



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 117813102 A

(43) 申请公布日 2024. 04. 02

(21) 申请号 202280052739.X

(22) 申请日 2022.07.28

(30) 优先权数据

63/226,559 2021.07.28 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.01.26

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/074251 2022.07.28

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/010073 EN 2023.02.02

(71) 申请人 小利兰·斯坦福大学托管委员会

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 安苏曼·萨特帕蒂

朱莉娅·贝尔克

(74) 专利代理机构 成都超凡明远知识产权代理
有限公司 51258

专利代理师 张大皓

(51) Int.Cl.

A61K 35/17 (2006.01)

C12P 19/34 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 38/46 (2006.01)

权利要求书5页 说明书37页
序列表(电子公布) 附图103页

(54) 发明名称

用于改善T细胞持久性和功能的组合物和方法

(57) 摘要

本文提供了包括经修饰以去除在T细胞耗竭中发挥作用的基因的T细胞的组合物,及其组合物和方法。提供了工程化T细胞,其缺失选自以下组成的组的至少一种基因:IN080C、GATA3、ARID1A、WDR82、TRP53、GPR137C、ZFP219、HDAC1、ELMSAN1和ACTR8。还提供了缺失编码染色质重塑蛋白的至少一种基因的工程化T细胞,该染色质重塑蛋白包括IN080核小体定位复合体蛋白和SWI/SNF家族成员(例如,BAF复合体蛋白)。提供了治疗受试者的疾病或疾患的方法,其包括给药工程化T细胞。还提供了用于防止工程化T细胞耗竭的方法、制备治疗性T细胞的方法和鉴定在T细胞耗竭中发挥作用的基因的方法。

1. 一种工程化T细胞,所述工程化T细胞缺失选自以下组成的组的至少一种基因: INO80C、GATA3、ARID1A、WDR82、TRP53、GPR137C、ZFP219、HDAC1、ELMSAN1和ACTR8。

2. 根据权利要求1所述的工程化T细胞,其中,所述工程化T细胞缺失选自以下组成的组的两种或更多种基因: INO80C、GATA3、ARID1A、WDR82、TRP53、GPR137C、ZFP219、HDAC1、ELMSAN1和ACTR8。

3. 一种工程化T细胞,所述工程化T细胞缺失至少一种染色质重塑蛋白或编码其的基因。

4. 根据权利要求3所述的工程化T细胞,其中,所述工程化T细胞缺失两种或更多种染色质重塑蛋白或编码其的基因。

5. 根据权利要求3或4所述的工程化T细胞,其中,所述至少一种染色质重塑蛋白是 INO80核小体定位复合体蛋白或SWI/SNF家族成员或其组合。

6. 根据权利要求5所述的工程化T细胞,其中,所述INO80核小体定位复合体蛋白是 Actr5、Ino80、Ino80c、Ino80b、Actr8或其组合。

7. 根据权利要求5或6所述的工程化T细胞,其中,所述SWI/SNF家族成员是cBAF复合体的成员。

8. 根据权利要求5-7中任一项所述的工程化T细胞,其中,所述SWI/SNF家族成员是 Arid1a、Arid2、Arid1b、Smarcb1、Smarcd2、Smarca4、Smarcc1或其组合。

9. 根据权利要求3-8中任一项所述的工程化T细胞,其中,所述工程化T细胞进一步缺失选自以下组成的组的至少一种基因: GATA3、WDR82、TRP53、GPR137C、ZFP219、HDAC1和 ELMSAN1。

10. 根据权利要求1-9中任一项所述的工程化T细胞,其中,在非工程化T细胞表现出耗竭的条件下,所述工程化T细胞保持功能性。

11. 根据权利要求1-10中任一项所述的工程化T细胞,进一步包括外源性受体或编码其的核酸。

12. 根据权利要求11所述的工程化T细胞,其中,所述外源性受体是T细胞受体 (TCR) 或嵌合抗原受体 (CAR)。

13. 根据权利要求11或12所述的工程化T细胞,其中,所述外源性受体对肿瘤抗原具有特异性。

14. 根据权利要求1-13中任一项所述的工程化T细胞,其中,所述T细胞源自受试者的生物样品。

15. 根据权利要求14所述的工程化T细胞,其中,所述T细胞分离自肿瘤样品。

16. 根据权利要求1-15中任一项所述的工程化T细胞,其中,所述T细胞是离体扩增的。

17. 一种组合物,所述组合物包括权利要求1-16中任一项所述的工程化T细胞群。

18. 根据权利要求17所述的组合物,进一步包括至少一种治疗剂。

19. 根据权利要求18所述的组合物,其中,所述至少一种治疗剂选自以下组成的组: 用于治疗T细胞耗竭的试剂;抗病毒剂;抗生素剂;抗微生物剂;化疗剂;或其组合。

20. 一种制备治疗性T细胞的方法,其包括以下步骤:

获得包括T细胞的样品;

改变所述T细胞的DNA以敲除或破坏选自以下组成的组的至少一种基因: INO80C、

GATA3、ARID1A、WDR82、TRP53、GPR137C、ZFP219、HDAC1、ELMSAN1和ACTR8;以及工程化所述T细胞以表达外源性受体。

21. 一种制备治疗性T细胞的方法,所述方法包括以下步骤:

获得包括T细胞的样品;

改变所述T细胞的DNA以敲除或破坏编码染色质重塑蛋白的至少一种基因;以及工程化所述T细胞以表达外源性受体。

22. 根据权利要求21所述的方法,其中,至少一种染色质重塑蛋白是INO80核小体定位复合体蛋白或SWI/SNF家族成员或其组合。

23. 根据权利要求22所述的方法,其中,所述INO80核小体定位复合体蛋白是Actr5、Ino80、Ino80c、Ino80b、Actr8或其组合。

24. 根据权利要求22或23所述的方法,其中,所述SWI/SNF家族成员是cBAF复合体的成员。

25. 根据权利要求22-24中任一项所述的方法,其中,所述SWI/SNF家族成员是Arid1a、Arid2、Arid1b、Smarcb1、Smarcd2、Smarca4、Smarcc1或其组合。

26. 根据权利要求21-25中任一项所述的方法,其中,所述方法进一步包括改变所述T细胞的DNA以敲除或破坏选自由以下组成的组的至少一种基因:GATA3、WDR82、TRP53、GPR137C、ZFP219、HDAC1和ELMSAN1。

27. 根据权利要求20-26中任一项所述的方法,其中,所述T细胞来自受试者。

28. 根据权利要求20-27中任一项所述的方法,其中,所述T细胞分离自肿瘤样品。

29. 根据权利要求27或28所述的方法,进一步包括离体扩增所述T细胞。

30. 根据权利要求20-29中任一项所述的方法,其中,所述外源性受体是T细胞受体(TCR)或嵌合抗原受体(CAR)。

31. 根据权利要求30所述的方法,其中,所述外源性受体对肿瘤抗原具有特异性。

32. 根据权利要求20-31中任一项所述的方法,其中,改变所述DNA防止或减少所述T细胞的耗竭。

33. 一种用于治疗受试者的疾病或疾患的方法,其包括向所述受试者给药有效量的权利要求1-16中任一项所述的工程化T细胞或权利要求17-19中任一项所述的组合物。

34. 根据权利要求33所述的方法,其中,所述疾病或疾患包括感染或癌症。

35. 根据权利要求34所述的方法,其中,所述癌症包括肿瘤。

36. 根据权利要求33-35中任一项所述的方法,其中,所述给药降低所述受试者中癌细胞的数量。

37. 根据权利要求33-36中任一项所述的方法,其中,所述给药降低和/或消除所述受试者中的肿瘤负荷。

38. 根据权利要求33-37中任一项所述的方法,其中,与给药未修饰的T细胞相比,所述给药示出增强的癌症治疗。

39. 根据权利要求33-38中任一项所述的方法,进一步包括给药至少一种额外的治疗剂。

40. 根据权利要求39所述的方法,其中,所述至少一种治疗剂选自由以下组成的组:用于治疗T细胞耗竭的试剂;抗病毒剂;抗生素剂;抗微生物剂;化疗剂;或其组合。

41. 根据权利要求33-40中任一项所述的方法,其中,所述工程化T细胞对于所述受试者是自体的。

42. 根据权利要求33-41中任一项所述的方法,其中,在非工程化T细胞表现出耗竭的条件下,所述工程化T细胞保持功能性。

43. 根据权利要求33-42中任一项所述的方法,其中,与未修饰的T细胞相比,所述工程化T细胞具有改善的持久性和功能。

44. 一种防止T细胞耗竭的方法,其包括基因修饰所述T细胞以缺失选自以下组成的至少一种基因:IN080C、GATA3、ARID1A、WDR82、TRP53、GPR137C、ZFP219、HDAC1、ELMSAN1和ACTR8。

45. 一种防止T细胞耗竭的方法,其包括基因修饰所述T细胞以缺失至少一种染色质重塑蛋白或编码其的基因。

46. 根据权利要求45所述的方法,其中,至少一种染色质重塑蛋白是IN080核小体定位复合体蛋白或SWI/SNF家族成员或其组合。

47. 根据权利要求46所述的方法,其中,所述IN080核小体定位复合体蛋白是Actr5、Ino80、Ino80c、Ino80b、Actr8或其组合。

48. 根据权利要求46或47所述的方法,其中,所述SWI/SNF家族成员是cBAF复合体的成员。

49. 根据权利要求46-48中任一项所述的方法,其中,所述SWI/SNF家族成员是Arid1a、Arid2、Arid1b、Smarcb1、Smarcd2、Smarca4、Smarcc1或其组合。

50. 根据权利要求46-49中任一项所述的方法,其中,所述方法进一步包括改变所述T细胞的DNA以敲除或破坏选自以下组成的至少一种基因:GATA3、WDR82、TRP53、GPR137C、ZFP219、HDAC1和ELMSAN1。

51. 根据权利要求44-50中任一项所述的方法,其中,所述T细胞进一步包括外源性受体或编码其的核酸。

52. 根据权利要求51所述的方法,其中,所述外源性受体是T细胞受体(TCR)或嵌合抗原受体(CAR)。

53. 根据权利要求51或52所述的方法,其中,所述外源性受体对肿瘤抗原具有特异性。

54. 根据权利要求44-53中任一项所述的方法,其中,在存在慢性抗原的情况下,所述T细胞具有增加的存活率。

55. 根据权利要求44-54中任一项所述的方法,进一步包括向有需要的受试者给药所述T细胞。

56. 根据权利要求55所述的方法,其中,所述受试者患有癌症或感染性疾病。

57. 一种用于筛选促进T细胞耗竭的基因的方法,其包括:

在慢性或急性刺激条件下培养T细胞至少六天,其中,每个T细胞包括至少一种基因敲除或敲低;

分离不显示耗竭的T细胞表面表型的T细胞;以及

鉴定所述至少一种基因敲除或敲低。

58. 根据权利要求57所述的方法,其中,所述T细胞是T细胞文库,其中,所述T细胞文库包括具有在所述T细胞的基因组中每种基因的敲除或敲低的至少一种T细胞。

59. 根据权利要求57或58所述的方法, 其中, 使用CRISPR-Cas系统生成所述T细胞, 其中, 每个细胞包括针对目的基因的至少一种指导RNA。

60. 根据权利要求57-59中任一项所述的方法, 其中, 所述T细胞是CD8⁺T细胞。

61. 根据权利要求57-60中任一项所述的方法, 其中, 所述T细胞分离自受试者。

62. 根据权利要求57-61中任一项所述的方法, 其中, 慢性刺激条件包括使用抗CD3包被的板培养所述T细胞。

63. 根据权利要求62所述的方法, 其中, 所述慢性刺激条件进一步包括用IL-2培养所述T细胞。

64. 根据权利要求57-63中任一项所述的方法, 其中, 急性刺激条件包括用IL-2培养所述T细胞。

65. 根据权利要求57-64中任一项所述的方法, 其中, 所述培养持续6-10天。

66. 根据权利要求57-65中任一项所述的方法, 其中, 所述耗竭的T细胞表面表型包括TIM-3和PD-1的浓度增加。

67. 根据权利要求1-16中任一项所述的工程化T细胞或根据权利要求17-19中任一项所述的组合物用于治疗受试者的疾病或疾患的用途。

68. 根据权利要求67所述的用途, 其中, 所述疾病或疾患包括感染或癌症。

69. 根据权利要求68所述的用途, 其中, 所述癌症包括肿瘤。

70. 根据权利要求67-69中任一项所述的用途, 其中, 所述受试者中癌细胞的数量降低。

71. 根据权利要求67-70中任一项所述的用途, 其中, 所述受试者的肿瘤负荷降低和/或消除。

72. 根据权利要求67-71中任一项所述的用途, 其中, 与未修饰的T细胞的用途相比, 所述用途示出增强的癌症治疗。

73. 根据权利要求67-72中任一项所述的用途, 进一步包括至少一种额外的治疗剂。

74. 根据权利要求73所述的用途, 其中, 所述至少一种治疗剂选自以下组成的组: 用于治疗T细胞耗竭的试剂; 抗病毒剂; 抗生素剂; 抗微生物剂; 化疗剂; 或其组合。

75. 根据权利要求67-74中任一项所述的用途, 其中, 所述工程化T细胞对于所述受试者是自体的。

76. 根据权利要求67-75中任一项所述的用途, 其中, 在非工程化T细胞表现出耗竭的条件下, 所述工程化T细胞保持功能性。

77. 根据权利要求67-76中任一项所述的用途, 其中, 与未修饰的T细胞相比, 所述工程化T细胞具有改善的持久性和功能。

78. 一种系统或试剂盒, 其包括权利要求1-16中任一项所述的工程化T细胞或用于基因工程化T细胞的系统。

79. 根据权利要求78所述的系统或试剂盒, 其中, 所述用于基因工程化T细胞的系统包括成簇间隔的短回文重复序列 (CRISPR) /CRISPR相关蛋白 (Cas) 系统。

80. 根据权利要求78或79所述的系统或试剂盒, 其中, 所述用于基因工程化T细胞的系统包括Cas9或编码Cas9的核酸, 以及针对促进T细胞耗竭的至少一种基因的gRNA或编码所述gRNA的核酸。

81. 根据权利要求80所述的系统或试剂盒, 其中, 所述至少一种基因选自以下组成的

组: INO80C、GATA3、ARID1A、WDR82、TRP53、GPR137C、ZFP219、HDAC1、ELMSAN1和ACTR8。

82. 根据权利要求80所述的系统或试剂盒, 其中, 所述至少一种基因编码染色质重塑蛋白。

83. 根据权利要求82所述的系统或试剂盒, 其中, 至少一种染色质重塑蛋白是INO80核小体定位复合体蛋白或SWI/SNF家族成员或其组合。

84. 根据权利要求83所述的系统或试剂盒, 其中, 所述INO80核小体定位复合体蛋白是Actr5、Ino80、Ino80c、Ino80b、Actr8或其组合。

85. 根据权利要求83或84所述的系统或试剂盒, 其中, 所述SWI/SNF家族成员是cBAF复合体的成员。

86. 根据权利要求83-85中任一项所述的系统或试剂盒, 其中, 所述SWI/SNF家族成员是Arid1a、Arid2、Arid1b、Smarcb1、Smarcd2、Smarca4、Smarcc1或其组合。

87. 根据权利要求78-86中任一项所述的系统或试剂盒, 进一步包括外源性受体或编码其的核酸。

88. 根据权利要求78-87中任一项所述的系统或试剂盒, 进一步包括至少一种额外的治疗剂。

89. 根据权利要求88所述的系统或试剂盒, 其中, 所述至少一种治疗剂选自以下组成的组: 用于治疗T细胞耗竭的试剂; 抗病毒剂; 抗生素剂; 抗微生物剂; 化疗剂; 或其组合。

用于改善T细胞持久性和功能的组合物和方法

技术领域

[0001] 本公开涉及修饰的T细胞及其组合物和使用方法。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求于2021年7月28日提交的美国临时申请号63/226,559的优先权,其内容通过援引以其全文并入本文。

[0004] 序列列表声明

[0005] 标题为(STDU2-39684-601.xml;大小:7,214字节;和创建日期:2022年7月28日)的电子序列列表的内容通过援引以其全文并入本文。

[0006] 关于联邦政府资助的研究或开发的声明

[0007] 本发明是在由国立卫生研究院(National Institutes of Health)授予的编号为CA230188的政府支持下完成。政府享有本发明的某些权利。

背景技术

[0008] T细胞耗竭的发展是持久且有效的CAR-T细胞疗法的主要障碍,特别是对于实体瘤。癌症识别后,通过肿瘤细胞对T细胞的慢性激活导致T细胞耗竭,从而导致增殖、细胞毒性和效应物功能受损,从而限制T细胞对癌细胞的杀伤。检查点抑制剂通常靶向作用于耗竭。然而,大多数患者对这些试剂没有反应,并且临床试验中也未示出与CAR T细胞联合使用的功效。

发明内容

[0009] 本文提供了工程化T细胞,其缺失促进或支持T细胞持久性和功能性的至少一种基因。在一些实施方式中,在非工程化T细胞表现出耗竭的条件下,工程化T细胞保持功能性。

[0010] 在一些实施方式中,工程化T细胞缺失选自以下组成的组的至少一种基因:IN080C、GATA3、ARID1A、WDR82、TRP53、GPR137C、ZFP219、HDAC1、ELMSAN1和ACTR8。在一些实施方式中,工程化T细胞缺失选自以下组成的组的两种或更多种基因:IN080C、GATA3、ARID1A、WDR82、TRP53、GPR137C、ZFP219、HDAC1、ELMSAN1和ACTR8。

[0011] 在一些实施方式中,工程化T细胞缺失至少一种染色质重塑蛋白或编码其的基因。在一些实施方式中,工程化T细胞缺失两种或更多种染色质重塑蛋白或编码其的基因。在一些实施方式中,至少一种染色质重塑蛋白是IN080核小体定位复合体蛋白或SWI/SNF家族成员或其组合。在一些实施方式中,IN080核小体定位复合体蛋白是Actr5、Ino80、Ino80c、Ino80b、Actr8或其组合。在一些实施方式中,SWI/SNF家族成员是cBAF(典型BRG1/BRM相关因子)复合体的成员。在一些实施方式中,SWI/SNF家族成员是Arid1a、Arid2、Arid1b、Smarcb1、Smarcd2、Smarca4、Smarcc1或其组合。在一些实施方式中,工程化T细胞进一步缺失选自以下组成的组的至少一种基因:GATA3、WDR82、TRP53、GPR137C、ZFP219、HDAC1和ELMSAN1。

[0012] 工程化T细胞可以进一步包括外源性受体或编码其的核酸。在一些实施方式中,外

源性受体是T细胞受体 (TCR) 或嵌合抗原受体 (CAR)。在一些实施方式中,外源性受体对肿瘤抗原具有特异性。

[0013] 在一些实施方式中,T细胞源自受试者的生物样品。在一些实施方式中,T细胞分离自肿瘤样品。在一些实施方式中,T细胞是离体扩增的。

[0014] 本文还提供了包括本文所述的工程化T细胞群的组合。该组合可以进一步包括至少一种治疗剂。在一些实施方式中,至少一种治疗剂选自由以下组成的组:用于治疗T细胞耗竭的试剂;抗病毒剂;抗生素剂;抗微生物剂;化疗剂;或其组合。

[0015] 本文进一步提供了制备治疗性T细胞的方法。在一些实施方式中,该方法包括获得包括T细胞的样品;改变T细胞的DNA以敲除或破坏选自由以下组成的组的至少一种基因:IN080C、GATA3、ARID1A、WDR82、TRP53、GPR137C、ZFP219、HDAC1、ELMSAN1和ACTR8;以及工程化T细胞以表达外源性受体。

[0016] 在一些实施方式中,该方法包括获得包括T细胞的样品;改变T细胞的DNA以敲除或破坏编码染色质重塑蛋白的至少一种基因;以及工程化T细胞以表达外源性受体。在一些实施方式中,染色质重塑蛋白是IN080核小体定位复合体蛋白或SWI/SNF家族成员或其组合。在一些实施方式中,IN080核小体定位复合体蛋白是Actr5、Ino80、Ino80c、Ino80b、Actr8或其组合。在一些实施方式中,SWI/SNF家族成员是cBAF复合体的成员。在一些实施方式中,SWI/SNF家族成员是Arid1a、Arid2、Arid1b、Smarcb1、Smarcd2、Smarca4、Smarcc1或其组合。在一些实施方式中,该方法还包括改变T细胞的DNA以敲除或破坏选自由以下组成的组的至少一种基因:GATA3、WDR82、TRP53、GPR137C、ZFP219、HDAC1和ELMSAN1。

[0017] 在一些实施方式中,改变DNA防止或减少T细胞的耗竭。

[0018] 在一些实施方式中,T细胞源自受试者的生物样品。在一些实施方式中,T细胞分离自肿瘤样品。在一些实施方式中,T细胞是离体扩增的。

[0019] 在一些实施方式中,外源性受体是T细胞受体 (TCR) 或嵌合抗原受体 (CAR)。在一些实施方式中,外源性受体对肿瘤抗原具有特异性。

[0020] 额外提供了用于治疗受试者的疾病或疾患的方法,其包括向受试者给药有效量的本文所述的工程化T细胞或其组合。在一些实施方式中,疾病或疾患包括感染或癌症。在一些实施方式中,癌症包括肿瘤。

[0021] 在一些实施方式中,与给药未修饰的T细胞相比,给药降低了受试者中癌细胞的数量,降低和/或消除了受试者中的肿瘤负荷,和/或示出增强的癌症治疗。

[0022] 在一些实施方式中,该方法进一步包括给药至少一种额外的治疗剂。至少一种治疗剂可以选自由以下组成的组:用于治疗T细胞耗竭的试剂;抗病毒剂;抗生素剂;抗微生物剂;化疗剂;或其组合。

[0023] 在一些实施方式中,T细胞对于受试者是自体的。

[0024] 在一些实施方式中,T细胞在非工程化T细胞表现出耗竭的条件下保持功能性和/或与非工程化T细胞相比具有改善的持久性和功能。

[0025] 本文提供了防止T细胞耗竭的方法。在一些实施方式中,该方法包括基因修饰T细胞以缺失选自由以下组成的组的至少一种基因:IN080C、GATA3、ARID1A、WDR82、TRP53、GPR137C、ZFP219、HDAC1、ELMSAN1和ACTR8。

[0026] 在一些实施方式中,该方法包括基因修饰T细胞以缺失编码染色质重塑蛋白的至

少一种基因。在一些实施方式中,染色质重塑蛋白是INO80核小体定位复合体蛋白或SWI/SNF家族成员或其组合。在一些实施方式中,INO80核小体定位复合体蛋白是Actr5、Ino80、Ino80c、Ino80b、Actr8或其组合。在一些实施方式中,SWI/SNF家族成员是cBAF复合体的成员。在一些实施方式中,SWI/SNF家族成员是Arid1a、Arid2、Arid1b、Smarca1、Smarca2、Smarca4、Smarcc1或其组合。在一些实施方式中,该方法进一步包括基因修饰T细胞以缺失自由以下组成的组的至少一种基因:GATA3、WDR82、TRP53、GPR137C、ZFP219、HDAC1和ELMSAN1。

[0027] 在一些实施方式中,在存在慢性抗原下,T细胞具有增加的存活率。

[0028] 工程化T细胞可以进一步包括外源性受体或编码其的核酸。在一些实施方式中,外源性受体是T细胞受体 (TCR) 或嵌合抗原受体 (CAR)。在一些实施方式中,外源性受体对肿瘤抗原具有特异性。

[0029] 该方法可以进一步包括向有此需要的受试者给药T细胞。在一些实施方式中,受试者患有癌症或感染性疾病。

[0030] 本文提供了用于筛选促进T细胞耗竭的基因的方法,其包括:在慢性或急性刺激条件下培养T细胞至少六天,其中,每个T细胞包括至少一种基因敲除或敲低;分离不显示耗竭的T细胞表面表型的T细胞;以及识别至少一种基因敲除或敲低。

[0031] 在一些实施方式中,T细胞是T细胞文库,其中,T细胞文库包括T细胞的基因组中每种基因被敲除或敲低的至少一种T细胞。在一些实施方式中,T细胞是CD8⁺T细胞。在一些实施方式中,T细胞分离自受试者。

[0032] 在一些实施方式中,使用CRISPR-Cas系统生成T细胞,其中,每个细胞包括针对目的基因的至少一种指导RNA。

[0033] 在一些实施方式中,慢性刺激条件包括使用抗CD3包被的板来培养T细胞。在一些实施方式中,慢性刺激条件进一步包括用IL-2培养T细胞。在一些实施方式中,急性刺激条件包括用IL-2培养T细胞。在一些实施方式中,培养持续六至十天。

[0034] 本文还提供了包括如本文所述的工程化T细胞的系统或试剂盒或者用于基因工程化T细胞的系统。用于基因工程化T细胞的系统可以包括成簇间隔的短回文重复序列 (CRISPR)/CRISPR相关蛋白 (Cas) 系统,或编码其的一种或多种核酸,如本文所述。在某些实施方式中,用于基因工程化T细胞的系统包括Cas9 (例如,dCas9) 或编码Cas9的核酸,以及针对促进T细胞耗竭的至少一种基因的gRNA或编码gRNA的核酸。

[0035] 在一些实施方式中,促进T细胞耗竭的至少一种基因可以选自由以下组成的组:INO80C、GATA3、ARID1A、WDR82、TRP53、GPR137C、ZFP219、HDAC1、ELMSAN1和ACTR8。

[0036] 在一些实施方式中,促进T细胞耗竭的至少一种基因是编码染色质重塑蛋白的基因。在一些实施方式中,染色质重塑蛋白是INO80核小体定位复合体蛋白或SWI/SNF家族成员或其组合。在一些实施方式中,INO80核小体定位复合体蛋白是Actr5、Ino80、Ino80c、Ino80b、Actr8或其组合。在一些实施方式中,SWI/SNF家族成员是cBAF复合体的成员。在一些实施方式中,SWI/SNF家族成员是Arid1a、Arid2、Arid1b、Smarca1、Smarca2、Smarca4、Smarcc1或其组合。

[0037] 在一些实施方式中,系统或试剂盒进一步包括外源性受体或编码其的核酸。

[0038] 在一些实施方式中,系统或试剂盒进一步包括至少一种额外的治疗剂。至少一种

治疗剂可以选自由以下组成的组：用于治疗T细胞耗竭的试剂；抗病毒剂；抗生素剂；抗微生物剂；化疗剂；或其组合。

[0039] 根据以下详细描述，本公开的其他方面和实施方式将变得显而易见。

附图说明

[0040] 图1A-1F示出了概括T细胞耗竭的表观遗传标志的示例性体外测定。图1A是体外耗竭测定图。图1B示出了在T细胞耗竭测定的第0天和第10天时CD8+T细胞的表面表型，以活细胞为门控。图1C是在整个慢性刺激过程中CD8+T细胞的ATAC-seq图谱的主成分分析。图1D是体外耗竭测定中每个时间点的代表性重复的Pdccl1和Entpd1基因座，以及先前公开的肿瘤或LCMV中T细胞的参考ATAC-seq图谱 (Miller et al., (2019) Nat. Immunol. 20, 326-336)。图1E是示出体外耗竭测定中每个时间点的“终末耗竭峰集”中每个峰的ATAC-seq覆盖度的热图。还包括TIL的参考数据。右侧示出选定的最近基因。图1F是每个ATAC-seq样品的chromVAR基序可及性热图。右侧指示选定的基序。示出了前100个变化最大的基序。

[0041] 图2A-2F示出了T细胞耗竭的全基因组功能询问。图2A是全基因组T细胞耗竭筛选图。图2B示出了重复筛选与基因的选定功能类别的相关性，按如图所示着色。基因集基于GO Term并辅以手动注释。图2C是标记有靠前命中 (top hits) 的火山图。图2D是不同功能类别中靠前命中的个体sgRNA残差：整合素或TCR信号传导。图2E是前100个命中的GO Term分析。图2F是不同功能类别中靠前命中的个体sgRNA残差：染色质 (左)、选定的受体和转录因子 (中) 或其他 (右)。以上示出了所有引导物残差的直方图，并且每行的背景中以灰色示出1000个随机选择的引导物，以供视觉参考。

[0042] 图3是靠前命中的cytoscape网络表示。示出了全基因组筛选中的靠前阳性和阴性命中。每个蛋白均由cytoscape网络中的节点表示，在全基因组筛选中由其z-评分进行着色。如果存在高置信度的蛋白-蛋白相互作用，则将节点连接。

[0043] 图4A-4G示出了体内靠前命中的靶向后续。图4A是示例性体内混合筛选图。图4B是MC-38肿瘤中富集或消耗的基因的火山图。图4C示出了按功能类别着色的肿瘤LFC z-评分与脾LFC z-评分的相关性。图4D示出了小型库 (minipool) 中基因的体内z-评分和体外 (全基因组) z-评分的相关性。图4E是MC-38肿瘤中按z-评分着色的cytoscape蛋白-蛋白相互作用网络。图4F是靶向指定基因的每个sgRNA的肿瘤相对于输入对数倍数变化 (减去平均对照对数倍数变化) 的箱线图。图4G是每个肿瘤的前15个体内命中以及对照引导物和Cd3d的z-评分。

[0044] 图5A-5G示出了肿瘤浸润淋巴细胞的体内干扰-seq (Perturb-seq)。图5A是分选的TIL的直接捕获干扰-seq图。图5B是按簇分配着色的TIL的scRNA-seq图谱。图5C，左侧是按每个细胞中检测到的干扰着色的细胞的scRNA-seq图谱。每个细胞中未检测到引导物或检测到多个引导物的细胞以灰色显示。图5C，右侧是体外和体内每种基因敲除的z-评分 (MC-38肿瘤z-评分)。图5D是与对照细胞相比，具有每个干扰的细胞的全基因组基因表达差异的相关性。对各细胞的基因表达谱取平均值，并且然后将其减去。图5E是针对不同干扰的诱导基因的集合图。图5F是针对不同干扰的抑制基因的集合图。图5G示出了按类别分组的选定基因，以及在不同干扰下相对于对照的表达变化。

[0045] 图6A-6F示出了体外测定的额外特征。图6A示出了在整个体外耗竭测定中慢性刺

激的T细胞的表面表型。图6B是体外慢性刺激和急性刺激的T细胞增殖图。图6C示出了急性(左)和慢性(右)刺激的T细胞的效应细胞因子产生。初始刺激后8天,用PMA和离子霉素再刺激细胞。图6D是与急性或慢性刺激的OT-1T细胞共培养后B16细胞的存活图。用同源肽(SIINFEKL-SEQ ID NO:1)脉冲肿瘤细胞。图6E是急性或慢性刺激的T细胞过继移植后体内B16-卵清蛋白肿瘤生长图。图6F是示出体外耗竭测定中每个时间点的“终末耗竭峰集”中每个峰的ATAC-seq覆盖度的热图。还包括LCMV中T细胞的参考数据。

[0046] 图7A-7D示出了体外全基因组筛选的质量控制数据。图7A示出了筛选第2天时BFP的表达。图7B示出了gDNA提取前细胞的表面表型。图7C示出了每个样品的sgRNA表示。图7D是每个重复的引导物计数相关性(急性相对于慢性)的图。CD3亚基以红色示出,所有其他引导物以黑色示出。

[0047] 图8A-8D示出了靠前命中的LCMV克隆13表达分析。图8A是scRNA-seq数据中识别的细胞类型图。图8B示出了单细胞中Pdccl1、Havcr2、Tcf7和Cx3cr1的表达。图8C是包含各簇的前100个体外命中的基因模块的表达的小提琴图。图8D是按所有单细胞的平均表达着色的靠前命中的cytoscape网络。

[0048] 图9A-9D示出了用于靶向体内筛选的额外的数据。图9A是小型库筛选中每组的肿瘤大小和T细胞注射时间线图。图9B,上图是靶向指定基因的每个sgRNA的脾相对于输入对数倍数变化(减去平均对照对数倍数变化)的箱线图。图9B,下图是每个脾的前15个体内命中以及对照引导物和Cd3d的z-评分的热图。图9C是肿瘤中前20个阳性命中的GO Term分析。图9D是9个靠前表现遗传学命中的LCMV表达分析。

[0049] 图10A-10E示出了体内直接捕获干扰-seq的额外数据。图10A是按簇示出Pdccl1、Havcr2和Mki67的表达的小提琴图。图10B是比较簇1(C1)与簇2(C2)的火山图。指示选定的差异基因。图10C示出了选定的转录因子Tbx21、Tox、Eomes和Tcf7的表达。图10D是包含每种基因敲除的细胞的可视化。图10E,上图是每个干扰的抑制或诱导基因的计数图。图10E,下图是每个干扰与Nr4a3-KO共有的抑制或诱导基因的计数图。

[0050] 图11A是慢性相对于急性刺激筛选比较的castLE火山图,其中标记靠前命中。图11B示出了小型库中急性相对于慢性z-评分相对于全基因组筛选的相关性。图11C示出了小型库慢性相对于急性z-评分针对急性相对于输入(左侧)或慢性相对于输入(右侧)的相关性。(G)和(H)中的基因按功能类别着色:TCR信号传导、整合素信号传导(橙色)、染色质(蓝色)或其他(灰色)。(H,左)中的有色框表示急性刺激后扩增增强、相似或减少(从上至下)。

[0051] 图12A示出了按功能类别着色的肿瘤LFC z-评分与脾LFC z-评分的相关性。图12B示出了CRISPR小型库中基因的体内z-评分和体外z-评分的相关性。图12C示出了CRISPR小型库中基因的体内MC-38和B16肿瘤z-评分的相关性。图12D是MC-38肿瘤中按z-评分着色的cytoscape蛋白-蛋白相互作用网络。图12E,上图是靶向指定基因的每个sgRNA的肿瘤相对于输入对数倍数变化(减去平均对照对数倍数变化)的箱线图。图12E,下图是示出相同命中的指定体内或体外筛选的sgRNA平均值的热图。图12F是六个靠前命中的单个sgRNA残差,示出了肿瘤相对于输入的比较(左)、脾相对于输入的比较(中)以及体外慢性相对于急性的比较(右)。

[0052] 图13A-13F示出了SWI/SNF小型库CRISPR筛选和功能研究,证明调节cBAF活性可以增强抗肿瘤免疫。图13A示出了Arid1a-sgRNA相对于CTRL1 T细胞的体外竞争测定。左侧:在

第4天按指定比率混合细胞,并在慢性刺激测定中传代6天。第10天,通过流式细胞术评估相对于CTRL1T细胞的增殖和表面表型。图13B示出了Arid1a-sgRNA相对于CTRL1 T细胞的体内竞争测定。在第6天(输入)混合细胞,并且然后移植到荷瘤小鼠中。第15天,通过流式细胞术评估肿瘤的相对增殖。图13C是每个队列的肿瘤大小图。第15天评估统计显著性。图13D是存活图,示出了Arid1a-sgRNA T细胞显著改善荷瘤小鼠的存活率。图13E示出了MC-38相对于B16肿瘤模型中SWI/SNF CRISPR小型库肿瘤富集的相关性。图13F是按来自MC-38肿瘤中SWI/SNF CRISPR小型库实验的z-评分着色的三个BAF复合体的动画。BAF复合体动画改编自(Mashtalir et al., 2018)。* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ 。

[0053] 图14A-14D示出了ARID1A在体外和体内人T细胞中的保守功能。图14A是指定RNP电穿孔后原代人T细胞的增殖和生存力图。左侧:急性刺激的T细胞。右侧:使用抗CD3包被的板的慢性刺激T的细胞。示出的数据代表3个独立实验和3个供体。图14B是用NY-ESO-1特异性TCR 1G4转导的原代人CD8⁺T细胞中CRISPR小型库筛选的示意图。图14C示出了按基因聚集的人CRISPR小型库筛选的结果。图14D示出了人CRISPR小型库筛选的结果,其中单个sgRNA重复以点示出。基因按照平均LFC从最高到最低的顺序排列。(图14C和14D)中所示的结果是来自2个独立供体、每个供体2只小鼠和每个靶基因2个sgRNA的组合,每个靶基因总计n=8个sgRNA重复。在(图14C和14D)中,橙色表示抑制性受体,红色表示TCR信号通路基因,蓝色表示染色质重塑体,以及灰色表示阴性对照。

[0054] 图15A-15G示出了揭示cBAF和INO80复合体在TIL中的不同转录作用的体内干扰-seq。图15A是排序的TIL的直接捕获干扰-seq的示意图。图15B是按簇分配着色的TIL的scRNA-seq图谱。图15C是按每个细胞中检测到的干扰着色的细胞的scRNA-seq图谱。未检测到引导物或检测到多个引导物的细胞以灰色示出。图15D示出了每个单细胞中选择的标记基因的表达。图15E是每个簇的LCMV特征基因组的分析。计算每个单细胞的基因集富集评分,细胞值按簇取平均值并进行z-评分。图15F是sgRNA对的基因表达差异的皮尔逊相关性的直方图。上图:靶向相同基因的对以蓝色示出,其他对以灰色示出。下图:靶向相同蛋白复合体的对以红色示出,其他对以灰色示出。分析中考虑的复合体是cBAF(Arid1a、Arid1b、Smarcd2和Smarcc1)以及INO80(Ino80c和Actr5)。排除靶向相同基因的sgRNA对。图15G,左侧:每个sgRNA对的基因表达差异相关性的热图。图15G,中间图(从左至右):移植前样品中每个sgRNA的表示、干扰-seq数据集中每个sgRNA的细胞计数以及每个sgRNA相对于对照的估计倍数变化。图15G,右侧:每个簇中每个sgRNA的细胞比例。

[0055] 图16A-16H示出了cBAF消耗的T细胞表现出增强的效应物基因特征和减少的终末耗竭。图16A是比较具有指示干扰的聚集细胞相对于CTRL1细胞的火山图。图16B是由每个干扰诱导的基因表达差异的成对相关性。图16C是至少一个干扰中所有上调(up,上)或下调(down,下)基因的热图,按干扰对表达具有最强影响进行分组。标记每个块中选定的基因。图16D示出了通过cBAF亚基Arid1a、Smarcd2或Smarcc1的干扰来比较上调或下调基因集。图16E示出了通过INO80亚基Actr5或Ino80c的干扰来比较上调或下调的基因集。图16F示出了通过cBAF亚基,INO80亚基,或者Pdcd1、Gata3或Arid2的干扰来比较上调的基因集。图16G是LCMV表达数据中上调和下调基因集的富集(Daniel et al., 2021)。计算LCMV数据集中每个单细胞的每个基因集的模式评分,按簇取平均值,并然后进行z-评分以获得指定的富集z-评分。图16H示出了指定基因集的选定GO Term。

[0056] 图17A-17F示出了Arid1a促进耗竭T细胞染色质状态的获得。图17A示出了体外耗竭竞争测定中Arid1a-sgRNA和CTRL1细胞的ATAC-seq图谱的主成分分析。包括未干扰的初始样品和激活样品(第0天和第2天)以供参考。图17B示出了每种基因型从第6天至第10天“开放”和“封闭”ATAC-seq峰集的比较。图16C是“开放”和“封闭”ATAC-seq峰集的可视化,其中标记选定的最接近基因。图16D示出了选定的基因座的ATAC-seq信号轨迹。示出了每个条件的代表性重复。图16E是示出体外耗竭测定中Arid1a-sgRNA和CTRL1细胞在第6天和第10天的“终末耗竭峰集”中每个峰的ATAC-seq覆盖度的热图。还包括来自TIL的参考数据,以及参考原始和激活细胞图谱。图16F是Arid1a-sgRNA和CTRL1 ATAC-seq样品的chromVAR基序可及性热图。右侧指示选定的基序。示出了前100个变化最大的基序。

[0057] 图18A示出了在慢性刺激6天(分离后第8天)后急性(左侧)和慢性(右侧)刺激的T细胞的效应细胞因子产生。初始刺激后8天,用PMA和离子霉素再刺激细胞。图18B是体外指定时间点Term.T_{EX}峰集(上图)和Prog.T_{EX}峰集(下图)中峰的峰可及性的经验累积分布图。如图所示包括TIL的参考图谱。图18C是体外耗竭测定和参考TIL样品中指示的峰集的箱线图。每个点代表一个峰。

[0058] 图19A和19B是急性刺激、慢性刺激(抗CD3刺激6天)(图19A)或修改的慢性刺激方案(休息48小时后抗CD3刺激6天)(图19B)后细胞因子产生的比较。图19C是针对全基因组筛选中的每个样品示出的Gini指数和经验累积分布函数。

[0059] 图20A-20E示出了CRISPR分析策略的比较。图20A是使用casTLE(左上)、MAGeCK(右上)和所公开的流程(下)的全基因组CRISPR筛选结果的火山图。图20B示出了三个流程中的每一个的命中列表的比较。图20C示出了由所公开的流程计算的LFC差异与casTLE Effect(左)和MAGeCK LFC(右)的比较。图20D是Rp113a的计数表。图20E示出了当相对于所有sgRNA或一组嗅觉受体(Vmn^r*基因)计算z-评分时的全基因组筛选结果。

[0060] 图21A-21E示出了用于靶向体外筛选的数据。图21A是体外小型库筛选中每个样品的sgRNA表示。图21B示出了小型库筛选中每个样品的sgRNA计数的相关性。图21C示出了慢性相对于急性重复z-评分的相关性。图21D是在慢性相对于急性小型库筛选中按其z-评分着色的基因的cytoscape相互作用网络。图21E是在急性刺激中按其适应性分类着色的基因的cytoscape相互作用网络。

[0061] 图22A-22F示出了靶向Arid1a的sgRNA的靶向体内筛选和验证的数据。图22A示出了体内小型库筛选中每个样品的sgRNA库覆盖度。图22B是“TCR信号传导”和“整合素信号传导”类别中选定的基因在肿瘤、脾和体外小型库慢性相对于急性中的sgRNA残差。图22C是靶向指定基因的每个sgRNA的脾相对于输入和急性相对于慢性对数倍数变化(减去平均对照对数倍数变化)的箱线图。图22D是Arid1a sgRNA的编辑效率的Sanger测序(TIDE)分析。图22E是Arid1a sgRNA的蛋白敲低以及Arid1b和Smarca4表达的蛋白质印迹分析。图22F示出了每种识别的Arid1a同工型的蛋白敲低定量(小图C三个条带)。*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001,****p<0.0001。

[0062] 图23A-23G示出了体内干扰-seq的数据。图23A是按每个独立实验着色的TIL的scRNA-seq图谱。图23B是按每个样品着色的TIL的scRNA-seq图谱。图23C是按细胞周期的预测时期着色的TIL的scRNA-seq图谱。图23D示出了针对每个簇示出的额外的标记基因。图23E示出了具有按LCMV簇着色的单细胞图谱的扩展的参考LCMV数据集。图23F示出了具有按

LCMV感染(急性对应于Armstrong感染,而慢性对应于克隆13)和时间点(感染后第8天或第21天)着色的单细胞图谱的扩展的LCMV数据集。图23G是每个簇上子集的基因表达差异的相关性热图。将指示的基因敲低与每个簇内的CTRL1细胞进行比较。由于缺少统计检验力,比较组中<150个细胞的比较被排除。

[0063] 图24A-24G示出了上调和下调基因集的数据以及ATAC-seq数据。图24A示出了通过cBAF亚基、IN080亚基或者Pdcd1-sgRNA、Gata3-sgRNA或Arid2-sgRNA的干扰而下调的基因集的比较。图24B是针对扩展的LCMV参考数据集中的每个细胞计算的指定基因集的模式评分。图24C是体外耗竭测定和参考TIL样品中指示的峰集的箱线图。每个点代表一个峰。图24D是体外指定样品的Term. T_{EX} 峰集(上图)和Prog. T_{EX} 峰集(下图)中峰的峰可及性的经验累积分布图。如图所示包括TIL的参考图谱。图24E是慢性刺激六天的原代人T细胞的ATAC-seq数据的主成分分析。图24F示出了ARID1A-sgRNA和AAVS原代人T细胞之间的差异峰。图24G是富含AAVS“上调”峰的TF基序的HOMER分析。示出了选定的排序较高的基序。(图24E-24G)中的结果是合并两个独立实验中三个不同人供体的结果,每个供体具有两种不同的ARID1A靶向sgRNA。

具体实施方式

[0064] 在本文中,体外T细胞耗竭模型使得能够对影响T细胞功能的基因进行全基因组筛选。使用该模型和全基因组CRISPR筛选,识别几种基因靶标,这些基因靶标的缺失:防止CAR-T细胞耗竭,在体外存在慢性抗原的情况下提高T细胞的存活率,以及提高体内肿瘤模型中T细胞的持久性和功能。这些包括涉及基因调控和表观遗传修饰的多种基因,包括ARID1A、WDR82、IN080、HDAC1和ZFP219。缺失这些基因中的每一个的细胞疗法可用于改进的CAR-T或其他基于过继性T细胞的疗法。

[0065] 本章节中使用的节标题和本文的整体公开内容仅用于组织目的并且不旨在进行限制。

[0066] 1. 定义

[0067] 如本文所用,术语“包括(comprise(s))”、“包括(include(s))”、“具有(having)”、“具有(has)”、“可以(can)”、“包含(contain(s))”及其变体旨在表示不排除额外行为或结构的可能性的开放式过渡短语、术语或词语。除非上下文另有明确说明,否则单数形式“一个/一种(a)”、“和”和“该/所述(the)”包括复数引用。本公开还考虑了“包括”本文提供的实施方式或要素、“由其组成”和“基本上由其组成”的其他实施方式,无论是否明确阐述。

[0068] 对于本文中数值范围的叙述,明确考虑了其具有相同精确度的每个中间数值。例如,对于6-9的范围,除了6和9之外,还考虑数值7和8,并且对于范围6.0-7.0,明确考虑数值6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9和7.0。

[0069] 除非本文另外定义,否则结合本公开使用的科学和技术术语应具有本领域普通技术人员通常理解的含义。术语的含义和范围应明确;然而,如果存在任何潜在的歧义,本文提供的定义优先于任何字典或外部定义。此外,除非上下文另有要求,否则单数术语应包括复数并且复数术语应包括单数。

[0070] 术语“工程化的”、“非天然存在的”、“修饰的”和“合成的”可互换使用并且表示人工参与。当提及细胞或核酸时,这些术语意指核酸或细胞至少基本上不含它们在自然界中

天然相关的和在自然界中发现的至少一种其他组分。

[0071] 如本文所用,“核酸”或“核酸序列”是指嘧啶和/或嘌呤碱基的聚合物或低聚物,分别优选胞嘧啶、胸腺嘧啶和尿嘧啶,以及腺嘌呤和鸟嘌呤(参见Albert L.Lehninger, Principles of Biochemistry, at 793-800(Worth Pub.1982))。本技术考虑任何脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸或肽核酸组分及其任何化学变体,诸如这些碱基的甲基化、羟甲基化或糖基化形式等。聚合物或低聚物的组成可以是异质或同质的,并且可以分离自天然存在的来源或者可以是人工或合成产生的。另外,核酸可以是DNA或RNA、或其混合物,并且可以以单链或双链形式永久或暂时存在,包括同源双链体、异源双链体和杂交状态。术语“核酸”或“核酸序列”还可以涵盖包括非天然核苷酸、修饰的核苷酸和/或非核苷酸构建块的链,其可以表现出与天然核苷酸相同的功能(例如,“核苷酸类似物”);此外,如本文所用,术语“核酸序列”是指寡核苷酸、核苷酸或多核苷酸、及其片段或部分,以及基因组或合成来源的DNA或RNA,其可以是单链或双链,并且代表有义链或反义链。术语“核酸”、“多核苷酸”、“核苷酸序列”和“寡核苷酸”可互换使用。它们是指任何长度的核苷酸的聚合形式,脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸,或其类似物。

[0072] 如本文所用,术语“提供”、“给药”和“引入”在本文中可互换使用,并且是指通过导致组合物至少部分定位至期望位点的方法或途径来将本公开的组合物置于受试者中。组合物可以通过任何适当的途径给药,其导致递送至受试者中的期望位置。

[0073] “受试者”或“患者”可以是人或非人,并且可以包括,例如,用作研究目的的“模型系统”的动物品系或物种,诸如本文所述的小鼠模型。同样,受试者可以包括成年人或青少年(例如,儿童)。此外,受试者可以意指可以从给药本文考虑的组合物获益的任何活生物,优选哺乳动物(例如,人和非人)。哺乳动物的实例包括但不限于哺乳动物纲的任何成员:人,非人灵长类动物,诸如黑猩猩以及其他类人猿和猴物种;农场动物,诸如牛、马、绵羊、山羊、猪;家畜,诸如兔、犬和猫;实验动物,包括啮齿动物,诸如大鼠、小鼠和豚鼠等。非哺乳动物的实例包括但不限于鸟、鱼等。在一种实施方式中,哺乳动物是人。

[0074] 如本文所用,“治疗(treat)”、“治疗(treating)”等意指当向适当的对照受试者提供本文所述的工程化T细胞或组合物时,使疾病或疾患的进展减慢、停止或逆转。该术语还意指将这种疾病或疾患的进展逆转至消除或大大减轻症状的程度。因此,“治疗”意指向受试者施用或给药本文所述的工程化T细胞或组合物,其中该受试者患有疾病或疾病的症状,其中目的是治愈、愈合、减轻、缓解、改变、补救、改进、改善或影响疾病或疾病的症状。

[0075] 2. 工程化T细胞

[0076] 本文提供了工程化T细胞,其缺失促进或支持T细胞持久性和功能性的至少一种基因。这些基因可以在以下项发挥作用:染色质组织、染色质重塑(例如,ATP依赖性染色重塑)、T细胞受体信号通路、免疫应答激活信号转导、免疫应答激活细胞表面受体信号通路、核小体分解和/或Fc受体信号通路。在一些实施方式中,基因包括染色质重塑和转录因子。

[0077] 在一些实施方式中,至少一种基因选自图3、5C和9B中包括的那些基因。在某些实施方式中,至少一种基因是:IN080C(IN080复合体亚基C)、GATA3(GATA结合蛋白3)、ARID1A(富含AT相互作用结构域1A)、WDR82(WD重复结构域82)、TRP53(肿瘤蛋白P53)、GPR137C(G蛋白偶联受体137C)、ZFP219(锌指蛋白219)、HDAC1(组蛋白脱乙酰酶1)、ELMSAN1(包含1的ELM2和Myb/SANT样结构域)或ACTR8(肌动蛋白相关蛋白8)。在一些实施方式中,工程化T细

胞缺失以下中的两种或更多种: INO80C、GATA3、ARID1A、WDR82、TRP53、GPR137C、ZFP219、HDAC1、ELMSAN1和ACTR8。在一些实施方式中,工程化T细胞另外缺失NR4A3(细胞核受体亚家族4A组成员3)。

[0078] 在一些实施方式中,工程化T细胞缺失至少一种染色质重塑蛋白或编码其的基因。在一些实施方式中,工程化T细胞缺失两种或更多种染色质重塑蛋白或编码其的基因。在一些实施方式中,至少一种染色质重塑蛋白是INO80核小体定位复合体蛋白或SWI/SNF(SWItch/蔗糖不可发酵)家族成员或其组合。在一些实施方式中,INO80核小体定位复合体蛋白是Actr5(肌动蛋白相关蛋白5)、Ino80(INO80复合体ATP酶亚基)、Ino80c(INO80复合体亚基C)、Ino80b(INO80复合体亚基B)、Actr8(肌动蛋白相关蛋白8)或其组合。在一些实施方式中,SWI/SNF家族成员是cBAF复合体的成员。在一些实施方式中,SWI/SNF家族成员是Arid1a(富含AT相互作用结构域1A)、Arid2(富含AT相互作用结构域2)、Arid1b(富含AT相互作用结构域1B)、Smarcb1(染色质SWI/SNF相关基质关联肌动蛋白依赖性调节因子,亚家族b,成员1)、Smarcd2(染色质SWI/SNF相关基质关联肌动蛋白依赖性调节因子,亚家族d,成员2)、Smarca4(染色质SWI/SNF相关基质关联肌动蛋白依赖性调节因子,亚家族a,成员4)、Smarcc1(染色质SWI/SNF相关基质关联肌动蛋白依赖性调节因子,亚家族c,成员1)或其组合。在一些实施方式中,工程化T细胞进一步缺失选自以下组成的组的至少一种基因: GATA3、WDR82、TRP53、GPR137C、ZFP219、HDAC1和ELMSAN1。

[0079] “缺失基因”可以指导致功能性基因产物不被表达或在表达后立即被靶向降解的或是完全或部分缺失、突变或者是其他破坏。因此,缺失基因可能是由于遗传密码的任何破坏使得基因的一部分被改变,从而影响转录和/或翻译,例如,通过以下来使基因不可读:敲除技术或通过插入期望蛋白的额外基因或插入调节现有序列转录的调控序列。在某些实施方式中,缺失基因或其部分,通常称为基因敲除。

[0080] 本领域已知的用于基因工程的任何方法可用于生成本文所述的工程化T细胞,包括但不限于使用成簇间隔的短回文重复序列(CRISPR)/CRISPR相关蛋白(Cas)系统、兆核酸酶、转录激活因子样效应物核酸酶(TALEN)或锌指核酸酶(ZFN)。

[0081] 在一些实施方式中,在未修饰的T细胞(不缺失促进或支持T细胞持久性和功能性的至少一种基因的T细胞)表现出耗竭的条件下,T细胞保持功能性(例如,保持暴露于过量抗原的T细胞的功能性)。“T细胞耗竭”是指T细胞功能丧失,其可能由于感染(例如,慢性感染)或疾病而发生。T细胞耗竭与耗竭标志物和抑制性受体(例如,PD-1、TIM-3和LAG-3)表达增加、细胞凋亡和细胞因子分泌减少相关。

[0082] 本发明不受经工程化以缺失促进或支持T细胞持久性和功能性的至少一种基因的T细胞的类型限制。T细胞可以选自CD3+T细胞(例如,CD4+和CD8+T细胞的组合)、CD8+T细胞、CD4+T细胞、自然杀伤(NK)T细胞、 $\alpha\beta$ T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞或其任何组合。在一些实施方式中,T细胞是记忆T细胞(例如,中央记忆T细胞或效应记忆T细胞)。在一些实施方式中,T细胞是肿瘤浸润淋巴细胞。在一些实施方式中,T细胞是细胞因子诱导的杀伤细胞。在选择实施方式中,T细胞是CD8+T细胞。

[0083] 在一些实施方式中,T细胞是天然存在的T细胞。例如,T细胞可以分离自受试者样品。在一些实施方式中,T细胞是抗肿瘤T细胞(例如,具有针对肿瘤(例如,自体肿瘤)的活性的T细胞,其响应于抗原而变成激活并扩增)。抗肿瘤T细胞包括但不限于获自切除的肿瘤或

肿瘤活体组织检查的T细胞(例如,肿瘤浸润淋巴细胞(TIL))和多克隆或单克隆肿瘤反应性T细胞(例如,通过血浆分离置换法、针对由自体或人工抗原呈递细胞呈递的肿瘤抗原进行体外扩增来获得)。在一些实施方式中,T细胞是离体扩增的。

[0084] 在一些实施方式中,T细胞进一步包括外源性受体或编码外源性受体的核酸。在一些实施方式中,外源性受体是T细胞受体(TCR)或嵌合抗原受体(CAR)。

[0085] 外源性受体不受其识别并响应于任何特异性抗原或蛋白的特异性的限制。此类受体通常由胞外结构域组成,该胞外结构域包括与胞内T细胞信号传导基序连接的特异性抗原结合基序(例如,单链抗体(scFv))。

[0086] 在某些实施方式中,用外源性受体对T细胞进行基因修饰,该外源性受体识别以下并对以下响应:对于感染性疾病和/或自身免疫的抗原(例如,曲霉属(*Aspergillus*)碳水化合物 β -葡聚糖、丙型肝炎病毒E2糖蛋白、HIV包膜糖蛋白gp120)。

[0087] 在某些实施方式中,用识别肿瘤抗原并对肿瘤抗原响应的外源性受体对T细胞进行基因修饰。本发明不受所识别的肿瘤抗原的类型的限制。如本文所用,术语“肿瘤抗原”是指由肿瘤细胞或癌细胞单独或主要表达或过表达的任何分子(例如,蛋白、肽、脂质、碳水化合物等),使得抗原与肿瘤或癌症相关。肿瘤抗原还可以由正常、非肿瘤或非癌细胞表达。然而,在这种情况下,由正常、非肿瘤或非癌细胞的肿瘤抗原表达不如由肿瘤或癌细胞的表达强烈。在这方面,与由正常、非肿瘤或非癌细胞的抗原表达相比,肿瘤或癌细胞可以过表达抗原或以显著更高的水平表达抗原。此外,癌症抗原可以额外地由不同发育或成熟状态的细胞表达。例如,肿瘤抗原可以额外地由胚胎或胎儿阶段的细胞表达,这些细胞通常在成人中不存在。替代地,肿瘤抗原可以额外地由干细胞或前体细胞表达,这些细胞通常在成人中不存在。

