的细胞包含编码与如SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列具有至少85%序列同一性(例如,85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更多)的CD46多肽的外源核苷酸序列。在一些实施方案中,本文概述的细胞包含编码包含如SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列的CD46多肽的过表达的核苷酸序列。在一些实施方案中,本文概述的细胞包含编码包含如SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列的CD46多肽的外源核苷酸序列。

[0343] 在一些实施方案中,本文概述的细胞包含编码与如SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列具有至少85%序列同一性(例如,85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更多)的CD46多肽的外源核苷酸序列。在一些实施方案中,本文概述的细胞包含编码包含如SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列的CD46多肽的外源核苷酸序列。在一些实施方案中,编码CD46多肽的外

源核苷酸序列可操作地连接至编码异源信号肽的序列。

[0344] 在一些实施方案中,CD46的全部或功能部分可以连接至其他组分,诸如信号肽、前导序列、分泌信号、标记(例如,报告基因)或它们的任何组合。在一些实施方案中,编码CD46的信号肽的核酸序列被编码来自异源蛋白质的信号肽的核酸序列替换。异源蛋白质可以是例如CD8 $\alpha$ 、CD28、组织纤溶酶原活化剂(tPA)、生长激素、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、GM-CSF受体(GM-CSFRa)或免疫球蛋白(例如,IgE或IgK)。在一些实施方案中,信号肽是来自免疫球蛋白(诸如IgG重链或IgG- $\kappa$ 轻链)、细胞因子(诸如白介素2(IL-2)或CD33)、血清白蛋白蛋白质(例如HSA或白蛋白)、人天青素前蛋白信号序列、荧光素酶、胰蛋白酶原(例如胰凝乳蛋白酶原或胰蛋白酶原)的信号肽,或能够通过细胞或在细胞上有效表达蛋白质的其他信号肽。

[0345] 在某些实施方案中,编码CD46的外源多核苷酸可操作地连接至启动子。

[0346] 在一些实施方案中,将编码CD46的多核苷酸插入表2中描绘的任一基因座中。在一些情况下,将编码CD46的多核苷酸插入安全港基因座(诸如但不限于选自AAVS1、CCR5、CLYBL、ROSA26、SHS231的基因座)中。在特定实施方案中,将编码CD46的多核苷酸插入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CD46的多核苷酸插入B2M基因座、CIITA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CD46的多核苷酸插入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CD46的多核苷酸插入细胞的基因组基因座中。

[0347] 在一些实施方案中,使用细胞裂解物的蛋白质印迹来检测CD46蛋白表达,所述裂解物用针对CD46蛋白的抗体进行探测。在另一个实施方案中,逆转录酶聚合酶链式反应(RT-PCR)用于确认外源CD46mRNA的存在。

#### [0348] D. CD59

[0349] 在一些实施方案中,工程化细胞含有编码CD59(诸如人CD59)的过表达多核苷酸。在一些实施方案中,工程化细胞含有编码CD59(诸如人CD59)的外源多核苷酸。在一些实施方案中,在细胞中过表达CD59。在一些实施方案中,与类似的参考细胞或未修饰细胞(包括具有任何其他修饰)(只是参考细胞或未修饰细胞不包含编码CD59的外源多核苷酸)相比,工程化细胞中CD59的表达增加。CD59是一种膜结合补体抑制剂。更具体地,CD59是补体膜攻击复合物(MAC)活性的抑制剂。CD59通过与组装MAC的C8和/或C9补体结合来发挥作用,从而防止完全形成渗透孔所需的C9的多个拷贝的掺入。关于人CD59的可用基因组、多核苷酸和多肽信息提供于例如GeneCard标识符GC11M033704、HGNC No.1689,NCBI Gene ID 966、UniprotNo.P13987以及NCBI RefSeq No.NP\_000602.1、NM\_000611.5、NP\_001120695.1、NM\_001127223.1、NP\_001120697.1、NM\_001127225.1、NP\_001120698.1、NM\_001127226.1、NP\_001120699.1、NM\_001127227.1、NP\_976074.1、NM\_203329.2、NP\_976075.1、NM\_203330.2、NP\_976076.1和NM\_203331.2。

[0350] 在一些实施方案中,本文概述的细胞包含编码与如NCBI Ref.Sequence No.NP\_000602.1、NP\_001120695.1、NP\_001120697.1、NP\_001120698.1、NP\_001120699.1、NP\_976074.1、NP\_976075.1和NP\_976076.1所示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CD59多肽的过表达的核苷酸序列。在一些实施方案

中,本文概述的细胞包含编码具有如NCBI Ref.Sequence No.NP\_000602.1、NP\_001120695.1、NP\_001120697.1、NP\_001120698.1、NP\_001120699.1、NP\_976074.1、NP\_976075.1和NP\_976076.1所示的氨基酸序列的CD59多肽的过表达的核苷酸序列。在一些实施方案中,细胞包含与NCBI Ref.No.NM\_000611.5、NM\_001127223.1、NM\_001127225.1、NM\_001127226.1、NM\_001127227.1、NM\_203329.2、NM\_203330.2和NM\_203331.2所示的序列具有至少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CD59的过表达的核苷酸序列。在一些实施方案中,细胞包含如NCBI Ref.Sequence Nos.NM\_000611.5、NM\_001127223.1、NM\_001127225.1、NM\_001127226.1、NM\_001127227.1、NM\_203329.2、NM\_203330.2和NM\_203331.2所示的CD59的过表达的核苷酸序列。

[0351] 在一些实施方案中,本文概述的细胞包含编码与如NCBI Ref.Sequence No.NP\_000602.1、NP\_001120695.1、NP\_001120697.1、NP\_001120698.1、NP\_001120699.1、NP\_976074.1、NP\_976075.1和NP\_976076.1所示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CD59多肽的过表达的核苷酸序列。在一些实施方案中,本文概述的细胞包含编码与如NCBI Ref.Sequence No.No.NP\_000602.1、NP\_001120695.1、NP\_001120697.1、NP\_001120698.1、NP\_001120699.1、NP\_976074.1、NP\_976075.1和NP\_976076.1所示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CD59多肽的外源核苷酸序列。在一些实施方案中,本文概述的细胞包含编码具有如NCBI Ref.Sequence No.NP\_000602.1、NP\_001120695.1、NP\_001120697.1、NP\_001120698.1、NP\_001120699.1、NP\_976074.1、NP\_976075.1和NP\_976076.1所示的氨基酸序列的CD59多肽的过表达的核苷酸序列。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\_000602.1、NP\_001120695.1、NP\_001120697.1、NP\_001120698.1、NP\_001120699.1、NP\_976074.1、NP\_976075.1和NP\_976076.1所示的氨基酸序列的CD59多肽的外源核苷酸序列。在一些实施方案中,细胞包含与NCBI Ref.No.NM\_000611.5、NM\_001127223.1、NM\_001127225.1、NM\_001127226.1、NM\_001127227.1、NM\_203329.2、NM\_203330.2和NM\_203331.2所示的序列具有至少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CD59的过表达的核苷酸序列。在一些实施方案中,细胞包含与NCBI Ref.No.NM\_000611.5、NM\_001127223.1、NM\_001127225.1、NM\_001127226.1、NM\_001127227.1、NM\_203329.2、NM\_203330.2和NM\_203331.2所示的序列具有至少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CD59的外源核苷酸序列。在一些实施方案中,细胞包含如NCBI Ref.Sequence No.NM\_000611.5、NM\_001127223.1、NM\_001127225.1、NM\_001127226.1、NM\_001127227.1、NM\_203329.2、NM\_203330.2和NM\_203331.2所示的CD59的过表达的核苷酸序列。在一些实施方案中,细胞包含如NCBI Ref.Sequence No.NM\_000611.5、NM\_001127223.1、NM\_001127225.1、NM\_001127226.1、NM\_001127227.1、NM\_203329.2、NM\_203330.2和NM\_203331.2所示的CD59的外源核苷酸序列。

[0352] 在一些实施方案中,细胞包含与如NCBI Ref.Sequence No.NP\_000602.1、NP\_001120695.1、NP\_001120697.1、NP\_001120698.1、NP\_001120699.1、NP\_976074.1、NP\_

976075.1, and NP\_976076.1所示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)的过表达的CD59多肽。在一些实施方案中,细胞包含与如NCBI Ref.Sequence No.NP\_000602.1、NP\_001120695.1、NP\_001120697.1、NP\_001120698.1、NP\_001120699.1、NP\_976074.1、NP\_976075.1和NP\_976076.1所示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)的外源CD59多肽。在一些实施方案中,本文概述的细胞包含具有如NCBI Ref.SequenceNo.NP\_000602.1、NP\_001120695.1、NP\_001120697.1、NP\_001120698.1、NP\_001120699.1、NP\_976074.1、NP\_976075.1和NP\_976076.1所示的氨基酸序列的过表达的CD59多肽。在一些实施方案中,本文概述的细胞包含具有如NCBI Ref.Sequence No.NP\_000602.1、NP\_001120695.1、NP\_001120697.1、NP\_001120698.1、NP\_001120699.1、NP\_976074.1、NP\_976075.1和NP\_976076.1所示的氨基酸序列的外源CD59多肽。

[0353] 在一些实施方案中,本文概述的细胞包含编码与如SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列具有至少85%序列同一性(例如,85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更多)的CD59多肽的过表达的核苷酸序列。在一些实施方案中,本文概述的细胞包含编码与如SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列具有至少85%序列同一性(例如,85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更多)的CD59多肽的外源核苷酸序列。在一些实施方案中,本文概述的细胞包含编码包含如SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的CD59多肽的过表达的核苷酸序列。在一些实施方案中,本文概述的细胞包含编码包含如SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的CD59多肽的外源核苷酸序列。

[0354] 在一些实施方案中,本文概述的细胞包含编码与如SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列具有至少85%序列同一性(例如,85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更多)的CD59多肽的过表达的核苷酸序列。在一些实施方案中,本文概述的细胞包含编码与如SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列具有至少85%序列同一性(例如,85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更多)的CD59多肽的外源核苷酸序列。在一些实施方案中,本文概述的细胞包含编码包含如SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列的CD59多肽的过表达的核苷酸序列。在一些实施方案中,本文概述的细胞包含编码包含如SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列的CD59多肽的外源核苷酸序列。在一些实施方案中,编码CD59多肽的外源核苷酸序列可操作地连接至编码异源信号肽的序列。

[0355] 在一些实施方案中,CD59的全部或功能部分可以连接至其他组分,诸如信号肽、前导序列、分泌信号、标记(例如,报告基因)或它们的任何组合。在一些实施方案中,编码CD59的信号肽的核酸序列被编码来自异源蛋白质的信号肽的核酸序列替换。异源蛋白质可以是例如CD8 $\alpha$ 、CD28、组织纤溶酶原活化剂(tPA)、生长激素、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、GM-CSF受体(GM-CSFRa)或免疫球蛋白(例如,IgE或IgK)。在一些实施方案中,信号肽是来自免疫球蛋白(诸如IgG重链或IgG- $\kappa$ 轻链)、细胞因子(诸如白介素2(IL-2)或CD33)、血清白蛋白蛋白质(例如HSA或白蛋白)、人天青素前蛋白信号序列、荧光素酶、胰蛋白酶原(例如胰凝乳蛋白酶原或胰蛋白酶原)的信号肽,或能够通过细胞或在细胞上有效表达蛋白质的其他信号肽。

[0356] 在某些实施方案中,编码CD59的外源多核苷酸可操作地连接至启动子。

[0357] 在一些实施方案中,将编码CD59的多核苷酸插入表2中描绘的任一基因座中。在一

些情况下,将编码CD59的多核苷酸插入安全港基因座(诸如但不限于选自AAVS1、CCR5、CLYBL、ROSA26和SHS231的基因座)中。在特定实施方案中,将编码CD59的多核苷酸插入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CD59的多核苷酸插入B2M基因座或CIITA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CD59的多核苷酸插入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CD59的多核苷酸插入细胞的基因组基因座中。

[0358] 在一些实施方案中,使用细胞裂解物的蛋白质印迹来检测CD59蛋白表达,所述裂解物用针对CD59蛋白的抗体进行探测。在另一个实施方案中,逆转录酶聚合酶链式反应(RT-PCR)用于确认外源CD59mRNA的存在。

[0359] E. CD55

[0360] 在一些实施方案中,工程化细胞含有编码CD55(诸如人CD55)的过表达多核苷酸。在一些实施方案中,工程化细胞含有编码CD55(诸如人CD55)的外源多核苷酸。在一些实施方案中,在细胞中过表达CD55。在一些实施方案中,与类似的参考细胞或未修饰细胞(包括具有任何其他修饰)(只是参考细胞或未修饰细胞不包含编码CD55的外源多核苷酸)相比,工程化细胞中CD55的表达增加。CD55是一种膜结合补体抑制剂。在一些实施方案中,CD55与细胞相关C4b和C3b多肽的相互作用干扰它们催化C2和因子B转化为酶活性C2a和Bb的能力,从而防止C4b2a和C3bBb(补体级联的扩增转化酶)的形成。在一些实施方案中,CD55通过破坏C3和C5转化酶的稳定并防止C3和C5转化酶的形成来抑制补体活化。关于人CD55(也称为补体衰变加速因子)的可用基因组、多核苷酸和多肽信息提供于例如GeneCard标识符GC01P207321、HGNC No.2665、NCBI Gene ID 1604、Uniprot No.P08174以及NCBI RefSeq No.NM\_000574.4、NM\_001114752.2、NM\_001300903.1、NM\_001300904.1、NP\_000565.1、NP\_001108224.1、NP\_001287832.1和NP\_001287833.1。

[0361] 在一些实施方案中,本文概述的细胞包含编码与如NCBI Ref.Sequence No.NP\_000565.1、NP\_001108224.1、NP\_001287832.1和NP\_001287833.1所示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CD55多肽的过表达的核苷酸序列。在一些实施方案中,本文概述的细胞包含编码具有如NCBI Ref.Sequence No.NP\_000565.1、NP\_001108224.1、NP\_001287832.1和NP\_001287833.1所示的氨基酸序列的CD55多肽的过表达的核苷酸序列。在一些实施方案中,细胞包含与NCBI Ref.No.NM\_001777.3和NM\_198793.2所示的序列具有至少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CD55的过表达的核苷酸序列。在一些实施方案中,细胞包含NCBI Ref.Sequence No.NM\_000574.4、NM\_001114752.2、NM\_001300903.1所示的CD55的过表达的核苷酸序列。

[0362] 在一些实施方案中,本文概述的细胞包含编码与如NCBI Ref.Sequence No.NP\_000565.1、NP\_001108224.1、NP\_001287832.1和NP\_001287833.1所示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CD55多肽的外源核苷酸序列。在一些实施方案中,本文概述的细胞包含编码具有如NCBI Ref.Sequence No.NP\_000565.1、NP\_001108224.1、NP\_001287832.1和NP\_001287833.1所示的氨基酸序列的CD55多肽的外源核苷酸序列。在一些实施方案中,细胞包含与NCBI Ref.No.NM\_001777.3和NM\_

198793.2所示的序列具有至少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CD55的外源核苷酸序列。在一些实施方案中,细胞包含NCBI Ref.Sequence No.NM\_000574.4、NM\_001114752.2、NM\_001300903.1和NM\_001300904.1所示的CD55的外源核苷酸序列。

[0363] 在一些实施方案中,细胞包含与如NCBI Ref.Sequence No.NP\_000565.1、NP\_001108224.1、NP\_001287832.1和NP\_001287833.1所示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)的过表达的CD55多肽。在一些实施方案中,细胞包含与如NCBI Ref.Sequence No.NP\_000565.1、NP\_001108224.1、NP\_001287832.1和NP\_001287833.1所示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)的外源CD55多肽。在一些实施方案中,本文概述的细胞包含具有如NCBI Ref.Sequence No.NP\_000565.1、NP\_001108224.1、NP\_001287832.1和NP\_001287833.1所示的氨基酸序列的过表达的CD55多肽。在一些实施方案中,本文概述的细胞包含具有如NCBI Ref.Sequence No.NP\_000565.1、NP\_001108224.1、NP\_001287832.1和NP\_001287833.1所示的氨基酸序列的外源CD55多肽。

[0364] 在一些实施方案中,本文概述的细胞包含编码与如SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列具有至少85%序列同一性(例如,85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更多)的CD55多肽的过表达的核苷酸序列。在一些实施方案中,本文概述的细胞包含编码与如SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列具有至少85%序列同一性(例如,85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更多)的CD55多肽的外源核苷酸序列。在一些实施方案中,本文概述的细胞包含编码包含如SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列的CD55多肽的过表达的核苷酸序列。在一些实施方案中,本文概述的细胞包含编码包含如SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列的CD55多肽的外源核苷酸序列。

[0365] 在一些实施方案中,本文概述的细胞包含编码与如SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列具有至少85%序列同一性(例如,85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更多)的CD55多肽的过表达的核苷酸序列。在一些实施方案中,本文概述的细胞包含编码与如SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列具有至少85%序列同一性(例如,85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更多)的CD55多肽的外源核苷酸序列。在一些实施方案中,本文概述的细胞包含编码包含如SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列的CD55多肽的过表达的核苷酸序列。在一些实施方案中,本文概述的细胞包含编码包含如SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列的CD55多肽的外源核苷酸序列。在一些实施方案中,编码CD59多肽的外源核苷酸序列可操作地连接至编码异源信号肽的序列。

[0366] 在一些实施方案中,CD55的全部或功能部分可以连接至其他组分,诸如信号肽、前导序列、分泌信号、标记(例如,报告基因)或它们的任何组合。在一些实施方案中,编码CD55的信号肽的核酸序列被编码来自异源蛋白质的信号肽的核酸序列替换。异源蛋白质可以是例如CD8 $\alpha$ 、CD28、组织纤溶酶原活化剂(tPA)、生长激素、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、GM-CSF受体(GM-CSFRa)或免疫球蛋白(例如,IgE或IgK)。在一些实施方案中,信号肽是来自免疫球蛋白(诸如IgG重链或IgG- $\kappa$ 轻链)、细胞因子(诸如白介素2(IL-2)或CD33)、血清白蛋白蛋白质(例如HSA或白蛋白)、人天青素前蛋白信号序列、荧光素酶、胰蛋白酶原(例如胰凝乳蛋白酶原或胰蛋白酶原)的信号肽,或能够通过细胞或在细胞上有效表

达蛋白质的其他信号肽。

[0367] 在某些实施方案中,编码CD55的外源多核苷酸可操作地连接至启动子。

[0368] 在一些实施方案中,将编码CD55的多核苷酸插入表2中描绘的任一基因座中。在一些情况下,将编码CD55的多核苷酸插入安全港基因座(诸如但不限于选自AAVS1、CCR5、CLYBL、ROSA26和SHS231的基因座)中。在特定实施方案中,将编码CD55的多核苷酸插入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CD55的多核苷酸插入B2M基因座或CIITA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CD55的多核苷酸插入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CD55的多核苷酸插入细胞的基因组基因座中。

[0369] 在一些实施方案中,使用细胞裂解物的蛋白质印迹来检测CD55蛋白表达,所述裂解物用针对CD55蛋白的抗体进行探测。在另一个实施方案中,逆转录酶聚合酶链式反应(RT-PCR)用于确认外源CD55mRNA的存在。

[0370] F. 补体抑制剂的组合

[0371] 在一些实施方案中,细胞包含增加的选自由任意组合的CD46、CD59和CD55组成的组的两种或更多种补体抑制剂的表达。

[0372] 在一些实施方案中,工程化细胞含有编码CD46的过表达的多核苷酸(诸如上文所述的任何多核苷酸)和编码CD59的过表达的多核苷酸(诸如上文所述的任何多核苷酸)。

[0373] 在一些实施方案中,工程化细胞含有编码CD46的外源多核苷酸(诸如上文所述的任何多核苷酸)和编码CD59的外源多核苷酸(诸如上文所述的任何多核苷酸)。

[0374] 在一些实施方案中,工程化细胞(包含增加CD46和CD59的表达的一种或多种修饰)相对于不包含修饰的细胞(例如,相对于CD46和CD59的内源表达)包含增加的CD46和CD59的表达。在一些实施方案中,工程化细胞与不具有修饰的细胞相比(例如,与CD46和CD59的内源表达相比)包含1.5倍至2倍、2倍至3倍、3倍至4倍、4倍至5倍、5倍至10倍、10倍至15倍、15倍至20倍、20倍至40倍、40倍至60倍、60倍至80倍、80倍至100倍或100倍至200倍增加的CD46和CD59的表达。在一些实施方案中,没有修饰的细胞不具有CD46和CD59的内源表达或者不具有可检测的CD46和CD59表达。在一些实施方案中,与缺乏修饰的细胞相比,表达增加的倍数大于200倍。

[0375] 在一些实施方案中,工程化细胞(包含增加CD46和CD59的表达的一种或多种修饰)与不具有修饰的细胞相比(例如,与CD46和CD59的内源表达相比)包含2倍至200倍、2倍至100倍、2倍至50倍或2倍至20倍增加的CD46和CD59的表达。在一些实施方案中,工程化细胞(包含增加CD46和CD59的表达的一种或多种修饰)与不具有修饰的细胞相比(例如,与CD46和CD59的内源表达相比)包含5倍至200倍、5倍至100倍、5倍至50倍或5倍至20倍增加的CD46和CD59的表达。

[0376] 在一些实施方案中,工程化细胞(包含增加CD46和CD59的表达的一种或多种修饰)相对于不包含修饰的细胞(例如,相对于CD46和CD59的内源表达)包含增加的CD46和CD59的表达。在一些实施方案中,工程化细胞与不具有修饰的细胞相比(例如,与CD46和CD59的内源表达相比)包含至少为或约2倍、至少为或约4倍、至少为或约6倍、至少为或约10倍、至少为或约15倍、至少为或约20倍、至少为或约30倍、至少为或约50倍、至少为或约60倍、至少

为或约70倍、至少为或约80倍、至少为或约100倍(或任何前述值之间的任何值)增加的CD46和CD59的表达。

[0377] 在一些实施方案中,工程化细胞(包含增加CD46和CD59的表达的一种或多种修饰)相对于不包含修饰的细胞(例如,相对于CD46和CD59的内源表达)包含增加的CD46和CD59的表达。在一些实施方案中,工程化细胞与不具有修饰的细胞相比(例如,与CD46和CD59的内源表达相比)包含为或约2倍、为或约4倍、为或约6倍、为或约10倍、为或约和15倍、为或约20倍、为或约30倍、为或约50倍、为或约60倍、为或约70倍、为或约80倍、为或约100倍(或任何前述值之间的任何值)增加的CD46和CD59的表达。

[0378] 在一些实施方案中,细胞包含编码CD46和CD59的一种或多种转基因。在一些实施方案中,转基因是单顺反子或多顺反子载体,如下文第II.B.4节中所述。在一些实施方案中,CD46和CD59由相同的多顺反子载体组成,任选地与一种或多种致耐受性因子诸如CD47组合。在一些实施方案中,CD46和CD59由不同的转基因组成,任选地与一种或多种致耐受性因子诸如CD47组合。

[0379] 在一些实施方案中,工程化细胞含有编码CD46的过表达的多核苷酸(诸如上文所述的任何多核苷酸)、编码CD59的过表达的多核苷酸(诸如上文所述的任何多核苷酸)以及编码CD55的过表达的多核苷酸(诸如上文所述的任何多核苷酸)。

[0380] 在一些实施方案中,工程化细胞含有编码CD46的外源多核苷酸(诸如上文所述的任何多核苷酸)、编码CD59的外源多核苷酸(诸如上文所述的任何多核苷酸)以及编码CD55的外源多核苷酸(诸如上文所述的任何多核苷酸)。

[0381] 在一些实施方案中,工程化细胞(包含增加CD46、CD59和CD55的表达的一种或多种修饰)相对于不包含修饰的细胞(例如,相对于CD46、CD59和CD55的内源表达)包含增加的CD46、CD59和CD55的表达。在一些实施方案中,工程化细胞与不具有修饰的细胞相比(例如,与CD46、CD59和CD55的内源表达相比)包含1.5倍至2倍、2倍至3倍、3倍至4倍、4倍至5倍、5倍至10倍、10倍至15倍、15倍至20倍、20倍至40倍、40倍至60倍、60倍至80倍、80倍至100倍或100倍至200倍增加的CD46、CD59和CD55的表达。在一些实施方案中,没有修饰的细胞不具有CD46、CD59和CD55的内源表达或者不具有可检测的CD46、CD59和CD55的表达。在一些实施方案中,与缺乏修饰的细胞相比,表达增加的倍数大于200倍。

[0382] 在一些实施方案中,工程化细胞(包含增加CD46、CD59和CD55的表达的一种或多种修饰)与不具有修饰的细胞相比(例如,与CD46、CD59和CD55的内源表达相比)包含2倍至200倍、2倍至100倍、2倍至50倍或2倍至20倍增加的CD46、CD59和CD55的表达。在一些实施方案中,工程化细胞(包含增加CD46、CD59和CD55的表达的一种或多种修饰)与不具有修饰的细胞相比(例如,与CD46、CD59和CD55的内源表达相比)包含5倍至200倍、5倍至100倍、5倍至50倍或5倍至20倍增加的CD46、CD59和CD55的表达。

[0383] 在一些实施方案中,工程化细胞(包含增加CD46、CD59和CD55的表达的一种或多种修饰)相对于不包含修饰的细胞(例如,相对于CD46和CD59的内源表达)包含增加的CD46、CD59和CD55的表达。在一些实施方案中,工程化细胞与不具有修饰的细胞相比(例如,与CD46、CD59和CD55的内源表达相比)包含至少为或约2倍、至少为或约4倍、至少为或约6倍、至少为或约10倍、至少为或约和15倍、至少为或约20倍、至少为或约30倍、至少为或约50倍、至少为或约60倍、至少为或约70倍、至少为或约80倍、至少为或约100倍(或任何前述值之间

的任何值)增加的CD46、CD59和CD55的表达。

[0384] 在一些实施方案中,工程化细胞(包含增加CD46、CD59和CD55的表达的一种或多种修饰)相对于不包含修饰的细胞(例如,相对于CD46、CD59和CD55的内源表达)包含增加的CD46、CD59和CD55的表达。在一些实施方案中,工程化细胞与不具有修饰的细胞相比(例如,与CD46、CD59和CD55的内源表达相比)包含为或约2倍、为或约4倍、为或约6倍、为或约10倍、为或约15倍、为或约20倍、为或约30倍、为或约50倍、为或约60倍、为或约70倍、为或约80倍、为或约100倍(或任何前述值之间的任何值)增加的CD46、CD59和CD55的表达。

[0385] 在一些实施方案中,细胞包含编码CD46、CD59和CD55的一种或多种转基因。在一些实施方案中,转基因是单顺反子或多顺反子载体,如下文第II.B.4节中所述。在一些实施方案中,CD46、CD59和CD55由相同的多顺反子载体组成,任选地与一种或多种致耐受性因子诸如CD47组合。在一些实施方案中,CD46、CD59和CD55由不同的转基因组成,任选地与一种或多种致耐受性因子诸如CD47组合。

[0386] 2. 致耐受性因子

[0387] 在一些实施方案中,在细胞中过表达或增加致耐受性因子的表达。在一些实施方案中,工程化细胞包含至少一种致耐受性因子的增加的表达,即过表达。在一些实施方案中,致耐受性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)耐受工程化细胞的任何因子。在一些实施方案中,致耐受性因子是DUX4、B2M-HLA-E、CD16、CD52、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、SERPINB9、CD35、IL-39、CD16 Fc受体、IL15-RF和H2-M3。在一些实施方案中,致耐受性因子是CD47、PD-L1、HLA-E或HLA-G、CCL21、FasL、Serpib9、CD200或Mfge8,或它们的任何组合。在一些实施方案中,细胞包含至少一种外源多核苷酸,所述至少一种外源多核苷酸包含编码致耐受性因子的多核苷酸。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者受试者时不触发或活化免疫应答的细胞。如上所述,在一些实施方案中,对细胞进行修饰以增加影响受者中的免疫识别和耐受的基因和致耐受性(例如,免疫)因子的表达。

[0388] 在一些实施方案中,本公开提供了一种细胞或其群体,其已经被修饰以表达致耐受性因子(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性因子(例如免疫调节多肽)诸如CD47的方法。在一些实施方案中,工程化细胞表达外源致耐受性因子(例如免疫调节多肽),诸如外源CD47。在一些情况下,通过用包含编码人CD47多肽的核苷酸序列的表达载体引入细胞中(例如转导细胞)来实现外源多核苷酸的过表达或增加表达。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,细胞经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性因子的多核苷酸。在任何实施方案中的一些实施方案中,致耐受性因子是DUX4、B2M-HLA-E、CD16、CD52、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、SERPINB9、CD35、IL-39、CD16 Fc受体、IL15-RF和H2-M3。在一些实施方案中,致耐受性因子选自CD47、PD-L1、HLA-E或HLA-G、CCL21、FasL、Serpib9、CD200或Mfge8,或它们的任何组合。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。

[0389] 在一些实施方案中,致耐受性因子是CD47。在一些实施方案中,工程化细胞含有编码CD47(诸如人CD47)的外源多核苷酸。在一些实施方案中,在细胞中过表达CD47。在一些实施方案中,与未用修饰工程化的相同细胞类型的相似细胞(诸如参考细胞或未修饰细胞,例如未用编码CD47的外源多核苷酸工程化的细胞)相比,工程化细胞中CD47的表达过表达或增加。CD47是一种白细胞表面抗原,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的可用的基因组、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。

[0390] 在一些实施方案中,工程化细胞包含至少一种致耐受性因子的增加的表达,即过表达。在一些实施方案中,细胞包含至少一种外源多核苷酸,所述至少一种外源多核苷酸包含编码致耐受性因子的多核苷酸。在一些实施方案中,致耐受性因子包括DUX4、B2M-HLA-E、CD16、CD52、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、SERPINB9、CD35、IL-39、CD16 Fc受体、IL15-RF和H2-M3,或它们的任何组合。例如,在一些实施方案中,至少一种过表达的(例如,外源)多核苷酸是编码CD47的多核苷酸。

[0391] 在一些实施方案中,本公开提供了一种细胞或其群体,其已经被修饰以表达致耐受性因子(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性因子(例如免疫调节多肽)诸如CD47的方法。在一些实施方案中,工程化细胞表达外源致耐受性因子(例如免疫调节多肽),诸如外源CD47。在一些情况下,细胞表达表达载体,所述表达载体包含编码人CD47多肽的核苷酸序列。

[0392] 在一些实施方案中,工程化细胞含有编码CD47(诸如人CD47)的过表达多核苷酸。在一些实施方案中,工程化细胞含有编码CD47(诸如人CD47)的外源多核苷酸。在一些实施方案中,在细胞中过表达CD47。在一些实施方案中,与类似的参考细胞或未修饰的细胞(包括具有任何其他修饰)(只是参考细胞或未修饰的细胞不包含编码CD47的外源多核苷酸)相比,工程化细胞中CD47的表达增加。CD47是一种白细胞表面抗原,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的可用的基因组、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。

[0393] 在一些实施方案中,本文概述的细胞包含编码与如NCBI Ref.Sequence No.NP\_001768.1和NP\_942088.1所示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多肽的外源核苷酸序列。在一些实施方案中,本文概述的细胞包含编码具有如NCBI Ref.Sequence No.NP\_001768.1和NP\_942088.1所示的氨基酸序列的CD47多肽的外源核苷酸序列。在一些实施方案中,细胞包含与NCBI Ref.No.NM\_001777.3和NM\_198793.2所示的序列具有至少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的外源核苷酸序列。在一些实施方案中,细胞包含如NCBI Ref.Sequence No.NM\_001777.3和NM\_198793.2所示的CD47的外源核苷酸序列。

[0394] 在一些实施方案中,本文概述的细胞包含编码与如NCBI Ref.Sequence No.NP\_001768.1和NP\_942088.1所示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多肽的外源核苷酸序列。在一些实施方案中,本文概述的细胞包含编码具有如NCBI Ref.Sequence No.NP\_001768.1和NP\_942088.1所示的氨基酸序列的CD47多肽的外源核苷酸序列。在一些实施方案中,细胞包含与NCBI Ref.No.NM\_001777.3和NM\_198793.2所示的序列具有至少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的外源核苷酸序列。在一些实施方案中,细胞包含如NCBI Ref.Sequence No.NM\_001777.3和NM\_198793.2所示的CD47的外源核苷酸序列。

[0395] 在一些实施方案中,细胞包含与如NCBI Ref.Sequence No.NP\_001768.1和NP\_942088.1所示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)的外源CD47多肽。在一些实施方案中,本文概述的细胞包含具有如NCBI Ref.SequenceNo.NP\_001768.1和NP\_942088.1所示的氨基酸序列的外源CD47多肽。

[0396] 在一些实施方案中,细胞包含编码与如SEQ ID NO:1所示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多肽的过表达的多核苷酸。在一些实施方案中,细胞包含编码与如SEQ ID NO:1所示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多肽的外源多核苷酸。在一些实施方案中,细胞包含编码具有如SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列的CD47多肽的过表达的多核苷酸。在一些实施方案中,细胞包含编码具有如SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列的CD47多肽的外源多核苷酸。

[0397] 在一些实施方案中,细胞包含与如SEQ ID NO:2所示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)的过表达的CD47多肽。在一些实施方案中,细胞包含与如SEQ ID NO:2所示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)的外源CD47多肽。在一些实施方案中,细胞包含具有如SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列的过表达的CD47多肽。在一些实施方案中,细胞包含具有如SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列的外源CD47多肽。在一些实施方案中,编码CD59多肽的外源核苷酸序列可操作地连接至编码异源信号肽的序列。在一些实施方案中,将编码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方法整合到细胞的基因组中。在一些实施方案中,靶向插入是通过同源依赖性插入靶基因座中,诸如通过插入表2中描绘的任一基因座(例如B2M基因、CIITA基因、TRAC基因、TRBC基因)中来进行的。在一些实施方案中,靶向插入是通过同源非依赖性插入,诸如通过插入安全港基因座中来进行的。在一些情况下,将编码CD47的多核苷酸插入安全港基因座(诸如但不限于选自AAVS1、CCR5、CLYBL、ROSA26和SHS231的基因座)中。在特定实施方案中,将编码CD47的多核苷酸插入CCR5基因座、PPP1R12C(也称为AAVS1)基因座或CLYBL基因座中。

[0398] 在一些实施方案中,CD47的全部或功能部分可以连接至其他组分,诸如信号肽、前导序列、分泌信号、标记(例如,报告基因)或它们的任何组合。在一些实施方案中,编码CD47的信号肽的核酸序列被编码来自异源蛋白质的信号肽的核酸序列替换。异源蛋白质可以是例如CD8 $\alpha$ 、CD28、组织纤溶酶原活化剂(tPA)、生长激素、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、GM-CSF受体(GM-CSFRa)或免疫球蛋白(例如,IgE或IgK)。在一些实施方案中,信号肽是来自免疫球蛋白(诸如IgG重链或IgG- $\kappa$ 轻链)、细胞因子(诸如白介素2(IL-2)或CD33)、血清白蛋白蛋白质(例如HSA或白蛋白)、人天青素前蛋白信号序列、荧光素酶、胰蛋

白酶原(例如胰凝乳蛋白酶原或胰蛋白酶原)的信号肽,或能够通过细胞或在细胞上有效表达蛋白质的其他信号肽。

[0399] 在某些实施方案中,编码CD47的外源多核苷酸可操作地连接至启动子。

[0400] 在一些实施方案中,将编码CD47的外源多核苷酸插入表2中描绘的任一基因座中。在一些情况下,将编码CD47的外源多核苷酸插入安全港基因座(诸如但不限于选自AAVS1、CCR5、CLYBL、ROSA26和SHS231的基因座)中。在特定实施方案中,将编码CD47的外源多核苷酸插入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的外源多核苷酸插入B2M基因座或CIITA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的外源多核苷酸插入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的多核苷酸插入细胞的基因组基因座中。

[0401] 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,逆转录酶聚合酶链式反应(RT-PCR)用于确认外源CD47mRNA的存在。

[0402] 在一些实施方案中,工程化细胞含有编码CD200(诸如人CD200)的外源多核苷酸。在一些实施方案中,在细胞中过表达CD200。在一些实施方案中,与类似的参考细胞或未修饰的细胞(包括具有任何其他修饰)(只是参考细胞或未修饰的细胞不包含编码CD200的外源多核苷酸)相比,工程化细胞中CD200的表达增加。关于人CD200的可用的基因组、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。

[0403] 在一些实施方案中,将编码CD200的多核苷酸插入表2中描绘的任一基因座中。在一些情况下,将编码CD200的多核苷酸插入安全港基因座(诸如但不限于选自AAVS1、CCR5、CLYBL、ROSA26和SHS231的基因座)中。在特定实施方案中,将编码CD200的多核苷酸插入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B2M基因座或CIITA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CD200的多核苷酸插入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的多核苷酸插入细胞的基因组基因座中。

[0404] 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,逆转录酶聚合酶链式反应(RT-PCR)用于确认外源CD200 mRNA的存在。

[0405] 在一些实施方案中,工程化细胞含有编码HLA-E(诸如人HLA-E)的外源多核苷酸。在一些实施方案中,在细胞中过表达HLA-E。在一些实施方案中,与类似的参考细胞或未修饰细胞(包括具有任何其他修饰)(只是参考细胞或未修饰细胞不包含编码HLA-E的外源多核苷酸)相比,工程化细胞中HLA-E的表达增加。关于人HLA-E的可用的基因组、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和NCBI RefSeq Nos.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。

[0406] 在一些实施方案中,将编码HLA-E的多核苷酸插入表2中描绘的任一基因座中。在一些情况下,将编码HLA-E的多核苷酸插入安全港基因座(诸如但不限于选自AAVS1、CCR5、CLYBL、ROSA26和SHS231的基因座)中。在特定实施方案中,将编码HLA-E的多核苷酸插入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B2M基因座或CIITA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HLA-E的多核苷酸插入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的多核苷酸插入细胞的基因组基因座中。

[0407] 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,逆转录酶聚合酶链式反应(RT-PCR)用于确认外源HLA-E mRNA的存在。

[0408] 在一些实施方案中,工程化细胞含有编码HLA-G(诸如人HLA-G)的外源多核苷酸。在一些实施方案中,在细胞中过表达HLA-G。在一些实施方案中,与类似的参考细胞或未修饰细胞(包括具有任何其他修饰)(只是参考细胞或未修饰细胞不包含编码HLA-G的外源多核苷酸)相比,工程化细胞中HLA-G的表达增加。关于人HLA-G的可用的基因组、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和NCBI RefSeq Nos.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。

[0409] 在一些实施方案中,将编码HLA-G的多核苷酸插入表2中描绘的任一基因座中。在一些情况下,将编码HLA-G的多核苷酸插入安全港基因座(诸如但不限于选自AAVS1、CCR5、CLYBL、ROSA26和SHS231的基因座)中。在特定实施方案中,将编码HLA-G的多核苷酸插入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B2M基因座或CIITA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HLA-G的多核苷酸插入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的多核苷酸插入细胞的基因组基因座中。

[0410] 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,逆转录酶聚合酶链式反应(RT-PCR)用于确认外源HLA-G mRNA的存在。

[0411] 在一些实施方案中,工程化细胞含有编码PD-L1(诸如人PD-L1)的外源多核苷酸。在一些实施方案中,在细胞中过表达PD-L1。在一些实施方案中,与类似的参考细胞或未修饰细胞(包括具有任何其他修饰)(只是参考细胞或未修饰细胞不包含编码PD-L1的外源多核苷酸)相比,工程化细胞中PD-L1的表达增加。关于人PD-L1或CD274的可用的基因组、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。

[0412] 在一些实施方案中,将编码PD-L1的多核苷酸插入表2中描绘的任一基因座中。在

一些情况下,将编码PD-L1的多核苷酸插入安全港基因座(诸如但不限于选自AAVS1、CCR5、CLYBL、ROSA26和SHS231的基因座)中。在特定实施方案中,将编码PD-L1的多核苷酸插入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B2M基因座或CIITA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PD-L1的多核苷酸插入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的多核苷酸插入细胞的基因组基因座中。

[0413] 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,逆转录酶聚合酶链式反应(RT-PCR)用于确认外源PD-L1 mRNA的存在。

[0414] 在一些实施方案中,工程化细胞含有编码FasL(诸如人FasL)的外源多核苷酸。在一些实施方案中,在细胞中过表达FasL。在一些实施方案中,与类似的参考细胞或未修饰细胞(包括具有任何其他修饰)(只是参考细胞或未修饰细胞不包含编码FasL的外源多核苷酸)相比,工程化细胞中FasL的表达增加。关于人Fas配体(其也被称为FasL、FASLG、CD178、TNFSF6等)的可用的基因组、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。

[0415] 在一些实施方案中,将编码Fas-L的多核苷酸插入表2中描绘的任一基因座中。在一些情况下,将编码Fas-L的多核苷酸插入安全港基因座(诸如但不限于选自AAVS1、CCR5、CLYBL、ROSA26和SHS231的基因座)中。在特定实施方案中,将编码Fas-L的多核苷酸插入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B2M基因座或CIITA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Fas-L的多核苷酸插入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的多核苷酸插入细胞的基因组基因座中。

[0416] 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,逆转录酶聚合酶链式反应(RT-PCR)用于确认外源Fas-LmRNA的存在。

[0417] 在一些实施方案中,工程化细胞含有编码CCL21(诸如人CCL21)的外源多核苷酸。在一些实施方案中,在细胞中过表达CCL21。在一些实施方案中,与类似的参考细胞或未修饰细胞(包括具有任何其他修饰)(只是参考细胞或未修饰细胞不包含编码CCL21的外源多核苷酸)相比,工程化细胞中CCL21的表达增加。关于人CCL21的可用的基因组、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。

[0418] 在一些实施方案中,将编码CCL21的多核苷酸插入表2中描绘的任一基因座中。在一些情况下,将编码CCL21的多核苷酸插入安全港基因座(诸如但不限于选自AAVS1、CCR5、CLYBL、ROSA26和SHS231的基因座)中。在特定实施方案中,将编码CCL21的多核苷酸插入

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B2M基因座或CIITA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CCL21的多核苷酸插入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的多核苷酸插入细胞的基因组基因座中。

[0419] 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,逆转录酶聚合酶链式反应(RT-PCR)用于确认外源CCL21 mRNA的存在。

[0420] 在一些实施方案中,工程化细胞含有编码CCL22(诸如人CCL22)的外源多核苷酸。在一些实施方案中,在细胞中过表达CCL22。在一些实施方案中,与类似的参考细胞或未修饰细胞(包括具有任何其他修饰)(只是参考细胞或未修饰细胞不包含编码CCL22的外源多核苷酸)相比,工程化细胞中CCL22的表达增加。关于人CCL22的可用的基因组、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。

[0421] 在一些实施方案中,将编码CCL22的多核苷酸插入表2中描绘的任一基因座中。在一些情况下,将编码CCL22的多核苷酸插入安全港基因座(诸如但不限于选自AAVS1、CCR5、CLYBL、ROSA26和SHS231的基因座)中。在特定实施方案中,将编码CCL22的多核苷酸插入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B2M基因座或CIITA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CCL22的多核苷酸插入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的多核苷酸插入细胞的基因组基因座中。

[0422] 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,逆转录酶聚合酶链式反应(RT-PCR)用于确认外源CCL22 mRNA的存在。

[0423] 在一些实施方案中,工程化细胞含有编码Mfge8(诸如人Mfge8)的外源多核苷酸。在一些实施方案中,在细胞中过表达Mfge8。在一些实施方案中,与类似的参考细胞或未修饰细胞(包括具有任何其他修饰)(只是参考细胞或未修饰细胞不包含编码Mfge8的外源多核苷酸)相比,工程化细胞中Mfge8的表达增加。关于人Mfge8的可用的基因组、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。

[0424] 在一些实施方案中,将编码Mfge8的多核苷酸插入表2中描绘的任一基因座中。在一些情况下,将编码Mfge8的多核苷酸插入安全港基因座(诸如但不限于选自AAVS1、CCR5、CLYBL、ROSA26、SHS231的基因座)中。在特定实施方案中,将编码Mfge8的多核苷酸插入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B2M基因座或CIITA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Mfge8的多核苷酸插入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的多核苷酸插入细胞的基因组基因座中。

[0425] 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,逆转录酶聚合酶链式反应(RT-PCR)用于确认外源Mfge8mRNA的存在。

[0426] 在一些实施方案中,工程化细胞含有编码SerpB9(诸如人SerpB9)的外源多核苷酸。在一些实施方案中,在细胞中过表达SerpB9。在一些实施方案中,与类似的参考细胞或未修饰细胞(包括具有任何其他修饰)(只是参考细胞或未修饰细胞不包含编码SerpB9的外源多核苷酸)相比,工程化细胞中SerpB9的表达增加。关于人SerpB9的可用的基因组、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SerpB9的多核苷酸可操作地连接至启动子。

[0427] 在一些实施方案中,将编码SerpB9的多核苷酸插入表2中描绘的任一基因座中。在一些情况下,将编码SerpB9的多核苷酸插入安全港基因座(诸如但不限于选自AAVS1、CCR5、CLYBL、ROSA26、SHS231的基因座)中。在特定实施方案中,将编码SerpB9的多核苷酸插入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SerpB9的多核苷酸插入B2M基因座或CIITA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SerpB9的多核苷酸插入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SerpB9的多核苷酸插入细胞的基因组基因座中。

[0428] 在一些实施方案中,使用细胞裂解物的蛋白质印迹来检测SerpB9蛋白表达,所述裂解物用针对SerpB9蛋白的抗体进行探测。在另一个实施方案中,逆转录酶聚合酶链式反应(RT-PCR)用于确认外源SerpB9 mRNA的存在。

### [0429] 3. 嵌合抗原受体

[0430] 在一些实施方案中,所提供的工程化细胞经进一步修饰以表达嵌合抗原受体(CAR)。在一些实施方案中,所提供的细胞含有一种或多种靶多核苷酸序列的基因修饰,所述基因修饰调控一种或多种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,降低补体途径活化,过表达如本文所述的致耐受性因子(例如CD47),并表达CAR。在一些实施方案中,所述细胞是其中:B2M被降低或消除(例如敲除),CIITA被降低或消除(例如敲除),CD46被过表达,CD59被过表达,CD47被过表达,并且CAR被表达。在一些实施方案中,细胞是B2M<sup>-/-</sup>、CIITA<sup>-/-</sup>、CD46tg、CD59tg、CD47tg、CAR<sup>+</sup>。在一些实施方案中,细胞(例如T细胞)还可以是其中TRAC被降低或消除(例如敲除)的细胞。在一些实施方案中,细胞是B2<sup>-/-</sup>、CIITA<sup>-/-</sup>、CD46tg、CD59tg、CD47tg、TRAC<sup>-/-</sup> CAR<sup>+</sup>。

[0431] 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细胞或从多能细胞(例如iPSC)分化的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细胞或从多能细胞(例如iPSC)分化的NK细胞。

[0432] 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的第三代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。

[0433] 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。

[0434] 在一些实施方案中, 本文所述的细胞中的任一种包含编码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细胞活化期间的细胞因子产生、CAR T细胞增殖和/或CAR T细胞持久性。

[0435] 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细胞活化期间的细胞因子产生、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。

[0436] 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细胞活化期间的细胞因子产生、CAR T细胞增殖和/或CAR T细胞持久性。

[0437] 在一些实施方案中, 本文提供的工程化细胞(例如原代或iPSC源性T细胞, 或原代或iPSC源性NK细胞)包括编码CAR的多核苷酸, 其中将所述多核苷酸插入基因组基因座中。在一些实施方案中, 将多核苷酸插入安全港基因座(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)中。在一些实施方案中, 将多核苷酸插入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)。

[0438] 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)。

[0439] 技术人员熟悉CAR以及CAR的不同组分和配置。任何已知的CAR都可以与所提供的实施方案结合采用。除了本文所述的CAR以外,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的示例性特征和组分在以下小节中描述。

#### [0440] G. 抗原结合结构域

[0441] 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。

[0442] 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。

[0443] 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性疾病的特征性抗原。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。

[0444] 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、粘蛋白、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-γ2、VEGF、VEGFR 1/2/3、αVβ3、α5β1、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-1β、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α(FRa)、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、IL13Rα1、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、血小板源生长因子受体β(PDGFR-β)、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β、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、豆荚蛋白(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剂受体(uPAR)、Fos-相关抗原1、p53、p53突变体、prostein、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、CYP1B I、BORIS、SART3、PAX5、OY-TES1、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)CD49f、CD151、CD340、CD200、tkrA、trkB或trkC,或其抗原片段或抗原部分。

[0445] 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、κ、λ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、FRa、IL-13Ra、间皮素、MUC1、MUC16和ROR1(与实体瘤相关)。

[0446] 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源自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申请公布第W02018/213337A 1号中进行了描述,这些文献中每一篇的全部内容通过引用并入本文。

[0447] 在一些实施方案中,CD19 CAR的胞外结合结构域包含源自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&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))。

[0448] 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, 作为B细胞受体 (BCR) 信号传导的抑制性受体起作用。CD22在60%-70%的B细胞淋巴瘤和白血病 (例如, B-慢性淋巴细胞白血病、毛细胞白血病、急性淋巴细胞白血病 (ALL) 和伯基特氏淋巴瘤) 中表达, 并且在B细胞发育早期的细胞表面上或在干细胞上不存在。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源自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源自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, 源自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CD22特异性scFv的治疗剂, 因此可以结合至表达CD22的癌细胞的表面并杀死癌细胞。BL22包含抗CD22抗体的dsFv, RFB4, 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, 莫塞妥莫单抗免疫毒素) 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, 这些专利特此通过引用整体并入。

[0449] 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、各种白血病和成胶质细胞瘤。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申请公布号W02016/014789、W02016/014565、W02013/154760和W0 2015/128653中描述。PCT申请公布号W02015/166073和W02014/068079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源自鼠单克隆抗体的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型式 (Sommermeyer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)。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. Commun.* 11 (1):283 (2020) 中所述。

[0450] 在一些实施方案中, 抗原结合结构域靶向自身免疫或炎症性病症特征性抗原。在

一些实施方案中,ABD结合与自身免疫或炎症性病征相关的抗原。在一些情况下,抗原由与自身免疫或炎症性病征相关的细胞表达。在一些实施方案中,自身免疫或炎症性病征选自慢性移植物抗宿主病(GVHD)、狼疮、关节炎、免疫复合物肾小球肾炎、古德帕斯丘、葡萄膜炎、肝炎、系统性硬化症或硬皮病、I型糖尿病、多发性硬化症、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、新生儿同种异体免疫性血小板减少症、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,同种异体致敏是指针对受者受试者或怀孕受试者的免疫系统认为是非自身抗原的人白细胞抗原产生免疫应答(诸如循环抗体)。在一些实施方案中,自身免疫或炎症性病征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。

[0451] 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,这些文献的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BCMA CAR。

[0452] 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剂受体(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。

[0453] 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(HHV-8、卡波西肉瘤相关疱疹病毒(KSHV))、人T-淋巴细胞病毒1(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。

[0454] 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。

[0455] 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的一些实施方案中,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,两个不同的抗原结合结构域中的每一者是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,或者连接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至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连接在抗原特异性结合区与跨膜结构域之间。

[0456] 在另一实施方案中,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(双scFv(di-scFv,bi-scFv))。在包含双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个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)。包含至少两个抗原特异性靶向区的CAR将表达对两种抗原中每一者具有特异性的两个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连接在抗原特异性结合结构域与跨膜结构域之间。

[0457] 在另一个实施方案中,CAR的每个抗原特异性靶向区包含双抗体。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,即所谓的三抗体(triobody)或三体(tribody)。也可以使用四抗体(Tetrabody)。

[0458] 在一些实施方案中,细胞经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的一些实施方案中,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。

[0459] 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中的每一者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的一些实施方案中,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的工程化细胞群体(例如低免疫原性)和表达针对第二靶抗原的第二CAR的工程化细胞群体(例如低免疫原性)分

别施用于受试者。在一些实施方案中,将第一和第二细胞群体以任何顺序依序施用。例如,在施用表达第一CAR的细胞群体之后施用表达第二CAR的细胞群体。

#### [0460] H. 间隔区

[0461] 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,诸如但不限于甘氨酸-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。

#### [0462] I. 跨膜结构域

[0463] 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,所述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。

#### [0464] J. 信号传导结构域

[0465] 在一些实施方案中,本文所述的CAR包含选自以下一者或多者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/BLyS/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、特异性结合CD83的配体、或其功能片段。

[0466] 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。

[0467] 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,所述共刺激结构域选自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者或多者。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。

[0468] 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;(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;(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。

[0469] 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;(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;(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。

[0470] 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。

[0471] 在一些实施方案中,所述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;以及(ii) CD28结构域,或4-1BB结构域,或其功能变体。

[0472] 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;以及(iii) 4-1BB结构域,或CD134结构域,或其功能变体。

[0473] 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。

[0474] 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;以及(iv)细胞因子或共刺激配体转基因。

[0475] K. 示例性CAR

[0476] 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(例如任何胞内信号传导结构域,诸如本文所述的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另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。

[0477] CAR的示例性组分的实例描述于表3中。在所提供的方面,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
<b>胞外结合结构域</b>		
抗 CD19 scFv (FMC63)	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLN WYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGS GTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGG TKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPG LVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRK GLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKS QVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAM DYWGQGTSVTVSS	22
[0478] 抗 CD19 scFv (FMC63)	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLN WYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGS GTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGG TKLEITGGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLV APSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLE WLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFL KMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWG QGTSVTVSS	23
<b>间隔区(例如铰链)</b>		
IgG4 铰链	ESKYGPPCPPCP	24
CD8 铰链	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPE	25
CD28	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFP	26

	GPSKP	
<b>跨膜</b>		
CD8	ACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCG VLLLSLVITLYC	27
CD28	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	28
CD28	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	29
<b>共刺激结构域</b>		
CD28	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPP RDFAAAYS	30
[0479] 4-1BB	KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFP EEEEGGCEL	31
<b>初级信号传导结构域</b>		
CD3 $\zeta$	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQK DKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTA TKDTYDALHMQUALPPR	33
CD3 $\zeta$	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEY DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQK DKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTA TKDTYDALHMQUALPPR	34

[0480] 4. 增加多核苷酸表达 (例如过表达多核苷酸) 的方法

[0481] 在一些实施方案中, 增加多核苷酸的表达可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) 表达的方法包括基因组编辑技术以及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节中描述的任何细胞。

[0482] L. 增加内源基因的表达

[0483] 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, 通过增加可操作地连接至内源基因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。

[0484] 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或另一种致耐受性因子) 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。

[0485] 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。

[0486] 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。

[0487] 在一些实施方案中,位点特异性结合结构域可源自核酸酶。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。另见美国专利第5,420,032号;美国专利第6,833,252号;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;美国专利公布第2007/0117128号。

[0488] 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;以及美国公布第20110301073号。

[0489] 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。

[0490] 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,由个别指组装产生。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。

[0491] 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。

[0492] 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布第20110301073号,其通过引用整体并入本文。

[0493] 在一些实施方案中,位点特异性结合结构域源自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。

[0494] 一般来讲,指导序列包括靶向结构域,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(例如,靶向序列)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。

[0495] 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(WO2016183041的表29,附录22)中任一个所示;HLA-E,诸如SEQ ID NO:189859-193183(WO2016183041的表19,附录12)中任一个所示;HLA-F,诸如SEQ ID NO:688808-699754(WO2016183041的表45,附录38)中任一个所示;HLA-G,诸如SEQ ID NO:188372-189858(WO2016183041的表18,附录11)中任一个所示;或PD-L1,诸如SEQ ID NO:193184-200783(WO2016183041的表21,附录14)中任一个所示。

[0496] 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。

[0497] 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。

[0498] 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。

[0499] 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。

[0500] 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源性反式活化结构域、Dnmt3a甲基转移酶结构域、p65、VP16和VP64。

[0501] 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)。

[0502] 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、抑制因子、共活化因子、共抑制因子)、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,美国公布第2013/0253040号,其通过引用整体并入本文。

[0503] 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 (1997))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)。另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 P<sub>v</sub>ALF、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。另外的示例性活化结构域包括但不限于OsgAI, HALF-1, C1, AP1, ARF-5、ARF-6、ARF-1和ARF-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-

Hausseis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。

[0504] 可用于制备遗传阻遏物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。另外的示例性抑制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。

[0505] 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(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 $\delta$ 、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)。

[0506] 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, 转录活化或抑制结构域)。融合分子还任选地包含核定位信号(例如像来自SV40培养基T抗原的信号)和表位标签(例如像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。

[0507] 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)之间的融合体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。

#### [0508] M. 外源多肽

[0509] 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细胞中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。在一些实施方案中, 编码本文的外源多肽的外源多核苷酸包含密码子优化的核酸序列。

[0510] 在某些实施方案中, 编码外源多肽诸如致耐受性因子或嵌合抗原受体的重组核酸可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者受试者。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。表达构建体可存在于细胞中的附加体(诸如质粒)上,或者表达构建体可插入染色体中。在具体实施方案中,表达载体包括选择标记基因以允许选择转化的宿主细胞。某些实施方案包括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、需要表达的特定变体多肽、载体的拷贝数、控制该拷贝数的能力和/或载体编码的任何其他蛋白质(诸如抗生素标志物)的表达。

[0511] 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。在另外的实施方案中,用于哺乳动物宿主细胞中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。

[0512] 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/或(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。

[0513] 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。

[0514] 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)各自由多顺反子分隔元件分隔。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。

[0515] 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性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种或更多种多肽。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:11所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,T2A是或包含SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,T2A是或包含SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,T2A是或包含SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列。

[0516] 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(双顺反子的或三顺反子的,参见例如美国专利第6,060,273号)。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性因子(诸如CD47)和/或一种或多种补体抑制剂(诸如CD46、CD59和CD55))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个单独的多肽。在一些情况下,由载体或构建体编码的两个单独的多肽是致耐受性因子(例如,两个因子选自CD47、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)。在一些情况下,由载体或构建体编码的两个单独的多肽是CD46和CD59。在一些实施方案中,由载体或构建体编码的两个单独的多肽是致耐受性因子(例如CD47)和选自CD46、CD59和CD55的补体抑制剂。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个单独的多肽。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性因子,诸如CD47、CD46和CD59。在一些情况下,三顺反子载体或构建体的三个核酸序列是CD46、CD59和CD55。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性因子:CD47、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,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个单独的多肽。在一些情况下,四顺反子载体或构建体的四个单独的多肽是CD47、CD46、CD59和CD55。在一些情况下,四顺反子载体或构建体的四个单独的多肽是选自以下的四种致耐受性因子:CD47、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。

[0517] 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意组合或顺序编码一种或多种致耐受性因子、补体抑制剂和/或其他多肽(诸如CAR)。

[0518] 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)的序列彼此分隔的两个、三个或四个基因(例如编码致耐受性因子(例如CD47)和/或选自CD46、CD59和CD55的一种或多种补体抑制剂。因此,ORF编码单个多肽,所述多肽在翻译期间(在2A的情况下)或在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(参见,例如,de Felipe.*Genetic Vaccines and Ther.*2:13(2004)以及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中的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:16)、马甲型鼻炎病毒(E2A,例如SEQ ID NO:15)、明脉扁刺蛾(*thosea asigna*)病毒(T2A,例如SEQ ID NO:11、12、17或18)和猪捷申病毒1(P2A,例如SEQ ID NO:13或14)的2A序列,如美国专利公布第20070116690号中所述。

[0519] 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CD46的第一外源多核苷酸和编码CD59的第二外源多核苷酸,或编码CD47的第一外源多核苷酸、编码CD56的第二外源多核苷酸和编码CD59的第三外源多核苷酸的情况下,载体或构建体(例如转基因)还可包括编码第一外源多核苷酸序列与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,位于第一外源多核苷酸与第二外源多核苷酸之间的核酸序列编码在翻译过程中或在翻译后分离第一外源多核苷酸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(核糖体跳跃元件)的肽,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种或更多种多肽。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:11所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,T2A是或包含SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,T2A是或包含SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,T2A是或包含SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列。

[0520] 将本文所述的多核苷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、融合原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),将多核苷酸引入细胞中。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用于将包装的多核苷酸递送至细胞或细胞群体。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附加型的。技术人员熟悉将核酸转基因引入细胞中的方法,包括本文所述的任何示例性方法,并且可以选择合适的方法。

[0521] 1) 非靶向递送

[0522] 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,以促进基因的稳定表达和复制。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稳定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稳定表达的方法涉及导致核酸稳定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。

[0523] 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,因为它们允许所递送的核酸转录物中含有的基因稳定表达。慢病毒载体表达逆转录酶和整合酶,这是所递送的核酸转录物中含有的基因稳定表达所需的两种酶。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稳定整合到基因组中,它就会与宿主一起分裂。整合DNA中含有的目标基因可以组成型表达,也可以诱导型表达。作为宿主细胞基因组的一部分,它可以经历细胞调控,包括活化或阻遏,取决于靶细胞中的许多因素。

[0524] 慢病毒是逆转录病毒科病毒的一个亚群,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/颗粒最重要的特征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)、杰姆布拉纳病病毒(Jembrana Disease Virus)(JDV)、马传染性贫血病毒(EIAV)、维斯纳-梅迪病毒和山羊关节炎脑炎病毒(CAEV)。

[0525] 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。相应地,例如源自HIV-1/HIV-2的慢病毒载体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。

[0526] 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选择性标志物(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))一起引入生产细胞系

中,随后在适当的药物存在下进行选择并分离克隆。

[0527] 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。重组慢病毒载体可以用于感染靶细胞,此类源细胞包括第II.C节中描述的任何细胞。

[0528] 可以用于产生高滴度慢病毒颗粒的细胞可包括但不限于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)。

[0529] 慢病毒颗粒中提供的另外的元件可包括5'或3'端的逆转录病毒LTR(长末端重复)、逆转录病毒输出元件、任选的慢病毒反向应答元件(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)。

[0530] 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,还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;国际专利公布号:W02012079000)。

[0531] 在一些实施方案中,在细胞瞬时表达的条件下,诸如通过导致外源多核苷酸附加型递送的方法,将外源多核苷酸引入细胞中。

[0532] 在一些实施方案中,可将编码外源多核苷酸的多核苷酸包装到重组腺相关病毒(rAAV)载体中。此类载体或病毒颗粒可被设计为利用任何已知的血清型衣壳或血清型衣壳组合。血清型衣壳可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文献中所述的序列:美国公布第US20030138772号;Pulicherla等人Molecular Therapy,2011,19(6):1070-1078;美国专利号:6,156,303、7,198,951;美国专利公布号:US2015/0159173和US2014/0359799;以及国际专利公布号:W01998/011244、W02005/033321和W02014/14422。

[0533] 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。

[0534] 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)等;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。

[0535] 2) 靶向递送

[0536] 可以将外源多核苷酸插入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 or 同源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。

[0537] 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)。

[0538] 在一些实施方案中,核酸酶在基因组中的所需位置 (例如靶位点) 处产生特定双链断裂 (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所需位置处产生特定单链断裂。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、其他核酸内切酶或核酸外切酶、其变体、其片段以及它们的组合。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处,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)、线性双链聚合酶链式反应 (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,所述途径诸如同源定向修复 (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。

[0539] 例如,DNA修复机制可以在以下情况之后由核酸酶诱导: (i) 两个SSB,其中每条链上都有一个SSB,从而诱导单链悬突;或(ii) 在两条链上的相同切割位点处出现DSB,从而诱导平端断裂。在被这些剂中的一者切割后,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以及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,这通常会导导致切割位点的核苷酸缺失和插入。

[0540] 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。

[0541] 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,专门设计用于靶向靶基因的至少一个靶位点序列。示例性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基因破坏。参见Sander和Joung, (2014) *Nature Biotechnology*, 32(4):347-355。

[0542] 任何用于基因破坏的系统描述于第II节中。可以使用A.1,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,A.1可以导致外源多核苷酸在基因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系统介导基因破坏。示例性Cas蛋白和gRNA描述于上文第II.A节中,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。

[0543] 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中。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,提供了用于产生工程化细胞的方法,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以及包括DNA核酸酶系统(例如Cas9)和基因座特异性gRNA的DNA核酸酶系统引入源细胞(例如原代细胞或多能干细胞,例如iPSC)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。

[0544] 一般而言,待插入的供体模板将至少包含含有目标外源多核苷酸(例如,致耐受性因子或CAR)的转基因盒,并且任选地还将包含启动子。在这些实施方案中的某些实施方案中,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所引入的插入片段的大小,较大的插入片段需要更长的同源臂。

[0545] 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)切割位点两侧的靶基因座(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选择性标志物、可检测标志物和/或纯化标志物。

[0546] 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。

[0547] 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。

[0548] 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需要的。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、MICA基因、MICB基因、LRP1基因、HMGB1基因、ABO基因、RHD基因、FUT1基因、KDM5D(即,HY)基因、PDGFRa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。在这些实施方案中的任一个实施方案中,插入靶基因组基因座中的转基因的取向可以与该基因座中基因的方向相同或相反。

[0549] 在一些实施方案中,将外源多核苷酸插入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2A中描述。

[0550] 表2A:用于插入外源多核苷酸的示例性基因组基因座

编号	物种	名称	Ensembl ID	切割的靶区域	也称为
1	人	B2M	ENSG00000166710	CDS	
2	人	CIITA	ENSG00000179583	CDS	
3	人	TRAC	ENSG00000277734	CDS	
4	人	PPP1R12C	ENSG00000125503	内含子 1 和 2	AAVS1
5	人	CLYBL	ENSG00000125246	内含子 2	
6	人	CCR5	ENSG00000160791	外显子 1-3、内含子 1-2 和 CDS	
[0551] 7	人	THUMPD3-AS1	ENSG00000206573	内含子 1	ROSA26
8	人	Ch- 4:58,976,613		500 bp 窗口	SHS231
9	人	F3	ENSG00000117525	CDS	CD142
10	人	MICA	ENSG00000204520	CDS	
11	人	MICB	ENSG00000204516	CDS	
12	人	LRP1	ENSG00000123384	CDS	
13	人	HMGB1	ENSG00000189403	CDS	
14	人	ABO	ENSG00000175164	CDS	
15	人	RHD	ENSG00000187010	CDS	
16	人	FUT1	ENSG00000174951	CDS	
17	人	KDM5D	ENSG00000012817	CDS	HY

[0552] 在一些实施方案中,靶基因座是安全港基因座。在一些实施方案中,安全港基因座是允许整合的DNA稳定表达而对附近或相邻的内源基因、调控元件等影响最小的基因组位置。在一些情况下,安全港基因能够实现可持续的基因表达,并且可以被工程化核酸酶靶向以在各种细胞类型中进行基因修饰,所述细胞类型包括原代细胞和多能干细胞,包括其衍生物,及其分化细胞。安全港基因座的非限制性实例包括但不限于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)。在一些实施方案中,安全港基因座选自由AAVS1基因座、CCR5基因座和CLYBL基因座组成的组。在一些情况下,SHS231可以作为许多细胞类型中的安全港基因座被靶向。在一些情况下,某些基因座可以在某些细胞类型中用作安全港基因座。例如,PDGFR $\alpha$ 是神经胶质祖细胞(GPC)的安全港,OLIG2是少突胶质细胞的安全港基因座,并且GFAP是星形胶质细胞的安全港基因座。根据特定的工程化细胞类型选择适当的安全港基因座在技术人员的水平之内。在一些情况下,可以靶向多于一种安全港基因,从而将多于一种转基因引入基因修饰的细胞中。

[0553] 在一些实施方案中,提供了用于产生工程化细胞的方法,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(例如原代细胞或多能干细胞,例如iPSC)中,所述基因座特异性gRNA包含对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)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任何基因座的4000bp内、3500bp内、3000bp内、2500bp内、2000bp内、1500bp内、1000bp内或500bp内。

[0554] 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)。在这些实施方案中的某些实施方案中,靶序列位于AAVS1的内含子1中。AAVS1位于19号染色体:55,090,918-55,117,637反向链处,并且AAVS1内含子1(基于转录物ENSG00000125503)位于19号染色体:55,117,222-55,112,796反向链处。在某些实施方案中,gRNA靶向19号染色体: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19号染色体: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19号染色体:55,115,674处或在19号染色体: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)中。此gRNA包含具有SEQ ID NO:36(表4中示出)所示的核酸序列的互补部分(例如gRNA靶向序列)并且靶向AAVS1的内含子1(也称为PPP1R12C)。

[0555] 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实施方案中,靶序列位于CLYBL的内含子2中。CLYBL位于13号染色体:99,606,669-99,897,134正向链处,并且CLYBL内含子2(基于转录物ENST00000376355.7)位于13号染色体:99,773,011-99,858,860正向链处。在某些实施方案中,gRNA靶向13号染色体: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13号染色体: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13号染色体:99,822,980处或在13号染色体:99,822,980的5、0、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:36(表4中示出)所示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Cerbini等人,PLoS One,10(1):e0116032(2015)中描述的TALEN的靶位点相似。

[0556] 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)。在这些实施方案中的某些实施方案中,靶序列位于CCR5的外显子3中。CCR5位于3号染色体:46,370,854-46,376,206正向链处,并且CCR5外显子3(基于转录物ENST00000292303.4)位于3号染色体:46,372,892-46,376,206正向链处。在某些实施方案中,gRNA靶向3号染色体: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3号染色体: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3号染色体:46,373,180处或在3号染色体: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)中。该gRNA包含具有SEQ ID NO:37(表4中示出)所示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)。

[0557] 表4列出了示例性gRNA靶向序列。在一些实施方案中,gRNA靶向序列可有表4中列

出的互补部分序列中的一个或多个胸腺嘧啶被尿嘧啶取代。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”表示而胸腺嘧啶用“t”表示;在核糖核酸的上下文中,应当理解,除非另有指示,否则“t”用于表示尿嘧啶。

[0558] 表4.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	35
GET000047指导物	(5'→3') tgttgaaggatgaggaaat	36
GET000048指导物	(5'→3') tcactatgctgccgccagt	37

[0560] 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,此种靶基因座是在细胞中需要破坏或消除诸如以调节细胞的表型或功能的任何靶基因座。例如,第II.A节中描述的用于降低靶基因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,其中靶基因的基因破坏或敲除以及通过靶向插入实现的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过程可用于导致基因破坏,以消除或降低(例如敲除)表1中列出的任何靶基因的表达,同时还通过使用具有侧翼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,所述同源臂与基因破坏的靶位点处或附近的核酸序列同源。

[0561] 在一些实施方案中,提供了用于产生工程化细胞的方法,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以及包括DNA核酸酶系统(例如Cas9)和基因座特异性gRNA的DNA核酸酶系统引入源细胞(例如原代细胞或多能干细胞,例如iPSC)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任何基因座的4000bp内、3500bp内、3000bp内、2500bp内、2000bp内、1500bp内、1000bp内或500bp内。

[0562] 在特定实施方案中,靶基因座是B2M。在一些实施方案中,工程化细胞包含靶向B2M基因的基因修饰。在一些实施方案中,靶向B2M基因的基因修饰是通过使用靶向核酸酶系统来进行的,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W02016/183041(其公开内容通过引用整体并入本文)的附录2或表15的SEQ ID NO:81240-85644组成的组。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。

[0563] 在特定实施方案中,靶基因座是CIITA。在一些实施方案中,工程化细胞包含靶向CIITA基因的基因修饰。在一些实施方案中,靶向CIITA基因的基因修饰是通过靶向核酸酶系统进行的,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W02016183041(其公开内容通过引用整体并入本文)的附录1或表12的SEQ ID NO:5184-36352组成的组。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。

[0564] 在一些实施方案中,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过程可用于导致基因破坏,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翼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,所述同源臂与基因破坏的靶位点处或附近的核酸序列同源。可用于本文所述的基于CRISPR/Cas的基因靶向的示例性gRNA序列在表2B中提供。所述序列可见于US20160348073,包括序列表的公开内容通过引用整体并入本文。

[0565] 表2A. 可用于靶向基因的示例性gRNA靶向序列

基因名称	US 20160348073 中的 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

[0567] 在一些实施方案中,工程化细胞包含靶向TRAC基因的基因修饰。在一些实施方案中,靶向TRAC基因的基因修饰是通过靶向核酸酶系统进行的,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(其公开内容通过引用整体并入)的SEQ ID NO:532-609和9102-9797组成的组。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。

[0568] 在一些实施方案中,工程化细胞包含靶向TRBC基因的基因修饰。在一些实施方案中,靶向TRBC基因的基因修饰是通过靶向核酸酶系统进行的,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(其公开内容通过引用整体并入)的SEQ ID NO:610-765和9798-10532组成的组。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。

[0569] 在一些实施方案中,鉴定用于所述的HDR介导的整合方法中的新基因座和/或gRNA序列在本领域技术人员的水平之内。例如,对于CRISPR/Cas系统,当特定基因座(例如,靶基因,例如表1中列出的靶基因内)的现有gRNA已知时,可以使用“英寸蠕虫(inch worming)”方法通过针对PAM序列扫描基因座任一侧上的侧翼区来鉴定靶向插入转基因的另外的基因座,通常在基因组中大约每100个碱基对(bp)进行一次。PAM序列将取决于所使用的特定Cas核酸酶,因为不同的核酸酶通常具有不同的相应PAM序列。基因座任一侧上的侧翼区可以是约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,可以根据该基因座的序列设计新的指导物,用于基因破坏方法中。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。

[0570] 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如本文所公开的安全港基因座或安全港位点中,或插入导致内源基因的表达沉默或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B2M、CIITA、TRAC、TRBC、PD1或CTLA4基因座中。

[0571] C. 细胞

[0572] 在一些实施方案中,本公开提供了已经被工程化(或修饰)的细胞(例如,干细胞、诱导性多能干细胞、由此种干细胞衍生或产生的分化细胞、造血干细胞或原代细胞)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(例如编码致耐受性因子诸如CD47的多核苷酸)。在一些实施方案中,本申请提供了还包含CD46和CD59的过表达或增加的表达的工程化细胞。在一些实施方案中,工程化细胞还包含CD55的过表达或增加的表达。

[0573] 在一些实施方案中,包含外源多核苷酸的工程化细胞是 $\beta$ 胰岛细胞并且包含编码CD47多肽的第一外源多核苷酸。在一些实施方案中,工程化 $\beta$ 胰岛细胞还包含编码本文所述的一种或多种补体抑制剂或其他致耐受性多肽的一种或多种另外的外源多核苷酸。在一些实施方案中, $\beta$ 胰岛细胞如第II.A节中所述包含CD46和CD59的过表达或增加的表达以及降低的一种或多种MHC I类分子的表达和/或降低的一种或多种MHC II类分子的表达。在一些实施方案中,将第一外源多核苷酸和一种或多种另外的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,将第一外源多核苷酸和一种或多种另外的外源多核苷酸插入不同的基因组基因座中。在示例性实施方案中,工程化(例如,低免疫原性)细胞是原代 $\beta$ 胰岛细胞或源自工程化(例如,低免疫原性)多能细胞(例如,iPSC)的 $\beta$ 胰岛细胞。

[0574] 在一些实施方案中,包含外源多核苷酸的工程化细胞是肝细胞并且包含编码CD47多肽的第一外源多核苷酸。在一些实施方案中,工程化肝细胞还包含编码本文所述的一种或多种补体抑制剂或其他致耐受性多肽的一种或多种另外的外源多核苷酸。在一些实施方案中, $\beta$ 胰岛细胞如第II.A节中所述包含增加的CD46和CD59的表达以及降低的的一种或多种MHC I类分子的表达和/或降低的一种或多种MHC II类分子的表达。在一些实施方案中,将第一外源多核苷酸和一种或多种另外的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,将第一外源多核苷酸和一种或多种另外的外源多核苷酸插入不同的基因组基因座中。在示例性实施方案中,工程化(例如,低免疫原性)细胞是原代肝细胞或源自工程化(例如,低免疫原性)多能细胞(例如,iPSC)的肝细胞。

[0575] 在一些实施方案中,如本文所提供的经工程化或修饰的细胞是多能干细胞或从多能干细胞分化的细胞。在一些实施方案中,如本文所提供的经工程化或修饰的细胞是原代细胞。

[0576] 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。细胞还可以是脊椎动物干细胞,例如哺乳动物干细胞,诸如人干细胞或小鼠干细胞。优选地,细胞或干细胞易于

[0577] 修饰。优选地,细胞或干细胞,或源自此种干细胞的细胞,具有或被认为具有治疗价值,使得细胞或干细胞或源自或分化自此种干细胞的细胞可用于治疗需要治疗的受试者

的疾病、病症、缺陷或损伤。

[0578] 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,细胞分离自胚胎或新生儿组织。在一些实施方案中,细胞是成纤维细胞、单核细胞前体、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

[0579] 或自然杀伤细胞。在一些实施方案中,细胞被操纵(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

[0580] 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 $\beta$ 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、 $\beta$ 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、角质形成细胞干细胞、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)。

[0581] 在一些实施方案中,细胞是体细胞。在一些实施方案中,细胞源自皮肤或其他器官,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)。

[0582] 在一些实施方案中,细胞是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。在一些实施方案中,细胞是已从工程化iPSC分化的iPSC源性细胞。在一些实施方案中,细胞是来自原代细胞的已经过修饰的工程化细胞。在一些实施方案中,细胞包含增加的一种或多种致耐受性因子的表达。在一些实施方案中,一种或多种致耐受性因子是CD47。

[0583] 在一些实施方案中,细胞包含编码CD47的外源多核苷酸。在一些实施方案中,细胞包含CD46和CD59的增加的表达或过表达。在一些实施方案中,细胞包含编码CD46的外源多核苷酸和编码CD59的外源多核苷酸,诸如第II.B.1节中描述的任何外源多核苷酸。在一些

实施方案中,两种或更多种外源多核苷酸包含在多顺反子构建体中,诸如第II.B.4节中描述的任何多顺反子载体、构建体或载体。在一些实施方案中,细胞包含一种或多种补体抑制剂的过表达或增加的表达。

[0584] 在一些实施方案中,细胞是经工程化以含有本文所述的修饰(例如基因修饰)的iPSC源性T细胞。在一些实施方案中,细胞是经工程化以含有本文所述的修饰(例如基因修饰)的原代T细胞。在一些实施方案中,细胞相对于不包含修饰的相同类型的细胞包含增加的CD46和CD59的表达。在一些实施方案中,细胞包含一种或多种补体抑制剂的过表达或增加的表达。在一些实施方案中,T细胞可以用嵌合抗原受体(CAR)(包括如本文所述的任何嵌合抗原受体)工程化。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IV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。

[0585] 在一些实施方案中,细胞是经工程化以含有本文所述的修饰(例如基因修饰)的iPSC源性NK细胞。在一些实施方案中,细胞是经工程化以含有本文所述的修饰(例如基因修饰)的原代NK细胞。在一些实施方案中,细胞包含增加的CD46和CD59的表达。在一些实施方案中,细胞包含一种或多种补体抑制剂的过表达或增加的表达。在一些实施方案中,NK细胞可以用嵌合抗原受体(CAR)(包括如本文所述的任何嵌合抗原受体)工程化。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IV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。

[0586] 在一些实施方案中,细胞是经工程化以含有本文所述的修饰(例如基因修饰)的iPSC源性内皮胰岛细胞。在一些实施方案中,细胞是经工程化以含有本文所述的修饰(例如基因修饰)的原代 $\beta$ 胰岛细胞。在一些实施方案中,细胞包含增加的CD46和CD59的表达。在一些实施方案中,细胞包含一种或多种补体抑制剂的过表达或增加的表达。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IV节)所述的任何适应症。

[0587] 在一些实施方案中,细胞是经工程化以含有本文所述的修饰(例如基因修饰)的iPSC源性 $\beta$ 胰岛细胞。在一些实施方案中,细胞是经工程化以含有本文所述的修饰(例如基因修饰)的原代 $\beta$ 胰岛细胞。在一些实施方案中,细胞包含增加的CD46和CD59的表达。在一些实施方案中,细胞包含一种或多种补体抑制剂的过表达或增加的表达。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IV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。

[0588] 在一些实施方案中,细胞是经工程化以含有本文所述的修饰(例如基因修饰)的iPSC源性内皮细胞。在一些实施方案中,细胞是经工程化以含有本文所述的修饰(例如基因修饰)的原代内皮细胞。在一些实施方案中,细胞相对于不包含修饰的相同类型的细胞包含增加的CD46和CD59的表达。在一些实施方案中,细胞包含一种或多种CD46、CD59和CD55的过表达或增加的表达。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IV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化或眼部疾病。

[0589] 在一些实施方案中,细胞是经工程化以含有本文所述的修饰(例如基因修饰)的iPSC源性上皮细胞。在一些实施方案中,细胞是经工程化以含有本文所述的修饰(例如基因修饰)的原代上皮细胞。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,细胞相对于不包含修饰的相同类型的细胞包含增加的CD46和CD59的表达。在一些实施方案中,细胞还包含增加的CD55的表达。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。

[0590] 在一些实施方案中,细胞是经工程化以含有本文所述的修饰(例如基因修饰)的iPSC源性肝细胞。在一些实施方案中,细胞是经工程化以含有本文所述的修饰(例如基因修饰)的原代肝细胞。在一些实施方案中,细胞相对于不包含修饰的相同类型的细胞包含增加的CD46和CD59的表达。在一些实施方案中,细胞包含CD46、CD59和CD55的过表达或增加的表达。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脏疾病。

[0591] 在一些实施方案中,如本文所提供的经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疾患的受试者)的细胞。例如,如果从供体受试者分离或获得细胞 $\beta$ 胰岛细胞,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疾患,供体受试者是健康受试者。

#### [0592] 5.原代细胞

[0593] 在一些实施方案中,如本文所提供的经工程化的细胞包含源自从一个或多个单个的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,细胞源自分离的原代细胞库,所述分离的原代细胞获自一个或多个(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,将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,并根据所提供的方法进行工程化。

[0594] 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者受试者(例如,被施用细胞的患者)。可以从1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、50、100个或更多个供体受试者获得原代细胞并将其汇集在一起。可以从1个或更多个、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个或更多个或100个或更多个供体受试者获得原代细胞并将其汇集在一起。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对原代细胞或原代T细胞库进行工程化或修饰。

[0595] 在一些实施方案中,所述方法包括从单个的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、NKT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对细胞进行工程化。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、 $\beta$ 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对每个单个的供体的细胞进行工程化,以及汇集至少两个单个的样本的工程化(修饰的)细胞以获得一批原代细胞类型的工程化细胞。

[0596] 在一些实施方案中,原代细胞是从个体或原代细胞库分离或获得,所述原代细胞库是从多于一个单个的供体分离或获得。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、 $\beta$ 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,来自单个的供体或单个的供体的库的原代细胞经工程化以含有本文所述的修饰(例如基因修饰)。

[0597] 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、角质形成细胞干细胞、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)。

[0598] 6. 诱导性多能干细胞的产生

[0599] 在一些实施方案中,如本文所提供的经工程化的细胞是诱导性多能干细胞或者是源自诱导性多能干细胞或从诱导性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)的产生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产生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 *Cell* 126:663-676(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Lakshmiathy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,特别是用于产生hiPSC的方法(参见例如后一篇参考文献的第3章)。

[0600] 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产生,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。

[0601] 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。

[0602] 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SOKMNL;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。

[0603] 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)制成。在一些实施方案中,非多能细胞,诸如成纤维细胞,在对细胞重编程之前从一个或多个单个的受试者或供体获得或分离。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)库制成,所述非多能干细胞获自一个或多个(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,将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)分离或获得的非多能细胞(诸如成纤维细胞)汇集为一批,重编程为iPSC并根据所提供的方法进行工程化。

[0604] 在一些实施方案中,iPSC源自非多能细胞(例如成纤维细胞)库,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者受试者(例如,施用细胞的患者)的一个或多个供体受试者。可以从1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、50、100个或更多个供体受试者获得待诱导为iPSC的非多能细胞(例如成纤维细胞)并将其汇集在一起。可以从1个或更多个、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个或更多个或100个或更多个供体受试者获得非多能细胞(例如成纤维细胞)并将其汇集在一起。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,将非多能细胞(例如成纤维细胞)或非多能细胞(例如成纤维细胞)库在体外培养,并用一种或多种重编程因子转染以诱导iPSC的产生。在一些实施方案中,根据本文提供的方法对非多能细胞(例如成纤维细胞)或非多能细胞(例如成纤维细胞)库进行工程化或修饰。在一些实施方案中,工程化iPSC或工程化iPSC库随后经历分化过程以分化成生物体和组织的任何细胞。

[0605] 一旦产生了工程化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细胞应答,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细胞应答。使用FACS或Luminex来评估B细胞应答或抗体应答。另外或另选地,可测定细胞避免先天免疫应答(例如,NK细胞杀伤)的能力,如W02018132783的图14和图15中通常所示。

[0606] 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细胞群体(或增殖的T细胞群体)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。

[0607] 可以执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,植入的工程化iPSC或其分化细胞在小鼠模型中展现出长期存活。

[0608] 用于确定免疫原性(包括细胞的低免疫原性)的另外的技术描述于例如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、附图说明和方法描述的公开内容通过引用整体并入本文。

[0609] 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,如本文通常描述和在W02018132783的图29中所示。另外或另选地,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。

[0610] 一旦产生了工程化多能干细胞(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。另外,它们可以在培养基中处于维持多能性的条件下。

[0611] 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,用于随后移植到受者受试者中。可以如本领域已知的那样,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。下文描述了分化细胞的示例性类型及其产生方法。在一些实施方案中,iPSC可分化成本文所述的任何类型的细胞,包括第II.C.3节中描述的任何类型。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(诸如来自单个的供体或单个的供体的库的非多能细胞(例如成纤维细胞)),产生iPSC,其中iPSC随后经工程化以含有本文所述的修饰(例如基因修饰),然后分化成所需的细胞类型。

[0612] 7. 细胞类型

[0613] N.  $\beta$ 胰岛细胞

[0614] 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(也称为胰腺胰岛细胞或胰腺 $\beta$ 细胞)。在一些实施方案中,从一个或多个单个的供体受试者,诸如一个或多个单个的健康供体(例如,未知或未怀疑患有疾病或感染,例如未表现出疾病或感染的临床体征的受试者)分离或获得原代 $\beta$ 胰岛细胞。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。本文提供了含有本文所述的修饰(例如基因修饰)的工程化原代 $\beta$ 胰岛细胞,用于随后移植或植入到受试者(例如,受者)中。

[0615] 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,施用治疗细胞的受者)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。

[0616] 在一些实施方案中,如本文所提供的细胞是源自工程化iPSC的 $\beta$ 胰岛细胞,所述工程化iPSC含有本文所述的修饰(例如基因修饰)并且分化成 $\beta$ 胰岛细胞。如本领域技术人员将理解的,用于分化的方法取决于使用已知技术的所需细胞类型。在一些实施方案中,分化成各种 $\beta$ 胰岛细胞的细胞可用于随后移植或植入到受试者(例如,受者)中。在一些实施方案中,胰腺胰岛细胞源自本文所述的工程化多能细胞。可用于将多能干细胞分化成 $\beta$ 胰岛细胞的方法描述于例如美国专利第9,683,215号;美国专利第9,157,062号;美国专利第8,927,280号;美国专利公布第2021/0207099号;Hogrebe等人,“Targeting the cytoskeleton to direct pancreatic differentiation of human pluripotent stem cells,” Nat. Biotechnol., 2020, 38:460-470;以及Hogrebe等人,“Generation of insulin-producing pancreatic beta cells from multiple human stem cell lines,” Nat. Protoc., 2021中,所述文献的内容通过引用整体并入本文。

[0617] 在一些实施方案中,本文所述的工程化多能细胞分化成 $\beta$ 样细胞或胰岛类器官以用于移植以解决I型糖尿病(T1DM)。细胞系统是解决T1DM的有前景的方法,参见例如Ellis等人, Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2017年10月; 14(10):612-628,其通过引用并入本文。另外, Pagliuca等人 (Cell, 2014, 159(2):428-39) 关于从hiPSC中成功分化 $\beta$ 细胞的报告,其内容通过引用整体并入本文,特别是其中概述的用于从人多能干细胞大规模产生功能性人 $\beta$ 细胞的方法和试剂)。此外, Vegas等人显示了从人多能干细胞产生人 $\beta$ 细胞,然后进行封装以避免宿主的免疫排斥; Vegas等人, Nat Med, 2016, 22(3):306-11,其通过引用整体并入本文,特别是其中概述的用于从人多能干细胞大规模产生功能性人 $\beta$ 细胞的方法和试剂。

[0618] 在一些实施方案中,通过体外分化从工程化多能细胞群体产生工程化胰腺胰岛细胞群体的方法包括:(a) 在包含选自以下组成的组的一种或多种因子的第一培养基中培养工程化iPSC群体:胰岛素样生长因子、转化生长因子、FGF、EGF、HGF、SHH、VEGF、转化生长因子b超家族、BMP2、BMP7、GSK抑制剂、ALK抑制剂、BMP 1型受体抑制剂和视黄酸,以产生未成熟的胰腺胰岛细胞群体;以及(b) 在与第一培养基不同的第二培养基中培养未成熟的胰

腺胰岛细胞群体,以产生工程化胰腺胰岛细胞群体。在一些实施方案中,GSK抑制剂是CHIR-99021、其衍生物或其变体。在一些情况下,GSK抑制剂的浓度范围为约2mM至约10mM。在一些实施方案中,ALK抑制剂是SB-431542、其衍生物或其变体。在一些情况下,ALK抑制剂的浓度范围为约1pM至约10pM。在一些实施方案中,第一培养基和/或第二培养基不含动物血清。

[0619] 如本领域已知的那样,通常通过评价 $\beta$ 细胞相关或特异性标志物(包括但不限于胰岛素)的存在来测定分化。也可以在功能上测量分化,诸如测量葡萄糖代谢,一般参见Muraro等人,Cell Syst.2016年10月26日;3(4):385-394.e3,其特此通过引用整体并入,特别是其中概述的生物标志物。一旦产生 $\beta$ 细胞,就可以将其移植(作为细胞悬浮液或在本文讨论的凝胶基质内)到门静脉/肝脏、网膜、胃肠粘膜、骨髓、肌肉或皮下囊中。

[0620] 用于本技术的胰腺胰岛细胞(包括)的另外描述可见于W02020/018615,其公开内容通过引用整体并入本文。

[0621] 在一些实施方案中,工程化 $\beta$ 胰岛细胞(诸如从一个或多个单个的供体(例如健康供体)分离的原代 $\beta$ 胰岛细胞或从源自一个或多个单个的供体(例如健康供体)的iPSC分化的内皮细胞)群体维持在培养基中,在一些情况下在施用之前扩增。在某些实施方案中,工程化 $\beta$ 胰岛细胞群体在施用之前冷冻保存。

[0622] 示例性胰腺胰岛细胞类型包括但不限于胰腺胰岛祖细胞、未成熟胰腺胰岛细胞、成熟胰腺胰岛细胞等。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。

[0623] 在一些实施方案中,如本文所公开的工程化的胰腺胰岛细胞(诸如从一个或多个单个的供体(例如健康供体)分离的原代 $\beta$ 胰岛细胞或从源自一个或多个单个的供体(例如健康供体)的iPSC分化的 $\beta$ 胰岛细胞)分泌胰岛素。在一些实施方案中,胰腺胰岛细胞表现出内源胰腺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 $\beta$ 细胞标志物的表达。