[0088] 肿瘤抗原可以由任何癌症或肿瘤的任何细胞表达的抗原。肿瘤抗原可以是仅一种类型的癌症或肿瘤的肿瘤抗原,使得肿瘤抗原与仅一种类型的癌症或肿瘤相关或具有仅一种类型的癌症或肿瘤的特征。替代地,肿瘤抗原可以是多于一种类型的癌症或肿瘤的肿瘤抗原(例如,可以是特征性的)。例如,肿瘤抗原可以由乳腺癌和前列腺癌细胞表达,而正常、非肿瘤或非癌细胞根本不表达。

[0089] 示例性肿瘤抗原包括但不限于糖蛋白100(gp100)、由T细胞识别的黑色素瘤抗原1(MART-1)、黑素瘤抗原基因(MAGE)家族成员(例如,MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A5、MAGE-A6、MAGE-A7、MAGE-A8、MAGE-A9、MAGE-A10、MAGE-A11、MAGE-A12)、纽约食管鳞状细胞癌1(NY-ESO-1)、血管内皮生长因子受体-2(VEGFR-2)、神经胶质瘤相关抗原、癌胚抗原(CEA)、 β -人绒毛膜促性腺素、甲胎蛋白(AFP)、凝集素反应性AFP、甲状腺球蛋白、人端粒酶逆转录酶、前列腺特异性抗原(PSA)、前列腺癌肿瘤抗原-1(PCTA-1)、胰岛素生长因子(IGF)-I、IGF-II、IGF-I受体、肠羧基酯酶、人表皮生长因子受体2(HER-2)、间皮素和表皮生长因子受体变体III(EGFR III)。

[0090] 包含识别肿瘤抗原的受体的任何T细胞可用于本发明的T细胞、组合物和方法。实例包括但不限于表达识别选自以下的抗原的受体(例如,天然或天然存在的受体,或经工程化以表达合成受体的受体诸如工程化TCR或CAR)的T细胞:CD19、CD20、CD22、受体酪氨酸激酶样孤儿受体1(ROR1)、二唾液酸神经节苷脂2(GD2)、爱泼斯坦-巴尔病毒(EBV)蛋白或抗原、叶酸受体、间皮素、人癌胚抗原(CEA)、前列腺酸性磷酸酶(PAP)、CD33/IL3R、酪氨酸蛋白

激酶Met (c-Met) 或肝细胞生长因子受体 (HGFR)、前列腺特异性膜抗原 (PSMA)、糖脂F77、表皮生长因子受体变体III (EGFRvIII)、NY-ESO-1、黑色素瘤抗原基因 (MAGE) 家族成员A3 (MAGE-A3)、由T细胞1识别的黑素瘤抗原 (MART-1)、GP100、p53或本文所述的其他肿瘤抗原。

[0091] 在一些实施方式中,T细胞经工程化以表达嵌合抗原受体 (CAR)。本发明可以使用特异性结合期望抗原 (例如,肿瘤抗原) 的任何CAR。在某些实施方式中,CAR包括抗原结合结构域。在某些实施方式中,抗原结合结构域是包含特异性结合期望抗原的重链和轻链可变区的单链可变片段 (scFv)。在一些实施方式中,CAR进一步包括跨膜结构域 (例如,T细胞跨膜结构域 (例如,CD28跨膜结构域)) 和包括一种或多种基于免疫受体酪氨酸的激活基序 (ITAM) 的信号传导结构域 (例如,T细胞受体信号传导结构域 (例如,TCR ζ 链))。在一些实施方式中,CAR包括一个或多个共刺激结构域 (例如,提供第二信号以刺激T细胞激活的结构域)。本发明不受共刺激结构域的类型限制。事实上,可以使用本领域已知的任何共刺激结构域,包括但不限于CD28、OX40/CD134、4-1BB/CD137/TNFRSF9、高亲和力免疫球蛋白E受体- γ 亚基、FcERI γ 、ICOS/CD278、白介素2亚基 β (ILR β) 或CD122、细胞因子受体共同亚基 γ (IL-2R γ) 或者CD132和CD40。在一些实施方式中,共刺激结构域是4-1BB。在一些实施方式中,共刺激结构域是CD28。

[0092] CAR可以包括靶标特异性结合元件,也称为抗原结合部分。部分的选择取决于限定靶细胞表面的配体的类型和数量。例如,可以选择抗原结合结构域来识别充当与特定疾病状态相关的靶细胞上的细胞表面标志物的配体。可以充当本发明的CAR中的抗原部分结构域的配体的细胞表面标志物的实例包括与病毒、细菌和寄生虫感染、自身免疫性疾病以及如上所述的癌细胞相关的那些。

[0093] 取决于待靶向的期望抗原,CAR可以经工程化以包括对期望抗原靶标具有特异性的适当的抗原结合部分。例如,如果CD19是待靶向的期望抗原,则CD19的抗体可以用作抗原结合部分以掺入本发明的CAR中。

[0094] 编码外源性受体的核酸可以包括DNA或RNA (例如,mRNA)。在一些实施方式中,核酸包括载体。

[0095] 核酸可以包括组成型、可调节或可诱导的、细胞类型特异性、组织特异性或物种特异性启动子。除了足以引导转录的序列之外,启动子还可以包括参与调节转录的其他调控元件的序列 (例如,增强子、Kozak序列和内含子)。用于驱动组成型表达的许多启动子/调控序列是本领域可获得的,并且包括但不限于例如CMV (巨细胞病毒启动子)、EF1a (人延伸因子1 α 启动子)、SV40 (猴空泡病毒40启动子)、PGK (哺乳动物磷酸甘油酸激酶启动子)、Ubc (人泛素C启动子)、人 β -肌动蛋白启动子、啮齿动物 β -肌动蛋白启动子、CBh (鸡 β -肌动蛋白启动子)、CAG (包含CMV增强子、鸡 β -肌动蛋白启动子和兔 β -珠蛋白剪接受体的杂合启动子)、TRE (四环素反应元件启动子)、H1 (人聚合酶III RNA启动子)、U6 (人U6小核启动子) 等。可以用于表达的额外的启动子包括但不限于巨细胞病毒 (CMV) 中间早期启动子、病毒LTR (诸如劳斯肉瘤病毒LTR、HIV-LTR、HTLV-1LTR、Maloney鼠白血病病毒 (MLLV) LTR、骨髓增殖性肉瘤病毒 (MPSV) LTR、脾病灶形成病毒 (SFFV) LTR)、猿病毒40 (SV40) 早期启动子、单纯疱疹tk病毒启动子、具有或不具有EF1- α 内含子的延伸因子1- α (EF1- α) 启动子。额外的启动子包括任何组成型活性启动子。替代地,可以使用任何可调节启动子,使得可以在细胞内调节其表达。

[0096] 此外,可以通过将编码此类分子的核酸置于诱导型启动子/调控序列的控制下来实现诱导型表达。本领域熟知的启动子可以对诱导剂诸如金属、糖皮质激素、四环素、激素等有反应而被诱导,也考虑用于本发明。因此,应当理解,本公开包括使用本领域已知的能够驱动与其可操作地连接的期望蛋白的表达的任何启动子/调控序列。

[0097] 本公开还提供了包含核酸的载体和包含核酸或其载体的细胞。

[0098] 在某些实施方式中,本公开的载体可以使用哺乳动物表达载体来驱动哺乳动物细胞中的一种或多种序列的表达。哺乳动物表达载体的实例包括pCDM8 (Seed, Nature (1987) 329:840,其通过援引并入本文) 和pMT2PC (Kaufman, et al., EMBO J. (1987) 6:187,其通过援引并入本文)。当用于哺乳动物细胞时,表达载体的控制功能通常由一种或多种调控元件提供。例如,常用的启动子源自多瘤病毒、腺病毒2、巨细胞病毒、猿猴病毒40以及本文公开的和本领域已知的其他启动子。对于其他合适的表达系统,参见,例如, Sambrook, et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd eds., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989 的第16章和第17章,其通过援引并入本文。

[0099] 此外,载体可以包含例如以下的一些或全部:用于选择宿主细胞中稳定或瞬时转染子的选择标记基因;转录终止和RNA加工信号;5'-和3'-非翻译区;内部核糖体结合位点 (IRESes)、多功能多克隆位点;和用于评估嵌合受体表达的报道基因。合适的载体和用于产生包含转基因的载体的方法是本领域熟知的且可获得的。选择标志物包括氯霉素 (chloramphenicol) 抗性、四环素 (tetracycline) 抗性、壮观霉素 (spectinomycin) 抗性、新霉素 (neomycin) 抗性、链霉素 (streptomycin) 抗性、红霉素 (erythromycin) 抗性、利福平 (rifampicin) 抗性、博来霉素 (bleomycin) 抗性、热适应卡那霉素 (kanamycin) 抗性、庆大霉素 (gentamycin) 抗性、潮霉素 (hygromycin) 抗性、甲氧苄啶 (甲氧苄啶) 抗性、二氢叶酸还原酶 (DHFR)、GPT;酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) 的URA3、HIS4、LEU2和TRP1基因。

[0100] 当引入细胞中时,载体可以维持为自主复制序列或染色体外元件,或可以整合至宿主DNA中。核酸可以通过任何合适的方式递送至细胞。

[0101] 基于病毒和非病毒的基因转移方法可以用于将核酸引入细胞中。此类方法可以用于将核酸给药至培养物或宿主生物中的细胞。非病毒载体递送系统包括DNA质粒、黏粒、RNA (例如,本文所述载体的转录物)、核酸和与递送运载体复合的核酸。

[0102] 病毒载体递送系统包括DNA和RNA病毒,其在递送至细胞后具有游离基因组或整合基因组。多种病毒构建体可以用于将本核酸递送至细胞。病毒载体包括,例如,逆转录病毒、慢病毒、腺病毒、腺相关的和单纯疱疹病毒载体。此类重组病毒的非限制性实例包括重组腺相关病毒 (AAV)、重组腺病毒、重组慢病毒、重组逆转录病毒、重组单纯疱疹病毒、重组痘病毒、噬菌体等。本公开提供了能够整合到宿主基因组中的载体,诸如逆转录病毒或慢病毒。参见,例如, Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, 1989; Kay, M.A., et al., 2001 Nat. Med. 7(1):33-40; and Walther W. and Stein U., 2000 Drugs, 60(2):249-71,其通过援引并入本文。

[0103] 根据本公开的载体可以被转化、转染或以其他方式引入细胞中。转染是指由细胞摄取载体,无论实际上是否表达任何编码序列。许多转染方法是普通技术人员已知的,例如,脂质转染胺、磷酸钙共沉淀、电穿孔、DEAE-葡聚糖处理、微注射、病毒感染和本领域已知

的其他方法。转导是指病毒进入细胞并表达(例如,转录和/或翻译)由病毒载体基因组递送的序列。在重组载体的情况下,“转导”通常是指重组病毒载体进入细胞并表达由载体基因组递送的目的核酸。

[0104] 将载体递送至细胞的方法是本领域熟知的,并且可以包括DNA或RNA电穿孔、转染试剂(诸如脂质体或纳米颗粒)以递送DNA或RNA;通过机械变形递送DNA、RNA或蛋白(参见,例如,Sharei et al.Proc.Natl.Acad.Sci.USA(2013)110(6):2082-2087,其通过援引并入本文);或病毒转导。在一些实施方式中,通过病毒转导将载体递送至细胞。核酸可以作为较大构建体(诸如质粒或病毒载体)的一部分递送,或直接递送,例如,通过电穿孔、脂质囊泡、病毒转运蛋白、微注射和基因枪法(高速粒子轰击)。

[0105] 此外,可以使用递送运载体,诸如基于纳米颗粒和基于脂质的递送系统。递送运载体的其他实例包括慢病毒载体、核糖核蛋白(RNP)复合体、基于脂质的递送系统、基因枪、流体动力学、电穿孔或核转染微注射和基因枪法。Nayerossadat等人(Adv Biomed Res.2012;1:27)和Ibraheem等人(Int J Pharm.2014Jan 1;459(1-2):70-83详细讨论了各种基因递送方法,其通过引用并入本文。

[0106] 还提供了包括本文所述的工程化T细胞群的组合物。

[0107] 组合物可以任选地包括至少一种额外的治疗剂,诸如用于治疗T细胞耗竭的其他药物(例如,抗PD-1检查点抑制剂,诸如纳武利尤单抗(nivolumab)),或者用于治疗受试者与T细胞耗竭相关的感染或疾病的其他药物(例如,抗病毒药物、抗生素、抗微生物药物或抗癌药物)。

[0108] 在一些实施方式中,至少一种额外的治疗剂包括至少一种化疗剂。如本文所用,术语“化疗”、“化疗剂”或“抗癌药物”包括用于癌症治疗或预防的任何小分子或其他药物。化疗剂包括但不限于环磷酰胺、甲氨蝶呤、5-氟尿嘧啶、多柔比星(doxorubicin)、多西他赛(docetaxel)、柔红霉素(daunorubicin)、博来霉素(bleomycin)、长春碱(vinblastine)、达卡巴嗪(dacarbazine)、顺铂、紫杉醇、盐酸雷洛昔芬(raloxifene hydrochloride)、枸橼酸他莫昔芬(tamoxifen citrate)、阿贝西利(abemaciclib)、飞尼妥(afinitor)(依维莫司(Everolimus))、阿培利司(alpelisib)、阿那罗唑(anastrozole)、帕米膦酸、阿那罗唑(anastrozole)、依西美坦(exemestane)、卡培他滨(capecitabine)、盐酸表柔比星(epirubicin hydrochloride)、甲磺酸艾日布林(eribulin mesylate)、托瑞米芬(toremifene)、氟维司群(fulvestrant)、来罗唑(letrozole)、吉西他滨(gemcitabine)、戈舍瑞林(goserelin)、伊沙匹隆(ixabepilone)、曲妥珠单抗(emtansine)、拉帕替尼(lapatinib)、奥拉帕利(olaparib)、甲地孕酮(megestrol)、奈拉替尼(neratinib)、哌柏西利(palbociclib)、瑞波西利(ribociclib)、他拉帕尼(talazoparib)、塞替派(thiotepa)、托瑞米芬(toremifene)、甲氨蝶呤(methotrexate)和图卡替尼(tucatinib)。在选择实施方式中,化疗剂包括紫杉醇。

[0109] 组合物可以包括,例如,细胞因子、趋化因子和其他生物信号传导分子、肿瘤特异性疫苗、细胞癌症疫苗(例如,GM-CSF转导的癌细胞)、肿瘤特异性单克隆抗体、自体 and 同种异体干细胞拯救(例如,增强移植物抗肿瘤效应)、其他治疗性抗体、分子靶向治疗、抗血管生成疗法、具有治疗目的感染原(诸如肿瘤定位细菌)和基因疗法。

[0110] 组合物可以包括药学上可接受的负载体。如本文所用,术语“药学上可接受的负载

体”意指无毒的惰性固体、半固体或液体填充剂,稀释剂,包封材料,表面活性剂,环糊精或任何类型的制剂助剂。负载体可以包括单一成分或者两种或更多种成分的组合。可以用作药学上可接受的负载体的材料的一些实例是糖,诸如但不限于乳糖、葡萄糖和蔗糖;淀粉,诸如但不限于玉米淀粉和马铃薯淀粉;纤维素及其衍生物,诸如但不限于羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和醋酸纤维素;粉状黄芪胶;麦芽;明胶;滑石;赋形剂,诸如但不限于可可脂和栓剂蜡;油,诸如但不限于花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油;表面活性剂,诸如但不限于cremophor EL、cremophor RH 60、Solutol HS15和聚山梨醇酯80;环糊精,诸如但不限于 α -CD、 β -CD、 γ -CD、HP- β -CD、SBE- β -CD;乙二醇;诸如丙二醇;酯,诸如但不限于油酸乙酯和月桂酸乙酯;琼脂;缓冲剂,诸如但不限于氢氧化镁和氢氧化铝;海藻酸;无热原水;等渗盐水;林格氏溶液;乙醇和磷酸盐缓冲溶液,以及根据制剂师的判断,组合物中还可以存在其他无毒相容润滑剂(诸如但不限于月桂醇硫酸酯钠和硬脂酸镁)、防腐剂和抗氧化剂。

[0111] 给药途径和组合物的形式将决定所使用的负载体的类型。组合物可以是多种形式,例如,适合于全身给药(例如,口服、直肠、鼻、舌下、颊、植入体或肠胃外注射)或外用给药(例如,真皮、肺、鼻、耳、眼部、脂质体递送系统或电离子透入疗法)。

[0112] 3. 制备治疗性T细胞的方法

[0113] 本公开提供了用于制备治疗性T细胞的方法。

[0114] 在一些实施方式中,该方法包括获得T细胞的样品;改变T细胞的DNA以敲除或破坏选自以下组成的组的至少一种基因:IN080C、GATA3、ARID1A、WDR82、TRP53、GPR137C、ZFP219、HDAC1、ELMSAN1和ACTR8;并且工程化T细胞以表达外源性受体。

[0115] 在一些实施方式中,该方法包括获得包括T细胞的样品;改变T细胞的DNA以敲除或破坏编码染色质重塑蛋白的至少一种基因;并且工程化T细胞以表达外源性受体。在一些实施方式中,染色质重塑蛋白是IN080核小体定位复合体蛋白或SWI/SNF家族成员或其组合。在一些实施方式中,IN080核小体定位复合体蛋白是Actr5、Ino80、Ino80c、Ino80b、Actr8或其组合。在一些实施方式中,SWI/SNF家族成员是cBAF复合体的成员。在一些实施方式中,SWI/SNF家族成员是Arid1a、Arid2、Arid1b、Smarcb1、Smarcd2、Smarca4、Smarcc1或其组合。在一些实施方式中,该方法还包括改变T细胞的DNA以敲除或破坏选自以下组成的组的至少一种基因:GATA3、WDR82、TRP53、GPR137C、ZFP219、HDAC1和ELMSAN1。

[0116] 与不包括修饰的细胞相比,改变DNA防止或减少T细胞耗竭。因此,改变DNA可以增加T细胞的持久性和功能,从而改善T细胞的治疗用途。

[0117] T细胞可以选自CD3+T细胞(例如,CD4+和CD8+T细胞的组合)、CD8+T细胞、CD4+T细胞、自然杀伤(NK)T细胞、 $\alpha\beta$ T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞或其任何组合。在一些实施方式中,T细胞是记忆T细胞(例如,中央记忆T细胞或效应记忆T细胞)。在一些实施方式中,T细胞是肿瘤浸润淋巴细胞。在一些实施方式中,T细胞是细胞因子诱导的杀伤细胞。在选择实施方式中,T细胞是CD8+T细胞。

[0118] 在一些实施方式中,T细胞是天然存在的T细胞。例如,T细胞可以分离自受试者样品。在一些实施方式中,T细胞是抗肿瘤T细胞(例如,具有针对肿瘤(例如,自体肿瘤)的活性的T细胞,其响应于抗原而变成激活并扩增)。抗肿瘤T细胞包括但不限于获自切除的肿瘤或肿瘤活体组织检查的T细胞(例如,肿瘤浸润淋巴细胞(TIL))和多克隆或单克隆肿瘤反应性

T细胞(例如,通过血浆分离置换法、针对由自体或人工抗原呈递细胞呈递的肿瘤抗原进行体外扩增来获得)。在一些实施方式中,T细胞是离体扩增的。

[0119] 改变T细胞的DNA以敲除或破坏至少一种基因可以使用本领域已知的和本文别处描述的方法。

[0120] 工程化T细胞以表达外源性受体可以包括转染、转化或以其他方式将核酸引入表达外源性受体的细胞中。本文别处描述的核酸和用于转染、转化或以其他方式将此类核酸引入细胞中的方法适合于所公开的方法。

[0121] 在一些实施方式中,外源性受体是T细胞受体(TCR)或嵌合抗原受体(CAR)。外源性受体不受其识别并响应于任何特异性抗原或蛋白的特异性的限制。在某些实施方式中,用识别并响应于感染性疾病和/或自身免疫抗原的外源性受体对T细胞进行基因修饰。在某些实施方式中,用识别并响应于肿瘤抗原的外源性受体对T细胞进行基因修饰

[0122] 4. 治疗方法

[0123] 本公开还提供了用于治疗疾病或疾患的方法。

[0124] 在一些实施方式中,该方法包括向受试者给药有效量的经修饰以缺失促进或支持T细胞持久性和功能性的至少一种基因的T细胞。

[0125] 在某些实施方式中,至少一种基因选自由以下组成的组:IN080C、GATA3、ARID1A、WDR82、TRP53、GPR137C、ZFP219、HDAC1、ELMSAN1和ACTR8。

[0126] 在某些实施方式中,至少一种基因编码染色质重塑蛋白。在一些实施方式中,染色质重塑蛋白是IN080核小体定位复合体蛋白或SWI/SNF家族成员或其组合。在一些实施方式中,IN080核小体定位复合体蛋白是Actr5、Ino80、Ino80c、Ino80b、Actr8或其组合。在一些实施方式中,SWI/SNF家族成员是cBAF复合体的成员。在一些实施方式中,SWI/SNF家族成员是Arid1a、Arid2、Arid1b、Smarcb1、Smarcd2、Smarca4、Smarcc1或其组合。

[0127] 本发明不受治疗的疾病或病症的类型限制。可以经由给药T细胞治疗的任何疾病或病症可以使用本文所述的T细胞及其组合物以改善且更有效的方式进行治疗。

[0128] 在一些实施方式中,给药抑制或减少T细胞耗竭(例如,与接受相同量的未经工程化以缺失至少一种基因的T细胞(例如,CAR T细胞或包括外源TCR的T细胞)的受试者相比)。在一些实施方式中,至少一种基因选自由以下组成的组:IN080C、GATA3、ARID1A、WDR82、TRP53、GPR137C、ZFP219、HDAC1、ELMSAN1和ACTR8。在一些实施方式中,染色质重塑蛋白是IN080核小体定位复合体蛋白或SWI/SNF家族成员或其组合。在一些实施方式中,IN080核小体定位复合体蛋白是Actr5、Ino80、Ino80c、Ino80b、Actr8或其组合。在一些实施方式中,SWI/SNF家族成员是cBAF复合体的成员。在一些实施方式中,SWI/SNF家族成员是Arid1a、Arid2、Arid1b、Smarcb1、Smarcd2、Smarca4、Smarcc1或其组合。

[0129] 在一些实施方式中,与非工程化T细胞相比,在存在慢性抗原的情况下,给药导致改善的T细胞存活率和/或改善的T细胞持久性和功能。

[0130] T细胞可以分离自受试者。在一些实施方式中,T细胞对于受试者是同种异体的。在一些实施方式中,T细胞对于受试者是自体的。因此,T细胞可以分离自受试者的样品,经离体修饰并扩增,并且返回至受试者。

[0131] 在一些实施方式中,疾病或病症是癌症。在一些实施方式中,疾病或病症是感染性疾病。本发明不受癌症类型或感染性疾病类型的限制。事实上,本领域已知的使用T细胞疗

法进行治疗的任何癌症均可以用本发明的组合物和方法进行治疗。类似地,本领域已知的使用T细胞疗法进行治疗的任何感染性疾病可以用本发明的组合物和方法进行治疗。

[0132] 在某些实施方式中,本发明提供了用于治疗或延迟个体中的癌症进展、或者用于治疗或延迟个体中的感染性疾病进展的方法,其包括向个体给药有效量的工程化T细胞或其组合物,如本文所述。在一些实施方式中,治疗在停止治疗后导致个体的持续反应。

[0133] 该方法可以用于任何癌细胞或患有任何类型癌症的受试者,例如国家癌症研究中心(National Cancer Institute)所描述的那些。在一些实施方式中,癌症可以是癌、肉瘤、淋巴瘤、白血病、黑素瘤、间皮瘤、多发性骨髓瘤或精原细胞瘤。癌症可以是膀胱癌、血液癌、骨癌、脑癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌/直肠癌、子宫内膜癌、头颈癌、肾癌、肝癌、肺癌、肌肉组织癌、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、皮肤癌、脾癌、胃癌、睾丸癌、甲状腺癌或子宫癌。在一些实施方式中,癌症包括实体瘤。在一些实施方式中,癌症是转移性癌症。

[0134] 本文所述的方法可以用于治疗期望免疫原性增强的病症,诸如增加肿瘤免疫原性以治疗癌症。在一些实施方式中,重组受体(例如,CAR和/或TCR)对所治疗的癌症具有特异性。在一些实施方式中,重组受体(例如,CAR和/或TCR)对于所有癌症是通用的。

[0135] 在某些实施方式中,本发明证明用治疗有效量的所公开的组合物治疗患有癌症的受试者优于用未修饰的T细胞治疗患有癌症的受试者。在一些实施方式中,用治疗有效量的所公开的T细胞或其组合物进行治疗抑制了癌细胞的发育或生长和/或使癌细胞作为群体更容易受到其他治疗(例如,癌症治疗药物或放射疗法的细胞死亡诱导活性)的影响。因此,本发明的T细胞、组合物和方法可以作为单药治疗使用(例如,以杀死癌细胞,和/或减少或抑制癌细胞生长,诱导癌细胞凋亡和/或细胞周期阻滞),或当与一种或多种额外的试剂诸如其他抗癌剂(例如,诱导细胞死亡或破坏细胞周期的癌症治疗药物或放射疗法)联合给药时,以使与仅用癌症治疗药物或单独放射疗法治疗的动物中相应比例的细胞相比,更大比例的癌细胞易于杀死、抑制癌细胞生长、诱导细胞凋亡和/或细胞周期阻滞。

[0136] 在一些实施方式中,个体患有对一种或多种其他形式的抗癌治疗(例如,化疗、免疫疗法等)具有抗性(例如,已被证明具有抗性)的癌症。在一些实施方式中,抗性包括癌症或难治性癌症的复发。复发可能是指治疗后癌症在原始部位或新部位重新出现。在一些实施方式中,抗性包括化疗治疗过程中癌症的进展。在一些实施方式中,抗性包括对于传统或常规化疗剂治疗没有反应的癌症。癌症可以在治疗开始时具有抗性,或可以在治疗期间变得具有抗性。在一些实施方式中,癌症处于早期或晚期。

[0137] 在一些实施方式中,修饰的T细胞及其组合物用于治疗、改善或预防特征在于对一种或多种常规癌症疗法具有抗性的癌症(例如,具有化学抗性、放射抗性、激素抗性等的某些癌细胞)。在一些实施方式中,治疗可以完全抑制抗癌细胞的生长和/或使此类细胞作为群体对癌症治疗药物或放射疗法(例如,对其诱导细胞死亡的活性)更敏感。

[0138] 在某些实施方式中,治疗有效量的修饰的T细胞组合物减少此类治疗后受试者中癌细胞的数量。在某些实施方式中,治疗有效量的修饰的T细胞组合物减少和/或消除此类治疗后受试者中的肿瘤负荷。

[0139] 多种第二疗法可以与本公开的方法结合使用。第二疗法可以是给药额外的治疗剂或可以是与另一试剂的给药不相关的第二疗法。此类第二疗法包括但不限于外科手术、免疫疗法、放射疗法或额外的化疗剂或抗癌剂。

[0140] 第二疗法可以与初始疗法同时给药,或作为单一组合物或在与初始疗法基本上同时给药的单独组合物中给药。在一些实施方式中,第二疗法可以在第一疗法的治疗之前或之后以范围从数小时到数月的时间间隔进行。

[0141] 在某些实施方式中,该方法进一步包括向受试者施用放射疗法。在某些实施方式中,在受试者接受治疗有效量的修饰的T细胞组合物之前、同时和/或之后施用放射疗法。

[0142] 在某些实施方式中,该方法进一步包括向受试者给药一种或多种抗癌剂和/或一种或多种化疗剂。在某些实施方式中,在受试者接受治疗有效量的工程化T细胞或其组合物之前、同时和/或之后给药一种或多种抗癌剂和/或一种或多种化疗剂。在某些实施方式中,与单独用工程化T细胞或抗癌药物/放射治疗的那些受试者相比,用治疗有效量的工程化T细胞和抗癌剂疗程对受试者进行联合治疗在此类受试者中产生更大的肿瘤应答和临床获益。由于所有批准的抗癌药物和放射治疗的剂量都是已知的,本发明设想了它们与工程化T细胞的各种组合。

[0143] 在一些实施方式中,第二疗法包括抗体给药。抗体可以靶向肿瘤细胞特异性表达的抗原或与正常细胞共有的抗原。在一些实施方式中,抗体可以靶向,例如,CD20、CD33、CD52、CD30、HER (也称为erbB或EGFR)、VEGF、CTLA-4 (也称为CD152)、上皮细胞黏附分子(EpCAM,也称为CD326)和PD-1/PD-L1。合适的抗体包括但不限于利妥昔单抗(rituximab)、兰妥莫单抗(blinatumomab)、曲司珠单抗(trastuzumab)、吉妥珠单抗(gemtuzumab)、阿仑珠单抗(alemtuzumab)、替伊莫单抗(ibritumomab)、托西莫单抗(tositumomab)、贝伐珠单抗(bevacizumab)、西妥昔单抗(cetuximab)、帕木单抗(panitumumab)、奥法木单抗(ofatumumab)、伊匹木单抗(ipilimumab)、维布妥昔单抗(brentuximab)、帕妥珠单抗(pertuzumab)等。在一些实施方式中,额外的治疗剂可以包括抗PD-1/PD-L1抗体,包括但不限于帕博利珠单抗(pembrolizumab)、纳武利尤单抗(nivolumab)、西米普利单抗(cemiplimab)、阿替利珠单抗(atenzolizumab)、阿维单抗(avelumab)、度伐利尤单抗(durvalumab)和伊匹木单抗(ipilimumab)。抗体还可以与化疗剂连接。因此,在一些实施方式中,抗体是抗体-药物缀合物。

[0144] 第二疗法的给药可以通过多种方法向受试者给药。在本文描述的任何用途或方法中,可以通过本领域技术人员已知的各种途径给药,包括但不限于向有此需要的受试者口服、吸入、静脉内、肌内、外用、皮下、全身和/或腹腔给药。

[0145] 5. 防止T细胞耗竭的方法

[0146] 本公开还提供了防止工程化T细胞耗竭(例如,保持暴露于过量抗原的T细胞的功能性)的方法。在一些实施方式中,该方法包括基因修饰T细胞以缺失选自以下组成的组的至少一种基因:IN080C、GATA3、ARID1A、WDR82、TRP53、GPR137C、ZFP219、HDAC1、ELMSAN1和ACTR8。在一些实施方式中,该方法包括基因修饰T细胞以缺失编码染色质重塑蛋白的至少一种基因。在一些实施方式中,染色质重塑蛋白是IN080核小体定位复合体蛋白或SWI/SNF家族成员或其组合。在一些实施方式中,IN080核小体定位复合体蛋白是Actr5、Ino80、Ino80c、Ino80b、Actr8或其组合。在一些实施方式中,SWI/SNF家族成员是cBAF复合体的成员。在一些实施方式中,SWI/SNF家族成员是Arid1a、Arid2、Arid1b、Smarca1、Smarca2、Smarca4、Smarca1或其组合。

[0147] 在一些实施方式中,该方法进一步包括向有此需要的受试者给药工程化T细胞。

[0148] “预防T细胞耗竭”是指与处于耗竭状态的细胞相比,T细胞的功能性保持或恢复的状态,其特征在于以下一种或多种:PD-1、TIM-3和LAG-3中的一种或多种的表达和/或水平降低;增加记忆细胞形成和/或保持记忆标志物(例如,CD62L);预防细胞凋亡;增加抗原诱导的细胞因子(例如,IL-2)的产生和/或分泌;增强杀伤能力;增加对具有低表面抗原的肿瘤靶标的识别;增强对抗原反应的增殖;以及抑制性受体(例如,程序性细胞死亡1(PDCD1,也称为PD1)和细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4(CTLA-4))的表达降低。

[0149] 因此,与未修饰的T细胞相比,工程化T细胞可以表现出增加的功能性和/或活性(例如,增加的抗原诱导的细胞因子产生、增强的杀伤能力(例如,增加对具有低表面抗原的肿瘤靶标的识别)、增加的记忆细胞形成和/或对抗原反应的增殖增强)和/或耗竭特征减少(例如,较低水平的指示耗竭的标志物或抑制性受体(例如,PD-1、TIM-3、LAG-3)和/或较低水平的程序化细胞死亡)。在治疗应用的背景下,修饰的T细胞可以增强疗法(例如,CAR T细胞)的临床功效。

[0150] 在一些实施方式中,分离的T细胞进一步包括编码外源性受体的核酸。在一些实施方式中,外源性受体是T细胞受体(TCR)或嵌合抗原受体(CAR)。用于修饰T细胞、外源性受体及其核酸和靶抗原的方法、受试者、以及与所公开的T细胞相关的上文所阐述的疾病和疾患及其组合物和方法的描述也适用于防止工程化T细胞耗竭的方法。

[0151] 本文公开的修饰的T细胞或组合物的有效量可以基于以下来确定:待治疗的疾病的类型、修饰的T细胞的类型、疾病的严重程度和病程、个体的临床病症、个体的临床病史和对治疗的反应以及主治医师的判断。

[0152] 本文描述的任何方法(例如,疾病或疾患的治疗)的功效可以在本领域已知的各种模型(诸如临床或临床前模型)中进行测试。治疗的有效性可以指以下任何一项或多项:延长生存期(包括总生存期和无进展生存期);产生客观反应(包括完全反应或部分反应);或者改善疾病或疾患(例如,癌症或感染性疾病)的体征或症状。

[0153] 在一些实施方式中,在用T细胞治疗(例如,单独使用或与本文描述的另一种疗法联合使用)之前获得样品作为用于测量对治疗的反应的基线。在一些实施方式中,样品是组织样品(例如,福尔马林固定的并石蜡包埋的(FFPE)、留存的、新鲜的或冷冻的)。在一些实施方式中,样品是全血。在一些实施方式中,全血包括免疫细胞、循环肿瘤细胞及其任何组合。

[0154] 对于任何示例性癌症模型,在形成肿瘤后,可以将小鼠置于接受治疗或对照治疗的治疗组中。在治疗过程期间测量肿瘤大小(例如,肿瘤体积),并且还监测总存活率。

[0155] 在一些实施方式中,功效可以是指根据用于确定癌症患者中的肿瘤状态(例如,反应、稳定或进展)的已公开的一组RECIST指南的一种或多种因素的改善。有反应的受试者可以指其一种或多种癌症显示出改善的受试者,例如,根据基于RECIST标准的一种或多种因素。无反应受试者可以指其一种或多种癌症没有显示出改善的受试者,例如,根据基于RECIST标准的一种或多种因素。

[0156] 有效性还可以指多个免疫相关反应标准(irRC)之一的改善。在一些实施方式中,将新病变添加至限定的肿瘤负荷中并且,例如,在随后的评估中跟踪放射学进展。在一些实施方式中,非靶标病变的存在被包括在完全反应的评估中并且不被包括在放射学进展的评估中。在一些实施方式中,放射学进展可以仅基于可测量的疾病来确定和/或可以通过自第

一次记录之日起一段时间(例如,四周)之后的连续评估来确认。

[0157] 6. T细胞耗竭基因的筛选方法

[0158] 本公开还提供了筛选促进T细胞耗竭的基因。该方法包括:在慢性或急性刺激条件下培养T细胞至少六天,其中,该T细胞包括至少一种基因敲除或敲低;分离不显示耗竭的T细胞表面表型的T细胞;以及识别至少一种基因敲除或敲低。在一些实施方式中,T细胞是T细胞文库,其中,T细胞文库包括针对T细胞基因组中的每种基因的至少一种T细胞。

[0159] T细胞可以选自CD3+T细胞(例如,CD4+和CD8+T细胞的组合)、CD8+T细胞、CD4+T细胞、自然杀伤(NK) T细胞、 $\alpha\beta$ T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞或其任何组合。在一些实施方式中,T细胞是记忆T细胞(例如,中央记忆T细胞或效应记忆T细胞)。在一些实施方式中,T细胞是肿瘤浸润淋巴细胞。在一些实施方式中,T细胞是细胞因子诱导的杀伤细胞。在选择实施方式中,T细胞是CD8+T细胞。

[0160] 在一些实施方式中,T细胞是天然存在的T细胞。例如,T细胞可以分离自受试者样品。

[0161] T细胞或T细胞文库可以使用本领域已知的基因筛选方法生成,例如,RNAi、互补DNA(cDNA)文库或基于CRISPR/Cas9的基因组编辑。该方法可以被设计成单独测量单基因敲低或敲除。替代地,该方法可以被设计成测量组合的基因敲低或敲除。

[0162] 在一些实施方式中,通过用指导RNA的全基因组文库进行单一或组合的基于CRISPR-Cas的基因敲低来生成T细胞。因此,在某些实施方式中,使用CRISPR-Cas系统生成T细胞,其中,每个细胞包括至少一种指导RNA。参见例如,美国专利申请20190085324,其通过援引以其全文并入本文。

[0163] 如本文所用,CRISPR-Cas系统(例如CRISPR-Cas9系统)是指源自细菌规律成簇的间隔短回文重复基因座的非天然存在的系统。这些系统通常包括酶(Cas蛋白,诸如Cas9蛋白)和一个或多个指导RNA。CRISPR-Cas系统可以经工程化,例如用于在哺乳动物细胞中最佳使用、用于其中最佳递送、用于基因编辑中的最佳活性。

[0164] 指导RNA(gRNA)可以是crRNA、crRNA/tracrRNA(或单导向RNA,sgRNA)。术语“gRNA”、“指导RNA”和“CRISPR指导序列”在全文中可以互换使用,并且是指包括决定CRISPR-Cas系统的结合特异性的序列的核酸。gRNA与靶核酸序列(例如,细胞基因组中的基因)杂交(部分或完全互补)。

[0165] 为了促进gRNA设计,已开发许多计算工具(参见Prykhodzhiy et al. (PLoS ONE,10(3):(2015));Zhu et al. (PLoS ONE,9(9)(2014));Xiao et al. (Bioinformatics.Jan 21(2014));Heigwer et al. (Nat Methods,11(2):122-123(2014))。Zhu(Frontiers in Biology,10(4) pp 289-296(2015))讨论了指导RNA设计的方法和工具,其通过援引并入本文。此外,还有许多公开可获得的软件工具可以用于促进一种或多种sgRNA的设计;包括但不限于Genscript交互式CRISPR gRNA设计工具、WU-CRISPR和Broad Institute GPP sgRNA Designer。还有公开可获得的预先设计的gRNA序列,以靶向许多物种(人、小鼠、大鼠、斑马鱼、秀丽隐杆线虫(*C.elegans*))基因组内的许多基因和位置,包括但不限于IDT DNA预先设计的Alt-R CRISPR-Cas9指导RNA、Addgene验证的gRNA靶序列和GenScript全基因组gRNA数据库。

[0166] 对于全基因组方法,可能设计和构建合适的gRNA文库。可以使用载体递送诸如病

毒载体递送来将此类gRNA递送至细胞。CRISPR-Cas介导的干扰的组合可以通过在单个细胞内递送多个gRNA来获得。

[0167] 在慢性或急性刺激条件下培养的T细胞可以变得耗竭。如本文所述,耗竭的T细胞表面表型包括PD-1、TIM-3和LAG-3的浓度增加。因此,导致T细胞耗竭的任何刺激条件均可以用于所公开的方法中。在一些实施方式中,慢性刺激条件包括使用抗CD3包被的板来培养T细胞。在一些实施方式中,慢性刺激条件进一步包括在存在IL-2的情况下培养。在一些实施方式中,急性刺激条件包括在存在IL-2的情况下培养T细胞。

[0168] 培养可以持续T细胞耗竭开始所需的任何时间段。在一些实施方式中,培养为至少6天。在一些实施方式中,培养的持续时间为6-10天(例如,6天、7天、8天、9天或10天)。在一些实施方式中,培养持续超过10天。

[0169] T细胞可以在慢性或急性刺激条件下在培养之前存在于培养物中。例如,在将T细胞置于慢性或急性刺激的条件之前,可以在正常培养条件下培养T细胞以进行生长、生殖或基因工程化。

[0170] 分离不显示耗竭的T细胞表面表型的T细胞包括允许识别耗竭的T细胞和/或分离识别的细胞的任何一种或多种方法。例如,如本文别处所述,T细胞耗竭标志物的FACS分析能够在识别至少一种基因敲除或敲低之前识别并去除未耗竭的T细胞。

[0171] 为了识别促进T细胞耗竭的基因,分离那些不表现出耗竭表型的T细胞并提取基因组DNA用于分析。分析可以包括基因组测序以确定被敲除的基因。在CRISPR-Cas筛选的情况下,gRNA编码区进行了PCR扩增、测序并定位到gRNA文库。通过比较gRNA图谱,可以确定基因敲除和T细胞耗竭之间的联系。

[0172] 本公开进一步提供了包含一种或多种试剂或其他组分的系统或试剂盒,其对于实践本文所述的任何方法是有用的、必需的或足够的。该系统或试剂盒可以包括外源性受体试剂(核酸、载体、组合物等)、转染或给药试剂、阴性和阳性对照样品(例如,T细胞或空载体DNA)、T细胞、用于基因工程化T细胞的系统(例如,Cas蛋白、gRNA、其载体等)、额外的治疗剂、容器(例如,微量离心管)、检测和分析仪器、软件、说明书等。本文别处提供的核酸、载体、组合物、T细胞、额外的治疗剂的描述适合与所公开的系统或试剂盒一起使用。

[0173] 在一些实施方式中,系统或试剂盒包括本文所述的工程化T细胞或用于基因工程化T细胞的系统。用于基因工程化T细胞的系统可以包括成簇间隔的短回文重复序列(CRISPR)/CRISPR相关蛋白(Cas)系统,如本文所述。在某些实施方式中,用于基因工程化T细胞的系统包括Cas蛋白(例如,Cas9、dCas9)或编码Cas蛋白的核酸,以及针对促进T细胞耗竭的至少一种基因的gRNA或编码gRNA的核酸。在一些实施方式中,编码Cas蛋白(例如,Cas9)和gRNA的核酸是相同或不同的核酸。例如,gRNA和Cas蛋白可以从相同载体表达。促进T细胞耗竭的至少一种基因可以选自由以下组成的组:IN080C、GATA3、ARID1A、WDR82、TRP53、GPR137C、ZFP219、HDAC1、ELMSAN1和ACTR8。促进T细胞耗竭的至少一种基因可以编码染色质重塑蛋白。在一些实施方式中,染色质重塑蛋白是IN080核小体定位复合体蛋白或SWI/SNF家族成员或其组合。在一些实施方式中,IN080核小体定位复合体蛋白是Actr5、Ino80、Ino80c、Ino80b、Actr8或其组合。在一些实施方式中,SWI/SNF家族成员是cBAF复合体的成员。在一些实施方式中,SWI/SNF家族成员是Arid1a、Arid2、Arid1b、Smarca1、Smarca2、Smarca4、Smarca1或其组合。

[0174] 在一些实施方式中,系统或试剂盒进一步包括外源性受体或编码其的核酸。

[0175] 在一些实施方式中,系统或试剂盒进一步包括至少一种额外的治疗剂。至少一种治疗剂可以选自由以下组成的组:用于治疗T细胞耗竭的试剂;抗病毒剂;抗生素剂;抗微生物剂;化疗剂;或其组合。

[0176] 在一些实施方式中,系统或试剂盒进一步包括使用系统或试剂盒的组件的说明书。该说明书是与系统或试剂盒相关的相关材料或方法。这些材料可以包括以下的任何组合:背景信息、组件列表及其可获得性信息(购买信息等)、使用系统或试剂盒的简要或详细方案、故障排除、参考、技术支持和任何其他相关文档。说明书可以与系统或试剂盒一起提供,或作为单独的成员组件提供,或作为纸质形式或可以在计算机可读存储设备上提供或从互联网网站下载的电子形式提供,或作为记录的演示文稿。

[0177] 7. 实施例

[0178] 材料和方法

[0179] 小鼠所有小鼠均购自JAX。野生型小鼠是C57BL/6J小鼠(JAX:000664)。Cas9敲入小鼠在室内饲养(JAX:026179)。OT-1小鼠(JAX:003831)与Cas9小鼠杂交。Rag1^{-/-}小鼠在室内饲养(JAX:002216)。

[0180] 原代T细胞分离和培养收集脾并通过70uM过滤器破碎。用ACK裂解缓冲液(Gibco)裂解RBC,并孵育6min,然后用PBS洗涤。对细胞进行计数,并且然后根据Miltenyi方案将其重悬于MACS缓冲液(PBS+0.5%BSA+2μM EDTA)中。使用Miltenyi的小鼠CD8⁺T细胞分离试剂盒富集CD8⁺T细胞,并且然后重悬于具有10% FBS、1%丙酮酸钠、1%非必需氨基酸、100U Pen/Strep、50nM β-巯基乙醇(cRPMI)并补充有10ng/ml的小鼠IL-2的RPMI中。将细胞以100万个细胞/ml的浓度接种在包被有5ug/ml抗CD3和2ug/ml抗CD28的板上。在所有实验开始时,细胞在这些激活板上保留48小时。经由流式细胞术验证CD8⁺T细胞纯度。细胞每两天传代一次并保持在每mL 100万个细胞。

[0181] 体外T细胞耗竭测定为了诱导T细胞耗竭,使用抗CD3包被的板以5ug/mL进行慢性刺激(在10ng/ml IL-2持续存在下)。每两天将细胞传代至新鲜包被的板上,并在第6、8或10天进行分析,如结果中所述。相比之下,急性刺激的细胞维持在单独使用的10ng/ml IL-2中,每两天传代一次,并在第6、8或10天进行分析

[0182] 细胞因子产生的测量用乙酸肉豆蔻佛波酯(phorbol myristate acetate)(Sigma,50ngml⁻¹)和离子霉素(Sigma,500ngml⁻¹)或板结合的3μg/ml抗CD3重新刺激T细胞。90min后,用布雷菲德菌素A(brefeldin A)处理细胞以阻断细胞因子分泌。然后,3h后,对细胞进行表面标志物染色,并同时用活/死细胞生存力蓝染(Live/Dead Blue Viability Dye,Thermo Fisher)在4℃下标记20min。将细胞洗涤两次并使用FoxP3固定/透化试剂盒(Thermo Fisher)固定过夜。次日,洗涤细胞并在室温下进行细胞内细胞因子染色1h。然后将它们洗涤三次并使用LSR Fortessa机器(Beckman Dickinson)进行分析。使用FlowJo v.10.0进行平均荧光强度分析。所有实验进行至少两次生物学重复。使用的抗体(除非另有说明否则以1:100)为TNF-PE(BioLegend,MP6-XT22,506306)、PD-1-PECy7(BioLegend,RMP1-30,109110)、IFN-γ-FITC(BioLegend,XMG1.2,505806)、CD4-BV711(BioLegend,RM4-5,100550)和CD8α-BV786(BioLegend,53-6.7,100750)。

[0183] 生长曲线激活T细胞,如所述。随后将它们以5×10⁵个细胞铺板于24孔板中的1ml

的RPMI-1640培养基中,该培养基包含10% FBS、2mM L-谷氨酰胺、5 μ M β -ME和10ngml⁻¹IL-2,并含有(慢性)或不含有(急性)板结合抗CD3(3 μ gml⁻¹)。实验持续中每2d收集细胞,并使用具有细胞体积门控为75-4,000飞升的Beckmann Coulter计数器对细胞数量进行计数。然后,将50%的细胞重新铺板于1ml新鲜T细胞培养基中。所有实验进行至少独立的两次。

[0184] 体外杀伤测定用SIINFEKL肽(Invivogen)以指定的浓度在37°C下脉冲表达荧光素酶报道基因的B16细胞4h。然后,将它们洗涤两次,并以每孔 4×10^4 个细胞连同 1×10^5 个OT-1转基因T细胞一起铺板,这些T细胞已如前所述被急性或慢性刺激8天。共培养24h后,裂解细胞,并按照生产商的说明书使用荧光素酶测定试剂盒(Promega)来测量荧光素酶活性。荧光素酶活性归一化为在不存在T细胞的情况下培养的细胞

[0185] B16-卵清蛋白体内肿瘤模型C57BL/6scid(Jackson 001913)小鼠皮下注射在PBS和Matrigel(Corning)的1:1混合物中的 2×10^5 个B16-OVA细胞。5d后,将被如先前所述急性或慢性刺激的 2×10^6 个OT-1T细胞经由眼眶后注射过继转移至小鼠。每日监测小鼠并根据发病率体征处死小鼠。

[0186] ATAC-seq样品处理和分析使用Omni-ATAC方案进行ATAC-seq(Corces et al., 2017, Nat. Methods 14, 959-962)。简言之,在ATAC-seq之前立即通过流式细胞术纯化50,000个活细胞。根据Omni-ATAC方案进行裂解、细胞核分离和转座。制备用于测序的文库,并在Illumina NovaSeq上以2x75双索引形式进行测序。

[0187] 使用fastp修剪fastp文件并使用hisat2与mm10基因组比对。对度长进行去重复,并针对包含过滤、去重复的ATAC-seq片段的每个样品创建bed文件。使用MACS2单独调用每个样品的峰,并且然后基于该样品的大多数重复中存在的峰来过滤成可重现的峰。通过将每个样品的可重复峰合并到一组高置信度非重叠固定宽度(500bp)峰中,构建所有样品的联合峰集,其用于通过下游分析中使用的样品矩阵创建峰。使用DESeq2确定差异峰(Love et al., 2014)。首先使用“DESeq2::varianceStabilizingTransformation”进行归一化,然后使用“stats::prcomp”,对峰值矩阵进行主成分分析。通过将每个样品的片段加载到R中创建基因组跟踪文件,并使用“rtracklayer::export”导出通过转录起始位点中的读长归一化的大文件。使用综合基因组学查看器使覆盖度文件可视化。为了分析先前公开的ATAC-seq数据(Miller et al., 2019, Nat. Immunol. 20, 326-336),从登录号GSE123236下载fastq文件,并使用所公开的流程重新处理以确保一致性。在比较终末相对于祖细胞T_{EX}样品(TIL样品或LCMV样品,如所示)时,使用DESeq2计算终末和祖细胞T_{EX} ATAC-seq峰,截止值Log₂FC ≥ 1 且FDR ≤ 0.05 。为了定量已公开的数据和体外测定数据之间的重叠峰,创建涵盖所有样品的联合峰集并重新分析。对于HOMER基序富集分析,如图24G所示,使用HOMER findMotifsGenome命令行实用程序来识别相对于背景峰集在指示峰集中的峰中存在的基序。对于背景峰设置,使用所考虑样品的联合峰集,并且因此富集的基序对应于相对于总体样品在差异峰集中富集的基序,而不是相对于随机基因组区域中在人T细胞中富集的基序。

[0188] 全基因组sgRNA文库逆转录病毒小鼠全基因组CRISPR敲除文库由Sarah Teichmann(Addgene#104861)馈赠。经由电穿孔扩增文库并通过测序确认。

[0189] sgRNA库设计和克隆

[0190] 使用先前开发的方案设计sgRNA小型库,用于克隆至慢病毒骨架中,并且然后亚克隆至逆转录病毒构建体pMSCV中(Flynn et al., 2021, Cell 184, 2394-2411)。

lentiCRISPR-v2由Feng Zhang (Addgene质粒#52961) 馈赠。pMSCV-U6sgRNA (BbsI) - PGKpuro2ABFP由Sarah Teichmann (Addgene质粒#102796) 馈赠。

[0191] 简言之,每个靶基因的六个20bp可变sgRNA序列获自广义遗传干扰平台 (GPP) 全基因组设计:sgRNA_design_10090_GRCm38_SpyoCas9_CRISPRko_NCBI_20200317(dot)txt(dot)gz,可以于portals(dot)broadinstitute(dot)org/gpp/public/dir?dirpath=sgrna_design在线获得。其中包括针对小鼠基因组设计的一百个非靶向和100个单靶向阴性对照引导物,其也来自Broad GPP门户网站。在每个20bp序列的开头添加“G”。该21bp序列侧翼为BsmBI-v2酶位点,并且然后是两个嵌套的PCR柄。混合寡核苷酸由Twist Bioscience合成。通过两轮PCR扩增寡核苷酸,并用Esp3I过夜消化lentiCRISPR-v2主链。使用1uL T4连接酶、1uL Esp3I、2uL T4连接酶缓冲液、200ng消化的主链和50ng扩增的插入片段,于37℃下在20uL反应中将扩增的寡核苷酸一步消化/连接至lentiCRISPR-v2中1小时。将反应在65℃下热灭活15分钟,并且然后使用25uL Lucigen Endura电感受态细胞和具有0.1cm间隙比色皿的BioRad MicroPulser对1uL进行电穿孔。在SOC中恢复1小时后,将1000x稀释液铺板于琼脂板上以确认文库覆盖度。将剩余物在150mL液体培养物中培养过夜,并且然后通过maxiprep纯化。最后,通过PCR扩增的sgRNA可变区的Gibson组装和用BbsI预消化的pMSCV主链,来将库亚克隆至pMSCV中。如上所述重复电穿孔。通过测序确认引导物代表。

[0192] 如上所述使用Broad GPP小鼠全基因组设计的小型库,将sgRNA SWI/SNF小型库和用于干扰-seq的微型库设计为每种基因有4个引导物。SWI/SNF小型库包含50个单靶标对照,以及干扰-seq微型库包含12个单靶标对照。根据设计的引导物订购两个引物,用于经由退火进行克隆。用BbsI消化pMSCV载体。所有引物对单独退火。等量混合退火产物,稀释,并且然后连接至pMSCV。使用Stb13化学感受态细胞 (ThermoFisher C737303) 进行扩增,并经由菌落计数并然后测序来确认文库覆盖度。

[0193] 逆转录病毒产生和转导将pMSCV质粒转染至以大约80%汇合度在包被有聚-d-赖氨酸的15cm组织培养板中的GP2-293细胞 (Takara, RetroPack™PT67细胞系) 或293T HEK细胞中。转染后48h和72h收集病毒上清液,经由0.45μm过滤单元 (Millipore) 过滤。使用LentiX浓缩器 (Takara) 以1500×g浓缩过滤的病毒45分钟。随后将浓缩的上清液等分、快速冷冻并储存在-80℃下直至使用。

[0194] 分离后24小时用浓缩的逆转录病毒转导CD8 T细胞。将4ug/ml的Polybrene添加至每个孔中。将板密封,并且然后在32℃下以1100×g旋转90分钟。旋转转染后24小时 (例如,从第2天开始),经由流式细胞术检查细胞的荧光,并向培养基中添加2ug/mL嘌呤霉素。

[0195] sgRNA文库制备和测序对于来自体外慢性培养物的样品,首先经由FACS分离活细胞。使用市售Zymo试剂盒提取gDNA。如前所述 (Flynn et al., 2021, Cell 184, 2394-2411) 制备sgRNA文库用于测序。简言之,使用标准三步扩增方案。首先,使用针对pMSCV载体特异的引物从gDNA中扩增sgRNA,进行22个PCR循环。使用100uL反应,每个反应至多4ug gDNA,并按比例增加反应数量,直至使用所有gDNA。对于质粒库的测序,跳过第一次PCR。对于第二次PCR,使用8个混合的交错引物在文库前面添加0-7bp偏移,以增加文库的多样性。PCR2引物靶位点嵌套在PCR1引物靶位点内,以提高产物的特异性。最后,在PCR3中,添加索引序列。在Illumina NextSeq或NovaSeq上以双索引1x75 bp或1x150 bp形式对文库进行测序。

[0196] 批量sgRNA筛选数据分析使用先前公开的流程 (Flynn et al., 2021, Cell 184,

2394-2411) 分析sgRNA测序数据。简言之,使用“fastp-f 10--max_len1=50”修剪fastq文件。将修剪的读长与相关库(全基因组库或小型库)的自定义fasta文件进行比对,其通过获取sgRNA可变序列并将其与pMSCV载体主链中的相邻序列侧翼而构建。使用带有--无-剪接-比对选项的hisat2进行比对。将Bam文件导入R中,并使用“Rsamtools::scanBam”转换为每个引导物的计数。在R中构建每个样品的引导物表,并通过将每个计数乘以1e6、除以该样品中的总计数、加1,并然后进行log2归一化进行归一化。计算两种条件(例如,慢性相对于急性或肿瘤相对于输入)之间的对数倍数变化,并且然后通过减去参考LFC平均值并除以参考LFC标准偏差来进行z-评分。对于全基因组筛选,所有引导物均用作参考(例如,引导物相对于所有其他引导物进行z-评分),而对于小型库筛选,则使用对照引导物作为参考。使用正态分布根据z-评分计算P值,并且然后通过使用R中的“p.adjust”校正多重假设检验来计算FDR。对于Gini指数分析,如图19所示,使用“ineq”R包。