[0624] 示例性 $\beta$ 细胞标志物或 $\beta$ 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)、激素原转换酶(PC 1/3)、Cdcpl、NeuroD、Ngn3、Nkx2.2、Nkx6.1、Nkx6.2、Pax4、Pax6、Ptfla、Is11、Sox9、Sox17和FoxA2。

[0625] 在一些实施方案中,胰腺胰岛细胞(诸如从一个或多个单个的供体(例如健康供体)分离的原代 $\beta$ 胰岛细胞或从源自一个或多个单个的供体(例如健康供体)的iPSC分化的 $\beta$ 胰岛细胞)响应于葡萄糖的增加而产生胰岛素。在各种实施方案中,胰腺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17pm至约25pm的直径。

[0626] 在一些实施方案中,本技术涉及工程化 $\beta$ 胰岛细胞,诸如从一个或多个单个的供体(例如健康供体)分离的原代 $\beta$ 胰岛细胞或从源自一个或多个单个的供体(例如健康供体)的iPSC分化的 $\beta$ 胰岛细胞,其过表达致耐受性因子(例如CD47),具有一种或多种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类人白细胞抗原和/或一种或多种MHC II类人白细胞抗原)的降低的表达或缺乏所述表达,并且具有CD46和CD59的增加的表达和/或过表达。在一些实施方案中, $\beta$ 胰岛细胞还表达一种或多种补体抑制剂。在某些实施方案中,工程化 $\beta$ 胰岛细胞过表达致耐受性因子(例如CD47),并且在B2M基因中具有基因组修饰,并且相对于不包含修饰的相同类型的细胞具有增加的CD46和CD59的表达。在一些实

实施方案中,β胰岛细胞还表达一种或多种补体抑制剂。在一些实施方案中,工程化β胰岛细胞过表达致耐受性因子(例如CD47),并且在CIITA基因中具有基因组修饰,并且相对于不包含修饰的相同类型的细胞具有增加的CD46和CD59的表达(例如,CD46和CD59的过表达)。在一些实施方案中,β胰岛细胞过表达致耐受性因子(例如CD47),并且具有破坏B2M和CIITA基因中的一者或多者的基因组修饰。

[0627] 在一些实施方案中,所提供的工程化β胰岛细胞逃避免疫识别。在一些实施方案中,本文所述的工程化β胰岛细胞(诸如从一个或多个单个的供体(例如健康供体)分离的原代β胰岛细胞或从源自一个或多个单个的供体(例如健康供体)的iPSC分化的β胰岛细胞)不活化患者(例如,施用后的受者)中的免疫应答。提供了通过向有需要的受试者(例如,受者)或患者施用本文所述的工程化β胰岛细胞群体来治疗疾病的方法。

[0628] 在一些实施方案中,所施用细胞的数量或剂量低于免疫原性细胞(例如相同或相似细胞类型或表型但不含有工程化细胞的修饰(例如基因修饰)的细胞群体,例如具有内源水平的一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子的表达且无CD47、CD46和CD59的增加的(例如,外源)表达的细胞群体)所需的剂量。

[0629] 0. 肝细胞

[0630] 在一些实施方案中,如本文所提供的经工程化或修饰的细胞是原代肝细胞。在一些实施方案中,从一个或多个单个的供体受试者,诸如一个或多个单个的健康供体(例如,未知或未怀疑患有疾病或感染,例如未表现出疾病或感染的临床体征的受试者)分离或获得原代肝细胞。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。本文提供了含有本文所述的修饰(例如基因修饰)的工程化原代肝细胞,用于随后移植或植入到受试者(例如,受者)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。

[0631] 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,施用治疗细胞的受者)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。

[0632] 在一些实施方案中,如本文所提供的细胞是从工程化iPSC分化的肝细胞,所述工程化iPSC含有本文所述的修饰(例如基因修饰)并且分化成肝细胞。如本领域技术人员将理解的,用于分化的方法取决于使用已知技术的所需细胞类型。在一些实施方案中,分化成肝细胞的细胞可用于随后移植或植入到受试者(例如,受者)中。在一些实施方案中,从多能干细胞分化的工程化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。

[0633] 在一些实施方案中,含有本文所述的修饰的工程化多能细胞分化成肝细胞。有许多技术可以用于使工程化多能细胞分化成肝细胞;参见例如Pettinato等人,doi:10.1038/spre32888、Snykers等人,Methods Mol Biol,2011 698:305-314、Si-Tayeb等人,Hepatology,2010,51:297-305和Asgari等人,Stem Cell Rev,2013,9(4):493-504,所有这

些文献都通过引用整体并入本文,特别是用于分化的方法和试剂。可以如本领域已知的那样,通常通过评价肝细胞相关和/或特异性标志物的存在来测定分化,所述标志物包括但不限于白蛋白、甲胎蛋白和纤维蛋白原。还可以在功能上(诸如氨的代谢、LDL储存和摄取、ICG摄取和释放以及糖原储存)测量分化。

[0634] 在一些实施方案中,工程化肝细胞(诸如从一个或多个单个的供体(例如健康供体)分离的原代肝细胞或从源自一个或多个单个的供体(例如健康供体)的iPSC分化的肝细胞)群体维持在培养基中,在一些情况下在施用之前扩增。在某些实施方案中,肝细胞群体在施用之前冷冻保存。

[0635] 在一些实施方案中,本技术涉及工程化肝细胞,诸如从一个或多个单个的供体(例如健康供体)分离的原代肝细胞或从源自一个或多个单个的供体(例如健康供体)的iPSC分化的肝细胞,其过表达致耐受性因子(例如CD47),并且具有一种或多种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类人白细胞抗原和/或一种或多种MHC II类人白细胞抗原)的降低的表达或缺乏所述表达,并且具有CD46和CD59的增加了的表达和/或过表达。在某些实施方案中,工程化肝细胞过表达致耐受性因子(例如CD47)、CD46和CD59,并且在B2M基因中具有基因组修饰。在一些实施方案中,肝细胞还包含CD55的增加了的表达和/或过表达。在一些实施方案中,工程化肝细胞过表达致耐受性因子(例如CD47)、CD46和CD59,并且在CIITA基因中具有基因组修饰。在一些实施方案中,工程化肝细胞具有CD46和CD59的增加了的表达和/或过表达。在一些实施方案中,工程化肝细胞过表达致耐受性因子(例如CD47),具有破坏以下基因中的一者或多者的基因组修饰:B2M和CIITA基因,并且具有CD46和CD59的增加了的表达和/或过表达。在一些实施方案中,肝细胞还包含CD55的增加了的表达和/或过表达。

[0636] 在一些实施方案中,所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(诸如从一个或多个单个的供体(例如健康供体)分离的原代肝细胞或从源自一个或多个单个的供体(例如健康供体)的iPSC分化的肝细胞)不活化患者(例如,施用后的受者)中的免疫应答。提供了通过向有需要的受试者(例如,受者)或患者施用本文所述的工程化肝细胞群体来治疗疾病的方法。

[0637] P.T细胞

[0638] 在一些实施方案中,如本文所提供的经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,从一个或多个单个的供体受试者,诸如一个或多个单个的健康供体(例如,未知或未怀疑患有疾病或感染,例如未表现出疾病或感染的临床体征的受试者)分离或获得原代T淋巴细胞。在一些情况下,T细胞是来自一个或多个个体的原代T细胞群体或亚群。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。本文提供了含有本文所述的修饰(例如基因修饰)的工程化原代T淋巴细胞,用于随后移植或植入到受试者(例如,受者)中。

[0639] 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,施用治疗细胞的受者)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。

[0640] 在一些实施方案中,如本文所提供的细胞是从工程化多能细胞分化的T淋巴细胞,所述工程化多能细胞含有本文所述的修饰(例如基因修饰)并且分化成T淋巴细胞。如本领域技术人员将理解的,用于分化的方法取决于使用已知技术的所需细胞类型。在一些实施方案中,分化成T淋巴细胞的细胞可用于随后移植或植入到受试者(例如,受者)中。

[0641] 用于从多能干细胞(例如,iPSC)产生T细胞的方法描述于例如Iriguchi等人,Nature Communications 12,430(2021);Themeli等人,Cell Stem Cell,16(4):357-366(2015);Themeli等人,Nature Biotechnology 31:928-933(2013)中。

[0642]  $\gamma$   $\delta$ 原代T细胞的非限制性实例包括CD3+T细胞、CD4+T细胞、CD8+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、记忆干细胞(Tsc)、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、肿瘤浸润淋巴细胞以及它们的组合的组。

[0643] 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、组织浸润淋巴细胞以及它们的组合。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。

[0644] 在一些实施方案中,本文所述的工程化T细胞(诸如从一个或多个单个的供体(例如健康供体)分离的原代T细胞或从源自一个或多个单个的供体(例如健康供体)的iPSC分化的T细胞)包含经工程化(例如,修饰)以表达嵌合抗原受体(包括但不限于本文所述的嵌合抗原受体)的T细胞。任何合适的CAR都可以包括在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,所述嵌合抗原受体特异性结合在以下细胞中的至少一者的表面上表达的目标抗原或表位: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、突变细胞以及它们的组合。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、组织或器官中调节目标生物学效应。对T细胞(包括原代T细胞)的可用修饰在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。

[0645] 在一些实施方案中,T细胞包括编码CAR的多核苷酸,其中将所述多核苷酸插入基因组基因座中。可以使用任何合适的方法将CAR插入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,将多核苷酸插入安全港基因座(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)中。在一些实施方案中,将多核苷酸插入B2M、CIITA、TRAC、TRBC、PD1或CTLA4基因中。

[0646] 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,诸如通过本文所述的基因编辑方法(例如,CRISPR/Cas系统),在细胞中将TRAC或TRBC基因座破坏或消除。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)插入破坏的TRAC或TRBC基因座中。

[0647] 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细胞包括降低的细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(CTLA4)的表达。在一些实施方案中,诸如通过本文所述的基因编辑方法(例如,CRISPR/Cas系统),在细胞中将CTLA-4基因座破坏或消除。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)插入破坏的CTLA-4基因座中。

[0648] 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细胞包括降低的程序性细胞死亡(PD1)的表达。在一些实施方案中,诸如通过本文所述的基因编辑方法(例如,CRISPR/Cas系统),在细胞中将PD1基因座破坏或消除。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细胞包括降低的CTLA4和PD1的表达。

[0649] 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细胞包括增强的PD-L1表达。在一些实施方案中,诸如通过本文所述的基因编辑方法(例如,CRISPR/Cas系统),在细胞中将PD-L1基因座破坏或消除。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)插入破坏的PD-L1基因座中。

[0650] 在一些实施方案中,本技术涉及工程化T细胞,诸如从一个或多个单个的供体(例如健康供体)分离的原代T细胞或从源自一个或多个单个的供体(例如健康供体)的iPSC分化的T细胞,其过表达致耐受性因子(例如CD47),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类人白细胞抗原和/或一种或多种MHC II类人白细胞抗原)的表达或缺乏所述表达,并且具有增加的CD46和CD59的表达。在一些实施方案中,工程化T细胞还包含CD55的增加了的表达(例如,过表达)。在某些实施方案中,工程化T细胞过表达致耐受性因子(例如CD47),并且在B2M基因中具有基因组修饰,并且具有增加的CD46和CD59的表达。在一些实施方案中,工程化T细胞还包含增加的CD55的表达。在一些实施方案中,工程化T细胞过表达致耐受性因子(例如CD47),并且在CIITA基因中具有基因组修饰,并且具有增加的CD46和CD59的表达。在一些实施方案中,工程化T细胞还表达一种或多种补体抑制剂。在一些实施方案中,工程化T细胞还经工程化以表达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细胞过表达致耐受性因子(例如CD47)和CAR并且具有破坏以下基因中的一者或多者的基因组修饰:B2M、CIITA、TRAC和TRBC基因,并且具有增加的CD46和CD59的表达。在一些实施方案中,工程化T细胞还包含编码CD55的外源多核苷酸。

[0651] 在一些实施方案中,所提供的工程化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(诸如从一个或多个单个的供体(例如健康供体)分离的原代T细胞或

从源自一个或多个单个的供体(例如健康供体)的iPSC分化的T细胞)不活化患者(例如,施用后的受者)中的免疫应答。提供了通过向有需要的受试者(例如,受者)或患者施用本文所述的工程化T细胞群体来治疗疾病的方法。

[0652] 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细胞急性成淋巴细胞白血病(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、急性髓淋巴细胞样白血病、多发性骨髓瘤、胃癌、胃腺癌、胰腺腺癌、成胶质细胞瘤、成神经细胞瘤、肺鳞状细胞癌、肝细胞癌和膀胱癌。

[0653] Q. 自然杀伤细胞

[0654] 在一些实施方案中,如本文所提供的经工程化或修饰的细胞是自然杀伤(NK)细胞。在一些实施方案中,从一个或多个单个的供体受试者,诸如一个或多个单个的健康供体(例如,未知或未怀疑患有疾病或感染,例如未表现出疾病或感染的临床体征的受试者)分离或获得NK细胞。在一些情况下,NK细胞是来自一个或多个个体的NK细胞群体或亚群。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。本文提供了含有本文所述的修饰(例如基因修饰)的工程化原代NK细胞,用于随后移植或植入到受试者(例如,受者)中。例如,通过将工程化NK细胞输注到受试者(例如受者,诸如患者)中,将工程化T细胞施用于受试者。

[0655] 在一些实施方案中,如本文所提供的细胞是从工程化多能细胞分化的NK细胞,所述工程化多能细胞含有本文所述的修饰(例如基因修饰)并且分化成NK细胞。如本领域技术人员将理解的,用于分化的方法取决于使用已知技术的所需细胞类型。在一些实施方案中,分化成NK细胞的细胞可用于随后施用于受试者(例如受者,诸如患者),例如通过将分化的NK细胞输注到受试者中。

[0656] 用于从多能干细胞(例如,iPSC)产生NK细胞的方法描述于例如美国专利第10626373号;Shankar等人Stem Cell Res Ther.2020;11:234;Euchner等人Frontiers in Immunology,2021;12,Article 640672.doi=10.3389/fimmu.2021.640672;

[0657] 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)NK细胞。在一些实施方案中,由NK细胞库产生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细胞的受者)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。

[0658] 在一些实施方案中,NK细胞(包括从一个或多个单个的供体(例如健康供体)分离的原代NK细胞或从源自一个或多个单个的供体(例如健康供体)的iPSC分化的NK细胞)表达CD56(例如CD56<sup>暗</sup>或CD56<sup>亮</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或一种或多种天然细胞毒性受体NKp46、NKp44、NKp30。例如,就原代NK细胞而言,在特定情况下可以通过消耗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)的样本)分离原代细胞。例如,可使

用其上附着有分别针对CD3、CD14和/或CD19的抗体的免疫磁珠来消耗细胞,从而产生富集的NK细胞群体。在其他情况下,可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)从为混合群体(例如PBMC)的起始来源分离原代NK细胞。

[0659] 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)可经历一个或多个扩增或活化步骤。在一些实施方案中,扩增可通过将NK细胞与饲养细胞(诸如可被照射或可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经工程化以表达膜结合的IL-21(mbIL-21)。在特定方面,APC另选地或另外地经工程化以表达IL-21、IL-15和/或IL-2。在特定实施方案中,在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将NK细胞工程化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天或在大约第2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12天进行。

[0660] 在一些实施方案中,本文所述的工程化NK细胞(诸如从一个或多个单个的供体(例如健康供体)分离的原代NK细胞)包含经工程化(例如,修饰)以表达嵌合抗原受体(包括但不限于本文所述的嵌合抗原受体)的NK细胞。任何合适的CAR都可以包括在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,所述嵌合抗原受体特异性结合在以下细胞中的至少一者的表面上表达的目标抗原或表位: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、突变细胞以及它们的组合。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、组织或器官中调节目标生物学效应。

[0661] 在一些实施方案中,NK细胞包括编码CAR的多核苷酸,其中将所述多核苷酸插入基因组基因座中。可以使用任何合适的方法将CAR插入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,将多核苷酸插入安全港基因座(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)中。

[0662] 在一些实施方案中,本技术涉及工程化NK细胞,诸如从一个或多个单个的供体(例如健康供体)分离的原代NK细胞或从源自一个或多个单个的供体(例如健康供体)的iPSC分化的NK细胞,其过表达致耐受性因子(例如CD47),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类人白细胞抗原和/或一种或多种MHC II类人白细胞抗原)的表达或缺乏所述表达,并且具有增加的CD46和CD59的表达。在一些实施方案中,工程化NK细胞还包含增加的CD55的表达。在某些实施方案中,工程化NK细胞过表达致耐受性因子(例如CD47),并且在B2M基因中具有基因组修饰,并且具有增加的CD46和CD59的表达。在一些实施方案中,工程化NK细胞过表达致耐受性因子(例如CD47),并且在CIITA基因中具有基因组修饰,并且具有增加的CD46和CD59的表达。在一些实施方案中,工程化NK细胞还经工程化以表达CAR。在一些实施方案中,工程化NK细胞还具有CD55的增加了的表达和/或过表达。

[0663] 在一些实施方案中,所提供的工程化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(诸如从一个或多个单个的供体(例如健康供体)分离的原代NK细胞)不活化患者(例如,施用后的受者)中的免疫应答。提供了通过向有需要的受试者(例如,受者)或患者施用本文所述的工程化NK细胞群体来治疗疾病的方法。

[0664] 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、急性髓样淋巴细胞样白血病、多发性骨髓瘤、胃癌、胃腺癌、胰腺腺癌、成胶质细胞瘤、成神经细胞瘤、肺鳞状细胞癌、肝细胞癌和膀胱癌。

[0665] R. 内皮细胞

[0666] 在一些实施方案中,如本文所提供的经工程化或修饰的细胞是原代内皮细胞。在一些实施方案中,从一个或多个单个的供体受试者,诸如一个或多个单个的健康供体(例如,未知或未怀疑患有疾病或感染,例如未表现出疾病或感染的临床体征的受试者)分离或获得原代内皮细胞。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。本文提供了含有本文所述的修饰(例如基因修饰)的工程化原代内皮细胞类型,用于随后移植或植入到受试者(例如,受者)中。

[0667] 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,施用治疗细胞的受者)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。

[0668] 在一些实施方案中,如本文所提供的细胞是从工程化iPSC分化的内皮细胞,所述工程化iPSC含有本文所述的修饰(例如基因修饰)并且分化成内皮细胞类型。如本领域技术人员将理解的,用于分化的方法取决于使用已知技术的所需细胞类型。在一些实施方案中,分化成各种内皮细胞类型的细胞可用于随后移植或植入到受试者(例如,受者)中。

[0669] 在一些实施方案中,本文所述的工程化多能细胞分化成内皮集落形成细胞(ECFC)以形成新血管,从而解决外周动脉疾病。分化内皮细胞的技术是已知的。参见例如Prasain等人,doi:10.1038/nbt.3048,其通过引用整体并入本文,特别是用于从人多能干细胞产生内皮细胞以及用于移植技术的方法和试剂。可以如本领域已知的那样,通常通过评价内皮细胞相关或特异性标志物的存在或通过功能上测量来测定分化。

[0670] 在一些实施方案中,通过体外分化从工程化多能细胞群体产生工程化内皮细胞群体的方法包括:(a)在包含GSK抑制剂的第一培养基中培养工程化iPSC细胞群体;(b)在包含VEGF和bFGF的第二培养基中培养工程化iPSC细胞群体以产生前内皮细胞群体;以及(c)在包含ROCK抑制剂和ALK抑制剂的第三培养基中培养前内皮细胞群体,以产生经工程化以含有本文所述的修饰的分化内皮细胞群体。

[0671] 在一些实施方案中,GSK抑制剂是CHIR-99021、其衍生物或其变体。在一些情况下,GSK抑制剂的浓度范围为约1mM至约10mM。在一些实施方案中,ROCK抑制剂是Y-27632、其衍

生物或其变体。在一些情况下,ROCK抑制剂的浓度范围为约1pM至约20pM。在一些实施方案中,ALK抑制剂是SB-431542、其衍生物或其变体。在一些情况下,ALK抑制剂的浓度范围为约0.5pM至约10pM。

[0672] 在一些实施方案中,第一培养基包含2pM至约10pM的CHIR-99021。在一些实施方案中,第二培养基包含50ng/ml VEGF和10ng/ml bFGF。在其他实施方案中,第二培养基还包含Y-27632和SB-431542。在各种实施方案中,第三培养基包含10pM Y-27632和1pM SB-431542。在某些实施方案中,第三培养基还包含VEGF和bFGF。在特定情况下,第一培养基和/或第二培养基不含胰岛素。

[0673] 本文提供的细胞可以在表面诸如合成表面上培养,以支持和/或促进多能细胞分化成内皮细胞。在一些实施方案中,所述表面包含聚合物材料,包括但不限于所选的一种或多种丙烯酸酯单体的均聚物或共聚物。丙烯酸酯单体和甲基丙烯酸酯单体的非限制性实例包括四(乙二醇)二丙烯酸酯、二甲基丙烯酸甘油酯、二甲基丙烯酸1,4-丁二醇、聚(乙二醇)二丙烯酸酯、二(乙二醇)二甲基丙烯酸酯、四(乙二醇)二甲基丙烯酸酯、1,6-己二醇丙氧基化物二丙烯酸酯、新戊二醇二丙烯酸酯、三羟甲基丙烷苯甲酸酯二丙烯酸酯、三羟甲基丙烷乙氧基化物(1EO/QH)甲基、三环[5.2.1.0<sup>2,6</sup>]癸烷二甲醇二丙烯酸酯、新戊二醇乙氧基化物二丙烯酸酯和三羟甲基丙烷三丙烯酸酯。丙烯酸酯按照本领域已知的方式合成或从商业供应商获得,诸如Polysciences, Inc.、Sigma Aldrich, Inc.和Sartomer, Inc。

[0674] 在一些实施方案中,内皮细胞可以接种到聚合物基质上。在一些情况下,聚合物基质是可生物降解的。合适的可生物降解的基质是本领域众所周知的并且包括胶原-GAG、胶原、纤维蛋白、PLA、PGA和PLA/PGA共聚物。另外的可生物降解的材料包括聚(酸酐)、聚(羧酸)、聚(原酸酯)、聚(富马酸丙酯)、聚(己内酯)、聚酰胺、聚氨基酸、聚缩醛、可生物降解的聚氰基丙烯酸酯、可生物降解的聚氨酯和多糖。

[0675] 也可以使用不可生物降解的聚合物。其他不可生物降解但生物相容的聚合物包括聚吡咯、聚苯胺、聚噻吩、聚苯乙烯、聚酯、不可生物降解的聚氨酯、聚脲、聚(乙烯乙酸乙烯酯)、聚丙烯、聚甲基丙烯酸酯、聚乙烯、聚碳酸酯和聚(环氧乙烷)。聚合物基质可以形成为任何形状,例如颗粒、海绵、管、球、线、卷绕线、毛细管网络、膜、纤维、网或片。聚合物基质可经修饰以包含天然或合成的细胞外基质材料和因子。

[0676] 聚合物材料可以分散在支撑材料的表面上。适用于培养细胞的可用支撑材料包括陶瓷物质、玻璃、塑料、聚合物或共聚物、其任何组合、或一种材料在另一种材料上的涂层。在一些情况下,玻璃包括钠钙玻璃、耐热玻璃、高硅氧玻璃、石英玻璃、硅或这些玻璃的衍生物等。

[0677] 在一些情况下,包括树枝状聚合物的塑料或聚合物包括聚(氯乙烯)、聚(乙烯醇)、聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚(乙酸乙烯酯-马来酸酐)、聚(二甲基硅氧烷)单甲基丙烯酸酯、环烯烃聚合物、氟碳聚合物、聚苯乙烯、聚丙烯、聚乙烯亚胺或这些的衍生物等。在一些情况下,共聚物包括聚(乙酸乙烯酯-共-马来酸酐)、聚(苯乙烯-共-马来酸酐)、聚(乙烯-共-丙烯酸)或这些的衍生物等。

[0678] 用于本文提供的方法中的内皮细胞及其分化的另外描述可见于W02020/018615,其公开内容通过引用整体并入本文。

[0679] 在一些实施方案中,工程化内皮细胞(诸如从一个或多个单个的供体(例如健康供

体)分离的原代内皮细胞或从源自一个或多个单个的供体(例如健康供体)的iPSC分化的内皮细胞)群体维持在培养基中,在一些情况下在施用之前扩增。在某些实施方案中,内皮细胞群体在施用之前冷冻保存。

[0680] 在一些实施方案中,本技术涉及工程化内皮细胞,诸如从一个或多个单个的供体(例如健康供体)分离的原代内皮细胞或从源自一个或多个单个的供体(例如健康供体)的iPSC分化的内皮细胞,其过表达致耐受性因子(例如CD47),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类人白细胞抗原和/或一种或多种MHC II类人白细胞抗原)的表达或缺乏所述表达,并且具有增加的CD46和CD59的表达。在一些实施方案中,内皮细胞还包含增加的CD55的表达。在某些实施方案中,工程化内皮细胞过表达致耐受性因子(例如CD47),在B2M基因中具有基因组修饰,并且具有增加的CD46和CD59的表达。在一些实施方案中,内皮细胞还包含增加的CD55的表达。在一些实施方案中,工程化内皮细胞过表达致耐受性因子(例如CD47),并且在CIITA基因中具有基因组修饰,并且具有增加的CD46和CD59的表达。在一些实施方案中,工程化内皮细胞过表达致耐受性因子(例如CD47),并且具有破坏以下基因中的一者或多者的基因组修饰:B2M、CIITA基因,并且具有增加的CD46和CD59的表达。在一些实施方案中,工程化内皮细胞还包含增加的CD55的表达。

[0681] 在一些实施方案中,所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(诸如从一个或多个单个的供体(例如健康供体)分离的原代内皮细胞或从源自一个或多个单个的供体(例如健康供体)的iPSC分化的内皮细胞)不活化患者(例如,施用后的受者)中的免疫应答。提供了通过向有需要的受试者(例如,受者)或患者施用本文所述的工程化内皮细胞群体来治疗疾病的方法。

[0682] 在一些实施方案中,工程化内皮细胞(诸如从一个或多个单个的供体(例如健康供体)分离的原代内皮细胞或从源自一个或多个单个的供体(例如健康供体)的iPSC分化的内皮细胞)施用于有需要的患者,例如人患者。工程化内皮细胞可以施用于患有疾病或疾患的患者,所述疾病或疾患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。

[0683] 例如,工程化内皮细胞可用于细胞疗法,用于修复缺血组织、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)。另外,内皮细胞可经进一步修饰以递送剂来靶向和治疗肿瘤。

[0684] 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化。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。

[0685] 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。

[0686] 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。

[0687] 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。

[0688] 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,和输液技术。

[0689] 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,可将细胞悬浮在凝胶基质中,以防止它们在固定时分散。

[0690] 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。

[0691] 本文概述的内皮细胞(诸如分离的原代内皮细胞或分化的内皮细胞)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(血管紧张素转换酶)(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)、LM02、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(冯威里氏因子)、ZO-1、内皮细胞选择性粘附分子(ESAM)、CD102、CD93、CD184、CD304和DLL4。

[0692] 在一些实施方案中,内皮细胞经进一步基因修饰以表达编码可用于治疗病症/疾患或改善所述病症/疾患的症状的目标蛋白质(诸如但不限于酶、激素、受体、配体或药物)的外源基因。用于基因修饰内皮细胞的标准方法描述于例如US5,674,722中。

[0693] 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,内皮细胞可经修饰以分泌胰岛素、凝血因子(例如,因子VIII或冯威里氏因子)、 $\alpha$ -1抗胰蛋白酶、腺苷脱氨酶、组织纤溶酶原活化剂、白介素(例如,IL-1、IL-2、IL-3)等。

[0694] 在某些实施方案中,可以按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物管腔内皮细胞衬里的程度或持续时间。

[0695] 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,从而达到目标解剖位置的预期效果。

[0696] 在其他实施方案中,内皮细胞经进一步基因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基因修饰以表达本文所述的任何一种选择性自杀基因,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。

[0697] 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或分化的内皮细胞施用于受者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、其他血管疾患或疾病。

[0698] S. 上皮细胞

[0699] 3) 视网膜色素上皮(RPE)细胞

[0700] 在一些实施方案中,如本文所提供的经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,从一个或多个单个的供体受试者,诸如一个或多个单个的健康供体(例如,未知或未怀疑患有疾病或感染,例如未表现出疾病或感染的临床体征的受试者)分离或获得原代RPE细胞。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。本文提供了含有本文所述的修饰(例如基因修饰)的工程化原代RPE细胞,用于随后移植或植入到受试者(例如,受者)中。

[0701] 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,施用治疗细胞的受者)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。

[0702] 在一些实施方案中,如本文所提供的细胞是从工程化iPSC分化的RPE细胞,所述工程化iPSC含有本文所述的修饰(例如基因修饰)并且分化成RPE细胞。如本领域技术人员将理解的,用于分化的方法取决于使用已知技术的所需细胞类型。在一些实施方案中,分化成RPE细胞的细胞可用于随后移植或植入到受试者(例如,受者)中。

[0703] 可用于将多能干细胞分化成RPE细胞的方法描述于例如US9,458,428和US9,850,463中,其公开内容通过引用整体并入本文,包括说明书。另外的用于从人诱导性多能干细胞产生RPE细胞的方法可见于例如Lamba等人,PNAS,2006,103(34):12769-12774;Mellough等人,Stem Cells,2012,30(4):673-686;Idelson等人,Cell Stem Cell,2009,5(4):396-408;Rowland等人,Journal of Cellular Physiology,2012,227(2):457-466、Buchholz等人,Stem Cells Trans Med,2013,2(5):384-393和da Cruz等人,Nat Biotech,2018,36:328-337。

[0704] 已经使用Kamao等人,Stem Cell Reports 2014:2:205-18(其特此通过引用整体并入,特别是其中概述的用于分化技术和试剂的方法和试剂)中概述的技术使人多能干细胞分化成RPE细胞;还可参见Mandai等人,N Engl J Med,2017,376:1038-1046,其内容对于用于产生RPE细胞片和移植到患者体内的技术整体并入。可以如本领域已知的那样,通常通过评价RPE相关和/或特异性标志物的存在或通过功能上测量来测定分化。参见例如Kamao等人,Stem Cell Reports,2014,2(2):205-18,其内容通过引用整体并入本文,特别是结果部分的第一段中概述的标志物。

[0705] 在一些实施方案中,通过体外分化从工程化多能细胞群体产生工程化视网膜色素上皮(RPE)细胞群体的方法包括:(a)在包含选自以下组成的组的任一种因子的第一培养基中培养工程化多能细胞群体:活化素A、bFGF、BMP4/7、DKK1、IGF1、noggin、BMP抑制剂、ALK抑制剂、ROCK抑制剂和VEGFR抑制剂,以产生前RPE细胞群体;以及(b)在与第一培养基不同的第二培养基中培养前RPE细胞群体,以产生工程化RPE细胞群体。在一些实施方案中,ALK抑制剂是SB-431542、其衍生物或其变体。在一些情况下,ALK抑制剂的浓度范围为约2mM至约10pM。在一些实施方案中,ROCK抑制剂是Y-27632、其衍生物或其变体。在一些情况下,ROCK抑制剂的浓度范围为约1pM至约10pM。在一些实施方案中,第一培养基和/或第二培养基不含动物血清。

[0706] 可以如本领域已知的那样,通常通过评价RPE相关和/或特异性标志物的存在或通过功能上测量来测定分化。参见例如Kamao等人,Stem Cell Reports,2014,2(2):205-18,其内容通过引用整体并入本文,特别是结果部分。

[0707] 用于本技术的RPE细胞(包括其分化方法)的另外描述可见于W02020/018615,其公开内容通过引用整体并入本文。

[0708] 在一些实施方案中,工程化RPE细胞(诸如从一个或多个单个的供体(例如健康供体)分离的原代RPE细胞或从源自一个或多个单个的供体(例如健康供体)的iPSC分化的RPE细胞)群体维持在培养基中,在一些情况下在施用之前扩增。在某些实施方案中,RPE细胞群体在施用之前冷冻保存。

[0709] 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。

[0710] 在一些实施方案中,RPE细胞(诸如从一个或多个单个的供体(例如健康供体)分离的原代RPE细胞或从源自一个或多个单个的供体(例如健康供体)的iPSC分化的RPE细胞)具有与天然RPE细胞相似或基本相似的基因表达谱。当在平面基底上生长至汇合时,此类RPE细胞可具有天然RPE细胞的多边形、平面片状形态。

[0711] 在一些实施方案中,本技术涉及工程化RPE细胞,诸如从一个或多个单个的供体(例如健康供体)分离的原代RPE细胞或从源自一个或多个单个的供体(例如健康供体)的iPSC分化的RPE细胞,其过表达致耐受性因子(例如CD47),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类人白细胞抗原和/或一种或多种MHC II类人白细胞抗原)的表达或缺乏所述表达,并且具有增加的CD46和CD59的表达。在一些实施方案中,RPE细胞还表达一种或多种补体抑制剂。在某些实施方案中,工程化RPE细胞过表达致耐受性因子(例如CD47),在B2M基因中具有基因组修饰,并且具有增加的CD46和CD59的表达。在一些实施方案中,RPE细胞还包含增加的CD55的表达。在一些实施方案中,工程化RPE细胞过表达致耐受性因子(例如CD47),并且在CIITA基因中具有基因组修饰,并且具有增加的CD46和CD59的表达。在一些实施方案中,RPE细胞还包含增加的CD55的表达。在一些实施方案中,工程化RPE细胞过表达致耐受性因子(例如CD47),并且具有破坏以下基因中的一者或多者的基因组修饰:B2M、CIITA,并且具有增加的CD46和CD59的表达。

[0712] 在一些实施方案中,所提供的工程化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(诸如从一个或多个单个的供体(例如健康供体)分离的原代RPE细胞或从源自一个或多个单个的供体(例如健康供体)的iPSC分化的RPE细胞)不活化患者(例如,施用后的受者)中的免疫应答。提供了通过向有需要的受试者(例如,受者)或患者施用本文所述的工程化RPE细胞群体来治疗疾病的方法。

[0713] 可将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,患者罹患视网膜脱离。

[0714] 对于治疗应用,根据所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。对于细胞组合物的药物配制物的一般原则,参见"Cell Therapy:Stem Cell Transplantation, Gene Therapy, and Cellular Immunotherapy,"Morstyn和Sheridan编辑,Cambridge University Press, 1996;和"Hematopoietic Stem Cell Therapy,"E.D.Ball、J.Lister和P.Law,Churchill Livingstone,2000。可以将细胞包装在适合分配或临床使用的装置或容器中。

[0715] 4) 甲状腺细胞

[0716] 在一些实施方案中,如本文所提供的经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,从一个或多个单个的供体受试者,诸如一个或多个单个的健康供体(例如,未知或未怀疑患有疾病或感染,例如未表现出疾病或感染的临床体征的受试者)分离或获得原代甲状腺细胞。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。本文提供了含有本文所述的修饰(例如基因修饰)的工程化原代

甲状腺细胞,用于随后移植或植入到受试者(例如,受者)中。

[0717] 在一些情况下,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,施用治疗细胞的受者)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。

[0718] 在一些实施方案中,如本文所提供的细胞是从工程化iPSC分化的甲状腺细胞,所述工程化iPSC含有本文所述的修饰(例如基因修饰)并且分化成甲状腺细胞。如本领域技术人员将理解的,用于分化的方法取决于使用已知技术的所需细胞类型。在一些实施方案中,分化成甲状腺细胞的细胞可用于随后移植或植入到受试者(例如,受者)中。

[0719] 在一些实施方案中,含有本文所述的修饰的工程化多能细胞分化成甲状腺祖细胞和甲状腺滤泡类器官,它们可以分泌甲状腺激素以解决自身免疫性甲状腺炎。分化甲状腺细胞的技术是本领域已知的。参见,例如Kurmann等人,Cell Stem Cell,2015年11月5日;17(5):527-42,其通过引用整体并入本文,特别是用于从人多能干细胞产生甲状腺细胞以及用于移植技术的方法和试剂。可以如本领域已知的那样,通常通过评价甲状腺细胞相关或特异性标志物的存在或通过功能上测量来测定分化。

[0720] 在一些实施方案中,工程化甲状腺细胞(诸如从一个或多个单个的供体(例如健康供体)分离的原代甲状腺细胞或从源自一个或多个单个的供体(例如健康供体)的iPSC分化的甲状腺细胞)群体维持在培养基中,在一些情况下在施用之前扩增。在某些实施方案中,甲状腺细胞群体在施用之前冷冻保存。

[0721] 在一些实施方案中,本技术涉及工程化甲状腺细胞,诸如从一个或多个单个的供体(例如健康供体)分离的原代甲状腺细胞或从源自一个或多个单个的供体(例如健康供体)的iPSC分化的甲状腺细胞,其过表达致耐受性因子(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类人白细胞抗原和/或一种或多种MHC II类人白细胞抗原)的表达或缺乏所述表达,并且具有增加的CD46和CD59的表达。在一些实施方案中,甲状腺细胞还表达一种或多种补体抑制剂。在某些实施方案中,工程化甲状腺细胞过表达致耐受性因子(例如CD47),并且在B2M基因中具有基因组修饰,并且具有增加的CD46和CD59的表达。在一些实施方案中,甲状腺细胞还表达一种或多种补体抑制剂。在一些实施方案中,工程化甲状腺细胞过表达致耐受性因子(例如CD47)、CD46和CD59,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性因子(例如CD47)、CD46和CD59,并且具有破坏B2M和CIITA基因中的一者或多者的基因组修饰。在一些实施方案中,甲状腺细胞经进一步修饰以增加CD55的表达。

[0722] 在一些实施方案中,所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(诸如从一个或多个单个的供体(例如健康供体)分离的原代甲状腺细胞或从源自一个或多个单个的供体(例如健康供体)的iPSC分化的 $\beta$ 胰岛细胞)不活化患者(例如,施用后的受者)中的免疫应答。提供了通过向有需要的受试者(例如,

受者)或患者施用本文所述的工程化内皮细胞群体来治疗疾病的方法。

[0723] T.心脏细胞

[0724] 本文提供了从HIP细胞分化的用于随后移植或植入到受试者(例如,受者)中的心脏细胞类型。如本领域技术人员将理解的,用于分化的方法取决于使用已知技术的所需细胞类型。示例性心脏细胞类型包括但不限于心肌细胞、结节心肌细胞、传导心肌细胞、工作心肌细胞、心肌细胞前体细胞、心肌祖细胞、心脏干细胞、心肌细胞、心房心脏干细胞、心室心脏干细胞、心外膜细胞、造血细胞、血管内皮细胞、心内膜内皮细胞、心脏瓣膜间质细胞、心脏起搏细胞等。

[0725] 在一些实施方案中,将本文所述的心脏细胞施用于受者受试者以治疗选自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、心肌缺血、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。

[0726] 因此,本文提供了用于治疗 and 预防有需要的受试者的心脏损伤或心脏疾病或病症的方法。本文所述的方法可用于治疗、改善、预防多种心脏疾病或其症状(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“心脏疾病”、“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)相关的疾患和/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。

[0727] 在一些实施方案中,心肌细胞前体包括能够产生包括成熟(末期)心肌细胞的子代的细胞。通常可以使用选自GATA-4、Nkx2.5和MEF-2转录因子家族的一种或多种标志物来鉴定心肌细胞前体细胞。在一些情况下,心肌细胞是指表达来自以下列表的一种或多种标志物(有时至少2、3、4或5种标志物)的未成熟心肌细胞或成熟心肌细胞:心肌肌钙蛋白I(cTnI)、心肌肌钙蛋白T(cTnT)、肌节肌球蛋白重链(MHC)、GATA-4、Nkx2.5、N-钙粘蛋白、 $\beta$ 2-肾上腺素受体、ANF、MEF-2转录因子家族、肌酸激酶MB(CK-MB)、肌红蛋白和心房利尿钠因子(ANF)。在一些实施方案中,心脏细胞表现出自发的周期性收缩活动。在一些情况下,当心脏细胞在具有适当Ca<sup>2+</sup>浓度和电解质平衡的合适组织培养环境中培养时,不必向培养基中添加任何另外成分就可以观察到细胞沿细胞的一个轴以周期性方式收缩,然后从收缩中释放。在一些实施方案中,心脏细胞是低免疫原性心脏细胞。

[0728] 在一些实施方案中,通过体外分化从低免疫原性多能(HIP)细胞群体产生低免疫原性心脏细胞群体的方法包括:(a)在包含GSK抑制剂的培养基中培养HIP细胞群体;(b)在包含WNT拮抗剂的培养基中培养HIP细胞群体以产生前心脏细胞群体;以及(c)在包含胰岛素的培养基中培养前心脏细胞群体以产生免疫低下心脏细胞群体。在一些实施方案中,GSK

抑制剂是CHIR-99021、其衍生物或其变体。在一些情况下,GSK抑制剂的浓度范围为约2mM至约10mM。在一些实施方案中,WNT拮抗剂是IWR1、其衍生物或其变体。在一些情况下,WNT拮抗剂的浓度范围为约2mM至约10mM。

[0729] 在一些实施方案中,低免疫原性心脏细胞群体与非心脏细胞分离。在一些实施方案中,在施用之前扩增分离的低免疫原性心脏细胞群体。在某些实施方案中,在施用之前扩增分离的低免疫原性心脏细胞群体并将其冷冻保存。

[0730] 用于将诱导性多能干细胞或多能干细胞分化成心脏细胞的其他可用方法描述于例如US2017/0152485;US2017/0058263;US2017/0002325;US2016/0362661;US2016/0068814;US9,062,289;US7,897,389;和US7,452,718中。另外的用于从诱导性多能干细胞或多能干细胞产生心脏细胞的方法描述于例如Xu等人,Stem Cells and Development, 2006,15(5):631-9,Burridge等人,Cell Stem Cell,2012,10:16-28和Chen等人,Stem Cell Res,2015,15(2):365-375中。

[0731] 在各种实施方案中,低免疫原性心脏细胞可以在包含以下的培养基中培养:BMP途径抑制剂、WNT信号传导活化剂、WNT信号传导抑制剂、WNT激动剂、WNT拮抗剂、Src抑制剂、EGFR抑制剂、PCK活化剂、细胞因子、生长因子、心肌剂、化合物等。

[0732] WNT信号传导活化剂包括但不限于CHIR99021。PCK活化剂包括但不限于PMA。WNT信号传导抑制剂包括但不限于选自KY02111、S03031(KY01-I)、S02031(KY02-I)和S03042(KY03-I)以及XAV939的化合物。Src抑制剂包括但不限于A419259。EGFR抑制剂包括但不限于AG1478。

[0733] 用于从iPSC产生心脏细胞的剂的非限制性实例包括活化素A、BMP4、Wnt3a、VEGF、可溶性卷曲蛋白、环孢菌素A、血管紧张素II、去氧肾上腺素、抗坏血酸、二甲基亚砷、5-氮杂-2'-脱氧胞苷等。

[0734] 本文提供的细胞可以在表面诸如合成表面上培养,以支持和/或促进低免疫原性多能细胞分化成心脏细胞。在一些实施方案中,所述表面包含聚合物材料,包括但不限于所选的一种或多种丙烯酸酯单体的均聚物或共聚物。丙烯酸酯单体和甲基丙烯酸酯单体的非限制性实例包括四(乙二醇)二丙烯酸酯、二甲基丙烯酸甘油酯、二甲基丙烯酸1,4-丁二醇、聚(乙二醇)二丙烯酸酯、二(乙二醇)二甲基丙烯酸酯、四(乙二醇)二甲基丙烯酸酯、1,6-己二醇丙氧基化物二丙烯酸酯、新戊二醇二丙烯酸酯、三羟甲基丙烷苯甲酸酯二丙烯酸酯、三羟甲基丙烷乙氧基化物(1E0/QH)甲基、三环[5.2.1.0<sup>2,6</sup>]癸烷二甲醇二丙烯酸酯、新戊二醇乙氧基化物二丙烯酸酯和三羟甲基丙烷三丙烯酸酯。丙烯酸酯按照本领域已知的方式合成或从商业供应商获得,诸如Polysciences, Inc.、Sigma Aldrich, Inc.和Sartomer, Inc。

[0735] 聚合物材料可以分散在支撑材料的表面上。适用于培养细胞的可用支撑材料包括陶瓷物质、玻璃、塑料、聚合物或共聚物、其任何组合、或一种材料在另一种材料上的涂层。在一些情况下,玻璃包括钠钙玻璃、耐热玻璃、高硅氧玻璃、石英玻璃、硅或这些玻璃的衍生物等。

[0736] 在一些情况下,包括树枝状聚合物的塑料或聚合物包括聚(氯乙烯)、聚(乙烯醇)、聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚(乙酸乙烯酯-马来酸酐)、聚(二甲基硅氧烷)单甲基丙烯酸酯、环烯炔聚合物、氟碳聚合物、聚苯乙烯、聚丙烯、聚乙烯亚胺或这些的衍生物等。在一些情况下,共聚物包括聚(乙酸乙烯酯-共-马来酸酐)、聚(苯乙烯-共-马来酸酐)、聚(乙烯-共-丙

烯酸)或这些的衍生物等。

[0737] 可以在心脏冷冻损伤的动物模型中评估如本文所述制备的心脏细胞的功效,所述心脏冷冻损伤导致55%的左心室壁组织在未经治疗的情况下变成疤痕组织(Li等人,Ann.Thorac.Surg.62:654,1996;Sakai等人,Ann.Thorac.Surg.8:2074,1999,Sakai等人,Thorac.Cardiovasc.Surg.118:715,1999)。成功的治疗可以减少疤痕面积,限制疤痕扩张,并改善心脏功能(通过收缩压、舒张压和发展压确定)。还可以使用左前降支的远端部分中的栓塞线圈来对心脏损伤进行建模(Watanabe等人,Cell Transplant.7:239,1998),并且可以通过组织学和心脏功能来评价治疗功效。