[0197] Go Term分析对于图6C和别处所示的基因分类,将基因集限定为:TCR-KEGG_T_CELL_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY、染色质-GOCC_CHROMATIN、整合素-GOBP_INTEGRIN_ACTIVATION、抑制性受体-GOBP_NEGATIVE_REGULATION_OF_LYMPHOCYTE_ACTIVATION。基因列表手动补充以下基因:染色质-ZFP219、TBX21、KDM6A、ELMSAN1、DNTTIP1、SETD1B、TADA2B、ZFP217、EOMES。整合素-ITGB3、APBB1IP、ITGAV。抑制性受体-PDCD1。对于基因集富集分析,将指定的基因列表上传至在线gProfiler工具(biit(dot)cs(dot)ut(dot)ee/gprofiler/gost可获得)。

[0198] Cytoscape相互作用网络将前一百个阳性命中和前二十个阴性命中导入Cytoscape中。通过使用stringApp Cytoscape插件导入从string-db策划的已知蛋白-蛋白相互作用来创建Edge(Szklarczyk et al., 2019, Nucleic Acids Res. 47, D607-D613)。Stringdb评分 ≥ 0.75 的截止值用于过滤这些蛋白-蛋白相互作用,这代表仅识别高置信度相互作用的保守截止值。基于GO Term分析、亚细胞定位和/或手动管理对节点进行分组。从可视化中去除少量特征不佳和/或断开连接的节点。

[0199] 用于体内CRISPR实验的肿瘤接种和T细胞过继转移通过重悬于人工基膜和PBS的1:1混合物中,制备异位表达mCherry-卵清蛋白融合构建体的B16细胞的MC-38用于注射。以每个肿瘤 1×10^6 个细胞皮下注射至Rag1^{-/-}小鼠的胁腹(每只小鼠两个肿瘤)。每三天测量肿瘤。Cas9-OT-1CD8⁺T细胞用sgRNA库或单个sgRNA转导,并用嘌呤霉素选择4天,如上所述。然后将T细胞静脉内注射至荷瘤小鼠中。对于体内竞争测定,在注射前立即混合细胞。T细胞注射九天后,从每只小鼠收获脾和肿瘤。

[0200] 组织处理和肿瘤浸润淋巴细胞的分离将肿瘤称重,并且然后切碎成小片。将肿瘤转移至gentleMACS C管中,并使用列出的软/中型肿瘤程序在方案建议的酶混合物中用gentleMACS octo解离器进行消化。然后用70uM过滤器过滤肿瘤悬浮液,并且然后进行RBC裂解。将脾粉碎并通过70uM过滤器过滤,并且然后用RBC裂解缓冲液处理。对于批量sgRNA测序和干扰-seq,通过FACS从肿瘤或脾中分离肿瘤浸润淋巴细胞或T细胞。将样品用MACS缓冲液洗涤两次并在冰上染色30min。经由流式细胞术分离CD8+BFP+细胞。

[0201] 用于验证个体sgRNA增殖的竞争测定pMSCV逆转录病毒载体经修饰以用VEX-嘌呤霉素融合体替换BFP-嘌呤霉素融合体。如上所述,通过引物对退火来克隆各个引导物。使用的Arid1a-1sgRNA序列是GCAGCTGCGAAGATATCGGG (SEQ ID NO:2),以及使用的Arid1a-2序列

是CAGCAGAACTCGCACGACCA (SEQ ID NO:3)。使用的CTRL sgRNA序列是CTTACTCGACGAATGAGCCC (SEQ ID NO:4)。如上所述进行肿瘤处理以进行体内验证。

[0202] 靶向Arid1a的sgRNA的验证通过分解跟踪得失位 (TIDE):使用市售试剂盒 (Zymo Cat#D3025) 从转导细胞中分离基因组DNA。使用预期编辑位点周围的引物和50ng输入DNA进行PCR反应。PCR条件为98℃ 30秒,随后98℃ 10秒,60℃退火10秒,72℃ 25秒,共35个循环,然后72℃ 2分钟。使用市售Zymo DNA清理试剂盒纯化PCR扩增子,并进行sanger测序。使用在线工具tide(dot)nki(dot)nl进行编辑定量。

[0203] 蛋白质印迹:使用放射免疫沉淀测定 (RIPA) 缓冲系统 (Santa Cruz, sc-24948) 从用指定的sgRNA转导的小鼠T细胞中制备蛋白裂解物。使用二喹啉甲酸 (BCA) 测定 (Pierce, ThermoFisher 23225) 对蛋白浓度进行定量。每个样品上样20μg蛋白,并在4-12% Bis-Tris PAGE凝胶 (NuPAGE 4-12%Bis-Tris蛋白凝胶, Invitrogen) 上运行,并且转移至聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜 (Immobilon-FL, EMD Millipore)。在室温 (RT) 下,用PBST中的5%牛奶封闭膜1h,并与抗Arid1a (兔, 1:1000, Cell Signaling, 12354S; 批号4)、Arid1b (小鼠, 1:1000, Abcam, ab57461; 批号GR3345290-4)、Smarca4 (兔, 1:1000, Cell Signaling, 49360S; 批号3) 和Tbp (小鼠, Abcam, ab51841; 批号GR3313213-3) 的第一抗体在4℃下孵育过夜。用PBST洗涤膜3次,并且然后与近红外荧光团缀合的物种特异性第二抗体:山羊抗小鼠IgG多克隆抗体 (IRDye 680RD, 1:10,000, LI-COR Biosciences, 926-68070) 或山羊抗-兔IgG多克隆抗体 (IRDye 800CW, 1:10,000, LI-COR Biosciences, 926-32211) 在RT下孵育1小时。应用第二抗体后,用PBST洗涤膜三次,并且然后使用LI-COR Odyssey CLx成像系统 (LI-COR) 进行成像。使用Image Studio Lite (LI-COR) 定量蛋白条带强度,并内置背景校正和Tbp对照归一化。使用Prism (v9.2.0) 上的Dunnett多重比较检验进行比较归一化为Tbp的Arid1a水平的统计分析。

[0204] 原代人T细胞的体外实验T细胞扩增和生存力测定:T细胞以T细胞与抗CD3/28Dynabeads (Invitrogen) 1:3的比率来激活4天。T细胞扩增测定使用培养基中10ng/mL的IL-2进行。使用Cellaca Mx自动细胞计数器 (Nexcelom) 来获得细胞计数和生存力测量。用吖啶橙和碘化丙啶对细胞进行染色以评估生存力。

[0205] 靶向CRISPR基因编辑:使用在TE缓冲液中以100μM稀释的具有2'-O-甲基硫代磷酸酯修饰的合成sgRNA (Synthego) 制备核糖核蛋白 (RNP)。将5μl sgRNA与2.5μl双链体缓冲液 (IDT) 和2.5μg Alt-R S.p.Cas9核酸酶V3 (IDT) 在室温下孵育30分钟。100μl反应由1000万个T细胞、90μl P3缓冲液 (Lonza) 和10μl RNP组装。使用P3原代细胞4D-Nucleofector试剂盒和4D Nucleofector系统 (Lonza) 按照E0115方案对细胞进行脉冲。立即用温热培养基恢复细胞6小时。引导序列:AAVS1-sg1 5'GGGGCCACUAGGGACAGGAU 3' (SEQ ID NO:5), ARID1A-sg58 5'CCUGUUGACCAUACCCGCUG 3' (SEQ ID NO:6), ARID1A-sg60 5'UGUGGCUGCUGCUGAUACGA 3' (SEQ ID NO:7)。

[0206] 靶向CRISPR基因编辑的评估:编辑后4-7天,用QuickExtract DNA提取溶液 (Lucigen) 提取基因组DNA,并用Phusion Hot Start Flex 2X Master Mix (New England Biolabs) 根据生产商的说明书扩增切割位点侧翼的~500bp区域。通过CRISPR编辑推断 (ICE) 分析Sanger测序追踪。

[0207] 原代人T细胞体内混合CRISPR筛选来自两个供体的激活的人T细胞通过慢病毒转

导以表达NY-ESO特异性TCR,与具有每个靶基因2个sgRNA和8个阴性对照的sgRNA文库的慢病毒转导并行。转导后24小时,用Cas9蛋白对细胞进行电穿孔,如前所述(Shifrut et al., 2018, Cell 175, 1958-1971.e15)。电穿孔后,T细胞在完全X-vivo 15培养基中扩增,并且每两天分裂一次,补充有50U/ml的IL-2。在第7天,向每个供体的2只NSG小鼠皮下注射 1×10^6 个A375细胞,如前所述(Roth et al., 2020, Cell 181, 728-744.e21)。7天后,经由眼眶后注射将 1×10^6 个TCR阳性T细胞转移至小鼠。T细胞转移后7天收集肿瘤和脾并加工成单细胞悬浮液,如前所述(Roth et al., 2020, Cell 181, 728-744.e21)。通过CD45染色对T细胞进行分选,并使用商业试剂盒提取gDNA。如前所述(Shifrut et al., 2018, Cell 175, 1958-1971.e15)进行文库制备、下一代测序和分析。使用每只小鼠的脾和肿瘤中的引导物丰度来计算每个引导物的对数倍数变化,并使用默认参数计算MAGeCK评分。

[0208] 直接捕获干扰-seq具有特征条形码试剂和方案的10x Chromium Next GEM单细胞V(D)J试剂试剂盒v1.1 5' scRNA经过调整以与单细胞中sgRNA的直接捕获相容。此处总结了对方案的修改。对于步骤1, GEM生成和条形码,将5pmol引物KP_bead_sgRNA_RT添加至反应中,从而能够捕获液滴中的sgRNA,并且然后逆转录sgRNA。步骤3.2B,对细胞表面活性型蛋白文库进行上清液清理以分离sgRNA文库。最后,使用3轮PCR扩增并索引步骤3.2B的2uL产物。根据10X方案指南,经由琼脂糖凝胶纯化250bp文库,并连同 26×91 形式的基因表达(GEX)文库一起测序。对于图23B中所示的干扰-seq重复样品,每个重复代表单个肿瘤或来自同一小鼠的两个肿瘤合并成一个样品。如果细胞产量远低于每次捕获目标回收10,000个细胞的10X指南,则合并来自同一小鼠的肿瘤。如果细胞产量远超过回收10,000个细胞所需的量,在某些情况下,将样品分成多个10X捕获,以最大限度地提高细胞产量。跨多个捕获的样品通过计算合并,并且不计为单独重复。

[0209] 使用具有能够一起处理GEX文库和sgRNA文库的特征条形码分析的10X cellranger计数流程来处理Fastq文件.mm10参考转录物组用于GEX文库。对于sgRNA文库,构建特征参考电子表格,其中包含每个引导物的可变序列(反向互补,因为它作为读长2的一部分进行测序)、引导物ID和靶基因。将“基因表达”和“CRISPR引导捕获”两者的过滤矩阵加载到Seurat中进行下游分析(Hao et al., 2021, Cell 184, 3573-3587)。Seurat “IntegrateData”实用程序用于合并两个独立实验的样品。

[0210] 为了将sgRNA分配至细胞,计算“CRISPR引导捕获”矩阵的行z-评分。计算X-评分以定量每个sgRNA相对于同一细胞中检测到的其他sgRNA的富集程度。还计算了最富集和第二富集的sgRNA之间z-评分的差异。将最大sgRNA z-评分 ≥ 5 且z-评分差异 ≥ 2 的细胞确定为包含具有最大z-评分的引导物,而没有sgRNA计数的细胞被指定为“无引导物”,并且其他细胞被指定为“多引导物”。将引导物分配添加至Seurat元数据中以进行下游处理。将Seurat细胞周期评分用于预测每个单细胞的细胞周期时期。对于火山图分析,显著差异基因被识别为 $FDR < 0.05$ 。为了比较各干扰的不同基因集,应用平均 $\log_2 FC > 0.1$ 或平均 $\log_2 FC < -0.1$ 的额外倍数变化截止值。为了对cBAF和INO80复合体内共有的“上调”和“下调”基因集进行分类(图16D-16E中所示的分析),聚集每个复合体内的显著差异基因的联合集,并且然后将每个亚基的“上调”和“下调”基因简单限定为 $LFC > 0$ 或 $LFC < 0$ 。选择该策略以比较基因集,尽管每个干扰收集的细胞量不同,并导致统计检验力存在差异,以达到 $FDR < 0.05$ 阈值。Seurat基因模块评分用于将LCMV基因集(由每个LCMV簇的前100个标记基因组成)转换成干扰-seq

数据集中每个细胞的基因模块评分。基因模块评分还用于将上调和下调的基因集转化成扩展的LCMV数据集中每个细胞的模块评分,如图24所示。

[0211] 实施例1

[0212] T细胞耗竭体外模型

[0213] 为了开发适合T细胞耗竭的全基因组CRISPR/Cas9筛选的测定,使用抗CD3抗体来强制T细胞共受体CD3聚集,从而以抗原非依赖性方式诱导慢性TCR信号传导(图1A)。该模型分离T细胞耗竭的核心决定因素——通过TCR复合体的慢性刺激——并消除T细胞定位和运输效应,以及肿瘤微环境中的免疫抑制因素,这可能是特定体内模型所特有的。重要地,该测定是可扩展的;能够培养高达108个细胞,实现全基因组CRISPR sgRNA文库的1,000x覆盖度。在8天的抗CD3刺激过程中(2天的抗CD3抗CD28激活后),证实抑制性受体PD-1和TIM3逐渐上调,并且与初始激活后未经进一步刺激而传代的细胞相比,慢性刺激的T细胞出现生长缺陷(急性刺激; $p < 0.0001$,非配对t检验;图1B和6A-6B)。与急性刺激的细胞相比,慢性刺激的T细胞在用乙酸肉豆蔻佛波酯和离子霉素再刺激后也表现出IFN γ 和TNF α 的分泌缺陷(急性:80% IFN γ +TNF α +,慢性:1% IFN γ +TNF α +,图6C和18A)。表达荧光素酶并用同源肽抗原SIINFEKL (SEQ ID NO:1)脉冲的OT-1T细胞和B16肿瘤细胞的共培养也证明慢性刺激的细胞在体外肿瘤杀伤中受损(图6D)。最后,与急性刺激的T细胞的移植相比,将慢性刺激的OT-1T细胞移植至B16-OVA荷瘤小鼠中,证实了体内肿瘤控制能力降低(移植后20天的平均肿瘤大小:1,849.6mm³(慢性)或755.0mm³(急性); $p = 0.005$,非配对t检验;图6E)。

[0214] 在慢性刺激过程中每两天进行转座酶可及染色质测序测定(ATAC-seq)并分析整体染色质可及性图谱。ATAC-seq图谱的主成分分析(PCA)示出,PC1将幼稚细胞(第0天)与所有其他样品分离,而PC2捕获慢性刺激期间T细胞的渐进表观遗传极化(图1C)。对单个基因座(包括Pdc1和Entpd1)的分析表明,已知的耗竭特异性调控元件的可及性增加(图1D)。评价体外刺激的细胞与来自肿瘤和慢性感染的参考T细胞耗竭数据的数据整体表观遗传相似性。将“终末耗竭峰集”限定为与祖细胞耗竭T细胞相比,在终末耗竭T细胞中特别活跃的ATAC-seq峰。在B16黑素瘤肿瘤模型中识别出3,537个终末衰竭ATAC-seq峰,并且在淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)慢性感染模型中识别出2,346个峰($\log_2 FC \geq 1$; $FDR \leq 0.05$;图1E和6F)。将每个模型中的终末耗竭峰可及性与体外耗竭ATAC-seq数据进行比较表明,体外测定密切概括了体内观察到的整体表观基因组变化:肿瘤中88.6%的ATAC-seq峰和慢性感染中70.1%的ATAC-seq峰在第10天的体外模型中示出可及性共同增加(图1E、6F和18B-18C)。相比之下,对TIL中识别的2,926个祖细胞T_{EX}峰的分析表明,这些位点示出可及性随重复刺激降低(图6F、18B-18C)。使用chromVAR评价转录因子(TF)结合位点的染色质可及性,其示出先前与终末耗竭相关的TF基序(包括Batf、Fos、Jun和Nr4a因子)在第10天时体外具有高可及性。此外,观察到幼稚和祖细胞耗竭相关的Lef1和Tcf7基序的可及性逐渐丧失,以及NF- κ B和Nfat基序的早期动态可及性,反映了在体内T细胞耗竭中观察到的TF活性的进展(图1F)。

[0215] 实施例2

[0216] T细胞耗竭相关基因的全基因组筛选

[0217] 通过使用组成型表达Cas9-P2A-EGFP的Rosa26-Cas9敲入小鼠,使体外耗竭测定经调整与CRISPR筛选相匹配(图2A)。T细胞分离二十四小时后,用包含90,230个sgRNA的全基

基因组逆转录病毒sgRNA文库转导Cas9+CD8+T细胞。在激活和慢性刺激开始之间引入48h延迟,以有时间进行有效的基因编辑和转导细胞的嘌呤霉素选择。这种修改的慢性刺激方案在用抗CD3或PMA/IO再刺激后引起细胞因子产生类似缺陷(图19A-19B)。为了识别在存在慢性刺激下特异性调节适应性的基因,在第4天将细胞分为急性(仅IL-2)和慢性(抗CD3和IL-2)刺激条件,并在第10天对两个库进行测序(图2A)。制备并确认重复筛选:(1)以低感染复数(MOI)转导T细胞以优化细胞的单sgRNA靶向(重复1:16.9%sgRNA+细胞,MOI=0.18;重复2:29.3%sgRNA+细胞,MOI=0.35;图7A),以及(2)使用慢性培养物第10天的细胞表面表型分析的T细胞耗竭(图7B)。分析每种条件下的引导物表示:在质粒文库设计中存在的90,230个sgRNA中,每个急性样品中回收>99%(急性重复1:89,329(99.0%);急性重复2:89,625(99.3%);Gini指数平均值:0.39;图7C和19C)。“慢性”样品表明更多选择压力的证据,引导物计数分布更广泛,并且从筛选中退出的引导物数量更多(慢性重复1:检测到75,776个sgRNA(83.9%);慢性重复2:检测到87,524个sgRNA(97.0%);Gini指数平均值:0.64;图7C和19C)。比较在急性和慢性条件下观察到的每种sgRNA的计数揭示与在慢性条件下显著富集的小群sgRNA呈正相关性(图7D)。

[0218] 筛选的阳性对照是TCR信号通路的组成部分,因为这些因子的敲除防止抗原驱动的(或抗CD3驱动的)信号传导,并且因此防止耗竭。因此,分析CD3受体亚基(Cd3e、Cd3d、Cd3g、Cd247,图7D)的富集,并且在两个重复中观察到靶向这些基因的引导物的稳健富集。对计数表进行归一化,并计算每个sgRNA的z-评分,并将这些sgRNA水平的z-评分合并为每种基因的z-评分,如前所述(Flynn et al., (2021) Cell 184, 2394-2411)。合并每种基因的重复产生的总体z-评分和排序(“命中”对应于FDR<0.001;图2B和2C)。通过比较从两种额外的广泛采用的CRISPR sgRNA富集分析方法MAGeCK和castLE获得的筛选命中,验证了该方法,其示出效应大小估计值之间存在高度相关性(castLE效应大小相关性: $R=0.66$;MAGeCK对数倍数变化相关性: $R=0.77$;图20A-20D)。使用每种方法分类为命中的基因的比较揭示所有三种方法共有最大的命中组(“命中”对应于流程的FDR<0.05以及MAGeCK或castLE评分>10;图20B)。逆转录病毒文库的库不包含对照sgRNA集,将归一化策略(相对于库中的所有sgRNA)与利用在T细胞中不表达或预期不发挥作用的一组靶向嗅觉受体的sgRNA的策略进行比较(Gilbert et al., 2014, Cell 159, 647-661)。将sgRNA富集归一化为嗅觉受体sgRNA组适度地提高筛选结果的统计检验力,但对结果的影响极小(图20E)。

[0219] 除了Cd3e、Cd3d和Cd3g之外,筛选中靠前命中还包括TCR信号通路的其他已知组分,诸如Zap70、Lcp2、Lat和Lck,以及细胞黏附和整合素相关基因Fermt3、Tln1、Itgav和Itgb3(图2B-2D)。对耗竭的前100个正向调控因子的GO Term分析证实,“T细胞受体信号通路”term高度富集($\text{padj}=7.30 \times 10^{-6}$;图2E)。出乎意料地,除了TCR相关的GO term外,其他靠前term均与表观遗传学相关,包括“染色质重塑”($\text{padj}=1.46 \times 10^{-6}$)、“染色质组织”($\text{padj}=8.92 \times 10^{-4}$)以及“核小体分解”($\text{padj}=4.02 \times 10^{-5}$;图2E)。对额外的靠前命中的检查发现许多染色质相关因子,包括Wdr82、Actr8、Ino80、Actb、Elmsan1、Ino80b、Hdac1和Arid1a(图2F,左)。共刺激和抑制受体Icos、Pdcd1、Ctla4、Cd28、Havcr2、Lag3和Tigit并未通过筛选显著富集(图2F,中间)。转录因子Irf4、Junb、Eomes和Batf3被消耗,而Tbx21和Nr4a3被适度富集,支持先前关于它们在耗竭中的作用的论证(图2F,中间)。相比之下,Tox和Tox2在该筛选中并不是显著的命中,表明缺失这些因子可能不改善T细胞在体内的持久

性,这可能是由于激活诱导的细胞死亡(图2F,中间)。类似地,Jun和Batf也没有命中,这表明这些因子的过表达改善T细胞的持久性,但缺失却没有。其他靠前命中包括基因,诸如Pggt1b、Spcs3、Sec63、Eif4g2、Sec62和Fas(图2F,右)。筛选识别阴性命中的,其代表在存在慢性抗原的情况下持续存在的基因,并且包括Zfp217、Gcnt2、Usp22、Irf4和Cblb(图2C)。

[0220] Cytoscape用于可视化靠前阳性和阴性命中的蛋白-蛋白相互作用网络(图3)。该分析证实与TCR复合体和下游信号传导组分以及其他几种蛋白复合体和功能类别直接相关的高度相连和富集的命中网络。这些包括Ino80核小体重塑复合体(命中包括Ino80、Ino80b、Actr5和Actr8)、调节组蛋白甲基化的Set1C/COMPASS复合体(命中包括Wdr82、Dpy30和Setd1b)、SWI/SNF染色质重塑复合体(命中包括Arid1a、Smarcb1、Smarcd2、Smarca4和Smarcc1),以及由Hdac1、Dnrtip1和Elmsan1组成的有丝分裂脱乙酰酶(MiDAC)复合体。在SWI/SNF家族成员中,Smarcc1、Smarcd2和Smarcb1是BAF核心的一部分,它们连同Arid1a、Smarca4(ATP酶)、Actb和其他组分组装在一起以形成BAF复合体(Mashtalir et al., 2018)。还观察到以下项的富集:mRNA处理CSTF复合体(Cstf1、Cstf2和Cstf3)、N6-甲基腺苷(m6A)RNA修饰相关基因(Zfp217、Rbm15和Virma)以及与内质网和蛋白分泌相关的几个命中(Spcs2、Spcs3、Sec62、Sec63)、脂质生物合成(Gpi1、Pigv、Dpm3)和线粒体复合体V(Atp5b、Atp5d、Atp5a1)。

[0221] 在慢性病毒感染中分析先前报道的耗竭的T细胞的单细胞RNA-seq数据中的基因表达模式(Raju et al., (2021) J. Immunol. 206(12) 2924-2936; FIGS. 8A-8B)。该数据集涵盖祖细胞、暂时性T细胞和终末耗竭T细胞的关键亚型,并且对前100个阳性命中的分析表明,所有因子在慢性病毒感染的T细胞中均可检测到表达(图8C-8D)。此外,除了Tmem253和Itgb3两种基因外,所有这些基因均在衰竭期间早期表达(前100个命中中的98个在耗竭的祖细胞中可检测到表达),并且在耗竭的亚型中保持相对稳定,这表明表观遗传因子和其他命中的破坏改变T细胞耗竭的分子过程,而不是仅在终末分化后逆转耗竭(图8C)。

[0222] 实施例3

[0223] 体内CRISPR筛选识别限制肿瘤中T细胞持久性的表观遗传因子

[0224] 创建2,000个sgRNA的定制库,其包括靶向前300个命中的sgRNA(每种基因6个sgRNA),以及100个非靶向和100个单靶向对照。将sgRNA库引入Cas9/OT-1T细胞,以消除由于不同TCR序列而导致的功能变异性。第0天,将异位表达卵清蛋白的双侧MC-38结肠腺癌肿瘤注射到Rag1^{-/-}小鼠中,并从Cas9/OT-1小鼠中分离CD8⁺T细胞。第1天,用定制小型库转导T细胞(图4A)。使用三种不同的T细胞剂量方案来监测方案特异性敲除效果:第1组在肿瘤接种后6天每只小鼠接受 1×10^6 个T细胞,第2组在肿瘤接种后6天每只小鼠接受 5×10^5 个T细胞,以及第3组在肿瘤接种后9天每只小鼠接受 5×10^5 个T细胞(图9A)。观察到肿瘤大小呈T细胞剂量依赖性减小。在第15天(第1组和第2组)或第18天(第3组)收获小鼠的肿瘤和脾并对每个组织中存在的sgRNA进行测序(图9A和22A)。最后,计算sgRNA富集并合并来自所有小鼠的结果以相对于对照分布创建每种基因的聚合肿瘤LFC z-评分和脾LFC z-评分(图4B和12A-12C)。

[0225] 分析靶向TCR复合体和信号传导基因的sgRNA,因为包含这些引导物的细胞应具有受损的识别抗原的能力,并且因此在肿瘤中被消耗。事实上,相对于脾,靶向几乎所有先前识别的TCR和整合素信号传导相关命中的sgRNA在肿瘤中均被消耗(图4C)。类似地,许多其

他功能类别的基因在肿瘤和脾两者中也被消耗,可能表明这些体内敲除产生普遍增殖损害(图12A和12D)。

[0226] 然而,相比之下,选定的一组体外命中在肿瘤和脾两者中强富集并且主要由染色质相关因子组成(图4B-4C和12A-12C)。肿瘤中富集的靠前命中是TF、Nr4a3和Gata3。识别包括以下项的8个表观遗传调控因子的功能作用:Ino80复合体因子Ino80、Actr5和Actr8, Set1C/COMPASS复合体成员Wdr82和Setd1b,BAF复合体成员Arid1a,以及MiDAC复合体成员Hdac1和Elmsan1(图4B)。Gata3是转录因子,先前已证明其调控T细胞耗竭的发展,并且重要地,缺失该因子改善T细胞功能、持久性和体内肿瘤控制。其余的命中尚未在T细胞耗竭或免疫疗法背景下进行研究。在Cytoscape网络的背景中对每种基因的肿瘤富集进行可视化显示了许多体内阳性命中均是表观遗传因子,包括两个染色质重塑复合体的亚基、INO80复合体(亚基Ino80c和Actr5)以及BAF复合体(亚基Arid1a、Smarcd2和Smarcc1;图12D)。还表示了其他类别,诸如G蛋白偶联受体Gpr137c、参与神经节苷脂生物合成的酶B4galnt1和IL-2诱导型T细胞激酶Itk。计算靠前阳性命中的sgRNA富集度并与输入对照进行比较。每个基因敲除均能将肿瘤中T细胞蓄积提高3.4倍。为了比较,缺失Cd3d的T细胞被消耗6.7倍,而缺失Cd3e的T细胞被消耗3.3倍,证明靶向靠前命中显著改善肿瘤中T细胞持久性(图12E和22C)。此外,每个敲除在肿瘤和脾中的持久性优势相似,并且除了Trp53之外没有任何干扰在不存在慢性TCR刺激(体外急性刺激期间)的情况下表现出显著改善的适应性,再次证明CRISPR筛选策略的特异性以识别仅在慢性抗原刺激的情况下改善T细胞持久性的干扰,而不是改善一般T细胞适应性(图12E-12F和22C)。

[0227] 还识别先前未表征的TF(Zfp219)在体内T细胞功能中的作用。靶向这些表观遗传因子的sgRNA在肿瘤中比靶向Nr4a3和Gata3的sgRNA富集更高。GO term分析和在cytoscape网络背景下体内sgRNA z-评分的可视化证实,与染色质和核小体重塑和组织相关的功能类别以及组蛋白修饰是主要富集的基因组(图4E和9C-9D)。单独分析肿瘤和脾样品中前15个体内命中的sgRNA富集,并分析各T细胞给药方案。靶向每种基因的sgRNA在个体小鼠、器官和肿瘤大小之间可重现地富集(图4F、4G、9B)。值得注意的是,与对照sgRNA相比,缺失每个表观遗传因子使肿瘤中T细胞的蓄积提高大约~3-5倍,这与在缺失CD3共受体Cd3d组分的T细胞中观察到的T细胞消耗的规模相当,证明通过缺失这些基因介导的T细胞功能的显著改善(图4F)。

[0228] 实施例4

[0229] TIL中T细胞耗竭因子的体内干扰-seq

[0230] 干扰-seq,其捕获单细胞中的CRISPR干扰和转录物组,用于理解在通过体内CRISPR筛选识别的每个敲除中驱动改善的T细胞功能的分子机制。具体地,使用直接捕获干扰-seq是因为它不需要带有与sgRNA分离的条形码序列的载体,也不需要标准sgRNA载体进行其他修饰,并且因此可以立即与逆转录病毒试剂相容。sgRNA的第三定制sgRNA库(小型库)通过优先考虑以下基因进行设计:(1)优先在体外测定中持续存在,(2)优先在体内增殖和浸润肿瘤,以及(3)是染色质相关蛋白或TF。基于这些标准,选择九种基因进行干扰-seq分析:Wdr82、Setd1b、Arid1a、Actr8、Ino80、Hdac1、Elmsan1、Nr4a3和Zfp219。sgRNA库包含每种基因两个引导物,以及两个非靶向和两个单靶向对照引导物,总共22个sgRNA。为了确保所有引导物的相似表示,将包含20bp可变sgRNA序列的引物对单独退火,然后将其混合并

一起克隆至逆转录病毒载体pMSCV中。

[0231] 如先前针对更大的CRISPR筛选所述进行类似的体内T细胞方案：从Cas9/OT-1小鼠中分离CD8⁺T细胞，用sgRNA微型库转导，并且然后移植到MC-38卵清蛋白荷瘤Rag1^{-/-}小鼠中。九天后，收获肿瘤，分离TIL，并使用10x Genomics 5'基因表达平台将直接捕获干扰-seq用于同时读出sgRNA身份和基因表达谱(图5A)。经过质量控制过滤后，从2,305个细胞中获得高质量的scRNA-seq图谱，并且进行scRNA-seq聚类并且降维识别出4个簇(图5B)。所有细胞簇均包含表达中等水平的Pdcd1和Havcr2的细胞，表明它们代表肿瘤微环境中耗竭的T细胞(图10A)。比较簇1和簇2之间的标记基因显示，簇1具有更高的共刺激分子表达，包括Tnfrsf9(编码4-1BB)和Tnfrsf4(编码OX40)、细胞毒性分子Gzmb和Prf1以及抑制性受体(包括Lag3、Havcr2和Cd160)(图10B)。相比之下，簇2具有祖细胞耗竭基因Tcf7、Ifngr1和Cc15以及若干干扰素反应基因(包括Ifit1、Ifit3、Irf1和Irf7)的较高表达(图10B-10C)。簇1和簇2包含绝大多数细胞，而簇3包含具有较高百分比线粒体读长的少量细胞群，以及簇4包含少量增殖细胞，以Mki67表达为标志(图10A)。

[0232] 通过经由细胞计数矩阵考虑sgRNA并计算行(细胞)z-评分(图5C和10D)，来确定每个细胞的高置信度sgRNA身份。将具有最大sgRNA z-评分>3的任何细胞确定为包含具有最大z-评分的引导物，将没有sgRNA计数的细胞指定为“无引导物”，并将具有最大z-评分较低的细胞指定为“多引导物”。计算具有给定干扰的细胞的平均基因表达谱，减去对照细胞的基因表达谱，并且在不同干扰之间关联差异基因表达谱(图5D)。总体上，具有每种基因KO的细胞在其转录谱中表现出大规模变化(1,474至2,533个诱导基因LFC>0.1;643至2,900个抑制基因LFC<-0.1;图10E)。缺失Elmsan1、Nr4a3、Zfp219、Arid1a或Setd1b的细胞与基因表达的变化高度相关(对于所有干扰对，R>0.5)，表明通过敲除这些因子诱导的趋同表型(图5D)。相对于对照细胞，定义每个干扰的一组“诱导”或“抑制”基因，并且所有干扰共有大约半数的由Nr4a3诱导或抑制的基因(图10E)。对五个干扰——Zfp219-KO、Nr4a3-KO、Arid1a-KO、Elmsan1-KO和Setd1b-KO——的基因集重叠进行可视化，并发现最大的重叠基因组在所有干扰中共有(图5E-5F)。这些基因包括：(1)细胞毒性分子、细胞因子和细胞因子受体，包括Tnf、Ifng和Il17r的上调，以及Gzmb、Gzmc和Gzmf的下调，(2)耗竭相关TF，包括Batf、Irf4和Klf2的上调，和Tbx21的下调，(3)以及氨基酸转运蛋白及其他代谢基因，包括Slc1a5(ASCT2，输入谷氨酰胺)、Slc38a1(SNAT1，中性氨基酸)和Slc38a2(SNAT2，中性氨基酸)的上调。尽管观察到抑制性受体表达的孤立变化，但在干扰期间没有观察到一致变化(图5G)。

[0233] 实施例5

[0234] TIL小型库CRISPR筛选验证体外T细胞耗竭的基因调控因子

[0235] 为了进一步验证和表征排序靠前的全基因组筛选因子，创建2,000个sgRNA的定制小型库，其包括靶向300个排序靠前的基因的sgRNA(每种基因6个sgRNA)，以及100个非靶向和100个单靶向对照。重复体外刺激筛选并在第4天收集急性慢性样品以及输入样品(图21A)。观察到生物重复之间的高度一致性，并且因此将重复合并以进行三种比较：(1)慢性相对于急性，(2)急性相对于输入，以及(3)慢性相对于输入(图21B-21E)。慢性相对于急性比较作为对原始全基因组筛选的验证，并且在全基因组筛选中显著阳性命中的库中的88种基因中，有52种(59.1%)在小型库中得到验证(FDR<0.05;图11B和21C)。接下来，将慢性相对于急性基因富集与急性相对于输入富集进行比较，其测量培养物中急性刺激的增殖T细

胞中每种基因敲低的适应性优势或劣势(图11C,左侧图和21E)。两个命中Trp53和Brd1在两次比较中均富集,表明这些因子的消耗在急性和慢性刺激条件下均赋予T细胞整体增殖优势。相比之下,与输入相比,大多数基因在急性刺激中表现出或是相似(233/300;77.7%)或是降低(64/300;21.3%)的富集,从而能够识别在存在慢性抗原的情况下特异性改善T细胞持久性的sgRNA,而不是通常的T细胞增殖,并且在急性刺激后维持增殖能力(相似: $-3.5 \leq z \leq 3$,减少: $z < -3.5$,改善: $z > 3.5$;图11C,左侧图和21E)。最后,将慢性相对于急性sgRNA富集与慢性相对于输入富集进行比较,以识别在慢性抗原刺激后具有总体持久性优势的sgRNA,而不仅仅是与急性刺激相比具有比较优势(图11C,右侧)。总之,这些小型库实验验证全基因组CRISPR筛选的命中,并识别在慢性抗原刺激环境中选择性限制T细胞持久性的基因。

[0236] 实施例6

[0237] 调节cBAF活性可以增强T细胞持久性

[0238] 为了验证Arid1a-sgRNA细胞(筛选中的靠前命中)的持久性优势并确定这些细胞是否在体内保留效应物功能,进行细胞竞争测定,其中将单靶向对照(CTRL1)sgRNA克隆至表达紫色激发荧光蛋白(VEX)的逆转录病毒载体中,而将两个Arid1a-sgRNA sgRNA(Arid1a-1和Arid1a-2)克隆至相同的载体中,除了使用蓝色荧光蛋白(BFP)置换之外。通过Sanger测序和蛋白质印迹在DNA和蛋白水平上证实两种Arid1a靶向sgRNA的活性(图22D-22F)。分别用任一载体转导细胞,用嘌呤霉素选择以富集转导的细胞,并混合在一起。然后将混合的细胞置于体外慢性刺激测定(图13A)或体内MC-38肿瘤模型(图13B)中。在体外和体内,与对照细胞相比,Arid1a-sgRNA细胞表现出显著增强的持久性,确认混合筛选的结果(图13A-13B;Arid1a-1与CTRL1平均归一化比率:体外第10天=4.03, $p=0.0059$;体内第15天=2.46, $p=0.033$;Arid1a-2与CTRL1平均归一化比率:体外第10天=3.79, $p=0.012$;体内第15天=2.72, $p=0.0088$;Welch双样本t检验)。此外,Arid1a-sgRNA细胞在体外慢性刺激后表现出较低水平的PD-1和Tim3(双阳性细胞百分比:Arid1a-1平均下降27.7%, $p=0.00099$;Arid1a-2平均下降10.6%, $p=0.038$;Welch双样本t检验;图13A)。最后,评价观察到的Arid1a-sgRNA细胞持久性增强和分化轨迹改变是否导致体内抗肿瘤应答改善。如先前所述用MC-38肿瘤接种Rag1^{-/-}小鼠,并在第6天,移植用或是CTRL1逆转录病毒或是Arid1a-sgRNA逆转录病毒转导的 5×10^5 CCas9/OT-1CD8⁺T细胞并监测肿瘤生长(图13C)。至第15天,与对照细胞的转移相比,Arid1a-sgRNA细胞的转移显著改善肿瘤清除率(Arid1a-sgRNA相对于CTRL1肿瘤大小,第15天: $p=5 \times 10^{-8}$;Welch双样本t检验)。重要地,与接受CTRL1T细胞的小鼠相比,接受Arid1a-sgRNA T细胞的小鼠的生存期显著延长(中位生存期=12天(无移植)、15天(CTRL1)、25天(Arid1a-sgRNA);Arid1a-sgRNA相对于CTRL1: $p=1.20 \times 10^{-8}$;图13C)。

[0239] 为了提供对BAF复合体因子在T细胞耗竭中的作用的更深入的机制洞察,设计靶向B16和MC-38肿瘤模型中29SWI/SNF复合体亚基基因中的每一个的额外的CRISPR小型库筛选,并且在SWI/SNF复合体组装的结构背景下对这些结果进行解读。如在之前体内筛选中观察到的,三个最显著的命中位于cBAF复合体(Arid1a、Smarcc1和Smarcd2)中,并且特别是位于复合体中可以被其他形式的复合体中的横向同源基因置换的位置(图13E-13F)。相比之下,干扰BAF核心不可替代的亚基(例如,Smarc1, Smarcb1)或ATPase模块组件是有害的,并导致这些sgRNA消耗。因此,提出了其中调节(减少)染色质上cBAF的存在有利于T细胞的持

久性的模型。先前的机制研究表明,ARID1A缺陷的肿瘤表现出染色质上cBAF复合体水平降低(但未消除),这导致关键转录因子(包括AP-1因子)的可及性降低。除了cBAF之外,还观察到靶向PBAF复合体成员Arid2的sgRNA的正富集,以及靶向ncBAF复合体成员Bicral、Bicra和Brd9的sgRNA的强消耗(图13E-13F)。总之,这些结果表明,干扰cBAF复合体亚基基因(包括Arid1a)可以改善体内T细胞的持久性和抗肿瘤免疫。

[0240] 实施例7

[0241] ARID1A的干扰改善原代人T细胞中的T细胞持久性

[0242] 为了使用人T细胞复制体外慢性刺激测定(图14A),将靶向ARID1A的CRISPR-Cas9/sgRNA RNP(两个独立的sgRNA)或对照RNP引入原代人T细胞中。将细胞分为急性和慢性培养物,并用抗CD3包被的板刺激慢性条件6天(类似于小鼠测定)。在急性刺激的培养物中,未观察到增殖或生存力的基因型之间的差异。然而,在慢性刺激的培养物中,ARID1A-sgRNA细胞比CTRL T细胞增殖显著更多,并保持更高生存力(ARID1A-sgRNA相对于CTRL1细胞:平均生存力增加22.75%, $p=1.70\times 10^{-5}$,以及扩增平均增加5.25倍, $p=0.013$;图14A)。

[0243] 为了验证ARID1A-sgRNA T细胞在体内和在最近从人T细胞功能性CRISPR筛选中出现的其他遗传因素的背景下的持久性优势,设计CRISPR小型库用于体内人T细胞实验,其中涵盖靶向20种基因的48个sgRNA,并且包括8个阴性对照引导物。包括靶向以下项的sgRNA: ARID1A,以及抑制性受体PDCD1、LAG3和HAVCR2,以及先前筛选的其他排序靠前的基因,诸如TMEM222、CBLB、TCEB2和SOCS1。在A375人黑素瘤异种移植模型中进行筛选,该模型表达可以用1G4 TCR靶向的NY-ESO-1抗原。在第1天将同源1G4 TCR连同sgRNA一起引入来自两个独立供体的原代人T细胞,并在第14天将T细胞移植到NOD-SCID-IL2R γ -null(NSG)荷瘤小鼠中(图14B)。7天后,从肿瘤和脾中分选T细胞,对每个器官中存在的sgRNA进行测序,并将其丰度与移植前的输入样品进行比较。未观察到对照sgRNA或靶向抑制性受体的sgRNA的富集,而观察到靶向CD3D的sgRNA消耗(图14C-14D)。相比之下,并且与鼠T细胞的结果一致,与两个供体的输入样品相比,靶向ARID1A的sgRNA在肿瘤中显著富集,表明cBAF限制T细胞持久性的功能在人T细胞中也是保守的(相对于输入,在肿瘤中富集的8个ARID1A-sgRNA复制中有7个,跨2个独立的sgRNA合并;ARID1A-sgRNA相对于CTRL LFC,通过Wilcoxon检验 $p=0.0010$;图14C-14D)。

[0244] 实施例8

[0245] TIL中染色质重塑复合体的转录效应

[0246] 为了理解通过体外和体内CRISPR筛选识别的命中中驱动T细胞功能改善的分子机制,进行干扰-seq,其同时捕获单细胞中的CRISPR sgRNA和转录物组。靶向IN080和BAF复合体设计第三个定制sgRNA库(微型库)。这两种复合体均是ATP依赖性染色质重塑体,其在发育的许多方面至关重要。对于SWI/SNF基因,靶向Arid1a、Smarcc1和Smarcd2(体外和体内识别的靠前命中)以及Arid2和Arid1b,其在SWI/SNF特异性小型库筛选中富集。其中,Smarcc1和Smarcd2位于BAF核心,Arid1a和Arid1b位于cBAF复合体中,以及Arid2仅存在于PBAF复合体中。从IN080复合体中,选择在体外和体内筛选中均富集的Actr5和Ino80c。有意思的是,Actr5和Ino80c的酵母同源物Arp5和Ies6已被证明在物理上相互缔合,形成不依赖于IN080复合体其余部分的子复合体。该子复合体可以调节IN080复合体其余部分的活性;它以IN080依赖性方式与染色质相互作用,并重新定位核小体(特别是+1核小体)以激活基因转

录,尤其是代谢相关基因的转录。最后,还包括阳性对照Pdccl1和Gata3,以及12个单靶向阴性对照,总计靶向9种基因的48个sgRNA。如上所述,针对更大的CRISPR筛选,进行相似的体内T细胞方案:从Cas9/OT-1小鼠中分离CD8⁺T细胞,用sgRNA微型库转导,并且然后移植到MC-38卵清蛋白荷瘤Rag1^{-/-}小鼠中。如之前的筛选,还收集输入样品(在移植当天收集)以评价每个sgRNA的持久性表型。T细胞移植后九天,收获肿瘤,分离TIL,并使用使用10x Genomics 5'基因表达平台将直接捕获干扰-seq用于同时读出sgRNA身份和基因表达谱(图15A)。对来自两个独立实验的七个生物复制干扰-seq样品的细胞进行测序(图23-23B)。

[0247] 经过质量控制过滤后,从70,646个细胞中获得高质量的scRNA-seq图谱,并且scRNA-seq成簇和降维识别出6个簇(图15B)。通过使用z-评分定量每个sgRNA相对于同一细胞中检测到的其他sgRNA的富集度,确定每个细胞的高置信度sgRNA身份。如果特定sgRNA具有的z-评分为至少5,并且z-评分比第二流行的sgRNA高至少2个单位,则分配细胞至该特定sgRNA。利用该策略,从进一步分析中去除由于逆转录病毒感染双联体、单细胞捕获双联体和/或背景读长而具有多个富集的sgRNA的细胞,并且52,607个细胞被置信分配至单sgRNA(74.4%;图15C)。细胞类型簇表达不同水平的抑制性受体、效应细胞因子和关键转录因子,表明它们代表TME中耗竭的T细胞和效应T细胞的混合(图15D和23C-23D)。簇1细胞表达高水平的Klf2和Slpr1(T效应记忆;T_{EM}),簇2表达高水平的干扰素刺激基因(ISG),包括Mx1(T_{ISG}),簇3表达高水平的Tnfrsf9(编码41BB)和Cd160(T-41BB),簇4表达高水平的祖细胞耗竭基因,包括Pdccl1、Tcf7和Slamf6(T_{EX}Prog),簇5表达最高水平的抑制性受体Pdccl1、Lag3和Havcr2(T_{EX}Term),以及簇6主要由以下组成:循环细胞,由Mki67标记并通过细胞周期分析(T-循环;图23C-23D)确认。为了进一步细化簇身份,从存在于体内急性或慢性LCMV感染中的CD8⁺T细胞类型生成基因特征(图23E-23F)。每个LCMV T细胞簇使用前100个标记基因,以根据这些特征基因集的平均表达对我们的干扰-seq数据集中的每个单细胞进行评分。可视化每个簇中这些LCMV特征的富集证明几个簇与参考数据集中的细胞类型的转录相似性(图15E)。例如,簇1富集效应记忆相关基因(T_{EM}特征),簇2与T_{EX}ISG特征相似,并且祖细胞和终末耗竭簇(簇4和5)富集相应LCMV特征(图15E)。

[0248] 进行几种sgRNA水平的质量控制以评估独立sgRNA的效应的重现性(图15F-15G)。计算数据集中每个sgRNA与所有其他细胞之间的基因表达差异,并确认靶向同一基因的独立sgRNA相对于靶向不同基因的sgRNA对具有高度相关的基因表达变化,如预期,其以零为中心(图15F,上图)。评价靶向同一复合体的sgRNA对的相关性,将靶向cBAF基因(Arid1a、Arid1b、Smarcc1和Smarcd2)的引导物和靶向IN080基因(Ino80c或Actr5)的引导物一起分组。值得注意的是,这些sgRNA对也比所有引导对显著更相关,表明靶向同一复合体内的不同亚基的共同转录效应(图15F,下图)。所有sgRNA对的基因表达相关性一起可视化(图15G)。无偏成簇将sgRNA组织成相关组,主要由靶基因和靶复合体身份驱动。有意思的是,Arid2与其余的BAF靶向sgRNA分开聚集,表明cBAF和PBAF复合体具有不同的作用(图15G)。每个sgRNA的输入表示连同用每个sgRNA检测到的细胞数量被用来估计每个sgRNA与单靶向阴性对照组之间的T细胞蓄积优势(图15G)。该分析表明,相对于对照sgRNA,大多数sgRNA增强肿瘤中T细胞蓄积,这与体内筛选结果一致。具体地,Arid1a-sgRNA细胞相对于对照平均富集2.74倍,而Pdccl1-sgRNA细胞相对于对照平均富集2.67倍(图15G)。最后,检查包含每种sgRNA的细胞的细胞类型簇组成(图15G,最右侧)。值得注意的是,所有干扰均包含来自每个

簇的相似比例的细胞,这表明每个靶基因的消耗可能不影响细胞类型组成或轨迹的整体变化,而是调节一个或多个簇中的基因表达。

[0249] 为了进一步研究这种可能性,聚集包含靶向相同基因的sgRNA的细胞,并且与CTRL1细胞相比,计算每个干扰的差异基因表达(图16A)。靶向cBAF亚基Arid1a、Smarcd2或Smarcc1诱导T细胞转录程序发生共同的全局变化,包括效应分子Gzmb和Ifng、细胞表面受体Cxcr6和Il17r以及转录因子Irf4和Batf的上调。同时,cBAF干扰使Pdcd1、Lag3和Cc15持续下调(图16A)。相比之下,Arid2干扰诱导独特的基因表达程序,尽管有一些相似之处,包括Pdcd1和Lag3下调。Gata3和Pdcd1的干扰诱导了与cBAF或Arid2干扰不同的基因表达变化;例如,Pdcd1消耗后上调最多的基因是Tox,这可能与PD-1缺失对加速分化至终末衰竭的拟定影响一致(图16A)。为了定量由每个干扰诱导的基因表达变化的总体相似性,将所有干扰对相关,并且根据该度量对相似的干扰组进行聚类(图16B)。该分析定量确认cBAF干扰Arid1a、Smarcc1和Smarcd2诱导类似程序的观察结果,而IN080干扰Ino80c和Actr5也表现出高度相关的变化(与由cBAF干扰诱导的变化不同)。相比之下,将Pdcd1和Gata3干扰单独聚类,尽管彼此之间具有中等相关性。最后,当考虑每个簇内的干扰细胞相对于CTRL1细胞的基因表达变化时,无论T细胞亚型如何,每个干扰均诱导基因表达的高度一致变化(图23G)。

[0250] 聚集受干扰的细胞和CTRL1细胞之间显著差异的所有基因,并限定由cBAF和IN080复合体的消耗而受干扰的核心基因程序(图16C-16E)。上调和下调的基因集在每个复合体中高度保守(图16D-16F和24A),具有cBAF干扰诱导基因,诸如Batf、Irf4、Il17r和Ccr2,同时抑制基因,诸如Stat3、Nfkb1、Nr4a3和Eomes。相比之下,IN080干扰显著调节代谢相关基因(图16E)。由cBAF消耗上调的基因向在慢性LCMV感染中识别的典型T细胞状态的投射示出了效应T细胞基因的富集,而下调基因的投射示出了终末耗竭相关基因的富集(图16G和24B)。对上调基因集进行GO Term分析。cBAF缺陷的T细胞中上调的基因富集效应物term,包括T细胞激活、细胞黏附、细胞因子产生和T细胞增殖,而IN080缺陷的T细胞中上调的基因富集代谢term,包括氧化磷酸化和有氧呼吸(图16H)。相比之下,Pdcd1的干扰诱导细胞信号传导相关term(图16H)。这些数据表明,cBAF和IN080染色质重塑复合体的亚基在T细胞耗竭中具有不同的作用,它们在同一复合体中很大程度上保守,其中cBAF主要调节效应和耗竭相关基因,而IN080调节代谢。此外,靶向染色质重塑因子的转录影响与先前已知的靶标Pdcd1和Gata3的影响极少重叠,表明协同靶向多个通路以改善T细胞功能的潜力(图16F和24A)。

[0251] 实施例9

[0252] Arid1a干扰与终末耗竭相关的染色质可及性

[0253] 如上所述进行竞争测定,其中CTRL1和Arid1a-sgRNA细胞以限定的比率混合并进行体外耗竭。两个独立的靶向Arid1a的sgRNA重复使用,总计四个重复样品。在第6天和第10天,从同一培养物中分离CTRL1和Arid1a-sgRNA细胞,并对每个群体进行ATAC-seq。为了在初始测定表征的背景下分析这些结果(图1),包括初始(第0天)和激活(第2天)WT T细胞的图谱(图17A)。CTRL1细胞中染色质状态的进展与先前在未受干扰的细胞中观察到的相似;然而,Arid1a-sgRNA细胞沿着不同的染色质状态轨迹前进,在两个时间点均比CTRL1细胞更接近于初始和激活样品(图17A)。

[0254] 如果观察到与第6天相比,在第10天的可及性增加,则将调控元件定义为“开放”

峰,并且如果与第6天相比,在第10天观察到可及性降低,则为“封闭”峰($p_{\text{adj}} < 0.05$, $\text{Log}_2 \text{FC} > 1$)。对这些峰集的分析表明,与CTRL1 T细胞相比,Arid1a-sgRNA T细胞中的染色质重塑变化显著不同(图17B-17C)。首先,Arid1a-sgRNA细胞表现出开放峰数量的显著整体减少,可能表示cBAF消耗的细胞相对无法建立可及的染色质(Arid1a-sgRNA:1,419个峰,CTRL1:5,692个峰;图17B)。其次,虽然Arid1a-sgRNA细胞和CTRL1细胞以相似的程度封闭染色质,但这些区域中的大多数是不重叠的(Arid1a-sgRNA:5,126个峰,CTRL1:4,558个峰;图17B)。对个体耗竭相关调控元件(包括Pdcd1、Lag3、Entpd1和Ifng基因座周围的调控元件)的检查揭示与CTRL1细胞相比,Arid1a-sgRNA细胞中可及性的显著损失(图17D)。对终末 T_{EX} 特异性峰集(如图1中限定)的分析示出,在两个时间点,Arid1a-sgRNA细胞中这些位点的可及性显著低于CTRL1细胞(相对于CTRL1细胞,Arid1a-sgRNA中终末 T_{EX} 峰的可及性平均降低:第6天为41.7% ($p < 2.2 \times 10^{-16}$, Wilcoxon检验),以及第10天为40.8% ($p < 2.2 \times 10^{-16}$, Wilcoxon检验);图17E和24C-24D)。使用chromVAR分析TF结合位点处的染色质可及性,这表明与CTRL1细胞相比,终末耗竭相关的TF基序(包括Fos、Jun和AP-1基序)在Arid1a-sgRNA细胞中的可及性显著更低(图17F)。相比之下,与效应T细胞功能相关的几个TF基序(包括Ets、Klf和Irf基序)在Arid1a-sgRNA细胞中显示出可及性增加。最后,慢性刺激的ARID1A-sgRNA人T细胞的ATAC-seq分析表明,与对照T细胞相比,AP-1基序处的全局染色质可及性具有相似损失,这支持ARID1A在人T细胞中具有保守表观遗传功能(图24E-24G)。这些结果表明,cBAF亚基(包括Arid1a)的消耗可以通过限制AP-1TF接近染色质来改善T细胞功能,从而防止采集与染色质终末耗竭相关的状态。

[0255] 本文引用的所有参考文献,包括出版物、专利申请和专利,均通过援引并入本文,其程度如同每篇参考文献单独且具体地表明通过援引并入并在本文中全文阐述。

[0256] 本文描述了本发明的优选实施方式,包括发明人已知的用于实施本发明的最佳模式。在阅读前述描述后,那些优选实施方式的变化对于本领域普通技术人员而言是显而易见的。发明人期望技术人员适当地采用此类变化,并且发明人意图以不同于本文具体描述的方式来实践本发明。因此,本发明包括适用法律允许的所附权利要求中记载的主题的所有修改和等同方案。此外,除非本文另有说明或与上下文明显矛盾,否则本发明涵盖上述元素在其所有可能变化中的任何组合。