[0738] 在一些实施方案中,工程化心脏细胞(诸如从源自一个或多个单个的供体(例如健康供体)的iPSC分化的心脏细胞)群体维持在培养基中,在一些情况下在施用之前扩增。在某些实施方案中,心脏细胞群体在施用之前冷冻保存。

[0739] 在一些实施方案中,本技术涉及工程化心脏细胞,诸如从源自一个或多个单个的供体(例如健康供体)的iPSC分化的心脏细胞,其过表达致耐受性因子(例如CD47),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类人白细胞抗原和/或一种或多种MHC II类人白细胞抗原)的表达或缺乏所述表达,并且具有增加的CD46和CD59的表达。在一些实施方案中,心脏细胞还表达一种或多种补体抑制剂。在某些实施方案中,工程化心脏细胞过表达致耐受性因子(例如CD47),并且在B2M基因中具有基因组修饰,并且具有增加的CD46和CD59的表达。在一些实施方案中,心脏细胞还表达一种或多种补体抑制剂。在一些实施方案中,工程化心脏细胞过表达致耐受性因子(例如CD47),在CIITA基因中具有基因组修饰,并且具有增加的CD46和CD59的表达。在一些实施方案中,心脏细胞还表达一种或多种补体抑制剂。在一些实施方案中,工程化心脏细胞过表达致耐受性因子(例如CD47、CD46和CD59),并且具有破坏B2M和CIITA基因中的一者或多者的基因组修饰。在一些实施方案中,心脏细胞经进一步修饰以增加CD55的表达。

[0740] 在一些实施方案中,所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(诸如从源自一个或多个单个的供体(例如健康供体)的iPSC分化的心脏细胞)不活化患者(例如,施用后的受者)中的免疫应答。提供了通过向有需要的受试者(例如,受者)或患者施用本文所述的工程化心脏细胞群体来治疗疾病的方法。

[0741] 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。

[0742] 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。适用于联合疗法中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、血管紧张素转换酶(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。

[0743] 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。

#### [0744] U. 神经细胞

[0745] 本文提供了从所述的工程化多能细胞(例如iPSC)分化的可用于随后移植或植入到受者受试者中的不同神经细胞类型。如本领域技术人员将理解的,用于分化的方法取决于使用已知技术的所需细胞类型。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。

[0746] 在一些实施方案中,诱导性多能干细胞的分化通过将细胞暴露或接触已知产生特定细胞谱系的特定因子来进行,以便将其分化物靶向特定的、期望的谱系和/或目标细胞类型。在一些实施方案中,终末分化细胞表现出专门的表型特性或特征。在某些实施方案中,本文所述的干细胞分化成神经外胚层、神经元、神经内分泌、多巴胺能、胆碱能、血清素能(5-HT)、谷氨酸能、GABA能、肾上腺素能、去甲肾上腺素能、交感神经元、副交感神经元、交感周围神经元或神经胶质细胞群体。在一些情况下,神经胶质细胞群体包括小胶质(例如,变形、分支、活化的吞噬和活化的非吞噬)细胞群体或大胶质(中枢神经系统细胞:星形胶质细胞、少突胶质细胞、室管膜细胞和放射状胶质细胞;和周围神经系统细胞:雪旺氏细胞(Schwann cell)和卫星细胞)细胞群体,或任何前述细胞的前体和祖细胞。

[0747] 用于产生不同类型的神经细胞的方案描述于PCT申请号W02010144696;美国专利号:9,057,053;9,376,664;和10,233,422。用于分化低免疫原性多能细胞的方法的另外的描述可见于例如Deuse等人,Nature Biotechnology,2019,37,252-258和Han等人,Proc Natl Acad Sci USA,2019,116(21),10441-10446。以下参考文献中描述了用于确定神经细胞移植在神经系统病症或疾患的动物模型中的效果的方法:对于脊髓损伤,Curtis等人,Cell Stem Cell,2018,22,941-950;对于帕金森病(Parkinson's disease),Kikuchi等人,Nature,2017,548:592-596;对于ALS-Izrael等人,Stem Cell Research,2018,9(1):152和Izrael等人,IntechOpen,DOI:10.5772/intechopen.72862;对于癫痫,Upadhya等人,PNAS,2019,116(1):287-296。

[0748] 在一些实施方案中,工程化神经细胞(诸如从源自一个或多个单个的供体(例如健康供体)的iPSC分化的神经细胞)群体维持在培养基中,在一些情况下在施用之前扩增。在某些实施方案中,神经细胞群体在施用之前冷冻保存。

[0749] 在一些实施方案中,本技术涉及工程化神经细胞,诸如从源自一个或多个单个的供体(例如健康供体)的iPSC分化的神经细胞,其过表达致耐受性因子(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类人白细胞抗原和/或一种或多种MHC II类人白细胞抗原)的表达或缺乏所述表达,并且具有增加的CD46和CD59的表达。在一些实施方案中,神经细胞还表达一种或多种补体抑制剂。在某些实施方案中,工程化神经细胞过表达致耐受性因子(例如CD47),并且在B2M基因中具有基因组修饰,并且具有增加的CD46和CD59的表达。在一些实施方案中,神经细胞还表达一种或多种补体抑制剂。在一些实施方案中,工程化神经细胞过表达致耐受性因子(例如CD47),并且在CIITA基因中具有基因组修饰,并且具有增加的CD46和CD59的表达。在一些实施方案中,神经细胞还表达一种或多种补体抑制剂。在一些实施方案中,工程化神经细胞过表达致耐受性因子(例如CD47),并且具有破坏B2M和CIITA基因中的一者或多者的基因组修

饰。在一些实施方案中,工程化神经细胞还具有增加的CD46和CD59的表达。在一些实施方案中,工程化神经细胞还具有增加的CD55的表达。

[0750] 在一些实施方案中,所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(诸如从源自一个或多个单个的供体(例如健康供体)的iPSC分化的神经细胞)不活化患者(例如,施用后的受者)中的免疫应答。提供了通过向有需要的受试者(例如,受者)或患者施用本文所述的工程化神经细胞群体来治疗疾病的方法。

[0751] 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疾患、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、其他神经精神障碍。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。

[0752] 1) 脑内皮细胞

[0753] 在一些实施方案中,脑内皮细胞(EC)、其前体和祖细胞通过在包含促进EC或神经细胞产生的一种或多种因子的培养基中培养细胞来从表面上的多能干细胞(例如,诱导性多能干细胞)分化。在一些情况下,培养基包含以下一者或多者:CHIR-99021、VEGF、碱性FGF(bFGF)和Y-27632。在一些实施方案中,培养基包含被设计用于促进神经细胞的存活和功能性的补充物。

[0754] 在一些实施方案中,脑内皮细胞(EC)、其前体和祖细胞通过非条件或条件培养基中培养细胞来从表面上的多能干细胞分化。在一些情况下,培养基包含促进或促成分化的因子或小分子。在一些实施方案中,培养基包含选自由以下组成的组的一种或多种因子或小分子:VEGF、FGF、SDF-1、CHIR-99021、Y-27632、SB 431542及其任何组合。在一些实施方案中,用于分化的表面包含一种或多种细胞外基质蛋白。表面可以涂覆有一种或多种细胞外基质蛋白。可以使细胞在悬浮液中分化,然后将其放入凝胶基质形式(诸如基质胶、明胶或纤维蛋白/凝血酶形式)中以促进细胞存活。在一些情况下,如本领域已知的那样,通常通过评价细胞特异性标志物的存在来测定分化。

[0755] 在一些实施方案中,脑内皮细胞表达或分泌选自由CD31、VE钙粘蛋白及其组合组成的组的因子。在某些实施方案中,脑内皮细胞表达或分泌选自由以下组成的组的一种或多种因子:CD31、CD34、CD45、CD117(c-kit)、CD146、CXCR4、VEGF、SDF-1、PDGF、GLUT-1、PECAM-1、eNOS、封闭蛋白5、闭锁蛋白、ZO-1、p-糖蛋白、冯威里氏因子(von Willebrand factor)、VE-钙粘蛋白、低密度脂蛋白受体LDLR、低密度脂蛋白受体相关蛋白1LRP1、胰岛素受体INSR、瘦素受体LEPR、基底细胞粘附分子BCAM、转铁蛋白受体TFR1、晚期糖基化终产物特异性受体AGER、视黄醇摄取受体STRA6、大中性氨基酸转运蛋白小亚基1SLC7A5、兴奋性氨基酸转运蛋白3SLC1A1、钠偶联中性氨基酸转运蛋白5SLC38A5、溶质载体家族16成员1SLC16A1、ATP依赖性转位酶ABCB1、ATP-ABCC2结合盒转运蛋白ABCG2、多药耐药相关蛋白1ABCC1、小管多特异性有机阴离子转运蛋白1ABCC2、多药耐药相关蛋白4ABCC4和多药耐药相关蛋白5ABCC5。

[0756] 在一些实施方案中,脑EC的特征在于具有选自由以下组成的组的一种或多种特征:紧密连接的高表达、高电阻、低开窗、小血管周围空间、胰岛素和转铁蛋白受体的普遍存在以及高线粒体数量。

[0757] 在一些实施方案中,使用正选择策略来选择或纯化脑EC。在一些情况下,根据内皮细胞标志物诸如但不限于CD31对脑EC进行分选。换句话说,将CD31阳性脑EC分离出来。在一些实施方案中,使用负选择策略来选择或纯化脑EC。在一些实施方案中,通过选择表达多能性标志物(包括但不限于TRA-1-60和SSEA-1)的细胞来去除未分化或多能干细胞。

[0758] 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、少突胶质细胞和小神经胶质细胞施用于经历过脊髓损伤的患者。

[0759] 2) 多巴胺能神经元

[0760] 在一些实施方案中,本文所述的HIP细胞分化成多巴胺能神经元,包括神经元干细胞、神经元祖细胞、未成熟多巴胺能神经元和成熟多巴胺能神经元。

[0761] 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者或多者: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)。在某些情况下,术语“神经干细胞”包括沿着神经细胞途径部分分化并表达一种或多种神经标志物(包括例如巢蛋白)的多能细胞群体。神经干细胞可以分化成神经元或神经胶质细胞(例如,星形胶质细胞和少突胶质细胞)。术语“神经祖细胞”包括表达FOXA2和低水平 $\beta$ -微管蛋白但不表达酪氨酸羟化酶的培养细胞。在培养适当的因子诸如本文所述的那些时,此类神经祖细胞具有分化成多种神经元亚型;特别是多种多巴胺能神经元亚型的能力。

[0762] 在一些实施方案中,将源自HIP细胞的DA神经元施用于患者,例如人患者,以治疗神经变性疾病或疾患。在一些情况下,神经变性疾病或疾患选自帕金森病、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(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)的一种或多种症状。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。

[0763] 在一些实施方案中,DA神经元、其前体和祖细胞通过在包含一种或多种因子或添加剂的培养基中培养干细胞来从多能干细胞分化。促进DA神经元分化、生长、扩增、维持和/或成熟的可用因子和添加剂包括但不限于Wnt1、FGF2、FGF8、FGF8a、音猬因子(SHH)、脑源性神经营养因子(BDNF)、转化生长因子 $\alpha$ (TGF- $\alpha$ )、TGF- $\beta$ 、白介素1 $\beta$ 、神经胶质细胞系源性神经营养因子(GDNF)、GSK-3抑制剂(例如,CHIR-99021)、TGF- $\beta$ 抑制剂(例如,SB-431542)、B-27补充剂、dorsomorphin、purmorphamine、noggin、视黄酸、cAMP、抗坏血酸、neurturin、敲除血清替代物、N-乙酰半胱氨酸、c-kit配体、其修饰形式、其模拟物、其类似物、及其变体。在一些实施方案中,DA神经元在活化或抑制WNT途径、NOTCH途径、SHH途径、BMP途径、FGF途径等的一种或多种因子的存在下分化。分化方案及其详细描述提供于例如US9,968,637、US7,674,620、Kim等人,Nature,2002,418,50-56;Bjorklund等人,PNAS,2002,99(4),2344-2349;Grow等人,Stem Cells Transl Med.2016,5(9):1133-44和Cho等人,PNAS,2008,105:3392-3397,包括实施例、方法、附图和结果的详细描述的全部内容通过引用整体并入本文。

[0764] 在一些实施方案中,低免疫原性多巴胺能神经元群体是从非神经元细胞分离的。在一些实施方案中,在施用之前扩增分离的低免疫原性多巴胺能神经元群体。在某些实施方案中,在施用之前扩增分离的低免疫原性多巴胺能神经元群体并将其冷冻保存。

[0765] 为了表征和监测DA分化并评估DA表型,可以评价任何数量的分子和遗传标志物的表达。例如,遗传标志物的存在可以通过本领域技术人员已知的各种方法来确定。分子标志物的表达可以通过定量方法来确定,所述方法诸如但不限于基于qPCR的测定、免疫测定、免疫细胞化学测定、免疫印迹测定等。DA神经元的示例性标志物包括但不限于TH、b-微管蛋白、配对盒蛋白(Pax6)、胰岛素基因增强蛋白(Is11)、巢蛋白、二氨基联苯胺(DAB)、G蛋白活化的内向整流钾通道2(GIRK2)、微管相关蛋白2(MAP-2)、NURR1、多巴胺转运蛋白(DAT)、叉头盒蛋白A2(FOXA2)、FOX3、双皮质素和LIM同源盒转录因子1- $\beta$ (LMX1B)等。在一些实施方案中,DA神经元表达选自corin、FOXA2、TuJ1、NURR1及其任何组合的一种或多种标志物。

[0766] 在一些实施方案中,根据细胞电生理活性评估DA神经元。细胞的电生理学可以通过使用本领域技术人员已知的测定来评价。例如,全细胞和穿孔膜片钳、用于检测细胞电生理活性的测定、用于测量细胞动作电位大小和持续时间的测定、以及用于检测DA细胞的多巴胺产生的功能测定。

[0767] 在一些实施方案中,DA神经元分化的特征在于自发节律性动作电位和在注入去极化电流后具有尖峰频率适应的高频动作电位。在其他实施方案中,DA分化的特征在于多巴胺的产生。产生的多巴胺水平是通过测量动作电位达到其最大幅度一半(尖峰半最大宽度)时的宽度来计算的。

[0768] 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,将分化的DA细胞移植到大脑的黑质(特别是致密区域中或附近)、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。分化的DA细胞可以作为细胞悬浮液注射到目标区域中。或者,当包含在此种递送装置中时,可将分化的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。

[0769] DA神经元的递送可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,分化的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,从HIP细胞分化的DA神经元以药物组合物的形式提供。细胞组合物的治疗配制物的一般原则可见于Cell Therapy:Stem Cell Transplantation,Gene Therapy,and Cellular Immunotherapy,G.Morstyn和W.Sheridan编辑,Cambridge University Press,1996和Hematopoietic Stem Cell Therapy,E.Ball,J.Lister和P.Law,Churchill Livingstone,2000,其公开内容通过引用并入本文。

[0770] 对源自干细胞的神经元及其制备方法的可用描述可见于例如Kirkeby等人,Cell Rep,2012,1:703-714;Kriks等人,Nature,2011,480:547-551;Wang等人,Stem Cell Reports,2018,11(1):171-182;Lorenz Studer,“Chapter 8-Strategies for Bringing Stem Cell-Derived Dopamine Neurons to the clinic-The NYSTEM Trial”in Progress in Brain Research,2017,第230卷,第191-212页;Liu等人,Nat Protoc,2013,8:1670-

1679;Upadhyia等人,Curr Protoc Stem Cell Biol,38,2D.7.1-2D.7.47;美国公布申请第20160115448号和US8,252,586;US8,273,570;US9,487,752和US10,093,897,其内容通过引用整体并入本文。

[0771] 除了DA神经元以外,其他神经元细胞、其前体和祖细胞也可以通过在包含一种或多种因子或添加剂的培养基中培养细胞来从本文概述的HIP细胞分化。因子和添加剂的非限制性实例包括GDNF、BDNF、GM-CSF、B27、碱性FGF、碱性EGF、NGF、CNTF、SMAD抑制剂、Wnt拮抗剂、SHH信号传导活化剂及其任何组合。在一些实施方案中,SMAD抑制剂选自自由以下组成的组:SB431542、LDN-193189、Noggin PD169316、SB203580、LY364947、A77-01、A-83-01、BMP4、GW788388、GW6604、SB-505124、乐德木单抗(lerdelimumab)、美替木单抗(metelimumab)、GC-I008、AP-12009、AP-110I4、LY550410、LY580276、LY364947、LY2109761、SB-505124、E-616452(RepSox ALK抑制剂)、SD-208、SMI6、NPC-30345、K 26894、SB-203580、SD-093、活化素M108A、P144、可溶性TBR2-Fc、DMH-1、dorsomorphin二盐酸盐及其衍生物。在一些实施方案中,Wnt拮抗剂选自自由以下组成的组:XAV939、DKK1、DKK-2、DKK-3、DKK-4、SFRP-1、SFRP-2、SFRP-3、SFRP-4、SFRP-5、WIF-1、Soggy、IWP-2、IWR1、ICG-001、KY0211、Wnt-059、LGK974、IWP-L6及其衍生物。在一些实施方案中,SHH信号传导活化剂选自自由以下组成的组:平滑激动剂(SAG)、SAG类似物、SHH、C25-SHH、C24-SHH、purmorphamine、Hg-Ag和/或其衍生物。

[0772] 在一些实施方案中,神经元表达选自自由以下组成的组的一种或多种标志物:离子型谷氨酸受体NMDA型亚基1GRIN1、谷氨酸脱羧酶1GAD1、 $\gamma$ -氨基丁酸GABA、酪氨酸羟化酶TH、LIM同源盒转录因子1- $\alpha$ LMX1A、叉头盒蛋白01 FOXO1、叉头盒蛋白A2 FOXA2、叉头盒蛋白04 FOXO4、FOXG1、2',3'-环核苷酸3'-磷酸二酯酶CNP、髓磷脂碱性蛋白MBP、微管蛋白 $\beta$ 链3TUB3、微管蛋白 $\beta$ 链3NEUN、溶质载体家族1成员6SLC1A6、SST、PV、钙结合蛋白、RAX、LHX6、LHX8、DLX1、DLX2、DLX5、DLX6、SOX6、MAFB、NPAS1、ASCL1、SIX6、OLIG2、NKX2.1、NKX2.2、NKX6.2、VGLUT1、MAP2、CTIP2、SATB2、TBR1、DLX2、ASCL1、ChAT、NGFI-B、c-fos、CRF、RAX、POMC、下视丘分泌素、NADPH、NGF、Ach、VACHT、PAX6、EMX2p75、CORIN、TUJ1、NURR1和/或其任何组合。

### [0773] 3) 神经胶质细胞

[0774] 在一些实施方案中,所描述的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、神经胶质前体及其神经胶质祖细胞是通过将多能干细胞分化成治疗有效的神经胶质细胞等产生的。低免疫原性多能干细胞的分化产生低免疫原性神经细胞,诸如低免疫原性神经胶质细胞。

[0775] 在一些实施方案中,通过在包含选自自由以下组成的组的一种或多种剂的培养基中培养多能干细胞来产生神经胶质细胞、其前体和祖细胞:视黄酸、IL-34、M-CSF、FLT3配体、GM-CSF、CCL2、TGF $\beta$ 抑制剂、BMP信号传导抑制剂、SHH信号传导活化剂、FGF、血小板源性生长因子PDGF、PDGFR- $\alpha$ 、HGF、IGF1、noggin、SHH、dorsomorphin、noggin及其任何组合。在某些情况下,BMP信号传导抑制剂是LDN193189、SB431542或其组合。在一些实施方案中,神经胶质细胞表达NKX2.2、PAX6、SOX10、脑源性神经营养因子BDNF、中性粒细胞营养因子3NT-3、NT-4、EGF、睫状神经营养因子CNTF、神经生长因子NGF、FGF8、EGFR、OLIG1、OLIG2、髓磷脂碱性蛋白MBP、GAP-43、LNGFR、nestin、GFAP、CD11b、CD11c、CX3CR1、P2RY12、IBA-1、TMEM119、CD45及

其任何组合。示例性分化培养基可以包括可促进或能够产生本领域技术人员所认识的神经胶质细胞类型的任何特定因子和/或小分子。

[0776] 为了确定根据体外分化方案产生的细胞是否表现出神经胶质细胞的特性和特征,可将细胞移植到动物模型中。在一些实施方案中,将神经胶质细胞注射到免疫受损的小鼠,例如免疫受损的shiverer小鼠中。将神经胶质细胞施用于小鼠的大脑中,并在预先选择的时间后对植入的细胞进行评价。在一些情况下,通过使用免疫染色和成像方法来使大脑中的植入细胞可视化。在一些实施方案中,确定神经胶质细胞表达已知的神经胶质细胞生物标志物。

[0777] 可用于从干细胞产生神经胶质细胞、其前体和祖细胞的方法可见于例如US7,579,188;US7,595,194;US8,263,402;US8,206,699;US8,252,586;US9,193,951;US9,862,925;US8,227,247;US9,709,553;US2018/0187148;US2017/0198255;US2017/0183627;US2017/0182097;US2017/253856;US2018/0236004;W02017/172976;和W02018/093681。用于分化多能干细胞的方法描述于例如Kikuchi等人,Nature,2017,548,592-596;Kriks等人,Nature,2011,547-551;Doi等人,Stem Cell Reports,2014,2,337-50;Perrier等人,Proc Natl Acad Sci USA,2004,101,12543-12548;Chambers等人,Nat Biotechnol,2009,27,275-280;和Kirkeby等人,Cell Reports,2012,1,703-714。

[0778] 神经细胞移植对于脊髓损伤的功效可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系统疾病或疾患选择特定的动物模型。

[0779] 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、肌肉内、腹膜内、皮下、肌肉内、腹内、眼内、球后以及它们的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、脑部附近以及它们的组合来施用。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、脑尾状区以及它们的组合。

[0780] 用于本技术的包括多巴胺能神经元的神经细胞的另外的描述可见于W02020/018615,其公开内容通过引用整体并入本文。

[0781] V. 造血干细胞(HSC)

[0782] 在一些实施方案中,工程化细胞是造血干细胞。在一些情况下,造血干细胞是一种未成熟的细胞,可以发育成所有类型的血细胞,包括白细胞、红细胞和血小板。造血干细胞(HSC)存在于外周血和骨髓中。在一些情况下,从外周血或骨髓中分离造血干细胞。

[0783] 在一些实施方案中,施用工程化HSC或包含工程化HSC的群体以治疗造血系统疾病或病症。在一些实施方案中,造血系统疾病或病症是脊髓发育不良、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)、成人成淋巴细胞白血病、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 AIDS。

[0784] 在一些实施方案中,施用工程化HSC或包含工程化HSC的群体以治疗与白血病或骨髓瘤相关的细胞缺陷,或治疗白血病或骨髓瘤。

[0785] 在一些实施方案中,施用工程化HSC或包含工程化HSC的群体以治疗与自身免疫性疾病或疾患相关的细胞缺陷,或治疗自身免疫性疾病或疾患。在一些实施方案中,所述自身免疫性疾病或疾患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 (Behcet's 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、古德帕斯彻综合征 (goodpasture's syndrome)、格雷夫氏病 (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、肯诺克-肖林紫癜 (Henoch-Schonlein purpura)、妊娠疱疹、低丙种球蛋白血症、特发性炎症性脱髓鞘病、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、炎症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、穆-哈二氏病(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、奥德甲状腺炎(Orlthyroiditis)、回纹型风湿症、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、进行性炎症性神经病、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)。

#### [0786] 8. ABO型和Rh抗原表达

[0787] 根据人体内每个红细胞表面是否存在抗原(ABO血型),血液制品可分成不同的组。A、B、AB和A1抗原是通过红细胞糖蛋白上的寡糖序列来决定。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。

[0788] 恒河猴(Rhesus)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。

[0789] A、B、H和Rh抗原是血液、组织和细胞移植供体与受者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组个体编码ABO基因产物,具有产生(1,3)N-乙酰半乳糖氨基转移酶活性的特异性和B组个体具有产生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并且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。

[0790] 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,并且Rh阴性的个体携带RHD基因的缺失或破坏。

[0791] 在一些实施方案中,本文提供的细胞或细胞群体是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因子阴性细胞源自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因子阴性细胞经工程化以缺乏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,因ABO基因的有害变异或因插入ABO基因的外显子6 258delG变异),并且/或者RHD基因的表达因RHD基因的有害变异而部分或完全失活。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,并且/或者RHD基因的表达因RHD基因的有害变异而部分或完全失活。在一些实施方案中,工程化的ABO O型和/或Rh因子阴性细胞是使用基因编辑产生的,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,且B型细胞修饰成O型细胞。示例性工程化ABO O型Rh因子阴性细胞及其产生方法描述于W02021/146222中,其内容通过引用整体并入本文。

[0792] 在一些实施方案中,本文提供的包含增加的CD46和CD59的表达的细胞或细胞群体是ABO A型、ABO B型或ABO AB型,并且/或者本文提供的包含增加的CD46和CD59的表达的细胞或细胞群体是Rh因子阳性的。在一些实施方案中,可以将包含增加的CD46和CD59的表达的细胞施用于ABO和/或Rh因子不相容性受者患者,而不引发CDC反应。

[0793] 9. 性染色体

[0794] 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),并且受者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,供体是男性并且受者是男性。在一些实施方案中,供体是女性并且受者是女性。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。

[0795] D. 工程化细胞的示例性实施方案

[0796] 在一些实施方案中,细胞(例如,工程化 $\beta$ 胰岛细胞、肝细胞或在移植期间与血液接触的其他细胞类型)及其群体表现出增加的CD47的表达,具有增加的CD46和CD59的表达,以及降低的MHC I类复合物的一种或多种分子的表达。在一些实施方案中,细胞及其群体表现出增加的CD47的表达,增加的CD46和CD59的表达,以及降低的MHC I类和/或MHC II类复合物的一种或多种分子的表达。在一些实施方案中,工程化细胞表达一种或多种选自CD46、CD59、CD55以及它们的任何组合的外源补体抑制剂多肽。在一些实施方案中,工程化细胞表达外源CD46和外源CD59。在一些实施方案中,工程化细胞还包含外源CD55的表达。

[0797] 在一些实施方案中,细胞及其群体表现出增加的CD47的表达,增加的CD46和CD59的表达,以及降低的B2M的表达。在一些实施方案中,细胞及其群体表现出增加的CD47的表达,增加的CD46和CD59的表达,以及降低的CIITA的表达。在一些实施方案中,细胞及其群体表现出增加的CD47的表达,增加的CD46和CD59的表达,以及降低的NLRC5的表达。在一些实施方案中,细胞及其群体表现出增加的CD47的表达,增加的CD46和CD59的表达,以及降低的B2M和CIITA的一种或多种分子的表达。在一些实施方案中,细胞及其群体表现出增加的CD47的表达,增加的CD46和CD59的表达,以及降低的B2M和NLRC5的一种或多种分子的表达。本文所述的任何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: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,工程化细胞表达一种或多种选自CD46、CD59、CD55以及它们的任何组合的外源补体抑制剂多肽。

[0798] 在一些实施方案中,细胞及其群体表现出增加的CD47的表达,以及增加的CD46和CD59的表达,以及降低的MHC I类复合物的一种或多种分子的表达。在一些实施方案中,细胞及其群体表现出增加的CD47的表达,以及增加的CD46和CD59的表达,以及降低的MHC I类和MHC II类复合物的一种或多种分子的表达。在一些实施方案中,细胞及其群体表现出增加的CD47的表达,以及增加的CD46和CD59的表达,以及降低的B2M的表达。在一些实施方案中,细胞及其群体表现出增加的CD47的表达,以及增加的CD46和CD59的表达,以及降低的CIITA的表达。在一些实施方案中,细胞及其群体表现出增加的CD47的表达,以及增加的CD46和CD59的表达,以及降低的NLRC5的表达。在一些实施方案中,细胞及其群体表现出增加的CD47的表达,以及增加的CD46和CD59的表达,以及降低的B2M和CIITA的一种或多种分子的表达。在一些实施方案中,细胞及其群体表现出增加的CD47的表达,以及增加的CD46和CD59的表达,以及降低的B2M和NLRC5的一种或多种分子的表达。在一些实施方案中,细胞及其群体表现出增加的CD47的表达,以及增加的CD46和CD59的表达,以及降低的CIITA和NLRC5的一种或多种分子的表达。在一些实施方案中,细胞及其群体表现出增加的CD47的表达,以及增加的CD46和CD59的表达,以及降低的B2M、CIITA和NLRC5的一种或多种分子的表达。在一些实施方案中,细胞及其群体还表现出增加的CD55的表达。

[0799] 本领域技术人员将理解,基因、蛋白质或分子的表达水平(诸如增加或降低的表达)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,具有增加的蛋白质(例如,CD46、CD59、CD55、CD47或任何其他致耐受性因子)的表达的工程化细胞是指与未修饰的细胞相比具有更高水平的蛋白质的修饰的细胞。在一些实施方案中,具有增加的蛋白质(例如,CD46、CD59、CD55、CD47或任何其他致耐受性因子)的表达的工程化细胞是包含修饰的细胞(例如,工程化多能干细胞或内皮细胞),其中包含修饰的细胞与没有所述修饰的细胞(例如,没有修饰的干细胞可以包含其他修饰)相比具有更高水平的蛋白质。在一些实施方案中,具有降低的蛋白质(例如,B2M或CIITA)的表达的工程化细胞是包含修饰的细胞,其中包含修饰的细胞与没有所述修饰的细胞(例如,没有修饰的干细胞可以包含其他修饰)相比具有更低水平的蛋白质或RNA。在一些实施方案中,工程化细胞表达一种或多种选自CD46、CD59、CD55以及它们的任何组合的外源补体抑制剂多肽。

[0800] 在一个实施方案中,本文提供了工程化细胞,所述工程化细胞表达外源CD47多肽并且具有增加的一种或多种补体抑制剂的表达和降低的一种或多种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,细胞表达外源CD47多肽并且表达降低水平的B2M和CIITA多肽。在一些实施方案中,细胞表达外源CD47多肽并且具有B2M和/或CIITA基因的修饰。在一些情况下,修饰使B2M和CIITA基因失活。在一些实施方案中,工程化细胞表达一种或多种选自CD46、CD59、CD55以及它们的任何组合的外源补体抑制剂多肽。在一些实施方案中,工程化细胞表达外源CD46和外源CD59。

[0801] 本文所述的任何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:DUX4、CD24、CD27、CD46、CD55、CD59、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,工程化细胞表达一种或多种选自CD46、CD59、CD55以及它们的任何组合的外源补体抑制剂多肽。

[0802] E. 低免疫原性表型的测定

[0803] 在一些实施方案中,所提供的工程化细胞经修饰,使得它们在施用于患者(例如,受者受试者)时能够逃避免疫识别和应答。所述细胞可以逃避免疫细胞在体外和体内的杀伤。在一些实施方案中,细胞逃避巨噬细胞和NK细胞的杀伤。在一些实施方案中,细胞被免疫细胞或受试者的免疫系统忽略。换句话说,根据本文所述的方法施用的细胞不可被免疫系统的免疫细胞检测到。在一些实施方案中,细胞被遮蔽并因此避免免疫排斥。

[0804] 确定本文提供的工程化细胞是否逃避免疫识别的方法包括但不限于IFN- $\gamma$  Elispot测定、小神经胶质细胞杀伤测定、细胞植入动物模型、细胞因子释放测定、ELISA、使用生物发光成像或铬释放测定或Xcelligence分析进行的杀伤测定、混合淋巴细胞反应、免疫荧光分析等。

[0805] 在一些实施方案中,在补体依赖性细胞毒性(CDC)测定中评价细胞的免疫原性。可以通过在含有补体的血清存在下将细胞与靶向细胞表面表达的HLA非依赖性抗原的IgG或IgM抗体一起孵育并分析细胞杀伤在体外测定CDC。在一些实施方案中,可以通过将细胞与ABO血型不相容性血清一起孵育来测定CDC,其中细胞包含A抗原或B抗原,并且血清包含针对细胞的A抗原和/或B抗原的抗体。

[0806] 在一些实施方案中,一旦如本文所述修饰或产生了工程化细胞,就可以测定它们的低免疫原性。可以使用多种测定中的任一种来评估细胞是否具有低免疫原性或是否可以逃避免疫系统。示例性测定包括如W02016183041和W02018132783中描述的任何测定。在一些实施方案中,本文所述的工程化细胞在宿主中存活而不刺激宿主免疫应答,持续一周或更长时间(例如,一周、两周、一个月、两个月、三个月、6个月、一年、两年、三年、四年、五年或更长时间,例如持续细胞和/或其子代的寿命)。只要细胞在宿主中存活,细胞就会保持转基因的表达,并且/或者缺失或降低靶基因的表达。在一些方面,如果不再表达转基因并且/或者如果表达了靶基因,则工程化细胞可能会被宿主的免疫系统去除。在一些实施方案中,在将工程化细胞施用于受者之后,可以通过进一步表达编码允许细胞在体内被检测的蛋白质(例如,荧光蛋白(诸如GFP)、截短的受体或其他替代标志物或其他可检测标志物)来监测工程化细胞的存在或存活。

[0807] 将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,流式细胞术可用于测定特定生物标志物的表面表达。在一些实施方案中,将低免疫原性细胞按预期植入到预期组织部位(例如,低免疫原性细胞的成功植入)。在一些实施方案中,将低免疫原性细胞按需要植入到预期组织部位,诸如细胞缺陷部位。在一些实施方案中,以与不包含修饰的相同类型的细胞相同的方式将低免疫原性细胞植入到预期组织部位。

[0808] 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,在将低免疫原性细胞植入到预期组织部位之前测定其功能。在一些实施方案中,在将低免疫原性细胞植入到预期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的功能。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,诸如在细胞缺陷部位具有足够的功能,同时避免抗体介导的排斥。在一些实施方案中,工程化细胞以与相同类型的非工程化细胞相同的方式发挥功能。

#### [0809] 10. 补体依赖性细胞毒性

[0810] 在一些实施方案中,本文提供的工程化细胞逃避补体依赖性细胞毒性(CDC)。

[0811] 在一些实施方案中,可以根据本领域普通技术人员理解的标准方案在体外分析细胞对CDC的易感性。在一些实施方案中,可以如下在体外分析CDC:将包含补体系统组分的血清(例如,人血清)与由抗体(例如,IgG或IgM抗体)结合的靶细胞混合,然后测定细胞死亡。在一些实施方案中,可以通过在ABO不相容性或Rh因子不相容性血清存在下孵育细胞在体外分析细胞对CDC的易感性,所述血清包含补体系统组分和针对细胞的ABO A型、ABO B型和/或Rh因子抗原的抗体。

[0812] 常见的CDC测定经由在靶细胞上预载放射性化合物来确定细胞死亡。当细胞死亡时,放射性化合物会从细胞中释放出来。因此,抗体介导细胞死亡的功效由放射性水平决定。与放射性CDC测定不同,非放射性CDC测定通常通过荧光或发光测定来确定丰富的细胞组分(诸如GAPDH)的释放。在一些实施方案中,可以使用无标记平台诸如xCELLigence™(Agilent)来分析CDC造成的细胞杀伤。

#### [0813] III. 工程化细胞群体和药物组合物

[0814] 本文提供了含有多个所提供的工程化细胞的细胞群体。在一些情况下,细胞群体包含细胞的混合物。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,细胞群体包含一种或多种不同的细胞类型。

[0815] 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β细胞、胰腺α细胞和胰腺γ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,从诱导性多能干细胞、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、多能干细胞(PSC)和多潜能干细胞分化的细胞)。

[0816] 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%的细胞包含本文所述的一组修饰。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%的细胞包含一组降低一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子的表达、增加一种或多种致耐受性因子的表达以及增加一种或多种补体抑制剂的表达的修饰。在一些实施方案中,一种或多种致耐受性因子是以下一项或多项:DUX4、B2M-HLA-E、CD16、CD52、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、SERPINB9、CD35、IL-39、CD16 Fc受体、IL15-RF和H2-M3,或它们的任何组合。在一些实施方案中,一种或多种致耐受性因子是CD47。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CD46的外源性多核苷酸。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CD59的外源性多核苷酸。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CD55的外源性多核苷酸。

[0817] 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CIITA基因的两个等位基因失活的改变。

[0818] 本文还提供了包含工程化细胞或工程化细胞群体的组合物。在一些实施方案中,组合物是药物组合物。

[0819] 在一些实施方案中,本文提供的药物组合物还包括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者是无毒的,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、明胶或免疫球蛋白等;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<sup>TM</sup>)、泊洛沙姆(PLURONICS<sup>TM</sup>)或聚乙二醇(PEG)。在一些实施方案中,药物组合物包括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、维持或保存例如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、或组合物的渗透。在一些方面,技术人员理解含有细胞的药物组合物可不同于含有蛋白质的药物组合物。

[0820] 术语“药物配制物”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配制物的受试者具有不可接受的毒性的另外的组分。

[0821] “药学上可接受的载剂”是指对受试者无毒的药物配制物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:缓冲液、赋形剂、稳定剂或防腐剂。

[0822] 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疾患的量(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。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疾患的量(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。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,根据疾患,重复治疗,直到出现对疾病症状的期望抑制。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快速施用、组合物的多次快速施用或组合物的连续输注施用来递送所需剂量。

[0823] 在一些实施方案中,使用标准施用技术、配制物和/或装置来施用如本文所述的工程化细胞。在一些实施方案中,使用标准施用技术、配制物和/或装置来施用如本文所述的工程化细胞。提供了用于储存和施用组合物的配制物和装置,诸如注射器和小瓶。工程化细胞可以经由局部注射施用,包括导管施用、全身注射、局部注射、静脉内注射或肠胃外施用。当施用治疗组合物(例如,含有工程化细胞的药物组合物)时,通常将其配制为单位剂量可注射形式(溶液、悬浮液、乳液)。

[0824] 配制物包括用于静脉内、腹膜内或皮下施用的配制物。在一些实施方案中,细胞群体是肠胃外施用的。如本文所用,术语“肠胃外”包括静脉内、肌肉内、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全身递送将细胞群体施用于受试者。

[0825] 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)以及它们的合适混合物的溶剂或分散介质。无菌注射溶液可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。

[0826] 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、抗细菌剂和抗真菌剂、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。补充性有效化合物也可并入组合物中。药物载剂应该是适用于工程化细胞的药物载剂,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。

[0827] 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性。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。

[0828] 本文还提供了适用于冷冻保存所提供的工程化细胞的组合物。在一些实施方案中,将所提供的工程化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(v/v)。在一些实施方案中,冷冻保存介质为5% DMSO(v/v)或为约5% DMSO(v/v)。在一些实施方案中,冷冻保存介质为6% DMSO(v/v)或为约6% DMSO(v/v)。在一些实施方案中,冷冻保存介质为7% DMSO(v/v)或为约7% DMSO(v/v)。在一些实施方案中,冷冻保存介质为7.5% DMSO(v/v)或为约7.5% DMSO(v/v)。在一些实施方案中,冷冻保存介质为8% DMSO(v/v)或为约8% DMSO(v/v)。在一些实施方案中,冷冻保存介质为9% DMSO(v/v)或为约9% DMSO(v/v)。在一些实施方案中,冷冻保存介质为10% DMSO(v/v)或为约10% DMSO(v/v)。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(诸如超低温)下储存,例如在-40°C至-150°C的温度范围(诸如或约-80°C±6.0°C)下储存。

[0829] 在一些实施方案中,药物组合物包含本文所述的工程化细胞和药学上可接受的载剂,所述载剂包含31.25%(v/v) Plasma-Lyte A、31.25%(v/v)的5%右旋糖/0.45%氯化钠、10%葡聚糖40(LMD)/5%右旋糖、20%(v/v)的25%人血清白蛋白(HSA)和7.5%(v/v)二甲基亚砜(DMSO)。

[0830] 在一些实施方案中,冷冻保存的工程化细胞通过解冻制备用于施用。在一些情况下,工程化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,工程化细胞在解冻后进一步加工(诸如通过与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。

[0831] IV. 药盒、组分和制品

[0832] 在一些方面,本文提供了本文所述的方法、装置和系统的药盒、组分和组合物(诸如消耗品)。在一些实施方案中,药盒包括根据本文公开内容使用的说明书。

[0833] 在一些实施方案中,本文提供了一种包含本文所述的工程化细胞群体的药盒。在一些实施方案中,本文提供了一种药盒,所述药盒包含:(a)包含多个工程化细胞的细胞群体,其中所述工程化细胞包含如下修饰:(i)增加CD47、CD46和CD59的表达,以及(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类人白细胞抗原和/或一种或多种MHC II类人白细胞抗原)的表达,其中(i)的增加的表达和(ii)的降低的表达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,本文提供了一种药盒或组合,所述药盒或组合包含:包含多个工程化细胞的细胞群体,其中所述工程化细胞包含如下修饰:(i)增加CD46、CD59和CD55的表达;(ii)增加CD47的表达;以及(iii)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类人白细胞抗原和/或一种或多种MHC II类人白细胞抗原)的表达,其中(i)和(ii)的增加

的表达以及 (iii) 的降低的表达是相对于不包含修饰的相同细胞类型的细胞而言的。

[0834] 在一些实施方案中,本文提供了一种药盒,所述药盒包含一组工程化细胞群体,其中第一工程化细胞群体包含本文所述的低免疫原性修饰的基本组并且不包含增加的CD46和CD47的表达,并且第二工程化细胞群体包含低免疫原性修饰基本组以及增加CD46和CD59的表达的修饰,其中药盒还包含用于基于ABO血型不相容性或Rh因子不相容性选择第一细胞群体或第二细胞群体以施用于患者的说明书。在一些实施方案中,说明书根据第V.C节中的描述来提供。

[0835] 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)、血管疾患或疾病、自身免疫性甲状腺炎、肝脏疾病(例如,肝硬化)、角膜疾病(例如,福克斯营养不良(Fuchs dystrophy)或先天性遗传性内皮营养不良)、肾脏疾病和癌症(例如,B细胞急性成淋巴细胞白血病(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、急性髓样淋巴细胞白血病、多发性骨髓瘤、胃癌、胃腺癌、胰腺腺癌、成胶质细胞瘤、成神经细胞瘤、肺鳞状细胞癌、肝细胞癌和膀胱癌)。该制品可以包括容器和在所述容器上或与所述容器相关联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或具有可被皮下注射针刺穿的塞子的小瓶)。

[0836] 在一些方面,本文提供的药盒或制品包含工程化细胞(诸如本文提供的任何工程化细胞(例如,多能细胞、分化细胞或原代细胞))群体。在一些实施方案中,药盒或制品包含组合物,所述组合物包含工程化细胞群体,其中所述工程化细胞包含:(i)包含编码CD47的外源多核苷酸的转基因,(ii),和(iii)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 $\beta$ 细胞还包含CIITA基因的两个等位基因的失活或破坏。

[0837] 标签或包装说明书指示该组合物用于治疗特定疾患。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,制品包括组合治疗。

[0838] 制品和/或药盒还可以包括包装说明书。说明书是指通常在治疗产品的商业包装中包括的说明,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。

#### [0839] V. 治疗方法

[0840] 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体,用于治疗受试者的疾病或疾患。本文提供了一种通过施用本文所述的工程化细胞群体来治疗患者的方法。在一些实施方案中,细胞群体被配制用于在药物组合物(诸如本文所述的任何药物组合物)中施用。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群体或含有其的组合物施用于患有疾病、疾患或病症的受试者。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,以及在制备药物以实施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疾患或病症。

[0841] 本文提供的工程化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细胞的治疗效果的疾病或疾患的任何患者。在一些实施方案中,患者是所施用的细胞的同种异体受者。在一些实施方案中,所提供的工程化细胞有效用于同种异体细胞疗法中。受益于本文提供的主题工程化细胞的治疗效果的候选者表现出疾病或疾患的消除、减轻或改善。

[0842] 在一些实施方案中,如本文所提供的工程化细胞(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、自身免疫性病症、神经系统病症等。

[0843] 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体的功能障碍或丧失的任何疾病或疾患,其中患者不能自然替换或再生细胞群体。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)、心血管疾患和疾病、血管疾患和疾病、角膜疾患和疾病、肝脏疾患和疾病、甲状腺疾患和疾病以及肾脏疾患和疾病。在一些实施方案中,施用工程化细胞的患者患有癌症。可以通过本文提供的工程化细胞治疗的示例性癌症包括但不限于B细胞急性成淋巴细胞白血病(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、急性髓样淋巴细胞样白血病、多发性骨髓瘤、胃癌、胃腺癌、胰腺腺癌、成胶质细胞瘤、成神经细胞瘤、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。

[0844] 在一些实施方案中,本文提供了一种向有需要的患者施用工程化细胞群体的方法,其中所述工程化细胞在施用期间或之后与血液接触,并且其中工程化细胞包含防止或减弱在工程化细胞与血液接触时出现IBMIR的修饰。在一些实施方案中,工程化细胞经静脉内施用或经由肌肉注射施用。在一些实施方案中,工程化细胞过表达致耐受性因子(例如CD47),具有降低的一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子的表达或缺乏所述表达,并且具有增加的CD46和CD59的表达。在一些实施方案中,工程化细胞是 $\beta$ 胰岛细胞或肝细胞。在一些实施方案中,工程化细胞还包含一种或多种补体抑制剂的过表达。

[0845] 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,工程化细胞群体是胰岛细胞(包括 $\beta$ 胰岛细胞)群体。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 $\beta$ 胰岛细胞群体的组合物,其中所述工程化细胞包含:(i)包含编码CD47的外源多核苷酸、编码CD46的外源多核苷酸和编码CD55的外源多核苷酸的多顺反子载体,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,所述方法包括向患者施用包含工程化 $\beta$ 胰岛细胞群体的组合物,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。在一些实施方案中,工程化 $\beta$ 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,包含编码CD47的多核苷酸的转基因是转基因是多顺反子载体,并且所述转基因还包含编码CD46的外源多核苷酸和编码CD59的外源多核苷酸。在其他实施方案中, $\beta$ 胰岛细胞还包含单独的多顺反子载体,其中所述多顺反子载体包含编码CD46的外源多核苷酸和编码CD59的外源多核苷酸。

[0846] 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,细胞群体是肝细胞或肝祖细胞群体。在一些实施方案中,所述方法包括向患者施用包含工程化肝细胞群体的组合物,其中所述工程化肝细胞包含:(i) 包含编码CD47的外源多核苷酸的转基因,(ii) 增加的CD46和CD59的表达,和(iii) B2M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肝细胞群体的组合物,其中所述工程化肝细胞包含:(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,包含编码CD47的多核苷酸的转基因是转基因是多顺反子载体,并且所述转基因还包含编码CD46的外源多核苷酸和编码CD59的外源多核苷酸。在其他实施方案中,肝细胞还包含单独的多顺反子载体,其中所述多顺反子载体包含编码CD46的外源多核苷酸和编码CD59的外源多核苷酸。

[0847] 在一些实施方案中,本文提供的工程化细胞或含有其的组合可用于治疗被先前的移植物(例如像细胞移植物、输血、组织移植物或器官移植物)中存在的一种或多种抗原致敏的患者。在某些实施方案中,先前的移植物是同种异体移植物,并且患者对来自同种异体移植物的一种或多种同种异体抗原敏感。同种异体移植物包括但不限于同种异体细胞移植物、同种异体输血、同种异体组织移植物或同种异体器官移植物。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,患者被先前的移植物中包含的一种或多种抗原致敏,其中先前的移植物是修饰的人细胞、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,先前的移植物是非人细胞、组织或器官。在示例性实施方案中,先前的移植物是修饰的非人细胞、组织或器官。在某些实施方案中,先前的移植物是包含人组分的嵌合体。在某些实施方案中,先前的移植物是CAR T细胞。在某些实施方案中,先前的移植物是自体移植物,并且患者对来自自体移植物的一种或多种自体抗原敏感。在某些实施方案中,先前的移植物是自体细胞、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。

[0848] 在一些实施方案中,经历使用所提供的工程化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,工程化细胞或含有其的组合用于治疗与先前的治疗相同的疾患。在某些实施方案中,工程化细胞或含有其的组合用于治疗与先前的治疗不同的疾患。在一些实施方案中,施用于患者的工程化细胞或含有其的组合对于治疗通过先前的治疗所治疗的相同疾患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,所施用的工程化细胞或含有其的组合对于治疗患者的疾患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,所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,工程化细胞是用于治疗癌症的CAR T细胞。

[0849] 本文提供的方法可以用作一线治疗失败后特定疾患或疾病的二线治疗。在一些实施方案中,先前的治疗是治疗上无效的治疗。如本文所用,“治疗上无效”的治疗是指在患者中产生低于期望的临床结果的治疗。例如,就细胞缺陷的治疗而言,治疗上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,治疗上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应答。在一些实施方案中,先前的治疗是被患者排斥的细胞、组织或器官植入物。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应答。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体,如果治疗细胞以不希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,患者产生免疫应答。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细胞致敏。

[0850] 在一些实施方案中,所提供的工程化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物之前施用。在特定实施方案中,患者不表现出对工程化细胞的免疫应答。在某些实施方案中,将工程化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物。在此类实施方案中,工程化细胞治疗作为最终组织或器官替换的过渡疗法发挥作用。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物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特定组织或器官的组织或器官移植物。例如,在一些实施方案中,患者是在接受肾移植物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,组织或器官移植物是心脏移植物、肺移植物、肾移植物、肝移植物、胰腺移植物、肠移植物、胃移植物、角膜移植物、骨髓移植物、血管移植物、心脏瓣膜移植物或骨移植物。

[0851] 治疗患者的方法通常是通过施用如本文所提供的工程化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所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位置,在所述位置中,植入的细胞或细胞组分中的至少一部分保持存活。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、疾患或其症状。

[0852] 在一些实施方案中,在患者致敏后施用工程化细胞群体或含有其的组合物,持续至少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,施用工程化细胞群体或含有其的组合物,持续至少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周或更长时间)或更久。在一些实施方案中,在患者已经接受移植物(例如,同种异体移植物)、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,施用工程化细胞群体或含有其的组合物,持续至少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。

[0853] 在一些实施方案中,向已经接受移植物、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,所述给药方案包括本文所述的工程化细胞群体的第一剂量施用、第一剂量后的恢复期,以及所述工程化细胞群体的第二剂量施用。在一些实施方案中,存在于第一细胞群体和第二细胞群体中的细胞类型的复合物是不同的。在某些实施方案中,存在于第一工程化细胞群体和第二工程化细胞群体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,第一工程化细胞群体和第二工程化细胞群体包含相同的细胞类型。在一些实施方案中,第一工程化细胞群体和第二工程化细胞群体包含不同的细胞类型。在一些实施方案中,第一工程化细胞群体和第二工程化细胞群体包含相同百分比的细胞类型。在其他实施方案中,第一工程化细胞群体和第二细胞群体包含不同百分比的细胞类型。

[0854] 在一些实施方案中,恢复期在第一次施用工程化细胞群体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周或更长时间)或更久。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。

[0855] 在一些实施方案中,所施用的工程化细胞群体或含有其的组合物在施用于受试者时是低免疫原性的。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(例如相同或相似细胞类型或表型但不含工程化细胞的修饰(例如基因修饰)的细胞群体)产生的免疫应答水平相比,针对工程化细胞的免疫应答减少或降低至少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,所施用的工程化细胞群体或含有其的组合物未能在患者中引发针对工程化细胞的免疫应答。

[0856] 在一些实施方案中,所施用的工程化细胞群体或含有其的组合物在患者中引发降低或较低水平的全身性TH1活化。在一些情况下,与通过施用免疫原性细胞(例如相同或相似细胞类型或表型但不含工程化细胞的修饰(例如基因修饰)的细胞群体)产生的全身性TH1活化水平相比,所述细胞引发的全身性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,所施用的工程化细胞群体或含有其的组合物未能在患者中引发全身性TH1活化。

[0857] 在一些实施方案中,所施用的工程化细胞群体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,与通过施用免疫原性细胞(例如相同或相似细胞类型或表型但不含工程化细胞的修饰(例如基因修饰)的细胞群体)产生的PBMC的免疫活化水平相比,所述细胞引发的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,所施用的工程化细胞群体或含有其的组合物未能在患者中引发PBMC的免疫活化。

[0858] 在一些实施方案中,所施用的工程化细胞群体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,与通过施用免疫原性细胞(例如相同或相似细胞类型或表型但不含工程化细胞的修饰(例如基因修饰)的细胞群体)产生的供体特异性IgG抗体水平相比,所述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,所施用的工程化细胞群体未能在患者中引发供体特异性IgG抗体。

[0859] 在一些实施方案中,所施用的工程化细胞群体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,与通过施用免疫原性细胞(例如相同或相似细胞类型或表型但不含工程化细胞的修饰(例如基因修饰)的细胞群体)产生的IgM和IgG抗体产生水平相比,所述细胞引发的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,所施用的工程化细胞群体或含有其的组合物未能在患者中引发IgM和IgG抗体产生。

[0860] 在一些实施方案中,所施用的工程化细胞群体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,与通过施用免疫原性细胞(例如相同或相似细胞类型或表型但不含工程化细胞的修饰(例如基因修饰)的细胞群体)产生的细胞毒性T细胞杀伤水平相比,所述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,所施用的工程化细胞群体或含有其的组合物未能在患者中引发细胞毒性T细胞杀伤。

[0861] 如上文所论述,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(诸如人白细胞抗原)敏感的患者的细胞。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怀孕期间同种异体免疫相关的病症或疾患,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。

[0862] 在施用所述细胞后,患者不表现出全身性免疫应答,或者表现出与对非低免疫原性的细胞的应答相比降低水平的全身性免疫应答。在一些实施方案中,患者不表现出适应性免疫应答,或者表现出与对非低免疫原性的细胞的应答相比降低水平的适应性免疫应答。在一些实施方案中,患者不表现出先天免疫应答,或者表现出与对非低免疫原性的细胞的应答相比降低水平的先天免疫应答。在一些实施方案中,患者不表现出T细胞应答,或者表现出与对非低免疫原性的细胞的应答相比降低水平的T细胞应答。在一些实施方案中,患者不表现出B细胞应答,或者表现出与对非低免疫原性的细胞的应答相比降低水平的B细胞

应答。

[0863] A. 剂量和剂量方案

[0864] 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原代细胞(例如原代 $\beta$ 胰岛细胞)和从所述的工程化诱导性多能干细胞分化的细胞(例如从iPSC分化的 $\beta$ 胰岛细胞或肝细胞)。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。

[0865] 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。

[0866] 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;配制物、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。

[0867] 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。

[0868] 在许多实施方案中,细胞是T细胞,并且药物组合物包括约 $2.0 \times 10^6$ 至约 $2.0 \times 10^8$ 个细胞,诸如但不限于原代T细胞、从工程化诱导性多能干细胞分化的T细胞。在一些情况下,所述剂量包括体积为约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,所述剂量包括体积为约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。在各种情况下,所述剂量包括体积为约10ml至50ml的约 $1.0 \times 10^5$ 至约 $2.5 \times 10^8$ 个本文所述的从工程化诱导性多能干细胞分化的T细胞。在其他情况下,所述剂量的范围低于约 $1.0 \times 10^5$ 至约 $2.5 \times 10^8$ 个T细胞,包括原代T细胞或从工程化诱导性多能干细胞分化的T细胞。在又其他情况下,所述剂量的范围高于约 $1.0 \times 10^5$ 至约 $2.5 \times 10^8$ 个T细胞,包括原代T细胞和从工程化诱导性多能干细胞分化的T细胞。

[0869] 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 $1.0 \times 10^7$ 个工程化细胞(诸如原代细胞和从工程化诱导性多能干细胞分化的细胞)/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。

[0870] 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(诸如原代细胞和从工程化诱导性多能干细胞分化的细胞)。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。

[0871] 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。

[0872] 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到2、3、4或5个单独的输液袋中。

[0873] 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。

[0874] 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。

[0875] 在一些实施方案中,细胞是工程化T细胞(例如原代T细胞或从工程化诱导性多能干细胞分化的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,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包括结合抗原的scFv,而第二CAR包括结合不同抗原的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细胞或原代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。

[0876] B. 免疫抑制剂

[0877] 在一些实施方案中,在第一次施用工程化细胞群体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。

[0878] 在一些实施方案中,可以向接受工程化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细胞的施用之前,施用免疫抑制剂和/或免疫调节剂。

[0879] 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、麦考酚酸、霉酚酸酯、皮质类固醇诸如泼尼松、甲氨蝶呤、金盐、柳氮磺胺吡啶、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,其中免疫抑制剂和/或免疫调节剂在第一次施用细胞之前或之后向患者施用,施用的剂量低于具有MHC I类和/或MHC II类表达且无外源CD47表达的细胞所需的剂量。

[0880] 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)和相似的剂。

[0881] 在一些实施方案中,在第一次施用工程化细胞群体之前,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,在第一次施用细胞之前至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14天或更长时间施用免疫抑制剂和/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周或更长时间施用免疫抑制剂和/或免疫调节剂。

[0882] 在特定实施方案中,在第一次施用细胞之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之后至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14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周或更长时间施用免疫抑制剂和/或免疫调节剂。

[0883] 在一些实施方案中,在施用工程化细胞群体之前,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细胞群体之前,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,在施用细胞之前至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14天或更长时间施用免疫抑制剂和/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周或更长时间施用免疫抑制剂和/或免疫调节剂。在特定实施方案中,在施用细胞之后至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14天或更长时间施用免疫抑制剂和/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周或更长时间施用免疫抑制剂和/或免疫调节剂。

[0884] 在一些实施方案中,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(例如相同或相似细胞细胞类型或表型但不含工程化细胞的修饰(例如基因修饰)的细胞器,例如具有内源水平的CD46、CD59和CD55、MHC I类和/或MHC II类表达且无CD47的增加的(例如,外源)表达的细胞群体)所需的剂量。

[0885] C. 选择接受治疗的患者

[0886] 在一些实施方案中,本文提供了一种基于血型(例如,基于ABO型和/或恒河猴因子(Rh因子)阳性或阴性)将包含第一或第二修饰组的细胞(例如,不包含增加的CD46和CD59的表达的细胞或包含增加的CD46和CD59的表达的细胞)群体与患者匹配的方法。

[0887] 细胞(例如,工程化细胞或工程化细胞所源自的供体受试者的细胞,或受者患者血细胞)或血清(例如,供体或受者患者的血清)的血型分型可以根据标准方法,诸如Mujahid等人“Blood Group Typing:From Classical Strategies to the Application of Synthetic Antibodies Generated by Molecular Imprinting.”Sensors(Basel, Switzerland)16,1 51卷.2015年12月31日中描述的方法进行,所述文献的内容通过引用整体并入本文。在一些实施方案中,可以使用正向分型(检验抗原的存在)和/或反向分型(检验血清中抗体的存在)来进行血型分型。正向血型分型表明细胞上A和B抗原的存在或不存在,而反向定型表明血清中抗A和抗B的存在或不存在。在正向定型的一个实例中,将血细胞与作为稀释介质的盐水一起放入两个试管中,然后在这些样本中各分别添加一滴抗A和抗B。将这些管离心几分钟,然后轻轻摇动所得基质以观察凝集。

[0888] 为了进行精确的血型定型,可以根据血液凝结的程度对两个试管进行分类。离心的目的是确保增强化学相互作用,尤其是使较弱的抗体发生反应,从而导致凝集。还可以添加一些增效剂来促进凝集;此外,管的长时间孵育也有利于这些反应,而无需干燥检验样本。以类似的方式,可以进行反向定型,如此处,针对A1和B的RBC试剂组处理血清,并监测随后的凝集模式。在正向和反向定型中凝集物的分级可用于比较溶血反应强度的差异。

[0889] 在一些实施方案中,正向血型分型可以类似地用于确定细胞上Rh抗原的存在或不存在,并且反向定型可以用于确定血清中抗Rh因子抗体的存在或不存在。

[0890] 在一些实施方案中,确定患者的血型与所述工程化细胞群体组的ABO血型 and Rh因子类型具有ABO血型相容性,其中:(a)如果(1)患者的血清包含针对ABO血型A抗原的抗体并且不包含针对ABO血型B抗原的抗体,并且如果患者的血型是恒河猴(Rh)因子阴性的,并且(2)所述群体组的细胞是ABO血型O或ABO血型B并且是Rh因子阴性的,所述方法包括选择第一工程化细胞群体(包含低免疫原性修饰基本组,但不包含增加CD46和CD59的表达的修饰)用于施用于患者。

[0891] 在一些实施方案中,确定患者的血型与所述工程化细胞群体组的ABO血型 and Rh因子类型具有ABO血型相容性,其中:(b)如果(1)患者的血清包含针对ABO血型B抗原的抗体并且不包含针对ABO血型A抗原的抗体,并且患者的血型是Rh因子阴性的,并且(2)所述细胞群体组的细胞是ABO血型O或ABO血型A,并且所述细胞是Rh因子阴性的,所述方法包括选择第一工程化细胞群体(包含低免疫原性修饰基本组,但不包含增加CD46和CD59的表达的修饰)用于施用于患者。

[0892] 在一些实施方案中,确定患者的血型与所述工程化细胞群体组的ABO血型 and Rh因子类型具有ABO血型相容性,其中:(c)如果(1)患者的血清包含针对ABO血型A抗原的抗体和针对ABO血型B抗原的抗体,并且(2)所述细胞群体组的细胞是ABO血型O细胞,所述方法包括选择第一工程化细胞群体(包含低免疫原性修饰基本组,但不包含增加CD46和CD59的表达的修饰)用于施用于患者。

[0893] 在一些实施方案中,确定患者的血型与所述工程化细胞群体组的ABO血型 and Rh因子类型具有ABO血型相容性,其中:(d)如果(1)患者的血清不包含针对ABO血型A抗原或ABO血型B抗原的抗体,并且患者的血型是Rh因子阳性的,并且(2)所述细胞群体组的细胞是ABO血型A、ABO血型B、ABO血型AB或ABO血型O细胞并且是Rh因子阴性或Rh因子阳性的,所述方法包括选择第一工程化细胞群体(包含低免疫原性修饰基本组,但不包含增加CD46和CD59的

表达的修饰)用于施用于患者。

[0894] 在一些实施方案中,确定患者的血型与所述工程化细胞群体组的ABO血型和Rh因子类型具有ABO血型相容性,其中:(e)如果(1)患者的血清不包含针对ABO血型A抗原或ABO血型B抗原的抗体,并且患者的血型是Rh因子阴性的,并且(2)所述细胞群体组的细胞是ABO血型A、ABO血型B、ABO血型AB或ABO血型O并且是Rh因子阴性的,所述方法包括选择第一工程化细胞群体(包含低免疫原性修饰基本组,但不包含增加CD46和CD59的表达的修饰)用于施用于患者。

[0895] 在一些实施方案中,患者的血型与所述工程化细胞群体组的ABO血型和Rh因子类型具有ABO不相容性,其中:(a)如果(1)患者的血清包含针对ABO血型A抗原的抗体并且不包含针对ABO血型B抗原的抗体,并且患者的血型是Rh因子阳性或Rh因子阴性的,并且(2)所述群体组的细胞是ABO血型A或ABO血型AB细胞,并且所述群体的细胞是Rh因子阳性或Rh因子阴性的,所述方法包括选择第二工程化细胞群体(包含低免疫原性修饰基本组并且包含增加CD46和CD59的表达的修饰)用于施用于患者。

[0896] 在一些实施方案中,患者的血型与所述工程化细胞群体组的ABO血型和Rh因子类型具有ABO不相容性,其中:(b)如果(1)患者的血清包含针对ABO血型B抗原的抗体并且不包含针对ABO血型A抗原的抗体,并且患者的血型是Rh因子阳性或Rh因子阴性的,并且(2)所述细胞群体组的细胞是ABO血型B或ABO血型AB细胞,并且所述群体的细胞是Rh因子阳性或Rh因子阴性的,所述方法包括选择第二工程化细胞群体(包含低免疫原性修饰基本组并且包含增加CD46和CD59的表达的修饰)用于施用于患者;或者

[0897] 在一些实施方案中,患者的血型与所述工程化细胞群体组的ABO血型和Rh因子类型具有ABO不相容性,其中:(c)如果(1)患者的血清包含针对ABO血型A抗原的抗体和针对ABO血型B抗原的抗体,并且患者的血型是Rh因子阳性或Rh因子阴性的,并且(2)所述细胞群体组的细胞是ABO血型A、ABO血型B或ABO血型AB,并且所述群体的细胞是Rh因子阳性或Rh因子阴性的,所述方法包括选择第二工程化细胞群体(包含低免疫原性修饰基本组并且包含增加CD46和CD59的表达的修饰)用于施用于患者;或者

[0898] 在一些实施方案中,患者的血型与所述工程化细胞群体组的ABO血型和Rh因子类型具有ABO不相容性,其中:(d)如果(1)患者的血清不包含针对ABO血型A抗原或ABO血型B抗原的抗体,并且患者的血型是Rh因子阴性的,并且(2)所述细胞群体组的细胞是ABO血型A、ABO血型B、ABO血型AB或ABO血型O并且是Rh因子阳性的,所述方法包括选择第二工程化细胞群体(包含低免疫原性修饰基本组并且包含增加CD46和CD59的表达的修饰)用于施用于患者。

[0899] VI. 示例性实施方案

[0900] 1. 一种工程化细胞,所述工程化细胞包含如下修饰:(i)增加一种或多种致耐受性因子的表达,(ii)增加CD46的表达,(iii)增加CD59的表达,以及(iv)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,其中(i)、(ii)和(iii)的所述增加的表达以及(iv)的所述降低的表达是相对于不包含所述修饰的相同细胞类型的细胞而言的。

[0901] 2. 如实施方案1所述的工程化细胞,其中(iv)中的所述修饰中的一者或多者降低以下各项的表达:

[0902] a. 一种或多种MHC I类分子

- [0903] b. 一种或多种MHC II类分子;或
- [0904] c. 一种或多种MHC I类分子和一种或多种MHC II类分子。
- [0905] 3. 如实施方案1或实施方案2所述的工程化细胞,其中所述一种或多种修饰降低选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以及它们的任何组合。
- [0906] 4. 如实施方案1-3中任一项所述的工程化细胞,其中所述工程化细胞不表达选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、RFX5、RFXANK、RFXAP、NFY-A、NFY-B和/或NFY-C以及它们的组合。
- [0907] 5. 如实施方案1-4中任一项所述的工程化细胞,其中所述一种或多种致耐受性因子包括选自由以下组成的组的一种或多种致耐受性因子: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以及它们的任何组合。
- [0908] 6. 如实施方案5所述的工程化细胞,其中所述一种或多种致耐受性因子选自由以下组成的组:CD47、PD-L1、HLA-E、HLA-G、CCL21、FASL、SERPINB9、CD200、MFGE8以及它们的任何组合。
- [0909] 7. 如实施方案1-6中任一项所述的工程化细胞,其中所述一种或多种致耐受性因子包括选自由以下组成的组的一种或多种致耐受性因子:A20/TNFAIP3、C1抑制剂、CCL21、CCL22、CD16、CD16 Fc受体、CD24、CD27、CD35、CD39、CD46、CD47、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、Serpnb9以及它们的任何组合。
- [0910] 8. 如实施方案1-7中任一项所述的工程化细胞,其中所述一种或多种致耐受性因子包括CD47。
- [0911] 9. 如实施方案1-8中任一项所述的工程化细胞,其中所述一种或多种致耐受性因子包括HLA-E。
- [0912] 10. 如实施方案1-9中任一项所述的工程化细胞,其中所述一种或多种致耐受性因子包括CD24。
- [0913] 11. 如实施方案1-10中任一项所述的工程化细胞,其中所述一种或多种致耐受性因子包括PDL1。
- [0914] 12. 如实施方案1-11中任一项所述的工程化细胞,其中所述一种或多种致耐受性因子包括CD55。
- [0915] 13. 如实施方案1-12中任一项所述的工程化细胞,其中所述一种或多种致耐受性因子包括CR1。
- [0916] 14. 如实施方案1-13中任一项所述的工程化细胞,其中所述一种或多种致耐受性因子包括MANF。
- [0917] 15. 如实施方案1-14中任一项所述的工程化细胞,其中所述一种或多种致耐受性因子包括A20/TNFAIP3。
- [0918] 16. 如实施方案1-15中任一项所述的工程化细胞,其中所述一种或多种致耐受性

因子包括HLA-E和CD47。

[0919] 17. 如实施方案1-16中任一项所述的工程化细胞,其中所述一种或多种致耐受性因子包括选自由CD24、CD47和PDL1组成的组的两种或更多种致耐受性因子,任选地其中所述一种或多种致耐受性因子包括CD24、CD47和PDL1。

[0920] 18. 如实施方案1-17中任一项所述的工程化细胞,其中所述一种或多种致耐受性因子包括选自由HLA-E、CD24、CD47和PDL1组成的组的两种或更多种致耐受性因子,任选地其中所述一种或多种致耐受性因子包括HLA-E、CD24、CD47和PDL1。

[0921] 19. 如实施方案1-18中任一项所述的工程化细胞,其中所述一种或多种致耐受性因子包括选自由CD46、CD55、CD59和CR1组成的组的两种或更多种致耐受性因子,任选地其中所述一种或多种致耐受性因子包括CD46、CD55、CD59和CR1。

[0922] 20. 如实施方案1-19中任一项所述的工程化细胞,其中所述一种或多种致耐受性因子包括选自由HLA-E、CD46、CD55、CD59和CR1组成的组的两种或更多种致耐受性因子,任选地其中所述一种或多种致耐受性因子包括HLA-E、CD46、CD55、CD59和CR1。

[0923] 21. 如实施方案1-20中任一项所述的工程化细胞,其中所述一种或多种致耐受性因子包括选自由HLA-E、CD24、CD47、PDL1、CD46、CD55、CD59和CR1组成的组的两种或更多种致耐受性因子,任选地其中所述一种或多种致耐受性因子包括HLA-E、CD24、CD47、PDL1、CD46、CD55、CD59和CR1。

[0924] 22. 如实施方案1-21中任一项所述的工程化细胞,其中所述一种或多种致耐受性因子包括HLA-E和PDL1。

[0925] 23. 如实施方案1-22中任一项所述的工程化细胞,其中所述一种或多种致耐受性因子包括选自由HLA-E、PDL1和A20/TNFAIP组成的组的两种或更多种致耐受性因子,任选地其中所述一种或多种致耐受性因子包括HLA-E、PDL1和A20/TNFAIP。

[0926] 24. 如实施方案1-23中任一项所述的工程化细胞,其中所述一种或多种致耐受性因子包括选自由HLA-E、PDL1和MANF组成的组的两种或更多种致耐受性因子,任选地其中所述一种或多种致耐受性因子包括HLA-E、PDL1和MANF。

[0927] 25. 如实施方案1-24中任一项所述的工程化细胞,其中所述一种或多种致耐受性因子包括选自由HLA-E、PDL1、A20/TNFAIP和MANF组成的组的两种或更多种致耐受性因子,任选地其中所述一种或多种致耐受性因子包括HLA-E、PDL1、A20/TNFAIP和MANF。

[0928] 26. 一种工程化细胞,所述工程化细胞包含如下修饰:(i) 增加CCL21、PD-L1、FASL、SERPINB9、HLA-G、CD47、CD200和MFGE8的表达,(ii) 增加CD46的表达,以及(iii) 增加CD59的表达,其中所述增加的表达是相对于不包含所述修饰的相同细胞类型的细胞而言的。

[0929] 27. 如实施方案26所述的工程化细胞,其中(i) 增加CCL21、PD-L1、FASL、SERPINB9、HLA-G、CD47、CD200和MFGE8的表达,(ii) 增加CD46的表达,以及(iii) 增加CD59的表达的所述修饰中的一者或多者包括增加内源基因的基因活性的一种或多种修饰。

[0930] 28. 如实施方案27所述的工程化细胞,其中所述内源基因编码所述CCL21、PD-L1、FASL、SERPINB9、HLA-G、CD47、CD200、MFGE8、CD46或CD59。

[0931] 29. 如实施方案27或28所述的工程化细胞,其中所述增加内源基因的基因活性的一种或多种修饰包括所述基因的内源启动子的一种或多种修饰或异源启动子的引入。

[0932] 30. 如实施方案29所述的工程化细胞,其中所述异源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,以及UBC启动子。

[0933] 31.如实施方案1-30中任一项所述的工程化细胞,其中所述工程化细胞还包含增加CD55的表达的修饰,其中所述增加的CD55的表达是相对于不包含所述修饰的相同细胞类型的细胞而言的。

[0934] 32.如实施方案1-31中任一项所述的工程化细胞,其中所述增加表达的修饰包括增加的表面表达,并且/或者所述降低表达的修饰包括降低的表面表达,任选地其中所述降低的表面表达包括没有可检测表面表达。

[0935] 33.如实施方案1-32中任一项所述的工程化细胞,其中所述增加CD46的表达并且增加CD59的表达的一种或多种修饰包括编码CD46的外源多核苷酸和编码CD59的外源多核苷酸。

[0936] 34.如实施方案31-33中任一项所述的工程化细胞,其中所述增加CD55的表达的修饰包括编码CD55的外源多核苷酸。

[0937] 35.如实施方案33或实施方案34所述的工程化细胞,其中所述编码CD46的外源多核苷酸编码与SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少85%同一性的氨基酸序列,并且表现出补体抑制活性。

[0938] 36.如实施方案35所述的工程化细胞,其中所述编码CD46的外源多核苷酸编码SEQ ID NO:3所示的序列。

[0939] 37.如实施方案33-36中任一项所述的工程化细胞,其中所述编码CD59的外源多核苷酸编码与SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有至少85%同一性的氨基酸序列,并且表现出补体抑制活性。

[0940] 38.如实施方案37所述的工程化细胞,其中所述编码CD59的外源多核苷酸编码SEQ ID NO:5所示的序列。

[0941] 39.如实施方案34-38中任一项所述的工程化细胞,其中所述编码CD55的外源多核苷酸编码与SEQ ID NO:8的氨基酸序列具有至少85%同一性的氨基酸序列,并且表现出补体抑制活性。

[0942] 40.如实施方案39所述的工程化细胞,其中所述编码CD55的外源多核苷酸编码SEQ ID NO:8所示的序列。

[0943] 41.如实施方案33-40中任一项所述的工程化细胞,其中所述编码CD46的外源多核苷酸和所述编码CD59的外源多核苷酸各自可操作地连接至启动子。

[0944] 42.如实施方案33-41中任一项所述的工程化细胞,其中所述编码CD55的外源多核苷酸可操作地连接至启动子。

[0945] 43.如实施方案1-42中任一项所述的工程化细胞,其中所述增加CD47的表达的修饰包括编码CD47蛋白的外源多核苷酸。

[0946] 44.如实施方案43所述的工程化细胞,其中所述编码CD47的外源多核苷酸编码与SEQ ID NO:1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细胞的先天免疫杀伤。

- [0947] 45. 如实施方案44所述的工程化细胞,其中所述编码CD47的外源多核苷酸编码SEQ ID NO:1所示的序列。
- [0948] 46. 如实施方案43-45中任一项所述的工程化细胞,其中所述编码CD47的外源多核苷酸可操作地连接至启动子。
- [0949] 47. 如实施方案1-46中任一项所述的工程化细胞,其中所述工程化细胞包含多顺反子载体,所述多顺反子载体包含选自由以下组成的组的两种或更多种外源多核苷酸:编码所述一种或多种致耐受性因子的一种或多种外源多核苷酸、编码CD46的外源多核苷酸、编码CD59的外源多核苷酸和编码CD55多肽的外源多核苷酸。
- [0950] 48. 如实施方案47所述的工程化细胞,其中所述多核苷酸中的每一者由IRES或自切割肽分隔。
- [0951] 49. 如实施方案47-48中任一项所述的工程化细胞,其中所述一种或多种致耐受性因子是CD47。
- [0952] 50. 如实施方案47-49中任一项所述的工程化细胞,其中所述多顺反子载体的每个多核苷酸可操作地连接至相同的启动子。
- [0953] 51. 如实施方案47-50中任一项所述的工程化细胞,其中所述多顺反子载体包含编码CD46的外源多核苷酸和编码CD59的外源多核苷酸。
- [0954] 52. 如实施方案47-50中任一项所述的工程化细胞,其中所述多顺反子载体包含编码CD46的外源多核苷酸、编码CD59的外源多核苷酸和编码CD55的外源多核苷酸。
- [0955] 53. 如实施方案51或实施方案52所述的工程化细胞,其中所述多顺反子载体还包含编码CD47的外源多核苷酸。
- [0956] 54. 如实施方案51或实施方案52所述的工程化细胞,其中所述多顺反子载体是第一转基因,并且所述工程化细胞包含含有编码CD47的外源多核苷酸的单独的转基因。
- [0957] 55. 如实施方案1-54中任一项所述的工程化细胞,其中所述工程化细胞包含第一转基因和第二转基因,
- [0958] 其中所述第一转基因和所述第二转基因各自包含选自由以下组成的组的一种或多种外源多核苷酸:编码CD47的外源多核苷酸、编码CD46的外源多核苷酸、编码CD59的外源多核苷酸和编码CD55多肽的外源多核苷酸,并且
- [0959] 其中所述第一转基因和所述第二转基因是单顺反子或多顺反子载体。
- [0960] 56. 如实施方案41-55中任一项所述的工程化细胞,其中所述启动子是组成型启动子。
- [0961] 57. 如实施方案50-56中任一项所述的工程化细胞,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,以及UBC启动子。
- [0962] 58. 如实施方案33-57中任一项所述的工程化细胞,其中所述编码CD46的外源多核苷酸和/或所述编码CD59的外源多核苷酸整合到所述工程化细胞的基因组中。
- [0963] 59. 如实施方案34-58中任一项所述的工程化细胞,其中所述编码CD55的外源多核苷酸整合到所述工程化细胞的基因组中。

[0964] 60. 如实施方案43-59中任一项所述的工程化细胞,其中所述编码CD47的外源多核苷酸整合到所述工程化细胞的基因组中。

[0965] 61. 如实施方案58-60中任一项所述的工程化细胞,其中所述整合是通过非靶向插入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所述细胞中来进行的。

[0966] 62. 如实施方案59或实施方案60所述的工程化细胞,其中所述整合是通过靶向插入所述细胞的靶基因组基因座中来进行的。

[0967] 63. 如实施方案62所述的工程化细胞,其中所述靶基因组基因座选自自由以下组成的组: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。

[0968] 64. 如实施方案62或实施方案63所述的工程化细胞,其中所述靶基因组基因座是MICA基因座、MICB基因座、TAP1基因座、B2M基因座、CIITA基因座、TRAC基因座、TRBC基因座或安全港基因座。

[0969] 65. 如实施方案62或实施方案63所述的工程化细胞,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。

[0970] 66. 如实施方案64所述的工程化细胞,其中所述安全港基因座选自自由以下组成的组:AAVS1、ABO、CCR5、CLYBL、CXCR4、F3、FUT1、HMGB1、KDM5D、LRP1、MICA、MICB、RHD、ROSA26和SHS231基因座。

[0971] 67. 如实施方案55-66中任一项所述的工程化细胞,其中所述编码CD55的外源多核苷酸整合到第四靶基因组基因座中。

[0972] 68. 如实施方案55-67所述的工程化细胞,其中第一、第二和第三靶基因组基因座中的至少两者是相同的基因座。

[0973] 69. 如实施方案67所述的工程化细胞,其中所述第一、第二、第三和第四靶基因组基因座中的至少两者是相同的基因座。

[0974] 70. 如实施方案55-69中任一项所述的工程化细胞,其中所述第一、第二和第三靶基因组基因座是相同的基因座。

[0975] 71. 如实施方案69所述的工程化细胞,其中所述第一、第二、第三和第四靶基因组基因座是相同的基因座。

[0976] 72. 如实施方案55-67所述的工程化细胞,其中所述第一、第二和第三靶基因组基因座中的每一者是不同的基因座。

[0977] 73. 如实施方案72所述的工程化细胞,其中所述第一、第二、第三和第四靶基因组基因座是不同的基因座。

[0978] 74. 如实施方案1-25和27-73中任一项所述的工程化细胞,其中所述降低一种或多种MHC I类分子的表达的修饰降低一种或多种MHC I类分子的蛋白质表达。

[0979] 75. 如实施方案1-25和27-73中任一项所述的工程化细胞,其中所述降低一种或多种MHC I类分子的表达的修饰包括降低的B2M的表达。

- [0980] 76.如实施方案75所述的工程化细胞,其中所述降低一种或多种MHC I类分子的表达的修饰包括降低的B2M的蛋白质表达。
- [0981] 77.如实施方案75或实施方案76所述的工程化细胞,其中所述修饰消除B2M基因活性。
- [0982] 78.如实施方案75-77中任一项所述的工程化细胞,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。
- [0983] 79.如实施方案75-78中任一项所述的工程化细胞,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。
- [0984] 80.如实施方案78或实施方案79所述的工程化细胞,其中所述失活或破坏包括所述B2M基因中的插入缺失。
- [0985] 81.如实施方案75-80中任一项所述的工程化细胞,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。
- [0986] 82.如实施方案75-81中任一项所述的工程化细胞,其中所述B2M基因被敲除。
- [0987] 83.如实施方案75-82中任一项所述的工程化细胞,其中所述修饰是通过基因组修饰蛋白进行的。
- [0988] 84.如实施方案83中任一项所述的工程化细胞,其中通过基因组修饰蛋白进行的所述修饰是通过CRISPR相关转座酶、先导编辑或经由位点特异性靶向元件的可编程添加(PASTE)进行的修饰。
- [0989] 85.如实施方案83-84中任一项所述的工程化细胞,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。
- [0990] 86.如实施方案85所述的工程化细胞,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选自Cas9或Cas12。
- [0991] 87.如实施方案83-85中任一项所述的工程化细胞,其中通过所述基因组修饰蛋白进行的所述修饰是通过选自由以下组成的组的一种或多种蛋白质进行的: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。
- [0992] 88.如实施方案86所述的工程化细胞,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)。
- [0993] 89.如实施方案88所述的工程化细胞,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。
- [0994] 90.如实施方案1-25和27-89中任一项所述的工程化细胞,其中所述降低一种或多种MHC II类分子的表达的修饰降低一种或多种MHC II类分子的蛋白质表达。
- [0995] 91.如实施方案1-25和27-89中任一项所述的工程化细胞,其中所述降低一种或多种MHC II类分子的表达的修饰包括降低的CIITA的表达。

- [0996] 92. 如实施方案91所述的工程化细胞,其中所述降低一种或多种MHC II类分子的表达的修饰包括降低的CIITA的蛋白质表达。
- [0997] 93. 如实施方案91或实施方案92所述的工程化细胞,其中所述修饰消除CIITA基因活性。
- [0998] 94. 如实施方案91-93中任一项所述的工程化细胞,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。
- [0999] 95. 如实施方案91-94中任一项所述的工程化细胞,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。
- [1000] 96. 如实施方案94或实施方案95所述的工程化细胞,其中所述失活或破坏包括所述CIITA基因中的插入缺失。
- [1001] 97. 如实施方案91-96中任一项所述的工程化细胞,其中所述修饰是所述CIITA基因的一段连续基因组DNA的移码突变或缺失。
- [1002] 98. 如实施方案91-97中任一项所述的工程化细胞,其中CIITA基因被敲除。
- [1003] 99. 如实施方案1-98中任一项所述的工程化细胞,其中所述工程化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。
- [1004] 100. 如实施方案1-99中任一项所述的工程化细胞,其中所述修饰:
- [1005] 降低NLRC5、TRAC、TRB、CD142、ABO、CD38、CD52、PCDH11Y、NLGN4Y和RHD中任一者或多者的表达。
- [1006] 101. 如实施方案1-100中任一项所述的工程化细胞,其中(i)增加一种或多种致耐受性因子的表达,(ii)增加CD46的表达,以及(iii)增加CD59的表达的所述修饰中的一者或多者包括增加内源基因的基因活性的一种或多种修饰。
- [1007] 102. 如实施方案101所述的工程化细胞,其中所述内源基因编码所述一种或多种致耐受性因子、CD46或CD59。
- [1008] 103. 如实施方案101或102所述的工程化细胞,其中所述增加内源基因的基因活性的一种或多种修饰包括所述基因的内源启动子的一种或多种修饰或异源启动子的引入。
- [1009] 104. 如实施方案103所述的工程化细胞,其中所述异源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,以及UBC启动子。
- [1010] 105. 如实施方案99所述的工程化细胞,其中所述工程化细胞是人细胞。
- [1011] 106. 如实施方案1-105中任一项所述的工程化细胞,其中所述工程化细胞是源自干细胞或祖细胞的分化细胞。
- [1012] 107. 如实施方案106所述的工程化细胞,其中所述干细胞或祖细胞选自由以下组成的组:诱导性多能干细胞、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、多能干细胞(PSC)和多潜能干细胞。
- [1013] 108. 如实施方案1-106中任一项所述的工程化细胞,其中所述工程化细胞是源自多能干细胞或其子代的分化细胞。

- [1014] 109. 如实施方案108所述的工程化细胞,其中所述多能干细胞是诱导性多能干细胞。
- [1015] 110. 如实施方案1-105中任一项所述的工程化细胞,其中所述工程化细胞是从供体受试者分离的原代细胞。
- [1016] 111. 如实施方案110所述的工程化细胞,其中在从单个的供体获得供体样本时,所述供体受试者是健康的或未被怀疑患有疾病或疾患。
- [1017] 112. 如实施方案1-111中任一项所述的工程化细胞,其中所述工程化细胞选自自由以下组成的组:胰岛细胞、 $\beta$ 胰岛细胞、胰腺胰岛细胞、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、视细胞、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、干细胞、造血干细胞、诱导性多能干细胞(iPSC)、间充质干细胞(MSC)、胚胎干细胞(ESC)、多能干细胞(PSC)和血细胞。113. 如实施方案1-111中任一项所述的工程化细胞,其中所述工程化细胞是内皮细胞。
- [1018] 114. 如实施方案1-111中任一项所述的工程化细胞,其中所述工程化细胞是上皮细胞。
- [1019] 115. 如实施方案112所述的工程化细胞,其中所述工程化细胞是T细胞。
- [1020] 116. 如实施方案112所述的工程化细胞,其中所述工程化细胞是NK细胞。
- [1021] 117. 如实施方案115或实施方案116所述的工程化细胞,其中所述工程化细胞包含嵌合抗原受体(CAR)。
- [1022] 118. 如实施方案1-105中任一项所述的工程化细胞,其中所述工程化细胞是干细胞。
- [1023] 119. 如实施方案1-105中任一项所述的工程化细胞,其中所述工程化细胞是造血干细胞(HSC)。
- [1024] 120. 如实施方案1-105中任一项所述的工程化细胞,其中所述工程化细胞是多能干细胞。
- [1025] 121. 如实施方案1-105中任一项所述的工程化细胞,其中所述工程化细胞是诱导性多能干细胞。
- [1026] 122. 如实施方案1-105中任一项所述的工程化细胞,其中所述工程化细胞是胚胎干细胞。
- [1027] 123. 如实施方案1-122中任一项所述的工程化细胞,其中所述细胞是ABO血型O型。
- [1028] 124. 如实施方案1-122中任一项所述的工程化细胞,其中所述细胞包含功能性ABO A等位基因和/或功能性ABO B等位基因。
- [1029] 125. 如实施方案1-124中任一项所述的工程化细胞,其中所述细胞是恒河猴因子阴性(Rh-)的。
- [1030] 126. 如实施方案1-124中任一项所述的工程化细胞,其中所述细胞是恒河猴因子阳性(Rh+)的。
- [1031] 127. 一种产生工程化细胞的方法,所述方法包括:
- [1032] a. 降低或消除所述细胞中MHC I类和/或MHC II类的表达;
- [1033] b. 增加所述细胞中一种或多种致耐受性因子的表达;

[1034] c.增加所述细胞中CD46的表达;以及

[1035] d.增加所述细胞中CD59的表达。

[1036] 128.如实施方案127所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性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以及它们的任何组合。

[1037] 129.如实施方案128所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子选自由以下组成的组:CD47、PD-L1、HLA-E、HLA-G、CCL21、FASL、SERPINB9、CD200、MFGE8以及它们的任何组合。

[1038] 130.如实施方案127所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子包括选自由以下组成的组的一种或多种致耐受性因子:A20/TNFAIP3、C1抑制剂、CCL21、CCL22、CD16、CD16 Fc受体、CD24、CD27、CD35、CD39、CD46、CD47、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、Serpib9以及它们的任何组合。

[1039] 131.如实施方案127-130中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子包括CD47。

[1040] 132.如实施方案127-131中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子包括HLA-E。

[1041] 133.如实施方案127-132中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子包括CD24。

[1042] 134.如实施方案127-133中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子包括PDL1。

[1043] 135.如实施方案127-134中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子包括CD55。

[1044] 136.如实施方案127-135中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子包括CR1。

[1045] 137.如实施方案127-136中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子包括MANF。

[1046] 138.如实施方案127-137中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子包括A20/TNFAIP3。

[1047] 139.如实施方案127-138中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子包括HLA-E和CD47。

[1048] 140.如实施方案127-139中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子包括选自由CD24、CD47和PDL1组成的组的两种或更多种致耐受性因子,任选地其中所述一种或多种致耐受性因子包括CD24、CD47和PDL1。

[1049] 141.如实施方案127-140中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子包括选自由HLA-E、CD24、CD47和PDL1组成的组的两种或更多种致耐受性因子,任选地其中所述一种或多种致耐受性因子包括HLA-E、CD24、CD47和PDL1。

[1050] 142.如实施方案127-141中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子包括选自由CD46、CD55、CD59和CR1组成的组的两种或更多种致耐受性因子,任选地其中

所述一种或多种致耐受性因子包括CD46、CD55、CD59和CR1。

[1051] 143. 如实施方案127-142中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子包括选自由HLA-E、CD46、CD55、CD59和CR1组成的组的两种或更多种致耐受性因子,任选地其中所述一种或多种致耐受性因子包括HLA-E、CD46、CD55、CD59和CR1。

[1052] 144. 如实施方案127-143中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子包括选自由HLA-E、CD24、CD47、PDL1、CD46、CD55、CD59和CR1组成的组的两种或更多种致耐受性因子,任选地其中所述一种或多种致耐受性因子包括HLA-E、CD24、CD47、PDL1、CD46、CD55、CD59和CR1。

[1053] 145. 如实施方案127-144中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子包括HLA-E和PDL1。

[1054] 146. 如实施方案127-145中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子包括选自由HLA-E、PDL1和A20/TNFAIP组成的组的两种或更多种致耐受性因子,任选地其中所述一种或多种致耐受性因子包括HLA-E、PDL1和A20/TNFAIP。

[1055] 147. 如实施方案127-146中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子包括选自由HLA-E、PDL1和MANF组成的组的两种或更多种致耐受性因子,任选地其中所述一种或多种致耐受性因子包括HLA-E、PDL1和MANF。

[1056] 148. 如实施方案127-147中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子包括选自由HLA-E、PDL1、A20/TNFAIP和MANF组成的组的两种或更多种致耐受性因子,任选地其中所述一种或多种致耐受性因子包括HLA-E、PDL1、A20/TNFAIP和MANF。