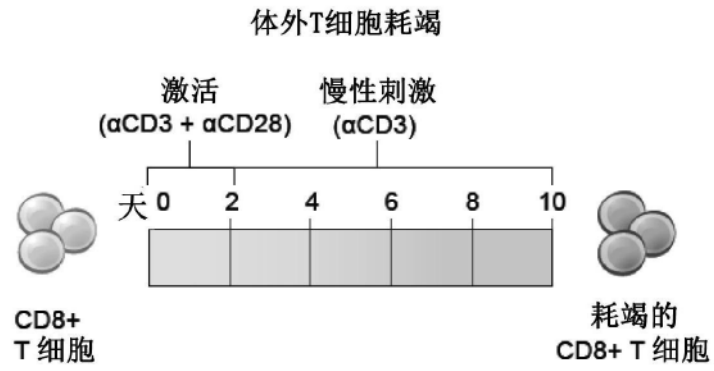


图1A

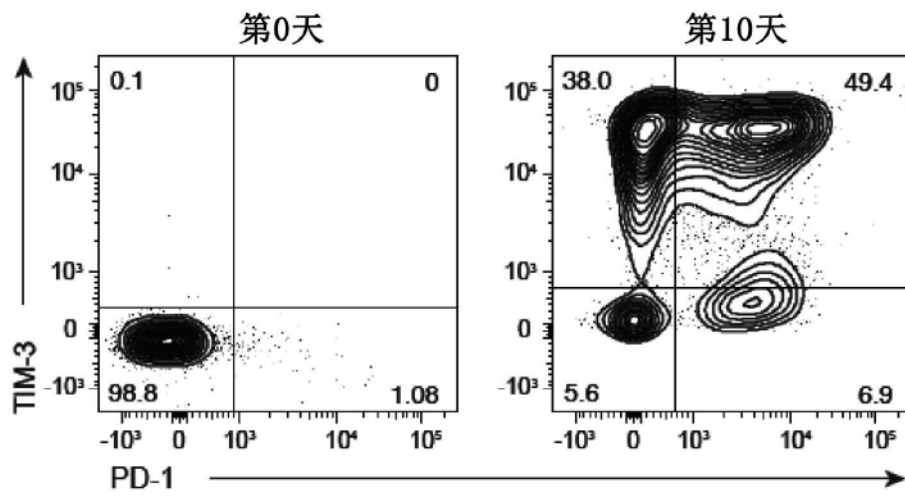


图1B

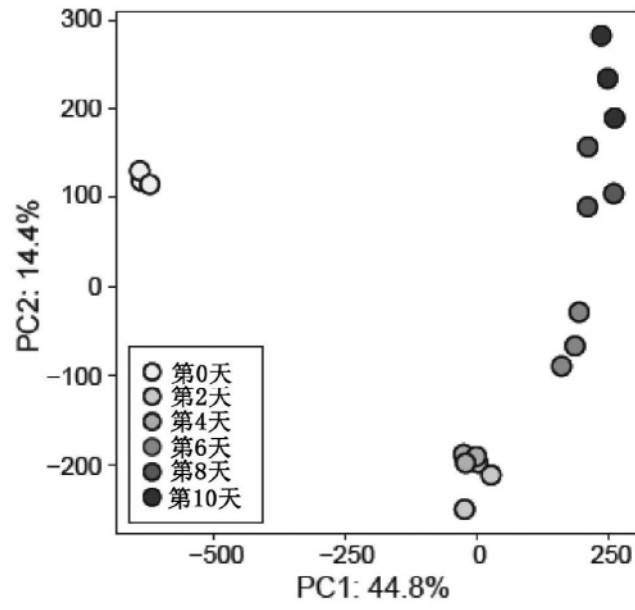


图1C

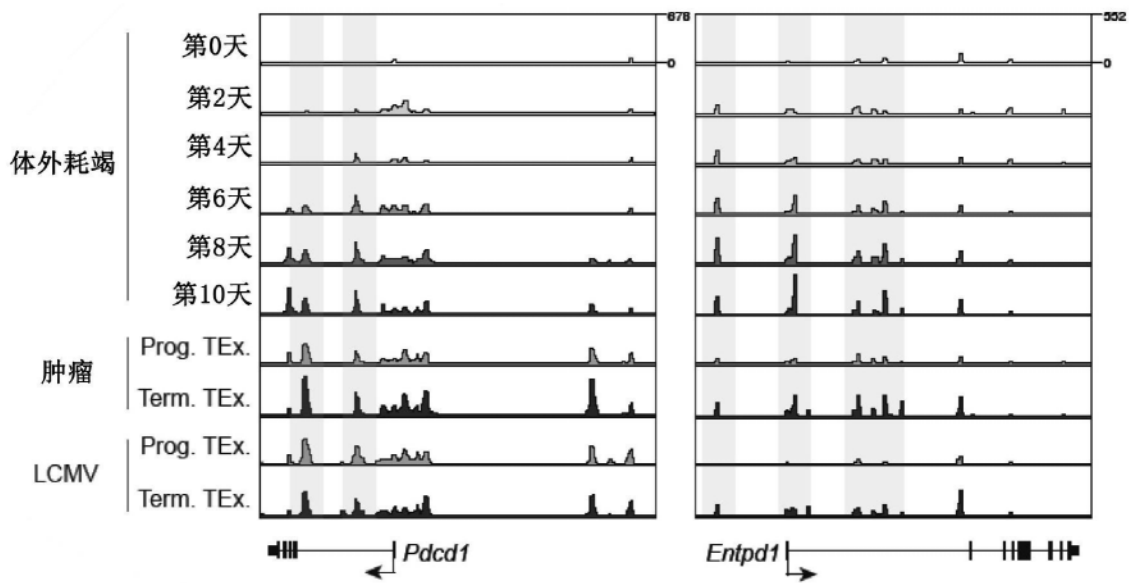


图1D

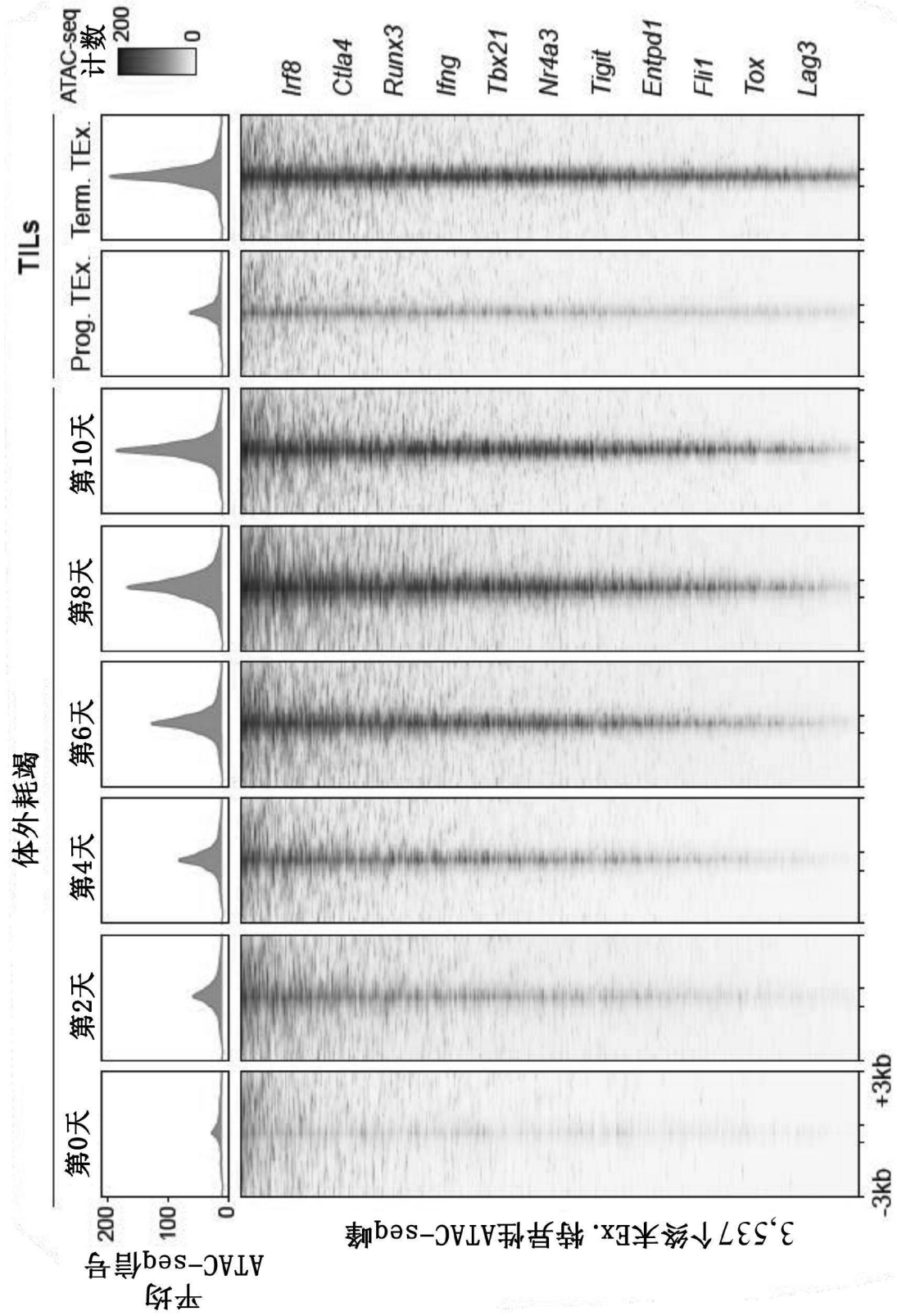


图1E

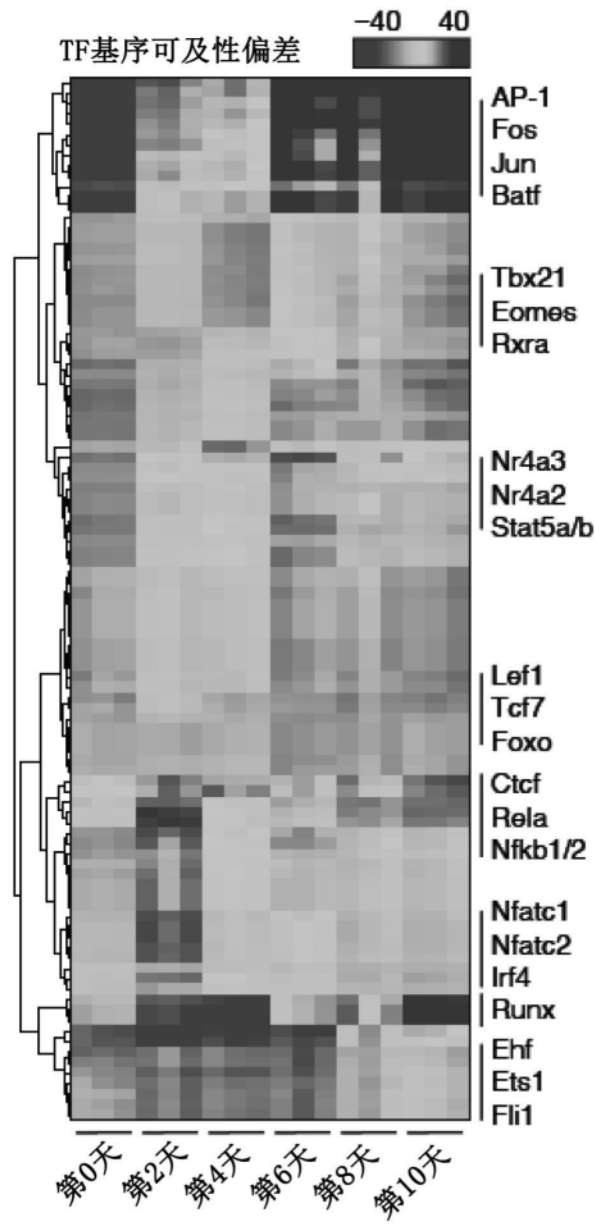


图1F

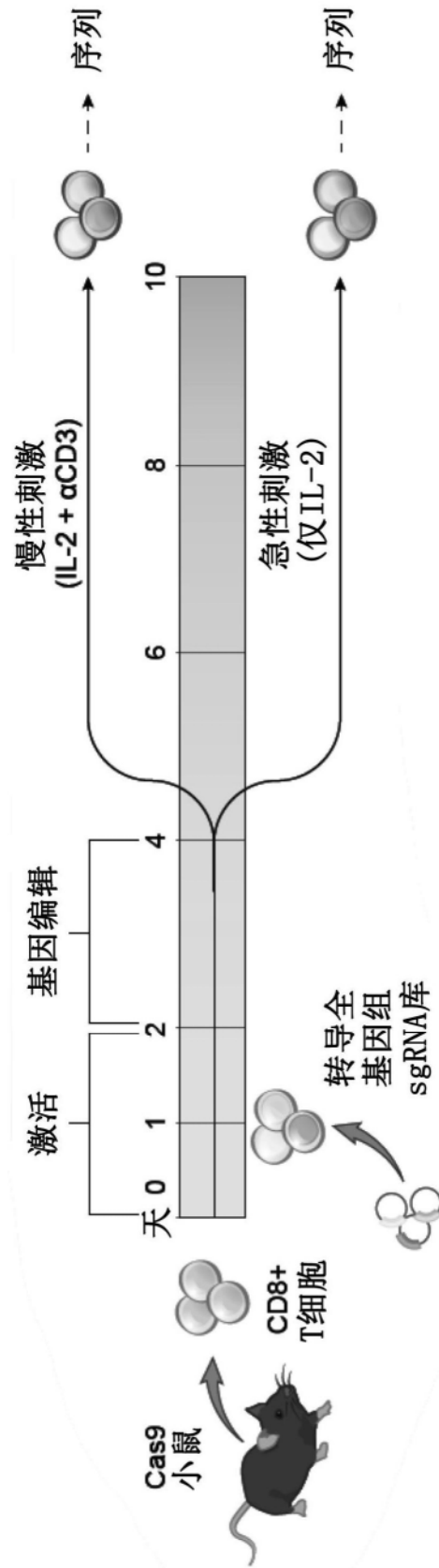


图2A

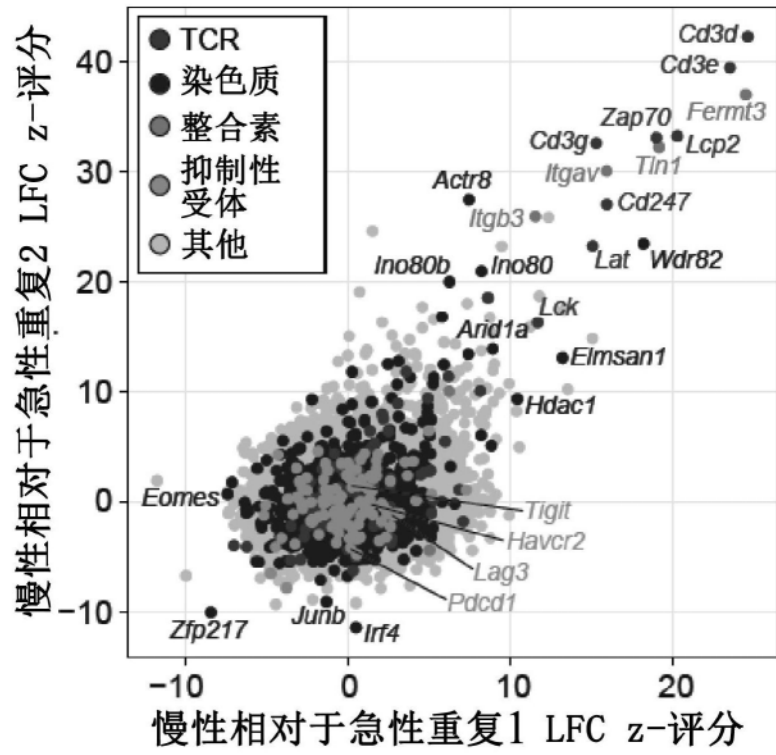


图2B

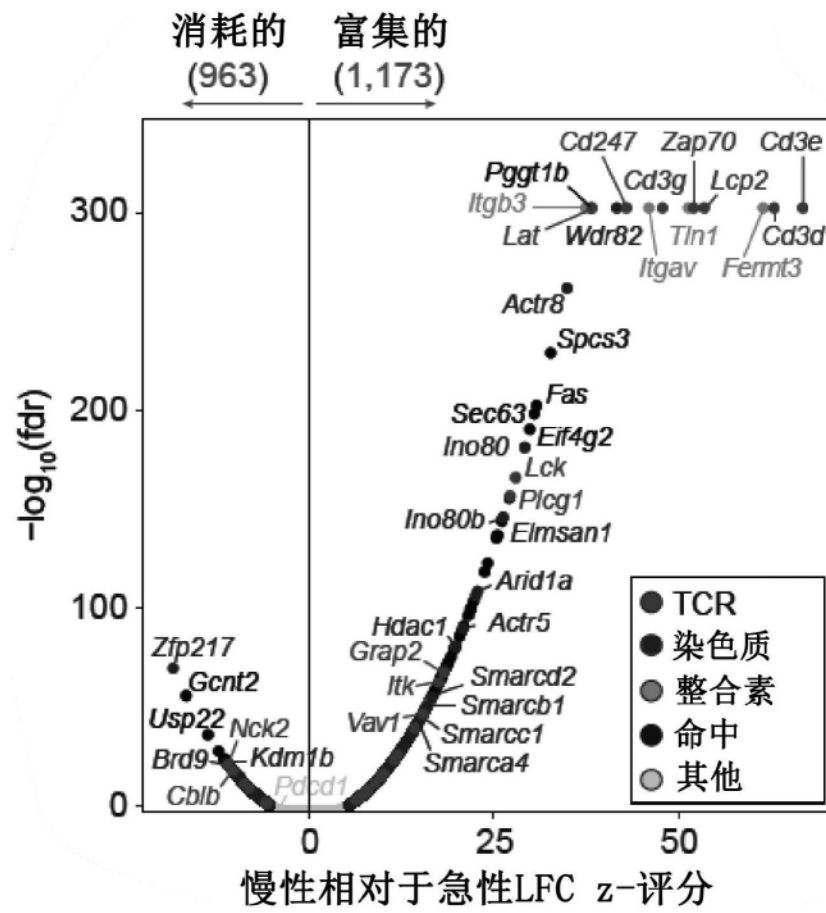


图2C

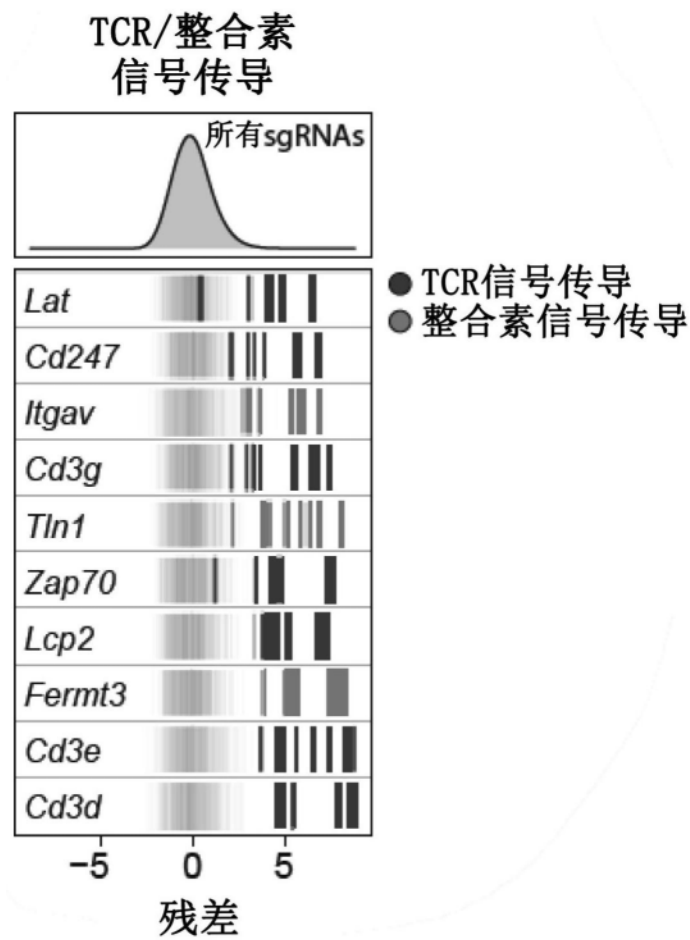


图2D

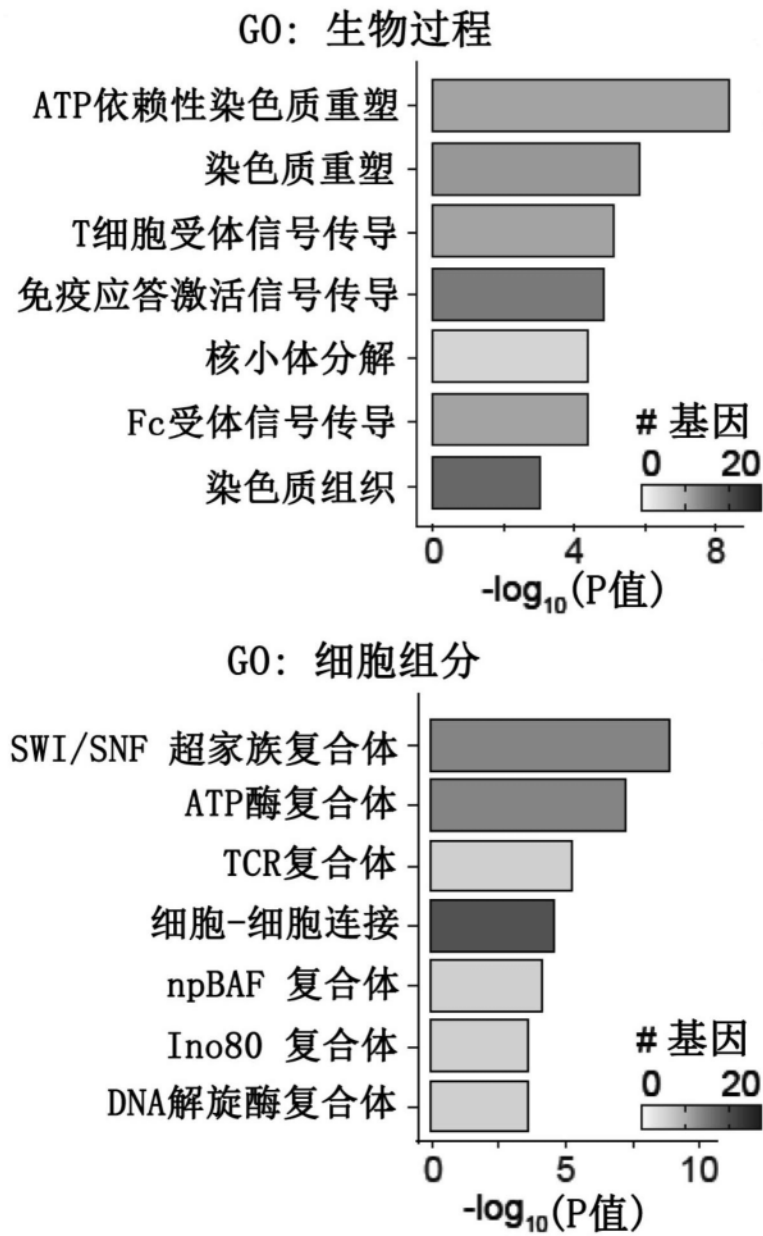


图2E

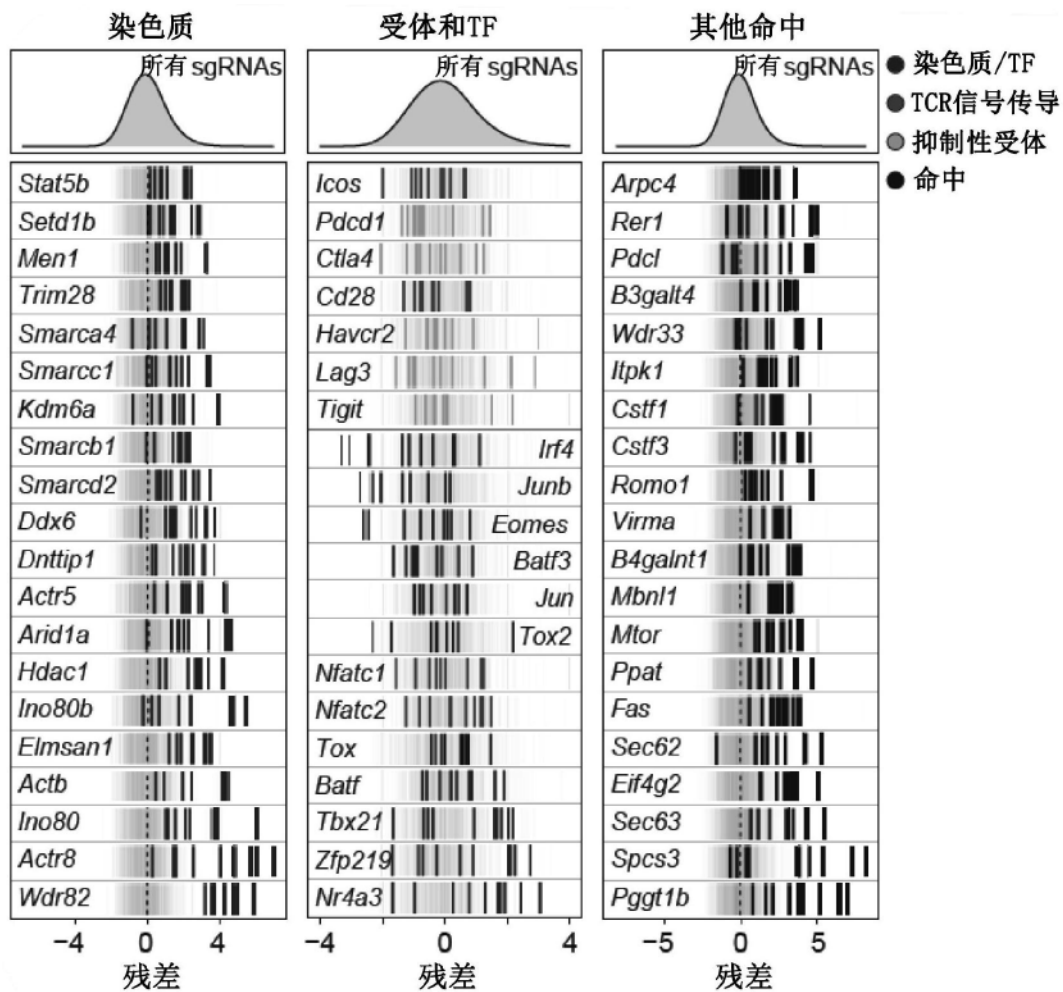


图2F

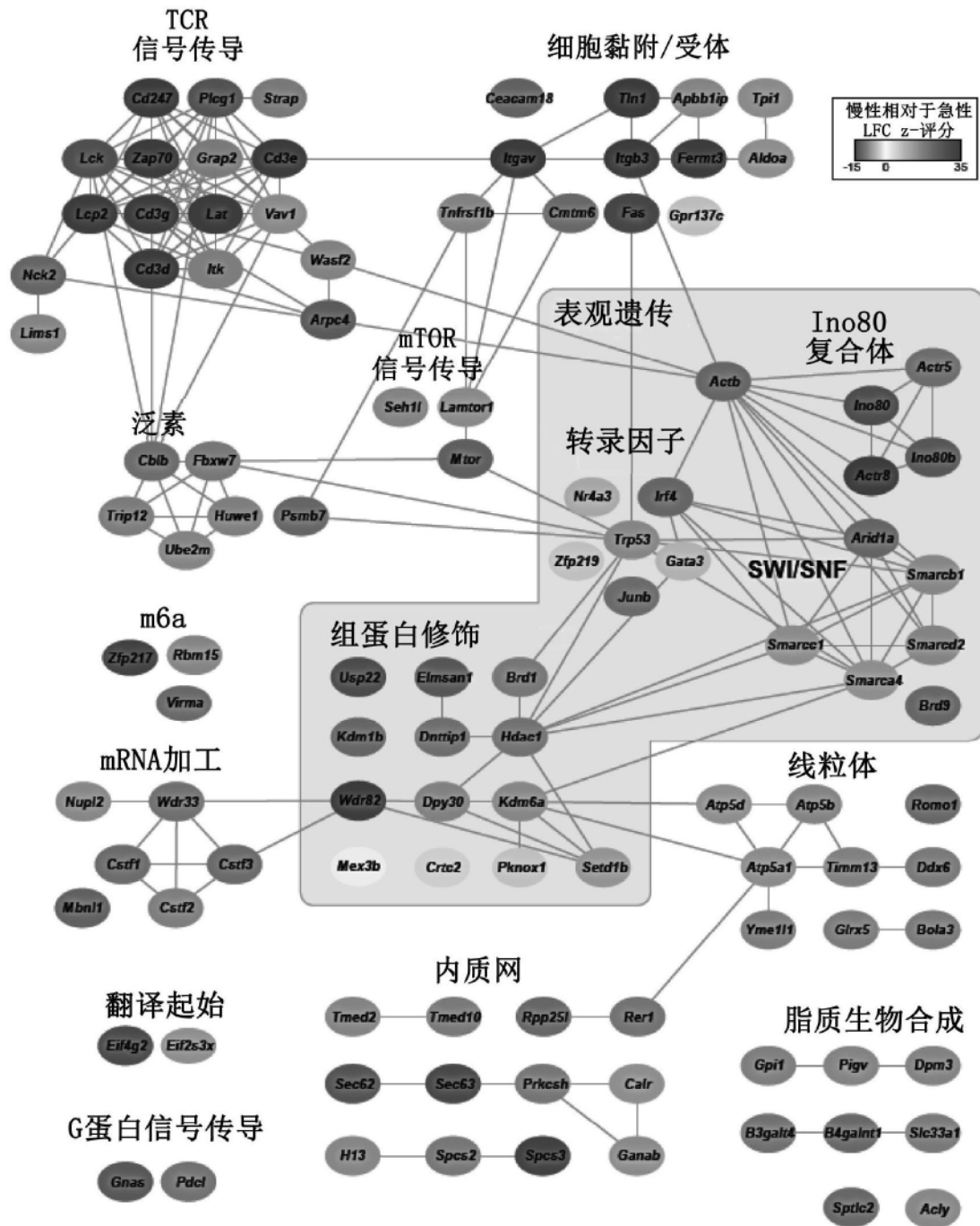


图3

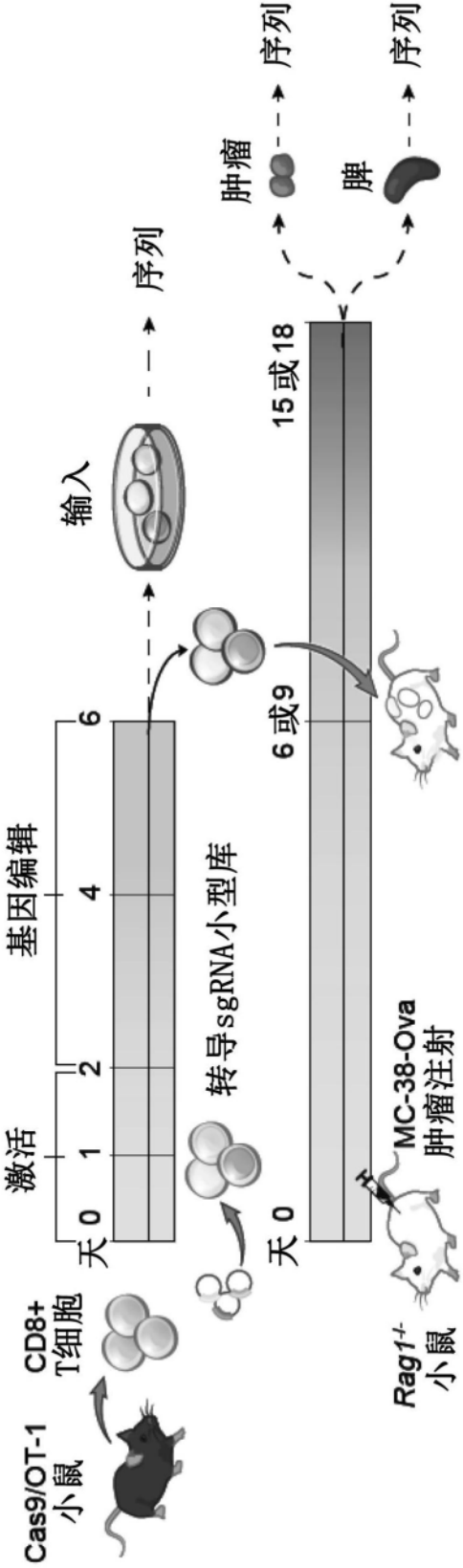


图4A

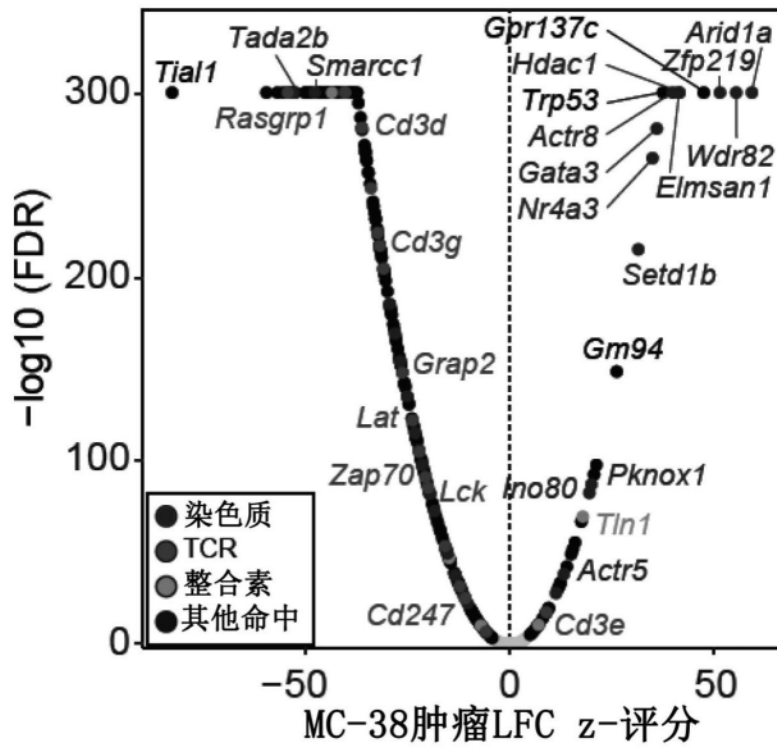


图4B

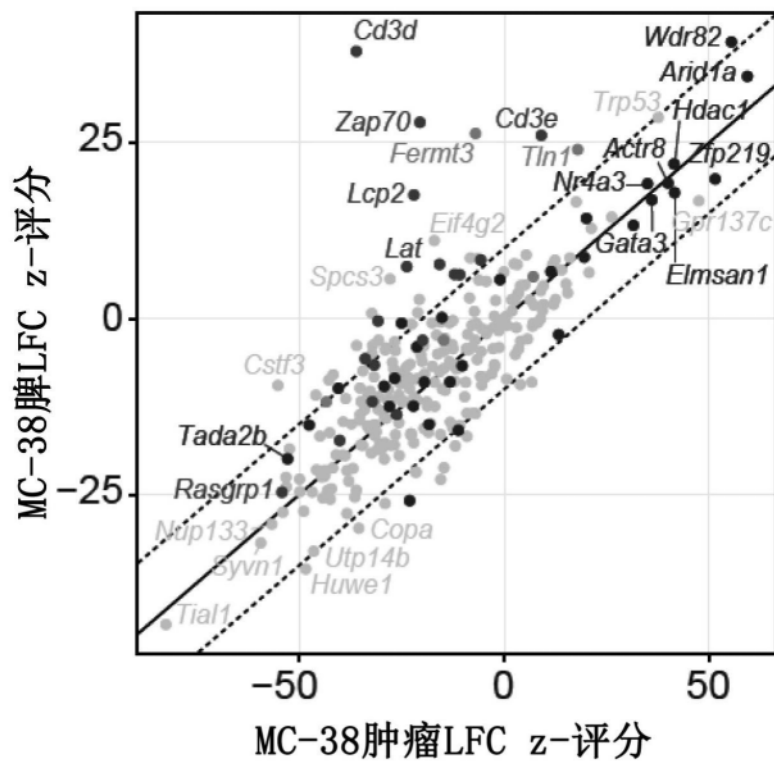


图4C

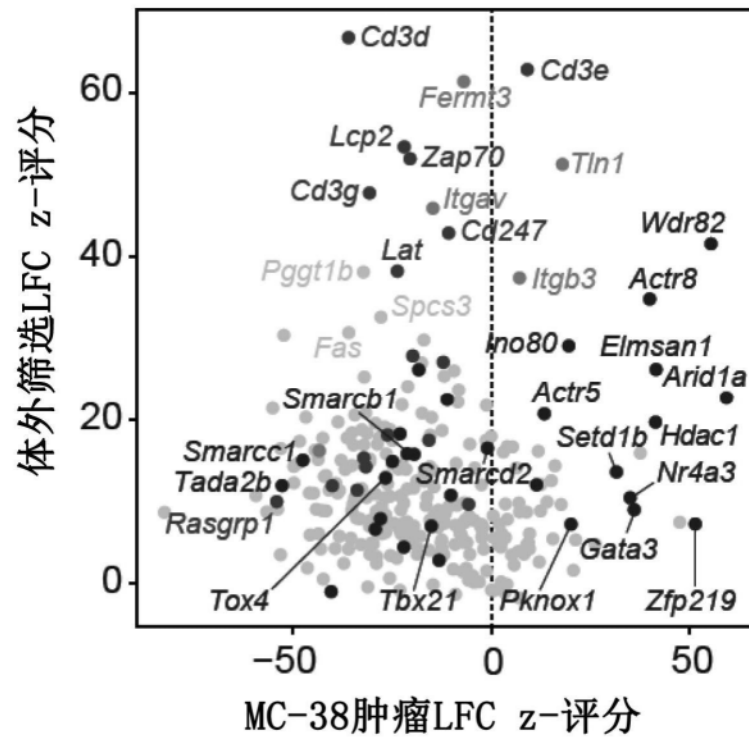


图4D

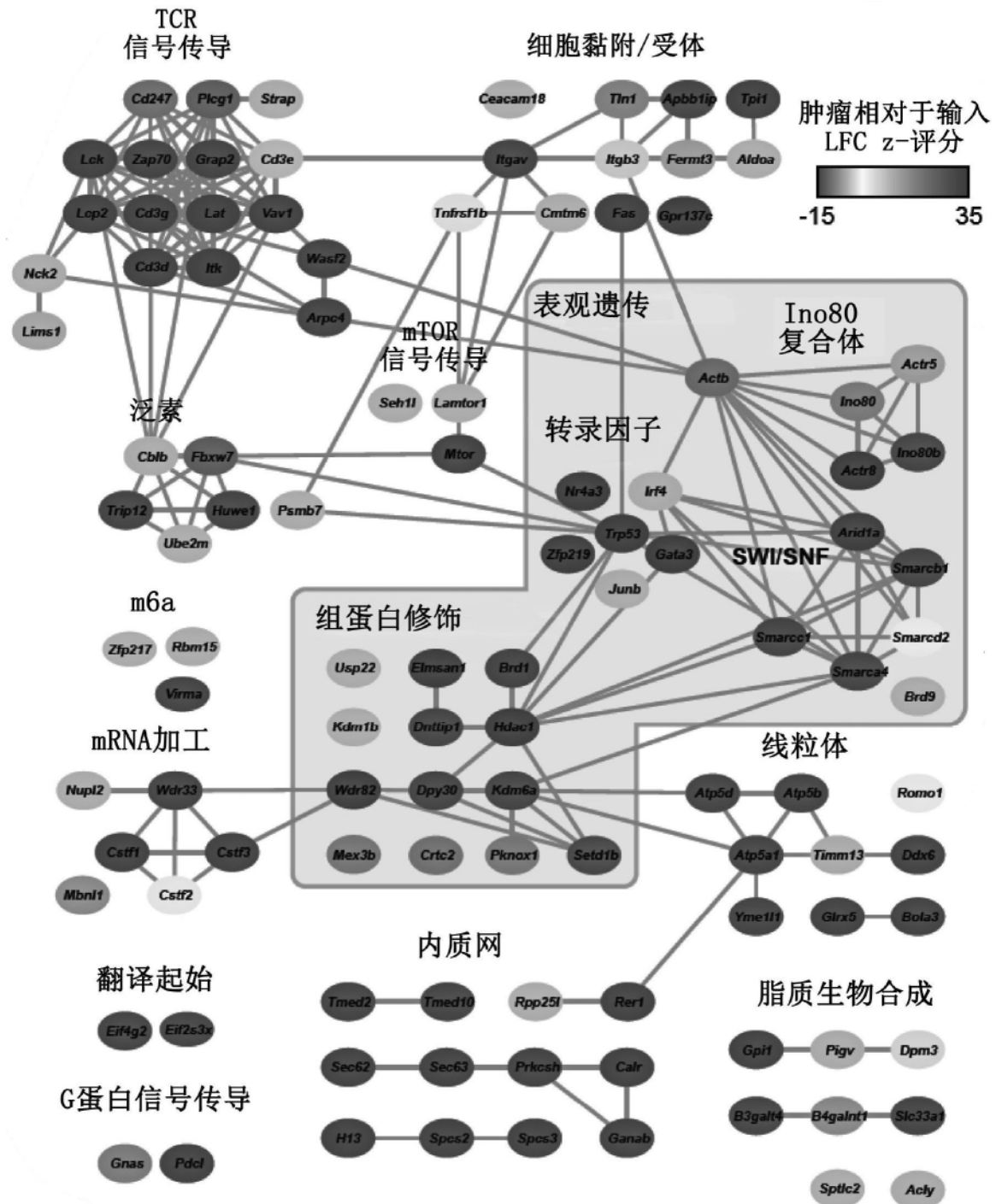


图4E

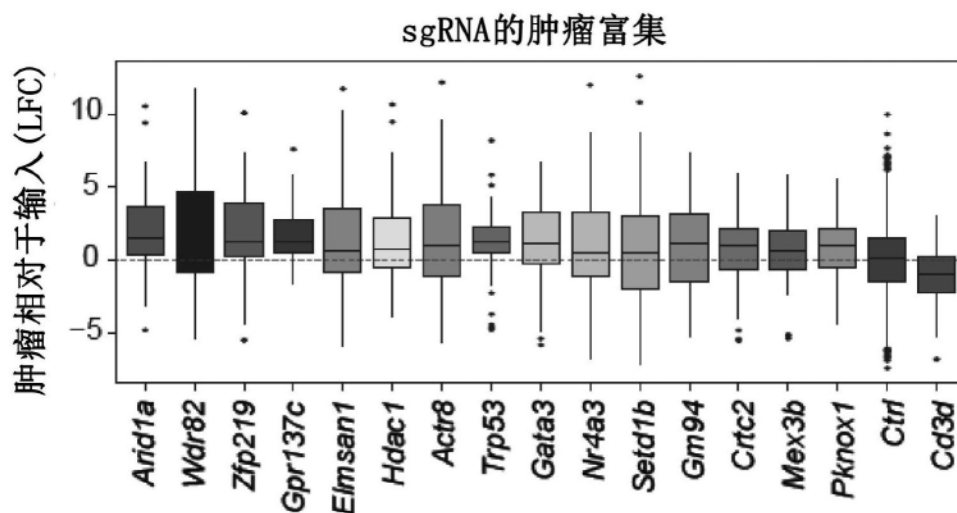


图4F

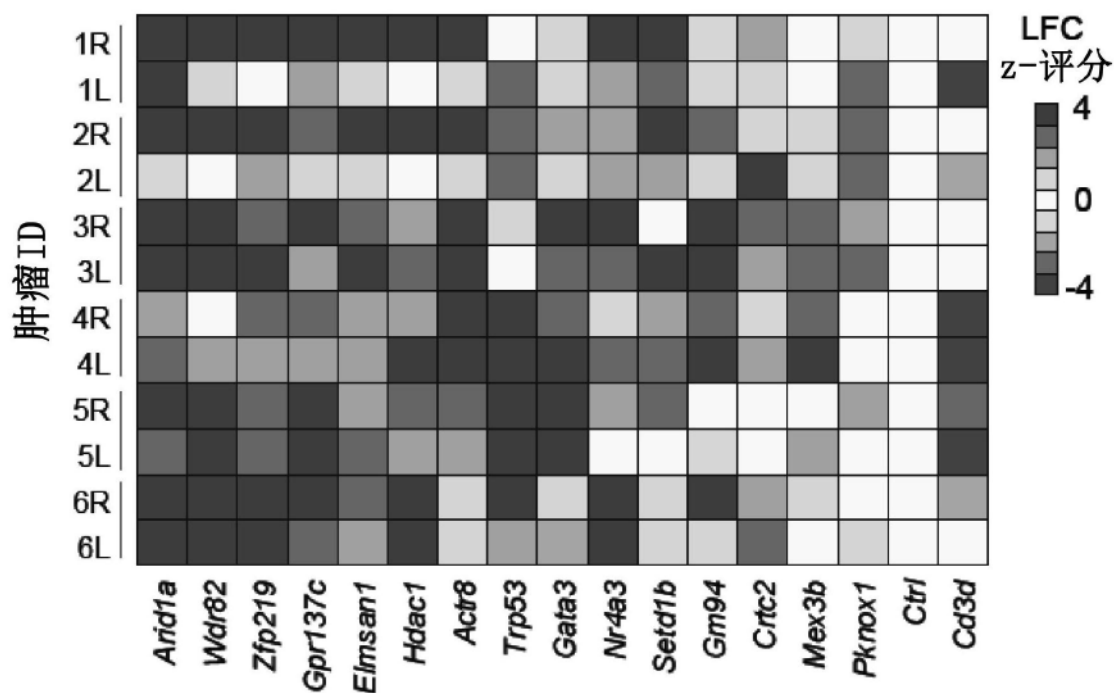


图4G



图5A

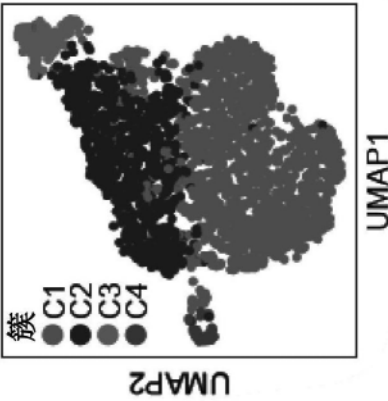


图5B

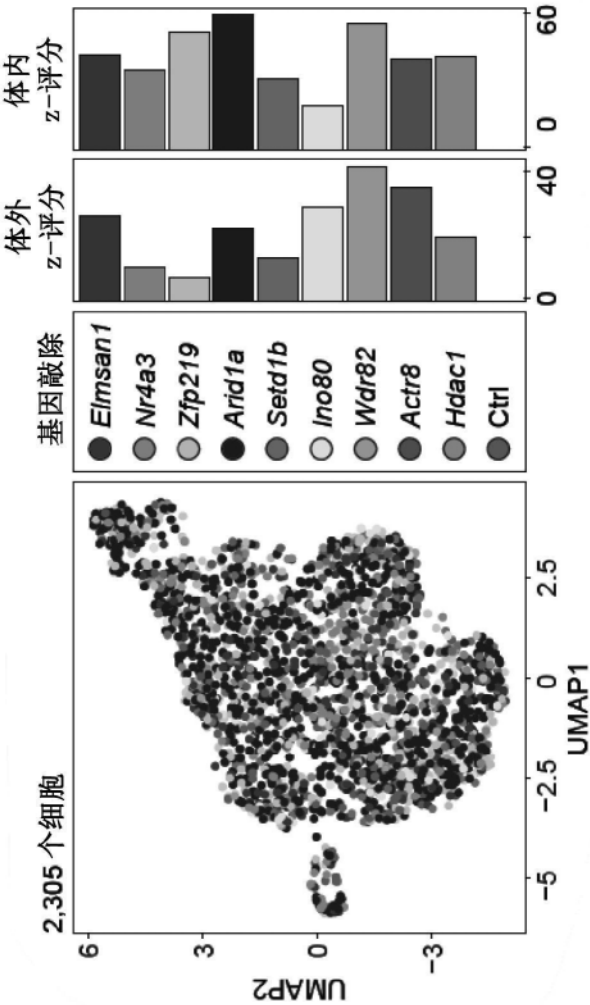


图5C

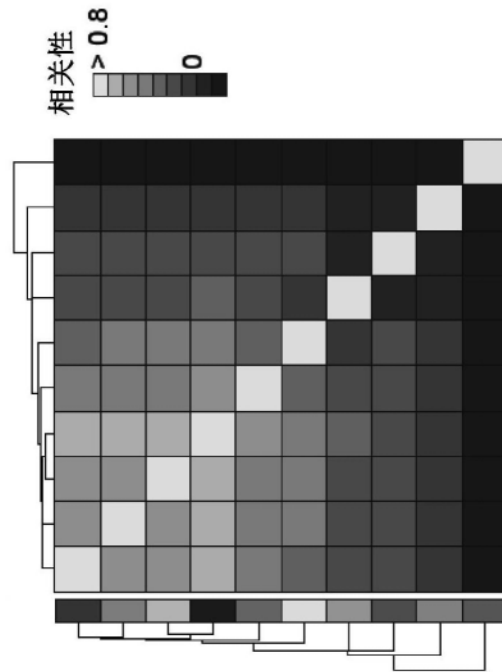


图5D

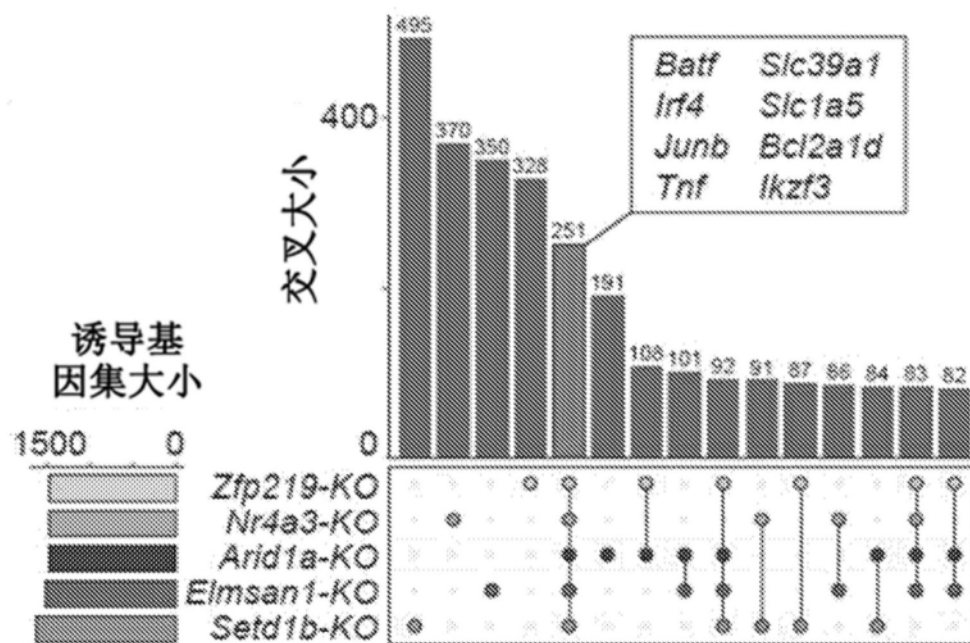


图5E

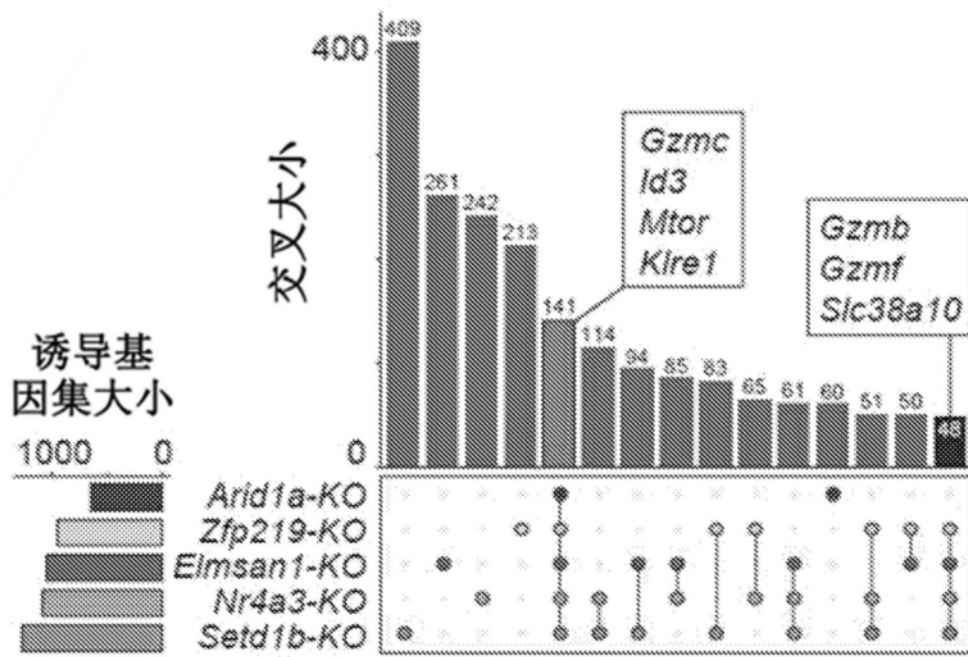


图5F

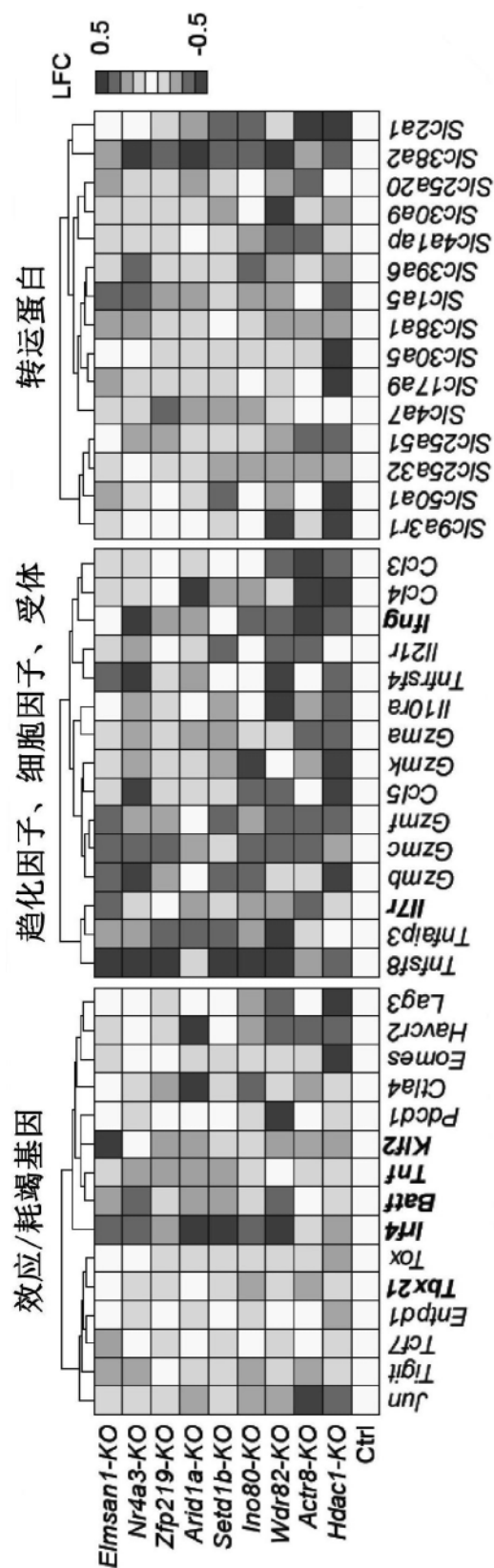