[1057] 149. 如实施方案127-148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。

[1058] 150. 如实施方案127-149中任一项所述的方法,其中(i)增加一种或多种致耐受性因子的表达,(ii)增加CD46的表达,以及(iii)增加CD59的表达中的一者或多者包括经由启动子增加内源基因的基因活性。

[1059] 151. 如实施方案150所述的方法,其中所述内源基因编码所述一种或多种致耐受性因子、CD46或CD59。

[1060] 152. 如实施方案150或151所述的方法,其中经由启动子增加所述内源基因的基因活性包括修饰所述基因的内源启动子或引入异源启动子。

[1061] 153. 如实施方案152所述的方法,其中所述异源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,以及UBC启动子。

[1062] 154. 一种产生工程化细胞的方法,所述方法包括:

[1063] a. 增加所述细胞中CCL21、PD-L1、FASL、SERPINB9、HLA-G、CD47、CD200和MFGE8的表达;

[1064] b. 增加所述细胞中CD46的表达;以及

[1065] c. 增加所述细胞中CD59的表达。

[1066] 155. 如实施方案127-154中任一项所述的方法,所述方法还包括增加所述细胞中

CD55的表达。

[1067] 156. 如实施方案127-155中任一项所述的方法,其中所述降低的表达包括降低的表面表达,并且/或者所述增加的表达包括增加的表面表达,任选地其中所述降低的表面表达包括没有可检测表面表达。

[1068] 157. 如实施方案127-156中任一项所述的方法,其中增加CD46和CD59的表达包括将编码CD46的外源多核苷酸和编码CD59的外源多核苷酸引入所述细胞中。

[1069] 158. 如实施方案155-157中任一项所述的方法,其中增加CD55的表达包括将编码CD55的外源多核苷酸引入所述细胞中。

[1070] 159. 如实施方案154-158中任一项所述的方法,其中(i)增加CCL21、PD-L1、FASL、SERPINB9、HLA-G、CD47、CD200和MFGE8的表达,(ii)增加CD46的表达,以及(iii)增加CD59的表达中的一者或多者包括增加内源基因的基因活性。

[1071] 160. 如实施方案159所述的方法,其中所述内源基因编码所述CCL21、PD-L1、FASL、SERPINB9、HLA-G、CD47、CD200、MFGE8、CD46或CD59。

[1072] 161. 如实施方案159或160所述的方法,其中经由启动子增加所述内源基因的基因活性包括修饰所述基因的内源启动子或增强子,或引入异源启动子。

[1073] 162. 如实施方案161所述的方法,其中所述异源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,以及UBC启动子。

[1074] 163. 如实施方案157或实施方案158所述的方法,其中所述编码CD46的外源多核苷酸编码与SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少85%同一性的氨基酸序列,并且表现出补体抑制活性。

[1075] 164. 如实施方案163所述的方法,其中所述编码CD46的外源多核苷酸编码SEQ ID NO:3所示的序列。

[1076] 165. 如实施方案157-164中任一项所述的方法,其中所述编码CD59的外源多核苷酸编码与SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有至少85%同一性的氨基酸序列,并且表现出补体抑制活性。

[1077] 166. 如实施方案165所述的方法,其中所述编码CD59的外源多核苷酸编码SEQ ID NO:5所示的序列。

[1078] 167. 如实施方案158-166中任一项所述的方法,其中所述编码CD55的外源多核苷酸编码与SEQ ID NO:8的氨基酸序列具有至少85%同一性的序列,并且表现出补体抑制活性。

[1079] 168. 如实施方案167所述的方法,其中所述编码CD55的外源多核苷酸编码SEQ ID NO:8所示的序列。

[1080] 169. 如实施方案157-168中任一项所述的方法,其中所述编码CD46的外源多核苷酸和所述编码CD59的外源多核苷酸各自可操作地连接至启动子。

[1081] 170. 如实施方案158-169中任一项所述的方法,其中所述编码CD55的外源多核苷酸可操作地连接至启动子。

- [1082] 171.如实施方案159-170中任一项所述的方法,其中所述增加CD47的表达的修饰包括编码CD47蛋白的外源多核苷酸。
- [1083] 172.如实施方案171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:1的氨基酸序列具有至少85%同一性的序列,并且降低所述工程化细胞的先天免疫杀伤。
- [1084] 173.如实施方案172所述的方法,其中所述编码CD47的外源多核苷酸编码SEQ ID NO:1所示的序列。
- [1085] 174.如实施方案171-173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。
- [1086] 175.如实施方案159-174中任一项所述的方法,其中所述方法包括引入多顺反子载体,所述多顺反子载体包含选自以下组成的组的两种或更多种外源多核苷酸:编码CD47的外源多核苷酸;编码CD46的外源多核苷酸;编码CD59的外源多核苷酸;和编码CD55多肽的外源多核苷酸。
- [1087] 176.如实施方案175所述的方法,其中所述多核苷酸中的每一者由IRES或自切割肽分隔。
- [1088] 177.如实施方案175或实施方案176所述的方法,其中所述多顺反子载体的每个多核苷酸可操作地连接至相同的启动子。
- [1089] 178.如实施方案175-177中任一项所述的方法,其中所述多顺反子载体包含编码CD46的外源多核苷酸和编码CD59的外源多核苷酸。
- [1090] 179.如实施方案175-177中任一项所述的方法,其中所述多顺反子载体包含编码CD46的外源多核苷酸、编码CD59的外源多核苷酸和编码CD55的外源多核苷酸。
- [1091] 180.如实施方案178或实施方案179所述的方法,其中所述多顺反子载体还包含编码CD47的外源多核苷酸。
- [1092] 181.如实施方案178或实施方案179所述的方法,其中所述工程化细胞包含含有编码CD47的多核苷酸的单独的转基因。
- [1093] 182.如实施方案157-181中任一项所述的方法,其中所述编码CD46的外源多核苷酸和/或所述编码CD59的外源多核苷酸整合到所述工程化细胞的基因组中。
- [1094] 183.如实施方案157-182中任一项所述的方法,其中所述编码CD55的外源多核苷酸整合到所述工程化细胞的基因组中。
- [1095] 184.如实施方案171-183中任一项所述的方法,其中所述编码CD47的外源多核苷酸整合到所述工程化细胞的基因组中。
- [1096] 185.如实施方案182-184中任一项所述的方法,其中所述整合是通过非靶向插入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所述细胞中来进行的。
- [1097] 186.如实施方案182-184中任一项所述的方法,其中所述整合是通过靶向插入所述细胞的靶基因组基因座中来进行的,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。
- [1098] 187.如实施方案186所述的方法,其中所述靶基因组基因座选自以下组成的组: 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。

[1099] 188.如实施方案186所述的方法,其中所述靶基因组基因座是MICA基因座、MICB基因座、TAP1基因座、B2M基因座、CIITA基因座、TRAC基因座、TRBC基因座或安全港基因座。

[1100] 189.如实施方案186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。

[1101] 190.如实施方案188所述的方法,其中所述安全港基因座选自自由以下组成的组:AAVS1、ABO、CCR5、CLYBL、CXCR4、F3、FUT1、HMGB1、KDM5D、LRP1、MICA、MICB、RHD、ROSA26和SHS231基因座。

[1102] 191.如实施方案128-190中任一项所述的方法,其中所述修饰是通过CRISPR相关转座酶、先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。

[1103] 192.如实施方案128-191中任一项所述的方法,其中所述修饰是通过基因组修饰蛋白进行的,任选地其中所述修饰是通过CRISPR相关转座酶、先导编辑、经由位点特异性靶向元件的可编程添加(PASTE)或核酸酶介导的基因编辑进行的。

[1104] 193.如实施方案191或192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。

[1105] 194.如实施方案186-193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选自Cas9或Cas12。

[1106] 195.如实施方案194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)以及包含所述编码CD46的外源多核苷酸、所述编码CD59的外源多核苷酸、所述编码CD55的外源多核苷酸和/或所述编码CD47的外源多核苷酸的同源定向修复模板。

[1107] 196.如实施方案195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。

[1108] 197.如实施方案127-196中任一项所述的方法,其中降低MHC I类的表达包括引入降低一种或多种MHC I类分子的蛋白质表达的修饰。

[1109] 198.如实施方案197所述的方法,其中所述降低一种或多种MHC I类分子的蛋白质表达的修饰包括降低的B2M的表达。

[1110] 199.如实施方案198所述的方法,其中所述降低一种或多种MHC I类分子的蛋白质表达的修饰包括降低的B2M的蛋白质表达。

[1111] 200.如实施方案198或实施方案199所述的方法,其中所述降低一种或多种MHC I

类分子的蛋白质表达的修饰降低B2M基因活性。

[1112] 201. 如实施方案197-200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。

[1113] 202. 如实施方案197-201中任一项所述的方法,其中所述降低一种或多种MHC I类分子的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。

[1114] 203. 如实施方案201或实施方案202所述的方法,其中所述失活或破坏包括所述B2M基因中的插入缺失或所述B2M基因的一段连续基因组DNA的缺失。

[1115] 204. 如实施方案203所述的方法,其中所述插入缺失是移码突变。

[1116] 205. 如实施方案197-204中任一项所述的方法,其中所述B2M基因被敲除。

[1117] 206. 如实施方案197-205中任一项所述的方法,其中所述降低一种或多种MHC I类分子的蛋白质表达的修饰是通过基因组修饰蛋白进行的,任选地其中所述降低一种或多种MHC I类分子的蛋白质表达的修饰是通过核酸酶介导的基因编辑进行的。

[1118] 207. 如实施方案206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选自Cas9或Cas12。

[1119] 208. 如实施方案207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)。

[1120] 209. 如实施方案208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。

[1121] 210. 如实施方案127-209中任一项所述的方法,其中降低MHC II类的表达包括引入降低一种或多种MHC II类分子的蛋白质表达的修饰。

[1122] 211. 如实施方案210所述的方法,其中所述降低一种或多种MHC II类分子的蛋白质表达的修饰包括降低的CIITA的表达。

[1123] 212. 如实施方案211所述的方法,其中所述降低一种或多种MHC II类分子的蛋白质表达的修饰包括降低的CIITA的蛋白质表达。

[1124] 213. 如实施方案211或实施方案212所述的方法,其中所述降低一种或多种MHC II类分子的蛋白质表达的修饰降低CIITA基因活性。

[1125] 214. 如实施方案211-213中任一项所述的方法,其中所述降低一种或多种MHC II类分子的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。

[1126] 215. 如实施方案211-214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。

[1127] 216. 如实施方案214或实施方案215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。

[1128] 217. 如实施方案216所述的方法,其中所述插入缺失是移码突变。

[1129] 218. 如实施方案211-217中任一项所述的方法,其中所述CIITA基因被敲除。

[1130] 219. 如实施方案127-218中任一项所述的方法,其中所述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。

[1131] 220. 如实施方案127-219中任一项所述的方法,其中所述工程化细胞是人细胞。

[1132] 221. 如实施方案127-220中任一项所述的方法,其中所述细胞是从供体受试者分离的原代细胞。

[1133] 222. 如实施方案127-220中任一项所述的方法,其中所述细胞是多能干细胞,其中所述工程化细胞是源自所述多能干细胞的分化细胞,并且所述方法还包括分化所述多能干细胞。

[1134] 223. 如实施方案222所述的方法,其中所述多能干细胞是诱导性多能干细胞。

[1135] 224. 如实施方案127-223中任一项所述的方法,其中所述工程化细胞选自自由以下组成的组:胰岛细胞、 $\beta$ 胰岛细胞、胰腺胰岛细胞、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、视细胞、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、干细胞、造血干细胞、诱导性多能干细胞(iPSC)、间充质干细胞(MSC)、胚胎干细胞(ESC)、多能干细胞(PSC)和血细胞。

[1136] 225. 一种工程化细胞,所述工程化细胞是根据实施方案127-224中任一项所述的方法产生的。

[1137] 226. 如实施方案1-126和225中任一项所述的工程化细胞,其中所述工程化细胞或源自所述工程化细胞的子代或分化细胞在施用于患者后能够逃避NK细胞介导的细胞毒性。

[1138] 227. 如实施方案1-126和225-226中任一项所述的工程化细胞,其中所述工程化细胞或源自所述工程化细胞的子代或分化细胞在施用于患者后受到保护而免于被成熟NK细胞进行细胞裂解。

[1139] 228. 如实施方案1-126和225-226中任一项所述的工程化细胞,其中所述工程化细胞或源自所述工程化细胞的子代或分化细胞在施用于患者后不诱导对所述细胞的免疫应答。

[1140] 229. 如实施方案1-126和225-228中任一项所述的工程化细胞,其中所述工程化细胞或源自所述工程化细胞的子代或分化细胞在施用于患者后不诱导对所述细胞的全身性炎症应答。

[1141] 230. 如实施方案1-126和225-229中任一项所述的工程化细胞,其中所述工程化细胞或源自所述工程化细胞的子代或分化细胞在施用于患者后不诱导对所述细胞的局部炎症应答。

[1142] 231. 如实施方案1-126和225-230中任一项所述的工程化细胞,其中所述工程化细胞或源自所述工程化细胞的子代或分化细胞在施用于患者后不诱导补体途径活化。

[1143] 232. 如实施方案1-126和225-231中任一项所述的工程化细胞,其中所述细胞在施用于患者后保留植入和发挥功能的能力。

[1144] 233. 一种细胞群体,所述细胞群体包含多个实施方案1-126和225-232中任一项所述的工程化细胞。

[1145] 234. 如实施方案233所述的群体,其中所述群体中至少约30%的细胞包含如实施方案1-126中任一项所述的工程化细胞。

[1146] 235. 如实施方案233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。

[1147] 236. 如实施方案233或235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。

[1148] 237.如实施方案233-236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CD46的外源多核苷酸。

[1149] 238.如实施方案233-237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%的细胞包含编码CD59的外源多核苷酸。

[1150] 239.如实施方案233-238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%的细胞包含编码CD55的外源多核苷酸。

[1151] 240.如实施方案233-239中任一项所述的群体,其中相对于不包含所述修饰的细胞,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。

[1152] 241.如实施方案233-240中任一项所述的群体,其中相对于不包含所述修饰的细胞,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。

[1153] 242.如实施方案233-240中任一项所述的群体,其中相对于不包含所述修饰的细胞,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。

[1154] 243.如实施方案233-242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%的细胞包含使B2M基因的两个等位基因失活的一种或多种改变。

[1155] 244.如实施方案233-243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%的细胞包含使CIITA基因的两个等位基因失活的一种或多种改变。

[1156] 245.一种组合物,所述组合物包含实施方案233-244中任一项所述的群体。

[1157] 246.一种包含工程化细胞群体的组合物,其中所述工程化细胞包含:(i) 编码CD47的外源多核苷酸,(ii) 编码CD46的外源多核苷酸,(iii) 编码CD59的外源多核苷酸,和(iv) B2M基因的两个等位基因的失活或破坏。

[1158] 247.如实施方案246所述的组合物,其中所述工程化细胞还包含CIITA基因的两个等位基因的失活或破坏。

[1159] 248.如实施方案246或247所述的组合物,其中所述工程化细胞还包含编码CD55的外源多核苷酸。

[1160] 249.如实施方案246-248中任一项所述的组合物,其中所述工程化细胞包含多顺反子载体,所述多顺反子载体包含所述编码CD47的外源多核苷酸、所述编码CD46的外源多核苷酸和所述编码CD59的外源多核苷酸。

[1161] 250.如实施方案246-248中任一项所述的组合物,其中所述工程化细胞包含第一

转基因和多顺反子载体,所述第一转基因包含所述编码CD47的外源多核苷酸,所述多顺反子载体包含所述编码CD46的外源多核苷酸和所述编码CD59的外源多核苷酸。

[1162] 251.如实施方案246-248中任一项所述的组合物,其中所述工程化细胞包含第一转基因和多顺反子载体,所述第一转基因包含所述编码CD47的外源多核苷酸,所述多顺反子载体包含所述编码CD46的外源多核苷酸、所述编码CD59的外源多核苷酸和所述编码CD55的外源多核苷酸。

[1163] 252.如实施方案248-251中任一项所述的组合物,其中所述多顺反子载体的所述多核苷酸中的每一者由IRES或自切割肽分隔。

[1164] 253.如实施方案248-252中任一项所述的组合物,其中通过使用同源定向修复的核酸酶介导的基因编辑将所述转基因引入靶基因组基因座位点处。

[1165] 254.如实施方案246-252中任一项所述的组合物,其中所述失活或破坏是通过基因组修饰蛋白进行的,任选地其中所述失活或破坏是通过核酸酶介导的基因编辑进行的。

[1166] 255.如实施方案245-254中任一项所述的组合物,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选自Cas9或Cas12。

[1167] 256.如实施方案255所述的组合物,其中所述核酸酶介导的基因编辑是通过选自Cas9或Cas12的Cas核酸酶进行的。

[1168] 257.如实施方案245-254中任一项所述的组合物,其中所述组合物是药物组合物。

[1169] 258.如实施方案257所述的组合物,所述组合物包含药学上可接受的赋形剂。

[1170] 259.如实施方案245-254中任一项所述的组合物,其中所述组合物被配制在包含冷冻保护剂的无血清冷冻保存介质中。

[1171] 260.如实施方案259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为5%至10% DMSO(v/v)。

[1172] 261.如实施方案259或260所述的组合物,其中所述冷冻保护剂为10% DMSO(v/v)或为约10% DMSO(v/v)。

[1173] 262.如实施方案245-261中任一项所述的组合物,所述组合物是无菌的。

[1174] 263.一种容器,所述容器包括实施方案245-261中任一项所述的组合物。

[1175] 264.如实施方案263所述的容器,所述容器是无菌袋。

[1176] 265.如实施方案264所述的无菌袋,其中所述袋是冷冻保存相容袋。

[1177] 266.一种治疗有需要的患者的疾病、疾患或细胞缺陷的方法,所述方法包括向所述患者施用有效量的实施方案233-244中任一项所述的群体或实施方案245-262中任一项所述的组合物。

[1178] 267.如实施方案266所述的方法,其中所述群体包含内皮细胞。

[1179] 268.如实施方案266或实施方案267所述的方法,其中所述疾患或疾病选自由以下组成的组:糖尿病、癌症、血管化病症、眼部疾病、甲状腺疾病、皮肤疾病和肝脏疾病。

[1180] 269.如实施方案266所述的方法,其中所述细胞缺陷与糖尿病相关,或者所述疾病或疾患是糖尿病,任选地其中所述糖尿病是I型糖尿病。

[1181] 270.如实施方案269所述的方法,其中所述细胞群体是胰岛细胞群体,包括 $\beta$ 胰岛细胞群体。

- [1182] 271. 如实施方案270所述的方法,其中所述胰岛细胞选自由胰岛祖细胞、未成熟胰岛细胞和成熟胰岛细胞组成的组。
- [1183] 272. 如实施方案266所述的方法,其中所述细胞缺陷与血管疾患或疾病相关,或者所述疾病或疾患是血管疾患或疾病。
- [1184] 273. 如实施方案272所述的方法,其中所述细胞群体是内皮细胞群体。
- [1185] 274. 如实施方案266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,或者所述疾病或疾患是自身免疫性甲状腺炎。
- [1186] 275. 如实施方案274所述的方法,其中所述细胞群体是甲状腺祖细胞群体。
- [1187] 276. 如实施方案266所述的方法,其中所述细胞缺陷与肝脏疾病相关,或者所述疾病是肝脏疾病。
- [1188] 277. 如实施方案276所述的方法,其中所述肝脏疾病包括肝硬化。
- [1189] 278. 如实施方案276或277所述的方法,其中所述细胞群体是肝细胞或肝祖细胞群体。
- [1190] 279. 如实施方案266所述的方法,其中所述细胞缺陷与角膜疾病相关,或者所述疾病是角膜疾病。
- [1191] 280. 如实施方案279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。
- [1192] 281. 如实施方案279或280所述的方法,其中所述细胞群体是角膜内皮祖细胞或角膜内皮细胞群体。
- [1193] 282. 如实施方案266所述的方法,其中所述细胞缺陷与肾脏疾病相关,或者所述疾病是肾脏疾病。
- [1194] 283. 如实施方案282所述的方法,其中所述细胞群体是肾前体细胞或肾细胞群体。
- [1195] 284. 如实施方案266所述的方法,其中所述细胞缺陷与癌症相关,或者所述疾病是癌症。
- [1196] 285. 如实施方案284所述的方法,其中所述癌症选自由以下组成的组: B细胞急性成淋巴细胞白血病(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、急性髓样淋巴细胞样白血病、多发性骨髓瘤、胃癌、胃腺癌、胰腺腺癌、成胶质细胞瘤、成神经细胞瘤、肺鳞状细胞癌、肝细胞癌和膀胱癌。
- [1197] 286. 如实施方案284或285所述的方法,其中所述细胞群体是T细胞、NK细胞或NKT细胞群体。
- [1198] 287. 如实施方案266所述的方法,其中所述细胞缺陷与造血系统疾病或病症相关,或者所述疾病或疾患是造血系统疾病或病症。
- [1199] 288. 如实施方案287所述的方法,其中所述造血系统疾病或病症是脊髓发育不良、再生障碍性贫血、范科尼贫血、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、施瓦赫曼-戴蒙德病、柯士文综合征、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、诸如急性淋巴细胞白血病(ALL)、急性髓性(髓细胞)白血病(AML)、成人成淋巴细胞白血病、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白血病(JMML)等白血病、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 (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、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤 (NHL) 或 AIDS。

[1200] 289. 如实施方案266所述的方法, 其中所述细胞缺陷与白血病或骨髓瘤相关, 或者其中所述疾病或疾患是白血病或骨髓瘤。

[1201] 290. 如实施方案266所述的方法, 其中所述细胞缺陷与自身免疫性疾病或疾患相关, 或者所述疾病或疾患是自身免疫性疾病或疾患。

[1202] 291. 如实施方案290所述的方法, 其中所述自身免疫性疾病或疾患是急性播散性脑脊髓炎、急性出血性白质脑炎、阿狄森病、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、巴洛同心性硬化、贝赫切特综合征、伯格病、比克斯塔夫脑炎、布劳综合征、大疱性类天疱疮、癌症、卡斯尔曼病、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、瘢痕性类天疱疮、科干综合征、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、皮肤白细胞破碎性血管炎、德戈病、德库姆病、疱疹样皮炎、皮炎、1型糖尿病、弥漫性皮肤系统性硬化症、德雷斯勒综合征、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、埃文综合征、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、古德帕斯彻综合征、格雷夫氏病、吉兰-巴雷综合征 (GBS)、桥本脑炎、桥本甲状腺炎、溶血性贫血、肯诺克-肖林紫癜、妊娠疱疹、低丙种球蛋白血症、特发性炎症性脱髓鞘病、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、炎症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、兰伯特-伊顿肌无力综合征、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、狼疮性肝炎、红斑狼疮、马吉德综合征、梅尼埃病、显微镜下多血管炎、米勒-费雪综合征、混合性结缔组织病、硬斑病、穆-哈二氏病、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、奥德甲状腺炎、回纹型风湿症、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、帕森斯-特纳综合征、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、进行性炎症性神经病、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、雷诺现象、复发性多软骨炎、赖特综合征、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、施尼茨勒综合征、巩膜炎、硬皮病、干燥综合征、脊柱关节病、斯蒂尔病、僵人综合征、亚急性细菌性心内膜炎、苏萨克综合征、斯维特综合征、西德纳姆舞蹈病、交感性眼炎、大动脉炎、颞动脉炎、痛性眼肌麻痹综合征、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。

[1203] 292. 如实施方案287-291中任一项所述的方法, 其中所述细胞群体是包含造血干

细胞 (HSC) 和/或其衍生物的群体。

[1204] 293. 如实施方案266所述的方法,其中所述细胞缺陷与帕金森病、亨廷顿病、多发性硬化症、神经变性疾病或疾患、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、神经精神障碍性中风或肌萎缩侧索硬化症 (ALS) 相关,或者其中所述疾病或疾患是帕金森病、亨廷顿病、多发性硬化症、神经变性疾病或疾患、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、神经精神障碍性中风或肌萎缩侧索硬化症 (ALS)。

[1205] 294. 如实施方案293所述的方法,其中所述细胞群体是包含神经细胞和/或神经胶质细胞的群体。

[1206] 295. 如实施方案266-294中任一项所述的方法,其中在施用之前将所述细胞扩增并冷冻保存。

[1207] 296. 如实施方案266-295中任一项所述的方法,其中施用所述群体包括静脉内注射、肌肉注射、血管内注射或移植所述群体。

[1208] 297. 如实施方案296所述的方法,其中经由血管内注射或肌肉注射移植所述群体。

[1209] 298. 如实施方案226-297中任一项所述的方法,其中所述群体源自供体受试者,其中所述供体的HLA类型与所述患者的HLA类型不匹配。

[1210] 299. 如实施方案226-298中任一项所述的方法,其中所述群体源自供体,其中所述供体的血型与所述患者的血型不匹配,并且所述供体的血型不是O型。

[1211] 300. 如实施方案226-299中任一项所述的方法,其中所述群体源自供体,其中所述供体的血型是恒河猴因子 (Rh) 阳性的,并且所述患者的血型是Rh阴性的。

[1212] 301. 如实施方案226-300中任一项所述的方法,其中所述患者的血清包含针对Rh的抗体。

[1213] 302. 如实施方案226-301中任一项所述的方法,其中所述群体是人细胞群体,并且所述患者是人患者。

[1214] 303. 如实施方案226-302中任一项所述的方法,其中所述细胞群体包含功能性ABO A等位基因和/或功能性ABO B等位基因。

[1215] 304. 如实施方案303所述的方法,其中所述细胞群体呈递ABO A型抗原,并且所述患者的血清包含抗A抗体。

[1216] 305. 如实施方案303所述的方法,其中所述细胞群体呈递ABO B型抗原,并且所述患者的血清包含抗B抗体。

[1217] 306. 如实施方案303所述的方法,其中所述细胞群体呈递ABO A型和B型抗原,并且所述患者的血清包含抗A和/或抗B抗体。

[1218] 307. 如实施方案266-306中任一项所述的方法,其中细胞群体表达Rh因子,并且所述患者的血清包含抗Rh抗体。

[1219] 308. 一种选择包含工程化细胞群体的细胞疗法用于施用于患者以治疗疾病、疾患或细胞缺陷的方法,所述方法包括,

[1220] 确定所述患者的血液是否与一组工程化细胞群体的ABO血型和/或Rh因子类型具有ABO血型不相容性或恒河猴 (Rh) 因子不相容性,其中所述群体组包括 (i) 第一工程化细胞群体,所述第一工程化细胞群体包含低免疫原性修饰基本组但不包含增加CD46和CD59的表

达的修饰,和(ii)第二工程化细胞群体,所述第二工程化细胞群体包含所述低免疫原性修饰基本组并且还包含增加CD46和CD59的表达的修饰,其中所述增加的表达是相对于不包含所述修饰的相同细胞类型的细胞而言的;其中:

[1221] 如果所述患者的血型与所述群体组的ABO血型和Rh因子类型不具有ABO血型不相容性或Rh因子不相容性,则所述方法包括选择所述第一工程化细胞群体用于施用于所述患者;以及

[1222] 如果所述患者的血型与所述群体组的ABO血型和/或Rh因子类型具有ABO血型不相容性或Rh因子不相容性,则所述方法包括选择所述第二工程化细胞群体用于施用于所述患者。

[1223] 309.一种治疗有需要的患者的疾病、疾患或细胞缺陷的方法,所述方法包括向所述患者施用有效量的工程化细胞群体,其中通过包括以下的方法选择所述患者进行治疗:

[1224] 确定所述患者的血液是否与一组工程化细胞群体的ABO血型和/或Rh因子类型具有ABO血型不相容性或恒河猴(Rh)因子不相容性,其中所述工程化细胞群体组包括(i)第一工程化细胞群体,所述第一工程化细胞群体包含低免疫原性修饰基本组但不包含增加CD46和CD59的表达的修饰,和(ii)第二工程化细胞群体,所述第二工程化细胞群体包含所述低免疫原性修饰基本组以及增加的CD46和CD59的表达,其中所述增加的表达是相对于不包含所述修饰的相同细胞类型的细胞而言的,其中:

[1225] 如果所述患者的血型与所述群体组的ABO血型和Rh因子类型不具有ABO血型不相容性或Rh因子不相容性,则所述方法包括向所述患者施用所述第一工程化细胞群体;以及

[1226] 如果所述患者的血型与所述群体组的ABO血型和/或Rh因子类型具有ABO血型不相容性或Rh因子不相容性,则所述方法包括向所述患者施用所述第二工程化细胞群体。

[1227] 310.如实施方案308或实施方案309所述的方法,其中所述低免疫原性修饰基本组包括如下修饰:

[1228] (i)增加一种或多种致耐受性因子的表达,以及(ii)降低一种或多种MHC I类分子和/或一种或多种MHC II类分子的表达,其中(i)的所述增加的表达以及(ii)的所述降低的表达是相对于不包含所述修饰的相同细胞类型的细胞而言的。

[1229] 311.如实施方案310所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性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以及它们的任何组合。

[1230] 312.如实施方案311所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子选自由以下组成的组:CD47、PD-L1、HLA-E或HLA-G、CCL21、FASL、SERPINB9、CD200、MFGE8以及它们的任何组合。

[1231] 313.如实施方案308或实施方案309所述的方法,其中所述低免疫原性修饰基本组包括增加CCL21、PD-L1、FASL、SERPINB9、HLA-G、CD47、CD200和MFGE8的表达的修饰,其中所述增加的表达是相对于不包含所述修饰的相同细胞类型的细胞而言的。

[1232] 314.如实施方案308-313中任一项所述的方法,其中所述第二工程化细胞群体是包含实施方案1-126和225-232中任一项所述的工程化细胞的群体,或者是实施方案233-244中任一项所述的工程化细胞群体。

[1233] 315.如实施方案308-314中任一项所述的方法,其中所述细胞群体组的所述第一

工程化细胞群体和所述第二工程化细胞群体源自同一供体或源自多于一个供体汇集的细胞,所述多于一个供体是相同供体。

[1234] 316. 如实施方案308-315中任一项所述的方法,其中所述细胞群体组的所述第一工程化细胞群体和所述第二工程化细胞群体具有相同的ABO血型 and Rh因子类型。

[1235] 317. 如实施方案308-316中任一项所述的方法,其中所述确定所述患者的血型是否与一组工程化细胞群体的ABO血型和/或Rh因子类型具有ABO血型不相容性或恒河猴(Rh)因子不相容性包括:

[1236] 确定所述患者的血清是否包含针对ABO血型A抗原的抗体,

[1237] 确定所述患者的血清是否包含针对ABO血型B抗原的抗体,以及/或者

[1238] 确定所述患者的血型是恒河猴(Rh)因子阳性的还是阴性的。

[1239] 318. 如实施方案308-317中任一项所述的方法,其中确定所述患者的血型与所述工程化细胞群体组的ABO血型和Rh因子类型具有血型不相容性,其中:

[1240] (a) 如果(1)所述患者的血清包含针对ABO血型A抗原的抗体并且不包含针对ABO血型B抗原的抗体,并且如果所述患者的血型是恒河猴(Rh)因子阴性的,并且(2)所述群体组的细胞是ABO血型O或ABO血型B并且是Rh因子阴性的,所述方法包括选择所述第一工程化细胞群体用于施用于所述患者;或者

[1241] (b) 如果(1)所述患者的血清包含针对ABO血型B抗原的抗体并且不包含针对ABO血型A抗原的抗体,并且所述患者的血型是Rh因子阴性的,并且(2)所述细胞群体组的细胞是ABO血型O或ABO血型A并且所述细胞是Rh因子阴性的,所述方法包括选择所述第一工程化细胞群体用于施用于所述患者;或者

[1242] (c) 如果(1)所述患者的血清包含针对ABO血型A抗原的抗体和针对ABO血型B抗原的抗体,并且(2)所述细胞群体组的细胞是ABO血型O细胞,所述方法包括选择所述第一工程化细胞群体用于施用于所述患者;或者

[1243] (d) 如果(1)所述患者的血清不包含针对ABO血型A抗原或ABO血型B抗原的抗体并且所述患者的血型是Rh因子阳性的,并且(2)所述细胞群体组的细胞是ABO血型A、ABO血型B、ABO血型AB或ABO血型O细胞并且是Rh因子阴性或Rh因子阳性的,所述方法包括选择所述第一工程化细胞群体用于施用于所述患者;或者

[1244] (e) 如果(1)所述患者的血清不包含针对ABO血型A抗原或ABO血型B抗原的抗体并且所述患者的血型是Rh因子阴性的,并且(2)所述细胞群体组的细胞是ABO血型A、ABO血型B、ABO血型AB或ABO血型O并且是Rh因子阴性的,所述方法包括选择所述第一工程化细胞群体用于施用于所述患者。

[1245] 319. 如实施方案308-317中任一项所述的方法,其中所述患者的血型与所述工程化细胞群体组的ABO血型和Rh因子类型具有ABO血型和/或Rh因子不相容性,其中

[1246] (a) 如果(1)所述患者的血清包含针对ABO血型A抗原的抗体并且不包含针对ABO血型B抗原的抗体,并且所述患者的血型是Rh因子阳性或Rh因子阴性的,并且(2)所述群体组的细胞是ABO血型A或ABO血型AB细胞并且所述群体的细胞是Rh因子阳性或Rh因子阴性的,所述方法包括选择所述第二工程化细胞群体用于施用于所述患者;或者

[1247] (b) 如果(1)所述患者的血清包含针对ABO血型B抗原的抗体并且不包含针对ABO血型A抗原的抗体,并且所述患者的血型是Rh因子阳性或Rh因子阴性的,并且(2)所述细胞群

体组的细胞是ABO血型B或ABO血型AB细胞并且所述群体的细胞是Rh因子阳性或Rh因子阴性的,所述方法包括选择所述第二工程化细胞群体用于施用于所述患者;或者

[1248] (c) 如果(1)所述患者的血清包含针对ABO血型A抗原的抗体和针对ABO血型B抗原的抗体,并且所述患者的血型是Rh因子阳性或Rh因子阴性的,并且(2)所述细胞群体组的细胞是ABO血型A、ABO血型B或ABO血型AB并且所述群体的细胞是Rh因子阳性或Rh因子阴性的,所述方法包括选择所述第二工程化细胞群体用于施用于所述患者;或者

[1249] (d) 如果(1)所述患者的血清不包含针对ABO血型A抗原或ABO血型B抗原的抗体并且所述患者的血型是Rh因子阴性的,并且(2)所述细胞群体组的细胞是ABO血型A、ABO血型B、ABO血型AB或ABO血型O并且是Rh因子阳性的,所述方法包括选择所述第二工程化细胞群体用于施用于所述患者。

[1250] 320. 如实施方案226-307和309-319中任一项的方法,所述方法还包括向所述患者施用一种或多种免疫抑制剂。

[1251] 321. 如实施方案226-307和309-319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。

[1252] 322. 如实施方案320或321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。

[1253] 323. 如实施方案320-322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、柳氮磺胺吡啶、抗疟药、布喹那、来氟米特、咪唑立宾、15-脱氧精肌菌素、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。

[1254] 324. 如实施方案320-323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。

[1255] 325. 如实施方案320-322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。

[1256] 326. 如实施方案320-323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。

[1257] 327. 如实施方案320-323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。

[1258] 328. 如实施方案320-323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。

[1259] 329. 如实施方案320-323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)。

[1260] 330. 如实施方案320-323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。

[1261] 331. 如实施方案320-323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。

[1262] 332. 如实施方案331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。

[1263] 333. 如实施方案322或实施方案332所述的方法,其中所述抗体与选自以下组成的组的受体或配体中的一者或多者结合: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,以及与它们的任何配体结合的抗体。

[1264] 334. 如实施方案320-333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施用所述一种或多种免疫抑制剂。

[1265] 335. 如实施方案320-334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施用所述一种或多种免疫抑制剂。

[1266] 336. 如实施方案320-334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周或更长时间向所述患者施用或已施用所述一种或多种免疫抑制剂。

[1267] 337. 如实施方案320-334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施用所述一种或多种免疫抑制剂。

[1268] 338. 如实施方案320-334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周或更长时间向所述患者施用或已施用所述一种或多种免疫抑制剂。

[1269] 339. 如实施方案320-334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施用所述一种或多种免疫抑制剂。

[1270] 340. 如实施方案320-334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施用所述一种或多种免疫抑制剂。

[1271] 341. 如实施方案320-334中任一项所述的方法,其中在施用所述工程化细胞的第一次和/或第二次施用之后向所述患者施用或已施用所述一种或多种免疫抑制剂。

[1272] 342. 如实施方案320-334中任一项所述的方法,其中在施用所述工程化细胞的第一次和/或第二次施用之前向所述患者施用或已施用所述一种或多种免疫抑制剂。

[1273] 343. 如实施方案320-334中任一项所述的方法,其中在施用所述工程化细胞的第一次和/或第二次施用之前至少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施用所述一种或多种免疫抑制剂。

[1274] 344. 如实施方案320-334中任一项所述的方法,其中在施用所述工程化细胞的第一次和/或第二次施用之前至少1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周或更长时间向所述患者施用或已施用所述一种或多种免疫抑制剂。

[1275] 345. 如实施方案320-334中任一项所述的方法,其中在施用所述工程化细胞的第一次和/或第二次施用之后至少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施用所述一种或多种免疫抑制剂。

[1276] 346. 如实施方案320-334中任一项所述的方法,其中在施用所述工程化细胞的第一次和/或第二次施用之后至少1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周或更长时间向所述患者施用或已施用所述一种或多种免疫抑制剂。

[1277] 347. 如实施方案320-346中任一项所述的方法,其中与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。

[1278] 348.如实施方案226-307和309-347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。

[1279] 349.如实施方案226-307和309-348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。

[1280] 350.如实施方案349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。

[1281] 351.如实施方案349或实施方案350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。

[1282] 352.如实施方案351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天冬酶蛋白。

[1283] 353.如实施方案352所述的方法,其中所述半胱天冬酶蛋白是半胱天冬酶9。

[1284] 354.如实施方案349-353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)、诱导型半胱天冬酶9(iCaspase9)和雷帕霉素活化的半胱天冬酶9(rapaCasp9)。

[1285] 355.如实施方案349-354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。

[1286] 356.如实施方案349-354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。

[1287] 357.如实施方案349-356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。

[1288] 358.如实施方案349-357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,则活化所述自杀基因或所述自杀开关以诱导受控细胞死亡。

[1289] 359.如实施方案226-307和309-349中任一项所述的方法,所述方法包括施用允许消耗所述工程化细胞群体的工程化细胞的剂。

[1290] 360.如实施方案359所述的方法,其中所述允许消耗所述工程化细胞的剂是识别在所述工程化细胞的表面上表达的蛋白质的抗体。

[1291] 361.如实施方案360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。

[1292] 362.如实施方案360或实施方案361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、奥滨尤妥珠单抗、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以及它们的生物类似物。

[1293] 363.如实施方案226-307、309-349和359-362中任一项所述的方法,所述方法包括施用识别所述工程化细胞的表面上的所述一种或多种致耐受性因子的剂。

[1294] 364.如实施方案363所述的方法,其中所述工程化细胞经工程化以表达所述一种或多种致耐受性因子。

[1295] 365.如实施方案310-364中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因

子包括选自由以下组成的组的一种或多种致耐受性因子：A20/TNFAIP3、C1抑制剂、CCL21、CCL22、CD16、CD16 Fc受体、CD24、CD27、CD35、CD39、CD46、CD47、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、Serpina9以及它们的任何组合。

[1296] 366. 如实施方案365所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子包括CD47。

[1297] 367. 如实施方案310-366中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子包括HLA-E。

[1298] 368. 如实施方案310-367中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子包括CD24。

[1299] 369. 如实施方案310-368中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子包括PDL1。

[1300] 370. 如实施方案310-369中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子包括CD55。

[1301] 371. 如实施方案310-370中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子包括CR1。

[1302] 372. 如实施方案310-371中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子包括MANF。

[1303] 373. 如实施方案310-372中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子包括A20/TNFAIP3。

[1304] 374. 如实施方案310-373中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子包括HLA-E和CD47。

[1305] 375. 如实施方案310-374中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子包括选自由CD24、CD47和PDL1组成的组的两种或更多种致耐受性因子,任选地其中所述一种或多种致耐受性因子包括CD24、CD47和PDL1。

[1306] 376. 如实施方案310-375中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子包括选自由HLA-E、CD24、CD47和PDL1组成的组的两种或更多种致耐受性因子,任选地其中所述一种或多种致耐受性因子包括HLA-E、CD24、CD47和PDL1。

[1307] 377. 如实施方案310-376中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子包括选自由CD46、CD55、CD59和CR1组成的组的两种或更多种致耐受性因子,任选地其中所述一种或多种致耐受性因子包括CD46、CD55、CD59和CR1。

[1308] 378. 如实施方案310-377中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子包括选自由HLA-E、CD46、CD55、CD59和CR1组成的组的两种或更多种致耐受性因子,任选地其中所述一种或多种致耐受性因子包括HLA-E、CD46、CD55、CD59和CR1。

[1309] 379. 如实施方案310-378中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子包括选自由HLA-E、CD24、CD47、PDL1、CD46、CD55、CD59和CR1组成的组的两种或更多种致耐受性因子,任选地其中所述一种或多种致耐受性因子包括HLA-E、CD24、CD47、PDL1、CD46、CD55、CD59和CR1。

[1310] 380. 如实施方案310-379中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子包括HLA-E和PDL1。

[1311] 381. 如实施方案310-380中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子包括选自由HLA-E、PDL1和A20/TNFAIP组成的组的两种或更多种致耐受性因子,任选地其中所述一种或多种致耐受性因子包括HLA-E、PDL1和A20/TNFAIP。

[1312] 382. 如实施方案310-381中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子包括选自由HLA-E、PDL1和MANF组成的组的两种或更多种致耐受性因子,任选地其中所述一种或多种致耐受性因子包括HLA-E、PDL1和MANF。

[1313] 383. 如实施方案310-382中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子包括选自由HLA-E、PDL1、A20/TNFAIP和MANF组成的组的两种或更多种致耐受性因子,任选地其中所述一种或多种致耐受性因子包括HLA-E、PDL1、A20/TNFAIP和MANF。

[1314] 384. 如实施方案226-307和309-383中任一项所述的方法,所述方法还包括向所述患者施用一种或多种另外的治疗剂。

[1315] 385. 如实施方案226-307和309-384中任一项所述的方法,其中已向所述患者施用一种或多种另外的治疗剂。

[1316] 386. 如实施方案226-307和309-385中任一项所述的方法,所述方法还包括监测所述方法的治疗功效。

[1317] 387. 如实施方案226-307和309-385中任一项所述的方法,所述方法还包括监测所述方法的预防功效。

[1318] 388. 如实施方案386或实施方案387所述的方法,其中重复所述方法直至出现对一种或多种疾病症状的期望抑制。

[1319] 389. 如实施方案1-126和225-232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的外源多核苷酸。

[1320] 390. 如实施方案1-126和225-232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开关的外源多核苷酸。

[1321] 391. 如实施方案389或实施方案390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)、诱导型半胱天冬酶9(iCaspase9)和雷帕霉素活化的半胱天冬酶9(rapaCasp9)。

[1322] 392. 如实施方案389-390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的基因组中的双顺反子盒表达。

[1323] 393. 如实施方案389-392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性因子由整合到所述工程化细胞的基因组中的双顺反子盒表达。

[1324] 394. 如实施方案392或实施方案393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所述工程化细胞的基因组中而整合的,任选地是通过使用慢病毒载体将所述外源多核苷酸引入所述细胞中而整合的。

[1325] 395. 如实施方案394所述的工程化细胞,其中所述双顺反子盒是通过靶向插入所述细胞的靶基因组基因座中而整合的,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。

[1326] 396. 如实施方案389-395中任一项所述的工程化细胞,其中所述一种或多种致耐

受性因子是CD47。

[1327] 397.如实施方案127-224和266-388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。

[1328] 398.如实施方案397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)、诱导型半胱天冬酶9(iCaspase9)和雷帕霉素活化的半胱天冬酶9(rapaCasp9)。

[1329] 399.如实施方案397或实施方案398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的基因组中的双顺反子盒表达。

[1330] 400.如实施方案397-399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性因子由整合到所述工程化细胞的基因组中的双顺反子盒表达。

[1331] 401.如实施方案399或实施方案400所述的方法,其中所述双顺反子盒是通过非靶向插入所述工程化细胞的基因组中而整合的。

[1332] 402.如实施方案399或实施方案400所述的方法,其中所述双顺反子盒是通过靶向插入所述工程化细胞的靶基因组基因座中而整合的。

[1333] 403.如实施方案397-402中任一项所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性因子是CD47。

[1334] 404.如实施方案245-262中任一项所述的组合物,其中所述工程化细胞群体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。

[1335] 405.如实施方案404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)、诱导型半胱天冬酶9(iCaspase9)和雷帕霉素活化的半胱天冬酶9(rapaCasp9)。

[1336] 406.如实施方案404或实施方案405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体的工程化细胞的基因组中的双顺反子盒表达。

[1337] 407.如实施方案404-406中任一项所述的组合物,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的基因组中的双顺反子盒表达。

[1338] 408.如实施方案406或实施方案407所述的组合物,其中所述双顺反子盒是通过非靶向插入所述基因组中而整合的,任选地是通过使用慢病毒载体将所述外源多核苷酸引入所述工程化细胞群体的工程化细胞中而整合的。

[1339] 409.如实施方案406或实施方案407所述的组合物,其中所述双顺反子盒是通过靶向插入所述工程化细胞群体的工程化细胞的靶基因组基因座中而整合的,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。

[1340] 实施例

[1341] 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。

[1342] 实施例1人B2M<sup>插入缺失/插入缺失</sup>、CIITA<sup>插入缺失/插入缺失</sup>、CD47tg细胞中CD46、CD55和/或CD59的过表达对人ABO不相容性介导的CDC的影响