图5G

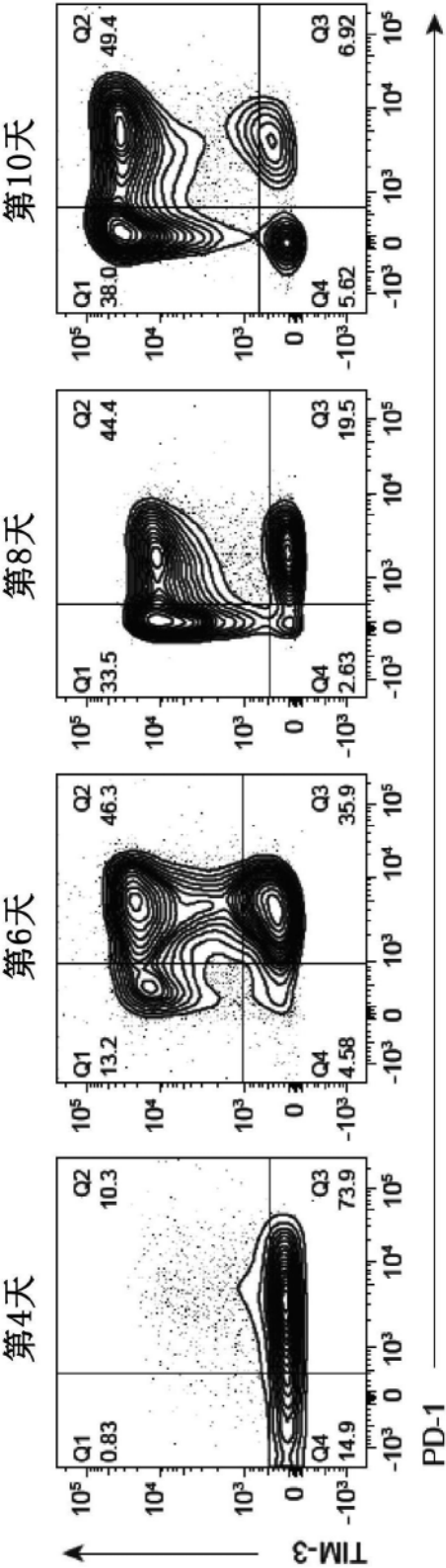


图6A

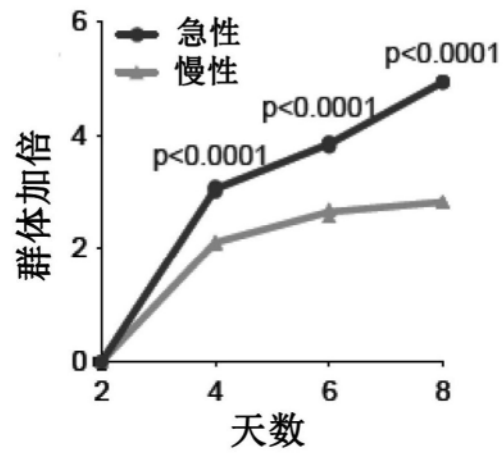


图6B

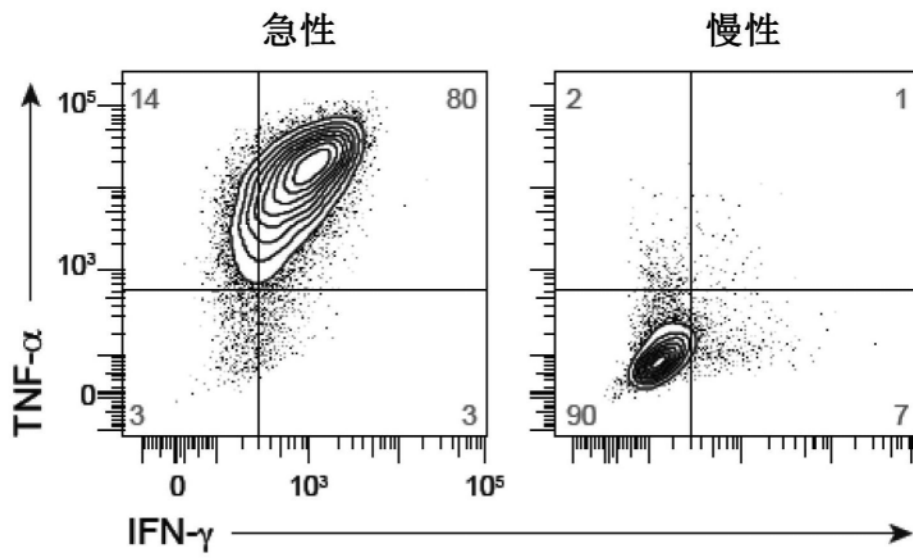


图6C

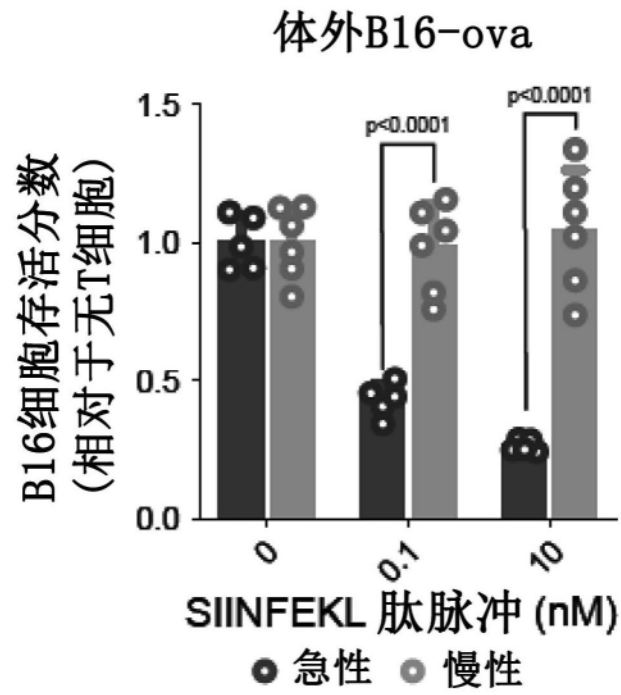


图6D

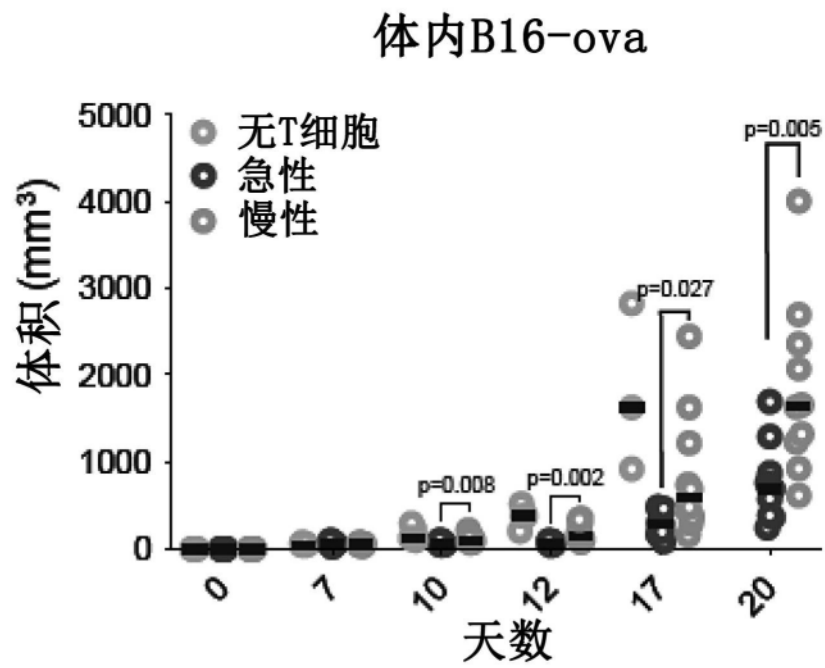


图6E

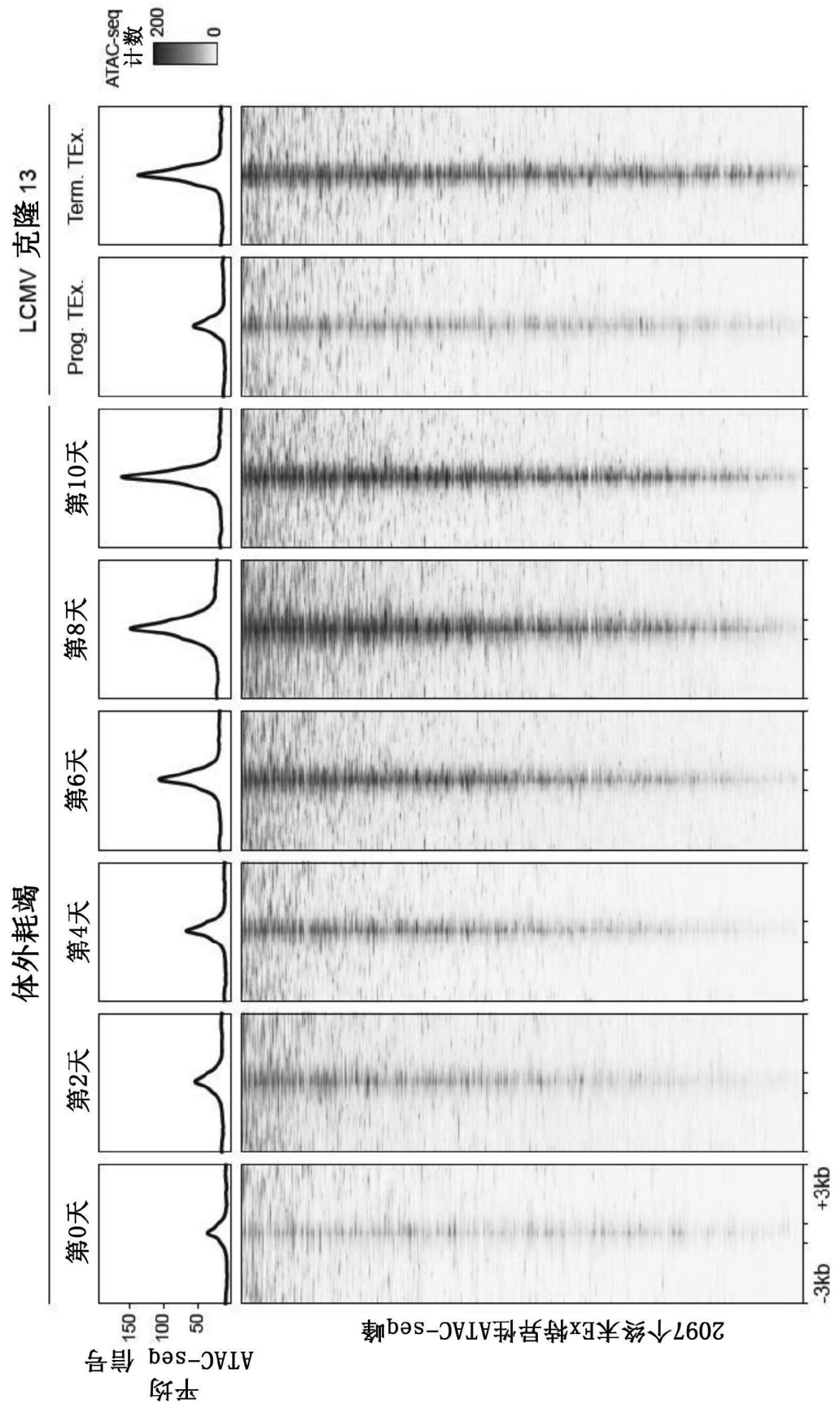


图6F

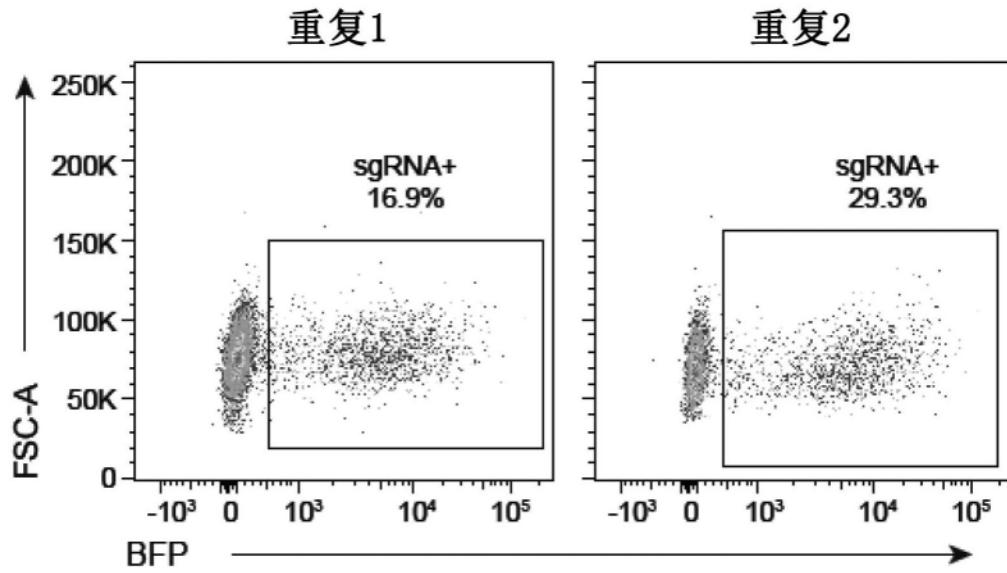


图7A

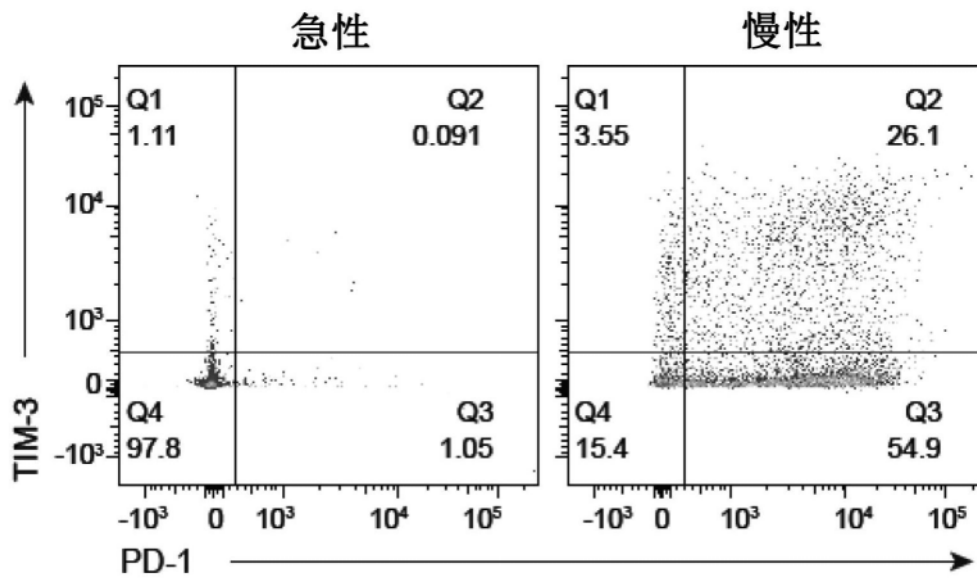


图7B

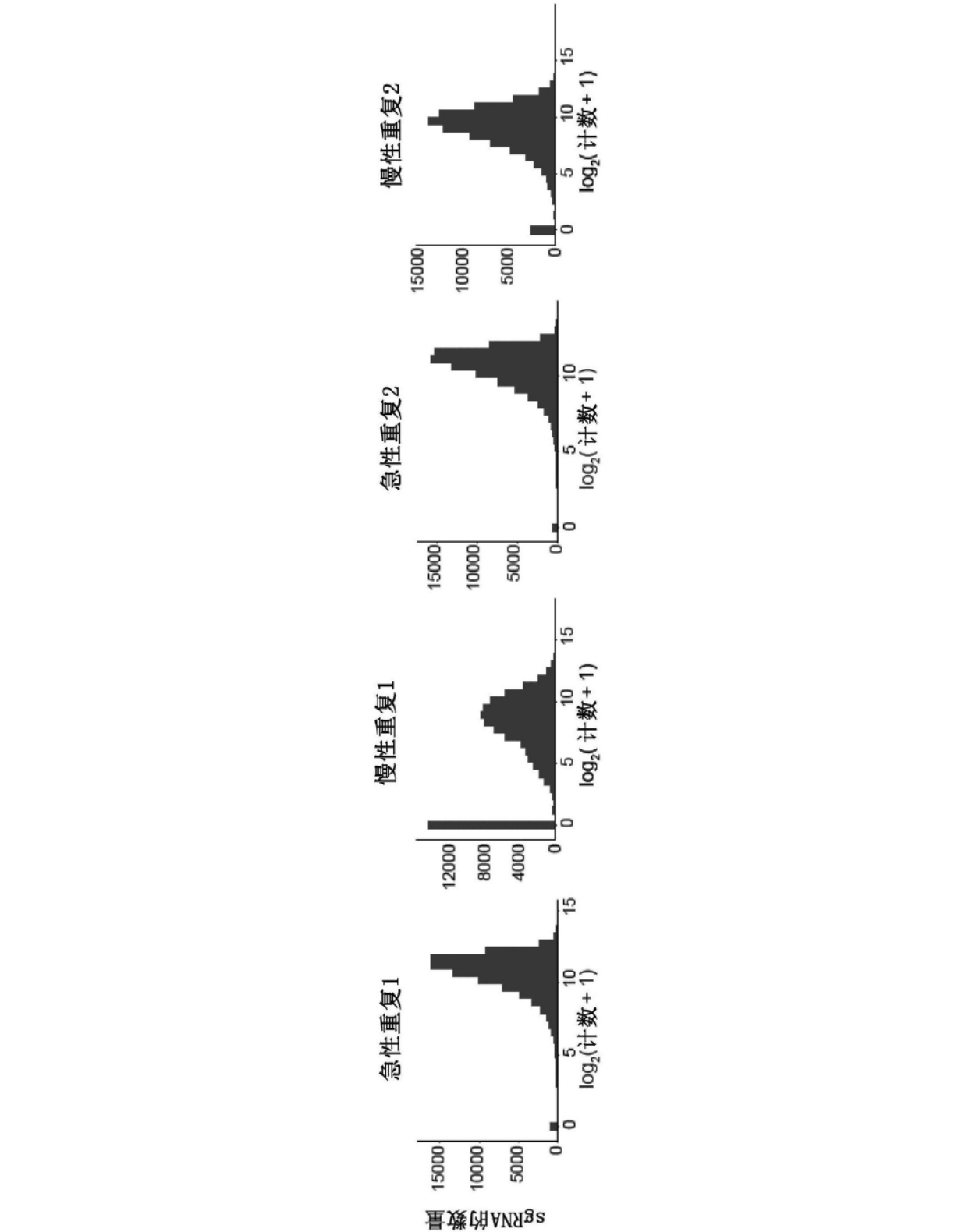


图7C

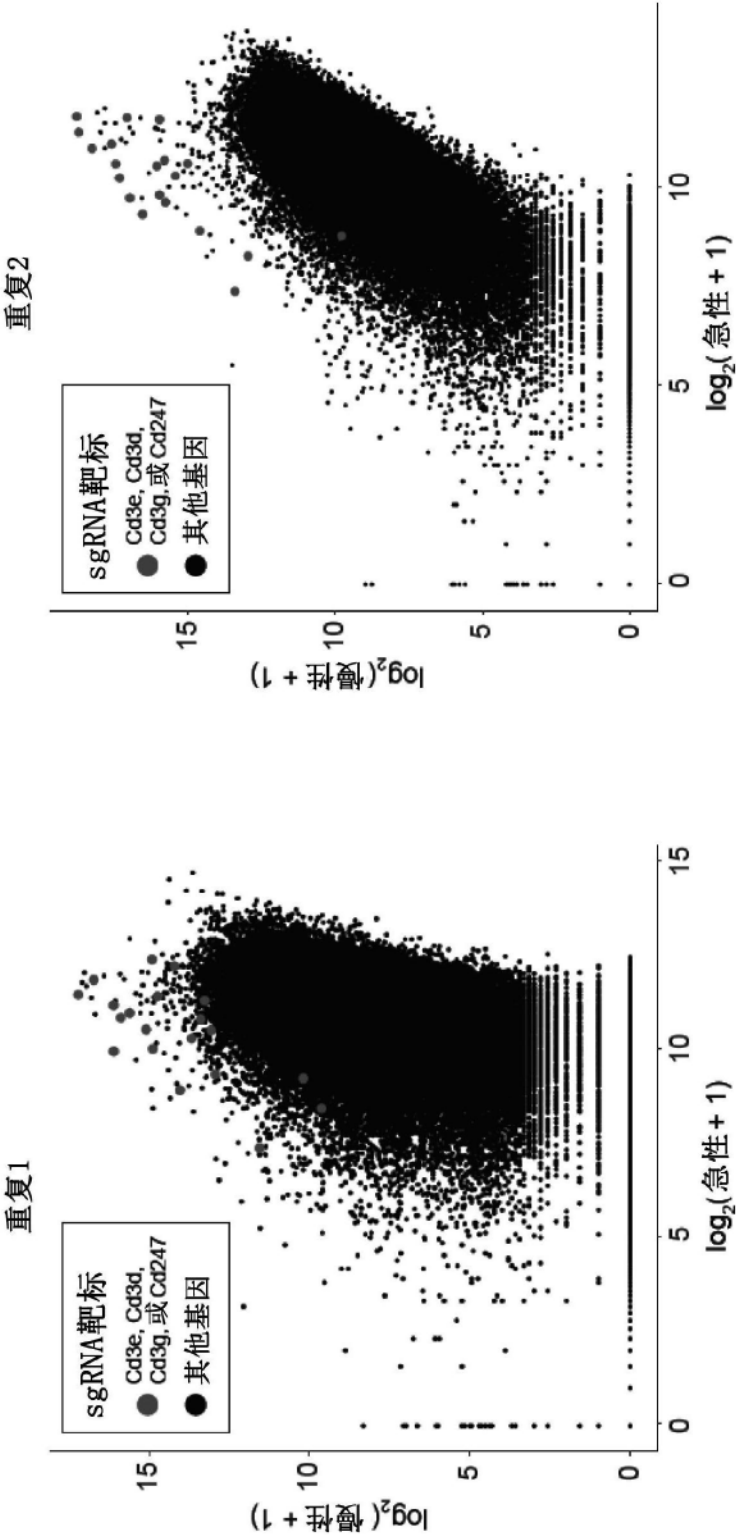


图7D

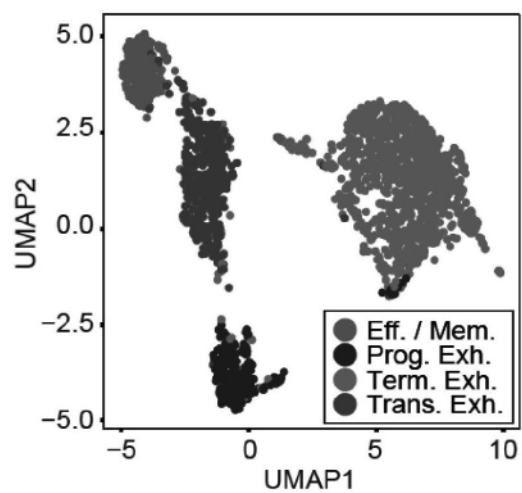


图8A

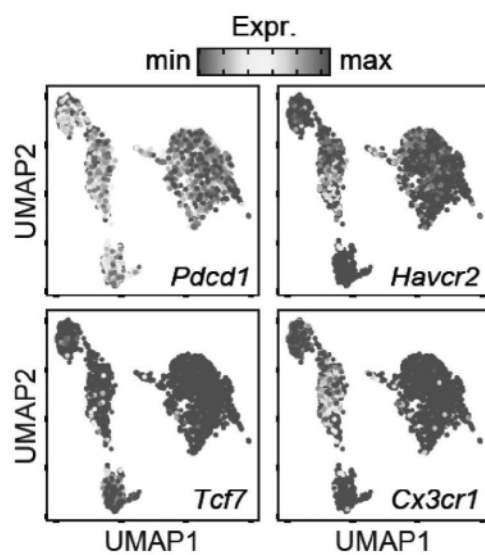


图8B

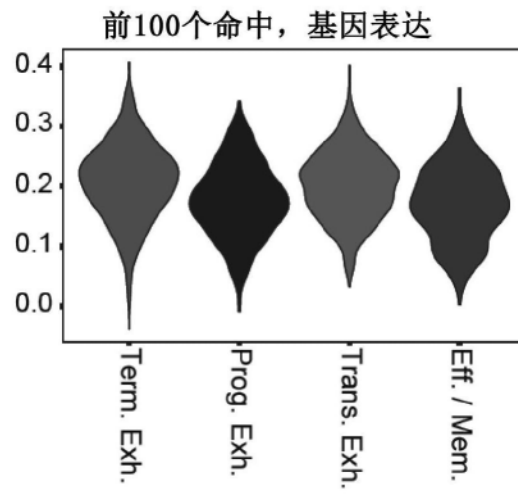


图8C

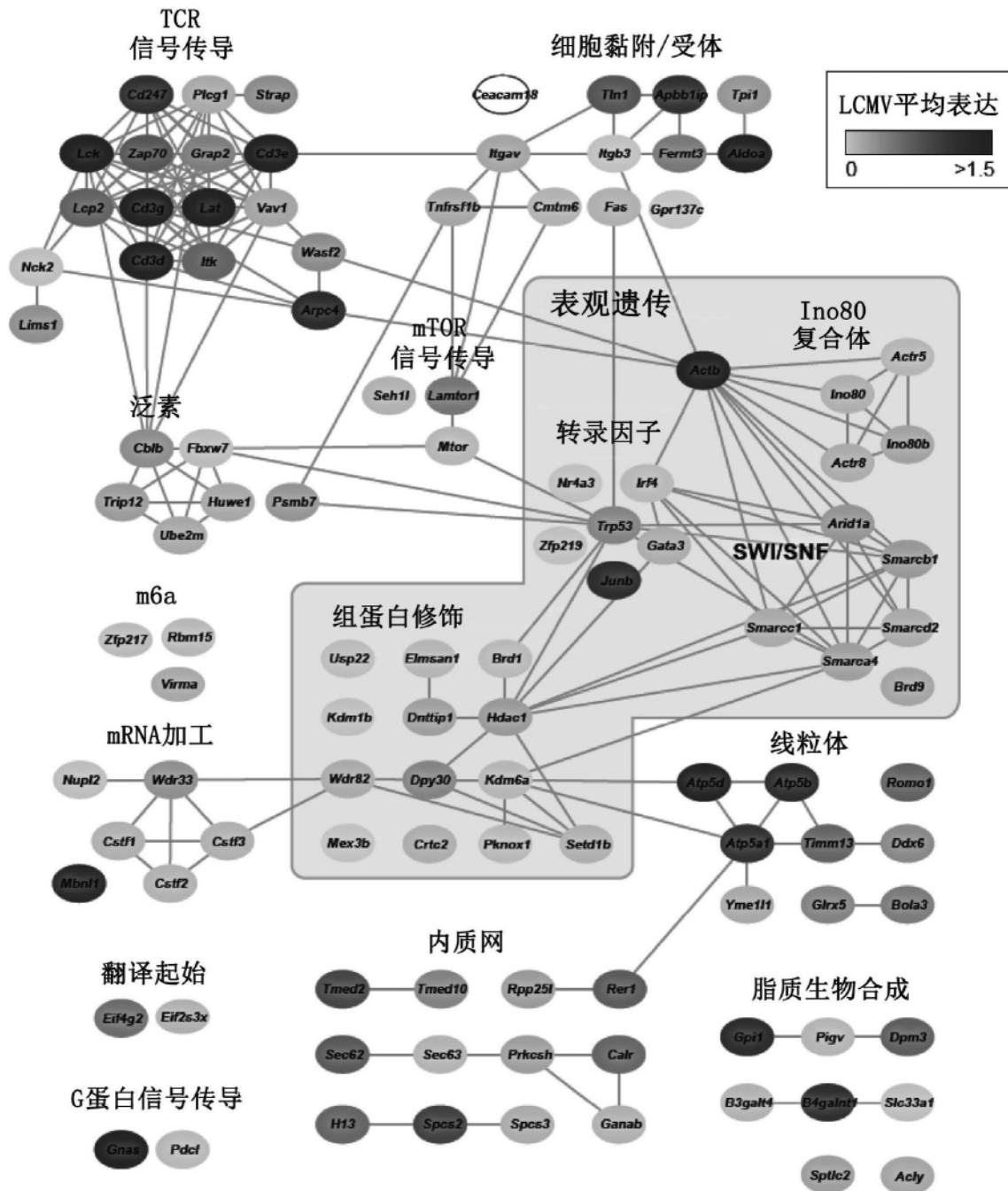


图8D

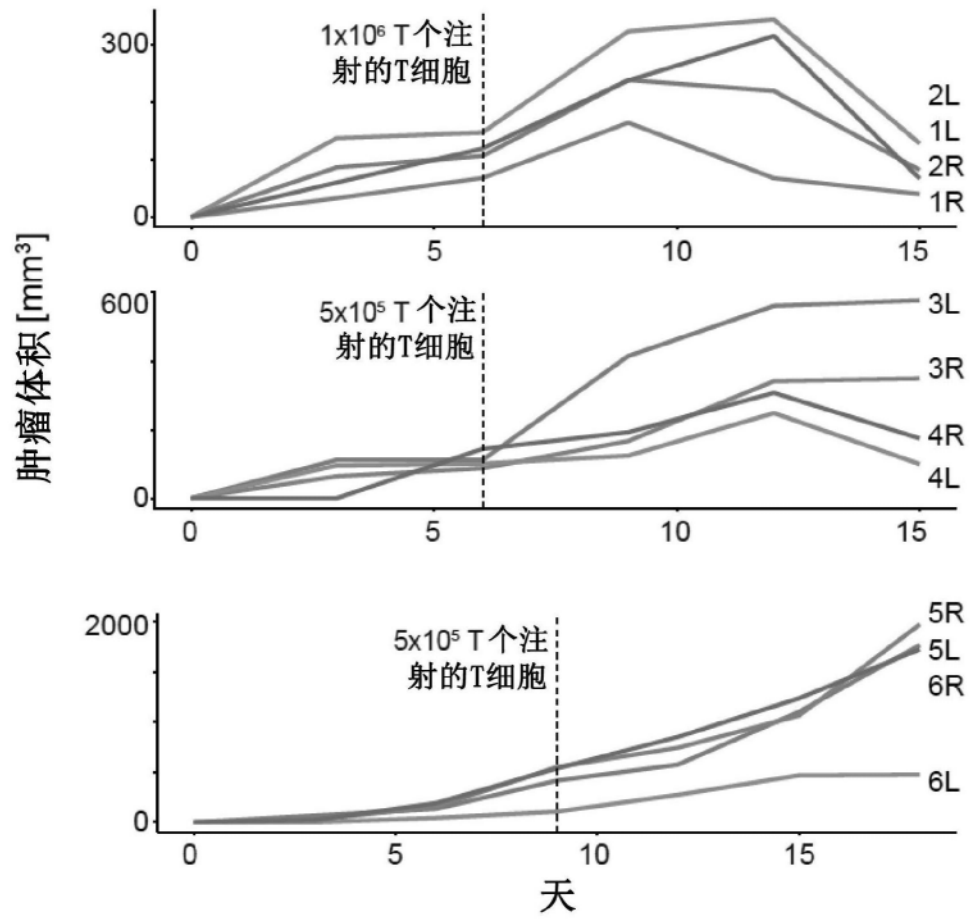


图9A

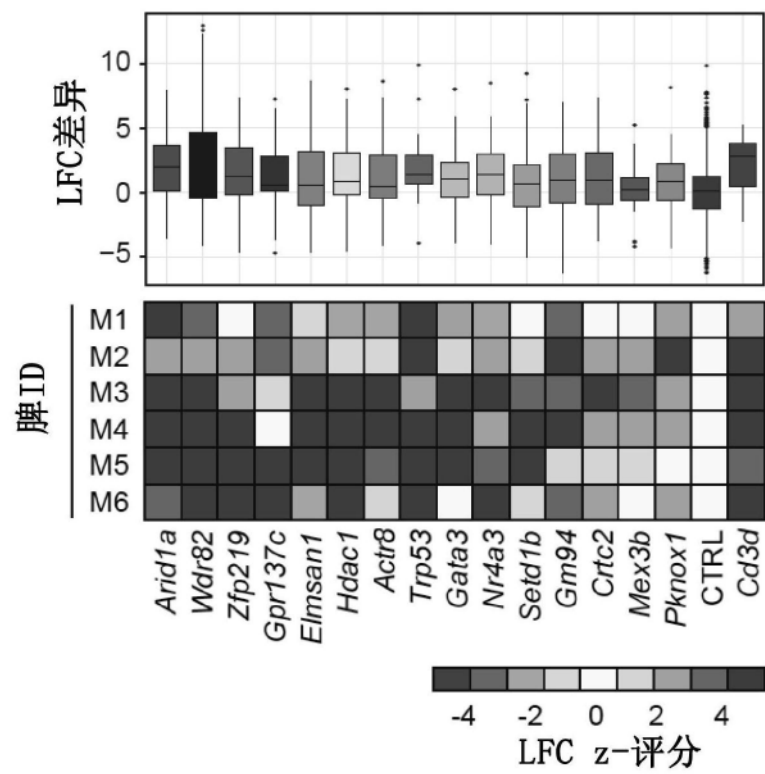


图9B

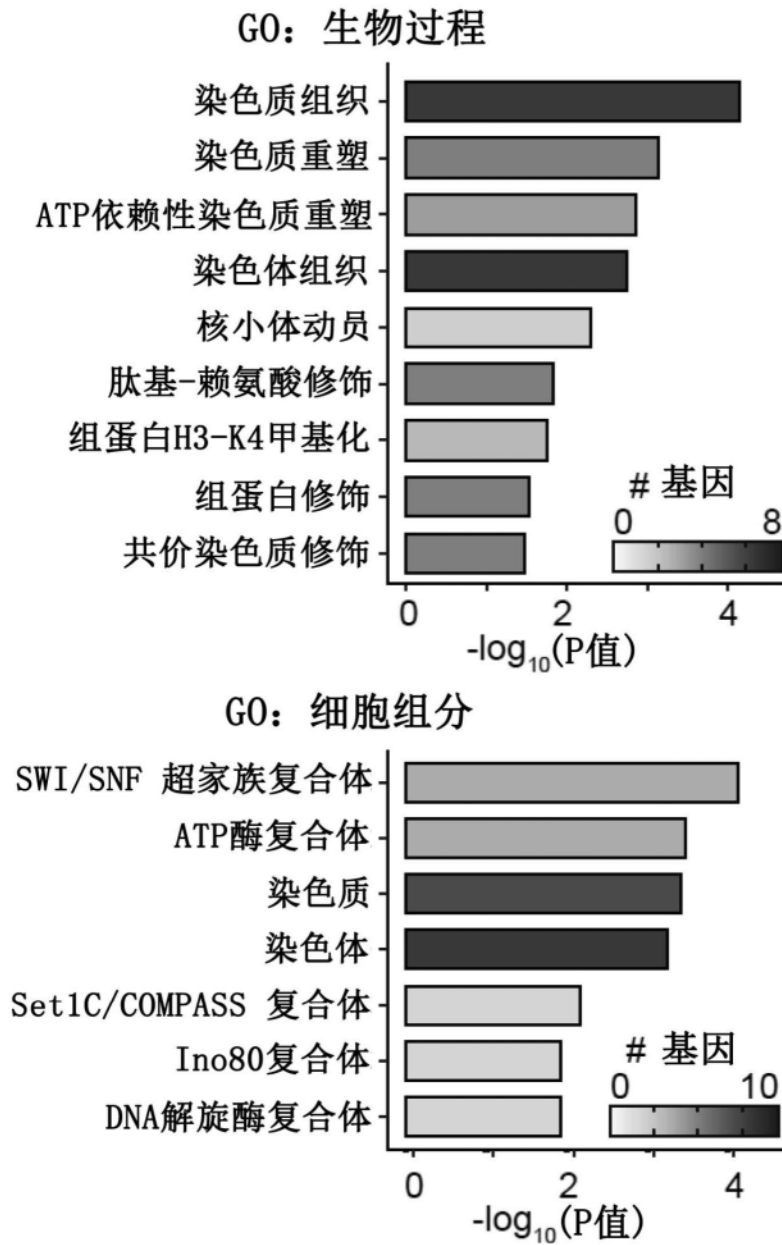


图9C

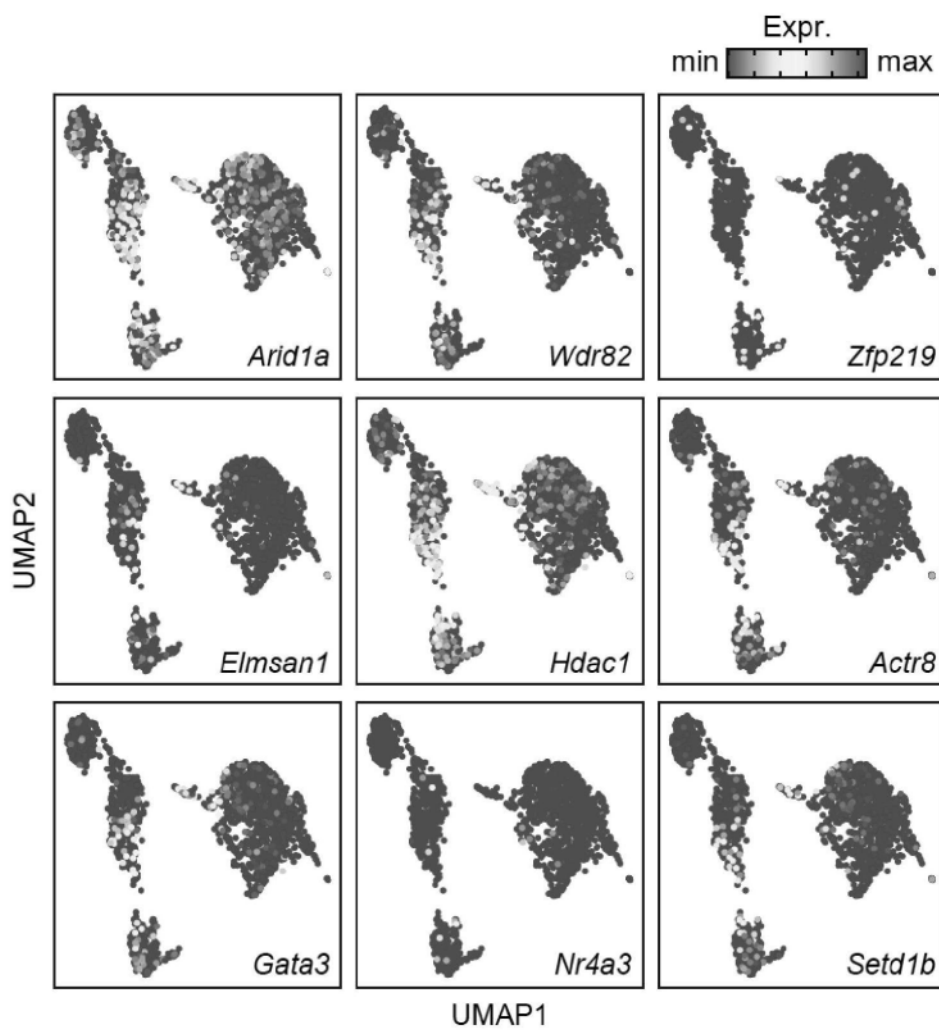


图9D

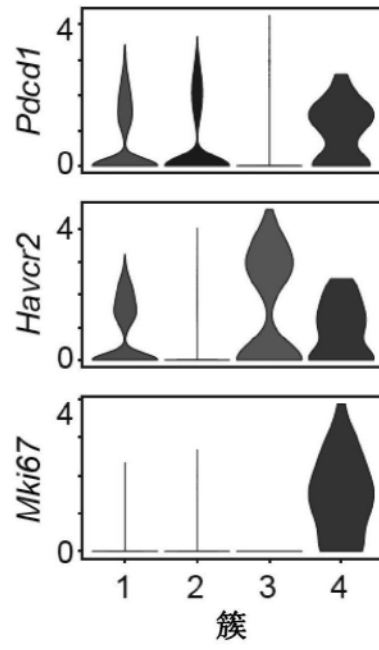


图10A

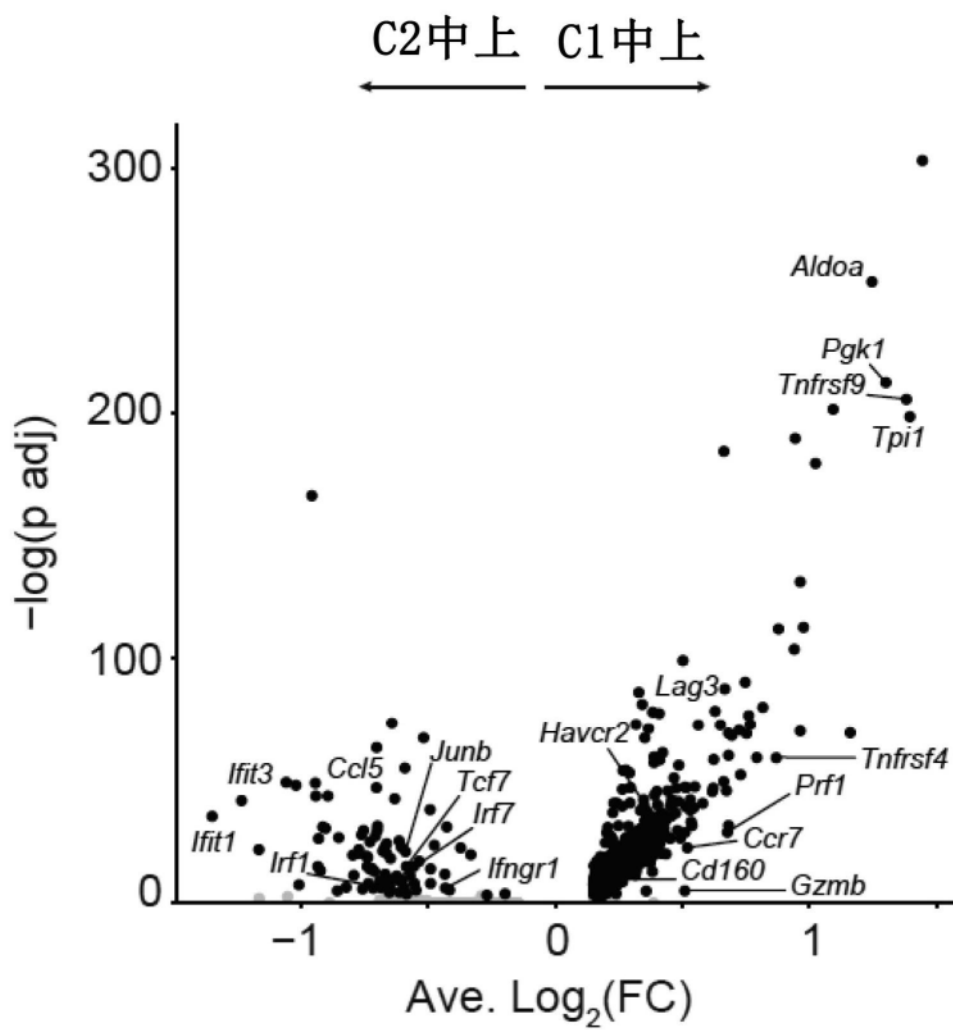


图10B

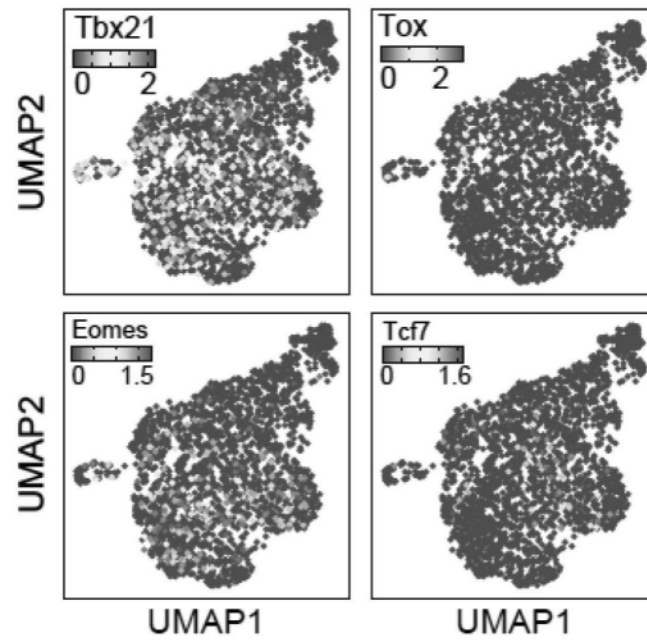


图10C

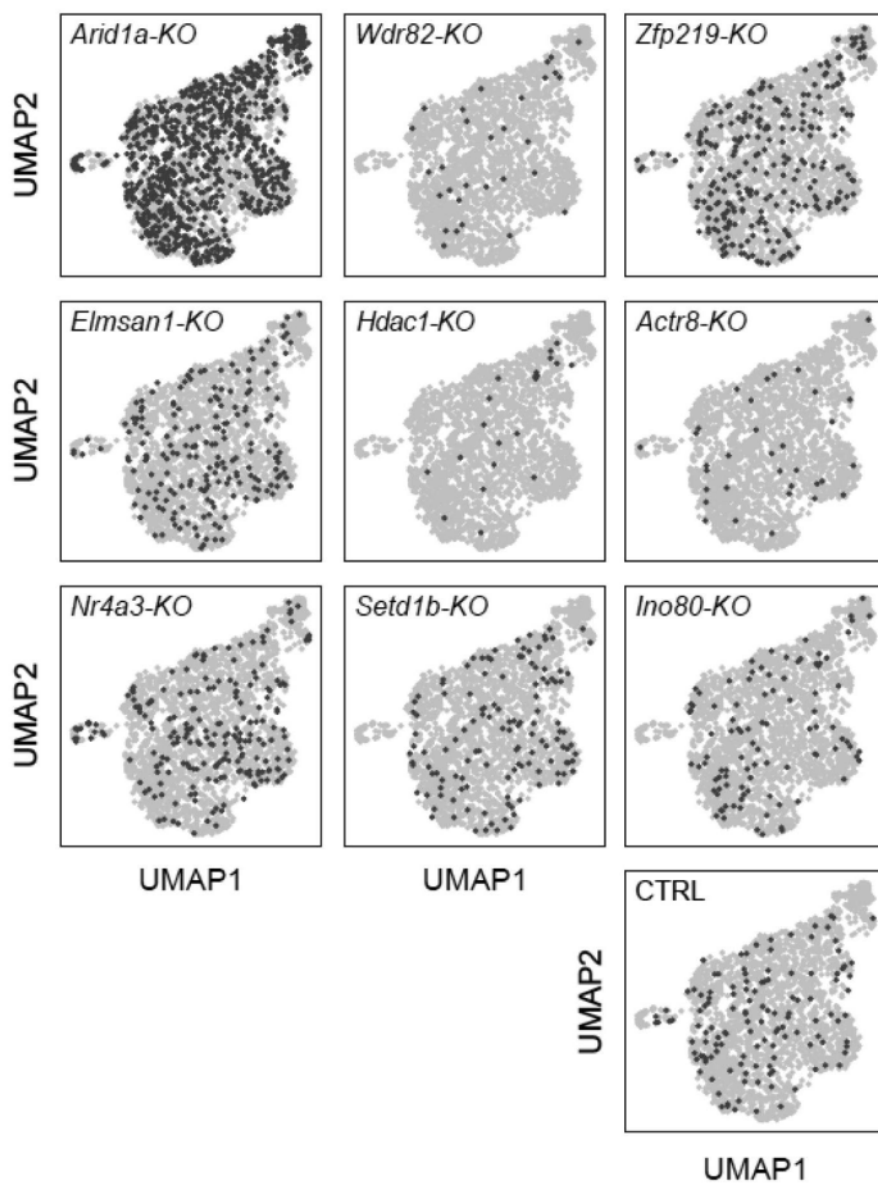


图10D

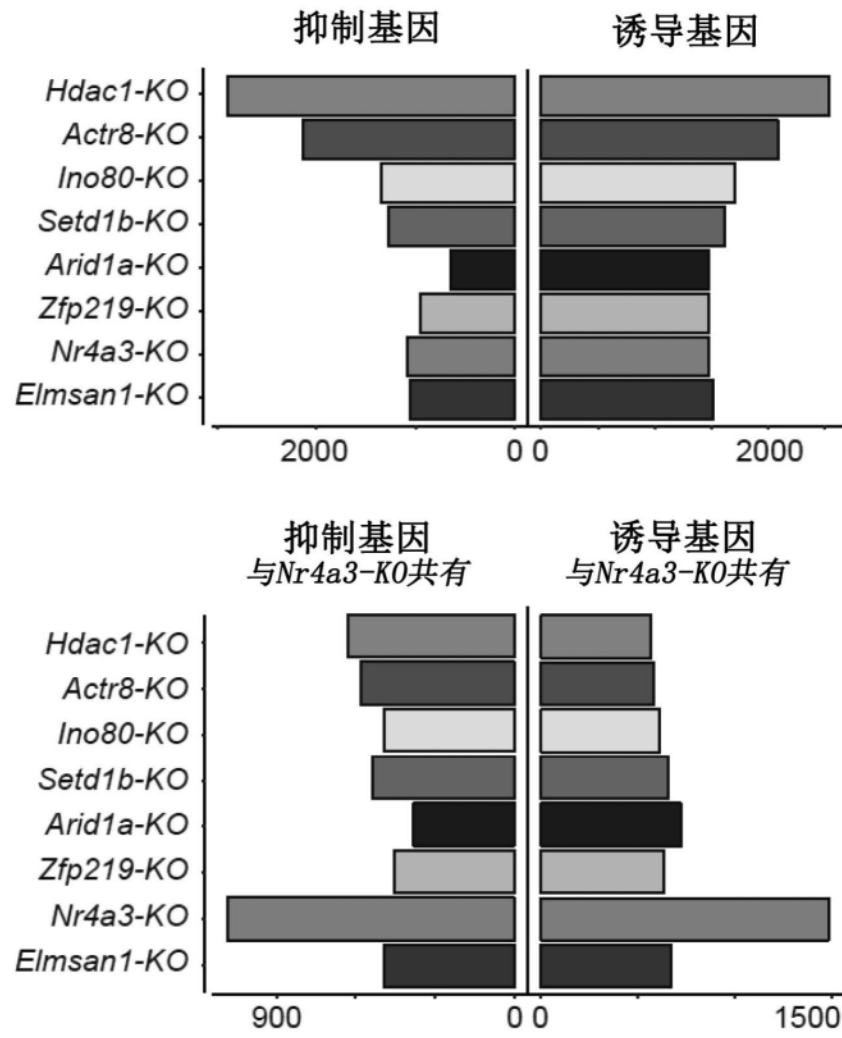


图10E

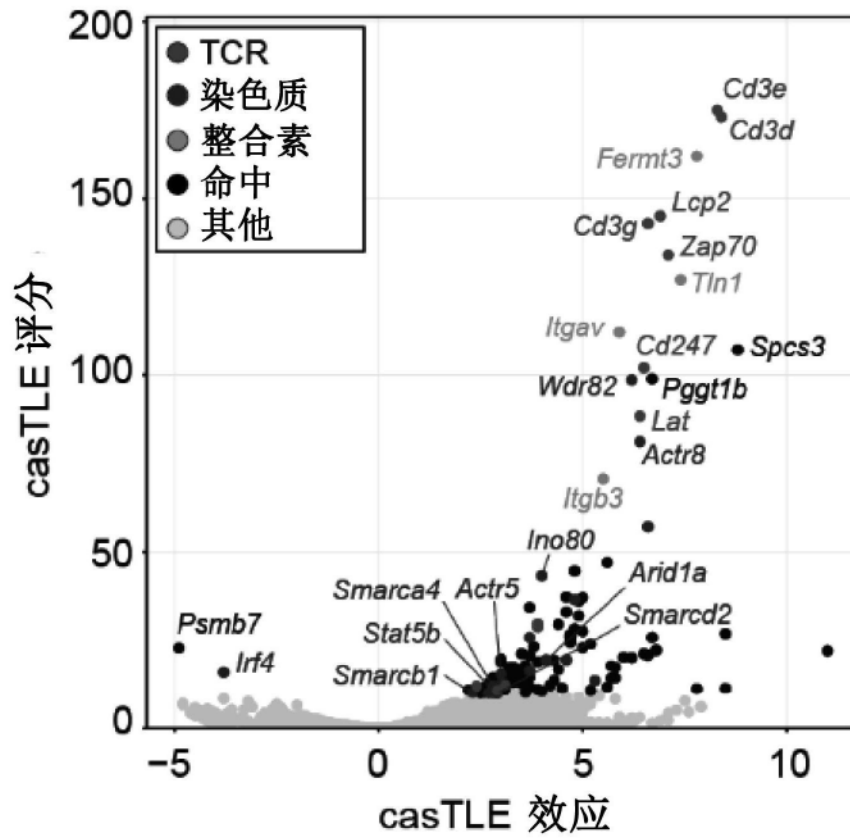


图11A

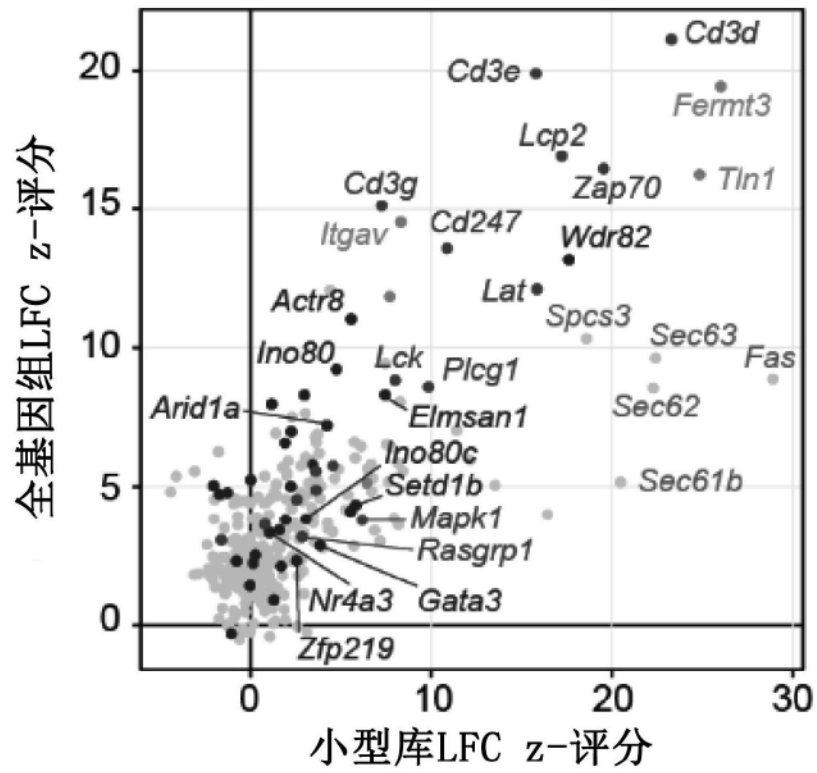


图11B

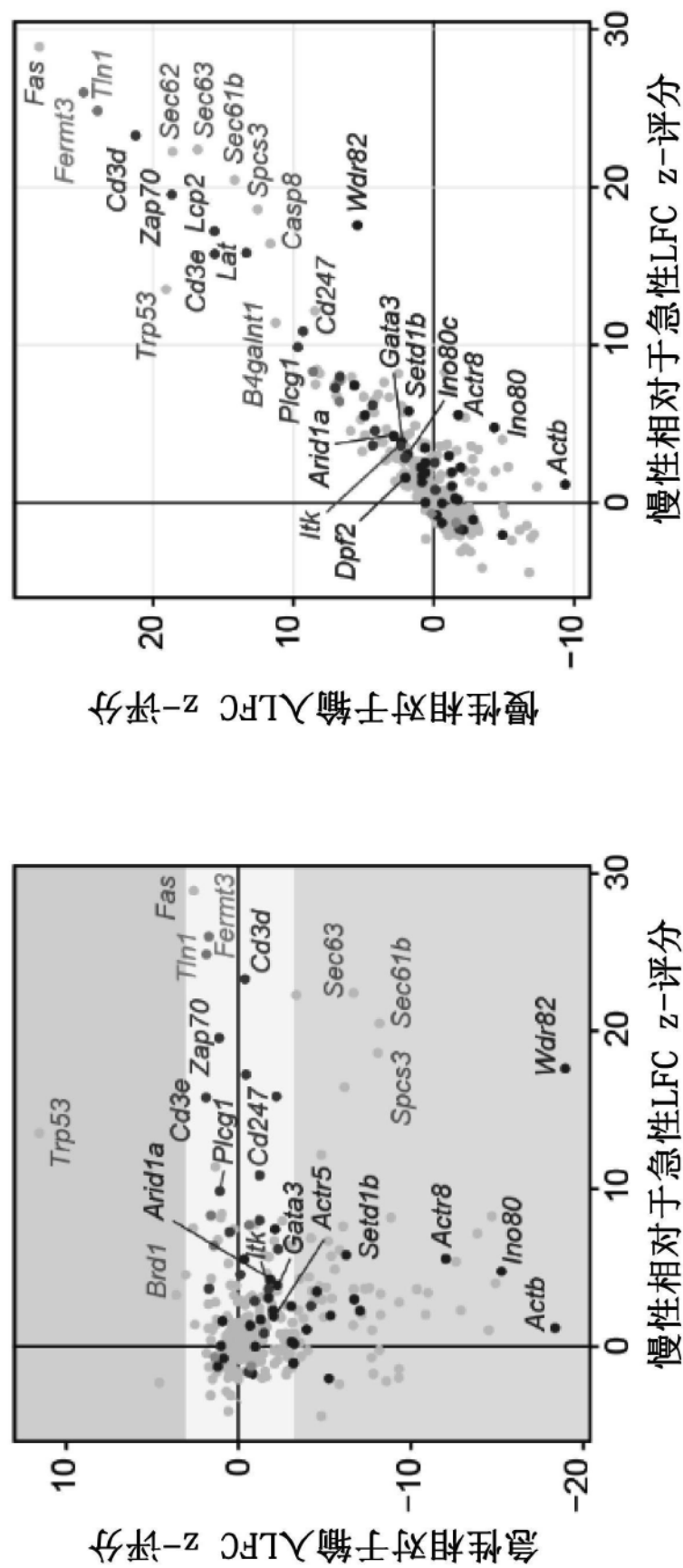


图11C

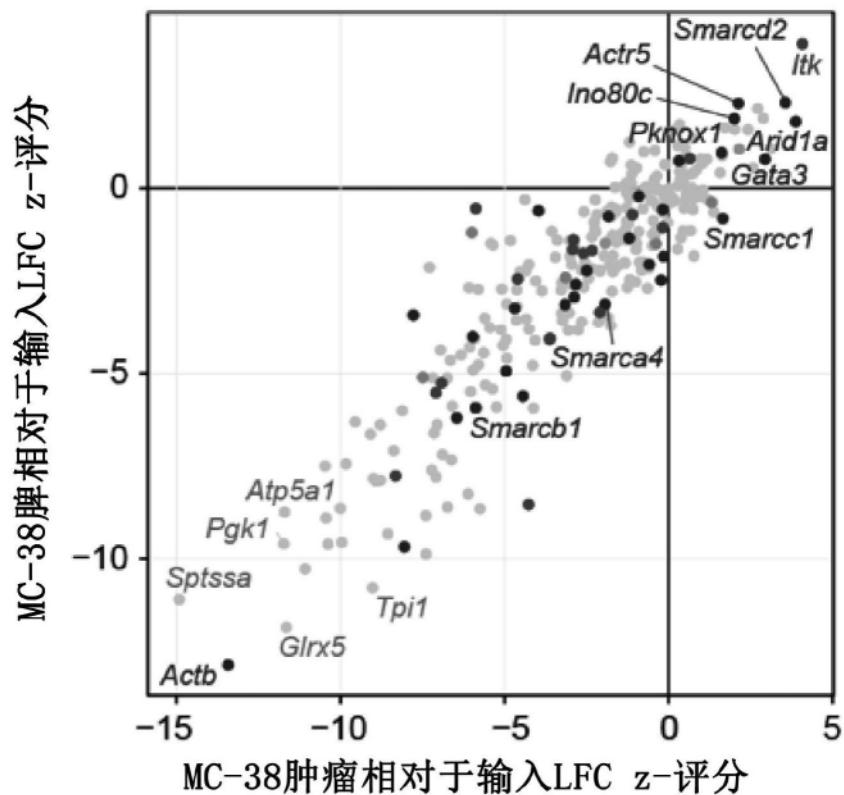


图12A

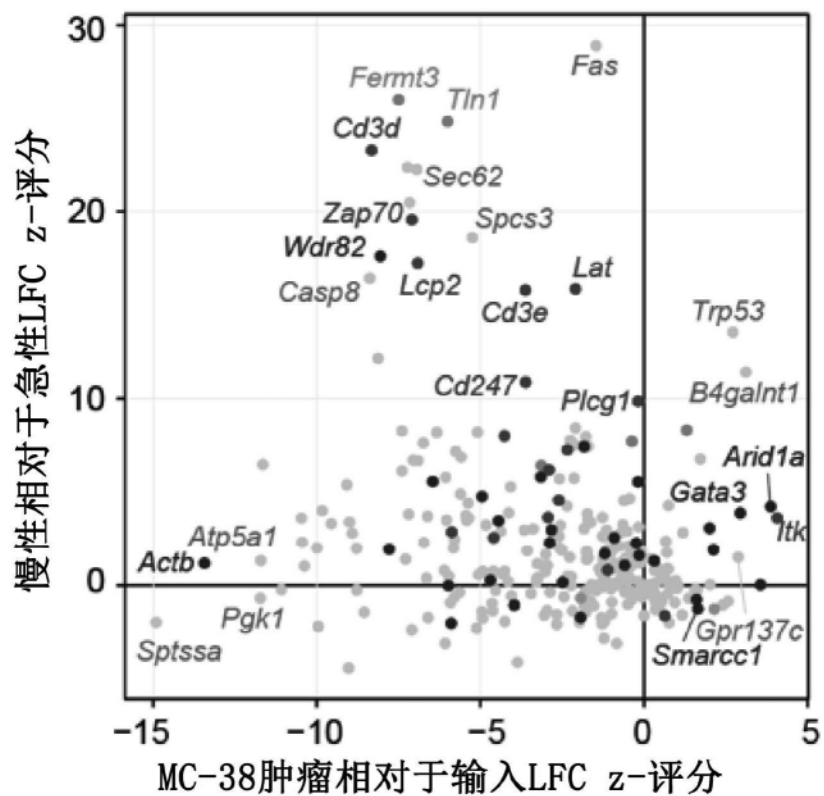


图12B

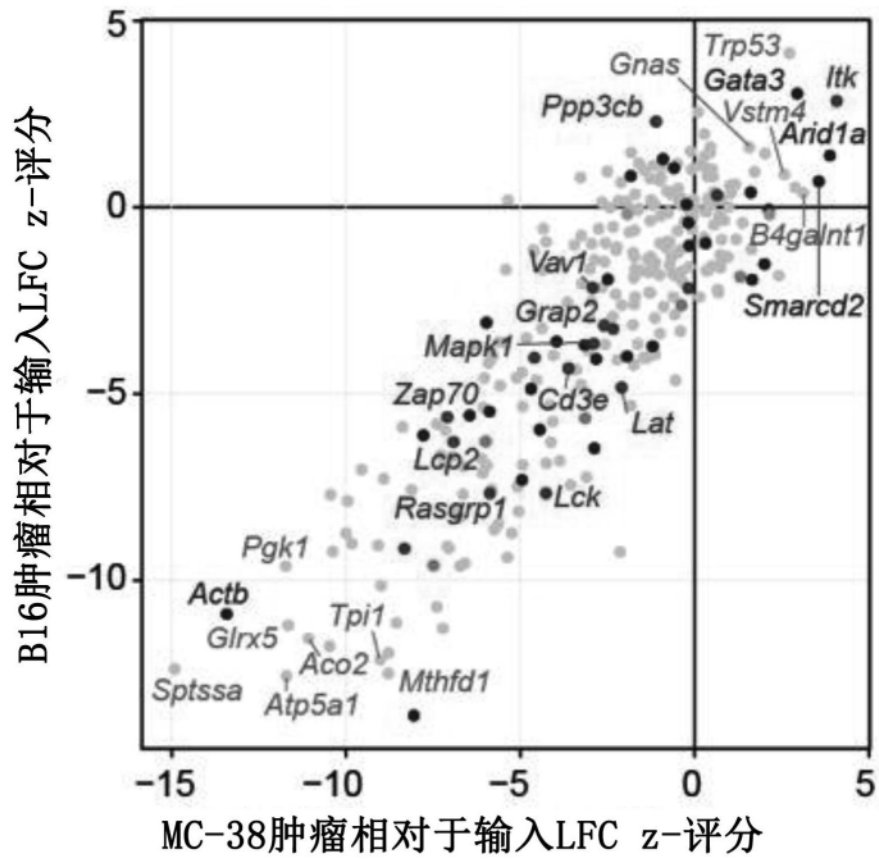


图12C

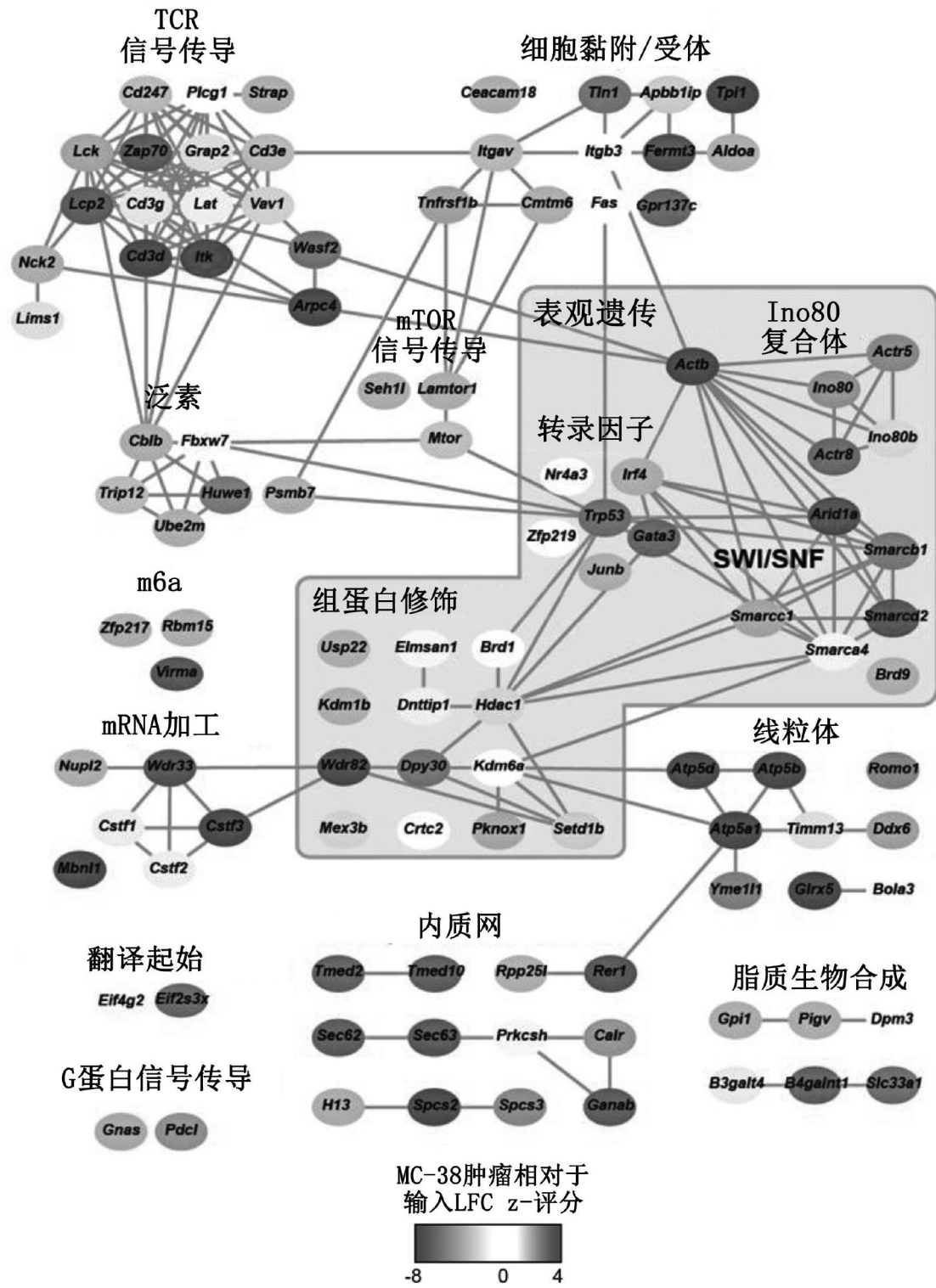


图12D

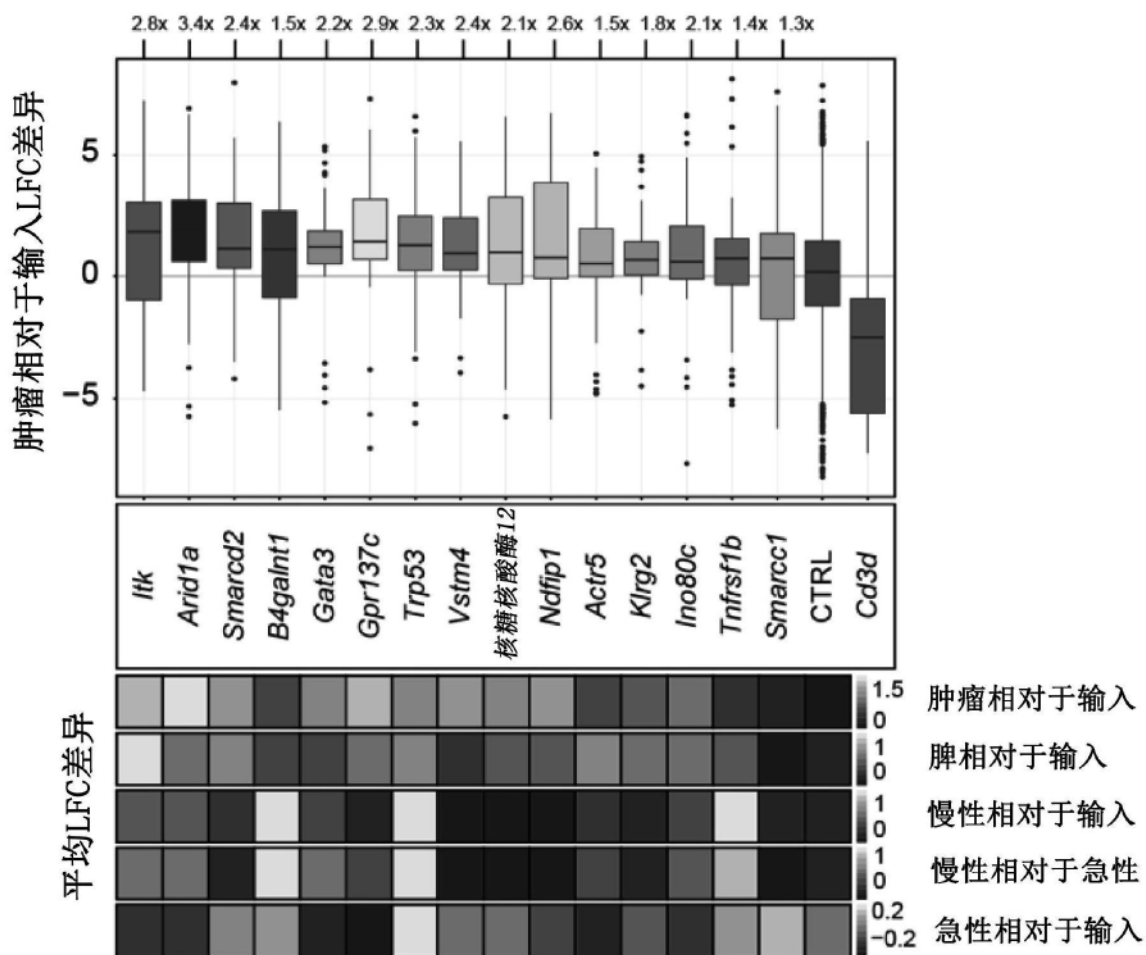


图12E

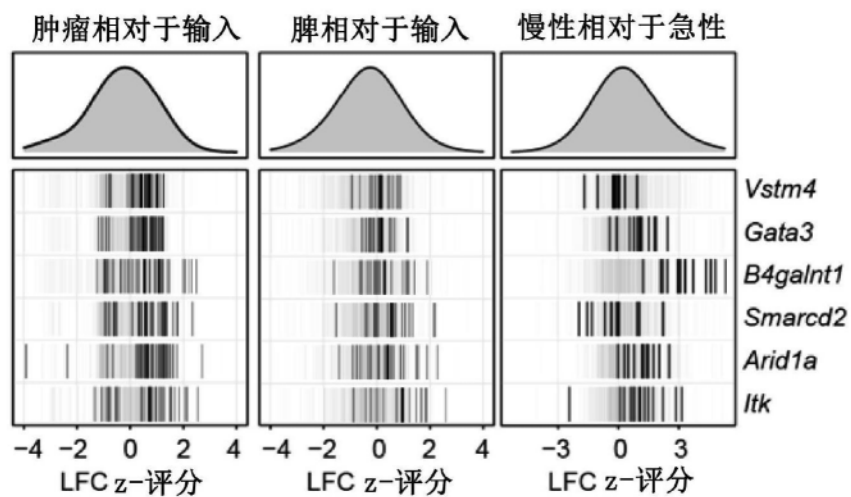


图12F

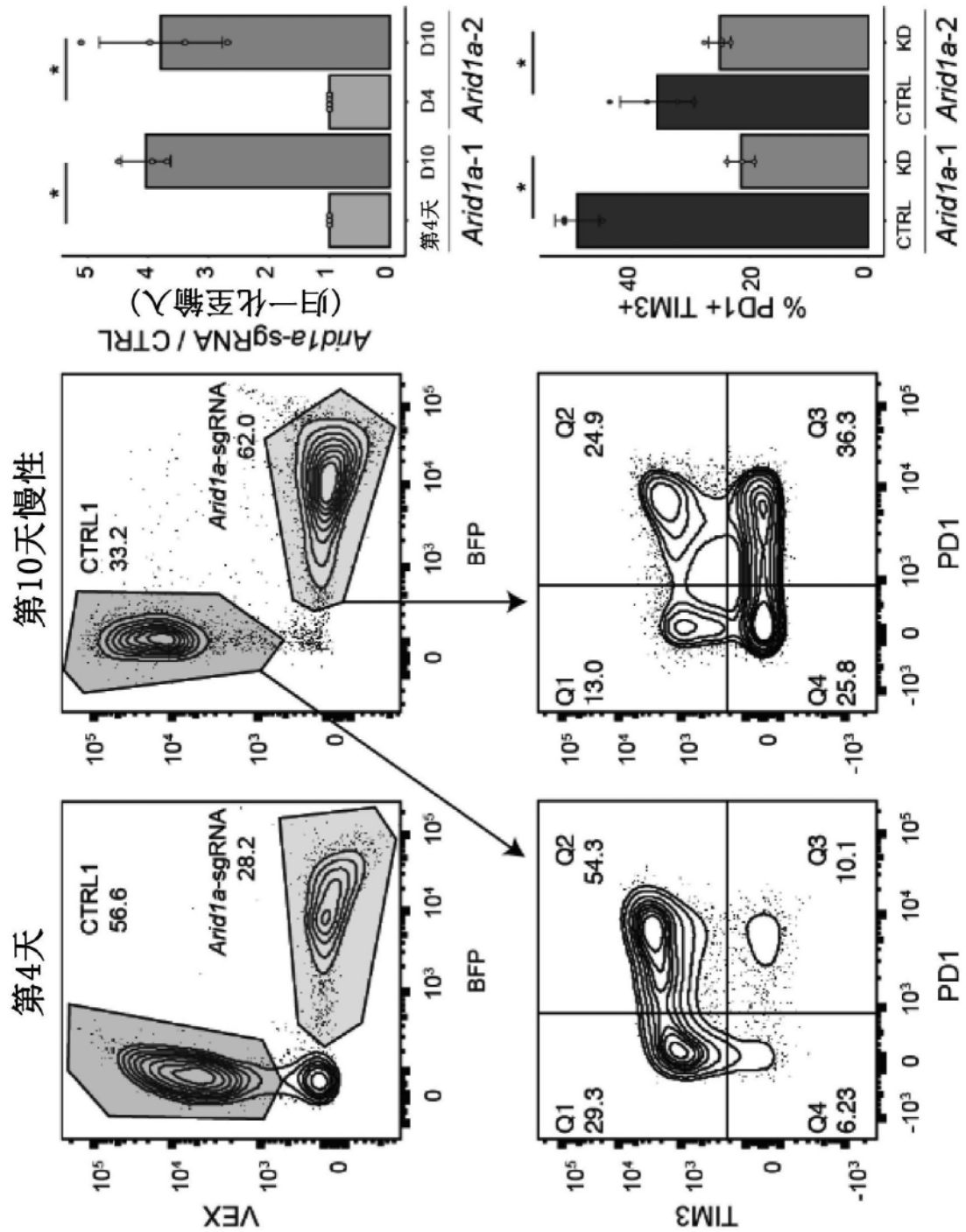


图13A

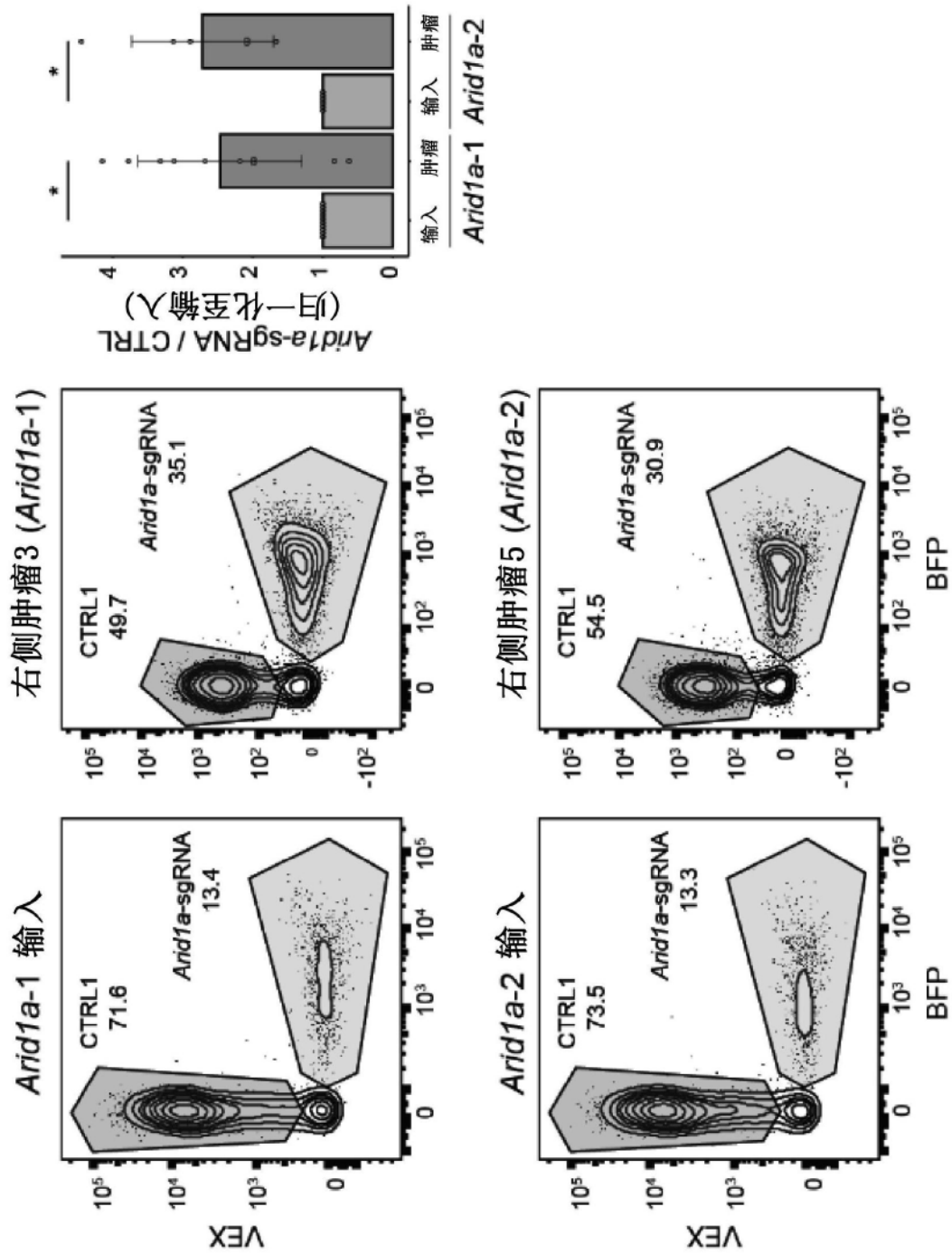


图13B

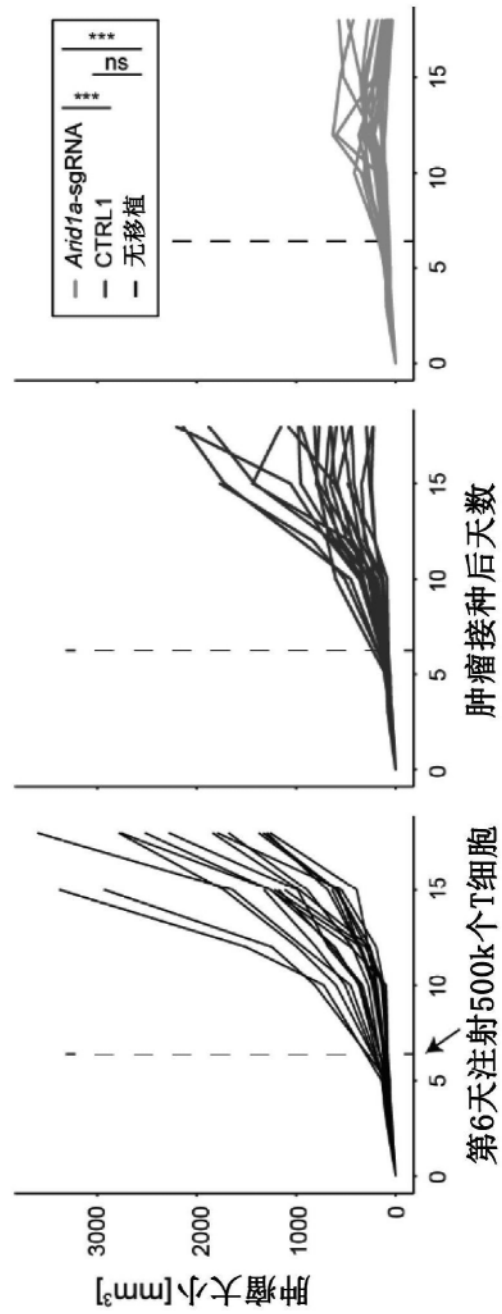


图13C

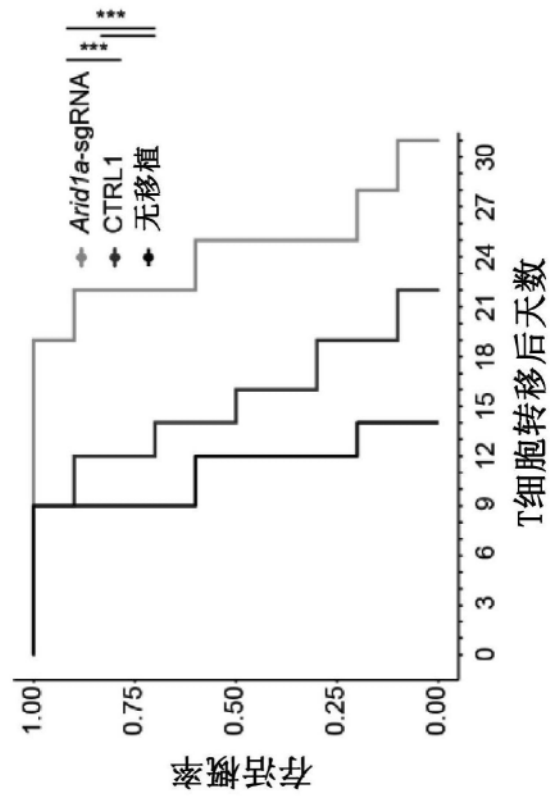


图13D

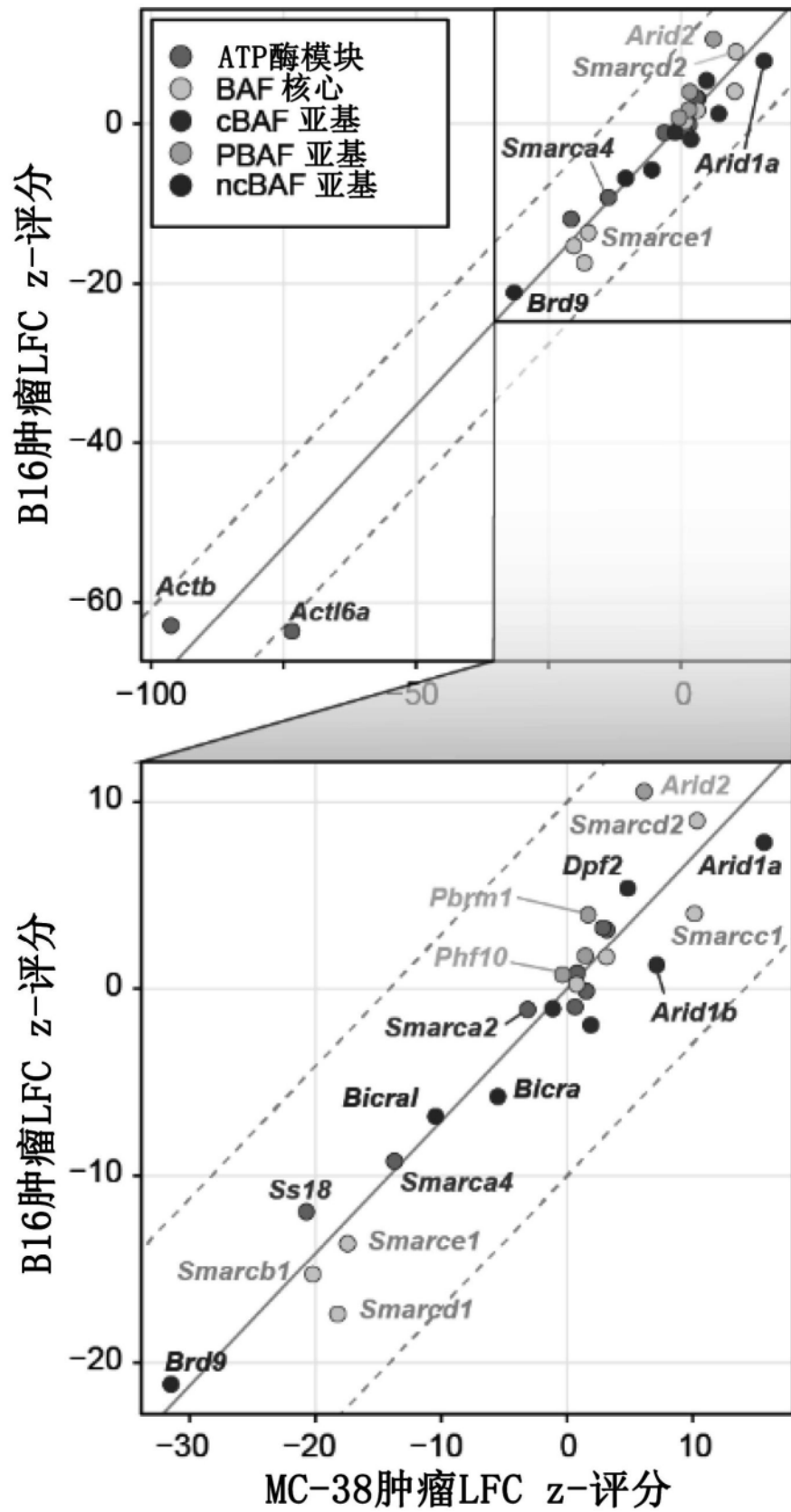


图13E

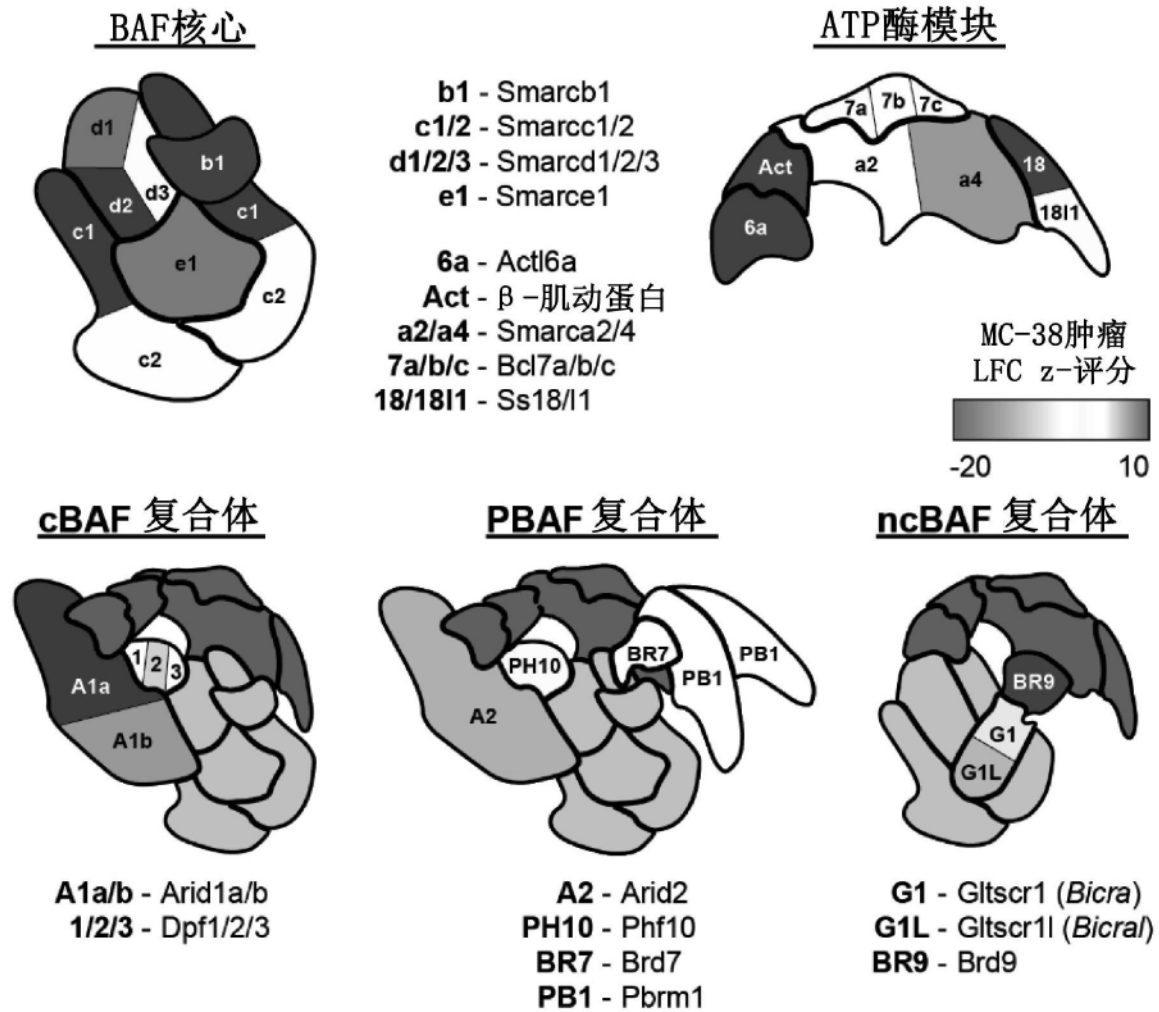


图13F

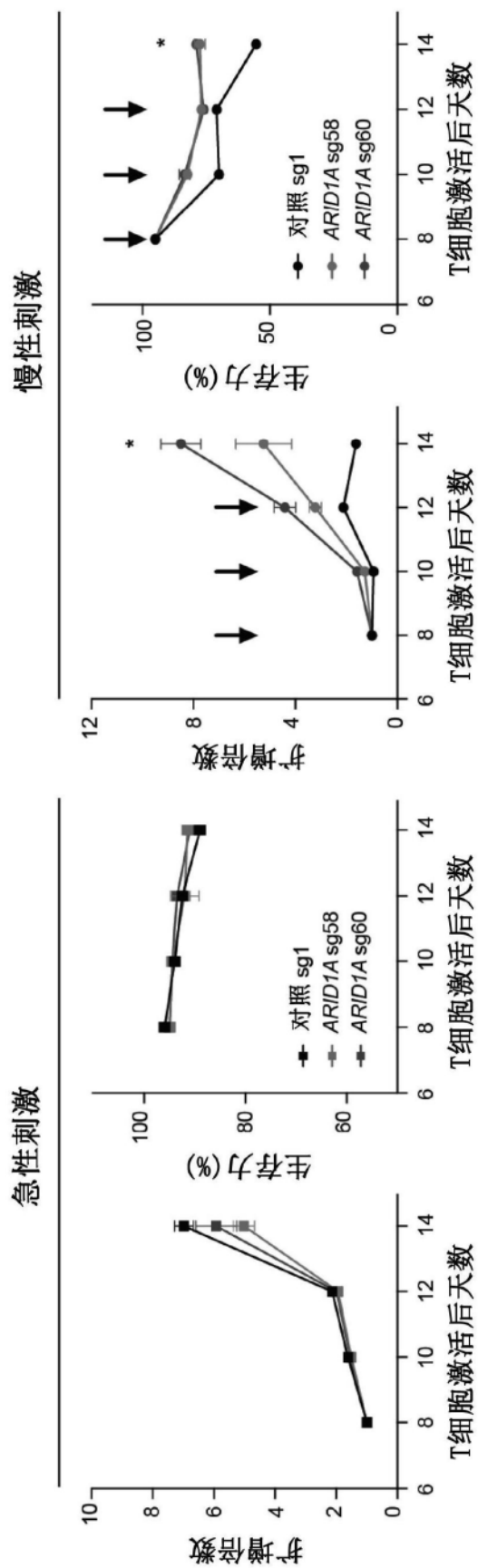


图14A

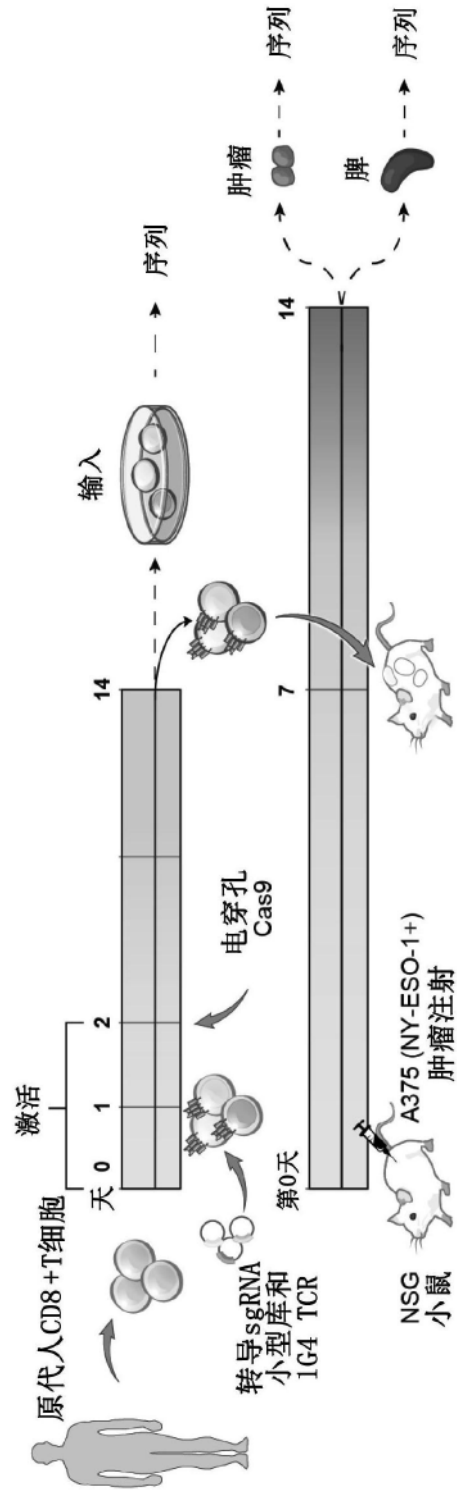


图14B

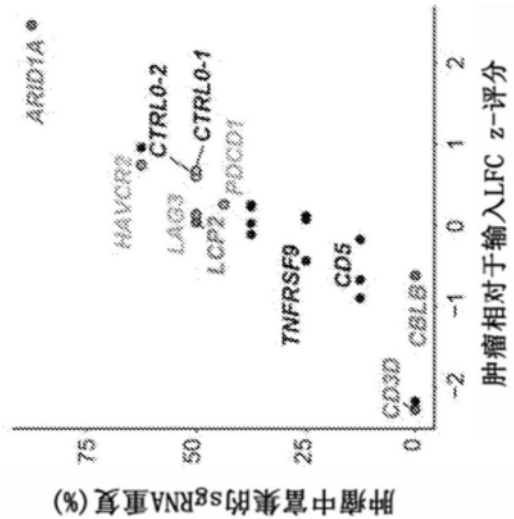


图14C

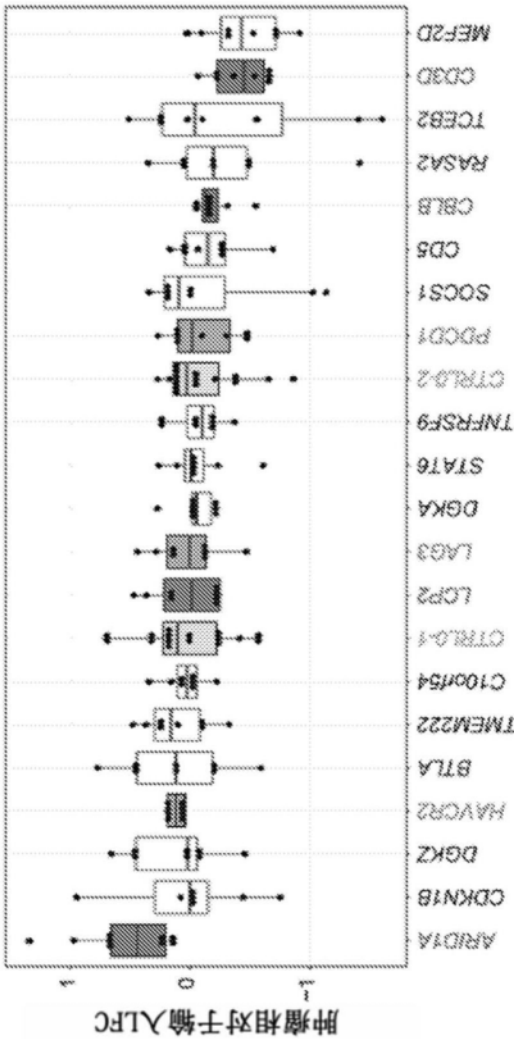


图14D

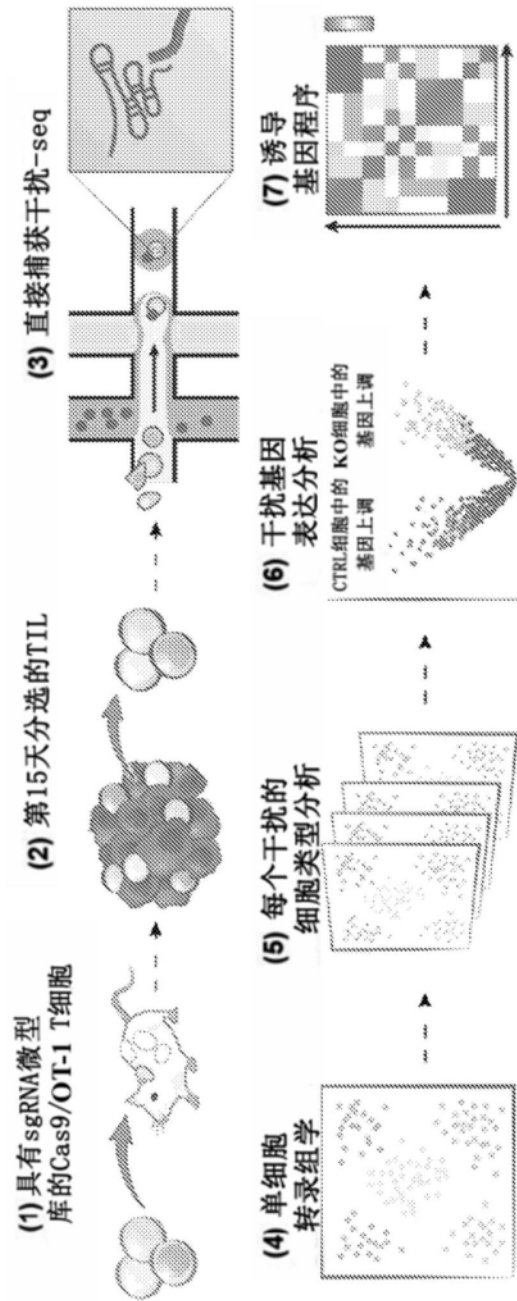


图15A

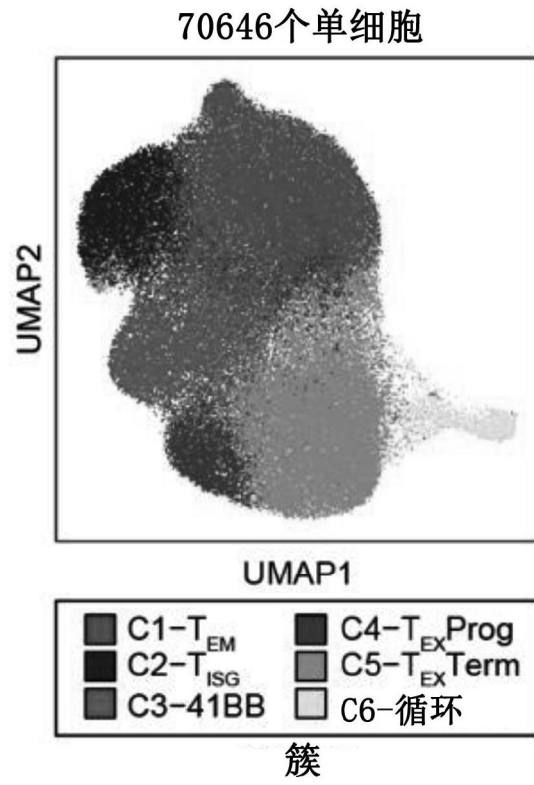


图15B

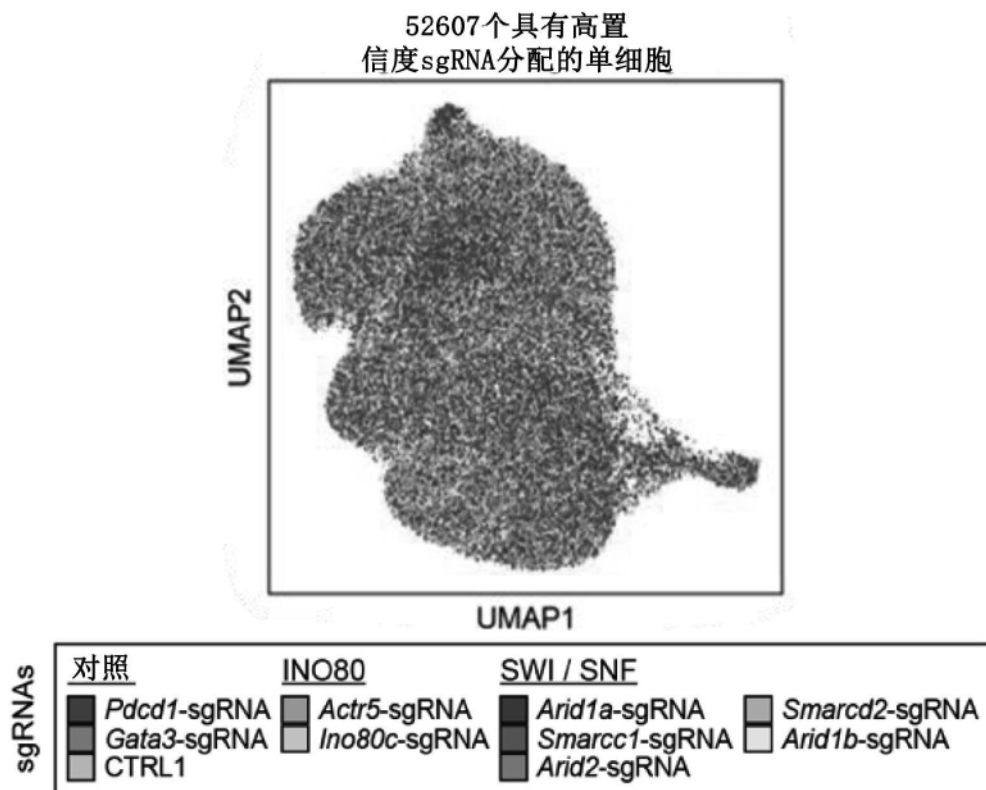


图15C

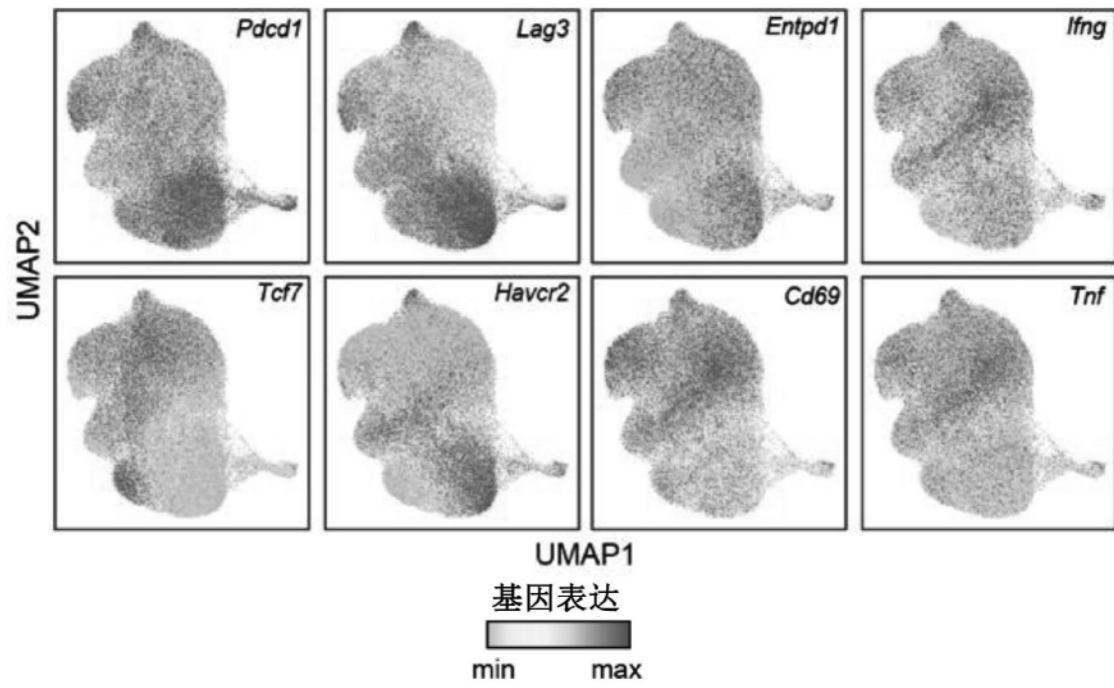


图15D

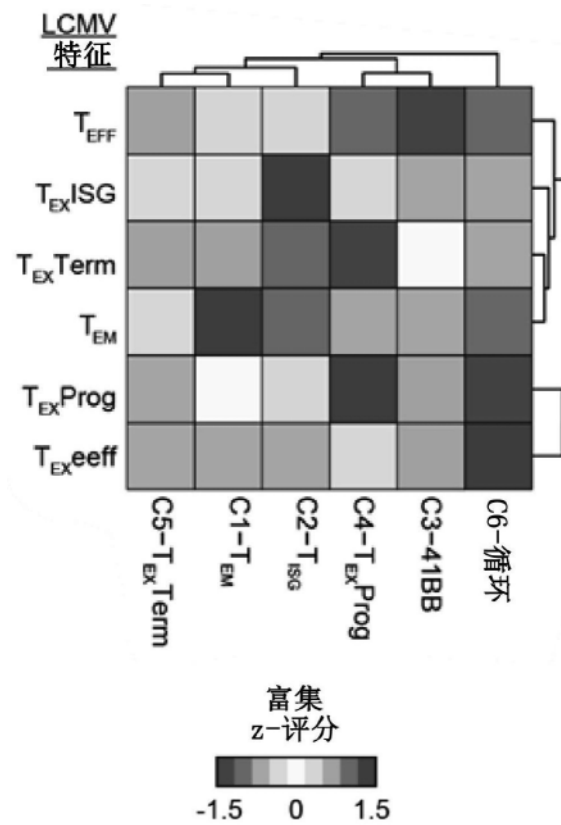


图15E

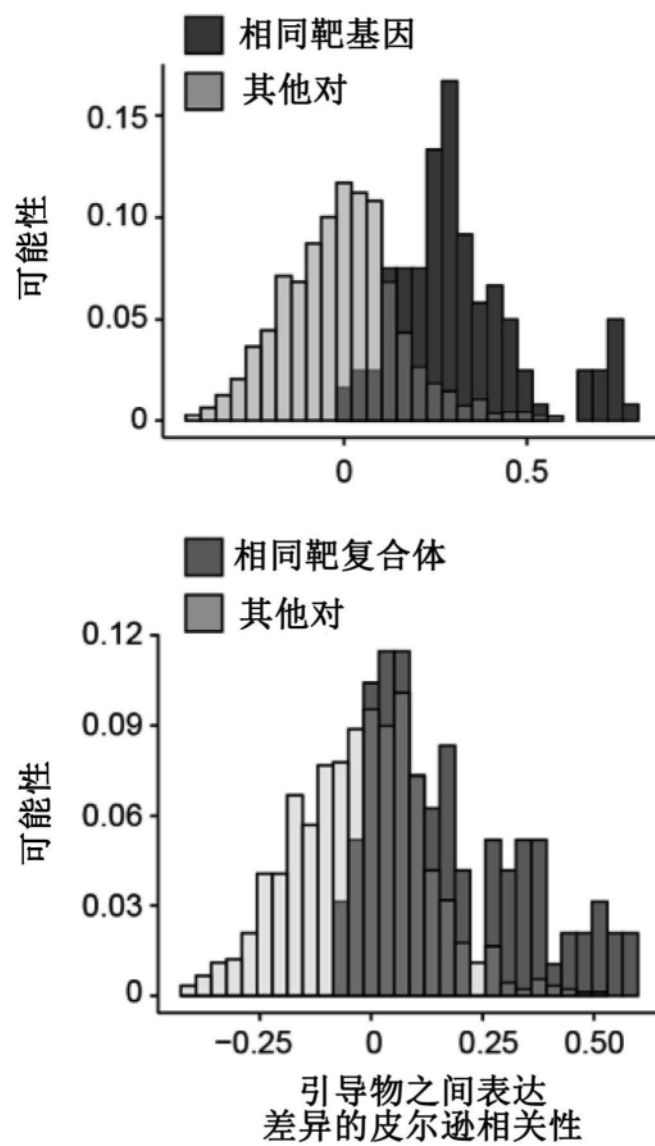


图15F

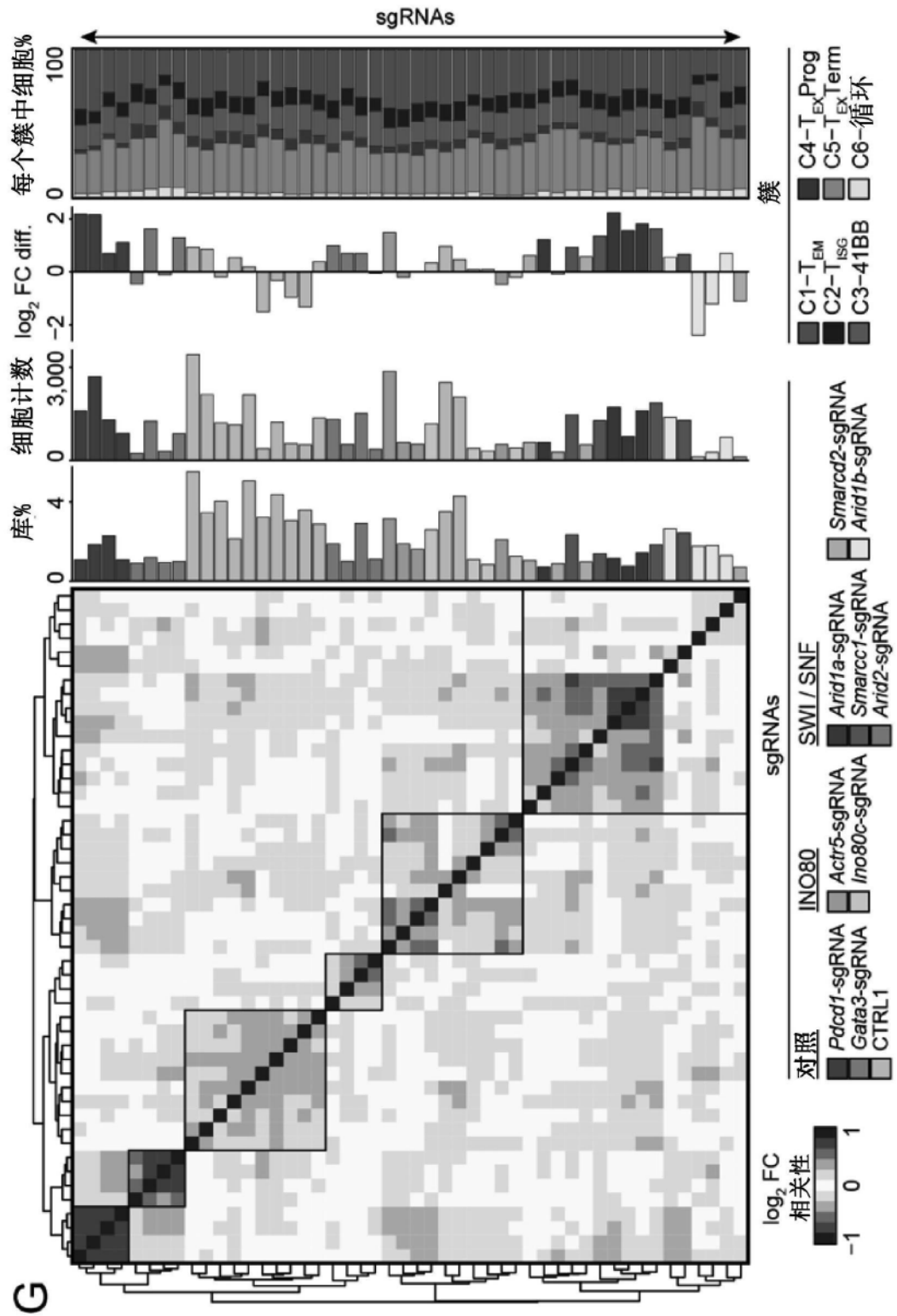


图15G

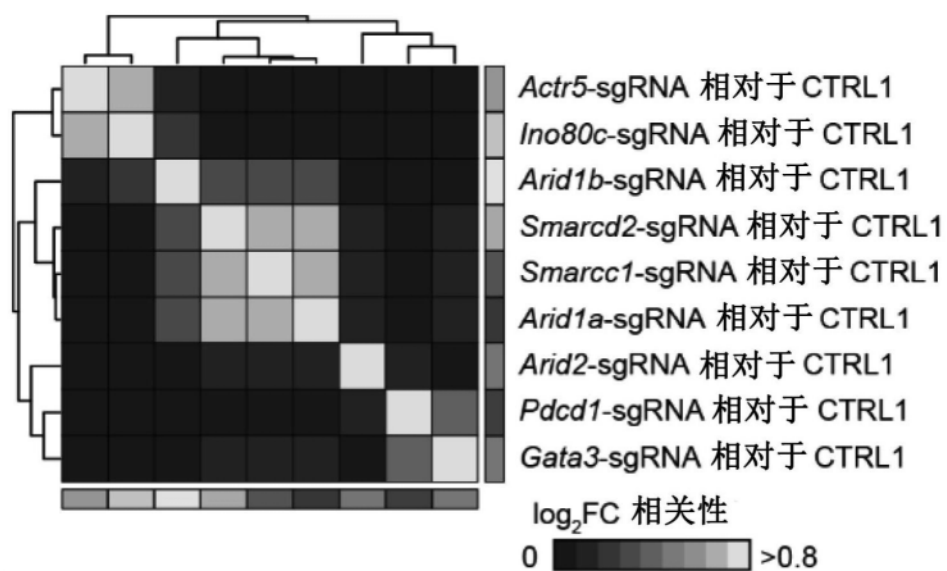


图16B

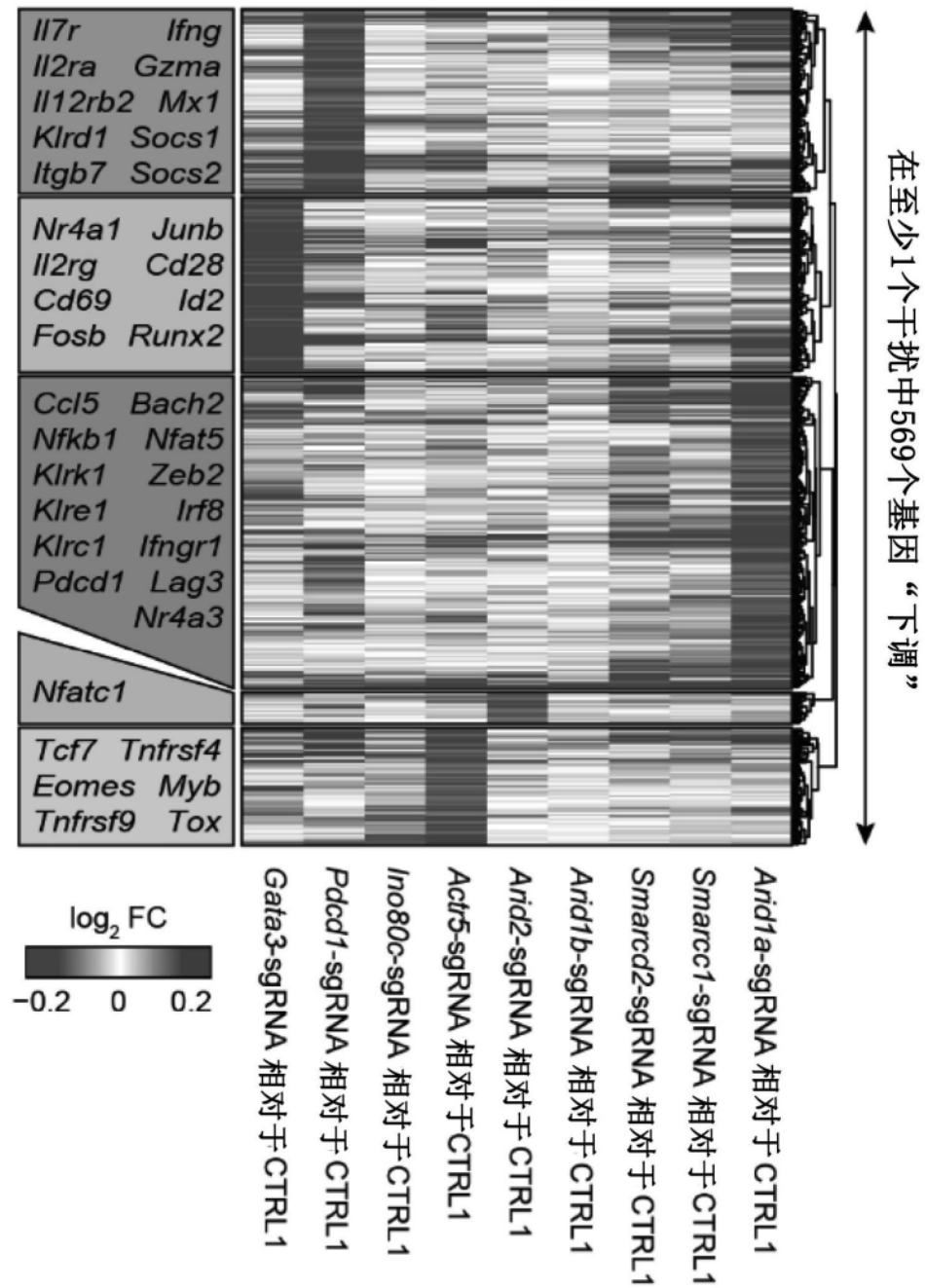


图16C