[1343] 此实施例描述了测试过表达膜结合补体抑制剂对CDC的影响的研究。CD46、CD55和CD59在人B2M<sup>插入缺失/插入缺失</sup>、CIITA<sup>插入缺失/插入缺失</sup>、CD47tg人诱导性多能干细胞(hiPSC)或从B2M

插入缺失/插入缺失、CIITA<sup>插入缺失/插入缺失</sup>、CD47tg hiPSC分化的内皮细胞中单独表达或以各种组合表达。

#### [1344] A. 方法

[1345] CD46、CD55和CD59单独或组合在B2M<sup>插入缺失/插入缺失</sup>、CIITA<sup>插入缺失/插入缺失</sup>、CD47tg低免疫细胞中的转基因表达。使用标准CRISPR/Cas9基因编辑技术产生B2M<sup>插入缺失/插入缺失</sup>、CIITA<sup>插入缺失/插入缺失</sup> hiPSC。使用标准慢病毒载体转导技术用编码外源蛋白的慢病毒载体将编码外源CD47和一种或多种外源膜结合补体抑制剂CD46、CD55和CD59的转基因(tg)引入细胞中。

[1346] 从修饰的hiPSC分化内皮细胞。从包含使用标准慢病毒载体转导技术引入的转基因的B2M<sup>插入缺失/插入缺失</sup>、CIITA<sup>插入缺失/插入缺失</sup> hiPSC分化内皮细胞,用于单独表达CD47或与选自CD46、CD55和CD59的一种或多种外源膜结合补体抑制剂组合表达CD47。如Deuse等人“Hypoimmunogenic derivatives of induced pluripotent stem cells evade immune rejection in fully immunocompetent allogeneic recipients.” Nature biotechnology卷37,3(2019):252-258所述进行内皮细胞分化,所述文献的内容通过引用整体并入本文。

[1347] 流式细胞术。使用抗体特异性试剂通过对细胞进行染色用流式细胞术来评估工程化细胞上的HLA-I、HLA-II、CD47、CD46、CD55和/或CD59的表面表达水平。使用同种型抗体作为对照。汇集工程化细胞进行分析或对工程化细胞进行分选以得到转基因的阳性(+)表面表达(与同种型相比30-60倍表达)、转基因的高(++)表面表达(与同种型相比61-400倍表达)或转基因的超高(+++)表达(与同种型相比超过400倍)。

[1348] 用ABO不相容血清对人细胞进行的CDC测定。将经工程化以过表达CD46;CD55;CD59;CD46和CD59;CD46和CD55;CD55和CD59;或CD46、CD55和CD59的B2M<sup>插入缺失/插入缺失</sup>、CIITA<sup>插入缺失/插入缺失</sup>、CD47tg hiPSC或hiEC与ABO不相容人血清一起孵育,并通过在xCELLigence<sup>TM</sup> MP平台(ACEA Biosciences)上测量随孵育时间变化的细胞裂解情况来分析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)。

#### [1349] B. 结果

[1350] B2M<sup>插入缺失/插入缺失</sup>、CIITA<sup>插入缺失/插入缺失</sup>、CD47tg细胞未受到保护而免于CDC。如图1A和图1B所示,B2M<sup>插入缺失/插入缺失</sup>、CIITA<sup>插入缺失/插入缺失</sup>、CD47tg hiPSC和hiEC各自不表达HLA-I或HLA-II,而过表达CD47。如图2A和图2B所示,B2M<sup>插入缺失/插入缺失</sup>、CIITA<sup>插入缺失/插入缺失</sup>、CD47tg hiPSC和hiEC还各自表现出CD46、CD55和CD59补体抑制性受体的内源表面表达。尽管表达了补体抑制性受体,但结果证明细胞未受到保护而免于CDC。具体地,与ABO不相容血清一起孵育导致B2M<sup>插入缺失/插入缺失</sup>、CIITA<sup>插入缺失/插入缺失</sup>、CD47tg hiPSC(图3A)和B2M<sup>插入缺失/插入缺失</sup>、CIITA<sup>插入缺失/插入缺失</sup>、CD47tg hiEC(图3B)两者的快速杀伤。

[1351] CD46和CD59或CD46、CD55和CD59的过表达保护细胞免于ABO不相容性介导的CDC。为了确定一种或多种膜结合补体抑制剂的过表达是否会保护细胞免于CDC,评估经工程化以过表达CD46、CD55和CD59中的一者或多者的B2M<sup>插入缺失/插入缺失</sup>、CIITA<sup>插入缺失/插入缺失</sup>、CD47tg hiPSC或hiEC对CDC的抗性。

[1352] 下表E1(hiPSC)和表E2(hiEC)中提供了未转导的细胞(内源表达)中或转导的细胞库或单个的克隆中的CD46、CD55和/或CD59的表达水平。转导细胞库和克隆中的过表达如下分类:+=与同种型对照相比30-60倍;+=与同种型对照相比61-400倍,以及+++ =与同种

型对照相比超过400倍。

[1353] 用含有编码单个补体抑制剂受体的转基因的慢病毒载体转导的B2M<sup>插入缺失/插入缺失</sup>、CIITA<sup>插入缺失/插入缺失</sup>、CD47tg hiPSC或hiEC的代表性流直方图表现出增加的CD46(图4A,hiPSC;和图5A,hiEC)、CD55(图6A,hiPSC;和图7A,hiEC)和CD59(图8A,hiPSC;和图9A,hiEC)的表面表达。在B2M<sup>插入缺失/插入缺失</sup>、CIITA<sup>插入缺失/插入缺失</sup>、CD47tg hiPSC或hiEC中单独过表达CD46、CD55或CD59并不能保护细胞免于CDC,即使有以下单个补体抑制剂的超高(+++)表达也是如此:CD46(图4B至图4E,hiPSC;图5B至图5D,hiEC);CD55(图6B至图6E,hiPSC;图7B至图7E,hiEC)或CD59(图8B至图8E,hiPSC;图9B至图9C,hiEC)。B2M<sup>插入缺失/插入缺失</sup>、CIITA<sup>插入缺失/插入缺失</sup>、CD47tg hiPSC(图10A)或B2M<sup>插入缺失/插入缺失</sup>、CIITA<sup>插入缺失/插入缺失</sup>、CD47tg hiEC(图11A)中CD46和CD55的组合的过表达(即使是高(++)表达)提供了针对CDC的一些保护,但不能有效防止细胞死亡,如图10B至图10E(hiPSC)和图11B至图11E(hiEC)所示。尽管未示出数据,但对于B2M<sup>插入缺失/插入缺失</sup>、CIITA<sup>插入缺失/插入缺失</sup>、CD47tg hiPSC中的CD46+CD55+库获得了相似的结果(表E1)。B2M<sup>插入缺失/插入缺失</sup>、CIITA<sup>插入缺失/插入缺失</sup>、CD47tg hiPSC(图12A)或B2M<sup>插入缺失/插入缺失</sup>、CIITA<sup>插入缺失/插入缺失</sup>、CD47tg hiEC(图13A)中CD55和CD59的组合的过表达(即使是高(++)表达)也没有提供针对CDC的任何保护,如图12B至图12E(hiPSC)和图13B至图13E(hiEC)所示。

[1354] 相比之下,B2M<sup>插入缺失/插入缺失</sup>、CIITA<sup>插入缺失/插入缺失</sup>、CD47tg hiPSC(图14A)或B2M<sup>插入缺失/插入缺失</sup>、CIITA<sup>插入缺失/插入缺失</sup>、CD47tg hiEC(图15A)中CD46和CD59组合的过表达显著降低或逃避CDC的细胞杀伤,如图14B至图14E(hiPSC)和图15B至图15E(hiEC)所指示。此外,CD49和CD59的高(++)表达(例如,与同种型对照相比低于100倍,如表E1和E2所示)足以防止CDC,如hiPSC克隆A1(图14C)和克隆A3(图14D)和hiEC克隆A1、A2和A3(图15C至图15E)所指示。

[1355] B2M<sup>插入缺失/插入缺失</sup>、CIITA<sup>插入缺失/插入缺失</sup>、CD47tg hiPSC(图16A)或B2M<sup>插入缺失/插入缺失</sup>、CIITA<sup>插入缺失/插入缺失</sup>、CD47tg hiEC(图17A)中CD46、CD55和CD59的组合的过表达也显著降低或逃避CDC的细胞杀伤,导致hiPSC或hiEC存活,如图16B至图16E(hiPSC)和图17B至图17C(hiEC)所示。

[1356] 图18中提供了仅分化自hiPSC的内皮细胞(hiEC)(即,不添加ABO不相容血清)的CDC测定结果。在ABO不相容血清存在下,仅hiEC(对照)的存活与过表达CD46和CD59(图14B至图14E和图15B至图15E)或CD46、CD55和CD59(图16B至图16E和图17B至图17E)的hiPSC或hiEC的存活之间未观察到显著差异,表明CD46和CD59或CD46、CD55和CD59的过表达阻断CDC。

[1357] 这些结果共同证明了内源性表达CDC抑制剂(包括膜结合补体抑制剂CD46、CD55和CD59)的细胞(包括hiPSC和分化的细胞(诸如hiEC))可能无法充分保护细胞免于CDC,即使是在不会触发先天或适应性免疫应答的B2M<sup>插入缺失/插入缺失</sup>、CIITA<sup>插入缺失/插入缺失</sup>、CD47tg细胞中也是如此。数据表明,CD46与CD59一起过表达或CD46与CD59和CD55一起过表达保护这些细胞免于CDC,即使存在与细胞表面上的抗原结合的IgM/IgG抗体(例如,ABO不相容血清中的抗A或抗B抗体)。

[1358] 表E1.B2M<sup>插入缺失/插入缺失</sup>、CIITA<sup>插入缺失/插入缺失</sup>、CD47tg hiPSC中CD46、CD55和/或CD59的表达数据

	人 iPSC 细胞库/克隆	CD46 同种型的倍数变化	CD55 同种型的倍数变化	CD59 同种型的倍数变化
[1359]	B2M <sup>插入缺失/插入缺失</sup> 、CIITA <sup>插入缺失/插入缺失</sup> 、CD47tg hiPSC	21	6	12
	CD46+库	82	-	-
	CD46+++ hiPSC 克隆 1	753	-	-
	CD46+++ hiPSC 克隆 2	640	-	-
	CD55+库	-	28	-
	CD55++ hiPSC 克隆 1	-	80	-
	CD55++ hiPSC 克隆 2	-	104	-
[1360]	CD55++ hiPSC 克隆 3	-	97	-
	CD59+库	-	-	36
	CD59++ hiPSC 克隆 1	-	-	243
	CD59++ hiPSC 克隆 2	-	-	70
	CD59+++ hiPSC 克隆 3	-	-	498
	CD46+ CD55+库	52	40	-
	CD46+++ CD55++库	637	66	-
	CD46++ CD55++ hiPSC 克隆 1	95	266	-
	CD46++ CD55++ hiPSC 克隆 2	189	245	-
	CD46++ CD55++ hiPSC 克隆 3	110	195	-
	CD46+++ CD59++库	574	-	219
	CD46++ CD59++ hiPSC 克隆 1	363	-	295
	CD46++ CD59+++ hiPSC 克隆 2	314	-	447
	CD46++ CD59++ hiPSC 克隆 3	247	-	60
	CD55++ CD59++库 1	-	236	186
	CD55++ CD59++库 2	-	95	90
	CD55++ CD59++ hiPSC 克隆 1	-	121	157
	CD55++ CD59++ hiPSC 克隆 2	-	63	92
	CD55++ CD59+++ hiPSC 克隆 3	-	85	458
	CD46++ CD55++ CD59+库	146	86	46
CD46++ CD55++ CD59++ hiPSC 克隆 1	180	86	60	
CD46+++ CD55+ CD59++ hiPSC 克隆 2	274	42	63	
CD46++ CD55++CD59++ hiPSC 克隆 3	88	62	67	

[1361] 表E2.B2M<sup>插入缺失/插入缺失</sup>、CIITA<sup>插入缺失/插入缺失</sup>、CD47tg hiEC中CD46、CD55和/或CD59的表达数据

	人 iEC 细胞库/克隆	CD46 同种型的倍数变化	CD55 同种型的倍数变化	CD59 同种型的倍数变化
[1362]	B2M <sup>插入缺失/插入缺失</sup> 、CIITA <sup>插入缺失/插入缺失</sup> 、CD47tg hiEC	9	7	76
	CD46++ hiEC 库	208	-	-
	CD46+++ hiEC 克隆 1	117	-	-
	CD46+++ 克隆 2	98	-	-
	CD55++ 库	-	201	-
	CD55++ hiEC 克隆 1	-	155	-
	CD55++ hiEC 克隆 2	-	256	-
[1363]	CD55++ hiEC 克隆 3	-	136	-
	CD59+++ 库	-	-	420
	CD59++ hiEC 克隆 1	-	-	361
	CD46++ CD55++ 库	290	184	-
	CD46++ CD55++ hiEC 克隆 1	287	216	-
	CD46++ CD55++ hiEC 克隆 2	471	274	-
	CD46++ CD55++ hiEC 克隆 3	340	458	-
	CD46++ CD59++ 库	110	-	105
	CD46++ CD59++ hiEC 克隆 1	318	-	156
	CD46++ CD59++ hiEC 克隆 2	95	-	127
	CD46++ CD59++ hiEC 克隆 3	103	-	73
	CD55++ CD59+++ 库	-	163	749
	CD55++ CD59++ hiEC 克隆 1	-	312	283
	CD55++ CD59+++ hiEC 克隆 2	-	168	527
	CD55++ CD59+++ hiEC 克隆 3	-	263	583
	CD46++ CD55++ CD59++ 库	206	284	90
CD46++ CD55++ CD59 + hiEC 克隆 1	166	75	50	

[1364] 实施例2B2M<sup>插入缺失/插入缺失</sup>、CIITA<sup>插入缺失/插入缺失</sup>、CD47tg细胞中CD46、CD55和/或CD59的过表达对IgG抗体介导的CDC的影响

[1365] 此实施例证明,在存在与细胞表面上的抗原结合的抗体(例如,单克隆抗体)的情况下,CD46和CD59的过表达或CD46、CD55和CD59的过表达保护细胞免于CDC。

[1366] A. 方法

[1367] 低免疫miPSC和转基因表达.使用标准CRISPR/Cas9基因编辑技术产生B2M<sup>插入缺失/插入缺失</sup>、CIITA<sup>插入缺失/插入缺失</sup>小鼠诱导性多能干细胞(miPSC)。使用标准慢病毒载体转导技术用编码外源蛋白的慢病毒载体将编码外源CD47和一种或多种外源膜结合补体抑制剂CD46、CD55和CD59的转基因(tg)引入细胞中。还将截短的EGFR转基因(EGFRtg)引入细胞中,所述转基因在细胞表面表达并保留表位,以便于在补体依赖性细胞毒性测定中使用抗EGFR抗体进行靶向。

[1368] 流式细胞术.如以上实施例1中所述使用抗体特异性试剂通过对细胞进行染色用流式细胞术来评估工程化miPSC细胞上的HLA-I、HLA-II、CD47、CD46、CD55和/或CD59的表面表达水平。

[1369] 用ABO不相容血清对人细胞进行的CDC测定.将还经工程化以过表达CD46;CD55;CD59;CD46和CD59;CD46和CD55;CD55和CD59;CD46、CD55和CD59的B2M<sup>插入缺失/插入缺失</sup>、CIITA<sup>插入缺失/插入缺失</sup>、CD47tg;EGFRtg miPSC与西妥昔单抗(IgG抗EGFR抗体)和人血清(含有人补体)一起孵育,并如以上实施例1中所述分析CDC的细胞杀伤。

[1370] CD46和CD59或CD46、CD55和CD59的过表达保护细胞免于抗体介导的CDC。为了确定一种或多种膜结合补体抑制剂的过表达是否会保护细胞免于CDC,评估经工程化以过表达CD46和CD59或CD46、CD55和CD59中的一者或多者的表达EGFRt的B2M<sup>插入缺失/插入缺失</sup>、CIITA<sup>插入缺失/插入缺失</sup>、CD47tg miPSC对CDC的抗性。

[1371] 下表E3中提供了B2M<sup>插入缺失/插入缺失</sup>、CIITA<sup>插入缺失/插入缺失</sup>;CD47tg;EGFRtg miPSC或用CD46和CD59或用CD46、CD59和CD55转导的B2M<sup>插入缺失/插入缺失</sup>、CIITA<sup>插入缺失/插入缺失</sup>;CD47tg;EGFRtg miPSC细胞库中的CD46、CD55和CD59的表达水平。正如预期的那样,在B2M<sup>插入缺失/插入缺失</sup>、CIITA<sup>插入缺失/插入缺失</sup>;CD47tg;EGFRtg miPSC中未观察到人CD46、CD55或CD59的表达。经CD46和CD59或CD46、CD59和CD55转导的细胞库中的过表达如下分类:+=与同种型对照相比30-60倍;+=与同种型对照相比61-400倍,以及+++与同种型对照相比超过400倍。

[1372] 如图19A所示,与西妥昔单抗一起孵育触发B2M<sup>插入缺失/插入缺失</sup>、CIITA<sup>插入缺失/插入缺失</sup>、CD47tg;EGFRtg miPSC中的快速杀伤。相比之下,所述miPSC中CD46和CD59或CD46、CD55和CD59的过表达显著降低或避免CDC的细胞杀伤,如图19B和图19C所示。

[1373] 这些结果共同证实了在存在靶向细胞表面抗原的抗体的情况下,CD46和CD59或CD46、CD55和CD59过表达的保护作用。

[1374] 表E3.

小鼠 iPSC 库	CD46 同种型的倍数变化	CD55 同种型的倍数变化	CD59 同种型的倍数变化
[1375] B2M <sup>插入缺失/插入缺失</sup> 、CIITA <sup>插入缺失/插入缺失</sup> 、CD47tg miPSC	1	1	1
CD46+ CD59+ 库	18	-	40
CD46+ CD55+ CD59++ 库	12	20	138

[1376] 实施例3物种特异性补体抑制

[1377] 此实施例表明,人补体抑制剂的补体抑制具有物种特异性,并且不能有效保护细胞免于非人补体。

[1378] 跨物种CDC测定.如以上实施例1中所述产生从过表达CD46和CD59或CD46、CD55和CD59的hiPSC分化的B2M<sup>插入插入</sup>、CIITA<sup>插入插入</sup>;CD47tg内皮细胞(hiEC)。将过表达CD46和CD59或CD46、CD55和CD59的B2M<sup>插入缺失/插入缺失</sup>、CIITA<sup>插入缺失/插入缺失</sup>、CD47tg hiEC与ABO不相容恒河猴血清(血清B)一起孵育,并如以上实施例1中所述分析CDC的细胞杀伤。

[1379] 人补体抑制剂的过表达不能防止非人ABO不相容性介导的CDC。如图20A至图20B所示,过表达人CD46和人CD59补体抑制性受体的B2M<sup>插入缺失/插入缺失</sup>、CIITA<sup>插入缺失/插入缺失</sup>;CD47tg hiEC

未受到保护而免于由ABO不相容恒河猴血清(血清B)触发的跨物种CDC。类似地,如图20C至图20D所示,过表达人CD46、人CD55和人CD59补体抑制性受体的B2M<sup>插入缺失/插入缺失</sup>、CIITA<sup>插入缺失/插入缺失</sup>;CD47tg hiEC未受到保护而免于由ABO不相容恒河猴血清(血清B)触发的跨物种CDC杀伤。

[1380] 这些数据证明,人补体抑制性受体CD46和CD59或CD46、CD55和CD59的保护作用对于人补体的抑制是特异性的。

[1381] 本发明的范围并不局限于具体公开的实施方案,这些实施方案是为了举例说明本发明的各个方面而提供的。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践此类变化,并且此类变化意图落入本公开的范围。

[1382] 序列

[1383]

#	序列	注释
1	QLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFVTNMEAQNTTEVYV KWFKGRDIYTFD GALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKG DASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETIHELKYR VVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGGM DEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGL IVTSTGILILLHYVVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVV GLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVAS NQKTIQPPRKAVEEPLNAFKESKGMNDE	人 CD47; aa 19-323
2	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTV VIPCFVTNMEAQNTTEVYVKWFKGRDIYTFD GALNK TVPTDFSSAKIEVSQLLKG DASLKMDKSDAVSHTGNYT CEVTELTREGETIHELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILL FWGQFGIKTLKYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGA ILFVPGEYSLKNATGLGLIVTSTGILILLHYVVFSTAIGL SFVIAILVIQVIAYILAVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSI LALAQLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRKAVEEPLNAFKE SKGMNDE	人 CD47; aa 1-323
3	CEEPPTFEAMELIGKPKPYEIGERVDYKCKKGYFYIPP LATH TICDRNHTWLPVSDDACYRETCPYIRDPLNGQAV PANGTYEFGYQMHFICNEGYYLIGEEILYCELKGSVAIW SGKPPICEKVLCTPPP KIKNGKHTFSEVEVFEYLDAVTYS CDPAPGDPFSLIGESTIYCGDNSVWSRAAPECKVVKCR FPVVENGKQISGFGKKFYKATVMFECDKGFYLDGSDT IVCDSNSTWDPPVPKCLKVLPPSSTKPPALSHSVSTSST KSPASSASGPRPTYKPPVSNYPGYPKPEEGILDSL DVWV IAVIVIAIVGVAVICVVPYRYLQRRKKKGTYL TDETHR EVKFTSL	人 CD46, aa 35-392
4	MEPPGRRECPFPSWRFPGLLLAAMVLLLYSFS DACEEPP TFEAMELIGKPKPYEIGERVDYKCKKGYFYIPPLATH ICDRNHTWLPVSDDACYRETCPYIRDPLNGQAVPANGT YEFYQMHFICNEGYYLIGEEILYCELKGSVAIW SGKPP ICEKVLCTPPP KIKNGKHTFSEVEVFEYLDAVTYS CDPAPGDPFSLIGESTIYCGDNSVWSRAAPECKVVKCRFPVVE NGKQISGFGKKFYKATVMFECDKGFYLDGSDTIVCDS	人 CD46; aa 1-392

[1384]

	NSTWDPPVPKCLKVLPPSSTKPPALSHSVSTSSSTTKSPAS SASGPRPTYKPPVSNYPGYPKPEEGILDSLVDVWVIAVIVI AIVVGVAVICVVPYRYLQRRKKKGYLTDETHREVKFT SL	
5	LQCYNCPNPTADCKTAVNCSSDFDAKLITKAGLQVYNK CWKFEHCNFNDVTTTLRENELTYCCKKDLNCFNEQL ENGGTSLSEKTVLLLVTPLAAAWSLHP	人 CD59; aa 26-128
6	MGIQGGSVLFGLLLVLAVFCHSGHSLQCYNCPNPTADC KTAVNCSSDFDAKLITKAGLQVYNK CWKFEHCNFNDV TTTLRENELTYCCKKDLNCFNEQL ENGGTSLSEKTVL LLVTPLAAAWSLHP	人 CD59; aa 1-128
7	LQCYNCPNPTADCKTAVNCSSDFDAKLITKAGLQVYNK CWKFEHCNFNDVTTTLRENELTYCCKKDLNCFNEQL EN	成熟人 CD59; aa 26-102
8	DCGLPPDVPNAQPALEGRTSFPEDTVITYKCEESFVKIPG EKDSVICLKGSQWSDIEEFCNRSCEVPTRLNSASLKQPYI TQNYFPVGTVVEYECRPGYRREPSLSPKLTCLQNLKWS TAVEFCKKKSCPNPGEIRNGQIDVPGGILFGATISFSCNT GYKLFGSTSSFCCLISGSSVQWSDPLPECREIYCPAPPQID NGIIQGERDHYGYRQSVTYACNKGFTMIGEHSIYCTVN NDEGEWSGPPPECRGKSLTSKVPPTVQKPTTVNVPTTE VSPTSQKTTTKTTTPNAQATRSTPVSRTTKHFHETTPNK GSGTTS GTTRLLSGHTCFTLTGLLGTLVTMGLLT	人 CD55; aa 35-381
9	MTVARPSVPAALPLL GELPRLLLL VLLCLPAVWGDCGL PPDVPNAQPALEGRTSFPEDTVITYKCEESFVKIPGEKDS VICLKGSQWSDIEEFCNRSCEVPTRLNSASLKQPYITQN YFPVGTVVEYECRPGYRREPSLSPKLTCLQNLKWSTAV EFCKKKSCPNPGEIRNGQIDVPGGILFGATISFSCNTGYK LFGSTSSFCCLISGSSVQWSDPLPECREIYCPAPPQIDNGII QGERDHYGYRQSVTYACNKGFTMIGEHSIYCTVNNDE GEWSGPPPECRGKSLTSKVPPTVQKPTTVNVPTTEVSPT SQKTTTKTTTPNAQATRSTPVSRTTKHFHETTPNK GSGT TSGTTRLLSGHTCFTLTGLLGTLVTMGLLT	人 CD55; aa 1-381
10	DCGLPPDVPNAQPALEGRTSFPEDTVITYKCEESFVKIPG EKDSVICLKGSQWSDIEEFCNRSCEVPTRLNSASLKQPYI TQNYFPVGTVVEYECRPGYRREPSLSPKLTCLQNLKWS TAVEFCKKKSCPNPGEIRNGQIDVPGGILFGATISFSCNT GYKLFGSTSSFCCLISGSSVQWSDPLPECREIYCPAPPQID NGIIQGERDHYGYRQSVTYACNKGFTMIGEHSIYCTVN NDEGEWSGPPPECRGKSLTSKVPPTVQKPTTVNVPTTE VSPTSQKTTTKTTTPNAQATRSTPVSRTTKHFHETTPNK GSGTTS	成熟人 CD55; aa 35-353
11	EGRGSLTTCGDVEENPGP	T2A
12	LEGGEGEGRGSLTTCGDVEENPGPR	T2A
13	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
14	ATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
15	QCTNYALLKLAGDVESNPGP	E2A
16	VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP	F2A

[1385]

17	GSGEGRGSLTTCGDVEENPGP	T2A
18	AAGSGEGRGSLTTCGDVVENPGP	T2A
19	GUUUUAGAGCUA	示例性 crRNA 重复 序列
20	UAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACU UGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUU	示例性 tracrRNA
	GAAA	四环序列