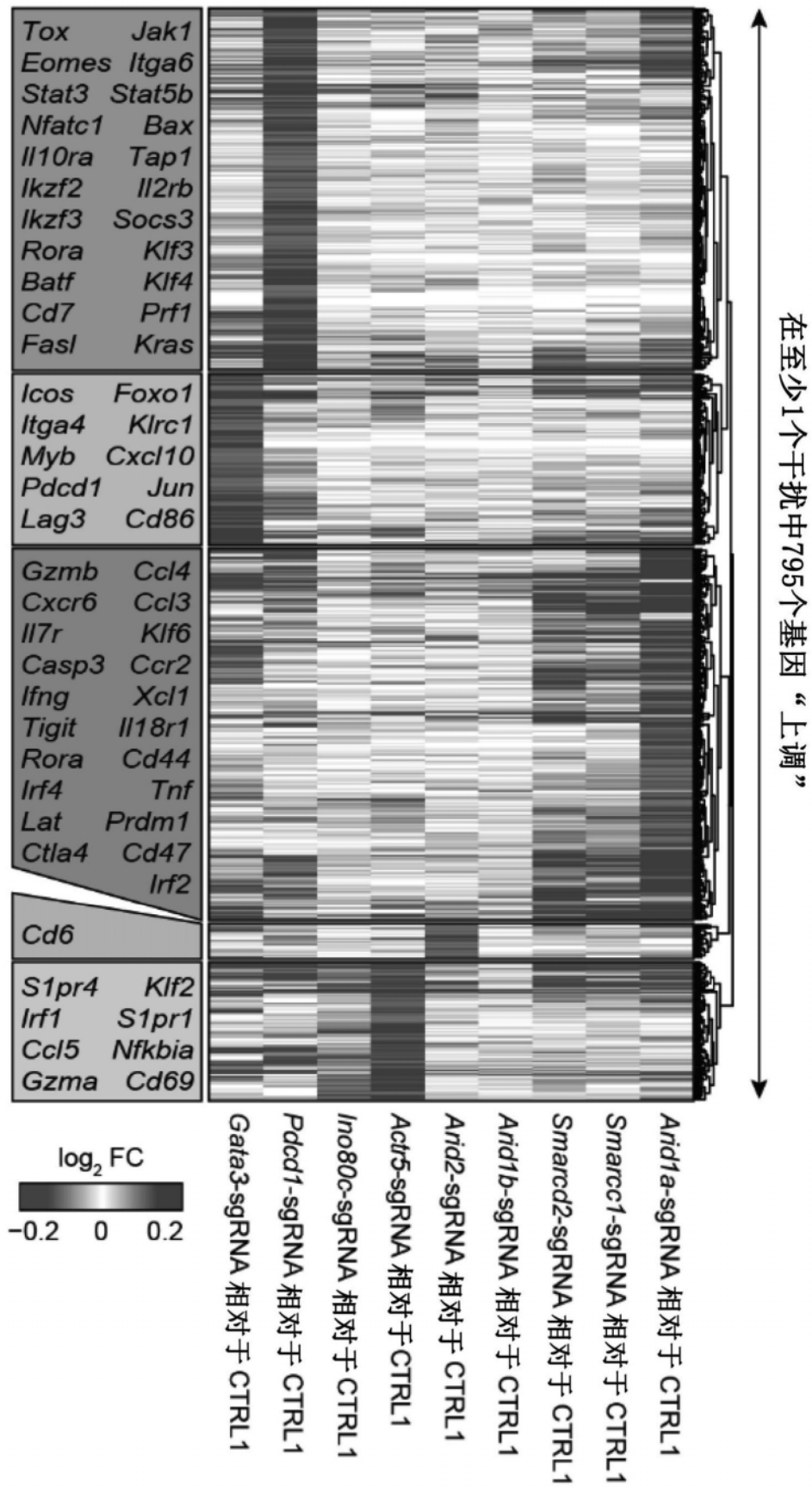


图16C续

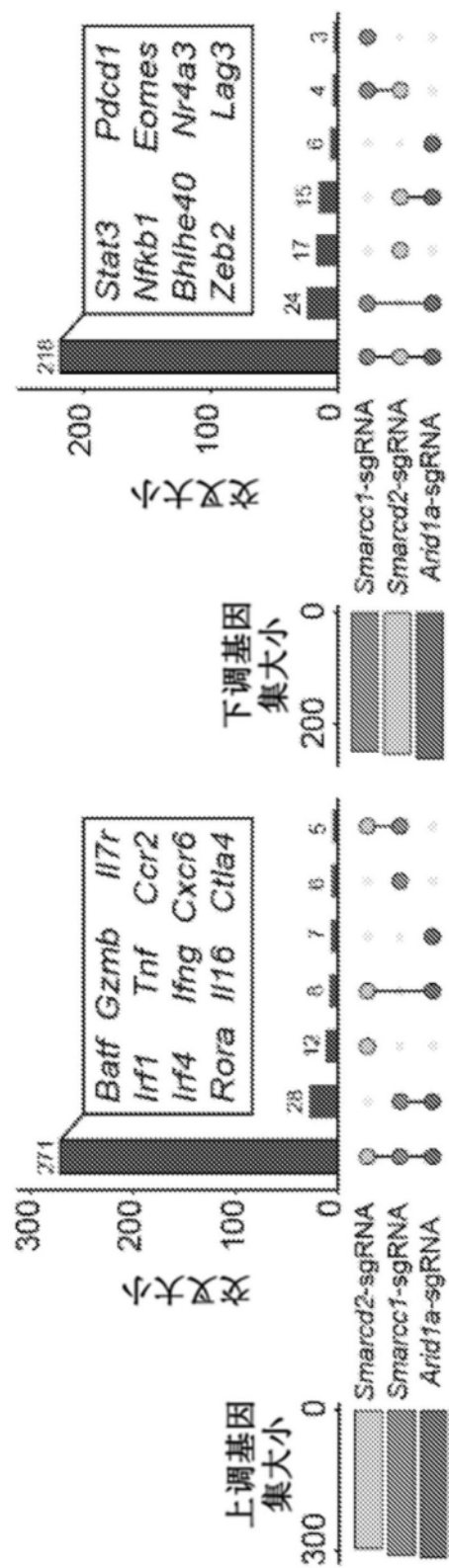


图16D

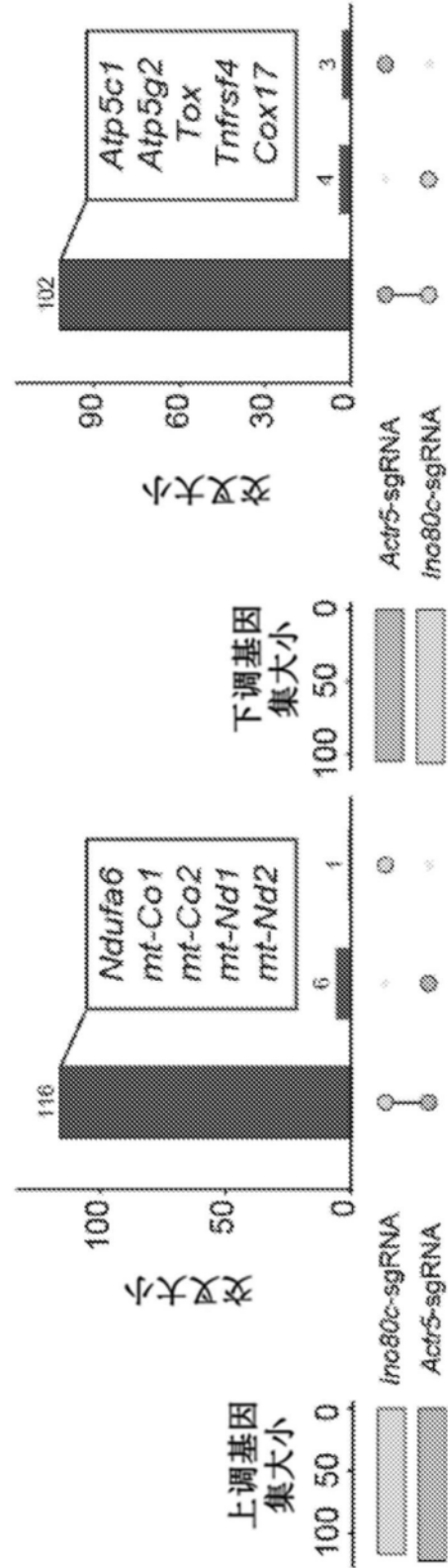


图16E

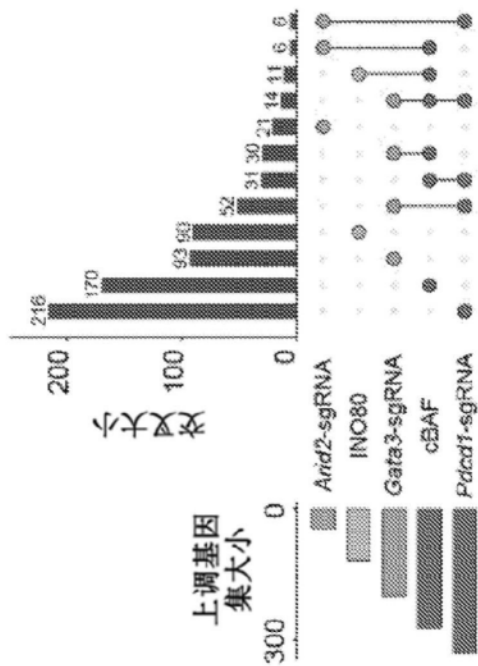


图16F

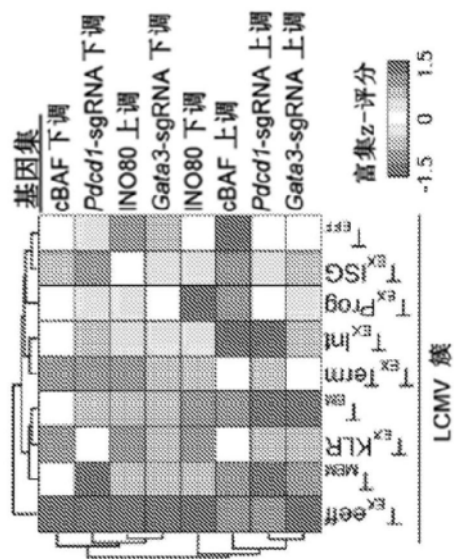


图16G

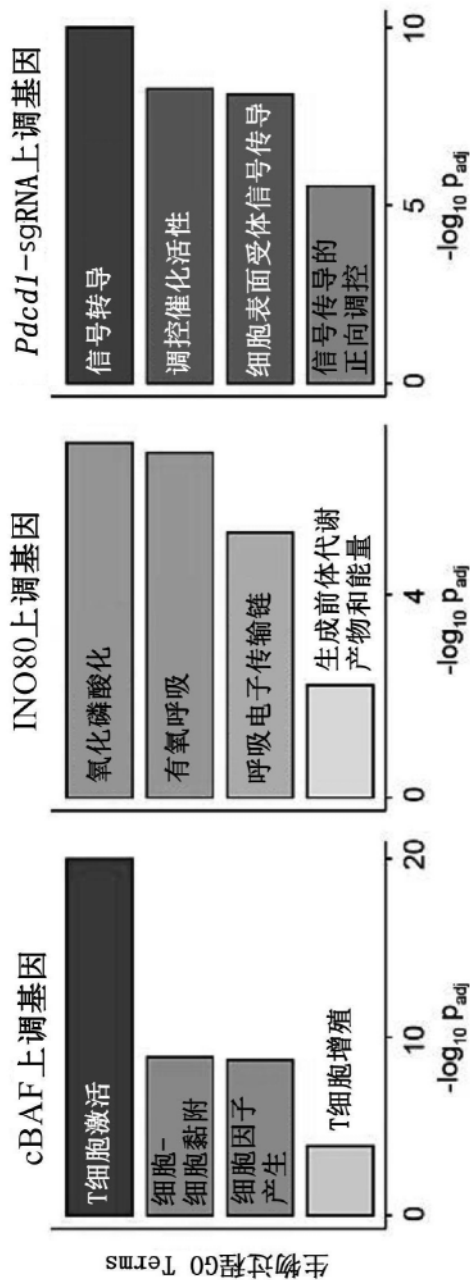


图16H

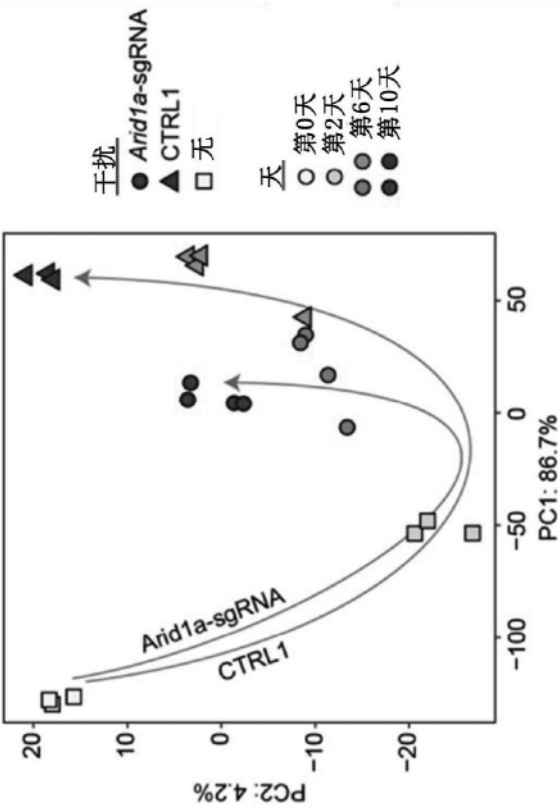


图17A

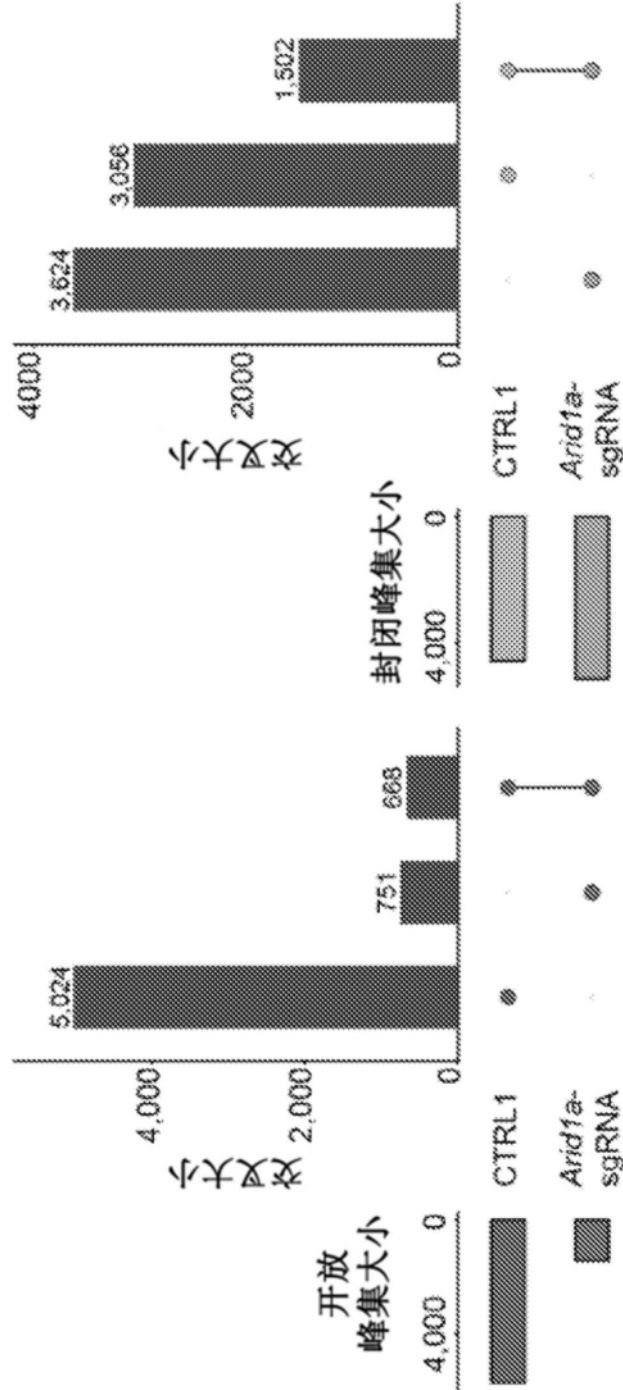


图17B



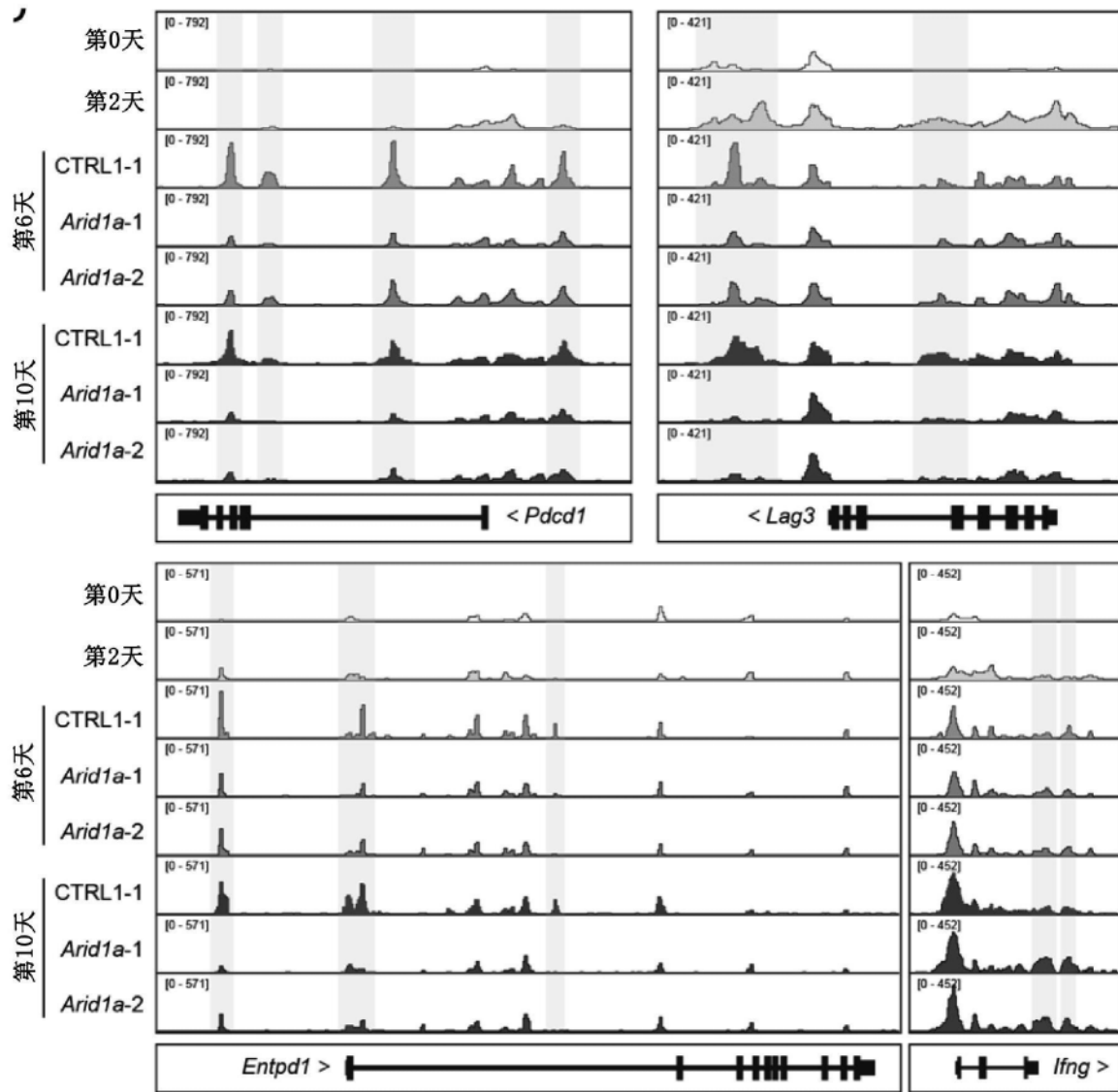


图17D

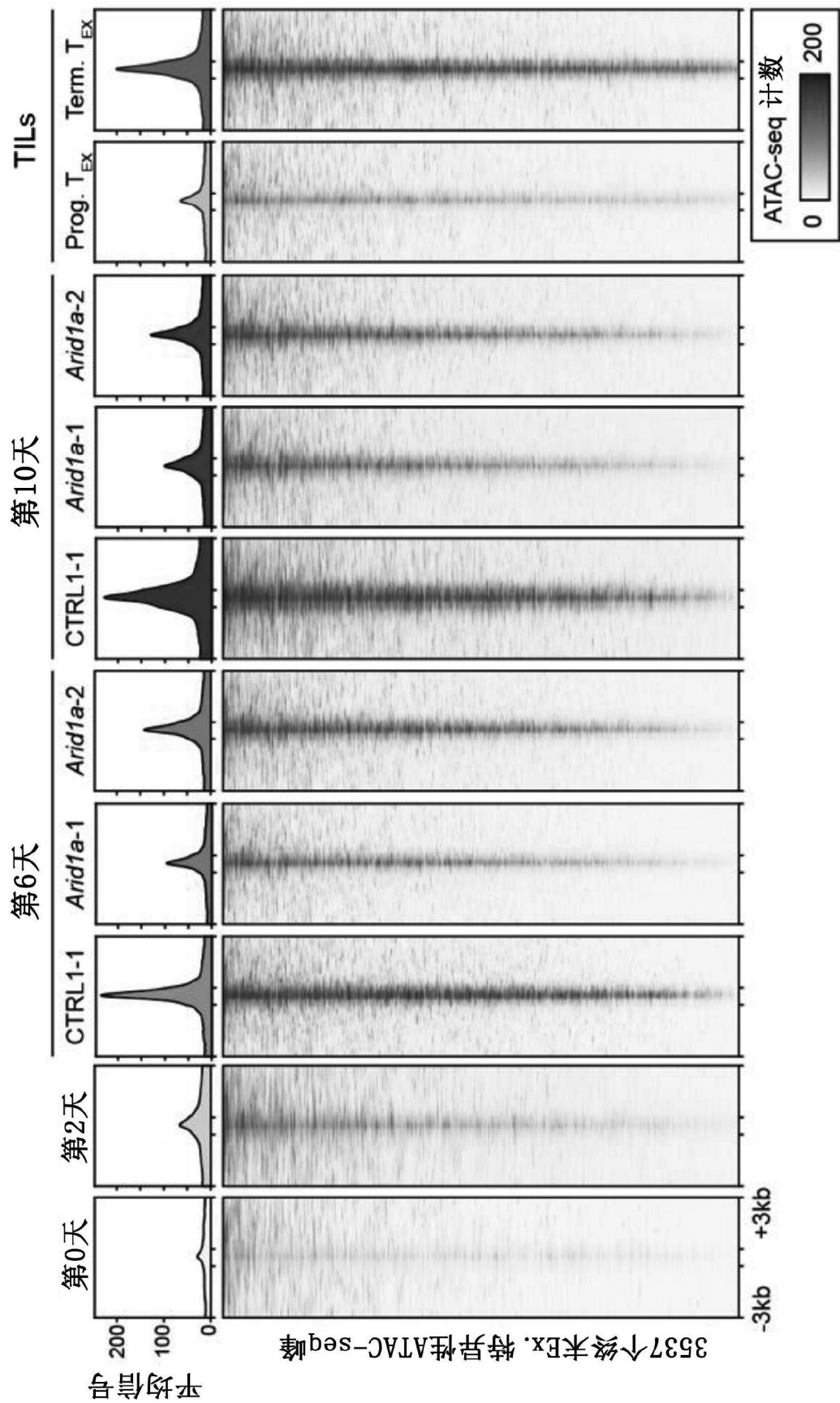


图17E

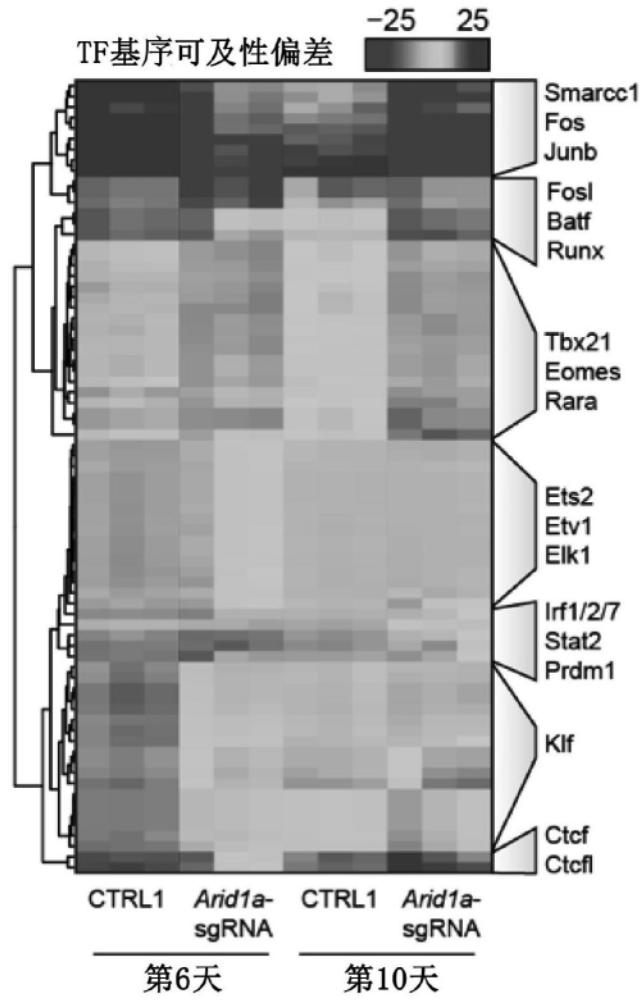


图17F

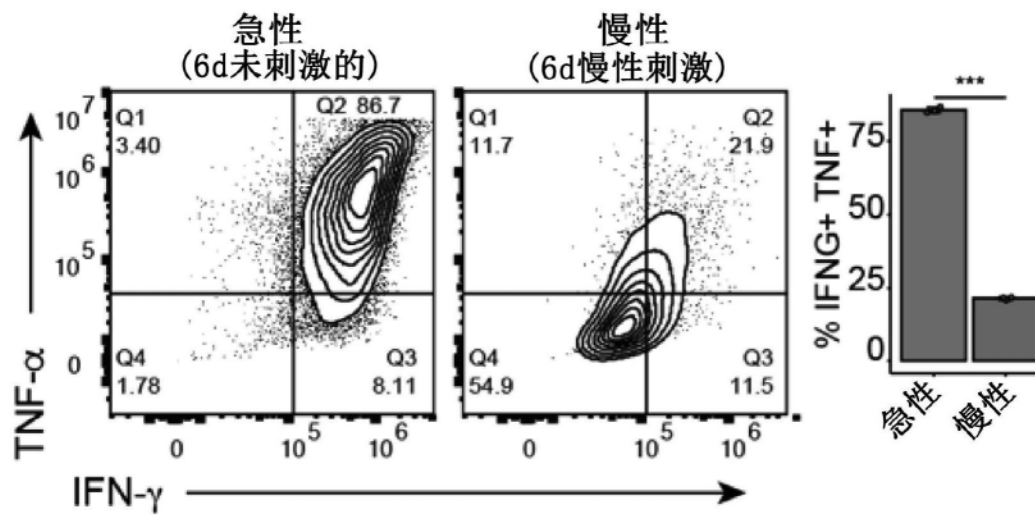


图18A

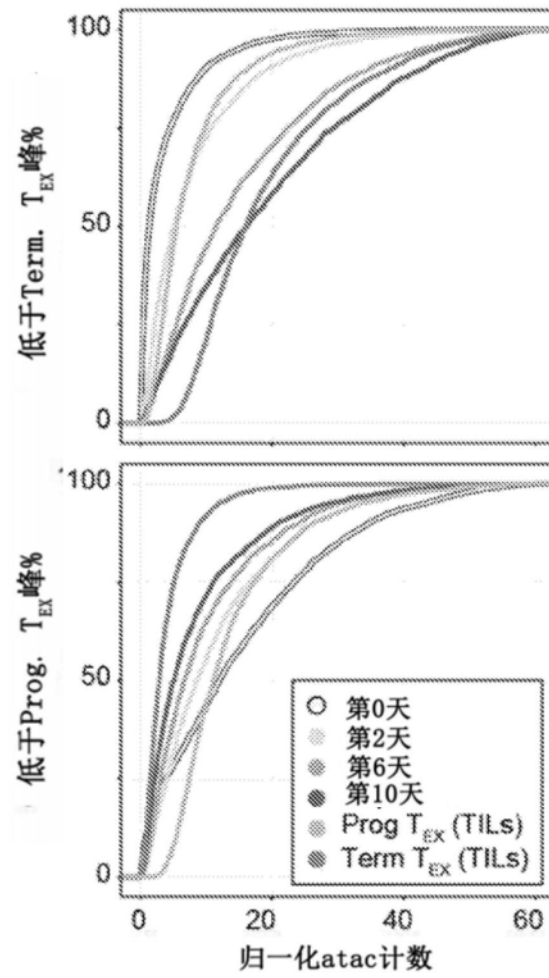


图18B

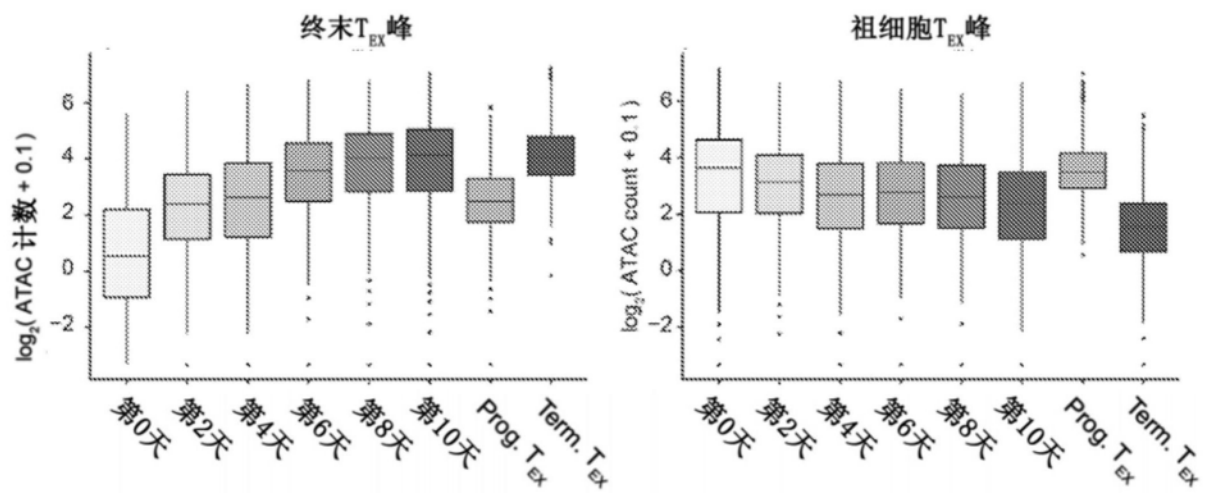


图18C

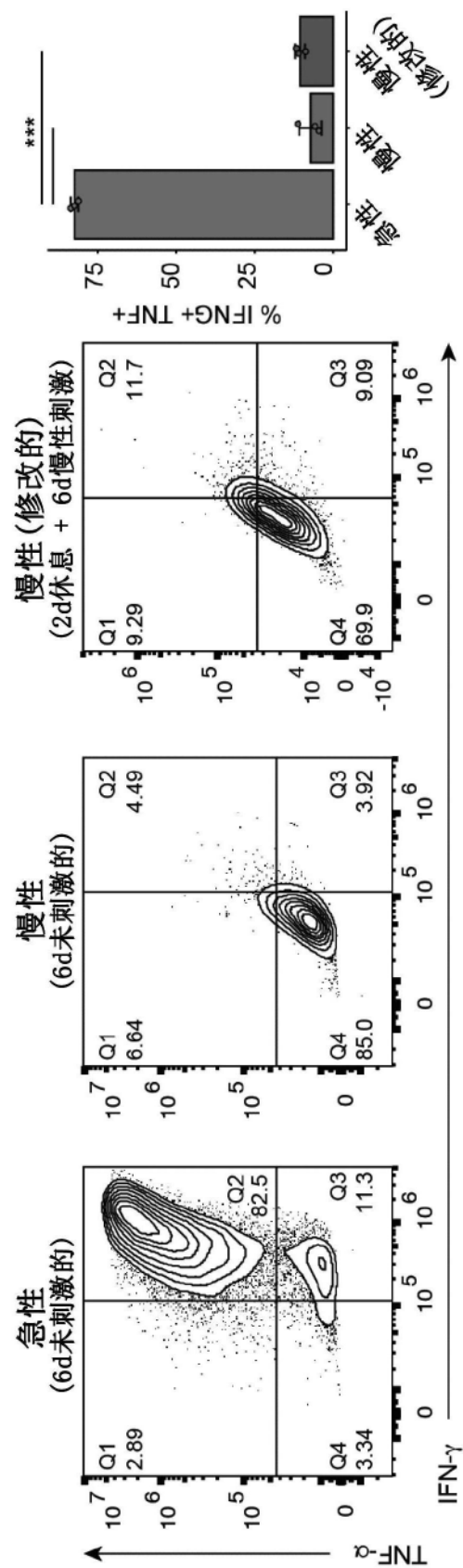


图19A

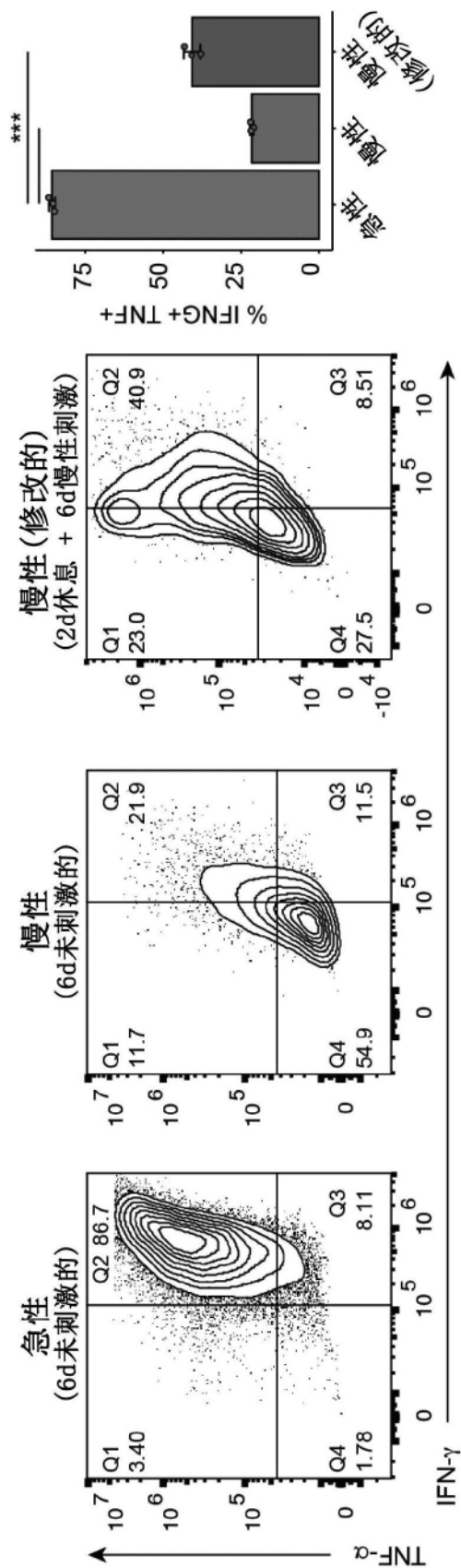


图19B

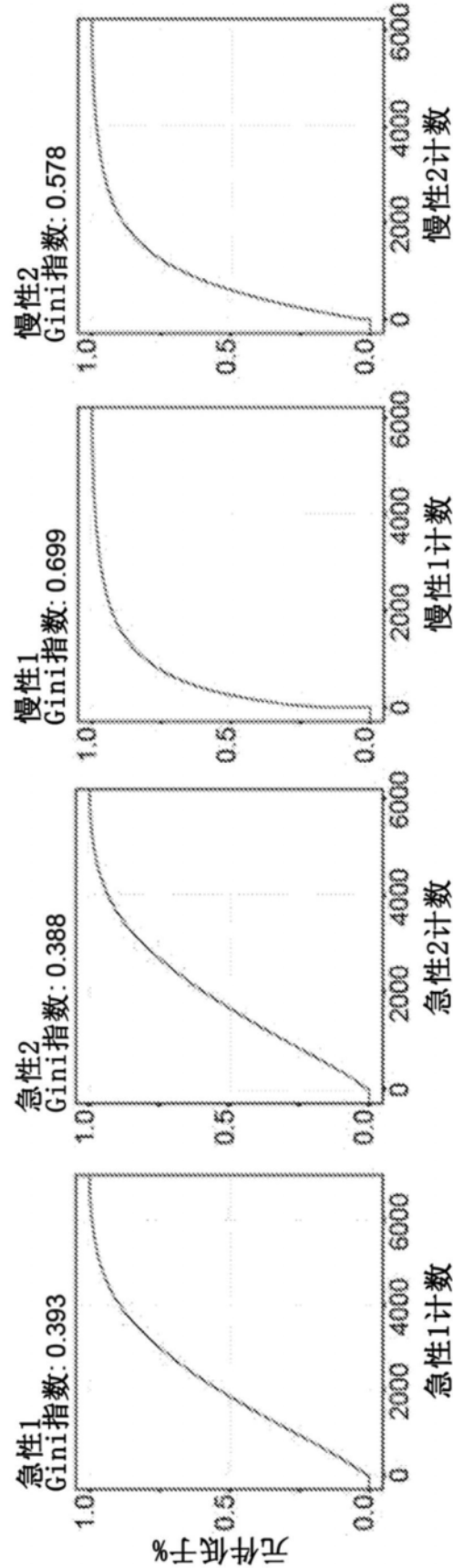


图19C

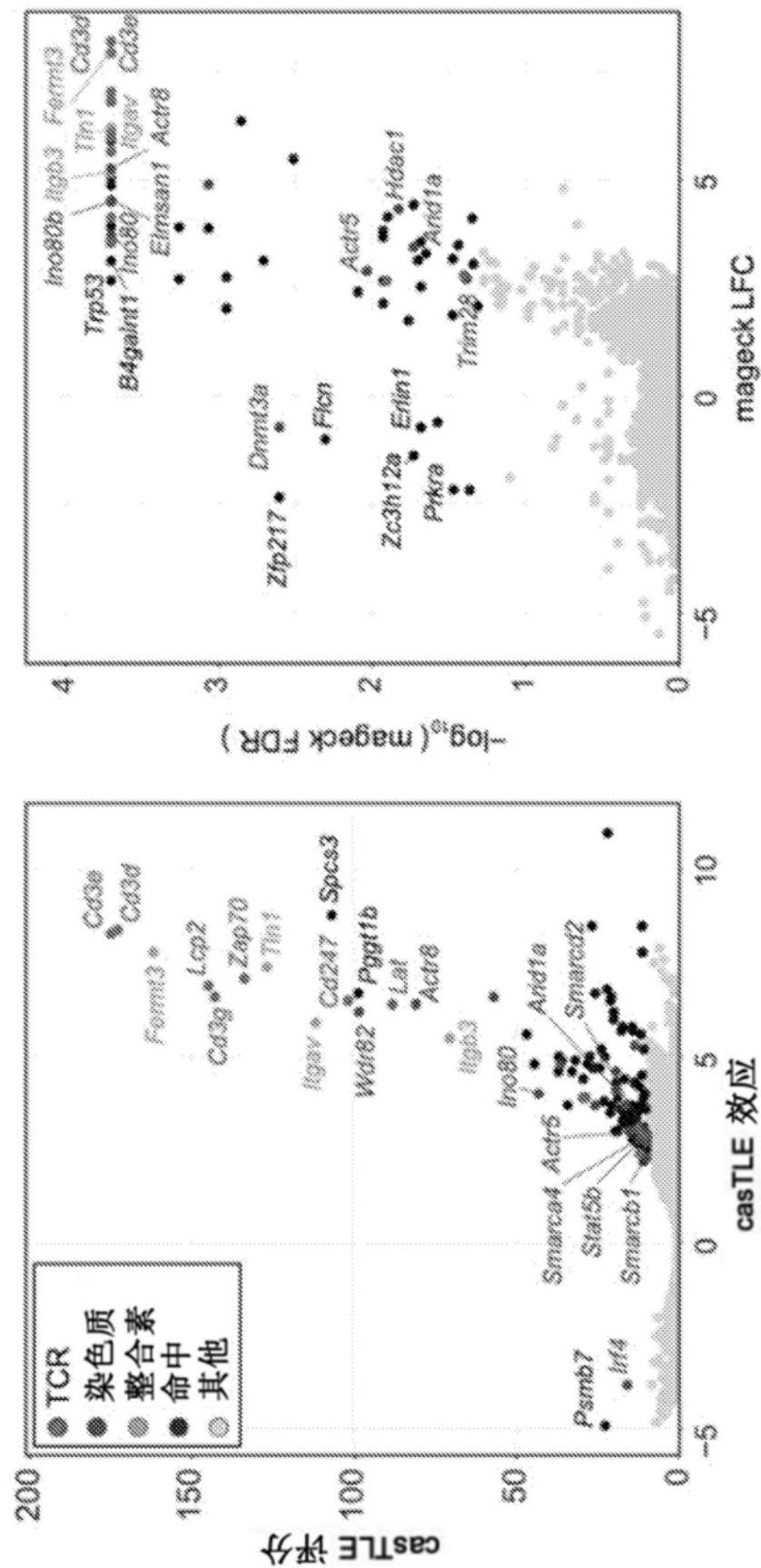


图20A

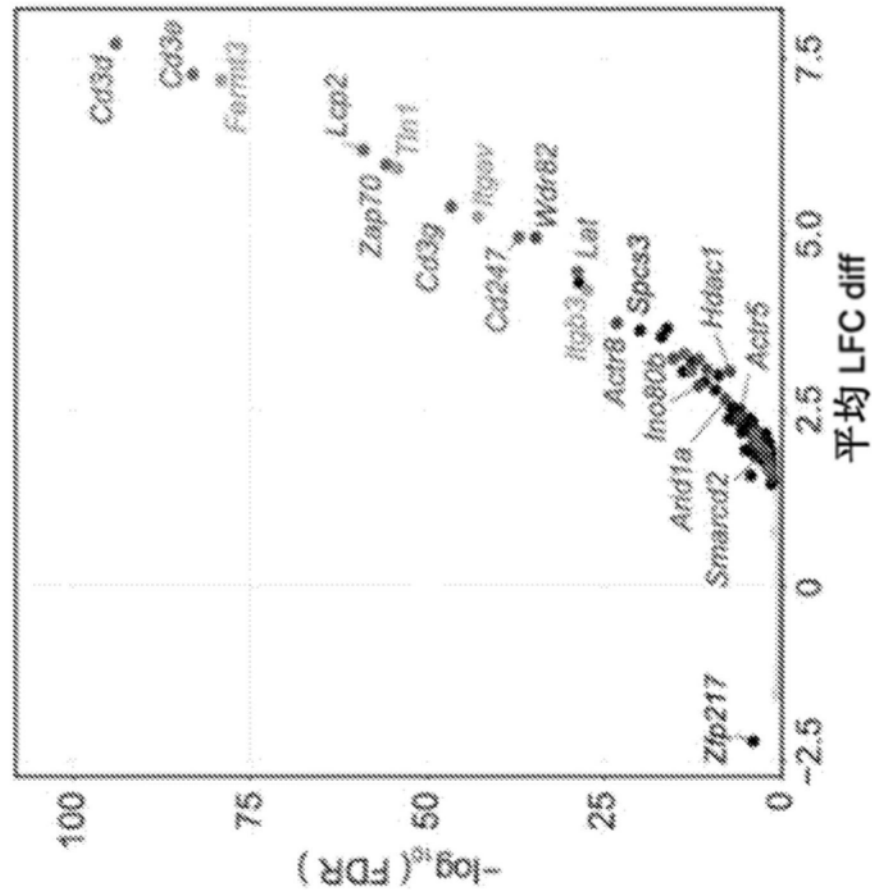


图20A续

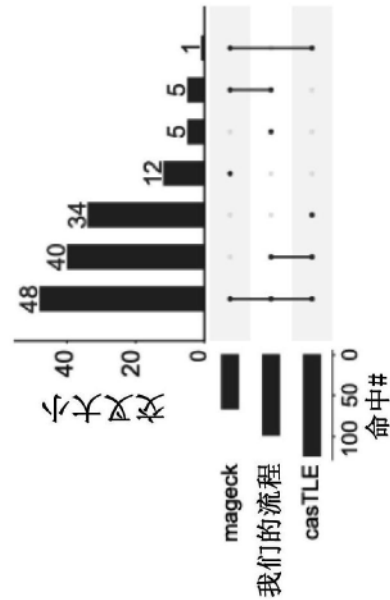


图20B

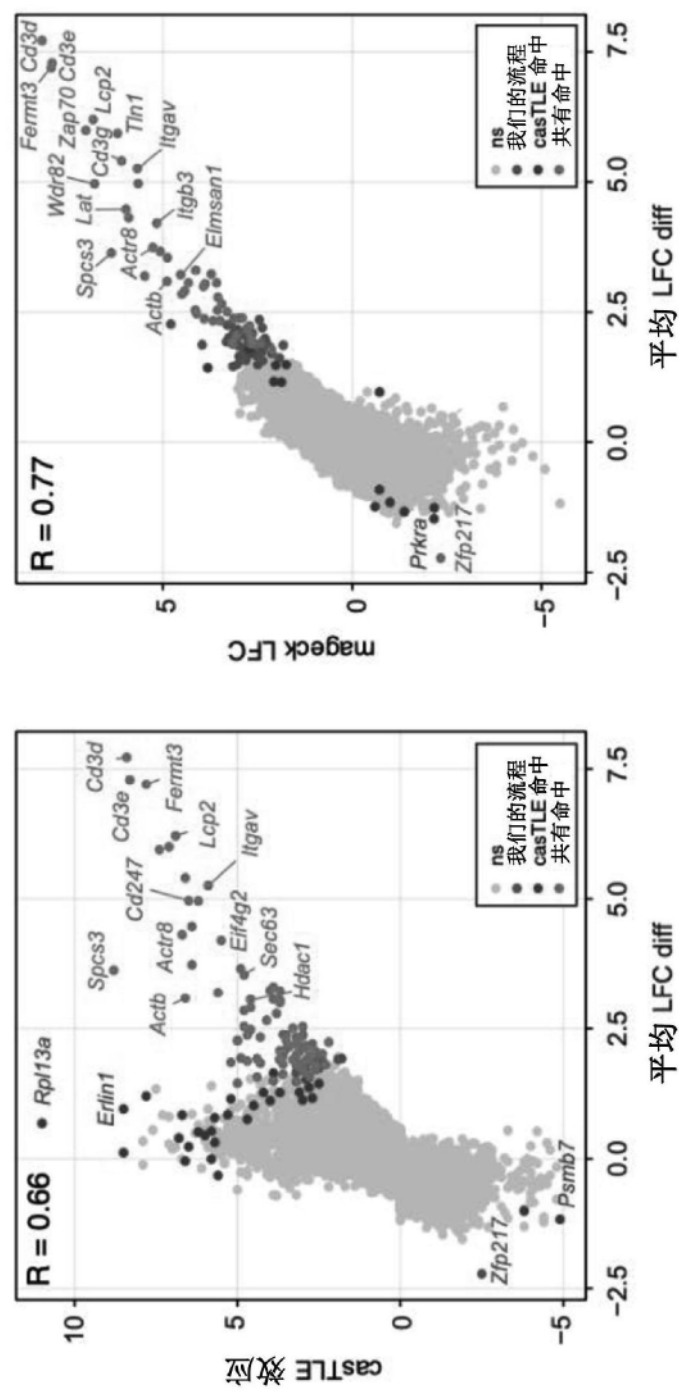


图20C

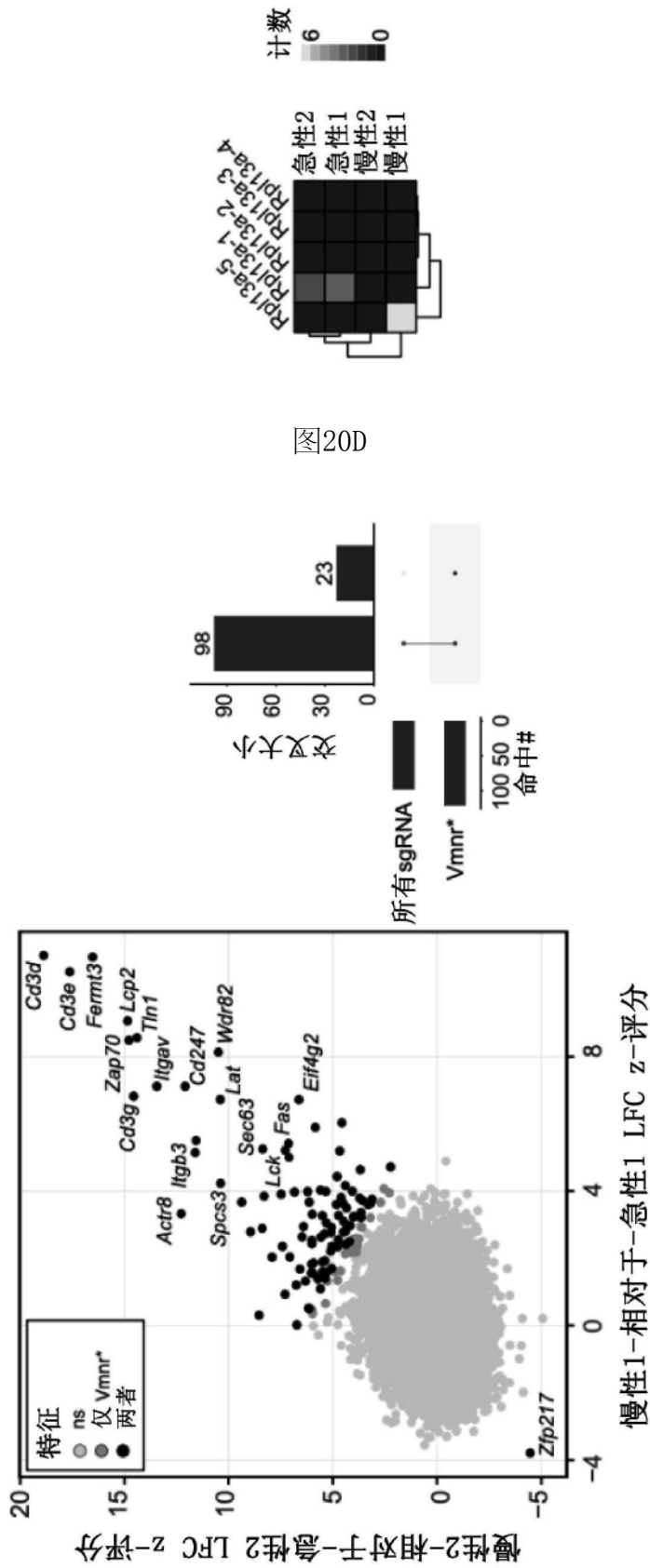


图20E

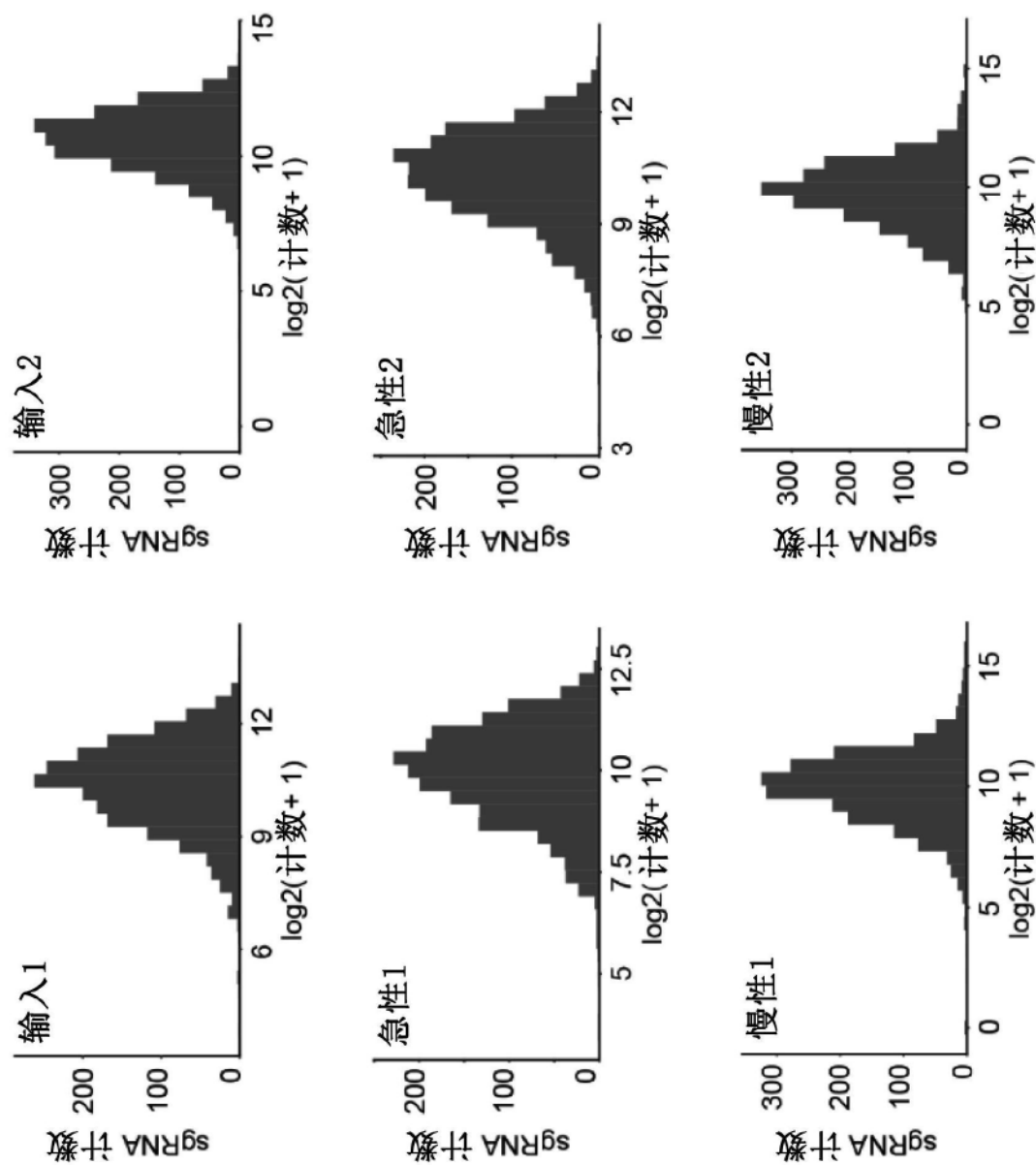


图21A

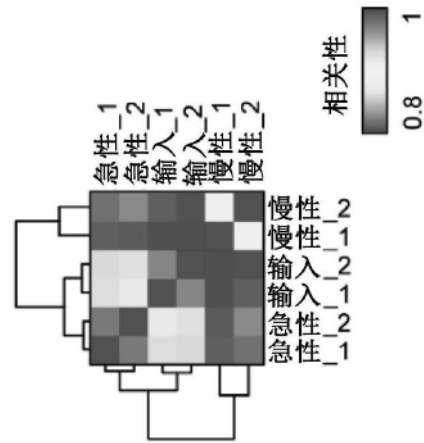


图21B

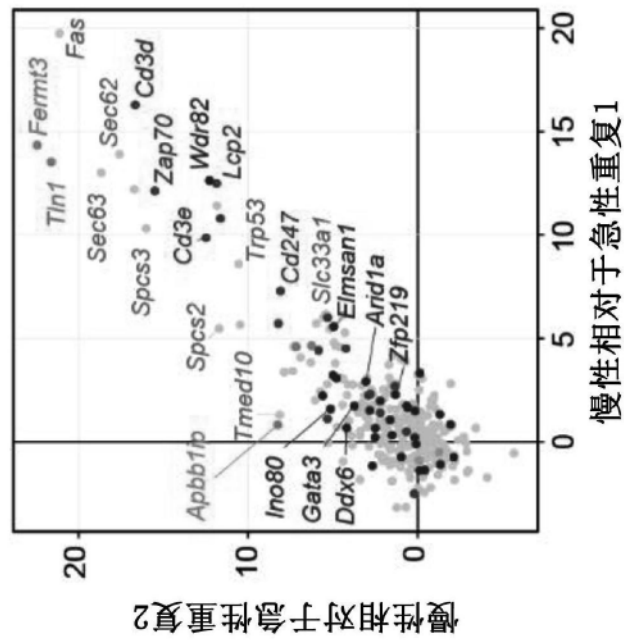


图21C

慢性相对于急性