**B2M** 插入缺失/插入缺失; **CIITA** 插入缺失/插入缺失; **CD47tg** hiPSC

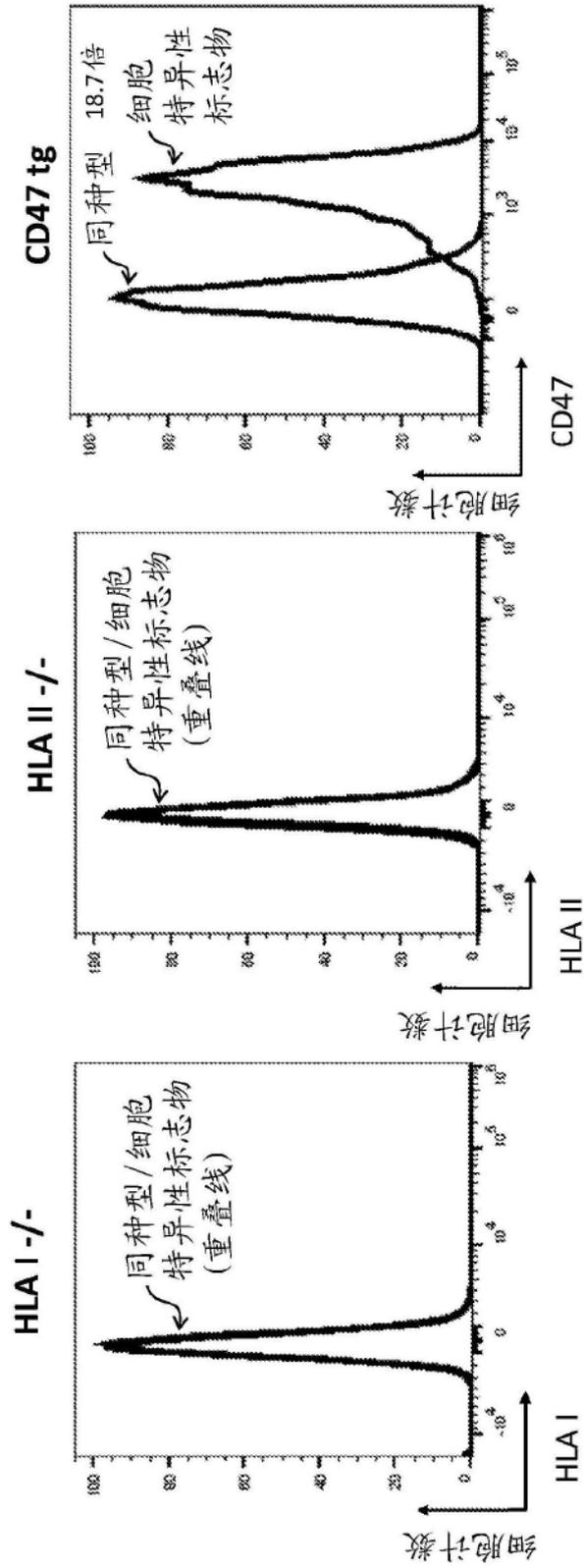


图1A

B2M 插入缺失/插入缺失; CIITA 插入缺失/插入缺失; CD47tg hiEC

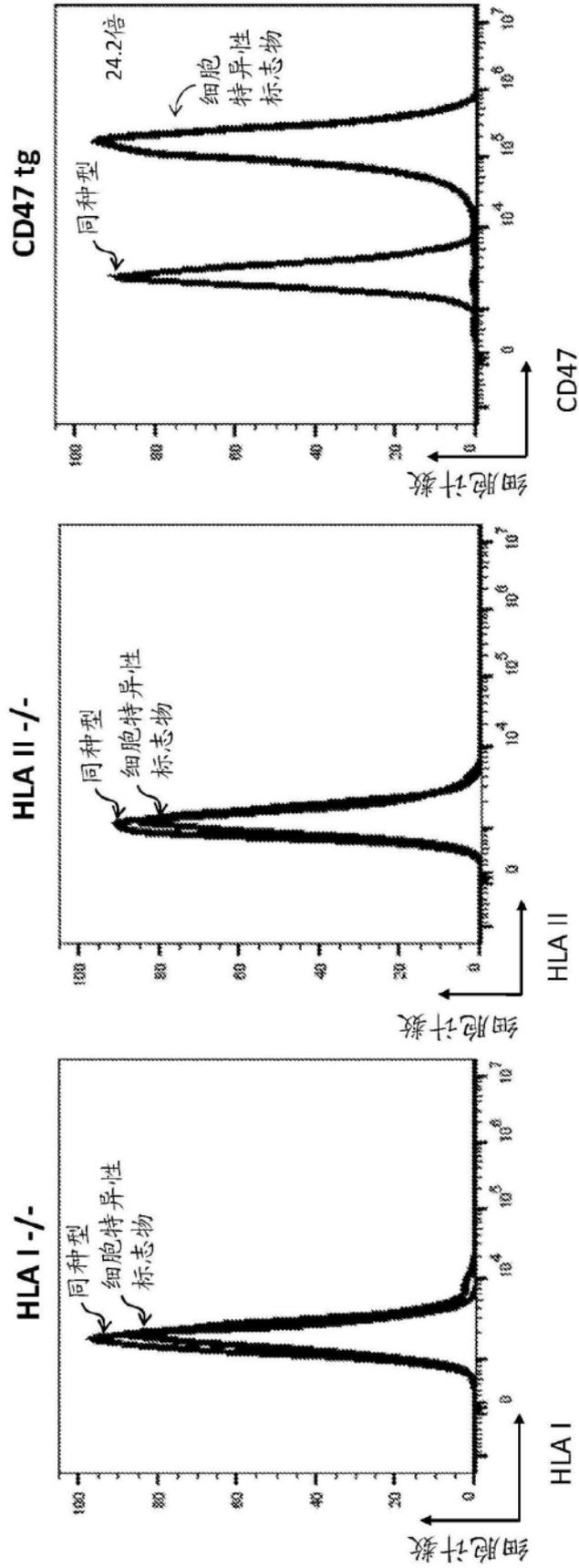


图1B

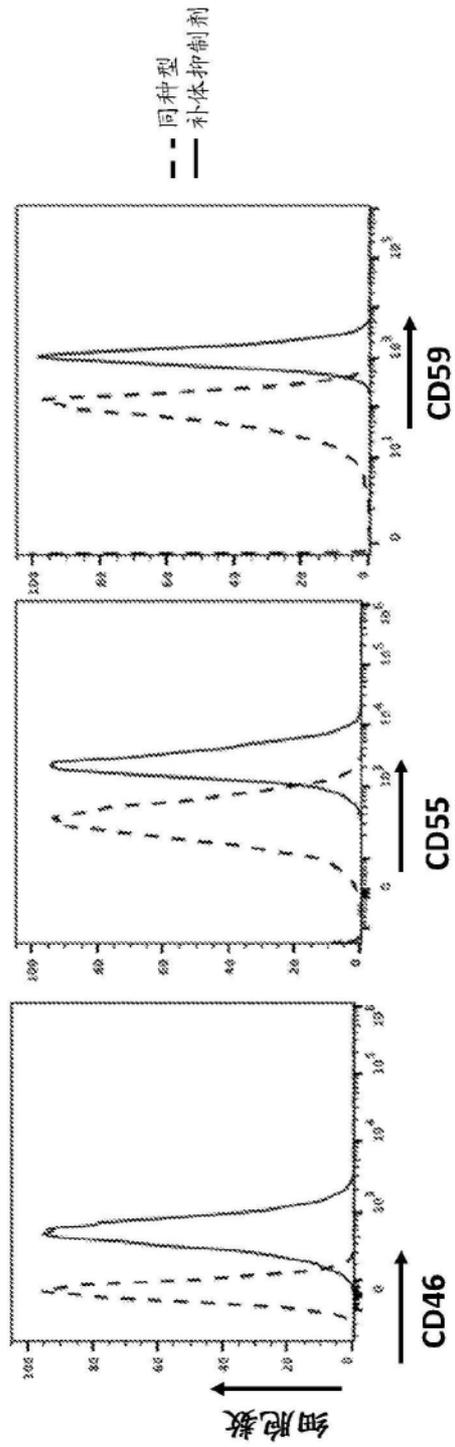


图2A

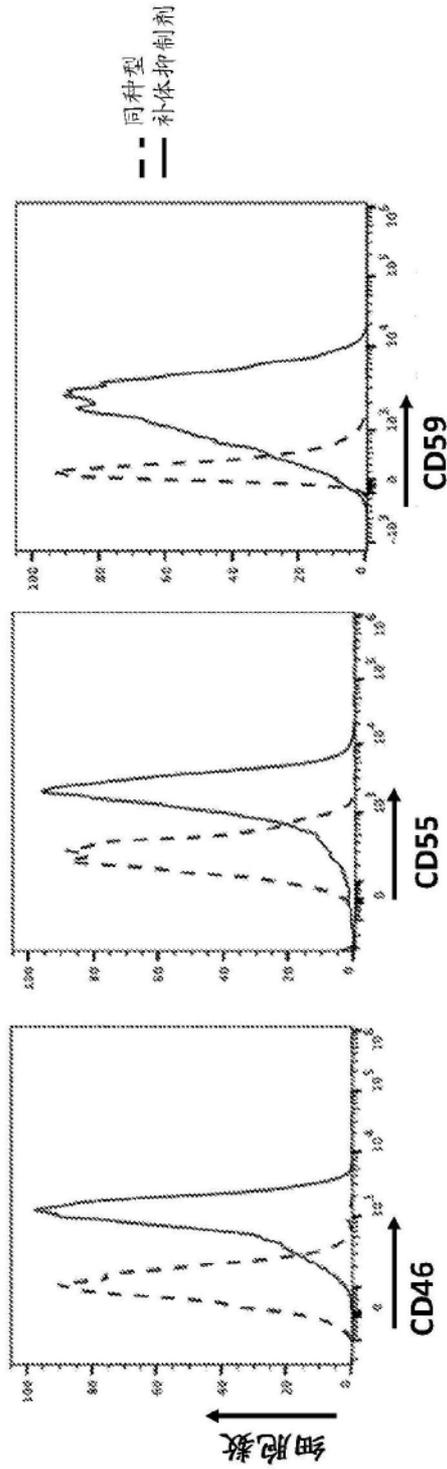


图2B

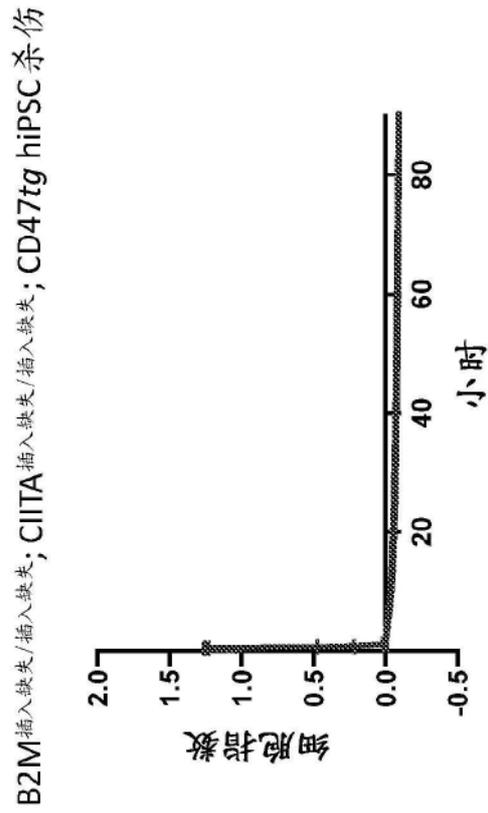


图3A

B2M 插入缺失/插入缺失; CIITA 插入缺失/插入缺失; CD47tg hiEC 杀伤

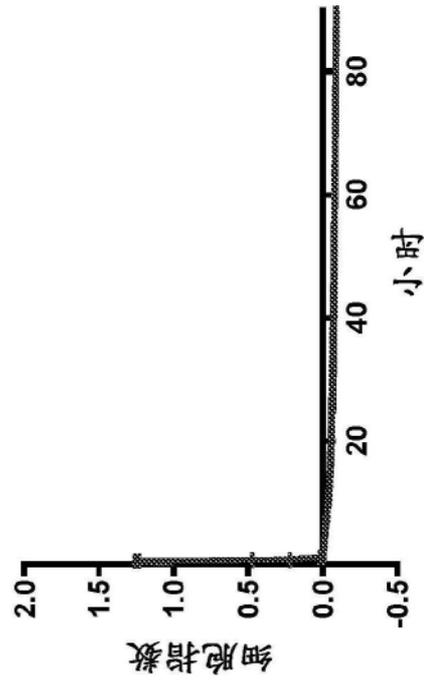


图3B

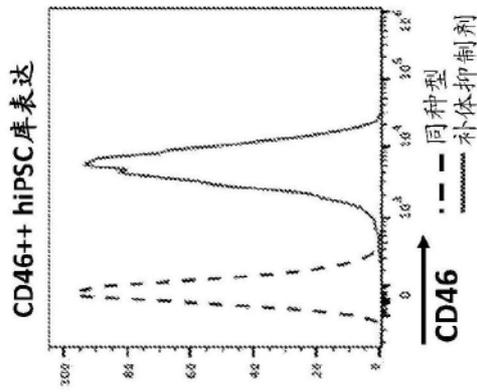


图4A

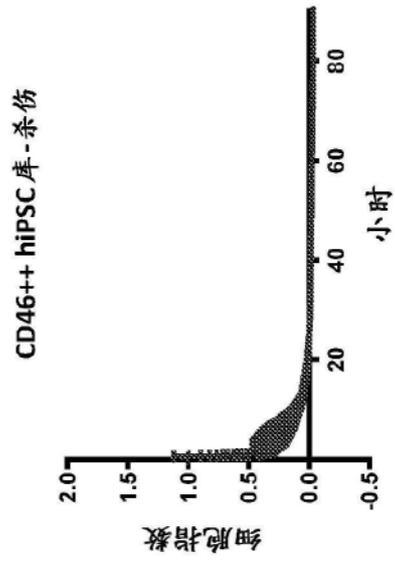


图4B

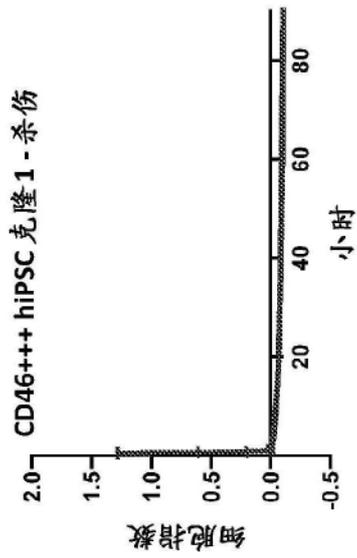


图4C

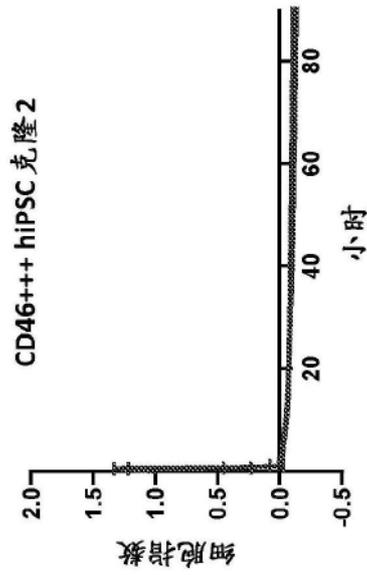


图4D

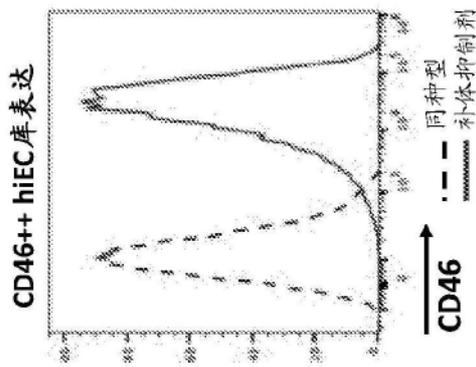


图5A

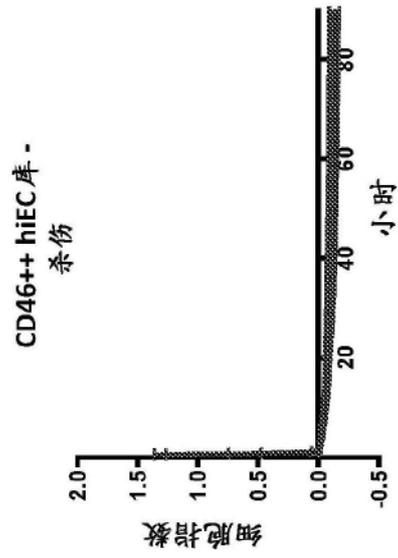


图5B

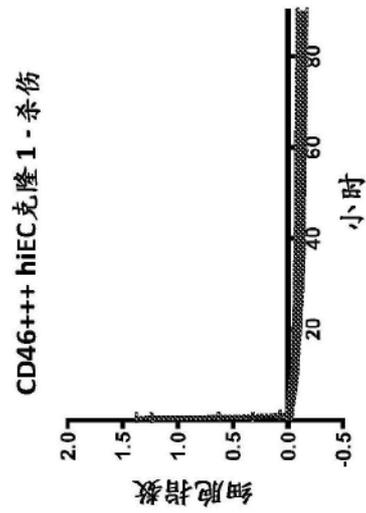


图5C

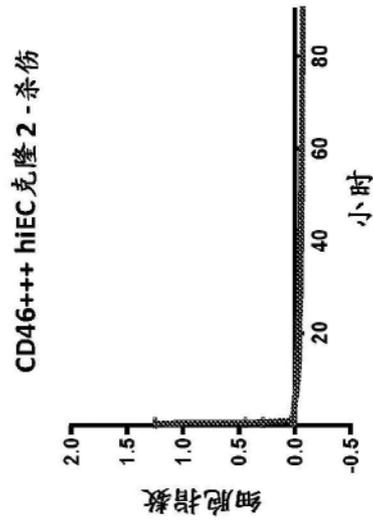


图5D

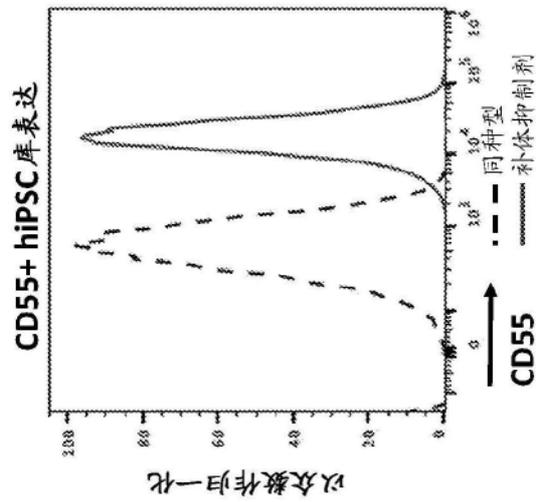


图6A

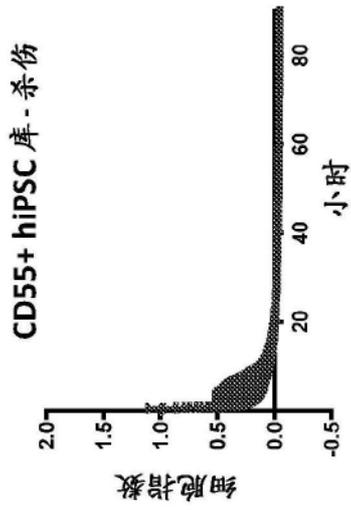


图6B

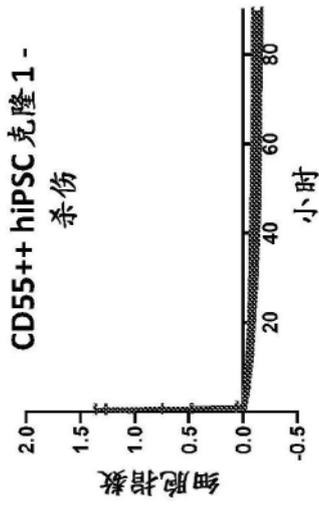


图6C

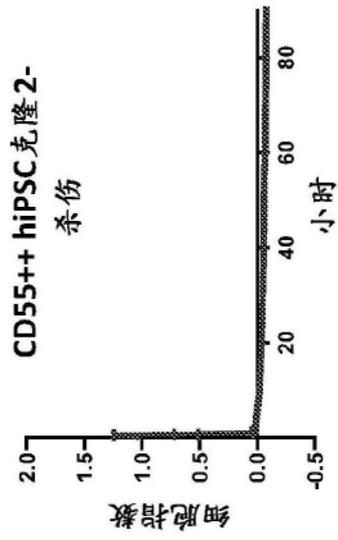


图6D

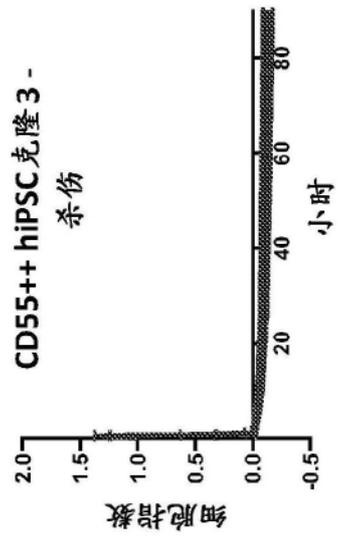


图6E

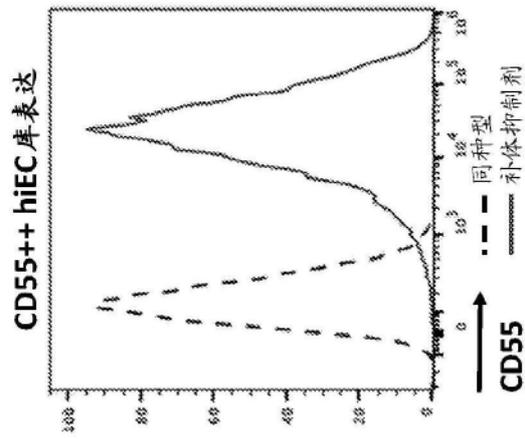


图7A

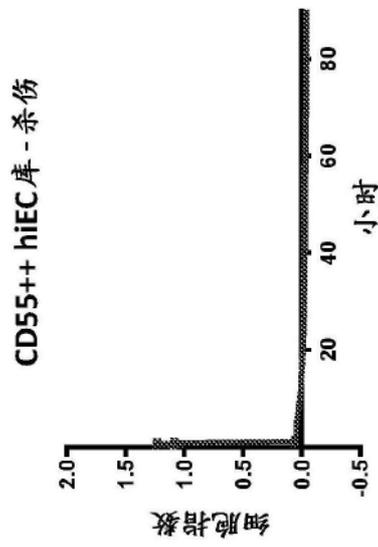


图7B

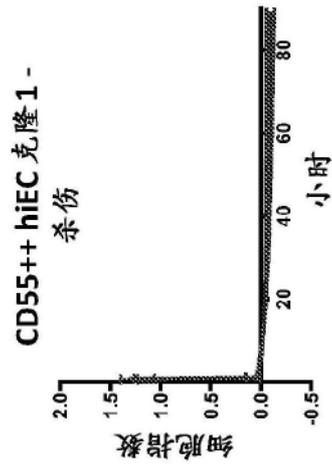


图7C

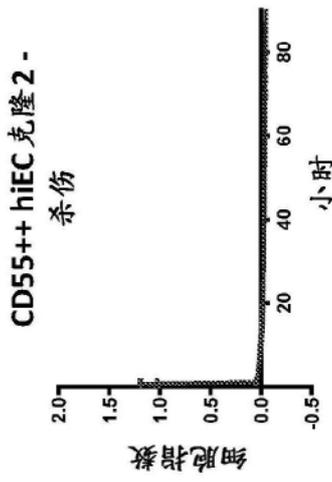


图7D

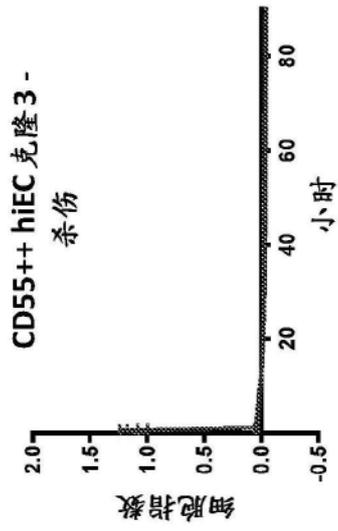


图7E

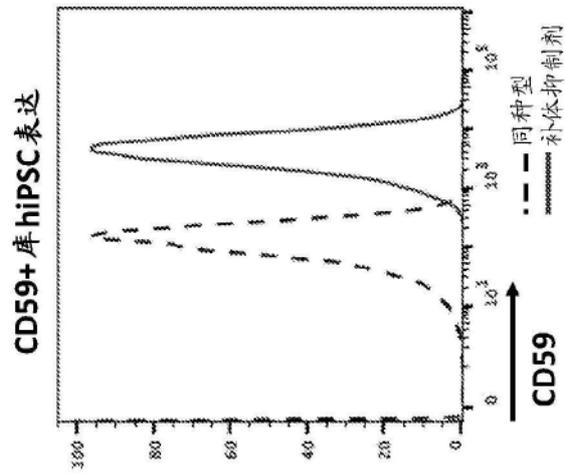


图8A

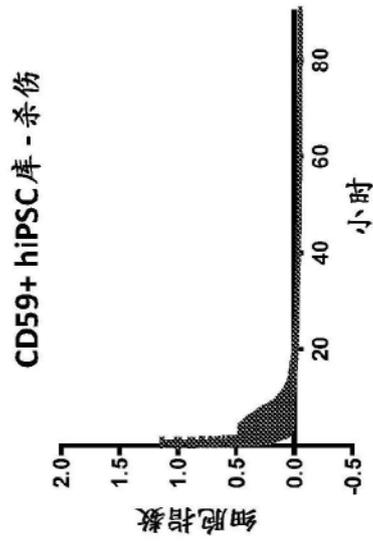


图8B

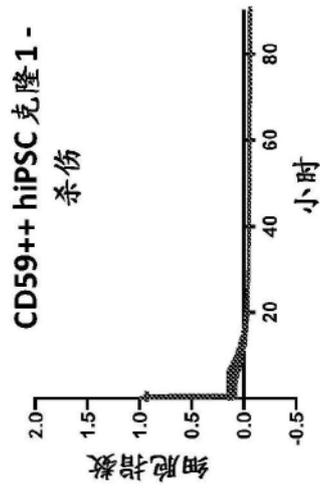


图8C

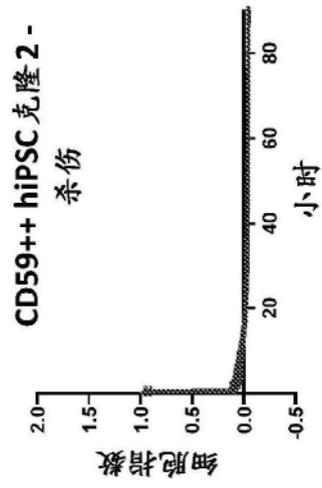


图8D

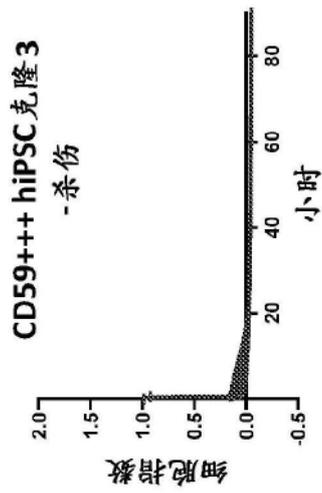


图8E

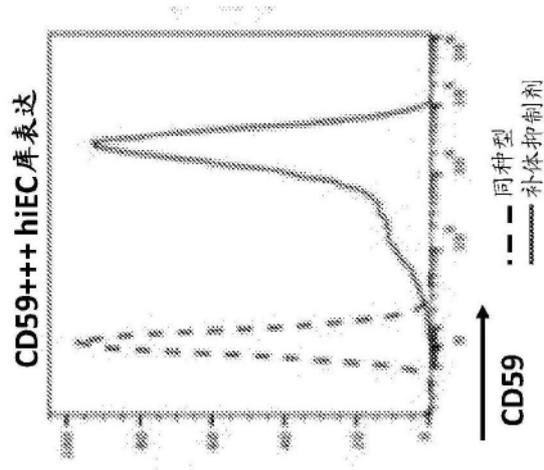


图9A

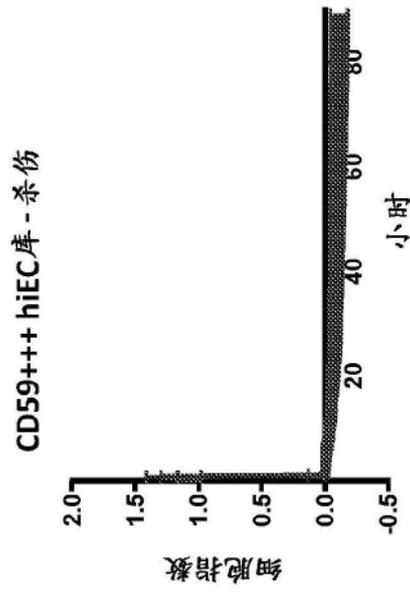


图9B

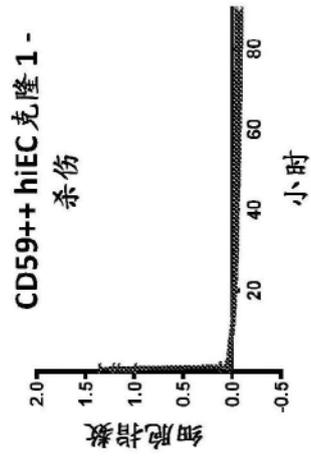


图9C

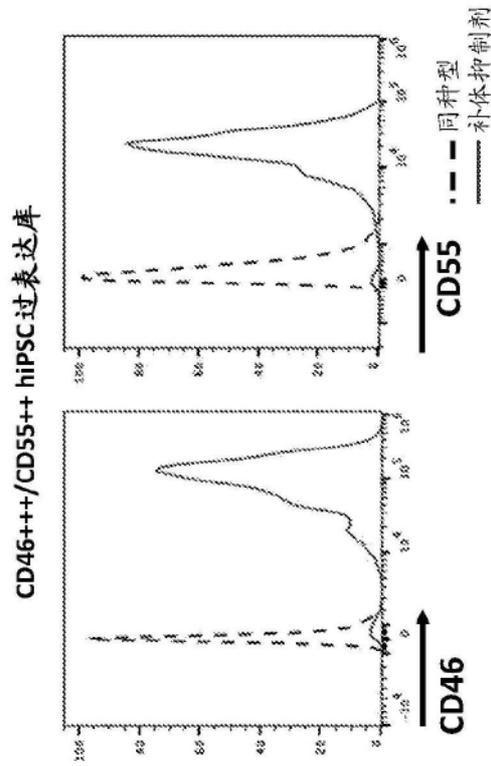


图10A

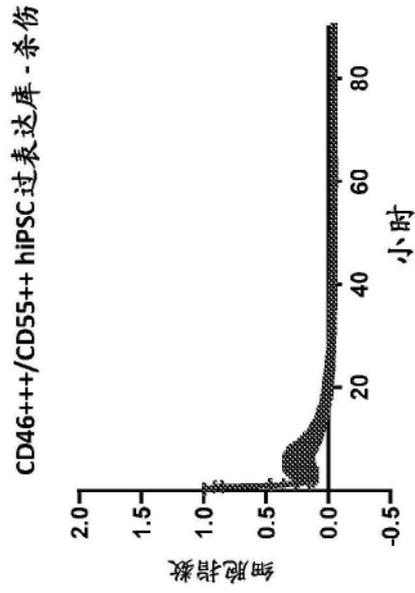


图10B

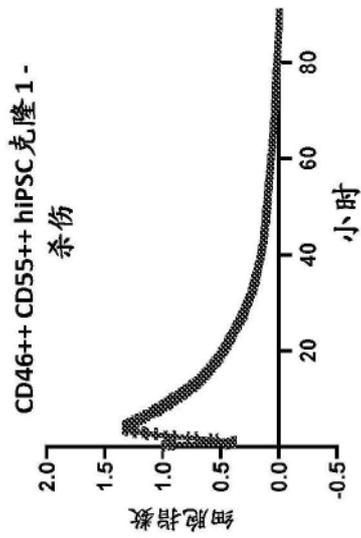


图10C

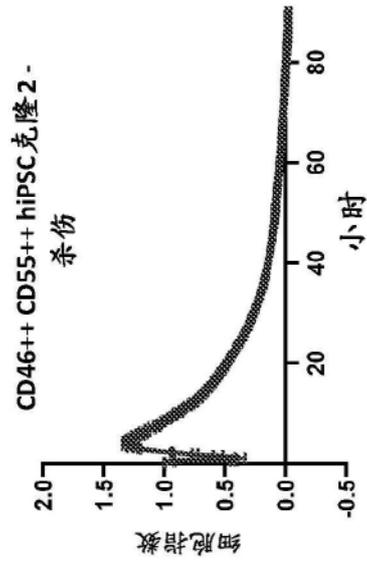


图10D

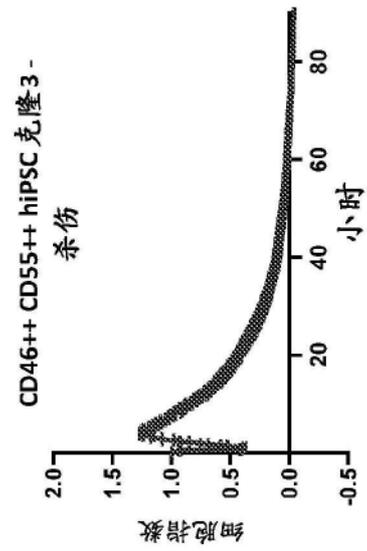


图10E

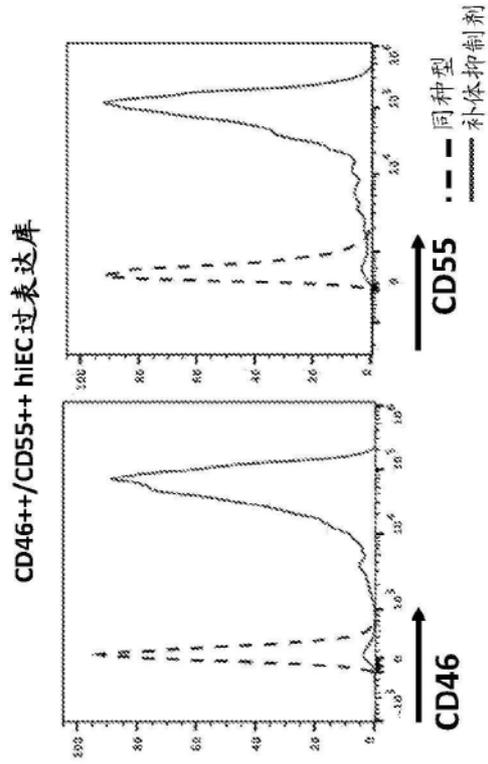


图11A

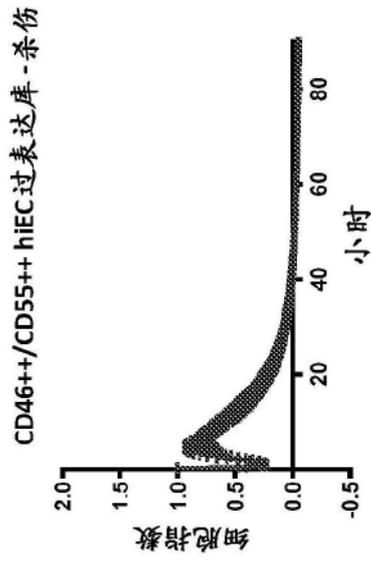


图11B

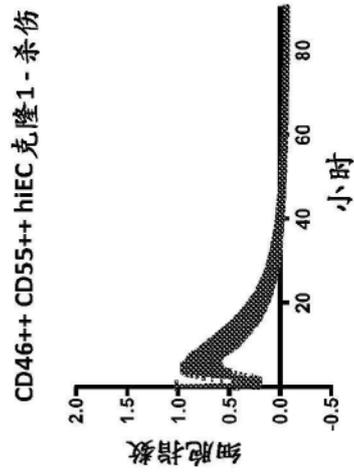


图11C

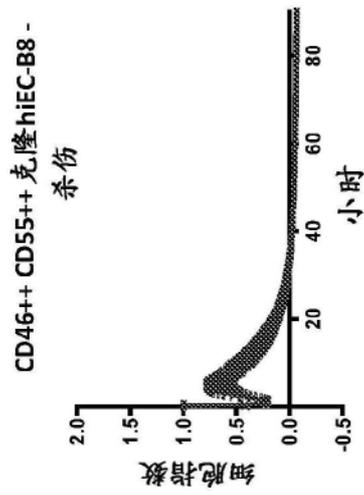


图11D

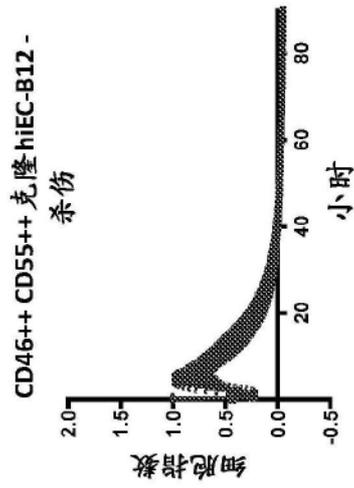


图11E

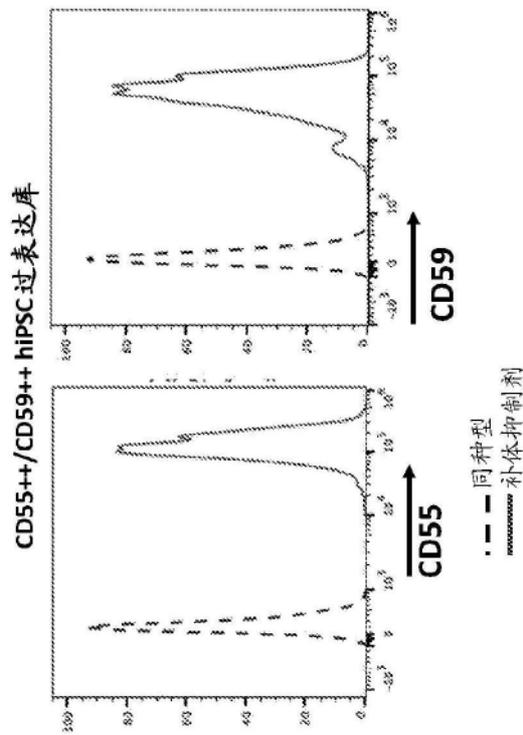


图12A

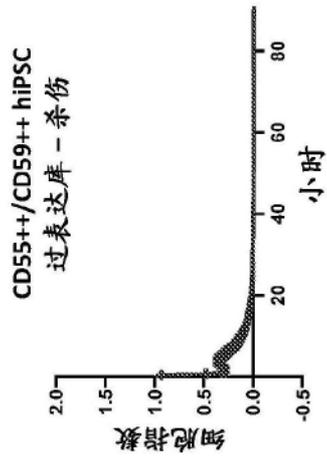


图12B

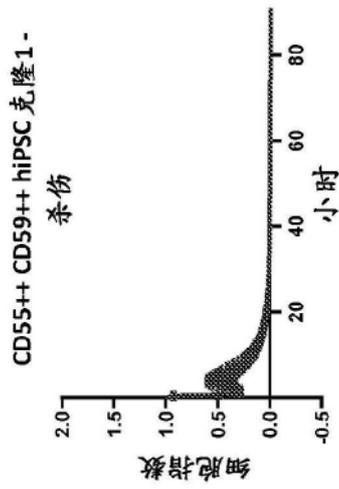


图12C

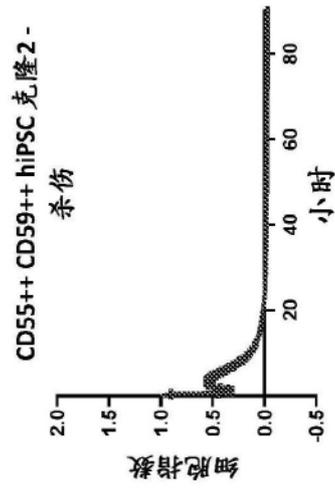


图12D

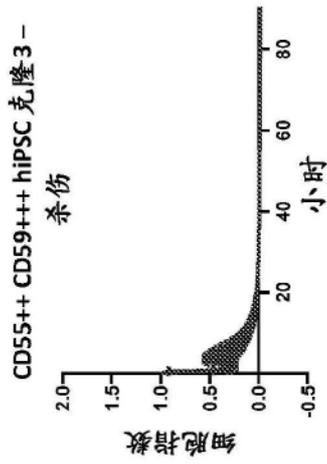


图12E

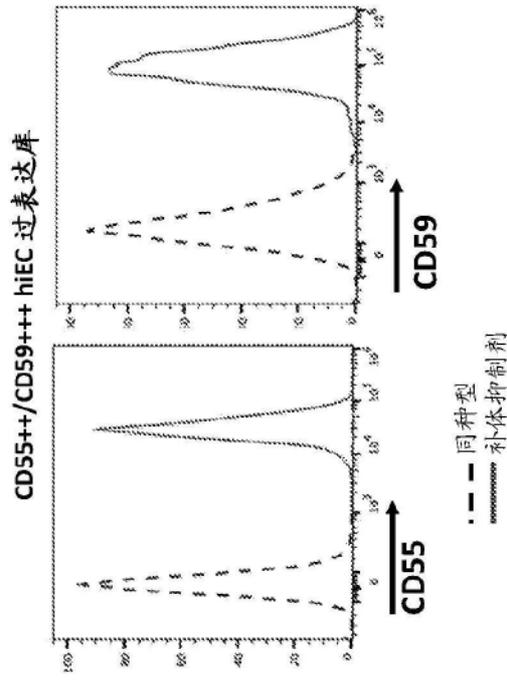


图13A

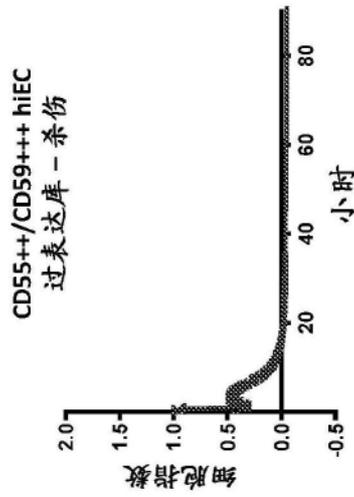


图13B

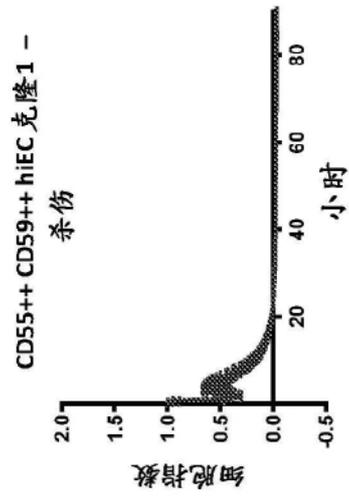


图13C

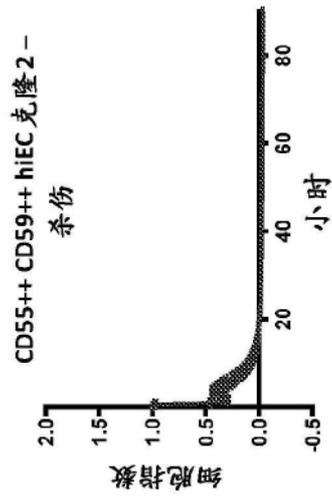


图13D

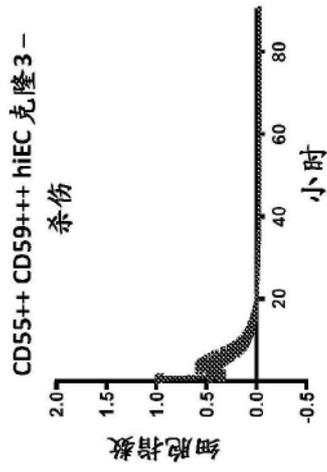


图13E

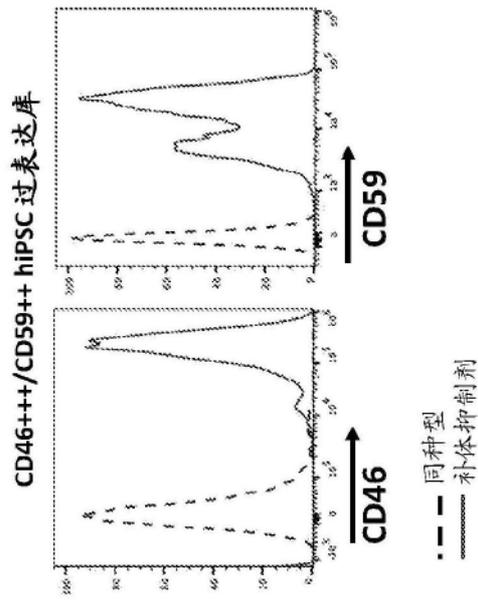


图14A

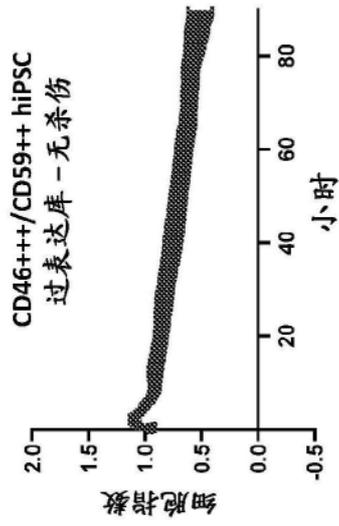


图14B

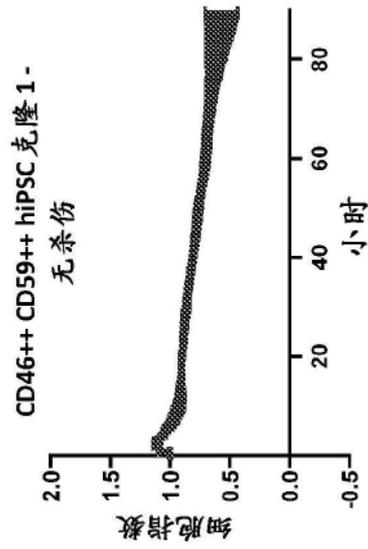


图14C

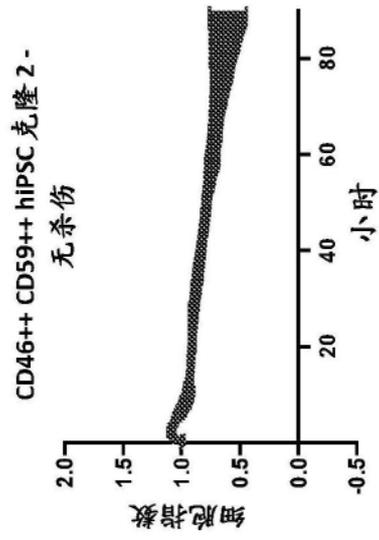


图14D

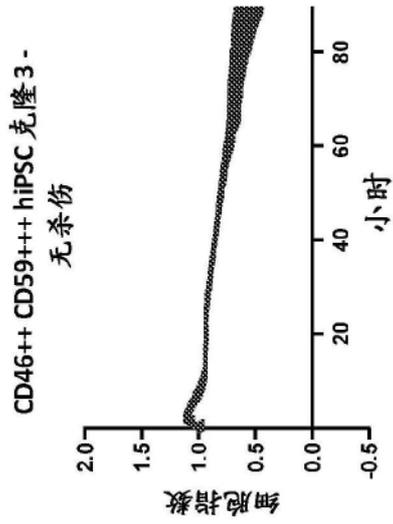


图14E

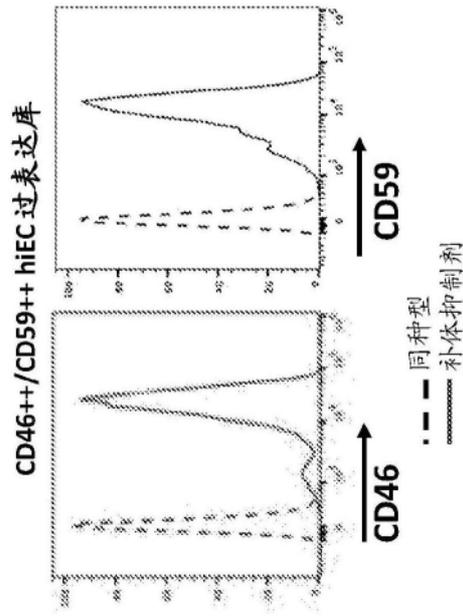


图15A

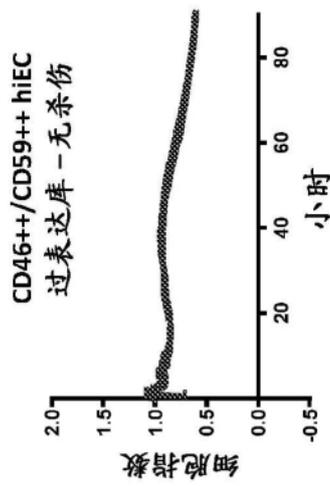


图15B

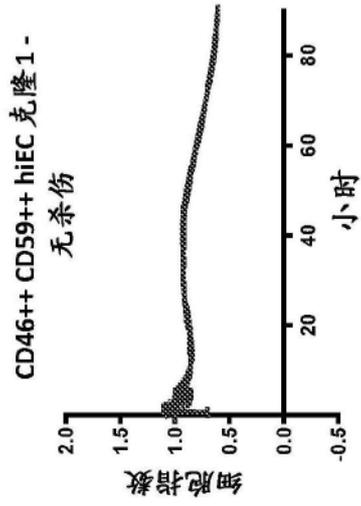


图15C

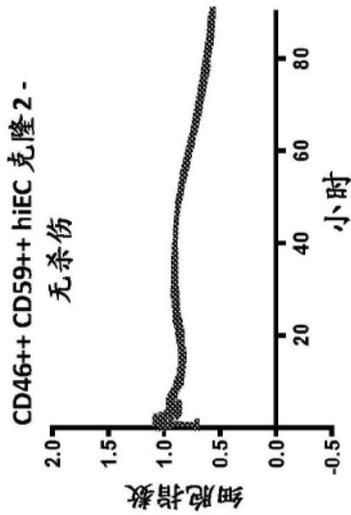


图15D

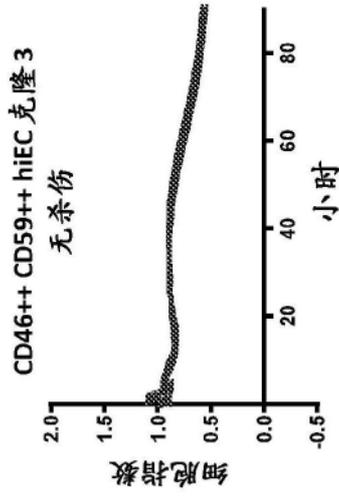


图15E

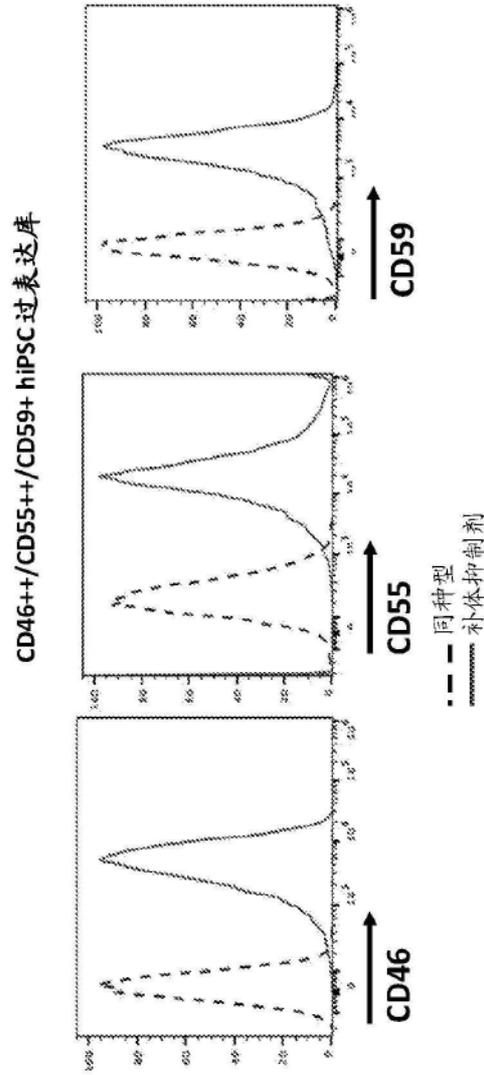


图16A

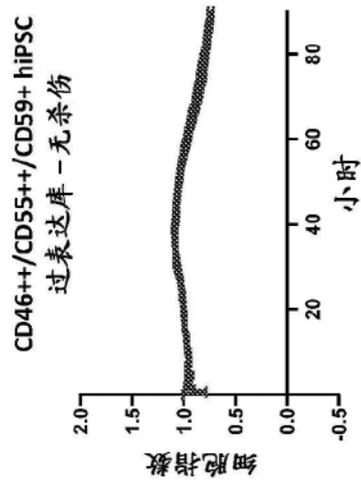


图16B

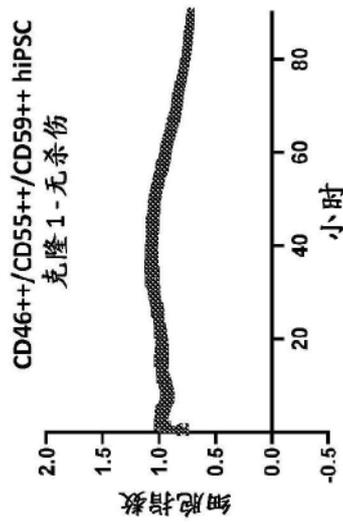


图16C

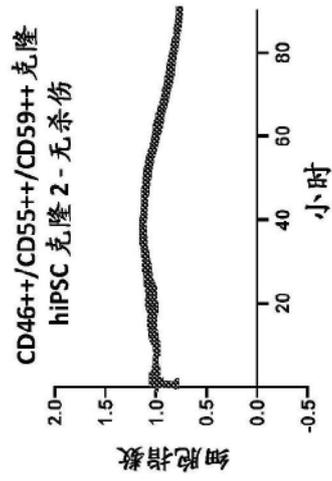


图16D

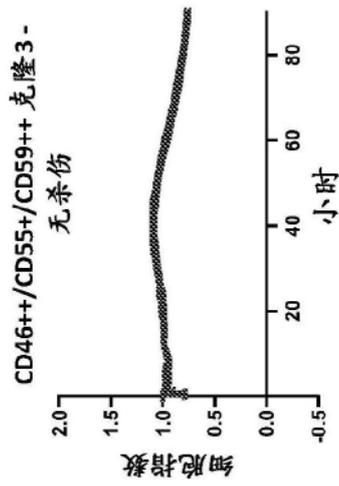


图16E

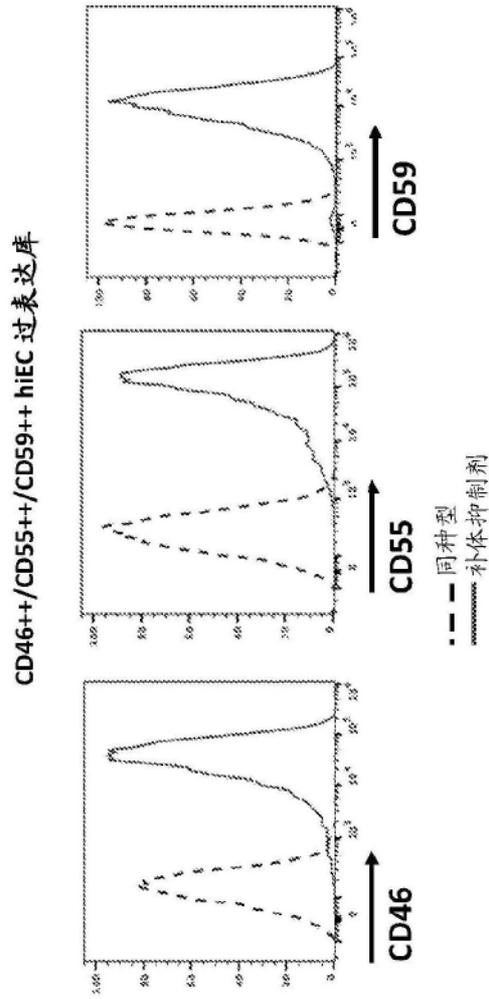


图17A

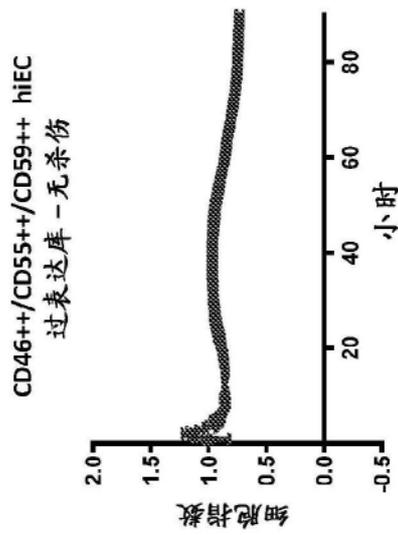


图17B

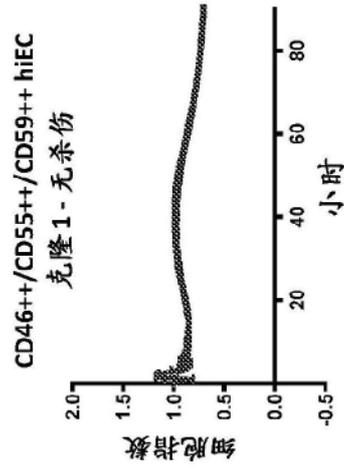


图17C

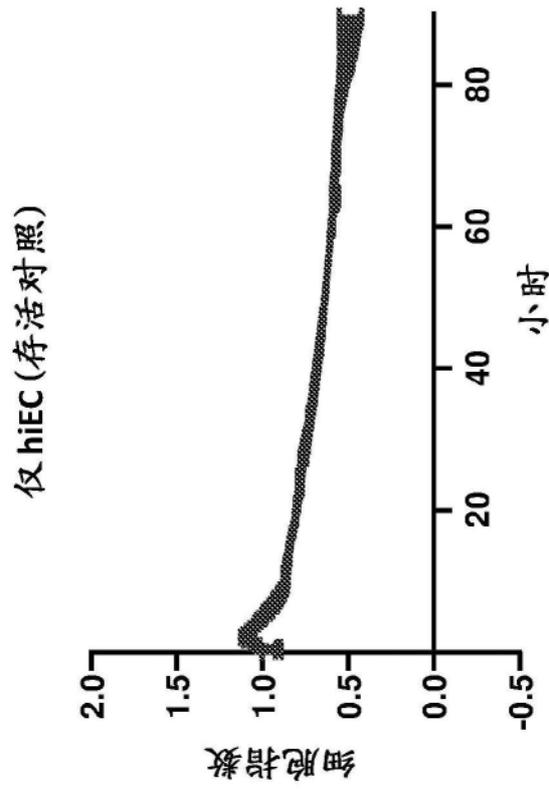


图18

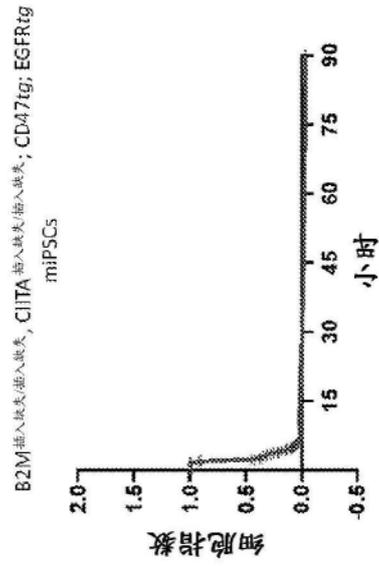


图19A

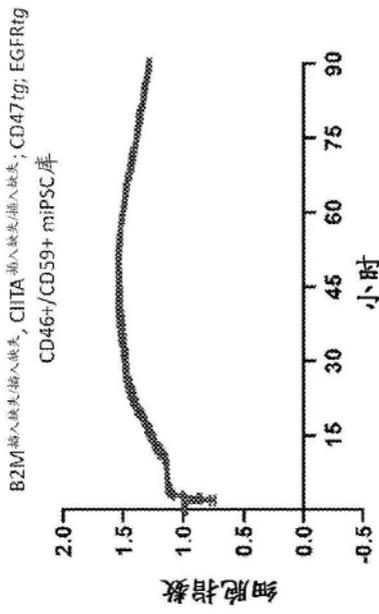


图19B

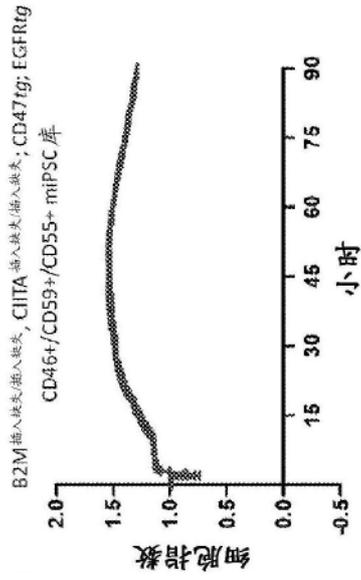


图19C

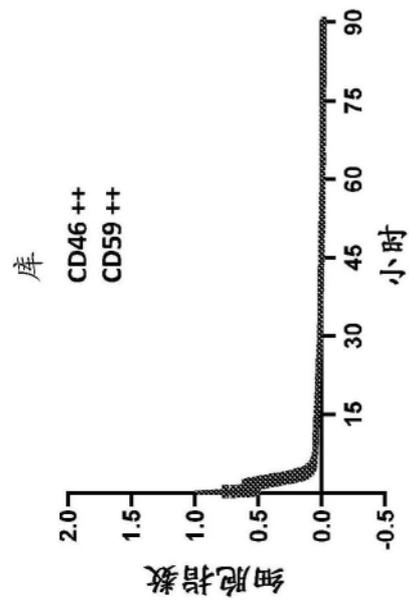


图20A

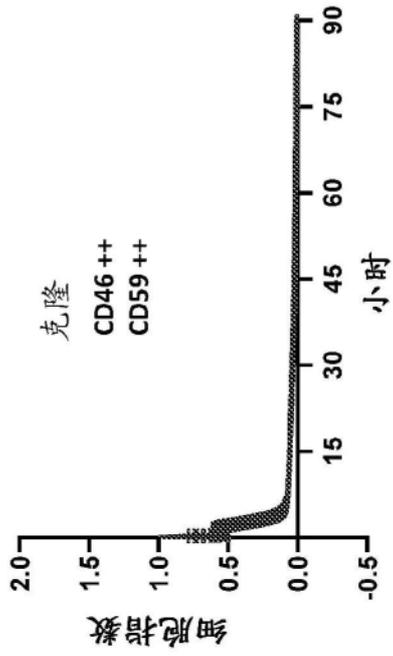


图20B

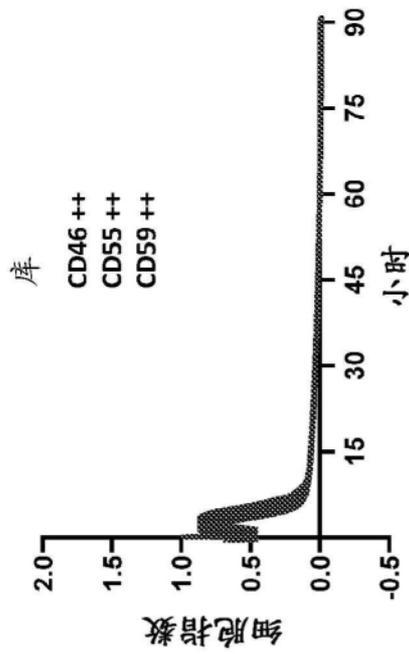


图20C

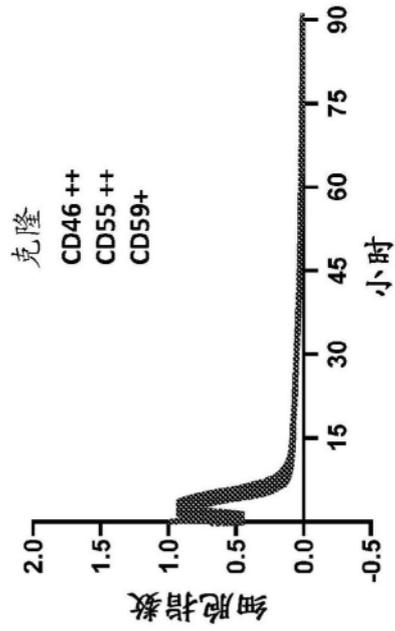


图20D