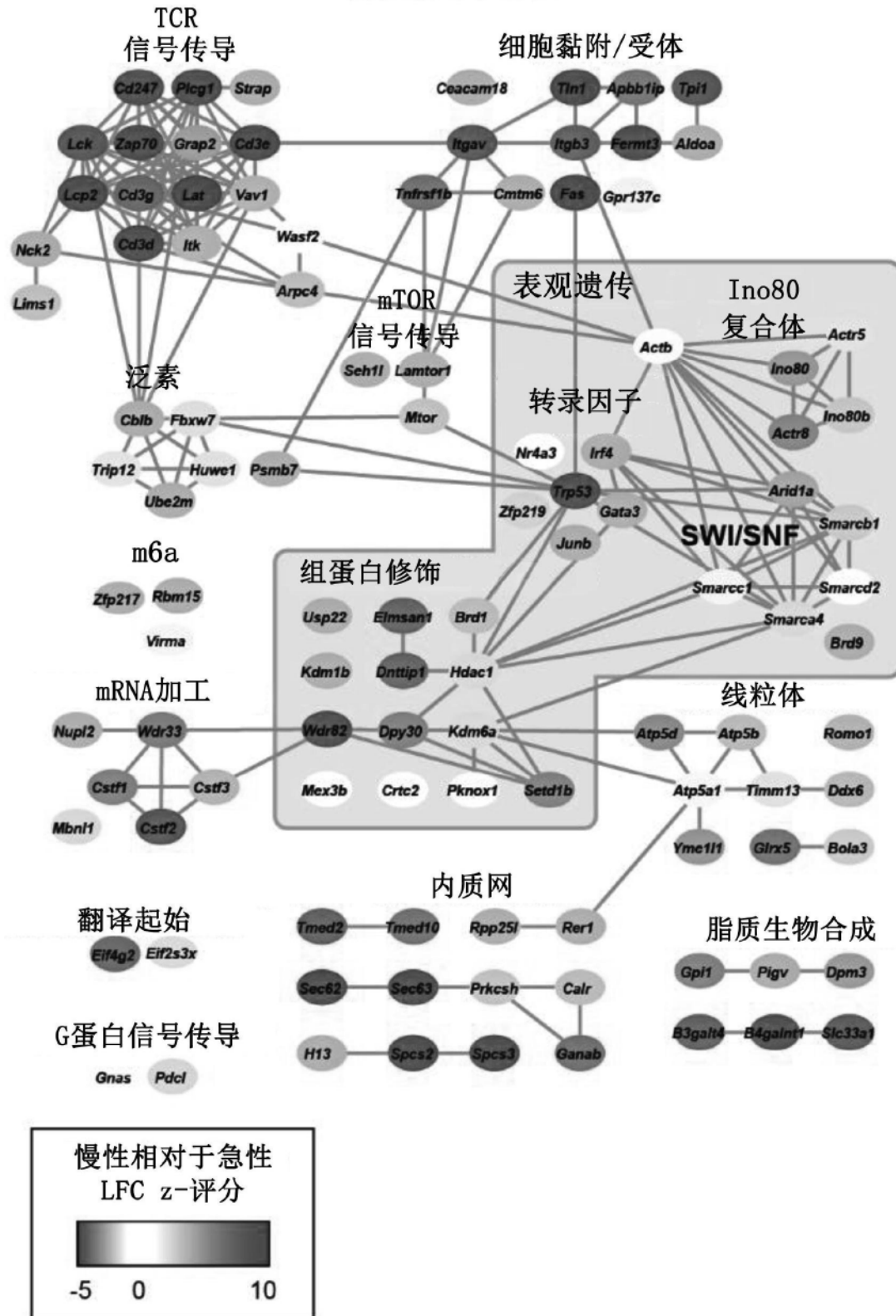


图21D

急性相对于输入

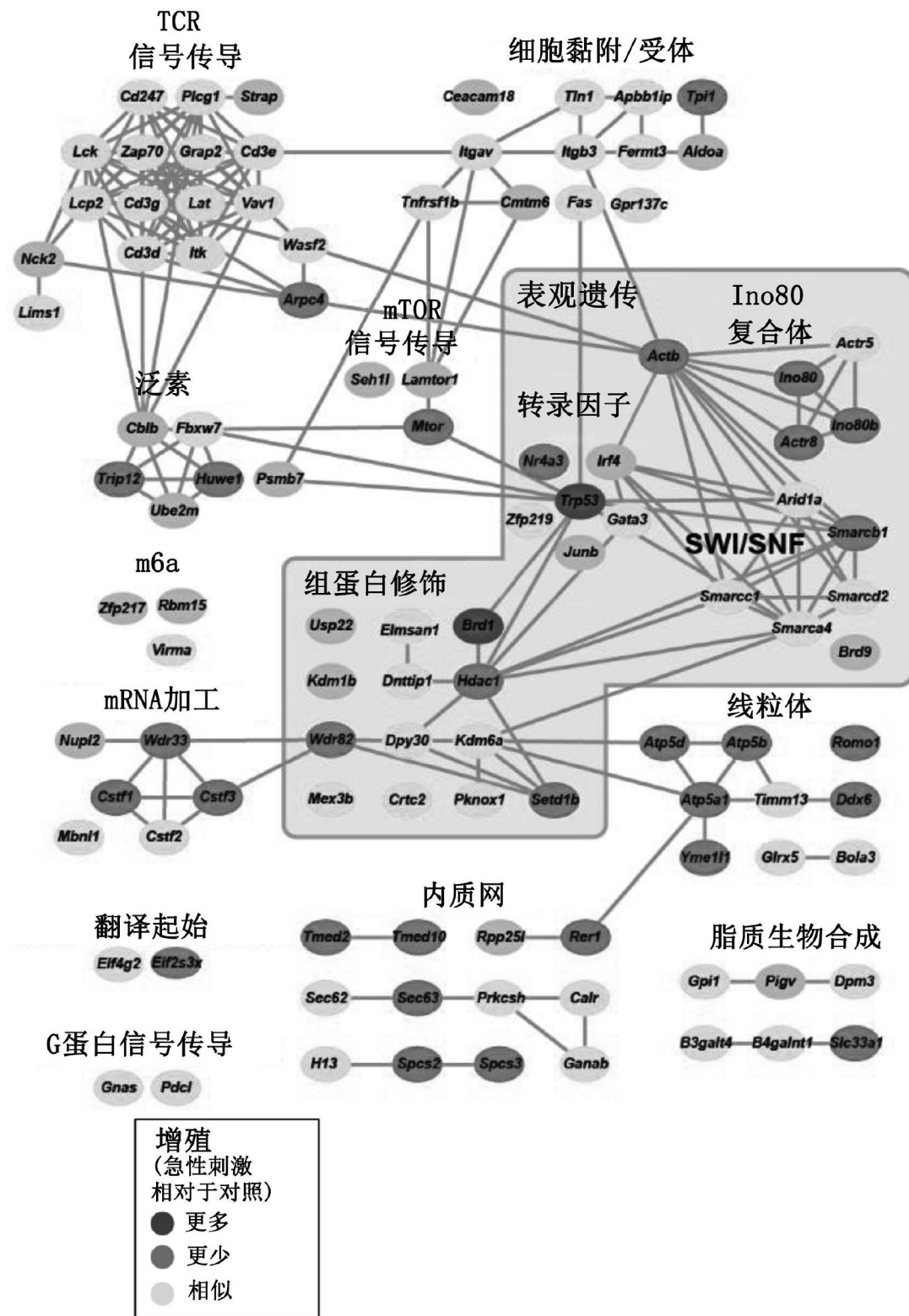


图21E

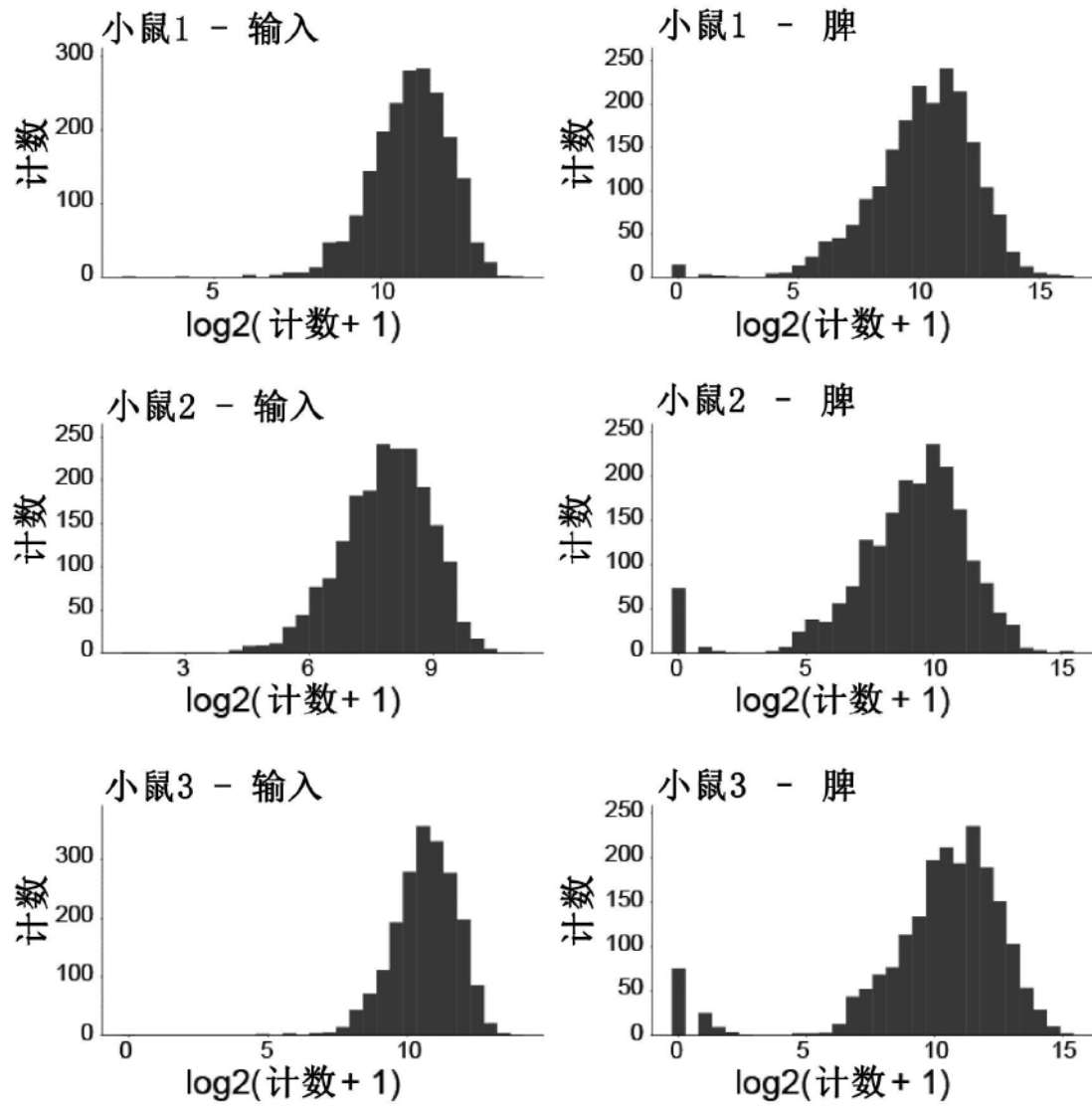


图22A

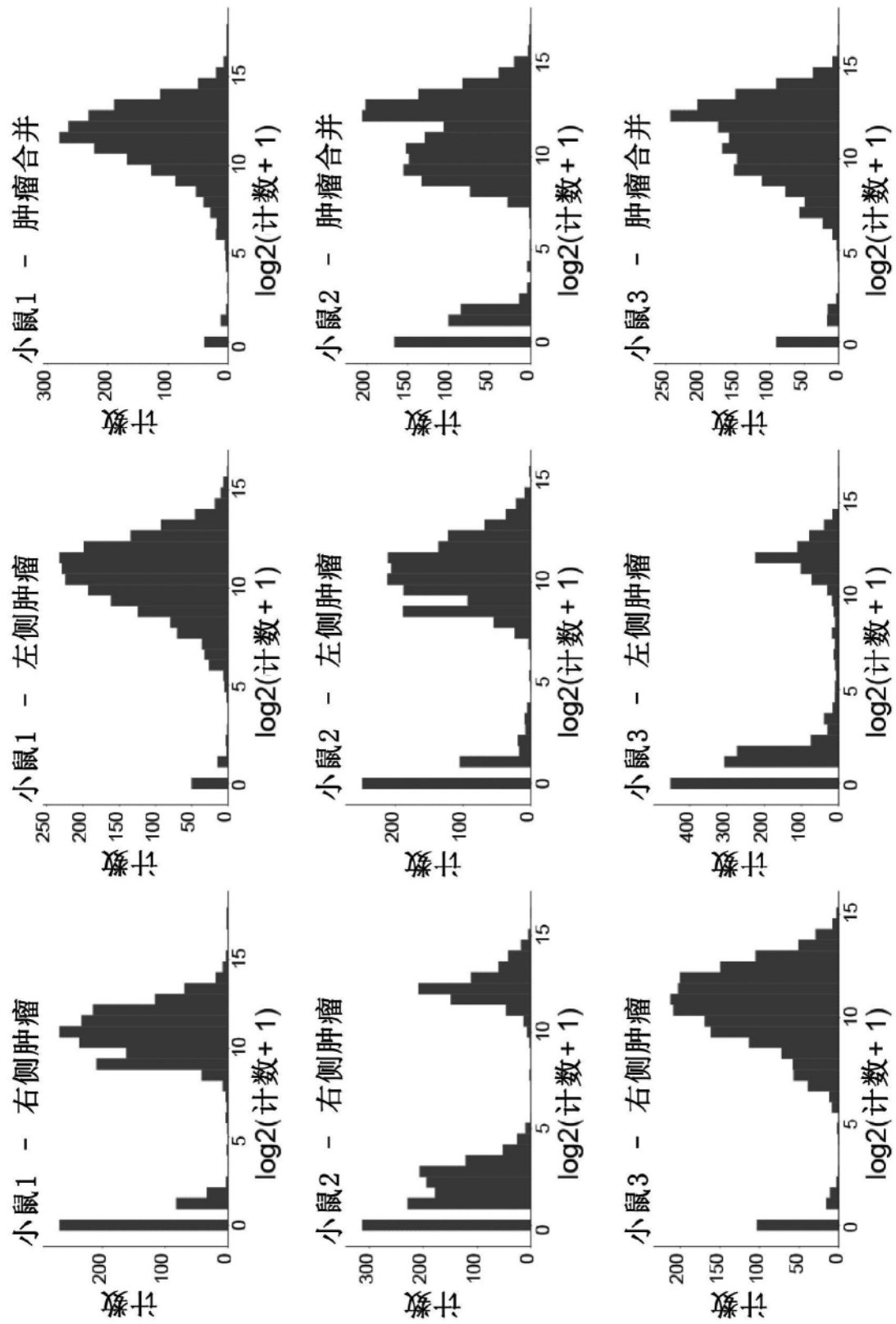


图22A续

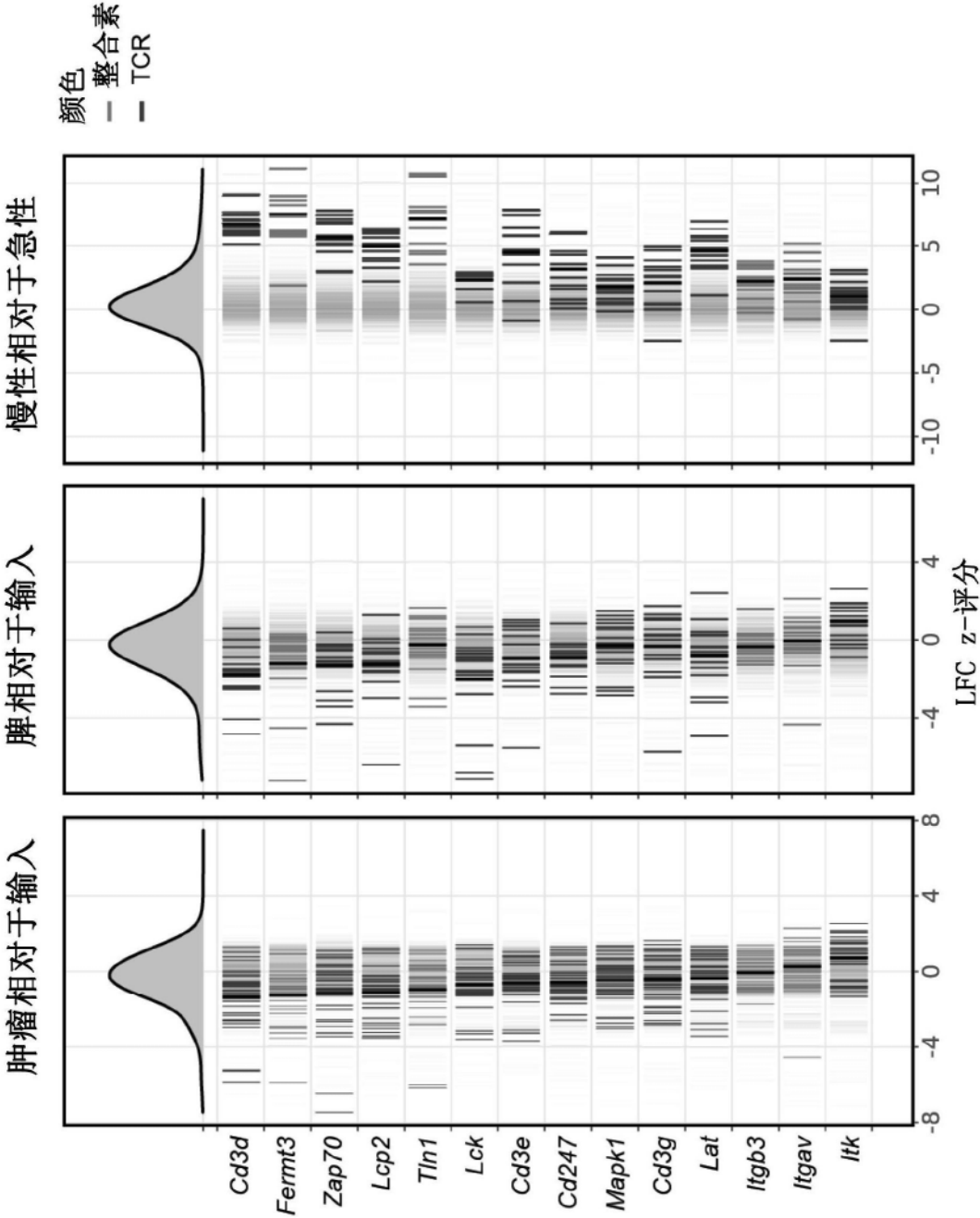


图22B

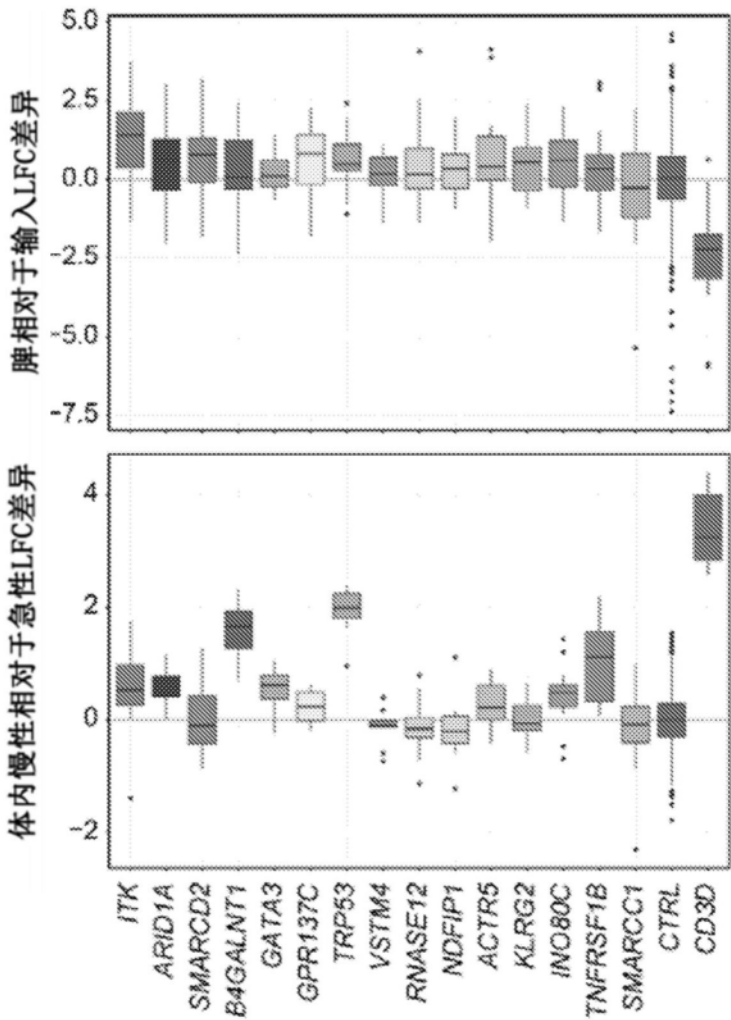


图22C

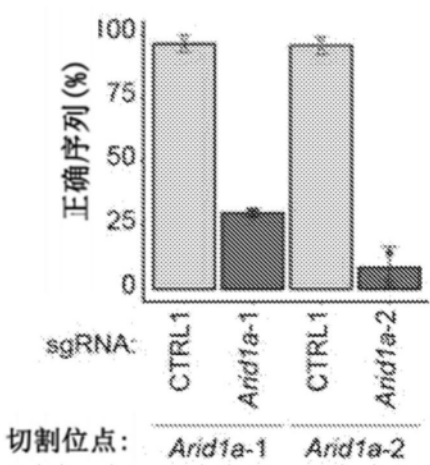


图22D

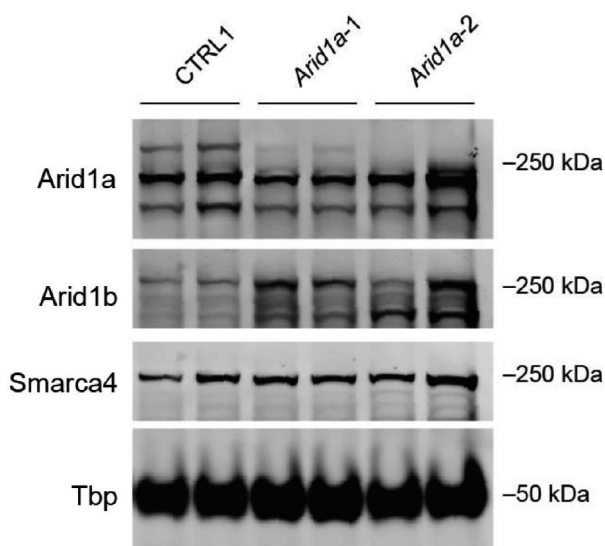


图22E

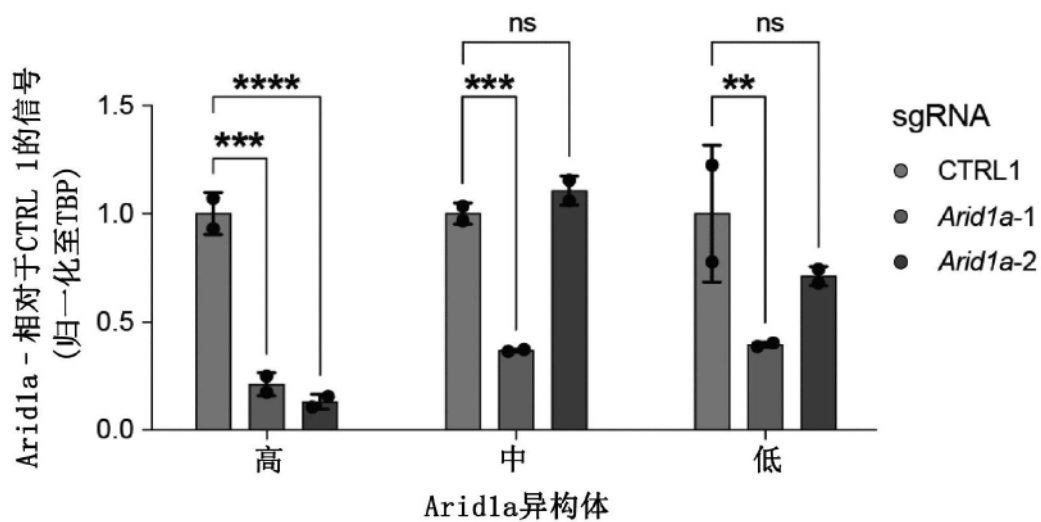


图22F

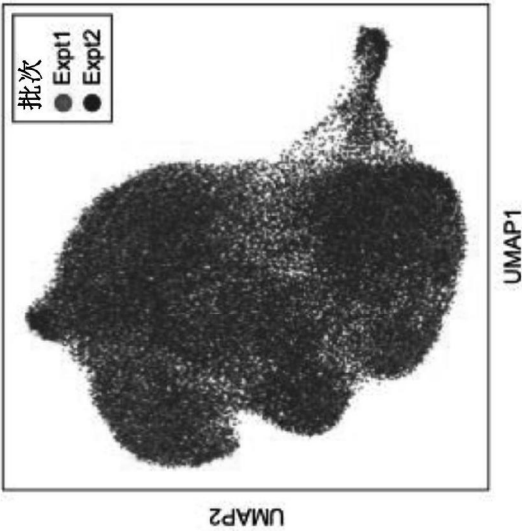


图23A

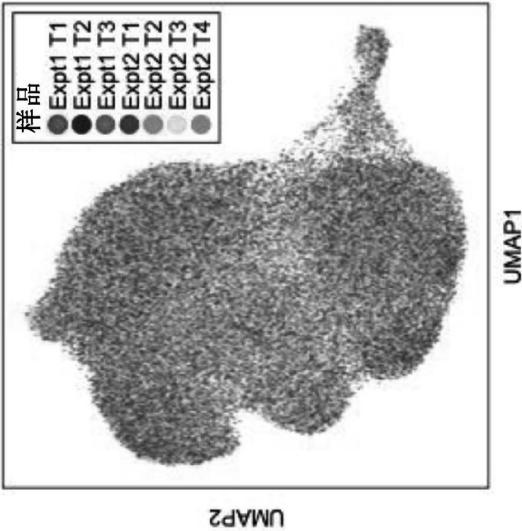


图23B

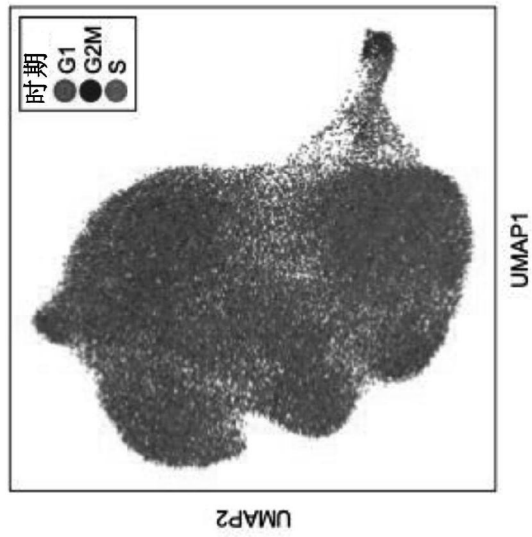


图23C

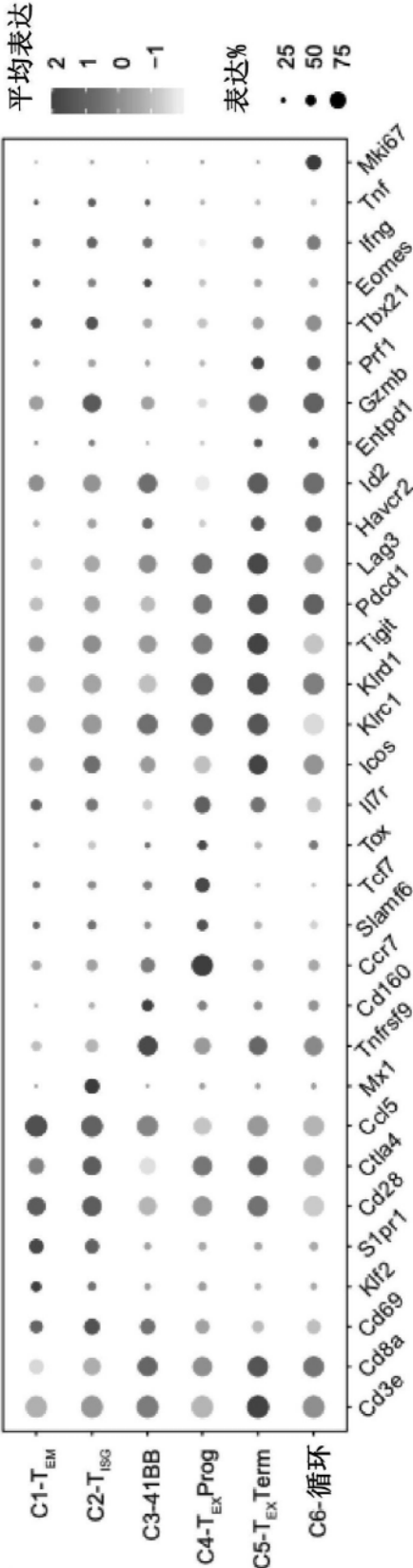


图23D

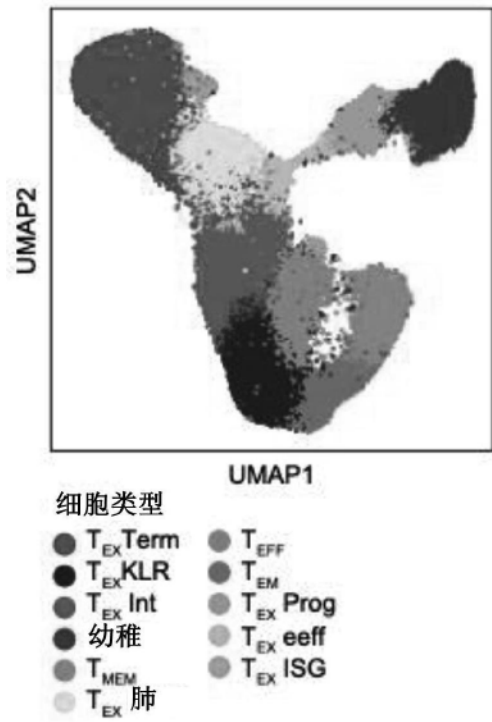


图23E

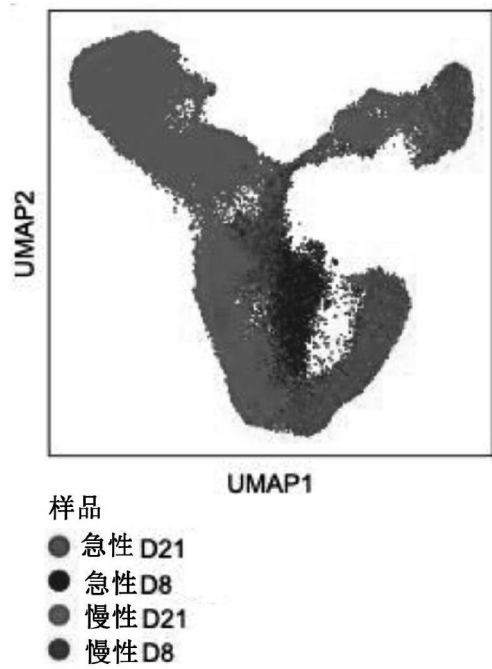


图23F

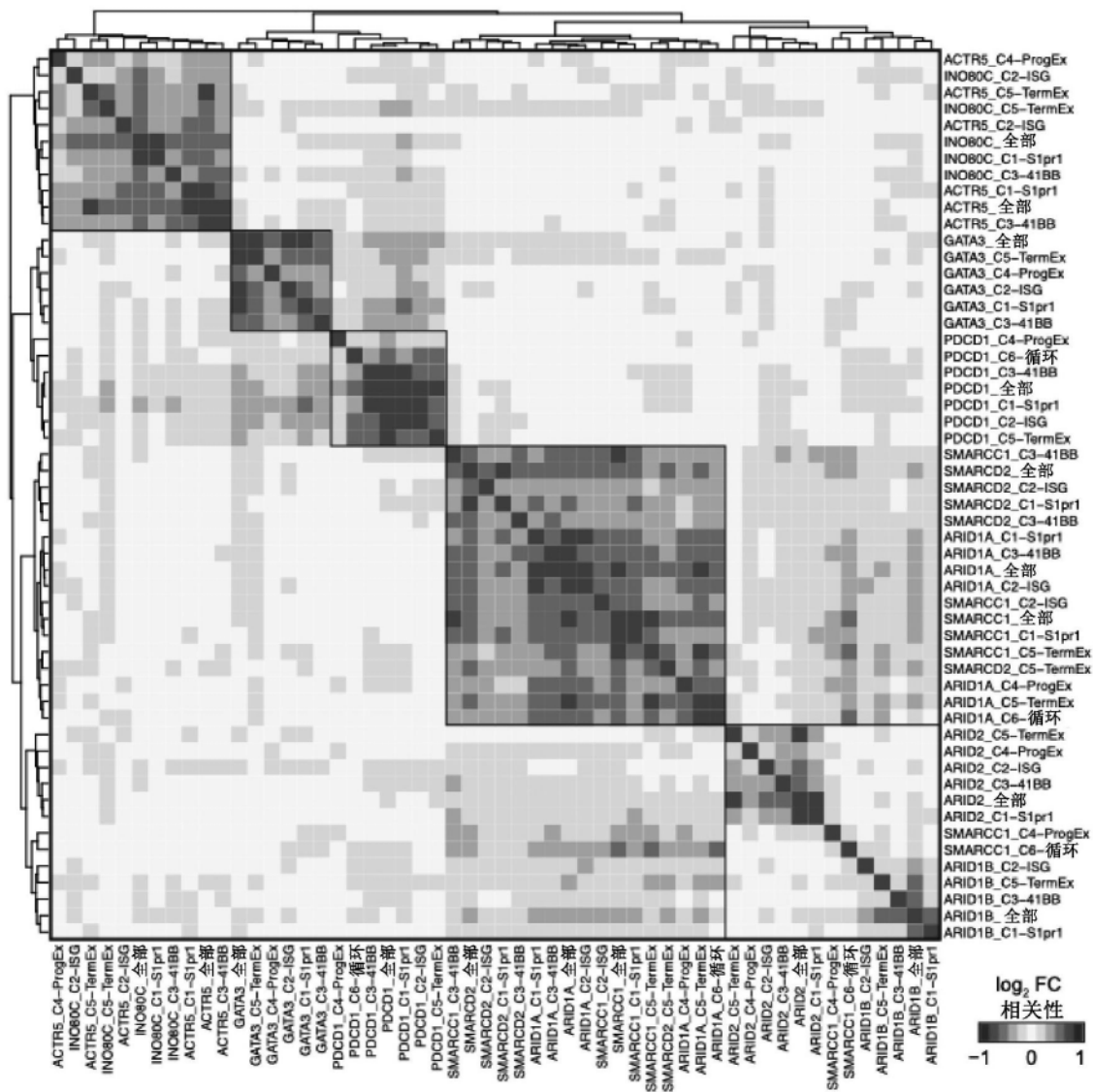


图23G

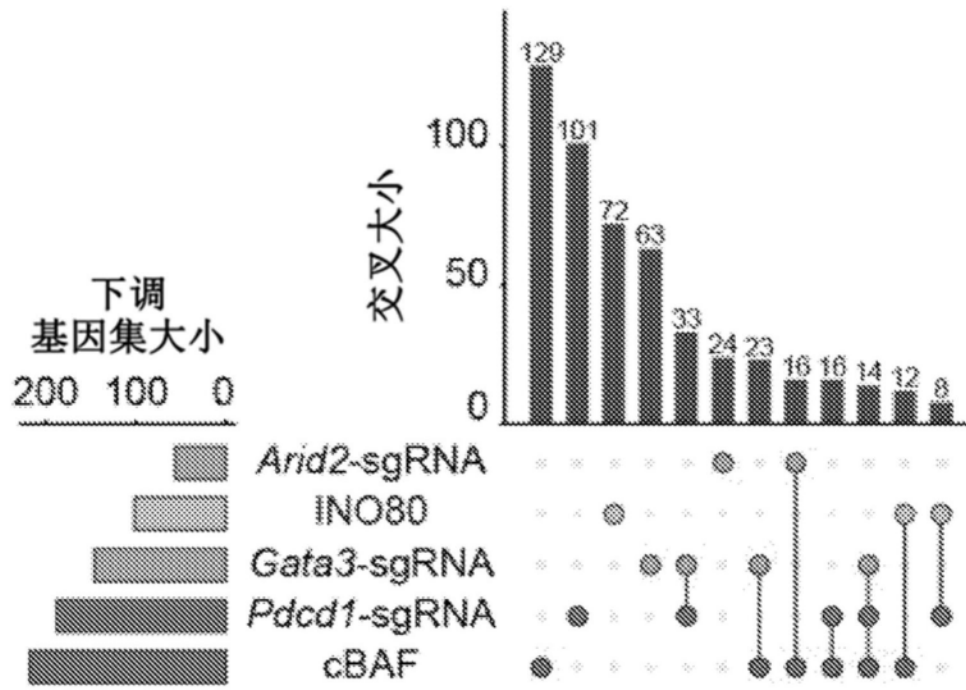


图24A

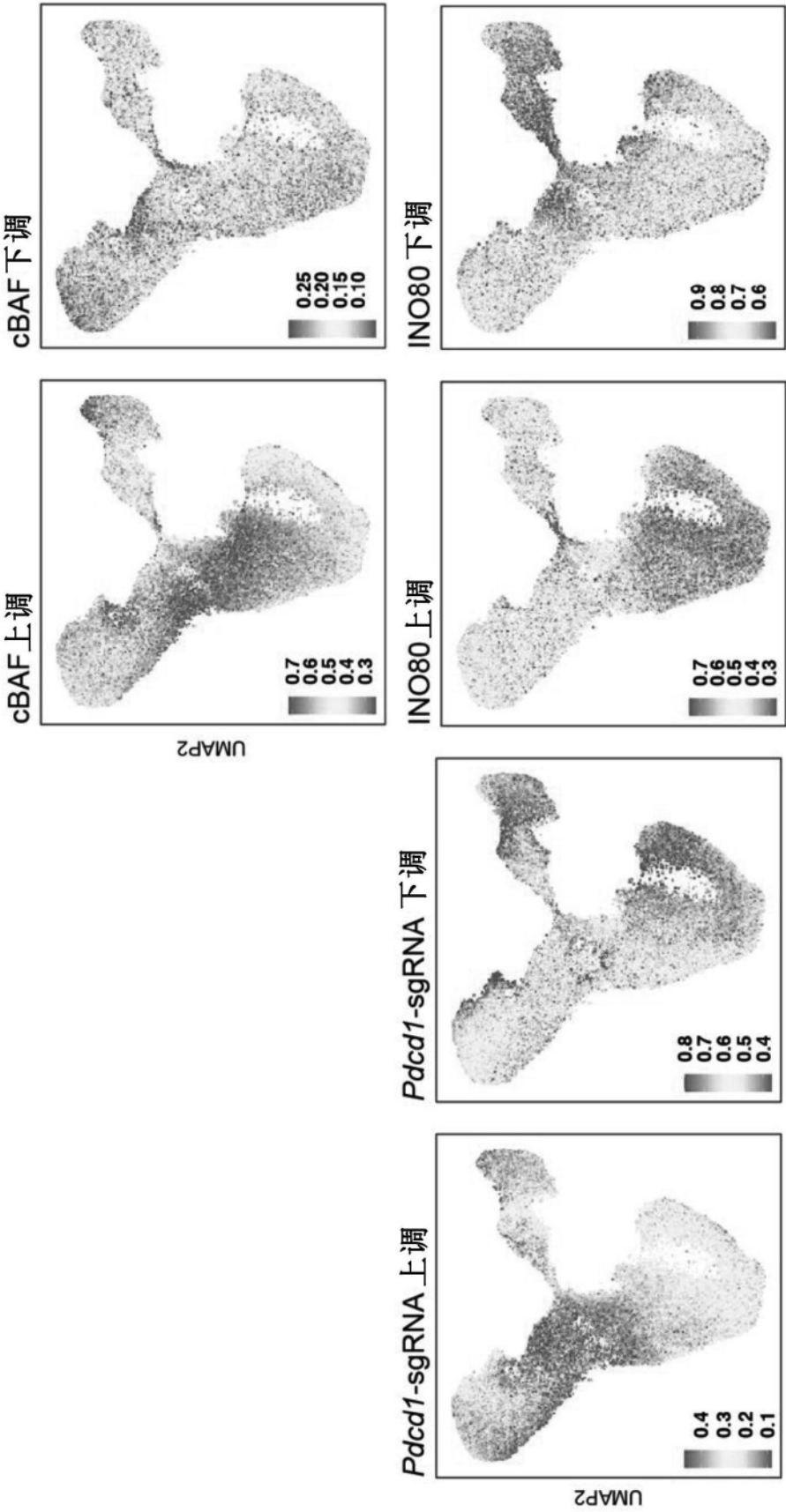


图24B

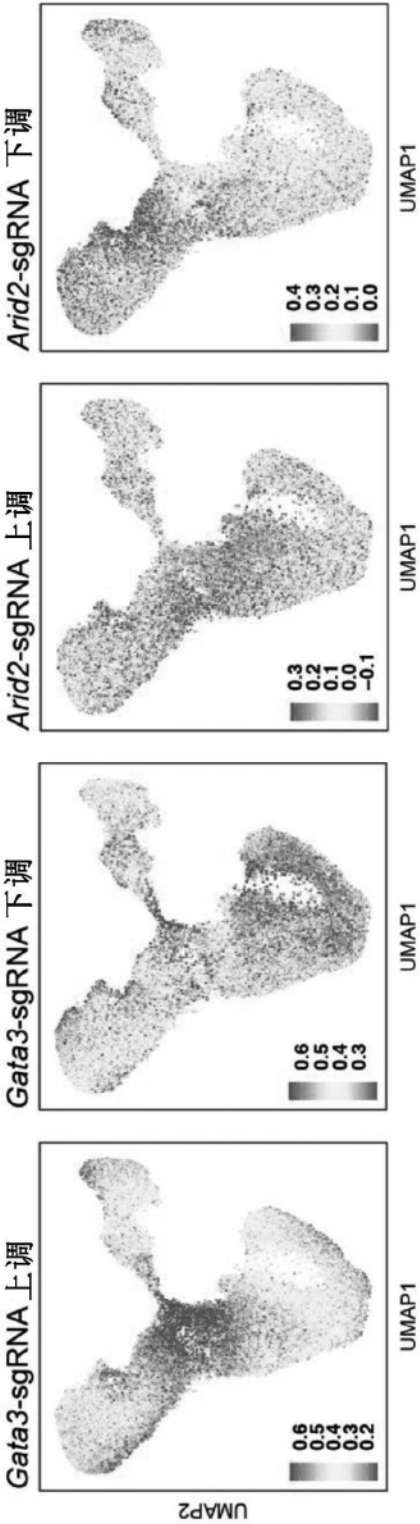


图24B续

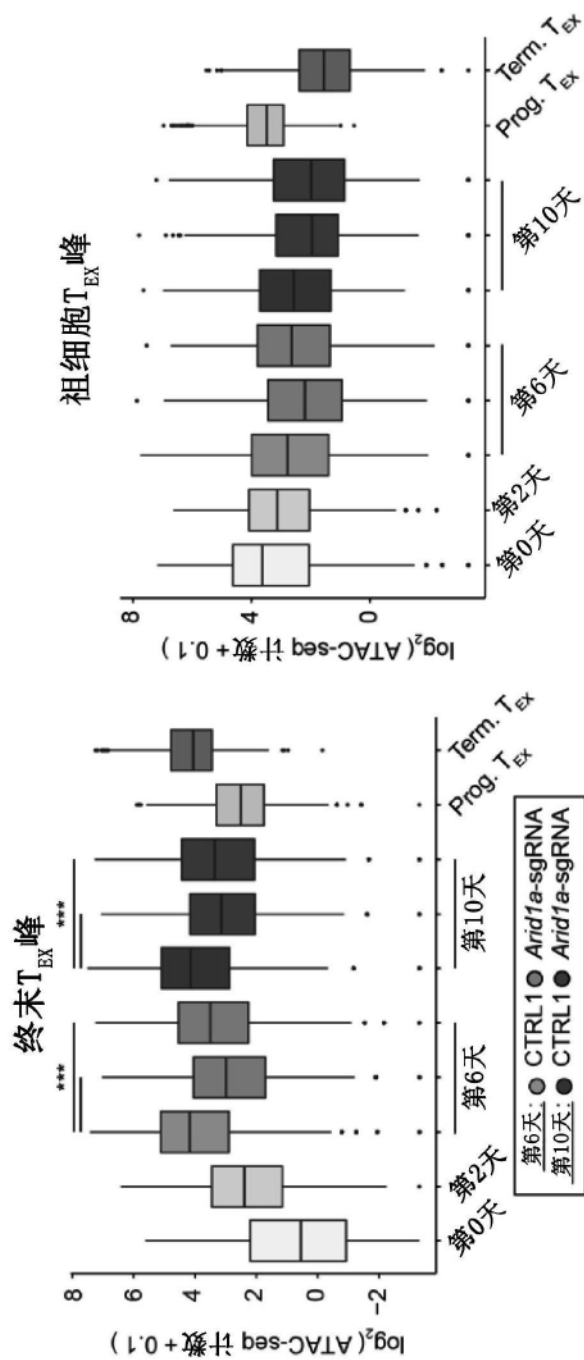


图24C

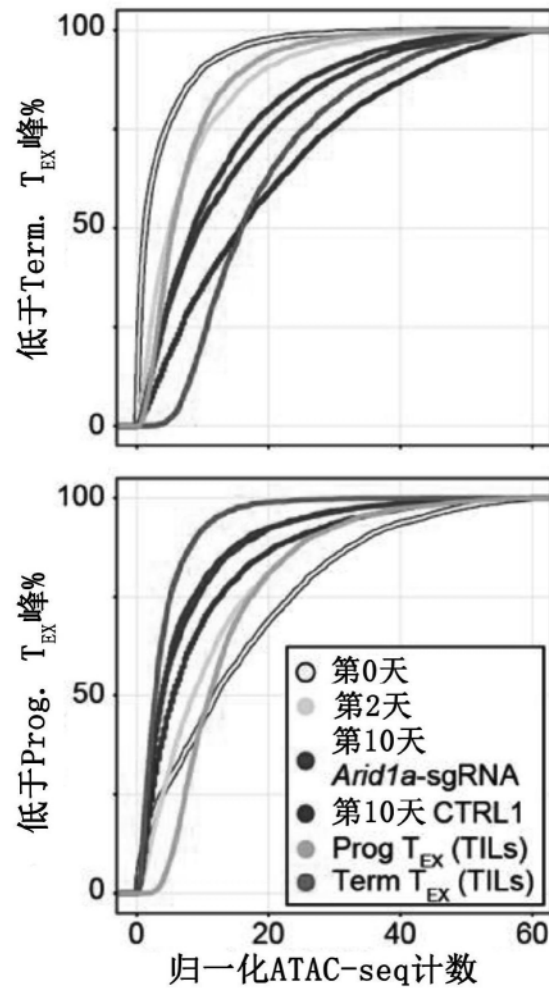


图24D

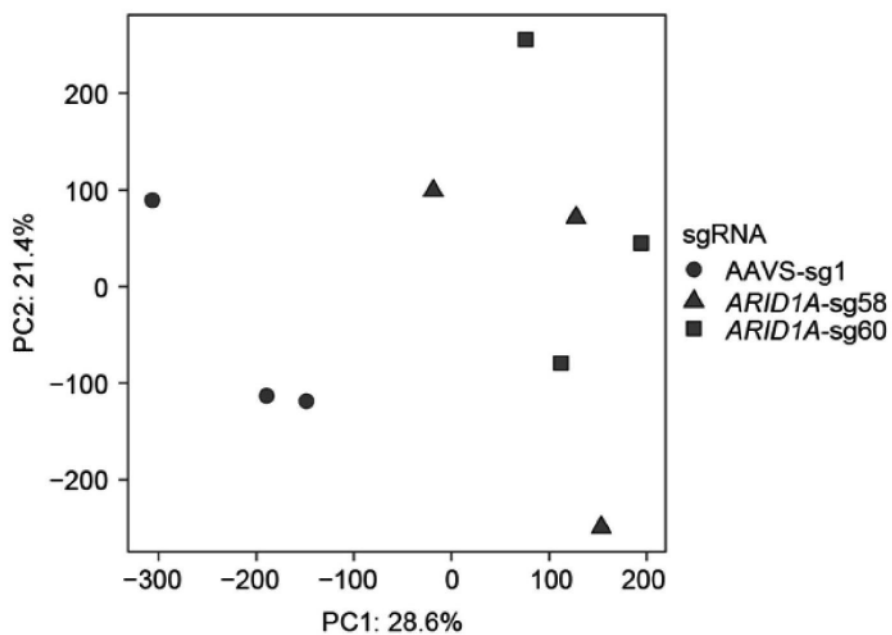


图24E

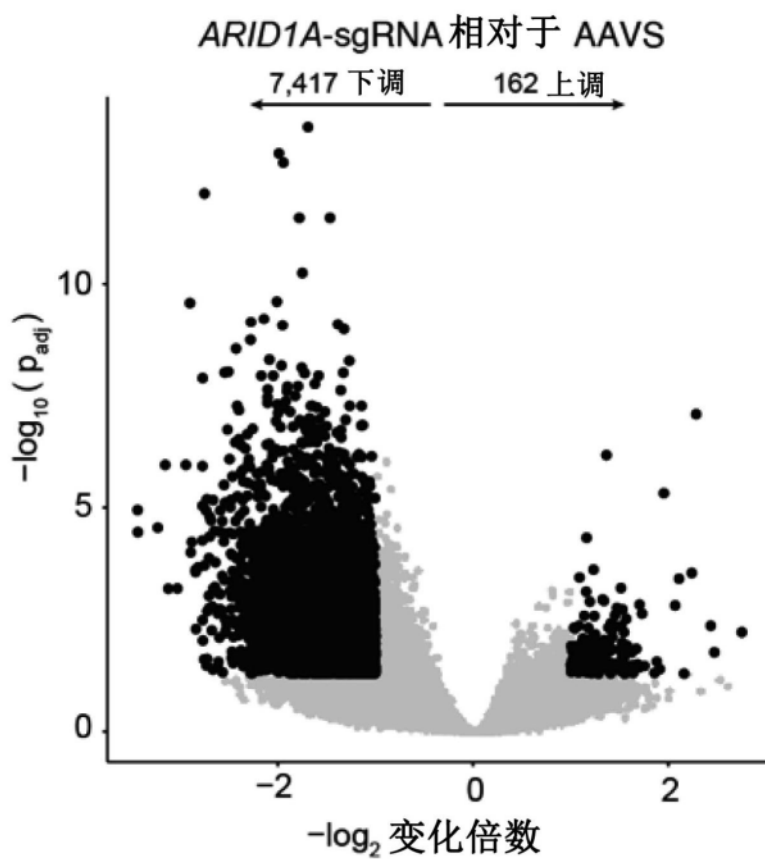


图24F

AAVS “上调” 峰中的基序 (7, 417)

基序	P值	
AP-1	1e-498	ATGAGTCAATC
Fos	1e-497	GGATGAGTCAATC
JunB	1e-471	GATGAGTCAAT

图24G